

阿维菌素在鲈鱼肌肉组织中的残留与消除规律

钱卓真^{1,3}, 吴成业¹, 刘智禹¹, 汤水粉¹, 罗方方²

(1. 福建省水产研究所, 福建 厦门 361012; 2. 集美大学生物工程学院, 福建 厦门 361021;
3. 厦门大学材料学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 为了解实际养殖过程中使用阿维菌素药物后, 鲈(*Lateolabrax japonicus*) 对阿维菌素的蓄积及消除规律, 以指导阿维菌素药物在实际生产中的应用。以毒性试验为基础, 在确定 96 h 半致死质量浓度(LC₅₀) 后, 以 0.25 倍 LC₅₀, 即指导用量, 质量浓度为 4 ng·mL⁻¹, 结合实际养殖用药情况, 药浴 72 h 后换水, 观察阿维菌素在鲈鱼肌肉组织中的残留与消除规律。文章建立高效液相色谱-串联质谱法测定鲈鱼中阿维菌素残留量的方法, 并以此法测定鲈鱼肌肉组织中阿维菌素的质量浓度。结果表明, 随着药浴时间的延长, 鲈鱼肌肉组织中的阿维菌素质量分数逐步增加, 在药浴结束时达到峰值 8.767 μg·kg⁻¹, 随后阿维菌素在体内的残留量随消除试验的进行逐渐下降, 至第 528 小时降至检测限以下。

关键词: 阿维菌素; 鲈鱼; 消除规律; 残留

中图分类号: S 965.334

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2013)06-0052-06

Accumulation and elimination of avermectin in perch (*Lateolabrax japonicus*) muscle

QIAN Zhuozhen^{1,3}, WU Chengye¹, LIU Zhiyu¹, TANG Shuifen¹, LUO Fangfang²

(1. Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361012, China; 2. College of Engineering Technology, Jimei University, Xiamen 361021, China; 3. College of Materials, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: To investigate the accumulation and elimination rules of avermectin in perch (*Lateolabrax japonicus*) muscle during actual breeding process, we determined the median lethal concentration in 96 h as 4 ng·mL⁻¹ based on a toxicity test, and exposed the perch to 4 ng·mL⁻¹ of avermectin for 72 h, and then transferred the solution into seawater. Thus, we develop a method by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine avermectin in perch muscle. The results show that the avermectin concentration in perch muscle gradually increases with passing medicated bath time, and reaches the peak of 8.767 μg·kg⁻¹ at the end of the medicated bath. Later, the avermectin in perch muscle gradually decreases and reduces below the detection limit at 528th hour.

Key words: avermectin; *Lateolabrax japonicus*; elimination; residues

阿维菌素类药物(avermectins)属于大环内酯类药物,由链霉菌产生,对动植物的寄生线虫和节肢动物均有高效的驱杀作用。阿维菌素作为一类广谱高效的抗寄生虫药物,目前广泛应用于水

产养殖。文献报道阿维菌素用于治疗青鱼、草鱼、鲤、鲫等养殖鱼类因中华蚤、锚头蚤、三代虫、指环虫、鱼虱等寄生虫引起的摄食不旺、浮头、弄水病等病症,同时能防治养殖鱼类的细菌

收稿日期: 2013-01-05; 修回日期: 2013-04-02

资助项目: 福建省海洋与渔业厅重点项目(KJXH-2010-007); 国家星火计划项目(2011GA72001)

作者简介: 钱卓真(1981-),女,助理研究员,从事水产品中兽药、农药残留、有毒有害物质检测方法及食品安全风险评估研究。E-mail: qianzhuozhen@126.com

性败血症^[1-3]。按世界卫生组织(WHO)五级分级标准,虽然阿维菌素属于微生物源农药,但仍属高毒化合物。此类药物会在生物体内富集,经过食物链传递而影响到人类安全。因此,生物组织中此类药物的残留不容忽视,欧盟、美国、日本等国均制定了阿维菌素类药物的最高残留限量。目前,有关水产品中阿维菌素类药物的残留检测方法、消除规律研究较少^[4-13],在很大程度上制约着此类药物在水产养殖中的安全应用。鲈(*Lateolabrax japonicus*)在养殖过程中发生寄生虫类的病害较少,但发病后治疗难度很大。对于此类由寄生虫引起的病害,一般以防治为主,每隔一段时间用阿维菌素药物播洒鱼池一次。因此,文章选用鲈为研究对象,模拟实际养殖中给药方式下鲈鱼中阿维菌素的残留及消除规律。

