

# 动物性食品中四环素类药物残留量的提取与检测（GB 31658.6-2021）

## 背景

四环素类药物具有抗菌谱广、价格低的优点，其作为饲料添加剂广泛使用在畜、禽、水产养殖业中；其添加到饲料中，可起到防治疾病和促进生长的作用，但其会在动物体内累积、残留，若是长期食用这些四环素类药物残留的动物性食品，将会危害人类的身体健康。近期实施的 GB 31658.6-2021 食品安全国家标准中，明确了动物性食品中四环素类药物残留测定的前处理方法和液相色谱方法，纳谱分析依照国标，推出四环素类药物前处理所需的 SelectCore HLB、SelectCore LCX 固相萃取产品及液相色谱检测必备的（ChromCore C18 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 $\times$ 150 mm）色谱柱。

## 适用范围

本方法参照 GB 31658.6-2021 食品安全国家标准 动物性食品中四环素类药物残留量的测定 高效液相色谱法，适用于猪、牛、羊、鸡的肌肉、肝脏和肾脏，猪、鸡的皮+脂肪，鸡蛋，牛奶，鱼皮+肉，虾肌肉中土霉素、四环素、金霉素、多西环素残留量的检测。

## 实验步骤

### 1、溶液配制

1.1 柠檬酸溶液：称取无水柠檬酸 19.21 g，用水溶解并稀释至 1000 mL。

1.2 磷酸氢二钠溶液：称取无水磷酸氢二钠 28.39 g，用水溶解并稀释至 1000 mL。

1.3 McIlvaine 缓冲溶液（pH4.0）：取柠檬酸溶液 1000 mL、磷酸氢二钠溶液 625 mL，混匀，用盐酸或氢氧化钠溶液调 pH 至  $4.0\pm 0.05$ 。

1.4 EDTA·2Na-McIlvaine 缓冲溶液：称取无水乙二胺四乙酸二钠 60.5 g，加 McIlvaine 缓冲溶液 1625 mL，溶解，混匀。

1.5 0.01 mol/L 草酸溶液：称取 0.09 g 无水草酸，用水溶解并稀释至 100 mL。

1.6 三氟乙酸溶液：吸取三氟乙酸 0.8 mL，用水溶解并稀释至 1000 mL。

1.7 硫酸溶液：吸取硫酸 1.85 mL，用水溶解并稀释至 100 mL。

1.8 钨酸钠溶液：称取 7.0 g 钨酸钠，用水溶解并稀释至 100 mL。

1.9 1 mol/L 草酸溶液：称取 9.0 g 无水草酸，用水溶解并稀释至 100 mL。

1.10 草酸-乙腈溶液：量取 1 mol/L 草酸溶液 20 mL，用乙腈溶解并稀释至 100 mL。

### 2、样品制备

#### 2.1 皮+脂肪

称取试料 5 g（精确至 $\pm 0.02$  g），加二氯甲烷 15 mL，涡旋 1 min，振荡 5 min，加 EDTA·2Na-McIlvaine 缓冲溶液 15 mL，涡旋 1 min，振荡 5 min，8500 r/min 离心 5 min，取上清液。下层溶液用 EDTA·2Na-McIlvaine 缓冲溶液重复萃取 2 次，每次 15 mL，合并上清液，中性滤纸过滤，备用。

#### 2.2 肌肉、肝脏、肾脏、牛奶、鸡蛋

称取试料 5 g（精确至 $\pm 0.02$  g），加 EDTA·2Na-McIlvaine 缓冲溶液 20 mL，涡旋 1 min，振荡 10 min，加硫酸溶液 5 mL、钨酸钠溶液 5 mL，涡旋 1 min，8500 r/min 离心 5 min，取上清液。残渣用 EDTA·2Na-McIlvaine 缓冲溶液 20 mL、10 mL 各提取 2 次，合并上清液，中性滤纸过滤，备用。

