

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.10.05

液相色谱-三重四极杆/线性离子阱复合质谱技术 检测牛奶中莫昔克丁残留

尹 晖,王亦琳,叶 妮,孙红洋,孙 雷*,王鹤佳

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2020-07-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 10-0030-06 [中图分类号] S859.84

[摘 要] 建立了牛奶中莫昔克丁残留检测的液相色谱-三重四极杆/线性离子阱复合质谱技术(LC-QTRAP)。样品用乙腈提取后,用 C18 固相萃取柱净化,上机测试。液相色谱条件:色谱柱为 BEH C18(50 mm×2.1 mm,1.7 μm),流动相为 0.1% 甲酸水溶液+0.1% 甲酸乙腈溶液,梯度洗脱,流速为 0.4 mL/min,柱温为 30 ℃,进样量为 5 μL。质谱条件:电喷雾正离子源(ESI⁺),采用多反应监测-信息依赖扫描-增强子离子扫描(MRM-IDA-EPI)方式采集。结果表明:在牛奶中,莫昔克丁在 1~80 ng/mL 基质匹配标准溶液浓度范围内均呈现良好的线性关系,相关系数(R^2)大于 0.990,定量限为 2 μg/kg。牛奶中莫昔克丁在 2、40 和 80 μg/kg 三个添加浓度平均回收率都在 60%~120% 之间,批内、批间 RSD 均小于 15%。该方法简便快捷、定性准确、灵敏度高,回收率和精密度满足残留检测要求。

[关键词] 莫昔克丁;牛奶;残留;液相色谱-三重四极杆/线性离子阱复合质谱

Determination of Moxidectin Residue in Milk by LC-QTRAP

YIN Hui, WANG Yi-lin, YE Ni, SUN Hong-yang, SUN Lei*, WANG He-jia

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

Corresponding author: SUN Lei, E-mail: 57469032@qq.com

Abstract: A LC-QTRAP method was established for the determination of Moxidectin residue in milk. The samples were extracted by acetonitrile, then purified with C18 SPE. LC conditions were as follows: the chromatography column is BEH C18 column of 50 mm×2.1 mm, 1.7 μm; mobile phase is acetonitrile(0.1% formic acid) and water(0.1% formic acid); flow rate is 0.4 mL/min; column temperature is 30 ℃; injection volume is 5 μL. Mass spectrometry conditions were ESI⁺ and Multi-reaction Monitoring-Information Dependent Acquisition-Enhanced Product Ion (MRM-IDA-EPI) mode. The calibration curve of Moxidectin were good linear from 1 to 80 ng/mL in milk with the correlation coefficient R^2 over 0.990. The limit of quantification was

作者简介:尹 晖,助理研究员,从事兽药残留的研究工作。

通讯作者:孙 雷。E-mail:57469032@qq.com

2 $\mu\text{g/kg}$. The average recoveries of Moxidectin from spiked milk at three concentrations of 2, 40 and 80 $\mu\text{g/kg}$ were between 60% and 120% , intra – batch and inter – batch *RSD* were both less than 15% .

Key words: moxidectin; milk; residue; LC – QTRAP

莫昔克丁 (Moxidectin) 属于米尔贝霉素类抗生素,主要用于动植物驱虫,具有广谱高效的驱虫活性和安全性^[1],目前临床上主要用于对牛^[2-4]、羊^[5-6]、猪、马和犬^[7-9]、猫^[10]等宠物的寄生虫防治。莫昔克丁用药量较少,对人畜和环境较为安全^[11],在动物组织、脂肪和粪便中的主要残留形式为莫昔克丁原形。随着莫昔克丁在兽医临床的广泛应用,随之产生的兽药残留和耐药性问题日益受到关注^[12]。欧盟、美国、日本规定莫西克丁在牛奶中的最大残留限量 (maximum residue limit, MRL) 为 40 $\mu\text{g/kg}$ ^[13],我国也规定了牛奶中莫昔克丁的 MRL 为 40 $\mu\text{g/kg}$ ^[14]。目前牛奶中莫昔克丁残留检测方法的报道较少^[15-17],其他动物组织中的莫昔克丁残留检测方法多为液相色谱法^[18-20],我国也没有牛奶中莫昔克丁残留检测方法的国家标准,因此建立一个准确、高效的检测方法,对动物性食品中莫昔克丁残留监控具有重要参考意义。

