

# GB 31658.17-2021 多兽残处理方案 (Copure® HLB)

2022年最新版食品安全抽检实施细则更新了针对于牛、羊、猪、鸡的肌肉、及肝、肾组织中部分四环素类、磺胺类和喹诺酮类的检测方法——《GB 31658.17-2021 动物性食品中四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》，逗点生物参照该标准进行试验，并优化了部分参数，建立了一份具有良好回收率及稳定性，能满足国标要求的 SPE-HPLC-MS/MS 方法，可供参考。

## 一、样品提取

准确称取粉碎均匀的肉类样品 1 g (精确至 0.01 g) 于干净离心管中，加入 8 mL McIlvaine-Na<sub>2</sub>EDTA 溶液，涡旋混匀后超声提取 20 min，-5℃下 120000 r/min 离心 5 min，取出上清液于另一干净离心管，试样残渣加入 8 mL 磷酸盐缓冲液，同上述操作，合并两次提取液，-5℃下 120000 r/min 离心 5 min，上清液待净化。

**McIlvaine-Na<sub>2</sub>EDTA 缓冲液：**取柠檬酸·一水 12.9g、磷酸氢二钠·十二水 10.9g、乙二胺四乙酸二钠·二水 39.2g，加水 900mL，用 1mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH 至 5.0±0.2，用水稀释至 1000mL。

**磷酸盐缓冲液：**取 0.05 mol/L 磷酸二氢钠溶液 190 mL，用 0.05 mol/L 磷酸氢二钠溶液稀释至 1000mL。

## 二、样品净化 (Copure®HLB, 200mg/6mL)

**活化：**固相萃取柱依次用 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化。

**上样：**取上述待净化液加入活化好的 HLB 固相萃取柱中。

**淋洗：**依次用 5 mL 水，5 mL 5% 甲醇 - 水溶液，抽干。

**洗脱：**用 8 mL 甲醇：乙酸乙酯：氨水 =50:50:2 溶液进行洗脱。

收集全部洗脱液，45℃下氮吹至 100 μL 左右，加入 0.1% 甲酸溶液定容至 1 mL，过 PTFE 亲水滤膜，上机测试。

## 三、基质标准曲线溶液的制备

取 6 个空白基质样品同正常样品一样操作，收集洗脱液后，于洗脱液中分别加入适量标液，再与其他样品洗脱液一同氮吹，定容，使最终上机溶液的浓度分别为 2 μg/L、10 μg/L、50 μg/L、100 μg/L、200 μg/L、500 μg/L。

## 四、仪器条件

### 色谱条件

仪器：UPLC-MS/MS (Thermo Fisher TSQ Endura)

色谱柱：Hypersil GOLD C18 (2.1 mm×100 mm, 1.9 μm)

流动相：A：水 (0.1% 甲酸)

B：甲醇：乙腈 =2:8 (0.1% 甲酸)

洗脱方式：梯度洗脱，见表 1

流速：0.3 mL/min

柱温：35℃

进样量：10 μL

表 1 梯度洗脱程序

| 时间/min | A/% | B/% |
|--------|-----|-----|
| 0.00   | 95  | 5   |
| 3.00   | 85  | 15  |
| 6.00   | 65  | 35  |
| 8.50   | 5   | 95  |
| 9.00   | 95  | 5   |
| 10.00  | 95  | 5   |

### 质谱条件

离子源：HESI

电喷雾电压：3500 V

鞘气压力：40 arb

辅气压力：2 arb

离子传输管：380 °C

辅气温度：350 °C

表 2 组分名称、保留时间及特征离子一览表 (\* 为定量离子)

| 序号 | 名称       | 保留时间/min | 母离子   | 子离子          |
|----|----------|----------|-------|--------------|
| 1  | 乙酰磺胺     | 3.06     | 215.0 | 108.0、155.9* |
| 2  | 磺胺吡啶     | 4.10     | 250.1 | 155.8*、183.9 |
| 3  | 磺胺嘧啶     | 3.52     | 251.1 | 92.1、155.9*  |
| 4  | 磺胺甲恶唑    | 6.46     | 254.0 | 108.1、155.9* |
| 5  | 磺胺噻唑     | 4.04     | 256.0 | 155.9*、92.1  |
| 6  | 磺胺甲基嘧啶   | 4.36     | 265.1 | 155.8*、171.8 |
| 7  | 磺胺二甲异恶唑  | 6.79     | 268.0 | 113.0、155.8* |
| 8  | 磺胺甲噻二唑   | 5.32     | 271.0 | 92.1、155.9*  |
| 9  | 磺胺二甲异嘧啶  | 3.50     | 279.1 | 124.0*、185.8 |
| 10 | 磺胺二甲嘧啶   | 5.07     | 279.1 | 155.8、185.8* |
| 11 | 磺胺甲氧哒嗪   | 5.29     | 281.0 | 155.8*、126.0 |
| 12 | 磺胺对甲氧嘧啶  | 5.38     | 281.0 | 155.9*、214.9 |
| 13 | 磺胺间甲氧嘧啶  | 5.96     | 281.0 | 155.9*、214.9 |
| 14 | 磺胺氯哒嗪    | 6.04     | 285.0 | 92.1、155.9*  |
| 15 | 磺胺邻二甲氧嘧啶 | 6.41     | 311.1 | 155.8*、244.9 |
| 16 | 磺胺间二甲氧嘧啶 | 7.47     | 311.1 | 155.8*、244.8 |
| 17 | 培氟沙星     | 5.23     | 334.2 | 290.1*、316.1 |
| 18 | 达氟沙星     | 5.48     | 358.2 | 314.1、340.0* |
| 19 | 马波沙星     | 4.93     | 363.1 | 320.0*、342.0 |
| 20 | 二氟沙星     | 6.19     | 400.2 | 299.0、356.1* |
| 21 | 强力霉素     | 7.20     | 445.2 | 321.0、428.0* |
| 22 | 四环素      | 5.52     | 445.2 | 410.0*、427.0 |
| 23 | 土霉素      | 5.18     | 461.2 | 426.0*、443.0 |
| 24 | 金霉素      | 6.00     | 479.1 | 444.0*、462.0 |

