



中华人民共和国国家标准

GB/T 20744—2006

蜂蜜中甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Method for the determination of metronidazole, ronidazole and
dimetridazole residues in honey—
LC-MS-MS method

2006-12-31 发布

2007-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局提出。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局归口。

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、山东农业大学。

本标准主要起草人：庞国芳、刘永明、曹彦忠、范春林、张进杰、李学民、吴艳萍、李金、连玉晶、林忠。

本标准系首次发布的国家标准。

蜂蜜中甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了蜂蜜中甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于蜂蜜中甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑残留量的测定。

本标准的方法检出限:甲硝唑检出限为 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$;洛硝哒唑和二甲硝咪唑检出限均为 $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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—1992,neq ISO 3696:1987)

3 原理

蜂蜜中三种硝基咪唑类药物残留用乙酸乙酯提取,提取液浓缩后,经过固相萃取柱净化,液相色谱-串联质谱仪测定,外标法定量。

4 试剂和材料

水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇:色谱纯。

4.2 乙腈:色谱纯。

4.3 乙酸乙酯:色谱纯。

4.4 甲酸:优级纯。

4.5 无水硫酸钠:分析纯。在 650°C 马弗炉中灼烧 6 h,贮存于干燥器中。

4.6 洗脱剂:甲醇+乙腈+0.1%甲酸水(40+18+42)。

4.7 甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑标准物质:纯度 $\geq 98\%$ 。

4.8 甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑标准储备溶液: 1.0 mg/mL 。准确称取适量的甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑标准物质,分别用甲醇配成标准储备液。储备液在低于 4°C 时可保存两个月。

4.9 甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑混合标准工作溶液 A 和 B:根据需要吸取适量甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑标准储备溶液,用甲醇稀释成甲硝唑为 $1.0 \mu\text{g/mL}$,洛硝哒唑和二甲硝咪唑均为 $2.0 \mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作溶液 A。再吸取适量混合标准工作溶液 A 用甲醇稀释成甲硝唑为 $0.010 \mu\text{g/mL}$,洛硝哒唑和二甲硝咪唑均为 $0.020 \mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作溶液 B。混合标准工作溶液 A 和 B 应现用现配。

4.10 甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑混合基质标准工作溶液:根据需要吸取适量甲硝唑、洛硝哒唑、

甲硝咪唑混合标准工作溶液 A 和 B,用空白样品提取液稀释成浓度分别为 0.25 ng/mL、0.50 ng/mL、1.00 ng/mL、5.00 ng/mL 的混合基质标准工作溶液。混合基质标准工作溶液应现用现配。

4.11 BAKERBOND Carboxylic Acid 固相萃取柱或相当者:500 mg,3 mL。使用前用 4 mL 乙酸乙酯预处理,保持柱体湿润。

4.12 滤膜:0.20 μm 。

5 仪器

5.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源。

5.2 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g。

5.3 液体混匀器。

5.4 固相萃取真空装置。

5.5 振荡器。

5.6 具塞玻璃离心管:50 mL。

5.7 真空泵:真空度应达到 80 kPa。

5.8 离心机。

5.9 旋转蒸发器。

5.10 刻度样品管:5 mL。

5.11 梨形瓶:150 mL。

5.12 筒形漏斗。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

对无结晶的实验室样品,将其搅拌均匀。对有结晶的样品,在密闭情况下,置于不超过 60℃ 的水浴中温热,振荡,待样品全部融化后搅匀,迅速冷却至室温。分出 0.5 kg 作为试样。制备好的试样置于样品瓶中,密封,并做上标记。

6.2 试样保存

将试样于常温下保存。

7 测定步骤

7.1 提取

称取 10 g 试样(精确到 0.01 g)置于 50 mL 具塞玻璃离心管中,加入 10 mL 水,在液体混匀器上混匀,加 20 mL 乙酸乙酯,于振荡器上振荡 20 min,以 3 000 r/min 离心 5 min,取上清液过盛有 25 g 无水硫酸钠筒形漏斗至梨形瓶中。再用 20 mL 乙酸乙酯提取一次,过无水硫酸钠筒形漏斗,合并上清液,用旋转蒸发器于 45℃ 水浴上减压蒸发至约 2 mL,待净化。

