



# 中华人民共和国国家标准

GB XXXX—XXXX

## 食品安全国家标准

### 动物性食品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 the aminoglycoside residues in animal derived food by liquid  
chromatography- tandem mass spectrometric method

(征求意见稿)

20xx-xx-xx 发布

20xx-xx-xx 发布

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

本文件规定了动物性食品中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。

本文件适用于猪、牛、羊、鸡的肌肉、肝脏、肾脏、脂肪和鱼（皮+肉）中大观霉素、潮霉素B、链霉素、双氢链霉素、阿米卡星、卡那霉素A、妥布霉素、新霉素B、庆大霉素（C1、C2+C2a、C1a）和安普霉素共10种氨基糖苷类药物残留量的测定。

### 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

试料中残留的氨基糖苷类药物，用含三氯乙酸的磷酸盐缓冲溶液提取，固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱法测定，安普霉素、潮霉素B、新霉素B和妥布霉素内标法定量，其余化合物外标法定量。

### 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 甲酸铵 (NH<sub>4</sub>COOH)：色谱纯。
- 5.1.5 三氯乙酸 (Cl<sub>3</sub>CCOOH)。
- 5.1.6 磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)。
- 5.1.7 氢氧化钠 (NaOH)。
- 5.1.8 乙二胺四乙酸二钠 (Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O)。
- 5.1.9 盐酸 (HCl)。
- 5.1.10 氯化钠 (NaCl)。

## 5.2 溶液配制

- 5.2.1 10 mol/L 氢氧化钠溶液：取氢氧化钠 40 g，用适量水溶解冷却后，用水稀释至 100 mL。
- 5.2.2 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液：取氢氧化钠 2 g，用适量水溶解冷却后，用水稀释至 100 mL。
- 5.2.3 0.5 mol/L 盐酸溶液：取盐酸 4.2 mL，用水稀释至 100 mL，混匀。
- 5.2.4 提取溶液：取磷酸二氢钾 1.36 g，加入 900 mL 水溶解，用 0.5 mol/L 盐酸溶液调 pH 值至 4.0，分别加入乙二胺四乙酸二钠 0.15 g、三氯乙酸 50.0 g 和氯化钠 50.0 g，用水稀释至 1000 mL，混匀。
- 5.2.5 5%甲醇溶液：取甲醇 5 mL，用水稀释至 100 mL。
- 5.2.6 洗脱溶液：取甲酸 10.0 mL、乙腈 5.0 mL，用水稀释至 100 mL，临用现配。
- 5.2.7 1%甲酸水溶液（含 1 mmol/L 甲酸铵）：取甲酸铵 0.0315 g，用适量水溶解，加入甲酸 5.0 mL，用水稀释至 500 mL。

## 5.3 标准品

阿米卡星、安普霉素、双氢链霉素、卡那霉素 A、新霉素 B、大观霉素、链霉素、庆大霉素（含 C1、C1a、C2+C2a）：含量均≥95.0%，潮霉素 B、妥布霉素：含量均≥92.0%。也可采用庆大霉素相应单组分标准品。D<sub>4</sub>-潮霉素 B、D<sub>7</sub>-安普霉素、D,<sup>18</sup>O-妥布霉素：含量均≥96.0%，具体见附录 A。

## 5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备溶液（1.0 mg/mL）：取标准品各适量（相当于各有效成分 10 mg），精密称定，用水溶解并定容至 10 mL 容量瓶中，配制成浓度均为 1.0 mg/mL 的标准储备液。转移至塑料密封容器中，于-18℃避光保存，有效期 6 个月。

注：若经常使用，建议将标准储备液分装成小包装，每次将小包装解冻使用。

5.4.2 内标储备溶液：取内标标准品适量，精密称定，分别加水溶解并定容至 10 mL 容量瓶中，配制成浓度均为 100 μg/mL 的标准储备液，于-18℃以下避光保存，有效期 6 个月。

