

水产品中土霉素、四环素、金霉素和多西环素残留量的测定 (Copure® HLB)

GB 31656.11-2021 《食品安全国家标准 水产品中土霉素、四环素、金霉素和多西环素残留量的测定》

2022年最新版食品安全抽检实施细则颁布了针对于鱼、虾、蟹、鳖及海参等水产品可食组织中土霉素、四环素、金霉素和多西环素残留量的测定方法——《GB 31656.11-2021 水产品中土霉素、四环素、金霉素和多西环素残留量的测定》，本标准替代了《GB/T 22961-2008 河豚鱼、鳗鱼中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素残留量的测定 液相色谱-紫外检测法》其中第二法——液相色谱-串联质谱法为今年新增的检测方法，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鱼、虾等水产类样品 2 g (精确至 0.02 g) 于干净离心管中，加入 6 mL Na2EDTA-McIlvaine 溶液 (pH=4±0.05) 和 2 mL 醋酸铅溶液，涡旋混合 1 min，超声 10 min，4℃下以 8000 离心 r/min 离心 5 min，取上清液于另一干净离心管，残渣继续加入 6 mL Na2EDTA-McIlvaine 溶液 (pH=4±0.05) 按上述方式重复提取两次，合并全部提取液，加入 10 mL 正己烷，涡旋 1 min，8000 r/min 离心 5 min，弃正己烷层，下层液取出 10 mL 待净化。Na2EDTA-McIlvaine 缓冲溶液 (0.1mol/L)：称取柠檬酸 12.9g、磷酸氢二钠 10.9g、乙二胺四乙酸二钠 37.2g，各自加水适量使溶解，混合，用水稀释至 1000mL，用 0.1 mol/L HCl 或 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 至 4.0±0.05。醋酸铅溶液 (20.0g/L)：取醋酸铅 20.0g，加水溶解并稀释至 1000mL。

二、样品净化 (Copure® HLB, 60mg/3mL)

活化：将 Copure®HLB 固相萃取柱依次用 5 mL 甲醇，5 mL 水活化。

上样：在固相萃取柱中加入上述待净化液。

淋洗：依次用 5 mL 水，5 mL 5% 甲醇 - 水溶液淋洗固相萃取柱，抽干。

洗脱：加入 5 mL 甲醇洗脱固相萃取柱，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，过尼龙滤膜，上机。

三、基质标准曲线溶液的制备

取空白基质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 5 μg/L、10 μg/L、50 μg/L、100 μg/L、200 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 (0.1% 甲酸)

洗脱方式：梯度洗脱，见表 1 流速：0.3 mL/min

柱温：30℃

进样量：5 μL

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%
0.00	95	5
2.00	70	30
4.00	70	30
4.20	30	70
6.00	30	70
7.00	95	5
8.00	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℃ 辅气温度：350℃

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	多西环素	5.77	445.2	321.0、428.0*
2	四环素	4.00	445.2	410.0*、427.0
3	土霉素	4.10	461.2	426.0*、443.0
4	金霉素	5.63	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	大头鱼						虾仁					
	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 (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
强力霉素	73.7	3.91	83.7	3.70	88.9	1.65	76.1	3.97	88.5	3.21	91.6	1.42
四环素	78.2	1.53	85.4	4.53	89.3	3.16	79.6	5.04	84.2	1.98	91.4	2.59
土霉素	86.4	2.29	94.5	2.47	101	1.39	88.9	6.38	92.4	5.92	103	1.96
金霉素	75.3	3.15	84.3	4.49	90.1	2.94	79.3	2.04	89.8	1.92	92.1	1.27

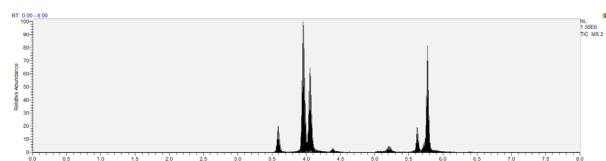


图 1 添加水平为 100.0 μg/kg 时大头鱼中四环素类的总离子流图

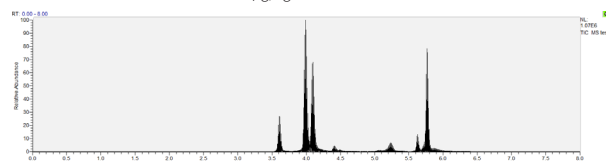


图 2 添加水平为 100.0 μg/kg 时虾仁中四环素的总离子流图

订购信息

货号	描述	包装
COHLB360	Copure®HLB 净化柱, 60mg/3mL	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	1 台 / 箱
SF130-22-NL	尼龙针式过滤器, 直径 13mm, 孔径 0.22μm, 有机系	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

动物源性食品中氯霉素的测定 (Copure® C18)

GB 31658.2-2021 《食品安全国家标准 动物性食品中氯霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》

