



中华人民共和国国家标准

GB 31659.10—2025

食品安全国家标准 禽蛋中 β -内酰胺类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard—
Determination of β -lactams residues in poultry eggs by liquid
chromatography-tandem mass spectrometry method

2025-06-03 发布

2025-09-01 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。

食品安全国家标准

禽蛋中 β -内酰胺类药物残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了禽蛋中青霉素 V、青霉素 G、氨苄西林、氯唑西林、阿莫西林、头孢氨苄、头孢唑肟残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于禽蛋中青霉素 V、青霉素 G、氨苄西林、氯唑西林、阿莫西林、头孢氨苄、头孢唑肟残留量的测定。

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

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中残留的青霉素 V、青霉素 G、氨苄西林、氯唑西林、阿莫西林、头孢氨苄、头孢唑肟，经 80% 乙腈水溶液提取，固相萃取柱净化浓缩，液相色谱-串联质谱测定，基质匹配标准溶液内标法定量。

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。

5.1.3 甲醇(CH_3OH): 色谱纯。

5.2 溶液配制

5.2.1 50% 乙腈水溶液: 取乙腈 50 mL，用水稀释至 100 mL。

5.2.2 80% 乙腈水溶液: 取乙腈 80 mL，用水稀释至 100 mL。

5.2.3 0.1% 甲酸乙腈溶液: 取甲酸 1 mL，用乙腈稀释至 1 000 mL。

5.2.4 0.1% 甲酸水溶液: 取甲酸 1 mL，用水稀释至 1 000 mL。

5.3 标准品

青霉素 V、青霉素 G、氨苄西林、氯唑西林、阿莫西林、头孢氨苄、头孢唑肟、青霉素 V- D_5 、青霉素- D_7 、氨苄西林- D_5 、氯唑西林- $^{13}\text{C}_4$ 、阿莫西林- D_4 、头孢氨苄- D_5 、头孢唑肟- D_7 标准品，含量均 $\geq 95\%$ ，具体见附录 A。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液: 取青霉素 V、青霉素 G、氨苄西林、氯唑西林、阿莫西林、头孢氨苄、头孢唑肟标准品各适量（相当于有效成分约 10 mg），精密称定，分别用 50% 乙腈水溶解并稀释定容于 100 mL 容量瓶中，配

制成浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液, 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 有效期 1 个月。

5.4.2 内标储备液: 取青霉素 V-D₅、青霉素-D₇、氨苄西林-D₅、氯唑西林-¹³C₄、阿莫西林-D₄、头孢氨苄-D₅、头孢唑肟-D₇ 标准品各适量(相当于有效成分约 10 mg), 精密称定, 分别用 50% 乙腈水溶解并稀释定容于 100 mL 容量瓶中, 配制成浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的内标储备液, 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 有效期 1 个月。

5.4.3 混合标准工作液: 分别精密量取 100 $\mu\text{g/mL}$ 的青霉素 V、青霉素 G、氨苄西林、氯唑西林、阿莫西林、头孢氨苄、头孢唑肟标准储备液各 0.1 mL, 于 100 mL 容量瓶中, 用 50% 乙腈水稀释至刻度, 配制成浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作液, 临用现配。

5.4.4 混合内标工作液: 分别精密量取 100 $\mu\text{g/mL}$ 的青霉素 V-D₅、青霉素-D₇、氨苄西林-D₅、氯唑西林-¹³C₄、阿莫西林-D₄、头孢氨苄-D₅、头孢唑肟-D₇ 内标储备液各 0.1 mL, 于 100 mL 容量瓶中, 用 50% 乙腈水稀释至刻度, 配制成浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 的混合内标工作液, 临用现配。

5.5 材料

5.5.1 固相萃取柱: 反相混合型亲水亲脂平衡共聚物固相萃取柱, 200 mg/6 mL, 或相当者。

5.5.2 微孔尼龙滤膜: 0.22 μm 。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪: 带电喷雾离子源。

