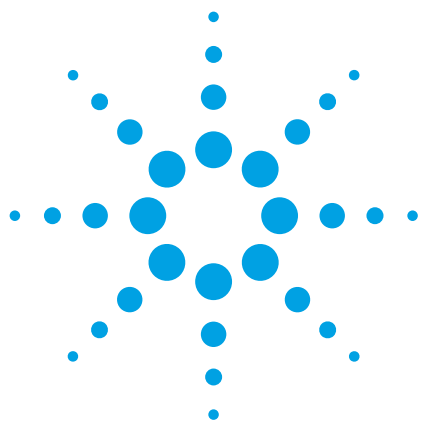




使用高效液相色谱法测定牛奶中喹诺酮类药物

应用简讯

食品检测与农业

作者

孙锦兰

安捷伦科技（中国）有限公司

前言

喹诺酮类药物 (4-Quinolones)，又称吡酮酸类或吡啶酮酸类，这类药物抗菌谱广、抗菌力强，主要作用于动物敏感菌所致的呼吸道、消化道和尿道感染，同时可促进动物日增重和提高饲料转化率。本方法参照食品安全国家标准 GB 29692-2013，建立了牛奶中喹诺酮类药物多残留量检测的制样和高效液相色谱测定方法。该方法适用于牛奶中恩诺沙星、环丙沙星、达氟沙星、沙拉沙星、二氟沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、培氟沙星、洛美沙星、氟甲喹和噁喹酸单个或多个药物残留的检测。

喹诺酮类药物的分析

对试料进行样品前处理。称取试料 1 ± 0.02 g，于 15 mL 具塞离心管中，加乙腈-10% 三氯乙酸溶液（取乙腈 10 mL，用 10% 三氯乙酸水溶液溶解并稀释至 100 mL）5 mL，漩涡混合 2 min，超声 5 min，于 4 °C 下 5000 rpm 离心 10 min，取上清液备用。所得样品提取液经 Agilent Bond Elut Plexa 固相萃取柱净化（操作流程见图 1），复溶后涡旋混匀，于 4 °C 下 12000 rpm 离心 6 min，取上清液供高效液相色谱测定（液相色谱分析条件见表 1）。



Agilent Technologies

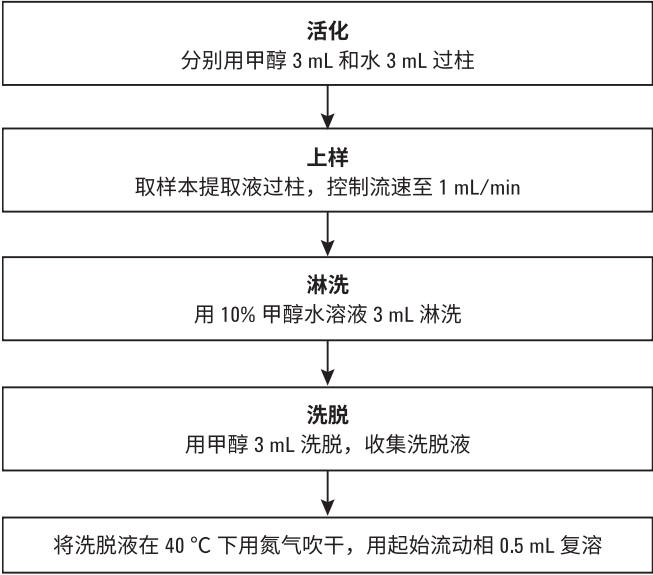


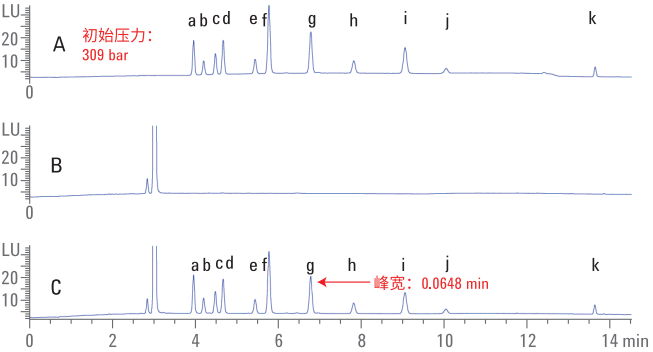
图 1. 固相萃取操作流程

表 1. 液相色谱条件

色谱柱 1	Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm		
色谱柱 2	Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 100 mm, 4 μm		
流速	2 mL/min		
柱温	50 °C		
进样体积	10 μL		
荧光检测器	时间 (min)	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)
检测波长	0	278	465
	9.5	312	366
	15	278	366
流动相	A) 柠檬酸/乙酸铵缓冲液* B) 乙腈		
梯度洗脱	时间 (min)	B%	
	0	8	
	7	12	
	9	13	
	15	35	
	15.1	90	
	20	90	
	20.1	8	
	25	8	

* 柠檬酸/乙酸铵缓冲液：取柠檬酸 10.56 g、乙酸铵 7.87 g，用水溶解并稀释至 1000 mL，用三乙胺调 pH 至 4.0，过滤膜

色谱柱 1 (4 μm):



色谱柱 2 (2.7 μm):