2022年最新版食品安全抽检实施细则更新了针对于猪、鸡肌肉、肝脏和鱼、虾可食性组织中氯霉素残留检测的检测方法——《GB 31658.2-2021 动物性食品中氯霉素残留量的测定 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 5 g (精确至 0.02 g) 于干净离心管中，加内标工作液 100 μ L，加入 10 mL 乙腈和 10 mL 4% NaCl 水溶液，涡旋提取 10 min，8000 r/min 离心 10 min，取出上清液于另一干净离心管，向离心管中加入 10 mL 正己烷，涡旋震荡 1 min，8000 r/min 离心 2 min，弃上清液，于离心管中加入 8 mL 水饱和的乙酸乙酯溶液，涡旋震荡 2 min，8000 r/min 离心 2 min，取出上层清液，氮吹干，用 5 mL 5% 乙腈-水溶液复溶，待净化。

二、样品净化 (Copure® C18, 500mg/3mL)

活化: 取固相萃取柱依次用 5 mL 甲醇, 5 mL 水进行活化。

上样: 将上述待净化液加入固相萃取柱中。

淋洗: 分别取 6 mL 水分两次淋洗固相萃取柱。

洗脱: 加入 8 mL 甲醇进行洗脱, 收集全部洗脱液, 氮吹干, 1 mL 50% 甲醇水溶液复溶, 过尼龙滤膜, 上机。

三、标准曲线溶液的制备

表 1 标准溶液配制方法

内标 CAP-D5 工作液: 50 ng/mL, 氯霉素工作液 10 ng/mL、50 ng/mL。

项目	0.5 ng/mL	1.0 ng/mL	2.0 ng/mL	5.0 ng/mL	10.0 ng/mL
10 ng/mL CAP	50 μ L	100 μ L	-	-	-
50 ng/mL CAP	-	-	40 μ L	100 μ L	200 μ L
50 ng/mL CAP-D5	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ 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 \times 100 mm, 1.9 μ m)

流动相: A: 水 B: 甲醇

洗脱方式: 梯度洗脱, 见表 1

流速: 0.3 mL/min

柱温: 30 $^{\circ}$ C

进样量: 20 μ L

订购信息

货号	描述	包装
COC183500	Copure®C18 固相萃取柱, 500mg/3mL	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	1 台 / 箱
SF130-22-NL	尼龙针式过滤器, 直径 13 mm, 孔径 0.22 μ m, 有机系	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 \times 32 mm, 9-425	100 个 / 盒

表 2 梯度洗脱程序

时间 /min	A/%	B/%
0.00	95	5
1.00	90	10
4.00	50	50
5.00	50	50
7.00	10	90
8.00	10	10
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: 10 arb

离子传输管: 380 $^{\circ}$ C

辅气温度: 350 $^{\circ}$ C

表 3 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 (CE/V)
1	氯霉素	4.45	320.8	152.0(15)、256.9*(10)
2	氯霉素-D5	4.43	326.0	157.0*(15)

五、实验结果

表 4 氯霉素加标回收实验结果

样品	0.1 μ g/kg		0.2 μ g/kg		1.0 μ g/kg	
	回收率 (%)	RSD (%) (n=3)	回收率 (%)	RSD (%) (n=3)	回收率 (%)	RSD (%) (n=3)
猪肉	74.4	7.93	80.9	2.26	78.9	4.35
鸡肉	90.8	4.62	94.1	5.75	86.6	7.69
虾肉	88.2	4.49	82.8	3.59	79.4	2.81

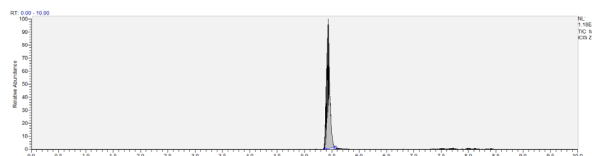


图 1 添加水平为 0.1 μ g/kg 时猪肉中氯霉素的总离子流图

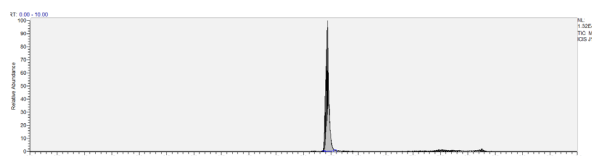


图 2 添加水平为 0.1 μ g/kg 时鸡肉中氯霉素的总离子流图

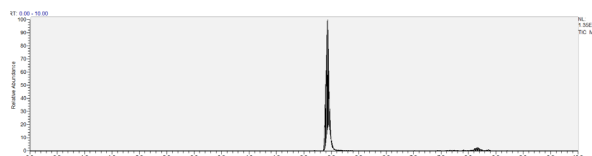


图 3 添加水平为 0.1 μ g/kg 时虾肉中氯霉素的总离子流图