

超高效合相色谱法分离和测定氟苯尼考对映体

张文华^{1,2*}, 王英^{1,2}, 侯建波^{1,2}, 陶红霞², 胡起立^{1,2}, 王良莉², 谢文^{1,2}, 徐敦明³

(1. 杭州海关技术中心, 浙江杭州 310016) (2. 浙江省检验检疫科学技术研究院, 浙江杭州 310016)

(3. 厦门海关技术中心, 福建厦门 361026)

摘要: 建立一种超高效合相色谱法(UPC²)快速分离和测定氟苯尼考对映体的方法。采用 Acquity Trefoil CEL2(150 mm×3.0 mm, 2.5 μm) 手性色谱柱, CO₂ 和甲醇为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 检测波长为 224 nm, 进样体积 5 μL, 系统背压 17.2 MPa, 柱温 40 °C。实验结果表明: 两种氟苯尼考对映体在 4.00~400.00 mg/L 线性范围内与峰面积呈良好线性关系, 相关系数均(r^2) 在 0.9993 以上, 仪器检出限(LOD, S/N=3) 为 2.0 mg/L。连续重复进样 10.0 mg/L 混合标准工作溶液 6 次, (-)、(+)-氟苯尼考的峰面积相对标准偏差值(RSD, n=6) 分别为 0.65%、0.81%。应用该方法对市售氟苯尼考标准品进行了分离及测定, 结果显示, 3 份标准品均未检出(+)-氟苯尼考, 均检出(-)-氟苯尼考, 含量为 9.20~10.00 mg/L, 在 6.0 min 内完成了两个氟苯尼考对映体的分离及含量测定, 该方法检测速度快、分离度高、绿色环保, 可以满足氟苯尼考对映体的分离检测要求。

关键词: 超高效合相色谱; 氟苯尼考; 对映体; 手性分离

文章编号: 1673-9078(2022)08-280-287

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.8.1339

Separation and Determination of Florfenicol Enantiomers Using Ultra-performance Convergence Chromatography

ZHANG Wenhua^{1,2*}, WANG Ying^{1,2}, HOU Jianbo^{1,2}, TAO Hongxia², HU Qili^{1,2}, WANG Liangli², XIE Wen^{1,2}, XU Dunming³

(1. The Technical Center of Hangzhou Customs, Hangzhou 310016, China)

(2. Zhejiang Academy of Science and Technology for Inspection and Quarantine, Hangzhou 310016, China)

(3. The Technical Center of Xiamen Customs, Xiamen 361026, China)

Abstract: A new method was established for the separation and determination of two florfenicol enantiomers using ultra-performance convergence chromatography (UPC²). The chromatographic separation conditions were optimized, and the stability of standard solutions of (-)-florfenicol and (+)-florfenicol enantiomers were observed. The separation process was carried out in Waters Acquity Trefoil CEL2 (150×3.0 mm, 2.5 μm) chiral columns. The mobile phase used carbon dioxide and methanol at a flow rate of 1.0 mL/min with gradient elution. The UV detection wavelength was set to 224 nm, the injection volume was 5 μL, the system backpressure was 17.2 MPa, and the column temperature was maintained at 40 °C. The method validation results indicate that the limit of detection (LOD, S/N=3) for both enantiomers was 2.00 mg/L, and the calibration linear range was between 4.00 and 400.00 mg/L, with correlation coefficients (r^2) > 0.9993. Repeated measurements of the peak area using 10 mg/L standard solutions of each florfenicol enantiomer showed relative standard deviations (RSD, n=6) of 0.65 and 0.81%, respectively. This method was then used to separate and measure commercially available standard florfenicol racemates. The results indicate that (+)-florfenicol was not detected in the three standard florfenicol racemates, but (-)-florfenicol (9.20~10.00 mg/L) was detected in all of them. The separation and content determination of the two florfenicol enantiomers were completed within 6.0 min. Therefore, this is a rapid, high-resolution, eco-friendly method that can be used for the separation and determination of florfenicol enantiomers.

引文格式:

张文华,王英,侯建波,等.超高效合相色谱法分离和测定氟苯尼考对映体[J].现代食品科技,2022,38(8):280-287,+137

Zhang Wenhua, WANG Ying, HOU Jianbo, et al. Separation and determination of florfenicol enantiomers using ultra-performance convergence chromatography [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(8): 280-287, +137

收稿日期: 2021-11-27

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFC1605400); 海关总署科研项目(2020HK196); 浙江省科技计划项目(2018C37014)

作者简介: 张文华(1984-), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品质量安全检测研究, E-mail: zwh@zaiq.org.cn

Key words: ultra-performance convergence chromatography; florfenicol; enantiomers; chiral separation

氟苯尼考 (Florfenicol, FF) 又称氟甲砜霉素, 化学名称为 2,2-二氯-N-[(1R,2S)-3-氟-1-羟基-1-(4-甲基磺酰基苯基)-2-丙基]乙酰胺, 是一种常用的兽用抗生素^[1], 抑菌效果好、抗菌谱广、安全高效, 常用于防治畜禽消化道和呼吸道细菌性感染病^[2]。氟苯尼考结构中存在两个对映体: (-)-氟苯尼考 (左旋体)、(+)-氟苯尼考 (右旋体) (图 1)。研究发现, 氟苯尼考外消旋体中不同结果对映体之间的生物活性差异较大, 其中含有抗菌活性的对映体为(-)-氟苯尼考 (左旋体), 无抗菌活性的对映体为(+)-氟苯尼考 (右旋体), 氟苯尼考中左旋体的含量决定了氟苯尼考药效的高低^[3,4]。

