

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.08.03

牛、羊奶中莫昔克丁残留高效液相色谱 荧光检测方法的建立

沈 昕, 张玉洁, 李 丹, 孙红洋, 朱馨乐, 黄耀凌*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2020-12-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021)08-0022-05 [中图分类号] S859.84

[摘 要] 建立了适用于牛、羊奶样品中莫昔克丁残留的高效液相色谱荧光检测方法。以乙腈为提取液, C18 固相萃取柱净化, 并用 N-甲基咪唑-乙腈(1+1, V/V) 和三氟乙酸酐-乙腈(1+2, V/V) 进行衍生化。乙腈+水(90+10, V/V) 为流动相, 荧光法定量。经测定, 该方法对牛、羊奶中莫昔克丁的检测限为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。空白牛、羊奶中标准品莫昔克丁添加量分别为 5、20、40 和 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 牛奶中莫昔克丁平均回收率范围为 75.5% ~ 110%, 其批内变异系数小于 7.38%, 批间变异系数小于 7.87%; 羊奶中莫昔克丁平均回收率范围为 77.5% ~ 95.6%, 其批内变异系数小于 5.06%, 批间变异系数小于 5.92%。该方法准确性强、灵敏度高, 适用于牛、羊奶中莫昔克丁的快速检测。

[关键词] 牛、羊奶; 莫昔克丁; 残留; 高效液相色谱荧光法

Determination of Moxidectin Residue in Milk by High Performance Liquid Chromatography – fluorescence Detection Method

SHEN Xin, ZHANG Yu-Jie, LI Dan, SUN Hong-Yang, ZHU Xin-le, HUANG Yao-ling*

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

Abstract: A method for determination of moxidectin residue in bovine and ovine milk by high performance liquid chromatography – fluorescence detection (HPLC – FLD) was established. The analyte were extracted with acetonitrile and cleaning with C18 solid phase extraction column, using N-methylimidazole + acetonitrile(1+1, V/V) and trifluoroacetic anhydride + acetonitrile(1+2, V/V) as the derivatization reagents. The mobile phase was acetonitrile and water(90+10, V/V) with equivalent elution, quantified by HPLC – FLD. The validation results showed that the limit of detection (LOD) of the method was 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the limit of quantification (LOQ) was 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in milk. Meanwhile, at the concentrations of 5, 20, 40 and 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in moxidectin spiked blank milk, the average recoveries of this method were 75.5% ~ 110%, with the intra-day coefficient variation

作者简介: 沈 昕, 硕士, 助理研究员, 从事兽医药理学研究。

通讯作者: 黄耀凌。E-mail: huangyaoling@ivdc.org.cn

(*CVd*) were less than 7.38%, inter-day coefficient variation (*CVr*) were less than 7.87%; the recoveries ranged from 77.5% to 95.6%, with the *CVd* were less than 5.06%, *CVr* were less than 5.92%. All of the above results show that this HPLC method has well practicability and accuracy, which could be applied in the rapid determination of moxidectin in milk.

Key words: milk; moxidectin; residue; HPLC-FLD

莫昔克丁, 又称莫西菌素, 是一种由链霉菌发酵产生的结构单一的大环内酯类抗生素, 为米尔贝霉素类药物^[1-2], 20 世纪 80 年代中期开始在畜牧业中被作为驱虫药应用, 具有高驱虫活性、长效性及安全性的特点, 莫昔克丁在较低剂量下即对线虫和节肢动物有明显杀灭作用^[3-5]。由于莫昔克丁在结构上缺少一个二糖取代基, 因此, 脂溶性较好, 同时也易溶于水。试验证明, 用药后莫昔克丁在脂肪组织中分布较高, 在肌肉与肾脏中分布较低, 主要以药物原形为其残留方式^[5-6]。有资料表明, 莫昔克丁在组织内停留时间较长, 而乳汁也是其主要排泄途径之一, 人类若长期食用含有莫昔克丁残留的奶制品, 会对其健康造成很大的威胁, 因此, 制定合理的休药期及高效、灵敏的检测方法十分必要。我国 2019 年发布的《GB 31650-2019 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》中规定, 牛、羊奶中莫昔克丁的最高残留限量 (MRL) 为 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[7], 但目前国内外关于莫昔克丁的检测方法报道较少^[8-11], 我国也没有相应残留检测方法的国家标准。高效液相色谱法具有快速、灵敏的优点, 且现在国内已基本普及, 因此, 建立一个高效、灵敏的液相色谱法对于更好的监测莫昔克丁在畜牧业中的合理化应用有着重要意义。

