

文章编号: 1674-5566(2009)03-0332-06

高效液相色谱法测定鳗鱼中 氟甲喹和噁喹酸的残留量

刘艳萍^{1,2}, 冷凯良¹, 王清印¹, 王志杰¹, 孙伟红¹, 谭志军¹, 郭萌萌¹

(1 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071;

2 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要:建立了高效液相色谱-荧光检测器法测定鳗鱼中氟甲喹和噁喹酸残留量的方法。用乙腈萃取鳗鱼样品中氟甲喹和噁喹酸残留物。色谱柱采用 C8Luna 柱温为 35℃, 激发波长和发射波长分别为 312 nm 和 369 nm, 流动相为 0.01 mol/L 草酸-乙腈=65:35(V/V)。氟甲喹和噁喹酸标准曲线在线性范围 1~100 ng/mL 时呈良好线性关系。对带皮的鳗鱼肉进行 3 种浓度的回收率测定。实验结果表明, 回收率 80%~110%, 变异系数≤10%。氟甲喹的检测限为 2.5 μg/kg, 定量下限为 5 μg/kg, 噁喹酸的检测限为 1 μg/kg, 定量下限为 2 μg/kg。整个提取过程步骤简单, 易于操作, 可以满足世界各国目前对出口水产品检测的限量要求。

关键词:氟甲喹; 噁喹酸; 鳗鱼; 高效液相色谱

中图分类号: S 948; O 657.7 **文献标识码:** A

Determination of flumequine and oxolinic acid in eel with HPLC method

LIU Yan-ping^{1,2}, LENG Kai-liang¹, WANG Qing-yin¹, WANG Zhi-jie¹,
SUN Wei-hong¹, TAN Zhi-jun¹, GUO Meng-meng¹

(1 Yellow Sea Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences Qingdao 266071, China;

2 College of Fisheries and Life Shanghai Ocean University Shanghai 201306, China)

Abstract: A high-performance liquid chromatography(HPLC)-fluorescence detection method is presented for the determination of flumequine and oxolinic acid residues in eel tissues at excitation wavelength of 312 nm and emission wavelength of 368 nm. The HPLC separation was carried out on a C8Luna column with 0.01 mol/L oxalic acid and acetonitrile(65:35) as the mobile phase. The pharmaceuticals were extracted from the matrix with acetonitrile solvent and analysed by HPLC-fluorescence detector. Under the optimum conditions excellent linearity was obtained in the range 1-100 ng/g concentrations with satisfactory correlation coefficients. In fortification studies the recoveries of the analytes were in the range of 80%-110%, the coefficients of variation within batches were ≤10%. Limits of detection (LODs) were 2.5 μg/kg for flumequine and 1 μg/kg for oxolinic acid while limits of quantitation(LOQs) were 5.0 μg/kg for flumequine

收稿日期: 2008-10-29

基金项目: 农业部行业专项(NYhyzx07-046); 国家“八六三”高技术研究发展计划(2008AA100805)

作者简介: 刘艳萍(1983-)女, 山东青岛人, 硕士研究生, 专业方向为水产品质量安全检测工作。Tel: 15866846512, E-mail: liuyanning696@163.com

通讯作者: 王清印, E-mail: wangqy@ysfri.ac.cn

and $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ for oxolinic acid. This method is suitable to verify surely flumequine and oxolinic acid residues testing in eel tissues. The method is suitable to verify surely flumequine and oxolinic acid residues testing in eel tissues.

Key words: flumequine; oxolinic acid; eel; HPLC

氟甲喹 (flumequine) 和噁喹酸 (oxolinic acid) 同为第二代氟喹诺酮类抗菌药, 是动物专用抗菌药物, 对治疗革兰氏阴性菌感染, 特别是对大肠杆菌、支原体、嗜水气单胞菌引起的畜、禽及水生动物疾病有较好疗效^[1-2], 其分子结构式见图 1。由于氟甲喹和噁喹酸具有高安全性、耐受性和独特的高渗透性, 在无公害养殖, 出口畜产品、淡水产品及海水产品养殖中得到广泛应用。但是研究发现其具有潜在的致癌性和诱导有机突变性, 因此欧盟和我国都对该类药物的最大残留量作出了一系列的规定^[3-4] (表 1)。

