

ICS 67.050
X 04



中华人民共和国国家标准

GB/T 20752—2006

猪肉、牛肉、鸡肉、猪肝和水产品中 硝基呋喃类代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Method for the determination residues of the metabolites of nitrofurans
in pork, beef, chicken, porcine liver and aquatic products—
LC-MS-MS method

2006-12-31 发布

2007-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局提出。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局归口。

本标准起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：庞国芳、张进杰、曹彦忠、郭彤彤、曹亚平、范春林、李学民、刘永明。

本标准系首次发布的国家标准。

猪肉、牛肉、鸡肉、猪肝和水产品中 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

本标准规定了猪肉、牛肉、鸡肉、猪肝和水产品(鱼类、虾蟹类和贝类)中呋喃它酮(furaltadone)的代谢物 5-吗啉甲基-3-氨基-2-噁唑烷基酮(3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone, 缩写为 AMOZ)、呋喃西林(nitrofurazone)的代谢物氨基脲(semicarbazide, 缩写为 SEM)、呋喃妥因(nitrofurantoin)的代谢物 1-氨基-2-内酰胺(1-aminohydantoin, 缩写为 AHD)和呋喃唑酮(furazolidone)的代谢物 3-氨基-2-噁唑烷基酮(3-amino-2-oxazolidinone, 缩写为 AOZ)残留量液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于猪肉、牛肉、鸡肉、猪肝和水产品(鱼类、虾蟹类和贝类)中 5-吗啉甲基-3-氨基-2-噁唑烷基酮、氨基脲、1-氨基-2-内酰胺、3-氨基-2-噁唑烷基酮残留量的测定。

本标准方法的检出限:5-吗啉甲基-3-氨基-2-噁唑烷基酮、氨基脲、1-氨基-2-内酰胺、3-氨基-2-噁唑烷基酮的检出限均为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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 6379.1 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第 1 部分:总则与定义(GB/T 6379.1—2004,ISO 5725-1:1994,IDT)

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第 2 部分:确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法(GB/T 6379.2—2004,ISO 5725-2:1994,IDT)

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—1992,neq ISO 3696:1987)

3 原理

试样中残留的硝基呋喃类代谢物在酸性条件下用 2-硝基苯甲醛衍生化,用 Oasis HLB 或性能相当的固相萃取柱净化。电喷雾离子化,液相色谱-串联质谱检测。用外标法或同位素标记的内标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外,所用试剂均为优级纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

- 4.1 甲醇:色谱纯。
- 4.2 乙腈:色谱纯。
- 4.3 乙酸乙酯:色谱纯。
- 4.4 磷酸氢二钾, K_2HPO_4 。
- 4.5 乙酸。
- 4.6 二甲亚砜。
- 4.7 盐酸。

4.8 氢氧化钠。

4.9 2-硝基苯甲醛(2-NBA), $C_7H_5NO_2$: 含量 $\geq 99\%$ 。

4.10 磷酸氢二钾溶液: 0.1 mol/L。称取 17.4 g 磷酸氢二钾(4.4), 用水溶解, 定容至 1 000 mL。

4.11 盐酸溶液: 0.2 mol/L。量取 17 mL 浓盐酸(4.7)用水定容至 1 000 mL。

4.12 氢氧化钠溶液: 1 mol/L。称取 40 g 氢氧化钠(4.8), 用水溶解, 定容至 1 000 mL。

4.13 衍生剂: 含 2-硝基苯甲醛 0.05 mol/L。称取 0.075 g 2-硝基苯甲醛(4.9)溶于 10 mL 二甲亚砜(4.6), 现用现配。

4.14 样品定容溶液: 10 mL 乙腈(4.2), 0.3 mL 乙酸(4.5), 用水稀释到 100 mL。

4.15 四种硝基呋喃代谢物标准物质: 呋喃它酮的代谢物 5-吗啉甲基-3-氨基-2-噁唑烷基酮(3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone, 缩写为 AMOZ)、呋喃西林的代谢物氨基脲(semicarbazide, 缩写为 SEM)、呋喃妥因的代谢物 1-氨基-2-内酰脲(1-aminohydantoin, 缩写为 AHD)和呋喃唑酮的代谢物 3-氨基-2-噁唑烷基酮(3-amino-2-oxazolidinone, 缩写为 AOZ)标准物质, 四种标准物质的纯度均 $\geq 99\%$ 。

