

饲料中氯霉素、甲矾霉素和氟甲矾霉素含量的 HPLC 测定方法

戴 华 王美玲 李拥军 朱中武

(湖南出入境检验检疫局技术中心 长沙市沙子塘路 161 号 410007)

摘 要 采用微量样品处理技术, 用乙酸乙酯提取饲料样品中的氯霉素、甲矾霉素、氟甲矾霉素, 并经液-液分配净化后, 用反相液相色谱梯度洗脱双波长对 3 种组分进行同时分离测定, 外标法定量, 检出限为 0.020 mg/kg, 回收率大于 70%, RSD 小于 17.2%。

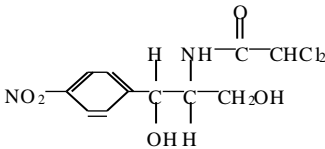
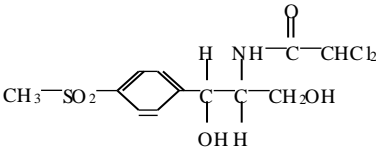
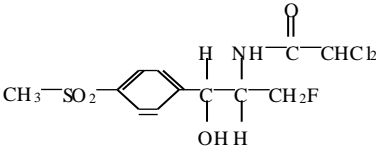
关键词 饲料, 氯霉素, 甲矾霉素, 氟甲矾霉素, 高效液相色谱。

中图分类号: O 657.7⁺2 文献标识码: A 文章编号: 1004-8138(2006)06-1208-05

1 前言

氯霉素(Chlramphenicol)、甲矾霉素(Thiamphenicol)和氟甲矾霉素(Florfenicol)属于酰胺醇类抗菌素, 后两者是氯霉素的衍生物, 它们的化学性质见表 1。

表 1 3 种酰胺醇类抗菌素的化学性质

组分名称	结构式	CAS 号	相对分子质量
氯霉素(左霉素) Chlramphenicol(Laevo mycetin)		56-75-7	323.14
甲矾霉素(硫霉素) Thiamphenicol		15318-45-3	356.23
氟甲矾霉素(氟罗芬尼, 氟苯尼考) (Florfenicol)		73231-34-2	358.21

氯霉素, 2, 2-二氯-N-[2-羟基-1-(羟甲基)-2-(4-硝基苯基)-乙基]乙酰胺, 具有左旋光性, 又名左霉素, 略溶于水, pH 10 以上失去活性。易溶于乙醇、甲醇、丙二醇、丙酮及乙酸乙酯, 不溶于苯及石油醚, 是一种有效的广谱抗生素。由于其对多种病原菌有较强的抑制作用, 曾在养殖业广泛使用, 但由于氯霉素能抑制人体骨髓造血功能, 引起人类再生障碍性贫血、粒状白细胞缺乏症、新生儿、早

联系人, 电话: (0731) 5385203; (0731) 5385202; E-mail: ddaihua@yeah.net

作者简介: 戴华(1964—), 男, 湖南省浏阳县人, 研究员, 主要从事食品理化检验和食品安全方法学研究。

收稿日期: 2006-06-28; 接受日期: 2006-08-15

产儿灰色综合症等疾病,且低浓度的药物残留还会诱发致病菌的耐药性,因此氯霉素残留问题已引起国际组织和世界许多国家和地区的高度重视。欧盟、美国、香港特别行政区政府均在法规中将氯霉素列为禁用兽药,动物组织中不得检出,我国农业部已将氯霉素从 2000 年的《中国兽药典》中删除。

甲砒霉素, *D*-苏型-2, 2-二氯-*N*-[β -羟基- α (羟甲基)-*p*-(甲磺酰基)苯乙基]乙酰胺, 是氯霉素的类似物, 对光、热稳定, 有吸湿性。室温下水中的溶解度为 0.5%—1.0%, 醇中的溶解度为 5%, 被称为第二代氯霉素。

氟甲砒霉素, 2, 2-二氯-*N*-[1-(氟甲基)-2-羟基-2-(4-(甲磺酰基)乙基)乙酰胺], 是甲砒霉素的氟化衍生物, 被称为第三代氯霉素。后两种药物有效地克服了氯霉素导致再生障碍性贫血的缺陷。

甲砒霉素和氟甲砒霉素由于没有氯霉素的缺陷, 作为氯霉素的替代品, 允许作为兽药使用。在防治猪呼吸道疾病时, 添加到饲料中的水平一般在 20—40 mg/kg。

国内外关于饲料中 3 种酰胺醇类抗菌素含量同时检测的方法还未见有报道。饲料主要报道的是氯霉素的检测方法, 葛明伟等^[1]采用高效液相色谱测定了饲料中氯霉素含量, 样品经甲醇提取然后用中性氧化铝净化, 紫外测定, 检出限为 1 mg/kg。Pilar Vinas 等^[2]采用液相色谱-二极管阵列检测器研究了饲料中氯霉素残留的检测方法, 样品经乙酸乙酯提取后, 用 Discovery DSC-18L 固相萃取小柱净化后进行测定。

