

水产品中氯丙嗪、地西洋、甲硝唑和地美硝唑残
留量的测定 超高效液相色谱-串联质谱法
编制说明

（征求意见稿）

《水产品中氯丙嗪、地西洋、甲硝唑和地美硝唑残留量的测定 超高效液相
色谱-串联质谱法》编制组

2024年12月

目录

1 工作简况	1
1.1 任务来源	1
1.2 工作过程	1
2 标准编制的原则	2
3 标准的主要内容及依据	2
3.1 药物种类的确定	2
3.2 标准适用范围说明	2
3.3 标准主要参数及实验条件的确定	3
3.3.1 仪器分析方法的建立	3
3.3.2 样品前处理方法的确定	6
3.3.3 定性定量方法的确定	7
3.3.4 方法有效性评价	8
4 主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果	11
5 与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系	11
6 重大分歧意见的处理经过和依据	11
7 标准作为强制性标准或推荐性标准的建议	11
8 贯彻标准的要求和措施建议	11

1 工作简况

1.1 任务来源

2024年2月28日，江苏省渔业协会发布《关于征集2024年江苏省渔业协会团体标准立项项目的通知》（苏渔协[2024]2号），征集2024年团体标准立项项目，要求立项范围围绕渔业相关的技术、产品、应用、服务等方面，聚焦新产品、新技术、新业态和新模式，填补标准空白。南京市农产品质量检测院响应江苏省渔业协会通知要求，提出《水产品中氯丙嗪、地西洋、甲硝唑和地美硝唑残留量的测定 超高效液相色谱-串联质谱法》标准的制定，经江苏省渔业协会团体标准工作委员会组织专家审定，于2024年5月13日发布“关于2024年江苏省渔业协会团体标准（第一批）立项的公告”正式公示立项。

起草单位：南京市农产品质量检测院，成立于2014年9月，是经市编委批准成立的全额拨款事业单位，行政隶属南京市农业农村局，承担主要农产品和农业项目环境及农产品安全事件质量检测相关工作。经江苏省市场监督管理局资质认定、江苏省农业农村厅农产品检测机构考核合格，能够客观、独立和公正地从事检测活动。实验室总面积3000m²，试验环境与设施良好，主要实验设备有：液质联用仪、气质联用仪、高效液相色谱仪和气相色谱仪等近百余台套。固定资产原值约两千万元。拥有一批素质高，熟悉法规和国内外标准，有一定检测能力和经验的专业技术人员，具有承检种植业农产品、畜禽产品、水产品、农产品产地环境、肥料、农作物种子等六大类297项参数的检测能力。近几年一次性通过部、省级畜禽产品和水产品中磺胺类、喹诺酮类、酰胺醇类检测能力验证达82项次，拥有扎实的经验基础和客观条件。南京市地方标准《渔业养殖用水中地西洋、甲硝唑和地美硝唑残留量的测定 超高效液相色谱-串联质谱法》获得批准立项。发表论文《超高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中地西洋、甲硝唑和地美硝唑残留量》《超高效液相色谱-串联质谱法测定克氏原螯虾和养殖水体中双唑草腈残留》等10余篇。

主要起草人：陈桂芳、丁春晖、张聪、陈琳琳、倪建秀、李文杰。

1.2 工作过程

（1）成立标准编制组

接受任务后，南京市农产品质量检测院组织相关技术团队成立了标准编制小组，研究标准制订背景、制定工作方案，部署研究工作。

（2）申请立项阶段

2024年4月启动了预草案的编制工作，结合近年来水产品中药物残留积累的经验，及相关资料的收集整理，依据GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和

起草规则》、GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》对标准进行了编写，经过多次内部讨论和修改，2024年5月形成了《水产品中氯丙嗪、地西洋、甲硝唑和地美硝唑残留量的测定超高效液相色谱-串联质谱法》团体标准预草案。

（3）起草阶段

编制小组对样品的前处理方法进行了优化，对仪器条件进行了优化，对最低检出限、回收率、精密度等方法性能参数进行了验证，对标准内容进行修改和完善，于2024年9月形成了团体标准草案。

