



中华人民共和国国家标准

GB 31659.3—2022

代替 GB/T 22989—2008

食品安全国家标准 奶和奶粉中头孢类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard—
Determination of cephalosporins residues in milk and milk powder by liquid chromatography-tandem mass spectrometric method

2022-09-20 发布

2023-02-01 实施



中华人民共和国农业农村部
中华人民共和国国家卫生健康委员会发布
国家市场监督管理总局

前　　言

本文件按照 GB/T 1. 1—2020《标准化工作导则 第 1 部分: 标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 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》，与 GB/T 22989—2008 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要变化如下：

- 标准文本格式修改为食品安全国家标准文本格式；
- 标准范围中增加羊奶的检测；
- 标准范围增加药物品种数量；
- 标准灵敏度进一步提高。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- GB/T 22989—2008。

食品安全国家标准

奶和奶粉中头孢类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了牛奶、羊奶和奶粉中头孢氨苄、头孢拉定、头孢唑林、头孢哌酮、头孢乙腈、头孢匹林、头孢洛宁、头孢喹肟、头孢噻肟残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于牛奶、羊奶和奶粉中头孢氨苄、头孢拉定、头孢唑林、头孢哌酮、头孢乙腈、头孢匹林、头孢洛宁、头孢喹肟、头孢噻肟残留量的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的药物残留用磷酸盐缓冲溶液提取,亲水亲脂平衡固相萃取柱净化,液相色谱-串联质谱法测定,基质校准外标法定量。

5 试剂与材料

除另有规定外,所有试剂均为分析纯,水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

- 5.1.1 甲醇(CH_3OH):色谱纯。
- 5.1.2 乙腈(CH_3CN):色谱纯。
- 5.1.3 甲酸(HCOOH):色谱纯。
- 5.1.4 正己烷(C_6H_{14})。
- 5.1.5 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。
- 5.1.6 氢氧化钠(NaOH)。

5.2 溶液配制

- 5.2.1 2.5 mol/L 氢氧化钠溶液:取氢氧化钠 50 g,加水溶解并稀释至 500 mL。
- 5.2.2 30% 乙腈溶液:取乙腈 30 mL,用水稀释至 100 mL。
- 5.2.3 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液($\text{pH}=8.5$):取磷酸二氢钾 6.8 g,用水溶解并稀释至 1 000 mL,用 2.5 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 8.5。
- 5.2.4 0.1% 甲酸溶液:取甲酸 1 mL,用水稀释至 1 000 mL。
- 5.2.5 0.1% 甲酸溶液-甲醇(95 : 5):取 0.1% 甲酸溶液 95 mL、甲醇 5 mL,混匀。

5.3 标准品

头孢氨苄、头孢拉定、头孢唑林、头孢哌酮、头孢乙腈、头孢匹林、去乙酰基头孢匹林,头孢洛宁、头孢喹



肟、头孢噻肟标准品,含量均 $\geqslant 95\%$,具体见附录 A。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液:取标准品各 10 mg,精密称量,分别用 30%乙腈溶液适量使溶解并稀释定容至 25 mL 容量瓶,配制成浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液。于-18 ℃避光保存,有效期 1 个月。

5.4.2 混合标准储备液:分别准确移取各标准储备液 0.25 mL 于 10 mL 容量瓶中,用 30%乙腈溶液稀释至刻度,配制成浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准储备液。于-18 ℃避光保存,有效期 7 d。

5.4.3 混合标准工作液:准确移取混合标准储备液适量,用 0.1%甲酸溶液-甲醇(95:5)稀释成浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、5.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的系列混合标准工作溶液。现用现配。

5.5 材料

5.5.1 固相萃取柱:亲水亲脂平衡型固相萃取柱,500 mg/6 mL,或相当者。

5.5.2 针头式过滤器:尼龙材质,孔径 0.22 μm 或性能相当者。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪:配电喷雾离子源。

6.2 分析天平:感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 氮吹仪。

6.4 固相萃取装置。

6.5 涡旋混合器。

6.6 离心管:聚丙烯塑料离心管,10 mL、50 mL。

6.7 pH 计。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试样品,并均质。

- a) 取均质后的供试样品,作为供试试样;
- b) 取均质后的空白样品,作为空白试样;
- c) 取均质后的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试样。