1 材料与方法

1.1 试验用鱼

试验用健康鲈鱼共计100尾,平均体质量250 g,饲养于福建省水产研究所水产养殖实验基地。试验前对鲈鱼进行暂养,保持水温(22±2)℃,pH 8.0,盐度30,正常充气并投喂空白配合饲料,日饲量不超过初始体质量的3%,14 d后挑选体色活力均正常者进行给药试验。

1.2 试剂与仪器

标准品阿维菌素购自Dr公司(纯度>92%)。试验用的阿维菌素药物购自无锡市中意生物技术有限公司,商品名混虫安,质量浓度为4 mg·mL⁻¹。乙腈、甲酸、正己烷均为色谱纯;无水硫酸钠、乙酸铵均为化学纯;水为Milli-Q制备的超纯水;无水硫酸钠固相萃取柱(5 g, 6 mL);碱性氧化铝固相萃取柱(500 mg, 3 mL)。Accela TSQ Quantum Access液相色谱串联四级杆质谱联用仪(美国Thermo Fisher公司出品);AB204-E型电子分析天平、PL203型电子分析天平(Mettler Toledo公司出品);离心机(北京时代北利离心机有限公司出品);MS3型旋涡混合器(德国IKA公司出品);氮吹仪(广州智真生物科技有限公司出品);旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司出品)。

1.3 试验设计

1.3.1 毒性试验 以自然状态为对照,以规格型号为1 m³的水泥池为试验用池,采用等比间距法,设置若干质量浓度梯度组。在参考文献的基

础上^[14-16],采用半静态停食试验法开展阿维菌素对鲈鱼的急性毒性试验。试验用健康鲈鱼平均体质量250 g,试验水温(22±2)℃。每种药物质量浓度梯度各放鲈鱼10尾,持续浸泡96 h。试验期间每隔12 h观察受试对象的活动情况,及时取出死亡个体,每24 h记录一次死亡数。根据阿维菌素对鲈鱼的急性毒性试验结果,采用改良的寇氏法计算96 h的半致死质量浓度(LC₅₀)为16.13 ng·mL⁻¹。

1.3.2 试验分组、给药与采样 试验组分为给药组 and 对照组,每池约为70尾鱼。结合实际养殖过程中的用药情况,采用0.25倍LC₅₀为投药质量浓度,即指导用药量,此质量浓度为4 ng·mL⁻¹,浸浴72 h,72 h后彻底换水。于给药后的第0.5、第1.5、第2.5、第4.5、第7.0、第10.5、第23.5、第44.5、第47.5、第58.5、第72.0、第82.5、第95.5、第175、第240、第312、第408、第528和第744小时采集肌肉,每个采样点采集3尾鲈鱼,采集后的全部样品于-20℃冰箱中冷冻保存,待整个给药试验结束后进行药物分析。

1.4 标准溶液配制

1.4.1 储备液 准确称取阿维菌素标准品10.0 mg,在棕色容量瓶中用乙腈定容至100 mL。该溶液质量浓度为100 μg·mL⁻¹,于-18℃下避光保存,有效期6个月。

1.4.2 标准中间溶液 准确移取阿维菌素标准储备液100 μL于10 mL容量瓶,用乙腈稀释成1 μg·mL⁻¹的标准中间溶液,于4℃下避光保存,有效期为1个月。

1.4.3 混合标准工作曲线工作液 准确吸取一定量的阿维菌素标准中间溶液,用空白样品提取液稀释成相应的标准工作液,使用时现配现用。

1.5 样品前处理

称取(5±0.05)g试样于50 mL塑料离心管中,加入5 g无水硫酸钠,涡旋30 s。加入15 mL乙腈,涡旋1 min,超声5 min,3 500 r·min⁻¹下离心6 min,再用10 mL乙腈重复提取离心1次。合并上清液至100 mL塑料离心管,提取液过无水硫酸钠固相萃取柱,所有流出液40℃旋转蒸发至干。用5 mL乙腈分2次洗涤旋转蒸发瓶,并将洗涤液转入预先用4 mL乙腈活化好的碱性氧化铝固相萃取柱,并用6 mL乙腈洗涤碱性氧化铝固相萃取柱,

