



中华人民共和国国家标准

GB 31658.6—2021

食品安全国家标准 动物性食品中四环素类药物残留量的测定 高效液相色谱法

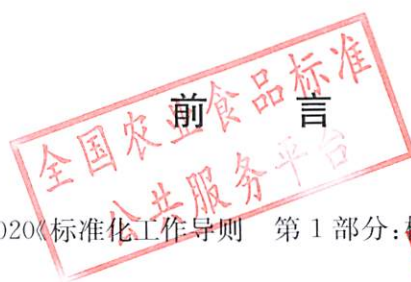
National food safety standard—
Determination of tetracyclines residues in animal derived food
by high performance liquid chromatography method

2021-09-16 发布

2022-02-01 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



本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件系首次发布。

食品安全国家标准

动物性食品中四环素类药物残留量的测定

高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了动物性食品中四环素类药物残留量检测的制样和高效液相色谱测定方法。

本文件适用于猪、牛、羊、鸡的肌肉、肝脏和肾脏,猪、鸡的皮+脂肪,鸡蛋,牛奶,鱼皮+肉,虾肌肉中土霉素、四环素、金霉素、多西环素残留量的检测。

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 原理

试料中残留的四环素类药物,经 EDTA·2Na-McIlvaine 缓冲溶液提取,固相萃取柱净化,高效液相色谱-紫外法测定,外标法定量。

5 试剂与材料

以下所用的试剂,除特别注明外均为分析纯试剂;水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

5.1.2 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

5.1.3 三氟乙酸(CF_3COOH)。

5.1.4 二氯甲烷(CH_2Cl_2)。

5.1.5 乙二胺四乙酸二钠($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$)。

5.1.6 枸橼酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)。

5.1.7 磷酸氢二钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)。

5.1.8 草酸($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。

5.1.9 硫酸(H_2SO_4)。

5.1.10 钨酸钠(Na_2WO_4)。

5.2 标准品

盐酸土霉素含量 $\geq 97.0\%$,盐酸四环素含量 $\geq 97.5\%$,盐酸金霉素含量 $\geq 93.1\%$,盐酸多西环素含量 $\geq 98.2\%$,见附录 A。

5.3 溶液配制

5.3.1 柠檬酸溶液:取柠檬酸 21.01 g,用水溶解并稀释至 1 000 mL。

5.3.2 磷酸氢二钠溶液:取磷酸氢二钠 71.63 g,用水溶解并稀释至 1 000 mL。

5.3.3 McIlvaine 缓冲溶液(pH 4.0):取枸橼酸溶液 1 000 mL、磷酸氢二钠溶液 625 mL,混匀,用盐酸或氢氧化钠溶液调 pH 至 4.0 ± 0.05 。

5.3.4 EDTA · 2Na-McIlvaine 缓冲溶液:取乙二胺四乙酸二钠 60.5 g,加 McIlvaine 缓冲溶液 1 625 mL,溶解,混匀。

5.3.5 草酸溶液(0.01 mol/L):取草酸 1.26 g,用水溶解并稀释至 1 000 mL。

5.3.6 三氟乙酸溶液:取三氟乙酸 0.8 mL,用水溶解并稀释至 1 000 mL。

5.3.7 硫酸溶液:取硫酸 1.85 mL,用水溶解并稀释至 100 mL。

5.3.8 钨酸钠溶液:取钨酸钠 7 g,用水溶解并稀释至 100 mL。

5.3.9 草酸溶液(1 mol/L):取草酸 12.6 g,用水溶解并稀释至 100 mL。

5.3.10 草酸-乙腈溶液:取草酸溶液(1 mol/L)20 mL,用乙腈溶解并稀释至 100 mL。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液:取盐酸土霉素、盐酸四环素、盐酸金霉素和盐酸多西环素标准品各约 10 mg,精密称定,用甲醇溶解并稀释定容至 10 mL 容量瓶,配制成浓度为 1 mg/mL 的土霉素、四环素、金霉素和多西环素标准储备液。 -18°C 以下保存,有效期 1 个月。

5.4.2 混合标准工作液:精密量取土霉素、四环素、金霉素和多西环素标准储备液各 1 mL,于 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液。 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存。现用现配。

