

# 中华人民共和国国家标准

农业部 781 号公告—4—2006

---

## 动物源食品中硝基呋喃类代谢物残留量的 测定 高效液相色谱—串联质谱法

**Determination of nitrofuran metabolites in animal derived food  
by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry**

2006-12-16 发布

2006-12-16 实施

---

中华人民共和国农业部 发布

## 目 次

### 前言

1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 制样 .....	1
3.1 样品的制备 .....	1
3.2 样品的保存 .....	1
4 测定方法 .....	1
4.1 方法提要或原理 .....	1
4.2 试剂和材料 .....	1
4.3 仪器和设备 .....	2
4.4 测定步骤 .....	2
4.5 结果计算和表述 .....	4
5 检测方法灵敏度、准确度和精密度 .....	5
5.1 灵敏度 .....	5
5.2 准确度 .....	5
5.3 精密度 .....	5
附录 A (资料性附录) 硝基咪唑类代谢物特征离子质量色谱图 .....	6

## 前 言

本标准附录是资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准起草单位：中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人：刘艳华、孙雷、王树槐、董琳琳、仲锋。

## 动物源食品中硝基呋喃类代谢物 残留量的测定 高效液相色谱—串联质谱法

### 1 范围

本标准规定了动物源食品中呋喃唑酮、呋喃它酮、呋喃妥因和呋喃西林单个或混合物的相应代谢产物 AOZ(3-amino-2-oxazolidone, 3-氨基-2-唑烷酮)、AMOZ(5-morpholinomethyl-3-amino-2-oxazolidone, 5-甲基吗啉代-3-氨基-2-唑烷酮)、AHD(1-aminohydantoin, 1-氨基乙内酰脲)和 SEM(semicarbazide, 氨基脲)残留检测的制样和高效液相色谱—串联质谱的测定方法。

本标准适用于动物源食品中呋喃唑酮、呋喃它酮、呋喃妥因和呋喃西林单个或混合物的相应代谢产物 AOZ、AMOZ、AHD 和 SEM 残留量的检测。

### 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 1.1—2000 标准化工作导则 第 1 部分:标准的结构和编写规则(ISO/IEC Directives, Part 3, 1997, Rules for the structure and drafting of International Standards, NEQ)。

GB/T 6682—1992 分析实验室用水规则和试验方法。

农业部农牧发[2003]1 号 兽药残留试验技术规范(试行)。

### 3 制样

#### 3.1 样品的制备

取适量新鲜或冷冻的空白或供试组织,绞碎并使均匀。

#### 3.2 样品的保存

—20℃ 以下贮存备用。

### 4 测定方法

#### 4.1 方法提要或原理

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—串联质谱法测定,同位素内标法定量。

#### 4.2 试剂和材料

以下所用的试剂,除特别注明者外均为分析纯试剂;水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.2.1 AOZ 对照品 含 AOZ( $C_3H_6N_2O_2$ )不得少于 99.0%。

4.2.2 内标 AOZ-D<sub>4</sub> 对照品 含 AOZ-D<sub>4</sub>( $C_3H_2D_4N_2O_2$ )不得少于 99.0%。

4.2.3 AMOZ 对照品 含 AMOZ( $C_8H_{15}N_3O_3$ )不得少于 99.0%。

4.2.4 内标 AMOZ-D<sub>5</sub> 对照品 含 AMOZ-D<sub>5</sub>( $C_8H_{10}D_5N_3O_3$ )不得少于 99.0%。

