

四种固相萃取柱在猪肉四种氟喹诺酮类药物残留检测中应用比较

祝曙华*, 苏青云

(东莞市农产品质量安全监督检测所, 东莞 523086)

摘要: **目的** 本文研究比较了四种固相萃取(solid phase extraction, SPE)柱在超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC)法检测猪肉中四种氟喹诺酮类药物的应用效果。**方法** 首先标液过SPE柱实验, 从中筛选出回收率符合要求的三种SPE柱, 再对其进行3水平、6平行的加标试验。加标试验添加含量以环丙沙星计为20、60、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。**结果** 三种SPE柱即HLB 3 cc、Agilent C₁₈ 1 cc和Supelclean LC-C₁₈ 1 mL都有较好的净化效果, 回收率和稳定性均能满足检测要求, 其中HLB 3 cc柱的回收率为87.3%~101.2%, RSD为0.2%~5.2%; Agilent C₁₈ 1 cc柱的回收率为89.0%~100.0%, RSD为1.0%~3.6%; Supelclean LC-C₁₈ 1 mL柱的回收率为83.7%~97.2%, RSD为0.7%~6.6%。在10~100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 浓度范围内线性关系良好, 相关系数 $R > 0.999$, 检出限为0.1~1.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为0.1~4.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。**结论** 三种SPE柱均能用于猪肉中四种氟喹诺酮类药物残留检测。

关键词: 固相萃取; 氟喹诺酮; 检测; 液相色谱

Application contrast of four kinds of SPE cartridges in detecting drug residues of four fluoroquinolones in pork by UPLC

ZHU Shu-Hua*, SU Qing-Yun

(Dongguan Supervision and Test Institute of Agro-product Quality and Safety, Dongguan 523086, China)

ABSTRACT: Objective Four kinds of SPE cartridges were applied and compared in the detection of drug residues of four fluoroquinolones in pork by UPLC. **Methods** Standard solutions were purified by four kinds of SPE columns, in which three kinds of columns were selected for their satisfying recoveries. Then recovery experiment was developed on three levels for 20, 60, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ with six parallels. **Results** The results showed that the three SPE cartridges (HLB 3 cc, Agilent C₁₈ 1 cc and Supelclean LC-C₁₈ 1 mL) had satisfying purification effect, and recovery rate and stability could meet the requirements of detection. For HLB 3cc cartridge, the recoveries were 87.3%~101.2% and RSD were 0.2%~5.2%. For Agilent C₁₈ 1 cc, the recoveries were 89.0%~100.0% and RSD values were 1.0%~3.6%. For Supelclean LC-C₁₈ 1 mL, the recoveries were 83.7%~97.2% and RSD values were 0.7%~6.6%. The linear relation was good when the concentration range was 10~100 $\mu\text{g}/\text{L}$ and the correlation coefficient was over 0.999. Limit of detection was 0.1~1.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and limit of quantification was 0.1~4.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$. **Conclusion** Three kinds of SPE columns can be applied for detection of four fluoroquinolones residues in pork.

*通讯作者: 祝曙华, 硕士, 工程师, 主要研究方向为兽药残留检测。E-mail: shzhu2013@163.com

*Corresponding author: ZHU Shu-Hua, Engineer, Dongguan Supervision and Test Institute of Agro-product Quality and Safety, No.133, Luse Road, Nancheng District, Dongguan 523086, China. E-mail: shzhu2013@163.com

KEY WORDS: solid phase extraction(SPE); fluoroquinolone; detection; liquid chromatography

氟喹诺酮类 FQs 是近 20 年来迅速发展起来的一类十分重要的广谱抗生素。在化学结构上, 本类药物属于吡酮酸衍生物, 俗称“喹诺酮类”。FQs 抑制细菌 DNA 螺旋酶, 其抗菌谱广、高效、低毒、组织穿透力强, 抗菌作用是磺胺类药物的近千倍, 可与第三代头孢类抗生素相媲美。FQs 系化学合成药物, 价格低廉, 故已成为兽医临床和水产养殖中最重要的抗感染药物之一, 被大量用于治疗、预防和促生长, 国内兽用 FQs 的使用量已接近 500 t/a。由于致病菌产生耐药性和某些 FQs 的潜在致癌性以及过敏、溢血和肾衰等不良反应^[1-5], 其残留问题已引起广泛关注。目前, 大多数 FQs 缺乏最大残留量 MRLs 资料。欧盟规定各种组织中恩诺沙星 ENR 的 MRLs 为 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 联合国粮农组织/世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会 JECFA 推荐鸡肝组织沙拉沙星 SAR 的 MRLs 为 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 猪肝组织中达氟沙星 DAN 的 MRLs 为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[1]。

