

GB 29694-2013 动物性食品中磺胺间甲氧嘧啶的测定应用

来源与性质：磺胺间甲氧嘧啶是磺胺药中抗菌作用最强的药物之一，化学式 $C_{11}H_{12}N_4O_3S$ 。外观为白色或类白色的结晶性粉末，无臭、几乎无味，遇光色渐变暗。本品在丙酮中略溶，在乙醇中微溶，在水中不溶，在稀盐酸或氢氧化钠度液中易溶。

应用领域：磺胺类药物为人工合成的抗菌药。磺胺类药物作为广谱抗菌药已有 70 年的历史，至今已合成 10000 多种磺胺类衍生物，其中 40 多种应用于人体和兽药。除了治疗敏感菌所致传染病，传染性脑膜炎、痢疾、弓形体病等之外，也常用于禽类的球虫病、白冠病、鼻炎类疾病；猪的弓形体、链球菌、附红细胞体等常见疾病的治疗。磺胺类药物具有抗菌面广，药效稳定，价格不贵等特点，作为兽药被频繁使用，甚至作为饲料添加剂用来促生长或增产。人在食用含残留的磺胺类药物家禽时，可能引起过敏反应，耐药性，胆红素病发病率的增加，乳儿粒细胞减少及溶血性贫血症等，长效磺胺类药物还可引起变形血红蛋白症，磺胺类药物对人体可能还会产生致畸、致癌作用。农业部将把畜产品磺胺类兽药残留作为重点监控目标。

《GB 29694-2013 食品安全国家标准 动物性食品中 13 种磺胺类药物多残留的测定 高效液相色谱法》于 2013 年 9 月 6 日发布，2014 年 1 月 1 日实施，试料中残留的磺胺类药物，用乙酸乙酯提取，0.1 mol/L 盐酸溶液转换溶剂，正己烷除脂，MCX 柱净化，高效液相色谱-紫外检测法测定，外标法定量。

曼哈格参考《GB 29694-2013 食品安全国家标准 动物性食品中 13 种磺胺类药物多残留的测定 高效液相色谱法》，重现了国标猪肉中磺胺间甲氧嘧啶的检测方法，采用 Bepure25692-25mg 猪肉磺胺间甲氧嘧啶标准品，BESEP SPE COLUMN P-SCX (MCX) 固相萃取柱净化样品，C18 色谱柱分离，高效液相色谱仪检测，外标法定量。

一、标准物质

纯品：标准物质/磺胺间甲氧嘧啶

货号：BePure-25692

网站链接：<https://item.bepurecrm.com/info/170017594.html>

https://list.bepurecrm.com/list_goods/0/1.html?keyword=Bepure25692-25mg

二、前处理萃取柱

混合型强阳离子交换反相柱：BESEP SPE COLUMN P-SCX(MCX) 60mg 3ml 50pk

货号：77715

网站链接：<https://item.bepurecrm.com/info/170033143.html>

1 标准溶液配制

标准系列工作液：100 $\mu\text{g/mL}$ 磺胺间甲氧嘧啶

混合标准贮备液：精密称取磺胺间甲氧嘧啶标准品各(Bepure25692-25mg)10 mg，于 100 mL 量瓶中，用乙腈溶解并稀释至刻度，配制成浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的磺胺类药物混合标准贮备液。

10 $\mu\text{g/mL}$ 磺胺间甲氧嘧啶混合标准工作液：精密量取 100 $\mu\text{g/mL}$ 磺胺间甲氧嘧啶混合标准贮备液 5.0 mL，于 50 mL 量瓶中，用乙腈稀释至刻度，配制成浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的磺胺类药物混合标准工作液。 -20 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期 6 个月。

精密量取 10 $\mu\text{g/mL}$ 磺胺间甲氧嘧啶混合标准工作液适量，用 0.1%甲酸乙腈溶液稀释，配制成浓度为 10、50、100、250、500、2500 和 5000 $\mu\text{g/L}$ 的系列混合标准溶液，供高效液相色谱测定。

2 提取

称取试料 4 $\text{g} \pm 0.05 \text{ g}$ ，于 50 mL 聚四氟乙烯离心管中，加乙酸乙酯 20 mL，涡动 2 min, 4000 r/min 离心 5 min，取上清液于 100 mL 鸡心瓶中，残渣中加乙酸乙酯 20 mL，重复提取一次，合并两次提取液。

