

杨 勇, 罗 奕, 吴琳琳, 等. 薄层色谱法测定牛奶、蜂蜜中 6 种氟喹诺酮类药物残留[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(10): 380–383.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.122

薄层色谱法测定牛奶、蜂蜜中 6 种氟喹诺酮类药物残留

杨 勇¹, 罗 奕², 吴琳琳², 罗 曼³, 茅向军³, 杨微微², 王偈珩²

(1. 贵阳中医学院, 贵州贵阳 550002; 2. 贵阳医学院, 贵州贵阳 550004; 3. 贵州省食品药品检验所, 贵州贵阳 550004)

摘要:建立动物源性食品牛奶及蜂蜜中诺氟沙星、环丙沙星、丹诺沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、双氟沙星等 6 种氟喹诺酮类药物残留快速筛查的薄层色谱法。该方法中, 样品经 5% 乙酸乙腈提取, 经改进的 QuEChERS 方法净化, 采用薄层色谱法对样品中 6 种氟喹诺酮类药物残留物进行检测。结果表明: 该方法对环丙沙星、恩诺沙星、诺氟沙星、双氟沙星、丹诺沙星、沙拉沙星的检出限分别为 10、10、10、10、2、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 经薄层色谱法检测, 在 15 批牛奶样品中检出 3 批疑似阳性样品, 在 15 批蜂蜜样品中检出 7 批疑似阳性样品; 通过最终质谱确认, 15 批牛奶样品中检出 1 批阳性样品, 15 批蜂蜜样品中检出 2 批阳性样品。该方法耐受性好, 可简单、快速适用于牛奶、蜂蜜中氟喹诺酮类残留的大批量筛选。

关键词: 牛奶; 蜂蜜; 氟喹诺酮类药物; 残留量; 薄层色谱法

中图分类号: TS207.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)10-0380-04

氟喹诺酮类(FQs)系化学合成药物, 因价格低廉、抗菌活性强, 在医学特别是在兽医学中应用广泛。由于致病菌产生的耐药性和某些 FQs 的潜在致癌性质, 其残留问题已引起广泛关注^[1-4]。氟喹诺酮类检测是动物源性食品中药物残留分析的重要研究内容。检测氟喹诺酮类药物残留的方法有微生物法、薄层色谱法、高效液相色谱法、高效液相色谱-质谱检测法等^[5-6], 牛奶、蜂蜜中氟喹诺酮类药物残留检测方法主要为高效液相色谱法和高效液相色谱-质谱法, 运用薄层色谱法进行检测的研究较少。用于检测食品中喹诺酮类药物残留的国家标准 GB 29692—2013《牛奶中喹诺酮类药物残留的测定》和 GB/T 23412—2009《蜂蜜中喹诺酮类药物残留的检测》均采用液相色谱-质谱/质谱法测定氟喹诺酮类残留。由于仪器设备昂贵、检测方法复杂、试验成本高的限制, 该方法在国内普及还需要较长时间。本研究应用近年来在兽药残留检测中应用日趋广泛的分散固相萃取样品前处理净化技术(quickly, easy, cheap, effective, rugged, safe, QuEChERS)^[7-11], 用薄层色谱法对牛奶、蜂蜜中氟喹诺酮类残留进行筛选, 以期找出更为经济简便、更适用于基层部门监管食品安全的氟喹诺酮类药物残留检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

牛奶样品、蜂蜜样品各 15 批, 均为市售。6 种氟喹诺酮类标准品: 恩诺沙星(纯度为 98.50%, 货号为 C 13170000, 批号为 lot: 91111)、沙拉沙星(纯度为 95.50%, 货号为 C

16908000, 批号为 lot: 10407)、双氟沙星(纯度为 97.50%, 货号为 C 12627000, 批号为 lot: 91103)、诺氟沙星(纯度为 99.50%, 货号为 C 15648000, 批号为 lot: 10214)、环丙沙星(纯度为 95.00%, 货号为 C 11668500, 批号为 lot: 00526)、丹诺沙星(纯度为 94.00%, 货号为 C 11960500, 批号为 lot: 00920), 以上标准品均来自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司。

1.2 仪器与试剂

仪器: ATS-4 型自动点样仪[瑞士 CAMAG(卡玛)公司]; TD6M 型医用离心机(长沙平凡仪器有限公司); BT2202S 型电子分析天平(德国 Sanorius 公司); TALBOYS 型涡旋仪(美国亨利特利姆有限公司)。

