

液相色谱荧光法测定水产品中伊维菌素、阿维菌素、莫能菌素、埃普里诺菌素和多拉菌素含量

徐英江¹,任传博²,刘慧慧¹,官向红¹,张秀珍^{1*},邹荣婕²,李佳蔚²,于召强²

(1. 山东省海洋水产研究所,山东 烟台 264006;2. 烟台山水海产有限公司,山东 烟台 264006)

摘要:研究了水产品中伊维菌素、阿维菌素、莫能菌素、埃普里诺菌素、多拉菌素的液液萃取-高效液相色谱分析方法。样品用异辛烷进行提取,蒸干后用正己烷溶解,再用乙腈进行反萃取净化,用N-甲基咪唑和三氟乙酸酐进行衍生,经ODS-3柱分离后液相色谱荧光检测器检测。伊维菌素、阿维菌素、莫能菌素、埃普里诺菌素、多拉菌素的检出限均能达到1.0 μg/kg。在添加1~50 μg/kg的浓度范围内,平均添加回收率为78.9%~106%,相对标准偏差为5.8%~11.2%。**[中国渔业质量与标准,2011,1(1):70~74]**

关键词:阿维菌素;水产品;液相色谱;荧光法

中图分类号:S94 文献标志码:A 文章编号:2095-1833(2011)01-0070-05

0 引言

阿维菌素类(avermectin, AVMs)是由放线菌(*Streptomyces avermitilis*)产生的一组大环内酯类抗生素。目前已商品化的有伊维菌素(ivermectin, IVM)、阿维菌素(avermectin, AVM)、多拉菌素(doramectin, DOR)、莫能菌素(Moxidectin)、伊普菌素(Eprinomectin)等。AVM是目前广泛使用的畜禽体内外抗寄生虫药。具有广谱、高效和使用安全的特点。近年来,该药也被广泛应用于水产养殖中,对鱼、虾、蟹的寄生虫防治有较好的疗效。能驱杀鱼体或鳃上寄生的中华鱲、锚头鱲、车轮虫、指环虫、线虫幼体等寄生虫。但是,AVMs作为脂溶性药物,在动物体内的残留时间较长,因此按世界卫生组织(WHO)5级分类标准,仍将其列为高毒化合物^[1~2]。随着人们对水产品质量要求越来越严格,几乎每个国家对食品中兽药残留都有相关的限量规定。因此,AVMs残留成为兽药残留研究领域重点监控对象之一,残留检测方法显得极其重要。

文献报道的阿维菌素类残留的分析方法主要有高效液相色谱法^[3~6],液相色谱-质谱检测方法(HPLC-MS)^[7],液相色谱串联质谱法(HPLC/MS/MS)^[8]等,测定的样品以动物源性食品^[9]、水果^[10]、

饲料^[11]为主,水产品阿维菌素类残留的研究报道相对较少,而且只能测定其中的一种或者几种,同时测定水产品中伊维菌素、阿维菌素、莫能菌素、埃普里诺菌素、多拉菌素的方法还未见报道。本文建立了水产品中的伊维菌素、阿维菌素、莫能菌素、埃普里诺菌素、多拉菌素的液相色谱荧光测定方法,分别对提取试剂、净化条件、衍生条件、检测和分离参数做了研究。

1 实验部分

1.1 试剂

标准品:伊维菌素、阿维菌素、莫能菌素、埃普里诺菌素、多拉菌素均购自德国Dr.公司。

氯化钠为分析纯,丙酮、异辛烷、乙腈、甲醇、正己烷、N-甲基咪唑和三氟乙酸酐为色谱纯;冰乙酸为优级纯,实验用水均为超纯水。

1.2 仪器设备

2695高效液相色谱仪,配2475荧光检测器(美国Waters公司),超纯水仪(Milli-Q Gradient, France, Millipore),高速离心机(TGL-10C,上海安亭科学仪器厂),超声波清洗器(KQ-600E,昆山市超声仪器有限公司),氮吹仪(N-EVAPTM112, USA, Organonation Associates, Inc),旋转蒸发仪(Laborota

收稿日期:2011-04-06;接收日期:2011-05-16

资助项目:海洋公益性行业科研专项经费资助项目(200805031);山东省水生动物营养与饲料泰山学者岗位资助

作者简介:徐英江(1979-),男,助理研究员,学士,研究方向为水产品质量安全。E-mail:xuyingjiang@yaeh.net

通信作者:张秀珍,研究员,主要从事水产品质量安全与标准化方向的研究。E-mail:zxz0535501@126.com

4001, Germany, Heidolph), 漩涡混合器, 垂直振荡器。

1.3 样品前处理

称取 5.00 g(精确至 0.01 g) 样品于 100 mL 离心管中, 加入 15 mL 丙酮水 1:1 混合溶液和 2.5 g 氯化钠, 摆匀, 加入 30 mL 异辛烷, 于垂直振荡器上剧烈振荡 5 min, 2 500 r/min 离心 5 min, 将上清液转移至 150 mL 梨形瓶中, 离心管中再加入 30 mL 异辛烷, 于垂直振荡器上剧烈振荡 5 min, 2 500 r/min 离心 5 min, 合并上清液至 150 mL 梨形瓶中, 38 ℃下旋转浓缩至干。

