

液相色谱荧光检测法检测水产品中甲砒霉素、氟甲砒霉素及代谢物氟甲砒霉素胺残留

杨方,方宇,刘正才,林永辉,陈健,李捷

(福建出入境检验检疫局,福州 350001)

[收稿日期] 2008-05-08 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2008)08-0013-04 [中图分类号] S859.84

[摘要] 建立了以带荧光检测器的液相色谱检测水产品中甲砒霉素、氟甲砒霉素与氟甲砒霉素胺残留的新方法。采用碱性乙酸乙酯-乙腈提取试样中残留的化合物,凝胶渗透色谱(GPC)净化,荧光检测器的激发与发射波长分别为225 nm与295 nm,可疑样品以液相色谱-质谱/质谱进行确证。在添加浓度为0.050~2.0 mg/kg时,平均回收率在86.4%~96.8%之间,相对标准偏差(RSD)在5.63%~9.71%之间($n=5$);甲砒霉素、氟甲砒霉素在0.20~5.0 mg/L范围内、氟甲砒霉素胺在0.10~5.0 mg/L范围内有良好的线性关系,甲砒霉素与氟甲砒霉素的检测限达0.020 mg/kg,氟甲砒霉素胺的检测限达0.010 mg/kg。

[关键词] 液相色谱-荧光检测;甲砒霉素;氟甲砒霉素;氟甲砒霉素胺;残留;水产品

Determination of Thiamphenicol, Florfenicol and Florfenicol Amine Residues in Aquatic Products by HPLC with Fluorescence Detection

YANG Fang, FANG Yu, LIU Zheng-cai, LIN Yong-hui, CHEN Jian, LI Jie

(Fujian Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001; China)

Abstract: A novel procedure using high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detector for the determination of thiamphenicol (TAP), florfenicol (FF) and florfenicol amine (FFA) in aquatic products was described. The analytes were extracted by basic ethyl acetate-acetonitrile, gel permeation chromatography (GPC) was used for cleanup, excitation and emission wavelength were 225 nm and 295 nm for fluorescence detection. The average recoveries and relative standard deviations (RSDs) for the analysis of all samples fortified over the range of 0.050~2.0 mg/kg were in the range of 86.4%~96.8% and 5.63%~9.71% ($n=5$), respectively. Good linearities were obtained in the concentration ranging from 0.20~5.0 mg/L for TAP and FF, and 0.10~5.0 mg/L for FFA. The limits of detection were 0.020 mg/kg for TAP and FF, and 0.010 mg/kg for FFA.

Key words: HPLC-FLD; thiamphenicol; florfenicol; florfenicol amine; residue; aquatic products

氯霉素(CAP)、甲砒霉素(TAP)和氟甲砒霉素(FF)是一类广谱抗菌药,广泛用于人类和各种动物疾病的治疗和预防。自从氯霉素被发现存在严重毒副作用而被世界各国禁止在食用动物中使用

后,这类药物中的TAP和FF尤其是FF因相对安全,且疗效极佳^[1]而成为年销售额上亿美元的药物。世界各国对甲砒霉素与氟甲砒霉素均有限量规定,联合国粮农组织对甲砒霉素的最高残留限量

基金项目:福建省科技攻关重点项目(2006Y0002)

作者简介:杨方(1969年-),女,副主任技师,主要从事农兽药残留检测工作。E-mail: yffjciq@gmail.com

(MRL)是以甲砒霉素计,从 0.05~0.50 mg/kg不等,对于鱼类来说,MRL值为 0.05 mg/kg^[2]。氟甲砒霉素在动物体内代谢复杂,主要代谢物为氟甲砒霉素胺(FFA)^[3],因而对于氟甲砒霉素的 MRL 值规定是以氟甲砒霉素及其代谢物氟甲砒霉素胺之和计算的,针对不同产品,MRL 值从 0.10~3.0 mg/kg不等,对于鱼类,其原药与代谢物之和不得超过 1.0 mg/kg^[4]。

