

中华人民共和国国家标准

GB 29695—2013

食品安全国家标准

水产品中阿维菌素和伊维菌素多 残留的测定 高效液相色谱法

2013-09-16 发布

2014-01-01 实施

中华人民共和国农业部
中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 发布

食品安全国家标准

水产品中阿维菌素和伊维菌素多 残留的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了水产品中阿维菌素和伊维菌素残留量的制样和高效液相色谱测定方法。

本标准适用于鱼的可食性组织中阿维菌素和伊维菌素残留量的检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 原理

试料中残留的阿维菌素和伊维菌素,用乙腈提取,正己烷除脂,碱性氧化铝柱净化,N-甲基咪唑和三氟乙酸酐衍生化,高效液相色谱-荧光法测定,外标法定量。

4 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。

- 4.1 阿维菌素标准品:B_{1a}含量≥94%。伊维菌素标准品:B_{1a}含量≥92%。
- 4.2 乙腈:色谱纯。
- 4.3 甲醇:色谱纯。
- 4.4 正己烷。
- 4.5 三氟乙酸酐。
- 4.6 N-甲基咪唑。
- 4.7 冰乙酸:优级纯。
- 4.8 无水硫酸钠:650 ℃烘4 h,干燥器中冷却备用。
- 4.9 碱性氧化铝固相萃取柱:1 g/3 mL,或相当者。
- 4.10 衍生化试剂 A:取N-甲基咪唑1 mL、乙腈1 mL,混匀,现配现用。
- 4.11 衍生化试剂 B:取三氟乙酸酐1 mL、乙腈2 mL,混匀,现配现用。
- 4.12 0.4%乙酸溶液:取冰乙酸0.4 mL,用水溶解并稀释至100 mL。
- 4.13 100 μg/mL 阿维菌素和伊维菌素混合标准贮备液:精密称取阿维菌素和伊维菌素标准品各10 mg,于100 mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,配制成浓度为100 μg/mL的阿维菌素和伊维菌素混合标准贮备液。-18 ℃以下保存,有效期6个月。
- 4.14 10 μg/mL 阿维菌素和伊维菌素混合标准工作液:精密量取100 μg/mL 阿维菌素和伊维菌素混

合标准贮备液 10 mL,于 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿维菌素和伊维菌素混合标准工作液。2 ℃~8 ℃保存,有效期 3 个月。

5 仪器

- 5.1 高效液相色谱仪:配荧光检测器。
- 5.2 分析天平:感量 0.000 01 g。
- 5.3 天平:感量 0.01 g。
- 5.4 旋涡混合器。
- 5.5 超声波清洗器。
- 5.6 离心机。
- 5.7 氮吹仪。
- 5.8 旋转蒸发仪。
- 5.9 固相萃取装置。
- 5.10 具塞玻璃离心管:5 mL。
- 5.11 无水硫酸钠柱:玻璃层析柱(φ 10 mm×150 mm,2 号砂芯)中装填 5 g 无水硫酸钠。
- 5.12 茄形瓶:50 mL。
- 5.13 具塞聚丙烯离心管:50 mL。
- 5.14 滤膜:0.45 μm 。

6 试料的制备与保存

6.1 试料的制备

- 取适量新鲜或解冻的空白或供试组织,绞碎,并使均质。
 - 取均质后的供试样品,作为供试试料。
 - 取均质后的空白样品,作为空白试料。
 - 取均质后的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试料。

6.2 试料的保存

- 18 ℃以下保存。

7 测定步骤

7.1 标准曲线的制备

精密量取 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿维菌素和伊维菌素混合标准工作液适量,用甲醇稀释,配制成浓度为 0.1、0.2、0.5、1 和 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列标准溶液,各取 0.1 mL 于 5 mL 离心管中,于 45 ℃~55 ℃水浴氮气吹干,按衍生化步骤处理。供高效液相色谱测定。以测得峰面积为纵坐标,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。

7.2 提取

称取试料 5 g±0.05 g,于 50 mL 聚丙烯离心管中,加乙腈 15 mL,旋涡混合 1 min,超声 30 min,4 000 r/min 离心 5 min,取上清液于另一 50 mL 聚丙烯离心管中。残渣中加入乙腈 10 mL,重复提取

一次,合并两次提取液。在提取液中加正己烷 10 mL,充分涡旋混合 1 min,4 000 r/min 离心 5 min,弃上层正己烷层。提取液中再加正己烷 10 mL,重复提取一次,弃正己烷层,备用。

7.3 净化

取备用液,依次过用乙腈 10 mL 活化的无水硫酸钠柱和碱性氧化铝固相萃取柱,收集滤液。待滤液流至将尽,用乙腈 10 mL 冲洗离心管,转至无水硫酸钠柱和碱性氧化铝固相萃取柱,吹干,合并滤液于茄形瓶中,于 40 ℃~50 ℃旋转蒸发至干。用乙腈 3 mL 分 2 次溶解残余物,并转至 5 mL 具塞玻璃离心管中,45 ℃~55 ℃水浴氮气吹干。

7.4 衍生化

于上述 5 mL 离心管中加衍生化试剂 A 100 μL,盖紧塞子,旋涡混合 30 s,再加衍生化试剂 B 150 μL,盖紧塞子,旋涡混合 30 s,密封避光,室温下衍生 15 min,加甲醇 750 μL,旋涡混合 30 s,过滤,供高效液相色谱测定。

