

ICS 65.120
CCS B 46



中华人民共和国国家标准

GB/T 21995—2025

代替 GB/T 21995—2008



饲料中硝基咪唑类药物的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of nitroimidazoles in feeds—
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2025-06-30 发布

2026-01-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 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。

本文件代替 GB/T 21995—2008《饲料中硝基咪唑类药物的测定 液相色谱-串联质谱法》，与 GB/T 21995—2008 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 适用范围增加了混合型饲料添加剂和异丙硝唑，更改了检出限和定量限（见第 1 章，2008 年版的第 1 章）；
- b) 更改了原理、试剂或材料、试验步骤、精密度（见第 4 章、第 5 章、第 8 章、第 10 章，2008 年版的第 3 章、第 4 章、第 7 章、第 9 章）。

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专利的责任。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

本文件起草单位：中国农业大学、河南省农畜水产品检验技术研究院。

本文件主要起草人：夏曦、吴宁鹏、彭丽、赵亮、孟蕾、黄立、冯晓友、李晓薇、江海洋、沈建忠。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2008 年首次发布为 GB/T 21995—2008；

——本次为第一次修订。



饲料中硝基咪唑类药物的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了饲料中 5 种硝基咪唑类药物的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂中甲硝唑、地美硝唑、洛硝达唑、异丙硝唑和替硝唑的测定。

本文件的检出限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的待测物用乙腈溶液提取,经混合型阳离子交换固相萃取柱净化,液相色谱-串联质谱法测定,基质匹配标准溶液校准,内标法定量。

5 试剂或材料



除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

5.1 水:符合 GB/T 6682 中一级的要求。

5.2 乙腈:色谱纯。

5.3 甲醇:色谱纯。

5.4 丙酮:色谱纯。

5.5 甲酸:色谱纯。

5.6 乙酸:色谱纯。

5.7 5% 甲酸甲醇溶液:取 5 mL 甲酸(5.5),用甲醇(5.3)稀释至 100 mL,混匀。

5.8 5% 氨化甲醇溶液:取 5 mL 氨水,用甲醇(5.3)稀释至 100 mL,混匀。

5.9 0.1% 甲酸溶液:取 100 μL 甲酸(5.5),用水稀释至 100 mL,混匀。

5.10 0.2% 乙酸溶液:取 1 mL 乙酸(5.6),用水稀释至 500 mL,混匀。

- 5.11 乙腈-甲醇溶液:取 400 mL 乙腈(5.2)、100 mL 甲醇(5.3)和 1 mL 乙酸(5.6),混匀。
- 5.12 标准储备溶液(1 mg/mL):称取甲硝唑标准品(CAS:443-48-1,纯度 \geq 99.5%)、地美硝唑标准品(CAS:551-92-8,纯度 \geq 99.8%)、洛硝达唑标准品(CAS:7681-76-7,纯度 \geq 99.0%)、异丙硝唑标准品(CAS:14885-29-1,纯度 \geq 99.9%)、替硝唑标准品(CAS:19387-91-8,纯度 \geq 98.0%)各 10 mg(精确至 0.01 mg),分别置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇(5.3)溶解并定容,混匀。-18℃以下保存,有效期 3 个月。
- 5.13 混合标准中间溶液 I(10 μ g/mL):准确移取甲硝唑、地美硝唑、洛硝达唑、异丙硝唑、替硝唑标准储备溶液(5.12)各 0.1 mL 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇(5.3)稀释、定容,混匀。-18℃以下保存,有效期 3 个月。
- 5.14 混合标准中间溶液 II(1 μ g/mL):准确移取混合标准中间溶液 I(5.13)1 mL 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇(5.3)定容,混匀。-18℃以下保存,有效期 3 个月。
- 5.15 内标储备溶液(0.5 mg/mL):称取甲硝唑-D₃标准品(CAS:83413-09-6,纯度 \geq 98.0%)、地美硝唑-D₃标准品(CAS:64678-69-9,纯度 \geq 98.0%)、洛硝达唑-D₃标准品(CAS:1015855-87-4,纯度 \geq 99.0%)、异丙硝唑-D₃标准品(CAS:1015855-83-0,纯度 \geq 99.0%)、替硝唑-D₅标准品(CAS:1216767-04-2,纯度 \geq 98.0%)各 5 mg(精确至 0.01 mg),分别置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇(5.3)溶解并定容,混匀。-18℃以下保存,有效期 3 个月。
- 5.16 混合内标工作溶液(1 μ g/mL):准确移取内标储备溶液(5.15)各 20 μ L 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇(5.3)定容。-18℃以下保存,有效期 3 个月。
- 5.17 混合标准系列溶液:准确移取适量混合标准中间溶液 I(5.13)、混合标准中间溶液 II(5.14)和 20 μ L 混合内标工作溶液(5.16)于 5 mL 容量瓶中,用 0.1% 甲酸水溶液(5.9)定容,配制成质量浓度分别为 1 ng/mL、2 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL、100 ng/mL(内标质量浓度均为 4 ng/mL)的混合标准系列溶液。临用现配。
- 5.18 混合型阳离子交换固相萃取柱:150 mg/6 mL,或性能相当者。
- 5.19 微孔滤膜:0.22 μ m,水系。

