

# 吡啶离子液体双水相-高效液相色谱法同时测定牛奶中3种喹诺酮药物残留

曾延波<sup>1</sup>, 赵弟海<sup>1,2</sup>, 李蕾<sup>1</sup>, 王练<sup>3</sup>, 沈兵<sup>3</sup>, 奚奇辉<sup>3</sup>, 张萌萌<sup>3</sup>

(1. 嘉兴学院生物与化学工程学院, 嘉兴 314001; 2. 江西理工大学材料与化学工程学院, 赣州 341000;  
3. 嘉兴出入境检验检疫局, 嘉兴 314001)

**摘要** 建立了吡啶离子液体双水相-高效液相色谱同时测定牛奶中噁喹酸、萘啶酸及氟甲喹3种喹诺酮药物残留的方法. 牛奶样品经氯化钠和磷酸混合溶液提取后, 采用吡啶离子液体 *N*-乙基-2-甲基吡啶溴化盐 ([EMPy]Br) 和  $K_2HPO_4$  形成的双水相体系萃取富集, 以 0.1% 磷酸水溶液-乙腈为流动相, 梯度洗脱, 紫外检测. 该方法对噁喹酸、萘啶酸和氟甲喹测定的线性范围分别为 0.3 ~ 15, 0.5 ~ 20 和 0.5 ~ 25  $\mu\text{g/mL}$ , 相关系数( $r$ )均大于 0.9997, 3种药物的检出限在 8 ~ 10  $\mu\text{g/kg}$  之间. 对不同加标浓度的牛奶样品测定, 绝对回收率均在 86.4%~94.8% 范围内, 相对标准偏差为 3.6%~8.3%. 该方法对牛奶中喹诺酮药物残留的检测具有简单、快速、环保和灵敏度高等优点.

**关键词** 双水相; 吡啶离子液体; 高效液相色谱; 喹诺酮药物检测; 牛奶

**中图分类号** O657      **文献标识码** A      **文章编号** 0251-0790(2009)10-1956-04

喹诺酮类药物(Quinolones, QNS)是一类人工合成的广谱杀菌性抗菌药物, 具有抗菌谱广、抗菌活性强及与其它抗菌药物无交叉耐药性等特点, 被广泛用于动物的多种感染性疾病的预防和治疗<sup>[1,2]</sup>. 然而该类药物在动物体内消除缓慢, 若过量使用或使用不当会造成动物源性产品中的药物残留; 人体摄入后容易导致细菌耐药性问题, 对中枢神经系统及关节部位造成不良反应等<sup>[3,4]</sup>. 因此, 喹诺酮类药物残留问题受到人们的关注. 我国以及日本、欧盟等国家都将喹诺酮类药物列入限制使用的兽药名单, 制订出相应的最高残留限量, 牛奶中喹诺酮类药物的最高残留限量在 20 ~ 100  $\mu\text{g/kg}$  之间<sup>[5]</sup>.

目前喹诺酮类药物残留的检测方法主要有微生物分析法<sup>[6]</sup>、分光光度法<sup>[7]</sup>、荧光光度法<sup>[8]</sup>、毛细管电泳法<sup>[9,10]</sup>和液相色谱紫外/荧光/质谱检测法<sup>[11~13]</sup>等方法. 其中应用最广的方法主要是液相色谱法, 但液相色谱分析通常需要经过一个复杂的前处理过程, 其液-液萃取需要使用大量挥发性有机溶剂, 而且比较复杂、耗时; 固相萃取方法价格较昂贵, 操作过程较繁琐. 因此简单、快捷、环保和高效的样品前处理方法得到关注. 固相微萃取、液相微萃取和分散液-液微萃取等方法已被用于样品前处理<sup>[14]</sup>.