7.5 测定

7.5.1 色谱条件

7.5.1.1 色谱柱:C₁₈(250 mm×4.6 mm,粒径 5 μm),或相当者。

7.5.1.2 流速:1.5 mL/min。

7.5.1.3 进样量:20 μL。

7.5.1.4 柱温:35 ℃。

7.5.1.5 检测器:激发波长 365 nm,发射波长 475 nm。

7.5.1.6 洗脱梯度见表 1。

表 1 洗脱梯度表

时间 min	甲醇 %	乙腈 %	0.4%乙酸 %
0	39	55	6
13	39	55	6
15	45	55	0
25	39	55	6

7.5.2 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,以峰面积计算。标准溶液及试样溶液中阿维菌素和伊维菌素响应值应在仪器检测的线性范围之内。在上述色谱条件下,标准溶液和空白添加试样溶液的高效液相色谱图见附录 A。

7.6 空白实验

除不加试料外,采用完全相同的步骤进行平行操作。

8 结果计算

试料中阿维菌素或伊维菌素的残留量按式(1)计算:

式中：

X ——供试试验料中相应的阿维菌素或伊维菌素残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

c ——试样溶液中相应的阿维菌素或伊维菌素的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——试样溶液总体积,单位为毫升(mL);

m ——供试试验料质量, 单位为克(g)。

注：计算结果需扣除空白值，测定结果用平行测定后的算术平均值表示，保留三位有效数字。

9 方法的灵敏度、准确度和精密度

9.1 灵敏度

本方法检测限为 $2 \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 准确度

本方法在 $4 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 70%~120%。

9.3 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
色谱图

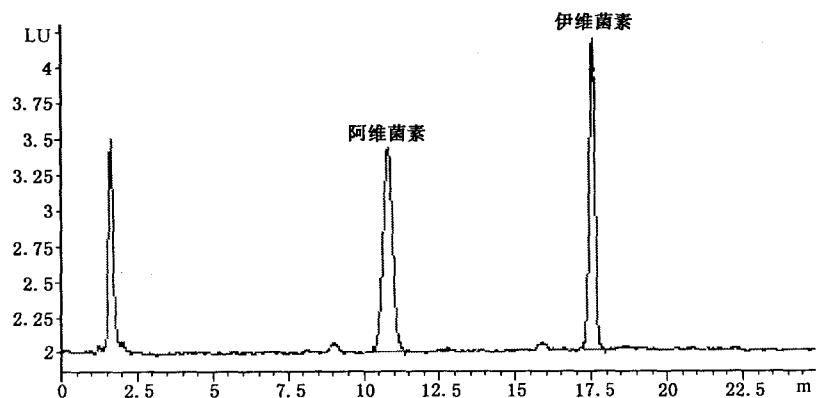


图 A.1 阿维菌素和伊维菌素标准溶液色谱图(100 ng/mL)

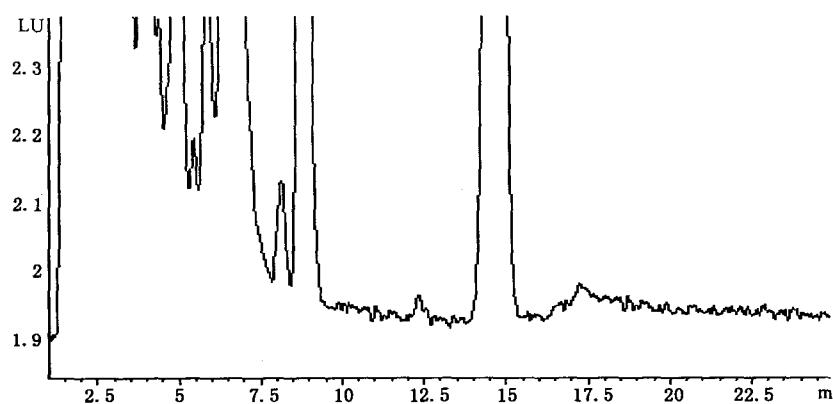


图 A.2 罗非鱼肌肉组织空白试样色谱图

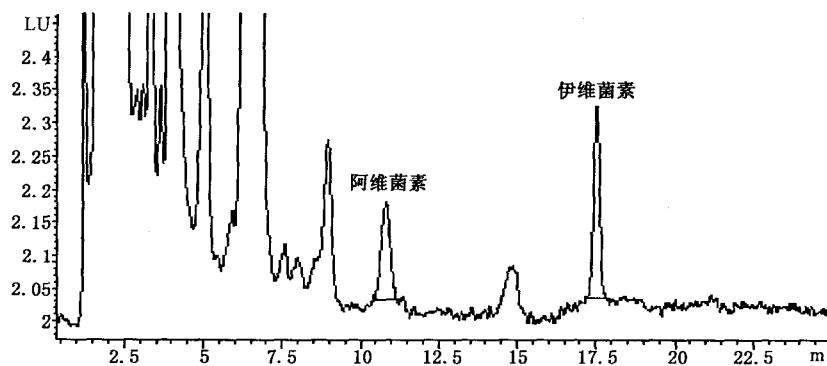


图 A.3 罗非鱼肌肉组织空白添加阿维菌素和伊维菌素试样色谱图($2 \mu\text{g}/\text{kg}$)