

硝基咪唑类药物在鸡肉组织中残留量的检测方法探究

齐鼎铭¹, 宋艳红², 刘春龙², 王 鹏¹, 程 序¹

1. 山西医科大学药学院, 太原 030001
2. 山西省兽药监察所残留室, 太原 030027

[摘要] 通过对组织样品前处理方法的深入探究, 从提取和净化的每一个环节入手, 改变提取时间和温度、萃取的振摇方式, 以及净化时的滴速等细节条件, 建立了高效液相色谱方法测定鸡肉组织中硝基咪唑类药物的残留量。结果表明: 测定鸡肉组织中硝基咪唑类药物残留量的回收率由 40%~50% 提高到 70%~80%, 同时增强了标准的可操作性, 优化了农业部 236 号公告发布的“动物性食品中硝基咪唑类药物残留检测方法”。

[关键词] 硝基咪唑类药物; 鸡肉; 残留; 高效液相色谱法

[中图分类号] S859.84 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-7857(2007)09-0036-04

Determination of Nitroimidazoles Residue in Chicken Tissues

QI Dingming¹, SONG Yanhong², LIU Chunlong², WANG Peng¹, CHENG Xu¹

1. College of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China
2. Shanxi Supervision Institute for Veterinary Drug Control, Taiyuan 030027, China

Abstract: A new HPLC method for determining the Nitroimidazoles in chicken tissues is proposed, based on the studies on the method of pre-processing of tissues and by adjustments of the time and temperature of extraction, the mode of shaking and the dropping rate during cleaning. The results show that the recovery rate is increased from 40%~50% to 70%~80%. This method is easier to be implemented than the previous one and is an optimization of the method in the 236th bulletin of Ministry of Agriculture.

Key Words: nitroimidazoles; chicken; residue; high-performance liquid chromatography

CLC Number: S859.84

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2007)09-0036-04

收稿日期: 2007-02-07

作者简介: 齐鼎铭, 男, 太原市新建南路 86 号山西医科大学药学院, 助理实验师, 研究方向为药物化学; E-mail: qidmde@yahoo.com.cn

参考文献(References)

- [1] AMARI S. Differential geometrical methods in statistics[M]. Germany: Springer lecture Notes in Statistics, 1985.
- [2] AMARI S. Methods of information geometry [M]. England: Oxford University Press, 2000.
- [3] DODSON C T. Gamma manifolds and stochastic geometry[C]// Proceedings of the workshop on recent topics in differential geometry. Santiago de Compostela, 1997: 16-19.
- [4] AMARI S. Differential geometry of a parametric family of invertible linear systems Riemannian metric, dual affine connections and divergence [J]. Mathematical Systems Theory, 1987(20): 53-82.
- [5] ABDEL-ALL N H, ABD-ELLAH H N, MOUSTAFA H M. Information geometry of random walk distribution[J]. Publ Math Debrecen, 2003(63): 51-66.
- [6] DODSON C T, MATSUZOE H. An affine embedding of the gamma manifold[J]. Appl Sci, 2003(5): 1-6.

(责任编辑 代 丽)

地美硝咪唑(DMZ)、甲硝唑(灭滴灵,MTZ)、洛硝唑(RNZ)是硝基咪唑类(Nitroimidazoles)兽药,有抗厌氧菌感染作用,常被用来预防、治疗家禽的原虫病等疾病。这些化合物具有潜在的致癌、致突变性,其残留对食品安全构成了潜在的威胁。欧盟各国均对硝基咪唑在禽肉中的最高残留限量做了规定。检测动物产品中地美硝咪唑残留量的方法较多,但多残留检测方法较少^[2-3]。

本文采用液相色谱法,通过对色谱条件和样品提取、净化的探索,优化了农业部 236 号公告发布的“动物性食品中硝基咪唑类药物残留检测方法”^[1];建立了多残留同时测定动物产品中 DMZ, RNX, TMZ 残留量的快速检测方法,并将回收率提高到 70%~80%。

1 材料

1.1 试剂和材料

甲硝唑对照品(ICN 公司,批号:8014F),洛硝唑对照品(Sigma 公司,批号:51H0726),地美硝咪唑对照品(Sigma 公司,批号:109H0903),甲醇、乙腈(色谱纯),其他试剂均为分析纯;固相萃取柱(Waters Oasis TMHLB 500 mg/6 mL);醋酸盐缓冲液:取无水醋酸钠 0.82 g 溶解于 800 mL 水中,用冰醋酸调节 pH 至 4.3,定容至 1 000 mL。

