

中华人民共和国国家标准

农业部 958 号公告—13—2007

水产品中氯霉素、甲矾霉素、 氟甲矾霉素残留量的测定 气相色谱法

Determination of chloramphenicol, thiamphenicol and
florfenicol residues in fishery products
Gas chromatography method

2007-12-18 发布

2008-03-01 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：农业部淡水鱼类种质监督检验测试中心。

本标准主要起草人：艾晓辉、李荣、刘永涛、袁科平、杨红。

水产品中氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素残留量的测定 气相色谱法

1 范围

本标准规定了水产品中氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素残留量的气相色谱测定方法。

本标准适用于水产品可食部分中氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素残留量的测定。

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

3 原理

样品用乙酸乙酯提取，正己烷去脂，经 C₁₈ 固相萃取柱净化，硅烷化试剂衍生化后，用配有电子捕获检测器的气相色谱仪测定，外标法定量。

4 试剂

本标准所用试剂除标明外，其他均为分析纯或更高纯度。试验用水符合 GB/T 6682 一级水标准。

4.1 乙腈：色谱纯。

4.2 甲醇：色谱纯。

4.3 正己烷：优级纯。

4.4 乙酸乙酯：色谱纯。

4.5 氯化钠：分析纯。

4.6 4%氯化钠溶液：称取 40 g 氯化钠，用水溶解，定容至 1 000 mL。

4.7 氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素标准品：纯度≥99%。

4.8 氯霉素标准储备液：准确称取 0.01 g(精确到 0.000 1 g)氯霉素，加少量乙腈溶解，用乙腈定容至 100 mL 棕色容量瓶中，保存于 4℃ 冰箱中(保存期不超过 3 个月)。该氯霉素标准储备液浓度为 100 μg/mL。

4.9 甲砒霉素标准储备液：精确称取 0.01 g(精确到 0.000 1 g)甲砒霉素，加少量乙腈溶解，用乙腈定容至 100 mL 棕色容量瓶中，保存于 4℃ 冰箱中(保存期不超过 3 个月)。该甲砒霉素标准储备液浓度为 100 μg/mL。

4.10 氟甲砒霉素标准储备液：精确称取 0.01 g(精确到 0.000 1 g)氟甲砒霉素，加少量乙腈溶解，用乙腈定容至 100 mL 棕色容量瓶中，保存于 4℃ 冰箱中(保存期不超过 3 个月)。该氟甲砒霉素标准储备液浓度为 100 μg/mL。

4.11 氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素标准工作液：分别取氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素标准储备液，用乙腈稀释成浓度范围分别为 0.001 μg/mL~0.1 μg/mL、0.005 μg/mL~0.5 μg/mL、0.005 μg/mL~0.5 μg/mL 的混合标准工作液，即氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素浓度比例以 1:5:5 为宜。

4.12 衍生化试剂:N,O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA):三甲基氯硅烷(TMCS)(99:1)。

5 仪器和设备

- 5.1 气相色谱仪,配⁶³Ni 电子捕获检测器。
- 5.2 高速组织捣碎机:转速不低于 20 000 r/min。
- 5.3 旋转蒸发器。
- 5.4 离心机。
- 5.5 旋涡混合器。
- 5.6 电子天平:感量 0.000 1 g。
- 5.7 氮吹仪。
- 5.8 SPE 固相萃取装置。
- 5.9 固相萃取柱:3 mL, C₁₈ 柱或相当者。
- 5.10 移液器:20 μL~200 μL, 200 μL~1 000 μL。
- 5.11 梨形瓶:125 mL。
- 5.12 具塞离心管:50 mL。
- 5.13 反应瓶:规格 3 mL。

6 样品测定

6.1 样品预处理

鱼,去鳞,沿脊背取肌肉和皮;虾,去头、去壳、去附肢,取可食肌肉部分;贝类,去壳,取可食部分;蟹、甲鱼等,取可食肌肉部分。样品切为不大于 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 的小块后混匀,高速组织捣碎机充分匀浆,密封,标明标记。-18℃以下冷冻保存备用。

6.2 提取

称取匀浆样品 5 g(精确到 0.01 g),置于 50 mL 具塞玻璃离心管中,加入 20 mL 乙酸乙酯,在旋涡混合器上旋涡振荡 5 min,提取氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素,4 000 r/min 离心 10 min,将上清液转移到 125 mL 梨形瓶中。重复操作一次,合并乙酸乙酯提取液于 125 mL 梨形瓶中,置 40℃ 旋转蒸发器上蒸发至干。

