

中华人民共和国国家标准

农业农村部公告第 197 号—1—2019

代替农业部 1486 号公告—4—2010

饲料中硝基咪唑类药物的测定 液相色谱-质谱法

Determination of nitroimidazoles in feeds—
Liquid chromatography mass spectrometry method

2019-08-01 发布

2020-01-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准代替农业部 1486 号公告—4—2010《饲料中硝基咪唑类药物的测定 液相色谱-质谱法》。与农业部 1486 号公告—4—2010 相比,除编辑性修改外主要技术变化如下:

- 扩充了标准的适用范围(见第 1 章,2010 年版的第 1 章);
- 修改了方法的定量限和检出限,检测限由 $8.0\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 修改为 $1.0\ \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限由 $25.0\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 修改为 $5.0\ \mu\text{g}/\text{kg}$ (见第 1 章,2010 年版的第 1 章);
- 修改了提取溶剂的组成,提取溶剂由乙酸乙酯改成了 $1\ \text{mol}/\text{L}$ 磷酸盐缓冲液($\text{pH}\ 2.0$)(见 7.1, 2010 年版的 7.1);
- 删除了净化中溶剂转换和液液分配萃取的步骤(见 7.2,2010 年版的 7.2);
- 修改了净化过程中净化柱的类型,MCX 小柱净化改成了 HLB 小柱净化(见 7.2,2010 年版的 7.2);
- 修改了液相色谱流动相与梯度洗脱程序(见 7.4.1,2010 版的 7.3.1)。

本标准由农业农村部畜牧兽医局提出。

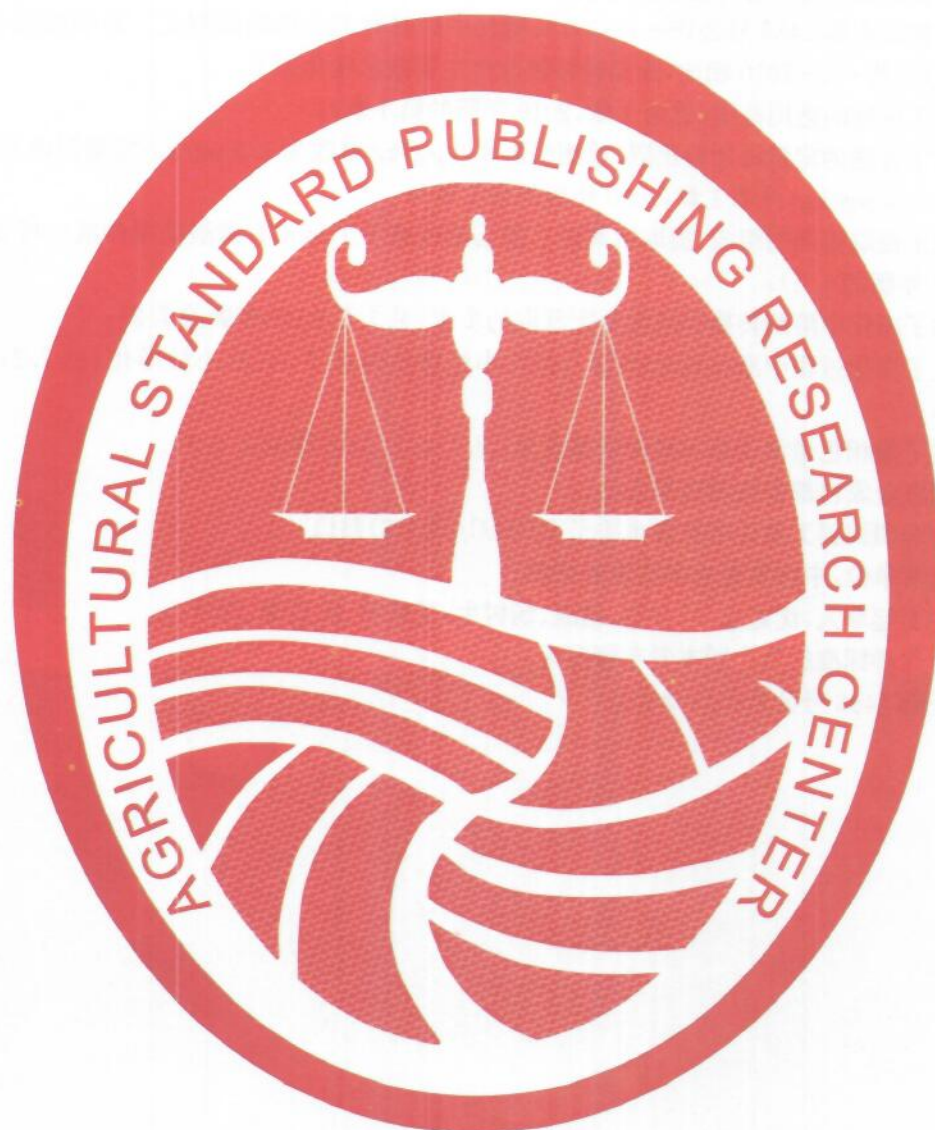
本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位:中国农业大学动物医学院。

本标准主要起草人:沈建忠、程林丽、温凯、汤树生、吴聪明、武英豪、陈可心。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- 农业部 1486 号公告—4—2010。



饲料中硝基咪唑类药物的测定 液相色谱-质谱法

1 范围

本标准规定了饲料中硝基咪唑类药物含量测定的液相色谱-质谱法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中甲硝唑(Metronidazole, MNZ)、二甲硝唑(Dimetridazole, DMZ)、洛硝哒唑(Ronidazole, RNZ)和替硝唑(Tinidazole, TNZ)含量的测定。

本方法的检出限:甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝唑和替硝唑均为 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

本方法的定量限:甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝唑和替硝唑均为 $5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

试样中的硝基咪唑类药物用磷酸盐缓冲液提取,经 HLB 固相萃取柱净化后,用液相色谱-串联质谱仪测定,基质匹配标准曲线校准,外标法定量。

4 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

4.1 水:GB/T 6682,一级。

4.2 乙腈:色谱纯。

4.3 甲醇:色谱纯。

4.4 标准品:甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝唑、替硝唑,纯度均大于等于 98%。

4.5 pH 2.0 磷酸盐缓冲液:准确量取 100 mL 水,备用。准确称取无水磷酸氢二钠 1.97 g,加部分水溶解;往其中继续加入准确量取的纯磷酸 1 204 μL ,加入剩余的水,混合均匀即得。

4.6 20%乙腈溶液:取 20 mL 乙腈和 80 mL 水,混匀。

4.7 5%乙腈溶液:取 5 mL 乙腈和 95 mL 水,混匀。

4.8 0.1%甲酸乙腈溶液:量取甲酸 1 mL,用乙腈定容至 1 000 mL。

4.9 0.1%甲酸溶液:量取甲酸 1 mL,用水定容至 1 000 mL。

4.10 硝基咪唑类药物标准储备液 ($1 \text{ mg}/\text{mL}$):称取硝基咪唑类药物(4.4)各 10 mg (精确到 0.000 1g) 分别置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解、定容。于 -20°C 保存,有效期为 3 个月。

4.11 硝基咪唑类药物混合标准溶液 ($200 \mu\text{g}/\text{mL}$):精确量取硝基咪唑类药物标准储备液(4.10)各 2 mL 置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解定容。于 4°C 保存,有效期为 1 个月。

4.12 硝基咪唑类药物混合标准系列工作溶液:分别移取适量硝基咪唑类药物混合标准溶液(4.11)于 100 mL 容量瓶中,用 20%乙腈溶液(4.6)稀释定容,配制成 $10 \mu\text{g}/\text{L}$ 、 $50 \mu\text{g}/\text{L}$ 、 $100 \mu\text{g}/\text{L}$ 、 $500 \mu\text{g}/\text{L}$ 、 $1\,000 \mu\text{g}/\text{L}$ 、 $5\,000 \mu\text{g}/\text{L}$ 的标准工作液。于 4°C 保存,有效期为 1 周。

4.13 亲水亲脂平衡固相萃取小柱(HLB 柱):规格为 500 mg/6 mL。

4.14 微孔滤膜:规格为 $0.22 \mu\text{m}$,尼龙材质。

5 仪器设备

- 5.1 液相色谱-质谱仪(配有电喷雾电离源)。
- 5.2 分析天平:感量 0.001 g 和 0.1 mg。
- 5.3 涡旋混合器。
- 5.4 振荡器。
- 5.5 离心机:可达 8 000 r/min(相对离心力为 7 012 g)。
- 5.6 固相萃取装置。
- 5.7 氮吹仪。

