

氧氟沙星在肉鸡体内残留的研究

施祖灏¹, 朱良强², 祁克宗¹, 卢运战¹

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 安徽合肥 230036; 2. 安徽省兽医工作站, 安徽合肥 230022)

[收稿日期] 2006-08-22 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2007)05-0010-04 [中图分类号] S859.84

[摘要] 建立了氧氟沙星在肉鸡组织内残留的高效液相色谱分析法。采用荧光检测器, 激发波长 278 nm, 发射波长 445 nm。色谱柱为 Hypersil BDS - C18, 柱温 40 ℃; 以磷酸 (三乙胺调 pH 至 2.5) - 乙腈 (86:14) 为流动相, 流速 1.0 mL/min; 进样量为 20 μL。氧氟沙星在肌肉、肝脏和肾脏中的平均回收率分别为 96.3%、87.5% 和 76.4%, 检测限为 10 ng/g, 在 10~1 000 ng/mL 浓度范围内, 氧氟沙星的峰面积与其浓度呈良好的线性相关, 达到了氧氟沙星残留分析的要求。利用建立的方法对氧氟沙星在肉鸡体内的残留消除规律进行了研究, 以 1L 水添加 500 mg 的剂量, 对 120 只肉鸡连续给药 5 d, 对不同停药时间所取肌肉、肝脏和肾脏样品中的药物残留进行分析。结果表明, 氧氟沙星在肉仔鸡组织中的残留消除速度较为缓慢, 至停药 23 d 时, 仍可在肝脏和肾脏分别检出 39 和 35 μg/kg 的氧氟沙星残留。在本实验的条件下, 建议氧氟沙星临床休药期以 25 d 为宜。

[关键词] 氧氟沙星; 肉鸡; 残留; 休药期

Studies on Residues of Ofloxacin in Broiler Chicken Tissues

SHI Zu-hao¹, ZHU Liang-qiang², QI Ke-zong¹, LU Yun-zhan¹

(1. College of Animal Science, Anhui Agriculture University, Hefei, Anhui 230036;

2. Anhui Veterinary Station, Hefei, Anhui 230022; China)

Abstract: A reversed-phase high performance liquid chromatographic method has been developed for the determination of ofloxacin residues in chicken tissues. After being extracted with phosphate buffer, ofloxacin was analyzed by HPLC (Hypersil BDS-C18) and detected by FLD ($\lambda_{ex} = 278 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 445 \text{ nm}$). The mobile phase was acetonitrile-phosphoric acid/triethylamine (14:86). The linear range was 10~1 000 ng/mL ($r = 0.9992$). The average recovery of ofloxacin was 96.3%, 87.5% and 76.4% in muscle, liver and kidney, respectively. The minimal detectable concentration of ofloxacin was 10 ng/g. This method can meet the demand of residues determination of ofloxacin in various chicken tissues. 120 broiler chickens were administered ofloxacin at a dosage of 500 g/L by drinking for 5 d. Results of this experiment showed that the depletion of ofloxacin in muscle was fast, the concentration of ofloxacin was declined lower than LOD at the 19 d. However, the depletion of drugs in liver and kidney were slower, the concentration of ofloxacin were 39 μg/kg and 35 μg/kg in liver and kidney respectively. A 25-day of withdrawal time was recommended.

Key words: ofloxacin; chicken tissues; residues; withdrawal time

基金项目:十五科技攻关二期项目(0400303041)

作者简介:施祖灏(1980年~),男,安徽庐江人,硕士研究生,主要从事动物源性食品安全研究。E-mail: vetszh@yahoo.com.cn

通讯作者:祁克宗

氧氟沙星 (Ofloxacin), 又名氟嗟酸, 属于氟喹诺酮类 (Fluoroquinolones, FQN s) 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。

