高效液相色谱-串联质谱测定猪肝中阿维菌素、伊维菌素残留

郑卫东[1]，胡江涛[2]，阴文娅[3,*]，盛 毅[2]，武志雄[3]

(1.四川省产品质量监督检验检测院，四川 成都 610031；2.四川出入境检验检疫局，四川 成都 610041；
3.四川大学华西公共卫生学院营养与食品卫生学教研室，四川 成都 610041)

摘 要：目的：建立高效液相色谱-四极杆串联质谱仪(LC-MS/MS)同时测定猪肝脏中阿维菌素(AVM)和伊维菌素(IVM)的残留量。方法：猪肝样品均质后用乙腈提取，碱性氧化铝固相萃取柱(SPE)净化，采用串联质谱电喷雾电离ESI(+)，多反应监测模式(MRM)检测，以保留时间和子离子比定性，外标法定量。结果：方法检出限(LOD)均为2.0μg/kg，定量限(LOQ)为5.0μg/L，两种药物的线性范围均为5～100μg/L，相关系数均为0.9999。添加水平在2～20μg/kg范围内，阿维菌素和伊维菌素的平均回收率分别为77.0%～83.3%和76.9%～79.8%之间，相对标准偏差(RSD)分别小于12.1%和13.0%。结论：方法操作简单，灵敏准确，可满足当前国内外该产品中此类药物的检测要求。

关键词：猪肝；阿维菌素；伊维菌素；高效液相色谱-串联质谱

Determination of Avermectin and Ivermectin Residues in Pork Liver by High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

ZHENG Wei-dong[1]，HU Jiang-tao[2]，YIN Wen-ya[3,*]，SHENG Yi[2]，WU Zhi-xiong[3]

(1. Sichuan Institute of Product Quality Supervision and Inspection, Chengdu 610031, China；
2. Sichuan Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Chengdu 610041, China；
3. Department of Nutrition and Food Hygiene, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract：Objective: To establish a method for the simultaneous determination of avermectin and ivermectin residues in pork liver using high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS). Methods: Avermectin and ivermectin residues were extracted with acetonitrile, cleaned up on a solid phase extraction (SPE) column containing alkaline aluminum oxide, separated on a C_8 column, detected by tandem mass spectrometry with electrospray ionization and multiple reaction monitoring interface and quantitatively determined by high performance liquid chromatography in an external standard manner. Results: The limits of detection (LOD) for avermectin and ivermectin were 2 μg/kg and limits of quantitation were 5 μg/L. Both the linear ranges of avermectin and ivermectin were 5－100 μg/L with correlation coefficients of both 0.9999. The recovery rate range of this method was 77.0%－83.3% for avermectin and 76.9%－79.8% for ivermectin with relative standard deviations (RSD) of 8.6% － 12.1% and 9.9% － 13.0% at spike levels of 2, 10 μg/kg and 20 μg/kg, respectively. Conclusion: This method is simple, sensitive and accurate, which can meet the domestic and international requirements for the detection of both veterinary drugs.

Key words：pork liver；avermectin；ivermectin；high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

中图分类号：R155.5 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2011)04-0185-04

阿维菌素(avermectin，AVM)和伊维菌素(ivermectin，IVM)[1-2]是由阿维链霉菌产生的一组广谱、高效、安全的大环内酯类抗寄生虫药，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，国内外

收稿日期：2010-03-11

基金项目：四川省科技厅应用基础研究项目(04JY029-033)

作者简介：郑卫东(1964—)，男，教授级高级工程师，硕士，研究方向为食品分析。E-mail：axlzwd2004@126.com

*通信作者：阴文娅(1972—)，女，副教授，博士，研究方向为营养与食品卫生学。E-mail：yinwenya@126.com

在猪、牛、羊等家畜中使用广泛。AVMs 主要分布于动物肝脏和脂肪组织中，且在动物体内残留时间长，动物实验也证实阿维菌素具有生殖毒性，长期暴露可能对人体具有严重健康损害危险，且对水生环境有剧毒性。各国都制定了阿维菌素最高残留限量(MRLs)[3-5]。

