

## 检测鸡蛋中 12 种喹诺酮类药物残留的 HPLC 方法

廖 兰<sup>1,2</sup>, 饶 勇<sup>1,3</sup>, 杨桂香<sup>1</sup>, 黄显会<sup>1</sup>, 曾忠良<sup>3</sup>, 曾振灵<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>华南农业大学兽医学院/广东省兽药研制和安全评价重点实验室, 广州 510640; <sup>2</sup>西南大学荣昌校区, 重庆 402460; <sup>3</sup>西南大学药学院, 重庆 400715)

**摘要:**【目的】建立并验证同时检测诺氟沙星、氧氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、洛美沙星、达氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、二氟沙星、噁喹酸、萘啶酸和氟甲喹等 12 种喹诺酮类药物在鸡蛋中残留的高效液相色谱-荧光检测分析方法。【方法】鸡蛋样品以乙腈-三氯乙酸溶液匀浆和超声提取, 经反相聚合物 SPE 净化和浓缩; 样品以乙腈-柠檬酸/乙酸铵缓冲液为流动相、经 C<sub>18</sub> 柱 HPLC 梯度洗脱分离, 用荧光检测器程序波长检测。【结果】线性范围除达氟沙星为 5.0~160.0 μg·kg<sup>-1</sup> 外, 其余 11 种药物为 12.5~400.0 μg·kg<sup>-1</sup>。添加 6 个浓度测得的校正曲线的相关系数除氟甲喹为 0.982 以外, 其它 11 种药物均大于 0.995。添加 1/2 MRL、MRL、2 MRL 共 3 个浓度水平 3 批样品的回收率除萘啶酸为 52% 外, 其它 11 种药物为 68%~85%。批内变异系数 < 8%, 批间变异系数除氟甲喹 1/2 MRL 为 18.0% 和恩诺沙星 1/2 MRL 为 18.8% 外, 其它药物均 ≤ 13.0%。12 种药物的检测限为 0.2~4.1 μg·kg<sup>-1</sup>, 定量限为 0.9~13.5 μg·kg<sup>-1</sup>。【结论】建立的检测鸡蛋中 12 种喹诺酮类药物残留的 HPLC 方法简便、快速、使用有机溶剂少, 适用范围广, 适合大量样品的筛选和定量检测。

**关键词:** 喹诺酮类; 残留; 高效液相色谱; 鸡蛋

## Development of HPLC Method for Multiresidue Determination of 12 Quinolones in Egg

LIAO Lan<sup>1,2</sup>, RAO Yong<sup>1,3</sup>, YANG Gui-xiang<sup>1</sup>, HUANG Xian-hui<sup>1</sup>, ZENG Zhong-liang<sup>3</sup>, ZENG Zhen-ling<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University/Guangdong Provincial Key Laboratory of Veterinary Pharmaceutics Development and Safety Evaluation; Guangzhou 510640; <sup>2</sup>Rongchang Campus, Southwest University, Chongqing 402460; <sup>3</sup>College of Pharmacy, Southwest University, Chongqing 400715)

**Abstract:** 【Objective】A high performance liquid chromatographic (HPLC) method with fluorescence detection (FLD) was developed and validated for simultaneous determination of residues of 12 quinolones (QNs), norfloxacin (NOR), ofloxacin (OFL), ciprofloxacin (CIP), pefloxacin (PEF), lomefloxacin (LOM), danofloxacin (DAN), enrofloxacin (ENR), sarafloxacin (SAR), difloxacin (DIF), oxolinic acid (OXO), nalidixic acid (NAL) and flumequine (FLU) in egg. 【Method】Egg samples were extracted by a homogenater and an ultrasonic cleaner in 10% trichloroacetic acid (TCA) in water – acetonitrile (8:2, v/v) and cleared and purified by a solid phase extraction (SPE) cartridges, Strata-X<sup>®</sup>, based on a modified styrene-divinylbenzene polymer. Twelve QNs were separated by C<sub>18</sub> column (Hypersil<sup>®</sup> BDS-C<sub>18</sub>) with acetonitrile-citric acid/ammonium acetate buffer in water as the mobile phase using a linear gradient elution program and detected with fluorescence detection by means of a wavelength program. 【Result】The tested ranges of quinolone calibrations were 5.0-160.0 μg·kg<sup>-1</sup> for DAN, 12.5-400.0 μg·kg<sup>-1</sup> for the other 11 QNs in egg with the correlation coefficients more than 0.995 for 11 QNs exception to FLU (0.982). The validations for egg fortified with 12 QNs at three levels (1/2 MRL, MRL, and 2 MRL) obtained recoveries of 68%-85% exception to NAL (52%), intra-day coefficient of variability (CV) of less 8% and inter-day CV of less 13% exception to ENR (18.8% at 1/2 MRL) and FLU (18.0% at 1/2 MRL), limit of detection (LOD) of 0.2-4.1 μg·kg<sup>-1</sup> and limit of quantification (LOQ) of 0.9-13.5 μg·kg<sup>-1</sup>. 【Conclusion】The results suggested that the method for determination of 12 QNs residues in egg has a simple, fast sample treatment procedure with a little consumption of