三重四极杆/线性离子阱复合质谱技术 (QTRAP) 在四极杆的高灵敏度基础上,增加了线性离子阱增强子离子扫描的定性功能,可以同时得到用于定性定量的 MRM 谱图和用于进一步定性的 EPI 二级谱图,大大提高了痕量药物定性的准确度^[21]。本研究采用 MRM – IDA – EPI 模式,在检测牛奶中莫昔克丁残留时提供了残留标志物的 EPI 指纹图,进一步提高了定性的准确性。

1 材料与方法

1.1 仪器和设备 Shimadzu 30A – QTRAP 6500 液相色谱 – 串联质谱仪,日本岛津公司 – 美国 AB SCIEX 公司;XS105DU 分析天平,Mettler Toledo 公司;AE260 电子天平,Mettler Toledo 公司;Biofuge Strators 高速冷冻离心机,贺利氏公司;SIR4 涡旋混合器,IKA 公司;氮吹仪,Jnc 公司。

1.2 药品和试剂 莫昔克丁,纯度 $\geq 98.0\%$,购自北京振翔科技有限公司;甲酸、乙腈为色谱纯,均购

自 MERCK 公司;所用水为超纯水。

1.3 对照溶液配制 精密称取莫昔克丁标准品适量,置于 10 mL 棕色量瓶中,用乙腈溶解并稀释成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液;量取标准储备液适量,用乙腈稀释成 10 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液,再用 50% 乙腈水溶液稀释成 100 ng/mL 的标准工作液。

1.4 测定方法

1.4.1 色谱条件 色谱柱为 BEH C18 (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm),流动相 A 相为 0.1% 甲酸水溶液,B 相为 0.1% 甲酸乙腈溶液,流动相梯度洗脱条件见表 1,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量 5 μL 。

表 1 流动相梯度洗脱条件

Tab 1 Gradient elution conditions of mobile phase			
时间/min	流速/($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)	A 相/%	B 相/%
0.01	0.4	25	75
1.00	0.4	25	75
3.00	0.4	5	95
4.50	0.4	5	95
4.60	0.4	25	75
6.00	0.4	25	75

1.4.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI⁺),采用多反应监测 – 信息依赖扫描 – 增强子离子扫描 (MRM – IDA – EPI) 方式采集,电喷雾电压 (IS) 为 5500 V,离子源温度为 550 $^{\circ}\text{C}$,气帘气 (CUR) 为 25 psi,碰撞气 (CAD) 为高等 (High),辅助气 (GS1) 为 50 psi,辅助气 (GS2) 为 50 psi;IDA 参数:动态背景扣除,从不排除之前的目标离子,触发阈值 100 cps;EPI 参数:扫描范围为 100 ~ 650 m/z ,扫描速度 10000 Da/s,CE 为 35 eV,CES 为 15 eV。待测药物定性定量离子对及对应的去簇电压 (DP) 和碰撞能量 (CE) 见表 2。

表 2 莫昔克丁定性定量离子对及对应的
去簇电压(DP)和碰撞能量(CE)

Tab 2 Qualitative ions, corresponding quota ions of
Moxidectin and corresponding declustering potential(DP),
collision energy(CE)

药物	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	去簇电压 /V	碰撞能量 /eV
莫昔克丁	640.4 > 528.2	640.4 > 528.2	45	11
	640.4 > 498.2			16

1.4.3 定性与定量 定性时试样溶液中色谱峰的保留时间,应与校正溶液的保留时间一致,容许偏差为±5%,试样溶液中的离子丰度比应与校正溶液的一致,容许偏差符合欧盟 2002/657/EC 决议要求。线性离子阱获得增强离子扫描(EPI)谱图,应与校正溶液的 EPI 谱图匹配。定量方法采用外标法定量。

1.4.4 基质匹配标准曲线绘制 精密量取莫昔克丁标准工作液适量,用 50% 乙腈水溶液稀释成浓度为 1、2.5、5、10、20、40 和 80 ng/mL 的系列标准工作液,从中各取 1.0 mL,分别加入到空白牛奶试料经提取、净化和吹干后的残余物中,充分溶解,过滤,过 0.2 μm 滤膜后,作为基质匹配标准溶液上机测定。按所得峰面积与相应的对照溶液浓度作标准曲线,并计算回归方程及相关系数。