据文献报道，目前阿维菌素的检测方法[6-13]主要有高效液相色谱法(HPLC)、酶联免疫法(ELISA)、液质联用法(LC-MS)等。已有方法主要是对药物制剂含量、植物、牛肉及尿液中阿维菌素残留量的测定。最新颁布的行业标准阿维菌素类药物残留的液相色谱 - 串联质谱分析方法也仅适用牛肉及牛肝[14]，还没有针对猪肝的液相色谱 - 串联质谱检测方法。猪肝基质复杂，常规的检测方法易出现假阳性、色谱峰易受杂质干扰，因此对前处理要求也较高。本实验采用超高效液相色谱 - 电喷雾四极杆串联质谱同时测定猪肝中的阿维菌素和伊维菌素，并对提取溶剂、净化方法以及测定技术进行研究，方法操作简便，定性定量准确，灵敏度等各项技术指标满足残留检测的要求，以期为阿维菌素和伊维菌素的检测研究提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜猪肝组织，搅碎混匀。

标准品阿维菌素(纯度≥96%)、伊维菌素(纯度≥98%) 德国 Augsburg 公司；乙腈、正已烷、乙酸、乙酸铵(均为色谱纯) 美国 Tedia 公司；无水硫酸钠(分析纯，650℃灼烧 4h，贮藏于干燥器中备用)；氯化钠(分析纯，400℃灼烧 2h，贮藏于干燥器中备用)。

1.2 仪器与设备

ABI4000 高效液相色谱 - 三重四极质谱联用仪(配有电喷雾离子源) 美国 ABI 公司；IKA-WERKE 型高速组织匀浆机 德国 IKA 公司；B8500S-DTH 超声波清洗器 上海必能信超声有限公司；LG10-2.4A 离心机 北京医用离心机厂；Anpelclea 碱性氧化铝 SPE 柱(6mL，1000mg，使用前用 10mL 乙腈活化) 上海安谱科学仪器有限公司；水浴氮吹仪。

1.3 方法

1.3.1 溶液的配制

乙腈饱和的正已烷：取 50mL 乙腈加入到 1000mL 正已烷中，充分混匀，分层后取正已烷层备用。

阿维菌素和伊维菌素标准储备溶液：准确称取适量标准品(精确至 0.1mg)，用乙腈配制成质量浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备液，置－18℃冰箱中避光保存。

空白样品提取液：准确称取 20g 空白猪肝脏组织，加入 100mL 乙腈，样品的前处理提取后合并提取液用足量无水硫酸钠脱水，再用 20mL 乙腈饱和正已烷除脂，备用。

1.3.2 色谱与质谱条件

Pickering laboratories C_8 柱(150mm × 4.6mm，5μm)；柱温：25℃；流动相：乙腈:(0.1% 乙酸 -5mmol/L 乙酸铵)=90:10(*V/V*)；等度洗脱；流速：0.6mL/min；进样量：20μL。

电喷雾离子源(ESI)，正离子扫描，多反应监测(MRM)。高纯氮气为载气、碰撞气和气帘气，电喷雾电压(IS)＋5500V，去簇电压(DP)12V，雾化气压力(GAS1)30psi，气帘气压力(CUR)20psi，辅助气压力(GAS2) 40psi，离子源温度(TEM)400℃，驻留时间 300ms。

1.3.3 样品的前处理

提取：称取 5.0g 匀浆后的新鲜猪肝脏组织至 50mL 离心管中，加 5g 无水硫酸钠、1g 氯化钠和 20mL 乙腈，高速匀浆 2min，超声 30min，4000r/min 离心 10min。取上清液至容量瓶，残渣分别用 15、10mL 乙腈重复提取离心两次，合并上清液，用乙腈定容至 50mL，待净化。

净化：取提取液 25mL 过碱性氧化铝小柱(已活化)，之后用 4mL 乙腈淋洗，收集全部流出液，控制流出液的速度低于 1.0mL/min。再经无水硫酸钠脱水后，在 50℃水浴下用氮气吹至近干，用 1.0 mL 流动相溶解残渣，过有机微孔滤膜(0.22μm)后，供 LC-MS/MS 测定。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

本实验选用广泛使用的 ESI 作为离子源，$[M+NH_4]^+$ 离子为两待测物的母离子，在流动相中加乙酸和乙酸铵以增强待测物的离子化。对 AVM 和 IVM 混合标准溶液(1mg/L)在正离子模式下对母离子进行全扫描，找出 AVM 和 IVM 的$[M+NH_4]^+$ 峰，以该分子离子峰对离子源参数(IS、GAS1、GAS2、CUR、TEM 等)进行优化，使仪器灵敏度达到最高。再对子离子进行二级质谱全扫描，选取二级质谱中没有干扰、信号相对较强的 2 个特征碎片离子，与其母离子组成两对离子对，对该药物进行定性和定量分析。AVM 和 IVM 的母离子 / 子离子及碰撞能量见表 1，提取离子色谱图见图 1。