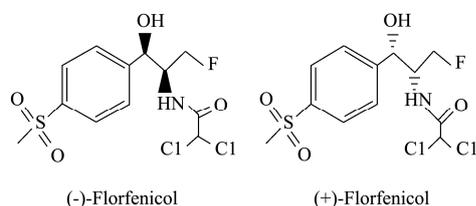


图 1 氟苯尼考两种对映体的结构式

Fig.1 Chemical structures of two florfenicol enantiomers

氟苯尼考的检测方法一般有酶联免疫吸附法 (ELISA)^[5]、分光光度法^[6]、液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS)^[7,8]、高效液相色谱法 (HPLC)^[9,10] 等, 主要测定氟苯尼考外消旋体, 未检测其对映体, 因而无法准确测定氟苯尼考产品中活性成分左旋体的含量, 不利于对药品质量和药效的监控。高效液相色谱法^[3,4,11,12] 为国内外检测氟苯尼考对映体的主要方法, 该方法分离效果好, 但有机试剂使用量大, 检测时间长。超高效合相色谱技术 (UPC²) 作为一种新型高效的色谱分离技术受到了广泛的关注, 该技术的主体流动相为超临界状态 CO₂, 可通过调整系统背压、色谱柱温度及有机溶剂的比例, 使流动相的密度和极性发生改变, 从而达到精密控制目标物分离效果的目的^[13], 在手性分离的应用中具有明显优势^[14-17]。目前, UPC² 技术应用于氟苯尼考对映体的分离及含量测定未见有报道。

本研究建立了一种超高效合相色谱法快速分离和测定氟苯尼考对映体的方法。本实验优化了氟苯尼考对映体的色谱分离条件, 考察了两种氟苯尼考对映体标准品的稳定性, 并对市售的常见氟苯尼考外消旋体标准品进行了分离及测定。

1 实验部分

1.1 仪器、材料与试剂

Waters 超高效合相色谱仪 (配有 PDA 检测器), 美国 Waters 公司; JJ500 电子天平, 美国双杰天平公司; AE260 电子天平, 瑞士 Mettler 公司; Synergy185 超纯水仪, 美国 Millipore 公司; N-1210BV 旋转蒸发器, 日本东京理化公司; N-EVAPTM 111 氮吹仪, 日本东京理化公司; WH-861 涡旋混匀器, 太仓市华利达实验设备有限公司。

异丙醇、乙醇、甲醇、正庚烷、乙腈、甲酸 (色谱纯), 德国 Merck 公司; 氨水 (分析纯), 莱阳市康德化工有限公司; CO₂ (99.999%); 水为超纯水; 其他实验所用试剂除特殊说明外均为分析纯。

手性分离色谱柱: Acquity Trefoil AMY1 [150 mm×3.0 mm, 2.5 μm, 填料为直链淀粉-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)]、Acquity Trefoil CEL1 [150 mm×3.0 mm, 2.5 μm, 纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)]、Acquity Trefoil CEL2 [150 mm×3.0 mm, 2.5 μm, 填料为纤维素-三(3-氯-4-甲基苯基氨基甲酸酯)], 美国 Waters 公司。

氟苯尼考对映体标准品: (-)、(+)-氟苯尼考 (纯度>99.0%, 中国牧工商总公司研究院)。测试样品来源于 3 个不同厂家, 样品均用甲醇超声溶解, 以 20% (V/V) 异丙醇正庚烷混合溶液稀释至相应浓度。

1.2 标准储备液及工作液的配制

1.2.1 外消旋体标准储备液

准确称取各氟苯尼考外消旋体标准品 0.01 g (精确至 0.1 mg), 用甲醇准确定容至 10 mL 容量瓶中, 配制成 1.00 g/L 的标准储备液, -18 °C 保存 30 d。

氟苯尼考外消旋体的标准中间溶液: 准确吸取一定量的外消旋体标准储备液, 用正庚烷稀释至 10.00 mg/L 的标准中间溶液, -18 °C 保存 14 d。

1.2.2 对映体标准储备液

分别准确称取(-)、(+)-氟苯尼考标准品 0.01 g (精确至 0.1 mg), 用甲醇准确定容至 10 mL 容量瓶中, 配制成 1.00 g/L 的标准储备液, -18 °C 保存 30 d。

两种氟苯尼考对映体的混合标准工作溶液: 分别准确移取(-)、(+)-氟苯尼考标准储备液, 用正庚烷溶液配制成 4.00、8.00、10.00、20.00、40.00、400.00 mg/L 的系列标准工作溶液, -18 °C 保存 14 d。

1.3 色谱条件

色谱柱: Acquity Trefoil CEL2 (150 mm×3.0 mm, 2.5 μm); 流动相 A 为 CO₂, 助溶剂 B 为甲醇; 采用

梯度洗脱, 洗脱程序为: 0~2 min (10% B), 2.0~3.0 min (10%~20% B), 3.0~6.0 min (20% B), 6.0~6.1 min (20%~10% B), 6.1~8.0 min (10% B); 系统背压 17.2 MPa; 检测波长 224 nm; 流速 1.0 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 5.0 μ L。

1.4 梯度分离条件

A 为 CO₂, B 为甲醇:

梯度分离条件 1: 0~8.0 min (15% B);

梯度分离条件 2: 0~2.0 min (10% B), 2.0~3.0 min (10%~20% B), 3.0~6.0 min (20% B), 6.0~6.1 min (20%~10% B), 6.1~8.0 min (10% B);

梯度分离条件 3: 0~3.0 min (12% B), 3.0~4.0 min (12%~20% B), 4.0~6.0 min (20% B), 6.0~6.1 min (20%~12% B), 6.1~8.0 min (12% B)。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的选择