2024年5月~2025年5月，组织三家单位江苏省水产质量检测中心、无锡市农产品质量监测中心、镇江市农产品质量检验检测中心进行方法验证。

2024年5月起先后征求了多位专家的意见，从标准文稿的名称、结构的安排、所用语言的叙述到数据的使用都进行了适当的修改，形成送审稿（汇总意见见附件）。

2 标准编制的原则

合法性：严格贯彻国家有关方针、政策、法规和规章，严格执行强制性国家标准和行业标准，避免与正在制定或已经制定的其他农业或国家标准发生技术冲突。

科学性：结合国内产业发展现状与趋势，编制过程中以反映科学技术的先进成果和先进经验，使各项技术指标满足要求，确保标准既能保持技术上的先进性和经济上的合理性。

实用性：团体标准的制定充分考虑市场需求和实际应用情况，确保标准的实用性和可操作性，标准的内容简明扼要、易于理解，方便农检机构使用。

规范性：编写规则及表述等要求主要依据《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》（GB/T 1.1-2020）。标准的构成严谨合理，内容编排、层次划分等符合逻辑与规定。

3 标准的主要内容及依据

3.1 药物种类的确定

氯丙嗪、地西洋、甲硝唑和地美硝唑是《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》（GB 31650-2019）标准中允许使用的兽药，不允许在产品中检出，但有在水产品中残留的报道。作为全球水产养殖大国，我国在水产养殖中普遍使用多种兽药，一些报道也关注到了鱼饵中地西洋残留的问题，为了更全面地监督国内水产养殖行业的兽药使用情况，需要做好水产品中的药物残留检测工作。

3.2 标准适用范围说明

本文件规定了水产品中地西洋、甲硝唑、地美硝唑和氯丙嗪残留量检测的制样和超高

效液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于淡水鱼、虾中地西洋、甲硝唑、地美硝唑和氯丙嗪残留量的测定。

3.3 标准主要参数及实验条件的确定

3.3.1 仪器分析方法的建立

3.3.1.1 质谱分析条件的优化

本文件采用电喷雾离子源（ESI），正离子模式对氯丙嗪、地西洋、甲硝唑和地美硝唑进行测定；将100 ng/mL的混合标准溶液通过自动进样器注入质谱仪中，对碎裂电压（Fragmentor）、碰撞能量（Collision Energy CE）、离子源温度（Temperature）等质谱参数进行优化，质谱参数如下：

离子化模式：电喷雾离子源(ESI)，正离子模式；

毛细管电压：4000 V；

干燥气温度：340 °C；

雾化气压力：45 psi；

干燥气流速：11 L/min

扫描模式：多反应监测(MRM)

在最佳离子源条件下，优化每种化合物的碰撞能量，获得了用于定性和定量的离子碎片，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；氯丙嗪、地西洋、甲硝唑和地美硝唑定性离子、定量离子、碎裂电压、碰撞能量及相应内标见表1，特征离子质量色谱图见图1。

表1 母离子、定性离子、定量离子、碎裂电压及碰撞能量

序号	化合物	母离子 m/z	子离子 m/z	碎裂电压 V	碰撞能量 eV
1	氯丙嗪	318.9	86.0*, 58.1	100	18, 46
2	地西洋	285.0	193.0*, 154.1	135	35, 30
3	甲硝唑	172.1	128.0*, 82.1	80	10, 25
4	地美硝唑	141.9	96.0*, 81.1	80	12, 28
5	氯丙嗪-D ₆	325.0	92.0*, 64.1	100	18, 46
6	地西洋-D ₅	290.1	198.1	135	35
7	甲硝唑-D ₄	176.1	128.1*, 82.1	95	12, 25
8	地美硝唑-D ₃	145.1	99.1	95	15

