

ICS67.050
X04

DB33

浙 江 省 地 方 标 准

DB33/T 693—2008

动物源性食品中硝基咪唑类药物残留量的 测定 高效液相色谱法

Determination of Nitroimidazoles residues in animal products

—High performance liquid chromatography method

2008-05-09 发布

2008-06-09 实施

浙江省质量技术监督局 发布

前 言

本标准的附录A和附录B为资料性附录。

本标准由浙江省水产标准技术委员会提出并归口。

本标准起草单位：浙江省水产质量检测中心。

本标准主要起草人：王扬、郑重莺、张海琪、宋琍琍、叶磊海、马文俊、柳怡、蒋林娟。

动物源性食品中硝基咪唑类药物残留量的测定

高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了动物源性食品中甲硝唑、洛硝哒唑、地美硝唑、替硝唑、奥硝唑残留量的液相色谱测定方法。

本标准适用于畜禽肌肉、水产品 and 蜂蜜中甲硝唑、洛硝哒唑、地美硝唑、替硝唑、奥硝唑残留量的测定。

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。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 方法提要

用乙酸乙酯提取样品中的甲硝唑、洛硝哒唑、地美硝唑、替硝唑、奥硝唑，正己烷脱脂、固相萃取柱净化、反相色谱柱分离、紫外检测器检测，外标法定量。

4 试剂与材料

所用试剂，除特别注明外，均为分析纯，实验用水应符合 GB/T 6682 中二级水要求。

- 4.1 氯化钠。
- 4.2 磷酸氢二钾。
- 4.3 乙酸乙酯。
- 4.4 无水硫酸钠：650℃灼烧 4h，冷却后贮存于密封的干燥器中备用。
- 4.5 浓盐酸。
- 4.6 正己烷。
- 4.7 甲醇：色谱纯。
- 4.8 乙腈：色谱纯。
- 4.9 氨水。
- 4.10 乙酸。
- 4.11 无水乙酸钠。
- 4.12 乙酸溶液(1.0mol/L)：量取 57.24mL 乙酸（4.10），加水定容至 1000mL。
- 4.13 乙酸缓冲液（pH=4.3）：以 0.82g 无水乙酸钠（4.11）溶解于 800mL 水中，以乙酸溶液（4.12）调节 pH 到 4.3，加水定容至 1000mL。
- 4.14 盐酸溶液(1.0mol/L)：量取 82.9mL 盐酸（4.5），加水定容至 1000mL。

- 4.15 2%氨水甲醇溶液：移取 2ml 氨水（4.9），用甲醇（4.7）定容到 100mL。
- 4.16 硝基咪唑类药物标准品：甲硝唑（ $C_6H_9N_3O_3$ ）、洛硝哒唑（ $C_6H_8N_4O_4$ ）、地美硝唑（ $C_5H_7N_3O_2$ ）、替硝唑（ $C_8H_{13}N_3O_4S$ ）、奥硝唑（ $C_7H_{10}ClN_3O_3$ ）标准品纯度 $\geq 99.0\%$ 。
- 4.17 标准储备液：称取甲硝唑、洛硝哒唑、地美硝唑、替硝唑、奥硝唑各 0.01g（精确到 0.01mg），用甲醇溶解分别配制成 1.0mg/mL 的标准贮备液。避光-18℃以下冷藏，保存期 6 个月。
- 4.18 混合标准中间液：分别准确移取各组分标准储备液（4.17）1.0mL 加入 10 mL 棕色容量瓶，混合，用甲醇定容到刻度，相当于 100 μ g/mL。避光 4℃以下冷藏，保存期 7 天。
- 4.19 混合标准工作液：准确移取混合标准中间液（4.18）1.0 mL 加入 10 mL 棕色容量瓶，用流动相定容到刻度，相当于 100 μ g/mL。制作标准曲线时，用流动相稀释成系列浓度。临用现配。
- 4.20 固相萃取小柱：Waters Oasis MCX，60mg，3mL，或性质相当者。
- 4.21 微孔滤膜：0.45 μ m（有机系）。

5 仪器与设备

- 5.1 液相色谱仪：配紫外检测器。
- 5.2 电子天平：感量为0.01g和0.0001g。
- 5.3 组织捣碎机。
- 5.4 恒温振荡器。
- 5.5 离心机：4000r/min。
- 5.6 旋转蒸发器。
- 5.7 固相萃取装置。
- 5.8 旋涡混匀器。
- 5.9 氮吹仪。
- 5.10 离心管：聚丙烯，100mL，具塞。

6 样品制备与保存

6.1 样品制备

取有代表性的禽肉，水产品约 500 g，肌肉样品要剔骨去皮，切成不大于 0.5cm \times 0.5cm \times 0.5cm 的小块，用组织捣碎机绞碎，混匀，装入洁净容器，密闭，标明标记。

