



中华人民共和国国家标准

GB 31658.23—2022

食品安全国家标准 动物性食品中硝 基咪唑类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard—
Determination of nitroimidazole residues in animal derived food
by liquid chromatography– tandem mass spectrometric method

2022-09-20 发布

2023-02-01 实施



中华人民共和国农业农村部
中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布
国家市场监督管理总局

前 言

本文件按照 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》的规定起草。

本文件系首次发布。

食品安全国家标准

动物性食品中硝基咪唑类药物残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了动物性食品中甲硝唑、羟基甲硝唑、地美硝唑和羟基地美硝唑残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于猪、牛、羊和鸡的肌肉、肝脏和肾脏组织中甲硝唑、羟基甲硝唑、地美硝唑和羟基地美硝唑残留量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中残留的硝基咪唑类药物经乙酸乙酯提取，正己烷液液萃取除脂，固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱检测，基质匹配内标法定量。

5 试剂与材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙酸乙酯($C_4H_8O_2$):色谱纯。

5.1.2 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

5.1.3 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

5.1.4 正己烷(C_6H_{14}):色谱纯。

5.1.5 甲酸($HCOOH$):色谱纯。

5.1.6 氨水($NH_3 \cdot H_2O$)。

5.1.7 盐酸(HCl)。

5.2 溶液配制

5.2.1 0.1 mol/L 盐酸溶液:取浓盐酸 8.3 mL,加水稀释至 1 L,混匀。

5.2.2 2%氨水溶液:取氨水 2 mL,加水稀释至 100 mL,混匀,现用现配。

5.2.3 洗脱液:取甲醇 80 mL,加水 15 mL、氨水 5 mL,混匀,现用现配。

5.2.4 0.1%甲酸水溶液:取水 500 mL,加甲酸 500 μ L,混匀。

5.2.5 0.1%甲酸乙腈溶液:取乙腈 500 mL,加甲酸 500 μ L,混匀。

5.3 标准品

甲硝唑、地美硝唑、羟基甲硝唑、羟基地美硝唑、甲硝唑-D₃、地美硝唑-D₃、羟基甲硝唑-D₂、羟基地美硝唑-D₃,含量均≥95%。具体见附录 A。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液:取甲硝唑、地美硝唑、羟基甲硝唑、羟基地美硝唑标准品适量(相当于各有效成分 10 mg),精密称定,用甲醇溶解并稀释定容于 10 mL 容量瓶,配制成浓度为 1 mg/mL 的甲硝唑、地美硝唑、羟基甲硝唑和羟基地美硝唑标准储备液。-18℃以下保存,有效期 6 个月。

5.4.2 内标储备液:取甲硝唑-D₃、地美硝唑-D₃、羟基甲硝唑-D₂和羟基地美硝唑-D₃标准品适量(相当于各有效成分 10 mg),精密称定,用甲醇溶解并稀释定容于 10 mL 容量瓶,配制成浓度为 1 mg/mL 的甲硝唑-D₃、地美硝唑-D₃、羟基甲硝唑-D₂和羟基地美硝唑-D₃内标储备液。-18℃以下保存,有效期 6 个月。

5.4.3 10 μg/mL 混合标准工作液:分别精密量取标准储备液各 0.1 mL 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度为 10 μg/mL 的混合标准工作液。-18℃以下保存,有效期 6 个月。

5.4.4 1 μg/mL 混合标准工作液:精密量取 10 μg/mL 混合标准工作液 1 mL 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度为 1 μg/mL 的混合标准工作液。-18℃以下保存,有效期 3 个月。

5.4.5 0.1 μg/mL 混合标准工作液:精密量取 1 μg/mL 混合标准工作液 1 mL 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度为 0.1 μg/mL 的混合标准工作液。-18℃以下保存,有效期 1 个月。

5.4.6 10 μg/mL 混合内标工作液:分别精密量取内标储备液各 0.1 mL 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度为 10 μg/mL 的混合内标工作液。-18℃以下保存,有效期 6 个月。

5.4.7 1 μg/mL 混合内标工作液:精密量取 10 μg/mL 内标工作液 1 mL 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度为 1 μg/mL 的混合内标工作液。-18℃以下保存,有效期 3 个月。

