

高效液相色谱法测定养殖水体中呋喃西林

岑剑伟, 李来好, 杨贤庆*, 郝淑贤, 魏 涯, 黄 卉, 刁石强, 辛少平

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部水产品加工重点实验室,

国家水产品加工技术研发中心, 广东 广州 510300)

摘要: 建立一套养殖水体中呋喃西林的高效液相色谱检测方法。结果表明液液提取不适用于水体中呋喃西林(NFZ)的提取, 利用固相萃取效果最佳, 比较几种固相萃取小柱萃取效果, 发现MCX、HLB、C₁₈对NFZ具有保留作用, MCX适合用于处理偏碱性样液, HLB处理效果受pH值影响较小, C₁₈与HLB相比效果稍差。以HLB小柱浓缩水体中呋喃西林方法, 回收率在85%~95%之间, 相对标准偏差小于10%, 定量限达到0.25μg/L, 可应用于各类型养殖水体中的呋喃西林残留测定。

关键词: 高效液相色谱; 水体; 呋喃西林; 固相萃取

Determination of Nitrofurazone Residues in Aquaculture Water by HPLC

CEN Jian-wei, LI Lai-hao, YANG Xian-qing*, HAO Shu-xian, WEI Ya, HUANG Hui, DIAO Shi-qiang, XIN Shao-ping
(South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture, National R&D Center For Aquatic Product Processing, Guangzhou 510300, China)

Abstract: An HPLC method for the determination of nitrofurazone (NFZ) residues in aquaculture water was established. Solid-phase extraction (SPE) rather than liquid-liquid extraction was a suitable sample preparation method for the extraction of nitrofurazone residues from aquaculture water. Although MCX, HLB and C₁₈ SPE cartridges had a good retention efficiency for NFZ, MCX was suitable for separating alkaline extracts, whereas HLB was minorly influenced by pH and slightly superior to C₁₈. When NFZ was separated on HLB cartridge, the average recovery rate of the developed method was 85%–95% ($n = 3$), with relative standard deviation (RSD) less than 10%. The limit of quantification (LOD) of the HPLC method was 0.25 μg/L. Thus, this method is applicable to determine residual NFZ in aquaculture water.

Key words: HPLC; aquaculture water; nitrofurazone; solid-phase extraction

中图分类号: X824

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)02-0175-04

呋喃西林(nitrofurazone, NFZ)是一种具有5-硝基呋喃基本结构的广谱抗菌药, 20世纪90年代被发现具有致畸、致突变和致癌作用, 由于其代谢产物在动物体内与蛋白质结合稳定地存在, 被人所食用后, 这些代谢物就可以在胃酸作用下从蛋白质中释放而被人体吸收, 造成严重危害, 世界各国均严禁在治疗和饲料中使用^[1]。我国农业部已于2002年公布的《食品动物禁用兽药及其他化合物清单》中规定禁止在所有食品动物中使用硝基呋喃类抗生素。但由于此类药物价格低, 药效好, 许多养殖户对使用违禁药物危害认识还不到位, 仍然在养殖过程

中使用或误用NFZ, 因而有必要制定和完善相关检测方法, 加强监管, 力求从源头控制水产品硝基呋喃类药物的使用。目前NFZ及其代谢物的检测方法主要有免疫检测法和理化检测法^[2-4], 如紫外分光光度法^[5-6]、薄层色谱法^[7]、荧光分析法^[8]、高效液相色谱法^[9-10]、液质联用技术^[10-12]等。虽然关于NFZ检测的研究报道已经很多, 然而这些研究多以饲料、肉类等为对象, 以水体中的NFZ检测研究尚未见有报道。本实验研究水产养殖水体中残留NFZ的测定方法, 拟建立快速、简便、准确、灵敏度高的方法检测水产养殖环境中NFZ的残留量。

收稿日期: 2012-04-06

基金项目: 国家现代农业产业技术体系专项(CARS-49); 广东省科技计划重点项目(2008A020100006; 2009B020201003);

