

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.02.05

高效液相色谱法测定牛、羊可食性组织中莫昔克丁残留量

沈 昕, 张玉洁, 黄耀凌, 李 丹, 张 骊, 孙红洋, 王鹤佳*

(中国兽医药品监察所, 北京 10081)

[收稿日期] 2021-08-16 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 02-0032-10 [中图分类号] S859.84

[摘 要] 建立了适用于检测牛、羊可食性组织中莫昔克丁残留的高效液相色谱法。样品经乙腈提取, C_{18} 固相萃取柱净化, 氮气吹干。将 N-甲基咪唑-乙腈 (1+1, V/V) 和三氟乙酸酐-乙腈 (1+2, V/V) 作为衍生化试剂, 65 °C 避光反应 15 min 进行衍生化。以乙腈+水 (90+10, V/V) 作为流动相, 等度洗脱, 荧光法测定。结果显示: 莫昔克丁在线性范围内呈良好线性关系, 相关系数 (r) 大于 0.999, 检测限和定量限分别为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。该方法在以上各组织中的回收率范围为 60.5% ~ 110%, 其批间、批内变异系数范围为 0.62% ~ 15.8%。该方法准确性强、灵敏度高, 可满足实验室实际工作需求。

[关键词] 莫昔克丁; 残留; 高效液相色谱

Determination of Moxidectin Residue in Edible Tissues of Bovine and Ovine by High Performance Liquid Chromatography Method

SHEN Xin, ZHANG Yu-Jie, HUANG Yao-Ling, LI Dan, ZHANG Li, SUN Hong-Yang, WANG He-Jia*

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

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

Abstract: To develop a method capable of the simultaneously determining moxidectin in edible tissues of bovine and ovine, we established a high performance liquid chromatography method. After the sample were extracted with acetonitrile, the whole of supernatant was purified with C_{18} column, then evaporation. Using N-methylimidazole + acetonitrile (1+1, V/V) and trifluoroacetic anhydride + acetonitrile (1+2, V/V) as the derivatization reagents, reactions at 65 °C in dark for 15 mins. The mobile phase was acetonitrile and water (90+10, V/V) with equivalent elution, quantified by HPLC-FLD. The results showed that a good linearity of the calibration curve of moxidectin was obtained in linear range, and the correlation coefficients (R^2) were more than 0.999; The validation results showed that the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 5

作者简介: 沈 昕, 助理研究员, 硕士, 从事兽医药理学研究。

通讯作者: 王鹤佳。E-mail: pharhejia@163.com

$\mu\text{g}/\text{kg}$ 。Meanwhile, the average recoveries of this method were 60.5% ~ 110% in various matrices, and the relative standard deviations for precision were 0.62% ~ 15.8%。All of the above results show that this HPLC method has well practicability and accuracy, which can meet the demand of determination of moxidectin in various laboratories.

Key words: moxidectin; residue; high performance liquid chromatography

莫昔克丁,也称莫西菌素,是一种安全、长效的杀虫药,在日本、欧洲等多个国家登记,并作为对环境友好的杀虫剂被美国环保局推荐使用^[1]。研究表明,莫昔克丁能杀灭盘尾丝虫的微丝蚴,还可通过抑制成虫体内的胚胎发育和微丝蚴的释放发挥其作用,同时不同程度的降低各成长阶段盘尾丝虫的蠕动、成虫的繁殖能力以及免疫调节蛋白的分泌^[2-3]。自 20 世纪 80 年代中期以来,莫昔克丁也被作为驱虫药广泛应用于畜牧业中^[4]。相关文献表明,莫昔克丁对牛、羊、猪体内的消化道线虫、肺线虫和体外寄生虫都具有良好的驱杀作用,其与吡虫啉的混合制剂可用于治疗犬、猫的线虫病、螨虫病及钩端螺旋体炎,同时也能在禽类体内保持高效的驱虫活性^[5-18]。2014 年,吡虫啉莫昔克丁滴剂(猫用、狗用)被批准在国内上市,同年,由浙江海正药业股份有限公司研发的二类新药莫昔克丁及莫昔克丁浇泼溶液在国内获批上市。

莫昔克丁为第三代阿维菌素类药物,具有很高的亲脂性,在脂肪中分布极高,粪便为其主要排泄途径,且主要残留形式为莫昔克丁原药^[14]。我国 GB-31650-2019 规定莫昔克丁在牛肌肉中的最大残留限量(maximum residue limit, MRL)为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$,在绵羊肌肉中的 MRL 为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,在牛、绵羊的脂肪、肝及肾中的 MRL 分别为 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[19]。目前,我国尚无动物组织中莫昔克丁残留检测方法的国家标准,且同时针对多种动物组织中莫昔克丁的残留方法的报道也较少^[21-23]。本研究拟建立一种适用于牛、羊组织样品中莫昔克丁残留检测的高效液相色谱方法,以满足当前的实验室检测需求,同时为动物食品安全检测提供有效技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 莫昔克丁标准品(纯度 $\geq 94\%$),德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;乙腈、甲醇均为色谱纯,三乙胺、三氟乙酸酐、冰醋酸,国药集团化学试剂有限公司;N-甲基咪唑,上海麦克林生化科技有限公司;水为一级水。

