

过海天, 范丽萍, 张贺超, 等. 猫血浆中莫昔克丁 LC-MS/MS 检测方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (5): 53-60.

GUO H T, FAN L P, ZHANG H C, et al. Development an LC-MS/MS method for moxidectin determination in cat plasma [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (5): 53-60.

猫血浆中莫昔克丁 LC-MS/MS 检测方法的建立

过海天^{1,2}, 范丽萍¹, 张贺超^{1,2}, 杨亚军¹, 李剑勇^{1,2*}, 周淑贞^{3*}

(1. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所/农业农村部兽药创制重点实验室/

甘肃省新兽药重点实验室, 甘肃 兰州 730050;

2. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070;

3. 佛山市南海东方澳龙制药有限公司, 广东 佛山 528234)

摘要: 旨在研究复方莫昔克丁 (moxidectin, Moxi) 滴剂在猫体内的药代动力学过程。以 Moxi-D₃ 为内标, 建立了猫血浆中 Moxi 的液相色谱-串联三重四极杆质谱联用 (LC-MS/MS) 检测方法, 以乙腈为提取溶剂, 水浴超声辅助提取, 提取液浓缩至干后复溶, LC-MS/MS 检测, 内标法定量。结果: 猫血浆基质对 Moxi 的定量检测干扰较小, 检测限 (LOD) 为 0.5 ng/mL, 定量限 (LOQ) 为 1 ng/mL; 基质效应不显著, 以溶剂标准溶液制备标准曲线, Moxi 在 1~120 ng/mL 的浓度范围内, 线性关系良好 ($R^2 > 0.99$); 在不同浓度的添加水平下, 批内、批间平均准确度分别在 90.15%~114.81% 和 101.32%~104.10%, 批内、批间变异系数均小于 11%; -18 °C 以下放置时, 标准储备液 9 个月内稳定, 标准工作液 2 个月内稳定; 低、高浓度的加标样品, -18 °C 以下冷冻保存 6 个月, 或反复冻融后均稳定, 处理液 4 °C 放置 72 h 稳定。结论: 本方法特异性强, 灵敏度高, 稳定可靠, 可用于复方 Moxi 滴剂在猫体内药代动力学的研究。

关键词: 猫; 血浆; 莫昔克丁; 液相色谱-串联三重四极杆质谱联用; 内标法

中图分类号: S859 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2026)05-0053-08

Development an LC-MS/MS method for moxidectin determination in cat plasma

GUO Haitian^{1,2}, FAN Liping¹, ZHANG Hechao^{1,2}, YANG Yajun¹, LI Jianyong^{1,2*}, ZHOU Shuzhen^{3*}

(1. Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences of Chinese Academy of Agricultural Sciences/

Key Laboratory of Veterinary Pharmaceutical Development of Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Gansu

Province Key Laboratory of New Animal Drug Project, Lanzhou 730050, China;

2. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

3. Eastern Along Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528234, China)

Abstract: To investigate the pharmacokinetics of compound moxidectin (Moxi) drops in cats, a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed for the determination of Moxi in cat plasma using Moxi-D₃ as the internal standard. Acetonitrile was used as the extraction solvent. The samples were processed by ultrasonication in a water bath, and the extract was concentrated to dryness. Finally, the residue was reconstituted and analyzed by LC-MS/MS, with quantification performed using the internal standard method. The results showed that the cat plasma matrix did not interfere with the quantitative determination of Moxi. The method exhibited high sensitivity, with a limit of detection (LOD) of 0.5 ng/mL and a limit of quantification (LOQ) of 1 ng/mL. The Matrix effects were negligible, hence, a standard curve was prepared with solvent standard solution, and the linearity of Moxi was good in the range of 1 to 120 ng/mL ($R^2 > 0.99$). The intra-batch and inter-batch accuracy ranged from 90.15% to 114.81% and 101.32% to 104.10% at different concentration levels of spiked samples, respectively. The coefficients of variation (CV) of intra-batch and inter-batch samples were less than 11%. The standard stock and working solutions stayed stable for 9 and 2 months at -18 °C, respectively. The spiked samples with different concentrations were stable after 6 months of freezing and storage at -18 °C, and still stable after repeated freezing and thawing. The processed solutions

收稿日期: 2025-05-30; 修回日期: 2026-03-03

基金项目: 佛山市自筹经费类科技创新项目 (2220001004511); 中国农业科技创新工程项目 (CAAS-25-LZIHPS-02)

第一作者: 过海天, 男, 硕士研究生

* 通信作者: 李剑勇, 博士, 研究员, 研究方向为兽药学, E-mail: lijy1971@163.com; 周淑贞, 硕士, 高级兽医师, 研究方向新型兽药创制, E-mail: zhousz@easternalong.com.

of the spiked samples remained stable at 4 °C for 72 h. These results indicated that the proposed method had good specificity, high sensitivity, stability and reliability, and could be used for the pharmacokinetics study of the compound moxidectin drops in cats.

