

ICS 67.050
B20

团 体 标 准

T/ NAIA XXX—2025

牛奶中 7 种硝基咪唑和大环内酯类残留 量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of Seven Nitroimidazoles and Macrolides Residues in Milk by
HPLC-MS/MS

2025-XX-XX 发布

2025-XX-XX 实施

宁夏化学分析测试协会 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》规定编写。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏回族自治区食品检测研究院（国家市场监督管理总局重点实验室（枸杞及葡萄酒质量安全））、宁夏计量质量检验检测研究院、宁夏化学分析测试协会。

本文件主要起草人：朱燕燕、马桂娟、汤丽华、郭阳、王泽岚、高永梅、何卉、吕毅、吴明、张小飞。

本文件于 2025 年 XX 月 XX 日首次发布。

牛奶中 7 种硝基咪唑和大环内酯类残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了牛奶中 7 种硝基咪唑和大环内酯类抗生素（甲硝唑、地美硝唑、洛硝达唑、林可霉素、阿奇霉素、替米考星、罗红霉素）的液相色谱-串联质谱检测方法。

本文件适用牛奶中 7 种硝基咪唑和大环内酯类的测定。

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实验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样经乙腈提取，分散固相萃取法净化，反相色谱柱分离，供液相色谱-串联质谱仪测定，基质匹配外标法定量。

5 试剂和材料

本方法所用的试剂，除另有规定外，均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈：色谱纯。

5.1.2 甲酸：优级纯。

5.1.3 无水硫酸钠：优级纯。

5.1.4 十八烷基（C₁₈）粉末：粒径 50μm。

5.1.5 N-丙基乙二胺（PSA）粉末：粒径 50μm

5.1.6 0.1%甲酸水溶液：取甲酸（5.1.2）1.0mL，用水溶解定容到 1000mL，摇匀。

5.1.7 0.1%甲酸乙腈溶液：取甲酸（5.1.2）1.0mL，用乙腈（5.1.1）溶解定容到 1000mL，摇匀。

5.2 标准品

7 种硝基咪唑和大环内酯类标准品名称、化学分子式和 CAS 号见附表 A。

5.3 标准溶液配制

5.3.1 标准储备液（1.0mg/mL）：分别准确称取 7 种硝基咪唑和大环内酯类标准物质适量，用乙腈

(5.1.1) 溶解并定容至10.0mL容量瓶中，避光冷冻贮存，保存期限为3个月。

5.3.2 混合标准储备液（10.0μg/mL）：分别移取7种硝基咪唑和大环内酯类标准储备液100μL，混合后用乙腈（5.1.1）稀释并定容至10.0mL容量瓶中，避光冷冻贮存，保存期限为1个月。

5.3.3 混合标准工作溶液：分别准确吸取不同体积混合标准储备液，用空白基质定容至1.0mL，配制浓度为1.0~200.0ng/mL的标准工作溶液，临用现配。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：配备电喷雾离子源。

6.2 天平：感量 0.00001g 和 0.01g。

6.3 涡旋混合器。

6.4 高速离心机：最大转速 9000r/min。

6.5 超声波清洗器。

6.6 氮吹仪。

6.7 有机微孔滤膜，孔径 0.22μm，或相当者。

7 分析步骤

7.1 试样制备

取适量样品混合均匀，冷藏保存。

7.2 试液的提取与净化

7.2.1 试液的提取

称取 5.0g 样品于 50.0mL 具塞离心管中，加入乙腈（5.1.1）15mL、无水硫酸钠 50g，高速匀浆 3min，8000r/min 离心 5min，取上清液；残渣再加乙腈（5.1.1）15mL 重复提取一次，合并上清液，用乙腈定容至 50.0mL，待净化。

7.2.2 试液的净化

移取 10.0mL 上清液至装有 150mg C₁₈（5.1.4）和 50mg PSA（5.1.5）的高速离心管中，涡旋 5min，8000r/min 离心 5min，取上清液于 45℃氮吹至近干，初始流动相复溶至 1.0mL，上清液过 0.22μm 有机滤膜，滤液供 HPLC-MS/MS 分析。

