

猪肉中莫西克汀残留高效液相色谱-荧光检测方法的建立

李林霞 崔耀文 沈建忠 冯培生 吴海霞 程林丽 张素霞*

(中国农业大学 动物医学院,北京 100193)

摘要 为方便检测猪肉中莫西克汀残留量,建立了高效液相色谱-荧光检测方法(HPLC-FLD)。样品采用乙腈提取,加水稀释,用三乙胺调节 pH, C₁₈固相萃取柱净化,加三氟乙酸酐和 N-甲基咪唑衍生化。以乙腈/水为流动相,高效液相色谱-荧光检测法测定,选择激发波长为 365 nm,发射波长为 475 nm。在 0.01~1.00 μg/mL 质量浓度范围内,莫西克汀的色谱峰面积与浓度呈线性相关,相关系数大于 0.99;添加量为 5、50 和 250 ng/g 时,平均添加回收率为 92.16%~99.39%;日内变异系数为 2.8%~4.1%(n=5),日间变异系数为 6.4%~8.5%(n=3)。本方法的检测限为 2 ng/g,定量限为 5 ng/g。该方法准确、灵敏,可用于猪肉中莫西克汀的残留分析。

关键词 猪肉; 高效液相色谱法; 荧光检测; 莫西克汀; 残留物测定

中图分类号 S 859.84

文章编号 1007-4333(2011)01-0084-04

文献标志码 A

Determination of Moxidectin residue in pork by HPLC-FLD

LI Lin-xia, CUI Yao-wen, SHEN Jian-zhong, FENG Pei-sheng,

WU Hai-xia, CHENG Lin-li, ZHANG Su-xia*

(College of Animal Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract A high-performance liquid chromatography-fluorescence detection (HPLC-FLD) method was developed for determination of Moxidectin in pork. The target compound was extracted by acetonitrile, diluted by water and pH was moderate with triethylamine. The solution was purified by C18 Column of solid-phase extraction (SPE), derived by trifluoroacetic anhydride and N-methylimidazole. Determination was performed by reverse phase HPLC-FLD with acetonitrile and water, with the Excitation spectra of 365 nm and Emission spectra of 475 nm. Between 0.01 and 1.00 μg/mL, the chromatographic peak area of Moxidectin showed linear correlation to their concentration, with the correlation coefficients of 0.99. At the spiked levels of 5, 50 and 250 ng/g, recoveries ranged from 92.16% to 99.39%, with the intra-day coefficient variation (CVd) of 2.8% - 4.1% (n = 5) and inter-day coefficient variation (CVr) was 6.4% - 8.5% (n = 3). The limit of detection (LOD) of Moxidectin in pork was 2 ng/g, and the limit of quantitation (LOQ) was 5 ng/g. The method was accurate and sensitive. It could be used for determining the residues of Moxidectin in pork.

Key words pork; HPLC; FLD; Moxidectin; residues determination

莫西克汀(Moxidectin, MXD)是由链霉菌发酵产生的成分单一,半合成的大环内酯类药物,是一种新型的阿维菌素类药物,有着较其他阿维菌素类药物更好的驱虫活性,同时具有长效、安全等特性^[1],因此 MXD 是理想的抗体内外寄生虫药物。有研究表明^[2], MXD 对牛辐射食道口线虫(*Oesophagostomum radiatum*)和 *Trichuris discolor*(未命名)线虫等第 3 阶段幼虫的驱杀率达 98%。在绵羊体内,耐伊维菌素(Ivermectin, IVM)

的捻转血矛线虫对 MXD 敏感^[3]。MXD 对猪体内的消化道线虫、肺线虫和体外寄生虫都有良好的驱杀效果^[4]。此外, MXD 对马、犬、驯鹿等体内外寄生虫也有很强的驱杀效果。在国外, MXD 已被广泛应用于治疗奶牛、猪等动物体内外寄生虫病,有取代伊维菌素的趋势。

莫西克汀的毒性反应表现为流涎、步态蹒跚及全身震颤痉挛,严重时出现昏迷。药物代谢动力学研究表明,动物组织及其他体液中的药物浓度、体内

收稿日期: 2010-04-26

基金项目: 农业行业标准项目(2009)