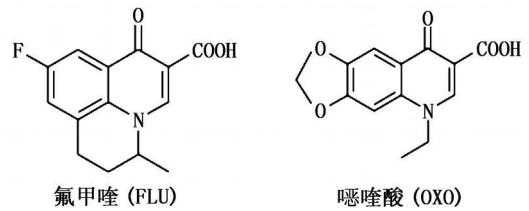


图 1 氟甲喹和噁喹酸结构图

Fig 1 Structures of oxolinic acid and flumequine

表 1 中国和欧盟对氟甲喹和噁喹酸两种药物的最大残留量

Tab. 1 MRLs established by EU and China for oxolinic acid and flumequine

药物名称	动物名称	日本 (MRL ng/g)	中国 (MRL ng/g)	欧盟 (MRL ng/g)
氟甲喹	鳗鱼	不得检出	500	不得检出
	罗非鱼	不得检出	500	400
	虾	不得检出	—	200
噁喹酸	鳗鱼	不得检出	不得检出	不得检出
	虾	不得检出	100	100

目前测定氟甲喹和噁喹酸残留的方法主要是高效液相色谱法配合紫外 (UV) 检测器、荧光 (FL) 检测器、质谱检测器或二极管阵列检测器, 以 FL 检测器最为常见^[5-8]。在国内测定水产品组织中氟甲喹和噁喹酸残留量的方法还不成熟。Brodfoehner 等^[9]用荧光检测的高效液相色谱法, 并采用液-液分配提取测定鸡肉组织中氟甲喹和噁喹酸残留, 但其流动相运用了四氢呋喃, 而四氢呋喃本身在氟甲喹和噁喹酸的最适波长处荧光值也很高, 对实验结果影响比较大。Turiet 等^[10]则采用固相萃取净化, 用荧光检测的高效液相色谱法测定猪肉组织中氟甲喹和噁喹酸残留, 试验中采用了固相萃取柱, 使操作过程繁琐, 回收率降低。本文利用高效液相色谱法配合荧光检测器测定鳗鱼组织中的氟甲喹和噁喹酸残留, 选择了简便快捷的液-液萃取方法。试验结果表明, 该方法具有步骤简单、易于操作的优点, 可以满足世界各国目前对出口水产品检测的限量要求。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和设备

Waters 2996 型高效液相色谱仪, 2475 型荧光检测器; C8Luna 色谱柱, $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm (id)}, 5 \mu\text{m}$, 美国 Phenomenex 公司; AM-6 型组织匀浆机 (日本)、离心机、旋转蒸发仪。

1.2 试剂与溶液

1.2.1 标准品与试剂

氟甲喹标准品 (含量 $\geq 99.0\%$), 噁喹酸标准品 (含量 $\geq 99.0\%$), 乙腈、草酸、正己烷均为色谱纯, 无水硫酸钠、氢氧化钠为分析纯, 水为去离子水。

1.2.2 标准储备液

准确称取氟甲喹和噁喹酸标准品各 10 mg 分别用 0.03 mol/L 氢氧化钠溶液溶解并定容至 10 mL 配成 1.0 mg/mL 的标准储备液, 置 -18°C 冰箱中保存备用。

1.2.3 混标使用液

准确量取适量氟甲喹和噁喹酸标准储备液, 用乙腈稀释成浓度为 $1.0\ \mu\text{g/mL}$ 和 $0.1\ \mu\text{g/mL}$ 混标使用液置 4°C 冰箱中保存。

1.3 色谱条件

C8Luna 色谱柱, 柱温为 35°C ; 激发波长 312 nm, 发射波长 369 nm; 流动相为 0.01 mol/L 草酸: 乙腈 = 65:35 (V/V); 流速 0.8 mL/min; 进样量 $10\ \mu\text{L}$ 。

1.4 样品处理

1.4.1 制样

鳗鱼取带皮肌肉。样品切为不大于 $0.5\ \text{cm} \times 0.5\ \text{cm} \times 0.5\ \text{cm}$ 的小块后混匀, 放置于 -18°C 冰箱备用。

