

# 优化超高效液相色谱法对鸡蛋中氟喹诺酮类药物残留的检测

李 宁, 林小莉, 董艳峰

(哈尔滨市兽药饲料监察所, 黑龙江 哈尔滨 150010)

**摘要:**为制定畜产品中沙星类药物残留高效实用的检测标准, 建立一种测定鸡蛋中 4 种氟喹诺酮类药物(环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、达氟沙星)残留的超高效液相色谱检测方法。结果表明: 4 种氟喹诺酮类药物峰面积与质量浓度呈良好的线性关系,  $R^2$  均大于 0.999 8。环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星的线性范围为 0~500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 达氟沙星的线性范围为 0~100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。鸡蛋样品中氟喹诺酮类药物的回收率为 78.9%~95.3%, 相对标准偏差为 5.5%~8.7%, 检出限为 10  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

**关键词:**环丙沙星; 恩诺沙星; 达氟沙星; 沙拉沙星; 超高效液相色谱; 鸡蛋

**中图分类号:**S859.84

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2014)03-0107-03

氟喹诺酮类药物主要用来预防和治疗动物疾病, 作为一种临床上比较常用的抗菌类药物, 少量使用可以对动物具有一定的生长促进作用, 但因该药物副作用比较明显, 如对人体中枢神经系统及心血管系统造成不良反应, 所以如果使用时超过标准规定剂量会导致畜产品中药物残留, 从而导致过敏或其它不良反应<sup>[1]</sup>。目前, 检测氟喹诺酮类药物的常规方法主要有固相萃取-高效液相色谱法、酶联免疫法、薄层色谱法和荧光法等<sup>[2]</sup>。该文借鉴农业部现行有效标准高效液相色谱法(HPLC)检测的前处理方法及检测过程, 建立了使用超高效液相色谱分析鸡蛋样品中 4 种沙星类药物残留量的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试仪器有 ACQUITY UPLC™ 超高效液相色谱仪, 配有二元高压梯度泵、自动进样器、荧光检测器; 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ), C18 固相萃取柱(100 mg·mL<sup>-1</sup>), 购自 Varian 公司; 涡流振荡器, 购自德国 IKAMS 公司; 离心机(安亭 TGL-16G); Milli-Q Gradient 超纯水净化器。

供试试剂有环丙沙星、恩诺沙星、达氟沙星及沙拉沙星标准品, 乙腈(色谱纯), 购自美国 Fisher 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 样品处理** 取 2 g 鸡蛋, 搅匀后加磷酸盐提取液 2.0 mL, 振荡混合 10 min, 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 将上清液转入另一离心管中, 以上步骤重复 1 次。合并 2 次上层清液于同一离心管中, 加入 10 mL 正己烷, 振荡 5 min, 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 弃上清, 再加入 10 mL 正己烷, 振荡, 离心。弃上清, 下层为备用液。

C18 固相萃取柱依次用 5 mL 乙腈, 5 mL 磷酸盐提取液和 5 mL 乙腈(30%)-缓冲液润洗。备用液全部通过萃取柱, 用 5 mL 水洗, 用真空泵抽至近干, 加 1 mL 流动相洗脱, 真空泵抽干, 收集洗脱液至试管中, 将洗脱液过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后, 进行分析。

**1.2.2 液相色谱分离条件** 流动相: 0.05 mol 磷酸溶液/三乙胺-乙腈(80+20); 激发波长 280 nm, 发射波长 450 nm; 流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量 5  $\mu\text{L}$ 。

**1.2.3 配制标准溶液** 准确称取 4 种沙星类药物标准品, 0.03 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液溶解并定容。用乙腈将环丙沙星、恩诺沙星和沙拉沙星分别稀释成 5、10、50、100 和 500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  5 个浓度, 达氟沙星稀释浓度为 1、2、10、20 和 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。液相色谱测定以各组分的色谱峰面积对浓度做线性回归, 绘制定量标准曲线。

**1.2.4 重复性及加标回收实验** 称取约 2 g 匀

收稿日期: 2013-11-07

第一作者简介: 李宁(1979-), 女, 黑龙江省哈尔滨市人, 硕士, 兽医师, 从事畜产品药物残留检测研究。E-mail: lining-catherine@163.com。

通讯作者: 林小莉(1966-), 女, 学士, 高级工程师, 从事兽药残留检测研究。

浆后的鸡蛋样品,分别加入一定量的4种混标溶液,然后与样品进行相同方法处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 液相色谱分离条件的优化

由于使用超高效液相色谱仪进行检测时,保留时间较短,几种沙星类药物分离度不理想,为改善峰形,将流动相的pH调至2.4,同时在流动相中加入三乙胺,从而消除硅羟基的影响,抑制解离。以不同比例的 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸溶液/三乙胺-乙腈为流动相进行试验,通过比较可以看出, $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸溶液/三乙胺-乙腈(80+20)可获得较高的仪器响应信号,得到较高的灵敏度和分辨率。

