



中华人民共和国国家标准

GB/T××××—××××

食品安全国家标准
蜂产品中硝基咪唑类药物及其代谢物
残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard-
Determination of nitroimidazole and metabolites residues in bee products by liquid
chromatography-tandem mass spectrometry method

(征求意见稿)

20××-××-××发布

20××-××-××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
国家市场监督管理总局

发布

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》的规定起草编制。

征求意见稿

食品安全国家标准

蜂产品中硝基咪唑类药物及其代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了蜂产品中硝基咪唑类药物残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于蜂蜜和蜂王浆中甲硝唑、羟基甲硝唑、地美硝唑、2-羟甲基-1-甲基-5 硝基咪唑、异丙硝唑、羟基异丙硝唑、洛硝哒唑、氯甲硝咪唑、苯硝咪唑、替硝唑、特尼哒唑残留量的测定。

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 分析实验室用水规则和试验方法。

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

蜂蜜和蜂王浆用磷酸二氢钾溶液溶解，残留的药物用乙酸乙酯提取，蜂蜜的提取液氮气吹干后复溶，蜂王浆的提取液经固相萃取柱净化后氮气吹干复溶，液相色谱-串联质谱测定，基质匹配标准曲线内标法定量。

5 试剂或材料

以下所用试剂，除特殊注明外均为分析纯试剂，水为符合GB/T 6682中规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 甲酸 (HCOOH)：色谱纯。

5.1.2 甲醇 (CH₃OH)：色谱纯。

5.1.3 乙腈 (C₂H₅N)：色谱纯。

5.1.4 乙酸乙酯 (C₄H₈O₂)：色谱纯。

5.1.5 磷酸二氢钾 (KH₂PO₄)。

5.1.6 无水硫酸镁 (MgSO₄)。

5.1.7 氯化钠 (NaCl)。

5.2 溶液配制

5.2.1 磷酸二氢钾溶液 (0.2 mol/L)：取磷酸二氢钾 13.6 g，用水溶解并稀释至 500 mL，混匀。5.2.2 乙腈溶液：取乙腈 10 mL 和甲酸 100 μ L，用水稀释至 100 mL，混匀。

5.2.3 0.1%甲酸溶液：取甲酸 1 mL，用水稀释至 1000 mL，混匀。

5.2.4 甲醇-乙腈溶液：取甲醇 20 mL 和甲酸 100 μ L，用乙腈稀释至 100 mL，混匀。

5.3 标准品及其纯度：甲硝唑、羟基甲硝唑、地美硝唑、2-羟甲基-1-甲基-5 硝基咪唑、异丙硝唑、羟基异丙硝唑、洛硝哒唑、氯甲硝咪唑、苯硝咪唑、替硝唑、特尼哒唑、甲硝唑-13C₂,15N₂、二甲硝咪唑-D₃、洛硝哒唑-D₃、羟基异丙硝唑-D₃ 和羟甲基甲硝咪唑-D₃，含量均 \geq 98%，具体信息见附录 A。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 硝基咪唑类药物单一标准储备液：取适量的 11 种硝基咪唑类药物标准品，用甲醇溶解，配制成 1000 mg/L 的标准储备液。-18 $^{\circ}$ C 避光可保存 3 个月。

5.4.2 硝基咪唑类药物混合标准中间液：分别准确量取 11 种硝基咪唑类药物单一标准储备液 100 μ L，于 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，配制成浓度为 10 mg/L 的硝基咪唑类药物混合标准中间液。4 $^{\circ}$ C 避光可保存 1 个月。

5.4.3 硝基咪唑类药物混合标准工作液：准确量取硝基咪唑类药物混合标准中间液适量，用甲醇稀释成浓度为 0.5 μ g/L、1.0 μ g/L、2.5 μ g/L、5.0 μ g/L、10.0 μ g/L 和 50.0 μ g/L 的系列混合标准工作液。现用现配。

5.4.4 硝基咪唑类药物同位素内标物单一标准储备液：分别准确称取硝基咪唑类药物同位素内标物 10 mg，用甲醇溶解，并定容至 10 mL，配制成 1000 mg/L 的标准储备液。-18 $^{\circ}$ C 避光可保存 3 个月。

