



中华人民共和国国家标准

GB/T 20755—2006

畜禽肉中九种青霉素类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Method for the determination of nine penicillins residues in
livestork and poultry muscles—
LC-MS-MS method

2006-12-31 发布

2007-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局提出。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局归口。

本标准起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：庞国芳、李学民、张进杰、曹彦忠、刘晓茂、范春林、刘永明、赵为。

本标准系首次发布的国家标准。

畜禽肉中九种青霉素类药物残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛、羊、猪和鸡肉中九种青霉素类药物残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛、羊、猪和鸡肉中九种青霉素类药物残留量的测定。

本标准的方法检出限：羧苄西林为 0.25 $\mu\text{g/kg}$ ，青霉素 G 为 0.5 $\mu\text{g/kg}$ ，哌拉西林、青霉素 V、苯唑西林为 1.0 $\mu\text{g/kg}$ ，阿莫西林、氨苄西林、氯唑西林、双氯西林为 2.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6379.1 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度） 第 1 部分：总则与定义（GB/T 6379.1—2004，ISO 5725-1:1994，IDT）

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度） 第 2 部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法（GB/T 6379.2—2004，ISO 5725-2:1994，IDT）

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法（GB/T 6682—1992，neq ISO 3696:1987）

3 原理

试样中青霉素类药物残留，用 0.15 mol/L 磷酸二氢钠（pH=8.5）缓冲溶液提取，经离心，上清液用固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为优级纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇：色谱纯。

4.2 乙腈：色谱纯。

4.3 磷酸二氢钠（ NaH_2PO_4 ）。

4.4 氢氧化钠。

4.5 乙酸。

4.6 乙腈+水（1+1）：量取 50 mL 乙腈（4.2）与 50 mL 水混合。

4.7 氢氧化钠溶液：5 mol/L。称取 20 g 氢氧化钠（4.4），用水溶解，定容至 100 mL。

4.8 磷酸二氢钠缓冲溶液：0.15 mol/L。称取 18.0 g 磷酸二氢钠（4.3），用水溶解，定容至 1 000 mL，然后用氢氧化钠溶液（4.7）调节至 pH=8.5。

4.9 阿莫西林、氨苄西林、哌拉西林、青霉素 G、青霉素 V、苯唑西林、氯唑西林、羧苄西林、双氯西林九种青霉素标准物质：纯度 $\geq 99\%$ 。

4.10 九种青霉素标准储备溶液：准确称取适量的每种标准物质（4.9），分别用水配制成浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备溶液。储备液贮存在 -18°C 冰柜中。

4.11 九种青霉素标准工作溶液：根据需要吸取适量的每种青霉素标准储备溶液（4.10），用空白样品提

取液稀释成适当浓度的基质混合标准工作溶液。

4.12 BUND ELUT C₁₈固相萃取柱或相当者:500 mg,6 mL。使用前分别用5 mL 甲醇(4.1)、5 mL 水和10 mL 磷酸二氢钠缓冲溶液(4.8)预处理,保持柱体湿润。

4.13 0.2 μm 滤膜。

5 仪器

5.1 液相色谱-串联四极杆质谱仪,配有电喷雾离子源。

5.2 分析天平:感量0.1 mg和0.01 g。

5.3 振荡器。

5.4 固相萃取真空装置。

5.5 贮液器:50 mL。

5.6 微量注射器:25 μL,100 μL。

5.7 刻度样品管:5 mL,精度为0.1 mL。

5.8 离心机:带有50 mL 具塞离心管。

5.9 pH 计:测量精度0.02 pH 单位。

6 测定步骤

6.1 试样溶液的制备

称取3 g 试样(精确到0.01 g)置于离心机(5.8)中,加入25 mL 磷酸二氢钠缓冲溶液(4.8),于振荡器上振荡10 min,然后,以4 000 r/min 离心10 min,把上层提取液移至下接BUND ELUT C₁₈固相萃取柱(4.12)的贮液器中,以3 mL/min 的流速通过固相萃取柱后,用2 mL 水洗柱,弃去全部流出液。用3 mL 乙腈+水(4.6)洗脱,收集洗脱液于刻度样品管(5.7)中,用乙腈+水定容至3 mL,摇匀后,过0.2 μm 滤膜(4.13),供液相色谱-串联质谱仪测定。按照上述操作步骤制备空白样品提取液。

6.2 测定

6.2.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱:SunFire™ C₁₈,3.5 μm,150 mm×2.1 mm (内径)或相当者;
- b) 流动相梯度程序及流速见表1;
- c) 柱温:30℃;
- d) 进样量:20 μL。

