



中华人民共和国国家标准

GB/T 20759—2006

畜禽肉中十六种磺胺类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Method for the determination of sixteen sulfonamide residues
in livestock and poultry muscles—
LC-MS-MS method

2006-12-31 发布

2007-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局提出。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局归口。

本标准起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：庞国芳、曹彦忠、贾光群、张进杰、范春林、李学民、刘永明、石玉秋。

本标准系首次发布的国家标准。

畜禽肉中十六种磺胺类药物残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛肉、羊肉、猪肉、鸡肉和兔肉中十六种磺胺类药物残留量液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛肉、羊肉、猪肉、鸡肉和兔肉中十六种磺胺类药物残留量的测定。

本标准的方法检出限:磺胺甲噻二唑为 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,磺胺醋酰、磺胺嘧啶、磺胺吡啶、磺胺二甲异噻唑、磺胺甲基嘧啶、磺胺氯吡嗪、磺胺-6-甲氧嘧啶、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺甲基异噻唑为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,磺胺噻唑,磺胺甲氧吡嗪、磺胺间二甲氧嘧啶为 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,磺胺对甲氧嘧啶、磺胺二甲嘧啶为 20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,磺胺苯吡唑为 40.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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 6379.1 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第1部分:总则与定义(GB/T 6379.1—2004,ISO 5725-1:1994,IDT)

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第2部分:确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法(GB/T 6379.2—2004,ISO 5725-2:1994,IDT)

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—1992,neq ISO 3696:1987)

3 原理

畜禽肉中磺胺类药物残留用乙腈提取,离心后,上清液用旋转蒸发器浓缩近干,残渣用流动相溶解,并用正己烷脱脂后,样品溶液供液相色谱-串联质谱仪测定,外标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外,所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 乙腈:色谱纯。

4.2 异丙醇。

4.3 正己烷。

4.4 乙酸铵。

4.5 无水硫酸钠:经 650 $^{\circ}\text{C}$ 灼烧 4 h,置于干燥器中备用。

4.6 流动相:乙腈+0.01 mol/L 乙酸铵溶液(12+88)。

4.7 磺胺醋酰、磺胺甲噻二唑、磺胺二甲异噻唑、磺胺氯吡嗪、磺胺嘧啶、磺胺甲基异噻唑、磺胺噻唑、磺胺-6-甲氧嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺吡啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺甲氧吡嗪、磺胺二甲嘧啶、磺胺苯吡唑、磺胺间二甲氧嘧啶标准物质:纯度 $\geq 99\%$ 。

4.8 十六种磺胺标准储备溶液:0.1 mg/mL。准确称取适量的每种磺胺标准物质,用甲醇配成 0.1 mg/mL 的标准储备溶液,该溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,可使用二个月。

4.9 基质混合标准工作溶液:根据每种磺胺的灵敏度和仪器线性范围用空白样品提取液配成不同浓度(ng/mL)的基质混合标准工作溶液,基质混合标准工作溶液在 4°C 保存,可使用一周。

4.10 滤膜: $0.2\ \mu\text{m}$ 。

5 仪器

5.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源。

5.2 匀质器。

5.3 旋转蒸发器。

5.4 液体混匀器。

5.5 离心机。

5.6 分析天平:感量 $0.1\ \text{mg}$, $0.01\ \text{g}$ 。

5.7 移液器: $1\ \text{mL}$, $2\ \text{mL}$ 。

5.8 鸡心瓶: $100\ \text{mL}$ 。

5.9 样品瓶: $2\ \text{mL}$,带聚四氟乙烯旋盖。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

从全部样品中取出有代表性样品约 $1\ \text{kg}$,充分搅碎,混匀,均分成两份,分别装入洁净容器内。密封作为试样,标明标记。在抽样和制样的操作过程中,应防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

6.2 试样保存

将试样于 -18°C 冷冻保存。

7 测定步骤

7.1 样品制备

称取 $5\ \text{g}$ 试样,精确至 $0.01\ \text{g}$,置于 $50\ \text{mL}$ 离心管中,加入 $20\ \text{g}$ 无水硫酸钠(4.5)和 $20\ \text{mL}$ 乙腈(4.1),均质 $2\ \text{min}$,以 $3\ 000\ \text{r/min}$ 离心 $3\ \text{min}$ 。上清液倒入 $100\ \text{mL}$ 鸡心瓶中,残渣再加入 $20\ \text{mL}$ 乙腈,重复上述操作一次。合并提取液,向鸡心瓶中加入 $10\ \text{mL}$ 异丙醇(4.2),用旋转蒸发器(5.3)于 50°C 水浴蒸干,准确加入 $1\ \text{mL}$ 流动相(4.6)和 $1\ \text{mL}$ 正己烷(4.3)溶解残渣。转移至 $5\ \text{mL}$ 离心管中,涡旋 $1\ \text{min}$,以 $3\ 000\ \text{r/min}$ 离心 $3\ \text{min}$,吸取上层正己烷弃去,再加入 $1\ \text{mL}$ 正己烷,重复上述步骤,直至下层水相变成透明液体。按上述操作步骤制备样品空白提取液。取下层清液,过 $0.2\ \mu\text{m}$ 滤膜(4.10)后,用液相色谱-串联质谱仪测定。