国家农业科技成果转化资金项目(2010GB23260577; 2009GB2E200303; 2010GB2E000335); 广东省海洋渔业科技推广项目(A200899B02; A200901C01); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2012TS22); 广西科学研究与技术开发计划项目(11107005-2)

作者简介: 岑剑伟(1976—), 男, 助理研究员, 硕士, 研究方向为水产品加工与质量安全。E-mail: genvex@163.com

*通信作者: 杨贤庆(1963—), 男, 研究员, 学士, 研究方向为水产品加工与质量安全。E-mail: yxqgd@163.com

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

池塘水、江水。

C₁₈ SPE小柱(C₁₈, 500mg/3mL)、Poly-Sery HLB SPE小柱(HLB, 60mg/3mL)、Poly-Sery MCX SPE小柱(MCX, 60mg/3mL) 德国CNW公司。

NFZ标准品 Dr.Ehrenstorfer公司; 甲醇(分析纯)、二氯甲烷(分析纯)、乙腈(色谱纯); 试验用水应符合GB/T 6682—2008《分析实验室用水规格和试验方法》, 一级水的标准。

1100高效液相色谱仪(配有DAD检测器) 美国安捷伦公司; 固相萃取装置 美国Supelco公司; GB204分析天平 瑞士梅特勒-托利多仪器公司; N-EVAP™112氮吹仪 美国Organomation公司。

1.2 方法

1.2.1 试剂配制

50%乙腈溶液: 取乙腈与水按体积比1:1混合; 标准储备溶液: 100μg/mL, 称取NFZ标准品10.0mg, 加入乙腈溶解, 定容到100mL, 4℃贮存; 标准工作液: 取标准储备液, 加50%乙腈溶液稀释配制质量浓度为0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2μg/mL的梯度系列。

1.2.2 NFZ理化性质研究

温度影响: 将NFZ标准溶液置于在50、60、70℃条件下避光保温放置60min, 监测NFZ含量变化。

光照影响: 将NFZ标准溶液分别曝光在室内日灯光下和阳光直射下, 监测NFZ含量变化。

酸碱稳定性: 将NFZ标准分别溶于pH2~12间醋酸-醋酸钠缓冲溶液中, 监测NFZ含量变化。

1.2.3 样品处理

液液萃取: 将NFZ标准加入水样中, 选取乙醚、二氯甲烷等低沸点溶剂按1:1水样进行萃取实验, 测定提取含量, 计算第一次提取的得率。用乙酸乙酯作为萃取溶剂, 以不同萃取体积比进行萃取, 萃取2次, 计算回收率。

固相萃取(SPE): 先将水样离心或过滤除去固体杂质。准确称取一定量加载到经活化的小柱上, 待样液全部过柱, 淋洗, 洗脱, 洗脱液于50℃水浴下在氮吹仪上吹干, 加50%乙腈溶液溶解, 于液相色谱上测定含量, 计算回收率。

色谱条件: 色谱柱: Agilent Zorbax SB-C₁₈, (250mm×4.6mm, 5μm); 流动相A为乙腈; 流动相B为超纯水; 进样量: 20μL; 流速: 1.0mL/min; 柱温: 30℃; 检测信号: 365nm。采用梯度洗脱程序如表1所示。

2 结果与分析

2.1 NFZ稳定性

本实验研究了温度、光照以及溶液酸碱度对NFZ稳定性之间的关系。在遮光条件下、70℃以下时NFZ降解缓慢, 在该温度以下短时间内作用的损失可忽略不计, 但在光热同时作用时降解较快, 这是因为NFZ对光照和温度均不稳定。因而在提取过程中应尽量避光操作, 尤其在进行热处理时应遮光。NFZ在pH4~10之间较稳定, 在强碱性溶液里不稳定, 降解生成其的同分异构体^[13], 在强酸性也不稳定, 因而在处理过程中应避免接触或使用极端pH值溶液。因此, 在以上所有试验均在遮光下进行, 热处理温度低于70℃, pH值须控制在目标物质稳定的范围内。

