

大菱鲆鱼粉中AOZ残留基体标准物质的研制

邢丽红,孙伟红*,姚琳,孙晓杰,李兆新

(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,
农业农村部水产品质量安全风险评估实验室(青岛),山东 青岛 266071)

摘要:本研究建立了大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)鱼粉中呋喃唑酮代谢物(AOZ)残留基体标准物质的制备方法。以大菱鲆为研制对象,通过药浴方式获得大菱鲆阳性基体标准物质原料样品。原料样品通过匀浆-冻干-制粉-过筛-混匀-封装-辐照灭菌等制备工艺,获得鱼粉中AOZ残留基体标准物质候选物。经过均匀性、稳定性检验,8家实验室合作定值以及不确定度评估,确定了2种大菱鲆冻干鱼粉中AOZ的特性值分别为 $(7.0 \pm 0.6) \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $(18.0 \pm 1.5) \mu\text{g}/\text{kg}$ ($k=2$)。获得的大菱鲆鱼粉基体标准物质的均匀性和稳定性良好,符合标准物质技术要求,定值结果可靠。该基体标准物质可用于水产品中AOZ残留检测,包括实验室内质量控制、实验室间能力验证及不同方法比对等工作。本方法为水产品中硝基呋喃类代谢物残留基体标准物质的制备提供了技术参考。[中国渔业质量与标准,2024,14(6):10-19]

关键词:大菱鲆;鱼粉;呋喃唑酮代谢物;AOZ;基体标准物质

中图分类号:S94

文献标志码:A

文章编号:2095-1833(2024)06-0010-10

硝基呋喃类药物是人工合成的具有5-硝基呋喃结构的广谱抗菌药物,主要包括呋喃唑酮、呋喃西林、呋喃它酮和呋喃妥因等^[1-3]。该类物质可以对细菌体内的氧化还原系统进行干扰,有效抑制革兰氏细菌,预防和治疗此类细菌引起的肠胃道疾病,在水产养殖业中曾被广泛使用^[4]。研究表明,该类物质半衰期很短,在动物体内能迅速代谢,而与蛋白结合的代谢物能产生稳定的残留^[5-7],具有潜在的致畸、致癌和诱导机体产生突变的作用^[1-2,4-6,8]。出于安全性考虑,欧盟、美国等发达国家和组织先后颁布了禁止使用该类药物^[9-10],中国农业农村部第250号公告《食品动物中禁止使用的药品及其他化合物清单》明确禁止使用硝基呋喃类广谱抗菌药物^[11]。根据欧盟(EU)2019/1871法规要求,自2022年11月28日起,动物源性食品中硝基呋喃类代谢物的测定限值将执行 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的新标准^[12]。

硝基呋喃类药物由于价格低廉、疗效好,在水产养殖中存在违禁使用的现象^[6-7]。近年来中国水产品质量安全监测结果显示,硝基呋喃类代谢物仍有一定程度检出。在检出的硝基呋喃类代谢物

中,大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)中硝基呋喃类代谢物残留是中国水产品质量安全较为突出的问题之一,而呋喃唑酮代谢物(AOZ)是不合格的主要参数^[13-15]。因此监测水产品中硝基呋喃类代谢物和保证检测结果的准确性至关重要。

标准物质在分析检测领域质量控制中发挥着非常重要的作用,用以确保检测方法以及检测数据的可靠性、可比性和可溯源性^[16-19]。水产样品基质复杂,在药物残留检测中,基质效应对检测结果的准确性影响较大。运用标准物质样品对检测过程和结果进行质量控制和校准是最为有效的手段,且相关产品已商品化^[16,19-20]。目前中国水产品药物残留检测方面的基体标准物质与实际需求还存在较大缺口。杨方等^[21]研制了鳗鲡(*Anguilla japonica*)肌肉冻干粉中AOZ残留标准物质,目前尚无大菱鲆鱼粉中AOZ残留基体标准物质。本研究研制了两种不同浓度的以大菱鲆为基体的AOZ残留基体标准物质,为保障水产品中硝基呋喃类代谢物残留检测结果的准确性,打击禁用药物违规使用行为提供了有力技术支撑。

收稿日期:2023-12-19;**接收日期:**2025-03-04

资助项目:国家自然科学基金项目(41806148);浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室、温州市海洋生物遗传育种重点实验室联合开放基金(J2021003)

第一作者:邢丽红(1981-),女,硕士,副研究员,研究方向为水产品质量与安全,E-mail: xinglh@ysfri.ac.cn

通信作者:孙伟红,高级工程师,主要从事水产品质量与安全方向的研究,E-mail: sunwh@ysfri.ac.cn

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

鲜活大菱鲆,购自海阳市黄海水产有限公司,约0.75 kg/尾,于海阳市黄海水产有限公司养殖实验基地暂养备用。

呋喃唑酮原药(纯度>98%,上海阿达玛斯试剂有限公司),AOZ纯度标准物质GBW10079(中国计量科学研究院,纯度为98.8%,不确定为0.5%)、AOZ-D₄标准品(Witega公司,纯度99.2%,不确定度0.3%);甲醇、乙酸乙酯、乙酸铵、二甲亚砜(色谱纯,德国Merck公司),二硝基苯甲醛(Sigma公司),磷酸氢二钾、盐酸(优级纯,国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

