

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 727—2003

饲料中呋喃唑酮的测定 高效液相色谱法

**Determination of furazolidone in feeds—
High performance liquid chromatography**

(ISO 14797, Animal feeding stuffs—Determination of
furazolidone content—method using high-performance liquid
chromatography, MOD)

2003-12-01 发布

2004-03-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准修改采用 ISO 14797:1999(E)《高效液相色谱法测定饲料中呋喃唑酮含量》(英文版)。

本标准根据 ISO 14797:1999(E)重新起草。

考虑到我国国情和实验室设备状况,在采用 ISO 14797:1999(E)时,本标准做了一些修改。有关技术性差异和编辑性修改已编入正文中并在它们所涉及的条款的页边空白处用垂直单线标识。在附录 B 中给出了这些技术性差异及编辑性修改的一览表以供参考。

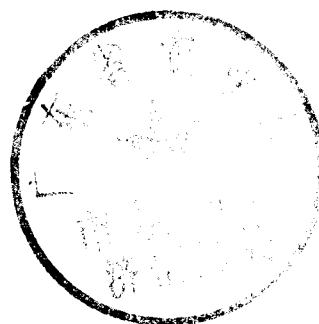
本标准的附录 A、附录 B 均为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国饲料标准化技术委员会归口。

本标准负责起草单位:国家饲料产品质量监督检验中心(北京),参加起草单位:农业部饲料工业中心。

本标准主要起草人:闫惠文、杨曙明、赵小阳、王彤、杨文军。



饲料中呋喃唑酮的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了高效液相色谱(HPLC)法测定配合饲料、预混合饲料及浓缩饲料中呋喃唑酮的方法。

本标准可用于含 10 mg/kg~5 000 mg/kg 呋喃唑酮的配合饲料和含量为 0.5%~20%的预混合饲料及浓缩饲料。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14699.1 饲料采样方法

3 原理

配合饲料以少量水湿润,用乙腈和甲醇的混合液将呋喃唑酮提取出来,预混合饲料和浓缩饲料直接用乙腈和甲醇的混合液将呋喃唑酮提取出来,提取液经氧化铝短柱净化,用稀释液稀释后在反相—HPLC上分离,紫外检测器 365 nm 处测定。

4 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为优级纯或色谱纯的试剂。

4.1 水:符合 GB/T 6682 一级用水的规定。

4.2 提取剂:乙腈:甲醇=1:1。充分混匀,使用前放至室温。

4.3 稀释剂:将 350 mL 提取剂(4.2)与 650 mL 水(4.1)混合。

4.4 10%乙酸溶液:将 10 mL 冰乙酸用水稀释至 100 mL。

4.5 乙酸钠缓冲液, $c(\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na})=0.01\text{ mol/L}$, $\text{pH}=6.0$ 。

用约 700 mL 水溶解 0.82 g 乙酸钠,用乙酸溶液(4.4)将 pH 调至 6.0,加水稀释至 1 000 mL,混匀。

4.6 HPLC 流动相:取 800 mL 乙酸钠缓冲液(4.5)和 200 mL 乙腈,混合均匀,通过 0.2 μm 的滤膜过滤,用前超声脱气 10 min。

4.7 呋喃唑酮标准物:N-(5-硝基-2-呋喃甲叉)-3-氨基-2-噁唑烷酮。

注意:由于呋喃唑酮对光十分敏感,所有操作都应在避光条件下操作,操作时还应避免吸入、接触有毒的呋喃唑酮标准物和溶液,配制溶液要在通风橱内进行,工作注意带眼镜、穿工作服防护。

4.8 呋喃唑酮贮备液(约 250 $\mu\text{g/mL}$):称取 25 mg $\pm$ 1 mg 呋喃唑酮标准物(4.7),准确至 0.1 mg,用提取液(4.2)溶解,稀释至 100 mL,混匀,贮于 0℃~8℃冰箱中。计算溶液浓度时要计入标准物的纯度。溶液有效期一个月。

4.9 呋喃唑酮工作液(约 5 $\mu\text{g/mL}$ 和 12.5 $\mu\text{g/mL}$):准确吸取 2.0 mL 和 5.0 mL 贮备液(4.8)分别置于 100 mL 容量瓶中,加 65 mL 水,用提取液(4.2)稀释至刻度并混匀,每批样品均需制备新鲜的工

