

水和沉积物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 metabolic residues in waters and sediment by
LC-MS/MS method

2019 - 01 - 14 发布

2019 - 02 - 15 实施

天津市市场监督管理委员会 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准由天津市农业农村委员会提出并归口。

本标准起草单位：农业农村部渔业环境及水产品质量监督检验测试中心（天津）。

本标准主要起草人：李春青、陈永平、高丽娜、时文博、李宝华。

水和沉积物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

本标准规定了水及沉积物中硝基呋喃类代谢物残留量测定的试剂、仪器设备、测定步骤、计算、方法灵敏度、方法回收率、方法精密度。

本标准适用于水和沉积物中 3-氨基-2-唑烷基酮（呋喃唑酮代谢物，以下简称：AOZ）、5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮（呋喃它酮的代谢物，以下简称：AMOZ）、氨基脲（呋喃西林代谢物，以下简称：SEM）和 1-氨基-2-内酰脲（呋喃妥因代谢物，以下简称：AHD）残留量的测定。

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

3 原理

水或沉积物中残留的硝基呋喃类代谢物在酸性条件下水解，用2-硝基苯甲醛衍生化，经乙酸乙酯液-液萃取净化后，液相色谱-串联质谱仪测定，内标法定量。

4 试剂

4.1 甲醇：色谱纯。

4.2 醋酸铵：色谱纯。

4.3 二甲基亚砜：色谱纯。

4.4 2-硝基苯甲醛：色谱纯。

4.5 三水合磷酸氢二钾：优级纯。

4.6 乙酸乙酯：色谱纯。

4.7 乙腈：色谱纯。

4.8 盐酸：优级纯。

4.9 0.002 mol/L 醋酸铵溶液：称取 0.15 g 醋酸铵，用水（实验用水当符合 GB/T 6682 规定）溶解并定容至 1000 mL。

4.10 甲醇溶液：甲醇：水=5：95(v/v)。

4.11 0.2 mol/L 盐酸溶液：量取浓盐酸（ $\rho = 1.19 \text{ g/mL}$ ）16.67 mL，用水稀释至 1000 mL。

4.12 0.05 mol/L 2-硝基苯甲醛溶液：称取 0.037 8 g 2-硝基苯甲醛，溶于 5 mL 二甲基亚砜中，现用现配。

4.13 1.0 mol/L 磷酸氢二钾溶液：称取 114 g 三水合磷酸氢二钾，溶解于 500 mL 水中。

- 4.14 标准物质 AOZ、AMOZ、SEM·HCl 和 AHD·HCl：纯度 $\geq 98\%$ 。
- 4.15 同位素内标溶液：AOZ-D₄、AMOZ-D₅、SEM·HCl-¹³C-¹⁵N₂和 AHD¹³C₃，浓度均为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- 4.16 AOZ（呋喃唑酮代谢物）标准储备溶液：1.0 mg/mL：准确称取 10.0 mg ± 0.1 mg AOZ，用甲醇溶解并定容至 10 mL 棕色容量瓶中，-20℃冷藏保存，有效期 6 个月。
- 4.17 AMOZ（呋喃它酮代谢物）标准储备溶液：1.0 mg/mL：准确称取 10.0 mg ± 0.1 mg AMOZ，用甲醇溶解并定容至 10 mL 棕色容量瓶中，-20℃冷藏保存，有效期 6 个月。
- 4.18 SEM（呋喃西林代谢物）标准储备溶液：1.0 mg/mL：准确称取 14.9 mg ± 0.1 mg SEM·HCl，用甲醇溶解并定容至 10 mL 棕色容量瓶中，-20℃冷藏保存，有效期 6 个月。
- 4.19 AHD（呋喃妥因代谢物）标准储备溶液：1.0 mg/mL：准确称取 13.2 mg ± 0.1 mg AHD·HCl，用甲醇溶解并定容至 10 mL 棕色容量瓶中，-20℃冷藏保存，有效期 6 个月。
- 4.20 硝基呋喃类代谢物混合标准工作溶液：准确吸取 AOZ、AMOZ、SEM 和 AHD 标准储备溶液，用水逐级稀释配成 100 ng/mL 和 10 ng/mL 混合溶液，4℃冷藏保存，有效期 1 个月。
- 4.21 硝基呋喃类代谢物混合内标工作溶液：准确吸取同位素内标溶液（4.15），用水逐级稀释配成 100 ng/mL 混合溶液，4℃冷藏保存，有效期 1 个月。

