



肌肉组织中硝基呋喃类代谢物残留检测方法——高效液相色谱-串联质谱法

1 安全要求

实验操作时穿工作服、戴口罩和手套；提取和净化操作都应在通风橱中进行，避免溶剂气体吸入和皮肤接触；废弃的化学试剂收集到专用容器中集中处理。

2 急救措施

皮肤接触到有机溶剂或酸、碱溶液后用清水清洗，有机溶剂或酸、碱溶液溅入眼中用清水灌洗。

3 适用范围

该标准操作规程适用于鸡、鱼和虾肌肉组织中硝基呋喃类代谢物残留量的确证检测。

4 职责

进行该项检验的检验员必须按该标准操作规程进行检验，质量监督员负责监督该标准操作规程的正确执行。

5 检测原理

试料依次用甲醇、乙醇和乙醚洗涤，去除杂质。在酸性条件下水解，与加入的2-硝基苯甲醛溶液进行衍生化反应，反应产物经乙酸乙酯提取，氮气吹干。溶解残余物，用高效液相色谱-串联质谱测定，同位素内标法定量。

6 方法灵敏度

AOZ、AMAZ、AHD 和 SEM 在肌肉组织中的检出限为 $0.25\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

7 注意事项

衍生化时一定要混匀且应避光。

8 材料、仪器、试剂的准备及基本要求

除特别注明外，以下所用试剂均为分析纯；水为符合 GB/T6682 规定的一级水。

8.1 对照品、试剂和药物储备液、工作液准备

8.1.1 AOZ 对照品 含 AOZ ($\text{C}_3\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$) 不得少于 99.0%。



- 8.1.2 内标 AOZ-D₄ 对照品 含 AOZ-D₄ (C₃D₄H₂N₂O₂) 不得少于 99.0%。
- 8.1.3 AMOZ 对照品 含 AMOZ (C₈H₁₅N₃O₃) 不得少于 99.0%。
- 8.1.4 内标 AMOZ-D₅ 对照品 含 AMOZ-D₅ (C₈D₅H₁₀N₃O₃) 不得少于 99.0%。
- 8.1.5 AHD 对照品 含 AHD (C₃H₅N₃O₂) 不得少于 99.0%。
- 8.1.6 内标 AHD-¹³C₃ 对照品 含 AHD-¹³C₃ (¹³C₃H₅N₃O₂) 不得少于 99.0%。
- 8.1.7 SEM·HCl 对照品 含 SEM·HCl (CH₆ClN₃O) 不得少于 99.0%。
- 8.1.8 内标 SEM·HCl- [1, 2-¹⁵N₂; ¹³C] 对照品 含 SEM·HCl- [1, 2-¹⁵N₂; ¹³C] (¹³CH₆Cl¹⁵N₂NO) 不得少于 99.0%。
- 8.1.9 2-硝基苯甲醛 色谱纯, 含 2-硝基苯甲醛 (C₇H₅NO₃) 不得少于 99.0%。
- 8.1.10 乙酸铵
- 8.1.11 磷酸氢二钾
- 8.1.12 氢氧化钠
- 8.1.13 盐酸
- 8.1.14 甲醇 色谱纯
- 8.1.15 乙醇
- 8.1.16 乙醚
- 8.1.17 二甲亚砜
- 8.1.18 乙酸乙酯
- 8.1.19 1mol/L 氢氧化钠溶液 取氢氧化钠 4g, 加水溶解并稀释至 100mL, 即得。
- 8.1.20 1mol/L 盐酸溶液 取盐酸 9mL, 加水稀释至 100mL, 即得。
- 8.1.21 50mmol/L 2-硝基苯甲醛的二甲亚砜溶液 称取 2-硝基苯甲醛 (37.8 ± 0.5) mg 置棕色瓶中, 加二甲亚砜 5.0mL 溶解, 临用前配制。
- 8.1.22 0.1mol/L 磷酸氢二钾溶液 称取磷酸氢二钾 2.28g, 用水溶解并稀释至 100mL, 临用前配制。
- 8.1.23 标准储备液的配制 精密称取 AOZ、AMOZ 和 AHD 对照品各约 10mg, 置 10mL 棕色量瓶中, 用甲醇溶解并稀释成浓度为 1mg/mL (含 AOZ、AMOZ 和 AHD) 的标准储备液。取 SEM·HCl 对照品约 14.9mg, 精密称定, 置 50mL 棕色量瓶中, 用甲醇溶解并稀释成含 SEM 0.2mg/mL 的标准储备液。-20℃ 以下保存, 有效期为 6 个月。
- 8.1.24 内标储备液的配制 精密称取 AOZ-D₄、AMOZ-D₅ 和 AHD-¹³C₃ 对照品各约 10mg, 置 10mL 棕色量瓶中, 用甲醇溶解并稀释成浓度为 1mg/mL (含 AOZ-D₄、AMOZ-D₅ 和 AHD-¹³C₃) 的内标储备液。取 SEM·HCl- [1, 2-¹⁵N₂; ¹³C] 对照品约 14.7mg, 精密称定, 置于 50mL 棕色量瓶中, 用甲醇溶解并稀释成含 SEM- [1, 2-¹⁵N₂; ¹³C] 0.2mg/mL 的内标储备液。-20℃ 以下保存, 有效期为 6 个月。
- 8.1.25 混合标准工作液 (20ng/mL) 精密量取 1mg/mL 的 AOZ、AMOZ 和 AHD 标准储备液 0.1mL 和 0.2mg/mL 的 SEM 标准储备液 0.5mL, 置于同一 10mL 量瓶内, 用甲醇稀释至刻度, 即得 10μg/mL 的混合标准溶液; 从中精密量取 0.1mL, 置于 10mL 量瓶内, 用甲醇稀释至刻度, 即得 100ng/mL 的混合标准溶液; 从中精密量取 2.0mL, 置于 10mL 量瓶内, 用甲醇稀释至刻度, 即得 20ng/mL 的混合标准工作液。-20℃ 以下保存, 有效期