1.4 样品的净化

残留物加入 20 mL 正己烷溶解, 移入 125 mL 分液漏斗中, 加入 20 mL 正己烷饱和乙腈, 于振荡器上剧烈振荡 5 min, 静置分层, 将下层转入另一盛有 10 mL 正己烷的 125 mL 分液漏斗中, 向第 1 个分液漏斗中再加入 20 mL 正己烷饱和乙腈, 于振荡器上剧烈振荡 5 min, 静置分层, 将下层合并于第 2 个 125 mL 分液漏斗中, 并加入 10 mL 正己烷, 于振荡器上剧烈振荡 5 min, 静置分层, 将下层转入 150 mL 梨形瓶中, 38 ℃下旋转浓缩至干, 每次用 2 mL 正己烷洗涤残留物, 洗涤 2 次转移到 15 mL 离心管中, 50 ℃下氮气吹干, 向离心管中加入 100 μL N-甲基咪唑-乙腈(1:1) 和 150 μL 三氟乙酸酐-乙腈(1:2), 漩涡振荡 30 s, 加入 50 μL 冰乙酸, 盖上盖子, 漩涡振荡 5 s, 避光放置 30 min, 加入 700 μL 甲醇, 混匀, 过 0.22 μm 有机系滤膜, 70 min 后上机测定。

1.5 液相色谱条件

流动相: 93% 乙腈, 7% 水; 流速: 1.2 mL/min; 分析时间: 25 min; 进样体积 50 μL; 柱温: 40 ℃; 色谱柱 ODS-3(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。

1.6 标准溶液的制备

量取相应体积的标准工作液, 50 ℃下氮气吹干, 向离心管中加入 100 μL N-甲基咪唑-乙腈(1:1) 和 150 μL 三氟乙酸酐-乙腈(1:2), 漩涡振荡 30 s, 加入 50 μL 冰乙酸, 盖上盖子, 漩涡振荡 5 s, 避光放置 30 min, 加入 700 μL 甲醇, 混匀, 过 0.22 μm 滤膜, 70 min 后上机测定。

2 结果讨论

2.1 检测条件的确定

AVMs 的共轭二烯结构在波长 240 ~ 250 nm 处有强烈的紫外吸收。利用此特点, 可建立紫外检测法, 但在此光谱区域, 皮质激素、维生素、脂类、核酸等众多内源性物质均有较强吸收, 严重地干扰了 AVMs 的测定。因此, 关于 AVMs 的紫外测定法并不适合 AVMs 的残留分析。但衍生后荧光法检测却可弥补紫外测定方法的不足。荧光检测法使检测的选择性和灵敏度显著提高, 检测限较紫外法约低 1 ~ 2 个数量级, 可满足 AVMs 残留分析需要。

2.2 流动相的选择

试验发现无论选择甲醇或者乙腈作为流动相, 有机相的体积分数都不能低于 90%, 否则保留时间显著延长, 峰扩散。但当有机相的体积分数太高时, 峰形变差, 有机相体积分数为 93% 时为最佳。在流动相中加入 0.1% 的甲酸, 能有效消除峰形拖尾现象, 并且响应值也大幅提高。本研究最终确定流动相为乙腈 - 0.1% 甲酸水溶液(V/V, 93:7), 流速为 1.2 mL/min, 既能实现 5 种药物的良好分离, 又缩短了分析时间(见图 1)。

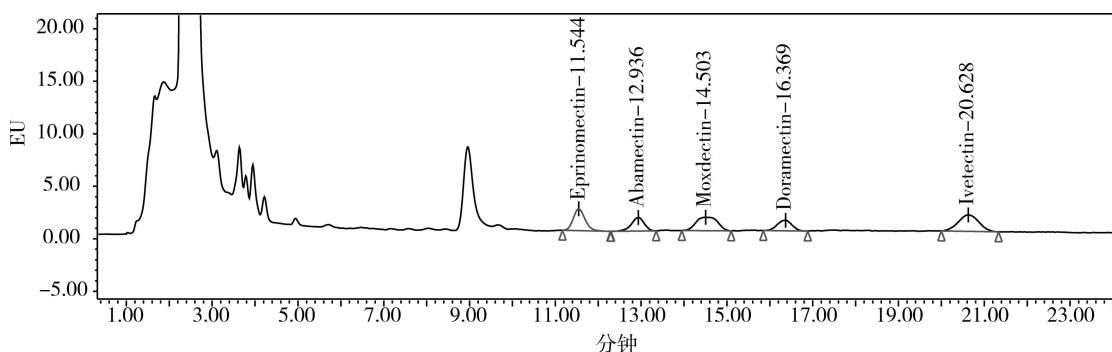


图 1 标准溶液色谱图(伊维菌素、阿维菌素、莫能菌素、埃普里诺菌素、多拉菌素均为 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Fig. 1 Standard solution Chromatography of 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ of ivermectin , avermectin , moxidectin , eprinomectin and doramectin.