取代表性的蜂产品样品约 500g，对无结晶的蜂蜜样品将其搅拌均匀；对有结晶析出的蜂蜜样品，在密闭情况下，将样品瓶置于不超过 60℃的水浴中温热，振荡，待样品全部融化后搅匀，迅速冷却至室温，在融化时必须注意防止水分挥发。装入洁净容器，密封，标明标记。

6.2 试样保存

禽肉，水产品等试样于-18℃以下冷冻保存。蜂蜜常温下保存备用。

在制样的操作过程中，应防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

7 分析步骤

7.1 提取

称取样品 10g（精确至 0.01g），置于 100mL 离心管（5.10），加入 2.0g 氯化钠（4.1）和 2.0g 磷酸氢二钾（4.2），混匀，加入 20.0mL 乙酸乙酯（4.3），40℃振荡提取 60min，

4000r/min 离心 5min, 上清液经过无水硫酸钠(4.4)滤入 100mL 浓缩瓶, 在残渣中加入 20.0mL 乙酸乙酯 (4.3), 重复提取一次, 合并滤液。

7.2 净化

将提取液于 40℃ 以下在旋转浓缩至近干。用 1.0mL 盐酸溶液(4.14)和 1.5mL 乙酸乙酯 (4.3) 溶解残渣, 溶液转移到 10mL 的离心管中, 重复操作一次, 溶解残渣, 合并溶液转移到离心管。加入 5.0mL 正己烷 (4.6), 涡旋振荡萃取脱脂, 弃去上层正己烷层, 重复萃取一次, 收集合并下层液。

预先用 2.0mL 甲醇 (4.7), 2.0mL 水活化固相色谱小柱 (4.20), 将提取净化液上柱, 控制流速在 1.0mL/min, 加 3.0mL 水洗柱, 抽干, 加 3.5mL 氨水甲醇溶液 (4.15) 洗脱, 收集洗脱液, 40℃ 水浴氮气吹至约 0.5mL, 用流动相定容至 1.0mL, 经 0.45μm 微孔滤膜过滤, 滤液供液相色谱测定。

7.3 测定

7.3.1 色谱条件

- a) 色谱柱: C₁₈ 柱 250mm×4.6mm (i.d.), 5μm 或同类型号色谱柱;
- b) 柱温: 30℃;
- c) 流动相: 乙酸缓冲液 (4.13) + 乙腈=86+14, V/V;
- d) 流速: 1.0mL/min;
- e) 进样量: 30μL;
- f) 检测器波长: 320nm。

7.3.2 色谱测定

分别取 30μL 进样, 以峰面积为纵坐标, 以标准样品中各种硝基咪唑含量为横坐标, 绘制工作曲线。对标准工作溶液和样液等体积参插进样测定。

7.4 空白试验

除不加试样外, 按上述测定步骤进行。

8 结果计算和表述

按 (1) 式计算试样中各种硝基咪唑药物的残留含量:

$$X_i = \frac{C_i \times V}{m} \times 1000 \dots\dots\dots(1)$$

式中: X_i ——试样中各种硝基咪唑的含量, 单位为毫克每千克 (μg/kg);

C_i ——试样溶液中各种硝基咪唑的含量, 单位为微克每毫升 (μg/mL);

V ——试样最终定容体积, 单位为毫升 (mL);