7.2 色谱测定

7.2.1 液相色谱条件

- 色谱柱:Lichrospher 100 RP-18, $5\ \mu\text{m}$, $250\ \text{mm}\times 4.6\ \text{mm}$ (内径)或相当者;
- 流动相:乙腈+ $0.01\ \text{mol/L}$ 乙酸铵溶液(12+88);
- 流速: $0.8\ \text{mL/min}$;
- 柱温: 35°C ;
- 进样量: $40\ \mu\text{L}$;
- 分流比:1:3。

7.2.2 质谱条件

- 离子源:电喷雾离子源;
- 扫描方式:正离子扫描;
- 检测方式:多反应监测;

- d) 电喷雾电压:5 500 V;
 e) 雾化气压力:0.076 MPa;
 f) 气帘气压力:0.069 MPa;
 g) 辅助气流速:6 L/min;
 h) 离子源温度:350℃;
 i) 定性离子对、定量离子对、碰撞气能量和去簇电压见表 1。

表 1 十六种磺胺的定性离子对、定量离子对、碰撞气能量和去簇电压

中文名称	英文名称	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	碰撞气能量/ V	去簇电压/ V
磺胺醋酸	sulfacetamide	215/156	215/156	18	40
		215/108		28	45
磺胺甲噻二唑	sulfamethizole	271/156	271/156	20	50
		271/107		32	50
磺胺二甲异噻唑	sulfisoxazole	268/156	268/156	20	45
		268/113		23	45
磺胺氯吡嗪	sulfachloropyridazine	285/156	285/156	23	50
		285/108		35	50
磺胺嘧啶	sulfadiazine	251/156	251/156	23	55
		251/185		27	50
磺胺甲基异噻唑	sulfamethoxazole	254/156	254/156	23	50
		254/147		22	45
磺胺噻唑	sulfathiazole	256/156	256/156	22	55
		256/107		32	47
磺胺-6-甲氧嘧啶	sulfamonomethoxine	281/156	281/156	25	65
		281/215		25	50
磺胺甲基嘧啶	sulfamerazine	265/156	265/156	25	50
		265/172		24	60
磺胺邻二甲氧嘧啶	sulfadoxin	311/156	311/156	31	70
		311/108		35	55
磺胺吡啶	sulfapyridine	250/156	250/156	25	50
		250/184		25	60
磺胺对甲氧嘧啶	sulfameter	281/156	281/156	25	65
		281/215		25	50
磺胺甲氧吡嗪	sulfamethoxypyridazine	281/156	281/156	25	65
		281/215		25	50
磺胺二甲嘧啶	sulfamethazine	279/156	279/156	22	55
		279/204		20	60
磺胺苯吡唑	sulfaphenazole	315/156	315/156	32	55
		315/160		35	55
磺胺间二甲氧嘧啶	sulfadimethoxine	311/156	311/156	31	70
		311/218		27	70

7.2.3 液相色谱-串联质谱测定

用混合标准工作溶液(4.9)分别进样,以工作溶液浓度(ng/mL)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线,用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中十六种磺胺的响应值均应在仪器测定的线性范围内。在上述色谱条件和质谱条件下,十六种磺胺的参考保留时间见表2。十六种磺胺混合标准总离子流图参见图 A.1 和图 A.2。

表2 十六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
磺胺醋酰	2.61	磺胺甲基嘧啶	9.93
磺胺甲噁二唑	4.54	磺胺邻二甲氧嘧啶	11.29
磺胺二甲异噁唑	4.91	磺胺吡啶	11.62
磺胺嘧啶	5.20	磺胺对甲氧嘧啶	12.66
磺胺氯吡嗪	6.54	磺胺甲氧吡嗪	17.28
磺胺甲基异噁唑	8.41	磺胺二甲嘧啶	17.95
磺胺噻唑	9.13	磺胺苯吡唑	22.29
磺胺-6-甲氧嘧啶	9.48	磺胺间二甲氧嘧啶	28.97

7.3 平行试验

按以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.4 空白试验

除不称取样品外,均按上述步骤进行。

8 结果计算

结果按式(1)计算:

$$X = c \times \frac{V}{m} \times \frac{1\ 000}{1\ 000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X——试样中被测组分残留量,单位为微克每千克(μg/kg);

c——从标准工作曲线得到的被测组分溶液浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V——试样溶液定容体积,单位为毫升(mL);

m——试样溶液所代表试样的质量,单位为克(g)。

注:计算结果应扣除空白值。

9 精密度

本标准的精密度数据是按照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 的规定确定的,其重复性和再现性的值以 95%的可信度来计算。

