

高效液相色谱测定海虾中呋喃唑酮残留量

景立新 孙武平 阮玲娟 赵林岩 王君君^a 李红^b 徐雯

(大连大学医学院医学检验系 辽宁省大连市开发区学府大街 10 号 116622)

^a(大连水产品交易市场监测室 辽宁省大连市 116011)

^b(大连医科大学检验医学院 辽宁省大连市 116044)

摘 要 样品用二氯甲烷提取, 正己烷纯化, 外标法定量, 高效液相色谱 (HPLC) 法检测海虾中呋喃唑酮残留量。本方法校准曲线线性范围为 0.01—1.00 μg/mL, $r = 0.9991$ 。检测下限为 1.0 μg/kg, 回收率 92.0%—100.5%, 相对标准偏差 (RSD) 为 2.9%—4.6%。测定方法准确, 灵敏, 达到了水产品检测的要求。

关键词 呋喃唑酮; 高效液相色谱; 海虾

中图分类号: O 657.7⁺2

文献标识码: B

文章编号: 1004-8138(2009)04-0872-04

1 前言

呋喃唑酮 (FZD) 又名痢特灵, 是一种广谱抗菌药物, 常被用于水产品养殖传染病的防治。有资料表明它具有诱变致癌作用, 已成为国内外水产行业的禁药^[1]。目前, 对于它的测定, 主要是液相色谱, 液相色谱-质谱联用等。此法虽然灵敏度高, 但测定成本及设备要求较高, 不适宜广泛应用。作者采用高效液相色谱 (HPLC) 法, 对海虾中呋喃唑酮的测定方法作了探讨, 并得到了满意结果。

2 实验方法

2.1 仪器与试剂

P2003 高效液相色谱仪 (大连智尔利科贸中心), 配有紫外检测器; TS-200 高速组织捣碎机 (江苏江阴科研仪器厂); SE502AA 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); LXJ-6401 离心机 (北京医疗仪器修理厂); KS-390 圆周震荡摇床 (上海振捷实验设备有限公司); MILLIQ plus 超纯水器 (法国 Hillipore 公司); 蒸发烧瓶; 具塞三角烧瓶; 刻度离心管。

乙腈、二氯甲烷色谱纯; 正己烷 (AR), 用乙腈饱和; 磷酸 (AR); 乙腈水溶液 (8:2); 无水硫酸钠 (AR) 经 640 °C 灼烧 4 h 后, 贮于密闭容器中备用。使用前装无水硫酸钠柱: 200mm × 24mm (id), 内装 10g; 重蒸馏水 (18.2 MΩ · cm)。

呋喃唑酮标准液配制: 称取 10.0mg 呋喃唑酮 (纯度 99.5%), 用乙腈水溶液溶解并稀释定容至 50mL 棕色容量瓶中, 在冰箱中冷藏保存, 保存期一个月。该液 1mL 相当于 200μg 呋喃唑酮。临用前, 吸取呋喃唑酮标准储备液, 用流动相稀释成浓度为 100μg/mL 的标准工作液。

联系人, 电话: (0411) 81126815; E-mail: nicholas-tsa@163.com

作者简介: 景立新 (1957—), 女, 辽宁省大连市人, 高级实验师, 主要从事卫生理化检验实验教学、食品营养分析。

收稿日期: 2008-11-10; 接受日期: 2009-03-02

2.2 色谱条件

色谱柱: ODS-C₁₈ 柱, 250mm × 4.6mm (id), 粒度 5μm.; 流动相: 乙腈 水 磷酸 (40 60 0.1); 流速: 1.0mL/min; 检测波长: 365nm; 柱温: 25 ; 进样量: 20μL。

2.3 实验方法

2.3.1 最大吸收波长测定

取 10mL 比色管 2 支, 加入呋喃唑酮标准液 (20μg/mL) 0.0mL, 0.6mL, 以乙腈水溶液加至 5mL, 混匀, 在 1cm 比色皿中, 零管调零, 检测呋喃唑酮最大吸收峰的波长。经 756MC 紫外可见分光光度计扫描测定, 测得呋喃唑酮最大吸收峰的波长为 365nm。实验测得数据如图 1。