1.2 仪器与设备 高效液相色谱仪(1260,配荧光检测器),美国 Agilent 公司;分析天平(XS105DU),电子天平(AE260),Mettler Toledo 公司;Biofuge stratos 离心机,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;涡旋混合器(MS3),振荡器(ks 501 digital),德国 IKA 公司;氮吹仪(FV64),得泰仪器公司;鼓风干燥箱(LC-213),上海爱斯佩克环境仪器有限公司;Milli-Q 纯水仪,美国 Millipore 公司;C₁₈固相萃取柱,美国 Agilent 公司。

1.3 方法

1.3.1 溶液配制

1.3.1.1 标准溶液配制及标准曲线绘制 按莫昔克丁标准品纯度折算后,精密称定 10.0 mg 于 10 mL 容量瓶中,用乙腈溶解并稀释至刻度,配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液;准确吸取 1.00 mL 标准储备液于 100 mL 容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,成为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作液,密封贮存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

精密量取莫昔克丁标准工作液适量,分别用乙腈逐级稀释,制成浓度为 4、10、100、500、1000 和 2000 ng/mL 的标准工作液。以上 6 个浓度的标准工作液,分别准确吸取 1.0 mL 于 10 mL 试管中,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下氮气吹干后,进行衍生化,加入甲醇,上机检测,绘制标准曲线。

1.3.1.2 衍生化试剂的配制 分别以 N-甲基咪唑-乙腈(1+1, V/V)和三氟乙酸酐-乙腈(1+2, V/V)作为衍生化试剂 A 液、B 液,并保证临用现配。

1.3.2 样品前处理

1.3.2.1 提取 称取均质后的牛、羊的肌肉、脂肪、肝脏、肾脏组织各(2 ± 0.02) g 置于 50 mL 离心管中,加入 5 mL 乙腈,涡旋混匀后中速振荡 5 min, 10000 r/min 离心 5 min,将上清液转移至另一 50 mL 离心管中。按照上述步骤再提取一次,将两次上清液合并,加入 5 mL 水,涡旋混匀后,加入三乙胺 20 μ L(羊肝脏加三乙胺 50 μ L),混匀备用。

1.3.2.2 净化 依次用 5 mL 乙腈和 5 mL 30% 乙腈水溶液活化 C_{18} 固相萃取柱,将上述备用液全部过柱后,用 5 mL 30% 乙腈水溶液淋洗,用 5 mL 乙腈洗脱萃取柱。将洗脱液收集于 10 mL 具塞试管中, 50 $^{\circ}$ C 水浴氮气吹干。

1.3.2.3 衍生化 依次向吹干后残渣中加入 100 μ L 衍生化试剂 A 液和 150 μ L 衍生化试剂 B 液,密闭涡动 10 s 后,加入 50 μ L 冰醋酸和三乙胺各 50 μ L,漩涡混匀 10 s, 65 $^{\circ}$ C 下,避光密闭反应 15 min。反应完成冷却后,加入 650 μ L 甲醇,混匀后经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,供高效液相色谱检测。

1.3.3 色谱条件 色谱柱:Phenomenonx luna C_{18} 250 mm $\times$ 4.6 mm(i.d), 粒径 5 μ m;柱温:40 $^{\circ}$ C;进样体积:20 μ L;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。

1.4 方法灵敏度的确定 分别在北京市内购置的不同品牌及厂家的牛及羊的肌肉、脂肪、肝脏、肾脏进行筛选,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 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)。

1.5 准确度和精密度的测定 采用标准添加法,在空白牛及羊的肌肉、脂肪、肝脏、肾脏组织中分别添加定量限、1/2 MRL、MRL 和 2 MRL 四个浓度的

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 线性范围与检测限和定量限 配制浓度分别为 4、10、100、500、1000 和 2000 ng/mL 的标准工作液,按照 1.3.2 项步骤处理,上机检测,得到莫昔克丁在 6 个浓度水平下的线性回归方程为 $y = 0.3412x - 3.2242$,其相关系数大于等于 0.9996,线性范围较好。依据信噪比 $S/N \geq 3$ 和 $S/N \geq 10$ (按 P/P 计算),确定检出限(LOD)及定量限(LOQ)分别为 2 μ g/kg 和 5 μ g/kg。标准对照液、空白牛、羊肝脏及添加标样中的高效液相色谱图见图 1 ~ 图 2。

