



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102081078 A

(43) 申请公布日 2011.06.01

(21) 申请号 201110045429.9

(22) 申请日 2011.02.24

(71) 申请人 北京吉天仪器有限公司

地址 100016 北京市朝阳区酒仙桥东路1号
6座西4层北京吉天仪器有限公司

(72) 发明人 赵萍 于辉

(74) 专利代理机构 北京双收知识产权代理有限公司 11241

代理人 王玉松

(51) Int. Cl.

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/06 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

动物性食品中四种氟喹诺酮类药物残留量的测定方法

(57) 摘要

本发明动物性食品中四种氟喹诺酮类药物残留量的测定方法涉及一种测定动物性食品中药物残留量的液相色谱法。其目的是为了提供一种操作简单,快速,自动化程度高,萃取效率高,回收率和重复性好的测定方法。本发明动物性食品中四种氟喹诺酮类药物残留量的测定方法包括以下步骤:样品制备;样品前处理;准确称取样品,与硅藻土混和均匀,转移至萃取池中,将萃取池放置于快速溶剂萃取仪上进行萃取,所得到的提取液中加入正己烷和乙醚去除脂类杂质,剧烈振荡后静止分层,弃去正己烷-乙醚层,再重复操作两次,下层溶液转入浓缩瓶中,在旋转蒸发仪中减压旋蒸至干,以流动相溶解残渣,溶液经滤膜过滤供 HPLC 分析;标准溶液的配制;高效液相色谱测定。

1. 一种动物性食品中四种氟喹诺酮类药物残留量的测定方法,包括以下步骤:

a、样品制备:将样品绞碎,冷冻保存;

b、样品前处理:准确称取样品,与硅藻土混和均匀至样品没有结块,转移至底部放一层纤维滤纸的萃取池中,将萃取池放置于快速溶剂萃取仪上进行萃取,所得到的提取液中加入正己烷和乙醚去除脂类杂质,剧烈振荡后静止分层,弃去正己烷-乙醚层,再加入正己烷和乙醚重复操作两次,下层溶液转入浓缩瓶中,在水浴 40℃ 的旋转蒸发仪中减压旋蒸至干,以流动相溶解残渣,溶液经滤膜过滤供 HPLC 分析;

c、标准溶液的配制:准确称取诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星标准品,将其一起溶于 0.03mol/L 氢氧化钠溶液中,配成同时含有上述四种标准品且其浓度均为 1mg/ml 的混合标准储备液,2℃~8℃ 避光保存,临用前准确量取上述混合标准储备液,用流动相稀释成系列梯度的标准工作液,低温条件下避光保存,当天使用;

d、高效液相色谱测定:吸取配制好的不同浓度的标准工作液,注入配有荧光检测器 FLD 串联紫外检测器 UV 的高效液相色谱仪;

e、残留量测定结果的计算:以保留时间进行氟喹诺酮类药物的定性分析,以峰面积进行氟喹诺酮类药物的定量分析,用外标法计算结果;

所述流动相的配制:先配制 0.05mol/L 的磷酸水溶液,用三乙胺将其调 pH 至 2.4,取 0.05mol/L 磷酸溶液/三乙胺、乙腈按体积比 82:18 的比例配制流动相。

2. 根据权利要求 1 所述的动物性食品中四种氟喹诺酮类药物残留量的测定方法,其特征在于:所述步骤 a 中的冷冻保存条件是 -18℃。

3. 根据权利要求 1 所述的动物性食品中四种氟喹诺酮类药物残留量的测定方法,其特征在于:所述步骤 b 中的样品前处理,硅藻土与样品的质量比例是 (1~3):1;正己烷浓度为每克样品中加入 3~5ml 正己烷,乙醚浓度为每克样品中加入 1~3ml 乙醚;快速溶剂萃取仪参数设置为:萃取溶剂:体积份数 8% 的氨水乙腈,温度:80℃,压力:10.0MPa,加热时间:5min,静态时间:5min,冲洗体积:萃取池体积的 60%,氮气吹扫时间:60s,静态循环次数:1 次;减压旋蒸时真空度为 -0.096MPa;滤膜孔径为 0.45 μm。

