

# 鸡蛋中氟喹诺酮类药物残留量检测方法研究

李丹, 张玉洁, 仲锋, 汪霞

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2010-05-11 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2010)06-0001-04 [中图分类号] S859.84

**[摘要]** 建立一种可同时检测鸡蛋中四种氟喹诺酮类药物(环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星和沙拉沙星)残留的高效液相色谱-荧光检测法。结果表明, 四种氟喹诺酮类药物中环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星在 2~500 ng/mL 范围内峰面积与浓度呈良好的线性关系,  $R^2$  均大于 0.9999, 达氟沙星在 0.4~100 ng/mL 范围内峰面积与浓度呈良好的线性关系,  $R^2$  大于 0.9999。环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星的定量限为 10  $\mu$ g/kg, 达氟沙星的定量限为 2  $\mu$ g/kg。环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星在 10~200  $\mu$ g/kg 的浓度添加水平上, 其回收率为 70%~100%; 达氟沙星在 2~40  $\mu$ g/kg 的浓度添加水平上, 其回收率为 70%~100%, 批内、批间的相对标准偏差均小于 10%。

**[关键词]** 高效液相色谱法; 氟喹诺酮类药物; 残留; 鸡蛋

## Study on Detection Method of Quinolones Residues in Egg

LIDan, ZHANG Yu-jie, ZHONG Feng, WANG Xia

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

**Abstract** A method for determination of quinolones residues in egg by HPLC with fluorescence detector detection was established. A good linearity of the calibration curves for ciprofloxacin, enrofloxacin, sarafloxacin was obtained within the range of 2~500 ng/mL ( $R^2 > 0.9999$ ), and danofloxacin was obtained within the range of 0.4~100 ng/mL ( $R^2 > 0.9999$ ). The limit of quantification of ciprofloxacin, enrofloxacin, sarafloxacin was 10 ng/g and danofloxacin was 2 ng/g. The average recoveries of ciprofloxacin, enrofloxacin, sarafloxacin from spiked eggs at three concentrations of 10, 50, 200 ng/g ranged from 70% to 100% ( $n = 5$ ), and danofloxacin from spiked eggs at three concentrations of 2, 10, 40 ng/g ranged from 70% to 100% ( $n = 5$ ). The intra- and inter-batch variation coefficients were both less than 10%.

**Key words** HPLC; quinolones residues; egg

环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星和沙拉沙星均属于氟喹诺酮类抗菌药物(FQs), 该类药物具有高效、广谱、低毒等特点, 在畜牧养殖中广泛用于预防与治疗动物疾病<sup>[1]</sup>。随着社会不断发展进步, 人民生活水平日益提高, 动物性食品的消费也日趋增加。因此动物性食品中的兽药残留问题也愈来愈受到关注。通过有效的技术手段对动物性食品中的药物残留进行检测, 以确保人类对动物性食品消

费的安全, 具有十分重要的意义。

有关 FQs 多残留在动物组织中的检测方法, 国内外已有诸多报道。主要是通过高效液相色谱法、液相色谱串联质谱法及荧光检测器检测, 提取的方法也各有不同, 有液-液萃取、液-固萃取等<sup>[2]</sup>。依据农业部 781 号公告-6-2006“鸡蛋中氟喹诺酮类药物残留检测——高效液相色谱法”进行检样, 实验结果显示四种氟喹诺酮类药物(环丙沙星、

作者简介: 李丹(1982年-), 研究实习员, 主要从事兽药残留检测方法研究。E-mail: lidan@ivdc.gov.cn

通讯作者: 仲锋(1956年-), 副研究员, 主要从事兽药残留检测方法研究。E-mail: zhongfeng@ivdc.gov.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

达氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星)回收率不理想,达不到鸡蛋中氟喹诺酮类药物残留检测的要求。因此本研究旨在改善提取净化条件,建立一种操作步骤简单,同时提高鸡蛋中四种氟喹诺酮类药物(环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星)回收率的多残留分析方法。

## 1 实验部分

1.1 仪器与试剂 Agilent 1100高效液相色谱仪(配荧光检测器),美国安捷伦公司;AE 240型分析天平;Delta-320型酸度计,上海梅特勒-托利多公司;Biofuge Stratos高速冷冻离心机,德国贺利氏公司;乙腈(色谱纯),美国Fisher公司;磷酸,北京化学试剂公司;三乙胺,广东汕头市西陇化工厂;正丙醇、甲酸,北京化工厂;环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、达氟沙星对照品,中国兽医药品监察所,含量均大于等于99.0%。

