



中华人民共和国国家标准

GB xxxx—xxxx

食品安全国家标准 禽蛋中头孢噻吩残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard-

Determination of ceftiofur residues in poultry eggs by liquid
chromatography-tandem mass spectrometry

(征求意见稿)

xxxx-xx-xx 发布

xxxx-xx-xx 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
国家市场监督管理总局

发布

前 言

本标准系首次发布。

征求意见稿

食品安全国家标准

禽蛋中头孢噻呋残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了禽蛋中头孢噻呋代谢物去吠喃甲酰基头孢噻呋残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于鸡蛋、鸭蛋、鹌鹑蛋中去吠喃甲酰基头孢噻呋残留量的检测。

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，仅所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

3 原理

试样中残留的头孢噻呋及代谢物，加入 0.4% 二硫赤藓醇溶液混匀，用 14% 碘乙酰胺溶液衍生化，生成稳定的乙酰胺衍生物，水饱和正己烷除脂，固相萃取柱净化浓缩，液相色谱-串联质谱测定，内标法定量。

4 试剂和材料

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。

4.1 试剂

4.1.1 乙腈 (CH_3CN)：色谱纯。

4.1.2 甲酸 (HCOOH)：色谱纯。

4.1.3 甲醇 (CH_3OH)：色谱纯。

4.1.4 二硫赤藓醇 ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$)。

4.1.5 碘乙酰胺 ($\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$)。

4.1.6 硼酸 (H_3BO_3)。

4.1.7 氯化钾 (KCl)。

4.1.8 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)。

4.1.9 正己烷 (C_6H_{14})。

4.1.10 氢氧化钾 (KOH)。

4.2 溶液配制

4.2.1 50%乙腈水溶液：取乙腈 50 mL，用水稀释至 100 mL。

4.2.2 90%乙腈水溶液：取乙腈 90 mL，用水稀释至 100 mL。

4.2.3 0.1%甲酸乙腈溶液：取甲酸 1 mL，用乙腈稀释至 1000 mL。

4.2.4 0.1%甲酸水溶液：取甲酸 1 mL，用水稀释至 1000 mL。

4.2.5 45%氢氧化钾：称取 45 g 氢氧化钾，加水溶解并稀释至 100 mL。

4.2.6 0.05 mol/L 硼酸缓冲液：称取 19 g 硼酸和 3.7 g 氯化钾，加水溶解并稀释至 1000 mL，用 45%氢氧化钾调 pH 至 9 ± 0.05 。

4.2.7 0.025 mol/L 磷酸缓冲液：称取 3.4 g 磷酸二氢钾，加水溶解并稀释至 1000 mL，用 45%氢氧化钾调 pH 至 7 ± 0.05 。

4.2.8 0.4%二硫赤藓醇溶液：称取 1 g 二硫赤藓醇溶于 250 mL 0.05 mol/L 硼酸缓冲液中，临用现配。

4.2.9 14%碘乙酰胺溶液：称取 7 g 碘乙酰胺溶于 50 mL 0.025 mol/L 的磷酸缓冲液中，临用现配。

4.2.10 水饱和正己烷：取水 100 mL，加正己烷 100 mL，摇匀，静置分层，取上层液。

4.3 标准品

去吠喃甲酰基头孢噻呋 (Desfuoyl ceftiofur, $C_{14}H_{15}N_5O_5S_3$, CAS: 120882-22-6)，去吠喃甲酰基头孢噻呋-D₃ (Desfuoyl ceftiofur-D₃, $C_{14}H_{12}D_3N_5O_5S_3$, CAS: 120882-22-6-unlabelled)，含量均 $\geq 95\%$ 。

4.4 标准溶液制备

4.4.1 标准储备液：取去吠喃甲酰基头孢噻呋、去吠喃甲酰基头孢噻呋-D₃ 各 10 mg 的标准品，精密称定，分别于 100 mL 容量瓶中，用 50%乙腈水溶解并定容，配制成浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的去吠喃甲酰基头孢噻呋、去吠喃甲酰基头孢噻呋-D₃ 标准储备液，2~8℃保存，有效期 1 个月。

4.4.2 标准工作液：精密量取 100 $\mu\text{g/mL}$ 的去吠喃甲酰基头孢噻呋、去吠喃甲酰基头孢噻呋-D₃ 标准储备液各 0.1 mL，于 100 mL 容量瓶中，用 50%乙腈水溶解并定容，配制成浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 的去吠喃甲酰基头孢噻呋、去吠喃甲酰基头孢噻呋-D₃ 标准工作液，临用现配。

