# 液相色谱-串联质谱法测定大菱鲆鱼粉中 呋喃唑酮代谢物残留

邢丽红<sup>1,2,3</sup>,孙伟红<sup>1,2,3\*</sup>,孙晓杰<sup>1,2,3</sup>,郭萌萌<sup>1,2,3</sup>,李兆新<sup>1,2,3</sup>,张泽凯<sup>1,2,3</sup> (1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所,农业农村部水产品质量安全检测与评价重点实验室,青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室,青岛 266237;

3. 大连工业大学,海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心,大连 116034)

**摘 要:目的** 建立液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)检测大 菱鲆鱼粉中呋喃唑酮代谢物 3-氨基-2-噁唑烷基酮(3-amino-2-oxazolidinone, AOZ)残留的分析方法。方法 大 菱鲆冻干鱼粉样品复水后,经盐酸水解, 2-硝基苯甲醛衍生化,乙酸乙酯提取,高速离心净化,采用 2 mmol/L 乙酸铵(A)和甲醇(B)作为流动相进行梯度洗脱,质谱(electron spray ionization, ESI<sup>+</sup>)选择反应监测模式对 AOZ 进行定性和定量测定。结果 在 1.0~40 μg/L 范围内线性关系良好,相关系数大于 0.999。AOZ 在 2.00、5.00、10.0 和 20.0 μg/kg 添加水平的回收率在 94.2%~100%之间,批内和批间相对标准偏差均<10%。本方法冻干鱼 粉中 AOZ 的定量限为 2.00 μg/kg。结论 该方法灵敏、准确,操作简便,适用于大菱鲆鱼粉中 AOZ 残留基体 标准物质的定值测定。

关键词: 呋喃唑酮; 液相色谱-串联质谱法; 定值; 鱼粉

# Determination of furazolidone metabolite residue in the turbot fish meal by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XING Li-Hong<sup>1,2,3</sup>, SUN Wei-Hong<sup>1,2,3\*</sup>, SUN Xiao-Jie<sup>1,2,3</sup>, GUO Meng-Meng<sup>1,2,3</sup>, LI Zhao-Xin<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Ze-Kai<sup>1,2,3</sup>

(1. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P. R. China; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China; 3. Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of furazolidone metabolite 3-amino-2-o xazolidinone (AOZ) residues in turbot fish meal by liquid chromatography-tandem mass spectrometry(LC-MS/MS). **Methods** After rehydration, the turbot fish meal was hydrolyzed by hydrochloric acid and derivatized by 2-nitrobenzaldehyde overnight. Then AOZ was extracted with ethyl acetate and purified by high-speed centrifugation.

基金项目:国家自然科学基金项目(41806148)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022018016, 20603022019001)、中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2020TD71)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (41806148), Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022018016, 20603022019001), and Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD71) \*通讯作者: 孙伟红,高级工程师,主要研究方向为水产品质量与安全。E-mail: sunwh@ysfri.ac.cn

<sup>\*</sup>Corresponding author: SUN Wei-Hong, Senior Engineers, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China. E-mail: sunwh@ysfri.ac.cn

The AOZ residue in the extract was separated on a reversed phase using a gradient elution program of 2 mmol/L ammonium acetate (A) and methanol (B). Using LC-MS/MS (ESI<sup>+</sup>) with selected reactions monitoring, identification of the major components of the AOZ residue was performed based upon the intensities of fragments. **Results** The calibration curve showed a good linearity in a range of 1.0–40  $\mu$ g/L with the correlation coefficient over 0.999. The recoveries were ranged from 94.2% to 100% for the AOZ residues with 4 spiked levels of 2.00, 5.00, 10.0 and 20.0  $\mu$ g/kg. The relative standard deviations (RSDs) were less than 10% (*n*=6), and the limit of quantitation (LOQ) for the AOZ in turbot fish meal was 2.00  $\mu$ g/kg. **Conclusion** The proposed method is sensitive, accurate and easy to operate, which is suitable for detecting AOZ residues in reference material of turbot fish meal.

