

中华人民共和国国家标准

农业部 1486 号公告 —7— 2010

饲料中 9 种磺胺类药物的测定 高效液相色谱法

Determination of nine sulfonamides in feeds—
High performance liquid chromatography

2010-11-16 发布

2010-11-16 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准遵照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部畜牧业司提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位:中国农业大学。

本标准主要起草人:任丽萍、孟庆翔、周波、李永山、周振明、郭凯军。

饲料中 9 种磺胺类药物的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中 9 种磺胺类药物的高效液相色谱检测方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混料中磺胺醋酰、磺胺嘧啶、磺胺吡啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺甲基异噁唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺喹噁啉含量的测定。

本方法的检测限为 0.1 mg/kg, 定量限为 0.5 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件, 仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

试样中的磺胺类药物经乙酸乙酯超声提取后, 用氨基固相萃取柱净化, 用高效液相色谱法检测, 外标法定量。

4 试剂和溶液

以下所用试剂, 除特别注明外均为分析纯试剂。

4.1 水: 色谱用水应符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.2 乙酸乙酯。

4.3 正己烷。

4.4 冰乙酸: 优级纯。

4.5 乙腈: 色谱纯。

4.6 甲醇: 色谱纯。

4.7 洗脱液: 乙腈+甲醇+水+乙酸=2+2+9+0.2。

4.8 流动相

4.8.1 A 液: 乙腈(4.5)与甲醇(4.6)以 1:1 的体积比混合摇匀, 脱气, 备用。

4.8.2 B 液: 在 1 000 mL 容量瓶中加入 1 mL 冰乙酸(4.4)用去离子水定容为乙酸溶液(0.1%), 混合摇匀后过 0.45 μm 滤膜, 脱气, 备用。

4.9 9 种磺胺类药物标准品: 磺胺醋酰、磺胺嘧啶、磺胺吡啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺甲基异噁唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺喹噁啉, 纯度均大于 97%。

4.10 标准溶液

4.10.1 标准贮备液: 准确称取磺胺药物的标准品 100 mg(精确至 0.000 1 g), 分别置于 100 mL 棕色容量瓶中, 加甲醇(4.6)超声使之完全溶解, 并定容至刻度, 摇匀。该溶液中磺胺药物的浓度为 1 mg/mL,

于-18℃保存,有效期 6 个月。

4.10.2 标准中间液:准确移取 9 种磺胺标准贮备液(4.10.1)5 mL 分别于 50 mL 棕色容量瓶中,用甲醇(4.6)定容至刻度。该溶液浓度为 100 μg/mL,于 4℃保存,有效期 1 个月。

4.10.3 标准工作液:准确移取 9 种磺胺标准中间液(4.10.2)5 mL 分别于 50 mL 棕色容量瓶中,用 20%的甲醇(4.6)水溶液定容至刻度。该溶液中磺胺浓度为 10 μg/mL,当日使用。

4.10.4 混合标准工作液:分别移取各磺胺药物标准中间液各 5 mL 于 50 mL 棕色容量瓶中,用 20%甲醇(4.6)水溶液定容至刻度。该溶液中磺胺药物的浓度均为 10 μg/mL,当日使用。

5 仪器设备

5.1 高效液相色谱仪:配紫外检测器。

5.2 分析天平:感量为 0.001 g 和 0.000 1 g。

5.3 漩涡混合仪。

5.4 旋转蒸发器。

5.5 离心机。

5.6 过滤器:配 0.45 μm 的有机微孔滤膜。

5.7 超声波清洗机。

5.8 固相萃取装置。

5.9 氨基固相萃取柱:500 mg/3 mL。

6 试样的选取和制备

按 GB/T 14699.1 的规定采样,按 GB/T 20195 的规定制备试样。

7 分析步骤

7.1 提取

称取 2 g(精确至 0.001 g)试样于 50 mL 具塞离心管中,加入乙酸乙酯(4.2)15 mL,漩涡混匀,30℃水浴中超声提取 3 min,然后以 4 000 r/min 离心 3 min,静置。将上清液转移到另一管中,重复提取残渣两次,合并上清液。将上清液转入梨形瓶中 40℃旋转蒸至近干。加入 3 mL 乙酸乙酯(4.2),充分摇匀溶解残渣。

7.2 净化

将上述溶解液过已经用 5 mL 正己烷(4.3)、5 mL 乙酸乙酯(4.2)预淋过的氨基固相萃取柱(5.9)。上样后,首先用 5 mL 正己烷(4.3)淋洗此柱去除杂质,减压抽干 10 min,然后用 2 mL 洗脱液(4.7)洗脱,减压抽干 10 min 收集洗脱液并定容为 2 mL,过 0.45 μm 滤膜供高效液相色谱分析。

注:上样溶液、淋洗液和洗脱液的流速均控制在 0.8 mL/min~1.0 mL/min。

7.3 测定

7.3.1 仪器条件

色谱柱:C₁₈色谱柱,柱长 150 mm,柱内径 4.6 mm,粒度 3.5 μm,或性能相当者;

流动相:A 液,乙腈甲醇混合液(4.8.1);B 液,0.1%乙酸溶液(4.8.2);流动相梯度洗脱见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱

时间,min	A 液,%	B 液,%
0	15	85
30	50	50
34	15	85

流速:0.8 mL/min;

检测波长:270 nm;

柱温:室温;

进样量:20 μ L。

7.3.2 样品测定

按(7.3.1)设置仪器条件,取相应的混合标准工作液和试样溶液,做多点校准,外标法定量。标准溶液和试样溶液中 9 种磺胺类药物的响应值均在仪器检测线性范围之内。

8 结果计算

8.1 饲料中磺胺的含量按(1)式计算:

$$w_i = \frac{P_i \times c_i \times V}{P_{si} \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

w_i ——试样中磺胺的质量浓度,单位为微克每克(μ g / g);

P_i ——试样溶液峰面积值;

V ——定容体积,单位为毫升(mL);

c_i ——标准溶液的浓度,单位为微克每毫升(μ g/mL);

P_{si} ——标准溶液峰面积的平均值;

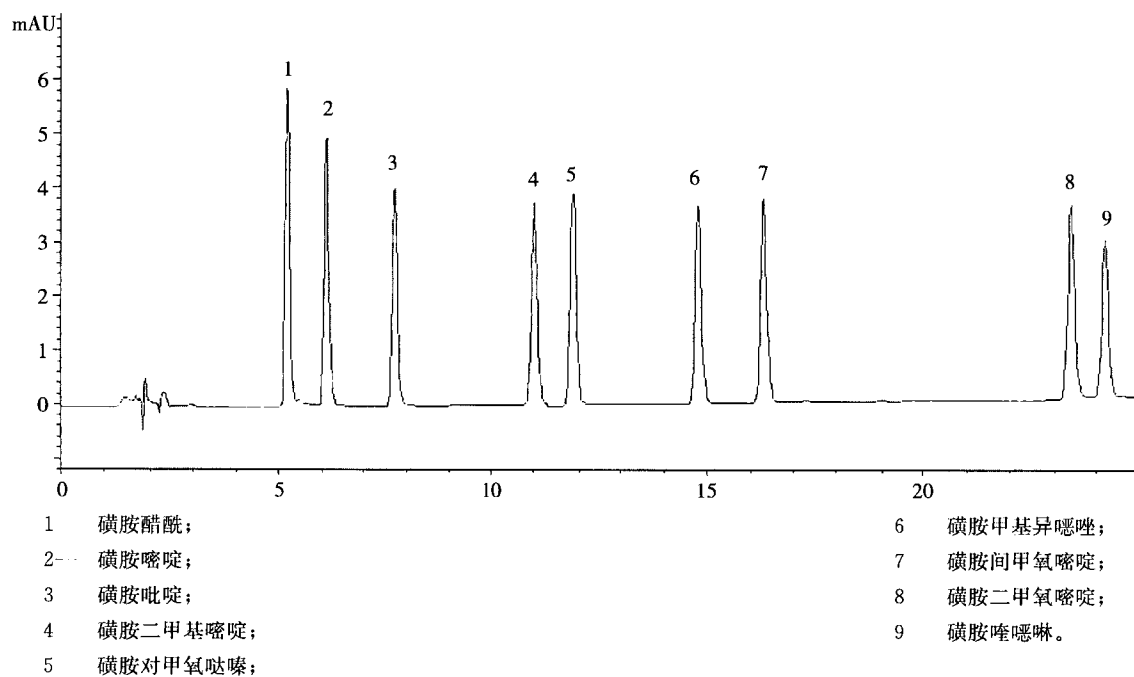
m ——试样的质量,单位为克(g)。

8.2 按平行测定的算术平均值报告结果,结果保留三位有效数字。

9 重复性

同一分析者在同一实验室使用同一台仪器,对同一试样进行平行测定结果的相对偏差 $\leq 15\%$ 。

附 录 A
(资料性附录)
9 种磺胺类药物标准溶液色谱图



附 录 B

(资料性附录)

9 种磺胺类药物的中英文名对照、分子式和分子量

磺胺药物中文名称	磺胺药物英文名称	分子式	分子量
磺胺醋酰	Sulfacetamide	$C_8H_{10}N_2O_3S$	214.2
磺胺嘧啶	Sulfadiazine	$C_{10}H_{10}N_4O_2S$	250.3
磺胺吡啶	Sulfapyridine	$C_{11}H_{11}N_3O_2S$	249.3
磺胺二甲基嘧啶	Sulfadimidine	$C_{12}H_{14}N_4O_2S$	278.3
磺胺对甲氧吡嗪	Sulfamethoxypyridazine	$C_{11}H_{12}N_4O_3S$	279.3
磺胺甲基异噁唑	Sulfamethoxazole	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	253.3
磺胺间甲氧嘧啶	Sulfamonomethoxine	$C_{11}H_{12}N_4O_3S$	280.3
磺胺二甲氧嘧啶	Sulfadimethoxine	$C_{12}H_{14}N_4O_4S$	310.3
磺胺喹噁啉(钠盐)	Sulfaquinoxaline sodium salt	$C_{14}H_{12}N_4NaO_2S$	322.3