氟喹诺酮类兽药残留检测方法研究进展

王 蕊, 廖晓萍, 刘雅红
(华南农业大学兽医学院,广东 广州 510642)

摘 要:氟喹诺酮类药物是一类广谱高效抗菌药,临床上广泛用于动物和人类的各种感染性疾病的治疗。综述了氟喹诺酮类药物的残留检测方法,为进一步开展该药残留检测的研究和监测提供借鉴。

关键词:氟喹诺酮; 残留; 微生物法; 色谱分析法; 免疫分析法
中图分类号:S859.84 **文献标识码**:A **文章编号**:1004-874X(2010)10-0041-03

氟喹诺酮类(Fluoroquinolones,FQNs)药物是一类人工合成的广谱抗菌药,其开发始于20世纪80年代。FQNs药物具有抗菌谱广、抗菌作用强、体内分布广泛、组织药物浓度高、蛋白结合率低、使用方便、不良反应小及价格低廉等特点,20余年来已成为发展最快的化学合成抗菌药物,在临床上广泛用于动物和人类的各种感染性疾病的治疗。随着在食品动物的广泛应用,其残留问题已引起了人们广泛关注。FQNs类药物残留不但对人体有直接的危害,更为严重的是致病菌对其耐药性正逐渐增强,从而不利于该类药物治疗人类相关疾病。目前已发现某些FQNs具有潜在致癌性,各国政府对FQNs残留检测的研究都非常重视,各种分析方法得以发展和应用,主要有微生物法、色谱法、免疫分析法等。

1 微生物法

微生物法适用于对畜禽组织中的抗菌药物进行快速筛选检验,通常的操作方法是将组织和抗微生物药物均匀分散到琼脂培养皿中抑制微生物的生长,该方法虽然能检测高浓度的残留,但检测限高于样品所规定的最高残留限量(MRLs)。

1998年Okerman[1]报道了用改进的欧洲四平皿法(four-plate test,FPT),检测市场上零售肉中恩诺沙星和环丙沙星的残留。邢应寿等[2]以藤黄微球菌为工作菌建立了检测肉鸡组织中环丙沙星残留的微生物法,各组织样品中的检出限为25~75 μg/kg。

2 色谱分析法

2.1 高效液相色谱法(HPLC)

HPLC是现代分离测定的重要手段。采用高效色谱柱、高压泵、高灵敏度的检测器、柱前或柱后衍生化技术以及计算机联用等,大大提高了液相色谱的检测效率、灵敏度、速度和操作自动化程度,在残留检测方面得到了广泛的应用。但亦有溶剂消耗量大、色谱柱价格较贵、存在环境污染等缺点。

Roybal等[3]用荧光HPLC检测了鲶鱼、虾、鲑鱼组织中的环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星和二氟沙星残留量。将鱼组织用酸化乙醇提取,在阳离子交换固相萃取柱中离析,甲醇洗脱,配荧光检测器的LC分析。流动相为乙腈-2%醋酸(16:84),激发波长278 nm,发射波450 nm。检测限可达20 μg/kg,回收率为56%~93%。刘媛等[4]建立了固相萃取-反相高效液相色谱同时分析鸡蛋样品中4种FQNs残留量的方法。对鸡蛋样品的提取及其在C18固相萃取柱上的净化条件进行了研究,采用荧光检测器检测,外标法定量。鸡蛋样品中4种沙星的加标回收率为78.1%~95.7%;相对标准偏差(*RSD*)为4.1%~16.2%。环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星的最低检出限(LOD)为10 μg/kg;达氟沙星的LOD为2 μg/kg。Marilyn等[5]采用高效液相色谱-荧光法(HPLC-FLD)法同时检测了鸡的肌肉组织中5种FQNs(甲达沙星、环丙沙星、恩诺沙星、二氟沙星、沙拉沙星)和3种四环素类药物,检测限分别达到0.5~5.0 μg/kg,能够满足各国和组织对FQNs的残留限量标准。研究达到了较高的样品回收率和较低的检测限,而且试验重现性好。李海燕等[6]报道了HPLC-FLD同时检测鸡蛋中9种喹诺酮和氟喹诺酮类药物(噢啉酸、氟甲喹、麻保沙星、诺氟沙星、甲磺酸培氟沙星、单诺沙星、恩诺沙星、二氟沙星、沙拉沙星)。样品经PBS提取,HLB小柱净化,用不同比例的甲醇-水洗涤洗脱,检测麻保沙星的定量限(LOQ)为2 μg/kg,其他药物的LOQ均为1 μg/kg。申京宇等[7]利用超临界流体萃取(Supercritical Fluid Extraction, SPE)与HPLC联用,同时检测了鸡肉中4种FQNs(氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星)。优化了SPE萃取的适宜条件:温度80℃,系统压力300 kg/cm^2,总流速3 mL/min,萃取时间30 min,夹带剂甲醇的比率为30%。萃取样品用HPLC-FLD(Ex=290 nm,Em=455 nm)外标法定量。检测限为10~25 μg/kg,平均加标回收率为56.6%~94.2%,相对标准偏差在1.4%~14.1%范围。

