工作简报

柱前衍生-高效液相色谱法测定牛筋中阿维菌素和伊维菌素

贾 方[1]，杨 霖[1]，孙 雷[1]，孙宝山[1]，周海鹏[1]，刘 颖[2]
(1. 沧州出入境检验检疫局，沧州 061001； 2. 沧州医学高等专科学校，沧州 061001)

摘 要：牛筋样品经乙腈提取，用 C_{18} 固相萃取柱净化，净化液经 N-甲基咪唑和三氟乙酸酐的乙腈溶液在室温下进行衍生化，所得阿维菌素和伊维菌素衍生物用高效液相色谱法分析。选用 C_{18} 色谱柱(4.6 mm×150 mm，5 μm)为固定相，以乙腈-水(97+3)溶液为流动相进行淋洗，于激发波长 365 nm 和发射波长 470 nm 处进行荧光检测。阿维菌素和伊维菌素衍生物的色谱峰面积与其质量分数分别在 5～100 ng·g^{-1} 和 10～100 ng·g^{-1} 范围内具有线性关系，检出限($3S/N$)分别为 2.5 ng·g^{-1} 和 4.0 ng·g^{-1}。在 3 个浓度水平下做加标回收试验，所得阿维菌素和伊维菌素的回收率在 81.6%～101.0% 和 101.5%～102.4% 之间，相对标准偏差(n=6)均不大于 2.0%。

关键词：阿维菌素；伊维菌素；柱前衍生；高效液相色谱法；牛筋
中图分类号：O652.63 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-4020(2011)11-1302-03

HPLC Determination of Avermectin and Ivermectin in Beef Tendon with Precolumn Derivatization

JIA Fang[1], YANG Lin[1], SUN Lei[1], SUN Bao-shan[1], ZHOU Hai-peng[1], LIU Ying[2]
(1. *Cangzhou Entry-Exit Iinspection and Quarantine Bureau*, *Cangzhou* 061001, *China*;
2. *Cangzhou Medical College*, *Cangzhou* 061001, *China*)

Abstract: The sample of beef tendon was extracted with acetonitrile, and the extract obtained was purified by passing through C_{18} SPE column. The purified solution was derivatized with N-methylimidazole and trifluoroacetic anhydride (dissolved in acetonitrile) at room temperature. The derivatized product of avermectin (AVM) and ivermectin (IVM) was used for HPLC determination with fluorescence detection using C_{18} chromatographic column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) as stationary phase and mixtures of acetonitrile and H_2O(97+3) as mobile phase. Linear relationships were found between values of fluorescence intensity and mass fraction of AVM in the range of 5－100 ng·g^{-1} and IVM 10－100 ng·g^{-1} as measured at wavelengths of 365 nm (λ_{ex}) and 470 nm (λ_{em}). Values of detection limit ($3S/N$) of AVM and IVM found were 2.5 ng·g^{-1} and 4.0 ng·g^{-1} respectively. Tests for recovery were performed by standard addition method at 3 concentration levels for 6 parallel determinations; results of recovery found were in the range of 81.6%－101.0% for AVM and 101.5%－102.4% for IVM, with RSD′s ≤2.0%.

Keywords: Avermectin; Ivermectin; Precolumn derivatization; HPLC; Beef tendon

阿维菌素类(AVMs)抗寄生虫药，活性极强，对多种家畜，具有广谱、高效、安全等优点，其中阿维菌素(AVM)、伊维菌素(IVM)应用最为广泛。但阿维菌素类抗寄生虫药属高毒化合物，在动物体内残效时期长，长期用药易导致其在动物体内中残留，已引起广泛关注，目前高效液相色谱法已用于测定鱼、

收稿日期：2010-11-05
作者简介：贾 方(1980－)，男，河北沧州人，硕士，从事食品安全检测与研究工作。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

兔、猪肉等组织中阿维菌素和伊维菌素的含量[1-6]。本工作采用柱前衍生-高效液相色谱,荧光检测器同时测定牛筋中阿维菌素、伊维菌素残留量,分离效果理想。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪,配有荧光检测器;IKA-T10 均质器;EVOR 50 氮吹仪,Waters C_{18} 固相萃取柱(500 mg/3 mL)。

阿维菌素、伊维菌素标准溶液:将 100 mg·L^{-1} 阿维菌素和伊维菌素标准储备溶液,用乙腈配制成 2 mg·L^{-1} 标准使用溶液。

条件化试剂:乙腈-水-三乙胺(30+70+1)混合溶液。

衍生化试剂 1:三氟乙酸酐-乙腈(1+2)混合溶液;衍生化试剂 2:N-甲基咪唑-乙腈(1+1)混合溶液。

乙腈为色谱纯;无水硫酸钠为分析纯,经 600 ℃灼烧 4 h,放置于密封容器中备用。

1.2 色谱条件

C_{18} 液相色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm),柱温为 40 ℃,流量 1.0 mL·min^{-1},流动相为乙腈-水(97+3)溶液,激发波长(λ_{ex}) 365 nm,发射波长(λ_{em}) 470 nm。

1.3 试验方法

称取牛筋试样(5±0.05) g 置于 50 mL 塑料离心管中,加入乙腈 15 mL,以 10 000 r·min^{-1} 转速均质 1 min,再以 3 000 r·min^{-1} 转速离心 5 min,将上清液置于另一离心管中。向提取液中加入三乙胺 0.5 mL,加入纯水至总体积约为 50 mL,确保水与提取液比例不小于 3∶2,否则待测物不能被吸附剂充分保留。

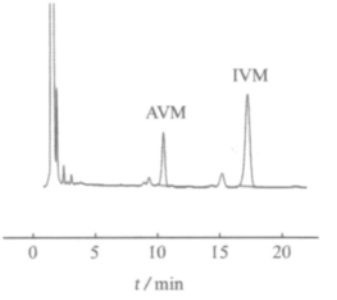
C_{18} 固相萃取柱依次以 5 mL 乙腈和 5 mL 条件化试剂进行条件化,并在吸附剂上方保持约 1 mm 厚的液层以保证吸附剂的润湿。在固相萃取柱上方加装储液器,将样品提取液加入储液器,抽真空,提取液完全通过固相萃取柱后,继续保持抽真空状态大约 30 min。以 5 mL 乙腈淋洗固相萃取柱,收集洗脱液。

将洗脱液在 50 ℃下氮吹至干,分别加入 300 μL衍生化试剂 1 和 200 μL 衍生化试剂 2,涡旋均匀后室温反应 20 min,以乙腈定容至 1 mL,按色谱条件进行测定。

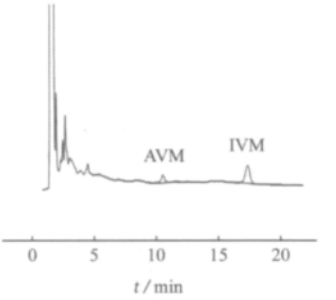
2 结果与讨论

2.1 色谱行为

在色谱条件下,阿维菌素和伊维菌素衍生化产物的保留时间分别为 10.5,17.2 min,标准品和加标牛筋样品的色谱图见图 1。



(a) 阿维菌素和伊维菌素标准溶液



(b) 加标空白样品

图 1 阿维菌素和伊维菌素标准和加标空白样品色谱图

Fig. 1 Chromatograms of mixed standard solution of AVM and IVM (a), and blank sample with addition of mixed standard (b)

由图 1 可见:阿维菌素和伊维菌素目标峰不受杂质及试剂的干扰,分离效果良好。

2.2 标准曲线和检出限

分别移取 2 mg·L^{-1} 阿维菌素标准溶液 25,50,100,200,400,500 μL,2 mg·L^{-1} 伊维菌素标准溶液 50,100,150,200,400,500 μL,置于 10 mL 玻璃离心管中,分别加入 300 μL 衍生化试剂 1 和 200 μL衍生化试剂 2,涡旋均匀后室温反应 20 min,以乙腈定容至 1 mL,按色谱条件对混合标准溶液系列进行测定。

称取空白牛筋组织(10±0.05) g,做 10 个平行样品,按标准溶液系列的方法进行衍生处理,以 3 倍信噪比计算检出限,以 10 倍信噪比计算测定下限,结果见表 1。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 线性参数、检出限和测定下限

Tab. 1 Linearity parameters, detection limits and lower limits of determination

药物	线性范围 $w/(ng \cdot g^{-1})$	线性回归方程	相关系数	检出限 $w/(ng \cdot g^{-1})$	测定下限 $w/(ng \cdot g^{-1})$
阿维菌素	5～100	$y=1\ 547.35\ x+0.59$	0.999 9	2.5	5.0
伊维菌素	10～100	$y=1\ 915.42\ x+0.52$	0.999 8	4.0	10.0

2.3 样品分析

在牛筋空白样品中分别加入不同量的阿维菌素、伊维菌素标准溶液,按试验方法经提取、净化、衍生后,按色谱条件进行测定,结果见表 2。

表 2 回收率及精密度试验结果($n=6$)

Tab. 2 Results of tests for recovery and precision

药物	标准加入量 $w/(ng \cdot g^{-1})$	回收量 $w/(ng \cdot g^{-1})$	回收率 /%	RSD /%
阿维菌素	5.0	4.08	81.6	1.8
	10.0	9.17	91.7	1.7
	50.0	50.52	101.0	2.0
伊维菌素	10.0	10.23	102.3	2.0
	20.0	20.49	102.4	1.9
	50.0	50.76	101.5	1.8

按试验方法对 15 批次出口牛筋串进行测定,并用 GB/T 21320－2007 液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)进行筛查检测,在第四、七批次样品中检出阿维菌素和伊维菌素,对比结果见表 3。

表 3 样品分析结果

Tab. 3 Analytical results of samples

样品批次	本法测定值 $w/(\mu g \cdot g^{-1})$		LC-MS/MS 测定值 $w/(\mu g \cdot g^{-1})$	
	阿维菌素	伊维菌素	阿维菌素	伊维菌素
4	0.07	—	0.08	—
7	—	0.12	—	0.11

由实际样品分析结果可知:阴性样品、阳性样品检测结果分布一致,阳性样品检出量相近,因此采用本法测定阿维菌素、伊维菌素结果可靠,可以用于日常检测。

参考文献:

[1] 陈静,罗永煌,付利芝. HPLC 检测草鱼组织中阿维菌素和伊维菌素的多残留[J]. 中国兽药杂志, 2009,43(12):17-20.

[2] 邢丽红,冷凯良,翟毓秀,等. 鲈鱼组织中阿维菌素、伊维菌素残留的高效液相色谱荧光检测法研究[J]. 海洋水产研究, 2008,4(29):53-57.

[3] HOU Xiao-lin, WU Yong-nin, SHEN Jian-zhong, et al. Multi-residue analysis of avermectins in bovine liver and muscle by liquid chromatography-fluorescence detector[J]. Chromatographia, 2007,65:77-80.

[4] 莫云,朱蓓蓄. 兔组织中阿维菌素残留的高效液相色谱法侧定研究[J]. 畜牧兽医学报, 1999,30(5):438-443.

[5] 王蓓,商军,华贤辉,等. 高效液相色谱法测定赛鸽用复方吡喹酮胶囊中吡喹酮和伊维菌素的含量[J]. 中国兽药杂志, 2005,39(9):16-18.

[6] 武志雄,胡江涛,郑卫东. 猪肉组织中阿维菌素、伊维菌素残留的高效液相色谱-串联质谱法研究[J]. 四川大学学报:医学版, 2010,41(3):523-526.

(上接第 1301 页)

参考文献:

[1] 岩石矿物分析. 岩石矿物分析[M]. 北京:地质出版社, 1991:540.

[2] GB/T 14352.2－1993 硫氰酸盐光度法测定钼量[S].

[3] GB/T 14352.3－1993 火焰原子吸收法测定铜量[S].

[4] 李建,张秋萍. 电感耦合等离子体发射光谱法测定粉丝中铝[J]. 理化检验-化学分册, 2005,41(12):917-918.

[5] 万益娟. ICP-AES 法同时测定阴极铜中杂质元素[J]. 理化检验-化学分册, 2006,42(6):481.

[6] 万益娟,朱亮. ICP-AES 法同时测定烧结矿中 CaO、MgO、SiO_2、Al_2O_3、MnO 和 P[J]. 理化检验-化学分册, 2006,42(7):577-578.

[7] 石景燕. 电感耦合等离子体发射光谱法测定电厂煤灰中常量元素[J]. 理化检验-化学分册, 2007,43(10):861-862.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net