

实验技术与方法

快速溶剂萃取-高效液相色谱-紫外串联荧光检测法测定
太平湖白鱼中4种氟喹诺酮类药物残留

于辉,赵萍

(北京吉天仪器有限公司,北京 100015)

摘要:目的 利用快速溶剂萃取(ASE),反相高效液相色谱-紫外串联荧光检测技术,建立了检测太平湖白鱼中4种氟喹诺酮类药物残留的定量分析方法。**方法** 以8%氨水乙腈作为提取溶剂,对样品中的氟喹诺酮类药物采用快速溶剂萃取仪提取,萃取液经正己烷和乙醚去脂净化,用高效液相色谱-紫外串联荧光检测器测定,外标法定量。**结果** 试样在10~200 $\mu\text{g/L}$ 范围内校正曲线呈良好的线性关系,4种物质的相关系数都在0.999以上。当添加水平为25、50 $\mu\text{g/kg}$ 时,鱼肉中4种氟喹诺酮类药物的加标回收率在82.7%~95.6%,相对标准偏差在2.1%~4.1% ($n=5$),检出限为1.3~3.0 $\mu\text{g/kg}$ 。**结论** 方法快速,操作简便,准确可靠,可以用于白鱼实际样品中氟喹诺酮类药物的日常检测。

关键词:快速溶剂萃取;高效液相色谱;荧光检测器;紫外检测器;氟喹诺酮类药物;淡水鱼;食品安全

中图分类号: O658 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2011)04-0322-04

Detection of residual fluoroquinolones in Taiping lake whitefish by ASE/HPLC/UV-FLD

Yu Hui, Zhao Ping

(Beijing Titan Instruments Co. Ltd., Beijing 100015, China)

Abstract: Objective To establish a ASE/HPLC/UV-FLD analytical method for the detection of four fluoroquinolones residues in Taiping lake whitefish. **Methods** Samples were extracted with 8% (V/V) ammonia in acetonitrile by accelerated solvent extractor (ASE), and then were defatted with hexane and ethylether. The collected sample solutions were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detector tandem programmable fluorescence detector (FLD) and quantified by external standard. **Results** The linearity of standard curve was in the range of 10-200 $\mu\text{g/L}$, and the correlation coefficient was higher than 0.999. The recoveries in spiked samples with fluoroquinolones were 82.7%-95.6%. The relative standard deviations were all below 5% ($n=5$). The limits of detection were 1.3-3.0 $\mu\text{g/kg}$. **Conclusion** The method was rapid, simple, accurate and reliable and could be applied to detect fluoroquinolones in whitefish.

Key words: Accelerated solvent extraction; high performance liquid chromatography; fluorescence detector; UV detector; fluoroquinolones; freshwater fish; food safety

氟喹诺酮类药物属于人工合成的抗菌药物,广泛使用于水产动物的细菌性疾病,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。这种药物在兽医临床广泛和大量的使用必然会导致其在动物性食品中的残留,如果不加以控制会严重危害人类的健康^[1],而且影响我国动物性食品的出口,造成巨大的经济损失^[2]。我国和欧盟都已制定了多种氟喹诺酮类

药物在动物组织中的最高残留限量^[3-4]。氟喹诺酮类药物在动物组织中残留量的检测方法主要有高效液相色谱-荧光法^[5]、高效液相色谱-质谱法^[6-7]和酶联免疫法^[7]。目前存在的问题是有些方法灵敏度较差,或仪器价格昂贵不易推广应用。

快速溶剂萃取(ASE),是一种在高温高压下萃取样品中组分的新方法,它通过维持体系的高压状态,使溶剂在高温下不发生汽化,克服了常压法萃取时提取温度的限制。快速溶剂萃取技术具有溶剂用量少、提取时间短和高度自动化的优点,已被美国 EPA 收录为处理固体样品的标准方法之一^[8],并已应用于土壤、食品、药物等样品中残留物的提取^[9-12]。

本研究采用快速溶剂萃取法提取白鱼肉中的氟

收稿日期:2010-10-25

作者简介:于辉 男 硕士/工程师 研究方向为样品前处理及药物分析

通信作者:赵萍 女 博士/高级工程师 研究方向为样品前处理及药物分析

喹诺酮类兽药残留,利用高效液相色谱荧光检测器和紫外检测器同时测定,建立了白鱼肉中氟喹诺酮类兽药残留的快速自动化前处理检测技术。该方法简单、快速、有机溶剂用量少,回收率和精密度好。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

