

中华人民共和国国家标准

GB/T 22982—2008

牛奶和奶粉中甲硝唑、洛硝哒唑、 二甲硝唑及其代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of metronidazole, ronidazole, dimetridazole residues
in milk and milk powder—
LC-MS-MS method

2008-12-31 发布

2009-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 A、附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局、中华人民共和国河北出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：王凤池、艾连峰、郭春海、段文仲、陈瑞春、吕红英、窦彩云、马育松、庞国芳。

牛奶和奶粉中甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝唑及其代谢物残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛奶和奶粉中甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝唑及其代谢物残留量的高效液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛奶和奶粉中甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝唑及其代谢物残留量的测定和确证。

本标准的方法检出限：牛奶中甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝唑为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，羟基甲硝唑为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，1-甲基-2-羟甲基-5-硝基咪唑为 $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ；奶粉中甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝唑为 $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，羟基甲硝唑为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，1-甲基-2-羟甲基-5-硝基咪唑为 $12.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6379.1 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度） 第1部分：总则与定义（GB/T 6379.1—2004，ISO 5725-1:1994，IDT）

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度） 第2部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法（GB/T 6379.2—2004，ISO 5725-2:1994，IDT）

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法（GB/T 6682—2008，ISO 3696:1987，MOD）

3 原理

用乙腈-乙酸乙酯提取试样中的分析物，阳离子固相萃取柱净化，高效液相色谱-串联质谱测定，内标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为液相色谱纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 乙腈。

4.2 乙酸乙酯。

4.3 甲醇。

4.4 丙酮。

4.5 乙酸。

4.6 氨水。

4.7 无水硫酸钠，分析纯：经 $650 \text{ }^\circ\text{C}$ 灼烧 4 h，置于干燥器内备用。

4.8 氨水-乙腈（1+19）：量取 5 mL 氨水，用乙腈定容至 100 mL。

4.9 标准品：甲硝唑（metronidazole，CAS:13182-89-3）、洛硝哒唑（ronidazole，CAS:7681-76-7）、二甲硝唑（dimetridazole，CAS:551-92-8）、羟基甲硝唑（metronidazole-OH，CAS:7681-76-7）、1-甲基-2-羟甲基-5-硝基咪唑（hydroxydimetridazole，CAS:936-05-0）、氘代洛硝哒唑（RNZ-D3）、氘代羟基甲硝唑（MZNOH-D2）和氘代 1-甲基-2-羟甲基-5-硝基咪唑（HMMNI-D3）：纯度均大于等于 98%。

- 4.10 标准储备液:分别精确称取适量标准品,用甲醇配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液。
- 4.11 混合标准中间工作液:取标准储备液各 1 mL 至 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,配制成混合标准工作液,浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- 4.12 内标标准储备溶液:称取适量氘代内标标准品,用甲醇溶解成浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 储备液。
- 4.13 内标混合标准中间工作液:量取适量标准储备液(4.12),用甲醇定配制成内标混合标准中间工作液,浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- 4.14 滤膜:0.45 μm 。
- 4.15 阳离子固相萃取柱:500 mg,3 mL,使用前依次用 3 mL 甲醇、3 mL 乙酸乙酯活化。

5 仪器和设备

- 5.1 高效液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源(ESI)。
- 5.2 离心机。
- 5.3 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g。
- 5.4 旋涡混和器。
- 5.5 旋转蒸发仪。
- 5.6 氮吹仪。
- 5.7 固相萃取装置。

6 试样的制备与保存

6.1 牛奶

取均匀样品约 250 g 装入洁净容器作为试样,密封置 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存,并标明标记。

6.2 奶粉

取均匀样品约 250 g 装入洁净容器作为试样,密封,并标明标记。

7 测定步骤

7.1 提取

牛奶样品称取 5 g(准确至 0.01 g)于 50 mL 具塞离心管中,奶粉样品称取 1 g(准确至 0.01 g)并加入 5 mL 水,往称取好的样品中加入 25 μL 100 ng/mL 内标混合液,混匀。

在称取好样品离心管中首先加入 5 mL 乙腈以沉淀蛋白,然后再加入 20 mL 乙酸乙酯,振荡提取 2 min 后,3 000 r/min 离心 10 min,移取上清液并通过 5 g 无水硫酸钠过滤至鸡心瓶中。再用 20 mL 乙酸乙酯重复提取一次,合并上清液于同一鸡心瓶中。

