

环境友好的 HPLC 方法检测鸡蛋中 6 种氟喹诺酮类药物残留

程勇翔¹ 夏曦¹ 张鹏春¹ 赵坤霞¹ 李晓薇¹ 丁双阳^{1*}

(中国农业大学 动物医学院,北京 100193)

摘要 为减少有机试剂使用,减轻环境污染,提高检测效率,建立了可同时检测鸡蛋中氧氟沙星(Ofloxacin, OFL)、培氟沙星(Pefloxacin, PEF)、环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)、达氟沙星(Danofloxacin, DAN)、恩诺沙星(Enrofloxacin, ENR)和沙拉沙星(Sarafloxacin, SAR)6种氟喹诺酮类药物残留的环境友好型高效液相色谱荧光检测方法。鸡蛋样品用纯水提取,氯化钠盐析,加热冷冻净化,正己烷脱脂,采用0.5%甲酸水-乙腈体系作为流动相,荧光激发波长280 nm,发射波长450 nm检测。结果显示:OFL的线性范围为8~1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$,DAN为0.4~50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,其余4种均为2~250 $\mu\text{g}/\text{kg}$,相关系数大于0.99。OFL检测限为4 $\mu\text{g}/\text{kg}$,DAN为0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$,其余4种均为1 $\mu\text{g}/\text{kg}$;OFL定量限为20 $\mu\text{g}/\text{kg}$,DAN为1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,其余4种均为5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。6种药物添加平均回收率为80.52%~101.10%;相对标准偏差为2.99%~10.40%。

关键词 氟喹诺酮类药物;高效液相;鸡蛋;药物残留;环境友好

中图分类号 S859.84

文章编号 1007-4333(2017)04-0109-11

文献标志码 A

Development of environment-friendly HPLC method for simultaneous determination of six fluoroquinolones in eggs

CHENG Yongxiang¹, XIA Xi¹, ZHANG Pengchun¹, ZHAO Kunxia¹, LI Xiaowei¹, DING Shuangyang^{1*}

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100093, China)

Abstract In order to reduce the use of organic reagents, decrease the pollution of environment and increase the efficiency of detection, an analytical method for simultaneous determination of six fluoroquinolones (FQs, including ofloxacin, pefloxacin, ciprofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin and sarafloxacin) residues in eggs based on high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC/FLD) was established. Samples were extracted by water and added NaCl to salt out. The extracts were heated and frozen, degreased by n-hexane. Six FQs were separated by C_{18} column with 0.5% methanoic acid/acetonitrile as the mobile phase and detected with fluorescence detection. The fluorometric excitation wavelength was 280 nm, and emission wavelength was 450 nm. The tested ranges of quinolone calibrations were 0–1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for ofloxacin, 0–50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for danofloxacin, 0–250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for the other four FQs with the correlation coefficients greater than 0.99. The limits of detection (LODs) were ofloxacin 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, danofloxacin 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the other four FQs 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. And the limits of quantification (LOQs) were ofloxacin 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, danofloxacin 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the other four FQs 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The average percentage recoveries were ranged from 80.52% to 101.10% for six FQs in eggs samples, coefficients of variability (CV) were ranged from 2.99%–10.40%.

Keywords fluoroquinolones; high performance liquid chromatography; egg; residue; environment-friendly

我国自1985年来鸡蛋产量一直位居世界第一,占世界鸡蛋总产量的比重约为40%^[1]。但由于有兽药残留等问题存在,所以在国际出口贸易上常受

到阻碍。氟喹诺酮类(Fluoroquinolones, FQs)药物是第三代喹诺酮类药物,其通过抑制DNA旋转酶的活性,阻碍DNA的正常复制,从而杀死细菌^[2]。

收稿日期:2016-04-20

基金项目:农业部公益性行业(农业)科研专项经费项目(201203069-2)

第一作者:程勇翔,硕士研究生,E-mail:yxcheng1991@126.com

通讯作者:丁双阳,研究员,主要从事兽医残留分析研究,E-mail:dingsy@cau.edu.cn

由于 FQs 对人体有潜在不良反应^[3],且食品中残留较低浓度的 FQs 还易诱导人类致病菌产生耐药性,其残留问题正逐渐引起人们的关注。因此,研究 FQs 在鸡蛋中的残留检测方法,对保障人体健康和贸易出口具有重大意义。如今不同国家和地区均规定 FQs 在产蛋鸡中的残留限量(MRL),其中欧盟禁止在产蛋鸡中使用环丙沙星(CIP)、达氟沙星(DAN)、恩诺沙星(ENR)和沙拉沙星(SAR)^[4];美国禁止家禽使用 ENR^[5];我国农业部 235 号公告规定在产蛋鸡中禁用 ENR、CIP^[6],近期发布的 2292 号公告规定在食品动物中停止使用包括培氟沙星(PEF)、氧氟沙星(OFL)在内的 4 种兽药,撤销相关兽药产品批准文号^[7]。

由于鸡蛋属于脂质性物质,目前的前处理技术主要采用缓冲盐或有机溶液提取-固相萃取净化技术^[8-9]。其步骤繁琐,样品处理时间较长,缓冲盐易损坏色谱柱。有机试剂的使用也对环境造成污染,使得空气中化学性污染物增多,水源、土壤积累有害物质,更直接对操作者的身体造成伤害^[10]。因此,改进前处理方法,减少化学试剂的使用,使之成为环境友好样品前处理技术是本研究的重点。

FQs 的检测方法有薄层色谱法(TLC)、毛细管电泳测定法(CE)、高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱串联质谱法(LC/MS)和 ELISA 等^[11-12]。HPLC 因其测量准确,已成为检测 FQs 残留的一种主要分析方法。但由于分离柱常使用硅胶基反相键合相(如 C₈、C₁₈),其固定相表面存在游离的硅醇基可通过氢键和离子交换作用吸附 FQs 中解离的羧基及叔胺基,导致色谱峰拖尾、保留值过长、分离度下降等情况出现^[13]。目前在改进液相色谱方法,使其在减少污染的情况下提高检测效率的研究报道较少。