收稿日期: 2007-10-25; 接受日期: 2008-01-07

基金项目: 科技部食品安全重大项目 (2001BA804A18-04)

作者简介: 廖 兰 (1969-), 女, 重庆荣昌人, 实验师, 硕士, 研究方向为兽医药理学与毒理学。E-mail: liaolan69@163.com。通讯作者曾振灵 (1963-), 男, 广东兴宁人, 教授, 博士, 研究方向为兽医药理学与毒理学, 动物源食品安全。Tel: 020-85280237; Fax: 020-85284896; E-mail: zlzeng@scau.edu.cn

organic solvent and an extensive applicability. It could meet the screening and quantification requirements for residue analysis.

**Key words:** Quinolones; Residue; High performance liquid chromatography (HPLC); Egg

## 0 引言

【研究意义】喹诺酮类药物 (quinolones, QNs) 是一类新型、高效、广谱的人工合成抗菌药, 在人医和兽医临床上都应用广泛。随着 QNs 在食品动物中大量使用, 微生物的耐药性越来越严重<sup>[1]</sup>, 而且残留于食品中的药物会直接危害消费者健康及影响动物性产品的出口贸易, 因此, 世界各国近年来加强了 QNs 在动物性食品中的残留监控。【前人研究进展】在检测 QNs 残留的标准方法中, 欧盟在 1994 年发布了检测环丙沙星和恩诺沙星在猪肉、熏肉和牛肉中残留的 HPLC 方法<sup>[2]</sup>, 中国在 2003 年公布了动物性食品中恩诺沙星和环丙沙星残留检测方法、噁唑酸和氟甲喹在鸡组织和鱼组织的残留检测方法—高效液相色谱法等 3 种方法<sup>[3]</sup>。在常规分析方面, 曾振灵等<sup>[4]</sup>建立了 9 种 FQs 在鸡蛋中的多残留 HPLC 检测方法, 此检测方法在色谱条件的筛选方面做了很多出色的工作, 但只能检测恩诺沙星等呈两性的 FQs, 而不能检测氟甲喹等呈酸性 QNs。Yang 等<sup>[5]</sup>建立了 11 种 QNs 在牛奶中的多残留 HPLC 检测方法, 此方法采用了固相萃取净化样品、曲线梯度洗脱和波长变化等技术手段, 但检测时间太长。【本研究切入点】目前, 在国内专门研究鸡蛋中 QNs 的多残留检测方法少, 能同时分析两性和酸性 QNs 的方法还未见报道。【拟解决的关键问题】本研究拟建立中国兽医临床可能应用于鸡蛋的 12 种 QNs 的 HPLC 残留检测方法, 能同时测定包括 9 种呈两性的药物[诺氟沙星 (norfloxacin, NOR)、氧氟沙星 (ofloxacin, OFL)、培氟沙星 (pefloxacin, PEF)、环丙沙星 (ciprofloxacin, CIP)、洛美沙星 (lomefloxacin, LOM)、达氟沙星 (danofloxacin, DAN)、恩诺沙星 (enrofloxacin, ENR)、沙拉沙星 (sarafloxacin, SAR)、二氟沙星 (difloxacin, DIF)] 和 3 种呈酸性药物[噁唑酸 (oxolinic acid, OXO)、萘啶酸 (nalidixic acid, NAL)、氟甲喹 (flumequine, FLU)], 所建立方法要具有简便、快速、使用有机溶剂少、适用范围广, 适合大量样品的筛选和定量检测, 为中国的兽药残留监控工作服务。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试剂