注：*为定量离子

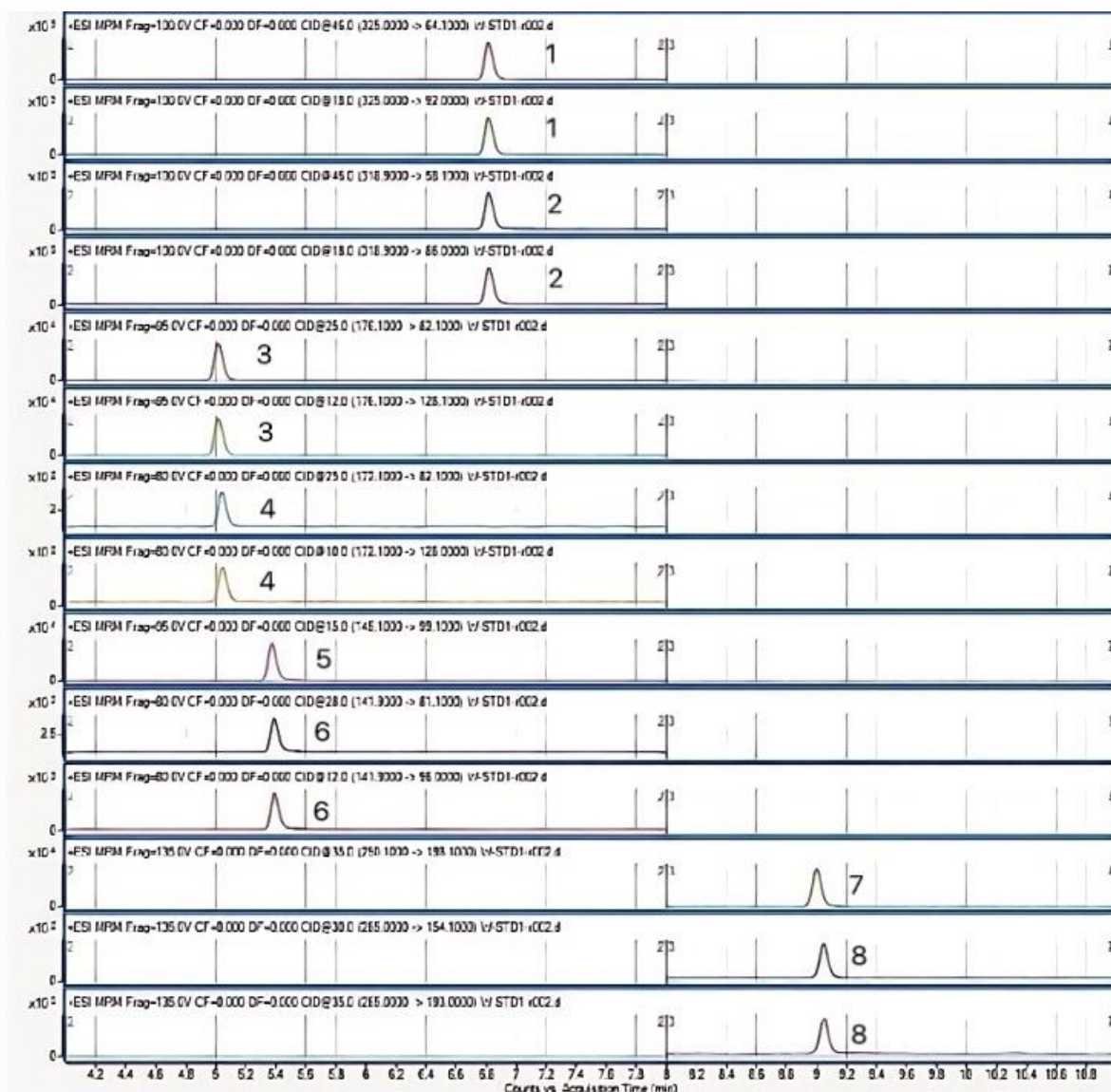


图1 氯丙嗪、甲硝唑、地美硝唑、地西泮和同位素标准溶液特征离子质量色谱图（1.0 $\mu\text{g/L}$ ）

质量色谱图中：

- 1-氯丙嗪-D₆特征离子质量色谱图（325>64.1）；
- 2-氯丙嗪特征离子质量色谱图（318.9>86.0，318.9>58.1）；
- 3-甲硝唑-D₄特征离子质量色谱图（176.1>128.1）；
- 4-甲硝唑特征离子质量色谱图（172.1>128.0，172.1>82.1）；
- 5-地美硝唑-D₃特征离子质量色谱图（145.1>99.1）；
- 6-地美硝唑特征离子质量色谱图（141.9>96.0，141.9>81.1）；
- 7-地西泮-D₃特征离子质量色谱图（290.1>198.1）；
- 8-地西泮特征离子质量色谱图（285.0>193.0，285.0>154.1）。

3.3.1.2 液相色谱条件的确定

(1) 色谱柱的选择

氯丙嗪、地西泮、甲硝唑和地美硝唑具有较高的极性，因此需要选用以高纯硅胶为基质并经端基封闭处理的C₁₈、C₈柱、苯基柱等反相色谱柱为分离柱。项目组使用Aglient Zorbax Eclipse Plus C₁₈色谱柱，这款色谱柱在实际使用过程中对常用兽药都表现出极好的分离度。结果表明，Aglient Zorbax Eclipse Plus C₁₈色谱柱能将氯丙嗪、地西泮、甲硝唑和地美硝唑分离，响应值高，各分析目标物分离效率高，稳定性好，色谱峰峰形优异，所以其作为氯丙嗪、地西泮、甲硝唑和地美硝唑的色谱分离柱。