5.5 材料

5.5.1 混合型强阳离子交换反相固相萃取柱:60 mg/3 mL,或相当者。

5.5.2 微孔滤膜:0.2 μm,水相。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪:带电喷雾离子源。

6.2 分析天平:感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 氮吹仪。

6.4 涡旋混合器。

6.5 离心机。

6.6 组织匀浆机。

6.7 固相萃取装置。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织,绞碎,并均质。

a) 取均质后的供试样品,作为供试试样;

b) 取均质后的空白样品,作为空白试样;

c) 取均质后的空白样品,添加适宜浓度的标准溶液,作为空白添加试料。

7.2 试样的保存

-18℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

称取试样 2 g(准确至 ± 0.05 g),于 50 mL 塑料离心管,加 1 $\mu\text{g/mL}$ 混合内标工作液 10 μL ,涡旋 30 s 混匀,静置 10 min。加乙酸乙酯 15 mL,涡旋 2 min,10 000 r/min 离心 5 min。取上清液于另一 50 mL 离心管中,残渣中加乙酸乙酯 15 mL,重复提取一次,合并 2 次提取液,于 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴氮气吹干。

8.2 净化

残余物中加 0.1 mol/L 盐酸溶液 5 mL,涡旋 1 min 充分溶解,加正己烷 5 mL,振摇 1 min,5 000 r/min 离心 5 min,弃正己烷层。下层再加正己烷 5 mL 重复除脂一次,弃正己烷层,备用。

固相萃取柱依次用甲醇 2 mL 和 0.1 mol/L 盐酸溶液 2 mL 活化,取备用液过柱,依次用 0.1 mol/L 盐酸溶液 2 mL、甲醇 1 mL 和 2% 氨水 1 mL 淋洗,用洗脱液 2 mL 洗脱。收集洗脱液,35 $^{\circ}\text{C}$ 水浴氮气吹干,残余物中加水 0.5 mL 涡旋 1 min,滤膜过滤,供液相色谱-串联质谱测定。

8.3 基质匹配标准曲线的制备

取经提取和净化的空白试料溶液,加入适量的混合标准工作液和 1 $\mu\text{g/mL}$ 混合内标工作液 10 μL ,35 $^{\circ}\text{C}$ 水浴氮气吹干,加水 0.5 mL 涡旋 1 min,配制成浓度为 2 $\mu\text{g/L}$ 、4 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 、40 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$ 和 400 $\mu\text{g/L}$ 的基质匹配标准溶液,过滤后供液相色谱-串联质谱测定。以测得的硝基咪唑类药物与相应内标的特征离子峰面积之比为纵坐标,标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线,求回归方程和相关系数。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱: C_{18} 色谱柱 (50 mm \times 2.1 mm,1.7 μm)或相当者;
- 流动相:A 为 0.1% 的甲酸水溶液,B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液,梯度洗脱程序见表 1;
- 流速:0.3 mL/min;
- 柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;
- 进样量:10 μL 。

表 1 梯度洗脱程序

时间,min	0.1%甲酸水溶液,%	0.1%甲酸乙腈溶液,%
0	95	5
0.5	95	5
2.0	85	15
3.0	0	100
3.1	95	5
4.5	95	5

8.4.2 质谱参考条件

- 离子源:电喷雾(ESI)离子源;
- 扫描方式:正离子扫描;
- 检测方式:多反应监测;
- 喷雾电压:3 000 V;
- 雾化温度:350 $^{\circ}\text{C}$;
- 源温:100 $^{\circ}\text{C}$;
- 锥孔气流速:30 L/h;
- 雾化气流速:600 L/h;
- 待测药物定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量的参考值见表 2。

表 2 待测药物定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量的参考值

化合物名称	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
甲硝唑	172.1 $>$ 82.1	172.1 $>$ 128.2	15	20
	172.1 $>$ 128.2			15

表 2 (续)

化合物名称	定性离子对 <i>m/z</i>	定量离子对 <i>m/z</i>	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
甲硝唑-D ₃	175.0>131.0	175.0>131.0	15	15
羟基甲硝唑	188.2>123.2	188.2>123.2	15	15
	188.2>126.2			15
羟基甲硝唑-D ₂	190.0>125.2	190.0>125.2	15	15
地美硝唑	142.0>81.2	142.0>96.0	10	20
	142.0>96.0			15
地美硝唑-D ₃	145.0>99.0	145.0>99.0	10	15
羟基地美硝唑	158.0>55.2	158.0>140.3	15	15
	158.0>140.3			10
羟基地美硝唑-D ₃	161.0>143.0	161.0>143.0	15	10

