



中华人民共和国国家标准

GB 31656.13—2021

食品安全国家标准 水产品中硝基呋喃类代谢物多残留的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard—
Determination of nitrofuran metabolites residues in aquatic products
by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method

2021-09-16 发布

2022-02-01 实施



中华人民共和国农业农村部

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

国家市场监督管理总局

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件系首次发布。

食品安全国家标准

水产品中硝基咪唑类代谢物多残留的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了水产品中硝基咪唑类代谢物 3-氨基-2-噁唑烷酮(3-amino-2-oxazolidinone, AOZ)、5-吗啉甲基-3-氨基-2-噁唑烷酮(5-morpholinomethyl-3-amino-2-oxazolidinone, AMOZ)、1-氨基-2-内酰胺(1-aminohydantoin, AHD)和氨基脲(semicarbazide, SEM)残留量的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于鱼、海参及鳖等水产品可食组织中硝基咪唑类代谢物 AOZ、AMOZ、AHD 和 SEM 残留量的测定,以及虾和蟹等甲壳类可食组织中 AOZ、AMOZ 和 AHD 的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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

GB/T 30891—2014 水产品抽样规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中残留的硝基咪唑类蛋白结合态代谢物在酸性条件下水解,经 2-硝基苯甲醛衍生化,用乙酸乙酯液液萃取,高速离心净化,液相色谱-串联质谱测定,内标法定量。

5 试剂与材料

除另有规定外,所有试剂均为分析纯,水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

- 5.1.1 甲醇(CH_3OH):色谱纯。
- 5.1.2 乙酸铵($\text{CH}_3\text{COONH}_4$):色谱纯。
- 5.1.3 乙酸乙酯($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$):色谱纯。
- 5.1.4 二甲亚砜[(CH_3) $_2\text{SO}$]:色谱纯。
- 5.1.5 2-硝基苯甲醛($\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_3$):色谱纯。
- 5.1.6 无水磷酸氢二钾(K_2HPO_4)。
- 5.1.7 盐酸(HCl)。

5.2 溶液配制

- 5.2.1 0.5 mol/L 盐酸溶液:取盐酸 42 mL,用水稀释至 1 000 mL,混匀。
- 5.2.2 0.002 mol/L 乙酸铵溶液:取乙酸铵 0.15 g,用水溶解并稀释至 1 000 mL,混匀。
- 5.2.3 0.05 mol/L 2-硝基苯甲醛溶液:取 2-硝基苯甲醛 0.076 g,用二甲亚砜溶解并稀释至 10 mL,混匀,现用现配。
- 5.2.4 1.0 mol/L 磷酸氢二钾溶液:取无水磷酸氢二钾 87.1 g,用水溶解并稀释至 500 mL,混匀。
- 5.2.5 5%甲醇溶液:取甲醇 5 mL,用水稀释至 100 mL,混匀。

5.3 标准品

5.3.1 硝基呋喃类代谢物:AOZ、AMOZ、AHD·HCl 和 SEM·HCl,含量均 $\geq 99.0\%$,具体内容见附录 A。

5.3.2 内标:AOZ-D₄、AMOZ-D₅、AHD-¹³C₃ 和 SEM·HCl-¹³C,¹⁵N₂,含量均 $\geq 99.0\%$,具体内容见附录 A。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 标准储备液:取 AOZ、AMOZ、AHD·HCl、SEM·HCl 标准品各适量(相当于活性成分 10 mg),精密称定,加甲醇适量使溶解并定容至 10 mL 棕色容量瓶,配制成浓度为 1.0 mg/mL 标准储备液。-18℃避光保存,有效期 6 个月。

5.4.2 混合标准中间液:分别准确量取标准储备液适量,用甲醇逐级稀释,配制成浓度为 1.0 μg/mL 混合标准中间液。2℃~8℃避光保存,有效期 1 个月。

5.4.3 混合标准工作液:分别准确量取混合标准中间液各 1 mL 于 10 mL 和 100 mL 棕色容量瓶,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度为 100 μg/L 和 10 μg/L 混合标准工作液。现用现配。

