



中华人民共和国国家标准

GB/T 18932.17—2003

蜂蜜中 16 种磺胺残留量的测定方法 液相色谱-串联质谱法

Method for the determination of sixteen sulfonamides residues in honey—
LC-MS-MS method

2003-12-26 发布

2004-06-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

GB/T 18932 的本部分修改采用加拿大标准 ACC-056-V2.0《蜂蜜中磺胺残留量测定方法——高效液相色谱-质谱测定法》，修改的主要内容是：

- 测定品种有所调整；
- 增加了苯磺酸盐阳离子交换柱和 Oasis HLB 柱净化步骤；
- 使用的液相色谱柱和流动相不同；
- 单四级杆质谱检测器换成串联四级杆质谱检测器。

本部分的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本部分由中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局提出。

本部分由中华全国供销合作总社归口。

本部分起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：庞国芳、曹彦忠、张进杰、贾光群、范春林、李学民、刘永明、石玉秋。

本部分系首次发布的国家标准。

蜂蜜中 16 种磺胺残留量的测定方法

液相色谱-串联质谱法

1 范围

GB/T 18932 的本部分规定了蜂蜜中 16 种磺胺残留量液相色谱-串联质谱测定方法。

本部分适用于蜂蜜中 16 种磺胺残留量的测定。

本部分的方法检出限：磺胺甲噻二唑为 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ ；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、磺胺氯噻嗪、磺胺-6-甲氧嘧啶、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺甲基异噻唑为 $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ ；磺胺噻唑、磺胺甲氧噻嗪、磺胺间二甲氧嘧啶为 $4.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ ；磺胺甲氧嘧啶、磺胺二甲嘧啶为 $8.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ ；磺胺苯吡唑为 $12.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 GB/T 18932 的本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注明日期的引用文件，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部分，然而，鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本部分。

GB/T 6379 测试方法的精密度 通过实验室间实验确定标准测试方法的重复性和再现性 (GB/T 6379—1986, neq ISO 5725:1981)

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

蜂蜜中磺胺类药物残留用磷酸溶液 ($\text{pH}=2$) 提取，过滤后，经阳离子交换柱和 Oasis HLB 或相当的固相萃取柱净化，用甲醇洗脱并蒸干，残渣用乙腈+乙酸铵溶液 ($0.1 \text{ mol}/\text{L}$) 溶解。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 甲醇：色谱纯。
- 4.2 乙腈：色谱纯。
- 4.3 磷酸：优级纯。
- 4.4 庚烷磺酸钠 ($\text{C}_7\text{H}_{15}\text{SO}_3\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$)：色谱纯。
- 4.5 乙酸铵。
- 4.6 磷酸二氢钾：优级纯。
- 4.7 磷酸氢二钾：优级纯。
- 4.8 磷酸溶液： $\text{pH}=2$ 。1 000 mL 水中加入 1 mL 磷酸 (4.3)，在 pH 计上再滴加磷酸以调节溶液 $\text{pH}=2$ 。
- 4.9 磷酸盐缓冲溶液： $0.2 \text{ mol}/\text{L}$ ， $\text{pH}=8$ 。分别称取 1.05 g 磷酸二氢钾 (4.6) 和 33.46 g 磷酸氢二钾 (4.7)，用水溶解，定容至 1 000 mL。
- 4.10 庚烷磺酸钠溶液： $0.5 \text{ mol}/\text{L}$ 。称取 11 g 庚烷磺酸钠 (4.4)，用水溶解，定容至 100 mL。

- 4.11 阳离子交换柱:苯磺酸型,500 mg,3 mL。用前分别用 5 mL 甲醇和 10 mL 水处理。保持柱体湿润。
- 4.12 Oasis HLB 柱或相当者:60 mg,3 mL。用前分别用 3 mL 甲醇和 6 mL 水处理。保持柱体湿润。
- 4.13 磺胺醋酸、磺胺甲噻二唑、磺胺二甲异噻唑、磺胺氯哒唑、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、磺胺甲氧哒唑、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 $\geq 99\%$ 。
- 4.14 16 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℃ 保存可使用两个月。
- 4.15 磺胺混合标准工作溶液: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)的混合标准工作溶液,混合标准工作溶液在 4℃ 保存,可使用一周。

