



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5481—2022

进出口食用动物、饲料中庆大霉素检测方法 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of Gentamycin in edible animal and feeds for import and export
—LC-MS/MS

2022-07-07 发布

2023-02-01 实施

中华人民共和国海关总署 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。

本文件由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本文件起草单位：中华人民共和国成都海关。

本文件主要起草人：于刚、谭志、李永丽、何开蓉、俞凌云、肖宇、林华、李丹丹。

以正式出版文本为准

进出口食用动物、饲料中庆大霉素检测方法

液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本文件规定了食用动物、饲料中庆大霉素残留量的液相色谱-质谱/质谱测定方法。

本文件适用于进出口工作中牛、猪、羊、鸡的血清，牛、猪、羊的尿液和猪饲料中庆大霉素的检测。

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 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇：色谱纯。

4.2 乙腈：色谱纯。

4.3 三氯乙酸：优级纯。

4.4 七氟丁酸(Heptafluorobutyric acid, HFBA)：HPLC 级。

4.5 甲酸：色谱纯。

4.6 标准物质：庆大霉素硫酸盐($C_{19}H_{39}N_5O_7 \cdot H_2SO_4$)，含量高于 99.0%。

4.7 标准储备溶液：1.0 mg/mL。称取 4.6 所述标准物质适量，用水配成 1.0 mg/mL 的标准储备溶液于塑料容量瓶中，2℃~8℃保存。

4.8 标准工作溶液(10.0 μg/mL)：吸取 4.7 所述各标准储备溶液 1 mL 于 100 mL 塑料容量瓶中，用水定容至刻度，2℃~8℃保存。

4.9 三氯乙酸溶液(5%)：称取三氯乙酸 10.0 g，用水 200 mL 溶解(常温下保存 2 个月)。

4.10 七氟丁酸(HFBA)水溶液(500 mmol/L)：准确量取 12.8 mL 七氟丁酸，用水稀释至 200 mL (4℃避光保存，有效期 1 个月)。

4.11 七氟丁酸(HFBA)水溶液(50 mmol/L)：准确量取 4.10 中七氟丁酸溶液 10 mL，用水稀释至 100 mL(4℃避光保存，有效期 1 个月)。

4.12 七氟丁酸(HFBA)水溶液(5 mmol/L)：准确量取 4.11 中七氟丁酸溶液 10 mL，用水稀释至 100 mL(4℃避光保存，有效期 1 个月)。

4.13 七氟丁酸(HFBA)水溶液(10 mmol/L)：准确量取 50 mmol/L 七氟丁酸溶液 10 mL，用水稀释

至 100 mL。

4.14 HLB 固相萃取柱(60 mg/3 mL)。

4.15 0.22 μm 水相滤膜。

5 仪器设备

5.1 液相色谱串联质谱仪:配有电喷雾离子源。

5.2 天平:感量分别为 0.01 g 和 0.000 1 g。

5.3 氮吹浓缩仪。

5.4 高速冷冻离心机(最高转速可达 15 000 r/min)。

5.5 固相萃取装置。

6 样品的采集与保存

6.1 血样的采集

采集动物血样约 10 mL,待自然凝固后分离血清,分装于聚四氟乙烯材质小管,加盖密封。

6.2 尿样的采集

采集动物尿样约 10 mL,12 000 r/min 离心 10 min 后,上清液分装于聚四氟乙烯材质小管,加盖密封。

6.3 饲料试样

采集饲料样品约 500 g。在实验室粉碎混匀,四分法至约 20 g 后分装于小塑料袋,密封。

6.4 试样的保存

将分装后的血清、尿样于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,饲料样品于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

7 测定步骤

7.1 提取

7.1.1 血清和尿样试样

称取约 2 g 血清或尿样(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 3 mL 三氯乙酸溶液(4.9),涡旋振荡 1 min,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 10 000 r/min 离心 5 min,取上清液置于 15 mL 离心管中。用 2 mL 三氯乙酸溶液重复提取 1 次,合并提取液,加 2 mL 七氟丁酸(HFBA)水溶液(4.11),混匀,备用。

7.1.2 饲料试样

称取约 2 g 试样(精确至 0.01 g),加入 5 mL 三氯乙酸溶液(4.9),涡旋振荡 3 min,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 10 000 r/min 离心 5 min,取上清液层置于 15 mL 塑料离心管中。用 5 mL 三氯乙酸溶液(4.9)重复提取 1 次,合并提取液,加 2 mL 七氟丁酸(HFBA)水溶液(4.11),混匀,备用。

7.2 净化

固相萃取柱(HLB)(4.14)依次用甲醇、水、七氟丁酸(HFBA)水溶液(4.12)各 3 mL 活化,取备用

液上柱,用水 5 mL 淋洗,甲醇 3 mL 洗脱,收集洗脱液于塑料离心管中,置于 40 °C 水浴中轻微氮气流吹干,用七氟丁酸(HFBA)水溶液(4.12)1.0 mL 溶解残渣,经 0.22 μm 滤膜过滤后,待测。