4.2.5 AHD 对照品 含 AHD( $C_3H_5N_3O_2$ )不得少于 99.0%。

## 农业部 781 号公告—4—2006

- 4.2.6 内标 AHD- $^{13}\text{C}_3$  对照品 含 AHD- $^{13}\text{C}_3$ ( $^{13}\text{C}_3\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2$ )不得少于 99.0%。
- 4.2.7 SEM·HCl 对照品 含 SEM·HCl( $\text{CH}_6\text{ClN}_3\text{O}$ )不得少于 99.0%。
- 4.2.8 内标 SEM·HCl-[1,2- $^{15}\text{N}_2$ ;  $^{13}\text{C}$ ]对照品 含 SEM·HCl-[1,2- $^{15}\text{N}_2$ ;  $^{13}\text{C}$ ]( $^{13}\text{CH}_6\text{Cl}^{15}\text{N}_2\text{NO}$ )不得少于 99.0%。
- 4.2.9 2-硝基苯甲醛 色谱纯,含 2-硝基苯甲醛( $\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_3$ )不得少于 99.0%。
- 4.2.10 乙酸铵 色谱纯。
- 4.2.11 磷酸氢二钾。
- 4.2.12 氢氧化钠。
- 4.2.13 盐酸。
- 4.2.14 甲醇 色谱纯。
- 4.2.15 乙醇。
- 4.2.16 乙醚。
- 4.2.17 二甲亚砜。
- 4.2.18 乙酸乙酯。
- 4.2.19 1 mol/L 氢氧化钠溶液 取氢氧化钠饱和液 5.6 mL,加水稀释至 100 mL,即得。
- 4.2.20 1 mol/L 盐酸溶液 取盐酸 9 mL,加水稀释至 100 mL,即得。
- 4.2.21 50 mmol/L 2-硝基苯甲醛的二甲亚砜溶液 称取 2-硝基苯甲醛( $37.8 \pm 0.5$ ) mg 置棕色瓶中,加二甲亚砜 5.0 mL 溶解,临用前配制。
- 4.2.22 0.1 mol/L 磷酸氢二钾溶液 称取磷酸氢二钾 2.28 g,用水溶解并稀释至 100 mL,临用前配制。
- 4.2.23 AOZ、AMAZ、AHD 和 SEM 标准储备液 取 AOZ、AMAZ 和 AHD 对照品约 10 mg,精密称定,分别置 10 mL 棕色量瓶中,用甲醇溶解并稀释成浓度为 1 mg/mL(含 AOZ、AMAZ 和 AHD)的标准储备液。取 SEM·HCl 对照品约 14.9 mg,精密称定,置 50 mL 棕色量瓶中,用甲醇溶解并稀释成含 SEM 0.2 mg/mL 的标准储备液。-20℃ 以下保存,有效期为 3 个月。
- 4.2.24 AOZ-D<sub>4</sub>、AMAZ-D<sub>5</sub>、AHD- $^{13}\text{C}_3$  和 SEM-[1,2- $^{15}\text{N}_2$ ;  $^{13}\text{C}$ ]内标储备液 取 AOZ-D<sub>4</sub>、AMAZ-D<sub>5</sub> 和 AHD- $^{13}\text{C}_3$  对照品约 10 mg,精密称定,分别置 10 mL 棕色量瓶中,用甲醇溶解并稀释成浓度为 1 mg/mL(含 AOZ-D<sub>4</sub>、AMAZ-D<sub>5</sub> 和 AHD- $^{13}\text{C}_3$ )的内标储备液。取 SEM·HCl-[1,2- $^{15}\text{N}_2$ ;  $^{13}\text{C}$ ]对照品约 14.7 mg,精密称定,置于 50 mL 棕色量瓶中,用甲醇溶解并稀释成含 SEM-[1,2- $^{15}\text{N}_2$ ;  $^{13}\text{C}$ ] 0.2 mg/mL 的内标储备液。-20℃ 以下保存,有效期为 3 个月。
- 4.2.25 AOZ、AMAZ、AHD 和 SEM 混合标准工作液 准确量取适量各标准储备液,用甲醇稀释成适宜等浓度的 AOZ、AMAZ、AHD 和 SEM 混合标准工作液。-20℃ 以下保存,有效期为 1 个月。
- 4.2.26 50 ng/mL AOZ-D<sub>4</sub>、AMAZ-D<sub>5</sub>、AHD- $^{13}\text{C}_3$  和 SEM-[1,2- $^{15}\text{N}_2$ ;  $^{13}\text{C}$ ]混合内标工作液 准确量取适量的各内标储备液,用甲醇稀释成含 AOZ-D<sub>4</sub>、AMAZ-D<sub>5</sub>、AHD- $^{13}\text{C}_3$  和 SEM-[1,2- $^{15}\text{N}_2$ ;  $^{13}\text{C}$ ]均为 50 ng/mL 的混合内标工作液。-20℃ 以下保存,有效期为 1 个月。

### 4.3 仪器和设备

- 4.3.1 液相色谱-串联质谱仪(配电喷雾离子源)
- 4.3.2 天平 感量 0.01 g。
- 4.3.3 分析天平 感量 0.000 01 g。
- 4.3.4 漩涡振荡器
- 4.3.5 振荡器

## 4.3.6 组织匀浆机

## 4.3.7 离心机

## 4.3.8 恒温水浴

## 4.3.9 精密 pH 试纸 (pH6.4~8.0)

## 4.3.10 具塞离心管 50 mL

## 4.3.11 样品浓缩器

4.3.12 微孔滤头 0.45  $\mu\text{m}$ 

## 4.4 测定步骤

## 4.4.1 试料的制备

试料的制备包括:

——取绞碎后的供试样品,作为供试试料。

——取绞碎后的空白样品,作为空白试料。

——取绞碎后空白样品,经洗涤后添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试料。

## 4.4.2 洗涤

取 10 000 r/min 匀浆 1 min 的试料 ( $2 \pm 0.05$ ) g 置离心管中,加水 1 mL 和冰浴甲醇 8 mL,涡旋,中速振荡 5 min,2 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,分别按上述洗涤过程用冰浴甲醇 8 mL 洗涤一次;冰浴乙醇洗涤 2 次,每次 8 mL;冰浴乙醚洗涤 2 次,每次 8 mL。

## 4.4.3 衍生

洗涤后试料加 50 ng/mL AOZ-D<sub>4</sub>、AMOZ-D<sub>5</sub>、AHD-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> 和 SEM-[1,2-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>; <sup>13</sup>C] 标准工作液 100  $\mu\text{l}$ ,再加水 4 mL,1 mol/L 盐酸 0.5 mL 和 50 mmol/L 2-硝基苯甲醛的二甲亚砷溶液 150  $\mu\text{l}$ ,涡旋、混匀。(37°C  $\pm$  1) 避光水浴放置约 16 h。

## 4.4.4 提取

衍生物加 0.1 mol/L 磷酸氢二钾溶液 5 mL,用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 7.2~7.4。加乙酸乙酯 5 mL,涡旋,中速振荡 5 min,2 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液。乙酸乙酯 5 mL 重复提取一次。合并上清液于 50°C 氮气吹干。

20% 甲醇的水溶液 0.5 mL 溶解残余物,经滤膜过滤后作为试样溶液,供高效液相色谱—串联质谱法测定。

## 4.4.5 标准曲线的制备

精密量取 2.5、5.0、10、20、50、100 ng/mL LAOZ、AMOZ、AHD 和 SEM 混合标准工作液 100  $\mu\text{l}$  置不同离心管中。按 4.4.3 和 4.4.4 操作,制得 0.5、1、2、4、10 和 20 ng/mL 各对照溶液浓度供高效液相色谱—串联质谱法测定。

## 4.4.6 测定

## 4.4.6.1 液相色谱条件

色谱柱: C<sub>8</sub>150 mm  $\times$  2.1 mm (i. d.), 粒径 5  $\mu\text{m}$ , 或相当者;

流动相: 梯度洗脱: 流动相 A: 0.5 mmol/L 乙酸铵-甲醇 (80 + 20)

流动相 B: 0.5 mmol/L 乙酸铵-甲醇 (10 + 90)

0 min: A - B (80 + 20), 0.1 min: A - B (70 + 30), 8 min: A - B (70 + 30)

8.1 min: A - B (0 + 100), 12 min: A - B (80 + 20), 25 min: A - B (80 + 20)

流速: 0.2 mL/min。

柱温: 30°C。

进样量: 50  $\mu\text{L}$ 。

#### 4.4.6.2 质谱条件

离子源:电喷雾离子源;  
 扫描方式:正离子扫描;  
 检测方式:多反应监测;  
 电离电压:3.8 kV;  
 源温:110℃;  
 雾化温度:350℃。  
 锥孔气流速:50 L/h;  
 雾化气流速:450 L/h;

定性、定量离子对和锥孔电压及碰撞电压见表 1。

表 1 4 种硝基咪唑素类代谢物和内标的定性、定量离子对及锥孔电压、碰撞电压

药物	定性离子对(m/z)	定量离子对(m/z)	锥孔电压(V)	碰撞电压(V)
AOZ	236.1>134.1	Sum (236.1>134.1+236.1>104.1)	28	13
	236.1>104.1			22
AMOZ	335.0>291.1	Sum (335.0>291.1+335.0>262.0)	26	12
	335.0>262.0			20
AHD	249.3>178.2	Sum (249.3>178.2+249.3>134.0)	28	13
	249.3>134.0			13
SEM	209.4>192.1	Sum (209.4>192.1+209.4>134.2)	25	10
	209.4>134.2			13
AOZ-D <sub>4</sub>	240.1>134.1	240.1>134.1	28	13
AMOZ-D <sub>5</sub>	340.0>296.1	340.0>296.1	26	12
AHD- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	252.3>134.0	252.3>134.0	28	13
SEM-[1,2- <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ; <sup>13</sup> C]	212.4>195.1	212.4>195.1	25	10