5.5 材料

5.5.1 HLB 固相萃取柱:500 mg/6 mL,亲脂性二乙烯苯和亲水性 N-乙烯吡咯烷酮按特定比例形成的聚合物,或相当者。

5.5.2 LCX 固相萃取柱¹⁾:500 mg/6 mL,填料为磷酸化聚苯乙烯二乙烯苯高聚物,或相当者。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪:配紫外检测器。

6.2 分析天平:感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 组织匀浆器。

6.4 涡旋混合器:3 000 r/min。

6.5 低温离心机:转速可达 8 500 r/min。

6.6 固相萃取装置。

6.7 氮吹仪。

6.8 尼龙微孔滤膜:0.22 μm 。

6.9 离心管:50 mL。

7 试料的制备与保存

7.1 试料的制备

7.1.1 组织

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织绞碎,并使均质。

a) 取均质的供试样品,作为供试试料;

b) 取均质的空白样品,作为空白试料;

c) 取均质的空白样品,添加适宜浓度的标准溶液,作为空白添加试料。

7.1.2 牛奶

1) 本实验所列 LCX 固相萃取柱由 Agela 公司研制提供的,此处列出固相萃取柱仅为提供参考,并不涉及商业目的,鼓励标准使用者尝试采用不同厂家或型号的固相萃取柱。

取适量新鲜或冷藏的空白或供试牛奶,混合均匀。

- a) 取均质的供试样品,作为供试试料;
- b) 取均质的空白样品,作为空白试料;
- c) 取均质的空白样品,添加适宜浓度的标准溶液,作为空白添加试料。

7.1.3 鸡蛋

取适量新鲜的供试鸡蛋,去壳,并使均质。

- a) 取均质的供试样品,作为供试试料;
- b) 取均质的空白样品,作为空白试料;
- c) 取均质的空白样品,添加适宜浓度的标准溶液,作为空白添加试料。

7.2 试料的保存

—18℃以下保存,3个月内进行分析检测。

8 测定步骤

8.1 提取

8.1.1 皮+脂肪

取试料 5 g(准确至±0.02 g),加二氯甲烷 15 mL,涡旋 1 min,振荡 5 min,加 EDTA·2Na-McIlvaine 缓冲溶液 15 mL,涡旋 1 min,振荡 5 min,8 500 r/min 离心 5 min,取上清液。下层溶液用 EDTA·2Na-McIlvaine 缓冲溶液重复萃取 2 次,每次 15 mL,合并上清液,中性滤纸过滤,备用。

8.1.2 肌肉、肝脏、肾脏、牛奶、鸡蛋

称取试料 5 g(准确至±0.02 g),加 EDTA·2Na-McIlvaine 缓冲溶液 20 mL,涡旋 1 min,振荡 10 min,加硫酸溶液 5 mL、钨酸钠溶液 5 mL,涡旋 1 min,8 500 r/min 离心 5 min,取上清液。残渣用 EDTA·2Na-McIlvaine 缓冲溶液 20 mL、10 mL 各提取 2 次,合并上清液,中性滤纸过滤,备用。

8.2 净化

HLB 柱依次用甲醇、水和 EDTA·2Na-McIlvaine 缓冲溶液各 5 mL 活化。备用液过柱,待全部备用液流出后,依次用水、5%甲醇溶液各 10 mL 淋洗,抽干 30 s,用甲醇 6 mL 洗脱,收集洗脱液于刻度试管中,加水 2 mL,混匀,过甲醇 5 mL、水 5 mL 活化的 LCX 柱,待全部液体流出后,用水、甲醇各 5 mL 淋洗,抽干 1 min,草酸-乙腈溶液 6 mL 洗脱,收集洗脱液,于 40℃水浴氮气吹至 0.5 mL~1.0 mL,再加甲醇 0.4 mL,用草酸溶液(0.01 mol/L)稀释至 2.0 mL,微孔滤膜过滤,高效液相色谱测定(上机溶液应在 24 h 内完成测定)。

8.3 标准曲线的制备

精密量取混合标准工作液适量,用草酸溶液(0.01 mol/L)稀释成浓度为 0.05 μg/mL、0.1 μg/mL、0.2 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL 的系列混合标准液,供高效液相色谱测定。以测得的峰面积为纵坐标、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: C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm),或相当者;
- b) 流动相: A 为三氟乙酸溶液, B 为乙腈,梯度洗脱条件见表 1;

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间 min	流速 mL/min	A %	B %
0	1.0	90	10
5	1.0	80	20
15	1.0	65	35
16	1.0	90	10
17	1.0	90	10