5 仪器和设备

- 5.1 液相色谱串联四极杆质谱仪：配备电喷雾（ESI）离子源。
- 5.2 电子天平：感量 0.000 1 g 和 0.01 mg。
- 5.3 涡旋混合器。
- 5.4 恒温水浴振荡器：可控温 37 $^{\circ}\text{C} \pm 1$ $^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.5 离心机：4 000 r/min。
- 5.6 氮气吹干仪。
- 5.7 冰箱：具备 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏功能。

6 测定步骤

6.1 样品处理

6.1.1 水样

取充分混匀的水样 100 mL 用 0.45 μm 滤膜过滤，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

6.1.2 沉积物

取沉积物样品 100 g，风干至内外部均干燥无水后，研磨成粉状，用 80 目圆筛筛分去除大型颗粒，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

6.2 水解和衍生化

6.2.1 水样品

量取 10 mL（精确到 0.1 mL， V_2 ）水样于 50 mL 离心管中，加入 0.05 mL 混合内标工作溶液（4.21）涡旋混合 50 s，再加入 5 mL 盐酸溶液（4.11）和 0.20 mL 2-硝基苯甲醛溶液（4.12），涡旋振荡 50 s 后，置于恒温水浴振荡器中 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光振荡 16 h。

6.2.2 沉积物样品

称取样品 5.00 g (精确到0.01 g, m), 加入 0.05 mL混合内标工作溶液(4.21) 涡旋混合 50 s, 再加入 5 mL盐酸溶液(4.11)和 0.20 mL 2-硝基苯甲醛溶液(4.12), 涡旋振荡 50 s后, 置于恒温水浴振荡器中 37 °C 避光振荡 16 h。

6.3 提取净化

取出离心管冷却至室温, 加入 3 mL ~ 5 mL 磷酸氢二钾溶液(4.13), 调节 pH 至 7.0 ~ 7.5, 加入 8 mL 乙酸乙酯, 涡旋振荡 50 s, 4000 r/min 离心 5 min, 取上层清液至 20 mL 玻璃离心管中, 再加入 8 mL 乙酸乙酯重复上述操作, 合并上清液于 40 °C 下氮气吹干。准确加入 1.0 mL (V_1) 甲醇溶液(4.10) 涡旋振荡溶解残留物, 用 0.22 μ m 滤膜过滤, 待测。(若样品杂质较多, 可考虑定容后用正己烷净化, 即加入 2 mL 正己烷涡旋离心后弃去上层, 取下清液过 0.22 μ m 微孔滤膜, 待测)。

6.4 标准工作曲线制作

分别准确移取 10 ng/mL混合标准工作液(4.20) 0.050 mL、0.10 mL和 100 ng/mL混合标准工作液(4.20) 0.020 mL、0.040 mL、0.060 mL、0.080 mL、0.10 mL于 7 个 50 mL离心管中, 除不加样品外, 按 6.1.2 和 6.1.3 步骤操作, 按 6.3 测定, 色谱图参见附录A。

6.5 测定

6.5.1 色谱条件

色谱柱: C_{18} 柱, 100 mm \times 2.1 mm (i. d.), 5 μ m, 或其他性能相当的色谱柱;

柱温: 40°C;

进样量: 20 μ L;

流动相: A . 0.002 mol/L 醋酸铵溶液; B. 乙腈; 梯度洗脱程序见表 1, 平衡时间为 5 min。

表1 流动相梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)	流速 (ml/min)
0.0	85	15	0.25
1.0	85	15	0.25
4.0	30	70	0.25
8.0	30	70	0.25
8.1	85	15	0.25
10	85	15	0.25

6.5.2 质谱条件

质谱参数应符合以下条件:

- a) 离子化模式: 大气压电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式;
- b) 喷雾电压: 4 000 v;
- c) 雾化气压力: 35 psi;
- d) 辅助气流量: 3 L /min
- e) 离子传输毛细管温度: 350 °C;
- f) 源内碰撞诱导解离电压: 10 v;
- g) 扫描模式: 选择反应监测 (SRM), 选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量见表 2;
- h) Q1 半峰宽: 0.7 Da;
- i) Q3 半峰宽: 0.7 Da;
- j) 碰撞气压力: 氩气, 1.5 mTorr

表2 选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量

目标化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量(v)
AOZ (呋喃唑酮代谢物)	236	104	19
	236	134*	15
AOZ-D ₄ (呋喃唑酮代谢物内标)	240	134*	12
AHD (呋喃妥因代谢物)	249	104	20
	249	134*	12
AHD- ¹³ C ₃ (呋喃妥因代谢物内标)	252	134*	15
SEM (呋喃西林代谢物)	209	166*	12
	209	192	10
SEM- ¹³ C- ¹⁵ N ₂ (呋喃西林代谢物内标)	212	168*	11
AMAZ (呋喃它酮代谢物)	335	262	22
	335	291*	14
AMAZ-D ₃ (呋喃它酮代谢物内标)	340	296*	12

注：*表示为定量离子

6.5.3 定性依据

在同样测试条件下，阳性样品保留时间与标准物质保留时间相对标准偏差在 ±5 % 以内，且检测到的离子的相对丰度，用与最强离子（基峰）的强度百分比表示，应当与浓度相当的校正标准相对丰度一致，校正标准可以是校正标准品溶液，也可以是添加了标准物质的样品。次强碎片离子丰度与基峰丰度比应符合表 3 要求：

表3 基峰与次强碎片离子丰度比要求

次强碎片离子相对丰度 (%)	允许相对偏差 (%)
> 50	± 20
> 20 ~ 50	± 25
>10 ~ 20	± 30
≤ 10	± 50

6.5.4 定量测定

定量离子采用丰度最大的二级特征离子碎片（表 2）。

6.6 空白实验

除不加试样外，按上述 6.2、6.3 测定步骤和 6.5 测定条件进行测定，色谱图参见附录B。

7 结果计算

7.1 用仪器自带工作站按内标法进行自动计算，以化合物上机响应的峰面积与内标物峰面积比值为纵坐标、化合物浓度与内标物浓度比值为横坐标，绘制标准曲线，再根据样品的峰面积响应值与内标物峰面积比值，利用标准曲线，得到样品制备液的实际测定浓度。

7.2 水样品中硝基呋喃类代谢物残留量按式（1）计算。计算结果须扣除空白值。

$$X=C_i \cdot V_1 / V_2 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X——样品中硝基呋喃类代谢物的含量，单位为微克每升（μg/L）；

C_i ——样品制备液中硝基呋喃类代谢物的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V_i ——定容体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——样品体积，单位为毫升（mL）。

- 7.3 沉积物样品中硝基呋喃类代谢物残留量按式（2）计算。计算结果须扣除空白值。

$$X=C_i \cdot V_i / m \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X ——样品中硝基呋喃类代谢物的含量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g/kg}$ ）；

C_i ——样品制备液中硝基呋喃类代谢物的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V_i ——定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——样品质量，单位为克（g）。

8 方法灵敏度

8.1 水中四种硝基呋喃类代谢物的检出限为 $0.1 \mu\text{g/L}$ ，定量限为 $0.2 \mu\text{g/L}$ 。

8.2 沉积物中四种硝基呋喃类代谢物的检出限为 $1.0 \mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $2.0 \mu\text{g/kg}$ 。

9 方法回收率

9.1 水中添加浓度为 $0.1 \mu\text{g/L} \sim 10 \mu\text{g/L}$ 时回收率为 $75\% \sim 110\%$ 。

9.2 沉积物中添加浓度为 $1.0 \mu\text{g/kg} \sim 10 \mu\text{g/kg}$ 时回收率为 $75\% \sim 110\%$ 。