6.2 分析天平: 感量分别为 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 涡旋混合器。

6.4 振荡器。

6.5 冷冻离心机: 转速 10 000 r/min。

6.6 氮吹仪。

6.7 固相萃取装置。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

取适量新鲜或冷藏的空白或供试禽蛋, 去壳后混合均匀。

a) 取均质的供试样品, 作为供试试样;

b) 取均质的空白样品, 作为空白试样;

c) 取均质的空白样品, 添加适宜浓度的标准工作液, 作为空白添加试样。

7.2 试样的保存

-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

称取禽蛋试料(2 $\pm$ 0.05) g, 置于 50 mL 塑料离心管, 添加混合内标工作液 100 μL , 加 80% 乙腈水溶液 6.0 mL, 涡旋混匀 1 min, 中速振荡提取 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液备用。

8.2 净化

将固相萃取柱安装到预先清洁过的真空萃取装置上, 直接取上清液 3.0 mL 通过小柱, 保持自然流速, 收集全部流出液。40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴氮吹至近干, 加入水 1.0 mL 溶解残余物, 涡旋混匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 供液相色谱-串联质谱测定。

8.3 基质匹配标准曲线的制备

精密量取混合标准工作液和混合内标工作液适量, 用水稀释配制成青霉素 V、青霉素 G、氨苄西林、氯唑西林、阿莫西林、头孢氨苄、头孢唑肟浓度为 1 $\mu\text{g/L}$ 、2 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$, 内标

浓度为 5 μg/L 的系列标准工作溶液,从中各取 1.0 mL 分别加入 6 份经 8.1 提取和 8.2 净化的空白试料浓缩液中,充分溶解混匀为基质匹配标准工作溶液,临用现配,微孔滤膜过滤,供液相色谱-串联质谱测定。以测试药物和其对应内标的特征离子峰面积之比为纵坐标、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(150 mm×2.1 mm,粒径 1.8 μm),或相当者;
- b)

柱温:30 ℃;
- c)

进样量:10 μL;
- d)

流速:0.3 mL/min;
- e)

流动相:A 为 0.1%甲酸乙腈溶液,B 为 0.1%甲酸水溶液,梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 min	A %	B %
0	5	95
5.0	80	20
8.0	80	20
8.1	5	95
10.0	5	95

8.4.2 质谱参考条件

- a)

离子源:电喷雾(ESI)离子源;
- b)

扫描方式:正离子扫描;
- c)

检测方式:多反应监测;
- d)

喷雾电压:5 500 V;
- e)

离子源温度:400 ℃;
- f)

雾化气压力(Gas1):379 kPa;
- g)

辅助加热气压力(Gas2):234 kPa;
- h)

气帘气压力(Curtain gas):241 kPa;
- i)

待测药物定性离子对、定量离子对、去簇电压和碰撞能量参考值见表 2。

表 2 待测药物定性离子对、定量离子对、去簇电压和碰撞能量参考值

被测物名称	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	去簇电压 V	碰撞能量 eV
青霉素 V	351.0>160.0	351.0>160.0	60	22
	351.0>114.0			47
青霉素 G	334.9>160.0	334.9>160.0	60	22
	334.9>176.0			22
氨苄西林	350.0>106.0	350.0>106.0	55	36
	350.0>160.0			25
氯唑西林	436.0>160.0	436.0>160.0	60	25
	436.0>277.0			23
阿莫西林	366.0>114.0	366.0>114.0	45	30
	366.0>208.0			19
头孢氨苄	347.9>158.0	347.9>158.0	40	18
	347.9>174.0			23
头孢噻肟	529.0>134.0	529.0>134.0	44	22
	529.0>396.0			19

表 2（续）

被测物名称	定性离子对 <i>m/z</i>	定量离子对 <i>m/z</i>	去簇电压 V	碰撞能量 eV
青霉素 V-D ₅	356.0>160.0	356.0>160.0	60	22
青霉素-D ₇	342.0>160.0	342.0>160.0	60	22
氨苄西林-D ₅	355.0>111.1	355.0>111.1	40	35
阿莫西林-D ₁	370.0>114.0	370.0>114.0	45	30
氯唑西林- ¹³ C ₄	440.0>160.0	440.0>160.0	60	25
头孢氨苄-D ₅	353.0>158.0	353.0>158.0	40	18
头孢唑肟-D ₇	536.0>141.0	536.0>141.0	44	47