第一作者: 李林霞, 硕士研究生, E-mail: llxia910@163.com

通讯作者: 张素霞, 教授, 博士生导师, 主要从事兽医药理学与毒理学研究, E-mail: suxia@cau.edu.cn

平均滞留时间都比在血浆中高,且比伊维菌素对应值高^[5-8]。但是,这些结果同时表明莫西克汀易在动物组织中残留,容易带来一系列的兽药残留问题,因此,动物组织中莫西克汀残留受到极大关注。

目前,国内外关于莫西克汀残留检测的报道较少,但关于其他阿维菌素类药物的残留检测方法很多,主要有薄层色谱法、高效液相色谱-紫外检测法、高效液相色谱-荧光检测法、液质联用法和免疫分析法。其中高效液相色谱-荧光检测法具有分离效能高、选择性高和检测灵敏度高等特点,是阿维菌素类药物残留检测的常用方法^[9-10]。本试验在前人研究^[1,3,10-18]的基础上,采用乙腈作为提取液,经 C_{18} 柱净化处理、荧光衍生化后分离检测,旨在建立在肉类中对莫西克汀药物残留的高效液相色谱-荧光检测方法(HPLC-FLD)。

1 材料与方法

1.1 试剂及药品

莫西克汀标准品(纯度 $\geq 98\%$ (质量分数)),美国 sigma 公司生产;甲醇、乙腈为色谱纯,美国 Fisher 公司生产;三乙胺、冰醋酸、N-甲基咪唑(N-MIM)和三氟醋酸酐(TFAA)为分析纯,美国 Fisher 公司生产;Millipore 超纯水,实验室自制。

200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 莫西克汀标准贮备液:准确称取莫西克汀 0.020 g,用甲醇溶解定容至 100 mL。

20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 莫西克汀标准贮备液:移取 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 莫西克汀标准贮备液 1 mL,用甲醇定容至 10 mL。以上 2 种贮备液均为 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下贮藏。

莫西克汀标准工作液:分别移取 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 莫西克汀标准贮备液 0.005、0.010、0.025、0.050、0.100、0.250 和 0.500 mL 置于 10 mL 容量瓶中,用乙腈稀释成 0.010、0.020、0.050、0.100、0.200、0.500 和 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 工作标准液。

固相萃取柱洗涤液:取乙腈 30 mL、Millipore 超纯水 70 mL 和三乙胺 20 μL ,混匀。

衍生化试剂:A 液为 1 mL N-MIM+1 mL 乙腈;B 液为 1 mL TFAA+2 mL 乙腈。

1.2 仪器设备

高效液相色谱仪,Waters 2695 型/配 Waters 2996 型二极管阵列检测器,(美国 Waters 公司);漩渦混合仪,WH-1 型(上海沪西分析仪器厂);离心机,LD4-2A 型(北京医用离心机厂);超纯水仪,Milli Q 型(美国 Millipore 公司);电子天平,AE240 型(北京塞多利斯科技发展有限公司);氮吹仪,N-

EVAP 112 型(美国 Organomation Associates 公司); C_{18} 柱,6 mL/500 mg(美国 Waters 公司);微孔滤膜,0.45 μm (美国 Waters 公司)。

1.3 样品前处理

准确称取(2.00 \pm 0.02)g 猪肉组织置于 50 mL 离心管中,加入 5 mL 乙腈,涡动 1 min,4 500 r/min 离心 10 min,收集上清液,重复提取 1 次,合并 2 次上清液,加水 20 mL 和三乙胺 50 μL ,混匀,为上样溶液。将 C_{18} 固相萃取柱安装于固相萃取装置上,依次用乙腈 5 mL 和固相萃取柱洗涤液 5 mL 平衡,将上样溶液过柱,自然流干后抽真空 5 min。5 mL 乙腈洗脱,收集洗脱液于玻璃试管中,60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下氮气吹干,备用。向试管中依次加衍生化试剂 A 液 100 μL 和衍生化试剂 B 液 150 μL ,密闭,涡动 10 s,依次加冰醋酸、三乙胺各 50 μL ,涡动 10 s,密闭反应 15 min,加 650 μL 甲醇混匀。过 0.45 μm 微孔滤膜,供 HPLC 分析。

