



中华人民共和国国家标准

GB 31656.25—2026

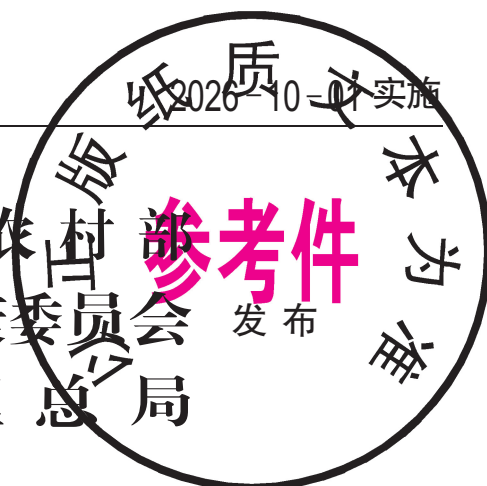
代替 GB/T 22954—2008

食品安全国家标准 水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 aquatic products—
Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method

2026-04-24 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



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。

本文件代替 GB/T 22954—2008《河豚鱼和鳗鱼中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》，与 GB/T 22954—2008 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要变化如下：

- a) 标准名称更改为《食品安全国家标准 水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》；
- b) 增加了 8 种药物的测定，分别为巴龙霉素、安普霉素、阿米卡星、大观霉素、妥布霉素、潮霉素 B、庆大霉素、新霉素 B；
- c) 扩大了标准适用范围，将适用范围扩大至鱼、虾和蟹；
- d) 更改了样品前处理方法，试料经磷酸盐提取后，采用分子印记固相萃取柱及 C₁₈ 固相萃取柱净化。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2008 年首次发布为 GB/T 22954—2008；

——本次为第一次修订。



食品安全国家标准

水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

本文件规定了水产品中 11 种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。

本文件适用于鱼、虾和蟹可食部分中链霉素、巴龙霉素、安普霉素、妥布霉素、新霉素 B、阿米卡星、双氢链霉素、卡那霉素 A、大观霉素、潮霉素 B、庆大霉素共 11 种氨基糖苷类药物残留量的测定,其他水产品的检测经验证后可参照执行。

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

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

试样中残留的氨基糖苷类药物,用磷酸盐缓冲液提取,分子印迹固相萃取柱和 C₁₈ 固相萃取柱净化,液相色谱-串联质谱仪测定,外标法定量。

5 试剂与材料

除非另有说明,所用试剂均为分析纯,水为 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 三氯甲烷(CHCl₃):色谱纯。

5.1.4 甲酸(HCOOH):色谱纯。

5.1.5 乙酸铵(CH₃COONH₄):色谱纯。

5.1.6 七氟丁酸(C₄HF₇O₂):纯度≥99.5%,色谱纯。

5.1.7 三氯乙酸(CCl₃COOH):纯度≥99.0%,优级纯。

5.1.8 氨水(NH₃·OH):25%~28%。

5.1.9 磷酸二氢钾(KH₂PO₄)。

5.1.10 乙二胺四乙酸二钠(Na₂EDTA·2H₂O)。

5.1.11 氢氧化钾(KOH)。

5.1.12 盐酸(HCl)。

5.2 溶液配制

5.2.1 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液:称取磷酸二氢钾 1.36 g,加入 980 mL 水溶解,用 1 mol/L 的盐酸调 pH 至 4.0,分别加入乙二胺四乙酸二钠 0.15 g 和三氯乙酸 20.0 g,溶解并稀释至 1 000 mL。

5.2.2 50 mmol/L 磷酸二氢钾溶液(pH 7.5):称取 1.7 g 磷酸二氢钾,加水溶解并稀释至 250 mL,用 5 mol/L 的氢氧化钾溶液调 pH 至 7.5。