对照品: 盐酸环丙沙星、甲磺酸培氟沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星, 中国兽医药品监察所; 甲磺酸达氟沙星, 广东燕塘兽药有限公司; 洛美沙星, 中国药品生物制品检定所; 盐酸二氟沙星, 广州惠华动物保健品有限公司; 噁唑酸、萘啶酸和氟甲喹, Sigma 公司。乙腈为色谱纯; 水为符合 GB/T 6682 规定的二级水; 柠檬酸、乙酸铵、三乙胺、乙醇、甲醇、三氯乙酸 (TCA)、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠均为分析纯。

### 1.2 设备

高效液相色谱仪: Waters 2695 分离系统、在线负压脱气机、2475 荧光检测器、自动进样器、柱温箱, Empower 色谱工作站, 美国 Waters。电子分析天平: AE160 型, 瑞士 Mettler; 离心机: Universal-16 型, 德国 Hettich, 5415D 型, 德国 Eppendorf。组织匀浆机。超声波洗涤仪: HS10260D 型, 天津市东科仪器设备有限公司。旋涡混合仪: MSI 型, 马来西亚 IKA。多功能振荡器: HS250 Basic 型, 德国 IKA。氮气浓缩仪: TurboVap LV 型, 配备 5 ml、20 ml 玻璃试管, 美国 Zymark。可调微量移液器: Eppendorf Research 型, 德国 Eppendorf。负压固相萃取装置: 配备真空泵, 美国 Waters。反相聚合物 SPE 柱: Strata-X, 60 mg/3 ml, Phenomenex。

### 1.3 试液

1.3.1 单药标准贮备液 用 0.5 ml 0.5 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶解对照品, 甲醇定容至 10 ml, 各药物的浓度为 1 mg·ml<sup>-1</sup>。使用期为 6 个月以内。

1.3.2 混合药物标准中间工作液 取达氟沙星标准贮备液 4.0 ml, 用甲醇定容到 10 ml 成浓度为 400 μg·ml<sup>-1</sup>。分别取达氟沙星溶液 (400 μg·ml<sup>-1</sup>) 和其它 11 种单药标准贮备液 (1 000 μg·ml<sup>-1</sup>) 各 40 μl, 以甲醇定容至 10 ml, 即成 8 MRL×10 的混合标准工作液。置 4℃ 保存, 使用期为 1 个月以内。

1.3.3 混合药物系列标准工作液 (×10) 按 2 倍稀释法配制×10 倍浓度混合药物系列标准工作液: 8 MRL、4 MRL、2 MRL、MRL、1/2 MRL 和 1/4 MRL。

1.3.4 样品提取液 含三氯乙酸 (TCA) 10% (m/v) 和乙腈 20% (v/v) 的水溶液。

1.3.5 PBS 缓冲液 称取 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 14.50 g 和 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 1.482 g, 用蒸馏水定容至 1 L。

1.3.6 样品淋洗液 10% (v/v) 甲醇-水溶液。

1.3.7 柠檬酸/乙酸铵缓冲液 称取 10.5598 g 柠檬酸和 7.8650 g 乙酸铵, 用纯净水定容至 1 L, 加三乙胺 1 ml, 0.45  $\mu\text{m}$  过滤, 为流动相的水相。

1.3.8 流动相 量取色谱纯乙腈 10 ml, 用柠檬酸/乙酸铵缓冲液定容至 100 ml。

#### 1.4 样品前处理过程

1.4.1 试样的制备 取鸡蛋 3~5 枚, 去蛋壳, 食品均质器处理 3 min。-20℃ 以下保存备用。

1.4.2 提取 样品室温解冻, 称样 (2.0±0.01) g, 加 PBS 缓冲液 4.0 ml, 涡旋 30 s。加样品提取液 10 ml, 组织匀浆机 10 000 r/min 匀浆 3 min, 另用 5 ml 提取液洗刀头和匀浆杯, 合并样液, 涡旋 30 s; 超声处理 5 min; 8 000 g 离心 6 min; 样液用 10 ml 蒸馏水稀释后供 SPE 净化。