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在相同测试条件下,试料溶液中 β-内酰胺类药物与其相应内标的保留时间之比与基质匹配标准溶液中 β-内酰胺类药物与其相应内标的保留时间之比偏差在 1% 以内;且检测到的相对离子丰度应与浓度相当的基质匹配标准溶液相对离子丰度一致,其允许偏差为 ±40%。

8.4.3.2 定量测定

取试料溶液和基质匹配标准溶液,做单点或多点校准,按内标法定量。基质匹配标准溶液及试料溶液中目标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-串联质谱条件下,β-内酰胺类药物标准溶液特征离子质量色谱图见附录 B。

8.5 空白试验

取空白试样,除不加药物外,采用完全相同的测定步骤进行平行测定。

9 结果计算和表述

试样中 β-内酰胺类药物的残留量按标准曲线或公式(1)计算。

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

式中:

- X ——试样中 β-内酰胺类药物残留量的数值,单位为微克每千克(μg/kg);
- A_i ——试料溶液中 β-内酰胺类药物的峰面积;
- A'_{is} ——基质匹配标准溶液中 β-内酰胺类药物内标的峰面积;
- C_s ——基质匹配标准溶液中 β-内酰胺类药物浓度的数值,单位为微克每升(μg/L);
- C_{is} ——试料溶液中 β-内酰胺类药物内标浓度的数值,单位为微克每升(μg/L);
- V ——溶解残余物所用溶液体积的数值,单位为毫升(mL);
- V₂ ——提取液总体积的数值,单位为毫升(mL);
- A_{is} ——试料溶液中 β-内酰胺类药物内标的峰面积;
- A_s ——基质匹配标准溶液中 β-内酰胺类药物的峰面积;
- C'_{is} ——基质匹配标准溶液中 β-内酰胺类药物内标浓度的数值,单位为微克每升(μg/L);
- V₁ ——用于净化过柱的提取液体积的数值,单位为毫升(mL);
- m ——供试试料质量的数值,单位为克(g);

10 方法灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

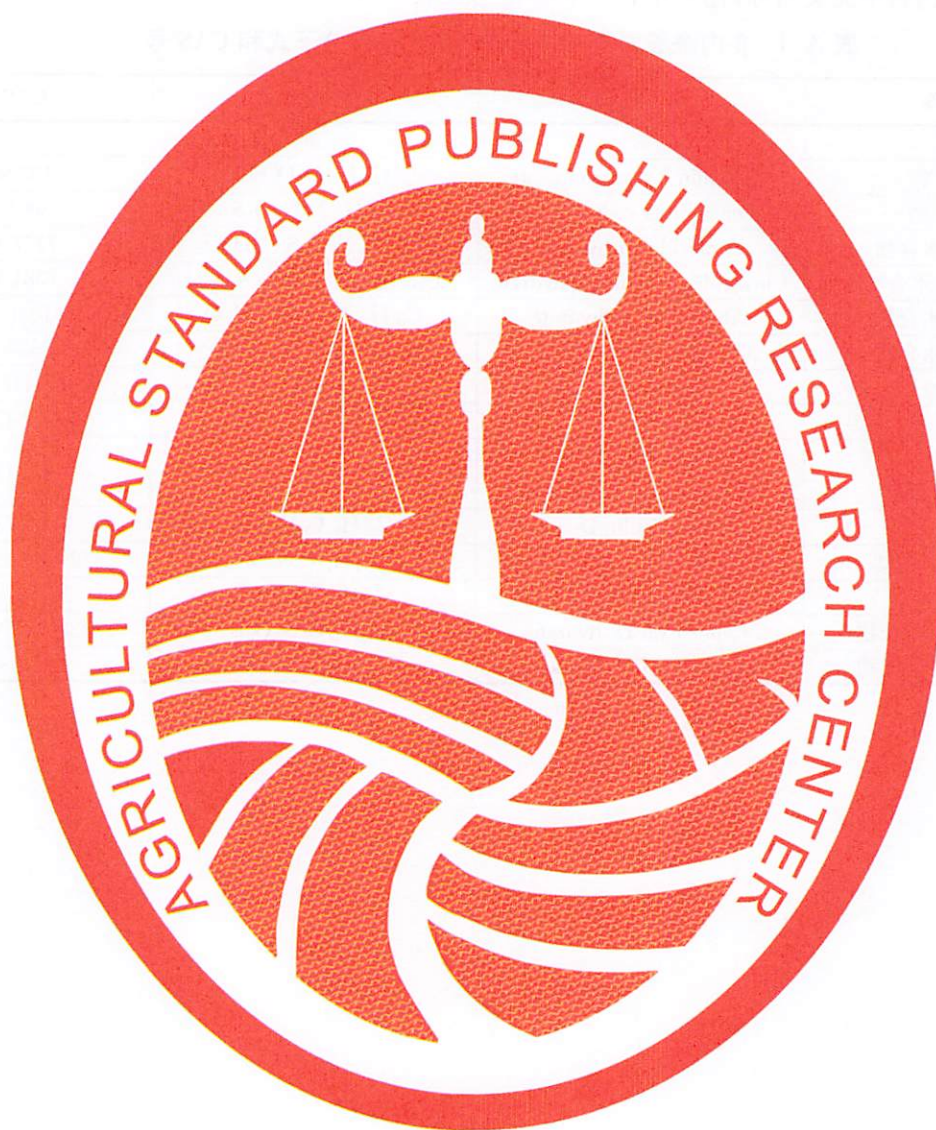
本方法青霉素 V、青霉素 G、氨苄西林、氯唑西林、阿莫西林、头孢氨苄、头孢唑肟的检出限为 1 μg/kg,定量限为 2 μg/kg。

