



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXX—XXXX

代替GB 31659.3-2022

食品安全国家标准

奶和奶粉中 β -内酰胺类药物残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

National food safety standard—

Determination of β -lactam drug residues in milk and milk powder 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 31659.3-2022《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》，主要变化如下：

——标准范围内增加了去乙酰基头孢匹林、阿莫西林、氨苄西林、美西林、阿洛西林、哌拉西林、甲氧西林、青霉素G、青霉素V、苯唑西林、氯唑西林、萘夫西林、氟氯西林、双氯西林等药物；

——样品提取液变更为酸化甲醇溶液；

——固相萃取柱净化方式变更为通过式净化；

——调整了方法的检出限和定量限。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——GB/T 22989-2008；

——GB 31659.3-2022。

食品安全国家标准 奶和奶粉中 β -内酰胺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23种 β -内酰胺类药物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、羊奶和奶粉中去乙酰基头孢匹林、阿莫西林、头孢匹林、头孢噻肟、氨苄西林、头孢氨苄、头孢洛宁、头孢拉定、头孢乙腈、头孢噻肟、美西林、头孢唑林、头孢哌酮、阿洛西林、哌拉西林、甲氧西林、青霉素G、青霉素V、苯唑西林、氯唑西林、萘夫西林、氟氯西林、双氯西林残留量的检测。

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 β -内酰胺类药物经酸化甲醇溶液提取，HLB固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱法测定，基质匹配标准溶液校准，外标法定量。

5 试剂与材料

除另有规定外，所有试剂均为色谱纯，水为符合GB/T 6682规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 甲醇（ CH_3OH ）。

5.1.2 乙腈（ CH_3CN ）。

5.1.3 甲酸（ HCOOH ）。

5.1.4 正己烷（ C_6H_{14} ），分析纯。

5.2 溶液的配制

5.2.1 50%乙腈溶液：取乙腈 100 mL，加水 100 mL，混匀。

5.2.2 0.1%甲酸溶液：精确吸取甲酸 1.0 mL 于 1000 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀。

5.2.3 0.1%甲酸甲醇溶液：精确吸取甲酸 1.0 mL 于 1000 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，摇匀。

5.2.4 乙腈饱和的正己烷溶液：取 500 mL 正己烷于试剂瓶中，加入 50 mL 乙腈，摇匀。

5.3 标准品

23 种 β -内酰胺类药物标准品：纯度 $\geq 99\%$ ，相关信息见附录 A。

5.4 标准溶液的配制

5.4.1 标准储备溶液（1 mg/mL）：分别称取 10.0 mg 标准品（精确至 0.1 mg）于 10 mL 棕色容量瓶中，

用 50%乙腈溶液溶解并定容, -18℃以下避光保存, 有效期 1 个月。

5.4.2 混合标准中间溶液(10 $\mu\text{g/mL}$): 分别准确吸取 0.1 mL 标准储备溶液于 10 mL 容量瓶中, 用 50% 乙腈溶液定容至刻度, 摇匀, -18℃以下避光保存, 有效期 10 d。

5.4.3 混合标准工作溶液(1 $\mu\text{g/mL}$): 准确吸取 1.0 mL 混合标准中间溶液于 10 mL 容量瓶中, 用 50% 乙腈溶液定容至刻度, 摇匀, 现用现配。

5.5 材料

5.5.1 聚苯乙烯/二乙烯苯亲水亲脂固相萃取柱, 500 mg/6 mL, 或性能相当者, 使用前用 5 mL 甲醇活化。

5.5.2 滤膜: 0.22 μm , 有机系。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪: 配电喷雾离子源(ESI)。

6.2 分析天平: 感量0.000 01 g和0.01 g。

6.3 涡旋混合器。

6.4 离心机: ≥ 8000 r/min。

6.5 固相萃取装置。

6.6 超声清洗仪。

6.7 氮吹仪。

7 试样的制备和保存

7.1 试样的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试牛奶或羊奶及奶粉, 混合均匀。

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溶液, 作为空白添加试样。

7.2 试样的保存

牛奶或羊奶: -18℃以下密封避光保存。

奶粉: 阴凉干燥处避光保存。

8 测定步骤

8.1 提取

8.1.1 牛奶、羊奶

准确称取牛奶、羊奶试料(2 \pm 0.05) g, 于50 mL离心管中, 加0.1%甲酸甲醇溶液8 mL, 涡旋1 min, 8000 r/min离心3 min, 收集上清液, 备用。

8.1.2 奶粉

准确称取奶粉试料(0.5 \pm 0.01) g, 于50 mL离心管中, 用1.5 mL 50℃温水充分溶解, 加0.1%甲酸甲醇溶液8 mL, 涡旋1 min, 8000 r/min离心3 min, 收集上清液, 备用。

