

猪肉中四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物多残留量的测定

关键词

全自动固相萃取；全自动氮吹浓缩仪；液相色谱-串联质谱；四环素类；磺胺类；喹诺酮类

介绍

四环素类药物（TCS）、磺胺类药物（SAS）和喹诺酮类药物（QNS）是畜牧养殖中常用的三类药物。它们具有抗菌、抗支原体、抗球虫等作用，常用来治疗或预防鸡的细菌、支原体和球虫感染。动物饲养过程中不科学地使用这些药物会导致其在动物源性食品中的残留超标，影响人类健康，并且会使细菌的耐药性增强，从而影响这几类药物在人类疾病治疗上的作用。因此，许多国家对动物性食品中这几类药物的最高残留限量（MRL）都做了规定。

2022年2月1日，GB 31658.17-2021《食品安全国家标准 动物性食品中四环素类、磺胺类和喹诺酮类多残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》正式实施，为动物性食品中这3大类药物的多残留测定提供了检测依据。

本文参考上述标准，试样中残留的四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物，用MCLL-VAINE-NA2EDTA缓冲液提取，使用HLB柱经睿科RAYKOL FOTECTOR PLUS全自动固相萃取仪净化，洗脱液经睿科RAYKOL EVA 80全自动氮吹仪浓缩，液相色谱-串联质谱法测定，外标法定量。

1. 仪器和耗材

仪器

Raykol Fotector Plus 全自动固相萃取仪

Agilent 1290II/6470 高效液相色谱-串联质谱仪

Raykol EVA 80 全自动氮吹浓缩仪

耗材

HLB 固相萃取柱 (RayCure, 200 mg/6 mL)

试剂

甲醇 (优级纯)

乙腈 (优级纯)

正己烷 (优级纯)

超纯水

0.05 mol/L 磷酸二氢钠溶液: 取磷酸二氢钠 7.8 g, 用水溶解并稀释至 1000 mL。

0.05 mol/L 磷酸氢二钠溶液: 取磷酸氢二钠 17.9 g, 用水溶解并稀释至 1000 mL。

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 1000 mL。

1 mol/L 氢氧化钠溶液: 取氢氧化钠 4 g, 用水溶解并稀释至 100 mL。

0.03 mol/L 氢氧化钠溶液: 取 1 mol/L 氢氧化钠溶液 3 mL, 用水稀释至 100 mL。

Mcllvaine-Na₂EDTA 缓冲液: 取柠檬酸 12.9 g、磷酸氢二钠 10.9 g、乙二胺四乙酸二钠 39.2 g, 加水 900 mL, 用 1 mol/L 的氢氧化钠溶液调 pH 值至 5.0±0.2, 用水稀释至 1000 mL。

洗脱液: 取甲醇 150 mL, 加乙酸乙酯 150 mL、浓氨水 6 mL, 混匀。

复溶液: 取水 40 mL, 加甲醇 5 mL、乙腈 5 mL、甲酸 0.05 mL, 混匀。

2. 样品制备

取试样 1 g (准确至±0.01 g) 于 50 mL 离心管, 加入 Mcllvaine-Na₂EDTA 缓冲液 8 mL, 涡旋 1 min, 超声 20 min, 高速冷冻离心 5 min, 收集上清液。

下层残渣中加磷酸盐缓冲液 8 mL, 重复提取一次, 合并两次提取液, 混匀, 备用。

2.1 净化

将 HLB 固相萃取柱安装在 Fotector Plus 全自动固相萃取仪上, 依次用甲醇 5 mL、水 5 mL 活化, 取备用液过柱, 依次用 5 mL 水和 20% 甲醇水溶液 5 mL 淋洗, 吹干, 用洗脱液 10 mL 洗脱。收集洗脱液于 EVA-80 全自动氮吹浓缩仪中 45 °C 水浴氮气

吹干。加入复溶液 1.0 mL, 涡旋 1 min 溶解残余物, 10000 r/min 离心 5 min, 微孔滤膜过滤, 液相色谱-串联质谱测定。

具体的固相萃取方法见图 3。

2.2 固相萃取净化条件

全自动固相萃取仪	Raykol Fotector Plus
固相萃取柱	HLB固相萃取柱 (RayCure, 200 mg/6mL)
活化	甲醇、水
淋洗	水、20%甲醇水溶液
洗脱	洗脱液



Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪

序号	命令	溶剂	排出	流速 (mL/min)	体积 (mL)	时间 (min)
1	清洗样品通道	CH3OH				2.5
2	活化	CH3OH	有机废液	2	5	3
3	活化	H2O	废水	3	5	2.1
4	上样		有机废液	3	17	6.8
5	清洗样品瓶	磷酸盐缓冲液	有机废液	70	2	1.4
6	淋洗	H2O	废水	5	5	1.5
7	淋洗	20%甲醇水溶液	有机废液	5	5	1.5
8	气推		有机废液	80	50	3.4
9	吹干					10
10	清洗注射泵	洗脱液		30	5	0.6
11	洗脱	洗脱液	收集	1	5	5.5
12	洗脱	洗脱液	收集	1	5	5.5
13	气推		收集	5	3	1.1
14	结束					
15						

