

高效液相色谱法检测 鸡肉中四种氟喹诺酮类药物残留的研究

刘俊华,石丽敏,鹿翠珍,李冬梅

(河北省秦皇岛正大有限公司,河北秦皇岛 066200)

[收稿日期] 2007-11-26 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2008)04-0019-04 [中图分类号] S859.84

[摘要] 建立了一种采用高效液相色谱同时测定鸡肉中氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星四种氟喹诺酮类药物残留的方法。鸡肉样品用 pH 7.0 的乙腈提取,正己烷去杂质,蒸发浓缩后,流动相定容,用激发波长是 280 nm,发射波长是 450 nm 的荧光检测器测定。氧氟沙星在 0.003 ~ 0.6 $\mu\text{g/g}$ 范围内呈良好的线性关系,诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星在 0.001 ~ 0.2 $\mu\text{g/g}$ 范围内呈良好的线性关系,相关系数均大于 0.999 8。样本的平均加标回收率在 56% ~ 105% 之间, $RSD < 15\%$ ($n = 5$)。

[关键词] 鸡肉;氟喹诺酮类药物;高效液相色谱法

Determination of Four Fluoroquinolones Drugs in Chicken by HPLC

LIU Jun-hua, SHI Li-min, LU Cui-zhen, LI Dong-mei

(Qinhuangdao Zhengda Co., Ltd, Qinhuangdao, Hebei 066200; China)

Abstract: A reversed-phase HPLC method was developed for the quantitative analysis of fluoroquinolones drugs in poultry meat. Samples were extracted with acetonitrile in pH 7.0. The sample extracts were cleaned up by Hexane, then enriched by evaporation and determined by fluorescence detection at 280 nm (EX) and 450 nm (EM). The calibration curves were liner in the range of 0.003 ~ 0.6 $\mu\text{g/g}$ in Ofloxacin, 0.001 ~ 0.2 $\mu\text{g/g}$ in Norfloxacin, Ciprofloxacin and Enrofloxacin, correlation coefficients were above 0.999 8. The mean recoveries of 4 veterinary drugs ranged from 56% to 105% with relative standard deviations below 15% ($n = 5$).

Key words: chicken; fluoroquinolones drugs; HPLC

氟喹诺酮类药物 (Fluoroquinolones, FQs) 是近年来发展迅速并被广泛应用的新一代全合成抗菌素。FQs 抗菌广谱,组织穿透力强,高效低毒,抗菌作用力强,价格低廉,在医学和兽医学中应用广泛。在兽医学中, FQs 主要用于预防和治疗畜禽及鱼类疾病^[1],少量使用还具有一定的促生长作用。但是该类物质在动物体内消除缓慢,过量使用或使用不当会造成动物产品中药物残留;人体摄入后可能导

致细菌耐药性问题,并对中枢神经系统造成不良反应^[2]。因此,氟喹诺酮类药物的残留问题越来越引起人们的重视。日本在 2006 年执行的新的肯定列表制度中也严格了氟喹诺酮类药物的检测限量。我国对恩诺沙星的限量要求在 0.1 $\mu\text{g/g}$ 以下,而日本规定在 0.01 $\mu\text{g/g}$ 以下。

目前公开发表的测定组织中氟喹诺酮和它的活性代谢物残留量的方法包括:筛选方法-微生物

作者简介:刘俊华 (1969年-),女,河北抚宁人,高级畜牧师,主要从事药物残留分析。E-mail: liujunhua8008@sina.com

抑制试验^[3]和免疫测定法^[4]。定量方法 - 薄层色谱法、高效液相色谱法^[5-7]、气相色谱 - 质谱测定方法^[7-8]。而氟喹诺酮类药物残留检测最常用的方法是高效液相色谱法,但这些方法多为测定动物性食品中一种或两种兽药残留,且检测水平在 0.1 μg/g 左右,个别达到 0.01 μg/g 水平。本试验建立了一种同时测定鸡肉中氧氟沙星 (OFLX)、诺氟沙星 (NOR)、环丙沙星 (CIP)、恩诺沙星 (ENR) 四种氟喹诺酮类药物残留的方法,检出限低,重现性好,为鸡肉制品的出口提供了保障。