KEY WORDS: furazolidone; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; definite value; fish meal

# 1 引 言

标准物质是分析检测过程中质量保证的基础,用以 确保检测方法及数据可靠性、可比性、可追溯性<sup>[1-3]</sup>。标准 物质主要包括纯度标准物质、溶液标准物质和基体标准物 质3大类<sup>[4]</sup>。食品农产品样品由于本身所固有的易变化的 特性使得单纯采用传统的纯化学物质标准品来校准检测 体系难以满足要求,需要同时采用基体标准物质进行校 准<sup>[5]</sup>。基体标准物质可用于量值溯源及实验室的质量控制、 方法溯源、技术人员考核等,标准物质的质量直接影响食 品安全检测数据的可靠、可比与国际互认<sup>[6-9]</sup>。

呋喃唑酮是人工合成的具有 5-硝基结构的广谱抗 菌药物,在水产养殖中曾用来预防和治疗革兰氏细菌引 起的肠胃道疾病<sup>[10]</sup>,是最常见的一种硝基呋喃类药物, 该类药物半衰期很短,在动物体内代谢迅速,而与蛋白 结合的代谢产物在生物体内则能长期稳定残留[11],并具 有显著的致畸、致癌和诱导机体产生突变的作用[12]。我 国于 2002 年明令禁止在食用动物上使用硝基呋喃类药 物,并规定在动物源性食品中不得检出<sup>[13]</sup>,然而硝基呋 喃类药物却屡禁不止。大菱鲆是我国主要的海水养殖品种, 自 2006 年"多宝鱼药残风波"发生后,水产品中硝基呋喃类 药物残留问题被暴露在大众面前, 对整个产业造成严重打 击。2015年媒体再次报道山东等地大菱鲆体内检出违禁药 物硝基呋喃。农业农村部开展了"三鱼两药"专项整治活动, 其中就包括大菱鲆中硝基呋喃药物。大菱鲆中硝基呋喃类 药物残留在行业中备受关注, 其测定结果的准确性是关系 到监管执法有效实施的重要依据。

标准物质在实验室质量控制中具有非常重要的作用, 而标准物质基体的差异对检测结果有一定的影响<sup>[14,15]</sup>, 建立基体标准物质中药物残留高准确度定值方法,对于 保证检测结果的准确性至关重要<sup>[16-18]</sup>。基体标准物质候 选物取自天然基体,并按照标准物质的要求进行制备<sup>[17]</sup>。 大菱鲆鱼粉中呋喃唑酮代谢物 3-氨基-2-噁唑烷基酮 (3-amino-2-oxazolidinone, AOZ)残留基体标准物质是通过 养殖给药方式获得,目标物(AOZ)和基体(大菱鲆)结合形 式与真实样品完全一致,不仅可以有效避免基体效应对 目标物分析的影响,而且可以从时间上保存量值、在空间 上溯源量值,保证在不同时间与空间上 AOZ 检测结果的 一致性与可比性,是实现 AOZ 准确定量和溯源的物质基 础。建立大菱鲆鱼粉中 AOZ 的高准确定值方法是研制鱼 粉中硝基呋喃类代谢物残留基体标准物质的关键技术保 障。液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)是目前硝基呋喃类代谢物 检测的最主要确证方法<sup>[19-23]</sup>,但由于鱼粉经过冻干浓缩 加工等过程,与新鲜的样品基质相比,其复杂的基体效 应会对测定结果产生影响。

在整个食品检测分析过程中,给实验带来误差的原 因有 60%以上源自样品前处理过程,样品的前处理是食 品分析的关键和难点,成为现代分析方法开展的制约, 也越来越引起人们的重视<sup>[24]</sup>。因此本研究重点对大菱鲆 鱼粉中呋喃唑酮代谢物 AOZ 残留基体标准物质定值方法 的关键技术进行研究,通过对样品复水、提取和净化等样 品前处理条件进行控制和优化,建立了液相色谱-串联质 谱法测定大菱鲆鱼粉中 AOZ 残留基体标准物质的高准确 定值方法,以期为标准样品研制提供准确可靠的定值方 法。候选标准样品经过实验室验证后将形成标准样品,对 于开展检测方法的确证、实验室质量控制等工作具有非 常重要的意义。

# 2 材料与方法

#### 2.1 仪器与试剂

#### 2.1.1 仪器与设备

LC20 液相色谱仪(日本岛津公司); AB SCIEX 5500 液相色谱-质谱联用仪(配有 ESI 离子源, 美国 AB SCIEX 公司); BT 224S 分析天平(感量 0.0001 g, 德国赛多利斯集 团); CR 22G 高速离心机(日本日立公司); 1-14 微量高速离 心机(14000 r/min, 德国 Sigma 公司); 1-14 微量高速离 心机(14000 r/min, 德国 Sigma 公司); Standard Vortex Mixer 涡旋混合器(美国 Talboys 公司); Gradient A10 Mill-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司); N-EVAP 112 氮气 吹干仪(美国 Organomation 公司); IS-RDS3 恒温振荡器(美 国精骐有限公司)。