咪唑离子液体(Ionic liquids, IL)的双水相体系(Aqueous two-phase systems, ATPS)萃取已被应用于短链醇<sup>[15]</sup>、青霉素<sup>[16]</sup>、牛血清白蛋白<sup>[17]</sup>、罂粟碱和吗啡<sup>[18]</sup>及尿液中睾酮和表睾酮<sup>[19]</sup>的分析, 而应用于食品安全前处理方面的相关报道却极少<sup>[20]</sup>. 本文基于 *N*-乙基-2-甲基吡啶溴化盐([EMPy]Br)离子液体双水相体系, 分析了牛奶中喹诺酮残留. 牛奶首先经氯化钠和磷酸混合溶液提取后, 得到牛奶样液, 然后用离子液体双水相体系对其进行萃取富集, 形成两层, 抽取上层(即离子液体层)直接进行高效液相色谱紫外检测分析, 同时测定牛奶中噁喹酸(Oxolinic acid, OA)、萘啶酸(Nalidix acid, NA)及氟甲喹(Flumequine, FQ)等3种喹诺酮药物残留. 该方法具有简单、快速、环保和灵敏度高等优点.

收稿日期: 2009-03-09.

基金项目: 浙江省科技计划(批准号: 2007C23071, 2007F70011)、浙江省自然科学基金(批准号: Y4080252)和嘉兴市科技计划(批准号: 2008AY2016)资助.

联系人简介: 李蕾, 男, 教授, 主要从事药物分子识别与分离分析技术研究. E-mail: lileichem@yahoo.com.cn

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); 400 MHz 核磁共振波谱仪(美国布鲁克公司); 高速离心机及回旋式振荡器(河南巩义予华仪器厂); 电子天平(瑞士梅特勒公司)。

噁喹酸、萘啶酸和氟甲喹标准品(纯度均大于 99.8%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 环己烷(分析纯, 上海联试化工公司); 溴乙烷及 2-甲基吡啶(分析纯, 中国国药集团); 甲醇(色谱纯, 上海陆都化学品有限公司); 乙腈(色谱纯, 上海凌峰化学品有限公司); 牛奶为纯牛奶系列, 购于当地超市; 其余试剂均为分析纯; 所用水为超纯水。

噁喹酸、萘啶酸和氟甲喹的储备液配制方法: 准确取适量标准品溶于甲醇, 配成 1 mg/mL 的溶液。噁喹酸、萘啶酸和氟甲喹的标液配制方法: 取适量储备液, 用超纯水稀释为低浓度的标准溶液。

[EMPy]Br 的合成: 将 0.1 mol 2-甲基吡啶、0.1 mol 溴乙烷和 15 mL 环己烷依次加入到 50 mL 两颈圆底烧瓶中, 于 35 °C 下搅拌回流反应 48 h, 产物经无水乙醇和乙酸乙酯多次重结晶, 得白色晶体  $C_7H_9NBr$ 。 $^1H$  NMR(400 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$ : 9.366(d,  $J=2.4$  Hz, 1H), 8.262(t,  $J=15.6$  Hz, 1H), 7.904(d,  $J=8.0$  Hz, 1H), 7.380(t,  $J=14.0$  Hz, 1H), 4.706(q,  $J=21.6$  Hz, 2H), 2.803(s, 3H), 1.405(t,  $J=14.8$  Hz, 3H)。 $^{13}C$  NMR(400 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$ : 153.766, 144.992, 129.947, 125.915, 109.499, 77.012, 53.247。

### 1.2 牛奶样品的处理

取 2.0 g 牛奶样品于 10.0 mL 刻度离心管中, 加入一定量的标准溶液, 再加入 4 mL 40 g/L 氯化钠溶液和 0.1 mL 磷酸, 混匀, 4000 r/min 离心 10 min, 将上层清液转入另一个 10.0 mL 离心管中, 下层加入 2 mL 40 g/L 氯化钠溶液, 重复以上操作, 合并上清液, 即得到牛奶样液。

### 1.3 双水相体系和高效液相色谱检测

在 10.0 mL 比色管中依次加入 5.6 g  $K_2HPO_4$ 、1.0 mL 0.8 g/mL [EMPy]Br 水溶液和牛奶样液, 加二次水定容到 10.0 mL, 振荡, 静置, 即分为两层。上层为富集离子液体的水层, 下层为富集盐的水层。用一次性注射器抽取上层, 并过 0.45  $\mu m$  滤膜, 取 20.0  $\mu L$  进样, 进行高效液相色谱检测。检测条件: Agilent1200 液相色谱仪, Eclipse XDB- $C_{18}$  柱(4.6 mm  $\times$  150 mm, 5.0  $\mu m$ )。流动相 A 与 B 梯度洗脱, A 为乙腈, B 为 0.1% 磷酸水溶液。梯度洗脱程序: 0 min 时, 流动相 A 和 B 体积比为 10:80, 流速为 0.8 mL/min; 10 min 时, A 和 B 体积比为 15:75, 流速为 1.0 mL/min。30 min 时, A 和 B 体积比为 30:70, 流速为 1.0 mL/min。紫外检测波长为 310 nm, 进样量 20  $\mu L$ , 柱温 30 °C。噁喹酸、萘啶酸和氟甲喹在此色谱条件下的保留时间分别为 16.3, 25.7 和 28.9 min。