5.4.5 硝基咪唑类药物同位素内标物混合标准中间液：依次吸取 5 种硝基咪唑类药物同位素内标物单一标准储备液 100 μ L，于 10 mL 容量瓶中，甲醇定容至刻度，配制成浓度为 10 mg/L 的硝基咪唑类药物同位素内标混合标准中间液。4 $^{\circ}$ C 避光可保存 1 个月。

5.4.6 硝基咪唑类药物同位素内标物混合标准工作液：吸取适量硝基咪唑类药物同位素内标物混合标准中间液，用甲醇稀释，配制成浓度为 100 μ g/L 的硝基咪唑类药物内标混合标准工作液。现配现用。

5.5 材料

5.5.1 亲水亲脂平衡型固相萃取柱：500 mg/6 mL，或相当者。

5.5.2 微孔尼龙滤膜：0.22 μ m。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾电离源。

6.2 涡旋振荡仪。

6.3 高速离心机：转速不低于 10000 r/min。

6.4 氮吹仪。

6.5 分析天平：感量 0.00001 g 和 0.01 g。

6.6 移液器：10 μ L、20 μ L、200 μ L、1000 μ L、5000 μ L。

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蜂产品, 将其搅拌均匀.对有结晶的蜂蜜样品, 在密闭情况下, 置于不超过60 °C的水浴中解晶, 待样品全部融化后搅匀, 冷却至室温。制备好的试样置于样品瓶中, 密封, 并做上标记。

- 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工作液, 作为空白添加试样。

7.2 试样的保存

蜂蜜样品于室温下避光保存; 蜂王浆样品于-18 °C下保存。

8 测定步骤

8.1 样品前处理

8.1.1 蜂蜜

称取蜂蜜试料(5±0.05) g于50 mL具塞塑料离心管中, 依次加入内标混合工作液100 μL和磷酸二氢钾溶液10 mL, 振荡溶解, 加入乙酸乙酯10 mL, 振荡5 min, 于4 °C下8000 r/min离心5 min, 取上层溶液于另一塑料离心管中, 再加入乙酸乙酯10 mL重复提取一次, 合并上层溶液, 于45 °C下氮吹至近干, 加入乙腈溶液1.0 mL复溶, 经0.22 μm尼龙滤膜过滤, 供液相色谱-串联质谱测定。

8.1.2 蜂王浆

8.1.2.1 提取

称取蜂王浆试料(2±0.05) g于50 mL具塞塑料离心管中, 依次加入内标混合工作液100 μL和磷酸二氢钾溶液10 mL, 振荡混匀, 依次加入乙酸乙酯10 mL, 无水硫酸镁4 g、氯化钠4 g, 振荡5 min, 于4 °C下10000 r/min离心5 min, 取上层溶液于另一塑料离心管中, 再加入乙酸乙酯10 mL, 重复提取一次, 合并上层溶液, 于45 °C下氮吹至近干。向离心管中加入水5 mL, 涡旋0.5 min后至离心管中, 重复该操作两次并合并水溶液, 备用。

8.1.2.2 净化

固相萃取小柱预先依次用甲醇5 mL和水5 mL活化。备用液过柱, 待液面到达小柱筛板后抽干小柱, 加入6 mL甲醇洗脱, 收集洗脱液, 于45 °C下氮吹至近干, 加入1.0 mL乙腈溶液复溶, 经0.22 μm尼龙滤膜过滤, 供液相色谱-串联质谱测定。

8.2 基质匹配标准曲线的制备

精密量取混合标准工作液和同位素内标混合标准工作液适量, 分别加入经提取和净化的空白试料残渣中, 于45 °C下氮吹至近干, 加入乙腈溶液1.0 mL涡旋溶解残余物, 配制成浓度为0.5 μg/L、1.0 μg/L、2.5 μg/L、5.0 μg/L、10.0 μg/L和50.0 μg/L的基质匹配系列混合标准溶液, 内标溶液浓度为10 μg/L, 微孔滤膜过滤, 供液相色谱-串联质谱测定。以待测物的峰面积的平均值与内标的峰面积比作为纵坐标, 标准溶液浓度为横坐标, 绘制基质匹配标准曲线, 求回归方程和相关系数。

