



中华人民共和国国家标准

GB/T 39670—2020

宠物饲料中硝基呋喃类代谢物残留量的 测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of nitrofuran metabolites in pet feeds—
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2020-12-14 发布

2021-07-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国南京海关、中华人民共和国淮安海关、江苏海企长城股份有限公司、淮阴师范学院。

本标准主要起草人：蒋原、何健、魏云计、宦海霞、朱臻怡、冯民、王远见、柯家法、张扬、张科、张敬友。



宠物饲料中硝基呋喃类代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了宠物饲料中硝基呋喃类代谢物(3-氨基-2-噁唑酮、5-吗啉甲基-3-氨基-2-噁唑烷基酮、1-氨基-乙内酰脲、氨基脲)残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于以动物源性成分为主要原料制成的宠物饲料中硝基呋喃类代谢物(3-氨基-2-噁唑酮、5-吗啉甲基-3-氨基-2-噁唑烷基酮、1-氨基-乙内酰脲、氨基脲)残留量的测定。

本标准的检出限为 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AOZ:3-氨基-2-噁唑酮(3-amino-2-oxalidinone)

AMOX:5-吗啉甲基-3-氨基-2-噁唑烷基酮(5-morpholinomethyl-3-amino-2-oxalidinone)

AHD:1-氨基-乙内酰脲(1-amino-hydantoin)

SEM:氨基脲(semicarbazide)

4 原理

试样经三氯乙酸沉淀蛋白质,游离出硝基呋喃类代谢物,在避光条件下用邻硝基苯甲醛衍生化、乙酸乙酯提取后,用液相色谱-串联质谱仪检测,同位素内标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定外,仅使用分析纯试剂。

5.1 水:GB/T 6682,一级。

5.2 乙腈:色谱纯。

5.3 乙酸铵:色谱纯。

5.4 甲酸:色谱纯。

5.5 甲醇:色谱纯。

5.6 二甲基亚砜。

5.7 正己烷。

5.8 乙酸乙酯。

5.9 邻硝基苯甲醛。

5.10 三氯乙酸溶液(200 g/L):称取 20.0 g 三氯乙酸溶解于 100 mL 水中。

5.11 邻硝基苯甲醛衍生试剂(50 mmol/L):称取 0.037 8 g 邻硝基苯甲醛(5.9)溶于 5 mL 二甲基亚砜(5.6)中。现用现配。

5.12 磷酸氢二钾溶液(1.0 mol/L):称取 17.4 g 无水磷酸氢二钾溶于 100 mL 水中。

5.13 乙酸铵缓冲液(0.5 mmol/L):称取 0.038 5 g 乙酸铵(5.3)溶于 500 mL 水中,加入 200 μ L 甲酸(5.4),用水定容至 1 000 mL。

5.14 样品溶解液:分别量取 10 mL 乙腈(5.2)和 90 mL 乙酸铵缓冲液(5.13),混合均匀。

5.15 乙腈饱和正己烷:量取 80 mL 正己烷(5.7)于 100 mL 分液漏斗中,加入适量乙腈后,剧烈振摇,静置分层后,弃去乙腈层。

5.16 标准品:AOZ(CAS:80-65-9)、AMOX(CAS:43056-63-9)、AHD $\cdot$ HCl(CAS:2827-56-7)、SEM $\cdot$ HCl(CAS:563-41-7)。纯度 $\geq$ 99.0%。

5.17 硝基咪唑类代谢物同位素内标: D_4 -AOZ、 D_5 -AMOX、 $^{13}C_3$ -AHD、 $^{13}C^{15}N_2$ -SEM $\cdot$ HCl。纯度 $\geq$ 99.0%。

5.18 标准储备溶液:分别准确称取适量硝基咪唑类代谢物标准品(5.16),用甲醇(5.5)溶解定容,配制成浓度约为 1.0 mg/mL 的标准储备液。 $-18^{\circ}C$ 以下避光保存,有效期为 6 个月。

5.19 混合标准中间溶液:分别准确移取标准储备溶液(5.18)各 1 mL 于 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度约为 10 μ g/mL 的混合中间标准溶液。 $-18^{\circ}C$ 以下避光保存,有效期为 3 个月。

5.20 混合标准工作溶液:分别准确移取适量的混合标准中间溶液(5.19)于 10 mL 和 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度分别为 100 ng/mL 和 10 ng/mL 的混合标准工作溶液。 $4^{\circ}C$ 避光保存,有效期为 7 天。