## 2 结果与讨论

### 2.1 无机盐对成相的影响和 IL-ATPS 体系成相条件优化

研究  $K_2HPO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ ,  $K_3PO_4$ , KCl,  $(NH_4)_2SO_4$  及 NaCl 等 6 种盐对 [EMPy]Br 的双水相成相的影响, 结果发现,  $K_2HPO_4$  与 [EMPy]Br 能形成双水相, 上层为富集 [EMPy]Br 的水相, 下层为富集  $K_2HPO_4$  的水相, 其它盐均不能成相。因此选用  $K_2HPO_4$  为成相盐。同时考察了  $K_2HPO_4$  的量和 [EMPy]Br 浓度对成相体系相比(上层体积与下层体积之比)的影响, 结果见图 1(A) 和 (B)。从图 1(A) 可看出, 当  $K_2HPO_4$  用量达到 5.6 g 时, 相比基本不变; 从图 1(B) 可看出, 相比随着 [EMPy]Br 浓度的增大而增大, 但浓度达到 0.8 g/mL 时, 相比增加趋势减小。实验表明, 不同量的 IL 和盐形成的 IL-ATPS 体系对噁喹酸、萘啶酸和氟甲喹的萃取效果不同。当 IL 的体积固定为 1.0 mL、萃取标样浓度为 10.0  $\mu g/mL$  时, IL-ATPS 体系对噁喹酸、萘啶酸和氟甲喹的萃取率随着 IL 浓度的增大而增大, 0.8 g/mL 时达到最大; 当 IL 浓度为 0.9 g/mL 时, 萃取率基本不变。考察了盐量对萃取率的影响, 结果表明, 随着盐量的增大, 萃取率也增大, 5.6 g 时达到最大; 当盐量大于 5.6 g 时, 该 IL-ATPS 体系有盐析出。因此选择 IL-ATPS 体系为 1.0 mL 0.8 g/mL [EMPy]Br 和 5.6 g  $K_2HPO_4$ 。

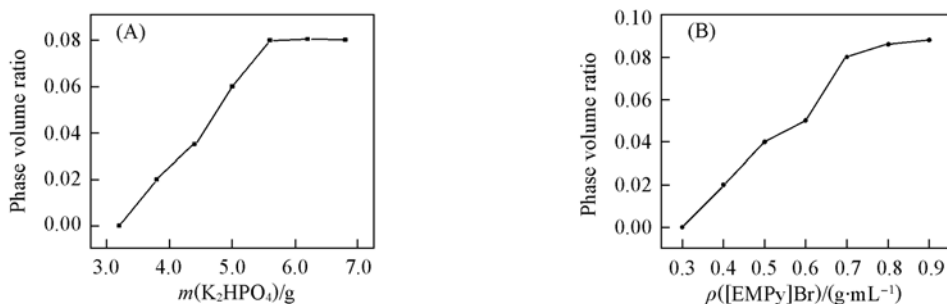


Fig. 1 Effects of  $K_2HPO_4$  amount (A) and  $[EMPy]Br$  concentration (B) on phase volume ratio

## 2.2 IL-ATPS 的富集效果

以乙腈-0.1%磷酸的水溶液为流动相,采用梯度洗脱的方法,在优化的色谱条件下对3种喹诺酮药物进行分离,并对添加标样为 $100\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 的牛奶样液进行分析.未经IL-ATPS富集直接进样的结果如图2谱线a;而经IL-ATPS富集后进样的结果如图2谱线b.保留时间在1~15和23 min为IL和样品基质峰.从图2可知,IL-ATPS体系对3种喹诺酮药物具有很好的富集效果,并提高了方法的灵敏度.