APLE-2000 快速溶剂萃取仪,配 11 ml 不锈钢萃取池;高效液相色谱仪(岛津 10A-VP),配紫外检测器(UV)和荧光检测器(FLD);TTL-30 型超纯水器;BS124S 型精密电子分析天平;旋转蒸发器;SHB-Ⅲ型循环水式多用真空泵;DFT-100 手提式高速中药粉碎机。

乙腈为色谱纯,磷酸、三乙胺、正己烷,均为分析纯;超纯水($>18\text{ M}\Omega/\text{cm}$)由超纯水器制备。硅藻土(青岛川一硅藻土有限公司),使用前在马弗炉经 $600\text{ }^\circ\text{C}$ 烘烤 6 h,然后放入干燥器中冷却至室温,备用。

1.2 标准品

诺氟沙星(NOR, $>99.5\%$)、环丙沙星(CIP, $>99.5\%$)、恩诺沙星(ENR, $>99.5\%$)、沙拉沙星(SAR, $>99.5\%$),均为固体粉末标样(Dr. Ehrenstorfer 公司)。

1.3 太平湖白鱼样品

购自本地超市。

1.4 标准储备液的配制

分别取诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星标准品各约 50 mg,精密称定,用 30 mmol/L 氢氧化钠溶液溶解并稀释成质量浓度为 1 mg/ml 的标准储备液。 $2\sim 8\text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存。

1.5 标准工作液的配制

准确量取上述 4 种氟喹诺酮标准储备液,用流动相稀释成浓度分别为 10、20、50、100 和 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准工作液。

1.6 流动相配制

50 mmol/L 磷酸/三乙胺溶液:取浓磷酸 3.4 ml,用水稀释至 1 000 ml。用三乙胺调 pH 至 2.4。

1.7 方法

1.7.1 试样制备

取一定量的太平湖白鱼样品,绞碎后初步混匀,四分法取样,所取试样等分为 2 份,1 份供测定,另一份置于 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.7.2 提取

称取 1.0 g 样品,与 1.5 g 硅藻土混和均匀后,置于 11 ml 萃取池中。萃取条件:用 8% 氨水乙腈作为提取试剂,温度 $80\text{ }^\circ\text{C}$,压力 10 MPa,加热 5 min,

静态提取 5 min,循环 1 次,淋洗体积 60%,用乙腈快速冲洗样品,氮气吹扫收集全部提取液。

1.7.3 净化

提取液中加入 3.0 ml 正己烷和 1 ml 乙醚去除脂类杂质,剧烈振荡后静止分层,弃去正己烷层,重复操作 2 次,下层溶液转入浓缩瓶中,在水浴 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 的旋转蒸发器中浓缩至干。以流动相溶解残渣,并准确定容 2 ml。溶液经 0.45 μm 滤膜过滤供 HPLC 分析。

1.8 色谱条件

色谱柱 Venusil MP- C_{18} , 5 μm , 4.6 mm (i. d.) \times 25 cm;柱温为室温;荧光检测器的激发波长为 265 nm,发射波长为 478 nm;紫外检测器波长为 271 nm,50 mmol/L 磷酸溶液/三乙胺-乙腈(82 + 18, V/V)流动相流速为 0.8 ml/min,进样量为 20 μl 。

2 结果与分析

2.1 样品前处理条件的优化

本方法采用快速溶剂萃取仪对太平湖白鱼中氟喹诺酮类兽药进行提取,相比传统的匀浆提取^[13]或超声波提取,方法简单、快速、节省溶剂。每个样品只需用 20 ml 溶剂提取 10 min。提取过程全部自动化完成,省时省力。

动物性食品中氟喹诺酮类兽药一般采用乙腈、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。本实验分别试验了 1% 乙酸乙腈溶液、8% 氨水乙腈溶液和磷酸盐缓冲液(流动相)提取样品的提取效率和基质干扰程度,试验证明磷酸盐缓冲液(流动相)和 8% 氨水乙腈溶液对 4 种氟喹诺酮类兽药有较好的提取效率,加标回收率在 88.7% ~ 95.6%。1% 乙酸乙腈溶液对诺氟沙星、环丙沙星、沙拉沙星的提取效率偏低,加标回收率在 68.3% ~ 72.1%。考虑到后续浓缩问题,磷酸盐缓冲溶液(流动相)不容易浓缩,所以采用 8% 氨水乙腈为提取剂。

