



中华人民共和国国家标准

GB/T 21318—2007

动物源食品中硝基咪唑残留量 检验方法

Determination of nitroimidazoles residues
in foodstuffs of animal origin

2007-10-29 发布

2008-04-01 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、附录 B、附录 C、附录 D 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：中华人民共和国吉林出入境检验检疫局、中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：荣会、牟峻、张代辉、林黎明、张鸿伟、马书民、赵庆松、李晓娟、彭涛。

引 言

硝基咪唑类药物主要包括 4-硝基咪唑、异丙硝唑、2-甲硝唑、洛硝哒唑、甲硝唑、氯甲硝唑、地美硝唑、苯硝唑，是一类抗菌素和抗原虫药。硝基咪唑类药物在体内吸收快，所以标示残留物除了原形药物外，还包括代谢产物羟基甲硝唑 MNZOH(甲硝唑代谢物)、羟甲基甲硝唑 HMMNI(2-甲硝唑、洛硝哒唑代谢物)，它们具有损害细菌 DNA 和抗厌氧菌感染的功效。该类药物主要用于治疗和预防厌氧菌引起的局部或系统感染，抑制厌氧菌的 DNA 合成，也用于抗滴虫和阿米巴原虫等。由于硝基咪唑类药物含有的硝基杂环类化合物具有细胞诱变性，从而导致此类药物有致癌作用和潜在的致畸作用。因此，硝基咪唑类药物在大多数国家为禁止使用或允许使用但必须严格监控的药物。

本标准提供了动物源食品中硝基咪唑类及代谢物的高效液相色谱/串联质谱多残留确证方法。

动物源食品中硝基咪唑残留量 检验方法

1 范围

本标准规定了动物源性食品中硝基咪唑原药 8 种、代谢产物 2 种残留量的高效液相色谱/串联质谱测定方法。

本标准适用于猪肉、鸡肉、牛肉、猪肝、鸡肝、牛肝、猪肾、牛肾、鱼肉、奶粉、蜂蜜中：4-硝基咪唑、异丙硝唑、2-甲硝咪唑、洛硝哒唑、甲硝唑、氯甲硝咪唑、地美硝唑、苯硝咪唑残留量及其代谢物羟基甲硝唑 MNZOH(甲硝唑代谢物)、羟甲基甲硝咪唑 HMMNI(2-甲硝咪唑、洛硝哒唑代谢物)的测定。

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 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

样品中残留的 8 种硝基咪唑、2 种代谢物用甲醇-丙酮均质或超声波提取，经乙酸乙酯液液分配，以凝胶色谱(GPC)净化，再经固相萃取(SPE)净化，采用液相色谱/串联质谱确证，外标法定量测定。

4 试剂和材料

除非另有说明，所有试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇：HPLC 级。

4.2 丙酮：HPLC 级。

4.3 乙酸乙酯：HPLC 级。

4.4 环己烷：HPLC 级。

4.5 氯化钠。

4.6 无水硫酸钠：经 650℃灼烧 4 h，贮于密封容器中备用。

4.7 甲酸：优级纯。

4.8 饱和氯化钠水溶液。

4.9 硅藻土：80 目~120 目。

4.10 C₁₈ 固相萃取柱：1.0 g, 6 mL。

4.11 微孔滤膜：有机系，0.45 μm。

4.12 硝基咪唑原药 8 种、代谢产物 2 种标准物质：纯度均大于等于 98%(详见附录 A)。

4.13 标准储备液：分别准确称取适量的每种标准物质，用甲醇配制成浓度为 1 000 μg/mL 的标准储备液。该溶液应配制于棕色容量瓶中，在 0℃~4℃冰箱中可保存 12 个月。

4.14 混合中间标准溶液：分别准确移取一定体积的每种标准储备液，用甲醇稀释成适当浓度的混合中间标准溶液。该溶液应配制于棕色容量瓶中，在 0℃~4℃冰箱中可保存 6 个月。

4.15 混合标准工作溶液:分别准确移取一定体积的混合中间标准溶液,可根据需要用甲醇稀释成适当浓度的混合标准工作溶液。该溶液应配制于棕色容量瓶中,在 0℃~4℃冰箱中可保存 3 个月。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪:配电喷雾离子源串联四极杆检测器。

