

实验技术与方法

HPLC法测定鳊鱼中三种喹诺酮类药物残留

张健玲 张勇清 黄慧贤 林银婷

(江门出入境检验检疫局, 广东 江门 529000)

摘要:目的 建立一种高效液相色谱方法测定鳊鱼中环丙沙星、恩诺沙星和恶喹酸 3 种喹诺酮类药物残留量。方法 试样用含 1% 乙酸的乙腈提取, 用正己烷脱脂、浓缩, 缓冲盐 + 乙腈 (80 + 20, 体积分数) 溶解, 超高速离心净化, 用荧光检测器测定, 外标法峰面积定量。结果 试样在 10.0 ~ 60.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内校正曲线呈良好的线性关系, 3 种物质的相关系数都在 0.999 以上。加标回收率: 恶喹酸为 87.4% ~ 105.1%, 环丙沙星为 70.0% ~ 85.7%, 恩诺沙星为 76.0% ~ 92.8%, 相对标准偏差均小于 10%; 检出限: 恶喹酸为 1.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 环丙沙星为 2.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 恩诺沙星为 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。结论 该方法操作简单、快捷, 结果准确、可靠。

关键词: 喹诺酮类; 环丙沙星; 鳊; 色谱法, 高压液相

Determination of Three Kinds of Quinolones in Eels by High Performance Liquid Chromatography

ZHANG Jian-ling, ZHANG Yong-qing, HUANG Hui-xian, LIN Yin-ting

(Jiangmen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangdong Jiangmen 529000, China)

Abstract: Objective To determine three kinds of quinolones (ciprofloxacin, enrofloxacin and oxolinic acid) residues in eels by high performance liquid chromatography (HPLC). **Method** The samples were extracted with 1% acetic acid-acetonitrile, then defatted with hexane and concentrated by evaporation. The residues were dissolved in the buffer-acetonitrile. After high speed centrifugation, the solutes were determined by HPLC-FLD, and quantified by external standard method. **Results** The linear ranges of standard curves were 10.0 ~ 60.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the correlation coefficients were more than 0.999. The recoveries in spiked samples of Oxolinic acid, Ciprofloxacin hydrochloride and Enrofloxacin were 87.4 ~ 105.1%, 70.0 ~ 85.7% and 76.0 ~ 92.8%, respectively. The RSDs were all below 10%. The detection limits of Oxolinic acid, Ciprofloxacin hydrochloride and Enrofloxacin were 1.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. **Conclusion** The method could be simple, fast, accurate and credible.

Key word: Quinolones; Ciprofloxacin; Eels; Chromatography, High Pressure Liquid

环丙沙星、恩诺沙星和恶喹酸是属喹诺酮类药物, 具有抗菌谱广、高效、组织穿透能力强、价格低廉等特点, 广泛使用于水产动物的细菌性疾病, 对疔疮病、赤鳍病、红点病、溃疡病、肠炎病等有非常好的疗效, 还常用于池塘与水体的消毒, 有时还作为饲料添加剂促进动物生长, 提高生长速度与产量。喹诺酮类药物的残留主要表现为毒性反应和耐药性, 可引起软骨毒性、消化系统不良反应、神经症状和生殖毒性, 具有潜在的致癌性, 因此其残留问题已经引起了人们的广泛关注。我国及世界卫生组织、欧盟、日本等国家和组织都将其列入限制使用的兽药名单中, 并制定了相应最高残留限量(MRL)。中国、欧盟、韩国等制定恶喹酸的 MRL 为 100 ~ 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 恩诺沙星和环丙沙星之和的 MRL 为 30 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 日本规

定鳊鱼中恶喹酸的 MRL 为 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 环丙沙星与恩诺沙星均为 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 本方法的定量限能达到国际最高残留限量要求。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 (Agilent 1200 配荧光检测器)、匀浆机 (IKA T25)、低速离心机 (上海安亭 TCL - 16C)、超高速离心机 (上海安亭 TDL - 5 - A)、旋转蒸发仪 (上海亚荣 RE - 52c)、超纯水机 (Milli - Q)、涡旋振荡器 (德国 IKA)、肉样组织粉碎机 (PHILIPS)、电子天平 (岛津 AY220)。

