

中华人民共和国国家标准

农业部 958 号公告—12—2007

水产品中磺胺类药物残留量的测定 液相色谱法

Determination of sulfonamide residues in aquatic products
High performance liquid chromatography

2007-12-18 发布

2008-03-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准附录 A、附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国水产标准化技术委员会水产品加工分技术委员会归口。

本标准起草单位：农业部水产品质量监督检验测试中心（上海）、农业部渔业环境及水产品质量监督检验测试中心（舟山）。

本标准主要起草人：郑斌、蔡友琼、于慧娟、陈伟斌、黄冬梅、陈雪昌、毕士川、钱蓓蕾。

水产品中磺胺类药物残留量的测定

液相色谱法

1 范围

本标准规定了水产品中 14 种磺胺类药物残留量的测定方法：液相色谱—紫外检测法、液相色谱—柱后衍生荧光检测法。

本标准规定了水产品中磺胺(sulfanilamide)、磺胺嘧啶(sulfadiazine)、磺胺噻唑(sulfathiazole)、磺胺甲基嘧啶(sulfamerazine)、磺胺 5-甲氧嘧啶(sulfameter)、磺胺二甲基嘧啶(sulfamethazine)、磺胺甲氧吡嗪(sulfamethoxypyridazine)、磺胺氯吡嗪(sulfachlorpyridazine)、磺胺 6-甲氧嘧啶(sulfamonomethoxine)、磺胺甲基异噁唑(sulfamethoxazole)、磺胺多辛(sulfadoxine)、磺胺异噁唑(sulfafurazole)、磺胺二甲氧吡嗪(sulfadimethoxine)、磺胺喹噁啉(sulfaquinoxaline)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。凡是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 液相色谱—紫外检测法

3.1 原理

样品中残留的磺胺类药物用乙酸乙酯提取，旋转蒸发至近干，甲醇溶解，正己烷脱脂，固相萃取柱净化，甲醇洗脱后旋转蒸发至干，用流动相定容，反相色谱柱分离，紫外检测器检测，外标法定量。

3.2 试剂

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，试验用水应符合 GB/T 6682 一级水的标准。

3.2.1 标准品：磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺甲基嘧啶、磺胺 5-甲氧嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲氧吡嗪、磺胺氯吡嗪、磺胺 6-甲氧嘧啶、磺胺甲基异噁唑、磺胺多辛、磺胺异噁唑、磺胺二甲氧吡嗪、磺胺喹噁啉，纯度均大于 98.0%。

3.2.2 乙酸乙酯。

3.2.3 正己烷。

3.2.4 乙腈：色谱纯。

3.2.5 甲醇：色谱纯。

3.2.6 冰乙酸：优级纯。

3.2.7 无水硫酸钠：经 650℃灼烧 4 h，置于干燥器内备用。

3.2.8 1%(V/V)乙酸溶液：取冰乙酸 5.00 mL，加水稀释至 500 mL。

3.2.9 2%(V/V)乙酸溶液：取冰乙酸 20.00 mL，加水稀释至 1 000 mL。

3.2.10 标准储备液：称取各磺胺标准品 10 mg(精确至 0.01 mg)，用甲醇分别溶解并定容至 10 mL，各磺胺标准储备液浓度为 1 000 mg/L。避光冷藏保存，保存期为 1 个月。

3.2.11 混合标准中间液：适量移取各标准储备液(3.2.10)，用甲醇稀释并定容至 10 mL，在室温下混

匀。其中磺胺嘧啶 40 mg/L、磺胺噻唑 40 mg/L、磺胺甲基嘧啶 40 mg/L、磺胺 5-甲氧嘧啶 40 mg/L、磺胺二甲基嘧啶 40 mg/L、磺胺甲氧哒嗪 40 mg/L、磺胺氯哒嗪 40 mg/L、磺胺 6-甲氧嘧啶 40 mg/L、磺胺甲基异噁唑 40 mg/L、磺胺多辛 40 mg/L、磺胺异噁唑 40 mg/L、磺胺二甲氧哒嗪 40 mg/L、磺胺喹噁啉 80 mg/L。避光冷藏保存,保存期为 1 周。

