

高效毛细管电泳法同时检测鸡肝中氟喹诺酮类和磺胺类药物残留

汪雪雁¹, 檀华蓉², 薛秀恒¹, 祁克宗³

(1. 安徽农业大学 茶与食品科技学院, 安徽 合肥 230036; 2. 安徽农业大学 生物技术中心, 安徽 合肥 230036; 3. 安徽农业大学 动物科技学院, 安徽 合肥 230036)

摘要:以空白鸡肝为试材,以高效毛细管电泳法为检测手段,建立了高效毛细管电泳(HPCE)法检测鸡肝中3种喹诺酮类、2种磺胺类等合成抗菌剂残留的方法。结果表明:样品经二氯甲烷提取,正己烷脱脂,旋转蒸发浓缩后,在pH 8.48的40 mmol·L⁻¹磷酸氢二钠-20 mmol·L⁻¹柠檬酸缓冲体系中,紫外检测波长262 nm,检测电压22 kV,检测温度25℃的电泳条件下,3种氟喹诺酮类和2种磺胺类药物在10 min内能够完全分离。5种抗生素在鸡肝组织中的回收率为85.39%~90.23%,RSD为2.95%~3.41%,且各组分浓度与峰面积呈良好的线性关系。

关键词:高效毛细管电泳;氟喹诺酮类;磺胺类;鸡肝;残留

中图分类号:TS201.6

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2011)02-0107-04

氟喹诺酮类药物(Fluoroquinolones, FQs)是人工合成的含4-喹诺酮基本结构的抗菌药,它通过抑制细菌DNA的合成而达到抑菌作用^[1]。磺胺类药物(sulfonamides, SAs)是一类具有对氨基苯磺酰胺结构的化学治疗药物,通过影响细胞核蛋白质的合成,抑制细菌的繁殖^[2]。由于FQs和SAs能抑制大多数革兰氏阳性菌和阴性菌,性质稳定、价格低廉、使用方便,常以亚治疗浓度的药物作为饲料添加剂来预防疾病的发生,提高饲料的转化率,促进动物生长。但长期用药所产生的不良反应、在畜禽产品中的残留、耐药性的增加以及在环境中的生态效应等已引起广泛关注^[3-7],欧美和日本等国对养殖业用的FQs和SAs及其检测方法都进行了广泛的研究,制定了牛奶和肉类食品中FQs和SAs的最高允许量。

我国对动物性食品中药物残留研究较晚,随着近年来养殖业的发展和人民生活质量的提高,居民对动物性食品安全的意识也越来越重视,农业部235号公告中规定了部分药物在动物可食用组织中的最高残留限量^[8-10]。因此加强对这两类药物在动物性食品中的残留检测和监督非常必要。目前动物可食用组织中兽药残留的检测手段主要包括微生物法^[11]、高效液相色谱

法(HPLC)^[12]、酶联免疫法(ELISA)^[13-14]、高效毛细管电泳法(HPCE)^[15]、放射免疫法^[16]和荧光光度法^[17]等。由于兽药性质差别较大,现有的残留分析一般按照化学结构类似的同族药物来建立相应的检测方法,而这些分析方法多集中在对单类抗生素的同时检测上,而对多类抗生素同时检测的方法研究较少,不能满足目前兽药种类不断增加,分析通量不断提高的需求。因此多种类、多组分残留、低能耗的高效样品检测技术的研究将是残留分析的重点。

该试验以空白鸡肝为试验材料,围绕禽类产品中常见的氟喹诺酮类和磺胺类抗生素多残留的分析,以高效毛细管电泳法为检测手段,建立了HPCE法同时检测鸡肝中3种氟喹诺酮类和2种磺胺类药物残留分析方法。具有快速、低成本、低耗样、应用范围广等特点。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

BECKMAN P/ACETMMDQ 毛细管电泳仪、二极管阵列(PDA)检测器(美国BECKMAN公司);未涂层熔融石英毛细管,内径50 μm×60 cm,购自河北永年与锐沣色谱器件有限公司;组织匀浆机:AM-6(Nihonseiki Kaisha Ltd,日本);旋转蒸发仪:RE-52AA(上海亚荣生化有限公司);冷冻离心机:37520 Osterode am Harz(德国Osterode am Harz公司)。

诺氟沙星(NOR)99.4%,批号:Hyf070400;

收稿日期:2010-12-09

第一作者简介:汪雪雁(1970-),女,安徽省宣州市人,硕士,讲师,从事动物源性食品安全研究。E-mail:wxy700303@ahau.edu.cn。

恩诺沙星(NER)100.1%,批号:H070204;甲磺酸培氟沙星(PEF)99.9%,批号:H070304;磺胺间甲氧嘧啶(SMM);批号:Hyf070400;磺胺对甲氧嘧啶(SMD)99.4%,批号:Hyf070400;5种标准品均由中国兽医药品监察所提供。磷酸氢二钠、柠檬酸均为分析纯。试验用水均为超纯水。

