ICS 67.050
B20

团 体 标 准

T/ NAIA XXX—2024

畜禽肉中青霉素族抗生素的测定 高效液相色谱-串联质谱法

Determination of Nine Penicillin Residues in Livestock and Poultry Meat by HPLC-MS/MS

2024-XX-XX 发布 2024-XX-XX 实施

宁夏化学分析测试协会 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》规定编写。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏回族自治区食品检测研究院（国家市场监管重点实验室（枸杞和葡萄酒质量安全））、宁夏计量质量检验检测研究院、宁夏化学分析测试协会。

本文件主要起草人：朱燕燕、马雪梅、马桂娟、姚博伟、张学玲、王鹏、刘竞泽、郭阳、李强、孙少忆、吕毅、吴明、张小飞。

本文件于 2024 年 XX 月 XX 日首次发布。

畜禽肉中青霉素族抗生素的测定 高效液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了畜禽肉中青霉素族抗生素（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、萘夫西林、双氯西林）的高效液相色谱-串联质谱检测方法。

本文件适用葡萄酒中 9 种青霉素的测定和确证。

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实验方法

GB 29682-2013《水产品中青霉素类药物多残留的测定　高效液相色谱法》

农业部 781 号公告-11-2006《牛奶中青霉素类药物残留的检测方法　高效液相色谱法》

农业部 958 号公告-7-2007《猪鸡可食性组织中青霉素类药物残留检测方法 高效液相色谱法》

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》

GB/T 22975-2008《牛奶和奶粉中阿莫西林、氨苄西林、哌拉西林、青霉素 G、青霉素 V、苯唑西林、氯唑西林、萘夫西林和双氯西林残留量的测定　液相色谱-串联质谱法》

GB 31656.12-2021《水产品中青霉素类药物多残留的测定　液相色谱-串联质谱法》

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》

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样经 70%的乙腈水溶液超声提取，QuEChERS 法净化后，经反相色谱柱分离，以保留时间定性，供高效液相色谱-串联质谱仪测定和确证，外标法定量。

5 试剂和材料

本方法所用的试剂，除另有规定外，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：色谱纯。

5.1.2 甲酸：优级纯。

5.1.3 十八烷基（C18）粉末。

5.1.4 N-丙基乙二胺（PSA）粉末。

5.1.5 含 0.2%甲酸的水溶液：取 0.2mL 甲酸用水定容到 100mL。

5.1.6 含 0.2%甲酸的乙腈溶液：取 0.2mL 甲酸用乙腈定容到 100mL。
5.1.7 70%的乙腈水溶液：取 70mL 乙腈和 30mL 水混合均匀。
5.1.8 20%的乙腈水溶液：取 20mL 乙腈和 80mL 水混合均匀。

5.2 标准品

5.2.1 标准品：阿莫西林（纯度：99.3%，CAS：26787-78-0）、氨苄西林（纯度：92.8%，CAS：69-53-4）、哌拉西林（纯度：99.6%，CAS：61477-96-1）、青霉素 G（纯度：98.2%，CAS：61-33-6）、青霉素 V（纯度：99.0%，CAS：87-08-1）、苯唑西林（纯度：95.7%，CAS：1173-88-2）、氯唑西林（纯度：98.9%，CAS：61-72-3）、萘夫西林（纯度：99.3%，CAS：985-16-0）、双氯西林（纯度：92.6%，CAS：3116-76-5）。
5.2.2 单标准储备液（1.0mg/mL）：分别准确称取 9 种青霉素标准物质适量，用水溶解并定容至 10.0mL 容量瓶中，配制成 1.0mg/mL 的单标准储备溶液，避光冷冻贮存，保存期限为 3 个月。
5.2.3 混合标准储备溶液的配制：分别移取青霉素 G 和奈夫西林单标准储备溶液适量，混合后用水逐级稀释得到 1.0μg/mL 的混合标准储备溶液 I;将其余 7 种青霉素用同样的方式进行稀释，得到 1.0μg/mL 的混合标准储备溶液 II，避光冷冻贮存，保存期限为 1 个月。
5.2.4 9 种青霉素标准工作溶液：分别准确吸取不同体积混合标准储备液 I 和 II，用空白牛肉基质定容至 1.0 mL，配制成青霉素 G 和奈夫西林的浓度分别为 0.4、1.0、2.0、5.0、10.0ng/mL，其余 7 种青霉素的浓度分别为 2.0、5.0、10.0、20.0、50.0ng/mL 的系列标准工作溶液，临用现配。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：配备电喷雾离子源。
6.2 天平：感量 0.1mg 和 0.01g。
6.3 涡旋混合器。
6.4 高速冷冻离心机：最大转速 10000r/min。
6.5 超声波发生器。
6.6 氮吹仪。
6.7 色谱柱： C18，2.1mm×150mm，粒径 3.5μm 或性能相当。