试剂: 乙腈(色谱纯, 美国天地试剂公司); 冰乙酸(优级纯, 国药集团化学试剂有限公司); 三乙胺(分析纯, 成都市科龙化工试剂厂); *N*-正丙基乙二胺(PSA)(美国 SELECTRA 公司); 正己烷(分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 无水硫酸镁(分析纯, 天津市美琳工贸有限公司); 无水硫酸钠(分析纯, 江苏强盛功能化学股份有限公司); 薄层板(Merck 板, 尺寸为 100 mm × 200 mm)。

1.3 对照品溶液的制备

1.3.1 标准贮备溶液 分别称取恩诺沙星 10.11 mg、沙拉沙星 10.27 mg、双氟沙星 10.22 mg、诺氟沙星 10.89 mg、环丙沙星 10.70 mg、丹诺沙星 10.81 mg, 置于 10 mL 容量瓶中, 加入 20 μL 甲酸和适量甲醇溶解, 最后用甲醇稀释至刻度, 摇匀。分别吸取上述溶液 1 mL 置于 100 mL 容量瓶, 用 0.2% 甲酸水溶液稀释至刻度, 摇匀, 即得恩诺沙星、沙拉沙星、双氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、丹诺沙星浓度分别为 9.958 3、9.907 8、9.964 5、10.835 6、10.165 0、10.161 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准贮备溶液。

1.3.2 混合标准使用溶液 分别吸取恩诺沙星、双氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星标准贮备溶液 1 mL, 沙拉沙星标准贮备溶液 5 mL, 丹诺沙星标准贮备溶液 0.2 mL, 置于同一个 10 mL 量瓶, 用 0.2% 甲酸水溶液稀释至刻度, 摇匀, 即得 0.995 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$

收稿日期: 2015-03-21

基金项目: 贵州省科技计划(编号: 黔科合 SY 字[2012]3061 号)。

作者简介: 杨 勇(1991—), 男, 四川安岳人, 硕士研究生, 主要从事中药及民族药质量控制与新药研究。E-mail: 1044066657@qq.com。

通信作者: 罗 曼, 硕士, 主任药师, 主要从事食品药品质量研究。E-mail: 1327343367@qq.com。

恩诺沙星、4.904 1 $\mu\text{g/mL}$ 沙拉沙星、0.996 4 $\mu\text{g/mL}$ 双氟沙星、1.083 6 $\mu\text{g/mL}$ 诺氟沙星、1.016 6 $\mu\text{g/mL}$ 环丙沙星、0.203 2 $\mu\text{g/mL}$ 丹诺沙星的混合标准使用溶液(临用前现配)。

1.4 供试品溶液的制备

1.4.1 牛奶样品溶液的制备 称取牛奶样品 10 g 于 50 mL 离心管中,加入 5% 乙酸乙腈溶液 15 mL,涡旋 1 min;加入无水硫酸钠 1.5 g 和无水硫酸镁 6 g,涡旋 5 min,4 000 r/min 离心 5 min,取上清液于另 1 个 50 mL 离心管中,加入正己烷 5 mL,涡旋 1 min,分取下层溶液。将上述残渣加入 10 mL 5% 乙酸乙腈溶液中,涡旋 1 min,4 000 r/min 离心 5 min,取上清液经同一份正己烷萃取,合并下层溶液,置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅上蒸干。将上述残渣加入 2 mL 0.2% 甲酸水溶液中,再加入 PSA 净化剂 0.2 g 和无水硫酸镁 0.5 g,涡旋 1 min,4 000 r/min 离心 5 min,上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,备用。

1.4.2 蜂蜜样品溶液的制备 称取蜂蜜样品 5 g,置于 100 mL 离心管中,加入 McIlvaine 缓冲液约 5 mL,涡旋 1 min;加入 5% 乙酸乙腈溶液至 50 mL,涡旋 10 min;加入无水硫酸镁 5 g,涡旋 2 min。5 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液 25 mL 至蒸发皿中于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴蒸干,加 0.2% 甲酸水溶液 2 mL,加入 PSA 净化剂 0.2 g,涡旋 1 min,离心,取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,备用。

