



中华人民共和国国家标准

GB/T 21315—2007

动物源性食品中青霉素族抗生素残留量 检测方法 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of penicillins residues in foodstuffs of animal origin—
LC-MS/MS method

2007-10-29 发布

2008-04-01 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、附录 B、附录 C 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：林维宣、唐英章、李一尘、赵彤彤、彭涛、田苗、于灵、李军、孙兴权。

本标准为首次发布。

动物源性食品中青霉素族抗生素残留量 检测方法 液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了动物源性食品中青霉素族抗生素残留量液相色谱-质谱/质谱测定和确证方法。

本标准适用于猪肌肉、猪肝脏、猪肾脏、牛奶和鸡蛋中羟氨苄青霉素(amoxicyllin)、氨苄青霉素(ampicillin)、邻氯青霉素(cloxacillin)、双氯青霉素(dicloxacillin)、乙氧萘胺青霉素(nafcillin)、苯唑青霉素(oxacillin)、苄青霉素(gpenicillin)、苯氧甲基青霉素(penicillin)、苯咪青霉素(azlocillin)、甲氧苯青霉素(methicillin)、苯氧乙基青霉素(phenethicillin)等11种青霉素族抗生素残留量的检测。

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

3 原理

样品中青霉素族抗生素残留物用乙腈-水溶液提取,提取液经浓缩后,用缓冲溶液溶解,固相萃取小柱净化,洗脱液经氮气吹干后,用液相色谱-质谱/质谱测定,外标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外,所用试剂均为分析纯,水为GB/T 6682—1992规定的一级水。

4.1 乙腈:高效液相色谱级。

4.2 甲醇:高效液相色谱级。

4.3 甲酸:高效液相色谱级。

4.4 氯化钠。

4.5 氢氧化钠。

4.6 磷酸二氢钾。

4.7 磷酸氢二钾。

4.8 0.1 mol/L 氢氧化钠:称取4 g 氢氧化钠,并用水稀释至1 000 mL。

4.9 乙腈+水(15+2,体积比)。

4.10 乙腈+水(30+70,体积比)。

4.11 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH=8.5):称取8.7 g 磷酸氢二钾,超纯水溶解,稀释至1 000 mL,用磷酸二氢钾调节pH至8.5±0.1。

4.12 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH=7.0):称取3.4 g 磷酸二氢钾,超纯水溶解,稀释至1 000 mL,用氢氧化钠调节pH至7.0±0.1。

4.13 0.01 mol/L 乙酸铵溶液(pH=4.5):称取0.77 g 乙酸铵,超纯水溶解,稀释至1 000 mL,用甲酸调节pH至4.5±0.1。

4.14 11种青霉素族抗生素标准品:羟氨苄青霉素、氨苄青霉素、邻氯青霉素、双氯青霉素、乙氧萘胺青

霉素、苯唑青霉素、苄青霉素、苯氧甲基青霉素、苯唑青霉素、甲氧苯青霉素、苯氧乙基青霉素,纯度均大于等于95%。

4.15 11种青霉素族抗生素标准储备溶液:分别称取适量标准品(4.14),分别用乙腈水溶液(4.10)溶解并定容至100 mL,各种青霉素族抗生素浓度为100 $\mu\text{g/mL}$,置于一18 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存,保存期5 d。

4.16 11种青霉素族抗生素混合标准中间溶液:分别吸取适量的标准储备液(4.15)于100 mL容量瓶中,用磷酸盐缓冲溶液(4.12)定容至刻度,配成混合标准中间溶液:各种青霉素族抗生素浓度为:羟苄青霉素500 ng/mL,氨苄青霉素200 ng/mL,苯唑青霉素100 ng/mL,甲氧苄青霉素10 ng/mL,苄青霉素100 ng/mL,苯氧甲基青霉素50 ng/mL,苯唑青霉素200 ng/mL,苯氧乙基青霉素1 000 ng/mL,邻氯青霉素100 ng/mL,乙氧萘青霉素200 ng/mL,双氯青霉素1 000 ng/mL。置于一4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存,保存期5 d。