1.4.5 样品前处理过程 称取牛奶(2±0.02)g 于 50 mL 离心管中,加乙腈 6 mL,涡旋后中速水平振荡 5 min,10000 r/min 离心 5 min,转移上清液至

另一 50 mL 离心管中,加水 10 mL,混匀,备用,C18 固相萃取柱依次用乙腈 5 mL 和洗涤溶液 5 mL 活化,取备用液 9 mL 过柱,用洗涤溶液 5 mL 淋洗,抽干,用乙腈 5 mL 洗脱,收集洗脱液于 10 mL 试管中,于 50 ℃ 水浴氮气吹干。用 50% 乙腈水溶液 1.0 mL 溶解残余物,充分溶解,过微孔滤膜后供液相色谱-串联质谱仪测定。

1.4.6 方法灵敏度确定 将适量莫昔克丁标准工作液加入到空白牛奶中,经上述方法进行前处理后,用 UPLC-QTRAP 检测,观察药物特征离子质量色谱峰信噪比(S/N)和对应药物浓度,S/N>10 者为方法的定量限。

1.4.7 准确度和精密度的测定 采用标准添加法,在空白牛奶试料中分别添加 2、40、80 μg/kg 三个不同浓度药物进行回收率试验,各浓度进行 5 个样品平行试验,重复 3 次,求批内、批间 RSD。

2 结果与分析

2.1 定性分析 本研究使用 MRM-IDA-EPI 扫描模式,当 MRM 通道采集的信号超过 100 cps 时触发 EPI 增强离子扫描,在保留时间 2.47 min 左右获得 3 个不同碰撞能量(20、35、50 eV)的 EPI 谱图,得到更多子离子信息。将空白牛奶添加试样和莫昔克丁标准溶液的 EPI 谱图进行比对,得到 10 个匹配的子离子,表明本方法定性高度准确。莫昔克丁基质匹配标准溶液和空白牛奶添加试样的 EPI 谱图见图 1-图 2。

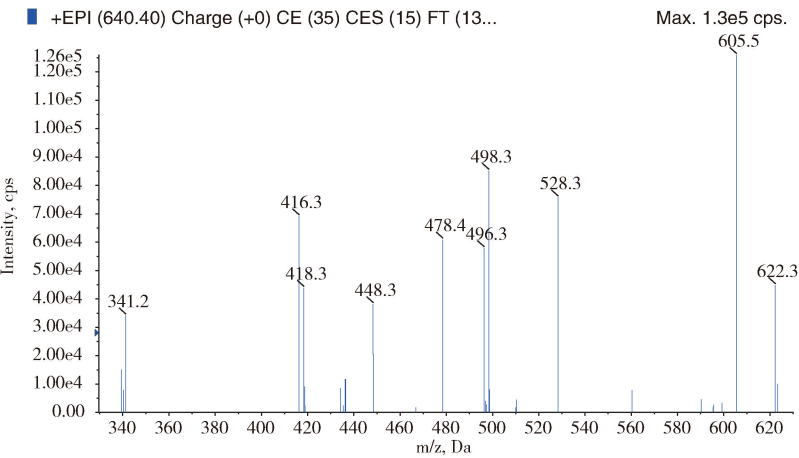


图 1 莫昔克丁基质匹配标准溶液的 EPI 谱图

Fig 1 EPI(Enhanced Product Ion) of Moxidectin in matrix-matched standard solution