国内外有很多研究者采用紫外或荧光检测的高效液相色谱法 (HPLC) 分析了动物的血清、血浆、尿、胆汁、唾液、皮肤水泡、脑脊髓和头发中氧氟沙星的残留量, 但报道的在食品动物组织中的残留分析研究仍较少。本试验对氧氟沙星在肉鸡体内的残留及其消除规律进行了研究, 建立了一种简便可靠的高效液相色谱法检测肉鸡组织中的氧氟沙星残留并为休药期的制订提供了依据。氧氟沙星在肌肉、肝脏和肾脏中的平均添加回收率分别为 96.3%、87.5% 和 76.4%, 检测限为 10 ng/g。氧氟沙星浓度在 10 ~ 1 000 ng/mL 范围内, 其峰面积与浓度呈良好的线性相关, 达到了残留分析的要求。

1 材料

1.1 仪器 高效液相色谱仪, Agilent 1100 型; 荧光检测器, Agilent 1100, DE43606853, 美国 Agilent 公司。

1.2 药品与试剂 氧氟沙星粉剂, 纯度 99.1%, 浙江新昌国邦兽药厂产品。氧氟沙星标准品, 纯度 99.5%, 批号为 H040798, 购自中国兽医药品监察所。乙腈, 色谱纯, 山东禹王实业有限公司。85% 磷酸, 上海建信化工有限公司试剂厂; 三乙胺, 上海凌峰化学试剂有限公司永华精细化学品有限公司; 甲醇, 江苏汉邦科技有限公司; 均为分析纯试剂。超纯水, 水质可达 18.2 M Ω ·cm, 符合国家实验室用水规格 (GB 6682-92)。

1.3 流动相 准确量取 85% 磷酸 3.4 mL, 用水稀释至 1 000 mL, 滴加三乙胺调节 pH 值至 2.5, 然后量取乙腈, 按缓冲液与乙腈的体积比为 86:14 进行配比, 过滤脱气后现用。

1.4 提取液 肌肉提取液配制: 取磷酸二氢钾 6.8 g, 加水溶解并稀释至 500 mL, 用 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.0, 用于肌肉中残留药物的提取。

肝 (肾) 脏提取液配制: 取磷酸二氢钾 6.8 g, 加水溶解并稀释至 500 mL, 用 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 5.0, 用于肝 (肾) 脏中残留药物的提取。

1.5 实验动物 22 日龄健康肉仔鸡 120 只, 由安徽省广德县和威农业开发股份有限公司肉鸡场提供。

2 方法

2.1 动物给药与采样

2.1.1 分组与饲养 实验鸡随机分成 2 组, 试验组 100 只, 对照组 20 只。实验鸡舍温度 (25 ± 2), 相对湿度 45% ~ 56%。自由采食和饮水, 饲喂不含药物的全价日粮。

2.1.2 给药 试验组鸡通过饮水投给氧氟沙星药物, 每 1L 水添加 0.5 g 氧氟沙星, 连续给药 5 d。

2.1.3 采样 试验组: 停药后分别于 0 h、24 h、3 d、7 d、11 d、15 d、19 d、23 d、25 d、27 d、29 d 各杀 6 只鸡, 分别采取肝脏、肾脏、肌肉 (胸肌) 组织样品, 置 -20℃ 冰箱保存。

对照组: 饲喂 30 d 后全部宰杀, 采样与样品保存同试验组。

2.2 样品前处理

2.2.1 肌肉预处理 组织样品在室温下解冻, 取适量放入 30 mL 匀浆杯中, 10 000 r/min 匀浆 1 min, 精密称取 2.0 g 肌肉于离心管中, 加肌肉提取液 10 mL, 中速振荡 5 min, 以 15 000 r/min 于 5℃ 离心 10 min, 倾取上清液, 待用; 选用 100 mg C₁₈ 固相萃取柱, 依次用甲醇、磷酸盐缓冲液 (pH 5.0) 各 10 mL 预洗。取上清液 5.0 mL 过柱, 用水 1 mL 淋洗, 挤干, 再用流动相 1.0 mL 洗脱, 挤干, 收集洗脱液。洗脱液经 0.45 μm 滤膜过滤后作为试样溶液, 供高效液相色谱法测定。