7.2 试样的保存

-18 ℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

取牛奶、羊奶试料 5 g(准确至 $\pm 0.05\text{ g}$)或奶粉试料 0.5 g(准确至 $\pm 0.01\text{ g}$),于 50 mL 离心管,加磷酸盐缓冲溶液 20 mL,涡旋混匀 30 s,用 2.5 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 8.5,备用。

8.2 净化

取固相萃取柱,依次用甲醇 5 mL、磷酸盐缓冲溶液 10 mL 活化。取备用液,过柱,待液面到达柱床表面时再依次用磷酸盐缓冲溶液 3 mL 和水 2 mL 淋洗,弃去全部流出液。用乙腈 3 mL 洗脱,收集洗脱液于 10 mL 离心管中,加正己烷 3 mL,涡旋混合 1 min,静置 5 min,弃去上层正己烷层,取乙腈层在 40 ℃水浴氮气吹干,加 0.1%甲酸溶液-甲醇(95:5)1.0 mL 溶解,过 0.22 μm 滤膜,供液相色谱-串联质谱测定。

8.3 基质匹配标准曲线的制备

取空白试料依次按 8.1 和 8.2 处理,40 ℃水浴氮气吹干,分别加系列混合标准工作溶液 1.0 mL 溶解残渣,过 0.22 μm 滤膜,制备 2.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、5.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的系列基质匹配标准工作溶液,供液相色谱-串联质谱测定。以定量离子对峰面积为纵坐标、标准溶液浓度为横坐标,

绘制标准曲线。求回归方程和相关系数。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱: C₁₈色谱柱(100 mm×2.0 mm, 1.7 μm)或相当者;
- b) 流动相:A为0.1%甲酸溶液,B为甲醇,梯度洗脱程序见表1;
- c) 流速:0.3 mL/min;
- d) 柱温:35 °C;
- e) 进样量:10 μL。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间 min	A %	B %
0	95	5
1.0	95	5
4.5	50	50
6.0	50	50
6.1	95	5
7.5	95	5

8.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源:电喷雾(ESI)离子源;
- b) 扫描方式:正离子扫描;
- c) 检测方式:多反应监测(MRM);
- d) 毛细管电压:2 000 V;
- e) RF透镜电压:0.5 V;
- f) 离子源温度:150 °C;
- g) 脱溶剂气温度:500 °C;
- h) 锥孔气流速:50 L/h;
- i) 脱溶剂气流速:1 000 L/h;
- j) 二级碰撞气:氩气;
- k) 定性离子对、定量离子对、碰撞能量和锥孔电压见表2。

表2 定性离子对、定量离子对、碰撞能量和锥孔电压

化合物名称	定性离子对(碰撞能量) <i>m/z</i> (eV)	定量离子对(碰撞能量) <i>m/z</i> (eV)	锥孔电压 V
头孢氨苄	348.1/106.0(32) 348.1/158.0(10)	348.1/158.0(10)	26
头孢拉定	350.2/157.9(12) 350.2/176.0(12)	350.2/176.0(12)	24
头孢乙腈	362.0/178.0(14) 362.0/258.0(10)	362.0/258.0(10)	24
头孢唑林	455.0/156.0(16) 455.0/323.0(10)	455.0/323.0(10)	4
头孢哌酮	646.2/143.0(38) 646.2/530.1(10)	646.2/143.0(38)	28
头孢匹林	424.1/151.9(22) 424.1/292.0(12)	424.1/151.9(22)	28
头孢洛宁	459.1/151.9(18) 459.1/337.0(8)	459.1/151.9(18)	12

表 2 (续)

化合物名称	定性离子对(碰撞能量) <i>m/z</i> (eV)	定量离子对(碰撞能量) <i>m/z</i> (eV)	锥孔电压 V
头孢唑肟	529.2/134.0(14) 529.2/396.0(12)	529.2/134.0(14)	34
去乙酰基头孢匹林	382.1/111.8(20) 382.1/151.9(26)	382.1/151.9(26)	32
头孢噻肟	456.0/167.0(18) 456.0/396.0(8)	456.0/167.0(18)	22