5.4.4 同位素内标标准储备液:取 AOZ-D₄、AMOZ-D₅、AHD-¹³C₃ 和 SEM·HCl-¹³C,¹⁵N₂ 标准品各适量(相当于活性成分 10 mg),精密称定,加甲醇适量使溶解并稀释定容至 10 mL 棕色容量瓶,配制成浓度为 1.0 mg/mL 内标标准储备液。-18℃避光保存,有效期 6 个月。

5.4.5 混合内标标准工作液:分别准确量取同位素内标标准储备液适量,用甲醇逐级稀释,配制成浓度为 100 μg/L 混合内标标准工作液。-18℃避光保存,有效期 3 个月。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪:带电喷雾电离源。

6.2 分析天平:感量 0.01 g 和 0.000 01 g。

6.3 离心机:6 000 r/min。

6.4 高速离心机:14 000 r/min。

6.5 涡旋混合器。

6.6 恒温振荡器。

6.7 氮吹仪。

7 试料的制备与保存

7.1 试料的制备

按 GB/T 30891—2014 附录 B 的要求制样。

a) 取均质的供试料品,作为供试试料;

b) 取均质的空白样品,作为空白试料;

c) 取均质的空白样品,添加适宜浓度的标准溶液,作为空白添加试料。

7.2 试料的保存

-18℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 水解与衍生化

取试料 2 g(精确至 ± 0.01 g),于 50 mL 聚丙烯离心管中,准确加入混合内标标准工作液 50 μL,涡旋混合 1 min,加盐酸溶液 5 mL、2-硝基苯甲醛溶液 0.15 mL,涡旋混合 1 min,置于恒温振荡器中,37℃避光振荡 16 h。

8.2 提取净化

取出离心管冷却至室温,用磷酸氢二钾溶液调 pH 至 7.0~7.5,加乙酸乙酯 8 mL,涡旋振荡 30 s,6 000 r/min 离心 5 min,取上清液至 10 mL 玻璃离心管,40℃氮气吹干。加 5% 甲醇溶液 1.0 mL 溶解残

留物,再将溶液转移至 1.5 mL 离心管中,以 14 000 r/min 的转速离心 10 min,取清液过 0.22 μm 滤膜,供液相色谱-串联质谱分析。

8.3 标准曲线的制备

分别准确移取 10 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ 混合标准工作液各 0.05 mL、0.1 mL、0.2 mL 于 6 个 50 mL 离心管中,除不加试料外,按 7.1 和 7.2 步骤操作,使最终浓度分别为 0.5 $\mu\text{g/L}$ 、1.0 $\mu\text{g/L}$ 、2.0 $\mu\text{g/L}$ 、5.0 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$,按 7.4 测定。以测得特征离子质量色谱峰外标和内标峰面积比值为纵坐标,对应的标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线,求回归方程和相关系数。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱: C_{18} 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 3.5 μm),或相当者。
- 柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;
- 进样量:10 μL ;
- 流速:0.35 mL/min;
- 流动相:A 为 0.002 mol/L 乙酸铵溶液,B 为甲醇。梯度洗脱条件见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间 min	A %	B %
0.50	90	10
4.00	5	95
5.50	5	95
6.00	90	10
7.00	90	10

8.4.2 质谱参考条件

- 离子源:电喷雾离子源;
- 扫描方式:正离子扫描;
- 检测方式:多反应离子监测(MRM);
- 脱溶剂气、锥孔气、碰撞气均为高纯氮气或其他合适气体;
- 喷雾电压、碰撞能等参数应优化至最优灵敏度;
- 监测离子参数情况见表 2。

表 2 硝基咪唑类代谢物特征离子参考质谱条件

化合物	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	去簇电压 V	碰撞能 eV
AOZ	236>104	236>134	80	29
	236>134		80	15
AOZ-D ₄	240>134	240>134	80	16
AMAZ	335>262	335>291	80	15
	335>291		80	15
AMAZ-D ₅	340>296	340>296	80	15
AHD	249>104	249>134	80	29
	249>134		80	16
AHD- ¹³ C ₃	252>134	252>134	80	16
SEM	209>166	209>166	80	15
	209>192		80	15
SEM- ¹³ C, ¹⁵ N ₂	212>168	212>168	80	13

