

水产品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 the metabolites of Nitrofuran Antibiotics residues in aquatic products——LC-MS/MS method

2006-01-05 发布

2006-02-08 实施

浙江省质量技术监督局 发布

前 言

本标准附录A为资料性附录。

本标准由浙江省海洋与渔业局提出并归口。

本标准起草单位：浙江省水产质量检测中心。

本标准主要起草人：张海琪、何中央、王扬、郑重莺、丁雪燕、应永飞。

水产品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

本标准规定了水产品中呋喃它酮的代谢物5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷基酮（简称AMOZ，下同）、呋喃西林的代谢物氨基脲（简称SEM，下同）、呋喃妥因的代谢物1-氨基-2-内酰脲（简称AHD，下同）和呋喃唑酮的代谢物3-氨基-2-噁唑烷基酮（简称AOZ，下同）残留量的液相色谱-串联质谱的测定方法。

本标准适用于水产品中呋喃它酮代谢物、呋喃西林代谢物、呋喃妥因代谢物和呋喃唑酮代谢物残留量的检验。

本标准规定呋喃它酮代谢物、呋喃西林代谢物、呋喃妥因代谢物和呋喃唑酮代谢物的检测限均为0.50 µg/kg。

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

3 原理

样品中残留的硝基呋喃类抗生素代谢物在酸性条件下水解，用2-硝基苯甲醛衍生化，经固相萃取柱净化后液相色谱-串联质谱法测定，内标法定量。

4 试剂

除非另有说明，仅使用分析纯试剂。

- 4.1 水：GB/T 6682 规定的一级水。
- 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。
- 4.6 甲酸：优级纯。
- 4.7 二甲亚砜：优级纯。
- 4.8 盐酸：优级纯。
- 4.9 氢氧化钠：优级纯。
- 4.10 2-硝基苯甲醛（2-NBA）：纯度≥99%。
- 4.11 磷酸氢二钾溶液：0.5 mol/L。称取 5.7 g 磷酸氢二钾（4.5），用水溶解，定容至 50 mL。
- 4.12 盐酸溶液：0.2 mol/L。量取 17 mL 浓盐酸（4.8）用水定容至 1 000 mL。
- 4.13 氢氧化钠溶液：1 mol/L。称取 40 g 氢氧化钠（4.9），用水溶解，定容至 1 000 mL。
- 4.14 2-硝基苯甲醛溶液：8.0 g/L。称取 80 mg 2-硝基苯甲醛（4.10）溶于 10 mL 二甲亚砜（4.7），临用前配制。

4.15 Oasis HLB 固相萃取柱或相当者：60 mg，3 mL。使用前分别用 3 mL 乙酸乙酯、3 mL 甲醇和 5 mL 水预处理，保持柱体湿润。

4.16 AMOZ、SEM、AHD、AOZ 及同位素内标物 AOZ-D₄、AMOZ-D₅、AHD-D₃ 和 SCA-¹³C-¹⁵N₂ 标准物质：纯度 ≥98%。

4.17 标准储备溶液：0.10 mg/mL。准确称取四种硝基呋喃类代谢物标准物质及四种相应的同位素内标物，分别用甲醇配成 0.10 mg/mL 的标准储备溶液。-18℃避光保存，保存期为三个月。

4.18 混合标准储备溶液：1 μg/mL。吸取四种硝基呋喃类代谢物标准储备溶液（4.17），用甲醇配成 1 μg/mL。-18℃避光保存，保存期为三个月，使用前回温到室温。

4.19 混合内标工作溶液：100 ng/mL。吸取四种硝基呋喃类代谢物同位素的标准储备溶液（4.17），用甲醇配成 100 ng/mL。-18℃避光保存，保存期为三个月，使用前回温到室温。

4.20 混合标准工作溶液：根据需要，临用前吸取一定量的混合标准储备溶液（4.18），用甲醇稀释配制适当浓度的混合标准工作液。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱串联四极杆质谱仪，配有电喷雾（ESI）离子源。

5.2 恒温振荡器。

5.3 固相萃取装置。

5.4 高速台式离心机：5 000 r/min。

5.5 氮气吹干仪。

5.6 pH 计。

6 测定步骤

6.1 提取

称取 10 g 均质试样（精确到 0.01 g）于 50 mL 聚丙烯离心管中，加入 100 μL 内标工作溶液（4.23），分别加入 25 mL 0.2 mol/L 盐酸溶液和 0.5 mL 衍生剂（4.14），涡旋混合 1 min，置于 37℃恒温振荡器中保持 16h。