NY/T 727—2003

作液。

4.10 中性氧化铝,活度 1(对于全去活的氧化铝可有 0%~1%的水)。

处理方法如下:将中性氧化铝(100 目~200 目)放入马福炉,于 550℃灼烧 3 h,移至干燥器中冷却,装入密封容器中保存。

5 仪器设备

常用的实验室仪器设备,特别是下述仪器设备:

- 5.1 pH 计(带温度补偿,精确至 0.01)。
- 5.2 溶剂过滤系统,全玻璃滤器,孔径 0.2 μm。
- 5.3 超声水浴。
- 5.4 振荡器,水平方向振荡,频率 250 r/min~300 r/min。
- 5.5 过滤装置,使用中速滤纸。
- 5.6 玻璃纤维。
- 5.7 玻璃层析柱,长 30 cm,内径 10 mm,末端缩小能放置玻璃毛。
- 5.8 过滤系统,能安放孔径为 0.2 μm 聚二氟乙烯(PVDF)或聚四氟乙烯(PTFE)滤膜。
- 5.9 HPLC 系统,由下述部件组成:
 - 5.9.1 泵,无脉冲,能将流速保持在 0.1 mL/min~2.0 mL/min。
 - 5.9.2 进样系统,进样环体积 20 μL~50 μL。
 - 5.9.3 UV 检测器,适合在波长 365 nm 测定。如可能可使用二极管阵列检测器,其还能用于呋喃唑酮的确证。
 - 5.9.4 记录仪。
 - 5.9.5 保护柱:长 20 mm,内径 3.9 mm,填有粒度为 37 μm~100 μm 的 C₁₈ 键合硅胶或质量相当的其他保护柱。
 - 5.9.6 分析柱:柱长 200 mm,内径 3.0 mm,填有粒度为 5 μm 的键合硅胶的 C₁₈ 柱或性能相当的其他分析柱。

分析柱的性能应确保以下条件:

呋喃唑酮的容量因子 $K' \geq 1$ 。

注:容量因子的计算见式(1):

$$K' = \frac{t_R}{t} - 1 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

K' ——容量因子;

t_R ——呋喃唑酮的保留时间,单位为分钟(min);

t ——不保留成分的保留时间,单位为分钟(min)。

5.10 微量注射器。

6 试样制备

按 GB/T 14699.1 采集实验室样品。将实验室样品(通常 500 g)粉碎,使之全部通过 1 mm 筛,充分混匀。贮于磨口瓶中备用。

7 分析步骤

7.1 一般要求

每次测定均应平行进行空白样品、空白添加样品的测定,如果可能还要进行参比样品的测定。

注意:空白样品是一些呋喃唑酮含量小于 10 mg/kg 样品的均匀混合物,空白添加样品是添加了呋

喃唑酮的空白样品。空白样品和参比样品在 0℃~8℃下可贮存一年。

如测得的添加回收率小于 94%或大于 106%，分析应重新进行。

7.2 空白添加样品的制备

添加样品中呋喃唑酮含量应与测试样品中预期的呋喃唑酮含量相当。制备方法如下例：

欲制备一个呋喃唑酮含量为 250 mg/kg 的添加样品，准确吸取 5.0 mL 呋喃唑酮贮备液(4.8)置于 250 mL 三角瓶中，用氮气吹至剩约 0.5 mL，加入 5 g 空白饲料样品，充分混匀，放置至少 10 min，然后再做提取。

7.3 提取

称取适量制备好的试样，置于适当的三角瓶中，准确加入一定体积(如需要)的水，混合后放置 5 min，准确加入提取剂(4.2)，盖好盖子，置于回旋振荡器上剧烈振摇 30 min，用过滤装置(5.5)过滤，滤液按 7.4 规定进行柱层析。

用稀释液(4.3)稀释滤液，使最后溶液中呋喃唑酮含量达 5 μg/mL~10 μg/mL。充分混匀，用过滤系统(5.8)过滤，滤液按 7.5 所述进行 HPLC 分析。

具体提取条件见表 1。

表 1

样品中呋喃唑酮含量	称样量	水/mL	提取剂/mL
10 mg/kg~2 500 mg/kg	5 g±50 mg	15.00	35.0
2 500 mg/kg~5 000 mg/kg	5 g±100 mg	30.0	70.0
0.5%~7%	1 g±50 mg	—	100.0
7%~10%	1 g±10 mg	—	200.0
10%~20%	0.5 g±5 mg	—	200.0