1.2 色谱条件 0.05 mol/L磷酸三乙胺溶液配制:取85%磷酸3.4 mL,用水稀释至1000 mL。用三乙胺调节pH值至2.4即得。流动相为0.05 mol/L磷酸三乙胺溶液-乙腈液(82+18 V/V);Hypersil C<sub>18</sub>色谱柱,250 mm×4.6 mm(i.d.),粒径5 μm,或相当者;流速1.0 mL/min;检测波长:激发波长280 nm,发射波长450 nm;柱温30℃;进样量20 μL。

1.3 对照溶液的配制 环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、达氟沙星混合标准储备液:分别称取环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、达氟沙星对照品约25、25、25、5 mg精密称定于25 mL量瓶中,用0.03 mol/L氢氧化钠溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,配成浓度分别为1 mg/mL(环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星)和0.2 mg/mL(达氟沙星)的混合标准储备液。2℃~8℃保存。

环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、达氟沙星混合标准工作液:准确量取适量标准储备液,用流动相稀释成浓度分别为1 μg/mL(环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星)和0.2 μg/mL(达氟沙星)的混合标准工作液。2℃~8℃保存。

1.4 组织样品的提取 称取试料(2±0.05)g置50 mL离心管中,加1%甲酸乙腈溶液6 mL,涡旋混匀,中速振荡5 min,8000 r/min离心6 min,上清液转入50 mL鸡心瓶中。残渣用1%甲酸乙腈溶液6 mL重复提取一次,合并上清液于同一50 mL鸡心瓶中,加入正丙醇3 mL,于50℃旋转蒸发器中蒸干。残余物用流动相4.0 mL溶解,涡旋混匀转入

15 mL离心管中,5000 r/min离心10 min,取上清液经微孔滤膜过滤,供高效液相色谱法分析。

## 2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择 参考国内外有关资料,经过反复试验摸索,氟喹诺酮类药物在酸性条件下,具有较强的荧光吸收。因此,确立用高效液相色谱仪荧光检测器,激发波长为280 nm;发射波长为450 nm;流动相为0.05 mol/L磷酸三乙胺-乙腈液。为达到分离度要求,在试验过程中调整流动相中有机相浓度比例,最后确立0.05 mol/L磷酸三乙胺-乙腈液(82:18)等度洗脱。空白鸡蛋色谱图、对照溶液色谱图及样品添加色谱图分别如图1、图2、图3所示。

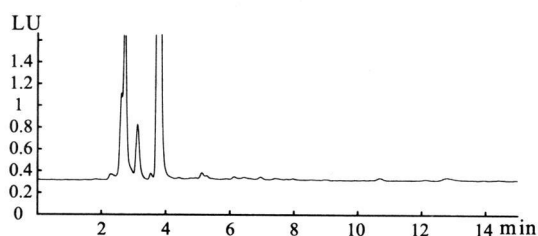


图1 空白鸡蛋色谱图

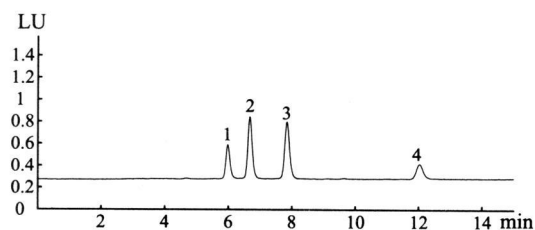
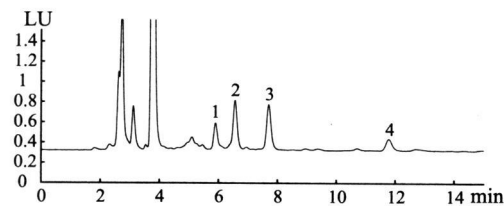


图2 5.0 ng/mL环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星, 1.0 ng/mL达氟沙星对照溶液色谱图



(1. 环丙沙星;2. 达氟沙星;3. 恩诺沙星;4. 沙拉沙星)

图3 鸡蛋中添加10 μg/kg环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星, 2 μg/kg达氟沙星色谱图

2.2 标准曲线及线性范围 精密量取含环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星1 μg/mL,含达氟沙星0.2 μg/mL的标准工作液0.02、0.05、0.1、0.25、1.0、5.0 mL至10 mL量瓶中,用流动相稀释至刻度,配成浓度分别为2.5、10、25、100、500 ng/mL的环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星标准溶液,0.4、1、2.5

