



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 21314—2007

## 动物源性食品中头孢匹林、头孢噻吩 残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of cephalosporin and ceftiofur residues  
in foodstuffs of animal origin—  
LC-MS/MS method

2007-10-29 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

本标准附录 A、附录 B、附录 C 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：中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：李一尘、林维宣、唐英章、田苗、彭涛、于灵、隋凯、杨春光、王宏伟。

本标准为首次发布。

# 动物源性食品中头孢匹林、头孢噻吩 残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法

## 1 范围

本标准规定了动物源性食品中头孢匹林、头孢噻吩残留量液相色谱-质谱/质谱测定和确证方法。

本标准适用于动物肌肉、肝脏、肾脏、鸡蛋和牛奶中头孢匹林(cephapirin)、头孢噻吩(ceftiofur)残留量的检测。

## 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—1992 分析实验室用水规格和试验方法(neq ISO 3696:1987)

## 3 原理

样品中头孢匹林、头孢噻吩残留物用乙腈-水溶液提取,提取液经浓缩后,用缓冲溶液溶解,固相萃取小柱净化,洗脱液经氮气吹干后,用液相色谱-质谱/质谱测定,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,水为 GB/T 6682—1992 规定的一级水。

- 4.1 乙腈:高效液相色谱级。
- 4.2 甲醇:高效液相色谱级。
- 4.3 甲酸:高效液相色谱级。
- 4.4 氯化钠。
- 4.5 氢氧化钠。
- 4.6 磷酸二氢钾。
- 4.7 磷酸氢二钾。
- 4.8 0.1 mol/L 氢氧化钠:称取 4 g 氢氧化钠,并用水稀释至 1 000 mL。
- 4.9 乙腈+水(15+2,体积比)。
- 4.10 乙腈+水(30+70,体积比)。
- 4.11 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH=8.5):称取 8.7 g 磷酸氢二钾,超纯水溶解,稀释至 1 000 mL,用磷酸二氢钾调节 pH 值至  $8.5 \pm 0.1$ 。
- 4.12 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH=7.0):称取 3.4 g 磷酸二氢钾,超纯水溶解,稀释至 1 000 mL,用氢氧化钠调节 pH 值至  $7.0 \pm 0.1$ 。
- 4.13 0.01 mol/L 乙酸铵溶液(pH=4.5):称取 0.77 g 乙酸铵,超纯水溶解,稀释至 1 000 mL,用甲酸调节 pH 值至  $4.5 \pm 0.1$ 。
- 4.14 头孢匹林、头孢噻吩标准品:纯度均大于等于 95%。
- 4.15 头孢匹林、头孢噻吩标准储备溶液:分别称取适量标准品(4.14),分别用乙腈水溶液(4.10)溶解

定容至 100 mL,溶液浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,置于 $-18^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存,保存期 5 d。

4.16 头孢匹林、头孢噻吩混合标准中间液:分别吸取适量标准储备液(4.15)于 100 mL 容量瓶中,用磷酸盐缓冲溶液(4.12)定容至刻度,配成混合标准中间液。混合标准中间液中头孢匹林、头孢噻吩的浓度分别为 100  $\text{ng}/\text{mL}$ 、5 000  $\text{ng}/\text{mL}$ 。置于 $-4^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存,保存期 5 d。

4.17 混合标准工作液:精密量取混合标准中间溶液(4.16)适量,用空白样品基质配制成不同浓度系列的混合标准工作溶液(用时现配)。

4.18 固相萃取  $\text{C}_{18}$ 柱:500 mg,6 mL。使用前用甲醇和水预处理,即先用 2 mL 甲醇淋洗小柱,然后用 1 mL 水淋洗小柱。

## 5 仪器

5.1 液相色谱-质谱/质谱仪,配有电喷雾离子源。

5.2 旋转蒸发器。

5.3 固相萃取装置。

5.4 离心机。

5.5 均质器。

5.6 旋涡混合器。

5.7 pH 计。

5.8 氮吹仪。

## 6 试样制备与保存

取代表性样品,用组织捣碎机充分捣碎,装入洁净容器中,密封,并标明标记,于 $-18^{\circ}\text{C}$ 以下冷冻存放。

## 7 检测步骤

### 7.1 提取

#### 7.1.1 肝脏、肾脏、肌肉组织、鸡蛋样品

称取约 5 g 试样(精确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 15 mL 乙腈水溶液(4.9),均质 30 s,4 000 r/min 离心 5 min,上清液转移至 50 mL 离心管中;另取一离心管,加入 10 mL 乙腈水溶液(4.9),洗涤均质器刀头,用玻棒捣碎离心管中的沉淀,加入上述洗涤均质器刀头溶液,在旋涡混合器上振荡 1 min,4 000 r/min 离心 5 min,上清液合并至 50 mL 离心管中,重复用 10 mL 乙腈水溶液(4.9)洗涤刀头并提取一次,上清液合并至 50 mL 离心管中,用乙腈水溶液(4.9)定容至 40 mL。准确移取 20 mL 入 100 mL 鸡心瓶。