7.4 柱层析

每个样品提取液，需用一根干法填充的玻璃层析柱。该玻璃层析柱下端放入一小团玻璃纤维(5.6)，上面填有 4 g 中性氧化铝(4.10)。向柱中加入 20 mL 根据 7.3 制备的样品提取液，弃去最初的 4 mL 流出液，用刻度试管收集随后的 8 mL 流出液。必要时，将流出液用稀释剂(4.3)稀释，使呋喃唑酮含量达 5 μg/mL~10 μg/mL，稀释倍数为 f 。

用过滤系统(5.8)过滤，滤液按 7.5 所述进行 HPLC 分析。

7.5 HPLC 分析

7.5.1 色谱条件

- a) 流动相流速:0.6 mL/min;
- b) 进样量:20 μL;
- c) 检测波长:365 nm。

7.5.2 分析程序

7.5.2.1 向 HPLC 分析仪中连续注入呋喃唑酮工作液(4.9)，直至得到基线平稳，峰形对称而且峰高或峰面积能够重现的呋喃唑酮峰，即三个连续测定的峰高或峰面积中最大与最小值间的差异小于其平均值的 5%。

呋喃唑酮峰应是对称的($f_{as}<2$)。

注： f_{as} 为呋喃唑酮峰峰高 10%处，尾半部峰宽与前半部峰宽之商。

两个呋喃唑酮工作液所得色谱峰峰高与浓度间应有正比例关系，如果偏差大于 5%，则需制备新的工作液。

注入空白样品和添加空白样品的提取净化液，如果呋喃唑酮峰形不对称或不能与基质中的杂峰分开，需更换分析柱或改变流动相中有机相与水相的比例。

依次注入呋喃唑酮工作液(4.9)、五个样品提取(净化)液和呋喃唑酮工作液(4.9)，观察工作液的峰

NY/T 727—2003

高或峰面积差异不得超过均值的 5%。可依此顺序不断加入待测样品。

7.5.2.2 如果测得的呋喃唑酮含量明显低于预期值,则需用比 7.3 所列体积多 50 mL 提取液(4.2)重新提取样品并上机分析。

如果新的分析结果较前一结果高出 15%以上,则需用再多 50 mL 的提取液(4.2)重新提取样品并上机分析,如此重复,直至两次测定的结果差异小于 15%为止。

8 确证

8.1 总则

如果从峰形、测定数值对呋喃唑酮的峰产生了怀疑,或所测定呋喃唑酮含量低于 25 mg/kg,则必须用重叠色谱分析(8.2)或二极管阵列检测器(8.3)来确证。

8.2 重叠色谱法

于样品提取液中加入适量的呋喃唑酮工作液(4.9),加入的量应与提取液中呋喃唑酮的量相当。

依次注入样品提取液、呋喃唑酮工作液和添加了呋喃唑酮的样品提取液。如果添加提取液样品峰的半峰宽变化不大于 10%,且峰高或峰面积发生了成比例的变化,则可确证原呋喃唑酮峰就是呋喃唑酮的。

8.3 二极管阵列检测器

8.3.1 条件

测定条件同 7.5.1 的规定,只是将 UV 检测器换为二极管阵列检测器,具体参数如下:

参 数	设 定
测定波长	365 nm
频带宽度	4 nm(即波长 365 ± 2 nm)
参比波长	450 nm
参比频带宽度	100 nm
光谱范围	225 nm~400 nm
光谱值	基线、峰最大值、上升斜率和下降斜率拐点

8.3.2 步骤

HPLC 系统稳定后,依次注入 5 $\mu\text{g/mL}$ 的呋喃唑酮工作液(4.9)、有疑问的样品提取液和又一 5 $\mu\text{g/mL}$ 的呋喃唑酮工作液(4.9)。记录、存储各个色谱峰的基线、最大值以及峰两侧的拐点数据。

8.3.3 评价

将样品峰不同光谱值(样品—基线)归一化并绘制成图,记录峰值和峰前后的拐点值。分别将样品峰光谱和呋喃唑酮工作液的光谱归一化,并绘图。在峰顶处标示。

8.3.4 确证标准

样品峰只有满足下述条件,才能证实是呋喃唑酮:

- 样品峰的保留时间应与标准峰的保留时间相同(差异 $\leq \pm 5\%$),如有怀疑,需做标准物添加(即将标准物加到样品中)实验。
- 样品峰的纯度评定是基于所记录的峰顶、上升斜率拐点和下降斜率拐点不同光谱的符合程度。所有光谱图每个波长的相对吸收值应该相等(差异 $\leq 15\%$)。
- 波长大于 220 nm、样品光谱图与标准光谱图在相对吸收至少等于 10%的部分无明显区别,样品峰和标准峰的最大吸收波长相同,即其差异不大于检测系统分辨率决定的范围(一般是 2 nm~4 nm),两个光谱图任一观察点的偏差均不能超过该特定波长下标准测定物吸收值的 15%。