2.2 方法的准确度和精密度 本方法分别选用由北京本地市场和网上购买的样品进行空白样品筛选。分别在 8 种不同空白样品中添加其相对应的定量限、1/2 MRL、MRL 和 2 MRL 水平浓度后进行测定,其中牛肌肉分别添加 5、10、20、40 ng/g 水平浓度,牛、羊肝脏分别添加 5、50、100、200 ng/g 水平浓度,牛肾脏、羊肌肉、羊肾脏分别添加 5、25、50、100 ng/g 水平浓度,牛脂肪、羊脂肪分别添加 5、250、500、1000 ng/g 水平浓度,每个水平浓度做 5 个平行样品,并重复 3 次实验,计算其批内、批间相对标准偏差,结果见表 1 ~ 表 8。

结果显示,莫昔克丁在牛肌肉的添加回收率为 71.8% ~ 103%,批内相对标准偏差 $\leq 10.6\%$,批间相对标准偏差 $\leq 7.55\%$;对羊肌肉、肾脏,牛肾脏的添加回收率均在 82.8% ~ 110% 之间,批内相对标准偏差 $\leq 7.29\%$,批间相对标准偏差 $\leq 7.95\%$;对牛肝脏、羊肝脏的添加回收率均在 74.7% ~ 108% 之间,批内相对标准偏差 $\leq 8.15\%$,批间相对标准偏差 $\leq 9.04\%$;对牛、羊脂肪的添加回收率均在 60.5% ~ 87.3% 之间,批内相对标准偏差 $\leq 15.8\%$,批间相对标准偏差 $\leq 8.50\%$ 。

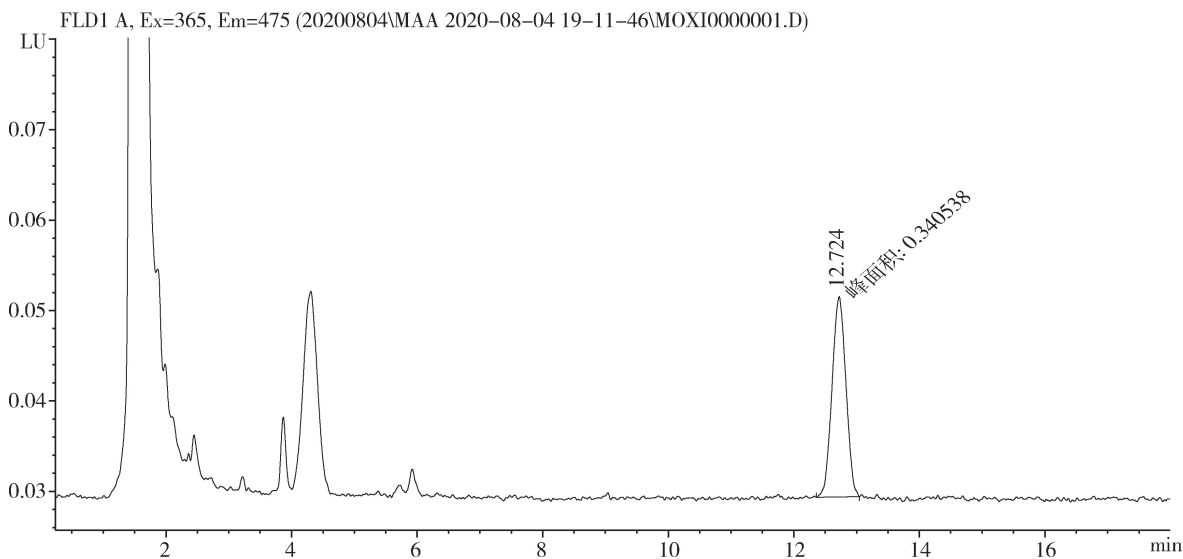


图 1 莫昔克丁标准溶液色谱图 (10 ng/mL)
Fig 1 Chromatograms of Moxidectin (10 ng/mL)