1.4.3 SPE 净化 将反相聚合物 SPE 柱 (Strata-X) 以 3 ml 甲醇活化, 3 ml 蒸馏水平衡; 将样品液加入 SPE 柱上接的贮液库中, 过柱流速约为 1~2 ml·min<sup>-1</sup>; 样品淋洗液 3 ml 淋洗, 抽干; 甲醇 3 ml 洗脱, 抽干。洗脱液于 60~70℃ 氮气 (或者空气) 吹干, 用 1 000  $\mu\text{l}$  流动相溶解残留物, 涡旋混匀, 12 000 g 离心 6 min, 上清液供 HPLC 测定。

#### 1.5 测定

色谱柱: C<sub>18</sub> (封尾), 250 mm×4.6 mm (i.d), 粒径 5  $\mu\text{m}$ , 大连伊利特分析仪器有限公司。保护柱: C<sub>18</sub>, 4 mm×3.0 mm (i.d), Phenomenex。柱温: 50℃。进样量: 40  $\mu\text{l}$ 。流动相 A 液为乙腈、B 液为柠檬酸/乙酸铵缓冲液, A 液的变化为: 0~11 min, 9%; 11~20 min, 9%~29%; 20~25 min, 29%~37%; 25.01 min, 9%。流速 2 ml·min<sup>-1</sup>。

荧光检测器检测波长: 9 种 FQs (NOR、OFL、CIP、PEF、LOM、DAN、ENR、DAR 和 DIF) Ex=278 nm, Em=465 nm; 3 种 QNs (FLU、NAL 和 OXO) Ex=312 nm, Em=366 nm。波长变化的时间在 DIF 和 OXO 之间, 不同的试验条件下保留时间可能会发生变化, 测定前应预测保留时间。

#### 1.6 校正曲线和线性范围

称取 (2.0±0.01) g 空白鸡蛋试样, 加系列混合标准工作液 (1.3.3) 200  $\mu\text{l}$ , 按 1.4 方法进行样品前处理和按 1.5 方法测定。添加 1/4 MRL、1/2 MRL、MRL、2 MRL、4 MRL 和 8 MRL 共 6 个浓度, 各浓度水平包含 3 个重复样品。将 3 个重复样品的色谱峰面积的平均值 (Y) 和相对应的药物质量浓度 (X) 进行线性回

归, 得到各个药物的校正曲线。

#### 1.7 回收率测定和变异系数测定

将×10 浓度的混合标准工作液 (1.3.3) 200  $\mu\text{l}$  加入到 2.0 g 空白鸡蛋中, 按方法 1.4 进行样品处理和 1.5 分析, 测定 1/2 MRL、MRL 和 2 MRL 共 3 个浓度水平, 每一添加水平包括 6 个重复样品; 同时测定相同浓度的标准液 (取×10 浓度的混合标准工作液 200  $\mu\text{l}$ , 加 800  $\mu\text{l}$  流动相, 混匀)。以相应水平的标准液为校正点, 用单点校正的方法以 EMPOWER 工作站处理得到添加样品的实测浓度。批内变异系数为各个添加水平的 6 个重复样品 (n=6); 批间变异系数为各个添加水平在不同的日期共做 3 个批次的所有重复样品 (n=18)。不同批次时间间隔为 1 d 或 1 d 以上, 可能由不同的操作者试验。

#### 1.8 灵敏度测定

计算回收率测定的最低质量浓度 (1/4 MRL) 的 18 个添加样品的 HPLC 色谱图的信号/噪声比 (S/N) 的平均值, 计算检测限 (LOD)=3 S/N 和定量限 (LOQ)=10 S/N。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱图

