

超高效液相色谱-串联质谱法同时检测牛乳中4种驱虫药物残留

侯改成¹, 谭艾娟^{2,*}, 吕世明³, 金晓峰⁴, 张剑勇⁴

(1. 贵州大学药学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025;

3. 贵州大学动物科学学院, 贵州 贵阳 550025; 4. 贵州省兽药监察所, 贵州 贵阳 550003)

摘要: 建立同时检测牛乳中4种驱虫药物(吡喹酮、伊维菌素、阿维菌素、多拉菌素)残留的超高效液相色谱-串联质谱的方法。样品经乙腈提取, 碱性氧化铝固相萃取小柱净化, 采用UPLC ACQUITY BEH C₁₈柱, 以0.1%甲酸-乙腈(A)和0.1%甲酸-5.0 mmol/L乙酸铵(B)为流动相, 梯度洗脱分离, 在电喷雾正离子模式下以多反应监测方式检测。结果表明: 4种驱虫药物在5~100 ng/mL范围内线性良好, 相关系数大于0.996, 加标样品的平均回收率为76.4%~113.3%, 相对标准偏差($n=6$)为2.4%~10.6%。吡喹酮、伊维菌素、阿维菌素、多拉菌素的检出限分别为1.0、2.5、2.5、2.5 $\mu\text{g/kg}$ 。该方法简便、快速、准确, 可以同时检测牛乳中吡喹酮、伊维菌素、阿维菌素、多拉菌素残留。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱; 吡喹酮; 阿维菌素类药物; 残留; 牛乳

Simultaneous Determination of 4 Parasiticide Residues in Milk by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

HOU Gaicheng¹, TAN Aijuan^{2,*}, LÜ Shiming³, JIN Xiaofeng⁴, ZHANG Jianyong⁴

(1. College of Pharmacy, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. College of Life Science, Guizhou University,

Guiyang 550025, China; 3. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

4. Guizhou Province Institute of Veterinary Drugs Control, Guiyang 550003, China)

Abstract: A new multi-residue analytical method was developed for the simultaneous determination of residues of 4 parasiticides, i.e. praziquantel, ivermectin, abamectin and doramectin, in milk by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS-MS). The samples were extracted with acetonitrile and then cleaned up with alkaline alumina column. The target compounds were separated with UPLC ACQUITY BEH C₁₈ column. The mobile phase A (acetonitrile plus 0.1% formic acid) and the mobile phase B (0.1% formic acid plus 5 mmol/L ammonium acetate) were used in a gradient elution program. The target drugs were detected by electrospray ionization mass spectrometry in positive ion mode with multiple reaction monitoring. The results showed good linear relationships in the range of 5–100 ng/mL and the correlation coefficients were all above 0.996. The average recoveries ranged from 76.4% to 113.3%, and the relative standard deviations (RSDs) were in the range of 2.4%–10.6%. The limits of detection (LODs) for praziquantel, ivermectin, abamectin and doramectin were 1.0, 2.5, 2.5, and 2.5 $\mu\text{g/kg}$, respectively. The method was simple, rapid, and accurate to measure the residues of these four parasiticides praziquantel, ivermectin, abamectin and doramectin in milk.

Key words: UPLC-MS-MS; praziquantel; avermectins; residue; milk

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2015) 06-0216-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201506041

阿维菌素类药物是由链霉菌产生的一组大环内酯类抗生素, 是目前公认的高效、广谱抗寄生虫类药物^[1]。阿维菌素类药物主要包括阿维菌素、伊维菌素和多拉菌素^[2], 该

类药物对动物体内的线虫和体外吸血昆虫有极强的驱杀作用^[3], 但对吸虫和绦虫无效^[4]。该类化合物对未成年人的脑和脊髓有较强的毒性, 甚至会引起死亡^[5]。美国、欧

收稿日期: 2014-05-30

基金项目: 贵州省科技厅农业攻关课题(黔科合NZ字[2012]3011号); 贵阳市农委科学技术计划项目(筑科合(2009第12-1号))

