

中华人民共和国国家标准

GB/T 22990—2008

牛奶和奶粉中土霉素、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

Determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline,
doxycycline residues in milk and milk powder—
HPLC-UV method

2008-12-31 发布

2009-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 A、附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出并归口。

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、中华人民共和国河北出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：郭春海、窦彩云、陈瑞春、马育松、艾连峰、吕红英、贾海涛、姚春毅、庞国芳。

牛奶和奶粉中土霉素、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

本标准规定了牛奶和奶粉中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素残留量液相色谱-紫外检测测定方法。

本标准适用于牛奶和奶粉中土霉素、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：牛奶中土霉素、四环素为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、金霉素、强力霉素为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。奶粉中土霉素、四环素为 $25 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、金霉素、强力霉素为 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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—2008, ISO 3696:1987, MOD）

3 原理

用 $0.1 \text{ mol/L Na}_2\text{EDTA-McIlvaine}$ 缓冲溶液提取试样中四环素族抗生素残留，Oasis HLB 或相当的固相萃取柱和羧酸型阳离子交换柱净化，液相色谱仪测定，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 磷酸氢二钠（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ）。

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

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

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

4.7 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液：称取 71.63 g 磷酸氢二钠（4.3），用水溶解，定容至 $1\,000 \text{ mL}$ 。

4.8 0.1 mol/L 柠檬酸溶液：称取 21.04 g 柠檬酸（4.4），用水溶解，定容至 $1\,000 \text{ mL}$ 。

4.9 McIlvaine 缓冲溶液：将 625 mL 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液（4.7）与 $1\,000 \text{ mL}$ 0.1 mol/L 柠檬酸溶液（4.8）混合，必要时用 NaOH 或 HCl 调 $\text{pH}=4.0 \pm 0.05$ 。

4.10 $0.1 \text{ mol/L Na}_2\text{EDTA-McIlvaine}$ 缓冲溶液：称取 60.50 g 乙二胺四乙酸二钠（4.5）放入 $1\,625 \text{ mL}$ McIlvaine 缓冲溶液（4.9）中，使其溶解，摇匀。

- 4.11 0.01 mol/L 草酸溶液:称取 1.26 g 草酸(4.6),用水溶解,定容至 1 000 mL。
- 4.12 甲醇-水(1+19):量取 5 mL 甲醇(4.1)与 95 mL 水混匀。
- 4.13 0.01 mol/L 草酸-乙腈溶液(1+1):量取 50 mL 草酸溶液(4.11)与 50 mL 乙腈(4.2)混匀。
- 4.14 土霉素(oxytetracycline,CAS:2058-46-0)、四环素(tetracycline,CAS:64-75-5)、金霉素(chlortetracycline,CAS:64-72-2)、强力霉素(doxycycline,CAS:24390-14-5)标准物质:纯度大于等于 96%。
- 4.15 0.1 mg/mL 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准储备溶液: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-20 °C 保存。
- 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、强力霉素标准储备液(4.15)稀释成所需浓度的混合标准工作溶液,储存于冰箱中,每周配制。
- 4.17 Oasis HLB 固相萃取柱¹⁾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 羧酸型阳离子交换柱:500 mg,6 mL。使用前用 5 mL 甲醇预处理,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 涡旋振荡器。
- 5.4 冷冻离心机:转速大于 5 000 r/min。
- 5.5 固相萃取装置。
- 5.6 真空泵。
- 5.7 氮气吹干仪。
- 5.8 pH 计:测量精度±0.02。
- 5.9 刻度样品管:10 mL,精度为 0.1 mL。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

将牛奶从冰箱中取出,放置至室温,摇匀,备用。

6.2 试样保存

牛奶置于 0 °C~4 °C 冰箱中避光保存,奶粉常温避光保存。

7 测定步骤

7.1 提取

牛奶试样称取 10 g(精确到 0.01 g),置于 50 mL 具塞塑料离心管中。奶粉试样称取 2 g(精确到 0.01 g),置于 50 mL 具塞塑料离心管中。向试样中加入 20 mL 0.1 mol/L Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲溶液(4.10),于涡旋振荡器上混合 2 min,于 10 °C,5 000 r/min 离心 10 min,上清液过滤至另一离心管中。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)通过处理好的 Oasis HLB 柱(4.17),待上清液完全流出后,用 5 mL 甲醇-水(4.12)淋洗,弃去全部流出液。减压抽干 5 min,最后用 5 mL 甲醇(4.1)洗脱,收集洗脱液于 10 mL 样品管中。

