

ICS 67.050
X 04



中华人民共和国国家标准

GB/T 22942—2008

蜂蜜中头孢唑啉、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 cefazolin, cephalixin, cephalexin, cefalonium,
cefquinome residues in honey—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 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 A、附录 B 为资料性附录。

本标准由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、姜宁、庞国芳。

蜂蜜中头孢唑啉、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

1 范围

本标准规定了蜂蜜中头孢唑啉、头孢匹林、头孢氨苄、头孢洛宁、头孢喹肟残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于蜂蜜中头孢唑啉、头孢匹林、头孢氨苄、头孢洛宁、头孢喹肟残留量的测定。

本标准的方法检出限：头孢唑啉为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，头孢匹林、头孢氨苄、头孢洛宁、头孢喹肟为 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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 6379.1 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

试样中五种头孢菌素类药物残留，用磷酸二氢钠缓冲溶液提取，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。

4.6 乙酸。

4.7 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。

4.8 0.15 mol/L 磷酸二氢钠缓冲溶液：称取 18.0 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（4.7）调节至 pH=8.5。

4.9 标准物质：头孢唑啉（CAS:25953-19-9）、头孢匹林（CAS:24356-60-3）、头孢氨苄（CAS:16549-56-7）、头孢洛宁（CAS:5575-21-3）、头孢喹肟（CAS:118443-89-3），纯度 $\geq 99\%$ 。

4.10 1.0 mg/mL 五种头孢菌素标准储备溶液：准确称取每种标准物质（4.9），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°C 冰柜中。

4.11 五种头孢菌素标准混合作溶液：根据需要吸取适量的每种头孢菌素标准储备溶液(4.10)，用空白样品提取液制成适当浓度的基质混合标准工作溶液。

4.12 固相萃取柱：Oasis HLB 固相萃取柱或相当者，500 mg，6 mL。使用前依次用 5 mL 甲醇(4.2)、5 mL 水(4.1)和 10 mL 磷酸二氢钠缓冲溶液(4.8)预处理，保持柱体湿润。

4.13 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 刻度样品管：5 mL，精度为 0.1 mL。

5.7 氮气浓缩仪。

6 试样制备与保存

6.1 试样的制备

对无结晶的实验室样品，将其搅拌均匀。对有结晶的样品，在密闭情况下，置于不超过 60°C 的水浴中温热，振荡，待样品全部融化后搅匀，冷却至室温。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 试样的保存

将试样于常温下保存。

7 测定步骤

7.1 试样溶液的制备

称取 5 g 试样(精确到 0.01 g)置于 150 mL 三角瓶中，加入 25 mL 磷酸二氢钠缓冲溶液(4.8)，溶解样品，混匀，用氢氧化钠溶液，调节至 $\text{pH}=8.5$ 。把样品提取液移至下接 Oasis HLB 固相萃取柱(4.12)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三角瓶并过柱，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(5.6)中，在 40°C 氮气吹干，用 2 mL 水溶解残渣，摇匀后，过 0.2 μm 滤膜(4.13)，供液相色谱-串联质谱仪测定。按照上述操作步骤制备空白样品提取液。

7.2 测定条件

7.2.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱：ZORBAX SB-C18，3.5 μm ，150 mm $\times$ 2.1 mm(内径)或相当者；
- 流动相梯度程序及流速见表 1；
- 柱温： 30°C ；
- 进样量：20 μL 。

表 1 流动相梯度程序及流速

时间/min	流速/($\mu\text{L}/\text{min}$)	水(含 0.1%乙酸)/%	乙腈/%
0.00	200	95.0	5.0
2.00	200	95.0	5.0

表 1 (续)

时间/min	流速/(μ L/min)	水(含 0.1%乙酸)/%	乙腈/%
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

7.2.2 质谱参考条件

- a) 离子源:电喷雾离子源;
- b) 扫描方式:正离子扫描;
- c) 检测方式:多反应监测;
- d) 电喷雾电压:5 500 V;
- e) 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、定量离子对和碰撞气能量(CE)、去簇电压(DP)见表 2。

表 2 五种头孢菌素的定性离子对、定量离子对、碰撞气能量、去簇电压

化合物中文名称	化合物英文名称	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	碰撞气能量/ V	去簇电压/ V
头孢唑啉	cefazolin	456/324 456/156	456/324	17 24	50
头孢匹林	cephapirin	424/292 424/152	424/292	23 34	45
头孢氨苄	cephalexin	348/158 348/174	348/158	14 22	40
头孢洛宁	cefalonium	459/152 459/123	459/152	29 18	35
头孢喹肟	cefquinome	529/134 529/396	529/134	21 19	49

7.3 液相色谱-串联质谱测定

7.3.1 定性测定

选择每种待测物质的 1 个母离子,2 个以上子离子,在相同试验条件下,样品中待测物质的保留时间与基质标准溶液中对应物质的保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 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 以%表示

相对离子丰度 K	$K > 50$	$20 < K < 50$	$10 < K < 20$	$K \leq 10$
允许的最大偏差	± 20	± 25	± 30	± 50

7.3.2 定量测定

用基质标准混合作溶液(4.11)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,样品溶液中五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,五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。

7.4 平行试验

按上述步骤,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,均按上述分析步骤进行。

8 结果计算

试样中五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($\mu\text{g}/\text{kg}$);