6.2 净化

将上述提取溶液（6.1）取出放置至室温，加入 1 mL 0.5 mol/L 磷酸氢二钾溶液（4.11），用 1 mol/L 氢氧化钠溶液（4.9）调节溶液 pH 范围至 7.0~7.4，以 4 500 r/min 的速度离心 15 min，上清液过已 Oasis HLB 或相当的固相萃取柱（4.15），调节流速小于等于 2 mL/min，待样液全部通过固相萃取柱后用 3 mL 水洗固相萃取柱，弃去全部流出液。负压下抽干固相萃取柱 10 min，再用 6mL 乙酸乙酯洗脱被测物，洗脱液全部收集于 10 mL 离心管中，并在氮气吹干仪上 40℃水浴吹干，1mL 乙腈与 0.4%甲酸水溶液（10+90）溶解残渣，过 0.2 μm 滤膜，滤液供液相色谱-串联质谱测定。

6.3 测定

6.3.1 色谱条件

- 色谱柱：Zorbax XDB C₁₈ 柱（150 mm×2.1 mm×5 μm）或相当者；
- 柱温：35℃；
- 进样量：40 μL；
- 流动相及流速见表 1。

6.3.2 质谱条件

- 离子源：电喷雾离子源（ESI）；
- 扫描方式：正离子扫描；
- 检测方式：多反应监测（MRM）；
- 雾化气（NEB）、气帘气（CUR）、辅助加热气（AUX）、碰撞气（CAD）均为高纯氮气；使

用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求；

- e) 喷雾电压、去集簇电压、碰撞能等电压值应优化至最优灵敏度；
- f) Q_1 , Q_3 均为单位分辨率 (UNIT)；
- g) 定性离子对、定量离子对、采集时间 (Dwell) 见表 2。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

时间 (min)	流速 (μL/min)	0.4%甲酸水溶液 (%)	乙腈 (%)
0.00	200	70	30
3.00	200	70	30
3.01	250	25	75
8.00	250	25	75
8.01	200	70	30
15.00	200	70	30

表 2 四种硝基呋喃代谢物的监测离子对

硝基呋喃代谢物名称	定量离子对 (m/z)	定性离子对 (m/z)	采集时间 (ms)
AMOZ	335/291	335/262	100; 100
SEM	209/166	209/192	100; 100
AHD	249/134	249/178	50; 100
AOZ	236/134	236/104	100; 50
AOZ-D ₄	240/134		50
AMOZ-D ₅	340/296		100
AHD-D ₃	252/134		50
SCA- ¹³ C- ¹⁵ N ₂	212/195		100

6.3.3 液相色谱-串联质谱测定

6.3.3.1 定性测定

在相同试验条件下，样品中待测物与同时检测的标准物质具有相同的保留时间，并且非定量离子对与定量离子对色谱峰面积的比值相对偏差小于 30%，则可判定为样品中存在该残留。

6.3.3.2 定量测定

按照 6.3.1 和 6.3.2 液相色谱-串联质谱条件测定样品和混合标准工作溶液 (6.1.4)，以色谱峰面积按内标法定量，以 AMOZ-D₅ (m/z 340/296) 计算 AMOZ (m/z 335/291) 的浓度，以 SCA-¹³C-¹⁵N₂ (m/z 212/195) 计算 SEM (m/z 209/166) 的浓度，以 AHD-D₃ (m/z 252/134) 计算 AHD (m/z 249/134) 的浓度，以 AOZ-D₄ (m/z 240/134) 计算 AOZ (m/z 236/134) 的浓度。在上述色谱条件下标准溶液的提取离子流图参见附录 A.1。

6.4 空白试验

除不加试样外，均按上述测定步骤进行。

7 结果计算

测定结果可由计算机按内标法自动计算，也可按式 (1) 计算，计算结果需扣除空白值。

$$X = \frac{C \times C_i \times A \times A_{si} \times V}{C_{si} \times A_i \times A_s \times W} \dots\dots (1)$$

式中：

- X ——样品中待测组分残留量，单位为微克每千克 (μg/kg)；
- C ——AMOZ、SEM、AHD 或 AOZ 标准工作溶液的浓度，单位为微克每升 (μg/L)；
- C_{si} ——标准工作溶液中内标物的浓度，单位为微克每升 (μg/L)；
- C_i ——样液中内标物的浓度，单位为微克每升 (μg/L)；

- A ——样液中 AMOZ、SEM、AHD 或 AOZ 的峰面积；
 A_s ——AMOZ、SEM、AHD 或 AOZ 标准工作溶液的峰面积；
 A_{si} ——标准工作溶液中内标物的峰面积；
 A_i ——样液中内标物的峰面积；
 V ——样品定容体积，单位为毫升（mL）；
 W ——样品称样量，单位为克（g）。