7.3 仪器参考条件

7.3.1 液相色谱参考条件

a) 色谱柱：C₁₈，2.1mm×150mm，粒径 3.5μm 或性能相当。

b) 柱温：35℃。

c) 流动相：A：0.1%的甲酸溶液（5.1.6），B：0.1%甲酸乙腈溶液（5.1.7）；梯度洗脱见表 1。

d) 流速：0.3mL/min。

e) 进样量：5μL。

表 1 流动相及梯度洗脱条件

时间/min	流速/（mL/min）	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	0.3	95	5
5.00	0.3	95	5
5.01	0.3	65	35
10.00	0.3	65	35
10.01	0.3	40	60
13.50	0.3	40	60
13.51	0.3	95	5
15.00	0.3	95	5

7.3.2 质谱参考条件

- a) 电离方式：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（MRM）。
- d) 鞘气温度：325℃。
- e) 鞘气流速：10.0L/min。
- f) 雾化器压力：310.23kPa。
- g) 喷嘴电压：500V。
- h) 毛细管电压：3500V。
- i) 定性离子对、定量离子对、碎裂电压、碰撞能量等参数参见附录 B。

7.4 定量测定

根据试液中被测物含量情况，选定浓度相近的基质标准混合使用液，基质标准混合使用液和待测试液中被测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。基质标准混合使用液与试液等体积进样测定。标准溶液及试液均按 7.3.1 和 7.3.2 规定的条件进行测定，如果试液中与标准溶液相同的保留时间有峰出现，则对其进行确证。7 种硝基咪唑和大环内酯类标准品的多反应监测（MRM）色谱图参见附录 C，采用基质溶液校准曲线外标法定量。

7.5 定性测定

经确证分析被测物质色谱峰保留时间与标准物质相一致，并且在扣除背景后的样品谱图中，所选择的离子均出现。同时所选择离子的丰度比与标准溶液中相关离子的相对丰度一致，相似度在允许偏差之内（见表 2），则可判定样品中存在对应的被测物。

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%至 50%	>10%至 20%	≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

7.6 空白试验

除不加试样外，均按上述步骤进行。

8 分析结果的表述

试样中 7 种硝基咪唑和大环内酯类的含量按式（1）进行计算：

$$X = \frac{c \times V \times 1000}{m \times 1000} \quad (1)$$

式中：

X ——试样中各种化合物含量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g/kg}$ ）；

c ——由标准曲线计算出的试样溶液浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

V ——试样的最后定容体积，单位为毫升（ mL ）；

m ——试样质量，单位为克（ g ）。

注：测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留两位有效数字。

9 精密度

在重复性测定条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

10 其他

当称样量为 5.0g,定容体积为 1.0mL 时，甲硝唑、地美硝唑、洛硝达唑、林可霉素、阿奇霉素、替米考星、罗红霉素的检出限为 0.5 $\mu\text{g/kg}$ ，定量限为 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

附录 A
(资料性附录)

表 A 7 种硝基咪唑和大环内酯类标准品名称、化学分子式和 CAS 号

序号	名称	化学分子式	CAS 号
1	甲硝唑	C ₆ H ₉ N ₃ O ₃	443-48-1
2	地美硝唑	C ₅ H ₇ N ₃ O ₂	551-92-8
3	洛硝达唑	C ₆ H ₈ N ₄ O ₄	7681-76-7
4	林可霉素	C ₁₈ H ₃₄ N ₂ O ₆ S	154-21-2
5	阿奇霉素	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂	83905-01-5
6	替米考星	C ₄₆ H ₈₀ N ₂ O ₁₃	108050-54-0
7	罗红霉素	C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁₅	80214-83-1

附录 B
(资料性附录)

表 B 7 种硝基咪唑和大环内酯类的质谱参数

序号	被测物名称	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碎裂电压(v)	碰撞能量(eV)
1	甲硝唑	172.1	128*,82	100	9, 24
2	地美硝唑	142.1	96*,81	100	14, 14
3	洛硝达唑	201.1	140*,55.2	80	5, 20
4	林可霉素	407.2	359*,126	150	15, 30
5	阿奇霉素	749.5	591.3*,158.1	190	28, 40
6	替米考星	869.6	696.4*,174	250	45, 50
7	罗红霉素	837.5	679.4*,158	170	18, 38

注：*为定量离子

附录 C
(资料性附录)

图 C 7 种硝基咪唑和大环内酯类的多反应监测 (MRM) 典型色谱图

