

• 研究论文 •

固相萃取-高效液相色谱法 测定水产品中 7 种氟喹诺酮类药物残留

惠芸华¹, 沈晓盛¹, 冯兵², 于慧娟^{*1}

(1. 中国水产科学研究院 东海水产研究所, 农业部水产品质量监督检验测试中心, 上海 200090)

2 大连水产学院 食品工程学院, 大连 116023)

摘要:建立了固相萃取-反相高效液相色谱法同时测定水产品(河鳗、南美白对虾和罗非鱼)中 7 种氟喹诺酮类药物残留的方法。样品经 1 mol/L 磷酸盐提取、正己烷去脂、C₁₈固相萃取柱净化后,用高效液相色谱分离、荧光检测器检测、外标法定量。诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星的最低添加水平为 5.0 μg/kg, 单诺沙星为 1.0 μg/kg, 培氟沙星为 4.0 μg/kg, 沙拉沙星为 20.0 μg/kg, 氧氟沙星为 30.0 μg/kg。结果表明, 7 种氟喹诺酮类药物的平均回收率在 75%~95% 之间, 相对标准偏差为 1.3%~9.3%; 检测限在 0.07~5.84 μg/kg 之间, 定量限在 0.23~19.48 μg/kg 之间。采用所建立方法对上海农贸市场随机抽取的实际样品进行检测, 结果均未检出 7 种氟喹诺酮类药物残留。

关键词:固相萃取; 高效液相色谱; 荧光检测器; 水产品; 氟喹诺酮

DOI: 10.3969/j.issn.1008-7303.2009.04.10

中图分类号: O657.7

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2009)04-0462-05

Determination of Seven Fluoroquinolones Residue in Aquatic Products by Solid-phase Extraction-HPLC

HUI Yun-hua¹, SHEN Xiao-sheng¹, FENG Bing², YU Huijuan^{*1}

(1. Ministry of Agriculture Supervision and Testing Center for Aquatic Products, East China Sea Fisheries

Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Shanghai 200090, China;

2 College of Food Engineering, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract A reversed-phase HPLC method for analyzing seven fluoroquinolones residue in aquatic products (*Anguilla anguilla*, *Penaeus vannamei* and *Oreochromis* spp.) with fluorescence detector was developed. The fluoroquinolones residue was extracted by phosphate, purified with n-hexane and solid-phase extraction, quantified using external standard calibration method. The minimum added concentration was 5.0 μg/kg for norfloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin, 1.0 μg/kg for danofloxacin, 4.0 μg/kg for pefloxacin, 20.0 μg/kg for sarafloxacin and 30.0 μg/kg for ofloxacin. The average recoveries of the seven fluoroquinolones in aquatic product ranged from 75% to 95%, with relative standard deviations of 1.3%~9.3%. The limit of detection (LOD) was 0.07~5.84 μg/kg.

收稿日期: 2009-01-20 修回日期: 2009-05-04

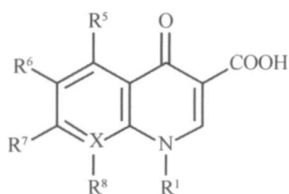
作者简介: 惠芸华 (1981-), 女, 研究实习生, 主要从事水产品质量安全方面的研究工作, 联系电话: 021-65680121, E-mail: huiyunhuan@126.com; * 通讯作者 (Author for correspondence): 于慧娟, 女, 研究员, 主要从事水产品质量安全方面的研究工作, 联系电话: 021-65680120, E-mail: yuhuijuan607@sohu.com

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (中国水产科学研究院东海水产研究所) 资助项目 (2007T06)。

the limit of quantification (LOQ) was 0.23-19.48 $\mu\text{g/kg}$. Samples obtained optionally from Shanghai terminal market were analyzed with the established method, and no fluoroquinolone was detected.

Key words solid-phase extraction; high performance liquid chromatography; fluorescence detector; aquatic products; fluoroquinolones

氟喹诺酮 (fluoroquinolones, FQs, 结构式如 I) 是近几年发展起来的一类重要的抗生素类药物, 因具有抗菌谱广、抗菌力强、组织穿透力强、低毒、结构简单、给药方便等优点^[1] 而愈来愈受到重视, 应用范围逐渐扩大。诺氟沙星 (norfloxacin)、恩诺沙星 (enrofloxacin)、环丙沙星 (ciprofloxacin)、氧氟沙星 (ofloxacin)、培氟沙星 (pefloxacin)、单诺沙星 (danofloxacin) 和沙拉沙星 (sarafloxacin) 是氟喹诺酮类药物的典型代表^[1-2], 目前在水产养殖过程中已普遍使用, 造成了水产品中此类药物的残留。由于使用不当所引起的抗生素类药物残留将可能对人体健康造成危害^[2-3], 目前水产品中氟喹诺酮类药物的残留问题已引起广泛关注^[3], 开展水产品中此类药物残留情况的监控、保障食品安全已是当务之急。



(I)

目前国内外有关氟喹诺酮类药物检测的报道较多^[1, 4-15], 测定方法主要为液相色谱法、液-质联用法和毛细管电泳法等, 主要是关于鸡蛋^[1, 4-7]、鸡肉^[8-9]、血浆、尿液^[10] 以及猪肾^[11-12] 中该类药物的残留量的测定, 关于水产品中氟喹诺酮类药物残留检测的相关报道还不多见, 且涉及水产品的这些报道有的采用液-质联用法^[13] 测定, 成本较高, 通用性不强, 而采用液相色谱法^[14-15] 测定则应用范围窄, 检测项目较少, 不能满足国际上对多残留检测的要求。因此开展水产品中氟喹诺酮类药物的多残留检测研究, 建立高效、灵敏的检测方法是极其必要的。本研究建立了可同时测定 7 种氟喹诺酮类药物残留的固相萃取-反相高效液相色谱检测方法, 成本低、通用性强, 经验证方法的准确性和灵敏度均满足分析测试的要求, 具有较好的实用性和推广价值。

1 材料与方法

1.1 材料

供试水产品河鳗 *Anguilla anguilla*、南美白对虾 *Penaeus vannamei*、罗非鱼 *Oreochromis spp* 均购自上海市农贸市场, 经检测, 样品均不含 7 种氟喹诺酮类药物。

1.2 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 配荧光检测器; Supelco 固相萃取装置, C_{18} 固相萃取柱 (200 mg, 3 mL); Xbridge Shield RP C_{18} (150 mm $\times$ 4.6 mm) 色谱柱, Waters 公司。

氧氟沙星 (ofloxacin)、诺氟沙星 (norfloxacin)、培氟沙星 (pefloxacin)、环丙沙星 (ciprofloxacin)、单诺沙星 (danofloxacin)、恩诺沙星 (enrofloxacin)、沙拉沙星 (sarafloxacin) 7 种氟喹诺酮类药物标准品均购自 Sigma 公司, 纯度 $\geq 99.0\%$ 。分别精确称取 0.0100 g 用 5 mL 浓度为 1 mol/L 的盐酸溶解, 乙腈定容至 100 mL, 0~4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 用前以流动相稀释。

1.3 色谱条件

Xbridge Shield RP C_{18} (4.6 mm $\times$ 150 mm) 色谱柱; 流动相: 0.1% 的三氟乙酸 (用三乙胺调 pH 为 3.0)-乙腈-甲醇 = 89:4:7 (体积比); 流速 2 mL/min; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 50 μL ; 荧光检测器激发波长 280 nm, 发射波长 450 nm。

1.4 样品处理

1.4.1 样品的制备 鱼去鳞、去皮后沿背脊取肌肉, 虾去头、去壳取可食肌肉部分, 经组织粉碎机粉碎, 于 -18 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷冻贮存, 测定前在室温下解冻。

1.4.2 提取与净化 分别称取 5.0 g 制备好的水产品样本于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 浓度为 1 mol/L 的磷酸二氢钾, 80 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h, 4 000 r/min 下离心 10 min, 取上清液; 用 5 mL 磷酸二氢钾清洗残渣, 4 000 r/min 下离心 10 min, 取上清液。合并两次上清液于另一 50 mL 离心管中, 用磷酸二氢钾定容至 20 mL。加入 30 mL 用水饱和的正己烷, 振荡至糊状, 静置分层。取 10 mL 下层水相清液进行固相萃取。

固相萃取柱预先用 3 mL 甲醇和 3 mL 水淋洗后, 将提取液加入萃取柱, 控制流速在每 3~4 s 1 滴, 试样液过柱后, 依次用 5 mL 水、3 mL 甲醇淋洗, 弃去淋洗液。用 6 mL 体积分数为 6% 的氨水-甲醇溶液洗脱, 洗脱液接收至 10 mL 的刻度离心管中, 55 ℃ 氮气吹干, 用流动相定容至 1 mL, 过滤, 待分析。