4.5 材料

4.5.1 固相萃取柱：反相混合型亲水亲脂平衡共聚物固相萃取柱，200 mg/6 mL，或相当者。

4.5.2 微孔滤膜：0.22 μm 。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾电离源。

5.2 分析天平：感量分别为 0.00001 g 和 0.01 g。

- 5.3 涡旋混合器。
- 5.4 振荡器。
- 5.5 冷冻离心机：转速 10 000 r/min。
- 5.6 氮吹仪。
- 5.7 固相萃取装置。

6 试料的制备与保存

6.1 试料的制备

取适量新鲜或冷藏的空白或供试禽蛋，去壳后混合均匀。

——取均质的供试样品，作为供试试料。

——取均质的空白样品，作为空白试料。

——取均质的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试料。

6.2 试料的保存

-18℃ 以下保存。

7 测定步骤

7.1 提取

取试料 2 g（准确至 ±0.02 g），置于 50 mL 塑料离心管，添加去吠喃甲酰基头孢噻吩-D₃ 标准工作液 100 μL，加 0.4% 二硫赤藓醇溶液 10 mL，涡旋混匀 2 min，室温静置 15 min。加入 14% 碘乙酰胺溶液 3 mL，涡旋混匀 2 min，室温衍生 15 min。衍生完毕后，加水饱和正己烷 10 mL，充分混匀，4℃ 10000 r/min 离心 20 min，取下层清液加入水饱和正己烷 10 mL 重复萃取一次，下层清液备用。

7.2 净化

用 6 mL 甲醇、6 mL 水活化固相萃取柱，将全部下层清液过柱，用 6 mL 水淋洗，抽干，用 5 mL 90% 乙腈水溶液洗脱，收集全部洗脱液。50℃ 水浴氮吹至近干，用 0.1% 甲酸水溶液 1.0 mL 溶解残余物，涡旋混匀，过 0.22 μm 微孔滤膜，供液相色谱-串联质谱测定。

7.3 标准曲线的制备

精密量取去吠喃甲酰基头孢噻吩和去吠喃甲酰基头孢噻吩-D₃ 标准储备液适量，分别置于 50 mL 塑料离心管中，加 0.4% 二硫赤藓醇溶液 10 mL，涡旋混匀 2 min，室温静置 15 min。加入 14% 碘乙酰胺溶液 3 mL，涡旋混匀 2 min，室温衍生 15 min。衍生完毕后加 0.1% 甲酸水溶液定容至 20 mL 混匀。用 0.1% 甲酸水溶液稀释配制去吠喃甲酰基头孢噻吩浓度为 2 μg/L、4 μg/L、10 μg/L、20 μg/L、50 μg/L、100 μg/L，内标浓度为 10 μg/L 的系列标准工作溶液，临用现配，供液相色谱-串联质谱测定。以测试药物和其对应的内标的特征离子质量色谱峰面积比为纵坐标，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。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱: C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 粒径 1.8 μm), 或相当者;
- b) 柱温: 30℃;
- c) 进样量: 10 μL;
- d) 流速: 0.3 mL/min;
- e) 流动相: A: 0.1%甲酸乙腈溶液; B: 0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 min	A: 0.1%甲酸乙腈溶液 %	B: 0.1%甲酸水溶液 %
0.0	5	95
5	80	20
8	80	20
8.1	5	95
10	5	95

7.4.2 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;
- d) 喷雾电压: 5500 V;
- e) 离子源温度: 550 °C;
- f) 雾化气: 55 psi;
- g) 辅助加热气: 60 psi;
- h) 气帘气: 35.0 psi;
- i) 定性离子对、定量离子对及去簇电压和碰撞能量见表 2。

表 2 去吠喃甲酰基头孢噻吩和内标物的质谱参数

被测物名称	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	去簇电压 V	碰撞能量 eV
去吠喃甲酰基头孢噻吩	487.0>241.0	487.0>241.0	50	27
	487.0>125.9			74
去吠喃甲酰基头孢噻吩-D ₃	490.0>244.0	490.0>244.0	50	27

7.4.3 测定法

a) 定性测定

在相同实验条件下，样品中待测物质的保留时间与标准溶液中对应的保留时间偏差在±2.5%之内；且样品中被测组分定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液中对应的定性离子的相对丰度进行比较，偏差不超过表3的范围，则可判定为样品中存在对应的待测物。

去吠喃甲酰基头孢噻唑药物标准工作液和内标工作液的特征离子质量色谱图见附录A。

表3 定性确证时相对离子丰度的允许偏差

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

b) 定量测定

按7.4.1和7.4.2设定仪器条件，取试样溶液和标准溶液，作单点或多点校准，按内标法以峰面积比计算，试样溶液及标准溶液中的去吠喃甲酰基头孢噻唑的峰面积与去吠喃甲酰基头孢噻唑-D₃的峰面积比应在仪器检测的线性范围之内。去吠喃甲酰基头孢噻唑多反应监测的特征离子质量色谱图见附录A。

7.5 空白试验

除不加试料外，采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

8 结果计算和表述

试料中待测物的残留量按式(1)计算：

$$X = \frac{A_i \times A'_{is} \times C_s \times C_{is} \times V}{A_{is} \times A_s \times C'_{is} \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X — 试料中去吠喃甲酰基头孢噻唑药物的残留量，单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)；

