

# 鸡肉组织中硝基咪唑类药物及代谢物多残留检测高效液相色谱法研究

胡海燕, 徐倩, 孙雷

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2008-06-12 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2008)08-0009-04 [中图分类号] S859.84

**[摘要]** 建立了鸡肉组织中甲硝唑、洛达硝唑、地美硝唑、替硝唑、塞克硝唑、奥硝唑 6种硝基咪唑类药物及地美硝唑代谢产物 1-甲基-5-硝基-2-羟甲基咪唑 (HMMND) 共 7种组分残留检测的高效液相色谱法 (HPLC)。样品采用乙酸乙酯提取, SCX 柱净化; 色谱条件: 色谱柱为 Eclipse Plus C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm); 流动相为水-乙腈-甲醇, 梯度洗脱; 柱温为 35 °C; 流速为 0.8 mL/min, 紫外检测波长为 320 nm, 外标法定量。结果表明: 7种组分在 5 ~ 60 ng/mL 范围内, 呈良好线性关系, 相关系数  $R^2$  均大于 0.998; 方法检出限为 1 μg/kg; 添加浓度分别为 2, 3, 5 μg/kg 时, 平均回收率为 66.6% ~ 101%, 批内和批间 RSD 均小于 20%。

**[关键词]** 硝基咪唑类药物; 代谢物; 残留; HPLC; 鸡肉

## Simultaneous Determination of Seven Nitroimidazole Residues in Chicken by HPLC

HU Hai-yan, XU Qian, SUN Lei

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081; China)

**Abstract:** An HPLC method was established for determination of seven nitroimidazole residues in chicken, including metronidazole, ronidazole, tinidazole, secnidazole, omidazole, dimetridazole and 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole (HMMND). The sample was extracted with ethyl acetate, and then was purified by strong cation exchange (SCX) solid phase extraction cartridge; HPLC conditions: the chromatography column was Eclipse Plus C<sub>18</sub> column of 4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm; mobile phase was water-acetonitrile-methanol; column temperature was 35 °C; flow rate was 0.8 mL/min; detection, wavelength was 320 nm. The calibration curve was good linear between the peak areas and concentrations of nitroimidazole from 5 to 60 ng/mL with the correlation coefficient  $R^2 > 0.998$ . The limit of detection was 1 μg/kg. The average recoveries from spiked chicken at the three concentrations of 2, 3 and 5 μg/kg ranged from 66.6% ~ 101%, and intra-day and inter-day ( $n=5$ ) batch variation coefficients were less than 20%.

**Key words:** nitroimidazole drugs; metabolites; residue; HPLC; chicken

作者简介: 胡海燕 (1956年-), 女, 研究员, 主要从事兽药及兽药残留研究和检验工作。E-mail: huhaiyan@ivdc.gov.cn

硝基咪唑类药物是结构中含有 5-硝基咪唑环的衍生物(见图 1),通过对咪唑环上  $R^1$  和  $R^2$  取代基的研究,目前其同类药物已发展到疗效更好,副作用更少的第三代和第四代,如奥硝唑和塞克硝唑。该类药物是兽医临床常用药,具有广谱抗菌和高效抗原虫作用,尤其对致病的厌氧菌有很强的杀灭作用,但由于其存在致突变和潜在的致癌性以及可通过食物链造成对人类的危害,而被欧盟、美国等许多国家列为食品动物的违禁药物,我国也做出了相应的规定,并加强了对动物源食品中该类药物的残留监控。

