



中华人民共和国国家标准

GB/T 21311—2007

动物源性食品中硝基呋喃类药物代谢物 残留量检测方法 高效液相色谱/串联质谱法

Determination of residues of nitrofuran metabolites in foodstuffs of
animal origin—HPLC-MS/MS method

2007-10-29 发布

2008-04-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 均为资料性附录。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出并归口。

本标准起草单位：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：彭涛、李晓娟、国伟、孙利、林黎明、于静、邱月明、储晓刚、唐英章。

动物源性食品中硝基咪唑类药物代谢物 残留量检测方法 高效液相色谱/串联质谱法

1 范围

本标准规定了动物源性食品中硝基咪唑类药物代谢物 3-氨基-2-恶唑酮(3-amino-2-oxalidinone, AOZ)、5-吗啉甲基-3-氨基-2-恶唑烷基酮(5-morpholinomethyl-3-amino-2-oxalidinone, AMOZ)、1-氨基-乙内酰脲(1-amino-hydantoin, AHD)和氨基脲(semicarbazide, SEM)残留量的高效液相色谱/串联质谱测定方法。

本标准适用于肌肉、内脏、鱼、虾、蛋、奶、蜂蜜和肠衣中硝基咪唑类药物代谢物 3-氨基-2-恶唑酮、5-吗啉甲基-3-氨基-2-恶唑烷基酮、1-氨基-乙内酰脲和氨基脲残留量的定性确证和定量测定。

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 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

样品经盐酸水解,邻硝基苯甲醛过夜衍生,调 pH 值 7.4 后,用乙酸乙酯提取,正己烷净化。分析物采用高效液相色谱/串联质谱定性检测,采用稳定同位素内标法进行定量测定。