## 2.3 线性回归方程、相关系数、线性范围及检出限

以牛奶空白样液为母液配制噁喹酸、萘啶酸和氟甲喹的标准溶液,在最佳色谱条件下检测噁喹酸、萘啶酸和氟甲喹的混合溶液,获得了3种喹诺酮药物的线性回归方程、相关系数和线性范围,并得到IL-ATPS与高效液相色谱结合后方法的检出限( $S/N=3$ ),结果见表1.该方法测定牛奶中喹诺酮药物的检出限为 $8\sim 10\ \mu\text{g}/\text{kg}$ .

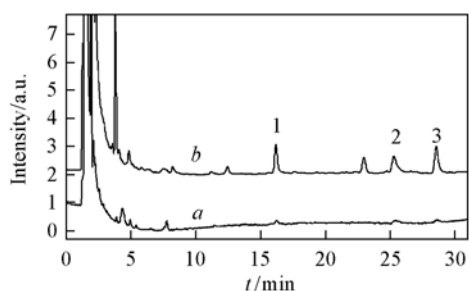


Fig. 2 HPLC chromatograms of spiked milk sample without enrichment (a) and with  $100\ \mu\text{g}/\text{kg}$  IL-ATPS (b)

Peak 1: Oxolinic acid; peak 2: nalidix acid; peak 3: flumequine.

Table 1 Regression analysis and limits of detection of quinolones

| Quinolone | Regression equation | Correlation coefficient, $r$ | Linear range/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ | Detection limit/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$ |
|-----------|---------------------|------------------------------|--|---|
| OA        | $A = 37.1c - 0.05$  | 0.9998                       | 0.03—15.0  | 8   |
| NA        | $A = 24.74c - 0.03$ | 0.9997                       | 0.05—20.0  | 10  |
| FQ        | $A = 32.42c + 0.06$ | 0.9998                       | 0.05—25.0  | 10  |

## 2.4 绝对回收率和精密度

用 $[EMPy]Br-K_2HPO_4$ 双水相体系-HPLC对50和 $100\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 加标浓度的牛奶样品分别进行6次平行测定,绝对和相对回收率与精密度的结果如表2.从表2可看出,绝对回收率均在85%以上,相对标准偏差 $3.6\%\sim 8.3\%$ ,相对回收率均在100%左右,相对标准偏差 $2.3\%\sim 6.2\%$ ,该法适用于牛奶中喹诺酮类药物检测.

Table 2 Recoveries and RSD of quinolones in spiked milk samples ( $n=6$ )

| Quinolone | Spiked concentration/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$ | Absolute recovery (%) | RSD (%) | Relative recovery (%) | RSD (%) |
|-----------|--|-----------------------|---------|-----------------------|---------|
| OA        | 50   | 87.3                  | 7.4     | 101.2                 | 4.6     |
|           | 100  | 93.4                  | 4.3     | 100.8                 | 2.3     |
| NA        | 50   | 86.4                  | 8.3     | 101.6                 | 5.2     |
|           | 100  | 91.2                  | 4.6     | 98.6                  | 2.7     |
| FQ        | 50   | 88.6                  | 6.2     | 100.6                 | 6.2     |
|           | 100  | 94.8                  | 3.6     | 97.3                  | 2.6     |

## 参 考 文 献

- [1] Mack G. J. Chromatogr. [J], 1992, **582**(122): 263—266
- [2] ZHANG Li-Wei(张黎伟), ZHANG Xin-Xiang(张新祥). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2008, **29**(4): 694—699
- [3] Linseman D. A., Hampton L. A., Branstetter D. G. Fund. Appl. Toxicol. [J], 1995, **28**: 59—64
- [4] DING Guo-Hua(丁国华), DING Lei-Ru(丁磊如), LIU Xia(刘霞). Chinese Journal of Hospital Pharm. Acy. (中国医院药学杂志)[J], 1995, **8**(15): 380—384

