



# 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  阿苯达唑、阿苯达唑亚砷、阿苯达唑砷和 2-氨基阿苯达唑砷标准贮备液:精密称取阿苯达唑、阿苯达唑砷和阿苯达唑亚砷各 10 mg 以及盐酸 2-氨基阿苯达唑砷 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准贮备液。-18  $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  2-氨基阿苯达唑砷、阿苯达唑亚砷、阿苯达唑砷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-氨基阿苯达唑砷 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、阿苯达唑亚砷 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、阿苯达唑砷 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以及阿苯达唑 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的混合标准工作液。2  $^{\circ}\text{C}$ ~8  $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{m}$ 。

## 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  $^{\circ}\text{C}$  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 $\pm$ 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 °C 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

备用液中加入 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 °C 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入乙酸乙酯 2 mL, 重复提取两次, 合并三次乙酸乙酯液, 于 40 °C 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  $2 \text{ g} \pm 0.02 \text{ g}$ , 于 50 mL 离心管中, 分别加入混合标准工作液 0、10、25、100 和 200  $\mu\text{L}$ , 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 阿苯达唑亚砜 0、0.02、0.05、0.2 和 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 阿苯达唑砜 0、0.002、0.005、0.02 和 0.04  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 阿苯达唑 0、0.05、0.125、0.5 和 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 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  $2 \text{ g} \pm 0.02 \text{ g}$ , 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 °C 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  $\mu\text{m}$  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  $2 \text{ g} \pm 0.02 \text{ g}$ , 于 50 mL 离心管中, 分别加混合标准工作液 10、25、100 和 200  $\mu\text{L}$ , 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 阿苯达唑亚砜 0、0.02、0.05、0.2 和 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 阿苯达唑砜 0、0.002、0.005、0.02 和 0.04  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 阿苯达唑 0、0.05、0.125、0.5 和 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 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: C<sub>18</sub> (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、阿苯达唑砒、阿苯达唑亚砒和 2-氨基阿苯达唑砒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:

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

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  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

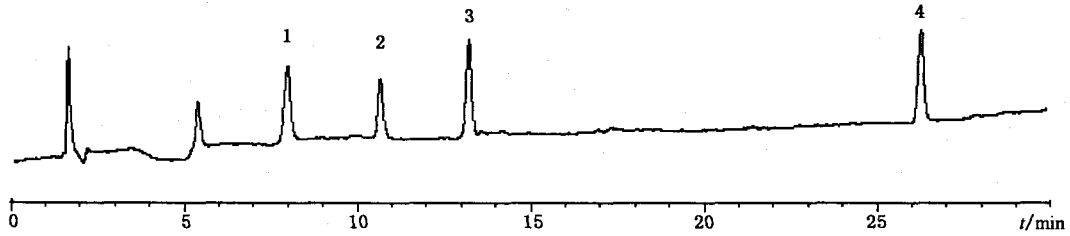
### 9.2 准确度

本方法阿苯达唑在 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、2-氨基阿苯达唑砜在 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、阿苯达唑亚砜在 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以及阿苯达唑砜在 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  添加浓度水平上的回收率为 70%~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 0.002 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

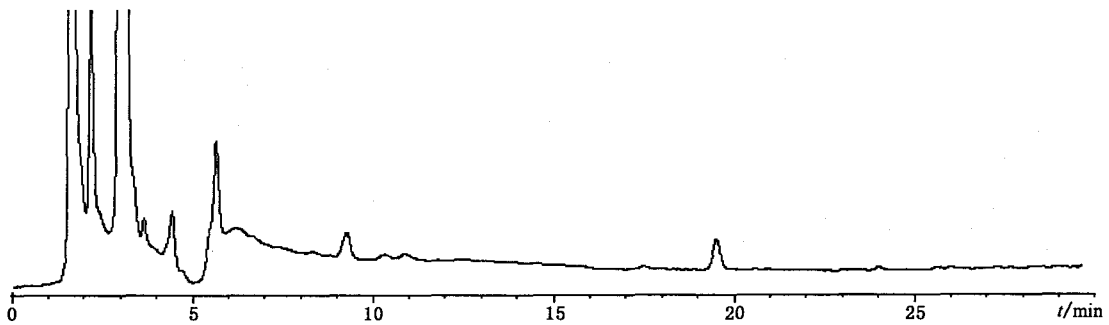
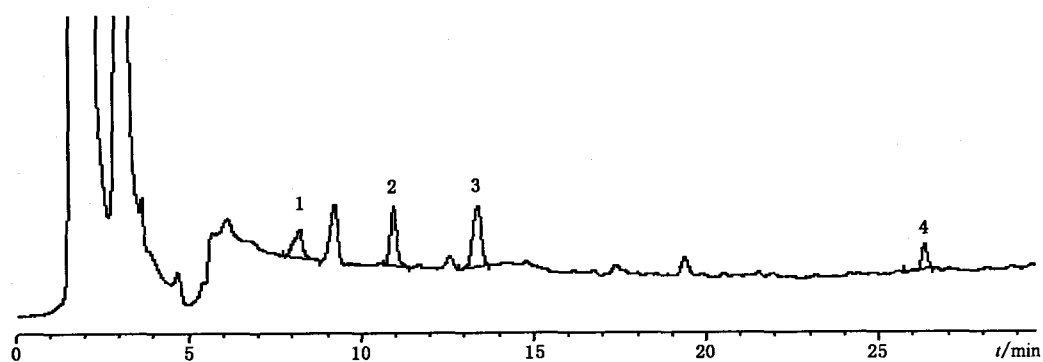


图 A.2 鲫肌肉组织空白试样色谱图



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  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )