

高效液相色谱法检测猪组织中硝基咪唑类药物残留

汪纪仓^{1,2}, 王大菊¹, 高小龙¹, 朱新术¹

(¹华中农业大学国家兽药残留基准实验室/农业部食品安全评价重点开放实验室, 武汉 430070; ²河南科技大学动物科技学院, 河南洛阳 471003)

摘要:【目的】建立猪肌肉、脂肪、肝脏和肾脏中羟基地美硝唑、洛硝唑、甲硝唑、替硝唑、地美硝唑和奥硝唑残留的高效液相色谱(HPLC)测定法。【方法】样品中硝基咪唑类药物用二氯甲烷萃取, 盐酸反萃取。盐酸溶液用 K_2HPO_4 碱化, 再用二氯甲烷反萃取, 萃取液于40℃水浴中旋转真空蒸干。残余物用流动相0.5 ml溶解, 进样量20 μ l。【结果】6种药物标准液浓度在0.005~2.0 μ g·ml⁻¹时, 与响应值呈良好线性关系, 相关系数均>0.999。羟基地美硝唑、洛硝唑和甲硝唑在肌肉和脂肪组织中检测限为0.5 μ g·kg⁻¹, 在肝脏和肾脏中为1.0 μ g·kg⁻¹; 替硝唑、地美硝唑和奥硝唑在肌肉、脂肪、肝脏和肾脏中均为1.0 μ g·kg⁻¹。空白样品添加药物浓度为0.5~4.0 μ g·kg⁻¹时, 6种药物的回收率为60%~83%, 日间变异系数均<15%。【结论】该方法能灵敏、准确的检测猪组织中硝基咪唑类药物。

关键词: 硝基咪唑类药物; 猪; 组织; 残留; 高效液相色谱法

Determination of Nitroimidazole Residues in Swine Tissues by a High-Performance Liquid Chromatography

WANG Ji-cang^{1,2}, WANG Da-ju¹, GAO Xiao-long¹, ZHU Xin-shu¹

(¹National Reference Laboratory of Veterinary Drug Residues, Huazhong Agricultural University/Key Laboratory of Food Safety Evaluation, Ministry of Agriculture, Wuhan 430070; ²College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan)

Abstract: 【Objective】A high-performance liquid chromatographic (HPLC) method is described for the determination of HMMNI, RNZ, MNZ, TNZ, DMZ and ONZ residues in swine tissues. 【Method】The nitroimidazole residues were extracted with dichloromethane, followed by reextraction with hydrochloric acid. The acid extract was made basic with K_2HPO_4 , followed by extraction with dichloromethane. The final solution was carefully evaporated just to dryness with a vacuum evaporator (water bath at 40℃). The residues were redissolved in 0.5 ml mobile phase. Detection wavelength was set at 320 nm and the injection volume was 20 μ l. The mobile phase was methanol and water (16 : 84, V : V). 【Result】The linear regression curves yielded correlation coefficients of over 0.999 of the six nitroimidazoles. The limits of detection were 0.5 μ g·kg⁻¹ for HMMNI, RNZ, MNZ and 1.0 μ g·kg⁻¹ for TNZ, DMZ, ONZ in muscle and fat, 1.0 μ g·kg⁻¹ for HMMNI, RNZ, MNZ, TNZ, DMZ and ONZ in liver and kidney. The control samples were all spiked with nitroimidazoles at levels of 0.5-4.0 μ g·kg⁻¹. The mean recoveries of nitroimidazoles were 60%-83%, the inter-day relative standard deviation was less than 15%. 【Conclusion】It is concluded that it is a sensitive and accurate method for determination of nitroimidazole residues in swine tissues.

Key words: Nitroimidazole; Swine; Tissue; Residues; High-performance liquid chromatography

0 引言

【研究意义】硝基咪唑类药物 (nitroimidazoles)

是一类抗厌氧菌和抗原虫感染的药物, 包括甲硝唑 (metronidazole, MNZ)、地美硝唑 (dimetridazole, DMZ)、洛硝唑 (ronidazole, RNZ)、替硝唑 (tinidazole,

收稿日期: 2008-05-13; 接受日期: 2008-07-10

基金项目: 农业部兽药残留专项基金资助项目 (2003, 76号)

作者简介: 汪纪仓 (1977-), 男, 河南南阳人, 讲师, 硕士, 研究方向为兽医药理学与毒理学。E-mail: wangjicang1977@yahoo.com.cn。通讯作者王大菊 (1946-), 女, 湖北当阳人, 教授, 研究方向为兽医药理学与毒理学。Tel: 027-87287255; E-mail: chinahbdj@mail.hzau.edu.cn