Keywords: cats; plasma; moxidectin; LC-MS/MS; internal standard

莫昔克丁 (moxidectin, Moxi), 又称为莫西菌素或莫西克汀, 是由链霉菌发酵产生的半合成单一成分的大环内酯类抗寄生虫药物^[1]。Moxi 属于米尔贝霉素家族, 是奈马菌素的衍生物, 属于第三代阿维菌素类 (AVMs) 药物。Moxi 与其他 AVMs 相比, 具有成分单一、驱虫谱广、驱虫活性强、长效、安全等特点^[2]。目前, 临床上常用的 Moxi 剂型有浇泼剂、注射剂、片剂、透皮剂、口服凝胶等, 其被用于牛、羊、马、猪、犬、猫等动物寄生虫病的防治^[1-2]。

本研究依据《兽用化学药物临床药代动力学试验指导原则》^[3], 《生物样品定量分析方法验证技术指导原则》^[4], 并参考《中国药典》中《9012 生物样品定量分析方法验证指导原则》^[5]的相关要求, 以稳定同位素标记的 Moxi 为内标, 建立基于液相色谱-串联三重四极杆质谱联用 (LC-MS/MS) 的猫血浆中 Moxi 含量测定方法, 以期明确复方 Moxi 滴剂对猫给药后的血浆药代动力学特征。

1 材料与方法

1.1 主要材料

Moxi、Moxi-D₃, 购自上海甄准生物科技有限公司; 猫血浆, 肝素钠抗凝, -18 °C 以下保存, 购自上海源叶生物科技有限公司; 另有自行采集的猫空白血浆, 采用肝素钠抗凝; 甲酸 (质谱纯), 购自日本东京化成工业株式会社; 甲酸铵, 购自美国赛默飞公司; 甲醇、乙腈、异丙醇 (色谱纯) 和乙腈 (质谱纯), 购自德国默克公司; 水为超纯水, 由优普®超纯水系统制备; 尼龙针筒式微孔滤膜 (13 mm 0.2 μm), 购自深圳逗点生物技术有限公司。

LC-MS/MS (Agilent 1200-6410A), 数据采集与处理软件为 MassHunter, 美国 Agilent Technologies 公司产品; 低温离心机 (Multifuge X3R), 美国 Thermo Scientific 公司产品; 涡旋混合器 (Vortex Genie 2), 美国 Scientific Industries 公司产品; 样品快速蒸发系统 (Rapid Vap), 美国 Labconco 公司产品; 数控超声波清洗器 (KQ-600DE), 昆山市超声仪器有限公司产品。

1.2 溶液配制

Moxi 标准储备液的配制: 精确称量 10 mg Moxi 标准品, 加入适量质谱纯乙腈使其完全溶解, 随后将溶液全部转移至 10 mL 量瓶中定容, 制得质量浓度为 1 mg/mL 的标准储备液, -18 °C 以下存放。

Moxi 中间标准储备液的配制: 准确移取 1 mL Moxi 标准储备液至 10 mL 容量瓶中, 以质谱纯乙腈稀释至刻度, 摇匀, 制得浓度为 100 μg/mL 的 Moxi 中间标准储备液, -18 °C 以下存放。

Moxi 标准工作液的配制: 准确移取适量 Moxi 中间标准储备液, 以质谱纯乙腈稀释, 分别制成浓度为 0.01、0.02、0.04、0.1、0.2、0.4、1、2 和 2.4 μg/mL 的 Moxi 系列标准工作液, -18 °C 以下存放。

Moxi-D₃ 内标储备液的配制: 将规格为 1.0 mg/瓶的 Moxi-D₃ 以质谱纯乙腈完全溶解, 随后将溶液全部转移至 10 mL 量瓶中定容, 制得质量浓度为 100 μg/mL 的内标储备液, -18 °C 以下存放。

Moxi-D₃ 内标工作液的配制: 移取 100 μg/mL 的 Moxi-D₃ 内标储备液适量, 以质谱纯乙腈稀释成 0.2 μg/mL 的内标工作液, -18 °C 以下存放。

其他溶液配制: 0.1% 甲酸-乙腈溶液, 准确移取甲酸 1 mL, 以乙腈稀释至 1 000 mL, 混匀即得, 临用现配; 0.1% 甲酸-5 mmol/L 甲酸铵溶液, 准确移取甲酸 1 mL, 加入 315 mg 甲酸铵, 以超纯水稀释至 1 000 mL, 混匀即得, 临用现配; 混合洗针液, 取甲醇、乙腈、异丙醇和超纯水各 100 mL, 混匀即得, 临用现配。