1 材料与方法

1.1 仪器设备 Agilent 高效液相色谱仪 (配荧光检测器), 美国安捷伦公司; XS105DU 分析天平, Mettler Toledo 公司; AE260 电子天平, Mettler Toledo 公司; MS3 涡旋混合器, ks 501 digital 振荡器, IKA 公司; FV64 氮吹仪, 得泰仪器公司; Biofuge Strators 高速冷冻离心机, 贺利氏公司; LC-213 鼓风干燥箱, 上海爱斯佩克环境仪器有限公司。

1.2 药品与试剂 莫昔克丁, 含量 $\geq 94\%$, Dr.

Ehrenstorfer; 三乙胺; 三氟乙酸酐; N-甲基咪唑; 冰醋酸; 乙腈、甲醇均为色谱纯。

1.3 溶液的配制

1.3.1 标准溶液的配制 莫昔克丁标准储备液 (1 mg/mL): 精密称取适量莫昔克丁标准品于 10 mL 容量瓶中, 用乙腈溶解并稀释至刻度, 成为浓度 1 mg/mL 的标准储备液; 量取适量标准储备液, 用乙腈稀释为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作液。

1.3.2 衍生化试剂的配制 A 液: N-甲基咪唑-乙腈 (1+1, V/V), 现用现配; B 液: 三氟乙酸酐-乙腈 (1+2, V/V), 现用现配。

1.4 液相色谱条件 色谱柱: Phenomenonx luna C18, 250 mm $\times$ 4.6 mm (i. d.), 粒径 5 μm ; 流动相: 乙腈+水 (90+10, V/V); 流速: 1.8 mL/min; 检测波长: 激发波长为 365 nm, 发射波长 475 nm; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL 。

1.5 标准曲线及线性范围的测定 精密量取莫昔克丁标准工作液适量于容量瓶中, 用乙腈稀释成浓度为 4、10、20、100、200 和 500 ng/mL 的系列标准工作液。取以上 6 个浓度的标准工作液各 1.0 mL 于各自的 10 mL 试管中, 于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴氮气吹干, 按衍生化步骤处理后, 供高效液相色谱仪测定。从低浓度到高浓度依次测定, 每一浓度进样 3 针。以测得峰面积为纵坐标, 对应的标准溶液浓度为横坐标, 绘制标准曲线。求回归方程和相关系数。

1.6 样品前处理 提取: 称取牛 (羊) 奶 (2 ± 0.02) g 于 50 mL 离心管中, 加乙腈 3 mL, 涡旋混匀, 中速振荡 5 min, 10000 r/min 离心 5 min, 收集上清液于另一 50 mL 离心管中。残渣再重复提取一次。合并两次上清液, 加水 3 mL, 混匀, 备用。

净化与浓缩: C18 固相萃取柱依次用乙腈 5 mL 和 30% 乙腈水溶液 5 mL 活化, 将备用液过柱, 用 30% 乙

腈水溶液 5 mL 淋洗,抽干。用乙腈 5 mL 洗脱,收集洗脱液于 10 mL 试管中,50 ℃ 水浴氮气吹干。备用。

衍生化:向试管中依次加入衍生化试剂 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,65 ℃ 避光密闭反应 15 min,取出后加 650 μL 甲醇混匀。经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,供高效液相色谱仪检测。

1.7 方法灵敏度的确定 分别对北京超市购置的不同品牌的牛、羊奶进行筛选,所得空白样品进行添加回收试验,按照上述样品前处理方法处理,进行 HPLC 分析,测得药物色谱保留处的基线噪音值,求其平均值。以 $S/N \geq 3$ 作为该方法药物的检测限;以 $S/N \geq 10$,且在该添加水平的回收率和变异系数均满足残留分析要求的最小浓度作为定量限(LOQ)。