为3个月。

8.1.26 混合内标工作液 (50ng/mL) 精密量取 1mg/mL 的 AOZ-D₄、AMOZ-D₅、AHD-¹³C₃ 标准储备液 0.1mL 和 0.2mg/mL 的 SEM- [1, 2-¹⁵N₂; ¹³C] 标准储备液 0.5mL, 置于同一 10mL 量瓶内, 用甲醇稀释至刻度, 即得 10μg/mL 的混合内标溶液; 从中精密量取 0.1mL, 置于 10mL 量瓶内, 用甲醇稀释至刻度, 即得 100ng/mL 的混合内标溶液; 从中精密量取 5.0mL, 置于 10mL 量瓶内, 用甲醇稀释至刻度, 即得 50ng/mL 的混合内标工作液。-20℃以下保存, 有效期为 3 个月。

8.2 仪器和设备

8.2.1 高效液相色谱-串联质谱仪 (带电喷雾离子源)

8.2.2 天平 感量 0.01g

8.2.3 分析天平 感量 0.000 01g

8.2.4 涡旋混合器

8.2.5 振荡器

8.2.6 组织匀浆机

8.2.7 离心机

8.2.8 恒温振荡水浴摇床

8.2.9 精密 pH 试纸 (pH 值 6.4 ~ 8.0)

8.2.10 具塞离心管 50mL

8.2.11 样品浓缩器

8.2.12 微孔滤头 0.45μm

9 检验步骤

9.1 试料的制备

9.1.1 取匀浆后的供试样品, 作为供试试料。

9.1.2 取匀浆后的空白样品 (2 ± 0.02) g, 作为空白试料 (阴性对照)。

9.1.3 取匀浆后的空白样品 (2 ± 0.02) g, 经洗涤后添加 20ng/mL 的混合标准工作液和 50ng/mL 的混合内标工作液各 0.1mL, 作为空白添加试料 (阳性对照)。