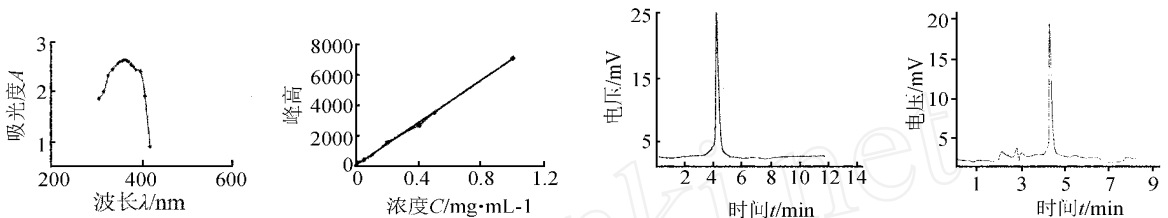


图 1 呋喃唑酮波长吸收曲线

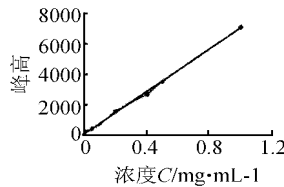


图 2 校准曲线谱图

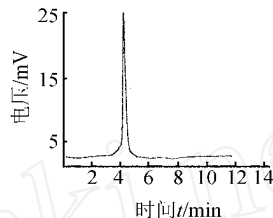


图 3 标准溶液谱图

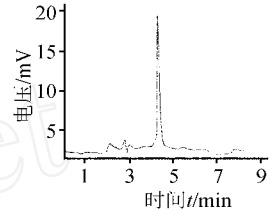


图 4 样品溶液加标谱图

本实验证明呋喃唑酮乙腈液最大吸收峰波长为 365nm 与文献报道^[1]相符。故本实验样品以及标准系列在波长 365nm 处测定。

2.3.2 试样制备

取市场销售的外地养殖虾、野生虾中可食部分, 切成不大于 5mm × 5mm × 5mm 小块后混匀, 经高速组织捣碎机捣碎即可, 充分混匀。剩余样品冰箱冷冻保存。

2.3.3 提取

称取捣碎样品约 10.00g 于碘量瓶中, 加入 25mL 二氯甲烷搅拌分散后浸泡 15min, 在振荡器上振荡 5min, 提取液经无水硫酸钠柱滤入蒸发烧瓶中, 残渣分别用 25mL 和 15mL 二氯甲烷按上述方法各重复提取一次, 再用 15mL 二氯甲烷冲洗无水硫酸钠柱, 并采用洗耳球吹出柱中液体, 滤液均滤入同一蒸发烧瓶中, 滤液于旋转蒸发仪上在 45℃ 以下减压蒸发去除溶剂, 蒸发速度控制在 2mL/min。

2.3.4 净化

用 1.0mL 流动相和 1.0mL 正己烷溶解残渣并充分洗涤蒸发烧瓶, 将液体移入塑料离心管中, 4000rpm 离心 5min, 用吸管移去上层正己烷层, 再向离心管中加入 1.0mL 正己烷, 充分振荡 2min 混匀, 离心, 用吸管移去上层正己烷层, 下层清液经 0.45μm 膜孔滤器过滤后进行 HPLC 分析。同时取二氯甲烷除不加试样外, 按 2.3.2—2.3.5 步骤操作进行空白试验。

2.3.5 测定

采用外标法, 标准工作溶液和样品液等体积进样 20μL 进行测定。根据样品液和相近标准工作液的峰高, 按公式计算样品中呋喃唑酮残留量:

$$C = C_s \times (h - h_0) \times V \times 1000 / h_s \times m$$

式中: C ——样品中呋喃唑酮残留量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$); h ——样品液中呋喃唑酮的峰高; h_s ——标准工作液中呋喃唑酮的峰高; h_0 ——空白试验的峰高; C_s ——标准工作溶液中呋喃唑酮的浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$);

