



中华人民共和国国家标准

GB/T 23407—2009

蜂王浆中硝基咪唑类药物及其 代谢物残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of residues of nitroimidazoles and
their metabolites in royal jelly—LC-MS/MS method

2009-03-28 发布

2009-07-01 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 和附录 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：中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：丁涛、吴斌、徐锦忠、张晓燕、张婧、杨安南、郭玲、蒋原、陶宏锦。

蜂王浆中硝基咪唑类药物及其 代谢物残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了蜂王浆中甲硝唑(简称 MNZ,下同),二甲硝咪唑(简称 DMZ,下同)及其代谢物 2-羟甲基-1-甲基-5-硝基咪唑(简称 HMMNI,下同),异丙硝唑(简称 IPZ,下同)及其代谢物 2-(2-羟异丙基)-1-甲基-5-硝基咪唑(简称 IPZOH),洛硝哒唑(简称 RNZ,下同)残留量的液相色谱-串联质谱的测定方法。上述硝基咪唑类药物中英文名称、结构式、CAS 号和相对分子质量参见附录 A。

本标准适用于蜂王浆中硝基咪唑类药物及其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—2008,ISO 3696:1987,MOD)

3 方法提要

试样加入相应内标,用氢氧化钠溶液溶解,乙酸乙酯提取硝基咪唑类药物及其代谢物,阳离子柱富集净化,利用液相色谱-串联质谱仪测定,梯度洗脱,内标法定量。

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 乙腈。

4.3 乙酸乙酯。

4.4 乙酸铵:HPLC 级。

4.5 氢氧化钠溶液:0.25 mol/L。

4.6 甲酸(85%)。

4.7 氨水(28%)。

4.8 阳离子交换柱(PCX):60 mg,3 mL。

4.9 甲酸乙腈溶液:量取适量甲酸(4.6)于适量乙腈(4.2)中,浓度为 10%(体积分数)。

4.10 氨水甲醇溶液:量取适量氨水(4.7)于适量甲醇(4.1)中,浓度为 5%(体积分数)。

4.11 同位素内标:DMZ-D₃、IPZOH-D₃、HMMNI-D₃,纯度≥98%。

4.12 MNZ、DMZ、HMMNI、IPZ、IPZOH 和 RNZ 标准品:纯度≥98%。

4.13 MNZ、DMZ、HMMNI、IPZ、IPZOH 和 RNZ 标准储备溶液:1 mg/mL。准确称取适量的 MNZ、DMZ、HMMNI、IPZ、IPZOH 和 RNZ 标准品(4.12),用甲醇(4.1)配成 1.0 mg/mL 的标准储备液,储备液贮存在 4℃冰箱中,可保存 6 个月。

4.14 DMZ-D₃、IPZOH-D₃ 和 HMMNI-D₃ 内标储备溶液:100 μg/mL。称取适量的 DMZ-D₃、IPZOH-D₃ 和

HMMNI-D₃ 内标物(4.11),用甲醇(4.1)配成 100 μg/mL 储备液,储备液贮存在 4 °C 冰箱中,可保存 6 个月。

4.15 DMZ-D₃、IPZOH-D₃ 和 HMMNI-D₃ 内标工作溶液:1 μg/mL。取适量内标储备液(4.14)用甲醇(4.1)稀释成 1 μg/mL 工作溶液,内标工作溶液在 4 °C 保存。

4.16 MNZ、IPZ、IPZOH、DMZ、HMMNI 和 RNZ 标准工作溶液:用甲醇-水(2+8,体积比)分别配成浓度范围为 1 ng/mL~100 ng/mL 标准工作溶液,其中内标溶液浓度为 50 ng/mL,现配。

4.17 甲醇-水(2+8,体积比):量取 20 mL 甲醇于 80 mL 水中,混合均匀。

5 仪器

5.1 液相色谱-质谱/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 旋转蒸发器或相当者。

5.4 涡旋混匀器。

5.5 真空泵:真空度不低于 80 kPa。

5.6 离心机:转速不低于 2 500 r/min。

5.7 移液器:5 mL,200 μL。

5.8 离心管:50 mL,具塞。

5.9 滤膜:有机相,0.45 μm。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

将王浆样品搅拌均匀,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。在制样的操作过程中,应防止样品污染或发生残留含量变化。

6.2 试样的保存

将试样于冷冻下保存。

7 测定步骤

7.1 提取

准确称取 5 g(精确到 0.01 g)试样,置于 50 mL 具塞离心管中,准确加入 3 种内标混合溶液(4.14) 50 μL,加入氢氧化钠溶液(4.5)10 mL 混合 15 s,溶解样品。加入 10 mL 乙酸乙酯(4.3),混合 30 s,2 500 r/min 离心 3 min,取上层乙酸乙酯到 50 mL 玻璃试管中,再加入 10 mL 乙酸乙酯(4.3),重复上述提取步骤,合并提取液,40 °C 水浴旋转蒸发干,5 mL 甲酸乙腈溶液(4.9)溶解。3 mL 甲醇、3 mL 水活化固相萃取柱,上样,3 mL 水洗,抽至近干,3 mL 氨水甲醇溶液(4.10)洗脱,45 °C 水浴旋转蒸发干,用甲醇-水(4.17)1.0 mL 定容,过滤到进样瓶中,供液相色谱-质谱/质谱仪测定。