6.3 净化和浓缩

向鸡心瓶中加入 1 mL 甲醇涡旋混合溶解残留物,再向梨形瓶中加入 25 mL 4%氯化钠溶液振荡 1 min后,将其转移到 50 mL 具塞离心管中,然后向离心管中加入 15 mL 正己烷,涡旋振荡 1 min,充分混合提取脂肪,4 000 r/min 离心 10 min,除去上层正己烷。向水相中加 15 mL 正己烷,重复提取 1 次,弃去正己烷。

给每个样品准备一根 C₁₈ 柱,依次用 5 mL 甲醇和 10 mL 水活化柱子,弃掉洗涤液,紧接着吸取待测样品水溶液过 C₁₈ 柱,弃掉流出液。再用 5 mL 水洗涤 C₁₈ 柱,弃掉流出液。用 3 mL 乙腈将 C₁₈ 柱中的氯霉素、氟甲砒霉素和甲砒霉素洗脱于 3 mL 反应瓶中,置 50℃ 氮吹仪上吹干。以上步骤必须连续做完,切莫让吸附剂变干,过柱的流速保持约每秒一滴。吹干后的提取物,应迅速进行下一步衍生化操作或置 80℃ 烘箱中 20 min 再冷却,确保提取物干燥。

6.4 衍生化

6.4.1 试样的衍生化

向吹干的提取物中,加入 100 μL BSTFA - TMCS 衍生化试剂,立即盖塞,并旋涡振荡混合 10 s,在 65℃ 恒温箱中反应 30 min。置 50℃ 氮吹仪上将衍生化溶液刚好吹干为止。加入 1 mL 正己烷,涡旋混

合 10 s。取 1 μ L 进样测定。

6.4.2 标准工作液的衍生化

取适量氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素混合标准工作液于 3 mL 反应瓶中,置 50 $^{\circ}$ C 氮吹仪上吹干。以下按 6.4.1 的步骤操作。

6.5 色谱条件

6.5.1 色谱柱:5%苯基和 95%聚二甲基硅氧烷。

6.5.2 进样方式:不分流进样。

6.5.3 载气:氮气,纯度 99.999%。

6.5.4 柱流速:2.5 mL/min,尾吹为:25 mL/min。

6.5.5 检测器温度 310 $^{\circ}$ C;进样口温度 230 $^{\circ}$ C。

6.5.6 柱温程序:起始 80 $^{\circ}$ C 保持 1min,以 20 $^{\circ}$ C/min,升至 150 $^{\circ}$ C,保持 2 min;然后以 20 $^{\circ}$ C/min,升至 200 $^{\circ}$ C,保持 5 min;再以 50 $^{\circ}$ C/min,升至 280 $^{\circ}$ C,保持 10 min,直至样品的组分全部流出。

6.5.7 进样量:1.0 μ L。

6.6 样品测定

根据样品中氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素残留量,选定标准工作溶液浓度范围。标准工作溶液和样品中氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素响应值均应在仪器检测线性范围内。取 1.0 μ L 衍生化的样液和标液进样测定,在 6.5 规定的色谱条件下,氯霉素保留时间约为 18.87 min,氟甲砒霉素保留时间约为 19.78 min,甲砒霉素保留时间约为 21.08 min,参见附录 A,外标法定量。

6.7 空白试验

同时测定试剂空白样品,方法按测定步骤进行。

7 结果计算与表述

根据标准工作液和样液的峰面积,按式(1)分别计算样品中氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素残留量:

$$C_i = C_s \times \frac{A_i \times V \times 1000}{A_s \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

C_i ——样品中氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素残留量,单位为微克每千克(μ g/kg);

C_s ——标准衍生物溶液相当于氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素的含量,单位为微克每毫升(μ g/mL);

A_i ——样液中氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素的峰面积;

V ——样品最终定容体积,单位为毫升(mL);

A_s ——标准工作溶液中氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素峰面积;

m ——样品的质量,单位为克(g)。

注:计算结果应扣除空白值,结果保留两位小数。

8 线性范围

氯霉素线性范围为 0.001 μ g/mL~0.1 μ g/mL;甲砒霉素线性范围为 0.005 μ g/mL~0.5 μ g/mL;氟甲砒霉素线性范围为 0.005 μ g/mL~0.5 μ g/mL。

