

# 中华人民共和国国家标准

农业部 783 号公告—1—2006

---

## 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 nitrofuran metabolic residues in aquatic products  
by LC-MS/MS method

2006-12-19 发布

2006-12-19 实施

---

中华人民共和国农业部 发布

## 目 次

|   |   |
|---|---|
| 前言 .....  | I |
| 1 范围 .....  | 1 |
| 2 规范性引用文件 .....                                     | 1 |
| 3 原理 .....  | 1 |
| 4 试剂 .....  | 1 |
| 5 仪器和设备 .....                                       | 2 |
| 6 测定步骤 .....  | 2 |
| 6.1 样品处理 .....                                      | 2 |
| 6.2 标准工作曲线制作 .....                                  | 2 |
| 6.3 测定 .....  | 2 |
| 6.4 空白试验 .....                                      | 4 |
| 7 结果计算 .....  | 4 |
| 8 方法灵敏度 .....                                       | 4 |
| 9 方法回收率 .....                                       | 4 |
| 10 方法精密度 .....                                      | 4 |
| 附录 A (资料性附录) 四种硝基咪唑代谢物中英文名称和缩写 .....                | 5 |
| 附录 B (资料性附录) 四种硝基咪唑代谢物混合标准(1.0ng/mL)特征离子质量色谱图 ..... | 6 |
| 附录 C (资料性附录) 空白鳊鱼样品特征离子质量色谱图 .....                  | 7 |
| 附录 D (资料性附录) 鳊鱼添加样品特征离子质量色谱图 .....                  | 8 |

## 前 言

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 和附录 D 均为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国水产标准化技术委员会水产品加工分技术委员会归口。

本标准起草单位：国家水产品质量监督检验中心。

本标准主要起草人：耿霞、冷凯良、翟毓秀、李兆新、刘莹。

# 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硝基呋喃类代谢物残留量的液相色谱-串联质谱测定法。

本标准适用于水产品中呋喃唑酮的代谢物 3-氨基-2-噁唑烷基酮(AOZ)、呋喃它酮的代谢物 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷基酮(AMOZ)、呋喃西林的代谢物氨基脲(SEM)和呋喃妥因的代谢物 1-氨基-2-内酰胺(AHD)残留量的测定。

### 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

样品肌肉组织中残留的硝基呋喃类蛋白结合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

除另有规定外,所用试剂均为分析纯,试验用水符合 GB/T 6682 一级水指标。

- 4.1 甲醇:色谱纯。
- 4.2 醋酸铵:色谱纯。
- 4.3 二甲亚砜。
- 4.4 2-硝基苯甲醛:色谱纯。
- 4.5 磷酸氢二钾。
- 4.6 乙酸乙酯。
- 4.7 0.002 mol/L 醋酸铵溶液:称取 0.15 g 醋酸铵,用水溶解并定容至 1 000 mL。
- 4.8 甲醇溶液:甲醇:水 = 5:95(*v/v*)。
- 4.9 0.2 mol/L 盐酸溶液:量取浓盐酸( $\rho = 1.19 \text{ g/mL}$ )0.6 mL,用水稀释至 100 mL。
- 4.10 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 二甲亚砜中,现用现配。
- 4.11 磷酸氢二钾溶液:1.0 mol/L。称取 87.1 g 磷酸氢二钾,溶解于 500 mL 水中。
- 4.12 标准物质 AOZ、AMOZ、SEM·HCl 和 AHD·HCl:纯度 $\geq 98\%$ 。
- 4.13 同位素内标溶液:AOZ-D<sub>4</sub>、AMOZ-D<sub>5</sub>、AHD-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> 和 SEM·HCl-<sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>,浓度均为 100  $\mu\text{g/mL}$ 。
- 4.14 AOZ 标准储备溶液:1.0 mg/mL。准确称取 10.0 mg  $\pm 0.1 \text{ mg}$  AOZ,用甲醇溶解并定容至 10 mL 棕色容量瓶中,4 $^{\circ}\text{C}$  冷藏保存。
- 4.15 AMOZ 标准储备溶液:1.0 mg/mL。准确称取 10.0 mg  $\pm 0.1 \text{ mg}$  AMOZ,用甲醇溶解并定容至

10 mL 棕色容量瓶中,4℃ 冷藏保存。

4.16 SEM 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,4℃ 冷藏保存。

4.17 AHD 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,4℃ 冷藏保存。

4.18 混合标准工作溶液:准确吸取 AOZ、AMAZ、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。