3.2.12 混合标准使用液:取混合标准中间液 5 mL,用甲醇稀释并定容至 100 mL。现配现用。

3.2.13 固相萃取柱:60 mg/3 mL HLB(二乙烯基苯/N-乙烯基吡咯烷酮共聚物),或其他等效效果的固相萃取柱。

3.3 仪器与设备

3.3.1 液相色谱仪:配紫外检测器。

3.3.2 电子天平:感量 0.000 1 g。

3.3.3 电子天平:感量 0.01 g。

3.3.4 高速组织捣碎机。

3.3.5 旋转蒸发器。

3.3.6 均质机:14 000 r/min。

3.3.7 离心机:5 000 r/min。

3.3.8 旋涡混匀器。

3.3.9 马福炉。

3.3.10 玻璃抽滤器。

3.4 色谱条件

3.4.1 色谱柱:ODS-C₁₈柱,5 μm,250 mm×4.6 mm(i. d.),或性能相当者。

3.4.2 柱温:40℃。

3.4.3 流动相:乙腈、甲醇和 2%乙酸溶液(3.2.9),梯度洗脱参数见表 1。

3.4.4 流速:0.6 mL/min。

3.4.5 检测波长:270 nm。

3.4.6 进样量:50 μL。

表 1 流动相梯度表

时间 min	乙腈 %	甲醇 %	2%乙酸溶液 %
0	5	10	85
15	5	10	85
30	20	10	70
45	20	10	70
45.1	5	10	85
55	5	10	85

3.5 分析步骤

3.5.1 样品制备

鱼,去鳞、去皮,沿脊背取肌肉;虾,去头、去壳、去肠线,取肌肉部分;样品切成不大于 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 的小块后混合。

3.5.2 提取

将样品解冻,称取 5.00 g,置于 50 mL 玻璃离心管。然后加入 25 mL 乙酸乙酯,超声 1 min,加入 5 g 无水硫酸钠,均质机 14 000 r/min 均质 1 min,旋涡混匀 1 min,3 000 r/min 离心 10 min,将乙酸乙酯层小

心转移到 100 mL 梨形瓶中。再向原离心管中加入 25 mL 乙酸乙酯,旋涡混匀 1 min,3 000 r/min 离心 10 min,将乙酸乙酯层合并于 100 mL 梨形瓶中,于 30℃ 水浴中减压浓缩至近干。

3.5.3 净化

先用 1 mL 甲醇溶解上述残渣,再加入 1% 2 mL 乙酸溶液,涡旋混匀,超声 1 min,转移到新的 50 mL 玻璃离心管中,再向梨形瓶中加入 1 mL 甲醇和 2 mL 1% 乙酸溶液,涡旋混匀,超声 1 min,转移到 50 mL 玻璃离心管中。向玻璃离心管中加入 8 mL 正己烷,涡旋混匀,3 000 r/min 离心 5 min,弃上层正己烷层,再加入 8 mL 正己烷重复操作一次,下层加水 6 mL 稀释。HLB(3 mL)固相萃取柱先分别用 3 mL 甲醇和 6 mL 水处理,处理完毕后,加入试样稀释液,再用 3 mL 水和 2 mL 5% 甲醇淋洗,最后用 10 mL 甲醇洗脱。洗脱液 30℃ 减压浓缩至干,用 1 mL 流动相(乙腈+甲醇+2% 乙酸溶液=5+10+85)定容,经孔径 0.45 μm 微孔滤膜过滤,供液相色谱测定。

