

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 685—2020

消毒剂与抗菌剂中抗真菌药物检测方法 与评价要求

Analytical method and evaluation requirements of antifungal drugs in disinfectant
and antibacterial and bacteriostatic agents

2020 - 07 - 20 发布

2021 - 02 - 01 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准起草单位：山东省疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所、山东省青岛市食品药品检验研究院、江苏省疾病预防控制中心、山东省德州市疾病预防控制中心、山东省济宁市疾病预防控制中心、北京市疾病预防控制中心。

本标准主要起草人：崔树玉、杨彬、苏冠民、姜大峰、辛成龙、沈瑾、张流波、卢京光、徐燕、董健、刘钧、孙惠惠、陈金东、王金燕、朱峰、杨晓、丁晓静、王萍。

消毒剂与抗抑菌剂中抗真菌药物检测方法与评价要求

1 范围

本标准规定了消毒剂与抗抑菌剂中抗真菌药物的检测方法和评价要求。

本标准适用于消毒剂与抗抑菌剂中灰黄霉素、硝酸益康唑、氟康唑、酮康唑、克霉唑、联苯苄唑、硝酸咪康唑、氟胞嘧啶、盐酸萘替芬及其它抗真菌药物的测定和评价。

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试验方法
中华人民共和国药典

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

抗真菌药物 antifungal drugs

具有抑菌和（或）杀菌特性、用于预防和治疗真菌性感染的药物，包括抗真菌药物和按处方药物管理的化学合成药物。

4 检测方法

4.1 原理

样品经1%甲酸乙腈超声提取后，膏霜剂型样品需经N-丙基乙二胺净化，其他剂型样品不需净化，用超高效液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

4.2 试剂和材料

除非另有说明，所用试剂均为色谱纯，实验用水为GB/T 6682规定的一级水。

4.2.1 试剂

4.2.1.1 乙腈（CH₃CN）。

4.2.1.2 甲酸（HCOOH）。

4.2.1.3 N-丙基乙二胺（C₅H₁₄N₂）。

4.2.2 试剂配制

4.2.2.1 0.1%甲酸水溶液：取甲酸 1.0 mL，用水定容至 1000 mL，混匀。

4.2.2.2 1%甲酸水溶液：取甲酸 10.0 mL，用水定容至 1000 mL，混匀。

4.2.2.3 0.1%甲酸乙腈溶液：取甲酸 1.0 mL，用乙腈定容至 1000 mL，混匀。

4.2.2.4 1%甲酸乙腈溶液：取甲酸 10.0 mL，用乙腈定容至 1000 mL，混匀。

4.2.2.5 0.1%甲酸乙腈水溶液：取乙腈 300 mL，加入甲酸 1.0 mL，用水定容至 1000 mL，混匀。

4.2.3 标准品

灰黄霉素、酮康唑、克霉唑、硝酸益康唑、硝酸咪康唑、氟康唑、联苯苄唑、氟胞嘧啶、盐酸萘替芬纯度均大于98.5%或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质，其他相关信息参见附录A。

4.2.4 标准溶液配制

4.2.4.1 标准储备液（1000 µg/mL）：分别准确称取标准品 50.0 mg（精确至 0.1 mg），用少量乙腈溶解后，转移至 50 mL 容量瓶中，加乙腈使溶解并定容至刻度，混匀，即配制成质量浓度为 1000 µg/mL 的标准储备液，-20℃±2℃冷冻保存，有效期 3 个月。

4.2.4.2 混合标准中间液：取上述标准储备液适量，用乙腈配置成酮康唑质量浓度为 10 µg/mL、氟胞嘧啶质量浓度为 5 µg/mL、氟康唑、灰黄霉素、联苯苄唑质量浓度为 1 µg/L、硝酸益康唑、硝酸咪康唑、盐酸萘替芬和克霉唑质量浓度为 0.5 µg/mL 的混合标准中间液，冷藏避光保存，有效期 1 个月。

