

中华人民共和国国家标准

农业部 958 号公告—2—2007

猪鸡可食性组织中四环素类残留检测方法 高效液相色谱法

High performance liquid chromatographic method for the
determination of tetracyclines residues in pig and chicken
edible tissues

13-Z-XCP-01-0379
25/6
2008

2007-12-29 发布

2008-03-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准起草单位：华中农业大学。

本标准主要起草人：袁宗辉、余欢、陶燕飞、陈冬梅、王玉莲、黄玲利、肖爱国、彭大鹏、刘振利、戴梦红。

本标准系首次发布的行业标准。

猪鸡可食性组织中四环素类残留检测方法

高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了猪鸡可食性组织中四环素类残留量检测的制样和高效液相色谱测定方法。

本标准适用于猪的肌肉、肝脏、肾脏、鸡的肌肉、肝脏组织中四环素、土霉素、金霉素、多西环素的残留量检测。

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 1.1—2000 标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写规则(ISO/IEC Directives, Part 3, 1997, Rules for the structure and drafting of International Standards, NEQ)

GB/T 6682—1992 分析实验室用水规则和试验方法

农业部农牧发[2003]1 号 兽药残留试验技术规范(试行)

3 制样

3.1 样品的制备

取新鲜或冷冻空白、供试组织，绞碎使均匀。

3.2 样品的保存

—20℃以下贮存。

4 测定方法

4.1 方法提要或原理

试料中残留的 4 种四环素类药物用 McIlvaine-Na₂EDTA 缓冲液提取，固相萃取柱净化，用高效液相色谱-紫外检测器法测定，外标法定量。

4.2 试剂和材料

以下所用试剂，除特别注明者外均为分析纯试剂；水为符合 GB/T 6682 规定的二级水。

- 4.2.1 盐酸四环素：含量不少于 95%。
- 4.2.2 盐酸金霉素：含量不少于 95%。
- 4.2.3 盐酸土霉素：含量不少于 95%。
- 4.2.4 盐酸多西环素：含量不少于 95%。
- 4.2.5 甲醇：色谱纯。
- 4.2.6 乙腈：色谱纯。
- 4.2.7 无水磷酸氢二钠。
- 4.2.8 柠檬酸。
- 4.2.9 草酸。

4.2.10 乙二胺四乙酸二钠。

4.2.11 0.01 mol/L 草酸水溶液的配制

称取草酸 1.26 g,加水溶解,稀释到 1 000 mL。

4.2.12 5%三氯乙酸溶液的配制

称取三氯乙酸 50 g,加水溶解,稀释到 1 000 mL。

4.2.13 McIlvaine- Na_2EDTA 缓冲液

称取无水磷酸氢二钠 28.4 g,加水溶解,稀释到 1 000 mL。

称取柠檬酸单水合物 21.0,加水溶解,稀释到 1 000 mL。

将上述柠檬酸溶液 1 L 与无水磷酸氢二钠溶液 625 mL 混合,加入乙二胺四乙酸(EDTA)二钠盐 60.5 g,溶解,混匀。用 0.1 mol/L HCl 或 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 至 4.0 ± 0.05 , 4°C 保存。

4.2.14 洗脱液的配制

称取草酸 1.26 g,加甲醇溶解,稀释到 1 000 mL。

4.2.15 标准贮备液的配制

分别取盐酸四环素、盐酸土霉素、盐酸金霉素、多西环素的标准品约 10.0 mg,精密称定,用适量流动相 A+乙腈(1:1)溶解,定容至 10 mL,得到按四环素、土霉素、金霉素和多西环素计为 1 mg/mL 的标准贮备液, 0°C 避光保存,有效期为 2 个月。

4.3 仪器和设备

4.3.1 高效液相色谱仪(配紫外检测器)。

4.3.2 天平:感量 0.01 g。

4.3.3 分析天平:感量 0.000 01 g。

4.3.4 离心机。

4.3.5 电热恒温水浴锅。

4.3.6 旋涡混合器。

4.3.7 超声波清洗机。

4.3.8 离心管。

4.3.9 氮吹仪。

4.3.10 组织匀浆机。

4.3.11 固相萃取柱 HLB,60 mg/3 mL。

4.4 测定步骤

4.4.1 试料的制备

试料的制备包括:

——取绞碎并均匀的供试样品,作为供试试料。

——取绞碎并均匀的空白样品,作为空白试料。

——取绞碎并均匀的空白样品,添加适宜浓度的标准溶液作为空白添加试料。

4.4.2 提取

称取 $5 \text{ g} \pm 0.05 \text{ g}$ 试料,置于 25 mL 离心管中,加入 McIlvaine- Na_2EDTA 缓冲液 10 mL,漩涡混匀, 15°C 5 000 r/min 离心 15 min,上清液转移到另一洁净的 50 mL 离心管中,残渣再用 McIlvaine- Na_2EDTA 缓冲液 10 mL 重复提取,合并两次提取液,加入 5%三氯乙酸溶液 2 mL,漩涡混匀,10 000 r/min 离心 10 min,上清液转移至另一洁净的 50 mL 玻璃离心管中,待净化。

4.4.3 净化

HLB 柱依次用甲醇、水 3 mL 活化。取提取液上柱,待液体全部流出后用水 5 mL 淋洗,洗脱液

3 mL洗脱, 45℃~50℃水浴下氮气吹干洗脱液, 用草酸溶液 1.0 mL 溶解残余物, 15℃ 4 000 r/min 离心 5 min, 取上清液供高效液相色谱检测。

