

高效液相色谱法测定鸡蛋中4种氟喹诺酮类药物的含量

姜兴华^{1*}, 杨韶芸², 沈荣明²

(1. 赣州市农业和粮食局, 赣州 341000; 2. 于都县农业和粮食局, 赣州 342300)

摘要: **目的** 采用高效液相色谱法同时测定鸡蛋中环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星和达氟沙星4种药物的残留量。**方法** 样品经磷酸盐提取液提取后, 经反相C₁₈柱分离, 采用0.05 mol/L磷酸-三乙胺溶液:乙腈(85:15, V:V)流动相进行等度洗脱, 流速为0.8 mL/min, 采用荧光检测器在激发波长280 nm、发射波长450 nm的条件下进行测定, 以外标法定量。**结果** 环丙沙星、恩诺沙星和沙拉沙星在0.005~0.5 µg/mL、达氟沙星在0.001~0.1 µg/mL浓度范围内具有良好的线性关系, 相关系数为0.9998, 加标回收率为96.5%~103%, 相对标准偏差为0.83%~1.28%。**结论** 该方法精确可靠, 重复性、稳定性和分离效果好, 可适用于测定鸡蛋中氟喹诺酮类药物的残留量。

关键词: 高效液相色谱法; 鸡蛋; 氟喹诺酮类; 药物残留

Determination of 4 kinds of fluoroquinolones in egg by high performance liquid chromatography

JIANG Xing-Hua^{1*}, YANG Shao-Yun², SHEN Rong-Ming²

(1. Ganzhou Municipal Bureau of Agriculture and Grain, Ganzhou 341000, China; 2. Agriculture and Grain Bureau of Yudu County, Ganzhou 342300, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of 4 kinds of fluoroquinolones residues including ciprofloxacin, enrofloxacin, sarafloxacin and danofloxacin in eggs by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The samples were extracted with phosphate, separated by a reversed-phase C₁₈ column using 0.05 mol/L phosphoric acid-triethylamine and acetonitrile (85:15, V:V) as the mobile phase for isocratic elution at the flow rate of 0.8 mL/min, and then detected by fluorescence detector at the excitation wavelength of 280 nm and the emission wavelength of 450 nm with the external standard method for quantification. **Results** The method showed good linearities in the ranges of 0.005~0.5 µg/mL for ciprofloxacin, enrofloxacin, and sarafloxacin and 0.001~0.1 µg/mL for danofloxacin with the correlation coefficients of 0.9998. The recoveries were 96.5%~103% with relative standard deviations in the range of 0.83%~1.28%. **Conclusion** The established method is accurate, reproducible, stable and has good separation effect, which can be used for the determination of fluoroquinolones residues in eggs.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; eggs; fluoroquinolones; drug residue

*通讯作者: 姜兴华, 硕士, 工程师, 主要研究方向农产品质量安全. E-mail: xinghua.jiang@163.com

*Corresponding author: JIANG Xing-Hua, Master, Engineer, Ganzhou Municipal Bureau of Agriculture and Grain, Ganzhou 341000, China. E-mail: xinghua.jiang@163.com

1 引言

氟喹诺酮类药物属第 3 代喹诺酮类抗菌药, 是在喹诺酮萘啶环的 6 位处引入了氟原子, 7 位上都连有哌嗪环, 因而又统称氟喹诺酮类^[1]。氟喹诺酮类药物属化学合成抗菌药, 通过抑制 DNA 回旋酶, 造成染色体的不可逆损害^[2]。该类药物不受质粒传导耐药性的影响, 与许多抗菌药物间无交叉耐药性; 其抗菌谱广、抗菌力强、组织穿透力强、不良反应少而被广泛应用于人类及动物感染性疾病的预防和治疗^[3-5]。但如果用药过量会造成中枢神经系统、消化系统和肝肾等器官发生病变, 因此氟喹诺酮类药物必须严格控制用量以确保家禽及其产品安全^[6,7]。