9.2 洗涤

9.2.1 称取供试试料 (2 ± 0.02) g 置具塞离心管中, 加水 1mL 和冰浴的甲醇 8mL, 涡旋, 中速振荡 5min, 于 -4℃ 下 3 000r/min 离心 5min, 弃上清液。

9.2.2 按上述洗涤过程用冰浴的甲醇 8mL 洗涤 1 次。

9.2.3 按上述洗涤过程用冰浴的乙醇洗涤 2 次, 每次 8mL。

9.2.4 按上述洗涤过程用冰浴的乙醚或正己烷洗涤 2 次, 每次 8mL。

9.3 衍生

9.3.1 洗涤后试料加 50ng/mL AOZ-D₄、AMOZ-D₅、AHD-¹³C₃ 和 SEM- [1, 2-¹⁵N₂; ¹³C] 混合内标工作液 0.1mL、水 4mL、1mol/L 盐酸 0.5mL 和 50mmol/L 2-硝基苯甲醛的二甲亚砷溶液 150μL, 涡旋、混匀。

9.3.2 (37 ± 1)℃ 避光水浴放置约 16h。



9.4 提取

9.4.1 衍生物中加入 0.1mol/L 磷酸氢二钾溶液 5mL, 用 1mol/L 氢氧化钠溶液调节其 pH 值至 7.2~7.4。

9.4.2 加乙酸乙酯 5mL, 涡旋, 中速振荡 5min, 3 000r/min 离心 10min, 吸取上清液。乙酸乙酯 5mL 重复提取一次。

9.4.3 合并上清液于 50℃ 水浴下氮气吹干或旋转蒸发仪浓缩至干。

9.4.4 用 20% 甲醇水溶液 0.5mL 溶解残余物, 经过滤后作为试样溶液, 供高效液相色谱-串联质谱仪测定。

9.5 测定条件

9.5.1 色谱条件

9.5.1.1 色谱柱: Symmetry C₈150mm×2.1mm (i. d.), 粒径 5μm, 或相当者。

9.5.1.2 柱温: 30℃。

9.5.1.3 进样量: 50μL。

9.5.1.4 流动相 A: 0.5mmol/L 乙酸铵-甲醇 (80:20, v/v)。

流动相 B: 0.5mmol/L 乙酸铵-甲醇 (10:90, v/v)。

流动相梯度洗脱条件见表 1。

表 1 色谱分离梯度条件

时间 (min)	A%	B%	流速 (mL/min)	曲线类型
0.00	80	20	0.2	1
0.10	70	30	0.2	6
8.00	70	30	0.2	6
8.10	100	0	0.2	1
12.00	80	20	0.2	6
25.00	80	20	0.2	6

注: 1 为即时变化, 6 为线性变化。

9.5.2 质谱条件

9.5.2.1 离子源参考参数, 见表 2。

表 2 离子源参考参数

离子源参数	参考数值
离子源类型	ESI+
毛细管电压	3.8kV
萃取电压	2.0V
RF 透镜电压	0.5V
源温	110℃
雾化温度	350℃
锥孔气流速	50L/h
雾化气流速	450L/h





9.5.2.2 质量分析器参考参数见表3。

表3 质量分析器参考参数

质量分析器参数	参考数值
低质量数分辨率 LM1	14.0
高质量数分辨率 HM1	14.0
离子能量 1	2.0
入口电压	2V
出口电压	2V
低质量数分辨率 LM2	14.0
高质量数分辨率 HM2	14.0
离子能量 2	0.3
氦气示数	3.2e-3mbar