Fotector Plus 固相萃取方法

3. 液质检测条件

3.1 液相条件

Column 色谱柱	Eclipse SB C18, 50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm
Column oven 柱温	35 °C
Flow rate 流速	0.3 mL/min
Injection volume 进样量	5 μL

3.2 液相梯度洗脱条件

时间/min	流动相 A (0.1%甲酸溶液)	流动相 B (乙腈)
0.0	95%	5%
2.0	85%	15%
5.0	60%	40%
7.0	5%	95%
7.1	95%	5%
10.0	95%	5%

3.3 质谱仪器参数

离子源	电喷雾源
电离模式	多离子反应监测 (正) 模式
喷雾针压力	35 psi
喷雾加热区电压	1500 V
四极杆温度	100 °C
干燥气流速	10 L/min
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	4000 V

增益电压

300 V

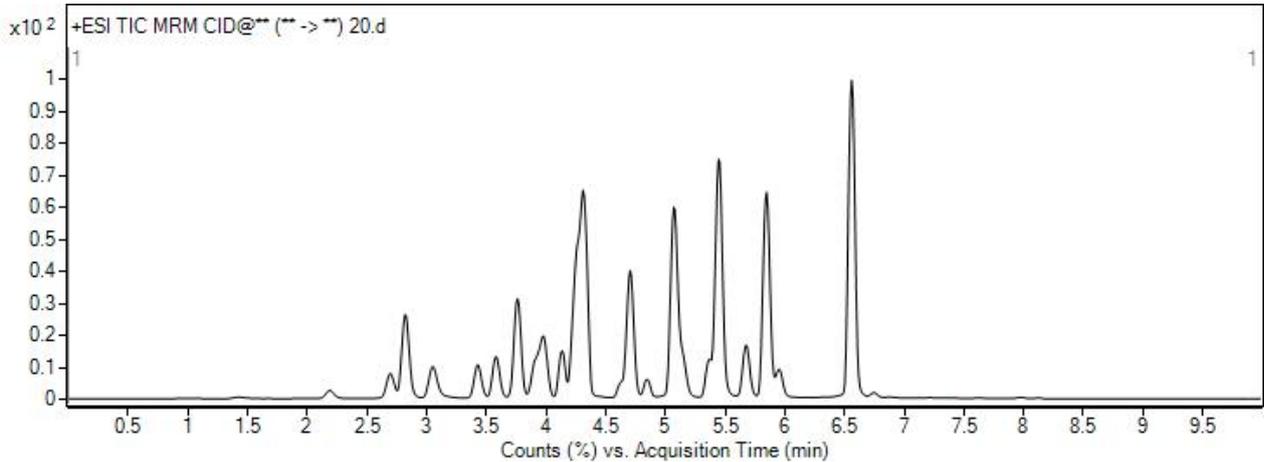
3.4 MRM 参数

No. 序号	Compound Name 化合物名称	Precursor Ion 母离子	Product Ion 子离子	Dwell 离子监测时间	Fragmentor 裂解电压	Collision Energy 碰撞能量
1	四环素	445.1	410.2*	70	25	19
			427.2	70		13
2	金霉素	479.1	444.2*	70	27	23
			462.2	70		19
3	土霉素	461.1	426.2*	70	23	20
			443.2	70		13
4	多西环素	445.1	410.2	70	26	24
			428.2*	70		19
5	乙酰磺胺	215.0	108.0	70	17	18
			156.0*	70		11
6	磺胺吡啶	250.0	108.0	70	27	25
			156.0*	70		16
7	磺胺嘧啶	251.0	92.0	70	23	27
			156.0*	70		25
8	磺胺甲恶唑	254.0	92.0*	70	27	26
			156.0	70		16
9	磺胺噻唑	256.0	92.0	70	26	25
			156.0*	70		15
10	磺胺甲噻啶	265.0	92.0	70	24	28
			156.0*	70		15
11	磺胺二甲异噻唑	268.0	92.0	70	22	28
			156.0*	70		16
12	磺胺甲噻二唑	271.0	92.0*	70	19	30
			156.0	70		15
13	苯甲酰磺胺	277.0	108.0	70	14	22
			156.0*	70		10
14	磺胺二甲异噻啶	279.0	124.0*	70	30	21
			186.0	70		17
15	磺胺二甲噻啶	279.0	92.0	70	30	28
			186.0*	70		16
16	磺胺间甲氧噻啶	281.0	92.0	70	28	31
			156.0*	70		22

