

中华人民共和国国家标准

GBxxxx—xxxx

食品安全国家标准 禽蛋中 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 -lactams 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 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

本标准规定了禽蛋中青霉素V、青霉素G、氨苄西林、氯唑西林、阿莫西林、头孢氨苄、头孢唑肟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、鹌鹑蛋中青霉素V、青霉素G、氨苄西林、氯唑西林、阿莫西林、头孢氨苄、头孢唑肟残留量的检测。

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

试样中残留的青霉素V、青霉素G、氨苄西林、氯唑西林、阿莫西林、头孢氨苄、头孢唑肟，经80%乙腈水溶液提取，固相萃取柱净化浓缩，液相色谱-串联质谱测定，基质匹配标准溶液内标法定量。

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（CH₃CN）：色谱纯。

4.1.2 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

4.1.3 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

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 80%乙腈水溶液：取乙腈80 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。

4.3 标准品

青霉素 V、青霉素 G、氨苄西林、氯唑西林、阿莫西林、头孢氨苄、头孢唑肟、青霉素 V-D₅、青霉素-D₇、氨苄西林-D₅、氯唑西林-¹³C₄、阿莫西林-D₄、头孢氨苄-D₅、头孢唑肟-D₇ 标准品，含量均≥95%，参见附录 A。

4.4 标准溶液制备

4.4.1 标准储备液：取青霉素 V、青霉素 G、氨苄西林、氯唑西林、阿莫西林、头孢氨苄、头孢唑肟各 10 mg 的标准品，精密称定，分别于 100 mL 容量瓶中，加 50%乙腈水溶解并定容，配制成浓度为 100 μg/mL 的标准储备液，2~8℃保存，有效期 1 个月。

4.4.2 内标储备液：取青霉素 V-D₅、青霉素-D₇、氨苄西林-D₅、氯唑西林-¹³C₄、阿莫西林-D₄、头孢氨苄-D₅、头孢唑肟-D₇ 各 10 mg 的标准品，精密称定，分别于 100 mL 容量瓶中，加 50%乙腈水溶解并定容，配制成浓度为 100 μg/mL 的内标储备液，2~8℃保存，有效期 1 个月。

4.4.3 混合标准工作液：精密量取 100 μg/mL 的青霉素 V、青霉素 G、氨苄西林、氯唑西林、阿莫西林、头孢氨苄、头孢唑肟标准储备液各 0.1 mL，于 100 mL 容量瓶中，用 50%乙腈水稀释并定容，配制成浓度为 100 μg/L 的混合标准工作液，临用现配。

4.4.4 混合内标工作液：精密量取 100 μg/mL 的青霉素 V-D₅、青霉素-D₇、氨苄西林-D₅、氯唑西林-¹³C₄、阿莫西林-D₄、头孢氨苄-D₅、头孢唑肟-D₇ 内标储备液各 0.1 mL，于 100 mL 容量瓶中，用 50%乙腈水稀释并定容，配制成浓度为 100 μg/L 的混合内标工作液，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：配电喷雾电离源。

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，添加混合内标工作液100 μL，加80%乙腈水溶液6.0 mL，涡旋混匀1 min，中速振荡提取5 min，4℃ 10000 r/min离心10 min，取上清液备用。

7.2 净化

将固相萃取柱安装到预先清洁过的真空萃取装置上，直接取上清液3.0 mL通过小柱，保持自然流速，收集全部流出液。40℃水浴氮吹至近干，加入水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 基质匹配标准曲线的制备