2.2 液液萃取

使用多种有机溶剂萃取水体中NFZ, 其中以乙酸乙酯的萃取效果最好, 重复萃取2次, 回收率可达到80%以上, 但萃取体积比须大于1:1, 因此要消耗大量乙酸乙酯。Jorge等^[10]在测定饲料中硝基咪唑类药物时使用乙酸乙酯萃取, 将样液调节到特定pH值下(pH8), 等体积萃取1次即可满足分析要求。实验按照其做法操作, 但结果提取率没有提高。在pH2~10之间改变水样的pH值, 萃取回收率并无明显改变, 可见pH值对乙酸乙酯的萃取回收率并无明显作用, 对于该实验的做法是否恰当值得商榷。

2.3 固相萃取

采用混合型的阳离子交换柱MCX和反相SPE小柱HLB进行固相萃取的研究。从活化、淋洗、洗脱等步骤研究了MCX、HLB和C₁₈ 3种小柱处理NFZ样品的使用方法, 并比较了其优劣。

2.3.1 使用方法

分别用pH4.0醋酸溶液、中性水和pH10氨水溶解NFZ(0.3μg/mL), 取3mL加载到经活化的小柱中, 探索淋洗和洗脱条件。小柱的活化依次加3mL水、3mL 10%甲醇溶液淋洗; 然后用甲醇分次洗脱, 每次3mL, 分别收集。测定各部分流出液中NFZ的含量。MCX、HLB和C₁₈对NFZ的保留效果均较好, 在上样流出液、淋洗液中均未检测到NFZ。用甲醇作为洗脱液可以较好的将NFZ从MCX、HLB柱上洗脱下来, 但却很难从C₁₈小柱上洗脱下来, 乙腈洗脱C₁₈小柱效果更佳。MCX小柱回收率与溶液pH值有关, 处理碱性溶液回收率比中性溶液好, 不宜用以处理酸性溶液; 样品液pH值对HLB和C₁₈小柱则无显著

表1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program

时间/min	流动相体积配比/%	
	A	B
0	10	90
9	35	65
9.1	10	90
14	10	90

影响,在pH4~10范围内回收率都较好,总体上,HLB优于C₁₈小柱。

2.3.2 处理回收率

取10mL池塘水,调节至相应pH值,将NFZ标准溶液(1μg)分别加入3种小柱,测试回收率。结果如表2所示,HLB小柱的回收率明显高于其他两种类型小柱,达到90%以上。MCX小柱处理不同pH样液时,回收率随pH值下降而降低,可能是因为酸性和中性条件下填料作用位点未被完全活化而导致吸附作用不强,表明该小柱适合处理偏碱性样液;C₁₈在不同pH值下回收率有变化,但不明显,更适合处理中性样液。HLB受pH影响不明显,在pH4~10之间回收率均稳定。HLB小柱是处理的最佳选择。

表2 SPE小柱提取效果比较
Table 2 Comparison of NFZ extraction efficiency using three different SPE cartridges

萃取柱	pH	加标量/μg	回收量/μg	回收率/%
MCX	4.0		0.4670±0.0335	46.7
	7.0		0.7210±0.0263	72.4
	10.0		0.8602±0.0047	86.0
HLB	4.0	1.000	0.9107±0.0030	91.0
	7.0		0.9135±0.0075	91.4
	10.0		0.9050±0.0043	90.4
C ₁₈	4.0		0.8404±0.0144	84.7
	7.0		0.8864±0.0060	88.6
	10.0		0.8595±0.0058	85.6

2.3.3 加载量影响

取池塘水,加入一定量NFZ标准,分别取5、10、15、20mL和25mL,过经活化的HLB小柱,用3mL水淋洗,5mL甲醇洗脱,测定洗脱液中的含量,并计算回收率。结果如表3所示,加载量在5~20mL内,回收率稳定,约在95%左右。上样量增加到25mL时,回收率有所下降,表明再增加上样量回收率将呈下降趋势。对于60mg/3mL规格的HLB小柱,本方法建议NFZ加载量不高于30μg,加载体积在10~20mL。