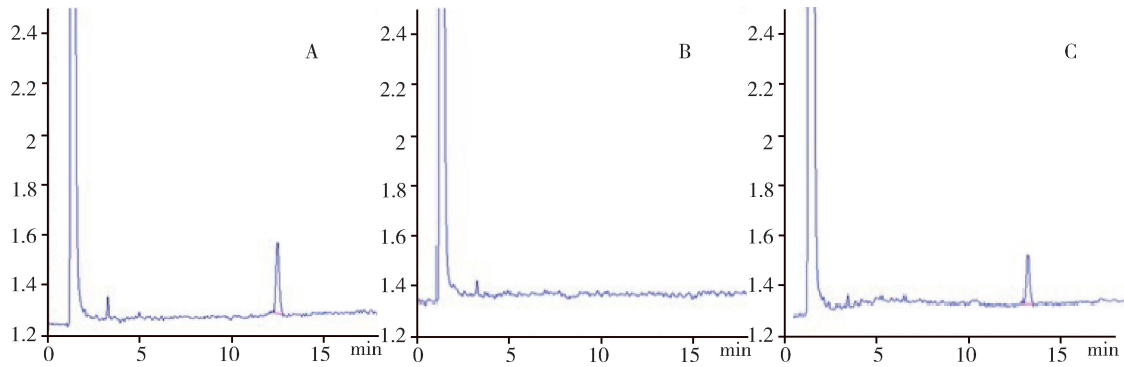
1.8 准确度和精密度的测定 采用标准添加法,在

空白牛奶、羊奶中分别添加定量限、1/2 MRL、MRL 和 2 MRL 四个浓度(5、20、40、80 μg/kg)的莫昔克丁标准工作液进行回收率试验,各浓度进行 5 个样品平行试验,同时重复 3 次空白试验,求每个样品的回收率和批内、批间相对标准偏差(RSD)。

2 结果与分析

2.1 标准曲线及线性范围 取 4、10、20、100、200 和 500 ng/mL 标准溶液浓度点进行检测,莫昔克丁在该浓度范围内呈良好线性关系,回归方程为 $y = 0.3303x - 0.6572$, $R^2 = 0.9998$ 。

2.2 方法灵敏度 按照本文建立方法,添加莫昔克丁浓度为 2 μg/kg 时, $S/N \geq 3$,添加莫昔克丁浓度为 5 μg/kg 时, $S/N \geq 10$,因此,本方法检测限为 2 μg/kg,定量限为 5 μg/kg。标准对照液、空白牛奶及添加试样中的高效液相色谱图见图 1。



(A) 莫昔克丁标准溶液色谱图(10 ng/mL)
(B) 空白牛奶试样色谱图 (C) 空白牛奶添加莫昔克丁试样色谱图(5 μg/kg)

图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC Chromatograms (A) Chromatograms of Moxidectin (10 ng/mL)
(B) Chromatogram of blank milk (C) Chromatogram of Moxidectin in milk spiked samples

2.3 方法准确度和精密度 根据莫昔克丁在牛、羊奶中 MRL 规定,在空白试料中添加定量限、1/2 MRL、MRL 和 2 MRL 四个浓度的莫昔克丁,进行回收率试验,每个浓度设置 5 个平行样品,并重复 3 次,按照上述方法处理后,高效液相色谱(荧光检测器)检测。分别计算回收率以及批内、批间变异系数,结果见表 1、表 2。

结果表明:本方法在 5 ~ 80 μg/kg 添加浓度范

围内,牛、羊奶的回收率范围分别为 75.5% ~ 110%、77.5% ~ 95.6%;批内变异系数分别为 0.84% ~ 7.38%,1.25% ~ 5.06%;批间变异系数分别为 3.98% ~ 7.87%,2.62% ~ 5.92%。

3 讨论与结论

3.1 提取条件的优化 根据现有文献作为参考^[8-12],并根据莫昔克丁易溶于多种有机溶剂的结构性质,本方法分别选用乙酸乙酯、20% 乙醇乙腈、

表 1 空白牛奶中添加莫昔克丁的回收率测定结果 (n = 5)