4.16 四种硝基呋喃代谢物内标标准物质: 5-吗啉甲基-3-氨基-2-噁唑烷基酮的内标物, D_5 -AMOZ; 氨基脲的内标物, $^{13}C^{15}N$ -SEM; 1-氨基-2-内酰脲的内标物, $^{13}C_3$ -AHD; 3-氨基-2-噁唑烷基酮的内标物, D_4 -AOZ。四种内标标准物质的纯度均 $\geq 99\%$ 。

4.17 四种硝基呋喃代谢物标准储备溶液: 1.0 mg/mL。称取适量的四种硝基呋喃代谢物标准物质(4.15), 分别用甲醇(4.1)稀释成 1.0 mg/mL 的标准储备液。避光保存于 $-18^\circ C$ 冰柜中, 可使用六个月。

4.18 四种硝基呋喃代谢物混合标准溶液: 0.1 $\mu g/mL$ 。吸取适量四种硝基呋喃代谢物的标准储备溶液(4.17), 用甲醇稀释成 0.1 $\mu g/mL$ 的混合标准溶液, 避光保存于 $-18^\circ C$ 冰柜中, 可使用三个月。

4.19 四种硝基呋喃代谢物内标标准储备溶液: 1.0 mg/mL。称取适量的四种硝基呋喃代谢物内标标准物质(4.16), 分别用甲醇配成 1.0 mg/mL 的标准储备液。避光保存于 $-18^\circ C$ 冰柜中, 可使用六个月。

4.20 四种硝基呋喃代谢物内标标准溶液: 0.1 $\mu g/mL$ 。移取适量的四种硝基呋喃代谢物内标标准储备溶液(4.19), 用甲醇稀释成 0.1 $\mu g/mL$ 的混合内标标准溶液, 避光保存于 $-18^\circ C$ 冰柜中, 可使用三个月。

4.21 Oasis HLB 固相萃取柱或相当者: 60 mg, 3 mL。使用前分别用 5 mL 甲醇和 10 mL 水预处理, 保持柱体湿润。

4.22 0.2 μm 滤膜。

5 仪器

5.1 液相色谱-串联四极杆质谱仪, 配有电喷雾离子源。

5.2 分析天平: 感量 0.1 mg 和 0.01 g 各一台。

5.3 液体混匀器。

5.4 固相萃取装置。

5.5 氮气吹干仪。

5.6 恒温振荡水浴。

5.7 真空泵: 真空度应达到 80 kPa。

5.8 微量注射器: 25 μL , 100 μL 。

5.9 棕色具塞离心管: 25 mL, 50 mL。

5.10 pH 计: 测量精度 ± 0.02 pH 单位。

5.11 贮液器: 50 mL。

5.12 离心机: 转速 4 000 r/min 以上。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

实验室样品用组织捣碎机绞碎,分出 0.5 kg 作为试样。

6.2 试样保存

试样置于 -18°C 冰柜,避光保存。

7 测定步骤

7.1 混合基质标准校准溶液的制备

7.1.1 样品称取和脱脂

称取 5 个阴性样品 2 g(精确到 0.01 g),分别置于 50 mL 棕色离心管(5.9)中,加入 10 mL 甲醇-水混合溶液(2+1),均质 1 min,再用 5 mL 甲醇-水混合溶液洗涤均质器刀头,二者合并 4 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液弃掉。向 5 个离心管中分别加入适量四种硝基咪唑代谢物混合标准溶液(4.18),使四种硝基咪唑代谢物最终测定浓度分别为 0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、4.0 ng/mL、10.0 ng/mL。再向每个离心管中加入适量混合内标标准溶液(4.20),使四种硝基咪唑代谢物内标物最终测定浓度均为 2.0 ng/mL。

7.1.2 水解和衍生化

向上述每个离心管中加入 10 mL 0.2 mol/L 盐酸溶液(4.11)均质 1 min,用 10 mL 0.2 mol/L 盐酸溶液洗涤均质器刀头,二者合并后加入 0.3 mL 衍生剂(4.13),用液体混匀器混匀,置于 37°C 恒温振荡水浴(5.6)中避光反应 16 h。

