

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.06.08

顶空气相色谱法检测羟基甲硝唑对照品中的残留溶剂

马秋冉, 杨 星, 杨秀玉, 张秀英, 于晓辉*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2019-02-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 06-0056-05 [中图分类号] S859.83

[摘 要] 建立了羟基甲硝唑对照品中残留溶剂甲醇和丙酮的顶空气相色谱测定方法。采用 Agilent-DB624 石英毛细管色谱柱 (30 m × 0.53 mm, 1.0 μm); 以氮气为载气, 氢火焰离子化检测器为检测器, 进样口温度 200 °C, 检测器温度 250 °C; 以起始温度 30 °C, 保持 5 min, 20 °C/min 升温至 200 °C, 保持 2 min 为程序升温方法; 以顶空瓶平衡温度 80 °C, 平衡 30 min 为顶空条件。结果表明, 在该色谱条件下甲醇和丙酮与其他物质分离良好。甲醇在 2~360 μg/mL 范围内线性关系良好, 检测限为 1.0 μg/mL; 丙酮在 1~600 μg/mL 范围内线性关系良好, 检测限为 0.5 μg/mL。甲醇回收率为 98.0%~102.4%, *RSD* 为 0.6%~0.9%; 丙酮回收率为 97.0%~99.6%, *RSD* 为 0.6%~1.0%。本方法操作简单, 准确度高, 重复性好, 可用于羟基甲硝唑中残留溶剂的检测。

[关键词] 羟基甲硝唑; 顶空气相色谱法; 残留溶剂

Determination of Residual Solvents in Hydroxy Metronidazole by Headspace Gas Chromatography

MA Qiu-ran, YANG Xing, YANG Xiu-yu, ZHANG Xiu-ying, YU Xiao-hui*

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

Abstract: A method for the determination of residual solvents in hydroxyl metronidazole was developed by headspace capillary gas chromatography. The two residual solvents were detected by GC with Agilent DB-624 capillary column (30 m × 0.53 mm, 1.0 μm) with FID detector and nitrogen as carrier gas. The temperature of the injection port was maintained at 200 °C and that of detector at 250 °C. The column temperature rose by program, and the initial temperature was 30 °C and maintained for 5 min. Thereafter the temperature was raised to 200 °C at a rate of 20 °C/min. Results showed that methanol and acetone were finely separated. There were good linearity of methanol in range of 2~360 μg/mL, the LOD is 1.0 μg/mL and acetone in range of 1~600 μg/mL, the

基金项目: “十二五”科技基础性工作专项 (2013FY113300-2)

作者简介: 马秋冉, 助理研究员, 从事化学药品检验工作。

通讯作者: 于晓辉。E-mail: Shuilon0220@sina.com

LOD is 0.5 $\mu\text{g/mL}$. The recovery rate were 98.0% ~ 102.4% (0.6% ~ 0.9%), 97.0% ~ 99.6% (0.6% ~ 1.0%), respectively. The method is rapid, accurate, sensitive, and suitable for determination of the residual solvents in hydroxy metronidazole.

Key words: hydroxy metronidazole; headspace gas chromatography; residual solvents

甲硝唑是畜牧生产中常用的一种硝基咪唑类药物,此类药物能杀灭和预防厌氧菌及病原虫,可用于治疗与预防滴虫病、球虫病及各种厌氧菌感染^[1]。由于甲硝唑含有的硝基杂环类化合物存在细胞诱变性,因此,具有潜在的动物致癌、致畸、致突变作用和遗传毒性,其药物残留对动物源性食品安全构成了直接威胁^[2]。为保证食品安全,我国对动物性食品中甲硝唑及其代谢物羟基甲硝唑进行残留量监控。在现行的残留监控检测标准中^[3-7],需使用羟基甲硝唑对照品,但目前国内未见供应,因此,制备该对照品以满足行业需求。采用质量平衡法对羟基甲硝唑对照品进行定值研究,需分别测定标准物质中的有关物质、水分、残留溶剂及无机杂质的含量。羟基甲硝唑对照品在生产工艺中用到了甲醇和丙酮,因此,确定甲醇和丙酮为残留溶剂测定目标。本文参考文献中甲醇和丙酮的残留溶剂测定方法^[8-10],建立了顶空毛细管气相色谱法检测羟基甲硝唑对照品中的残留溶剂,并进行方法学研究,最终采用外标标准曲线法对其残留溶剂进行含量测定。

1 材料与方法

1.1 仪器 7890A 气相色谱仪(包括 7697A 型顶空进样器,安捷伦科技公司);XS205 电子天平(Mettler Toledo 公司,感量 0.1 mg);顶空进样瓶(20 mL,安捷伦科技公司)。