精密量取混合标准工作液和混合内标工作液适量，用水稀释配制成青霉素 V、青霉素 G、氨苄西林、氯唑西林、阿莫西林、头孢氨苄、头孢唑肟浓度为 1 μg/L、2 μg/L、5 μg/L、10 μg/L、20 μg/L、50 μg/L，内标浓度为 5 μg/L 的系列标准工作溶液，从中各取 1.0 mL 分别加入到 6 份经“7.1”提取和“7.2”净化的空白试料浓缩液中，充分溶解混匀为基质匹配标准工作溶液，临用现配，微孔滤膜过滤，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 色谱柱(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	5	95
5.0	80	20
8.0	80	20
8.1	5	95
10.0	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: 400 °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 β -内酰胺类药物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
青霉素 V	351.0>160.0	351.0>160.0	60	22
	351.0>114.0			47
青霉素 G	334.9>160.0	334.9>160.0	60	22
	334.9>176.0			22
氨苄西林	350.0>106.0	350.0>106.0	55	36
	350.0>160.0			25
氯唑西林	436.0>160.0	436.0>160.0	60	25
	436.0>277.0			23
阿莫西林	366.0>114.0	366.0>114.0	45	30
	366.0>208.0			19
头孢氨苄	347.9>158.0	347.9>158.0	40	18
	347.9>174.0			23
头孢唑肟	529.0>134.0	529.0>134.0	44	22
	529.0>396.0			19
青霉素 V-D ₅	356.0>160.0	356.0>160.0	60	22
青霉素-D ₇	342.0>160.0	342.0>160.0	60	22

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
氨苄西林-D ₅	355.0>111.1	355.0>111.1	40	35
阿莫西林-D ₄	370.0>114.0	370.0>114.0	45	30
氯唑西林- ¹³ C ₄	440.0>160.0	440.0>160.0	60	25
头孢氨苄-D ₅	353.0>158.0	353.0>158.0	40	18
头孢唑肟-D ₇	536.0>141.0	536.0>141.0	44	47

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。

7种β-内酰胺类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B。

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，取试样溶液和基质匹配标准溶液，作单点或多点校准，按内标法以峰面积比计算，试样溶液及基质匹配标准溶液中的7种β-内酰胺类药物的峰面积与其相应内标的峰面积比应在仪器检测的线性范围之内。7种β-内酰胺类药物的多反应监测特征离子质量色谱图见附录B。

7.5 空白试验

取空白试料，除不加药物外，采用完全相同的测定步骤进行平行测定。

8 结果计算和表述

试料中待测物的残留量按式（1）计算：

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

式中:

X — 试料中 β -内酰胺类药物的残留量, 单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

C_{is} — 试样溶液中 β -内酰胺类药物内标的浓度, 单位为微克每升 ($\mu\text{g}/\text{L}$);

C_s — 标准溶液中 β -内酰胺类药物的浓度, 单位为微克每升 ($\mu\text{g}/\text{L}$);

C'_{is} — 标准溶液中 β -内酰胺类药物内标的浓度, 单位为微克每升 ($\mu\text{g}/\text{L}$);

A_i — 试样溶液中 β -内酰胺类药物的峰面积;

A_{is} — 试样溶液中 β -内酰胺类药物内标的峰面积;

A_s — 标准溶液中 β -内酰胺类药物的峰面积;

A'_{is} — 标准溶液中 β -内酰胺类药物内标的峰面积;

V — 溶解残余物所用试样溶液体积, 单位为毫升 (mL);

V_1 — 用于净化过柱的提取液体积, 单位为毫升 (mL);

V_2 — 提取液体积, 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

青霉素V、青霉素G、氨苄西林、氯唑西林、阿莫西林、头孢氨苄、头孢唑肟的检出限为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 准确度

青霉素V、青霉素G、氨苄西林、氯唑西林、阿莫西林、头孢氨苄、头孢唑肟在 $2 \sim 20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $70\% \sim 120\%$ 。

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 $\leq 20\%$ 。

附 录A
(资料性附录)