10 方法精密度

本方法的批内相对标准偏差小于10%，批间相对标准偏差小于15%。

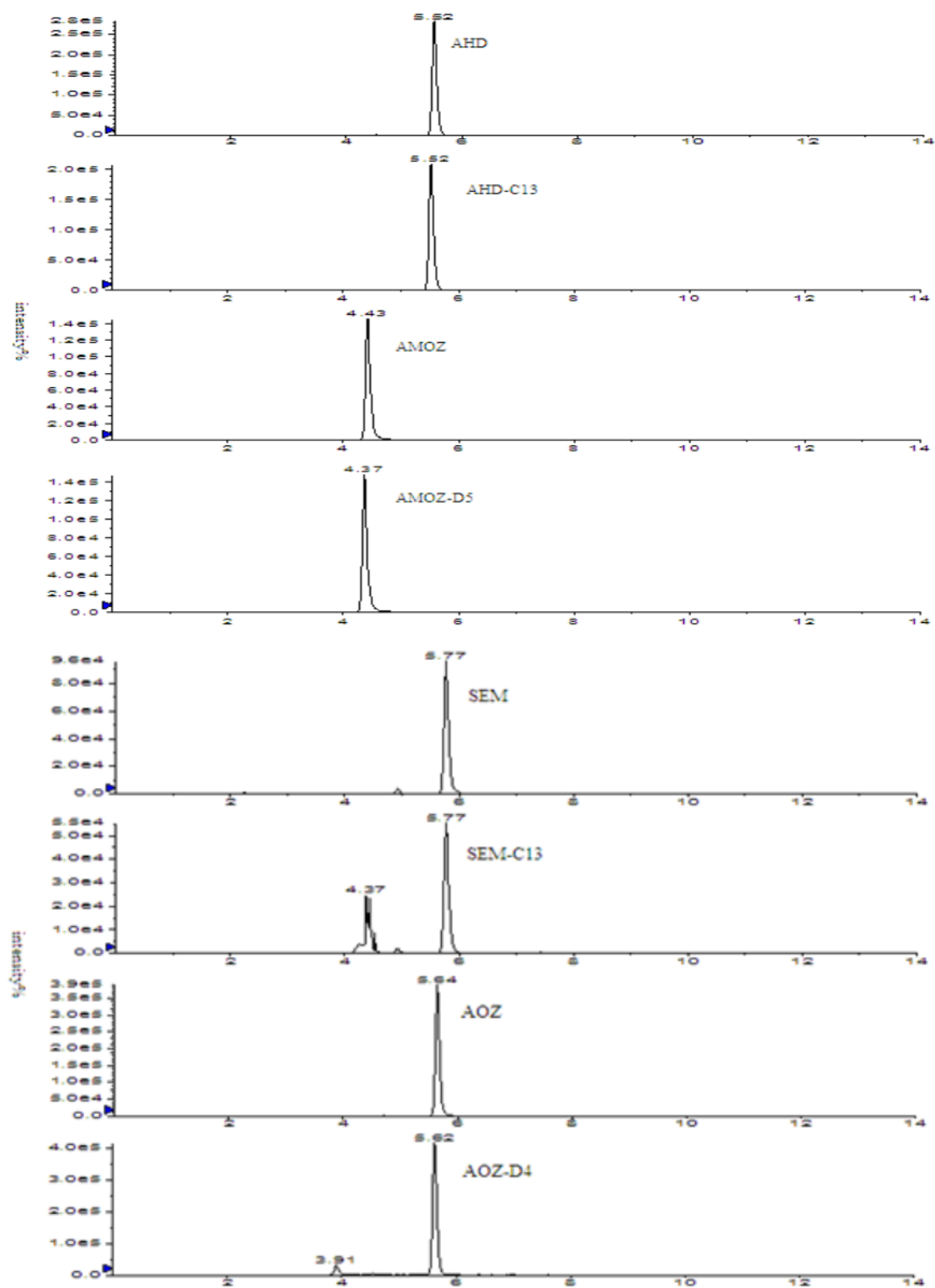
11 注意事项