5.2.3 80%乙腈溶液:准确量取乙腈 400 mL、水 100 mL、甲酸 5 mL、七氟丁酸 325 μ L,混匀。

5.2.4 75%乙腈溶液:称取乙酸铵 0.019 g,分别加入乙腈 75 mL、水 25 mL、甲酸 250 μ L,溶解并混匀。

5.2.5 1 mol/L 盐酸:取盐酸 16.7 mL,用水稀释至 200 mL。

5.2.6 5 mol/L 氢氧化钾:称取氢氧化钾 56.1 g,用水溶解并稀释至 200 mL。

5.3 标准品

链霉素、巴龙霉素、安普霉素、妥布霉素、新霉素 B、阿米卡星和双氢链霉素纯度 $\geq 98.0\%$;卡那霉素 A 和大观霉素纯度 $\geq 95.0\%$;潮霉素 B 纯度 $\geq 90.0\%$;庆大霉素纯度 $\geq 90.0\%$,其中 C_1 纯度为 25.7%, C_{1a} 纯度为 24.3%, C_2 类($C_2 + C_{2a} + C_{2b}$)纯度为 50.0%。上述标准品的英文名称、化学分子式和 CAS 号等相关信息见附录 A。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液:取各氨基糖苷类标准品适量,精密称定,分别于 100 mL 容量瓶中,用水溶解并定容,配制成折合化合物浓度均为 100 μ g/mL 的单个标准储备液,于 4 $^{\circ}$ C 塑料离心管中避光保存,有效期 6 个月。

5.4.2 混合标准中间液:分别准确移取适量 100 μ g/mL 单个标准储备液,于 100 mL 容量瓶中,用水稀释并定容,配制成巴龙霉素、卡那霉素 A、双氢链霉素、安普霉素、阿米卡星、妥布霉素、链霉素浓度、大观霉素、潮霉素 B、新霉素 B 浓度为 4.0 μ g/mL;庆大霉素浓度为 4.0 μ g/mL 的混合标准储备液,其中庆大霉素 C_1 浓度为 1.028 μ g/mL,庆大霉素 C_{1a} 浓度为 0.972 μ g/mL,庆大霉素 C_2 类($C_2 + C_{2a} + C_{2b}$)浓度为 2.0 μ g/mL,4 $^{\circ}$ C 塑料离心管中避光保存,有效期 7 d。

5.5 材料

5.5.1 氨基糖苷类药物分子印迹固相萃取柱(Aminoglycosides MIP)或效果相当的固相萃取柱:50 mg/3 mL。

5.5.2 C_{18} 固相萃取柱:500 mg/6 mL,或相当者。

5.5.3 微孔滤膜:0.22 μ m 有机系尼龙滤膜。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪:配电喷雾离子源(ESI)。

6.2 高速冷冻离心机:10 000 r/min 或以上。

6.3 电子天平:感量为 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.4 涡旋混合器。

6.5 pH 计。

6.6 高通量组织研磨仪或均质机。

6.7 固相萃取装置。

6.8 氮吹仪。

6.9 超声波提取仪。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

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

准确称取试料(2±0.05) g,置于 50 mL 塑料离心管中,加入 10 mL 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液,涡旋混合 1 min,超声提取 10 min,再涡旋混匀 1 min,5 ℃ 10 000 r/min 离心 10 min,移取上清液至另一塑料离心管中;残渣再用 8 mL 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液按上述方法重复提取 1 次,合并上清液,混匀后用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液定容至 20 mL;准确移取 5 mL 上述定容后的提取液至另一新塑料离心管中,用氨水调 pH 至 7.0~7.5,加入 5 mL 三氯甲烷,充分涡旋混匀 1 min,4 000 r/min 离心 8 min,取上清液待净化。

8.2 净化

MIP 固相萃取柱依次用 1 mL 甲醇、1 mL 50 mmol/L 磷酸二氢钾溶液活化,将待净化液加入 MIP 固相萃取柱中,控制流速约 1 滴/2 s;分别用 3 mL 水和 3 mL 乙腈淋洗小柱并抽干,弃去流出液。

C₁₈ 固相萃取柱依次用 5 mL 甲醇、5 mL 水预活化后,串接在 MIP 柱下方,向 MIP 柱加入 2.5 mL 80%乙腈溶液,收集流出液于 10 mL 塑料离心管中,待 80%乙腈溶液流尽后吹干上方的 MIP 柱并弃掉,加 0.5 mL 80%乙腈溶液于 C₁₈ 柱中,收集全部洗脱液于同一塑料离心管中,45 ℃ 下氮气吹干,加入 1.0 mL 复溶液溶解,0.22 μm 有机相滤膜过滤,滤液装入带有塑料内衬管的进样小瓶中,供液相色谱-串联质谱测定。

