



李维铨, 姬长云, 张静洁, 等. 高效液相色谱法检测鸡肉中氟喹诺酮类药物残留量前处理方法的优化[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(5): 14-18.

高效液相色谱法检测鸡肉中氟喹诺酮类药物残留量 前处理方法的优化

李维铨, 姬长云, 张静洁, 程汉奎, 邓超, 钟佳莲, 邓衔柏, 沈祥广

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】建立一种用高效液相色谱法快速检测鸡肉组织中5种氟喹诺酮类药物(诺氟沙星、环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星)残留量的方法。【方法】样品的提取液由乙腈与三氯乙酸溶液(质量分数2%)按体积比1:3的比例混合而成,流动相为乙腈-磷酸/三乙胺溶液($0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),荧光激发波长280 nm,发射波长450 nm。【结果和结论】添加低、中、高浓度水平时,回收率为84.71%~99.66%,变异系数为0.20%~4.34%。该方法检测诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星的残留定量限为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,达氟沙星的残留定量限为 $2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,沙拉沙星的残留定量限为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。此法操作简单、实用,灵敏度高,可以满足鸡肉食品中氟喹诺酮类药物残留检测的需要。

关键词: 高效液相色谱法; 氟喹诺酮类药物; 鸡肉; 药物残留; 方法优化

中图分类号: S859

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2014)05-0014-05

An optimization study on determination of fluoroquinolones residues in chicken muscle by high performance liquid chromatography

LI Weicheng, JI Changyun, ZHANG Jingjie, CHENG Hankui, DENG Chao,
ZHONG Jialian, DENG Xianbai, SHEN Xiangguang

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】A method for rapid determination of five fluoroquinolones (norfloxacin, ciprofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, sarafloxacin) residues in chicken muscle using high performance liquid chromatography (HPLC) was established. 【Method】The extracting solution of the chicken samples included a mixture of acetonitrile and trichloroacetic acid (the mass fraction of 2%). HPLC mobile phase consisted of acetonitrile and phosphate buffer ($0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) with triethylamine. Fluorometric excitation wavelength was 280 nm, and emission wavelength was 450 nm. 【Result and conclusion】The recoveries of 5 fluoroquinolones were 84.71% - 99.66% at three spiked level (low, medium, high), and the relative standard deviations (RSD) were 0.20% - 4.34%. The limit of quantitation (LOQ) of norfloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin was $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. The LOQ of danofloxacin was $2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, and the sarafloxacin was $20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. The method is simple, practical, and sensitive. It can meet the needs of determination of fluoroquinolones in chicken muscle.

收稿日期: 2013-02-21 优先出版时间: 2014-07-17

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20140717.0910.030.html>

作者简介: 李维铨 (1987—), 男, 硕士研究生, E-mail: 610659219@qq.com; 通信作者: 沈祥广 (1970—), 男, 高级兽医师, E-mail: shenxg@scau.edu.cn

基金项目: 省部产学研结合项目 (2011B090400228)

<http://xuebao.scau.edu.cn>

Key words: high performance liquid chromatography; fluoroquinolones; chicken muscle; residue; optimization

诺氟沙星(NOR)、恩诺沙星(ENR)、环丙沙星(CIP)、达氟沙星(DAN)和沙拉沙星(SAR)为常见的氟喹诺酮类抗菌剂,目前在畜禽生产中被广泛应用。此类药物使用不当导致的药物残留可能直接危害人体健康,也可能使致病菌产生耐药性,间接对人类健康造成影响^[1-2]。多个国家和地区均规定了氟喹诺酮类药物的最高残留限量^[1]。检测动物源食品中氟喹诺酮类药物残留的方法有微生物法^[3]、酶联免疫法(ELISA)^[4]、毛细管区带电泳法^[5-6]、电解分析法^[7]、高效液相色谱法(HPLC)^[8-10]、高效液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS)^[11-14]等。目前,在鸡肉产品的检测中,常采用的方法是《动物性食品中氟喹诺酮类药物残留检测-高效液相色谱法》(农业部1025号公告14-2008)^[15]。本试验以此标准为基础,简化了试验前处理方法,优化了检测过程。经试验验证,该法非常适合大批量处理样品,大量节省了处理时间和所需耗材,较大幅度降低成本,方法的灵敏度和回收率均可满足我国现行兽药残留检测分析的要求。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

恩诺沙星对照品、环丙沙星对照品、诺氟沙星对照品、达氟沙星对照品、沙拉沙星对照品,均为中国兽医药品监察所产品,磷酸二氢钾、磷酸、三乙胺、氢氧化钠溶液(分析纯,广州试剂厂),乙腈(色谱纯,Fisher公司)。