目前氟喹诺酮类药物的残留检测方法一般包括微生物法^[8]、免疫法、高效液相色谱法^[9]和高效液相色谱-质谱联用法等^[10]。但是目前国内关于氟喹诺酮类药物残留的研究较少, 本研究拟建立一种鸡蛋中氟喹诺酮类药物残留的快速检测方法。

2 材料与方法

2.1 试剂与仪器

乙腈(色谱纯, SK Chemicals); 正己烷(色谱纯, 美国 Tedia 公司); 磷酸(优级纯, 国药集团化学试剂有限公司); 三乙胺(优级纯, 美国 Fisher Scientific 公司); 磷酸二氢钾、氢氧化钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 磷酸盐提取液(磷酸二氢钾 6.8 g, 加水溶解稀释至 500 mL, 用 5.0 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 7.0)。

环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星和达氟沙星标准溶液(农业部环境保护科研监测所, 浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$);

Waters 2695 型液相色谱仪(配备 Waters2475 荧光检测器, 美国 Waters 公司); T25 匀浆机(德国 IKA 公司); HZF-A500 电子天平(福州华志科学仪器有限公司); CTH1850 离心机(湖南湘立科学仪器有限公司); GL-88B 旋

涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);
鸡蛋(基地和养殖户抽取的样品)。

2.2 实验方法

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Waters Symmetry[®] C₁₈ 柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 5.0 μm); 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 试样温度: 室温; 进样量: 20 μL ; 流动相: A 相为 0.05 mol/L 磷酸-三乙胺溶液, B 相为乙腈; 等度洗脱: A:B=85:15(V:V); 荧光检测器: 激发波长 280 nm, 发射波长 450 nm。

2.2.2 供试品溶液的制备

准确称取 2 g 试料, 加磷酸盐提取液 2.0 mL, 搅拌后离心取上清液, 残渣再提取一次, 合并上清液。加 10 mL 水饱和的正己烷溶液, 震荡 5 min 后离心, 弃去上层物质, 下层溶液再萃取一次, 弃去正己烷层, 下层为备用液。备用液用 C₁₈ 柱(200 mg/3 mL)净化, 用 1 mL 流动相洗脱, 收集液作为试样溶液, 过膜后上机分析。

2.2.3 标准溶液的配制

分别精密量取环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星标准溶液各 0.05 mL 和达氟沙星标准溶液 0.01 mL, 置于 10 mL 容量瓶中用流动相定容至刻度, 然后采用倍比稀释法配制成系列浓度的标准混合工作溶液供上机。

3 结果与分析

3.1 色谱条件

在 2.2.1 色谱条件下, 考察了 0.05 mol/L 磷酸-三乙胺溶液和乙腈的比例, 以 82:18、85:15 和 90:10(V:V)进行了实验, 结果表明流动相为 85:15(V:V)的比例分离效果较好; 随后又考察了 0.8 mL/min 和 1.0 mL/min 的流速, 最终确定本实验流速为 0.8 mL/min。在此色谱条件下, 试样中环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星和达氟沙星均得到较好的分离, 结果如图 1 所示。