本研究通过优化鸡蛋前处理及液相色谱方法,建立了一种能够同时检测 OFL、PEF、CIP、DAN、ENR 和 SAR 6 种 FQs 多残留的高效液相色谱法,旨在提供一种简单、成本低、绿色环保,且准确度和精密度均满足相关指南要求,非常适合大批量样品的处理和检测的操作方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)由 2695 分离系统、2475 荧光检测器组成;5810R 离心机(德国 Eppendorf 公司);水浴锅(上海一恒科技有限公

司);多管涡旋振荡器(北京踏锦科技有限公司)超低温冰箱(美国 Thermo 公司);天平(感量 0.01 g,北京赛多利斯仪器系统有限公司);Milli-Q 超纯水(美国 Millipore 公司)。

6 种氟喹诺酮类(FQs)药物:恩诺沙星(纯度:100%)、盐酸环丙沙星(纯度:100%)、培氟沙星(纯度:99.9%)、达氟沙星(纯度:≥99.0%)、沙拉沙星(纯度:99.6%)对照品(中国兽医药品监察所),氧氟沙星(纯度:≥99.0%)对照品(美国 Sigma 公司)。甲酸、氯化钠、氢氧化钠(分析纯,均为国药集团化学试剂有限公司),正己烷、甲醇、乙腈(色谱纯,均为美国 Fisher 公司)。

1.2 试剂配制

标准储备液:精密称取适量的 FQs 对照品,用 0.03 mol/L 氢氧化钠溶液配制成质量浓度为 1 000 mg/L 的储备液,置于棕色瓶中,−20 °C 保存。

标准工作液:准确量取适量的 FQs 标准储备液,用流动相稀释成适宜浓度的 FQs 标准工作液,−20 °C 保存。

0.5%甲酸水溶液:准确吸取 5 mL 甲酸至 1 L 容量瓶中,加水定容至 1 L。

1.3 样品的制备

鸡蛋打碎去皮后,搅匀,−20 °C 冷冻保存备用。

1.4 样品前处理

准确称取样品 2 g(精确到 0.05 g),置 50 mL 离心管中,加纯水提取液 20 mL,再加入氯化钠 1.5 g 盐析,涡动 3 min。离心管置水浴锅中加热 90 °C 1 h,迅速放置 −80 °C 低温冰箱中冷却 30 min。超声解冻,10 000 r/min 离心 15 min,取上清液 2 mL,加入正己烷 5 mL,手摇 20 次脱脂,10 000 r/min 离心 10 min,用吸管将上层正己烷及絮凝状固体弃去。重复脱脂 1 次,14 000 r/min 离心 15 min,取 1 mL 上清液,加入 5 μL 甲酸,旋涡混匀后经 0.22 μm 尼龙滤膜过滤后,供高效液相色谱仪测定。

1.5 色谱条件

色谱柱:XBridge Shield RP₁₈ 4.6 mm × 250 mm,5 μm(美国 Waters 公司);流动相为 0.5%甲酸水溶液-乙腈(体积比为 90:10);流速 0.8 mL/min;进样量 20 μL;柱温 30 °C;检测波长:激发波长 280 nm;发射波长 450 nm。

1.6 标准曲线绘制

取混合标准储备液,用流动相逐级稀释为 250、

100、50、10、5和2 $\mu\text{g/L}$ 6个质量浓度(OFL为1 000、400、200、40、20和8 $\mu\text{g/L}$, DAN为50.0、20.0、10.0、2.0、1.0和0.4 $\mu\text{g/L}$),取1 mL按照上述色谱条件进样,以各药物峰面积 Y 对药物质量浓度 X ($\mu\text{g/L}$)进行线性回归分析。

1.7 检测限及定量限的确定

取20份空白鸡蛋,按1.4方法进行前处理、1.5色谱条件进行分析,将信噪比 $S/N \geq 3$ 对应的添加浓度作为检测限(LOD),将信噪比 $S/N \geq 10$ 对应的添加浓度作为定量限(LOQ)。

1.8 准确度及精密度的确定

取空白鸡蛋,添加适宜质量浓度的标准溶液,按1.4方法进行前处理、1.5色谱条件进样,每个批次设3个质量浓度,每个质量浓度处理6个平行样品,计算回收率和日内变异系数。将准确度与精密度的测定试验重复3次,计算样品的平均回收率和日间变异系数。

2 结果与分析

2.1 样品前处理条件的优化

2.1.1 提取液的选择

FQs可溶于极性溶剂与有机溶剂,不溶于非极性溶剂。目前常用的提取液主要有磷酸缓冲溶液、EDTA缓冲溶液、酸化乙腈等^[8,14-18]。酸化乙腈即在乙腈中加入一定比例的三氯乙酸、醋酸等,其具有良好的组织渗透性、除蛋白质和释放药物作用,在提取中常用^[19]。但乙腈属于有机试剂,对环境污染较大,提取需耗费较多溶剂,因此不选择;采用磷酸盐缓冲液提取是国家标准方法^[20],杨娜娜等^[8]建立了鸡蛋中诺氟沙星、环丙沙星、洛美沙星和恩诺沙星残留量测定的高效液相色谱法,样品即通过磷酸盐缓冲液提取,检出限为10 ng/g,定量限为50 ng/g;但磷酸盐缓冲液配制耗时,且作为流动相上机检测时缓冲盐与乙腈、甲醇混合时易产生结晶^[19],容易导致柱压升高,柱效下降,故在提取液和流动相上均不选择。Bogialli等^[21]在前处理中利用固相机制分散技术,样品通过加热、纯水提取,其回收率与精密度均符合标准,但在其他提取方法中并未见使用纯水。

本研究比较了三氯乙酸、甲酸、乙酸、磷酸盐、EDTA-McIlvaine缓冲溶液和纯水的提取效果。结果表明,2%甲酸、2%乙酸和0.1 mol/L EDTA-McIlvaine缓冲溶液提取后带有较多脂肪,无法通过滤膜;1%乙酸与1%甲酸提取后可过膜,但回收率

较低;三氯乙酸沉淀蛋白与脂肪的效果较好,但上机检测时峰型较差,且其对分析者呼吸道有刺激作用,同时对环境污染较大;本研究采用纯水提取,经盐析后再加热、冷冻,提取液清澈,基质干扰较少,回收率也较高,且提取液对环境无任何污染,对操作人员也不会造成健康损害。同时采用该方法进行前处理无需使用固相萃取柱净化,减少了试验步骤,可节省时间和成本。