1.5 点样

在同一默克薄层板上,距板底边 13 mm 处依次点 6 种氟喹诺酮标准使用溶液、混合对照溶液和供试品溶液各 5 μL ,将溶液点成带状,带状宽度为 3 mm。

1.6 展开及检视

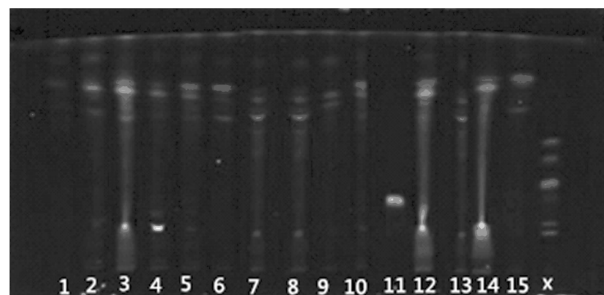
以三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-氨水-水(体积比 15:10:4:2:1)为展开剂,饱和 15 min 后上行展开,取出,晾干,再喷 3% 三氯化铋乙醇溶液,100 $^{\circ}\text{C}$ 烘 1 min,取出,冷至室温,在 365 nm 波长下检视。

2 结果与分析

2.1 样品结果判断

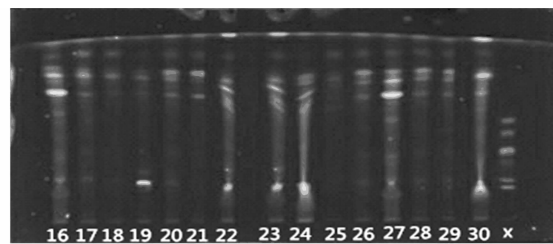
如果供试品色谱中与对照色谱相应的位置上显相同颜色的斑点,被视为疑似阳性样品。试验表明:15 批牛奶样品供试品色谱中,有 3 批样品在与对照品色谱相应位置上显相同颜色的斑点,则视为疑似阳性样品,分别是 2 号、4 号、11 号样

品,其他样品在与对照品色谱相应位置上均未显相同颜色的斑点,初步判断其他 12 批样品中未检出 6 种氟喹诺酮类药物残留物。15 批蜂蜜样品供试品色谱中,有 6 批样品在与对照品色谱相应位置上显相同颜色的斑点,则视为疑似阳性样品,分别是 17 号、19 号、26 号、27 号、28 号、29 号样品,其他 9 批样品在与对照品色谱相应位置上均无显相同颜色的斑点,初步判断其他 9 批样品未检出 6 种氟喹诺酮类药物残留物。从牛奶检测结果图谱(图 1)可见,基质对样品测定结果基本无干扰,说明牛奶样品前处理方法是适用的;从蜂蜜检测结果图谱(图 2)可见,蜂蜜基质对样品测定结果有干扰,说明蜂蜜前处理方法不够完善。



1~15 分别代表 1~15 号样品; X 代表 6 种沙星混合标准使用溶液

图1 15 批牛奶样品检测结果

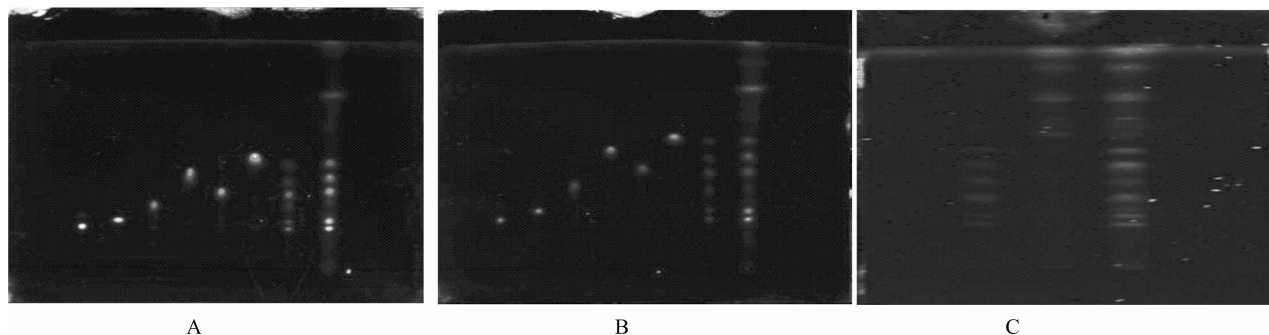


16—30 分别代表 16—30 号样品; X 代表 6 种沙星混合标准使用溶液

图2 15 批蜂蜜样品检测结果

2.2 专属性

取对照品溶液和自制模拟样品溶液用点样仪点样,然后展开及检视。结果表明,该方法专属性强,阴性样品无干扰,适用于牛奶、蜂蜜中 6 种氟喹诺酮类药物的快速筛查。结果见图 3。



