



中华人民共和国国家标准

GB 29693—2013

食品安全国家标准 动物性食品中常山酮残留量的测定 高效液相色谱法

Determination of Halofuginone residue in animal derived food

by High Performance Liquid Chromatographic method

(电子版仅供参考，以标准正式出版物为准)

2013-09-16 发布

2014-01-01 实施

中华人民共和国农业部 发布
中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会

目 次

目 次	I
前 言	II
动物性食品中常山酮残留量的测定 高效液相色谱法	1
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 原理	1
4 试剂和材料	1
5 仪器和设备	2
6 样品的制备与保存	3
6.1 样品的制备.....	3
6.2 样品的保存.....	3
7 测定步骤	3
7.1 提取.....	3
7.2 净化.....	3
7.3 空白添加标准曲线的制备.....	3
7.4 测定.....	4
7.5 空白试验.....	4
8 结果计算和表述	4
9 检测方法灵敏度、准确度和精密度	5
9.1 灵敏度.....	5
9.2 准确度.....	5
9.3 精密度.....	5
附录 A	6

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准系国内首次发布的国家标准。

动物性食品中常山酮残留量的测定

高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了动物性食品中常山酮残留量检测的制样和高效液相色谱测定方法。

本标准适用于鸡的肌肉和肝脏组织中常山酮残留量的检测。

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 1.1-2000 标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则

GB/T 6682 分析实验室用水规则和试验方法

3 原理

试样中残留的常山酮，用胰蛋白酶酶解，乙酸乙酯提取，液液萃取，HLB柱净化，高效液相色谱-紫外测定，外标法定量。

4 试剂和材料

以下所用试剂，除特殊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 氢溴酸常山酮对照品：含量 $\geq 99.6\%$ 。

4.2 甲醇：色谱纯。

4.3 乙酸乙酯：色谱纯。

4.4 乙腈：色谱纯。

4.5 无水碳酸钠

4.6 胰蛋白酶 1 000 U/mg

4.7 乙酸铵

4.8 乙酸

4.9 甲苯

4.10 HLB 固相萃取柱：500 mg/6 mL，或相当者。

4.11 0.25 mol/L 乙酸铵缓冲液：取乙酸铵 19.27 g，加乙酸 30 mL，用水溶解并稀释至 1 000 mL，用乙酸调 pH 至 4.3。

4.12 0.125 mol/L 乙酸铵缓冲液：取 0.25 mol/L 乙酸铵缓冲液 500 mL，用水溶解并稀释至 1 000 mL。

4.13 10%碳酸钠溶液：取无水碳酸钠 10g，用水溶解并稀释至 100 mL。

4.14 流动相：取乙腈 250 mL、0.25 mol/L 乙酸铵缓冲液 150 mL 和水 600 mL，混匀，用冰乙酸调 pH 至 4.3，滤膜过滤，现配现用。

4.15 200 μ g/mL 常山酮标准贮备液：精密称取氢溴酸常山酮标准品 10 mg，于 50 mL 棕色量瓶中，用 0.25 mol/L 乙酸铵缓冲液溶解并稀释至刻度，配制成浓度为 200 μ g/mL 的常山酮标准贮备液。密封，用铝箔包裹，2~8℃避光保存，有效期 6 个月。

4.16 10 μ g/mL 常山酮标准贮备液：精密量取 200 μ g/mL 常山酮标准贮备液 0.5 mL 于 10 mL 棕色量瓶中，用水溶解并稀释至刻度，配制成浓度为 10 μ g/mL 常山酮标准贮备液。密封，用铝箔包裹，2~8℃避光保存，有效期为 6 个月。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪：配紫外检测器。

5.2 分析天平：感量 0.000 01 g。

5.3 天平：感量 0.01 g。

5.4 离心机

5.5 均质机

5.6 涡旋振荡器

5.7 旋转蒸发仪

5.8 氮吹仪

5.9 固相萃取装置

5.10 恒温水浴箱

5.11 滤膜：0.45 μ m。

6 试料的制备与保存

6.1 试料的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织，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 样品的保存