多种酰胺醇类抗菌素药物的检验方法集中在组织样品中残留量的检测, 采用的方法有 GC-ECD^[3,4]、液相色谱-质谱测定法^[5], 这些方法对于提取的样液均采取固相萃取技术进行净化后进行测定。

由于饲料的杂质和干扰物质相对于组织样品多且复杂, 而且饲料中允许加入甲砒霉素和氟甲砒霉素, 如果饲料中加入了氯霉素, 其含量也会比组织样品中的残留量高得多。本文采用微量样品处理技术, 建立了一种反相 HPLC、梯度洗脱、二极管阵列检测器同时分离测定饲料中 3 种酰胺醇类抗菌素含量的快速方法。3 种酰胺醇类抗菌素的检出限均为 0.10 mg/kg, 回收率和精密度均满足饲料中酰胺醇类抗菌素含量的检测要求。

2 实验部分

2.1 仪器与设备

Shimadzu LC-10AT 系列色谱仪(日本 Shimadzu 公司), 配 SPD-M10AVP 检测器, CTO-M10AVP 柱温箱; LD4-2 低速离心机, 4000 r/min(北京医用离心机厂); 华利达-866 旋涡混匀器, 200—24000 r/min(太仓市科教器材厂); BRANSON B3200S-T 超声波清洗器(必能信超声(上海)有限公司); CNM-MST-2 多功能微量样品处理仪(长沙中讯电子工程研究所)。

2.2 试剂

准确分别称取氯霉素(美国 Sigma 公司, 纯度 99%)、甲砒霉素(ICN Biomedicals Inc 美国产品, 纯度 99%)、氟甲砒霉素(德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司, 纯度 99%) 0.050 g 置于 50 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 即为 1.0 mg/mL 混合标准储备液。再根据需要用甲醇将标准储备液稀释成适当浓度的混合标准工作液。

所用试剂乙腈为 HPLC 级试剂, 其余为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

2.3 实验步骤

准确称取 5.000 g 粉碎均匀试样于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 水于旋涡混匀器上混匀 2 min,

置于超声波清洗器中超声 15min 后,加入 10mL 乙酸乙酯于混匀器上混匀 3min, 2000r/min 离心 5min, 将上清液用尖嘴吸管转入另一支 30mL 离心管; 残样再用 2 × 5mL 乙酸乙酯于混匀器上混匀提取 2 次, 每次 2min, 2000r/min 离心 5min, 将上清液吸取合并, 于 65 °C 的空气流下浓缩至干; 加入 5mL 正己烷于混匀器混匀溶解残渣, 然后加入 5mL 4% Na₂SO₄ 水溶液, 于混匀器上充分旋涡混匀 5min, 2000r/min 离心 5min, 将上层有机相用尖嘴吸管吸出弃去, 水相再用 2 × 5mL 正己烷同样处理 2 次; 然后用 3 × 6mL 乙酸乙酯萃取水相 3 次, 每次于混匀器上混匀 2min, 2000r/min 离心 3min, 用尖嘴吸管将上层有机相吸取合并于 30mL 离心管中, 于 65 °C 的空气流下浓缩至近干, 用 1.0mL 甲醇溶解残渣混匀, 过 0.45μm 滤膜后上 HPLC 测定, 外标法定量。

2.4 仪器条件

色谱柱: Varian Polar C18-A (25cm × 4.6mm, 5μm) 色谱柱; 柱温: 40 °C; 进样量: 10μL; 氯霉素检测波长: 277nm, 甲砒霉素、氟甲砒霉素检测波长 225nm; 流速: 0.5mL/min。

梯度洗脱程序: 见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	乙腈 (%)	水 (%)
0.00	20	80
5.00	20	80
30.00	45	55
30.01	20	80
40.00	20	80

3 结果和讨论

3.1 色谱条件的选择

图 1 是氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素标准混合溶液色谱分离后, 二极管阵列检测器采集波长 210—350nm 的紫外吸收光谱图, 从其吸收峰看, 氯霉素在 277nm 左右, 有最大吸收外, 而甲砒霉素、氟甲砒霉素的紫外吸收光谱特征一致, 最大吸收波长在 225nm 左右, 因此在使用液相色谱同时分析这 3 种酰胺醇类抗菌素含量时, 要保证 3 种酰胺醇类抗菌素最大的检测灵敏度, 必须选择两个波长作为测定波长, 并采用二极管阵列检测器或双波长检测器才能一次完成。

