



中华人民共和国国家标准

GB ×××××—××××

食品安全国家标准 动物性食品中庆大霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard

Determination of gentamicin residues in animal derived foods by liquid
chromatography-tandem mass spectrometric method

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××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。

征求意见稿

食品安全国家标准

动物性食品中庆大霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了动物性食品中庆大霉素残留检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于猪、牛、羊、鸡的肌肉、脂肪、肝脏和肾脏组织以及牛奶和鸡蛋中庆大霉素的残留量测定。

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 分析实验室用水规则和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的庆大霉素残留用磷酸盐缓冲溶液提取，混合型阳离子交换固相萃取柱净化。液相色谱-串联质谱测定，基质匹配外标法定量。

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 乙腈（ CH_3CN ）：色谱纯。

5.1.2 甲醇（ CH_3OH ）：色谱纯。

5.1.3 甲酸（ HCOOH ）：色谱纯。

5.1.4 醋酸（ CH_3COOH ）：色谱纯。

5.1.5 乙酸铵（ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ）：色谱纯。

5.1.6 七氟丁酸酐 (C₈F₁₄O₃)：色谱纯。

5.1.7 三氯乙酸 (CCl₃COOH)。

5.1.8 乙二胺四乙酸二钠 (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈)。

5.1.9 磷酸二氢钾 (KH₂PO₄)。

5.1.10 氨水 (NH₃ H₂O)。

5.2 溶液配制

5.2.1 15%氨化甲醇溶液：量取氨水15 mL，用甲醇稀释至100 mL，现用现配。

5.2.2 0.3%醋酸溶液：量取醋酸0.3 mL，用水稀释至100 mL。

5.2.3 磷酸盐缓冲液：称取磷酸二氢钾1.36 g，用980 mL水溶解，分别加入乙二胺四乙酸二钠0.15 g和三氯乙酸20 g，溶解混匀并用水稀释至1000 mL，至4℃保存，有效期一个月。

5.2.4 2 mol/L乙酸铵溶液：称取乙酸铵15.416 g，用水溶解并稀释至100 mL。

5.2.5 0.1%甲酸溶液(含2 mmol/L乙酸铵)：取2 mol/L乙酸铵溶液1 mL，甲酸1 mL，用水稀释至1000 mL。

5.2.6 0.1%甲酸乙腈溶液：取甲酸1 mL，用乙腈稀释至1000 mL。

5.2.7 1%七氟丁酸酐醋酸溶液：量取0.5 mL的七氟丁酸酐，用0.3%醋酸溶液稀释至50 mL。现用现配。

5.3 标准品

5.3.1 庆大霉素 (Gentamicin, C₆₀H₁₂₃N₁₅O₂₁, CAS号1403-66-3)：纯度≥94%。其中C1组分含量为31.0%，C1a组分含量为22.2%，C2与C2a组分含量为46.8%。各组分含量可能因不同生产厂家而异，仅为参考，也可以采用相应单组分标准品。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准贮备液：取庆大霉素标准品约10 mg，精确至0.1mg，用水溶解并稀释成浓度为1 mg/mL的标准贮备液，置-20℃避光保存，有效期6个月。

5.4.2 标准中间液：准确量取庆大霉素标准贮备溶液适量，用1%七氟丁酸酐醋酸溶液稀释定容，得到庆大霉素浓度为10 μg/mL。现用现配。

5.4.3 系列标准工作液：准确量取庆大霉素标准中间液适量，用1%七氟丁酸酐醋酸溶液稀释定容，得到庆大霉素浓度为5 μg/L、10 μg/L、50 μg/L、100 μg/L、200 μg/L、500 μg/L（其中庆大霉素C1组分为1.55、3.1、15.5、31.0、62.0、155 μg/L；庆大霉素C1a组分为1.11、2.22、11.1、22.2、44.4、111 μg/L；庆大霉素C2+C2a组分为2.34、4.68、23.4、46.8、93.6、234 μg/L）的标准工作液。现用现配。

