

中华人民共和国国家标准

GB 29687—2013

食品安全国家标准

水产品中阿苯达唑及其代谢物 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

水产品中阿苯达唑及其代谢物 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苯达唑及代谢物(2-氨基阿苯达唑砜、阿苯达唑亚砜、阿苯达唑砜)残留量检测的制样和高效液相色谱测定方法。

本标准适用于水产品中阿苯达唑及代谢物(2-氨基阿苯达唑砜、阿苯达唑亚砜、阿苯达唑砜)残留量的测定。

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

SC/T 3016 水产品抽样方法

3 原理

试料中残留的阿苯达唑及代谢物,用乙酸乙酯提取,正己烷除脂,乙酸乙酯反萃取,高效液相色谱-荧光检测器测定,外标法定量。

4 试剂和材料

以下所用试剂,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 盐酸 2-氨基阿苯达唑砜、阿苯达唑亚砜、阿苯达唑砜和阿苯达唑对照品:含量 $\geq 99\%$ 。
- 4.2 正己烷:色谱纯。
- 4.3 乙腈:色谱纯。
- 4.4 甲醇:色谱纯。
- 4.5 乙酸乙酯:色谱纯。
- 4.6 二氯甲烷:色谱纯。
- 4.7 磷酸。
- 4.8 十二水磷酸氢二钠。
- 4.9 庚烷磺酸钠:色谱纯。
- 4.10 乙酸铵。
- 4.11 20%甲醇溶液:取甲醇 80 mL,用水溶解并稀释至 100 mL。
- 4.12 0.05 mol/L 乙酸铵溶液:取乙酸铵 3.85 g,用水溶解并稀释至 1 000 mL。
- 4.13 0.04 mol/L 庚烷磺酸钠-磷酸溶液:取磷酸 2.7 mL,加水混匀,加庚烷磺酸钠 8.08 g,用水溶解并

稀释至 1 000 mL。

4.14 3% 磷酸溶液：取磷酸 1.75 mL，用水溶解并稀释至 100 mL。

4.15 0.02 mol/L 磷酸氢二钠溶液：取磷酸氢二钠 0.716 g，用水溶解并稀释至 100 mL，用 3% 磷酸溶液调节 pH 至 8.5，现配现用。

4.16 100 μg/mL 阿苯达唑、阿苯达唑亚砜、阿苯达唑砜和 2-氨基阿苯达唑砜标准贮备液：精密称取阿苯达唑、阿苯达唑砜和阿苯达唑亚砜各 10 mg 以及盐酸 2-氨基阿苯达唑砜 11.5 mg，分别于 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 的标准贮备液。−18 ℃ 以下避光保存，有效期 3 个月。

4.17 混合标准工作液：分别精密量取 100 μg/mL 2-氨基阿苯达唑砜、阿苯达唑亚砜、阿苯达唑砜和阿苯达唑标准储备液适量，于同一量瓶中，用 80% 甲醇溶液溶解并稀释至刻度，配制成浓度分别为 2-氨基阿苯达唑砜 1.0 μg/mL、阿苯达唑亚砜 2.0 μg/mL、阿苯达唑砜 0.2 μg/mL 以及阿苯达唑 5.0 μg/mL 的混合标准工作液。2 ℃~8 ℃ 避光保存，有效期 1 个月。

5 仪器与设备

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 均质机。

5.5 离心机。

5.6 旋转蒸发器。

5.7 氮吹仪。

5.8 梨形瓶：100 mL。

5.9 滤膜：有机相，0.45 μm。

6 试料的制备与保存

6.1 试料的制备

取适量新鲜或冷冻的鱼，去鳞、去皮，沿脊背取肌肉；虾，去头、去壳，取肌肉部分。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

−20 ℃ 以下保存。

7 测定步骤

7.1 虾、蟹类

7.1.1 提取

称取试料 2 g±0.02 g，于 50 mL 离心管中，加乙酸乙酯 15 mL，均质 30 s，振荡 5 min，4 000 r/min 离心 10 min，取上清液于 100 mL 梨形瓶中，残渣备用。另取一 50 mL 离心管，加乙酸乙酯 15 mL，清洗

均质机 30 s, 洗涤液于残渣中, 振荡 5 min, 4 000 r/min 离心 10 min, 上清液合并至 100 mL 梨形瓶中, 于 35 ℃旋转蒸发至干, 用 20% 甲醇溶液 1.0 mL 溶解残渣。

7.1.2 除脂

将上述溶液移入 10 mL 离心管中, 再向梨形瓶中加入正己烷 1 mL, 洗涤, 正己烷转入离心管中, 振荡 1 min, 4 000 r/min 离心 5 min, 弃正己烷层液, 再加入正己烷 1 mL, 重复操作两次, 取下层液备用。