药物中英文名称、化学分子式和CAS号

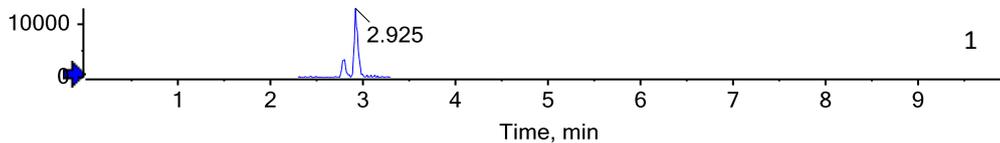
表 A. 1 药物中英文名称、化学分子式和 CAS 号

中文名称	英文名称	化学分子式	CAS 号
青霉素 V 钾	Penicillin V Potassium Salt	$C_{16}H_{17}N_2O_5SK$	132-98-9
青霉素 G 钠	Penicillin G Sodium Salt	$C_{16}H_{17}N_2NaO_4S$	69-57-8
氨苄西林三水合物	Ampicillin trihydrate	$C_{16}H_{19}N_3O_4S \cdot 3H_2O$	7177-48-2
氯唑西林钠一水合物	Cloxacillin sodium salt hydrate	$C_{19}H_{17}ClN_3O_5SNa \cdot H_2O$	7081-44-9
阿莫西林三水合物	Amoxicillin trihydrate	$C_{16}H_{19}N_3O_5S \cdot 3H_2O$	61336-70-7
头孢氨苄一水合物	Cefalexin monohydrate	$C_{16}H_{17}N_3O_4S \cdot H_2O$	23325-78-2
硫酸头孢喹肟	Cefquinome sulfate	$C_{23}H_{25}N_6O_5S_2 \cdot HSO_4$	118443-89-3
青霉素 V-D ₅	Penicillin V-D ₅	$C_{16}H_{13}D_5N_2O_5S$	1356837-87-0
青霉素-D ₇ N-乙基哌啶鎓盐	Benzylpenicilline-D ₇ N-ethylpiperidinium salt	$C_{16}H_{10}D_7N_2O_4S \times C_7H_{16}N$	1217445-37-8
氨苄西林-D ₅	Ampicillin-D ₅	$C_{16}H_{14}D_5N_3O_4S$	1426173-65-0
氯唑西林- ¹³ C ₄ 钠盐	Cloxacillin- ¹³ C ₄ sodium salt	$C_{15}^{13}C_4H_{17}ClN_3NaO_5S$	642-78-4
阿莫西林-D ₄	Amoxicillin-D ₄	$C_{16}H_{15}N_3O_5SD_4$	26787-78-0
头孢氨苄-D ₅ 一水合物	Cefalexin-D ₅ hydrate	$C_{16}H_{14}D_5N_3O_5S$	1217541-99-5
头孢喹肟-D ₇ 氢碘化物	Cefquinome-D ₇ hydroiodide	$C_{23}H_{18}D_7IN_6O_5S_2$	118443-88-2

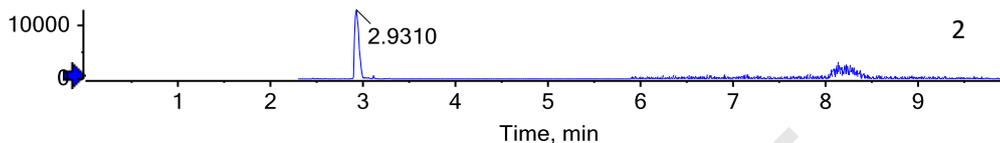
附录B
(资料性附录)

β -内酰胺类药物特征离子质量色谱图

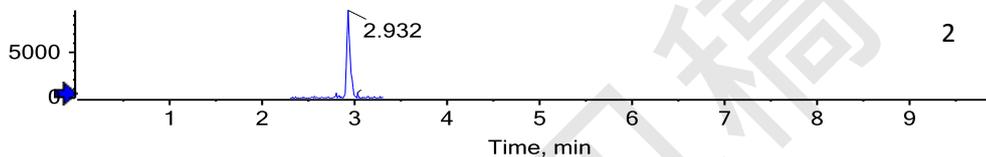
XIC from 20210120.wiff (sample 15) - S1ppb, +MRM (24 transitions): Cefquinome IS (536.0 / 141.0)



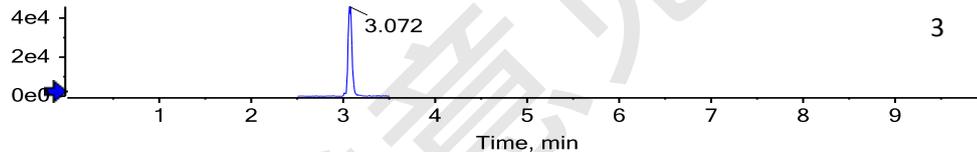
XIC from 20210120.wiff (sample 15) - S1ppb, +MRM (24 transitions): Cefquinome 1 (529.0 / 134.0)