TNZ) 和奥硝唑 (ornidazole, ONZ) 等 (表 1)。甲硝唑、地美硝唑和洛硝唑常用于预防和治疗鸡组织滴虫病、猪密螺旋体性痢疾, 肠道和全身的厌氧菌感染。但它们有致癌、致突变及潜在毒性。DMZ 的主要代谢产物羟基地美硝唑 (hydroxydimetridazole, HMMNI) 同样可能有致突变性^[1,2], 欧盟^[3-6]和美国^[7]均对此类化合物的使用和残留量做了严格的规定。中国规定甲硝唑、地美硝唑及其盐、酯和制剂禁用于所有食品动物的促生长^[8]。替硝唑和奥硝唑是继甲硝唑之后疗效更高、耐受性更好、不良反应较少的药物, 但未见各国对这两种药物在动物组织中的使用和残留量的规定, 因此, 在实际生产中它们有可能替代甲硝唑和地美硝唑等应用于兽医临床, 而替硝唑和奥硝唑也可能具有其它硝基咪唑类药物的毒副作用, 因此本研究也将其包括在内。【前人研究进展】国外建立了多种检测动物组织中硝基咪唑类药物的检测方法, 主要有高效薄层色谱法 (HPTLC)^[9]、气相色谱法 (GC)^[10]、高效液相色谱-电化学检测法 (HPLC-ECD)^[11,12]、高效液相色谱-紫外法 (HPLC-UV)^[13,14]、气相色谱-

质谱法 (GC-MS)^[15-18]、液相色谱-质谱法 (HPLC-MS)^[19-22]和酶联免疫吸附法 (ELISA)^[23]等。国内王大菊等^[24]建立了高效液相色谱法测定鸡体内的替硝唑后, 相继建立了鸡蛋、牛奶和蜂产品中硝基咪唑类药物单残留或多残留的检测方法^[25], 并通过动物试验检验了方法的适用性。谢凯舟等^[26]用 HPLC 测定地美硝唑在肉鸡组织中的残留, 沈建忠等^[27]建立了检测家禽肌肉组织中硝基咪唑类药物的液相色谱法。【本研究切入点】有关同时检测 6 种硝基咪唑类药物的多残留, 尤其是同时检测 DMZ 代谢物的方法国内外未见报道。【拟解决的关键问题】因而建立猪组织中羟基地美硝唑、洛硝唑、甲硝唑、替硝唑、地美硝唑和奥硝唑残留的高效液相色谱 (HPLC-UV) 测定法。

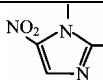
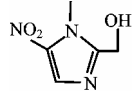
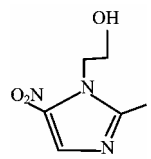
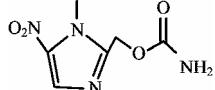
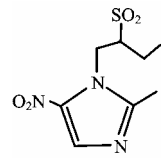
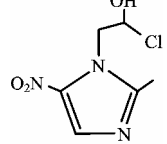
1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物与试剂 甲硝唑 (批号 033K14731), 洛硝唑 (批号 051H0726), 地美硝唑 (批号 073K0675),

表 1 硝基咪唑类药物的化学结构式

Table 1 Chemical structures of nitroimidazoles

硝基咪唑类药物 Nitroimidazoles	结构式 Structure	分子式 Formula	分子量 Molecular mass
地美硝唑 Dimetridazole (DMZ) 1, 2-dimethyl-5-nitromidazole		C ₅ H ₇ N ₃ O ₂	141.1
羟基地美硝唑 Hydroxydimetridazole (HMMNI) 2-Hydroxymethyl-1-methyl-5-nitromidazole (HMMNI)		C ₅ H ₇ N ₃ O ₃	157.0
甲硝唑 Metronidazole (MNZ) 1-(2-Hydroxymethyl)-2-methyl-5-nitromidazole		C ₆ H ₉ N ₃ O ₃	171.1
洛硝唑 Ronidazole (RNZ) 1-methyl-2-(carbamoyloxymethyl)-5-nitromidazole		C ₆ H ₈ N ₄ O ₄	200.2
替硝唑 Tinidazole (TNZ) 2-methyl-1-(2-(ethylsulfonyl)ethyl)-5-nitromidazole		C ₈ H ₁₃ N ₃ O ₄ S	247.3
奥硝唑 Ornidazole (ONZ) 1-(3-chloro-2-hydroxypropyl)-2-methyl-5-nitromidazole		C ₇ H ₁₀ ClN ₃ O ₃	219.6

