

牛奶中喹诺酮类药物多残留的测定

GB 29692-2013

1、适用范围

本方法规定了牛奶中喹诺酮类药物残留量检测的高效液相色谱测定方法。

本标准适用于牛奶中达氟沙星、恩诺沙星和环丙沙星药物残留量的检测。（本实验样品为牛奶）

参考标准：《GB 29692-2013 牛奶中喹诺酮类药物多残留的测定 高效液相色谱法》

2、溶液的配制

- 1) 5.0mol/L 氢氧化钠溶液：称取 20g 氢氧化钠固体于 100mL 容量瓶中，用水定容至刻度。
- 2) 0.1mol/L 氢氧化钠溶液：量取 2.0mL 5.0mol/L 氢氧化钠溶液于 100mL 容量瓶中，用水定容至刻度。
- 3) 10%三氯乙酸溶液：称取 10.0g 三氯乙酸，用水稀释并定容至 100mL。
- 4) 乙腈-10%三氯乙酸溶液：量取 10mL 乙腈，用 10%三氯乙酸溶液稀释并定容至 100mL。
- 5) 10%甲醇水溶液：量取甲醇 10mL，用水稀释并定容至 100mL。
- 6) 柠檬酸/乙酸铵缓冲液：称取柠檬酸 10.56g、乙酸铵 7.87g，用水溶解并稀释至 1000mL，用乙酸调 pH 至 4.0，滤膜过滤。
- 7) 乙腈-柠檬酸/乙酸铵缓冲液：取乙腈 8mL，用柠檬酸/乙酸铵缓冲液溶解并稀释至 100mL。



8) 达氟沙星标准储备液：称取 5mg 达氟沙星标准品，用甲醇定容至 10mL，配制成 500 μ g/mL 的标准储备液。

9) 恩诺沙星标准储备液：称取 5mg 恩诺沙星标准品，用甲醇定容至 10mL，配制成 500 μ g/mL 的标准储备液。

10) 环丙沙星标准储备液：称取 5mg 环丙沙星标准品，用 0.1mol/L 氢氧化钠溶液定容至 10mL，配制成 500 μ g/mL 的标准储备液。

11) 达氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星标准工作液：分别都吸取三种标准储备液各 0.4mL，用 0.1mol/L 氢氧化钠溶液分别都定容到 10mL，配置成对应的 20 μ g/mL 的标准工作液。

12) 混合标准工作液：吸取 0.1mL 达氟沙星标准工作液、0.5mL 恩诺沙星、环丙沙星标准工作液，混合，再用 0.1mol/L 氢氧化钠溶液定容至 10mL，配制成混合工作液。

3、提取步骤

准确称取牛奶样品 1.0g 于 15mL 离心管中，加入乙腈-10%三氯乙酸溶液 5.0mL，混匀，超声 5min，8000r/min 离心 10min，取上清液备用。

4、净化步骤

SPE 柱：月旭 Welchrom® BRP 小柱，规格：60mg/3mL

活化：3mL 甲醇，3mL 水，弃去；

上样：所有上清液，弃去；

淋洗：3mL 10% 甲醇水溶液，抽干，弃去；

洗脱：3mL 甲醇，抽干，收集；



收集到的洗脱液于 60℃ 下氮气吹干，用乙腈-柠檬酸/乙酸铵缓冲液 500μL 溶解残留物，涡旋混匀，8000r/min 离心 10min，取上清液过 0.22μm 微孔滤膜，供上机检测。

5、注意事项

- 1) 加标水平: 1g 样品中加入 25μL 混合工作液, 因此达氟沙星加标水平为 5μg/kg, 最终机度数为 10ng/mL; 恩诺沙星、环丙沙星加标水平为 25μg/kg, 最终机度数为 50ng/mL。

6、色谱条件

6.1 高效液相色谱条件

色谱柱: 月旭 Ultimate® XB-C18, 4.6×250mm, 5μm

流速: 1.5mL/min

柱温: 50℃

进样量: 20μL

荧光检测器:

时间/min	激发波长 Ex/nm	发射波长 Em/nm
0	278	465
23.4	312	366
32.0	278	465

洗脱程序:



时间/min	乙腈/%	柠檬酸/乙酸铵缓冲溶液 /%
0.01	8	92
30.0	55	45
32.0	8	92
35.0	8	92

7、色谱图或者加标回收率结果

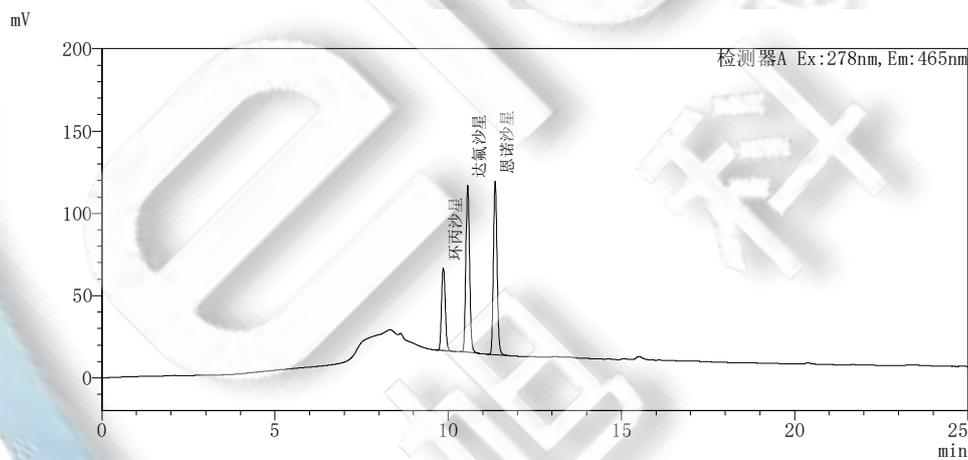


图 1.达氟沙星 10ng/mL，恩诺沙星、环丙沙星 50ng/mL 图谱

峰名称	保留时间	峰面积	峰高	相对峰面积	拖尾因子	塔板数
	min	mV*min	mV	%	(EP)	(EP)
环丙沙星	9.860	359804	50002	19.108	1.113	42506
达氟沙星	10.561	738438	101616	39.217	1.118	48636
恩诺沙星	11.354	784732	105225	41.675	1.123	53569



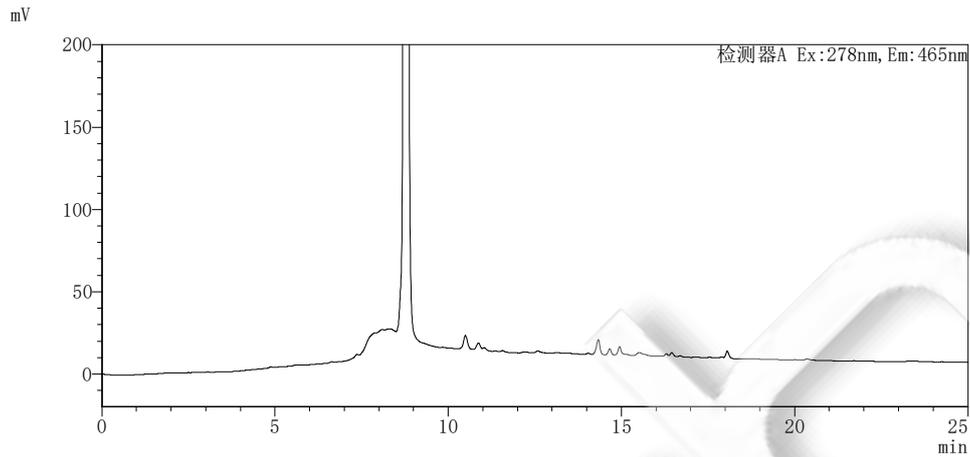


图 2.牛奶样品空白图谱

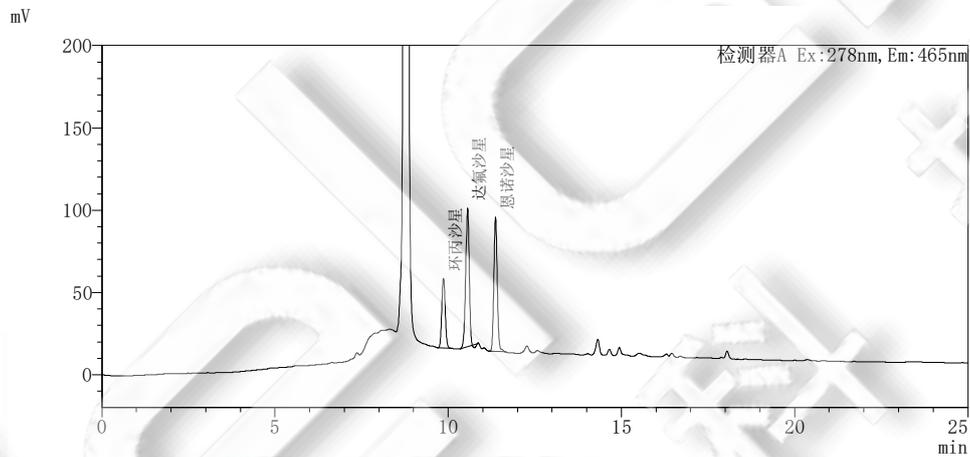


图 3.牛奶样品达氟沙星加标 5 μ g/kg, 恩诺沙星、环丙沙星加标 25 μ g/kg 图谱

表 1.加标回收率表

物质	加标水平	平均回收率	RSD 值 (n=2)
达氟沙星	5 μ g/kg	78.47%	0.79%
恩诺沙星	25 μ g/kg	75.36%	0.26%
环丙沙星	25 μ g/kg	79.01%	2.88%



8、相关产品信息

货号	名称	规格
00522-20009	SPE 小柱	Welchrom® BRP,60mg/3mL, 50pk
00837-05002	15mL 螺口尖底离心管	离心管 一次性离心管, 平盖, 锥形底,RCF12000xg, 袋装,未灭菌, 15mL, 50/包
00824-31001	Welch 固相萃取装置	12 位方缸
00821-32291	盖子+垫片	预切口红色特氟龙/白色硅胶隔垫, 9mm 蓝色短螺纹开口盖 中心孔 6mm 100pk
00821-40927	样品瓶	2mL 透明短螺纹广口样品瓶 带书写处 11.6*32mm 一级水解玻璃 100pk
00201-31043	液相色谱柱	Ultimate® XB-C18, 4.6×250mm, 5μm
00802-02201	针头式过滤器	进口 NY,13mm*0.22μm,100pk
	达氟沙星标准品	CAS:112398-18-0
	恩诺沙星标准品	CAS:93106-60-6
	环丙沙星标准品	CAS:85721-33-1