4. 根据权利要求 1 所述的动物性食品中四种氟喹诺酮类药物残留量的测定方法,其特征在于:所述步骤 c 中系列梯度的标准工作液为 0.01、0.02、0.05、0.1 和 0.2mg/L。

5. 根据权利要求 1 所述的动物性食品中四种氟喹诺酮类药物残留量的测定方法,其特征在于:所述步骤 d 中采用的高效液相色谱条件为:基质为 B 型超高纯球形硅胶的 C18 液相色谱柱,规格为 4.6mm×250mm×5 μm,硅胶纯度>99.999%,柱温:15~25℃;流动相流速为 0.8mL/min,进样量为 20 μL;荧光检测器的激发波长为 265nm,发射波长为 478nm;紫外检测器波长为 271nm。

6. 根据权利要求 1 至 5 所述之一的动物性食品中四种氟喹诺酮类药物残留量的测定方法,其特征在于:所述快速溶剂萃取仪选用北京吉天仪器有限公司 APLE2000 快速溶剂萃取仪。

动物性食品中四种氟喹诺酮类药物残留量的测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种动物性食品中兽药残留量的测定方法,特别是涉及一种用于同时测定动物性食品中诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星四种氟喹诺酮类药物残留量的测定方法。

背景技术

[0002] 氟喹诺酮类药物属于人工合成的抗菌药物,广泛使用于防治水产动物的细菌性疾病,也常用于池塘与水体的消毒,有时还作为饲料添加剂促进动物生长,提高生长速度与产量。但这种药物在兽医临床广泛和大量的使用必然会导致其在动物性食品中的残留,如果不加以控制会严重危害人类的健康;影响我国动物性食品的出口,造成巨大的经济损失。我国和欧盟都已制定了多种氟喹诺酮类药物在动物组织中的最高残留限量。【农业部 1025 号公告-14-2008 动物性食品中氟喹诺酮类药物残留检测高效液相色谱法】规定了动物性食品中的氟喹诺酮类药物的测定方法,为该类兽药残留量的检测提供了分析依据。但该法在进行样品前处理采用磷酸盐缓冲溶液匀浆振荡提取,然后离心收集上清液,所得上清液仍需用固相萃取的方法进行净化。操作步骤繁杂,时间长,不能自动化。

发明内容

[0003] 本发明要解决的技术问题是提供一种操作简单,快速,自动化程度高,萃取效率高,回收率和重复性好的动物性食品中四种氟喹诺酮类药物残留量的测定方法。

[0004] 本发明动物性食品中四种氟喹诺酮类药物残留量的测定方法,包括以下步骤:

[0005] a、样品制备:将样品绞碎,冷冻保存;

[0006] b、样品前处理:准确称取样品,与硅藻土混和均匀至样品没有结块,转移至底部放一层纤维滤纸的萃取池中,将萃取池放置于快速溶剂萃取仪上进行萃取,所得到的提取液中加入正己烷和乙醚去除脂类杂质,剧烈振荡后静止分层,弃去正己烷-乙醚层,再加入正己烷和乙醚重复操作两次,下层溶液转入浓缩瓶中,在水浴 40℃ 的旋转蒸发仪中减压旋蒸至干,以流动相溶解残渣,溶液经滤膜过滤供 HPLC 分析;

[0007] c、标准溶液的配制:准确称取诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星标准品,将其一起溶于 0.03mol/L 氢氧化钠溶液中,配成同时含有上述四种标准品且其浓度均为 1mg/ml 的混合标准储备液,2℃~8℃ 避光保存,临用前准确量取上述混合标准储备液,用流动相稀释成系列梯度的标准工作液,低温条件下避光保存,当天使用;

[0008] d、高效液相色谱测定:吸取配制好的不同浓度的标准工作液,注入配有荧光检测器 FLD 串联紫外检测器 UV 的高效液相色谱仪;

[0009] e、残留量测定结果的计算:以保留时间进行氟喹诺酮类药物的定性分析,以峰面积进行氟喹诺酮类药物的定量分析,用外标法计算结果;