5.21 同位素内标储备溶液:分别准确称取适量硝基咪唑类代谢物同位素内标(5.17),用甲醇(5.5)溶解定容,配制成浓度约为 1.0 mg/mL。 $-18^{\circ}C$ 以下避光保存,有效期为 6 个月。

5.22 同位素内标混合标准中间溶液:分别准确移取同位素内标储备溶液(5.21)各 1 mL 于 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度约为 10 μ g/mL 的同位素内标混合标准中间溶液。 $-18^{\circ}C$ 以下避光保存,有效期为 3 个月。

5.23 同位素内标混合标准工作溶液:准确移取同位素内标混合标准中间溶液(5.22)0.1 mL 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度约为 100 ng/mL 的同位素内标混合标准中间溶液。 $4^{\circ}C$ 避光保存,有效期为 7 天。

5.24 微孔滤膜:0.22 μ m,有机系。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源(ESI)。

6.2 分析天平:感量 0.01 mg 和 0.01 g。

6.3 水浴恒温振荡器: $37^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ 。

6.4 离心机:转速不低于 8 000 r/min。

6.5 涡旋混匀器。

6.6 氮吹仪。

7 样品

固态样品按 GB/T 20195 进行样品制备,高速研磨仪粉碎,转速 10 000 r/min 以上,过 0.42 mm 孔径筛,混匀装于密封容器,备用。

半固态样品按 GB/T 20195 进行样品制备,用高速均质器均质,转速 12 000 r/min 以上,均质后装于密封容器,备用。

试样置于-18 ℃避光保存。

8 试验步骤

8.1 衍生

平行做两份试验。称取试样 2 g,准确至 0.01 g,置于 50 mL 具塞离心管中,准确加入 0.05 mL 同位素内标混合标准工作溶液(5.23),4 mL 水(5.1)和 2.0 mL 三氯乙酸溶液(5.10),涡旋 1 min 后,加入 150 μL 邻硝基苯甲醛衍生试剂(5.11),在 37 ℃±1℃水浴中避光振荡水解 16 h,冷却,备用。

8.2 提取



备用液(8.1)用磷酸氢二钾溶液(5.12)调节 pH 至 7.0~7.5,加入 8 mL 乙酸乙酯(5.8),涡旋 1 min,于 8 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液。残留物再加入 8 mL 乙酸乙酯重复上述操作,合并上清液,40 ℃下氮气吹干,加入 1.0 mL 样品溶解液(5.14)充分溶解,再加入 1.0 mL 乙腈饱和正己烷(5.15)涡旋,于 8 000 r/min 离心 1 min,吸取下层溶液,过 0.22 μm 滤膜后,待测。

8.3 标准曲线的制备

准确移取 10 ng/mL 和 100 ng/mL 混合标准工作溶液(5.20)0.20 mL、0.10 mL 和 0.05 mL,分别置于 50 mL 离心管中,按 8.1 和 8.2 进行衍生和提取。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱:C₁₈柱,柱长 100 mm ,内径 2.0 mm,粒径 5 μm ,或性能相当者;
柱温:35 ℃;
流速:0.25 mL/min;
进样量:10 μL;
流动相:A:乙腈(5.2),B:乙酸铵缓冲溶液(5.13),梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%
0.00	10	90
2.50	10	90
6.30	95	5
7.50	95	5
7.60	10	90
11.0	10	90

8.4.2 质谱参考条件

电离方式:电喷雾电离,正离子模式(ESI^+);

检测方式:多反应监测(MRM);

电喷雾电(IS)压:5500 V;

离子源温度(TEM):500 °C;

气帘气压力(CUR):206.85 kPa(30 psi);

雾化气压力(GS1):344.75 kPa(50 psi);

辅助气压力(GS2):344.75 kPa(50 psi);

碰撞气压力(CAD):62.055 kPa(9 psi);