Tab 1 Recoveries of Moxidectin in milk spiked samples

添加浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	批次	回收率/%	批内 RSD/%	批间 RSD/%
5.00	I	94.8, 89.1, 94.1, 97.2, 96.0	3.30	4.93
	II	101, 94.9, 93.5, 93.2, 85.6	5.98	
	III	83.3, 88.6, 94.9, 92.2, 91.5	4.89	
20.0	I	90.9, 92.7, 98.1, 98.3, 100	4.25	3.98
	II	93.4, 91.3, 95.5, 96.4, 97.2	2.52	
	III	89.4, 91.7, 89.9, 89.3, 89.9	1.09	
40.0	I	97.8, 99.2, 98.7, 97.4, 99.0	0.84	7.37
	II	93.2, 95.9, 94.3, 95.0, 81.5	6.48	
	III	89.8, 87.6, 90.1, 90.9, 75.5	7.38	
80.0	I	98.4, 97.6, 95.7, 101, 110	5.53	7.87
	II	95.2, 91.4, 91.5, 92.1, 91.0	1.83	
	III	85.1, 86.2, 82.3, 84.6, 87.4	2.26	

表 2 空白羊奶中添加莫昔克丁的回收率测定结果 (n = 5)

Tab 2 Recoveries of Moxidectin in goat milk spiked samples

添加浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	批次	回收率/%	批内 RSD/%	批间 RSD/%
5.00	I	84.1, 84.8, 85.2, 87.6, 88.4	2.19	4.77
	II	94.1, 86.7, 83.9, 85.6, 86.2	4.51	
	III	95.6, 87.4, 92.6, 86.2, 96.4	5.06	
20.0	I	88.9, 89.3, 93.7, 91.2, 90.8	2.11	2.62
	II	91.4, 87.7, 91.2, 90.2, 89.0	1.74	
	III	85.1, 89.5, 85.1, 87.4, 88.3	2.23	
40.0	I	90.9, 90.4, 82.7, 83.8, 84.6	4.47	3.92
	II	91.8, 90.3, 87.4, 92.0, 91.8	2.13	
	III	90.0, 85.8, 92.0, 90.7, 94.3	3.47	
80.0	I	86.5, 84.8, 82.0, 85.8, 89.5	3.19	5.92
	II	92.2, 92.5, 90.3, 90.2, 90.2	1.25	
	III	80.8, 86.2, 77.5, 79.5, 78.5	4.23	

乙腈对莫昔克丁进行提取,经试验发现,莫昔克丁用乙酸乙酯提取回收率较低,用 20% 乙醇乙腈、乙腈提取时,回收率均能达到 80% 以上,但经进一步比较分析,用 20% 乙醇乙腈提取后,莫昔克丁药物

峰形变宽,因此,本方法选择乙腈作为提取溶剂,并通过高速离心去除蛋白质等大量杂质的干扰,有效提取其中的莫昔克丁药物。

3.2 衍生化条件的优化 莫昔克丁为米尔贝霉素类药物,其分子结构与阿维菌素类药物十分类似,适合用高效液相色谱法进行测定。此类药物衍生化后的荧光响应值高,杂质干扰少,且相较于成本更高的液相色谱-质谱法成本低,具有更好的普适性。在目前衍生化方法中,对阿维菌素类药物的衍生化试剂普遍使用 N-甲基咪唑-乙腈(1+1, V/V)和三氟乙酸酐-乙腈(1+2, V/V)进行^[13]。本实验对衍生化的温度、时间、光照条件等进行了摸索。经试验比较发现,若在室温下进行衍生化,则需要较长反应时间;若在加热条件下进行,65℃反应 15 min,即可充分衍生化。同时,在反应温度和时间一定的前提下,在正常光照和避光两种条件下,前者药物的峰面积均明显低于后者。因此,本方法选用 65℃反应避光 15 min 衍生化条件。此反应条件衍生化反应效率高、反应充分、杂质干扰少,反应后的衍生产物与甲醇混合后,形成稳定的醇式衍生物,其含量稳定,保存一天以后进样,测得莫昔克丁药物峰面积与立即进样峰面积基本无变化。