LC20液相色谱仪,日本岛津公司;AB 5500液相色谱-串联质谱仪(配电喷雾离子源),美国AB SCIEX公司;分析天平(感量0.01 mg),德国赛多利斯集团;高速离心机(6 000 r/min),美国Thermo Fisher公司;离心机(14 000 r/min),德国Sigma公司;涡旋混合器,美国Talboys公司;超声波清洗仪,昆山市超声仪器有限公司;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;药浴池为长方形养殖缸,长70 cm,宽50 cm,高30 cm;beta1-8 ldplus冷冻干燥机,德国Marin Christ公司。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液配制

AOZ标准储备液:准确称取10.12 mg(精确到0.01 mg)AOZ标准品,用甲醇溶解并定容至10 mL棕色容量瓶中,配制成浓度为1.0 mg/mL的AOZ储备液。

AOZ标准中间液:准确移取1.0 mL AOZ标准储备液,用甲醇稀释并定容至100 mL棕色容量瓶,配制成10 μg/mL标准中间液。

AOZ标准工作液:准确移取适量10 μg/mL标准中间液,用水稀释并定容,配制浓度为100 ng/mL和10 ng/mL标准工作液。

AOZ-D₄内标标准储备液:准确称取10.10 mg(精确到0.01 mg)AOZ-D₄标准品,用甲醇溶解并定容至10 mL棕色容量瓶中,配制成浓度为1.0 mg/mL的AOZ-D₄同位素内标标准储备液。

AOZ-D₄内标标准中间液:准确移取1.0 mL AOZ-D₄标准储备液,用甲醇稀释并定容至100 mL棕色容量瓶,配制成10 μg/mL内标标准中间液。

AOZ-D₄内标标准工作液:准确移取适量10 μg/mL标准中间液,用水稀释并定容,配制成100 ng/mL标准工作液。

1.3.2 AOZ残留分析方法

参照农业部783号公告-1-2006^[22]和GB 31656.13-2021^[23]并进行优化改进,具体方法如下:

(1)样品前处理方法

水解和衍生化:称取试样约0.5 g(精确到0.001 g)于50 mL聚丙烯离心管中,准确加入1.5 mL水,涡旋1 min,准确加入内标溶液100 μL,涡旋2 min,静置30 min。再加入5 mL 0.5 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。

提取净化:取出离心管冷却至室温,加入1.0 mol/L磷酸氢二钾溶液约5 mL,调节pH至7.25,加入乙酸乙酯8 mL,涡旋振荡1 min,6 000 r/min离心5 min,取上层清液转移至10 mL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,10 000 r/min离心10 min,取下层清液过0.22 μm滤膜,供液相色谱-串联质谱仪分析。

(2)标准工作曲线的制作

精密量取10 ng/mL标准工作液0.1 mL、0.2 mL和100 ng/mL标准工作液0.05 mL、0.10 mL、0.20 mL和0.4 mL于6个50 mL离心管中,除不加样品外,按上述步骤(1)操作,按步骤(3)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为横坐标,绘制标准曲线。

(3)液相色谱条件

Waters X-bridge C₁₈色谱柱(150 mm×2.1 mm, 3.5 μm);柱温:35℃;进样量:10 μL;流动相:A为0.002 mol/L乙酸铵溶液,B为甲醇;梯度洗脱程序见表1。

表1 流动相梯度洗脱程序

Tab.1 Mobile phase gradient elution procedure

时间/h Time	流速/(mL·min ⁻¹)	A/%	B/%
	Flow speed		
0.50	0.35	90	10
4.00	0.35	5	95
5.50	0.35	5	95
6.00	0.35	90	10
7.00	0.35	90	10

(4) 质谱参考条件

离子源:电喷雾离子源(ESI),正离子模式;喷雾电压(IS):5 500 V;离子源温度(TEM):550 ℃;碰撞气(CAD):Medium;气帘气(CUR):30 psi;雾化器(Gas1):35 psi;辅助加热气(Gas2):35 psi;去簇电压(DP):80 V;射入电压(EP):10 V;碰撞室射出电压(CXP):10 V;扫描模式:多反应选择监测(MRM),选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量见表2。

表2 选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量

Tab.2 Selection reaction monitoring parent ions, daughter ions, and collision energy

化合物 Compounds	母离子 m/z Parent ion	碎片离子 Fragment ion	碰撞能量/V Collision
NP-AOZ	236	104	29
		134 *	15
NP-AOZ-D ₄	240	134 *	16

注:*为定量碎片离子

1.3.3 阳性基质的制备

从海阳市黄海水产有限公司购买大菱鲆成鱼200尾,统一集中暂养1周,所用大菱鲆饲料、水体及大菱鲆肌肉组织经检测均无AOZ药物残留。待养殖稳定后,开始进行药浴实验。将大菱鲆随机分为A、B两组,每组各100尾。药浴时,将各组大菱鲆随机分别放入10个养殖缸中,每个养殖缸10尾鱼,进行大菱鲆药浴养殖实验。A组呋喃唑酮药浴浓度100 ng/mL,B组呋喃唑酮药浴浓度250 ng/mL,两组药浴时间均为2 h。

停药后,取出大菱鲆,用自来水将表面残留的药物冲洗干净。分别取各组大菱鲆肌肉组织样品,并于-20 ℃条件下冷冻保存。本研究分别以A组(低浓度)和B组(高浓度)药浴获得的大菱鲆肌肉组织作为基体标准物质原料。