9.1 重复性

在重复性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 r,畜禽肉中十六种磺胺含量范围及重复性方程见表 3。

表 3 含量范围及重复性和再现性方程

药物名称	含量范围/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	重复性限 r	再现性限 R
磺胺醋酰	5.0~100.0	$\lg r=0.833\ 2\lg m-0.890\ 8$	$\lg R=0.886\ 7\lg m-0.473\ 6$
磺胺甲噻二唑	2.5~50.0	$\lg r=1.148\ 2\lg m-1.206\ 2$	$\lg R=0.872\ 0\lg m-0.671\ 9$
磺胺二甲异噻唑	5.0~100.0	$\lg r=0.916\ 9\lg m-0.949\ 8$	$\lg R=0.972\ 1\lg m-0.764\ 8$
磺胺氯哒嗪	5.0~100.0	$\lg r=1.037\ 0\lg m-1.104\ 0$	$\lg R=0.762\ 9\lg m-0.481\ 1$
磺胺嘧啶	5.0~100.0	$\lg r=1.006\ 6\lg m-1.096\ 7$	$\lg R=0.862\ 6\lg m-0.707\ 7$
磺胺甲基异噻唑	5.0~100.0	$\lg r=1.003\ 9\lg m-1.102\ 0$	$\lg R=0.766\ 9\lg m-0.472\ 5$
磺胺噻唑	10.0~200.0	$\lg r=0.895\ 8\lg m-0.875\ 4$	$\lg R=0.779\ 2\lg m-0.513\ 7$
磺胺-6-甲氧嘧啶	5.0~100.0	$\lg r=0.815\ 6\lg m-0.752\ 3$	$\lg R=0.842\ 2\lg m-0.613\ 9$
磺胺甲基嘧啶	5.0~100.0	$\lg r=1.246\ 8\lg m-1.441\ 5$	$\lg R=0.916\ 9\lg m-0.702\ 4$
磺胺邻二甲氧嘧啶	5.0~100.0	$\lg r=1.184\ 8\lg m-1.413\ 1$	$\lg R=0.886\ 9\lg m-0.694\ 4$
磺胺吡啶	5.0~100.0	$\lg r=0.967\ 2\lg m-1.026\ 0$	$\lg R=0.855\ 1\lg m-0.671\ 6$
磺胺对甲氧嘧啶	20.0~400.0	$\lg r=0.778\ 9\lg m-0.584\ 2$	$\lg R=0.788\ 0\lg m-0.460\ 2$
磺胺甲氧哒嗪	10.0~200.0	$\lg r=0.817\ 3\lg m-0.822\ 5$	$\lg R=0.738\ 5\lg m-0.449\ 8$
磺胺二甲嘧啶	20.0~400.0	$\lg r=0.970\ 2\lg m-0.997\ 0$	$\lg R=0.855\ 4\lg m-0.589\ 2$
磺胺苯吡唑	30.0~600.0	$\lg r=1.083\ 9\lg m-1.199\ 4$	$\lg R=1.043\ 1\lg m-0.823\ 3$
磺胺间二甲氧嘧啶	10.0~200.0	$\lg r=1.069\ 7\lg m-1.302\ 0$	$\lg R=0.763\ 7\lg m-0.421\ 8$

注： m 为两次测定值的算术平均值。

如果差值超过重复性限 r , 应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.2 再现性

在再现性条件下, 获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R , 畜禽肉中十六种磺胺的含量范围及再现性方程见表 3。

