



中华人民共和国国家标准

GB/T××××—××××

食品安全国家标准
蜂产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 aminoglycoside residues in bee products by liquid
chromatography-tandem mass spectrometry method

(征求意见稿)

20××-××-××发布

20××-××-××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》的规定起草编制。



食品安全国家标准

蜂产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

本文件规定了蜂产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。

本文件适用于蜂蜜和蜂王浆中链霉素、双氢链霉素、庆大霉素、新霉素、卡那霉素、安普霉素、大观霉素、潮霉素、妥布霉素残留量的测定。

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

蜂蜜和蜂王浆中残留的药物用磷酸盐缓冲液提取，提取液分成两等份后分别经混合型强阳离子和混合型弱阳离子交换固相萃取柱净化，复溶液用液相色谱-串联质谱测定，外标法定量。

5 试剂和材料

以下所用试剂，除特殊注明外均为分析纯试剂，水为符合GB/T 6682中规定的一级水。

5.1 试剂

- 5.1.1 甲醇 (CH_3OH)：色谱纯。
- 5.1.2 胰蛋白酶 ($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{O}_{12}\text{P}_3$)：1000-2000 U/mg。
- 5.1.3 七氟丁酸 ($\text{C}_3\text{F}_7\text{COOH}$)：HFBA，色谱纯。
- 5.1.4 乙酸 (CH_3COOH)：色谱纯。
- 5.1.5 乙酸铵 ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)：色谱纯。
- 5.1.6 甲酸 (HCOOH)：色谱纯。
- 5.1.7 乙腈 (CH_3CN)：色谱纯。
- 5.1.8 乙二胺四乙酸二钠 (Na_2EDTA)。
- 5.1.9 三氯乙酸 (CCl_3COOH)。
- 5.1.10 氢氧化钠 (NaOH)。
- 5.1.11 氨水 (NH_4OH)。

5.1.12 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)。

5.2 溶液配制

5.2.1 50%甲醇溶液:取甲醇 10mL, 用水稀释至 20 mL。

5.2.2 0.3%乙酸水溶液: 取乙酸 300 μL , 用水稀释至 100 mL。

5.2.3 磷酸盐缓冲液 (含 5%三氯乙酸和 0.4 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠): 取磷酸二氢钾 1.36 g、乙二胺四乙酸二钠 0.15 g 和三氯乙酸 50 g, 用水溶解并稀释至 1000 mL。

5.2.4 氢氧化钠溶液 (5 mol/L): 取氢氧化钠 20g, 用水溶解并稀释至 100mL, 混匀。

5.2.5 乙酸铵溶液 (2 mol/L): 取乙酸铵 15.4 g, 用水溶解并稀释至 100mL, 混匀。

5.2.6 乙酸甲醇溶液: 取乙酸 10 mL 和甲醇 70 mL, 用水稀释至 100 mL, 混匀。

5.2.7 氨水甲醇溶液: 取氨水 20 mL 和甲醇 60 mL, 用水稀释至 100 mL, 混匀。

5.2.8 乙酸铵溶液 (0.5 mol/L): 取乙酸铵 3.85 g, 用水溶解并稀释至 100 mL。

5.2.9 0.1%甲酸溶液 (含 0.5 mmol/L 乙酸铵): 取甲酸 1 mL 和 0.5 mol/L 乙酸铵溶液 1 mL, 加水稀释至 1000 mL, 混匀。

5.3 标准品及其纯度: 链霉素、双氢链霉素、庆大霉素、新霉素、卡那霉素、安普霉素、大观霉素、潮霉素和妥布霉素, 具体见附录 A。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 标准储备液: 分别准确称取 11 种氨基糖苷类药物标准品 10 mg, 用 0.3%乙酸水-甲醇溶解, 并定容至 10 mL, 配制成 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液, 放置于塑料材质容器中。于-18 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存, 有效期 3 个月。

5.4.2 混合标准工作液: 精密量取 11 种氨基糖苷类药物标准储备液各 125 μL , 于 25 mL 容量瓶中, 用 0.3%乙酸水溶液定容至刻度, 配制成浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氨基糖苷类药物混合标准工作液, 放置于塑料材质容器中。于-18 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存, 有效期 1 个月。

5.5 材料

5.5.1 混合型强阳离子交换固相萃取柱: 200 mg/6 mL, 或相当者。

5.5.2 混合型弱阳离子交换固相萃取柱: 150 mg/3 mL, 或相当者。

5.5.3 聚醚砜滤膜: 0.22 μm 。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱-串联质谱仪: 配有电喷雾电离源。