m ——试样质量, 单位为克 (g)。

注: 计算结果应扣除空白值。测定结果用平行测定的算术平均值表示。

9 方法检测限和回收率

9.1 检测限

本方法甲硝唑、洛硝哒唑、地美硝唑、替硝唑、奥硝唑的检测限均为 2μg/kg。

9.2 回收率

本方法在不同的样品基质中甲硝唑、地美硝唑、奥硝唑、替硝唑、洛硝哒唑添加浓度及回收率的实验数据见附录 B 表 B.1。

附录 A
(资料性附录)
硝基咪唑类药物的色谱标准图

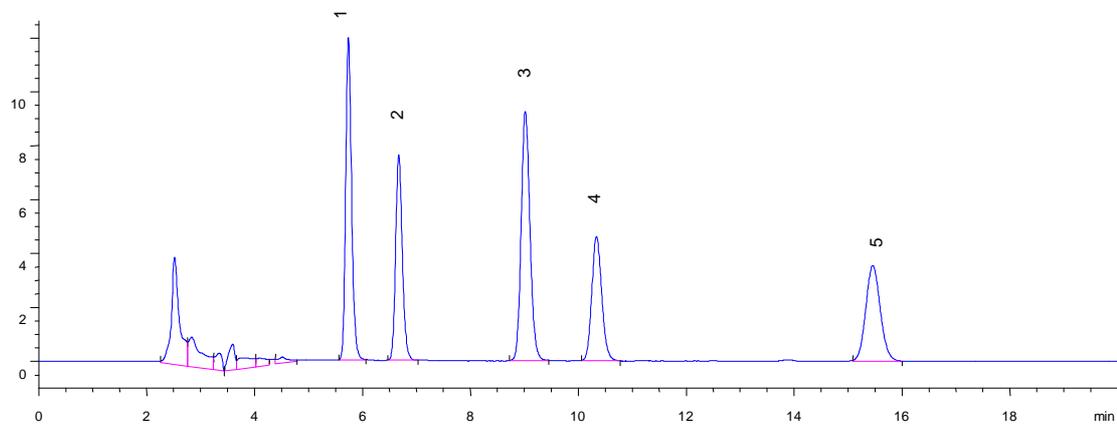


图 A.1 五种硝基咪唑类药物的标准品色谱图

1. 甲硝唑(5.8min) 2. 洛硝哒唑(6.7min) 3. 地美硝唑(9.1min) 4. 替硝唑(10.5min) 5. 奥硝唑(15.7min)

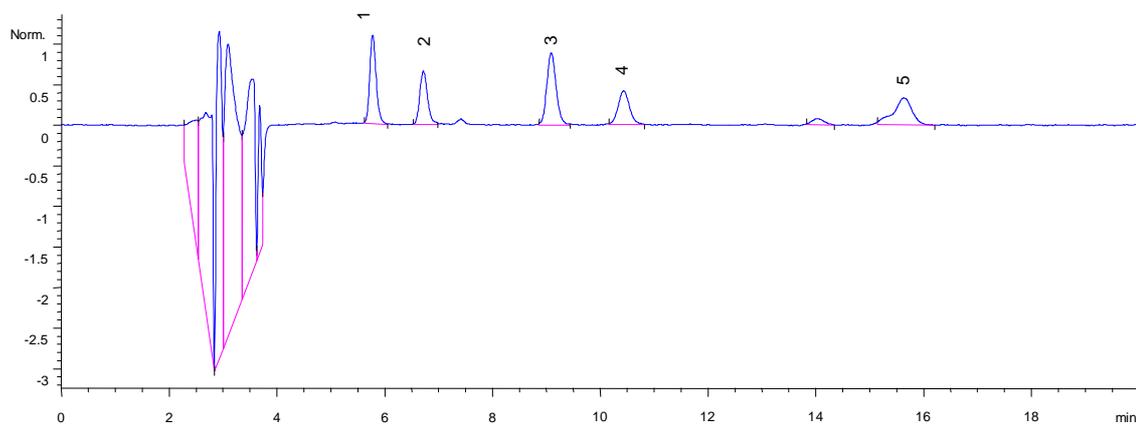


图 A.2 五种硝基咪唑类药物的在空白大黄鱼加标色谱图

- 1 甲硝唑(5.8min) 2. 洛硝哒唑(6.7min) 3. 地美硝唑(9.1min) 4. 替硝唑(10.5min) 5. 奥硝唑(15.7min)

附录 B
(资料性附录)
不同的样品基质添加浓度回收率

表 B.1 不同的样品基质添加浓度回收率

样品 种类	添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)				
		甲硝唑	洛硝哒唑	地美硝唑	替硝唑	奥硝唑
鸡肉	2.0	88.0~92.4	75.4~84.7	77.0~81.2	72.1~80.1	64.3~68.9
	10.0	92.9~95.7	81.5~90.0	80.6~89.5	75.8~82.5	62.3~70.1
	100.0	90.1~97.4	83.3~89.6	82.6~90.1	78.5~83.0	62.2~69.1
猪肉	2.0	80.3~87.3	77.0~89.9	72.5~81.5	70.3~79.2	62.0~70.1
	10.0	95.3~99.1	78.9~91.2	93.7~99.2	75.8~85.2	63.0~75.8
	100.0	79.4~94.3	77.8~86.7	85.0~89.4	70.8~84.7	63.1~72.2
大黄鱼	2.0	70.5~83.6	69.8~81.9	70.6~81.6	70.3~78.7	62.9~73.4
	10.0	80.5~96.4	70.5~82.9	70.5~82.4	72.6~86.5	60.3~73.3
	100.0	85.3~92.4	76.2~87.0	70.3~83.4	76.9~89.8	63.2~78.9
蜂蜜	2.0	80.6~90.2	77.9~86.5	72.1~78.4	72.1~80.9	60.3~69.4
	10.0	92.1~98.1	81.6~88.8	78.6~87.1	81.1~88.2	62.8~70.4
	100.0	92.7~98.3	83.0~88.6	80.3~91.6	80.5~94.2	62.4~72.9