5.2 凝胶色谱仪:配有馏份收集浓缩器。

5.3 组织捣碎机。

5.4 均质器。

5.5 超声波发生器。

5.6 旋转蒸发器。

5.7 高速离心机。

5.8 氮吹仪。

5.9 具塞锥形瓶:250 mL。

5.10 分液漏斗:250 mL。

5.11 浓缩瓶:50 mL、250 mL。

6 试样制备与保存

6.1 肌肉组织及脏器组织类、水产品类

从原始样品中取出有代表性样品(脏器应剔除筋膜)约 500 g,用组织捣碎机充分捣碎混匀,均分成两份,分别装入洁净的容器作为试样,密封并标明标记,将试样置于-18℃冷冻避光保存。

6.2 乳及乳制品类

从原始样品中取出有代表性样品约 500 g,用组织捣碎机充分捣碎混匀,均分成两份,分别装入洁净的容器作为试样,密封并标明标记,将试样置于 4℃冷藏避光保存。

6.3 蜂蜜

从原始样品中取出有代表性样品约 200 g,对无结晶的蜂蜜样品用组织捣碎机充分捣碎混匀,均分成两份,分别装入洁净的容器作为试样,密封并标明标记,将试样置于 4℃冷藏避光保存;对有结晶析出的蜂蜜样品,在密闭情况下,将样品瓶置于不超过 60℃的水浴中温热,振荡,待样品全部融化后用组织捣碎机充分捣碎混匀,均分成两份,分别装入洁净的容器作为试样,密封并标明标记,将试样置于 4℃冷藏避光保存。在融化时应注意防止水分挥发。

在制样的操作过程中,应防止样品污染或残留物含量发生变化。

7 样品处理

7.1 提取

7.1.1 肌肉组织、脏器组织样品及水产品

准确称取约 20 g 样品(精确至 0.1 g)于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入 10 g 硅藻土(4.9)与样品充分混匀,再依次加入 5 mL 饱和氯化钠水溶液和 70 mL 甲醇-丙酮(3+1),高速均质提取 3 min。将提取液移入离心管中,于 10 000 r/min 条件下离心 2 min,将上层提取液移入 250 mL 浓缩瓶中,残渣每次再用 50 mL 甲醇-丙酮(3+1)重复提取两次,合并提取液。

7.1.2 蜂蜜、乳及乳制品样品

分别准确称取约 20 g 样品(精确至 0.1 g)于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入 10 mL 饱和氯化钠水溶液和 70 mL 甲醇-丙酮(3+1),超声波提取 30 min。移入离心管中,于 10 000 r/min 条件下离心 2 min,

将上层提取液移入 250 mL 浓缩瓶中。残渣每次再用 50 mL 甲醇-丙酮(3+1)重复提取两次,合并提取液。

7.2 液液分配

将 7.1.1 和 7.1.2 所得提取液于 40℃ 水浴中旋转浓缩至只剩水相,并转移至 250 mL 分液漏斗中,加入 50 mL 饱和氯化钠水溶液和 25 mL 乙酸乙酯,振摇 3 min,静置分层,收集乙酸乙酯相。水相再用 20 mL 乙酸乙酯重复提取两次,合并乙酸乙酯相。经无水硫酸钠柱脱水,收集于 250 mL 浓缩瓶中,于 40℃ 水浴中旋转浓缩至近干,加入 5 mL 乙酸乙酯-环己烷(1+1)溶解残渣,并用 0.45 μm 滤膜过滤,待净化。

7.3 净化

7.3.1 凝胶色谱(GPC)净化

7.3.1.1 凝胶色谱净化条件

- a) 净化柱:700 mm×25 mm, Bio Beads S-X3,或相当者;
- b) 流动相:乙酸乙酯-环己烷(1+1);
- c) 流速:4.7 mL/min;
- d) 样品定量环:5.0 mL;
- e) 预淋洗体积:50 mL;
- f) 洗脱总体积:210 mL;
- g) 开始弃去体积:90 mL;
- h) 收集体积:90 mL;
- i) 最后弃去体积:30 mL。

7.3.1.2 凝胶色谱净化步骤

将 5 mL 待净化液按 7.3.1.1 规定的条件进行净化,合并馏份收集器中的收集液于 250 mL 浓缩瓶中,于 40℃ 水浴中旋转浓缩至近干,加入 5 mL 甲醇以溶解残渣,待净化。