目前,各国对于FQNs药物残留的检出限要求越来越低。HPLC虽然检测结果稳定,具有较好的灵敏度和回收率,但是由于方法和仪器自身的限制,检出限难以进一步降低,而且HPLC对于FQNs的多残留检测效果不好。

2.2 液相质谱联用法(LC-MS)

液质联用技术结合了色谱、质谱两者的优点。质谱作为理想的色谱检测器,不仅特异性强,而且灵敏度极高,在FQNs药物的残留分析中,以LC-MS作为检测手段愈加广泛。

Toussaint等[8]采用LC-MS/MS对猪肾中11种喹诺酮类药物同时定量和确证,最低检出限小于或等于50 μg/kg,低于欧盟规定的MRL。陈笑梅等[9]建立了液相色谱串联质

收稿日期:2010-04-25
基金项目:国家"十一五"科技支撑计划项目(2006BAD31B01);广东省农业科技重大专项(2007B080401018,2008A080401008)
作者简介:王蕊(1983-),女,硕士,E-mail:wangrui1016@163.com
通讯作者:刘雅红(1966-),女,博士,教授,E-mail:gale@scau.edu.cn

谱法测定鳗鱼中恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星和氧氟沙星,采用乙睛萃取样品中的残留物,在氮气下浓缩干燥,加流动相溶解残渣,正己烷液液萃取,弃上层液,下层溶液用作液相色谱分析荧光检测或质谱检测。鳗鱼中添加平均回收率为70%~84.3%,相对标准偏差为3.0%~6.3%。杜振霞等[10]建立了牛肉中环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星3种FQNs兽药残留的LC-MS/MS分析方法,3种药物的检出限均为0.05 μg/L,定量限为0.1 μg/L。

2.3 高效毛细管电泳分析法(HPCE)

高效毛细管电泳法是近年发展起来的新技术,与常用的HPLC法相比,它不受运行缓冲液的酸、碱性和其中的表面活性剂等添加剂的影响,具有样品用量少、分析速度快、分离效率高、适用范围广等特点,有利于实际样品的分析。

Hernandez等[11]应用非水毛细管电泳法(non aqueous capillary electrophoresis,NACE)对猪肾样品中的恩诺沙星、环丙沙星、达氟沙星、二氟沙星、麻保沙星、氟甲喹、恶喹酸进行分析,用20 mmol醋酸铵,0.004% HDB (polycation hexadimethrine bromide),含4%乙酸(pH5.4)的乙腈溶液为流动相,分离效果很好。前处理用盐酸作为提取剂,Baker C18柱固相萃取,回收率大于80%。Hernandez等[12]还应用毛细管等速电泳-毛细管区带电泳(capillary isotachophoresis capillary zone electrophoresis,ITP-CZE)检测猪血清中的环丙沙星、恩诺沙星和氟甲喹,其检出限分别为70、85、50 μg/kg,该方法简单灵敏,可作为HPLC的一种替代方法。Barron等[13]应用固相萃取和毛细管电泳分析鸡肉中二氟沙星和沙拉沙星,检测器为光电二极管阵列检测系统,标准曲线线性范围50~300 μg/kg,二氟沙星和沙拉沙星的检出限分别为10μg/kg和25 μg/kg,其数值低于欧盟规定的阳性肌肉允许的MRL。饶钦雄等[14]报道了以伊诺沙星为内标,环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、二氟沙星在鱼组织中的毛细管电泳多残留检测方法。研究采用含10 mL/L乙腈的pH 5.0的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液,C18固相萃取柱浓缩和净化处理,二极管阵列检测器进行检测(275 nm)。4种药物的回收率均大于75%。恩诺沙星的检测限低于25 μg/kg,其余均为25 μg/kg。王艳红[15]建立了同时检测鸡肉中洛美沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、培氟沙星多残留的基质固相分散萃取法-高效毛细管电泳法(HPCE)及液相-质谱联用(LC-MS)验证方法。采用pH值为8.8的35 mmol/L硼砂缓冲液,乙腈沉淀蛋白,基质固相分散萃取时用正己烷淋洗,4%氨水甲醇洗脱。4种药物的回收率为75.9%~91.6%,最低检测限范围为51~100 μg/kg。