4.2.4.3 混合标准系列溶液：吸取不同体积的混合标准中间液，用空白样品提取液配制成适当质量浓度的标准工作溶液，酮康唑的质量浓度为 10 µg/L、25 µg/L、50 µg/L、100 µg/L、150 µg/L、200 µg/L，氟胞嘧啶的质量浓度为 5 µg/L、12.5 µg/L、25 µg/L、50 µg/L、75 µg/L、100 µg/L，氟康唑、灰黄霉素、联苯苄唑的质量浓度为 1 µg/L、2.5 µg/L、5 µg/L、10 µg/L、15 µg/L、20 µg/L，硝酸益康唑、硝酸咪康唑、盐酸萘替芬和克霉唑的质量浓度为 0.5 µg/L、1.25 µg/L、2.5 µg/L、5 µg/L、7.5 µg/L、10 µg/L，临用现配。

4.2.5 材料

有机系滤膜：孔径为0.22 µm。

4.3 仪器和设备

4.3.1 超高效液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源（ESI 源）。

4.3.2 分析天平：最小分度值 0.1 mg。

4.3.3 离心机：转速≥9000 r/min。

4.3.4 涡旋混合器。

4.3.5 超声波清洗器。

4.4 分析步骤

4.4.1 样品前处理

4.4.1.1 膏霜剂型样品净化处理

称取0.5 g（精确至1 mg）试样置于15 mL离心管中，加入8.0 mL 1%甲酸乙腈，涡旋1 min，加入50 mg N-丙基乙二胺，超声提取30 min，离心（9000 r/min）5 min，将上清液转移至10 mL容量瓶，1%甲酸乙腈定容至刻度。混匀后取1.0 mL置于10 mL容量瓶，用0.1%甲酸乙腈水溶液定容至刻度，混匀后转移至离心管，离心（9000r/min）5 min，取上清液经滤膜过滤后备用。

4.4.1.2 其他剂型样品处理

称取0.5 g（精确至1 mg）试样置于15mL离心管中，加入8.0 mL 1%甲酸乙腈，涡旋1 min，超声提取 30 min，离心（9000 r/min）5 min，将上清液转移至10 mL容量瓶，1%甲酸乙腈定容至刻度。混匀后取

1.0 mL置于10 mL容量瓶，用初始流动相定容至刻度，混匀后转移至离心管，离心（9000 r/min）5 min，取上清液经滤膜过滤后备用。

4.4.2 样品测定

4.4.2.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C₁₈柱(柱长 100 mm，内径为 2.1 mm，粒径为 1.7 μm)，或相当者；
- b) 流动相：A 相为 0.1%甲酸水溶液，B 相为 1%甲酸乙腈溶液；
- c) 流速：0.3 mL/min；
- d) 柱温：30℃；
- e) 进样体积：2 μL；
- f) 梯度洗脱程序：见附录 B。

4.4.2.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 电离方式：ESI⁺；
- b) 离子源温度：150℃；
- c) 毛细管电压：3.0 kV；
- d) 脱溶剂气温度：400℃；
- e) 脱溶剂气(N₂)流量：800 L/h；
- f) 锥孔气(N₂)流量：150 L/h；
- g) 监测方式：多反应监测（MRM）模式；
- h) 其他质谱参数：见附录 C。

4.4.2.3 标准曲线的制作

将混合标准系列溶液，按质量浓度由低到高依次进样注入液相色谱串联质谱仪中，测得相应的峰面积。以各抗真菌药物标准工作溶液的质量浓度为横坐标，以各抗真菌药物的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。以离子对定性，采用外标法进行定量分析，标准图谱参见附录D。

4.4.2.4 定性测定

在相同测试条件下，试样中目标化合物色谱峰的保留时间与相应标准色谱峰的保留时间相比较，变化范围在±2.5%以内，且检测到的相对离子丰度，应与质量浓度相当的标准溶液中相对离子丰度一致，其相对离子丰度比偏差应符合表1要求。

表1 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

4.4.2.5 定量测定

按照外标法进行定量计算，标准溶液和试样溶液中抗真菌药物的响应值均应在仪器线性响应范围内。如果浓度超过标准曲线范围，应稀释到合适质量浓度后分析。

4.4.2.6 样品中目标化合物的测定

将试样溶液进样注入液相色谱-串联质谱仪中，以保留时间和两对离子（特征离子对/定量离子对）所对应的色谱峰面积相对丰度进行定性，根据标准曲线计算试样溶液中目标化合物的质量浓度。