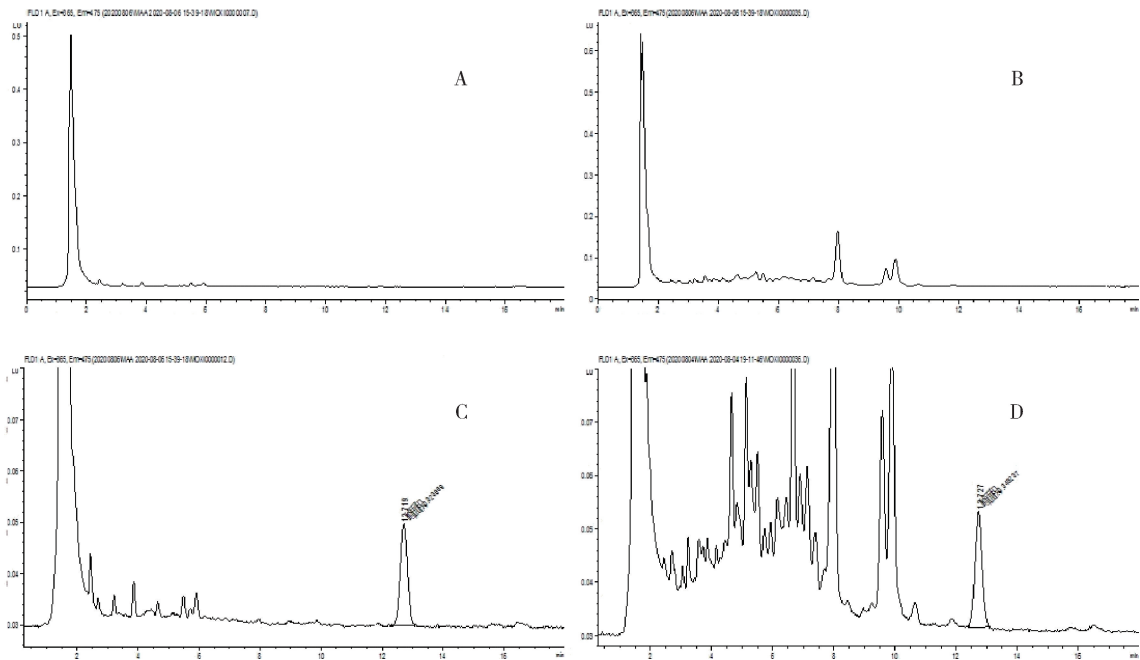


图 2 空白牛肝脏试样色谱图 A;空白羊肝脏试样色谱图 B;牛肝脏添加莫昔克丁试样色谱图(5 $\mu\text{g/kg}$) C ;
羊肝脏添加莫昔克丁试样色谱图(5 $\mu\text{g/kg}$) D
Fig. 2 A Chromatograms of blank liver samples of bovine;B Chromatograms of blank liver samples of ovine
C Chromatograms for moxidectin in spiked liver samples of bovine(5 $\mu\text{g/kg}$)
D Chromatograms for moxidectin in spiked liver samples of ovine(5 $\mu\text{g/kg}$)

表 1 牛肌肉中莫昔克丁添加回收率

Tab 1 Recoveries for moxidectin in spiked muscle samples of bovine					
药物	添加浓度/(ng·g ⁻¹)	批次	回收率/%	批内 RSD/%	批间 RSD/%
莫昔克丁	5	I	78.8、99.2、89.5、86.7、90.7	8.26	7.18
		II	93.3、88.6、94.0、88.4、89.0	3.03	
		III	101.7、92.8、83.8、103.2、96.6	8.17	
	10	I	91.0、89.1、87.7、85.1、91.0	2.81	2.87
		II	86.2、85.8、88.4、91.2、90.1	2.69	
		III	84.7、85.0、87.5、84.0、89.6	2.69	
	20	I	90.5、88.9、87.6、87.4、82.4	3.49	7.55
		II	97.2、96.2、97.4、95.4、87.1	4.56	
		III	93.6、77.1、92.7、93.9、76.3	10.6	
	40	I	84.2、84.3、86.1、87.0、86.4	1.50	7.24
		II	84.9、83.1、88.4、88.0、86.2	2.55	
		III	72.3、72.9、71.8、75.7、81.4	5.29	

表 2 牛肝脏中莫昔克丁添加的回收率

Tab 2 Recoveries for moxidectin in spiked liver samples of bovine					
药物	添加浓度/(ng·g ⁻¹)	批次	回收率/%	批内 RSD/%	批间 RSD/%
莫昔克丁	5	I	98.5、98.5、97.6、94.7、94.4	2.12	4.14
		II	100.6、101.4、99.4、94.8、94.5	3.32	
		III	94.8、87.4、97.7、89.1、92.8	4.54	
	50	I	88.1、89.3、88.9、92.7、93.4	2.47	5.39
		II	88.7、88.7、91.9、93.6、97.5	4.02	
		III	108.3、90.3、93.9、92.1、93.9	7.52	
	100	I	89.7、91.5、91.5、92.6、91.7	1.14	3.01
		II	94.1、94.0、92.5、93.7、94.9	0.938	
		III	96.9、95.4、95.5、99.3、99.6	2.08	
	200	I	91.5、91.7、90.9、94.2、95.4	2.12	7.38
		II	97.8、100.2、100.5、105.1、108.0	4.05	
		III	90.1、84.6、85.3、91.6、86.7	3.50	