- [5] YUE Zhen-Feng(岳振峰), XIE Li-Qi(谢丽琪), CHEN Xiao-Xia(陈小霞), *et al.*. Journal of Instrumental Analysis(分析测试学报) [J], 2008, **27**(3): 240—243
- [6] Ev L. D., Schapoval E. E. S. J. Pharm. Biomed. Anal. [J], 2002, **27**: 91—96
- [7] Khateeb S. Z. E., Razek S. A. A., Amer M. M. J. Pharm. Biomed. Anal. [J], 1998, **17**: 829—840
- [8] Du L. M., Yang Y. Q., Wang Q. M. Anal. Chim. Acta [J], 2004, **516**: 237—243
- [9] Michalska K., Pajchel G., Tyski S. J. Chromatogr. A [J], 2004, **1051**: 267—272
- [10] ZHAO Yan-Yan(赵燕燕), WANG Li-Juan(王丽娟), LI Yue-Qiu(李月秋), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2007, **28**(1): 62—64
- [11] Christodoulou E. A., Samanidou V. F., Papadoyannis I. N. J. Chromatogr. B [J], 2007, **859**: 246—255
- [12] ZHAO Si-Jun(赵思俊), LI Cun(李存), JIANG Hai-Yang(江海洋), *et al.*. Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学) [J], 2007, **35**(6): 786—790
- [13] Schneider M. J., Donogoe D. J. Anal. Chim. Acta [J], 2003, **483**: 39—49
- [14] Chen H. X., Chen H., Jun Y., *et al.*. Anal. Chim. Acta [J], 2009, **632**: 80—85
- [15] Gutowski K. E., Broker G. A., Willauer H. D., *et al.*. J. Am. Chem. Soc. [J], 2003, **125**: 6632—6633
- [16] LIU Qing-Fen(刘庆芬), HU Xue-Sheng(胡雪生), WANG Yu-Hong(王玉红), *et al.*. Chinese Science Bulletin(科学通报) [J], 2005, **50**(8): 756—759
- [17] DENG Fan-Zheng(邓凡政), GUO Dong-Fang(郭东方). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学) [J], 2006, **34**(10): 1451—1453
- [18] Li S. H., He C. Y., Liu H. W., *et al.*. J. Chromatogr. B [J], 2005, **826**: 58—62
- [19] He C. Y., Li S. H., Liu H. W., *et al.*. J. Chromatogr. A [J], 2005, **1082**: 143—149
- [20] ZHAO Di-Hai(赵弟海), ZENG Yan-Bo(曾延波), LI Lei(李蕾), *et al.*. Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学) [J], 2009, **37**(3): 445—448

## Simultaneous Determination of Three Quinolones Residues in Milk by Pyridinium Ionic Liquid-based Aqueous Two-phase Systems Coupled with High Performance Liquid Chromatography

ZENG Yan-Bo<sup>1</sup>, ZHAO Di-Hai<sup>1,2</sup>, LI Lei<sup>1\*</sup>, WANG Lian<sup>3</sup>,  
SHEN Bing<sup>3</sup>, XI Qi-Hui<sup>3</sup>, ZHANG Meng-Meng<sup>3</sup>

1. School of Biological and Chemical Engineering, Jiaying University, Jiaying 314001, China;
2. School of Material and Chemical Engineering, Jiangxi University of Technology, Ganzhou 341000, China;
3. Jiaying Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Jiaying 314001, China)

**Abstract** A method was developed for the analysis of three quinolones (oxolinic acid, nalidixic acid and flumequine) in milk by pyridinium ionic liquid-based aqueous two-phase systems coupled with high performance liquid chromatography. Milk samples were extracted with the mixed solutions consisting of sodium chloride and phosphoric acid. Then extracts were enriched by aqueous two-phase systems composed of the ionic liquid pyridine *N*-ethyl-2-methyl-pyridine bromide salt ([EMPy]Br) and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. The separation of the analytes was achieved via 0.1% phosphoric acid and acetonitrile with gradient elution under UV detection. The linear ranges are 0.3—15 μg/mL for oxolinic acid, 0.5—20 μg/mL for nalidixic acid and 0.5—25 μg/mL for flumequine. The correlation coefficient (*r*) is more than 0.9997. The limits of detection are 8—10 μg/kg. Based on detecting spiked quinolones concentrations in milk samples, the absolute recoveries ranged from 86.4% to 94.8% with relative standard deviation from 3.6% to 8.3%. The proposed method of determining quinolones residues in milk is simple, rapid, friendly to environment and high sensitive.

**Keywords** Aqueous two-phase systems; Pyridinium ionic liquid; High performance liquid chromatography; Determination of quinolone; Milk