7.2 净化

将上述浓缩液移至 Carboxylic Acid 固相萃取柱中,再分别用 4 mL 乙酸乙酯和 4 mL 乙腈洗涤梨形瓶和萃取柱,弃去全部流出液。在 65 kPa 的负压下,减压抽干萃取柱 2 min,用 2 mL 洗脱剂以 ≤ 3 mL/min 流速洗脱,收集洗脱液于 5 mL 刻度样品管中,用洗脱剂定容至 2 mL,过 0.20 μm 滤膜,供液相色谱-串联质谱仪测定。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱条件

- 色谱柱:Atlantis dC₁₈,3 μm ,150 mm \times 2.1 mm(内径)或相当者;
- 流动相:乙腈+0.1%甲酸水(30+70);

- c) 流速:200 $\mu\text{L}/\text{min}$;
- d) 柱温:30℃;
- e) 进样量:20 μL 。

7.3.2 质谱条件

- a) 离子源:电喷雾离子源(ESI);
- b) 扫描方式:正离子扫描;
- c) 检测方式:多反应监测;
- d) 电喷雾电压:5 500 V;
- e) 雾化气压力:0.069 MPa;
- f) 气帘气压力:0.069 MPa;
- g) 辅助气流速:6 L/min;
- h) 离子源温度:700℃;
- i) 定性离子对,定量离子对,去簇电压和碰撞能量见表 1。

表 1 三种硝基咪唑药物的质谱参数

中文名称	英文名称	定性离子对(m/z)	定量离子对(m/z)	去簇电压/V	碰撞能量/V
甲硝唑	metronidazole	172.1/128.1	172.1/128.1	30	19
		172.1/82.1		30	34
洛硝哒唑	ronidazole	201.1/140.2	201.1/140.2	26	14
		201.1/110.1		26	20
二甲硝咪唑	dimetridazole	142.2/96.1	142.2/96.1	40	22
		142.2/81.2		40	40

7.3.3 液相色谱-串联质谱测定

在仪器最佳工作条件下,用甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑混合基质标准工作溶液分别进样,以峰面积为纵坐标,混合基质标准工作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,样品溶液中甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑的响应值均应在仪器测定的线性范围内。甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑标准物质总离子流图参见图 A.1。在上述色谱条件和质谱条件下,甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑的参考保留时间见表 2。

表 2 三种硝基咪唑药物的参考保留时间

中文名称	保留时间/min
甲硝唑	2.80
洛硝哒唑	3.12
二甲硝咪唑	3.57

本方法的添加回收率数据参见附录 B。

7.4 平行试验

按以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.5 空白试验

除不称取试样外,均按上述步骤同时完成空白试验。

8 结果计算

结果按式(1)计算:

$$X = c \times \frac{V}{m} \times \frac{1\,000}{1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X——试样中被测组分残留量，单位为微克每千克(μg/kg)；

c——从标准工作曲线得到的被测组分溶液浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

V——样品溶液最终定容体积，单位为毫升(mL)；

m——样品溶液所代表最终试样的质量，单位为克(g)。

注：计算结果应扣除空白值。

9 精密度

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。

9.1 重复性

在重复性测定条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 *r*。蜂蜜中甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑含量范围及重复性方程见表 3。

表 3 含量范围及重复性和再现性方程

名 称	含量范围/(μg/kg)	重复性限 <i>r</i>	再现性 <i>R</i>
甲硝唑	0.05~1.0	$\lg r = 0.843\,9 \lg m - 0.931\,6$	$\lg R = 0.950\,2 \lg m - 0.746\,6$
洛硝哒唑	0.1~2.0	$\lg r = 1.200\,8 \lg m - 0.595\,4$	$\lg R = 1.110\,0 \lg m - 0.588\,4$
二甲硝咪唑	0.1~2.0	$r = 0.151\,9m + 0.000\,3$	$\lg R = 0.955\,7 \lg m - 0.788\,1$

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。

9.2 再现性

在再现性测定条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 *R*。蜂蜜中甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑的含量范围及再现性方程见表 3。