8.3 基质添加标准曲线的制备

称取 6 份阴性空白样品,每份(2±0.05) g 于 50 mL 塑料离心管中,分别加入 5 μL、10 μL、50 μL、100 μL、250 μL、500 μL 混合标准中间液,按 8.1 和 8.2 操作,配制成系列基质添加标准工作液,供液相色谱-串联质谱测定。各标准物质系列基质添加标准工作液浓度见表 1,其中庆大霉素总组分浓度分别为 5.0 μg/L、10 μg/L、50 μg/L、100 μg/L、250 μg/L、500 μg/L。以各标准物质特征离子色谱峰的峰面积为纵坐标、相应的浓度为横坐标,绘制基质添加标准工作曲线,求回归方程和相关系数。

表 1 氨基糖苷类药物系列基质添加标准工作曲线浓度

化合物	基质添加标准工作曲线浓度, μg/L					
	S1	S2	S3	S4	S5	S6
巴龙霉素	5.0	10	50	100	250	500
卡那霉素 A						
双氢链霉素						
安普霉素						
阿米卡星						
妥布霉素						
链霉素						
大观霉素						
潮霉素 B						
新霉素 B						
庆大霉素 C ₁	1.28	2.56	12.8	25.6	64	128
庆大霉素 C _{1a}	1.22	2.44	12.2	24.4	61	122
庆大霉素 C ₂ 类 (C ₂ +C _{2a} +C _{2b})	2.5	5.0	25	50	125	250

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱:液态分理池技术色谱柱(可用 Obelisc R 柱¹⁾,100 mm×2.1 mm,5 μm,或性能相当者);
- b) 流动相:A 为 1%甲酸溶液(含 2 mmol/L 乙酸铵),B 为 1%甲酸乙腈(含 2 mmol/L 乙酸铵),梯度洗脱条件见表 2;
- c) 流速:0.3 mL/min;
- d) 柱温:30 ℃;
- e) 进样量:10 μL。

表 2 流动相梯度洗脱条件

时间 min	A %	B %
0	10	90
5.5	10	90
6.0	97	3
13.0	97	3
13.1	10	90
15.5	10	90

8.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源:电喷雾离子源(ESI);
- b) 扫描方式:正离子扫描;
- c) 检测方式:多反应监测(MRM);
- d) 离子传输管温度:325 ℃;
- e) 喷雾电压:3.5 kV;
- f) 雾化器流速:8.3 L/min;
- g) 辅助气流速:5.3 L/min;
- h) 二级碰撞气:氦气;
- i) 定性离子对、定量离子对及对应的锥孔电压、碰撞能量见表 3。

表 3 化合物的定性离子对、定量离子对及对应的锥孔电压、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>	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
巴龙霉素	616.3>163.1	616.3>163.1	46	12
	616.3>293.3			19
大观霉素	351.2>333.1	351.2>333.1	75	19
	351.2>207.1			22
妥布霉素	468.3>163.1	468.3>163.1	63	23
	468.3>324.1			14
卡那霉素 A	485.3>163.1	485.3>163.1	67	25
	485.3>324.1			16
潮霉素 B	528.3>352.0	528.3>352.0	85	22
	528.3>177.1			28
安普霉素	540.3>217.1	540.3>217.1	78	26
	540.3>378.1			17
链霉素	582.3>263.0	582.3>263.0	159	32
	582.3>246.0			38
双氢链霉素	584.3>263.0	584.3>263.0	114	30
	584.3>246.0			37
阿米卡星	586.3>425.2	586.3>425.2	84	18
	586.3>264.0			26

1) 非商业性声明:本试验是利用此色谱柱进行检测,此处列出的色谱柱仅是为了提供参考,并不涉及商业目的,鼓励标准使用者尝试不同型号的色谱柱。

表 3（续）

化合物	定性离子对 <i>m/z</i>	定量离子对 <i>m/z</i>	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
新霉素 B	615.3>293.1	615.3>293.1	88	23
	615.3>455.2			21
庆大霉素 C ₁	478.3>157.1	478.3>157.1	70	28
	478.3>322.2			20
庆大霉素 C _{1a}	450.3>160.1	450.3>160.1	70	30
	450.3>322.2			20
庆大霉素 C ₂ 类 (C ₂ +C _{2a} +C _{2b})	464.1>322.2	464.1>322.2	70	18
	464.1>160.1			30

