|  |  |
| --- | --- |
| ICS  |   |
| CCS  | 点击此处添加CCS号 |

|  |
| --- |
|  43 |

湖南省地方标准

DB 43/T XXXX—2025

水产养殖环境（水体、底泥）中甲霜灵及其代谢物的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of metalaxyl and its metabolite in water and sediment from aquaculture environments by liquid chromatography—tandem mass spectrometry method

2025 - XX - XX发布

2025 - XX - XX实施

湖南省市场监督管理局  发布

目次

[前言 II](#_Toc197268487)

[1 范围 1](#_Toc197268488)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc197268489)

[3 术语和定义 1](#_Toc197268490)

[4 方法原理 1](#_Toc197268491)

[5 试剂与材料 1](#_Toc197268492)

[6 仪器与设备 2](#_Toc197268493)

[7 样品 2](#_Toc197268494)

[8 测定步骤 3](#_Toc197268495)

[9 结果计算和表述 5](#_Toc197268496)

[10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度 5](#_Toc197268497)

[附录A（资料性） 甲霜灵及其代谢物标准溶液特征离子质量色谱图 7](#_Toc197268498)

1. 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专利的责任。

本文件由湖南省农业农村厅提出。

本文件由湖南省农业标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：湖南省水产科学研究所、农业农村部渔业产品质量检验测试中心（长沙）、澧县农产品质量安全检测中心。

本文件主要起草人：万译文、杨霄、何咏、雷琴、李小玲、崔先锋、尹升福、索纹纹、陈湘艺、曾春芳、刘伶俐、黄华伟、谢玉昆、洪波。

水产养殖环境（水体、底泥）中甲霜灵及其代谢物的测定 液相色谱-串联质谱法

* 1. 范围

本文件描述了水产养殖环境（水体、底泥）中甲霜灵及其代谢物的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于水产养殖环境（水体、底泥）中甲霜灵及其代谢物的测定。

* 1. 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 17378.5 海洋监测规范 第5部分：沉积物分析

SC/T 9102.3 渔业生态环境监测规范 第3部分：淡水

* 1. 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

* 1. 方法原理

水样经二氯甲烷提取，N-丙基乙二胺净化；底泥样品冷冻干燥，经1%甲酸-乙酸乙酯提取，采用混合型强阴离子交换固相萃取小柱富集与净化，液相色谱-串联质谱仪测定，内标法定量。

* 1. 试剂与材料
		1. 试剂

水：GB/T 6682规定的一级水。

乙腈（CH3CN）：色谱纯。

二氯甲烷（CH2Cl2）：分析纯。

乙酸乙酯（CH3COOC2H5）：色谱纯。

甲酸（HCOOH）：色谱纯。

氨水（NH3 ▪ H2O）：分析纯，浓度为25%～28%。

* + 1. 溶液配制

1%甲酸-二氯甲烷溶液：移取10 mL甲酸，加入990 mL二氯甲烷中，混匀。

1%甲酸-乙酸乙酯溶液：移取10 mL甲酸，加入990 mL乙酸乙酯中，混匀。

1%氨水溶液：移取10 mL氨水，加入990 mL实验用水中，混匀。

5%甲酸-乙腈溶液：移取25 mL甲酸，加入475 mL乙腈中，混匀。

20%乙腈溶液：移取20 mL乙腈，加入80 mL实验用水，混匀。

0.1%甲酸溶液：移取1 mL甲酸，加入实验用水，定容至1000 mL，混匀。

* + 1. 标准品

甲霜灵（Metalaxyl, C15H21N4O, CAS号：57837-19-1）。

甲霜灵酸（Metalaxyl acid, C14H19N4O2, CAS号：87764-37-2）。

氘代甲霜灵（Metalaxyl-D6, C9H21C136N4O, CAS号：65854-76-4）。

* + 1. 溶液配制

混合标准储备液（100 μg/mL）：称取甲霜灵、甲霜灵酸标准品各10 mg，精密称定，用乙腈溶解并定容于100 mL棕色容量瓶，配制成浓度为100 μg/mL的标准储备液，于-18 ℃以下避光保存，有效期6个月。

内标储备液（100 μg/mL）：称取甲霜灵-D6标准品各10 mg，精密称定，用乙腈溶解并定容于100 mL棕色容量瓶，配制成浓度为100 μg/mL的内标储备液，于-18 ℃以下避光保存，有效期6个月。

