

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

郭根和, 潘 葳, 苏德森, 陈涵贞

(福建省农业科学院中心实验室, 福建 福州 350003)

摘要 :采用离子对高效液相色谱法同时测定了鱼类中4种喹诺酮类药物(FQS)的残留。检测条件为:采用 Waters μ BondapakTM C₁₈柱,以11 mmol/L的四丁基溴化铵溶液-乙腈(体积比为94:6)为流动相(用冰乙酸调pH为3.0,流速1.0 mL/min),柱温40℃;采用荧光检测器检测,激发波长280 nm,发射波长460 nm。测定结果表明,该方法对FQS的最低检测限为1 μ g/kg,在6~100 μ g/kg线性范围内,溶液含量与峰面积的相关系数达0.9995以上。在高、中、低3种含量水平下对所测鱼组织中4种喹诺酮类药物进行回收率测定,结果为76%~100%,相对标准偏差小于7%。该法简便、准确,灵敏度高,符合痕量测定的要求。

关键词 :离子对高效液相色谱法;氧氟沙星;诺氟沙星;环丙沙星;恩诺沙星;鱼

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2005)04-0401-03

Simultaneous Determination of Four Fluoroquinolone Residues in Fish by Ion-Pair High Performance Liquid Chromatography

GUO Genhe, PAN Wei, SU Desen, CHEN Hanzhen

(Central Laboratory, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

Abstract : An ion-pair high performance liquid chromatographic method with a fluorescence detector was established to determine four fluoroquinolone residues in fish. The chromatographic conditions were as follows: Waters μ BondapakTM C₁₈ column (3.9 mm i. d. \times 300 mm, 10 μ m) was used at 40 $^{\circ}$ C with 11 mmol/L tetrabutylammonium bromide solution (pH 3.0)-acetonitrile (94:6, v/v) as the mobile phase with a flow rate of 1.0 mL/min, at the excitation wavelength of 280 nm and emission wavelength of 460 nm. The detection limit for fish was 1 μ g/kg. The linear range was from 6 - 100 μ g/kg, and correlation coefficients were more than 0.9995. At the levels of 10, 50 and 100 μ g/kg, the recoveries were 76% - 100% with relative standard deviations of less than 7%. The method developed can meet the requirement for residue analysis.

Key words : ion-pair high performance liquid chromatography; ofloxacin; norfloxacin; ciprofloxacin; enrofloxacin; fish

喹诺酮类药物(FQS)具有抗菌谱广、抗菌作用强、生物利用度高、毒副作用小、组织分布广等特点,已被世界各国广泛用于畜禽和鱼类疾病的防治。由于FQS在动物体内的残留消除缓慢,过量的药物残留会损害人体健康,因此做好FQS残留的监测工作很有必要。近年来,有关高效液相色谱测定FQS残留的方法国内已有不少报道,但有的方法虽然灵敏度足够高却只能测定恩诺沙星^[1];有的方法只能同时测定恩诺沙星和环丙沙星^[2,3];有的方法虽然能同时测定几种FQS^[4-7],但检测灵敏度偏低,而且有的流动相体系很复杂^[7],缓冲溶液易与有机相产生结晶而引起色谱流路堵塞。国外报道的方法中流动

相多采用梯度洗脱^[8-10]。我们用离子对反相高效液相色谱法(IP-HPLC)采用等度洗脱,可以同时测定鱼类中4种FQS的含量,最低检测限达到1 μ g/kg,满足中华人民共和国农业部提出的、国家水产品质量监督检验中心起草的《无公害食品、水产品中渔药残留限量》NY 5070-2001中规定的水产品中有关喹诺酮类药物的最高残留限量的检测要求。方法简便、准确,灵敏度高,重现性好。

1 实验部分

1.1 仪器和主要试剂

Waters 2695型高效液相色谱仪, Waters 2475

型荧光检测器, Empower 色谱工作站, 均质器, 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), 离心机(金坛市江南仪器厂), XW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂), pH 计(上海埃依琪实业有限公司), 吹氮装置, 恒温水浴, 微量可调移液器。