表 1 AVM 和 IVM 的母离子、子离子及碰撞能量

Table 1 Parent and daughter ions and collision energy of avermectin and ivermectin

化合物	母离子(*m/z*)	子离子(*m/z*)	碰撞能量 /V
阿维菌素	890.4	305.3*	35
		567.4	20
伊维菌素	892.5	307.3*	35
		569.4	20

注：*. 定量离子。

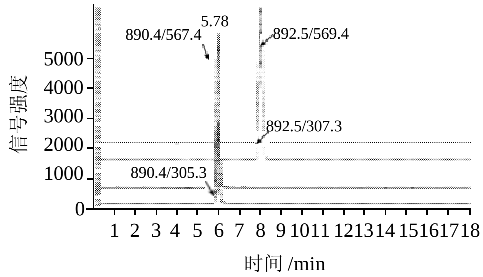

图 1 AVM 和 IVM 的提取离子色谱图(添加水平 10μg/L)

Fig.1 Ion chromatograms of avermectin and ivermectin standards

2.2 色谱条件的优化

2.2.1 色谱柱的选择

阿维菌素类药物是一类相对分子质量较高的弱极性化合物，选用反相高效液相色谱进行分离较合适。本实验对 C_8 和 C_{18} 两种色谱柱进行比较，结果发现：阿维菌素和伊维菌素在 C_{18} 柱上出峰太快，不能完全和杂质分开，且响应强度较低；而其在 C_8 柱上则能完全与杂质分离，且峰型更尖锐，响应强度也较 C_{18} 上的大得多。进一步比较 3 个品牌的 C_8 色谱柱，发现不同厂家的 C_8 柱间存在着差别，最终选定产生峰形和响应强度最好的 Carbamate Analysis C_8(150mm × 4.6mm，5μm)为实验所用色谱柱。

2.2.2 流速和柱温的选择

本实验比较 0.2、0.4、0.5、0.6、0.7mL/min 流速时，待测物的峰型和响应强度等指标，结果显示流速加大，待测物的响应有一定增加，增大质谱雾化气流速后，质谱的响应强度趋于稳定，最终确定 0.6mL/min 为理想流速。实验表明柱温对两种化合物的分离基本没有显影响，考虑室温，选定柱温为 25℃。

2.2.3 流动相的选择

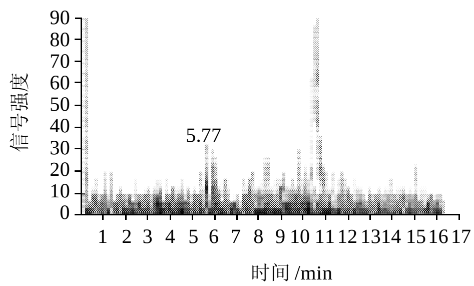

图 2 空白猪肝脏组织的色谱图

Fig.2 Chromatogram of blank pork liver tissue

本实验选用 ESI 正离子模式，$[M+NH_4]^+$ 离子为母离子，在流动相中加入 5mmol/L 乙酸铵可促进母离子的形成，同时加入 0.1% 乙酸来增强待测物的离子化。比较甲醇和乙腈，结果显示甲醇作流动相时，两待测物的峰形延展较宽，响应强度较低，有时会出现同物质的双峰现象；乙腈作流动相时，两物质出峰的峰型和响应强度均比甲醇好，特别是伊维菌素的响应有成倍的增强，最终选择乙腈:缓冲液(0.1% 乙酸 -5mmol/L 乙酸铵)=90:10(*V/V*)为流动相。在所选的最佳仪器条件下，空白猪肝脏组织及其加混标 10μg/kg 阿维菌素和伊维菌素的色谱图分别见图 2、3。