收集全部流出液。流出液在 50 °C 下氮吹至干, 加入 1.0 mL 初始流动相, 过 0.22 μm 滤膜后供液相色谱-串联质谱测定。

1.6 色谱条件

色谱柱为 Hypersil Gold C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.9 μm); 流动相为 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵-0.1% 甲酸水溶液 + 乙腈, 梯度洗脱(表 1); 柱温为 35 °C; 流速为 0.20 mL·min⁻¹; 进样量为 15 μL 。

1.7 质谱条件

电喷雾离子源, 正离子模式; 喷雾电压为 3 200 V; 鞘气压力为 2×10^5 Pa, 辅气压力为 1.3×10^4 Pa, 离子传输毛细管温度 360 °C; 选择反应监测(SRM); 母离子、子离子和碰撞能量见表 2, Q1 半峰宽为 0.7 Da, Q3 半峰宽为 0.7 Da, 碰撞气压力为氩气, 0.199 5 Pa。

2 结果与讨论

2.1 色谱及质谱条件优化

阿维菌素属于极性较弱的化合物, 在 C₁₈ 色谱柱上的保留较强, 因此流动相中有机相比例需要较高。阿维菌素在 ESI 源下以加合峰的形式出现, 一般与流动相中的钠(Na⁺)和氨(NH₄⁺)结合, 形成加钠峰或加氨峰。选择加钠峰作为母离子, 得到的碎片峰信息不稳定; 而选择加氨峰作为母离子, 可

以得到稳定且丰富的碎片离子。因此, 在流动相中加入微量甲酸和乙酸铵, 可以抑制加钠峰, 促进加氨峰的响应值。以注射泵直接进样将 1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的阿维菌素标准品注入质谱离子源中, 以分子离子峰为母离子对离子源参数进行优化, 如喷雾电压、鞘气压力、辅气压力、离子传输毛细管温度、碰撞能量。

2.2 样品基质效应的消除

LC-MS/MS 中的基质效应由分析物的共同流出组分影响电喷雾接口的离子化效率所致, 表现为离子增强或抑制^[17]。基质效应主要来源于生物样品的内源性组分, 内源性组分是指生物样品中存在的有机或无机成分^[17], 经前处理后存在于提取液中。因此采用流动相为基底的标准溶液(组 1), 与采用空白样品提取液为基底的标准溶液(组 2)进行比较, 考察基质效应。两者比值(RA)等于或接近 100 时表明不存在基质效应的影响; RA 小于 100 时表明存在离子抑制作用; RA 大于 100 时表明存在离子增强作用。笔者试验 RA 大于 100, 基质对阿维菌素存在增强作用(表 3)。为了消除基质效应, 试验采用提取后添加法, 即空白样品提取液配制标准曲线法。

表 1 HPLC 流动相梯度洗脱程序

Tab. 1 HPLC gradient elution program of mobile phase

时间/min time	10 mmol·L ⁻¹ 乙酸铵-0.1% 甲酸水溶液 10 mmol·L ⁻¹ ammonium acetate-0.1% formic acid in water	乙腈 acetonitrile
0	40.0	60.0
3.0	10.0	90.0
6.3	10.0	90.0
6.5	60.0	40.0
11.5	60.0	40.0

表 2 选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量

Tab. 2 Optimized SRM parameters for the analytes

化合物 compound	母离子/(m/z) parent ion	子离子/(m/z) product ions	碰撞能量/eV collision energy
阿维菌素	890.3	304.9* 567.0	26 13

注*. 定量碎片离子

Note: *. quantitative ion

表 3 不同条件下基质效用计算结果 (n = 3)

Tab. 3 Calculation results of matrix effect under different conditions

化合物 compound	峰面积 peak area		基质效应 / % RA
	组 1 No. 1	组 2 No. 2	
阿维菌素 avermectin	248 036. 87	291 777. 03	118

2.3 样品前处理条件的优化

阿维菌素是一类脂溶性的药物, 一般溶于有机溶剂。试验比较了乙腈、乙酸乙酯和甲醇对阿维菌素的提取效果。试验结果表明乙酸乙酯和乙腈的提取效果较好, 但乙酸乙酯沉淀蛋白效果较差, 不利于后续的净化, 所以最终选用乙腈作为提取剂。