V —— 样品液最终定容体积 (mL); m —— 样品的称取量 (g)。

3 结果与讨论

3.1 色谱条件的优化

在 HPLC 色谱条件下, 对流动相的比例、流速、30、20、25 柱温, 365、375、380、320nm 紫外检测波长进行实验条件优化, 选择流动相: 乙腈-水-磷酸 (40:60:0.1); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 365nm; 柱温: 25℃, 对保留时间和样品的色谱峰形及机器的保养均适宜。在上述色谱条件下, 呋喃唑酮保留时间约为 4.3 min。

3.2 溶剂的影响

样品提取溶液一般为乙酸乙酯、二氯甲烷、乙腈, 实验表明: 乙酸乙酯提取率高, 但杂质多, 易将呋喃唑酮代谢产物-二乙脂类提取出来^[2]。乙腈提取毒性大, 提取浓缩时泡沫多。而二氯甲烷提取样品, 杂质少, 易排除基质干扰; 浓缩器比较, 取 1 份样品同时用 KD 浓缩器和旋转蒸发仪浓缩, KD 浓缩器浓缩时间长, 易损失, 温度不好控制。旋转蒸发仪浓缩时间短, 易能控制温度, 重现性好。

3.3 校准曲线与线性相关系数

校准曲线配制: 取 10mL 比色管, 分别加入呋喃唑酮标准工作液 0.001、0.005、0.01、0.02、0.04、0.05、0.10mL, 分别用流动相加至刻度, 混匀。依次进行测定, 得到相应峰高数值。并绘出校准曲线图 (图 2), 回归方程: $y = 6942.6x + 24.475$, 线性相关系数 $r = 0.9991$ 。标准品与样品加标的色谱图见图 3、图 4。

3.4 方法的最低检出限

在本实验操作条件和色谱条件下, 根据 3 倍噪音的峰响应值, 进样量计算即为最低检出量^[3]。本方法的检出限为 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3.5 回收率与精密度测定

批间精密度实验 选择养殖虾、野生虾样品, 以样品同样方法操作, 每天测定 1 次, 连续 6 次, 所得结果见表 1。

表 1 批间精密度实验 (n=6)

样品号	测定值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)						$\bar{X} \pm \text{SD}$	RSD (%)
1 号样	16.8	18.6	19.2	19.0	15.6	18.8	18.0 ± 1.4587	8.1
2 号样	18.7	19.1	19.2	17.4	18.5	16.9	18.3 ± 0.9402	5.1
3 号样	17.7	18.5	18.6	19.2	19.3	15.3	18.1 ± 1.4873	8.2
4 号样	16.2	17.6	16.3	15.8	14.9	17.1	16.3 ± 1.0342	6.3
5 号样	16.1	17.1	16.6	15.7	15.3	17.6	16.4 ± 0.8672	5.3
6 号样	16.4	14.9	15.6	16.7	17.3	15.7	16.1 ± 0.8649	5.4

1、2、3 号样为养殖虾, 4、5、6 号样为野生虾。

表 2 批内精密度与回收率 (n=6)

样品号	本底值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	加标值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	测定值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)	RSD (%)
1 号样	18.0	10	27.6	9.6	96.0	4.2
1 号样	18.0	20	36.1	18.4	92.0	3.8
1 号样	18.0	40	55.9	37.9	94.7	3.5
4 号样	16.3	10	26.1	9.8	98.0	2.9
4 号样	16.3	20	36.4	20.1	100.5	3.9
4 号样	16.3	40	54.5	38.2	95.5	4.6

1 号样为养殖虾, 4 号样为野生虾。

批内精密密度与回收率实验 取 2 份不同含量的样品平行称取 6 份, 向其中一份加入相应浓度的呋喃唑酮标准溶液, 按样品前处理和测定部分操作, 在选定的色谱条件下, 连续进样 6 次, 按峰高计算 RSD, 实验结果见表 2。

