

液相色谱法快速测定鸡肉中氧氟沙星 手性对映体残留量

叶宇飞¹, 刘勇军², 赵 健¹, 吕 燕¹, 吴银良^{1,*}

(1.宁波市农业科学研究院, 浙江 宁波 315040; 2.中国动物疫病预防控制中心, 北京 100125)

摘 要:建立了鸡肉样品中氧氟沙星对映体液相色谱荧光检测 (liquid chromatography fluorescence detector, LC-FLD) 残留量快速分析方法。鸡肉样品经磷酸盐缓冲液提取后, 用C₁₈固相萃取小柱净化, 洗脱液吹干后用流动相复溶即可进行液相色谱分析。分析时采用Leapsil™ C₁₈色谱柱, 以水相 (含2 mmol/L硫酸铜和2.5 mmol/L异亮氨酸, pH 3.5) 和甲醇作为流动相进行梯度分析, 荧光检测器检测, 其中激发波长为297 nm, 发射波长为487 nm, 外标法定量。本方法在5.0、50、100 μg/kg和150 μg/kg 4个添加水平下, 左氧氟沙星对映体平均添加回收率在75.5%~86.1%之间, 批内变异系数在1.97%~4.42%之间, 批间变异系数在3.02%~6.02%之间; 右氧氟沙星对映体平均添加回收率在77.3%~84.9%之间, 批内变异系数在2.15%~4.21%之间, 批间变异系数在3.87%~5.84%之间。方法对两种对映体的检测限均为1.5 μg/kg, 定量限均为5.0 μg/kg。

关键词: 氧氟沙星; 手性对映体; 液相色谱法; 固相萃取

Determination of Residual Ofloxacin Enantiomers in Chicken Muscle by Liquid Chromatography

YE Yu-fei¹, LIU Yong-jun², ZHAO Jian¹, LÜ Yan¹, WU Yin-liang^{1,*}

(1. The Ningbo Academy of Agricultural Sciences, Ningbo 315040, China;

2. The Center for Animal Disease Control and Prevention, P.R. China, Beijing 100125, China)

Abstract: A method was developed for determining residual ofloxacin enantiomers in chicken muscle by liquid chromatography with fluorescence detection. Samples were extracted with phosphate buffer solution. The extract was purified by solid phase extraction (SPE) using a C₁₈ cartridge and the eluent was then dried by nitrogen blowing and dissolved in mobile phase. The analytes were separated on a Leapsil™ C₁₈ column using a mobile phase composed of a mixture of methanol and aqueous solution of (pH 3.5) 2 mmol/L copper sulfate and 2.5 mmol/L isoleucine. Excitation wavelength was 297 nm and emission wavelength was 487 nm. Quantitation was performed by using the external standard calibration method. The average recoveries for the two enantiomers in spiked chicken muscle were 75.5%–86.1% at four fortified levels ranging from 5 to 150 μg/kg, and the intra- and inter-batch coefficients of variation (CVs) were 2.15%–4.21% and 3.87%–5.84%, respectively. The limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were 1.5 and 5.0 μg/kg for the two enantiomers of ofloxacin, respectively.

Key words: ofloxacin; enantiomers; liquid chromatography; solid phase extraction

中图分类号: TS251.7

文献标志码: A

文章编号: 1001-8123 (2014) 05-0025-04

氧氟沙星 (ofloxacin), 又名氟嗟酸, 属于氟喹诺酮类 (fluoroquinolones) 抗菌药, 具有抗菌谱广, 组织穿透性好, 低浓度即呈现较强的杀菌作用及价格低廉等优点, 广泛应用于临床以及畜牧业生产中。然而, 它在动物源性食品中的残留以及引起病原菌的耐药性问题已受到普遍的关注和重视。可现对于评估该药物对健康造成

的危害时, 仅对该药物作为纯的单一化合物来看等, 未考虑该药物是手性药物这一特征。而手性药物不同异构体之间在毒性、致畸、致癌、致突变上往往存在差异, 必然导致对其危害估计不是过高就是过低。现生产中仍然大量使用氧氟沙星外消旋体, 而大量实验表明氧氟沙星在实验动物中的代谢具有立体选择性^[1], 导致氧氟沙星

收稿时间: 2014-03-04

基金项目: 宁波市重大科技攻关项目 (2013C11003)