1.2 溶液的制备

1.2.1 标准溶液的配制 准确称取5种标准品,用30 mmol·L⁻¹氢氧化钠溶解定容。分别配成1 mg·mL⁻¹标准储备液;储备液再用30 mmol·L⁻¹氢氧化钠依次稀释成浓度为75.000、50.000、25.000、12.500、6.250、3.125 μg·mL⁻¹的混合标准工作液,0.22 μm滤膜过滤,置4℃冰箱储存,待用。

1.2.2 缓冲溶液的配制 配40 mmol·L⁻¹磷酸氢二钠溶液和20 mmol·L⁻¹柠檬酸溶液,按一定比例混合,调节pH分别为7.82、8.15、8.48、8.90、9.27,过0.22 μm滤膜,待用。

1.2.3 样品处理溶液的配制 甲醇/乙酸(体积比为8:2)溶液的配制:取20 mL乙酸置于100 mL的容量瓶中,用甲醇稀释至刻度。0.22 μm滤膜过滤后上机测定

1.3 电泳条件

缓冲体系为40 mmol·L⁻¹磷酸氢二钠-20 mmol·L⁻¹柠檬酸缓冲液(pH 8.48),0.5 psi压力进样10 s,在电压22 kV、柱温25℃下分离,于262 nm波长处检测。为保证试验结果的重复性,2次进样间用0.1 mol·L⁻¹NaOH、超纯水和缓冲液分别冲洗毛细管10 min。

1.4 样品处理

准确称取1.000 0 g匀浆后的空白鸡肝组织样品,置于7 mL离心管中,加入3 mL二氯甲烷,漩涡振荡,12 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液50℃旋转蒸发,浓缩至干,用二氯甲烷溶解并定容10 mL,得样品提取液,0.22 μm滤膜过滤,备用。

将SPE C₁₈胶柱先用2 mL甲醇活化,再加入5 mL正己烷,待正己烷没入柱填料时,取1 mL上述样品提取液,以5 mL·min⁻¹的流速过柱,用

5 mL正己烷淋洗,弃淋洗液,再用6 mL甲醇/乙酸(体积比为8:2)进行洗脱,收集洗脱液,水浴蒸干,用30 mmol·L⁻¹氢氧化钠溶液0.5 mL溶解,过0.22 μm微孔滤膜,4℃保存备用。

1.5 定量方法的确立

1.5.1 线性关系的测定 将浓度梯度分别为3.125、6.250、12.500、25.000、50.000、75.000 μg·mL⁻¹的5种抗生素的混合标样,在选定色谱条件下,用外标峰面积法进行测定。每个浓度点重复测定6次,取平均值绘制色谱峰面积-浓度标准曲线。用峰面积(Y)对质量浓度(X,μg·mL⁻¹)作线性回归曲线。

1.5.2 回收率测定 按照1.4中鸡肝样品的前处理方法,得到样品溶液。不同浓度样品添加药物标准品溶液,计算回收率结果。每个浓度梯度的样品设置5次重复。

2 结果与分析

2.1 色谱分离

在优化的色谱分离条件下,3种氟喹诺酮类和2种磺胺类药物获得了良好的分离,NOR、NER、PEF、SMD、SMM,保留时间依次为6.526、7.178、7.568、9.278、9.525 min,各组分分离度高,色谱峰峰形良好(见图1)。

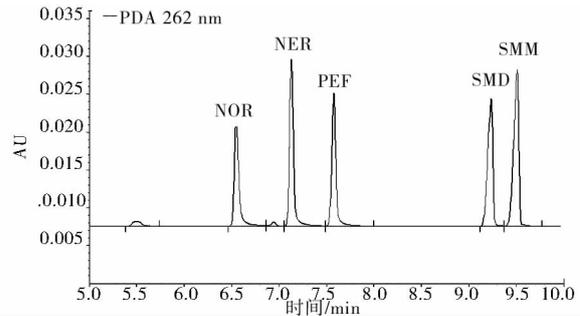


图1 标准混合溶液电泳图谱

2.2 线性关系的测定

6个浓度的5种抗生素的混合标样,在选定电泳条件下得到的回归方程和工作曲线的线性范围见表1。结果表明,这种分析方法所得线性关系较好,相关系数为0.996 9~0.998 5。

表1 线性方程和相关系数

组分名称	线性范围/μg·mL ⁻¹	回归方程	相关系数
NOR	3.125~75.000	y=928.48x + 1051.3	0.9969
NER	3.125~75.000	y=1293.6x + 537.67	0.9979
PEF	3.125~75.000	y=1082.5x + 444.3	0.9981
SMD	3.125~75.000	y=1276.2x - 1241.9	0.9979
SMM	3.125~75.000	y=1526.2x - 721.69	0.9985