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添加标准工作液中待测物质的保留时间偏差在±0.1 min 之内，且试样中各组分的离子相对丰度与浓度相近的基质添加标准工作液中各组分的离子相对丰度一致，其允许偏差为±40%。

8.4.3.2 定量测定

按 8.4.1 和 8.4.2 设定仪器条件，将试样溶液和系列基质添加标准工作液上机测定，以基质添加标准溶液浓度为横坐标、峰面积为纵坐标，绘制标准工作曲线，以浓度相近的单点或多点作校准，按外标法计算试样中药物的残留量，基质添加标准溶液及试样溶液中的目标物响应值均应在仪器检测的线性范围内。氨基糖苷类化合物基质添加标准溶液特征离子质量色谱图见附录 B。对于试料中氨基糖苷类药物残留量超过仪器测定线性范围的，应对试样溶液采用空白基质溶液稀释后测定。

8.5 空白试验

取空白试样，采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算

试样中待测药物的残留量按标准曲线或公式(1)计算，其中庆大霉素以总量计。

$$\omega = \frac{\rho_s \times A \times V_1 \times V_3 \times 1000}{A_s \times V_2 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- ω —— 试样中待测药物残留量的数值，单位为微克每千克(μg/kg)；
- ρ_s —— 标准溶液中待测药物浓度的数值，单位为微克每升(μg/L)；
- A —— 试样溶液中待测药物的峰面积；
- V₁ —— 提取溶液总体积的数值，单位为毫升(mL)；
- V₃ —— 最终定容体积的数值，单位为毫升(mL)；
- A_s —— 标准溶液中待测药物的峰面积；
- V₂ —— 吸取出用于净化的提取溶液体积的数值，单位为毫升(mL)；
- m —— 试样质量的数值，单位为克(g)。

注：计算结果保留 3 位有效数字。

10 方法灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法链霉素、巴龙霉素、安普霉素、妥布霉素、新霉素 B、阿米卡星、双氢链霉素、卡那霉素 A、大观霉素、潮霉素 B 检出限为 10.0 μg/kg，定量限为 20.0 μg/kg；庆大霉素检出限为 10.0 μg/kg，定量限为 20.0 μg/kg，其中庆大霉素 C₁、C_{1a} 和 C₂类(C₂+C_{2a}+C_{2b})检出限均为 10.0 μg/kg，定量限均为 20.0 μg/kg。

10.2 正确度

本方法链霉素、巴龙霉素、安普霉素、妥布霉素、新霉素 B、阿米卡星、双氢链霉素、卡那霉素 A、大观霉素、潮霉素 B 在 $20.0\ \mu\text{g}/\text{kg}\sim 1\ 000\ \mu\text{g}/\text{kg}$, 庆大霉素在 $20.0\ \mu\text{g}/\text{kg}\sim 1\ 000\ \mu\text{g}/\text{kg}$ [其中庆大霉素 C_1 在 $5.0\ \mu\text{g}/\text{kg}\sim 250\ \mu\text{g}/\text{kg}$, C_{1a} 在 $5.0\ \mu\text{g}/\text{kg}\sim 250\ \mu\text{g}/\text{kg}$, C_2 类 ($C_2 + C_{2a} + C_{2b}$) 在 $10.0\ \mu\text{g}/\text{kg}\sim 500\ \mu\text{g}/\text{kg}$] 添加浓度范围内回收率为 $70\%\sim 120\%$ 。