混合标准中间液（10.0 μg/mL）：准确移取1 mL混合标准储备液，于10 mL棕色容量瓶中，用乙腈定容，混匀，于-18 ℃以下避光保存，有效期1个月。

内标中间液（10.0 μg/mL）：准确移取1 mL内标储备液，于10 mL棕色容量瓶中，用乙腈定容，混匀，于-18 ℃以下避光保存，有效期1个月。

混合标准使用液（0.10 μg/mL）：准确移取1 mL标准中间液于100 mL棕色容量瓶中，用乙腈定容，混匀，于4 ℃以下避光保存，现配现用。

内标使用液（0.10 μg/mL）：准确移取1 mL内标中间液于100 mL棕色容量瓶中，用乙腈定容，混匀，于4 ℃以下避光保存，现配现用。

* + 1. 材料
			1. 混合型强阴离子交换固相萃取小柱：150 mg/6 mL，或者相当者。
			2. 聚四氟乙烯滤膜：0.22 μm。

玻璃纤维滤膜：0.45 μm。

* + - 1. N-丙基乙二胺：40 μm～60 μm粒径范围，100 Å平均孔径。
	1. 仪器与设备
		1. 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源。
		2. 分析天平：感量0.01 g和0.00001 g。
		3. 冷冻干燥机。

涡旋混合器。

高速离心机：转速不低于8000 r/min。

超声波清洗器。

* + 1. 固相萃取装置，带真空泵。
		2. 氮吹仪。
	1. 样品
		1. 样品采集

水样和底泥样品按照SC/T 9102.3规定的方法进行采集。

* + 1. 试样制备

水样采样量应不少于1 L，经0.45 μm玻璃纤维滤膜过滤，置于棕色样品瓶中，0 ℃～4 ℃避光保存，一周内完成分析。底泥样品采样量应不少于500 g，于-20 ℃预冷冻24 h，经冷冻干燥机（-50 ℃，真空度< 20 Pa，冷冻干燥10 h）冻干，剔除石块和植物体等异物，用研钵研磨后过孔径100目网筛，置于棕色样品瓶中，0 ℃～4 ℃避光保存，一个月内完成分析。

* 1. 测定步骤
		1. 提取
			1. 水

准确移取100 mL水样，置于分液漏斗中，加入20 mL 1%甲酸-二氯甲烷，再加入100 μL内标使用液，震荡提取5 min，静置分层，收集下层清液于鸡心瓶中。加入20 mL 1%甲酸-二氯甲烷，重复提取一次。合并提取液，45 ℃旋蒸至近干，加入1 mL 20%乙腈溶液溶解，溶液转移至2 mL离心管，加入100 mg N-丙基乙二胺，涡旋混合1 min，于4 ℃ 10000 r/min离心10 min，取上清液过0.22 μm有机相微孔滤膜，供液相色谱串联质谱仪测定。

* + - 1. 底泥

准确称取制备的底泥样品2 g（精确至0.01 g），置于50 mL离心管中，加入100 μL内标使用液和5 mL水，涡旋混合1 min，静置30 min，然后加入15 mL 1%甲酸-乙酸乙酯溶液涡旋混合2 min，超声提取10 min，于4 ℃ 4 000 r/min离心5 min，取上清液。残渣加入10 mL 1%甲酸-乙酸乙酯溶液，重复提取一次。合并提取液，45 ºC氮气吹干，加入5 mL乙腈和250 μL氨水，涡旋混合2 min，备用。

用5 mL乙腈和5 mL 1%氨水溶液预活化固相萃取小柱。取备用液过柱，保持柱流速小于1.5 mL/min，再用5 mL 1%氨水溶液和5 mL乙腈淋洗，弃去流出液，用4 mL 5%甲酸-乙腈溶液洗脱，收集洗脱液，于45 ºC氮气吹至近干，加入1 mL 20%乙腈溶液溶解，过0.22 μm有机相微孔滤膜，供液相色谱-串联质谱仪测定。

* + 1. 底泥含水率测定

按照GB 17378.5规定的方法进行测定。

* + 1. 标准曲线制备

分别移取标准使用液和内标使用液，用乙腈配制成甲霜灵及其代谢物的浓度为0.50 μg/L、1.00 μg/L、5.00 μg/L、10.0 μg/L、20.0 μg/L、50.0 μg/L，氘代甲霜灵浓度为10.0 μg/L的系列标准工作液，供液相色谱-串联质谱仪测定。以待测物和内标物特征离子质量色谱峰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，计算回归方程和相关系数。