10.2 正确度

本方法青霉素 V、青霉素 G、氨苄西林、氯唑西林、阿莫西林、头孢氨苄、头孢唑肟在 $2\ \mu\text{g}/\text{kg}\sim 20\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 70%~120%。

10.3 精密度

本方法批内相对标准偏差 $\leq 20\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。



附 录 A
(资料性)

β-内酰胺类药物中英文名称、化学分子式和 CAS 号

β-内酰胺类药物中英文名称、化学分子式和 CAS 号见表 A. 1。

表 A. 1 β-内酰胺类药物中英文名称、化学分子式和 CAS 号

中文名称	英文名称	化学分子式	CAS 号
CAS 号			
青霉素 V 钾	Penicillin Vpotassium salt	C ₁₆ H ₁₇ N ₂ O ₅ SK	132-98-9
青霉素 G 钠	Penicillin G sodium salt	C ₁₆ H ₁₇ N ₂ NaO ₄ S	69-57-8
氨苄西林三水合物	Ampicillin trihydrate	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S · 3H ₂ O	7177-48-2
氯唑西林钠一水合物	Cloxacillin sodiumsalt hydrate	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₃ O ₅ SNa × H ₂ O	7081-44-9
阿莫西林三水合物	Amoxicillin trihydrate	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S · 3H ₂ O	61336-70-7
头孢氨苄一水合物	Cefalexin monohydrate	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄ S · H ₂ O	23325-78-2
硫酸头孢喹肟	Cefquinome sulfate	C ₂₃ H ₂₅ N ₆ O ₅ S ₂ × HSO ₄	118443-89-3
青霉素 V-D ₅	Penicillin V-D ₅	C ₁₆ H ₁₃ D ₅ N ₂ O ₅ S	1356837-87-0
青霉素-D ₇ N-乙基哌啶鎓盐	Benzylpenicilline-D ₇ N-ethylpiperidinium salt	C ₁₆ H ₁₀ D ₇ N ₂ O ₄ S × C ₇ H ₁₆ N	1217445-37-8
氨苄西林-D ₅	Ampicillin-D ₅	C ₁₆ H ₁₄ D ₅ N ₃ O ₄ S	1426173-65-0
氯唑西林- ¹³ C ₄ 钠盐	Cloxacillin- ¹³ C ₄ sodium salt	C ₁₅ ¹³ C ₄ H ₁₇ ClN ₃ NaO ₅ S	642-78-4-unlabelled
阿莫西林-D ₄	Amoxicillin-D ₄	C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₅ SD ₄	2673270-36-3
头孢氨苄-D ₅ 一水合物	Cephalexin-D ₅ hydrate	C ₁₆ H ₁₄ D ₅ N ₃ O ₅ S	23325-78-2-unlabelled
头孢喹肟-D ₇ 氢碘化物	Cefquinome-D ₇ hydroiodide	C ₂₃ H ₁₈ D ₇ IN ₆ O ₅ S ₂	118443-88-2