2.2.2 肝脏和肾脏预处理 组织解冻后, 精密称取 2.0 g, 放入 30 mL 匀浆杯中, 加肝 (肾) 脏提取液 10 mL, 10 000 r/min 匀浆 1 min, 匀浆液转入离心管中, 中速振荡 5 min, 以 15 000 r/min 于 5℃ 离心 10 min, 倾取上清液, 待用; 用提取液 10 mL 洗刀头及匀浆杯, 转入离心管, 洗残渣, 混匀, 中速振荡 5 min, 同上离心, 倾取并合并两次上清液, 混匀。取上清液 10.0 mL 过柱, 以下处理方法和步骤同肌肉预处理。

2.3 色谱条件 采用 Hypersil BDS-C18 色谱柱 (美国 Agilent 公司); 流动相如 1.3 项; 荧光检测器的激发波长设在 278 nm, 发射波长设在 445 nm; 柱温 40℃; 流速 1.0 mL/min; 进样量为 20 μL。

2.4 标准曲线 称取氧氟沙星对照品 10.05 mg, 放入 100 mL 的棕色量瓶中, 用 0.03 mol/L 氢氧化钠溶液溶解并稀释至刻度, 得对照品储备液。精密量取不同体积的对照品储备液, 分别放入 100 mL 棕色量

瓶中,用流动相稀释并定容,摇匀,制得含氧氟沙星浓度依次为 10、20、50、100、200、500 和 1 000 ng/mL 的标准工作液。在 2-3 项所述色谱条件下,以浓度由小到大的次序,分别进样作 HPLC 测定。以峰面积 (S) 对药物浓度 (C) 作直线回归,求得标准曲线的回归方程及相关系数。

2.5 样品回收率的测定 准确称取 9 份各 2.0 g 空白肌肉、空白肾脏、空白肝脏的匀浆样品,分别加入浓度为 50、100 或 500 ng/mL 标准工作液 1 mL,按样品处理方法处理后测定,按外标法以峰面积计算,测定回收率,计算公式为:

$$X = A_{\text{样}} \cdot C_{\text{对}} \cdot V_1 \cdot V_3 / A_{\text{对}} \cdot V_2 \cdot M$$

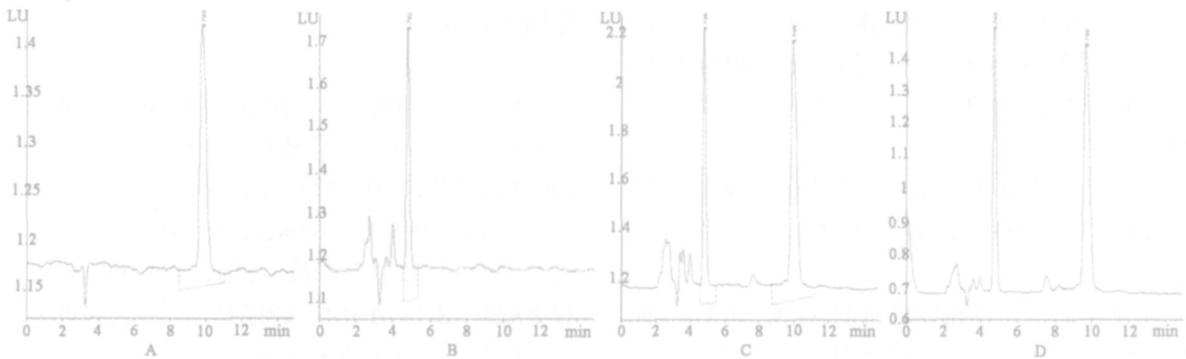
式中: X 为试料中的药物残留量 (ng · g⁻¹); A_样 为试样溶液中药物的峰面积; A_对 为对照溶液中药物

