

LC-MS/MS 法测定猪肉、牛肉、鸡肉、猪肝和水产品中硝基呋喃类代谢物的残留量作业指导书 (SOP)

标准号：GB/T 20752-2006

■ 参考标准

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》

■ 方法概述

2.1 方法编制说明

硝基呋喃类药物在养殖业中较为广泛使用，该类物质及其代谢物具有强的致癌、致畸、致突变等毒副作用。欧盟、日本、中国等国都将其列为禁用药物，目前硝基呋喃类药物及其代谢物残留是国际动物源性食品贸易的必检项目。

2.2 方法使用范围

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）中呋喃西林的代谢物氨基脲（简称 SEM）、呋喃妥因的代谢物 1-氨基-2-内酰脲（简称 AHD）、呋喃唑酮的代谢物 3-氨基-2-噁唑烷基酮（简称 AOZ）和呋喃它酮的代谢物 5-吗啉甲基-3-氨基-2-噁唑烷基酮（简称 AMOZ）残留量的液相色谱 - 串联质谱测定方法。

2.3 方法技术指标

本方法的检出限：0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

本方法标准溶液线性范围：0.5~20.0 ng/mL（内标物浓度均为 2.0 ng/mL）

■ 方法原理

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。用同位素标记的内标法定量。

■ 仪器设备及辅助设备

4.1 仪器设备

岛津 LCMS-8050 三重四极杆液相色谱质谱联用仪，ESI 离子源

4.2 辅助设备

分析天平：Shimadzu AP135W

离心机：BECKMAN COMLTER Allegra™ 64R，转速 4000 r/min 以上

涡旋仪：Talboys

固相萃取装置

样品组织捣碎机

氮吹仪：EYELA NE-1001
真空泵：真空度应达到 80 kPa
恒温振荡水浴箱
pH 计：测量精度± 0.02 pH 单位
移液枪：5 mL，1 mL，200 μL，100 μL

■ 标准品、试剂、耗材

四个硝基咪喃代谢衍生物及其内标物标准品：其中氨基脲的内标物为 $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -SEM、1-氨基-2-内酰脲的内标物为 $^{13}\text{C}_3$ -AHD、3-氨基-2-噁唑烷基酮的内标物为 D_4 -AOZ，5-吗啉甲基-3-氨基-2-噁唑烷基酮的内标物为 D_5 -AMAZ，购自 Dr.E，固体粉末，纯度要求 >99.0%。

以下除另有说明外，所用试剂均为优级纯，水为 GB/T 682 规定的一级水

甲醇：色谱纯

乙腈：色谱纯

乙酸乙酯：色谱纯

磷酸氢二钾： K_2HPO_4 ，分析纯或以上

乙酸：LCMS 质谱级，用于流动相添加剂

乙酸铵：LCMS 质谱级，用于流动相添加剂

二甲亚砜：分析纯或以上

盐酸：分析纯或以上

氢氧化钠：分析纯或以上

2-硝基苯甲醛 (2-NBA, $\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_3$)：含量 ≥ 99%

磷酸氢二钾溶液 (0.1 mol/L)：称取 17.4 g 磷酸氢二钾用水溶解，定容至 1000 mL

盐酸溶液 (0.2 mol/L)：量取 17 mL 浓盐酸用水定容至 1000 mL

氢氧化钠溶液 (1 mol/L)：称取 40 g 氢氧化钠，用水溶解，定容至 1000 mL

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

样品定容溶液：10 mL 乙腈、0.3 mL 乙酸，用水稀释到 100 mL

棕色具塞离心管：125 mL、50 mL

微量注射器：规格分别为 25 μL, 100 μL

微孔过滤膜：疏水性聚四氟乙烯针头过滤器 (0.22 μm)

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

■ 操作步骤

6.1 标准工作曲线制作

6.1.1 标准溶液配制

硝基咪喃代谢衍生物 (1.0 mg/mL)：称取适量的 4 个标准物质固体粉末，分别用甲醇 (AMAZ、AOZ) 和甲醇丙酮溶液 (体积比 1:1，针对 SEM 和 AHD，溶解时可超声以助溶解) 稀释成 1.0 mg/mL 的标准储备液，避光保存于 -18°C 冰柜中，可使用六个月。

硝基咪喃代谢衍生物混合标准溶液 (10 μg/mL)：吸取适量 4 种硝基咪喃代谢衍生物的标准储备溶液，用甲醇稀释成 10 μg/mL 的混合标准溶液，避光保存于 -18°C 冰柜中，可使用三个月。

