

配合饲料中磺胺类药物的测定 高效液相色谱法

Determination of sulfonamides in formula feeds

High—performance liquid chromatography

2008-07-07 发布

2008-08-07 实施

浙江省质量技术监督局 发布

前 言

本标准附录A、附录B为资料性附录。

本标准由浙江省水产标准化技术委员会提出并归口。

本标准起草单位：宁波市海洋与渔业研究院、台州市水产技术推广站。

本标准主要起草人：杨家锋、段青源、程岩雄、钟惠英、卓华龙、朱励华、郑丹。

引 言

饲料中磺胺类药物的测定，已有国家标准：GB/T 19542-2007 《饲料中磺胺类药物的测定--高效液相色谱法》，该标准规定了饲料中磺胺嘧啶,磺胺二甲基嘧啶,磺胺间甲氧嘧啶,磺胺甲噁唑,磺胺喹噁啉等5种磺胺类药物的测定方法。与该标准相比，本标准适用于检测的药物品种更广。

当需要对饲料中磺胺嘧啶,磺胺二甲基嘧啶,磺胺间甲氧嘧啶,磺胺甲噁唑,磺胺喹噁啉含量进行仲裁检验时，应优先依据 GB/T 19542—2007进行。

配合饲料中磺胺类药物的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了配合饲料中磺胺、磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺吡啶、磺胺喹噁啉等 15 种磺胺类药物的高效液相色谱测定方法。

本标准适用于配合饲料中磺胺、磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺吡啶、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、磺胺甲基异噁唑、磺胺 6-甲氧嘧啶、磺胺多辛、磺胺异噁唑、磺胺二甲氧哒嗪、磺胺喹噁啉 15 种磺胺类药物含量的测定。

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 原理

试样中磺胺类药物用乙腈—氯仿溶液提取，正己烷除杂质，经液—液萃取，浓缩，微孔滤膜过滤后，用反相色谱柱分离，紫外检测器检测，外标法定量。

4 试剂与材料

除另有规定外，试剂均为分析纯，水符合 GB/T 6682 中二级水的规定。

- 4.1 乙酸。
- 4.2 乙腈：色谱纯。
- 4.3 甲醇：色谱纯。
- 4.4 氯仿。
- 4.5 正己烷。
- 4.6 无水硫酸钠。
- 4.7 20%甲醇溶液：取 20 mL 甲醇用水溶解并稀释至 100 mL。
- 4.8 乙腈-氯仿混合溶液（10+1，v/v）。
- 4.9 乙腈-氯仿混合溶液（1+2，v/v）。
- 4.10 10%硫酸钠溶液：称取 10g 无水硫酸钠，用水溶解并稀释至 100 mL。
- 4.11 2%硫酸钠溶液：称取 2g 无水硫酸钠，用水溶解并稀释至 100 mL。
- 4.12 1%乙酸溶液：乙酸-水（1+99，v/v），pH=3.0。
- 4.13 磺胺类药物标准品：纯度大于 98%。

磺胺，磺胺嘧啶，磺胺噻唑，磺胺吡啶，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，磺胺甲基异噁唑，磺胺 6-甲氧嘧啶，磺胺多辛，磺胺异噁唑，磺胺二甲氧哒嗪，磺胺喹噁啉。

4.14 磺胺类药物标准溶液

4.14.1 磺胺类药物标准贮备液：准确称取 15 种磺胺类标准品各 100.0 mg，分别放入 100 mL 的棕色容量瓶中，用甲醇溶解，并稀释定容至刻度，摇匀。该溶液中 15 种磺胺类药物浓度均为 1.00 mg/mL。置

4℃冰箱中保存（保存期不超过3个月）。

4.14.2 磺胺类药物混合标准中间液：分别移取15种磺胺类药物标准贮备液（4.14.1）各1.00 mL于100 mL棕色容量瓶中，用20%甲醇（4.7）稀释定容，即得混合标准中间液。该标准溶液含各种磺胺浓度均为10.0 µg/mL，置4℃冰箱中保存（保存期不超过1周）。

4.14.3 磺胺类药物混合标准工作液：分别移取0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 mL混合标准中间液（4.14.2），用20%甲醇（4.7）稀释定容至1.0 mL，即得混合标准工作液。该混合标准工作液中含每种磺胺浓度分别为0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 µg/mL，现用现配。