替硝唑(批号 074H0126), 奥硝唑(批号 044H0887); 以上标准品均购自 Sigma 公司。羟基地美硝唑由中国农业大学惠赠。

甲醇、二氯甲烷、无水硫酸钠、磷酸氢二钾、二甲基亚砜(DMSO)等均为分析纯。

1.1.2 仪器设备 高效液相色谱系统(Waters515泵, Waters 2487 检测器); 20 μl 手动进样器(美国 Agilent 公司); 色谱柱(大连依利特分析仪器有限公司); 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); 循环水真空泵(SHZ-III, 上海亚荣生化仪器厂); 上皿式电子天平(TMP-1, 感量 0.01 g, 湖南仪器仪表总厂天平厂); 天平(感量 0.00001 g, SHIMADZU)。

1.1.3 溶液的配制

①标准贮备液的配制。准确称取 MNZ、RNZ、HMMNI、DMZ、TNZ 和 ONZ 各 10.0 mg, 用甲醇溶解并定容配成浓度均为 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的贮备液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

②标准工作液的配制。准确量取适量的标准贮备液, 用流动相稀释成适宜浓度的混合标准工作液, 供添加组织用。

1.2 方法

1.2.1 样品的提取和净化 称取组织 10 g 置 50 ml 离心管中, 加入无水硫酸钠 15 g (脂肪不加)、 CH_2Cl_2 20 ml, 旋涡混合 5 min, 3 600 r/min 离心 10 min, 取有机层置 50 ml 离心管中, 用 CH_2Cl_2 15 ml 再萃取 1 次, 合并萃取液。萃取液中加入 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 10ml, 振荡, 3 600 r/min 离心 10min, 取上层溶液; 萃取液再加 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 5 ml 重提一次。合并两次提取的上层溶液, 加 K_2HPO_4 15 g, 混合将之完全溶解, 混合溶液用 CH_2Cl_2 萃取 2 次, 每次加入 10 ml, 混合, 离心, 取上层溶液置旋转蒸发瓶中, 加 10%DMSO-甲醇溶液 25 μl , 置 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中减压旋转蒸发至干, 残余物溶于 0.5 ml 流动相进样分析。

1.2.2 色谱条件 色谱柱为 Hypersil-C18 柱(250 mm \times 4.6 mm, 粒径 5 μm); 流动相为甲醇:水(14:86, V:V); 流速 1.0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长 320 nm; 进样量 20 μl 。

1.2.3 样品中药物残留量的计算方法 取适量试样溶液和相应的标准工作液, 作单点或多点校准, 以色谱峰面积积分值定量。样品中硝基咪唑类药物残留量($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)按下式计算:

$$X = \frac{C_s A V}{A_s W}$$

式中, X 为组织中药物的残留量($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$); C_s 为标准工作液中药物的浓度($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); A 为样品中药物的峰面积 A_s 为标准工作液中药物的峰面积; V 为样品提取液浓缩至干后, 溶解残余物所用流动相的总体积(ml); W 为样品的质量(kg)。

1.2.4 标准曲线的制备 取标准工作液, 用流动相将 HMMNI、RNZ 和 MNZ 的浓度均分别稀释为 0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.5 和 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、TNZ、DMZ 和 ONZ 的浓度分别为 0.01、0.02、0.05、0.1、0.5、1.0 和 2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的标准工作液。进样分析并计算出药物峰面积, 每个浓度均测定 3 次, 取其平均值。以峰面积对标准溶液浓度作图, 得到 6 条标准曲线。并分别求出其回归方程及其相关系数。

1.2.5 回收率及变异系数 取空白组织样品添加硝基咪唑类药物工作溶液, 配成肌肉和脂肪中 HMMNI、RNZ 和 MNZ 的浓度均分别为 0.5、1.0 和 2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、TNZ、DMZ 和 ONZ 的浓度均分别为 1.0、2.0 和 4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的组织样品, 肝脏和肾脏中 HMMNI、RNZ、MNZ、TNZ、DMZ 和 ONZ 的浓度均分别为 1.0、2.0 和 4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的组织样品, 然后对照样品处理方法处理进样分析, 每个浓度做 5 个平行样, 重复 5 个批次的试验, 计算样品的药物回收率和日间变异系数。

2 结果与分析

2.1 色谱条件

在选择色谱条件下, HMMNI、RNZ、MNZ、TNZ、DMZ 和 ONZ 的保留时间分别为 7.2、8.1、9.5、13.5、15.2 和 30.0 min 左右, 峰形对称尖锐。空白样品在药物出峰时无杂质峰干扰, 各药物之间的分离度良好, 相邻两药物之间的分离度均大于 1.5(图 1~图 9)。