6 样品

按照 GB/T 20195 的规定制备样品,粉碎后过 0.42 mm 孔径的分析筛,混匀,装入磨口瓶中备用。

7 试验步骤

7.1 提取

平行做 2 份试验。称取 2 g(精确到 0.001 g)试样于 50 mL 离心管中,准确加入 1 mol/L 磷酸盐缓冲液(4.5)10 mL,涡动 1 min,300 r/min 振荡 30 min。8 000 r/min 离心 10 min。取上清液于另一离心管中。下层残渣加 1 mol/L 磷酸盐缓冲液(4.5)5 mL 重复提取一次,8 000 r/min 离心 10 min。合并 2 次提取液,备用。

7.2 净化

取 HLB 柱,依次用乙腈 5 mL、1 mol/L 磷酸盐缓冲液(4.5)5 mL 活化。将试样提取液(7.1)全部加载于 HLB 柱上(流速小于 1 mL/min)。用 5%乙腈溶液(4.7)5 mL 淋洗 HLB 柱,抽干。用 5 mL 乙腈(4.2)洗脱(流速小于 1 mL/min)。30℃氮气吹干。准确加入 20%乙腈溶液(4.6)1 mL 溶解,过膜,过滤膜后上机测定。

7.3 基质匹配标准系列溶液的制备

称取同类基质的空白样品 6 份,按 7.1~7.2 步骤处理至 30℃氮气吹干,分别加入 1 mL 混合标准系列工作溶液(4.12)各 1 mL,涡旋、混匀,制得理论浓度为 10.0 $\mu\text{g/L}$ 、50.0 $\mu\text{g/L}$ 、100.0 $\mu\text{g/L}$ 、500.0 $\mu\text{g/L}$ 、1 000 $\mu\text{g/L}$ 、5 000 $\mu\text{g/L}$ 的基质匹配标准系列溶液,过滤膜后上机测定。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱: C_{18} 柱,长 50 mm,内径 2.1 mm,粒径 1.7 μm ,或性能相当者;
- b) 柱温:室温;
- c) 流速:0.3 mL/min;
- d) 进样体积:10 μL ;
- e) 流动相:A 为 0.1%甲酸乙腈溶液(4.8),B 为 0.1%甲酸溶液(4.9),梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间,min	A,%	B,%
0	5	95
2	5	95
3	90	10
4	5	95
5	5	95

7.4.2 质谱参考条件

- a) 电离源:电喷雾离子源(ESI);
- b) 扫描:正离子扫描;
- c) 检测:选择离子监测模式;
- d) 电喷雾毛细管电压:3.5 kV;
- e) 离子源温度:100℃;
- f) 去溶剂温度:300℃;
- g) 脱溶剂气体流量:630 L/h;
- h) 碰撞气流量:27 L/h;
- i) 硝基咪唑类药物的定性离子对、定量离子对及其他质谱条件见表 2。

表 2 硝基咪唑类药物的定性、定量离子和质谱条件

药物名称	监测离子对, m/z	锥孔电压, V	碰撞能量, eV
MNZ	171.5 > 127.8	20	20
	171.5 > 82.3	20	20
DMZ	142.2 > 95.9 ^a	30	20
	142.2 > 81.1	30	20
RNZ	201.0 > 139.5	15	20
	201.0 > 54.5	15	20
TNZ	247.3 > 121 ^a	30	20
	247.3 > 82	30	20

^a 为定量离子对。

7.4.3 定性测定

选择各药物的母离子和它的两个子离子为特征离子,在相同试验条件下,样品中待测物质的保留时间与标准溶液中对应的保留时间偏差在±2.5%之内,且样品中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液中对应的定性离子的相对丰度进行比较,偏差不得超过表 3 规定的范围,则可判定样品中存在对应的待测物。标准溶液中各咪唑类药物的选择离子色谱图参见附录 A。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

单位为百分率

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

7.4.4 定量测定

在仪器最佳工作条件下,分别对基质匹配标准系列溶液和试样溶液进样测定。以基质匹配标准溶液的峰面积为纵坐标、浓度为横坐标绘制工作曲线,该标准曲线的相关系数应不小于 0.99。试样溶液中待测物的响应值应在基质匹配标准曲线的线性范围内。若超过线性范围,需用 20%乙腈稀释溶液对试样溶液和基质匹配标准溶液做相应稀释后,重新测定。可用单点或多点校准对试样待测物进行定量。单点校准时,试样溶液中待测物响应与对应标准溶液中待测物的差异应在±30%之内。

8 试验数据处理

试样中硝基咪唑类药物的含量 w 以质量分数计,单位为毫克每千克(mg/kg),单点校准按式(1)计算,多点校准按式(2)计算。

$$w = \frac{A \times C_s \times V}{A_s \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (1)$$