[0010] 所述流动相的配制:先配制 0.05mol/L 的磷酸水溶液,用三乙胺将其调 pH 至 2.4,取 0.05mol/L 磷酸溶液/三乙胺、乙腈按体积比 82:18 的比例配制流动相。

[0011] 本发明动物性食品中四种氟喹诺酮类药物残留量的测定方法,其中所述步骤 a 中的冷冻保存条件是 -18°C 。

[0012] 本发明动物性食品中四种氟喹诺酮类药物残留量的测定方法,其中所述步骤 b 中的样品前处理,硅藻土与样品的质量比例是 $(1 \sim 3) : 1$;正己烷浓度为每克样品中加入 $3 \sim 5\text{ml}$ 正己烷,乙醚浓度为每克样品中加入 $1 \sim 3\text{ml}$ 乙醚;快速溶剂萃取仪参数设置为:萃取溶剂:体积份数 8% 的氨水乙腈,温度: 80°C ,压力: 10.0MPa ,加热时间: 5min ,静态时间: 5min ,冲洗体积:萃取池体积的 60%,氮气吹扫时间: 60s ,静态循环次数:1 次;减压旋蒸时真空度为 -0.096MPa ;滤膜孔径为 $0.45\ \mu\text{m}$ 。

[0013] 本发明动物性食品中四种氟喹诺酮类药物残留量的测定方法,其中所述步骤 c 中系列梯度的标准工作液为 0.01 、 0.02 、 0.05 、 0.1 和 0.2mg/L 。

[0014] 本发明动物性食品中四种氟喹诺酮类药物残留量的测定方法,其中所述步骤 d 中采用的高效液相色谱条件为:基质为 B 型超高纯球形硅胶的 C18 液相色谱柱,规格为 $4.6\text{mm} \times 250\text{mm} \times 5\ \mu\text{m}$,硅胶纯度 $> 99.999\%$,柱温: $15 \sim 25^{\circ}\text{C}$;流动相流速为 0.8mL/min ,进样量为 $20\ \mu\text{L}$;荧光检测器的激发波长为 265nm ,发射波长为 478nm ;紫外检测器波长为 271nm 。

[0015] 本发明动物性食品中四种氟喹诺酮类药物残留量的测定方法,其中所述快速溶剂萃取仪选用北京吉天仪器有限公司 APLE2000 快速溶剂萃取仪。

[0016] 本发明动物性食品中四种氟喹诺酮类药物残留量的测定方法利用快速溶剂萃取仪在高温高压下萃取动物性食品中氟喹诺酮类药物,萃取液经净化,进高效液相色谱荧光检测器 (FLD) 串联紫外检测器 (UV) 进行分析测定。快速溶剂萃取法样品前处理过程简单,整个操作自动化程度高,荧光检测器 (FLD) 串联紫外检测器 (UV) 测定准确、灵敏度高、重复性好。

附图说明

[0017] 图 1 是诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星标准品荧光色谱图;

[0018] 图 2 是诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星标准品紫外色谱图。

具体实施方式

[0019] 本发明动物性食品中四种氟喹诺酮类药物残留量的测定方法包括以下步骤:

[0020] 标准溶液的配制:准确称取诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星标准品,将其一起溶于 0.03mol/L 氢氧化钠溶液中,配成同时含有上述四种标准品且其浓度均为 1mg/ml 的混合标准储备液, $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 避光保存,临用前准确量取上述混合标准储备液,用流动相稀释成浓度分别为 0.01 、 0.02 、 0.05 、 0.1 和 0.2mg/L 的标准工作液, 4°C 条件下避光保存,当天使用。流动相的配制:先配制 0.05mol/L 的磷酸水溶液,用三乙胺将其调 pH 至 2.4,取 0.05mol/L 磷酸溶液 / 三乙胺、乙腈按体积比 $82 : 18$ 的比例配制流动相。