4.19 混合内标工作溶液:准确吸取同位素内标溶液(4.13),用水逐级稀释配成 100 ng/mL 混合溶液,4℃ 冷藏保存。

## 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 均质机。

5.3 分析天平:感量 0.000 1 g。

5.4 分析天平:感量 0.01 g。

5.5 涡旋混合器。

5.6 恒温水浴振荡器:可控温 37℃ ± 1℃。

5.7 离心机:4 000 r/min。

5.8 氮气吹干仪。

## 6 测定步骤

### 6.1 样品处理

#### 6.1.1 制样

取水产品可食部分,切成不大于 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm 的小块,充分匀浆,备用。

#### 6.1.2 水解和衍生化

称取样品 2.0 g(精确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 0.05 mL 混合内标工作溶液(4.19)涡旋混合 50 s,再加入 5 mL 盐酸溶液(4.9)和 0.15 mL 2-硝基苯甲醛溶液(4.10),涡旋振荡 50 s 后,置于恒温水浴振荡器中 37℃ 避光振荡 16 h。

#### 6.1.3 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(4.11),调节 pH 至 7.0 ~ 7.5,加入 4 mL 乙酸乙酯,涡旋振荡 50 s,4 000 r/min 离心 5 min,取上层清液转移至 10 mL 玻璃离心管中;再加入 4 mL 乙酸乙酯重复上述操作,合并上清液于 40℃ 下氮气吹干。准确加入 1.0 mL 甲醇溶液(4.8)涡旋振荡溶解残留物,过 0.45 μm 滤膜,待测。

### 6.2 标准工作曲线制作

分别准确移取 10 ng/mL 混合标准工作溶液(4.18)0.010 mL、0.025 mL、0.050 mL、0.10 mL 和 100 ng/mL 混合标准工作溶液(4.18)0.025 mL、0.050 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。

### 6.3 测定

#### 6.3.1 色谱条件

色谱柱:C<sub>18</sub>柱,100 mm × 2.1 mm(i.d.),5 μm,或其他性能相当的色谱柱;  
柱温:室温;

进样量:20  $\mu\text{L}$ ;

流动相:A.0.002 mol/L 醋酸铵溶液,B. 甲醇;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 <sup>-1</sup> |
|--------|------|------|-------------------------|
| 0.0    | 60   | 40   | 0.25                    |
| 6.0    | 40   | 60   | 0.25                    |
| 9.0    | 40   | 60   | 0.25                    |

### 6.3.2 质谱条件

离子化模式:大气压电喷雾离子源(ESI),正离子模式;

喷雾电压:4 100 v;

雾化气压力:35 psi;

辅助气流量:3 L/min;

离子传输毛细管温度:350℃;

源内碰撞诱导解离电压:10 v;

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;

Q1 半峰宽:0.7 Da;

Q3 半峰宽:0.7 Da;

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<br>m/z | 子离子<br>m/z | 碰撞能量<br>v |
|--|------------|------------|-----------|
| AOZ  | 236        | 104        | 19        |
|  | 236        | 134 *      | 22        |
| AOZ-D <sub>4</sub>                                 | 240        | 134 *      | 14        |
| AHD  | 249        | 104        | 22        |
|  | 249        | 134 *      | 14        |
| AHD- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>                  | 252        | 134 *      | 14        |
| SEM  | 209        | 166 *      | 11        |
|  | 209        | 192        | 13        |
| SEM- <sup>13</sup> C- <sup>15</sup> N <sub>2</sub> | 212        | 168 *      | 11        |
| AMAZ   | 335        | 262        | 19        |
|  | 335        | 291 *      | 12        |
| AMAZ-D <sub>5</sub>                                | 340        | 296 *      | 12        |

注: \* 为定量碎片离子

### 6.3.3 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  $\pm 5\%$  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。基峰与次强碎片离子丰度比应符合表 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      |

#### 6.3.4 定量测定

按 6.3.1 和 6.3.2 设定仪器条件,待仪器稳定后,将混合标准工作液和样品制备液等体积进样测定,内标法定量,定量离子采用丰度最大的二级特征离子碎片(表 2)。

#### 6.4 空白试验

除不加试样外,均按上述测定条件和步骤进行。

### 7 结果计算

测定结果由仪器工作站按内标法自动计算。

样品中硝基咪唑类代谢物残留量按式(1)计算。计算结果需扣除空白值。

$$X = \frac{C_i \times V}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

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

$C_i$  ——样品制备液中硝基咪唑类代谢物的浓度,单位为纳克每毫升( $\text{ng}/\text{mL}$ );