8.4.3 测定法

取试料溶液和基质匹配标准溶液,作单点或多点校准,按外标法以色谱峰面积定量。基质匹配标准溶液及试料溶液中目标药物的特征离子质量色谱峰峰面积均应在仪器检测的线性范围之内,如超出线性范围,应将基质匹配标准溶液和试料溶液作相应稀释后重新测定。试料溶液中待测物质的保留时间与基质匹配标准工作液中待测物质的保留时间之比,偏差在±2.5%以内,且试料溶液中的离子相对丰度与基质匹配标准溶液中的离子相对丰度相比,符合表3的要求,则可判定为样品中存在对应的待测物质。标准溶液多反应监测色谱图见附录B。

表 3 定性确证时相对离子丰度的允许偏差

单位为百分号

相对离子丰度	允许偏差
>50	±20
>20~50	±25
>10~20	±30
<10	±50

8.5 空白试验

取空白试料,除不加药物外,采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试样中待测药物的残留量按标准曲线或公式(1)计算。

$$X = \frac{C_s \times A \times V \times 1000}{A_s \times m \times 1000} \quad (1)$$

式中:

X——试样中待测药物残留量的数值,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

C_s ——标准溶液中待测药物浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

A——试样溶液中待测药物的峰面积;

V——定容体积的数值,单位为毫升(mL);

A_s ——标准溶液中待测药物的峰面积;

m——试样质量的数值,单位为克(g)。

注:头孢匹林残留量以头孢匹林和去乙酰基头孢匹林之和计。

10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法中头孢哌酮、头孢乙腈和头孢唑林在奶和奶粉中的检测限分别为 $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限分别为 $4.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $40 \mu\text{g}/\text{kg}$;其余头孢类药物和去乙酰基头孢匹林在奶和奶粉中的检测限分别为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限分别为 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法在 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 200 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $60\% \sim 120\%$ 。

10.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差 $\leq 15\%$, 批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附录 A

(资料性)

头孢类药物和去乙酰基头孢匹林的英文名称、分子式和 CAS 号

头孢类药物和去乙酰基头孢匹林的英文名称、分子式和 CAS 号见表 A.1。

表 A.1 头孢类药物和去乙酰基头孢匹林的英文名称、分子式和 CAS 号

化合物	英文名称	分子式	CAS 号
头孢氨苄	Cefalexin	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄ S	15686-71-2
头孢拉定	Cefradine	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	38821-53-3
头孢乙腈	Cefacetile	C ₁₃ H ₁₃ N ₃ O ₆ S	10206-21-0
头孢唑林	Cefazolin	C ₁₄ H ₁₄ N ₈ O ₄ S ₃	25953-19-9
头孢哌酮	Cefoperazone	C ₂₅ H ₂₇ N ₉ O ₈ S ₂	62893-19-0
头孢匹林	Cefapirin	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₆ S ₂	21593-23-7
头孢洛宁	Cefalonium	C ₂₀ H ₁₈ N ₄ O ₅ S ₂	5575-21-3
头孢喹肟	Cefquinome	C ₂₃ H ₂₄ N ₆ O ₅ S ₂	84957-30-2
去乙酰基头孢匹林	Desacetyl Cefapirin	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O ₅ S ₂	38115-21-8
头孢噻肟	Cefotaxime	C ₁₆ H ₁₇ N ₅ O ₇ S ₂	63527-52-6