1.3.4 标准物质样品的制备

通过开展大菱鲆药浴养殖,共获得两个浓度水平的AOZ残留阳性原料各约25 kg,预处理后冷冻保存。将冷冻保存原料肉样,置于常温下解冻,先将大菱鲆肌肉组织切成约1 cm³大小的肉块,然后进行组织匀浆。将匀浆好的标准物质原料肉样,均匀平铺于清洗干净的冷冻干燥盘中,在-20 ℃冰箱中预冻后,将其放入冷冻干燥机中冷冻干燥。将冷冻干燥后的

原料肉样,粉碎成5 cm³的小块,再用研磨机进行磨粉,过40目筛板后,对样品进一步混匀。然后采用带有密封内盖的棕色玻璃瓶进行样品的分装,每个包装单元按照每瓶5 g冻干粉分装,共分装500瓶。封装时充氮气保护,加盖密封并用铝袋真空封口包装。最后利用放射性同位素Co⁶⁰的 r -射线辐照灭菌,-20 ℃冷冻避光保存。

1.3.5 样品均匀性检验

根据JJF 1343—2022^[24]和JJF 1006—1994^[25]的要求对样品进行均匀性检验。按照整个封装过程的前、中、后随机抽取20个包装单元,每个随机抽取的包装单元取3个平行,采用1.3.2的分析方法进行样品测定。结果采用方差分析法进行统计分析,通过比较 F 检验值与 F 临界值的大小来判断。

1.3.6 样品稳定性检验

根据JJF 1343—2022^[24]和JJF 1006—1994^[25]的要求对样品进行长期稳定性和短期稳定性检验。标准物质稳定性考察按照先密后疏的原则进行。

长期稳定性检验:将随机抽取的标准物质样品置于-20 ℃保存,分别在第0、1、3、6、9个月时,每次随机抽取3个包装单元,测量方法按照1.3.2操作。

短期稳定性检验:将随机抽取的标准物质样品分别置于-20 ℃、4 ℃、25 ℃条件下保存,分别在第0、3、6、9、12、15 d各随机抽取3个包装单元,测量方法按照1.3.2操作。

以3个包装单元测量结果的平均值作为稳定性检测结果,并对结果进行统计分析。

1.3.7 样品定值

参照标准JJF 1343—2022^[24]和CNAS-GL017^[26],本研究采用同一种方法多个实验室合作定值的方式对标准物质进行定值。选取的8家实验室是在行业内具有相关资质的、专业的、权威的实验室,每个实验室随机发放3个样品,每个样品做3个平行。所有检测数据经狄克逊准则(Dixon Criterion)与科克伦(Cochran)检验后,数据等精度、无界外值,取平均值定值。

1.3.8 不确定度评定

大菱鲆鱼粉中呋喃唑酮代谢物AOZ残留基体标准物质样品定值结果的不确定度由4部分组成:即标准物质定值引入的不确定度 u_{char} 、标准物质的均匀性引入的不确定度 u_{hb} 、标准物质长期稳定性引入的不确定度 u_{ls} 、标准物质短期稳定性引入的不确定度 u_{sts} 。

2 结果

2.1 药浴浓度的确定

呋喃唑酮进入鱼体内可快速代谢生成呋喃唑酮代谢物 AOZ^[27],为了确认本实验条件下药浴后大菱鲆体内 AOZ 残留量与呋喃唑酮药浴浓度的关系,本研究采用初始浓度为 1 μg/mL 的呋喃唑酮药浴溶液进行预试验,由预试验得到大菱鲆肌肉组织中 AOZ 残留量为 13.89 μg/kg。则在本实验条件下,得到 AOZ 残留量与呋喃唑酮药浴浓度关系式为 $y = 13.89x$,其中, x 为呋喃唑酮药浴浓度(μg/mL), y 为 AOZ 残留量(μg/kg)。

GB 31656.13—2021 规定了 AOZ 的检出限为 0.5 μg/kg,根据检测工作质量控制的要求,预期制备可食新鲜肌肉组织中浓度分别为 1.5 μg/kg(3 倍检出限)和 3.5 μg/kg(7 倍检出限)的 AOZ 基体标准物质(以下简称标准物质 A 和标准物质 B),呋喃唑酮药浴浓度按照 $y = 13.89x$ 进行估测。期望制备 1.5 μg/kg 的标准物质 A 原料,由公式计算可知,呋

喃唑酮药浴浓度为 100 ng/mL,由于大菱鲆的个体差异,药浴后所得阳性大菱鲆肌肉组织,采用 GB 31656.13—2021 方法测得 AOZ 残留量在 1.16 ~ 1.74 μg/kg。期望获得 3.50 μg/kg 的标准物质 B 原料,由公式计算可知,呋喃唑酮药浴浓度为 250 ng/mL,药浴后所得阳性大菱鲆肌肉组织,采用 GB 31656.13—2021 方法测得 AOZ 残留量在 3.41 ~ 4.44 μg/kg。由此可知,分别采用 100 ng/mL 和 250 ng/mL 呋喃唑酮溶液进行药浴,可获得预期浓度的大菱鲆中 AOZ 残留基体标准物质原料。以此为原料,按照 1.3.4 的步骤操作即可分别制备获得基体标准物质样品 A 和基体标准物质样品 B。

2.2 最小取样量研究

最小取样量即在规定的分析测试条件下,保证标准物质均匀性的最少样品量。本研究针对两个浓度水平的大菱鲆鱼肉粉中 AOZ 残留基体标准物质候选物开展了 100 mg、200 mg、300 mg、400 mg、500 mg、600 mg、700 mg、800 mg 等不同取样量实验,每个取样量 5 个平行,从而确定标准物质的最小取样量,结果分别见表 3。