7.1.3 净化

备用液中加 0.04 mol/L 磷酸 1 mL, 混匀, 加二氯甲烷 1.5 mL, 混合 1 min, 4 000 r/min 离心 5 min, 取二氯甲烷液于 10 mL 离心管中, 再加二氯甲烷 1.5 mL, 重复提取两次, 合并三次二氯甲烷液于 10 mL 离心管中, 于 35 ℃氮气吹干; 用 0.02 mol/L 磷酸氢二钠溶液 1.0 mL 溶解残余物, 加乙酸乙酯 2 mL, 混合 1 min, 4 000 r/min 离心 5 min, 将乙酸乙酯液移入另一 10 mL 离心管中, 再向磷酸氢二钠溶液中加乙酸乙酯 2 mL, 重复提取两次, 合并三次乙酸乙酯液, 于 40 ℃氮气吹干, 用 20% 甲醇-水 1.0 mL 溶解残留物, 滤膜过滤, 供液相色谱测定。

7.1.4 基质匹配标准溶液的制备

称取 5 份空白试料 2 g±0.02 g, 于 50 mL 离心管中, 分别加入混合标准工作液 0、10、25、100 和 200 μL, 混匀, 按提取、除脂、净化步骤操作, 基质标准溶液浓度分别为: 2-氨基阿苯达唑砜 0、0.01、0.025、0.1 和 0.2 μg/mL, 阿苯达唑亚砜 0、0.02、0.05、0.2 和 0.4 μg/mL, 阿苯达唑砜 0、0.002、0.005、0.02 和 0.04 μg/mL, 阿苯达唑 0、0.05、0.125、0.5 和 1 μg/mL, 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 鱼类

7.2.1 提取

称取试料 2 g±0.02 g, 于 50 mL 离心管中, 加乙酸乙酯 15 mL, 均质 30 s, 振荡提取 5 min, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液于 100 mL 梨形瓶中, 残渣备用。另取一 50 mL 离心管加乙酸乙酯 15 mL, 清洗均质机 30 s, 将此液倒入上述残渣中振荡提取 5 min, 4 000 r/min 离心 10 min, 上清液合并至 100 mL 梨形瓶中, 于 35 ℃减压旋转蒸发至干, 加入 20% 甲醇溶液 1.0 mL 溶解残渣。

7.2.2 除脂

将上述溶液移入 10 mL 离心管中, 再向梨形瓶中加入正己烷 1 mL, 洗涤, 正己烷转入离心管, 振荡 1 min, 4 000 r/min 离心 5 min, 去除正己烷层, 再加入正己烷 1 mL, 依法重复操作两次。下层溶液过 0.45 μm 有机相滤膜, 供液相色谱测定。

7.2.3 混合基质标准溶液的制备

称取 5 份空白试料 2 g±0.02 g, 于 50 mL 离心管中, 分别加混合标准工作液 10、25、100 和 200 μL, 混匀, 按提取、除脂步骤操作, 基质标准溶液浓度分别为: 2-氨基阿苯达唑砜 0、0.01、0.025、0.1 和 0.2 μg/mL, 阿苯达唑亚砜 0、0.02、0.05、0.2 和 0.4 μg/mL, 阿苯达唑砜 0、0.002、0.005、0.02 和 0.04 μg/mL, 阿苯达唑 0、0.05、0.125、0.5 和 1 μg/mL, 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。

7.3 测定

7.3.1 色谱条件

- 7.3.1.1 色谱柱: C₁₈(150 mm×4.6 mm, 粒径 5 μm), 或相当者。
 - 7.3.1.2 检测波长: 激发波长: 290 nm, 发射波长: 320 nm。
 - 7.3.1.3 柱温: 30 ℃。
 - 7.3.1.4 流速: 1.0 mL/min。
 - 7.3.1.5 进样量: 30 μL。
 - 7.3.1.6 流动相: 梯度程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

| 时间 min | 乙腈 % | 甲醇 % | 0.05 mol/L 乙酸铵 % |
|-----------|---------|---------|---------------------|
| 0.00 | 10 | 8 | 82 |
| 30.0 | 40 | 17 | 43 |
| 32.0 | 50 | 20 | 30 |
| 40.0 | 50 | 20 | 30 |
| 40.1 | 10 | 8 | 82 |
| 45.0 | 10 | 8 | 82 |

7.3.2 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苯达唑、阿苯达唑砜、阿苯达唑亚砜和 2-氨基阿苯达唑砜响应值应在仪器检测的线性范围之内。在上述色谱条件下,标准溶液和空白组织添加试样溶液的高效液相色谱图分别见附录 A。

7.4 空白试验

除不加试料外,采用完全相同的步骤进行平行操作。

8 结果计算和表述

试料中阿苯达唑及代谢物残留量按式(1)计算：

$$X = \frac{c_s \times A \times V \times 1\,000}{A_s \times m} \quad \dots \dots \dots \quad (1)$$

式中：

X ——供试试料中相应的阿苯达唑及代谢物残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

c_s ——基质标准溶液中相应的阿苯达唑及代谢物标准溶液浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

A ——试样溶液中相应的阿苯达唑及代谢物峰面积；

V ——样品定容体积,单位为毫升(mL);

A_s ——基质标准溶液中相应的阿苯达唑及代谢物标准溶液的峰面积；

m ——供试试料质量,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的算术平均值表示，保留三位有效数字。