附录 B
(资料性)
头孢类药物和去乙酰基头孢匹林标准溶液 MRM 色谱图

头孢类药物和去乙酰基头孢匹林标准溶液 MRM 色谱图见图 B. 1。

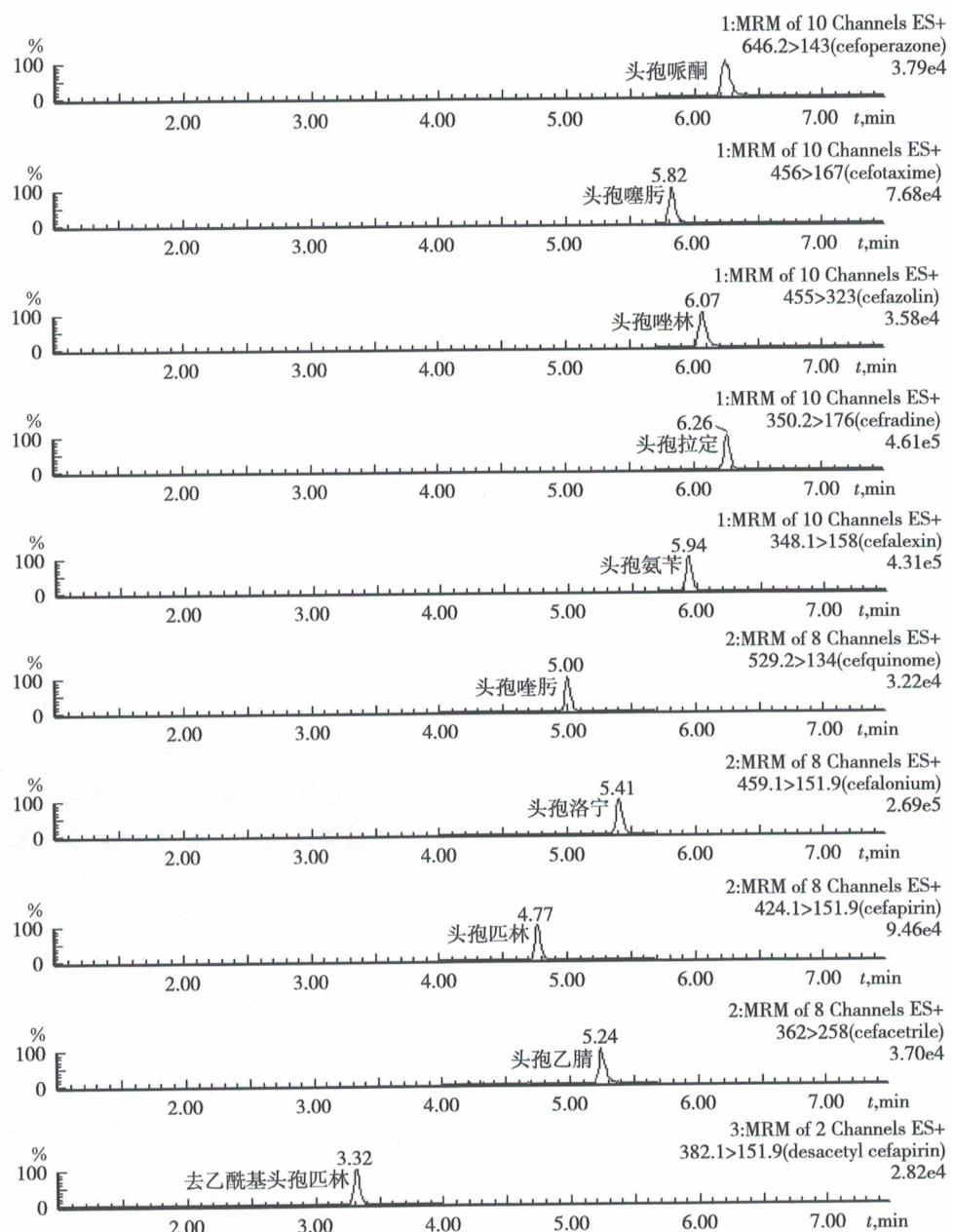


图 B. 1 头孢类药物和去乙酰基头孢匹林标准溶液 MRM 色谱图(2.5 μg/L)

中华人民共和国
国家标准
食品安全国家标准 奶和奶粉中头孢类药物
残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

GB 31659.3—2022

* * *

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)
(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

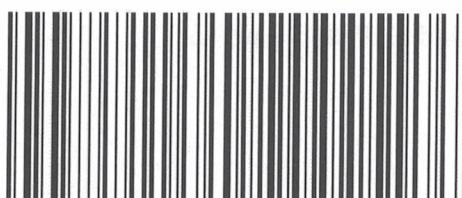
北京印刷一厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15 千字
2022 年 12 月第 1 版 2022 年 12 月北京第 1 次印刷
书号: 16109 • 9135
定价: 24.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



GB 31659.3—2022