8.3 测定

8.3.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱: C₁₈色谱柱(150×3.0 mm, 1.8 μm) 或相当者;

b) 流动相： A相： 0.1%甲酸溶液， B相： 甲醇-乙腈（体积比2+8， 含0.1%甲酸）溶液， 洗脱梯度条件见表1；

c) 流速： 0.3 mL/min；

d) 柱温： 35 ℃；

e) 进样量： 10 μ L。

表 1 梯度洗脱条件

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.00	95	5
1.00	90	10
4.00	50	50
6.00	5	95
6.50	0	100
9.50	0	100
10.00	95	5
13.00	95	5

8.3.2 质谱参考条件

a) 离子源： 电喷雾离子源；

b) 扫描方式： 正离子模式；

c) 检测方式： 多反应监测（MRM）；

d) 干燥气温度： 290 ℃；

e) 干燥气流速： 11 L/min；

f) 雾化器压力： 45 psi；

g) 鞘气温度： 400 ℃；

h) 鞘气流速： 12 L/min；

i) 毛细管电压： 3500 V；

j) 喷嘴电压： 500 V；

选择离子参数设定见表2。

表 2 11 种硝基咪唑药物的选择离子参数设定

化合物名称	定性离子对及碰撞能量, eV	定量离子对及碰撞能量, eV
甲硝唑	172.0 > 128.0 (15) 172.0 > 82.0 (30)	172.0 > 128.0 (15)
羟基甲硝唑	188.0 > 126.0 (15) 188.0 > 123.0 (10)	188.0 > 126.0 (15)
地美硝唑	142.0 > 96.0 (15) 142.0 > 81.0 (30)	142.0 > 96.0 (15)
2-羟甲基-1-甲基-5硝基咪唑	158.0 > 140.0 (10) 158.0 > 55.0 (20)	158.0 > 140.0 (10)
异丙硝唑	170.0 > 124.0 (20) 170.0 > 109.0 (20)	170.0 > 124.0 (20)

羟基异丙硝唑	186.0 > 169.0 (20) 186.0 > 122.0 (20)	186.0 > 169.0 (20)
洛硝哒唑	201.0 > 140.0 (10) 201.0 > 55.0 (25)	201.0 > 140.0 (10)
氯甲硝咪唑	162.0 > 145.0 (15) 162.0 > 116.0 (15)	162.0 > 145.0 (15)
苯硝咪唑	164.0 > 118.0 (20) 164.0 > 91.0 (40)	164.0 > 118.0 (20)
替硝唑	248.0 > 128.0 (15) 248.0 > 121.0 (15)	248.0 > 128.0 (15)
特尼哒唑	186.0 > 128.0 (15) 186.0 > 82.0 (30)	186.0 > 128.0 (15)
甲硝唑 - ¹³ C ₂ , ¹⁵ N ₂	176.0 > 132.0 (15)	176.0 > 132.0 (15)
二甲硝咪唑-D3	145.0 > 99.0 (15)	145.0 > 99.0 (15)
洛硝哒唑-D3	204.0 > 143.0 (10)	204.0 > 143.0 (10)
羟基异丙硝唑 -D3	189.0 > 171.0 (10)	189.0 > 171.0 (10)
羟甲基甲硝咪唑 -D3	161.0 > 143.0 (10)	161.0 > 143.0 (10)

8.3.3 测定法

8.3.3.1 定性测定

在相同测试条件下,试样溶液中硝基咪唑类药物及其代谢物与其内标的保留时间之比与基质匹配标准溶液中硝基咪唑类药物及其代谢物与其内标的保留时间之比的偏差在1%之内;且检测到的相对离子丰度,应与浓度相当的校正标准溶液相对离子丰度一致。其允许偏差为±40%。