我国近年来发表的相关文献包括带紫外检测器的液相色谱法^[5]、气相色谱法^[6]及气相色谱-质谱联用^[7]与液相色谱-质谱联用等^[8-10],这些方法均未涉及氟甲砒霉素代谢产物氟甲砒霉素胺的检测。另外,与氯霉素不同的是,甲砒霉素与氟甲砒霉素均非禁用药,样品基体中可检出的含量较高,而色-质联用法同时检测这类化合物的检测限一般在 1 μg/kg以下,在定量时常需进行大比例稀释。本文以凝胶渗透色谱(GPC)净化、液相色谱-荧光检测法同时测定水产品中甲砒霉素、氟甲砒霉素及代谢物氟甲砒霉素胺,相关方法未见文献报道。该方法干扰少,可操作性强,回收率和精密度好,已在日常检测中应用。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 美国 Agilent 1100 高效液相色谱仪,配备荧光检测器;Accurep MPSTM 凝胶渗透色谱仪(美国 J2 Scientific 公司),配备紫外检测器;AccuvapTM 自动浓缩装置(美国 J2 Scientific 公司)。乙腈、甲醇、乙酸乙酯、环己烷、正己烷为色谱纯;庚烷磺酸钠、三乙胺、乙酸均为分析纯。实验用水为去离子水。甲砒霉素、氟甲砒霉素标准物质,购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;氟甲砒霉素胺标准品,购自美国 Toronto Research Chemicals 公司。以甲醇配成 100 mg/L 的储备液,使用时根据需要以流动相配成标准工作液。

1.2 方 法

1.2.1 样品提取与净化 称取 10 g 样品匀样,加入 20 mL 乙酸乙酯-乙腈-氨水(49:49:2, V/V),在高速分散器上以 14 000 r/min 的转速分散提取 1 min,4 000 r/min 离心 5 min,重复以上步骤,合并提取液,40 °C 旋转蒸发至近干,以 10 mL 乙酸乙酯-环己烷溶解残渣,4 000 r/min 离心 3 min 后取 5 mL 上清液通过样品环注入 GPC。GPC 条件:净化柱为 Bio-Beads S-X3 填料,200 mm × 25 mm;流动相为乙酸乙酯-环己烷(1:1, V/V);流速 4.2 mL/min,收集 7.5~20 min 流出液于 40 °C 旋转蒸发至近干,

以 1 mL 流动相溶解残渣,过 0.22 μm 滤膜,待测。

1.2.2 色谱条件 色谱柱:Agilent C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm, i.d. 5 μm);等度洗脱,流动相为 25 mmol/L 乙酸铵溶液(其中含 100 mmol/L 庚烷磺酸钠溶液,以乙酸调节 pH 值为 6.5)-乙腈(85:15, V/V),流速为 1.0 mL/min;检测器为荧光检测器,Ex = 224 nm, Em = 295 nm;柱温 35 °C;进样量 50 μL。

2 结果与讨论

2.1 提取与净化条件的选择 氟甲砒霉素微溶于水,溶于有机溶剂,常用乙腈、丙酮、乙酸乙酯及三氯甲烷等有机溶剂提取,代谢物氟甲砒霉素胺的极性较强,溶于水,在碱性条件下溶于有机溶剂。本文比较了乙腈、乙酸乙酯、碱性乙酸乙酯与碱性乙酸乙酯-乙腈混合液作为提取溶剂以最大限度地从生物体中提取氟甲砒霉素及代谢物氟甲砒霉素胺。结果表明碱性乙酸乙酯-乙腈是较理想的提取溶剂。