7.2 测定

7.2.1 液相色谱条件

- 色谱柱:C₁₈(封端),3 μm,150 mm×2.0 mm(内径)或相当者;
- 流动相:甲醇+5 mmol/L 乙酸铵溶液;
- 流速:0.20 mL/min;
- 梯度洗脱程序:参见附录 B;
- 柱温:室温;
- 进样量:25 μL。

7.2.2 串联质谱条件

参见附录 C。

7.3 液相色谱-质谱测定

7.3.1 定性测定

进行样品测定时,如果检出的质量色谱峰保留时间与标准样品一致,并且在扣除背景后的样品谱图中,各定性离子的相对丰度与浓度接近的同样条件下得到的标准溶液谱图相比,最大允许相对偏差不超过表 1 中规定的范围,则可判断样品中存在对应的被测物。

表 1 定性确证时相对离子丰度的最大允许相对偏差

相对离子丰度	>50%	>20% ~ 50%	>10% ~ 20%	≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

7.3.2 定量测定

标准工作溶液(4.16)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(1 ng/mL~100 ng/mL),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在仪器测定的线性范围内。其中 DMZ-D₃ 作为 MNZ 和 DMZ 内标使用;HMMNI-D₃ 作为 HMMNI 和 RNZ 内标使用;IPZOH-D₃ 作为 IPZ 和 IPZOH 内标使用。在上述色谱条件下,其相应的标准物质和内标离子流色谱图参见附录 D。

7.4 平行试验

按以上(7.1~7.3)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(7.1~7.3)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:

$$c_x = \frac{A_x \times c_s}{A_s \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

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

注:计算结果需扣除空白值。

9 检测低限、回收率范围和精密度

本标准中 MNZ、DMZ、RNZ 和 IPZ 测定低限为 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, HMMNI 和 IPZOH 测定低限为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

蜂王浆中硝基咪唑及其代谢物添加浓度及回收率范围(内标校正)的试验数据($n=10$):

添加水平为 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, MNZ、DMZ、RNZ 和 IPZ 平均回收率范围为 98%~100%;

添加水平为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, MNZ、DMZ、RNZ、IPZ、HMMNI 和 IPZOH 平均回收率范围为 97%~101%;

添加水平为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, MNZ、DMZ、RNZ、IPZ、HMMNI 和 IPZOH 平均回收率范围为 97%~101%;

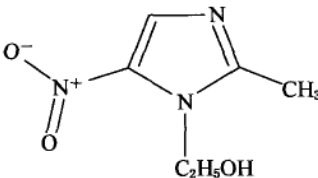
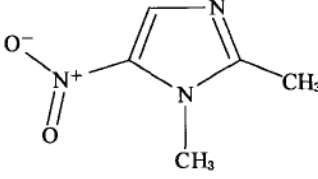
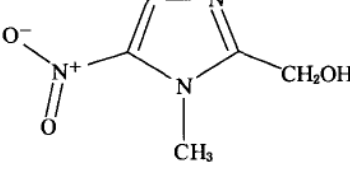
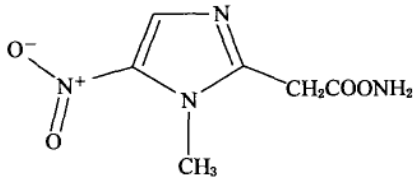
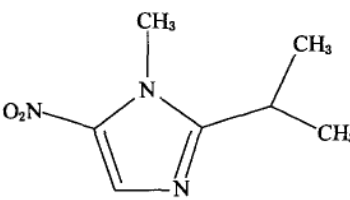
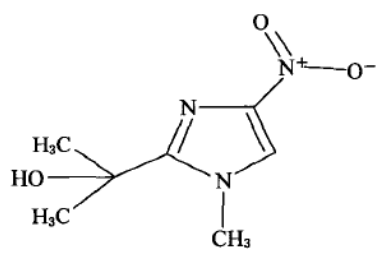
添加水平为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, HMMNI 和 IPZOH 平均回收率范围为 96%~97%。

在 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平上,相对标准偏差(RSD)为 3.2%~7.2%。

附录 A
(资料性附录)

硝基咪唑类药物及其代谢物中英文名称、化学结构式、CAS 号和相对分子质量

表 A.1 硝基咪唑类药物及其代谢物中英文名称、化学结构式、CAS 号和相对分子质量

序号	中文名称/英文名称及简称	化学结构式	相对分子质量	CAS 号
1	甲硝唑 (Metronidazole, MNZ)		171	443-48-1
2	二甲硝基咪唑 (Dimetridazole, DMZ)		141	551-92-8
3	二甲硝基咪唑-代谢物 (Hydroxydimetridazole, HMMNI)		158	936-05-0
4	洛硝唑 (Ronidazole, RNZ)		200	7681-76-7
5	异丙硝唑 (Ipronidazole, IPZ)		169	14885-29-1
6	异丙硝唑代谢物 (Ipronidazole-OH, IPZOH)		185	35175-14-5

