



中华人民共和国国家标准

GB 31656.11—2021

代替 GB/T 22961—2008

食品安全国家标准 水产品中土霉素、四环素、金霉素、 多西环素残留量的测定

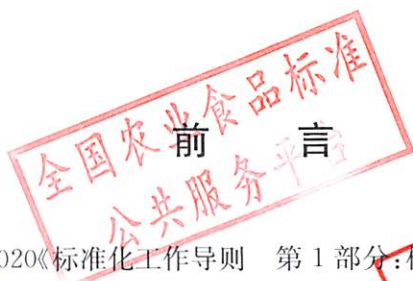
National food safety standard—
Determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline
and doxycycline residues in aquatic products

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：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 GB/T 22961—2008，并增加液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件方法一对 GB/T 22961—2008《河豚鱼、鳗鱼中土霉素、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》进行修订。本文件与 GB/T 22961—2008 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术内容变化如下：

- 更改了标准的适用范围(见 1、2008 年版的 1)；
- 更改了方法的检测器，由紫外检测器改为荧光检测器(见 6.1、2008 年版的 5.1)；
- 更改了方法的部分测定步骤和检出限(见 8、2008 年版的 7)。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- GB/T 22961—2008；
- 本次为第一次修订。

食品安全国家标准

水产品中土霉素、四环素、金霉素、多西环素残留量的测定

方法一 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了水产品中土霉素、四环素、金霉素和多西环素残留量测定的高效液相色谱法。

本文件适用于鱼、虾、蟹、鳖及海参等水产品可食组织中土霉素、四环素、金霉素和多西环素残留量的测定。

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

GB/T 30891—2014 水产品抽样规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中土霉素、四环素、金霉素和多西环素经柠檬酸缓冲溶液提取后，固相萃取柱净化，液相色谱荧光检测器检测，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；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 乙酸镁($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Mg} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)。

5.1.3 咪唑($\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$)。

5.1.4 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。

5.1.5 柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)：优级纯。

5.1.6 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)：优级纯。

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

5.1.8 冰乙酸(CH_3COOH)。

5.2 溶液配制

5.2.1 磷酸二氢钾溶液：取磷酸二氢钾 13.6 g，加水适量使溶解并稀释至 1 000 mL。

5.2.2 甲醇溶液：取甲醇 5 mL、水 95 mL，混匀。

5.2.3 柠檬酸缓冲液：取柠檬酸 6.30 g、磷酸氢二钠 13.8 g、乙二胺四乙酸二钠 1.86 g，加水 400 mL 使溶解，用冰乙酸调 pH 至 4.0，再用水稀释至 500 mL。

5.2.4 咪唑缓冲溶液：取咪唑 68.0 g、乙二胺四乙酸二钠 0.40 g、乙酸镁 10.0 g，加水 800 mL 使溶解，用

冰乙酸调 pH 至 7.2,再用水稀释至 1 000 mL,经 0.45 μm 水相微孔滤膜过滤后备用。

5.2.5 甲醇-咪唑缓冲溶液:取甲醇 20 mL、咪唑缓冲溶液 80 mL,混匀。

5.3 标准品

盐酸四环素、盐酸金霉素、盐酸土霉素、盐酸多西环素,含量均 $\geq 95\%$,具体见附录 A。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液(100 $\mu\text{g/mL}$):分别准确称取适量标准品,用甲醇溶解稀释定容配制成土霉素、四环素、金霉素和多西环素浓度均为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液。 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下避光储存,有效期 1 个月。

5.4.2 混合标准中间液:分别准确移取土霉素、四环素、金霉素和多西环素标准储备液 1.0 mL、1.0 mL、2.0 mL 和 2.0 mL 于 100 mL 容量瓶,用甲醇稀释并定容,配制成土霉素、四环素、金霉素和多西环素浓度分别为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准中间液。 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下避光储存,有效期为 7 d。

5.5 材料

5.5.1 固相萃取柱:500 mg/6 mL, Oasis HLB 或性能相当者。

5.5.2 水相微孔滤膜:0.22 μm 。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪:配荧光检测器。