1.4.2 提取

将试样解冻, 称取 2.0 g 精确到 0.01 g 置于 50 mL 聚乙烯离心管中, 加乙腈 10 mL 无水硫酸钠 2 g 均质提取 30 s 加入 8 mL 正己烷, 涡旋混合 1 min, 以 4000 r/min 离心 10 min 弃去上层有机相, 下层清液转移至 50 mL 鸡心瓶中; 另取一个 50 mL 离心管, 加入 10 mL 乙腈, 洗涤均质刀头 10 s 洗涤液移入第一支离心管中, 用玻璃棒搅动残渣, 加入 8 mL 正己烷, 涡旋提取 1 min 以 4000 r/min 离心 10 min 弃去上层有机相, 下层清液转移至上述 50 mL 鸡心瓶中, 于 55°C 下旋转蒸发至干。准确加入 1 mL 0.01 mol/L 草酸: 乙腈 = 65:35 (V/V) 液体溶解残留物, 在振荡器上涡旋 30 s 过 $0.45\ \mu\text{m}$ 的滤膜, 供高效液相色谱分析。

2 结果

2.1 标准曲线及回归方程

准确量取适量混标使用液, 用乙腈稀释成浓度为 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 ng/mL 的系列工作液。将工作液从低浓度到高浓度依次注入液相色谱仪, 按 1.3 项下的色谱条件进行分析。每一浓度进 3 针, 按其所得峰面积的平均值与对应的标准溶液浓度作标准曲线图, 结果表明, 氟甲喹的线性相关系数 $R^2 = 0.9997$, 噁喹酸的线性相关系数 $R^2 = 0.9999$, 绘制标准曲线图 (图 2)。

2.2 检测限和定量限

在空白鳗鱼带皮肌肉组织中分别添加氟甲喹标准溶液 $2.5\ \mu\text{g/kg}$ 和噁喹酸标准溶液 $1.0\ \mu\text{g/kg}$ 经测定其信噪比 (S/N) 都大于 3, 表明氟甲喹和噁喹酸检测下限分别为 $2.5\ \mu\text{g/kg}$ 和 $1.0\ \mu\text{g/kg}$ 。在空白鳗鱼带皮肌肉组织中分别添加氟甲喹标准溶液 $5\ \mu\text{g/kg}$ 和噁喹酸标准溶液 $2\ \mu\text{g/kg}$ 经测定其信噪比 (S/N) 都大于 10, 表明氟甲喹和噁喹酸的定量下限分别为 $5\ \mu\text{g/kg}$ 和 $2\ \mu\text{g/kg}$ 。从测定结果来看 (图 3), 分离效果好, 在目标物保留时间附近没有任何干扰峰。

2.3 回收率及变异系数

取空白鳗鱼带皮肌肉组织 2.0 g 加适量的标准溶液, 制成含氟甲喹和噁喹酸浓度为 $5.0 \sim 20.0\ \mu\text{g/kg}$

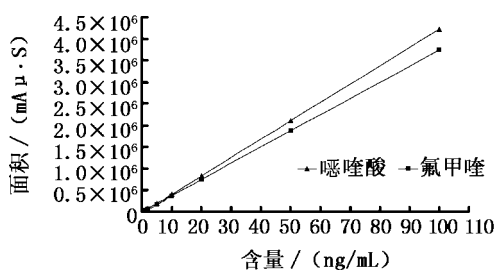


图 2 1~100 ng/mL 噁喹酸和氟甲喹标准曲线

Fig 2 Specification curve of oxolinic acid and flumequine at 1~100 ng/mL

的添加样品,按 1.5 中步骤组织样品的提取方法处理后进行色谱分析。取峰面积值计算氟甲唑和噁唑酸的含量,以加入量和测得量之比计算回收率。选择 3 个不同水平,按每个水平各测 5 个样品的回收率计算批内的变异系数;每个浓度各测 3 批,计算批间的变异系数(表 2)。