表1 流动相梯度程序及流速

时间/ min	流速/ (μL/min)	水(含0.3%乙酸)/ (%)	乙腈(含0.3%乙酸)/ (%)
0.00	200	95.0	5.0
3.00	200	95.0	5.0
3.01	200	50.0	50.0
13.00	200	50.0	50.0
13.01	200	25.0	75.0
18.00	200	25.0	75.0
18.01	200	95.0	5.0
25.00	200	95.0	5.0

6.2.2 质谱条件

- 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;
- d) 电喷雾电压:5 500 V;
- e) 雾化气压力:0.055 MPa;
- f) 气帘气压力:0.079 MPa;
- g) 辅助气流速:6 L/min;
- h) 离子源温度:400℃;
- i) 定性离子对、定量离子对和去簇电压(DP)、聚焦电压(FP)、碰撞气能量(CE)及碰撞室出口电压(CXP)见表2。

表2 九种青霉素的定性离子对、定量离子对、去簇电压、聚焦电压、碰撞气能量和碰撞室出口电压

名 称	定性 离子对 (<i>m/z</i>)	定量 离子对 (<i>m/z</i>)	碰撞气 能量/ V	去簇 电压/ V	聚焦 电压/ V	碰撞室 出口电压/ V
阿莫西林 amoxicillin	366/114 366/208	366/208	30 19	21	90	10
氨苄西林 ampicillin	350/192 350/160	350/160	23 20	20	90	10
哌嗪西林 piperacillin	518/160 518/143	518/143	35 35	27 25	90	10
青霉素 G penicillin G	335/160 335/176	335/160	20 20	23	90	10
青霉素 V penicillin V	351/160 351/192	351/160	20 15	40	90	10
苯唑西林 oxacillin	402/160 402/243	402/160	20 20	23	90	10
氯唑西林 cloxacillin	436/160 436/277	436/160	21 22	20	90	10
萘夫西林 nafcillin	415/199 415/171	415/199	23 52	23	90	10
双氯西林 dicloxacillin	470/160 470/311	470/160	20 22	20	90	10

6.2.3 液相色谱-串联质谱测定

6.2.3.1 定性测定

选择每种待测物质的一个母离子,二个以上子离子,在相同试验条件下,样品中待测物质的保留时间与基质标准溶液中对对应物质的保留时间偏差在±2.5%之内;样品色谱图中各定性离子相对丰度与浓度接近的基质标准溶液的色谱图中离子相对丰度相比,若偏差不超过表3规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 3 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
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

6.2.3.2 定量测定

用九种青霉素标准储备溶液配成的基质混合标准溶液(4.11)分别进样,以标准工作溶液浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线。用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中九种青霉素的响应值均应在仪器测定的线性范围内。在上述色谱条件下,九种青霉素标准物质的总离子流图参见图 A.1。九种青霉素的保留时间见表 4。

表 4 九种青霉素的参考保留时间

青霉素名称	保留时间/min
阿莫西林	2.50
氨苄西林	9.82
哌拉西林	11.79
青霉素 G	12.71
青霉素 V	13.48
苯唑西林	14.18
氯唑西林	15.22
羧夫西林	15.45
双氯西林	17.30

本方法的添加回收率数据参见表 B.1。

6.3 平行试验

按上述步骤,对同一试样进行平行试验测定。

6.4 空白试验

除不称取试样外,均按上述分析步骤进行。

7 结果计算

试样中青霉素残留量利用数据处理系统计算或按式(1)计算:

$$X = c \times \frac{V}{m} \times \frac{1\,000}{1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X ——试样中被测组分残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

c ——从标准工作曲线得到的试样溶液中被测组分的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——试样溶液定容体积,单位为毫升(mL);

m ——最终试样溶液所代表的试样质量,单位为克(g)。

注:计算结果需将空白值扣除。

8 精密度

本标准的精密度数据是按照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 规定确定的,其重复性和再现性的值以 95%的可信度来计算。

