

液相色谱法测定猪组织中阿维菌素类药物残留量

王海,刘素英,单吉浩,吴银良

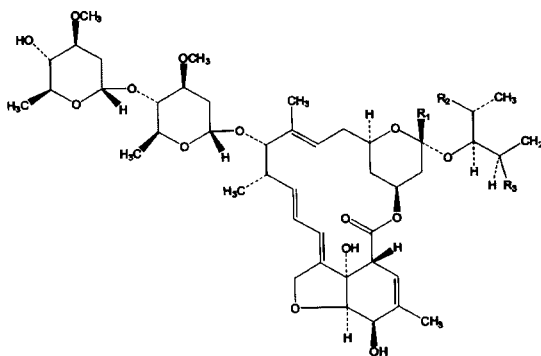
(农业部畜禽产品质量监督检验测试中心,北京 100026)

[收稿日期] 2004-12-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2005)09-0012-04 [中图分类号] S859.84

[摘要] 动物组织中残留的阿维菌素、依维菌素和多拉菌素经乙腈提取,碱性氧化铝固相萃取柱净化后,与荧光衍生化试剂反应,产物用高效液相色谱(荧光检测器)进行检测,实现了阿维菌素类药物的残留分析。本方法在猪组织中测定阿维菌素类药物的检测限为 1 μg/kg,在猪组织中添加浓度为 1、2、5 μg/kg时的回收率为 55% ~ 75%。

[关键词] 高效液相色谱;阿维菌素;荧光;残留

阿维菌素类药物是有效的抗寄生虫药,目前已商品化的有阿维菌素(Avemectin B₁,AVM或Abamectin)、伊维菌素(Ivemectin,IM)、多拉菌素(doramectin,DRM)和Eprinomectin等。阿维菌素和伊维菌素的化学结构见图1。



- Abamectin B_{1a}: R₁R₂ = -CH=CH- R₃ = -C₂H₅
- Abamectin B_{1b}: R₁R₂ = -CH=CH- R₃ = -CH₃
- Ivemectin B_{1a}: R₁R₂ = -CH₂-CH₂- R₃ = -C₂H₅
- Ivemectin B_{1b}: R₁R₂ = -CH₂-CH₂- R₃ = -CH₃

图1 阿维菌素类药物的化学结构

阿维菌素由阿维菌素 B_{1a} (80%) 和阿维菌素 B_{1b} (<20%) 组成,伊维菌素由 22,23-二氢阿维菌素 B_{1a} (80%) 和 22,23-二羟基阿维菌素 B_{1b} (<20%) 组成,规定的残留检测标识物分别为

阿维菌素 B_{1a} 和 22,23-二氢阿维菌素 B_{1a}^[1]。其中伊维菌素更具有广谱、高效、低毒的特点,对体内外寄生虫特别是线虫和节肢动物均有良好的驱杀作用。自1976年问世以来,引起化学、医学和农业等多方面的广泛关注,被誉为寄生虫药物研究的重大突破。阿维菌素类药物已成为当前我国最常用的抗寄生虫药物之一。

药代动力学数据表明,阿维菌素和伊维菌素在动物体内残留的时间较长,属于毒性较大、休药期长的药物,在使用不当的情况下,动物组织中残留的过量阿维菌素类药物会对人体健康造成严重危害。目前国内虽然已有伊维菌素残留的液相色谱分析方法标准,但其余几种已商品化的阿维菌素类药物如阿维菌素、多拉菌素等均没有检测方法标准,无法满足残留监控的要求。当前已有的分析方法主要是以荧光衍生化检测为基础的高效液相色谱法^[2-4],Li等^[5]报道了以免疫亲和色谱柱分离、纯化和HPLC仪器测定绵羊血清中伊维菌素的残留。本文研究的方法克服了原有标准方法^[6]衍生化反应产物稳定性较差,脂肪样品净化困难等问题。该方法适用于猪组织中阿维菌素、依维菌素和多拉菌素的残留分析。

