



中华人民共和国国家标准

GB ×××××.×—××××

食品安全国家标准  
禽蛋中氨基糖苷类药物残留量的测定  
液相色谱-串联质谱法

National food safety standard-

Determination of aminoglycosides residues in eggs by liquid  
chromatography-tandem mass spectrometry method

××××-××-××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  
国家市场监督管理总局

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》的规定起草。

本文件系首次发布。

征求意见稿

# 食品安全国家标准

## 禽蛋中氨基糖苷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大观霉素、双氢链霉素、链霉素、卡那霉素、庆大霉素、新霉素、潮霉素B和安普霉素等氨基糖苷类药物残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于禽蛋中大观霉素、双氢链霉素、链霉素、卡那霉素A、庆大霉素C1、庆大霉素C1a、庆大霉素C2+C2a、新霉素B、潮霉素B和安普霉素等氨基糖苷类药物残留量的检测。

### 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

试料中残留的氨基糖苷类药物用三氯乙酸溶液提取，亲水-亲脂固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱法测定，外标法定量。

### 5 试剂和材料

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 甲醇（CH<sub>3</sub>OH）：色谱纯。

5.1.2 乙腈（CH<sub>3</sub>CN）：色谱纯。

5.1.3 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

5.1.4 异丙醇（C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OH）：色谱纯。

5.1.5 乙酸铵（CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>）：色谱级。

5.1.6 三氯乙酸（Cl<sub>3</sub>CCOOH）。

5.1.7 氨水（NH<sub>4</sub>OH）。

## 5.2 溶液配制

5.2.1 5%三氯乙酸溶液：取三氯乙酸 50 g，用水溶解并稀释至 1 000 mL。

5.2.2 5%甲醇溶液：取甲醇 5 mL，用水稀释至 100 mL。

5.2.3 0.1 mol/L 乙酸铵溶液：取乙酸铵 0.77 g，用水溶解并稀释至 100 mL。

5.2.4 0.002 mol/L 乙酸铵溶液：取 0.1 mol/L 乙酸铵溶液 10 mL，用水稀释至 500 mL。

5.2.5 洗脱溶液：取甲酸 20 mL、异丙醇 10 mL、0.002 mol/L 乙酸铵溶液 170 mL，混匀，用甲酸调节 pH 至 0.8。

5.2.6 流动相 A：取甲酸 5 mL、0.1 mol/L 乙酸铵溶液 10 mL，用水稀释至 500 mL。

5.2.7 流动相 B：取甲酸 5 mL、0.1 mol/L 乙酸铵溶液 10 mL，用乙腈稀释至 500 mL。

## 5.3 标准品

盐酸大观霉素、硫酸卡那霉素A含量≥96.0%，硫酸双氢链霉素、硫酸链霉素、潮霉素B含量≥92.0%，庆大霉素C1五乙酸盐、庆大霉素C1a五乙酸盐、庆大霉素C2五乙酸盐含量≥95.0%，硫酸新霉素B、硫酸安普霉素含量≥99.0%，具体见附录A。

## 5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液：取标准品各适量（相当于各活性成分约 10 mg），精密称定，用水适量使溶解并稀释定容至 10 mL 聚丙烯容量瓶，分别制成浓度均为 1 mg/mL 的标准储备液。于聚丙烯圆形广口瓶中 2℃~8℃保存，有效期 1 个月。

5.4.2 混合标准中间液：准确移取双氢链霉素、链霉素、卡那霉素 A、庆大霉素 C1、庆大霉素 C2+C2a、潮霉素 B 和安普霉素标准储备液各 0.1 mL，大观霉素、庆大霉素 C1a、新霉素 B 标准储备液各 0.2 mL，于 10 mL 聚丙烯容量瓶，用水稀释定容至刻度，配制成混合标准中间液，其中双氢链霉素、链霉素、卡那霉素 A、庆大霉素 C1、庆大霉素 C2+C2a、潮霉素 B 和安普霉素浓度均为 10 μg/mL，大观霉素、庆大霉素 C1a、新霉素 B 浓度均为 20 μg/mL。于聚丙烯圆形广口瓶中 2~8℃保存，有效期 1 周。