8.2 净化

取备用液通过活化后的通过式亲水亲脂固相萃取柱, 收集全部流出液于15 mL离心管中。用2 mL 甲醇洗涤固相萃取柱, 收集全部流出液, 50℃氮气吹干, 用初始比例流动相1.0 mL溶解残余物, 加入1 mL 乙腈饱和的正己烷溶液, 涡旋30 s, 8000 r/min离心3 min, 弃去上层溶液, 下层溶液过0.22 μm 滤膜, 供液相色谱-串联质谱仪测定。

8.3 基质匹配标准曲线的制备

精密量取混合标准工作溶液适量, 用初始比例流动相稀释成各 β -内酰胺类药物浓度分别为2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL的系列标准溶液, 从上述标准溶液中各取1.0 mL, 分别加

入空白试样经提取、净化和吹干后的残余物中，充分溶解，作为基质匹配标准溶液，过 0.22 μm 滤膜后上机测定。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：C₁₈柱（100 mm×2.1 mm，1.9μm），或性能相当者；
- b) 流动相：A：0.1%甲酸溶液；B：乙腈。梯度洗脱程序见表1；
- c) 流速：0.2 mL/min；
- d) 柱温：30 ℃；
- e) 进样量：5 μL；

表 1 液相色谱的梯度洗脱程序表

时间 min	A %	B %
0.00	90	10
5.00	10	90
7.00	10	90
7.10	90	10
10.00	90	10

8.4.2 串联质谱参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源；
- b) 扫描方式：正离子扫描；
- c) 检测方式：多反应监测（MRM）；
- d) 电喷雾电压：3500 V；
- e) 离子源温度：150 ℃；
- f) 定性离子对、定量离子对、保留时间、碰撞能量参见附录B。

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β-内酰胺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，且检测到的离子相对丰度，应当与浓度相当的基质匹配标准溶液离子相对丰度一致，其允许相对偏差不超过±40%。

8.4.3.2 定量测定

以基质匹配标准溶液浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准工作曲线，作单点或多点校准，按外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。对于试样中β-内酰胺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。23种β-内酰胺类药物特征离子质量色谱图参见附录C。

8.5 空白试验

取空白试样，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：

$$\omega = \frac{A_i \times \rho_s \times V \times 1000}{A_s \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- ω ——试样中待测药物残留量, 单位为微克每千克 ($\mu\text{g/kg}$);
- A_i ——试样溶液中待测药物的峰面积;
- ρ_s ——基质匹配标准溶液中待测药物的浓度, 单位为纳克每毫升 (ng/mL);
- V ——洗脱液氮吹后复溶液的体积, 单位为毫升 (mL);
- A_s ——基质匹配标准溶液中待测药物的峰面积;
- m ——试样质量, 单位为克 (g);
- n ——上机测定的试样溶液超出线性范围后, 进一步稀释的倍数;

注: 计算结果保留3位有效数字。

10 检测方法灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法对牛奶或羊奶的检出限为 $1\mu\text{g/kg}$, 定量限为 $2\mu\text{g/kg}$; 对奶粉的检出限为 $4\mu\text{g/kg}$, 定量限为 $8\mu\text{g/kg}$ 。

10.2 正确度

本方法牛奶或羊奶在 $2\mu\text{g/kg} \sim 40\mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $70\% \sim 110\%$; 奶粉在 $8\mu\text{g/kg} \sim 160\mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $70\% \sim 110\%$ 。

10.3 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)

23种β-内酰胺类药物基本信息

23 种 β-内酰胺类药物基本信息见表 A.1。

表 A.1 23 种 β-内酰胺类药物基本信息

序号	名称	英文名称	化学式	CAS 号	相对分子质量
1	去乙酰基头孢匹林	Desacetyl Cefapirin	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O ₅ S ₂	38115-21-8	381.4
2	阿莫西林	Amoxicillin	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	26787-78-0	365.4
3	头孢匹林	Cephapirin	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₆ S ₂	21593-23-7	423.5
4	头孢喹肟	Cefquinome	C ₂₃ H ₂₄ N ₆ O ₅ S ₂	84957-30-2	528.6
5	氨苄西林	Ampicillin	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	69-53-4	349.4
6	头孢氨苄	Cefalexin	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄ S	15686-71-2	347.4
7	头孢洛宁	Cephalonium	C ₂₀ H ₁₈ N ₄ O ₅ S ₂	5575-21-3	458.5
8	头孢拉定	Cephadrine	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	38821-53-3	349.4
9	头孢乙腈	Cefacetrile	C ₁₃ H ₁₃ N ₃ O ₆ S	10206-21-0	339.3
10	头孢噻肟	Cefotaxime	C ₁₆ H ₁₇ N ₅ O ₇ S ₂	63527-52-6	455.4
11	美西林	Mecillinam	C ₁₅ H ₂₃ N ₃ O ₃ S	32887-01-7	325.4
12	头孢唑林	Cefazolin	C ₁₄ H ₁₃ N ₈ NaO ₄ S ₃	27164-46-1	454.5
13	头孢哌酮	Cefoperazone	C ₂₅ H ₂₇ N ₉ O ₈ S ₂	62893-19-0	645.7
14	阿洛西林	Azlocillin	C ₂₀ H ₂₃ N ₅ O ₆ S	37091-66-0	461.5
15	哌拉西林	Pipracil	C ₂₃ H ₂₇ N ₅ O ₇ S	61477-96-1	517.5
16	甲氧西林	Methicillin	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₆ S	61-32-5	380.1
17	青霉素 G	Penicillin G	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	61-33-6	334.4
18	青霉素 V	Penicillin V	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₅ S	87-08-1	350.4
19	苯唑西林	Oxacillin	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	66-79-5	401.4
20	氯唑西林	Cloxacillin	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₅ S	61-72-3	435.9
21	萘夫西林	Nafcillin	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₅ S	147-52-4	414.4
22	氟氯西林	Flucloxacillin	C ₁₉ H ₁₇ ClFN ₃ O ₅ S	5250-39-5	453.9
23	双氯西林	Dicloxacillin	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₅ S	3116-76-5	469.3

