

中华人民共和国国家标准

GB/T 21167—2007

蜂王浆中硝基呋喃类代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of nitrofuran metabolites residues in royal jelly—
LC-MS/MS method

2007-10-31 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 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：中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：丁涛、徐锦忠、沈崇钰、吴斌、陈惠兰、赵增运、张扬、朱春、蒋原、陶宏锦。

蜂王浆中硝基咪唑类代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了蜂王浆中咪唑它酮的代谢物 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷基酮(简称 AMOZ)、咪唑西林的代谢物氨基脲(简称 SEM)、咪唑妥因的代谢物 1-氨基-2-内酰胺(简称 AHD)和咪唑唑酮的代谢物 3-氨基-2-噁唑烷基酮(简称 AOZ)残留量的液相色谱-串联质谱的测定。

本标准适用于蜂王浆中硝基咪唑类代谢物残留量的测定。

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 方法提要

硝基咪唑类药物在动物体内迅速分解,其原位稳定性只有数小时,而其代谢物在动物体内容易和蛋白组织结合,十分稳定。利用三氯乙酸溶液沉淀王浆中蛋白质后,邻硝基苯甲醛作为衍生化试剂避光衍生化 16 h,乙酸乙酯提取浓缩后,用液相色谱-串联质谱仪测定,内标法定量。

4 试剂和材料

4.1 水:应符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.2 甲醇:HPLC 级。

4.3 乙酸乙酯:HPLC 级。

4.4 乙酸铵:HPLC 级。

4.5 三氯乙酸:分析纯。

4.6 无水磷酸氢二钾:分析纯。

4.7 二甲基亚砜:分析纯。

4.8 邻硝基苯甲醛:分析纯。

4.9 同位素内标:AHD-¹³C₃, AMOZ-D₅, AOZ-D₄, SEM·HCl - (¹³C, ¹⁵N₂), 100 μg/mL, 纯度≥98%。

4.10 AOZ、SEM·HCl、AMOZ 和 AHD·HCl 标准品: 纯度≥98%。

4.11 AOZ、SEM、AMOZ 和 AHD 标准储备溶液: 1 mg/mL。准确称取适量的 AOZ、SEM·HCl、AMOZ 和 AHD·HCl 标准品(4.10), 用甲醇(4.2)配成 1.0 mg/mL 的标准储备液。储备液贮存在 4℃冰箱中, 1 年有效。

4.12 AOZ、SEM、AMOZ 和 AHD 标准工作溶液: 用流动相分别配成浓度为 100 ng/mL、10 ng/mL 标准工作溶液, 标准工作溶液在 4℃保存, 3 个月有效。

4.13 内标溶液: 用流动相配制浓度为 50 ng/mL 四种内标混合溶液, 内标混合溶液在 4℃保存, 1 年有效。

4.14 衍生化溶液:50 mmol/L 邻硝基苯甲醛。称取 0.037 8 g 的邻硝基苯甲醛(4.8)到 50 mL 烧杯中,加入 5 mL 二甲基亚砜(4.7)溶解,现配。