1.2 仪器设备

高效液相色谱仪(美国 Waters 公司,2695 型);匀浆机(日本 ACE 公司,AM-6 型);回旋振荡器(国华 HY-5 型);高速冷冻离心机(日本日立公司,CR22DG 型);旋转蒸发器(德国海盗夫公司,LR4000/HB/G3 型);氮吹仪(美国 Organomation Associates 公司,N-E-VAPTM 型)。

2 实验方法与结果

2.1 样品的制备

取适量新鲜或冷冻的空白或供试组织,绞碎使均匀。

2.2 样品的前处理

2.2.1 提取

称取绞碎后的鸡肉试样 10.00 g,置 50 mL 匀浆杯(外围加 40℃ 的热水)中,加乙酸乙酯 15 mL,10 000 r/min 匀浆 1 min,浆液转入 50 mL 离心管中,用 5 mL 乙酸乙酯清洗刀头和匀浆杯,一并转入离心管中,加 2.0 g K_2HPO_4 和 2.0 g 无水 Na_2SO_4 ,混匀,置回旋振荡器中速振荡 60 min,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液至鸡心瓶中。沉淀物再用乙酸乙酯 20 mL 提取一次,合并上清液,50℃ 旋转蒸发至干。依次加入 1 mol/L 盐酸 2 mL,乙酸乙酯 1.5 mL 溶解残余物,转入有正己烷 20 mL 的分液漏斗中。将分液漏斗竖直,轻轻旋摇 3 圈,静置 5 min;振摇 1 下,静置 10 min;再振摇 3 下,静置

30 min,收集下层溶液。再用 1 mol/L 盐酸 4 mL,乙酸乙酯 3 mL 洗涤鸡心瓶,并转至同一分液漏斗中,重复萃取一次(振摇 3 次,每次摇 3 下),收集下层溶液,合并,用 1 mol/L 盐酸或 5 mol/L 氢氧化钠调节 pH 值至 4.8~5.2,备用。

2.2.2 净化

将固相柱依次用甲醇 10 mL、水 10 mL 预洗,挤干。取备用液过柱,控制流速 1 滴/2 s,挤干。用水 3 mL 洗柱,挤干,用甲醇 3 mL 洗脱,不要吹,收集洗脱液至试管中,氮气吹干,加流动相 1.00 mL 溶解残余物,过 0.45 μ m 微孔滤膜,收集滤液,制得试样溶液。

2.3 标准溶液的配制

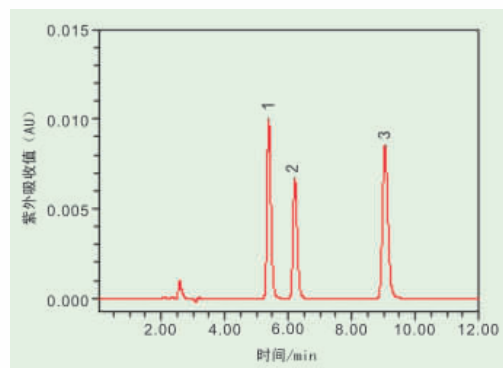
精密称取甲硝唑、洛硝唑以及地美硝咪唑对照品各 50 mg,置同一 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 1 mg/mL 的储备液。精密量取储备液 0.5 mL,置 100 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得 5 μ g/mL 的工作液。精密量取工作液 0.4, 1, 2, 4, 10, 20 mL,分别置 100 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得 20 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 500 ng/mL, 1 000 ng/mL 的对照液。

2.4 色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μ m); 流动相: 醋酸缓冲液-乙腈(85:15); 流速: 1 mL/min; 进样量: 50 μ L。检测波长: 320 nm。

2.5 系统适用性实验

取 2.3 节中配制的 500 ng/mL 标准对照液,精密进样 50 μ L,在 2.4 节的色谱条件下,记录色谱图如图 1 所示。计算结果见表 1。



1-甲硝唑(MTZ), 2-洛硝唑(TNZ), 3-地美硝咪唑(DMZ)