5.4.3 混合标准中间液：分别精密量取标准储备液适量，用水稀释配制成阿米卡星、安普霉素、双氢链霉素、潮霉素 B、卡那霉素 A、庆大霉素和链霉素浓度为 10 μg/mL，大观霉素和妥布霉素浓度为 20 μg/mL；新霉素 B 浓度为 50 μg/mL 的混合标准溶液，转移至塑料密封容器中，4℃避光保存，有效期 1 个月。

5.4.4 混合内标中间液：分别精密量取内标储备液适量，用水稀释配制成浓度为 10 μg/mL 混合内标中间液，4℃避光保存，有效期 1 个月。

## 5.5 材料

5.5.1 通过式反相混合型亲水亲脂平衡共聚物固相萃取柱：500 mg/6 mL，或相当者。

5.5.2 微孔滤膜：0.22 μm。

5.5.3 具塞塑料离心管：50 mL 和 15 mL。

## 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 0.000 01 g 和 0.01g。

6.3 旋涡混合器。

6.4 超声波清洗器。

6.5 离心机：≥8 000 r/min。

6.6 组织匀浆机。

6.7 pH 计。

6.8 固相萃取装置。

## 7 试料的制备与保存

### 7.1 试样的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织，绞碎，并使均质。鱼类按照 GB/T 30891-2014 附

录 B 的要求制样。

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

称取试料（ $5 \pm 0.05$ ）g于50 mL离心管中，加入混合内标中间液50  $\mu$ L，涡旋混合30 s，静置10 min。加提取溶液16 mL，涡旋混合2 min，室温下超声提取10 min，8000 r/min离心3 min，取上清液于另一50 mL离心管中。残渣先后加入提取液16 mL、8 mL重复提取2次，合并上清液。用10 mol/L氢氧化钠溶液调pH至 6~8之间，再用0.5 mol/L氢氧化钠溶液和/或0.5 mol/L盐酸溶液调pH至 6.8（ $\pm 0.1$ ），用水定容至50.0 mL，混匀。将上述提取液转至50 mL离心管8000 r/min离心3 min（必要时），滤纸过滤，收集滤液。准确移取5.0 mL滤液，加入10 mL水混匀，备用。

### 8.2 净化

固相萃取柱依次用甲醇5 mL和水5 mL活化。取备用液过柱，保持流速不高于1 mL/min，弃去流出液，依次用水3 mL和甲醇溶液3 mL淋洗，抽干。用洗脱溶液2.0 mL进行洗脱，收集全部洗脱液，抽干，涡旋混匀。过0.22  $\mu$ m微孔滤膜，滤液装入塑料进样瓶中，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

称取空白试样，除不加入混合内标中间液外，按 8.1 与 8.2 中步骤处理得到空白基质溶液。

准确移取混合标准中间液、混合内标中间液适量，用空白基质溶液配制阿米卡星、安普霉素、双氢链霉素、潮霉素B、卡那霉素A、庆大霉素C1、庆大霉素C2+C2a、庆大霉素C1a、链霉素浓度分别为5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、250 ng/mL；大观霉素和妥布霉素浓度分别为10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL；新霉素B浓度分别为25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、250 ng/mL、500 ng/mL、1250

ng/mL，内标浓度为25 ng/mL的基质匹配标准工作溶液，根据仪器性能和检测需要选择不少于5个浓度点，供液相色谱-串联质谱测定。临用前配制。

对于内标法定量的化合物，以待测药物特征离子与对应内标物特征离子的峰面积比值为纵坐标，对应的浓度为横坐标，绘制基质匹配标准曲线，求回归方程和相关系数；对于外标法定量的化合物，以各药物特征离子的峰面积为纵坐标，对应的标准溶液浓度为横坐标，绘制基质匹配标准曲线，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：阳离子交换色谱柱（硅胶镶嵌羧酸类基团）(100 mm×2.1 mm, 5 μm)，或性能相当者；

b) 流动相：A相为乙腈，B相为1%甲酸水溶液（含1 mmol/L甲酸铵），梯度洗脱程序见表1；

c) 流速：0.3 mL/min；

d) 柱温：40 °C；

e) 进样量：5 μL。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.0	90	10
3.0	75	25
6.0	20	80
8.0	5	95
11.0	5	95
11.1	90	10
16.0	90	10