表 3 牛肾脏中莫昔克丁添加的回收率

Tab 3 Recoveries for moxidectin in spiked kidney samples of bovine					
药物	添加浓度/(ng·g ⁻¹)	批次	回收率/%	批内 RSD/%	批间 RSD/%
莫昔克丁	5	I	97.0、101.5、101.6、109.2、103.8	4.34	7.95
		II	83.4、89.0、84.4、89.5、91.4	3.95	
		III	96.3、101.1、92.1、100.6、89.4	5.37	
	25	I	97.1、98.4、97.3、100.4、97.6	1.37	2.50
		II	93.3、95.5、95.0、99.5、98.9	2.75	
		III	91.8、98.1、97.3、100.3、98.1	3.26	
	50	I	98.9、97.7、101.3、101.6、99.4	1.63	3.92
		II	94.7、94.4、92.5、90.0、89.6	2.60	
		III	93.2、98.5、95.9、94.7、98.7	2.50	
	100	I	92.3、90.0、90.4、92.0、93.0	1.41	2.25
		II	87.5、87.9、90.3、91.4、91.4	2.09	
		III	92.4、94.0、94.6、91.6、93.7	1.34	

表 4 牛脂肪中莫昔克丁添加的回收率

Tab 4 Recoveries for moxidectin in spiked fat samples of bovine					
药物	添加浓度/(ng·g ⁻¹)	批次	回收率/%	批内 RSD/%	批间 RSD/%
莫昔克丁	5	I	64.3、69.3、69.7、71.7、66.3	4.31	4.85
		II	68.4、71.3、72.8、74.2、71.6	2.99	
		III	72.9、67.5、69.8、62.7、65.8	5.70	
	250	I	70.2、70.4、68.8、67.3、65.8	2.85	4.94
		II	75.4、73.9、73.6、71.5、68.8	3.55	
		III	64.1、65.7、65.7、66.5、67.7	2.01	
	500	I	61.8、63.2、65.3、63.2、63.1	1.99	5.04
		II	65.4、65.7、67.9、65.7、64.1	2.11	
		III	70.2、70.7、74.0、66.0、65.1	5.31	
	1000	I	68.5、69.3、70.7、70.5、70.4	1.37	8.50
		II	69.8、70.8、70.6、71.2、73.4	1.93	
		III	61.9、65.4、87.3、72.7、60.5	15.8	

表 5 羊肌肉中莫昔克丁添加的回收率

Tab 5 Recoveries for moxidectin in spiked muscle samples of ovine					
药物	添加浓度/(ng·g ⁻¹)	批次	回收率/%	批内 RSD/%	批间 RSD/%
莫昔克丁	5	I	82.8、85.6、87.0、91.2、85.9	3.56	4.90
		II	96.8、94.5、88.6、96.8、95.6	3.60	
		III	89.8、87.4、95.0、89.8、89.5	3.13	
	25	I	94.6、92.7、91.0、93.8、92.4	1.49	2.31
		II	89.2、90.7、93.9、91.2、92.8	1.99	
		III	96.2、96.0、96.6、94.3、93.6	1.36	
	50	I	93.8、92.9、91.5、92.5、91.0	1.23	1.96
		II	89.7、91.0、92.5、90.7、92.0	1.21	
		III	93.3、91.9、94.4、95.5、96.2	1.83	
	100	I	93.8、94.6、92.6、94.0、93.4	0.779	2.80
		II	91.6、92.0、92.7、93.1、92.3	0.624	
		III	97.7、96.4、100.5、97.9、97.2	1.55	

表 6 羊肝脏中莫昔克丁添加的回收率

Tab 6 Recoveries for moxidectin in spiked liver samples of ovine					
药物	添加浓度/(ng·g ⁻¹)	批次	回收率/%	批内 RSD/%	批间 RSD/%
莫昔克丁	5	I	95.8、95.6、94.7、100.6、101.7	3.27	2.72
		II	94.6、96.0、97.7、95.2、95.5	1.25	
		III	99.2、99.4、100.3、93.0、95.0	3.27	
	50	I	82.4、83.8、82.1、85.3、87.2	2.50	3.46
		II	80.5、84.2、90.7、89.4、89.1	4.92	
		III	83.3、84.0、86.9、84.5、87.7	2.23	
	100	I	85.0、87.7、94.4、92.8、94.9	4.78	3.87
		II	85.4、86.2、85.8、89.9、88.7	2.29	
		III	87.7、91.1、89.6、93.8、93.5	2.89	
	200	I	74.7、87.9、89.3、90.2、92.7	8.15	9.04
		II	88.8、89.7、88.5、92.0、92.7	2.13	
		III	101.1、104.5、104.4、106.6、100.9	2.36	