7.2 净化

将提取液于 45 $^{\circ}\text{C}$ 下旋转蒸发至约 2 mL 左右,然后转移到已活化的固相萃取柱上,再用 5 mL 乙酸乙酯洗涤鸡心瓶两次,洗液一并转移到固相萃取柱上,以小于 2 mL/min 流速滴下。接着依次用 3 mL 丙酮,3 mL 甲醇,2 mL 氨水-乙腈(5+95)淋洗,最后用 5 mL 氨水-乙腈(5+95)洗脱并收集(此过程流速小于 2 mL/min)。洗脱液在 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴上用氮气小心吹至近干,用水定容至 1 mL,涡漩混合后,过 0.45 μm 滤膜供 HPLC-MS-MS 分析。

7.3 空白基质溶液的制备

将取牛奶阴性样品 5 g,奶粉阴性样品 1 g(精确到 0.01 g),按 7.1 和 7.2 操作。

7.4 测定条件

7.4.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: C_{18} , 5 μm , 150 mm \times 2.1 mm (内径)或相当者;

- b) 色谱柱温度:30 °C;
c) 进样量:15 μL;
d) 流动相梯度及流速见表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

时间/min	流速/(μL/min)	0.1%乙酸水溶液/%	乙腈/%
0.00	200	80	20
6.00	200	65	35
8.00	200	65	35
8.10	200	80	20
10.0	200	80	20

7.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- a) 离子化模式:电喷雾正离子模式(ESI+);
b) 质谱扫描方式:多反应监测(MRM);
c) 鞘气压力:104 kPa;
d) 辅助气压力:138 kPa;
e) 正离子模式电喷雾电压(IS):4 000 V;
f) 毛细管温度:320 °C;
g) 源内诱导解离电压:10 V;
h) Q1 为 0.4, Q3 为 0.7;
i) 碰撞气:高纯氩气;
j) 碰撞气压力:0.2 Pa;
k) 参考保留时间、监测离子对和裂解能量见表 2。

表 2 被测物的参考保留时间、监测离子对和裂解能量

化合物名称	保留时间/min	检测离子对(m/z)	裂解能量/eV
羟基甲硝唑	3.74	188.04/122.96 ^a	13
		188.04/125.94	18
1-甲基-2-羟甲基-5-硝基咪唑	4.82	158.06/140.01 ^a	12
		158.06/112.05	19
甲硝唑	4.79	172.09/128.00 ^a	15
		172.09/82.03	25
洛硝哒唑	5.76	201.05/139.98 ^a	12
		201.051/110.0	17
二甲硝唑	6.43	142.07/96.03 ^a	16
		142.07/81.03	29
氘代羟基甲硝唑	3.74	190.05/124.97	12
氘代 1-甲基-2-羟甲基-5-硝基咪唑	4.82	161.06/143.00	13
氘代洛硝哒唑	4.79	204.04/143.00	11

^a 为定量离子对,对于不同质谱仪器,仪器参数可能存在差异,测定前应将质谱参数优化到最佳。

7.4.3 液相色谱-串联质谱测定

7.4.3.1 定性测定

每种被测组分选择 1 个母离子, 2 个以上子离子, 在相同实验条件下, 样品中待测物质的保留时间, 与混合基质标准校准溶液中对应的保留时间偏差在 ±2.5% 之内; 且样品谱图中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的混合基质标准校准溶液谱图中对应的定性离子的相对丰度进行比较, 偏差不超过表 3 规定的范围, 则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差 %

相对离子丰度 K	$K > 50$	$20 < K < 50$	$10 < K < 20$	$K \leq 10$
允许最大偏差	±20	±25	±30	±50

7.4.3.2 定量测定

在仪器最佳工作条件下, 对混合基质标准校准溶液进样, 以被测物峰面积和内标峰面积的比值为纵坐标, 混合基质校准溶液浓度为横坐标绘制标准工作曲线, 用标准工作曲线对样品进行定量, 样品溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。上述色谱和质谱条件下, 标准物质多反应监测 (MRM) 色谱图参见附录 A 中的图 A.1。

7.5 平行试验

按以上步骤, 对同一试样进行平行试验测定。

7.6 回收率试验

吸取适量混合标准工作溶液, 用空白基质溶液稀释成所需浓度的标准校准溶液。阴性样品中添加标准溶液, 按 7.1 和 7.2 操作, 测定后计算样品添加的回收率, 回收率范围参见附录 B 中的表 B.1。