4.15 磷酸氢二钾缓冲液(1 mol/L):称取 87.1 g 无水磷酸氢二钾(4.6),加入 500 mL 水溶解。

4.16 三氯乙酸溶液[25% (质量浓度)]:称取 25 g 三氯乙酸溶解于 100 mL 水中。

5 仪器

5.1 液相色谱-串联质谱仪(串联四极杆):配有电喷雾离子源。

5.2 分析天平:感量 0.01 g 和 0.1 mg 各一台。

5.3 旋转蒸发仪或相当者。

5.4 水浴振荡器。

5.5 旋涡混匀器。

5.6 真空泵:真空度应达到 80 kPa。

5.7 离心机。

5.8 移液器:5 mL,200 μ L。

5.9 离心管:50 mL,具塞。

6 试样的制备与保存

6.1 试样制备

将实验室样品搅拌均匀,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

将试样于冷冻状态下保存(-18℃)。

7 测定步骤

7.1 提取

准确称取 2.00 g 试样,置于 50 mL 具塞离心管中,准确加入 0.100 mL 四种标准内标混合溶液(4.13)、2 mL 25%三氯乙酸溶液、3 mL 水,于液体混匀器上快速混合 1 min,室温下振荡 60 min。2 500 r/min 离心 5 min,转移上层清液于干净 50 mL 玻璃离心管中,加入 150 μ L 邻硝基苯甲醛溶液,37℃水浴振荡过夜(16 h)。取出样品,冷却到室温后,加入 4 mL 磷酸氢二钾缓冲溶液(4.15),调节样品溶液 pH 7~7.5。加入 10 mL 乙酸乙酯,混合 30 s,2 500 r/min 离心 5 min,取上层乙酸乙酯溶液到 50 mL 玻璃试管中,再加入 8 mL 乙酸乙酯,重复上述提取步骤,合并提取液,40℃水浴旋转蒸发干。用甲醇水溶液(4+6)1.0 mL 定容,过 0.45 μ m 的滤膜到进样瓶中,供液相色谱-串联质谱仪测定。

7.2 标准溶液的衍生化

分别准确移取 100 ng/mL 和 10 ng/mL 四种标准混合溶液(4.12)0.20 mL、0.10 mL 和 0.050 mL 到干净的 50 mL 玻璃离心管中,准确加入 0.100 mL 四种标准内标混合溶液(4.13)、0.5 mL 1 mol/L HCl、150 μ L 邻硝基苯甲醛溶液(4.14),于旋涡混匀器上快速混合 30 s,37℃水浴振荡过夜(16 h)。按照样品提取步骤处理(7.1)后,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

- a) 色谱柱: C₁₈, 5 μ m, 150 mm×2.1 mm (内径),或相当者;
- b) 流动相: 甲醇(A) +0.5 mmol/L 乙酸铵水溶液(B);
- c) 流速:0.25 mL/min;
- d) 梯度洗脱程序:0 min~6.0 min 20%~60%A,6 min~8 min 60%A,8 min~9 min 60%~80%A,9 min~9.1 min 80%~20%A,9.1 min~10.5 min 20%A;

- e) 柱温:室温;
f) 进样量:25 μL 。

7.3.2 串联质谱条件

- a) 离子源:电喷雾离子化电离源(ESI),正离子监测;
b) 扫描方式:选择离子检测(SRM);
c) 雾化气、鞘气为高纯氮气,碰撞气为高纯氦气;
d) 喷雾电压、碰撞电压等电压值均优化至最佳灵敏度;
e) 选择离子对见表 1。

表 1 选择离子对

测定物质	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)
AOZ	236.0	134.0 ^a
		104.0
AOZ - D4	240.0	134.0 ^a
SEM	209.0	166.0 ^a
		192.0
SEM- (¹³ C, ¹⁵ N ₂)	212.0	168.0 ^a
AHD	249.0	134 ^a
		178
AHD- ¹³ C3	252.0	134 ^a
AMAZ	335.0	291 ^a
		262
AMAZ - D5	340.0	296.0 ^a
^a 定量离子。		

7.3.3 液相色谱-串联质谱测定

衍生化后的标准工作溶液(7.2)在液相色谱-串联质谱设定条件下分别进样,以标准与内标物峰面积比值为纵坐标,工作溶液浓度(ng/mL)为横坐标,绘制 6 点标准工作曲线,用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中标准的响应值均应在仪器测定的线性范围内。在上述色谱条件下,其相应的标准物质、内标色谱图和串联质谱图参见图 A.1 和图 A.2。