乙腈、正己烷、乙酸、磷酸、三乙胺为分析纯, 天津市化学试剂一厂; 乙腈 色谱纯, 德国 Sigma; 超纯水; 恶喹酸、环丙沙星、恩诺沙星标准品 (纯度 99%), 德国 DR。

作者简介: 张健玲 女 在职研究生 兽医师

1.2 溶液的配制

标准储备溶液 分别称取适量环丙沙星、恩诺沙星、恶喹酸标准品用乙腈配制,浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$,在 - 20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱里可保存半年。

标准工作液 分别准确吸取适量环丙沙星、恩诺沙星、恶喹酸标准储备液,用乙腈配成浓度为 1 $\mu\text{g/ml}$ 标准液,于 - 20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,可保存一个月。

试样提取液 乙腈 + 乙酸(体积分数,100 + 1);
缓冲液 900 ml 水加入 3 ml 三乙胺,用磷酸调 pH 值至 3.0;
定容液 缓冲液 + 乙腈(80 + 20)。

1.3 方法

1.3.1 试样提取 准确称取 5.0 g 已捣碎混匀的组织试样于 50 ml 离心管中,加入 24 ml 试样提取液,用匀浆机以 14 000 r/min 速度均质 30 s,另取 24 ml 试样提取液以 14 000 r/min 速度洗涤匀浆刀,该提取液留作第二次提取用。将第一次提取液以 4 500 r/min 速度离心 5 min,把上清液转移至 50 ml 具塞比色管,下层残渣用玻棒捣碎后加入 24 ml 第二次提取液进行提取,在涡旋振荡器上振荡 1 min 后以 4 500 r/min 速度离心 5 min,合并上清液至 50 ml 具塞比色管中,用提取液定容至 50 ml,摇匀备用。

1.3.2 试样净化 吸取 15 ml 试样提取液至 50 ml 具塞离心管中,加 5 ml 正己烷,在涡旋振荡器上振荡 30 s,静置 10 min,弃去上层正己烷及少量杂质,下层溶液中再加入 5 ml 正己烷,重复净化步骤,弃去上层正己烷。吸取 10 ml 下层溶液至鸡心瓶中以 40 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发至干,残渣用 1.0 ml 定容液(缓冲液 + 乙腈,80 + 20)和 0.5 ml 正己烷溶解,将鸡心瓶置于超声波水浴中振荡 1.5 min,涡旋振荡 30 s,吸取溶液,以 15 000 r/min 离心 5 min,取中层液经 0.45 μm 滤膜过滤后进行液相色谱分析。

1.3.3 色谱条件 由于环丙沙星、恩诺沙星与恶喹酸的最佳色谱条件差异较大,须分两次进样进行液相色谱分析。其色谱条件见表 1。

表 1 色谱条件

条件	环丙沙星、恩诺沙星	恶喹酸
色谱柱	Agilent ZORBAX	SB - C ₁₈ 250 mm × 4.6 mm × 5 mm
流速(ml/min)	1.0	1.0
进样体积(μl)	20	20
流动相(缓冲液/乙腈)	86/14	70/30
柱温($^{\circ}\text{C}$)	40	35
激发波长(nm)	280	265
发射波长(nm)	460	380

1.3.4 校正曲线绘制 分别准确吸取 1 $\mu\text{g/ml}$ 环丙沙星、恩诺沙星、恶喹酸标准液 1 ml 置于 100 ml 容量瓶中,用定容液(缓冲液 + 乙腈:80 + 20)稀释至刻

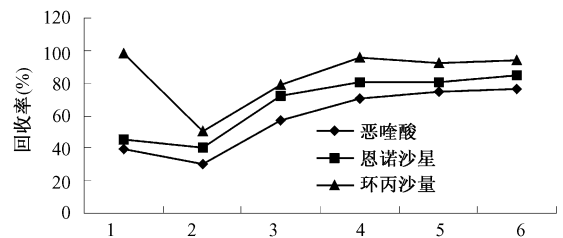
度,摇匀配成 10 ng/ml 混合标准液,按同样方法配制 20、30、40、50、60 ng/ml 的混合标准液,进行液相色谱分析,做校正曲线。

