



中华人民共和国国家标准

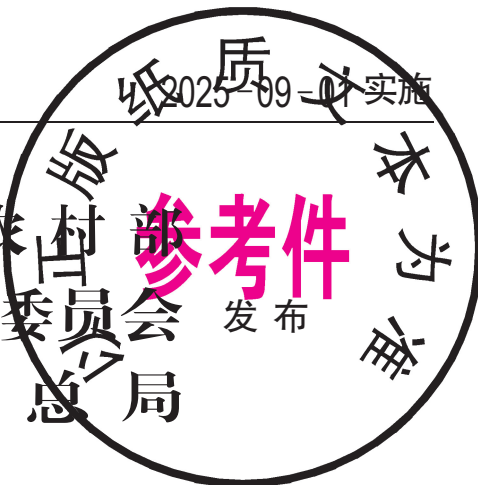
GB 31656.21 —2025

食品安全国家标准 水产品中硝呋索尔代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard—
Determination of nifursol metabo lite residues in aquatic products by
liquid chromatography–tandem mass spectrometric method

2025-06-03 发布

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



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。



食品安全国家标准

水产品中硝呋索尔代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了水产品中硝呋索尔代谢物 3,5-二硝基水杨酸肼(3,5-Dinitrosalicylic acid hydrazide, DNSAH)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、虾、蟹及鳖等水产品可食组织中 3,5-二硝基水杨酸肼(DNSAH)残留量的检测,其他水产品的检测可参照执行。

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

试样中残留的硝呋索尔代谢物 DNSAH 在酸性条件下水解,用 2-硝基苯甲醛衍生化,乙酸乙酯液-液萃取、浓缩及超滤净化,液相色谱-串联质谱仪测定,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 醋酸铵($\text{CH}_3\text{COONH}_4$):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($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$):色谱纯。

5.1.5 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

5.1.6 2-硝基苯甲醛($\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_3$):色谱纯。

5.1.7 磷酸氢二钾(K_2HPO_4)。

5.1.8 盐酸(HCl)。

5.1.9 氨水(NH_4OH):25%~28%。

5.2 溶液配制

5.2.1 0.5 mol/L 盐酸溶液:准确量取 42 mL 盐酸,用水稀释并定容至 1 000 mL。

5.2.2 2 mmol/L 醋酸铵溶液:称取 0.15 g 醋酸铵,用水溶解并稀释至 1 000 mL。

5.2.3 0.05 mol/L 2-硝基苯甲醛溶液:称取 0.076 g 2-硝基苯甲醛,用二甲亚砜溶解并稀释至 10 mL,现用现配。

5.2.4 1.0 mol/L 磷酸氢二钾溶液:称取 87.1 g 磷酸氢二钾,用水溶解并定容至 500 mL。

5.2.5 10%乙腈水溶液:准确移取 10 mL 乙腈,用水稀释并定容至 100 mL。

5.2.6 氨水乙腈溶液:准确移取 35 μ L 氨水,用 10%乙腈水溶液稀释并定容至 100 mL。

5.3 标准品

5.3.1 3,5-二硝基水杨酸肼(3,5-Dinitrosalicylic acid hydrazide, DNSAH, $C_7H_6O_6N_4$, CAS 号:955-07-7),纯度 $\geq 99\%$,或相当者。

5.3.2 3,5-二硝基水杨酸肼- $^{15}N_2$ (3,5-Dinitrosalicylic acid hydrazide- $^{15}N_2$, DNSAH- $^{15}N_2$, $C_7H_6O_6N_2^{15}N_2$, CAS 号:1346598-09-1):纯度 $\geq 95\%$,或相当者。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液(1.0 mg/mL):取 DNSAH 标准品约 10 mg,精密称定,先用 1 mL 二甲亚砜溶解,再用甲醇稀释并定容至 10 mL 棕色容量瓶中,配制成浓度为 1.0 mg/mL 标准储备液,−18 °C 避光保存,有效期为 6 个月。

5.4.2 标准中间液(1.0 μ g/mL):准确移取 1.0 mg/mL 标准储备液 0.1 mL 于 100 mL 棕色容量瓶中,用甲醇稀释并定容,配制成浓度为 1.0 μ g/mL 的标准中间液,−18 °C 避光保存,有效期 3 个月。