2.2 色谱条件的优化

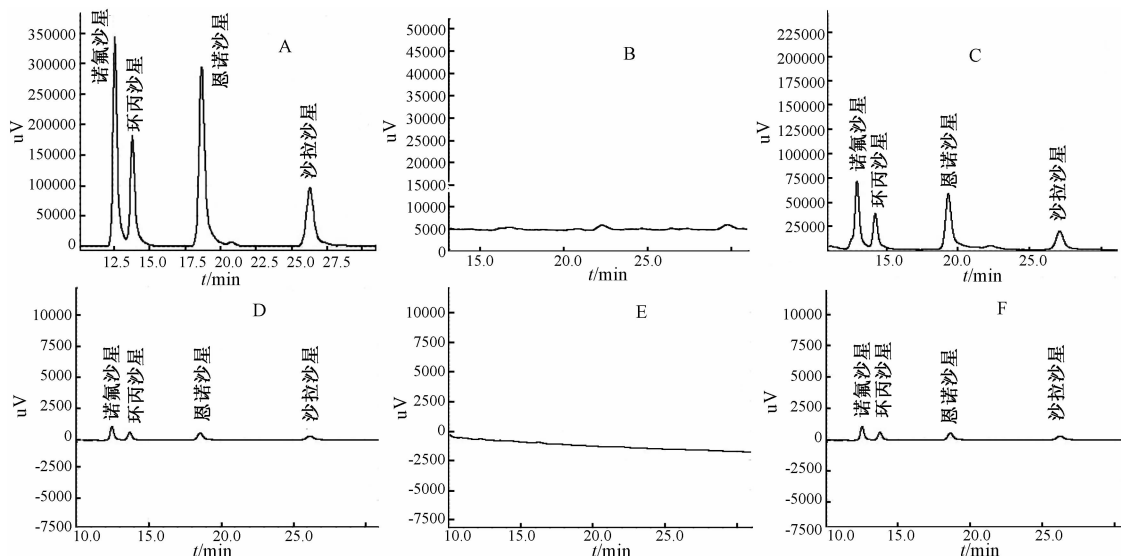
氟喹诺酮类兽药为两性化合物,流动相酸度对其分离影响很大。诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星在含一定比例乙腈的酸性水溶液中能有效分离,而流动相的 pH 值对 4 种药物的分离也有影响。本方法选用磷酸水溶液作为流动相组成部分,并对不同 pH 的磷酸水溶液进行比较,实验结果表明,在相同流动相比例条件下,随着流动相 pH 的降低,目标峰的保留时间延长,且与干扰峰完全分开,但色谱峰容易拖尾,加入少量三乙胺能获得更好的峰形。故本方法选用 pH 2.4 的 50 mmol/L 磷

酸溶液/三乙胺-乙腈(82 + 18, V/V)作为流动相,4种氟喹诺酮类药物能完全分开,而且峰形较好。一个样品测定时间为31 min。

氟喹诺酮类兽药在荧光检测器上的响应值较在紫外检测器上响应值大2个数量级,采用荧光检测器和紫外双检测器同时测定,荧光检测器作为主要定性定量检测器,紫外检测器作为辅助定性检测

器,可以更好地确认目标物,弥补了液相色谱在有杂质时定性不准的缺点。

在上述色谱条件下,得到太平湖白鱼空白试样、白鱼添加试样与4种氟喹诺酮类兽药的液相荧光色谱图和紫外色谱图(图1)。从图1可知,在所采用的色谱条件下,目标组分得到了很好的分离,且杂质色谱峰没有干扰。



A: 标准品荧光色谱图(100 µg/L); B: 样品空白荧光色谱图; C: 空白样品加标(50 µg/kg)荧光色谱图;
D: 标准品紫外色谱图(100 µg/L); E: 样品空白紫外色谱图; F: 空白样品加标(50 µg/kg)紫外色谱图

图1 色谱图

Figure 1 Chromatograms

2.3 校正曲线与检出限

分别配制诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星标准溶液质量浓度为10、20、50、100和200 µg/L。在1.8色谱条件下,以峰面积为y值,标准溶液浓度为x值进行线性回归,求得线性方程。以不含氟喹

诺酮类药物的白鱼作为空白样品添加4种氟喹诺酮标准溶液。样品中氟喹诺酮类药物添加浓度为0.01 mg/kg,按1.7节所述方法测定结果,以10倍信噪比(S/N)确定分析物的定量限。回归方程、相关系数以及定量限见表1。

表1 4种氟喹诺酮类药物的线性方程、线性范围、相关系数及定量限

Table 1 Regression equations, linear ranges, correlation coefficients and quantitative limits of four fluoroquinolones

组分名称	线性范围(µg/L)	线性方程	R ²	定量限(µg/kg)
诺氟沙星	10 ~ 200	y = 0.00001x - 1.007	0.9996	4.3
环丙沙星	10 ~ 200	y = 0.00002x - 0.539	0.9997	9.0
恩诺沙星	10 ~ 200	y = 0.00001x - 0.499	0.9997	5.0
沙拉沙星	10 ~ 200	y = 0.00003x - 0.163	0.9997	10.0

