

ICS 67.050
X 04



中华人民共和国国家标准

GB/T 22989—2008

牛奶和奶粉中头孢匹林、头孢氨苄、 头孢洛宁、头孢喹肟残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of cefapirin, cephalixin, cefalonium, cefquinome
residues in milk and milk powder—
LC-MS-MS method

2008-12-31 发布

2009-05-01 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

237

前 言

本标准的附录 A、附录 B 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：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：李学民、母健、曹彦忠、刘晓茂、钱小清、庞国芳。

牛奶和奶粉中头孢匹林、头孢氨苄、 头孢洛宁、头孢唑肟残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛奶和奶粉中头孢匹林、头孢氨苄、头孢洛宁、头孢唑肟残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛奶和奶粉中头孢匹林、头孢氨苄、头孢洛宁、头孢唑肟残留量的测定。

本标准牛奶的方法检出限：头孢匹林、头孢氨苄、头孢洛宁、头孢唑肟为 $4.0 \mu\text{g/kg}$ ；奶粉的方法检出限为：头孢匹林、头孢氨苄、头孢洛宁、头孢唑肟为 $32 \mu\text{g/kg}$ 。

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 5071 1 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度） 第1部分：总则与定义（GB/T 6379.1—2004, ISO 5725-1:1994, IDT）

GB/T 6379 2 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度） 第2部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法（GB/T 6379.2—2004, ISO 5725-2:1994, IDT）

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 原理

试样中四种头孢菌素类药物经乙腈-磷酸盐缓冲液提取，固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为分析纯。

- 4.1 水：GB/T 6682，一级。
- 4.2 甲醇：色谱纯。
- 4.3 乙腈：色谱纯。
- 4.4 磷酸二氢钠（ NaH_2PO_4 ）。
- 4.5 氢氧化钠：优级纯。
- 4.6 乙酸。
- 4.7 正己烷。
- 4.8 乙腈-水溶液（3+1）：量取 60 mL 乙腈（4.3）和 20 mL 水充分混合。
- 4.9 乙腈饱和的正己烷：取 100 mL 正己烷（4.7）和 50 mL 乙腈于 250 mL 分液漏斗中，振摇 1 min，静置分层后，弃掉乙腈。
- 4.10 5 mol/L 氢氧化钠溶液：称取 20 g 氢氧化钠（4.5），用水溶解，定容至 100 mL。
- 4.11 0.10 mol/L 磷酸二氢钠缓冲溶液：称取 12.0 g 磷酸二氢钠（4.4），用水溶解，定容至 1 000 mL。

然后用氢氧化钠溶液(4.10)调节至 pH=8.5。

4.12 标准物质:头孢匹林(CAS:24356-60-3)、头孢氨苄(CAS:16549-56-7)、头孢洛宁(CAS:5575-21-3)、头孢唑肟(CAS:118443-89-3),纯度大于等于 99%。

4.13 1.0 mg/mL 四种头孢菌素标准储备溶液:准确称取适量的每种标准物质(4.12),分别用水配制成浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备溶液。储备液贮存在-18℃冰柜中。

4.14 四种头孢菌素标准混合工作溶液:根据需要吸取适量的每种头孢菌素标准储备溶液(4.13),用水制成适当浓度的混合标准工作溶液。

4.15 Oasis HLB 固相萃取柱¹⁾或相当者:500 mg,6 mL。使用前依次用 5 mL 甲醇(4.2)、5 mL 水和 10 mL 磷酸二氢钠缓冲溶液(4.11)预处理,保持柱体湿润。

4.16 滤膜:0.2 μm。

5 仪器

5.1 液相色谱-串联四极杆质谱仪,配有电喷雾离子源。

5.2 分析天平:感量 0.1 mg、0.01 g。

5.3 固相萃取真空装置。

5.4 贮液器:50 mL。

5.5 微量注射器:25 μL,100 μL。

5.6 均质器。

5.7 高速冷冻离心机:带有 50 mL 具塞离心管,转速达到 10 000 r/min 以上。

5.8 刻度样品管:5 mL,精度为 0.1 mL。

5.9 旋转浓缩仪。

5.10 氮气浓缩仪。

6 试样制备与保存

6.1 试样的制备

从全部样品中取出有代表性样品约 1 kg,充分混匀,均分成两份,分别装入洁净容器内。密封后作为试样,标明标记。在抽样和制样的操作过程中,应防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