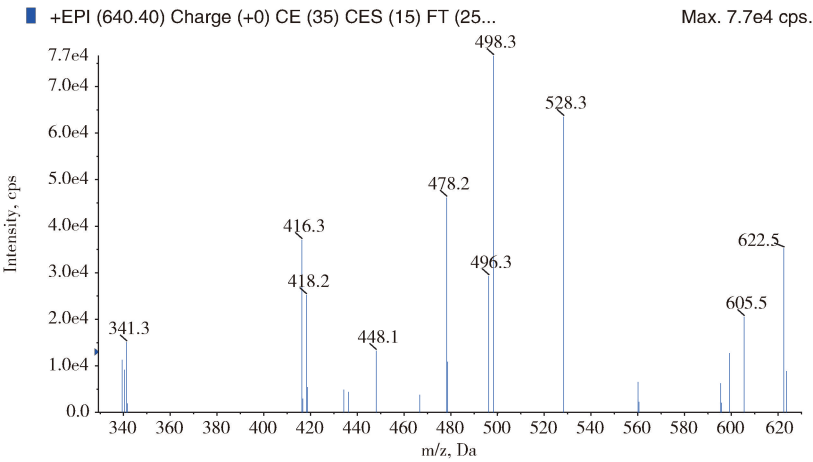


图 2 空白牛奶添加莫昔克丁试样的 EPI 谱图

Fig 2 EPI(Enhanced Product Ion) of Moxidectin in milk spiked samples

2.2 基质匹配标准曲线 按照上述系列基质匹配标准溶液浓度进行线性回归,得到的回归方程及相关系数见表 3。从表中可以看出,牛奶中莫昔克丁在 1 ~ 80 ng/mL 的浓度范围内呈现良好的线性关系, R^2 大于 0.990。

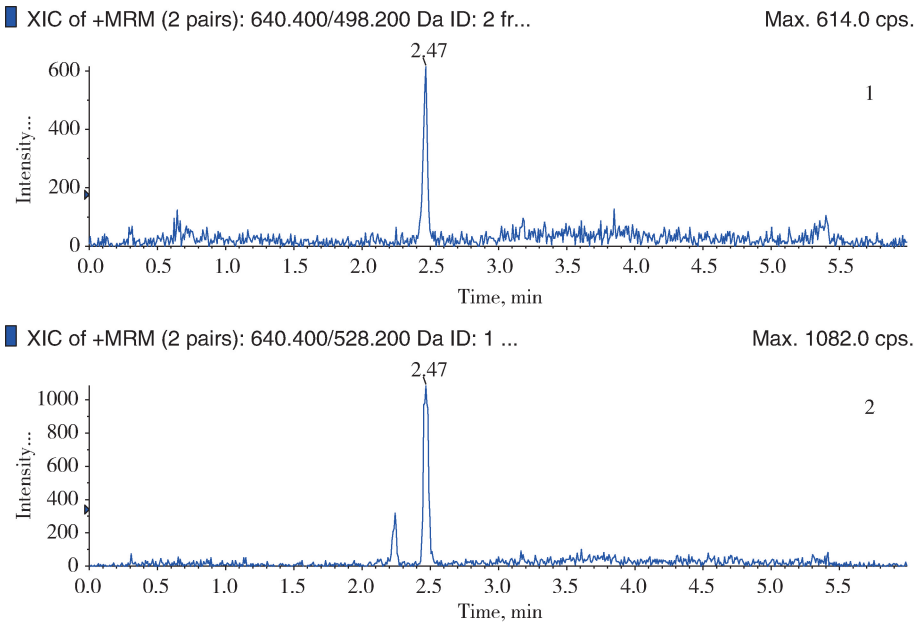
2.3 方法灵敏度 按上述方法进行处理,当添加浓度为 2 $\mu\text{g/kg}$ 时,测得莫昔克丁的 $\text{S/N} > 10$,说明

方法定量限为 2 $\mu\text{g/kg}$ 。2 $\mu\text{g/kg}$ 空白牛奶添加试样中莫昔克丁的特征离子质量色谱图见图 3。

表 3 牛奶中莫昔克丁基质匹配标准曲线

Tab 3 Matrix – matched standard curve of

Moxidectin in milk			
药物	浓度范围/(ng · mL ⁻¹)	回归方程	R ²
莫昔克丁	1 ~ 80	$y = 4337.9x - 3699.7$	0.9932



1. 莫昔克丁 (640.4 > 498.2) ; 2. 莫昔克丁 (640.4 > 528.2)

1. Moxidectin(640.4 > 498.2) ; 2. Moxidectin(640.4 > 528.2)

图 3 空白牛奶添加试样溶液中得到的特征离子质量色谱图 (2 $\mu\text{g/kg}$)

Fig 3 Qualitative ions of Moxidectin in milk (2 $\mu\text{g/kg}$)

2.4 方法精确度 在空白牛奶中添加低、中、高三个不同浓度的莫昔克丁进行回收率试验,结果汇总见表 4。可以看出,空白牛奶中莫昔克丁在 2~80 μg/kg 添加浓度范围内的回收率为 76.8%~115%,批内、批间 RSD 均 <15%。