4.17 混合标准工作溶液:准确移取标准中间溶液(4.16)适量,用空白样品基质配制不同浓度系列的混合标准工作溶液(用时现配)。

4.18 Oasis HLB固相萃取小柱,或相当者:500 mg,6 mL。使用前用甲醇和水预处理,即先用2 mL甲醇淋洗小柱,然后用1 mL水淋洗小柱。

5 仪器

5.1 液相色谱-质谱/质谱仪:配有电喷雾离子源。

5.2 旋转蒸发器。

5.3 固相萃取装置。

5.4 离心机。

5.5 均质器。

5.6 旋涡混合器。

5.7 pH计。

5.8 氮吹仪。

6 试样制备与保存

取代表性样品,用组织捣碎机充分捣碎,装入洁净容器中,密封,并标明标记,于一18 $^{\circ}\text{C}$ 以下冷冻存放。

7 检测步骤

7.1 提取

7.1.1 肝脏、肾脏、肌肉组织、鸡蛋样品

称取约5 g试样(精确到0.01 g)于50 mL离心管中,加入15 mL乙腈水溶液(4.9),均质30 s,4 000 r/min离心5 min,上清液转移至50 mL离心管中;另取一离心管,加入10 mL乙腈水溶液(4.9),洗涤均质器刀头,用玻棒捣碎离心管中的沉淀,加入上述洗涤均质器刀头溶液,在旋涡混合器上振荡1 min,4 000 r/min离心5 min,上清液合并至50 mL离心管中,重复用10 mL乙腈水溶液(4.9)洗涤刀头并提取一次,上清液合并至50 mL离心管中,用乙腈水溶液(4.9)定容至40 mL。准确移取20 mL入100 mL鸡心瓶。

7.1.2 牛奶样品

称取10 g样品(精确到0.01 g)于50 mL离心管中,加入20 mL乙腈(4.9),均质提取30 s,4 000 r/min离心5 min,上清液转移至50 mL离心管中;另取一离心管,加入10 mL乙腈水溶液(4.9),洗涤均质器刀头,用玻棒捣碎离心管中的沉淀,加入上述洗涤均质器刀头溶液,在旋涡混合器上振荡1 min,4 000 r/min离心5 min,上清液合并至50 mL离心管中,重复用10 mL乙腈水溶液(4.9)洗涤刀

头并提取一次,上清液合并至 50 mL 离心管中,用乙腈水溶液(4.9)定容至 50 mL。准确移取 25 mL 入 100 mL 鸡心瓶。

将鸡心瓶于旋转蒸发器上(37 ℃水浴)蒸发除去乙腈(易起沫样品可加入 4 mL 饱和氯化钠溶液)。

7.2 净化

立即向已除去乙腈的鸡心瓶中加入 25 mL 磷酸盐缓冲溶液(4.11),涡旋混匀 1 min,用 0.1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 为 8.5,以 1 mL/min 的速度通过经过预处理的固相萃取柱,先用 2 mL 磷酸盐缓冲溶液(4.11)淋洗 2 次,再用 1 mL 超纯水淋洗,然后用 3 mL 乙腈洗脱(速度控制在 1 mL/min)。将洗脱液于 45 ℃下氮气吹干,用 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(4.12)定容至 1 mL,过 0.45 μm 滤膜后,立即用液相色谱-质谱/质谱仪测定。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱条件

7.3.1.1 色谱柱: C₁₈ 柱, 250 mm×4.6 mm(内径), 粒度 5 μm, 或相当者。

7.3.1.2 流动相: A 组分是 0.01 mol/L 乙酸铵溶液(甲酸调 pH 至 4.5); B 组分是乙腈。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

步骤	时间/min	流速/(mL/min)	组分 A/%	组分 B/%
1	0.00	1.0	98.0	2.0
2	3.00	1.0	98.0	2.0
3	5.00	1.0	90.0	10.0
4	15.00	1.0	70.0	30.0
5	20.00	1.0	60.0	40.0
6	20.10	1.0	98.0	2.0
7	30.00	1.0	98.0	2.0