[0021] 高效液相色谱测定:吸取配制好的不同浓度的标准工作液,注入配有荧光检测器 FLD 串联紫外检测器 UV 的高效液相色谱仪。高效液相色谱条件为:基质为 B 型超高纯球形硅胶的 C18 液相色谱柱,规格为 $4.6\text{mm} \times 250\text{mm} \times 5\ \mu\text{m}$,硅胶纯度 $> 99.999\%$,柱温: 15°C ;流动相流速为 0.8mL/min ,进样量为 $20\ \mu\text{L}$;荧光检测器的激发波长为 265nm ,发射波长为

478nm;紫外检测器波长为 271nm。

[0022] 残留量测定实施例 1:

[0023] 测定 8 个白鱼样品,将样品绞碎,于 -18℃ 条件下储存。

[0024] 样品前处理:准确称取 1.0g 解冻后的样品,同 1.5g 硅藻土一起置于研钵中,研磨至样品没有明显结块,将样品置于底部放一层纤维滤纸的 11mL 萃取池中,萃取条件为:用体积份数 8% 的氨水乙腈作为提取试剂,温度 80℃,压力 10MPa,加热 5min,静态提取 5min,循环 1 次,淋洗体积为 60% 的萃取池体积,用乙腈快速冲洗样品,氮气吹扫收集全部提取液。所得提取液中加入 3ml 正己烷和 1ml 乙醚去除脂类杂质,振荡后静止分层,弃去正己烷-乙醚层,重复操作两次,下层溶液转入浓缩瓶中,在水浴 40℃ 的旋转蒸发仪中减压旋蒸,真空度 -0.096MPa,浓缩至干。以流动相溶解残渣,并准确定容至 2mL,溶液经 0.45 μm 滤膜过滤供 HPLC 分析。快速溶剂萃取仪选用北京吉天仪器有限公司 APLE2000 快速溶剂萃取仪。

[0025] 残留量测定结果的计算:以保留时间进行氟喹诺酮类药物的定性分析,以峰面积进行氟喹诺酮类药物的定量分析,用外标法计算结果,结果在 8 份白鱼样品中均未检出含有 4 种氟喹诺酮类药物残留。

[0026] 重复性和回收率测定:

[0027] 采用阴性白鱼肉样品(四种氟喹诺酮类药物均无检出)进行测定,以 3 倍信噪比确定分析物的检测限,以 10 倍信噪比确定分析物的定量限,结合回收率和样品量,方法的定量检出限为 4.3-10.0 μg/kg,采用样品中添加标准溶液的方法,在同样的样品处理条件下对四种氟喹诺酮类药物进行加标回收率实验,结果见表 2。

[0028] 表 1 液相色谱法检测四种氟喹诺酮类药物的线性范围、相关系数、检出限和定量限

[0029]

组分名称	线性范围	相关系数	检出限 (μg/Kg)	定量限 (μg/Kg)
诺氟沙星	10-200	0.9996	1.3	4.3
环丙沙星	10-200	0.9997	2.7	9.0
恩诺沙星	10-200	0.9997	1.5	5.0
沙拉沙星	10-200	0.9997	3.0	10.0

[0030] 表 2 白鱼肉中氟喹诺酮类药物的回收率及精密度试验结果 (n = 5)

[0031]

标准物质	加标水平			
	25 $\mu\text{g}/\text{kg}$		50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
	平均回收率 (%)	RSD (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
诺氟沙星	88.5	3.0	90.5	2.7
环丙沙星	83.6	4.1	88.7	3.5
恩诺沙星	90.3	2.9	95.6	2.1
沙拉沙星	82.7	3.8	89.2	3.6

[0032] 残留量测定实施例 2 :

[0033] 测定 10 个牛肉样品,将样品绞碎,于 -18°C 条件下储存。

[0034] 样品前处理 :准确称取 1.0g 解冻后的样品,同 1.5g 硅藻土一起置于研钵中,研磨至样品没有明显结块,将样品置于底部放一层纤维滤纸的 11mL 萃取池中,萃取条件为 :用体积份数 8% 的氨水乙腈作为提取试剂,温度 80°C ,压力 10MPa,加热 5min,静态提取 5min,循环 1 次,淋洗体积为 60% 的萃取池体积,用乙腈快速冲洗样品,氮气吹扫收集全部提取液。所得提取液中加入 3ml 正己烷和 1ml 乙醚去除脂类杂质,振荡后静止分层,弃去正己烷-乙醚层,重复操作两次,下层溶液转入浓缩瓶中,在水浴 40°C 的旋转蒸发仪中减压旋蒸,真空度 -0.096MPa ,浓缩至干。以流动相溶解残渣,并准确定容至 2mL,溶液经 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤供 HPLC 分析。快速溶剂萃取仪选用北京吉天仪器有限公司 APLE2000 快速溶剂萃取仪。