2.3 重现性试验

在上述优化条件下,取上述 $25.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 混合标准溶液进行毛细管电泳测定,连续进样 6 次,考察各组分的迁移时间和校正峰面积的精密度。NOR 的迁移时间和峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为:0.06%和 4.22%,NER 为 0.07%和 3.25%,PEF 为 0.08%和 4.11%,SMD 为 0.10%和 4.29%,SMM 为 0.07%和 4.42%。结果显示,这种分析方法重现性良好,精密度优秀。

2.4 样品回收率的测定

按照 1.4 中鸡肝样品的前处理方法,得到样品溶液。不同浓度样品添加回收率结果见表 2。空白样品及添加后结果色谱图见图 2。结果表明,5 种抗生素在鸡肝组织中的回收率为 85.39%~90.32%,相对标准偏差(RSD)为 2.95%~3.41%,符合残留检测的要求。

表 2 药物在鸡肝中的添加回收率 $n=5$

药物	添加浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	平均回收率/%	相对标准偏差 RSD/%
NOR	6.250	87.44	3.23
	25.000		
	50.000		
NER	6.250	85.39	3.41
	25.000		
	50.000		
PEF	6.250	90.32	3.23
	25.000		
	50.000		
SMD	6.250	88.13	2.95
	25.000		
	50.000		
SMM	6.250	88.99	2.96
	25.000		
	50.000		

3 结论与讨论

通过应用高效毛细管电泳为检测手段,建立了 HPCE 法同时检测鸡肝中 3 种氟喹诺酮类和 2 种磺胺类药物残留分析方法。其平均回收率在 85.39%~90.32%,重复性试验的相对标准偏差(RSD)2.95%~3.41%,且 5 种药品在给定的条件下 10 min 内完全分离,标准曲线所呈现的线性关系较好,相关系数为 0.996 9~0.998 5。

该文所采用的缓冲体系是 pH 为 8.48 的 $40 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠- $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸缓冲体系。在试验过程中,也曾经试用了 pH 为

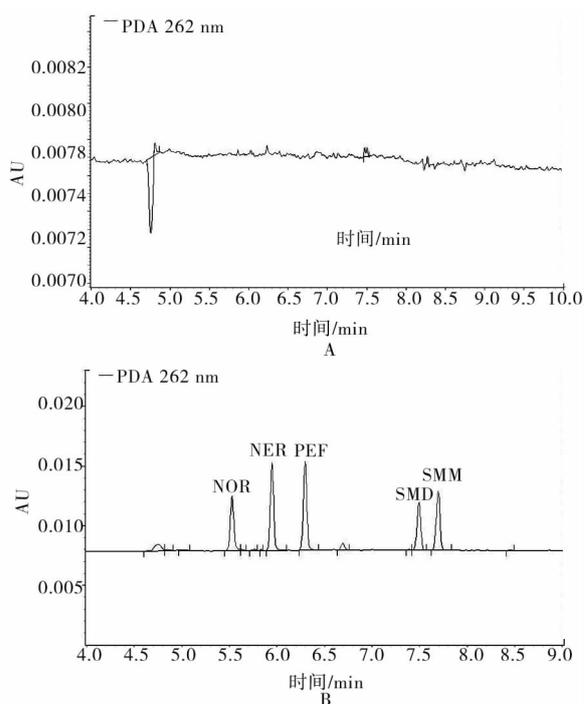


图 2 鸡肌肉组织样品空白及鸡肌肉组织添加抗生素的色谱

8.22 的缓冲溶液。结果证实,在 pH 为 8.22 的缓冲溶液中,其中 2 种药品的迁移时间明显后移,峰宽度增大,药品峰基本重合,无法分离。而且,根据资料得知,氟喹诺酮类和磺胺类药物易在碱性条件下充分溶解,适度的碱性 pH 会对样品中的氟喹诺酮类和磺胺类抗生素含量的正常检测起到促进作用。

试验所确立的毛细管电泳法很好地完成了诺氟沙星、恩诺沙星、甲磺酸培氟沙星 3 种氟喹诺酮类药物及磺胺对甲氧嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶 2 种磺胺类药物稳定的特征性分离,该方法操作简便,成本低,为同时快速检测氟喹诺酮类与磺胺类药物提供了一种更有效的分析手段。

参考文献:

- [1] Rodriguez E, Moreno-Bondi M C, Marazuela M D. Development and validation of a solid-phase extraction method coupled to liquid chromatography with fluorescence detection for the determination of fluoroquinolone residues from the Spanish and Latin American market[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1209:136-144.
- [2] Whittingham D J. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C [J]. Science, 1972, 178:411-414.
- [3] Zong H M, Ma D Y, Wang J Y, et al. Research on florfenicol residue in coastal area of dalian(Northern China) and Analysis of functional diversity of the microbial community in marine sediment[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2010, 84: 245-249.

