

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

董琳琳¹, 刘艳华¹, 汪霞¹, 仲锋¹, 彭莉², 岳秀英², 高岚²

(1. 中国兽医药品监察所, 北京 100081; 2. 四川省兽药监察所, 四川 成都 610041)

摘要: 建立了一种可同时测定鸡可食性组织中环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星及沙拉沙星等多种残留的反相高效液相色谱-荧光分析法。鸡的肌肉、皮和脂、肝、肾等 4 种组织经不同 pH 值的磷酸二氢钾缓冲溶液匀浆提取, 上清液通过 C₁₈ 固相萃取柱净化, 以流动相洗脱。洗脱液经液相色谱分离后, 用荧光检测器进行检测(激发波长 280 nm, 发射波长 450 nm), 外标法定量。对鸡的 4 种组织进行添加回收率测定, 结果显示方法在添加水平为 20 ~ 300 μg/kg 时药物的回收率约为 53.9% ~ 93.4%, 批间回收率测定值的相对标准偏差低于 23%; 环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星的定量检出限为 20 μg/kg, 达氟沙星为 4 μg/kg。方法简单、快速, 能满足常规兽药残留检测的需要。

关键词: 高效液相色谱法; 环丙沙星; 达氟沙星; 恩诺沙星; 沙拉沙星; 残留; 鸡可食性组织

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2005)03-0285-04

Simultaneous Determination of Four Fluoroquinolone Residues in Edible Chicken Tissues by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

DONG Linlin¹, LIU Yanhua¹, WANG Xia¹, ZHONG Feng¹,
PENG Li², YUE Xiuying², GAO Lan²

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China;

2. Sichuan Province Institute of Veterinary Drug Control, Chengdu 610041, China)

Abstract: A reversed-phase high performance liquid chromatographic method with fluorescence detection was developed for the simultaneous analysis of ciprofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin and sarafloxacin residues in edible chicken tissues. The analytes were extracted from chicken muscle, skin and fat, liver, kidney by aqueous potassium dihydrogenphosphate of different pH values through homogenization. The supernatant of the extract was applied onto a C₁₈ solid phase extraction cartridge for clean-up. The separation was achieved on a C₁₈ column, and the detection was performed with a fluorescence detector (excitation at 280 nm and emission at 450 nm). The four fluoroquinolones were analyzed in spiked samples of four chicken tissues with mean recoveries in the range of 53.9% - 93.4% at spiked levels of 20 - 300 μg/kg. The relative standard deviations of inter-assay were no more than 23%. The detection limits of quantification were 20 μg/kg for ciprofloxacin, enrofloxacin and sarafloxacin and 4 μg/kg for danofloxacin. The method is simple, fast, and sufficient for routine analysis.

Key words: high performance liquid chromatography; ciprofloxacin; danofloxacin; enrofloxacin; sarafloxacin; residues; edible chicken tissues

环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星及沙拉沙星均属于氟喹诺酮类抗菌药物(FQs), 由于该类药物多具有广谱、高效、低毒等特点, 因此应用颇为广泛^[1]。在我国, 上述 4 种 FQs 及相关制剂已先后被农业部正式批准作为兽药使用。但自 20 世纪 80 年代以

来, 越来越多的研究证实 FQs 可引起动物或人类的耐药性问题。在许多工业化国家, 对 FQs 耐药的沙门氏菌和弯曲杆菌所引发的人类食源性疾病大多被证实与在食用动物中使用 FQs 有关^[2, 3]。与此同时, 由于该类药物除部分被用作兽药外, 尚有很多品

种在人类临床治疗中使用,从而使得 FQs 相互之间的交叉耐药问题同样不容忽视^[4]。就目前看来,国内亦有金黄色葡萄球菌等致病菌对 FQs 的耐药率不断上升的报道^[5]。因此,通过有效的技术手段对动物组织中有关药物残留量进行检测以监督养殖企业和养殖户,促使其严格遵守兽药使用过程中用药剂量、疗程以及休药期的规定,依法合理使用此类抗菌药物无疑是必要的。