7.1.3 净化

上述衍生溶液放置至室温后,加入 5 mL 0.1 mol/L 磷酸氢二钾溶液(4.10),用 1 mol/L 氢氧化钠溶液(4.12)调节溶液 pH 约为 7.4,4 000 r/min 离心 10 min,上清液(若待测样品含脂肪较多,上清液加 5 mL 正己烷,振荡 2 min,4 000 r/min 离心 10 min 吸取并弃掉正己烷)倒入下接 Oasis HLB 固相萃取柱(4.21)的贮液器(5.11)中,在固相萃取装置(5.4)上使样液以小于 2 mL/min 的流速通过 Oasis HLB 柱,待样液全部通过固相萃取柱后用 10 mL 水洗涤固相萃取柱,弃去全部流出液。用真空泵(5.7)在 65 kPa 负压下抽干 Oasis HLB 固相萃取柱 15 min。用 5 mL 乙酸乙酯(4.3)洗脱被测物于 25 mL 棕色离心管中,使用氮气吹干仪(5.5),在 40°C 水浴中吹干,用样品定容溶液(4.14)溶解并定容至 1.0 mL,混匀后过 0.2 μm 滤膜(4.22)用液相色谱-串联质谱测定。

7.2 待测样品溶液的制备

称取待测样品 2 g(精确到 0.01 g),置于 50 mL 棕色具塞离心管(5.9)中,加入 10 mL 甲醇-水混合溶液(2+1),均质 1 min,再用 5 mL 甲醇-水混合溶液洗涤均质器刀头,二者合并 4 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液弃掉。向离心管中加入适量混合内标标准溶液,使四种硝基咪唑代谢物内标物最终测定浓度均为 2.0 ng/mL。按 7.1.2 和 7.1.3 操作。

7.3 阴性样品基质空白溶液的制备

称取阴性样品 2 g(精确到 0.01 g),置于 50 mL 棕色具塞离心管(5.9)中,加入 10 mL 甲醇-水混合溶液(2+1),均质 1 min,再用 5 mL 甲醇-水混合溶液洗涤均质器刀头,二者合并 4 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液弃掉。按 7.1.2 和 7.1.3 操作。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱:Atlantis- C_{18} , 3.5 μm , 150 mm \times 2.1 mm(内径)或相当者;
- b) 柱温: 35°C ;

- c) 进样量:40 μL ;
d) 流动相及流速见表1。

表1 液相色谱梯度洗脱条件

时间/min	流速/ $(\mu\text{L}/\text{min})$	0.3%乙酸水溶液/(%)	0.3%乙酸乙腈溶液/(%)
0.00	200	80	20
3.00	200	50	50
8.00	200	50	50
8.01	200	80	20
16.00	200	80	20

7.4.2 质谱条件

- a) 离子源:电喷雾离子源(ESI);
b) 扫描方式:正离子扫描;
c) 检测方式:多反应监测(MRM);
d) 电喷雾电压(IS):5 000 V;
e) 辅助气(AUX)流速:7 L/min;
f) 辅助气温度(TEM):480°C;
g) 聚焦电压(FP):150 V;
h) 碰撞室出口电压(CXP):11 V;
i) 去簇电压(DP):45 V;
j) 四种硝基咪唑代谢物和内标衍生物的定性离子对、定量离子对,采集时间及碰撞气能量质谱参数见表2。

表2 四种硝基咪唑代谢物和内标衍生物的质谱参数

衍生后的硝基咪唑代谢物 及内标物名称	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	采集时间/ms	碰撞气能量/V
5-吗啉甲基-3-氨基-2-咪唑烷基酮的衍生物(2-NP-AMZO)	335/291	335/291	100	18
	335/128			16
氨基脲的衍生物(2-NP-SEM)	209/192	209/166	150	17
	209/166			15
1-氨基-2-内酰脲的衍生物(2-NP-AHD)	249/134	249/134	200	19
	249/178			22
3-氨基-2-咪唑烷基酮的衍生物(2-NP-AOZ)	236/134	236/134	100	19
	236/192			17
5-吗啉甲基-3-氨基-2-咪唑烷基酮内标物的衍生物(2-NP-D ₅ -AMZO)	340/296	340/296	100	18
氨基脲内标物的衍生物(2-NP- ¹³ C ¹⁵ N-SEM)	212/168	212/168	100	15
1-氨基-2-内酰脲内标物的衍生物(2-NP- ¹³ C ₃ -AHD)	252/134	252/134	100	32
3-氨基-2-咪唑烷基酮内标物的衍生物(2-NP-D ₅ -AOZ)	240/134	240/134	100	22

7.4.3 液相色谱-串联质谱测定

7.4.3.1 定性测定

每种被测组分选择 1 个母离子, 2 个以上子离子, 在相同实验条件下, 样品中待测物质和内标物的保留时间之比, 也就是相对保留时间, 与混合基质标准校准溶液中对应的相对保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内; 且样品谱图中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的混合基质标准校准溶液谱图中对应的定性离子的相对丰度进行比较, 若偏差不超过表 3 规定的范围, 则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

