

中华人民共和国国家标准

农业农村部公告第 316 号—5—2020

饲料中17种头孢菌素类药物的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of 17cephalosporins in feeds—
Liquid chromatography–tandem mass spectrometry

2020-07-17 发布

2020-11-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

前言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由农业农村部畜牧兽医局提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位:农业农村部农产品质量安全监督检验测试中心(宁波)、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所。

本标准主要起草人:吴银良、宋荣、朱勇、付岩、索德成、赵健、赵根龙、陈国、许秀琴、王全胜、张亮、张艳。

饲料中 17 种头孢菌素类药物的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了饲料中头孢曲松、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、头孢噻肟、头孢噻肟、头孢噻吩、头孢羟氨苄、头孢呋辛、头孢他定、头孢克洛和头孢丙烯的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中 17 种头孢菌素类药物的测定。

本标准头孢唑林、头孢哌酮、头孢乙腈、头孢噻肟、头孢噻吩、头孢呋辛和头孢他定检出限为 $100\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 $250\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ；头孢曲松、头孢氨苄、头孢拉定、头孢匹林、头孢洛宁、头孢噻肟、头孢噻吩、头孢羟氨苄、头孢克洛和头孢丙烯的检出限为 $40\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 $100\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

试样经乙腈溶液提取，甲酸溶液稀释后，用液相色谱-串联质谱仪检测，基质匹配标准溶液校准，外标法定量。

4 试剂或材料

除另有规定外，仅使用分析纯试剂。

4.1 水：GB/T 6682，一级。

4.2 甲酸：色谱纯。

4.3 乙腈：色谱纯。

4.4 甲醇：色谱纯。

4.5 氨水：色谱纯， $\geq 25\%$ 。

4.6 乙酸铵：色谱纯。

4.7 30%乙腈溶液：取 300 mL 乙腈（4.3）与 700 mL 水混匀。

4.8 40%乙腈溶液：取 400 mL 乙腈（4.3）与 600 mL 水混匀。

4.9 0.1%甲酸溶液：取甲酸 1 mL，用水稀释至 1 000 mL，混匀。

4.10 0.05 mol/L 乙酸铵溶液：称取 3.85 g 乙酸铵（4.6），加适量水溶解，再加入 20 mL 氨水（4.5）和 2 mL 甲酸（4.2），混匀后用水定容至 1 000 mL。

4.11 标准品：头孢曲松（Ceftriaxone, $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_8\text{O}_7\text{S}_3$ ，CAS 号：73384-59-5）、头孢氨苄（Cefalexin, $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ ，CAS 号：15686-71-2）、头孢拉定（Cefradine, $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ ，CAS 号：38821-53-3）、头孢唑林（Cefazolin, $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_8\text{O}_4\text{S}_3$ ，CAS 号：27164-46-1）、头孢乙腈（Cefacetrile, $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ ，CAS 号：10206-21-0）、头孢匹林（Cefapirin, $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_2$ ，CAS 号：21593-23-7）、头孢洛宁（Cefalonium, $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}_2$ ，CAS 号：5575-21-3）、头孢噻呋（Ceftiofur, $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_3$ ，CAS 号：80370-57-6）、头孢噻吩（Cefalothin, $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$ ，CAS 号：153-61-7）、头孢呋辛（Cefuroxime, $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}$ ，CAS 号：55268-75-2）、头孢他定

(Ceftazidime, $C_{22}H_{22}N_6O_7S_2$, CAS 号: 72558-82-8)、头孢丙烯(Cefprozil, $C_{18}H_{19}N_3O_5S$, CAS 号: 92665-29-7), 纯度均不低于 95%。头孢哌酮(Cefoperazone, $C_{25}H_{27}N_9O_8S_2$, CAS 号: 62893-19-0)、头孢喹肟(Cefquinome, $C_{23}H_{24}N_6O_5S_2$, CAS 号: 84957-30-2)、头孢噻肟(Cefotaxime, $C_{16}H_{17}N_5O_7S_2$, CAS 号: 63527-52-6)、头孢羟氨苄(Cefadroxil, $C_{16}H_{17}N_3O_5S$, CAS 号: 50370-12-2)、头孢克洛(Cefaclor, $C_{15}H_{14}ClN_3O_4S$, CAS 号: 53994-73-3), 纯度均不低于 92%。

