

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

侯晓林¹, 何继红^{1,2}, 杜向党^{1,3}, 沈建忠^{1*}

(1. 中国农业大学动物医学院药理与毒理学系, 北京 100094;

2. 中牧股份有限公司, 北京 100070; 3. 河南农业大学牧医学院药理与毒理学系, 郑州 450002)

摘要: 采用高效液相色谱分离, 荧光检测器检测, 建立了固相萃取分析牛组织中埃普利诺菌素、阿维菌素、多拉菌素和伊维菌素残留的方法。样品用乙腈提取, 碱性氧化铝和 C₁₈ SPE 柱净化, 用乙酸酐和 1-甲基咪唑的乙腈溶液作衍生化试剂, 在 96 °C 条件下, 完全衍生化需要 100 min。4 种药物的平均回收率为 70.02%~88.75%, 日内变异系数小于 8.52%, 日间变异系数小于 7.13%。埃普利诺菌素、阿维菌素、多拉菌素和伊维菌素的检出限为 0.4~0.5 μg/kg, 定量限为 2 μg/kg。该方法可靠、灵敏, 可用于常规残留分析。

关键词: 埃普利诺菌素; 阿维菌素; 多拉菌素; 伊维菌素; 测定; 牛肝脏

中图分类号: S859.84

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)05-0500-04

Determination of Residual Avermectins in the Cattle Liver Using HPLC with Fluorescence Detection

HOU Xiao-lin¹, HE Ji-hong^{1,2}, DU Xiang-dang^{1,3}, SHEN Jian-zhong^{1*}

(1. Department of Pharmacology and Toxicology, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. China Animal Husbandry Industry Co. Ltd., Beijing 100070, China; 3. Department of Pharmacology and Toxicology, College of Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: A method using high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection was presented for the simultaneous measurement of the eprinomectin, avermectin, doramectin and ivermectin in liver. Samples were extracted with acetonitrile and cleaned up using solid phase extraction on alumina-B and C₁₈ column, and followed by derivatization with acetic anhydride and 1-methylimidazole in acetonitrile. The optimum time required for the completion of derivation reaction of the 4 drugs was 100 min at 96 °C. Mean recoveries of the 4 drugs in bovine liver ranged from 70.02% to 88.75%. The intra- and inter-day variations were less than 8.52% and 7.13% respectively. The limit of detection was 0.4–0.5 μg/kg, and the limit of quantitation of the method was 2 μg/kg for all of the 4 drugs. The procedure provides a reliable and sensitive method for routine residual analysis.

Key words: eprinomectin; avermectin; doramectin; ivermectin; determination; cattle liver

阿维菌素类药物包括埃普利诺菌素 (eprinomectin)、阿维菌素 (avermectin)、多拉菌素 (dor-

amectin) 和伊维菌素 (ivermectin)。本类药物驱虫谱广, 驱虫活性高, 在目前世界上应用非常广泛^[1]。

收稿日期: 2005-04-25

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目 (30325032)

作者简介: 侯晓林 (1973-), 男, 山西人, 博士生, 主要从事兽医药理与毒理学研究, E-mail: hxlsx@163.com

* 通讯作者: 沈建忠, Tel: 010-62892803; E-mail: sjz@cau.edu.cn

阿维菌素、多拉菌素和伊维菌素在我国已投入使用,埃普利诺菌素也将投入使用。由于本类药物的脂溶性较高,在动物组织中残留时间较长;而且本类药物具有神经和发育毒性,检测可食性组织中的残留对保证消费者健康甚为重要。中国农业部规定牛肝脏中阿维菌素、多拉菌素和伊维菌素的最高残留限量为 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[2],美国 FDA 规定埃普利诺菌素、多拉菌素和伊维菌素最高残留限量分别为 $4\ 800$ 、 100 和 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[3],联合国 FAO/WHO 规定阿维菌素最高残留限量为 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[3]、本类药物的残留检测方法有高效液相色谱—荧光测定^[3~7]、高效液相色谱—质谱测定^[8~11]。液质联用是确证方法,需要昂贵的仪器,液相色谱—荧光检测为常用的测定方法。我国还未见有关本类药物多残留测定的有关报道。本研究旨在建立一种快速、灵敏、稳定的固相萃取净化、高效液相色谱测定方法。

1 材料与方法

1.1 仪器设备

高效液相色谱仪:Waters 2695 分离系统,Waters 2475 荧光检测器,waters 公司;离心机:LD4-2A,北京医用离心机厂;组织匀浆机:Nissei AM-6 型,日本 ACC 公司;微量分析天平:AE240 型,Mettler 公司;旋转蒸发器:laborota 4003 型,法国 Heidolph 公司。