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
(规范性)
氨基糖苷类化合物信息

氨基糖苷类化合物的中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号见表 A.1。

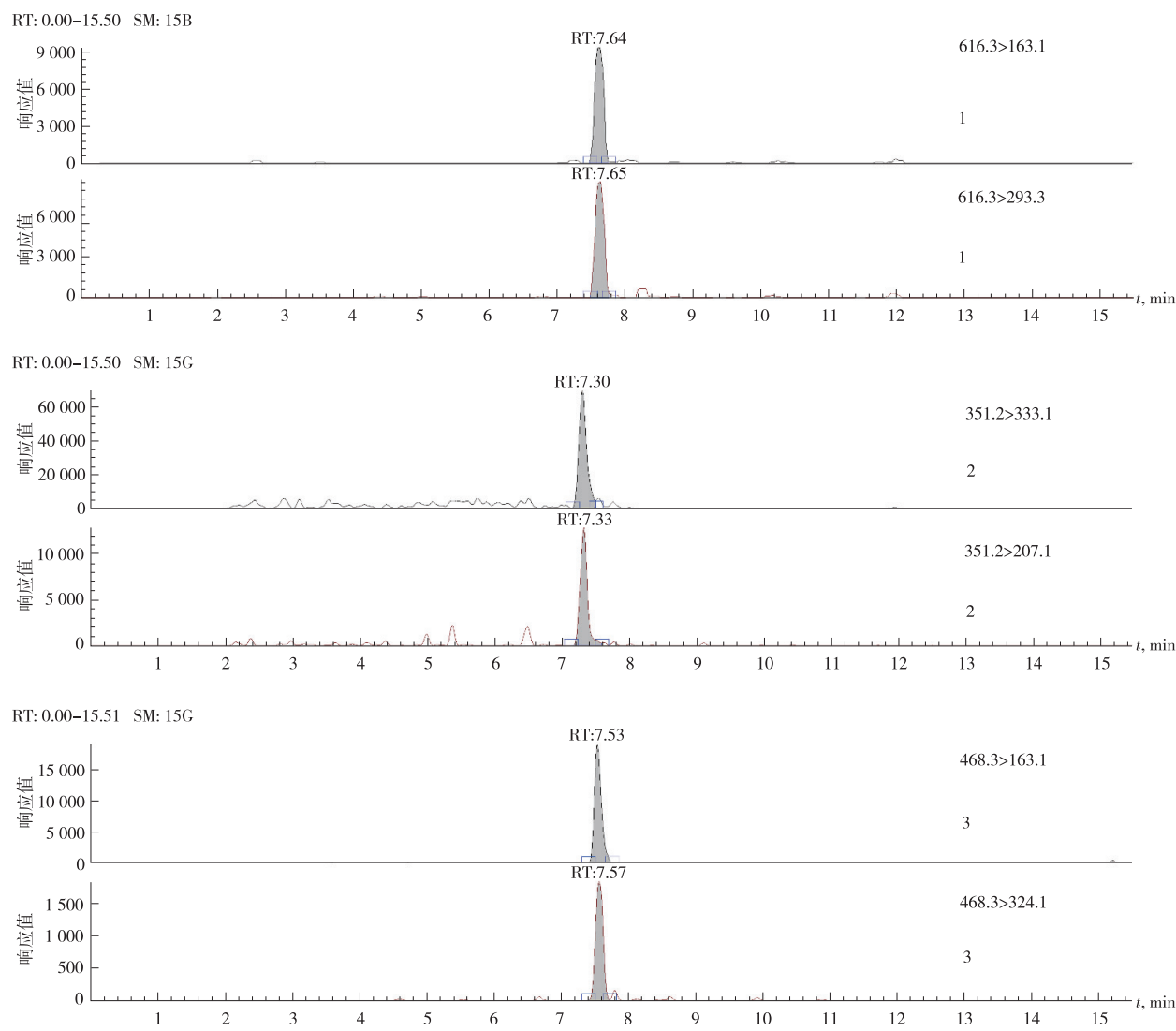
表 A.1 氨基糖苷类化合物标准物质的信息

序号	中文通用名称	英文通用名称	化学分子式	CAS 号
1	硫酸巴龙霉素	Paromomycin sulfate	$C_{23}H_{47}N_5O_{18}S$	1263-89-4
2	盐酸大观霉素	Spectinomycin dihydrochloride pentahydrate	$C_{14}H_{36}Cl_2N_2O_{12}$	22189-32-8
3	妥布霉素	Tobramycin	$C_{18}H_{37}N_5O_9$	32986-56-4
4	硫酸庆大霉素	Gentamycin sulfate	$C_{60}H_{127}N_{15}O_{26}S$	1405-41-0
5	硫酸卡那霉素	Kanamycin sulfate	$C_{18}H_{38}N_4O_{15}S$	25389-94-0
6	潮霉素 B	Hygromycin B	$C_{20}H_{37}N_3O_{13}$	31282-04-9
7	硫酸安普霉素	Apramycin sulfate	$C_{21}H_{43}N_5O_{15}S$	65710-07-8
8	硫酸链霉素	Streptomycin sulfate	$2C_{21}H_{39}N_7O_{12} \cdot 3H_2SO_4$	3810-74-0
9	硫酸双氢链霉素	Dihydrostreptomycin sulfate	$2C_{21}H_{41}N_7O_{12} \cdot 3H_2SO_4$	5490-27-7
10	阿米卡星	Amikacin	$C_{22}H_{43}N_5O_{13}$	37517-28-5
11	硫酸新霉素	Neomycin sulfate	$C_{23}H_{52}N_6O_{25}S_3$	1405-10-3

