

超高效液相色谱质谱联用法测定血液中伊维菌素和丙硫苯咪唑的残留量

方雅莉 (广东医科大学科研服务管理中心, 广东东莞 523808)

摘要: **目的** 了解超高效液相色谱质谱联用法测定血液中伊维菌素和丙硫苯咪唑的残留量的效果。**方法** 血样用乙腈沉淀蛋白过滤提取伊维菌素和丙硫苯咪唑,以乙腈和5 mmol/L 乙酸铵+0.1% 甲酸水溶液为流动相,经C18 色谱柱洗脱分离,采用电喷雾离子源,多反应监测正离子模式进行分析。**结果** 在10~5 000 $\mu\text{g/L}$ 添加范围内,质谱响应强度与其质量浓度呈良好的线性关系。丙硫苯咪唑的检出限为5 $\mu\text{g/L}$,定量检出限为5 $\mu\text{g/L}$;伊维菌素检出限为0.5 $\mu\text{g/L}$,定量检出限为1 $\mu\text{g/L}$ 。**结论** 该方法处前处理简单,准确度高,精密度好,可以为人畜中毒提供快速安全检测方法。

关键词: 丙硫苯咪唑;伊维菌素;超高效液相色谱;质谱分析

中图分类号: O61

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2021)03-0264-03

Determination of blood residues of ivermectin and albendazole by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry

FANG Ya-li (Research Service Management Center, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract: **Objective** To investigate the feasibility of ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS) in blood residues of ivermectin and albendazole. **Methods** Blood ivermectin and albendazole were extracted using acetonitrile precipitated protein. Acetonitrile, 5 mmol/L ammonium acetate and 0.1% formic acid aqueous solution used as mobile phase, the samples were eluted by C18 column and then analyzed by UPLC/electrospray ionization tandem MS. **Results** There was a good linear relationship between response intensity and mass concentration at the range of 10–5 000 $\mu\text{g/L}$. The detection limit and limit of quantization were 5 $\mu\text{g/L}$ and 5 $\mu\text{g/L}$ for albendazole, and 0.5 $\mu\text{g/L}$ and 1 $\mu\text{g/L}$ for ivermectin, respectively. **Conclusion** UPLC-MS is simple, accurate and precise for detecting blood residues of ivermectin and albendazole, which can provide a rapid and safe detection method for human and animal poisoning.

Key words: albendazole; ivermectin; ultra performance liquid chromatography; mass spectrometry

伊维菌素(IVM)和丙硫苯咪唑(BZs)是广泛应用于家畜的高效、广谱、低毒抗生素类抗寄生虫药物^[1-2],也是目前国内使用较为广泛的抗寄生虫药^[3]。市面上销售的一种名为“百虫灵”的广谱杀虫剂同时含有IVM和BZs成分,由于IVM脂溶性较高,具有神经毒性和发育毒素,在体内残留时间较长,因此按照世界卫生组织5级分类标准,它被列为高毒化合物。苯并咪唑类药物在体内转化的代谢物具有毒理作用,因此有必要针对IVM和丙硫苯咪唑建立一种快速、高效的检测方法。本文以超高效液相色谱质谱联用仪中液相色谱法对血样中的IVM和BZs进行了检测。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

IVM标准物质(98.5%),美国百灵威科技有限公

司;BZs标准物质,美国AccuStandard公司;甲醇色谱纯(HPLC),德国默克公司;乙腈色谱纯(HPLC),德国默克公司;乙酸铵色谱纯(HPLC),美国西格玛公司;甲酸色谱纯(HPLC),安普科技有限公司。空白血1份。

1.2 仪器和设备

Exion LC-MS/MS超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪,美国ABSCIEX公司;振荡器德国艾卡(IKA)公司;电子天平日本岛津公司;超纯水器德国默克密理博公司;离心机美国西格玛公司;水浴氮吹仪瑞典拜泰齐公司。

1.3 方法

1.3.1 样品前处理 取解冻的血样0.5 mL,边振荡边缓慢加入2.5 mL乙腈,8 000 r/min振荡5 min,10 000 r/min离心5 min,将上清液分出,过0.22 μm 微孔滤膜,收集滤液,45 $^{\circ}\text{C}$ 氮吹近干,用初始流动相定容至0.5 mL,供检验。

收稿日期: 2020-12-23; 修订日期: 2021-03-30

作者简介: 方雅莉(1991-),女,硕士,助理实验师

1.3.2 溶液配制 系列标准工作溶液的配制:精确称取 IVM、BZs 对照品适量,分别置于 20 mL 的容量瓶中,用甲醇溶解并定容,超声促溶,并充分摇匀,配制成 1 g/L 标准储备液,用移液枪各取适量标准储备液于体积分数为 50% 的甲醇水中,配制成 100 mg/L 的混合作液,用体积分数为 50% 的甲醇水梯度稀释至 0.01、0.05、0.10、0.30、0.50 mg/L 的混合系列标准工作溶液。

