



中华人民共和国国家标准

GB 31659.12—2025

食品安全国家标准 禽蛋和奶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 and milk 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

禽蛋和奶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

本文件规定了禽蛋和奶中大观霉素、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。

本文件适用于禽蛋和牛奶、羊奶中大观霉素、双氢链霉素、链霉素、卡那霉素 A、庆大霉素 C₁、庆大霉素 C_{1a}、庆大霉素 C₂+C_{2a}、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,其他类型奶的检测可参照执行。

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(CH₃OH):色谱纯。

5.1.2 乙腈(CH₃CN):色谱纯。

5.1.3 甲酸(HCOOH):色谱纯。

5.1.4 异丙醇(C₃H₇OH):色谱纯。

5.1.5 乙酸铵(CH₃COONH₄):色谱纯。

5.1.6 三氯乙酸(Cl₃CCOOH)。

5.1.7 氨水(NH₄OH)。

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 $\geq 96.0\%$,硫酸双氢链霉素、硫酸链霉素、潮霉素 B 含量 $\geq 92.0\%$,庆大霉素 C_1 五乙酸盐、庆大霉素 C_{1a} 五乙酸盐、庆大霉素 C_2 五乙酸盐含量 $\geq 95.0\%$,硫酸新霉素 B、硫酸安普霉素含量 $\geq 99.0\%$,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 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 1 个月。

5.4.2 混合标准中间液 I:准确移取双氢链霉素、链霉素、卡那霉素 A、庆大霉素 C_1 、庆大霉素 C_2+C_{2a} 、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 C_{1a} 、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 C_1 、庆大霉素 C_2+C_{2a} 、潮霉素 B 和安普霉素浓度均为 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$,大观霉素、庆大霉素 C_{1a} 、新霉素 B 浓度均为 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。于聚丙烯圆形广口瓶中 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 1 周。

5.4.3 混合标准中间液 II:准确移取潮霉素 B 安普霉素标准储备液各 0.1 mL,大观霉素、双氢链霉素、链霉素、卡那霉素 A 庆大霉素 C_1 、庆大霉素 C_{1a} 、庆大霉素 C_2+C_{2a} 、新霉素 B 标准储备液各 0.4 mL,于 10 mL 聚丙烯容量瓶,用水稀释至刻度,配制成混合标准中间液。其中,潮霉素 B 安普霉素浓度均为 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$,大观霉素、双氢链霉素、链霉素、卡那霉素 A 庆大霉素 C_1 、庆大霉素 C_{1a} 、庆大霉素 C_2+C_{2a} 、新霉素 B 浓度均为 $40\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。于聚丙烯圆形广口瓶中 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 1 周。

5.4.4 混合标准工作液 I:准确移取混合标准中间液 I 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 C_1 、庆大霉素 C_2+C_{2a} 、潮霉素 B 和安普霉素浓度分别为 $0.125\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $0.25\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $0.50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $0.75\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $3\text{ }\mu\text{g/mL}$,大观霉素、庆大霉素 C_{1a} 、新霉素 B 浓度分别为 $0.25\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $0.50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $1.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $4\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $6\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液。临用现配。

5.4.5 混合标准工作液 II:准确移取混合标准中间液 II 适量,用洗脱溶液稀释,配制成潮霉素 B、安普霉素浓度分别为 $0.125\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $0.25\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $0.50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $0.75\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $3\text{ }\mu\text{g/mL}$,大观霉素、双氢链霉素、链霉素、卡那霉素 A、庆大霉素 C_1 、庆大霉素 C_{1a} 、庆大霉素 C_2+C_{2a} 、新霉素 B 浓度分别为 $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $3\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $4\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $8\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $12\text{ }\mu\text{g/mL}$ 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: $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 。

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 $0.000\text{ }01\text{ g}$ 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 $10\text{ }000\text{ r/min}$ 。

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,去壳并均质。

取适量新鲜或解冻的空白或供试奶,混合均匀。

- 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溶液,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 ± 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

8.3.1 禽蛋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I各100 μ L,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 C_1 、庆大霉素 C_2+C_{2a} 、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 C_1 、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。以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标,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。

8.3.2 牛/羊奶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II各100 μ L,用空白基质溶液稀释至1 mL,制成潮霉素B、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、双氢链霉素、链霉素、卡那霉素A、庆大霉素 C_1 、庆大霉素 C_{1a} 、庆大霉素 C_2+C_{2a} 、新霉素B浓度分别为50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、300 ng/mL、400 ng/mL、800 ng/mL、1 200 ng/mL的系列基质匹配标准溶液,供液相色谱-串联质谱测定。以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标,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:酰胺基柱,100 mm $\times$ 2.1 mm,1.7 μ m,或相当者;
- b) 柱温:40℃;
- c) 进样量:5 μ 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,梯度洗脱程序见表1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 min	A %	B %
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:5 500 V;
- e) 雾化温度:550 ℃;
- f) 气帘气:206.84 kPa(30 psi);
- g) 雾化气:448.16 kPa(65 psi);
- h) 待测药物的定性离子对、定量离子对、去簇电压和碰撞能量见表 2。