附 录 B
(资料性)

23 种 β-内酰胺类药物的质谱分析参数

23种β-内酰胺类药物的质谱分析参数见表B.1。

表 B.1 23 种 β-内酰胺类药物的质谱分析参数

序号	中文名称	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
1	去乙酰基头孢匹林	382.1/112.1	382.1/112.1	72	20
		382.1/152.0			12
2	阿莫西林	366.1/114.0	366.1/114.0	46	29
		366.1/208.0			10
3	头孢匹林	424.0/292.0	424.0/292.0	68	18
		424.0/320.0			10
4	头孢唑肟	529.0/134.1	529.0/134.1	75	10
		529.0/396.0			14
5	氨苄西林	350.1/106.1	350.1/106.1	56	10
		350.1/174.1			19
6	头孢氨苄	348.0/106.1	348.0/106.1	52	21
		348.0/158.0			28
7	头孢洛宁	459.0/152.0	459.0/152.0	59	32
		459.0/337.0			10
8	头孢拉定	350.1/158.0	350.1/158.0	52	19
		350.1/176.0			10
9	头孢乙腈	361.9/178.0	361.9/178.0	61	20
		361.9/257.9			16
10	头孢噻肟	456.0/167.0	456.0/167.0	71	19
		456.0/395.9			10
11	美西林	326.1/139.1	326.1/139.1	71	10
		326.1/167.1			10
12	头孢唑林	455.0/156.0	455.0/156.0	57	10
		455.0/323.0			12
13	头孢哌酮	646.0/143.1	646.0/143.1	72	10
		646.0/530.0			13
14	阿洛西林	462.1/218.1	462.1/218.1	67	34
		462.1/246.0			12
15	哌拉西林	518.1/143.1	518.1/143.1	66	10
		518.1/160.0			14
16	甲氧西林	381.1/165.1	381.1/165.1	65	12
		381.1/222.0			14
17	青霉素 G	335.1/160.0	335.1/160.0	47	19
		335.1/176.0			16
18	青霉素 V	351.1/114.1	351.1/114.1	57	10
		351.1/160.0			15
19	苯唑西林	402.0/160.0	402.0/160.0	56	14
		402.0/243.0			10
20	氯唑西林	436.0/160.0	436.0/160.0	60	21
		436.0/276.9			14