(2) 流动相组分和梯度的优化

分别比较了甲醇和乙腈作为本实验流动相的有机相对各分析目标物的分离效果影响。结果表明甲醇作为流动相时，离子化效率更高，基线噪音低，分析目标物的灵敏度相对更高。因此，相较而言本实验选择了甲醇作为强洗脱流动相。

本实验还分别选取了水-甲醇，0.1%甲酸水溶液-甲醇、0.1%甲酸水溶液-0.1%甲酸甲醇作为流动相，经实验表明甲酸能够增加各种化合物在ESI+模式下的离子化效率，峰形对称尖锐；0.1%甲酸水溶液-0.1%甲酸甲醇流动相下，氯丙嗪、地西泮、甲硝唑和地美硝唑离子化效率最好，响应最高，故本实验选择了0.1%甲酸水溶液-0.1%甲酸甲醇作为流动相。

确定0.1%甲酸溶液和0.1%甲酸甲醇作为流动相，色谱柱采用Aglient Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (3.0 mm×150 mm, 1.8 μm) 对目标化合物进行分离。为了使氯丙嗪、地西泮、甲硝唑和地美硝唑实现色谱上的分离，对流动相梯度洗脱条件进行了优化，流速设定为0.25 mL/min，并通过改变0.1%甲酸甲醇配比和分段梯度洗脱的方法使氯丙嗪、地西泮、甲硝唑和地美硝唑得到良好的分离，出峰时间控制在4~10 min，确保其定性和定量的准确性。

(3) 最佳液相色谱分析条件

色谱柱：Aglient Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (3.0 mm×150 mm, 1.8 μm) 或性能相当；

柱温：40 °C，流速：0.25 mL/min；

进样量：20 μL；

流动相：A为0.1%甲酸溶液，B为0.1%甲酸甲醇；洗脱程序见表2。

表2 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.00	80	20
1.00	80	20
3.00	30	70
9.00	10	90
11.00	10	90
11.01	80	20

3.3.2 样品前处理方法的确定

3.3.2.1 提取液的优化

考虑提取液不同pH值时目标物的分子状态、极性以及对蛋白沉淀作用等，选用1%甲酸乙腈、碱性乙酸乙酯、90%乙腈-水、碱性乙腈四种提取液进行实验，不同的提取液回收率数据存在一定差异，发现90%乙腈-水提取液对蛋白沉淀好，且回收率较好，故采用90%乙腈-水作为提取液。

3.3.2.2 SPE柱的选择

SPE柱中Oasis MCX小柱为混合型阳离子小柱，对碱性化合物具有高选择性；Oasis PRiME HLB小柱为亲水亲脂平衡的水可浸润性的反相吸附剂，是酸性、中性及碱性化合物的通用型小柱；Oasis MAX小柱为混合型阴离子反相吸附剂，对酸性化合物具有高选择性；Oasis C₁₈小柱是以硅胶为基质的反相C₁₈萃取柱，具有高键和密度等特点，是适合于非极性到中等极性化合物的通用型小柱。对Oasis MCX、Oasis HLB柱、Oasis WAX柱、Oasis C₁₈柱和小柱萃取效率进行了比较，实验结果发现，Oasis MCX柱萃取效率最高，对氯丙嗪、地西洋、甲硝唑和地美硝唑平均回收率为80.5%~114.3%。因此，采用Oasis MCX固相萃取柱。

3.3.2.3 MCX固相萃取萃取柱使用条件研究

(1) MCX固相萃取柱淋洗条件的考察

淋洗液选用5 mL水+5 mL甲醇、5%甲醇-水、10%甲醇-水、20%甲醇-水分别进行淋洗。收集淋洗液，上机分析，结果显示：5 %甲醇-水、10 %甲醇-水和20 %甲醇-水淋洗时，淋洗液中检测到部分目标化合物。故在阳性添加的空白基质样品提取液过Oasis MCX固相萃取柱后，用5 mL水+5 mL甲醇作为淋洗液，可在化合物没有损失的前提下，进一步去除杂质干扰。

