



中华人民共和国国家标准

GB/T 22987—2008

牛奶和奶粉中呋喃它酮、呋喃西林、 呋喃妥因和呋喃唑酮代谢物 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination for the residues of furaltadon, nitrofurazone,
nitrofurantoin and furazolidone metabolites in milk and milk powder—
LC-MS-MS method

2008-12-31 发布

2009-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 A、附录 B 和附录 C 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：张进杰、曹亚平、刘晓茂、曹彦忠、王静淑、杨志伟、庞国芳。



牛奶和奶粉中呋喃它酮、呋喃西林、 呋喃妥因和呋喃唑酮代谢物 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛奶和奶粉中呋喃它酮代谢物(5-吗啉甲基-3-氨基-2-噁唑烷基酮,英文缩写为 AMOZ)、呋喃西林代谢物(氨基脲,英文缩写为 SEM)、呋喃妥因代谢物(1-氨基-2-内酰脲,英文缩写为 AHD)和呋喃唑酮代谢物(3-氨基-2-噁唑烷基酮,英文缩写为 AOZ)残留量液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛奶和奶粉中 AMOZ、SEM、AHD 和 AOZ 残留量的测定。

本标准的方法检出限:牛奶中 AMOZ、SEM、AHD 和 AOZ 的检出限均为 $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$;奶粉中 AMOZ、SEM、AHD 和 AOZ 的检出限均为 $1.6 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

注:本标准中呋喃它酮、呋喃西林、呋喃妥因和呋喃唑酮及代谢物中英文名称及英文缩写参见附录 A 中的表 A.1。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6379.1 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第1部分:总则与定义(GB/T 6379.1—2004,ISO 5725-1:1994,IDT)

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第2部分:确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法(GB/T 6379.2—2004,ISO 5725-2:1994,IDT)

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

3 原理

牛奶或奶粉试样用三氯乙酸水解并脱蛋白,硝基呋喃类代谢物在酸性条件下用 2-硝基苯甲醛衍生化,用 Oasis HLB 或性能相当的固相萃取柱净化。液相色谱-串联质谱仪(ESI+)检测。用内标法或外标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外,所用试剂均为优级纯。

- 4.1 水:GB/T 6682,一级。
- 4.2 甲醇:色谱纯。
- 4.3 乙腈:色谱纯。
- 4.4 乙酸乙酯:色谱纯。
- 4.5 磷酸氢二钾, K_2HPO_4 。
- 4.6 乙酸。
- 4.7 二甲亚砞。

- 4.8 盐酸。
- 4.9 三氯乙酸, $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$ 。
- 4.10 氢氧化钠。
- 4.11 2-硝基苯甲醛(2-NP), $\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_3$; 含量 $\geq 99\%$ 。
- 4.12 0.1 mol/L 磷酸氢二钾溶液: 称取 17.4 g 磷酸氢二钾(4.5), 用水溶解, 定容至 1 000 mL。
- 4.13 0.2 mol/L 盐酸: 量取 17 mL 浓盐酸(4.8), 用水定容至 1 000 mL。
- 4.14 4 mol/L 氢氧化钠溶液: 称取 80 g 氢氧化钠(4.10), 用水溶解, 定容至 500 mL。
- 4.15 0.5 mol/L 三氯乙酸溶液: 称取 37.5 g 三氯乙酸(4.9), 用水溶解, 定容至 500 mL。
- 4.16 衍生剂: 含 2-硝基苯甲醛 0.05 mol/L。称取 0.075 g 2-硝基苯甲醛(4.11)溶于 10 mL 二甲亚砜(4.7), 现用现配。
- 4.17 样品定容溶液: 取 10 mL 乙腈(4.3), 0.3 mL 乙酸(4.6), 用水稀释到 100 mL。
- 4.18 标准物质: AMOZ (CAS: 43056-63-9)、SEM (CAS: 563-41-7)、AHD (CAS: 2827-56-7) 和 AOZ (CAS: 80-65-9), 纯度均 $\geq 99\%$ 。
- 4.19 同位素标记物标准物质: D_5 -AMOZ、 $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -SEM、 $^{13}\text{C}_3$ -AHD 和 D_4 -AOZ。四种内标标准物质的纯度均 $\geq 99\%$ 。
- 4.20 1.0 mg/mL 标准储备溶液: 分别称取适量的四种硝基呋喃代谢物标准物质(4.18), 分别用甲醇稀释成 1.0 mg/mL 的标准储备溶液。避光保存于 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 冰柜中。
- 4.21 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 混合标准溶液: 分别吸取适量四种硝基呋喃代谢物的标准储备溶液(4.20), 用甲醇稀释成 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准溶液, 避光保存于 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 冰柜中。
- 4.22 1.0 mg/mL 同位素标记物混合内标储备溶液: 分别称取适量的四种硝基呋喃代谢物的同位素标记物标准物质(4.19), 分别用甲醇配成 1.0 mg/mL 的标准储备液。避光保存于 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 冰柜中。
- 4.23 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 同位素标记物混合内标溶液: 分别移取适量的四种硝基呋喃代谢物的同位素标记物内标储备溶液(4.22), 用甲醇稀释成 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的混合内标标准溶液, 避光保存于 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 冰柜中。
- 4.24 Oasis HLB 固相萃取柱¹⁾或相当者: 60 mg, 3 mL。使用前依次用 5 mL 甲醇和 10 mL 水预处理, 保持柱体湿润。
- 4.25 滤膜: 0.2 μm 。

