出口肉及肉制品中磺胺甲氧吡嗪残留量检验方法

thod for the determination of sulfamethoxypyridazine residues in meats and meat products for export

SN 0 689—1997

前言

本标准是根据GB/T 1.1—19936《标准化工作导则 第1单元：标准的起草与表述规则 第1部分：标准编写的基本规定》及SN/T 0001—1995《出口商品中农药、兽药残留量及生物毒素检验方法标准编写的基本规定》的要求而进行编写的。其中测定方法是等同采用了美国农业部食品安全署《肉类及其制品化学分析检验手册》中所载的“动物组织中磺胺残留量的薄层色谱法”中磺胺甲氧吡嗪残留量分析方法。技术内容与原方法相同，经验证后，按规定格式要求作了编辑性修改。在标准中同时制定了抽样和制样方法。

测定低限是根据国际上对肉及肉制品中磺胺甲氧吡嗪残留量的最高限量和测定方法的灵敏度而制定的。

本标准的附录A为提示的附录。

本标准由中华人民共和国国家进出口商品检验局提出并归口。

本标准由中华人民共和国湖北进出口商品检验局负责起草。

本标准主要起草人：孙保国、胡小钟、任家其、卢康全。

本标准系首次发布的行业标准。

1 范围

本标准规定了出口肉及肉制品中磺胺甲氧吡嗪残留量检验的抽样、制样和薄层色谱测定方法。

本标准适用于出口牛肉中磺胺甲氧吡嗪残量的检验。

2 抽样和制样

2.1 检验批

以不超过2500件为一检验批。

同一检验批的商品应具有相同的特征，如包装、标记、产地、规格和等级等。

2.2 抽样数量

批量，件	最低抽样数，件
1～25	1
26～100	5
101～250	10
251～500	15
501～1000	17
1001～2500	20

2.3 抽样方法

按2.2规定的抽样件数，随机抽取，逐件开启。从每件内抽取一袋作为原始样品，其总量不少于2kg，放入清洁的容器内，加封后，标明标记并及时送交实验室。

如每件中无小包装或有小包装但每袋重量超过2kg者，则可用灭菌锋利刀在抽出的包件中，每件割取不少于100 g，混合后置于清洁容器内，作为混合原始样。混合原始样的重量不少于2kg。加封后，标明标记，及时送实验室。

2.4 试样制备

从原始样品中分取出1kg，充分绞碎混匀，分成两等份，分别装入清洁的容器内，作为试样，密封并标明标记。

2.5 试样保存

将试样于-18℃以下冷冻保存。

注：在抽样和制样的操作过程中，必须防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

3 测定方法

3.1 方法提要

试样中残留的磺胺甲氧吡嗪和添加的内标物(磺胺吡啶)用乙酸乙酯提取，然后液一液分配进入甘氨酸缓冲液(pH12.25)。将水相pH值调至5.25后，用正己烷抽提以去除杂质。然后用二氯甲烷提取。在二氯甲烷中加入二乙胺，以防被测物在蒸发过程中被氧化。将二氯甲烷蒸发至近干，残渣用甲醇溶解并定容。溶液供薄层色谱法测定，标准曲线法定量。

3.2 试剂和材料

除另有规定外，所用试剂均为分析纯，水为蒸馏水。

3.2.1 乙酸乙酯。

3.2.2 二氯甲烷。

3.2.3 正己烷。

3.2.4 三氯甲烷。

3.2.5 特丁醇。

3.2.6 甲醇。

3.2.7 丙酮。

3.2.8 浓盐酸：密度(ρ)约1.19g/mL。

3.2.9 氢氧化钠溶液：10 mol/L水溶液。

3.2.10 荧光胺溶液：30 mg荧光胺溶于250mL丙酮中，可用于8～9块展开板。

3.2.11 二乙胺。

3.2.12 展开溶剂：三氯甲烷—特丁醇(80+20)，当日新配。

3.2.13 甘氨酸缓冲液：0.2mol/L水溶液。使用前用10 mol/L氢氧化钠溶液调pH值达到12.25(本步骤需在使用前、在20℃室温的蒸气浴上进行)。

3.2.14 磷酸盐缓冲溶液：2mol/L水溶液。用2mol/L的磷酸二氢钾与2mol/L的磷酸氢二钾混合，得到pH为5.25的缓冲溶液。

3.2.15 盐酸(1.7mol/L)—磷酸盐缓冲溶液(2mol/L，pH5.25)：(1+1)。

3.2.16 磷酸盐缓冲溶液：0.20 mol/L。称取45.646g磷酸氢二钾($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)，溶于1000mL水中(溶液1)，另称取27.218g磷酸二氢钾，溶于1000mL水中(溶液2)。用溶液2调节溶液1至 pH为7.55±0.05(约80 mL溶液1加20 mL溶液2，混合成约100 mL pH 7.6的溶液)。