图 1 系统适用性实验的色谱图

Fig. 1 Chromatogram in the system applicability experiment

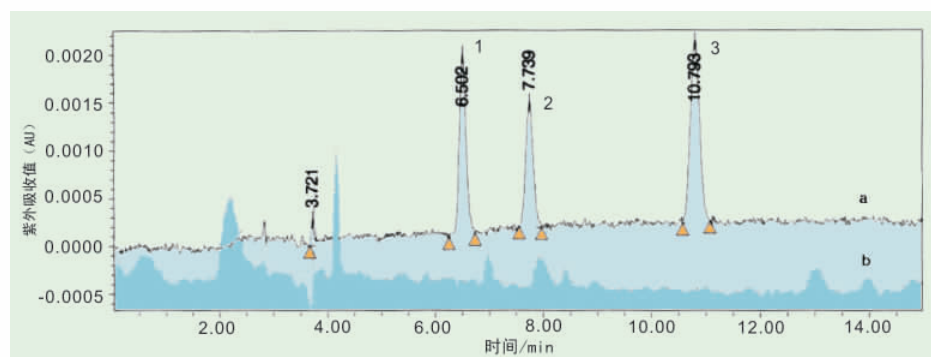
表 1 系统适用性实验结果
Table 1 Results of the system applicability experiment

	理论塔板数	分离度	重复性 RSD/%
甲硝唑	9 335	7.0	0.01
洛硝唑	10 486	3.5	0.14
地美硝唑	13 759	7.0	0.22

2.6 空白实验

除不加试料外,采用完全相同的测定步骤进行平行

操作。色谱图(图 2)显示,在 2.4 节色谱条件下,空白样品(b)对待测组分(a)没有干扰。



1-甲硝唑(MTZ),2-洛硝唑(TNZ),3-地美硝唑(DMZ)

图 2 空白实验的高效液相色谱图

Fig. 2 Chromatogram in a blank experiment

2.7 线性关系考察

取 2.3 节中配制的 6 个系列标准对照液,精密进样 50 μL ,平行进样 3 针,在 2.4 节色谱条件下,进行色谱分析并记录峰面积。结果见表 2~表 4。

上述结果说明,在 20~1 000 ng/mL 范围内,甲硝唑、洛硝唑、地美硝唑峰面积与浓度均呈良好的线性关系。

2.8 回收率实验

取已绞碎的空白肌肉 10.00 g 置 50 mL 匀浆杯中,添加 2.5 节中标准工作液 20 μL ,制成 100 ng/g 的阳性添加样品,涡动混匀,加乙酸乙酯 15 mL,10 000 r/min 匀浆 1 min,以下操作同 2.2 节,制得阳性添加样品,精密进样 50 μL ,照 2.4 色谱条件进行色谱分析,计算回收率,结果见表 5~表 7。

表 2 甲硝唑的线性关系
Table 2 Linear correlation of MTZ

浓度 C $/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	20.168	50.420	100.84	201.68	504.20	1 008.4
峰面积	3 375.0	8 632.2	16 957.7	33 834.7	84 985.4	169 764.4
A 平均值						
回归方程	$Y=0.00594X-0.07594$			相关系数	$R=0.9999$	

表 3 洛硝唑线性关系
Table 3 Linear correlation of RNZ

浓度 C $/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	20.112	50.280	100.56	201.12	502.80	1 005.6
峰面积	2 483.6	6 175.6	12 195.6	24 371.2	60 946.9	121 739.6
A 平均值						
回归方程	$Y=0.008263X-0.46476$			相关系数	$R=0.999 998$	

表 4 地美硝唑线性关系
Table 4 Linear correlation of DMZ

浓度 C $/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	20.156	50.390	100.78	201.56	503.90	1 007.8
峰面积	4 002.1	10 142.0	20 022.8	40 069.4	100 358.0	201 665.4
A 平均值						
回归方程	$Y=0.0049999X+0.636623$			相关系数	$R=0.999 997$	

表 5 甲硝唑 10 ng/g 阳性添加时的回收率
Table 5 Recovery rate of positive additive of 10 ng/g MTZ

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
称样量/g	10.03	9.99	10.01	9.95	10.04	9.97	10.01	10.06	10.02
标品加入量/ng	10.03	10.09	10.07	10.13	10.04	10.11	10.07	10.02	10.06
测得值/ng	6.43	6.46	6.14	7.90	7.09	8.07	6.23	7.47	8.12
回收率/%	64.07	63.98	60.95	77.97	70.64	79.80	61.83	74.54	80.66
平均回收率/%	70.49								
RSD/%	8.00								

表 6 洛硝唑 10 ng/g 阳性添加时的回收率
Table 6 Recovery rate of positive additive of 10 ng/g RNZ

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
称样量/g	10.03	10.01	10.00	9.97	10.06	10.02	9.99	10.05	9.96
标品加入量/ng	10.03	10.05	10.06	10.09	10.00	10.04	10.07	10.01	10.10
测得值/ng	8.43	8.71	9.81	9.09	8.57	9.47	6.84	8.58	8.47
回收率/%	84.11	86.66	97.57	90.08	85.77	94.41	67.95	85.72	83.86
平均回收率/%	86.24								
RSD/%	8.33								