6.2 试样的保存

将试样于-18℃保存。

7 测定步骤

7.1 试样溶液的提取

7.1.1 牛奶

称取 5 g 试样(精确到 0.01 g)置于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 乙腈(4.3),使用均质器(5.6)均质 1 min,提取液使用高速冷冻离心机(5.7)在 10℃ 10 000 r/min 离心 10 min,把上层提取液移至另一离心管中。用 15 mL 乙腈-水溶液(4.8)重复提取一次,合并两次的提取液,并加入 10 mL 乙腈饱和的正己烷(4.9),振荡 1 min,弃掉正己烷。把提取液移至 100 mL 鸡心瓶中,在 40℃ 用旋转浓缩仪(5.9)旋转蒸发除去乙腈。

7.1.2 奶粉

称取 0.5 g 试样(精确到 0.01 g)置于 50 mL 离心管中,加入 4.0 mL 水,使奶粉充分溶解,加入

1) Oasis HLB 固相萃取柱是 Waters 公司产品的商品名称,给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不是表示对该产品的认可。如果其他产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

20 mL 乙腈(4.3),使用均质器(5.6)均质 1 min,提取液使用高速冷冻离心机(5.7)在 10 ℃ 10 000 r/min 离心 10 min,把上层提取液移至另一离心管中。用 15 mL 乙腈-水溶液(4.8)重复提取一次,合并两次的提取液,并加入 10 mL 乙腈饱和的正己烷(4.9),振荡 1 min,弃掉正己烷。把提取液移至 100 mL 鸡心瓶中,在 40 ℃ 用旋转浓缩仪(5.9)旋转蒸发除去乙腈。

7.2 试样溶液的净化

向已除去乙腈的样品溶液中加入 20 mL 磷酸二氢钠缓冲溶液,然后用氢氧化钠溶液(4.10)调节至 pH=8.5。把样品提取液移至下接 Oasis HLB 固相萃取柱(4.15)的贮液器中,以 3 mL/min 的流速通过固相萃取柱,先用 5 mL 磷酸二氢钠缓冲溶液洗涤鸡心瓶并过柱,再用 2 mL 水洗柱,弃去全部流出液。用 2 mL 乙腈洗脱,收集洗脱液于刻度样品管(5.8)中,在 40 ℃ 氮气浓缩仪(5.10)吹干,用 2 mL 水溶解残渣,摇匀后,过 0.2 μm 滤膜(4.16),供液相色谱-串联质谱仪测定。

7.3 空白样品添加标准混合工作溶液的制备

7.3.1 牛奶

分别准确移取适量四种头孢菌素标准混合工作溶液(4.14),添加到 5.0 g 样品中,按照 7.1、7.2 步骤操作,制得头孢匹林、头孢氨苄、头孢洛宁、头孢唑肟浓度分别为 4.0 μg/kg、8.0 μg/kg、16 μg/kg、40 μg/kg 四个样品添加标准混合工作溶液,供液相色谱-串联质谱仪测定。

7.3.2 奶粉

分别准确移取适量四种头孢菌素标准混合工作溶液(4.14),添加到 0.5 g 样品中,按照 7.1、7.2 步骤操作,制得头孢匹林、头孢氨苄、头孢洛宁、头孢唑肟浓度分别为 32 μg/kg、64 μg/kg、128 μg/kg、320 μg/kg 四个样品添加标准混合工作溶液,供液相色谱-串联质谱仪测定。