注：报告测定结果至小数二位。

8 方法检测限、准确度和精密度

8.1 方法检测限

本方法在水产品中 AMOZ、AOZ、SEM 和 AHD 的检测限均为 0.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

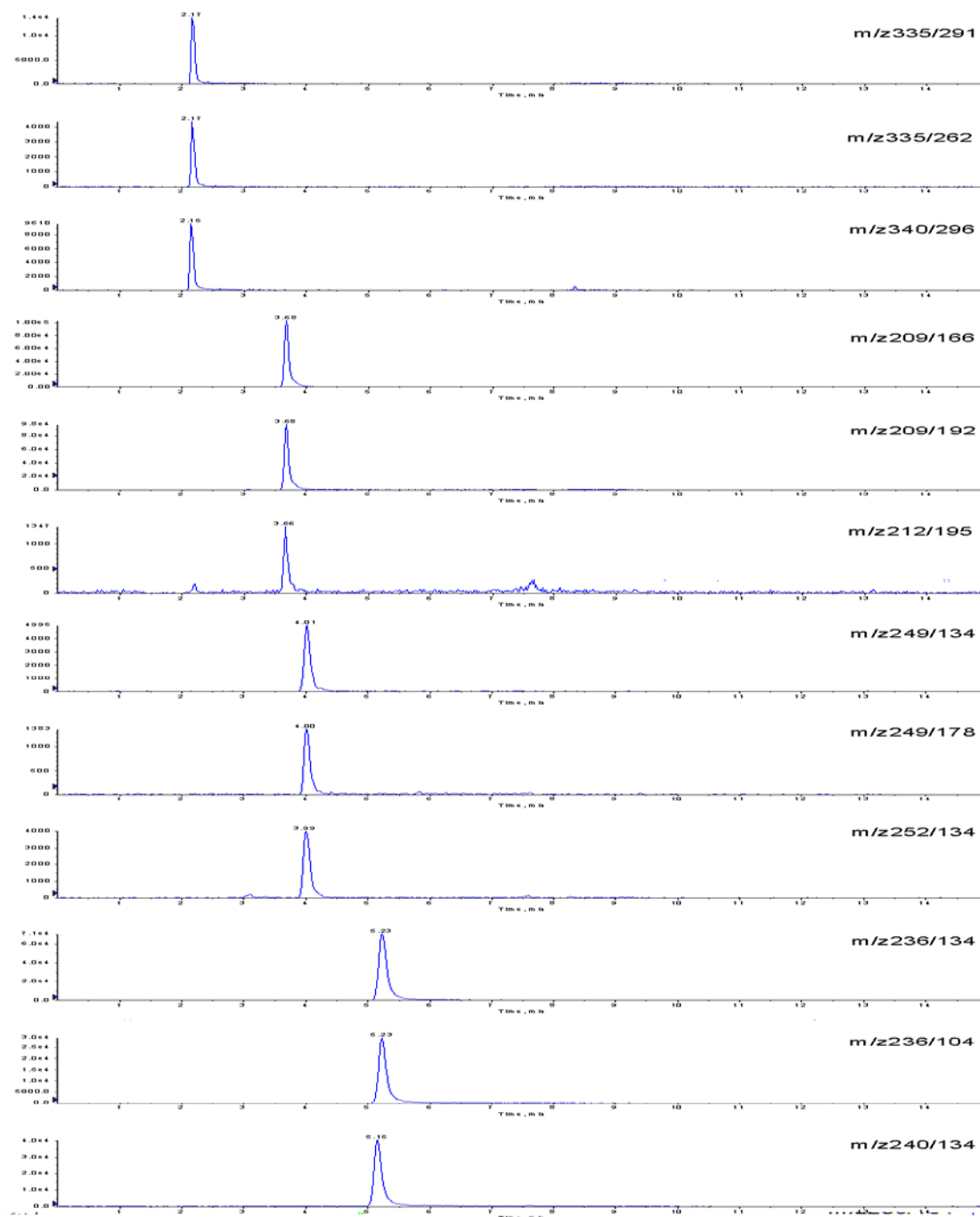
8.2 准确度

本方法在 0.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率均大于 70%。

8.3 精密度

本方法的相对标准偏差 RSD 小于 15%。

附录 A
(资料性附录)
四种硝基呋喃类代谢物标准物质的提取离子流图



A.1 AMOZ、AMOZ-D₅、SEM、SCA-¹³C-¹⁵N₂、AHD、AHD-D₃、AOZ和AOZ-D₄标准物质的提取离子流图