9 结果计算

样品提取液中呋喃唑酮的含量是通过比较样品提取液色谱峰的峰高或峰面积和在样品前后注入的

呋喃唑酮工作液的峰高或峰面积的平均值而计算出来的。

9.1 呋喃唑酮含量为 10 mg/kg~5 000 mg/kg 的样品：

配合饲料样品中呋喃唑酮的含量 W_f ，可用式(2)计算：

$$W_f = \frac{A}{A_s} \times C_s \times \frac{V}{m} \times f \dots\dots\dots (2)$$

式中：

W_f ——试样中呋喃唑酮的含量，单位为毫克每千克(mg/kg)；

A ——试样提取液测得的色谱峰面积；

A_s ——呋喃唑酮标准工作液测得的色谱峰面积；

C_s ——标准工作液中呋喃唑酮含量，单位为微克每毫升(μ g/mL)；

V ——加到试样中的提取液体积，单位为毫升(mL)；

m ——试样质量，单位为克(g)；

f ——提取液的稀释倍数。

注：也可用峰高代替峰面积做计算。

结果保留至 1 mg/kg。

9.2 呋喃唑酮质量分数为 0.5%~20% 的样品。

预混合饲料或浓缩饲料中呋喃唑酮的质量分数 W_{ip} ，可用式(3)计算：

$$W_{ip} = \frac{A}{A_s} \times C_s \times \frac{V}{m} \times f \times 10^{-4} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

W_{ip} ——试样中呋喃唑酮的含量，%；

A ——试样提取液测得的色谱峰面积；

A_s ——呋喃唑酮标准工作液测得的色谱峰面积；

C_s ——标准工作液中呋喃唑酮含量，单位为微克每毫升(μ g/mL)；

V ——加到试样中的提取液体积，单位为毫升(mL)；

m ——试样质量，单位为克(g)；

f ——提取液的稀释倍数。

注：也可用峰高代替峰面积做计算。

结果保留至 0.01%。

10 精密度

10.1 重复性

在同一实验室由同一操作人员完成的两个平行测定的结果应满足以下要求：

- a) 当呋喃唑酮含量为 10 mg/kg~5 000 mg/kg 时，相对相差 $\leq$ 8%；
- b) 当呋喃唑酮含量为 0.5%~20% 时，相对相差 $\leq$ 10%。

10.2 再现性

在不同实验室由不同操作人员用不同的仪器设备完成的两个测定结果应满足以下要求：

- a) 当呋喃唑酮含量为 10 mg/kg~5 000 mg/kg 时，相对相差 $\leq$ 17%；
- b) 当呋喃唑酮含量为 0.5%~20% 时，相对相差 $\leq$ 20%。