1.2 试剂 甲醇、丙酮、N,N-二甲基甲酰胺(Thermo Fisher 公司,色谱纯)。

1.3 试药 羟基甲硝唑(成都大学四川抗菌素工业研究所制备,批号 160815)。

1.4 色谱条件 色谱柱为 Agilent DB-624 石英毛细管色谱柱(30 m $\times$ 0.53 mm,1.0 μm);程序升温:起始温度为 30 $^{\circ}\text{C}$,保持 5 min,以 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升

温至 200 $^{\circ}\text{C}$,保持 2 min;进样口温度 200 $^{\circ}\text{C}$;氢火焰离子化检测器(FID)温度为 250 $^{\circ}\text{C}$;载气为高纯氮气,流量为 3 mL/min,分流比为 5:1。

1.5 顶空进样器条件 顶空瓶平衡温度为 80 $^{\circ}\text{C}$,顶空瓶体积为 20 mL,供试的溶液体积为 1 mL,平衡时间为 30 min;定量环温度为 90 $^{\circ}\text{C}$;传输线温度为 105 $^{\circ}\text{C}$,分流比为 1:5。

1.6 溶液的制备

1.6.1 混合对照品溶液 取甲醇约 0.1 g,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,用 N,N-二甲基甲酰胺稀释至刻度,摇匀,作为甲醇对照品储备液;取丙酮约 0.1 g,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,用 N,N-二甲基甲酰胺稀释至刻度,摇匀,作为丙酮对照品储备液;精密量取甲醇对照品储备液 0.3 mL、丙酮对照品储备液 0.5 mL,置同一 10 mL 容量瓶中,用 N,N-二甲基甲酰胺稀释至刻度,摇匀,配制含甲醇 300 $\mu\text{g/mL}$ 和丙酮 500 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

1.6.2 供试品溶液 取羟基甲硝唑 0.5 g,精密称定,置 5 mL 量瓶中,用 N,N-二甲基甲酰胺溶解并稀释至刻度,摇匀,配制成含羟基甲硝唑 0.1 g/mL 的供试品溶液。

1.6.3 空白溶液 N,N-二甲基甲酰胺为空白溶液。

1.6.4 检测限与定量限试验溶液 分别取甲醇和丙酮对照品储备液,逐级稀释为 4、3、2、1、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 甲醇对照品溶液,及 3、2、1、0.5、0.25 $\mu\text{g/mL}$ 丙酮对照品溶液。

1.6.5 线性与范围试验溶液 分别取甲醇和丙酮对照品储备液,配制 2、30、120、240、300、360 $\mu\text{g/mL}$ 的甲醇对照品溶液,及 1、50、200、400、500、600 $\mu\text{g/mL}$ 的丙酮对照品溶液。

1.6.6 回收率试验溶液 取羟基甲硝唑 0.1 g,精

密称定,置 20 mL 顶空瓶中,用 1 mL 相当于混合对照品溶液浓度 80% ,100% ,120% 的含各溶剂的溶液(80% 对照品溶液中甲醇浓度为 240 μg/mL,丙酮浓度为 400 μg/mL;100% 对照品溶液中甲醇浓度为 300 μg/mL,丙酮浓度为 500 μg/mL;120% 对照品溶液中甲醇浓度为 360 μg/mL,丙酮浓度为 600 μg/mL。)溶解,每个浓度点制备 3 份,作为回收率试验溶液。

2 结果与分析

2.1 专属性 分别精密量取空白溶液和混合对照品溶液 1 mL 置 20 mL 顶空瓶中,进样,记录色谱图,见图 1。结果显示,甲醇、丙酮的保留时间分别为 4.478、7.718 min,空白溶剂 N,N-二甲基甲酰胺的保留时间为 16.840 min。甲醇、丙酮,N,N-二甲基甲酰胺分离度均大于 1.5。表明顶空进样条件能够将甲醇和丙酮充分富集,色谱分离条件能够有效分离甲醇、丙酮,且 N,N-二甲基甲酰胺对测定结果无影响,具有较好的专属性。

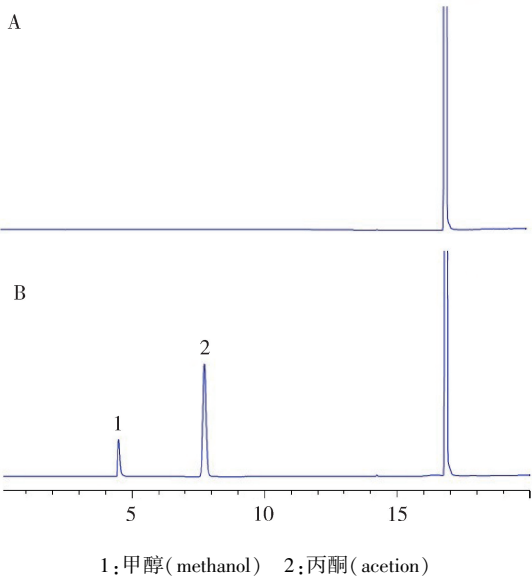


图 1 空白溶液(A)与混合对照品溶液(B)的气相色谱图
Fig 1 GC chromatograms of blank solution(A) and substances solution(B)