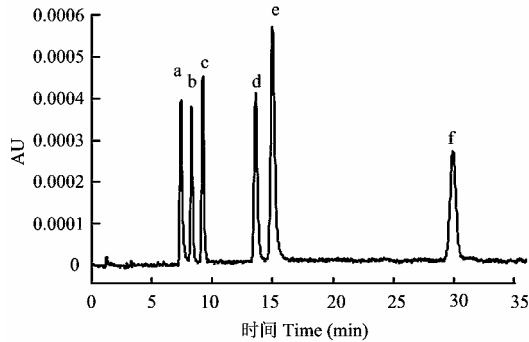
2.2 标准曲线

在本试验的色谱条件下, HMMNI、RNZ、MNZ、TNZ、DMZ 和 ONZ 的标准曲线和相关系数可知(表 2)。各药物在测定浓度范围内时, 药物浓度与相应峰面积线性关系良好, 相关系数 r^2 均在 0.999 以上。y 表示分析物的响应值, x 表示样品中分析物的浓度。

2.3 回收率和变异系数

在检测限浓度时, 药物的回收率和变异系数均达到残留检测要求, 因此 HMMNI、RNZ 和 MNZ 在肌肉和脂肪组织中定量限为 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 在肝脏和肾脏中为 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; TNZ、DMZ 和 ONZ 在肌肉、脂肪、肝脏和肾脏中定量限均为 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。空白组织中添

加 6 种硝基咪唑类药物的浓度为 $0.5 \sim 4.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 回收率均 $>60\%$, 日间变异系数 $<15\%$ 。药物添加浓度相同时, 肌肉和脂肪组织的回收率大于肝脏和肾脏的 (表 3~表 5)。



a. HMMNI; b. RNZ; c. MNZ; d. TNZ; e. DMZ; f. ONZ

图 1 $50 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ HMMNI、RNZ、MNZ 和 $100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ TNZ、DMZ、ONZ 标准品色谱图

Fig. 1 Standard chromatogram of $50 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ HMMNI, RNZ, MNZ and $100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ TNZ, DMZ, ONZ

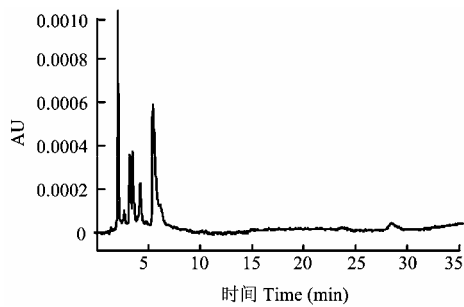


图 2 空白肌肉组织色谱图

Fig. 2 Chromatogram of a blank swine muscle

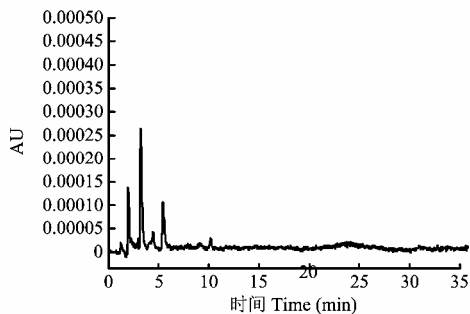
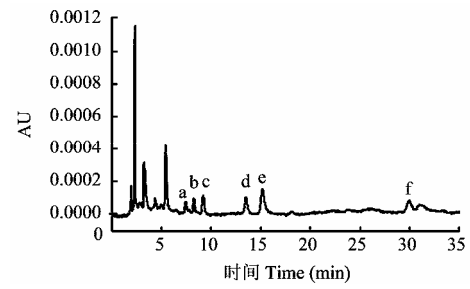


图 3 空白脂肪组织色谱图

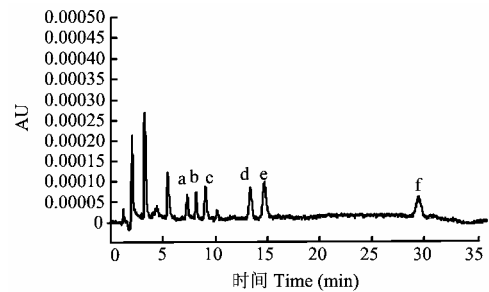
Fig. 3 Chromatogram of a blank swine fat



a. HMMNI; b. RNZ; c. MNZ; d. TNZ; e. DMZ; f. ONZ

图 4 空白肌肉组织添加 $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ HMMNI、RNZ、MNZ 和 $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ TNZ、DMZ、ONZ 色谱图

Fig. 4 Chromatogram of a blank swine muscle spiked at a level of $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ HMMNI, RNZ, MNZ and $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ TNZ, DMZ, ONZ



a. HMMNI; b. RNZ; c. MNZ; d. TNZ; e. DMZ; f. ONZ

图 5 空白脂肪组织添加 $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ HMMNI、RNZ、MNZ 和 $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ TNZ、DMZ、ONZ 色谱图

Fig. 5 Chromatogram of a blank swine fat spiked at a level of $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ HMMNI, RNZ, MNZ and $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ TNZ, DMZ, ONZ