5.4.3 标准工作液 1(100 ng/mL):准确移取适量 1.0 μ g/mL 标准中间液,用甲醇稀释成 100 ng/mL 标准工作液 1,现用现配。

5.4.4 标准工作液 2(10 ng/mL):准确移取适量 100 ng/mL 标准工作液 1,用甲醇稀释成 10 ng/mL 标准工作液 2,现用现配。

5.4.5 内标储备液(0.1 mg/mL):取 DNSAH- $^{15}N_2$ 内标标准品,精密称定,先用 1 mL 二甲亚砜溶解,再用甲醇稀释并定容至 10 mL 棕色容量瓶中,配制成浓度为 0.1 mg/mL 内标储备液,−18 °C 避光保存,有效期为 6 个月。

5.4.6 内标工作液(0.1 μ g/mL):准确移取适量 DNSAH- $^{15}N_2$ 内标储备液,用甲醇逐级稀释成浓度为 0.1 μ g/mL 的内标工作液,−18 °C 避光保存,有效期 3 个月。

5.5 材料

5.5.1 超滤离心管:10 ku。

5.5.2 聚丙烯离心管:50 mL、20 mL、1.5 mL。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪:配电喷雾离子源。

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 6 000 r/min。

6.4 微量高速离心机:14 000 r/min。

6.5 氮吹仪。

6.6 涡旋混合器。

6.7 pH 计。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

按 GB/T 30891—2014 附录 B 的要求制样。

a) 取均质后的供试样品,作为供试试样;

b) 取均质后的空白样品,作为空白试样;

c) 取均质后的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试样。

7.2 试样的保存

−18℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 水解和衍生化

称取试料(2±0.05)g于50 mL离心管中,加入内标工作液0.1 mL,涡旋混合1 min,再加入盐酸溶液5 mL和2-硝基苯甲醛溶液0.15 mL,涡旋混合1 min后,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,加入磷酸氢二钾溶液,调节pH至7.0~7.5,加入乙酸乙酯8 mL,涡旋振荡10 min,6 000 r/min离心5 min,取上层清液转移至10 mL离心管中,于40℃下氮气吹干。准确加入氨水乙腈溶液0.5 mL,充分涡旋振荡溶解残留物,14 000 r/min离心10 min,将清液转移至超滤离心管中,14 000 r/min离心10 min,取滤液,供液相色谱-串联质谱仪分析。实验过程需要注意避免阳光直射,样品前处理完后应及时上机检测。

8.3 基质标准曲线的制备

取空白试料于7个50 mL离心管中,分别准确移取标准工作液2(10 ng/mL)0.025 mL、0.05 mL、0.1 mL、0.2 mL和标准工作液1(100 ng/mL)0.05 mL、0.1 mL和0.2 mL,按8.1和8.2步骤操作,使标准溶液最终浓度分别为0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、4.0 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL和40.0 ng/mL,内标溶液的浓度为20.0 ng/mL,并按8.4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(100 mm×2.1 mm,3.5 μm),或相当者;
- b) 柱温:35℃;
- c) 进样量:10 μL;
- d) 流速:0.35 mL/min;
- e) 流动相:A为2 mmol/L醋酸铵溶液,B为甲醇,梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

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

- a) 离子源:电喷雾(ESI)离子源,负离子模式;
- b) 喷雾电压(IS):−4 500 V;
- c) 离子源温度(TEM):550℃;
- d) 碰撞气(CAD):Medium;
- e) 气帘气(CUR):30 psi;
- f) 雾化器(Gas1):35 psi;
- g) 辅助加热气(Gas2):35 psi;
- h) 去簇电压(DP):−110 V;
- i) 射入电压(EP):−10 V;
- g) 碰撞室射出电压(CXP):−10 V;
- k) 扫描模式:多反应选择监测(MRM),选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量见表2。

表 2 定性离子对、定量离子和碰撞能量

化合物	定性离子对, m/z	定量离子对, m/z	碰撞能, eV
NP-DNSAH	374. 2>225. 8	374. 2>182. 8	-23
	374. 2>182. 8		-28
NP-DNSAH- ¹⁵ N ₂	376. 2>182. 8	376. 2>182. 8	-28