注: 标准品可含结晶水或为相应的盐。

4.12 标准储备溶液(500 $\mu\text{g/mL}$): 称取适量标准品(精确至 0.01 mg)(4.11), 分别置于 20 mL 容量瓶中, 用 30% 乙腈溶液(4.7)溶解并定容。于 -18°C 以下保存, 有效期为 1 个月。如所用标准品为相应的盐或含结晶水, 应折算成有效成分。

4.13 混合标准中间溶液(25 $\mu\text{g/mL}$): 分别准确移取标准储备溶液(4.12)各 1.0 mL, 于 20 mL 容量瓶中, 用 30% 乙腈溶液(4.7)定容。于 -18°C 以下保存, 有效期为 7 d。

4.14 混合标准系列工作溶液: 准确移取适量混合标准中间溶液(4.13), 用 0.1% 甲酸溶液(4.9)稀释定容配成混合标准系列工作溶液, 浓度分别为 0.625 $\mu\text{g/L}$ 、3.125 $\mu\text{g/L}$ 、6.25 $\mu\text{g/L}$ 、25 $\mu\text{g/L}$ 、125 $\mu\text{g/L}$ 、250 $\mu\text{g/L}$ 和 625 $\mu\text{g/L}$ 。临用现配。

4.15 微孔滤膜: 0.22 μm , 水系。

5 仪器设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪: 带电喷雾离子源。

5.2 离心机: 转速不低于 9 500 r/min。

5.3 分析天平: 感量 0.01 mg 和 0.01 g。

5.4 振荡器。

5.5 涡旋混合器。

5.6 塑料离心管: 50 mL。

6 样品

按 GB/T 20195 制备样品, 至少 200 g, 粉碎使其全部通过 0.42 mm 孔径的分析筛, 充分混匀, 装入磨口瓶中, 保存, 备用。选取类型相同、均匀一致且在待测物保留时间处仪器响应值小于方法定量限 30% 的饲料样品, 作为空白样品。

7 试验步骤

7.1 试样溶液的制备

平行做 2 份试验。称取试样 5 g, 精确至 0.01 g, 置于 50 mL 离心管中, 准确加入 40% 乙腈溶液(4.8) 25 mL, 振荡提取 30 min, 于 9 500 r/min 离心 5 min, 取出上清液, 残渣用 40% 乙腈溶液(4.8) 25 mL 重复提取一次, 合并上清液。准确吸取 0.2 mL 上清液, 与 0.8 mL 0.1% 甲酸溶液(4.9), 混合均匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜(4.15)过滤备用。

7.2 基质匹配标准系列溶液的制备

取空白试样, 按 7.1 处理得到空白基质溶液。准确吸取 0.2 mL 上清液, 与 0.8 mL 混合标准系列工作溶液(4.14), 混合均匀, 配制成浓度为 0.5 $\mu\text{g/L}$ 、2.5 $\mu\text{g/L}$ 、5.0 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$ 和 500 $\mu\text{g/L}$ 的基质匹配标准系列溶液, 用 0.22 μm 微孔滤膜(4.15)过滤备用。临用现配。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} 柱, 柱长 100 mm, 内径 2.1 mm, 粒度 1.7 μm ; 或性能相当者。

柱温: 35°C 。

进样量: 10 μL 。

头孢曲松分析梯度洗脱程序见表 1,其他头孢菌素类药物分析梯度洗脱程序见表 2。

表 1 头孢曲松分析梯度洗脱程序

时间,min	流速,mL/min	0.05 mol/L 乙酸铵溶液,%	甲醇,%
0	0.3	95	5
1.0	0.3	95	5
2.5	0.3	30	70
3.5	0.3	30	70
3.6	0.3	95	5
5.0	0.3	95	5

