

# 高压液相色谱法测定水产品中呋喃苯烯酸钠残留

徐英江<sup>1\*</sup>, 任传博<sup>2</sup>, 宫向红<sup>1</sup>, 李佳蔚<sup>2</sup>, 黄会<sup>2</sup>

(1. 山东省海洋资源与环境研究院, 山东省海洋生态修复重点实验室, 烟台 264006;  
2. 烟台山水海产有限公司, 烟台 264006)

**摘要:** **目的** 建立高压液相色谱法测定水产品中呋喃苯烯酸钠残留量的分析方法。**方法** 水产品样品经 0.5% 甲酸乙腈(v/v)提取后, 氨水、正己烷液-液萃取去除杂质, Zorbax SB-C<sub>18</sub> 为分析柱, 0.1%甲酸:乙腈(58:42, v/v)为流动相, 经 DAD 检测器( $\lambda=398$  nm)测定, 基质标准溶液外标法定量。**结果** 方法的线性范围为 50~1000  $\mu\text{g/L}$ , 相关系数  $r>0.998$ , 检出限 5  $\mu\text{g/kg}$ , 定量限 10  $\mu\text{g/kg}$ , 在 10~100  $\mu\text{g/kg}$  添加水平下平均回收率为 87.1%~102%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 4.3%~8.4%。**结论** 该方法能满足水产品中呋喃苯烯酸钠残留量测定的需要。

**关键词:** 呋喃苯烯酸钠; 水产品; 高压液相色谱法

## Determination of residues of sodium nifurstylenate in aquatic products by high pressure liquid chromatography

XU Ying-Jiang<sup>1\*</sup>, REN Chuan-Bo<sup>2</sup>, GONG Xiang-Hong<sup>1</sup>, LI Jia-Wei<sup>2</sup>, HUANG Hui<sup>2</sup>

(1. Shandong Provincial Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, China; 2. Yantai Shanshui Seafood Co., LTD, Yantai 264006, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish an analytical method for the determination of sodium nifurstylenate in aquatic products by high pressure liquid chromatography. **Methods** Samples were extracted by 0.5% formic acid-acetonitrile(v/v), and cleaned up by liquid-liquid extraction with ammonium hydroxide and *n*-hexane. A Zorbax SB-C<sub>18</sub> column was adopted with the mobile phase of 0.1% formic acid- acetonitrile(58:42, v/v). Sodium nifurstylenate was detected by DAD detector at 398 nm, and quantitatively analyzed by external standard. **Results** The method showed a good linearity in the range of 50~1000  $\mu\text{g/L}$  with the correlation coefficients over 0.998. The limit of detection(LOD) was 5  $\mu\text{g/kg}$ , and the limit of quantitation(LOQ) was 10  $\mu\text{g/kg}$ . The average recoveries were 87.1%~102% at the spiked level of 10~100  $\mu\text{g/kg}$  with the relative standard deviation (RSD) of 4.3%~8.4%. **Conclusion** This method can meet the requirement of fast and accurate determination of sodium nifurstylenate in aquatic products.

**KEY WORDS:** sodium nifurstylenate; aquatic products; high pressure liquid chromatography

基金项目: 山东省现代农业产业技术体系刺参产业创新项目(2012134)、泰山学者岗位“水生动物营养与饲料”

**Fund:** Supported by Shandong Provincial Modern Agricultural Industry Technology System Apostichopus japonicus Industry Innovation Team (2012134) and Taishan Scholars Station of Aquatic Animal Nutrition and Feed

\*通讯作者: 徐英江, 助理研究员, 主要研究方向为水产品质量安全。E-mail: xuyingjiang@yeah.net

\*Corresponding author: XU Ying-Jiang, Associate Researcher, Marine Fisheries Research Institute of Shangdong Province, No. 216, Changjiang Road, Yantai 264006, China. E-mail: xuyingjiang@yeah.net