8.5 测定法

8.5.1 定性测定

在相同测试条件下,试料溶液中 DNSAH 与其内标 DNSAH-¹⁵N₂ 的保留时间之比与标准溶液中 DN-
SAH 与其内标 DNSAH-¹⁵N₂ 的保留时间之比偏差在 1% 以内;且检测到的相对离子丰度应与浓度相当的
校正标准溶液相对离子丰度一致,其允许偏差为±40%。

8.5.2 定量测定

取试料溶液和相应的标准工作液,作单点或多点校准,按内标法以峰面积定量,标准工作液及试料溶
液中目标化合物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。在上述色谱-质谱条件下,硝呋索尔代谢物
DNSAH 标准溶液特征离子质量色谱图见附录 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 DNSAH 的残留量按标准曲线或公式(1)计算。

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

式中:

- X —— 试样中 DNSAH 残留量的数值,单位为微克每千克(μg/kg);
- C_{is} —— 试料溶液中 DNSAH-¹⁵N₂ 浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- C_s —— 标准溶液中 DNSAH 浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- C'_{is} —— 标准溶液中 DNSAH-¹⁵N₂ 浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A_i —— 试料溶液中 DNSAH 的峰面积;
- A_{is} —— 试料溶液中 DNSAH-¹⁵N₂ 的峰面积;
- A_s —— 标准溶液中 DNSAH 的峰面积;
- A'_{is} —— 标准溶液中 DNSAH-¹⁵N₂ 的峰面积;
- V —— 定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- m —— 供试试样质量的数值,单位为克(g)。

10 方法灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法的检出限为 0.25 μg/kg,定量限为 0.5μg/kg。

10.2 正确度

本方法在 0.5 μg/kg~10 μg/kg 添加浓度的回收率为 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)

DNSAH 和 DNSAH-¹⁵N₂ 标准溶液特征离子质量色谱图

DNSAH 和 DNSAH-¹⁵N₂ 标准溶液特征离子质量色谱图见图 A. 1。

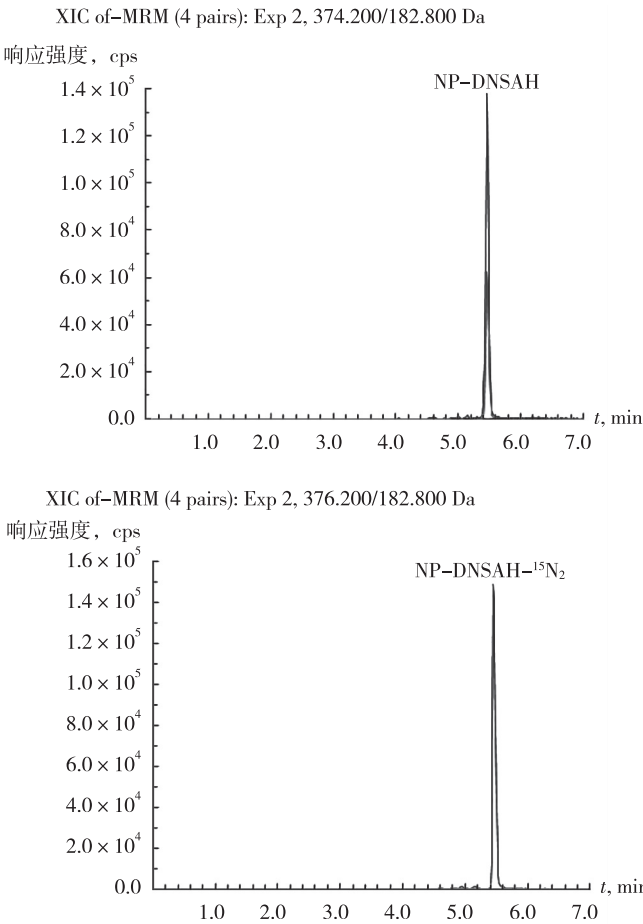


图 A. 1 DNSAH 和 DNSAH-¹⁵N₂ 标准溶液特征离子质量色谱图 (1 ng/mL)