目前, 国内外关于动物性食品中 FQs 残留分析的报道已有很多, 主要采用高效液相色谱、液质联用技术等一些高灵敏度的分析检测技术进行准确测定^[1-11]。但是生物样品基质复杂、干扰物质多, 而且 FQs 在生物样品中的残留浓度也很低, 对 FQs 的残留分析带来了很大的困难, 因而样品前处理问题一直是分析检测人员关注的热点。固相萃取技术是目前在氟喹诺酮类兽药残留分析中应用较为普遍的样品前处理技术, 与液-液萃取相比, 它不需要大量互不相溶的溶剂, 处理过程中不会产生乳化现象, 而且采用高效、高选择性的吸附剂(固定相), 能显著减少溶剂的用量, 简化样品的处理过程, 同时减少所需费用^[10]。目前应用于 FQs 检测的均为反相固相萃取柱, 回收率范围为 56%~119%^[3,4,7,8]。

本文采取超高效液相色谱法同时检测猪肉中四种氟喹诺酮类药物, 研究比较了四种反相固相萃取柱的应用效果。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器

对照品: 环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星和沙拉沙星均产自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司, 纯度依次为

98.5%、94.0%、95.5%、95.0%; 磷酸、甲醇(色谱纯, 德国 Merck 公司); 三乙胺(色谱纯, J.T.Baker 公司); 磷酸二氢钾(分析纯, 广州化学试剂厂); 氢氧化钠(分析纯, 广州化学试剂厂)。

SPE 柱: Waters HLB 3 cc, 60 mg; Agilent Bond ELUT-C₁₈ 1 cc, 100 mg; Supelclean LC-C₁₈ 1 mL; Supelclean LC-C₁₈ 3 mL。

超高效液相色谱仪(Waters Acquity UPLC H-Class)、荧光检测器 FLR、高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司)、涡旋振荡器(德国 IKA 公司)、超声波清洗器(上海科导超声器皿有限公司)、电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司)、超纯水器(德国默克 Millipore)。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈(4.6 mm×100 mm, 2.7 μm); 流动相: 乙腈:磷酸/三乙胺(19+81); 流速: 0.60 mL/min; 柱温: 35.0 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μL ; 检测波长: 激发波长: 280 nm; 发射波长: 450 nm。

1.2.2 标准曲线

取适量 FQs 标准储备液(0.03 mol/L NaOH 溶解后用乙腈稀释), 以流动相稀释定容, 配制工作液, 其中环丙沙星、恩诺沙星和沙拉沙星浓度为 10.0、20.0、40.0、80.0、100 $\mu\text{g}/\text{L}$, 达氟沙星浓度为 2.00、4.00、8.00、16.0、20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。依照浓度由小到大的次序进样分析, 以组分含量为横坐标, 峰面积为纵坐标作图, 计算线性回归方程和相关系数。

1.2.3 样品前处理

称取试样 2.00 g 置于 50 mL 离心管中, 加入 0.1 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液 10.0 mL, 涡旋混合 30 s, 水浴超声提取 15 min, 12000 r/min 离心 10 min, 取上清液。残渣再以磷酸二氢钾缓冲液 10.0 mL 提取一次, 离心, 取上清液。合并两次上清液, 混匀, 离心, 分取 5.0 mL 上清液过 SPE 柱净化。净化流程: 1 倍柱体积甲醇→1 倍柱体积水→上样→1 倍柱体积水润洗试管→1 倍柱体积水洗→抽干→洗脱、收集洗脱液→抽干→混匀。最后过 0.2 μm 滤膜上 UPLC 测定。