附录 A
(资料性附录)
标准物质总离子流图

A.1 十一种磺胺混合标准物质总离子流图,见图 A.1。

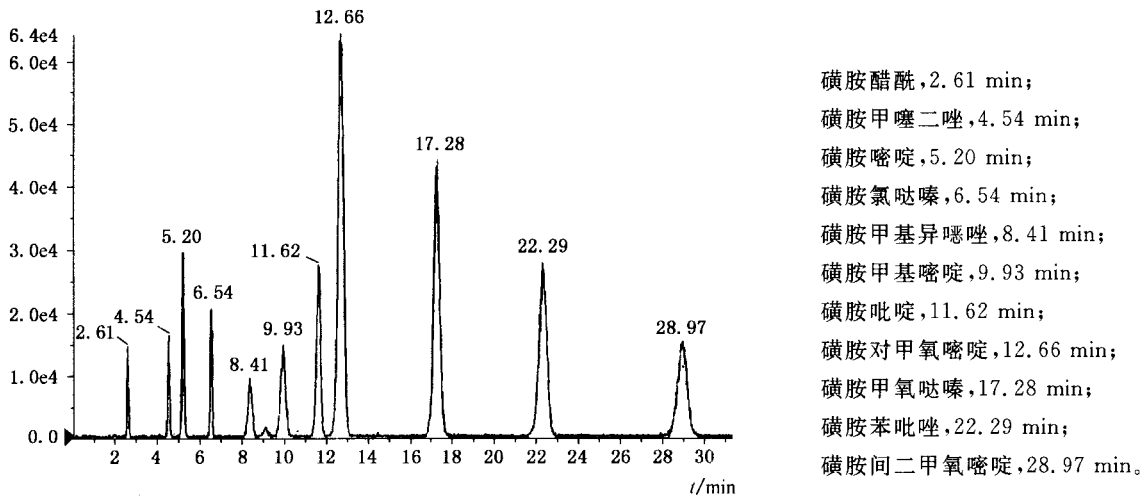


图 A.1 十一种磺胺混合标准物质总离子流图

A.2 五种磺胺混合标准物质总离子流图,见图 A.2。

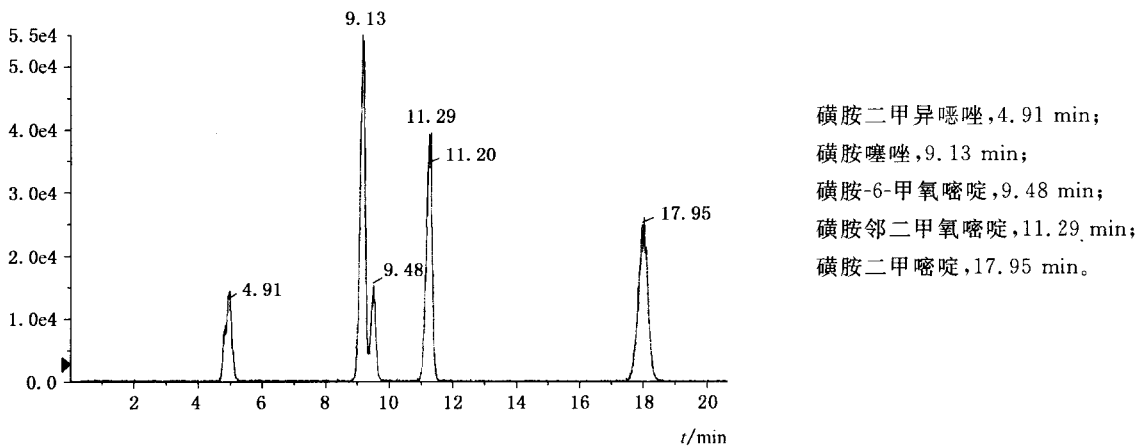


图 A.2 五种磺胺混合标准物质总离子流图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

本方法中十六种磺胺添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 十六种磺胺添加浓度及其平均回收率的试验数据

药 物 名 称	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/(%)
磺胺醋酰	5.0	77.5
	10.0	96.6
	50.0	81.6
	100.0	82.5
磺胺甲噻二唑	2.5	92.8
	5.0	87.5
	25.0	93.6
	50.0	86.0
磺胺嘧啶	5.0	85.5
	10.0	87.3
	50.0	85.6
	100.0	86.2
磺胺氯吡嗪	5.0	95.3
	10.0	91.3
	50.0	88.0
	100.0	82.0
磺胺甲基异噻唑	5.0	85.2
	10.0	86.8
	50.0	85.1
	100.0	83.0
磺胺甲基嘧啶	5.0	85.7
	10.0	88.1
	50.0	88.8
	100.0	88.7
磺胺吡啶	5.0	92.0
	10.0	88.2
	50.0	85.0
	100.0	79.7
磺胺对甲氧嘧啶	20.0	91.6
	40.0	90.1
	200.0	93.2
	400.0	93.2

表 B.1(续)

药物名称	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/(%)
磺胺甲氧嘧啶	10.0	92.6
	20.0	87.4
	100.0	88.5
	200.0	78.2
磺胺苯吡唑	30.0	83.0
	60.0	82.5
	300.0	84.2
	600.0	78.3
磺胺间二甲氧嘧啶	10.0	83.8
	20.0	86.5
	100.0	84.2
	200.0	78.3
磺胺二甲异噻唑	5.0	81.7
	10.0	76.4
	50.0	75.4
	100.0	84.4
磺胺-6-甲氧嘧啶	5.0	92.9
	10.0	86.9
	50.0	88.9
	100.0	86.8
磺胺噻唑	10.0	84.0
	20.0	83.4
	100.0	84.7
	200.0	81.8
磺胺邻二甲氧嘧啶	5.0	97.3
	10.0	88.8
	50.0	92.9
	100.0	93.9
磺胺二甲嘧啶	20.0	90.8
	40.0	96.9
	200.0	90.9
	400.0	91.3