20、100 ng/mL的达氟沙星标准溶液,依次从低浓度到高浓度按液相色谱条件进行分析,每一浓度进样三次,按其所得三次峰面积的平均值与对应的对照溶液的浓度做标准曲线,四种氟喹诺酮类药物(环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、达氟沙星)的标准曲线图、回归方程及相关系数分别如图4图5图6图7所示。

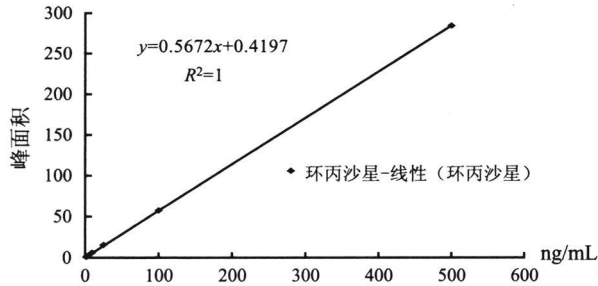


图4 环丙沙星标准曲线

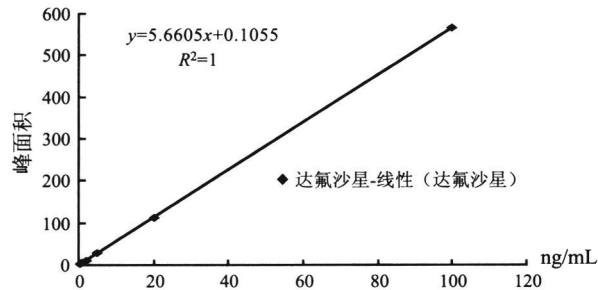


图5 达氟沙星标准曲线

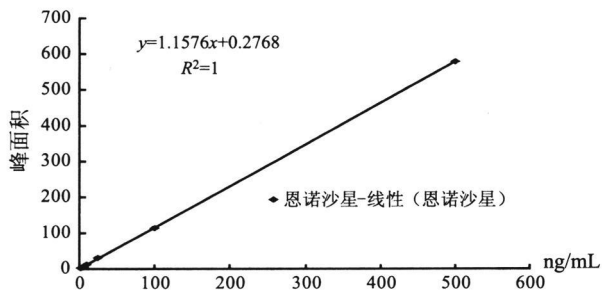


图6 恩诺沙星标准曲线

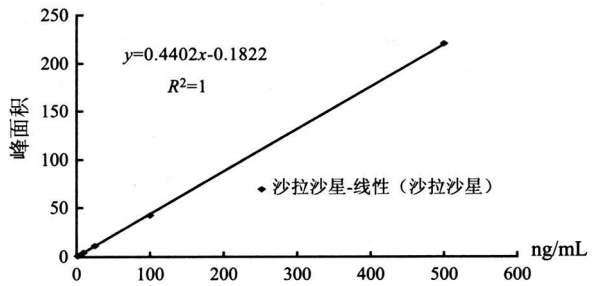


图7 沙拉沙星标准曲线

2.3 样品提取 在方法研究过程中,对样品的提取液进行了实验摸索。采用酸性、碱性乙腈溶液分别进行提取实验,并同时进行了0.5%甲酸乙腈溶液、1%甲酸乙腈溶液、2%甲酸乙腈等不同浓度提取液的效果实验。结果发现四种氟喹诺酮类药物经1%酸性乙腈溶液提取,效果非常理想,对不同浓度的添加实验其回收率均高于70%,达到了残留检测的要求,因此确立1%酸性乙腈溶液作为提取液,直接从鸡蛋中提取药物残留,提取液经旋转蒸发浓缩后,用流动相溶解供高效液相色谱仪分析。

由于采用酸性乙腈溶液提取,甲酸及乙腈作为蛋白沉淀剂和提取液能很好地沉淀蛋白,提取液经旋转蒸发浓缩,用流动相溶解离心后,所得溶液比较澄清,再经微孔滤膜过滤可直接供高效液相色谱仪分析,故本方法中未采用固相萃取技术。

2.4 方法准确度和精密度 采用标准添加法,在空白鸡蛋中添加3个不同浓度(低、中、高三个浓度)的环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星进行回收率试验,各浓度进行5个样品平行试验,重复3次,求批内、批间相对标准偏差,计算结果如表1表2表3表4所示。从表可以看出,本方法在空白鸡蛋中进行适当浓度添加后方法的回收率为70%~100%,批内、批间相对标准偏差均小于10%。

