

鲫组织中伊维菌素含量的检测方法

彭章晓¹, 江敏^{1,2*}, 吴昊¹, 何琳¹, 杨李¹

(1. 上海海洋大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学水域环境生态上海高校工程研究中心, 上海 201306)

摘要: 采用反相高效液相色谱分离、紫外检测器检测, 建立了鲫血液、肌肉、肝胰脏、肾脏及性腺组织中伊维菌素(IVM)残留的检测方法。将匀浆后的鲫组织用乙酸乙酯提取, 离心后取上清液于45℃下氮气吹干, 用甲醇-水(4:1, V/V)混合液溶解残渣, 加正己烷, 漩涡振荡后离心, 取下清液经0.22 μm的滤膜过滤后, 进样20 μL进行分析, 检测波长为245 nm, 外标法定量。结果表明: 伊维菌素在血浆和肌肉中的检出限分别为7.5 μg/L和7.0 μg/kg; 肌肉、肝胰脏、肾脏及性腺中IVM为0.025~1.00 mg/kg, 血液中为0.025~1.00 mg/L时, 色谱峰峰高与浓度呈良好的线性相关。各组织中IVM的平均回收率为(90.09 ± 6.54)% ~ (97.77 ± 5.91)%, 平均批内RSD为(2.55 ± 1.78)% ~ (3.99 ± 1.55)%, 平均批间RSD为(4.18 ± 3.97)% ~ (6.01 ± 2.54)%。对鲫以0.4 mg/kg(药量/体重)剂量单次口灌给药后, 用该方法进行残留检测, 结果发现: 25℃水温条件下, 鲫肌肉中伊维菌素的休药期不得少于15 d。

关键词: 鲫; 伊维菌素; 检测; 高效液相色谱

中图分类号: X 835; S 917.1

文献标识码: A

伊维菌素(ivermectin, IVM)为阿维菌素的衍生物, 是由链霉菌产生的一种大环内酯类物质, 在农牧业中常作为抗寄生虫剂和杀蜻剂使用, 具有作用机制独特、用量小、安全性高等特点。随着水产养殖规模和密度的不断扩大, 一些寄生虫病如鱼虱病、车轮虫病、指环虫病和异尖线虫病等给水产养殖业造成的损失与日俱增, 甚至可能危害人类健康^[1]。作为一种新型、高效的鱼类抗寄生虫药剂, 伊维菌素在国外水产养殖中已有一定范围的使用。欧洲许多国家如苏格兰、爱尔兰等将其添加到饲料中, 用于鲑和海鲷养殖中的海虱防治^[2-3]。我国主要将其应用于淡水鱼养殖中的斜管虫、车轮虫病防治^[4-5]。农业部颁布的NY5029—2001和NY5044—2001无公害食品质量标准规定: 猪肉脂肪中IVM的含量不得超过0.02 mg/kg^[6], 牛肉脂肪中IVM的含量不得超过0.04 mg/kg^[7]。尽管IVM在鱼肉中的最高残留量尚无规定, 但鉴于目前IVM在水产养殖中应用

的日益广泛及食品安全的重要性, 研究出一种适合检测鱼体组织中IVM残留的方法十分必要。目前, 动物体内IVM含量的检测方法主要有高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[8-10]、酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[11]、液相色谱串联质谱法(high performance liquid chromatography-mass spectrum, HPLC-MS)^[12-13], 但这些方法主要针对家畜动物, 且样品前处理均很复杂。本实验也采用HPLC法, 但对样品的前处理过程和色谱条件进行了优化, 使该检测方法具有快速、简便、准确和廉价的优点, 可用于鱼体组织中IVM的残留检测及药代动力学等研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

鲫购买自上海浦东新区果园镇集贸市场, 健康无伤病, 平均体重(250 ± 20) g。实验前在循环

收稿日期: 2010-01-22 修回日期: 2010-04-09

资助项目: 上海市教委理科重点项目(07ZZ132); 上海市教委重点学科建设项目(J50701); 上海海洋大学博士启动基金项目(B-8201-06-0312)