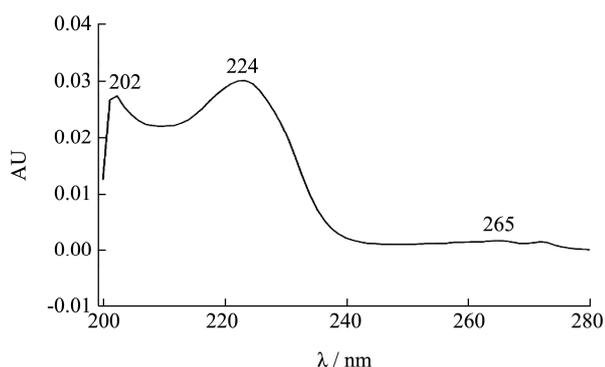


图2 氟苯尼考标准溶液光谱图

Fig.2 Scan curve of florfenicol using photo-diode array detection

经过 UPC² 二极管检测器 (PDA) 扫描后, 在色谱图中所提取氟苯尼考罗对映体的紫外光谱图。结果表明, 在 202、224、265 nm 处出现了较强的吸收峰 (图 2), 其中最强烈的吸收波长为 224 nm, 灵敏度相对较高, 氟苯尼考对映体出峰处干扰峰较少。综合考虑, 对氟苯尼考药品检测而言, 用杂质较少且吸光度较高的 224 nm 波长检测更具有优势, 故本实验选择 224 nm 作为检测波长。

2.2 色谱柱的优化

本研究中分离的两种氟苯尼考对映体, 因结构相似度高, 较难分离。因此, 选择沃特世 3 种相同规格且适用于手性分离的色谱柱 CEL2、AMY1、CEL1, 来考察不同色谱柱对两种氟苯尼考对映体的分离效

果。移取 3 份 10.0 mg/L 氟苯尼考对映体的系列标准工作溶液 0.50 mL 至 3 个进样小瓶中, 采用上述色谱条件进行检测。

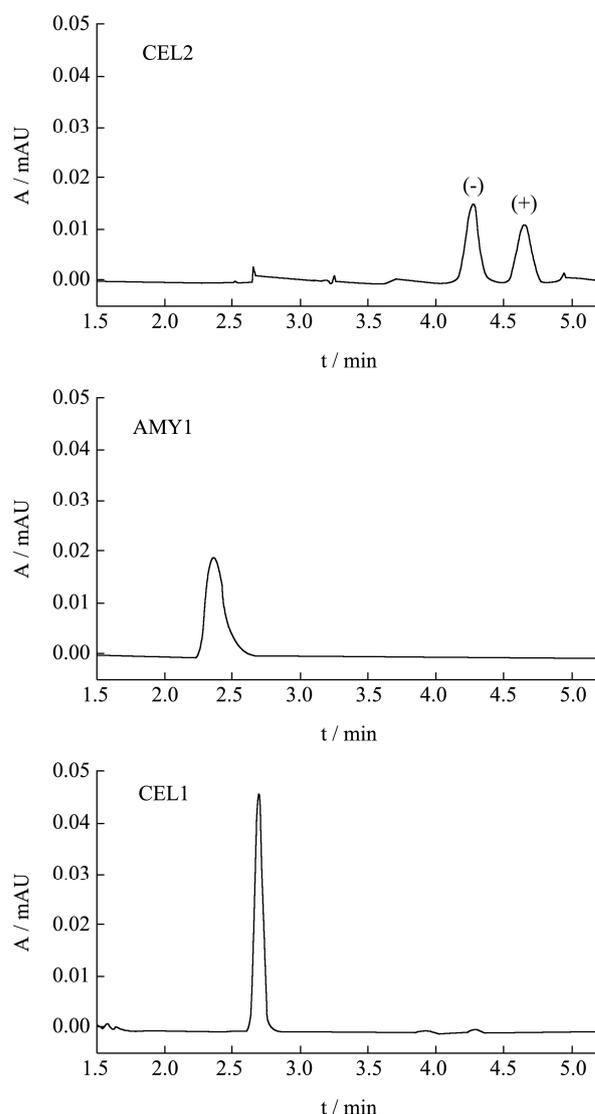


图3 不同色谱柱对(-)-氟苯尼考和(+)-氟苯尼考分离效果的影响

Fig.3 Effect of different chromatographic columns on the separation of (+)-florfenicol and (-)-florfenicol

结果表明, 采用 AMY1 和 CEL1 手性色谱柱分离时, 在色谱图上只出现 1 个色谱峰, 说明两种氟苯尼考对映体在这两款手性色谱柱上无法实现分离; 而采用 CEL2 手性色谱柱分离时, 两种氟苯尼考分离度和色谱峰形良好 (图 3)。ACQUITY UPC² Trefoil 色谱柱是基于改性的多聚糖型固定相, 能提供广泛的手性选择性。Trefoil CEL2、AMY1 和 CEL1 键合相不同, 选择性彼此互补, 为手性化合物的分离提供不同的保留特性。多糖类纤维素 CEL2 手性柱固定相具有高度有序的结构, 能形成许多手性的空腔, 其拆分机理为氟苯尼考对映体的官能团与固定相上的手性空腔相互作用

用,通过“三点作用”方式^[18]进行手性识别,两个对映体与固定相的作用力有差异,使得保留时间不同。由于(-)-氟苯尼考对映体分子中的空间构型与CEL2手性固定相分子中的位阻基团之间产生了强烈的位阻作用,阻碍了手性识别所需的分子间作用力的形成,减弱了其在手性固定相上的有效吸附,故(-)-氟苯尼考对映体分子被流动相优先洗脱而先出峰;而(+)-氟苯尼考对映体分子的空间构型无明显的位阻效应,对映体分子中的羟基易与固定相的酯基形成氢键作用力,从而有利于“三点作用”的形成,在色谱柱上不易被洗脱,保留时间延长,后出峰。因此本实验选择CEL2色谱柱作为氟苯尼考的手性分离柱。