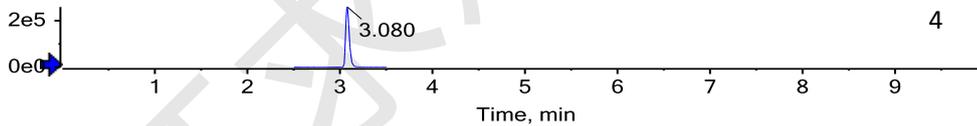
XIC from 20210120.wiff (sample 15) - S1ppb, +MRM (24 transitions): Cefquinome 2 (529.0 / 396.0)



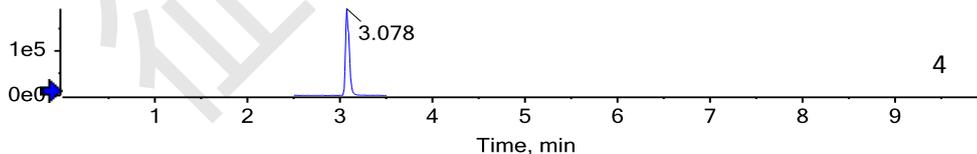
XIC from 20210120.wiff (sample 15) - S1ppb, +MRM (24 transitions): Cefalexin IS (353.0 / 158.0)



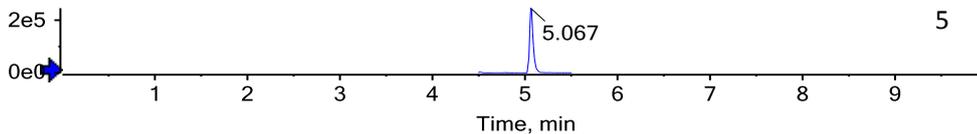
XIC from 20210120.wiff (sample 15) - S1ppb, +MRM (24 transitions): Cefalexin 1 (347.9 / 158.0)



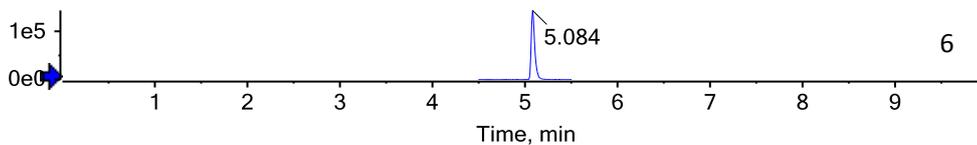
XIC from 20210120.wiff (sample 15) - S1ppb, +MRM (24 transitions): Cefalexin 2 (347.9 / 174.0)



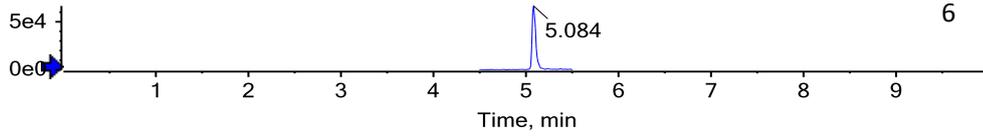
XIC from 20210120.wiff (sample 15) - S1ppb, +MRM (24 transitions): PenicillinV IS (356.0 / 160.0)



XIC from 20210120.wiff (sample 15) - S1ppb, +MRM (24 transitions): PenicillinV 1 (351.0 / 160.0)

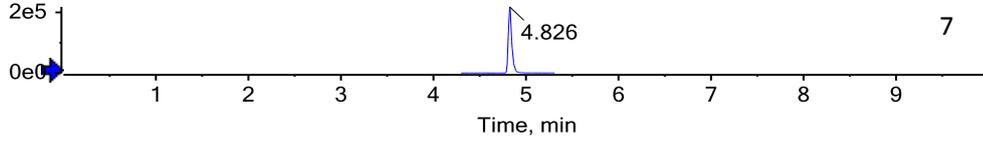


XIC from 20210120.wiff (sample 15) - S1ppb, +MRM (24 transitions): PenicillinV 2 (351.0 / 114.0)