鸡心瓶中加入 0.1 mol/L 盐酸溶液 4 mL，于 40 $^{\circ}\text{C}$ 下旋转蒸发浓缩至少于 3 mL，转至 10 mL 离心管中。用 0.1 mol/L 盐酸溶液 2 mL 洗鸡心瓶，转至同一离心管中。再用正己烷 3 mL 洗鸡心瓶，将正己烷转至同一离心管中，涡旋混合 30s, 3000 r/min 离心 5 min, 弃正己烷。再次用正己烷 3 mL 洗鸡心瓶，转全同一离心管中，涡旋混合 30 s, 3000 r/min 离心 5 min, 弃正己烷，取下层液备用。

3 净化

BESEP SPE COLUMN P-SAX(MAX) 60mg 3ml 50pk

活化:	MCX 柱依次用甲醇 2 mL 和 0.1 mol/L 盐酸溶液 2 mL 活化
上样:	取备用液过柱, 控制流速 1 mL/min
淋洗:	依次用 0.1 mol/L 盐酸溶液 1 mL 和 50 %甲醇乙腈溶液 2 mL 淋洗
洗脱:	用洗脱液 6 mL 洗脱
复溶:	收集洗脱液, 于 40℃氮气吹近干, 加 0.1%甲酸乙腈溶液 1.0 mL 溶解残余物, 滤膜过滤, 供高效液相色谱测定。

三、仪器检测方法

色谱柱:C18 250mm*4.6mm*5 μ m

流动相: 0.1%甲酸+乙腈, 梯度洗脱见表 1

进样量:100 μ L

柱温:40℃

检测波长:270 nm

流速: 1mL/min

表 1 流动相梯度洗脱条件

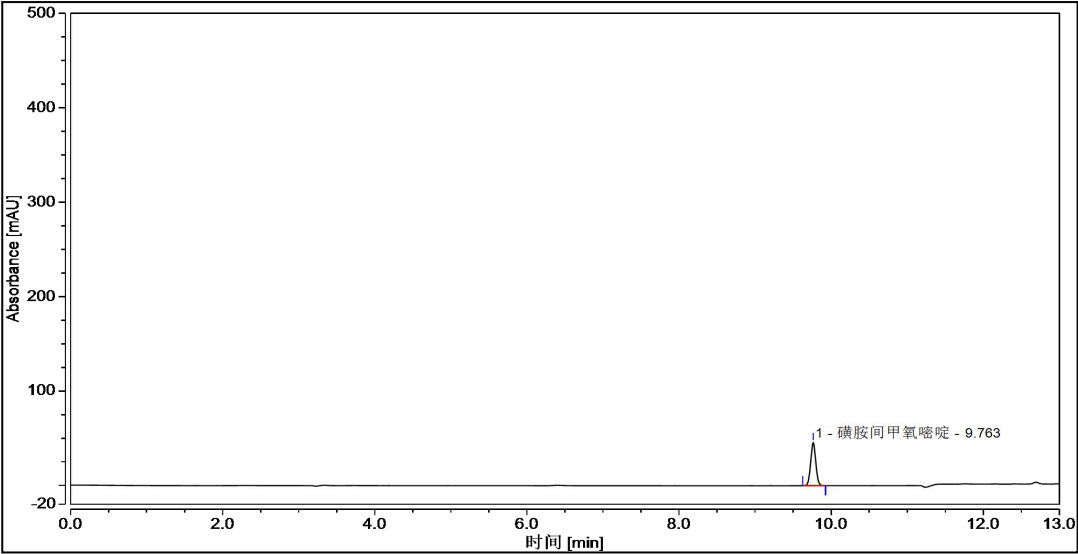
时间 min	0.1%甲酸 %	乙腈 %
0.0	83	17
5.0	83	17
10.0	80	20
22.3	60	40
22.4	10	90
30.0	10	90
31.0	83	17
48.0	83	17