2.1.2 不同类型盐的影响

提取时加入某些无机盐后,可降低蛋白质的溶解度,使其凝聚而从溶液中析出,提高提取效率^[22]。FQs与金属离子易络合成难溶性螯合物,EDTA作为金属螯合剂,可螯合金属离子,减少药物与金属离子络合的发生,有利于药物的提取^[23]。本研究比较了不加盐以及添加2、4和6 g无水硫酸钠、氯化钠以及EDTA二钠的效果,发现不加任何盐时,提取液浑浊,不符合上机标准;澄清程度随氯化钠添加含量增大而提高,但过多的氯化钠会导致絮状物增多,当加至6 g时蛋白沉淀会浮起,推测是过多盐使浮力增大。无水硫酸钠与EDTA二钠溶解度不如氯化钠,且对环境存在污染。因此选择添加氯化钠;进一步选择氯化钠添加量(0.5、1.0、1.5和2.0 g),综合盐析效果与回收率,最终选择添加1.5 g氯化钠。

2.1.3 加热、冷冻温度及时间影响

乔立文等^[24]和熊捷等^[25]曾报道,加热或冷冻可使鸡蛋蛋白发生不同程度的变性。加热会破坏蛋白空间结构,产生和暴露了更多的疏水性区域,表面游离巯基含量也随之增加,导致蛋白的变性;冷冻破坏了蛋黄低密度脂蛋白的水化层结构,变性形成凝胶。本研究分别考察了加热、冷冻以及加热后冷冻这3种情况下的蛋白变性情况,发现加热和冷冻步骤二者均不可缺,只单独进行一项提取液仍十分混浊。对比加热温度(50、60、70、80和90 $^{\circ}\text{C}$)和冷冻温度(-20和-80 $^{\circ}\text{C}$),发现提取液澄清程度随着加热温度上升及冷冻温度下降而提高。对药物的稳定性试验表明在90 $^{\circ}\text{C}$ 下药物无明显分解情况,超过90 $^{\circ}\text{C}$ 则易造成提取液的挥发损失^[10]。最后确定加热温度为90 $^{\circ}\text{C}$,冷冻温度为-80 $^{\circ}\text{C}$ 。对比加热时间(0.25、0.50、1.00、1.50、2.00和4.00 h)和冷冻时间(0.25、0.50、1.00、2.00和4.00 h),发现澄清程度随着加热时间增加而提高,但在1 h后差异不显著,且回收率基本相同;冷冻时间超过0.5 h后也无明显差别,故为了节约时间,本研究最终选择水浴

90 ℃ 1 h 后, -80 ℃ 冷冻 0.5 h。

2.2 色谱条件的选择和优化

2.2.1 色谱柱的选择

色谱柱的类型决定色谱性质, 粒径、长度、含碳量等影响分析时间和分析效率^[26]。FQs 的 HPLC 方法常使用 C₁₈ 柱, 但不同产家、不同型号的 C₁₈ 柱因为键合方式、粒径、长度等方面的不同, 在分离度、保留时间上可能出现较大差异。表征色谱柱的方法有非色谱法和色谱法, 非色谱法包括含碳量、粒径、孔径等参数, 色谱法测定的参数则主要包括疏水性、空间选择性和硅醇基活性等^[27]。

本研究选择 5 种 C₁₈ 柱进行对比, 分别为 Xbridge Shield RP₁₈ (美国 Waters 公司)、Luna C18 (2) (美国 Phenomenex 公司)、Inertsil ODS-3 (日本 GL Sciences 公司)、ZORBAX Bonus-RP (美国 Agilent 公司) 和 ZORBAX Eclipse Plus C18 (美国

Agilent 公司)。其表征参数如表 1 所示。对比可发现, 不同色谱柱基质不同, XBridge 柱基质为杂化颗粒, 可改善峰型, ZORBAX Bonus-RP 柱嵌入极性酰胺基团, 有独特的选择性。而其余三者基质则属于中性硅胶; 根据 USP (美国药典) 网站 (<http://apps.usp.org/app/USPNF/columnsDB.html>) 提供的参数和分类, 可发现 Luna C18 (2), Inertsil ODS-3 和 ZORBAX Eclipse Plus C18 属于 B 型色谱柱 (即新型色谱柱), 而 XBridge Shield RP₁₈ 和 ZORBAX Bonus-RP 属于 EP 型色谱柱 (即内嵌极性基团或极性基团封尾的色谱柱), 在低 pH 条件下, EP 型色谱柱的 H、A、C 值较低, B 值较高, 优先保留羧酸类化合物^[28]。5 种色谱柱中 ZORBAX Eclipse Plus C18 柱和 ZORBAX Bonus-RP 含碳量都较低, XBridge Shield RP₁₈ 柱, ZORBAX Eclipse Plus C18 柱和 ZORBAX Bonus-RP 表面积较小, 而这些均会缩短

表 1 不同色谱柱的表征

Table 1 Characterization of different chromatographic columns

色谱柱 Column	表征 Characterization									
	非色谱法 Non-chromatographic method				色谱法 Chromatographic method					
	基质 Particle substrate	含碳 量/% Carbon load	孔径/A Pore size	表面积/ (m ² /g) Surface area	H	S	A	B	C(2.8)	C(7.0)
Waters XBridge shield RP ₁₈	基于亚乙基 桥杂化颗粒	17.0	130	185	0.835	-0.026	-0.372	0.095	-0.122	-0.051
Luna C18(2)	多孔硅	17.5	100	400	1.002	0.024	-0.124	-0.007	-0.269	-0.174
Inertsil ODS-3	十八烷基键 合超纯硅胶	15.0	100	450	0.990	0.022	-0.146	-0.023	-0.474	-0.334
ZORBAX Bonus-RP	长烷基链中 嵌入极性酰 胺基团	9.5	80	180	0.654	0.107	-1.046	0.373	-2.971	-1.103
ZORBAX eclipse plus C18	十八烷基键 合 Eclipse Plus 硅胶	9.0	95	160	1.030	0.007	-0.072	-0.02	-0.004	0.020

注: H 为疏水性; S 为立体选择性; A 为溶质受体与非离子化硅烷醇的氢键作用; B 为溶质供体与固定相中某受体的氢键作用; C(2.8) 为 pH2.8 时离子化硅醇基对质子化碱的作用; C(7.0) 为 pH7.0 时离子化硅醇基对质子化碱的作用。

Note: H: Hydrophobicity; S: Steric selectivity; A: Column hydrogen-bond acidity; B: Column hydrogen-bond basicity; C(2.8): Column cation exchange for pH 2.8; C(7.0): Column cation exchange for pH 7.0.