附 录 B
(资料性)

氨基糖苷类化合物基质添加标准溶液特征离子质量色谱图

氨基糖苷类化合物基质添加标准溶液特征离子质量色谱图见图 B.1。



- 标引序号说明：
- | | |
|----------------------------------|--|
| 1 —— 巴龙霉素 10 $\mu\text{g/L}$; | 8 —— 双氢链霉素 10 $\mu\text{g/L}$; |
| 2 —— 大观霉素 10 $\mu\text{g/L}$; | 9 —— 阿米卡星 10 $\mu\text{g/L}$; |
| 3 —— 妥布霉素 10 $\mu\text{g/L}$; | 10 —— 新霉素 B 10 $\mu\text{g/L}$; |
| 4 —— 卡那霉素 A 10 $\mu\text{g/L}$; | 11 —— 庆大霉素 C_1 2.56 $\mu\text{g/L}$; |
| 5 —— 潮霉素 B 10 $\mu\text{g/L}$; | 12 —— 庆大霉素 C_{1a} 2.44 $\mu\text{g/L}$; |
| 6 —— 安普霉素 10 $\mu\text{g/L}$; | 13 —— 庆大霉素 C_2 类 ($\text{C}_2 + \text{C}_{2a} + \text{C}_{2b}$) 5.0 $\mu\text{g/L}$, 庆大霉素总组分为 10.0 $\mu\text{g/L}$ 。 |
| 7 —— 链霉素 10 $\mu\text{g/L}$; | |