5 仪器

- 5.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源。
- 5.2 固相萃取真空装置。
- 5.3 旋转蒸发器。
- 5.4 液体混匀器。
- 5.5 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g 各一台。
- 5.6 真空泵。
- 5.7 移液器:1 mL,2 mL。
- 5.8 鸡心瓶:150 mL。
- 5.9 样品瓶:2 mL,带聚四氟乙烯旋盖。
- 5.10 玻璃贮液器:50 mL。
- 5.11 pH 计:测量精度 ± 0.02 。

6 试样制备与保存

6.1 试样的制备

对无结晶的实验室样品,将其搅拌均匀。对有结晶的样品,在密闭情况下,置于不超过 60℃ 的水浴中温热,振荡,待样品全部融化后搅匀,冷却至室温。分出 0.5 kg 作为试样。制备好的试样置于样品瓶中,密封,并做上标记。

6.2 试样的保存

将试样于常温下保存。

7 测定步骤

7.1 提取

称取 5 g 试样,精确至 0.01g。置于 150 mL 三角瓶中,加入 25 mL 磷酸溶液(4.8),于液体混匀器上快速混匀 1 min,使试样完全溶解。

7.2 净化

将塞有玻璃棉塞的玻璃贮液器连到苯磺酸型阳离子交换柱(4.11)上,把样液(7.1)倒入玻璃贮液器中,在减压情况下使样液以小于等于 3 mL/min 的流速通过苯磺酸型阳离子交换柱,待样液完全流出后,分别用 5 mL 磷酸溶液和 5 mL 水洗柱,弃去全部流出液。最后用 40 mL 磷酸盐缓冲溶液(4.9)洗脱,收集洗脱液于 100 mL 平底烧瓶中。在洗脱液中加入 1.5 mL 庚烷磺酸钠溶液(4.10),然后用磷酸(4.3)调至 pH=6。

按上述方法将调好 pH 的洗脱液过 Oasis HLB 或相当的固相萃取柱(4.12),调节流速小于等于

3 mL/min,待洗脱液完全流出后,再用3 mL水洗柱,弃去全部流出液。在65 kPa负压下,减压抽干5 min,最后用10 mL甲醇(4.1)洗脱,洗脱液收集于150 mL鸡心瓶中。用旋转蒸发器于45℃水浴中减压蒸发至干。准确加入1.0 mL流动相溶解残渣,供液相色谱-串联质谱仪测定。

7.3 色谱测定

7.3.1 液相色谱条件

- 色谱柱: Lichrospher®100 RP-18 5 μm 250 mm \times 4.6 mm(i.d)或相当者;
- 流动相: 乙腈+乙酸铵溶液(0.01 mol/L)(12+88);
- 流速: 0.8 mL/min;
- 柱温: 35℃;
- 进样量: 40 μL ;
- 分流比: 1:3。

7.3.2 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: 多反应检测;
- 电喷雾电压: 5 500 V;
- 雾化气压力: 0.076 MPa;
- 气帘气压力: 0.069 MPa;
- 辅助气流速: 6 L/min;
- 离子源温度: 350℃;
- 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 16种磺胺的定性离子对、定量离子对、碰撞气能量和去簇电压

名称	定性离子对/(m/z)	定量离子对/(m/z)	碰撞气能量/V	去簇电压/V
磺胺醋酰	215/156	215/156	18	40
	215/108		28	45
磺胺甲噻二唑	271/156	271/156	20	50
	271/107		32	50
磺胺二甲异噻唑	268/156	268/156	20	45
	268/113		23	45
磺胺氯砒喹	285/156	285/156	23	50
	285/108		35	50
磺胺嘧啶	251/156	251/156	23	55
	251/185		27	50
磺胺甲基异噻唑	254/156	254/156	23	50
	254/147		22	45
磺胺噻唑	256/156	256/156	22	55
	256/107		32	47
磺胺-6-甲氧嘧啶	281/156	281/156	25	65
	281/215		25	50

表 1 (续)