9.5.2.3 光电倍增器电压：650V。

9.5.2.4 定性、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量见表4。

表4 硝基咪唑类代谢物衍生物和内标的定性、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量

药物	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
AOZ	236.1 > 134.1	Sum	35	13
	236.1 > 104.1	(236.1 > 134.1 + 236.1 > 104.1)		18
AMOZ	335.0 > 291.1	Sum	26	12
	335.0 > 262.0	(335.0 > 291.1 + 335.0 > 262.0)		16
AHD	249.3 > 178.2	Sum	30	13
	249.3 > 134.0	(249.3 > 178.2 + 249.3 > 134.0)		13
SEM	209.4 > 192.1	Sum	25	10
	209.4 > 134.2	(209.4 > 192.1 + 209.4 > 134.2)		10
AOZ-D ₄	240.1 > 134.1	240.1 > 134.1	35	13
AMOZ-D ₅	340.0 > 296.1	340.0 > 296.1	26	12
AHD- ¹³ C ₃	252.3 > 134.0	252.3 > 134.0	30	13
SEM- [1, 2- ¹⁵ N ₂ ; ¹³ C]	212.4 > 195.1	212.4 > 195.1	25	10

注：准确质量数在每次试验前进行调谐确认。

9.6 检测数据的质量控制

9.6.1 线性考察

精密量取 2.5ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、100ng/mL 的 AOZ、AMOZ、AHD 和 SEM 混合标准工作液 100μL，置于不同离心管中。按 9.3 和 9.4 步骤操作，制得 0.5ng/mL、1ng/mL、2ng/mL、4ng/mL、10ng/mL 和 20ng/mL 各对照溶液，从低浓度到高浓度测定，每一浓度进样 3 针，按所得峰面积与相应内标峰面积的比值与相应的对照溶液浓度作标准曲线，并依次计算回归方程及相关系数。



9.6.2 空白试验和添加试验

空白试料、阳性添加试料的洗涤、提取和净化采用与样品相同的方法操作。对照溶液用 20ng/mL 的标准工作液和 50ng/mL 内标工作液各 0.1mL，再加水 4mL，1mol/L 盐酸 0.5mL 和 50mmol/L 2-硝基苯甲醛的二甲亚砷溶液 150 μ L，涡旋混匀，同样品一样进行衍生化，然后一起提取浓缩，备用。

空白溶液、对照溶液和试样溶液中各特征离子的质量色谱图分别见附录中图 1、图 2 和图 3。

9.6.3 序列表的编制

- 试剂空白进 1 针；
- 样品空白进 2 针；
- 对照溶液进 3 针，其 RSD < 10%；
- 样品 1-1 进 1 针；
- 样品 1-2 进 1 针；
-
- 样品 4-1 进 1 针；
- 样品 4-2 进 1 针；
- 阳性添加各进 1 针；
- 对照溶液进 2 针；
-

(注：顺序的任何调整应有充分理由证明其合理性)

9.6.4 定性需同时满足下列条件：

- 9.6.4.1 试剂空白和样品空白不能出现与阳性对照相同的离子峰。
- 9.6.4.2 所有离子色谱峰的信噪比 (S/N) 都在 3:1 以上，信噪比以峰对峰 (PtP) 计算。
- 9.6.4.3 试样溶液色谱峰的保留时间，应与校正溶液的保留时间一致，容许偏差为 $\pm 2.5\%$ 。
- 9.6.4.4 试样溶液中的离子丰度比应与校正溶液的一致，容许偏差符合表 5 的要求。

表 5 试样溶液中离子丰度比的允许偏差范围

相对丰度 (%)	允许偏差 (%)
> 50	± 20
> 20 ~ 50	± 25
> 10 ~ 20	± 30
≤ 10	± 50

9.6.5 定量方法

采用单点校准或标准曲线校准，按内标法以峰面积比计算，即得。采用标准曲线校准时试样溶液及对照溶液中 AOZ、AMAZ、AHD 和 SEM 及相应内标的峰面积比均应在仪器检测的线性范围之内。





9.7 记录与计算

9.7.1 记录项目

- 9.7.1.1 逐项填写中国兽医药品监察所“检验记录”首页。
- 9.7.1.2 对照品名称、来源、批号、含量。
- 9.7.1.3 储备液、工作液及对照溶液制备及制备日期。
- 9.7.1.4 试料制备、提取、净化、测定（包括测定过程中涉及的计量仪器编号）。
- 9.7.1.5 原始数据（包括仪器测定图谱和打印的数据）。
- 9.7.1.6 计算公式及计算过程（软件计算除外）。