17	磺胺甲氧哒嗪	281.0	92.0	70	26	30
			156.0*	70		17
18	磺胺对甲氧嘧啶	281.0	92.0	70	25	29
			156.0*	70		17
19	磺胺氯哒嗪	285.0	92.0	70	22	28
			156.0*	70		15
20	磺胺邻二甲氧嘧啶	311.0	92.0	70	28	32
			156.0*	70		17
21	磺胺间二甲氧嘧啶	311.0	92.0	70	28	32
			156.0*	70		21
22	磺胺苯吡唑	315.0	92.0	70	32	42
			158.0*	70		28
23	酞磺胺噻唑	404.0	149.0	70	27	32
			256.0*	70		15
24	恶喹酸	262.0	216.0	70	24	28
			244.0*	70		18
25	氟甲喹	262.0	202.0	70	26	32
			244.0*	70		18
26	诺氟沙星	320.1	233.0	70	33	25
			302.0*	70		19
27	依诺沙星	321.1	234.0	70	32	22
			303.0*	70		20
28	环丙沙星	332.1	231.1*	70	31	38
			314.1	70		22
29	培氟沙星	334.1	290.1	70	34	18
			316.1*	70		20
30	洛美沙星	352.1	265.1*	70	31	22
			308.1	70		16
31	达氟沙星	358.1	96.0	70	34	25
			340.2*	70		23
32	恩诺沙星	360.2	245.0	70	34	26
			316.1*	70		20
33	氧氟沙星	362.1	261.1	70	30	26
			318.1*	70		20
34	麻保沙星	363.1	72.0	70	24	21
			320.0*	70		15

35	沙拉沙星	386.2	299.1*	70	33	27
			342.1	70		20
36	二氟沙星	400.2	299.0	70	37	30
			356.1*	70		19

3.5 色谱图



四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物标准溶液总离子流图 (20 μg/L)

4.结果与讨论

为了验证该方法的回收率，本实验在空白猪肉样品中加入四环素类、喹诺酮类和磺胺类标准品进行加标回收验证(n=3)，并采用基质标准曲线定量，数据结果如表-2所示。加标回收率在 62.4%~105.6%

之间，RSD 值控制在 15%以内，满足标准要求，说明该方法能够很好地运用于动物性食品中四环素类、喹诺酮类和磺胺类多残留量的检测。

表-2.猪肉样品加标回收率及 RSD 值

序号	目标物	添加浓度 μg/kg	平均回收率(%)	RSD(%)
1	乙酰磺胺	50	70.9	10.5
2	磺胺嘧啶	50	87.3	13.1
3	磺胺噻唑	50	87.2	4.4
4	磺胺吡啶	50	105.6	6.7
5	磺胺甲噁啶	50	104.3	9.4
6	依诺沙星	50	95.9	6.9
7	麻保沙星	50	103.4	8.7
8	诺氟沙星	50	100.2	10.3
9	氧氟沙星	50	100.5	3.9
10	培氟沙星	50	82.7	10.4
11	土霉素	50	89.3	12.6
12	环丙沙星	50	96.2	4.7

13	达氟沙星	50	77.9	7.0
14	洛美沙星	50	98.6	7.6
15	四环素	50	83.3	6.9
16	磺胺二甲嘧啶	50	88.6	5.0
17	磺胺二甲异嘧啶	50	89.0	5.5
18	磺胺甲噻二唑	50	75.4	11.1
19	恩诺沙星	50	87.6	13.0
20	磺胺对甲氧嘧啶	50	87.1	5.7
21	沙拉沙星	50	87.9	12.1
22	二氟沙星	50	81.9	10.2
23	磺胺间甲氧密度	50	81.9	4.7
24	磺胺甲氧哒嗪	50	85.5	5.7
25	磺胺氯哒嗪	50	79.5	8.1
26	酞磺胺噻唑	50	74.7	11.2
27	金霉素	50	62.4	9.2
28	磺胺间二甲氧嘧啶	50	85.7	4.7
29	磺胺甲噻唑	50	88.7	10.0
30	多西环素	50	64.2	7.4
31	磺胺二甲异噻唑	50	74.3	13.0
32	氟甲喹	50	74.1	7.1
33	噻唑酸	50	77.6	5.9
34	苯甲酰磺胺	50	65.1	9.1
35	磺胺邻二甲氧嘧啶	50	77.7	2.9
36	磺胺苯吡唑	50	71.3	5.8

5.总结

1. 在超声提取步骤时使用冰水浴来进行 20 min 的超声，可减少由于长时间超声引起的温度升高，而造成目标物的损失。

2. 应避免样品在浓缩过程中长时间氮吹、过分浓缩干燥，否则可能会造成回收率损失。

3. 本解决方案中 EVA 系列全自动平行浓缩仪可以自动完成样品的浓缩，采用氮吹针追随的方式

使得浓缩进程更快，并节省氮气；Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪采用全自动操作，可以排除人员操作带来的误差，从活化到上样、洗脱一步到位，六通道同时进行；同时 Fotector Plus 能够实现高通量处理，最多一天能够处理 180 个样品，省时省力，真正为批量检测提供帮助。



睿科集团股份有限公司
RayKol Group Corp., Ltd.

智能化、自动化实验室整体解决方案

网址: www.raykol.com

电话: 400-885-1816

邮箱: info@raykol.com



本文中的信息、说明和技术指标如有变更, 恕不另行通知

© 睿科集团股份有限公司

2020年10月版