

前言

本标准是根据GB/T1.1—1993《标准化工作导则 第1单元：标准的起草与表述规则 第1部分：标准编写的基本规定》及SN/T 0001—1995《出口商品中农药、兽药残留量及生物毒素检验方法标准编写的基本规定》的要求而进行编写的。其中测定方法是参考国内外有关文献，经研究、改进和验证后制定的。本标准同时制定了抽样和制样方法。

测定低限是根据国际上对肉及肉制品中溴氯常山酮残留量的最高限量和测定方法的灵敏度而制定的。

本标准的附录A为提示的附录。

本标准由中华人民共和国国家进出口商品检验局提出并归口。

本标准由中华人民共和国山东进出口商品检验局负责起草。

本标准主要起草人：刘心同、孙忠松、王可珍、李戈、薛君华。

本标准系首次发布的行业标准。

1 范围

本标准规定了出口肉及肉制品中溴氯常山酮残留量检验的抽样、制样和液相色谱测定及液相色谱—质谱确证方法。

本标准适用于出口鸡肉中溴氯常山酮残留量的检验。

2 抽样和制样

2.1 检验批

以不超过2500件为一检验批。

同一检验批的商品应具有相同的特征，如包装、标记、产地、规格和等级等。

2.2 抽样数量

批量，件	最低抽样数，件
1～25	1
26～100	5
101～250	10
251～500	15
501～1000	17
1001～2500	20

2.3 抽样方法

按2.2规定的抽样件数随机抽取，逐件开启。从每件中取一袋作为原始样品，其总量不少于2kg，放入清洁容器内，加封后，标明标记，及时送交实验室。

如每件中无小包装，或有小包装但每袋重量超过2kg者，可用灭菌的锋利刀在抽出的包件中，每件割取不少于100 g，混合后置于洁净容器内，作为混合原始样。混合原始样的重量不少于2kg。加封后，标明标记，及时送交实验室。

2.4 试样制备

从所取全部样品中取出有代表性样品约1kg，经组织捣碎机充分捣碎均匀，均分成两份，分别装入洁净容器内作为试样。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

用胰蛋白酶将试样水解，游离出溴氯常山酮，用乙酸乙酯提取。提取液经过滤后，用乙酸铵缓冲溶液进行液—液分配。乙酸铵提取液用Sep-Pak C₁₈小柱净化，以甲醇洗脱。挥干洗脱液后用流动相溶解。用高效液相色谱仪(HPLC)测定，外标法定量。如残留量超过最高限量时可用液相色谱—质谱联用仪(HPLC-MS)进行确证。

3.2 试剂和材料

除另有规定外，试剂均为分析纯，水为重蒸馏水。

3.2.1 乙酸乙酯：重蒸馏。

3.2.2 乙脂：紫外光谱纯。

3.2.3 甲醇：紫外光谱纯。

3.2.4 胰蛋白酶：生化试剂。

3.2.5 氯化钠。

3.2.6 助滤剂：硅藻土545，使用前用乙酸乙酯清洗。

3.2.7 碳酸钠溶液：10%(W/V)水溶液。

3.2.8 氯化钠饱和的5%碳酸钠溶液：用近1L水溶解50 g碳酸钠，加氯化钠至饱和，定容至1L。

3.2.9 乙酸铵缓冲溶液(I)：0.25mol/L，取19.27g乙酸铵和30 mL乙酸，用水溶解并定容至1L，pH=4.3。

3.2.10 乙酸铵缓冲溶液(II)：0.125mol/L，取500 mL乙酸铵缓冲溶液(I)(3.2.9)，用水定容至1L。

3.2.11 乙酸铵缓冲溶液(III)：0.025mol/L，取100 mL乙酸铵缓冲溶液(I)(3.2.9)，用水定容至1L。

3.2.12 溴氯常山酮标准品：纯度≥99%。

3.2.13 溴氯常山酮标准溶液：准确称取适量的溴氯常山酮标准品(精确至0.0001g)，用乙酸铵缓冲溶液(I)配制成浓度为0.200 mg/mL的标准储备液。再根据需要用乙酸铵缓冲溶液(I)稀释成适当浓度的标准工作溶液。