6 仪器设备



- 6.1 液相色谱-串联质谱仪:带电喷雾离子源。
- 6.2 分析天平:精度 0.01 mg 和 0.01 g。
- 6.3 旋涡混合器。
- 6.4 冷冻离心机:转速不低于 14 000 r/min。
- 6.5 固相萃取装置。
- 6.6 氮吹仪。

7 样品

按 GB/T 20195 制备试样,取样品至少 200 g,粉碎使其全部通过 0.425 mm 孔径的试验筛,充分混匀,装入密闭容器中,备用。选取类型相同、均匀一致、且在待测物保留时间处,仪器响应值小于方法定量限 30% 的饲料样品,作为空白样品。

8 试验步骤

8.1 提取

平行做两份试验。称取试样 2 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 20 μ L 混合内标工作溶液(5.16),涡旋混合 30 s,静置 10 min。加入 10 mL 乙腈,涡旋混合 5 min,于 4 $^{\circ}$ C、11 000 r/min 离心 5 min,转移上清液于另一离心管,残渣加入 10 mL 乙腈重复提取一次。合并两次提取液,加入 100 μ L 甲酸,涡旋混合 30 s,于 4 $^{\circ}$ C、11 000 r/min 离心 5 min,上清液备用。

8.2 净化

依次用 5 mL 甲醇、5 mL 乙腈活化固相萃取柱,取 4 mL 备用液(8.1)过柱,依次用 5 mL 丙酮和 5 mL 5% 甲酸甲醇溶液(5.7)淋洗,抽干。用 3 mL 5% 氨化甲醇溶液(5.8)洗脱,收集洗脱液,30 $^{\circ}$ C 水浴氮气吹干。准确加入 1 mL 0.1% 甲酸溶液(5.9)复溶,4 $^{\circ}$ C、14 000 r/min 离心 5 min,取上清液过微孔滤膜(5.19),作为试样溶液,待测。

8.3 基质匹配标准溶液制备

取空白样品,按 8.1(不加内标溶液)和 8.2 处理得到氮气吹干后的空白基质,分别准确移取 1 mL 混合标准系列工作溶液(5.17)复溶,配制质量浓度为 1 mg/mL、2 mg/mL、10 mg/mL、20 mg/mL、40 mg/mL、100 mg/mL 的基质匹配混合标准系列溶液。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- 色谱柱: C_{18} 色谱柱,柱长 100 mm,内径 2.1 mm,粒径 1.7 μ m,或性能相当者;
- 流动相:A 相为 0.2% 乙酸溶液(5.10),B 相为乙腈-甲醇溶液(5.11),梯度洗脱程序见表 1;
- 柱温:40 $^{\circ}$ C;
- 进样量:5 μ L。

表 1 梯度洗脱程序

时间 min	流速 mL/min	A %	B %
0	0.3	85	15
0.5	0.3	85	15
1.5	0.3	60	40
2.5	0.3	60	40
3.0	0.3	35	65
3.5	0.3	35	65
4.0	0.3	1	99
5.0	0.3	1	99
5.5	0.3	85	15
7.0	0.3	85	15