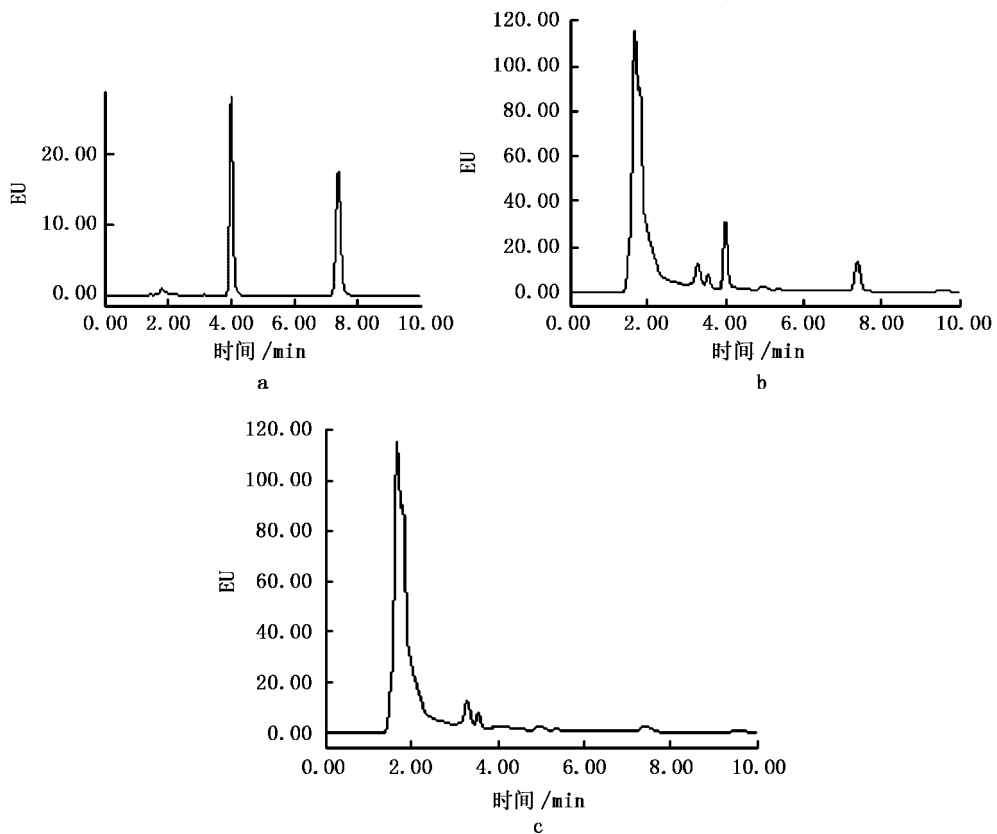


图 3 色谱图

Fig 3 Chromatograms

a 50 ng/mL 标准溶液色谱图; b 25 ng/g 加标回收色谱图; c 空白鳗鱼肌肉色谱图

表 2 鳗鱼组织中噁唑酸和氟甲唑回收率测定结果

Tab 2 Recoveries of oxolinic acid and flumequinone from eel tissue

n=5

分析物	添加水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	测定批次	检测结果 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)	批内变异 系数 CV (%)	批间变异 系数 CV (%)
噁唑酸	5	1	3.949	78.98 \pm 1.23	5.09	8.92
		2	3.162	63.24 \pm 1.31	4.21	
		3	3.213	64.26 \pm 1.27	5.23	
	10	1	9.63	96.3 \pm 0.76	4.76	7.44
		2	10.03	100.3 \pm 0.67	3.67	
		3	11.03	110.3 \pm 1.17	3.79	
	20	1	19.08	95.40 \pm 0.83	2.87	6.41
		2	18.92	94.60 \pm 0.79	2.84	
		3	18.96	94.80 \pm 0.76	2.12	
氟甲唑	5	1	3.812	76.24 \pm 0.99	8.33	8.77
		2	4.125	82.50 \pm 1.11	7.31	
		3	3.658	73.16 \pm 1.08	8.26	
	10	1	8.93	89.30 \pm 0.56	6.63	7.52
		2	9.62	69.20 \pm 0.61	5.63	
		3	9.41	94.10 \pm 0.62	7.66	
	20	1	21.93	109.6 \pm 1.22	3.13	4.79
		2	20.89	104.4 \pm 1.19	2.14	
		3	21.01	105.0 \pm 1.25	3.19	