V ——最终定容体积,单位为毫升( $\text{mL}$ );

m ——样品质量,单位为克( $\text{g}$ )。

### 8 方法灵敏度

四种硝基咪唑代谢物的检测限为  $0.25 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,定量限为  $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

### 9 方法回收率

本方法添加浓度为  $0.25 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$  时回收率为 75% ~ 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%。

附 录 A  
(资料性附录)

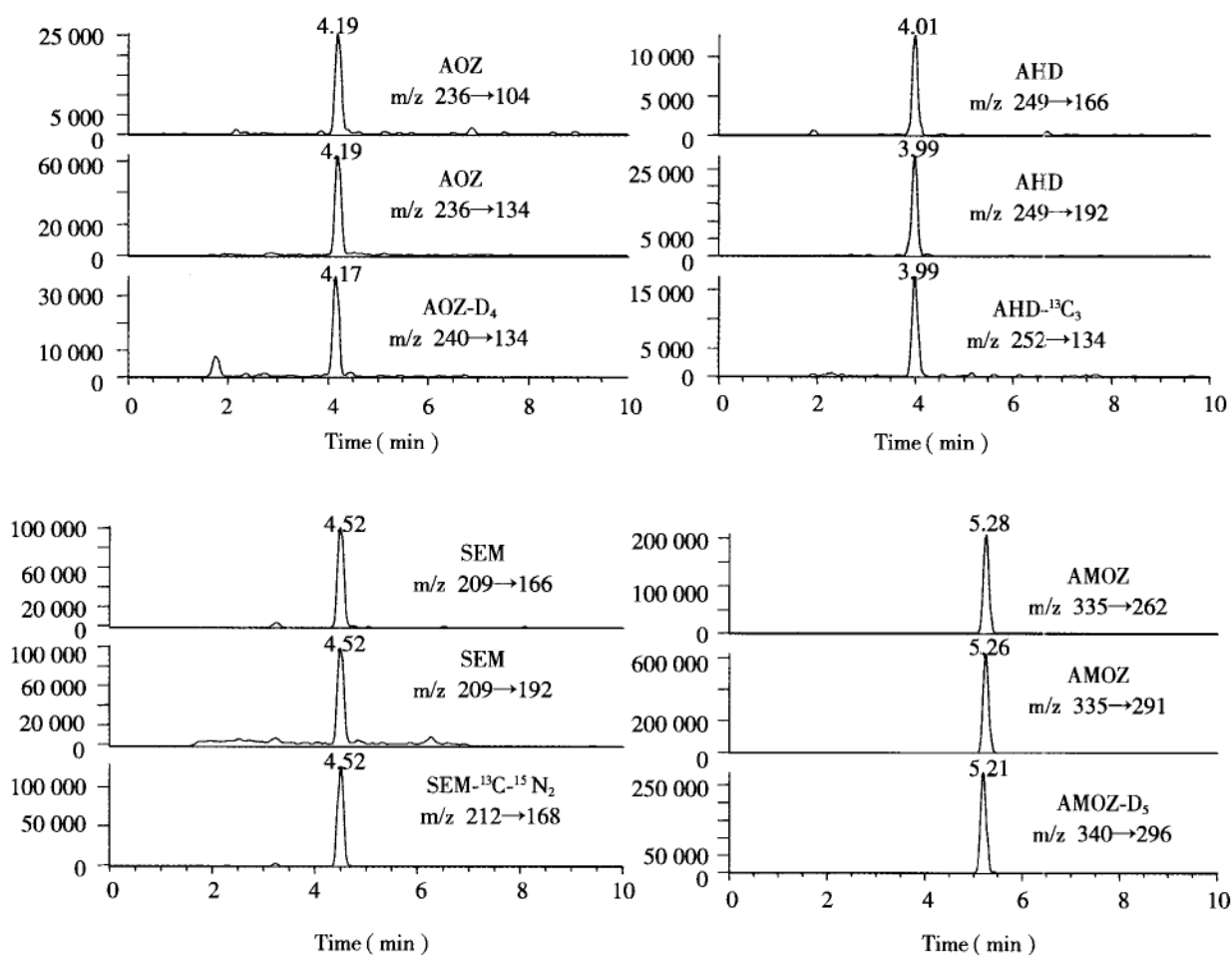
四种硝基呋喃代谢物中英文名称和缩写

| 原药名称 | 代谢物名称               | 代谢物英文名称                                     | 代谢物英文名称缩写 |
|------|---------------------|---|-----------|
| 呋喃唑酮 | 3-氨基-2-噁唑烷基酮        | 3-Amino-2-oxazolidinone                     | AOZ       |
| 呋喃它酮 | 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷基酮 | 5-Morpholino-methyl-3-amino-2-oxazolidinone | AMOZ      |
| 呋喃西林 | 氨基脲                 | Semicarbazid                                | SEM       |
| 呋喃妥因 | 1-氨基-2-内酰脲          | 1-Aminohydantoin                            | AHD       |