6.2 分析天平:感量 0.01 g。

6.3 分析天平:感量 0.000 01 g。

6.4 涡旋振荡器。

6.5 离心机:转速 6 000 r/min 或以上。

6.6 固相萃取装置(带负压抽滤器)。

6.7 氮吹仪。

6.8 组织匀浆机。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

按 GB/T 30891—2014 附录 B 的要求制样。

a) 取均质后的供试样品,作为供试试样;

b) 取均质后的空白样品,作为空白试样;

c) 取均质后的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试样。

7.2 试样的保存

$-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

取试样 5 g(准确至 $\pm 0.05\text{ g}$),加柠檬酸缓冲液 20 mL,涡旋震荡 2 min,超声提取 10 min,以 6 000 r/min 离心 10 min,取上清液于另一 50 mL 离心管中。向残渣加柠檬酸缓冲液 10 mL,重复提取 2 次,合并 3 次上清液,待净化。

8.2 净化

将 Oasis HLB 固相萃取柱依次用甲醇 10 mL、水 10 mL、柠檬酸缓冲液 5 mL 活化,移入待净化液,用甲醇溶液 10 mL、水 10 mL 淋洗,抽干,加甲醇 10 mL 洗脱,收集洗脱液,40 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干,加磷酸二氢钾溶液 1.0 mL 溶解残渣,超声 1 min,过 0.22 μm 水相微孔滤膜后,供高效液相色谱测定。

8.3 标准曲线的制备

准确移取土霉素、四环素、金霉素和多西环素混合标准中间溶液适量,用甲醇-咪唑缓冲溶液稀释成土霉素和四环素浓度分别为 50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、1 000 ng/mL,金霉素和多西环素浓度分别为 100 ng/mL、200 ng/mL、400 ng/mL、1 000 ng/mL、2 000 ng/mL 的混合标准系列工作溶液供高效液相色谱测定。以待测物峰面积为纵坐标、相应的标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线。计算回归方程和相关系数。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱: C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),或相当者;
- 柱温: 40 ℃;
- 进样量: 30 μL;
- 流速: 0.8 mL/min;
- 激发波长: 380 nm;
- 发射波长: 520 nm;
- 流动相: 甲醇-咪唑缓冲溶液。

8.4.2 测定法

取试样溶液和相应的标准溶液,作单点或多点校准,以色谱峰面积定量,外标法计算。标准工作液及试样溶液中土霉素、四环素、金霉素和多西环素响应值应在仪器检测的线性范围之内。标准溶液的高效液相色谱图见附录 B 中的图 B.1。

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

试样中待测物残留量按标准曲线或公式(1)计算。

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

式中:

X —— 试样中土霉素、四环素、金霉素和多西环素含量的数值,单位为微克每千克(μg/kg);

A —— 试样中土霉素、四环素、金霉素和多西环素的峰面积;

A_s —— 标准溶液中土霉素、四环素、金霉素和多西环素的峰面积;

C_s —— 标准溶液中土霉素、四环素、金霉素和多西环素浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V —— 最终试样定容体积的数值,单位为毫升(mL);

m —— 供试试样质量的数值,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

本方法在水产品可食组织中土霉素和四环素的检测限均为 10.0 μg/kg,多西环素和金霉素的检测限均为 20.0 μg/kg;土霉素和四环素的定量限均为 20.0 μg/kg,多西环素和金霉素定量限均为 40.0 μg/kg。

10.2 准确度

土霉素和四环素在 20.0 μg/kg~200 μg/kg 添加浓度的回收率为 60%~110%;多西环素和金霉素在 40.0 μg/kg~400 μg/kg 添加浓度的回收率为 60%~110%。

10.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差≤15%,批间相对标准偏差≤15%。

方法二 液相色谱-串联质谱法

11 范围

本文件规定了水产品中土霉素、四环素、金霉素和多西环素残留量测定的液相色谱-串联质谱法。

本文件适用于鱼、虾、蟹、鳖及海参等水产品可食组织中土霉素、四环素、金霉素和多西环素残留量的测定。

12 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

GB/T 30891—2014 水产品抽样规范

13 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

14 原理

试样中残留的土霉素、四环素、金霉素和多西环素,用 Na_2EDTA -McIlvaine 缓冲溶液提取,醋酸铅沉淀,正己烷除脂,固相萃取柱净化,液相色谱-串联质谱测定,以基质校正标准曲线进行外标法定量。