#### 2.1.2 材料与试剂

呋喃唑酮(纯度 > 98%, 上海阿达玛斯试剂有限公司); AOZ 标准品[纯度 99.3%, 不确定度 0.3%, 批号 261923(NF005), 德国 WiTEGA 公司]; AOZ-D<sub>4</sub>[纯度 99.2%, 不确定度 0.3%, 同位素丰度 >99%, 批号 292028(NF006), 德国 WiTEGA 公司]; 甲醇、乙酸乙酯、二甲亚砜、乙酸铵、2-硝基苯甲醛(色谱纯, 德国 Merck 公司); 盐酸、磷酸氢二钾(优级纯, 国药集团化学试剂有 限公司); 0.22 µm 水相滤膜(天津津腾公司)。

#### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 溶液配制

AOZ、AOZ-D₄标准溶液配制:分别准确称取 10 mg 的 AOZ、AOZ-D₄对照品到 10 mL 的容量瓶中,用甲醇配 成 1.0 mg/mL 外标和内标标准储备液,-20 ℃保存。分别量 取适量 AOZ、AOZ-D₄标准储备液置于棕色容量瓶中,用 甲醇逐级稀释成浓度为 100 ng/mL 标准工作液。

2.2.2 大菱鲆鱼粉标准物质的制备

大菱鲆鱼粉标准物质原料为大菱鲆肌肉组织,用绞肉机制成均匀的鱼糜,然后冷冻干燥,再用研磨机磨粉,过40目筛板,过筛后分装于棕色玻璃瓶中,利用放射性同位素 Co<sup>60</sup>-y 射线杀菌保存,用于标准物质的均匀性和稳定性检验及定值研究。

2.2.3 样品前处理

①水解和衍生化

称取试样约 0.5 g(准确到 0.001 g)于 50 mL 聚丙烯离 心管中,准确加入 1.5 mL 水,涡旋混合 1 min,准确加入内 标溶液 100 μL,涡旋混合 2 min,避光静置 30 min。再加入 5 mL 0.2 mol/L 盐酸溶液和 0.15 mL 0.05 mol/L 2-硝基苯甲 醛溶液,涡旋混合 1 min 后,置于恒温振荡器中 37 ℃ 避光 振荡 16 h。

②提取净化

取出离心管冷却至室温,加入 1.0 mol/L 磷酸氢二钾 溶液,调节 pH 至 7.25,加入乙酸乙酯 8 mL,涡旋振荡 1 min,8000 r/min 离心 5 min,取上层清液转移至 10 mL 玻 璃离心管中,于40 ℃ 下氮气吹干。准确加入 5%甲醇溶液 1.0 mL,充分涡旋振荡溶解残留物,再将溶液转移至 1.5 mL 离心管中,14000 r/min 离心 10 min,取下层清液过 0.22 μm 水相滤膜,供液相色谱-串联质谱仪分析。

③标准工作曲线的制作

精密量取 10 ng/mL 混合标准工作液 0.1、0.2 mL 和 100 ng/mL 混合标准工作液 0.05、0.1、0.2 和 0.4 mL 于 6 个 50 mL 离心管中,除不加样品外,按上述<sup>①</sup> 和<sup>②</sup> 步骤操 作,按 2.2.4 测定。以测得特征离子质量色谱峰外标和内标 峰面积比值为纵坐标,对应的标准溶液浓度(μg/L)为横坐 标,绘制标准曲线。

2.2.4 液相色谱-串联质谱条件

①液相色谱条件

Waters Xbridge C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 3.5 μm); 柱温: 35 °C; 进样量: 10 μL; 流速: 0.35 mL/min; 流动相: 0.002 mol/L 乙酸铵溶液(A)-甲醇(B); 液相色谱梯度洗脱程 序: 0~0.5 min, 10%B; 0.5~4.0 min, 10%~95%B; 4.0~5.5 min, 95%B; 5.5~6.0 min, 95%~10%B; 6.0~7.0 min, 10%B。

②质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(electron spray ionization, ESI), 正离子模式; 喷雾电压(ionspray voltage, IS): 5500 V; 离子 源温度(ion source temperature, TEM): 550 °C; 碰撞气 (collision activated dissociation, CAD): 中等; 气帘气 (curtain gas, CUR): 30 psi; 雾化气(nebulizing gas, Gas1): 35 psi; 辅助加热气(heater gas, Gas2): 35 psi; 去簇电压 (declustering potential, DP): 80 V; 射入电压(entrance potential, EP): 10 V; 碰撞室射出电压(collision cell exit potential, CXP): 10 V; 扫描模式: 多反应选择监测(multiple reaction monitoring, MRM), 选择反应监测母离子、子离子 和碰撞能量见表 1。

表 1 选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量 Table 1 Selected reaction monitoring of parent ion, daughter ion and collision energy