名称	定性离子对/(m/z)	定量离子对/(m/z)	碰撞气能量/V	去簇电压/V
磺胺甲基嘧啶	265/156	265/156	25	50
	265/172		24	60
磺胺邻二甲氧嘧啶	311/156	311/156	31	70
	311/108		35	55
磺胺吡啶	250/156	250/156	25	50
	250/184		25	60
磺胺对甲氧嘧啶	281/156	281/156	25	65
	281/215		25	50
磺胺甲氧哒嗪	281/156	281/156	25	65
	281/215		25	50
磺胺二甲嘧啶	279/156	279/156	22	55
	279/204		20	60
磺胺苯吡唑	315/156	315/156	32	55
	315/160		35	55
磺胺间二甲氧嘧啶	311/156	311/156	31	70
	311/218		27	70

7.3.3 液相色谱-串联质谱测定

用混合标准工作溶液(4.15)分别进样,以峰面积为纵坐标,工作溶液浓度(ng/mL)为横坐标,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 16 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,16 种磺胺的参考保留时间见表 2。16 种磺胺的标准总离子流图参见附录 A 中的图 A.1、图 A.2。

表 2 16 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
磺胺酞酰	2.61	磺胺甲基嘧啶	9.93
磺胺甲噻二唑	4.54	磺胺邻二甲氧嘧啶	11.29
磺胺二甲异噻唑	4.91	磺胺吡啶	11.62
磺胺嘧啶	5.20	磺胺对甲氧嘧啶	12.66
磺胺氯哒嗪	6.54	磺胺甲氧哒嗪	17.28
磺胺甲基异噻唑	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

7.4 平行试验

按以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.5 空白试验

除不称取样品外,均按上述步骤进行。

8 结果计算

试样中每种磺胺残留量利用数据处理系统计算或按式(1)计算:

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

式中:

X ——试样中被测组分残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

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

本部分的精密度数据是按照 GB/T 6379 的规定确定的,其重复性和再现性的值是以 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),蜂蜜中 16 种磺胺含量范围及重复性方程见表 3。

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),蜂蜜中 16 种磺胺的含量范围及再现性方程见表 3。

表 3 含量范围及重复性和再现性方程

名称	含量范围/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	重复性限 r	再现性限 R
磺胺酯酞	2.0~50.0	$\lg r = 0.9358 \lg m - 1.0259$	$\lg R = 0.1539 \lg m + 0.0561$
磺胺甲噻二唑	2.0~50.0	$\lg r = 1.0841 \lg m - 1.0704$	$\lg R = 1.0744 \lg m - 0.6765$
磺胺二甲异噻唑	2.0~50.0	$\lg r = 0.8428 \lg m - 0.8760$	$\lg R = 0.7392 \lg m - 0.5488$
磺胺氯哒嗪	2.0~50.0	$\lg r = 0.9705 \lg m - 1.0008$	$R = 0.1414 m + 0.2000$
磺胺嘧啶	2.0~50.0	$\lg r = 1.2712 \lg m - 1.2329$	$\lg R = 0.8401 \lg m - 0.5495$
磺胺甲异噻唑	2.0~50.0	$\lg r = 1.0624 \lg m - 1.0368$	$\lg R = 0.9819 \lg m - 0.7392$
磺胺噻唑	4.0~100.0	$\lg r = 1.0918 \lg m - 1.0852$	$\lg R = 0.9107 \lg m - 0.6442$
磺胺-6-甲氧嘧啶	2.0~50.0	$\lg r = 1.0931 \lg m - 1.1693$	$\lg R = 1.0980 \lg m - 0.8558$
磺胺甲基嘧啶	2.0~50.0	$\lg r = 1.1531 \lg m - 1.2676$	$\lg R = 0.7928 \lg m - 0.5102$
磺胺邻二甲氧嘧啶	2.0~50.0	$\lg r = 0.9147 \lg m - 0.8606$	$\lg R = 0.7911 \lg m - 0.4748$
磺胺吡啶	2.0~50.0	$\lg r = 0.8943 \lg m - 0.8190$	$\lg R = 0.8292 \lg m - 0.5530$
磺胺对甲氧嘧啶	8.0~200.0	$\lg r = 1.0755 \lg m - 1.0745$	$\lg R = 1.1364 \lg m - 0.8346$
磺胺甲氧哒嗪	4.0~100.0	$\lg r = 1.1270 \lg m - 1.1279$	$\lg R = 1.1291 \lg m - 0.8120$
磺胺二甲嘧啶	8.0~200.0	$\lg r = 1.0379 \lg m - 1.0642$	$\lg R = 1.0498 \lg m - 0.7143$
磺胺苯吡唑	12.0~300.0	$\lg r = 1.1421 \lg m - 1.2258$	$\lg R = 1.0512 \lg m - 0.8053$
磺胺间二甲氧嘧啶	4.0~100.0	$\lg r = 0.8598 \lg m - 0.8796$	$\lg R = 0.9760 \lg m - 0.6733$