空白鸡蛋样品没有干扰, 结果见图 1。1/2 MRL 标样和添加于空白鸡蛋样品的 HPLC-FLD 的色谱图分别见图 2 和图 3。12 种药物的保留时间 (min) 为: NOR 8.30、OFL 8.99、CIP 9.62、PEF 10.44、LOM 12.64、DAN 13.38、ENR 15.20、SAR 16.23、DIF 17.22、OXO 18.23、NAL 21.91、FLU 22.72, 所有药物均达到了基线分离, 分离度好。

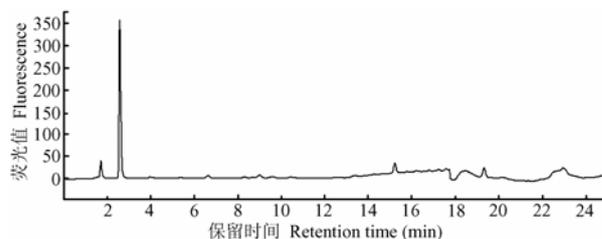
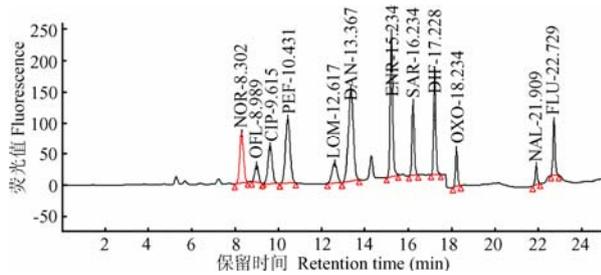


图 1 空白鸡蛋的 HPLC 色谱图

Fig. 1 Chromatogram of blank egg by HPLC

### 2.2 标准曲线和线性范围

添加 1/4 MRL、1/2 MRL、MRL、2 MRL、4 MRL 和 8 MRL 共 6 个浓度水平, 各水平包含 3 个重复样品结果见表 1。NOR、OFL、CIP、PEF、LOM、ENR、



各药物浓度分别为  $25 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (NOR, OFL, CIP, PEF, LOM, ENR, SAR, DIF, OXO, FLU) 和  $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (DAN)。下同  
Concentrations of 12 QNs are  $25 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (NOR, OFL, CIP, PEF, LOM, ENR, SAR, DIF, OXO, FLU) and  $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (DAN) respectively. The same as below

图2 12种QNs标样的HPLC色谱图

Fig. 2 Chromatogram of 12 QNs stand solution by HPLC

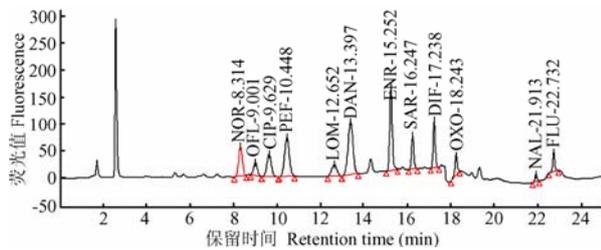


图3 空白鸡蛋添加12种QNs标样的HPLC色谱图

Fig. 3 Chromatogram of egg spiked 12 QNs 1/2 MRL stand by HPLC

表1 鸡蛋添加12种QNs的校正曲线

Table 1 Calibration curves of 12 QNs spiked in egg

药物 QNs	添加浓度 Ranges of conc. ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	回归方程 Regression equations	相关系数 <i>r</i>
NOR	12.5~400	$Y = 3.36 \times 10^4 X + 2.67 \times 10^4$	0.99838
OFL	12.5~400	$Y = 1.37 \times 10^4 X + 4.46 \times 10^4$	0.99684
CIP	12.5~400	$Y = 2.67 \times 10^4 X + 7.90 \times 10^4$	0.99829
PEF	12.5~400	$Y = 5.30 \times 10^4 X - 1.54 \times 10^2$	0.99876
LOM	12.5~400	$Y = 1.77 \times 10^4 X - 1.38 \times 10^4$	0.99864
DAN	5.0~160	$Y = 1.92 \times 10^5 X - 6.72 \times 10^3$	0.99911
ENR	12.5~400	$Y = 5.27 \times 10^4 X + 1.22 \times 10^5$	0.99855
SAR	12.5~400	$Y = 2.01 \times 10^4 X + 1.94 \times 10^4$	0.99853
DIF	12.5~400	$Y = 2.71 \times 10^4 X - 7.42 \times 10^3$	0.99850
OXO	12.5~400	$Y = 1.18 \times 10^4 X + 1.23 \times 10^4$	0.99820
NAL	12.5~400	$Y = 5.37 \times 10^3 X + 1.43 \times 10^4$	0.99462
FLU	12.5~400	$Y = 1.60 \times 10^4 X + 1.04 \times 10^5$	0.98216