通讯作者: 江敏, E-mail: mjiaing@shou.edu.cn

水养殖箱(250 cm × 150 cm × 70 cm)中暂养10 d,水温控制在(25 ± 1)℃,以增氧机充氧。饲料为不含 IVM 的全价饲料(浙江恒兴饲料有限公司)。

1.2 仪器与试剂

SHIMADZU 高效液相色谱仪(HPLC)配置紫外检测器(SPD-20A);冷冻离心机(SupRa22K);氮气吹干仪(QGC-24T);匀浆机(FSH-2);超声波仪(SK-2200L);漩涡混合器(H-101);纯水机(Milli-Q);电子天平(FA2004);超低温冰箱(Thermo Forma -700)

伊维菌素标准品(Sigma 公司);甲醇(色谱纯, MERCK 公司);乙酸乙酯(色谱纯, urchem 公司);肝素钠、正己烷、无水乙醇、无水硫酸钠均为分析纯(国药公司);水为 Milli-Q 超纯水。

1.3 色谱条件和标准溶液配制

色谱条件 色谱柱: VP-ODS C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。流动相: 甲醇-水(91:9), 流速 1.0 mL/min。柱温为 35℃, 紫外检测波长为 245 nm, 进样量 20 μL。

IVM 标准溶液的配制 精密称取 0.050 0 g 伊维菌素标准品, 置于 50 mL 的棕色容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀即得 1 g/L 的标准贮备液。精密量取 1 mL 标准贮备液, 置于 100 mL 的棕色容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 即得 10 mg/L 的标准溶液 A。精密量取标准溶液 A 适量, 用甲醇稀释成质量浓度分别为 0.025、0.05、0.10、0.25、0.50、1.00 mg/L 的系列标准工作液。

1.4 样品的采集

对暂养后的实验鱼静脉取血, 血液置于 10 mL 的塑料离心管中, 加入少量肝素钠后以 5 000 r/min 离心, 离心 5 min, 分离上层血浆于 -70℃ 超低温冰箱中保存。解剖采完血后的鲫, 分别取肝胰脏、肾脏、性腺和肌肉组织, 将这些组织分装于塑料自封袋中, 于 -70℃ 超低温冰箱中保存、待用。

1.5 样品的处理

肌肉、肝胰脏、肾脏和性腺组织样品的处理 从冰箱中取出组织, 自然解冻后准确称取 1.00 g 样品, 置于 10 mL 小烧杯中, 加甲醇 1 mL, 避光放置 0.5 h, 剪碎后加少许无水硫酸钠和 3 mL 乙酸乙酯, 以 10 000 r/min 匀浆 30 s, 将匀浆液倒入 10 mL 塑料离心管 A 中, 再用 3 mL 乙酸乙酯洗涤

刀头和小烧杯, 将洗涤液一并倒入 A 管。超声提取 10 min, 以 5 000 r/min 离心 8 min, 将上清液倒入 10 mL 尖底玻璃离心管 B 中, A 管残余物再用 5 mL 的乙酸乙酯提取一次, 涡旋振荡 30 s, 超声, 离心后, 合并上清液于 B 管中。用氮气在 45℃ 条件下将 B 管提取液吹干后, 向 B 管中精确加入 1 mL 甲醇-水(4:1, V/V) 混合液溶解, 充分振荡使残渣完全溶解, 再加入 2 mL 正己烷去脂, 涡旋振荡 30 s, 3 000 r/min 离心 3 min, 肌肉组织去脂一次, 其它组织去脂两次。去脂后, 下清液以 0.22 μm 的微孔滤膜过滤器过滤, 样品进行 RP-HPLC 检测。

血液样品的处理 从冰箱中取出血浆, 自然解冻后摇匀, 精确吸取 1 mL, 置于 10 mL 的塑料离心管 A 中, 加 1 mL 的甲醇和 3 mL 的乙酸乙酯, 从“超声提取 10 min”起, 其后的处理步骤同“肌肉、肝胰脏、肾脏和性腺组织样品的处理”方法。