15 试剂与材料

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

15.1 试剂

15.1.1 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

15.1.2 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

15.1.3 乙酸乙酯($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$):色谱纯。

15.1.4 正己烷(C_6H_{14}):色谱纯。

15.1.5 甲酸(HCOOH):色谱纯。

15.1.6 盐酸(HCl)。

15.1.7 氢氧化钠(NaOH)。

15.1.8 柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$):优级纯。

15.1.9 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4):优级纯。

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

15.1.11 醋酸铅 $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ 。

15.2 溶液配制

15.2.1 Na_2EDTA -McIlvaine 缓冲溶液(0.1 mol/L):称取柠檬酸 12.9 g、磷酸氢二钠 10.9 g、乙二胺四乙酸二钠 37.2 g,各自加水适量使溶解,混合,用水稀释至 1 000 mL,用 0.1 mol/L HCl 或 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 至 4.0 (± 0.05)。

15.2.2 醋酸铅溶液(20.0 g/L):取醋酸铅 20.0 g,加水溶解并稀释至 1 000 mL。

15.2.3 甲酸溶液(0.1%):取甲酸 0.1 mL,加水溶解并稀释至 100 mL。

15.2.4 甲醇溶液:取甲醇 5 mL、水 95 mL,混匀。

15.2.5 甲醇-乙酸乙酯:取甲醇 10 mL、乙酸乙酯 90 mL,混匀。

15.2.6 甲酸溶液(0.1%)-乙腈:取 0.1% 甲酸溶液 90 mL、乙腈 10 mL,混匀。

15.3 标准品

盐酸四环素、盐酸金霉素、盐酸土霉素、盐酸多西环素,含量均 $\geq 95\%$,具体见附录 A。

15.4 标准溶液制备

15.4.1 标准储备液(100 $\mu\text{g/mL}$):分别取标准品 10 mg,精密称定,加甲醇溶解并分别定容于 100 mL 容量瓶中,配制成土霉素、四环素、金霉素和多西环素浓度分别为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液。 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,有效期为 1 个月。

15.4.2 混合标准中间液(1.0 $\mu\text{g/mL}$):分别准确移取土霉素、四环素、金霉素和多西环素标准储备液 1 mL 于 100 mL 容量瓶,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度均为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准中间液。 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,有效期为 7 d。

15.5 材料

15.5.1 固相萃取柱:60 mg/3 mL。Oasis HLB 或性能相当者。

15.5.2 聚丙烯离心管:50 mL。

15.5.3 微孔滤膜:0.22 μm 。

16 仪器和设备

16.1 液相色谱-串联四级杆质谱仪:配有电喷雾离子源(ESI)。

16.2 分析天平:感量 0.01 g。

16.3 分析天平:感量 0.000 01 g。

16.4 离心机:转速 8 000 r/min 或以上。

16.5 固相萃取装置(带负压抽滤器)。

16.6 超声波清洗器。

16.7 涡旋混合器。

16.8 氮吹仪。

16.9 组织匀浆机。

17 试样的制备与保存

17.1 试样的制备

按 GB/T 30891—2014 附录 B 的要求制样。

a) 取均质后的供试样品,作为供试试样;

b) 取均质后的空白样品,作为空白试样;

c) 取均质后的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试样。

17.2 试样的保存

$-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

18 测定步骤

18.1 提取

取试样 2 g(准确至 $\pm 0.02\text{ g}$),加入 Na_2EDTA -McIlvaine 缓冲溶液 6.0 mL、醋酸铅溶液 2.0 mL,涡旋混合 1 min,超声 10 min 后,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 8 000 r/min 离心 5 min,移取上清液;残渣分别用 Na_2EDTA -

