

高效液相色谱法检测水产养殖品中抗生素药物残留

张英武¹, 黄邵玲¹, 姚剑敏²

(1. 泉州师院化生学院, 福建泉州 362000; 2. 厦门大学海洋与环境学院, 福建厦门 361005)

摘要: 随着我国水产养殖业的迅速发展, 渔药大量投入使用。由于药物残留具有毒副作用, 严重危害着人体健康, 渔药残留已成为国际社会对我国水产品设置的主要贸易壁垒之一, 是影响我国水产品进入国际市场的关键。抗生素使用非常普遍, 易造成残留。本文建立了一种快速、简便的反相高效液相色谱检测水产品中抗生素残留的方法。该方法以 0.01mol/L 磷酸: 甲醇 (80: 20) 和 0.01mol/L 磷酸: 乙腈: 甲醇 (30: 50: 20) 为流动相, 利用梯度洗脱, 能够同时检测氟喹诺酮, 土霉素, 四环素。对黄花鱼组织及其肝脏、鳊鱼组织及其肝脏、虾组织进行检测。在鳊鱼组织和肝脏中发现有氟喹诺酮的残留, 残留量分别为 1.76ug/kg, 和 8.57ug/kg。

关键词: 渔药, 氟喹诺酮, 土霉素, 四环素, 高效液相色谱

近几十年来, 我国水产养殖业发展迅速, 养殖规模不断扩大, 产量迅猛增加。目前, 我国已成为世界水产品生产和出口大国, 水产品养殖产量已占全球养殖产量的 2/3。但我国养殖水产品质量水平不高, 总体形势不容乐观, 尤其是出口鳊鱼、虾仁等药残问题, 在国际市场上造成了极为恶劣的影响, 并给我国水产品出口企业带来了灾难性的打击。1995 - 2000 年间, 日本市场多次退回并销毁抗生素超标的我国鳊鱼及其制品; 另外, 2002 年 1 月 31 日, 欧盟因氟喹诺酮超标禁止进口中国的所有动物源性食品, 造成我国水产行业近 5 万劳动力下岗, 十几万渔民的水产品因企业无法履行收购合同卖不出去, 损失达 6.23 亿美元^[1-3]。因而加强养殖水产品中药物残留的检测方法研究, 加强监控管理已是当务之急。目前水产品中药物残留检测分析方法主要有气相色谱法、液相色谱法、免疫法和联用技术等。高效液相色谱法 (HPLC) 灵敏度较高、可靠性较强, 是目前应用广泛的一种理化检测手段。此法重复性好、速度快, 可使许多极难分离的待测物得以分析。本文以 0.01mol/L 磷酸: 甲醇 (80: 20) 和 0.01mol/L 磷酸: 乙腈: 甲醇 (30: 50: 20) 为流动相, 利用梯度洗脱, 能够同时检测氟喹诺酮、土霉素、四环素。该方法可快速、简便地用于检测水产品中抗生素的残留。

1 实验材料与方法

1.1 仪器: 旋转蒸发仪 (宁波科生仪器); 过滤装置 (德国); 高效液相色谱仪 (HP1100);

光二极管阵列检测器 (DAD) (HP1100); Hypersil ODS 柱 (5um, 4.0 * 250cm)

1.2 试剂:

甲醇 (色谱纯), 乙腈 (色谱纯), 正己烷 (色谱纯), 磷酸 (分析纯), 盐酸 (优级纯),

无水硫酸钠 (分析纯), 乙酸乙酯 (色谱纯)。

氟喹诺酮标准品 (德国进口)

土霉素标准品 (国产)

四环素标准品 (国产)

1.3 样品的制备

样品 (鳊鱼, 黄花鱼, 虾) 购于本地市场, 分别称取其肌肉组织或肝脏 20 - 40g, 加入等量的无水硫酸钠, 并加入 40mL 的 1mol/L HCl 溶液和 40mL 的乙酸乙酯, 用高级组织捣碎机将混合物绞碎, 并用 40mL 的 1mol/L HCl 溶液和 40mL 的乙酸乙酯转移至烧杯中, 静置浸泡 1 - 2h, 以 3000rpm/min 的速度离心, 滤出上清液, 于蒸馏烧瓶中, 沸水浴旋转蒸发浓缩, 在残留物中加入 10mL 甲醇和 10mL 正己烷, 并转移至分液漏斗中, 静置, 分液, 弃去正己烷。再加入 10mL 正己烷, 重复上述操作。滤液通过 0.45um 的有机相针