(2) 洗脱条件的考察

分别选用6 mL甲醇、6 mL 1%甲酸甲醇溶液、氨化甲醇进行洗脱，结果显示：氨化甲醇可基本将氯丙嗪、地西泮、甲硝唑和地美硝唑洗脱下来，洗脱速度快，平均回收率80.5%-114.3%。故选择氨化甲醇作为洗脱液。

综合以上最优条件，并考虑操作性及可重复性，适合批量操作等要求，得出最佳样品前处理方法。

最佳样品前处理方法：

称取5.00g试样（准确至±0.05g）于50 mL离心管中，加入1 µg/mL混合内标工作液10 µL，充分混匀。加90%乙腈水溶液15 mL，充分混匀。8000r/min离心10min。将10mL上清液转移至15mL离心管中于40 °C水浴用氮气吹至近干，用0.1 mol/L盐酸水溶液5 mL复溶待净化。

取固相萃取柱，依次使用5mL甲醇和5mL水活化，将复溶液以约3~5 mL/min流速通过固相萃取柱。过柱后依次用5mL水和5mL甲醇淋洗，负压抽干。最后用6 mL 氨化甲醇溶液洗脱。洗脱液40 °C水浴用氮气吹至近干，用0.1%甲酸水-0.1%甲酸甲醇（80+20）定容至1 mL，涡旋混匀1 min，过0.22 µm亲水PTFE滤膜，供超高效液相色谱-串联质谱仪测定。

3.3.3 定性定量方法的确定

3.3.3.1 内标物确定的研究

本文件同时测定氯丙嗪、地西泮、甲硝唑和地美硝唑，采用了4种内标物，分别是氘代氯丙嗪、氘代地西泮、氘代甲硝唑和氘代地美硝唑。由于氯丙嗪、地西泮、甲硝唑和地美硝唑的性质不完全相同，因此在样品前处理过程和质谱测定过程中氯丙嗪、地西泮、甲硝唑和地美硝唑会有不同的响应；为能达到准确定量，分别用目标化合物的氘代内标物对每一种目标化合物进行定量。

3.3.3.2 定性依据

在相同的测试条件下，试料溶液中氯丙嗪、地西泮、甲硝唑和地美硝唑的保留时间与标准工作液中相应药物的保留时间的比值，偏差在±2.5%以内。并且，试料溶液中定性离子的相对丰度与浓度接近的标准工作液中定性离子的相对丰度进行比较，其偏差应满足欧盟2002/657/EC《执行关于分析方法运行和结果解释的欧盟委员会指令96/23/EC》中的规定，见表3。

表3 定性确证时相对离子丰度最大允许偏差

相对离子丰度（%）	>50	20~50	10~20	≤10
允许的最大偏差（%）	±20	±25	±30	±50

3.3.4 方法有效性评价

3.3.4.1 方法检出限和定量限的确定

通常方法的检出限规定为，以测定结果的信噪比（S/N）大于3的最小浓度为检出限。方法的定量限是指在保证具有一定可靠性（准确度和精密度）的前提下，分析方法能够准确测定出的样品中药物的最低浓度，回收率大于70%，精密度小于15%，信噪比（S/N）大于10。经实际加标测得，本文件氯丙嗪、地西洋、甲硝唑和地美硝唑检出限为0.1 µg/kg，定量限为0.5 µg/kg。

3.3.4.2 方法线性范围

通过配制系列混合标准溶液，绘制标准曲线，得出线性方程和相关系数，确定氯丙嗪、地西洋、甲硝唑和地美硝唑的线性范围为0.2~50.0 µg/L，相关系数均大于0.99。

表4 氯丙嗪、地西洋、甲硝唑和地美硝唑回归方程、线性范围和相关系数

化合物	线性回归方程	线性范围 µg/L	线性相关系数
氯丙嗪	$y=0.9613x-0.014782$	0.2 ~ 50.0	0.9914
地西洋	$y=0.9538x-0.004573$	0.2 ~ 50.0	0.9955
甲硝唑	$y=0.7652x-0.004872$	0.2 ~ 50.0	0.9950
地美硝唑	$y=1.2034x-0.007790$	0.2 ~ 50.0	0.9958

3.3.4.3 方法的精密度和回收率

分别以鳊鱼和青虾的空白基质为测试对象，添加氯丙嗪、地西洋、甲硝唑和地美硝唑，添加水平为定量限、2倍定量限和10倍定量限。每个浓度水平测定3批，每批6个样品，结果见表5。