1 材料和方法

1.1 色谱仪及色谱条件 高效液相色谱(HPLC)系统 Waters2690,配 Waters 474荧光检测器。色谱

基金项目:国家科技攻关项目(2002BA906A75)

作者简介:王海(1972年~),男,硕士,工程师,分析化学专业。

柱为 Nova-Pak C₁₈柱 (150 mm × 3.9 mm, 4.6 μm); 流动相采用甲醇-水, 体积比为 92:8; 柱温 25℃; 流速 1.0 mL/min; 进样 50 μL; 激发波长 365 nm, 发射波长 475 nm。

1.2 试剂和材料 阿维菌素标准品 (阿维菌素 B_{1a})、伊维菌素标准品 (22, 23-二氢阿维菌素 B_{1a}) 和多拉菌素标准品, 纯度均 99%, 购于美国 Sigma 公司, 用甲醇配制成含 3 种阿维菌素类药物, 且每种药物浓度均为 1 000 mg/L 的混合标准储备液, 有效期 1 个月。甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。N-甲基咪唑-乙腈溶液由 N-甲基咪唑和乙腈以 1:1 (V/V) 混合; 三氟乙酸酐-乙腈溶液由三氟乙酸酐和乙腈以 1:2 (V/V) 混合。固相萃取柱为 Sep-pak Alumina B, 2 g/12 mL, 美国 Waters 公司。

1.3 样品处理

1.3.1 提取 准确称取 (2.00 ± 0.05) g 组织样品匀浆物 (10 000 r/min 匀浆 1 min), 置于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入 6.0 mL 乙腈, 涡旋混合 1 min, 7 000 r/min 离心 5 min, 上清液即为样品提取液。

1.3.2 净化 将固相萃取柱用 4 mL 乙腈预洗, 取样品提取液过柱, 自然流出, 收集于 10 mL 具塞试管中, 再用 3 mL 乙腈洗涤固相萃取柱, 同样收集于 10 mL 具塞试管中。

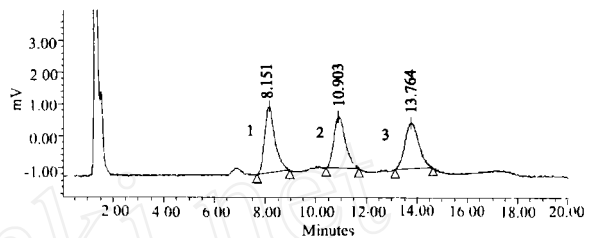
1.3.3 衍生化 将试管中的溶液在 50℃ 下用氮气吹干, 残存的微量水分于 50℃ 烘箱中烘烤 15~20 min。向试管中加入 100 μL N-甲基咪唑-乙腈溶液, 涡旋混合 30 s 后加入 150 μL 三氟乙酸酐-乙腈溶液, 试管内立即出现白雾并放热, 立即将试管塞住, 轻轻振荡, 30 s 后加入 750 μL 甲醇, 静置 15 min 后将溶液转移至 1 mL 进样管中供分析。

1.4 标准曲线 准确移取适量阿维菌素类药物标准工作液于 4 支 1 mL 进样管中, 分别配制成终浓度为 2.5、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0、600.0 μg/L 的溶液, 按照 1.3.3 项下方法进行衍生化后分析。

2 结果和讨论

2.1 色谱分离 在 1.1 项色谱条件下, 分析得到标准溶液、空白猪肝和空白猪肝添加药物样品处理液的色谱图, 见图 1~图 4。从图 1 可知, 在所采用的色谱条件下, 分析物可以得到很好的分离, 未发现杂质峰的干扰。

