

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00397

鳊鱼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

杨方^{*1} 杨守深³ 卢声宇¹ 刘正才¹ 余孔捷¹ 李耀平¹ 储晓刚²

¹(福建出入境检验检疫局 福州 350001) ²(中国检验检疫科学研究院, 北京 100123)

³(福建农林大学动物科学学院, 福州 350003)

摘 要 建立了鳊鱼肌肉冻干粉中 3-氨基-2-噁唑烷酮(AOZ) 残留分析标准物质的研制和定值方法。以约 0.16 mg/L 呋喃唑酮对鳊鱼进行药浴给药, 使呋喃唑酮在鱼体中代谢, 从而使鳊鱼肌肉中含有一定浓度的呋喃唑酮代谢物 AOZ。经冻干、真空包装及辐照等处理后获得 1 批 400 个独立包装的肌肉冻干粉样本。经过均匀性与稳定性检验, 由 11 家实验室采用同位素稀释液相色谱-串联质谱法进行协同定值, 并进行了不确定度评估, 已被国家质检总局批准为国家二级标准物质。

关键词 标准物质; 3-氨基-2-噁唑烷酮; 鳊鱼肌肉; 残留

1 引言

标准物质在保证分析方法的准确性及可溯源性方面具有重要作用。食品与农产品本身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的检测方法的可靠性难以满足要求, 需要同时采用纯化学物质标准品与基体标准物质对检测体系进行评价^[1,2]。

由于药物在动物体内代谢复杂, 与动物体结合形式多样, 在提取方式、提取剂的使用等均同人为添加药物残留的检测不同, 因此, 与其它基体标准物质相比, 含兽药残留的基体标准物质在研制过程中还需重点考虑以恰当的方式用药、在适当的时候屠宰、选择含有预期目标化合物及浓度的合适部位制作有足够数量的样品。自 20 世纪 80 年代, 国外已开始研究其中关键性的技术问题^[3,4]。在我国, 虽然标准物质不少, 但基本集中在无机元素方面, 含兽药残留基体标准物质的研究刚起步^[5], 无论种类还是数量均十分缺乏。

作为一种广谱抗菌药, 呋喃唑酮曾得到广泛应用。但因该药及代谢物可致癌并具生殖毒性, 已被禁用于食用动物, 并要求动物源食品中不得检出其代谢物 3-氨基-2-噁唑烷酮(AOZ)^[6]。本研究以呋喃唑酮在鳊鱼体内的代谢为基础, 研制成含代谢物 AOZ 残留的鳊鱼肌肉冻干粉标准物质。此批标准物质已被批准为国家二级标准物质, 这是我国发布的首个兽药代谢物基体标准物质, 目前尚未见有类似文献报道。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Waters UPLC/Premier 液相色谱-串联质谱仪(美国 Waters 公司); 分析天平(德国 Sartorius 公司); 冷冻干燥机(英国 BOC Edwards 公司); 空气浴振荡摇床(上海琪特公司); 涡旋振荡器(德国 IKA 公司); 离心机(上海安亭科学仪器厂); 旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司)。3-氨基-2-噁唑烷酮(AOZ) 与 D₄-AOZ 标准品(美国 Sigma 公司)。

2.2 样本的制备

选取 200 ~ 300 g 已确认不含 AOZ 的鳊鱼, 于面积为 70 m² 的水泥养殖池中养殖, 平均水温 21 ℃, 日均换水率 95% ~ 100%, 使用增氧机 24 h 增氧。

给药前暂养鳊鱼 5 d 使适应环境。以全池泼洒方式给药呋喃唑酮, 水体中呋喃唑酮浓度约

2009-09-03 收稿; 2009-11-09 接受

本文系“十一·五”国家科技支撑计划项目(No. 2006BAK02A08) 和福建省科技攻关重点项目(No. 2006Y0002) 资助

* E-mail: yffjciq@gmail.com

0.16 mg/L。用药 15 d 后采集样本。取去皮的鱼背肉切成小块,匀浆,低温冷冻干燥至水分含量低于 1%,制成冻干粉。以正己烷脱脂后进行二次研磨,过 0.18 mm 孔筛,再次混匀后采用双层复合袋独立真空包装,每袋约 3 g。将分装好的样品以⁶⁰Co 辐照灭菌,室温保存。

