



中华人民共和国国家标准

GBXXXXX—XXXX

代替GB/T 20755-2006

食品安全国家标准 动物性食品中青霉素类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard-
Determination of the penicillins residues in animal derived food by liquid
chromatography-tandem mass spectrometric method

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 20755-2006《禽肉中9种青霉素类药物残留量的测定.液相色谱-串联质谱法》。与GB/T 20755-2006相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 标准文本格式修改为食品安全国家标准文本格式。
 - 标准范围从“牛、羊、猪和鸡肉”扩大至“猪、牛、羊、鸡的肝脏、肾脏、脂肪，鱼（皮+肉）和牛、羊奶”。
 - 标准范围中药物数量从9种增加至12种。
- 本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：
- GB/T 20755-2006。

食品安全国家标准

动物性食品中青霉素类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了动物性食品中12种青霉素类药物残留检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于猪、牛、羊、鸡的肌肉、肝脏、肾脏、脂肪，鱼（皮+肉）和牛、羊奶中青霉素G、阿莫西林、氨苄西林、氯唑西林、双氯西林、苯唑西林、羧苄西林、青霉素V、阿洛西林、甲氧西林、非奈西林和哌拉西林共12种青霉素类药物残留量的检测。

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

GB/T 30891-2014 水产品抽样规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的青霉素类药物经乙腈-水溶液提取，脂质净化固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱测定，基质匹配标准溶液内标法定量。

5 试剂与材料

除非另有说明，所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

5.1.2 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

5.1.3 乙腈。

5.2 溶液配制

5.2.1 30%乙腈水溶液：取乙腈 300 mL，加水稀释至 1000 mL，混匀。

5.2.2 0.1%甲酸水溶液：取甲酸 0.5 mL，加水稀释至 500 mL，混匀。5%氨水乙腈溶液：取氨水 5 mL，用乙腈稀释至 100 mL，混匀。

5.3 标准品

5.3.1 青霉素药物标准品：青霉素 G、阿莫西林、氨苄西林、氯唑西林、双氯西林、苯唑西林、羧苄西林、青霉素 V、阿洛西林、甲氧西林、非奈西林、哌拉西林含量均≥95.0%。详细信息见附录 A。标准品也可作为相应的盐。

5.3.2 同位素内标标准品：阿莫西林-D4、羧苄西林-D5、苯唑西林-D5、氨苄西林-D5，含量均≥95.0%，详细信息见附录 A。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液：分别取青霉素类药物标准品各适量（相当于各有效成分约 10 mg），精密称定，用 30%乙腈水溶液溶解并定容至 10 mL 棕色容量瓶，摇匀，配制成浓度为 1 mg/mL 标准储备液。-18℃ 避光保存，有效期 1 个月。

5.4.2 内标储备液：分别取阿莫西林-D4、羧夫西林-D5、苯唑西林-D5、氨苄西林-D5 标准品各 10 mg，精密称定，用 30%乙腈水溶液溶解并定容至 10 mL 棕色容量瓶，摇匀，配制成浓度为 1 mg/mL 内标标准储备液。-18℃ 避光保存，有效期 1 个月。

5.4.3 混合标准中间液：分别移取标准储备液各 100 μ L，于 10 mL 容量瓶中，用 30%乙腈水溶液稀释至刻度，配制成浓度为 10 μ g/mL 的混合标准中间液。-18℃ 避光保存，有效期 5d。

5.4.4 内标中间液：分别移取内标储备液各 100 μ L，于 10 mL 容量瓶中，用 30%乙腈水溶液稀释至刻度，配制成浓度为 10 μ g/mL 的内标中间液。-18℃ 避光保存，有效期 5d。

5.4.5 混合标准工作液：移取混合标准中间液 1000 μ L，于 10 mL 容量瓶中，用 30%乙腈水溶液稀释至刻度，配制成浓度为 1.0 μ g/mL 的混合标准中间液。-18℃ 避光保存，有效期 5d。

5.4.6 内标工作溶液：移取内标中间液 1000 μ L、100 μ L，于 10 mL 容量瓶中，用 30%乙腈水溶液稀释至刻度，配制成浓度为 1.0 μ g/mL、0.1 μ g/mL 的内标工作液。-18℃ 避光保存，有效期 5d。

5.5 材料

5.5.1 脂质净化固相萃取柱：300 mg/3 mL，或相当者。

5.5.2 尼龙微孔滤膜：0.22 μ m。

5.5.3 具塞离心管：50 mL 和 15 mL。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源。