图 B.1 氨基糖苷类化合物基质添加标准溶液特征离子质量色谱图

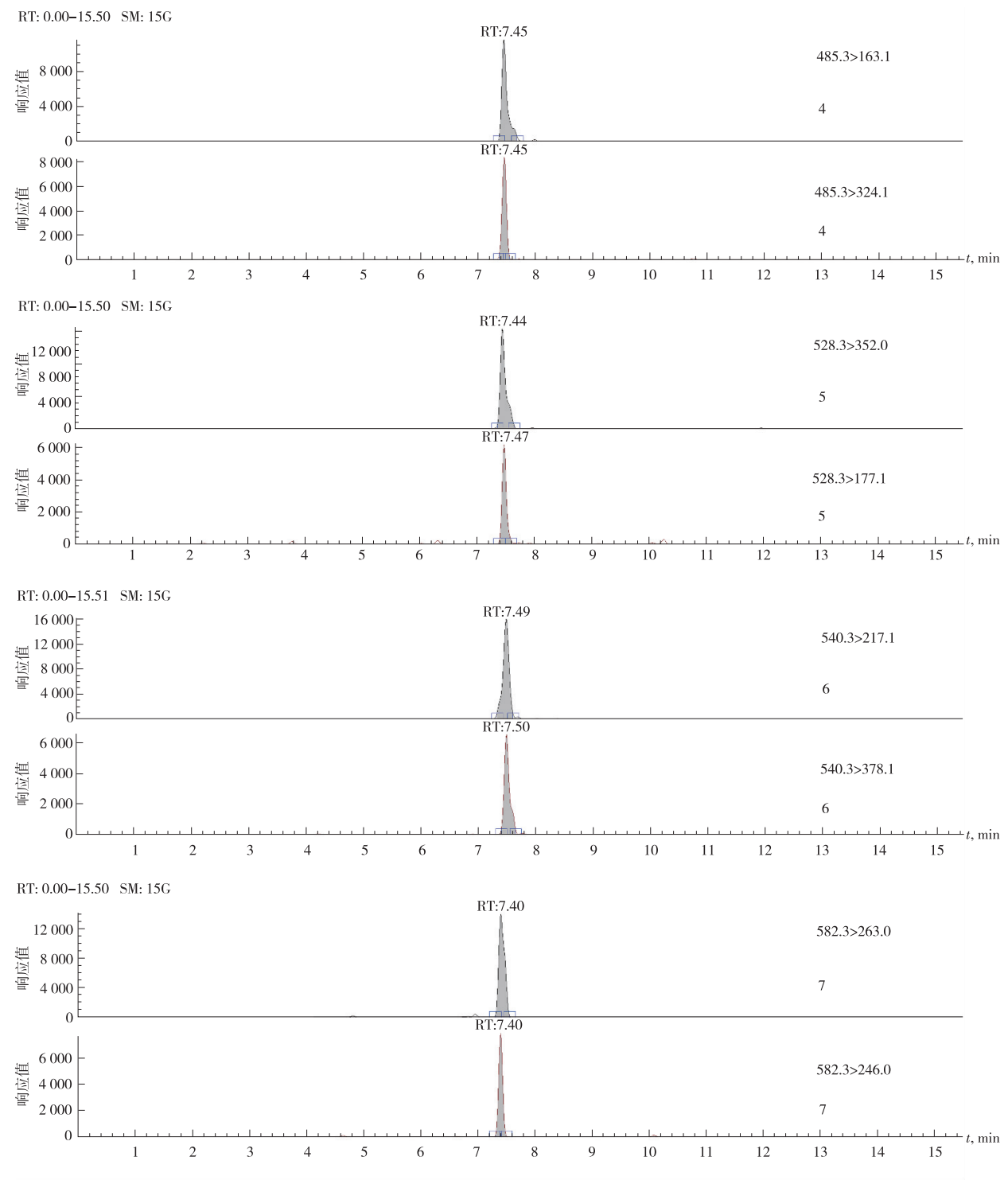


图 B. 1 (续)