由于超高效液相色谱法系统在高压下低扩散输送流动相的特殊能力,结合亚 $2\text{ }\mu\text{m}$ 杂化颗粒色谱柱,充分发挥这种小颗粒化学组分在色谱分析方面的优点,能得到更尖、更集中的色谱峰,不损失分离度的高速度优点;超高效液相色谱法增加了通量,减少了溶剂使用量<sup>[3]</sup>。结果表明,在此色谱条件下4 min内4种沙星类药物的峰达到较好基线分离,出峰时间合适,峰形较好。图1为4种沙星的标准溶液(环丙沙星、恩诺沙星和沙拉沙星的浓度为 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,达氟沙星的浓度为 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )的色谱分离图。由此可知,保留时间分别为环丙沙星1.064 min、达氟沙星1.372 min、恩诺沙星1.456 min、沙拉沙星2.267 min。

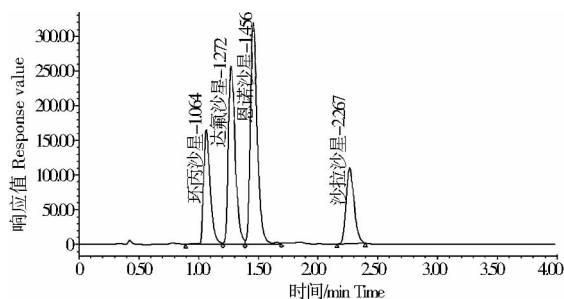


图1 4种沙星类药物标准色谱  
Fig. 1 Chromatogram of standard solution of the four fluoroquinolones

### 2.2 样品提取及净化条件的优化

由于鸡蛋中含有大量的脂类、氨基酸及蛋白质等干扰物,样品的提取液呈现浑浊状态,所以上样前必须对提取液进行预处理,用正己烷和二氯甲烷两种有机溶剂分别对提取液进行萃取。结果证明,用正己烷基本能去除提取液中的脂类成分,满足下一步固相萃取净化的要求,萃取效果优于

二氯甲烷<sup>[4]</sup>。

在对提取液进行净化处理过程中,采用C18和C8固相萃取柱分别进行萃取,两种固相萃取小柱都为反相萃取,适合于非极性到中等极性的化合物<sup>[5]</sup>。结果表明,使用C18固相萃取柱进行净化,净化效果优于C8固相萃取柱。使用C18固相萃取柱进行样品净化,首先用5 mL乙腈活化柱子,再依次选用5 mL乙腈(30%)-缓冲液和5 mL磷酸盐提取液进行活化。分别用5 mL乙腈(30%)-缓冲液和5 mL磷酸盐提取液作为淋洗液,用1 mL流动相作为洗脱液。图2为鸡蛋空白样品色谱图,图3为加标样品(环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星加标量为 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,达氟沙星 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )的液相色谱图。从图2和图3可知,通过上述净化过程对鸡蛋样品进行处理后,影响4种沙星类药物含量的干扰成分基本被除去。

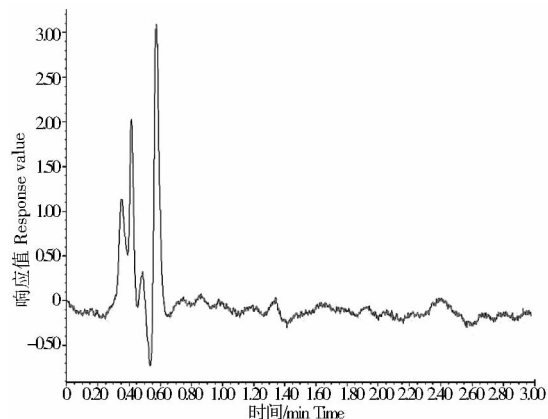


图2 四种沙星类药物空白色谱  
Fig. 2 Blank chromatogram of egg fortified with four fluoroquinolones

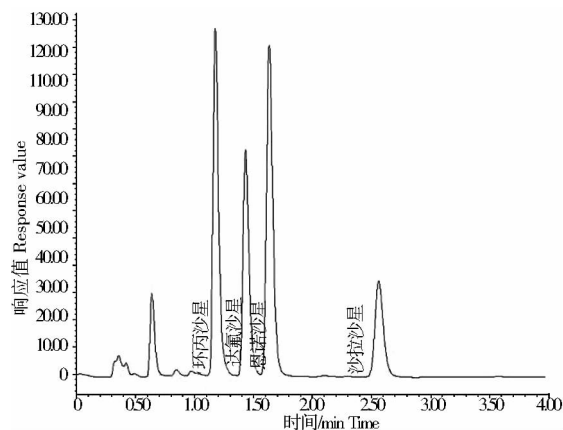


图3 四种沙星类药物回收色谱  
Fig. 3 Chromatogram of reocycle egg fortified with four fluoroquinolones

2.3 验证试验

2.3.1 线性范围 4 种药物的标准曲线见图 4 及图 5。标准曲线的线性方程及  $R^2$  见表 1。在浓度  $0\sim 500\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  范围内,4 种氟喹诺酮类药物的峰面积与质量浓度呈良好的线性关系。