3.5.4 色谱分析

取 50 μL 进样,记录峰高,响应值均应在仪器检测的线性范围之内。根据标准品的保留时间定性,外标法定量。13 种磺胺参考保留时间参见附录 A。

3.5.5 工作曲线

取 13 种磺胺类药物标准中间液,用流动相稀释成标准工作液。取 50 μL 进样,以峰高为纵坐标,以标准样品中磺胺浓度为横坐标,绘制工作曲线。

3.6 计算

样品中磺胺类药物残留量按公式(1)计算。

$$X = \frac{C \times V}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X——样品中磺胺类药物的含量,单位为微克每千克(μg/kg);
- C——样品提取液中磺胺类药物的浓度,单位为微克每升(μg/L);
- V——最终定容体积,单位为毫升(mL);
- M——样品质量,单位为克(g)。

3.7 方法检出限

本方法检出限:磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺 5-甲氧嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺氯哒嗪、磺胺 6-甲氧嘧啶、磺胺甲基异噁唑、磺胺多辛、磺胺异噁唑、磺胺二甲氧哒嗪为 10 μg/kg;磺胺喹噁啉为 20 μg/kg。

3.8 方法回收率

本方法回收率≥70%。

3.9 精密度

在重复条件下获得的两次独立测定结果的相对标准偏差≤15%。

3.10 方法线性范围

方法线性范围:磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺 5-甲氧嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺氯哒嗪、磺胺 6-甲氧嘧啶、磺胺甲基异噁唑、磺胺多辛、磺胺异噁唑、磺胺二甲氧哒嗪为 0.01 mg/L~1.0 mg/L,磺胺喹噁啉为 0.02 mg/L~2.0 mg/L。

4 液相色谱—柱后衍生荧光检测法

4.1 原理

样品中残留的磺胺类药物用乙酸乙酯提取,稀盐酸反提取,正己烷脱脂,反相色谱柱分离,荧光胺柱后衍生,荧光检测器检测,内标法定量。

4.2 试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯,试验用水应符合 GB/T 6682 一级水的标准。

4.2.1 标准品:磺胺、磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺甲基嘧啶、磺胺 5-甲氧嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺氯哒嗪、磺胺 6-甲氧嘧啶、磺胺甲基异噁唑、磺胺多辛、磺胺异噁唑、磺胺二甲氧哒嗪、磺胺喹噁啉,纯度均大于 98.0%。

4.2.2 荧光胺(fluorescamine):纯度大于 99.0%。

4.2.3 乙酸乙酯。

4.2.4 盐酸。

4.2.5 正己烷。

4.2.6 甲醇:色谱纯。

4.2.7 乙腈:色谱纯。

4.2.8 冰乙酸:优级纯。

4.2.9 乙酸钠:优级纯。

4.2.10 2 mol/L 盐酸溶液:量取 180 mL 盐酸,加水定容至 1 000 mL。

4.2.11 2%(V/V)乙酸溶液:量取 20 mL 冰乙酸,加水定容至 1 000 mL。

4.2.12 3.5 mol/L 乙酸钠溶液:称取 28.7 g 无水乙酸钠溶于蒸馏水中,定容至 100 mL。

4.2.13 0.2 mg/mL 荧光胺溶液:称取 0.04 g 荧光胺,加 100 mL 乙腈、20 mL 甲醇、80 mL 乙酸溶液,摇匀,存放在暗处。现配现用。

4.2.14 标准储备液:称取各种磺胺标准品各 10 mg(称准至 0.01 mg),用甲醇分别溶解并定容至 10 mL,各磺胺标准储备液浓度为 1 000 mg/L。避光冷藏保存,保存期为 1 个月。

4.2.15 内标储备液:称取磺胺吡啶标准品 10 mg(称准至 0.01 mg),用甲醇溶解并定容至 10 mL,该内标储备液浓度为 1 000 mg/L。避光冷藏保存,保存期为 1 个月。