Mcllvaine 缓冲溶液 6.0 mL 重复提取 2 次,合并 3 次提取液。

18.2 净化

向上述提取液中加入正己烷 10 mL,涡旋 1 min 后,8 000 r/min 的速率离心 5 min,去除上层液,下层溶液待进一步净化(对于鳗鲡、蟹和海参样品,需按照上述方法净化 2 次)。

固相萃取柱预先依次用甲醇 5 mL 和水 5 mL 活化,取 10.0 mL 提取液上样,控制流速约 1 mL/min,依次用水 5 mL 和甲醇溶液 5 mL 淋洗萃取柱,弃去全部流出液,减压抽干 5 min。最后用甲醇-乙酸乙酯 5 mL 洗脱,洗脱液于 40 °C 下用氮气吹至近干,用甲酸溶液(0.1%)-乙腈 1.0 mL 溶解残留物,涡旋混匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,为防药物变性,需及时供液相色谱-质谱仪测定。

18.3 标准曲线的制备

精密量取 1 μg/mL 混合标准工作液,依次加入 6 份经提取和净化处理的空白试料洗脱液中,氮气吹至近干后,用甲酸溶液(0.1%)-乙腈 1.0 mL 溶解残留物,配制成 5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL 和 250 ng/mL 的基质混合标准系列工作溶液,现用现配。以基质校正标准工作液的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,求回归方程和相关系数。

18.4 测定

18.4.1 色谱参考条件

- a) 色谱柱: C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×150 mm, 5 μm), CAPCELL PAK C₁₈ MG II 或性能相当者;
- b) 流速: 0.2 mL/min;
- c) 柱温: 30 °C;
- d) 进样量: 10 μL;
- e) 流动相: A 为甲酸溶液(0.1%); 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	A %	B %
0.0	90	10
0.5	90	10
3.0	10	90
6.0	10	90
7.0	90	10
8.0	90	10

18.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源: 电喷雾(ESI)离子源;
- b) 扫描方式: 正离子扫描;
- c) 检测方式: 多反应监测(MRM);
- d) 喷雾电压: 4 200 V;
- e) 离子传输管温度: 350 °C;
- f) 鞘气流量: 35 L/min;
- g) 辅助气流量: 10 L/min;
- h) 碰撞气: 氦气;
- i) 定性离子对、定量离子对和碰撞能量见表 2。

表 2 土霉素、四环素、金霉素、多西环素的质谱参数

化合物	定性离子对 <i>m/z</i>	定量离子对 <i>m/z</i>	碰撞能量 eV
土霉素 (Oxytetracycline, OTC)	461>426	461>426	19
	461>443		12

表 2 (续)

化合物	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	碰撞能量 eV
四环素 (Tetracycline, TC)	445>410	445>410	20
	445>427		13
金霉素 (Chlortetracycline, CTC)	479>444	479>444	21
	479>154		24
多西环素 (Doxycycline, DOC)	445>428	445>428	18
	445>154		31

18.4.3 测定法

18.4.3.1 定性测定

在同样测试条件下,试样液中土霉素、四环素、金霉素和多西环素的保留时间与标准工作液中的相应保留时间之比,偏差在±2.5%以内,且检测到的相对离子丰度,应当与浓度相当的校正标准溶液相对丰度一致。基峰与次强碎片离子丰度比应符合表 3 的要求。

表 3 定性确证时相对离子丰度的允许偏差

单位为百分号

相对离子丰度	允许偏差
>50	±20
20~50	±25
10~20	±30
≤10	±50

18.4.3.2 定量测定

待仪器稳定后,将净化好的试样溶液和相应的基质校正标准系列工作液等体积进样,作单点或多点校准,以色谱峰面积定量,外标法计算。标准工作液及试样中土霉素、四环素、金霉素和多西环素的响应值均应在仪器检测的线性范围之内。标准溶液的多反应监测色谱图见图 B.2。

18.5 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。

19 结果计算和表述

试样中待测物残留量按标准曲线或公式(2)计算。

$$X = \frac{C_s \times A \times V_1 \times V_3}{A_s \times V_2 \times m} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

