

中华人民共和国国家标准

GB XXXXX—XXXX

食品安全国家标准 水产品中呋喃苯烯酸残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard-

Determination of nifurstylenate residues in aquatic products
by liquid chromatography- tandem mass spectrometry method

XXXX-XX-XX发布

XXXX-XX-XX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
国家市场监督管理总局

发布

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准系首次发布。

征求意见稿

食品安全国家标准

水产品中呋喃苯烯酸残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了水产品中呋喃苯烯酸（Nifurstylenate）残留量的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于鱼、虾、蟹及鳖等水产品可食组织中呋喃苯烯酸残留量的测定。

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，仅所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

GB/T 30891 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

试样中残留的呋喃苯烯酸，用甲酸水溶液分散，以叔丁基羟基茴香醚作为保护剂，用乙腈提取，经亚铁氰化钾和乙酸锌沉淀蛋白，正己烷和C₁₈柱净化，液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

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 试剂和材料

5.1.1 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

5.1.2 正己烷（C₆H₁₄）：色谱纯。

5.1.3 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

5.1.4 醋酸铵（CH₃COONH₄）：色谱纯。

5.1.5 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

5.1.6 氯化钠（NaCl）：优级纯。

5.1.7 叔丁基羟基茴香醚（C₁₁H₁₆O₂）：纯度大于99%。

5.1.8 亚铁氰化钾（K₄Fe(CN)₆·3H₂O）。

5.1.9 乙酸锌 ($C_4H_6ZnO_4 \cdot 2H_2O$)。

5.1.10 氨水 (NH_4OH): 25%~28%。

5.2 溶液配制

5.2.1 50%乙腈水溶液: 取乙腈 500 mL, 用水稀释至 1000 mL。

5.2.2 1%甲酸水溶液: 取甲酸 1 mL, 用水稀释至 100 mL。

5.2.3 亚铁氰化钾溶液: 称取亚铁氰化钾 10.6 g, 用水溶解并稀释至 100 mL。

5.2.4 乙酸锌溶液: 称取乙酸锌 22.0 g, 加冰乙酸 3 mL, 用水溶解并稀释至 100 mL。

5.2.5 50%甲醇水溶液: 取甲醇 50 mL, 用水稀释至 100 mL。

5.2.6 0.1%甲酸溶液(含5 mmol/L醋酸铵)溶液: 称取醋酸铵0.385 g溶解于800 mL水中, 再加入甲酸1 mL, 用水稀释至1000 mL。

5.2.7 20 mg/mL叔丁基羟基茴香醚溶液: 称取叔丁基羟基茴香醚200 mg, 用乙腈溶解并稀释至10 mL。

5.3 标准品

呋喃苯烯酸钠(Sodium Nifurstylenate, $C_{13}H_8NNaO_5$, CAS: 54992-23-3), 含量 $\geq 99\%$, 或相当者。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 标准储备液 (1.0 mg/mL): 取呋喃苯烯酸钠标准品 10 mg, 精密称定, 用甲醇溶解并定容至 10 mL 棕色容量瓶中, 配制成浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备液, $-18^\circ C$ 避光保存, 有效期 6 个月。

5.4.2 标准中间液 (10 $\mu g/mL$): 准确移取标准储备液 1.0 mL, 用甲醇稀释并定容至 100 mL 棕色容量瓶中, 配制成浓度为 10 $\mu g/mL$ 的标准中间液, $-18^\circ C$ 避光保存, 有效期 6 个月。

5.4.3 标准工作液(0.1 $\mu g/mL$): 准确移取适量 10 $\mu g/mL$ 标准中间液, 用甲醇稀释配制成 0.1 $\mu g/mL$ 标准工作液, 现用现配。

5.5 材料

5.5.1 C_{18} 固相萃取柱: 1000 mg/6 mL。

5.5.2 50 mL 聚丙烯离心管。

5.5.3 50 mL 梨形瓶。

5.5.4 聚四氟乙烯微孔滤膜: 0.22 μm 。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪: 带电喷雾离子源。

6.2 分析天平: 感量 0.01 g 和 0.000 01 g。

- 6.3 离心机：转速不低于 4 000 r/min。
- 6.4 超声波清洗器。
- 6.5 旋涡混合器。
- 6.6 旋转蒸发仪。
- 6.7 固相萃取装置。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

按 GB/T 30891 附录 B 的要求制样。

- a) 取均质的供试样品，作为供试试样。
- b) 取均质的空白样品，作为空白试样。
- c) 取均质的空白样品，添加适宜浓度的标准溶液，作为空白添加试样。

7.2 试样的保存

-18℃ 以下避光保存。

8 测定步骤

8.1 提取

称取试样 4 g（精确至 0.01 g）于 50 mL 具塞离心管中，加入 1% 甲酸水溶液 5 mL，涡旋混合 30 s，加入乙腈 20.0 mL，20 mg/mL 叔丁基羟基茴香醚 200 μ L，涡旋混合 1 min，超声提取 30 min。加入亚铁氰化钾溶液 2.5 mL，乙酸锌溶液 2.5 mL，氯化钠 10 g，震荡提取 3 min，4000 r/min 离心 5 min，上清液待净化。

8.2 净化

准确移取 8.1 上清液 10.0 mL 于 50 mL 离心管中，再加入水 10 mL，正己烷 6 mL，震荡 1 min，4000 r/min 离心 5 min，弃去上层正己烷相，下层清液备用。C₁₈ 固相萃取柱依次用 10 mL 乙腈和 10 mL 水活化，取备用液全部过 C₁₈ 固相萃取柱，收集流出液于 50 mL 离心管中。在 C₁₈ 固相萃取柱中再加入 50% 乙腈水溶液 10 mL，收集并合并流出液。在上述离心管中加入乙腈 10 mL，氯化钠 10 g，震荡提取 3 min，4000 r/min 离心 5 min，取上清液于 50 mL 梨形瓶中，加入 200 μ L 氨水，45℃ 下减压浓缩至干，用 50% 甲醇水溶液定容至 2 mL，过 0.22 μ m 聚四氟乙烯微孔滤膜，置于棕色进样瓶中，供液相色谱-串联质谱仪测定。