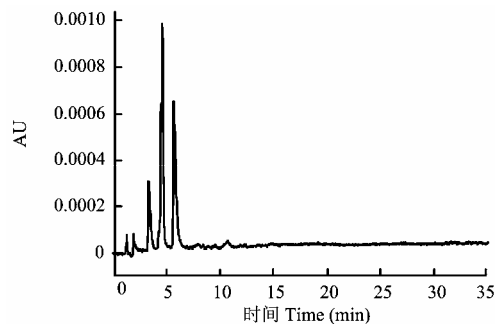
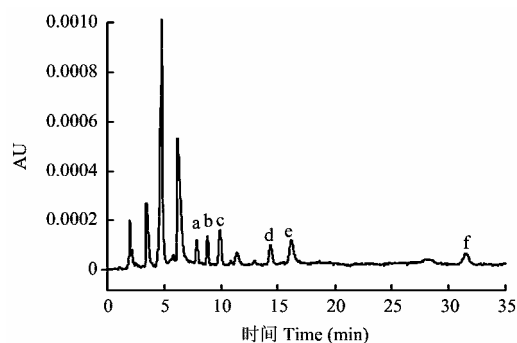


图 6 空白肝脏组织色谱图

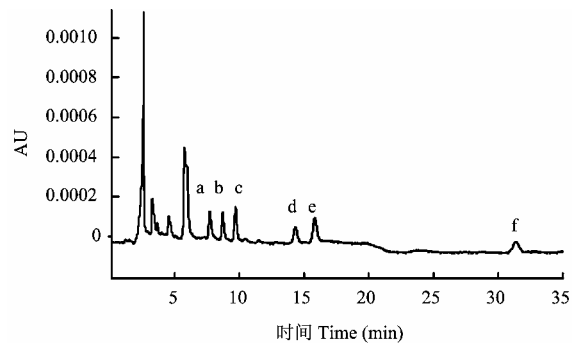
Fig. 6 Chromatogram of a blank swine liver



a. HMMNI; b. RNZ; c. MNZ; d. TNZ; e. DMZ; f. ONZ

图7 空白肝脏组织添加 $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ HMMNI、RNZ、MNZ、TNZ、DMZ 和 ONZ 色谱图

Fig. 7 Chromatogram of a blank swine liver spiked at a level of $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ HMMNI, RNZ, MNZ, TNZ, DMZ and ONZ



a. HMMNI; b. RNZ; c. MNZ; d. TNZ; e. DMZ; f. ONZ

图9 空白肾脏组织添加 $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ HMMNI、RNZ、MNZ、TNZ、DMZ 和 ONZ 色谱图

Fig. 9 Chromatogram of a blank swine kidney spiked at a level of $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ HMMNI, RNZ, MNZ, TNZ, DMZ and ONZ

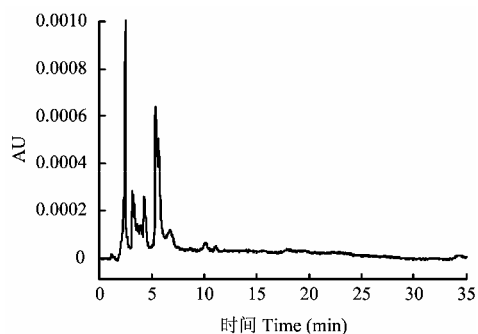


图8 空白肾脏组织色谱图

Fig. 8 Chromatogram of a blank swine kidney

表2 硝基咪唑类药物标准曲线方程与相关系数

Table 2 The calibration curves and correlation coefficients of nitroimidazoles

药物 Medication	标准曲线回归方程 Correlation coefficients	相关系数 r^2
HMMNI	$y=75878x-97.398$	0.9992
RNZ	$y=64464x+518.39$	0.9997
MNZ	$y=30200x+217.82$	0.9998
TNZ	$y=67167x+174.79$	0.9999
DMZ	$y=102984x-499.14$	0.9994
ONZ	$y=65689x-440.16$	0.9996

表3 猪肌肉和脂肪中 HMMNI、RNZ 和 MNZ 的回收率

Table 3 Recoveries of HMMNI, RNZ and MNZ spiked in control swine muscle and fat

组织 Tissue	药物 Drug	$0.5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$		$1.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$		$2.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	
		回收率 Recovery (%)	变异系数 C.V. (%)	回收率 Recovery (%)	变异系数 C.V. (%)	回收率 Recovery (%)	变异系数 C.V. (%)
肌肉 Muscle	HMMNI	65.6±5.8	8.8	72.7±5.7	7.9	75.5±6.0	7.8
	RNZ	72.2±8.9	12.3	73.6±6.8	9.2	74.2±6.5	8.7
	MNZ	75.1±7.2	9.6	75.5±9.4	12.4	76.3±7.3	9.5
脂肪 Fat	HMMNI	68.5±7.1	10.4	76.8±8.7	11.3	73.2±6.2	8.5
	RNZ	75.5±7.6	10.0	77.1±6.0	7.7	77.1±8.4	10.9
	MNZ	82.7±8.3	10.0	74.1±7.2	9.7	72.6±8.2	11.2