9.7.2 计算

$$\text{单点校准: } X = \frac{AA'_{is}C_sC_{is}}{A_{is}A_sC'_{is}} \times \frac{V}{m}$$

$$\text{或标准曲线校准: 由 } \frac{A_s}{A'_{is}} = a \frac{C_s}{C'_{is}} + b$$

$$\text{求得 } a \text{ 和 } b, \text{ 则 } C = \frac{C_{is}}{a} \left(\frac{A}{A_{is}} - b \right)$$

按下式计算试料中 AOZ、AMAZ、AHD 和 SEM 残留量:

$$X = \frac{CV}{m}$$

式中:

- A_s ——对照溶液中相应硝基呋喃类代谢物的峰面积;
- A'_{is} ——对照溶液中相应硝基呋喃类代谢物内标的峰面积;
- C_s ——对照溶液中相应硝基呋喃类代谢物的浓度 (ng/mL);
- C'_{is} ——对照溶液中相应硝基呋喃类代谢物内标的浓度 (ng/mL);
- C ——试样溶液中相应硝基呋喃类代谢物的浓度 (ng/mL);
- C_{is} ——试样溶液中相应硝基呋喃类代谢物内标的浓度 (ng/mL);
- A ——试样溶液中相应硝基呋喃类代谢物的峰面积;
- A_{is} ——试样溶液中相应硝基呋喃类代谢物内标的峰面积;
- X ——试料中相应硝基呋喃类代谢物的残留量 (ng/g);
- V ——溶解残余物所用试样溶液体积 (mL);
- m ——组织样品的质量 (g)。

(注: 计算结果需扣除空白值, 测定结果用平行测定的算术平均值表示, 保留 3 位有效数字)

9.7.3 结果判定

- 9.7.3.1 线性范围 线性范围在 0.5 ~ 20ng/mL 范围考察线性, 计算回归方程, 其相关系数 $R^2 > 0.990$ 。
- 9.7.3.2 准确度 本方法在 0.5 ~ 2ng/g 添加浓度的回收率为 70% ~ 120%。
- 9.7.3.3 精密度 本方法的批内相对标准偏差 $\leq 20\%$, 批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

若方法学考察符合以上规定, 则供试组织中药物残留量之和 $\sum_{i=1}^n X_i < \text{检测限时}$, 判为未检出; 检测限 $\leq \sum_{i=1}^n X_i < 1\mu\text{g/kg}$ 时, 判为符合规定; $\sum_{i=1}^n X_i \geq 1\mu\text{g/kg}$ 时, 判为不符合