1.3 色谱条件和质谱条件

色谱柱为 Agilent Eclipse plus C18 (3.0 mm × 50 mm, 1.8 μm); 流动相 A 为 0.1% 甲酸-乙腈溶液, 流动相 B 为 0.1% 甲酸和 5 mmol/L 甲酸铵溶液, 梯度洗脱 (表 1)。进样量 10 μL, 运行时间 7 min, 柱温 35 °C, 2 次进样之间的平衡时间 0.5 min, 每针进样前以混合洗针液 (甲醇、乙腈、异丙醇、水比例为 1 : 1 : 1 : 1) 自动洗针 20 s。

表 1 梯度洗脱条件

时间/min	A/%	B/%	流速/(mL·min ⁻¹)
0	20	80	0.4
0.5	20	80	0.4
1.8	100	0	0.4
4.0	100	0	0.4
6.0	20	80	0.4
6.5	20	80	0.4

优化后的多离子反应监测 (MRM) 参数见表 2。采用电喷雾离子源 (ESI) 正离子模式, 毛细管电压

4 000 V, 喷雾器压力 40 psi, 干燥气 (N₂) 温度 (ΔEMV) 为+500 V。200 ℃, 流量 13 L/min, 电子倍增器电压增量

表 2 优化后的 MRM 参数

化合物	母离子	子离子	驻留时间/ms	碎裂电压/V	碰撞能量/eV	极性
Moxi	640.4	528.3*	100	110	2	+
		498.3	100	110	8	+
Moxi-D ₃	643.4	531.3*	100	105	2	+
		499.3	100	105	8	+

注: * 为定量离子。

1.4 猫血浆样品的处理

取猫血浆 0.2 mL, 加入 10 μL 浓度为 0.2 μg/mL 的 Moxi-D₃ 内标工作溶液, 涡旋 30 s 以充分混匀。加入 600 μL 乙腈, 涡旋 1 min, 水浴超声处理 10 min, 4 ℃ 条件下, 以 12 000 r/min 离心 10 min, 45 ℃ 条件下将上清液减压浓缩至干, 加入 200 μL 乙腈使残渣完全溶解, 上清液过 0.2 μm 尼龙微孔滤膜后, 以备 LC-MS/MS 检测。

1.5 方法学验证

1.5.1 选择性

对标准溶液进行 LC-MS/MS 检测。取不同来源的空白猫血浆, 制成空白样品和空白加内标样品, 依 1.4 项下样品处理方法进行处理, 按 1.3 项下分析方法进行检测, 以考察空白血浆中内源性物质或其他组分的干扰, 其响应需低于 Moxi 定量限 (LOQ) 响应的 20%, 并低于 Moxi-D₃ 响应的 5%。

在相同测试条件下, 试样溶液中待测药物 Moxi 与其对应内标 Moxi-D₃ 的保留时间之比, 与标准溶液中的保留时间比进行比较, 要求偏差在 1% 以内; 同时, 试样溶液中定性、定量离子的相对离子丰度, 应与浓度相当的校正标准溶液中的相对离子丰度保持一致, 允许的偏差范围为 ±40%^[6]。

1.5.2 灵敏度

取空白猫血浆样品 0.2 mL 多份, 分别加入浓度为 0.01 和 0.02 μg/mL 的 Moxi 标准工作液 10 μL, 以及浓度为 0.2 μg/mL 的 Moxi-D₃ 内标工作液 10 μL, 涡旋混匀后, 得到相应浓度的空白猫血浆 Moxi 加标样品, 依 1.4 和 1.3 项下方法, 进行前处理和检测, 记录色谱图, 采用峰高对峰高的方式计算 Moxi 定量离子的信噪比 (SNR), 结合准确度及精密度的试验结果, 确定本方法的检测灵敏度, 即检测限 (LOD) 和 LOQ。

1.5.3 基质效应

取 6 批不同来源的猫空白血浆 0.2 mL, 不加内标, 按照 1.4 项下样品处理方法进行前处理, 得空白

基质液。分别添加 10 μL 浓度为 0.04 和 2 μg/mL 的 Moxi 标准工作液, 以及浓度为 0.2 μg/mL 的 Moxi-D₃ 工作液, 制成浓度为 2 倍 LOQ 和高浓度 (HQC) 的加标基质样品, 依 1.3 项下的方法检测, 记录色谱图, 对 Moxi 和 Moxi-D₃ 的定量离子进行积分 (峰面积: Area)。根据公式 (1) 和 (2), 分别计算待测物 Moxi 及内标 Moxi-D₃ 的基质因子 (MF), 根据公式 (3) 计算经内标归一化的不同浓度的基质效应 (ME_{is}), S1 为标准溶液定量离子峰面积, S2 为加标基质样品定量离子峰面积。

$$MF_{\text{Moxi}} = \text{Area}_{\text{S2Moxi}} \div \text{Area}_{\text{S1Moxi}}, \quad (1)$$

$$MF_{\text{Moxi内标}} = \text{Area}_{\text{S2Moxi内标}} \div \text{Area}_{\text{S1Moxi内标}}, \quad (2)$$

$$ME_{\text{is}} = MF_{\text{Moxi}} \div MF_{\text{Moxi内标}} \times 100\%。 \quad (3)$$