的峰面积; C_对 为对照溶液中药物的浓度 (ng · g⁻¹); V₁ 为提取用溶剂的总体积 (mL); V₂ 为过 C18 固相萃取柱所用备用液体积 (mL); V₃ 为试样溶液体积 (mL); M 为供试试料的质量 (g)。

将上述各浓度样品在一日内重复测定 6 次,计算其变异系数,以此衡量方法的日内 (批内) 精密性;在一周内 5 次重复配制上述空白添加样品,进行日间 (批间) 精密性测定。

3 结果

3.1 色谱分离 在本试验选定的色谱条件下,测得氧氟沙星的保留时间为 9.79 min 左右,色谱峰峰形较佳,且多为基线分离峰。组织提取液在上述保留时间无干扰峰出现,见图 1。



A, 100 ng/mL 氧氟沙星对照品溶液; B, 空白肌肉提取液;
C, 空白肌肉添加氧氟沙星后的提取液 (100 ng/mL); D, 鸡服用氧氟沙星后第 3 天肌肉组织提取液

图 1 氧氟沙星色谱图

3.2 标准曲线与线性范围、最低检测限 在选定的色谱条件下,各浓度氧氟沙星的工作液分别用 HPLC 测定,在药物浓度为 10 ~ 1 000 ng/mL 范围内,各浓度与其响应值 (色谱峰面积) 呈线性关系,得到标准

曲线线性回归方程为: $C = 30.4751S - 39.9554$, 相关系数 $r = 0.9992$ 。在本实验条件下,最低检测限为 10 ng/mL。

3.3 回收率与精密性 结果见表 1。

表 1 组织中氧氟沙星的回收率与精密性 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

样品	添加浓度 / (mg · kg ⁻¹)	实测浓度 / (mg · kg ⁻¹)	回收率 / %	平均回收率 / %	日内 RSD / %	日间 RSD / %
肌肉	0.05	0.0473 ± 0.0021	94.5	96.3	4.36	5.13
	0.1	0.0976 ± 0.0033	97.6	3.37	4.49	
	0.5	0.4831 ± 0.0155	96.8	3.21	4.36	
肝脏	0.05	0.0438 ± 0.0027	87.6	87.5	6.14	8.25
	0.1	0.0887 ± 0.0052	88.7	5.87	6.73	
	0.5	0.4315 ± 0.0221	86.3	5.13	7.76	
肾脏	0.05	0.0365 ± 0.0041	73.1	76.4	11.35	12.35
	0.1	0.0767 ± 0.0083	76.7	10.81	11.14	
	0.5	0.3973 ± 0.0500	79.5	12.59	12.78	

从表 1 可以看出,每千克组织中分别添加 0.05、0.10、0.50 mg 氧氟沙星,测得的肌肉组织回收率分别是 94.5%、97.6%、96.8%,日内重复测定的变异系数均小于 4.36%,日间重复测定的变异系数均小于 5.13%;肝脏组织的回收率分别为 87.6%、88.7%、86.3%,日内重复测定的变异系数均小于 6.14%,日间重复测定的变异系数均小于 8.25%;肾脏组织的回收率分别为 73.1%、76.7%、79.5%,日内重复测定的变异系数均小于 12.59%,日间重复测定的变异系数均小于 12.78%。结果表明,该检测方法可靠,重复性好。

3.4 组织中氧氟沙星的残留量及消除规律 不同停药时间宰杀的肉仔鸡组织中氧氟沙星残留量测定结果见表 2。

表 2 肉仔鸡组织中氧氟沙星残留量 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

停药时间 / d	残留量 / ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)		
	肌肉	肝脏	肾脏
0	2.357 \pm 0.171	8.765 \pm 0.685	5.193 \pm 0.467
1	0.295 \pm 0.134	0.809 \pm 0.130	0.572 \pm 0.175
3	0.187 \pm 0.037	0.437 \pm 0.111	0.319 \pm 0.097
7	0.095 \pm 0.037	0.238 \pm 0.052	0.198 \pm 0.040
11	0.055 \pm 0.021	0.177 \pm 0.038	0.119 \pm 0.024
15	0.027 \pm 0.016	0.118 \pm 0.023	0.089 \pm 0.021
19	ND	0.076 \pm 0.012	0.059 \pm 0.017
23	ND	0.039 \pm 0.005	0.035 \pm 0.006
25	ND	ND	ND
27	ND	ND	ND
29	ND	ND	ND