5.4.3 混合标准工作液：准确移取混合标准中间液适量，用洗脱溶液稀释，配制成双氢链霉素、链霉素、卡那霉素 A、庆大霉素 C1、庆大霉素 C2+C2a、潮霉素 B 和安普霉素浓度分别为 0.125 μg/mL、0.25 μg/mL、0.50 μg/mL、0.75 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、3 μg/mL，大观霉素、庆大霉素 C1a、新霉素 B 浓度分别为 0.25 μg/mL、0.50 μg/mL、1 μg/mL、1.5 μg/mL、2 μg/mL、4 μg/mL、6 μg/mL 的混合标准工作液。临用现配。

## 5.5 材料

5.5.1 亲水-亲脂固相萃取柱：200 mg/6 mL，或相当者。

5.5.2 尼龙微孔滤膜：0.22 μm。

## 6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）。

6.2 分析天平：感量 0.00001 g 和 0.01 g。

- 6.3 涡旋混合器。
- 6.4 振荡混合器。
- 6.5 低温高速离心机：转速不低于 1 0000 r/min。
- 6.6 pH 计。
- 6.7 组织匀浆机。
- 6.8 固相萃取装置。
- 6.9 聚丙烯容量瓶。
- 6.10 聚丙烯圆形广口瓶。

## 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，并使均质。

——取均质后的供试样品，作为供试试样。

——取均质后的空白样品，作为空白试样。

——取均质后的空白样品，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℃以下保存。

## 8 测定步骤

### 8.1 提取

取试料5 g（准确至±0.05 g）于50 mL聚丙烯离心管，加5%三氯乙酸溶液20 mL，涡旋混合1 min，振荡提取15 min，4℃下10 000 r/min离心5 min，收集上清液，用氨水调节pH至7.5，备用。

### 8.2 净化

固相萃取柱依次用甲醇、水各5 mL活化，取备用液过柱，依次用水、5%甲醇溶液各3 mL淋洗，抽干。用洗脱溶液2.0 mL进行洗脱，收集洗脱液，抽干，涡旋，尼龙微孔滤膜过滤，供液相色谱-串联质谱仪测定。

### 8.3 基质匹配标准曲线的制备

取空白试料，按8.1与8.2中步骤处理得到空白基质溶液。准确移取混合标准工作液各100 μL，用空白基质溶液稀释至1 mL，制成双氢链霉素、链霉素、卡那霉素A、庆大霉素C1、庆大霉素C2+C2a、潮霉素B和安普霉素浓度分别为12.5 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、75 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、300 ng/mL，大观霉素、庆大霉素C1a、新霉素B浓度分别为25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、150 ng/mL、200 ng/mL、400 ng/mL、600 ng/mL的系列基质匹配标准溶液，供液相色谱-串联质谱仪测定。以定量离子对质量色谱峰面积为纵坐标，相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：酰胺基柱，100 mm×2.1 mm，1.7  $\mu\text{m}$ ，或相当者；  
 b) 柱温：40  $^{\circ}\text{C}$ ；  
 c) 进样量：5  $\mu\text{L}$ ；  
 d) 流速：0.3 mL/min；  
 e) 流动相：A为甲酸-乙酸铵溶液，B为甲酸-乙酸铵乙腈溶液，梯度洗脱条件见表1。

表1 梯度洗脱条件

时间 min	A %	B %
0.0	20	80
2.5	20	80
3.5	65	35
5.5	90	10
6.7	90	10
7.5	20	80
12.0	20	80

## 8.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源；  
 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：5500 V；  
 e) 雾化温度：550  $^{\circ}\text{C}$ ；  
 f) 气帘气：30 psi；  
 g) 雾化气：65 psi；  
 h) 定性、定量离子对和去簇电压、碰撞能量见表2。