7.3 基质工作曲线的配制

取空白试样(不含有庆大霉素的动物生物样品或饲料),按 7.1 和 7.2 进行提取净化,获得基质提取液。分别吸取适量标准工作溶液(4.8),依次加入相应试剂瓶中,用基质提取液定容至 1.0 mL,获得 0.05 mg/L、0.2 mg/L、1.0 mg/L、2.0 mg/L 和 5.0 mg/L 的系列基质标准工作溶液。

7.4 测定条件

7.4.1 液相色谱-质谱参考条件

7.4.1.1 色谱柱: C₁₈, 3 μm, 2.1×100 mm, 或相当者。

7.4.1.2 流速: 0.3 mL/min。

7.4.1.3 柱温箱温度: 35 °C。

7.4.1.4 进样量: 5 μL。

7.4.1.5 流动相: 10 mmol/L HFBA 水溶液 (A) 和乙腈(B)。梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	90	10
3.0	10	90
6.0	10	90
6.5	90	10
10.0	90	10

7.4.1.6 离子源: 电喷雾离子源。

7.4.1.7 扫描方式: 正离子扫描。

7.4.1.8 检测方式: 多反应监测。

7.4.1.9 电喷雾电压: 5 500 V。

7.4.1.10 气帘气压力: 20 psi。

7.4.1.11 辅助气压力: GAS1, 60 psi; GAS2, 60 psi。

7.4.1.12 离子源温度: 550 °C。

7.4.1.13 定性离子对、定量离子对、去簇电压、碰撞能量, 见表 2。

表 2 庆大霉素定性离子对、定量离子对、去簇电压、碰撞能量

被测物名称	离子对/(m/z)	去簇电压/V	碰撞能量/eV
庆大霉素(C1)	478.4/157.1	50	22
	478.4/322.2 ^a	50	41
^a 为定量离子。			

7.4.2 测定

7.4.2.1 定性测定

在相同试验条件下,样品溶液中的被测物的保留时间与基质标准工作溶液中被测物的保留时间比

值,偏差在±2.5%之内。待测样品溶液中,被测物中各定性离子相对丰度与浓度接近的基质标准工作溶液中被测物的各定性离子相对丰度的比值,若偏差不超过表3规定的范围,则可判定为样品中存在庆大霉素。

表3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

单位为%

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

7.4.2.2 定量测定

在相同的仪器工作条件下,以基质标准溶液中被测组分峰面积为纵坐标,以对应的标准溶液浓度(mg/L)为横坐标,绘制标准工作曲线。用标准工作曲线对样品进行定量,应使样品溶液中庆大霉素的响应值在仪器测定的线性范围内。在上述色谱和质谱条件下,庆大霉素(组分C₁)的提取离子色谱图见附录A。

7.5 空白试验

除不加试样溶液外,均按上述操作步骤进行。

8 结果计算

庆大霉素的含量用色谱数据处理软件外标法计算或按式(1)计算:

$$X = \frac{A \times C_s \times V}{A_s \times W} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X——试样中庆大霉素残留量,单位为毫克每千克(mg/kg);

A——试样溶液中庆大霉素的峰面积;

C_s——标准工作液中庆大霉素的浓度,单位为毫克每升(mg/L);

V——溶解残余物所得试样溶液体积,单位为毫升(mL);

A_s——标准工作液中庆大霉素的峰面积;

