

高效毛细管电泳法同时分离氟喹诺酮类 与四环素类药物的研究

沈虎琴¹, 檀华蓉^{2*}, 祁克宗³, 田春秋¹

(1. 安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学生物技术中心, 合肥 230036;
3. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

摘要: 采用高效毛细管电泳建立 4 种氟喹诺酮类 (FQs) 与 2 种四环素类 (TC) 药物同时分离的方法。通过考虑缓冲液离子浓度、pH、有机添加剂以及分离电压、温度等电泳参数, 通过正交试验确立了电泳的最佳条件: 紫外检测波长 270 nm, 缓冲溶液为 50 mmol·L⁻¹ 硼砂-200 mmol·L⁻¹ 硼酸, pH 8.41, 分离电压为 18 kV。结果表明, 6 种药物在 12 min 内达到完全分离, 且各组分浓度与峰面积呈良好的线性关系, 其相关系数 R^2 为 0.998 2~1, 迁移时间的相对标准偏差为 0.25%~0.68%, 峰面积相对标准偏差为 7.3%~9.8%。

关键词: 高效毛细管电泳; 氟喹诺酮; 四环素; 同时分离

中图分类号: S859.83

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2012)02-0207-04

Separation and determination of fluoroquinolones and tetracyclines by high performance capillary electrophoresis

SHEN Hu-qin¹, TAN Hua-rong², QI Ke-zong¹, TIAN Chun-qiu¹

(1. School of Tea and Food Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Biotechnology Center, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

3. Animal Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: A method for the simultaneous separation of fluoroquinolones (FQs) and tetracyclines (TCs) by high performance capillary electrophoresis (HPCE) was developed. The effects of several factors such as the concentration and pH of running buffer, the organic added to the electrolyte, the voltage and the temperature on separation were investigated. The optimal conditions were as follows. The UV detection wavelength was 262 nm. The running buffer consisted of 50 mmol·L⁻¹ NaB₄O₇-200 mmol·L⁻¹ H₃BO₃ with pH 8.41, and the separation voltage was at 18 kV. The results showed that the six remedies can be well separated within 12 min. Each had a good linear relationship ($R^2=0.998\ 2\sim 1$). The RSD was 0.25%~0.68% and 7.3%~9.8%.

Key words: HPCE; FQs; TCs; simultaneous separation

氟喹诺酮类 (FQs) 与四环素类 (TCs) 药物是化学合成抗感染药物, 因其抗菌谱广、抗菌活性强、毒副作用小等特点, 广泛用于动物饲养中。但随着药物长期使用, 加上不合理用药, 导致细菌耐药性的产生, 药物在动物体内残留, 对人们的健康造成危害。同时通过动物的各种排泄物 (包括粪、尿等) 向周围环境排放, 使周围的环境受到严重污染。因

此, 抗菌药残留已成为一类重要环境污染物^[1]。目前, 对这两类药物的检测手段较多, 有微生物抑制实验 (MIA)、薄层色谱 (TLC)、高效液相色谱法 (HPLC)、气质联用法 (GC/MS)、液质联用法 (LC/MS、LC/MS/MS) 和酶联免疫分析方法^[2-6], 但未见用毛细管电泳对这两类药物的同时分离检测的报道。作者以 6 种兽医临床常用的抗菌药达氟沙星 (DAR)、恩

收稿日期: 2011-05-09

基金项目: “十一五” 国家科技支撑项目 (2006BAK02A08-4) 资助。

作者简介: 沈虎琴, 女, 硕士研究生。E-mail: jsyxshq@163.com

* 通讯作者: 檀华蓉, 女, 副研究员。E-mail: tan890112@ahau.edu.cn

诺沙星(ENR)、培氟沙星(PER)、沙拉沙星(SAR)、四环素(TC)、强力霉素(DOC)为研究对象,优化了HPCE条件,建立了同时检测这6种抗菌药的方法。此方法具有快速、低成本、低耗样、应用范围广等特点。

1 材料与方法

1.1 材料仪器试剂与药品

1.1.1 仪器 Beckman P/ACE™ MDQ 毛细管电泳仪、二极管阵列(PDA)检测器,未涂层熔融石英毛细管内径 50 μm×60 cm(购置河北永年与瑞沅色谱器件有限公司),SevenMulti 型 pH 精密酸度计(梅特勒-托利多仪器有限公司),SB3200 超声波清洗机。

1.1.2 主要试剂 标准品:四环素、强力霉素、恩诺沙星、培氟沙星、沙拉沙星、达氟沙星标准品 6 种标准品均由中国兽药药品监察所提供;