3 讨论

3.1 提取和净化

文献报道的萃取硝基咪唑类药物常用二氯甲烷^[9-11,24]、乙腈^[13,14,23]、甲苯^[16]和乙酸乙酯^[19,26]等有机溶剂。本试验选用极性较低的二氯甲烷萃取,再经两

表 4 猪肌肉和脂肪中 TNZ、DMZ 和 ONZ 的回收率

Table 4 Recoveries of TNZ, DMZ and ONZ spiked in control swine muscle and fat

组织 Tissue	药物 Drug	1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$		2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$		4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	
		回收率 Recovery (%)	变异系数 C.V. (%)	回收率 Recovery (%)	变异系数 C.V. (%)	回收率 Recovery (%)	变异系数 C.V. (%)
肌肉 Muscle	TNZ	70.8±6.8	9.6	71.1±6.5	9.2	78.0±7.6	9.7
	DMZ	71.0±8.7	12.2	76.1±7.6	9.9	79.5±6.8	8.5
	ONZ	66.1±5.8	8.8	72.7±9.0	12.4	73.3±9.4	12.9
脂肪 Fat	TNZ	78.2±7.0	9.0	77.1±10.7	13.9	78.9±8.2	10.4
	DMZ	72.2±8.1	11.3	72.2±8.3	11.5	76.0±7.2	9.5
	ONZ	67.8±7.6	11.3	70.1±8.9	12.6	80.3±9.6	12.0

表 5 猪肝脏和肾脏中 HMMNI、RNZ、MNZ、TNZ、DMZ 和 ONZ 的回收率

Table 5 Recoveries of HMMNI, RNZ, MNZ, TNZ, DMZ and ONZ spiked in control swine liver and kidney

组织 Tissue	药物 Drug	1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$		2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$		4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	
		回收率 Recovery (%)	变异系数 C.V. (%)	回收率 Recovery (%)	变异系数 C.V. (%)	回收率 Recovery (%)	变异系数 C.V. (%)
肝脏 Liver	HMMNI	63.1±6.7	10.6	69.4±6.0	8.6	72.9±5.8	7.9
	RNZ	65.6±5.8	8.8	72.7±5.7	7.9	75.5±5.9	7.8
	MNZ	60.4±6.2	10.3	68.9±6.0	8.7	69.0±4.4	6.4
	TNZ	59.7±4.2	7.1	71.0±6.0	8.4	75.4±7.3	9.6
	DMZ	63.3±6.4	10.2	74.7±7.0	9.4	79.3±6.6	8.3
	ONZ	64.1±4.8	7.6	73.8±7.1	9.6	74.7±5.2	6.9
肾脏 Kidney	HMMNI	69.1±8.0	11.6	66.9±9.6	14.4	70.9±7.9	11.1
	RNZ	70.3±7.3	10.4	73.5±6.6	9.0	73.4±6.1	8.3
	MNZ	69.0±6.3	9.1	71.6±6.4	9.0	74.1±5.4	7.3
	TNZ	64.8±7.3	11.3	69.3±7.7	11.2	76.8±6.9	8.9
	DMZ	72.4±6.8	9.3	70.7±5.6	8.0	74.4±6.9	9.2
	ONZ	68.5±7.7	11.3	72.6±5.9	8.1	74.5±5.5	7.4

次液一液反萃, 样品净化效果好, 药物回收率高, 且二氯甲烷沸点为 39.8℃, 很容易旋转蒸发至干。

二氯甲烷密度为 1.322~1.324 $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 高于组织的密度, 用它萃取组织中的药物离心后, 肌肉、肝脏、肾脏组织漂浮在上层, 且与二氯甲烷混合, 使二氯甲烷不能完全取出, 严重影响了回收率。加入无水硫酸钠可以吸去组织中的部分水分, 使组织密度升高, 离心时完全沉淀到离心管底部, 另外硫酸钠的盐析作用可提高回收率。而脂肪基本完全溶解到了萃取溶剂中, 因此不必加硫酸钠脱水。

萃取样品的二氯甲烷液中含有蛋白质、脂肪等较低极性的杂质, 在加入盐酸反萃时, 过力的振荡会使混合溶液发生乳化现象, 尤其是肝脏样品的萃取液,

所以这一步操作中让两种溶剂混合均匀即可, 避免过度振荡。

硝基咪唑类药物是光敏物质, 见光易分解。Polzer 等^[15]报道在室温时它们在生物基质中的降解速度很快, 大于此类药物对光的降解速度, 因此样品处理应在避光处快速进行。