1.2 仪器和设备

Agilent 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)配荧光检测器,高速匀质机及振荡器(德国 IKA 公司),高速台式冷冻离心机(美国 Thermo 公司)。

1.3 试液配制

分别称取恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星对照品各 10 mg,置于同一个 10 mL 容量瓶中,用 0.05 mol · L⁻¹ 的氢氧化钠溶液溶解定容至刻度,制得质量浓度均为 1 mg · mL⁻¹ 的混合储备溶液。准确称取达氟沙星对照品 10 mg,0.05 mol · L⁻¹ 的氢氧化钠溶液溶解定容至 10 mL,使其质量浓度为 1 mg · mL⁻¹。准确称取沙拉沙星对照品 10 mg,0.05 mol · L⁻¹ 的氢氧化钠溶液溶解定容至 10 mL,使其质量浓度为 1 mg · mL⁻¹。

置 2 ~ 8 °C 冰箱中保存备用,有效期 1 个月。

取上述恩诺沙星、环丙沙星和诺氟沙星的混和储备液 100 μL,达氟沙星储备液 20 μL,沙拉沙星储备液 200 μL,置于同一个 100 mL 容量瓶中,用流动相定容至刻度,配置成恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星的质量浓度为 1 μg · mL⁻¹,达氟沙星质量浓度为 0.2 μg · mL⁻¹,沙拉沙星质量浓度为 2 μg · mL⁻¹ 的混合标准溶液。

提取液:称取 2 g 三氯乙酸于容量瓶中,加水至 100 mL,制得的三氯乙酸溶液与乙腈按体积比 3:1 的比例混合,搅拌均匀,得到提取液。

磷酸/三乙胺溶液:取磷酸 3.4 mL,用水稀释至 1 000 mL,配成 0.02 mol · L⁻¹ 的磷酸溶液,用三乙胺调 pH 至 2.4。临用配制(易产生沉淀)。

1.4 测定方法

1.4.1 供试材料的制备 将市售的鸡肉样品用高速匀浆机绞碎得到供试试料,将空白鸡肉样品绞碎得到空白试料,在空白试料中添加适宜浓度的标准溶液作为空白添加试料。

1.4.2 提取与净化 称取 1 g 试料,置于匀浆杯中,加提取液 4 mL,高速匀浆 1 min。匀浆液转入 15 mL 聚丙烯离心管中,振荡 30 min,16 000 r/min,离心 8 min,取上清液过 0.2 μm 滤膜,装入进样瓶,待测。

1.4.3 色谱条件 色谱柱:Agilent TC-C₁₈ 250 mm × 4.6 mm(i.d),粒径 5 μm。流动相:V(0.02 mol · L⁻¹ 磷酸/三乙胺溶液):V(乙腈) = 80:20。流速:1 mL · min⁻¹。检测波长:激发波长 280 nm;发射波长 450 nm。进样量:20 μL。

1.5 线性范围与检出限

空白样品中加入混合标准液配制成的诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、达氟沙星、沙拉沙星系列标准溶液。高效液相色谱仪检测后,以峰面积为纵坐标,药物质量浓度为横坐标,进行线性回归分析。在空白样品中添加不同质量浓度混合标准溶液,按“1.4”的方法进行处理,检测后取信噪比 S/N = 3 对应的样品浓度为方法检出限(LOD),信噪比 S/N = 10 对应的样品浓度为方法定量限(LOQ)。

1.6 回收率和精密度

向空白待测样品中分别添加 3 个浓度水平的混合标准液,按“1.4”的方法进行处理,每个浓度重复

5次,连续做3个批次,计算回收率和变异系数.

2 结果与分析

2.1 色谱分析

在试验选定的条件下,测得诺氟沙星的保留时间为6.67 min,环丙沙星为7.19 min,达氟沙星为8.18 min,恩诺沙星为9.07 min,沙拉沙星为12.93 min,峰形尖锐,分离完全,空白组织样品在上述保留时间无干扰峰出现(图1).