### 8.4.2 质谱参考条件

a) 离子源：电喷雾离子源；

b) 检测方式：多反应监测（MRM）；

c) 扫描方式：正离子扫描；离子源：电喷雾离子源（ESI源）；

d) 电喷雾电压：5500 V；

e) 雾化气压力：35 psi；

- f) 气帘气压力：30 psi；
- g) 辅助气压力：60 psi；
- h) 碰撞气压力：8 psi。
- i) 离子源温度：500 °C；
- j) 两个四极杆均采用单位质量分辨；
- k) 雾化气、辅助气为零级空气或高纯氮气，气帘气、碰撞气为高纯氮气，使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求；
- l) 定性离子对、定量离子对、驻留时间、去簇电压及碰撞能量见表2。

表 2 氨基糖苷类药物主要质谱参数

化合物	离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	去簇电压 /V	驻留时间/ (ms)	碰撞能 /V
阿米卡星	586.3/163.2	586.3/163.2	180	30	26
	586.3/425.2				45
安普霉素	540.3/217.1	540.3/378.1	175	30	34
	540.3/378.1				23
双氢链霉素	584.3/263.0	584.3/263.0	250	30	38
	584.3/246.0				48
潮霉素 B	528.3/352.2	528.3/177.2	210	30	34
	528.3/177.2				31
卡那霉素 A	485.3/163.1	485.3/163.1	140	30	31
	485.3/324.1				24
新霉素 B	615.3/203.0	615.3/203.0	220	30	47
	615.3/161.2				40
大观霉素	351.2/207.2	351.2/207.2	120	30	25
	351.2/333.1				28
妥布霉素	468.3/163.0	468.3/163.0	180	30	32
	468.3/324.3				22
链霉素	582.0/263.0	582.0/263.0	220	30	43
	582.0/246.0				49
庆大霉素 C1	478.3/322.2	478.3/322.2	200	30	23
	478.3/157.1				30
庆大霉素 C2+C2a	464.0/322.0	464.0/322.0	120	30	17.5
	464.0/160.0				30.6
庆大霉素 C1a	450.0/322.0	450.0/322.0	120	30	21
	450.0/160.0				31
D <sub>7</sub> -安普霉素	547.5/217.3	547.5/217.3	130	30	33.1
D <sub>4</sub> -潮霉素 B	532.5/179.3	532.5/179.3	100	30	35
D, <sup>18</sup> O-妥布霉素	471.4/205.0	471.4/205.0	100	30	31



注：安普霉素以 D<sub>7</sub>-安普霉素为内标，潮霉素以 D<sub>4</sub>-潮霉素 B 为内标，新霉素 B 和妥布霉素均以 D,<sup>18</sup>O-妥布霉素为内标，如果市场上有一一对应的同位素内标，优先采用。

### 8.4.3 测定法

#### 8.4.3.1 定性测定

在相同测试条件下，试样溶液中待测物质的保留时间与基质匹配标准工作液中待测物质的保留时间之比，偏差在±0.1min 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%。

#### 8.4.3.2 定量测定

取试样溶液和基质匹配标准工作溶液，作单点或多点校准，安普霉素、潮霉素B、新霉素B和妥布霉素按内标法以峰面积比计算，其他化合物按外标法以峰面积定量。基质匹配标准工作溶液及试样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，基质匹配标准溶液的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，采用相同的测定步骤进行平行操作。

