

【化学测定方法】

高效液相色谱荧光检测法同时测定婴幼儿食用鱼粉中环丙沙星和恩诺沙星残留量

王红青, 姜荷, 屠海云, 黄建萍, 林伟杰

(杭州质量技术监督检测院, 杭州 310019)

[摘要] 目的: 建立用高效液相色谱荧光检测器同时测定婴幼儿食用鱼粉中环丙沙星和恩诺沙星残留的方法。方法: 试样经水复原后, 由 5% 乙酸乙腈提取, 正己烷脱脂, 以 0.05 mol/L 磷酸三乙胺缓冲液-乙腈 (体积比为 85:15) 为流动相洗脱, 荧光检测器定性定量。结果: 该方法对测定的两种药物的检出限均为 5 μg/kg, 定量限均为 10 μg/kg, 两种药物在 5 μg/L~80 μg/L 范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.99。在添加水平分别为 10 μg/kg、20 μg/kg 和 80 μg/kg 时, 两种药物的加标回收率为 80.3%~92.6%, 相对标准偏差 (RSD) 为 1.2%~3.8%。结论: 方法操作简单、重现性好、灵敏度高、分析时间短, 适用于鱼粉中环丙沙星和恩诺沙星残留的确证检测。

[关键词] 高效液相色谱; 荧光检测; 婴幼儿食用鱼粉; 环丙沙星; 恩诺沙星

[中图分类号] O657.7²

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-8685(2011)01-0050-03

Simultaneous determination of ciprofloxacin and enrofloxacin residues in fish meal for children by high performance liquid chromatography with fluorescence detector

WANG Hong-qing, JIANG He, TU Hai-yun, HUANG Jian-ping, LIN Wei-jie

(Hangzhou Institute of Test and Calibration for Quality and Technology Supervision Hangzhou 310019, China)

[Abstract] **Objective** A confirmative method for simultaneous determination of ciprofloxacin hydrochloride and enrofloxacin residues in fish meal for children by high performance liquid chromatography with fluorescence detector was developed. **Methods** The sample was extracted with acidified acetonitrile after recovered by water, and defatted with n-hexane. The target compounds were separated by phosphoric acid-triethylamine buffer-acetonitrile (85:15), detected by fluorescence detector. **Results** The limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 5 and 10 μg/kg respectively for each drug. The linear ranges were from 5 μg/kg to 80 μg/kg with the correlation coefficients above 0.99 for all the two drugs. The average recoveries spiked at the 3 concentration levels of 10 μg/kg, 20 μg/kg, 80 μg/kg ranged from 80.3% to 92.6% with the relative standard deviations (RSD) of 1.2%~3.8%. **Conclusion** The method was proved to be simple, good reproducibility, high sensitivity, rapid, reliable and suitable for the simultaneous determination of ciprofloxacin and enrofloxacin residues in fish meal.

[Key words] High performance liquid chromatography; Fluorescence detection; Fish meal; Ciprofloxacin; Enrofloxacin

环丙沙星 (Ciprofloxacin) 和恩诺沙星 (Enrofloxacin) 是目前应用的喹诺酮类抗菌药中抗菌活性较强的药物。喹诺酮类药物 (QN_s) 是畜牧、水产养殖中常用到的药物, 饲养过程中不科学地使用这些药物会导致其在动物源食品中的残留超标, 影响人类健康, 并且会使细菌的耐药性增强, 从而影响药物在人类疾病治疗上的作用。目前测定动物源性食品中喹诺酮类药物残留的方法主要有高效液相色谱法 (HPLC)^[1-3]、液相色谱-质谱法联用法 (LC-MS/MS, UPLC-MS/MS)^[4-8] 等。现在, 食用鱼粉越来越多地成为婴幼儿的辅食产品, 对它的药物残留监控有非常重要的意义。目前还没有婴幼儿食用鱼粉中喹诺酮类药物的研究报道。本研究旨在通过改进前处理方法

和优化色谱条件, 从而建立起一种简便、快捷、灵敏, 同时可以满足国内外有关法规要求的方法。该法在鱼粉中的环丙沙星和恩诺沙星残留的实际检测中应用良好。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

Agilent LC-1200 高效液相色谱仪 (配有二极管阵列检测器、荧光检测器); 超声仪; 涡旋混匀器; 离心机; 氮吹仪; MilliQ 超纯水仪; 旋转蒸发仪; 精密天平。