8.3.3.2 定量测定

分别取适量试料溶液和相应浓度的基质匹配标准工作液,作单点校准或多点校准,以色谱峰峰面积积分值定量。基质匹配标准工作液及试样液中药物的响应值均应在仪器检测的线性范围内,试样液进样过程中应穿插标准工作液,以便准确定量。其中,甲硝唑-¹³C₂,¹⁵N₂作为甲硝唑、异丙硝唑、特尼哒唑的内标;二甲硝咪唑-D3作为二甲硝咪唑、苯硝咪唑的内标;洛硝哒唑-D3作为洛硝哒唑、氯甲硝咪唑、替硝唑的内标;羟基异丙硝唑-D3作为羟基异丙硝唑的内标;羟甲基甲硝咪唑-D3作为羟甲基甲硝咪唑、2-羟甲基-1-甲基-5硝基咪唑的内标。硝基咪唑类药物标准溶液的特征离子色谱图参见附录B。

8.4 空白试验

取空白试样,除不加标准溶液外,采用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及其代谢物的残留量 X ,按标准曲线或公式(1)计算:

$$X = \frac{C_S \times C_{is} \times A_i \times A'_{is} \times V \times 1000}{C'_{is} \times A_S \times A_{is} \times m \times 1000} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

X 一试样中硝基咪唑类药物及代谢物残留量，单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)；

C_S 一基质匹配标准溶液中硝基咪唑类药物及代谢物浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

C_{is} 一试样溶液中硝基咪唑类药物及代谢物内标物浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

C'_{is} 一基质匹配标准溶液中硝基咪唑类药物及代谢物内标物浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

A_i 一试样溶液中硝基咪唑类药物及代谢物的峰面积；

A_S 一基质匹配标准溶液中硝基咪唑类药物及代谢物峰面积；

A_{is} 一试样溶液中硝基咪唑类药物及代谢物的内标物峰面积；

A'_{is} 一标准溶液中硝基咪唑类药物及代谢物的内标物峰面积；

V 一试样最终定容体积，单位为毫升(mL)；

m 一试料质量，单位为克(g)。

10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法蜂蜜中11种硝基咪唑类药物检测限为 $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ；蜂王浆中11种硝基咪唑类药物检测限为 $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法蜂蜜在 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为70%~120%。

本方法蜂王浆在 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 25 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为70%~120%。

10.3 精密度

本方法批内相对标准偏差 $\leq 15\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 15\%$ 。

附录 A

(资料性)