1.2.4 实验步骤

第一步是取标准工作液(达氟沙星 0.02 mg, 其余

三种各为 0.1 mg)以 5.00 mL 提取缓冲液稀释后过四种 SPE 柱, 分别为 HLB、Agilent、Supelclean 1 mL 和 Supelclean 3 mL, 分批以 1、2、4 mL 洗脱液(乙腈:磷酸/三乙胺=20+80)洗脱, 从而确定洗脱体积, 筛选出回收率、稳定性较高的 SPE 柱; 第二步是在此基础上将加标样品提取过柱, 考察 SPE 柱的净化效果、回收率及稳定性。加标实验以 20、60、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (以环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星计, 达氟沙星为其 1/5 浓度)3 水平、6 平行进行。

2 结果与分析

2.1 标准曲线、线性范围、检出限与定量限

以选定的仪器方法进行 UPLC 检测, 能有效分离 4 种 FQs 组分, 6 min 内出峰完毕。色谱峰尖锐、对称, 灵敏度较高, 标准谱图如图 1 所示。CIP、ENR、SAR 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{L}$, DAN 浓度为 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

2.1.1 标准曲线与线性范围

在检测浓度范围内, 以各组分的浓度与其色谱

峰面积进行线性分析, 呈现良好的线性关系, 其相关参数如表 1 所示。

2.1.2 标液过柱

标液过柱的回收率如表 2 所示。从表 2 中可以看出: HLB 柱须用 4 mL 洗脱液才能完全洗脱, 回收率 94.8%~102.1%; Agilent 柱 1 mL 洗脱液即可, 回收率 92.7%~102.9%; Supelclean 1 mL 柱用 4 mL 洗脱液才能大致洗脱, 回收率 76.2%~96.2%; 而 Supelclean 3 mL 柱即使 4 mL 洗脱液也远未洗脱完全, 回收率 9.0%~63.5%。洗脱体积过大会导致误差加大和灵敏度下降, 因此确定前三种 SPE 柱的洗脱体积分别为 4、1、4 mL, 可进一步分析应用, 而最后一种 SPE 柱则弃用。

2.1.3 检出限与定量限

以 3 倍信噪比(S/N)计算, 该方法测定猪肉中 4 种 FQs 组分的检出限是 0.1~1.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 以 10 倍信噪比(S/N)计算, 该方法的定量限是 0.1~4.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。具体参数如表 3 所示。

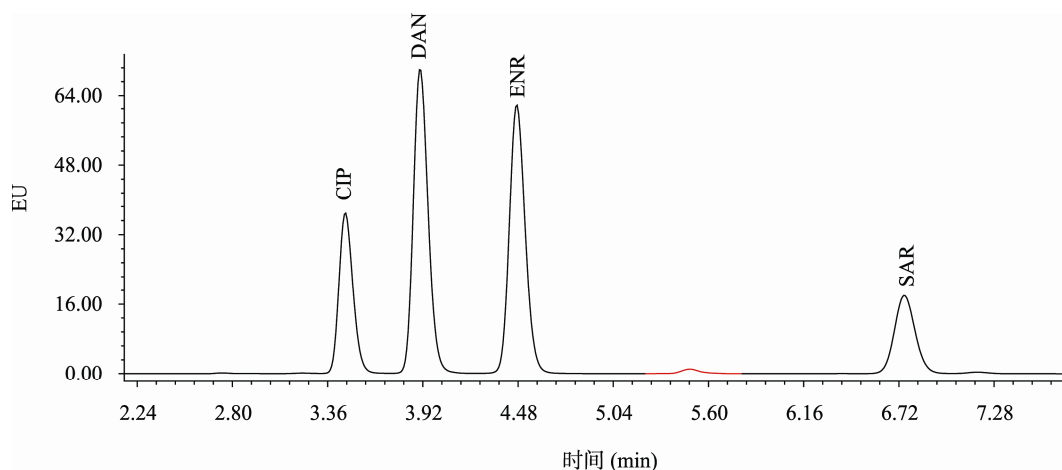


图 1 四种氟喹诺酮类药物标准溶液 UPLC 谱图

Fig. 1 Chromatogram of standard solution of 4 kinds of FQs

表 1 四种沙星的回归分析

Table 1 Regression analysis of four kinds of FQs

| 组分 | 线性范围 $\mu\text{g}/\text{L}$ | 回归方程 | 相关系数 R |
|------|-----------------------------|-------------------------------------------|----------|
| 环丙沙星 | 10.0~100 | $Y=2.12 \times 10^4 X - 4.14 \times 10^3$ | 0.999997 |
| 达氟沙星 | 2.00~20.0 | $Y=2.10 \times 10^5 X - 9.46 \times 10^3$ | 0.999999 |
| 恩诺沙星 | 10.0~100 | $Y=3.99 \times 10^4 X - 7.63 \times 10^3$ | 0.999998 |
| 沙拉沙星 | 10.0~100 | $Y=1.51 \times 10^4 X - 1.68 \times 10^3$ | 0.999998 |

表 2 四种 SPE 柱不同洗脱体积的回收率比较
Table 2 Analysis of different elution volumes of four kinds of SPE cartridges

| SPE 柱 | 洗脱体积(mL) | 回收率(%) | | | |
|-----------------|----------|--------|-------|-------|-------|
| | | 环丙沙星 | 达氟沙星 | 恩诺沙星 | 沙拉沙星 |
| HLB | 1 | 77.7 | 71.9 | 69.2 | 39.0 |
| | 2 | 99.0 | 95.2 | 101.0 | 90.2 |
| | 4 | 99.9 | 94.8 | 102.1 | 99.1 |
| Agilent | 1 | 102.6 | 99.9 | 105.1 | 99.6 |
| | 2 | 107.8 | 104.7 | 109.9 | 106.0 |
| | 4 | 98.9 | 96.3 | 102.9 | 92.7 |
| Supelclean 1 mL | 1 | 73 | 76.1 | 72.4 | 35.5 |
| | 2 | 81.5 | 85.6 | 86.5 | 62.7 |
| | 4 | 87.1 | 90 | 92.2 | 76.2 |
| Supelclean 3 mL | 1 | 0.7 | 0.4 | 0.0 | 0.0 |
| | 2 | 29.9 | 23.9 | 10.8 | 0.0 |
| | 4 | 63.5 | 62.2 | 48.7 | 9.0 |

表 3 四种沙星的检出限与定量限
Table 3 Limit of detection and limit of quantitation of four kinds of FQs

| 组分 | 检出限 $\mu\text{g}/\text{kg}$ | | | 定量限 $\mu\text{g}/\text{kg}$ | | |
|------|-----------------------------|---------|------------|-----------------------------|---------|------------|
| | HLB | Agilent | Supelclean | HLB | Agilent | Supelclean |
| 环丙沙星 | 0.7 | 0.2 | 0.7 | 2.2 | 0.6 | 2.2 |
| 达氟沙星 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.3 | 0.1 | 0.3 |
| 恩诺沙星 | 0.4 | 0.1 | 0.4 | 1.3 | 0.3 | 1.3 |
| 沙拉沙星 | 1.3 | 0.3 | 1.3 | 4.2 | 1.1 | 4.2 |

2.2 加标回收净化效果

根据标液过柱实验确定的洗脱体积,对加标样品分别采用三种 SPE 柱进行净化,其结果分析如下。

2.2.1 杂质去除情况

三种 SPE 柱净化后的加标样品谱图如图 2 所示。由谱图可见,样品基质杂质能被有效去除,对 FQs 组分的定性和定量没有干扰。因此,三种 SPE 柱均可有效净化样品,满足检测的需要。

2.2.2 回收率和稳定性

分析加标回收的回收率和稳定性,从表 4、表 5 中可见,HLB、Agilent、Supelclean 三种 SPE 柱的回收率分别为 87.3%~101.2%、89.0%~100.0%、83.7%~97.2%,相对标准偏差 RSD 值依次为 0.2%~5.2%、1.0%~3.6%、0.7%~6.6%。虽然 Supelclean SPE 柱的回收率相对偏低,但也能满足国标中回收率 60%~100%的要求^[7]。三者均能用于猪肉中四种氟喹诺酮类药物的检测。

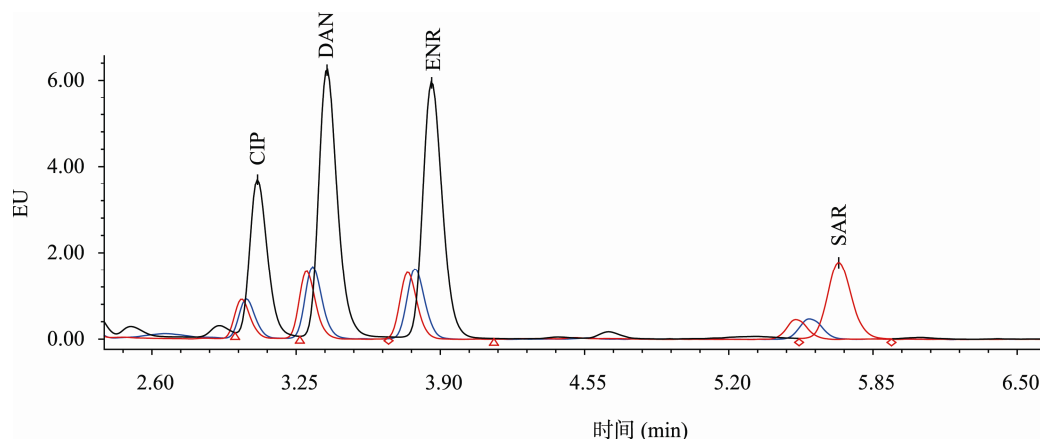


图 2 三种 SPE 柱净化的样品 UPLC 谱图

Fig. 2 Chromalogram of samples treated by three kinds of SPE cartridges

表 4 三种 SPE 柱净化回收率(%)的比较

Table 4 Recoveries(%) of standard addition treated by three kinds of SPE cartridges

| 目标物 | 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ | | | 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ | | | 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ | | |
|------|----------------------------|---------|------------|----------------------------|---------|------------|-----------------------------|---------|------------|
| | HLB | Agilent | Supelclean | HLB | Agilent | Supelclean | HLB | Agilent | Supelclean |
| 环丙沙星 | 100.2 | 100.0 | 97.2 | 95.4 | 99.6 | 94.9 | 91.6 | 97.0 | 90.1 |
| 达氟沙星 | 97.8 | 91.3 | 90.2 | 90.6 | 91.3 | 87.2 | 87.3 | 89.0 | 84.0 |
| 恩诺沙星 | 101.2 | 94.5 | 93.2 | 96.3 | 94.6 | 92.4 | 93.2 | 91.3 | 89.7 |
| 沙拉沙星 | 97.8 | 95.3 | 83.7 | 95.1 | 97.8 | 83.8 | 92.0 | 95.0 | 84.1 |

表 5 三种 SPE 柱净化稳定性的比较(RSD/%)

Table 5 Stability of standard additions treated by three kinds of SPE cartridges(RSD/%)

| 目标物 | 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ | | | 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ | | | 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ | | |
|------|----------------------------|---------|------------|----------------------------|---------|------------|-----------------------------|---------|------------|
| | HLB | Agilent | Supelclean | HLB | Agilent | Supelclean | HLB | Agilent | Supelclean |
| 环丙沙星 | 5.2 | 1.0 | 2.9 | 0.5 | 2.1 | 6.6 | 0.2 | 3.0 | 0.8 |
| 达氟沙星 | 3.7 | 1.4 | 2.2 | 1.0 | 1.9 | 4.0 | 0.4 | 2.9 | 1.1 |
| 恩诺沙星 | 3.2 | 1.4 | 1.0 | 0.7 | 2.1 | 3.6 | 0.3 | 2.8 | 0.7 |
| 沙拉沙星 | 4.8 | 3.6 | 4.6 | 0.6 | 3.0 | 4.9 | 0.4 | 3.1 | 1.2 |

3 结 论

本文采用超高效液相色谱法检测猪肉中四种 FQs 药物残留, 从四种 SPE 柱中比较筛选, 确立了其中三种 SPE 柱能有效净化猪肉样品基质。与当前报道的同类检测方法^[3-8]相比, 该方法具有简便快速、回收率和稳定性较高、检测灵敏度较高的优势, 能满足实际样品分析的要求。

参考文献

- [1] 李俊锁, 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.
Li JS, Qiu YM, Wang C, *et al.* Analysis of veterinary drug residues[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Pressure, 2002: 228-264.
- [2] 杜付彬, 谭建华. 动物性食品中氟喹诺酮类药物残留检测研究进展[J]. 动物医学进展, 2006, 27(12): 39-43.