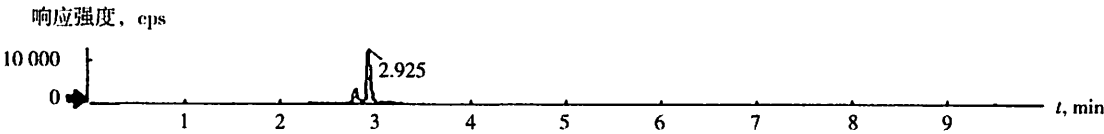
附 录 B

(资料性)

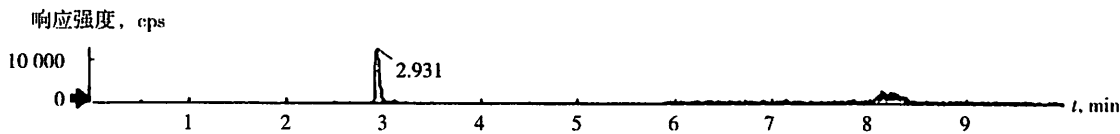
β -内酰胺类药物标准溶液特征离子质量色谱图

β -内酰胺类药物标准溶液特征离子质量色谱图见图 B. 1。

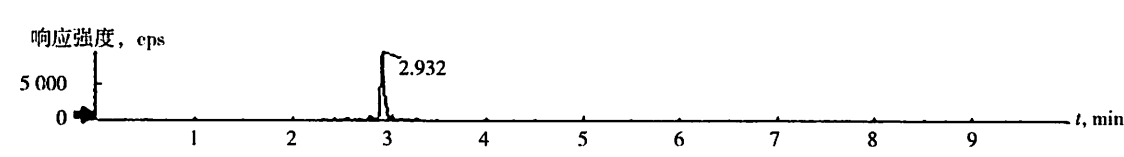
XIC from 20210120. wiff (sample 15)-S1pph, +MRM (24 transitions): Cefquinome IS (536.0/141.0)



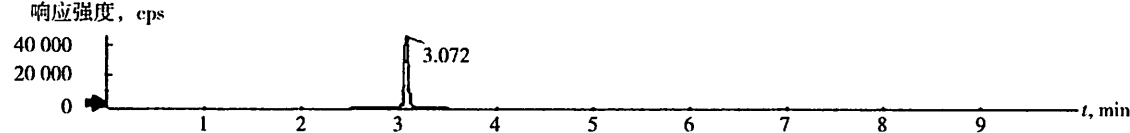
XIC from 20210120.wiff (sample 15)-S1pph, +MRM (24 transitions): Cefquinome 1 (529.0/134.0)



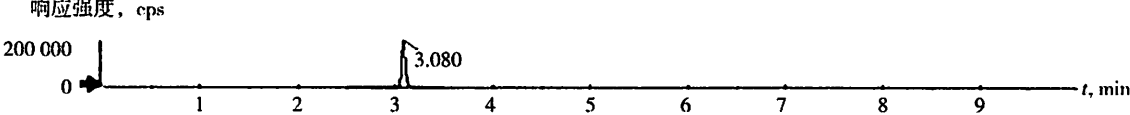
XIC from 20210120 wiff (sample 15)-S1pph, +MRM (24 transitions): Cefquinome 2 (529.0/396.0)



XIC from 20210120 wiff (sample 15)-S1pph, +MRM (24 transitions): Cefalexin IS (353.0/158.0)



XIC from 20210120 wiff (sample 15)-S1pph, +MRM (24 transitions): Cefalexin 1 (347.9/158.0)



XIC from 20210120 wiff (sample 15)-S1pph, +MRM (24 transitions): Cefalexin 2 (347.9/174.0)