4 试剂和材料

除非另有说明,所有试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇:高效液相色谱级。

4.2 乙腈:高效液相色谱级。

4.3 乙酸乙酯:高效液相色谱级。

4.4 正己烷:高效液相色谱级。

4.5 浓盐酸。

4.6 氢氧化钠。

4.7 甲酸:高效液相色谱级。

4.8 邻硝基苯甲醛。

4.9 三水磷酸钾。

4.10 乙酸铵。

4.11 0.2 mol/L 盐酸溶液:准确量取 17 mL 浓盐酸(4.5),用水定容至 1 L。

4.12 2.0 mol/L 氢氧化钠溶液:准确称取 80 g 氢氧化钠(4.6),用水溶解并定容至 1 L。

4.13 0.1 mol/L 邻硝基苯甲醛溶液:准确称取 1.5 g 邻硝基苯甲醛(4.8),用甲醇溶解并定容至 100 mL。

4.14 0.3 mol/L 磷酸钾溶液:准确称取 79.893 g 三水磷酸钾(4.9),用水溶解并定容至 1 L。

- 4.15 乙腈饱和的正己烷:量取正己烷 80 mL 于 100 mL 分液漏斗中,加入适量乙腈后,剧烈振摇,待分配平衡后,弃去乙腈层即得。
- 4.16 0.1%甲酸水溶液(含 0.000 5 mol/L 乙酸铵):准确量取 1 mL 甲酸(4.7)和称取 0.038 6 g 乙酸铵(4.10)于 1 L 容量瓶中,用水定容至 1 L。
- 4.17 标准物质:3-氨基-2-恶唑酮、5-吗啉甲基-3-氨基-2-恶唑烷基酮、1-氨基-乙内酰胺、氨基脲,纯度 $\geq 99\%$ 。
- 4.18 内标物质:3-氨基-2-恶唑酮的内标物, D_4 -AOZ;5-吗啉甲基-3-氨基-2-恶唑烷基酮的内标物, D_5 -AMAZ;1-氨基-乙内酰胺的内标物, ^{13}C -AHD;氨基脲的内标物, $^{13}C^{15}N$ -SEM,纯度 $\geq 99\%$ 。
- 4.19 标准储备液:分别准确称取适量标准品(精确至 0.000 1 g),用乙腈溶解,配制成浓度为 100 mg/L 的标准储备溶液, $-18^{\circ}C$ 冷冻避光保存,有效期 3 个月。
- 4.20 混合中间标准溶液:准确移取标准储备液(4.19)各 1 mL 于 100 mL 容量瓶中,用乙腈定容至刻度,配制成浓度为 1 mg/L 的混合中间标准溶液, $4^{\circ}C$ 冷藏避光保存,有效期 1 个月。
- 4.21 混合标准工作溶液:准确移取 0.1 mL 混合中间标准溶液(4.20)于 10 mL 容量瓶中,用乙腈定容至刻度,配制成浓度为 0.01 mg/L 的混合标准工作溶液, $4^{\circ}C$ 冷藏避光保存,有效期 1 周。
- 4.22 内标储备液:准确称取适量内标物质(精确至 0.000 1 g),用乙腈溶解,配制成浓度为 100 mg/L 的标准储备溶液, $-18^{\circ}C$ 冷冻避光保存,有效期 3 个月。
- 4.23 中间内标标准溶液:准确移取 1 mL 内标储备液(4.22)于 100 mL 容量瓶中,用乙腈定容至刻度,配制成浓度为 1 mg/L 的中间内标标准溶液, $4^{\circ}C$ 冷藏避光保存,有效期 1 个月。
- 4.24 混合内标标准溶液:准确移取中间内标标准溶液(4.23)各 0.1 mL 于 10 mL 容量瓶中,用乙腈定容至刻度,配制成浓度为 0.01 mg/L 的混合内标标准溶液, $4^{\circ}C$ 冷藏避光保存,有效期 1 周。
- 4.25 微孔滤膜:0.20 μm ,有机相。
- 4.26 氮气:纯度 $\geq 99.999\%$ 。
- 4.27 氩气:纯度 $\geq 99.999\%$ 。

5 仪器和设备

- 5.1 液相色谱/串联质谱仪:配备电喷雾离子源(ESI)。
- 5.2 组织捣碎机。
- 5.3 分析天平:感量 0.000 1 g,0.01 g。
- 5.4 均质器:10 000 r/min。
- 5.5 振荡器。
- 5.6 恒温箱。
- 5.7 pH 计:测量精度 ± 0.02 pH 单位。
- 5.8 离心机:10 000 r/min。
- 5.9 氮吹仪。
- 5.10 旋涡混合器。
- 5.11 容量瓶:1 L,100 mL,10 mL。
- 5.12 具塞塑料离心管:50 mL。
- 5.13 刻度试管:10 mL。
- 5.14 移液枪:5 mL,1 mL,100 μL 。

6 试样制备与保存

6.1 肌肉、内脏、鱼和虾

从原始样品取出有代表性样品约 500 g,用组织捣碎机充分捣碎混匀,均分成两份,分别装入洁净容

器作为试样,密封,并标明标记。将试样置于 -18°C 冷冻避光保存。

6.2 肠衣

从原始样品取出有代表性样品约 100 g,用剪刀剪成边长 $<5\text{ mm}$ 的方块,混匀后均分成两份,分别装入洁净容器作为试样,密封,并标明标记。将试样置于 -18°C 冷冻避光保存。

6.3 蛋

从原始样品取出有代表性样品约 500 g,去壳后用组织捣碎机搅拌充分混匀,均分成两份,分别装入洁净容器作为试样,密封,并标明标记。将试样置于 4°C 冷藏避光保存。

6.4 奶和蜂蜜

从原始样品取出有代表性样品约 500 g,用组织捣碎机充分混匀,均分成两份,分别装入洁净容器作为试样,密封,并标明标记。将试样置于 4°C 冷藏避光保存。

注:在制样的操作过程中,应防止样品污染或残留物含量发生变化。

7 样品处理

7.1 水解和衍生化

7.1.1 肌肉、内脏、鱼、虾和肠衣

称取约 2 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 塑料离心管中,加入 10 mL 甲醇-水混合溶液(1+1,体积比),振荡 10 min 后,以 4 000 r/min 离心 5 min,弃去液体。残留物中加入 10 mL 0.2 mol/L 盐酸,用均质器以 10 000 r/min 均质 1 min 后,再依次加入混合内标标准溶液(4.24)100 μL ,邻硝基苯甲醛溶液(4.13)100 μL ,涡动混合 30 s 后,再振荡 30 min,置 37°C 恒温箱中过夜(16 h)反应。