碰撞室出口电压(CXP):6 V。

多反应监测(MRM)离子对、驻留时间、去簇电压和碰撞能量见表2。

表2 硝基呋喃代谢物及内标的多反应监测(MRM)离子对、驻留时间、去簇电压及碰撞能量的参考值

被测物名称	监测离子对(m/z)	驻留时间/ms	去簇电压(DP)/V	碰撞能量(CE)/V
AOZ	236.0>134.1 ^a	50	90	19
	236.0>104.1	50	90	31
AMAZ	335.2>291.2 ^a	50	87	17
	335.2>262.1	50	87	23
AHD	249.1>134.2 ^a	50	90	19
	249.1>104.0	50	90	30
SEM	209.0>166.3 ^a	50	84	15
	209.0>192.2	50	84	16
D ₄ -AOZ	240.1>134.1	50	90	19
D ₅ -AMAZ	340.2>296.0	50	90	18
¹³ C ₃ -AHD	252.0>134.1	50	82	19
¹³ C ¹⁵ N ₂ -SEM	212.0>168.1	50	84	14
^a 为定量离子。				

8.4.3 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取标准系列溶液(8.3)和试样溶液(8.2)上机测定。硝基呋喃类代谢物标准溶液的定量离子色谱图参见附录A。

8.4.4 定性

在相同试验条件下,试样溶液与标准系列溶液中硝基呋喃类代谢物的保留时间相对偏差应在±2.5%之内。根据表2选择的定性离子对,比较试样谱图中硝基呋喃类代谢物定性离子的相对离子丰度与浓度接近的标准系列溶液中对应的定性离子的相对离子丰度,若偏差不超过表3规定的范围,则可判定为样品中存在对应的硝基呋喃类代谢物。

表 3 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	>50	>20~50	>10~20	≤10
最大允许偏差/%	±20	±25	±30	±50

8.4.5 定量

以硝基呋喃类代谢物的浓度为横坐标,硝基呋喃类代谢物和内标峰面积比值为纵坐标,绘制标准曲线,标准曲线的相关系数应不低于 0.99。试样溶液与标准溶液中硝基呋喃类代谢物的响应值均应在仪器检测的线性范围内,如超出范围,应重新试验或将试样溶液和标准系列溶液做相应稀释后重新测定。

9 试验数据处理

试样中硝基呋喃类代谢物的含量以质量分数 ω 计,数值以微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)表示。按式(1)计算:

$$\omega = \frac{A \times A'_{\text{is}} \times \rho_{\text{s}} \times \rho_{\text{is}} \times V \times 1\,000}{A_{\text{is}} \times A_{\text{s}} \times \rho'_{\text{is}} \times m \times 1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

- 式中:
- A ——试样溶液中硝基呋喃类代谢物的峰面积;
 - A'_{is} ——标准溶液中硝基呋喃类代谢物同位素内标的峰面积;
 - ρ_{s} ——标准溶液中硝基呋喃类代谢物的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
 - ρ_{is} ——试样溶液中硝基呋喃类代谢物同位素内标的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
 - V ——溶解残余物溶液的体积,单位为毫升(mL);
 - A_{is} ——试样溶液中硝基呋喃类代谢物同位素内标的峰面积;
 - A_{s} ——标准溶液中硝基呋喃类代谢物的峰面积;
 - ρ'_{is} ——标准溶液中硝基呋喃类代谢物同位素内标的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
 - m ——试样质量,单位为克(g)。

测定结果以平行测定的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

10 精密度

在重复性条件下,两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 15%。

附 录 A

(资料性附录)