7 分析步骤

7.1 试液的提取

准确称取 2.0g（精确至 0.01mg）均匀制备的样品于 50.0mL 具塞离心管中，加入 70%乙腈水溶液 10mL，涡旋混合 1min，超声 5min，8000 r/min 离心 5 min，取上清液，残渣加 70%乙腈水溶液 10mL 重复提取一次，合并上清液，用 70%乙腈水溶液稀释至 25.0mL。精密吸取 5mL 上清液，置于预先装有 150 mg C18、100 mg N-丙基乙二胺（PSA）的离心管中，涡旋 2min，8000 r/min 离心 5 min，取上清液于 45 ℃水浴氮气吹干，精密加入 20%乙腈溶液 1.0 mL，涡旋混匀，用 0.22 μm 有机滤膜过滤后，上机测定。

7.2 仪器参考条件

7.2.1 液相色谱参考条件

7.2.1.1 柱温：30℃。
7.2.1.2 流动相：A：0.2%的甲酸水溶液，B：0.2%甲酸乙腈溶液；梯度洗脱见表 1。

7.2.1.3 流速：0.3mL/min。
7.2.1.4 进样量：5μL。

表 1　流动相及梯度洗脱条件

时间/min	流速/（mL/min）	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	0.3	95	5
3.00	0.3	95	5
3.01	0.3	50	50
13.00	0.3	50	95
13.01	0.3	95	5
15.00	0.3	95	5

7.2.2 质谱参考条件

7.2.2.1 离子源：电喷雾离子源（ESI）。
7.2.2.2 扫描方式：正离子扫描和。
7.2.2.3 检测方式：多反应监测（MRM）。
7.2.2.4 鞘气温度：375℃。
7.2.2.5 鞘气流速：12.0L/min。
7.2.2.6 雾化器压力：310.23kPa。
7.2.2.7 喷嘴电压：500V。
7.2.2.8 毛细管电压：3000V。
7.2.2.7 定性离子对、定量离子对、碎裂电压、碰撞能量等参数参见附录 A。

7.3 定量测定

根据试液中被测物含量情况，选定浓度相近的基质标准混合使用液，基质标准混合使用液和待测试液中被测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。基质标准混合使用液与试液等体积进样测定。标准溶液及试液均按 7.2.1 和 7.2.2 规定的条件进行测定，如果试液中与标准溶液相同的保留时间有峰出现，则对其进行确证。9 种青霉素标准品的多反应监测（MRM）色谱图参见附录 B，采用基质溶液校准曲线外标法定量。

7.4 定性测定

经确证分析被测物质色谱峰保留时间与标准物质相一致，并且在扣除背景后的样品谱图中，所选择的离子均出现。同时所选择离子的丰度比与标准溶液中相关离子的相对丰度一致，相似度在允许偏差之内（见表 2），则可判定样品中存在对应的被测物。

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%至 50%	＞10%至 20%	≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

7.5 空白试验

除不加试样外，均按上述步骤进行。

8 分析结果的表述

试样中 7 种链格孢霉毒素的含量按式（1）进行计算：

$$X = \frac{c \times V \times 1000}{m \times 1000} \quad (1)$$

式中：

X ——试样中各种化合物含量，单位为微克每千克（μg/kg）；

c ——由标准曲线计算出的试样溶液浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V ——试样的最后定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）。

注：测定结果用平行测定的算数平均值表示，保留两位有效数字。

9 精密度

在重复性测定条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

10 其他

当称样量为 2.0g,定容体积为 10mL 时，阿莫西林、氨苄西林、哌拉西林、青霉素 V、苯唑西林、氯唑西林、双氯西林的定量限为 1.5μg/kg，检出限为 0.8μg/kg；青霉素 G 和奈夫西林的定量限为 0.5μg/kg，检出限为 0.2μg/kg。

附录 A
(资料性附录)