7.1.2 蛋、奶和蜂蜜

称取约 2 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 塑料离心管中,加入 10 mL~20 mL 0.2 mol/L 盐酸(以样品完全浸润为准),用均质器以 10 000 r/min 均质 1 min 后,再依次加入混合内标标准溶液(4.24)100 μL ,邻硝基苯甲醛溶液(4.13)100 μL ,涡动混合 30 s 后,再振荡 30 min,置 37°C 恒温箱中过夜(16 h)反应。

7.2 提取和净化

取出样品,冷却至室温,加入 1 mL~2 mL 0.3 mol/L 磷酸钾(1 mL 盐酸溶液加 0.1 mL 磷酸钾溶液),用 2.0 mol/L 氢氧化钠调 pH7.4(± 0.2)后,再加入 10 mL~20 mL 乙酸乙酯(乙酸乙酯加入体积与盐酸溶液体积一致),振荡提取 10 min 后,以 10 000 r/min 离心 10 min,收集乙酸乙酯层。残留物用 10 mL~20 mL 乙酸乙酯再提取一次,合并乙酸乙酯层。收集液在 40°C 下用 N_2 吹干,残渣用 1 mL 0.1%甲酸水溶液(4.16)溶解,再用 3 mL 乙腈饱和的正己烷(4.15)分两次液液分配,去除脂肪。下层水相过 0.20 μm 微孔滤膜后,取 10 μL 供仪器测定。

7.3 混合基质标准溶液的制备

7.3.1 肌肉、内脏、鱼、虾和肠衣

称取 5 份约 2 g 的阴性试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 塑料离心管中,加入 10 mL 甲醇-水混合溶液(1+1,体积比),振荡 10 min 后,以 4 000 r/min 离心 5 min,弃去液体。残留物中加入 10 mL 0.2 mol/L 盐酸,用均质器以 10 000 r/min 均质 1 min 后,按照最终定容浓度:1、5、10、50、100 ng/mL,分别加入混合中间标准溶液(4.20)或混合标准工作溶液(4.21),再加入混合内标标准溶液(4.24)100 μL ,余下操作同 7.1.1 和 7.2。

7.3.2 蛋、奶和蜂蜜

称取 5 份约 2 g 的阴性试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 塑料离心管中,加入 10 mL~20 mL 0.2 mol/L 盐酸(以样品完全浸润为准),用均质器以 10 000 r/min 均质 1 min 后,按照最终定容浓度:1、5、10、50、100 ng/mL,分别加入混合中间标准溶液(4.20)或混合标准工作溶液(4.21),再加入混合内标标准溶液(4.24)100 μL ,余下操作同 7.1.2 和 7.2。

8 测定

8.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱: XTerra MS C₁₈, 150 mm×2.1 mm (内径), 3.5 μm, 或相当者;
- b) 柱温: 30℃;
- c) 流速: 0.2 mL/min;
- d) 进样量: 10 μL;
- e) 流动相及洗脱条件见表 1。

表 1 流动相及梯度洗脱条件

时间/min	流动相 A (乙腈)	流动相 B (4.16)
0	10%	90%
7.00	90%	10%
10.00	90%	10%
10.01	10%	90%
20.00	10%	90%

8.2 串联质谱条件

参见附录 A。

8.3 液相色谱/串联质谱测定

8.3.1 定性测定

按照上述条件测定样品和混合基质标准溶液, 如果样品的质量色谱峰保留时间与混合基质标准溶液一致; 定性离子对的相对丰度与浓度相当的混合基质标准溶液的相对丰度一致, 相对丰度偏差不得超过表 2 的规定, 则可判断样品中存在相应的被测物。混合基质标准溶液的液相色谱/串联质谱色谱图参见图 B. 1。

表 2 定性测定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%

8.3.2 定量测定

按照内标法进行定量计算。

8.4 平行试验

按照以上步骤对同一试样进行平行试验测定。

8.5 空白试验

除不称取试样外, 均按照以上步骤进行。

9 结果计算

按式(1)进行计算:

$$X = \frac{R \times c \times V}{R_s \times m} \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X —— 试样中分析物的含量, 单位为微克每千克(μg/kg);