2 结果

2.1 定容剂的选择和乳化现象的消除

样品前处理过程中, 经氮气吹干后 B 管中的残渣需用一定体积的定容剂定容。IVM 微溶于水, 易溶于甲醇、乙醇等有机溶剂。考虑到色谱条件中的流动相为甲醇和水, 因此用甲醇作为定容剂较为合理。但实验发现, 甲醇和正己烷部分互溶, 甲醇中水的含量越高, 这种互溶现象越不明显, 经过一系列的甲醇-水体积比梯度实验(表 1), 最终将定容剂中甲醇和水的比例定位 V/V = 4:1。此定容剂既不与正己烷互溶, 又能很好地溶解 B 管中的残渣。为使 B 管中的残渣快速彻底地溶于定容剂中, 可采用超声助溶或漩涡震荡方式, 也可将两种方式联合使用。本实验发现, 两种方式联用时溶解残渣的效果非常好, 但在加正己烷去脂过程中常常会出现乳化现象, 严重影响实验结果。分开对比两种助溶方式后发现, 乳化现象是超声助溶引起的, 因此本实验采用漩涡震荡方法溶解残渣, 不会发生乳化现象。

2.2 色谱行为

图 1 中所示的 a、b、c、d、e、f 色谱图分别为 IVM 标准工作液、加标血浆、肝胰脏、肌肉、肾脏、卵巢和精巢样品的色谱图; 图 h 为空白肌肉样品

色谱图。由图可知,在本实验条件下,基线走动平稳,IVM 的保留时间约为 14.2 min,样品中的内源性杂质与 IVM 分离良好,无干扰峰出现。

表 1 不同甲醇-水体积比组成的混合液溶解残渣的效果

Tab.1 Dissolved effects of residues with different gradient mixture of methanol-water

甲醇-水(V/V) methanol-water(V/V)	90:10	80:20	70:30	50:50
互溶程度 degree of mutual dissolution	甲醇-水层体积增大 大约 7% the volume of methanol-water layer increases about 7%	不互溶 no mutual dissolution	不互溶 no mutual dissolution	不互溶 no mutual dissolution
残渣溶解时间 time of dissolving residue	20 s	30 s	3 min	少量残渣难溶解 a few residues are difficult to be dissolved