1.3.3 液相色谱串联质谱条件 UPLC 色谱条件:色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm×50 mm, ID 1.7 μm);流动相 A:0.1% 甲酸+5 mmol/L 乙酸铵的超纯水;流动相 B:乙腈;流速:0.4 mL/min;进样体积:1 μL;梯度洗脱条件见表 1。质谱条件:电喷雾离子源(ESI),正离子模式,多扫描方式:多反应检测(MRM)。质谱离子源参数为 CUR:30;CAD:Medium;IS:5 500;TEM:550;GSI:50;GS2:50。2 种化合物质谱参数见表 2。

表 1 梯度洗脱条件

步骤	时间/min	流动相体积配比/%	
		A 相	B 相
1	0.00	90.0	10.0
2	1.00	90.0	10.0
3	1.50	5.0	95.0
4	6.50	5.0	95.0
5	7.00	90.0	10.0
6	9.00	90.0	10.0

表 2 两种化合物质谱参数

化合物	m/z:MS/MS	DP	CE	EP	CXP
IVM	892.5/569.3	60	19.85	10	13
IVM	892.5/307.2	60	30.66	10	13
BZs	266.1/234.0	50	25	10	13
BZs	266.1/192.0	50	38	10	13

1.4 数据处理

每组实验重复 3 次,结果取平均值。

2 结果

2.1 质谱条件优化

IVM 准确分子量为 874.5, BZs 准确分子量 265.3, 分别配制 500 μg/L, 以注射的方式在正离子模式下进行一级质谱母离子全扫描, 分子离子 m/z 分别为 892.5、266.1, IVM 为 [NH₄⁺] 的分子离子峰, 丙硫苯咪唑为 [H⁺] 的分子离子峰, 自动优化确定最高及次

高响应的二级离子 m/z 以及相应的 DP、CE、CXP 等参数, 具体见表 2。

2.2 色谱条件优化

本文分别研究了含有 0.1% 甲酸、5 mmol/L 醋酸铵和 0.1% 甲酸、5 mmol/L 醋酸铵的超纯水作水相; 乙腈、甲醇作为有机相, 以灵敏度和峰形作为评判条件, 最终发现含有 5 mmol/L 醋酸铵和 0.1% 甲酸的超纯水作水相, 乙腈作为有机相, 选择梯度洗脱, 以相对高的流速低比例的有机相作为起始流动相, 提高分析效率和灵敏度。

2.3 样品的提取

本文采用较为简单的乙腈蛋白沉淀法, 过程提取回收率约为 92%, 步骤简单, 大大提高了样品前处理的效率。

2.4 方法的检测限和线性范围

在本文方法所确定的试验条件下, 进行数据的采集与分析, 以浓度分数为横坐标, 峰面积为纵坐标 y, 分别绘制质量浓度为 10 ~ 500 μg/L 的 IVM 和 BZs 标准品线性回归方程, 计算相关系数。见图 1 ~ 2。按照 1.3.1 样品前处理的方法, 分别测定 IVM、BZs 0.5、1.0、5、10 μg/L 的加标空白血样定量离子信噪比, 根据信噪比 (RS/N) > 10 的定量下限要求, 可知 BZs 的检出限为 5 μg/L, 定量检出限为 5 μg/L; IVM 的检出限为 0.5 μg/L, 定量检出限为 1 μg/L。见图 3 ~ 4。

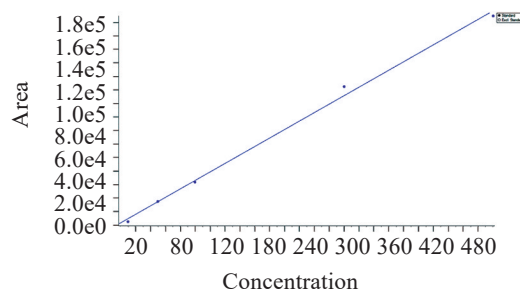


图 1 IVM 标准曲线的线性回归

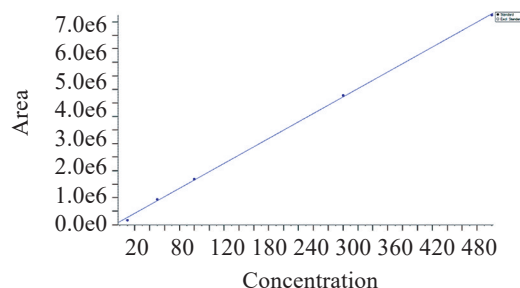


图 2 BZs 标准曲线的线性回归

2.5 加标样品回收率

两种药物在 10 ~ 5 000 μg/L 添加水平下, 平均回收率为 91.5% ~ 93.2%, RSD 为 2.1% ~ 3.6%, 提示本方法可以同时检测生物检材中的 2 种药物。见表 3。

表3 IVM和BZs的标准曲线回归方程、相关系数、检出限及定量限

药物	回归方程	相关系数(<i>r</i>)	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)
IVM	$y=375.79631x + 2351.74736$	0.99803	0.5	1
BZs	$y=15340.74175x + 1.17054e5$	0.99975	5	5