硝基呋喃类代谢物衍生物对光敏感，以上操作应在避光条件下进行。

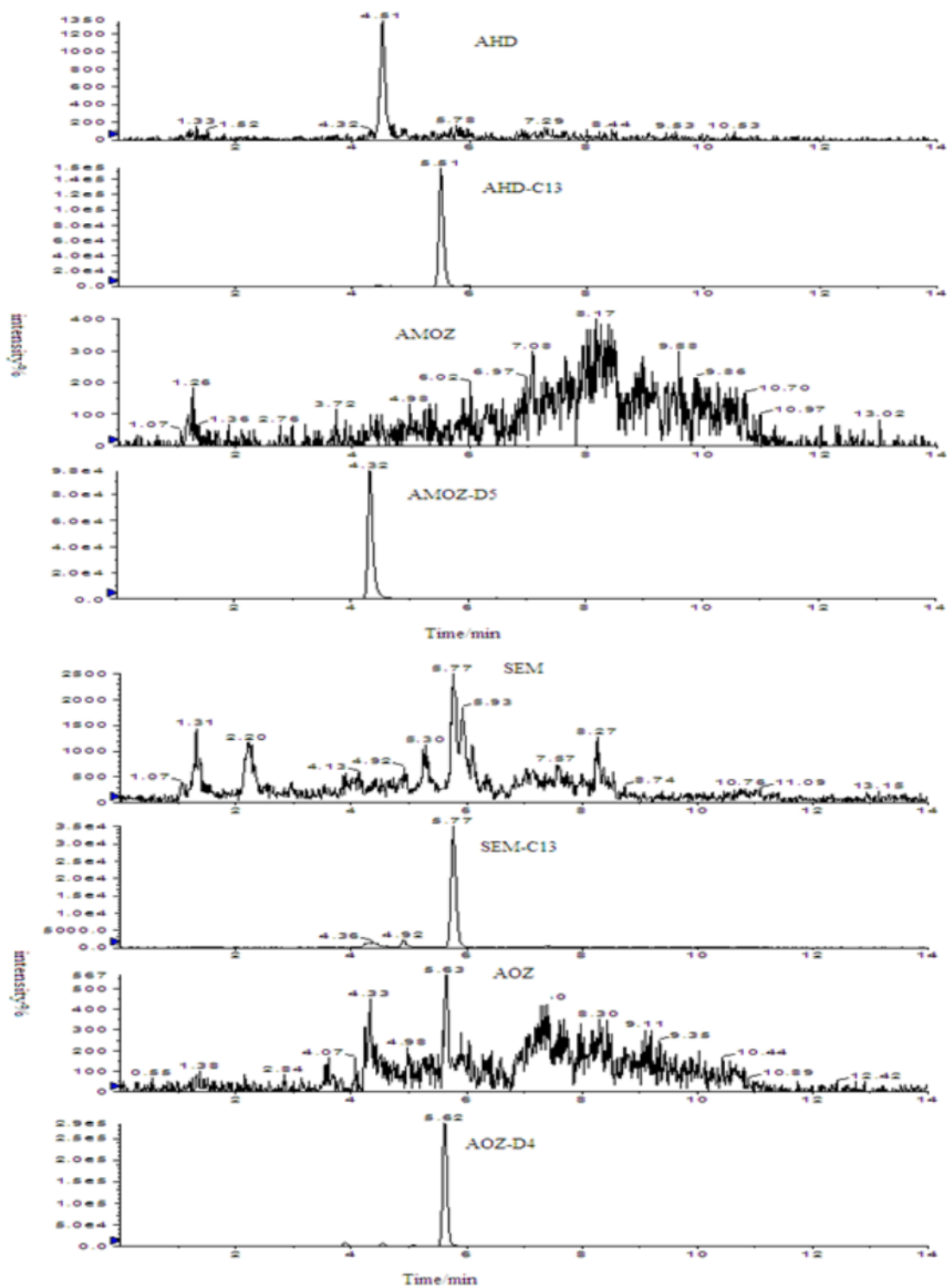
附录 A

(资料性附录)

