

牛奶中四环素类抗生素的测定解决方案

1、适用范围

适用于牛奶中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素残留量的测定。

2、参考标准

《GBT 22990-2008 牛奶和奶粉中土霉素、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》

3、原理

试样中四环素类抗生素残留用 0.1 mol/L Na_2EDTA -McIlvaine 缓冲液 ($\text{pH}=4.0\pm0.05$): 甲醇 (9:1) 提取, 经涡旋和离心后, 取上层清液, 用月旭公司 BRP 固相萃取柱净化, 然后用 HPLC-UV 测定, 外标法进行定量。

4、试剂

试剂 1: 磷酸氢二钠 0.2mol/L: 称取十二水合磷酸氢二钠 71.63g, 加水溶解, 稀释到 1000mL

试剂 2: 柠檬酸 0.1mol/L: 称取柠檬酸单水合物 21.04g, 加水溶解, 稀释到 1000mL

试剂 3: 移取 625mL 试剂 1 与 1000mL 试剂 2, 混匀。

试剂 4: 0.1 mol/L Na_2EDTA -McIlvaine: 称取 60.5g 乙二胺四乙酸 (EDTA) 二钠盐, 用试剂 3 溶解并混匀。用 0.1 mol/L 的 HCl 或 NaOH, 调节 pH 至 4.0 ± 0.05 , 4°C 保存

声明:除非另有说明, 此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可, 不可复制。

Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号 Tel:400-808-6760

邮编: 321000E-mail:guodeyong@welchmat.com

提取液: Na_2EDTA -McIlvaine 缓冲液: 甲醇= (9:1)

5、提取步骤

称取 5g 牛奶样品, 加入 20mL 提取液, 涡旋混合 1min, 常温超声 10min, 4000r/min 离心 10min, 将上清液转移到 50mL 的容量瓶中, 再分别用 15mL、10mL 提取液重复上述提取操作, 合并上清液, 并用提取液定容到 50mL, 转移到离心管中, 待净化。

6、SPE 净化步骤

SPE 柱: 月旭 Welchrom®BRP, 规格: 200 mg/6mL。

a)活化: 5mL 甲醇, 5mL 水, 弃去

b)上样: 移取待净化液 5mL, 弃去

c)淋洗: 用 5mL 水淋洗小柱, 弃去淋洗液, 并抽干小柱。

d)洗脱: 用 2 mL 甲醇, 稍用负压将小柱湿润, 再用 20mL 乙酸乙酯洗脱, 收集洗脱液, 抽干小柱

e)浓缩: 将收集的洗脱液在 40℃ 加热条件下氮吹吹干, 然后用甲醇复溶并定容到 1mL, 并过 0.22 μm PTFE 滤膜, 上高效液相色谱仪检测。

7、注意事项

(1) 标准是用 0.1 mol/L Na_2EDTA -McIlvaine 进行提取的, 但实验效果不佳, 后改成 Na_2EDTA -McIlvaine 缓冲液: 甲醇= (9:1)

(2) 在过 SPE 小柱的过程中, “活化”和“上样”这两个步骤要注意不要使得小柱干涸, 这样会影响小柱的回收率。而在“淋洗”步骤一定要抽干, 因为乙酸乙酯和水是不

声明:除非另有说明, 此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可, 不可复制。

Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号 Tel:400-808-6760

邮编: 321000E-mail:guodeyong@welchmat.com

互溶的。

(3) 加标过程：样品的加标量分别为 2mg/kg，1mg/kg，往 5 g 牛奶加入 1 mL 10µg/mL 和 0.5 mL 10µg/mL 混标溶液，然后用提取液提取，最后用 Na₂EDTA-Mallvaine 缓冲液定容至 50mL，准确移取 5 mL 上固相萃取柱净化，最终定容到 1mL。

8、色谱条件

色谱柱：月旭 Ultimate®Plus-C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm)