表 7 地美硝唑 10ng/g 阳性添加时的回收率
Table 7 Recovery rate of positive additive of 10 ng/g DMZ

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
称样量/g	9.97	10.01	10.03	9.99	10.06	10.02	10.05	9.98	10.04
标品加入量/ng	10.11	10.07	10.05	10.09	10.02	10.06	10.03	10.10	10.04
测得值/ng	7.87	6.16	7.72	8.85	9.15	8.30	6.37	6.49	6.10
回收率/%	77.87	61.16	76.84	85.73	91.3	82.56	63.51	64.29	60.77
平均回收率/%	73.78								
RSD/%	11.60								

3 讨论

3.1 提取条件的优化

为了提高提取效率,该试验从以下方面进行了调整,经多次试验,回收率均有所改善。加入 K_2HPO_4 ,调节了目标物所在的酸碱环境,使其转变为分子状态,更易被提取出来。通过在匀浆杯外周加热水及增加振摇时间,证明温度和时间对于目标物的提取都有一定影响。将 20 mL 乙酸乙酯分 2 次加,减少了目标物的损失。为了减少乳化的发生,本试验采取以下措施:① 加无水 Na_2SO_4 ,使极少量的无机盐能有效地加速 W/O 型乳液的破乳,提高破乳脱出水的透光率^[4];② 改变振摇方式,即先将分液漏斗竖直,轻轻旋摇 3 圈,静置 5 min;再振摇 1 下,静置 10 min;再振摇 3 下,静置 30 min,收集下层溶液。这样做是为了让两相逐步接触,使一起被提取出来的脂肪更易除去,同时避免了剧烈振摇、目标物被包裹而难以分开的局面。

3.2 净化条件的提示

净化条件基本上未动,但值得提醒的有以下两点。

1) 第一步的“吹干”。一般情况下样品过固相柱时,活化液不可流干就要加样液,但此处的吹干十分重要,原因还是硝基咪唑类药物的两性决定的。在提取的最后一步,已将提取液 pH 值调为 5.0 左右,如果预洗一步的水未吹干就加样,会改变样液的 pH 值,从而改变目标物的状态、降低固相柱对目标物的吸附,导致样品的损失、回收率的下降。

2) 控制流速。虽然标准规定自然流出,如果有条件,最好用固相萃取装置,控制流速 1 滴/2 s,同时可以保证样品与添加的平行操作,确保被测结果的准确、可靠。

4 结论

用本实验方法,在 3 种药物中,洛硝唑的回收率最

高,平均回收率为 86.24%;地美硝唑的回收率居中,平均回收率为 73.78%;甲硝唑的回收率最低,平均回收率为 70.49%。3 种药物的回收率均由 40%~50% 提高到 70%~80% 以上。

参考文献 (References)

- [1] 农业部畜牧兽医局. 动物性食品硝基咪唑类药物残留检测方法——高效液相色谱法 [J]. 中国兽药杂志, 2003, 37 (5): 6, 13-14.
Ministry of Agriculture, Animal Husbandry and Veterinary Bureau. Determination of the residue in the animal food by high-performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2003, 37(5): 6, 13-14.
- [2] 沈建忠, 项新华, 等. 家禽肌肉组织中硝基咪唑类药物残留高效液相色谱检测法研究 [J]. 中国农业科学, 2003, 36(6): 700-703.
SHEN Jianzhong, XIANG Xinhua, et al. Determination of nitromidazoles in poultry muscle tissue by high-performance liquid chromatography [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2003, 36(6): 700-703.
- [3] 王建华, 林黎明, 等. 液相色谱紫外法测定鸡肉中三种硝基咪唑残留量 [J]. 化学分析计量, 2000, 9(4): 9-10.
WANG Jianhua, LIN Liming, et al. Determination of three kinds of nitromidazole residues in chicken muscle by high-performance liquid chromatography [J]. Chemical Analysis and Meterage, 2000, 9(4): 9-10.
- [4] 夏立新, 曹国英, 等. 无机盐对乳液破乳效果的影响 [J]. 石油学报 (石油加工), 2003, 19(4): 94-97.
XIA Lixin, CAO Guoying, et al. Influence of inorganic salts on demulsification of emulsions [J]. Acta Petrolei Sinica (Petroleum Processing Section), 2003, 19(4): 94-97.

(责任编辑 王 芷)