

中华人民共和国国家标准

农业部 1077 号公告—2—2008

水产品中硝基呋喃类代谢物残留量的测定 高效液相色谱法

Determination of nitrofurans metabolites residues in fishery products
by high performance liquid chromatography

2008-08-11 发布

2008-08-11 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部渔业局提出。

本标准由全国水产标准化技术委员会水产品加工分技术委员会归口。

本标准起草单位：农业部水产品质量监督检验测试中心(上海)、中国水产科学研究院东海水产研究所。

本标准主要起草人：蔡友琼、王媛、贾东芬、于慧娟、黄冬梅、钱蓓蕾、史志霞、徐捷。

水产品中硝基呋喃类代谢物残留量的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了水产品中呋喃唑酮代谢物 3-氨基-2-唑烷基酮(AOZ)、呋喃它酮代谢物 5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮(AMOZ)、呋喃西林代谢物氨基脲(SEM)和呋喃妥因代谢物 1-氨基-2-内酰脲(AHD)残留量的高效液相色谱测定方法。

本标准适用于水产品中呋喃唑酮代谢物、呋喃它酮代谢物、呋喃西林代谢物和呋喃妥因代谢物残留量的测定。

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 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

试样中残留的硝基呋喃类代谢物用三氯乙酸-甲醇溶液提取,经衍生、乙酸乙酯萃取、固相萃取柱净化后,用紫外检测器进行检测,外标法定量。

4 试剂和材料

- 4.1 本标准所用试剂应无干扰峰。除另有特别说明外,所用试剂均为分析纯。试验用水应符合 GB/T 6682 一级水的要求。
- 4.2 乙腈:色谱纯。
- 4.3 乙腈溶液:30 mL 乙腈与 70 mL 水混合溶解。
- 4.4 甲醇:色谱纯。
- 4.5 5%甲醇溶液:5 mL 甲醇与 95 mL 水混合溶解。
- 4.6 乙酸乙酯:色谱纯。
- 4.7 异丙醇:色谱纯。
- 4.8 庚烷磺酸钠:色谱级。
- 4.9 异辛烷:色谱纯。
- 4.10 冰乙酸:色谱纯。
- 4.11 酸性氧化铝:100 目~200 目。
- 4.12 硅胶 C18 键合材料:100 目~200 目。
- 4.13 吸附型离子交换树脂:100 目~200 目。
- 4.14 提取剂 1:酸性氧化铝、硅胶 C18 键合材料和吸附型离子交换树脂按 30 : 40 : 30 比例混合。

- 4.15 三氯乙酸:优级纯。
- 4.16 提取剂 2:三氯乙酸-甲醇溶液,称取 55.4 g 三氯乙酸溶于 500 mL 水中,加入 500 mL 甲醇混合。
- 4.17 邻氯苯甲醛:色谱纯。
- 4.18 衍生化试剂:吸取 100 μ L 邻氯苯甲醛,溶解于 5 mL 冰乙酸和 20 mL 甲醇混合液中。
- 4.19 氢氧化钠。
- 4.20 10 mol/L 氢氧化钠:称取固体氢氧化钠 40 g,加水溶解冷却后,定容到 100 mL。
- 4.21 1 mol/L 氢氧化钠:称取固体氢氧化钠 4 g,加水溶解冷却后,定容到 100 mL。
- 4.22 净化柱:C18-CN 混合柱,200 mg,3 mL;或性能相当者。
- 4.23 0.05% 庚烷磺酸钠溶液:称取 0.500 g 庚烷磺酸钠,加 1 000 mL 水溶解。
- 4.24 标准品:氨基脲(SEM)、3-氨基-2-唑烷基酮(AOZ)、5-甲基吗啉-3-氨基-2-唑烷基酮(AMOZ)、1-氨基-2-内酰脲(AHD),纯度 \geq 99%。
- 4.25 标准贮备溶液:准确称量 AMOZ、AHD、AOZ、SEM 各 10 mg,用甲醇分别定容于 100 mL 容量瓶中,配制成 100 μ g/mL 的标准贮备液。 -18°C 冰箱中保存,有效期 6 个月。
- 4.26 混合标准工作溶液:使用前取 4.25 标准贮备溶液,用甲醇稀释成所需浓度。

