



中华人民共和国国家标准

GB 31656.12—2021

代替 GB/T 22952—2008

食品安全国家标准 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

National food safety standard—
Determination of Penicillin multi-residues in aquatic products by
liquid chromatography-tandem mass spectrometry method

2021-09-16 发布

2022-02-01 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 发布
国家市场监督管理总局

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》的规定起草。

本文件代替 GB/T 22952—2008《河豚鱼和鳗鱼中阿莫西林、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、双氯西林残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》，与 GB/T 22952—2008 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术内容变化如下：

- a) 更改了标准的适用范围(见 1,2008 年版的 1);
- b) 增加了阿洛西林和甲氧西林的测定(见表 2、附录 A 表 A.1);
- c) 更改了定量方法(见 8.5.2,2008 年版的 7.4.2);
- d) 更改了部分测定步骤(见 8,2008 年版的 7);
- e) 增加了固相萃取和超滤管离心的净化步骤(见 8.2);
- f) 更改了方法的检出限和定量限(见 10.1,2008 年版的 1)。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2008 年首次发布为 GB/T 22952—2008;

——本次为第一次修订。

食品安全国家标准

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

1 范围

本文件规定了水产品中青霉素类药物残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于鱼、虾、蟹和海参等水产品可食组织中阿莫西林、氨苄西林、青霉素 G、青霉素 V、苯唑西林、氯唑西林、双氯西林、萘夫西林、哌拉西林、阿洛西林和甲氧西林单个或多个药物残留量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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

GB/T 30891—2014 水产品抽样规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试料中残留的青霉素类药物,用乙腈水溶液提取,固相萃取柱净化,液相色谱-串联质谱测定,内标法定量。

5 试剂与材料

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。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

5.1.2 甲酸(HCOOH):色谱纯。

5.2 溶液配制

5.2.1 30%乙腈水溶液:取乙腈 30 mL、水 70 mL,混合。

5.2.2 80%乙腈水溶液:取乙腈 400 mL、水 100 mL,混合。

5.2.3 0.05%甲酸水溶液:取甲酸 250 μL ,加水稀释至 500 mL。

5.2.4 0.05%甲酸乙腈溶液:取甲酸 250 μL ,加乙腈稀释至 500 mL。

5.3 标准品

5.3.1 青霉素类药物:阿莫西林、氨苄西林、青霉素 G、青霉素 V、苯唑西林、氯唑西林、双氯西林、萘夫西林、哌拉西林、阿洛西林和甲氧西林,含量均 $\geq 95\%$,具体内容见附录 A。

5.3.2 内标:阿莫西林-d₄、氨苄西林-d₅、青霉素 G-d₇、萘夫西林-d₆,含量均 $\geq 95\%$,具体内容见附录 A。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 青霉素标准储备液(0.10 mg/mL):取青霉素类药物标准品约 10 mg,精密称定,用 30%乙腈水溶液溶解并稀释定容至 100 mL,配制成浓度均为 0.10 mg/mL 的标准储备液。 -18°C 避光保存,有效期 5 d。

5.4.2 内标储备液(0.10 mg/mL):取内标标准品约 10 mg,精密称定,用 30%乙腈水溶液溶解并稀释定

容至 100 mL, 配制成浓度均为 0.10 mg/mL 的内标储备液。−18 ℃避光保存, 有效期 5 d。

5.4.3 混合标准中间液(1.0 μg/mL): 分别精密量取青霉素标准储备液适量, 用水稀释制成阿莫西林、氨苄西林、青霉素 G、青霉素 V、苯唑西林、氯唑西林、双氯西林、萘夫西林、哌拉西林、阿洛西林和甲氧西林浓度均为 1.0 μg/mL 的混合标准溶液。−4 ℃避光保存, 有效期 5 d。

5.4.4 内标工作液(1.0 μg/mL): 分别精密量取内标储备液适量, 用水稀释制成阿莫西林-d₄、氨苄西林-d₅、青霉素 G-d₇、萘夫西林-d₆ 浓度均为 1.0 μg/mL 的内标工作液。−4 ℃避光保存, 有效期 5 d。