1.2 试剂和材料

乙腈、甲醇为色谱纯;水为 Milli-Q 高纯水;无水硫酸钠、乙酸酐为分析纯;1-N-甲基咪唑;含量 99%。

色谱柱:Inertsil ODS3, $5 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$; C_{18} 固相萃取柱: Bond Elute, 200 mg , 3 mL , Varian; 碱性氧化铝 SPE 柱: Sep-Pak, 2 g , 12 mL , waters。

衍生化试剂: A 液为 1-甲基咪唑-乙腈(2:5); B 液为乙酸酐-乙腈(3:4)

流动相: 甲醇-水(97:3)

标准品:埃普利诺菌素, B_{1a} 含量 90.4%, 美国默克公司;阿维菌素, B_{1a} 含量 92.1%, 伊维菌素, B_{1a} 含量 91.9%, 中农大生物技术股份有限公司;多拉菌素, 94.3%, 美国辉瑞公司。

1.3 衍生化反应的动力学研究

取 $100 \mu\text{L}$ $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准工作液,加衍生化试剂 A、B 各 $100 \mu\text{L}$, 混匀,密封, $96 \text{ }^\circ\text{C}$ 衍生化反应。在反应的 50、60、70、80、90 和 100 min 分别取样测定,绘制衍生化反应曲线。

1.4 样品前处理

1.4.1 提取 称取 2.5 g 牛肝脏匀浆物,置于 50 mL 离心管中,加入 8 mL 乙腈,涡动 0.5 min , $2\ 000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 2 min 。残留组织用 8 mL 乙腈重复提取一次,合并上清液过碱性氧化铝 SPE 柱(首先在 SPE 柱床上平铺 2 g 无水硫酸钠,再用 10 mL 乙腈活化和平衡),等滤液流至将尽,用 6 mL 乙腈冲洗离心管壁,加至碱性氧化铝 SPE 柱,吹干,合并滤液于鸡心瓶中, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 减压浓缩至干。用 0.5 mL 乙腈溶解残余物,涡动 0.5 min ,使充分溶解,上 C_{18} SPE 柱(先用 5 mL 乙腈活化和平衡),再用 2 mL 乙腈洗脱,吹干,收集所有流出液于 5 mL 刻度试管内,氮气吹干。

1.4.2 荧光衍生化 加入 $100 \mu\text{L}$ 衍生化试剂 A 液,涡动 0.5 min ,再加入 $100 \mu\text{L}$ 衍生化试剂 B 液,涡动 0.5 min ,密闭,于 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 衍生化反应 100 min ,用流动相定容至 2.5 mL ,过 $0.45 \mu\text{m}$ 针筒过滤膜,进 HPLC 分析。

1.5 标准溶液的配制及标准曲线的制备

1.5.1 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 标准贮备液 分别称取适量埃普利诺菌素、阿维菌素、多拉菌素和伊维菌素 4 种标准品,溶解于乙腈,配置成 100 mL 的 4 种标准贮备液。在 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光条件下,混合标准贮备液可稳定保存 6 个月。

1.5.2 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 混合标准工作液 用移液器分别精密量取 1 mL 标准贮备液,用乙腈定容至 100 mL 。

1.5.3 分别量取上述混合标准工作液,吹干,衍生化,定容,配置成 0.5 、 1 、 5 、 10 、 20 、 50 、 100 和 $200 \mu\text{g}/\text{L}$ 的标准溶液。液相色谱测定,以各组分的色谱峰面积对浓度作线性回归,得定量标准曲线。

1.6 液相色谱条件

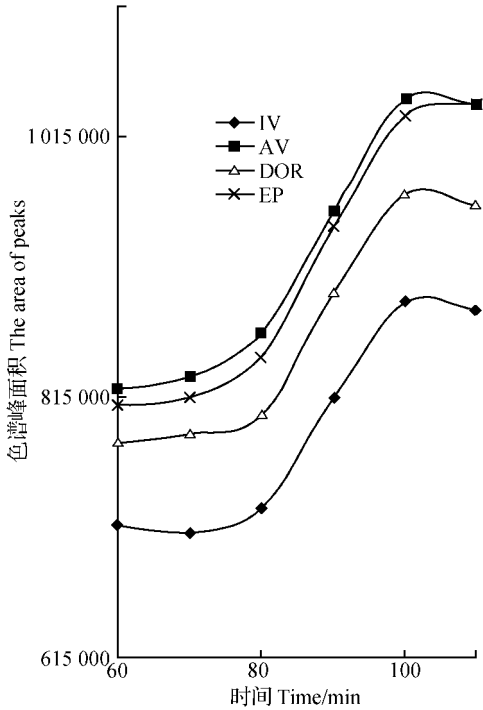
流动相流速: $1 \text{ mL}/\text{min}$;柱温: $30 \text{ }^\circ\text{C}$;进样量: $20 \mu\text{L}$;激发波长: 365 nm ;发射波长: 475 nm 。

