

方法开发报告 2014-APP-RLC-019

Online SPE-HPLC 法快速测定牛奶中喹诺酮的残留量

赛默飞世尔科技色谱产品应用中心

检测项目	牛奶中氟喹诺酮残留
仪器型号	Ultimate DGP 3600 RS 系列: DGP-3600RS WPS 3000TSL TCC-3000 (配置一个六通阀和一个十通阀) DAD-3000 RS
方法开发	张艳海
审核人	金燕
时间	2014.3.10~ 2014. 3. 25

1 引言

氟喹诺酮 (Fluoroquinolone, FQs) 类药物是近 20 年来喹诺酮类药物迅速发展起来的一类十分重要的广谱抗生素。因其有抗菌谱广、吸收好、血液浓度高、能迅速分解到各组织、半衰期长、能制成各种剂型等特点而得到迅速推广。不仅在临床中得到了广泛应用, 随着畜牧业发展的需要, 氟喹诺酮类药物在治疗和预防动物疾病、促进动物生长、提高饲料转化率上应用相当广泛。这类药物的原形及其代谢产物可蓄积或贮存于动物的细胞、组织、器官或可食性产品(如蛋、奶)中, 这便形成药物残留。FQs 在动物源性食品中的残留可直接对人体健康造成危害, 长期食用药物残留超标的牛奶, 可能会引起皮疹、过敏性休克等不良反应, 并会抑制人体肠道中正常的敏感菌群生长, 低浓度的残留药物也可能诱导对喹诺酮类药物敏感的致病菌产生耐药性, 间接危害人类健康。基于食品安全考虑, 一些国家像中国、澳大利亚、加拿大、美国和欧盟成员国已禁止在家畜饲料中添加一些抗生素类药物。同时为保护消费者健康, 并减少潜在危害, 欧盟 (Commission Decision 37/2010/CE) (European Commission Regulation, 2010) 和美国 FDA 制定了抗生素类药物的最大残留限量^[1]。作为牛奶, 从达氟沙星的最大限度为 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 恩诺沙星及其代谢物环丙沙星残留总量不超过 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 因此, 建立灵敏度较高的动物性食品中喹诺酮类抗生素残留量的测定方法, 以符合法规检测的要求, 具有重要的意义。

文献关于食品中氟喹诺酮类药物的残留测定方法较多, 通常在提取、净化和检测原理不同。基于液相色谱结合不同检测技术的方法较为常见。例如 UV^[2]、电化学检测^[3]、荧光检测^[4-6]、质谱^[7-9]和化学发光检测^[10]。方法建立的主要难点是样品的前处理, 文献中也报道了很多关于样品净化和富集的方法, 如液相萃取^[4]、QuEChERS 方法^[7,11]、基于分子印迹技术的 SPE 法^[6]、SPE 法^[12]、基于离子液体的液液微萃取法^[2]等。与离线的样品处理方法比较, 在线方法具有自动化程度高、准确度和重现性较好, 且溶剂消耗少、样品分析效率高等优点, Lina Kantiani^[13]采用在线固相的方法, 利用 Spark Holland 的专用 online SPE 仪器,

以 oasis HLB 作为 SPE 柱，MS/MS 的检测对 15 种喹诺酮类抗生素进行了分析，进样 300 微升，最低检出限做到 0.01~1.93ppb，但该方法需要专用仪器，且 SPE 柱不可多次重复使用，检测成本较高。涡流色谱技术（Turbulent flow chromatography, TFC）是利用大粒径填料使流动相在高流速下产生涡流状态，在这种情况下，大分子的基质成分如蛋白质等，还未能扩散进入填料颗粒内部就已被洗出柱外，而小分子的待测物则可以保留下来，与基质分离，从而对生物样品进行净化与富集。该技术可以在线处理生物样品，速度快、选择性好、灵敏度高，易于实现自动化，近年来在生物领域尤其是体内药物分析中得到了广泛的应用^[14]，在牛奶和动物可食组织的喹诺酮残留测定中也有应用^[15,16]，两个方法采用聚合物基质的 Cyclone 柱作为 TFC 柱，以 MS/MS 检测同时测定了环丙沙星等氟喹诺酮的残留量，具有快速、灵敏度较高，且 TFC 柱耐用性较好等优点，但方法也有不足之处，如需要专用仪器或多个液相泵的配置和复杂连接，采用串联质谱进行检测时，随样品基质不同存在基质效应等，使该方法不具有普适性。本文采用双三元液相色谱（DGLC）Online-TFC-LC-FLD 法，结合在线稀释，建立了快速测定牛奶中环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星和二氟沙星残留的分析方法。