1.5.4 线性范围

根据基质效应的结果, 选择合适的标准曲线制备方式, 制备内标浓度为 10 ng/mL, 对应 Moxi 在猫血浆样品浓度为 0.5、1、2、5、10、20、50、100 和 120 ng/mL 的系列标准溶液样品。按 1.3 项所述的检测方法, 以 Moxi 与内标浓度的比值作为横坐标 (x), 以 Moxi 与内标定量离子的峰面积比值作为纵坐标 (y), 并选用适当的加权方式, 进行线性回归分析。

1.5.5 准确度和精密度

制备加标水平分别为 LOD、LOQ、低浓度 (LQC)、中浓度 (MQC) 和 HQC 的质控样品, 依 1.4 项下样品处理方法进行提取净化, 每一浓度水平 6 个平行, 按 1.3 项下分析方法进行检测, 由同时制备的随行标准曲线分析样品。

1.6 样品稳定性

1.6.1 标准储备液稳定性

将 Moxi 标准储备液 (1 mg/mL)、中间标准储备液 (100 μg/mL) 于 -18 ℃ 以下存放, 分别于 1、3、6 和 9 个月后取出。将 Moxi 储备液和中间标准储备液稀释至 1 μg/mL, 分别取稀释后的储备液、中间储备液各 10 μL, 以及 0.2 μg/mL 的内标工作液 10 μL,

加入 180 μL 乙腈中, 制成储备液稳定性样品, 按 1.3 项下分析方法进行检测。由新制备的对照样品分析样品。

1.6.2 标准工作液稳定性

将浓度为 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Moxi 标准工作液放置于 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 以下保存, 分别于 1 个月和 2 个月取出, 各取 10 μL , 加入 180 μL 乙腈中, 再加入浓度为 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的内标工作液, 制成标准工作液稳定性样品, 按 1.3 项下分析方法进行检测。利用新制备的对照样品分析样品。

1.6.3 冻存稳定性

将空白加标样品, 于 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 以下冻存, 分别于 2、4 和 6 个月取出, 室温下解冻, 依 1.4 和 1.3 项下的方法, 进行处理和检测。每一浓度水平设置 6 个平行, 同时设置空白对照、空白加内标对照和对应相同浓度的新配制质控样品, 同法处理和检测。

1.6.4 反复冻融稳定性

将空白加标样品, 每一浓度水平 6 个平行样, 于

$-18\text{ }^\circ\text{C}$ 以下完全冻结, 每 12 h 取出于室温彻底融化后再进行冷冻, 如此反复循环 3 次, 依 1.4 和 1.3 项下的方法, 添加内标后, 进行处理和检测, 同时设置空白对照、空白加内标对照和对应相同浓度的新配制质控样品, 同法处理和检测。

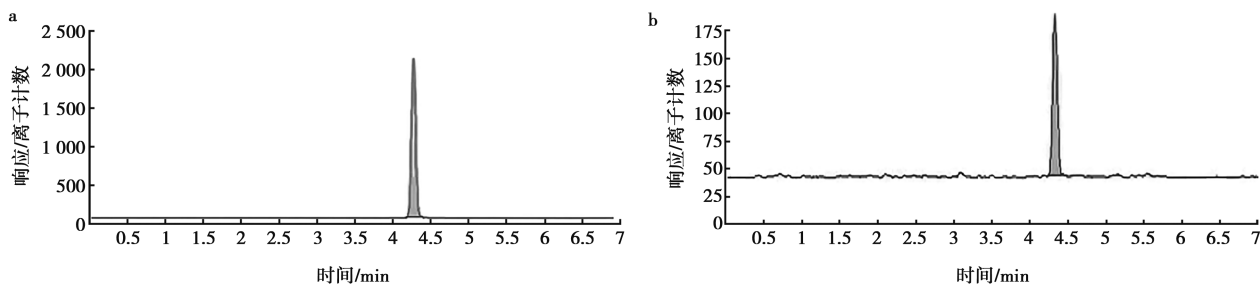
1.6.5 样品处理液稳定性

将空白加标样品, 每一浓度各 6 个平行样品, 依 1.4 和 1.3 项下的方法, 添加内标后进行处理, 复溶液过滤于样品瓶, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 存放 72 h 后检测。