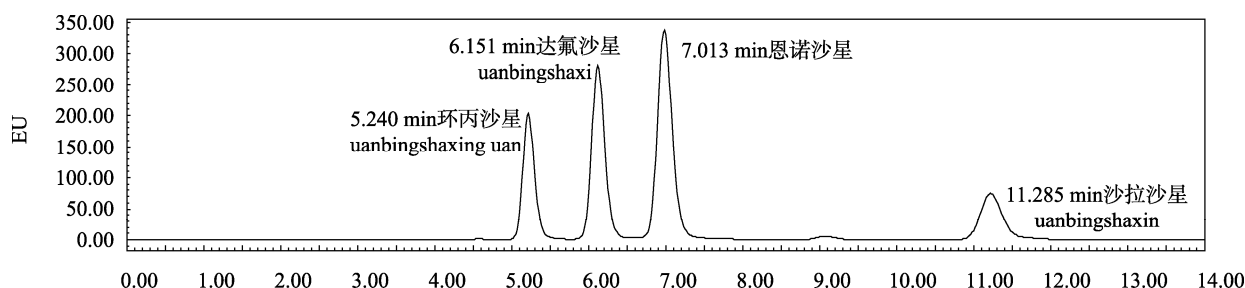


图 1 4 种氟喹诺酮类标准溶液的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of 4 kinds of fluoroquinolones standard

表 1 4 种氟喹诺酮类农药的线性方程和相关系数
Table 1 Linear equations, correlation coefficients of 4 kinds of fluoroquinolones multi-residues standard

名称	线性回归方程	相关系数 r^2	线性范围($\mu\text{g/mL}$)
环丙沙星	$Y=2.163632\times10^8X+581163$	0.9998	0.005~0.5
恩诺沙星	$Y=4.550928\times10^8X+984376$	0.9998	0.005~0.5
沙拉沙星	$Y=1.50636\times10^8X+309753$	0.9998	0.005~0.5
达氟沙星	$Y=1.653525\times10^9X+828813$	0.9998	0.001~0.1

表 2 鸡蛋中氟喹诺酮类药物添加实验的平均回收率和相对标准偏差($n=5$)
Table 2 Average spiked recoveries and relative standard deviations (RSDs) of fluoroquinolones in eggs ($n=5$)

	加标值(μg)	回收值(μg)	平均回收率(%)	RSD(%)
环丙沙星	0.02	0.0193	96.5	0.83
恩诺沙星	0.02	0.0206	103	1.28
沙拉沙星	0.02	0.0198	99.0	0.98
达氟沙星	0.004	0.00392	98.0	1.06

3.2 线性关系考察

在 2.2.1 色谱条件下进样, 以标准溶液浓度 $X(\mu\text{g/mL})$ 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线。回归方程、相关系数及线性范围见表 1, 从该表可以看出, 方法线性关系较好。

3.3 精密度试验

在 2.2.1 色谱条件下, 取低(环丙沙星、恩诺沙星和沙拉沙星浓度为 $0.005\ \mu\text{g/mL}$, 达氟沙星浓度为 $0.001\ \mu\text{g/mL}$)、中(环丙沙星、恩诺沙星和沙拉沙星浓度为 $0.1\ \mu\text{g/mL}$, 达氟沙星浓度为 $0.02\ \mu\text{g/mL}$)、高(环丙沙星、恩诺沙星和沙拉沙星浓度为 $0.5\ \mu\text{g/mL}$, 达氟沙星浓度为 $0.1\ \mu\text{g/mL}$)3 个浓度的标准混合工作溶液进样, 每个浓度连续进样 5 次, 记录峰面积并计算精密度。经测定, 环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星和达氟沙星在低浓度下 RSD 分别为 0.46%、0.24%、0.82%和 0.43%($n=5$), 中浓度下 RSD 分别为 0.13%、0.21%、0.12%和 0.12%($n=5$), 高浓度下 RSD 分别为 0.09%、0.15%、0.05%和 0.09%($n=5$)。结果表明, 仪器在此色谱条件下进样精密度良好。

3.4 稳定性试验

取中浓度标准混合工作溶液, 室温放置 0、4、8、12、16、20、24 h 后按 2.2.1 色谱条件进样, 记录峰面积, 环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星和达氟沙星 4 种物质的 RSD 分别为 1.30%、1.03%、0.67%和 0.48%($n=7$), 说明样品在 1 d 内测定结果稳定。