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在同样测试条件下,试料溶液中硝基咪唑类药物的保留时间与基质匹配标准工作液中硝基咪唑类药物的保留时间之比,偏差在±2.5%以内,且检测到的相对离子丰度,应当与浓度相当的基质匹配标准溶液离子相对丰度一致。其允许偏差应符合表 3 要求。

表 3 定性确证时相对离子丰度的允许偏差

				单位为百分号
相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

8.4.3.2 定量测定

取试料溶液和基质匹配标准工作液,作单点或多点校准,按内标法定量。基质匹配标准工作液及试料溶液中目标物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。在上述色谱-质谱条件下,标准溶液特征离子质量色谱图见附录 B。

8.5 空白试验

取空白试料,除不加药物外,采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试样中硝基咪唑类药物的残留量按标准曲线或公式(1)计算。

$$X = \frac{A \times A'_{is} \times C_s \times C_{is} \times V}{A_{is} \times A_s \times C'_{is} \times m}$$

..... (1)

式中:

- X* —— 试样中硝基咪唑类药物残留量的数值,单位为微克每千克(μg/kg);
- A* —— 供试试样溶液中硝基咪唑类药物的峰面积;
- A'is* —— 基质匹配标准溶液中内标的峰面积;
- Cs* —— 基质匹配标准溶液中硝基咪唑类药物浓度的数值,单位为微克每升(μg/L);
- Cis* —— 供试试样中内标浓度的数值,单位为微克每升(μg/L);
- V* —— 供试试样最终定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- Ais* —— 供试试样溶液中内标的峰面积;
- As* —— 基质匹配标准溶液中硝基咪唑类药物的峰面积;
- C'is* —— 基质匹配标准溶液中内标浓度的数值,单位为微克每升(μg/L);
- m* —— 供试试样质量的数值,单位为克(g)。

10 方法灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法的检测限为 $0.5\ \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法在 $1\ \mu\text{g}/\text{kg}\sim 10\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $60\%\sim 120\%$ 。

10.3 精密度

本方法批内相对标准偏差 $\leq 20\%$, 批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附 录 A
(资料性)