实验结果表明,方法中氟甲喹和咪唑酸在 5 ng/g、10 ng/g、20 ng/g 添加水平的平均回收率在 85% ~ 105% 之间。批内变异系数 <2%, 批间变异系数 <9%, 结果重复性好, 回收率高, 方法的准确度和精密度可以满足药残检测的要求。

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

3.1.1 流动相的选择

氟甲喹和咪唑酸的性质不同, 它们没有共同的最大吸收和发射波长, 但荧光检测器利用特定波长能有效地检测和定量这两种物质。利用乙腈和草酸作为流动相比用盐溶液或离子试剂作流动相具有更好的分辨率和峰形^[11-12]。实验分别考察了由乙腈 (CAN) 水组成的混合物、CAN 甲醇 水混合物和 CAN-四氢呋喃 (THF) 水混合物 3 种不同的流动相, 结果发现运用 CAN-THF-0.02 mol/L 的磷酸溶液作为流动相, 10 ng/mL 的标准液峰形拖尾严重, 检出限稍高, 并在试验中利用荧光分光光度计测得 10 ng/mL 的标准液在激发波长 312 nm, 发射波长 369 nm 处的荧光值与纯四氢呋喃在此处的荧光值相差很少, 影响了检出限的降低; 利用 CAN 甲醇 水混合物作为流动相, 峰形稍差。本试验采用 CAN-0.01 mol/L 的草酸作为流动相, CAN 和草酸都没有荧光值, 可以降低检出限到 2 ng/mL。

3.1.2 流动相比例的选择

由于氟甲喹和咪唑酸具有相似的化学结构和色谱特征, 为了缩短分析时间, 我们采用等梯度洗脱, 即乙腈 : 0.01% 的草酸 = 35 : 65 (V/V), 两种物质都能在 9 min 内被分离。实验研究了乙腈 草酸的比例、草酸的浓度、柱温及流速对峰形及保留时间的影响, 通过对流动相中不同比例的乙腈和草酸进行的研究结果显示, 随着乙腈比例的增加, 两种物质的保留时间降低, 但是乙腈比例增加对荧光响应值没有明显影响 (图 3)。当乙腈比例增加到 70% 时, 峰形明显变差, 当乙腈比例增加到 75% 时, 两个峰保留时间很接近, 没法将其分开。本试验还对不同浓度的草酸对荧光值的影响进行了研究, 发现不同浓度的草酸对荧光值没有明显影响 (图 4)。

本文考虑到保留时间和峰形及分离度的多重影响, 最后确定了乙腈 草酸比例为 35:65, 草酸浓度为 0.01 mol/mL, 流速为 0.8 mL/min, 柱温为 35℃。

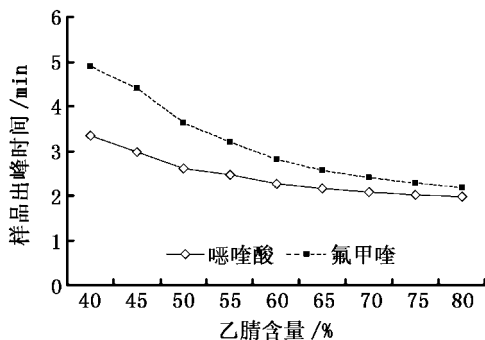


图 4 流动相中不同比例的乙腈对保留时间的影响

Fig 4 Effects of different proportions of acetonitrile and oxalic acid on retention time

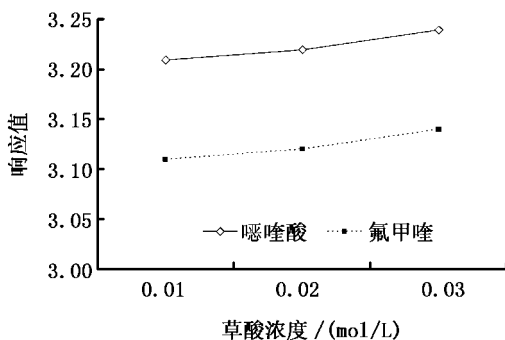


图 5 不同浓度草酸对荧光值的影响

Fig 5 Effects of different concentrations of oxalic acid on the fluorescence

3.2 前处理过程的优化

3.2.1 萃取方法和萃取试剂的选择

固相萃取是近年来常用的前处理提取净化方式^[13-14]。目前针对氟甲喹和咪唑酸净化而使用的固相萃取柱主要是 SPE 柱, SPE 柱的填料可以是 C18, C8, C2 或苯乙烯-二乙烯苯共聚物, 但固相萃取需要淋洗及洗脱, 对样品提取液也有一定要求, 本试验选择了成本低、样品处理速度快的液液萃取。试