作者简介: 侯改成(1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为微生物活性物质。E-mail: gaichenghou_123@126.com

*通信作者: 谭艾娟(1963—), 女, 教授, 研究方向为微生物与生化药学。E-mail: ajtan@gzu.edu.cn

盟、日本和中国等均制定了限定阿维菌素类药物残留的相关规定^[6-7]。吡啶酮是驱除动物体内吸虫和绦虫的首选药^[8]，但在食品中的残留会引发诸多的副作用，给人类的生命健康带来严重威胁^[9-10]。

由于奶牛为食草动物，多为线虫、绦虫、吸虫以及各种体外寄生虫混合感染^[11]，使用单一药物驱虫效果不理想，临床上常常将阿维菌素类药物与吡啶酮联合用于奶牛体内蠕虫和体外寄生虫的驱除，驱虫效果好，简便、经济^[12-14]，因此，牛乳中同时出现此两类药物残留的机率较高，目前牛乳中兽药残留的检测主要涉及氟喹诺酮类药物、 β -类酰胺类药物、氯霉素、黄曲霉毒素等，有关阿维菌素类药物和吡啶酮检测方法的研究报道较少^[15-17]，还未见到同时检测牛乳中此两类药物残留的相关报道。本研究建立了超高效液相色谱-串联质谱法同时测定牛乳中吡啶酮、伊维菌素、阿维菌素、多拉菌素药物残留的方法，该方法为鲜乳生产企业、乳产品加工企业和食品安全监管部门加强原料乳收储、产品质量控制，降低牛乳中阿维菌素类药物和吡啶酮残留的危害、保障牛乳安全提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

吡啶酮（纯度99.5%）、阿维菌素（纯度95.0%）、多拉菌素（纯度96.0%）德国Dr. Ehrenstorfer公司；伊维菌素（纯度93.9%）中国兽医药品监察所；甲醇、乙腈（色谱纯）德国Merck公司；甲酸（色谱纯）上海安谱科学仪器有限公司；水为超纯水；正己烷、乙酸乙酯、二氯甲烷、乙酸铵、氯化钠均为分析纯。

1.2 仪器与设备

UPLC超高效液相色谱、Quattro Premier XE三重四极杆质谱仪 美国Waters公司；碱性氧化铝固相小柱（500 mg/6 mL）天津博纳艾杰尔科技有限公司；氮气吹干仪 美国Organomation公司；3K15离心机 美国Sigma公司；涡旋混合器 德国IKA公司；XS105电子天平 瑞士Mettler Toledo公司。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液制备

分别准确称取一定量的标准品，用甲醇溶解于100 mL棕色容量瓶中，4℃条件下避光保存^[18]，备用。使用前移取适量标准储备液，用乙腈稀释成所需质量浓度的混合标准液。

1.3.2 样品处理

准确称取1 g样品（精确至0.01），置于50 mL离心管中，先加入5 mL饱和氯化钠溶液，涡旋混匀，继续加入5 mL×2乙腈，涡旋混匀，10 000 r/min离心5 min，合

并二次上清液至碱性氧化铝固相小柱上，净化液收集于50.0 mL氮吹管中，45℃氮气吹干，准确加入1.0 mL乙腈，充分涡旋并超声溶解后过0.22 μ m滤膜，供超高效液相色谱-串联质谱测定。

1.3.3 质谱条件

电离方式：电喷雾（electrospray ionization, ESI）正离子源；扫描方式：多反应监测；毛细管电压：3.5 eV；离子源温度：120℃；溶剂气温度：350℃。

表1 吡啶酮、伊维菌素、阿维菌素、多拉菌素的质谱参数
Table 1 Mass spectral parameters for PZQ, IVR, AVB and DOR

目标物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量/eV	锥孔电压/V
吡啶酮	312.2	202.8*, 82.9	19, 25	35
伊维菌素	892.0	307.0*, 568.9	28, 15	25
阿维菌素	809.5	305.0*, 567.0	28, 15	22
多拉菌素	917.1	331.1*, 593.0	25, 13	22