附录 B
(资料性附录)
流动相梯度洗脱程序

表 B.1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	甲醇/%	5 mmol/L 乙酸铵溶液/%
0.00	20	80
1.00	20	80
2.00	90	10
5.50	90	10
6.00	20	80
8.00	20	80

附 录 C
(资料性附录)

质谱/质谱条件及选择离子参数设定表

离子源:电喷雾离子化电离源(ESI),正离子监测;

扫描方式:选择离子检测(SRM);

雾化气、鞘气为高纯氮气,碰撞气为高纯氩气;

喷雾电压:4 200 V;

加热毛细管温度:350 ℃。

表 C.1 选择离子参数设定表

测定物质	母离子 (m/z)	定性离子 (m/z)	碰撞电压/ V	定量离子 (m/z)
MNZ	172	82 128	22 14	128
DMZ	142	81 96	24 18	96
HMMNI	158	55 140	27 12	140
RNZ	201	55 140	21 12	140
IPZ	170	109 124	19 16	124
IPZOH	186	122 168	17 11	168
DMZ-D ₃	145	99	16	99
HMMNI-D ₃	161	143	12	143
IPZOH-D ₃	189	171	13	171

附录 D

(资料性附录)

硝基咪唑及其代谢物选择离子流色谱图

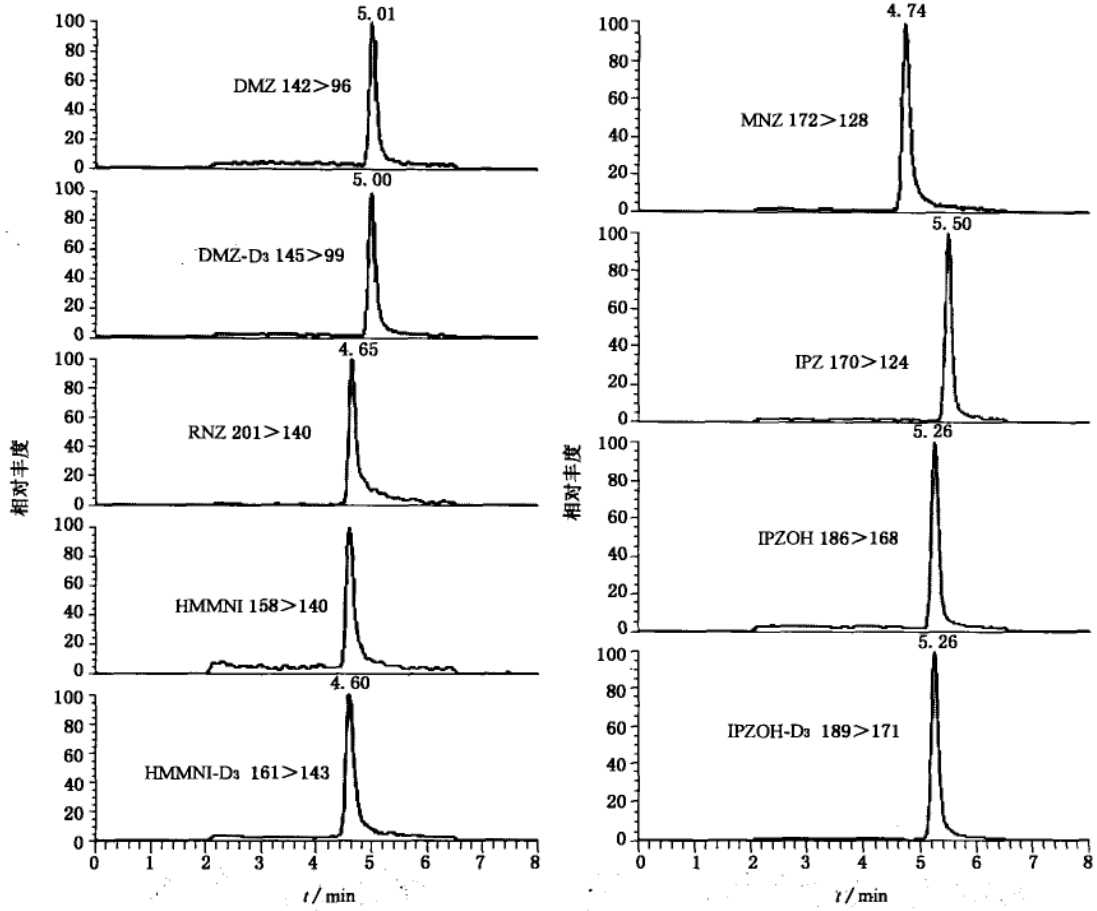


图 D.1 硝基咪唑及其代谢物选择离子流色谱图