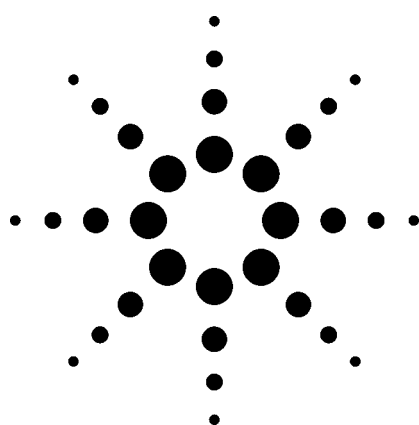


用 Agilent LC-MSD 四极杆和离子阱测定环境中兽药残留的方法确证

应用



环境

作者

Anthony Gravell
Environment Agency
National Laboratory Service
Llanelli Laboratory
19 Pen-y-Fai Lane
Furnace
Llanelli
Wales
SA15 4EL
UK

摘要

建立并确证了河水、土壤和沉积物中多拉菌素、乙酰氨基阿维菌素、伊维菌素和莫斯达汀等四种兽药多残留的定量测定方法。

采用固相萃取技术从河水中提取四种目标分析物，土壤和沉积物中的提取采用的是戴安的快速溶剂萃取技术。分析提取物用配置了大气压化学电离源的 Agilent 1100 液相色谱/质谱 (LC/MS) 系统进行分析。LC/MS 分析前不需要对分析物进行衍生。

四种目标化合物中的三种用 Agilent 1100 系列 LC/MSD SL 四极杆质谱仪可以达到要求的检测限。Agilent 1100 系列 LC/MSD 离子阱 SL 用于对化合物进行鉴定。

前言

兽药被广泛用于治疗动物疾病、保障动物健康。某些药物，如莫能霉素，被作为饲料添加剂，用于促进动物生长。其它可用于水产业渔场的处理，如溴硝醇。

有一类兽药包括阿维菌素和莫斯达汀，属于大环内酯类化合物 [1]。这些化合物在动物饲养中广泛用于对抗线虫和节肢动物寄生虫。它们在水中以低浓度存在时，对水生脊椎动物和无脊椎动物都有很高的毒性，在环境中很可能以有生态学意义的浓度存在着 [2]。因此，需要有能够检测环境中是否存在这些化合物的方法。几乎没有文献报道过环境中极低浓度阿维菌素和莫斯达汀的测定方法。

表 1 列出了这些化合物的分析检测限 (LOD)，这是根据这些化合物已知的生态毒性和需要监测的水平而定的。

表 1. 目标化合物及其所需的分析检测限 (LOD)

化合物	土壤和沉积物	水
	LOD (mg/kg)	LOD (µg/L)
多拉菌素	5	0.001
乙酰氨基阿维菌素	NA	0.004
伊维菌素	5	0.0002
莫斯达汀	NA	0.0003

NA 未检测



Agilent Technologies

实验

阿维霉素非常适合用 LC/MS 分析，因为它能够离子化，而且有很好的保留。可以用大气压化学电离 (APCI) 以正离子和负离子两种模式对阿维霉素进行分析。药物中伊维霉素 B_{1a} 与 B_{1b} 的比例是 93:7。本

工作只对 B_{1a} 异构体进行了定量。另外，药物中乙酰氨基阿维菌素 B_{1a} 和 B_{1b} 的比例大约是 90:10，本工作也只对 B_{1a} 异构体进行了定量。目标化合物的结构见图 1。