R —— 样液中的分析物与内标物峰面积比值;

c —— 混合基质标准溶液中分析物的浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——样液最终定容体积,单位为毫升(mL);
 R_s ——混合基质标准溶液中的分析物与内标物峰面积比值;
 m ——试样的质量,单位为克(g)。

注:计算结果需将空白值扣除。

10 测定低限(LOQ)

本方法的测定低限(LOQ):AOZ、AMAZ、SEM、AHD,均为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

11 回收率和精密度

参见表 C.1。

附 录 A
(资料性附录)
串联质谱条件¹⁾

毛细管电压:3.5 kV;
离子源温度:120℃;
去溶剂温度:350℃;
锥孔气流:氮气,流速 100 L/h;
去溶剂气流:氮气,流速 600 L/h;
碰撞气:氩气,碰撞气压 2.60×10^{-4} Pa;
扫描方式:正离子扫描;
检测方式:多反应监测(MRM),监测条件见表 A.1。

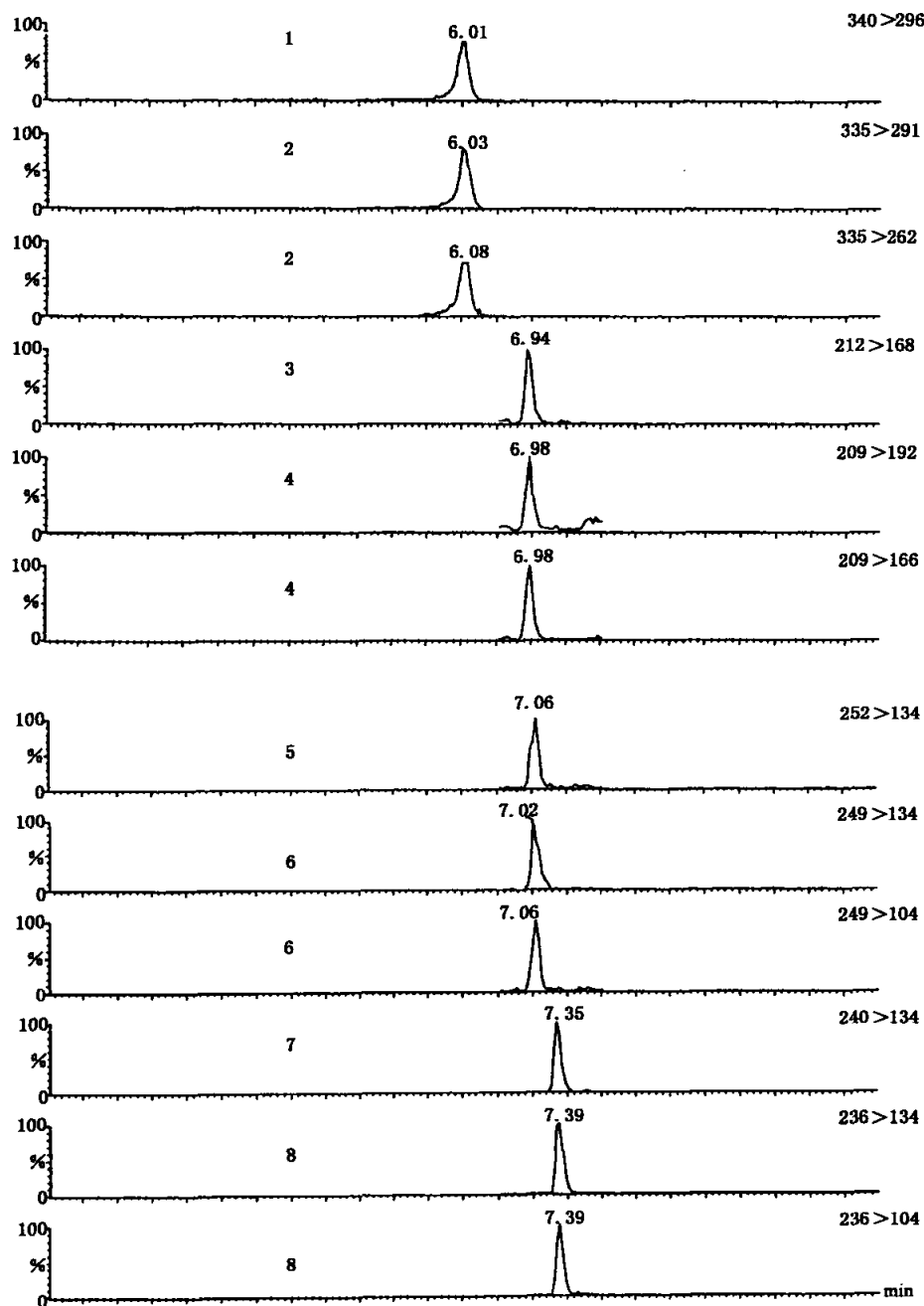
表 A.1 多反应监测(MRM)的条件

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时间/s	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
AMTZ	335	262	0.1	60	13
		291 ^a	0.1	60	9
D ₅ -AMTZ	340	296	0.1	60	9
SEM	209	166 ^a	0.1	50	8
		192	0.1	50	8
¹³ C ¹⁵ N-SEM	212	168	0.1	50	8
AHD	249	104	0.1	80	15
		134 ^a	0.1	80	10
¹³ C-AHD	252	134	0.1	80	10
AOZ	236	104	0.1	77	14
		134 ^a	0.1	77	10
D ₄ -AOZ	240	134	0.1	77	10

^a 用于定量。

1) 所列参数是在 Waters Quattro Ultima™ PT 质谱仪上完成的,此处列出试验用仪器型号仅是为了提供参考,并不涉及商业目的,鼓励标准使用者尝试采用不同厂家或型号的仪器。

附录 B
(资料性附录)
标准样品质量色谱图



- | | |
|---|-------------------------|
| 1—D ₅ -AMOZ; | 5— ¹³ C-AHD; |
| 2—AMOZ; | 6—AHD; |