7.3.1.3 流速: 1.0 mL/min。

7.3.1.4 进样量: 100 μL。

7.3.2 质谱条件

7.3.2.1 离子源: 电喷雾离子源。

7.3.2.2 扫描方式: 正离子扫描。

7.3.2.3 检测方式: 多反应监测。

7.3.2.4 雾化气、气帘气、辅助气、碰撞气均为高纯氮气; 使用前应调节各参数使质谱灵敏度达到检测要求, 参考条件见附录 A。

7.3.3 液相色谱-质谱/质谱测定

根据试样中被测物的含量情况, 选取响应值相近的标准工作液一起进行色谱分析。标准工作液和待测液中青霉素族抗生素的响应值均应在仪器线性响应范围内。对标准工作液和样液等体积进行测定。在上述色谱条件下, 11 种青霉素的参考保留时间分别约为: 羟苄青霉素 8.5 min, 氨苄青霉素 12.2 min, 苯咪青霉素 16.5 min, 甲氧苄青霉素 16.8 min, 苄青霉素 18.1 min, 苯氧甲基青霉素 19.4 min, 苯唑青霉素 20.3 min, 苯氧乙基青霉素 20.5 min, 邻氯青霉素 21.5 min, 乙氧萘青霉素 22.3 min, 双氯青霉素 23.5 min。青霉素族抗生素标准溶液的定量离子对重构离子色谱图见图 B.1。

7.3.4 定性测定

按照上述条件测定样品和建立标准工作曲线, 如果样品中化合物质量色谱峰的保留时间与标准溶液相比在±2.5%的允许偏差之内; 待测化合物的定性离子对的重构离子色谱峰的信噪比大于或等于 3

($S/N \geq 3$), 定量离子对的重构离子色谱峰的信噪比大于或等于 10 ($S/N \geq 10$); 定性离子对的相对丰度与浓度相当的标准溶液相比, 相对丰度偏差不超过表 2 的规定, 则可判断样品中存在相应的目标化合物。

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%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

7.3.5 定量测定

按外标法使用标准工作曲线进行定量测定。

7.3.6 空白试验

除不加试样外, 均按上述操作步骤进行。

8 结果计算与表述

用色谱数据处理机或按式(1)计算试样中青霉素族抗生素残留量, 计算结果需扣除空白值:

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

式中:

- X ——试样中青霉素族残留量, 单位为微克每千克($\mu\text{g/kg}$);
- c ——从标准曲线上得到的青霉素族残留溶液浓度, 单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V ——样液最终定容体积, 单位为毫升(mL);
- m ——最终样液代表的试样质量, 单位为克(g)。

9 测定低限与回收率

9.1 测定低限(LOQ)

11 种青霉素族抗生素的测定低限分别为: 羟氨苄青霉素 $5\ \mu\text{g/kg}$, 氨苄青霉素 $2\ \mu\text{g/kg}$, 苯咪青霉素 $1\ \mu\text{g/kg}$, 甲氧苄青霉素 $0.1\ \mu\text{g/kg}$, 苄青霉素 $1\ \mu\text{g/kg}$, 苯氧甲基青霉素 $0.5\ \mu\text{g/kg}$, 苯唑青霉素 $2\ \mu\text{g/kg}$, 苯氧乙基青霉素 $10\ \mu\text{g/kg}$, 邻氯青霉素 $1\ \mu\text{g/kg}$, 乙氧萘青霉素 $2\ \mu\text{g/kg}$, 双氯青霉素 $10\ \mu\text{g/kg}$ 。

9.2 回收率

见表 C.1 和表 C.2。

附录 A
(资料性附录)

质谱/质谱测定参考质谱条件¹⁾

质谱/质谱测定参考质谱条件:

- a) 电喷雾电压(IS):5 500V;
- b) 雾化气压力(GS1):0.483 MPa(70 Psi);
- c) 气帘气压力(CUR):0.207 MPa(30 Psi);
- d) 辅助气压力(GS2):0.621 MPa(90 Psi);
- e) 离子源温度(TEM):700 ℃;
- f) 11种青霉素族抗生素的定性离子对、定量离子对、去簇电压(DP)、碰撞气能量(CE)及碰撞室出口电压(CXP)见表 A.1。

表 A.1 青霉素族抗生素的定性离子对、定量离子对、去簇电压、碰撞气能量和碰撞室出口电压

组分名称	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	去簇电压 (DP)/V	碰撞气能量 (CE)/V	碰撞室出口电压 (CXP)/V
羟氨苄青霉素	366/349	366/349	48	14	10
	366/208		50	17	10
氨苄青霉素	350/106	350/106	60	23	10
	350/192		50	50	10
苯唑青霉素	462/218	462/218	65	20	10
	462/246		60	20	10
甲氧苄青霉素	381/165	381/165	55	23	10
	381/222		60	30	10
苄青霉素	335/160	335/160	60	25	10
	335/175		60	25	10
苯氧甲基青霉素	351/160	351/160	65	16	10
	351/192		60	25	10
苯唑青霉素	402/160	402/160	70	25	10
	402/243		60	25	10
苯氧乙基青霉素	387/182	387/228	100	22	10
	387/228		65	16	10
邻氯青霉素	436/277	436/277	60	17	10
	436/160		60	25	10
乙氧萘青霉素	415/199	415/199	50	50	10
	415/256		70	20	10
双氯青霉素	492/182	470/160	60	25	10
	492/333		60	25	10

