

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2020.07.03

阿维菌素类药物残留检测衍生化研究

张玉洁, 沈昕, 李丹, 李倩, 王鹤佳*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2020-03-18 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 07-0018-05 [中图分类号] S859.79

[摘要] 本文优化了猪、牛组织及奶和奶粉中阿维菌素类药物残留检测的衍生化方法。经过对反应温度、时间及光照的系统摸索, 采用 N-甲基咪唑-乙腈(1+1, v/v) 与三氟乙酸酐-乙腈(1+2, v/v) 为衍生化试剂, 经 65℃ 避光反应 15 min 进行衍生化。该衍生化方法用时短、效率高, 进一步提高了检测方法的灵敏度, 使得乙酰氨基阿维菌素、阿维菌素、伊维菌素和多拉菌素在牛、羊奶中的定量限为 0.5 μg/kg; 在猪、牛组织和奶粉中的定量限为 5 μg/kg。

[关键词] 阿维菌素类; 衍生化; 高效液相色谱法

Derivatization of Avermectin in Residues Detection

ZHANG Yu-jie, SHEN Xin, LI Dan, LI Qian, WANG He-jia*

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

Corresponding author: WANG He-jia, E-mail: pharhejia@163.com

Abstract: An derivatization method for the determination of avermectin residues in swine and beef tissues, milk and milk powder has been developed. Based on the systematic investigation of the impact of various temperature, duration time and light, the optimized method was established using N-methylimidazole + acetonitrile(1+1, v/v) and trifluoroacetic anhydride + acetonitrile(1+2, v/v) as the derivatization reagents and taking place at 65℃ in dark for 15 mins. This derivatization method not only get the efficient products at the short duration, but also improve the sensitivity of the method: the limit of quantification (LOQ) of eprinomectin, abamectin, ivermectin and doramectin was 0.5 μg/kg in milk and goat milk and 5 μg/kg in milk powder, swine and beef tissues.

Key words: avermectin; derivatization; HPLC

阿维菌素类药物化学结构新颖, 作用机制独特, 杀虫活性强, 杀虫谱广, 因而被广泛应用于牛、羊等动物。2020 年 4 月 1 日生效的 GB 31650-2019 规定, 阿维菌素禁用于泌乳期牛、羊, 在牛羊组

织中的最大残留限量 (MRL) 为 20 ~ 100 μg/kg; 伊维菌素在牛奶中的最高残留限量为 10 μg/kg, 在牛、羊、猪组织中的 MRL 为 30 ~ 100 μg/kg; 多拉菌素在牛奶中的 MRL 为 15 μg/kg, 在牛、羊、猪组织

作者简介: 张玉洁, 助理研究员, 主要从事兽药残留检测研究。

通讯作者: 王鹤佳。E-mail: pharhejia@163.com

中的 MRL 为 5 ~ 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 乙酰氨基阿维菌素在牛奶中的 MRL 为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 牛肌肉等组织中 MRL 为 100 ~ 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[1]。对比之前的农业部第 235 号公告, GB31650 对阿维菌素类药物最主要的变化一是取消了多拉菌素泌乳期的禁用限制, 制定了其在牛奶中的 MRL, 二是增补了乙酰氨基阿维菌素的限量规定^[2]。阿维菌素类药物是目前兽医临床上用量最大的抗寄生虫药物, 而其在奶、奶粉及动物组织中的残留也会对消费者健康产生不利影响。

目前阿维菌素类药物主要采用高效液相色谱法^[3-16]和液相色谱-质谱法^[8]进行分析。虽然阿维菌素分子结构中具有共轭二烯结构, 能在 245 nm 处有强的紫外吸收, 但紫外检测法的选择性和灵敏度不能满足要求。80 年代后, 荧光衍生化检测成为阿维菌素残留检测的主要研究方向。经过 de Montigny 等人^[4]的研究摸索和逐步改善, 基本确定了 N-甲基咪唑和三氟乙酸酐作为衍生化试剂, 乙腈作为反应溶剂。发展至目前, 各具体方法的衍生化步骤存在差异, 不同方法的检测限、定量限也有很大差别。