8 结果计算

试样中分析物的残留量利用数据处理系统计算或按式(1)计算:

$$X = c_s \times \frac{A}{A_s} \times \frac{c_i}{c_{si}} \times \frac{A_{si}}{A_i} \times \frac{V}{m} \times \frac{1\,000}{1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X ——试样中被测物残留量, 单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- c_s ——基质标准工作溶液中被测物的浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A ——试样溶液中被测物的色谱峰面积;
- A_s ——基质标准工作溶液中被测物的色谱峰面积;
- c_i ——试样溶液中内标物的浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL);
- c_{si} ——基质标准工作溶液中内标物的浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A_{si} ——基质标准工作溶液中内标物的色谱峰面积;
- A_i ——试样溶液中内标物的色谱峰面积;
- V ——样液最终定容体积, 单位为毫升(mL);
- m ——试样溶液所代表试样的质量, 单位为克(g)。

计算结果应扣除空白值。

9 精密度

9.1 一般规定

本标准的精密度数据是按照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 的规定确定的, 重复性和再现性的值以 95% 的可信度来计算。

9.2 重复性

在重复性条件下, 获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限(r), 被测物的添加浓度范

围及重复性方程见表 4 和表 5。

表 4 牛奶样品五种分析物的添加浓度范围及重复性和再现性方程

单位为微克每千克

化合物名称	添加浓度范围	重复性限 r	再现性限 R
羟基甲硝唑	1~10	$r=0.2259m-0.1764$	$R=0.1812m+0.0496$
1-甲基-2-羟甲基-5-硝基咪唑	2.5~25	$\lg r=0.929 \lg m-0.836$	$\lg R=1.009 \lg m-0.692$
甲硝唑	0.5~5	$\lg r=0.952 \lg m-0.902$	$\lg R=0.898 \lg m-0.680$
洛硝哒唑	0.5~5	$\lg r=0.873 \lg m-0.670$	$\lg R=0.854 \lg m-0.665$
二甲硝唑	0.5~5	$r=0.200m-0.0548$	$R=0.193m+0.0356$
注： m 为两次测定结果的算术平均值。			

表 5 奶粉样品五种分析物的添加浓度范围及重复性和再现性方程

单位为微克每千克

化合物名称	添加浓度范围	重复性限 r	再现性限 R
羟基甲硝唑	5~50	$\lg r=1.2597 \lg m-1.1738$	$\lg R=1.0540 \lg m-0.6542$
1-甲基-2-羟甲基-5-硝基咪唑	12.5~125	$r=0.133m+1.190$	$R=0.137m+3.694$
甲硝唑	2.5~25	$\lg r=1.033 \lg m-0.811$	$\lg R=0.985 \lg m-0.622$
洛硝哒唑	2.5~25	$\lg r=0.928 \lg m-0.687$	$\lg R=0.924 \lg m-0.553$
二甲硝唑	2.5~25	$\lg r=1.133 \lg m-0.916$	$\lg R=0.980 \lg m-0.562$
注： m 为两次测定结果的算术平均值。			

如果差值超过重复性限,应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.3 再现性

在再现性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 (R),被测物的添加浓度范围及再现性方程见表 4 和表 5。

附录 A
(资料性附录)