- [4] Hamscher J G, Hartung. Veterinary antibiotics in dust, sources, environmental concentrations, and possible health Hazards[J]. *Pharmaceuticals in the Environment*, 2008, 2: 95-102.
- [5] Boxall A B A, Fogg L A, Blackwell P A, et al. Veterinary medicines in the environment[J]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2004, 180: 1-91.
- [6] Hwang Y H, Kim M S, Song I B, et al. Altered pharmacokinetics of enrofloxacin in experimental models of hepatic and renal impairment[J]. *Vet Res Commun*, 2009, 33: 481-487.
- [7] Lim S, Hossain M A, Park J, et al. The effects of enrofloxacin on canine tendon cells and chondrocytes proliferation in vitro[J]. *Vet Res Commun*, 2008, 32: 243-253.
- [8] 葛志荣. 主要贸易国家和地区食品中农兽药残留限量标准(农兽药卷下册)[M]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [9] 葛志荣. 日本列表制度. 食品中农业化学品残留限量(药品卷)[M]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [10] 中华人民共和国农业部公告第 235 号[EB/OL]. [2008-07-28]. <http://docin.com/p-44704444.html>.
- [11] 陈曦, 朱良强, 祁克宗. 微生物法检测动物源性食品中抗生素残留的研究进展[J]. *中国动物检疫*, 2008, 5(9): 53-55.
- [12] 李德良. 高效液相色谱法测定鸡肉中几种兽药残留量[J]. *理化检验: 化学分册*, 2007, 43(10): 838-840.
- [13] 姜佩, 陈宇鹏, 金燕飞, 等. 应用酶联免疫法快速检测乳品中β-内酰胺类抗生素残留[J]. *中国乳品工业*, 2010(1): 51-54.
- [14] 赵卫东, 郑文杰, 贺艳, 等. 酶联免疫法检测动物源性产品中阿维菌素残留[J]. *食品研究与开发*, 2009, 30(4): 127-130.
- [15] 饶钦雄, 童敬, 郭平, 等. 高效毛细管电泳法测定牛奶和奶粉中残留的三聚氰胺[J]. *色谱*, 2008, 26(6): 755-758.
- [16] 林杰, 黄晓蓉, 郑晶, 等. 放射免疫法快速检测猪尿样中的磺胺类药物残留[J]. *食品科学*, 2006, 27(10): 468-470.
- [17] 任乃林, 郭祥群. 荧光光度法测定鱼肉中的氧氟沙星残留[J]. *食品科学*, 2007, 28(8): 386-389.

Simultaneous Determination of Residual Fluoroquinolones and Sulfonamides in Chicken Liver by High Performance Capillary Electrophoresis

WANG Xue-yan¹, TAN Hua-rong², XUE Xiu-heng¹, QI Ke-zong³

(1. Tea and Food of Science and Technology College of Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036; 2. Biotechnology Center of Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036; 3. Animal Science College of Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036)

Abstract: A procedure is developed for the simultaneous determination of fluoroquinolones (FQs) and sulfonamides (SAs). The antibiotics in the samples were extracted by dichloromethane, and defatted with hexane, concentrated by rotary evaporation, then determined by HPCE at 22 kV of separation voltage and 262 nm detection wave length, and column temperature 25°C, in 40 mmol·L⁻¹ Na₂ HPO₄-20 mmol·L⁻¹ citric acid running buffer (pH 8.47), the five remedies could be well separated within 10 min. Each had a good linear relationship. The average recoveries from laboratory spiking experiments were 85.39%~90.23%, the relative standard deviations (RSD) were in the range of 2.95%~3.41%.

Key words: high performance capillary electrophoresis; fluoroquinolones; sulfonamides; chicken liver; residue

寒冷天养猪四怕

一怕冷: 当猪舍温度低于适宜温度的下限时, 每降低 1°C, 其日增重可减少 17.8 g; 如果舍温继续下降至 4°C 以下时, 其增重速度锐减 50%, 增加饲料消耗量 1 倍以上。

二怕潮: 当舍内环境温度较低时, 相对湿度大, 会使猪增加寒冷感。这种低温高湿的环境, 会严重影响猪的生产性能, 特别对幼猪危害更大。

三怕凉: 若水温、料温是 0°C 时, 要把这些水、料温度升高到体温 39°C 的水平, 猪体就要消耗 682~878 kcal 的热能, 也就等于每天需要 0.5~0.75 kg 的精料白白地消耗在维持体温上。冬季妊娠母猪喂冰凉水料, 还易造成流产等不良后果。

四怕风: 猪在严冬最怕“穿堂风”和“贼风”, 因为这两种风吹入猪舍, 不仅会降低舍温, 更易引起猪感冒、中风、风湿等疾病。