在采用有机溶剂对水产品提取时,有大量脂质及类脂物质同时被提取出来,需除去这类脂溶性杂质。对于本文所分析的这类药物,常用正己烷或固相萃取小柱净化。本文比较了正己烷脱脂净化、C₁₈固相萃取小柱净化、填料为 N-丙基乙二胺的 PSA 固相萃取小柱以及凝胶渗透净化色谱的净化效果。实验发现,单纯以正己烷去脂对复杂基体如烤鳗等样品的净化效果不甚理想;而氟甲砒霉素胺无法在 C₁₈ 填料上保留,采用 C₁₈ SPE 净化小柱实际上对于氟甲砒霉素胺的检测并无净化作用,PSA SPE 柱的净化机理为离子交换,对氟甲砒霉素胺的检测有较好净化作用,但对于甲砒霉素与氟甲砒霉素的净化效果不佳,采用 C₁₈ SPE 柱与 PSA SPE 柱串联进行样品净化可取得较好效果。凝胶渗透色谱净化是近年来受到重视的净化方式,净化容量较大,可重复使用,适用范围广,易于实现自动化操作。GPC 净化的切割时间要考虑基质与待测组分的分离。甲砒霉素与氟甲砒霉素从 7.5 min 开始流出至 16 min 结束,氟甲砒霉素胺自 10 min 开始流出至 20 min 结束,大部分脂质在 7 min 前流出,最终确定收集 7.5~20 min 流出液,这样既能除去大部分杂质,又能保证回收率。

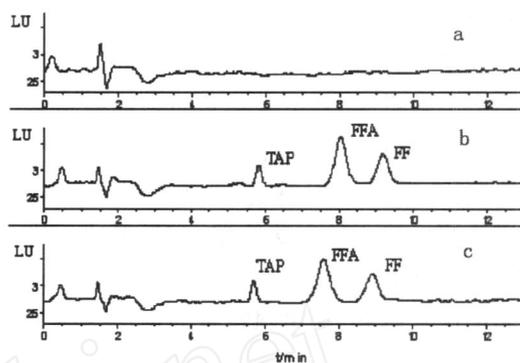
2.2 色谱条件的选择 甲砒霉素、氟甲砒霉素与氟甲砒霉素胺在 225 nm 处有强的紫外吸收,可在此波长下进行检测,灵敏度高。但在此波长下,样品提取液的谱图上会出现许多内源性化合物的干扰峰难以消除,尤其是对于较复杂的基体更是如此。荧光扫描发现,三种化合物在 Ex = 225 nm、Em = 295

nm下均有响应,基线噪音低,干扰极少,较紫外检测效果更好。

氟甲砒霉素与甲砒霉素性质相近,采用 C_{18} 分析柱或 C_8 分析柱均可很好地分离这两种物质。氟甲砒霉素胺是动物体中氟甲砒霉素的酰氨基团被代谢成为氨基的产物,极性很强,在 C_{18} 、 C_8 等反相色谱柱上几乎不保留。Homazabal 等人在流动相中加入了离子对试剂庚烷磺酸钠与三乙胺以获得较好分离^[11],随后发表的检测方法采用了相似的色谱条件^[12-13]。本文在试验过程中,除按上述方法进行试验外,还尝试采用填料为键合了少量阳离子的聚羧甲基丙烯酸酯全多孔树脂的离子交换分析柱(Shodex Rspak NN-414, 4.6 mm × 150 mm, 10 μm)进行色谱分离,由于该色谱柱的分离原理与反相 C_{18} 柱不同,是基于离子交换的原理,因此根据流动相洗脱液中乙酸铵的浓度不同可以调整氟甲砒霉素的保留时间,甲砒霉素、氟甲砒霉素的保留时间可由流动相中乙腈或甲醇的比例控制,也可获得较满意的分离效果。

本文比较了不同 pH 值的流动相对荧光强度的影响,在乙酸铵缓冲液中,中性至弱酸性条件下效果较好。在离子对试剂中加入三乙胺虽有助于改善峰形,但实际检测时发现抑制现象。本文采用庚烷磺酸钠为离子对试剂,随着其浓度增大,氟甲砒霉素胺的保留时间明显延后,可以获得较好分离效果。图 1 为采用 Agilent C_{18} 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, id 5 μm)、在流动相中添加了离子对试剂进行分析所得到的空白样品、待测物标准溶液与空白样品添加后典型色谱图。