表2 定性离子对、定量离子对和碰撞电压

化合物	定性离子对 $m/z$	定量离子对 $m/z$	去簇电压 V	碰撞能量 eV
大观霉素	333.1>98.2	333.1>98.2	155	33.0
	333.1>140.1			31.0
双氢链霉素	584.4>263.1	584.4>263.1	244	40.0
	584.4>246.2			57.0
链霉素	582.4>263.2	582.4>263.2	270	44.3
	582.4>221.4			49.0
卡那霉素 A	485.2>163.2	485.2>163.2	50	33.0
	485.2>324.3			24.3
庆大霉素 C1	478.4>157.2	478.4>157.2	85	20.8
	478.4>322.2			27.0

庆大霉素 C1a	450.8>322.3	450.8>322.3	85	20.0
	450.8>160.0			35.0
庆大霉素 C2+ C2a	464.0>160.3	464.0>160.3	61	31.0
	464.0>322.0			19.0
新霉素 B	615.4>161.3	615.4>161.3	90	38.0
	615.4>293.2			34.9
潮霉素 B	528.3>177.1	528.3>177.1	30	39.2
	528.3>351.9			33.6
安普霉素	540.3>378.3	540.3>378.3	108	25.0
	540.3>217.0			36.0

## 8.5 测定法

### 8.5.1 定性测定

在同样测试条件下，试料溶液中氨基糖苷类药物色谱峰的保留时间与基质配备标准溶液中相应峰的保留时间相对偏差在±2.5%以内，且检测到的相对离子丰度，应当与浓度相当的基质匹配标准溶液相对离子丰度一致。其允许偏差应符合表3的要求。

表3 定性确证时相对离子丰度的允许偏差

单位为百分号

相对离子丰度	>50	20~50	10~20	≤10
允许偏差	±20	±25	±30	±50

### 8.5.2 定量测定

取试料溶液和相应的基质配备标准溶液，作单点或多点校准，按外标法以特征离子质量色谱峰面积定量，基质配备标准溶液及试料溶液中的氨基糖苷类药物响应值均应在仪器检测的线性范围内。在上述色谱-质谱条件下，氨基糖苷类药物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，采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

## 9 结果计算和表述

试样中氨基糖苷类药物的残留量按标准曲线或公式（1）计算。

$$X = \frac{C_s \times A \times V}{A_s \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X—供试试样中氨基糖苷类药物残留量的数值，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

$C_s$ —基质匹配标准溶液中氨基糖苷类药物浓度的数值，单位为纳克每毫升（ $\text{ng}/\text{mL}$ ）；

A—试料溶液中氨基糖苷类药物的色谱峰面积；

$A_s$ —基质匹配标准溶液中氨基糖苷类药物的色谱峰面积；

$V$ —溶液残余物所用溶液体积的数值，单位为毫升（mL）；

$m$ —供试试料的质量，单位为克（g）。

## 10 方法灵敏度、准确度和精密度

### 10.1 灵敏度

本方法双氢链霉素、链霉素、卡那霉素A、庆大霉素C1、庆大霉素C2+C2a、潮霉素B、安普霉素的检测限均为 $5\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ，大观霉素、庆大霉素C1a、新霉素B的检测限均为 $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

本方法双氢链霉素、链霉素、卡那霉素A、庆大霉素C1、庆大霉素C2+C2a、潮霉素B、安普霉素的定量限均为 $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ，大观霉素、庆大霉素C1a、新霉素B的定量限均为 $20\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

### 10.2 准确度

本方法在 $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $4000\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为60%~110%。

### 10.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差 $\leq 15\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。