头滤器过滤, 滤液供 HPLC 检测使用。

1.4 液相色谱条件

色谱柱: Hypersil ODS 柱 (5um, 4.0 * 250cm);

流动相: A: 0.01mol/L 磷酸: 甲醇 (80: 20)

B: 0.01mol/L 磷酸: 乙腈: 甲醇 (30: 50: 20), 过滤、脱气;

流速: 1.000mL/min;

检测波长: 278nm, 268nm, 254nm, 355nm;

梯度洗脱: 0-2min: 100% A

2-4min: 0-100% B

4min 后: 100% B;

进样量: 20uL。

1.5 氯霉素标准工作曲线的绘制

用电子天平准确称 0.00150g 的氯霉素标准品于小烧杯中, 用甲醇少量多次转移于 10mL 的容量瓶中, 定容、摇匀。配成 0.15mg/mL 的氯霉素标准液。

用移液枪分别取 0.15mg/mL 的氯霉素标准液 5.0、7.5、15.0、22.5、31.0uL 于 1.5mL 的小瓶子中, 用甲醇定容 1.5mL, 配成 0.50、0.75、1.50、

2.25、3.10ug/mL 五个标样, 供 HPLC 进样。

1.6 氯霉素、土霉素、四环素混合标液的配制

称取土霉素标准品 0.00190g 于小烧杯中, 用 0.1mol/L HCl 溶液少量多次转移至 10mL 的容量瓶中, 每次转移都用一次性针头水相滤器抽滤, 定容、摇匀, 配成 0.19mg/mL 的土霉素标准液。

称取 0.00170g 的四环素标准品, 用 0.01mol/L HCl 溶液按上述方法配制 0.17mg/mL 的四环素标准液。

各取 0.15mg/mL 氯霉素标准液, 0.19mg/mL 土霉素标准液, 0.17mg/mL 四环素标准液 0.5mL 于 10mL 容量瓶中, 用 0.01mol/L HCl 溶液定容、摇匀。供 HPLC 进样。

1.7 样品的测定

分别检测以下五个样品液: 黄花鱼组织, 黄花鱼肝脏, 虾组织, 鳗鱼组织, 鳗鱼肝脏。吸取样品液 20uL 进样, 根据工作曲线, 用峰面积进行定量计算。

2 结果与讨论

2.1 氯霉素标准工作曲线

表 1 氯霉素标准液工作曲线的绘制

Table 1 The drawing of standard curves of CAP

浓度 (ug/ml.)	出峰时间 (min)	峰面积
0.5	6.405	71.7
0.75	6.403	78.0
1.5	6.403	101.8
2.25	6.408	124.5
3.1	6.407	151.0