注:ND表示未测出。

从表 2 可以看出,肉仔鸡连续 5 d 饮用 500 mg/L 氧氟沙星水溶液后,各组织中氧氟沙星残留消除缓慢。在停药的 48 h 内,组织内的绝大多数药物 (90%左右)都已经完成代谢被排出体外,仍存在体内的痕量水平的氧氟沙星代谢极为缓慢。休药 11 d 时,肌肉中氧氟沙星的残留量仍高于 0.05 mg/kg;至休药 23 d 时在肝脏和肾脏中仍可检出 0.039 mg/kg 和 0.035 mg/kg 氧氟沙星残留;休药 25 d 时,各组织均未检出。

4 讨论

4.1 色谱条件 应用 HPLC 检测肉仔鸡组织中氧氟沙星残留量,选择合适的液相色谱条件至关重要。在广泛使用的 C_{18} 硅胶基键合固定相表面存在一定量的游离硅醇基。由于氧氟沙星结构中的叔胺基和羧基能在水中发生解离,固定相表面的这些游离硅醇基可通过氢键或离子交换作用强烈吸附氧氟沙星,出现色谱峰拖尾、保留值不稳定或过长,甚至被长期保留在色谱柱上,导致峰形异常和分离度下降。在本实验中使用三乙胺调节流动相的 pH,一方面用以掩蔽硅醇基对氧氟沙星碱性基团的吸附作用,另一方面可以抑制药物解离,从而保持正常的峰形和稳定的保留值。

3.2 氧氟沙星在肉鸡体内的残留及消除规律 从本实验的结果可以看出,氧氟沙星残留的消除速度较为缓慢。肉仔鸡连续 5 d 饮用 500 mg/L 氧氟沙星水溶液后,休药 11 d 时,肌肉中氧氟沙星的残留量仍高于 0.05 mg/kg;至休药 23 d 时在肝脏和肾脏中仍可检出 0.039 mg/kg 和 0.035 mg/kg 氧氟沙星残留;休药 25 d 时,各组织均未检出。参考和借鉴美国 FDA 和欧共体 (EEC) 规定的氟喹诺酮类药物在肉仔鸡食用组织中的最高残留限量 (MRL) 标准^[4,5],建议我国氧氟沙星在肉仔鸡食用组织中的最高残留限量 (MRL) 标准规定为 0.03 mg/kg。按此标准,肉仔鸡饮用剂量 500 mg/kg 的氧氟沙星水溶液,其休药期以 25 d 为宜。

参考文献:

- [1] 张秀英,佟恒敏,郭文欣,等. 单诺沙星在雏鸡体内的组织动力学及残留 [J]. 中国兽医学报. 2003, 23 (1): 72 - 74.
- [2] 邓国东,曾振灵,陈杖榴,等. 达氟沙星在鸡体内的组织残留 [J]. 中国兽医学报 2003, 23 (6): 598 - 600.
- [3] 谢恺舟,王志跃,张军,等. 环丙沙星在肉仔鸡组织中残留的研究 [J]. 畜牧兽医学报. 2003, 34 (1): 88 - 93.
- [4] Anadon A, Martinez Larranaga. Residues of Antimicrobial Drugs and Feed Additives in Animal Products: Regulatory Aspects [J]. Livestock Production Science. 1999, 59: 183 - 198.
- [5] FAO/WHO. Evaluation of Certain Veterinary Drug Residues in Food [R]. Thirty-fourth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, 1989.