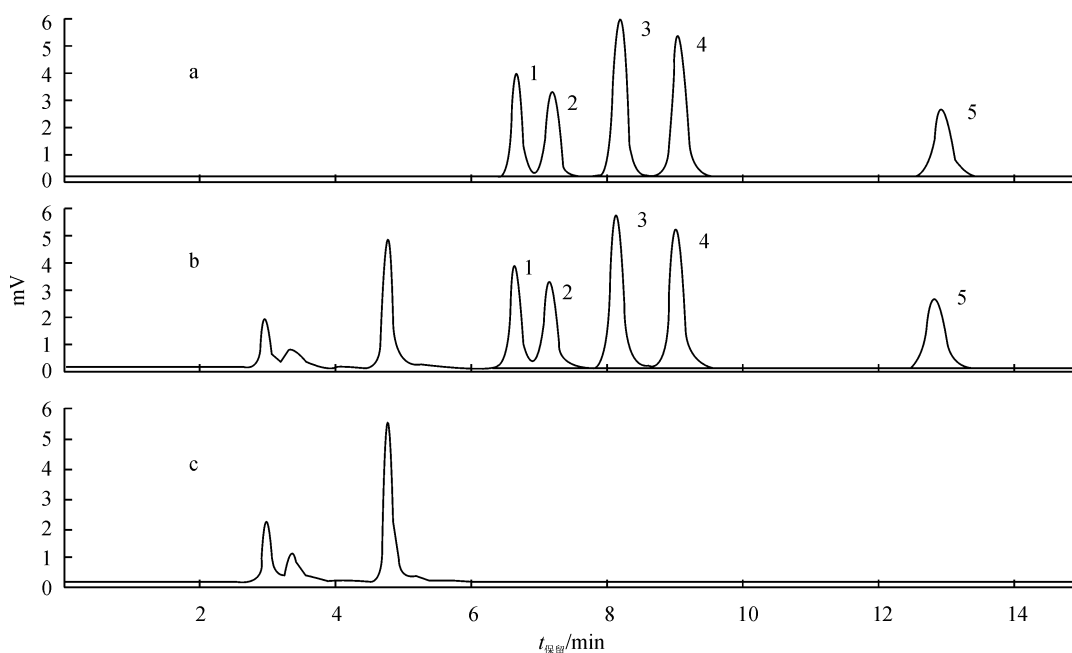
2.2 方法的检出限及标准曲线

空白鸡肉样品中添加不同质量浓度的标准工作溶液,诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星的残留定量限

为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,达氟沙星的残留定量限为 $2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,沙拉沙星的残留定量限为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$.诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星的线性范围为 $10 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,达氟沙星为 $2 \sim 20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,沙拉沙星为 $20 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$.对质量浓度不同的混合标准使用液进行色谱分析,工作曲线的线性范围、回归方程、相关系数见表1.可见,本方法灵敏度高、线性范围较宽,有一定的实用价值.

2.3 方法的回收率与精密度

对鸡肉样品分别进行4个浓度的添加试验,测得的回收率为84.71%~99.66%,批内变异系数为0.20%~4.42%,批间变异系数为0.33%~2.68%(表2).



1:诺氟沙星($0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$);2:环丙沙星($0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$);3:达氟沙星($0.02 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$);4:恩诺沙星($0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$);5:沙拉沙星($0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

图1 标准溶液(a)、空白肌肉添加药品(b)、空白肌肉样品(c)的色谱图

Fig. 1 The chromatography of standard solution of five fluoroquinolones (a), spiked sample (b), blank muscle tissue (c)

表1 方法的线性范围、回归方程与相关系数

Tab. 1 The linear ranges, regression equations and correlation coefficients

氟喹诺酮类 药物	线性范围/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	回归方程	检出限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	定量限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	相关系数(<i>r</i>)
诺氟沙星	10 ~ 100	$Y = 0.395X - 0.089$	5	10	1
环丙沙星	10 ~ 100	$Y = 0.335X - 0.028$	5	10	1
达氟沙星	2 ~ 20	$Y = 0.711X - 0.011$	1	2	1
恩诺沙星	10 ~ 100	$Y = 0.654X + 0.361$	5	10	1
沙拉沙星	20 ~ 200	$Y = 0.459X - 0.018$	10	20	1

