

出口鳗鱼中吡咯啉酸残留量检验方法

Method for the detdrmination of piromidic acid residues in eel for export

SN 0335-95

1 主题内容与适用范围

本标准规定了出口鳗鱼中吡咯啉酸残留量检验的抽样、制样和液相色谱测定方法。

本标准适用于出口鳗鱼(活鳗和烤鳗)中吡咯啉酸残留量的检验。

2抽样和制样

2.1 检验批

烤鳗以不超过2 000件为一检验批。

活鳗以同一养鳗池同一规格为一检验批。

同一检验批的商品应具有相同的特征，如包装、标记、产地(养鳗场)、规格和等级等。

2.2 抽样数量

2.2.1 烤鳗

批量，件	最低抽样数，件
1~1000	4
1001~2000	6

2.2.2 活鳗

每一检验批抽取活鳗两条。

2.3 抽样方法

2.3.1 烤鳗

按2.2.1规定的抽样件数随机抽取，逐件开启。每件至少抽取一条作原始样品，原始样品总量不少于1kg，放入洁净容器内，加封后标明标记，及时送交实验室。

2.3.2 活鳗

按2.2.2规定的抽样数量随机抽取，标明标记，及时送交实验室。

2.4 试样制备

从每条原始烤鳗样品中取出部分代表性样品(每条活鳗样品将其窒息，开膛去除内脏后切碎)，放入组织捣碎机中捣碎，充分混匀后按四分法缩分出不少于200g试样，装入洁净的容器内，加封，并标明标记。

2.5 试样保存

将试样于-18℃以下冷冻保存。

注：在抽样及制样的操作过程中，必须防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

3 测定方法

3.1 方法提要

用三氯甲烷-甲醇提取试样中的吡咯啉酸，于提取液中加入缓冲溶液进行液液分配。蒸干三氯甲烷层，残渣用乙腈、正己烷溶解后，用氯化钠水溶液进行液液分配，水相用二氯甲烷提取，蒸干二氯甲烷层，其残留物用甲醇-水-乙腈溶解，供HPLC测定，外标法定量。

3.2 试剂和材料

除另有规定外，试剂均为分析纯。水指蒸馏水。

3.2.1 乙腈：色谱试剂(液相色谱专用)。

3.2.2 甲醇：色谱试剂(液相色谱专用)。

3.2.3 三氯甲烷：经重蒸馏。

3.2.4 二氯甲烷：经重蒸馏。

3.2.5 正己烷：经重蒸馏。

3.2.6 氯化钠。

3.2.7 柠檬酸。

3.2.8 氢氧化钠。

3.2.9 硼酸。

3.2.10 无水硫酸钠：640℃灼烧4h，贮于干燥器内备用。

3.2.11 十二烷基磺酸钠。

3.2.12 磷酸氢二钠。

3.2.13 缓冲溶液(pH 3)：将0.1 mol/L柠檬酸158.9mL和0.2mol/L磷酸氢二钠41.1 mL混合配制。

3.2.14 硼酸缓冲溶液(pH 10.0)：取硼酸8.183g溶于约800mL水中，用1mol/L氢氧化钠溶液调整pH为10.0后加水定容至1L。

3.2.15 吡咯啉酸标准品：纯度≥99%。

3.2.16 吡咯啉酸标准液：准确称取吡咯啉酸10.0mg，溶于100mL硼酸缓冲液(pH 10.0)中配成0.100mg/L的储备液。根据需要用甲醇-水-乙腈(4+5+2)稀释配制成适当浓度的标准工作液。

3.3 仪器和设备

3.3.1 高速均质器：3 000r/min。

3.3.2 离心机：3 000r/min。

3.3.3 振荡器。

3.3.4 旋转蒸发器。

3.3.5 液相色谱仪配有紫外检测器。

3.3.6 微量注射器：100 μL。

3.4 测定步骤

称取试样5.0g(精确至0.1g)，置于均质器中，加入无水硫酸钠10g及三氯甲烷-甲醇(2+1)混合液100mL，均质1min，3 000r/min离心10min后，将提取液转入500mL分液漏斗中。于残留物中再加三氯甲烷-甲醇(2+1)混合液75mL，同样操作。合并提取液。加入缓冲液(pH 3)50mL，振摇5min。静置分层，取下层。于上层中加入三氯甲烷40mL，同样操作。合并下层溶液。用旋转蒸发器浓缩至干。将残留物用乙腈10mL及正己烷50mL移入预先加入2%氯化钠溶液100mL的500mL的分液漏斗中，振摇10min，静置分层，取下层置于另一分液漏斗中。于上层中再加入乙腈10mL，振摇5min后，静置分层。合并下层溶液，再振摇5min，静置分层，弃去上层溶液。于下层溶液中加入二氯甲烷50mL，振摇10min。静置分层，取下层二氯甲烷。上层再用二氯甲烷50mL作同样操作。合并二氯甲烷层并使其全部通过装有5g无水硫酸钠柱，滤入蒸馏瓶中，用旋转蒸发器将二氯甲烷层浓缩至干。加入甲醇-水-乙腈(4+5+2)1.0mL以溶解残留物，供测定。

3.4.2 测定

3.4.2.1 色谱条件

- a. 色谱柱：250mm×3.9mm(内径)，μBondapakC₁₈，10μm粒度；
- b. 流动相：甲醇-柠檬酸(0.1mol/L)-乙腈(4+5+2)(含0.025%十二烷基磺酸钠)；
- c. 流速：1 mL/min；
- d. 检定波长：280nm。

3.4.2.2 色谱测定

分别将等体积标准工作液、样液注入液相色谱仪，测量峰面积(或峰高)。

吡咯啉酸响应值应在仪器测定线性范围内。吡咯啉酸保留时间约10 min。

3.4.3 空白试验

除不称取样品外，按上述测定步骤进行。

3.5 结果计算和表述

按下式计算试样中吡咯啉酸的含量：

$$X=\frac{A\cdot C\cdot V}{A_s\cdot m}$$

式中：X—试样中吡咯啉酸含量，mg/kg；

A—样液中吡咯啉酸色谱峰面积(或峰高)，mm²(或mm)；

A_s—标准工作溶液中吡咯啉酸色谱峰面积(或峰高)，mm²(或mm)；

c—标准工作溶液中吡咯啉酸的浓度，μg/mL；

V—样液最后定容体积，mL；

m—试样量，g。

注：计算结果需扣除空白值。

4 测定低限、回收率

4.1 测定低限

本方法测定低限为0.05mg/kg。

4.2 回收率

回收率的实验数据：吡咯啉酸添加浓度在0.05~0.4mg/kg范围内，回收率为76.7%~89.7%。

注：考虑到柠檬酸对色谱柱的使用寿命有影响，也可用0.5mol/L的H₃PO₄溶液调节pH到4的甲醇-水-乙腈(25+55+20)作流动相。

附加说明：

本标准由中华人民共和国国家进出口商品检验局提出。

本标准由中华人民共和国福建进出口商品检验局负责起草。

本标准主要起草人梁鸣、林碧贞。

参考文献：

日本厚生省环境卫生局“家畜及水产食品中残留量检验方法”第二册，日本(1982年3月)。