## 9 结果计算和表述

### 9.1 内标法定量部分

试样中内标法定量的待测物的残留量按标准曲线或公式（1）计算：

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

式中：

X—试样中被测物质的残留量的数值，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

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

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

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

A—试样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；

$A_{is}$ —试样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；

$V$ —供试试样洗脱溶液体积，单位为毫升（mL）；

$V_1$ —提取液定容体积，单位为毫升（mL）；

$V_2$ —提取液过柱体积，单位为毫升（mL）；

$m$ —试样质量，单位为克（g）。

## 9.2 外标法定量部分

试样中外标法定量的待测物的残留量按标准曲线或公式（2）计算：

$$X = \frac{C_s \times A \times V}{A_s \times m} \times \frac{V_1}{V_2} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

$X$ —试样中被测组分残留量的数值，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

$A$ —试样中被测组分的峰面积；

$A_s$ —标准溶液中被测组分的峰面积；

$C_s$ —标准溶液中被测组分浓度的数值，单位为纳克每毫升（ $\text{ng}/\text{mL}$ ）；

$V$ —供试试样洗脱液体积，单位为毫升（mL）；

$V_1$ —提取液定容体积，单位为毫升（mL）；

$V_2$ —提取液过柱体积，单位为毫升（mL）；

$m$ —试样质量，单位为克（g）。

注：计算结果以平行测定结果的算术平均值表示，保留3位有效数字。

## 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：在肌肉、脂肪和鱼中阿米卡星、安普霉素、双氢链霉素、潮霉素B、卡那霉素A、链霉素、庆大霉素C1、庆大霉素C2+C2a、庆大霉素C1a的检出限均为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，大观霉素、妥布霉素的检出限为 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，新霉素B的检出限为 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ；在肝脏和肾脏中阿米卡星、安普霉素、双氢链霉素、潮霉素B、卡那霉素A、庆大霉素C1、庆大霉素C2+C2a、庆大霉素C1a的检出限均为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，链霉素、妥布霉素的检出限为 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，大观霉素、新霉素B的检出限为 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

本方法的定量限：在肌肉、脂肪和鱼中阿米卡星、安普霉素、双氢链霉素、潮霉素B、卡那霉素A、链霉素、庆大霉素C1、庆大霉素C2+C2a、庆大霉素C1a的定量限均为 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，

大观霉素、妥布霉素的定量限为40 µg/kg，新霉素B的定量限为200 µg/kg；在肝脏和肾脏中阿米卡星、安普霉素、双氢链霉素、潮霉素B、卡那霉素A、庆大霉素C1、庆大霉素C2+C2a、庆大霉素C1a的定量限均为20 µg/kg，链霉素、妥布霉素的定量限为40 µg/kg，大观霉素、新霉素B的定量限为200 µg/kg。

## 10.2 准确度

本方法阿米卡星、安普霉素、潮霉素B在20 µg/kg~200 µg/kg添加水平，卡那霉素A在20 µg/kg~5000 µg/kg添加水平，庆大霉素C1、庆大霉素C2+C2a、庆大霉素C1a在20 µg/kg~10000 µg/kg添加水平，链霉素、双氢链霉素在20 µg/kg~2000 µg/kg添加水平，妥布霉素在40 µg/kg~400 µg/kg添加水平，大观霉素在40 µg/kg~10000 µg/kg添加水平，新霉素B在200 µg/kg~18000 µg/kg添加水平上的回收率均为60%~120%。

## 10.3 精密度

本方法批内相对标准偏差≤20%，批间相对标准偏差≤20%。

## 附录A

(资料性附录)