表2 回收率及相对标准偏差

Tab.2 Recoveries and relative standard deviations

氟喹诺酮类 药物	$w_{\text{添加}} /$ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	批内						批间	
		回收率($n=5$)/%			CV/%			回收率 ($n=15$)/%	CV/%
		1	2	3	1	2	3		
诺氟沙星	10	99.00 ± 1.27	96.72 ± 2.74	97.00 ± 2.26	1.29	2.84	2.33	97.54 ± 2.20	2.26
	20	99.66 ± 0.37	98.59 ± 1.06	98.59 ± 1.06	0.37	1.08	1.08	98.93 ± 0.95	0.96
	50	98.66 ± 0.50	98.54 ± 0.63	98.39 ± 0.75	0.51	0.64	0.76	98.53 ± 0.60	0.61
	100	99.36 ± 0.70	99.62 ± 0.20	99.49 ± 0.20	0.71	0.20	0.21	99.49 ± 0.40	0.41
环丙沙星	10	96.88 ± 2.31	97.51 ± 1.78	96.57 ± 2.46	2.38	1.82	2.55	96.96 ± 2.01	2.07
	20	94.51 ± 4.17	96.80 ± 1.21	96.80 ± 1.21	4.42	1.25	1.24	96.08 ± 2.57	2.68
	50	98.45 ± 0.51	98.51 ± 0.67	98.43 ± 0.86	0.52	0.68	0.87	98.46 ± 0.64	0.65
	100	99.31 ± 0.31	98.80 ± 0.23	99.25 ± 0.24	0.31	0.24	0.23	99.13 ± 0.33	0.33
达氟沙星	2	99.08 ± 0.32	97.81 ± 1.12	97.09 ± 1.12	0.32	1.15	1.15	97.94 ± 1.19	1.22
	4	98.13 ± 1.58	97.78 ± 0.56	97.78 ± 0.56	1.61	0.57	0.57	97.89 ± 0.93	0.95
	10	98.51 ± 0.71	98.47 ± 0.86	98.27 ± 0.65	0.72	0.88	0.66	98.42 ± 0.70	0.71
	20	97.46 ± 1.28	97.18 ± 1.11	95.77 ± 1.11	1.31	1.15	1.16	96.74 ± 1.31	1.35
恩诺沙星	10	96.35 ± 1.82	94.67 ± 0.95	94.55 ± 1.15	1.89	1.00	1.22	95.15 ± 1.47	1.55
	20	96.07 ± 1.84	96.74 ± 0.53	96.41 ± 0.53	1.92	0.55	0.55	96.41 ± 1.06	1.10
	50	98.47 ± 0.62	98.38 ± 0.85	98.24 ± 0.89	0.63	0.86	0.90	98.37 ± 0.74	0.75
	100	97.01 ± 1.18	97.01 ± 1.18	96.42 ± 1.93	1.22	1.22	2.00	96.79 ± 1.35	1.40
沙拉沙星	20	85.78 ± 2.40	86.67 ± 1.76	86.41 ± 4.34	2.80	2.03	5.02	85.97 ± 1.85	2.16
	40	84.71 ± 3.01	86.91 ± 0.87	86.36 ± 0.87	3.56	1.00	1.00	86.01 ± 1.93	2.24
	100	97.95 ± 0.95	98.85 ± 0.72	98.30 ± 0.76	0.97	0.73	0.77	98.37 ± 0.85	0.86
	200	91.70 ± 1.89	92.88 ± 1.80	93.01 ± 1.31	2.06	1.93	1.41	92.56 ± 1.63	1.75

2.4 抽样检测

从市场上购买 30 个鸡肉样品,每份样品 2 个重复,按本方法进行制样和检测,结果发现一例鸡肉样品中诺氟沙星残留量为 $43.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,平行样品中诺氟沙星的质量浓度为 $41.4 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,其余样品均未检出氟喹诺酮药物的残留.表明该方法检测鸡肉中氟喹诺酮类药物残留量的重现性非常好,相对偏差保持在 3% 之内,数据可靠.

3 讨论与结论

3.1 样品前处理方法的优化

动物源食品中基质干扰复杂,富含脂肪和蛋白质,选择并优化样品的前处理方法对结果的准确性尤为重要.本试验在农业部 1025 号公告-14-2008 所采用方法^[15]的基础上,对样品的前处理过程进行了一定的优化.该标准检测方法采用磷酸盐缓冲液提取完后,离心取上清液,过固相萃取柱,从而除去样

品中的杂质.本试验的提取液由乙腈与质量分数为 2% 的三氯乙酸按体积比 1:3 混合而配得,蛋白质在酸性条件下变性,离心出沉淀除掉杂质,而提取液中加入乙腈也与流动相中乙腈比例吻合,出峰较好.

比较其他相关研究,仲锋^[16]在鸡组织中检测氟喹诺酮类药物残留量的回收率为 70% ~ 107%,变异系数小于 10%;陈红等^[17]在鸡排泄物中检测氟喹诺酮类药物的回收率为 75% 以上,批内变异系数在 2.2% ~ 10% 之间,批间变异系数在 6.2% ~ 13.0% 之间;而本试验测得的回收率为 84.71% ~ 99.66%,批内变异系数为 0.20% ~ 4.42%,批间变异系数为 0.33% ~ 2.68%.相较而言,本试验的回收率有了明显稳定的提高,精密度和准确度也相应改善了,定量限能满足日常采集样品的检测范围,而且检测的效率大大增加,节省了柱子的成本,减少了处理的时间,非常适用于样本量较大时的残留检测.