氧氟沙星(OFLX)、诺氟沙星(NFLX)、环丙沙星(CPFX)、恩诺沙星(ENX)等 4 种 FQS 标准品均购自 Sigma 公司, 甲醇、乙腈为色谱纯, 四丁基溴化铵、无水硫酸钠、正己烷及提取用乙腈、正丙醇、乙二醇、冰乙酸、氢氧化钠均为分析纯, 水为二次蒸馏水。

实验用鳗鱼购自福州农产品市场。

1.2 色谱分析条件

色谱柱: Waters μ BondapakTM C₁₈ 柱(3.9 mm i. d. \times 300 mm, 10 μ m)。流动相: 11 mmol/L 四丁基溴化铵溶液-乙腈(体积比为 94:6), 用冰乙酸调 pH 3.0, 流速 1.0 mL/min。柱温 40 $^{\circ}$ C。采用荧光检测器检测, 激发波长 280 nm, 发射波长 460 nm。进样量 10 μ L。此条件下, 4 种 FQS 能得到有效的分离(见图 1)。

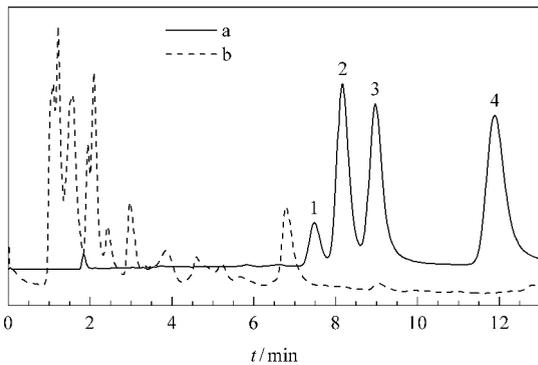


图 1 混合标准品(a)和鳗鱼样品(b)的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of a mixture of standards (a) and an eel sample (b)

1. OFLX; 2. NFLX; 3. CPFX; 4. ENX.

1.3 试液的配制

FQS 标准储备液: 精密称取氧氟沙星、诺氟沙星、恩诺沙星和环丙沙星标准品各 25.0 mg, 除环丙沙星用 0.03 mol/L 的 NaOH 溶液溶解并定容至 50 mL 外, 其他 3 种标准品均分别用乙腈溶解并定容至 50 mL。4 种标准储备液的质量浓度均为 500 mg/L。将上述 4 种储备液置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内保存。

FQS 混合标准工作液: 移取上述 4 种标准储备液各 1.0 mL 于同一 50 mL 棕色容量瓶中, 用乙腈稀释并定容, 配制成 4 种药物的质量浓度均为 10 mg/L 的混合标准工作液 I。移取 FQS 混合标准工作液 I 5.0 mL, 用流动相溶液稀释并定容于 50 mL 棕色容量瓶中, 制成 4 种药物的质量浓度均为 1.0 mg/L 的混合标准工作液 II。

四丁基溴化铵溶液: 称取 3.46 g 四丁基溴化铵, 溶于 1 000 mL 二次蒸馏水中, 用冰乙酸调 pH 值至 3.0, 得 11 mmol/L 四丁基溴化铵溶液。

1.4 样品处理

取一定量的鱼组织样品进行匀浆, 置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱内保存备用。准确称取 10.000 g 鱼组织样品, 置于 100 mL 聚丙烯离心管中, 加入经灼烧的无水硫酸钠, 用干净玻璃棒将样品与无水硫酸钠搅拌均匀。再加入 25 mL 乙腈涡旋振荡 2 min, 超声波提取 15 min, 然后以 3 000 r/min 的速率离心 5 min。将上清液移入 125 mL 分液漏斗中, 加 25 mL 正己烷混合, 涡旋振荡, 静置分层。将下层溶液(乙腈层)移入 100 mL 棕色细口鸡心瓶中。用 25 mL 乙腈对沉淀物重复以上操作, 合并乙腈层于鸡心瓶中。在以上提取液中加入 8 mL 正丙醇, 于 50 $^{\circ}$ C 水浴中吹氮蒸发至近干。加入 2 mL 流动相溶液超声 5 min 溶解残渣后移入 10 mL 离心管中, 再加入 2 mL 正己烷, 涡旋混匀, 离心分层, 弃去上层正己烷相, 将下层溶液过 0.45 μ m 水相滤膜后供液相色谱测定。