1.3.5 样品测定 取试样待测液 20 μl 进行液相色谱分析。

2 结果与讨论

2.1 提取条件及净化条件的选择 动物食品中喹诺酮类药物一般采用乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯等有机溶剂及其与乙酸、磷酸、氨水等的混合溶液进行提取,以乙腈和乙酸的混合溶液作为提取液较多。本实验曾用乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯对喹诺酮加标试样进行提取作比较,以乙腈对 3 种喹诺酮的回收率较高。再分别以乙腈、含 1% 乙酸的乙腈、含 1% 磷酸的乙腈、含 3% 乙酸的乙腈作提取液进行比较,实验结果显示纯乙腈与含 1% 乙酸的乙腈对 3 种药物同时有较好的回收(结果见图 1)。本方法选用含 1% 乙酸的乙腈作试样提取液。本方法只取 50 ml 提取液中的 10 ml 提取液进行浓缩,大大缩短检验时间,减少了空气污染。

试样净化常用方法有液液萃取法和固相萃取小柱净化。本方法采用正己烷对去脂和去杂质有较好的作用,比较 SPE 净化更省时、省成本且操作简易。



提取液: 1. 二氯甲烷; 2. 乙酸乙酯; 3. 含 3% 乙酸乙酯;

4. 含 1% 磷酸乙腈; 5. 乙腈; 6. 含 1% 乙酸乙腈

图 1 回收率与不同提取液关系曲线

2.2 色谱条件的优化 环丙沙星、恩诺沙星、恶喹酸在含一定比例乙腈的酸性水溶液中能有效分离,但色谱峰容易拖尾,加入少量三乙胺能获得更好的峰形。而流动相的 pH 值对 3 种药物的分离也有影响。本方法选用磷酸水溶液作为流动相组成部分,并对不同 pH(3、4、5、6)的磷酸水溶液进行比较,实验结果表明,在相同流动相比例条件下,随着流动相 pH 的降低,目标峰的保留时间延长,且与干扰峰完全分开,故本方法选用 pH 3 的磷酸水溶液 + 三乙胺(900 + 3,体积分数)为缓冲液,与乙腈组成流动相,3 种喹诺酮得到很好的分离,且目标峰尖锐、对称。见 10 ng/g 加标回收色谱图 2、3。

2.3 校正曲线与检出限 用 1 $\mu\text{g/ml}$ 环丙沙星、恩诺沙星、恶喹酸标准溶液分别配制成 10、20、30、40、

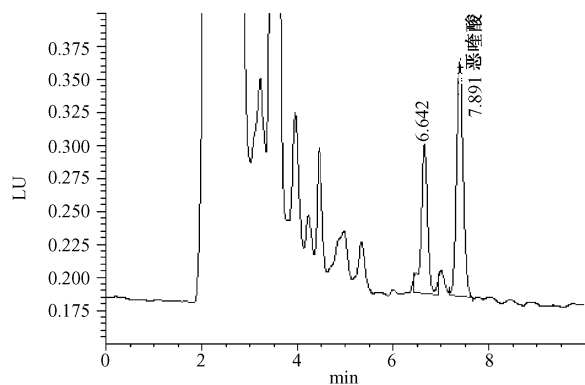


图2 添加 10 ng/g 恶喹酸的加标回收色谱图

50、60 ng/ml 的混合标准溶液,按该方法进行色谱测定。以标准浓度 (ng/ml) 为 x 值,标准峰面积为 y 值进行线性回归,求得线性方程,以 3 倍信噪比为检出限,以 10 倍信噪比为定量限。数据见表 2。

2.4 方法的准确度和精密度 将 3 种药物在空白基质鳗鱼中加入 10、20、50 ng/g 3 个浓度水平,分别

表 2 校正曲线数据

名称	线性范围 (ng/ml)	曲线方程式	相关系数	检出限 (ng/g)	定量限 (ng/g)
环丙沙星	10.0 ~ 60.0	$y = 0.4950x - 0.0163$	0.9992	2.7	8.9
恩诺沙星	10.0 ~ 60.0	$y = 1.2913x - 0.0524$	0.9995	1.5	5.1
恶喹酸	10.0 ~ 60.0	$y = 0.8437x - 0.3020$	0.9998	1.4	4.6