### 3、固相萃取方法

SelectCore HLB 500mg/6mL

活化：依次用甲醇、水、EDTA·2Na-McIlvaine 缓冲溶液各 5 mL 活化；

上样：备用液全部过柱，弃去流出液；

淋洗：依次用水、5%甲醇溶液各 10 mL 淋洗，抽干 30 s；

洗脱：用甲醇 6 mL 洗脱，收集洗脱液于刻度试管中，加水 2 mL，混匀。

SelectCore LCX 500mg/6mL

活化：依次用甲醇、水各 5 mL 活化；

上样：SelectCore HLB 洗脱步骤中混匀的溶液全部过柱，弃去流出液；

淋洗：依次用水、甲醇溶液各 5 mL 淋洗，抽干 1 min；

洗脱：用草酸-乙腈溶液 6 mL 洗脱，收集洗脱液，于 40 °C 水浴氮气吹至 0.5-1.0 mL，再加甲醇 0.4 mL，用 0.01 mol/L 草酸溶液稀释至 2.0 mL，微孔滤膜过滤，高效液相色谱测定（上机溶液应在 24 h 内完成测定）。

#### 4、液相色谱条件

Column: ChromCore C18 5 μm

Dimension: 4.6×150 mm

Mobile Phase: A) 三氟乙酸溶液

B) 乙腈

Gradient: t(min)	A	B
0.00	90	10
5.00	80	20
15.00	65	35
16.00	90	10
17.00	90	10

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 30 °C

Injection: 50 μL