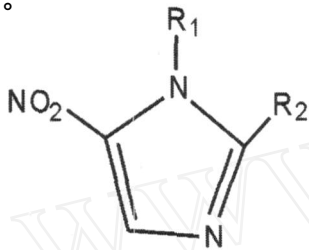


图 1 硝基咪唑类药物基本结构式

2-羟甲基-1-甲基-5-硝基咪唑(HMMNI)是地美硝唑的主要代谢物,具有硝基咪唑类药物的基本结构(见图 2),在残留检测中需要与原形药物同时测定<sup>[1]</sup>。甲硝唑、洛达硝唑、替硝唑和地美硝唑及代谢物 HMMNI 均性质相近,采用 HPLC 法同时分离检测十分困难,因而目前报道的 HPLC 法,大多是测定单一药物或两种原形药物与 HMMNI 同时检测上述 5 种及 5 种以上该类组分的研究在国内外报道很少,我国现应用的动物性食品中硝基咪唑类药物残留检测 HPLC 法<sup>[2]</sup>存在着未能同时测定其代谢物等问题,因此,本文对现上市的所有硝基咪唑类药物及其代谢物共 7 种物质进行了鸡肉中残留检测方法研究,即在原有方法<sup>[2-3]</sup>的基础上,进行优化、改进和完善,以满足兽药残留检测相关法规的要求。

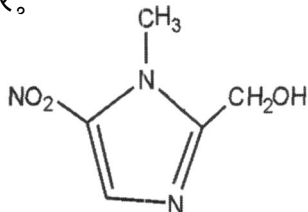


图 2 HMMNI 化学结构式

## 1 材料与与方法

1.1 仪器 液相色谱仪 (Agilent1100), Agilent 公司;离心机 (biofuge Strators), Heraeus 公司;旋转蒸

发器 (Rescti-Them3), pierce 公司; Bond Elut SCX 柱 (500 mg/3cc), Varian 公司。

1.2 药品与试剂 6 种硝基咪唑类药物对照品 (甲硝唑、洛达硝唑、地美硝唑、替硝唑、塞克硝唑、奥硝唑),纯度均大于 99.0%, Sigma 公司; 2-羟甲基-1-甲基-5-硝基咪唑 (HMMNI), 纯度大于 99.0%, Dr Ehrenstorfer 公司; 乙腈、甲醇为色谱纯, Fisher 公司; 乙酸乙酯、乙酸、氨水为分析纯; 水为超纯水。

1.3 标准溶液的配制 分别精密称取 6 种硝基咪唑类药物对照品和 HMMNI 各约 10.0 g 至同一 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度使成 1 mg/mL 标准储备液;准确量取标准储备液适量,用甲醇稀释成浓度为 1  $\mu$ g/mL 的标准工作液,至 -20 冰箱中保存,有效期为 3 个月。

### 1.4 实验方法

1.4.1 色谱条件 色谱柱为 Eclipse Plus  $C_{18}$  柱 (4.6 mm  $\times$  150 mm, 3.5  $\mu$ m); 流动相:水 (A) - 乙腈 (B) - 甲醇 (C) 梯度洗脱: 0 min, B% - C% (3 17); 2 min, B% - C% (0 25); 13 min, B% - C% (0 25) 15 min, B% - C% (3 17); 20 min, B% - C% (3 17); 柱温为 35  $^{\circ}$ C; 流速为 0.8 mL/min; 检测波长为 320 nm; 进样量为 50  $\mu$ L。

1.4.2 标液的重复性和重现性考察 准确量取 1  $\mu$ g/mL 的 6 种硝基咪唑类药物和 HMMNI 混合工作液制成 60 ng/mL 的标准溶液,按上述色谱条件,连续进样 5 次,计算各组分峰面积的相对标准偏差 (RSD),考察标液重复性。按相同配制方法,分别配制 60 ng/mL 同一浓度样品 5 份,分别进样,计算 5 个样品之间各组分峰面积的 RSD,考察标液重现性。

1.4.3 线性考察 精密量取标准工作液,用水稀释成各组分浓度为 5、10、20、30、50、60 ng/mL 的系列混合对照溶液,由低浓度到高浓度进样分析,以绘制标准曲线,考察各组分的线性关系。