9 灵敏度

氯霉素的检出限为 0.3 μ g/kg,甲砒霉素的检出限为 1.0 μ g/kg,氟甲砒霉素的检出限为 1.0 μ g/kg。

10 准确度

氯霉素在添加浓度为 $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$, 甲砒霉素和氟甲砒霉素在添加浓度为 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $10.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 回收率皆为 70%~110%。

11 精密度

本方法批内和批间变异系数皆 $\leq 15\%$ 。

附录 A
(资料性附录)

氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素标准溶液、组织空白及加标气相色谱图

见图 A.1~图 A.5。

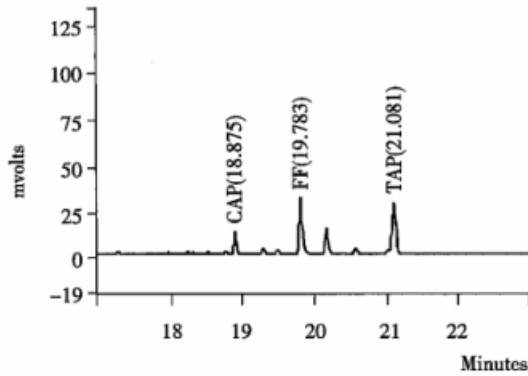


图 A.1 氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素标准溶液色谱图

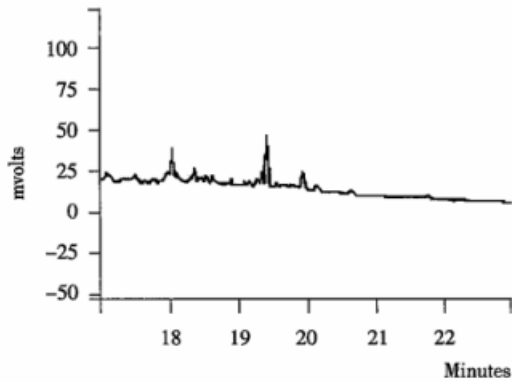


图 A.2 尼罗罗非鱼组织样品空白气相色谱图

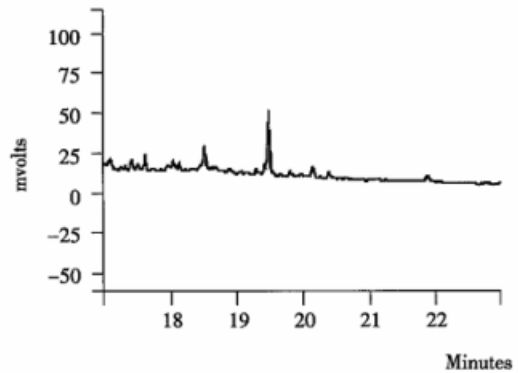


图 A.3 南美白对虾组织样品空白气相色谱图

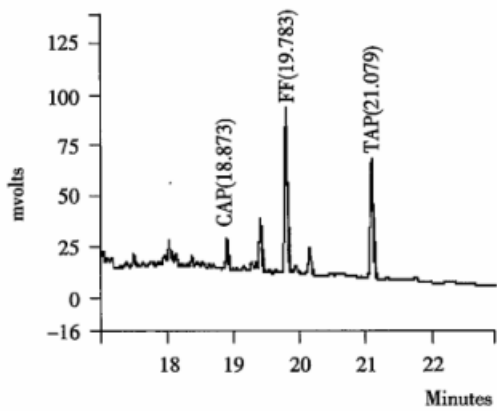


图 A.4 尼罗罗非鱼组织加标样品气相色谱图

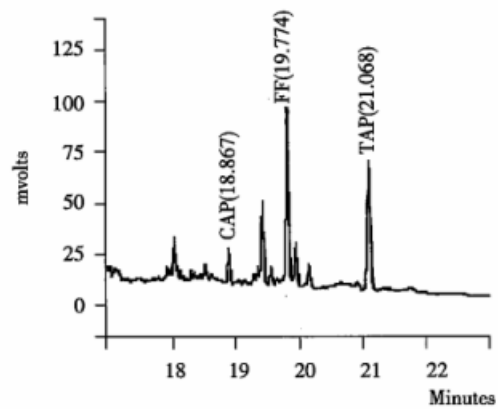


图 A.5 南美白对虾组织加标样品气相色谱图