6.2 分析天平：感量 0.000 01 g 和 0.01g。

6.3 旋涡混合器。

6.4 超声波清洗器。

6.5 离心机： $\geq 8\ 000$ r/min。

6.6 均质机。

6.7 氮吹仪。

6.8 固相萃取装置。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

7.1.1 畜禽肉、组织及鱼

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织，绞碎，并使均质。鱼类按照 GB/T 30891-2014 附录B的要求制样。新鲜或冷藏的供试样或空白，混合均匀。

a) 取混匀的供试样品，作为供试试样；

b) 取混匀的空白样品，作为空白试样；

c) 取混匀的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试样。

7.1.2 乳

取适量新鲜或冷藏的供试乳或空白，混合均匀。

a) 取混匀的供试样品，作为供试试样；

b) 取混匀的空白样品，作为空白试样；

c) 取混匀的空白样品，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

肌肉、组织试样于-18℃以下保存，保存期不超过10天，或-80℃保存，保存期不超过30天；牛奶试样于0℃~4℃保存，保存期不超过3天。

8 测定步骤

8.1 提取

8.1.1 畜禽组织（肌肉、肝脏、肾脏、脂肪）及鱼（皮+肉）

称取（ 2 ± 0.05 ）g试样于50 mL具塞离心管中，加1.0 μg/mL内标工作溶液40 μL，加水2 mL，涡旋30 s。加乙腈8 mL，涡旋混匀30 s，超声15 min，8000 r/min离心3 min，取全部上清液，用乙腈定容至10 mL，备用。

8.1.2 奶

称取（ 2 ± 0.05 ）g试样于50 mL具塞离心管中，加1.0 μg/mL内标工作溶液40 μL，加入乙腈8 mL，涡旋混匀30 s，超声15 min，8000 r/min离心3 min，取全部上清液，用乙腈定容至10 mL，备用。

8.2 净化

8.2.1 畜禽组织（肌肉、肝脏、肾脏、脂肪）及鱼（皮+肉）

取备用液2.0 mL注入固相萃取柱，以不大于1 mL/min的流速通过固相萃取柱，收集全部流出液，抽干，涡旋混匀，过0.22 μm微孔滤膜，供液相色谱-串联质谱仪测定，并于8 h内完成测定。

8.2.2 奶

取备用液5.0 mL注入固相萃取柱，以不大于1 mL/min的流速通过固相萃取柱，收集全部流出液，抽干，于35℃氮吹至0.5 mL以下，加水定容至1.0 mL，涡旋混匀，过0.22 μm微孔滤膜，供液相色谱-串联质谱仪测定，并于8 h内完成测定。

8.3 基质匹配标准曲线的制备

称取空白试样（ 2 ± 0.05 ）g于50 mL离心管中，按8.1与8.2步骤操作后获得空白试样的基质溶液。精密量取标准工作液、内标溶液适量，用空白试样基质溶液配制浓度为0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、10.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100 ng/mL和200 ng/mL的系列标准工作液，过微孔滤膜后，上机测定。或根据仪器的灵敏度及样品中目标物的实际含量，确定标准系列溶液中目标物的浓度。以特征离子质量色谱峰的峰面积与对应内标物特征离子色谱峰的峰面积比值为纵坐标，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

- 色谱柱：C18 色谱柱(100 mm×2.1 mm，1.7 μm)或相当者；
- 流动相：A 为 0.1% 甲酸水溶液，B 为乙腈，梯度洗脱条件见表 1；
- 流速：0.3 mL/min；
- 柱温：35℃；
- 进样量：1 μL。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间, min	A, %	B, %
0.0	95	5
0.5	95	5

7.0	5	95
8.0	5	95
8.1	95	5
10.0	95	5

8.4.2 质谱参考条件

- 电离方式：电喷雾电离，正离子模式；
- 数据采集：多反应监测（MRM），质谱参数参见表 2；
- 电喷雾电压：4000 V；
- 喷嘴电压：500 V；
- 辅助气压力：40 psi；
- 鞘气温度：350 ℃；
- 鞘气流量：11 L/min；
- 雾化气温度：250℃；
- 雾化气流量：12 L/min。

表2 化合物的母离子及定量定性离子、碰撞能量

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碎裂电压 (Fragmentor) /V	驻留时间/ms	碰撞能量 (CE) /eV
阿莫西林	366.2	208.0*	70	20	6
		349.0			2
氨苄西林	350.2	106.1*	110	20	15
		160.0			10
双氯西林	470.1	160.0*	100	20	10
		311.2			10
氯唑西林	436.1	277.0*	90	20	2
		160.0			10
羧夫西林	415.2	199.0*	100	20	10
		256.0			30
阿洛西林	462.2	218.1*	120	10	20
		246.0			10
哌拉西林	518.2	143.0*	140	20	15
		160.0			10
苯唑西林	402.2	160.0*	100	20	10
		243.0			10
甲氧西林	381.2	165.0*	100	20	20

		222.0			20
非奈西林	365.1	160.0*	90	20	10
		112.0			10
青霉素 G	335.1	176.0*	90	20	8
		160.0			4
青霉素 V	351.2	160.0*	120	20	10
		192.0			10
阿莫西林-D ₄	370.2	212.0	53	20	9
氨苄西林-D ₅	355.1	111.0	110	25	15
羧夫西林-D ₅	420.0	204.1	78	20	17
苯唑西林-D ₅	407.0	160.0	73	20	13
注：1. *定量离子。 2. 双氯西林、氯唑西林、阿洛西林、哌拉西林、甲氧西林、非奈西林、青霉素G和青霉素V采用苯唑西林同位素内标定量，如果市场上有一一对应的同位素内标，优先采用。					

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在同样测试条件下，试样溶液中的青霉素类药物的保留时间与基质匹配标准溶液中相应组分的保留时间相比，偏差在±0.1min以内，且检测到的相对离子比率，应当与浓度相当的基质匹配标准溶液相对离子比率一致，其允许相对偏差不超过±40%。

8.4.3.2 定量测定

按8.4.1和8.4.2设定仪器条件，以基质匹配标准溶液待测物质与其内标物质浓度比为横坐标，以待测物质与其内标物质峰面积比为纵坐标，绘制标准工作曲线，作单点或多点校准，按内标法计算试样中药物的残留量，基质匹配标准溶液及试样溶液中的目标物响应值均在仪器检测的线性范围内。标准溶液特征离子质量色谱图见附录B。对于试料中青霉素类药物残留量超过仪器测定线性范围的，应对试样溶液采用空白基质溶液稀释后测定。

8.5 空白试验

取空白试样，除不加药物外，采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算

试样中待测药物的残留量按标准曲线或公式（1）计算，

$$X = \frac{C_s \times C_{is} \times A_i \times A'_{is} \times V \times V_2}{C'_{is} \times A_s \times A_{is} \times m \times V_1} \dots \dots (1)$$

式中：

X—试样中被测物质残留量，单位为微克每千克（μg/kg）；

C_S —标准工作溶液中被测物质浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

C_{is} —试料溶液中内标浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

C'_{is} —标准溶液中内标浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

A_i —试料溶液中被测物质的峰面积；

A'_{is} —标准工作溶液中内标的峰面积；

A_{is} —试料溶液中内标的峰面积；

A_s —标准溶液中被测物质的峰面积；

V —试料提取液总体积，单位为毫升（mL）；

V_1 —用于净化分取的试料提取液体积，单位为毫升（mL）；

V_2 —试样经净化后最终定容体积，单位为毫升（mL）；

m —试料质量，单位为克（g）。

注：计算结果不小于 $1 \mu\text{g/kg}$ 的保留3位有效数字， $1 \mu\text{g/kg}$ 以下保留至小数点后2位。

10 方法灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法在猪、牛、羊、鸡的肌肉、肝脏、肾脏、脂肪及鱼（皮+肉）中，青霉素G、氨苄西林、氯唑西林、双氯西林、苯唑西林、萘夫西林、青霉素V、阿洛西林、甲氧西林、非奈西林、哌拉西林检出限为 $2.5 \mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $5.0 \mu\text{g/kg}$ ；阿莫西林检出限为 $5.0 \mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $10.0 \mu\text{g/kg}$ 。

本方法在牛、羊奶中，青霉素G、氨苄西林、氯唑西林、双氯西林、苯唑西林、萘夫西林、青霉素V、阿洛西林、甲氧西林、非奈西林、哌拉西林、阿莫西林检出限为 $1.0 \mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $2.0 \mu\text{g/kg}$ 。