表 3 鱼肉粉中 AOZ 残留基体标准物质的最小取样量结果($n=5$)

Tab.3 Results of minimum sampling size of AOZ residual matrix reference materials in fish meal

名称 name	平均值及相对标准偏差 Mean and relative standard deviation	测定结果 Results							
		100 mg	200 mg	300 mg	400 mg	500 mg	600 mg	700 mg	800 mg
标准物质 A	平均值(μg/kg)	7.08 ± 0.88	7.07 ± 0.70	7.09 ± 0.46	7.04 ± 0.41	7.08 ± 0.32	7.00 ± 0.28	6.98 ± 0.28	7.02 ± 0.27
	RSD (%)	12.36	9.87	6.53	5.75	4.59	4.05	4.03	3.89
标准物质 B	平均值(μg/kg)	17.98 ± 2.34	17.94 ± 1.81	18.22 ± 1.11	18.08 ± 0.93	18.13 ± 0.81	17.94 ± 0.79	18.12 ± 0.72	18.01 ± 0.70
	RSD (%)	12.36	9.87	6.53	5.75	4.59	4.05	4.03	3.89

参照 JJF 1343—2022 中 5.11.3 的规定,结合以上试验结果,在取样量大于 500 mg 时,取样量对重复性标准偏差没有影响,样品均匀性良好。同时,综合考虑冻干过程 75% 失水率以及现有检测标准方法中 2 g 的鲜样取样量,本标准物质采用 500 mg 取样量作为大菱鲆鱼肉粉中 AOZ 残留成分标准物质的最小取样量。

2.3 均匀性研究

根据 JJF 1343—2022^[24] 和 JJF 1006—1994^[25] 的要求对标准物质进行均匀性检验。记总体单元数为 N ,当 $200 < N \leq 500$ 时,抽样单元数不少于 15 个。因此,本研究按照整个封装过程的前、中、后随即抽取 20 个包装单元,随机抽取的样品从 1 到 20 编号,每个随机抽取的单元平行测定 3 次。均匀性检验取样 500 mg,按照 1.3.2 的方法处理样品,结果采用方差

分析法进行统计分析,通过比较 F 检验值与 F 临界值的大小来判断。

标准物质 A 和标准物质 B 鱼肉粉中 AOZ 残留成分特性量值均匀性检验测定结果及数据统计分析结果见表 4。

方差分析结果表明 $F < F_{0.05}(19, 40)$,其 P -value 均大于 0.05,表明显著水平 $\alpha = 0.05$ 时,其结果均未见显著差异,从而可以判定所研制的基体标准物质是均匀的。

2.4 稳定性研究

稳定性是研制生物类标准物质的最关键指标,大菱鲆肌肉含有丰富的蛋白质、脂肪等营养物质,且水分含量高,在常温条件下很容易受微生物的影响发生变质。本研究使用冷冻干燥技术得到含呋喃唑酮代谢物 AOZ 的大菱鲆鱼粉,利于长期保存和运输,还可

快速复溶,便于使用。 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照杀菌是一种特殊的“冷加工”技术,它可以在常温下杀灭细菌, γ 射线能量高、穿透力强,在杀菌的同时,不会引起水产品内部温度的升高,能够最大限度的保持样品原有的特性。本研究对标准物质原料样品采用 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照灭菌,辐照后样品中AOZ的浓度未出现显著降低。灭菌后的样品置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰柜冷冻保存。

表4 鱼肉粉中AOZ残留基体标准物质的均匀性检验结果

Tab.4 Homogeneity test results of AOZ residual matrix reference materials in fish meal $n=3$

编号 number	标准物质 A 平均值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Mean value standard substance A	标准物质 B 平均值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Mean value standard substance B
1	7.01 ± 0.14	18.22 ± 0.19
2	7.08 ± 0.16	17.90 ± 0.27
3	7.12 ± 0.15	17.85 ± 0.21
4	7.03 ± 0.15	18.13 ± 0.18
5	6.87 ± 0.15	17.79 ± 0.30
6	7.10 ± 0.17	18.24 ± 0.31
7	7.10 ± 0.16	17.74 ± 0.39
8	6.91 ± 0.16	17.94 ± 0.22
9	6.97 ± 0.15	18.17 ± 0.26
10	7.11 ± 0.17	18.04 ± 0.24
11	7.10 ± 0.16	17.88 ± 0.30
12	6.99 ± 0.13	17.83 ± 0.35
13	6.94 ± 0.12	18.02 ± 0.31
14	6.90 ± 0.17	18.29 ± 0.27
15	7.07 ± 0.15	17.80 ± 0.29
16	6.89 ± 0.14	17.91 ± 0.26
17	7.08 ± 0.18	18.14 ± 0.34
18	6.88 ± 0.16	18.26 ± 0.31
19	7.02 ± 0.06	17.76 ± 0.31
20	7.03 ± 0.09	18.10 ± 0.23
总平均	7.01	18.00
总标准偏差	0.15	0.18
$S_1^2 \delta$	0.022 42	0.099 11
$S_2^2 \delta$	0.021 76	0.079 25
F	1.03	1.25
$F_{0.05}(19,40)$	1.84	1.84
结论	$F < F_{\alpha}(v_1, v_2)$, 原料样品均匀	$F < F_{\alpha}(v_1, v_2)$, 原料样品均匀