化合物	母离子 (m/z)	碎片离子 (m/z)	碰撞能量/V
NP-AOZ	226	104	29
	230	134*	15
NP-AOZ-D <sub>4</sub>	240	134*	16

注:\*为定量碎片离子。

# 3 结果与分析

## 3.1 色谱和质谱条件的优化

研究表明同位素内标不但可抵消质谱离子化时的基 质效应,还可消除样品前处理过程中的差异。本研究对 AOZ 及其同位素内标的质谱条件进行优化。取 AOZ 及其 同位素内标标准溶液进行衍生化处理,得到 NP-AOZ、 NP-AOZ-D4标准溶液。将该标准溶液通过针泵以流动注射 的方式进行全扫描,确定分子离子。在全扫描模式下,分 别进行正负离子扫描,结果显示 AOZ 和 AOZ-D4在正离子 模式下有较强的离子响应,硝基呋喃类药物含有氨基,容 易得到 H<sup>+</sup>而形成较为稳定的[M+H]<sup>+</sup>分子离子,所以选择 正离子扫描模式。以各自的分子离子峰为母离子,分别优 化去簇电压(DP)、射入电压(EP)、碰撞室射出电压(CXP) 和碰撞能量等质谱参数,使分子离子和特征碎片离子强度 达到最大。NP-AOZ 丰度最大的碎片离子为 m/z 134,次强 碎片离子为 m/z 104。NP-AOZ-D4 丰度最大的碎片离子为 *m/z* 134。以丰度最大的二级碎片离子作为定量离子,次强碎片离子作为定性离子,本方法中 NP-AOZ、NP-AOZ-D<sub>4</sub>的母离子、定性离子和定量离子及碰撞能量见表 1。

色谱分离及峰形的好坏对定量结果具有非常重要的 影响。本研究分别对不同流动相及比例、色谱柱等条件进 行优化。甲醇和乙腈都可用作有机相,但实验结果表明采 用甲醇作为有机相具有更高的响应。在正离子扫描模式下, 甲酸水溶液和乙酸铵水溶液均有助于提高 NP-AOZ 及其内 标的离子化效率,同时乙酸铵还具有改善峰形的作用,因 此本研究选取甲醇和乙酸铵分别作为流动相中的有机相和 水相。初始比例采用高水相,可以使 NP-AOZ 及其内标在 色谱柱上具有较好的保留,随后逐渐增加有机相的比例, 使目标物从色谱柱洗脱,并与杂质分离,进而进行检测。 此外,还比较了 Thermo Hypersil Gold C<sub>18</sub>、Agilent XDB C<sub>18</sub>、Waters X-bridge C<sub>18</sub>、Phenomenex Kinetex XB C<sub>18</sub>色谱柱,峰形更加尖锐对称,定量精准,最 终实验选择 Waters X-bridge C<sub>18</sub>色谱柱。

## 3.2 称样量和复水时间的确定及称样环境的控制

3.1.1 大菱鲆失水率的测定和称样量的确定

分别称量并记录大菱鲆肌肉冻干前后的质量,对失 水率进行考察,结果见表 2。

表 2 大菱鲆冻干鱼粉失水率 Table 2 Dehydration ratio of freeze-dried fish meal produced by turbot

样品名称	冻干前质量/kg	冻干后质量/kg	失水率/%
鱼粉 1	22.90	5.68	75.2
鱼粉 2	23.56	5.79	75.4

由表 2 可知, 鱼粉冻干后的失水率约为 75%。农业部 783 号公告-1-2006<sup>[25]</sup>、GB/T 21311-2007<sup>[26]</sup>、GB/T 20752-2006<sup>[27]</sup>、农业部 781 号公告-4-2006<sup>[28]</sup>等标准中规定称样量均为 2 g,大菱鲆冻干鱼粉的失水率按照 75%计算,则鱼粉的称样量选择 0.5 g。

称取 0.5 g大菱鲆鱼粉后,加入 1.5 mL 超纯水,充分 涡旋混合均匀,分别避光静置 10、20、30 min,结果表明, 避光静置 10 min,冻干鱼粉复水不充分,肉眼可见较多颗 粒物;避光静置 20 min,冻干鱼粉基本复水,偶见复水不 完全颗粒物;避光静置 30 min,冻干鱼粉充分复水,呈均 匀细腻鱼糜状。因此,选择复水时间为 30 min。