X 为药物浓度; Y 为峰面积

X is concentration of QNs; Y is peak area

SAR、DIF、OXO、NAL 和 FLU 11 种药物的线性范围定为  $12.5 \sim 400 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , DAN 的线性范围定为  $5.0 \sim 160 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。在上述的线性范围内, 添加 6 个浓度测得的校正曲线的相关系数除 FLU 为 0.982 以外, 其它 11 种 QNs 均大于 0.995, 表明线性关系良好。

### 2.3 回收率与变异系数

鸡蛋添加 1/2 MRL、MRL、2 MRL 共 3 个浓度药物的 3 批回收率和变异系数见表 2。回收率除个别药物较低 (NAL 为 52%) 外, 其它 11 种均大于 70%。批内变异系数  $< 8\%$ , 批间变异系数除个别药物较大外 (如 FLU 的 3 个浓度分别为 18.0%、14.9%、10.6%, ENR 在 1/2 MRL 为 18.8%), 其它各药物和各浓度的变异系数均  $\leq 13\%$ 。

表2 鸡蛋中添加12种QNs的回收率和变异系数

Table 2 Recoveries and CVs of 12 QNs spiked in egg

药物 QNs	回收率 Recovery (%)			变异系数 CV (%)		
	1/2 MRL	MRL	2 MRL	1/2 MRL	MRL	2 MRL
NOR	79.0	79.2	78.1	5.3	4.9	3.2
OFL	84.1	81.5	79.9	4.8	4.4	2.8
CIP	83.5	82.1	79.8	5.5	10.2	3.9
PEF	81.9	82.8	81.2	4.0	6.5	3.5
LOM	78.7	77.0	75.2	5.5	5.8	5.6
DAN	78.5	78.1	76.7	6.2	3.9	4.3
ENR	78.0	77.9	76.0	18.8	4.8	3.8
SAR	72.0	70.2	68.4	4.3	7.7	4.3
DIF	74.8	72.5	68.9	7.0	11.8	7.1
OXO	79.3	79.4	73.9	7.4	13.0	6.2
NAL	51.7	52.2	52.2	5.8	4.7	6.5
FLU	76.0	74.0	71.8	18.0	14.9	10.6

n=18

### 2.4 灵敏度

鸡蛋中 12 种 QNs 的 LOD 和 LOQ 见表 3, LOD 为  $0.2 \sim 4.1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , LOQ 为  $0.9 \sim 13.5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。DAN 灵敏度最高 (LOD= $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , LOQ= $0.9 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 氧氟沙星的灵敏度最低 (LOD= $4.1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , LOQ= $13.5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 均能达到残留分析的要求。

## 3 讨论

### 3.1 药物的提取方法

鸡蛋中含有大量的水分、蛋白质和卵磷脂, 因此样品的提取和净化的主要目的是沉淀蛋白质和去脂

表 3 鸡蛋中添加 12 种 QNs 的灵敏度

Table 3 LODs and LOQs for 12 QNs spiked in egg

药物 QNs	保留时间 Ret. time(min)	LOD ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )
NOR	8.30	1.4	4.6
OFL	8.99	4.1	13.5
CIP	9.62	1.8	5.9
PEF	10.44	0.9	3.1
LOM	12.64	1.4	4.6
DAN	13.38	0.2	0.7
ENR	15.20	0.6	1.9
SAR	16.23	1.1	3.6
DIF	17.22	0.6	2.1
OXO	18.23	1.6	5.4
NAL	21.91	2.4	7.8
FLU	22.72	1.4	5.6