8.5 测定法

8.5.1 定性测定

在同样测试条件下,试料溶液中硝基呋喃类代谢物的保留时间与标准溶液中硝基呋喃类代谢物的保留时间之比,偏差在±2.5%以内,且检测到的相对离子丰度,应当与浓度相当的校正标准溶液相对丰度一致。其允许偏差应符合表3的要求。

表3 定性确证时相对离子丰度的最大允许误差

单位为百分号

相对离子丰度	允许偏差
>50	±20
20~50	±25
10~20	±30
≤10	±50

8.5.2 定量测定

取试料溶液和相应的标准溶液,作单点或多点校准,以色谱峰面积定量,按内标法计算,标准溶液及试料溶液中的硝基呋喃类代谢物响应值均应在仪器检测的线性范围内。在上述液相色谱-质谱条件下,硝基呋喃类代谢物标准溶液的液相色谱-质谱图见附录B。

8.6 空白试验

取空白试料,除不加标准溶液外,采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试料中硝基呋喃类代谢物的残留量按标准曲线法或公式(1)计算。

$$X = \frac{A_i \times A'_{is} \times C_s \times C_{is} \times V}{A_{is} \times A_s \times C'_{is} \times m} \quad (1)$$

式中:

- X —— 试料中硝基呋喃类代谢物的残留量的数值,单位为微克每千克(μg/kg);
- C_{is} —— 试料溶液中硝基呋喃类代谢物内标浓度的数值,单位为微克每升(μg/L);
- C_s —— 对照溶液中硝基呋喃类代谢物浓度的数值,单位为微克每升(μg/L);
- C'_{is} —— 对照溶液中硝基呋喃类代谢物内标浓度的数值,单位为微克每升(μg/L);
- A_i —— 试料溶液中硝基呋喃类代谢物的峰面积;
- A_{is} —— 试料溶液中硝基呋喃类代谢物内标的峰面积;
- A_s —— 对照溶液中硝基呋喃类代谢物的峰面积;
- A'_{is} —— 对照溶液中硝基呋喃类代谢物内标的峰面积;
- V —— 定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- m —— 试料质量的数值,单位为克(g)。

10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法 AOZ、SEM、AMOZ、AHD 的检测限均为 0.5 μg/kg,定量限均为 1.0 μg/kg。

10.2 准确度

本方法在 1.0 μg/kg~10 μg/kg 添加浓度水平上的回收率为 70%~120%。

10.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差≤15%,批间相对标准偏差≤15%。

附录 A

(资料性)

药物中英文名称、化学分子式和 CAS 号

药物中英文名称、化学分子式和 CAS 号见表 A.1。

表 A.1 4 种硝基咪唑类代谢物及内标中英文名称、化学分子式和 CAS 号

中文通用名称	英文名称	化学分子式	CAS 号
3-氨基-2-噁唑烷基酮 (AOZ)	3-Amino-2-oxazolidinone	$C_3H_6N_2O_2$	80-65-9
5-吗啉甲基-3-氨基- 2-噁唑烷基酮(AMOZ)	5-Morpholinomethyl-3-amino- 2-oxazolidinone	$C_8H_{15}N_3O_3$	43056-63-9
1-氨基-2-内酰胺盐酸盐 (AHD·HCl)	1-Aminohydantoin hydrochloride	$C_3H_5N_3O_2 \cdot HCl$	2827-56-7
氨基脒盐酸盐 (SEM·HCl)	Semicarbazide hydrochloride	$CH_5N_3O \cdot HCl$	563-41-7
3-氨基-2-噁唑烷基酮-D ₄ (AOZ-D ₄)	3-Amino-2-oxazolidinone- D ₄	$C_3H_2D_4N_2O_2$	1188331-23-8
5-吗啉甲基-3-氨基-2-噁唑 烷基酮-D ₅ (AMOZ-D ₅)	3-Amino-5-morphinomethyl- 2-oxazolidinone-D ₅	$C_8H_{10}D_5N_3O_3$	1017793-94-0
1-氨基-2-内酰胺- ¹³ C ₃ (AHD- ¹³ C ₃)	1-Aminohydantoin- ¹³ C ₃	$^{13}C_3H_5N_3O_2$	957509-31-8
氨基脒盐酸盐- ¹³ C, ¹⁵ N ₂ (SEM·HCl- ¹³ C, ¹⁵ N ₂)	Semicarbazide hydrochloride- ¹³ C, ¹⁵ N ₂	$^{13}CH_5N^{15}N_2O \cdot HCl$	1173020-16-0