表3 加载量对回收率的影响
Table 3 Effect of NFZ loading volume on recovery rate

加标样液的质量浓度/(μg/mL)	加载量/mL	回收量/μg	回收率/%
1.881	5	8.903±0.058	94.6
	10	17.709±0.148	94.1
	15	26.860±0.213	95.2
	20	35.489±0.234	94.3
	25	42.845±0.416	91.1

2.4 方法评价

2.4.1 准确度和精密度

取20mL样品液,加标混匀,每个质量浓度3个平行,过HLB小柱,用3mL蒸馏水淋洗,抽干后,加5mL甲醇分两次洗脱小柱,洗脱液于40℃水浴下氮气吹干,然后用1mL 50%乙腈溶液溶解、定容,过0.45μm滤

膜,上机分析。另外做一份空白对照。本方法回收率在85%~95%之间,相对标准偏差小于10%(表4),方法回收率高、稳定性好。空白样品和加标样品色谱图分别见图1。

表4 方法回收率
Table 4 Recovery rate of the developed method

样品	含量/(μg/kg)	添加量/(μg/L)	测定值/(μg/L)	平均回收率/%	相对标准偏差/%
池塘水	0.0	0.25	0.2162±0.0199	86.5	9.2
		0.5	0.4613±0.0325	92.3	7.1
		2.5	2.212±0.042	88.5	1.9
江水	0.0	10	8.650±0.114	86.5	1.3
		50	43.79±0.76	87.6	1.8
		5	4.449±0.308	89.0	6.9

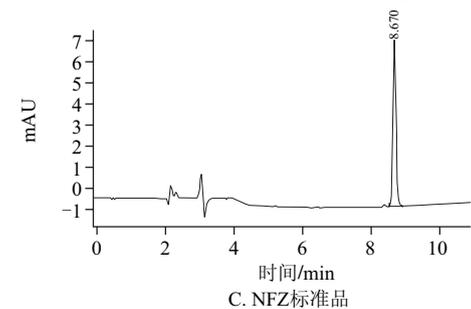
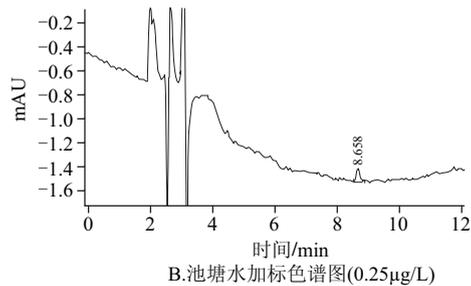
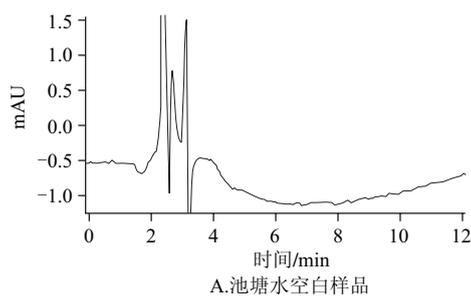


图1 NFZ色谱图

Fig.1 Chromatograms of NFZ standard and blank pool water with and without the addition of NFZ

2.4.2 方法线性范围和检测限

配制NFZ标准工作液,用液相色谱分析,测定不同质量浓度工作液的峰面积,并做峰面积(A)-质量浓度(C)校正曲线,曲线方程为: A=96.409C-0.00034,相关系数为: 0.99998。NFZ在0.005~2μg/mL范围内具有很好的线性。NFZ标准色谱图见图1C。以6倍信噪比计算得检测限的质量浓度为0.0025μg/mL,但测得色谱峰较小,难以辨认,信噪比达不到6倍,因而确定定量限为0.005μg/mL(R_{SN}=12)。以20mL的上样量计算,该法定量限为0.25μg/L。