2 结果与分析

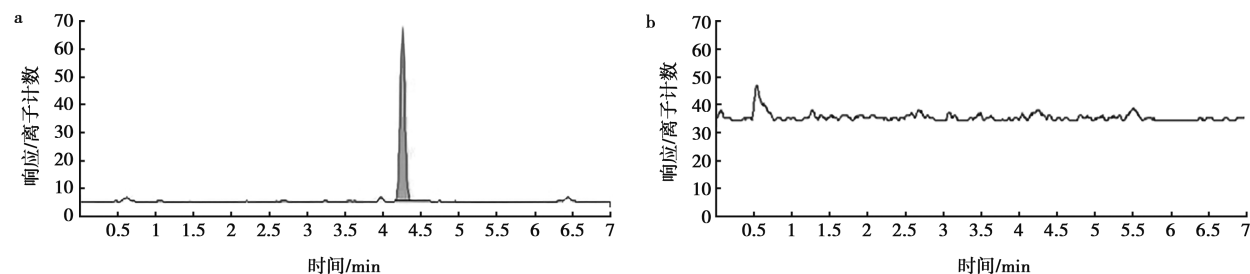
2.1 方法的选择性

依前述方法, 对 Moxi 及内标的混合标准溶液 (图 1)、加内标空白猫血浆样品 (图 2) 以及不同来源猫血浆的代表性样品 (图 3) 进行前处理与 LC-MS/MS 分析检测。结果显示, 在 Moxi 的保留时间处 (4.3 min), 未发现干扰。



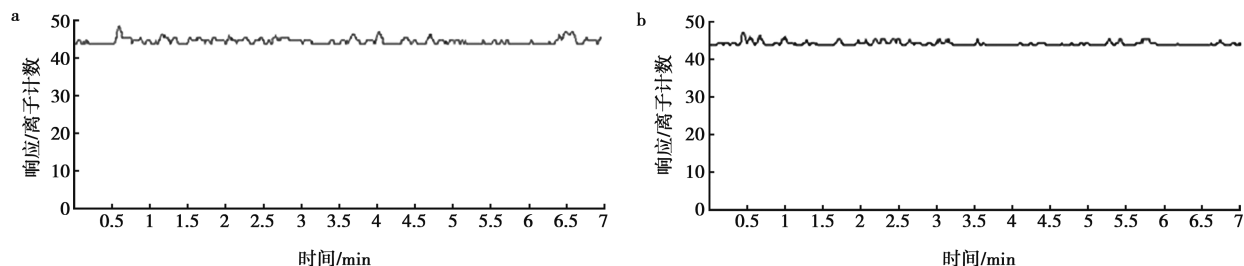
a. Moxi- D_3 的定量离子 643.40 \rightarrow 531.30; b. Moxi 的定量离子 640.40 \rightarrow 528.30。

图 1 Moxi 标准溶液的多反应监测色谱



a. Moxi- D_3 的定量离子 643.40 \rightarrow 531.30; b. Moxi 的定量离子 640.40 \rightarrow 528.30。

图 2 加内标空白猫血浆的多反应监测色谱



a. Moxi- D_3 的定量离子 643.40 \rightarrow 531.30; b. Moxi 的定量离子 640.40 \rightarrow 528.30。

图 3 不同来源猫血浆的代表性多反应监测色谱

2.2 定量下限

对3批不同来源的样品进行前处理和检测，每批每个添加浓度设置6个平行样，结果显示当空白猫血

浆中 Moxi 添加浓度为 0.5 和 1 ng/mL 后，其定量离子 SNR 满足检测要求（表3）。

表3 定量离子 SNR 结果

添加水平	添加浓度/ (ng · mL ⁻¹)	不同进样 SNR					
		1	2	3	4	5	6
LOD	0.5	12.5	16.2	10.3	16.5	19.1	11.5
		6.8	6.4	6.0	6.1	5.8	7.3
		38.7	35.1	26.8	29.8	38.2	22.1
LOQ	1	16.9	21.8	12.6	24.7	14.8	15.3
		16.2	10.9	10.3	12.2	11.7	14.1
		66.5	61.7	69.3	45.5	86.0	66.1

2.3 基质效应

考察结果显示，本方法的平均 ME_{is} 在 95.37% ~

110.32%（表4）， ME_{is} 的变异系数（RSD）均低于10%，满足检测要求。

表4 同位素内标法考察 Moxi 在猫血浆中的 ME_{is} 比较

添加浓度/ (ng · mL ⁻¹)	批次	批内 (n=6)		批间 (n=36)	
		基质效应/%	RSD/%	基质效应/%	RSD/%
2	1	96.22±1.73	1.80	99.12±4.97	5.02
	2	95.37±3.86	4.05		
	3	97.19±2.42	2.49		
	4	101.64±5.21	5.12		
	5	98.79±2.35	2.37		
	6	105.49±5.38	5.10		
100	1	108.91±3.81	3.50	107.01±4.63	4.33
	2	109.86±4.36	3.97		
	3	110.32±1.86	1.69		
	4	105.30±1.98	1.88		
	5	105.24±5.08	4.83		
	6	102.47±4.93	4.81		

2.4 线性范围

根据同位素内标法的 ME_{is} 考察结果，本研究采用系列浓度的 Moxi 溶剂标准溶液绘制标准曲线，采用不同的加权方式进行回归，对不同浓度标液的回算准确度进行比较。结果显示，不同加权方式的 R^2 均大于 0.99。但不同加权方式的标准曲线对低浓度标准溶液的回算准确度存在较大差异，其中无加权 (NONE) 及 log 权重的低浓度回算准确度与其他 5 种加权方式之间，存在较大差异；而加权方式为 $1/x$ 、 $1/x^2$ 、 $1/y$ 、 $1/y^2$ 或 $1/SD^2$ 时，相互之间的差异不显著。