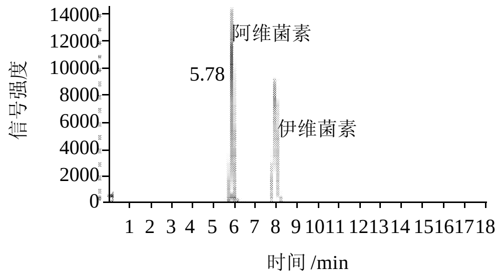

图 3 空白猪肝脏组织添加 10μg/kg 标准品的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of blank swine liver tissue spiked at 10μg/kg

2.3 样品处理条件的选择及优化

2.3.1 提取条件的选择

参考国内外文献资料，大多选用乙腈作为样品提取溶剂。乙腈与水任一比混溶，很容易渗透到组织内部，提取效率高，且乙腈本身对样品中的糖、脂肪和蛋白质的溶解性较小，对蛋白又有沉淀作用，所以实验选用乙腈作为提取溶剂。

2.3.2 净化方法的选择

常用的净化方法有乙腈饱和的正己烷液 - 液萃取法和 C_{18} 柱、中性氧化铝柱、碱性氧化铝柱固相萃取法。本实验比较几种净化方法的去脂效果，结果发现：乙腈饱和的正己烷、C_{18} 及中性氧化铝小柱的去脂效果均不甚理想，且回收率在 60% 以下，而碱性氧化铝小柱不仅去脂效果好，而且回收率也高，可达 80%，完全能满足方法要求，所以本实验确定用碱性氧化铝柱净化。

同时进行碱性氧化铝柱洗脱效率的实验，以验证小柱对阿维菌素和伊维菌素的吸留作用。实验表明：样品提取液过柱后，固相萃取柱再用 2mL 乙腈即可将残留的阿维菌素和伊维菌素完全洗脱，过量的洗脱液可能将小柱吸附的杂质洗脱，综合考虑采用 4mL 乙腈来洗脱柱内吸留待测物。

2.4 方法线性方程和检出限

实验比较乙腈和空白样品提取液作为标准的稀释液配制标准系列，发现猪肝脏样中存在着基质减弱效应，使得阿维菌素和伊维菌素的仪器响应不理想，回收率偏低；本实验用空白猪肝样品提取液配制标准，以补偿基质效应[15]吸取标准贮备液，用阴性猪肝脏组织的空白提取液稀释成 0.005、0.010、0.020、0.050、0.100mg/L 标

准溶液，按1.3.2节的仪器条件进行测定。用选定的定量离子峰面积(Y)对质量浓度(X)绘制标准曲线，得线性方程及相关系数见表2。

表2 阿维菌素和伊维菌素的线性方程、相关系数

Table 2 Linear equations and correlation coefficients for the determination of avermectin and ivermectin

化合物	线性范围/(μg/L)	线性方程	相关系数r
AVM	5～100	Y=7590X＋4670	0.9999
IVM	5～100	Y=7200X＋1130	0.9999

以10倍信噪比所对应的待测物质量浓度为最低定量质量浓度，根据样品的浓缩倍数，确定本方法定量限为5.0μg/L，样品定量限为2.0μg/kg，线性范围是5～100μg/L，在线性范围以外时，可适当增大样品最终定容体积或减小样品净化体积。

2.5 方法回收率和精密度

2.5.1 方法回收率

选取不含阿维菌素和伊维菌素本底的猪肝脏组织样品，进行不同添加水平的阿维菌素和伊维菌素加标回收实验，添加水平为2、10、20μg/kg三个添加水平，每个质量浓度做10个平行样，阿维菌素样品添加平均回收率在77.0%～83.3%之间，相对标准偏差在8.6%～12.1%之间；伊维菌素样品添加平均回收率在76.9%～79.8%之间，相对标准偏差在9.9%～13.0%之间。回收率满足要求。回收率结果见表3。

表3 阿维菌素和伊维菌素加标回收率实验(n=10)

Table 3 Spike recovery rates for avermectin and ivermectin

化合物	添加水平/(μg/kg)	平均回收率/%	相对标准差/%
阿维菌素	2	79.8	12.1
	10	77.0	8.6
	20	83.3	9.0
伊维菌素	2	79.8	9.9
	10	78.0	10.5
	20	76.9	13.0

2.5.2 方法精密度

表4 阿维菌素精密度实验结果(n=10)

Table 4 Precision of this method in avermectin determination

μg/kg

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	s	r
1	1.41	1.44	1.74	1.44	1.56	1.66	1.81	2.01	1.43	1.46	0.20	0.60
2	7.54	8.20	7.25	7.89	7.05	8.92	7.60	8.60	6.74	7.23	0.70	2.10
3	17.20	16.80	18.60	16.10	14.70	19.20	17.80	15.70	14.30	16.20	1.59	4.77