5 仪器

- 5.1 高效液相色谱仪:配紫外检测器。
- 5.2 天平:感量 0.01 g。
- 5.3 分析天平:感量 0.000 01 g。
- 5.4 离心机:6 000 r/min。
- 5.5 旋转蒸发器。
- 5.6 可水浴加热超声波清洗机或恒温水浴摇床。
- 5.7 氮吹仪。
- 5.8 旋涡混合器。
- 5.9 固相萃取仪。
- 5.10 匀浆机。

6 色谱条件

- 6.1 色谱柱:SB-CN 柱,250 mm \times 4.6 mm(i. d.),粒度 5 μ m;或性能相当者。
- 6.2 流动相:乙腈+异丙醇+乙酸乙酯+冰乙酸+0.05% 庚烷磺酸钠溶液(5+10+5+0.1+80)。
- 6.3 流速:1.0 mL/min。
- 6.4 柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.5 检测波长:280 nm。
- 6.6 进样量:50 μ L。

7 测定步骤

7.1 样品处理

7.1.1 试样制备

按照 SC/T 3016 规定执行。

7.1.2 提取

准确称取已捣碎的样品 10 g(±0.05 g),置于 50 mL 离心管中,加入 7 g 提取剂 1(4.14)及 10 mL 提取剂 2(4.16),漩涡混合后于 40℃ 摇床振摇或超声 30 min,于 6 000 r/min 离心 10 min,取出上清液于另一 50 mL 离心管中;再加入 10 mL 提取剂 2(4.16),重复提取一遍,合并提取液。

7.1.3 衍生化

于 7.1.2 提取液中,加入衍生化试剂(4.18)0.5 mL 混匀后,于 40℃ 摇床振摇或超声 60 min,取出冷至室温。

7.1.4 萃取

将冷却后的上清液用 10 mol/L 和 1 mol/L 的氢氧化钠调 pH 到 7.0(±0.1),加入 15 mL 乙酸乙酯萃取,4 000 r/min 离心 10 min 后,取出乙酸乙酯层于梨形瓶中,再加入 10 mL 乙酸乙酯,重复上述操作两次,合并乙酸乙酯层,于 35℃ 水浴中减压旋转蒸发至干,加入 5% 的甲醇溶液(4.5)5 mL 溶解残渣。

7.1.5 净化

将净化柱(4.22)依次用 5 mL 甲醇、5 mL 水活化后,加入 7.1.4 最终溶液以 1 mL/min~2 mL/min 速度过柱,待样液全部过完后加 5 mL 水淋洗,抽干,弃去流出液,用 2 mL 甲醇以 1 mL/min~2 mL/min 速度洗脱,接收全部洗脱液,40℃ 氮气吹干。残留物用 1.0 mL 乙腈溶液(4.3)及 2 mL 异辛烷溶解,振荡混匀,6 000 r/min 离心 10 min,取下层乙腈水层过 0.22 μm 有机相微孔滤膜,供高效液相色谱测定。

7.2 工作曲线

移取适量 AMOZ、AHD、AOZ、SEM 混合标准溶液,添加到 10 mL 提取剂 2(4.16)中,使其浓度分别为 0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL 和 50.0 ng/mL,按 7.1.3~7.1.5 测定步骤处理,用高效液相色谱仪测定,绘制标准工作曲线。或采用与待测物相近浓度的标样进行单点测定。

7.3 色谱测定

标准工作溶液和样液中的 AMOZ、AHD、AOZ、SEM 响应值均应在线性范围之内。在上述条件下,空白试样、标准溶液和加标样品的色谱图参见附录 A。

8 计算

样品中 AMOZ、AHD、AOZ、SEM 的含量按公式(1)计算。计算结果需扣除空白值,结果保留三位有效数字。

$$C = \frac{A \times C_s \times V}{A_s \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