试剂:十二烷基硫酸钠(SDS)、四硼酸钠、硼酸、柠檬酸、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾均为分析纯,实验用水均为超纯水。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制 准确称取恩诺沙星、培氟沙星、沙拉沙星、达氟沙星、四环素、强力霉素各 50.00 mg,用甲醇溶液溶解并分别定容至 10 mL 容量瓶中,配制成 5.00 mg·mL⁻¹ 标准储备液,并配置浓度为 500 μg·mL⁻¹ 的混合储备液,依次稀释成浓度为 125、100、75、50、25、12.5 和 6.25 μg·mL⁻¹ 的混合标准工作液,置于-4℃冰箱密封保存。

1.2.2 电泳缓冲液的配制 分别称取一定量的硼酸、硼砂、柠檬酸、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾,用超纯水溶解定容,配制成浓度为 20、50、80 mmol·L⁻¹ 的溶液,按一定比例混合,调 pH 值分别为 7.5、8.1、8.6、9.0,经 0.22 μm 滤膜过滤,备用。

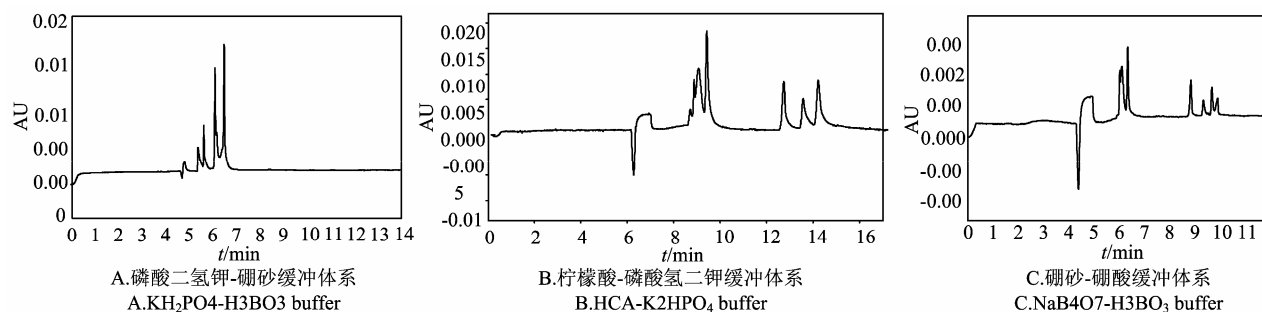


图 2 不同类型缓冲液的电泳图

Figure 2 The electropherogram of different buffer kinds

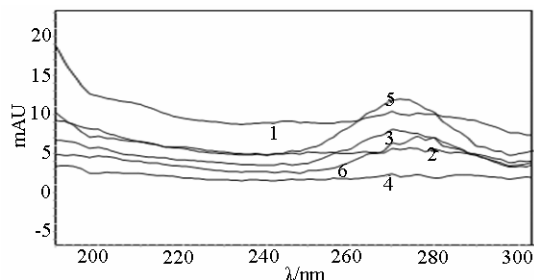
2.2.2 电泳缓冲液离子浓度的选择 在高效毛细管电泳中,缓冲溶液的浓度会影响缓冲容量,也会影

1.2.3 电泳条件 未涂层熔融石英毛细管柱(50 μm×60 cm),0.5 psi 压力进样 8 s,50 mmol·L⁻¹ 硼砂-200 mmol·L⁻¹ 硼酸缓冲液,pH 为 8.41,分离电压为 18 kV,分离温度为 28℃,紫外检测波长为 262 nm^[3]。

2 结果与分析

2.1 检测波长的确定

6 种药物的标准溶液经紫外检测器在 190~400 nm 波长范围内扫描,在 270 nm 处都有比较强吸收,所以选定 270 nm 作为本试验的检测波长(见图 1)。



1.TC, 2.DOC, 3.ENR, 4.PER, 5. DAR, 6.SAR

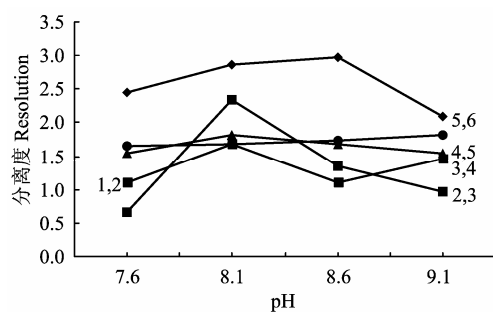
图 1 6 种物质的紫外光谱图

Figure 1 Ultraviolet spectrogram of six remedies

2.2 缓冲体系的选择

2.2.1 电泳缓冲溶液的选择 缓冲溶液背景电解质的选择对毛细管区带电泳分离效果有十分明显的影响。本试验在同一离子浓度和 pH 条件下考察了 3 种不同的缓冲体系:柠檬酸-磷酸氢二钾、硼砂-硼酸、磷酸二氢钾-硼砂缓冲体系。结果表明:磷酸二氢钾-硼砂缓冲体系分离效果较差,组分不能达到基线分离;柠檬酸-磷酸氢二钾缓冲体系峰形较好,但有部分重叠;硼酸-硼砂缓冲体系分离效果较好。综合考虑迁移时间与分离度的影响,硼砂-硼酸缓冲体系有较好的分离趋势。因此,选择硼砂-硼酸体系作为本试验的运行缓冲液(见图 2)。