| 3— ¹³ C ¹⁵ N-SEM; | 7—D ₄ -AOZ; |
| 4—SEM; | 8—AOZ。 |

注：在选定条件下，AMOZ、SEM、AHD、AOZ 的保留时间分别为 6.03、6.96、7.06 和 7.39 min。

图 B.1 硝基咪唑代谢物 HPLC-MS/MS 质量色谱图

附 录 C
(资料性附录)
添加回收率

表 C.1 8 种动物源性食品中硝基咪唑代谢物的添加回收率($n=10$)

食品名称	化合物	添加浓度/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均测定值/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率范围/ %	相对标准偏差/ %
鸡肉	AOZ	0.5	0.51	97.0~107.9	3.9
		1.0	0.98	95.8~100.0	2.1
		10	9.92	96.8~102.8	3.3
	AMOX	0.5	0.50	94.3~102.6	3.4
		1.0	1.00	96.9~102.4	2.3
		10	10.27	100.4~105.3	2.2
	AHD	0.5	0.48	88.7~99.9	4.4
		1.0	0.98	92.1~103.9	4.9
		10	10.09	97.2~105.3	3.3
	SEM	0.5	0.51	94.1~107.4	5.3
		1.0	1.01	98.6~104.0	6.7
		10	10.10	98.7~105.7	6.9
猪肝	AOZ	0.5	0.49	96.8~101.2	5.9
		1.0	1.01	98.4~103.1	6.8
		10	9.96	95.4~103.9	3.1
	AMOX	0.5	0.51	99.8~105.2	7.9
		1.0	0.99	96.0~101.7	5.2
		10	10.02	96.8~105.1	6.8
	AHD	0.5	0.47	89.3~98.7	9.0
		1.0	0.98	94.5~101.9	6.1
		10	10.11	96.0~105.3	8.4
	SEM	0.5	0.49	96.6~100.7	3.7
		1.0	1.03	102.6~103.7	7.4
		10	9.96	97.1~104.7	7.2
肠衣	AOZ	0.5	0.52	95.9~107.7	4.5
		1.0	0.98	94.7~101.7	3.4
		10	9.98	95.3~105.4	4.3
	AMOX	0.5	0.50	94.8~105.0	4.3
		1.0	0.98	96.0~102.6	2.7
		10	9.79	96.2~100.6	2.0