2 结果与讨论

2.1 衍生化

用三氟乙酸酐和 1-甲基咪唑衍生化^[3~6],反应完毕后需立即测定,否则埃普利诺菌素的衍生化产物将水解成三种产物,且不稳定^[5],因此,只能测定除埃普利诺菌素以外的其他 3 种药物。Nagata 报道了用 1-甲基咪唑-乙酸酐-N,N-二甲基甲酰胺(2:3:9)作衍生化试剂,每次的衍生化试剂需现配现用^[7]。本研究用 1-甲基咪唑-乙腈(2:5)和乙酸酐-乙腈(3:4)作衍生化试剂,两种配制好的衍生化溶

液密封避光可稳定保存。并对衍生化进行了优化,衍生化反应的动力学表明衍生化反应时间需要 100 min,见图 1。衍生化的产物稳定,在室温避光条件下,放置 48 h 无显著变化,适宜大批量测定。埃普利诺菌素 B_{1a}、阿维菌素 B_{1a}、多拉菌素和伊维菌素 B_{1a}的衍生化产物相应保留时间分别为 11.221、15.720、19.649 和 22.690 min。



IV. Ivermectin; AV. Avermectin; DOR. Doramectin; EP. Eprinomectin

图 1 100 µg/L 的混合标样的衍生化反应动力学曲线
Fig. 1 Curve of derivation reaction kinetics of 100 µg/L mixed standards

2.2 固相萃取条件优化

本类药物测定的前处理净化程序有液液分配与固相萃取联用^[7],或两次固相萃取^[3~6]净化。液液分配操作复杂,耗时,本研究采用串联固相萃取净化法。用乙腈直接提取肝脏组织,提取液中含有少量水分,水分降低了碱性氧化铝的吸附活性,对提取液的净化效果较差。通过在氧化铝 SPE 柱床平铺 2 g 无水硫酸钠,先脱去提取液中的水分,可提高净化效果和测定结果的重复性。

2.3 标准曲线

标准曲线以各组分的浓度对相应的色谱峰面积作图,得到 4 种药物的标准曲线。其线性方程和线性回归系数见表 1。

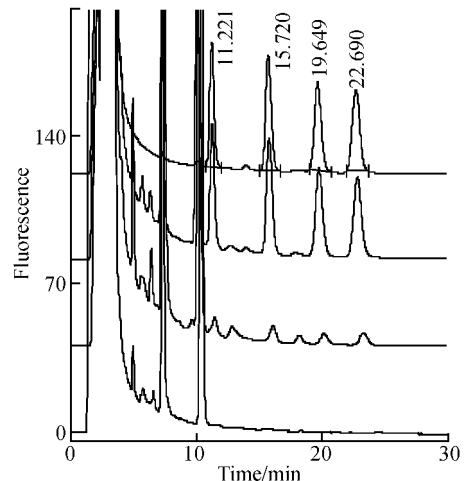
表 1 标准曲线方程及线性回归系数

Table 1 The linear equations and regression coefficients of the standard curves

样品 Samples	线性方程 Linear equations	回归系数 Regression coefficients
埃普利诺菌素 Eprinomectin	$y=86\ 412x-19\ 821$	0.999 9
阿维菌素 Avermectin	$y=103\ 426x-1\ 437$	0.999 89
多拉菌素 Doramectin	$y=86\ 360x-12\ 670$	0.999 9
伊维菌素 Ivermectin	$y=102\ 091x-33\ 570$	0.999 99