2.3 梯度分离条件的优化

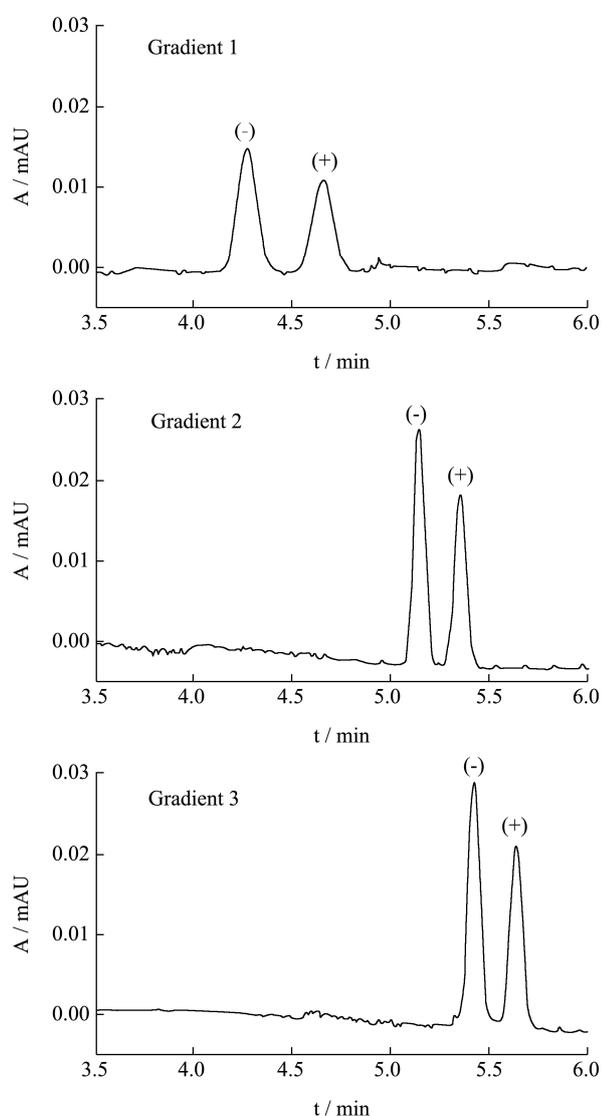


图4 不同梯度条件对(-)-氟苯尼考和(+)-氟苯尼考分离效果的影响

Fig.4 Effect of different gradient conditions on the separation of (-)-florfenicol and (+)-florfenicol

为了获取最佳的梯度分离条件,实验选择流动相为CO₂(A)-甲醇(B),考察了“1.4”节中不同梯度分离条件对两种氟苯尼考对映体分离效果的影响。由图4可见,相比梯度1的分离条件,采用梯度2和梯度3的分离条件,两种氟苯尼考对映体的色谱峰形更尖锐,但梯度2的分离度更好,达到1.68,故本实验采用梯度条件2。

2.4 流动相中助溶剂的选择

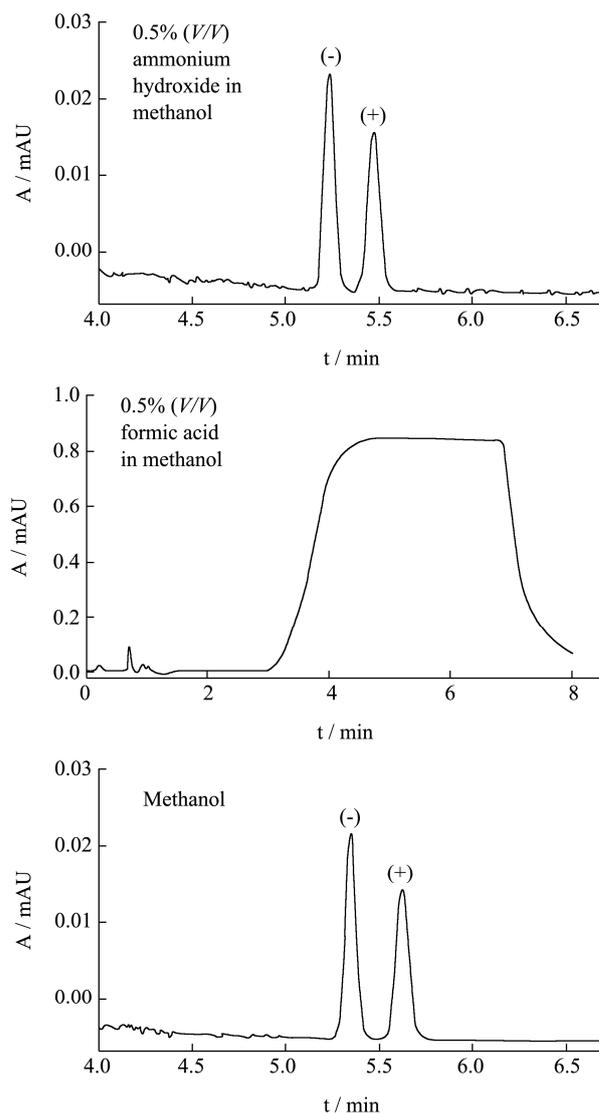


图5 不同助溶剂对(+)-氟苯尼考和(-)-氟苯尼考分离效果的影响

Fig.5 Effect of different organic solvent mobile phases on separation of (-)-florfenicol and (+)-florfenicol

超高效合相色谱仪的有机溶剂使用量少,主要采用超临界CO₂作为流动相,通过在助溶剂中加入少量有机溶剂来加强对目标产物的洗脱能力和选择性。实验考察了甲醇、0.5% (V/V) 甲酸甲醇溶液、0.5% (V/V) 氨水甲醇溶液等不同助溶剂对两种氟苯尼考对映体分

离的影响。如图 5 所示,当采用 0.5% (V/V) 甲酸甲醇溶液作为助溶剂时,色谱图基线抬高,未出现目标峰;当采用 0.5% (V/V) 氨水甲醇溶液和甲醇作为助溶剂时,目标物的色谱峰的峰形尖锐,且甲醇作为助溶剂时,两种氟苯尼考对映体的分离度更好,达到 1.69。因此,本实验室选择甲醇作为助溶剂。

2.5 系统背压的优化

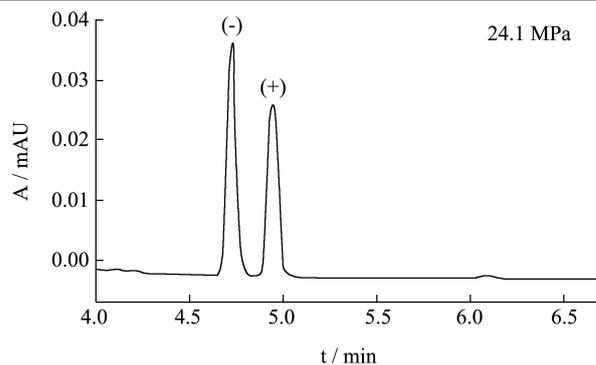
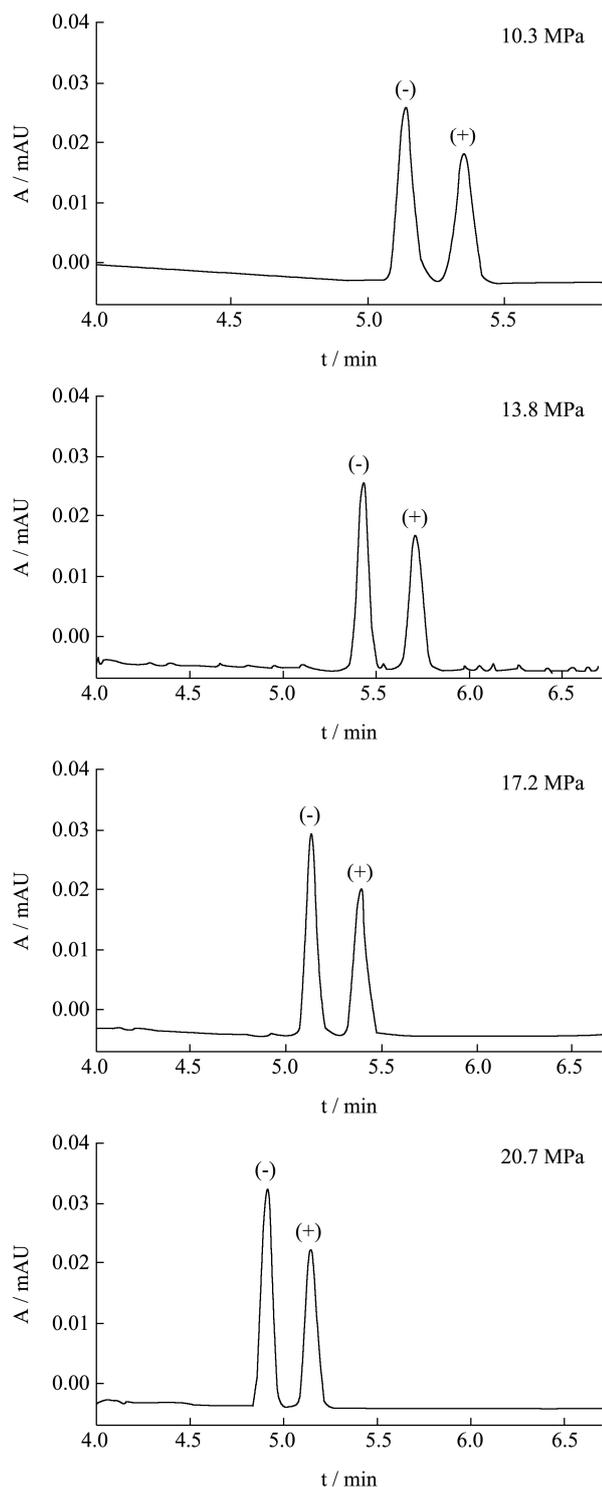


图 6 不同系统背压对(-)-氟苯尼考和(+)-氟苯尼考对映体分离效果的影响

Fig.6 Effect of system back pressure on the separation of (-)-florfenicol and (+)-florfenicol

UPC² 采用超临界状态的 CO₂ 作为流动相,实验过程中通过控制系统背压可有效改变流动相的粘度和密度,从而调节流动相的溶解能力和洗脱能力。流动相的粘度和密度会随着系统背压的升高而增加。由于 CO₂ 的压力超过 7.38 MPa 且温度超过 31 °C 以上,CO₂ 才会进入超临界状态。因此本实验以甲醇作为助溶剂,在柱温 40 °C 条件下,考察了 10.3、13.8、17.2、20.7、24.1 MPa 4 种系统背压对目标物峰形和分离度的影响。当实验逐渐提高系统背压,目标物的保留时间提前,峰形变得更尖锐(图 6)。4 种条件下,两种氟苯尼考对映体在系统背压 17.2 MPa 时色谱峰形和分离度均达到最佳。综合考虑色谱峰形、分离度及系统压力,最终选择 17.2 MPa 为最佳系统背压。

2.6 色谱柱温的优化

在 UPC² 系统中,色谱柱温度主要通过影响超临界状态 CO₂ 流动相的密度来影响对目标物的分离效果。实验升高色谱柱温度,流动相的粘度逐渐降低,密度减小,对目标产物的洗脱能力也随之减弱,保留时间延长。鉴于 Acquity Trefoil CEL2 手性色谱柱的运行最高温度为 40 °C,CO₂ 的温度大于 31 °C 且压力高于 7.38 MPa,CO₂ 才会进入超临界 CO₂ 状态。因此本实验考察了色谱柱温在 31~40 °C 范围内对目标化合物色谱峰形和分离度的影响。结果表明,随着温度的升高,两种氟苯尼考对映体的保留时间逐渐增加(图 7)。当柱温为 31 °C 时,色谱图基线不平,两种氟苯尼考对映体的分离度为 1.2;当色谱柱温为 35 °C 和 40 °C 时,两种氟苯尼考对映体的分离度分别为 1.70 和 1.69,在 6.0 min 内实现良好的基线分离。相比 35 °C,在 40 °C 的柱温条件下,色谱峰更尖锐。因此,最终选择色谱柱温度为 40 °C。