表 2 定性离子对、定量离子对、去簇电压和碰撞能量

化合物	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
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 C ₁	478.4>157.2	478.4>157.2	85	20.8
	478.4>322.2			27.0
庆大霉素 C _{1a}	450.8>322.3	450.8>322.3	85	20.0
	450.8>160.0			35.0
庆大霉素 C ₂ +C _{2a}	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

在相同测试条件下,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氨基糖苷类药物色谱峰的保留时间偏差在±0.1 min 以内;且检测到的相对离子丰度应与浓度相当的基质匹配标准溶液相对离子丰度一致,其允许偏差为±40%。

8.5.2 定量测定

取试料溶液和相应的基质配备标准溶液,做单点或多点校准,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,氨基糖苷类药物基质匹配标准溶液特征离子质量色谱图见附录 B。

8.6 空白试验

取空白试样,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。

$$X = \frac{C_s \times A \times V \times 1000}{A_s \times m \times 1000} \quad (1)$$

式中:

- X ——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(ng/mL);
 A ——试料溶液中氨基糖苷类药物的色谱峰面积;
 V ——洗脱溶液体积的数值,单位为毫升(mL);
 A_s ——基质匹配标准溶液中氨基糖苷类药物的色谱峰面积;
 m ——试料质量的数值,单位为克(g);
 1 000 ——换算系数。

10 方法灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法在禽蛋中双氢链霉素、链霉素、卡那霉素 A、庆大霉素 C_1 、庆大霉素 $C_1 + C_2$ 、潮霉素 B、安普霉素的检出限均为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限均为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$;大观霉素、庆大霉素 C_{1a} 、新霉素 B 的检出限均为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。在牛、羊奶中潮霉素 B、安普霉素的检出限均为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限均为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$;大观霉素、双氢链霉素、链霉素、卡那霉素 A、庆大霉素 C_1 、庆大霉素 C_{1a} 、庆大霉素 $C_2 + C_{2a}$ 、新霉素 B 的检出限均为 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 $40 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 正确度

本方法禽蛋在 $10 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 1\,000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、牛、羊奶在 $10 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 3\,000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $60\% \sim 110\%$ 。