8.3 标准曲线的制备

准确移取适量标准工作液，用 50% 甲醇水溶液稀释，使呋喃苯烯酸的浓度分别为 0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL 和 20 ng/mL，供液相色谱-串联质谱仪测定。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：C₁₈ 色谱柱（50 mm×2.1 mm，1.8 μ m），或相当者。
- b) 柱温：35℃；

- c) 进样量: 3 μL ;
d) 流速: 0.4 mL/min;
e) 流动相: A: 0.1%甲酸溶液(含5 mmol/L醋酸铵), B: 乙腈。梯度洗脱程序见表1。

表1 流动相梯度洗脱程序

时间, min	A, %	B, %
0.00	80	20
2.00	50	50
2.80	50	50
3.20	10	90
4.50	80	20
5.50	80	20

8.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源: 电喷雾 (ESI) 离子源;
b) 扫描方式: 负离子扫描;
c) 检测方式: 选择反应监测 (SRM);
d) 电离电压: 2500 V;
e) 离子源温度: 300 $^{\circ}\text{C}$;
f) 雾化温度: 350 $^{\circ}\text{C}$;
g) 锥孔气流速: 8 L/min;
h) 雾化气流速: 11 L/min;
i) 监测离子参数情况见表2。

表2 呋喃苯烯酸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	碰撞能, eV
呋喃苯烯酸	258.0>214.0	258.0>214.0	10
	258.0>184.0		15

8.5 测定法

8.5.1 定性测定

在同样测试条件下, 试样溶液中目标化合物色谱峰的保留时间与标准工作液中相应标准物质色谱峰的保留时间, 偏差在 $\pm 2.5\%$ 以内, 且检测到的离子的相对丰度, 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要求。

表3 定性确证时相对离子丰度的最大允许误差

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

取试样溶液和相应的标准溶液，作单点或多点校准，按外标法以峰面积定量，标准溶液及试样溶液中的呋喃苯烯酸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，呋喃苯烯酸标准溶液的液相色谱-质谱图见附录A。

8.6 空白试验

取空白试样，除不加药物外，采用完全相同的操作步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试样中呋喃苯烯酸残留量按式（1）计算：

$$X = \frac{A_i \times C_s \times V_1 \times V_3}{A_s \times V_2 \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X —试样中呋喃苯烯酸残留量的数值，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

C_s —标准溶液中呋喃苯烯酸浓度的数值，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

A_i —试样溶液中呋喃苯烯酸的峰面积；

A_s —标准溶液中呋喃苯烯酸的峰面积；

V_1 —待净化液总体积的数值，单位为毫升（ mL ）；

V_2 —吸取出用于净化的净化液体积的数值，单位为毫升（ mL ）；

V_3 —最终试样定容体积的数值，单位为毫升（ mL ）；

m —试样质量的数值，单位为克（ g ）。

计算结果扣除空白值，测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法的检测限为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法在 $1.0 \sim 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为70%~110%。

10.3 精密度

本方法批内相对标准偏差 $\leq 15\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 15\%$ 。

附录 A
(资料性附录)
特征离子质量色谱图

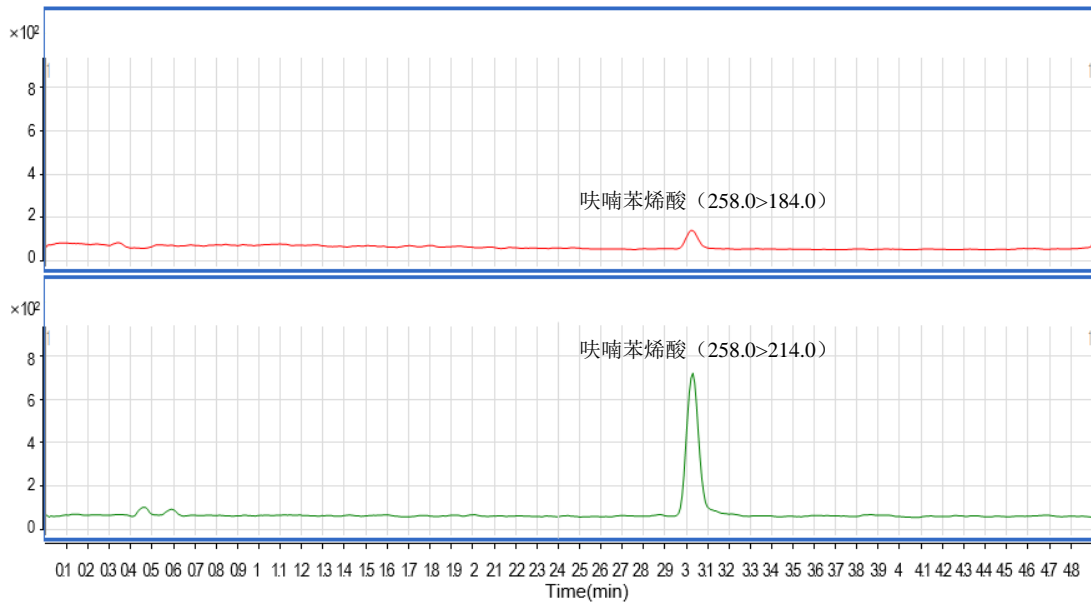


图 A.1 呋喃苯烯酸标准溶液特征离子质量色谱图 (2 ng/mL)