X —— 试样中土霉素、四环素、金霉素和多西环素含量的数值,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

A —— 试样中土霉素、四环素、金霉素和多西环素的峰面积;

A_s —— 标准溶液中土霉素、四环素、金霉素和多西环素的峰面积;

C_s —— 标准溶液中土霉素、四环素、金霉素和多西环素浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V_1 —— 提取溶液总体积的数值,单位为毫升(mL);

V_2 —— 吸取出用于净化的提取溶液体积的数值,单位为毫升(mL);

V_3 —— 最终试样定容体积的数值,单位为毫升(mL);

m —— 供试试样质量的数值,单位为克(g)。

20 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

20.1 灵敏度

本方法在水产品可食组织中土霉素、四环素、金霉素和多西环素的检测限均为 $5.00\ \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限均为 $10.0\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

20.2 准确度

本方法在水产品可食组织中添加 $10.0\ \mu\text{g}/\text{kg}\sim 200\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度下的回收率为 $60\%\sim 120\%$ 。

20.3 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)

药物的英文名称、分子式和 CAS 号

4 种药物的英文名称、分子式和 CAS 号见表 A.1。

表 A.1 4 种药物的英文名称、分子式和 CAS 号

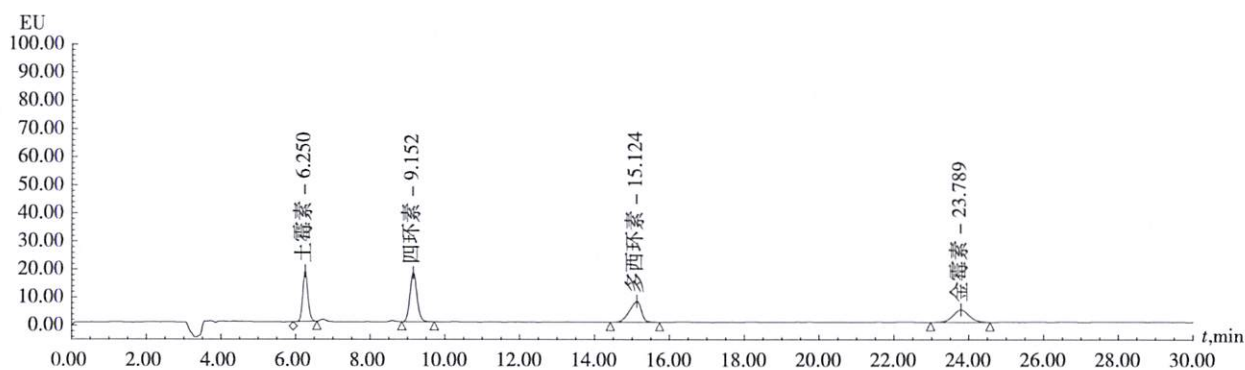
化合物	英文名称	分子式	CAS 号
盐酸土霉素	Oxytetracycline hydrochloride	$C_{22}H_{24}N_2O_9 \cdot HCl$	2058-46-0
盐酸四环素	Tetracycline hydrochloride	$C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$	64-75-5
盐酸金霉素	Chlortetracycline hydrochloride	$C_{22}H_{23}ClN_2O_8 \cdot HCl$	64-72-2
盐酸多西环素	Doxycycline hydrochloride	$C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl \cdot 0.5H_2O \cdot 0.5C_2H_5O$	24390-14-5

附录 B

(资料性)