表 B.1 续

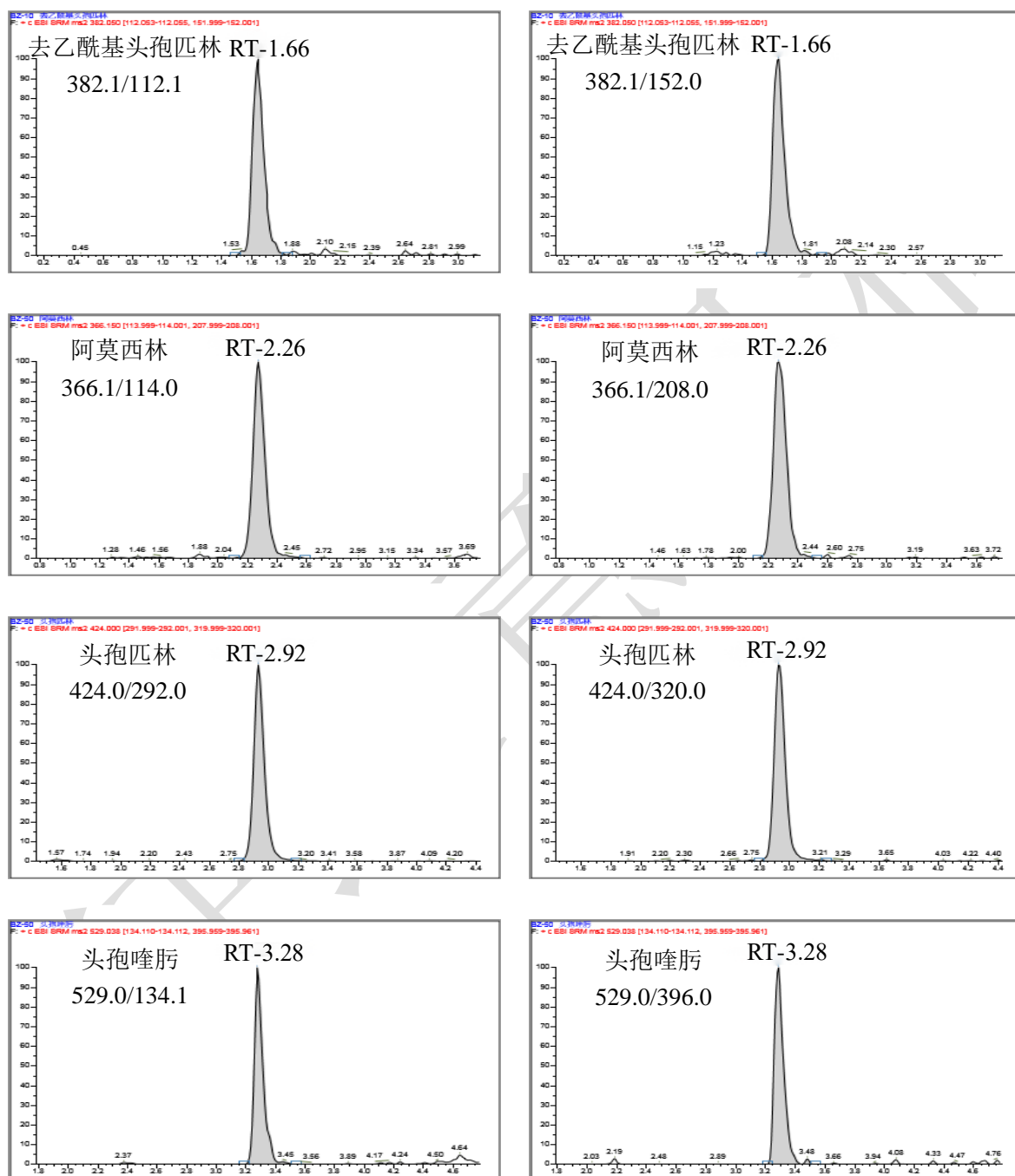
序号	中文名称	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
21	萘夫西林	415.1/171.0	415.1/171.0	59	25
		415.1/199.0			20
22	氟氯西林	454.1/160.0	454.1/160.0	75	17
		454.1/294.9			14
23	双氯西林	469.9/160.0	469.9/160.0	64	23
		469.9/310.9			18