A—牛奶, B—蜂蜜, C—阴性样品(第2个点为阴性样品);图A、B中从左至右依次是环丙沙星、丹诺沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、诺氟沙星、双氟沙星等6种氟喹诺酮类混合标准使用溶液和供试品溶液(自制模拟样品);图C 3条带依次为混合对照品、阴性样品、自制模拟样品

图3 专属性考察图谱

2.3 检出限

供试品溶液色谱中待检查的斑点应与相应的对照品溶液或系列对照品溶液的相应斑点比较,颜色(或荧光)不得更深。结果表明,牛奶、蜂蜜中环丙沙星、恩诺沙星、诺氟沙星、双氟沙星的检出限均为 10 μg/kg,丹诺沙星的检出限为 2 μg/kg,沙拉沙星的检出限为 20 μg/kg。

2.4 质谱确认结果

将疑似阳性样品经过质谱确认,结果显示所有疑似阳性样品中有 3 批为阳性样品,其余几批均为假阳性样品。质谱确认结果见表 1,色谱图和质谱图见图 4 至图 9。

表 1 阳性样品测定结果

样品号	样品类别	测出指标成分	峰面积 (mAU · s)	检出量 (μg/kg)
2 号	牛奶	诺氟沙星	69 098	2.49
26 号	蜂蜜	诺氟沙星	199 465	7.81
28 号	蜂蜜	环丙沙星	2 056	1.34

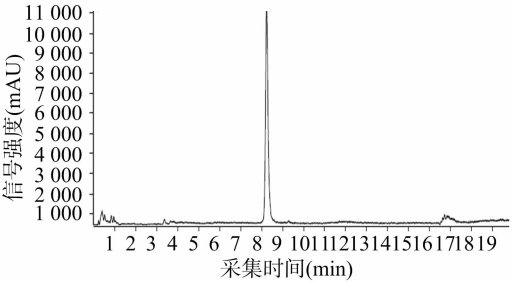


图 4 2号样品色谱结果

2.5 展开剂的考察

分别考察了 5 种展开系统:(1)四氢呋喃-乙酸乙酯-异丙醇-氨水(体积比 4:3:6:3);(2)三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-氨水(体积比 16:10:4:3);(3)三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-氨水(体积比 15:10:4:3);(4)三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-氨水(体积比 15:10:7:3);(5)三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-氨水-水(体积比 15:10:4:2:1)。结果表

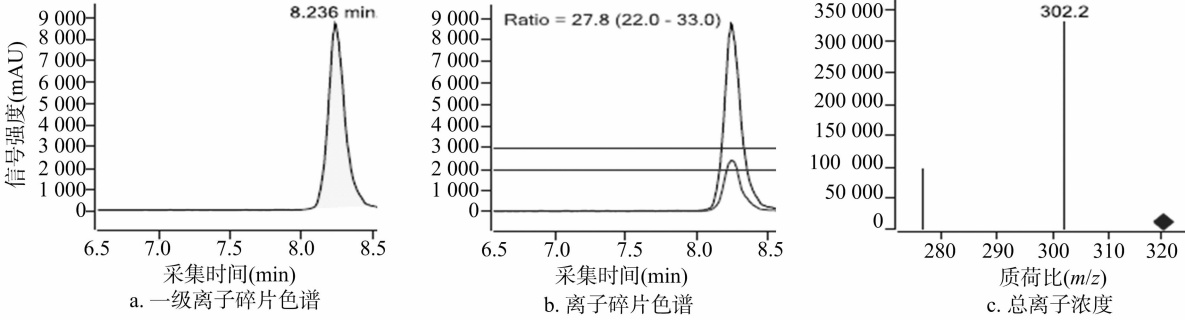


图 5 2号样品质谱结果(诺氟沙星)