4.4.4 标准曲线的绘制

准确量取标准贮备液适量, 用甲醇稀释成浓度为 50 μg/L、100 μg/L、250 μg/L、500 μg/L、1 000 μg/L、1 500 μg/L 的混合标准溶液, 供高效液相色谱分析, 每个浓度进样 3 针, 用平均峰面积与相应的标准溶液浓度作标准曲线, 并计算回归方程及相关系数。

4.4.5 测定

4.4.5.1 液相色谱条件

色谱柱: C₁₈柱, 250 mm×4.6 mm(i. d.), 粒径 5 μm。

流动相: A 相: 0.01 mol/L 的草酸水溶液, B 相: 乙腈, C 相: 甲醇。

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	A 相/B 相/C 相(V/V/V)	流速(mL/min)
0~10	83/11/6	1
10~25	60/30/10	1

检测波长: 355 nm。

进样量: 100 μL。

柱温: 35℃。

4.4.5.2 测定法

取试样溶液和相应的标准溶液作单点或多点校准, 按外标法, 以峰面积定量, 即得。

4.5 空白试验

除不加试料外, 采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

4.6 结果计算和表述

按式(1)计算试料中四环素类药物的残留量(μg/kg):

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

式中:

X——试料中四环素类残留量, μg/kg;

A——试样溶液中四环素类药物的峰面积;

A_s——标准工作液中四环素类药物峰面积;

C_s——标准工作液中四环素类药物的浓度, μg/L;

V——溶解残余物所得试样溶液体积, mL;

W——组织样品质量, g。

5 检测方法灵敏度、准确度、精密度

5.1 灵敏度

本方法在猪鸡肌肉组织中的检测限均为 10 μg/kg, 定量限均为 20 μg/kg, 在猪鸡肝脏组织中检测限均为 25 μg/kg, 定量限均为 50 μg/kg, 在猪肾脏组织中检测限均为 30 μg/kg, 定量限均为 50 μg/kg。

5.2 准确度

本方法在 20 μg/kg~1 200 μg/kg 添加浓度的回收率为 70%~110%。

5.3 精密度

本方法的批内、批间变异系数 CV≤20%。

附录 A
(资料性附录)
高效液相色谱图

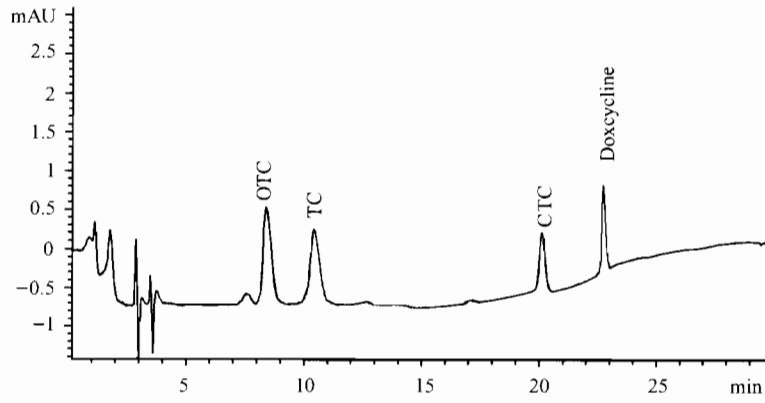


图 A.1 四环素类药物(土霉素、四环素、金霉素、多西环素)
标准溶液浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 色谱图

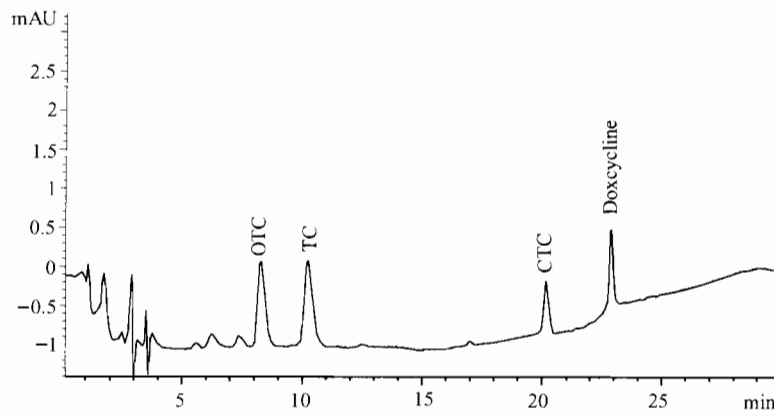


图 A.2 猪肌肉添加四环素类药物(20 $\mu\text{g/kg}$) 色谱图

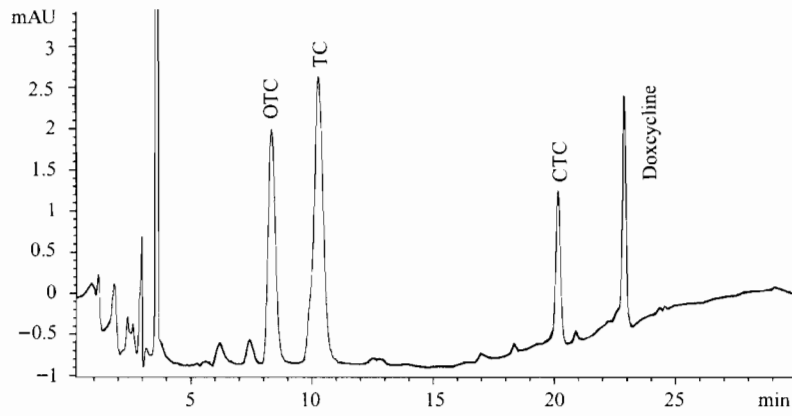


图 A. 3 猪肝脏添加四环素类药物 (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 色谱图