

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-Na2EDTA 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-Na2EDTA 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 (%) n=3	回收率 (%)	RSD (%) n=3	回收率 (%)	RSD (%) n=3	回收率 (%)	RSD (%) n=3	回收率 (%)	RSD (%) n=3	回收率 (%)	RSD (%) 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

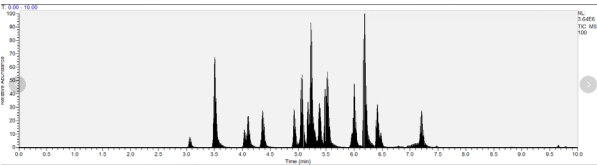


图 1 添加水平为 100.0 µg/kg 时猪肉中兽残的总离子流图

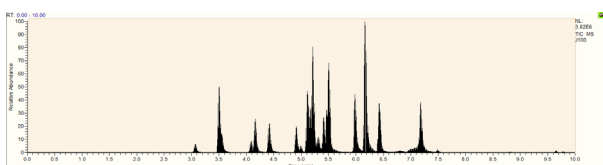


图 2 添加水平为 100.0 µg/kg 时鸡肉中兽残的总离子流图

优化 Tips:

1. 在提取过程中降低离心的温度至 -5℃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