7.3.2 固相萃取(SPE)净化

使用前用 5 mL 甲醇预淋洗 C₁₈ 固相萃取柱,将 5 mL 溶解液倾入 C₁₈ 固相萃取柱中,以 1 mL/min 速度收集流出液,再用 10 mL 甲醇进行洗脱。收集全部洗脱液于 50 mL 浓缩瓶中,于 40℃ 水浴中旋转浓缩至干。用甲醇溶解并定容至 1.0 mL,经 0.45 μm 滤膜过滤后,供液相色谱/串联质谱测定和确证。

7.4 混合基质标准溶液的制备

7.4.1 肌肉组织及脏器组织样品、水产品样品

称取 6 份约 20 g 阴性试样(精确至 0.1 g)于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入 5 mL 饱和氯化钠水溶液和 70 mL 甲醇-丙酮(3+1),高速均质提取 3 min,于 10000 r/min 条件下离心 2 min,弃去上层提取液。按照最终定容浓度 0、10、20、50、100、500 ng/mL 分别加入混合中间标准溶液(4.14)或混合标准工作溶液(4.15),余下操作同 7.1.1、7.2、7.3。

7.4.2 蜂蜜、乳及乳制品样品

称取 6 份约 20 g 阴性试样(精确至 0.1 g)于 250 mL 具塞锥形瓶中,按照最终定容浓度 0、10、20、50、100、500 ng/mL 分别加入混合中间标准溶液(4.14)或混合标准工作溶液(4.15),余下操作同 7.1.2、7.2、7.3。

8 测定

8.1 液相色谱条件

- a) 流动相:见表 1;
- b) 进样量:10 μL。

表 1 流动相条件

时间/min	流速/($\mu\text{L}/\text{min}$)	甲醇/%	0.1%甲酸水溶液/%
0.00	250	13.0	87.0
8.00	250	13.0	87.0
8.10	250	40.0	60.0
13.5	250	100	0.00
19.0	250	100	0.00
19.1	250	13.0	87.0
25.0	250	13.0	87.0

8.2 串联质谱条件

参见附录 B。

8.3 液相色谱/串联质谱测定

8.3.1 定性测定

对混合标准工作液及样液按上述规定的条件进行测定时,若检测样品的色谱峰保留时间与标准品一致,且与浓度相当标准工作溶液的相对丰度一致,相对丰度允许偏差不超过表 2 规定的范围,则可判断样品中存在对应的被测物。每种硝基咪唑的选择离子对的种类、相对丰度比见附录 C。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

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

8.3.2 定量测定

根据样液中被测 8 种硝基咪唑、2 种代谢物的含量,选定浓度相近的标准工作溶液。标准工作溶液和待测样液中 8 种硝基咪唑、2 种代谢物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。对混合标准溶液与样液等体积组分时段参插进样测定。外标法定量测定。在上述液相色谱/串联质谱条件下,8 种硝基咪唑、2 种代谢物标准物质的保留时间见附录 C,液相色谱/串联质谱总离子流色谱图见附录 D。

8.4 平行试验

按照以上步骤对同一试样进行平行试验测定。

8.5 空白试验

除不称取试样外,均按照以上步骤进行。

9 结果计算

按式(1)进行计算:

$$X_i = \frac{A_i \times c_i \times V \times 1\,000}{A_{is} \times m \times 1\,000} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X_i ——试样中硝基咪唑或代谢物 i 残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

A_i ——样液中硝基咪唑或代谢物 i 的峰面积(或峰高);

c_i ——标准工作液中硝基咪唑或代谢物 i 的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——样液最终定容体积,单位为毫升(mL);

A_{is} ——标准工作液中硝基咪唑或代谢物 i 的峰面积(或峰高);

m ——最终样液代表的试样质量,单位为克(g)。

计算结果需扣除空白值。

10 检出限(LOQ)