2.4 高效薄层色谱法(HPTLC)

HPTLC的出现使薄层色谱法(TLC)进入了新的时期,现已成为仅次于HPLC和GC的残留分析方法。其优势在于简便、快速和高通量,在兽药多残留检测中有很好的应用前景。

Mody等[16]很早就报道了利用HPTLC方法检验人体血浆中的斯帕沙星及其代谢动力学研究。Vega等[17]也报道了测定鱼饲料和组织中恶喹酸、氟甲喹的HPTLC方法。HPTLC的斑点原位扫描定量、定性和高效分离材料改变了常规TLC在灵敏度和重现性方面的不足,但保持了TLC的大的优点,可使用正相或反相板,因此可以广泛应用在氟喹诺酮多残留快速筛查。

3 免疫分析法

3.1 酶联免疫分析法(ELISA)

近年来,应用ELISA法测定抗生素残留的研究越来越多,FQNs结构中含有羧基,多采用FQNS羧基与载体蛋白质游离氨基的缩合反应,将FQNs与载体连接合成人工抗原,方法简单、快速,而且不需要昂贵的仪器设备,非常适于大量样品的同时检测,用于药物残留分析可使分析过程大大简化。

魏东等[18]以沙拉沙星为半抗原,牛血清白蛋白偶联后免疫兔,获得对多种FQNs药物有特异性的广谱性抗体。以沙拉沙星与卵清白蛋白的偶联物作包被原,建立了间接竞争ELISA检测方法,对沙拉沙星检测限达19 μg/L,且对诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星均有特异性识别,检测限分别是22、26 μg/L和19 μg/L。刘欢欢等[19]以FQNs药物多残留试剂盒为基础,建立了鸡蛋中FQNs药物残留的间接竞争ELISA检测方法。该方法在5~50 μg/kg浓度范围内的平均添加回收率在70%以上,检测限为5 μg/kg。Bucknall等[20]用几种喹诺酮和FQNs半抗原生产多克隆抗体,呈现出特异性和对该类抗菌药的交叉反应性。对于单独检测恩诺沙星、环丙沙星、萘啶酸和氟甲喹,其ELISA方法具有相当高的特异性,还可检测另外5种喹诺酮类药物。在牛奶和羊肾组织的药物残留分析中,批内*RSD*值为10.5%,批间*RSD*值为11.2%。检测限除了哌嗪酸为6 μg/kg,其余为4 μg/kg。Duan等[21]制备了环丙沙星多克隆抗体,并建立了检测环丙沙星残留的间接竞争ELISA方法,检测限为0.32 ng/mL,环丙沙星在猪肉、鸡肉及牛乳中的回收率分别为75.58%、81.2%和84.50%。抗血清与恩诺沙星和诺氟沙星的交叉反应率分别为69.8%、44.6%,与金霉素、庆大霉素、青霉素、新霉素、喹乙醇和磺胺等无交叉反应。Gobbo等[22]报道了环丙沙星的抗原捕获ELISA(Plate Trapped Antigen, PTA-ELISA)测定法。用环丙沙星与BSA偶连,免疫新西兰雌性家兔(4次),从家兔耳边缘静脉取血,离心提取血清,低温保存。利用PTA-ELISA方法测定,用碱性磷酸(酯)酶和辣根过氧化物酶显色,所得数据用Packard系统软件统计。利用本方法可有效检测家畜体内环丙沙星残留量。用此方法还可检测其它的氟酮诺酮类兽药,如诺氟沙星、恩诺沙星、氧氟沙星。