6.2 涡动仪。

6.3 高速冷冻离心机: 转速 10000 r/min 或以上。

6.4 水浴振荡器。

6.5 氮吹仪。

6.6 分析天平: 感量 0.00001 g 和 0.01 g。

6.7 固相萃取装置。

6.8 pH 计。

6.9 超声波清洗机。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试蜂产品，将其搅拌均匀。对有结晶的蜂蜜样品，在密闭情况下，置于不超过60℃的水浴中解晶，待样品全部融化后搅匀，冷却至室温。制备好的试样置于样品瓶中，密封，并做上标记。

- 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

蜂蜜样品于室温下避光保存；蜂王浆样品于-18℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

称取蜂蜜试料（ 5 ± 0.05 ）g，蜂王浆试料（ 2 ± 0.05 ）g于50 mL具塞塑料离心管中（蜂王浆试料中预先加入0.25 g胰蛋白酶和5 mL水，混匀，37℃水浴反应2 h），加入10 mL磷酸盐缓冲液，涡旋振荡1 min，超声5 min，于4℃下8 000 r/min离心10 min，取上清液于另一塑料刻度离心管中，残渣加5 mL磷酸盐缓冲液重复提取一次，合并上清液，用磷酸盐缓冲液定容至20 mL，备用。

8.2 净化

依次用甲醇、水各5 mL分别活化混合型强阳离子交换固相萃取柱、混合型弱阳离子交换固相萃取柱。备用液分成两等份，分别为备用液A和备用液B。取备用液A过混合型强阳离子交换固相萃取柱，再依次用超纯水、甲醇各7.5 mL淋洗抽干，5 mL氨水甲醇溶液洗脱，用于分析新霉素、卡那霉素、安普霉素、大观霉素、潮霉素和妥布霉素。取备用液B用氢氧化钠溶液调节pH为7.5，过混合型弱阳离子交换固相萃取柱，用7.5 mL水淋洗抽干，用5 mL乙酸甲醇溶液洗脱，用于分析链霉素、双氢链霉素和庆大霉素。两部分洗脱液分别于40℃下氮吹至近干，用2 mL 0.3%乙酸水-HFBA溶液（99:1）复溶，复溶液经0.22 μm滤膜过滤后放入塑料进样瓶中，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适量，分别加入经提取和净化的蜂蜜或蜂王浆空白试料残渣中，40℃水浴氮气吹干，加入2 mL 0.3%乙酸水-HFBA溶液（99+1）涡旋溶解残余物，配制成浓度为5.0 μg/L、10 μg/L、50 μg/L、100 μg/L、200 μg/L和500 μg/L的基质匹配系列混合标准溶液，微孔滤膜过滤，供液相色谱-串联质谱测定。以待测物的峰面积为纵坐标，相应的标准溶液浓度为横坐标，绘制基质匹配标准曲线，计算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：C₈色谱柱（100×2.1mm，2.7 μm）或相当者；
- b) 流动相：A相：0.1%甲酸溶液（含0.5 mmol/L乙酸铵），B相：乙腈溶液，洗脱梯度条件见表1；
- c) 流速：0.3 mL/min；
- d) 柱温：35℃；
- e) 进样量：5 μL。

表 1 梯度洗脱条件

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	98	2
2	98	2
2.1	92	8
6	60	40
6.5	10	90
7.5	98	2
10.0	98	2

8.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源；
- b) 检测方式：正离子模式；
- c) 扫描方式：多反应监测（MRM）；
- d) 干燥气温度：350 °C；
- e) 干燥气流速：7 L/min；
- f) 雾化器压力：40 psi；
- g) 鞘气温度：350 °C；
- h) 鞘气流速：12 L/min；
- i) 毛细管电压：3500 V；
- j) 选择离子参数设定见表2。

表 2 选择离子参数设定

化合物名称	定性离子对及碰撞能量, eV	定量离子对及碰撞能量, eV
庆大霉素C1a	450.2>322.1 (12) 450.2>159.9 (24)	450.2>322.1 (12)
庆大霉素C2、C2a	464.2>322.1 (12) 464.2>160.1 (20)	464.2>322.1 (12)
庆大霉素C1	478.2>322.1 (12) 478.2>160.1 (20)	478.2>322.1 (12)
新霉素	615.3>293.1 (20) 615.3>161.1 (30)	615.3>161.1 (30)
双氢链霉素	584.4>263.3 (30) 584.4>246.2 (40)	584.4>263.3 (30)
链霉素	582.4>263.2 (30) 582.4>245.8 (35)	582.4>263.2 (30)
安普霉素	540.3>378.2 (12) 540.3>217.1 (25)	540.3>217.1 (25)
潮霉素B	528.3>352.0 (20) 528.3>177.1 (25)	528.3>177.1 (25)