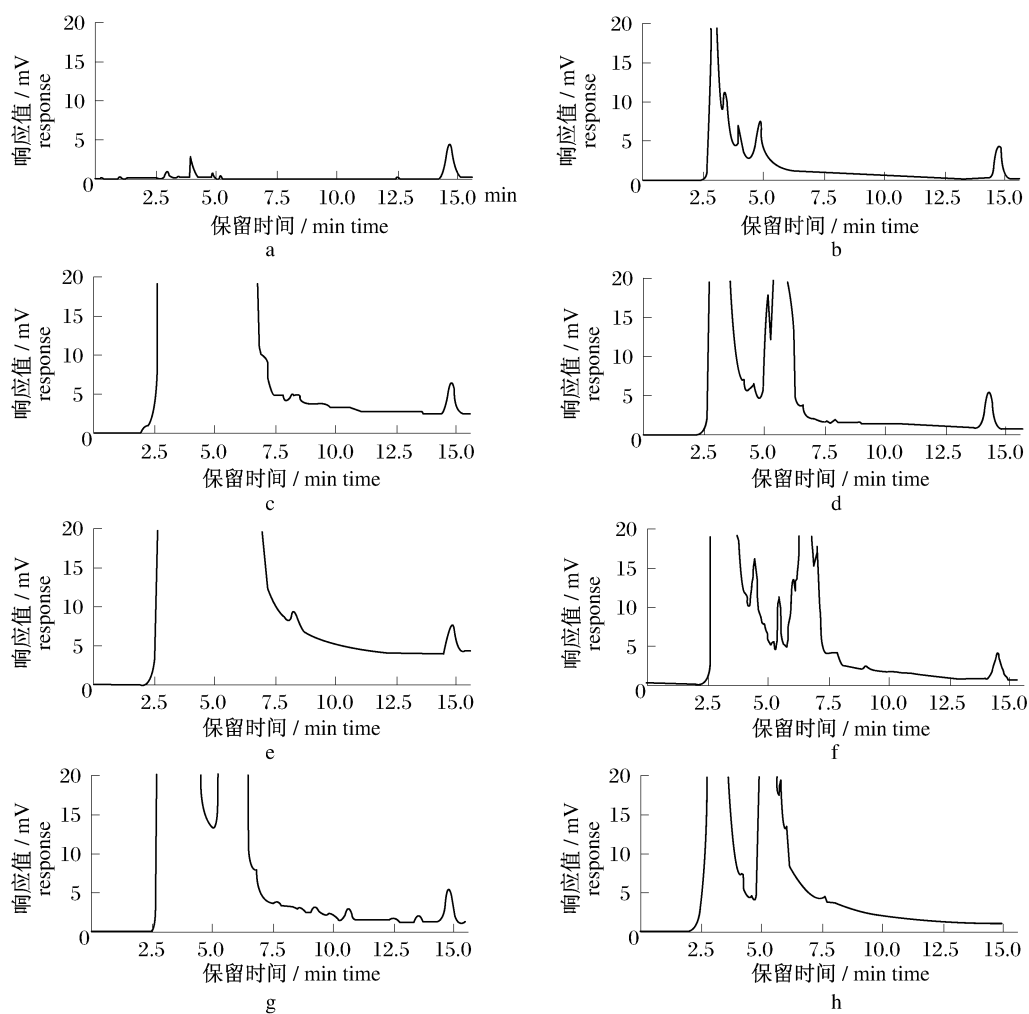


图 1 伊维菌素的色谱图

a. 1.00 mg/L IVM 标准工作液; b. 加标 1.00 mg/L 的血浆样品; c. 加标 1.00 mg/kg 的肝胰脏样品; d. 加标 1.00 mg/kg 的肌肉样品; e. 加标 1.00 mg/kg 的肾脏样品; f. 加标 1.00 mg/kg 的卵巢样品; g. 加标 1.00 mg/kg 的精巢样品; h. 空白肌肉样品。

Fig.1 Chromatogram of IVM

a. standard; b. spiked plasma of 1.00 mg/L IVM; c. spiked hepatopancreas of 1.00 mg/kg IVM; d. spiked muscle of 1.00 mg/kg IVM; e. spiked kidney of 1.00 mg/kg IVM; f. spiked ovary of 1.00 mg/kg IVM; g. spiked spermary of 1.00 mg/kg IVM; h. blank muscle tissue.

2.3 标准曲线

取质量浓度分别为 0.025、0.05、0.10、0.25、0.50、1.00 mg/L 的系列标准 IVM 溶液直接进行 HPLC 分析,每个浓度平行测定 3 次,在质量浓度为 0.025 ~ 1.00 mg/L 的范围内,系列标准 IVM 溶液的色谱峰高与其浓度具有良好的线性关系,回归方程为 $Y_1 = 1\,997.66X_1 - 0.58$, $R^2 = 0.999\,9$ (Y - 峰高, X - IVM 浓度)。

准确称取 1.00 g 的组织或量取 1.00 mL 的血浆样品,加入 1 mL 0.025 ~ 1.00 mg/L 的系列标准 IVM 溶液,按 1.5 项方法处理,每个浓度设 3 个平行,在加标质量浓度为 0.025 ~ 1.00 mg/L 的范围内,肌肉样品中 IVM 色谱峰高与其浓度具有良好的线性关系,回归方程分别为

$$\text{血浆}(Y_2): Y_2 = 1\,592.96X_2 + 19.76,$$

$$R^2 = 0.999\,6$$

$$\text{肝胰脏}(Y_3): Y_3 = 1\,730.75X_3 + 23.05,$$

$$R^2 = 0.999\,4$$

$$\text{肌肉}(Y_4): Y_4 = 1\,919.00X_4 + 23.99,$$

$$R^2 = 0.999\,4$$

$$\text{肾脏}(Y_5): Y_5 = 1\,841.99X_5 + 14.70,$$

$$R^2 = 0.999\,5$$

$$\text{卵巢}(Y_6): Y_6 = 1\,365.90X_6 + 12.11,$$

$$R^2 = 0.999\,9$$

$$\text{精巢}(Y_7): Y_7 = 1\,620.05X_7 + 15.40,$$

$$R^2 = 0.999\,0$$

(Y - 峰高, X - IVM 浓度)