6.1.2 内标溶液配制

内标储备溶液 (1.0 mg/mL)：称取适量的 4 个内标物固体粉末，分别用甲醇 (D_5 -AMAZ 和 D_4 -AOZ) 和

甲醇丙酮溶液（体积比 1:1，针对 $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -SEM 和 $^{13}\text{C}_3$ -AHD，溶解时可超声以助溶解）稀释成 1.0 mg/mL 的内标储备液，避光保存于 -18°C 冰柜中，可使用六个月。

内标混合标准溶液（0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：分别吸取适量的 4 种硝基咪喃代谢衍生物内标物的标准储备溶液，用甲醇稀释成 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准溶液，避光保存于 -18°C 冰柜中，可使用三个月。

6.1.3 空白基质溶液的制备

取空白基质样品，同样品的制备方法处理制成空白基质溶液。

6.1.4 基质匹配混合校准溶液配制

使用甲醇将硝基咪喃代谢衍生物混合标准溶液（10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）分别稀释成 0.025、0.05、0.1、0.25、0.5 和 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的低浓度溶液，用于配制基质匹配校准溶液。分别对应移取该组溶液各 10 μL 、取内标混合标准溶液（0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）10 μL ，最后加入 480 μL 空白基质溶液定容（定容 0.5 mL），即得基质匹配混合校准溶液，测试中应现用现配，具体配制方法见下表 1。

表 1 基质匹配混合校准溶液的配制方法

No.	选择加入的标准溶液浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	标准溶液加入量 (μL)	内标混合标准溶液 (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 加入量 (μL)	空白基质溶液取用量 (μL)	最终空白基质定容体积 (mL)	最终浓度 (ng/mL)
1	0.025	10	10	480	0.5	0.5
2	0.05	10	10	480	0.5	1.0
3	0.1	10	10	480	0.5	2.0
4	0.2	10	10	480	0.5	5.0
5	0.5	10	10	480	0.5	10.0
6	1.0	10	10	480	0.5	20.0

6.2 仪器条件

6.2.1 液相条件

色谱柱：Shim-pack GISS C18 (2.1 mm I.D. \times 100 mm L., 1.9 μm ，岛津（上海）实验器材有限公司，PN：227-30048-02)，或可选择性能相当的其他型号色谱柱。

流动相 A：水溶液（含 0.002% 乙酸，若测试样品有基质干扰峰，可再加入 0.25 mM 乙酸铵）。

流动相 B：乙腈

进样量：10 μL

柱温：40 $^\circ\text{C}$

流速：0.3 mL/min

洗脱方式：梯度（见表 2）

表 2 液相色谱梯度洗脱条件

Time(min)	Module	Command	Value
0.5	Pumps	Pump B Conc.	15
2	Pumps	Pump B Conc.	35
5	Pumps	Pump B Conc.	70
5.1	Pumps	Pump B Conc.	90
6.5	Pumps	Pump B Conc.	90
6.6	Pumps	Pump B Conc.	15
10	Controller	Stop	

6.2.2. 质谱条件

离子源：ESI⁺
 雾化气流速：3.0 L/min
 加热气流速：15.0 L/min
 干燥气流速：5.0 L/min
 DL 温度：250 °C
 加热模块温度：450 °C
 接口温度：400 °C
 喷针位置：4.0 或 4.5 mm
 采集方式：MRM（见下表 3）

表 3 MRM 参数（表格中电压数值仅供参考，以实际优化为准）

英文简称	前体离子	产物离子	Q ₁ PreBias(V)	CE(V)	Q ₃ PreBias(V)
AHD	249.1	134.00*	-26	-11	-12
		104.1	-27	-21	-21
SEM	209.1	166.20*	-21	-11	-16
		192.2	-20	-12	-20
AMOU	335.15	291.20*	-22	-12	-22
		261.95	-25	-17	-27
AOZ	236.15	134.15*	-12	-13	-14
		104.25	-26	-22	-18
¹³ C ₃ -AHD	252.1	134.1	-28	-10	-23
¹³ C ¹⁵ N-SEM	212.1	168.1	-11	-11	-16
D ₅ -AMOU	340.1	296.2	-17	-12	-20
D ₄ -AOZ	240.1	134.1	-12	-12	-13