10.2 正确度

本方法在猪、牛、羊、鸡的肌肉、肝脏、肾脏、脂肪及鱼（皮+肉）中，青霉素G、阿莫西林、氨苄西林、双氯西林、萘夫西林、青霉素V、阿洛西林、甲氧西林、非奈西林、哌拉西林在 $5.0 \sim 100 \mu\text{g/kg}$ （阿莫西林在 $10.0 \sim 100 \mu\text{g/kg}$ ）添加浓度范围内，添加回收率为60%~120%，苯唑西林、氯唑西林在 $5.0 \sim 600 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度范围内，添加回收率为60%~110%。

本方法在牛、羊奶中，青霉素G、阿莫西林、氨苄西林、双氯西林、萘夫西林、青霉素V、阿洛西林、甲氧西林、非奈西林、哌拉西林在 $2.0 \sim 40.0 \mu\text{g/kg}$ （苯唑西林、氯唑西林在 $2.0 \sim 60.0 \mu\text{g/kg}$ ）添加浓度范围内，添加回收率为60%~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

(规范性)

青霉素类化合物及内标物信息

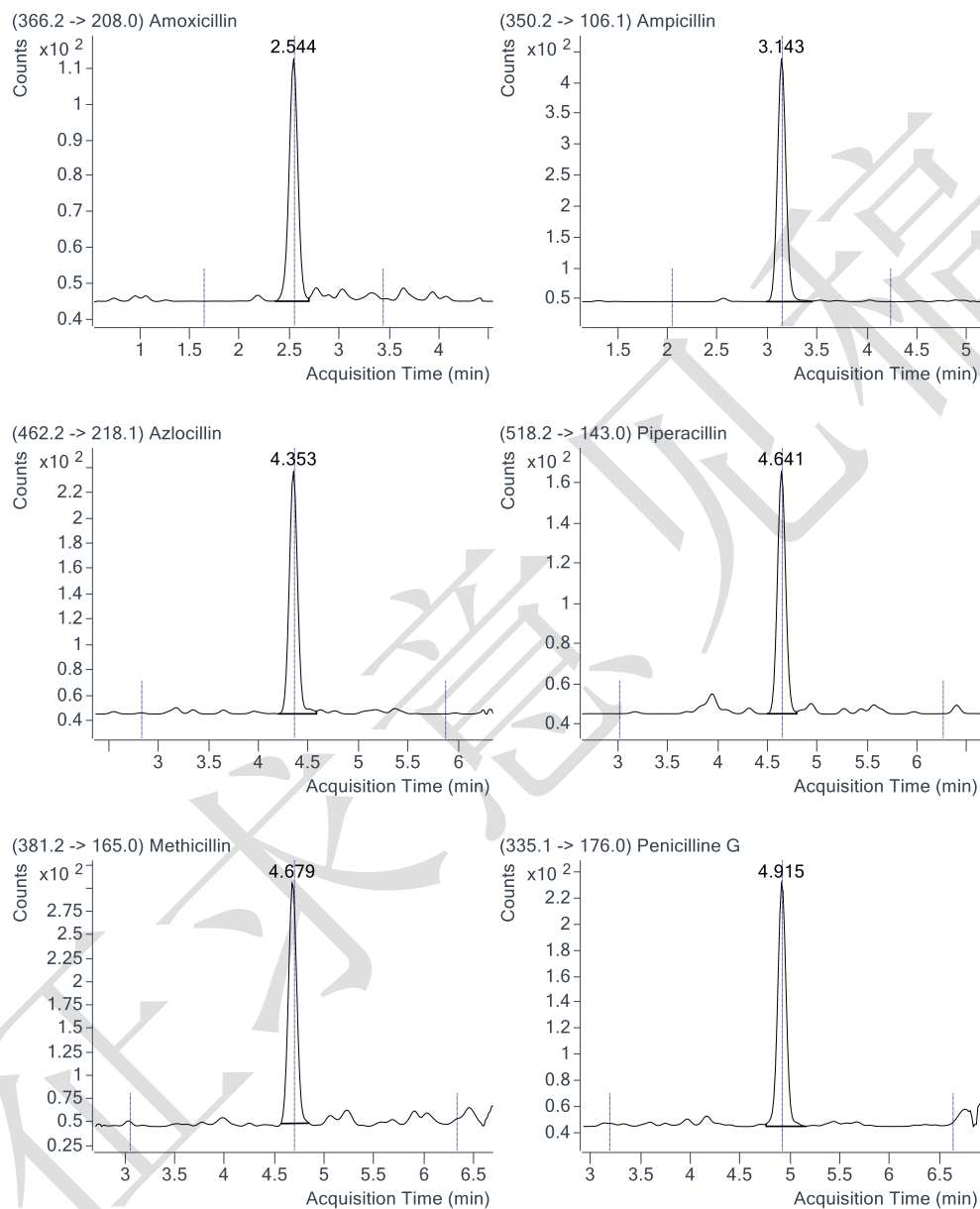
青霉素类化合物及内标的中英文名称、CAS号、化学分子式及相对分子质量参见表A.1。