表 7 羊肾脏中莫昔克丁添加的回收率

Tab 7 Recoveries for moxidectin in spiked kidney samples of ovine					
药物	添加浓度/(ng·g ⁻¹)	批次	回收率/%	批内 RSD/%	批间 RSD/%
莫昔克丁	5	I	90.3、91.4、91.7、95.4、93.7	2.22	2.06
		II	92.6、93.1、93.4、94.9、94.9	1.11	
		III	87.9、93.3、93.5、92.4、93.0	2.53	
	25	I	96.7、95.1、93.2、93.9、94.0	1.44	4.79
		II	92.5、92.3、92.7、90.6、90.7	1.14	
		III	109.7、92.9、94.8、95.8、93.0	7.29	
	50	I	95.0、94.7、91.2、95.9、96.9	2.29	2.61
		II	95.0、94.1、90.9、92.4、89.5	2.44	
		III	95.3、97.8、97.7、94.1、95.5	1.69	
	100	I	91.0、92.7、94.3、93.3、97.1	2.41	2.16
		II	90.9、91.6、91.9、93.3、93.0	1.08	
		III	97.4、93.1、94.8、92.6、95.8	2.09	

表 8 羊脂肪中莫昔克丁添加的回收率

Tab 8 Recoveries for moxidectin in spiked fat samples of ovine					
药物	添加浓度/(ng·g ⁻¹)	批次	回收率/%	批内 RSD/%	批间 RSD/%
莫昔克丁	5	I	67.7、69.8、79.1、65.2、61.4	9.64	7.87
		II	75.7、76.5、78.0、66.9、71.6	6.13	
		III	70.7、64.3、71.0、78.3、67.0	7.49	
	250	I	73.1、75.3、74.2、74.0、73.3	1.14	6.40
		II	80.7、70.6、82.1、77.7、84.3	6.70	
		III	86.1、85.7、82.0、82.0、81.0	2.84	
	500	I	71.4、72.6、69.1、77.3、80.6	6.27	5.14
		II	71.7、73.3、76.5、74.4、73.7	2.33	
		III	82.4、75.5、81.8、73.9、76.3	4.97	
	1000	I	72.5、70.5、70.1、76.1、75.9	3.93	7.86
		II	64.5、66.3、68.2、71.6、72.7	5.05	
		III	78.5、84.3、77.9、80.1、82.2	3.30	

3 讨论与结论

3.1 提取条件的优化 莫昔克丁易溶于多种有机溶剂^[16-18],本方法分别对乙酸乙酯、20% 乙醇乙腈、乙腈的提取效果比较时发现,乙酸乙酯提取回收率较低,20% 乙醇乙腈和乙腈提取回收率均能达到 80% 以上,但经比较分析,20% 乙醇乙腈提取后,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,有效提取其中的待测药物。

实验过程中发现,提取液中加入适量三乙胺

可降低基质杂质的影响,但加入过多三乙胺会影响药物的回收率,因此,本方法经过向不同组织中分别添加不同量的三乙胺,最终确定合适添加量为 20 μL,但羊肝脏中需添加 50 μL,可达到较好效果(图 3)。

3.2 净化条件的优化 由于莫昔克丁具有很高的亲脂性^[17-18],同时,动物肌肉及内脏中含有丰富的脂肪,因此,本试验未选用正己烷等有机溶剂进行除脂。通过参考阿维菌素类药物净化方法的文献^[20-26],试验分别选取 HLB 柱和 C₁₈ 柱进行净

化比较。试验发现,虽然 2 种固相萃取柱回收率与稳定性均较好,但 HLB 柱过滤后的溶液杂质较多, C_{18} 柱的净化效果更好,且在去除蛋白、脂肪等杂质方面更有优势,故本方法选用 C_{18} 柱作为净化固相萃取柱。在淋洗试剂的选用上,大部分阿维菌素类药物使用异辛烷或正己烷淋洗进一步除脂^[20-25],考虑到莫昔克丁的脂溶性较强,本试验选用乙腈和 30% 乙腈水溶液活化 C_{18} 柱,并用 30% 乙腈水溶液进行淋洗,在进一步有效去除杂质的同时,保证了药物的回收率(图 4)。

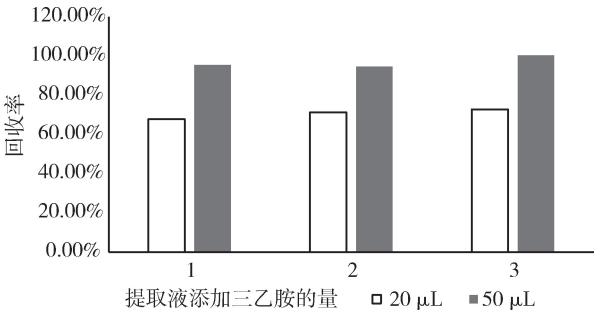


图 3 提取溶剂对回收率的影响(羊肝脏)
Fig 3 Effect of extraction solvents on the recovery of moxidectin in ovine liver