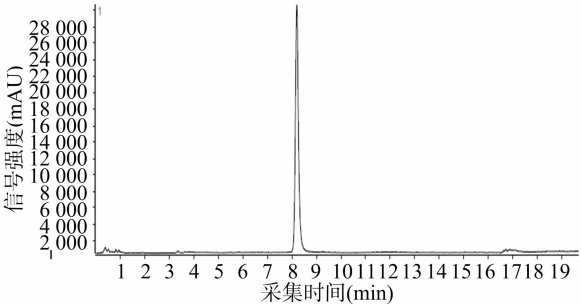


图 6 26号样品色谱结果

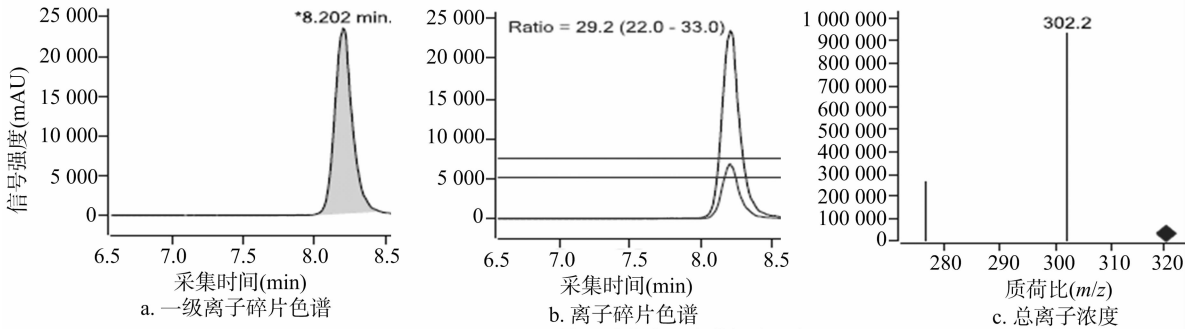


图 7 26号样品质谱结果(诺氟沙星)

2.6 显色剂的考察

分别考察了 3% 三氯化铋乙醇溶液、3% 三氯化铋乙醇溶液 2 种显色剂,在波长 365 nm 下检视。结果显示,3% 三氯化

明,系统 1 中 6 种喹诺酮只呈现 4 个点,其中丹诺沙星和沙拉沙星、恩诺沙星和双氟沙星无法分离;系统 2 中 6 种喹诺酮只呈现 5 个点,其中丹诺沙星和沙拉沙星无法分离;系统 3/系统 4 中丹诺沙星和沙拉沙星无法分离;只有系统 5 中 6 种喹诺酮均能分离,且 R_f 值为 0.2 ~ 0.8。故选择系统 5 为展开剂,饱和 15 min,直立上行展开 8 ~ 10 cm,取出,晾干。在紫外波长 365 nm 下观察 6 种喹诺酮的斑点,并测量 R_f 值进行定性。

铋乙醇溶液显色后在波长 365 nm 下斑点明显易于观察。另外考察了 1%、3%、5%、7% 三氯化铋乙醇溶液的显色效果,结果显示,3% 三氯化铋乙醇溶液显色后在波长 365 nm 下斑

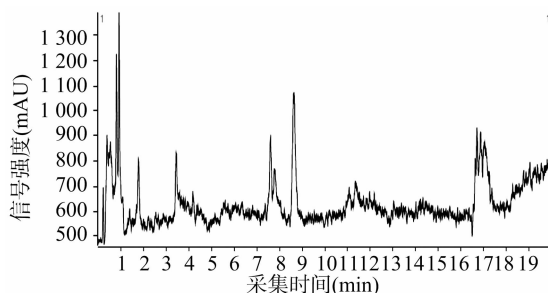


图8 28号样品色谱结果

点明显易于观察、无扩散。故选择 3% 三氯化铋乙醇溶液作为最终显色剂。

2.7 薄层板的选择

在选定条件下,分别运用国产高效硅胶 G 预制板、国产普通硅胶 G 预制板、自制板、H 板、Merck 板,观察分离效果。结果表明,在 Merck 板中的分离效果优于其他薄层板,斑点清晰,条带无扩散,因此选择 Merck 板进行薄层鉴别。

2.8 耐受性考察

用不同浓度的硫酸溶液来控制薄层板的相对湿度,观察

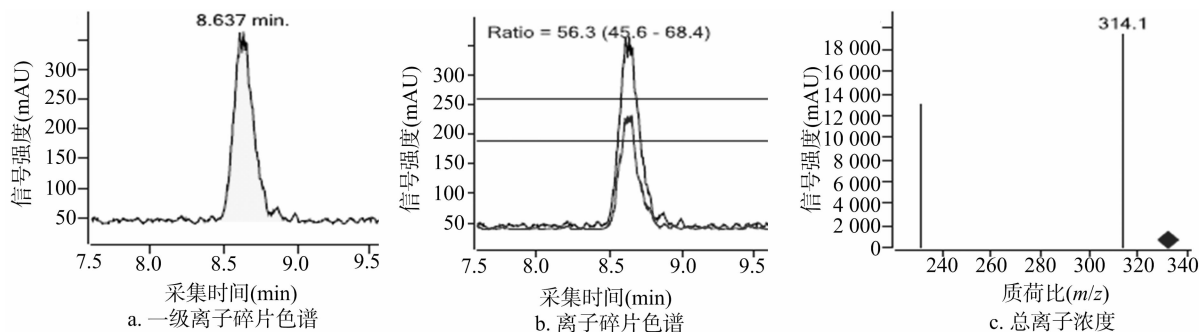


图9 28号样品质谱结果(环丙沙星)