表5 水产品加标回收率结果

分析物	添加水平 µg/kg	基质	测定批次	平均回收率 %, n=6	批内RSD %	批间RSD %
氯丙嗪	0.5	鳊鱼	1	104.0	3.5	5.0
			2	94.9	4.5	
			3	96.2	9.5	
		青虾	1	108.0	8.2	8.9
			2	94.7	3.8	

分析物	添加水平 μg/kg	基质	测定批次	平均回收率 %, n=6	批内RSD %	批间RSD %
	1.0	鳙鱼	3	91.5	3.9	3.8
			1	95.8	3.3	
			2	89.3	2.7	
			3	90.6	7.4	
		青虾	1	87.1	2.4	7.2
			2	91.5	6.0	
			3	100.3	8.2	
		鳙鱼	1	103.4	3.9	1.2
			2	104.6	5.2	
			3	106.0	7.7	
	5.0	青虾	1	98.7	9.1	4.9
			2	99.1	10.8	
			3	107.5	6.3	
地西洋	0.5	鳙鱼	1	107.9	5.0	7.8
			2	112.5	12.1	
			3	96.1	4.1	
		青虾	1	110.3	5.1	9.5
			2	95.1	0.8	
			3	96.9	8.5	
	1.0	鳙鱼	1	104.4	1.6	4.5
			2	99.5	1.7	
			3	92.3	3.6	
		青虾	1	93.2	5.9	6.4
			2	92.9	5.2	
			3	104.9	8.3	
	5.0	鳙鱼	1	80.8	3.1	4.8
			2	86.0	8.5	
			3	83.4	5.1	
		青虾	1	80.5	9.6	8.0
			2	84.3	6.3	
			3	91.2	2.9	

分析物	添加水平 μg/kg	基质	测定批次	平均回收率 %, n=6	批内RSD %	批间RSD %
甲硝唑	0.5	鳙鱼	1	112.9	3.3	3.8
			2	107.5	3.8	
			3	104.9	3.9	
		青虾	1	114.3	4.8	7.8
			2	111.5	1.5	
			3	100.3	6.9	
	1.0	鳙鱼	1	112.0	2.2	3.0
			2	105.0	2.1	
			3	102.6	1.7	
		青虾	1	106.3	7.0	1.0
			2	105.4	5.9	
			3	106.4	4.7	
甲硝唑	5.0	鳙鱼	1	90.2	2.5	6.2
			2	97.3	8.8	
			3	93.8	2.5	
		青虾	1	101.3	4.4	1.9
			2	97.0	7.2	
			3	102.9	5.3	
地美硝唑	0.5	鳙鱼	1	100.9	3.6	2.5
			2	96.3	6.8	
			3	97.0	8.8	
		青虾	1	105.2	4.8	8.9
			2	90.2	1.8	
			3	90.9	2.9	
	1.0	鳙鱼	1	101.0	1.8	3.5
			2	93.6	4.1	
			3	92.5	2.6	
		青虾	1	91.4	3.4	1.9
			2	92.6	4.3	
			3	92.7	9.8	
	5.0	鳙鱼	1	83.0	5.6	2.0
			2	86.2	7.9	
			3	88.4	6.3	
		青虾	1	82.1	9.4	3.4
			2	82.0	4.8	
			3	88.2	5.0	

4 主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

方法线性关系：以同位素内标法定量，氯丙嗪、地西洋、甲硝唑和地美硝唑在0.2~50.0 µg/L浓度范围内，相关系数均大于0.99，线性关系良好。选择淡水鱼、虾空白基质，添加标准溶液，添加浓度分别为0.5 µg/kg、1.0 µg/kg、5.0 µg/kg，每个浓度水平测定3批，每批6个样品，平均回收率在80.5%~114.3%之间，相对偏差在0.8%~12.1%之间，符合GB 5009.295-2023《食品安全国家标准 化学分析方法验证通则》对方法正确度和精密度的要求。

方法验证基础上，起草工作组组织3家实验室进行验证，结果符合验证比对要求。

具体方法验证报告见附件二。

5 与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系

与现行法律、法规及强制性国家标准协调一致。

6 重大分歧意见的处理经过和依据

本文件在起草过程中无重大意见分歧。

7 标准作为强制性标准或推荐性标准的建议

本文件建议作为推荐性标准。

8 贯彻标准的要求和措施建议

标准的推广实施将在协会的统一领导和协调下进行，以农产品质量安全检测机构为主要实施对象，组织宣贯培训，合理规范利用，促进水产品质量安全检测技术的发展。