2.2 检测限与定量限 分别精密量取甲醇和丙酮的检测限与定量限试验溶液 1 mL 置 20 mL 顶空瓶

中,进样,记录色谱图。以信噪比大于等于 3:1 时的浓度为检测限,信噪比大于等于 10:1 时的浓度为定量限,考察甲醇与丙酮的检测限和定量限。结果显示,甲醇检测限为 1.0 μg/mL,定量限为 2.0 μg/mL;丙酮检测限为 0.5 μg/mL,定量限为 1.0 μg/mL。

2.3 线性与范围 分别精密量取甲醇和丙酮的线性与范围试验溶液 1 mL 置 20 mL 顶空瓶中,进样,记录色谱图。以峰面积与对照品浓度作图,用最小二乘法进行线性回归。结果显示,甲醇在 2 ~ 360 μg/mL 浓度范围内线性关系良好,线性方程为 $Y = 1807.5X - 3.0667$,相关系数 $r = 0.9996$;丙酮在 1.0 ~ 600 μg/mL 浓度范围内线性关系良好,线性方程为 $Y = 4754.3X + 3.3266$,相关系数 $r = 0.9997$ 。

2.4 精密度(重复性) 精密量取混合对照品溶液 1 mL 置 20 mL 顶空瓶中,平行制备 6 份,进样,记录色谱图。结果显示,甲醇和丙酮峰面积的 RSD 分别为 0.3% 和 0.4% (表 1)。

表 1 精密度试验结果(n=6)							
Tab 1 The results of precision test(n=6)							
	编号						RSD/%
	1	2	3	4	5	6	
甲醇峰峰面积	570	569	574	573	571	571	0.3
丙酮峰峰面积	2535	2524	2544	2552	2549	2536	0.4

2.5 准确度 分别精密量取各浓度回收率试验溶液 1 mL 置 20 mL 顶空瓶中,进样,记录色谱图,采用外标标准曲线法对残留溶剂进行含量测定。结果显示,甲醇回收率为 98.0% ~ 102.4% ,RSD 为 0.6% ~ 0.9% ;丙酮回收率为 97.0% ~ 99.6% ,RSD 为 0.6% ~ 1.0% 。表明两者均具有较好的回收率(表 2)。

2.6 样品的测定 精密量取供试品溶液 1 mL 置 20 mL 顶空瓶中,平行制备 4 份,进样,记录色谱图。结果测得,羟基甲硝唑中残留溶剂量分别为甲醇 0.04% ,丙酮 0.01% (表 3)。

表 2 回收率试验结果

Tab 2 The results of recovery test

溶剂	样品量/mg	加入量/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	测得量/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	回收率/%	RSD/%
甲醇	101.39	244.6	245.4	102.4	0.9
	103.52	244.6	246.4	100.7	
	101.03	244.6	246.9	100.9	
	100.28	305.8	308.1	100.8	
	101.49	305.8	312.2	102.1	0.6
	100.56	305.8	310.1	101.4	
	101.78	367.0	364.7	98.0	
	100.67	367.0	366.2	99.8	
	100.61	367.0	369.8	99.4	0.7
丙酮	101.39	406.4	392.8	97.0	0.8
	103.52	406.4	396.8	97.9	
	101.03	406.4	390.8	96.4	
	100.28	508.0	496.2	97.7	
	101.49	508.0	503.2	99.3	1.0
	100.56	508.0	504.7	99.6	
	101.78	609.6	598.7	98.4	
	100.67	609.6	591.5	97.3	
	100.61	609.6	595.8	98.0	0.6

表 3 羟基甲硝唑残留溶剂测定结果

Tab 3 The results of residual organic solvents testing of hydroxy metronidazole

溶液	编号				平均值
	1	2	3	4	
甲醇	0.034%	0.036%	0.036%	0.036%	0.04%
丙酮	0.013%	0.014%	0.013%	0.013%	0.01%

3 讨论与结论

在性状考察中发现,羟基甲硝唑在水中几乎不溶,此种情况下可选用 N,N - 二甲基甲酰胺(或二甲亚砜)作为溶剂。经试验表明羟基甲硝唑在 N,N - 二甲基甲酰胺和二甲亚砜中溶解性好,且两种溶剂对待测组分均无干扰。但二甲亚砜比 N,N - 二甲基甲酰胺在柱中的保留时间长,所以为缩短分析时间,最终选择 N,N - 二甲基甲酰胺作为试验溶剂。