本方法的测定低限见表3。

表3 硝基咪唑原药8种、代谢物2种测定方法的测定低限及添加回收率范围

药物名称	测定低限和 确证低限/ (mg/kg)	回收率/%										
		猪肉	猪肝	猪肾	牛肉	牛肝	牛肾	鸡肉	鸡肝	鱼肉	奶粉	蜂蜜
4-硝基咪唑	0.001	72.2~ 102.1	71.4~ 99.5	74.7~ 89.1	77.5~ 97.8	73.6~ 87.9	75.4~ 92.8	79.5~ 98.2	72.7~ 86.4	82.3~ 95.1	77.4~ 89.1	70.7~ 104.2
异丙硝唑	0.000 5	75.4~ 108.6	76.5~ 102.8	80.4~ 105.3	87.3~ 99.0	78.4~ 114.7	80.7~ 98.2	73.6~ 99.7	78.1~ 103.5	88.5~ 97.7	83.2~ 107.6	72.4~ 108.7
2-甲硝咪唑	0.000 5	77.1~ 113.2	73.9~ 108.7	76.2~ 99.9	75.8~ 111.6	72.5~ 106.3	74.0~ 100.1	71.7~ 97.5	71.8~ 103.9	79.6~ 96.4	74.8~ 108.0	69.5~ 102.0
洛硝哒唑	0.001	74.4~ 97.1	72.8~ 106.2	75.3~ 94.8	72.5~ 99.2	71.3~ 98.1	74.2~ 111.5	78.7~ 95.9	73.0~ 105.2	76.8~ 112.6	74.4~ 111.5	73.3~ 99.6
甲硝唑	0.000 5	77.8~ 98.3	73.5~ 105.9	77.5~ 96.2	75.4~ 96.5	73.1~ 103.2	74.8~ 100.3	82.2~ 99.1	75.2~ 107.7	80.9~ 97.0	75.9~ 114.8	72.9~ 103.5
氟甲硝咪唑	0.001	76.6~ 95.8	74.0~ 98.3	78.9~ 103.7	79.7~ 117.3	76.7~ 95.4	76.9~ 102.6	80.3~ 96.6	73.6~ 102.8	82.3~ 96.2	73.0~ 116.4	70.2~ 111.3
地美硝唑	0.001	78.2~ 96.9	72.5~ 107.4	77.6~ 97.5	79.1~ 97.4	75.8~ 100.5	77.3~ 95.7	79.0~ 94.8	76.3~ 105.1	84.7~ 98.5	74.5~ 111.2	72.3~ 115.1
苯硝咪唑	0.000 5	74.6~ 109.4	71.9~ 102.5	78.1~ 97.9	82.2~ 99.1	75.2~ 113.6	77.6~ 94.4	81.9~ 99.3	75.5~ 98.3	81.4~ 96.3	77.7~ 105.3	73.8~ 106.8
羟基甲硝唑 (MNZOH)	0.001	74.7~ 97.7	72.7~ 105.6	73.8~ 98.2	81.6~ 96.9	73.9~ 92.8	71.1~ 93.0	76.4~ 99.4	71.9~ 112.6	80.2~ 104.8	73.6~ 97.8	73.0~ 108.4
羟甲基甲硝 咪唑 (HMMNI)	0.001	75.5~ 112.5	74.0~ 111.8	75.1~ 105.4	83.9~ 101.7	77.6~ 94.0	80.5~ 96.7	77.8~ 104.0	72.4~ 101.5	78.0~ 109.6	75.1~ 100.7	70.1~ 96.6

11 回收率和精密度

本方法对硝基咪唑原药8种、代谢物2种的添加回收率见表3。

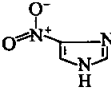
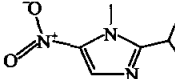
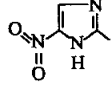
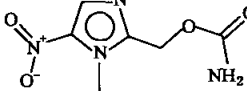
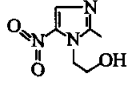
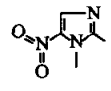
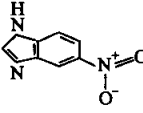
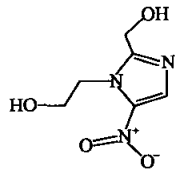
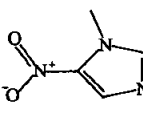
采用添加法,即对本底不含8种硝基咪唑原药及2种代谢物的猪肉、鸡肉、牛肉、猪肝、鸡肝、牛肝、猪肾、牛肾、鱼肉、奶粉、蜂蜜样品,添加分别为(0.5)1.0、2.0、4.0 ng/g水平的样品进行回收测定,每水平单独测定10次,相对标准偏差在4.99%~22.41%范围内。