5.5 材料

5.5.1 混合模式的阳离子交换固相萃取柱：规格为60 mg/3 mL，或相当者。

5.5.2 微孔水系滤头：聚醚砜（PES）微孔滤膜，0.22 μm。

5.5.3 塑料进样小瓶。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源（ESI）。

6.2 分析天平：感量 0.01 g 和 0.000 01 g。

6.3 漩涡混合仪。

6.4 组织匀浆机。

6.5 超声清洗仪。

6.6 高速冷冻离心机：转速不低于 10000 r/min。

6.7 固相萃取装置。

6.8 氮吹仪。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

7.1.1 猪、牛、羊、鸡的肌肉、脂肪、肝脏和肾脏组织

取新鲜或冷冻空白或供试组织，绞碎，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。

7.1.2 牛奶

取新鲜或冷藏空白或供试牛奶，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。

7.1.3 鸡蛋

取新鲜或冷藏空白或供试鸡蛋，去壳，混合，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 °C以下贮存。

8 测定步骤

8.1 提取

称取试样(2±0.05) g于50 mL离心管中，加10 mL磷酸盐缓冲液提取，涡旋混匀1 min，超声提取5 min，以10000 r/min离心10 min。取上清液于另一50 mL离心管中。残渣再加磷酸盐缓冲液4 mL，重复提取一次，合并两次提取液并用磷酸盐缓冲液定容至15 mL，涡旋混匀，为备用液，供固相萃取柱净化。

8.2 净化

混合型阳离子交换柱依次用甲醇5 mL和水5 mL活化，取7.5 mL的备用液上柱，流干后，依次用水5 mL和甲醇5 mL淋洗，抽干，用15%氯化甲醇5 mL洗脱，收集洗脱液于10 mL塑料离心管中，于40 °C下用氮气吹至近干，加入1 mL 1%七氟丁酸酐醋酸溶液复溶，充分涡旋，用0.22 μm滤膜过滤，滤液装塑料进样小瓶，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

取空白样品，按“7.1”和“7.2”处理样品，获得试样空白基质，分别取庆大霉素标准工作液1 mL，溶解吹至近干后的空白试剂残余物，制得浓度5 μg/L、10 μg/L、50 μg/L、100 μg/L、200 μg/L、500 μg/L的系列基质匹配标准工作溶液（其中庆大霉素C1组分为1.55、3.1、15.5、31.0、62.0、155 μg/L；庆大霉素C1a组分为1.11、2.22、11.1、22.2、44.4、111 μg/L；庆大霉素C2+C2a组分为2.34、4.68、23.4、46.8、93.6、234 μg/L），供液相色谱-串联质谱仪测定。以各组分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，绘制基质匹配标准曲线。求各组分回归方程和相关系数，当样品中庆大霉素含量超出标准曲线线性范围时，用相应空白基质溶液稀释至标准曲线线性范围内后进行测定。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

a) 色谱柱：EC-C₈ (3.0x100 mm, 2.7 μm) 或相当者；

b) 柱温：35 °C；

- c) 流速: 0.4 mL/min;
- d) 进样量: 10 μ L;
- e) 流动相 A: 0.1%甲酸溶液 (含 2 mmol/L 乙酸铵); 流动相 B: 0.1%甲酸乙腈溶液;
- f) 梯度洗脱程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.0	90.0	10.0
1.0	90.0	10.0
4.0	70.0	30.0
4.1	5.0	95.0
5.0	5.0	95.0
5.1	90.0	10.0
8.0	90.0	10.0

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) 离子源温度 (TEM): 500 $^{\circ}$ C;
- e) 离子化电压 (IS): 5500 V;
- f) 气帘气 (CUR): 172.368932 kPa (25 psi);
- g) 喷雾气 (GS1): 344.737864 kPa (50 psi);
- h) 辅助加热气 (GS2): 344.737864 kPa (50 psi);
- i) 定性、定量离子及对应的锥孔电压和碰撞电压见表 2。

表2 庆大霉素特征离子参考质谱条件

目标物	母离子	子离子	去簇电压 (V)	碰撞能量 (eV)
庆大霉素C1a	450.2	322.1*	95	20
		159.9	95	30
庆大霉素 C2+C2a	464.2	322.1*	105	20
		160.1	105	25
庆大霉素C1	478.2	322.1*	105	25

		160.1	105	30
--	--	-------	-----	----

注：*为定量离子

8.4.3 定性测定

通过样品色谱图的保留时间与标准品的保留时间、色谱峰的特征离子与相应浓度标准品色谱峰的特征离子相对照定性。试样溶液与标准溶液被测物保留时间偏差在±0.1 min以内；且检测到的相对离子丰度，应与浓度相当的校正标准溶液相对离子丰度一致。其允许偏差为±40%。