2 结果与讨论

2.1 色谱分离条件

氟喹诺酮属两性化合物, 在水溶液中均以离子形式存在, 给液相色谱分离带来了一定难度。研究过程中分别以不同离子对试剂为流动相考察了色谱柱对氟喹诺酮分离的影响, 发现 Xbridge Sh 18 RP C₁₈ 的分离效果较好, 峰形对称 (见图 1), 因此选择其作为氟喹诺酮分离的最佳色谱柱。

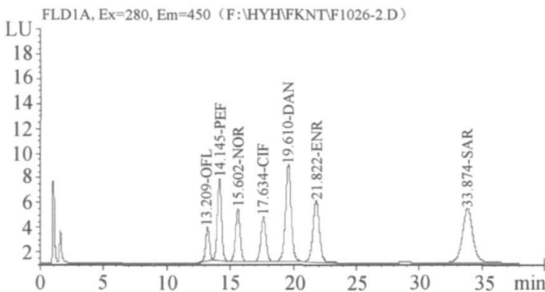


图 1 7 种氟喹诺酮类药物标准品的液相色谱图

Fig. 1 Standard HPLC chromatogram of 7 fluoroquinolones

OFL: 氧氟沙星 ofloxacin PEF 培氟沙星 pefloxacin NOR 诺氟沙星 norfloxacin CIF 环丙沙星 ciprofloxacin DAN: 单诺沙星 dano-floxacin ENR: 恩诺沙星 enrofloxacin SAR: 沙拉沙星 sarafloxacin

图 3 同。The same as in Fig 3.

2.2 提取剂的选择

氟喹诺酮类药物分子中含有氨基和羧基, 易

溶于稀酸、稀碱和乙腈。目前常用的提取方法主要有两种: 一是用乙腈^[12]、二氯甲烷^[5]等有机溶剂提取, 然后减压蒸发; 另一种是用盐酸^[7]、pH 7.0 的磷酸盐缓冲液^[6]等水溶液提取, 然后经固相萃取净化。考虑到多残留分析对样品净化的要求较高, 需采用固相萃取以排除杂质干扰, 故选用水溶液作为提取剂。比较发现, 1 mol/L 的盐酸和 1 mol/L 的磷酸二氢钾 (pH 7.0) 溶液的提取效果都非常理想, 但用盐酸溶液提取时杂质含量较高, 易堵塞固相萃取柱; 而用磷酸二氢钾溶液提取蛋白质含量高的品种 (如南美白对虾) 时, 由于水溶性蛋白质的影响, 提取液呈胶状, 无法离心分离, 可在 80 ℃ 保温 1 h 使蛋白质变性后分离出提取液和残渣。综合考虑, 以 1 mol/L 的磷酸二氢钾缓冲溶液 (pH 7.0) 作为提取剂可满足测定要求。

2.3 工作曲线和线性范围

在上述色谱条件下, 氟喹诺酮类药物浓度和峰面积呈现良好的线性关系, 其工作曲线和线性范围见表 1。

2.4 回收率和精密度

分别测定了脂肪含量高的河鳗、蛋白质含量高的南美白对虾及罗非鱼中的氟喹诺酮类药物残留。添加水平、回收率和方法的相对标准偏差见表 2 空白谱图和最低添加水平下的谱图见图 2-图 3。

2.5 方法的定量限和检测限

配制不同浓度的混合标样, 分别对南美白对虾空白样品进行添加回收实验。7 种氟喹诺酮类药物的添加回收率均在 70%~95% 之间, 相对标准偏差都低于 10%, 各组信噪比大于 10。分别计算得到方法的定量限和检测限 (表 2)。

表 1 7 种氟喹诺酮类药物的线性范围和回归方程

Table 1 Linear ranges regression equations of the 7 fluoroquinolones

氟喹诺酮 Fluoroquinolones	回归方程 Regression equations	相关系数 R ² Correlation coefficient	线性范围 Linear ranges/(mg/L)
氧氟沙星 ofloxacin	Y = 49.19x - 3.637	0.998 9	0.025~5.0
培氟沙星 pefloxacin	Y = 709.0x - 16.33	0.999 7	0.005~1.0
诺氟沙星 norfloxacin	Y = 524.7x - 12.58	0.999 9	0.005~1.0
环丙沙星 ciprofloxacin	Y = 496.3x - 11.36	0.999 7	0.005~1.0
单诺沙星 dano-floxacin	Y = 4.863x - 28.63	0.999 9	0.001~0.2
恩诺沙星 enrofloxacin	Y = 865.6x - 20.73	0.999 9	0.005~1.0
沙拉沙星 sarafloxacin	Y = 258.4x - 31.52	0.999 7	0.025~5.0