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 ,试样中五种头孢菌素添加浓度范围及重复性方程见表 4。

表 4 五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
头孢唑啉	10~100	$\lg r = 0.946\,5 \lg m - 0.725\,5$	$\lg R = 0.956\,9 \lg m - 0.617\,6$
头孢匹林	2.0~20	$\lg r = 0.946\,6 \lg m - 0.765\,6$	$\lg R = 0.968\,0 \lg m - 0.677\,1$
头孢氨苄	2.0~20	$\lg r = 0.942\,8 \lg m - 0.762\,8$	$\lg R = 0.949\,4 \lg m - 0.645\,2$
头孢洛宁	2.0~20	$r = 0.135\,7 m + 0.132\,6$	$\lg R = 0.906\,6 \lg m - 0.621\,1$
头孢唑肟	2.0~20	$\lg r = 0.942\,1 \lg m - 0.761\,0$	$\lg R = 0.928\,0 \lg m - 0.688\,5$
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 ,试样中五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)

五种头孢菌素标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

五种头孢菌素标准物质的多反应监测(MRM)色谱图见图 A.1。

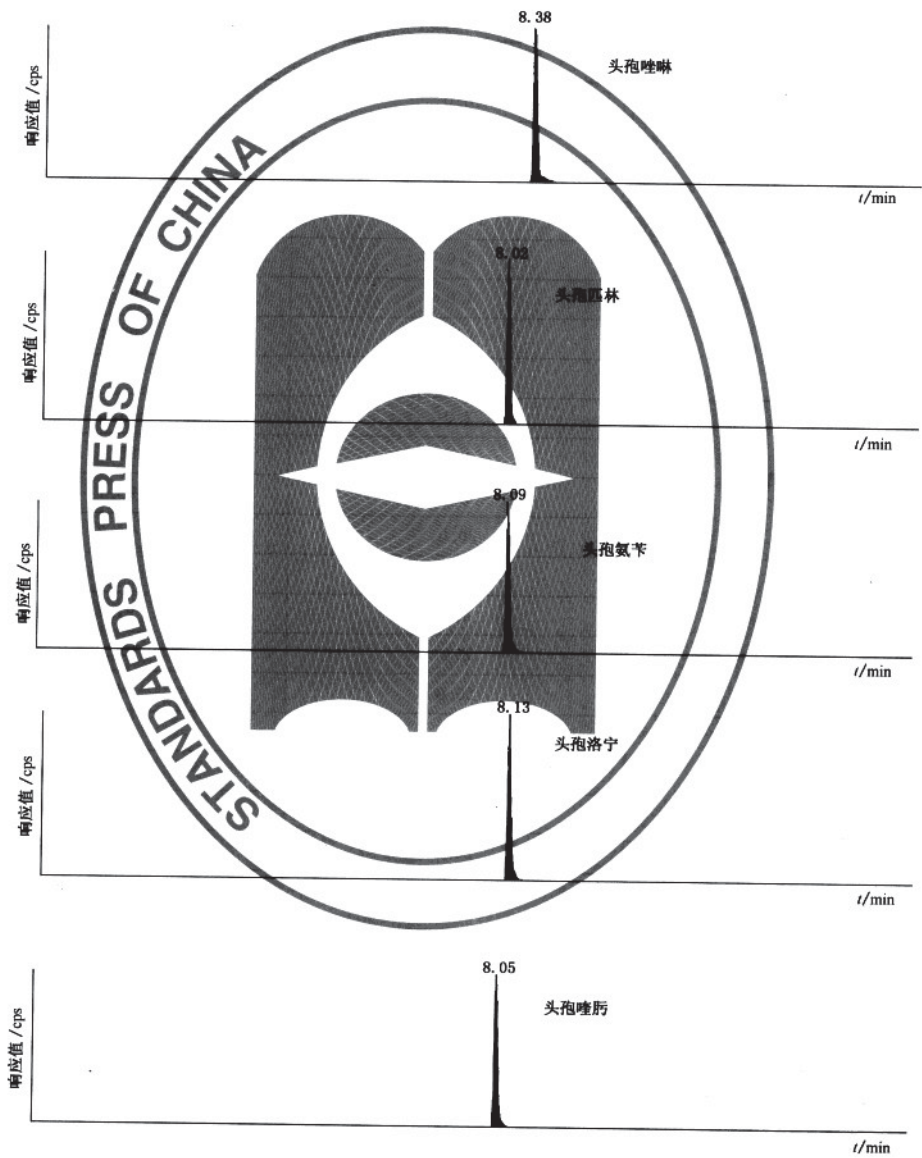


图 A.1 五种头孢菌素标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

五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 五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	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/%
头孢唑啉	10.0	85.6
	20.0	89.1
	40.0	89.6
	100.0	91.7
头孢匹林	2.0	86.7
	4.0	92.4
	8.0	95.4
	20.0	93.8
头孢氨苄	2.0	84.2
	4.0	95.3
	8.0	98.1
	20.0	94.3
头孢洛宁	2.0	87.2
	4.0	91.7
	8.0	102.5
	20.0	94.1
头孢唑肟	2.0	93.7
	4.0	96.5
	8.0	91.5
	20.0	97.9