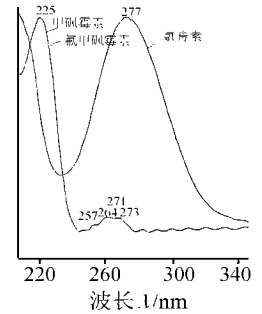


图 1 三种酰胺醇类抗菌素紫外吸收光谱图

现有关于氯霉素分析方法的液相色谱法, 采用的是反相色谱 C18 柱, 使用的流动相有乙腈-水、乙腈-磷酸缓冲液、甲醇-水、甲醇-盐酸缓冲液, 都是等梯度洗脱; 由于饲料样品中组分比组织样品复杂得多, 如果采用等梯度洗脱, 将难以保证目标物与杂质的完全分离, 我们通过实验, 采用梯度洗脱方式, 通过实验确定了流动相采用乙腈-水, 并让乙腈含量小比例增加的程序, 可保证有效分离和定量(图 3)。

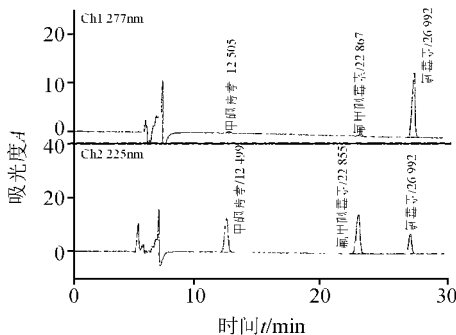


图 2 3 种酰胺醇类抗菌素标准溶液色谱分离图

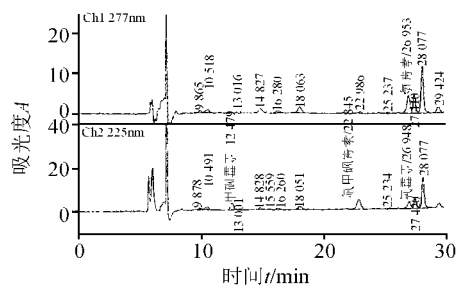


图 3 空白全价饲料样品中添加 0.1mg/kg 水平 3 种酰胺醇类抗菌素药物色谱分离图

3.2 提取与净化条件的选择

热稳定性: (60 ± 5) 的条件下, 空气流将标准溶液吹至近干, 回收率分别为氯霉素 98.7%、甲矾霉素 96.4%、氟甲矾霉素 97.9%。

萃取回收率: 取 1 mL 0.5 μg/mL 混合标准溶液, 按我们拟定的样品处理过程处理 3 种酰胺醇类抗菌素的回收率为: 氯霉素 99.8%、甲矾霉素 99.5%、氟甲矾霉素 101.1%。

光稳定性: 在避光的条件下室温保存, 6 个月内标准工作溶液浓度不发生变化。

以上结果表明, 3 种酰胺醇类抗菌素的化学性质对光、热和空气稳定。

氯霉素类药物易溶于乙酸乙酯, 是普遍采用的提取剂, 利用氯霉素溶于水溶液而不溶于正己烷的性质, 采用液-液分配方法, 用正己烷将提取液中的脂溶性杂质去除, 然后再用乙酸乙酯把从水中的 3 种酰胺醇类抗菌素萃取出来, 从而达到满意的净化效果, 整个过程采用了微量样品处理设备和技术^[6], 使得操作简便、快速。

3.3 方法的线性和检出限

在本方法确定的色谱实验条件下, 3 种酰胺醇类抗菌素在 0.10—20 μg/mL 间峰面积 (x) 与进样浓度 (y) 呈线性关系, 其线性方程分别为氯霉素 $y = 3 \times 10^{-5}x - 0.0432$, $r = 0.9998$; 甲矾霉素 $y = 2 \times 10^{-5}x + 0.0404$, $r = 0.9997$; 氟甲矾霉素 $y = 2 \times 10^{-5}x - 0.1200$, $r = 0.9993$ 。3 种抗生素的定量检出限均为 0.10 μg/mL, 相当与样品定量低限为 0.020 mg/kg。

3.4 方法的精密度和回收率实验

在本方法确定的实验条件下, 称取 5.000 g 空白全价猪饲料样, 分别添加不同量的 3 种酰胺醇类抗菌素混合标准溶液, 使样品分别具备不同浓度水平, 然后敞口于室温下放置 1 周, 充分自然挥发掉溶剂后, 按本法平行进行 6 次, 测定回收率、精密度, 结果见表 2。

表 2 全价饲料中添加 3 种酰胺醇类抗菌素实验室内加标测得量、精密度实验数据 (空白样未检出)

