

## 固相萃取法用于猪肉中磺胺类药物多残留的测定

### 1 前言

近年来，越来越多的研究结果表明，磺胺类药物特别是磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺甲基异恶唑等残留对人体的危害主要表现为“致癌、致畸、致突变”作用，引起过敏、中毒和导致耐药性菌株产生，以及引起造血系统障碍、急性溶血性贫血、粒细胞缺乏症、再生障碍性贫血等。因此，加强磺胺残留的检测及监控是控制兽药残留发生的重要措施之一。

### 2 仪器与试剂

#### 2.1 仪器

SPE400 全自动机械臂固相萃取仪；高效液相色谱仪；绞肉机；均质机；离心机；旋转蒸发仪；滤膜（有机相，0.22 $\mu$ m）

#### 2.2 试剂及耗材

乙酸乙酯（色谱纯）、盐酸溶液（0.1mol/L）、正己烷、甲醇（色谱纯）、乙腈（色谱纯）、甲酸（色谱纯）、氨水

MCX 固相萃取柱，3ml，填充物 60mg

50%甲醇乙腈溶液：取甲醇 50mL，用乙腈溶液并稀释至 100mL

氨化甲醇洗脱液：取氨水 5mL，用甲醇溶解并稀释至 100mL

0.1%甲酸溶液：取甲酸 1mL，用水溶解并稀释至 1000mL

0.1%甲酸乙腈溶液：取 0.1%甲酸 830mL，用乙腈溶解并稀释至 1000mL

### 3 实验方法

#### 3.1 实验步骤

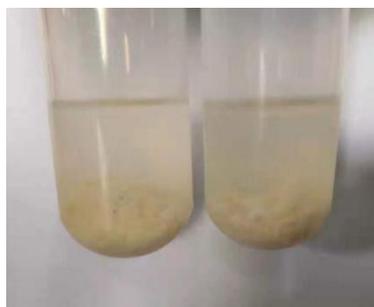
##### 3.1.1 取样

取适量新鲜或解冻的供试组织，采用绞肉机绞碎均质后备用。



##### 3.1.2 提取

精确称取均质好的试样 5g 于聚四氟乙烯离心管中，加入乙酸乙酯 20mL，摇动 5min，将试样分散开，在 4000r/min 下离心 5min，取上层清液与 10mL 于锥形瓶中；残渣中再加入 20 mL 乙酸乙酯，重复抽提一次，合并两次提取液。



##### 3.1.3 脱脂

在提取液中加 0.1mol/L 盐酸溶液 4mL，于 40℃下蒸发至少于 3mL，转入 10ml 离心管中。用 0.1mol/L 盐酸溶液 2mL 洗锥形瓶并转至同一离心管中，再用正己烷 3mL 洗锥形瓶，再将正己烷转至同一离心管中，晃动离心管将其混合均匀，在 3000r/min 下离心 5min，弃去正己烷。再次用正己烷 3mL 洗锥形瓶，转至同一离心管中，摇晃离心管将样品在溶剂中混合均匀，在 3000r/min 下离心 5min，弃去正己烷。取下层液备用。



### 3.1.4 固相小柱净化

过程	试剂名称	用量	速度	等待时间	空气助推	次数
活化	甲醇	2mL	3mL/min	0s	2mL	1
	盐酸 ( 0.1mol/L )	2mL	3mL/min	0s	2mL	1
上样		2mL	1mL/min	0s	2mL	1
淋洗	盐酸 ( 0.1mol/L )	1mL	3mL/min	0s	2mL	1
	甲醇乙腈 ( 50% )	2mL	3mL/min	0s	2mL	1
洗脱	氨化甲醇	4mL	3mL/min	5s	2mL	1

将洗脱液于 40℃氮气吹干，加 0.1%甲酸乙腈溶液 1mL 溶解残余物，滤膜过滤，供高效液相色谱测定。

### 3.1.5 色谱测定条件

色谱柱：C<sub>18</sub>

流动相：0.1%甲酸+乙腈

流速：1mL/min

柱温：30℃

检测波长：270nm

进样体积：100uL

流动相梯度洗脱条件

时间/min	0.1%甲酸/%	乙腈/%
0.0	83	17
5.0	83	17
10.0	80	20
22.3	60	40
22.4	10	90
30.0	10	90
31.0	83	17
48.0	83	17

### 3.1.6 标准曲线制备

精密量取 10ug/mL 磺胺类药物混合标准工作液适量，用 0.1%甲酸乙腈溶液稀释，配置成浓度为 10、50、100、250、500、和 5000ug/L 的系列混合标准溶液，供高效液相色谱测定。以测得峰面积为纵坐标，对应的标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。求回归方程和相关系数。

### 3.1.7 测定

将样品按照与标准曲线绘制时相同的色谱条件进行测试，得到样品色谱峰的峰面积。根据所得的标准曲线，计算样品中磺胺类药物的浓度。

## 4 结果与讨论

4.1 活化、上样、淋洗步骤中所用到的试剂以设置的速度进入固相小柱后均可以以较快的速度流出，无需设置等待时间，只需设置一较小体积的空气助推将残留在管路里的少量试剂完全推出即可。

4.2 洗脱步骤里因洗脱液流出小柱较为缓慢需设置一段等待时间，以保证足量的洗脱液可以充分将目标物洗脱。

### 4.3 结论

用固相萃取法净化猪肉中磺胺类药物残留的过程实现自动化，减少人力的消耗，实验过程中使用的有机溶剂采用密封处理，降低了对人体的伤害且仪器能精准的控制活化、上样、淋洗、洗脱等溶剂流速，使样品净化的更为充分。

## 参考文献

[1] GB 29694-2013 食品安全国家标准 动物性食品中13种磺胺类药物多残留的测定 高效液相色谱法.

## 注意事项

样品液蒸发至 2mL 左右转移至 10mL 离心管后，需用国标中规定的试剂充分洗涤锥形瓶，并将洗液一同倒入离心管。经提取和脱脂后备用的下层液约为 3mL 左右，将其从离心管转至样品管后，需用 3mL 盐酸溶液（0.1mol/L）对离心管进行润洗，洗液一并倒入样品管，供后续净化。