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名称、化学分子式和 CAS 号

氨基糖苷类药物中英文名称、化学分子式和 CAS 号见表 A.1。

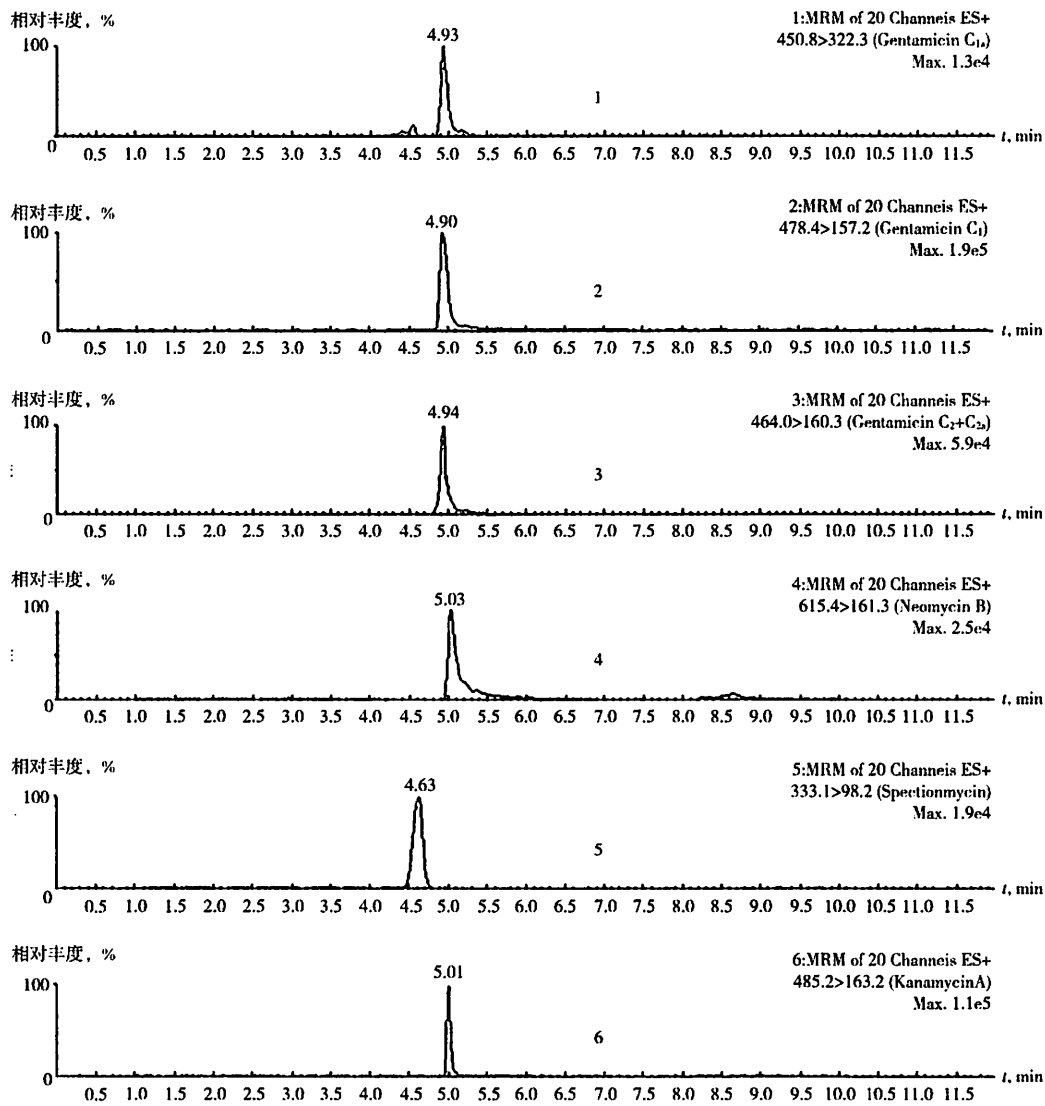
表 A.1 氨基糖苷类药物中英文名称、化学分子式和 CAS 号

中文名称	英文名称	化学分子式	CAS 号
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 C ₁ 五乙酸盐	Gentamicin C ₁ pentaacetate salt	$C_{21}H_{43}N_5O_7 \cdot 5CH_3CO_2H$	25876-10-2
庆大霉素 C _{1a} 五乙酸盐	Gentamicin C _{1a} pentaacetate salt	$C_{19}H_{39}N_5O_7 \cdot 5CH_3CO_2H$	26098-04-4
庆大霉素 C ₂ 五乙酸盐(含 C ₂ +C _{2a})	Gentamicin C ₂ 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)

氨基糖苷类药物基质匹配标准溶液特征离子质量色谱图

氨基糖苷类药物基质匹配标准溶液特征离子质量色谱图见图 B.1。



索引序号说明:
1——庆大霉素 C_{1a} 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+C_{2a} 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)。

注:双氢链霉素、链霉素、卡那霉素 A 庆大霉素 C₁、庆大霉素 C₂+C_{2a}、潮霉素 B 安普霉素均为 25 ng/mL,大观霉素、庆大霉素 C_{1a}、新霉素 B 均为 50 ng/mL。

图 B.1 氨基糖苷类药物基质匹配标准溶液特征离子质量色谱图

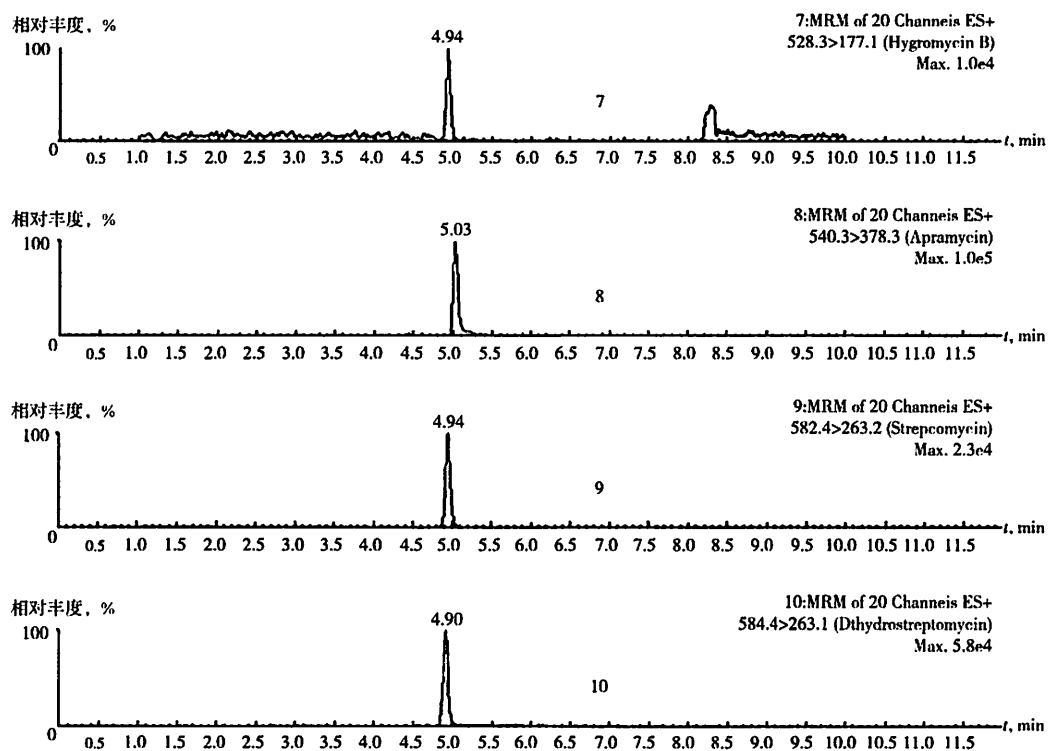


图 B.1 (续)

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
食品安全国家标准 禽蛋和奶中氨基糖苷
类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法
GB 31659.12—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: 16109·10321
定价: 32.00 元



GB 31659.12—2025

版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 59194261