6.3 样品前处理

6.3.1 待测样品溶液的制备

6.3.1.1 样品称取和脱脂

称取待测样品 2 g（精确到 0.01 g），置于 50 mL 棕色具塞离心管中，加入 10 mL 甲醇 - 水混合溶液（体积比 2:1）均质 1 min，再用 5 mL 甲醇水混合溶液（体积比 2:1）洗涤均质器刀头，二者合并 4000 r/min 离心 5 min，吸取上清液部分并弃掉，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。

6.3.1.2 水解和衍生化

向上述每个离心管中加 10 mL 0.2 mol/L 盐酸溶液均质 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，用液体混匀器混匀，置于 37°C 恒温振荡水浴中避光反应 16 h。

6.3.1.3 净化

上述衍生溶液放置室温后，加入 5 mL 0.1 mol/L 磷酸氢二钾溶液，用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节溶液 pH 约为 7.4，4000 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，4000 r/min 离心 10 min，吸取并弃掉正己烷）倒入下接 Oasis HLB 固相萃取柱的贮液器中，在固相萃取装置上使样液以小于 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，用真空泵在 65 kPa 负压下抽干 Oasis HLB 固相萃取柱 15 min，用 5 mL 乙酸乙酯洗脱被测物于 25 mL 棕色离心管中，使用氮气吹干仪在 40°C 水浴中吹干，用样品定容溶液溶解并定容至 1.0 mL，混匀后过 0.2 μm 滤膜，上机测定。

6.3.2 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 棕色具塞离心管中，加入 10 mL 甲醇 - 水混合溶液（体积比 2:1），均质 1 min，再用 5 mL 甲醇水混合溶液（体积比 2:1）洗涤均质器刀头，二者合并 4000 r/min 离心 5 min，吸取上清液部分并弃掉，剩余步骤按 6.3.1.2 和 6.3.1.3 操作。

6.3.3 平行试验

按以上步骤，对同一试样进行平行试验测定。

6.3.4 回收率试验

阴性样品中添加标准溶液和内标溶液，按 6.3.2 操作，测定后计算样品的添加回收率。

6.4 测定

6.4.1 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（即相对保留时间）与混合基质校准溶液中对应的相对保留时间偏差在 ±2.5% 之内；且样品谱图中各组分定性离子对的相对丰度与浓度接近的混合基质校准溶液谱图中对应的定性离子的相对丰度进行比较，若偏差不得超过下表 4 规定的范围，则可判定为该样品中存在对应待测物。

表 4 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	最大允许偏差
> 50%	±20%
> 20%~50%	±25%
> 10%~20%	±30%
≤ 10%	±50%

6.4.2 定量测定

内标法定量：在仪器最佳工作条件下，对 4 种硝基咪唑代谢物及内标物的混合基质校准溶液进样测定，以混合基质校准物与内标物的浓度比值为横坐标，以其峰面积比值为纵坐标，绘制校准工作曲线，用校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。4 种硝基咪唑代谢物的校准物质多反应监测（MRM）色谱图参见附录 A。

6.4.3 结果计算

本方法采用内标法定量测定。为减少基质的影响，定量校准溶液采用基质匹配混合校准工作溶液。液相色谱 - 质谱测定结果可按照下式计算：

$$X=C \times \frac{V}{m}$$

式中：

X- 试样中被测组分残留量，单位为微克每千克（μg/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）

■ 其他注意事项

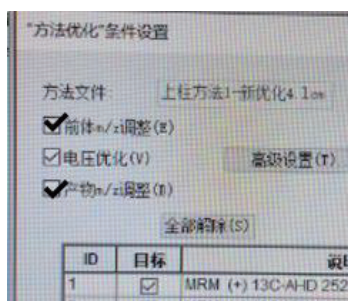
7.1 质谱参数优化方面

7.1.1 在质谱参数优化确定分子离子时，建议使用 1.0 mg/L 的标准物质及其内标物溶液。对于 AHD 和 SEM 及其内标物，若优化信号不大理想，可适当提高溶液浓度（如 5.0 mg/L）；

7.1.2 优化流动相分别为 A 相水（建议加酸，以抑制加钠峰，提高加氢分子离子峰的强度），B 相乙腈；

7.1.3 在再解析寻找并确定分子离子时，当采用平均化扣除本底，而在质谱图上未能查看到分子离子时，可采用直接提取分子离子 m/z 的形式来查看；

7.1.4 优化 MRM 离子对工作电压时，可根据国标中的子离子进行指定离子优化（电压的优化）。在参数优化界面，建议选择对前体离子和产物离子强度进行调整的优化方式，此方式可进一步提高灵敏度，设置如下图。（注：若调整强度优化后的子离子质量数与标准中离子质量数偏差大于 0.5，需注意核对子离子质量数的准确性，此时可能需再微调指定离子优化的初始质量数，进行再次优化。）