卡那霉素	485.3 > 324.2 (10) 485.3 > 163.1 (20)	485.3 > 163.1 (20)
大观霉素	351.2 > 333.2 (15) 351.2 > 207.1 (18)	351.2 > 333.2 (15)
妥布霉素	468.1 > 324.0 (14) 468.1 > 168.2 (27)	468.1 > 324.0 (14)

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在相同试验条件下,试样溶液中氨基糖苷类药物的保留时间与基质匹配标准溶液中对应的保留时间的偏差在±0.1 min以内,且样品中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的基质匹配标准溶液中对应的定性离子的相对丰度一致,其允许偏差为±40%。

8.4.3.2 定量测定

分别取适量试样溶液和相应浓度的基质匹配标准工作液,作单点校准或多点校准,以色谱峰峰面积积分值定量。基质匹配标准工作液及试样液中药物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。氨基糖苷类药物标准溶液的特征离子色谱图参见附录B。

8.5 空白试验

取空白试样,除不加标准溶液外,采用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:

$$X = \frac{C_S \times A \times V \times 1000}{A_S \times m \times 1000} \times f \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X — 试样中相应的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相应的氨基糖苷类药物浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A_S — 基质匹配标准溶液中相应的氨基糖苷类药物峰面积;

A — 试样中相应的氨基糖苷类药物峰面积;

V — 试样最终定容体积的数值,单位为毫升(mL);

m — 试样质量的数值,单位为克(g);

f — 稀释因子,公式中为2。

注:庆大霉素残留量以庆大霉素C1、C1a、C2、C2a总和计。

10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法蜂蜜中链霉素、双氢链霉素、卡那霉素、庆大霉素C1、庆大霉素C2, C2a、潮霉素检测限为 $2.5\ \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $5\ \mu\text{g}/\text{kg}$; 新霉素、安普霉素、妥布霉素、庆大霉素C1a、大观霉素检测限为 $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $25\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

蜂王浆中链霉素、双氢链霉素、卡那霉素、庆大霉素C1、庆大霉素C2, C2a、潮霉素检测限为 $5\ \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$; 安普霉素、新霉素、妥布霉素、庆大霉素C1a、大观霉素检测限为 $12.5\ \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $25\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法蜂蜜在 $5\text{-}100\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $60\%\sim 120\%$, 蜂王浆在 $10\text{-}100\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $60\%\sim 120\%$ 。

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)

氨基糖苷类药物的英文名称、分子式和 CAS 号

氨基糖苷类药物的英文名称、分子式和 CAS 号见表 A.1。

表 A.1 氨基糖苷类药物的英文名称、分子式和 CAS 号

化合物名称	英文名称	分子式	CAS 号	生产厂家	纯度
链霉素硫酸盐	Streptomycin sulfate	$C_{21}H_{39}N_7O_{12} \cdot 1.5H_2SO_4$	3810-74-0	Dr. Ehrenstorfer	89.3%
双氢链霉素硫酸盐	Dihydrostreptomycin sulfate	$C_{21}H_{41}N_7O_{12} \cdot 1.5H_2SO_4$	5490-27-7	Dr. Ehrenstorfer	95.1%
庆大霉素硫酸盐	Gentamicin sulfate	$C_{21}H_{43}N_5O_7 \cdot H_2SO_4$	1405-41-0	Dr. Ehrenstorfer	89.8%
新霉素硫酸盐	Neomycin sulfate	$C_{23}H_{52}N_6O_{25}S_3$	1405-10-3	Dr. Ehrenstorfer	84.8%
卡那霉素硫酸盐	Kanamycin sulfate	$C_{18}H_{36}N_4O_{11} \cdot H_2SO_4$	25389-94-0	Dr. Ehrenstorfer	94.0%
安普霉素	Apramycin	$C_{21}H_{41}N_5O_{11}$	37321-09-8	Dr. Ehrenstorfer	81.1%
大观霉素盐酸盐	Spectinomycin hydrochloride	$C_{14}H_{24}N_2O_7 \cdot 2HCl \cdot 5H_2O$	22189-32-8	Dr. Ehrenstorfer	95.8%
潮霉素	Hygromycin	$C_{20}H_{37}N_3O_{13}$	31282-04-9	Dr. Ehrenstorfer	82.4%
妥布霉素	Tobramycin	$C_{18}H_{37}N_5O_9$	32986-56-4	Dr. Ehrenstorfer	82.9%

附录 B

(资料性)