FQs 的分析时间;实际检测中发现 B 型色谱柱出峰均有延后,可能与其 H 值(疏水性)较高有关;ZORBAX Bonus-RP 柱出峰最早,但 CIP、DAN、ENR 分离度不佳,需要增加水相比例才能较好分离,但这样会增加柱压并延长分离时间;XBridge Shield RP₁₈ 柱分离度高,且出峰时间合理,峰型对称、尖锐。因此试验最终选择 XBridge Shield RP₁₈ 柱。

2.2.2 流动相的选择

FQs 是酸碱两性化合物($pK_{a1} = 5.5 - 6.3$, $pK_{a2} = 7.6 - 8.5$),其在流动相中的溶解度受 pH 影响,故不同的流动相 pH 会影响其保留值。硅胶键合固定相表面残余硅醇基的解离程度也与流动相 pH 有关,pH 在 2~4 时能降低其与 FQs 阳离子之间的互相影响^[13]。因此调节流动相的 pH 是改善峰型、分离度的影响因素之一。检测中常用磷酸盐缓冲液-乙腈、甲酸-乙腈体系等作为流动相。由于缓冲盐对色谱柱存在损伤,本研究采用甲酸-乙腈作为流动相。

本研究比较了 0.02%、0.10%、0.20%、0.50%、1.00% 甲酸水对 FQs 的分离情况,结果表明随着流动相酸度的降低,pH 升高,FQs 保留时间缩短,0.02%、0.10% 和 0.20% 甲酸水均存在严重拖尾情况,且 PEF 与 CIP 不能完全分离;1.00% 甲酸水虽然能较好分离 6 种药物,但过低的 pH 会影

响色谱系统,损害色谱柱,且导致出峰时间过长,SAR 在柱内扩散严重,峰型变宽,响应降低。0.50% 甲酸水 pH 为 2.4,在色谱柱的适宜范围(pH 2~8)内,保留时间、分离度均满足要求,故本研究采用其作为流动相。另外 FQs 的出峰时间与流动相中有有机相比例有关,本研究比较了不同有机相比例下的 FQs 分离情况,发现随着有机相比例的上升,FQs 保留时间缩短。由于 FQs 的极性较强,流动相中有有机相的比例不宜过高,最终确定 0.50% 甲酸水溶液-乙腈(体积比为 90:10)作为流动相,其色谱峰形尖锐、对称,同时空白样品在该药物保留时间内无干扰。

2.2.3 复溶液的选择

在 FQs 前处理中,大多将复溶液 pH 调节为酸性,将其转化为阳离子形式。选择 0.02%、0.10%、0.50% 和 1.00% 甲酸水复溶,上机检测,发现出峰时间、峰形均无明显变化,故最终选择与流动相相同的 0.50% 甲酸水作为复溶液。

2.2.4 检测器的选择

FQs 结构中存在共轭系统,在紫外区有特征性吸收,另外其自身还具有荧光性质,因此紫外检测和荧光检测均有相关报道^[15-16,18,29]。由于荧光检测较紫外灵敏度高 2~3 个数量级^[21],且本研究所检测的 6 种 FQs 均含有哌嗪环,具有相似的光谱特性,因此选择荧光检测器(表 2)。

表 2 与国家标准方法比较

Table 2 Comparison of the method established in this study and the national standard method

项目 Item	农业部 781 号公告-6-2006 方法 No. 781-6, 2006 method	本方法 This method	本方法的优点 Advantages of this method
提取	缓冲盐提取液	纯水+1.5 g 氯化钠	减少配置时间,对环境伤害小
净化	C ₁₈ 固相萃取柱(预平衡使用乙腈 12 mL/样品)	不使用 C ₁₈ 固相萃取柱,采用加热、冷冻	节省成本(10 元/支 C ₁₈ 柱,每份样品至少 2 支)、减少有机溶剂使用,环保
流动相	0.05 mol/L 磷酸/三乙胺-乙腈=(体积比 81:19)	0.50% 甲酸水溶液-乙腈(体积比 90:10)	对色谱柱损伤小,且对人和环境伤害小(三乙胺易燃易爆有毒且有强烈刺激气味)
适用范围	CIP、DAN、ENR、SAR	OFL、PEF、CIP、DAN、ENR、SAR	增加了养殖中常用的 PEF/OFL 检测,扩大了适用范围

注:农业部 781 号公告-6-2006 为全国畜产品质量安全例行监测使用的检测方法。

Note: No. 781-6-2006 is the national standard method for routine monitoring of quality safety of livestock products.

2.3 线性范围、检测限及定量限

在上述色谱条件下得到 FQs 标准工作液,以各组分的浓度与其色谱峰面积进行线性回归,其线性关

系良好,相关参数见表 3。根据添加回收的结果,以 3 倍信噪比(S/N)对应的添加浓度作为检测限,该方法在鸡蛋中 6 种 FQs 的检测限为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (DAN 为 0.2