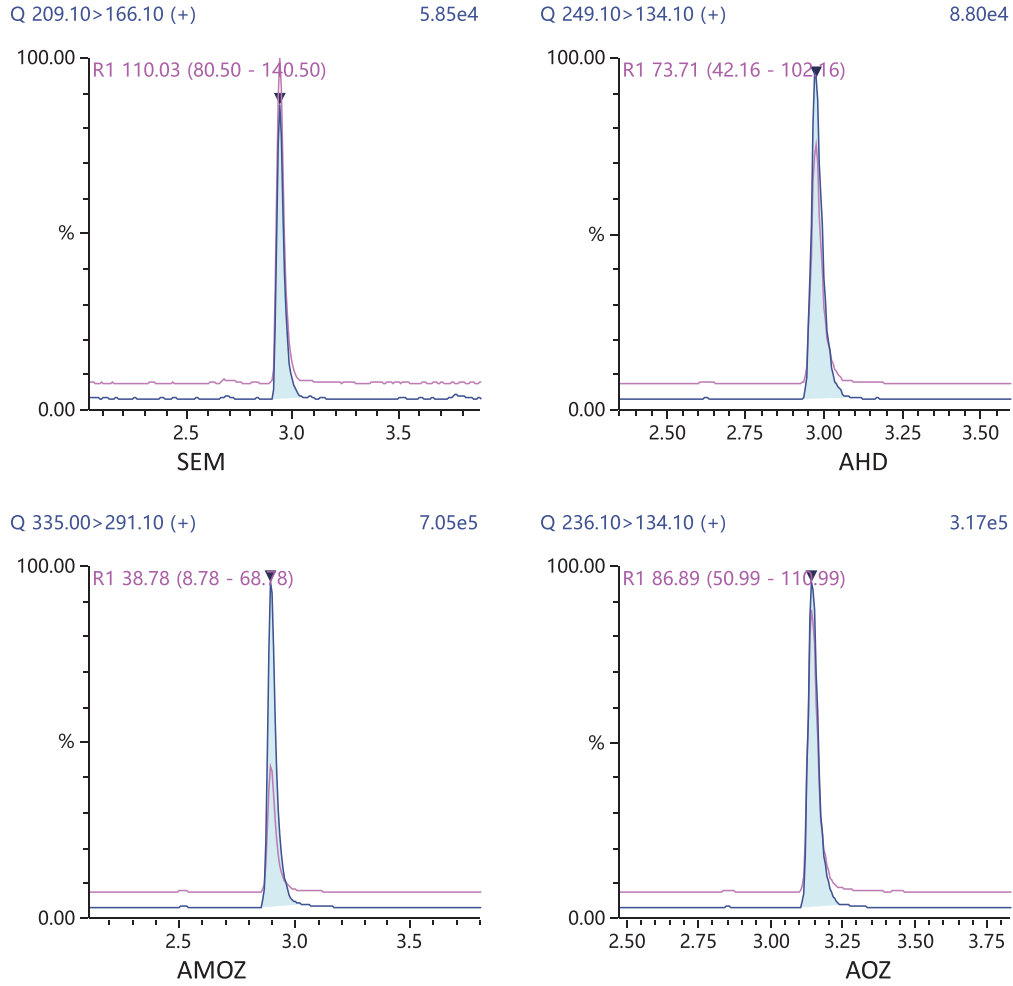
7.2 其他方面

7.2.1 仪器系统的平衡 在测试之前，如果仪器系统使用过高酸度流动相（如 0.1% 甲酸或乙酸，甚至更高），建议纯水条件下清洗 2 小时（具体以实际情况为准），如清洗不够，则可能会抑制目标物的信号强度。同时为保证测试结果的稳定性，低酸度流动相下仪器系统也需更长的平衡时间。

7.2.2 流动相中的乙酸浓度 合适的乙酸浓度为 0.0005%、0.001%、0.002% 或 0.005%，具体可根据实际测试情况进行微调。

7.2.3 色谱柱差异 同一分析条件，在不同色谱柱的分析结果有较大差异，特别是在测试样品时，有些色谱柱分析的干扰峰明显，有条件可进行多根色谱柱分析比对，优中择取。

附录 A
四种硝基咪喃代谢物 MRM 色谱图 (1.0 μ g/L)



岛津应用云