4.2.16 混合标准中间液:适量移取标准储备液(4.2.14),用甲醇稀释并定容至 10 mL,在室温下混匀。其中磺胺 20 mg/L、磺胺嘧啶 40 mg/L、磺胺噻唑 40 mg/L、磺胺甲基嘧啶 40 mg/L、磺胺 5-甲氧嘧啶 80 mg/L、磺胺二甲基嘧啶 40 mg/L、磺胺甲氧哒嗪 80 mg/L、磺胺氯哒嗪 80 mg/L、磺胺 6-甲氧嘧啶 80 mg/L、磺胺甲基异噁唑 80 mg/L、磺胺多辛 80 mg/L、磺胺异噁唑 80 mg/L、磺胺二甲氧哒嗪 80 mg/L、磺胺喹噁啉 160 mg/L。避光冷藏保存,保存期为 1 周。

4.2.17 内标中间液:取内标储备液 1 mL,用甲醇稀释并定容至 25 mL,在室温下混匀,该内标中间液浓度为 40 mg/L。避光冷藏保存,保存期为 1 周。

4.2.18 混合标准使用液:取混合标准中间液 5 mL,用乙酸乙酯稀释并定容至 100 mL。现配现用。

4.2.19 内标使用液:取内标中间液 5 mL,用乙酸乙酯稀释并定容至 100 mL。现配现用。

4.3 仪器与设备

4.3.1 液相色谱仪:配荧光检测器,柱后衍生装置。

4.3.2 电子天平:感量 0.000 1 g。

4.3.3 电子天平:感量 0.01 g。

4.3.4 高速组织捣碎机。

4.3.5 均质机:14 000 r/min。

4.3.6 离心机:5 000 r/min。

4.3.7 氮吹仪。

4.3.8 旋涡混匀器。

4.4 色谱条件

- 4.4.1 色谱柱: ODS-C₁₈, 5 μm, 4.6 mm×250 mm, 或性能相当者。
- 4.4.2 柱温: 40℃。
- 4.4.3 柱后反应器温度: 70℃。
- 4.4.4 衍生试剂流速: 0.1 mL/min。
- 4.4.5 流动相: 乙腈、甲醇和 2% 乙酸溶液(4.2.11), 梯度洗脱参数见表 1。
- 4.4.6 流速: 0.6 mL/min。
- 4.4.7 进样量: 50 μL。
- 4.4.8 激发波长: 405 nm。
- 4.4.9 发射波长: 495 nm。

4.5 分析步骤

4.5.1 样品制备

按 3.5.1 条的规定执行。

4.5.2 提取

将样品解冻, 称取 10.00 g, 置于 50 mL 离心管中。加入磺胺吡啶内标使用液 250 μL, 然后加入乙酸乙酯 30 mL, 均质机 14 000 r/min 均质 1 min, 振动 2 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 将乙酸乙酯层小心转移到 100 mL 梨形瓶中。再向原离心管中加入乙酸乙酯 20 mL, 旋涡混匀 30 s, 振动 2 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 将乙酸乙酯层小心转移到原 100 mL 梨形瓶中, 40℃ 减压浓缩至约 1 mL。然后将梨形瓶中的溶液转移至 15 mL 刻度离心管, 再用 4 mL 乙酸乙酯分两次清洗梨形瓶, 溶液合并至 15 mL 刻度离心管。在离心管中加入 2.00 mL 2 mol/L 盐酸溶液(4.2.10), 旋涡混匀 1 min, 加盖后振动 2 min, 3 000 r/min 离心 8 min, 移去乙酸乙酯层, 在余液中加入正己烷 5 mL, 旋涡混匀 30 s, 3 000 r/min 离心 8 min, 移去正己烷层, 0.45 μm 微孔滤膜过滤。取 200 μL 滤液、200 μL 乙酸钠溶液、50 μL 乙腈和 50 μL 甲醇加入到试样瓶中, 旋涡混匀 1 min, 供液相色谱分析。

4.5.3 色谱分析

取 50 μL 进样, 记录峰高, 响应值均应在仪器检测的线性范围之内。根据标准样品的保留时间定性, 内标法定量。14 种磺胺参考保留时间参见附录 B。

4.5.4 工作曲线

称取空白样品 10.00 g, 分别添加混合标准使用液(4.2.18) 25 μL、100 μL、250 μL、500 μL、1 000 μL, 同时分别添加内标使用液(4.2.19) 250 μL, 按 4.5.2、4.5.3 操作, 以磺胺峰高为纵坐标, 磺胺浓度为横坐标, 绘制工作曲线。