2.4.1 短期稳定性

根据JJF 1343—2022^[24]和JJF 1006—1994^[25]的要求,标准物质短期稳定性考察主要评价标准物质在运输过程中特性量值受环境温度变化而产生的影响。本研究将随机抽取的样品分别置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存(模拟运输条件),分别在第0、3、6、9、12、15 d进行稳定性监测。模拟运输过程对标准物质样品进行研究,在上述保存条件下,标准物质样品在外观上未出现涨袋、吸潮、样品变质等异常状态。检测数据采用 t 检验结果表明:在显著水平 $\alpha=0.05$ 时, $|b_1| < t_{0.95, n-2} \cdot s(b_1)$,其结果均未见显著差异,从而可以判定所研制的自然基体标准物质在短期是稳定的,满足实际运输要求。两个浓度水平的鱼肉粉中AOZ残留基体标准物质短期稳定性监测结果见表5。

2.4.2 长期稳定性

根据JJF 1343—2022^[24]和JJF 1006—1994^[25]的要求,标准物质稳定性考察按照先密后疏的原则进行。因此,本研究分别在第0、1、3、6、9个月开展长期稳定性检测研究。每次随机抽取3个包装单元。两个浓度水平的鱼肉粉中AOZ残留基体标准物质的长期稳定性检测结果见表6。

由表6可知,两个浓度水平的鱼肉粉中AOZ残留基体标准物质在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存条件下,吡喃唑酮代谢物AOZ量值9个月的稳定性监测结果表明,在显著水平 $\alpha=0.05$ 时, $|b_1| < t_{0.95, n-2} \cdot s(b_1)$,其结果均未见显著差异,因此本标准物质在9个月内特性量值稳定可靠。

2.5 定值

根据JJF 1343—2022^[24]和CNAS-GL017^[26]的要求,标准物质定值有多种方式,既可以采用两种不同原理的方法同时定值,也可以采用一种方法多家实验室联合定值的方式等。对于复杂基体标准物质,一般难以满足两种不同原理方法进行定值,而是通常采用一种或多种可证明其准确度的方法,多家实验室联合定值的方式。关于吡喃唑酮代谢物AOZ残留量的测定方法,目前国内外通用的是采用液相色谱-串联质谱法进行分析。因此本研究对大菱鲆冻干鱼粉中AOZ残留基体标准物质的定值方式,采用本研究1.3.2所述的液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)作为测量方法,8家实验室联合定值。鱼肉粉中AOZ残留基体标准物质的联合定值结果见表7-8,数据统计分析分别采用狄克逊和科克伦检验。

表5 鱼肉粉中AOZ残留基体标准物质的短期稳定性结果

Tab.5 Short-term stability results of AOZ residual matrix reference materials in fish meal

时间/d Time	标准物质 A/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Standard substance A			标准物质 B/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Standard substance B		
	-20 °C	4 °C	25 °C	-20 °C	4 °C	25 °C
0	7.01 ± 0.09	6.97 ± 0.12	7.05 ± 0.13	17.86 ± 0.16	17.85 ± 0.24	17.82 ± 0.31
3	6.94 ± 0.13	7.01 ± 0.11	6.96 ± 0.12	17.78 ± 0.12	17.66 ± 0.12	17.60 ± 0.18
6	7.09 ± 0.06	6.85 ± 0.12	6.82 ± 0.12	17.92 ± 0.10	17.84 ± 0.09	17.77 ± 0.19
9	6.97 ± 0.18	6.94 ± 0.12	6.79 ± 0.10	17.84 ± 0.20	17.69 ± 0.20	17.63 ± 0.20
12	6.95 ± 0.13	6.84 ± 0.17	6.81 ± 0.13	17.75 ± 0.21	17.70 ± 0.17	17.57 ± 0.29
15	7.06 ± 0.10	6.98 ± 0.12	6.87 ± 0.14	17.83 ± 0.20	17.64 ± 0.22	17.54 ± 0.16
b_1	0.001 52	-0.003 52	-0.013 14	-0.003 05	-0.010 29	-0.015 5
b_0	6.992	6.958	6.981 9	17.852 9	17.807	17.771
s^2	0.004 59	0.005 78	0.006 18	0.004 13	0.006 33	0.006 65
$s(b_1)$	0.005 4	0.006 1	0.006 3	0.005 1	0.006 3	0.006 50
$t_{0.95,n-2}$	2.78	2.78	2.78	2.78	2.78	2.78
$t_{0.95,n-2} \cdot s(b_1)$	0.015 01	0.016 84	0.017 42	0.014 2	0.017 6	0.018 1
结论	$ b_1 < t_{0.95,n-2} \cdot s(b_1)$, 稳定	$ b_1 < t_{0.95,n-2} \cdot s(b_1)$, 稳定	$ b_1 < t_{0.95,n-2} \cdot s(b_1)$, 稳定	$ b_1 < t_{0.95,n-2} \cdot s(b_1)$, 稳定	$ b_1 < t_{0.95,n-2} \cdot s(b_1)$, 稳定	$ b_1 < t_{0.95,n-2} \cdot s(b_1)$, 稳定