试验中发现,采用直接进样法进行测定,虽操作简便,但有未知峰干扰甲醇测定,改变载气流速、

程序升温方式、色谱柱等条件,均不能将两者有效分离,考虑可能是样品中含有不挥发性组分所造成。后改用顶空进样法进行测定,未见未知峰干扰甲醇、丙酮的测定。该方法可有效避免未知物的干扰,且简便,干净,快速,仪器自动化程度高,可作为残留溶剂测定首选方法。

顶空进样法测定残留溶剂时,平衡条件对试验结果影响很大。为确定最佳平衡条件,分别对平衡温度 60、70、80、90 ℃进行考察,结果表明同一浓度试液在上述不同平衡温度下,各待测物的峰面积在 80 ℃时达到最大且保持稳定。确定平衡温度 80 ℃

后,又对平衡时间 10、20、30、40 min 进行考察,结果表明同一浓度试液在上述不同平衡时间下,各待测物的峰面积在平衡时间为 30 min 时达到最大且保持稳定,即各待测组分达到了气液两相平衡。因此,最终确定平衡温度为 80 ℃,平衡时间为 30 min。

本试验采用顶空气相色谱法,对羟基甲硝唑对照品中甲醇、丙酮两种有机溶剂残留量进行测定,该方法分离度、精密度和回收率等指标均能达到《中国兽药典》^[11] 中有机溶剂残留量测定法的要求,可用于羟基甲硝唑对照品中甲醇、丙酮残留量的检测,也可为其他药物中甲醇、丙酮残留量的检测提供参考。

参考文献:

- [1] 韩飞,张曼,张周,等. 动物体内甲硝唑药动学特征及残留检测研究[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2014, 30(5): 42-44.
Han F, Zhang M, Zhang Z, *et al.* Determination of residues and solvents and pharmacokinetic characteristics of metronidazole in animals. China animal science and veterinary medicine, 2014, 30(5): 42-44.
- [2] 丁燕玲,陈彤,黄婷,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡肉中甲硝唑、二甲硝唑及其代谢物的方法研究[J]. 广东化工, 2018, 43(13): 245-248.
Ding Y L, Chen T, Huang T, *et al.* Determination of metronidazole, dinitrazole and metabolites in chicken by UPLC-MS[J] Guangzhou Chemical Industry, 2018, 43(13): 245-248.
- [3] GB/T 21318-2007. 动物源性食品中硝基咪唑残留量检测方法[S].
GB/T 21318-2007. Determination of nitroimidazole residues in animal derived food[S].
- [4] GB/T 22949-2008. 蜂王浆及冻干粉中硝基咪唑类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
GB/T 22949-2008. Determination of nitroimidazole residues in

royal jelly and freeze-dried powder by HPLC-MS[S].

- [5] GB/T 2298-2008. 牛奶和奶粉中甲硝唑、洛硝达唑、二甲硝唑及其代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
GB/T 2298-2008. Determination of metronidazole, ronidazole, dinitrazole and metabolites in milk and milk powder by HPLC-MS[S].
- [6] GB/T 23406-2009. 肠衣中硝基咪唑类药物及代谢物残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法[S].
GB/T 23406-2009. Determination of nitromidazole and metabolites residues in casing by HPLC-MS-MS[S].
- [7] 中华人民共和国农业部公告第 236 号. 动物源食品中甲硝唑、地美硝唑及其代谢物残留检测液相色谱-串联质谱法[S].
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China Announcement No. 236. Determination of metronidazole, dimetridazole and metabolites by HPLC-MS[S].
- [8] 吴凤如. 气相色谱法测定氟米龙残留溶剂的方法研究[J]. 中国药品标准, 2018, 19(3): 196-199.
Wu F R. Determination of residual solvents in fluorometholone by GC[J]. Drug Standards of China, 2018, 19(3): 196-199.
- [9] 郑荣杰. 毛细管气相色谱法测定吉非替尼原料药中残留有机溶剂[J]. 西北药学杂志, 2018, 33(4): 46-49.
Zheng R J. Determination of residual organic solvents in gefitinib by capillary GC[J]. Northwest Pharmaceutical Journal. 2018, 33(4): 46-49.
- [10] 郑瀚,丁爱华,支荣荣. 顶空气相色谱法同时测定环维黄杨星 D 中四种有机溶剂残留量的研究[J]. 首都食品与医药, 2019, 22(4): 181-183.
Zheng H, Ding A H, Zhi R R. Simultaneous research of four organic solvents residues in D by headspace gas chromatography [J]. Capital Food and Drugs, 2019, 22(4): 181-183.
- [11] 中国兽药典委员会. 中国人民共和国兽药典[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Chinese Veterinary Pharmacopoeia[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015.

(编辑:侯向辉)