#### 7.1.2 牛奶样品

称取 10 g 样品(精确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 乙腈(4.9),均质提取 30 s,4 000 r/min 离心 5 min,上清液转移至 50 mL 离心管中;另取一离心管,加入 10 mL 乙腈水溶液(4.9),洗涤均质器刀头,用玻棒捣碎离心管中的沉淀,加入上述洗涤均质器刀头溶液,在旋涡混合器上振荡 1 min,4 000 r/min 离心 5 min,上清液合并至 50 mL 离心管中,重复用 10 mL 乙腈水溶液(4.9)洗涤刀头并提取一次,上清液合并至 50 mL 离心管中,用乙腈水溶液(4.9)定容至 50 mL。准确移取 25 mL 入 100 mL 鸡心瓶。

将鸡心瓶于旋转蒸发器上( $37^{\circ}\text{C}$ 水浴)蒸发除去乙腈(易起沫样品可加入 4 mL 饱和氯化钠溶液)。

### 7.2 净化

立即向已除去乙腈的鸡心瓶中加入 25 mL 磷酸盐缓冲溶液(4.11),涡旋混匀 1 min,用 0.1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 值为 8.5,以 1 mL/min 的速度通过经过预处理的固相萃取柱,先用 2 mL 磷酸盐缓冲

溶液(4.11)淋洗2次,再用1 mL超纯水淋洗。用3 mL乙腈洗脱(速度控制在1 mL/min)。将洗脱液于45℃下氮气吹干,用0.025 mol/L磷酸盐缓冲溶液(4.12)定容至1 mL,过0.45 μm滤膜后,立即用液相色谱-质谱/质谱仪测定。

### 7.3 测定

#### 7.3.1 液相色谱条件

7.3.1.1 色谱柱: COSMOSIL C<sub>18</sub>柱, 250 mm×4.6 mm(内径), 粒度5 μm。

7.3.1.2 流动相: A组分是0.01 mol/L乙酸铵溶液(甲酸调pH至4.5); B组分是乙腈。梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

步骤	时间/min	流速/(mL/min)	组分 A/%	组分 B/%
1	0.00	1.0	98.0	2.0
2	3.00	1.0	98.0	2.0
3	5.00	1.0	90.0	10.0
4	15.00	1.0	70.0	30.0
5	20.00	1.0	98.0	2.0

7.3.1.3 流速: 1.0 mL/min。

7.3.1.4 进样量: 100 μL。

#### 7.3.2 质谱条件

7.3.2.1 离子源: 电喷雾离子源。

7.3.2.2 扫描方式: 正离子扫描。

7.3.2.3 检测方式: 多反应监测。

7.3.2.4 雾化气、气帘气、辅助气、碰撞气均为高纯氮气; 使用前应调节各参数使质谱灵敏度达到检测要求, 参考条件见附录A。

#### 7.3.3 液相色谱-质谱/质谱测定

根据试样中被测物的含量情况, 选取响应值相近的标准工作液一起进行色谱分析。标准工作液和待测液中头孢匹林、头孢噻唑的响应值均应在仪器线性响应范围内。对标准工作液和样液等体积进行测定。在上述色谱条件下头孢匹林和头孢噻唑的参考保留时间分别约为12.2 min、13.0 min。标准溶液的选择性离子流图见图B.1。

#### 7.3.4 定性测定

按照上述条件测定样品和建立标准工作曲线, 如果样品中化合物质量色谱峰的保留时间与标准溶液相比在±2.5%的允许偏差之内; 待测化合物的定性离子对的重构离子色谱峰的信噪比大于或等于3 ( $S/N \geq 3$ ), 定量离子对的重构离子色谱峰的信噪比大于或等于10 ( $S/N \geq 10$ ); 定性离子对的相对丰度与浓度相当的标准溶液相比, 相对丰度偏差不超过表2的规定, 则可判断样品中存在相应的目标化合物。

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

#### 7.3.5 定量测定

按外标法使用标准工作曲线进行定量测定。

#### 7.3.6 空白试验

除不加试样外, 均按上述操作步骤进行。

## 8 结果计算与表述

用色谱数据处理机或按式(1)计算试样中头孢匹林、头孢噻吩的残留量,计算结果需扣除空白值:

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

式中:

$X$ ——试样中头孢匹林、头孢噻吩残留量,单位为微克每千克( $\mu\text{g}/\text{kg}$ );

$c$ ——从标准曲线上得到的头孢匹林、头孢噻吩溶液浓度,单位为纳克每毫升( $\text{ng}/\text{mL}$ );

$V$ ——样液最终定容体积,单位为毫升( $\text{mL}$ );