1 材料与方法

1.1 仪器 美国 WATERS 公司 2695 型高效液相色谱仪,配有 2475 荧光检测器;美国 ZKAL-ABORTECHNIK 公司 T25 型均质器;上海安亭离心机 ANKE TDL-40B 型;德国旋转蒸发器 LABRO-TA4000 型;ZORBAX SB-AQ 色谱柱,Aglient 公司生产。

1.2 材料与试剂 甲醇、乙腈均为色谱级;无水硫酸钠,分析纯;正己烷,色谱级;四丁基溴化铵,分析纯;娃哈哈纯净水。氟喹诺酮类标准物质:氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星标准品,纯度 ≥ 95%,德国生产。

1.3 色谱条件 色谱柱, ZORBAX SB-AQ 4.6 mm × 250 mm, 5 μm;柱温, 35 °C;流动相, 乙腈 0.01 mol/L 四丁基溴化铵溶液 (2.5:97.5) (体积比);流速, 1.1 mL/min;进样量, 20 μL。

1.4 样品提取 准确称取绞碎鸡肉样品 5 g (精确至 0.01 g) 于 50 mL 塑料离心管,加入 10 g 无水硫酸钠,加 25 mL 乙腈,用高速分散器于 15 000 r/min 高速分散 0.8 ~ 1.5 min 后, 3 500 r/min 离心 10 min,移取上清液转移到另一 50 mL 塑料离心管中,残渣用 15 mL 乙腈重复提取一次,合并上清液于上述离心管中,然后加入 30 mL 正己烷溶液,置振荡器上高速振荡 5 min, 3 500 r/min 离心 10 min,去除上层正己烷相,收集下层乙腈于蒸发浓缩瓶中,然后置 40 °C 水浴上减压蒸发浓缩至干,准确加入 2 mL 流动相溶解残渣,转移至离心管,加入正己烷 2 mL,置振荡器上高速振荡 5 min,于 4 000 r/min 离心 5 min,吸取下层液体用尼龙微孔滤膜过滤,滤液待测。

1.5 测定

1.5.1 标准工作曲线的制作 分别移取浓度为 1.0 μg/mL 的标准混合液 2、10、20、50、100、200 μL 用流动相稀释成浓度分别为 0.002、0.01、0.02、

0.05、0.1、0.2 μg/mL 的标准混合溶液系列,供高效液相色谱分析,制作标准工作曲线。

1.5.2 液相色谱的测定 根据样品溶液中氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星残留量情况,选定峰面积或峰高相近的标准工作溶液。标准工作溶液和样品溶液中氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星响应值均应在仪器检测线性范围内。对标准工作溶液和样品溶液等体积参插进样进行测定。

1.5.3 空白试验与空白添加回收试验 每个试验批次的样品中,包括 1 个空白样品和 1 个空白添加样品 (实际加入值为已知)。空白鸡肉添加样品的实际加入值水平可选在等于最大残留限量 0.01 μg/g,或方法检测限略高的实际加入值。试验的回收率用于对阳性的残留结果进行残留量的校正。回收率 (RC) 按公式 (1) 计算。

$$RC = \frac{\text{空白添加样品的残留量测定值}}{\text{空白样品中药物实际加入值}} \times 100\% \quad (1)$$

1.5.4 结果报告 试样中氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星残留量 (待校正) 按公式 (2) 计算。

$$C = \frac{(A - A_0) \times C_s \times V}{A_s \times m} \quad (2)$$

式中:

C—样品中氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星残留量, μg/g

A—样品溶液中氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星的峰面积或峰高

A₀—空白试验被测物的色谱峰面积或峰高

A_s—标准工作溶液中氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星的峰面积或峰高

C_s—标准工作溶液中氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星的浓度, μg/mL

V—样品定容体积, mL

m—样品的克重, g

1.5.5 方法的灵敏度、准确度及精密度 灵敏度: 本方法在鸡肉组织中的氧氟沙星定量检出限为 0.006 μg/g, 诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星定量检出限为 0.002 μg/g。准确度及精密度: 本方法在 0.01 μg/g 添加水平下样品的回收率范围 57% ~ 100%, RSD < 14%。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择 高效液相色谱仪常规的流动相采用甲醇水溶液或乙腈水溶液作为药物分析的流动相,本试验若采用类似这样的流动相,色谱峰宽,拖尾;文献中多采用磷酸盐缓冲溶液作为流动

相的组成部分来改善峰型^[9-10],但析出的结晶对进样垫、泵及流路系统损害严重;又考虑到添加离子对试剂方法也可以改善峰型,解决色谱峰拖尾现象^[11],故采用离子对试剂四丁基溴化铵作为缓冲液,用冰乙酸调节缓冲液 pH 值为 3.0,乙腈-四丁基溴化铵(体积比)为(2.5:97.5),经实验验证,4 种氟喹诺酮类药物色谱峰分离效果好,见图 1。

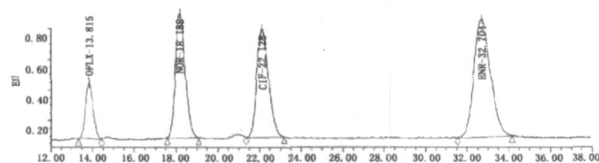


图 1 4 种喹诺酮类药物混合标准样品的色谱图

2.2 色谱柱的选择 在 FQs 的 HPLC 分析中大多数采用了反相色谱柱(如 C18、C8)。当流动相 pH > 3 时,普通色谱柱填料中残余的 50% 左右的硅醇基可能通过氢键或离子交换作用对 FQs 强烈吸附^[12],造成色谱峰拖尾、保留值不稳定、峰形异常和分离度下降等现象。在已报道的 FQs HPLC 分析方法中,都尽量选用低残余硅醇基固定相、酸性流动相(pH < 3)以及加入硅醇基掩蔽剂或竞争剂的分离体系,本实验选择的色谱柱分离度好,峰型尖锐。

2.3 样品前处理条件的优化 FQs 具有酸碱两性的特点,其前处理方法国内外报道的很多。本实验研究的是鸡肉中氟喹诺酮类药物的残留,鸡肉本身略显酸性,若采用酸性乙腈提取、正己烷净化的方法,则氧氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星回收率均在 75% 以上,但诺氟沙星回收率只有 30% 左右,而直接采用乙腈两次提取,4 种氟喹诺酮类药物回收率均在 70% 以上,提取效果好。

2.4 方法的线性范围和检出限 配制含 4 种氟喹诺酮类药物浓度为 1.0 μg/mL 混合标准溶液。分别做一系列稀释,稀释成浓度分别是 0.001、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.15、0.2 μg/mL,线性关系见表 1。

表 1 4 种氟喹诺酮类药物的线性范围与线性方程

药物组别	线性范围 / (μg · g ⁻¹)	线性方程	相关系数
OFLX	0.003 ~ 0.6	$Y = 8.21e + 006x + 2.37e + 005$	0.999 817
NOR	0.001 ~ 0.2	$Y = 6.51e + 007x - 4.33e + 005$	0.999 827
CIF	0.001 ~ 0.2	$Y = 6.58e + 007x - 3.92e + 005$	0.999 835
ENR	0.001 ~ 0.2	$Y = 1.04e + 008x - 6.07e + 005$	0.999 842

当添加 4 种氟喹诺酮类药物,氧氟沙星浓度达到 0.001 5 μg/g,诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星浓度达到 0.000 5 μg/g 时,色谱图信噪比大于 3,故此