2.2 标准曲线 阿维菌素在 2.5~600 μg/L 浓度范围内的线性方程为 $y = 2.33 \times 10^{-3} x - 2.84 \times 10^{-3}$, 相关系数 $R^2 = 0.9994$; 依维菌素在 2.5~600 μg/L 浓度范围内的线性方程为 $y = 2.45 \times 10^{-3} x - 2.45 \times 10^{-3}$, 相关系数 $R^2 = 0.9998$; 多拉菌素在 2.5~600 μg/L 浓度范围内的线性方程为 $y = 2.59 \times 10^{-3} x - 2.13 \times 10^{-3}$, 相关系数 $R^2 = 0.9997$ 。显示线性关系良好。



1、阿维菌素; 2、多拉菌素; 3、依维菌素

图 1 阿维菌素类药物标准品色谱图 (25 μg/kg)

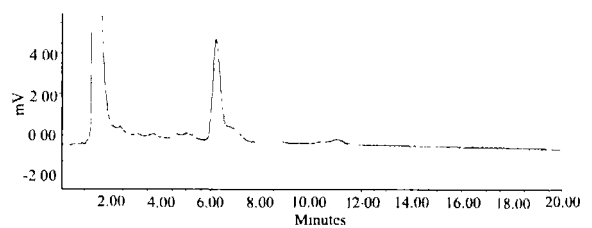
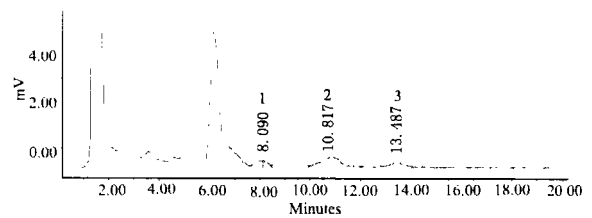
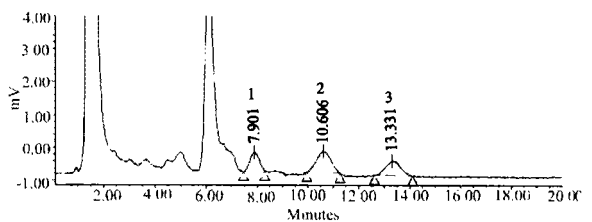


图 2 空白猪肝样品色谱图



1、阿维菌素; 2、多拉菌素; 3、依维菌素

图 3 空白猪肝添加药物样品色谱图 (添加浓度均为 1 μg/kg)



1、阿维菌素; 2、多拉菌素; 3、依维菌素

图 4 空白猪肝添加药物样品色谱图 (添加浓度均为 5 μg/kg)

2.3 方法的检出限、定量限、回收率 通过对猪的肝、肌肉、脂肪、肾脏等空白组织中添加标准溶

液的方法,在相同样品处理步骤下对阿维菌素、伊维菌素和多拉菌素进行了添加回收率实验,每种药物 3 个添加浓度,在每一个添加水平上重复 4 次实验,每次 5 个平行,实验结果见表 1。按信噪

比 $S/N = 3$, 计算 3 种阿维菌素类药物的检出限为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$,在各浓度点回收率均在 55%~75% 范围内。本方法的批内相对标准差在 5%~12% 范围之内,批间相对标准差在 7%~17% 范围之内。

表 1 阿维菌素、多拉菌素和依维菌素在猪组织中的添加回收率

化合物	添加浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	回收率 / %			
		肌肉	肝脏	肾脏	皮下组织
阿维菌素	1	61.21 \pm 8.33	58.27 \pm 12.87	56.77 \pm 13.01	61.61 \pm 11.18
	2	68.83 \pm 6.78	62.78 \pm 12.03	62.59 \pm 11.11	65.29 \pm 12.02
	5	70.19 \pm 6.90	75.59 \pm 7.33	68.97 \pm 11.20	80.79 \pm 9.35
多拉菌素	1	59.30 \pm 10.83	61.69 \pm 11.56	58.33 \pm 9.02	63.41 \pm 9.33
	2	60.62 \pm 9.06	65.18 \pm 12.01	58.95 \pm 10.95	65.00 \pm 10.07
	5	72.87 \pm 8.51	75.62 \pm 8.90	70.06 \pm 7.96	75.95 \pm 8.36
依维菌素	1	58.23 \pm 11.05	62.51 \pm 11.99	56.87 \pm 16.33	63.65 \pm 16.39
	2	61.10 \pm 10.67	64.91 \pm 9.76	62.09 \pm 12.56	68.88 \pm 10.05
	5	66.88 \pm 8.89	77.66 \pm 9.33	68.59 \pm 10.80	71.58 \pm 9.96