2.3 样品均匀性检验

共进行两次均匀性检验。第一次针对匀浆样本,随机抽取 13 份约 20 kg 匀样,以每份样的 3 次重复检测数据为一组,共 13 组 39 个数据,取样量为 2 g;第二次在制成的 400 袋独立包装样品,随机抽取 15 份,以每份样 3 次重复检测数据为一组,共 15 组 45 个数据,取样量为 0.5 g。

2.4 样品稳定性检验

稳定性检验分为长期稳定性与短期稳定性进行。长期稳定性研究进行 6 个月,每月抽取室温存放的 3 个独立包装的样本,每个样本重复测定 2 次,共 6 个数据,以平均值作为检测结果。短期稳定性研究时模拟样品运输的极端条件,取出 10 个独立包装样品置于 -60 °C 冰柜中放置 60 d,取出于室温下放置 30 d,再于 70 °C 烘箱中放置 48 h 后测定。取样量均为 0.5 g。

2.5 样品的分析方法

2.5.1 样品前处理 样品前处理参考 GB/T 21311-2007 “动物源性食品中硝基咪唑类药物代谢物残留量检测方法 高效液相色谱-串联质谱法”进行。

2.5.2 仪器条件 色谱条件: Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱(55 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 柱温: 35 °C。流动相 A 为 5 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.2% 甲酸), B 为甲醇(含 0.2% 甲酸)。梯度洗脱 0 ~ 1.0 min 90% A; 1.0 ~ 3.5 min 90% ~ 20% A; 3.5 ~ 4.0 min 20% ~ 10% A; 4.0 ~ 4.3 min 10% A; 4.3 ~ 4.5 min, 10% ~ 90% A。流速 0.3 mL/min; 进样量 10 μL。

质谱条件: ESI 源, 正离子模式; 锥孔电压: 0.6 kV; 源温度: 120 °C; 去溶剂温度: 350 °C; D₄-AOZ 为同位素内标进行定量分析。AOZ 监测母离子 m/z 236, 子离子 m/z 104, 134, m/z 134 为定量离子, D₄-AOZ 监测母离子 m/z 204, 定量离子 m/z 134。

3 结果与讨论

3.1 实验材料的选择与样品的制备

首选以用药后在动物体内存在实际残留的动物组织为材料研制含兽药残留的基体标准物质^[7]。养殖鱼类的给药方式一般为药浴给药、拌饲给药和口灌给药。呋喃唑酮味苦,若拌饲给药,鳊鲈不易摄食,还因个体摄食量不同而使摄入药物量不同。口灌给药因样本量大,给药过程耗时费力,且极易导致鳊鲈死亡,实际操作不可行。药浴给药是鳊鲈养殖的常用给药方式,操作简便,可保证个体摄入药量均一。

在本研究所述养殖及用药条件下,对肌肉、血液及肝脏中 AOZ 的变化进行研究。每次随机采取 6 条鳊鲈作为一个检体,检测结果表明,随着时间的延长,鳊鲈的肌肉、血液及肝脏中 AOZ 浓度逐渐升高,于 24 h 达到峰值,其中以肝脏中残留最高(图 1)。因此,制备样品时应采取肌肉,尽可能避免混入内脏及血液。鳊鲈肌肉中水分与脂肪含量高,为便于贮存及使用,将其低温干燥制成冻干粉;同时为防止脂肪可能在保存过程中析出及可能酸败变质,需进行脱脂。为考察采用正己烷脱脂造成样品中 AOZ 损失的可能性,本研究称取 2 g 冻干粉,以 3 × 15 mL 正己烷脱脂,收集全部正己烷,40 °C 氮气吹至近干,按 2.5 节进行分析,重复测定 5 次,均未检出 AOZ(检出限为 0.1 μg/kg),表明采用正己烷脱脂未造成 AOZ 损失。

选用双层复合袋对鳊鲈肌肉冻干粉进行真空包装,避免受微生物污染及氧化变质,从而延长保存期。

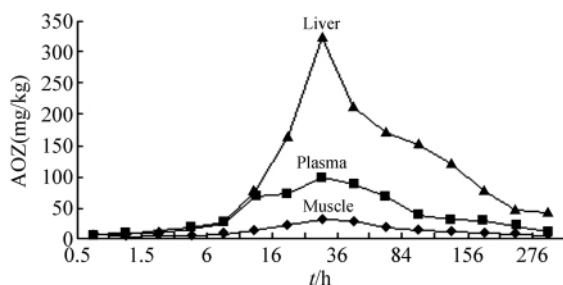


图1 药浴给药后肌肉、血浆和肝脏中的 AOZ 含量与时间曲线

Fig. 1 Time-concentration curves of 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ) in muscle, plasma and liver after dips administration