2.4 精密度和回收率

组织中 IVM 添加水平为 0.04、0.20、0.80 mg/kg 和血浆中 IVM 添加水平为 0.04、0.20、0.80 mg/L,按样品处理的方法,每隔一天测 1 次,共测 3 次,每个浓度设 5 个平行,据此计算加标样品的平均批内、批间 RSD 以及回收率,结果见表 2。平均批内 RSD 为 2.80% ~ 3.99%,平均批间 RSD 为 4.18% ~ 6.01%,回收率均在 90% 以上,因此该检测方法精密度较好,回收率高。

表 2 鲫血浆、肌肉、肝胰脏、肾脏、性腺中 IVM 回收率和精密度的测定结果

Tab.2 Results of determination of recovery and precision in crucian tissues

项目 item	血浆加标 spiked plasma	肌肉加标 spiked muscle	肝胰脏加标 spiked hepatopancreas	肾脏加标 spiked kidney	卵巢加标 spiked ovary
添加浓度 (mg/L) added	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
实测浓度 (mg/L) found	0.038 4	0.038 0	0.032 6	0.038 6	0.036 4
	0.201 0	0.185 0	0.201 5	0.180 6	0.201 8
	0.759 5	0.768 2	0.804 1	0.667 5	0.811 5
回收率 (%) recovery	96.11	95.12	81.39	96.51	90.95
	100.51	92.50	100.74	90.31	100.92
	94.93	96.03	100.51	83.44	101.44
平均回收率 (%) mean recovery	97.18 ± 2.94	94.55 ± 1.83	94.21 ± 11.11	90.09 ± 6.54	97.77 ± 5.91
批内 RSD (%) within-batch RSD	5.77	3.87	6.02	3.64	3.87
	3.22	0.52	3.53	2.07	3.17
	2.97	3.25	1.62	4.19	1.36
平均批内 RSD (%) average within-batch RSD	3.99 ± 1.55	2.55 ± 1.78	3.72 ± 2.21	3.30 ± 1.10	2.80 ± 1.30
批间 RSD (%) between-batch RSD	8.87	7.27	8.70	5.03	6.86
	5.11	3.16	2.60	2.86	7.02
	4.04	3.48	1.24	4.81	1.42
平均批间 RSD (%) average between-batch RSD	6.01 ± 2.54	4.64 ± 2.29	4.18 ± 3.97	4.23 ± 1.19	5.10 ± 3.19

2.5 方法检出限

鲫肌肉、肝胰脏、肾脏和性腺组织的处理过程完全相同,IVM 在这几种组织中的回收率以及色谱图等均很相似。由于鲫肌肉组织是人们主要的

取食部分,而血浆样品的处理与其它组织略有不同,故本实验只选取肌肉组织和血浆样品做方法检出限 (method detection limits, MDL)。根据美国 EPA SW-846 中规定的检出限研究方法,测定

2组低浓度加标样品(0.025 mg/kg),每组设7个平行样,进行差异显著性分析,计算标准偏差S。以公式 $MDL = 3.143 \cdot S$ 求出方法检出限^[13]。

方法检出限的测定结果见表3,取 $\alpha = 0.05$,血液的两组数据经差异显著性检验可知 $F = 0.02 < F(0.05) = 4.75$,两组数据无显著差异。计算可得

$S = 0.0024$, $MDL = 3.143 \cdot S = 0.0075$,即血浆中IVM的检出限为7.5 $\mu\text{g/L}$ 。肌肉样品中的两组数据经差异显著性检验可知 $F = 0.09 < F(0.05) = 4.75$,两组数据无显著差异。计算可得 $S = 0.0022$, $MDL = 3.143 \cdot S = 0.0070$,即肌肉中IVM的检出限为7.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

表3 RP-HPLC的方法检出限
Tab.3 Results of method detection limits by RP-HPLC

项目 item	添加浓度(mg/L) added	实测浓度(mg/L) found						
血液(mg/L) blood	0.025	0.022 1	0.026 5	0.024 0	0.024 6	0.018 4	0.022 7	0.025 9
		0.024 0	0.025 9	0.023 4	0.025 3	0.023 4	0.021 5	0.019 6
肌肉(mg/kg) muscle	0.025	0.020 9	0.021 9	0.019 3	0.020 3	0.024 0	0.025 5	0.022 4
		0.022 9	0.026 6	0.020 3	0.019 8	0.019 8	0.020 9	0.021 4

