



中华人民共和国国家标准

GBXXXXX—XXXX

食品安全国家标准 牛羊组织中三氯苯达唑残留量的测定 高效液相色谱法

National food safety standard-
Determination of ketotriclabnedazole residues in cattle and sheep by high
performance liquid chromatography method

征求意见稿

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中华人民共和国农业农村部
中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局

发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

征求意见稿

食品安全国家标准

牛羊组织中三氯苯达唑残留量的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了牛羊组织中三氯苯达唑酮残留量检测的制样和高效液相色谱测定方法。
本文件适用于牛、羊的肌肉、脂肪、肝脏和肾脏组织中三氯苯达唑酮药物残留量的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的三氯苯达唑酮，经乙酸乙酯/乙腈提取提取，异辛烷去脂，固相萃取柱净化。高效液相色谱-紫外检测法测定，外标法定量。

5 试剂与材料

除非另有说明，所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

5.1 试剂

- 5.1.1 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。
- 5.1.2 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。
- 5.1.3 盐酸（HCl）。
- 5.1.4 正丙醇（CH₃CH₂CH₂OH）。
- 5.1.5 异辛烷（CH₃CH₃CHCH₂C(CH₃)₃）。
- 5.1.6 乙酸铵（CH₃COONH₄）。
- 5.1.7 无水乙醇（CH₃CH₂OH）。
- 5.1.8 无水硫酸钠（Na₂SO₄）。

5.2 溶液配制

- 5.2.1 0.1 mol/L 盐酸溶液：取盐酸 0.9 mL，用水稀释至 100 mL。
- 5.2.2 0.02 mol/L 乙酸铵溶液：取乙酸铵 1.54 g，用水溶解并稀释至 1000 mL。
- 5.2.3 30%酸化乙醇溶液：量取 0.1 mol/L 盐酸溶液 30 mL，用乙醇稀释至 100 mL，混匀。
- 5.2.4 5%氨化甲醇溶液：量取氨水 5 mL，用甲醇稀释至 100 mL，混匀。
- 5.2.5 0.02 mol/L 乙酸铵溶液/乙腈（40：60）：量取 0.02 mol/L 乙酸铵溶液 40 mL，用乙腈稀释至 100 mL，混匀，使用前经滤膜过滤。

5.3 标准品

三氯苯达唑酮标准品（Ketotriclabnedazole, CAS 号 1201920-88-8, 分子式 C₁₃H₇Cl₃N₂O₂, 相对分

子质量 329.57)，含量 $\geq 99.0\%$ 。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液：取三氯苯达唑酮标准品 10 mg，精密称定，用甲醇溶解并稀释定容至 10 mL 容量瓶，配制成浓度为 1mg/mL 的标准储备液。—18℃以下保存，有效期 6 个月。

5.4.2 标准工作液（10 $\mu\text{g/mL}$ ）：准确量取混合标准储备液 0.1 mL，于 10 mL 容量瓶中，用甲醇稀释配制成浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 标准工作液。—18℃以下保存，有效期 2 个月。

5.5 材料

5.5.1 反相聚合物基质固相萃取柱：200 mg/3 mL，或相当者。

5.5.2 微孔滤膜：0.45 μm 有机系尼龙滤膜。

6 仪器设备

6.1 高效液相色谱仪：配紫外检测器或二极管阵列检测器

6.2 分析天平：感量 0.01 g 和 0.000 01 g

6.3 离心机：8000 r/min 或以上。

6.4 振荡器。

6.5 固相萃取装置。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织，绞碎并使均质。

a) 取均质后的供试样品，作为供试试样；

b) 取均质后的空白样品，作为空白试样；

c) 取混匀的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试样。

7.2 试样的保存

—18℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 羊组织（肌肉、肝脏、肾脏、脂肪）的提取和净化

称取（ 2 ± 0.02 ）g 试料，置 50 mL 离心管中，加 0.1 mol/L 盐酸溶液 0.6 mL，乙酸乙酯 5 mL（脂肪组织用乙腈 5 mL），涡旋混匀，中速振荡 5 min，8000 r/min 离心 6 min，上清液转入 25 mL 鸡心瓶中，残渣再重复提取一遍，合并两次提取液，于 50℃水浴下旋转蒸发至干。加流动相 1.0 mL，异辛烷 3 mL 溶解残余物，混匀，静置分层。取下层液过滤膜，供高效液相色谱法分析。

8.2 牛组织（肌肉、肝脏、肾脏、脂肪）的提取和净化

称取（ 2 ± 0.02 ）g 试料，置 50 mL 离心管中，加无水硫酸钠 3 g，乙腈 5 mL，异辛烷 10 mL，涡旋混匀，中速振荡 5 min，8000 r/min 离心 5 min，下层清液转入 50 mL 鸡心瓶中，残渣再用乙腈 5 mL，提取一遍，合并两次提取液，加正丙醇 5 mL，于 55℃水浴下旋转蒸发至干。加 30% 酸化乙醇溶液 4 mL、水 4 mL 溶解，涡旋混匀 30 s，备用。