四、检测结果

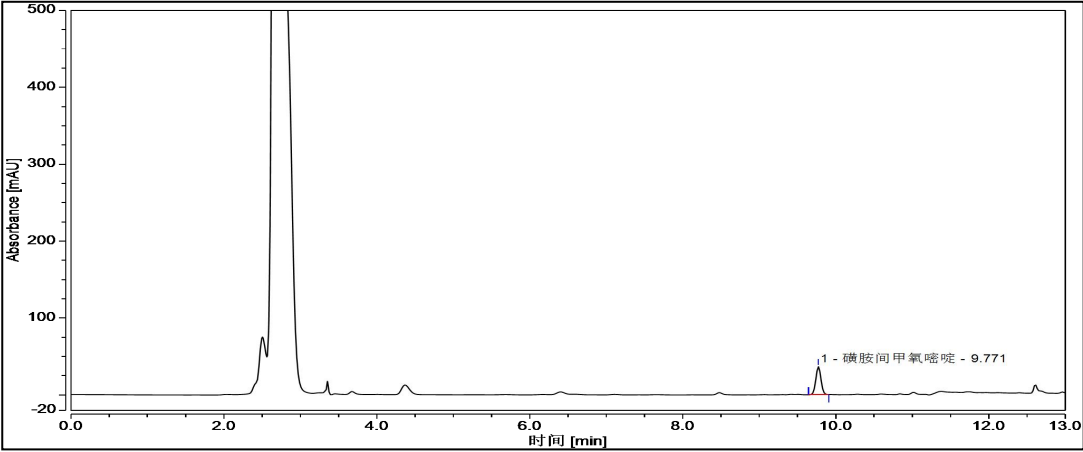
检测项目	样品编号	称样量 m (g)		仪器读数 ρ (μg/L)	检测结果 X (μg/kg)	检测结果 X (μg/kg) 以干样计	平均值 (μg/kg)
磺胺间 甲氧嘧 啉	BQC13411256 92-1	4.000		417.2094	104	417	423
	BQC13411256 92-2	4.000		428.0093	107	428	
加标回收	样品编号	添加浓度	称样	仪器读数 ρ (μg/L)	检测结果 X (μg/kg)	检测结果 X	回收率 (%)

		($\mu\text{g/kg}$)	量 m(g)			($\mu\text{g/kg}$)以干样计	
	BQC1341125692	150	4.000	1012.6584344	253	1013	103
备注	质控样开启真空包装袋后，称取 1.0g 猪肉冻干粉样品，需加入 3.0g 的蒸馏水充分复水 30min，混合后的样品为肉糜状，即为复原样品。即称取 1.0g 的猪肉冻干粉样品经过复原后相当于 4.0g 的肉糜样品。						

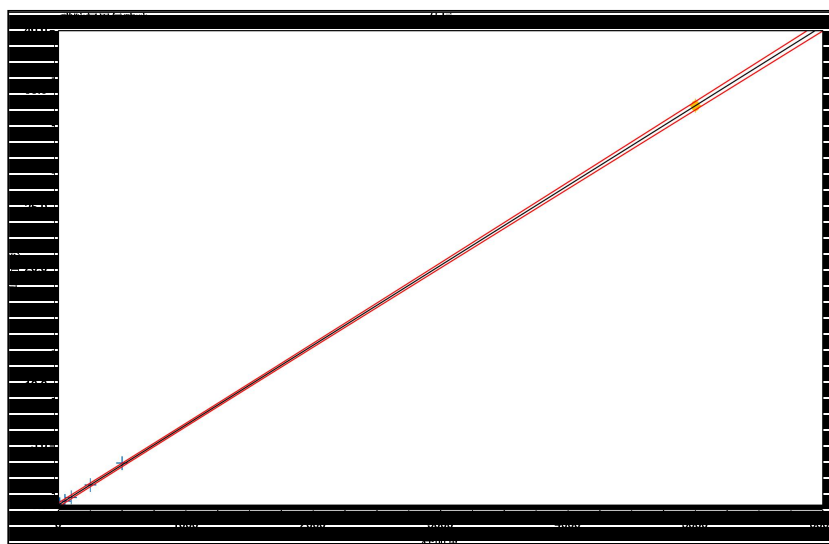
五、谱图



磺胺间甲氧嘧啶标准溶液（500ng/mL）液相色谱图



猪肉中磺胺间甲氧嘧啶液相色谱图



磺胺间甲氧嘧啶标准曲线图($R^2 = 1.0000$, 截距: 0.0327, 斜率 0.0067)

五、实验注意事项

前处理实验过程中加入正己烷除脂，极其容易乳化，可用手轻轻振摇即可。