2.6 检测方法在药物残留与药动学研究中的应用

取鲫40条,按400 $\mu\text{g/kg}$ (药量/体重)的剂量单次口灌给药,给药后6 h开始正常喂食。另取5条鲫,作为空白对照。实验鱼共分8组,每组5条,分别于给药后1、4、16、48、192、288、480、600 h取样,每次取一组鱼(5条),取其肌肉组织,按建立的检测方法测定肌肉中IVM的含量。图2为IVM在鲫肌肉中的药时曲线,经药代动力学软件DAS 2.0处理后发现,鲫肌肉中IVM的药代动力学特征符合一级吸收和一级消除的单室模型,模型方程:

$$C_t = A(e^{-K_e t} - e^{-K_a t}), \quad A = \frac{D_0 K_a}{V_d (K_a - K_e)}$$

式中, K_a :吸收速率常数; K_e :消除速率常数; D_0 :给药剂量; V_d :中央室分布容积鲫肌肉中IVM的药代动力学参数见表4,拟合药时方程:

$$C_{\text{肌肉}} = 0.041(e^{-0.002t} - e^{-1.921t}), \quad R^2 = 0.81$$

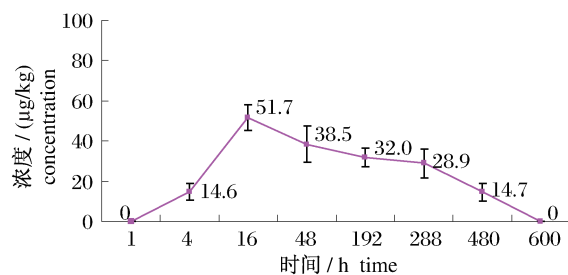


图2 鲫肌肉中IVM的药时曲线(单次口灌给药)
Fig.2 Concentration-time curve of IVM in muscle tissues (a single oral administration)

表4 IVM在鲫肌肉中的药代动力学参数
Tab.4 Pharmacokinetic data of IVM in crucian muscle tissues

房室参数 compartment parameter	单位 unit	参数值 parameter data
$t_{1/2}$	h	319.5
K_e	1/h	0.002
V_1/F	L/kg	9.707
CL/F	L/h · kg	0.021
$AUC_{(0-1)}$	mg/L · h	13.94
$AUC_{(0-\infty)}$	mg/L · h	18.99
K_a	1/h	1.921
T_{lag}	h	0
C_{max}	mg/kg	0.041

为保障水产品的食用安全性,通常根据国家规定的最大残留限量(maximum residue limits, MRL)标准和动物对药物的残留消除规律来确定休药期。农业部无公害食品质量标准对猪肉和牛肉中IVM的残留量有明确规定,但尚无鱼肉中残留的限量要求。暂取牛、猪中IVM的限量低值0.02 mg/kg为标准,在25 $^{\circ}\text{C}$ 水温条件下,若按0.4 mg/kg(药量/体重)的剂量单次口灌给药,通过药时方程可计算出休药期不得少于15 d。

3 讨论

IVM是近30年来最优秀的广谱抗寄生虫药之一,长期作为兽药使用。自苏格兰将其用于鲑鱼养殖的海虱防治后,IVM在水产养殖中的应用越来越广泛,并取得了非常理想的效果。尽管如此,人们对IVM作为渔药使用还存在很

多顾虑,因为 IVM 易残留在底泥中,可能会对水生生态系统造成影响,因此美国食品和药物监督管理局只批准其作为兽药使用,而非作为渔药使用^[14]。尽管 IVM 对水生生态系统的影响评估还在进一步研究中,但它已被广泛应用于水产养殖中已是一个不争的事实,因此建立一种快速、简便、准确的鱼肉中 IVM 的残留检测方法已迫在眉睫。