3.2 均匀性检验

鳙鲮肌肉为高蛋白、高脂肪物质,极易受微生物污染,对制成的冻干粉检测细菌总数时检测值达 170 万 CFU/g 也证实了这一点。因此,制备时采用了辐照灭菌技术。文献[8]报道,样品经辐照后药物残留浓度有所下降,尤其是未经冻干处理的样本,本研究也证实了这一点(表 1)。为确认样本均匀性,在匀浆后进行了第一次均匀性检验 $0.516 < F_{0.05(12,26)} = 2.49$,证明样品均匀性满足要求;在辐照后又随机抽取 15 个独立包装的样品进行了第二次均匀性实验 $0.703 < F_{0.05(14,30)} = 2.31$,结果表明样本也是均匀的。

表 1 辐照对鳙鲮肌肉冻干粉中 AOZ 浓度的影响
Table 1 Influence of irradiation to AOZ concentration

	测定值 Found ($\mu\text{g/kg}$)	RSD (%, $n=5$)
冻干 Lyophil.	4.67	7.57
冻干+辐照 Lyophil. + ^{60}Co	3.62	9.36

3.3 稳定性检验

本批标准物质进行了长期稳定性与短期稳定性检验。长期稳定性实验设计为经典稳定性研究,即同时制备的样品在相同条件下随着时间的推移进行测量。实验设计与计算过程按 GB/T15000.3-2008 之“8 稳定性研究”进行。以直线为经验模型,截距(在不确定度内)等于测定得到的值,而斜率趋近于零。长期稳定性实验进行了 6 个月,每月抽取室温存放的 3 个独立包装的样本、每个样本重复测定 2 次,共 6 个数据,以平均值作为检测结果(表 2),在 95% 置信水平上,斜率是不显著的,即未观测到不稳定性,样本是长期稳定的。

短期稳定性实验模拟样品运输的极端条件,取出 10 个独立包装样品置于 $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰柜中放置 60 d,取出于室温下放置 30 d,再于 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱放置 48 h 后测定。与均匀性实验结果采用 t 检验进行比较,在 95% 置信水平上,二者无显著差异,样品在极端条件下短期内是稳定的。

表 2 稳定性实验数据
Table 2 Results of stability tests

日期 Date	2008-09-10	2008-10-09	2008-11-10	2008-12-10	2009-01-19	2009-02-16
AOZ($\mu\text{g/kg}$)	3.70	3.28	3.95	4.12	3.93	4.03

3.4 样本的定值和不确定度评估

3.4.1 样本的定值 本批标准物质采用多实验室协同定值的方案^[9],邀请了国家兽药残留基准实验室(华中农业大学)、福建海洋环境与渔业资源监测中心、福建省中心检验所、江苏出入境检验检疫局、广东出入境检验检疫局、浙江出入境检验检疫局、上海出入境检验检疫局、深圳出入境检验检疫局、天津出入境检验检疫局和莆田出入境检验检疫局 10 家机构与标准物质研制单位共同定值。检测结果经过柯克伦检验和格布拉斯检验,所有单元的数据均可保留并参与最终定值(表 3)。

表 3 GBW(E) 100180 定值结果
Table 3 Certified values and related parameters of GBW(E) 100180

n	AOZ($\mu\text{g/kg}$)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	14.09	3.55	4.00	3.28	4.05	3.89	3.51	3.70	3.73	3.49	3.20
2	4.18	3.82	3.55	3.75	3.29	3.94	3.64	3.45	3.69	3.74	3.33
3	3.91	3.67	3.74	3.65	3.26	3.90	3.55	3.56	3.92	3.78	3.40

3.4.2 不确定度评估 由于该批标准物质中参与协同定值的所有数据均被采纳。因此,由协同定值实验室所带来的批测定不确定度的主要分量是标准偏差;瓶间均匀性已被验证。因此,由瓶间均匀性带来的不确定度在计算时可采用单因素方差分析,瓶间标准偏差是该方差的平方根,加合瓶内重复性标准偏差即得到由瓶间均匀性带来的不确定度。稳定性研究是采用直线为经验模型,假设该批标准物质的特性值从初始值以一个常数线性降解,相对降解速率为时间的函数,因此稳定性不确定度是通过将自变量初始值、时间和相对降解速率的不确定度传播给因变量特性值而得到^[10,11]。此外,由于该批标准物质特性值为协同定值确定,由邮政网络将标准物质分发给各参加协同定值的实验室,所得到的一系列测量