肪。沉淀蛋白常用的方法有使用乙醇、甲醇和乙腈等有机溶剂, 或者用乙酸、甲酸、磷酸和三氯乙酸等酸性的溶液, 在建立本方法的过程中, 进行过以上各种沉淀蛋白方法的比较, 若用有机溶剂提取, 虽然回收率较好, 但一般都需要先挥发掉有机溶剂后才能进行 SPE 等净化处理, 增加了操作的复杂性, 同时, 大量有机溶剂的使用不利于废液的处理及环境保护。在比较各种酸对蛋白的沉淀过程中, 三氯乙酸的效果明显较乙酸、甲酸和磷酸的效果好, 而加入了柠檬酸后, 沉淀蛋白的效果很差, 溶液呈混浊状态, 很难进行净化。Posyniak 等<sup>[6]</sup>研究表明提取液中乙腈的比例与样品的回收率及提取的杂质的量有较大的关系, 在鸡肝和鸡肉提取时用 10%三氯乙酸: 乙腈 (8: 2, v/v) 混合液, 效果最为理想。笔者的研究证实了此提取溶剂也适合对鸡蛋的处理, 为了不影响在 SPE 柱上的保留, 样液要用水或者 PBS 液稀释到乙腈的含量低于 10%。在加入 10%三氯乙酸: 乙腈 (8: 2, v/v) 混合液提取之前, 加入 2 倍量的 pH 7.4 PBS 液的目的是调节 pH 和防止加入提取液后蛋白质迅速变性而形成大块的沉淀。为了提取更为充分, 采用了先高速匀浆再用超声波处理的提取过程。

### 3.2 净化方法

在 QNs 残留分析方法中, 常用的净化方法包括液-液萃取 (liquid-liquid extraction, LLE)、固相萃取 (solid phase extraction, SPE)、免疫亲和层析, 据 Hernández-Arteseros 等<sup>[7]</sup>的统计, 在分析 QNs 残留的净化方法中, LLE 占 34%、SPE 占 26%、LLE+SPE

占 8%, 无特定净化方法占 21%。LLE 为传统的净化方法, 一般需要消耗大量的有机溶剂, 净化的选择性差; 免疫亲和层析的选择性很高, 但要获得理想的抗体难度很大, 抗体性质的稳定性和检测成本使此类净化方法应用受到很大的限制。SPE 方法具有简便、快速、选择性较强、使用有机溶剂少等优点。Strata-X SPE 柱的填料是新型的苯乙烯-二乙烯基苯 (styrene divinylbenzene) 聚合物, 和传统的  $\text{C}_{18}$  柱相比, 具有高保留效率, 柱容量可达 10%填料, 少量的填料就可以净化大量的样品, 流速快且均匀, 操作简便和能重复使用等优点。

### 3.3 测定方法

HPLC 是分析 QNs 应用最为广泛的分析方法, 其检测器通常使用的是紫外检测器 (UVD, 包括二极管阵列检测器) 和荧光检测器 (FLD), 因为 FLD 较 UVD 有更高的选择性和灵敏度, 所以后者应用更多<sup>[8]</sup>。但有个别化合物如麻保沙星 (marbofloxacin) 和伊诺沙星 (enofloxacin) 用 UVD 检测更为灵敏。液相色谱-质谱联用方法作为此类药物的确证有较多研究报道<sup>[9-16]</sup>。本文所检测的 12 种 QNs 包括 9 种呈两性的 FQs (NOR, OFL, PEF, CIP, LOM, DAN, ENR, SAR, DIF) 和 3 种呈酸性的 QNs (OXO, NAL, FLU), 这两类化合物的检测波长有较大的差异, 因此采用了程序波长变化来同时检测这两类药物, FQs 为  $\text{Ex}=278\text{ nm}$ ,  $\text{Em}=465\text{ nm}$ ; QNs 为  $\text{Ex}=312\text{ nm}$ ,  $\text{Em}=366\text{ nm}$ 。为了能有效分离 12 种药物, 采用了等度与梯度相结合的洗脱方式。