8.4.4 定量测定

取空白样品溶液与相应的标准工作液，配制基质标准曲线，做单点或多点校准，按外标法计算试样中庆大霉素的残留量。实测试料采用多点校正的方式定量；对于超过标准曲线最高点浓度的样品，将样品稀释后到线性范围内后进行定量。相关图谱见附录 A。

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测定。

9 结果计算和表述

按标准曲线或公式（1）计算供试试料中庆大霉素单组分残留量 X_{C1} 、 X_{C1a} 、 X_{C2+C2a} ，再按公式（2）将各组分残留量相加即得到庆大霉素总组分残留量。

$$X = \frac{C_s \times A \times V_1 \times V_3}{A_s \times m \times V_2} \dots\dots\dots (1)$$

$$X_{\text{总}} (\mu\text{g/kg}) = X_{C1} + X_{C1a} + X_{C2+C2a} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X ——试料中被测庆大霉素单组分的残留量（ $\mu\text{g/kg}$ ），分别用 X_{C1} 、 X_{C1a} 、 X_{C2+C2a} 表示；

C_s ——对照溶液中庆大霉素单组分的浓度（ ng/mL ）；

A ——试料溶液中庆大霉素单组分的色谱峰面积；

A_s ——对照溶液中庆大霉素单组分的色谱峰面积；

m ——试料的质量（ g ）；

V_1 ——备用液的总体积（ mL ）；

V_2 ——过柱上样液的体积（ mL ）；

V_3 ——残余物定容的体积（ mL ）；

$X_{\text{总}}$ ——被测试料中庆大霉素总组分的残留量（ $\mu\text{g/kg}$ ）。

10 检测方法灵敏度、准确度、精密度

10.1 灵敏度

本方法在猪、牛、羊、鸡肌肉、脂肪、肝脏和肾脏组织以及鸡蛋和牛奶中的定量限为10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；检测限为5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法庆大霉素在10~10000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平下，庆大霉素总组分及各组分的回收率范围为60%~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 $\leq 20\%$ 。

附录 A

(资料性)

庆大霉素标准溶液定量离子色谱图

庆大霉素标准溶液 (100 ng/mL) 定量离子色谱图见图 A.1 - 图 A.3

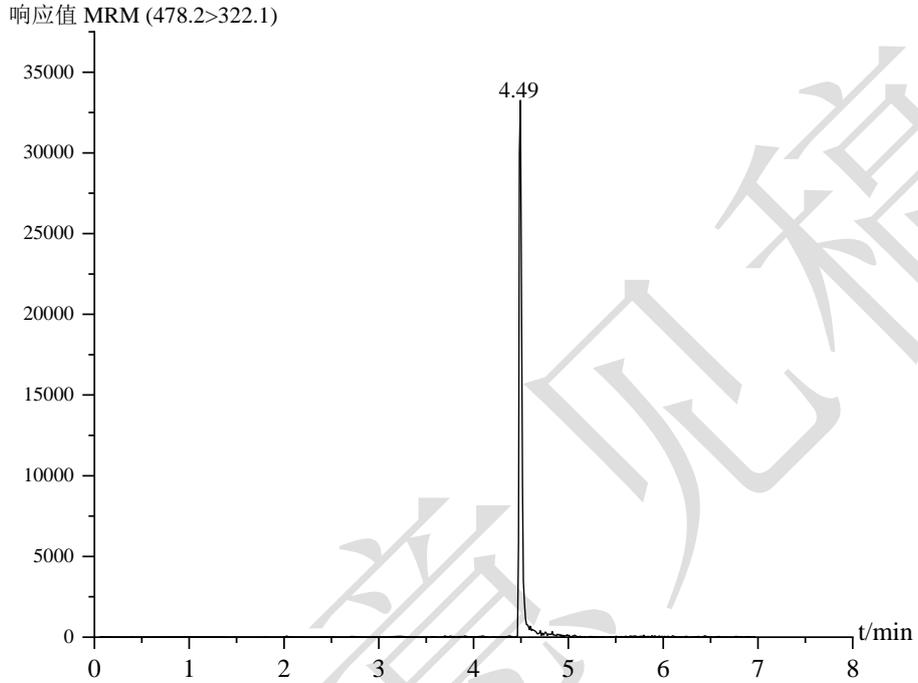


图 A.1 庆大霉素 C1 标准溶液定量离子色谱图 (RT = 4.49 min)