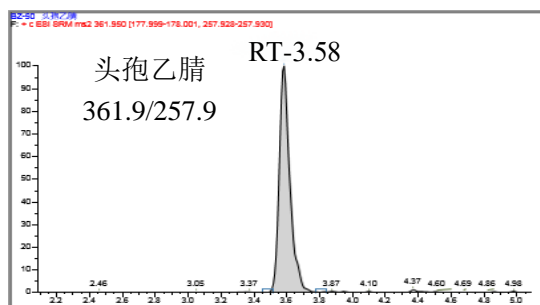
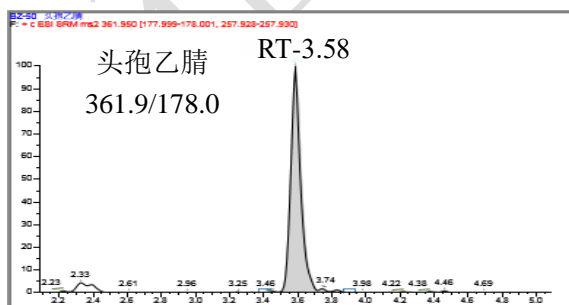
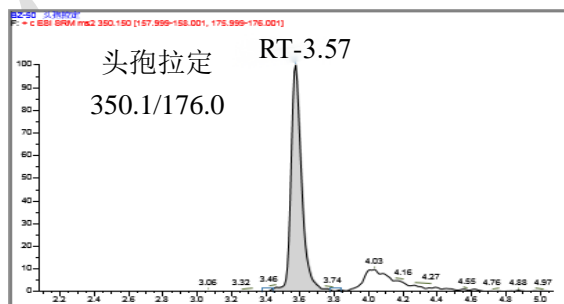
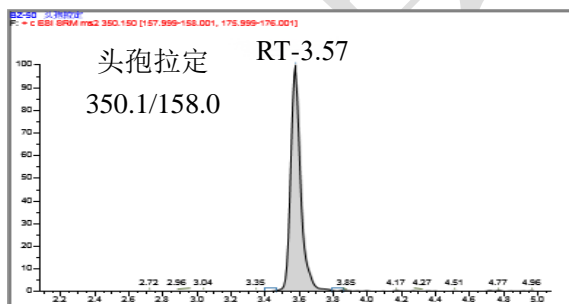
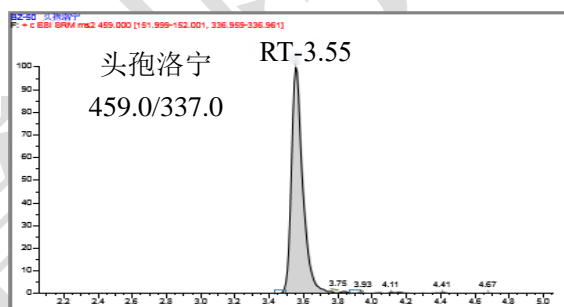
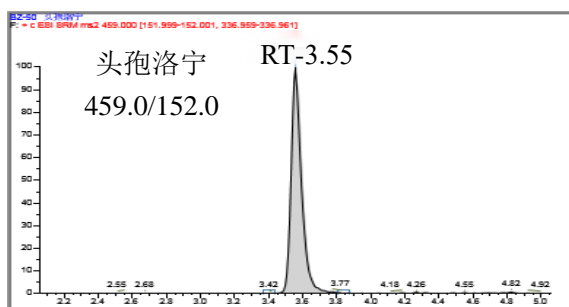
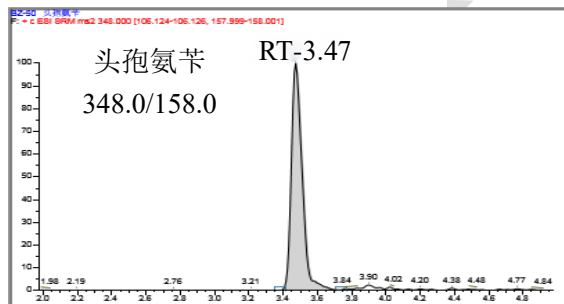
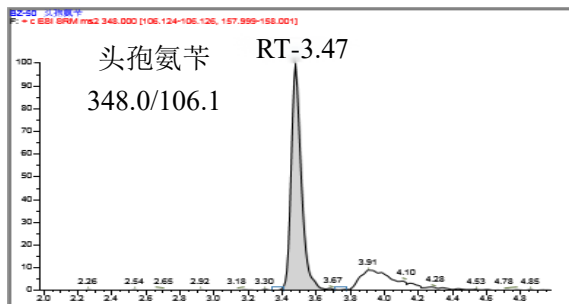
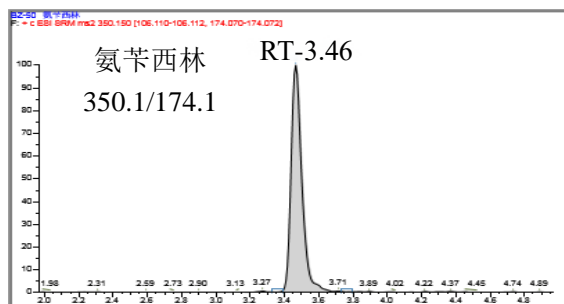
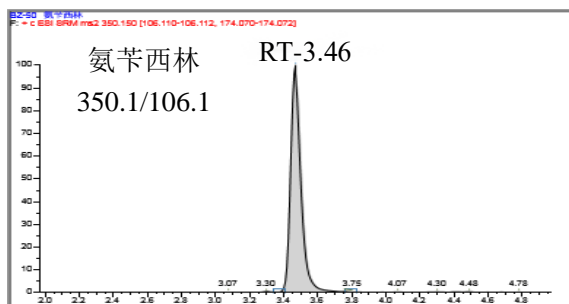
附 录 C