9 方法灵敏度、准确度和精密度

9.1 灵敏度

本方法检测限:阿苯达唑为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$, 2-氨基阿苯达唑砜为 $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}$, 阿苯达唑亚砜为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$, 阿苯达唑砜为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

本方法定量限:阿苯达唑为 $25 \mu\text{g}/\text{kg}$, 2-氨基阿苯达唑砜为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$, 阿苯达唑亚砜为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$, 阿苯达唑砜为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

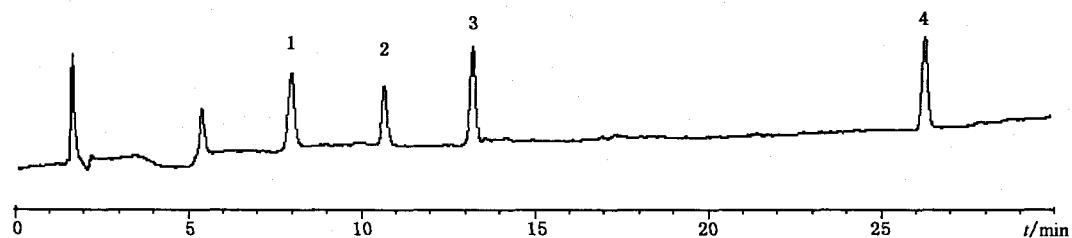
9.2 准确度

本方法阿苯达唑在 $25 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 500 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、2-氨基阿苯达唑砜在 $5 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、阿苯达唑亚砜在 $10 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 200 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以及阿苯达唑砜在 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $70\% \sim 110\%$ 。

9.3 精密度

本方法批内相对标准偏差 $\leq 15\%$, 批间相对标准偏差 $\leq 15\%$ 。

附录 A
色谱图



说明：

1——2-氨基阿苯达唑砜；

2——阿苯达唑亚砜；

3——阿苯达唑砜；

4——阿苯达唑。

图 A.1 阿苯达唑及其代谢物混合标准溶液色谱图

(阿苯达唑 $0.05 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、2-氨基阿苯达唑砜 $0.01 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、阿苯达唑亚砜 $0.02 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和阿苯达唑砜 $0.0024 \mu\text{g}/\text{mL}$)

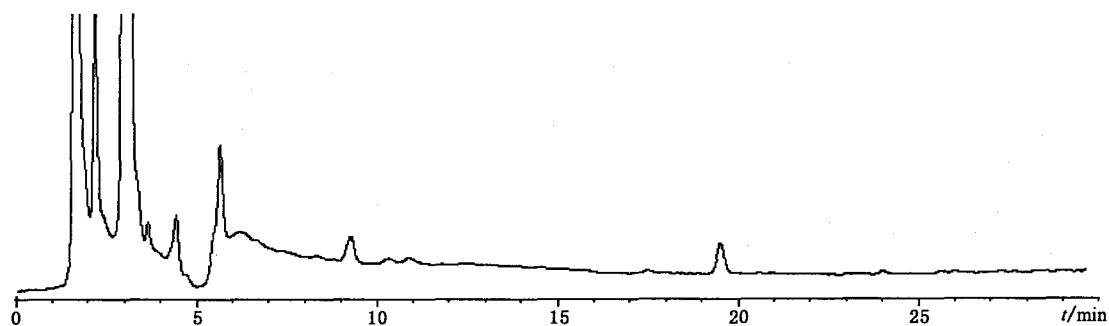
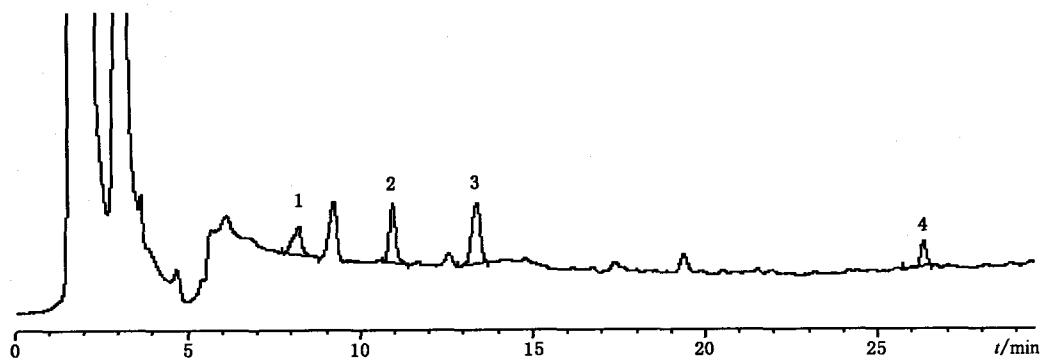


图 A.2 鲫肌肉组织空白试样色谱图



说明：

- 1——2-氨基阿苯达唑砜；
- 2——阿苯达唑亚砜；
- 3——阿苯达唑砜；
- 4——阿苯达唑。

图 A.3 鲫肌肉组织空白添加阿苯达唑及其代谢物试样色谱图
(阿苯达唑 $62.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、2-氨基阿苯达唑 $12.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、阿苯达唑亚砜 $25 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、阿苯达唑砜 $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}$)