3.2.17 磷胺甲氧吡嗪标准品：纯度≥99%。

3.2.18 磷胺甲氧吡嗪标准储备液(1mg/mL)：准确称取100 mg磷胺甲氧吡嗪(精确至0.1mg)于100 mL容量瓶中，用丙酮溶解并定容后存放在聚乙烯瓶中，于-10℃保存可使用一个月。

3.2.19 内标储备液(1mg/mL)：准确称取100mg磷胺吡啶(精确至0.1mg)于100 mL容量瓶中，用丙酮溶解并定容后存放在聚乙烯瓶中，于-10℃保存可使用一个月。

3.2.20 磷胺甲氧吡嗪标准工作液(10μg/mL)：移取标准储备液1mL于100 mL容量瓶中，加pH 7.6的缓冲溶液至刻度。

3.2.21 内标工作液(10 μg/mL)：移取标准储备液1mL于100 mL容量瓶中，加pH 7.6的磷酸盐缓冲溶液(3.2.16)至刻度。

3.2.22 内标工作液(2.50μg/mL)：移取内标工作液(10μg/mL)25mL于100 mL容量瓶中，用pH 7.6的磷酸盐缓冲溶液(3.2.16)稀释至刻度。

3.2.23 标准溶液A：含5.00 μg/mL磷胺甲氧吡嗪和2.50μg/mL内标工作液。移取50 mL磷胺甲氧吡嗪标准工作液(10μg/mL)和25mL内标工作液(10μg/mL)于100mL，容量瓶中，用pH 7.6的磷酸盐缓冲溶液(3.2.16)稀释至刻度。

3.2.24 标准溶液B：含2.50μg/mL磷胺甲氧吡嗪和2.50μg/mL内标工作液。移取25mL标准溶液A于50 mL容量瓶中，用内标工作液(2.50 μg/mL)稀释至刻度。

3.2.25 标准溶液C：含1.25μg/mL磷胺甲氧吡嗪和2.50 μg/mL内标工作液。移取25mL标准溶液B于50 mL容量瓶中，用内标工作液(2.50μg/mL)稀释至刻度。

3.3 仪器和设备

3.3.1 高速离心机：6000 r/min。

3.3.2 pH计。

3.3.3 具塞离心管：50mL。

3.3.4 薄层展开槽。

3.3.5 微量注射器：10～100μL。

3.3.6 紫外灯箱。

3.3.7 调旋混匀器。

3.3.8 组织捣碎机。

3.3.9 卧式振荡器。

3.3.10 薄层色谱仪：配有荧光附件。

3.3.11 薄层色谱点样器。

3.3.12 多功能微量化样品处理仪，或相当者。

3.3.13 薄层板：高效硅胶板，10 cm×10 cm。使用前在100℃烘箱中活化1h。

3.4 测定步骤

3.4.1 提取

称取约2.5g试样(精确至0.1g)置于50 mL离心管中，加入100μL内标工作液(3.2.22)。另称取不含磺胺甲氧吡嗪的空白试样三份，分别加入磺胺甲氧吡嗪标准溶液A、B和C各100μL(相当于试样中添加磺胺甲氧吡嗪的量分别为0.2，0.1，0.05mg/kg)。静置15min后，加入25mL乙酸乙酯，搅拌1min，盖上螺旋盖，于卧式振荡器上以约250 r/min振荡20 min。于2500 r/min离心5min后，将上层清液转移到另一50 mL离心管中。弃去残渣。

3.4.2 净化

向上述离心管中加入2mL甘氨酸缓冲溶液(3.2.13)，振荡5min，于2500 r/min离心5min，除去上层有机层。再加2mL磷酸盐缓冲溶液(3.2.15)，使pH值达到5.25±0.1(必要时用氢氧化钠溶液(1.0 mol/L)或盐酸溶液(1.0 mol/L)调节pH)。