有关 FQs 多残留的检测方法国外已有诸多报道,主要是通过高效液相色谱法以梯度或等度的方式分离,再以紫外(UV)或荧光(FL)检测法测定^[6-9]。随着我国对食品安全问题的日趋重视,能满足 1~2 种 FQs 残留检测的方法在国内已陆续报道^[3,10,11],但能够同时测定鸡可食性组织中环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星及沙拉沙星残留的检测方法未见报道。本研究旨在建立一种操作步骤较为简单,并可同时满足鸡可食性组织中上述 4 种 FQs 检测的多残留分析方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters-600E 型高效液相色谱系统(配 474 型荧光检测器、717 型自动进样器及 Millennium³² 色谱数据处理系统)购自美国 Waters 公司;F-4500 型荧光分光光度计购自日本日立公司;AM-6 型组织匀浆机购自日本精机制作所;AE 240 型分析天平(精度 0.000 01 g)及 Delta-320 型酸度计购自上海梅特勒-托利多公司;Biofuge Stratos 高速冷冻离心机购自德国贺利氏公司;Bond Elut C₁₈ 固相萃取柱(100 mg, 1 mL)系美国 Varian 公司产品。

环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星和沙拉沙星对照品由中国兽医药品监察所供给(含量均不低于 99.0%)。

用于鸡的肌肉、(皮+脂肪)样品的提取液配制方法:取磷酸二氢钾 6.8 g,加水溶解并稀释至 500 mL,用 5.0 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值至 7.0;用于鸡的肝脏、肾脏样品的提取液配制方法:取磷酸二氢钾 6.8 g,加水溶解并稀释至 500 mL 即得。

1.2 色谱条件

0.05 mol/L 磷酸/三乙胺缓冲溶液的配制:取 85% 磷酸 3.4 mL,用水稀释至 1 000 mL,以三乙胺调节 pH 值至 2.4 即得。

色谱柱为 Wakosil C₁₈ RS 柱(5 μm, 250 mm × 4.6 mm i. d.),保护柱为 10GC4-ODS2 C₁₈ 柱芯,二者均为澳大利亚 SGE 公司产品;流动相为 0.05 mol/L 磷酸/三乙胺缓冲溶液-乙腈(82:18, 体积

比),用前经 0.45 μm 滤膜过滤,并超声脱气;流速为 0.8 mL/min;色谱柱温度为室温;进样量为 20 μL。荧光检测器的激发波长为 280 nm,发射波长为 450 nm。

1.3 对照溶液的配制及线性范围的确定

分别取达氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星和沙拉沙星对照品约 10, 50, 50 和 50 mg,精密称定,用 0.03 mol/L 氢氧化钠溶液溶解并制成质量浓度为 0.2 g/L(达氟沙星)和 1 g/L(恩诺沙星、环丙沙星和沙拉沙星)的混合储备液,再以乙腈稀释,配制成为一定质量浓度的混合工作液。

准确移取上述混合工作液适量,用流动相稀释,使达氟沙星质量浓度为 0.001, 0.002, 0.01, 0.02, 0.060 和 0.100 mg/L,恩诺沙星、环丙沙星和沙拉沙星质量浓度均为 0.005, 0.010, 0.050, 0.100, 0.300 和 0.500 mg/L 的系列混合对照溶液。将此系列混合对照溶液依次从低浓度到高浓度,按照液相色谱条件进行分析,每一浓度进样 3 次,按其所得峰面积的平均值与对应的对照溶液的质量浓度作标准曲线,并计算回归方程及相关系数。

1.4 组织样品的提取

称取绞碎后的鸡可食性组织样品 2.0 g,置于 30 mL 匀浆杯中,加提取液 10.0 mL,于 10 000 r/min 速率下匀浆 1 min。将匀浆液转移至离心管中,于振荡器中振荡提取 5 min 后,再于 10 000 r/min 速率下离心 5 min(对于肝脏和肾脏两种组织则须在 15 000 r/min 下离心 10 min),分离上清液。另取提取液 10.0 mL,清洗刀头、匀浆杯后,对离心管中的组织残渣重复提取 1 次。合并两次离心得到的上清液于适宜容器中,混匀后作为样液。

1.5 组织样品的净化

C₁₈ 固相萃取柱依次用甲醇 2 mL、相应 pH 值的提取液 2 mL 预洗。取 5.0 mL 样液过柱,用 1 mL 水淋洗并吹去小柱中残余的液体。加 1.0 mL 流动相洗脱,收集洗脱液,供高效液相色谱分析。