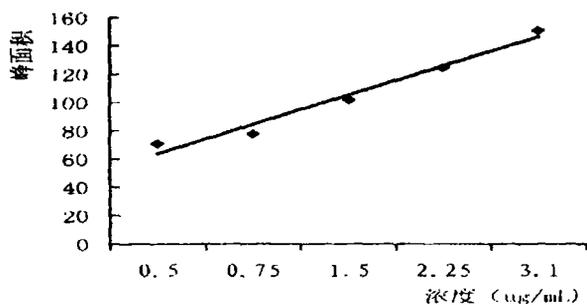


图 1 氯霉素标准工作曲线

Fig .1 Standard curves of chloramphenicol

从上图可看出, 线性关系较好, 线性回归方程为 $y = 20.61x + 43.47$, 相对系数 $R^2 = 0.9704$ 。

2.2 氯霉素标准液色谱图

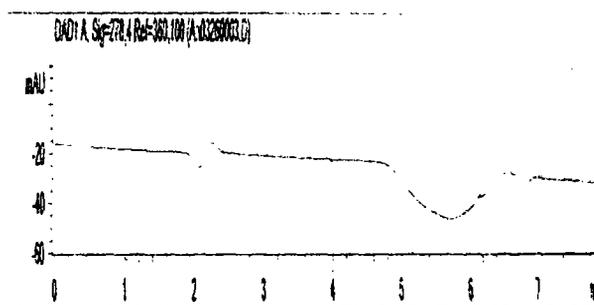


图 2 氯霉素标准液色谱图

Fig .2 Chromatorama of chloramphenicol standard sample

2.3 氯霉素、土霉素、四环素混合标液色谱图

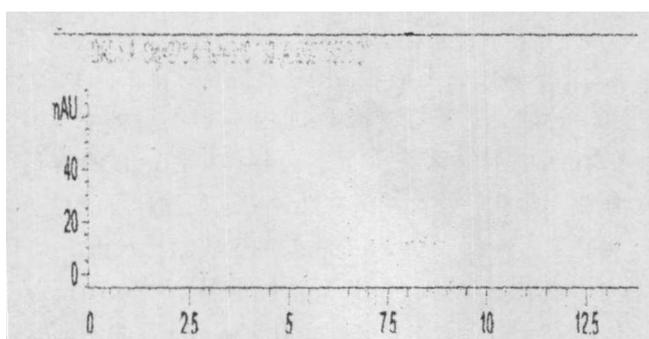


图3 混合标准样品色谱图

Fig.3 Chromatogram of medley standard sample

从上图可以看出, 色谱图可以完全分离。可以同时检测氯霉素, 土霉素, 四环素。

2.4 精密度实验

取氯霉素标准品 5.10mg 于 10mL 的容量瓶中, 用甲醇溶解, 配成 510ug/mL 的氯霉素标液。再取 510ug/mL 的标液 1mL 于 10 mL 的容量瓶中, 用甲醇定容, 配成 51ug/mL 的标液。在上述色谱条件下, 重复进样 5 次。

表2 精密度实验结果

Table 2 Result of precision

RSD (%)	1	2	3	4	5	平均值
峰面积	1583.2	1578.8	1594.0	1606.4	1550.3	1582.54

精密度良好。

2.4 样品的色谱图

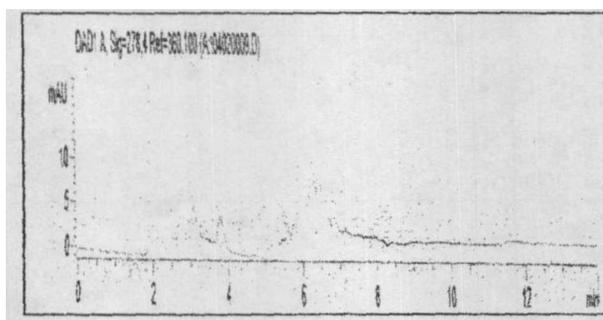


图4 鳗鱼组织样品色谱图

Fig.4 Chromatogram of eel tissue sample

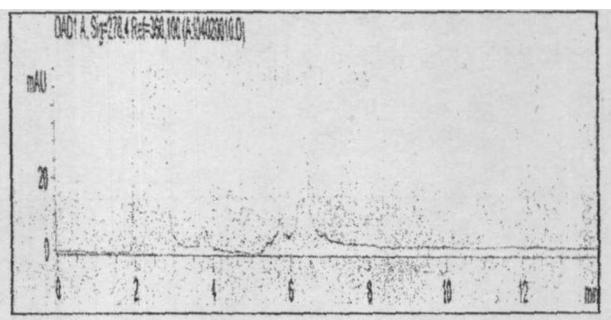


图5 鳗鱼肝脏样品色谱图

Fig.5 Chromatogram of eel liver sample

实验结果发现鳗鱼及鳗鱼肝脏两个样品液中, 在 6.42min 有明显的出峰, 通过加标验证是氯霉素的残留。由峰面积计算得鳗鱼组织和鳗鱼肝脏中氯霉素残留含量分别为 1.76ug/kg、8.57ug/kg, 没有检测到土霉素和四环素残留。

参考文献

1 胡松学. 我国水产养殖标准化管理工作存在的问题及对策探讨

[J]. 中国水产, 2004, 8: 23-24.

2 刘彦, 窦海鸽. 水产养殖用药存在的问题及对策. 渔业致富指南, 2004, 11: 15-16.

3 李兆新, 冷凯良, 李健等. 我国渔药质量状况及水产品中渔药残留监控[J]. 海洋水产研究 2001, 22 (2): 76-80.