标准品: 盐酸环丙沙星 (ciprofloxacin hydrochloride, CIP, 99.9%), 恩诺沙星 (enrofloxacin, ENR, 99.9%), 均购自 Dr. Ehrenstorfer 公司。

乙腈 (色谱纯); 乙酸 (36%, 分析纯); 正己烷 (分析纯); 磷酸 (分析纯); 三乙胺 (分析纯)。

[作者简介] 王红青 (1979-), 硕士, 工程师, 主要从事食品检验工作。

1.2 色谱条件

色谱柱: ODS-C18柱 (150 × 4.6 mm, 5 μm, 末端封尾), C18预柱, 柱温 30℃; 流动相: 0.05 mol/L 磷酸溶液 / 三乙胺 (取 3.4 ml 浓磷酸, 用 900 ml 水稀释, 三乙胺调 pH 至 2.4, 定容到 1000 ml) 和乙腈, 体积比为 85:15 检测条件: 荧光检测器, 激发波长 280 nm, 发射波长 450 nm, 进样体积 20 μl 流速 1 ml/min

1.3 标准储备液和工作液的配制

分别准确称取标准品各 10.0 mg 用 5% 乙酸乙腈溶解并定容至 100 ml 棕色容量瓶, 于 -20℃ 条件下保存。使用时取一定体积的上述标准储备液混合, 用流动相稀释成质量浓度为 5.0 μg/L, 10.0 μg/L, 20.0 μg/L, 40.0 μg/L, 80.0 μg/L 的标准工作液。

1.4 样品提取与净化

称取试样 1 g (精确到 0.01 g) 于 50 ml 聚丙烯离心管中, 加入 2.5 g 超纯水涡旋混匀后, 室温放置 2 h 加 15 ml 5% 乙酸乙腈溶液, 15℃ 以下超声提取 15 min, 于 5℃ 下 8000 r/min 离心 8 min, 收集上清液于 50 ml 棕色梨形瓶中, 残渣再重复提取一次, 合并上清液, 于 40℃ 旋转蒸发至近干, N₂ 气吹干。用 2 ml 流动相将残渣转移到 5 ml 具塞离心管中, 加入 2 ml 乙腈饱和正己烷, 涡旋混合, 于 5℃ 下 8000 r/min 离心 8 min 弃去正己烷层 (上层), 下层过 0.22 μm 滤膜, 待测。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 色谱柱 考虑到方法的通用性, 既满足目标物的分离, 抗干扰能力强, 峰形不拖尾, 又节省时间和试剂, 选择 150 × 4.6 mm, 5 μm 末端封尾的色谱柱, 10 min 即完成一次检测。

2.1.2 流动相 郭黎明^[8]等人研究了磷酸盐缓冲液对喹诺酮类药物响应信号的影响, 发现喹诺酮类药物以磷酸三乙胺缓冲液-乙腈为复溶液时的响应信号最强, 故选择 0.05 mol/L 磷酸三乙胺缓冲液 (pH 2.4) 和乙腈为流动相。改变磷酸缓冲液和乙腈的比例, 发现比例为 82:18 时, 6 min 即完成检测, 但检测样品时有杂质峰干扰; 比例为 85:15 时, 10 min 完成检测, 峰形良好, 目标物和杂质很好分离, 灵敏度高, 故采用 85:15 的比例。

2.1.3 波长 环丙沙星和恩诺沙星的紫外吸收很弱, 但有强荧光性质, 灵敏度高, 基线平稳, 杂质峰少, 故采用荧光检测法。环丙沙星和恩诺沙星的最大激发波长为 280 nm, 最大发射波长为 450 nm, 采用 λ_{ex} = 280 nm, λ_{em} = 450 nm 为实验波长。

2.2 前处理条件的优化

2.2.1 是否用水复原和复原时间 试验比较了直接提取和先用水复原 (润湿) 再用溶剂提取两种方法。结果表明, 直接提取方法的提取效率只有复原后的提取效率的 20% ~ 30%, 可能因为鱼粉是细小的颗粒状, 直接用 5% 乙酸乙腈提取, 蛋白变性, 目标物被包被, 无法提取完全。而用水复原后, 鱼粉溶胀, 与溶剂的接触面积增加, 提取效率也随之增加。

复原时间长短对提取效率也有影响。试验比较了复原 24 h (过夜)、6 h、2 h、1 h 后的提取效率, 结果表明复原 2 h 以上即可提取完全, 所以采取两小时为复原时间。