作者简介: 叶宇飞 (1980—), 男, 农艺师, 学士, 主要从事农产品中农兽药残留分析研究, E-mail: yyfafs@aliyun.com

*通信作者: 吴银良 (1975—), 男, 教授级高级工程师, 博士, 从事农产品中农兽药残留分析研究。

E-mail: wupaddyfield@sina.com



两对映体含量不一致。因此为安全评估该药物对人体健康造成的危害, 首先应建立该药物在动物组织中的对映体残留分析方法。

由于氟喹诺酮类抗生素对动物性食品安全的影响较大, 目前无论国内外对动物性食品中的氟喹诺酮类抗生素残留的分析方法较多, 主要有酶联免疫吸附法^[2-3]、液相色谱法^[4-7]和液相色谱串联质谱法^[8-9]等; 但对生物样品中氧氟沙星对映体水平上的分析方法研究多集中在生物体液, 而对动物组织中的对映体分析报道国内尚未见相关报道。氧氟沙星的手性分离方法主要包括采用手性流动相或衍生的方法以及采用手性色谱柱进行分离^[10-20]。本实验采用手性流动相添加剂法实现了氧氟沙星映体的拆分, 并在参考前人对动物性食品中氟喹诺酮类药物残留分析的基础上, 建立了提取、净化效果较好, 分离较快的鸡肉中氧氟沙星对映体残留量分析方法, 该方法的建立为进一步研究氧氟沙星在对映体水平上的毒性毒理、代谢等奠定了一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

空白鸡肉样品 市购, 实验用肉鸡为健康肉鸡, 体质量0.5 kg左右, 用药前测定是否含氧氟沙星。

氧氟沙星(99%) 德国Dr. Ehrenstorfer公司; 左旋氧氟沙星(99%) 河南赫福莱生物制药有限公司; 甲醇(色谱纯) 美国默克公司; 甲酸(色谱纯) 美国天地有限公司; Bond Elut C₁₈(200 mg³/mL) Varian公司; pH 7.0磷酸盐缓冲液 实验室自制; 其他试剂均为分析纯试剂。

1.2 仪器与设备

UPLC超高效液相色谱仪 美国Waters公司; SIGMA3K15离心机 北京博励行有限公司; Milli-Q超纯水仪 美国Millipore公司。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液的配制

1.3.1.1 标准储备液

称取氧氟沙星和左氧氟沙星标准品或原药各100.0 mg于10 mL容量瓶中, 分别用甲醇定容至刻度, 即成质量浓度1 000 mg/L的标准储备液, -18 ℃条件下保存, 保质期为6个月。

1.3.1.2 标准工作液

用流动相稀释氧氟沙星标准储备液配制质量浓度分别为2.0、10、20、50、100、200 μg/L和500 μg/L的标准工作液, 现配现用。

1.3.2 样品前处理

称取2.0 g鸡肉样品于带盖的50 mL聚四氟乙烯离心

管中, 加入10 mL磷酸盐缓冲液, 然后以10 000 r/min以上的速度均质60 s, 盖上盖子以8 000 r/min的速度离心5 min, 上清液转入另一离心管中, 同样步骤重复提取一次, 合并上清液, 混匀后取10 mL提取液过已经2 mL甲醇、2 mL磷酸盐缓冲溶液依次活化的C₁₈小柱, 待样品溶液流过固相萃取小柱后, 依次用2 mL超纯水和2 mL磷酸盐缓冲溶液淋洗柱子, 待全部溶液过柱后, 抽干C₁₈小柱, 然后用2 mL甲醇洗脱, 洗脱液经50℃水浴氮气吹干后用1.00 mL流动相溶解, 过0.22 μm滤膜后进行液相色谱分析。