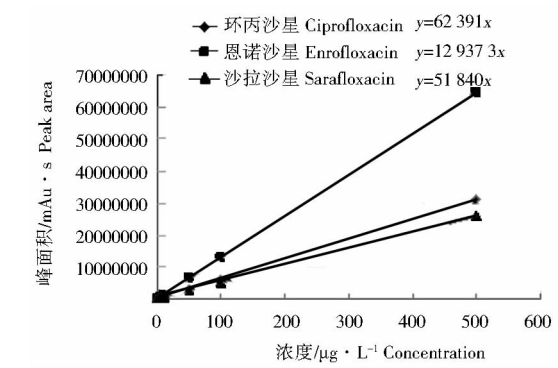


图 4 环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星标准曲线  
Fig. 4 The standard curve of Ciprofloxacin, Enrofloxacin and Sarafloxacin

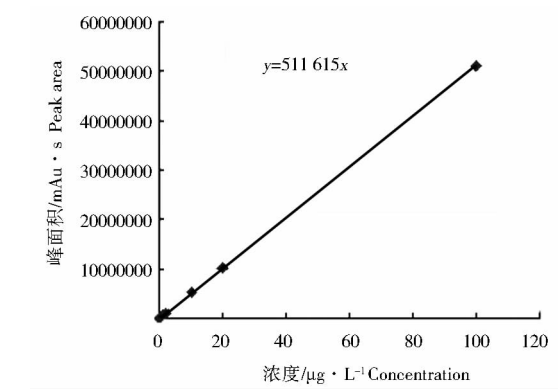


图 5 达氟沙星标准曲线  
Fig. 5 The standard curve of Danofloxacin

表 1 标准曲线的线性方程和回归系数  
Table 1 The linear equation and regression coefficient

| 样品<br>Samples      | 线性方程<br>Linear equation | $R^2$  |
|--------------------|-------------------------|--------|
| 环丙沙星 Ciprofloxacin | $y=62391x$              | 0.9998 |
| 恩诺沙星 Enrofloxacin  | $y=129373x$             | 0.9999 |
| 达氟沙星 Danofloxacin  | $y=511615x$             | 0.9999 |
| 沙拉沙星 Sarafloxacin  | $y=51840x$              | 0.9998 |

2.3.2 回收率、精密度和检测限 在 2 g 空白样品中添加不同浓度的混合标准溶液(环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星分别为  $5、10、50\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,达氟沙星添加水平为  $1、2、10\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),按照建立的方法进行处理和测定,由表 2 可知,平均回收率为  $78.9\%\sim 95.3\%$ ,相对标准偏差为  $5.5\%\sim 8.7\%$ ,( $n=5$ )。鸡蛋中环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星和达氟沙星的检出限为  $10\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

表 2 不同加标浓度氟喹诺酮药物  
在鸡蛋样品中的回收率

Table 2 The recoveries of four fluoroquinolones in eggs fortified with different concentrations

| 样品<br>Samples         | 加标浓度/<br>$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$<br>Concentration<br>fortification | 平均回收<br>率/%<br>Average<br>recovery | 相对标<br>准偏差/<br>%<br>RSD |
|-----------------------|---|------------------------------------|-------------------------|
| 环丙沙星<br>Ciprofloxacin | 5   | 86.5                               | 5.5                     |
|                       | 10  | 78.9                               | 7.8                     |
|                       | 15  | 90.6                               | 6.5                     |
| 恩诺沙星<br>Enrofloxacin  | 5   | 89.5                               | 7.6                     |
|                       | 10  | 80.5                               | 8.3                     |
|                       | 15  | 95.3                               | 8.7                     |
| 达氟沙星<br>Danofloxacin  | 1   | 87.2                               | 8.2                     |
|                       | 2   | 79.3                               | 7.6                     |
|                       | 3   | 91.6                               | 7.0                     |
| 沙拉沙星<br>Sarafloxacin  | 5   | 88.1                               | 8.4                     |
|                       | 10  | 81.2                               | 6.4                     |
|                       | 15  | 89.3                               | 7.5                     |

3 结论

该试验建立了一种同时测定鸡蛋中 4 种沙星类药物残留的超高效液相色谱检测法(UPLC)。将鸡蛋样品用磷酸盐提取液提取后振荡、离心,上清液经正己烷提取。依次用乙腈,磷酸盐提取液和乙腈(30%)-缓冲液润洗 C18 固相萃取柱,将提取后的溶液全部通过萃取柱,水洗,抽干后加 1 mL 流动相洗脱,抽干,收集洗脱液过  $0.22\ \mu\text{m}$  滤膜后,在超高效液相色谱仪中进行含量分析。试验结果表明,4 种氟喹诺酮类药物峰面积与质量浓度呈良好的线性关系, $R^2$  均大于 0.999 8。鸡蛋样品中氟喹诺酮类药物的回收率为  $78.9\%\sim 95.3\%$ ,相对标准偏差为  $5.5\%\sim 8.7\%$ ,检出限为  $10\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,与普通液相色谱法相比,超高效液相方法分离时间短,分离度高,重现性好,能满足实验室对于沙星类药物残留分析的要求,适用于大批量检测鸡蛋中氟喹诺酮类药物。