附录 B
(资料性)
特征离子质量色谱图

硝基咪唑类代谢物标准溶液特征离子质量色谱图见图 B.1。

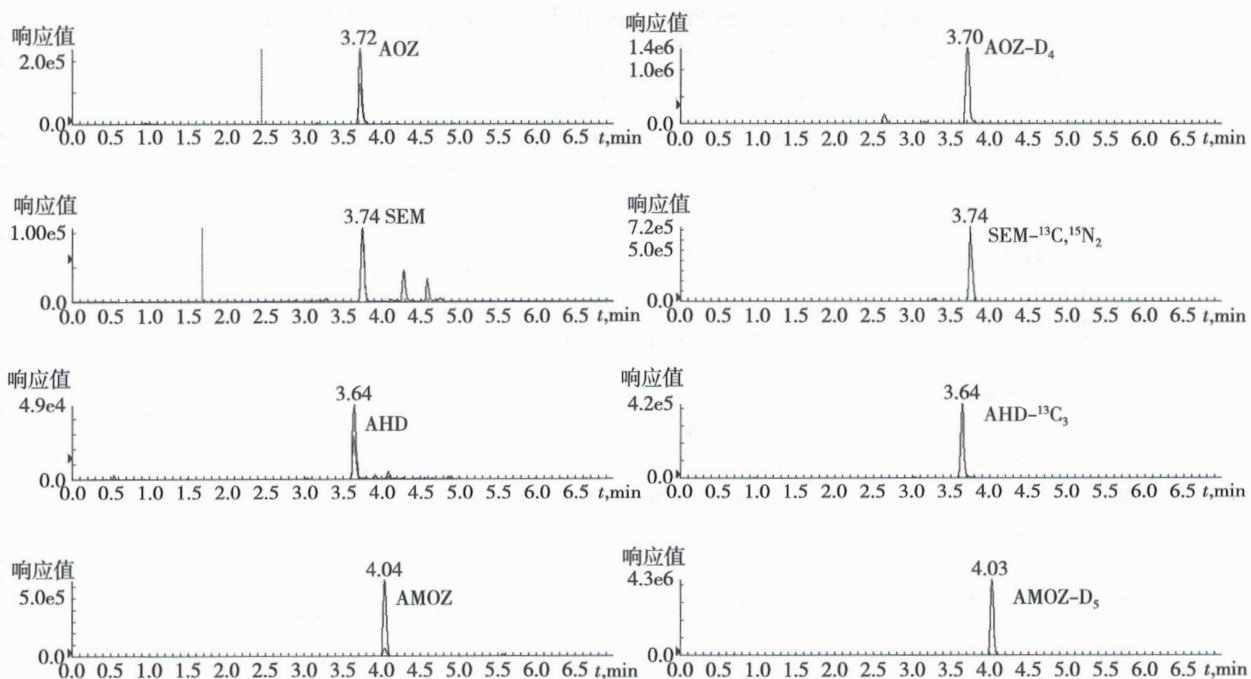


图 B.1 硝基咪唑类代谢物标准溶液特征离子质量色谱图(2.0 μg/L)

中华人民共和国
国家标准
食品安全国家标准
水产品中硝基呋喃类代谢物多残留的测定
液相色谱-串联质谱法

GB 31656.13—2021

* * *

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区麦子店街18号楼)
(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15 千字

2022年1月第1版 2022年1月北京第1次印刷

书号: 16109·8749

定价: 24.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



GB 31656.13—2021