7.4 空白试验

除不加入试样外,按上述步骤进行。

8 结果计算

结果用色谱数据处理机或按式(1)计算样品中硝基咪唑代谢物的浓度,结果需扣除空白值:

$$c_x = \frac{A_x \cdot m_s}{A_s \cdot m} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- c_x ——样品中硝基咪唑代谢物的浓度,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
 A_x ——样品中硝基咪唑代谢物的峰面积与相应内标峰面积比值;
 m_s ——硝基咪唑代谢物标准的质量,单位为纳克(ng);
 A_s ——标准品中硝基咪唑代谢物的峰面积与相应内标峰面积比值;
 m ——样品质量,单位为克(g)。

9 测定低限和回收率范围

本方法中四种硝基咪唑类代谢物测定低限均为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

蜂王浆中四种硝基咪唑类代谢物添加浓度及回收率范围(内标校正)的试验数据($n=10$):

0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平, 回收率在 92%~116%;

1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平, 回收率在 87%~112%;

2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平, 回收率在 92%~109%。

附录 A
(资料性附录)
标准品色谱图及二级质谱碎片图

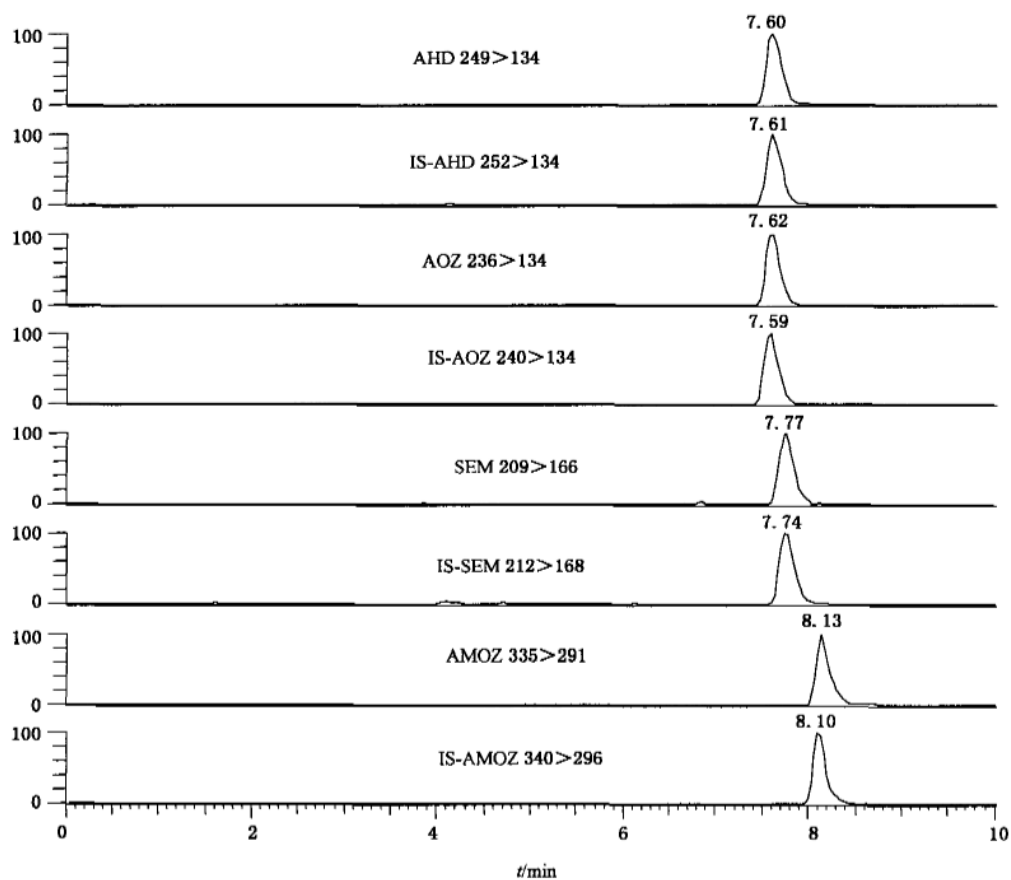


图 A.1 硝基咪唑类代谢物和其相应内标离子流色谱图

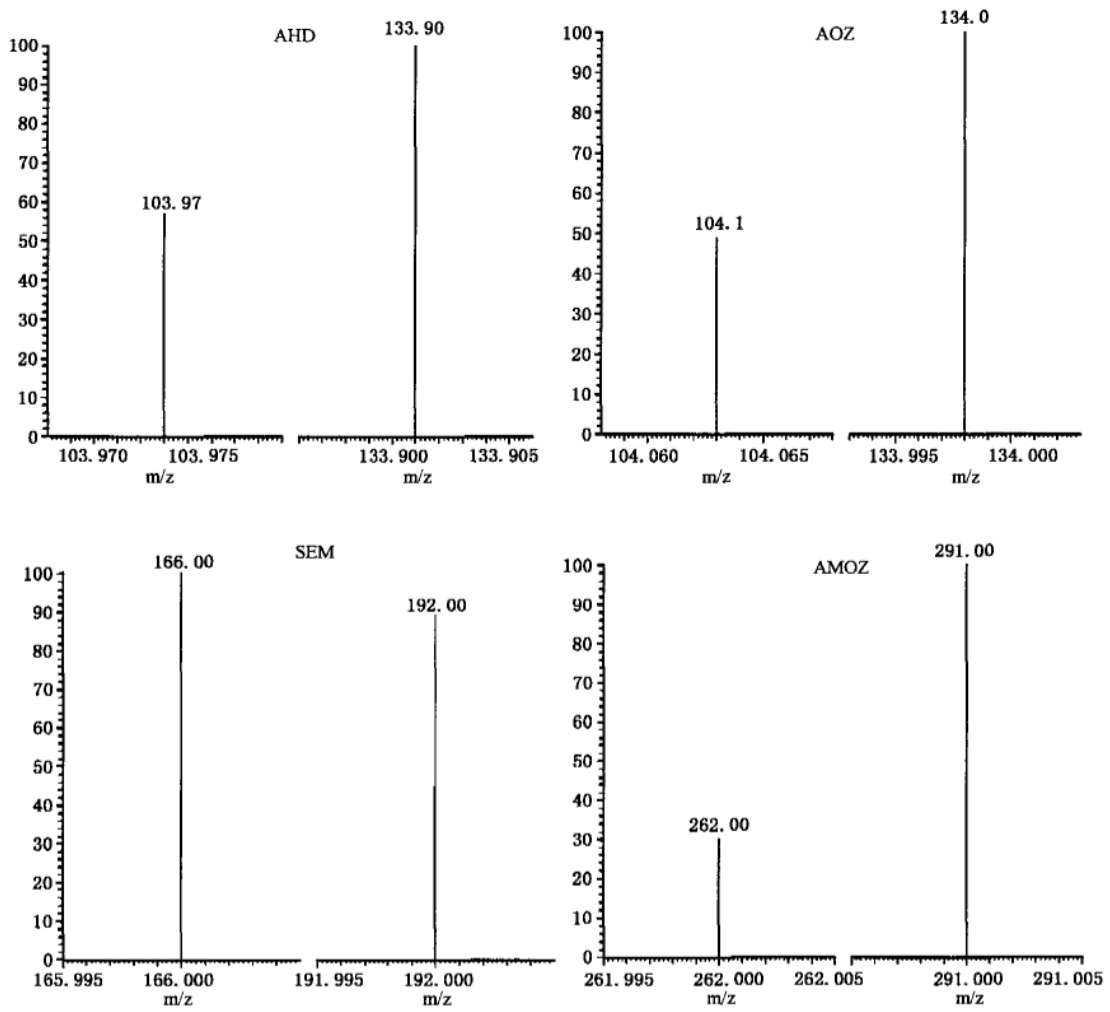


图 A.2 四种硝基咪喃代谢物二级质谱碎片图