2.3 净化条件的选择

本方法采用的是正己烷净化除脂,但是在净化时发现莫能菌素损失较多。因为莫能菌素脂溶性较强,正己烷对其有一定的溶解。经分配比试验发现其在正己烷中的分配比(正己烷:乙腈=1:1)为15%左右,因此本实验在操作中采用两次乙腈饱和正己烷反萃取。在用10 mL正己烷再次净化时由于乙腈量比较大,莫能菌素的损失也就很少。

2.4 衍生条件的选择

(1) 光照的影响:光照对衍生化反应有抑制作用,光强越大,抑制作用越明显,因此衍生反应需避光进行。

(2) 衍生反应中水和醇类的影响:AVMs的衍生反应产物是一个含4,2-三氟乙酰基的荧光衍生物(酯式),当它碰到水或醇类羟基物质时极不稳定。酯键易发生断裂,从而转化为稳定的醇式结构。这2种结构在荧光检测器上均有响应,其中醇式结构产物的保留时间更短,出峰时间早。数据处理时只需对醇式结构产物进行分析即可准确对AVMs定量。

(3) 乙酸^[12-13]对衍生的影响:在只加入衍生化试剂进行衍生时,莫能菌素衍生效果不稳定,埃普里诺菌素达到稳定需7 h以上,且峰面积只有阿维菌素

的一半,本研究在衍生时通过加入乙酸来改善衍生效果,发现随着乙酸量的加大,埃普里诺菌素响应值增大。最终根据实验结果确定采用50 μL冰乙酸,避光衍生30 min,然后静置70 min。

2.5 定容液的选择及衍生物的稳定性

实验发现甲醇作为定容液可以使衍生物更稳定,而用乙腈作为定溶液则会导致埃普里诺菌素和莫能菌素在荧光检测器上没有响应。原因可能是甲醇可以使衍生物转换为稳定的醇式结构而乙腈不能。另外,通过实验考察了醇式结构产物的稳定性,实验发现其在常温下12 h内稳定,放置时间超过12 h时,其峰值显著下降,而在4 °C时保存24 h内没有出现降解现象。所以样品经衍生化反应后应尽快上机测定,不能立即进行测定时,应放在4 °C冰箱中避光保存。

2.6 线性范围和检出限

配制浓度为0.5、1.0、2.0、4.0、8.0和10.0 μg/L的阿维菌素类标准溶液,按照本研究的仪器条件,得到阿维菌素类浓度(X)与峰面积(Y)之间的线性关系,相关系数r均大于0.99。分别在空白样品中添加阿维菌素类药物,按信噪比大于3计算其检出限,按信噪比大于10计算定量限。线性方程和检出限见表1。

表1 5种阿维菌素类药物线性方程、相关系数、检出限及定量限

Tab. 1 The linear equations, regression coefficients of the standard curves and the limits of detection and quantification of the five AVMs.

化合物名称	线性方程	相关系数	检出限/(μg·kg ⁻¹)	定量限/(μg·kg ⁻¹)
Eprinomectin	$Y = 1134.37053X - 2.42589$	0.998	1	5
Abamectin	$Y = 1270.39287X - 3.40879$	0.998	1	5
Moxidectin	$Y = 1570.74425X - 1.185$	0.999	1	5
Doramectin	$Y = 1185.66253X - 2.31359$	0.998	1	5
Ivemectin	$Y = 1164.04251X - 2.47663$	0.998	1	5

2.6 方法回收率和变异系数

本文以鲫鱼为研究对象,研究了方法的回收率和精密度。在空白样品中添加3个不同浓度的阿维菌素类药物标准溶液,按照本研究的方法步骤进行回收

率试验,同时每个浓度的实验重复6次,计算回收率和精密度,结果表明在添加1~50 μg/kg的浓度范围内,平均回收率为78.9%~106%,相对标准偏差为5.8%~11.2%,见表2。

表2 方法的加标回收率、相对标准偏差
Tab. 2 Spiked recoveries, relative standard deviations of AVMs (n=6)