3.1.2 大菱鲆冻干鱼粉在不同环境条件下吸水率测定

大菱鲆冻干鱼粉样品在称量过程中吸水可能会影响 最后定值结果,为了评估其对测定结果的影响,实验分别 对不同湿度、不同暴露时间下大菱鲆冻干鱼粉吸潮情况进 行研究。

分别在 20 ℃、RH=33%, 22 ℃、RH=55%, 22 ℃、 RH=90%条件下, 称量约 0.5 g 样品, 分别记录样品、称量 舟、样品与称量舟的总质量。每半小时称量 1 次样品与称 量舟的总质量, 重复 3 次, 测量时间 240 min。根据样品质 量变化计算吸湿率, 结果见表 3。

从表 3 实验数据可知,环境湿度越大,对样品称量 质量的影响越大。大菱鲆肌肉冻干鱼粉在使用过程中,应 该在环境湿度为 33%及以下使用,在半小时内环境湿度 对样品称重的影响很小,对定值的影响也较小,可忽略 不计。

## 3.3 前处理条件优化

硝基呋喃代谢物的相对分子质量是在 75~201 之间, 在这一段质荷比范围内质谱背景干扰较大,且离子化效率 比较低,离子碎片不具备特征性,因此通常采用 2-硝基苯 甲醛作为衍生化试剂对自由氨基团进行衍生化,可取得较 好的效果。

表 3 不同环境条件下大菱鲆鱼粉的吸湿情况(n=3) Table 3 Moisture absorption of turbot fish meal in different environmental conditions (n=3)

时间/min -	20	0 °C, RH=33%		22 °C, RH=55%			22 °C, RH=90%		
	初始重量/g	吸湿值/g	吸湿率/%	初始重量/g	吸湿值/g	吸湿率/%	初始重量/g	吸湿值/g	吸湿率/%
30		0.0011	0.22	0.5077	0.0206	4.05	0.5017	0.0613	12.21
60		0.0056	1.12		0.0290	5.71		0.0731	14.58
90		0.0109	2.18		0.0341	6.72		0.0789	15.73
120	0.4089	0.0131	2.62		0.0377	7.43		0.0832	16.58
150	0.4988	0.0137	2.75		0.0392	7.73		0.0880	17.53
180		0.0148	2.97		0.0393	7.75		0.0912	18.19
210		0.0150	3.01		0.0407	8.01		0.0911	18.17
240		0.0155	3.10		0.0403	7.93		0.0905	18.04

中和试剂多采用 Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 溶液和 NaOH 溶液,后在实验过程中发现,采用 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶液调节溶液的 pH 值效果比较理想,且无需再使用 NaOH 溶液调节,简化了实验过程。同时对溶液中和后的 pH 值范围进行了实验研究,确定 AOZ 最佳提取 pH 值为 7.25。

分别以乙腈、乙酸乙酯和二氯甲烷作为提取溶剂,比 较其提取效果。结果发现乙酸乙酯和二氯甲烷的提取效果 较好,其中乙酸乙酯稍优于二氯甲烷。在提取过程中,乙 酸乙酯提取液在样品的上层,比较易于提取,而二氯甲烷 提取液在样品的下层,不利于提取,本研究采用乙酸乙酯 作为提取试剂。

液液萃取过程中,当离心转速选用常规的 4000 r/min 时,萃取液容易出现乳化现象,而当转速提高至 8000~10000 r/min时,可有效避免乳化现象的出现。乙酸乙 酯浓缩并复溶后的目标溶液,经过 14000 r/min高速离心净 化作用,脂类等干扰物质由于密度较低,处于液面的上层, 取下层清液过 0.22 μm 滤膜,操作既简便快捷,又可以避 免杂质干扰,取得较好的实验结果。

## 3.4 基质效应的考察

采用液质联用法在分析生物样品时通常存在基质效 应,基质效应是兽药残留检测中重要的影响因素之一,本 研究对基质效应进行了考察,结果见表4。

通过测定同浓度的基质提取液中 AOZ 和纯溶剂中 AOZ 的离子响应值, 计算二者比值以考察样品的基质效应 (*ME*), 计算公式为: *ME*=B/A, 其中, A 为 AOZ 在纯溶剂中 的峰面积, B 为 AOZ 在空白基质溶液中的峰面积。若*ME*<1, 说明基质会抑制分析物的响应; *ME*>1,则说明基质对分析 物的响应有增强作用; *ME*=1 表示不存在基质效应。