5 仪器与设备

5.1 高效液相色谱仪 配备紫外检测器。

5.2 分析天平：感量为0.0001 g。

5.3 均质器。

5.4 高速离心机：8000 r/min。

5.5 氮吹仪。

5.6 旋涡混合器。

5.7 真空旋转蒸发仪。

5.8 聚四氟乙烯离心管：15 mL。

5.9 容量瓶：100 mL。

5.10 玻璃鸡心瓶：100 mL。

5.11 聚四氟乙烯滤膜，孔径0.45 µm。

6 分析步骤

6.1 试样制备

采集具有代表性的饲料样品至少2 kg，四分法缩减至250 g，粉碎，过40目分析筛，混匀，装入密闭容器中，避光室温保存，备用。

6.2 提取

6.2.1 脂肪含量不高的试样：准确称取试样1 g（精确到0.001 g），放入15 mL离心管内，依次加入0.5 mL 10%硫酸钠溶液（4.10）和5 mL 乙腈-氯仿混合溶液（4.8），于旋涡混合器上剧烈混匀，4000 r/min离心10 min，将上层清液转入玻璃鸡心瓶内。再依次用5 mL 乙腈-氯仿混合溶液（4.8）重复提取残渣二次，合并提取液于玻璃鸡心瓶中。

6.2.1 高脂肪含量试样：准确称取试样1 g（精确到0.001 g），加入5 g碱性氧化铝外，按6.2.1操作。

6.3 净化

将提取液置于真空旋转蒸发仪上，低于40℃蒸发至近干，向残渣中加入2 mL 2%硫酸钠溶液（4.11）和5 mL 正己烷（4.5），于旋涡混合器上剧烈混匀，使残渣溶解，溶液转入离心管中，4000 r/min离心5 min，用吸管移去正己烷层。若杂质较多，再用5 mL 正己烷萃取水相一次，离心，弃去正己烷层。

6.4 萃取、浓缩

水相中加入5 mL 乙腈-氯仿混合溶液（4.9），在旋涡混合器上剧烈混匀，4000 r/min离心5 min。用吸管将下层有机相转入离心管内，再用2 mL 乙腈-氯仿混合溶液（4.9）重复操作，合并提取液，氮气吹干。用甲醇溶液（4.7）溶解残渣，并定容至1 mL，8000 r/min离心10 min，过0.45 µm微孔滤膜后，供高效液相色谱测定。

6.5 高效液相色谱测定

6.5.1 高效液相色谱条件

色谱柱：ODS C₁₈ 4.6 mm×250 mm，填料粒度为5 µm，或性能相当者。

柱温：40℃。

流速：0.8 ml/min。

进样量：20 μL。

检测波长：285 nm。

流动相：A 乙腈， B 甲醇， C 1%乙酸；流动相梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0	5	5	90
15	5	8	87
45	10	15	75
60	20	25	55
65	5	5	90

6.5.2 标准曲线制作

以色谱条件（6.5.1）测定混合标准工作液(4.14.3)，以磺胺类药物各组份测得结果的峰面积或峰高为纵坐标，以标准溶液的浓度为横坐标作标准曲线。

6.5.3 试液测定

以上述色谱条件（6.5.1）测定试液，记录相应的色谱峰峰面积或峰高，从标准曲线中查得试液中各种磺胺类药物浓度。15 种磺胺类药物保留时间参见附录 A。

6.5.4 空白试验

除不加试样外，均按分析步骤进行。

7 结果计算与表述

7.1 试样中磺胺类药物的含量按公式（1）计算：

$$X_i = \frac{C_i \times V}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X_i ---试样中每种磺胺类药物残留量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

