



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXX—XXXX

废水中头孢菌素类抗生素的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of Cephalosporins in wastewater by
Liquid chromatography-tandem mass spectrometric method

（征求意见稿）

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

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。

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专利的责任。

本文件由中国石油和化学工业联合会提出。

本文件由全国废弃化学品处置标准化技术委员会（SAC/TC 294）归口。

本文件起草单位：大连产品质量检验检测研究院有限公司等

本文件主要起草人：

废水中头孢菌素类抗生素的测定

液相色谱-串联质谱法

警告：使用本文件的人员应有正规实验室工作实践经验。本文件并未指出所有可能的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施，并保证符合国家有关法规规定的条件。

1 范围

本文件规定了废水中头孢匹罗、头孢唑肟、头孢洛宁、头孢乙腈、头孢氨苄、头孢噻肟、头孢拉定、头孢呋辛、头孢克肟、头孢唑林、头孢哌酮、头孢噻吩、头孢噻吩，13种头孢菌素类抗生素的测定方法液相色谱-串联质谱法。

本文件适用于生活污水、养殖废水和医疗废水中13种头孢类抗生素的测定。当取样量为500 mL，定容体积为1 mL，进样体积为2 μ L时，13种头孢菌素类抗生素的方法检出限为0.03 ng/L~1.0 ng/L，测定下限为1.0 ng/L~3.0 ng/L。参见附录A。

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—2008 分析实验室用水规格和试验方法

HJ 493 水质采样 样品的保存和管理技术规定

HJ 494 水质 采样技术指导

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

样品过滤后，经固相萃取柱富集和净化，用液相色谱-串联质谱测定，基质校准外标法定量。

5 一般规定

本文件所用试剂和水，在没有注明其他要求时，均指分析纯试剂和GB/T 6682—2008表1中的一级水。

6 试剂与材料

6.1 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

6.2 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

6.3 盐酸：分析纯。

6.4 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

6.5 0.1%甲酸溶液：准确移取 0.5 mL 甲酸于预先加入适量水的 500 mL 容量瓶中，用水稀释定容至标线，混匀。

6.6 盐酸溶液：取适量盐酸用水调节至 pH≈3。

6.7 30%乙腈溶液：取 300 mL 乙腈与 700 mL 水混匀。

6.8 头孢菌素类标准物质：头孢匹罗、头孢唑肟、头孢洛宁、头孢乙腈、头孢氨苄、头孢噻肟、头孢拉定、头孢呋辛、头孢克肟、头孢唑林、头孢哌酮、头孢噻吩、头孢噻吩，纯度均≥92.0%（详见附录 A）；也可使用市售有证标准物质。

6.9 标准储备溶液（500 μg/mL）：称取适量标准品（精确至 0.01 mg）（6.8），分别置于 10 mL 容量瓶中，用 30%乙腈溶液溶解并定容。于-18℃以下保存，有效期为 3 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。

6.10 混合标准中间溶液（10 μg/mL）：分别准确移取标准储备溶液各 10 mL，于 10 mL 容量瓶中，用 30%乙腈溶液定容。于-18℃以下保存，有效期为 1 个月。

6.11 混合标准系列工作溶液：准确移取适量混合标准中间溶液，用空白基质稀释定容配成混合标准系列工作溶液，浓度分别为 5.0 μg/L、10.0 μg/L、20.0 μg/L、50.0 μg/L、100.0 μg/L，现用现配。