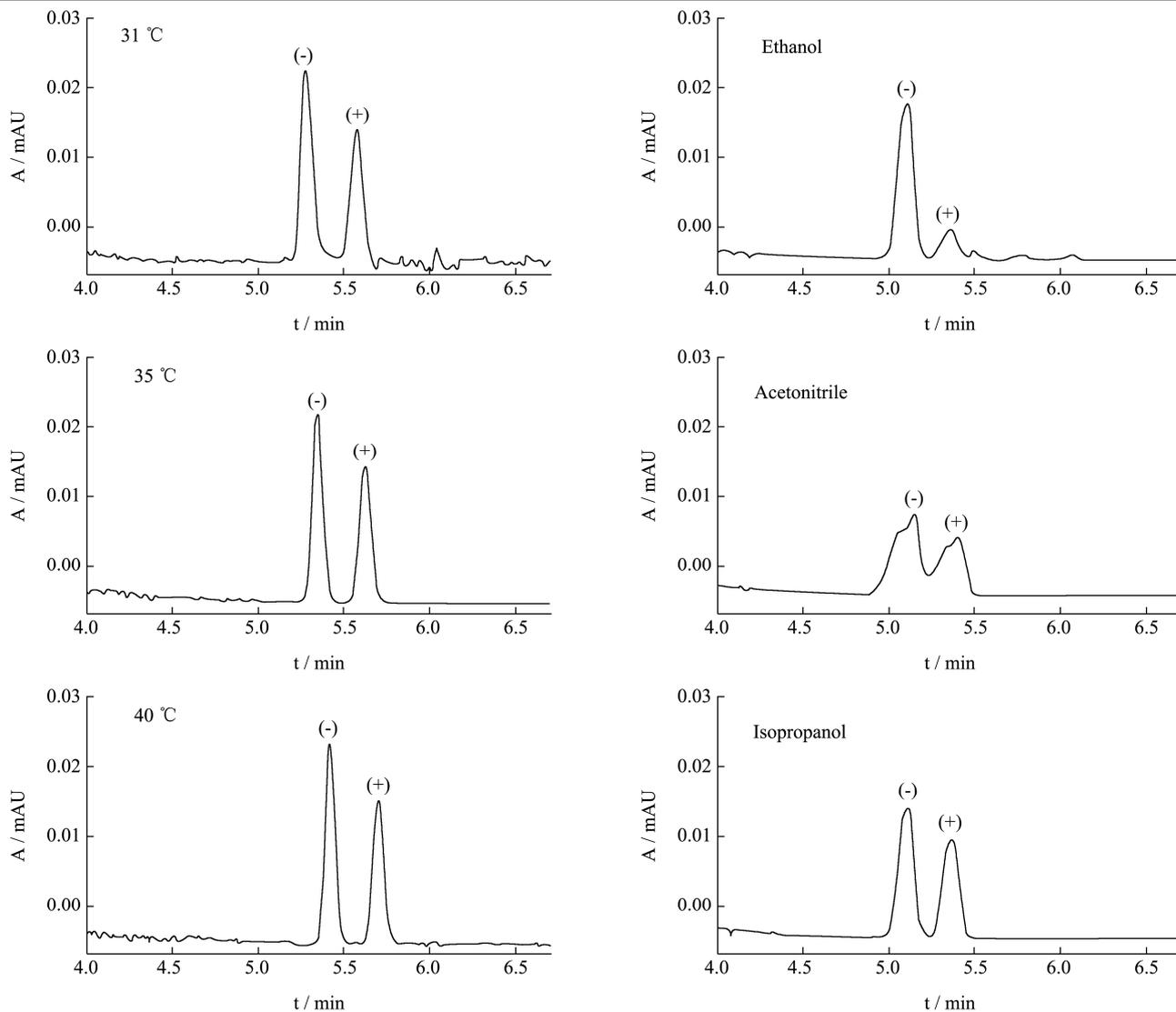


图7 不同色谱柱温度对(-)-氟苯尼考和(+)-氟苯尼考分离效果的影响

Fig.7 Effect of column temperature on the separation of (-)-florfenicol and (+)-florfenicol

2.7 定容试剂的优化

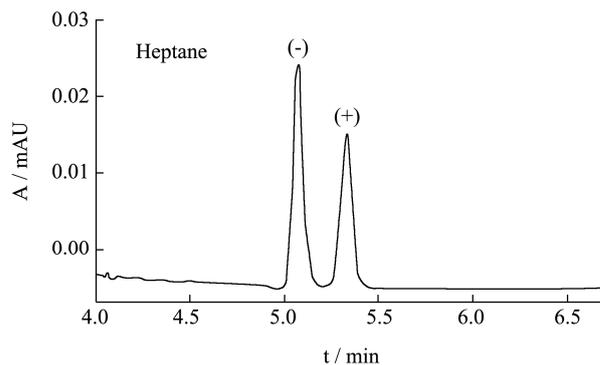
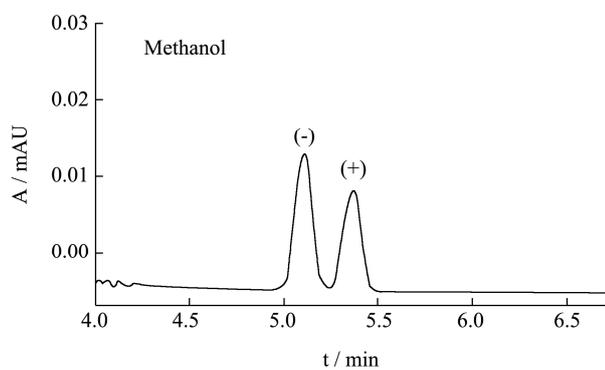