验比较了利用乙酸乙酯、氯仿、二氯甲烷,乙腈作为提取液的效果。由于氯仿具有比较大的毒性,一般不采用;用二氯甲烷提取的方法在离心过程中有悬浮物,上清液不易提取;利用乙酸乙酯和乙腈提取回收率相差不大,但利用乙腈可以直接加正己烷去脂,简化试验步骤。所以选择乙腈作为提取剂。对鳗鱼肌肉进行不同溶度的氟甲喹和噁喹酸(5~20 ng/g)的加标回收,回收率为85%~105%。

3.2.2 定容溶液的选择

本试验比较了氮吹仪浓缩至干后利用流动相、0.01 mol/L的氢氧化钠、0.2%甲酸定容、1:1的乙腈比0.01%草酸这4种不同溶剂或比例定容,过膜,进样测其回收率,结果显示利用流动相定容的方法其峰形最好。

3.2.3 提取方法的选择

本试验对同一样品同种浓度加标后在4种情况下的回收率进行了分析。分别进行了不均质旋转蒸发至干、均质旋转蒸发至干、不均质氮吹仪浓缩至干和均质氮吹仪浓缩至干4种方法的比较。结果发现,均质比不均质效果好;用旋转蒸发至干比用氮吹仪浓缩至干回收率要好,最终选择了均质后旋转蒸发至干为优化后的提取方法。

3.3 稳定性研究

氟甲喹和噁喹酸无论在碱性环境下还是酸性环境下都具有很好的稳定性。本试验中,样品在室温(20~25℃)或4℃间隔96 h再进样,峰形及面积没有明显影响。

试验建立了测定鳗鱼肌肉中氟甲喹和噁喹酸残留量的高效液相色谱荧光检测方法。样品经乙腈提取,正己烷去脂,离心后,取下层清液过膜,进高效液相色谱进行分析,无须再过柱净化步骤,整个提取过程步骤简单,易于操作。

参考文献:

- [1] 沈建忠,谢联金. 兽医药理学[M]. 北京:中国农业大学出版社,2000:162-167.
- [2] 杨永胜,闰章年. 国内鱼因抗菌药物的现状与展望[J]. 中国兽药杂志,1997,31(2):51-54.
- [3] European Commission Regulation 99/508/EEC. 9 March[S]. Off J European Commission L60, 1999:305.
- [4] 仲锋,董琳琳,汪霞. 噁喹酸、氟甲喹在鱼组织中残留量的检测方法研究[J]. 中国兽药杂志,2002,36(11):20-22.
- [5] 农业部畜牧兽医局. 动物性食品中噁喹酸和氟甲喹残留检测方法(鱼)——高效液相色谱法[J]. 中国兽药杂志,2003,37(10):8,16-17.
- [6] Harry V B. Analysis of oxolinic acid in fish by high performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography, 1990, 530: 75-82.
- [7] Germain C, Lyse L, Stephen S. Assay of oxolinic acid residues in salmon muscle by liquid chromatography with fluorescence detection: interlaboratory study[J]. J Assoc Off Anal Chem, 1991, 74(6): 906-909.
- [8] Lyse L, Mary S, Stephen S et al. Determination of oxolinic acid residues in salmon muscle tissue by liquid chromatography with fluorescence detection[J]. J Assoc off Anal Chem, 1991, 74(4): 608-611.
- [9] Brodfuehrer J I, Priebe S, Guttendorf R. Achiral and chiral high performance liquid chromatographic methods for cinafloxacin, a fluorquinolone antibacterial in human plasma[J]. J Chromatogr B, 1998, 709: 265-272.
- [10] Turie E, Bordin G, Rodriguez A R. Trace enrichment of (fluoro) quinolone antibiotics in surface waters by solid phase extraction and their determination by liquid chromatography-ultraviolet detection[J]. J Chromatogr A, 2003, 1008: 145-155.