表A.1 青霉素类化合物标准物质的信息

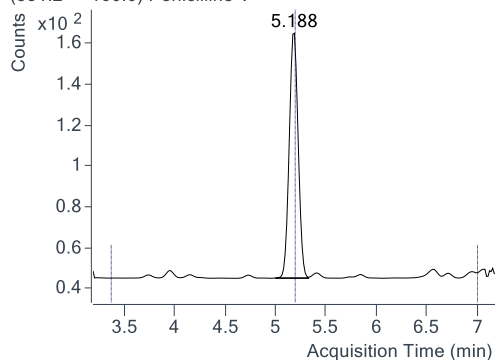
序号	中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子质量
1	阿莫西林	Amoxicillin	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	26787-78-0	365.2
2	氨苄西林	Ampicillin	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	69-53-4	349.2
3	阿洛西林	Azlocillin	C ₂₀ H ₂₃ N ₅ O ₆ S	37091-66-0	217.0
4	哌拉西林	Piperacillin	C ₂₃ H ₂₇ N ₅ O ₇ S	61477-96-1	517.2
5	甲氧西林	Methicillin	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₆ S	61-32-5	380.1
6	青霉素 G	Penicilline G	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	61-33-6	334.1
7	青霉素 V	Penicilline V	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₅ S	87-08-1	350.2
8	苯唑西林	Oxacillin	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	66-79-5	401.2
9	非奈西林	Phenethicillin	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₅ S	147-55-7	364.1
10	氯唑西林	Cloxacillin	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₅ S	61-72-3	435.1
11	羧夫西林	Nafcillin	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₅ S	147-52-4	414.2
12	双氯西林	Dicloxacillin	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₅ S	3116-76-5	469.1
13	阿莫西林-D4	Amoxicillin-D4	C ₁₆ H ₁₅ D ₄ N ₃ O ₅ S	26787-78-0	369.2
14	氨苄西林 D5	Ampicillin-D5	C ₁₆ H ₁₄ D ₅ N ₃ O ₄ S	1426173-65-0	354.1
15	苯唑西林-D5	Oxacillin-D5	C ₁₉ H ₁₄ D ₅ N ₃ O ₅ S	1173-88-2	406.2
16	羧夫西林-D5	Nafcillin D5	C ₂₁ H ₁₇ D ₅ N ₂ O ₅ S	1356354-25-0	419.2