1.4 高效液相条件

色谱柱,Symmetry C_{18} 柱,250 mm \times 4.6 mm \times 5 μm ;流动相,乙腈-水(体积比=92:8);流速,1 mL/min;柱温,30 $^{\circ}\text{C}$;激发波长,365 nm,发射波长,475 nm;进样体积,20 μL 。

1.5 灵敏度的测定

取空白猪肉样品,设 10 个平行,按上述方法进行处理进样,得到空白猪肉样品色谱图,测得基线噪音值,将其与标准工作溶液的响应信号进行比较,以 3 倍信噪比(3S/N)所对应的样品中药物浓度为检测限(LOD),以 10 倍信噪比(10S/N)所对应的样品中药物浓度为定量限(LOQ)。

1.6 准确度与精密度的测定

设 5、50 和 250 ng/g 3 个添加水平,并分别设空白对照,按 1.3 样品前处理方法进行添加回收试验,每个水平设 5 个平行,连续做 3 d。根据测得量与添加量计算回收率、日内变异系数(CVd)和日间变异系数(CVr)。

2 结果与分析

2.1 方法的线性相关性

对质量浓度为 0.010~1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列标准液进行液相色谱-荧光检测(HPLC-FLD)分析,莫西克汀色谱峰面积与浓度呈线性相关。其线性方程为 $y=1112x+23260$,线性相关系数大于 0.99。

2.2 方法的灵敏度

根据 10 个空白样品的基线噪音值求其平均值,

按3倍信噪比(3S/N)计算,莫西克汀在猪肉组织中的LOD为2 ng/g。按10倍信噪比(10S/N)计算,在猪肉组织中的LOQ为5 ng/g。

2.3 方法的准确度和精密度

在每克猪肉中分别添加5、50和250 ng的莫西克汀溶液,进行添加回收试验,结果见表1。由表1可知,在3个添加水平上,莫西克汀回收率在92.16%~99.39%之间,日内变异系数 $CV_d \leq 4.1\%$,日间变异系数 $CV_r \leq 8.5\%$,符合痕量分析的准确度和精密度要求。

表1 猪肉中莫西克汀添加回收率和变异系数

Table 1 Intra- and inter-day variation and recovery of Moxidectin in pork

莫西克汀 添加量/(ng/g)	回收率/ %	日内变异 系数/(n=5)	日间变异 系数/(n=3)
5	99.39	2.8	6.9
50	92.16	3.1	8.5
250	96.57	4.1	6.4

2.4 色谱图

在上述色谱条件下,莫西克汀类药物衍生化产物的保留时间约为15 min,峰形良好,与猪肉中杂质峰以及溶剂峰都能很好的分离,色谱图见图1~图3。

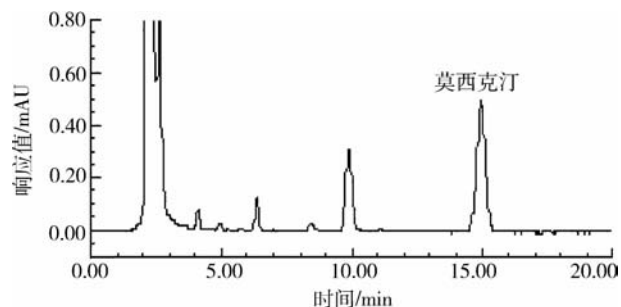


图1 10 ng/mL 标准溶液色谱图

Fig. 1 Chromatogram of standard of moxidectin (10 ng/mL)