5.5 材料

5.5.1 通过式反相混合型亲水亲脂固相萃取柱: 200 mg/6 mL, 或相当者。

5.5.2 超滤管: 10 kD, 0.5 mL。

6 仪器与设备

6.1 液相色谱-串联四极杆质谱仪: 配电喷雾离子源。

6.2 分析天平: 感量 0.01 g 和 0.000 01 g。

6.3 高速冷冻离心机。

6.4 固相萃取装置。

6.5 超声波清洗仪。

6.6 组织匀浆机。

6.7 涡旋混合器。

6.8 氮吹仪。

7 试料的制备与保存

7.1 试料的制备

按 GB/T 30891—2014 附录 B 的要求制样。

- a) 取均质的供试样品, 作为供试试料;
- b) 取均质的空白样品, 作为空白试料;
- c) 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。

7.2 试料的保存

−18 ℃以下保存, 3 个月内进行分析检测。

8 测定步骤

8.1 提取

取试料 2.5 g(准确至±0.02 g), 加内标工作液 100 μL, 静置 10 min, 加 80% 乙腈水溶液 5 mL, 涡旋混合 1 min, 超声 10 min, 4 ℃ 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 残渣加 80% 乙腈水溶液 4 mL 重复提取一次, 合并上清液, 用 80% 乙腈水溶液稀释至 10.0 mL, 备用。

8.2 净化

取 80% 乙腈水溶液约 1 mL 润洗固相萃取柱, 弃去流出液, 取备用液 2.0 mL 过柱, 保持流速为 1 滴/s, 收集流出液, 35 ℃氮气吹至少于 0.5 mL, 加水定容至 0.5 mL, 用超滤管以 12 000 r/min 离心 10 min, 取滤液, 供液相色谱-串联质谱测定。

8.3 标准曲线的制备

精密量取混合标准中间液、内标工作液适量, 用水配制成青霉素类药物浓度为 2 μg/L、5 μg/L、10 μg/L、25 μg/L、50 μg/L、150 μg/L 和 300 μg/L 的混合标准工作液, 其中青霉素内标溶液浓度均为 40 μg/L。以测得特征离子质量色谱峰外标和内标峰面积比值为纵坐标、对应的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。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱:C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.6 μm), 或性能相当者;
- b) 柱温:35 °C;
- c) 流速:0.4 mL/min;
- d) 进样量:10 μL;
- e) 流动相:A为0.05%的甲酸水溶液,B为0.05%的甲酸乙腈溶液。梯度洗脱条件见表1。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间 min	A %	B %
0.0	98	2
1.0	98	2
3.0	60	40
7.0	0	100
10.0	0	100
10.1	98	2
12.0	98	2

8.4.2 质谱参考条件

- a) 离子化模式:电喷雾离子源(ESI),多反应监测(MRM),正离子模式;
- b) 喷雾电压:5.5 kV;
- c) 气帘气压力:0.24 MPa;
- d) 碰撞气压力:0.02 MPa;
- e) 离子源温度:500 °C;
- f) 碰撞室入口电压:10 V;
- g) 碰撞室出口电压:12 V;
- h) 驻留时间:50 ms;
- i) 离子源 Gas1:0.34 MPa;
- j) 离子源 Gas2:0.34 MPa;
- k) 多反应监测母离子、子离子、解簇电压和碰撞能量见表2。

表2 多反应监测母离子、子离子、解簇电压和碰撞能量

目标化合物	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	解簇电压 V	碰撞能量 eV
阿莫西林	366	349	40	11
		208 ^a	40	16
氨苄西林	350	192	55	21
		106 ^a	55	22
青霉素 G	335	176	60	34
		160 ^a	60	34
青霉素 V	351	192	60	16
		160 ^a	60	17
苯唑西林	402	243	60	18
		160 ^a	60	17
氯唑西林	436	277	120	18
		160 ^a	120	18
萘夫西林	415	171	70	52
		199 ^a	70	20

表 2 (续)

目标化合物	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	解簇电压 V	碰撞能量 eV
双氯西林	470	311	120	19
		160 ^a	120	19
哌拉西林	518	160	60	15
		143 ^a	60	20
阿洛西林	462	246	60	17
		218 ^a	60	26
甲氧西林	381	222	40	21
		165 ^a	40	25
阿莫西林-d ₄	370	212	60	17
氨苄西林-d ₅	355	111	65	25
青霉素 G-d ₇	342	183	120	18
萘夫西林-d ₆	421	205	120	18