## 1 引言

呋喃苯烯酸钠又名上野黄粉、上野黄药和尼复康,属于硝基呋喃类药物,是人工合成的一种广谱抗菌药物,主要用于动物和鱼类的细菌病预防和治疗中,有良好的效果。因此,在一些报道<sup>[1-6]</sup>中呋喃苯烯酸钠作为一种有效的抗菌药物在水产养殖业使用。但是,世界卫生组织和联合国粮农组织联合报道<sup>[7]</sup>硝基呋喃类药物具有潜在的致突变和致癌性。为了保护消费者的健康,世界各国政府纷纷禁止了硝基呋喃类药物在食品动物上所有目的的使用。我国农业部于2002年将呋喃苯烯酸钠及制剂列入水产养殖禁用兽药清单<sup>[8]</sup>。然而,违规使用这些药物的现象仍然存在<sup>[1-4]</sup>。

目前,关于呋喃苯烯酸钠检测方法的研究报道很少,仅见于饲料、猪肉、鸡肉、乳制品以及鱼血清等的检测,分析方法包括液相色谱法和液相色谱-串联质谱法<sup>[9-12]</sup>,而关于水产品中呋喃苯烯酸钠的检测却鲜有报道。从方法的灵敏度分析,液相色谱法和液相色谱-质谱法均能满足药残检测的要求,但由于质谱法仪器价格昂贵,一些单位无法配备。因此,本研究用液相色谱法对呋喃苯烯酸钠残留量进行分析测定,在满足灵敏度和准确度的前提下,使本方法具有更好的通用性和推广价值。为水产品质量安全监管提供技术支持。

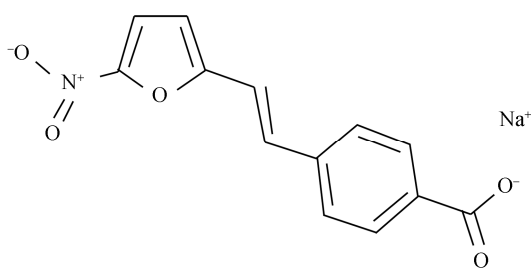


图1 呋喃苯烯酸钠分子结构式

Fig. 1 Molecular structure of sodium nifurstylenate

## 2 材料与方法

### 2.1 试剂

呋喃苯烯酸钠(纯度99.9%,日本Hayashi Pure Chemical Ind., Ltd.); 乙腈、甲酸、正己烷均为色谱

纯; 氨水为优级纯; 实验用水为超纯水系统制备的超纯水。

呋喃苯烯酸钠标准储备溶液: 称取呋喃苯烯酸钠标准品0.01 g(精确至0.0001 g), 用乙腈溶解配成100 mg/L的储备液, 置于4 °C冰箱中存放。

0.1%甲酸-乙腈溶液: 0.1%甲酸溶液80 mL加乙腈20 mL, 混匀备用。

### 2.2 仪器设备

高压液相色谱仪(美国Agilent 1200 Series, 配DAD检测器); 超纯水系统(美国Millipore公司, Milli-Q Gradient); 电子天平(德国Sartorius公司, BA210S); 高速离心机(上海安亭科学仪器厂, TGL-10C); 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, KQ-600E); N-EVAPTM112氮吹仪(美国Organomation Associates公司); 旋转蒸发仪(德国Heidolph公司, Laborota 4001)。

固相萃取柱: HLB(60 mg, 3 mL); C<sub>18</sub>(200 mg, 3 mL); MAX(60 mg, 3 mL); MCX(60 mg, 3 mL)。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 样品前处理

称取(10±0.01)g样品, 加0.5%甲酸乙腈30 mL, 40 °C超声提取1 h, 4000 r/min离心10 min, 上清液转入100 mL离心管中, 残渣用0.5%甲酸乙腈20 mL重复提取1次, 合并上清液, 加入氨水1 mL, 漩涡混匀, 4000 r/min离心10 min, 上清液转入100 mL棕色梨形瓶中, 50 °C旋转蒸发至近干, 用0.1%甲酸-乙腈溶液溶解残渣, 加入正己烷3 mL, 漩涡混匀1 min, 4000 r/min离心10 min, 弃去正己烷层, 水相用0.45 μm滤膜过滤上机。