6.12 固相萃取柱：填料为二乙烯苯和 N-乙烯基吡咯烷酮共聚物（HLB）或同等柱效的萃取柱，规格为 6 mL/500 mg。

6.13 有机滤膜：0.22 μm 聚醚砜和聚四氟乙烯或其他等效材质滤膜。

6.14 玻璃纤维滤膜：0.45 μm 玻璃纤维滤膜或其他材质等效滤膜。

7 仪器设备

7.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI），具备梯度洗脱和多反应监测功能。

7.2 固相萃取装置：流速可调节。

7.3 氮吹浓缩仪。

7.4 旋涡混匀器：转动频次 0 rpm~3000 rpm。

7.5 采样瓶：1000 mL 磨口或带聚四氟乙烯内衬垫瓶盖的棕色玻璃瓶。

7.6 微量注射器或移液器：10 μL、50 μL、100 μL、500 μL、1 mL。

8 试样制备与保存

8.1 试样的制备

称样量和制备试验溶液的方法按相关产品标准中的规定进行。

8.2 试样的保存

水样的采集按照HJ 494和HJ 493的相关规定。

9 试验步骤

9.1 提取

量取 500 mL 样品，并充分混匀，用 0.45 μm 的玻璃纤维膜对样品进行过滤，收集水样。

9.2 净化

将固相萃取柱，固定在固相萃取装置上，依次用 6 mL 甲醇、6 mL 水及 6 mL 盐酸溶液活化。将预处理过的样品以 4mL/min 的流速通过小柱。上样完毕后，用 5 mL 水淋洗小柱。然后用氮气吹扫或固相萃取装置的真空泵干燥小柱 25 min，去除小柱中的残留水分。再用 5 mL 乙腈（6.1.4）洗脱小柱，收集洗脱液。洗脱液经浓缩装置浓缩至近干，用 0.1%甲酸溶液定容至 1.0 mL，涡旋混匀，过 0.22 μm 滤膜后置于棕色进样瓶中，待测。

9.3 基质匹配标准曲线的制备

精密量取混合标准工作液适量，用经提取净化后的空白样品溶液稀释配制浓度为 5.0μg/L、10.0μg/L、20.0μg/L、50.0μg/L、100.0μg/L 的系列基质校准工作溶液，0.22 μm 滤膜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。

9.4 测定

9.4.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：填料粒径为1.8μm，柱长50 mm，内径2.1 mm 的 C18反相液相色谱柱或其他性能相近的色谱柱；
- b) 流速：0.2 mL/min；
- c) 柱温：30℃；
- d) 进样体积：2 μL；
- e) 流动相：A相为0.1%甲酸水，B相为甲醇，梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间（min）	流动相A（%）	流动相B（%）
0.0	95	5
0.5	95	5
4.5	50	50

6.0	50	50
6.1	95	5
7.5	95	5

9.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源（ESI）；
 - b) 扫描模式：正离子模式；
 - c) 监测方式：多反应监测（MRM）；
 - d) 喷雾电压：3.0 kV；
 - e) 离子源温度：150℃；
 - f) 离子源温度:150℃；
 - g) 脱溶剂气温度:500℃；
 - h) 锥孔气流速:50L/h；
 - i) 脱溶剂气流速:1000L/h；
 - j) 二级碰撞气:氩气
- 多反应监测（MRM）、离子对、碰撞能量参见附录B。

9.5 测定方法

9.5.1 定性分析

按照液相色谱-质谱/质谱条件测定试样和基质混合标准工作溶液，如果检测的质量色谱峰保留时间与标准物质保留时间相差不超过± 2.5%，定性离子对的相对丰度(是用相对于最强离子丰度的强度百分比表示)与浓度相当基质标准工作溶液的相对丰度一致，相对丰度允许偏差不超过表 2 规定的范围，则可判断试样中存在对应的被测物。

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
最大允许偏差（%）	±20	±25	±30	±50

9.5.2 定量分析

根据试样中头孢类药物的含量情况，选取响应值相近的基质标准工作液一起进行色谱分析。基质标准工作液和待测液中头孢类药物的响应值应在仪器线性响应范围内。在上述色谱条件下头孢类药物的多反应监测(MRM)色谱图参见附录 C。

9.6 空白实验

取空白试样，除不加抗生素外，采用完全相同的步骤进行平行操作。

9.7 试验数据处理

采用基质匹配标准曲线定量，试样中 13 种头孢类药物的含量由液相色谱-质谱/质谱仪的数据处理软件或按公式(1)计算，计算结果需扣除空白值。

$$\rho_i = \frac{\rho_{ix} \times V_1}{V_0} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ρ_i ——样品中目标化合物 x 的质量浓度的数值，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