注：*，定量离子。

1.3.4 色谱条件

Waters UPLC ACQUITY BEH C₁₈柱（50 mm×2.1 mm，1.7 μ m）；流动相A：乙腈-0.1%甲酸；流动相B：0.1%甲酸-5.0 mmol/L乙酸铵；梯度洗脱程序：0~1.0 min，50% B；1.0~3.5 min，90% B；3.5~3.7 min，90% B；3.7~4.3 min，50% B。柱温：30℃；流速：0.3 mL/min；进样量：10 μ L。

2 结果与分析

2.1 提取剂的选择

4种驱虫药物均属弱极性化合物，在乙酸乙酯、乙腈等有机溶剂中有较高的溶解度。实验考察A为乙酸乙酯，B为乙腈，C为乙腈-二氯甲烷（8:2，V/V），D为乙腈-二氯甲烷（6:4，V/V），4种提取剂在添加量为5 μ g/kg的提取效率，如表2所示。结果发现，乙酸乙酯容易引起乳化，回收率普遍较低；在乙腈中加入不同比例的二氯甲烷虽有助于沉淀蛋白和水相的分离，但回收率也普遍较低，并对人和环境危害较大^[19]；通过加入饱和氯化钠改善有机相和水相的分离^[20]，再经乙腈提取后4种驱虫药物的回收率普遍较高，且杂质少，基质干扰小。

表2 4种提取剂的提取效率对比（n=6）
Table 2 Comparison of extraction efficiencies of 4 different solvents (n=6)

提取剂	平均回收率/%			
	吡啶酮	伊维菌素	阿维菌素	多拉菌素
A	53.0	50.1	48.2	37.8
B	87.0	82.0	83.0	86.3
C	54.8	45.2	49.4	60.7
D	55.6	54.0	51.8	51.8

注：A. 乙酸乙酯；B. 乙腈；C. 乙腈-二氯甲烷（8:2，V/V）；D. 乙腈-二氯甲烷（6:4，V/V）。

2.2 净化方法的确定

净化方法主要包括固相萃取和液液萃取^[21]。固相萃取选用碱性氧化铝固相萃取小柱,液液萃取选用正己烷,由于正己烷在乙腈中有一定的溶解度,考虑到上机溶液需与流动相有良好的适配性,因此选用乙腈饱和的正己烷净化。碱性氧化铝固相萃取小柱能更有效地净化富含脂肪的牛乳样品,降低非极性杂质对测定结果的影响,消除了基质中的杂质干扰,效果较理想。