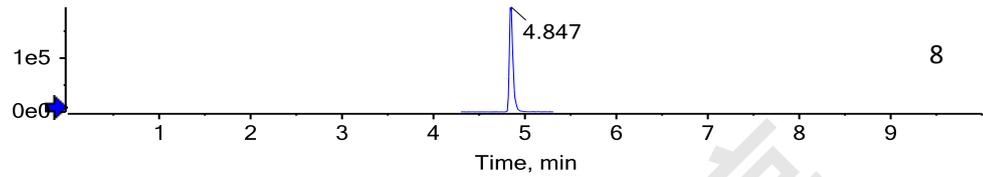
6

XIC from 20210120.wiff (sample 15) - S1ppb, +MRM (24 transitions): PenicillinG IS (342.0 / 160.0)



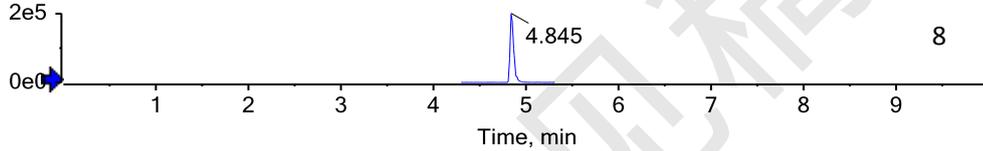
7

XIC from 20210120.wiff (sample 15) - S1ppb, +MRM (24 transitions): PenicillinG 1 (334.9 / 160.0)



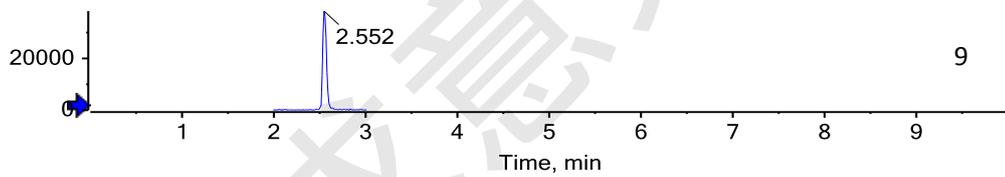
8

XIC from 20210120.wiff (sample 15) - S1ppb, +MRM (24 transitions): PenicillinG 2 (334.9 / 176.0)



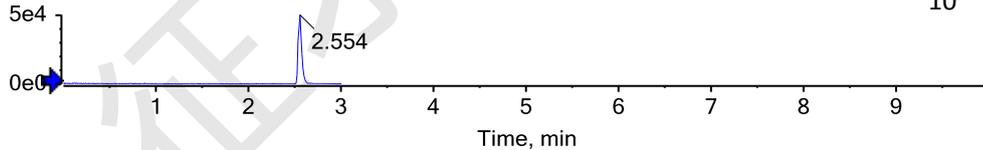
8

XIC from 20210120.wiff (sample 15) - S1ppb, +MRM (24 transitions): Amoxicillin IS (370.0 / 114.0)



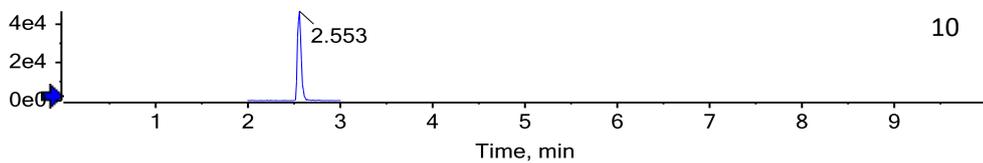
9

XIC from 20210120.wiff (sample 15) - S1ppb, +MRM (24 transitions): Amoxicillin 1 (366.0 / 114.0)



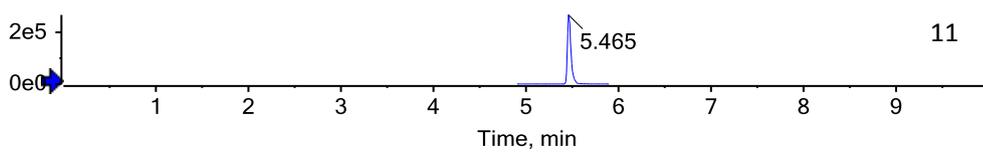
10

XIC from 20210120.wiff (sample 15) - S1ppb, +MRM (24 transitions): Amoxicillin 2 (366.0 / 208.0)



