

附录 3

动物性食品中 β -内酰胺类药物残留检测— 液相色谱-串联质谱法

2 范围

本标准规定了动物性食品中青霉素G、青霉素V、阿莫西林、羧苄西林、氨苄西林、苯唑西林、氯唑西林、萘夫西林、头孢唑肟、头孢氨苄、头孢拉定、头孢唑啉和头孢哌酮等13种 β -内酰胺类药物残留检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛奶、猪、鸡肌肉和肾脏中青霉素G、青霉素V、阿莫西林、羧苄西林、氨苄西林、苯唑西林、氯唑西林、萘夫西林、头孢唑肟、头孢氨苄、头孢拉定、头孢唑啉和头孢哌酮单个或多个药物残留量的检测。

3 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 分析实验室用水规格和试验方法

4 制样

6.1 样品的制备

3.1.1 牛奶

取适量新鲜或解冻的空白或供试牛奶，混合均匀。

3.1.2 猪、鸡肌肉和肾脏

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织，绞碎并使匀质。

6.2 样品的保存

上述制备样品-20℃以下贮存备用。

5 测定方法

6.1 方法提要或原理

供试样品中的残留药物用水和乙腈提取后，用正己烷去除脂肪，再用C₁₈固相萃取柱去除杂质，浓缩后供超高效液相色谱-串联质谱法测定，外标法定量。

6.2 试剂和材料

以下所用的试剂，除特别注明者外均为分析纯试剂；水为符合GB/T 6682规定的二级水。

4.2.1 青霉素 G、青霉素 V、阿莫西林、羧苄西林、氨苄西林、苯唑西林、氯唑西林、萘夫西林、头孢唑肟、头孢氨苄、头孢拉定、头孢唑啉和头孢哌酮对照品：纯度均大于 95.0%。

4.2.2 乙腈 色谱纯

4.2.3 正己烷

4.2.4 甲酸

4.2.5 标准储备液（1mg/mL）：准确称取适量的青霉素 G、青霉素 V、阿莫西林、羧苄西林、氨苄西林、苯唑西林、氯唑西林、萘夫西林、头孢唑肟、头孢氨苄、头孢拉定、头孢唑啉和头孢哌酮对照品，用 50%乙腈水溶液溶解并稀释，分别配制成 1mg/mL 的标准储备液。4℃下保存，有效期为 1 周。

4.2.6 混合标准工作液（10 μ g/mL）：分别准确吸取 0.1mL 的青霉素 G、青霉素 V、阿莫西林、羧苄西林、氨苄西林、苯唑西林、氯唑西林、萘夫西林、头孢唑肟、头孢氨苄、头孢拉定、头孢唑啉和头孢哌酮标准储备液至 10mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，混匀即得。4℃下保存，有效期为 1 周。

4.2.7 基质匹配标准工作液：准确量取适当浓度的混合标准工作液适量，加入空白组织经提取、净化及浓缩后的溶液中，加水定容至1mL，充分混匀，即得。

4.3 仪器和设备

4.3.1 液相色谱-串联质谱仪（带电喷雾离子源）

4.3.2 分析天平 感量0.00001g

4.3.3 天平 感量0.01g

4.3.4 高速离心机

4.3.5 涡旋混合器

4.3.6 水平振荡器

4.3.7 固相萃取装置

4.3.8 BakerBond C₁₈固相萃取柱：500mg/6mL，或相当者。

4.3.9 氮吹仪

4.3.10 滤膜 0.2μm

4.4 测定步骤

4.4.1 试料的制备

试料的制备包括：

——取匀质的供试样品，作为供试试料。

——取匀质的空白样品，作为空白试料。

——取匀质的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试料。

4.4.2 提取

称取 2 (±0.02) g 试料，置于 50mL 离心管内，加水 2mL 和乙腈 8mL（牛奶样品直接加乙腈 8mL），涡旋混合后中速振荡 5min，10000r/min 离心 10min，取上清液于另一 50mL 离心管内，加正己烷 5mL，涡旋混合后中速振荡 5min，5000r/min 离心 5min，弃上层溶液，下层溶液作为备用液。