—20℃以下保存。

7 测定步骤

7.3 基质匹配标准曲线的制备

精密量取 10 $\mu\text{g/mL}$ 的常山酮标准贮备液适量，用甲醇溶解并稀释，配制成浓度为 50、100、300、500 和 1 000 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准溶液，各取 1.0 mL，分别加至经提取、净化步骤处理的空白试料洗脱液中，于 38℃ 水浴下氮气吹干，用流动相 1.0 mL 溶解残余物，供高效液相色谱法测定。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。

7.1 提取

称取试料 (4 ± 0.04) g，于 100 mL 离心管中，加胰蛋白酶 50 mg，加水 2 mL（肝脏组织）或水 10 mL（肌肉组织），涡动 1 min，用 10% 碳酸钠溶液调 pH 至 8.0，于 40℃ 水浴下酶解 3 h。取出，放至室温，加 10% 碳酸钠溶液 2 mL，涡动 1 min，再加乙酸乙酯 20 mL，涡动 10 s，在冰水浴中静置 3 min，立即 2 000 r/min 离心 2 min，将上清液转入 100 mL 分液漏斗中。下层液用乙酸乙酯 20 mL 重复提取一次，合并两次上清液于同一分液漏斗中，加 0.125 mol/L 乙酸铵溶液 10 mL，振摇 1 min，静置 2 min，收集下层水相。再加 0.125 mol/L 乙酸铵溶液 10 mL，重复萃取一次，合并两次水相，转至鸡心瓶中，于 38℃ 旋转蒸发，除尽残余的乙酸乙酯，备用。

7.2 净化

HLB 柱依次用甲醇 3 mL、水 3 mL 和 0.125 mol/L 乙酸铵 3 mL 活化，取备用液过柱，控制流速 1

mL/min, 用甲苯 2 mL 洗涤, 挤干, 用甲醇 3 mL 洗脱, 收集洗脱液, 于 38℃ 氮气吹干, 用流动相 1.0 mL 溶解残余物, 混匀, 滤膜过滤, 供高效液相色谱法测定。

7.4 测定

7.4.1 色谱条件

色谱柱: C₁₈ (150 mm × 3.9 mm, 粒径 4 μm), 或相当者;

流动相: 乙腈-0.25 mol/L 乙酸铵缓冲液-水

流速: 1.0 mL/min;

柱温: 30℃;

检测波长: 243 nm;

进样体积: 25 μL。

7.4.2 测定法

取试样溶液和相应的对照溶液, 作单点或多点校准, 按外标法, 以峰面积计算。对照溶液及试样溶液中常山酮响应值应在仪器检测的线性范围之内。在上述色谱条件下, 对照溶液和试样溶液的高效液相色谱图分别见附录 A。

7.5 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

试料中常山酮的残留量 (μg/kg): 按下式计算

$$X = \frac{C \times V}{m}$$

式中: X—供试试料中常山酮的残留量, μg/kg;

C—试样溶液中常山酮浓度, μg/mL;

V—溶解残留物所用流动相体积, mL;

m—供试试料质量, g。

注: 计算结果需扣除空白试料值, 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 检测方法灵敏度、准确度和精密度

9.1 灵敏度

本方法检测限为 $25\ \mu\text{g/kg}$ ；定量限为 $50\ \mu\text{g/kg}$ 。

9.2 准确度

本方法在 $50\sim 500\ \mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上回收率为 $80\%\sim 110\%$ 。

9.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差 $\leq 15\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附录 A

(资料性附录)