3.3 色谱条件的优化 本试验经过衍生化后,基质中的干扰成分已基本去除,药物色谱峰保留时间内也无干扰。因此,在色谱条件上,本试验将流速增加至 1.8 mL/min,同时将柱温升高至 40℃,缩短了分析时间,提高了试验效率。本方法与李林霞等^[8]建立的 HPLC 方法相比,减少了提取液用量,加快了提取液经固相萃取柱净化速度,且优化了色谱条件,加大了流速,提高了柱温,使药物保留时间由 15 min 提前至 12 min,更好的去除了样品中杂质干扰,在缩短了试验的前处理和样品检测时间、加快了试验进度的同时,保证了样品的基质效应降得更低,为检测莫昔克丁大批量试验保证了效率和准确度。

本试验建立了牛、羊奶中莫昔克丁残留的高效液相色谱检测方法,其检测限为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,平均回收率范围为 75.5% ~ 110%,批间

及批内变异系数均低于 7.87%。该方法操作简单、适用性强、灵敏度高,可满足检测工作的需要。

参考文献:

- [1] Hidalgo - argello M R, Diez - banos N, Rojo - vquez F A. Efficacy of moxidectin 1% injectable and 0.2% oral drench against natural infection by *Dictyocaulus filarial* in sheep[J]. *Veterinary Parasitology*, 2002, 107(1/2): 95 - 101.
- [2] 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.
- [3] 刘开永, 李英伦, 周岷江, 等. 新一代驱虫抗生素——莫西菌素[J]. *中国兽药杂志*, 2003, 37(5): 40 - 44.
- Lv K Y, Li Y L, Zhou M J, *et al.* A new deworming antibiotic - Moxidectin. [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2003, 37(5): 40 - 44.
- [4] 李 娇, 李庆山, 徐风波. 莫西菌素在畜牧业中的应用研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(12): 3587 - 3593.
- Li J, Li Q S, Xu F B. Research progress of Moxidectin in animal husbandry. [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 45(12): 3587 - 3593.
- [5] 杜小燕, 蒋金书, 李志强. 莫西菌素的研究进展[J]. *中国兽医杂志*, 2003, 39(6): 47 - 49.
- Du X Y, Jiang J S, Li Z Q. Research progress of Moxidectin. [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2003, 39(6): 47 - 49.
- [6] Lifchitz A, virkel G. Loperamide induced enhancement of moxidectin availability in cattle[J]. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2002, 25: 111 - 120.
- [7] 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].
- [8] 李林霞, 崔耀文, 沈建忠, 等. 猪肉中莫西克汀残留高效液相色谱 - 荧光检测方法的建立[J]. *中国农业大学学报*, 2011, 16(1): 84 - 87.
- Li L X, Cui Y W, Shen J Z, *et al.* Determination of Moxidectin residue in pork by HPLC - FLD. [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2011, 16(1): 84 - 87.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 尹 晖, 王亦琳, 叶 妮, 等. 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[J]. *中国兽药杂志*, 2020, 54(10): 30 - 35.
- Yin H, Wang Y L, Ye N, *et al.* Determination of Moxidectin residue in milk by LC - QTRAP. [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2020, 54(10): 30 - 35.
- [12] 谭 梅, 李燕君, 李 然, 等. 动物性食品中阿维菌素类药物残留检测高效液相色谱法的优化[J]. *中国兽医杂志*, 2020, 55(10): 86 - 90.
- Tan M, Li Y J, Li R, *et al.* Optimization of High Performance Liquid Chromatography for the Detection of Avermectins residues in animal foods. [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2019, 55(10): 86 - 90.
- [13] 张玉洁, 沈 昕, 李 丹, 等. 阿维菌素类药物残留检测衍生化研究[J]. *中国兽药杂志*, 2020, 54(7): 18 - 22.
- Zhang Y J, Shen X, Li D, *et al.* Derivatization of Avermectin in residues detection. [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2020, 54(7): 18 - 22.

(编辑: 侯向辉)