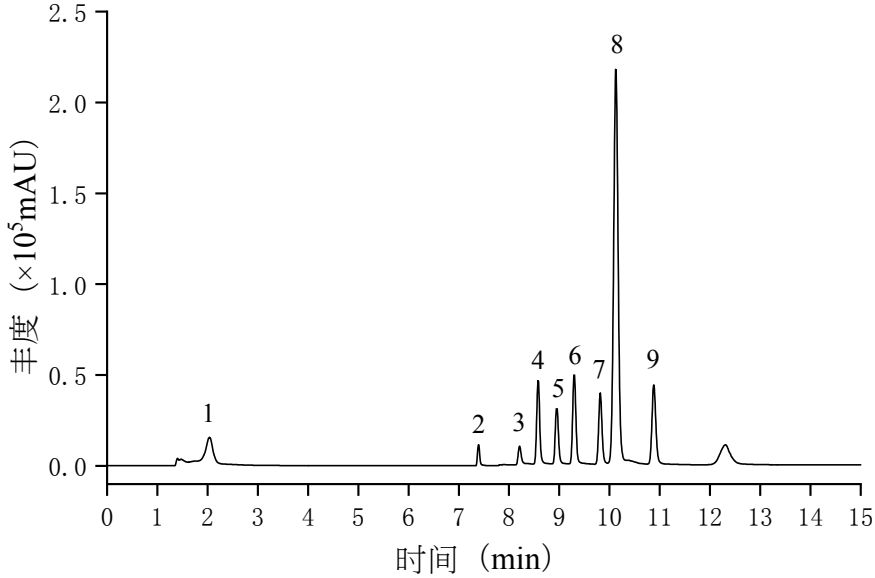
表 A.1　9 种青霉素的质谱参数

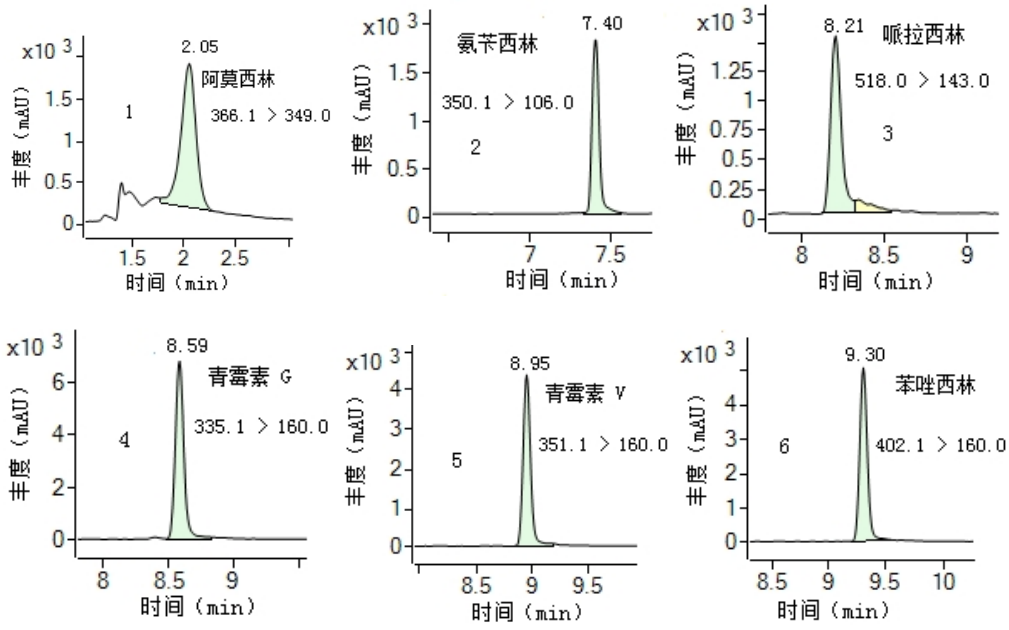
序号	被测物名称	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碎裂电压(v)	碰撞能量(ev)
1	阿莫西林	366.1	349.0*,113.9	90,90	4,15
2	氨苄西林	350.1	106.0*,160.0	110,110	12,6
3	哌拉西林	518.0	143.0*,160.0	110,110	20,10
4	青霉素 G	335.1	160.0*,176.0	90,90	5,6
5	青霉素 V	351.1	160.0*,114.0	90,90	5,32
6	苯唑西林	402.1	160.0*,243.1	100,100	12,8
7	氯唑西林	436.0	277.0*,160.0	110,110	10,6
8	萘夫西林	415.1	199.0*,171.0	110,110	8,35
9	双氯西林	470.0	160.0*,310.9	100,100	8,8

注：*为定量离子

附录 B

(资料性附录)


丰度（×10^5mAU）
时间（min）
1
2
3
4
5
6
7
8
9


x10 3
丰度（mAU）
时间（min）
2.05
阿莫西林
366.1 > 349.0
1
氨苄西林
7.40
350.1 > 106.0
2
8.21
哌拉西林
518.0 > 143.0
3
8.59
青霉素 G
335.1 > 160.0
4
8.95
青霉素 V
351.1 > 160.0
5
9.30
苯唑西林
402.1 > 160.0
6

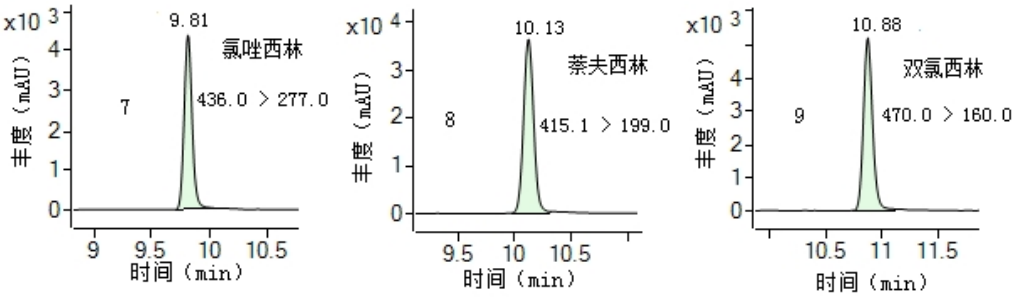


图 B　9 种青霉素的多反应监测（MRM）典型色谱图