## 五、实验结果

表 3 兽残加标回收实验结果

| 目标物      | 猪肉         |                |            |                |             |                | 鸡肉         |                |            |                |             |                |
|----------|------------|----------------|------------|----------------|-------------|----------------|------------|----------------|------------|----------------|-------------|----------------|
|          | 10.0 µg/kg |                | 50.0 µg/kg |                | 100.0 µg/kg |                | 10.0 µg/kg |                | 50.0 µg/kg |                | 100.0 µg/kg |                |
|          | 回收率 (%)    | RSD (%)<br>n=3 | 回收率 (%)    | RSD (%)<br>n=3 | 回收率 (%)     | RSD (%)<br>n=3 | 回收率 (%)    | RSD (%)<br>n=3 | 回收率 (%)    | RSD (%)<br>n=3 | 回收率 (%)     | RSD (%)<br>n=3 |
| 乙酰磺胺     | 109        | 1.88           | 106        | 3.48           | 104         | 2.05           | 92.1       | 1.55           | 82.1       | 6.56           | 80.8        | 6.28           |
| 磺胺吡啶     | 94.5       | 3.54           | 98.7       | 10.0           | 98.3        | 4.32           | 84.2       | 3.79           | 96.2       | 8.97           | 99.4        | 3.71           |
| 磺胺嘧啶     | 77.4       | 3.48           | 98.1       | 6.25           | 99.0        | 3.42           | 82.5       | 5.51           | 91.3       | 5.97           | 87.8        | 0.37           |
| 磺胺甲恶唑    | 101        | 6.88           | 100        | 9.07           | 104         | 1.33           | 105        | 4.21           | 97.1       | 4.95           | 96.7        | 3.35           |
| 磺胺噻唑     | 95.2       | 3.65           | 89.8       | 7.24           | 85.6        | 3.89           | 83.1       | 5.76           | 85.2       | 7.93           | 94.7        | 6.25           |
| 磺胺甲基嘧啶   | 92.5       | 3.14           | 93.8       | 6.68           | 92.8        | 4.88           | 89.9       | 1.77           | 98.5       | 6.67           | 93.2        | 2.63           |
| 磺胺二甲异恶唑  | 90.7       | 11.9           | 93.2       | 12.7           | 95.1        | 9.88           | 101        | 4.83           | 98.2       | 0.77           | 99.2        | 6.11           |
| 磺胺甲噻二唑   | 106        | 3.71           | 89.6       | 8.41           | 85.9        | 0.57           | 88.0       | 4.34           | 89.2       | 6.96           | 94.6        | 7.85           |
| 磺胺二甲嘧啶   | 82.5       | 1.63           | 103        | 4.15           | 107         | 0.99           | 77.6       | 0.24           | 88.6       | 7.07           | 93.8        | 0.35           |
| 磺胺二甲嘧啶   | 80.6       | 1.16           | 104        | 4.15           | 102         | 0.77           | 99.3       | 1.34           | 88.4       | 3.01           | 93.1        | 1.13           |
| 磺胺甲氧哒嗪   | 87.1       | 3.74           | 99.6       | 5.95           | 97.5        | 0.22           | 90.2       | 5.31           | 85.9       | 7.29           | 93.6        | 4.31           |
| 磺胺对甲氧嘧啶  | 82.8       | 0.22           | 101        | 4.38           | 97.3        | 2.62           | 90.4       | 4.22           | 89.1       | 5.45           | 94.4        | 4.94           |
| 磺胺间甲氧嘧啶  | 94.1       | 6.02           | 103        | 7.43           | 108         | 1.41           | 101        | 4.51           | 92.8       | 1.54           | 100         | 4.58           |
| 磺胺氯哒嗪    | 87.9       | 1.96           | 95.3       | 6.54           | 101         | 3.15           | 101        | 6.56           | 86.2       | 0.96           | 92.5        | 3.75           |
| 磺胺邻二甲氧嘧啶 | 79.1       | 3.59           | 99.8       | 7.87           | 98.9        | 0.99           | 91.8       | 0.96           | 94.7       | 2.05           | 94.3        | 2.21           |
| 磺胺间二甲氧嘧啶 | 67.4       | 7.02           | 75.7       | 5.69           | 78.6        | 5.78           | 102        | 3.97           | 107        | 7.81           | 106         | 4.86           |
| 培氟沙星     | 78.7       | 3.48           | 90.9       | 0.51           | 95.7        | 4.99           | 87.1       | 3.77           | 79.8       | 5.92           | 85.9        | 4.08           |
| 达氟沙星     | 97.5       | 4.26           | 78.8       | 2.96           | 82.6        | 4.85           | 76.3       | 5.99           | 72.9       | 1.78           | 82.4        | 4.78           |
| 马波沙星     | 83.9       | 2.12           | 95.2       | 1.73           | 97.5        | 8.28           | 80.8       | 3.61           | 93.4       | 4.17           | 89.3        | 3.85           |
| 二氟沙星     | 64.4       | 3.42           | 92.8       | 0.99           | 95.8        | 5.45           | 87.7       | 0.81           | 85.9       | 0.23           | 87.6        | 2.81           |
| 强力霉素     | 103        | 2.18           | 74.9       | 0.36           | 78.6        | 0.55           | 85.2       | 3.97           | 82.3       | 1.53           | 84.2        | 5.54           |
| 四环素      | 67.7       | 2.55           | 69.3       | 1.08           | 77.1        | 4.27           | 76.6       | 1.42           | 75.8       | 4.96           | 90.4        | 5.30           |
| 土霉素      | 78.7       | 4.57           | 70.3       | 0.26           | 85.3        | 4.71           | 74.3       | 2.39           | 80.6       | 7.95           | 86.2        | 0.69           |
| 金霉素      | 68.3       | 3.61           | 75.4       | 1.84           | 82.7        | 3.95           | 83.5       | 7.13           | 84.3       | 6.12           | 98.8        | 3.71           |