3.2 高效免疫亲和色谱法(HPIAC)

免疫亲和色谱法是一种将免疫技术和色谱技术结合的分析方法。它的原理是将特异性的抗体与惰性基质耦联,制备成免疫吸附剂后装柱,对待测样品进行净化后,再进行色谱分析。利用抗原抗体反应提取所分析的药物,其特异性强,纯化效率较高。

Holtzapple等[23]用HPIAC同时检测了牛血清中的环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星和二氟沙星,用荧光检测器检测,激发波长和发射波长分别为280 nm和444 nm。样品进柱前需用PBS进行10倍稀释,并经0.2 μm滤膜过滤以除去微粒物质。从样品矩阵观察不到显著的干扰物,这表明HPIAC柱具有很好的选择性。样品回收率大于

95%,重现性也很高($RSD<7.0\%$)。

4 结语

FQNs 残留检测的研究越来越受到重视，检测 FQNs 在动物食品中的残留，应选择特异性强、灵敏度高、高效、快速的检测方法，其中微生物法检测限过高，特异性不强，不够灵敏，适合于快速筛选；HPLC 法具有高效、快速、灵敏、准确等特点，而且是目前应用最多的一种方法，但该方法前处理较复杂，所需仪器也较昂贵；LC-MS 法所用仪器要求高、价格昂贵，适于残留药物的确证；免疫分析法灵敏度高，特异性比微生物法强，单抗的特异性更高，可适用于大量样品的快速筛选及某一样品的确证。

目前，我国对 FQNs 药物残留检测的研究仍处于初级阶段，还需进一步研究多残留检测方法，并且制备出多残留 ELISA 检测试剂盒，从而监控 FQNS 药物在动物源性食品中的残留，确保人们的健康，并促进我国畜牧业的良性发展。

参考文献：

[1] Okerman L, Hoof J V, Debeuckelaere W. Evaluation of the european four-plate test as a tool for screening antibiotic residues in meat samples from retail outlets [J]. J AOAC Int, 1998,81(1):51-56.

[2] 邢应寿，祁克宗，汪雪雁，等. 肉鸡组织中环丙沙星残留的微生物学检测方法的建立[J]. 动物医学进展，2006,27(9):70-74.

[3] Roybal J, Walker C C, Pfenning A P, et al. Concurrent determination of four fluoroquinolones in catfish, shrimp,and salmon by liquid chromatography with fluorescence detection[J]. J AOAC Int, 2002,85(6):1293-1301.

[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] Marilyn J S, Susan E B, Ixchel R H, et al. Simultaneous determination of fluoroquinolones and tetracyclines in chicken muscle using HPLC with fluorescence detection[J].J Chromatogr B, 2007,846(1):8-13.

[6] 李海燕，李小薇，李娜，等. 鸡蛋中 9 种喹诺酮类药物多残留检测方法的建立及甲磺酸培氟沙星在鸡蛋中的消除研究[J]. 中国兽医杂志，2008,44(5):84-85.

[7] 申京宇，尹花仙，沈在濮. 超临界流体萃取和高效液相色谱同时测定鸡肉中 4 种氟喹诺酮类药物残留[J].食品科技，2007(10): 210-212.

[8] Toussaint B, Bordin G, Janosi A, et al. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification fo 11 (fluoro)quinolone antibiotics in swine kidney[J]. J Chromatogr A, 2002,976(1):195-206.

[9] 陈笑梅，池浩超，刘海山，等. 液相色谱串联质谱检测鳗鱼中四种氟喹诺酮残留[J]. 生命科学仪器，2005,3(5):20-23.

[10] 杜振霞，孙妹琦. 牛肉中三种氟喹诺酮类兽药残留的 HPLC-MS/MS 分析方法[J]. 质谱学报，2007,28(4):219-223.