ρ_{ix} ——由标准曲线得到的试样中目标化合物 x 的质量浓度的数值，单位为纳克每升（ ng/mL ）；

V_1 ——试样定容体积的数值，单位为毫升（ mL ）；

V_0 ——取样体积的数值，单位为升（ L ）。

测定结果小数点后位数的保留与方法检出限一致，最多保留三位有效数字。

10 准确度

本方法在5.0ng/L~50.0ng/L添加浓度水平上的回收率为60% ~120%。

11 精密度

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

附 录 A

(资料性附录)

13种头孢菌素类抗生素信息见表A. 1。

表 A. 1 13 种头孢菌素类抗生素信息

序号	化合物中文名称	英文名称	CAS No.	检出限(ng/L)	测定下限(ng/L)
1	头孢匹罗	Cefpirome	98753-19-6	0.10	0.3
2	头孢喹肟	Cefquinome	84957-30-2	0.30	0.9
3	头孢洛宁	Cefalonium	5575-21-3	0.03	0.1
4	头孢乙腈	Cefacetrile	1020-21-0	0.03	0.1
5	头孢氨苄	Cefalexin	15686-71-2	0.03	0.1
6	头孢噻肟	Cefotaxime	63527-52-6	0.03	0.1
7	头孢拉定	Cefradinc	38821-53-3	0.10	0.3
8	头孢呋辛	Cefuroxime	55268-75-2	1.0	3.0
9	头孢克肟	Cefixime	79350-37-1	0.06	0.2
10	头孢唑林	Cefazolin	27164-46-1	0.10	0.3
11	头孢哌酮	Celoperazone	62893-19-0	0.06	0.2
12	头孢噻呋	Ceftiofur	80370-57-6	0.03	0.1
13	头孢噻吩	Cefalothin	153-61-7	0.1	0.3

附录 B

(资料性附录)

13种头孢菌素类抗生素的多离子反应监测条件见表B.1。

表 B.1 13 种头孢菌素类抗生素的多离子反应监测条件

序号	化合物名称	离子对	保留时间, min	碰撞能, ev
1	头孢匹罗	514.8/120*	3.18	30
		514.8/396		15
2	头孢噻肟	528.8/133.9*	3.52	60
		528.8/396		15
3	头孢洛宁	458.8/337*	3.61	10
		458.8/151.9		15
4	头孢乙腈	356.8/280*	3.62	15
		356.8/252		15
5	头孢氨苄	347.9/158*	4.03	8
		347.9/105.8		25
6	头孢噻肟	455.8/396*	4.15	8
		455.8/167		15
7	头孢拉定	349.8/176*	4.32	10
		349.8/157.9		10
8	头孢呋辛	441.8/363.9*	4.33	8
		441.8/335.9		8
9	头孢克肟	453.8/285*	4.36	12
		453.8/126		10
10	头孢唑林	454.8/323*	4.47	8
		454.8/155.8		15
11	头孢哌酮	645.8/143*	4.72	10
		645.8/530		30
12	头孢噻呋	523.8/124.8*	5.62	60
		523.8/125.8		40
13	头孢噻吩	413.8/336.8*	5.66	12
		413.8/3151.9		10
*为定量离子对				

附录 C

(资料性附录)