2 结果与讨论

2.1 色谱柱的选择

对于喹诺酮类药物的高效液相色谱测定, 使用最多的是 C₁₈ 柱。本文分别用 Waters Nova-Pak C₁₈ (3.9 mm i. d. \times 150 mm, 4 μ m) 和 Waters μ BondapakTM C₁₈ (3.9 mm i. d. \times 300 mm, 10 μ m) 色谱柱进行实验, 结果表明: 用 Nova-Pak 柱虽然也能将 4 种喹诺酮类药物完全分离, 但流动相中四丁基溴化铵溶液所占的比例要大于 97%, 如此高的比例会增加色谱柱的损坏程度; 用 Waters μ BondapakTM 柱, 流动相中四丁基溴化铵溶液所占的比例为 94% 时就能将 4 种喹诺酮类药物完全分离, 这样的流动相比例有利于对色谱柱的保护。因此选择用 μ BondapakTM 柱。

2.2 流动相的选择及优化

采用乙腈-甲醇-Britton Robinson(BR) 缓冲液(体积比为 73:7:20)作流动相^[5]时, BR 缓冲液为磷酸、乙酸、硼酸混合液, 成分复杂, 其与乙腈、甲醇混合时极易产生结晶而引起色谱流路堵塞, 且灵敏度偏低; 用 5 mmol/L 磷酸盐缓冲液-乙腈溶液作流动相^[7], 无论怎么调整两种溶液的比例、调节流动相的酸度, 都无法将氧氟沙星与诺氟沙星分离; 用甲醇-柠檬酸加醋酸铵(体积比为 25:75)作流动相^[3], 虽能将 4 种药物完全分离, 但检测灵敏度偏低, 检出限均大于 360 μ g/L。本文用四丁基溴化铵溶液-乙腈(体积比为 94:6)作流动相, 可将 4 种药物完全分

离,且4种药物的检出限都能达到5 $\mu\text{g/L}$ 。

考察了1~15 mmol/L共5个浓度水平下的四丁基溴化铵溶液,结果发现当四丁基溴化铵浓度达到11 mmol/L时4种药物的色谱峰才能得到有效分离;当浓度继续增大时,4种药物的色谱峰分离度仅略微变大。为了降低试剂的费用,选择四丁基溴化铵浓度为11 mmol/L。

四丁基溴化铵是一种离子对试剂(TBA^+),它的加入改变了氧氟沙星与诺氟沙星的保留因子 k ,因而也改变了分离因子 α ,使氧氟沙星与诺氟沙星的分离度 R_s 发生了较大变化,从而使原先无法分离的这两种药物得到了有效分离。需注意的是,色谱柱用含有离子对试剂的流动相进行初始平衡时,色谱柱吸收和释放离子对试剂的过程缓慢,因此柱平衡较慢,需要证实保留值能重现后再进行测定。

FQS是两性分子,同时含有一个氨基和一个羧基,因而流动相的pH值对FQS的分离度影响很大。我们考察了流动相的pH值(pH为2.0~4.5)对FQS分离度的影响,发现当pH为3.0时,4种FQS的分离最好,故选定流动相的pH值为3.0。

2.3 工作曲线、线性范围及最低检测限

取1.0 mg/L的混合标准工作液II,用流动相溶液稀释成30~500 $\mu\text{g/L}$ 即6~100 $\mu\text{g/kg}$ 系列浓度的混合工作液,按“1.2”节所述色谱条件每种质量浓度的溶液依次进样10 μL 。分别以各成分的峰面积 Y 对标准工作溶液的质量浓度 X ($\mu\text{g/L}$)进行

线性回归分析,结果见表1。

表1 喹诺酮类药物的线性回归方程、相关系数和线性范围
Table 1 Regression equations, correlation coefficients and linear ranges for the determination of fluoroquinolones