响毛细管的电渗流和焦耳热,因此影响毛细管电泳的分离,同时对柱效也会产生一定的影响^[7]。



1.TC, 2.DOC, 3.ENR, 4.PER, 5.DAR, 6.SAR

图 3 不同 pH 值对分离度的影响

Figure 3 Comparison of resolution between different pH values

本试验选择了硼砂-硼酸缓冲溶液作为电泳缓冲液,探讨了在浓度分别为 20~150、50~200、80~250 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时毛细管电泳的分离效果。结果表明 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼砂-200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸缓冲体系时毛细管分离效果最好。

2.2.3 电泳缓冲溶液 pH 值的选择 毛细管电泳的分离是因组分的离子淌度不同所致,离子的淌度与

其有效电荷成正比,而离子的有效电荷易受操作缓冲溶液 pH 值的影响。因而,缓冲溶液 pH 值的调节与控制是优化分离的重要因素^[7]。在 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼砂-200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸缓冲液条件下,分别调 pH 值为 7.5、8.1、8.6 和 9.0。结果表明,随 pH 值的升高,毛细管内层表面的负电荷减少,电渗流减少,迁移时间相应延长。但在 pH 大于 8.6 时,完成分离的迁移时间反而缩短,综合考虑迁移时间和分离度, pH 值在 8.1~8.6 之间分离效果较好(见图 3)。

2.2.4 电泳缓冲溶液中 SDS 浓度的影响 为了进一步分离,向缓冲溶液中加入超过临界胶束浓度的 SDS,即使用胶束电动毛细管色谱(MEKC)。MEKC 基于被分析物在水相和胶束相之间的分配系数的差异^[8-10]。SDS 是最常用的阴离子表面活性剂。本试验选择 SDS 的浓度为 20、30 和 40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结果表明(表 1),当加入 30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 SDS 时得到最佳分离。

表 1 不同 SDS 浓度下各抗生素分离度

Table 1 Resolution of antibiotics at different SDS concentrations

SDS / $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	分离度 Resolution				
	TC-DOC	DOC-EFR	EFR-SAR	SAR-ENR	ENR-DAR
20	0.53	2.77	1.01	重叠 Overlap	2.12
30	0.75	4.73	1.15	0.67	4.67
40	0.91	4.81	1.22	0.72	重叠 Overlap

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果Table 2 The result of $L_9(3^4)$ orthogonal test

No.	因素 Factor			迁移时间/min Transition time	分离度 Resolution				
	pH (A)	运行电压 (B) Separation voltage	温度/ $^{\circ}\text{C}$ Temperature		DOC-TC	TC-PEF	PEF-SAR	SAR-ENR	ENR-DAR
1	1(8.2)	1 (25)	1 (20)	9.665	0.96	4.57	1.23	1.67	2.10
2	1	2(20)	2 (28)	10.117	0.86	4.69	1.41	1.97	2.54
3	1	3(18)	3 (25)	12.417	1.50	5.12	1.15	1.76	2.13
4	2(8.41)	1	3	9.346	1.27	2.73	1.09	1.19	3.15
5	2	2	1	14.133	1.31	3.82	1.46	0.97	2.76
6	2	3	2	10.588	2.86	1.62	2.45	1.71	1.98
7	3(8.60)	1	2	7.463	1.20	0.98	0.87	1.09	3.09
8	3	2	3	12.017	1.14	1.09	0.78	1.32	3.98
9	3	3	1	14.658	1.17	1.16	0.95	1.45	4.00

2.3 分离电压和温度的选择

毛细管电泳分离电压的高低会影响到溶质的迁移速度,从而影响分离效果。改变电泳电压范围 15~25 kV 进行试验。当电泳电压为 18 kV 时,6 峰完全分离,且分析时间最短。

温度的改变,将导致溶液的粘度改变,从而导

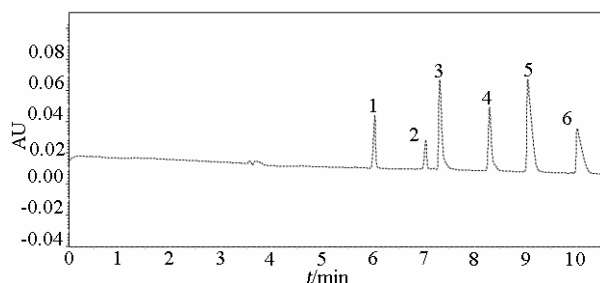
致进样和迁移时间的改变。考察了 20、25、30 $^{\circ}\text{C}$ 时迁移时间与峰高的变化。温度过低 SAR 峰拖尾严重;温度过高,基线产生漂移。所以综合考虑在 25 $^{\circ}\text{C}$ 左右选择最佳温度。