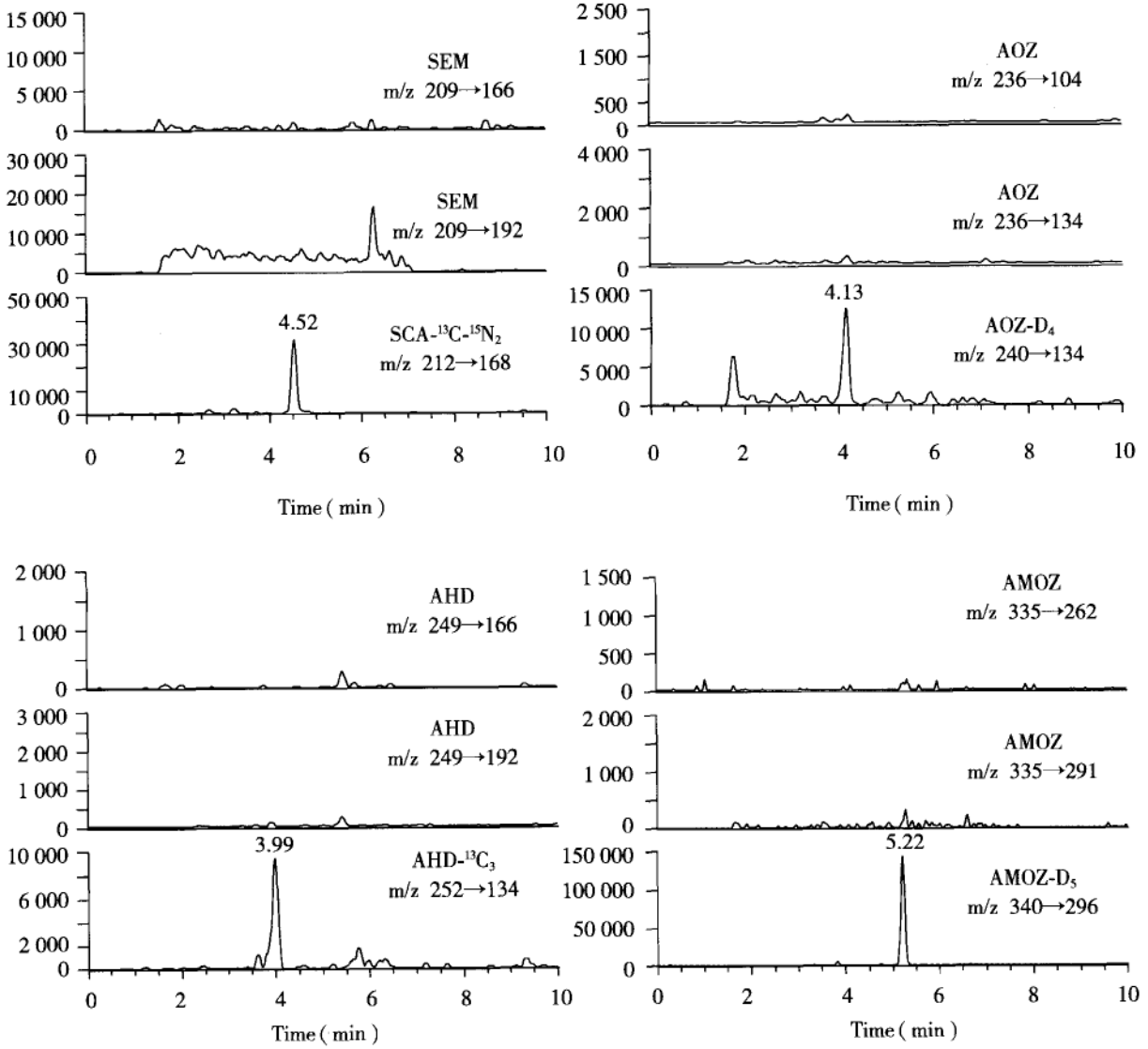


附录 B  
(资料性附录)

四种硝基咪唑代谢物混合标准 (1.0 ng/mL) 特征离子质量色谱图



附录 C  
(资料性附录)  
空白鳊鱼样品特征离子质量色谱图



附录 D

(资料性附录)

鳗鱼添加样品特征离子质量色谱图