^a 为定量碎片离子。

8.5 测定法

8.5.1 定性测定

在同样测试条件下, 试料溶液中青霉素类药物的保留时间与标准工作液中青霉素类药物的保留时间之比, 偏差在±2.5%以内, 且检测到的相对离子丰度, 应与浓度相当的标准溶液相对丰度一致。其允许偏差应符合表 3 的要求。

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	单位为百分号			
	>50	20~50	>10~20	≤10
允许偏差	±20	±25	±30	±50

8.5.2 定量测定

取试料溶液和混合标准工作溶液等体积进样测定, 作单点或多点校准, 以色谱峰面积定量, 按内标法计算, 其中阿莫西林以阿莫西林-d₄为内标, 氨苄西林以氨苄西林-d₅为内标, 青霉素 G、青霉素 V、苯唑西林、氯唑西林和双氯西林以青霉素 G-d₇为内标, 萘夫西林、哌拉西林、阿洛西林和甲氧西林以萘夫西林-d₆为内标。标准溶液及试料溶液中青霉素类药物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。在上述液相色谱-质谱条件下, 标准溶液中特征离子质量色谱图见附录 B。

8.6 空白试验

取空白试料, 除不加标准溶液外, 采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试料中青霉素类药物的残留量按标准曲线或公式(1)计算。

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

式中:

X —— 试料中被测物质残留量的数值, 单位为微克每千克(μg/kg);

C_s —— 标准工作溶液中被测物质浓度的数值, 单位为纳克每毫升(ng/mL);

C_{is} —— 试料溶液中内标浓度的数值, 单位为纳克每毫升(ng/mL);

C'_{is} —— 标准工作溶液中内标浓度的数值, 单位为纳克每毫升(ng/mL);

A —— 试料溶液中被测物质的峰面积;

A'_{is} —— 标准工作溶液中内标的峰面积;

A_{is} ——试料溶液中内标的峰面积；
 A_s ——标准工作溶液中被测物质的峰面积；
 V ——试料溶液浓缩后定容体积的数值，单位为毫升(mL)；
 V_1 ——试料提取液体积的数值，单位为毫升(mL)；
 V_2 ——试料提取液过柱体积的数值，单位为毫升(mL)；
 m ——试料质量的数值，单位为克(g)。

10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法的检出限：氨苄西林、青霉素 G、青霉素 V、苯唑西林、氯唑西林、双氯西林、萘夫西林、哌拉西林、阿洛西林、甲氧西林均为 $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，阿莫西林为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

本方法的定量限：氨苄西林、青霉素 G、青霉素 V、苯唑西林、氯唑西林、双氯西林、萘夫西林、哌拉西林、阿洛西林、甲氧西林均为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，阿莫西林为 $25 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法中氨苄西林、青霉素 G、青霉素 V、苯唑西林、氯唑西林、双氯西林、萘夫西林、哌拉西林、阿洛西林和甲氧西林添加浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 300 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，阿莫西林添加浓度为 $25 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 300 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的回收率均为 $70\% \sim 120\%$ 。

10.3 精密度

本方法批内相对标准偏差 $\leq 15\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 15\%$ 。

附录 A

(资料性)

青霉素类药物的英文名称、分子式和 CAS 号

11 种青霉素类药物的英文名称、分子式和 CAS 号见表 A. 1。

表 A. 1 11 种青霉素类药物的英文名称、分子式和 CAS 号

化合物	英文名称	分子式	CAS 号
阿莫西林	Amoxicillin	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	26787-78-0
氨苄西林	Ampicillin	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	69-53-4
青霉素 G	Penicillin G	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	61-33-6
青霉素 V	Penicillin V	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₅ S	87-08-1
苯唑西林	Oxacillin	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	66-79-5
氯唑西林	Clloxacillin	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₅ S	61-72-3
双氯西林	Dicloxacillin	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₅ S	3116-76-5
萘夫西林	Nafcillin	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₅ S	147-52-4
哌拉西林	Piperacillin	C ₂₃ H ₂₇ N ₅ O ₇ S	61477-96-1
阿洛西林	Azlocillin	C ₂₀ H ₂₃ N ₅ O ₆ S	37091-66-0
甲氧西林	Methicillin	C ₁₇ H ₂₁ N ₂ NaO ₇ S	7246-14-2