1) 所列参数是在 API 4000 质谱仪完成的,此处列出的实验用仪器型号仅是为了提供参考,并不涉及商业目的,鼓励标准使用者尝试不同型号的仪器。

附录 B

(资料性附录)

11 种青霉素类抗生素标准品的定量离子对重构离子色谱图

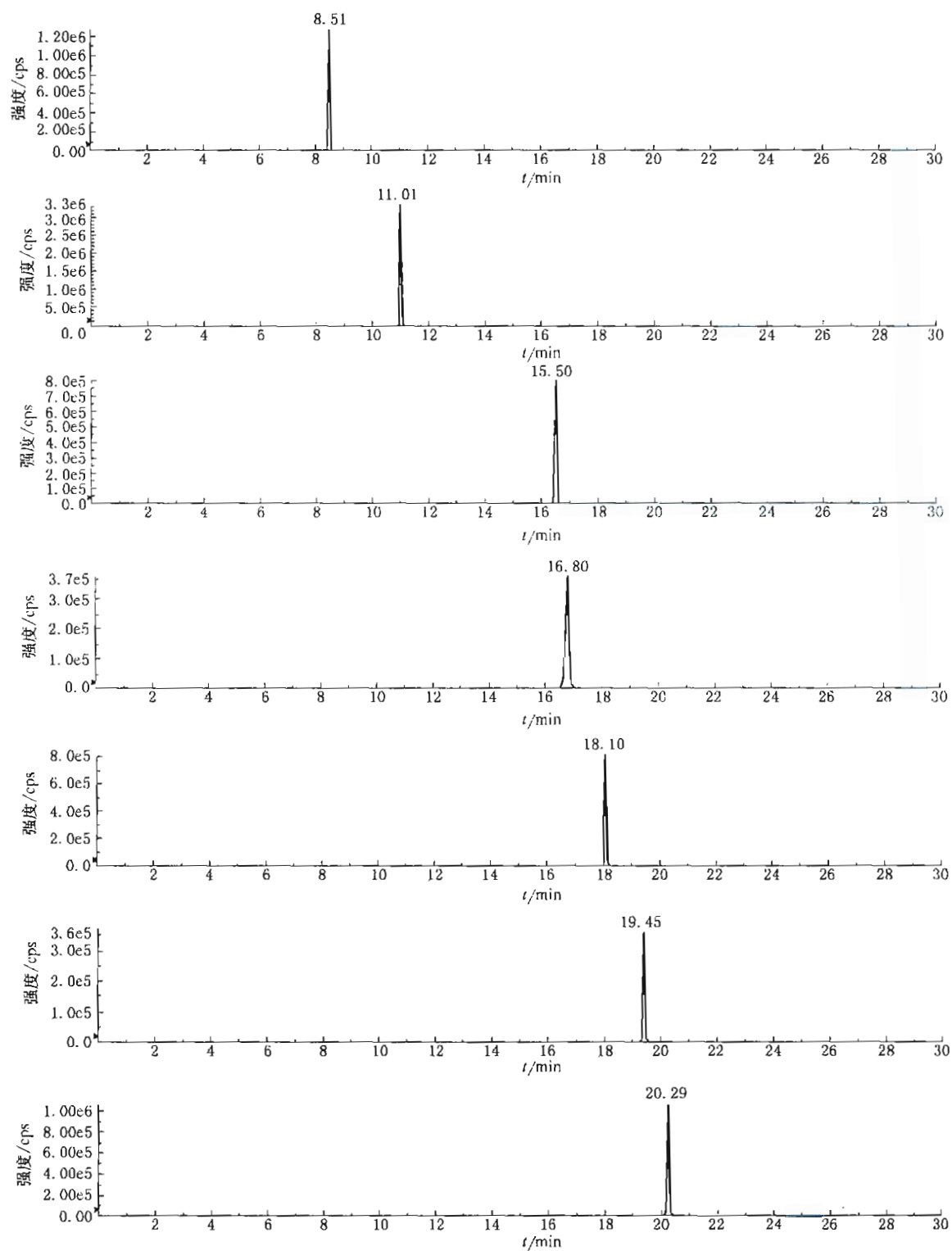


图 B.1 11 种青霉素类抗生素标准品的定量离子对重构离子色谱图

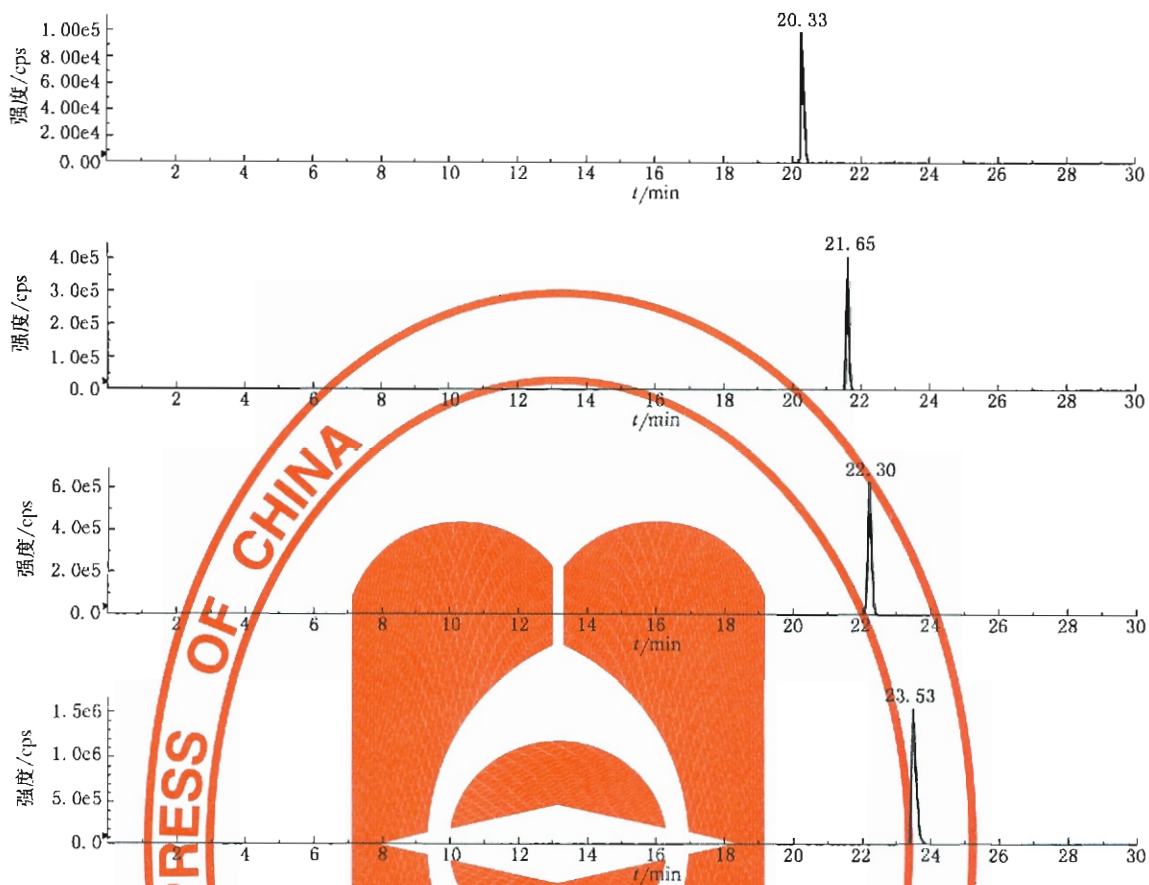


图 B. 1(续)