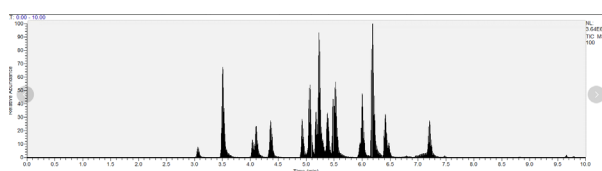


图 1 添加水平为 100.0 µg/kg 时猪肉中兽残的总离子流图

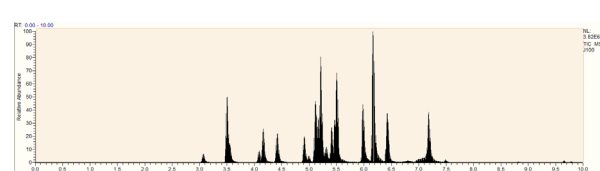


图 2 添加水平为 100.0 µg/kg 时鸡肉中兽残的总离子流图

### 优化 Tips:

1. 在提取过程中降低离心的温度至  $-5^{\circ}\text{C}$  可以更好的抑制样品中的脂肪在水溶液表面的分散，有利于样品的提取转移。
2. 在超声提取完全并两次的提取液之后，再进行一次离心，更好的去除基质的影响，便于上样过柱。
3. 在淋洗过程中使用 5 mL 5% 甲醇 - 水溶液淋洗液，可以减少在淋洗过程中部分目标物的损失。
4. 标准中氮吹至 100 µL 左右，不氮吹干可以减少在氮吹过程中部分目标化合物的损失。
5. 复溶时，加入 0.1% 甲酸溶液定容至 1 mL，可以有效的改善部分目标化合物的峰型，同时提高部分化合物的回收率。
6. 为了改善上样后的流速问题，使用 Copure® HLB( 货号：COHLB6200-M) 较普通的 HLB 固相萃取柱可以获得更好的流速。

### 订购信息

| 货号               | 描述                                   | 包装        |
|------------------|--------------------------------------|-----------|
| COHLB6200-M      | Copure®HLB 固相萃取柱, 200 mg/6mL         | 50 支 / 盒  |
| SDC-3000-D       | biocomma® 多管涡旋混匀仪                    | 1 台 / 箱   |
| BN24             | 智能水浴氮吹仪, 含可视化界面                      | 1 台 / 箱   |
| SF250-22-PTFE-HL | 针式过滤器, PTFE, 直径 25mm, 孔径 0.22µm, 亲水  | 100 个 / 盒 |
| SC2-1            | 2 mL 蓝色聚丙烯盖, 白色 PTFE/ 红色硅胶垫, 9-425   | 100 个 / 盒 |
| V2-AL            | 2 mL 螺纹棕色样品瓶, 带书写处 11.6*32 mm, 9-425 | 100 个 / 盒 |