4.4.3 空白试验

除不加试样溶液外，均按上述4.4.2.6步骤进行。

4.4.4 结果计算和表述

试样中目标化合物的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{\rho \times V \times K}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——试样中目标化合物的含量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g/kg}$ ）；

ρ ——由标准曲线计算出的试样溶液中目标化合物的质量浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

V ——试样最终定容体积，单位为毫升（ mL ）；

K ——稀释倍数；

m ——样品称样量，单位为克（ g ）。

计算结果保留三位有效数字。

4.4.5 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的15%。本方法的回收率和精密度见附件E。

4.4.6 检出限和定量限

当取样量为0.5 g，定量体积为10 mL时，本方法的检出限和定量限见附件F。

5 其他抗真菌药物的检测方法

可参照《中华人民共和国药典》方法并进行方法验证后执行。

《中华人民共和国药典》未涵盖的抗真菌药物的检测方法。可参考文献报道的方法，通过认证后方可使用。

6 评价要求

6.1 消毒剂与抑菌剂中不应添加抗真菌药物。

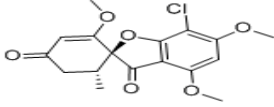
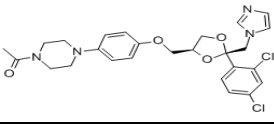
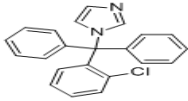
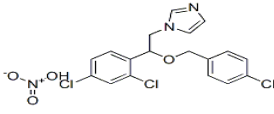
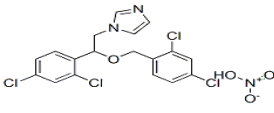
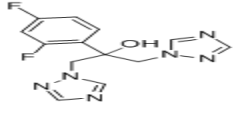
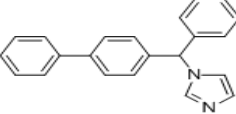
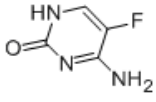
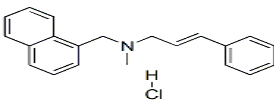
6.2 消毒剂与抑菌剂中灰黄霉素、酮康唑、克霉唑、硝酸益康唑、硝酸咪康唑、氟康唑、联苯苄唑、氟胞嘧啶、盐酸萘替芬含量或总量均不应超过100 mg/kg。

6.3 消毒剂与抑菌剂中其他抗真菌药物的含量或总量不应超过外用药物最小规格的1%。

附 录 A
(资料性附录)
标准品相关信息

标准品相关信息见表A. 1。

表A. 1 标准品相关信息

抗真菌药	英文名称	分子式	CAS 号	化学结构式
灰黄霉素	Griseofulvin	$C_{17}H_{17}ClO_6$	126-07-8	
酮康唑	Ketoconazole	$C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$	65277-42-1	
克霉唑	Clotrimazole	$C_{22}H_{17}ClN_2$	23593-75-1	
硝酸益康唑	Econazole Nitrate	$C_{18}H_{16}Cl_3N_3O_4 \cdot$	68797-31-9	
硝酸咪康唑	Miconazole Nitrate	$C_{18}H_{15}Cl_4N_3O_4$	22832-87-7	
氟康唑	Fluconazole	$C_{13}H_{12}F_2N_6O$	86386-73-4	
联苯苄唑	Bifonazole	$C_{22}H_{18}N_2$	60628-96-8	
氟胞嘧啶	Flucytosine	$C_4H_4FN_3O$	2022-85-7	
盐酸萘替芬	Naftifine hydrochloride	$C_{21}H_{22}ClN$	65473-14-5	

附 录 B
(规范性附录)
超高效液相色谱梯度洗脱程序

超高效液相色谱梯度洗脱程序见表B. 1。

表B. 1 超高效液相色谱梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	95	5
1	95	5
3	55	45
4	40	60
9	10	90
9.5	0	100
10	95	5
13	95	5