11 种氨基糖苷类药物标准物质质量特征离子色谱图见图 B.1。

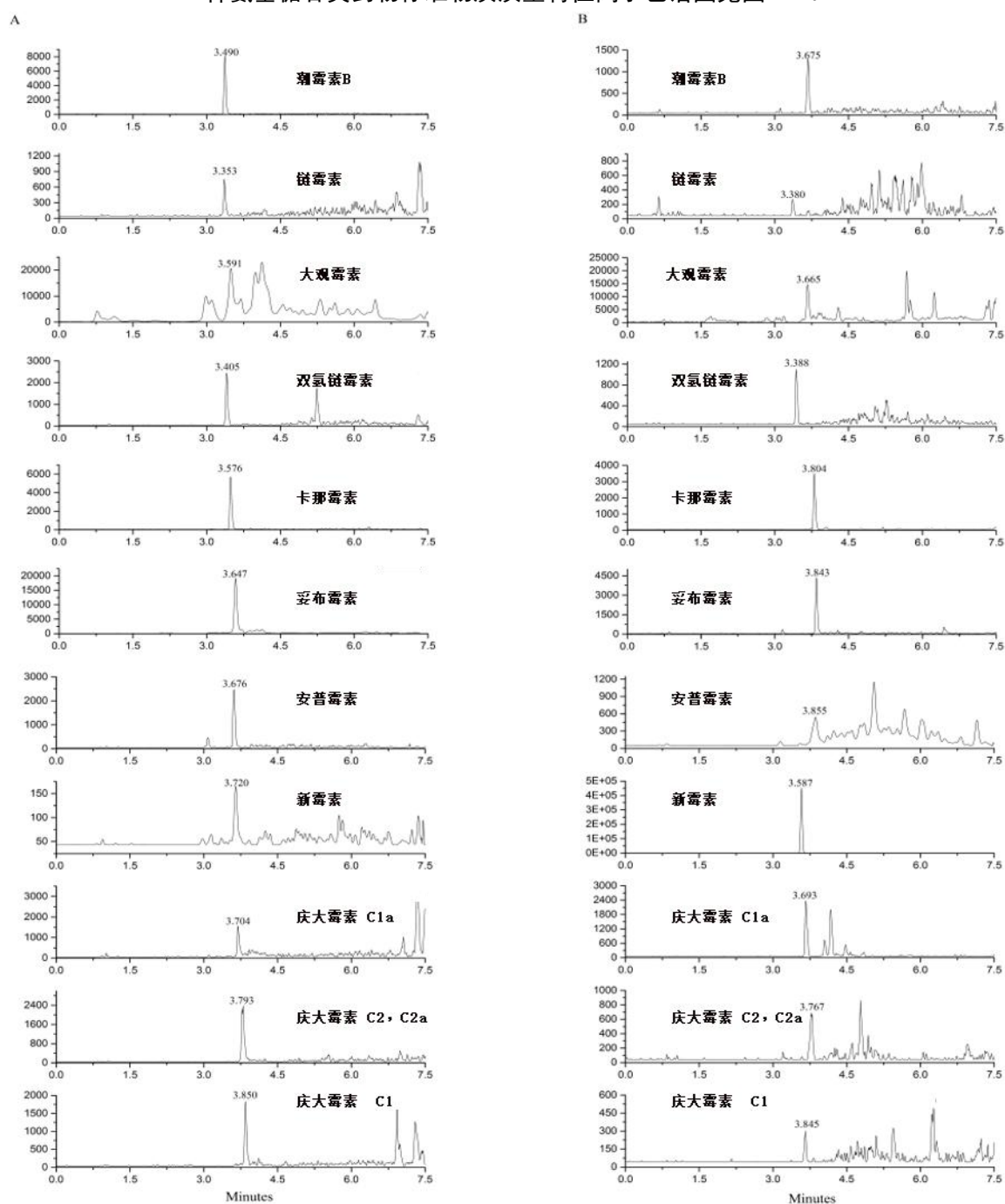


图 B.1. 11 种氨基糖苷类药物标准物质色谱图(A:蜂蜜; B:蜂王浆) (蜂蜜中链霉素、双氢链霉素、卡那霉素、庆大霉素 C1、庆大霉素 C2, C2a、潮霉素浓度为 6.25 ng/mL, 新霉素、安普霉素、妥布霉素、庆大霉素 C1a、大观霉素浓度为 31.25 ng/mL; 蜂王浆中链霉素、双氢链霉素、卡那霉素、庆大霉素 C1、庆大霉素 C2, C2a、潮霉素浓度为 5 ng/mL, 安普霉素、新霉素、妥布霉素、庆大霉素 C1a、大观霉素

浓度为 12.5 ng/mL)

征求意见稿