7.4 测定条件

7.4.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- 色谱柱:ZORBAX SB-C₁₈, 3.5 μm, 150 mm×2.1 mm(内径) 或相当者;
- 流动相组成、流速及梯度程序见表 1;
- 柱温:30 ℃;
- 进样量:20 μL。

表 1 流动相梯度程序及流速

时间/min	流速/(μL/min)	水(含 0.1%乙酸)/%	乙腈/%
0.00	200	95.0	5.0
2.00	200	95.0	5.0
2.01	200	40.0	60.0
8.00	200	40.0	60.0
8.01	200	95.0	5.0
15.00	200	95.0	5.0

7.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- 离子源:电喷雾离子源;
- 扫描方式:正离子扫描;
- 检测方式:多反应监测;
- 电喷雾电压:5 500 V;
- 雾化气压力:0.055 MPa;

- f) 气帘气压力:0.079 MPa;
- g) 辅助气流速:6 L/min;
- h) 离子源温度:400 ℃;
- i) 定性离子对、定量离子对和去簇电压(DP)、碰撞气能量(CE)见表 2。

表 2 四种头孢菌素的定性离子对、定量离子对、去簇电压、碰撞气能量

中文名称	英文名称	定性离子对(<i>m/z</i>)	定量离子对(<i>m/z</i>)	碰撞气能量/V	去簇电压/V
头孢匹林	cefapirin	424/292	424/292	23	45
		424/152		34	
头孢氨苄	cephalexin	348/158	348/158	14	40
		348/174		22	
头孢洛宁	cefalonium	459/152	459/152	29	35
		459/123		18	
头孢喹肟	cefquinome	529/134	529/134	21	49
		529/396		19	

7.4.3 液相色谱-串联质谱测定

7.4.3.1 定性测定

选择每种待测物质的一个母离子,二个以上子离子,在相同实验条件下,样品中待测物质的保留时间,与基质标准溶液中对对应物质的保留时间偏差在±2.5%之内;样品谱图中各定性离子相对丰度与浓度接近的基质标准溶液的谱图中离子相对丰度相比,偏差不超过表 3 规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差 %

相对离子丰度(<i>K</i>)	<i>K</i> >50	20< <i>K</i> <50	10< <i>K</i> <20	<i>K</i> ≤10
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

7.4.3.2 定量测定

用 7.3 制备的基质标准混合工作溶液分别进样,以标准工作溶液浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线。用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中四种头孢菌素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,四种头孢菌素标准物质的多反应监测(MRM)色谱图参见附录 A 中的图 A.1。

本方法的添加回收率数据参见附录 B 中的表 B.1。

7.5 平行试验

按上述步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.6 空白试验

除不称取试样外,均按上述分析步骤进行。

8 结果计算

试样中四种头孢菌素残留量利用数据处理系统计算或按式(1)计算:

$$X = c \times \frac{V}{m} \times \frac{1\,000}{1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X——试样中被测组分残留量,单位为微克每千克(μg/kg);

c——从标准工作曲线得到的试样溶液中被测组分的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V——试样溶液定容体积,单位为毫升(mL);
m——最终试样溶液所代表的试样质量,单位为克(g)。
计算结果应扣除空白值。

9 精密度

9.1 一般规定

本标准的精密度数据是按照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 规定确定的,其重复性和再现性的值是以 95%的可信度来计算。

9.2 重复性

在重复性试验条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 r ,试样中四种头孢菌素添加浓度范围及重复性方程见表 4。