固相萃取柱用甲醇 3 mL、水 3 mL 活化。取备用液过柱，用水 3 mL 淋洗，真空抽干。5% 氨化甲醇 5 mL 洗脱。于 55℃水浴下氮气吹干。加流动相 1.0 mL，混匀，过滤膜，供高效液相色谱法测定。

8.3 标准曲线的制备

精密量取适量三氯苯达唑酮标准工作液，用流动相稀释成浓度分别为 20 ng/mL、60 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、400 ng/mL、600 ng/mL 和 1200 ng/mL 的系列标准溶液，供高效液相色谱测定。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。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱：C₁₈ 柱（250 mm×4.6 mm，5μm）或相当者；
- 流动相：0.02 mol/L 乙酸铵溶液/乙腈（40：60）；
- 流速：1.0 mL/min；
- 检测波长：296 nm；
- 柱温：30℃；
- 进样量：20 μL。

8.4.2 测定法

取试样溶液和相应的标准溶液，作单点或多点校准，按外标法以峰面积计算。标准溶液及试样溶液中三氯苯达唑酮响应值均应在仪器检测的线性范围之内。在上述色谱条件下，标准溶液的高效液相色谱图见附录A。

8.5 空白试验

取空白试样，除不加药物外，采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算

试样中三氯苯达唑酮的残留量按标准曲线或公式（1）计算，

$$\omega = \frac{\rho_s \times A \times V \times 1000}{A_s \times m \times 1000} \dots\dots (1)$$

式中：

ω—试样中三氯苯达唑酮残留量，单位为微克每千克（μg/kg）；

A—试样溶液中三氯苯达唑酮的峰面积；

A_s—标准溶液中三氯苯达唑酮的峰面积；

V—流动相溶解残余物所用体积，单位为毫升（mL）；

m—试样质量，单位为克（g）；

注：计算结果不小于1μg/kg的保留3位有效数字，1μg/kg以下保留至小数点后2位。

10 方法灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法三氯苯达唑酮在羊组织中的检测限为15 g/kg，定量限为30 μg/kg。牛组织中的检测限为30 μg/kg，定量限为50 μg/kg。

10.2 正确度

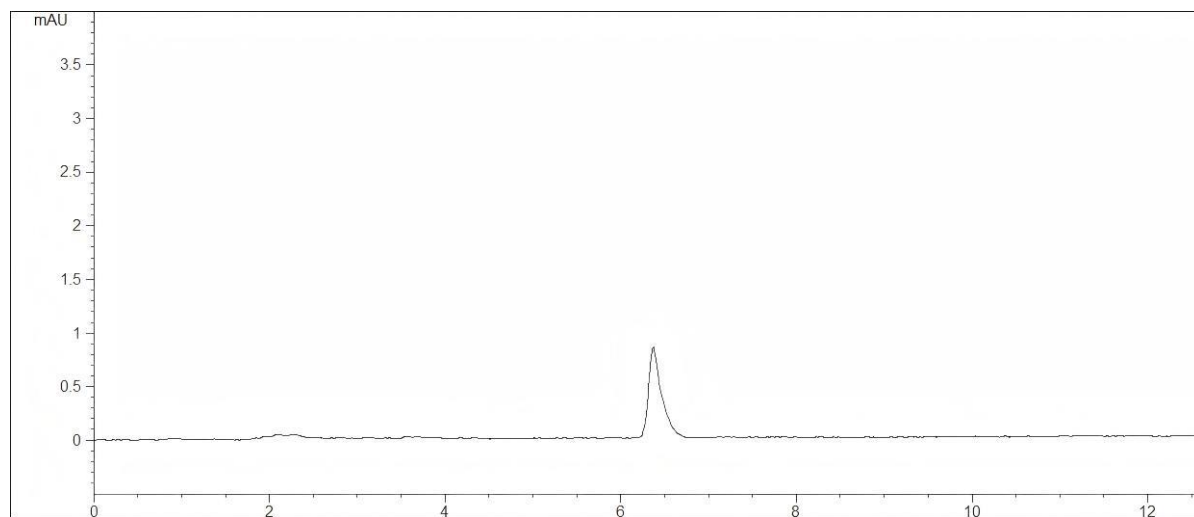
本方法在羊肝脏、肌肉、肾脏、脂肪组织30 μg/kg～300 μg/kg添加浓度水平的回收率为60 %～100 %。在牛肝脏、肌肉、肾脏、脂肪组织50 μg/kg～600 μg/kg添加浓度的回收率为60 %～100 %。

10.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差≤15%，批间相对标准偏差≤20%。

附录 A
(资料性)
标准溶液色谱图

三氯苯达唑酮标准溶液色谱图见图A.1。



图A.1 三氯苯达唑酮标准溶液色谱图 (100 $\mu\text{g/L}$)