由于水产品中含有大量水溶液, 当提取液采用乙腈时, 乙腈水溶液在减压旋转时易引起爆沸现象, 会导致回收率偏低及不稳定结果。因此, 试验采用

450 °C 灼烧后的无水硫酸钠粉末及无水硫酸钠固相萃取柱作为除水剂, 有效地防止了爆沸现象。

为了有效地除去提取液中的杂质, 比较了碱性氧化铝固相萃取柱及 C₁₈ 固相萃取柱的净化效果, 两者净化效果相当。但 C₁₈ 固相萃取柱的净化步骤较为繁琐, 因此采用碱性氧化铝固相萃取柱进一步净化提取液。

2.4 标准曲线、线性范围、检出限和定量限

样品空白提取液由空白样品制备, 用该提取液将标准液稀释成 5 ng·mL⁻¹、10 ng·mL⁻¹、50 ng·mL⁻¹、100 ng·mL⁻¹、150 ng·mL⁻¹、200 ng·mL⁻¹ 和 300 ng·mL⁻¹ 溶液, 以各组分质量浓度与其色谱峰面积进行线性回归, 呈良好线性关系; 线性回归方程 $y = -14\ 335.1 + 5\ 168.6x$, 相关系数 $R^2 = 0.999\ 0$ 。以 3 倍信噪比 (S/N) 计算, 检出限为 0.5 μg·kg⁻¹; 以 10 倍信噪比 (S/N) 计算, 定量限为