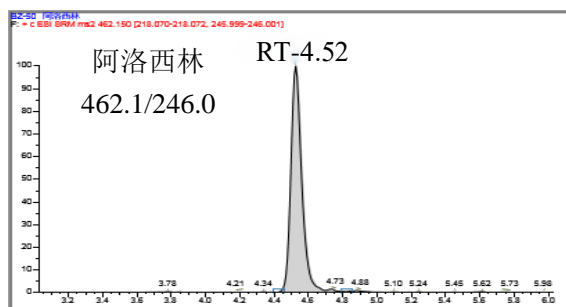
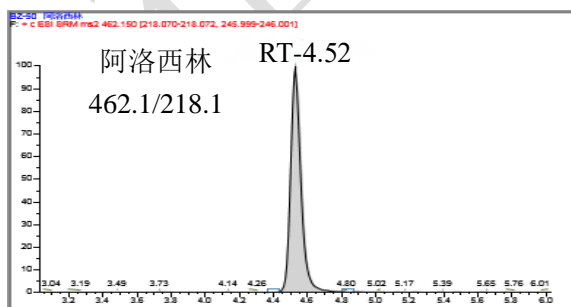
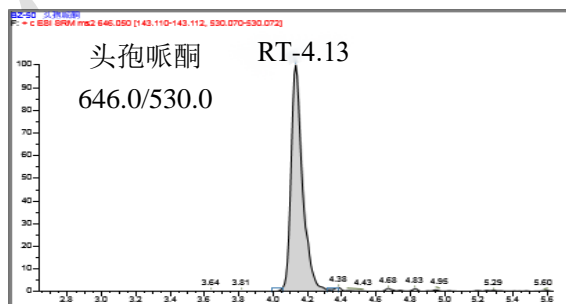
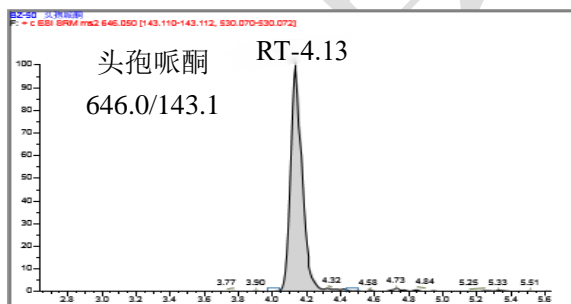
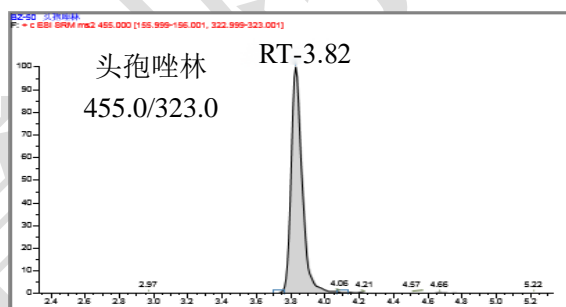
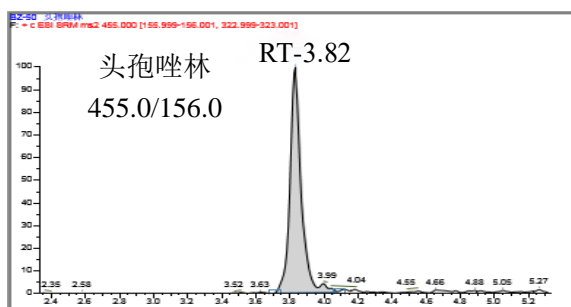
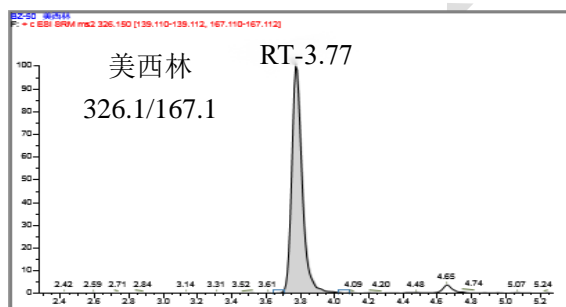
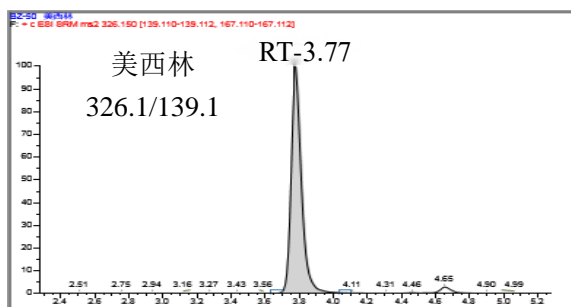
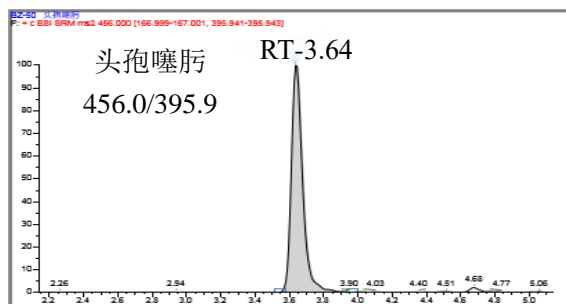
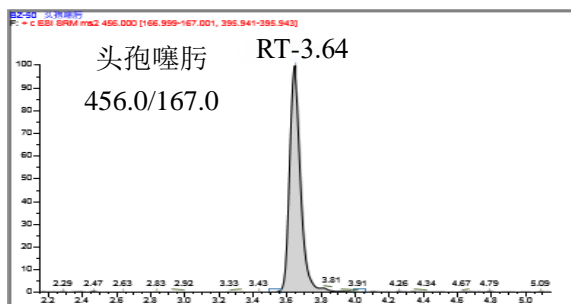
(资料性)