3.5 加标回收率试验

以空白基质的新鲜鸡蛋为样品, 采用添加法进行试验。准确称取平行样品 5 份, 加入环丙沙星、恩诺沙星和

沙拉沙星浓度为 $0.1\ \mu\text{g/mL}$ 、达氟沙星浓度为 $0.02\ \mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作溶液 $200\ \mu\text{L}$, 按照 2.2.2 的方法制备供试品溶液, 在 2.2.1 的条件下进行测定, 计算加标回收率, 结果如表 2 所示。4 种物质的回收率均高于 96.5%, 相对标准偏差(RSD)低于 1.28%, 表明该方法稳定、可靠。

4 结论与讨论

本研究的色谱条件主要考察了流动相比比例和流速对分离效果的影响, 最终确定 $0.05\ \text{mol/L}$ 磷酸-三乙胺溶液和乙腈比例为 85:15(V:V), 流速为 $0.8\ \text{mL/min}$ 。本方法的精密度、稳定性和回收率均符合要求, 且线性关系良好, 适用于鸡蛋中氟喹诺酮类物质的药物残留量测定。

参考文献

[1] 高硕, 张红梅, 蒋若冰. 氟喹诺酮类药物的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(9): 756-759.
Gao S, Zhang HM, Jiang RB. Research progress of fluoroquinolones [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2011, 28(9): 756-759.

[2] 饶勇, 曾振灵, 杨桂香, 等. 液相色谱-质谱联用检测牛奶中氟喹诺酮类药物残留的确证方法[J]. 中国农业科学, 2007, 40(5): 1033-1041.
Rao Y, Zeng ZL, Yang GX, et al. Confirmation of fluoroquinolone residues in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Sci Agric Sin, 2007, 40(5): 1033-1041.

[3] Papich MG, Riviere JE. Veterinary pharmacology and therapeutics [M]. Iowa: Iowa State University Press, 2000.

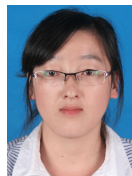
[4] Scholar EM. Fluoroquinolones: past, present and future of a novel group of antibacterial agents [J]. Am J Pharm Edu, 2003, 66: 164-172.

[5] Emmerson AM, Jones AM. The fluoroquinolones: decades of development and use [J]. J Antimicrob Chem, 2003, 51(Suppl): 13-21.

[6] 乔坤云, 孙涛, 刘圣红, 等. 高效液相色谱荧光法检测鸡肉中 4 种氟喹诺酮药物残留[J]. 分析仪器, 2015, 6: 43-46.

- Qiao KY, Sun T, Liu SH, *et al.* Detection of 4 fluoroquinolone drug residues in chicken by high performance liquid chromatography with fluorescence [J]. *Anal Instrum*, 2015, 6: 43–46.
- [7] 樊雯娟, 代立勤, 刘新智. 高效液相色谱-柱后衍生法检测牛奶中 10 种氨基甲酸酯类农药残留[J]. *农产品加工*, 2015, 1(1): 29–34.
- Fan WJ, Dai LQ, Liu XZ. Determination of ten carbamates residues in milk by HPLC with postcolumn derivatization [J]. *Farm Prod Process*, 2015, 1(1): 29–34.
- [8] Nouws J, Egmond H, Smulders I, *et al.* A microbiological assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue levels [J]. *Int Dairy J*, 1999, 9: 85–90.
- [9] Verdon E, Couedor P, Roudaut B, *et al.* Multiresidue method for simultaneous determination of ten quinolone antibacterial residues in multimatrix/multispecies animal tissues by liquid chromatography with fluorescence detection: single laboratory validation study [J]. *J AOAC Int*, 2005, 88(4): 1179–1192.
- [10] Schneider MJ, Donoghue DJ. Multiresidue analysis of fluoroquinolone antibiotics in chicken tissue using liquid chromatography-fluorescence-multiple mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2002, 780: 83–92.
- (责任编辑: 姚 菲)

作者简介



姜兴华, 工程师, 主要研究方向为农产品质量安全。

E-mail: xinghua.jiang@163.com