图8 不同定容试剂对(-)-氟苯尼考和(+)-氟苯尼考分离效果的影响

Fig.8 Effect of different constant volume reagents on the separation of (-)-florfenicol and (+)-florfenicol

在样品测定的过程中，定容试剂的选择会对目标化合物色谱峰的灵敏度和峰形产生较大的影响。因此

本实验考察 5 种常用定容试剂甲醇、乙醇、乙腈、异丙醇、正庚烷对氟苯尼考对映体色谱峰形的影响 (图 8)。结果表明, 当用乙醇和乙腈作为定容试剂时, 两个氟苯尼考色谱峰未完全分离, 峰形较差; 当用甲醇、异丙醇和正庚烷作为定容试剂时, 两种氟苯尼考对映体的色谱峰均在 6.0 min 内实现了完全分离, 但相比甲醇、异丙醇 3 种定容试剂, 正庚烷作为定容试剂时, 目标物的色谱峰形变得尖锐, 且分离度为 1.65。因此, 本实验选择正庚烷作为定容试剂。

2.8 标准溶液的稳定性

化合物的稳定性是保障整个实验检测结果准确的前提, 因此本文以新配制氟苯尼考对映体标准溶液为基准, 计算储存不同时间的氟苯尼考对映体的含量, 来考察氟苯尼考对映体标准溶液的稳定性。分别精确移取 1.00 mL 的 10.00 mg/L 氟苯尼考对映体的混合标准工作溶液于 7 个 1.5 mL UPC² 专用进样小瓶中, 上机进行含量测定, 检测完成后转移至 7 个密封性良好的进样小瓶中, 并用封口膜封好后于 -18 °C 下保存放置。按照上述优化后的色谱条件测定新配制的与分别储存 1、3、5、7、14、30、60 d 的氟苯尼考对映体标准溶液, 14 d 内(-)-氟苯尼考、(+)-氟苯尼考含量的相对标准偏差 (*RSD*) 分别为 4.0%、2.1%, 30 d 内(-)-氟苯尼考、(+)-氟苯尼考含量的 *RSD* 分别为 10.2%、12.1%。采用 *T* 检验法比较新配制与储存不同天数的

氟苯尼考对映体含量是否存在显著性差异。结果表明, 两种氟苯尼考对映体-18 °C 下放置 14 d 时 $p>0.05$, 在统计学上无显著性差异, 表现良好的稳定性; -18 °C 下放置 30 d 时 $p<0.05$, 说明两种氟苯尼考对映体在 30 d 时具有显著性差异。因此, 两种氟苯尼考对映体标准溶液在 -18 °C 条件下可保存 14 d。

2.9 方法学考察

2.9.1 线性范围和灵敏度

选择“1.2.2 节”中的 4.00、8.00、10.00、20.00、40.00、400.00 mg/L 的氟苯尼考对映体系列标准工作溶液, 按照优化后的色谱条件进行测定, 以对应峰面积为纵坐标 (*Y*), 标准溶液的质量浓度为横坐标 (*X*), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 如表 1 所示。同时以 3 倍信噪比计算仪器的检出限 (*LOD*, $S/N=3$), 结果表明, 两种氟苯尼考对映体的仪器检出限 (*LOD*) 为 2.00 mg/L, 在表 1 所列的线性范围内, 线性良好, 相关系数 (r^2) 均大于 0.9993。

2.9.2 精密度

在优化后的色谱条件下, “1.2.2” 中的 10.0 mg/L 系列标准工作溶液, 连续进样 6 次上机测定, 记录两种目标化合物的色谱峰面积, 计算各物质对应峰面积的 *RSD*, 分别为 0.65% 和 0.81%, 表明该方法的精密度良好, 符合 GB/T 32465-2015^[19] 的要求, 能够满足氟苯尼考对映体的分离和测定要求。

表 1 各个化合物的线性范围、线性方程、相关系数、检出限

Table 1 Linear range, linear equation, correlation coefficient (r^2) and limit of detection (*LOD*) of each compound

Florfenicol enantiomer	Linear range/(mg/L)	Linear equation	r^2	<i>LOD</i> /(mg/L)
(-)-florfenicol	4.00~400.00	$Y=1.21 \times 10^4 X + 4.67 \times 10^3$	0.9993	2.00
(+)-florfenicol	4.00~400.00	$Y=9.74 \times 10^3 X + 3.91 \times 10^3$	0.9995	2.00

2.10 方法的应用

在优化的条件下, 应用本方法分别测定 3 份市售常见氟苯尼考粉中(-)、(+)-氟苯尼考的含量, 采用“2.9.1”所绘制的标准曲线以外标定量法计算氟苯尼考粉中(-)、(+)-氟苯尼考对映体的含量。结果表明, 3 份氟苯尼考粉中均未检出(+)-氟苯尼考, 均只检出(-)-氟苯尼考, 含量达到标签值的 80% 以上, 样品纯度与文献^[3,11]报道采用 HPLC 法测试氟苯尼考样品的纯度相符。但目前文献^[3,4,11]所报道 HPLC 方法的检测时长达到 10 min 以上, 而本方法在 6.0 min 内完成了两个氟苯尼考对映体的分离及含量测定, 相比而言, 本方法的检测时间更短, 分离度更高、有机试剂使用量更少。