为 $y=1.3542x+0.0947$ （图4）。在 1~120 ng/mL 的浓度范围内线性关系良好 ($R^2=0.9993$)。

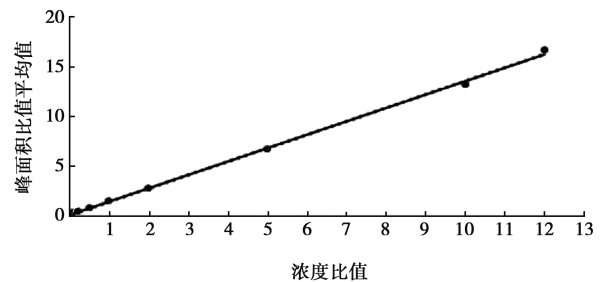


图4 Moxi 的代表性标准曲线

综合比较后，本研究以 $1/x$ 为权重，代表性方程

2.5 准确度和精密度

当空白猫血浆 Moxi 的加标浓度分别为 0.5 和 1 ng/mL 时, 定量离子的 SNR 满足定性和定量检测的要求 (表 3)。因此, 将 0.5 ng/mL 定为 LOD, 本研

究在猫空白血浆中设定了 0.5、1、2、10 和 100 ng/mL 的 Moxi 添加浓度, 本方法的准确度和精密度 (表 5) 满足检测要求。

表 5 猫血浆中 Moxi 检测的方法学准确度与精密度考察比较

添加水平	添加浓度/ (ng · mL ⁻¹)	批次	批内 (n=6)		批间 (n=18)	
			准确度/%	RSD/%	准确度/%	RSD/%
LOD (单点校正, 仅定性)	0.5	1	102.15±8.42	8.25	106.94±12.42	11.62
		2	121.08±6.55	5.41		
		3	97.59±6.19	6.34		
LOQ	1	1	107.36±1.71	1.60	104.10±11.19	10.75
		2	114.81±3.94	3.43		
		3	90.15±4.85	5.38		
LQC (2LOQ)	2	1	105.96±4.02	3.79	103.50±9.57	9.25
		2	111.51±8.61	7.72		
		3	93.02±2.27	2.44		
MQC	10	1	100.13±4.82	4.82	102.65±4.39	4.27
		2	104.33±4.90	4.69		
		3	103.49±2.51	2.43		
HQC	100	1	98.97±2.75	2.78	101.32±3.02	2.98
		2	101.72±3.08	3.03		
		3	103.27±1.59	1.54		

2.6 稳定性

2.6.1 标准溶液

标准储备液及中间储备液 -18 °C 以下存放 9 个

月, 标准工作液在 -18 °C 以下存放 2 个月时, 准确度偏差在 ±15% 以内, 满足稳定性要求, 结果分别见表 6 和表 7。

表 6 -18 °C 以下存放标准储备液、中间储备液的稳定性比较 (n=4)

标液浓度/ (μg · mL ⁻¹)	准确度/%			
	1 个月	3 个月	6 个月	9 个月
100	99.89±6.19	96.40±0.64	97.53±1.71	96.76±0.45
1 000	102.01±3.86	100.03±1.24	100.85±2.00	96.80±1.10

表 7 -18 °C 以下存放标准工作液的稳定性比较 (n=6)

标液浓度/ (μg · mL ⁻¹)	准确度/%	
	1 个月	2 个月
0.02	101.42±1.67	101.42±1.06
2	100.99±2.18	100.84±2.04

2.6.2 加标样品

如表 8 所示, 低、高浓度的空白血浆加标样品, 在 -18 °C 以下冻存 6 个月, 或反复冻融 3 次后, 含量检测结果均值与标示浓度的偏差均在 ±15% 范围内; 加标样品处理液在 4 °C 下存放 72 h 后检测, 准确度、精密度符合定量检测要求。

表 8 加标样品、反复冻融及处理液的存放稳定性 ($n=6$)

储存条件	添加水平	添加浓度/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	冻存时间/月	准确度/%	RSD/%
-18 ℃ 以下冻存	LQC	20	2	95.83±7.04	7.35
			4	101.52±7.39	7.28
			6	89.25±4.60	5.15
	HQC	5 000	2	91.34±2.95	3.24
			4	94.45±1.45	1.53
			6	99.41±1.56	1.57
反复冻融 3 次	LQC	2	—	86.91±5.40	6.21
	HQC	100	—	94.87±2.77	2.92
处理液稳定性	LQC	2	72 h	110.91±2.55	2.30
	HQC	100		106.39±5.14	4.84