驱虫剂

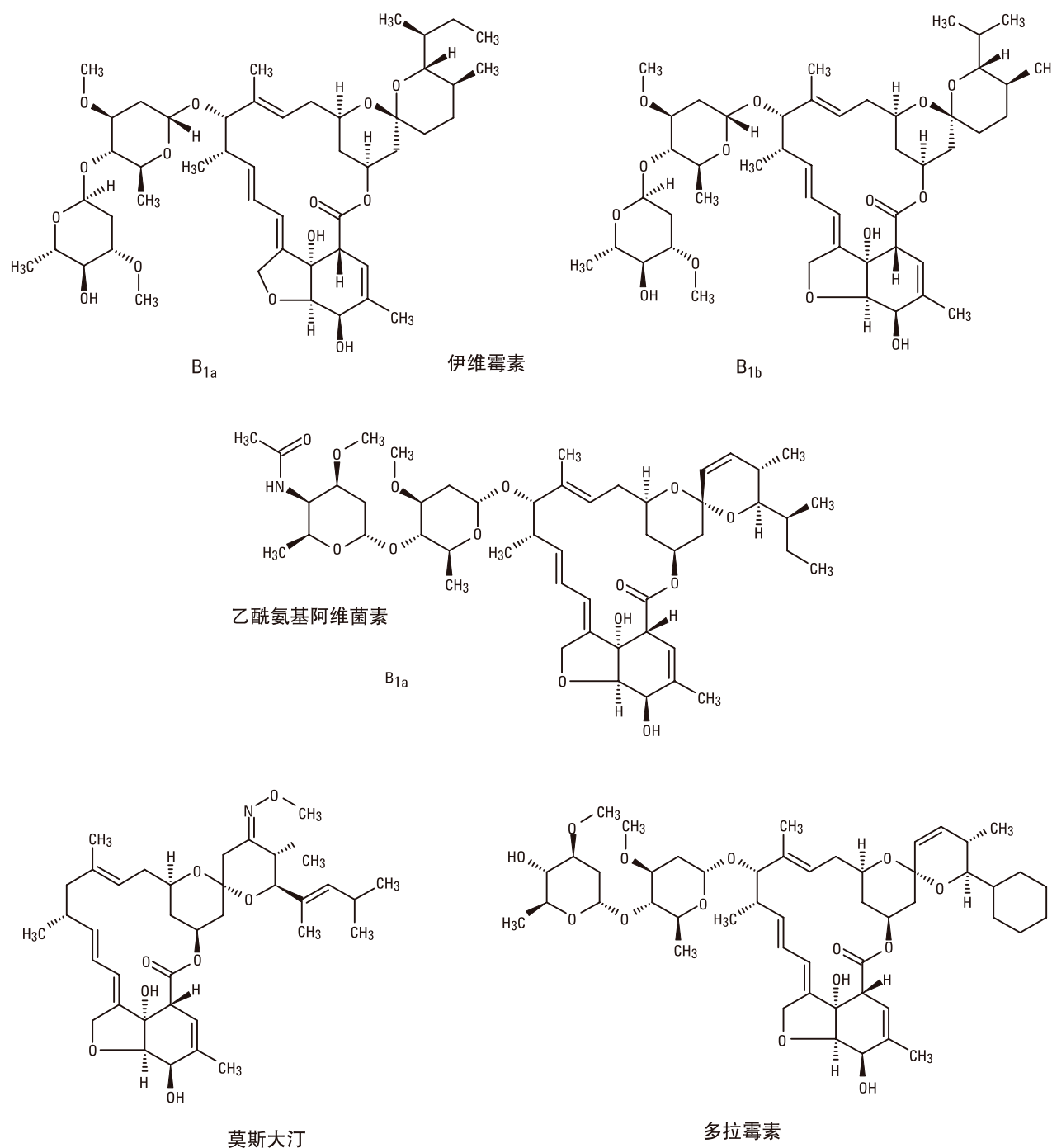


图 1. 目标化合物的结构

样品制备

河水中阿维霉素的固相萃取 (SPE) 方法

- SPE 小柱 - 60-mg Waters Ltd., Elstree, Hertfordshire, UK
- 用甲醇老化 (5 mL)
- 250 mL 样品 - 流速 5 mL/min
- 用氮气吹干小柱
- 用 5 x 1 L 酸化甲醇 (0.1% TFA) 冲洗
- 蒸干至 500 µL, 加去离子水至 625 µL

土壤和沉积物中阿维霉素的戴安快速溶剂萃取 (ASE) 方法

- 提取溶剂: 95% 甲醇, 5% 水
- 在反相净化前将提取物蒸发至小体积
- 用安捷伦 1100 净化系统进行反相净化
 - 1100 泵和脱气机、1100 自动进样器和 1100 分析型馏分收集器, 可以对目标化合物进行分离

土壤和沉积物中阿维霉素的 ASE 提取条件

参数	设置
溶剂	95% 甲醇, 5% 水
压力	1500 psi
温度	125 °C
循环	1
加热时间	6 分钟
静止时间	10 分钟
冲洗	25 % 体积
清洗	60 秒

已证明若要获得很好的离子比确定必须进行清洗

化学品

试剂

阿维霉素	多拉菌素、乙酰氨基阿维菌素、伊维菌素和莫斯达汀, QMX 实验室, Thaxted, Essex, UK
甲醇	Ultra Gradient HPLC 级, Romil, Cambridge, UK
水	Ultra Gradient HPLC 级, Romil, Cambridge, UK
甲酸	VWR 国际公司, Lutterworth, Leicestershire, UK
盐酸	Aristar 级 BDH
三氟醋酸	VWR 国际公司, Lutterworth, Leicestershire, UK
甲酸铵	HPLC 级, Fisher 化学试剂, Loughborough, Leicestershire, UK
EDTA 二钠	高纯
60 mg, 3 mL Oasis HLB SPE 柱	Waters 公司
SPE 工作站	Kinesis Ltd., Bolnhurst, Bedfordshire, UK

用于 SPE 和 HPLC 分析的溶液

洗脱液: 0.1% 三氟醋酸的甲醇溶液
100 µL 三氟醋酸加至容量瓶中, 加 HPLC 级甲醇至 100 mL, 混匀

1% 甲酸溶液: 1 mL 甲酸加至 100 mL 容量瓶中, 加 HPLC 级水至 100 mL, 混匀

甲酸铵 pH 5.5 溶液: 将 0.32g 甲酸铵溶解于 500 mL 去离子水中, 用 1% 甲酸溶液 (约 200 µL) 将 pH 调至 5.5, 混匀, 并检查 pH

HPLC 流动相 (及稀释溶剂): 甲酸铵 pH 5.5/甲醇 (80:20)