硝基呋喃类代谢物标准溶液的定量离子色谱图

硝基呋喃类代谢物标准溶液的定量离子色谱图见图 A.1。

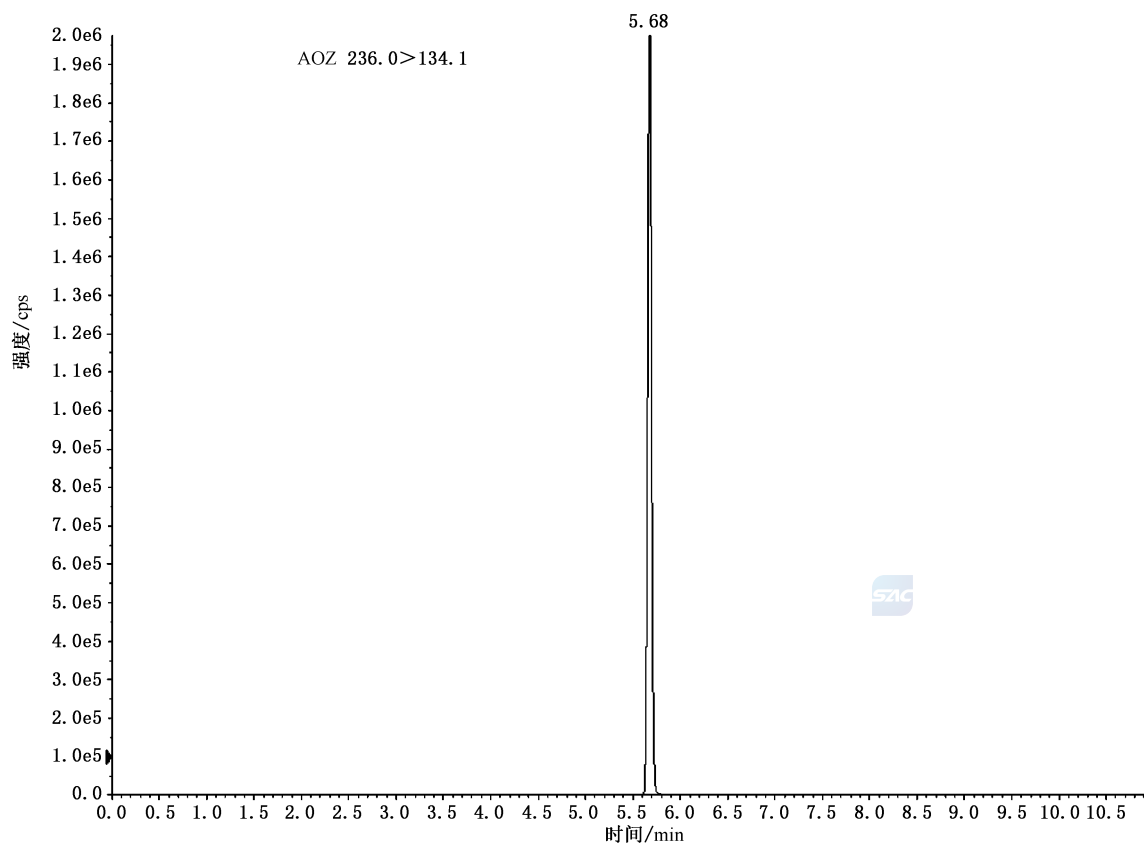


图 A.1 硝基呋喃类代谢物标准溶液的定量离子色谱图
(硝基呋喃代谢物浓度 1 ng/mL, 硝基呋喃代谢物同位素内标浓度 5 ng/mL)