表1 鸡蛋中环丙沙星回收率测定结果

添加浓度( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	测定批次	回收率(%)				平均回收率(%)	批内 RSD(%)	批间 RSD(%)	
10	1	79.8	87.7	73.5	87.0	84.2	5.87		
	2	95.6	94.7	97.4	97.8	97.4	1.36	5.92	
	3	93.8	88.7	85.5	84.0	83.5	4.26		
50	1	70.4	71.7	76.8	80.7	79.3	4.57		
	2	82.9	92.5	91.4	87.3	89.8	2.95	5.87	
	3	71.9	79.8	76.1	71.3	79.8	3.34		
200	1	82.0	87.3	89.4	70.2	86.9	7.72		
	2	89.7	89.9	90.4	89.3	96.2	89.1	1.16	2.91
	3	86.6	85.2	88.6	86.9	86.8	7.28		

表 2 鸡蛋中达氟沙星回收率测定结果

添加浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	测定批次	回收率 (%)				平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
2	1	70.3	93.4	74.2	89.8	86.1	82.8	10.0
	2	84.8	90.2	93.9	91.5	93.8	90.9	3.72
	3	93.3	78.5	86.5	78.1	81.8	83.6	6.38
10	1	71.8	76.6	79.4	81.4	81.6	78.2	4.08
	2	82.3	86.4	91.8	80.0	84.6	85.0	3.26
	3	74.8	75.5	78.8	71.9	75.2	75.2	1.52
40	1	86.0	90.5	93.5	70.1	89.8	86.0	9.26
	2	90.2	92.8	90.2	91.5	88.3	90.6	1.25
	3	88.6	86.6	87.0	86.3	83.6	86.4	1.20

表 3 鸡蛋中恩诺沙星回收率测定结果

添加浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	测定批次	回收率 (%)				平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
10	1	78.3	99.9	74.2	86.9	84.6	84.8	9.83
	2	90.3	94.8	96.3	94.9	92.7	93.8	2.33
	3	98.8	86.3	86.1	76.3	88.1	87.1	8.02
50	1	70.9	75.0	80.8	83.2	82.9	78.6	5.42
	2	84.3	90.5	93.1	85.2	87.5	88.1	2.92
	3	77.2	77.1	79.8	74.0	78.4	77.3	1.46
200	1	86.2	90.1	92.7	71.8	90.8	86.5	8.43
	2	91.0	93.4	90.8	93.7	89.3	92.6	1.54
	3	87.8	86.9	86.8	85.6	83.5	88.6	1.23

表 4 鸡蛋中沙拉沙星回收率测定结果

添加浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	测定批次	回收率 (%)				平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
10	1	85.4	98.1	82.7	92.2	88.7	89.4	6.02
	2	90.3	94.8	96.3	94.9	92.7	88.8	2.33
	3	98.8	86.3	86.1	76.3	88.1	87.8	8.02
50	1	72.5	76.3	82.4	83.5	83.9	79.7	5.07
	2	88.1	90.4	91.8	86.3	88.0	88.9	1.72
	3	79.0	75.7	85.0	75.9	76.9	78.5	2.80
200	1	87.2	90.7	93.0	71.9	89.8	86.5	8.42
	2	92.2	95.1	92.5	92.7	90.8	92.6	0.98
	3	92.0	89.0	87.9	87.8	86.4	88.6	1.48

从上述表中数据可以看出,无论是各种浓度的回收率,还是批内、批间的变异系数,均符合农业部农发[2003]1号关于发布《兽药残留试验技术规范(试行)》通知的规定要求。

### 3 结论

此方法提取过程简单,操作步骤少,所用化学试剂的量也少,减少了对环境的污染。此方法适用于鸡蛋中四种氟喹诺酮类药物(环丙沙星、达氟沙

星、恩诺沙星、沙拉沙星)残留的检测。

### 参考文献:

- [1] 董琳琳,刘艳华,汪霞,等.反相高效液相色谱法同时测定 4 种氟喹诺酮类药物在鸡可食性组织中的残留[J].色谱, 2005, 3(23): 285-288
- [2] 董志远,赵晓凤,宫秀杰,等.牛奶中氟喹诺酮类药物残留量检测方法研究[J].中国兽药杂志, 2008, 42(10): 14-16