附 录 C
(资料性附录)
添加回收率

表 C.1 11 种青霉素族抗生素在猪肉、猪肝、猪肾中的添加回收率

化合物	添加浓度/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/%		
		猪 肉	猪 肝	猪 肾
羟氨苄青霉素	5	74.6~86.0	64.0~86.8	63.8~86.2
	50	75.0~89.8	73.0~89.6	76.2~86.8
	500	75.3~90.2	70.5~90.3	70.8~90.9
氨苄青霉素	2	71.5~94.0	68.5~87.5	68.5~81.5
	20	71.0~93.5	68.5~94.0	72.0~90.5
	200	74.2~87.1	69.2~89.9	76.0~88.2
苯唑青霉素	1	74.0~84.0	62.0~83.0	67.0~84.0
	10	72.3~86.4	74.5~82.1	70.9~85.9
	100	79.0~89.1	72.0~87.0	77.5~88.5
甲氧苄青霉素	0.1	70.0~84.0	63.0~85.0	65.0~87.0
	1	75.0~83.0	73.0~87.0	76.0~89.0
	10	81.3~94.2	73.5~89.3	77.4~87.8
苄青霉素	1	72.0~81.0	71.0~80.0	66.0~84.0
	10	72.5~87.3	75.3~87.6	73.5~87.5
	100	73.4~84.3	72.2~85.7	77.9~88.4
苯氧甲基青霉素	0.5	72.0~88.0	64.0~86.0	72.0~88.0
	5	72.2~90.6	73.4~90.6	69.6~89.0
	50	73.8~85.2	74.2~94.8	71.2~95.0
苯唑青霉素	2	70.0~76.0	65.5~85.0	72.5~87.5
	20	67.0~84.5	70.0~89.0	75.5~93.5
	200	77.0~90.2	70.1~88.7	71.3~87.6
苯氧乙基青霉素	10	70.2~86.5	64.7~81.0	77.5~86.3
	100	73.8~86.5	74.0~87.8	71.5~89.3
	1 000	79.8~90.4	77.8~89.2	78.1~89.3
邻氯青霉素	1	72.0~85.0	63.0~83.0	66.0~85.0
	10	74.7~88.5	77.0~88.7	74.2~89.1
	100	76.2~88.4	73.2~87.3	77.6~89.4
乙氧萘青霉素	2	71.0~89.0	64.0~81.5	68.0~84.5
	20	64.5~84.5	72.5~87.5	75.5~89.5
	200	68.5~82.6	76.2~89.5	77.3~90.6
双氯青霉素	10	62.5~83.7	64.5~80.4	66.1~83.3
	100	77.7~87.3	71.8~88.0	74.2~87.1
	1 000	76.6~82.7	75.6~87.3	78.4~87.1

表 C.2 11种青霉素族抗生素在牛奶、鸡蛋中的添加回收率

化合物	添加浓度/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/%	
		牛奶	鸡蛋
羟苄青霉素	2.5	62.4~84.8	66.4~92.8
	25	75.2~88.8	71.6~91.6
	250	73.9~92.5	68.1~96.6
苄青霉素	1	68.0~87.0	68.0~85.0
	10	73.9~87.5	71.5~88.7
	100	77.4~88.5	76.1~88.1
苯唑青霉素	0.5	68.0~88.0	72.0~88.0
	5	75.4~90.4	76.6~90.0
	50	77.4~91.0	78.0~92.4
甲氧苄青霉素	0.05	66.0~82.0	72.0~84.0
	0.5	74.0~88.0	74.0~88.0
	5	76.4~91.6	73.2~91.2
苄青霉素	0.5	64.0~86.0	76.0~96.0
	5	74.2~90.2	73.0~93.0
	50	77.0~90.6	74.2~91.4
苯氧甲基青霉素	0.25	64.0~88.0	68.0~92.0
	2.5	74.8~96.0	71.6~98.8
	25	70.8~96.0	70.8~96.8
苯唑青霉素	1	68.0~83.0	67.0~88.0
	10	76.4~87.6	75.5~90.3
	100	76.9~89.6	77.7~92.5
苯氧乙基青霉素	5	66.6~83.4	68.2~86.4
	50	71.8~91.0	77.2~93.2
	500	78.0~91.4	76.2~92.9
邻氯青霉素	0.5	66.0~84.0	66.0~88.0
	5	77.2~90.6	70.6~90.6
	50	78.4~92.0	72.8~90.4
乙氧萘青霉素	1	68.0~84.0	69.0~88.0
	10	75.5~86.1	75.4~89.6
	100	79.3~89.5	77.0~94.5
双氯青霉素	5	66.8~83.0	68.8~83.4
	50	74.2~90.8	73.2~89.2
	500	75.0~92.9	71.2~88.7