8.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 离子源：电喷雾离子源；
- 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) 离子源温度：500 ℃；
- f) 雾化气压力(GS1)：344.74 kPa(50 psi)；
- g) 辅助气压力(GS2)：413.69 kPa(60 psi)；
- h) 气帘气压力(CUR)：206.84 kPa(30 psi)；
- i) 定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量见表 2。

表 2 硝基咪唑类药物质谱参数的参考值

化合物名称	监测离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
甲硝唑	172.1>82.0	172.1>128.1	32	30
	172.1>128.1			18
地美硝唑	142.1>81.0	142.1>96.1	43	32
	142.1>96.1			29
洛硝达唑	201.1>55.1	201.1>140.1	44	25
	201.1>140.1			14
异丙硝唑	170.1>109.1	170.1>124.1	72	32
	170.1>124.1			23
替硝唑	248.1>121.0	248.1>121.0	68	21
	248.1>93.0			24
甲硝唑-D ₃	175.2>131.1	175.2>131.1	62	19
地美硝唑-D ₃	145.1>99.1	145.1>99.1	70	21
洛硝达唑-D ₃	204.1>143.1	204.1>143.1	42	15
异丙硝唑-D ₃	173.2>127.2	173.2>127.2	76	23
替硝唑-D ₅	253.1>126.1	253.1>126.1	68	22



8.4.3 基质匹配混合标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取基质匹配混合标准系列溶液(8.3)和试样溶液(8.2)上机测定。甲硝唑、地美硝唑、洛硝达唑、异丙硝唑、替硝唑及其内标甲硝唑-D₃、地美硝唑-D₃、洛硝达唑-D₃、异丙硝唑-D₃、替硝唑-D₅的定量离子质量色谱图见附录 A。

8.4.4 定性

在相同试验条件下,试样溶液与基质匹配标准系列溶液(质量浓度相当)中待测物的保留时间一致,相对偏差应在±2.5%之内。根据表 2 选择的监测离子对,比较试样图谱中待测物定性离子的相对离子丰度与浓度接近的基质匹配标准溶液中对应的定性离子的相对离子丰度,若偏差不超过表 3 规定

的范围,则可判定为试样中存在对应的待测物。

表 3 定性测定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
最大允许偏差/%	±20	±25	±30	±50

8.4.5 定量

以标准溶液中待测组分的峰面积和内标峰面积的比值为纵坐标,以标准溶液中待测组分的质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,其相关系数应不低于 0.99。试样溶液与标准溶液中待测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内,如超出线性范围,应重新测定。单点校准定量时,试样溶液中待测组分质量浓度与标准溶液质量浓度相差不超过 30%。

9 试验数据处理

试样中待测物的含量以质量分数 w_i 计,数值以微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)表示。多点校准按式(1)计算;单点校准按式(2)计算。

$$w_i = \frac{\rho \times V_1 \times V_2 \times k}{V_3 \times m \times k} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- w_i ——待测物含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- ρ ——从基质匹配标准曲线得到的试样溶液中待测物质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V_1 ——提取溶液的总体积,单位为毫升(mL);
- V_2 ——氮气吹干后复溶液的体积,单位为毫升(mL);
- k ——换算系数,固定取值为 1 000;
- V_3 ——净化用提取溶液体积,单位为毫升(mL);
- m ——试样质量,单位为克(g)。

$$w_i = \frac{A \times A'_{is} \times \rho_s \times \rho'_{is} \times V_1 \times V_2 \times k}{A_{is} \times A_s \times \rho'_{is} \times m \times V_3 \times k} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- w_i ——待测物含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- A ——试样溶液中待测物的峰面积;
- A'_{is} ——标准溶液中内标的峰面积;
- ρ_s ——标准溶液中待测物的质量浓度,单位为微克每升(ng/mL);
- ρ'_{is} ——试样溶液中内标的质量浓度,单位为微克每升(ng/mL);
- V_1 ——提取溶液的总体积,单位为毫升(mL);
- V_2 ——氮气吹干后复溶液的体积,单位为毫升(mL);
- k ——换算系数,固定取值为 1 000;
- A_{is} ——试样溶液中内标的峰面积;
- A_s ——标准溶液中待测物的峰面积;
- ρ'_{is} ——标准溶液中内标的质量浓度,单位为微克每升(ng/mL);
- m ——试样的质量,单位为克(g);
- V_3 ——净化用提取溶液分取体积,单位为毫升(mL)。