#### 2.3.2 色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB-C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1%甲酸溶液+乙腈(58+42, v/v); 流量: 1.0 mL/min; 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μL; 检测波长: 398 nm。

#### 2.3.3 标准曲线绘制

准确移取呋喃苯烯酸钠标准储备溶液, 用0.1%甲酸-乙腈溶液稀释至浓度为1 mg/L的标准使用液, 称取空白样品10.0 g, 分别添加标准使用液50、100、200、500和1000 μL, 按2.3.1、2.3.2步骤操作, 以呋喃苯烯酸钠峰面积为纵坐标, 呋喃苯烯酸钠含量为横坐标, 绘制工作曲线。

### 3 结果与分析

#### 3.1 提取方法的确定

呋喃苯烯酸钠在水中几乎不溶解, 在醇、二甲基甲酰胺中极微溶, 在二甲基亚砜中微溶, 甲酸对呋喃苯烯酸钠有助溶作用<sup>[13]</sup>。呋喃苯烯酸钠在碱性条件下相对稳定, 酸性条件下在丙酮、甲醇、乙腈等有机溶剂中溶解度较高<sup>[10]</sup>。呋喃苯烯酸钠属于硝基呋喃类药物, 此类药物残留检测多采用乙腈、二氯甲烷等溶剂提取<sup>[14-19]</sup>。本研究对比了乙腈、丙酮、二氯甲烷、甲酸乙腈对目标物的提取效率, 结果表明, 甲酸乙腈的提取效率要高于其他几种提取溶剂。

本研究对不同比例甲酸乙腈溶液对呋喃苯烯酸钠的提取效率进行了分析, 分别采用 0.1%、0.2%、0.5%、1%、2%甲酸乙腈进行提取实验, 结果显示随着甲酸浓度的增加, 提取的效率有先增加后降低的趋势, 0.5%和 1%甲酸乙腈提取效果最好(图 2)。实验发现甲酸浓度高会导致样品结块, 甚至无法分散, 使呋喃苯烯酸钠的回收率偏低, 因而采用 0.5%甲酸乙腈作为提取剂。

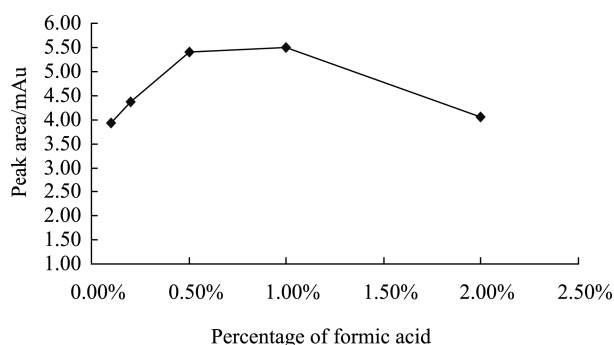


图 2 甲酸比例对呋喃苯烯酸钠回收率的影响

Fig. 2 Effect of the percentage of formic acid on the recovery of sodium nifurstylenate

超声提取是水产品中药物残留检测常用的方法, 本研究发现超声有利于目标物的提取, 并随着超声时间的增长目标物的回收率有一定的提升, 实验发现 1 h 时提取效果最好, 因此, 本研究采用超声 1 h 提取。

#### 3.2 甲酸和光照对呋喃苯烯酸钠的影响

甲酸能够提高目标物的提取效率, 但是本研究发现, 在旋蒸浓缩的过程中由于甲酸的存在会对目标物的回收率有一定的影响, 在浓缩之前加入氨水使提取液呈碱性后, 回收率有明显的提高。同时, 加入