8.1 重复性

在重复性试验条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 r ,试样中九种青霉素

含量范围及重复性方程见表 5。

表 5 九种青霉素含量范围及重复性和再现性方程

青霉素名称	含量范围/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	重复性限 r	再现性限 R
阿莫西林	2.0~20	$\lg r = 0.924\ 8 \lg m - 1.307\ 3$	$\lg R = 0.988\ 1 \lg m - 0.946\ 1$
氨苄西林	2.0~20	$\lg r = 0.951\ 1 \lg m - 1.383\ 1$	$\lg R = 0.985\ 7 \lg m - 0.946\ 4$
哌拉西林	1~10	$r = 0.018\ 2m + 0.036\ 2$	$\lg R = 0.993\ 0 \lg m - 0.961\ 6$
青霉素 G	0.5~5	$\lg r = 0.325\ 2 \lg m - 1.326\ 0$	$\lg R = 0.968\ 3 \lg m - 0.952\ 7$
青霉素 V	1~10	$\lg r = 1.496\ 3 \lg m - 1.751\ 3$	$\lg R = 1.020\ 1 \lg m - 0.975\ 4$
苯唑西林	1~10	$\lg r = 0.871\ 9 \lg m - 1.432\ 3$	$\lg R = 0.992\ 1 \lg m - 0.961\ 6$
氯唑西林	2~20	$\lg r = 0.831\ 3 \lg m - 1.331\ 7$	$\lg R = 0.997\ 3 \lg m - 0.958\ 2$
羧夫西林	0.25~2.5	$\lg r = 0.998\ 0 \lg m - 1.492\ 7$	$R = 0.108\ 1m + 0.000\ 4$
双氯西林	2~20	$\lg r = 1.280\ 0 \lg m - 1.679\ 1$	$\lg R = 1.034\ 3 \lg m - 0.982\ 3$

注： m 为两次测定结果的算术平均值。

如果两次测定值的差值超过重复性限 r ，应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

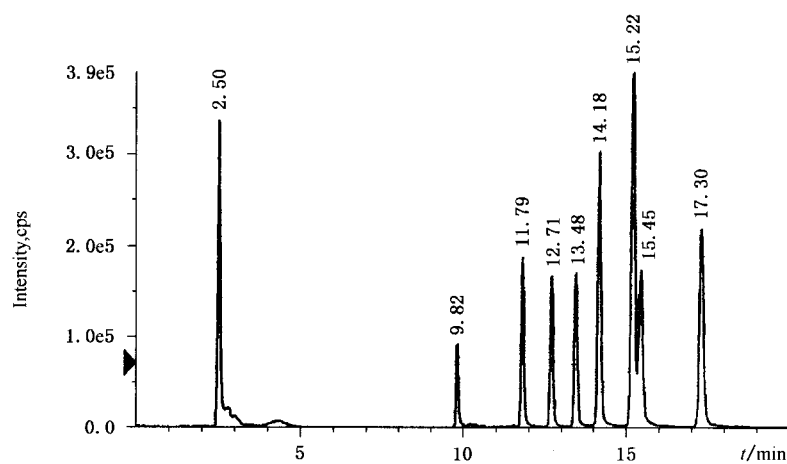
8.2 再现性

在再现性试验条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R ，试样中九种青霉素含量范围及重复性方程见表 5。

附 录 A
(资料性附录)

九种青霉素标准物质的总离子流图

九种青霉素标准物质的总离子流图,见图 A.1。



- 1——阿莫西林, 2.50 min;
- 2——氨苄西林, 9.82 min;
- 3——哌拉西林, 11.79 min;
- 4——青霉素 G, 12.71 min;
- 5——青霉素 V, 13.48 min;
- 6——苯唑西林, 14.18 min;
- 7——氯唑西林, 15.22 min;
- 8——萘夫西林, 15.45 min;
- 9——双氯西林, 17.30 min。

图 A.1 九种青霉素标准物质的总离子流图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

九种青霉素添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 九种青霉素添加浓度及其平均回收率的试验数据

青霉素名称	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/(%)
阿莫西林	2.0	73.1
	4.0	75.6
	8.0	73.6
	20.0	78.6
氨苄西林	2.0	82.6
	4.0	85.7
	8.0	89.7
	20.0	97.2
哌拉西林	1.0	81.7
	2.0	90.9
	4.0	98.2
	10.0	95.7
青霉素 G	0.5	85.9
	1.0	92.5
	2.0	103.4
	5.0	89.8
青霉素 V	1.0	86.4
	2.0	89.6
	4.0	96.5
	10.0	93.4
羧夫西林	0.25	82.5
	0.5	105.6
	1.0	95.9
	2.5	94.3
苯唑西林	1.0	90.7
	2.0	97.3
	4.0	85.6
	10.0	90.5
氯唑西林	2.0	89.2
	4.0	84.7
	8.0	97.2
	20.0	87.6
双氯西林	2.0	87.3
	4.0	91.7
	8.0	82.4
	20.0	97.1