附 录 C
(规范性附录)
质谱参考条件

质谱参考条件见C.1。

表C.1 质谱参考条件

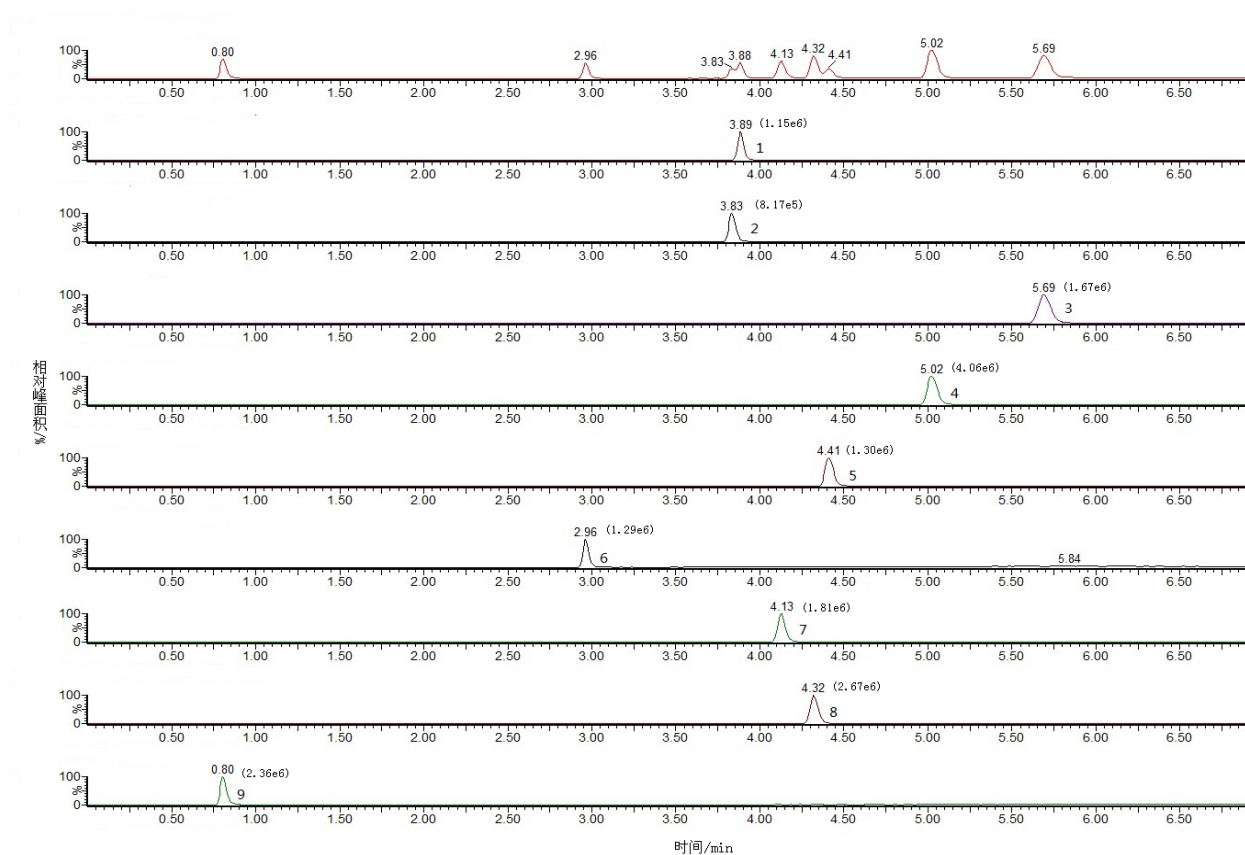
序号	物质名称	母离子（m/z）	锥孔电压/V	子离子（m/z）	碰撞能量/eV
1	灰黄霉素	353.0	35	165.0*	25
			35	215.0	20
2	酮康唑	531.0	59	489.0*	29
			59	255.0	36
3	克霉唑	277.0	45	165.0*	25
			45	241.0	25
4	硝酸益康唑	381.0	31	125.0*	31
			31	193.0	18
5	硝酸咪康唑	417.0	48	159.0*	35
			48	161.0	32
6	氟康唑	307.0	42	238.0*	15
			42	220.0	16
7	联苯苄唑	311.0	23	243.0*	14
			23	165.0	18
8	氟胞嘧啶	130.0	21	113.0*	17
			21	85.0	20
9	盐酸萘替芬	288.0	26	117.0*	15
			26	141.0	20
*为定量离子					