加标量 (mg/kg)	甲矾霉素			氟甲矾霉素			氯霉素		
	平均测得量 (mg/kg)	平均回收率 (%)	RSD (%)	平均测得量 (mg/kg)	平均回收率 (%)	RSD (%)	平均测得量 (mg/kg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.02	0.0149	74.3	17.2	0.0181	90.5	15.2	0.0173	86.5	9.2
0.10	0.0782	78.2	14.6	0.0883	88.3	11.7	0.0902	90.2	9.3
0.50	0.403	80.6	14.3	0.448	89.6	10.8	0.462	92.4	8.1
1.00	0.865	86.5	10.3	0.925	92.5	9.3	0.931	93.1	7.6
5.00	4.26	85.2	7.5	4.78	95.6	8.2	4.78	95.6	8.2
10.0	8.74	87.4	6.1	9.22	92.2	8.7	9.85	98.5	8.1
20.0	17.7	88.5	6.5	18.7	93.5	8.3	19.4	97.0	6.2

实验结果表明, 采用微量样品处理技术, 高效液相色谱法测定饲料中的氯霉素、甲矾霉素、氟甲矾霉素, 简便、快速、灵敏、重复性好、准确度高, 方法的各项技术指标满足 SN/T 0001-1995《出口商品中农药、兽药残留量及生物毒素检验方法标准编写的基本规定》的要求。

参考文献

- [1] 葛明伟, 陈莹莹, 王淑芬. 饲料中氯霉素高效液相色谱分析研究[J]. 辽宁畜牧兽医, 1997, (2): 31—32
- [2] Vinas P, Balsobre N, Hernández-Córdoba M. Determination of Chloramphenicol Residues in Animal Feeds by Liquid Chromatography with Photo-Diode Array Detection[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, **558**: 11—15
- [3] Pfennig A P, Royablj E, Rupp H S, Turnpseed S B, Gonzales S A, Hurlbut J A. Simultaneous Determination of Residues of Chloramphenicol, Florfenicol, Florfenicol Amine, and Thiamphenicol in Shrimp Tissue by Gas Chromatography with Electron Capture

Detection[J]. *J. of AOAC International*, 2000, **83**(1): 26—30

- [4] 王建华, 陈世山. 同时测定鱼肉中氯霉素和甲矾霉素残留量的毛细管气相色谱法[J]. 分析测试学报, 2001, **20**(3): 89—91.
- [5] Riet J M, Potter R A, Christie-Fougere M, Burns B G. Simultaneous Determination of Residues of Chloramphenicol, Thiamphenicol, Florfenicol, and Florfenicol Amine in Farmed Aquatic Species by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry[J]. *J. of AOAC International*, 2003, **86**(3): 510—514.
- [6] 聂洪勇, 黄志强. 农、兽药及工业化学物残留量分析中样品前处理微量化学法技术研究[J]. 现代商检科技, 1991, **1**(3): 1—4.

Determination of Chloramphenicol, Florfenicol and Thiamphenicol in Swine Feed by HPLC

DAI Hua WANG MeiLing LI Yong-Jun ZHU ZhongWu

(Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changsha 410007, P. R. China)

Abstract Chloramphenicol, florfenicol and thiamphenicol in swine feed were extracted from the test sample by ethyl acetate and determined by HPLC with PAD, using external standard method. Chromatographic separation was performed with Meta Chem Polaris 5 μ m C18-A (25cm \times 4.6mm I.D.) column with eluant consisting acetonitrile-water, and the eluate were monitored at 225nm and 277nm. The detection limit is 0.020mg/kg, the recovery is higher than 70%, and RSD is lower than 17.2%.

Key words Swine Feed, Chloramphenicol, Thiamphenicol, Florfenicol, HPLC.

廉价光谱分析资料讯息

1. 《光电光谱分析》, 周开亿主编, 4 册, 16 开, 1236 页, 《光谱实验室》编辑部增刊, 每套 55 元。
2. 《光谱实验室》2004 年 1—6 期, 16 开, 1248 页, 每套 75 元。
3. 《数理统计在化学、光谱分析中的应用》, 纳利莫夫著, 余生等译, 《光谱实验室》编辑部编, 16 开, 396 页, 每册 10 元。
4. 《邮票上的光谱学和化学史》, 周开亿等编, 《科学出版社》出版, 16 开, 158 页, 每册 10 元。
5. 《空心阴极放电及其应用》, 周开亿主编, 《真空科学与技术》杂志社出版, 32 开, 798 页, 上下册, 每套 10 元。
6. 《邮票上的化学、光学和光谱学史》, 周开亿主编, 《光谱实验室》2006 年第 1 期彩色抽印本(收藏本), 16 开, 64 页, 每册 30 元。

以上各书售价中均含普通印刷品邮费。

联系地址: 北京市 81 信箱 66 分箱《光谱实验室》编辑部联络处 刘建林, 邮编: 100095