3 结论

本文采用 UPC² 对氟苯尼考对映体进行分离, 考察了氟苯尼考检测波长和储存稳定性, 同时还考察了手性色谱柱、梯度分离条件、助溶剂、系统背压、柱温、定容试剂对氟苯尼考对映体分离的影响。最佳色谱条件为: 手性色谱柱 Acquity Trefoil CEL2 (150 mm×3.0 mm, 2.5 μm), 助溶剂甲醇, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 224 nm, 柱温 40 °C, 系统背压 17.2 MPa。在 6.0 min 内可实现两种氟苯尼考对映体的分离。该方法分离效果好、检测时间短、稳定性良好, 为氟苯尼考对映体的精确测定提供了一种新方法。

参考文献

- [1] 李秀波, 石波, 梁萍, 等. 新型广谱抗菌药-氟苯尼考[J]. 国外畜牧学, 1999, 26(3): 50-52
LI Xiubo, SHI Bo, LIANG Ping, et al. A new broad spectrum

- antibiotic-florfenicol [J]. *Animal Science Abroad*, 1999, 26(3): 50-52
- [2] 缪小群,宋治萍,黄显会,等.氟苯尼考对鸡多杀性巴氏杆菌感染的疗效试验[J].*中国兽药杂志*,2006,40(8):52-55
MIU Xiaoqun, SONG Yeping, HUANG Xianhui, et al. Therapeutic efficacy of florfenicol against experimental *Pasteurella multocida* infection in chickens [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2006, 40(8): 52-55
- [3] 赵梅仙,张传良,马佳颖,等.氟苯尼考对映异构体手性拆分及其光学纯度的测定[J].*分析测试学报*,2013,32(4):459-462
ZHAO Meixian, ZHANG Chuanliang, MA Jiaying, et al. Separation of florfenicol enantiomer by chiral stationary phase and determination of optical purity [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2013, 32(4): 459-462
- [4] 吴东林,王铭宏.一种测定氟苯尼考中手性活性成分含量的方法:中国,CN 201310244316.0[P]. 2013.10.2 [2021.7.14]
WU Donglin, WANG Minghong. A method for determining the content of chiral active ingredients in florfenicol: China, CN 201310244316.0 [P]. 2013.10.2 [2021.7.14]
- [5] Sarver R, Steiner B, Sherry M, et al. ELISA screening assays for florfenicol and fluoroquinolones [R]. Lansing, MI: Neogen Corporation, 2017
- [6] Rasheed C M, Fakhre N A. Derivative spectrophotometric determination of florfenicol in chicken samples [J]. *ZANCO Journal of Pure and Applied Sciences*, 2017, 29(6): 49-58
- [7] LI Jiong, GONG Jinyan, YUAN Haina, et al. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol in Chinese gelatin medicines using dispersive solid-phase extraction coupled with ultra high-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatographic Science*, 2020, 58(5): 471-476
- [8] Aldeek F, Hsieh K C, Ugochukwu O N, et al. Accurate quantitation and analysis of nitrofurantoin metabolites, chloramphenicol, and florfenicol in seafood by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: method validation and regulatory samples [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(20): 5018-5030
- [9] YANG Jinjing, SUN Guizhi, QIAN Mingrong, et al. Development of a high-performance liquid chromatography method for the determination of florfenicol in animal feedstuffs [J]. *Journal of Chromatography B*, 2017, 1068: 9-14
- [10] YU Wenhong, HSUAN Wenchiu, CHING Fengchiu, et al. Validated HPLC method with UV detection for florfenicol determination in bester sturgeon, a cultured hybrid of *Huso huso* × *Acipenser ruthenus* [J]. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 2019, 17(3): 12781-12789
- [11] 何红梅,徐秀珠,潘春秀,等.氯霉素类药物的高效液相色谱手性分离研究[J].*分析化学*,2005,33(2):165-168
HE Hongmei, XU Xiuzhu, PAN Chunxiu, et al. Study of chiral separation of chloramphenicol analogs by high performance liquid chromatography [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2005, 33(2): 165-168
- [12] T Joseph Sunder Raj, N Srinivas, C H S Prasad, et al. Validated chiral liquid chromatographic method for the enantiomeric separation of florfenicol [J]. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2008, 31(2): 231-239
- [13] 徐永威,孙庆龙,黄静,等.Waters ACQUITY UPC² 仪器结构和性能特点[J].*现代仪器*,2012,18(5):45-48
XU Yongwei, SUN Qinglong, HUANG Jing, et al. The characters of Waters ACQUITY UPC² system [J]. *Modern Instruments*, 2012, 18(5): 45-48
- [14] 张文华,谢文,侯建波,等.超高效液相色谱法对 6 种三唑类农药对映体的拆分及其在黄瓜中的残留分析[J].*色谱*,2019, 37(12):1356-1362
ZHANG Wenhua, XIE Wen, HOU Jianbo, et al. Chiral separation of six triazole pesticide enantiomers by ultra-performance convergence chromatography and residue determination in cucumber [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2019, 37(12): 1356-1362
- [15] JIANG Hai, YANG Liu, XING Xudong, et al. Development of an analytical method for separation of phenolic acids by ultra-performance convergence chromatography (UPC²) using a column packed with a sub-2- μm particle [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018, 153: 117-125
- [16] YU Weisong, LIU Xue, ZHANG Yizhi, et al. Simultaneous determination of pigments in tea by ultra-performance convergence chromatography (UPC²) [J]. *Analytical Letters*, 2020, 53(10): 1654-1666
- [17] CHANG Xiaoqing, SUN Peng, MA Yue, et al. A new method for determination of thymol and carvacrol in thymihherba by ultraperformance convergence chromatography (UPC²) [J]. *Molecules*, 2020, 25(3): 502-514
- [18] Pirkle W H, Pochapsky T C. Consideration of chiral recognition relevant to the liquid chromatographic separation of enantiomers [J]. *Chemical Reviews*, 1989, 89(2): 347-362