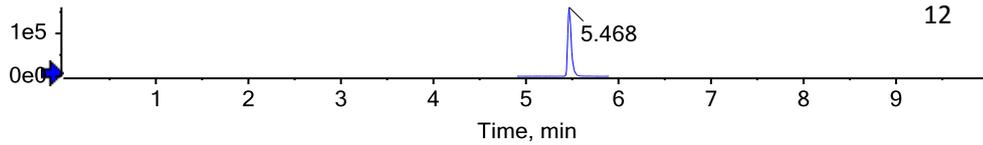
10

XIC from 20210120.wiff (sample 15) - S1ppb, +MRM (24 transitions): Cloxacillin IS (440.0 / 160.0)

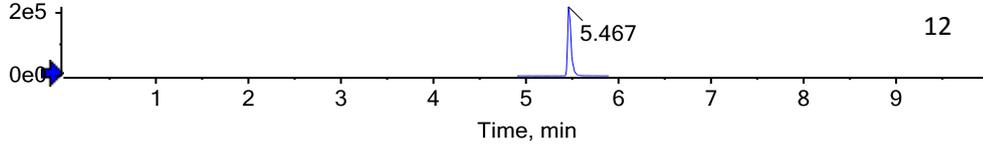


11

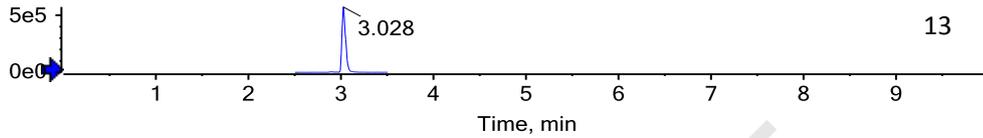
XIC from 20210120.wiff (sample 15) - S1ppb, +MRM (24 transitions): Cloxacillin 1 (436.0 / 160.0)



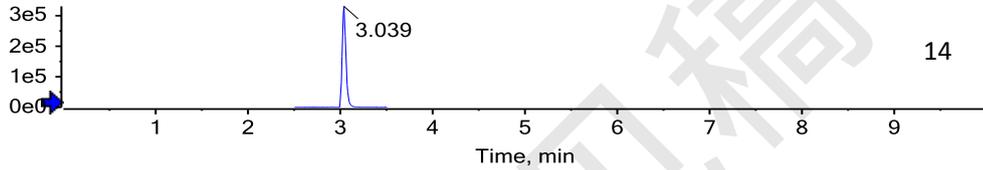
XIC from 20210120.wiff (sample 15) - S1ppb, +MRM (24 transitions): Cloxacillin 2 (436.0 / 277.0)



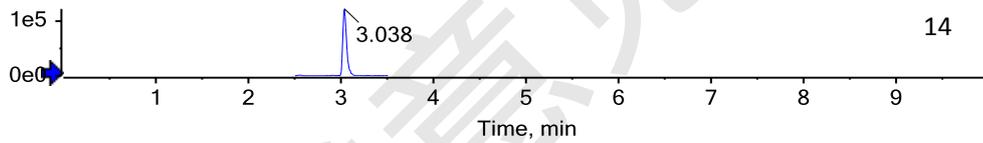
XIC from 20210120.wiff (sample 15) - S1ppb, +MRM (24 transitions): Ampicillin IS (355.0 / 111.1)



XIC from 20210120.wiff (sample 15) - S1ppb, +MRM (24 transitions): Ampicillin 1 (350.0 / 106.0)



XIC from 20210120.wiff (sample 15) - S1ppb, +MRM (24 transitions): Ampicillin 2 (350.0 / 160.0)



图B 标准溶液中 β -内酰胺类药物及内标特征离子质量色谱图(1 $\mu\text{g/L}$)

- 1--头孢唑肟-D₇; 2--头孢唑肟; 3--头孢氨苄-D₅; 4--头孢氨苄; 5--青霉素V-D₅;
6--青霉素V; 7--青霉素-D₇; 8--青霉素G; 9--阿莫西林-D₄; 10--阿莫西林;
11--氯唑西林-¹³C₄; 12--氯唑西林; 13--氨苄西林-D₅; 14--氨苄西林。