W——样品质量,单位为克(g)。

9 检测限、定量限、回收率和精密度

9.1 检测限和定量限

本方法对血清、尿样和猪饲料中庆大霉素的检测限为0.025 mg/kg,定量限为0.05 mg/kg。

9.2 回收率和精密度

牛、猪、羊和鸡血清,牛、猪、羊尿液和猪饲料中庆大霉素类药物的添加回收率和精密度见附录B。

附录 A
(资料性)
多重反应监测(MRM)色谱图

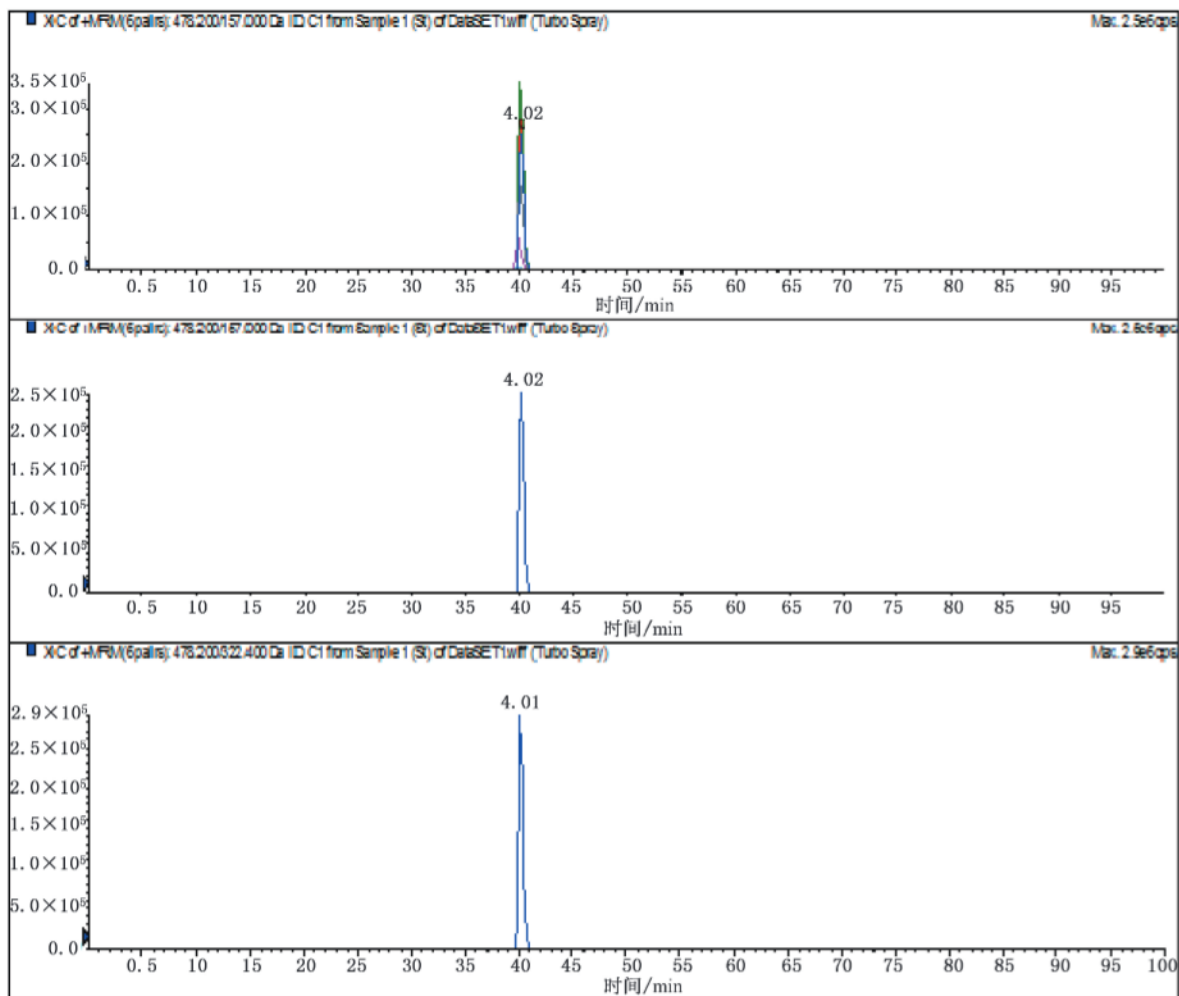


图 A.1 庆大霉素标准溶液多重反应监测(MRM)色谱图

附录 B

(资料性)

庆大霉素添加实验回收率和精密度数据

B.1 牛血清和尿样中添加回收率和精密度

表 B.1 牛血清和尿样中添加回收率和精密度

名称	添加浓度 μg/kg	牛血清		牛尿液	
		回收率/%	精密度/%	回收率/%	精密度/%
庆大霉素	100	72.3~92.0	10.1	70.9~98.4	6.1
	200	70.6~98.5	9.2	75.9~96.0	9.5
	500	80~99.1	5.1	86~96.0	6.6

B.2 猪血清和尿样中添加回收率和精密度

表 B.2 猪血清和尿样中添加回收率和精密度

名称	添加浓度 μg/kg	猪尿液		猪血清	
		回收率/%	精密度/%	回收率/%	精密度/%
庆大霉素	100	74.2~88.6	12.4	70~90.2	13.4
	200	75.8~96	11.6	78.6~101	11.1
	500	77~98	9.3	76.7~98	10.3

B.3 羊血清和尿样中添加回收率和精密度

表 B.3 羊血清和尿样中添加回收率和精密度

名称	添加浓度 μg/kg	羊尿液		羊血清	
		回收率/%	精密度/%	回收率/%	精密度/%
庆大霉素	100	77.4~97.8	6.2	79.6~86.8	9.4
	200	79~95	5.1	77.2~92	6.4
	500	82.5~97.5	7.0	81~95.5	7.0

B.4 鸡血清和猪饲料中添加回收率和精密度

表 B.4 鸡血清和猪饲料中添加回收率和精密度

名称	添加浓度 μg/kg	猪饲料		鸡血清	
		回收率/%	精密度/%	回收率/%	精密度/%
庆大霉素	100	79.6~102.8	6.2	79.4~100.8	8.4
	200	78.2~92.2	5.1	77.8~92	8.3
	500	82.5~94.6	7.0	81~93.5	6.0

以正式出版文本为准

以正式出版文本为准

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
进出口食用动物、饲料中庆大霉素检测方法
液相色谱-质谱/质谱法

SN/T 5481—2022

*

中国海关出版社有限公司出版发行
北京市朝阳区东四环南路甲1号(100023)
编辑部:(010)65194242-7530

网址 www.customskb.com/book

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 18 千字

2023年1月第一版 2023年1月第一次印刷

印数 1—500

*

书号: 155175·856 定价 12.00 元



SN/T 5481-2022