5 仪器

- 5.1 液相色谱-串联四极杆质谱仪, 配有电喷雾离子源。
- 5.2 分析天平: 感量 0.1 mg 和 0.01 g。
- 5.3 液体混匀器。
- 5.4 固相萃取装置。
- 5.5 氮气吹干仪。
- 5.6 恒温振荡水浴。
- 5.7 真空泵: 真空度应达到 80 kPa。
- 5.8 微量注射器: 25 μL , 100 μL 。
- 5.9 棕色具塞离心管: 25 mL, 50 mL。
- 5.10 pH 计: 测量精度 $\pm 0.02\text{pH}$ 单位。
- 5.11 贮液器: 50 mL。

1) Oasis HLB 固相萃取柱是 Waters 公司产品的商品名称, 给出这一信息是为了方便本标准的使用者, 并不是表示对该产品的认可。如果其他产品具有相同的效果, 则可使用这些等效产品。

5.12 高速离心机:转速 10 000 r/min 以上。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

实验室样品混合均匀,分出 0.5 kg 作为试样。

6.2 试样保存

试样置于-18℃冰柜,避光保存。

7 测定步骤

7.1 待测样品溶液的制备

7.1.1 牛奶样品脱蛋白、水解和衍生化

称取牛奶样品 8 g(精确到 0.01 g),置于 50 mL 棕色离心管中,加入 15 mL 三氯乙酸溶液(4.15)。向上述离心管中加入 0.2 mL 衍生剂(4.16),再加入适量混合内标溶液(4.23),使四种硝基咪唑代谢物内标物最终定容浓度均为 2.0 ng/mL。用液体混匀器混匀,置于 37℃恒温振荡水浴中避光反应 16 h。离心管取出后放置至室温,在 10 000 r/min 下离心 10 min,上清液倒入另一棕色离心管中。

7.1.2 奶粉样品脱蛋白、水解和衍生化

称取奶粉样品 1 g(精确到 0.01 g),置于 50 mL 棕色离心管中,加入 8 mL 水,涡旋混合后,再加入 15 mL 三氯乙酸溶液(4.15)。向上述离心管中加入 0.2 mL 衍生剂(4.16),再加入适量混合内标溶液(4.23),使四种硝基咪唑代谢物内标物最终定容浓度均为 2.0 ng/mL。用液体混匀器混匀,置于 37℃恒温振荡水浴中避光反应 16 h。离心管取出后放置至室温,在 10 000 r/min 下离心 10 min,上清液倒入另一棕色离心管中。

7.1.3 样品溶液净化

上述衍生溶液加入 5 mL 0.1 mol/L 磷酸氢二钾溶液(4.12),用 4 mol/L 氢氧化钠溶液(4.14)调节溶液 pH 约为 7.4,在 10 000 r/min 下离心 10 min,上清液倒入下接 Oasis HLB 固相萃取柱(4.24)的贮液器中,在固相萃取装置上使样液以小于 2 mL/min 的流速通过 Oasis HLB 固相萃取柱(4.24),待样液全部通过固相萃取柱后用 20 mL 20% 甲醇水淋洗固相萃取柱,弃去全部流出液。抽干 Oasis HLB 固相萃取柱(4.24)15 min。用 5 mL 乙酸乙酯(4.4)洗脱,收集洗脱液于 25 mL 棕色离心管中,在氮气吹干仪上 45℃水浴吹干,准确加入 1.0 mL 样品定容溶液(4.17)溶解残渣,混匀后过 0.2 μm 滤膜(4.25),供液相色谱-串联质谱测定。