与液相色谱-质谱法相比, 高效液相色谱法具有仪器普及率高、成本低、操作简单、基质影响小, 定量准确等特点。而相比于其他的禁用药物, 阿维菌素类药物衍生化后的荧光响应值很高, 杂质干扰很少, 很适合用高效液相色谱法进行定量检测。因此, 本研究在对比现行标准衍生化方法的基础上, 详细研究了时间、温度及光照条件对衍生化产物的影响, 从而制定了衍生化程度最充分、用时最短、操作最简便的衍生化方法, 并且将这一衍生化方法应用于牛奶、羊奶、奶粉及猪、牛的肌肉、肝脏等组织的检测, 实践效果良好。

1 材料与方 法

1.1 仪器设备、试剂及对照品 Agilent 1100 高效液相色谱仪(配荧光检测器); SPE 柱: Bond Elut C18 固相萃取柱(500 mg/6 mL); 固相萃取装置; 氮吹仪; 高速冷冻离心机; Milli-Q 超纯水仪等。

阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素对照品, 纯度 $\geq 91.0\%$, 由中国兽医药品监察所

提供。甲醇、乙腈、无水乙醇为色谱纯, 异辛烷、三乙胺为分析纯。试验用水为符合国家标准的一级水。

1.2 溶液配制 衍生化试剂 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。

1.3 试验方法

1.3.1 液相色谱条件: 色谱柱: C_{18} 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 365 nm; 发射波长 475 nm; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 40 μL 。

1.3.2 衍生化步骤 洗脱液氮气吹干后, 向试管中依次加入衍生化试剂 A 液 100 μL 和 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。衍生化反应后加 650 μL 甲醇混匀。经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 供高效液相色谱检测。

1.3.3 测定温度对衍生化产物的影响 取 100 ng/mL 的阿维菌素、伊维菌素、多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素混合标准工作液 1 mL 至玻璃试管中, 50 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干后按照 1.3.2 步骤加入衍生化试剂和催化反应液。制备三组样品, 常温组 14 个样品, 另外两组各 12 个样品。上述样品分别置于常温、50 $^{\circ}\text{C}$ 和 65 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中避光反应。并分别于 0、15、30、45、60、75 及 100 min 时间点从各组取出两个平行样品加入甲醇后上机测定。

1.3.4 测定光照对衍生化产物的影响 取 100 ng/mL 的阿维菌素类药物混合标准工作液 1 mL 至玻璃试管中, 50 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干后按照 1.3.2 步骤加入衍生化试剂和催化反应液。设置两组样品, 每组 2 个平行样, 一组用棕色试管置于黑暗密闭条件下反应, 另一组用透明试管置于实验室明亮光照条件下反应。两组均在常温下反应 75 min, 加入甲醇后上机测定。

1.3.5 组织样品衍生化测定步骤 奶及奶粉的样品前处理过程见张玉洁等的试验方法^[5]。与之相比, 猪、牛肌肉、肝脏的前处理过程略有差异: 称取试料(5 \pm 0.05) g, 8 mL 乙腈作为提取溶剂提取两次, 同时, 离心管中加入不锈钢珠 2 粒防止组织凝聚抱团, 之后的净化浓缩步骤同奶及奶粉中^[5]的相关步骤。

洗脱液氮气吹干后,按照 1.3.2 步骤加入衍生化试剂和催化反应液,65℃ 密闭避光反应 15 min,取出后加 650 μL 甲醇混匀。经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,供高效液相色谱检测。