氨基糖苷类药物中英文通用名称、化学分子式和CAS号

12种氨基糖苷类药物的中英文通用名称、化学分子式和CAS号见表A.1。

表 A.1 12 种氨基糖苷类药物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号

序号	化合物名称	英文名	化学分子式	CAS 号
1	链霉素	Streptomycin	$C_{21}H_{39}N_7O_{12}$	57-92-1
2	双氢链霉素	Dihydrostreptomycin	$C_{21}H_{41}N_7O_{12}$	5490-27-7
3	潮霉素 B	Hygromycin B	$C_{20}H_{37}N_3O_{13}$	31282-04-9
4	阿米卡星	Amikacin	$C_{22}H_{43}N_5O_{13}$	37517-28-5
5	安普霉素	Apramycin	$C_{21}H_{41}N_5O_{11}$	37321-09-8
6	大观霉素	Spectinomycin	$C_{14}H_{24}N_2O_7$	1695-77-8
7	新霉素 B	Neomycin B	$C_{23}H_{46}N_6O_{13}$	119-04-0
8	庆大霉素 (含 C1、C1a、C2+C2a)	Gentamicin Sulphate	/	1405-41-0
9	卡那霉素 A	Kanamycin	$C_{18}H_{36}N_4O_{11}$	25389-94-0
10	妥布霉素	Tobramycin	$C_{18}H_{37}N_5O_9$	32986-56-4
11	D4-潮霉素 B	Hygromycin B -d <sub>4</sub>	$C_{20}H_{33}D_4N_3O_{13}$	/
12	D7-安普霉素	Apramycin acetate -d <sub>7</sub>	$C_{21}H_{34}D_7N_5O_{11} \cdot XC_2H_4O_2$	/
13	D, <sup>18</sup> O-妥布霉素	Tobramycin-d, <sup>18</sup> O acetic acid salt	$^{18}OC_{18}H_{36}DN_5O_8 \cdot XC_2H_4O_2$	/

注：1.硫酸庆大霉素为混合物，所购买的标准品应标明各组分含量，也可采用相应单组分标准品。2.庆大霉素的结构式如图1所示。

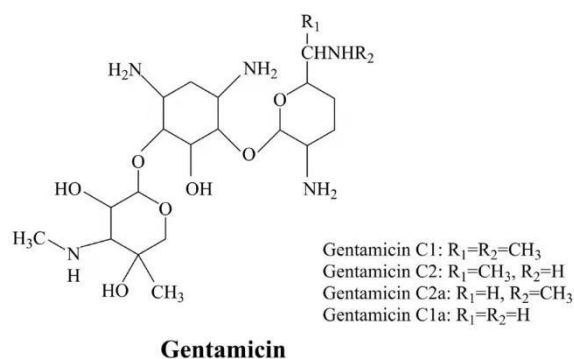


图 1. 庆大霉素结构式

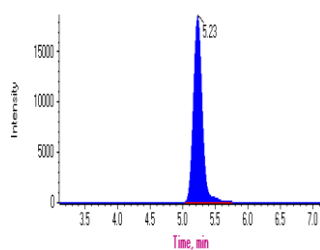
## 附录 B

(资料性)

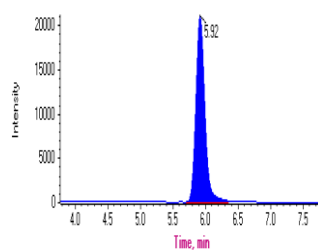
## 氨基糖苷类药物特征离子质量色谱图

猪肝基质匹配标准溶液特征离子质量色谱图见图B.1。

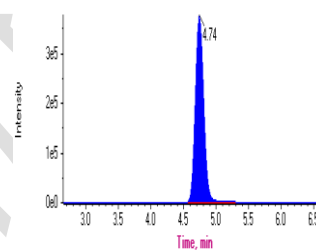
阿米卡星(586.3 / 163.2)



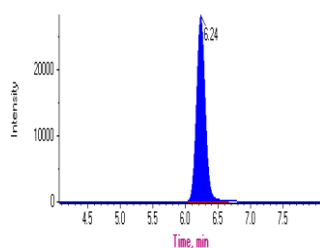
安普霉素(540.3 / 378.1)



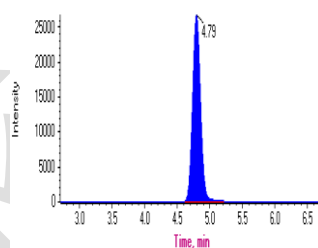
双氢链霉素(584.3 / 263.0)