附 录 D
(资料性附录)
参考图谱

参考图谱见图D. 1。

说明：

- 1——灰黄霉素（3.89min）；
- 2——酮康唑（3.83min）；
- 3——硝酸咪康唑（5.69min）；
- 4——硝酸益康唑（5.02min）；
- 5——联苯苄唑（4.41min）；
- 6——氟康唑（2.96min）；
- 7——盐酸萘替芬（4.13min）；
- 8——克霉唑（4.32min）；
- 9——氟胞嘧啶（0.80min）。



图C. 1 参考图谱

附 录 E
(规范性附录)
回收率与精密度

E.1 膏霜剂型各添加浓度的回收率与精密度见表E.1。

表 E.1 膏霜剂型各添加浓度的回收率与精密度

抗真菌药	添加浓度/(mg/kg)	回收率范围/%	精密度 (n=8) /%
灰黄霉素	4	87.5~103.0	3.08
	1	88.0~104.3	5.34
	0.5	80.0~100.6	3.80
酮康唑	40	76.0~87.1	3.25
	10	74.4~102.4	4.38
	5	88.4~99.2	5.45
克霉唑	2	84.0~96.0	3.76
	0.5	83.0~99.0	4.12
	0.25	85.0~105.0	5.33
硝酸益康唑	2	88.0~98.0	3.66
	0.5	92.0~95.4	4.32
	0.25	80.0~104.0	3.22
硝酸咪康唑	2	92.0~105.0	3.53
	0.5	92.0~104.0	4.55
	0.25	80.0~96.0	5.26
氟康唑	4	78.6~95.0	4.40
	1	78.0~98.2	5.55
	0.5	80.0~102.3	6.15
联苯苄唑	4	89.5~99.1	4.66
	1	85.0~103.5	3.22
	0.5	86.5~101.9	3.16
氟胞嘧啶	20	84.3~103.2	2.52
	5	89.5~98.8	3.05
	2.5	84.8~106.4	4.15
盐酸萘替芬	2	82.0~97.0	3.40
	0.5	84.0~102.0	5.05
	0.25	80.0~95.0	5.85

E.2 其他剂型各添加浓度的回收率与精密度见表E.2。

表 E.2 其他剂型各添加浓度的回收率与精密度

抗真菌药	添加浓度/ (mg/kg)	回收率范围/%	精密度 (n=8) /%
灰黄霉素	4	82.5~94.5	4.24
	1	78.0~94.0	3.04
	0.5	80.0~104.0	4.77
酮康唑	40	73.5~90.3	3.99
	10	81.5~90.4	4.75
	5	84.2~95.6	5.05
克霉唑	2	88.0~100.0	3.73
	0.5	72.0~88.0	4.03
	0.25	80.0~96.0	5.55
硝酸益康唑	2	90.0~97.0	3.58
	0.5	90.0~98.5	5.22
	0.25	88.0~95.0	3.06
硝酸咪康唑	2	90.0~97.0	4.89
	0.5	90.0~98.5	4.18
	0.25	88.0~95.0	3.76
氟康唑	4	89.5~102.5	3.02
	1	78.5~97.5	5.25
	0.5	86.0~100.8	5.15
联苯苄唑	4	88.0~106.0	5.94
	1	82.0~96.0	4.85
	0.5	76.0~92.0	5.45
氟胞嘧啶	20	85.0~104.7	3.89
	5	81.6~98.0	4.77
	2.5	76.0~96.0	4.55
盐酸萘替芬	2	87.0~95.0	5.64
	0.5	80.0~96.0	3.08
	0.25	72.0~96.0	5.09

附 录 F
(规范性附录)
方法检出限和定量限

方法检出限和定量限见表F. 1。

表 F. 1 方法检出限和定量限

抗真菌药	检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)
灰黄霉素	0.06	0.2
酮康唑	0.6	2.0
克霉唑	0.03	0.1
硝酸益康唑	0.03	0.1
硝酸咪康唑	0.03	0.1
氟康唑	0.06	0.2
联苯苄唑	0.06	0.2
氟胞嘧啶	0.3	1.0
盐酸萘替芬	0.03	0.1