7.2 混合基质标准校准溶液的制备

7.2.1 牛奶混合基质标准校准溶液的制备

称取五个阴性牛奶样品,每个样品为 8 g(精确到 0.01 g)。分别加入适量混合标准溶液(4.21),制成四种硝基咪唑代谢物含量均为 0.1 μg/kg、0.2 μg/kg、0.5 μg/kg、1.0 μg/kg 和 2.0 μg/kg 的基质标准溶液,再分别加入适量混合内标溶液(4.23),含量均为 2.0 ng/mL。同 7.1.1 和 7.1.3 操作,作为牛奶标准校准曲线。

7.2.2 奶粉混合基质标准校准溶液的制备

称取五个阴性奶粉样品,每个样品为 1 g(精确到 0.01 g)。分别加入适量混合标准溶液(4.21),制成四种硝基咪唑代谢物含量均为 0.8 μg/kg、1.6 μg/kg、4.0 μg/kg、8.0 μg/kg 和 16.0 μg/kg 的基质标准溶液,再分别加入适量混合内标溶液(4.23),含量均为 2.0 ng/mL。同 7.1.2 和 7.1.3 操作,作为奶粉标准校准曲线。

7.3 测定条件

7.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱:Atlantis C₁₈,3.5 μm,150 mm×2.1 mm(内径)或相当者;
- b) 柱温:35 ℃;
- c) 进样量:40 μL;
- d) 流动相:流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液,流动相 B 为 0.1%甲酸乙腈溶液,梯度洗脱参考条件见表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱参考条件

时间/min	流速/(μL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	200	80	20
3.00	200	50	50
8.00	200	50	50
8.01	200	80	20
16.00	200	80	20

7.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- a) 离子源:电喷雾离子源(ESI);
- b) 扫描方式:正离子扫描;
- c) 检测方式:多反应监测(MRM);
- d) 电喷雾电压(IS):5 000 V;
- e) 辅助气(AUX)流速:7 L/min;
- f) 辅助气温度(TEM):480 ℃;
- g) 聚焦电压(FP):150 V;
- h) 碰撞室出口电压(CXP):11 V;
- i) 去簇电压(DP):45 V;
- j) 四种硝基呋喃代谢物和内标衍生物的质谱参数见表 2。

表 2 四种硝基呋喃代谢物和内标衍生物的质谱参数

衍生后的硝基呋喃代谢物 及同位素内标物名称	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	去簇电压 (DP)/V	采集时间/ ms	碰撞能量 (CE)/V
2-NP-AMTZ	335/291 335/128	335/291	50	100	18 16
2-NP-SEM	209/192 209/166	209/166	40	150	17 15
2-NP-AHD	249/134 249/178	249/134	50	200	19 22
2-NP-AOZ	236/134 236/192	236/134	50	100	19 17
2-NP-D ₅ -AMTZ	340/296	340/296	45	100	18
2-NP- ¹³ C ¹⁵ N-SEM	212/168	212/168	45	100	15
2-NP- ¹³ C ₃ -AHD	252/134	252/134	40	100	32
2-NP-D ₄ -AOZ	240/134	240/134	40	100	22

7.4 液相色谱-串联质谱测定

7.4.1 定性确证

每种被测组分选择 1 个母离子,2 个以上子离子,在相同实验条件下,样品中待测物质和内标物的保留时间之比,也就是相对保留时间,与混合基质标准校准溶液中对应的相对保留时间偏差在±2.5%之内;且样品谱图中各组分的相对离子丰度与浓度接近的混合基质标准校准溶液谱图中对应的相对离子丰度进行比较,偏差不超过表 3 规定的范围,则可判定样品中存在对应的待测物。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差 %

相对离子丰度 K	$K>50$	$20<K<50$	$10<K<20$	$K\leq 10$
允许最大偏差	±20	±25	±30	±50

7.4.2 定量测定

内标法定量:用仪器软件中的内标定量程序。

外标法定量:在仪器最佳工作条件下,对四种硝基呋喃代谢物的混合基质标准校准溶液进样测定,以混合基质标准校准溶液浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线,用标准工作曲线对待测样品进行定量,样品溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。

四种硝基呋喃代谢物及内标衍生物的多反应监测(MRM)色谱图参见附录 B 中的图 B.1。四种硝基呋喃代谢物的添加浓度及其平均回收率的试验数据参见附录 C 中的表 C.1。