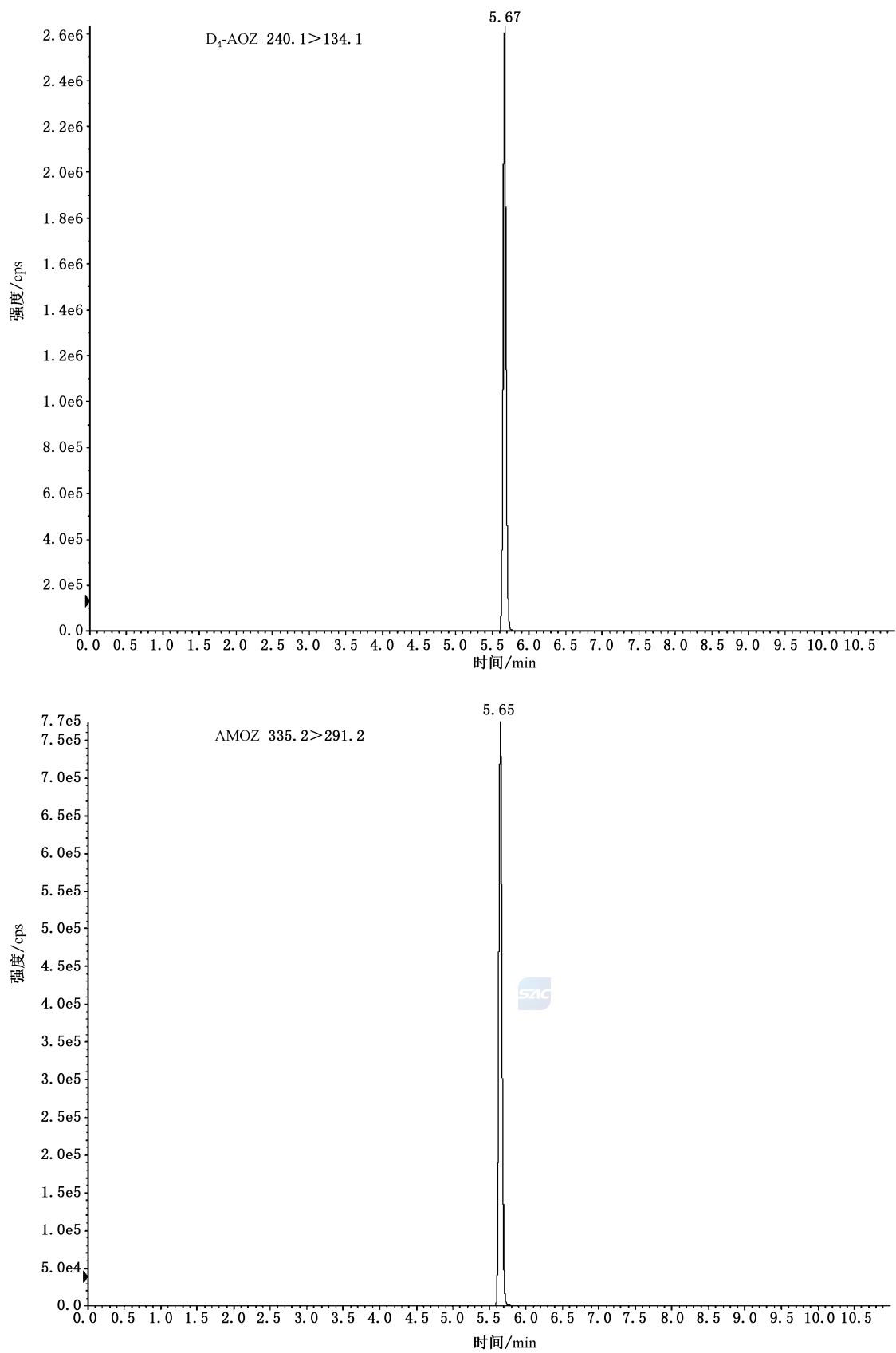


图 A.1（续）