从表 4 可以看出, 同一浓度的 AOZ 在基质标准溶液 中的信号强度大于标准溶液中的信号强度, ME 值在 1.017~1.127 之间,具有弱基质增强效应。但是同一浓度标 准溶液中 AOZ 和基质溶液中 AOZ 与内标的比值基本一致, 以 AOZ 标准溶液浓度(μg/L)为横坐标, AOZ 外标与其内标 峰面积的比值为纵坐标进行拟合,则溶剂标准溶液曲线方 程为: *Y*=0.2663*X*+0.0153, *r*<sup>2</sup>=0.9998,基质匹配标准溶液曲 线方程为: *Y*=0.2696*X*+0.0054, *r*<sup>2</sup>=0.9998,基质匹配标准溶 液曲线方程斜率与溶剂标准溶液曲线方程斜率比 *SR*=1.012,由此可知,通过采用内标法定量能够克服基质 效应的影响,减少前处理过程对于结果定量的影响,采用 溶剂标准溶液绘制标准曲线,可对结果进行准确定量。

### 3.5 线性范围及检出限

分别配制 1.0、2.0、5.0、10、20 和 40 μg/L AOZ 系列 标准溶液,按照与样品相同的衍生化方式和提取净化方式 处理,并按照设定的色谱条件和质谱条件进样分析。以检 测到的 AOZ 与同位素内标的峰面积比为纵坐标,以 AOZ 的浓度(μg/L)为横坐标,进行线性回归。结果表明,AOZ 标 准溶液在 1.0~40 μg/L 浓度范围内线性良好,相关系数大 于 0.999。

测定方法的灵敏度是采用添加法进行实测的情况确定的。在空白样品中添加一定量的 AOZ 标准溶液,按照样品复水、水解和衍生化及提取和净化方法进行样品处理后,经过液相色谱-串联质谱法检测。当添加水平为 2.00 µg/kg时,其信噪比(*S/N*)大于 10,故本方法的定量限(limits of quantification, LOQ)为 2.00 µg/kg,见图 1。

### 3.6 回收率及精密度

本研究采用标准添加法,在空白大菱鲆冻干鱼粉样 品中添加 AOZ,添加浓度分别为 2.00、5.00、10.0、 20.0 µg/kg,每个浓度平行测定6次,计算样品的回收率和 批内相对标准偏差。按照同样方式进行3个重复批次的实 验,确定方法的回收率和相对标准偏差。测定结果见表5。

Table 4 Matrix effect of AOZ in turbot fish mean $(n-5)$									
浓度/ (µg/L)	溶剂标准溶液中 AOZ 峰面积(A)	基质标准溶液中 AOZ 峰面积(B)	B/A	溶剂标准溶液中内标 AOZ-D₄峰面积(A-IS)	基质标准溶液中内 标 AOZ-D₄峰面积 (B-IS)	A/(A-IS)	B/(B-IS)		
0.5	30658	32816	1.070	206164	233171	0.149	0.141		
1.0	70778	75533	1.067	242960	278965	0.291	0.271		
2.0	138087	144581	1.047	236675	245796	0.583	0.588		
5.0	358465	364430	1.017	273700	275041	1.310	1.325		
10	564708	636326	1.127	213021	238125	2.651	2.672		
20	1312774	1413503	1.077	244920	261035	5.360	5.415		

表 4 AOZ 在大菱鲆鱼粉基质中的基质效应(*n=*3) Table 4 Matrix effect of AOZ in turbot fish meal (*n=*3)



图 1 大菱鲆鱼粉中 AOZ 及其同位素内标特征离子质量色谱图 Fig.1 Characteristic ion mass chromatograms of AOZ and its isotope internal standard in turbot fish meal

添加浓度/(µg/kg)	批次	测定值/(μg/kg)					回收率/%	批内 RSD/%	批间 RSD/%	
	1	1.92	1.89	1.74	2.17	2.03	1.82	96.4	7.95	
2.00	2	1.94	1.82	2.12	2.25	1.93	1.77	98.6	9.24	7.58
3	3	2.15	1.92	2.11	1.84	1.86	1.98	98.8	6.53	
	1	4.65	5.27	5.27	4.36	5.45	5.12	100	8.42	
5.00	2	5.17	4.62	4.42	5.28	5.34	4.65	98.3	8.04	7.25
3	3	4.62	5.34	4.84	4.56	5.15	5.08	98.6	6.28	
	1	9.76	9.54	11.2	8.87	9.39	10.4	98.6	8.36	
10.0	2	8.47	9.74	9.53	10.5	9.34	8.92	94.2	7.42	8.03
3	3	9.71	10.6	9.35	8.29	9.46	10.6	96.7	9.00	
	1	10.8	8.75	9.45	9.61	9.18	10.1	96.5	7.47	
20.0	2	8.85	11.2	10.6	9.14	9.65	9.72	98.6	9.01	7.22
	3	9.64	10.7	9.37	9.92	10.5	9.26	99.0	5.99	

表 5 大菱鲆冻干鱼粉中添加 AOZ 的回收率(*n*=6) Table 5 Recoveries of AOZ in turbot freeze-dried fish meal (*n*=6)