2.4 讨论 提取溶剂采用乙腈和甲醇均能定量萃取 3 种阿维菌素类药物,但乙腈能更有效地沉淀蛋白,减少杂质干扰。

碱性氧化铝小柱与 C_{18} 小柱相比,能更有效地净化富含脂肪的动物组织样品,降低非极性杂质对测定结果的影响。本方法采用提取液直接通过碱性氧化铝小柱的方式进行净化,操作简单。

衍生化试剂三氟乙酸酐具有强烈的吸水性,为了降低衍生化反应中残留水分的影响,在开始反应之前,用烘烤去除样品中残留的水分有利于提高衍生化效率。此外,衍生化试剂不稳定,为保证实验的可靠性,应当在每次试验前新配。

原有标准方法^[6]存在衍生反应产物不稳定的问题,一般情况下在 3 h 后即可观察到明显降解,在衍生化反应结束后,加入一定量的甲醇,能够有效地抑制衍生化产物的降解,显著提高产物的稳定性,根据实验观察,加入甲醇的衍生化产物能稳定至少 24 h 以上。

3 结论

该方法操作简单,灵敏度高,经添加回收率实验表明,该分析方法的检测限、回收率、重复性和线

性范围均能满足现行兽药残留分析的要求。适用于猪组织中 3 种阿维菌素类药物的多残留分析。

参考文献:

- [1] 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]. 2002.
- [2] Danaher M, O'Keefe M, Glennon JD. Extraction and isolation of avermectins and milbemycin from liver samples using unmodified supercritical CO_2 with in-line trapping on basic alumina [J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001, 761(1): 115 - 123.
- [3] Payne LD, Hicks MB, Wehner TA. Determination of abamectin and/or ivermectin in cattle feces at low parts per billion levels using HPLC with fluorescence detection [J]. J Agric Food Chem, 1995, 43(5): 1233 - 1237.
- [4] Schenck FJ, Lagan LH. Multiresidue determination of abamectin, doramectin, ivermectin, and moxidectin in milk using liquid chromatography and fluorescence detection [J]. J AOAC Int, 1999, 82(6): 1340 - 1344.
- [5] Li J, Qian C. Determination of avermectin B₁ in biological samples immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography with UV detection [J]. J AOAC Int, 1996, 79(5): 1062 - 1067.
- [6] NY5029 - 2001. 无公害食品猪肉 [S]

Detemination of avermectin residues in swine tissue by HPLC

WANG Hai, LU Su-ying, SHAN Ji-hao, WU Yin-liang

(Quality Control and Inspection Center for Domestic Animal Products of MOA, Beijing 100026; China)

Abstract: A multi-residue analytical method has been developed for the quantitative determination of avermectin

(AVM), ivermectin (IVM) and doramectin (DRM) in swine tissue samples. The samples are extracted with acetonitrile, followed by clean-up on a alumina column, extracts are derivatized and determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection. Recoveries ranged from 55% to 75% for swine tissue samples fortified with avermectins ranged from 1 ~ 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The limit of detection is 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Key words: solid phase extraction; high performance liquid chromatography (HPLC); avermectins; residue; swine tissue

我国农产品质量安全分析及监管对策

农产品安全问题主要表现在以下几个方面:一是食用产品质量不高,二是专用产品不足,三是卫生安全状况不理想,四是农产品中掺杂兑假,甚至掺进有害物质,影响农产品品质和人身健康。