表5 伊维菌素精密度实验结果(n=10)

Table 5 Precision of this method in ivermectin determination

μg/kg

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	s	r
1	1.31	1.66	1.46	1.79	1.68	1.42	1.81	1.75	1.51	1.58	0.17	0.51
2	8.25	9.72	7.37	6.75	7.30	7.29	7.05	8.50	7.82	7.92	0.93	2.79
3	13.25	19.40	14.80	13.90	14.30	18.60	15.40	13.70	14.20	16.20	2.10	6.30

分别选取3个添加水平的样品，在同一天重复测定10次。分别计算结果标准差s和3个浓度水平平均标准差$\bar{s}=\sqrt{s_1^2+s_2^2+s_3^2}$。重复性限$r$=3$s$，再现性限$R$=3$\bar{s}$。结果见表4、表5。

再现性限：阿维菌素为R=3$\bar{s}_1$=5.24μg/kg；伊维菌素为R=3$\bar{s}_2$=6.61μg/kg。表4、5结果表明：随着样品中目标组分含量的增加，重复性限也增加。为此，建议在较低浓度下测量，结果的重复性较好。

3 结　论

本实验建立猪肝脏组织中阿维菌素类药物残留的液相色谱-串联质谱法，其前处理过程简单，灵敏度高，准确度、精密度和各项技术指标均满足国内外残留检测的相关要求，可用于猪肝脏组织中阿维菌素类药物残留的检测。

参考文献：

[1] SAMSONOVA J V, BAXTER G A, CROOKS S R, et al. Determination of ivermectin in bovine liver by optical immunobiosensor[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2002, 17(6/7): 523-529.

[2] DANAHERK M, HOWELLS L C, CROOKS S R, et al. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices[J]. Journal of Chromatography B, 2006, 844(2): 175-203.

[3] 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.

[4] Official Journal of the European Union. EU Pesticides database[EB/OL]. (2010-11-10). http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm.

[5] FAO/WHO Food standards codex alimentarius. Pesticide residues in food[EB/OL]. (2010-07). http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-e.jsp.

[6] DANAHERK M, OKEFFE M, GLENNON J D. Validation and robustness testing of a HPLC method for the determination of avermectins and moxidectin in animal liver samples using an alumina column clean-up[J]. Analyst, 2000, 125(10): 1741-1744.

[7] TURNIPSEED S B, ROYBAL J E, RUPP H S, et al. Confirmation of avermectin residues in food matrices with negative-ion atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography/mass spectrometry[J]. Rapid Communications In Mass Spectrometry, 1999, 13(6): 493-499.

[8] 张启迪, 邹明, 刘文华, 等. 阿维菌素残留检测中不同SPE柱净化效果的比较研究[J]. 中国动物检疫, 2007, 24(12): 29-30.

[9] WANG Jian. Analysis of macrolide antibiotics, using liquid chromatography-mass spectrometry, in food, biological and environmental matrices[J]. Mass Spectrom Rev, 2009, 28(1): 50-92.

[10] RUDIK I, CUMMINGS M R, POPPENGA R H. Isolation and multiresidue detection of macrolide endectocides present in animal matrices[J]. J Vet Diagn Invest, 2002,14(4): 295-302.

[11] 赵东豪, 贺利民, 聂建荣, 等. 猪肉组织中阿维菌素类药物残留的高效液相色谱-串联质谱法测定[J]. 分析测试学报, 2008, 27(8): 862-865.

[12] HEERNANDO M D, SUAREZ-BARCENA J M, BUENO M J, et al. Fast separation liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the confirmation and quantitative analysis of avermectin residues in food[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1155(1): 62-73.

[13] HOU Xiaolin, LI Xiaowei, DING Shuangyang, et al. Simultaneous analysis of avermectins in bovine tissues by LC-MS-MS with immunoaffnity chromatography[J]. Chromatographia, 2006, 63(11/12): 543-550.

[14] GB/T 21320—2007动物源食品中阿维菌素类药物残留量的测定: 液相色谱串联质谱法[S].

[15] HERNANDEZ F, SANCHO J V, POZO J. Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005, 382(4): 934-946.