



中华人民共和国国家标准

GB/T 20764—2006

可食动物肌肉中土霉素、四环素、 金霉素、强力霉素残留量的测定 液相色谱-紫外检测法

Method for the determination of oxytetracycline, tetracycline,
chlortetracycline, and doxycycline residues in edible animal muscles—
LC-UV detection method

2006-12-31 发布

2007-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准修改采用 AOAC 标准 995.09《可食动物组织中土霉素、四环素、金霉素残留量测定——液相色谱法》，修订的主要内容是：

- C₁₈固相萃取柱改为 Oasis HLB 固相萃取柱；
- 淋洗液由甲醇改为乙酸乙酯；
- 增加了羧酸型阳离子交换柱净化；
- 增加了测定品种。

本标准的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局提出。

本标准由中华人民共和国质量监督检验检疫总局归口。

本标准起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：庞国芳、曹彦忠、石玉秋、张进杰、范春林、李学民、刘永明、贾光群。

本标准系首次发布的国家标准。

可食动物肌肉中土霉素、四环素、 金霉素、强力霉素残留量的测定 液相色谱-紫外检测法

1 范围

本标准规定了牛肉、羊肉、猪肉、鸡肉和兔肉中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素残留量液相色谱-紫外检测法。

本标准适用于牛肉、羊肉、猪肉、鸡肉和兔肉中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素残留量的测定。

本标准的方法检出限：土霉素、四环素、金霉素、强力霉素均为 0.005 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6379.1 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度） 第 1 部分：总则与定义（GB/T 6379.1—2004, ISO 5725-1:1994, IDT）

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度） 第 2 部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法（GB/T 6379.2—2004, ISO 5725-2:1994, IDT）

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法（GB/T 6682—1992, neq ISO 3696:1987）

3 原理

用 0.1 mol/L Na_2EDTA -Mcllvaine ($\text{pH}=4.0\pm0.05$) 缓冲溶液提取可食动物肌肉中四环素族抗生素残留，提取液经离心后，上清液用 Oasis HLB 或相当的固相萃取柱和羧酸型阳离子交换柱净化，液相色谱-紫外检测器测定，外标法定量。

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 乙酸乙酯：色谱纯。

4.4 磷酸氢二钠：优级纯。

4.5 柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)。

4.6 乙二胺四乙酸二钠 ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。

4.7 草酸。

4.8 磷酸氢二钠溶液：0.2 mol/L。称取 28.41 g 磷酸氢二钠 (4.4)，用水溶解，定容至 1 000 mL。

4.9 柠檬酸溶液：0.1 mol/L。称取 21.01 g 柠檬酸 (4.5)，用水溶解，定容至 1 000 mL。

4.10 Mcllvaine 缓冲溶液：将 1 000 mL 0.1 mol/L 柠檬酸溶液 (4.9) 与 625 mL 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液 (4.8) 混合，必要时用 NaOH 或 HCl 调 $\text{pH}=4.0\pm0.05$ 。

4.11 Na_2EDTA -Mcllvaine 缓冲溶液：0.1 mol/L。称取 60.5 g 乙二胺四乙酸二钠 (4.6) 放入 1 625 mL

Mcllvaine 缓冲溶液(4.10)中,使其溶解,摇匀。

4.12 甲醇+水(1+19):量取 5 mL 甲醇(4.1)与 95 mL 水混合。

4.13 流动相:乙腈+甲醇+0.01 mol/L 草酸溶液(2+1+7)。

4.14 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准物质:纯度 $\geq 95\%$ 。

4.15 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准储备溶液:0.1 mg/mL。准确称取适量的土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准物质(4.14),分别用甲醇配成 0.1 mg/mL 的标准储备液。储备液于 -18°C 贮存。

4.16 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素混合标准工作溶液:根据需要用流动相将土霉素、四环素、金霉素、强力霉素稀释成 5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL 不同浓度的混合标准工作溶液,混合标准工作溶液当天配制。