表6 鱼肉粉中AOZ残留基体标准物质的长期稳定性结果

Tab.6 Long-term stability results of AOZ residual matrix reference materials in fish meal

n=3

时间/M Time	标准物质 A/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Standard substance A	标准物质 B/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Standard substance B
0	6.94 ± 0.22	18.74 ± 0.61
1	6.94 ± 0.14	18.19 ± 0.47
3	7.00 ± 0.19	17.94 ± 0.37
6	7.02 ± 0.15	17.99 ± 0.31
9	6.94 ± 0.18	18.06 ± 0.36
b_1	0.0023	-0.0082
b_0	6.957	18.083
s^2	0.00199	0.0106
$s(b_1)$	0.0060	0.0139
$t_{0.95,n-2}$	3.18	3.18
$t_{0.95,n-2} \cdot s(b_1)$	0.0192	0.0442
结论	$ b_1 < t_{0.95,n-2} \cdot s(b_1)$, 稳定	$ b_1 < t_{0.95,n-2} \cdot s(b_1)$, 稳定

表 7 冻干鱼肉粉中 AOZ 残留基质标准物质 A 合作定值结果及统计检验结果

Tab. 7 Results of multiple collaborations on AOZ residue matrix reference materials A in fish meal and statistical test results

编号 Number	实验室 1 Laboratory 1	实验室 2 Laboratory 2	实验室 3 Laboratory 3	实验室 4 Laboratory 4	实验室 5 Laboratory 5	实验室 6 Laboratory 6	实验室 7 Laboratory 7	实验室 8 Laboratory 8
1-1	7.71	6.95	7.90	6.86	7.60	6.64	7.37	7.28
1-2	7.48	6.40	7.72	7.30	6.59	6.82	7.30	7.43
1-3	7.22	6.21	8.10	6.56	6.68	6.32	7.36	7.02
2-1	7.50	6.51	7.94	6.34	6.94	6.34	7.30	6.81
2-2	7.32	6.44	7.68	6.88	6.91	6.60	7.18	7.12
2-3	7.19	6.75	7.73	6.52	6.69	6.78	7.19	7.55
3-1	7.51	6.57	7.64	6.64	7.02	6.30	7.13	6.67
3-2	7.26	6.01	7.82	6.66	7.21	6.60	7.37	6.86
3-3	6.97	6.46	7.76	7.02	7.26	7.12	7.29	6.61
平均值/ $\mu\text{g}/\text{kg}$	7.35	6.48	7.81	6.75	6.99	6.61	7.28	7.04
标准偏差/ $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.22	0.27	0.15	0.29	0.33	0.27	0.09	0.33
总平均值/ $\mu\text{g}/\text{kg}$				7.000				
标准偏差/ $\mu\text{g}/\text{kg}$				0.440				
r_1				0.153 4				
r_2				0.111 1				
$f(0.05, 72)$				0.309 0				
C				0.200 6				
$C(0.05, 8, 8)$				0.304 3				

表 8 冻干鱼肉粉中 AOZ 残留基质标准物质 B 合作定值结果及统计检验结果

Tab. 8 Results of multiple collaborations on AOZ residue matrix reference materials B in fish meal and statistical test results

编号 Number	实验室 1 Laboratory 1	实验室 2 Laboratory 2	实验室 3 Laboratory 3	实验室 4 Laboratory 4	实验室 5 Laboratory 5	实验室 6 Laboratory 6	实验室 7 Laboratory 7	实验室 8 Laboratory 8
1-1	17.7	17.0	19.5	16.2	20.9	17.6	17.6	18.2
1-2	18.2	16.6	19.3	17.1	21.5	16.8	17.7	16.6
1-3	18.6	16.3	19.2	17.5	21.0	17.3	17.6	17.9
2-1	18.5	16.2	19.2	16.3	20.8	17.2	17.3	17.0
2-2	18.6	16.2	19.3	16.0	20.3	17.3	17.4	17.1
2-3	19.6	16.5	19.4	17.2	20.6	17.2	17.3	17.1
3-1	18.7	16.3	19.1	16.9	20.0	17.5	17.2	18.3
3-2	19.5	16.2	18.9	16.5	21.2	17.2	17.2	17.7
3-3	18.0	16.3	18.9	16.3	20.9	17.2	17.5	17.6
平均值/ $\mu\text{g}/\text{kg}$	18.6	16.4	19.2	16.7	20.8	17.3	17.4	17.5
标准偏差/ $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.63	0.26	0.21	0.52	0.45	0.22	0.19	0.58
总平均值/ $\mu\text{g}/\text{kg}$				18.0				
标准偏差/ $\mu\text{g}/\text{kg}$				1.5				
r_1				0.040 0				
r_2				0.094 3				
$f(0.05, 72)$				0.309				
C				0.280 2				
$C(0.05, 8, 8)$				0.304 3				

采用狄克逊准则对合作定值数据进行统计检验, r_1 和 r_2 均小于 $f(0.05, 72)$, 故全部数据均应保留。同时, 8家合作定值实验室均采用液相色谱-质谱方法作为定值方法, 属于同等精度方法; 进而采用科克伦(Cochran)准则进行检验, $C < C(0.05, 8, 8)$, 无可疑数据。经过狄克逊和科克伦检验法检验, 鱼肉粉中AOZ残留基体标准物质的合作定值结果数据等精度、无界外值, 均符合定值要求。