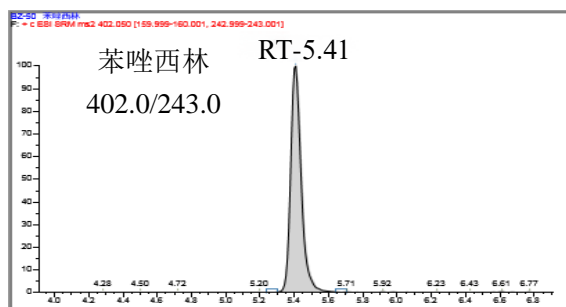
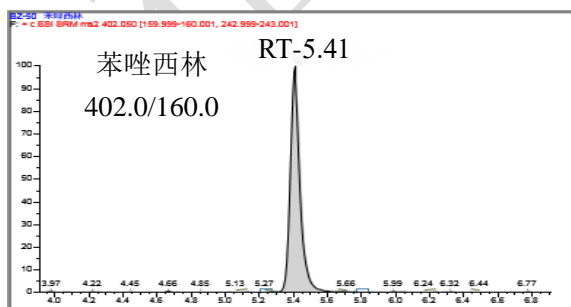
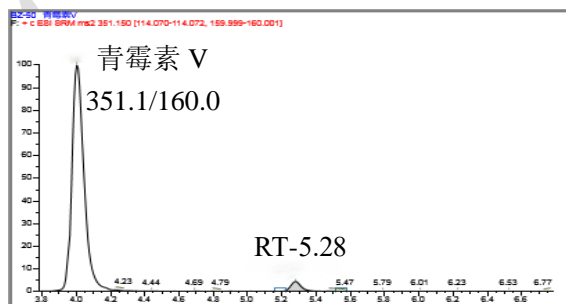
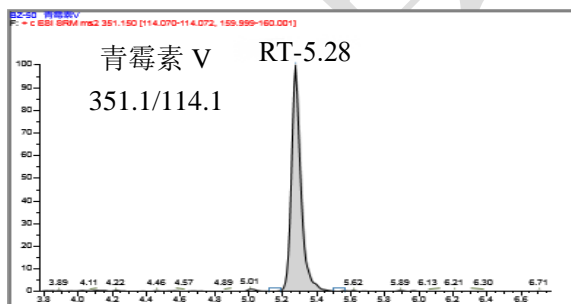
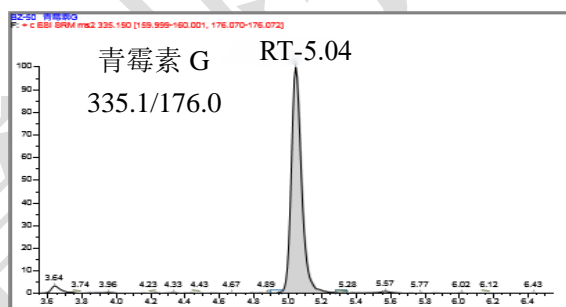
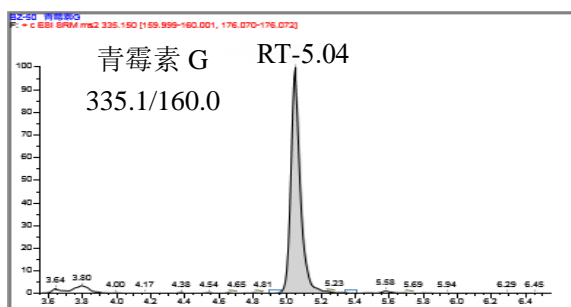
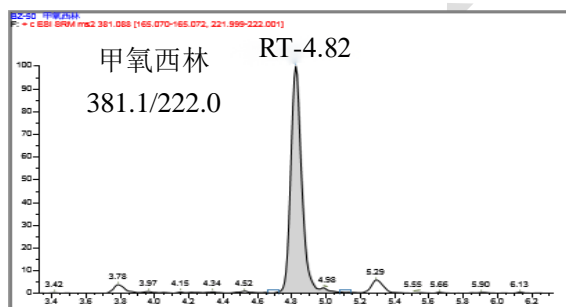
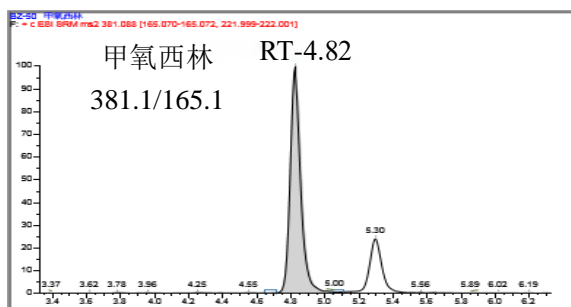
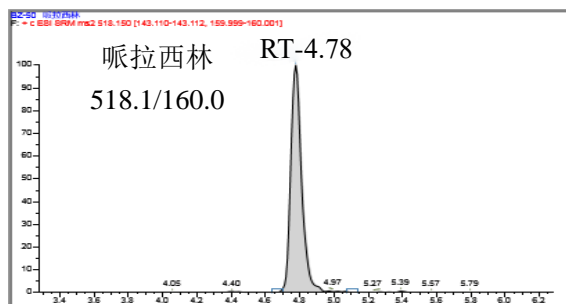
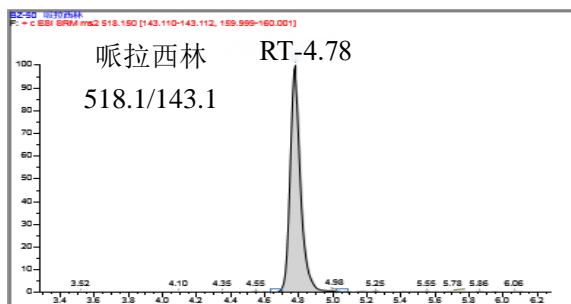
牛奶基质匹配标准溶液中 23 种药物特征离子质量色谱图