标准物质多反应监测(MRM)色谱图

标准物质多反应监测(MRM)色谱图,见图 A.1。

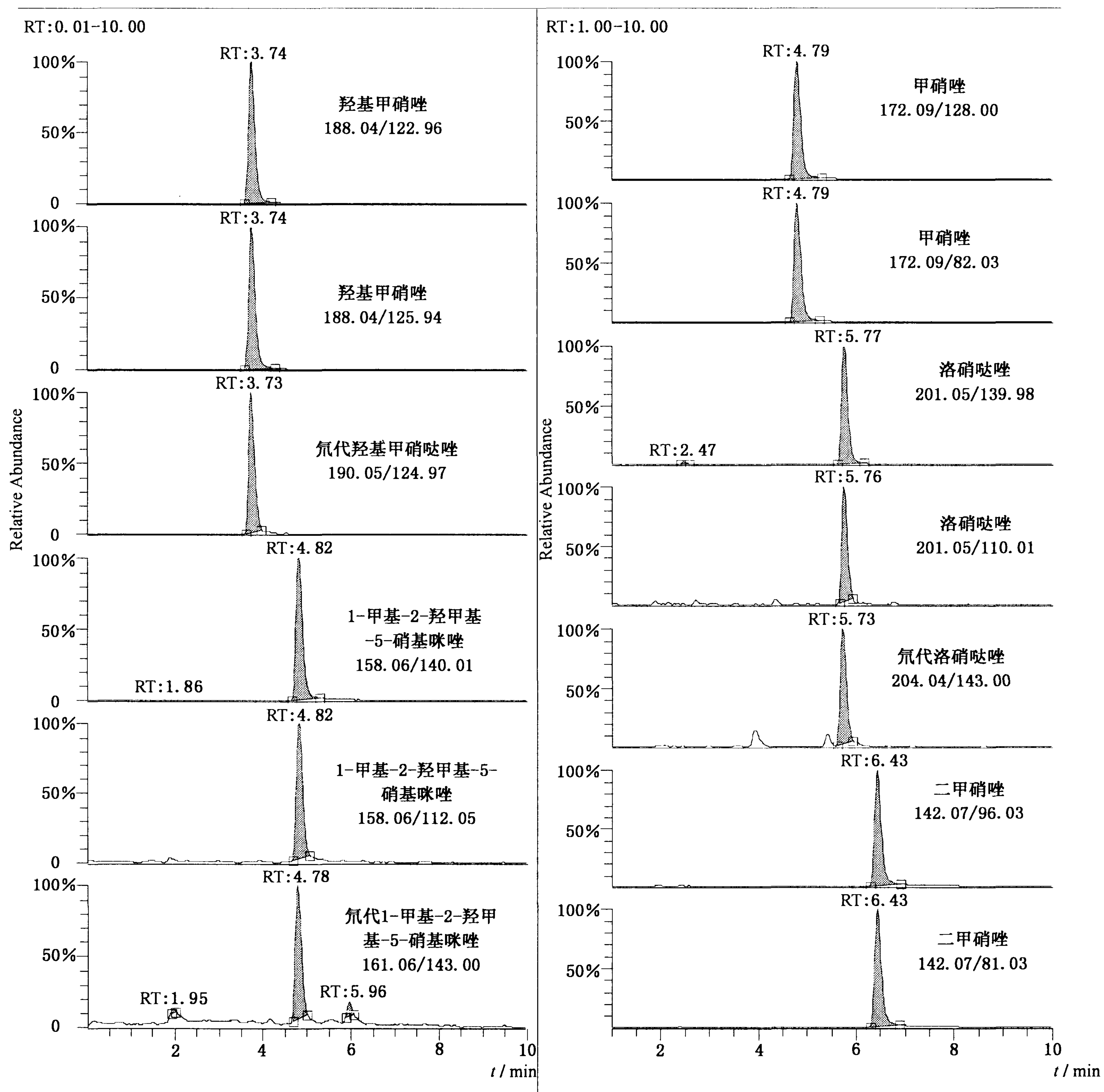


图 A.1 标准物质多反应监测(MRM)色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

五种分析物的添加浓度及其回收率范围数据,见表 B.1。

表 B.1 五种分析物的添加浓度及其回收率范围数据

化合物名称	牛奶		奶粉	
	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率范围/%	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率范围/%
羟基甲硝唑	1	89.0~108	5	83.2~105
	2	98.0~110	10	87.4~111
	4	91.0~106	20	89.9~109
	10	83.8~105	50	80.1~101
甲硝唑	0.5	82.0~102	2.5	82.8~100
	1	90.0~110	5	91.8~116
	2	85.5~115	10	88.7~105
	5	94.8~106	25	81.5~109
1-甲基-2-羟甲基-5-硝基咪唑	2.5	94.8~108	12.5	94.3~109
	5	98.2~110	50	82.4~105
	10	92.1~112	100	87.0~116
	25	89.6~106	125	94.3~111
洛硝哒唑	0.5	82.0~102	2.5	82.0~105
	1	86.0~110	5	89.6~109
	2	91.0~108	10	81.8~97.4
	5	88.2~103	25	82.6~97.3
二甲硝唑	0.5	82.0~98.0	2.5	82.4~104
	1	80.0~97.0	5	84.4~103
	2	86.0~101	10	80.3~103
	5	94.8~106	25	81.6~107