C —— 样品中被测物含量,单位为微克每千克(μg/kg);

C_s —— 上机测定时的标准溶液中被测物的含量,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A —— 被测样品的峰面积;

A_s —— 标准的峰面积;

V —— 样品最终定容体积,单位为毫升(mL);

m —— 样品质量,单位为克(g)。

9 方法灵敏度、准确度和精密度

9.1 灵敏度

本方法 AMOZ、AHD、AOZ、SEM 的检出限为 0.5 μg/kg,最低定量限均为 1.0 μg/kg。

9.2 准确度

本方法在 0.5 ng/mL~50 ng/mL 范围内, AMOZ、AHD、AOZ、SEM 的回收率均为 70%~110%。

9.3 精密度

本方法批内和批间相对标准偏差 \leq 15%。

附录 A
(资料性附录)
液相色谱图

A.1 硝基呋喃类代谢物混合标准溶液色谱图

100 ng/mL 硝基呋喃类代谢物混合标准溶液色谱图见图 A.1。

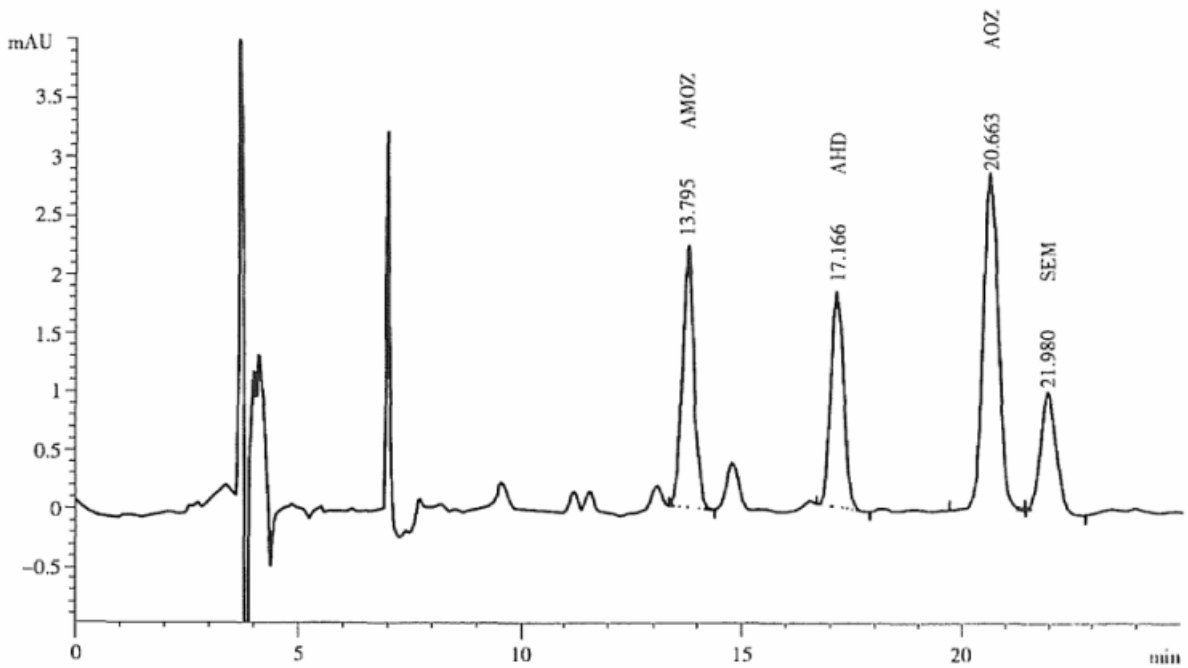


图 A.1 100 ng/mL 硝基呋喃类代谢物混合标准溶液色谱图

A.2 空白虾样品色谱图

空白虾样品色谱图见图 A.2。

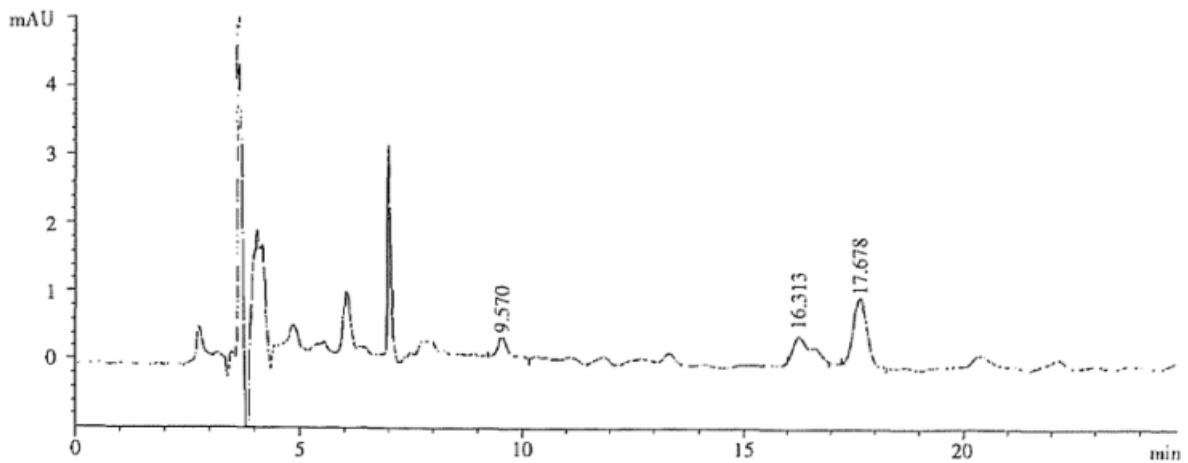


图 A.2 空白虾样品色谱图

A.3 空白虾样品添加 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 硝基咪唑类代谢物色谱图

空白虾样品添加 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 硝基咪唑类代谢物色谱图见图 A.3。

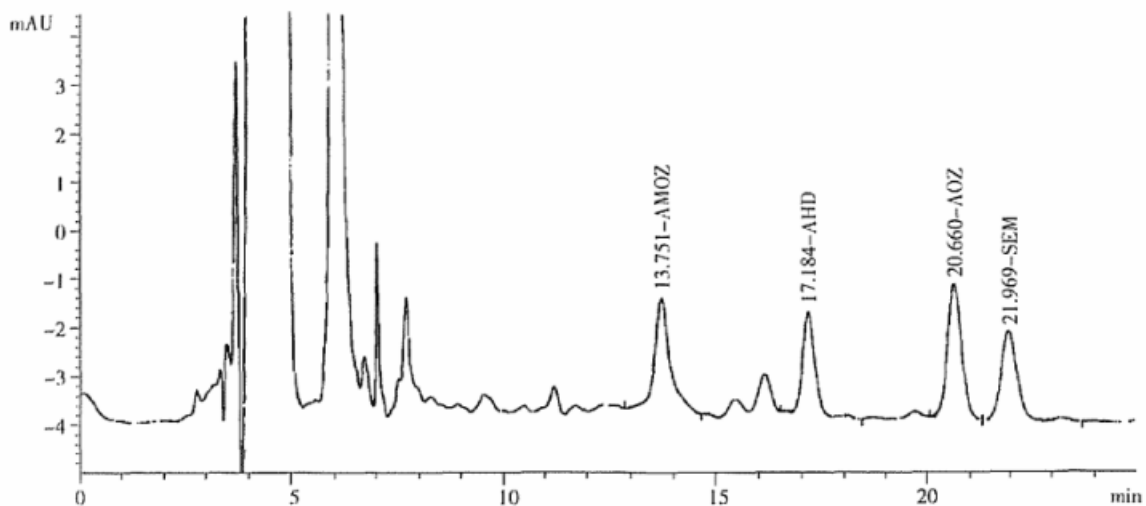


图 A.3 空白虾样品添加 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 硝基咪唑类代谢物色谱图