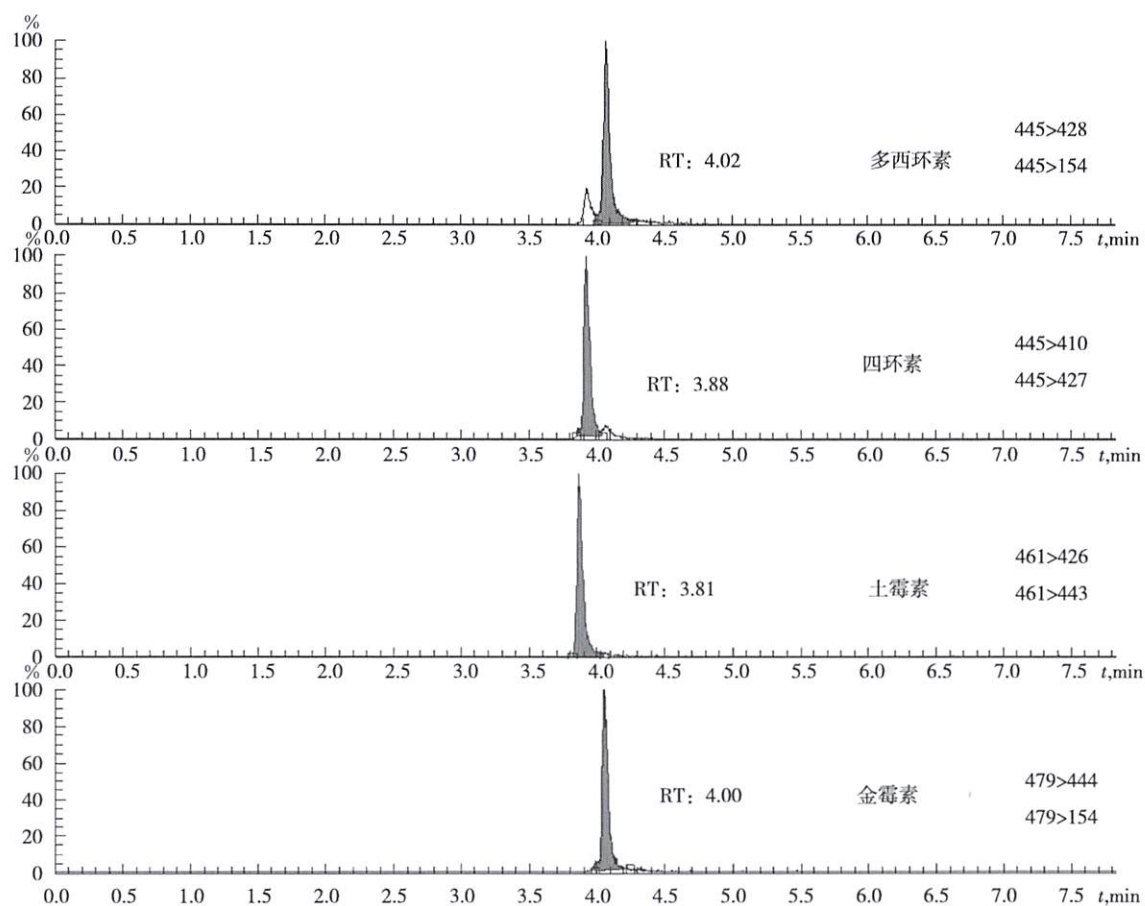
目标化合物特征离子质量色谱图

目标化合物特征离子质量色谱图见图 B.1 和图 B.2。



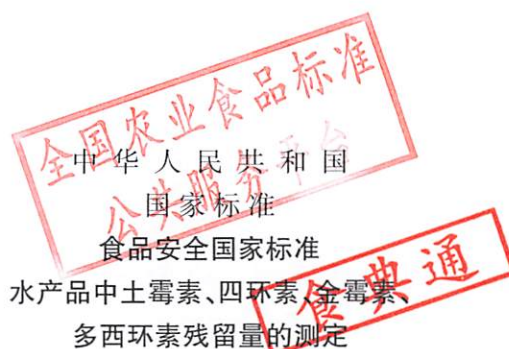
注:土霉素 100 ng/mL,四环素 100 ng/mL,多西环素 200 ng/mL,金霉素 200 ng/mL。

图 B.1 混合标准溶液的液相分离色谱图



注:土霉素、四环素、金霉素和多西环素均为 50 ng/mL。

图 B.2 混合标准溶液的特征离子质量色谱图



水产品中土霉素、四环素、金霉素、
多西环素残留量的测定

GB 31656.11—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 1 字数 20 千字

2022 年 1 月第 1 版 2022 年 1 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·8747

定价: 32.00 元



GB 31656.11—2021

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261