#### 4.4.6.3 测定法

取试样溶液和相应的对照溶液,作单点或多点校准,按内标法以峰面积比计算,即得。对照溶液及试样溶液中 AOZ、AMOZ、AHD 和 SEM 及内标 AOZ-D<sub>4</sub>、AMOZ-D<sub>5</sub>、AHD-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> 和 SEM-[1,2-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>; <sup>13</sup>C] 的峰面积之比均应在仪器检测的线性范围之内。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 A 中图 A.1、图 A.2 和图 A.3。

#### 4.4.7 空白试验

除不加试料外,采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

#### 4.5 结果计算和表述

单点校准:

$$C_i = \frac{A_i A'_{is} C_S C_{is}}{A_{is} A_S C'_{is}} \dots\dots\dots (1)$$

或标准曲线校准:由

$$\frac{A_S}{A'_{is}} = a \frac{C_S}{C'_{is}} + b \dots\dots\dots (2)$$

求得 a 和 b,则

$$C_i = \frac{C_{is}}{a} \left( \frac{A_i}{A_{is}} - b \right) \dots\dots\dots (3)$$

按下式计算试料中 AOZ、AMOZ、AHD 和 SEM 残留量:

$$X = \frac{C_i V}{m} \dots\dots\dots (4)$$

式中:

- $C_i$  —— 试料溶液中相应硝基呋喃类代谢物的浓度(ng/mL);  
 $C_{is}$  —— 试料溶液中相应硝基呋喃类代谢物内标的浓度(ng/mL);  
 $C_s$  —— 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的浓度(ng/mL);  
 $A_i$  —— 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;  
 $A_s$  —— 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;  
 $X$  —— 试料中相应硝基呋喃类代谢物的残留量(ng/g);  
 $V$  —— 溶解残余物所得试样溶液体积(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,保留三位有效数字。

## 5 检测方法灵敏度、准确度和精密度

### 5.1 灵敏度

AOZ、AMOZ、AHD 和 SEM 在动物源食品中的检测限为 0.25 ng/g,定量限为 0.5 ng/g。

5.2 准确度 本方法在 0.5 ng/g~2 ng/g 添加浓度的回收率为 60%~120%。

5.3 精密度 本方法的批内相对标准偏差 $\leq 30\%$ ,批间相对标准偏差 $\leq 30\%$ 。



附录 A

(资料性附录)