4.6 计算

按 3.6 条的规定执行。

4.7 方法检出限

本方法检出限: 磺胺为 2.5 μg/kg; 磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲基嘧啶为 5 μg/kg; 磺胺 5-甲氧嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺氯哒嗪、磺胺 6-甲氧嘧啶、磺胺甲基异噁唑、磺胺多辛、磺胺异噁唑、磺胺二甲氧哒嗪为 10 μg/kg; 磺胺喹噁啉为 20 μg/kg。

4.8 回收率

本方法回收率 ≥ 70%。

4.9 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的相对标准偏差 ≤ 15%。

4.10 方法线性范围

农业部 958 号公告—12—2007

方法线性范围:磺胺为 0.0025 mg/L~0.5mg/L,磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲基嘧啶为 0.005 mg/L~1.0mg/L,磺胺 5-甲氧嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺氯哒嗪、磺胺 6-甲氧嘧啶、磺胺甲基异噁唑、磺胺多辛、磺胺异噁唑、磺胺二甲氧哒嗪为 0.01 mg/L~2.0 mg/L,磺胺喹噁啉为 0.02 mg/L~4.0 mg/L。

附录 A

(资料性附录)

液相色谱—紫外检测法 13 种磺胺类药物色谱分析图及保留时间

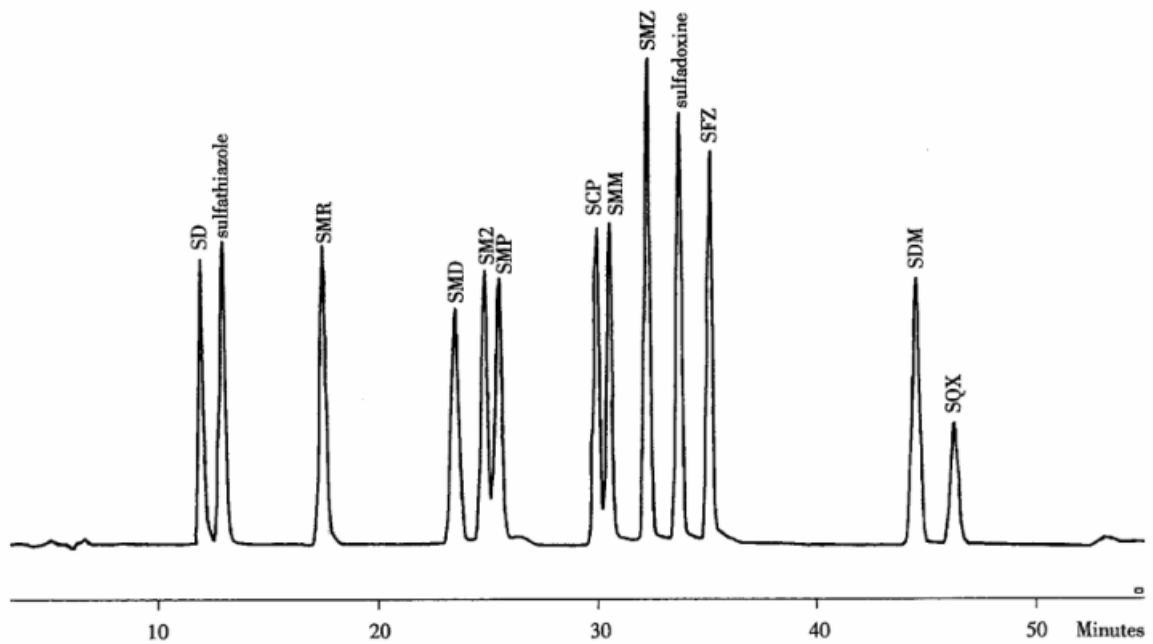


图 A. 1 液相色谱—紫外检测法检测 13 种磺胺标准物质色谱图

表 A. 1 13 种磺胺参考保留时间

药物名称	保留时间 min	药物名称	保留时间 min
磺胺嘧啶	11.778	磺胺 6-甲氧嘧啶	30.436
磺胺噻唑	12.676	磺胺甲基异噻唑	32.098
磺胺甲基嘧啶	17.265	磺胺多辛	33.541
磺胺 5-甲氧嘧啶	23.354	磺胺异噻唑	34.889
磺胺二甲基嘧啶	24.798	磺胺二甲氧吡嗪	44.154
磺胺甲氧吡嗪	25.453	磺胺喹噁啉	45.858
磺胺氯吡嗪	29.777		

附录 B

(资料性附录)

液相色谱—柱后衍生荧光检测法 14 种磺胺类药物色谱分析图及保留时间

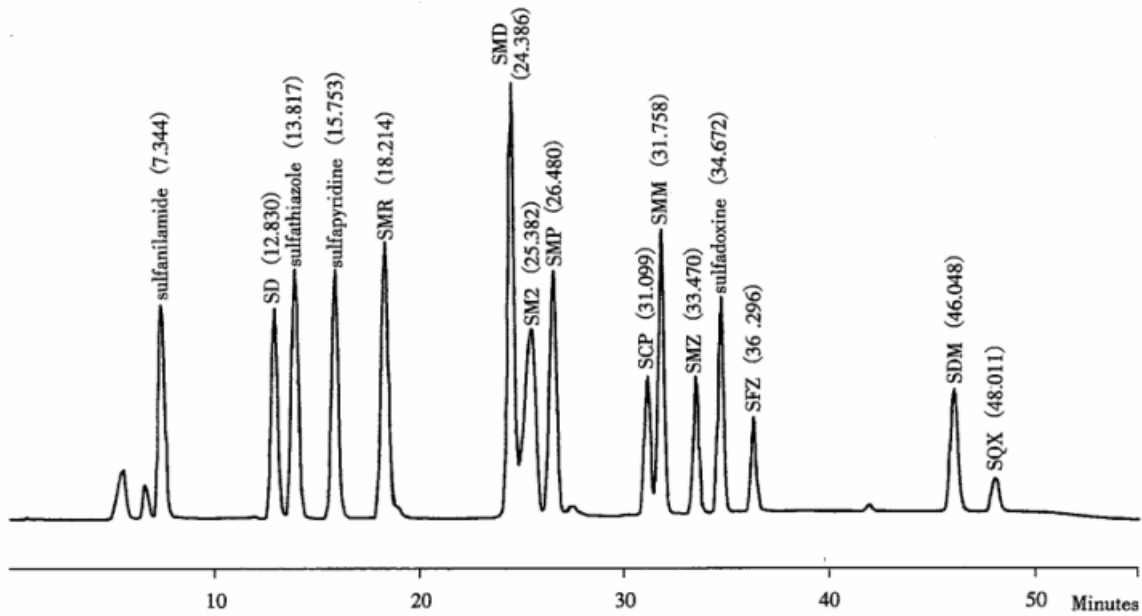


图 B.1 液相色谱—柱后衍生荧光检测法检测 14 种磺胺标准物质色谱图

表 B.1 14 种磺胺参考保留时间

药物名称	保留时间 min	药物名称	保留时间 min
磺胺	7.344	磺胺氯哒嗪	31.099
磺胺嘧啶	12.830	磺胺 6-甲氧嘧啶	31.756
磺胺噻唑	13.817	磺胺甲基异噁唑	33.470
磺胺甲基嘧啶	18.214	磺胺多辛	34.672
磺胺 5-甲氧嘧啶	24.386	磺胺异噁唑	36.296
磺胺二甲基嘧啶	25.382	磺胺二甲氧哒嗪	46.048
磺胺甲氧哒嗪	26.480	磺胺噻噁啉	48.011