附录 A
(资料性附录)
标准物质总离子流图

甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑标准物质总离子流图,见图 A.1。

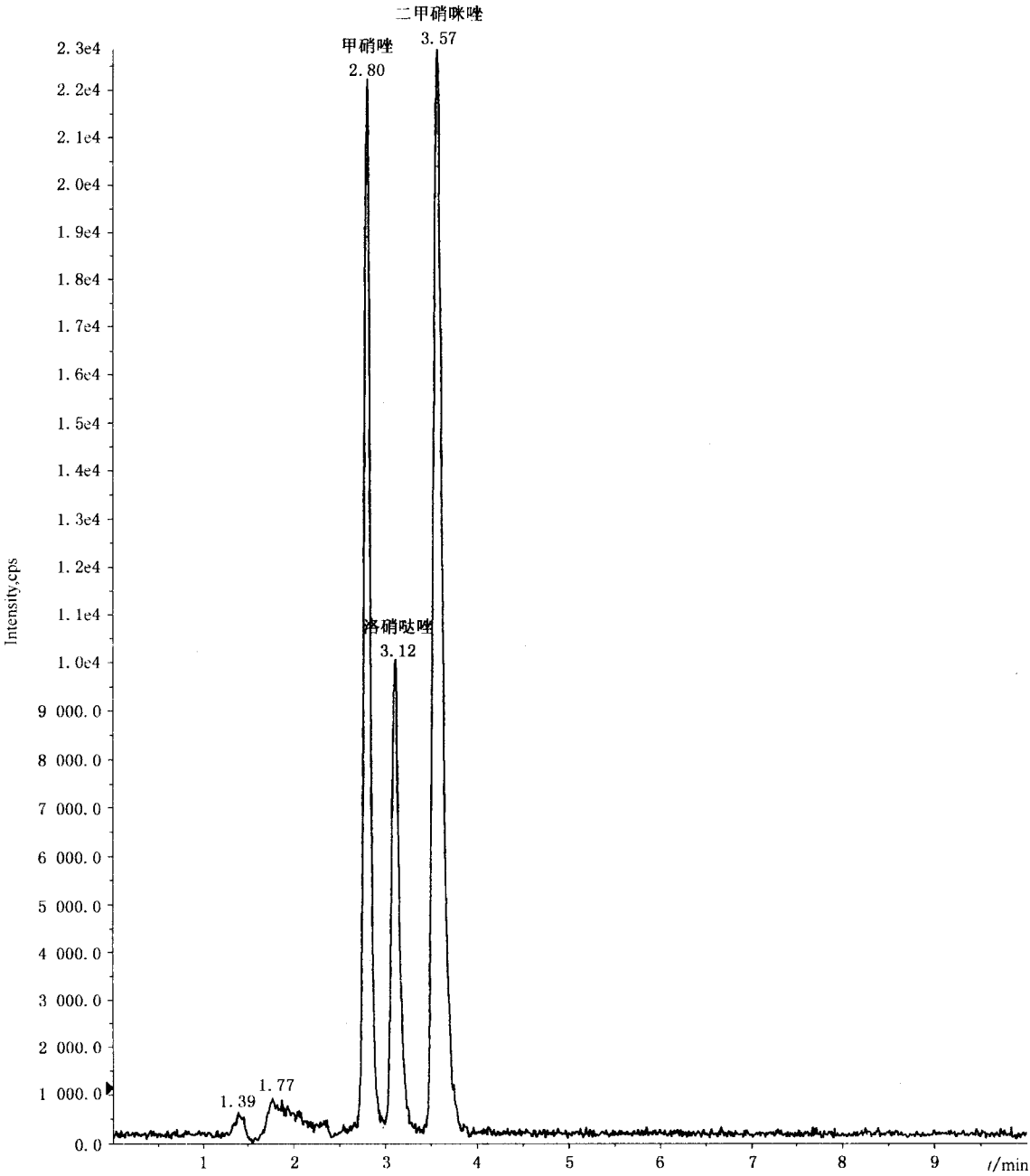


图 A.1 甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑标准物质总离子流图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

本方法中甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑添加浓度及其平均回收率的试验数据

药物名称	添加浓度/($\mu\text{g/kg}$)	平均回收率/(%)
甲硝唑	0.05	76.0
	0.10	79.0
	0.20	77.0
	1.00	82.4
洛硝哒唑	0.10	69.5
	0.20	78.5
	0.40	73.9
	2.00	71.7
二甲硝咪唑	0.10	75.6
	0.20	74.9
	0.40	75.4
	2.00	81.7