### 3.4 灵敏度

在中国, 鸡蛋中只规定了 OXO 的 MRL 为  $50\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ <sup>[17]</sup>, 其它 QNs 的 MRL 参照 OXO 的标准暂定为  $50\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , DAN 的荧光反应性很强, 灵敏度更高, 其 MRL 暂定为  $20\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。提高灵敏度的措施有: 样品分析量为 2 g 而上机前定容为 1 ml, 相当于样品浓缩了 2 倍; 采用高效的梯度洗脱分离, 提高柱效; 进样量为 40  $\mu\text{l}$ 。

## 4 结论

建立了 12 种 QNs 在鸡蛋中残留的 HPLC-FLD 分析方法, 能同时分析 9 种 FQs 和 3 种酸性的 QNs, 具有操作简便、快速和适用范围广等优势。

## References

- [1] Appelbaum P C, Hunter P A. The fluoroquinolone antibacterials: past,

- present and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2000, 16: 5-15.
- [2] European Union Commission (Sg 3.5) Ciprofloxacin and enrofloxacin-routine screening method for the determination by HPLC after cation-exchange column chromatography in pig muscle, bacon and bovine muscle. 1994.
- [3] 中华人民共和国农业部公告第 236 号. 2003. Bulletin of Ministry of Agriculture, P.R. China. No. 236. 2003. (in Chinese)
- [4] Zeng Z L, Dong A G, Yang G X, Chen Z L, Huang X H. Simultaneous determination of nine fluoroquinolones in egg white and egg yolk by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 2005, 821: 202-209.
- [5] Yang G X, Lin B Y, Zeng Z L, Chen Z L, Huang X H. Multiresidue determination of eleven quinolones in milk by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International*, 2005, 88 (6): 1688-1694.
- [6] Posyniak A, Zmudzki J, Semeniuk S. Effects of the matrix and sample preparation on the determination of fluoroquinolone residues in animal tissues. *Journal of Chromatography A*, 2001, 914: 89-94.
- [7] Hernández-Arteseros J A, Barbosa J, Compañó R, Prat M D. Analysis of quinolone residues in edible animal products. *Journal of Chromatography A*, 2002, 945: 1-24.
- [8] Verdon E, Couedor P, Roudaut B, Sanders P. 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. *Journal of AOAC International*, 2005, 88: 1179-1192.
- [9] Donoghue D J, Schneider M J. Comparison between a bioassay and liquid chromatography-fluorescence-mass spectrometry for the determination of incurred enrofloxacin in whole eggs. *Journal of AOAC International*, 2003, 86(4): 609-674.
- [10] 饶 勇, 曾振灵, 杨桂香, 陈杖榴. 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. *中国农业科学*, 2007, 40(5): 1033-1041.
- Rao Y, Zeng Z L, Yang G X, Chen Z L. Confirmation of fluoroquinolone residues in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40(5): 1033-1041. (in Chinese)
- [11] Volmer D A, Mansoori B, Lacke S J. Study of 4-quinolone antibiotics in biological samples by short-column liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1997, 69: 4143-4155.
- [12] Schneider M J, Donoghue D J. Multiresidue analysis of fluoroquinolone antibiotics in chicken tissue using liquid chromatography-fluorescence-multiple mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2002, 780: 83-92.
- [13] Schneider M J, Donoghue D J. Multiresidue determination of fluoroquinolone antibiotics in eggs using liquid chromatography-fluorescence-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 483: 39-49.
- [14] Toussaint B, Chedin M, Bordin G, Rodriguez A R. Determination of (fluoro)quinolone antibiotic residues in swine kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. I. Laboratory-validated method. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1088: 32-39.
- [15] Toussaint B, Chedin M, Vincent V, Bordin G, Rodriguez A R. Determination of (fluoro)quinolone antibiotic residues in swine kidney using liquid chromatography – tandem mass spectrometry. II. Intercomparison exercise. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1088: 40-48.
- [16] Yamada R, Kozono M, Ohmori T, Morimatsu F, Kitayama M. Simultaneous determination of residual veterinary drugs in bovine, porcine, and chicken muscle using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 2006, 70(1): 54-65.
- [17] 中华人民共和国农业部公告第 235 号. 动物性食品中兽药最高残留限量. 2002. Bulletin of Ministry of Agriculture, P.R. China. No. 235. Veterinary drug maximum residue limits in the food of animal origin. 2002. (in Chinese)

(责任编辑 曲来娥)