4.4.3 净化

C₁₈小柱依次用乙腈 5mL、水 5mL 活化，取全部备用液过柱同时收集于 15mL 玻璃试管内，挤干，于 40℃下氮气吹至体积小于 1mL，加水定容至 1mL，充分涡旋混匀，转移至 1.5mL 塑料离心管内，4℃下 15000r/min 离心 10min，取适量上清液过滤膜后，供液相色谱-串联质谱仪测定。

4.4.4 基质匹配标准曲线的制备

分别准确量取 13 种 β-内酰胺类药物系列混合标准溶液适量，依次加入 6 份空白组织经提取、净化及浓缩后的溶液中，加水定容至 1mL，充分混匀，制得浓度为 5、10、50、100、200 和 500ng/mL 的基质匹配系列混合标准溶液，离心过滤膜后上机测定。以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标，标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。

4.4.5 测定

4.4.5.1 液相色谱参考条件

色谱柱：BEH C₁₈ (50×2.1mm, 1.7μm)，或相当者；

流动相：A 相为 0.1%甲酸乙腈溶液；B 相为 0.1%甲酸水溶液；

梯度洗脱：0~1min，保持 5%A；1~2.5min，5%A 线性变化至 50%；2.5min~4min，保持 50%A；4~5min，保持 5%A；

流速：0.3mL/min；

柱温：30℃；

进样量：10μL。

4.4.5.2 质谱参考条件

离子源：电喷雾离子源；

扫描方式：正离子扫描；

检测方式：多反应监测；

电离电压：3.1kV；

源温：110℃；

雾化温度：350℃；

锥孔气流速：50L/h；

雾化气流速：650L/h；

测试药物定性、定量离子对及对应的锥孔电压、碰撞能量见表1。

表1 13种β-内酰胺类药物定性、定量离子对及锥孔电压、碰撞能量

药物	保留时间 (min)	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	锥孔 电压(V)	碰撞 能量(eV)
阿莫西林	1.59	366.3 > 113.7	366.3 > 113.7	15	20
		366.3 > 208.0			12
头孢唑肟	2.15	529.4 > 133.9	529.4 > 133.9	25	15
		529.4 > 396.2			15
氨苄西林	2.24	350.4 > 105.8	350.4 > 105.8	25	15
		350.4 > 159.8			10
头孢氨苄	2.26	348.3 > 157.8	348.3 > 157.8	18	8
		348.3 > 174.0			15
头孢拉定	2.30	350.3 > 157.8	350.3 > 157.8	18	8
		350.3 > 175.9			12
头孢唑啉	2.46	455.2 > 155.7	455.2 > 323.1	20	15
		455.2 > 323.1			10
头孢哌酮	2.61	646.6 > 142.9	646.6 > 142.9	20	32
		646.6 > 530.3			10
羧苄西林	2.79	379.3 > 159.8	379.3 > 159.8	22	15
		379.3 > 220.0			18
青霉素G	3.01	335.3 > 159.8	335.3 > 159.8	20	10
		335.3 > 176.0			12
青霉素V	3.14	351.3 > 159.9	351.3 > 159.9	20	12
		351.3 > 192.0			10
苯唑西林	3.23	402.3 > 159.8	402.3 > 159.8	20	15
		402.3 > 243.1			12
氯唑西林	3.36	436.3 > 159.9	436.3 > 159.9	22	15
		436.3 > 277.2			12
萘夫西林	3.45	415.3 > 170.9	415.3 > 199.0	20	35
		415.3 > 199.0			15

4.4.5.3 测定法

取试料溶液和基质匹配标准溶液，作单点或多点校准，外标法计算。试料溶液和基质匹配标准溶液中青霉素G、青霉素V、阿莫西林、羧苄西林、氨苄西林、苯唑西林、氯唑西林、萘夫西林、头孢唑肟、头孢氨苄、头孢拉定、头孢唑啉和头孢哌酮的特征离子质量色谱峰面积均应在仪器检测的线性范围之内。试料溶液中的离子相对丰度与基质匹配标准溶液中的离子相对丰度相比，符合表2的要求。标准溶液和添加试液中特征离子质量色谱图分别见附录A中图A.1~图A.4。

表2 试料溶液中离子相对丰度的允许偏差范围

相对丰度 (%)	允许偏差 (%)
>50	±20
20~50	±25
10~20	±30
≤10	±50

4.4.6 空白试验

取空白试料，采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

4.5 结果计算和表述