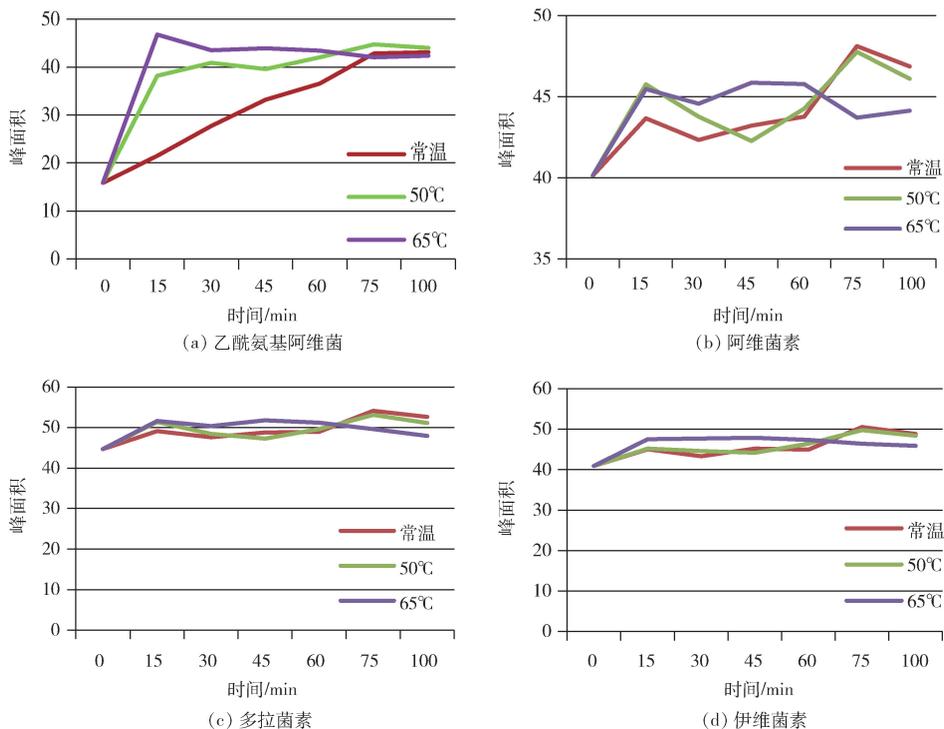
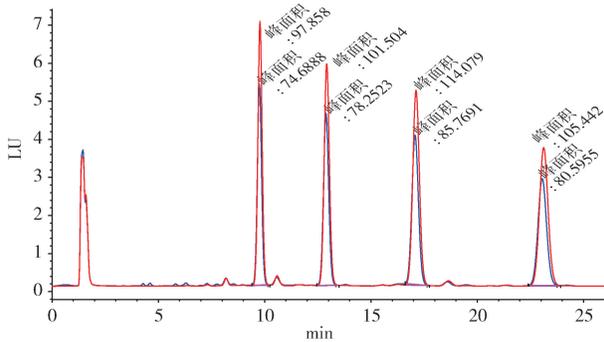


图 1 温度和反应时间对阿维菌素类药物衍生化效果的影响

Fig 1 The derivatization effect of the avermectins under various temperature and duration time

2.2 光照对衍生化反应的影响 在实验室明亮光照和避光两种条件下的色谱图如下(图 2),结果显示明亮光照下四种药物的峰面积均明显低于避光条件下的衍生化产物峰面积。



注:红色为避光条件下 4 种阿维菌素类药物衍生化反应的色谱图,蓝色为实验室明亮光照下 4 种阿维菌素类药物的色谱图。

图 2 光照对衍生化反应的影响

Fig 2 The effect of light on the derivatization

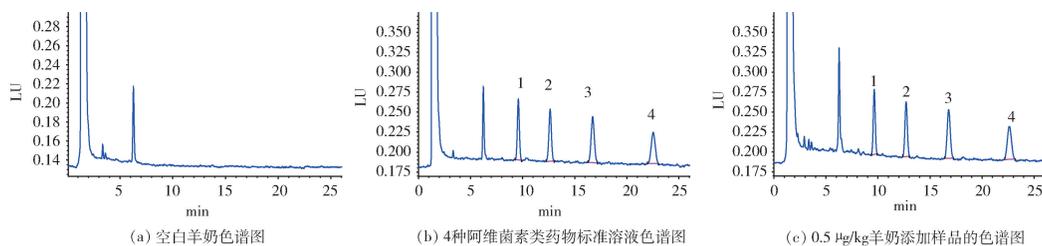
2 结果与分析

2.1 衍生化条件的温度 - 时间曲线 根据平行样品的峰面积平均值及对应温度和时间点绘制了反应曲线图(图 1)如下。

2.3 奶、奶粉及猪、牛组织样品的测定 牛奶、羊奶、奶粉及猪、牛的肌肉和肝脏样品经衍生化后用荧光检测器进行测定,以信噪比(S/N) ≥ 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)。经测定乙酰氨基阿维菌素、阿维菌素、多拉菌素和伊维菌素在牛奶、羊奶组织中的定量限为 0.5 μg/kg;在猪、牛的肌肉、肝脏及奶粉中的定量限为 5 μg/kg。羊奶空白样品、标准溶液及 0.5 μg/kg 添加样品衍生化色谱图如下(图 3A、B、C):