HPLC-荧光检测法、HPLC-MS 法和 ELISA 法检测的灵敏度高,但不同生物样品中 IVM 的检出限不尽相同。刑丽红等^[15]、农启才等^[16]、侯晓林等^[17]、刘迎贵等^[18]采用 HPLC-荧光检测法分别检测了鲈组织、人血清、牛肝、猪牛羊肉中 IVM 的含量,检出限分别为 0.20、0.25、0.52、2.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。张云等^[19]采用 HPLC-MS 法检测鳗鱼肌肉中 IVM 的残留,检测限为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$,Katharios 等^[2]采用 ELISA 法测定海鲷血清中 IVM 的含量,检出限为 1.6 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。本论文中的方法检出限为 7 $\mu\text{g}/\text{kg}$,较上述 3 种方法的检出限高但略低于同类 HPLC-UV 检测法。赵剑虹等^[20]用 HPLC-UV 法测定猪血清中 IVM 的含量,检出限为 10 $\mu\text{g}/\text{L}$;商检行业标准 SN0650-1997 采用 HPLC-UV 法的检出限为 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[21]。本实验方法的优点在于样品前处理简便,目前文献中报道的生物样品中 IVM 的检测法几乎均需采用 SPE 柱净化-洗脱等步骤,HPLC-荧光检测法还需柱前衍生化;HPLC-MS 法和 ELISA 法检测成本高,较难推广使用。本实验方法通过优化色谱条件来实现 IVM 与杂质的分离,无须衍生化和 SPE 柱净化-洗脱等步骤,也能得到较好的色谱图。同时该方法操作步骤简便,回收率高(90%以上),适用范围广,可用于鱼体各个脏器中 IVM 的含量测定。尽管该检测法的检出限(7 $\mu\text{g}/\text{kg}$)高于 HPLC-荧光检测法,但也可用于残留检测(MRL = 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$),且非常适用于药代动力学研究。

利用该方法进行口灌给药后,鲫肌肉中 IVM 的残留研究,研究发现:25 $^{\circ}\text{C}$ 水温条件下,按剂量 0.4 mg/kg (药量/体重)单次给药后,休药期不得少于 15 d。由于休药期与水温条件、给药剂量以及给药方式都有关系,因此在实际养殖过程中,要根据情况适当调整休药期。伊维菌素具有一定的神经毒性,故一般给药剂量以 0.1 ~ 0.4 mg/kg

(药量/体重)为宜。

参考文献:

- [1] 陈琳,陈仗榴.大环内酯类抗寄生虫药耐药性研究进展[J].动物医学进展,2005,26(10):9-13.
- [2] Katharios P, Iliopoulou G I, Antimisariis S, et al. Pharmacokinetics of ivermectin in sea bream, *Sparus aurata* using a direct competitive ELISA [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2002, 26 (5): 189-195.
- [3] Grant A, Briggs A D. Use of ivermectin in marine fish farms: some concerns [J]. Marine Pollution Bulletin, 1998, 36(8):566-568.
- [4] 谢卫华,张新强.伊维菌素治疗斜管虫鱼病效果[J].科学养鱼,2007,(4):59-59.
- [5] 潘洪彬,陈浩洲.阿维菌素治愈维红斑例[J].科学养鱼,2005,11:57-57.
- [6] 周光宏,徐幸莲,孙京新. NY5029—2001 无公害食品 猪肉[S].北京:中国标准出版社,2001.
- [7] 周光宏,徐幸莲,孙京新. NY5044—2001 无公害食品牛肉[S].北京:中国标准出版社,2001.
- [8] Ali M S, Sun T, McLeroy G E, et al. Simultaneous determination of eprinomectin, moxidectin, abamectin, doramectin and ivermectin in beef liver by LC with fluorescence detection [J]. Journal of AOAC International, 2000, 83(1):31-38.
- [9] Nagata T, Miyamoto F, Hasegawa Y, et al. Simultaneous determination of residual antiparasitic lactones in bovine muscle and liver by liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Journal of AOAC International, 2003, 86 (3): 490-493.
- [10] Riet V D, Jeffrey M, Brothers N N, et al. Simultaneous determination of emamectin and ivermectin residues in atlantic salmon muscle by high performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Journal of AOAC International, 2001, 84(5):1358-1362.
- [11] Pantelis K, Michalis P, Joan I G. Accumulation of ivermectin in the brain of sea bream, *Sparus aurata* after intraperitoneal administration [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2004, 17(1):9-12.
- [12] Ali M S, Sun T, McLeroy G E, et al. Confirmation of eprinomectin, moxidectin, doramectin, and ivermectin in beef liver by liquid chromatography/positive ion atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry [J]. Journal of AOAC