图 B. 1 β -内酰胺类药物标准溶液特征离子质量色谱图

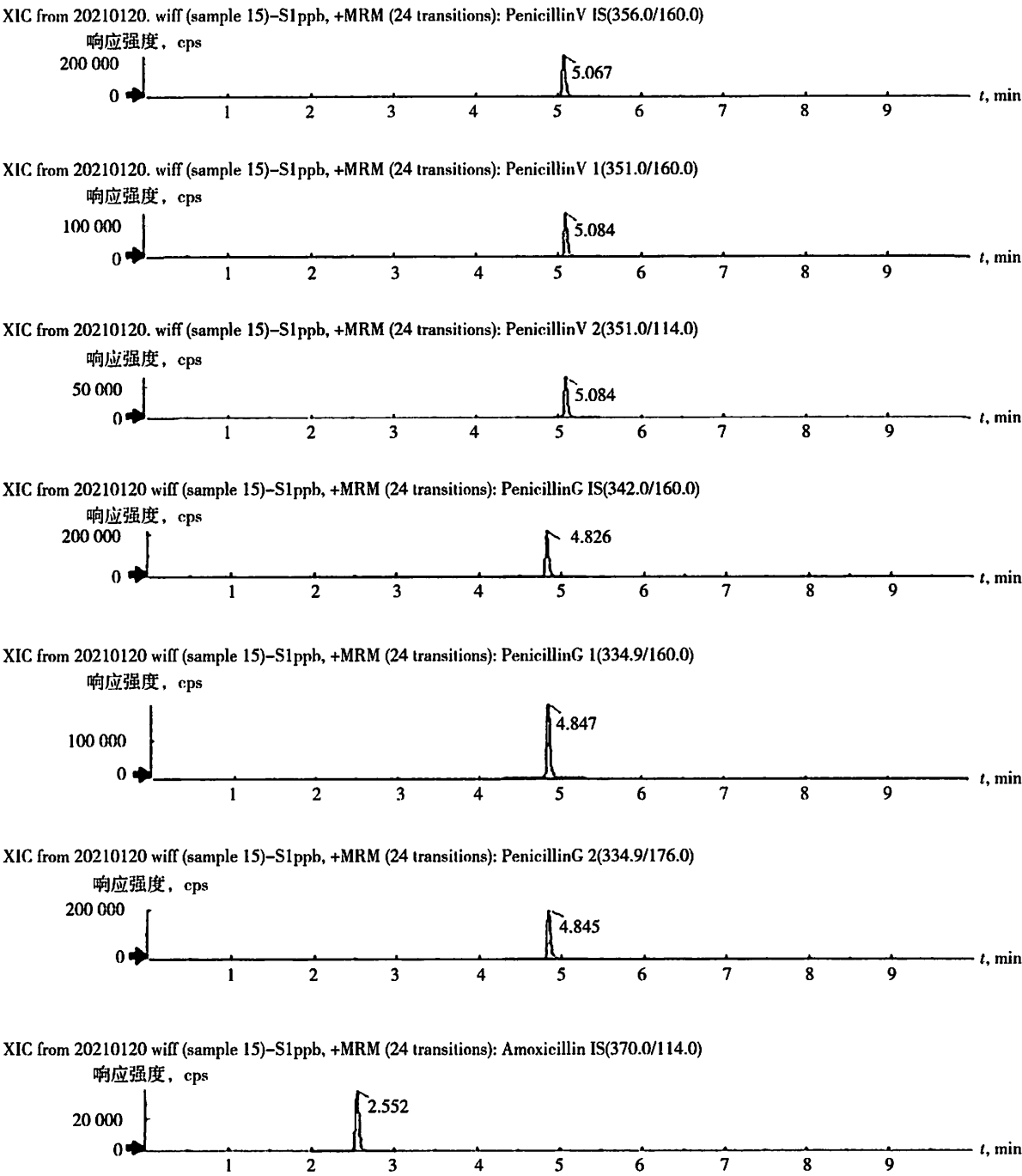


图 B. 1 (续)