- Du FB, Tan JH. The residue analysis of fluoroquinolones in animal derived food[J]. *Progr in Vet Med*, 2006, 27(12): 39–43.
- [3] 赵思俊, 李存, 江海洋, 等. 高效液相色谱检测动物肌肉组织中 7 种喹诺酮类药物的残留[J]. *分析化学研究报告*, 2007, 35(6): 786–790.
- Zhao SJ, Li C, Jiang HY, *et al.* Simultaneous determination of 7 quinolones residues in animal muscle tissues by high performance liquid chromatography[J]. *Chin J Anal Chem*, 2007, 35(6): 786–790.
- [4] 贾涛, 肖勇, 王有月. 高效液相色谱法检测鸡肉组织中氟喹诺酮类药物[J]. *饲料研究*, 2011, 7: 44–47.
- Jia T, Xiao Y, Wang YY. Detection of fluoroquinolones in chicken tissues by high performance liquid chromatography[J]. *Feed Res*, 2011, 7: 44–47.
- [5] 刘靖靖, 林黎明, 江志刚, 等. 高效液相色谱法同时检测 8 种喹诺酮类药物残留量[J]. *分析实验室*, 2007, 26(8): 5–9.
- Liu JJ, Lin LM, Jiang ZG, *et al.* Determination of 8 quinolone multi-residues by high-performance liquid chromatography [J]. *Chin J Anal Lab*, 2007, 26(8): 5–9.
- [6] 潘媛, 牛华, 程晓云, 等. 高效液相色谱法检测六种氟喹诺酮类药物残留前处理的优化[J]. *分析实验室*, 2011, 30(5): 69–72.
- Pan Y, Niu H, Cheng XY, *et al.* Pretreatment optimization on determination of six fluoroquinolones in animal foods[J]. *Chin J Anal Lab*, 2011, 30(5): 69–72.
- [7] 中华人民共和国农业部. 农业部 1025 号公告-14-2008 动物性食品中氟喹诺酮类药物残留检测高效液相法[S].
Ministry of Agriculture. No.1025 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Determination of fluoroquinolones residues in animal derived food by high performance liquid chromatography [2008].
- [8] 林保银. 鸡肉中 11 种喹诺酮类药物多残留的高效液相色谱检测[J]. *色谱*, 2009, 27(2): 206–210.
- Du BY. Multi-residue determination of 11 quinolones in chicken muscle by high performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. *Chin J Chromatogr*, 2009, 27(2): 206–210.
- [9] 蒋小武. 浅析氟喹诺酮类药物残留检测方法[J]. *中国畜牧兽医文摘*, 2011, 27(3): 188–191.
- Jiang XW. Analysis of detecting methods of fluoroquinolones drug residues[J]. *China Animal Husbandry and Vet Abstract*, 2011, 27(3): 188–191.
- [10] 姜宁, 刘芑岩, 吴伟. 固相萃取技术及其在氟喹诺酮类药物残留分析中的应用[J]. *河北大学成人教育学院学报*, 2006, 8(4): 126–128.
- Jiang N, Liu FY, Wu W. Solid phase extraction technology and its application in analysis of fluoroquinolones drug residues[J]. *J Adult Educ Hebei Univ*, 2006, 8(4): 126–128.
- [11] 赵玉丛, 樊国燕. 固相萃取-高效液相色谱同时测定中兽药中 8 种氟喹诺酮类药物[J]. *黑龙江畜牧兽医(科技版)*, 2012, 6: 90–91, 94.
- Zhao YC, Fan GY. Detection of fluoroquinolones in Chinese veterinary drugs by solid phase extraction and high performance liquid chromatography [J]. *Heilongjiang Animal Sci Vet Med*, 2012, 6: 90–91, 94.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



祝曙华, 硕士, 工程师, 主要研究方向为兽药残留检测。

E-mail: shzhu2013@163.com