头孢类药物标准物质多反应监测(MRM)色谱图见图 C.1。

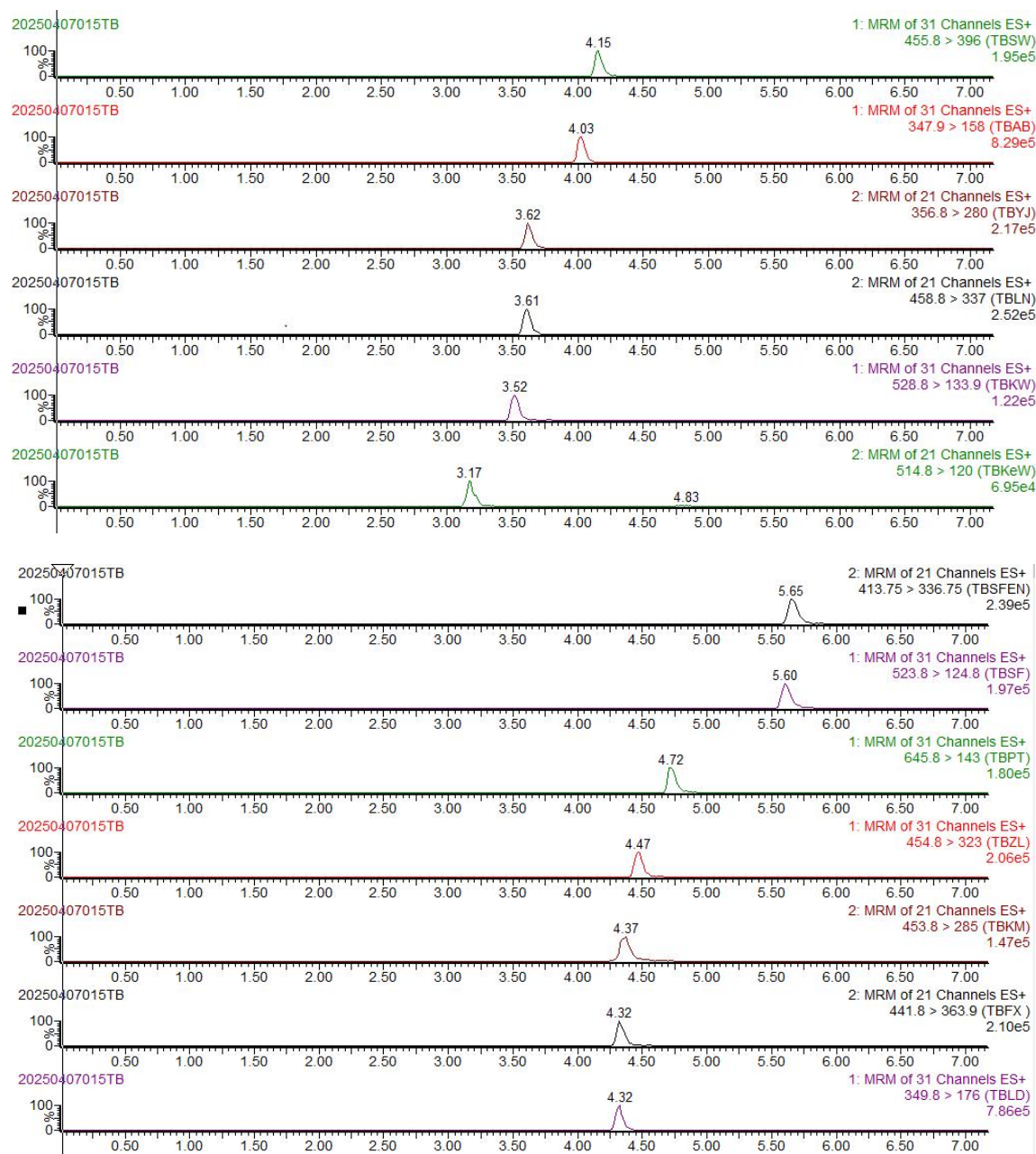


图 C.1 头孢类药物标准物质多反应监测(MRM)色谱图

1. 头孢匹罗 (3.18min)、2.头孢喹肟 (3.52min)、3.头孢洛宁 (3.61min)、4.头孢乙腈 (3.62min)、
5. 头孢氨苄 (4.03min)、6.头孢噻肟 (4.15min)、7.头孢拉定 (4.32min)、8.头孢呋辛 (4.33min)、
- 9.头孢克肟 (4.36min)、10.头孢唑林 (4.47min)、11.头孢哌酮 (4.72min)、12.头孢噻吩 (5.62min)、

13. 头孢噻吩 (5.66min)