2.3 线性范围、线性关系及检测限 在本方法所确定的实验条件下,以峰面积(y)和标准溶液的质量浓度(x, mg/L)作图,获得的甲砒霉素、氟甲砒霉



a - 烤鳗空白基体; b - 甲砒霉素、氟甲砒霉素与氟甲砒霉素胺标准品(0.5 mg/L); c - 烤鳗加标样品(添加浓度 0.05 mg/kg)

图 1 色谱图

素、氟甲砒霉素胺的线性方程、相关系数、线性范围见表 1。以实际样品检测时的信噪比(S/N)为 3 作为检出限时,本方法对甲砒霉素、氟甲砒霉素、氟甲砒霉素胺的检测限分别为 0.020、0.020、0.010 mg/kg。

表 1 回归方程与相关系数、线性范围、检测限

化合物	回归方程	相关系数	线性范围 / (mg · L ⁻¹)	检测限 / (mg · kg ⁻¹)
甲砒霉素	$y = 2.36x + 1.02$	0.999 1	0.20 ~ 5.0	0.020
氟甲砒霉素	$y = 3.45x + 2.15$	0.999 6	0.20 ~ 5.0	0.020
氟甲砒霉素胺	$y = 16.82x + 7.63$	0.998 9	0.10 ~ 2.0	0.010

2.4 方法回收率和精密度 以不含甲砒霉素、氟甲砒霉素与氟甲砒霉素胺的花蛤、烤鳗为基质,进行 0.05、0.5 和 2.0 mg/kg 三个浓度水平的添加回收实验,每个样品基体和每个添加水平重复测定 5 次,回收率与精密度见表 2。由表可见,三种添加水平下的平均回收率在 86.4% ~ 96.8% 之间,相对标准偏差(RSD)在 5.63% ~ 9.71% 之间。说明本方法可满足甲砒霉素、氟甲砒霉素、氟甲砒霉素胺的检测要求。

表 2 甲砒霉素、氟甲砒霉素与氟甲砒霉素胺的平均回收率与相对标准偏差(n=5)

化合物	烤鳗样品			花蛤样品		
	添加水平 / (mg · kg ⁻¹)	回收率 / %	RSD / %	添加水平 / (mg · kg ⁻¹)	回收率 / %	RSD / %
甲砒霉素	0.05	90.8	6.44	0.05	89.7	6.61
	0.5	89.6	6.71	0.5	90.2	5.63
	2.0	91.0	7.64	2.0	92.5	6.65
氟甲砒霉素	0.05	86.4	6.44	0.05	87.3	6.32
	0.5	91.6	9.71	0.5	90.1	7.75
	2.0	88.0	7.64	2.0	89.7	6.49
氟甲砒霉素胺	0.05	93.6	8.34	0.05	91.8	8.82
	0.5	96.8	6.25	0.5	93.3	7.19
	2.0	93.5	6.48	2.0	92.6	5.65

3 结论

建立了一种以荧光检测的液相色谱技术测定水产品中甲砒霉素、氟甲砒霉素及氟甲砒霉素胺残留的方法。以碱性乙酸乙酯 - 乙腈提取试样中残留的待测物,采用 GPC 净化,带有荧光检测器的液相色谱检测。建立的方法简单、容易形成标准化操作,方法的准确度与精密度较好,适用性强,已用于水产品中甲砒霉素、氟甲砒霉素与氟甲砒霉素胺残留的分析。

参考文献:

[1] Lobell R D, Vama K J, Johnson J C, *et al* Pharmacokinetics of Florfenicol Following Intravenous and Intramuscular Doses to Cattle[J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 1994, 17(4): 253 - 258

[2] Proposed Draft and Proposed Draft Revised Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs [ftp://ftp.fao.org/codex/ccrvdfl3/V0131e.pdf](http://ftp.fao.org/codex/ccrvdfl3/V0131e.pdf)

[3] Horsberg T E, Martinsen B, Vama K J. The Disposition of 14C - Florfenicol in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) [J]. *Aquaculture*, 1994, 122: 97 - 106

[4] Committee for Veterinary Medicinal Products, Florfenicol (Extension to Fish), Summary Report(5). <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/025197en.pdf>

[5] 戴华,王美玲,李拥军,等. 饲料中氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素含量的 HPLC 测定方法 [J]. *光谱实验室*, 2006, 23 (6): 1208 - 1212

[6] 刘永涛,李荣,袁科平,等. 气相色谱法同时测定水产品中氯霉素、氟甲砒霉素和甲砒霉素残留量 [J]. *淡水渔业*, 2007, 37: 44 - 47.