牛奶基质匹配标准溶液中 23 种药物 (50 ng/mL) 特征离子质量色谱图见图 C.1。









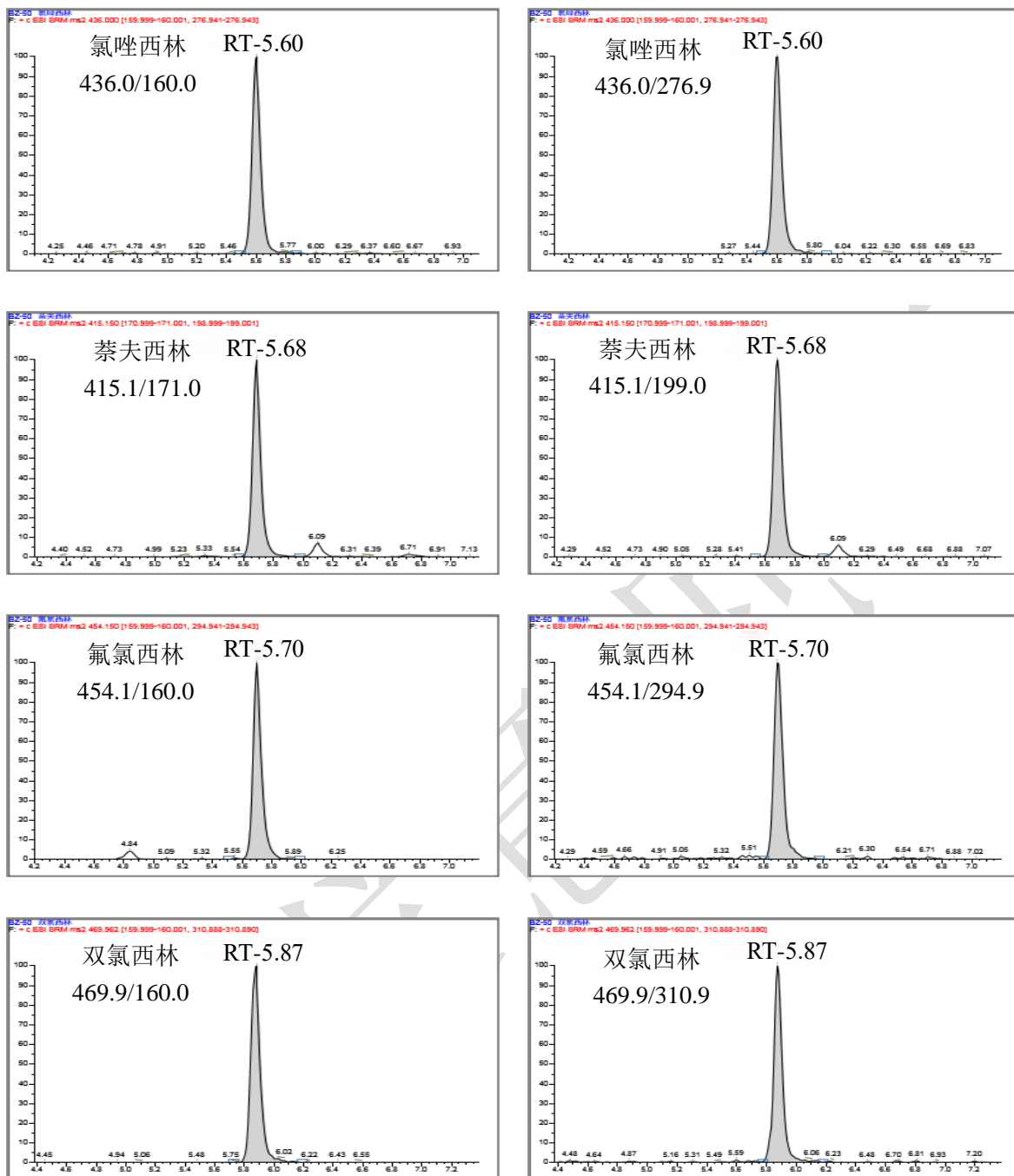


图 C.1 牛奶基质匹配标准溶液中 23 种药物 (50 ng/mL) 特征离子质量色谱图