表 2 其他头孢菌素类药物分析梯度洗脱程序

时间,min	流速,mL/min	0.1%甲酸溶液,%	甲醇,%
0	0.3	95	5
1.0	0.3	95	5
4.5	0.3	50	50
7.5	0.3	30	70
7.6	0.3	95	5
9.0	0.3	95	5

7.3.2 质谱参考条件

电离方式:电喷雾电离,正离子模式(ESI⁺)。

检测方式:多反应监测(MRM)。

毛细管电压:2.5 kV。

离子源温度:150℃。

脱溶剂温度:500℃。

脱溶剂气:氮气 1 000 L/h。

多反应监测(MRM)离子对、锥孔电压及碰撞能量见表 3。

表 3 17 种头孢菌素类药物的多反应监测(MRM)离子对、锥孔电压及碰撞能量的参考值

被测物名称	监测离子对, m/z	锥孔电压,V	碰撞能量,eV
头孢曲松	554.9/166.7	10	26
	554.9/395.9 ^a	10	12
头孢氨苄	347.9/105.7	16	20
	347.9/157.7 ^a	16	6
头孢拉定	350.0/157.7	16	8
	350.0/175.8 ^a	16	10
头孢乙睛	361.9/177.7	8	12
	361.9/257.8 ^a	8	10
头孢唑林	455.0/156.0	4	16
	455.0/323.0 ^a	4	10
头孢哌酮	646.0/530.0	8	10
	646.0/142.8 ^a	8	34
头孢匹林	423.9/151.7	10	20
	423.9/291.8 ^a	10	14
头孢洛宁	459.0/122.7	4	10
	459.0/151.7 ^a	4	16
头孢喹肟	529.0/124.7	6	62
	529.0/133.7 ^a	6	14
头孢噻肟	456.0/166.7	6	18
	456.0/124.9 ^a	6	44

表 3（续）

被测物名称	监测离子对, m/z	锥孔电压, V	碰撞能量, eV
头孢噻吩	523. 9/125. 5	4	38
	523. 9/240. 8 ^a	4	16
头孢噻吩	418. 9/314. 8	6	12
	418. 9/358. 8 ^a	6	10
头孢羟苄苄	363. 9/207. 8	6	8
	363. 9/113. 6 ^a	6	18
头孢呋辛	447. 0/341. 9	16	12
	447. 0/385. 9 ^a	16	10
头孢他定	547. 0/166. 7	4	26
	547. 0/467. 9 ^a	4	10
头孢克洛	367. 9/173. 8	6	14
	367. 9/105. 7 ^a	6	18
头孢丙烯	390. 0/207. 8	6	8
	390. 0/113. 6 ^a	6	18

^a 为定量离子对。

7.3.3 基质匹配标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取基质匹配标准系列溶液(7.2)和试样溶液(7.1)上机测定。头孢曲松基质匹配标准溶液的定量离子色谱图参见附录 A 中的 A.1,其余 16 种头孢菌素类药物基质匹配标准溶液的定量离子色谱图参见 A.2。

7.3.4 定性

在相同试验条件下,试样溶液与基质匹配标准系列溶液中待测物的保留时间相对偏差在±2.5%之内。根据表 3 选择的定性离子对,比较试样谱图中待测物定性离子的相对离子丰度与浓度接近的基质匹配标准系列溶液中对应的定性离子的相对离子丰度,若偏差不超过表 4 规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 4 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

单位为百分号

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

7.3.5 定量

以 17 种头孢菌素类药物的浓度为横坐标、以色谱峰面积(响应值)为纵坐标,绘制标准曲线,标准曲线的相关系数应不低于 0.99。试样溶液与标准溶液中待测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内(头孢唑林、头孢哌酮、头孢乙腈、头孢唑肟、头孢噻吩、头孢呋辛和头孢他定的线性范围为 2.5 μg/L~500 μg/L,其余头孢菌素类药物的线性范围为 0.5 μg/L~500 μg/L)。如超出线性范围,应重新试验或将试样溶液和基质匹配标准系列溶液作相应稀释后重新测定。单点校准定量时,试样溶液中待测物的浓度与标准溶液浓度相差不超过 30%。