2.5 实际样品分析

按照上述试验方法对市售随机取样的10份样品进行分析,每份样品做4个平行,其中1份检出莫西克汀,质量分数为6.7 ng/g,其余9份未检出。

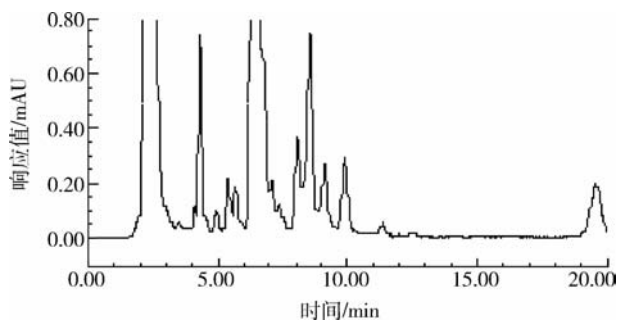


图2 空白猪肉样品色谱图

Fig. 2 Chromatogram of blank pork

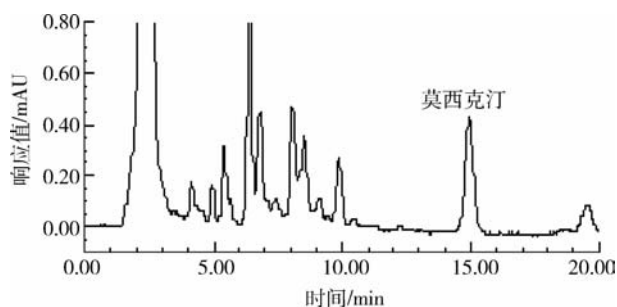


图3 5 ng/g 添加样品色谱图

Fig. 3 Chromatogram of pork sample fortified with 5 ng/g of moxidectin

3 讨论

3.1 提取条件的选择

莫西克汀易溶于多种有机溶剂,在提取时常用的溶剂有甲醇、乙腈和乙酸乙酯等,它们与组织相容性较好,兼有去蛋白的功能。在对其中的乙腈和甲醇的提取效果进行比较分析发现,2种方法的回收率均在90%以上,但甲醇提取液在药峰后出现一杂质峰与药峰相连,同时药峰峰形变宽,使方法灵敏度下降,因此本试验采用乙腈作为提取溶剂。

3.2 净化条件的选择和优化

在进行残留检测时,组织中的脂肪会影响样品处理过程及检测结果,对于高脂肪组织中阿维菌素类药物残留测定的前处理过程中,有报道可采用正己烷去脂^[11]。试验中发现,在过柱前液液萃取净化去脂或在 C_{18} 固相萃取柱净化时用正己烷去脂,均会降低回收率,回收率仅为50%~60%;当试验中省去正己烷去脂部分时,回收率符合检测要求。伊维菌素在正己烷中的溶解度为0.77 mg/mL,莫西克汀化学结构与其他阿维菌素类药物相比, C_{18} 位引入了=N-OCH₃基团, C_{13} 位少了个二糖基,有更高

的脂溶性。同时,荧光检测为痕量分析,灵敏度较高,故在液液萃取中会有部分药物溶解于正己烷而使回收率降低,影响检测的准确度,因此本试验中省去了正己烷去脂的步骤。

3.3 衍生化条件的选择和优化

莫西克汀本身没有对称共轭结构,所以不能直接用荧光检测器检测,只有经衍生化后,生成具有对称共轭的苯环结构后才能发射荧光^[12]。在对AVMs进行衍生化时,de Montigny P的1-MIM、TEAA和CAN衍生化方法应用较广^[13]。Danaher M等^[14]报道加入衍生化试剂后65℃衍生化30 min;侯晓林等^[15]采用乙酸酐和1-MIM的乙腈溶液作衍生化试剂,反应100 min。本试验在参照上述的荧光衍生化反应条件的基础上,采用向试剂中依次加入衍生化试剂A液100 μL和B液150 μL,密闭,涡动1 min,依次加冰醋酸、三乙胺各50 μL,涡动1 min,密闭反应15 min,加650 μL甲醇水解。同时试验证明,衍生化时单独加冰醋酸或三乙胺时,回收率在70%~85%之间;两者都不加时,回收率低于80%。相比,在加入衍生化试剂后加入冰醋酸和三乙胺可提高回收率,从而提高方法的灵敏度。本试验在衍生化前氮吹时完全吹干,以免影响后面的衍生化。