表9 不确定度评定结果

Tab. 9 Uncertainty evaluation results

不确定度来源 Source of uncertainty	标准物质 A Standard substance A		标准物质 B Standard substance B	
	不确定度/ $\mu\text{g}/\text{kg}$	相对不确定度/%	不确定度/ $\mu\text{g}/\text{kg}$	相对不确定度/%
定值	$u_{\text{char}} = 0.240$	$u_{\text{char,rel}} = 3.41$	$u_{\text{char}} = 0.700$	$u_{\text{char,rel}} = 3.89$
均匀性	$u_{\text{bb}} = 0.0148$	$u_{\text{bb,rel}} = 0.212$	$u_{\text{bb}} = 0.0814$	$u_{\text{bb,rel}} = 0.45$
长期稳定性	$u_{\text{ls}} = 0.054$	$u_{\text{ls,rel}} = 0.767$	$u_{\text{ls}} = 0.125$	$u_{\text{ls,rel}} = 0.695$
短期稳定性	$u_{\text{sts}} = 0.0945$	$u_{\text{sts,rel}} = 1.342$	$u_{\text{sts}} = 0.0975$	$u_{\text{sts,rel}} = 0.542$
合成不确定度	$u_{\text{CRM}} = 3.75\%$		$u_{\text{CRM}} = 4.02\%$	
相对扩展不确定	$U_{\text{CRM,rel}} = 7.5\%$		$U_{\text{CRM,rel}} = 8.1\%$	
扩展不确定度	$U_{\text{CRM}} = 0.6 \mu\text{g}/\text{kg}$		$U_{\text{CRM}} = 1.5 \mu\text{g}/\text{kg}$	

综合定值和不确定度评定结果, 大菱鲈鱼粉中呋喃唑酮代谢物AOZ残留基体标准物质的特性值分别为 $7.0 \pm 0.6 \mu\text{g}/\text{kg}$, $k=2$ 和 $18.0 \pm 1.5 \mu\text{g}/\text{kg}$, $k=2$ 。

3 结论

本研究通过药浴方式获得了两种浓度的大菱鲈阳性基质原料样品。原料样品经过匀浆-冻干-制粉-过筛-混匀-封装-辐照灭菌等制备工艺处理, 制备得到的2种AOZ残留基体标准物质样品均匀性良好, 性质稳定, 特性量值准确可靠。该方法对进一步开展水产品中硝基呋喃类代谢物残留基体标准物质的制备提供了技术参考。研制成果可用于水产品中硝基呋喃类代谢物残留检测, 包括实验室内质量控制、实验室间能力验证、不同方法间比对及仪器校准等领域, 对完善中国水产品药物残留检测工作具有很高的实用价值。

参考文献:

[1] Du N N, Chen M M, Sheng L Q, et al. Determination of nitrofurans metabolites in shrimp by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and liquid

2.6 不确定度评估

标准物质特性值不确定度通过测定标准物质的定值不确定度(u_{char})、标准物质的均匀性不确定度(u_{bb})、标准物质的长期稳定性不确定度(u_{ls})和标准物质的短期稳定性不确定度(u_{sts})的合成并扩展来评估。合成不确定度为, 相对扩展不确定度 $U_{\text{CRM,rel}} = k * u_{\text{CRM}}$, k 为包含因子。不确定度评定结果见表9。

chromatography - tandem mass spectrometry using a new derivatization reagent [J]. J Chromatogr A, 2014, 1327: 90 - 96.

- [2] Pacholak A, Żur - Pińska J, Piński A, et al. Potential negative effect of long - term exposure to nitrofurans on bacteria isolated from wastewater [J]. Sci Total Environ, 2023, 872: 162199.
- [3] Dong Y J, Wang R J, Chen Y, et al. Facile synthesis of triazine - based porous organic polymer for the extraction and determination of nitrofurans metabolites residues from meat samples with ultra - high performance liquid chromatography - quadrupole time of flight mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2023, 1693: 463875.
- [4] Suo D C, Song Z D, Xiao Z M, et al. Enrichment and determination of nine nitrofurans in aquaculture water and aquatic feed by using metal - organic framework NDO - Zn [J]. Microchem J, 2023, 190: 108639.
- [5] Zhang Y B, Qiao H O, 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.
- [6] Fernando R, Munasinghe D M S, Gunasena A R C, et al. Determination of nitrofurans metabolites in shrimp muscle by liquid chromatography - photo diode array detection