2.4 正交试验

为了进一步优化以获得最佳分析条件,在前面

试验的基础上采用正交试验设计方案完善试验。将缓冲体系的 pH 值、电泳的电压和温度作为 3 个因素,每个因素设 3 个水平,即根据正交设计表 $L_9(3^4)$ 进行试验,见表 2^[7]。由于毛细管电泳具有能在较短时间内达到最佳分离效果的优点,本试验分析了各组试验条件下完成分离的迁移时间以及两个色谱峰之间的分离度。

由表 2 结果可知,第 7 组试验迁移时间最短,但不能完全分离。综合考虑分离度、迁移时间的因素,选择第 6 组即 pH8.41、18 kV 和 28℃ 作为最佳电泳分离条件(见图 4)。



1.TC, 2.DOC, 3.ENR, 4.PER, 5.DAR, 6.SAR

图 4 最佳电泳图

Figure 4 The best electropherogram

表 3 线性方程和线性范围

Table 3 Regression of the accuracy test

组分 Element	线性方程 Regression equation	相关系数 R^2
TC	$y = 153.03x - 573.12$	0.999 9
DOC	$y = 168.78x - 269.14$	1
PEF	$y = 271.79x - 18.952$	0.998 7
SAR	$y = 132.61x - 621.26$	0.999 8
ENR	$y = 462.31x - 2503.9$	0.999 6
DAR	$y = 307.08x - 95.833$	0.998 2

表 4 精密度试验

Table 4 Results of the accuracy test

组分 Element	峰面积 RSD% Area RSD	迁移时间 RSD% Time RSD
TC	9.8	0.25
DOC	9.6	0.27
PEF	8.8	0.38
SAR	7.3	0.32
ENR	8.6	0.40
DAR	7.2	0.68

2.5 方法评估

2.5.1 标准曲线 在选定的条件下,以浓度由小到大的次序分别进样 6.25、12.5、25、50、75、100、125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准工作液,按上述最佳条件进行分析,得到待测物质的峰面积,以浓度为横坐标,以

相应峰面积为纵坐标做回归分析,得到标准曲线和回归方程(表 3)^[11]。分析结果表明,6 组分线性关系良好,相关系数为 0.998 2~1。

2.5.2 重现性 取一定量的 6 种混合标准样品溶液,利用最佳的电泳条件连续 6 次进样,其中各组分的浓度为 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,考察各组分的校正峰面积和迁移时间的重复性。结果表明,6 种药物的峰面积与迁移时间的相对标准偏差(RSD)分别小于 9.8%和 0.68%(见表 4)。

3 小结

本试验所确立的毛细管电泳法完成了四环素、强力霉素 2 种四环素类药物及培氟沙星、沙拉沙星、恩诺沙星和达氟沙星 4 种氟喹诺酮药物的稳定的特征性分离。该方法操作简便,成本低,为同时快速检测氟喹诺酮类与四环素类药物提供了一种更有效的分析手段。

参考文献:

- [1] 吴静,陈如登,丘建华.我国兽药残留的现状与危害[J].福建畜牧兽医,2001(S1).
- [2] Choi J, Yee A J. Determination of fluoroquinolone residues in animal tissues using *Escherichia coli* as indicator organism [J]. AOAC Int, 1999, 82(6): 1407-1412.
- [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]. AOAC Int, 2002, 85(6): 1293-1301.
- [4] 张国文. HPLC 法测定鳊鱼中多种氟喹诺酮[J]. 食品科技, 2004, 11: 69-71.
- [5] 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.
- [6] 刘欢欢,于学辉,彭莉,等.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:自然科学版,2008,34(6): 1182-1185.
- [7] 田志仁,秦卫东.毛细管电泳用于抗生素的分离检测[J].北京师范大学学报:自然科学版,2009,25(03): 254-258.
- [8] 陈义.毛细管电泳技术与应用[M].北京:化学工业出版社,2000.
- [9] 赵燕燕,王丽娟,李志平,等.猪肝脏中痕量喹诺酮类药物的胶束毛细管电泳在线富集技术检测[J].河北大学学报:自然科学版,2007,27(01): 35-39.
- [10] 陈方博,方云,吴丽娜.十二烷基硫酸钠浓溶液的胶束行为与其溶液体相行为间的相关性[J].应用化学,2008,25(4): 401-404.
- [11] 邓勃.分析测试数据的统计处理方法[M].北京:清华大学出版社,1995: 304.