1.3.3 仪器条件

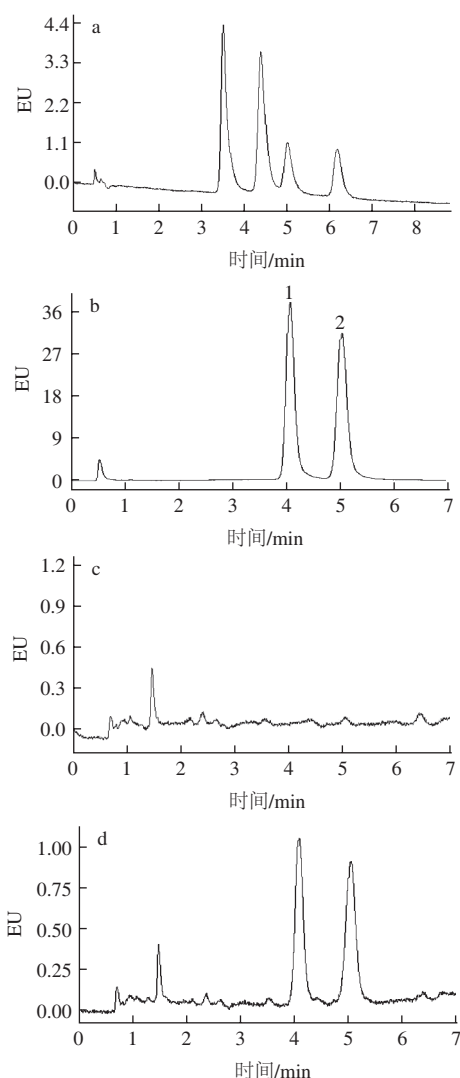
色谱柱Leapsil™ C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm, 2.7 μm); 流动相: pH3.5的2 mmol/L硫酸铜溶液(含2.5 mmol/L异亮氨酸): 甲醇=9:1 (V/V); 流速0.5 mL/min, 柱温30 ℃; 进样量10 μL。激发波长297 nm, 发射波长487 nm。

2 结果与分析

2.1 分离条件的选择和优化

对于氧氟沙星对映体的分离, 研究较多, 按仪器分主要为毛细管电泳手性拆分和高效液相色谱手性拆分, 而应用最广泛最成熟的当属采用手性流动相添加剂法分析氧氟沙星对映体。而当采用手性流动相添加剂法时, Cu²⁺经常为配合离子, 手性氨基酸为配合剂, 手性氨基酸则通常为苯丙氨酸和异亮氨酸。Shao Bing等^[18]曾详细研究了异亮氨酸和硫酸铜溶液的浓度及两者比例对氧氟沙星对映体的分离影响, 确定硫酸铜溶液最佳浓度为4.0 mmol/L, 异亮氨酸最佳浓度为5.0 mmol/L, 然而完全按照Shao Bing等^[18]建立的方法进行分析时每个样品分析时间较长, 需要25 min, 同时荧光检测器(fluorescence detector, FLD)流通池也易堵塞, 为缩短分析时间和解决流通池易堵塞情况, 本研究对色谱柱、硫酸铜和异亮氨酸浓度的浓度进行了选择和优化。

为缩短样品分析时间, 本研究首次尝试采用UPLC对氧氟沙星对映体进行分析。由图1可知, 实验中当色谱柱采用内径较小的Acquity BHE C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)时, 标准溶液色谱图中出现了4个色谱峰, 而采用内径较大的色谱柱Leapsil™ C₁₈(100 mm×2.1 mm, 2.7 μm)时只有2个色谱峰。这一现象目前尚未见相关报道, 而根据已报道的文献分析, 氧氟沙星仅有2个对映体, 因此本实验采用Leapsil™ C₁₈(100 mm×2.1 mm, 2.7 μm)进行后续的流动相优化实验。



图中1和2分别为左氧氟沙星和右氧氟沙星。

图1 氧氟沙星对映体标准溶液 (a, Acquity BHE C₁₈柱, b, LeapsilTM C₁₈柱)、鸡肉空白样品 (c) 和鸡肉添加样品 (d, 0.50 µg/kg) 色谱图

Fig.1 Chromatograms of ofloxacin enantiomers in mixed standard solution (a, Acquity BHE C₁₈ column; b, LeapsilTM C₁₈ column), chicken muscle blank sample (c) and chicken muscle fortified sample (d, at 0.50 µg/kg)

优化时发现降低硫酸铜和异亮氨酸浓度有利于解决荧光检测器流通池易堵塞问题, 因此优化实验时硫酸铜和异亮氨酸的浓度为Shao等^[18]优化浓度的一半, 分别为2 mmol/L和2.5 mmol/L。当固定流动相比例(90:10)和柱温(40 ℃)时, 分离度随流速升高(0.3~0.7 mL/min)而降低(1.55~1.18), 但分析时间逐步缩短; 而柱温对分离度的影响较小, 当固定流动相比例(90:10)和流速(0.3 mL/min)时, 分离度随温度升高(25~45 ℃)略有改善(1.35~1.45)。而改变流动相比例对分离度影响较大, 当固定流速0.3 mL/min和柱温30 ℃时, 流动相中有机相从10%变化到12%时, 分离度从1.4降为0.94。综合