方法的检出限: OFLX 为 0.001 5 μg/g; NOR、CIF、ENR 为 0.000 5 μg/g,见图 2。

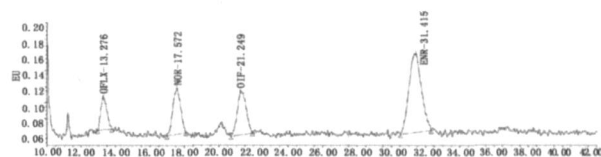


图 2 鸡肉中添加 0.001 5 μg/g 氧氟沙星, 0.000 5 μg/g 诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星的色谱图

添加 4 种氟喹诺酮类药物,氧氟沙星浓度达到 0.006 μg/g,诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星浓度达到 0.002 μg/g 时,色谱图信噪比大于 10,此方法的定量检出限: OFLX 为 0.006 μg/g; NOR、CIF、ENR 为 0.002 μg/g,见图 3。

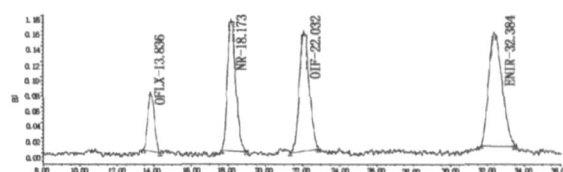


图 3 鸡肉中添加 0.006 μg/g 氧氟沙星, 0.002 μg/g 诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星的色谱图

2.5 方法的准确度和精密度 以空白鸡肉样品做添加回收实验,分别添加 0.002、0.01、0.2 μg/g 3 个水平 4 种氟喹诺酮药物的混合标样,每个浓度做 5 个平行实验,按照样品前处理方法进行提取和净化,结果见表 2~4。

表 2 加标水平为 0.002 μg/g 的 4 种氟喹诺酮类药物实验结果

药物名称	回收率范围	平均回收率 / %	样本间标准偏差 s	变异系数 cv / %
氧氟沙星	59% ~ 89%	75	8.6	11%
诺氟沙星	57% ~ 89%	75	9.2	12%
环丙沙星	56% ~ 80%	70	7.3	11%
恩诺沙星	72% ~ 88%	79	5.7	7%

表 3 加标水平为 0.01 μg/g 的 4 种氟喹诺酮类药物实验结果

药物名称	回收率范围	平均回收率 / %	样本间标准偏差 s	变异系数 cv / %
氧氟沙星	64% ~ 94%	80.1	9.04	11%
诺氟沙星	62% ~ 92%	74.8	10.0	13%
环丙沙星	57% ~ 88%	69.7	9.6	14%
恩诺沙星	70% ~ 100%	83.7	9.5	11%

表 4 加标水平为 0.2 μg/g 的 4 种氟喹诺酮类药物实验结果

药物名称	回收率范围	平均回收率 / %	样本间标准偏差 s	变异系数 cv / %
氧氟沙星	80% ~ 95%	87.5	5.6	5%
诺氟沙星	64% ~ 99%	81.5	8.2	9%
环丙沙星	68% ~ 91%	79.5	7.6	7%
恩诺沙星	89% ~ 105%	97.0	4.9	4%

2.6 方法验证 通过实验室内部人员的比对及与秦皇岛市出入境检验检疫局技术中心进行实验间比对,进一步证明了方法的可操作性和科学性。

3 结论

本文报道了同时检测鸡肉组织中 4 种氟喹诺酮类药物残留的检测方法。实验结果表明,该方法准确、可靠,回收率高,重现性好,不仅提高了兽药残留检测效率,而且检出限均低于我国和日本列表制度对氟喹诺酮类药物最高残留限量的规定,能成功用于测定鸡肉中的氟喹诺酮类药物残留。

参考文献:

- [1] 李俊索,邱月明,王超,等. 兽药残留分析 [M]. 上海:上海科学技术出版社, 2002: 228 - 264.
- [2] 德明. 氟喹诺酮类药物不良反应及对策 [J]. 医药与保健, 1996, (12): 21.
- [3] 黄晓蓉,郑晶,李寿崧,等. 鳊鱼及其制品中喹诺酮类药物残留的微生物快速检测方法研究 [J]. 淡水渔业, 2005, 35 (4): 3 - 6.
- [4] Silverlight J, Coldham N, Thome L, 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] 长尾稔. 肉中喹诺酮类药物残留的 HPLC 简易分析法 [J]. 食品卫生学杂志, 1998, 39 (5): 329 - 332.
- [6] Roybal J, Walker C C, Pfenning A P, et al. Concurrent Determination of Four Fluoroquinolones in Catfish, Shrimp, and Salmon by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection [J]. J AOAC Int, 2002, 85 (6): 1293 - 1301.
- [7] Cinquina A L, Roberti P, Gannetti L, et al. Determination of Enrofloxacin and Its Metabolite Ciprofloxacin in Goat Milk by High Performance Liquid Chromatography with Diode - array Detection. Optimization and Validation [J]. J Chromatogr A, 2003, 987 (1 - 2): 221 - 226.
- [8] 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 Chromatogr A, 2002, 976 (1 - 2): 195 - 206.
- [9] 农业部第 236 号公告. 动物性食品中恩诺沙星和环丙沙星残留检测方法 - 高效液相色谱法 [S]. 2003.
- [10] 梁沛,秦永超. 反相高效液相色谱法同时测定四种氟喹诺酮类药物 [J]. 分析实验室, 2000, 19 (3): 56 - 59.
- [11] 刘媛,单吉浩. 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]. 化学分析简报, 2004, 32 (3): 352 - 355.
- [12] 郭根和,潘葳,苏德森,等. 离子对高效液相色谱法同时测定鱼类中四种喹诺酮类药物的残留 [J]. 色谱, 2005, 23 (4): 401 - 403.

春季全国重大动物疫病疫苗定点生产企业监督检查工作全面展开

根据全国重大动物疫病防控工作视频会议部署和《农业部办公厅关于做好禽流感等重大动物疫病疫苗生产供应工作的通知》(农办医[2008]8号)要求,为确保重大动物疫病疫苗生产供应,进一步保障疫苗质量,中国兽医药品监察所对全国 43 个高致病性禽流感、口蹄疫、高致病性猪蓝耳病、猪瘟、小反刍兽疫疫苗定点生产企业实施全面监督检查。

此次监督检查的形式包括对 31 个企业实施驻厂监督,对 12 个猪瘟疫苗生产企业实施飞行检查,以及由 4 位所领导分别带队对部分企业进行督查督导。监督检查的内容包括了解各企业的疫苗生产进度,查找生产、质量管理中存在问题,对企业按照兽药 GMP 要求组织疫苗生产和检验工作进行监督。

由所长于康震带领的检查组,赴江苏、浙江和上海,对扬州优邦生物制药有限公司、南京天邦生物科技股份有限公司、乾元浩生物股份有限公司南京生物药厂、南京梅里亚动物保健有限公司、浙江荐量生物工程有限公司、浙江易邦生物技术有限公司、上海海利生物药品有限公司和申联生物医药(上海)有限公司等 8 个重大动物疫病疫苗生产企业进行了生产督导。

由书记李向东带领的检查组也已于前日赶赴东北三省,对哈药集团生物疫苗有限公司、哈尔滨维科生物技术开发公司、吉林正业生物制品有限责任公司和辽宁益康生物制品有限公司进行生产督导。

分别由副所长高光和杨劲松带领的两个检查组分别赴华南和华中地区,对广东永顺生物制药有限公司和武汉中博生物科技股份有限公司等 6 个企业实施飞行检查。

赴 31 个企业进行驻厂监督的监督员由中监所 8 人和各企业所在地省级兽药监察所有关人员 20 人组成。目前,有关驻厂监督员已经全部到达指定企业。

摘自: <http://www.farmer.com.cn/wlb/xmb/xm8/200803190182.htm>