3.2 检测方法的稳定性

将新鲜配制的混合标准工作液 $50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 于 4

℃冰箱中避光保存 1、3、5、7 d 后上机检测,结果表明,被测药物保留时间基本不变,但浓度明显降低,可见标液在保存过程中不稳定,因此在测定过程中应该做到现用现配,处理完后的样品也应及时上机.

3.3 结论

本试验在农业部 1025 号公告-14-2008 所采用方法^[15]的基础上,对样品的前处理过程进行了优化,使样品处理快捷便利,灵敏度高,重现性好,明显降低批量样品的检测成本,可有效应用于鸡肉食品品质的日常监控.

参考文献:

- [1] 李俊锁,邱月明,王超. 兽药残留分析[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002: 365-390.
- [2] WINTER R W, KELLY J X, SMILKSTEIN M J. Antimalarial quinolones: Synthesis, potency, and mechanistic studies[J]. *Exp Parasitol*, 2008, 118(4): 487-497.
- [3] 朱蓓蕾. 动物性食品药物残留[M]. 上海:上海科学技术出版社,1994: 115.
- [4] BUCKNALL S, SILVERLIGHT J, COLDHAM N, et al. Antibodies to the quinolones and fluoroquinolones for the development of generic and specific immunoassays for detection of these residues in animal products[J]. *Food Addit Contam*, 2003, 20(3): 221-228.
- [5] BARRON D, JIMENEZ-LOZANO E, BAILAC S, et al. Determination of difloxacin and sarafloxacin in chicken muscle using solid-phase extraction and capillary electrophoresis[J]. *J Chromatogr B*, 2002, 767(2): 313-319.
- [6] SCHMITT-KOPPLIN Ph, BURHENNE D, FREITAG M, et al. Development of capillary electrophoresis methods for the analysis of fluoroquinolones and application to the study of the influence of humic substances on their photodegradation in aqueous phase[J]. *J Chromatogr A*, 1999, 837(1/2): 253-265.
- [7] BELTAGI A M. Determination of the antibiotic drug pefloxacin in bulk form, tablets and human serum using square wave cathodic adsorptive stripping voltammetry[J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2003, 31(6): 1079-1088.
- [8] 钱卓真,苏秀华,魏博娟,等. 高效液相色谱法同时测定水产品中 6 种喹诺酮药物的残留[J]. *食品科学*, 2010, 31(6): 185-189.
- [9] 赵思俊,李存,江海洋,等. 高效液相色谱检测动物肌肉组织中 7 种喹诺酮类药物的残留[J]. *分析化学*, 2007, 35(6): 786-790.
- [10] HOLIZAPPLE C K, BUCKLEY S A, STANKER L H. Determination of fluoroquinolones in serum using an on-line clean-up column coupled to high-performance immunoaffinity-reversed-phase liquid chromatography[J]. *J Chromatogr B*, 2001, 754(1): 1-9.
- [11] 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(增刊): 25-30.
- [12] VAN HOOF N, DE WASCH K, OKERMAN L, et al. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the quantification of eight quinolones in bovine muscle, milk and aquacultured products[J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 529(1/2): 265-272.
- [13] 岳振峰,林秀云,唐少冰,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定动物组织中的 16 种喹诺酮类药物残留[J]. *色谱*, 2007, 25(4): 491-495.
- [14] SAMANIDOU V, EVAGGELOPOULOU E, TRITZMÜLLER B M, et al. Multi-residue determination of seven quinolones antibiotics in gilthead seabream using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1203(2): 115-123.
- [15] 农业部. 农业部 1025 号公告 14-2008 动物性食品中氟喹诺酮类药物残留检测-高效液相色谱法[S]. 北京:中国农业出版社,2008.
- [16] 仲锋. 恩诺沙星、环丙沙星在鸡组织中残留量的检测方法研究[J]. *中国兽药杂志*, 1999, 33(4): 5-8.
- [17] 陈红,曾振灵. 鸡排泄物中恩诺沙星和环丙沙星含量 HPLC 检测方法的建立[J]. *中国兽医科技*, 2005, 35(12): 1004-1007.

【责任编辑 柴 焰】