8 试验数据处理

试样中头孢菌素类药物的含量(以有效成分计)以质量分数 w_i 表示,数值以微克每千克(μg/kg)表示。多点校准按式(1)计算,单点校准按式(2)计算。

$$w_i = \frac{\rho_i \times V \times V_2 \times 1000}{V_1 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- ρ_i ——由标准曲线得到的试样溶液中待测物的质量浓度,单位为微克每升(μg/L);
- V ——提取溶液的体积,单位为毫升(mL);

- V_1 ——吸取上清液体积,单位为毫升(mL);
- V_2 ——定容体积,单位为毫升(mL);
- m ——试样质量,单位为克(g);
- 1 000 ——换算系数。

$$w_i = \frac{A_i \times \rho_s \times V \times V_2 \times 1000}{A_s \times V_1 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- A_i ——试样溶液中待测物的色谱峰面积;
- A_s ——基质匹配标准溶液中待测物的峰面积;
- ρ_s ——基质匹配标准溶液中待测物的质量浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
- V ——试样提取溶液的体积,单位为毫升(mL);
- V_1 ——吸取上清液体积,单位为毫升(mL);
- V_2 ——定容体积,单位为毫升(mL);
- m ——试样质量,单位为克(g);
- 1 000 ——换算系数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

9 精密度

在重复性条件下,2 次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 15%。

附 录 A
(资料性附录)
头孢菌素类药物标准溶液定量离子色谱图

A.1 头孢曲松基质匹配标准溶液(2.5 µg/L)定量离子色谱图

见图 A.1。

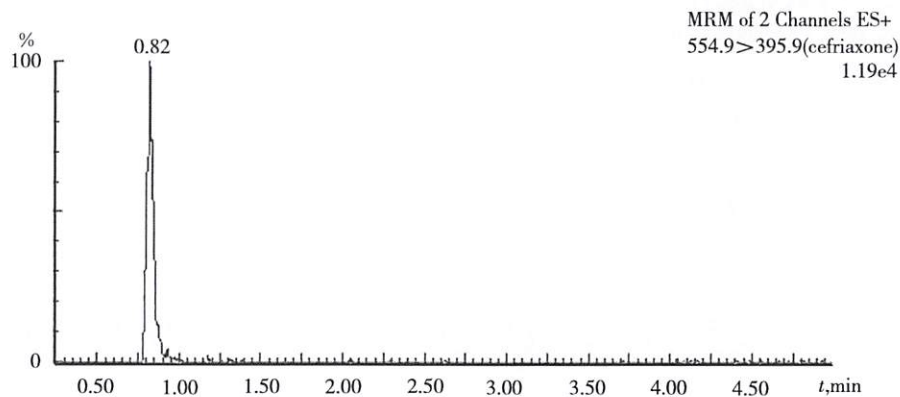


图 A.1 头孢曲松基质匹配标准溶液(2.5 µg/L)定量离子色谱图

A.2 16 种头孢菌素类药物基质匹配标准溶液(2.5 µg/L)定量离子色谱图

见图 A.2。

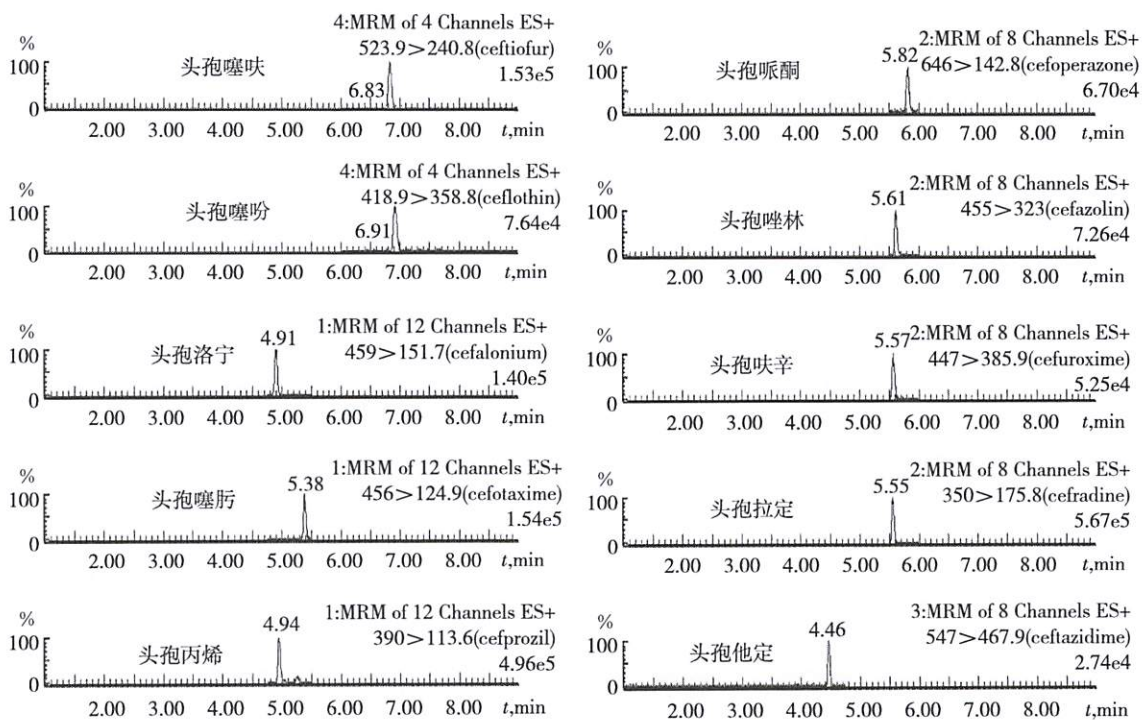


图 A.2 16 种头孢菌素类药物基质匹配标准溶液(2.5 µg/L)定量离子色谱图

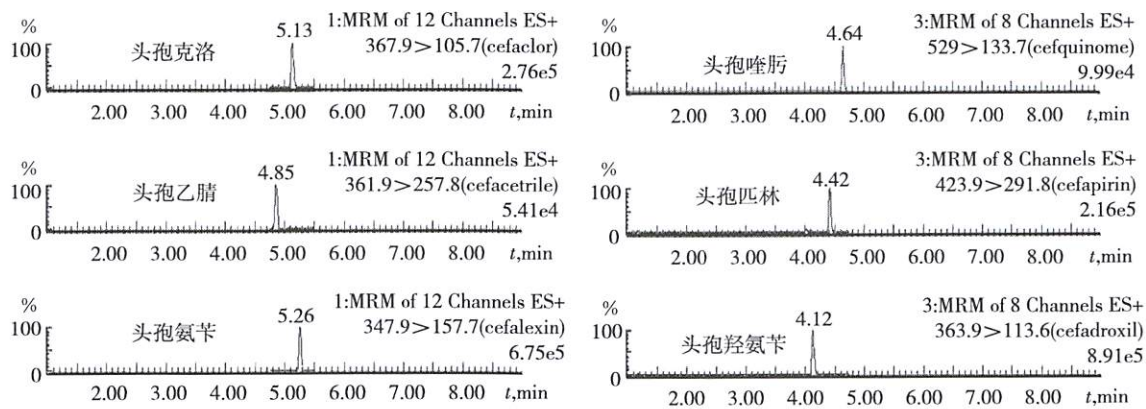


图 A.2 (续)

中华人民共和国
国家标准
饲料中 17 种头孢菌素类药物的测定
液相色谱-串联质谱法
农业农村部公告第 316 号—5—2020

* * *

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

2020 年 10 月第 1 版 2020 年 10 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·8154

定价: 18.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



农业农村部公告第 316 号—5—2020