硝基咪唑类药物的英文名称、分子式和 CAS 号

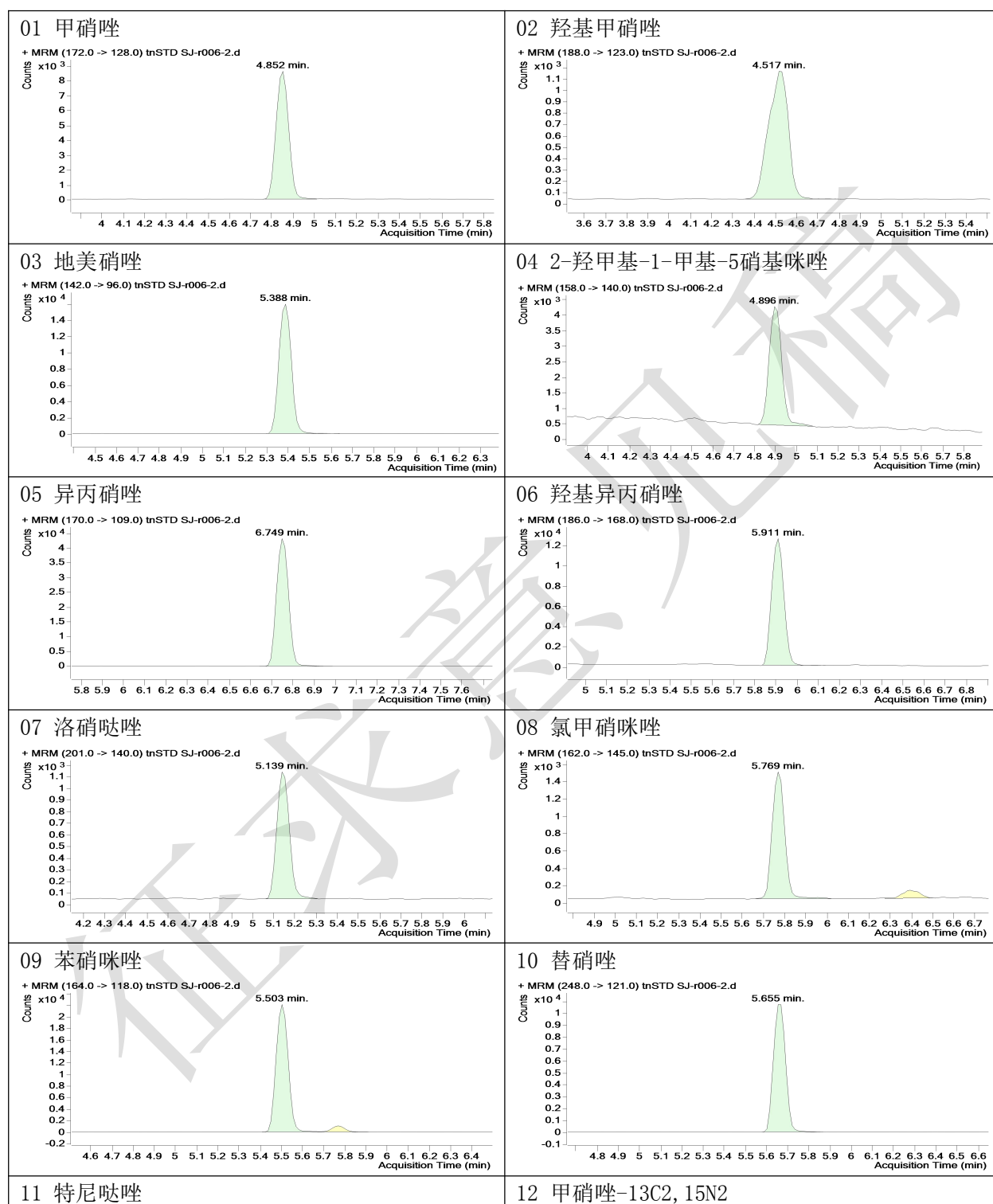
硝基咪唑类药物的英文名称、分子式和 CAS 号见表 A.1。

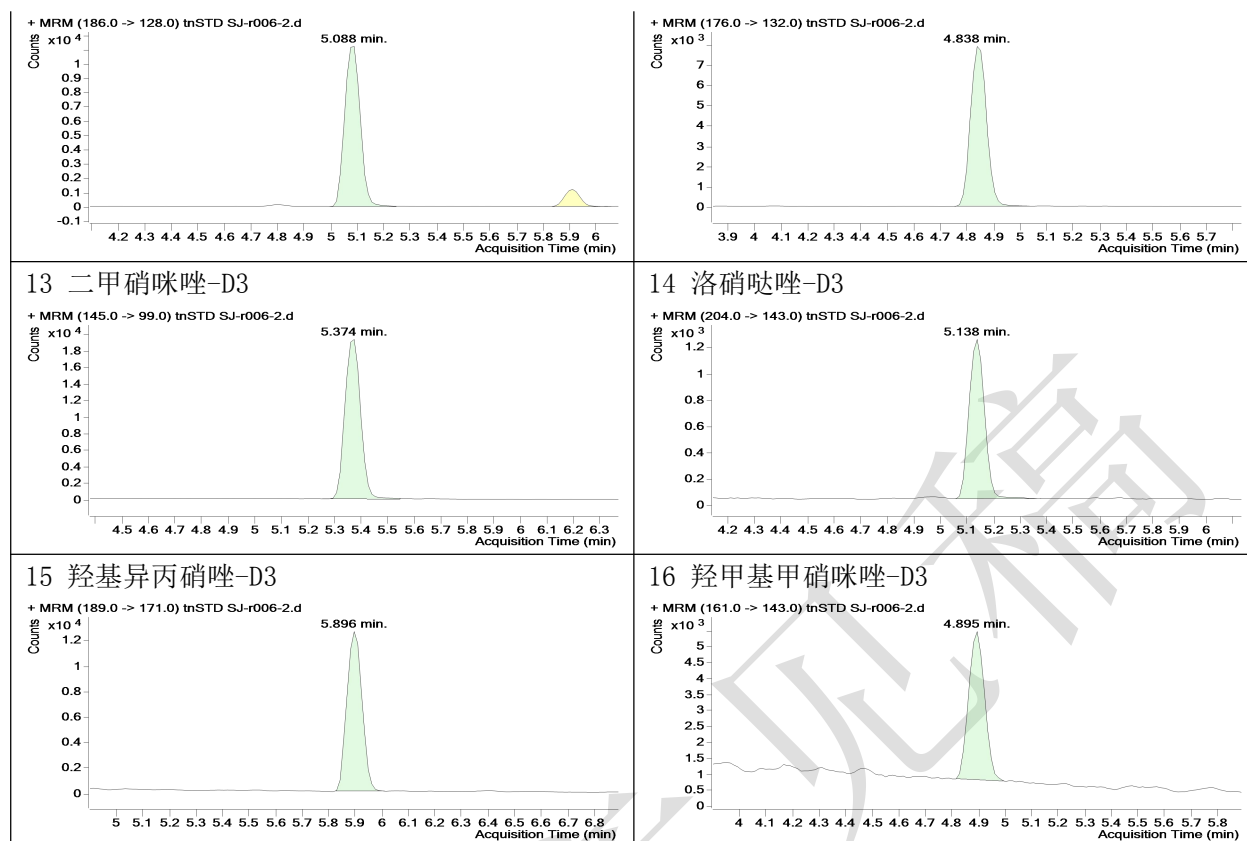
表 A.1 硝基咪唑类药物的英文名称、分子式和 CAS 号

化合物名称	英文名称	分子式	CAS 号
甲硝唑	Metronidazole	C ₆ H ₉ N ₃ O ₃	443-48-1
羟基甲硝唑	Hydroxy Metronidazole	C ₆ H ₉ N ₃ O ₄	4812-40-2
地美硝唑	Dimetridazole	C ₅ H ₇ N ₃ O ₂	551-92-8
2-羟甲基-1-甲基-5 硝基咪唑	(1-Methyl-5-nitro-1H-imidazol-2-yl)methanol	C ₅ H ₇ N ₃ O ₃	936-05-0
异丙硝唑	Ipronidazole	C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₂	14885-29-1
羟基异丙硝唑	Hydroxyipronidazole	C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₃	35175-14-5
洛硝哒唑	Ronidazole	C ₆ H ₈ N ₄ O ₄	7681-76-7
氯甲硝咪唑	5-chloro-1-methyl-4-nitroimidazole	C ₇ H ₁₀ ClN ₃ O ₃	4897-25-0