展开剂在 5 种湿度下的展开情况。结果显示,湿度为 32% ~ 72% 时,均能获得较好的分离效果。分别在高温(40℃)、室温(20℃)、低温(4℃)环境下考察温度对展开效果的影响,发现在各温度条件下均能获得较好的分离效果。

2.9 净化剂及其用量选择

目前对于氟喹诺酮类药物残留的净化大多数选择固相萃取。但是此方法操作步骤繁琐、费用较高且回收率普遍偏低。本研究对近年来在农药、兽药残留应用广泛的样品前处理技术 QuEChERS 进行了探索。目前分散固相萃取技术常用的吸附剂有 C18、NH₂、PSA、PAX 等 4 种,根据牛奶基质特点,选取 C18、PSA 比较其净化效果及其对目标物的影响。试验表明,2 种吸附剂对目标物的影响没有明显区别,但 C18 对牛奶中蛋白质和蜂蜜中糖提取物净化效果有限,故采用 PSA 作为净化剂。比较 0、25、50、75、100、150、200 mg/mL PSA 下的净化效果,发现过量使用吸附剂会吸附目标化合物,吸附剂使用较少时净化效果不佳,当吸附剂用量为 100 mg/mL 时目标物几乎无损失,且净化效果较好。因此选择 PSA 净化剂用量为 100 mg/mL。

3 结论

本研究建立了牛奶、蜂蜜中诺氟沙星、环丙沙星、丹诺沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、双氟沙星等 6 种氟喹诺酮类的快速检测方法,即薄层鉴别法。本方法简单、快速,灵敏度高,检出限均可满足兽药残留筛查检测要求。本方法为牛奶、蜂蜜中氟喹诺酮类药物残留监测提供了简单、快速的前处理和检测手段,适用于大批量牛奶、蜂蜜样品中氟喹诺酮类药物残留的筛选。本方法也适合其他对象中该类兽药残留的监测,为食品安全快速检测研究提供了研究基础。

参考文献:

- [1] 蒋 锦,刘明亮. 氟喹诺酮类抗菌药的安全性[J]. 国外医药:抗生素分册,2003(5):226-231.
- [2] 毛浩玉,游雪甫. 喹诺酮类抗菌药不良反应及其机制研究现状[J]. 国外医药:抗生素分册,2004,25(1):23-26.
- [3] Snyder R D, Cooper C S. Photogenotoxicity of fluoroquinolones in Chinese hamster V79 cells: dependency on active topoisomerase II[J]. Photochemistry and Photobiology, 1999, 69(3):288-293.
- [4] 郑 晶,黄晓蓉,郑俊超,等. 微生物抑制法与酶联免疫法检测鲢鱼中喹诺酮类药物残留的比较研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(1):79-81.
- [5] 李俊锁,邱月明,王 超,等. 兽药残留分析[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002:257-258.
- [6] 刘波静. 4 种氟喹诺酮类药物在肉鸡组织中残留的研究[J]. 中国畜牧兽医,2007,34(1):112-115.
- [7] 赵维国,安 蓉,霍润兰,等. 食品中抗生素和农药残留分析:用于 LC-MS 分析的 SPE 样品前处理方法[J]. 现代科学仪器, 2005, 11(1):10-14.
- [8] 乔凤霞,孙汉文,刘广宇,等. 基质固相分散-牛奶、蜂蜜中喹诺酮的多残留分析[J]. 河北大学学报:自然科学版,2008,28(6):620-624.
- [9] 张 伟,张明霞,艾 霞,等. 高效液相色谱法同时测定猪肌肉中氟喹诺酮类和磺胺类药物残留[J]. 黑龙江畜牧兽医,2014,4(7):185-188.
- [10] 刘 博,薛南冬,杨 兵,等. 高效液相色谱-荧光检测法同时分析鸡粪中六种氟喹诺酮类抗生素[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(5):1050-1056.
- [11] 江 森,韩宏超,郭文欣,等. 动物性食品中喹诺酮类药物残留检测方法研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2014(2):87-88.