测定结果以平行测定的算术平均值表示,保留三位有效数字。

10 精密度

在重复性条件下,两次独立测试结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 15%。

附录 A

(资料性)

甲硝唑、地美硝唑、洛硝达唑、异丙硝唑、替硝唑及其内标溶液定量离子色谱图

甲硝唑、地美硝唑、洛硝达唑、异丙硝唑、替硝唑及其内标溶液定量离子色谱图见图 A.1。

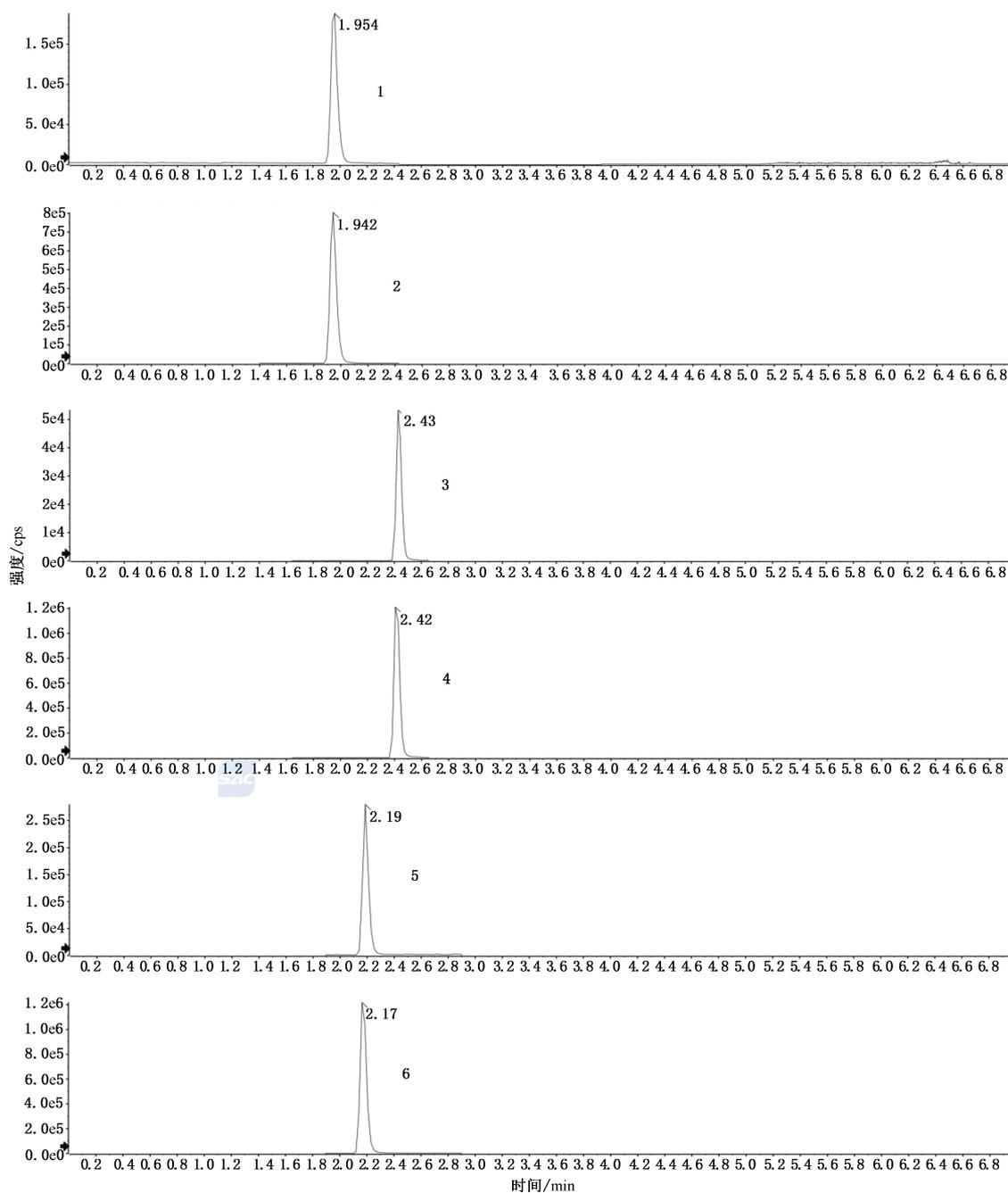