7.5 平行试验

按试样步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.6 空白试验

不称取样品,其余均按试样步骤进行。

7.7 回收率试验

阴性样品中添加标准溶液,除不加内标溶液外,均按 7.1 和 7.2 操作,测定后计算样品添加的回收率。

8 结果计算

四种硝基呋喃代谢物的测定按式(1)计算:

$$X = c_s \times \frac{A}{A_s} \times \frac{c_i}{c_{Si}} \times \frac{A_{Si}}{A_i} \times \frac{V}{m} \times \frac{1\,000}{1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X ——试样中被测物残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g/kg}$);

c_s ——基质标准工作溶液中被测物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A ——试样溶液中被测物的色谱峰面积;

A_s ——基质标准工作溶液中被测物的色谱峰面积;

c_i ——试样溶液中内标物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

c_{Si} ——基质标准工作溶液中内标物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A_{Si} ——基质标准工作溶液中内标物的色谱峰面积;

A_i ——试样溶液中内标物的色谱峰面积;

V ——样液最终定容体积,单位为毫升(mL);

m ——试样溶液所代表试样的质量,单位为克(g)。

计算结果应扣除空白值。



9 精密度

9.1 一般规定

本标准的精密度数据是按 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 规定确定的,重复性和再现性的值以 95%的可信度来计算。

9.2 重复性

在重复性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 r ,四种硝基呋喃代谢物的添加浓度范围及重复性方程见表 4。

表 4 添加浓度范围及重复性和再现性方程

硝基呋喃代谢物的衍生物名称	添加浓度范围/($\mu\text{g/kg}$)	重复性限 r	再现性限 R
2-NP-AMTZ	0.2~5.0	$\lg r=0.895\ 0\ \lg m-1.087\ 4$	$\lg R=0.944\ 8\ \lg m-0.711\ 6$
2-NP-SEM	0.2~5.0	$\lg r=1.120\ 9\ \lg m-1.011\ 0$	$\lg R=0.978\ 7\ \lg m-0.731\ 7$
2-NP-AHD	0.2~5.0	$\lg r=0.850\ 2\ \lg m-1.020\ 6$	$\lg R=1.029\ 3\ \lg m-0.709\ 5$
2-NP-AOZ	0.2~5.0	$\lg r=1.071\ 0\ \lg m-0.885\ 2$	$\lg R=0.993\ 3\ \lg m-0.700\ 8$
注: m 为两次测定结果的算术平均值。			

如果差值超过重复性限 r ,应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.3 再现性

在再现性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R ,四种硝基呋喃代谢物的添加浓度范围及再现性方程见表 4。



附 录 A
(资料性附录)

四种硝基呋喃及代谢物的中英名称及英文缩写

呋喃它酮、呋喃西林、呋喃妥因和呋喃唑酮及代谢物的中英名称及英文缩写,见表 A.1。

表 A.1 呋喃它酮、呋喃西林、呋喃妥因和呋喃唑酮及代谢物的中英名称及英文缩写

四种硝基呋喃 中文名称	四种硝基呋喃 英文名称	四种硝基呋喃代谢物中文名称	四种硝基呋喃代谢物英文名称	英文缩写
呋喃它酮	furaltadon	5-吗 啉 甲 基-3-氨 基-2-噁 唑 烷 基 酮	3-amino-5-morpholinomethyl-1, 3-oxazolidin-2-one	AMOZ
呋喃西林	nitrofurazone	氨基脒	semicarbazide	SEM
呋喃妥因	nitrofurantoin	1-氨基-2-内酰脲	1-aminohydantoin	AHD
呋喃唑酮	urazolidone	3-氨基-2-噁唑烷基酮	3-amino-2-oxazolidinone	AOZ

附 录 B

(资料性附录)