附 录 A

(资料性附录)

8 种硝基咪唑原药及 2 种代谢物的英文名、化学名、结构式

表 A.1 8 种硝基咪唑原药及 2 种代谢物的英文名、化学名、结构式

序号	药物名称	英文名称	CAS 号	分子式	结构式	相对分子质量
1	4-硝基咪唑	4-nitroimidazole	3034-38-6	$C_3H_3N_3O_2$		113.08
2	异丙硝唑	ipronidazole	14885-29-1	$C_7H_{11}N_3O_2$		169.18
3	2-甲硝咪唑	2-methyl-5-nitroimidazole	88054-22-2	$C_4H_5N_3O_2$		127.10
4	洛硝哒唑	ronidazole	7681-76-7	$C_6H_8N_4O_4$		200.15
5	甲硝唑	metronidazole	443-48-1	$C_6H_9N_3O_3$		171.15
6	氯甲硝咪唑	5-chloro-1-methyl-4-nitroimidazole	4897-25-0	$C_4H_4ClN_3O_2$		161.55
7	地美硝唑	dimetridazole	551-92-8	$C_5H_7N_3O_2$		141.13
8	苯硝咪唑	5-nitrobenzimidazole	94-52-0	$C_7H_5N_3O_2$		163.14
9	羟基甲硝唑 (MNZOH)	1-(2-hydroxyethyl)-2-hydroxymethyl-5-nitroimidazole 2-(2-hydroxymethyl-5-nitroimidazole-1-yl)-ethanol	4812-40-2	$C_8H_9N_3O_4$		187.15
10	羟甲基甲硝咪唑 (HMMNI)	1-methyl-5-nitro-1H-imidazole 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole	936-05-0	$C_5H_7N_3O_3$		157.13

附 录 B
(资料性附录)
液相色谱/串联质谱条件

色谱柱: ZORBAX SB-C₁₈, 150 mm×2.1 mm, 3.5 μm, 或相当者;

柱温: 30℃;

电离方式: 电喷雾(ESI);

扫描方式: 正离子扫描, 多反应监测(MRM);

电喷雾电压: 5 500 V;

雾化气压力: 0.21 MPa;

气帘气压力: 0.088 MPa;

辅助气压力: 0.062 MPa;

离子源温度: 550℃。

附 录 C
(资料性附录)

8 种硝基咪唑原药及 2 种代谢物的保留时间、选择监测离子设定参数表¹⁾

表 C.1 8 种硝基咪唑原药及 2 种代谢物的保留时间、选择监测离子设定参数表

序号	药物名称	保留时间/ min	定量离子对	定性离子对	碰撞气能量/ eV	去簇电压/V	相对强度 (基峰)/%
1	4-硝基咪唑	2.4	114.0/83.7	114.0/67.9	23	64	21
				114.0/83.7	19		
2	羟基甲硝唑(MNZOH)	3.2	187.7/123.3	187.7/123.3	18	55	95
				187.7/126.2	25		
3	2-甲硝咪唑	3.6	128.0/41.9	128.0/41.9	42	79	35
				128.0/81.6	24		
4	羟甲基甲硝咪唑(HMMND)	4.3	157.8/140.2	157.8/140.2	17	50	25
				157.8/55.1	27		
5	甲硝唑	4.9	172.0/81.7	172.0/127.8	20	59	80
				172.0/81.7	34		
6	洛硝哒唑	5.5	201.1/54.8	201.1/139.7	17	59	19
				201.1/54.8	34		
7	地美硝唑	6.9	142.0/95.9	142.0/95.9	24	69	75
				142.0/80.7	36		
8	氯甲硝咪唑	9.2	161.9/115.8	161.9/115.8	25	76	66
				161.9/144.8	22		
9	苯硝咪唑	10.0	163.9/117.8	163.9/117.8	30	74	30
				163.9/90.9	52		
10	异丙硝唑	15.1	169.5/124.3	169.5/124.3	25	65	95
				169.5/109.1	35		

1) 所列参数是在 API 4000 质谱仪完成的,此处列出试验用仪器型号仅是为了提供参考,并不涉及商业目的,鼓励标准使用者尝试不同厂家和型号的仪器。

附 录 D
(资料性附录)