实验结果, 本研究中硫酸铜和异亮氨酸最终浓度分别为2 mmol/L和2.5 mmol/L, 柱温30 ℃, 流动相中水相有机相比比例为90:10, 在此条件下先出峰的为左氧氟沙星, 后出峰的为右氧氟沙星。

2.2 前处理条件的选择

仲锋曾利用C₁₈固相萃取小柱建立了鸡肉中恩诺沙星和环丙沙星的净化方法^[21]。本研究考虑到该净化方法较简单方便, 因此参考该方法对鸡肉中的氧氟沙星进行了净化效果实验, 结果发现氧氟沙星利用该净化方法净化效果较好, 当采用液相色谱荧光检测分析时鸡肉样品中不存在明显的杂质峰干扰。

2.3 线性实验

根据1.3.1.2节配制标准工作溶液, 对氧氟沙星2种对映异构体在2.0~500 µg/L质量浓度范围内以待测物峰面积对质量浓度作图, 所得标准曲线方程分别为 $y=40\,778x+9\,772$ (左氧氟沙星) 和 $y=39\,517x+19\,587$ (右氧氟沙星), 相关系数(R^2)分别为0.999 1和0.999 3, 说明本方法适用于2种氧氟沙星对映体残留量的定量分析。

2.4 回收率、精密度和检出限

从表1可见, 各浓度点平均添加回收率在75.5%~86.1%之间。批内相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为1.97%~4.42%, 批间RSD为3.02%~6.02%, 可见该方法能满足现行药物残留分析的要求。本方法选择5.0 µg/kg添加实验中响应最低样品的信噪比, 并按 R_{SN} 为3计算2种氧氟沙星对映体的检出限均为1.0 µg/kg, 按 R_{SN} 为10计算定量限均为5.0 µg/kg。标准溶液、空白样品和添加样品的色谱图详见图1。

表1 鸡肉中的氧氟沙星对映体添加实验回收率和相对标准偏差 ($n=3$)
Table 1 Mean recoveries and relative standard deviations (RSDs) of ofloxacin enantiomers in chicken muscle ($n=3$)

药物种类	添加量/(µg/kg)	平均回收率/%	批内相对标准偏差/%	批间相对标准偏差/%
左氧氟沙星 (-)-ofloxacin	5	75.5 84.6 80.4	3.02 4.28 4.42	6.02
	50	81.8 85.2 81.2	3.31 3.59 2.15	3.98
	100	77.4 86.1 80.9	2.77 2.31 4.13	4.71
右氧氟沙星 (+)-ofloxacin	150	85.5 84.6 80.4	1.97 2.67 3.32	3.02
	5	77.3 83.2 80.6	2.88 3.97 4.21	5.84
	50	81.3 84.6 83.0	3.65 3.27 2.42	4.36
	100	78.2 84.9 81.2	2.84 2.41 3.59	4.52
	150	84.3 83.7 81.0	2.15 2.84 3.51	3.87

2.5 方法应用

利用该方法进行了氧氟沙星外消旋体在鸡体内氧氟沙星立体选择性降解行为试验, 停药后1 d测定鸡肉中氧氟沙星2种对映体含量, 发现左旋体含量为0.021 µg/g ($n=3$), 右旋体含量为0.012 µg/g ($n=3$), 可见氧氟沙星外消旋体在鸡体内降解存在立体选择性。



3 结论

本研究建立了鸡肉中氧氟沙星对映体的快速测定LC-FLD方法。鸡肉样品经磷酸盐缓冲液提取后,通过C₁₈固相萃取小柱净化,净化后的样品利用手性流动相添加剂法在色谱柱上分离对映体,进行LC-FLD法测定。该方法具有快速、灵敏、准确的特点,利用该方法可为进一步开展氧氟沙星在对映体水平上的毒性毒理、代谢等研究奠定基础。

参考文献:

- [1] GARCIA M A, SOLANS C, CALVO A, et al. HPLC separation and quantification of ofloxacin enantiomers in rabbit plasma. application to pharmacokinetic studies[J]. *Chromatographia*, 2002, 56: 39-42.
- [2] 姜金庆, 杨雪峰, 王自良, 等. 氟喹诺酮类药物多残留间接竞争ELISA检测方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(11): 887-892.
- [3] HUET A C, CHARLIER C, TITTELMIER S A, et al. Simultaneous determination of (fluoro) quinolone antibiotics in kidney, marine products, eggs, and muscle by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)[J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2006, 54(8): 2822-2827.
- [4] 刘媛, 谢孟峡, 丁岚, 等. 高效液相色谱同时测定鸡蛋中4种氟喹诺酮类药物残留[J]. *分析化学*, 2004, 32(3): 352-355.
- [5] PENA A, SILVA L J G, PEREIRA A, et al. Determination of fluoroquinolone residues in poultry muscle in portugal[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 397(6): 2615-2621.
- [6] MOEMA D, NINDI MM, DUBE S. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of fluoroquinolones in chicken liver by high performance liquid chromatography[J]. *Analytical Chimica Acta*. 2012, 730: 80-86.
- [7] HUANG Jingfang, LIN Bo, YU Qiongwei. Determination of fluoroquinolones in eggs using in-tube solid phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography[J]. *Analytical Chimica Acta*. 2006, 384: 1228-1235.
- [8] 李雅丽, 郝晓蕾, 冀宝庆, 等. HPLC-ESI-MS/MS测定动物性食品中19种喹诺酮类药物残留的研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(8): 502-506.
- [9] SHEN J Z, GUO L M, XU F, et al. Simultaneous determination of fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides in chicken muscle by UPLC-MS-MS[J]. *Chromatographia*, 2010, 71(5/6): 383-388.
- [10] 曾苏, 章立, 刘志强. RP-HPLC手性流动相添加剂法分析尿中氧氟沙星对映体[J]. *药学报*, 1994, 29(3): 223-227.
- [11] 黄双英. 氧氟沙星对映体的高效毛细管电泳法手性拆分[J]. *今日药*, 2009, 19(5): 45-47.
- [12] 马骞, 赵明丽, 王柱命, 等. 氧氟沙星片剂和滴眼液中氧氟沙星对映体的毛细管电泳拆分及定量分析[J]. *分析测试技术与仪器*, 2006, 9(2): 84-87.
- [13] 赵燕, 杨兴斌, 李晓晔, 等. 中性环糊精毛细管电泳法手性拆分氧氟沙星对映体的对比[J]. *第四军医大学学报*, 2006, 27(3): 196-198.
- [14] 孙小杰, 邵兵, 董慧茹, 等. 液相色谱测定水样中的氧氟沙星手性对映体[J]. *北京化工大学学报*, 2008, 35(1): 20-23.
- [15] 范柏, 袁雯玮, 杉井笃, 等. 手性HPLC拆分氧氟沙星对映体[J]. *中国药理学杂志*, 1998, 33(11): 693-695.
- [16] 王乃毅, 白小红. 固相萃取-高效液相色谱手性流动相添加剂法测定血浆中氧氟沙星对映体[J]. *山西职工医学院学报*, 2012, 22(1): 1-4.
- [17] JIAO Feiping, CHEN Xiaoqing, JIANG Xinyu. Enantioselective extraction of ofloxacin enantiomers using ester alcohol *L*-tartarate as chiral selector[J]. *Iran Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 2009, 28(1): 7-11.
- [18] SHAO Bing, SUN Xiaojie, ZHANG Jing, et al. Determination of ofloxacin enantiomers in sewage using two-step solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1182: 77-84.
- [19] TIAN M, ROW H S, ROW K H. Chiral separation of ofloxacin enantiomers by ligand exchange chromatography[J]. *Monatshefte fur Chemie*, 2010, 141: 285-290.
- [20] GONG Qiaojuan, QIAO Jinli, DU Liming, et al. Recognition and simultaneous determination of ofloxacin enantiomers by synchronization: 1st derivative fluorescence spectroscopy[J]. *Talanta*, 2000, 53: 359-365.
- [21] 仲锋. 恩诺沙星、环丙沙星在鸡组织中残留量的检测方法研究[J]. *中国兽药杂志*, 1999, 33(4): 5-8.