4.17 Oasis HLB 固相萃取柱或相当者:500 mg,6 mL。使用前分别用 5 mL 甲醇和 10 mL 水预处理,保持柱体湿润。

4.18 阳离子交换柱:羧酸型,500 mg,3 mL。使用前用 5 mL 乙酸乙酯预处理,保持柱体湿润。

5 仪器

5.1 液相色谱仪:配有紫外检测器。

5.2 分析天平:感量 0.1 mg,0.01 g。

5.3 液体混匀器。

5.4 固相萃取装置。

5.5 贮液器:50 mL。

5.6 高速冷冻离心机:最大转速 13 000 r/min。

5.7 刻度样品管:5 mL,精度为 0.1 mL。

5.8 真空泵:真空度应达到 80 kPa。

5.9 振荡器。

5.10 平底烧瓶:100 mL。

5.11 pH 计:测量精度 ± 0.02 。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

从全部样品中取出有代表性样品约 1 kg,充分搅碎,混匀,均分成两份,分别装入洁净容器内。密封作为试样,标明标记。在抽样和制样的操作过程中,应防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

6.2 试样保存

将试样于 -18°C 冷冻保存。

7 测定步骤

7.1 提取

称取 6 g 试样,精确到 0.01 g,置于 50 mL 具塞聚丙烯离心管中,加入 30 mL 0.1 mol/L Na_2EDTA -Mcllvaine 缓冲溶液($\text{pH}=4$)(4.11),于液体混匀器上快速混合 1 min,再用振荡器振荡 10 min,以 10 000 r/min 离心 10 min,上清液倒入另一离心管中,残渣中再加入 20 mL 缓冲溶液,重复提取一次,合并上清液。

7.2 净化

将上清液(7.1)倒入下接 Oasis HLB 固相萃取柱(4.17)的贮液器中,上清液以 ≤ 3 mL/min 的流速通过固相萃取柱,待上清液完全流出后,用 5 mL 甲醇+水(4.12)洗柱,弃去全部流出液。在 65 kPa 的

负压下,减压抽干 40 min,最后用 15 mL 乙酸乙酯(4.3)洗脱,收集洗脱液于 100 mL 平底烧瓶中。

将上述洗脱液在减压情况下以≤3 mL/min 的流速通过羧酸型阳离子交换柱(4.18),待洗脱液全部流出后,用 5 mL 甲醇(4.1)洗柱,弃去全部流出液。在 65 kPa 负压下,减压抽干 5 min,再用 4 mL 流动相(4.13)洗脱,收集洗脱液于 5 mL 样品管中,定容至 4 mL,供液相色谱-紫外检测器测定。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱:Mightsil RP-18 GP,3 μm,150 mm×4.6 mm 或相当者;
- b) 流动相:乙腈+甲醇+0.01 mol/L 草酸溶液(2+1+7);
- c) 流速:0.5 mL/min;
- d) 柱温:25℃;
- e) 检测波长:350 nm;
- f) 进样量:60 μL。

7.3.2 液相色谱测定

将混合标准工作溶液(4.16)分别进样,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线,用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素的响应值均应在仪器测定的线性范围内。在上述色谱条件下,土霉素、四环素、金霉素、强力霉素的参考保留时间见表 1。土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准物质液相色谱图参见图 A.1。

表 1 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素参考保留时间

药物名称	保留时间/min
土霉素	4.82
四环素	5.42
金霉素	10.32
强力霉素	15.45

7.4 平行试验

按以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.5 空白试验

除不称取试样外,均按上述步骤同时完成空白试验。

8 结果计算

结果按式(1)计算:

$$X = c \times \frac{V}{m} \times \frac{1\,000}{1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X——试样中被测组分残留量,单位为毫克每千克(mg/kg);
- c——从标准工作曲线得到的被测组分溶液浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
- V——试样溶液定容体积,单位为毫升(mL);
- m——试样溶液所代表试样的质量,单位为克(g)。

注:计算结果应扣除空白值。

9 精密度

本标准的精密度数据是按照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 的规定确定的,其重复性和再现性的值以 95%的可信度来计算。

9.1 重复性

在重复性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 r ,动物肌肉中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素含量范围及重复性方程见表 2。