* + 1. 测定
			1. 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

1. 色谱柱：C18 (100 mm×2.1 mm，粒径2.6 µm)，或相当者；
2. 流动相：A为乙腈，B为0.1%甲酸-水溶液。梯度洗脱条件见表1；
3. 进样量：5 μL；
4. 流速：0.3 mL/min；
5. 柱温：40 ℃。
6. 流动相梯度洗脱条件

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 时间min | A% | B% |
| 0 | 5.0 | 95.0 |
| 1.2 | 95.0 | 5.0 |
| 2.0 | 95.0 | 5.0 |
| 2.1 | 5.0 | 95.0 |
| 4.0 | 5.0 | 95.0 |

* + - 1. 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

1. 离子源：电喷雾离子源；
2. 扫描方式：正离子扫描；
3. 检测方式：多反应监测（MRM）；
4. 喷雾电压：5.5 kV。
5. 脱溶剂气温度：550 ℃；
6. 多反应监测母离子、子离子、去簇电压和碰撞能量见表2。
7. 多反应监测母离子、子离子、去簇电压和碰撞能量

| 化合物名称 | 母离子m/z | 子离子m/z | 去簇电压V | 碰撞能量eV |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 甲霜灵 | 280.2 | 220.1a | 100 | 15 |
| 192.1 | 100 | 20 |
| 甲霜灵酸 | 266.1 | 220.1a | 100 | 16 |
| 192.1 | 100 | 20 |
|  氘代甲霜灵 | 286.2 | 198.2 | 100 | 22 |
| a 为定量离子。 |

* + - 1. 定性测定

在相同测试条件下，试样中待测物的保留时间与标准工作液中待测物的保留时间一致，偏差在±2.5%以内，且试样中待测物定性离子的相对丰度与浓度相当的标准溶液对应的定性离子的相对丰度一致。其允许偏差应符合表3的要求。

1. 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 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 允许的相对偏差，% | ± 20 | ± 25 | ± 30 | ± 50 |

* + - 1. 定量测定

按8.5.1和8.5.2设定仪器条件，取标准工作溶液、试样溶液、空白试样溶液等体积进样测定，内标法定量。标准工作溶液和试样溶液中目标物的响应值均应在仪器检测线性范围内。甲霜灵及其代谢物标准溶液特征离子质量色谱图参见附录A。

* + 1. 空白实验

按照8.1～8.4相同的测定步骤进行空白试样（见7.3）的测定。

* 1. 结果计算和表述
		1. 水样中甲霜灵及其代谢物含量

水样中甲霜灵及其代谢物含量按式（1）计算。计算结果应扣除空白值，保留2位有效数字。

 $X\_{1}=\frac{C\_{i}×V}{V\_{0}}$ ()

式中：

*X*1 ——试样中甲霜灵及其代谢物的含量，单位为微克每升（μg/L）；

*C*i ——从标准工作曲线得到的待测物溶液浓度，单位为微克每升（μg/L）；

*V* ——试样最终定容体积，单位为毫升（mL）；

*V0* ——试样体积，单位为毫升（mL）。

* + 1. 底泥中甲霜灵及其代谢物含量

底泥中甲霜灵及其代谢物含量按式（2）计算。计算结果应扣除空白值，保留2位有效数字。

 $X\_{2}=\frac{C\_{i}×V}{m×(1−w)}$ ()

式中：

*X*2 ——试样中甲霜灵及其代谢物的含量，单位为微克每千克（μg/kg）；

*C*i ——从标准工作曲线得到的待测物溶液浓度，单位为微克每升（μg/L）；

*V* ——试样最终定容体积，单位为毫升（mL）；

*m* ——试样质量，单位为克（g）；

*w* ——试样含水率，单位为质量分数（%）

* 1. 检测方法的灵敏度、准确度和精密度
		1. 灵敏度

本方法在水产养殖环境水中甲霜灵及其代谢物的检出限为0.05 μg/L，定量限为0.1 μg/L；在水产养殖环境底泥中甲霜灵及其代谢物的检出限为0.5 μg/kg，定量限为1.0 μg/kg。

* + 1. 准确度

本方法水样在0.1 μg/L～1.0 μg/L添加浓度水平上的回收率为70%～120%；底泥在1.0 μg/kg～10 μg/kg添加浓度水平上的回收率为70%～120%。

* + 1. 精密度

本方法的批内相对标准偏差≤10%，批间相对标准偏差≤15%。

1.
2. （资料性）
甲霜灵及其代谢物标准溶液特征离子质量色谱图

甲霜灵及其代谢物标准溶液特征离子质量色谱图见图A.1。



* 1. 甲霜灵及其代谢物标准溶液特征离子质量色谱图（5 μg/L ）