苯硝咪唑	5-Nitrobenzimidazole	C ₇ H ₅ N ₃ O ₂	94-52-0
替硝唑	Tinidazole	C ₈ H ₁₃ N ₃ O ₄ S	19387-91-8
特尼哒唑	Ternidazole Hydrochloride	C ₇ H ₁₂ ClN ₃ O ₃	1077-93-6
甲硝唑- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N ₂	Metronidazole- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N ₂	C ₄ ¹³ C ₂ H ₉ N ¹⁵ N ₂ O ₃	1173020-03-5
二甲硝咪唑-D ₃	Dimetridazol-d ₃	C ₅ D ₃ H ₄ N ₃ O ₂	64678-69-9
洛硝哒唑-D ₃	Ronidazole-d ₃	C ₆ D ₃ H ₅ N ₄ O ₄	1015855-87-4
羟基异丙硝唑-D ₃	Hydroxy ipronidazole-d ₃	C ₇ D ₃ H ₈ N ₃ O ₃	1156508-86-9
羟甲基甲硝咪唑-D ₃	HMMNI-d ₃	C ₅ H ₄ D ₃ N ₃ O ₃	1015855-78-3

附录 B

11 种硝基咪唑类药及 5 种内标物标准物质混合标准溶液的质量色谱图见图 B.1





图B.1 11种硝基咪唑类药物及其同位素内标标准溶液特征离子质量色谱图 (10 ng/mL)