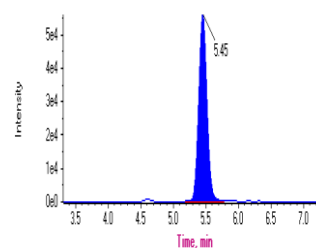
庆大霉素 C1 (478.3 / 322.2)



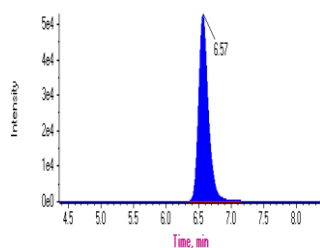
潮霉素 B (528.3 / 177.2)



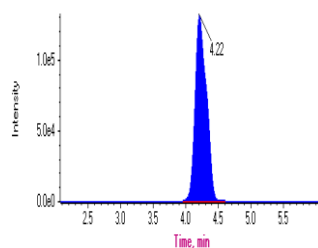
卡那霉素 A(485.3 / 163.1)



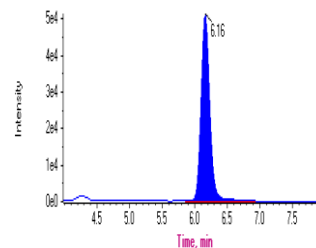
新霉素 B(615.3 / 203.0)

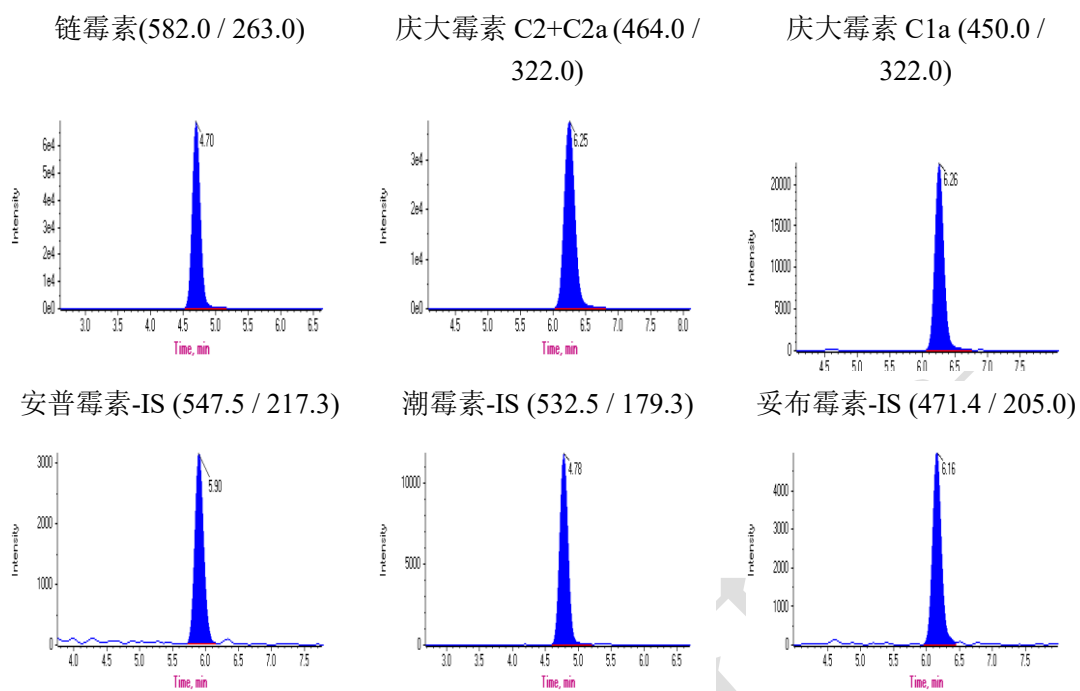


大观霉素(351.2 / 207.2)



妥布霉素(468.3 / 163.0)





图B.1 猪肝基质匹配标准溶液特征离子质量色谱图 (50 ng/mL)