- International, 2000, 33(1): 39-52.
- [13] Croubels S, Baere S D, Cherlet M, *et al.* Determination of ivermectin B(1a) in animal plasma by liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2002, 37(2): 840-847.
- [13] EPA SW-846. The Method Detection Limit Procedure of the U. S. Environmental Protection Agency [CP/OL]. <http://www.cee.vt.edu/ewr/environmental/teach/smprimer/mdl/mdl.htm#USEPA>.
- [14] Shaikh B, Rummel N, Gieseke C, *et al.* Residue depletion of tritium-labeled ivermectin in rainbow trout following oral administration [J]. *Aquaculture*, 2007, 272(1-4): 192-198.
- [15] 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, 29(4): 52-57.
- [16] 农启才, 任斌, 黎曙霞, 等. 口服伊维菌素的人体药代动力学 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2001, 17(3): 203-206.
- [17] 侯晓林, 何继红, 杜向党, 等. 牛肝中阿维菌素类药物残留的高效液相色谱荧光检测方法的研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(5): 500-503.
- [18] 刘迎贵, 苏亚, 韩琪, 等. 牛羊猪肉组织中伊维菌素残留量检测 HPLC 法的改进 [J]. *中国兽药杂志*, 2007, 41(7): 28-31.
- [19] 张云, 江昌木, 陈虹, 等. 液相色谱串联质谱法同时测定鳗鱼中阿维菌素和伊维菌素残留量 [J]. *分析试验室*, 2008, 27(5): 104-107.
- [20] 赵剑虹, 孙成均, 毛丽莎, 等. 高效液相色谱法测定猪血清中的伊维菌素 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2005, 36(1): 130-131.
- [21] 姜伟, 张晓辉, 王洪涛, 等. SN0650-1997 出口肉及肉制品中伊维菌素残留量的检测方法——液相色谱法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.

Research on the method for ivermectin determination in different crucian tissues

PENG Zhang-xiao¹, JIANG Min^{1,2*}, WU Hao¹, HE Lin¹, YANG Li¹

(1. *Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;*

2. *Research and Engineering Center on Aquatic Environment Ecosystem, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)*

Abstract: A method using reversed phase high performance liquid chromatography with UV detection has been developed for the determination of ivermectin residues in crucian blood, muscle, hepatopancreas, kidney and gonad tissues. Homogenized crucian tissues were extracted with ethylacetate prior to centrifugation. The supernatants were evaporated to dryness at 45 °C with nitrogen. The residues were dissolved with the mixture of methanol-water (4:1, V/V) and defatted with hexane. After centrifugation, the underlayers were filtrated with 0.22 μm filter and then 20 μL filtrates were detected by reverse phase high performance liquid chromatography with 245 nm detection wavelength. Its method detection limit was 7.5 μg/L and 7.0 μg/kg in plasma and muscle respectively. The good linear range was 0.025 – 1.00 mg/kg in crucian muscle, hepatopancreas, kidney, gonad tissues and 0.025 – 1.00 mg/L in plasma. In different tissues, the average within-batch and the between-batch standard deviations of this method are (2.55 ± 1.78)% – (3.99 ± 1.55)% and (4.18 ± 3.97)% – (6.01 ± 2.54)% respectively, with an average recovery of (90.09 ± 6.54)% – (97.77 ± 5.91)%. After a single oral administration of 0.4 mg/kg body weight, we detected ivermectin residues in crucian muscle tissues with this method. When the water temperature is 25 °C, we found that the free-drug period of crucian muscle tissues should not be less than 15 days.

Key words: crucian; ivermectin; concentration determination; high performance liquid chromatography

Corresponding author: JIANG Min. E-mail: mjiang@shou.edu.cn