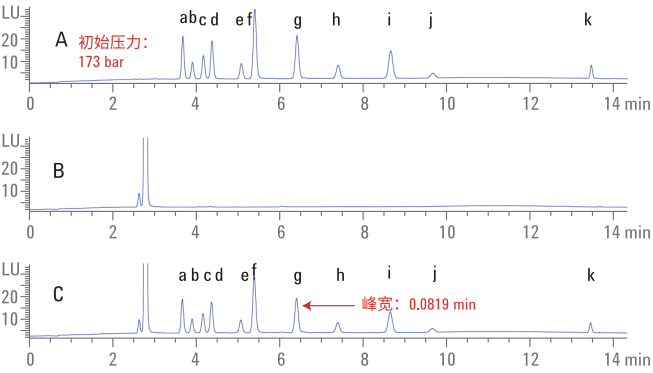


图 2. 分别采用色谱柱 1、2 分析喹诺酮类药物混合标准溶液 (A)、牛奶空白试样 (B)、牛奶空白添加喹诺酮类药物混合标准品试样 (C) 所得色谱图：图谱中 a、b、c、d、e、g、h、i、j 分别代表了诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星、培氟沙星、洛美沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、二氟沙星、噁喹酸，其浓度均为 0.2 μg/mL；f 代表达氟沙星，浓度为 0.06 μg/mL；k 代表氟甲喹，浓度为 0.1 μg/mL

如图 2 所示，本方法比较了 4 μm 和 2.7 μm 薄壳型填料色谱柱的分析结果：

- 4 μm 色谱柱半峰宽比 2.7 μm 色谱柱增加了近 30%，灵敏度有所下降
- 4 μm 色谱柱的压力较 2.7 μm 色谱柱低 45%，更适合在 400 bar 仪器上使用，2.7 μm 色谱柱适合在 600 bar 仪器上使用，可根据不同的仪器配置选择不同色谱柱
- 低柱压和大颗粒填料更耐“脏”样品

本文所采用的薄壳型填料色谱柱相比于传统 5 μm 的全多孔性填料色谱柱，柱效更高，分析速度更快，在多组分复杂分析中体现出明显的优势。根据实验结果得到，在喹诺酮类药物分析中 4 μm 的薄壳型色谱柱相比于 2.7 μm 的薄壳型色谱柱，在满足分离要求的前提下，具有压力更低、更加耐用的优势，因此本文选用 4 μm 薄壳型色谱柱进行后续实验。

通过计算得到，本方法诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星、培氟沙星、洛美沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、二氟沙星、噁喹酸的定量限为 50 μg/kg，达氟沙星的定量限为 15 μg/kg，氟甲喹的定量限为 25 μg/kg。

实验在 100-1600 μg/L 浓度范围内测试了各种喹诺酮类药物的线性，所得结果表明所有化合物在此浓度范围内具有良好的线性相关性，相关系数 R² 均大于 0.999，如表 2 所示。

表 2. 各喹诺酮类药物的回归方程及相关系数

喹诺酮类药物 (4-Quinolones)	回归方程	相关系数 R ²
诺氟沙星 (Norfloxacin)	Y = 270.9X + 0.192	0.999
氧氟沙星 (Ofloxacin)	Y = 100.6X - 0.078	0.999
环丙沙星 (Ciprofloxacin)	Y = 161.2X - 0.015	0.999
培氟沙星 (Pefloxacin)	Y = 267.8X + 0.075	0.999
洛美沙星 (Lomefloxacin)	Y = 107.9X - 0.214	0.999
达氟沙星 (Danofloxacin)	Y = 527.1X + 0.404	0.999
恩诺沙星 (Enrofloxacin)	Y = 358.7X + 0.337	0.999
沙拉沙星 (Sarafloxacin)	Y = 118.3X - 0.114	0.999
二氟沙星 (Difloxacin)	Y = 275.1X + 0.028	0.999
噁喹酸 (Oxilinic acid)	Y = 51.40X + 0.004	0.999
氟甲喹 (Flumequine)	Y = 89.58X - 1.778	0.999

如表 3 所示，诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星、培氟沙星、洛美沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、二氟沙星、噁喹酸在 50-200 μg/kg，达氟沙星在 15-60 μg/kg，氟甲喹在 25-100 μg/kg 的添加浓度水平下，牛奶基质中各药物的空白样品加标回收率均为 79.28%-99.14%，RSD (%) ≤ 7.42 (n = 6)，表明该方法的准确度和精密度完全能满足喹诺酮类药物多残留分析的要求。

表 3. 牛奶基质中各喹诺酮类药物的空白样品加标回收率和 RSD 值 (n = 6)

喹诺酮类药物	添加水平 (μg/kg)	回收率 (%)	RSD 值 (n = 6)
诺氟沙星	50	92.37	3.11
	100	95.66	3.72
	200	91.23	2.64
氧氟沙星	50	89.77	3.12
	100	91.97	3.41
	200	93.58	3.96
环丙沙星	50	92.46	4.12
	100	94.54	4.43
	200	91.75	3.21
培氟沙星	50	89.21	3.87
	100	92.61	2.95
	200	90.42	3.01
洛美沙星	50	88.49	4.73
	100	91.85	3.44
	200	90.64	3.09
达氟沙星	15	83.76	2.91
	30	87.75	3.5
	60	91.08	3.24
恩诺沙星	50	84.09	5.13
	100	88.69	3.68
	200	87.63	6.29
沙拉沙星	50	89.18	3.74
	100	84.21	3.67
	200	81.63	4.94
二氟沙星	50	80.67	3.86
	100	82.82	3.95
	200	79.28	7.42
噁喹酸	50	80.17	3.64
	100	84.56	3.90
	200	86.35	3.27
氟甲喹	25	98.04	4.73
	50	99.14	2.98
	100	93.20	3.17

消耗品订购信息

Agilent Bond Elut Plexa 固相萃取小柱：60 mg，3 mL，
部件号 12109603

Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱：4.6 mm × 100 mm，2.7 μm，
部件号 695975-902

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2016

2016 年 10 月 2 日，中国印刷

5991-7522CHCN



Agilent Technologies