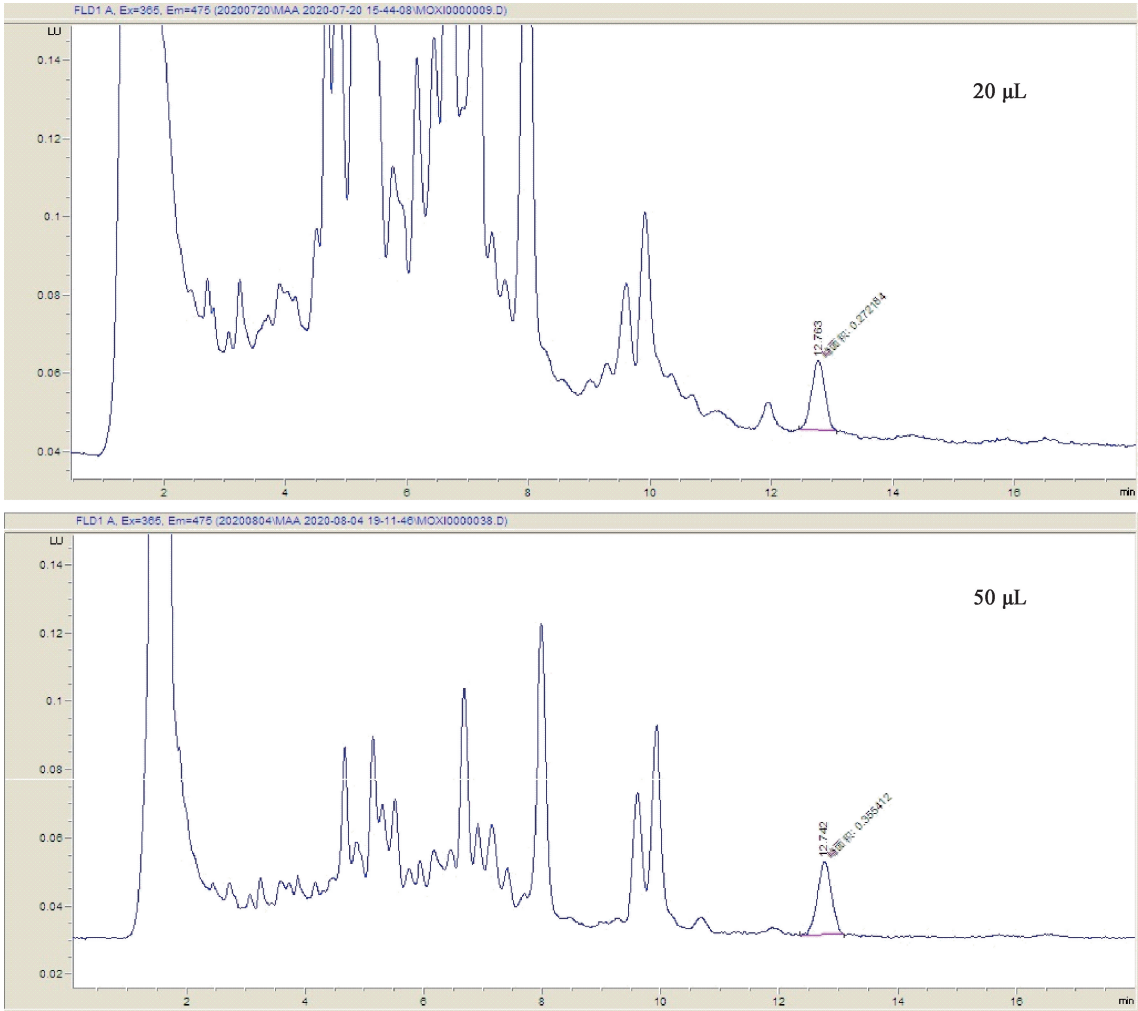


图 4 提取溶剂对杂质的影响(羊肝脏)
Fig. 4 Effect of extraction solvents on the impurity of moxidectin in ovine liver

3.3 衍生化条件的优化 阿维菌素类药物衍生化试剂的选用,普遍使用 A 液:N-甲基咪唑-乙腈

(1 + 1, V/V) 和 B 液:三氟乙酸酐-乙腈(1 + 2, V/V)^[24-26]。本试验分别对衍生化的温度、时间、光

照条件进行了摸索,发现反应若在室温下进行,则衍生化时间较长,若在加热条件下进行,衍生化速度快且充分。在反应温度和时间一定的前提下,在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。在衍生化试剂的选择上,本试验分别选用了不同品牌的试剂进行比对,试验发现,国药品牌与麦克林品牌 N-甲基咪唑均适用于本试验,且回收率结果基本一致,但分别选用国药品牌与 TCI 品牌三氟乙酸酐进行衍生化后,在检测结果信噪比相同的情况下,选用 TCI 品牌三氟乙酸酐衍生化的样品峰高明显低于国药品牌。故本试验选用国药品牌试剂,在避光、65 ℃ 条件下反应 15 min 作为衍生化条件,并将衍生产物与甲醇混合形成醇式衍生物,具有较好稳定性,4 ℃ 保存 24 h 后进样,测得药物峰面积基本不变。