3 讨论与结论

3.1 阿维菌素类药物衍生化测定现状 对阿维菌素类药物的衍生化试剂普遍使用 N - 甲基咪唑 - 乙腈和三氟乙酸酐 - 乙腈进行^[3-15],不过不同方法间衍生化反应条件有所差异,反应温度、时间跨度



注:1-乙酰氨基阿维菌素,2-阿维菌素,3-多拉菌素,4-伊维菌素

图3 羊奶样品色谱图

Fig 3 The chromatograms of goat's milk

较大。现有国家标准 GB 29696-2013^[6]和程林丽等^[7]的研究均以牛奶为基质,其衍生化反应在室温进行,时长 30 min。农业农村部公告 1025 号—5—2008《动物性食品中阿维菌素类药物残留检测——酶联免疫吸附法,高效液相色谱法和液相色谱—串联质谱法》测定了牛肝脏、肌肉和猪肝脏中的 4 种阿维菌素类药物,其衍生化反应在 96 °C 下反应 100 min^[8]。农业部公告 781 号—5—2006《动物源食品中阿维菌素类药物残留量的测定 高效液相色谱法》^[9]和王海等人^[10]测定了动物组织中阿维菌素、伊维菌素和多拉菌素三个药物,其衍生化反应在室温瞬间进行。魏广智等^[11]认为阿维菌素类药物在室温下衍生化反应 15 min 达到峰值,反应时间太短或过长都影响产率。谢显传等人^[12]研究了阿维菌素的荧光反应影响因素,认为温度对其衍生化反应影响不大,衍生化反应对光线敏感,反应在 30 min 左右达到峰值。Ali 等人^[13]曾研究了 5 种阿维菌素类药物的荧光衍生化反应条件和动态,结果显示阿维菌素、伊维菌素和莫西克丁的反应产率瞬间可达峰值,此后逐渐降低。而乙酰氨基阿维菌素在室温下要 7 h 才能达到峰值,若在 65 °C 下反应 90 min 产率最高。

由此可见,目前阿维菌素类药物的衍生化方法各异。经本试初步摸索,猪、牛组织、牛羊奶和奶粉的提取液经过 C₁₈ 固相萃取柱净化浓缩后,在室温下衍生化反应 15 或 30 min 并不充分,将进样溶液立即进样与存放数小时后再进样所得的乙酰氨基阿维菌素色谱峰面积相差较大,说明在放置过程

中试样溶液中的残留药物和衍生化试剂仍在继续进行衍生化反应。此现象用 Ali 等人^[13]的研究结果可以印证。

3.2 反应温度、时间及光照对衍生化产物的影响从本实验对衍生化反应温度及时间的研究结果可以看出:反应若在室温下进行,阿维菌素、多拉菌素及伊维菌素经过 15-30 min,衍生化反应基本可以完成,而乙酰氨基阿维菌素则需 75 min 以上反应才能进行完全。衍生化反应若在加热条件下进行,65 °C 反应 15 min,四种药物的衍生化即可充分完成。这其中,阿维菌素的反应规律又与其他三种药物略有差别:65 °C 下反应超过 70 min,其产物含量不升反降。综合四种药物的温度-时间反应曲线来看,室温反应 75 min 或者 65 °C 反应 15 min 都可以获得较好的衍生化效果。

而本实验结果显示在实验室明亮光照和避光两种条件下,前者四种药物的峰面积均明显低于后者。由此可见,在反应温度和时间一定的前提下,光照对衍生化产物的稳定性影响很大,应尽量避光反应。

综合考虑 4 种药物的反应效率以及试验时长的问题,本实验确定衍生化反应条件为 65 °C 避光反应 15 min。此反应条件下的衍生化反应效率高、反应充分,并且反应后的衍生产物加入甲醇后形成的醇式衍生物含量稳定,反应结束后立即进样与存放 24 h 后再进样所得的检测组分的峰面积相差无几。