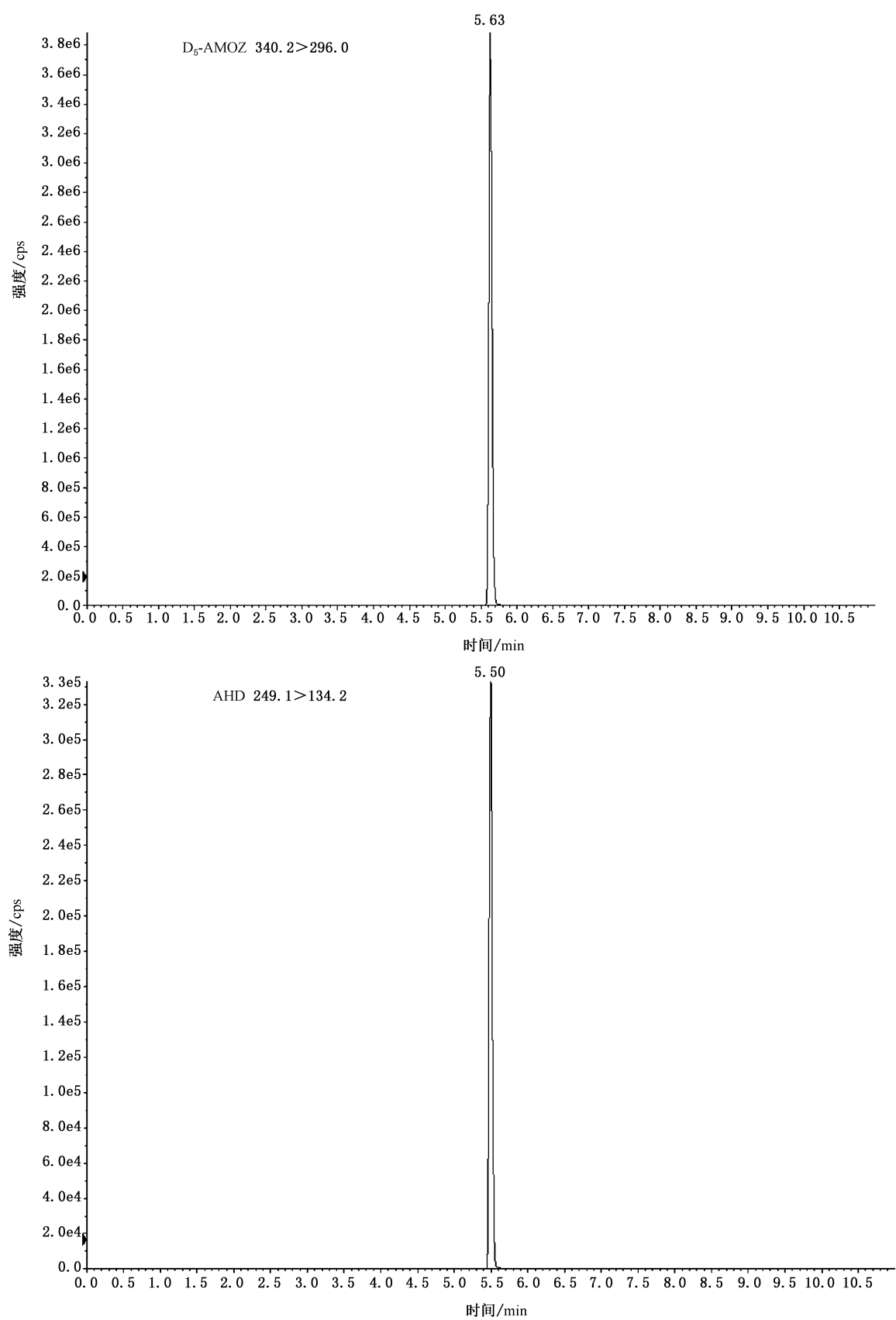


图 A.1 (续)