附录A  
(资料性)  
氨基糖苷类药物中英文通用名称、化学分子式和CAS号

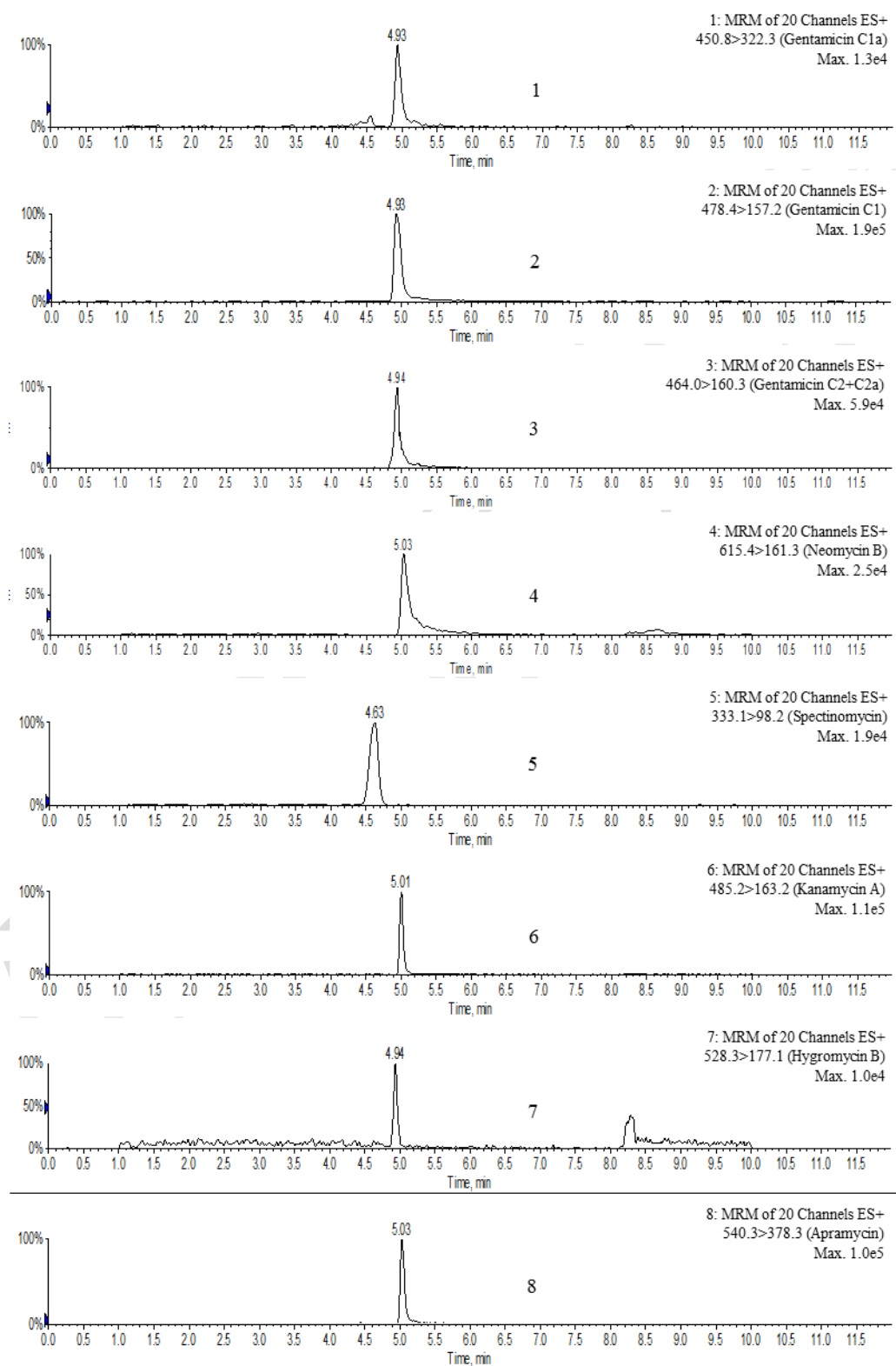
氨基糖苷类药物中英文通用名称、化学分子式和CAS号见表A.1。

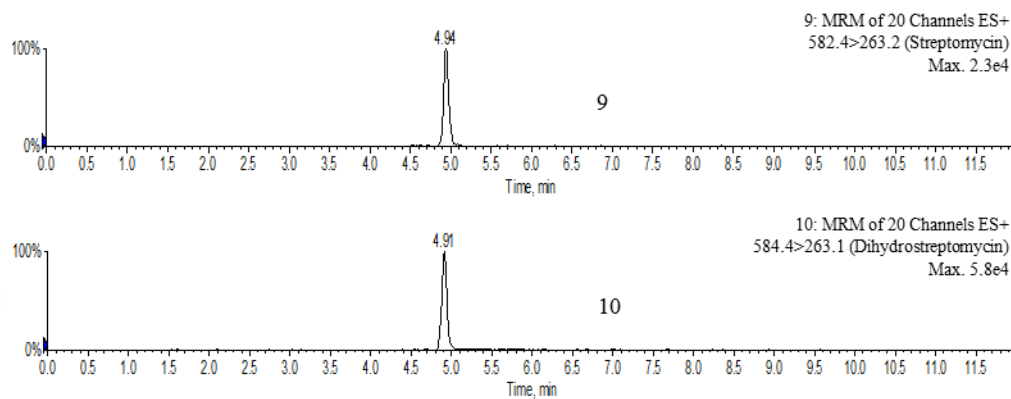
表A.1 氨基糖苷类药物中英文通用名称、化学分子式和CAS号

化合物名称	英文通用名称	化学分子式	CAS 号
盐酸大观霉素	Spectinomycin dihydrochloride	$C_{14}H_{24}N_2O_7 \cdot 2HCl$	21736-83-4
硫酸双氢链霉素	Dihydrostreptomycin sesquisulfate	$C_{21}H_{41}N_7O_{12} \cdot 3/2H_2SO_4$	5490-27-7
硫酸链霉素	Streptomycin sulfate	$C_{21}H_{39}N_7O_{12} \cdot 3/2H_2SO_4$	3810-74-0
硫酸卡那霉素 A	Kanamycin sulfate	$C_{18}H_{36}N_4O_{11} \cdot H_2SO_4$	25389-94-0
庆大霉素 C1 五乙酸盐	Gentamicin C1 Pentaacetate Salt	$C_{21}H_{43}N_5O_7 \cdot 5CH_3CO_2H$	25876-10-2
庆大霉素 C1a 五乙酸盐	Gentamicin C1a Pentaacetate Salt	$C_{19}H_{39}N_5O_7 \cdot 5CH_3CO_2H$	26098-04-4
庆大霉素 C2 五乙酸盐(含 C2、C2a)	Gentamicin C2 Pentaacetate Salt	$C_{20}H_{41}N_5O_7 \cdot 5CH_3CO_2H$	287916-51-2