2 结果与讨论

2.1 激发波长与发射波长的选择

用流动相分别配制以上 4 种 FQs 的对照溶液,并以 F-4500 荧光分光光度计进行扫描,测得环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星及沙拉沙星的最大激发波长(λ_{ex})分别为 281, 284, 280 和 278 nm,最大发射波长(λ_{em})分别为 451, 444, 448, 460 nm。当以 $\lambda_{ex} = 280$ nm 和 $\lambda_{em} = 450$ nm 对由色谱柱洗脱的 4 种 FQs 进行连续测定时,4 种 FQs 均有很强的荧光响应。该试验结果与 Yorke 等^[8]的报道相似。

2.2 色谱条件的选择

根据文献[12]的报道,对 FQs 进行色谱分离常使用 C_{18} 或 C_8 色谱柱。然而由于 FQs 的结构中同时包含有氨基和羧基,属于两性分子,传统的色谱柱常常会因为残余硅醇基和金属不纯物的存在而导致色谱峰拖尾。为此,实验选择了以端基封闭的高纯硅胶为固定相的 Wakosil C_{18} RS 色谱柱,并在流动相中加入适量三乙胺,有效地抑制了拖尾峰的产生。4 种 FQs 混合对照溶液的色谱图如图 1。

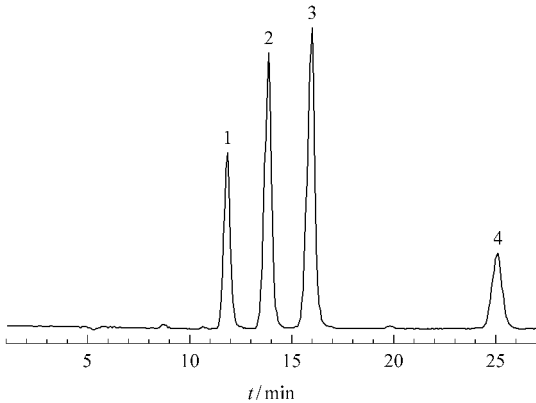


图 1 4 种 FQs 混合对照溶液的色谱图

Fig.1 Chromatogram of a mixture of the four fluoroquinolone standards

1. ciprofloxacin (20 $\mu\text{g/L}$); 2. danofloxacin (4 $\mu\text{g/L}$);
3. enrofloxacin (20 $\mu\text{g/L}$); 4. sarafloxacin (20 $\mu\text{g/L}$).

2.3 标准曲线

由于 4 种 FQs 中达氟沙星的荧光响应最强,约为相同浓度恩诺沙星的 4~5 倍,为更好地反映出同时被分析的 4 种 FQs 色谱峰的分离情况(见图 1),配制的混合对照溶液中达氟沙星的浓度仅为其他 3 种 FQs 的 1/5。在“1.2”节所述的色谱条件下,环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星的峰面积与其质量浓度均呈现良好的线性关系(见表 1)。

表 1 4 种 FQs 的线性范围、回归方程和线性相关系数

Table 1 Linear ranges, regression equations and correlation coefficients for the four fluoroquinolones

Analyte	Linear range/ (mg/L)	Regression equation	Correlation coefficient
Ciprofloxacin	0.005 - 0.5	$Y = 82.8X - 71.5$	0.99998
Danofloxacin	0.001 - 0.1	$Y = 830X - 60.5$	0.99999
Enrofloxacin	0.005 - 0.5	$Y = 178X - 3710$	0.99997
Sarafloxacin	0.005 - 0.5	$Y = 62.9X - 2030$	0.99999

Y : peak area; X : mass concentration of fluoroquinolone, mg/L.