3 结 论

本实验摸索HLB等小柱处理NFZ的使用方法, 比较它们处理不同pH值样液的萃取效果, MCX适合处理偏碱性样品, 而HLB处理pH值适用范围较宽, 表现出很好的效果。C₁₈小柱与HLB相似, 但效果稍差。除以上所提到SPE小柱外, 相关文献的报道中还用到酸性氧化铝柱和NH₂型柱^[14], 其用途一般为除杂, 浓缩效果不明显。由于NFZ对光照和温度均不稳定, 实验对象——养殖水体中的残留量不可能太大, 因此本实验仅考察3种浓缩效果较好的SPE柱, 其中HLB小柱是最佳选择, 除杂及浓缩效果均显著, 浓缩倍数可达20倍以上。相对于液液萃取, SPE在净化、浓缩以及简化操作等方面都具有明显的优势。最终确定以HLB固相萃取小柱提取、浓缩, 建立SPE-液相色谱法测定水产养殖水体中残留的NFZ方法, 该方法回收率在85%~95%之间, 稳定性好, 相对标准偏差小于10%, 定量限可达0.25 μ g/L。

参考文献:

- [1] 田蕴, 罗晓琴. 水产品硝基呋喃类药物残留检测[J]. 动物保健, 2006(7): 45-47.
- [2] 何方洋, 沈建忠, 万宇平, 等. NFZ及其代谢物残留检测研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(4): 51-54.
- [3] 王习达, 陈辉, 左健忠, 等. 水产品中硝基呋喃类药物残留的检测与控制[J]. 现代农业科技, 2007(18): 152-155.
- [4] 徐一平, 胥传来. 动物源食品中硝基呋喃类物质及其代谢物残留的检测技术研究[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 590-593.
- [5] 欧翠华, 陈江飞, 胡毅坚, 等. 紫外分光光度法测定呋喃西林氧化锌搽剂中主药的含量[J]. 中国药房, 2007, 18(31): 2461-2462.
- [6] 谭锡军. 紫外分光光度法测定呋麻滴鼻液中呋喃西林含量[J]. 荆门职业技术学院学报, 2007, 22(9): 68-69.
- [7] VELAE H S, HARRINGTON G W. Hightly speciifc and sensitive detection method for nitrofurans by thin layer chromatography[J]. Journal of Chromatography, 1981, 208(1/3): 161-163.
- [8] BELAL T S. A simple and sensitive spectrofluorimetric method for analysis of some nitrofurans in pharmaceutical preparations[J]. Journal of Fluorescence, 2008, 18(5): 771-780.
- [9] VINAS P, CAMPILLO N, CARRASCO L, et al. Analysis of nitrofurans residues in animal feed using liquid chromatography and photodiode-array detection[J]. Chromatographia, 2007, 65(1/2): 85-89.
- [10] BARBOSA J, MOURA S, BARBOSA R, et al. Determination of nitrofurans in animal feeds by liquid chromatography-UV photodiode array detection and liquid chromatography-ionspray tandem mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 586(1/2): 359-365.
- [11] FINZI J K, DONATO J L, SUCUPIRA M, et al. Determination of nitrofurans metabolites in poultry muscle and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2005, 824(1/2): 30-35.
- [12] JIETRUSZKA K, OLEJNIK M, SELL B. Development and validation of a liquid chromatography method for the determination of nitrofurans in water[J]. Bull Vet Inst Pulawy, 2007, 51: 267-270.
- [13] QUILLIAM, M A, MCCARRY B E, HOO K H, et al. Identification of the photolysis products of nitorfurazone irradiated with laboratory illumination[J]. Canadian Journal of Chemistry, 1987, 65(5): 1128-1132.
- [14] DB33/T 599—2006 水产品中硝基呋喃类代谢物残留量的测定: 液相色谱-串联质谱法[S].