氨水后, 提取液出现分层现象, 离心除去下层液体可去掉一些色素等杂质, 因此, 本研究在旋蒸浓缩前加入氨水并离心, 既保证了目标物的回收率, 又起到初步净化的作用。实验过程中发现目标物在强烈的日光下不稳定, 因此在实验过程中采取一定的避光措施, 采用棕色梨形瓶进行旋蒸浓缩。

#### 3.3 净化方法的选择

本研究比较了正己烷液-液萃取净化和固相萃取(solid phase extraction, SPE)净化两种方式, 其中 SPE 净化又对比了 HLB、普通 C<sub>18</sub> 柱、MAX 和 MCX 柱, 回收率情况见图 3。结果表明在 SPE 净化中 HLB 柱的回收率最高, 然而 HLB 柱净化和正己烷液-液萃取净化的效果没有显著差异, 因此为了节约成本和提高工作效率, 本研究选择了正己烷液-液萃取净化。

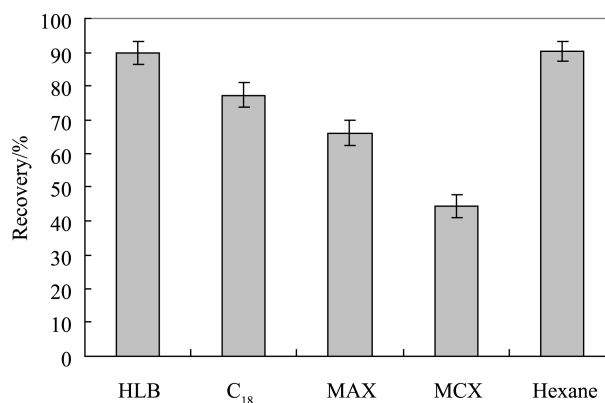


图 3 不同净化方法的回收率比较( $n=6$ )

Fig. 3 Recoveries of sodium nifurstylenate by different clean-up method ( $n=6$ )

#### 3.4 色谱条件的选择

##### 3.4.1 检测波长的选择

对呋喃苯烯酸钠标准溶液进行紫外扫描发现, 其在 265、398 nm 左右均存在吸收峰, 且在 398 nm 的吸收峰最大, 因而确定最佳检测波长为 398 nm, 既保证了方法的灵敏度, 又能有效减少杂质干扰。

##### 3.4.2 流动相的选择

参照文献<sup>[9-11]</sup>方法, 采用乙腈-水、乙腈-甲酸溶液为流动相体系, 并实验不同浓度的甲酸溶液对呋喃苯烯酸钠的灵敏度及峰形的影响, 结果显示 0.1% 甲酸-乙腈 58+42(v/v) 作为流动相时, 呋喃苯烯酸钠峰形尖锐、对称, 干扰峰少, 可获得较好的灵敏度和选择性(图 4、图 5)。

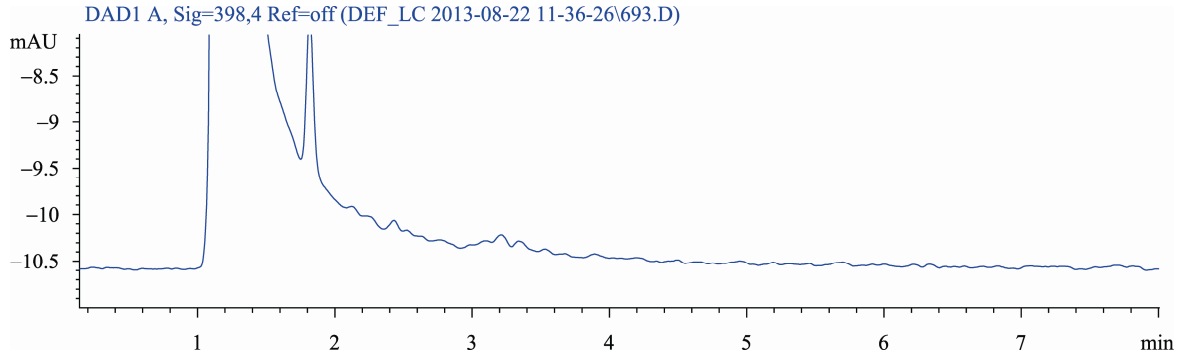


图 4 海参空白色谱图

Fig. 4 The chromatogram of sea cucumber blank

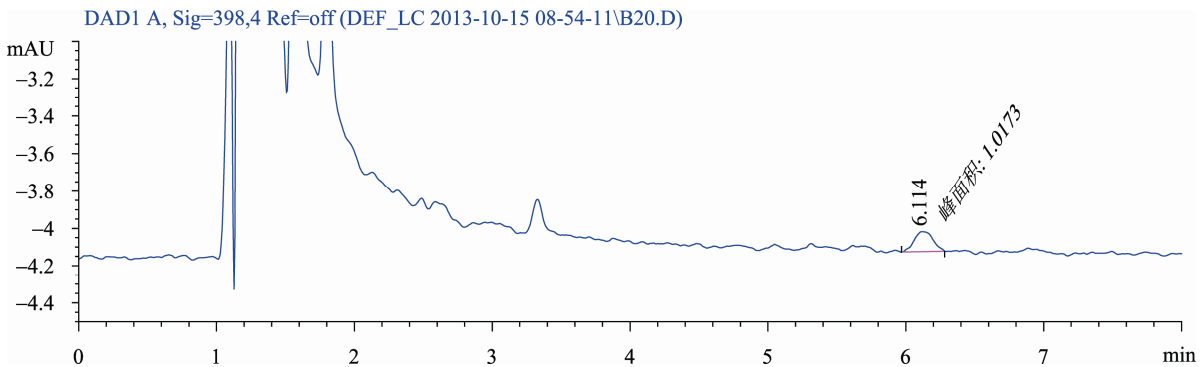


图 5 海参基质标准溶液色谱图(100 µg/L)

Fig. 5 The chromatogram of sea cucumber matrix standard solution (100 µg/L)

### 3.4.3 定容液的选择

实验中发现定容液中 0.1%甲酸溶液-乙腈的比例对呋喃苯烯酸钠的灵敏度有很大的影响, 采用 0.1%甲酸溶液-乙腈(80:20, v/v)做定容液, 比用流动相定容峰形好, 因此选择了 0.1%甲酸溶液-乙腈(80:20, v/v)作为定容液。

## 3.5 方法评价

### 3.5.1 线性范围、检出限和定量限

本方法基质标准溶液在 50~1000 µg/L 范围内, 以目标物峰面积为纵坐标, 溶液的质量浓度为横坐标, 绘制基质标准工作曲线(见图 6), 线性方程为  $Y=0.00967698X-0.0311232$ , 相关系数大于 0.999。

分别在阴性的鲤鱼、对虾、海参中添加呋喃苯烯酸钠 5 µg/kg 时, 呋喃苯烯酸钠峰形明显, 信噪比均大于 3, 当添加量为 10 µg/kg 时, 信噪比大于或等于 10, 平均回收率均大于 70%, 因此最终确定该方法的检出限为 5 µg/kg, 定量限为 10 µg/kg。

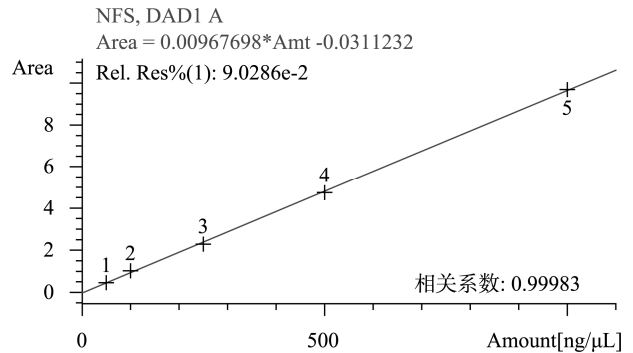


图 6 呋喃苯烯酸钠工作曲线

Fig. 6 Calibration curve of sodium nifurstylenate

### 3.5.2 方法的回收率和精密度

分别选用阴性的鲤鱼、对虾、海参进行加标回收和精密度实验, 考察方法的准确度和重现性。实验采用在 10 g 样品中分别添加相当于呋喃苯烯酸钠 10、20、100 µg/kg 的标准溶液, 每个水平加标 6 个样品, 测定 3 个批次。实验结果, 平均回收率都在 70% 以上, 批内、批间相对标准偏差均在 10% 以下, 以海参为例, 实验数据见表 1。

表 1 海参中呋喃苯烯酸钠加标回收率及精密度  
Table 1 Recoveries and RSD of sodium nifurstylenate in sea cucumber

添加量/( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	测定批次	平均回收率/%( $n=6$ )	批内相对标准偏差/%( $n=6$ )	批间相对标准偏差/%( $n=18$ )
10	1	102.2	8.4	
	2	91.4	6.8	7.3
	3	87.1	7.2	
20	1	92.6	5.8	
	2	87.5	6.7	6.4
	3	93.8	6.0	
100	1	98.8	4.9	
	2	97.6	5.2	5.1
	3	94.7	4.3	

## 4 结 论

本实验建立了水产品中呋喃苯烯酸钠残留量的液相色谱测定方法, 试样中呋喃苯烯酸钠用 0.5% 甲酸乙腈提取, 氨水、正己烷液-液萃取去除杂质, ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 为分析柱, 0.1% 甲酸: 乙腈(58:42, v/v) 为流动相, 经 DAD 检测器( $\lambda=398\text{ nm}$ ) 测定, 基质标准溶液外标法定量。结果表明此方法过程简单、灵敏度高、准确性好, 适用于水产品中呋喃苯烯酸钠残留量的测定。

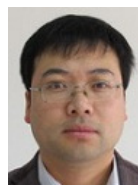
### 参考文献

- [1] 李活. 驼背鲈人工繁育与苗种培育技术[J]. 齐鲁渔业, 2007, 24(10): 16-18.  
Li H. Artificial breeding and seedling technology of *cromileptes altivelis* [J]. Shandong Fish, 2007, 24(10): 16-18.
- [2] 赵春民, 曾兆爽. 三疣梭子蟹蚤状幼体阶段“粘脏病”的危害及综合防治技术[J]. 科学养鱼, 2011, (8): 48-49.  
Zhao CM, Zeng ZS. Comprehensive prevention and control technology for wimming crab fleas zoea "dirty-stick" disease [J]. Sci Fish Farm, 2011, (8): 48-49.
- [3] 张明, 沈树军, 李为学. 南美白对虾子虾红线病的防治[J]. 渔业致富指南, 2010, 5: 57-58.  
Zhang M, Shen SJ, Li WX. The prevention of red line disease of *Penaeus vannamei* juveniles [J]. Fish Guide Rich, 2010, 5: 57-58.
- [4] 黄进光. 橙点石斑鱼驯养与水泥池集约化养殖试验[J]. 水产养殖, 2010, 10: 1-3.  
Huang JG. Domestication of *epinephelus bleekeri* and intensive culture in cement pool [J]. J Aquacult, 2010, 10: 1-3.
- [5] Katsuyuki H, Yasuhiro O, Shigeki D, et al. A review of seed production and stock enhancement for commercially important portunid crabs in Japan [J]. Aquacult Int, 2011, 19: 217-235.
- [6] Kazuaki U, Takahiko A, Ryuji U. Pharmacokinetics of sodium nifurstyrenate in cultured yellowtail after oral administration [J]. Aquaculture, 1993, 116: 331-339.
- [7] 傅国, 李宁毅. 硝基呋喃类和硝基咪唑类药物的研究进展[J]. 青岛大学医学院学报, 2003, 39(4): 486-488.  
Fu G, Li NY. The research progress of nitrofurans and nitroimidazoles drugs [J]. Acta Acad Med Qingdao Univ, 2003, 39(4): 486-488.
- [8] 食品动物禁用的兽药及其它化合物清单[Z]. 中华人民共和国农业部公告第 193 号, 2002.  
List of banned veterinary drugs and other compounds for food animals [Z]. The announcement of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China, 2002.
- [9] 张会彩, 李军, 闫晓东, 等. 高效液相色谱法检测饲料中 7 种硝基呋喃类药物[J]. 中国兽医杂志, 2011, 47(5): 72-74.  
Zhang HC, Li J, Yan XD, et al. Detection of seven kinds of nitrofurans drugs in feed by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Vet Med, 2011, 47(5): 72-74.
- [10] 李海燕, 郭平, 占春瑞. 高效液相色谱法检测乳及乳制品中的呋喃苯烯酸钠残留[J]. 食品科学, 2011, 32(2): 263-264.  
Li HY, Guo P, Zhan CR. Determination of sodium nifurstylenate in milk and dairy products by high performance liquid chromatography [J]. Food Sci, 2011, 32(2): 263-264.
- [11] 占春瑞, 李海燕, 郭平. 动物源食品中呋喃苯烯酸钠残留的液相色谱串联质谱法检测[J]. 分析测试学报, 2009, 28(9): 1074-1076.  
Zhan CR, Li HY, Guo P. Determination of sodium nifurstylenate in animal origin food by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrumental Anal, 2009,