3 讨论

生物样品中 Moxi 的定量检测,多采用高效液相色谱-荧光检测法 (HPLC-FLD) 和 LC-MS/MS 法。采用 HPLC-FLD 时,对样品体积、前处理过程、浓缩倍数、进样体积等进行优化后,可以达到接近于 LC-MS/MS 法的灵敏度。Chen 等^[7]以伊维菌素为内标, HPLC-FLD 定量检测血浆 Moxi 浓度,乙腈沉淀血浆蛋白,上清液经 HLB SPE 柱净化, N₂ 吹干洗脱液,然后进行衍生化,内标法定量,结果显示方法 LOQ 为 0.2 ng/mL。Fazzio 等^[8]建立了牛血浆中 Moxi 的 HPLC-FLD 检测方法,以 C₁₈ SPE 柱净化提取液,衍生化之后进样量为 100 μL,外标法定量,方法的 LOQ 为 0.5 ng/mL。陈国庆等^[9]在开展莫昔克丁浇泼剂在猪体内的药代动力学研究时,建立了基于 HPLC-FLD 的猪血浆中 Moxi 浓度检测方法,1 mL 血浆以乙腈沉淀蛋白后,经 HLB SPE 柱净化, N₂ 吹干洗脱液,然后进行衍生化,进样量为 50 μL,外标法定量,方法的 LOD 和 LOQ 分别为 0.4 ng/mL 和 0.5 ng/mL。然而,在采用 HPLC-FLD 进行血浆 Moxi 的定量检测时,均需进行提取液的 SPE 柱净化,再对洗脱液进行吹干,然后进行衍生化等,前处理过程较为耗时,且进样体积较大。

以 LC-MS/MS 对血浆中 Moxi 进行定量检测时,不需进行衍生化,简化了前处理过程,方法 LOQ 可以达到 1 ng/mL 或 0.5 ng/mL,甚至更低的 0.1 ng/mL^[10]。LC-MS/MS 法对生物样品中的 Moxi 进行定量检测时,多采用正离子模式,但也有使用负离子模式的报道^[10]。正离子模式中,多采用与本文一致的特征离子对 640.4→528.3^{*}, 498.3; 也有使用 640.4→123.0^{*}, 622.2 特征离子对的报道^[11]。在血浆样

品的前处理过程中,有进行净化的^[10-12],也有未进行净化的报道^[13];有以阿维菌素为内标^[10,13],也有采用 Moxi-D₃ 为内标的研究^[11-12]。相关方法的灵敏度,在进样体积较小且前处理较为简便的情况下,与 HPLC-FLD 的灵敏度较为类似。

本研究的内标为 Moxi-D₃,样品量为 0.2 mL,乙腈提取,涡旋、水浴超声、离心、浓缩和复溶等前处理过程耗时较短,以标准溶液制备标准曲线,进样量 10 μL, LC-MS/MS ESI⁺ 检测,内标法定量。相比于其他研究报道,本文所建立的方法,具有样品量少,前处理简便,特异性强,灵敏度高,稳定可靠等优点。

Moxi 属于米尔贝霉素类药物,其化学结构与阿维菌素类药物相似,易溶于多种有机溶剂,甲醇和乙腈对生物样品中 Moxi 的提取回收率均能达到 90% 以上,但是使用甲醇提取,可使 Moxi 的峰型变宽,导致方法灵敏度降低^[12,14]。因此,本方法选用乙腈沉淀血浆蛋白并复溶残渣,结果显示基质干扰较小,峰形较为理想,结合同位素内标后,特异性强,灵敏度高,稳定可靠。

本方法选用 0.1% 甲酸乙腈溶液和 0.1% 甲酸-5 mmol/L 甲酸铵溶液作为流动相,有利于正离子条件下待测物的离子化,进而提高检测灵敏度。通过验证不同梯度的洗脱效果,确定了洗脱程序, Moxi 的保留时间为 4.3 min 左右,且无杂峰干扰。

由于同位素内标与待测物的理化性质高度相似,可以在相同条件下被离子化,补偿了 LC-MS/MS 检测过程中基质效应等因素造成的待测物响应异常等问题^[15]。本研究的结果显示,方法的基质效应平均值在 95.40%~110.32%,批内、批间的变异系数均在 10% 以内,体现出了稳定同位素内标法的优越性,同时提高了样品前处理效率。鉴于基质效应的结果,本

方法采用了溶剂标准溶液制备标准曲线, 减少了检测批的准备时间。

Moxi 具有高亲脂特性^[16], 给药后进入血液循环, 能广泛分布于全身各组织和器官, 在皮肤组织中也能达到一定浓度, 有助于发挥全身及局部驱虫作用。Moxi 在体内的消除半衰期相对较长, 原形及其代谢产物主要经粪便排出^[17]。一般来说, Moxi 经皮给药的吸收速度相对口服或注射给药的较慢, 通常在给药后 1~5 d 达到最大血药浓度。欧盟 EMA 的资料显示, BRAVECTO® PLUS (复方莫昔克丁氟雷拉纳滴剂) 以推荐量经皮给药时, Moxi 的给药剂量为 2 mg/kg, Moxi 的 C_{\max} 为 (36.7 ± 26.7) ng/mL^[17]。而在后续研究中, 拟采取的给药方案与此接近。因此, 本方法的 LOQ 1 ng/mL 约为 C_{\max} 平均值的 1/40, 能够满足 LOQ 可检测出 C_{\max} 的 1/20~1/10 药物浓度的要求。本方法考察了 1~120 ng/mL 的线性范围, 亦可满足 Moxi 滴剂在猫体内药代动力学研究。