7.4.3.2 定量测定

内标法定量: 用仪器软件中的内标定量程序。

外标法定量: 在仪器最佳工作条件下, 四种硝基咪喃代谢物的混合基质标准校准溶液进样测定, 以混合基质标准校准溶液浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 绘制标准工作曲线, 用标准工作曲线对待测样品进行定量, 样品溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。四种硝基咪喃代谢物和内标物衍生物的标准物质多反应监测 (MRM) 色谱图参见图 A. 1。四种硝基咪喃代谢物的添加浓度及其平均回收率的试验数据参见表 B. 1。

7.5 平行试验

按以上步骤, 对同一试样进行平行试验测定。

7.6 回收率试验

吸取适量混合标准工作溶液和内标标准工作溶液, 分别按 7.1.2 和 7.1.3 衍生、浓缩, 得到相应浓度的混合标准衍生溶液和内标标准衍生溶液。用基质空白溶液 (7.3) 稀释成所需浓度的标准校准溶液。阴性样品中添加标准溶液, 按 7.2 操作, 测定后计算样品添加的回收率。

8 结果计算

结果按 (1) 式计算:

$$X = c \times \frac{V}{m} \times \frac{1\ 000}{1\ 000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X —— 试样中被测组分残留量, 单位为微克每千克 ($\mu\text{g}/\text{kg}$);

c —— 从标准工作曲线得到的被测组分溶液浓度, 单位为纳克每毫升 (ng/mL);

V —— 样品溶液最终定容体积, 单位为毫升 (mL);

m —— 样品溶液所代表最终试样的质量, 单位为克 (g)。

9 精密度

本部分的精密度数据是按照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 的规定确定的, 重复性和再现性的值以 95% 的可信度来计算。

9.1 重复性

在重复性条件下, 获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 r 。四种硝基咪喃代谢物的含量范围及重复性方程见表 4。

如果差值超过重复性限, 应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.2 再现性

在再现性条件下, 获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R 。四种硝基咪喃代谢物

的含量范围及再现性方程见表4。

表4 含量范围及重复性和再现性方程

硝基咪唑代谢物的衍生物名称	含量范围/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	重复性限 r	再现性限 R
5-吗啉甲基-3-氨基-2-噁唑烷基酮的衍生物	0.2~2.0	$r=0.0966m+0.0048$	$\lg R=1.1707 \lg m-0.6600$
氨基脲的衍生物	0.2~2.0	$\lg r=1.0512 \lg m-0.9801$	$\lg R=1.0002 \lg m-0.8848$
1-氨基-2-内酰胺的衍生物	0.5~5.0	$\lg r=1.0349 \lg m-0.9565$	$\lg R=1.0083 \lg m-0.8949$
3-氨基-2-噁唑烷基酮的衍生物	0.2~2.0	$\lg r=0.9919 \lg m-0.9195$	$\lg R=0.8278 \lg m-0.8431$
注： m 为两次测定结果的算术平均值。			

附录 A
(资料性附录)