硝基咪唑类药物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号

硝基咪唑类药物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号见表 A.1。

表 A.1 硝基咪唑类药物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号

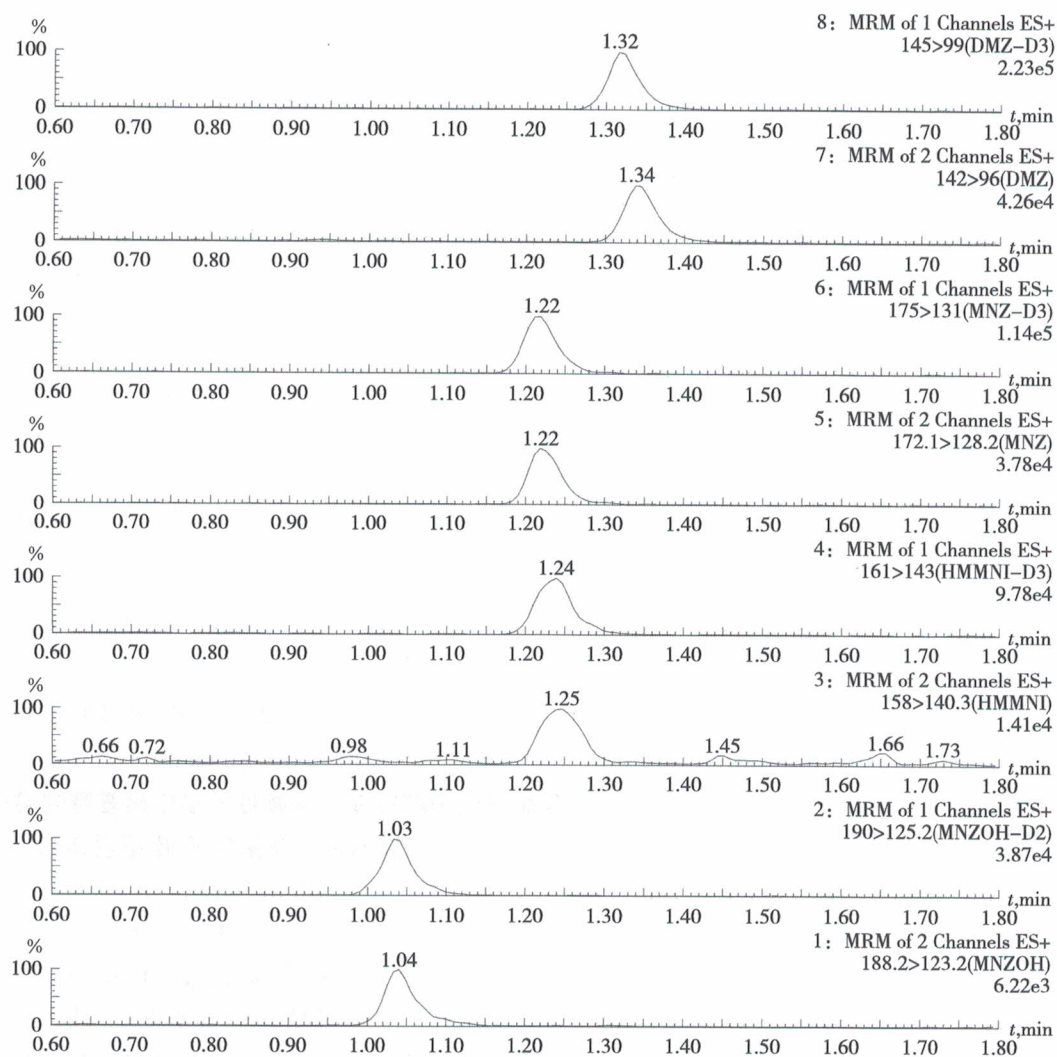
中文通用名称	英文通用名称	化学分子式	CAS 号
羟基甲硝唑	Hydroxy Metronidazole	C ₆ H ₉ N ₃ O ₄	4812-40-2
羟基甲硝唑-D ₂	Hydroxy Metronidazole-D ₂	C ₆ H ₇ D ₂ N ₃ O ₄	—
羟基地美硝唑	Hydroxy Dimetridazole	C ₅ H ₇ N ₃ O ₃	936-05-0
羟基地美硝唑-D ₃	Hydroxy Dimetridazole-D ₃	C ₅ H ₄ D ₃ N ₃ O ₃	1015855-78-3
甲硝唑	Metronidazole	C ₆ H ₉ N ₃ O ₃	443-48-1
甲硝唑-D ₃	Metronidazole-D ₃	C ₆ H ₆ D ₃ N ₃ O ₃	83413-09-6
地美硝唑	Dimetridazole	C ₅ H ₇ N ₃ O ₂	551-92-8
地美硝唑-D ₃	Dimetridazole-D ₃	C ₅ H ₄ D ₃ N ₃ O ₂	64678-69-9

附录 B

(资料性)

硝基咪唑类药物标准溶液特征离子质量色谱图

硝基咪唑类药物标准溶液特征离子质量色谱图见图 B.1。

图 B.1 硝基咪唑类药物标准溶液特征离子质量色谱图 (4 $\mu\text{g/L}$)

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
食 品 安 全 国 家 标 准 动 物 性 食 品 中 硝 基 咪 唑 类 药 物 残 留 量
的 测 定 液 相 色 谱-串 联 质 谱 法

GB 31658.23—2022

* * *

中 国 农 业 出 版 社 出 版
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北 京 印 刷 一 厂 印 刷

新 华 书 店 北 京 发 行 所 发 行 各 地 新 华 书 店 经 销

* * *

开 本 880mm×1230mm 1/16 印 张 0.75 字 数 15 千 字

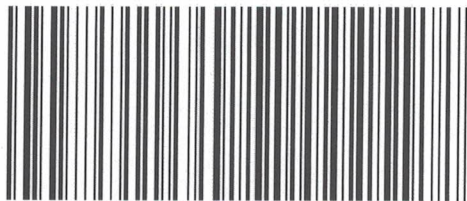
2022 年 12 月 第 1 版 2022 年 12 月 北 京 第 1 次 印 刷

书 号: 16109·9149

定 价: 24.00 元

版 权 专 有 侵 权 必 究

举 报 电 话: (010) 59194261



GB 31658.23—2022