4 结论

本研究所建立的猫血浆中 Moxi 的 LC-MS/MS 检测方法, 具有良好的特异性和较高的灵敏度, 稳定、可靠, 为复方 Moxi 滴剂在猫体内药代动力学研究建立了基础。同时考察了标准储备液和标准工作液稳定性, 以及加标样品长期冻存 6 个月、反复冻融 3 次和样品处理液的稳定性, 结果表明, 在考察条件下均稳定, 可以满足复方 Moxi 滴剂药代动力学研究中标准液存放、样品长期保存、多次冻融, 处理液短时存放的要求。

参考文献:

- [1] 陈杖榴, 曾振灵. 兽医药理学 [M]. 4 版. 北京: 中国农业出版社, 2017.
- [2] 何广, 邓小玲, 戚传勇, 等. 莫西菌素药效学与药动学研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2021, 49 (5): 5-9.
- [3] 中华人民共和国农业部. 兽用化学药物临床药代动力学试验指导原则 [EB/OL]. (2009-10-13) [2026-03-23]. http://www.xmsyj.moa.gov.cn/zcjd/202403/t20240322_6452081.htm.
- [4] 农业农村部畜牧兽医局. 生物样品定量分析方法验证技术指导原则 [EB/OL]. (2022-06-22) [2026-03-23]. http://www.xmsyj.moa.gov.cn/zcjd/202206/t20220622_6398841.htm.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典-四部: 2020 年版 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [6] 孙雷, 王亦琳, 叶妮, 等. 欧盟关于食品动物用药理活性物质残留分析执行条例 (EU) 2021/808 概述 [J]. 中国兽药杂志, 2022, 56 (6): 77-81.
- [7] CHEN Y C, HUNG Y P, FLECKENSTEIN L. Liquid chromatographic assay of moxidectin in human plasma for application to pharmacokinetic studies [J]. J Pharm Biomed Anal, 2002, 29 (5): 917-926.
- [8] FAZZIO L, MORENO L, GALVAN W, et al. Pharmacokinetic profile and anthelmintic efficacy of moxidectin administered by different doses and routes to feedlot calves [J]. Vet Parasitol, 2019, 266: 73-79.
- [9] 陈国庆, 邓梦梦, 谢等龙, 等. 莫昔克丁浇泼剂在猪体内的药代动力学研究 [J]. 中国兽医杂志, 2025, 61 (5): 73-78.
- [10] CHHONKERY S, SLEIGHTHOLM R L, MURRY D J. Bioanalytical method development and validation of moxidectin in plasma by LC-MS/MS: application to *in vitro* metabolism [J]. Biomed Chromatogr, 2019, 33 (2): e4389.
- [11] ZELEKE G, DE BAERE S, SULEMAN S, et al. Development and validation of a reliable UHPLC-MS/MS method for simultaneous quantification of macrocyclic lactones in bovine plasma [J]. Molecules, 2022, 27 (3): 998.
- [12] HOFMANN D, SAYASONE S, KEISER J. Development and validation of an LC-MS/MS method for the quantification of the anthelmintic drug moxidectin in a volumetric absorptive microsample, blood, and plasma: application to a pharmacokinetic study of adults infected with *Strongyloides stercoralis* in Laos [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2021, 1166: 122556.
- [13] ZHANG H, YANG Z, HAO B, et al. Development of a UHPLC-MS/MS method for the determination of moxidectin in rat plasma and its application in pharmacokinetics [J]. Molecules, 2024, 29 (20): 4786.
- [14] 李林霞, 崔耀文, 沈建忠, 等. 猪肉中莫西克汀残留高效液相色谱-荧光检测方法的建立 [J]. 中国农业大学学报, 2011, 16 (1): 84-87.
- [15] 杜晓琳, 黄娟, 刘小娟, 等. 内标在 LC-MS 法生物样品分析中的相关问题探讨 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27 (2): 138-141.
- [16] BASSISSI M F, ALVINERIE M, LESPINE A. Macrocyclic lactones: distribution in plasma lipoproteins of several animal species including humans [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2004, 138 (4): 437-444.
- [17] European Medicines Agency. BRAVECTO® PLUS EPAR Public Assessment Report [EB/OL]. (2023-06-15) [2026-03-23]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/bravecto-plus-epar-public-assessment-report_en.pdf.