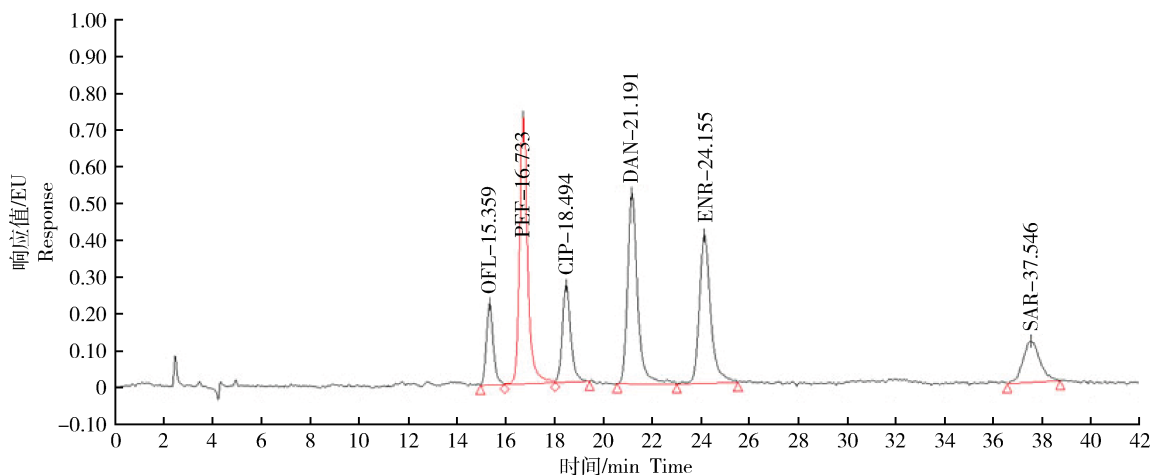
$\mu\text{g}/\text{kg}$, OFL 为 $4 \mu\text{g}/\text{kg}$); 以 10 倍信噪比(S/N)对应的添加浓度, 该方法的定量限为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ (DAN 为

$1 \mu\text{g}/\text{kg}$, OFL 为 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$)。对应的 FQs 检测限与定量限低于其他鸡蛋提取 FQs 的方法^[8-9](图 1)。

表 3 6 种氟喹诺酮类的标准线方程及线性回归常数

Table 3 Regress linear formulation and coefficient of six fluoroquinolones

药物 Analyte	线性范围/ $(\mu\text{g}/\text{L})$ Linear range	线性方程 Regress linear formulation	R^2
OFL	8~1 000	$y=9\ 706.9x-28\ 014$	0.998 1
PEF	2~250	$y=36\ 314x-124\ 830$	0.997 9
CIP	2~250	$y=14\ 489x-68\ 364$	0.995 9
DAN	0.4~50.0	$y=31\ 810x-140\ 210$	0.996 9
ENR	2~250	$y=27\ 375x-113\ 275$	0.997 7
SAR	2~250	$y=11\ 262x-54\ 736$	0.995 9



OFL 为 $4.0 \mu\text{g}/\text{L}$, DAN 为 $0.2 \mu\text{g}/\text{L}$, 其余为 $1.0 \mu\text{g}/\text{L}$
 $4.0 \mu\text{g}/\text{L}$ of OFL, $0.2 \mu\text{g}/\text{L}$ of DAN, $1.0 \mu\text{g}/\text{L}$ of PEF, CIP, ENR and SAR

图 1 6 种氟喹诺酮类标准溶液色谱图

Fig. 1 Chromatograph of standard of six fluoroquinolones

2.4 准确度和精密度

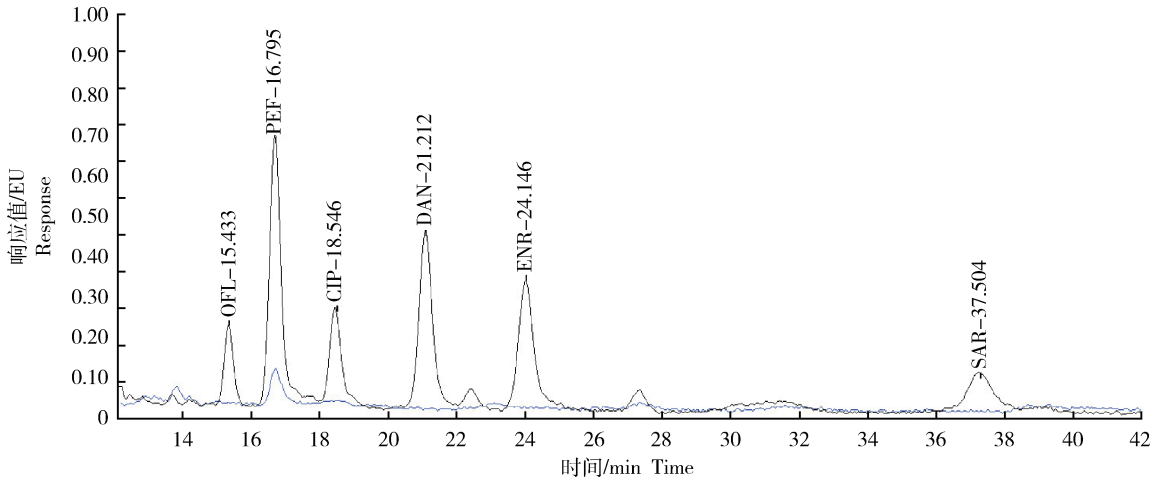
在空白鸡蛋中添加 5、10 和 $25 \mu\text{g}/\text{kg}$ FQs 标准工作液 (OFL 为 20、40 和 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$, DAN 为 1、2 和 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$) (图 2), 测得 6 种 FQs 在鸡蛋中的平均回收率范围为 $80.52\% \sim 101.10\%$, 批内变异系数 $\leq 8.05\%$, 批间变异系数 $\leq 10.41\%$, 结果见表 4。这表明该方法稳定性、重现性较好, 满

足我国农业部^[30]、国家质量监督检验检疫总局^[31]、以及欧盟^①规定的残留分析方法要求 (表 5)。

2.5 实际样品检测

采用本方法对来取自北京、厦门、银川、西宁、武汉、青海、齐齐哈尔和合肥的 13 份鸡蛋阳性样品进行了测定, 检测结果见表 6。

① The European Commission. Commission decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC). Brussels: Official Journal of the European Communities, 2002, L221:8-36



OFL 为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, DAN 为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 其余为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。
 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of OFL, 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of DAN, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of PEF, CIP, ENR and SAR.