注: m 为两次测定值的平均值。

附录 A
(资料性附录)
标准物质总离子流图

A.1 11种磺胺标准物质总离子流图,见图 A.1。

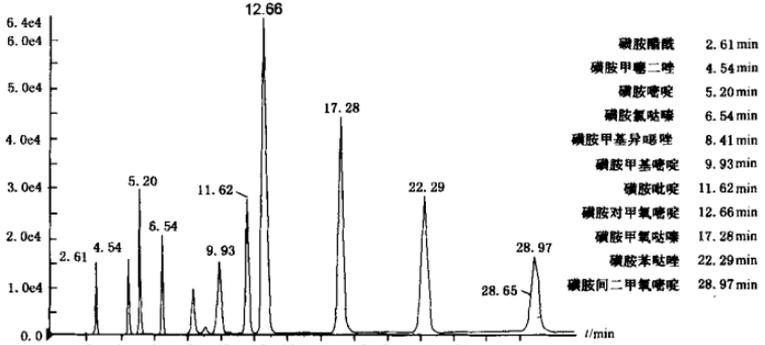


图 A.1

A.2 5种磺胺标准物质总离子流图,见图 A.2。

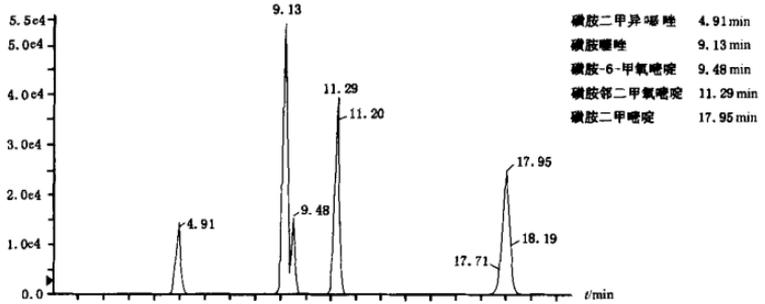


图 A.2

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

本方法中 16 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

药物名称	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/(%)
磺胺醋酰	2.0	77.1
	5.0	77.7
	10.0	77.3
	50.0	78.7
磺胺甲噻二唑	1.0	78.7
	2.5	80.0
	5.0	79.3
	25.0	77.9
磺胺嘧啶	2.0	84.7
	5.0	86.6
	10.0	86.4
	50.0	77.5
磺胺氯哒嗪	2.0	82.1
	5.0	85.7
	10.0	77.2
	50.0	78.6
磺胺甲基异噻唑	2.0	83.0
	5.0	87.8
	10.0	97.8
	50.0	80.5
磺胺甲基噻唑	2.0	81.8
	5.0	83.3
	10.0	89.4
	50.0	81.6
磺胺吡啶	2.0	87.9
	5.0	85.0
	10.0	84.1
	50.0	77.9

表 B.1 (续)

药物名称	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/(%)
磺胺对甲氧嘧啶	8.0	91.3
	20.0	84.2
	40.0	88.9
	200.0	76.4
磺胺甲氧哒嗪	4.0	89.8
	10.0	92.0
	20.0	80.2
	100.0	75.2
磺胺苯吡唑	12.0	85.0
	30.0	83.8
	60.0	86.4
	300.0	77.6
磺胺间二甲氧嘧啶	4.0	90.4
	10.0	81.9
	20.0	89.8
	100.0	74.4
磺胺二甲异噻唑	2.0	90.2
	5.0	75.5
	10.0	76.9
	50.0	87.5
磺胺-6-甲氧嘧啶	2.0	95.6
	5.0	88.9
	10.0	94.8
	50.0	102.5
磺胺噻唑	4.0	85.3
	10.0	70.9
	20.0	76.5
	100.0	86.7
磺胺邻二甲氧嘧啶	2.0	97.4
	5.0	86.5
	10.0	92.1
	50.0	95.4
磺胺二甲噻唑	8.0	95.0
	20.0	82.4
	40.0	92.4
	200.0	94.8