从碱化的盐酸溶液中萃取药物的二氯甲烷, 进样分析之前要真空旋转蒸发至干, 在旋转蒸发至干过程中 DMZ 的回收率总是低于其它几种药物。原因是 DMZ 的蒸汽压较高为 5.58×10^{-4} mmHg, 样品处理后含药物的二氯甲烷无论是真空旋转蒸发至干, 还是很小流速的氮气吹干, 都将使溶剂挥发过程中 DMZ 损失, 而此处理过程对其它药物回收率无观察到的影响。

因此二氯甲烷蒸干时,可加入 2.5 μl 高沸点的 DMSO 降低溶剂的蒸汽压,防止 DMZ 挥发。

3.2 灵敏度

本试验以外标法定量,以空白样品在标准品保留时间的基线噪音的 3 倍为依据,当组织样品量为 10 g 时,肌肉和脂肪中 HMMNI、RNZ 和 MNZ 的检测限为 $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, TNZ、DMZ 和 ONZ 均为 $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,肝脏和肾脏中 HMMNI、RNZ、MNZ、TNZ、DMZ 和 ONZ 的均为 $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,在检测限浓度时,方法的回收率和变异系数均符合残留检测方法规定和要求,表明本方法的定量限低,灵敏度高。

4 结论

本文通过建立猪组织中羟基地美硝唑、洛硝唑、甲硝唑、替硝唑、地美硝唑和奥硝唑残留的高效液相色谱(HPLC-UV)测定法,并对其检测效果进行了比较研究。表明该方法是一种灵敏、准确的检测猪组织中硝基咪唑类药物的方法。

References

- [1] Voogd C E. On the mutagenicity of nitroimidazoles. *Mutation Research*, 1981, 86(3): 243-277.
- [2] Papakonstantinou-Garoufalios S, S, Todoulou O G, Filippatos E C, Papadaki-Valiraki A E, Chytiroglou-Lada A. Synthesis, antifungal activity and antibacterial evaluation of some 3-piperazinylmethyl-5-aryl-1-H-1,2,4-triazoles. *Arzneimittel-Forschung*, 1998, 48(10): 1019-1023.
- [3] Commission Regulation (EEC) No.2377/90. *Official Journal of the European Communities*, 1990, L224/1.
- [4] Commission Regulation (EC) No.3426/93. *Official Journal of the European Communities*, 1993, L312/15.
- [5] Commission Regulation (EC) No.1798/95. *Official Journal of the European Communities*, 1995, L174/20.
- [6] Commission Regulation (EC) No.613/98. *Official Journal of the European Communities*, 1998, L82/14.
- [7] 朱其太. 部分国家对兽药使用的规定. *中国检验检疫*, 2003, 6: 49. Zhu Q T. The provisions of veterinary drugs' use of some countries. *China Inspection and Quarantine*, 2003, 6: 49. (in Chinese)
- [8] 中华人民共和国农业部第 193 号公告. 2002, 4. The Ministry of Agriculture. Notice of the Ministry of Agriculture of People's Republic of China No. 193. 2002, 4. (in Chinese)
- [9] Gaugain M, Abjean J P. High-performance thin-layer chromatographic method for the fluorescence detection of three nitroimidazole residues in swine and poultry tissue. *Journal of Chromatography A*, 1996, 737(2): 343-346.
- [10] Newkirk D R, Righter H F, Schenck F J, Okrasinsik J L, Barnes C J. Gas chromatographic determination of incurred dimetridazole residues in swine tissue. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 1990, 73(5): 702-704.
- [11] Carignan G, Skakum W, Sved S. Dimetridazole residues in pork tissue. I. Assay by liquid chromatography with electrochemical detector. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 1988, 71(6): 1141-1145.
- [12] Carignan G, MacIntosh A I, Skakum W, Sved S. Dimetridazole residues in pork tissue. II. Application of liquid chromatographic method to monitor elimination of drug and its major metabolite. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 1988, 71(6): 1146-1149.
- [13] Serensen L K, Hansen H. Determination of metronidazole and hydroxymetronidazole in trout by a high-performance liquid chromatographic method. *Food Additives and Contaminants*, 2000, 17(3): 197-203.
- [14] Semeniuk S, Posyniak A, Niedzielska J, Zmudzki J. Determination of nitroimidazole residues in poultry tissues, serum and eggs by high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*, 1995, 9(5): 238-242.
- [15] Polzer J, Gowik P. Validation of a method for the detection and confirmation of nitroimidazoles and corresponding hydroxy metabolites in turkey and swine muscle by means of gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B (Biomedical Sciences and Applications)*, 2001, 761(1): 47-60.
- [16] Ho C, Della W M Sin, Wong K M, Tang H P O. Determination of dimetridazole and metronidazole in poultry and porcine tissues by gas chromatography-electron capture negative ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 530(6): 23-31.
- [17] Morris W J, Nandrea G J, Roybal J E, Munns R K, Shimoda W, Skinner H R J. Quantitative confirmation of dimetridazole and ipronidazole in swine feed by capillary gas chromatography/mass spectrometry with multiple ion detection. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 1987, 70(4): 630-644.
- [18] Garland W A, Hodshon B J, Chen G, Weiss G, Felicito N R, MacDonald A. Determination of ipronidazole and its principal metabolite in turkey skin and muscle by combined gas-negative chemical ionization mass spectrometry-stable isotope dilution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1980, 28: 273-277.