3.6 讨论

(1) 采用国产仪器, 本实验方法呋喃唑酮校准曲线线性范围为 0.01—1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $r=0.9991$, 检出限为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 回收率 92.0%—100.5%, RSD 为 2.9%—4.6%, 方法简便, 灵敏, 达到了实验方法的要求。

(2) 在研究过程中, 我们进行了实际样品的测定, 目前国内报道的相关研究只做了样品加标测定, 因此, 我们的研究与实际更接近了一步。对进行批量的水产品(虾类)检测具有重要的意义。国内水产品药物残留量标准为“不得检测出呋喃唑酮” $10\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[4]。欧盟规定出口食品中呋喃唑酮残留量不得大于 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[5]。从实验结果看, 市场销售的野生虾、养殖虾, 个别样品均不同程度超标, 建议有关部门, 加强对水产品的监控, 尤其饲料监控, 确保国内消费者的食用安全及出口产品的质量。

(3) 选用二氯甲烷提取样品, 杂质少, 易排除基质干扰, 效果比乙酸乙酯理想。无水 N_2SO_4 必须高温灼烧, 否则影响除水效果; 正己烷必须用乙腈饱和, 否则除脂时造成样品流失, 结果不准确; 旋转蒸发器浓缩样品优于 KD 浓缩器。在浓缩试剂时, 速度勿快, 否则导致呋喃唑酮被蒸汽带出, 测定值偏低。蒸发速度控制在 $2\text{mL}/\text{min}$, 温度在 45°C 以下。

(4) 由于硝基呋喃类药物在高温、光线、空气暴露等条件下, 会部分降解损失, 故样品提取净化操作中, 尽可能避光, 室温小于 25°C 条件下操作^[3]。所用器皿应尽可能采用棕色, 标准液和样品液在冷藏、避光条件下保存, 样品应尽快分析。

参考文献

- [1] 丁岚, 谢孟峡, 刘媛等. 高效液相色谱法测定鸡蛋中呋喃唑酮的残留量[J]. 分析化学, 2004, 32(2): 139—142
- [2] 许金花. 浅谈水产养殖药物残留的危害与监控措施[J]. 内陆水产, 2004, 13(8): 27—29
- [3] 葛宝坤, 王运凤, 常春艳等. 测定鸡肉、水产品中四种硝基呋喃类药物残留量的固相萃取-液相法[J]. 分析测试学报, 2003, 22(5): 91—93
- [4] 王秉栋主编. 食品卫生检验手册[M]. 上海: 科学技术出版社, 2003. 590—591.
- [5] 张心会, 冯玉明, 彩根法. HPLC 法测定动物源性食品中呋喃唑酮残留的研究[J]. 中国卫生检验, 2004, 14(3): 310—311.

Detem ination of Furazolidone Residue in Shrimp by HPLC

JING Li-Xin SUN Wu-Ping RUAN Ling-Juan

ZHAO Lin-Yan WANG Jun-Jun^a LI Hong^b XU Wu-n

(M edical Laboratory D epartm ent, M edical College, D alian U niversity, D alian, L iaoning 116622, P. R. China)

^a(L aboratory for A quatic P roduct T rade M arket, D alian, L iaoning 116011, P. R. China)

^b(M edical Laboratory College, D alian M edical U niversity, D alian, L iaoning 116044, P. R. China)

Abstract The furazolidone residue in shrimp samples were extracted with dichloromethane, purified with n-Hexane, and determined with external standard curve, by high pressure liquid chromatography (HPLC). The linear range of method is 0.01—1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $r=0.9991$, and test lower limit is 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The recovery is from 92.0% to 100.5%. The relative standard deviation is from 2.9% to 4.6%. The method is accurate sensitive, and meets the requirements for determination of the aquatic product.

Key words Furazolidone; HPLC; Shrimp