本研究在 4 个浓度添加水平的回收率结果均在 94.2%~100%之间,说明方法具有良好的准确度。不同样品 在同一添加水平下平行测定 6次结果的相对标准偏差不超 过 10%,3个批次间的相对标准偏差也均不超过 10%,由此 表明该方法具有良好的精密度。

## 3.7 实际样品测定

采用上述建立的方法对大菱鲆鱼粉中呋喃唑酮代谢 物 AOZ 基体标准物质候选物进行测定,并邀请国内多家 省部级以上权威实验室合作定值。在定值过程中每家实验 室平行测定 3 瓶基体标准物质候选物,每瓶做 3 个平行, 测得基体标准物质候选物中 AOZ 含量为(7.0±0.6) μg/kg (*k*=2)。本实验室的测定结果为 7.33 μg/kg, 与标准值的相 对偏差仅为 2.3%。通过与权威实验室的比较,结果证明该 方法准确度高,精密度好,能够满足基体标准物质的定值 要求。

# 4 结 论

本研究优化了液相色谱和质谱仪器条件,测定了大 菱鲆鱼粉的失水率,确定了称样量、复水时间和称样的环 境条件,并对前处理提取和净化条件进行了优化,考察了 基质效应,建立了大菱鲆鱼粉中 AOZ 残留高准确度定值 方法,该方法具有良好的准确度和精密度,满足大菱鲆鱼 粉中 AOZ 残留基体标准物质高准确度定值要求。

### 参考文献

 刘素丽, 王宏伟, 赵梅, 等. 食品中基体标准物质研究进展[J]. 食品安 全质量检测学报, 2019, 10(1): 8–13.

Liu SL, Wang WH, Zhao M, et al. Research progress of matrix reference materials for food [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(1): 8–13.

[2] 李微微, 董新宇, 蒋君杰, 等. 生物标准物质研制面临的困难[J]. 中国 计量, 2018, (8): 84-85.

Li WW, Dong XY, Jiang JJ, *et al.* Difficulties in the development of biological reference materials [J]. Chin Metrol, 2018, (8): 84–85.

[3] 李秀琴, 逯海, 李红梅, 等. 食品安全化学计量技术与标准物质发展
[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(15): 3891–3896.
Li XQ, Lu H, Li HM, *et al.* Development of food safety chemical metrology technology and standard material [J]. J Food Saf Qual, 2018,

9(15): 3891-3896. [4] 张庆合. 食品安全标准物质研究动态[J]. 食品安全质量检测学报,

2018, 9(15): 3381–3382. Zhang QH. Advances in research on the certified reference materials of

food safety [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(15): 3381–3382.

[5] 杨方,余孔捷,李耀平,等.用于农、兽药残留分析的基体标准物质研究进展[J].化学分析计量,2009,18(3):82-85.

Yang F, Yu KJ, Li YP, *et al.* Study progress of matrix reference materials for pesticides and drug residues analysis [J]. Chem Anal Meter, 2009, 18(3): 82–85.

[6] 池敏. 牛肉中二噁英及其类似物标准物质的研制与应用[D]. 太原: 山

西医科大学, 2016.

Chi M. Development and application of reference material of dioxins in beef [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2016.

- [7] 程涛,田玉平. 食品类标准物质的发展[J]. 中国计量, 2012, (8): 80-81.
   Cheng T, Tian YP. Development of food reference materials [J]. Chin Metrol, 2012, (8): 80-81.
- [8] Heinz S, Ingrid Z. Performance criteria for reference measurement procedures and reference materials [J]. Clin Chem Lab Med, 2015, 53(6): 899–904.
- [9] Lesley J, Meg C, John M, *et al.* Preparation and characterisation of certified reference materials for furazolidone and nitrofurazone metabolites in prawn [J]. Accred Qual Assur, 2015, 20: 401–410.
- [10] 邢丽红,孙伟红,彭吉星,等. 液相色谱-串联质谱法测定贝类组织中 硝基呋喃类代谢物残留量[J]. 环境化学, 2019, 38(2): 287–296. Xing LH, Sun WH, Peng JX, et al. Determination of nitrofuran metabolites residues in shellfish tissues by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Environ Chem, 2019, 38(2): 287–296.
- [11] Radovnikovic A, Conroy ER, Gibney M, et al. Residue analyses and exposure assessment of the Irish population to nitrofuran metabolites from different food commodities in 2009–2010 [J]. Food Addit Contam: Part A, 2013, 30(11): 1858–1869.
- [12] Zhang XY, Liu JX, Jiang ZQ, *et al.* Molecularly imprinted polymer based chemiluminescence method for detection of nitrofurans [J]. Aust J Chem, 2019, 72(5): 375–382.
- [13] 中华人民共和国农业部公告第 193 号 食品动物禁用的兽药及其它化合物清单[S].
   Announcement No. 193 of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China-List of prohibited veterinary drugs and other compounds in food animals [S].
- [14] 纪洁,卢晓华.标准物质基体差异性对检测结果产生影响的探讨[J]. 中国计量,2010,(5): 80-81.