图 2 空白鸡蛋样品及阳性添加样品色谱图

Fig. 2 Chromatograph of blank egg and egg fortified with six fluoroquinolones

表 4 鸡蛋中 6 种氟喹诺酮类的回收率及变异系数

Table 4 Intra- and inter-day variation and recovery of six fluoroquinolones

药物名称 Analyst	添加质量 分数/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) Fortified concentrations	FQs 回收率/% Rates of recovery of six FQs						批内平均 回收率/% Intra-day average rates of recovery	批内 变异 系数 ($n=6, \%$) Intra- day CV	批间平均 回收率/% Inter-day average rates of recovery	批间变异 系数 ($n=18, \%$) Inter-day CV
		1	2	3	4	5	6				
		OFL	20	87.40	96.11	88.30	87.85				
OFL	40	92.84	93.88	83.54	94.81	88.19	82.52	89.30	6.01	85.80	5.36
		74.58	85.98	84.98	83.38	77.09	79.80	80.97	5.64		
		92.24	90.09	90.20	91.17	91.77	90.51	91.00	0.97		
OFL	100	87.28	84.21	86.76	87.01	87.07	83.08	85.90	1.57	86.19	2.99
		78.72	81.78	80.36	82.60	79.68	79.91	80.51	1.78		
		89.66	89.24	89.53	89.50	88.67	89.92	89.42	0.48		
PEF	5	82.54	83.06	85.36	83.57	80.21	81.90	82.77	2.08	101.10	4.61
		86.53	86.10	86.70	85.31	85.79	87.83	86.38	1.01		
		96.06	107.33	97.58	98.61	95.98	103.22	99.80	4.55		
	107.62	109.63	101.73	102.28	105.72	103.27	105.04	3.01			
	97.13	103.67	95.79	99.85	93.31	101.07	98.47	3.83			
	98.72	95.10	97.90	96.37	97.56	96.70	97.06	1.32			
PEF	10	92.35	93.40	91.87	91.02	90.14	91.63	91.73	1.22	90.37	7.14
		78.87	85.08	83.66	83.11	81.15	81.97	82.31	2.63		
	93.89	93.60	94.96	93.93	92.15	92.55	93.51	1.01			
	83.06	85.42	87.12	85.18	81.61	82.66	84.17	2.45			
PEF	25	86.54	89.46	87.26	84.63	85.55	91.82	87.54	3.04	88.41	4.99

表4(续)

药物名称 Analyst	添加质量 分数/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) Fortified concentrations	FQs 回收率/% Rates of recovery of six FQs						批内平均 回收率/% Intra-day average rates of recovery	批内 变异 系数 ($n=6, \%$) Intra- day CV	批间平均 回收率/% Inter-day average rates of recovery	批间变异 系数 ($n=18, \%$) Inter-day CV
		1	2	3	4	5	6				
CIP	5	85.49	98.14	81.16	86.03	83.86	88.70	87.23	6.76		
		90.04	95.48	90.11	96.14	94.28	90.61	92.78	3.06	84.93	10.07
		76.40	76.14	75.18	75.23	72.17	73.66	74.80	2.15		
	10	84.75	83.98	85.15	87.55	87.44	83.79	85.28	2.05		
		82.86	84.62	82.75	83.32	80.75	82.01	82.72	1.57	82.09	3.95
		76.85	77.48	78.87	79.17	78.67	78.59	78.27	1.15		
25	88.65	89.05	88.29	88.91	87.84	85.88	88.10	1.33			
	83.53	86.23	84.81	82.19	78.87	82.69	83.05	3.04	85.02	3.46	
	81.59	84.44	85.21	82.54	82.62	87.02	83.90	2.42			
DAN	1	88.57	97.43	88.72	91.83	86.29	96.87	91.62	5.06		
		97.36	95.56	96.29	97.61	94.96	96.09	96.31	1.06	90.95	6.19
		81.68	86.34	85.92	86.38	81.64	87.54	84.92	3.04		
	2	92.21	91.02	93.88	93.09	93.80	91.96	92.66	1.22		
		90.00	89.17	90.36	89.64	87.14	88.83	89.19	1.29	85.24	9.95
		71.01	74.40	74.69	75.01	75.10	73.08	73.88	2.15		
5	89.97	91.22	91.94	90.48	88.80	90.37	90.46	1.19			
	81.90	85.87	87.09	85.40	82.71	82.16	84.19	2.62	87.59	3.48	
	87.72	87.48	89.09	86.87	87.62	90.06	88.14	1.35			
ENR	5	88.66	108.90	94.04	92.06	88.07	94.64	94.39	8.05		
		92.58	96.34	88.43	93.64	94.26	96.40	93.61	3.15	88.71	10.40
		77.36	84.34	73.00	82.39	73.59	78.10	78.13	5.84		
	10	96.42	94.00	97.71	90.36	96.31	94.07	94.81	2.76		
		85.49	85.51	86.14	85.13	80.64	86.34	85.10	1.98	84.72	10.41
		71.99	76.34	75.03	77.40	73.73	72.30	74.46	2.93		
25	90.88	93.39	93.24	92.75	88.98	88.62	91.31	2.35			
	77.92	81.82	82.33	81.62	76.89	79.17	79.96	2.85	85.56	6.00	
	84.88	85.78	87.05	83.29	84.32	87.15	85.41	1.80			
SAR	5	82.70	85.56	79.44	83.65	78.23	81.19	81.79	3.33		
		85.13	90.89	88.80	87.98	93.54	88.15	89.08	3.21	83.79	5.38
		80.20	83.17	80.77	79.66	78.94	80.27	80.50	1.80		
	10	81.84	72.09	74.34	71.60	81.18	82.01	77.18	6.51		
		88.15	84.84	84.35	85.36	83.07	84.85	85.10	1.98	81.14	5.65
		76.62	83.26	81.02	81.11	82.31	82.31	81.15	2.93		
25	84.25	82.86	83.83	83.26	81.75	85.17	83.52	1.41			
	81.90	80.70	80.52	80.10	80.64	82.95	81.13	1.33	80.52	3.82	
	75.82	77.21	74.89	79.57	77.62	76.28	76.90	2.12			

注:OFL为氧氟沙星;PEF为培氟沙星;CIP为环丙沙星;DAN为达氟沙星;ENR为恩诺沙星;SAR为沙拉沙星。1~6为日平行样,每组试验重复3次。

Note:OEL:ofloxacin;PEF:peflocacin;CIP:ciproflocacin;DAN:danofloxacin;ENR:enrofloxacin;SAR:sarafloxacin. 1-6:intra-day parallel samples,each concentration repeated thrice.

表 5 欧盟、农业部、国家质监局对于准确度与精密度的要求
Table 5 Requirement of intra- and inter-day variation in EU, MOA, AQSIQ

待测物 质量分数/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) Concentrations of analyst	批内变异系数/% Intra-day CV			批间变异系数/% Inter-day CV			添加质量 分数/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) Fortified concentrations	回收率/% Recovery rates		
	欧盟	农业部	质监局	欧盟	农业部	质监局		欧盟	农业部	质监局
100	—	17	—	23	26	23	>10	80~110	70~110	80~110
10	—	21	—	*	32	32	1~10	70~110	60~120	70~110
1	—	30	—	*	45	45	≤ 1	50~120	50~120	50~120

注：* 对于低于 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的质量范围，用 Horwitz 公式计算会得出不可接受的高值。因此，对于低于 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的浓度其 CVs 应尽可能地低。“—”未给出。

Note: * For mass fractions lower than 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ the application of the Horwitz Equation gives unacceptable high values. Therefore, the CVs for concentrations lower than 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ shall be as low as possible. “—” not given.

表 6 实测样品中氟喹诺酮类检测质量分数
Table 6 Quantitative analysis on six fluoroquinolones of samples $\mu\text{g}/\text{kg}$

样品编号 Sample ID	样品名称 Analyst					
	OFL	PEF	CIP	DAN	ENR	SAR
HD1	ND	ND	ND	ND	94.77	ND
XM1	ND	30.67	ND	ND	ND	ND
QQHE1	ND	ND	33.51	ND	126.57	ND
BJ1	ND	ND	16.88	ND	82.88	ND
XM2	ND	ND	ND	ND	ND	25
SZS1	ND	ND	12.64	ND	48.55	ND
BJ2	ND	ND	20.18	ND	ND	ND
BJ3	ND	ND	8.64	ND	35.28	ND
X1	ND	58.26	ND	ND	ND	ND
HF1	ND	ND	28.50	ND	267.24	ND
XN1	ND	ND	21.52	ND	ND	ND
XM3	ND	ND	56.99	ND	ND	ND
SZS2	ND	6.37	22.61	ND	1 507.36	ND

注：ND，未检出。实际样品由农业部兽药安全监督检验测试中心（北京）提供。

Note: ND, not detected. Samples were provided by Veterinary drug safety inspection & testing center of ministry of agriculture (Beijing).

3 结论

本方法对样品的前处理过程进行了优化，采用纯水提取，氯化钠盐析，经过加热、冷冻、脱脂，高效液相色谱法检测鸡蛋中 6 种 FQs，可获得较好回收率，准确度和灵敏度高，检测限等指标能够满足国内

对 FQs 检测的要求。且该方法使样品处理快速方便，节约成本，且最大限度避免环境污染。

参考文献 References

[1] 王盛威. 中国蛋鸡产业国际竞争力研究[D]. 北京: 中国农业科

- 学院,2011
- Wang S W. Study on the international competitiveness of hen's egg industry in China [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences,2011 (in Chinese)
- [2] 陈杖榴. 兽医药理学[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社,2009: 272-274
- Chen Z L. *Veterinary Pharmacology*[M]. 3 ed. Beijing: China Agriculture Press,2009:272-274 (in Chinese)
- [3] Tome, A M, Filipe A. Quinolones; Review of psychiatric and neurological adverse reactions[J]. *Drug Safety*, 2011, 34(6): 465-488
- [4] The European Commission. Commission Regulation (EU) No. 37/2010 of 22 December 2009[S]. Brussels: Official Journal of the European Union,2009
- [5] Federal Register, Docket No. 2000N-1571[R/OL]. (2005-07-28) [2016-04-20]. <http://www.fda.gov/animalveterinary/safetyhealth/recallswithdrawals/ucm042004.htm>
- [6] 中华人民共和国农业部. 动物性食品中兽药最高残留限量(第235公告)[S]. 北京: 中华人民共和国农业部,2002
- The ministry of agriculture of the People's Republic of China. Document No. 235[S]. Beijing: The ministry of agriculture of the People's Republic of China,2002 (in Chinese)
- [7] 中华人民共和国农业部. 第2292号公告[R/OL]. (2015-09-01)[2016-04-20]. http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201509/t20150907_4819267.htm
- The ministry of agriculture of the People's Republic of China. Document No. 2292 [R/OL]. (2015-09-01) [2016-04-20]. http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201509/t20150907_4819267.htm (in Chinese)
- [8] 杨娜娜,王庚南,刘静,刘聚祥. 高效液相色谱测定鸡蛋中4种喹诺酮类药物[J]. 河北农业大学学报,2014,37(6):101-105
- Yang N N, Wang G N, Liu J, Liu J X. The determination of four kinds of quinolones in eggs by high performance liquid chromatography (HPLC) [J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2014, 37(6): 101-105 (in Chinese)
- [9] 李宁,林小莉,董艳峰. 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[J]. 黑龙江农业科学,2014(3):107-110
- Li N, Lin X L, Dong Y F. Detection of quinolones residues in egg by UPLC method [J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2014(3): 107-110 (in Chinese)
- [10] 张兴梅,邓巧巧,李桂芝,刘永明. 环境友好型方法快速检测牛奶中的六种喹诺酮残留[J]. 化学研究与应用,2013,25(9): 1303-1307
- Zhang X M, Deng Q Q, Li G Z. Rapid determination of six quinolones in bovine milk with an environment friendly method [J]. *Chemical Research and Application*, 2013, 25(9): 1303-1307 (in Chinese)
- [11] 王婧,金钥,杨毅青,梁丽雅,闫师杰. 动物食品氟喹诺酮类药物残留国内外研究现状[J]. 食品研究与开发,2014,35(16):121-125
- Wang Q, Jin Y, Yang Y Q, Liang L Y, Yan S J. Research status on determination of fluoroquinolones residues in animal food both at home and abroad[J]. *Food Research and Development*, 2014, 35(16): 121-125 (in Chinese)
- [12] 张家禾,孟婷,周作红,管远红,洪伟鸣,刘莉,王永娟,左伟勇. 动物性食品中氟喹诺酮类药物残留检测方法的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2014,41(5):262-266
- Zhang J H, Meng T, Zhou Z H, Guan Y H, Hong W M, Liu L, Wang Y J, Zuo W Y. Research progress on detection method for fluoroquinolones residues in edible animal products[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014, 41(5): 262-266 (in Chinese)
- [13] 李俊锁,邱月明,王超. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社,2002:264-265
- Li J S, Que Y M, Wang C. *Analysis of Veterinary Drug Residues* [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2002: 264-265 (in Chinese)
- [14] Gajda A, Posylniak A, Zmudzki J, Gbylik M, Bladek T. Determination of (fluoro) quinolones in eggs by liquid chromatography with fluorescence detection and confirmation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(2): 430-439
- [15] Evaggelopoulos E N, Samanidou V F. HPLC confirmatory method development for the determination of seven quinolones in salmon tissue (*Salmo salar* L) validated according to the European Union Decision 2002/657/EC[J]. *Food Chemistry*, 2013, 136(2): 479-484
- [16] 宫小明,于金玲,孙军,万进,崔晓娜,高彦. 固相萃取-高效液相色谱-荧光检测法同时测定动物源性食品中8种氟喹诺酮类药物残留[J]. 中国食品卫生杂志,2014,26(5):460-464
- Gong X M, Yu J L, Sun J, Wan J, Cui X N, Gao Y. Simultaneous determination of 8 fluoroquinolones residues in animal derived food by SPE-HPLC-FLD[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2014, 26(5): 460-464 (in Chinese)
- [17] 李丽娟,张宇,车友志,王哈,杨春蕾,郭亮. 高效液相色谱法检测鸡蛋中氟喹诺酮类药物研究[J]. 食品工业,2012,33(8): 150-152
- Li L J, Zhang N, Che Y Z, Wang H, Yang C L, Guo L. Detection of fluoroquinolones on eggs by HPLC[J]. *The Food Industry*, 2012, 33(8): 150-152 (in Chinese)
- [18] Stoilova N A, Surleva A R, Stoev G. Simultaneous determination of nine quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *Food Analytical Methods*, 2013, 6(3): 803-813
- [19] 李佩佩,郭远明,陈雪昌,张小军,梅光明,龙举. 色谱法检测动物源食品中喹诺酮类药物残留研究进展[J]. 食品科学,2013, 34(3): 303-307
- Li P P, Guo Y M, Chen X C, Zhang X J, Mei G M, Long J. Chromatographic detection of quinolones residues in animal tissues[J]. *Food Science*, 2013, 34(3): 303-307 (in Chinese)
- [20] 中华人民共和国农业部. 鸡蛋中氟喹诺酮类药物残留量的测定 高效液相色谱法(第781公告-6-2006)[S]. 北京: 中华人民共和国

- 和国农业部, 2006
The ministry of agriculture of the People's Republic of China, Document [2006] No. 781-6 [S]. Beijing: The ministry of agriculture of the People's Republic of China, 2006 (in Chinese)
- [21] Bogialli S, D'Ascenzo G, Corcia A D, Laganà A, Tramontana G. Simple assay for monitoring seven quinolone antibacterials in eggs: Extraction with hot water and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry Laboratory validation in line with the European Union Commission Decision 657/2002/EC[J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(5): 794-800
- [22] 章敏, 宁军, 余军军, 韦田, 邵楠. 三种喹诺酮类药物在鸡蛋中残留消除规律的研究[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(3): 55-58
Zhang M, Ning J, Yu J J, Wei T, Tai D. Studies on elimination rule of residues of three kinds of quinolones in eggs[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2014, 48(3): 55-58 (in Chinese)
- [23] Tang C M, Yu Y Y, Huang Q X, Peng X Z. Simultaneous determination of fluoroquinolone and tetracycline antibacterials in sewage sludge using ultrasonic-assisted extraction and HPLC-MS/MS[J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2012, 92(12): 1389-1402
- [24] 乔立文, 杨新宇, 杨严俊. 热处理对于鸡蛋全蛋液功能性质的影响[J]. 食品工业科技, 2011, 32(11): 134-137
Qiao L W, Yang X Y, Yang Y J. Effect of heat-treatment on the functional properties of liquid whole egg [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2011, 32(11): 134-137 (in Chinese)
- [25] 熊键, 苏思婷, 何佩文, 何均燃, 叶君. 冷冻储存对鸡蛋理化性质及微观结构的影响[J]. 现代食品科技, 2013, 29(10): 2345-2348, 2468
Xiong J, Su S T, He P W, He J R, Ye J. Effect of frozen storage on physicochemical properties and microstructure of eggs[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(10): 2345-2348, 2468 (in Chinese)
- [26] 林兰, 程奇蕾, 宁保明, 耿颖. 浅谈分析实验室高效液相色谱柱的管理[J]. 中国药师, 2014, 17(11): 1972-1973
Lin L, Cheng Q L, Ning B M, Geng Y. Discussion of HPLC column management in analytical laboratory [J]. *China Pharmacist*, 2014, 17(11): 1972-1973 (in Chinese)
- [27] 胡秋馨, 胡昌勤. 反相色谱柱的表征与选择[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(2): 343-348
Hu Q X, Hu C Q. Characterization and selection of reversed phase columns [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2013, 33(2): 343-348 (in Chinese)
- [28] 张伟清, 胡昌勤. 反相 C18 液相色谱柱选择性理论及其应用[J]. 药学学报, 2010, 45(5): 555-559
Zhang W Q, Hu C Q. Theory of selectivity of RP-LC C18 column and its application[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2010, 45(5): 555-559 (in Chinese)
- [29] Canada-Canada F, Espinosa-Mansilla A, Giron A J. Simultaneous determination of the residues of fourteen quinolones and fluoroquinolones in fish samples using liquid chromatography with photometric and fluorescence detection [J]. *Czech Journal of Food Science*, 2012, 30(1): 74-82
- [30] 中华人民共和国农业部. NY/T 1896-2010, 兽药残留实验室质量控制规范[S]. 北京: 中华人民共和国农业部 2010
The ministry of agriculture of the People's Republic of China. NY/T 1896-2010, Criterion on quality control of laboratories for residue analysis of veterinary drugs [S]. Beijing: The Ministry of Agriculture of the People's Republic of China, 2010 (in Chinese)
- [31] 国家质量监督检验检疫总局. 国家质量监督检验检疫总局关于印发《残留分析质量控制指南》的通知(国质检食[2002]79号)[R]. 北京: 中华人民共和国农业部, 2002
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. The country food quality control supervisor[2002]No. 79[R]. Beijing: The Ministry of agriculture of the People's Republic of China, 2002 (in Chinese)

责任编辑: 苏燕