流动相：A:0.01 mol/L 草酸溶液 B:乙腈： 甲醇=18:5

洗脱梯度：

时间 min	A:0.01 mol/L 草酸溶液	B:乙腈： 甲醇=18:5
0	79	21
8	79	21
20	60	40
21	79	21

流速：1.0 mL/min

进样量：10 µL

柱温：30 °C

检测波长：350 nm

9、色谱图或者加标回收率结果

声明:除非另有说明，此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可，不可复制。

Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号 Tel:400-808-6760

邮编：321000E-mail:guodeyong@welchmat.com

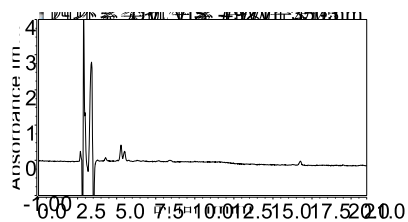


图 1：牛奶样品色谱图

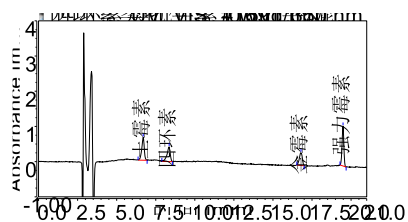


图 2：对照品 0.5ug/mL 色谱图

声明:除非另有说明,此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可,不可复制。

Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号 Tel:400-808-6760

邮编:321000E-mail:guodeyong@welchmat.com

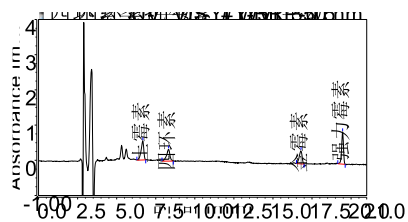


图 3: 牛奶样品加标 1mg/kg 图谱

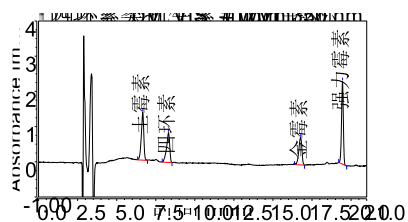


图 4: 对照品 1µg/mL 色谱图

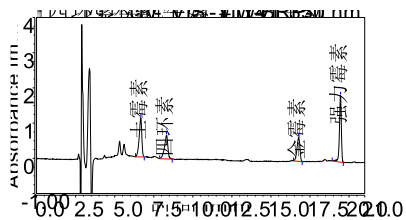


图 5：牛奶样品加标 2mg/kg 图谱

表 1：加标回收率测定结果

物质名称	加标量 mg/kg	处理加标回收率%
土霉素	1	91
四环素	1	85
金霉素	1	82
强力霉素	1	84
土霉素	2	104
四环素	2	111
金霉素	2	103
强力霉素	2	98

由表 1 可知，采用固相萃取结合高效液相色谱检测四种四环素类药物，加标量为 1.0mg/kg、2.0mg/kg，回收率为 82%~111%，能够满足检测要求。

由图 1-5 可看出经 Welchrom® BRP 固相萃取柱净化，采用 Ultimate®Plus-C18 色谱柱检测能够使四种四环素类药物得到良好的分离，且各种物质峰形良好，保留时间稳定。

声明:除非另有说明，此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可，不可复制。

Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号 Tel:400-808-6760

邮编：321000E-mail:guodeyong@welchmat.com

10、相关产品信息

货号	名称	规格
00522-20014	Welchrom®BRP	200 mg/6mL, 30pk
00000-30013	15mL 螺口尖底离心管	100 支/包
00000-30016	50mL 螺口尖底离心管	50 支/包
00824-31001	Welch 固相萃取装置	12 位方缸
00802-02201	针头式过滤器 Nylon	13*0.22 100pk
00824-11101	一次性注射器	200pk/盒 带针头 橡胶头 1ml
00822-00007	样品瓶套装	2ml 透明短螺纹广口样品瓶 (带手写处), 预切口 白色特氟龙/红色硅胶隔垫, 9mm 蓝色短螺纹开口 盖 中心孔 6mm 100pk
00260-31043	Ultimate®Plus-C18	4.6 x 250 mm, 5 μm

声明:除非另有说明, 此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可, 不可复制。

Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号 Tel:400-808-6760

邮编: 321000E-mail:guodeyong@welchmat.com