2.3 质谱条件的优化

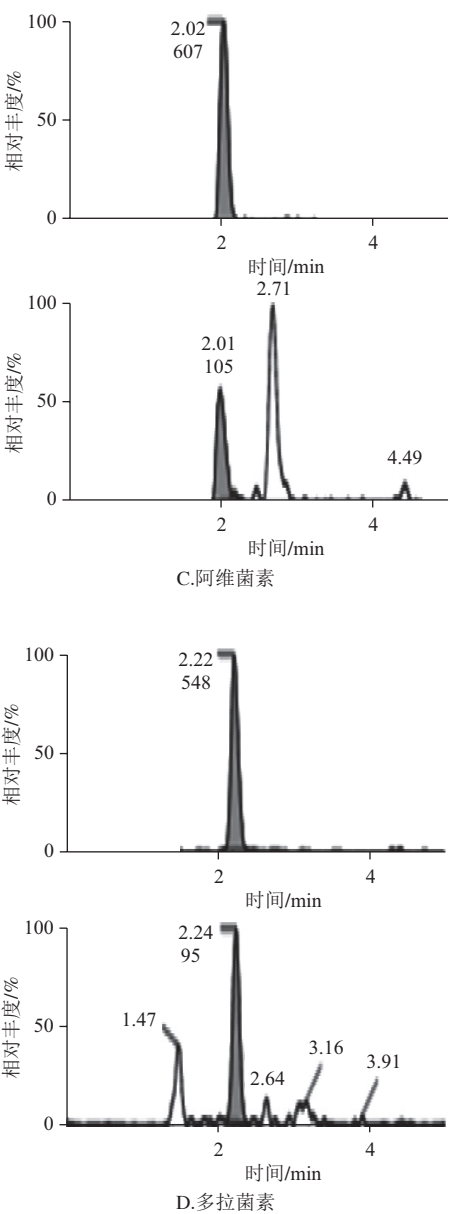
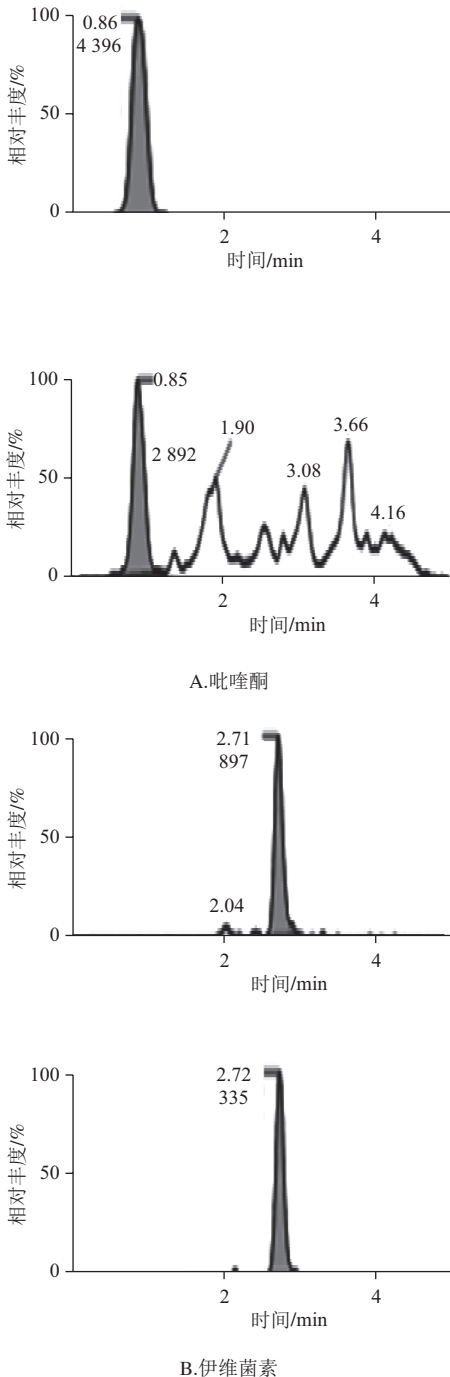


图1 4种驱虫药物在添加量10 µg/kg的牛乳中的提取离子色谱图
Fig.1 Extracted ion chromatograms of 4 parasiticides spiked in milk at 10 µg/kg

质谱检测主要采用ESI⁻和ESI⁺模式。ESI⁻灵敏度较低,阿维菌素类药物均未检出。ESI⁺又分为[M+Na]⁺和[M+NH₄]⁺模式,结果表明,[M+Na]⁺的离子化效率和响应值虽然很高,但基质标样中目标物的响应值远远小于溶剂标样中目标物的相应值,且重复检测后响应值衰减很快。[M+NH₄]⁺模式的灵敏度高,样品基质的离子抑制较小。选择加入5 mmol/L乙酸铵可以提高离子化效率,增强稳定性。以分离时间为横坐标,相对丰度为纵坐标,4种驱虫药物在添加量为10 µg/kg的牛乳中的提取离子色谱图如图1所示。

2.4 色谱条件的优化

综合考察甲醇和乙腈的色谱分离效果和组分进入质

谱前的离子化效率。与甲醇相比,以乙腈作为流动相,色谱峰响应值高,对称性好,但离子化效率却较低。结果表明,在乙腈中加入0.1%的甲酸,能有效促进化合物的电离,峰形较理想。