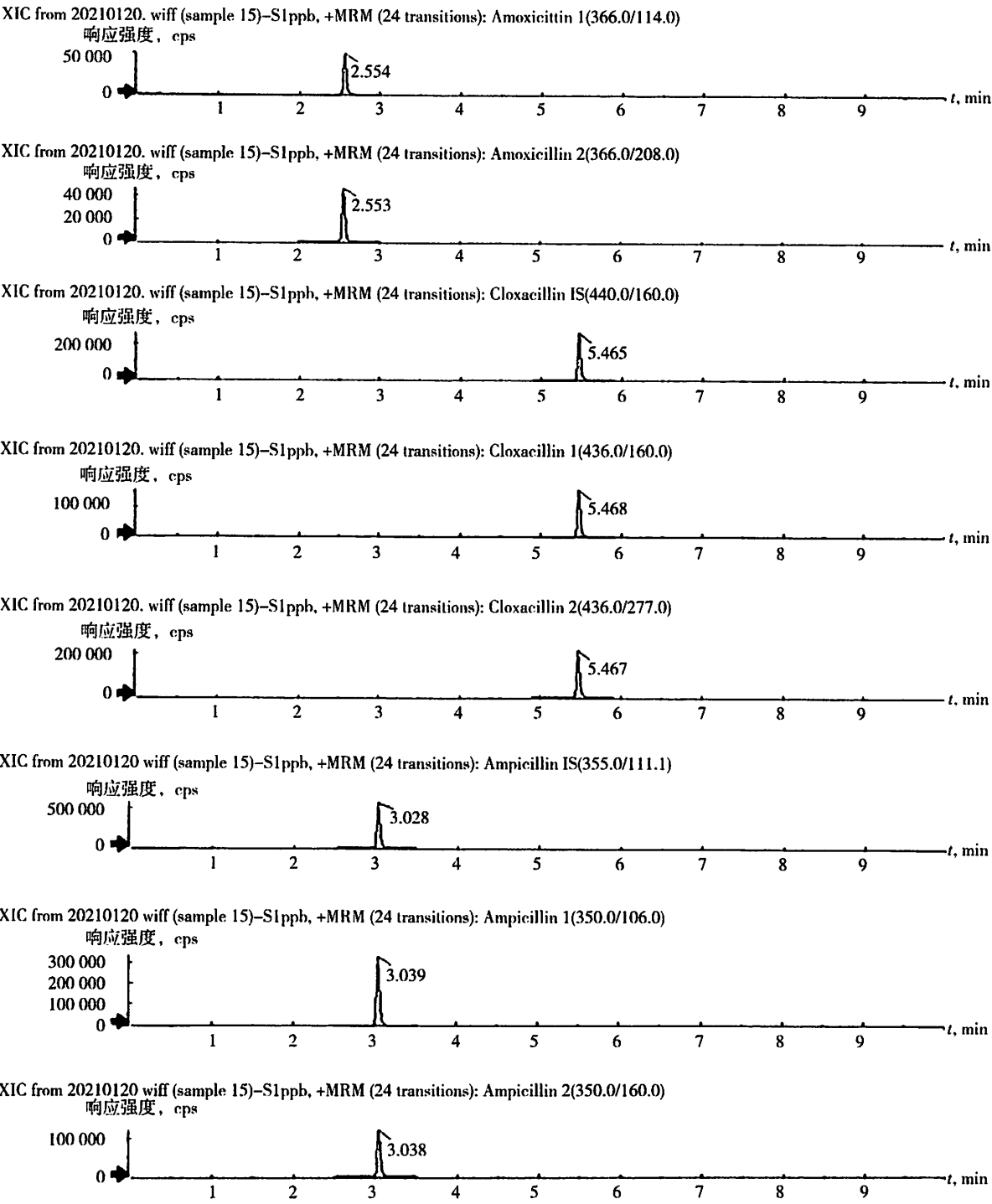


图 B. 1 (续)

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
食品安全国家标准 禽蛋中 β -内酰胺类药物
残留量的测定 液相色谱-串联质谱法
GB 31659.10—2025

* * *

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)
北京印刷集团有限责任公司印刷
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 1 字数 20 千字
2025 年 8 月第 1 版 2025 年 8 月北京第 1 次印刷
书号: 16109·10319
定价: 32.00 元



GB 31659.10—2025

版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 59194261