造成这些质量安全问题有以下六个原因:一是产地环境受到污染;二是高毒、剧毒农药过量使用,造成农药残留超标;三是氮素化肥使用比例偏高,土壤中易生成亚硝酸盐积累,影响农产品的品质;四是兽药、饲料添加剂、消毒剂等使用不当,造成肉类、水产品中含有有害成分;五是缺乏严格的生产技术标准、检验检测制度和监督机制,致使不合格的农产品进入市场;六是缺乏社会诚信,一些生产者和经营者不按规定进行生产和经营,只图经济利益,不顾消费者的身体健康,影响农产品的质量和品质。

农产品质量安全水平和管理水平是现代农业发展的重要内容和主要标志。解决农产品质量安全问题,必须对“从农田到餐桌”全过程各个环节进行全面的监管。

第一,建立农业标准体系,实行全方位监管。制定农业标准化发展规划,科学确定农业标准的制订原则和依据,逐步实现我国农业标准体系和标准管理体系与国际惯例接轨;加快制订和完善农产品质量标准,重点突出优势农产品质量标准制订,不断完善农产品质量标准;强化农产品质量标准的实施和推广;加强农产品质量监督和管理,尤其要加强对农产品中有毒有害物质的监测,确保农产品消费安全;加强国际农产品质量标准研究,以适应农业国际化发展的需要。

第二,加强生产管理,强化源头监管。净化产地环境,严格控制工业“三废”和城市生活垃圾对农业生态环境的污染;严格农产品投入品管理,按照国家法律法规,建立农业投入品禁用、限用公告制度;推行标准化生产;加大无公害农产品生产技术和规范的实施力度,指导农产品生产者、经营者严格按照标准化组织生产和加工;提高农产品生产经营组织化程度,积极扶植和发展专业技术协会、流通协会等农村专业合作组织,通过公司加农户、协会加农户等多种产业化经营方式,促进农业产业化龙头企业带动农产品生产者按照市场要求调整农产品品质结构和布局。

第三,实行市场准入制度,加强流通监管。实行农产品市场准入,一要实行农产品质量认证、认可制度。积极开展无公害农产品、绿色食品、有机食品的认证,对生产出的符合质量安全标准的农产品,实行标识管理,发展品牌农产品。二要建立监测制度。建立农产品质量安全快速检测点,开展农药残留、兽药残留等有毒有害物质残留检测,不符合质量安全标准的农产品不准流通和销售。三要实行标识管理,推行产品分级包装上市和产地标识制度,对包装上市的农产品,要求标明产地和生产者。四要推行追溯和承诺制度。按照从生产到销售的每一个环节可相互追查的原则,建立农产品生产、经营记录制度,实现农产品质量安全的可追溯。

第四,建立检验检测体系,实行全面质量监管。一是统一规划,建立健全农产品质量安全执法检测机构和自律检测机构。国家和省、市级农业主管部门要建立农产品质量安全检测中心,主要承担执法性检测任务;县级农业主管部门、农产品生产基地、批发市场、农贸市场和连锁超市也建立速测站,主要是开展自律性检测。同时也可以鼓励社会力量建立中介性检测中心。二是加大投入,完善仪器设备和检测手段,充实检测力量,提高检测能力。三是严格检测机构的资质认证和计量认证,统一检测标准,做到检测结果互认。四是加强检验检测人员培训,提高检验检测水平。五是推广速测技术,扩大消费者的知情权和监督权。

第五,完善法律法规体系,依法进行监督。尽快出台农产品的质量安全管理方面的法律和法规,并加强法制宣传和教育;加强对农产品质量安全的执法监督,定期不定期地开展农产品质量安全执法检查,对查出的有毒有害物质超标的农产品依法进行处理,依法确保农产品质量安全。

(摘编自:中国食品产业网)