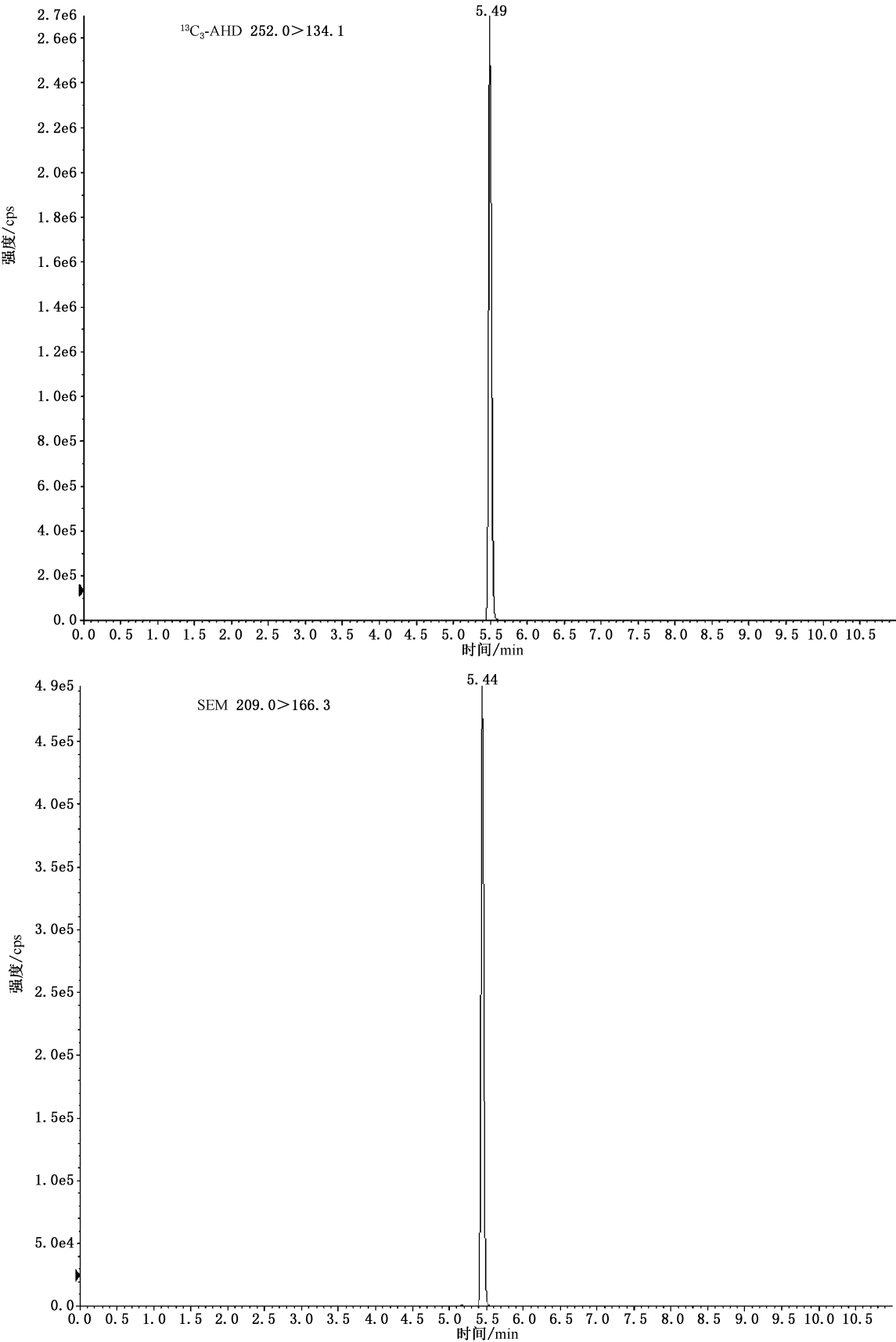


图 A.1 (续)

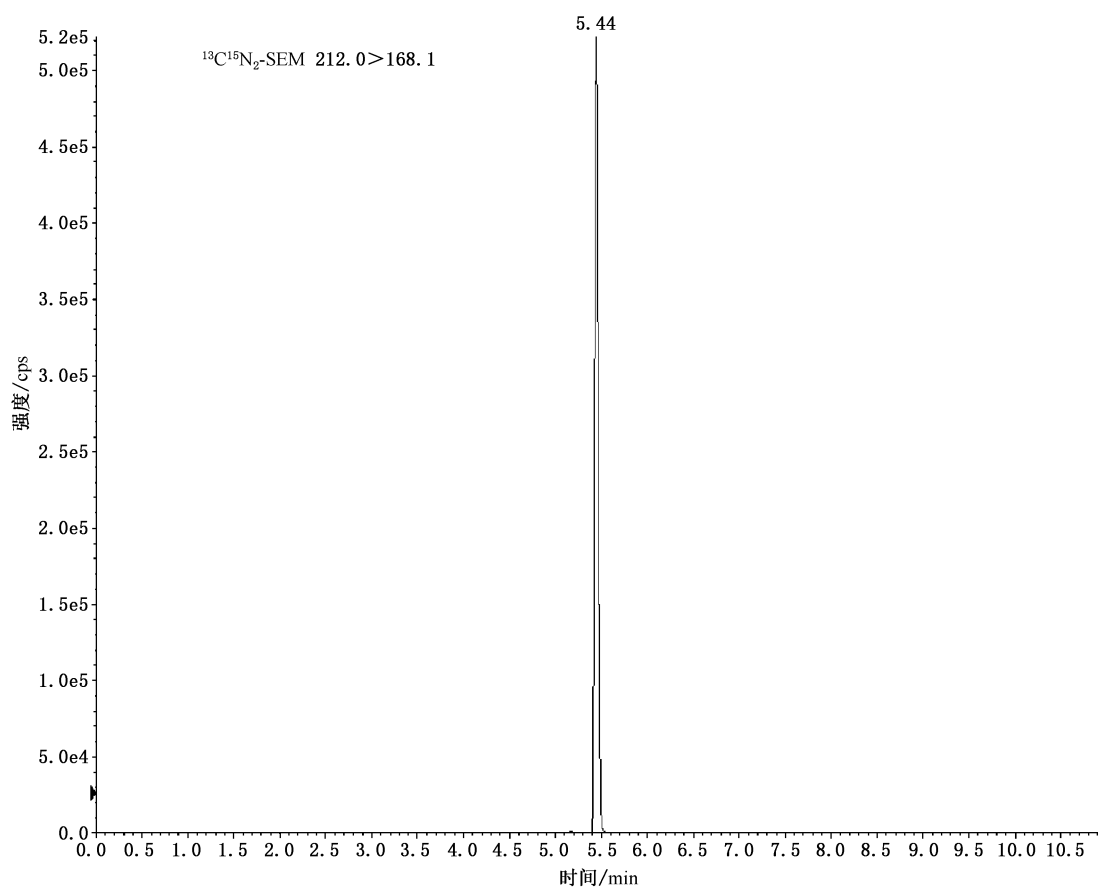


图 A.1 (续)