2.5 线性范围与检出限

用乙腈配制系列不同质量浓度的混合标准溶液,同时选取不含目标化合物的空白奶样,按1.3.2节处理后配制成一系列同溶剂标样质量浓度相同的基质标样,以信噪比为3的条件下确定方法检出限,以信噪比为10的条件下确定方法定量限。分别以标样质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标进行线性回归。结果表明,在5~100 ng/mL范围内,溶剂标样和基质标样的标准曲线线性良好($R^2 > 0.996$)。用基质与溶剂标准曲线斜率的比值反映基质效应的强弱^[22],见表3。结果表明,牛乳对吡喹酮和阿维菌素的基质效应较为明显,吡喹酮表现为增强效应,而阿维菌素则表现为抑制效应。因此,本实验选用基质标准曲线进行校正,消除基质效应对检测结果的影响。我国农业部235号公告规定牛乳中伊维菌素的最大残留限量为10 $\mu\text{g/kg}$ ^[23],本方法对吡喹酮、伊维菌素、阿维菌素、多拉菌素的检出限分别为1.0、2.5、2.5、2.5 $\mu\text{g/kg}$,因此,本方法完全满足上述药物的实际检测要求。

表3 4种驱虫药物的标准曲线、相关系数(R^2)、斜率比值、检出限与定量限

Table 3 Standard curves in matrix and solvent with correlation coefficient (R^2) and slope ratio, LODs and LOQs for 4 parasiticides

目标物	基质标准曲线	溶剂标准曲线	斜率比值	检出限/ ($\mu\text{g/kg}$)	定量限/ ($\mu\text{g/kg}$)
吡喹酮	$y=264.604x+521.895$ ($R^2=0.9961$)	$y=263.911x+525.208$ ($R^2=0.9966$)	1.002 6	1.0	2
伊维菌素	$y=10.2752x+25.3231$ ($R^2=0.9968$)	$y=11.2808x+9.74072$ ($R^2=0.9990$)	0.910 9	2.5	5
阿维菌素	$y=11.3051x+2.81914$ ($R^2=0.9989$)	$y=13.9772x+9.54151$ ($R^2=0.9986$)	0.808 8	2.5	5
多拉菌素	$y=7.0965x+1.77932$ ($R^2=0.9996$)	$y=7.46396x+14.3566$ ($R^2=0.9978$)	0.950 8	2.5	5

2.6 方法准确度和精密度

在空白样品中添加不同量的混合标准溶液,相当于5、10、20 $\mu\text{g/kg}$ 3个添加量,每一个添加水平重复6次,按照1.3.2节进行处理并测定。由表4可见,4种驱虫类药物的平均回收率为76.4%~113.3%,相对标准偏差为2.4%~10.6%,符合多组分痕量残留检测的要求。

表4 样品加标回收率及精密度($n=6$)

Table 4 Recoveries and precisions of samples spiked with standards ($n=6$)

添加量/ ($\mu\text{g/kg}$)	吡喹酮		伊维菌素		阿维菌素		多拉菌素	
	平均 回收率/%	相对标准 偏差/%	平均 回收率/%	相对标准 偏差/%	平均 回收率/%	相对标准 偏差/%	平均 回收率/%	相对标准 偏差/%
5	113.3	2.4	88.5	3.6	104.8	7.4	87.0	2.5
10	104.8	8.4	85.0	4.3	109.7	8.7	96.6	3.9
20	96.2	9.1	91.4	10.6	76.4	7.9	100.2	10.4

2.7 实际样品的测定

应用本方法对采自贵州省规模养殖场的15份牛乳样品进行测定,仅1份检出多拉菌素(3.8 $\mu\text{g/kg}$,我国规

定泌乳期禁用),而吡喹酮、伊维菌素、阿维菌素均未检出。

3 结论

本实验建立了超高效液相色谱-串联质谱法同时检测牛乳中吡喹酮、伊维菌素、阿维菌素和多拉菌素残留的方法,并对提取剂、净化方法、色谱条件和质谱条件进行了优化,最终建立了一种简便、快速、准确的检测方法,满足牛乳中吡喹酮、伊维菌素、阿维菌素和多拉菌素残留的测定。

参考文献:

- [1] 张文娟,连庚寅,郭晓喜,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定10种食品中的阿维菌素类药物残留[J].食品科学,2012,33(18):226-231.
- [2] 徐汉虹,梁明龙,胡林.阿维菌素类药物的研究进展[J].华南农业大学学报,2005,26(1):1-6.
- [3] 汪芳,周绪正,李冰,等.动物抗寄生虫药物的研究与应用[J].中国兽医科学,2010,40(7):766-770.
- [4] 陈小军,孙志良,杨惠麟.伊维菌素制剂在动物医学中的研究进展[J].湖南畜牧兽医,2005(1):1-3.
- [5] 潘保良,汪明.关注抗寄生虫药物在牛奶中的残留[J].中国奶牛,2010(8):53-54.
- [6] 韩荣伟,王加启,郑楠,等.牛奶质量安全主要风险因子分析III:兽药残留[J].中国畜牧兽医,2012,39(4):1-10.
- [7] DURDEN D A. Positive and negative electrospray LC-MS-MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocides drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk[J]. Journal of chromatography B, 2007, 850(1/2):134-146.
- [8] BYGOTT J M, CHIODINI P L. Praziquantel: Neglected drug? Ineffective treatment? Or therapeutic choice in cystic hydatid disease?[J]. Acta Tropica, 2009, 111(2):95-101.
- [9] 胡晶,胡悦君,郭润正,等.吡喹酮治疗血吸虫病的不良反应及处理[J].中国现代医药杂志,2013,15(10):111-112.
- [10] 向纯明.吡喹酮治疗血吸虫病引起多种不良反应1例报告[J].中国病原生物学杂志,2013,8(5):4-5.
- [11] 叶秀娟,李君荣.不同驱虫药组合对奶牛体内寄生虫驱虫效果试验[J].中国奶牛,2013(12):50-51.
- [12] 陈琳琳,肖希龙,郭召绪,等.伊维菌素和吡喹酮复方注射液在绵羊体内的药代动力学[J].中国兽医杂志,2011,47(6):73-76.
- [13] 汤佳莘,欧阳五庆,吴小利.复方伊维菌素和吡喹酮纳米乳的制备与质量评价[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2014,42(2):35-40.
- [14] TANG Shusheng, CHEN Linlin, GUO Zhaoxu, et al. Pharmacokinetics of a new ivermectin/praziquantel oil suspension after intramuscular administration in pigs[J]. Veterinary Parasitology, 2012, 185:229-235.
- [15] 林峰,吴映璇,姚仰勋,等.GB 29696—2013牛奶中阿维菌素类药物多残留的测定:高效液相色谱法[S].北京:中国标准出版社,2009.
- [16] MARTINEZ VIDAL J L, FRENICH GARRIDO A, LUIZ-AGUILERA M M, et al. Development of fast screening methods for the analysis of veterinary drug residues in milk by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 397:2777-2790.
- [17] BUTCHER P, MADEN K, WALKER S, et al. Quantification of anthelmintic drug residues in milk and muscle tissues by liquid chromatography coupled to orbitrap and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry[J]. Talanta, 2011, 85:991-1000.
- [18] 吴传万,杜小凤,王伟中,等.阿维菌素光分解及其光稳定剂的筛选[J].农药,2006,45(12):828-833.
- [19] 何红梅,赵华,张春荣,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定水稻基质中阿维菌素残留量[J].分析化学,2012,40(1):140-144.
- [20] 杨方,杨守深,林永辉,等.超高效液相色谱-电喷雾电离串联质谱联用法检测茶叶中阿维菌素类药物残留[J].色谱,2009,27(2):153-155.
- [21] 高洁,苗虹.兽药残留检测技术研究进展[J].食品安全质量检测学报,2013,4(1):11-17.
- [22] 何红梅,赵华,张春荣,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定水稻基质中阿维菌素残留量[J].分析化学,2012,40(1):140-144.
- [23] 农业部畜牧局.农业部公告第235号:动物性食品中兽药最高残留限量[EB/OL]. (2008-03-04) [2014-07-11]. http://www.moa.gov.cn/zwlilm/nybz/200803/t20080304_1028649.htm.