附录 B
(资料性)
目标化合物特征离子质量色谱图

目标化合物特征离子质量色谱图见图 B. 1。

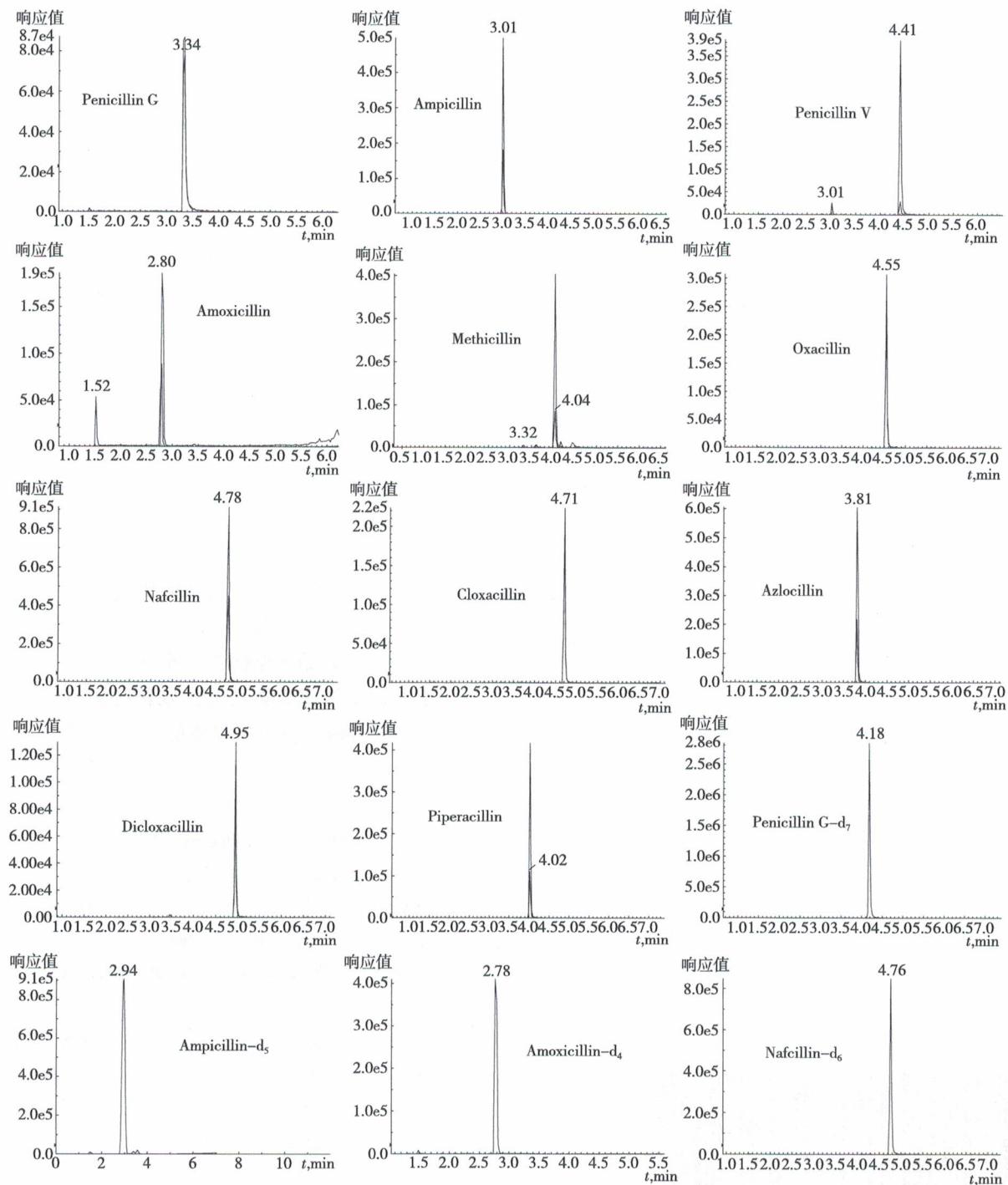


图 B. 1 青霉素类药物混合标准溶液特征离子质量色谱图(5 μg/L)

中华人民共和国

国家标准

食品安全国家标准

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 31656.12—2021

* * *

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15 千字

2022 年 1 月第 1 版 2022 年 1 月北京第 1 次印刷

书号: 16109 · 8748

定价: 24.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



GB 31656.12—2021