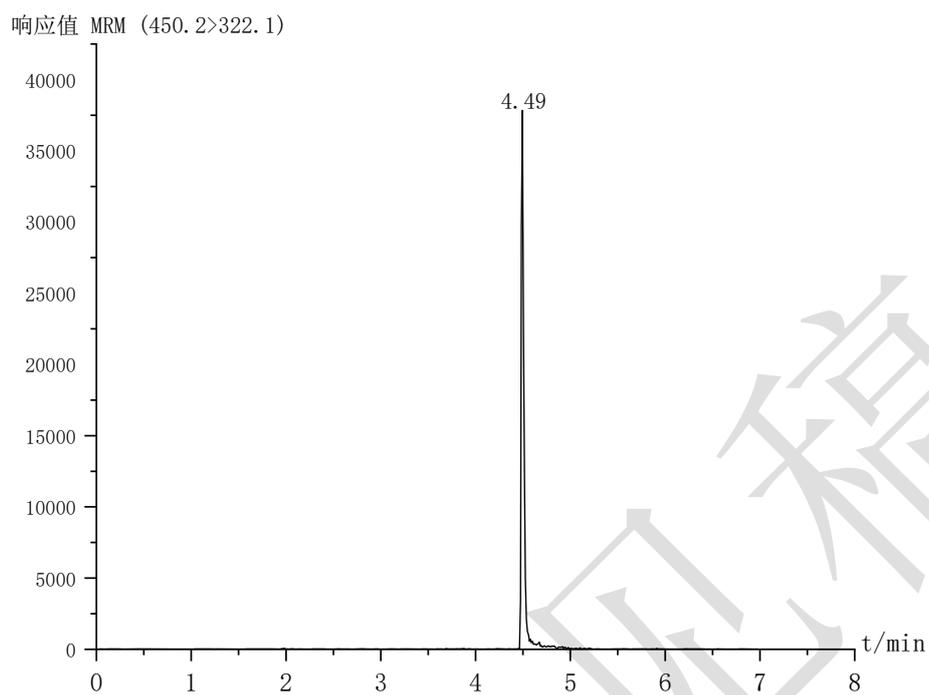


图 A.2 庆大霉素 C1A 标准溶液定量离子色谱图 (RT = 4.49 min)

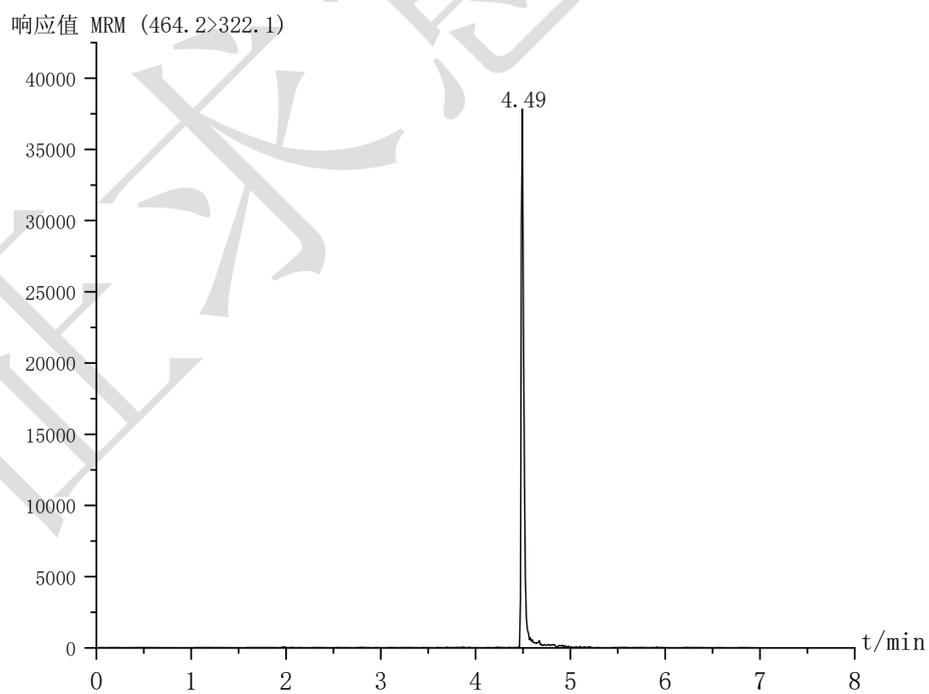


图 A.3 庆大霉素 C2+CA2 标准溶液定量离子色谱图 (RT = 4.49 min)