1) Oasis HLB 固相萃取柱是 Waters 公司产品的商品名称,给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不是表示对该产品的认可。如果其他产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

将收集的洗脱液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,减压抽干,用4 mL 0.01 mol/L 草酸-乙腈溶液(4.13)洗脱,收集洗脱液于10 mL 样品管中,45 °C 氮气吹至1.5 mL 左右,流动相定容至2 mL,供液相色谱-紫外检测器测定。

7.3 测定条件

7.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱:Kromasil 100-5C₁₈, 5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm(内径)或相当者;
- b) 流动相:0.01 mol/L 草酸溶液-乙腈-甲醇(77+18+5);
- c) 流速:1.0 mL/min;
- d) 柱温:40 °C;
- e) 检测波长:350 nm;
- f) 进样量:60 μ L。

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分别为3.09 min、3.73 min、8.27 min 和 12.53 min。土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准物质液相色谱图参见附录 A 中的图 A.1。

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,按以上步骤同时完成空白试验。

7.6 回收率试验

向阴性试样中添加标准溶液,均按上述步骤操作,测定后计算试样中添加的回收率。添加浓度及回收率范围参见附录 B 中的表 B.1。

8 结果计算

被测物残留量的测定按式(1)计算:

$$X_i = c_i \times \frac{V}{m} \times \frac{1\ 000}{1\ 000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

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

计算结果应扣除空白值。

9 精密度

9.1 一般规定

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是以 95% 的可信度来计算。

9.2 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 ,牛奶和奶粉中土霉素、

四环素、金霉素、强力霉素添加浓度范围及重复性方程见表 1 和表 2。

表 1 牛奶中四环素族抗生素添加浓度范围及重复性和再现性方程 单位为微克每千克

化合物名称	添加浓度范围	重复性限 r	再现性限 R
土霉素	5~50	$\lg r=0.881 \lg m-0.812$	$\lg R=0.899 \lg m-0.574$
四环素	5~50	$\lg r=1.06 \lg m-1.00$	$\lg R=1.00 \lg m-0.612$
金霉素	10~100	$\lg r=1.08 \lg m-1.15$	$\lg R=0.819 \lg m-0.430$
强力霉素	10~100	$\lg r=0.963 \lg m-0.903$	$\lg R=0.838 \lg m-0.465$
注： m 为两次测定结果的算术平均值。			

表 2 奶粉中四环素族抗生素添加浓度范围及重复性和再现性方程 单位为微克每千克

化合物名称	添加浓度范围	重复性限 r	再现性限 R
土霉素	25~250	$\lg r=0.872 \lg m-0.791$	$\lg R=0.834 \lg m-0.500$
四环素	25~250	$\lg r=0.996 \lg m-1.07$	$\lg R=0.877 \lg m-0.542$
金霉素	50~500	$\lg r=0.997 \lg m-1.12$	$\lg R=1.12 \lg m-1.04$
强力霉素	50~500	$\lg r=0.817 \lg m-0.738$	$\lg R=0.860 \lg m-0.464$
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 r ，应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.3 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 ，牛奶和奶粉中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素的添加浓度范围及再现性方程见表 1 和表 2。

附录 A
(资料性附录)
标准物质液相色谱图

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。

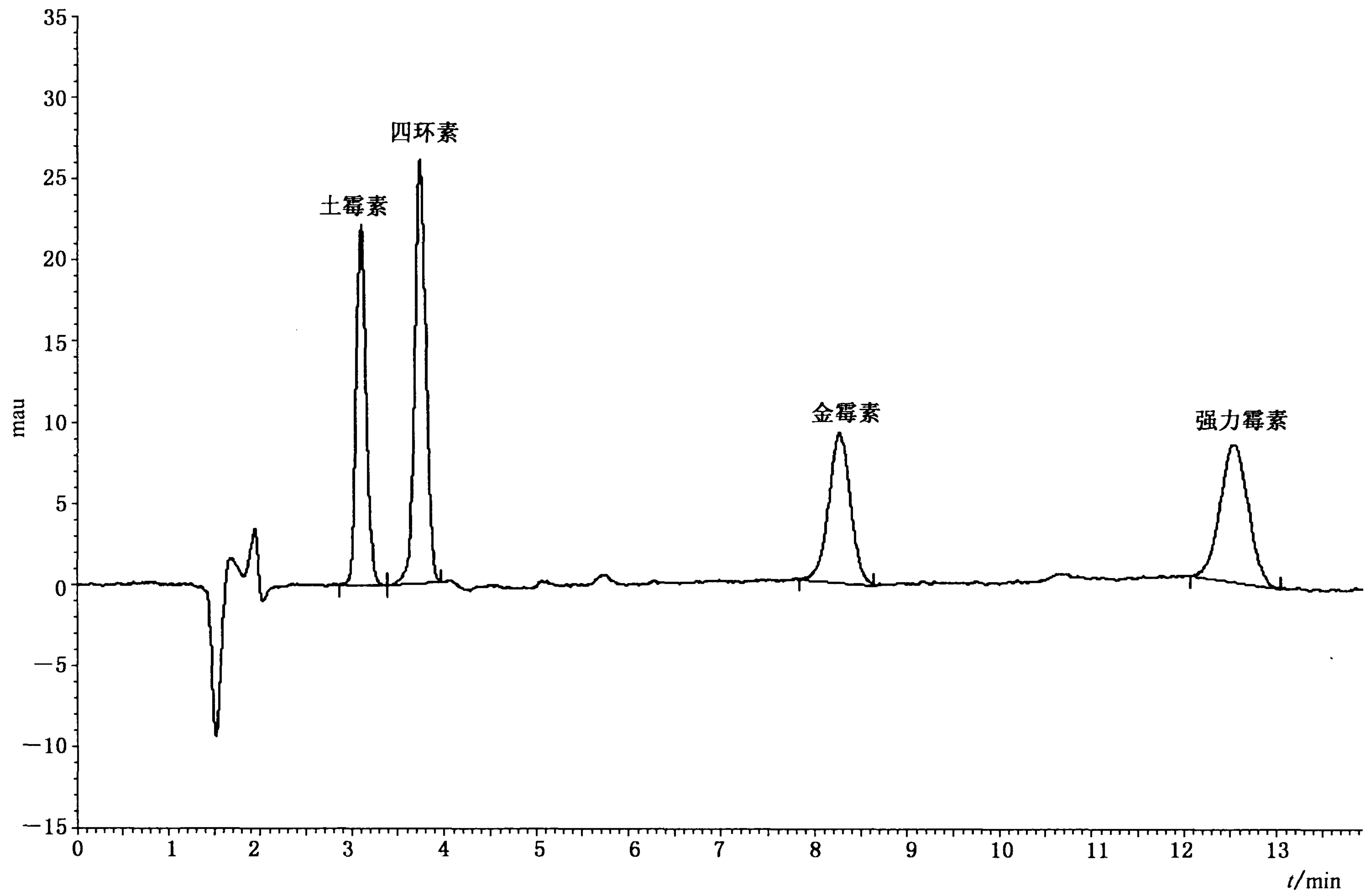


图 A.1 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准物质液相色谱图

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范围试验数据,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范围试验数据

化合物名称	牛奶		奶粉	
	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率范围/%	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%
土霉素	5	71.3~87.6	25	71.9~98.7
	10	81.2~94.6	50	76.5~90.0
	25	77.0~98.4	125	80.5~95.1
	50	80.1~93.8	250	81.4~99.2
四环素	5	63.7~74.3	25	71.9~84.8
	10	71.3~84.6	50	70.3~89.5
	25	70.2~80.3	125	80.2~93.6
	50	70.0~86.3	250	81.8~92.9
金霉素	10	71.7~85.7	50	71.5~84.3
	20	70.6~88.3	100	81.4~90.8
	50	72.5~89.9	250	80.5~92.9
	100	80.3~90.9	500	82.8~90.7
强力霉素	10	71.1~85.7	50	72.6~93.6
	20	70.8~90.5	100	80.2~89.1
	50	74.0~88.5	250	82.8~94.5
	100	82.1~94.8	500	81.4~90.7