3.2.14 净化柱：Sep-Pak C₁₈小柱。使用前以5mL甲醇、10 mL，水依次洗涤后，备用。

3.3 仪器和设备

3.3.1 高效液相色谱仪：配紫外检测器(UVD)或二极管阵列检测器(DAD)。

3.3.2 高效液相色谱—质谱联用仪：配电喷雾接口(ESI)或粒子束接口(FBI)或相当者。

3.3.3 组织捣碎机。

3.3.4 匀浆机。

3.3.5 pH计。

3.3.6 旋转蒸发器。

3.3.7 K-D浓缩器。

3.3.8 恒温水浴。

3.3.9 布氏漏斗。

3.3.10 微量进样器：25μL。

3.4 测定步骤

3.4.1 提取

称取试样约20g(精确至0.1g)于250 mL烧瓶中，加入10 mL水和500 mg胰蛋白酶，摇匀。用碳酸钠溶液(10%)调节溶液pH为8.0～8.5。在40℃水浴中培养3h。冷却至室温。加10mL，碳酸钠溶液(10%)，混匀，加100 mL乙酸乙酯和3g助滤剂，高速均质3min。在布氏漏斗上敷上2g助滤剂，抽滤均质后的样液。在残渣中再加100 mL乙酸乙酯，高速均质3min，抽滤再次均质后的样液，合并滤液于250 mL分液漏斗中。加50 mL氯化钠饱和的5%碳酸钠溶液至此分液漏斗中，轻轻1min。静置分层，弃去水层。

3.4.2 净化

在上述乙酸乙酯提取液中，用2×50 mL乙酸铵缓冲溶液(II)，每次振荡1min，静置分层。合并乙酸铵提取液于150 mL分液漏斗中，加10 mL乙酸乙酯，轻摇1min。将乙酸铵缓冲溶液层转入250mL圆底烧瓶中，于70℃水浴中旋转蒸发至无乙酸乙酯味。将乙酸铵提取液转入100 mL容量瓶中，用乙酸铵缓冲溶液(II)定容至100 mL。移取50 mL溶液并使通过预先洗涤好的Sep-Pak C₁₈小柱，弃去流出液。用3mL水淋洗小柱，并弃去淋洗液。用10 mL甲醇进行洗脱，洗脱液收集于10 mL K—D浓缩瓶中。

在平缓氮气流下将洗脱液浓缩至干。用0.50 mL流动相溶解，振荡后，溶液供HPLC测定。

3.4.3 测定

3.4.3.1 液相色谱条件

a) 色谱柱：ODS C₁₈色谱柱，20 cm×4.6mm(内径)，5μm(粒径)，或相当者；

b) 流动相：乙酸铵缓冲溶液(I)—乙腈(65+35)；

c) 流速：1.2mL/min；

d) 检测波长：243nm；

e) 灵敏度：100 mAU；

f) 色谱柱温度：室温；

g) 进样量：20μL。

3.4.3.2 液相色谱测定

根据样液中溴氯常山酮含量情况，选定峰高相近的标准工作溶液。标准工作溶液和样液中溴氯常山酮响应值均应在仪器检测线性范围内。对标准工作溶液和样液等体积参插进样测定，在上述液相色谱条件下，溴氯常山酮保留时间约为6.5min。标准品液相色谱图见附录A中图A1。

3.4.4 确证

3.4.4.1 高效液相色谱—质谱条件

a) 色谱柱：ODS C₁₈色谱柱，20cm×2.1mm(内径)，5μm(粒径)，或相当者；

b) 流动相：乙酸铵缓冲溶液(III)—乙腈(65+35)；

c) 流速：0.3mL/min；

d) 色谱柱温度：室温；

e) 进样量：25μL；

f) 扫描方式：全扫描，范围400～450amu(ESI)；或选择离子监测(FBI)；

g) 离子化方式：EI(FBI)；

h) 离子化电压：70 eV；

i) 电子倍增器电压：自动调谐值加200 V。

3.4.4.2 高效液相色谱—质谱确证

若试样中溴氯常山酮含量超出限量规定，必要时则对样液按上述液相色谱—质谱条件进行液相色谱—质谱确证分析。

3.4.5 空白试验

除不加试样外，均按上述测定步骤进行。

3.5 结果计算和表述

用色谱数据处理机或按式(1)计算试样中溴氯常山酮残留量：

$$X = \frac{h \cdot c \cdot V}{h_s \cdot m} \dots\dots\dots(1)$$

式中：X—试样中溴氯常山酮残留量，mg/kg；

h—样液中溴氯常山酮色谱峰高，mm；

h_s—标准工作液中溴氯常山酮色谱峰高，mm；

c—标准工作液中溴氯常山酮浓度，μg/mL；

V—样液最终定容体积，mL；

m—最终样液所代表的试样量，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

本方法的测定低限为0.05mg/kg。

4.2 回收率

鸡肉中溴氯常山酮添加浓度及其回收率的实验数据：

在0.05mg/kg时，回收率为87.6%；

在0.10 mg/kg时，回收率为92.6%；

在0.50 mg/kg时，回收率为95.8%。

附 录 A

(提示的附录)

标准品色谱图



图 A1 溴氯常山酮标准品的液相色谱图