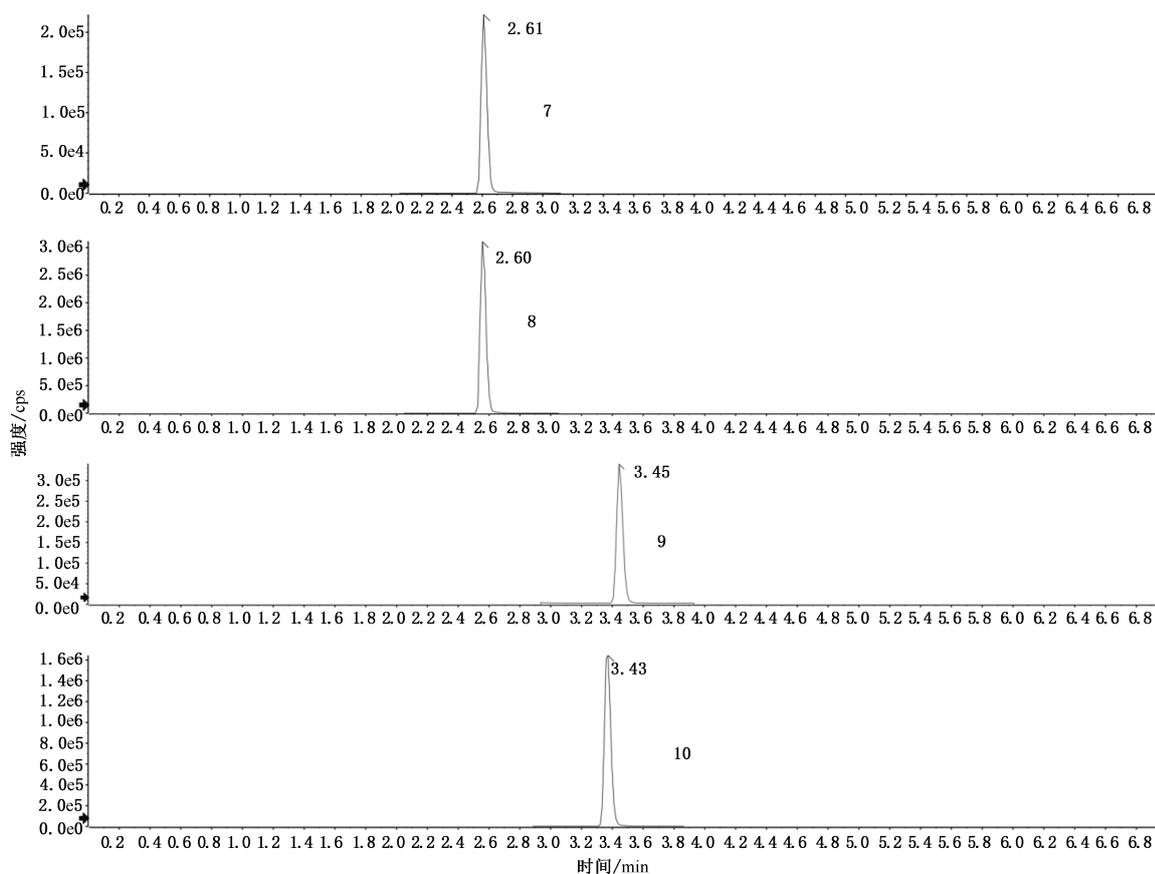


图 A.1 硝基咪唑类药物(2 ng/mL)及其内标的标准溶液定量离子色谱图



标引序号说明：

- 1 —— 甲硝唑；
- 2 —— 甲硝唑-D₃；
- 3 —— 地美硝唑；
- 4 —— 地美硝唑-D₃；
- 5 —— 洛硝达唑；
- 6 —— 洛硝达唑-D₃；
- 7 —— 替硝唑；
- 8 —— 替硝唑-D₅；
- 9 —— 异丙硝唑；
- 10 —— 异丙硝唑-D₃。



图 A.1 硝基咪唑类药物(2 ng/mL)及其内标的标准溶液定量离子色谱图(续)