C_{is} — 试样溶液中去吠喃甲酰基头孢噻唑内标的浓度，单位为微克每升 ($\mu\text{g}/\text{L}$)；

C_s — 标准溶液中去吠喃甲酰基头孢噻唑药物的浓度，单位为微克每升 ($\mu\text{g}/\text{L}$)；

C'_{is} — 标准溶液中去吠喃甲酰基头孢噻唑药物内标的浓度，单位为微克每升 ($\mu\text{g}/\text{L}$)；

A_i — 试样溶液中去吠喃甲酰基头孢噻唑药物的峰面积；

A_{is} — 试样溶液中去吠喃甲酰基头孢噻唑药物内标的峰面积；

A_s — 标准溶液中去吠喃甲酰基头孢噻唑药物的峰面积；

A'_{is} —标准溶液中去吠喃甲酰基头孢噻吩药物内标的峰面积；

V —溶解残余物所用试样溶液体积，单位为毫升（mL）；

m —供试试料质量，单位为克（g）；

计算结果需扣除空白值，测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

9 方法灵敏度、准确度和精密度

9.1 灵敏度

去吠喃甲酰基头孢噻吩的检出限为1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 准确度

去吠喃甲酰基头孢噻吩在2~20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为70%~120%。

9.3 精密度

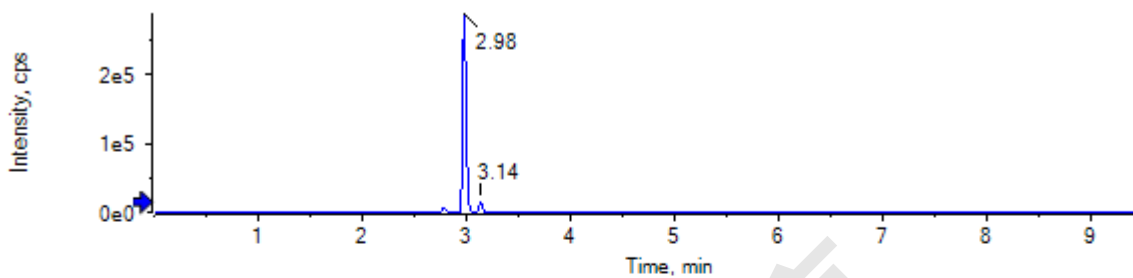
本方法批内相对标准偏差 $\leq 20\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

征求意见稿

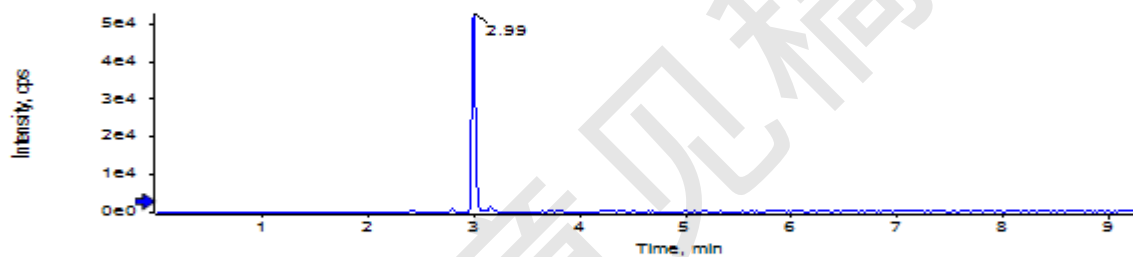
附录A
(资料性附录)

去吠喃甲酰基头孢噻呋药物特征离子质量色谱图

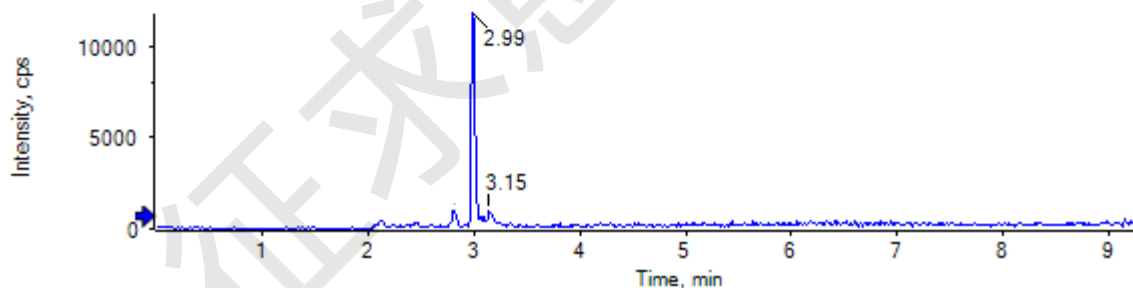
XIC from 2021 dfc.wiff (sample 25) - S4,+MRM (3 transitions): DFC IS (490.0/ 244.0)



XIC from 2021 dfc.wiff (sample 25) - S4,+MRM (3 transitions): DFC 1 (487.0 / 241.0)



XIC from 2021 dfc.wiff (sample 25) - S4,+MRM (3 transitions): DFC 2 (487.0 / 125.9)

图A 标准溶液中去吠喃甲酰基头孢噻呋药物及内标特征离子质量色谱图 (4 $\mu\text{g/L}$)