1.4.4 样品前处理 取匀浆后鸡肉组织 (5  $\pm$  0.05) g,置 50 mL 离心管中,加入 20 mL 乙酸乙酯,振荡 10 min, 3 000 r/min 离心 10 min,上清液转移至 50 mL 茄形瓶中,重复提取一次,合并上清液,40  $^{\circ}$ C 浓缩至近干,加入 5 mL 乙酸-乙酸乙酯溶液 (5 95, V/V) 溶解后,过预先用 5 mL 该溶液淋洗的 SCX 萃取柱,再用等量同种溶液洗瓶后,一起过柱,依次用丙酮 2.5 mL、甲醇 5 mL 和乙腈 5 mL 淋洗,挤干,用 20% 氨水乙腈溶液 5 mL 洗脱,收集洗脱

液,  $N_2$  吹干后, 加 1.0 mL 水溶解残余物, 过滤膜后上机测试。

1.4.5 方法灵敏度的确定 取标准工作液适量, 加入空白鸡肉组织中制成 1、2 和 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  三个浓度的添加样品, 经上述方法前处理后, 用 HPLC 检测, 观察不同浓度各组分色谱峰信噪比 ( $S/N$ ),  $S/N \geq 3$  者, 定为其方法的检出限。

1.4.6 方法准确度和精密度的确定 采用标准添加法, 在空白鸡肉组织中添加 2、3、5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  三个浓度的样品, 每个浓度做 5 个平行样, 重复 3 次, 外标法定量, 考察各组分回收率和批内批间  $RSD$ 。

## 2 结果

2.1 标液的重复性和重现性 重复性考察结果: HMMNI 洛达硝唑、甲硝唑、替硝唑、地美硝唑、塞克硝唑和奥硝唑峰面积的  $RSD$  分别为: 1.02%、0.98%、2.18%、2.01%、1.43%、0.56% 和 1.46%; 按上出峰顺序考察重现性结果的  $RSD$  依次为: 5.81%、5.30%、6.40%、6.15%、6.45%、8.42% 和 5.28%, 表明在该色谱条件下检测, 标液精密度良好。

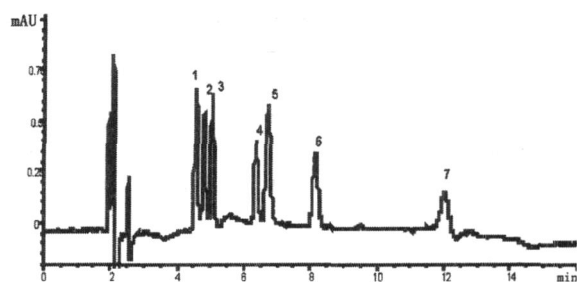
2.2 标准曲线 按上述方法得出的各组分回归方程和相关系数 ( $R^2$ ) 结果见表 1, 7 种硝基咪唑类药物及代谢物在 5 ~ 60  $\text{ng}/\text{mL}$  浓度范围内呈良好线性关系,  $R^2$  均大于 0.998。

表 1 7 种硝基咪唑类药物及代谢物回归方程和相关系数

名称	回归方程	$R^2$
HMMNI	$y = 0.1906x + 0.0496$	0.99964
洛达硝唑	$y = 0.1576x + 0.0752$	0.99956
甲硝唑	$y = 0.2206x - 0.0752$	0.99941
替硝唑	$y = 0.1227x + 0.0303$	0.99960
地美硝唑	$y = 0.2684x - 0.0605$	0.99961
塞克硝唑	$y = 0.1823x + 0.0333$	0.99947
奥硝唑	$y = 0.2496x - 0.0450$	0.99860

2.3 方法灵敏度 按上述方法处理, 当添加浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时, 测得各组分  $S/N$  符合检出限的要求。

2.4 方法准确度和精密度 硝基咪唑类药物及代谢物标准溶液、空白鸡肉组织和添加样品得到的色谱图分别见图 3 ~ 5。在空白鸡肉中添加三个不同浓度的 7 种硝基咪唑类药物及代谢物回收试验结果见表 2, 结果表明: 7 种组分平均回收率在 66.6% ~ 101% 之间, 批内  $RSD$  17.2%, 批间  $RSD$  14.5%。