表 4 空白牛奶中莫昔克丁添加回收试验结果
Tab 4 Recoveries of Moxidectin in milk spiked samples

药物	添加浓度 /(μg · kg ⁻¹)	批次	回收率/%					批内 RSD/%	批间 RSD/%
莫昔克丁	2	I	94.4	87.2	104	111	112	10.8	8.43
		II	93.9	95.6	99.4	88.4	102	3.01	
		III	98.7	93.5	88.6	87.1	93.1	4.05	
	40	I	98.4	99.2	101	104	105	5.66	6.25
		II	98.6	96.6	92.9	101	97.4	3.35	
		III	115	102	104	115	97.1	5.46	
	80	I	78.9	76.8	80.7	79.8	85.5	4.96	10.4
		II	99.4	87.4	94.0	89.3	97.3	7.61	
		III	90.6	91.4	109	95.3	103	8.27	

3 讨论与结论

3.1 提取和净化 本方法称取牛奶样品 2 g,加入 3 倍体积的乙腈 6 mL 进行提取,然后通过高速离心去除蛋白质等大量杂质的干扰,有效地提取莫昔克丁药物残留。固相萃取法是常见的净化方式,莫昔克丁可采用反相 C8^[15]或 C18 固相萃取柱净化,经过比较试验,本研究采用 C18 固相萃取柱净化,可以有效吸附脂肪及其他杂质,去除牛奶样品中的大部分基质干扰。在不影响回收率的情况下尽可能减少过柱体积,取一半备用液过柱,不仅能够有效降低基质效应,还能节约过柱时间,为实际应用中大批量样品检测提供了便捷。

3.2 定性分析 根据欧盟 2002/657/EC 要求,要确证莫昔克丁至少需要 3 个识别点(IP),因此在大多数检测方法中,采用 MRM 扫描模式,选定母离子及对应的两个响应较强的子离子作为定性定量依据,母离子是 1 个 IP 点,两个子离子分别是 1.5 个 IP 点,共 4 个 IP 点,足以达到检测方法要求。本研究中,采用 QTRAP 质谱仪特有的 MRM-IDA-EPI 扫描模式,当 MRM 通道采集的信号超过 100 cps 时触发 EPI 增强离子扫描,在保留时间左右获得更多

子离子的信息,得到莫昔克丁的特征性 EPI 谱图,将空白牛奶添加试样和莫昔克丁标准溶液的 EPI 谱图进行比对后,得到母离子和 10 个匹配的子离子,共 16 个 IP,极大地提高了定性的准确度。

本方法利用液相色谱-三重四极杆/线性离子阱复合质谱技术建立了牛奶中莫昔克丁的残留检测方法,定性、定量准确,前处理方法简捷,由于 EPI 谱图具有很强的特异性,极大提高了定性的准确度,可以作为牛奶中莫昔克丁残留检测的确证方法,为动物性食品中兽药残留监控工作提供了重要的技术支持。

参考文献:

[1] 王 则,王相晶,向文胜. 生物农药米尔贝霉素杀虫活性特性研究综述[J]. 世界农药, 2009, 31(1): 13-16.
Wang Z, Wang X J, Xiang W S. Research review of the insecticidal properties biological pesticide milbemycins. [J]. World Pestic, 2009, 31(1): 13-16.

[2] Rodriguez-Vivas R, Castillochab C G, Rosadoaguilar J. Evaluation of the efficacy and persistence of moxidectin (10%) and ivermectin (3.15%) against natural infestation of gastrointestinal nematodes in cattle from the Mexican tropics [J]. Archivos De Medicina Veterinaria, 2014, 46(1): 69-74.