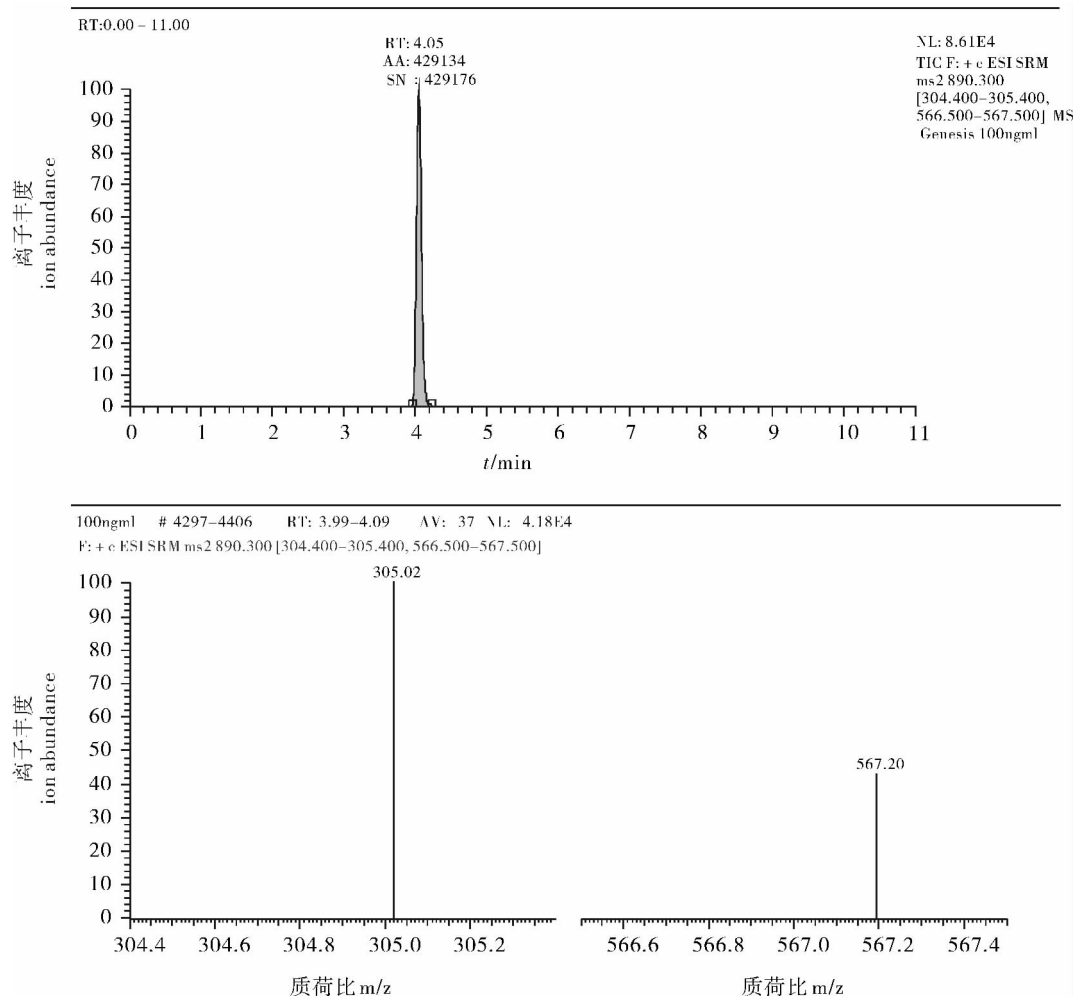


图 1 阿维菌素选择离子流图 (100 ng·mL⁻¹)

Fig. 1 SRM chromatograms for 100 ng·mL⁻¹ avermectin standard

1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; 标准品图谱见图 1。

2.5 方法准确度及精密度

以阴性鲈鱼为研究对象, 进行标准添加试验, 研究在 2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 加标水平下测定结果的准确度及精密度。每个浓度水平做 6 个平行试验, 批内加标平均回收率分别为 78.6%、91.1% 和 94.4%, 相对标准偏差分别为 9.22%、6.03% 和 3.75%。18 d 内在 2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 加标水平下进行 6 次标准添加试验, 批间加标平均回收率分别为 82.7%、85.7% 和 90.6%, 方法的批间相对标准偏差为 7.44%、8.93% 和 6.06%。

2.6 药浴后阿维菌素药物残留及消除规律

结合指导用药量及毒性试验, 得出实际生产的药浴质量浓度为 4 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 鲈鱼在此质量浓度下根据实际生产的情况持续药浴 72 h。用阿维菌素溶液药浴 72 h 后进行消除试验。按照设计的时间点采集鲈鱼的肌肉组织, 采用已建立的测定鲈鱼肌肉组织中阿维菌素残留量的方法处理样品, 并经高效液相色谱-串联质谱法测定。试验结果表明, 鲈鱼肌肉中的阿维菌素质量分数在停止给药 22 d 后低于检测限, 其药时曲线图见图 2。

肌肉是鱼类最重要的可食组织, 也是食品安全管理者和消费者共同关注的重点, 因此应重点监测肌肉中药物残留的含量。水温 20 ~ 24 $^{\circ}\text{C}$ 范围内, pH 为 8.0, 盐度 30, 正常充气情况下鲈鱼在质量浓度为 4 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的阿维菌素的海水中持续药浴 72 h。随药浴时间的延长, 鲈鱼肌肉组织中的阿维菌素质量分数逐步增加, 在药浴结束时达到峰值, 质量分数为 8.767 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 更换不含阿维菌素药物的海水后, 随消除试验的进行, 阿维菌素在鲈鱼体内的残留量逐渐下降, 第 528 小时(即第 22 天)降低至检测限以下(图 2)。

2.7 临床休药期的确定

休药期也叫消除期, 是根据药物允许残留量及药物在食用组织中消除规律而确定。水生动物的休药期随着种属差异、生理差异、给药途径、制剂形式、给药剂量、温度、盐度、pH 的不同而有差异^[18-19]。所有影响因素中水温影响最大。试验结果表明, 药物的代谢强度在一定温度范围内与水温成正比, 水温越高, 代谢速度越快^[20]。日本肯定列表中规定阿维菌素在鳗科类肌肉中的最高残留量为 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 但目前中国水产品