- [J]. Food Control, 2017, 72: 300 – 305.
- [7] Anoop A K, Venkateswarlu T, Anoop S S, et al. Simultaneous determination of five metabolites of nitrofurans including the metabolite nifursol in shrimp and fish by UP-LC – MS/MS: in – house method validation according to commission implementing regulation (EU) 2021/808 [J]. Food Addit Contami A, 2023, 40(2): 222 – 234.
- [8] Kaufmann A, Butcher P, Maden K, et al. Determination of nitrofurans and chloramphenicol residues by high resolution mass spectrometry versus tandem quadrupole mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2015, 862: 41 – 52.
- [9] Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin [S]. Off J Eur Commun, 1990, L224: 1 – 8.
- [10] Food and Drug Administration USA (FDA), Code of Federal Regulations Title 21 (21CFR530.41), Drugs prohibited for extralabel use in animals. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=530.41>.
- [11] 中华人民共和国农业农村部公告第 250 号 食品动物中禁止使用的药品及其他化合物清单. http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg_1/gg/202001/t20200106_6334375.htm
- [12] Commission Regulation (EU) 2019/1871 of 7 November 2019 on reference points for action for non – allowed pharmacologically active substances present in food of animal origin and repealing Decision 2005/34/EC [S]. Off J Eur Union, 2019, 289: 41 – 46.
- [13] 高丽娜, 马丹, 时文博, 等. 天津流通领域鲆鲽类水产品硝基呋喃类代谢物残留现状 [J]. 河北渔业, 2018: 294(6): 34 – 38.
- [14] 张旭晟, 宇盛好, 李亦奇, 等. 上海市市售 3 种鱼类中孔雀石绿和硝基呋喃化合物监测结果及膳食暴露评估 [J]. 中国食品卫生杂志, 2020, 32(1): 88 – 92.
- [15] 赵丹. 大连市区水产品中硝基呋喃代谢物、孔雀石绿及氯霉素残留情况监测与评价 [J]. 食品安全导刊, 2021, 8: 76 – 77.
- [16] 呼念念, 黎焯昕, 陈冬东, 等. 兽药残留分析质量控制基体标准物质研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(20): 8242 – 8250.
- [17] 郭玲玲, 徐慧, 匡华. 食品安全检测基体标准物质研究进展 [J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(7): 71 – 83.
- [18] 李吉, 林涛, 李艳红, 等. 食品农兽药残留基体标准物质研究进展 [J]. 中国食品, 2023, 6: 96 – 98.
- [19] 刘天和, 武彩红, 左伟勇, 等. 动物源性食品相关兽药基体标准物质的研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(4): 90 – 96.
- [20] 刘正才, 陈舒奕, 翁齐彪, 等. 草鱼肌肉粉中地西洋基体标准物质的研制 [J]. 中国口岸科学技术, 2022, 4(11): 72 – 77.
- [21] 杨方, 杨守深, 卢声宇, 等. 鳊鲃肌肉冻干粉中呋喃唑酮代谢物 3 – 氨基 – 2 – 噁唑烷酮残留标准物质的研制 [J]. 分析化学, 2010, 38(3): 397 – 400.
- [22] 农业部. 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: 农业部 783 号公告 – 1 – 2006 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2006.
- [23] 农业农村部, 国家卫生健康委员会国家市场监督管理总局. 水产品中硝基呋喃类代谢物多残留的测定 液相色谱 – 串联质谱法: GB 31656.13—2021 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2021.
- [24] 国家市场监督管理总局. 标准物质的定值及均匀性、稳定性评估: JJF 1343—2022 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
- [25] 国家技术监督局. 一级标准物质技术规范: JJG 1006—1994 [S]. 北京: 中国质检出版社, 1994.
- [26] 中国合格评定国家认可委员会. 标准物质/标准样品定值的一般原则和统计方法: CNAS – GL017 [S]. 中国合格评定国家认可委员会, 2018.
- [27] 刘莹, 李兆新, 郑炯, 等. 呋喃唑酮及其代谢物在牙鲆肌肉组织中的代谢动力学研究 [J]. 中国渔业质量与标准, 2013, 3(1): 19 – 26.

Preparation of matrix reference materials for AOZ residues in turbot powder

XING Lihong, SUN Weihong*, YAO Lin, SUN Xiaojie, LI Zhaoxin

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products (Qingdao), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao, 266071, China)

Abstract: The preparation method of matrix reference materials for furazolidone metabolite AOZ residues in turbot

powder was established in this study. Taking turbot as the research object, the raw material of positive matrix reference materials containing AOZ were got by a medicated bath method. Then, the raw material samples were subjected to preparation processes such as homogenization, freeze - drying, pulverization, sieving, mixing, encapsulation, irradiation sterilization and other processes to obtain candidate of AOZ matrix reference materials of fish meal. After uniformity test and stability tests, cooperative settings by 8 laboratory and uncertainty evaluation, the quantity of AOZ in turbot powder were finally determined to be $(7.0 \pm 0.6) \mu\text{g}/\text{kg}$ and $(18.0 \pm 1.5) \mu\text{g}/\text{kg}$ ($k = 2$), respectively. The obtained reference material of turbot fish meal matrix had good properties with uniformity and stability, and they could meet the technical requirements of the reference material, and the calibration results were reliable. The reference materials can be used for laboratory internal quality control, inter laboratory capability verification, and different method validation for AOZ residue detection in aquatic products. This method provides a technical reference for the preparation of residual matrix standard materials of nitrofurans metabolites in aquatic products. [Chinese Fishery Quality and Standards, 2024, 14(6):10 - 19]

Key words: Turbot; powder; furazolidone metabolite; AOZ; matrix reference material

Corresponding author: SUN Weihong. E - mail: sunwh@ysfri.ac.cn

(责任编辑:徐小栋)



《水产学杂志》征订启事

《水产学杂志》是中国水产科学研究院黑龙江水产研究所主办的综合性的水产学期刊,双月刊,国内外公开发行。

价格:《水产学杂志》每本订价 12 元,全年 72 元/份。

汇款方式:

1. 邮局汇款

地址:哈尔滨市道里区河松街 232 号。

单位及收款人:黑龙江水产研究所《水产学杂志》编辑部,邮编:150070

2. 银行汇款

开户银行:中国农业银行哈尔滨市汇金支行

帐号:08 - 068201040020169

户名:中国水产科学研究院黑龙江水产研究所

注:从银行汇款的订户请务必在汇款单的正确位置上注明单位或电话号码,并汇款后及时与水产学杂志联系。

E - mail:zazhi2000@126.com

电 话:0451 - 84861626

传 真:0451 - 84604803

网 址:www.scxzz.net