附 录 A
(资料性附录)
呋喃唑酮标准色谱图和光谱图

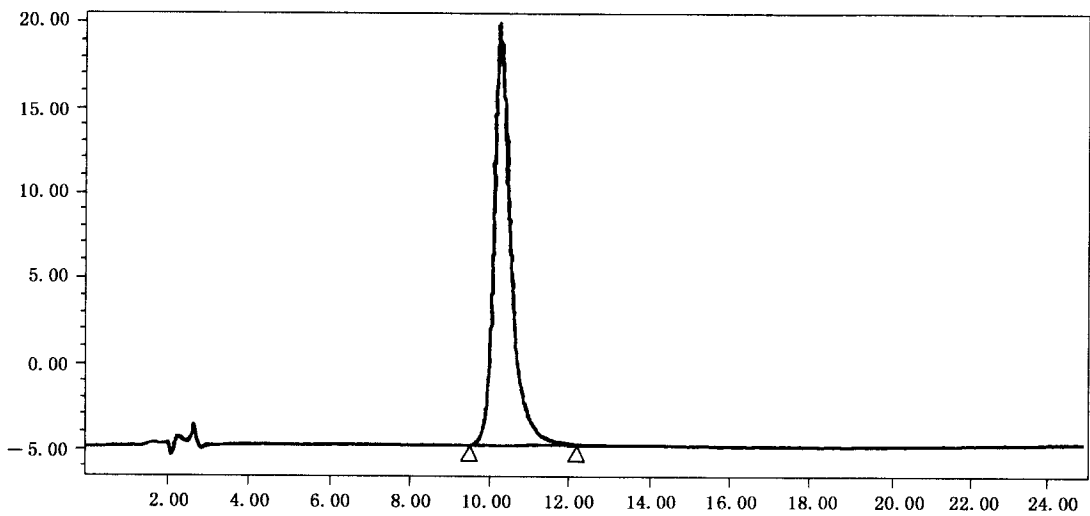


图 A.1 呋喃唑酮标准色谱图

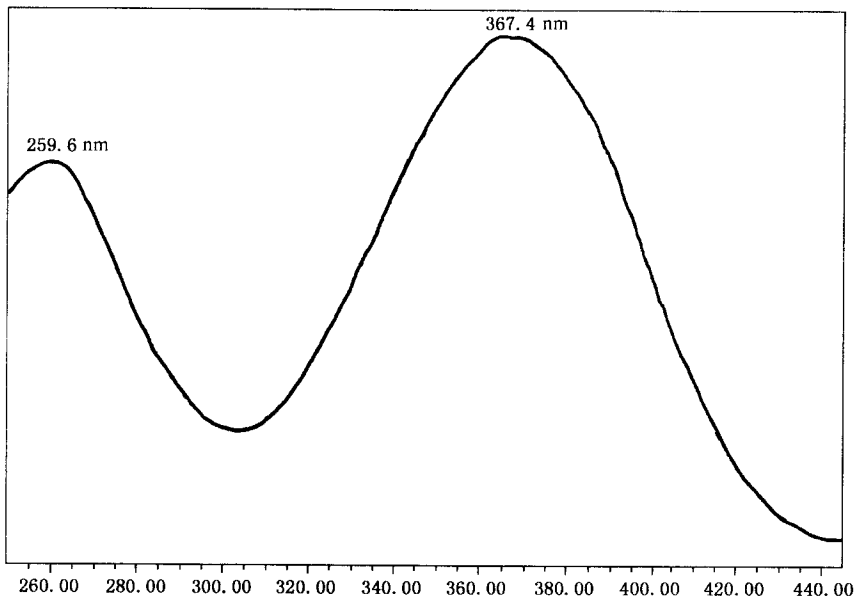


图 A.2 呋喃唑酮标准光谱图

附 录 B
(资料性附录)

本标准与 ISO 14797:1999(E)技术性和编辑性差异及其原因

表 B.1 本标准与 ISO 14797:1999(E)技术性和编辑性差异及其原因

本标准的章条编号	技术性 & 编辑性差异	原 因
1	增加了浓缩饲料的测定。 将最低检测限由原标准的 25 mg/kg 修改为 10 mg/kg。	这一修改是针对我国浓缩饲料产量较高,以增加方法的适用性。 根据实验数据,我国饲料生产中存在主动与被动加入呋喃唑酮的情况,后者含量一般较低,方法力求将两种情况做到有效监控。
2	增加了 GB/T 14699.1—1993。 增加了 GB/T 6682。	以适合我国国情。
6	增加了 GB/T 14699.1—1993。 删除了 ISO 6498。	力求本标准与我国其他相关标准的配套性。
7.3	修改了原提取步骤的编排格式。此处为编辑性修改。	简化标准格式,便于操作者使用。
8.1	增加了“或所测定呋喃唑酮含量低于 25 mg/kg”。 将“可用”改为“则必须用”	力求做到测定的准确性。
9	将计算公式中的峰高改为峰面积。	力求与我国其他标准靠近。

中 华 人 民 共 和 国 农 业
行 业 标 准
饲 料 中 呋 喃 唑 酮 的 测 定
高 效 液 相 色 谱 法

NY/T 727—2003

*

中 国 标 准 出 版 社 出 版
北 京 复 兴 门 外 三 里 河 北 街 16 号
邮 政 编 码:100045

电 话:68523946 68517548

中 国 标 准 出 版 社 秦 皇 岛 印 刷 厂 印 刷
新 华 书 店 北 京 发 行 所 发 行 各 地 新 华 书 店 经 售

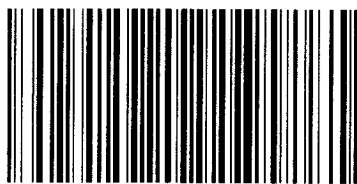
*

开 本 880×1230 1/16 印 张 3/4 字 数 15 千 字
2004 年 2 月 第 一 版 2004 年 2 月 第 一 次 印 刷
印 数 1—600

*

书 号: 155066 • 2-15561 定 价 10.00 元
网 址 www.bzebs.com

版 权 专 有 侵 权 必 究
举 报 电 话: (010)68533533



NY/T 727-2003