多反应监测(MRM)色谱图

四种硝基呋喃代谢物及内标衍生物的多反应监测(MRM)色谱图,见图 B.1。

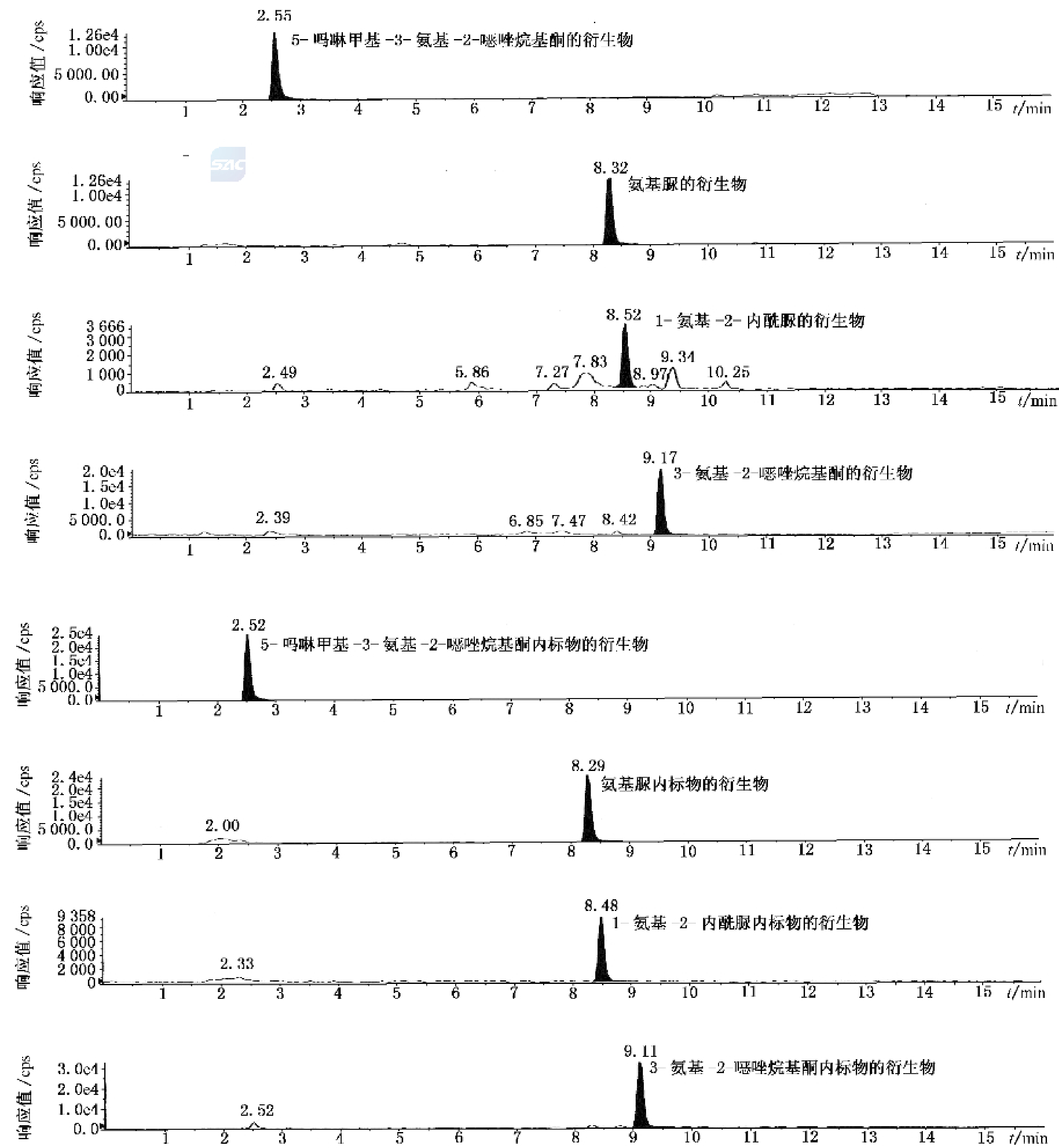


图 B.1 四种硝基呋喃代谢物及内标物衍生物的多反应监测(MRM)色谱图

附 录 C
(资料性附录)
回 收 率

四种硝基呋喃代谢物的添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 C.1。

表 C.1 四种硝基呋喃代谢物添加浓度及其平均回收率的试验数据

基质样品	添加浓度/ (μg/kg)	奶粉和牛奶样品中四种硝基呋喃代谢物的平均回收率/%			
		2-NP-AMTZ	2-NP-SEM	2-NP-AHD	2-NP-AOT
牛奶	0.2	96.4	92.8	91.8	96.1
	0.5	91.2	94.7	92.1	93.5
	1.0	98.2	97.4	93.2	92.1
	2.0	95.3	95.6	98.7	93.2
奶粉	1.6	96.1	91.2	92.4	94.7
	4.0	93.5	94.3	98.4	97.4
	8.0	97.4	92.5	94.3	91.2
	16.0	91.4	93.8	92.8	94.3