表 2 含量范围及重复性和再现性方程

药物名称	含量范围/(mg/kg)	重复性限 r	再现性限 R
土霉素	0.005~0.100	$\lg r = 0.873\ 8 \lg m - 0.930\ 2$	$\lg R = 0.932\ 2 \lg m - 0.761\ 3$
四环素	0.005~0.100	$\lg r = 0.872\ 5 \lg m - 0.886\ 2$	$\lg R = 0.950\ 4 \lg m - 0.843\ 5$
金霉素	0.005~0.100	$\lg r = 0.910\ 7 \lg m - 0.772\ 5$	$\lg R = 0.891\ 1 \lg m - 0.371\ 2$
强力霉素	0.005~0.100	$\lg r = 0.921\ 8 \lg m - 0.739\ 5$	$\lg R = 0.876\ 1 \lg m - 0.335\ 0$

注: m 为两次测定结果的算术平均值。

如果差值超过重复性限,应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.2 再现性

在再现性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R ,动物肌肉中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素的含量范围及再现性方程见表 2。

附 录 A
(资料性附录)
标准物质色谱图

土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准物质液相色谱图,见图 A.1。

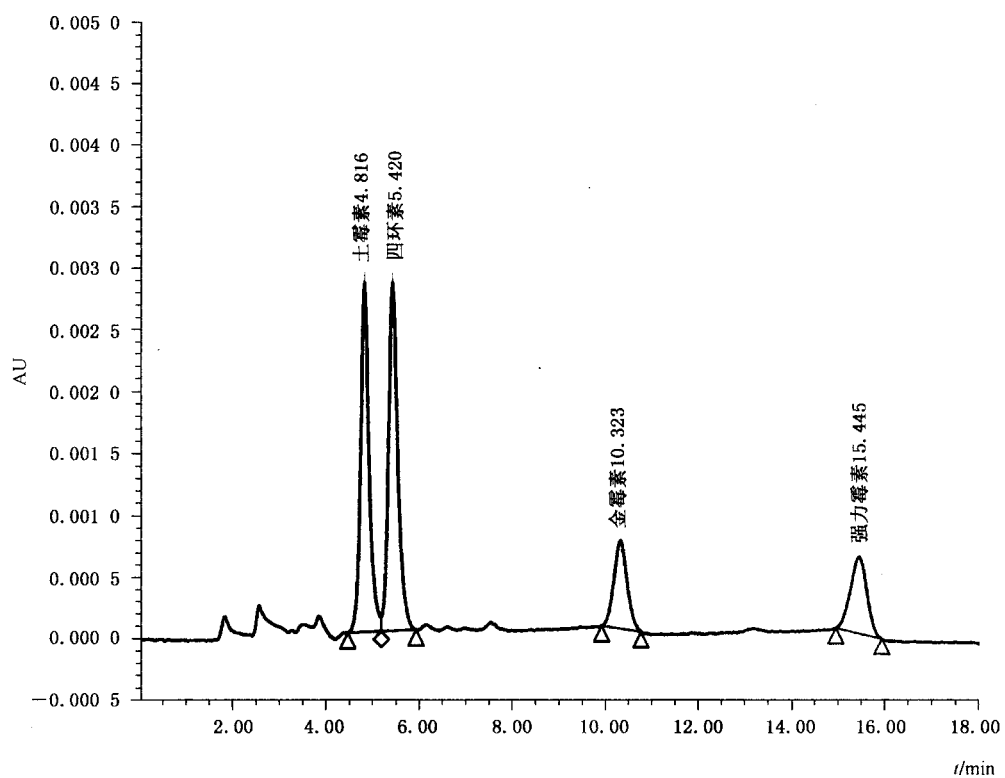


图 A.1 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准物质液相色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

本方法中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素添加浓度及其回收率的试验数据,见表 B. 1。

表 B. 1 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素添加浓度及其回收率的试验数据

药物名称	添加浓度/(mg/kg)	回收率/(%)
土霉素	0.005	84.6
	0.010	95.3
	0.050	94.5
	0.100	96.8
四环素	0.005	75.1
	0.010	75.6
	0.050	83.5
	0.100	89.3
金霉素	0.005	77.2
	0.010	77.0
	0.050	86.6
	0.100	90.8
强力霉素	0.005	82.2
	0.010	82.3
	0.050	81.8
	0.100	84.9