表 2 7 种氟喹诺酮类药物的添加回收率、精密度及检测限、定量限

Table 2 Results of recovery, precision, LOD and LOQ of the 7 fluoroquinolones

氟喹诺酮 Fluoroquinolones	添加水平 Fortified level/ ($\mu\text{g/kg}$)	平均回收率 Average recovery /%			相对标准偏差 RSD /%	检测限 LOD / ($\mu\text{g/kg}$)	定量限 LOQ / ($\mu\text{g/kg}$)
		河鳗 Anguilla anguilla	南美白对虾 Penaeus vannamei	罗非鱼 Oreochromis spp			
氧氟沙星 ofloxacin	30.0	87.4	82.6	80.3	3.1	5.84	19.48
	200.0	89.0	84.7	81.7			
培氟沙星 pefloxacin	4.0	78.1	77.1	75.2	3.8	0.33	1.09
	10.0	75.4	76.1	76.7			
诺氟沙星 norfloxacin	5.0	80.9	83.7	82.2	2.3	0.63	2.09
	20.0	81.4	84.4	81.4			
环丙沙星 ciprofloxacin	5.0	86.2	83.6	85.9	3.1	0.73	2.43
	20.0	89.5	85.5	84.5			
单诺沙星 danofloxacin	1.0	95.0	84.0	80.1	5.3	0.07	0.23
	10.0	90.0	86.4	81.4			
恩诺沙星 enrofloxacin	5.0	80.5	82.8	81.6	1.3	0.52	1.75
	20.0	82.2	81.7	82.2			
沙拉沙星 sarafloxacin	20.0	77.9	83.2	78.1	2.0	2.39	7.97
	90.0	79.4	81.3	79.4			

法进行检测,结果表明,此次抽取的样品中均未检出含有 7 种氟喹诺酮类药物残留。

3 结论

用本文所建立方法进行检测, 7 种氟喹诺酮类药物在各基质中的平均回收率在 75%~95% 之间, 相对标准偏差均小于 10%, 定量限低, 且各药剂浓度和峰面积呈现良好的线性关系, 表明方法的准确性、精密度和灵敏度均符合残留分析要求。所建立方法操作简便、灵敏度高, 适用于水产品中 7 种氟喹诺酮类药物残留的同时测定。

参考文献:

[1] ZENG Z L, DONG A G, YANG G X, et al Simultaneous Determination of Nine Fluoroquinolones in Egg White and Egg Yolk by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection [J]. J Chromatog B, 2005, 821: 202– 209

[2] DING Guo-hua (丁国华), DING Lei-nu (丁磊如), LU Xia (刘霞). 氟喹诺酮类药的神经毒性作用 [J]. Chin J Hospital Pharma (中国医院药学杂志), 1995, 8(15): 380– 384.

[3] SHERRI B, TURNIPSEED A R L. Detection Methods of Medicine Residues in Foodstuff of Animal (动物源性食品中药物残留分析方法) [M]. Tianjin (天津): Tianjin Science and Technology Translation and Publishing Corporation (天津科技翻译出版公司), 1999 401

[4] HASSOUAN M K, BALLESTEROS O, TAOUFKI J et al Multiresidue Determination of Quinolone Antibacterials in Eggs

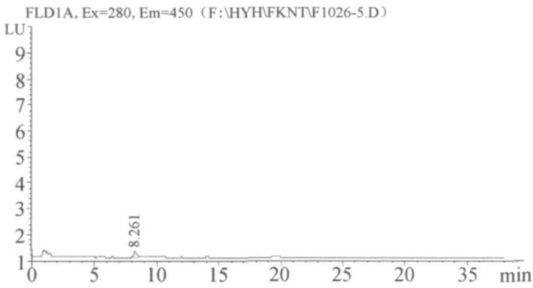


图 2 空白样品谱图

Fig. 2 Chromatogram of blank sample

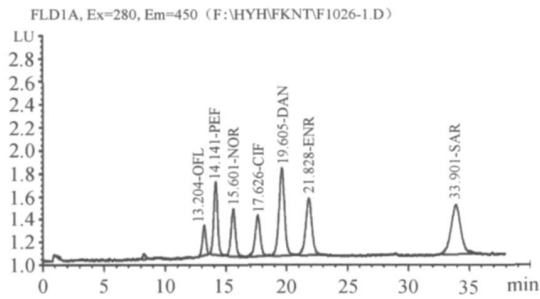


图 3 最低添加水平下样品的加标谱图

Fig. 3 Chromatogram of sample spiked minimum

2.6 实际样品检测结果

于 2008 年 11 月从上海市农贸市场随机抽取草鱼 *Ctenopharyngodon idellus*、南美白对虾和大黄鱼 *Pseudosciaena crocea* 3 种样品按 1.3 节所述方