2.4 样品前处理方法

采用的前处理方法参考了文献[13]的工作,并针对不同的动物组织作了适当的改动。从不同鸡可食性组织的空白及阳性添加样品的色谱图(见图 2)可以看到,在 4 种 FQs 的出峰位置,没有明显的杂质干扰峰出现,说明现有的处理条件可以有效地去除各组织样品中的干扰组分。

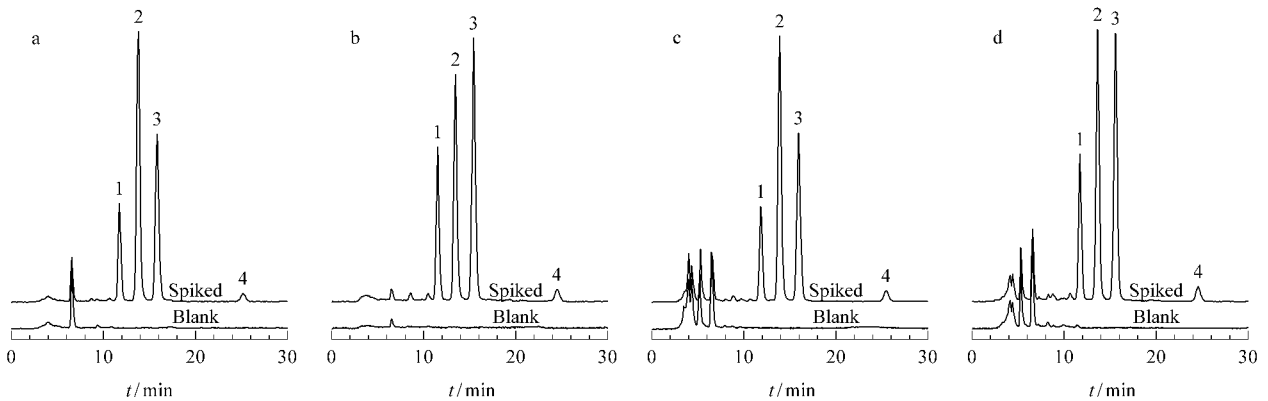


图 2 4 种鸡可食性组织的空白样品及阳性添加样品的色谱图

Fig.2 Chromatograms of the blank and spiked chicken tissue samples

a. muscle; b. skin + fat; c. liver; d. kidney.

1. ciprofloxacin; 2. danofloxacin; 3. enrofloxacin; 4. sarafloxacin.

在选择 C_{18} 固相萃取小柱时,优先选择了填料用量小且经济,但能够满足试验需要的 100 mg 小柱。另外,通过与其他两个品牌固相萃取小柱的比较还发现,相同填料量的 Alltech C_{18} 、Phenomenex StrataTM C_{18} -E 固相萃取柱在本方法中较 Varian 公司的 Bond Elut[®] C_{18} 柱回收率大约低 15%~20%。因此,在进行实际样品检测时,有必要对选用的 C_{18} 固相萃取小柱的回收率进行考察。

2.5 添加回收率及重复性试验

在 2.0 g 绞碎的空白鸡可食性组织样品中添加适宜浓度的混合对照溶液 0.1 mL,制得所需的阳性添加样品,并依“1.4”和“1.5”节的方法进行样品的提取和净化。实验分别就 4 种不同鸡可食性组织中 4 种 FQs 最高残留限量(MRL)值的差异^[14]设计了各自的添加浓度水平。对于达氟沙星及沙拉沙星,由于前者荧光响应值高,而后者 MRL 低,因此以相

对较低的添加浓度水平进行回收率实验。根据表 2 中所列出的添加浓度水平,取每种组织每批 5 份平行样品,共测定 3 批,通过外标法定量,得到相应的平均回收率及批间相对标准偏差。

实验数据显示,按信噪比为 10 计,该方法对于环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星的定量检出限为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$,达氟沙星为 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。该法对于鸡肝组织样

品的提取回收率略低,这可能与肝脏组织中复杂的本底及内源物质干扰有关,去除杂质的同时可能引起目标组分的损失。沙拉沙星在低添加水平(20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)时批间相对标准偏差偏大,但均符合《农业部兽药残留试验技术规范(试行)》的要求。故该法可以作为鸡可食性组织中上述 4 种 FQs 的常规残留检测方法使用。

表 2 鸡可食性组织中 4 种 FQs 药物的回收率测定结果($n = 5$)
Table 2 Recovery of the four fluoroquinolones from chicken tissues ($n = 5$)