硝基咪唑类代谢物特征离子质量色谱图

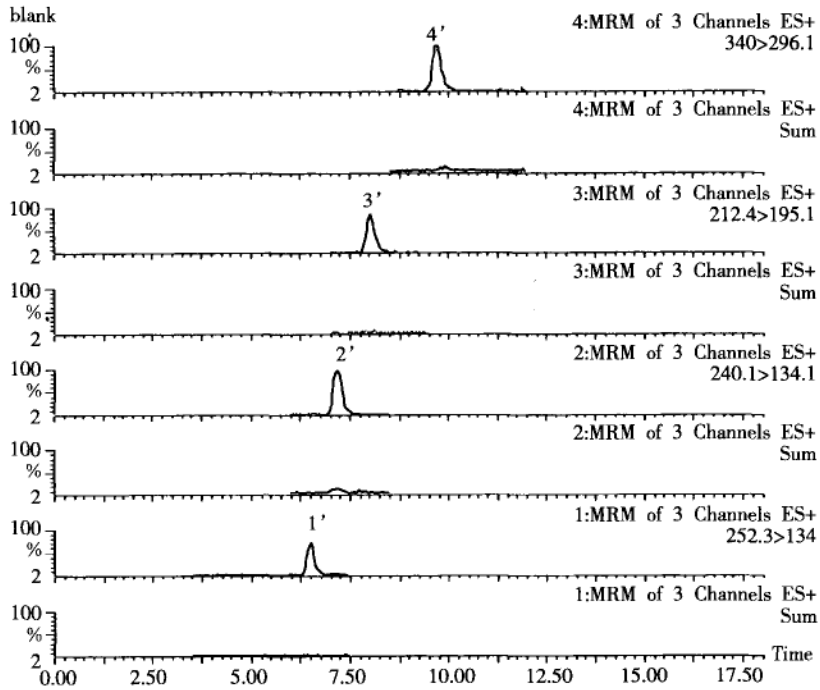


图 A.1 空白溶液中硝基咪唑类代谢物特征离子质量色谱图

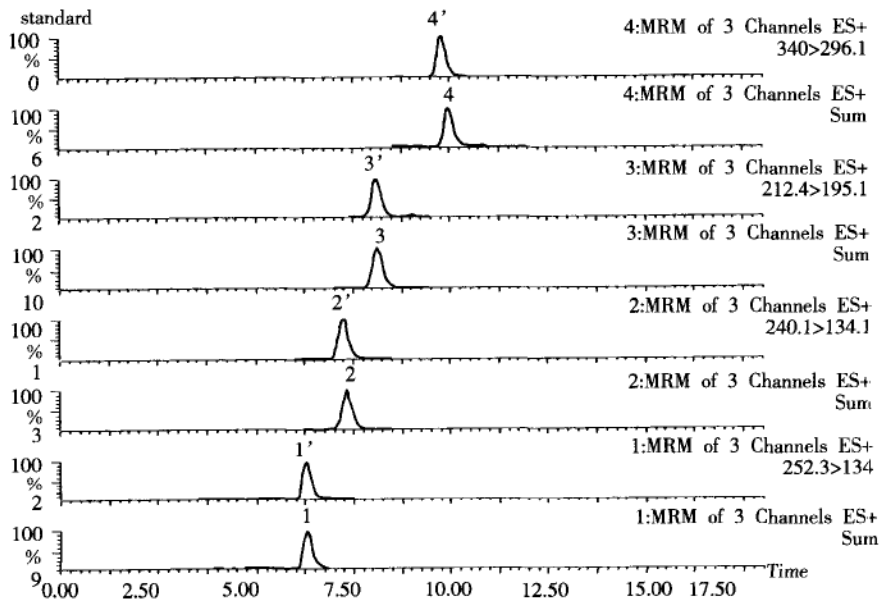


图 A.2 对照溶液中硝基咪唑类代谢物特征离子质量色谱图

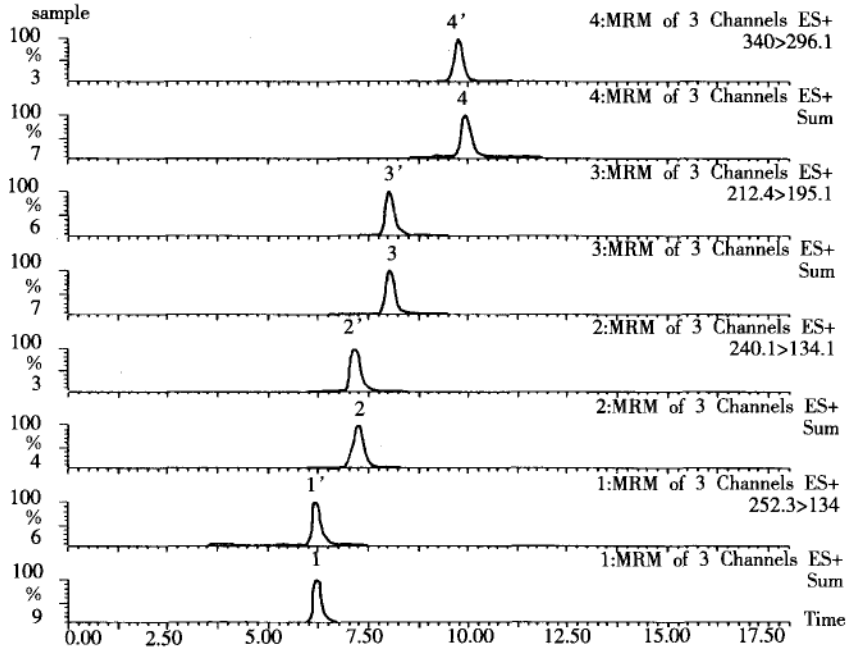


图 A.3 动物源食品中硝基咪唑类代谢物特征离子质量色谱图

质量色谱图中:

- 1—AHD 衍生化产物得到的特征离子质量色谱图加和(Sum:249.3>178.2+249.3>134.0);
- 1'—AHD 同位素内标衍生化产物得到的特征离子质量色谱图(252.3>134.0);
- 2—AOZ 衍生化产物得到的特征离子质量色谱图加和(Sum:236.1>134.1+236.1>104.1);
- 2'—AOZ 同位素内标衍生化产物得到的特征离子质量色谱图(240.1>134.1);
- 3—SEM 衍生化产物得到的特征离子质量色谱图加和(Sum:209.4>192.1+209.4>134.2);
- 3'—SEM 同位素内标衍生化产物得到的特征离子质量色谱图(212.4>195.1);
- 4—AMAZ 衍生化产物得到的特征离子质量色谱图加和(Sum:335.0>291.1+335.0>262.0);
- 4'—AMAZ 同位素内标衍生化产物得到的特征离子质量色谱图(340.0>296.1)。