3.4 组织适用性的优化 莫昔克丁为第三代阿维菌素类药物,目前文献报道中尚且没有一种方法能同时应用于多种动物组织中莫昔克丁的残留检测^[21-23]。本研究为了更好的适应我国现阶段食品安全监测工作需要,完善相应药物检测方法,利用现有检测技术手段,通过对样品的提取、净化、衍生化等条件的优化,建立了可同时适用于牛、羊的肌肉、脂肪、肝脏及肾脏样品中莫昔克丁的残留检测方法,进一步完善了我国兽药残留检测标准体系。

本试验建立了一种适用于牛、羊肌肉、肝脏、肾脏、脂肪等多种组织中莫昔克丁的高效液相色谱法。该方法操作简单、准确性好、灵敏度高、成本低,适用于莫昔克丁的分析检测。本方法的建立,进一步完善了我国兽药残留检测标准体系,为食品安全检测提供了有效技术手段。

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] 莫西菌素 (Moxidectin). 中国药物化学杂志[J]. 2019, 29(1): 81.

- Moxidectin. Chinese Journal of Medicine Chemistry[J]. 2019, 29(1): 81.
- [3] US FDA. Drug approval package: Moxidectin [EB/OL]. [2018-07-05].
<https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/drug-trials-snapshots-moxidectin>.
- [4] 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,(8)4:13-16.
Lv K Y, Li Y L, Zhou M J, *et al.* Research progress of a deworming antibiotic - Moxidectin. [J]. Veterinary Pharmaceuticals & Feed Additives, 2003, (8)4: 13-16.
- [5] 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 C Y. Advances on biological pesticide milbemycins. [J]. Pesticides, 2003, 42(4): 5-9.
- [6] Rodriguez - vivas R, Castillochab C G, Rosadoaguilar J, *et al.* 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.
- [7] 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.
- [8] Fazio L E, Streitenberger N, Galvan W R, *et al.* Efficacy and productive performance of moxidectin in feedlot calves infected with nematodes resistant to ivermectin[J]. Veterinary Parasitology, 2016, 223: 26-29.
- [9] Vadlajch 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Beeskei C, Bock F D, Illambas J, *et al.* Efficacy and safety of a novel oral isoxazoline, sarolaner (Sim - paricaTM), for the treatment of sarcoptic mange in dogs [J]. Veterinary Parasitology, 2016, 222(56): 56-61.

- [13] Regalnono A F D, Cesare A D, Traversa D, *et al.* Microfilaricidal efficacy of a single administration of Advocate in dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis*, or *Dirofilaria repens*[J]. *Veterinary Parasitology*, 2016, 226:30–34.
- [14] Nigaud C, Fang F, Fischer K, *et al.* Preclinical study of single-dose moxidectin, a new oral treatment for scabies; Efficacy, safety, and pharmacokinetic compared to two-dose ivermectin in a porcine model[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2016, 10(10): e0005030.
- [15] 韦冬妹,王先坤,唐得淋,等. 多拉菌素和莫西菌素治疗鸡体内犬蛔虫幼虫试验[A]. 中国畜牧兽医学会兽医寄生虫学会第十三次学术研讨会论文集[C]. 2015.
- Wei D M, Wang X K, Tang D L, *et al.* Test of canine larvae in chickens with doramectin and moxidectin[A]. *Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Sciences Veterinary Parasitology 13th Symposium Proceedings*[C]. 2015. (in Chinese)
- [16] 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
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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].
- [20] 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.
- Zhang R, Wang H T, Yao Y L, *et al.* Determination of 4 kinds of Avermectin residues in Edible Tissues by Pre-column derivation HPLC. [J]. *Inspection and Quarantine Science*, 2008, (4): 30–32.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 王亦琳,尹晖,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可食性组织中莫昔克丁的残留[J]. *中国兽药杂志*, 2021, 55(2):32–39.
- Wang Y L, Yin H, Ye N, *et al.* The Research of Moxidectin Residues in Cattle Edible Tissues by Liquid Chromatography – Quadruple /Linear Ion Trap Mass Spectrometry. [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2021, 55(2):32–39.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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 4 kinds of avermectin in milk by HPLC[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2010, 15(4):95–98.

(编辑:侯向辉)