表 C.1 (续)

食品名称	化合物	添加浓度/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均测定值/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率范围/ %	相对标准偏差/ %	
肠衣	AHD	0.5	0.49	89.5~101.9	4.7	
		1.0	0.97	92.3~104.6	5.1	
		10	10.10	97.5~105.1	3.4	
	SEM	0.5	0.52	96.2~108.7	5.4	
		1.0	0.99	97.2~100.7	6.7	
		10	10.06	97.9~106.2	5.4	
虾	AOZ	0.5	0.50	95.2~105.4	4.3	
		1.0	0.99	94.5~102.4	3.2	
		10	10.11	96.7~105.7	4.0	
	AMZO	0.5	0.49	94.2~101.6	3.3	
		1.0	1.00	96.8~102.1	2.1	
		10	10.14	98.3~105.8	3.4	
	AHD	0.5	0.48	88.9~101.9	5.6	
		1.0	0.97	93.0~104.5	4.6	
		10	10.19	97.2~104.4	2.6	
	SEM	0.5	0.52	100.4~107.7	8.9	
		1.0	1.00	97.7~103.8	5.3	
		10	10.17	97.8~105.4	5.2	
	鱼	AOZ	0.5	0.52	98.8~107.4	3.6
			1.0	1.00	97.0~103.9	3.2
			10	10.26	95.3~106.8	4.6
AMZO		0.5	0.50	94.4~103.8	3.4	
		1.0	1.00	96.6~103.1	2.4	
		10	10.22	100.0~103.4	1.3	
AHD		0.5	0.48	88.5~101.6	5.0	
		1.0	0.97	92.6~103.5	4.4	
		10	10.09	97.3~103.8	4.7	
SEM		0.5	0.51	97.2~106.7	4.0	
		1.0	1.00	97.5~103.9	7.8	
		10	9.99	97.6~103.5	5.2	
鸡蛋		AOZ	0.5	0.50	95.5~107.9	8.9
			1.0	0.99	95.9~102.3	5.9
			10	10.36	99.9~106.4	4.4

表 C.1 (续)

食品名称	化合物	添加浓度/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均测定值/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率范围/ %	相对标准偏差/ %
鸡蛋	AMAZ	0.5	0.50	96.4~105.6	3.7
		1.0	0.99	96.4~101.7	5.3
		10	9.98	96.6~104.4	2.8
	AHD	0.5	0.47	91.9~97.3	12.1
		1.0	0.97	92.6~104.5	10.5
		10	9.80	95.1~102.1	8.4
	SEM	0.5	0.50	94.6~109.4	10.1
		1.0	0.99	98.0~102.5	10.9
		10	10.20	98.2~105.3	8.7
蜂蜜	AOZ	0.5	0.52	103.0~106.5	3.5
		1.0	1.00	96.6~103.6	2.8
		10	10.34	100.1~106.2	2.9
	AMAZ	0.5	0.50	94.5~103.6	4.4
		1.0	1.00	97.5~103.3	2.4
		10	9.93	96.5~102.3	2.2
	AHD	0.5	0.46	89.7~95.0	5.1
		1.0	0.98	94.4~102.0	3.2
		10	10.05	94.1~105.2	4.0
	SEM	0.5	0.52	97.2~108.9	5.3
		1.0	1.01	99.4~104.8	5.1
		10	10.19	98.3~106.0	3.0
奶粉	AOZ	0.5	0.50	94.1~105.6	12.6
		1.0	1.00	97.2~102.7	7.1
		10	10.17	99.2~106.7	9.9
	AMAZ	0.5	0.51	100.6~105.6	12.2
		1.0	0.98	96.8~101.0	11.5
		10	10.07	97.2~105.7	12.1
	AHD	0.5	0.46	88.3~96.7	11.5
		1.0	0.98	93.9~100.7	12.7
		10	10.18	95.7~105.7	9.5
	SEM	0.5	0.52	96.2~108.6	12.3
		1.0	1.02	99.7~104.5	12.2
		10	10.49	103.3~106.4	11.3