[0035] 残留量测定结果的计算 :以保留时间进行氟喹诺酮类药物的定性分析,以峰面积进行氟喹诺酮类药物的定量分析,用外标法计算结果,结果在 1 份牛肉样品中检出含有环丙沙星 $105\mu\text{g}/\text{kg}$,其他牛肉样品未检出氟喹诺酮类药物残留。

[0036] 重复性和回收率测定 :

[0037] 采用阴性牛肉样品 (四种氟喹诺酮类药物均无检出) 进行测定,采用样品中添加标准溶液的方法,在同样的样品处理条件下对四种氟喹诺酮类药物进行加标回收率实验,结果见表 3。

[0038] 表 3 牛肉中氟喹诺酮类药物的回收率及精密度试验结果 ($n = 5$)

[0039]

标准物质	加标水平			
	25 $\mu\text{g}/\text{kg}$		50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
	平均回收率 (%)	RSD (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
诺氟沙星	89.6	3.1	92.5	2.5
环丙沙星	86.5	3.8	90.7	3.1
恩诺沙星	92.6	3.2	96.5	1.8
沙拉沙星	80.1	3.5	92.3	3.0

[0040] 以上所述的实施例仅仅是对本发明的优选实施方式进行了描述,并非对本发明的范围进行限定,在不脱离本发明设计精神的前提下,本领域普通技术人员对本发明的技术方案作出的各种变形和改进,均应落入本发明权利要求书确定的保护范围内。