- of Laying Hens by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection[J]. J Chromatog B, 2007, 852: 625– 630.
- [5] DU Lin-ming (杜黎明), WEI Hong-qing (卫洪清), ZHANG Jun-yan (张俊燕), et al. 反相高效液相色谱法同时测定 6 种氟喹诺酮类药物 [J]. J Chromatog (色谱), 2003, 21(5): 503– 506.
- [6] LU Yuan (刘媛), XIE Meng-xia (谢孟峡), DING Lan (丁岚), et al. 高效液相色谱同时测定鸡蛋中 4 种氟喹诺酮类药物残留 [J]. Chin J Analyst Chem (分析化学), 2004, 32(3): 352– 355.
- [7] GIGOSOS P G, REVESADO P R, CADAHIA O, et al. Determination of Quinolones in Animal Tissues and Eggs by High-performance Liquid Chromatography with Photodiode-array Detection[J]. J Chromatog A, 2000, 871: 31– 36.
- [8] SCHNEIDER M J, BRADEN S E, REYES-HERRERA I et al. Simultaneous Determination of Fluoroquinolones and Tetracyclines in Chicken Muscle Using HPLC with Fluorescence Detection[J]. J Chromatog B, 2007, 846: 8– 13.
- [9] BARRON D, JMENEZ-LOZANO E, BAILLAC S, et al. Determination of Difloxacin and Sarafloxacin in Chicken Muscle Using Solid-phase Extraction and Capillary Electrophoresis[J]. J Chromatog B, 2002, 767: 313– 319.
- [10] ESPINOSA-MANSILLA A, Munoz de la Pina A, González Gómez D, et al. HPLC Determination of Enoxacin, Ciprofloxacin, Norfloxacin and Ofloxacin with Photoinduced Fluorimetric (PF) Detection and Multimission Scanning Application to Urine and Serum [J]. J Chromatog B, 2005, 822: 185– 193.
- [11] TOUSSAINT B, CHEDIN M, BORDIN G, et al. Determination of (Fluoro) Quinolone Antibiotic Residues in Pig Kidney Using Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry: A Laboratory-validated Method[J]. J Chromatog A, 2005, 1088: 32– 39.
- [12] TOUSSAINT B, BORDIN G, JANOSI A, et al. Validation of a Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Quantification of 11 (Fluoro) Quinolone Antibiotics in Swine Kidney[J]. J Chromatog A, 2002, 976: 195– 206.
- [13] 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: 97– 109.
- [14] ZHANG Guo-wen (张国文), ZHAN Chun-ni (占春瑞), NI Yong-nian (倪永年). HPLC 法测定鳗鱼中多种氟喹诺酮 [J]. Food Sci Tech (食品科技), 2004(11): 69– 71.
- [15] CHEN Hui-hua (陈辉华), DAI Jun (戴军), WANG Hong-xin (王洪新). HPLC 法对鱼肉中 3 种四环素类和 5 种氟喹诺酮类兽药残留的同时测定 [J]. J Int Analyst (分析测试学报), 2008, 9(27): 951– 955.

(Ed TANG J)

• 书 讯 •

The Pesticide Manual—New Fifteenth Edition

Edited by Clive Tomlin

由 Clive Tomlin 主编的《农药手册》第 15 版 (The Fifteenth Edition of the Pesticide Manual) 已于 2009 年 11 月出版, ISBN 978 1 901396 18 8, 定价 250 英镑。根据世界各地农药生产商提供的信息, 在最新版中新增加了 30 个农药品种, 其中有 20 个是新的化学合成品。该版共收录农药 1 436 种, 涉及 2 600 余个产品, 包括除草剂、杀菌剂、杀虫剂、杀螨剂、杀线虫剂、植物生长调节剂、除草剂、安全剂、驱避剂、增效剂、信息素、有益微生物和无脊椎动物剂、杀鼠剂及杀动物外寄生虫药。

另外, 与第 14 版相比, 最新版还在产品的分析方法、EPA 推荐用量、风险评估、毒理学和环境评价以及公司信息等方面进行了更新和完善。

该书的电子版 (e-Pesticide Manual) 也已同期出版。

(杨新玲 供稿)