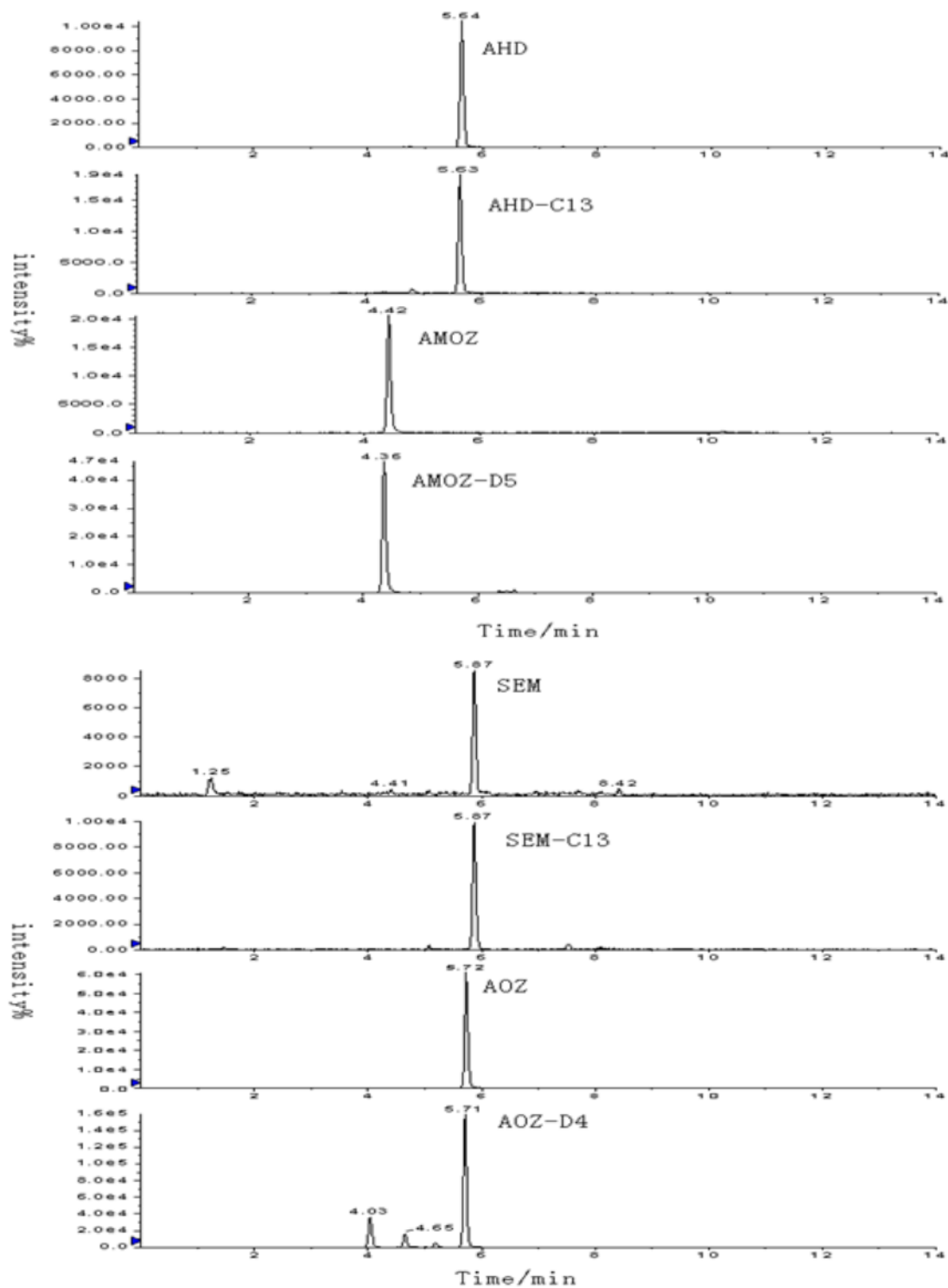
四种硝基呋喃类代谢物混合标准 (2.0 ng/mL) 特征离子质量色谱图



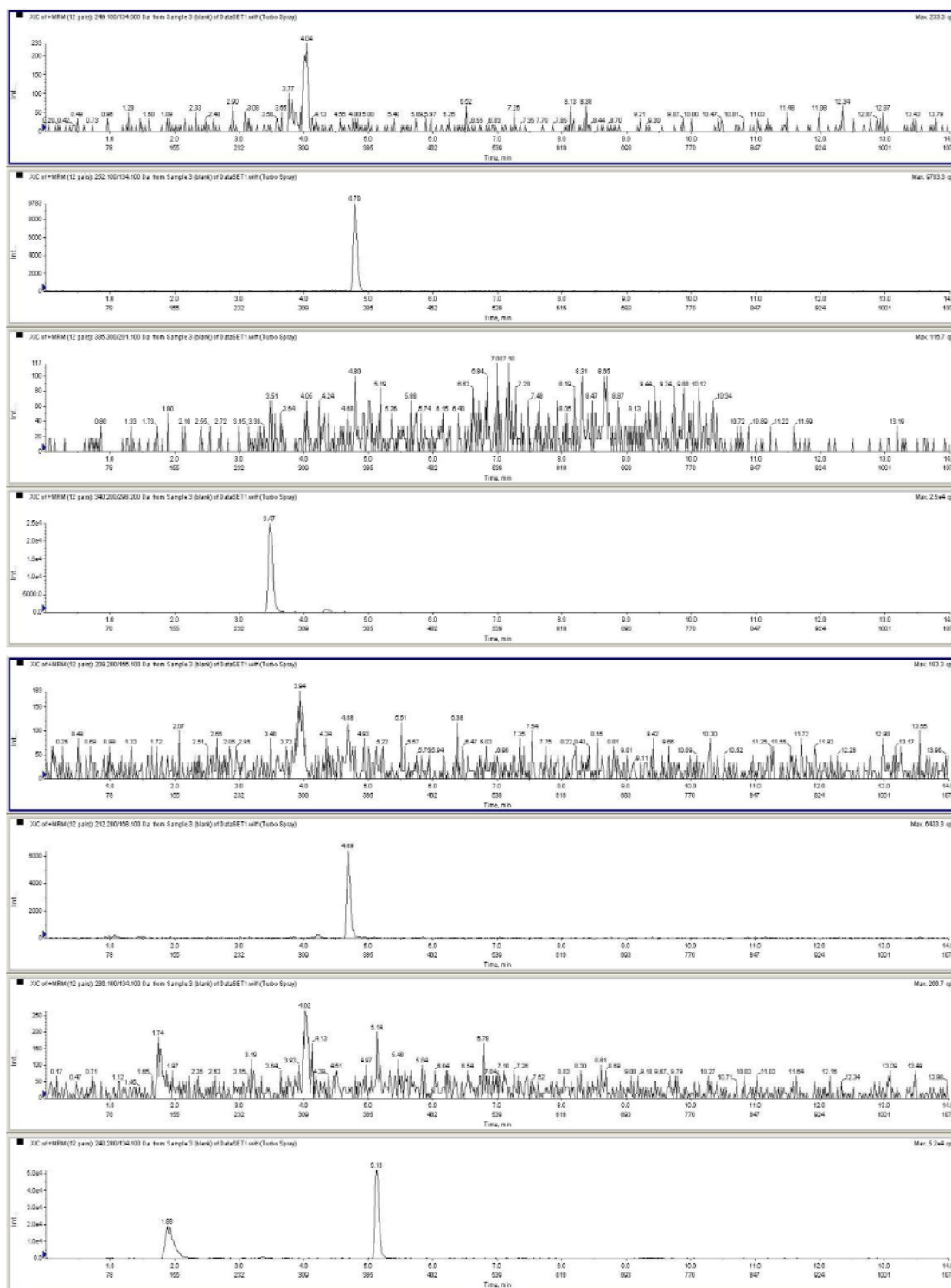
附录 B
 (资料性附录)
 空白沉积物样品特征离子质量色谱图



附录 C
(资料性附录)
沉积物添加样品特征离子质量色谱图



附录 D
(资料性附录)
空白水样品特征离子质量色谱图



附 录 E
(资料性附录)
水添加样品特征离子质量色谱图