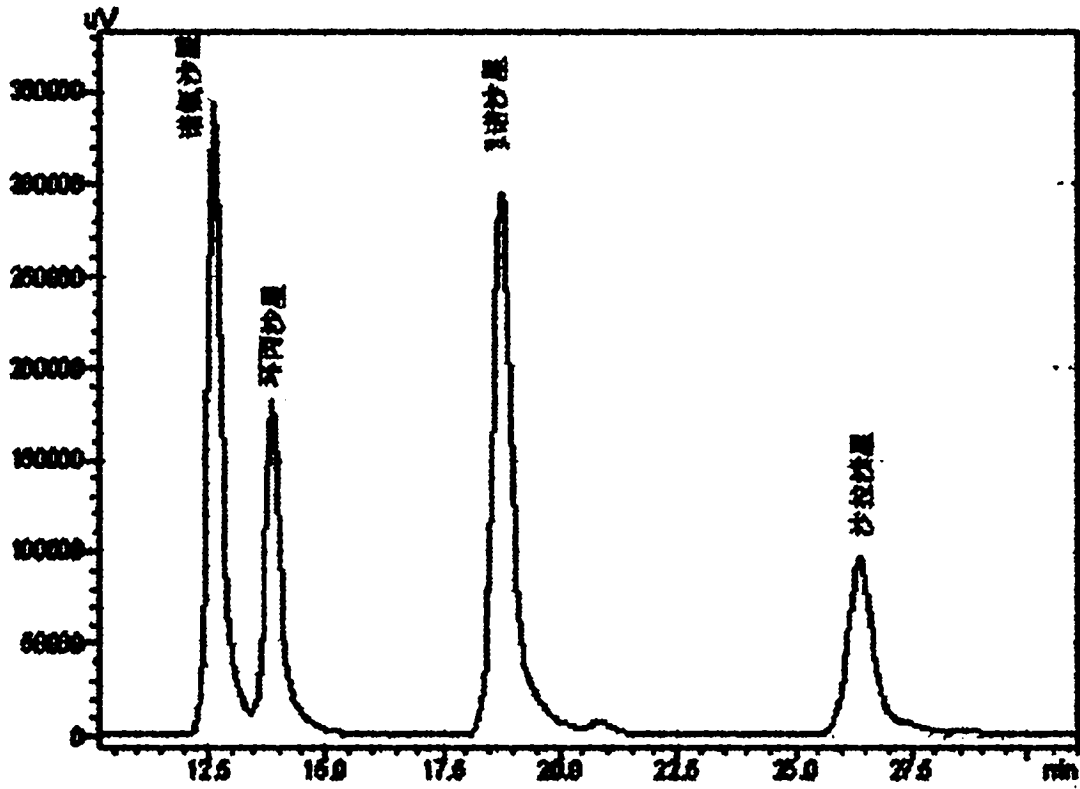


图 1

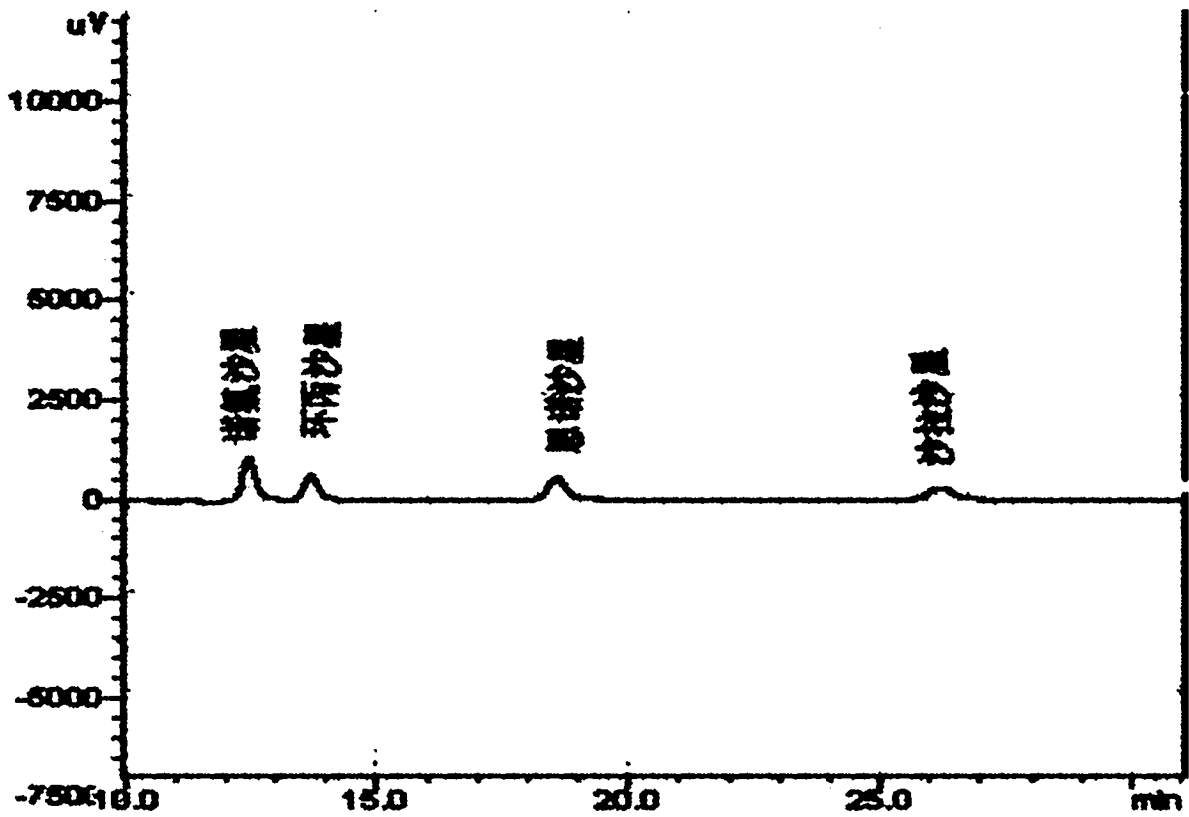


图 2