2.4 回收率与精密度

在空白基质白鱼样品中添加一定量的氟喹诺酮混合标准溶液,使样品中分别含有25和50 µg/kg两个水平含量的4种氟喹诺酮。按优化条件,每个水平重复测定5次,同时做空白实验,分别计算加标样品的平均回收率(n = 5),所得结果见表2。白鱼的平均添加回收率是82.7% ~ 95.6%,相对标准偏

差均小于5%,说明该方法测定4种氟喹诺酮类药物的准确度和精密度好,可以满足兽药残留量分析的要求。

2.5 样品测定

于2010年9月从北京超市随机抽取8份太平湖白鱼样品按1.7所述方法进行检测,结果表明,此次抽取的样品中均未检出含有4种氟喹诺酮类药物残留。

表2 白鱼肉中氟喹诺酮类药物的回收率及精密度试验结果

Table 2 Recovery and precision of results in the detection of fluoroquinolones in whitefish ($n=5, \%$)

标准物质	加标水平			
	25 $\mu\text{g}/\text{kg}$		50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
	平均回收率	RSD	平均回收率	RSD
诺氟沙星	88.5	3.0	90.5	2.7
环丙沙星	83.6	4.1	88.7	3.5
恩诺沙星	90.3	2.9	95.6	2.1
沙拉沙星	82.7	3.8	89.2	3.6

3 结论

本方法用快速溶剂萃取仪提取太平湖白鱼中的4种氟喹诺酮类兽药,样品的前处理操作简便,溶剂用量少,萃取速度快,提取过程全部自动完成,省时省力。高效液相色谱荧光检测器和紫外检测器同时测定,定性更加准确。该方法的灵敏度和精密度可以满足实际样品检测需要,适用于白鱼肉中4种氟喹诺酮类兽药残留含量的测定。

参考文献

- [1] BLONDEAU J M. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance [J]. Survey of Ophthalmology, 2004, 49(2): S73-S78.
- [2] 周侃侃,郭建亭,朱世敏.日本肯定列表制度对我国农产品出口贸易的影响思考[J].现代商贸工业, 2010, 22(3): 102-103.
- [3] 中华人民共和国农业部.动物性食品中兽药最高残留限量[S].北京:中国标准出版社, 2002.
- [4] Council Regulation (EEC) No. 2377/90 of 26 June 1990, Off. J, Eur, Commun, L224 (1990) 1[S]. 1990-06-26.
- [5] SCHNEIDER M J, DARWISH A M, FREEMAN D W. Simultaneous multiresidue determination of tetracyclines and fluoroquinolones in catfish muscle using high performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 586(1-2): 269-274.
- [6] JOHNSTON L, MACKAY L, CROFT M. Determination of quinolones and fluoroquinolones in fish tissue and seafood by high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometric detection[J]. J Chromatog A, 2002, 982(1): 97-109.
- [7] MARCHESIN G R, HAASNOOT W, DELAHAUT P, et al. Dual biosensor immunoassay-directed identification of fluoroquinolones in chicken muscle by liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 586(1-2): 259-268.
- [8] Test Methods for Evaluating Solid Waste, Method 3545, EPA SW-846[M]. 3rd ed. Update III US GPO, Washington, 1995.
- [9] SANCHEZ BRUNETE C, MIGUEL E, TADEO J L. Analysis of 27 polycyclic aromatic hydrocarbons by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry in sewage sludge from the Spanish area of Madrid [J]. J Chromatography, 2007, 1148(2): 219-227.
- [10] WANG Pu, ZHANG Qinghua, WANG Yawei, et al. Evaluation of Soxhlet extraction, accelerated solvent extraction and microwave-assisted extraction for the determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in soil and fish samples[J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 663(1): 43-48.
- [11] YU Huan, TAO Yanfei, LE Tao, et al. Simultaneous determination of amitraz and its metabolite residue in food animal tissues by gas chromatography-electron capture detector and gas chromatography-mass spectrometry with accelerated solvent extraction[J]. J Chromatography B, 2010, 878(21): 1746-1752.
- [12] YANG Yi, HOFMANN T. Aqueous accelerated solvent extraction of native polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from carbonaceous river floodplain soils[J]. Environ Pollution, 2009, 157(10): 2604-2609.
- [13] 张健玲,张勇清,黄慧贤,等. HPLC法测定鳊鱼中三种喹诺酮类药物残留[J]. 中国食品卫生杂志, 2008, 20(4): 316-318.