[7] 李鹏,邱月明,蔡慧霞,等. 气相色谱 - 质谱联用法测定动物组织中氯霉素、氟甲砒霉素和甲砒霉素残留量 [J]. *色谱*, 2006, 24(1): 14 - 18.

[8] 彭涛,李淑娟,储晓刚,等. 高效液相色谱 / 串联质谱法同时测定虾中氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素残留量 [J]. *分析化学*, 2005, 33(4): 463 - 466.

[9] 陈小霞,岳振峰,吉彩霓,等. 高效液相色谱 - 电喷雾电离三级四级杆质谱测定鸡肉中氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素的残留量 [J]. *色谱*, 2005, 23(1): 92 - 95.

[10] 谢文,丁慧瑛,黄雷芳,等. 高效液相色谱 - 电喷雾电离三级四级杆质谱检测动物源食品中氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考残留量 [J]. *分析实验室*, 2007, 25: 1 - 4.

[11] Homazabal V, Steffenak I, Yndestad M. Simultaneous Determination of Residues of Florfenicol and the Metabolite Florfenicol Amine in Fish Tissues by High - Performance Liquid Chromatography[J]. *J Chromatogr*, 1993, 616(1): 161 - 165.

[12] Vue C, Schmidt L J V, Stehly G R, *et al* Liquid Chromatographic Determination of Florfenicol in the Plasma of Multiple Species of Fish[J]. *J Chromatogr B*, 2002, 780: 111 - 117.

[13] Homazabal V, Steffenak I, Yndestad M. Simultaneous Extraction and Determination of Florfenicol and the Metabolite Florfenicol Amine in Sediment by High - Performance Liquid Chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 1996, 724: 364 - 366.

农业部:中国采取有力措施有效控制口蹄疫疫情

农业部新闻发言人 26 日表示,2005 年中国部分地区发生亚洲型口蹄疫疫情以来,中国政府高度重视口蹄疫防控工作,有效控制了口蹄疫暴发流行。

根据世界动物卫生组织 (OIE) 疫情通报,近年来中国周边国家一直存在口蹄疫疫情。为有效防控口蹄疫,中国实施免疫与扑杀相结合的综合防控措施,成效显著。

亚洲型口蹄疫疫情由 2005 年 10 个疫点、2006 年 17 个疫点,下降到 2007 年的 8 个疫点。今年到目前为止,只有 2 个疫点。所有疫情均被扑灭在疫点上,没有扩散蔓延。

中国对所有易感家畜进行口蹄疫疫苗强制免疫,并要求各级部门定期对免疫抗体进行检测,对抗体水平达不到规定要求的家畜及时进行强化免疫,以确保免疫密度和质量。

另外,中国要求各级兽医部门制定应急预案和实施方案,组建应急队伍,储备必要的应急物资,确保一旦发生疫情,能及时启动应急机制,采取封锁疫区、扑杀并无害处理发病动物、紧急免疫和消毒等措施,在最短时间内扑灭疫情。

目前,中国已建立起覆盖全国所有乡村的动物疫情报告网络,除了各级兽医机构的疫情报告人员外,全国村一级设有疫情报告观察员 64 万人。实行疫情举报制度,确保及时发现和报告疫情。同时,在全国建立了动物追溯体系,确保发生疫情后能追踪溯源。(记者王亚光 朱绍斌)

来源:中新网 <http://www.chinanews.com.cn/gn/news/2008/07-26/1325498.shtml> [2008 - 08 - 01]