2.2.2 提取溶剂的选择 盐酸环丙沙星和恩诺沙星是水溶性物质, 一般用酸化乙腈或甲醇提取, 本文比较了 1%、2%、3%、10% 乙酸乙腈的提取效率, 试验结果表明, 5% 乙酸乙腈的提取效率最高, 如表 1 所示。10% 的乙酸乙腈由于水相的比例较高, 影响后续操作, 浓缩时间长, 可能是影响提取率的原因之一。所以最终选择 5% 乙酸乙腈作为提取溶剂。

表 1 乙酸浓度和提取效率

目标物	乙酸浓度 (%) 和提取效率 (%)			
	1	2	5	10
环丙沙星	77	81	88	85
恩诺沙星	80	83	92	86

2.3 方法性能指标的考察

2.3.1 线性关系 测定环丙沙星和恩诺沙星的质量浓度均为 5.0 μg/L, 10.0 μg/L, 20.0 μg/L, 40.0 μg/L, 80.0 μg/L 的混合标准溶液, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得到的线性回归方程见表 2。两种物质均在 0.1 ng ~ 1.6 ng 进样质量范围内与其峰面积呈线性关系, 相关系数均大于 0.99。

表 2 方法的线性范围、线性回归方程、相关系数

名称	线性范围 (μg/kg)	线性方程	相关系数 r ²
环丙沙星	5-80	Y = 0.3731X + 1.1998	0.99827
恩诺沙星	5-80	Y = 0.7331X + 1.6042	0.99996

注: Y: peak area X: mass concentration μg/L.

2.3.2 检出限和定量限 在 5.0 μg/kg 添加水平时, 环丙沙星和恩诺沙星的信噪比均大于 3, 故将其定为检出限。在 10.0 μg/kg 添加水平时, 环丙沙星和恩诺沙星的信噪比均大于 10, 且回收率、相对标准偏差 (RSD) 满足条件, 故将其定为定量限。

2.3.3 方法的回收率 称取 1 g 空白试样, 添加混合标准溶液, 使加标水平分别达到 10 μg/kg, 20 μg/kg 和 80 μg/kg 充分混匀, 按照本文建立的方法进行测定, 每个添加水平作 3 份平行测定, 由表 3 可见回收率稳定, 均在 80% 以上, 可以满足分析要求。

表 3 方法的加标回收率试验 (n = 3)

样品	D _{ng}	本底值 (μg/kg)	回收率 recovery (%)		
			10 μg/kg	20 μg/kg	80 μg/kg
鳕鱼粉	环丙沙星	< LOD	80.5	88.8	87.6
	恩诺沙星	< LOD	84.2	92.4	92.6
鲤鱼粉 1	环丙沙星	< LOD	80.3	88.2	86.8
	恩诺沙星	< LOD	83.4	91.5	91.9

2.3.4 方法的精密度 对一种试样分别进行 5 次实际处理和仪器分析检测, 结果 RSD 小于 3%, 方法的精密度良好, 见表 4 和图 1、图 2。

表 4 方法的精密度试验 ($n=5$)

样品名称	D mg	测定值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					RSD (%)
		1	2	3	4	5	
鲤鱼粉 2	环丙沙星	10.7	11.7	11.5	10.9	11.4	3.75
	恩诺沙星	40.3	41.5	41.1	40.6	40.9	1.12

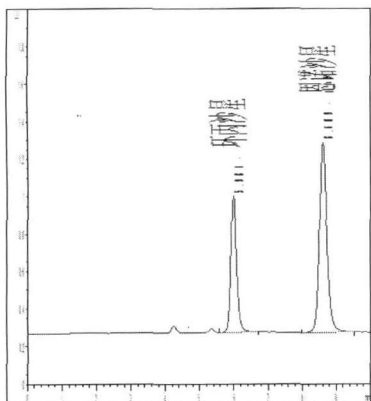


图 1 标准品色谱图

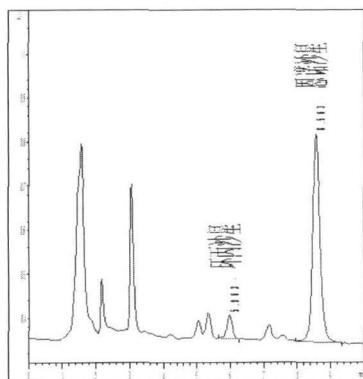


图 2 鱼粉样品色谱图

3 结论

本文用酸化乙腈提取婴幼儿食用鱼粉中的恩诺沙星和环丙沙星,乙腈饱和正己烷脱脂净化,前处理过程简单且操作方便,无需 SPE 净化,不需用基质标样,既节约成本又缩短了样品的分析时间。用荧光检测器进行定性定量分析,提高了检测灵敏度,抗干扰能力强,且方法线性相关性好、回收率高、测试结果稳定,可以作为婴幼儿食用鱼粉中恩诺沙星和环丙沙星残留的分析确证方法。