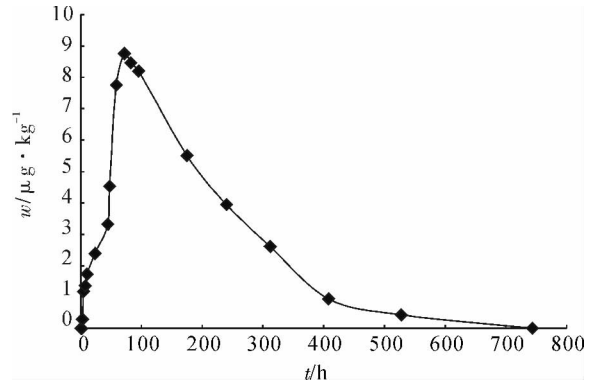


图 2 鲈鱼肌肉的药-时曲线

Fig. 2 Concentration-time curve of perch muscle

无此药物最高残留限量标准。出于食用安全考虑, 以无残留法作为最终休药期制定的标准。因此, 在笔者试验条件下鲈鱼单次药浴 72 h 后的临床休药期为 22 d。

3 结论

作为一类广谱、高效的杀虫剂, 阿维菌素目前广泛应用于鱼类病害的治疗和预防, 然而目前关于此类药物在水产品中的药代动力学及残留规律研究较少。文章建立了阿维菌素在鲈鱼组织中的残留检测方法, 模拟实际养殖过程中的给药方式, 研究在药浴条件下阿维菌素在鲈鱼组织中的富集和消除规律, 并确定了在此条件下的临床休药期, 有利于健全水产品中此类药残监控体系。

参考文献:

- [1] 农业部《新编渔药手册》编撰委员会. 新编渔药手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 521-522.
- [2] 周帅. 水产养殖用阿维菌素水乳剂的研制与应用[D]. 上海: 上海海洋大学, 2009.
- [3] 吴秀云. 阿维菌素在贝类养殖中杀灭线虫效果的初步观察[J]. 中国水产, 2009(7): 58-59.
- [4] 张启迪. 阿维菌素在鲟鱼体内生物富集与生物消除规律的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2003.
- [5] 郭少忠, 王少敦, 林延川. 阿维菌素在鳗鱼养殖中残留和停药期的初步研究[J]. 海洋与渔业, 2007(1): 18-19.
- [6] 秦改晓. 阿维菌素在水产品中残留检测及在草鱼体内药动学研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [7] 陈静. 鲫鱼肌肉中阿维菌素类残留检测和消除规律研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- [8] 徐英江, 任传博, 刘慧慧, 等. 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[J]. 中国渔业质量与标准, 2011, 1(1): 70-74.

- [9] 秦改晓,袁科平,艾晓辉. 高效液相色谱法测定水产品中阿维菌素的残留量[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(1): 84-88.
- [10] 林立峰,梁震. 高效液相色谱法检测鳗鱼组织中阿维菌素的残留量[J]. 食品科学, 2008, 29(3): 436-437.
- [11] KATHARIOS P, LLIPOULOU-GEORGUDAKI J, ANTIMISIA-RIS S, et al. Pharmacokinetics of ivermectin in sea bream, *Sparus aurata* using a direct competitive ELISA[J]. Fish Physiol Biochem, 2002, 26(2): 189-195.
- [12] HOU X L, WU Y, SHEN J, et al. Multi-residue analysis of avermectins in bovine liver and muscle by liquid chromatography-fluorescence detector [J]. Chromatographia, 2007, 65(1/2): 77-80.
- [13] KATHARIOS P, PAVLIDIS M, LLIPOULOU-GEORGUDAKI J. Accumulation of ivermectin in the brain of sea bream, *Sparus aurata* after intraperitoneal administration [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2004, 17(1): 9-12.
- [14] 张启迪,潘宗海,刘文华. 阿维菌素对鲟鱼的急性毒性试验研究[J]. 现代农业科技, 2007(24): 153.
- [15] 曹岩,朱邦科,王剑伟. 四种渔药对稀有鮠鲫的急性毒性[J]. 淡水渔业, 2010, 40(3): 56-60.
- [16] 郑燕,蔡雷鸣. 阿维菌素对南美白对虾的急性毒性试验[J]. 现代农业科技, 2009(23): 326-327.
- [17] 向平,沈敏,卓先义. 液相色谱-质谱分析中的基质效应[J]. 分析测试学报, 2009, 28(6): 753-756.
- [18] 房文红,郑国兴. 水产动物药物代谢动力学研究概况[J]. 中国水产科学, 2004, 11(4): 380-384.
- [19] 王锡珍. 阿维菌素对几种淡水生物毒性及在异育银鲫体内药物代谢动力学[D]. 上海: 上海海洋大学, 2009.
- [20] INGEBRIGTSEN K. Factors affecting drug disposition in fish[J]. Acta Vet Scand, 1991, 87: 44-56.