- c) 检测波长:350 nm;
- d) 进样量:50 μL ;
- e) 柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ 。

8.4.2 测定法

取试料溶液和相应的标准溶液,作单点或多点校准,以色谱峰面积定量,按外标法计算。标准溶液及试料溶液中四环素类药物响应值应在仪器检测的线性范围之内。试料中四环素类药物的保留时间与标准工作液相应峰的保留时间相对偏差应在 $\pm 2.5\%$ 以内。在上述色谱条件下,标准溶液的高效液相色谱图分别见附录B。

8.5 空白试验

取空白试料,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

试料中四环素类药物的残留量按标准曲线或公式(1)计算。

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

式中:

- X —— 试料中相应的四环素类药物残留量的数值,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- A —— 试料中相应的四环素类药物的峰面积;
- A_s —— 标准溶液中相应的四环素类药物的峰面积;
- C_s —— 标准溶液中相应的四环素类药物浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V —— 最终试料定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- m —— 供试试料质量的数值,单位为克(g)。

10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法在猪、牛、羊、鸡的肌肉,鸡蛋,牛奶,鱼皮+肉、虾肌肉中检测限为20 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为50 $\mu\text{g}/\text{kg}$;在猪、牛、羊、鸡的肝脏、肾脏,猪、鸡的皮+脂肪的检测限为50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法在猪、牛、羊、鸡肌肉50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为60%~120%,在猪、牛、羊、鸡肝脏100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为60%~120%,在猪、牛、羊、鸡肾脏组织100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~1 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为60%~120%,猪、鸡皮+脂肪100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为60%~120%,鱼皮+肉、虾肌肉50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为60%~120%,在牛奶50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为60%~120%,在鸡蛋50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为60%~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 $\leq 15\%$ 。

附 录 A

(资料性)

4 种四环素类药物中英文通用名称、化学分子式、CAS 号

4 种四环素类药物的中英文通用名称、分子式和 CAS 号见表 A.1。

表 A.1 4 种四环素类药物中英文通用名称、化学分子式、CAS 号

化合物名称	英文名称	分子式	CAS 号
土霉素	Oxytetracycline	$C_{22}H_{24}N_2O_9$	79-57-2
四环素	Tetracyclines	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	60-54-8
金霉素	Chlortetracycline	$C_{22}H_{23}ClN_2O_8$	57-62-5
多西环素	Doxycycline	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	564-25-0

附 录 B
(资料性)

4 种四环素类药物标准溶液色谱图

4 种四环素类药物标准溶液色谱图见图 B. 1。

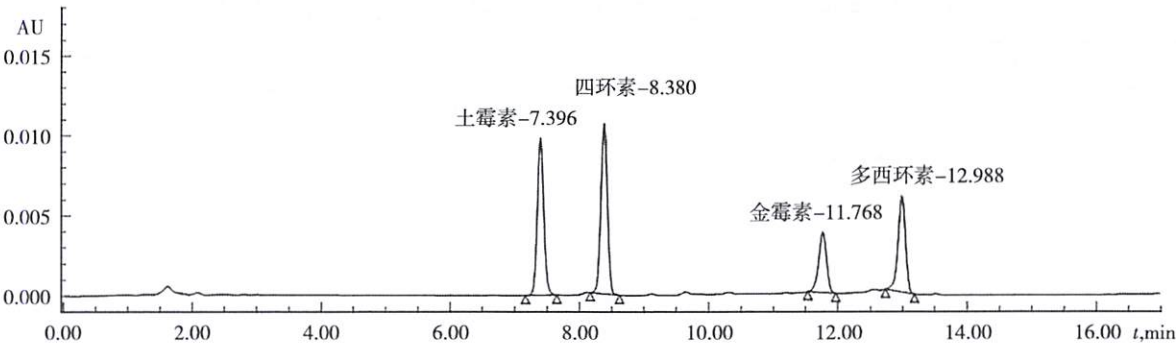


图 B. 1 4 种四环素类药物标准溶液色谱图(750 μg/L)

中华人民共和国
国家标准
食品安全国家标准

动物性食品中四环素类药物残留量的测定
高效液相色谱法

GB 31658.6—2021

* * *

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)

北京印刷一厂印刷

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 0.75 字数 15 千字

2022 年 1 月第 1 版 2022 年 1 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·8757

定价: 24.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



GB 31658.6—2021