$m$ ——最终样液代表的试样质量,单位为克( $\text{g}$ )。

## 9 测定低限与回收率

### 9.1 测定低限(LOQ)

头孢匹林为  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ , 头孢噻吩为  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

### 9.2 回收率

见表 C.1。

附 录 A  
(资料性附录)

质谱/质谱测定参考质谱条件<sup>1)</sup>

质谱/质谱测定参考质谱条件:

- a) 电喷雾电压(IS):5 500 V;
- b) 雾化气压力(GS1):0.414 MPa(60 Psi);
- c) 气帘气压力(CUR):0.207 MPa(30 Psi);
- d) 辅助气压力(GS2):0.621 MPa(90 Psi);
- e) 离子源温度(TEM):700 °C;
- f) 头孢匹林、头孢噻唑的定性离子对、定量离子对、去簇电压(DP)、碰撞气能量(CE)及碰撞室出口电压(CXP)见表 A.1。

表 A.1 头孢匹林、头孢噻唑的定性离子对、定量离子对、去簇电压、碰撞气能量和碰撞室出口电压

名 称	定性 离子对 (m/z)	定量 离子对 (m/z)	去簇电压 (DP)/ V	碰撞气 能量(CE)/ V	碰撞室出口 电压(CXP)/ V
头孢匹林	424.3/292.1	424.3/292.1	55	33	10
	424.3/152.0			19	10
头孢噻唑	523.9/241.2	523.9/241.2	60	25	15
	523.9/210.1			30	15

1) 所列参数是在 API4000 质谱仪完成的,此处列出的实验用仪器型号仅是为了提供参考,并不涉及商业目的,鼓励标准使用者尝试不同型号的仪器。

附录 B

(资料性附录)

头孢匹林、头孢噻吩标准品的定量离子对重构离子色谱图

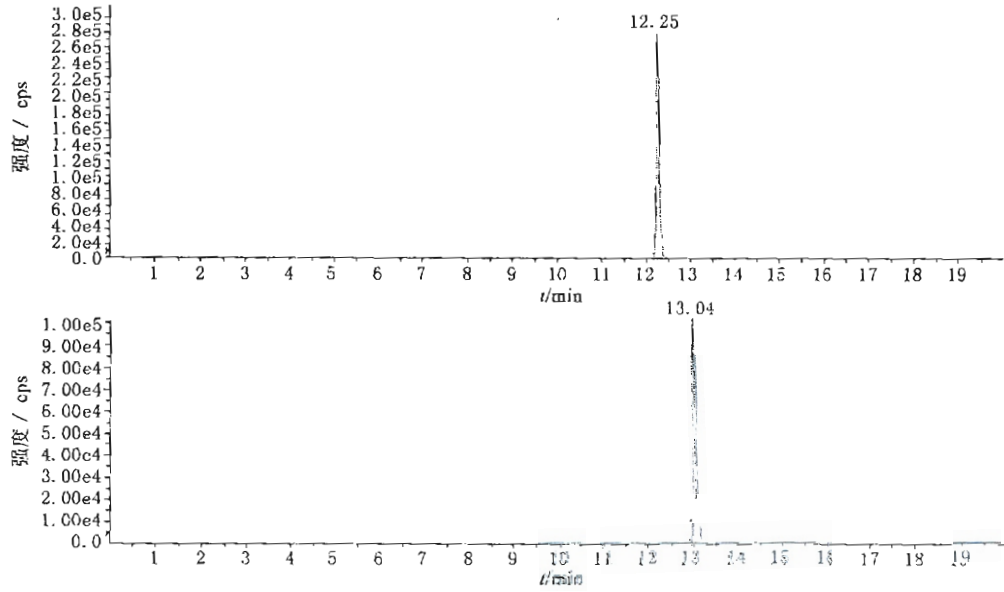


图 B.1 头孢匹林、头孢噻吩标准品的定量离子对重构离子色谱图

附 录 C  
(资料性附录)  
添加回收率

表 C.1 头孢匹林、头孢噻唑添加回收率

待测物质	添加浓度/ μg/kg	回收率/%				
		猪肉	猪肝	猪肾	鸡蛋	牛奶
头孢匹林	1	86.1~92.7	69.2~78.5	69.2~90.6	75.3~91.1	73.3~90.0
	10	62.2~80.6	62.8~71.6	70.5~91.0	72.5~88.1	79.4~93.5
	100	72.5~90.2	66.5~78.7	68.1~86.4	71.6~86.5	77.1~88.6
头孢噻唑	50	78.3~85.2	74.6~82.3	68.7~85.9	75.2~91.3	72.5~90.8
	500	72.4~87.0	66.8~81.7	65.2~93.1	65.7~90.9	76.1~85.7
	2 000	70.9~83.7	73.8~88.2	68.8~80.7	78.0~86.8	73.0~92.2