值已包含运输不稳定性造成的附加不确定度,不再另计算。

综上所述,本标准物质的不确定度评估通过合成由协同定值实验室所带来的批测定的不确定度、由瓶间均匀性所带来的不确定度及由长期稳定性所带来的不确定度对特性值总不确定度的贡献而成,最终确定的标准值为 $(3.67 \pm 0.56) \mu\text{g}/\text{kg}$ 。本工作对进一步开展各类残留检测用基体标准物质的研制工作具有重要意义。

References

- 1 YANG Fang(杨方), YU Kong-Jie(余孔捷), LI Yao-Ping(李耀平), CHU Xiao-Gang(储晓刚), ZHANG Feng(张峰), CHEN Guo-Nan(陈国南). *Chem. Anal. Meter.* (化学分析计量), **2009**, 18(3): 82 ~ 85
- 2 Thompson M, Ellison S L R, Wood R. *Pure Appl. Chem.*, **2002**, 74(5): 835 ~ 855
- 3 Belliardo J J, Wagstaffe P J. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1988**, 332(6): 533 ~ 538
- 4 Pfaffl M W, van Ginkel L A, McEvoy J D G, Maghuin-Rogister G, Meyer H H D. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **2001**, 371(8): 1086 ~ 1091
- 5 GUO De-Hua(郭德华), DENG Xiao-Jun(邓晓军), LI Bo(李波), WANG Min(王敏), YANG Hui-Qin(杨惠琴), HAN Li(韩丽), CHEN Shun-Sheng(陈舜胜). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(9): 1221 ~ 1227
- 6 van Koten-Vernelen J E M. *Report of 40th Meeting of the JECFA World Health Organization*. Geneva. **1993**, 85: 85 ~ 90
- 7 Heitzman R J. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1993**, 345(2-4): 207 ~ 208
- 8 Balizs G, Arnold D. *Chromatographia*, **1989**, 27(9-10): 489 ~ 493
- 9 Ellison S L R, Rosslein M, Williams A. *Eurachem/Citac Guide-Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. <http://www.eurachem.org/guides/QUAM2000-1.pdf>, **2000**
- 10 Linsinger T, Pauwels J, Lamberty A, Schimmel H G, van der Veen A M H, Siekmann L. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **2001**, 370(2-3): 183 ~ 188
- 11 van der Veen A M H, Linsinger T, Lamberty A, Pauwels J. *Accreditation and Quality Assurance*, **2001**, 6(7): 257 ~ 263

Preparation and Certification of Reference Materials for 3-Amino-2-oxazolidinone Residue in Eel Muscle Lyophilisates

YANG Fang^{*1}, YANG Shou-Shen³, LU Sheng-Yu¹, LIU Zheng-Cai¹, YU Kong-Jie¹, LI Yao-Ping¹, CHU Xiao-Gang²

¹(Fujian Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001)

²(Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123)

³(College of Animal Science, Fujian Agriculture And Forestry University, Fuzhou 350003)

Abstract A methodology for preparing and certifying the reference material of 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ) in eel muscle lyophilisates was presented. Furazolidone was accessed to eel by dipping fish in pond with furazolidone solution at a dosage of ca 0.16 mg/L. With the metabolism of furazolidone in eel, the muscles contain a certain concentration of AOZ as furazolidone metabolite was obtained. Lyophilization of the muscles was performed in one batch and 400 bags of samples were obtained by the procedure of homogenation, cryodesiccation and irradiation. The homogeneity and stability of the sample was examined. The value of the chemical constituent of the sample was certified through the collaborative analysis program participated by 11 laboratories using isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and the uncertainty assessment was performed. The reference materials have been approved as certified reference materials by AQSIQ, China (State General Administration of the People's Republic of China for Quality Supervision and Inspection and Quarantine) in 2009 after one year of trial period. The serial numbers is GBW(E) 100180.

Keywords Reference materials; 3-Amino-2-oxazolidinone; Eel muscle lyophilisates; Residues

(Received 3 September 2009; accepted 9 November 2009)