Fluoro-quinolone	Regression equation	r	Linear range/ ($\mu\text{g/kg}$)
OFLX	$Y = 2.03 \times 10^3 X - 2.38 \times 10^4$	0.9995	6 - 100
NFLX	$Y = 1.11 \times 10^4 X - 6.71 \times 10^4$	0.9998	6 - 100
CPFEX	$Y = 1.18 \times 10^4 X - 5.88 \times 10^4$	0.9996	6 - 100
ENX	$Y = 1.27 \times 10^4 X - 3.21 \times 10^4$	0.9996	6 - 100

Y : peak area; X : mass concentration ($\mu\text{g/L}$)

选取经测定确认样品中不含4种FQS的空白样品,采用添加标准溶液的方法,检测FQS的最低检测限。按信噪比大于2计,得到鱼样品中4种FQS的最低检测限均为1 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.4 回收率及日内、日间精密度的测定

在不含4种FQS的10.000 g鱼均质组织中分别添加前述混合标准工作液II 100, 500, 1 000 μL , 涡动混合5 min, 静置10 min, 制成含量分别为10, 50及100 $\mu\text{g/kg}$ 的样品。

将上述样品在每个浓度水平下做5次平行实验,按样品处理方法处理后进样,计算4种FQS的加标回收率,结果见表2。表2的数据表明,采用该方法测定,FQS的回收率良好,精密度令人满意。将各浓度样品日内重复测定5次,并连续测定5 d,计算日内和日间精密度。结果表明4种FQS测定结果的相对标准偏差均小于8%,精密度良好。

表2 鱼类中4种喹诺酮类药物的回收率和精密度(以相对标准偏差计)($n=5$)

Table 2 Recovery and precision of four fluoroquinolones in fish ($n=5$)

Added/ ($\mu\text{g/kg}$)	OFLX		NFLX		CPFEX		ENX	
	recovery/%	RSD/%	recovery/%	RSD/%	recovery/%	RSD/%	recovery/%	RSD/%
100	92.5	2.1	97.2	3.9	97.9	2.4	99.8	3.8
50	86.3	4.2	84.9	4.6	88.7	3.7	88.1	3.5
10	76.8	6.9	80.1	7.3	79.4	5.8	84.2	5.2

2.5 样品测定

在本实验设定的条件下,大量测定了福建仙游、霞浦、福清的鳗鱼、黄瓜鱼、甲鱼等鱼类样品。结果发现4种FQS标样峰与鱼组织中的杂质峰均达到良好分离(见图1)。

参考文献:

[1] Pan Wei, Guo Genhe, Su Desen, Rao Qihua. Analysis and Testing Technology and Instruments (潘 蔚, 郭根和, 苏德森, 饶秋华. 分析测试技术与仪器), 2004, 10(2): 107

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

[3] Bureau of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Chinese Journal of Veterinary Drug (中国农业部畜牧兽医局. 中国兽药杂志), 2003, 37(8): 11

[4] Liang Pei, Qin Yongchao, Jiang Zucheng, Xiong Chaomei. Chinese Journal of Analysis Laboratory (梁 沛, 秦永超, 江祖成, 熊朝梅. 分析实验室), 2000, 19(3): 56

[5] Du Liming, Wei Hongqing, Gao Yan, Chang Zhaoyong. Chinese Journal of Analytical Chemistry (杜黎明, 卫洪清, 郭 艳, 常兆勇. 分析化学), 2001, 29(9): 1 108

[6] Sun Hui, Dong Xiangchao, Lü Xianyu, Wang Haibo, Han Jianfang. Chinese Journal of Chromatography (孙 慧, 董襄朝, 吕宪禹, 王海波, 韩建仿. 色谱), 2003, 21(3): 233

[7] Du Liming, Wei Hongqing, Zhang Junyan, Zhang Qiaoping. Chinese Journal of Chromatography (杜黎明, 卫洪清, 张俊燕, 张巧平. 色谱), 2003, 21(5): 503

[8] Marazuela M D, Moreno-Bondi M C. J Chromatogr A, 2004, 1 034(1-2): 25

[9] Johnston L, Mackay L, Croft M. J Chromatogr A, 2002, 982(1): 97

[10] Schneider M J, Donoghue D J. Anal Chim Acta, 2003, 483(1-2): 39