- 28(9): 1074–1076.
- [12] Isao S, Kazuo I. A simple determination of sodium nifurstyrenate in Yellowtail serum by high performance liquid chromatography [J]. *Fish Pathol*, 2000, 35 (1): 51–52.
- [13] 邵淑梅, 张君仁. 百分吸收系数法测定尼富康含量[J]. *中国药品标准*, 2001, 2(1): 57–58.
- Shao SM, Zhang JR. Determination of the content of nifurstyrenate by percent absorption coefficient [J]. *Drug Stand Chin*, 2001, 2(1): 57–58.
- [14] 葛宝坤, 王云凤, 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-液相色谱法[J]. *分析测试学报*, 2003, 22(5): 91–93.
- Ge BK, Wang YF, Chang CY, *et al.* Determination of the pesticide residues of furaltadon, furacilin, nitrofurantoin and furazolidonum in chicken, fish, shrimp by SPE-HPLC [J]. *J Ins Anal*, 2003, 22(5): 91–93.
- [15] 吴富忠, 欧阳立群. 水产品中呋喃唑酮、呋喃西林药物残留的 HPLC 法测定[J]. *中国卫生检验杂志*, 2006, 16(7): 812–813.
- Wu FZ, Ouyang LQ. HPLC method for the determination of furazolidone, furacilin residues in aquatic products [J]. *Chin J Health Lab Tech*, 2006, 16(7): 812–813.
- [16] 于慧娟, 蔡友琼, 毕士川, 等. 高效液相色谱法测定水产品中呋喃唑酮的残留量[J]. *色谱*, 2005, 23(1): 114.
- Yu HJ, Cai YQ, Bi SC, *et al.* Determination of residues of furazolidone in aquatic products by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr*, 2005, 23(1): 114.
- [17] Vinas P, Campillo N, Carrasco L, *et al.* Analysis of nitrofurans residues in animal feed using liquid chromatography and photodiode-array detection [J]. *Chromat*, 2007, 65: 85–89.
- [18] Wang JR, Zhang LY. Simultaneous determination and identification of furazolidone, furahadone, nitrofurazone and nitrovin in feeds by HPLC and LC-MS [J]. *J Liq Chromatogr Rt*, 2006, 29(3): 377–390.
- [19] Barbosa J, Moura S, Barbosa R, *et al.* Determination of nitrofurans in animal feeds by liquid chromatography-UV Photo diodearray detection and liquid chromatography-ionspray tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 586: 359–365.

(责任编辑: 赵静)

### 作者简介



徐英江, 助理研究员, 主要研究方向为水产品质量安全。  
E-mail: xuyingjiang@yeah.net