C_i ---从标准曲线中查的试样液中每种磺胺类药物浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V ---试样最终定容体积，单位为毫升（mL）；

m ---称取的试样重量，单位为克（g）。

注：计算结果需将空白值扣除。

7.2 平行测定结果用算术平均值表示，保留三位有效数字。

8 方法回收率、定量限和重复性

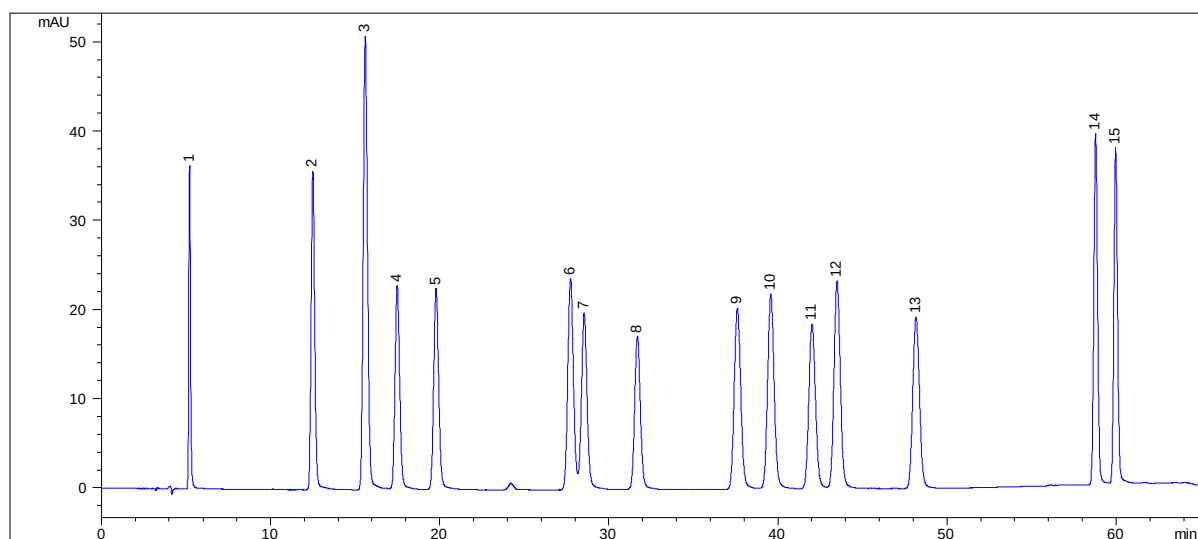
本方法添加浓度在 0.5mg/kg~10 mg/kg 时，15 种磺胺类药物回收率参见附录 B；

15 种磺胺类药物的定量限均为 0.5 mg/kg；

两个平行测定的结果相对偏差不得大于 15%。

附 录 A
(资料性附录)

15 种磺胺类药物标准色谱图



- 1——磺胺（5.21min）
- 2——磺胺嘧啶（12.50 min）
- 3——磺胺噻唑（15.60 min）
- 4——磺胺吡啶（17.49 min）
- 5——磺胺甲基嘧啶（19.79 min）
- 6——磺胺 5-甲氧嘧啶（27.74min）
- 7——磺胺二甲基嘧啶（28.55min）
- 8——磺胺甲氧哒嗪（31.70min）
- 9——磺胺氯哒嗪（37.61min）
- 10——磺胺甲基异噁唑（39.58min）
- 11——磺胺 6-甲氧嘧啶（42.02min）
- 12——磺胺多辛（43.50min）
- 13——磺胺异噁唑（48.17min）
- 14——磺胺二甲氧哒嗪（58.79min）
- 15——磺胺喹噁啉（59.97min）

附 录 B
(资料性附录)

15 种磺胺类药物方法回收率

B.1 本方法添加浓度在 0.5~10 mg/kg 时, 15 种磺胺类药物回收率分别为:

磺胺 73.8% ~ 90.8%;
磺胺嘧啶 77.4% ~ 98.1%;
磺胺噻唑 75.7% ~ 92.4%;
磺胺吡啶 71.9% ~ 95.4%;
磺胺甲基嘧啶 86.8% ~ 105.1%;
磺胺 5-甲氧嘧啶 72.2% ~ 106.5%;
磺胺二甲基嘧啶 69.7% ~ 95.3%;
磺胺甲氧哒嗪 76.3% ~ 91.4%;
磺胺氯哒嗪 72.4% ~ 93.6%;
磺胺甲基异噁唑 71.8% ~ 95.3%;
磺胺 6-甲氧嘧啶 70.0% ~ 90.1%;
磺胺多辛 73.0% ~ 102.0%;
磺胺异噁唑 86.5% ~ 105.2%;
磺胺二甲氧哒嗪 78.1% ~ 91.7%;
磺胺喹噁啉 76.4% ~ 105.0%。