3.4 流动相的选择与优化

据国内外文献报道,HPLC-FLD检测AVMs残留时,流动相一般为甲醇-水^[12,15-17]和乙腈-水^[18],还有文献报道采用甲醇-乙腈-三乙胺/磷酸缓冲液作流动相^[14]。本试验比较了不同流动相的分离效果,以甲醇作为流动相时,药峰峰形变宽,使方法灵敏度下降;以乙腈/水(92/8)作为流动相,所测峰形及与杂质分离效果良好,且流动相简单,不需要磷酸盐缓冲液,可减少因使用盐类而对仪器造成的损害。

参 考 文 献

- [1] 刘开永,李英伦,周岷江,等. 驱虫抗生素莫西菌素的研究应用进展[J]. 兽药与饲料添加剂,2003,4(8):13-16
- [2] Reinemeyer C R, Cleale R M. Dose confirmation studies of moxidectin 0.1% non-aqueous injectable and moxidectin 0.5% pour-on formulations against experimentally induced infections of Larval and adultstage *Oesterphagostomum raiatum* and *Trichuris discolor* in cattle [J]. Veterinary Parasitology,2002,108:75-83
- [3] Leathwick D M, Moen I C, Sutherland I A. Ivermectin resistant *Ostertagia* spp. from sheep and its susceptibility to other macrocyclic lactones anthelmintics [J]. New Zealand Vet J, 2002,48:151-154
- [4] Stewart T B, Wiles S E, Miller J E, et al. Efficacy of moxidectin 0.5% pour-on against swine nematodes [J]. Veterinary Parasitology,1999,87(1):39-44
- [5] Lifchite A, Virkel G. Loperamide-induced enhancement of moxidectin availability in cattle [J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics,2002,25:111-120
- [6] James B, David H. Activity of injectable, sustained-prophylactically to mixed-breed dogs to prevent infection with *Dimmitis* [J]. AJVR,2001,62(11):1721-1726
- [7] Craven J, Bjorn H. The effects of body composition on the pharmacokinetics of subcutaneously injected ivermectin and moxidectin in pigs [J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics,2002,25:227-232
- [8] Alvineie M, Sutre J F. Pharmacokinetics of moxidectin after and subcutaneous administration in sheep [J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics,1997,20(1):73
- [9] 李俊锁,邱月明,王超. 兽药残留分析[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002:414,151-152
- [10] 程林丽,安洪泽,沈建忠,等. 牛奶中4种阿维菌素类药物的高效液相色谱快速测定[J]. 中国农业大学学报,2010,15(4):95-98
- [11] 张睿,王海涛,姚燕林,等. 柱前衍生高效液相色谱法检测动物源性食品中4种阿维菌素类药物残留[J]. 检验检疫科学,2008(4):30-32
- [12] 张启迪. 阿维菌素在鲟鱼体内生物富集生物消除规律的研究[D]. 北京:中国农业大学,2003:1-56
- [13] de Montigny P, Shin J S K, Pivniehny J V. Liquid chromatographic determination of ivermectin in animal plasma with trifluoroacetic anhydride and N-methylimidazole as the derivatization reagent [J]. J Pharm Biomed Anal,1990,8(6):507-511
- [14] Danaher M, Krffe M, Glennon J D. Extraction and isolation of avermectins and milbemycins from liver samples using unmodified supercritical CO₂ with in-line trapping on basic alumina [J]. Journal of Chromatography B,2001,761:115-123
- [15] 侯晓林,何继红,杜向党. 牛肝中阿维菌素类药物残留的高效液相色谱荧光检测方法的研究[J]. 畜牧兽医学报,2006,37(5):500-503
- [16] 莫云,朱蓓蕾. 兔组织中阿维菌素残留的高效液相色谱法测定研究[J]. 畜牧兽医学报,1999,30(5):438-443
- [17] Pollmeier M, Maier S, Moriarty K. High-performance liquid chromatographic assay for the determination of a semisynthetic avermectin analog (eprinomectin) in bovine milk at parts per billion levels-method development and validation [J]. Journal of Chromatography B,2002,772:99-105
- [18] 赵云峰,译. 猪肝中伊维菌素和多拉菌素残留的液相色谱测定法[J]. 国外医学:卫生学分册,2003,30(2):126