规定。

10 附加说明

10.1 本标准操作规程依据农业部 781 号公告制定。

10.2 硝基咪唑类代谢物的最高残留限量：

药物名称	禁用动物种类	靶组织	监控计划要求
硝基咪唑类代谢物	所有食品动物	所有可食组织	1 μg/kg

附 录

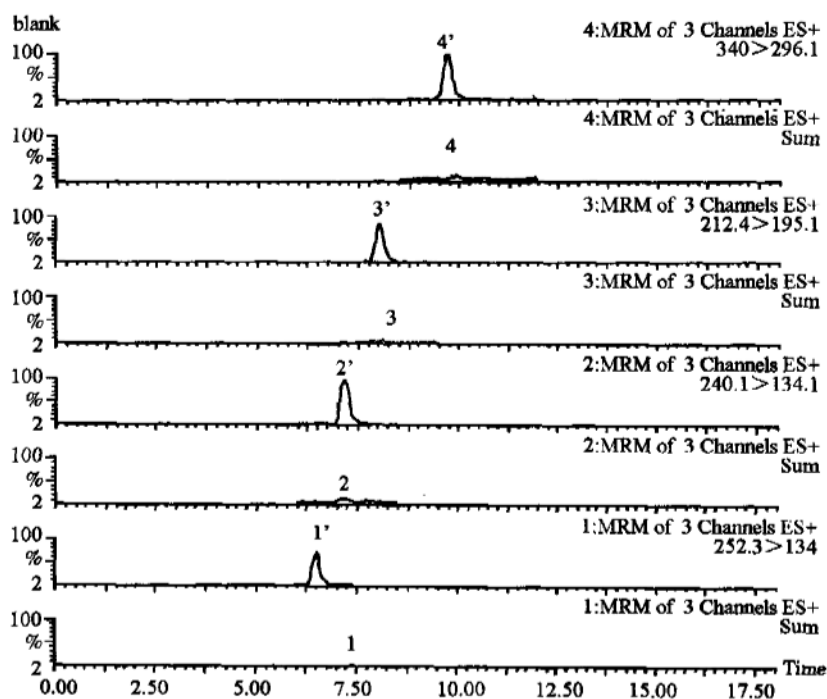


图 1 空白溶液中硝基咪唑类代谢物衍生物特征离子质量色谱图

质量色谱图中：

1. AHD 衍生物特征离子质量色谱图 (Sum: 249.3 > 178.2 + 249.3 > 134.0)；
- 1'. AHD 同位素内标衍生物特征离子质量色谱图 (252.3 > 134.0)；
2. AOZ 衍生物特征离子质量色谱图 (Sum: 236.1 > 134.1 + 236.1 > 104.1)；
- 2'. AOZ 同位素内标衍生物特征离子质量色谱图 (240.1 > 134.1)；
3. SEM 衍生物特征离子质量色谱图 (Sum: 209.4 > 192.1 + 209.4 > 134.2)；
- 3'. SEM 同位素内标衍生物特征离子质量色谱图 (212.4 > 195.1)；
4. AMOZ 衍生物特征离子质量色谱图 (Sum: 335.0 > 291.1 + 335.0 > 262.0)；
- 4'. AMOZ 同位素内标衍生物特征离子质量色谱图 (340.0 > 296.1)



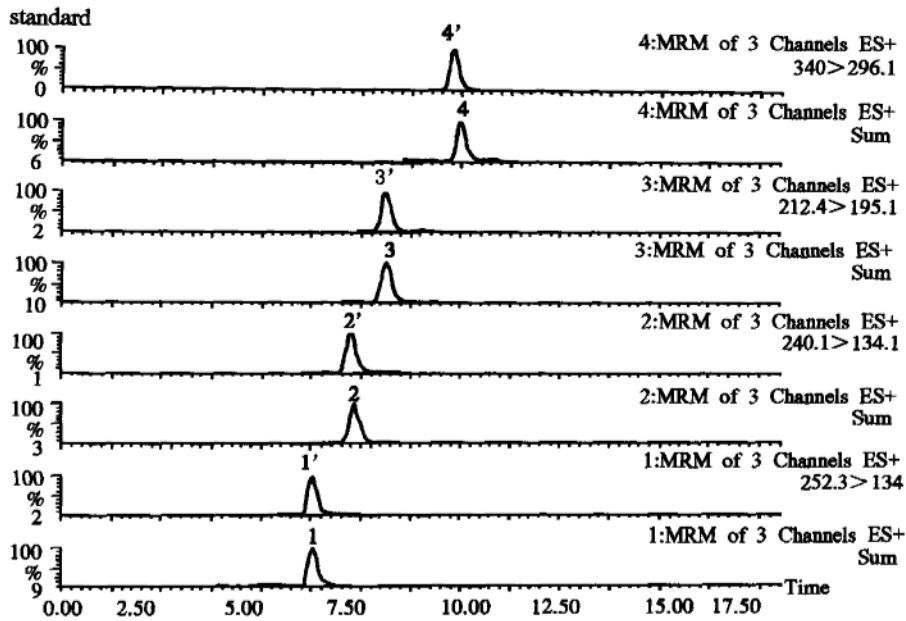


图2 对照溶液中硝基咪唑类代谢物衍生物特征离子质量色谱图

质量色谱图中:

1. AHD 衍生物特征离子质量色谱图 (Sum: 249.3 > 178.2 + 249.3 > 134.0);
- 1'. AHD 同位素内标衍生物特征离子质量色谱图 (252.3 > 134.0);
2. AOZ 衍生物特征离子质量色谱图 (Sum; 236.1 > 134.1 + 236.1 > 104.1);
- 2'. AOZ 同位素内标衍生物特征离子质量色谱图 (240.1 > 134.1);
3. SEM 衍生物特征离子质量色谱图 (Sum; 209.4 > 192.1 + 209.4 > 134.2);
- 3'. SEM 同位素内标衍生物特征离子质量色谱图 (212.4 > 195.1);
4. AMOZ 衍生物特征离子质量色谱图 (Sum; 335.0 > 291.1 + 335.0 > 262.0);
- 4'. AMOZ 同位素内标衍生物特征离子质量色谱图 (340.0 > 296.1)

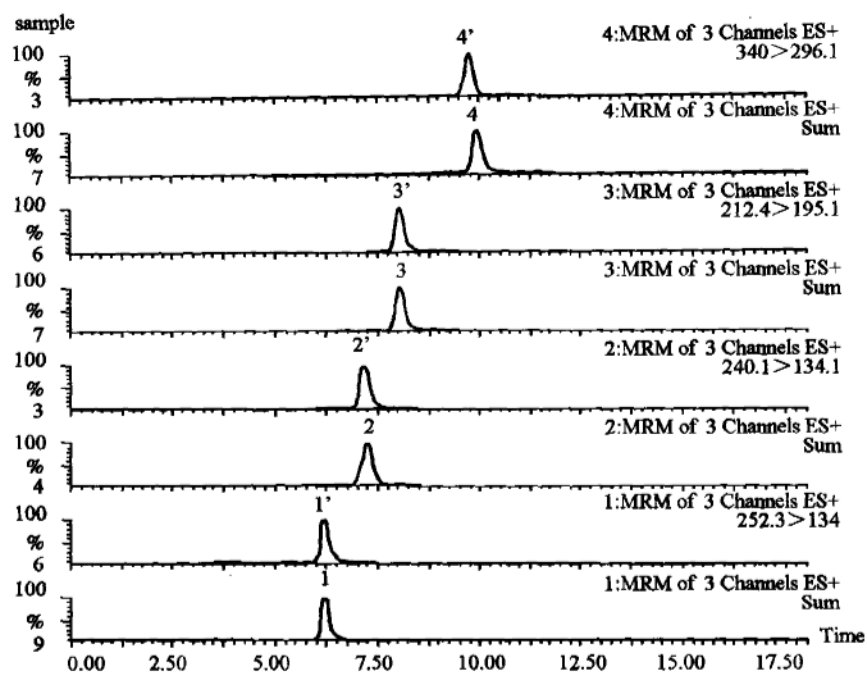


图3 鸡肌肉组织中硝基咪唑类代谢物衍生物特征离子质量色谱图
质量色谱图中:

1. AHD 衍生物特征离子质量色谱图 (Sum: 249.3 > 178.2 + 249.3 > 134.0);
- 1'. AHD 同位素内标衍生物特征离子质量色谱图 (252.3 > 134.0);
2. AOZ 衍生物特征离子质量色谱图 (Sum: 236.1 > 134.1 + 236.1 > 104.1);
- 2'. AOZ 同位素内标衍生物特征离子质量色谱图 (240.1 > 134.1);
3. SEM 衍生物特征离子质量色谱图 (Sum: 209.4 > 192.1 + 209.4 > 134.2);
- 3'. SEM 同位素内标衍生物特征离子质量色谱图 (212.4 > 195.1);
4. AMOZ 衍生物特征离子质量色谱图 (Sum: 335.0 > 291.1 + 335.0 > 262.0);
- 4'. AMOZ 同位素内标衍生物特征离子质量色谱图 (340.0 > 296.1)