Detection: UV 350 nm

#### 实验谱图

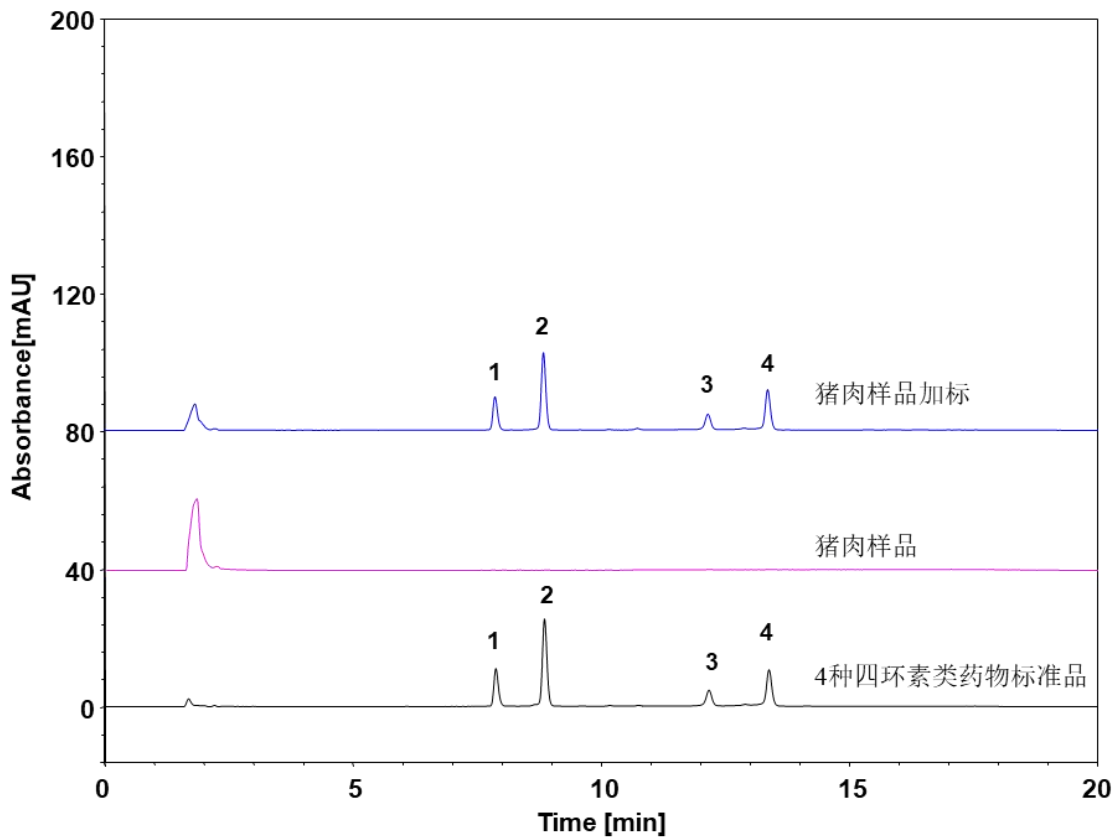


图 1 4 种四环素类药物标准品、猪肉样品、猪肉样品加标对比图

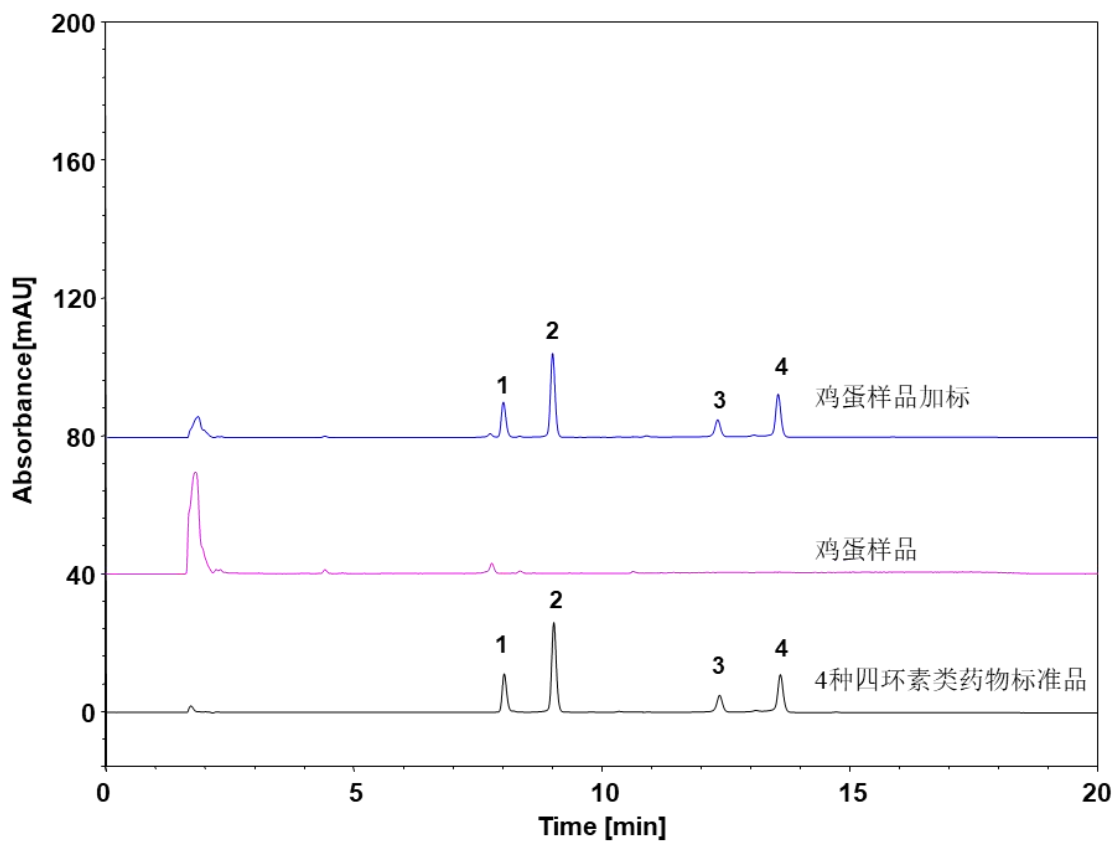


图 2 4 种四环素类药物标准品、鸡蛋样品、鸡蛋样品加标对比图

## 加标回收率

峰序号	四环素类药物名称	加标量	猪肉样品加标回收率	鸡蛋样品加标回收率
1	土霉素	1000 µg/kg	91.09%	93.61%
2	四环素	1000 µg/kg	85.16%	87.85%
3	金霉素	1000 µg/kg	93.06%	94.95%
4	多西环素	1000 µg/kg	100.81%	99.03%

## 实验结论

由图 1、图 2 可以看出，猪肉和鸡蛋样品经过 SelectCore HLB 500mg/6mL 和 SelectCore LCX 500mg/6mL 两根固相萃取产品处理后，基线稳定、基质干扰小、峰型良好，其中加标回收率也符合国标要求。另外按照国标要求进行样品净化时，需将 50mL 的提取液全部过柱，如果此时固相萃取产品滴速较慢，将消耗大量的时间在过柱上，而纳谱分析的 SelectCore HLB、SelectCore LCX 固相萃取产品是采用了国际领先科技的单分散聚合物填料，由于细小颗粒得到严格控制 (<1%)，不容易堵塞筛板而滴速较快，相比其他品牌同类产品要快 20%~40% 之间，节约时间的同时，回收率也可以保证。