1 - HMMNI; 2 - 洛达硝唑; 3 - 甲硝唑; 4 - 替硝唑;  
5 - 地美硝唑; 6 - 塞克硝唑; 7 - 奥硝唑

图 3 20  $\text{ng}/\text{mL}$  硝基咪唑类药物及代谢物标准溶液色谱图

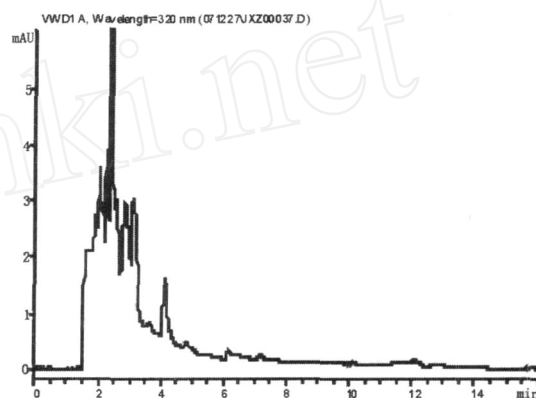


图 4 空白鸡肉组织色谱图

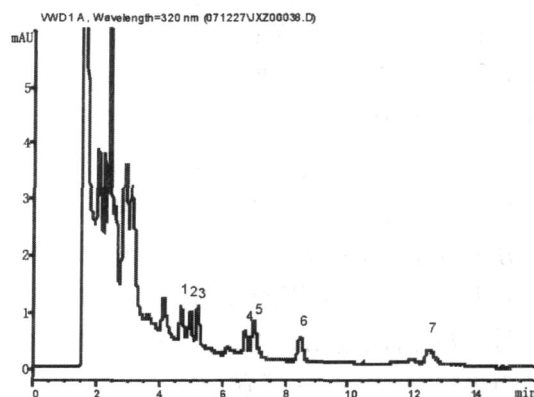


图 5 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  空白鸡肉添加样品色谱图

## 3 讨论

3.1 色谱条件的确定 依据兽药残留重点检测的硝基咪唑类药物及代谢物 - 甲硝唑、地美硝唑、HMMNI 洛达硝唑和替硝唑, 笔者进行了规格分别为 4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$  和 4.6 mm  $\times$  150 mm, 3.5  $\mu\text{m}$  两种  $C_{18}$  色谱柱对该类药物分离效果的考察, 采用资料<sup>[3]</sup>中的色谱条件, 即第一种规格的色谱柱, 当混合标准溶液浓度为 5  $\text{ng}/\text{mL}$  时, 洛达硝唑和甲硝唑两个色谱峰未能分离, 并且随着标液浓度的增大, 上述药物之间的分离度降低, 难以准确

表 2 鸡肉中添加 7 种硝基咪唑类药物及代谢物回收试验结果 ( $n=5$ )