附 录 B
(资料性)
标准物质选择离子质量色谱图

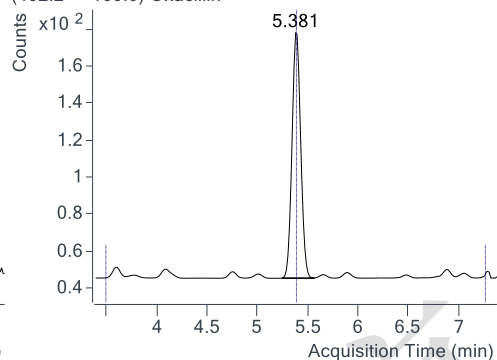
鸡肉基质匹配标准溶液特征离子质量色谱图见图B. 1。



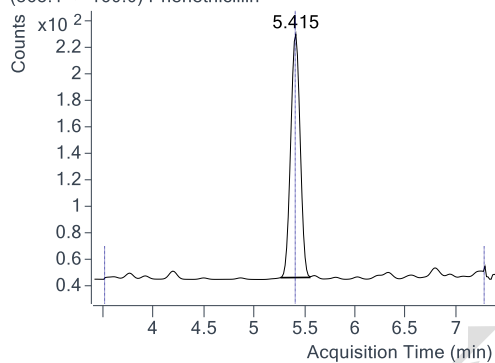
(351.2 -> 160.0) Penicilline V



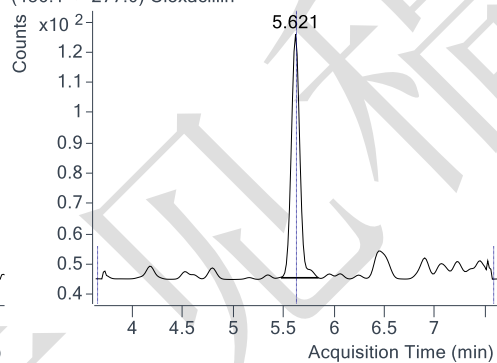
(402.2 -> 160.0) Oxacillin



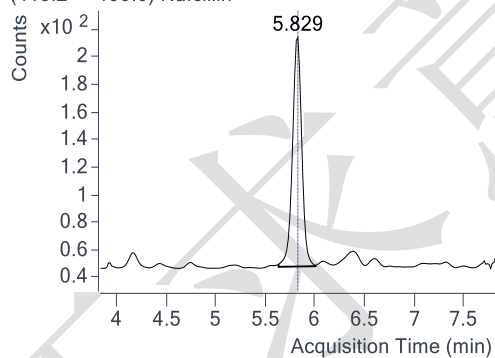
(365.1 -> 160.0) Phenethicillin



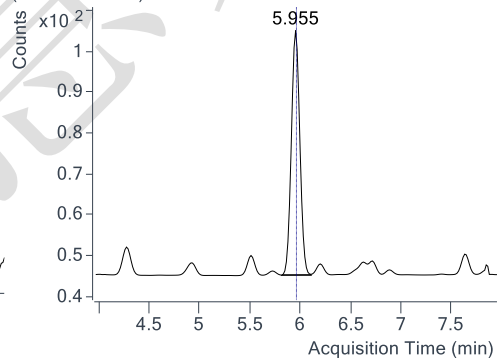
(436.1 -> 277.0) Cloxacillin



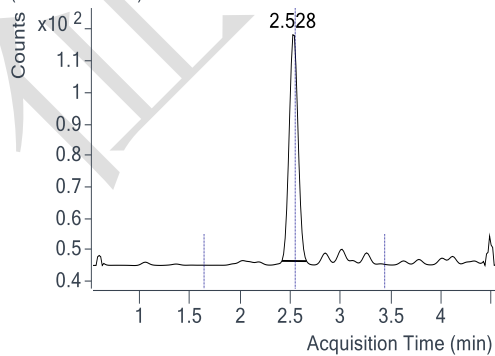
(415.2 -> 199.0) Nafcillin



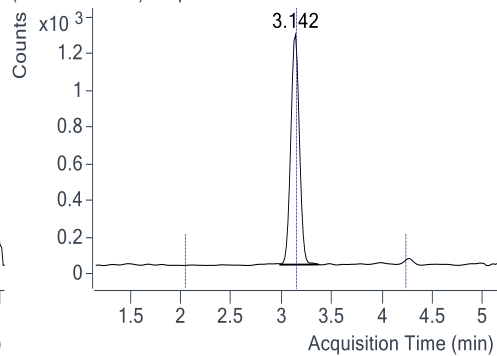
(470.1 -> 160.0) Dicloxacillin



(370.2 -> 212.0) Amoxicillin-D4



(355.1 -> 111.0) Ampicillin-D5



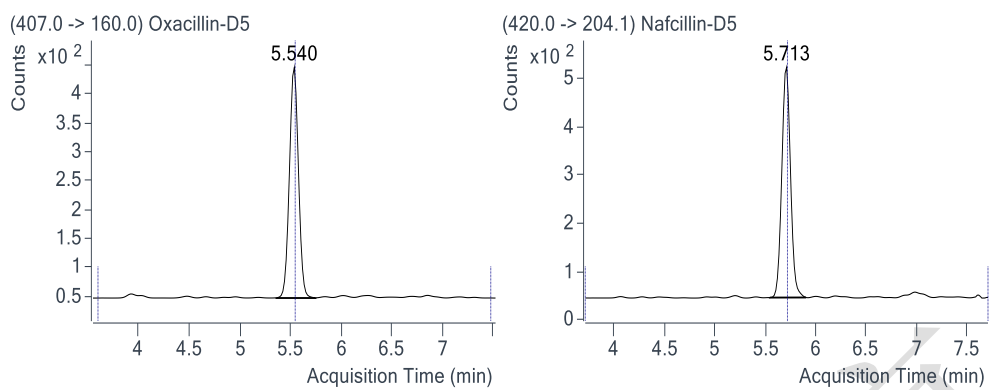


图 B.1 鸡肉基质匹配标准溶液特征离子质量色谱图 (1ng/mL)