加5mL正己烷，振荡5min，于2500 r/min离心5min，弃去上层有机层。加入10 mL二氯甲烷，振荡5min，于2500 r/min离心5min(如有乳化时，于3500 r/min离心10 min)。将离心管倾斜，彻底吸除上层水相。注意清除界面处的油脂和杂物。如在水和有机相之间存在凝胶状物，不要除去，以免降低回收率。加10μL二乙胺至二氯甲烷中，于40℃氮气流下，蒸发至近干(切勿蒸干)。蒸发时当二氯甲烷液面降至5mL时，用约2mL二氯甲烷洗涤试管内壁；降至2.5mL时，再洗一次；降至1.0～1.5mL时，再洗一次。将残渣溶解在100 μL甲醇中，旋转混匀30 s，静置，使不溶物沉淀于试管底。溶液供测定用。

3.4.3 测定

3.4.3.1 薄层色谱扫描条件

a) 光源：氙灯；

b) 激发波长：410 nm；发射波长：410nm，或根据不同型号的仪器选择不同的滤光片；

c) 激发狭缝与发射狭缝：可根据斑点大小进行调节；

d) 检测方式：反射荧光；

e) 扫描方式：线性扫描。

3.4.3.2 薄层色谱测定

将点样器调至65℃，分别点20μL样液和加有磺胺甲氧吡嗪及内标物标准液的试液到薄层板上。

按下法进行点样：于距薄层板的底边约1.0～1.5cm的底线上，距左边约1cm处开始，每隔1 cm顺序点样：样液，标准液(0.10 mg/kg)，样液，样液，标准液(0.05mg/kg)，样液，样液，标准液(0.2mg/kg)，样液。共点六个样液。

用甲醇作展开剂，展开薄层板至前沿距甲醇液面达1cm时，取出薄层板置于烘箱(100℃)干燥1min。然后在盛有三氯甲烷—特丁醇(80+20)混合液的饱和展开槽中展开，至前沿距液面6cm处。取出，置于烘箱(100℃)干燥1min。

将层析板完全浸没于荧光胺溶液1～2s，然后置于室温暗处15～30 min后，在紫外灯下观测，测量各斑点的R_f值。在上述色谱条件下，磺胺甲氧吡嗪的R_f值约为0.83，磺胺吡啶的R_f值约为0.71。然后按3.4.3.1扫描条件进行薄层扫描。标准品的扫描色谱图，见附录A中图A1。

3.4.4 结果计算与表述

根据三个标准液中磺胺甲氧吡嗪的峰高值与内标物的峰高值的比值为横坐标，以磺胺甲氧 吡嗪的浓度为纵坐标，绘制标准曲线。再按样液中磺胺甲氧吡嗪峰高与内标物峰高的比值，在标准曲线上查得试样中磺胺甲氧吡嗪的浓度(即含量)。

或用线性回归法，计算试样中磺胺甲氧吡嗪残留含量，回归方程为式(1)：

$$y = mx + b \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (1)$$

式中：y—试样中磺胺甲氧吡嗪残留含量，mg/kg；

x—磺胺甲氧吡嗪峰高/内标峰高；

m—斜率；

b—截距。

4 检测低限、回收率

4.1 测定低限

本方法的测定低限为0.02mg/kg。

4.2 回收率

牛肉中磺胺甲氧吡嗪添加浓度及其回收率的实验数据：

在0.02mg/kg时，回收率为89.3%；

在0.10mg/Kg时，回收率为92.6%；

在0.20mg/kg时，回收率为96.5。

附 录 A

(提示的附录)

标准品色谱图

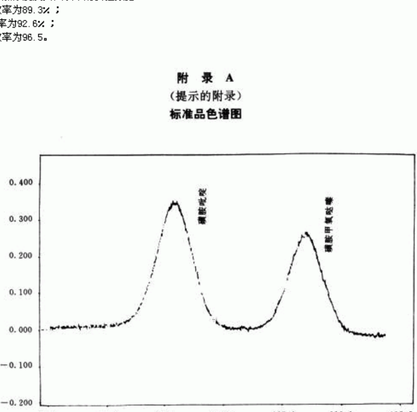

图 A1 磺胺甲氧吡嗪和磺胺吡啶标准品的薄层扫描色谱图