名称	添加浓度 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	批内平均回收率 / % (RSD / %)			批间平均回收率 / % (RSD / %)
HMMNI	2	84.4(7.04)	93.7(7.57)	70.6(17.2)	82.9(11.7)
	3	89.2(5.15)	79.4(9.60)	83.0(4.02)	83.9(4.07)
	5	95.2(4.46)	87.9(7.98)	90.0(11.4)	91.0(3.72)
洛达硝唑	2	66.6(7.34)	94.1(7.13)	72.2(11.5)	77.6(14.5)
	3	83.2(5.07)	76.2(8.06)	75.3(8.21)	78.2(4.31)
	5	81.3(5.33)	77.7(7.87)	89.1(10.6)	82.7(5.84)
甲硝唑	2	73.5(5.43)	90.3(9.52)	74.1(9.30)	79.3(9.54)
	3	80.2(11.1)	77.1(7.04)	77.8(4.84)	78.4(1.66)
	5	92.2(4.00)	87.2(4.79)	89.6(3.24)	89.6(2.50)
替硝唑	2	71.1(5.68)	80.7(5.42)	67.0(7.19)	72.9(7.05)
	3	83.4(7.86)	81.9(7.32)	72.6(5.45)	79.3(5.83)
	5	98.8(5.93)	95.9(4.78)	99.1(3.59)	97.9(1.78)
地美硝唑	2	72.6(7.14)	68.0(5.79)	68.8(10.6)	69.8(2.48)
	3	70.4(5.69)	72.5(6.02)	71.4(5.21)	71.5(1.04)
	5	88.3(3.24)	77.9(7.80)	86.7(12.2)	84.3(5.62)
塞克硝唑	2	85.3(8.11)	97.4(6.75)	80.0(13.0)	87.6(8.88)
	3	81.2(9.71)	78.4(8.26)	85.7(6.77)	81.8(3.70)
	5	101(2.02)	101(7.16)	98.3(4.34)	100(1.51)
奥硝唑	2	92.0(9.03)	87.4(13.5)	86.4(12.6)	88.6(2.98)
	3	93.5(1.81)	83.3(4.82)	83.6(4.93)	86.8(5.82)
	5	99.2(5.35)	101(6.25)	101(5.04)	100(1.08)

测定,改变流动相比例后,虽然各组能得到良好分离,但响应值偏低,难以达到残留检测的要求;而后者由于柱填料粒径的降低有利于柱效的提高,研究表明,采用适宜的流动相比例,各组分之间的分离度和灵敏度均有很好的提高,从而改善了原方法中各组分色谱峰的分离效果。

考察了二元流动相和三元流动相对各组分之间的分离效果,结果表明,采用三元流动相更有利于其分离,其中水相采用醋酸盐缓冲液和纯水的效果无明显差异,故选用成本低、简便、易得的纯水;流动相组成为:水(A)-乙腈(B)-甲醇(C),在考虑流动相通过色谱柱进入检测器滞后时间的同时兼顾各组分的分配比例,确定了两种梯度洗脱条件:见 1.4.1 0 min, B% - C% (2 18); 3 min B% - C% (5 10); 8 min, B% - C% (5 10); 11 min, B% - C% (2 18); 20 min, B% - C% (2 18),采用后者洗脱条件各组分色谱峰的分离度好于前者,但响应值相对偏低,方法检测限为  $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,本文选用了检测限更低的梯度洗脱条件 进行试验。

### 3.2 净化条件的确定 同时对阳离子交换 SCX 柱

和 MCX 柱进行了净化效果比较实验,结果表明虽然 MCX 柱净化效果很好,但地美硝唑回收率偏低,故选择了净化效果和回收率均可的 SCX 柱。采用 SCX 柱上样后,本方法依次尝试了使用丙酮、甲醇、乙腈淋洗和用 1%乙酸、甲醇、1.5%氨水乙腈淋洗,结果表明两者效果相当,而选用前组试剂操作更为简单。分别对浓度为 5、7、10、20、30%氨水乙腈洗脱溶液进行了筛选,结果:采用 20%氨水乙腈进行洗脱,得到的各组分回收率最高,且重现性良好。

### 参考文献:

- [1] Martin J Sams, Paul R Strutt, Karen A Bames, *et al* Determination of Dimetridazole, Rondazole and Their Common Metabolite in Poultry Muscle and Eggs by High Performance Liquid Chromatography with UV Detection and Confirmatory Analysis by Atmospheric Pressure Chemical Ionisation Mass Spectrometry [J]. Analyst, 1998, 123, 2545 - 2549.
- [2] 农业部第 236 号公告. 动物性食品中硝基咪唑类药物残留检测方法 - 高效液相色谱法 [S]. 2003.
- [3] 中国质量检验检疫总局. 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 SN/T1626 - 2005 [S].