1 样品前处理

方法一：称取牛奶样品 (2±0.05) g，于 50 mL 离心管中，加 85%磷酸 100 μL，乙腈 4 mL，涡旋混匀，振荡 5 min，10000 r/min 离心 5 min，取上清液于另一离心管中，加正己烷 5 mL，涡旋 1min，静置，取下层清液于 25 mL 鸡心瓶中。残渣中加乙腈 4 mL，重复提取一次，上清液经同一份正己烷分配，合并两次提取液，于 50℃氮吹至干。用流动相 1.0 mL 溶解残余物，滤膜过滤，供高效液相色谱法测定。

方法二：称取牛奶样品 (1±0.02) g，于 15 mL 聚丙烯离心管中，加乙腈-0.2%三氯乙酸 (10: 90) 溶液 5 mL，涡旋混匀，超声 5 min，于 10000 r/min 离心 5min，取上清液，直接进样测定。

2 色谱条件

Online SPE 柱	TurboFlow HTLC Cyclone , 0.5×50mm, PN: CH-953288; S/N 221336						
分析柱	Acclaim C18 120Å 3.0*150mm*3μm, PN: 063691; S/N 001198; Accucore C18 4.6*150mm*2.6μm, PN: 17126-154630; S/N 10032030						
柱温	40℃						
流动相 A	上样净化泵：甲醇；分析泵：乙腈						
流动相 B	柠檬酸-醋酸铵缓冲盐（含0.1%TEA）						
流动相 C	水						
检测	UV@275 nm; FLD@EX=278nm, EM=465nm, sensitivity=1.0						
进样量	1000 μL						
梯度及阀切换	表 1 online SPE 方法上样净化泵及阀切换时间						
	时间 (min)	Flow mL/min	A%	B%	阀切换时间	右阀位置	左阀位置
	0	1.5	5	95	0	6-1	6-1
	2.0	1.5	5	95	10	1-2	1-2
	2.5	0.5	5	95	12	6-1	6-1

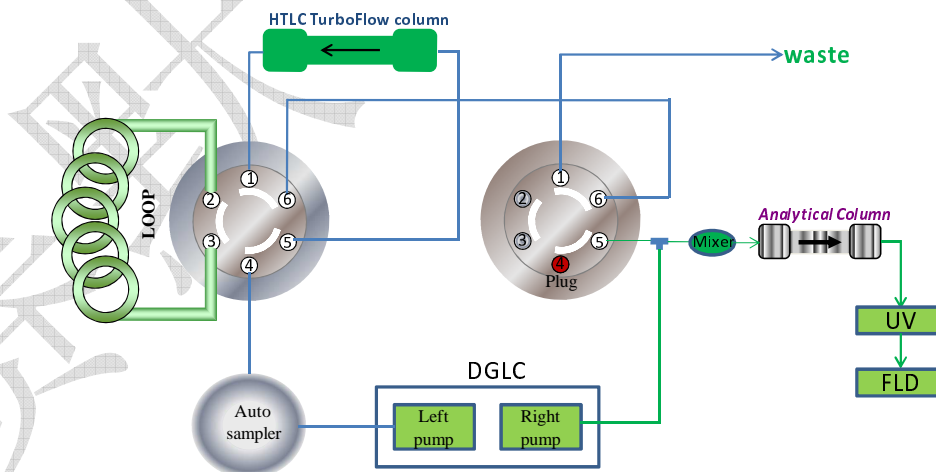
9.0	0.5	5	95	18.0	6-1	1-2
10.0	0.3	5	95	20.0	6-1	1-6
12.0	0.3	5	95			
15.0	0.5	80	20			
20.0	0.5	80	20			
30.0	0.5	90	10			
32.0	1.5	5	95			
35.0	1.5	5	95			

表 2 Online SPE 方法中分析泵梯度

时间 (min)	Flow	A%	B%
0	0.5	5	95
12	0.5	5	95
13	0.6	5	95
25	0.6	30	70
30	0.6	65	35
30.5	0.6	5	95
32	0.6	5	95

A%+B%=100%

系统连接图



注: loop 环体积 100 μ L

4、结果

4.1 混合标准品谱图