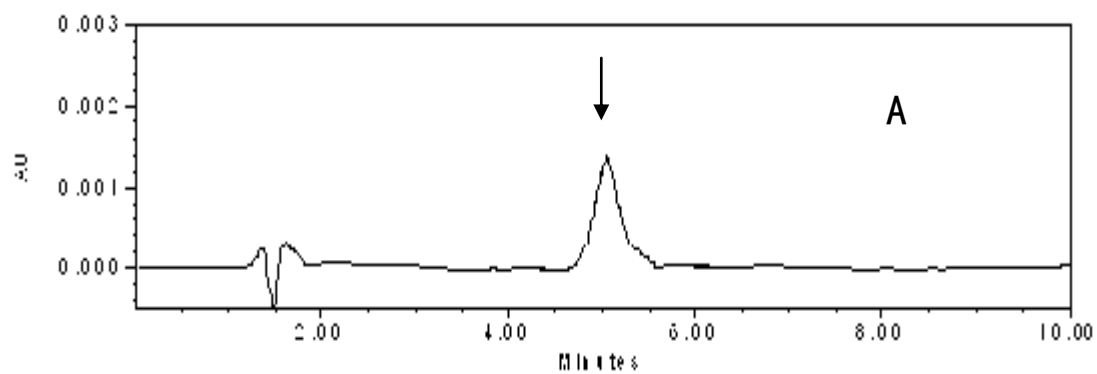


图 A1 常山酮标准溶液色谱图 (100 ng/mL)

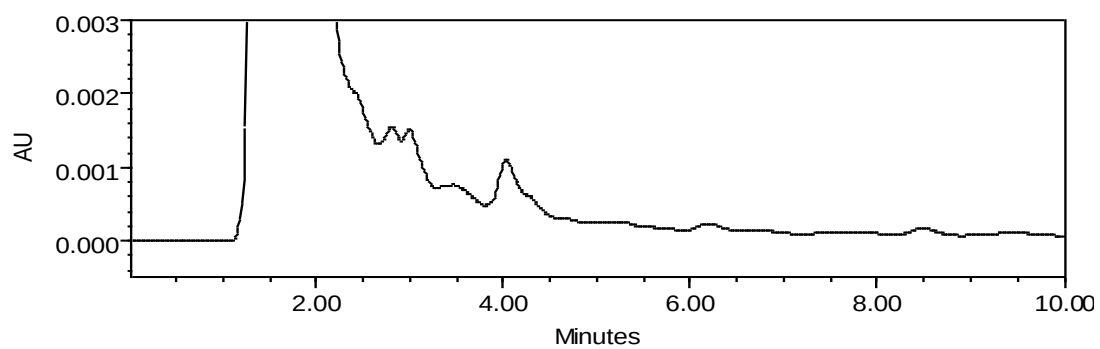


图 A2 鸡肝脏组织空白试样色谱图

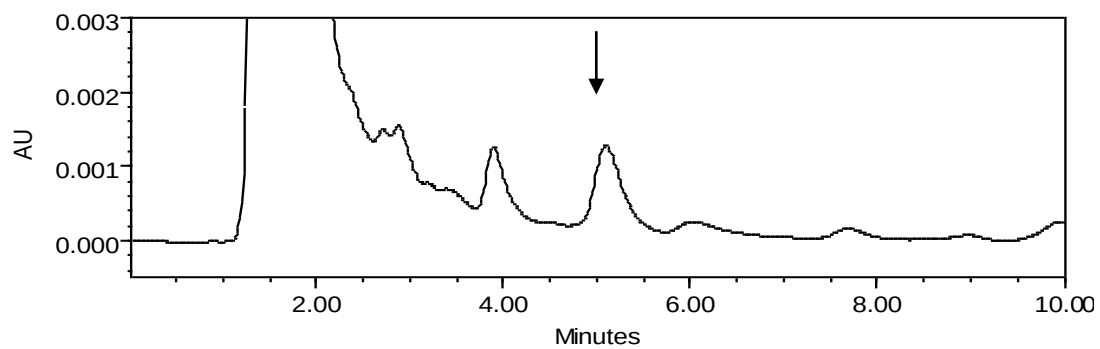


图 A3 鸡肝脏组织空白添加常山酮试样色谱图 (100 ng/g)