2.4 回收率、检测限和方法的重现性

通过向组织中加标样,静置 15 min 后提取测定的方法,对 4 种药物在 3 个不同浓度的标准样品进行了逐一分析(色谱图见图 2),测定该方法的回收率和变异系数结果见表 2。在 2、20 和 100 µg/kg 添加浓度,4 种药物的回收率为 70.02%~88.75%,日内和日间变异系数均小于 8.52%。计算空白肝脏样品的噪音与对应保留值处药物的峰面积的比值,以信噪比为 3 计,埃普利诺菌素和阿维菌素的检测限在 0.4 µg/kg,多拉菌素和伊维菌素的检测限在 0.5 µg/kg。以信噪比为 12~18 计,4 种药物的定量限为 2 µg/kg,均低于药物的最高残留限量。该方法满足牛肝组织中埃普利诺菌素、阿维菌素、多拉菌素和伊维菌素残留测定的要求,灵敏,重现性好,可用作常规检测。



自上而下分别为 20 µg/L 的 4 种药物混合标样、添加 20 µg/kg 药物的牛肝脏组织、添加 2 µg/kg 药物的肝脏组织和空白肝脏组织样品的分析结果

Chromatograms of 20 µg/L 4 mixed standards, blank liver fortified with 20 µg/kg, blank liver fortified with 2 µg/kg drugs, and blank liver extract from top to bottom, respectively

图 2 样品的色谱分析

Fig. 2 Chromatograms of samples

表 2 牛肝脏组织中不同添加浓度的 4 种药物的回收率

Table 2 The recoveries of four drugs in tissues fortified with different concentrations

%

	添加水平 Fortification level/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	日内 Intra-day		日间 Inter-day	
		平均回收率	相对标准偏差	平均回收率	相对标准偏差
		Mean recovery (n=5)	RSD	Mean recovery (n=3)	RSD
埃普利诺菌素 Eprinomectin	2	88.75	8.52	85.55	7.13
	20	83.09	1.49	85.12	2.02
	100	72.21	3.23	73.03	1.24
阿维菌素 Avermectin	2	76.13	4.09	81.51	5.36
	20	82.05	4.70	85.39	6.57
	100	71.20	1.74	71.60	1.32
多拉菌素 Doramectin	2	82.28	4.17	83.93	6.08
	20	83.39	4.85	80.92	5.56
	100	70.19	1.06	70.40	2.42
伊维菌素 Ivermectin	2	83.02	2.02	83.84	4.83
	20	83.76	6.36	80.32	6.81
	100	70.02	0.67	70.41	1.75

参考文献:

- [1] Mckllar Q A, Benchaoui H A. Avermectins and milbemycins[J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1996, 19: 331~351.
- [2] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业部 235 号公告《动物性食品中兽药最高残留限量》[S]. 2002.
- [3] Ali M S, Sun T, McLeroy G E, *et al.* Simultaneous determination of eprinomectin, moxidectin, abamectin, doramectin and ivermectin in beef liver by LC with fluorescence detection[J]. Journal of AOAC International, 2000, 83(1): 31~38.
- [4] Roudaut B, van Peteghem C. Multiresidue method for the determination of avermectin and moxidectin residues in the liver using HPLC with fluorescence detection[J]. Analyst, 1998, 123(12): 2 541~2 544.
- [5] Danaher M O, Keefe M, Glennon J D, *et al.* Development and optimization of an improved derivatisation procedure for the determination of avermectins and milbemycins in bovine liver[J]. Analyst, 2001, 126 (5): 576~580.
- [6] Danaher M O, Keefe M, Glennon J D. Validation and robustness testing of a HPLC method for the determination of avermectins and moxidectin in animal liver samples using an alumina column clean-up[J]. Analyst, 2000, 125(10): 1 741~1 744.
- [7] Nagata T, Miyamoto F, Hasegawa Y, *et al.* Simultaneous determination of residual antiparasitic lactones in bovine muscle and liver by liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Journal of AOAC International, 2003, 86(3): 490~493.
- [8] Ali M S, Sun T, McLeroy G E, *et al.* Confirmation of eprinomectin, moxidectin, doramectin, and ivermectin in beef liver by liquid chromatography/positive ion atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry[J]. Journal of AOAC International, 2000, 83 (1): 39~52.
- [9] Howells L, Sauer M J. Multiresidue analysis of avermectins and moxidectin by ion-trap LC-MS [J]. Analyst, 2001, 126(2): 155~160.
- [10] Ballard J M, Payne L D, Egan R S, *et al.* Development and validation of an HPLC/MS/MS method for the confirmation of eprinomectin marker residue in bovine liver[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45(9): 3 507~3 510.
- [11] Croubels S, Baere S D, Cherlet M, *et al.* Determination of ivermectin B1a in animal plasma by liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry [J]. Journal of Mass Spectrometry, 2002, 37: 840~847.