- [3] Geurden T, Chartier C, Fanke J, *et al.* Anthelmintic resistance to ivermectin and moxidectin in gastrointestinal nematodes of cattle in Europe[J]. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2015, 5(3):163–171.
- [4] Fazio L E, Streitenberger N, Galvan W R. Efficacy and productive performance of moxidectin in feedlot calves infected with nematodes resistant to ivermectin[J]. *Veterinary Parasitology*, 2016, 223: 26–29.
- [5] Vadlejch J, Makovich Y P, Cadkova Z, *et al.* Efficacy and persistent activity of moxidectin against natural *Muellerius capillaris*, infection in goats and pathological consequences of muelleriosis [J]. *Veterinary Parasitology*, 2016, 218: 98–101.
- [6] Ragbetli C, Ceylan E, Tanritanir P. The efficacy of moxidectin against gastrointestinal nematode infections in goats[J]. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2009, 4(3): 134–138.
- [7] Otranto D, Colella V, Crescenzo G, *et al.* Efficacy of moxidectin 2.5% and imidacloprid 10% in the treatment of ocular thelaziosis by *Thelazia callipaeda* in naturally infected dogs[J]. *Veterinary Parasitology*, 2016, 227:118–121.
- [8] Becskei C, Bock F D, Illambas J, *et al.* Efficacy and safety of a novel oral isoxazoline, sarolaner (SimparicaTM), for the treatment of sarcoptic mange in dogs[J]. *Veterinary Parasitology*, 2016, 222(56): 56–61.
- [9] Regalnono A F D, Cesare A D, Traversa D, *et al.* Microfilaricidal efficacy of a single administration of Advocate[®] (Bayer Animal Health) in dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis*, or *Dirofilaria repens* [J]. *Veterinary Parasitology*, 2016, 226: 30–34.
- [10] Han H S, Noli C, Cena T. Efficacy and duration of oral fluralaner and spot-on moxidectin/imidacloprid in cats infested with *Lynxacarus radovskyi* [J]. *Veterinary Dermatology*, 2016, 27(6): 474.
- [11] 陈小龙, 郑裕国, 沈寅初. 生物农药米尔贝霉素的研究进展[J]. *农药*, 2003, 42(4): 5–9.
- Chen X L, Zheng Y G, Shen Y C. Advances on biological pesticide milbemycins [J]. *Pesticides*, 2003, 42(4): 5–9.
- [12] 刘琳琳, 刘翠翠, 王相晶, 等. 阿维菌素类和米尔贝霉素类杀虫剂的特性[J]. *世界农药*, 2012, 34(5): 34–39.
- Liu L L, Liu C C, Wang X J, *et al.* The characteristics of biological insecticide avermectins and milbemycins [J]. *World Pesticides*, 2012, 34(5): 34–39.
- [13] Bjorn J A, Patrick P J, Hans A. The derivatisation of avermectins and milbemycins in milk: new insights and improvement of the procedure [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 585(1): 126–133.
- [14] GB 31650–2019 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量[S].
- GB 31650–2019 National Standard – Maximum residue limits for veterinary drugs in foods[S].
- [15] Vesna C F, Luka M, Adica S, *et al.* Trace analysis of endectocides in milk by high performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 663(2): 165–171.
- [16] Robert S, Lucille D. Determination of abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, and moxidectin in milk by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry [J]. *J AOAC Int*, 2006, 89(4): 1088–1094.
- [17] Sherri B T, Jose E R, Wendy C A, *et al.* Analysis of avermectin and moxidectin residues in milk by liquid chromatography – tandem mass spectrometry using an atmospheric pressure chemical ionization/atmospheric pressure photoionization source [J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 529: 159–165.
- [18] Martin D, Laurence C H, Steven R H C, *et al.* Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices [J]. *J Chromatogr B*, 2006, 844(2): 175–203.
- [19] Tomoko N, Fumio M, Yasuyuki H, *et al.* Simultaneous determination of residual antiparasitic lactones in bovine muscle and liver by liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *J AOAC Int*, 2003, 86(3): 490–493.
- [20] Ali M S, Tung S, Gina E M, *et al.* Simultaneous determination of eprinomectin, moxidectin, abamectin, doramectin, and ivermectin in beef liver by LC with fluorescence detection [J]. *J AOAC Int*, 2000, 83(1): 31–38.
- [21] 刘柱, 华颖, 徐潇颖. 同位素稀释-超高效液相色谱-线性离子阱串联质谱分析谷物及其制品中呕吐毒素及其衍生物和代谢物[J]. *分析化学*, 2016, 44(11): 1728–1734.
- Liu Z, Hua Y, Xu X Y, *et al.* Analysis of deoxynivalenol and related derivatives and metabolites in cereal and cereal products by ultra performance liquid chromatography – quadrupole linear ion trap mass spectrometry with isotopic dilution [J]. *Chinese J Anal Chem*, 2016, 44(11): 1728–1734.