8 种硝基咪唑原药及 2 种代谢物的液相色谱/串联质谱总离子流色谱图

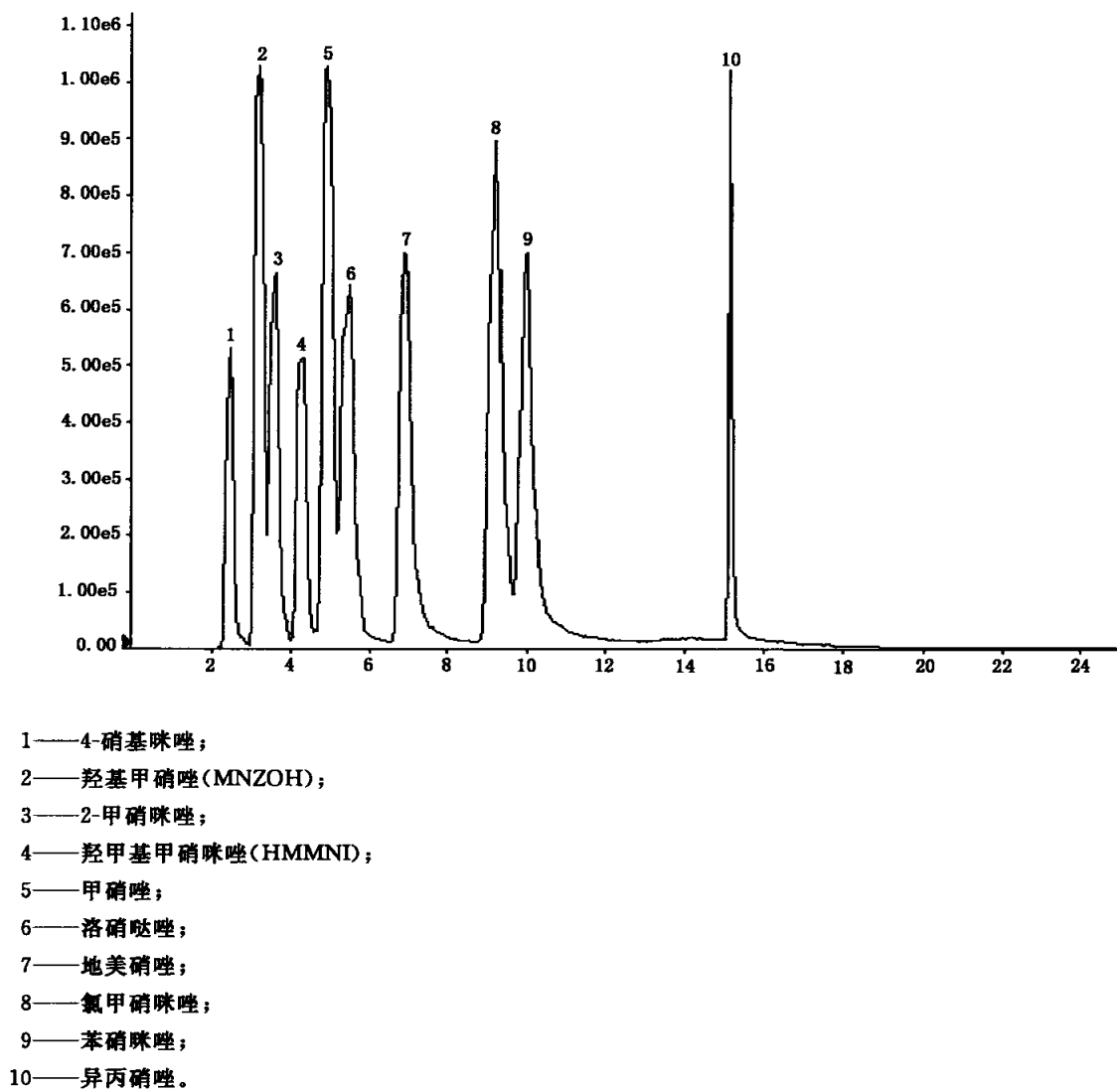


图 D.1 8 种硝基咪唑原药及 2 种代谢物的液相色谱/串联质谱总离子流色谱图