化合物名称	加标量/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	平均回收率/%	相对标准偏差/%
Eprinomectin	5	99.8	8.9
	10	91.2	8.1
	50	106.0	6.1
Abamectin	5	93.2	9.9
	10	97.3	9.4
	50	102.0	6.2
Moxidectin	5	91.0	8.0
	10	96.0	7.4
	50	96.7	7.2
Doramectin	5	86.5	9.4
	10	78.9	6.6
	50	102.0	6.6
Ivomectin	5	92.5	7.5
	10	97.7	6.2
	50	98.7	5.8

3 结 论

本实验建立了采用高效液相色谱检测水产品中阿维菌素类药物的方法,该方法的检测下限为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$,回收率和精密度符合要求,可以满足我国和国外对水产品中阿维菌素残留检测需求;同时方法简便、容易操作、成本低、适用于日常检测。

参考文献:

- [1] Egertou J E. Avermectins, a new family of potent antelminthic agents: efficacy of the Blacompent [J]. Antimicrob Agents Chernother, 1979, 15: 372–378.
- [2] Takahashi Y, Matsumoto A, Seino A, et al. Streptomyces avermectinii sp. nov. an avermectin producing strain [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2002, 52 (6): 2163–2168.
- [3] Reuvers T, Diaz R, De Pozuelo M M, et al. Rapid screening method for ivermectin residue detection in cattle muscle and liver by liquid chromatography with UV detection [J]. Anal Chim Acta, 1993, 275: 353–358.
- [4] Bernal J L, Del Nozal M J, Salas M, et al. HPLC determination of residual ivermectin in cattle dung following subcutaneous injection [J]. Liq Chromatogr, 1994, 17 (11): 2429–2444.
- [5] 卢平, 古丽曼, 宫秀杰, 等. 伊维菌素在牛奶山羊奶中的残留量[J]. 动物医学进展, 2002, 23(6): 104–105.
- [6] 高国文. 高效液相色谱法检测大白菜中阿维菌素残留量[J]. 农业科学与管理, 2005, 26(11): 8.
- [7] Howells L, Sauer M J. Multi – residue analysis of avermectins and moxidectin by ion – trap LC – MSⁿ [J]. Analyst, 2001, 126: 155–160.
- [8] Sheridan R, Desjardins L. Determination of abamectin, doramectin, emamectin, Eprinomectin and moxidectin in milk by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry [J]. J AOAC Int, 2006, 89 (4): 1088–1094.
- [9] 赵东豪, 贺利民, 聂建荣, 等. 猪肉组织中阿维菌素类药物残留的高效液相色谱 – 串联质谱法测定 [J]. 分析测试学报, 2008, 27(8): 862–865.
- [10] 谢显传, 张少华, 王冬生, 等. 柱前衍生高效液相色谱法测定果蔬产品阿维菌素及其有毒代谢物的残留量 [J]. 中国农业科学, 2005, 38(11): 2254–2260.
- [11] 程林丽, 沈建忠, 张素霞, 等. 液相色谱 – 质谱法测定饲料中阿维菌素类药物 [J]. 分析试验室, 2009, 28 (8): 101–103.
- [12] 农业部781号公告. 动物源性食品中阿维菌素类药物残留量的测定高效液相色谱法[S]. 2006.
- [13] 程传民, 冯娅. 高效液相色谱法测定动物源食品中阿维菌素类药物残留量 [J]. 饲料工业, 2009, 30(20): 54–55.

Determination of residual ivermectin, avermectin, moxdectin, eprinomectin and doramectin in aquatic products using HPLC with fluorescence detection

XU Yingjiang¹, REN Chuanbo², LIU Huihui¹, GONG Xianghong¹, ZHANG Xiuzhen^{1*}, ZOU Rongjie², LI Jiawei², YU Zhaoqiang²

(1. Marine Fisheries Research Institute of Shandong Province, Yantai, 264006, China;
2. Yantai Shanshui Seafood Co. Ltd., Yantai, 264006, China)

Abstract: A method using high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection was employed for the simultaneous determination of the ivermectin, avermectin, moxdectin, eprinomectin and doramectin in aquatic products. Samples were extracted with isoctane, dissolved with hexane after concentration, re-extracted with acetonitrile and then derivatised with N-methylimidazole and trifluoroacetic anhydride. The target compounds were separated in ODS - 3 chromatographic column and detected by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. The limit of detection of the five compounds is 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The average recoveries were between 78.9% – 106% with relative standard deviation (RSD) 5.8% – 11.2% in the spiked concentration range of 1 – 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. [Chinese Fishery Quality and standards, 2011, 1(1):70 – 74]

Key words: avermectins (AVMs); aquatic products; HPLC; fluorescence detection

Corresponding author: ZHANG Xiuzhen. E-mail: zxz0535501@126.com