Ji J, Lu XH. Discussion on the influence of matrix difference of reference materials on test results [J]. Chin Metrol, 2010, (5): 80–81.

- [15] 周剑, 王敏, 杨梦瑞, 等. 两种样品处理方法对 LC-MS/MS 测定鸡肉中 金刚烷胺基质效应比较[J]. 分析科学学报, 2016, 32(4): 500–504. Zhou J, Wang M, Yang MR, *et al.* Comparasion of two pretreatment method on the matrix effects for the determination of amantadine in chicken by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Anal Sci, 2016, 32(4): 500–504.
- [16] 王根荣.标准物质的制备、定值及数据处理[J].上海计量测试, 2002, 29(4): 43-45.

Wang GR. Preparation, determination and data processing of reference materials [J]. Shanghai Measur Test, 2002, 29(4): 43–45.

[17] 李云巧. 无机成分基体标准物质常用定值技术及其应用[J]. 中国计量, 2009, (11): 71–74.

Li YQ. Commonly used fixed value technology and application of inorganic matrix reference materials [J]. Chin Metrol, 2009, (11): 71–74.

- [18] 付川,史乃捷,冯流星,等. 牛肝标准物质中氯含量的定值方法研究
  [J]. 计量学报, 2019, 40(6): 1129–1134.
  Fu C, Shi NJ, Feng LX, *et al.* Determination of chlorine in novine liver reference material [J]. Acta Metrol Sin, 2019, 40(6): 1129–1134.
- [19] Kaufmann A, Butcher P, Maden K, et al. Determination of nitrofuran and

chloramphenicol residues by high resolution mass spectrometry versus tandem quadrupole mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2015, 862: 41–52.

- [20] Verdon E, Couedor P, Sanders P. Multi-residue monitoring for the simultaneous determination of five nitrofurans (furazolidone, furaltadone, nitrofurazone, nitrofurantoine, nifursol) in poultry muscle tissue through the detection of their five major metabolites (AOZ, AMOZ, SEM, AHD, DNSAH) by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry in house validation in line with commission decision 657/2002/EC [J]. Anal Chim Acta, 2007, 586: 336–347.
- [21] Du NN, Chen MM, Sheng LQ, et al. Determination of nitrofuran metabolites in shrimp by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a new derivatization reagent [J]. J Chromatogr A, 2014, 1327: 90–96.
- [22] Zhang YB, Qiao HO, Chen C, et al. Determination of nitrofurans metabolites residues in aquatic products by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Chem, 2016, 192: 612–617.
- [23] Zhang ZW, Wu YP, Li XW, et al. Multi-class method for the determination of nitroimidazoles, nitrofurans, and chloramphenicol in chicken muscle and egg by dispersive-solid phase extraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Chem, 2017, 217: 182–190.
- [24] 段嫚雷,李兰英,李杰,等. 猪肉中磺胺类兽药残留基体标准物质高准确度定值方法[J]. 化学试剂, 2019, 41(3): 263–269.
  Duan ML, Li LY, Li J, *et al.* High accuracy certifying value method of matrix reference materials for sulfonamides residues in pork [J]. Chem Reag, 2019, 41(3): 263–269.
- [25] 农业部783号公告-1-2006 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[S].

Announcement No.783 of the Ministry of Agriculture-1-2006 Determination

of nitrofuran metabolic residues in aquatic products-LC-MS/MS method [S]. [26] 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[S]. GB/T 21311-2007 Determination of residues of nitrofuran metabolites in foodstuffs of animal origin-HPLC-MS/MS method [S].
- [27] 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[S]. GB/T 20752-2006 Method for the determination residues of the

metabolites of nitrofuran in pork, beef, chicken, porcine liver and aquatic products-LC-MS-MS method [S].

 [28] 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[S].
 Announcement No.781 of the Ministry of Agriculture-4-2006 Determination of nitrofuran metabolites in animal derived food-High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [S].

(责任编辑:于梦娇)

# 作者简介



邢丽红,工程师,主要研究方向为水 产品质量与安全。 E-mail: xinglh@ysfri.ac.cn

孙伟红, 高级工程师, 主要研究方向为 水产品质量与安全。 E-mail: sunwh@ysfri.ac.cn