表 4 四种头孢菌素添加浓度范围及重复性限和再现性限方程 单位为微克每千克

化合物名称	添加浓度范围	重复性限 r	再现性限 R
头孢匹林	4.0~200	$\lg r = 1.058\ 9\ \lg m - 1.174\ 8$	$\lg R = 1.021\ 8\ \lg m - 0.694\ 5$
头孢氨苄	4.0~200	$\lg r = 1.061\ 4\ \lg m - 1.177\ 4$	$\lg R = 1.027\ 0\ \lg m - 0.702\ 0$
头孢洛宁	4.0~200	$\lg r = 1.060\ 9\ \lg m - 1.177\ 1$	$\lg R = 1.023\ 7\ \lg m - 0.697\ 1$
头孢唑肟	4.0~200	$\lg r = 1.065\ 3\ \lg m - 1.188\ 7$	$\lg R = 1.024\ 1\ \lg m - 0.698\ 5$

注: m 为两次测定结果的算术平均值。

如果两次测定值的差值超过重复性限 r ,应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.3 再现性

在再现性试验条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R ,试样中四种头孢菌素添加浓度范围及重复性方程见表 4。

附录 A
(资料性附录)

标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

四种头孢菌素标准物质的多反应监测(MRM)色谱图,见图 A.1。

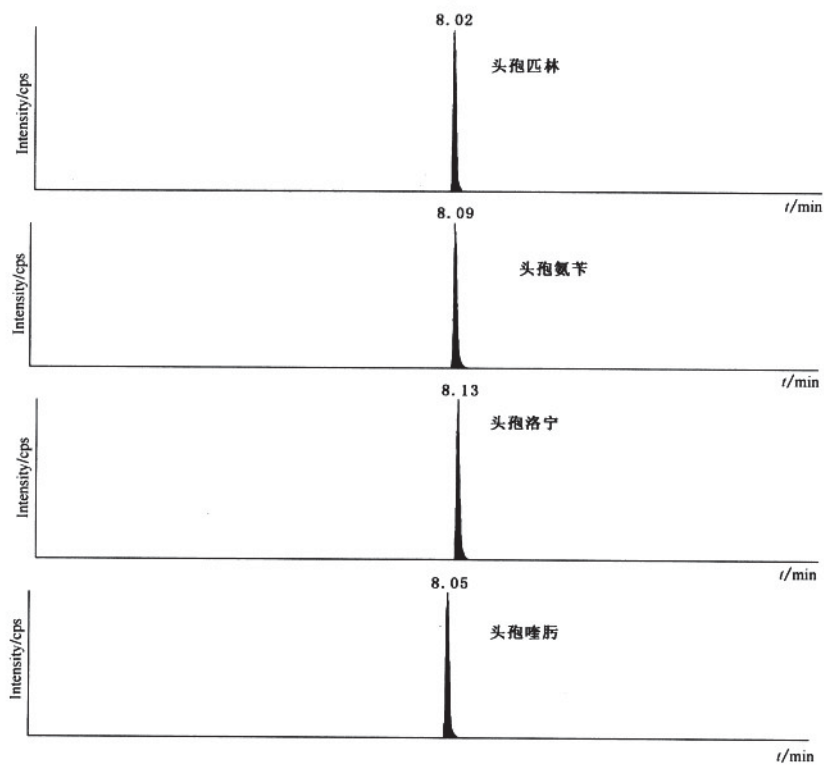


图 A.1 四种头孢菌素标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

四种头孢菌素添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 四种头孢菌素添加浓度及其平均回收率的试验数据

化合物名称	牛 奶		奶 粉	
	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/%	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/%
头孢匹林	4.0	85.2	32	84.6
	8.0	97.5	64	90.8
	16.0	85.1	128	98.6
	40.0	90.4	320	86.7
头孢氨苄	4.0	86.4	32	80.2
	8.0	89.7	64	85.6
	16.0	91.2	128	102.3
	40.0	101.5	320	95.3
头孢洛宁	4.0	92.3	32	85.7
	8.0	107.6	64	101.2
	16.0	89.3	128	87.1
	40.0	91.7	320	97.4
头孢唑肟	4.0	97.4	32	92.6
	8.0	86.4	64	89.5
	16.0	101.7	128	82.4
	40.0	97.4	320	87.6