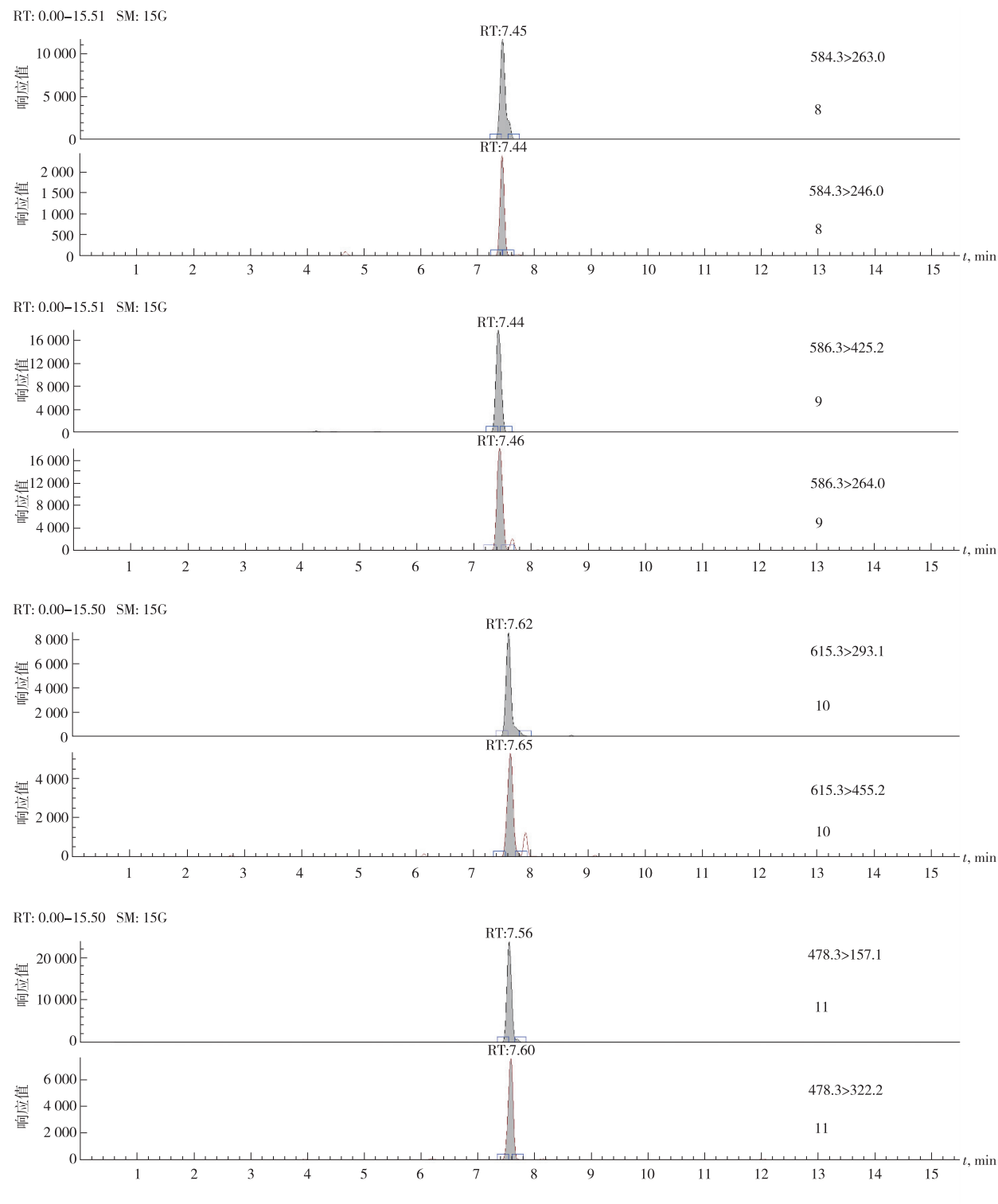


图 B. 1 (续)

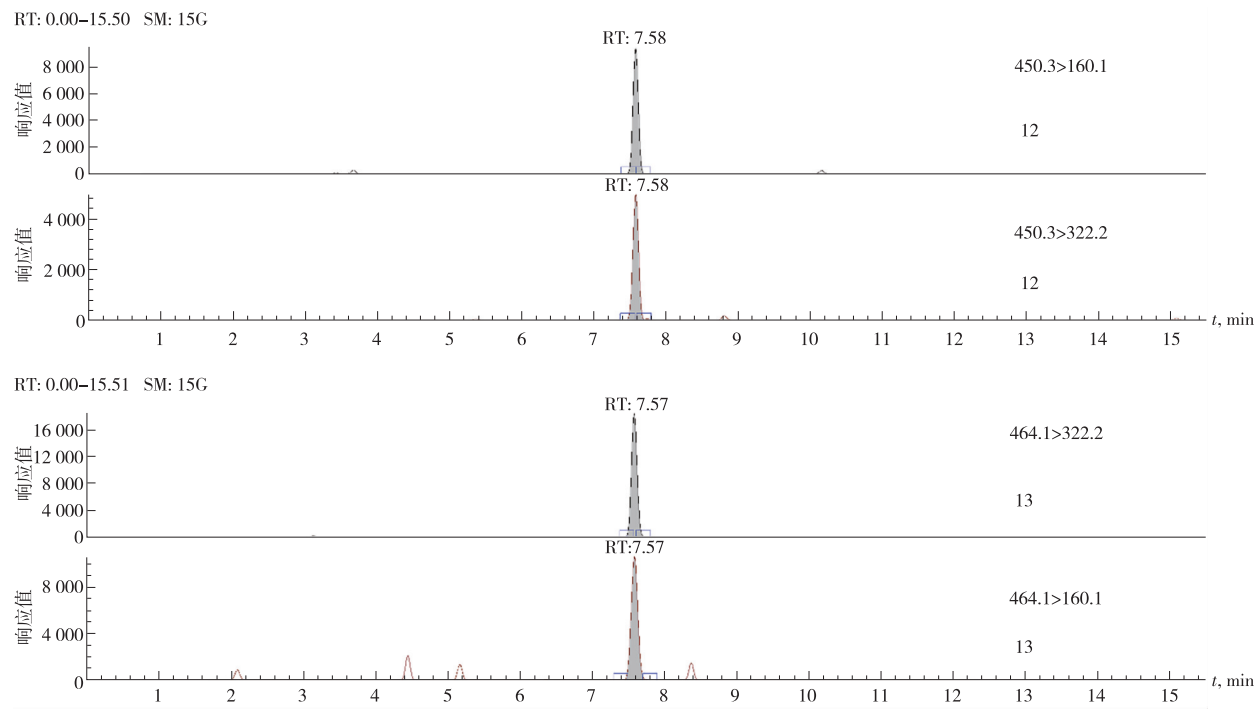


图 B. 1 (续)