式中:

A ——试样中待测组分的峰面积;

- C_s ——标准工作液浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
 V ——样液最终定容体积,单位为毫升(mL);
 A_s ——标准工作液峰面积;
 m ——试样质量,单位为克(g);
 n ——上机测定的试样溶液超出线性范围后进一步稀释的倍数。

$$w = \frac{(A - b) \times V}{a \times m \times 1000} \times n \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- A ——试样中硝基咪唑类药物的色谱峰面积;
 b ——通过标准溶液系列进行线性回归计算得出的直线与 Y 轴相交截距;
 V ——样液最终定容体积,单位为毫升(mL);
 a ——标准工作曲线的斜率;
 m ——试样质量,单位为克(g);
 n ——上机测定的试样溶液超出线性范围后进一步稀释的倍数。

平行测定结果用算术平均值表示,结果保留 3 位有效数字。

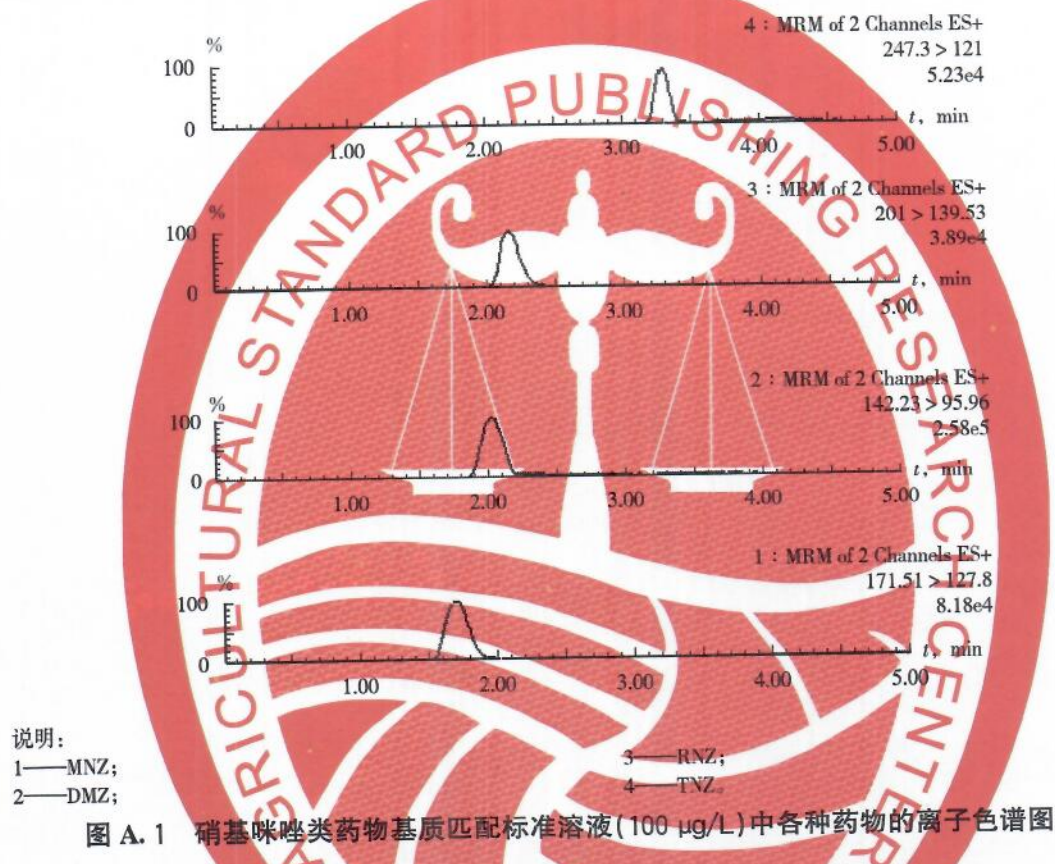
9 精密度

在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不得超过该算术平均值的 20%。

附录 A
(资料性附录)

硝基咪唑类药物基质匹配标准溶液(100 $\mu\text{g/L}$)中各种药物的离子色谱图

硝基咪唑类药物基质匹配标准溶液(100 $\mu\text{g/L}$)中各种药物的离子色谱图见图 A. 1。



中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
饲料中硝基咪唑类药物的测定
液相色谱-质谱法
农业农村部公告第197号—1—2019

* * *

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

2019年10月第1版 2019年10月北京第1次印刷

书号: 16109·4863

定价: 18.00 元



农业农村部公告第197号—1—2019

版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 59194261