- [19] Hurtaud-Pessel D, Delepine B, Laurentie M. Determination of four nitroimidazole residues in poultry meat by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2000, 882(1-2): 89-98.
- [20] Capitan-Vallvey L F, Ariza A, Checa R, Navas N. Determination of five nitroimidazoles in water by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2002, 978(1-2): 243-248.
- [21] Cannavan A, Kennedy D G. Determination of Dimetridazole in poultry Tissues and Eggs Using Liquid Chromatography-Thermospray Mass Spectrometry. *Analyst*, 1997, 122: 963-966.
- [22] Matusik J E, Leadbetter M G, Barnes C J, Sphon J A. Identification of dimetridazole, ipronidazole, and their alcohol metabolites in turkey by thermospray tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40: 439-443.
- [23] Huet A C, Mortier L, Daeseleire E, Fodey T, Elliott C, Delahaut P. Development of an ELISA screening test for nitroimidazoles in egg and chicken muscle. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 534: 157-162.
- [24] 王大菊, 王旭, 邱银生, 杨尔宁. 高效液相色谱法测定鸡体内的替硝唑. *中国兽医学报*, 2002, 22(3): 284-286.
Wang D J, Wang X, Qiu Y S, Yang E N. Determination of tinidazole in chickens by HPLC. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2002, 22(3): 284-286. (in Chinese)
- [25] 王大菊, 王旭, 刘书庆, 艾霞, 汪纪仓, 高小龙. 动物性食品中硝基咪唑类药物残留的检测方法. *毒理学杂志*, 2005, 19(3)增刊: 330-331.
Wang D J, Wang X, Liu S Q, Ai X, Wang J C, Gao X L. Determination of nitroimidazoles residues in foods of animal origin. *Journal of Toxicology*, 2005, 19(3)Suppl: 330-331. (in Chinese)
- [26] 谢凯舟, 张雨梅, 曹永忠, 祁永红. 二甲硝咪唑在肉鸡组织中残留的研究. *江苏农业研究*, 2000, 21(4): 22-26.
Xie K Z, Zhang Y M, Cao Y Z, Qi Y H. Studies on residues of dimetridazole in broiler chicken tissues. *Jiangsu Agricultural Research*, 2000, 21(4): 22-26. (in Chinese)
- [27] 沈建忠, 项新华, 张跃, 赵珊. 家禽鸡肉组织中硝基咪唑类药物残留高效液相色谱法研究. *中国农业科学*, 2003, 36(6): 700-703.
Shen J Z, Xiang X H, Zhang Y, Zhao S. Determination of nitroimidazoles in poultry muscle tissues by high-performance liquid chromatography. *Scientia Agricultura Sinica*, 2003, 36(6): 700-703. (in Chinese)

(责任编辑 林鉴非)

欢迎订阅 2009 年《农业质量标准》

主管: 中华人民共和国农业部; 主办: 中国农业科学院

协办: 农业部农产品质量安全中心; 承办: 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所

主要栏目: 本刊特稿、本刊专访、专家点评、专题论坛、政策法规、农产品质量安全、农业标准化、农产品地理标志、无公害食品行动、标准制定与实施、质量认证与管理、质量监督与检验、检验检测体系建设、农业标准公告、研究与探讨、质检中心之窗、名企名品、市场信息与动态、海外博览、编读园地、广告信息等。

读者对象: 与农产品质量安全和农业质量标准有关的各级农业行政管理、科研教学、检验检测、技术推广、生产企业等部门的有关人员。

本刊为双月刊, 逢双月 10 日出版。大 16 开本, 彩色四封, 56 页。全国各地邮局(所)均可订阅, 也可直接到本刊编辑部办理订阅手续。邮发代号: 82-223, 每册定价: 6.80 元, 全年共 40.80 元。

通讯地址: 北京中关村南大街 12 号中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所(邮政编码: 100081)

联系电话/传真: 010-82106316; E-mail: aqs@caas.net.cn

欢迎各界朋友赐教、赐稿、订阅和刊登广告。