[11] Hernandez M, Borrull F, Calull M. Using nonaqueous capillary electrophoresis to analyze several quinolones in pig kidney samples[J]. Electrophoresis, 2002,23(3):506-511.

[12] Hernandez M,Aguilar C,Borrull F.Determination of ciprofloxacin, enrofloxacin and flu mequine in pig plas ma samples by capillary isotachophoresis-capillary zone electrophoresis [J]. J chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,2002,772(1): 163-172.

[13] Barron D, Jimenez-Lozano E, Bailac S, et al.Determination of difloxacin and sarafloxacin in chicken muscle using solid-phase extraction and capillary electrophoresis[J].J Chromatogr B Analyt technol Biomed Life Sci, 2002, 767(2):313-319.

[14] 饶钦雄，刘慧慧，刘向明，等. 鱼组织中氟喹诺酮类药的 HPCE 多残留检测方法的建立[J].中国农学通报,2007,23(2): 93-97.

[15] 王红艳. 鸡肉中氟喹诺酮类残留 MSPD-HPCE 检测方法研究[D].合肥：安徽农业大学，2008.

[16] Mody V D, Pandya K K, Satia M C, et al. High performance thin-layer chromatographic method for the determination of sparfloxacin in human plasma and its use in pharmacokinetic studies[J]. J Pharmaceutial and Analysis, 1998,16(8):1289-1294.

[17] Vega M, Rios G. Analysis of ofloxacin flumequine in fish by high performance thin layer chrmatography[J].J Planar Chromatogr,1995 (18):1473.

[18] 魏东，杨正涛，李颖，等. 氟喹诺酮类药物残留免疫学检测方法的研究[J].中国兽医学报，2009,29(12):1593-1598.

[19] 刘欢欢，于学辉，彭莉. 用 ELISA 方法检测鸡蛋氟喹诺酮类药物残留的研究[J].西南民族大学学报，2008,34(6):1182-1185.

[20] Bucknall S, Silverlight J,Coldham N, et al. Antibodies to the quinolones and fluoroquinolones for the development of generic and specific immunoassays for detection of these residues in animal products[J]. Food Addit Contam, 2003,20(3):221-228.

[21] Jiuhuan Duan, Zonghui Yuan. Development of an Indirect Competitive ELISA for Ciprofloxacin Residues in Food Animal Edible Tissues[J]. Agric Food Chem, 2001,49(3):1087-1089.

[22] Gobbo S P, Longo C, Bueno I C S. Production of polyclonal antibody for ciprofloxacin detection in Brazilian livestock [J]. Proceedings of the British Society of Animal Science, 2003:84.

[23] Holtzapple C K, Buckley S A, Stanker L H. Determination of fluoroquinolones in serum using an on-line clean-up column coupled to high-performance immunoaffinity-reversed-phase liquid chromatography[J].J chromatogr B Biomed Appl,2001,754(1):1-9.

(上接第 37 页)

3 结语

本研究通过石墨炉原子吸收光谱法和极谱法对食盐中铅含量的测定进行研究，建立了食盐样品铅的测定方法。当氯化钠中铅含量较高时，采用石墨炉原子吸收光谱法，可通过增加稀释倍数来降低氯化钠的干扰，该法灵敏度低。采用极谱法测定食盐中的铅，样品溶解后，高浓度氯化钠溶液对铅的测定没有影响，该法能有效消除基体干扰，具有良好的精密度、准确度和灵敏度，适合食盐和高盐食品中铅的测定。

参考文献：

[1] NY/T 1040-2006,绿色食品 食用盐[S].

[2] GB/T 5009.12-2010,食品中铅的测定[S].

[3] 梁志芳，魏利滨.极谱吸附催化波法连续测定微量铅、镉的方法[J].金属矿山，2003(3)：33-34,39.

[4] 王金星，赵红英，刘飞红.乌鸡白凤丸中铅镉催化极谱法的测定[J].华北煤炭学院学报，2001,3(6)：685.

[5] 王锋.示波极谱法测定饮料中铅和镉[J].理化检验和分析手册，2005(41)：204-205.