3.3 奶、奶粉及猪、牛组织的检测 经过衍生化条件的优化,4 种阿维菌素类药物在牛奶和羊奶中的

定量限可降低至 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 在猪、牛组织及奶粉中的定量限可达到 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。与现有国家标准 GB 29696-2013^[6]、GB/T 22968-2008^[8] 和其他的液相色谱法^[7,9~11] 的研究相比, 应用该衍生化方法后, 四种阿维菌素类药物的定量限更低, 更能符合检测需求。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家标准 GB31650-2019《食品安全国家标准食品中最大残留限量》[S].
National food safety standard GB31650-2019 - Maximum residue limits for veterinary drugs in foods[S].
- [2] 中华人民共和国农业部公告第 235 号《动物性食品中兽药最高残留限量》[S].
Announcement No. 235 of the Ministry of agriculture of the People's Republic of China. Maximum residues limit of Veterinary drugs in animal derived food[S].
- [3] 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: 257-262.
Li J S, Qiu Y M, Wang C. Analyze of Veterinary drug residues [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2002: 257-262.
- [4] Pierre de Montigny, Jung - Sook K, Shim, *et al.* Liquid chromatographic determination of ivermectin in animal plasma with trifluoroacetic anhydride and N - methylimidazole as the derivatization reagent[J]. Journal of Pharm. B iomed. Anal. , 1990, (8): 507 - 511.
- [5] 张玉洁, 李丹, 李倩, 等. 奶及奶粉中 4 种阿维菌素类药物残留检测高效液相色谱法[J]. 中国兽医杂志, 2017, 4(53): 88-91.
Zhang Y J, Li D, Li Q, *et al.* Determination of 4 kinds of avermectin residues in milk and milk powder by HPLC[J]. Chinese Journal of Veterinary medicine, 2017, 4(53): 88-91.
- [6] 中华人民共和国 GB 29696-2013 牛奶中阿维菌素类药物残留的测定 高效液相色谱法[S].
People's Republic of China GB 29696-2013 Determination of avermectin residues in milk by HPLC[S].
- [7] 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.
Cheng L L, An H Z, Shen J Z, *et al.* Determination of of 4 kinds of avermectin residues in milk by HPLC[J]. Journal of China Ag-
- ricultural University, 2010, 15(4): 95-98.
- [8] 中华人民共和国农业部公告 1025 号—5—2008 动物性食品中阿维菌素类药物残留检测——酶联免疫吸附法, 高效液相色谱法和液相色谱—串联质谱法[S].
Announcement No. 1025-5-2008 of the Ministry of agriculture of the People's Republic of China. Determination of avermectins residue in animal derived food ELISA method, HPLC method and LC-MS-MS method[S].
- [9] 中华人民共和国农业部公告 781 号-5-2006 动物源食品中阿维菌素类药物残留量的测定 高效液相色谱法[S].
Announcement No. 1025-5-2008 of the Ministry of agriculture of the People's Republic of China. Method for determination of avermectin residues in animal derived food - HPLC[S].
- [10] 王海, 刘素英, 单吉浩, 等. 液相色谱法测定猪组织中阿维菌素类药物残留量[J]. 中国兽药杂志, 2005, 39(9): 12-15.
Wang H, Liu S Y, Shan J H, *et al.* Determination of of avermectin residues in swine tissue by HPLC[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2005, 39(9): 12-15.
- [11] Wei G Z, Li J S. Improved method for determination of abamectin and ivermectin in cattle plasma[J]. J AOAC Int, 2001, 84(6).
- [12] 谢显传, 张少华, 王冬生, 等. 阿维菌素荧光衍生反应影响因素的研究[J]. 分析化学研究简报, 2006, 12: 1745-1748.
Xie X Z, Zhang S H, Wang D S, *et al.* Impact factors of Fluorescence Derivatization Reaction of Abamectin[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2006, 12: 1745-1748.
- [13] Ali S M, Sun T, Mcleeroy G E, *et al.* Simultaneous determination of Eprinomectin, Moxidectin, Abamactin, Doramactin, and Ivermectin in beef liver by LC with Fluorescence detection [J]. AOAC Int, 2000, 83: 31-38.
- [14] Payne L d. HPLC - Fluorescence method for the determination of eprinomectin marker residue in edible bovine tissue[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry , 1997, 45: 3501-3505.
- [15] Xiao L H, Yongnin W, Jianzhong S, *et al.* Multi - Residue Analysis of Avermectins in Bovine Liver and Muscle by Liquid Chromatography - Fluorescence Detector [J]. Chromatographia, 2007, 65: 77-80.
- [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.
Mo Y, Zhu B L. Determination of of avermectin residues in rabbit tissue by HPLC[J]. Chinese Journal of animal and veterinary sciences, 1999, 30(5): 438-443.