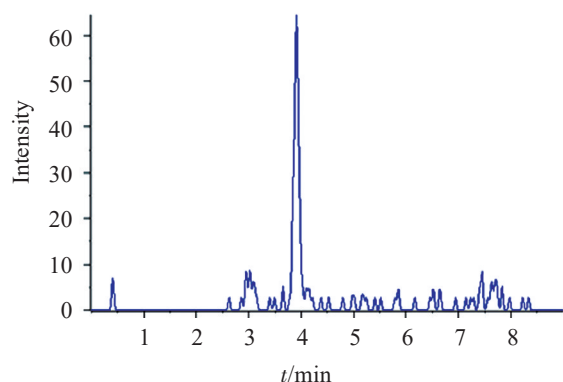


图3 IVM定量下限的信噪比图谱

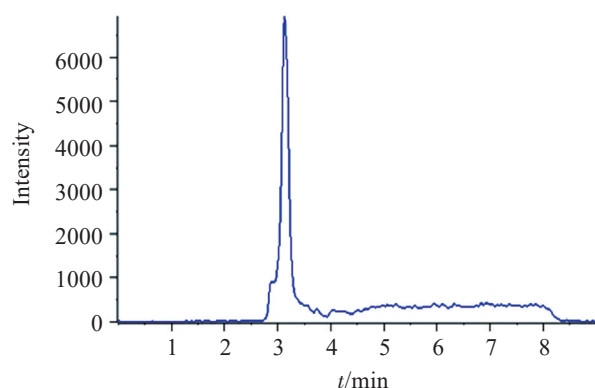


图4 BZs定量下限的信噪比图谱

3 讨论

IVM和BZs在日常生产生活中应用广泛,目前有分别使用液相色谱法检测BZs^[4-5]和使用液相色谱质谱法、液相色谱法检测IVM^[6-11]的文献报道,未检索到使用超高效液相色谱质谱法对IVM和BZs进行检测的文献报道。本文以超高效液相色谱质谱联用仪中液相色谱法对血样中的IVM和BZs进行检测,仅需0.1~0.5 g样品,经90%的乙腈高速匀浆离心去蛋白,过微孔滤膜供检,操作简单,5 min前能出峰,方法检出限低,分析快速。在样品前处理的方式上,目前常用的有QuEChERS(Quick、Easy、Cheap、Effective、Rugged、Safe)、固相萃取(Solid phase extraction, SPE)、液-液萃取(Liquid-liquid extraction, LLE)和分子印迹(Molecular imprinting technique, MIT)等技术,它们各有优点,但普遍存在前处理复杂、耗时长等缺

点。本文采用乙腈直接沉淀蛋白过微孔滤膜的形式进行前处理,较为简单且耗时短。总之,本文建立的UPLC-MS/MS检测方法回收率、准确率高,具有高速、高分离度与高选择性、高灵敏度的特点,能完全满足生物体内、外IVM和BZs的残留检测和验证需要。

参考文献:

- [1] HEDAYATIM, SADEGHI A, MAROUFPOOR M, et al. Trans-generational sublethal effects of abamectin and pyridaben on demographic traits of *Phytonemus pallidus* (Banks) (Acari: Tarsonemidae) [J]. *Ecotoxicology*, 2019, 28(4):467-477.
- [2] GOBBI F, DORA B, FRANCESCA T, et al. Efficacy of high-dose albendazole with ivermectin for treating imported loiasis, Italy [J]. *Emerging Infect Dis*, 2019, 25(8):1574-1576.
- [3] 刘勇军, 吴银良, 姜艳彬, 等. 固相萃取高效液相色谱法测定猪肉中六种苯并咪唑类药物残留的研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(10): 212-213.
- [4] 林海丹, 谢守新, 吴映璇. 固相萃取高效液相色谱法测定乳铁中苯并咪唑类药物残留[J]. *分析试验室*, 2005, 24(1): 27-29.
- [5] 张仟春, 杨燕群, 苏姚, 等. 固相微萃取/高效液相色谱联用分析食品中痕量苯并咪唑[J]. *分析测试学报*, 2017, 36(6): 718-724.
- [6] 冒玉娟, 邢晓玲, 沈小艮, 等. UPLC-MS/MS法测定鸡肉中阿维菌素类药物残留检测方法的建立[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(15):146-150.
- [7] 胡晓楠, 郭文丽, 王云, 等. 高效液相色谱-荧光法同时检测水产中阿维菌素和伊维菌素[J]. *分析检测*, 2019, 45(6): 164-166.
- [8] 李光满, 夏明星, 唐璜, 等. 液相色谱-串联质谱法检测食用动物血液中伊维菌素残留[J]. *饲料加工与检测技术*, 2017, 53(10):106-109.
- [9] 虞森, 吴淑春. 高效液相色谱-串联质谱法测定草莓中伊维菌素残留[J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26(17):2464-2467.
- [10] 宓捷波, 张然, 王飞, 等. 在线固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定动物源食品中阿维菌素和伊维菌素的残留量[J]. *理化检验-化学分册*, 2017, 53(9):1009-1013.
- [11] 宋玉梅, 何建强, 刘杰恒, 等. 高效液相色谱法测定白蚁防治药土屏障中的吡虫啉和伊维菌素[J]. *化学试剂*, 2017, 39(8):850-852.