四种硝基咪喃代谢物及内标衍生物的多反应监测(MRM)色谱图

四种硝基咪喃代谢物及内标物衍生物的多反应监测(MRM)色谱图,见图 A.1。

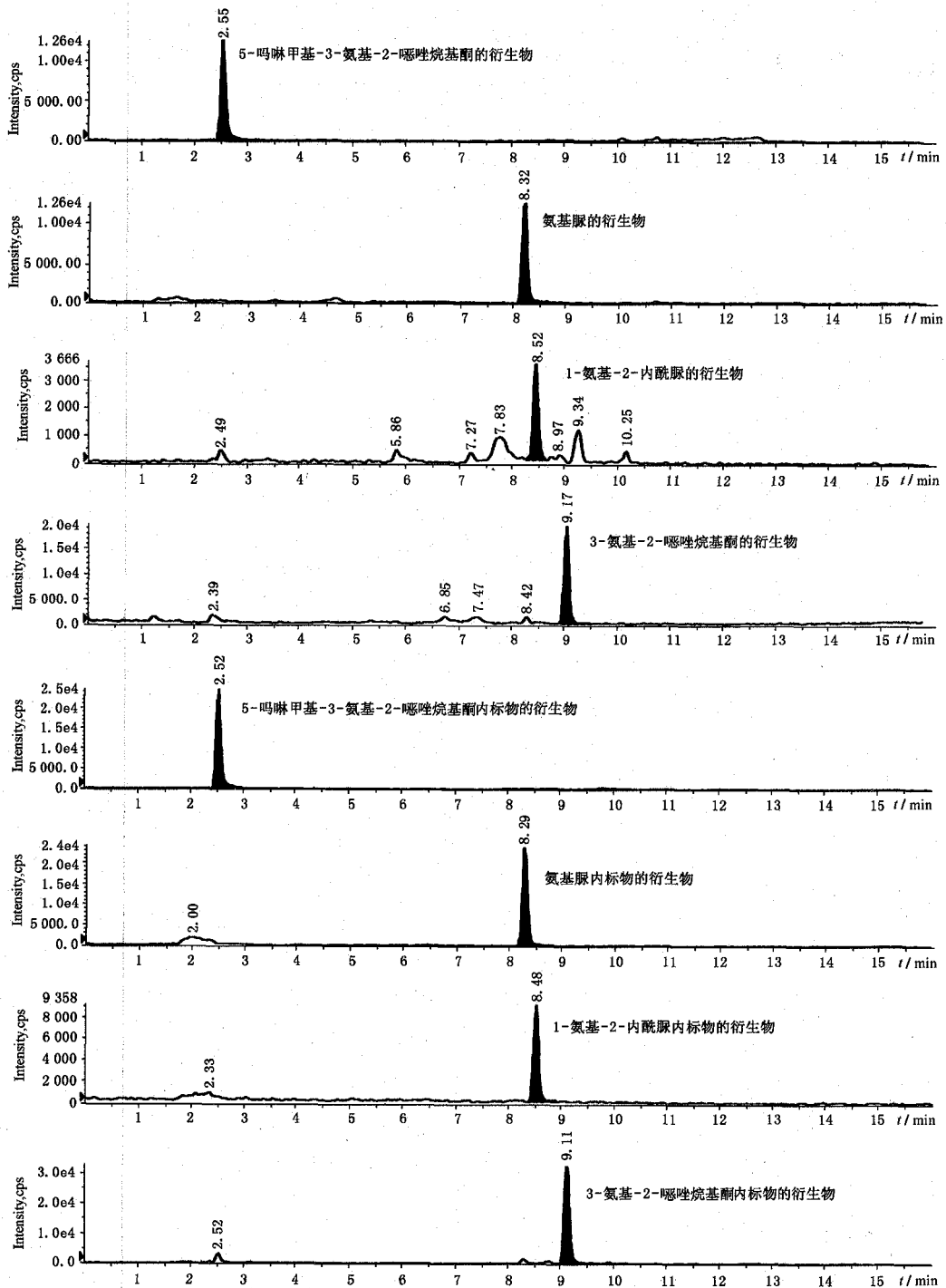


图 A.1 四种硝基咪喃代谢物及内标物衍生物的多反应监测(MRM)色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

四种硝基咪唑代谢物平均添加回收率($n=10$),见表 B.1。

表 B.1 四种硝基咪唑代谢物平均添加回收率($n=10$)

四种硝基咪唑代谢物 衍生物名称	添加浓度/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	不同样品中四种硝基咪唑代谢物的平均回收率/(%)						
		猪 肉	牛 肉	鸡 肉	猪 肝	河豚鱼	虾	扇 贝
2NP-AMOZ	0.2	88.2	90.1	91.2	85.4	89.5	82.3	84.5
	0.5	90.3	88.2	92.3	83.2	87.9	84.1	87.8
	1.0	85.6	85.5	88.6	82.4	90.1	85.2	88.2
	2.0	87.8	90.6	85.9	84.1	85.6	83.1	85.6
2NP-SEM	0.2	89.1	88.9	89.7	82.4	88.9	81.2	82.3
	0.5	87.6	87.5	88.6	86.6	87.8	86.6	84.5
	1.0	86.8	86.8	86.9	82.1	85.6	85.8	86.2
	2.0	85.4	85.4	85.8	83.5	87.2	82.6	82.1
2NP-AHD	0.5	84.2	83.2	88.9	82.3	88.2	82.1	82.1
	1.0	87.8	85.9	89.6	81.6	85.7	83.2	82.8
	2.0	88.1	87.1	87.5	84.6	84.6	84.2	83.6
	5.0	83.6	82.6	86.8	84.7	82.8	81.6	84.2
2NP-AOZ	0.2	91.2	90.2	92.1	88.2	90.2	88.2	88.2
	0.5	90.3	91.0	90.5	87.3	85.3	87.9	89.1
	1.0	88.6	88.9	89.6	85.6	91.2	86.2	85.4
	2.0	86.2	85.6	88.2	84.8	88.6	85.4	83.2