[参考文献]

- [1] 刘明生,甘辉群,谭菊,等. 高效液相色谱法同时测定鸡蛋中恩诺沙星和环丙沙星的残留 [J]. 饲料工业, 2007, 28(21): 39-40.
- [2] 周萍,胡福良,徐权华,等. 高效液相色谱-荧光检测器测定蜂王浆中氟喹诺酮类药物残留的研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(6): 222-225.
- [3] 林保银. 鸡肉中 11 种喹诺酮类药物多残留的高效液相色谱检测 [J]. 色谱, 2009, 27(2): 206-210.
- [4] 李雅丽,郝晓蕾,冀宝庆,等. HPLC-ESI-MS/MS 测定动物性食品中 19 种喹诺酮类药物残留的研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(8): 502-506.
- [5] 刘正才,杨方,余孔捷,等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速检测鳗鱼中磺胺类、喹诺酮类、四环素族抗生素药物残留等 [J]. 食品科学, 2009, 30(14): 167-170.
- [6] 孙广大,苏仲毅,陈猛,等. 固相萃取-超高压液相色谱-串联质谱同时分析环境水样中四环素类和喹诺酮类抗生素 [J]. 色谱, 2009, 27(1): 54-58.
- [7] 郭伟,刘永,刘宁. 超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法同时分析鸡肉中 7 种喹诺酮类药物残留 [J]. 色谱, 2009, 27(4): 406-411.
- [8] 郭黎明,朱奎,江海洋,等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定鸡肝中残留的四环素类、磺胺类、喹诺酮类药物 [J]. 色谱, 2009, 27(4): 412-416.

(收稿日期: 2010-10-19)

(上接第 49 页)

图和总离子流图如下。

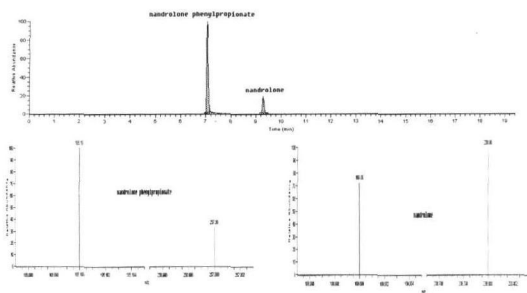


图 1 苯丙酸诺龙及诺龙标准溶液的总离子流图和特征离子质谱图

[参考文献]

- [1] 张昱,余德河,胥传来,等. 动物源性食品中激素及其代谢物残留检测技术研究进展 [J]. 食品科学, 2008, 29(8): 643-646.
- [2] 湛嘉,俞雪钧,李佐卿,等. 黄鳝肌肉中 11 种性激素的气质联用检测方法 [J]. 分析测试学报, 2007, 26(5): 642-646.

- [3] 叶荔,张长久,张亦中. 人尿中诺龙和快诺酮代谢物的气相色谱-质谱分析 [J]. 分析化学, 1995, 23(1): 32-35.
- [4] Marie Bresson, Vincent Cirimele, Marion Villain. Doping control for mesterolone using hair analyzed by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography B, 2006, 836(1): 124-128.
- [5] 张霁,刘春胜,毕红钢,等. 尿中多种蛋白同化激素药物的 GC/MS 分析及代谢研究 [J]. 药理学, 1991, 26(8): 598-605.
- [6] B. Le Bizec, F. M. Onteau, I. Gaudin, et al. Evidence for presence of endogenous 19-norandrostosterone in human urine [J]. Journal of Chromatography B, 1999, 723(2): 157-172.
- [7] 刘玉波,马剑文. 苯丙酸诺龙高效液相色谱测定法 [J]. 药物分析杂志, 1993, 13(1): 272-273.
- [8] 张兰,陈金凤,董萍,等. 高效液相色谱法同时测定血浆中的 10 种蛋白同化激素 [J]. 色谱, 2008, 26(4): 449-453.
- [9] 秦晓,刘欣,王占良,等. 液相色谱-电喷雾电离串联质谱法检测尿液中的 3 种合成类固醇药物 [J]. 色谱, 2008, 26(4): 465-468.

(收稿日期: 2010-08-18)