Analyte	Tissue	Spiked level/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	(Mean recoveries \pm SD)/%			RSD/%
			batch 1	batch 2	batch 3	
Ciprofloxacin	muscle	100	89.1 \pm 2.7	91.5 \pm 2.8	92.0 \pm 2.0	1.7
	skin + fat	100	85.5 \pm 4.2	84.5 \pm 4.9	83.9 \pm 9.4	1.0
	liver	200	65.6 \pm 5.1	77.3 \pm 3.8	66.0 \pm 1.8	9.5
	kidney	300	70.7 \pm 10.4	77.0 \pm 3.8	75.7 \pm 6.2	4.5
Danofloxacin	muscle	40	73.7 \pm 2.5	82.1 \pm 2.1	85.3 \pm 1.3	7.4
	skin + fat	20	76.2 \pm 4.4	75.9 \pm 5.3	73.2 \pm 7.0	2.3
	liver	80	55.4 \pm 4.6	70.8 \pm 5.4	62.6 \pm 2.4	12.2
	kidney	80	63.2 \pm 9.9	68.9 \pm 3.8	68.4 \pm 6.0	4.7
Enrofloxacin	muscle	100	78.1 \pm 2.4	84.5 \pm 2.4	93.4 \pm 1.8	9.0
	skin + fat	100	74.5 \pm 2.2	82.8 \pm 3.5	85.4 \pm 4.8	7.0
	liver	200	71.8 \pm 4.8	79.6 \pm 5.8	63.4 \pm 2.1	11.3
	kidney	300	74.5 \pm 9.9	77.2 \pm 3.9	73.9 \pm 5.2	2.3
Sarafloxacin	muscle	20	59.2 \pm 5.2	59.2 \pm 1.2	86.3 \pm 4.1	22.9
	skin + fat	20	53.9 \pm 5.2	77.4 \pm 6.6	75.0 \pm 5.2	18.8
	liver	80	57.2 \pm 2.6	57.1 \pm 11.7	60.5 \pm 4.5	3.3
	kidney	80	63.5 \pm 9.2	69.9 \pm 4.4	66.5 \pm 9.3	4.8

参考文献:

[1] Dai Shucheng. Chinese Journal of Veterinary Drug (戴述诚. 中国兽药杂志), 2003, 37(9): 48

[2] SCVPH (Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health). Opinion on the Human Health Risk Caused by the Use of Fluoroquinolones in Animals. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out64_en.pdf. 2003

[3] Xie Kaizhou, Wang Zhiyue, Zhang Jun, Gong Daoqing, Dai Guojun, Qi Yonghong, Zhao Wanli. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica (谢恺舟, 王志跃, 张 军, 龚道清, 戴国俊, 祁永红, 赵万里. 畜牧兽医学报), 2003, 34(1): 88

[4] Jin Yufang. World Notes on Antibiotics (金毓芳. 国外医药·抗生素分册), 1998, 19(3): 221

[5] Zhong Li, Feng Ping, Fan Xinjian, Lü Xiaojun, Xia Peiyuan, Lei Bingjun, Yu Rujia. Chinese Journal of Infectious Diseases (钟 利, 冯 萍, 范昕建, 吕晓菊, 夏培元, 雷秉钧, 俞汝佳. 中华传染病杂志), 2003, 21(2): 142

[6] Rogstad A, Hormazabal V, Yndestad M. J Liq Chromatogr,

1991, 14(3): 521

[7] Horie M, Saito K, Nose N, Nakazawa H. J Chromatogr B, 1994, 653(1): 69

[8] Yorke J C, Froc P. J Chromatogr A, 2000, 882 : 63

[9] Hernández-Arteseros J A, Companó R, Prat M D. Proceedings 4th Euro Residue Conference, Barcelona (Spain), 2000

[10] Zhong Feng. Chinese Journal of Veterinary Drug (仲 锋. 中国兽药杂志), 1999, 33(4): 5

[11] Li Yanhua, Tong Hengmin, Zhao Jing, Yan Qingbo. Chinese Journal of Veterinary Medicine (李艳华, 佟恒敏, 赵 晶, 阎清波. 中国兽医杂志), 2001, 37(7): 1

[12] Hernández-Arteseros J A, Barbosa J, Companó R, Prat M D. J Chromatogr A, 2002, 945 : 1

[13] Björklund H V. J Chromatogr, 1990, 530(1): 75

[14] Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China, No. 235 : The Maximum Residue Limits of Veterinary Medicinal Products in Foodstuffs of Animal Origin (中华人民共和国农业部公告第 235 号《动物性食品中兽药最高残留限量》), 2002