表 3 方法回收率和精密度试验结果 ($n = 10$)

添加浓度 (ng/g)	环丙沙星		恩诺沙星		恶喹酸	
	平均回收率 (%)	RSD (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
10	78.7	4.47	85.9	6.84	96.4	3.63
20	74.6	4.53	85.0	5.61	94.2	4.92
50	75.3	5.06	83.8	5.46	92.7	6.11

2.5 方法应用 本方法不仅适用于鳗鱼肌肉,还适用于其他水产品肌肉,其 3 种药物的回收率略高于鳗鱼的回收率。

3 小结

本方法用含 1% 乙酸的乙腈提取 3 种喹诺酮类药物,有快速、灵敏、精确、操作简便的特点,并能满足出口检验检疫要求。

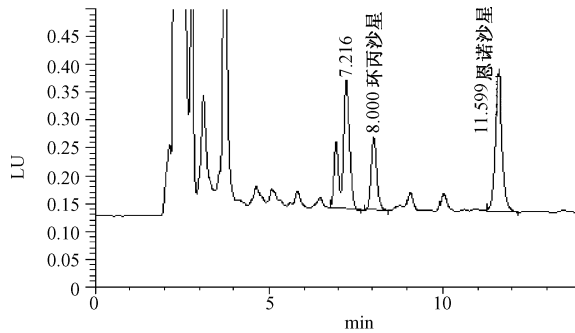


图 3 添加 10 ng/g 环丙沙星与恩诺沙星的加标回收色谱图

进行加标回收试验,以回收率表示方法准确度,以每个水平的 10 次测定数据的相对标准偏差做方法精密度,结果见表 3。恶喹酸为 87.4% ~ 105.1%,环丙沙星为 70.0% ~ 85.7%,恩诺沙星为 76.0% ~ 92.8%,相对标准偏差均小于 10%,说明该方法精密度好,稳定可靠。

参考文献

- [1] 高华鹏,李佐卿. 高效液相色谱法检测冷冻烤鳗中恩诺沙星等药物残留[J]. 理化检验 - 化学分册, 2005, 41(5): 31-33.
- [2] 张德云,李孟玻,彭之见. 高效液相色谱法测定鱼肉中 4 种喹诺酮类药物[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(5): 526-527.
- [3] 徐亚萍,丁红云,潘海洋. 高效液相色谱 - 紫外 - 荧光测定水产品中环丙沙星[J]. 中国卫生检验杂志, 2007(06): 977-978.
- [4] 刘媛,谢孟峡,丁岚,等. 高效液相色谱同时测定鸡蛋中 4 种喹诺酮类药物残留[J]. 分析化学, 2004(03): 352-355.
- [5] 施冰,张志刚,吴抒怀,等. LC/MS/MS 测定水产品中 7 种氟喹诺酮类抗菌素残留量的方法研究[J]. 检验检疫科学, 2004, 14(B12): 25-30.
- [6] 林峰,林海丹,吴映璇,等. LC-MS-MS 测定烤鳗中 4 种喹诺酮类药物残留量[J]. 分析测试学报, 2004(05): 43-47.

[收稿日期: 2007 - 12 - 18]

中图分类号: R15; O657.72

文献标识码: B

文章编号: 1004 - 8456(2008)04 - 0316 - 03

消息(二)

如何区分无公害食品、绿色食品、有机食品

无公害是食品的一种基本要求,所有食品都应达到这一要求。绿色食品是从“普通食品”向“有机食品”发展的一种过渡性产品,经农业部门认证推广,分 A 级和 AA 级两种。其中, A 级绿色食品允许在生产过程中限量使用化学合成物质; AA 级绿色食品则较为严格地要求不使用化学合成物质。有机食品与无公害食品、绿色食品的最显著区别在于,在生产和加工过程中绝对禁止使用农药、化肥、除草剂、合成色素、激素等人工合成物质,其生产难度更大。