硫酸新霉素 B	Neomycin B sulfate	$C_{23}H_{46}N_6O_{13} \cdot 3H_2SO_4$	4146-30-9
潮霉素 B	Hygromycin B	$C_{20}H_{37}N_3O_{13}$	31282-04-9
硫酸安普霉素	Apramycin sulfate	$C_{21}H_{41}N_5O_{11} \cdot H_2SO_4$	65710-07-8

**附录B**  
(资料性)  
**氨基糖苷类药物特征离子质量色谱图**

氨基糖苷类药物特征离子质量色谱图见图B.1。





标引序号说明:

- 1——庆大霉素 C1a 特征离子质量色谱图 (450.8>322.3)
- 2——庆大霉素 C1 特征离子质量色谱图 (478.4>157.2)
- 3——庆大霉素 C2+C2a 特征离子质量色谱图 (464.0>160.3)
- 4——新霉素 B 特征离子质量色谱图 (615.4>161.3)
- 5——大观霉素特征离子质量色谱图 (333.1>98.2)
- 6——卡那霉素 A 特征离子质量色谱图 (485.2>163.2)
- 7——潮霉素 B 特征离子质量色谱图 (528.3>177.1)
- 8——安普霉素特征离子质量色谱图 (540.3>378.3)
- 9——链霉素特征离子质量色谱图 (582.4>263.2)
- 10——双氢链霉素特征离子质量色谱图 (584.4>263.1)

图 B.1 鸡蛋基质匹配氨基糖苷类标准溶液特征离子质量色谱图

(双氢链霉素、链霉素、卡那霉素 A、庆大霉素 C1、庆大霉素 C2+C2a、潮霉素 B、安普霉素均为 25 ng/mL, 大观霉素、庆大霉素 C1a、新霉素 B 均为 50 ng/mL)