校正标样溶液

单个标样的原液

用预先清洗过的玻璃称量舟精密称取（如果可能）各基础标样 25 mg (± 0.2 mg)，分别洗入 25 mL 容量瓶，加甲醇至刻度，并充分混合，配制成各 1 mg/mL 的甲醇溶液。

校正标样混合物 A 的储备液

量取约 20 ± 5 mL 的甲醇，置 25 mL 容量瓶中，分别加入 250 μ L 多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素标样原液、50 μ L 伊维菌素和莫斯达汀标样原液。加甲醇至刻度，充分混合。添加时使用校准过的微量取液器，每次加入后更换枪头。将混合物转移到一个透明、带隔膜塞的干燥瓶中贮存。每周补齐液面。混合物中的化合物浓度为多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素 10 mg/L (10 ng/ μ L)，伊维菌素和莫斯达汀 2.0 mg/L 或 (2.0 ng/ μ L)。

校正标样混合物 B 的储备液

量取约 20 ± 1 mL 的甲醇，置 25 mL 容量瓶中，分别加入 62.5 μ L 校正标样混合物 A 的储备液，加甲醇至刻度，充分混合。添加时使用校准过的 mL 取液器，每次加入后更换枪头。将混合物转移到一个透明、带隔膜塞的干燥瓶中贮存。每天补齐标准混合物的液面。混合物中的化合物浓度为多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素 0.025 mg/L (0.025 ng/ μ L)，伊维菌素和莫斯达汀 0.005 mg/L 或 (0.005 ng/ μ L)。

校正标样混合物 1 的工作液

将 25 μ L 校正标样混合物 B 的储备液加入 250 mL 去离子水中，充分混合。添加时使用校准过的微量取液器，每次加入后更换枪头。工作标准中多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素的浓度为 2.5 ng/L，伊维菌素和莫斯达汀的浓度为 0.5 ng/L。

校正标样混合物 2 的工作液

将 100 μ L 校正标准混合物 B 的储备液加入 250 mL 去离子水中，充分混合。添加时使用校准过的微量取液器，每次加入后更换枪头。标样工作液中多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素的浓度为 10 ng/L，伊维菌素和莫斯达汀的浓度为 2 ng/L。

校正标样混合物 3 的工作液

将 500 μ L 校正标样混合物 B 的储备液加入 250 mL 去离子水中，充分混合。添加时使用校准过的微量取液器，每次加入后更换枪头。标样工作液中多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素的浓度为 50 ng/L，伊维菌素和莫斯达汀的浓度为 10 ng/L。

贮存

贮存在 2 到 7 °C。每次测定至少需要 250 mL 样品。

样品提取

1. 取 250 mL 样品。
2. SPE 小柱的老化：
 - 10 mL 甲醇
 - 10 mL HPLC 级水。
3. 使样品以 10 mL/min 的流速通过按前面操作老化过的 60 mg, 3 mL Oasis HLB SPE 柱。
4. 用 1 mL HPLC 级 的水冲洗。
5. 用最大真空度干燥 2 分钟。
6. 用 5 x 1 mL 0.1% TFA 甲醇洗脱进入一个 turbopap 管中。让每个组分浸入 SPE 管中，洗脱前至少平衡 2 分钟。

7. 汇集洗脱液，逐渐蒸发至 0.5 mL。充分混合，如有必要可超声。

8. 转移到自动进样器样品管中进行分析。

标样提取

与样品提取方法相同

LC/MSD 四极杆 SL 方法具体条件

LC 条件

仪器: Agilent 1100 LC 系统, 包括脱气机、四元泵、自动液体进样器 (ALS)、色谱柱和柱温箱

色谱柱: ZORBAX 80 SB-C18, 2.1 x 150 mm, 3 μ m (部件号 830990-902) 带 Eclipse XDB-C8 窄径保护柱 2.1 x 12.5 mm, 5 μ m (部件号 821125-926)

柱温: 60 °C

流动相: A = 5 mM 甲酸铵水溶液 (pH 5.5)
B = 甲醇

等梯度洗脱: 80% B

流速: 0.5 mL/min

进样量: 100 μ L

MS 条件

仪器: Agilent LC/MSD SL

离子源: Positive APCI

干燥气流量: 5 L/min

雾化器: 60 psig

蒸发温度: 300 °C

干燥气温度: 250 °C

V_{cap} : 2500 V

电晕电流: 4 μ A

SIM 离子 (正离子模式): m/z 640.6, 莫斯达汀 (M+H)⁺
 m/z 892.8, 伊维霉素 (M+NH₄)⁺
 m/z 914.8, 乙酰氨基阿维菌素 (M+H)⁺
 m/z 916.8, 多拉菌素 (M+NH₄)⁺

SIM 参数

时间 (分钟)	组	SIM 离子	碎裂器	增益	化合物
3.00	1	804.7	130	50	乙酰氨基阿维菌素
		878.7	150	50	乙酰氨基阿维菌素
		914.8	120	50	乙酰氨基阿维菌素
6.50	2	331.5	140	50	多拉菌素
		604.7	340	50	莫斯达汀
		622.6	120	50	莫斯达汀
		640.6	160	50	莫斯达汀
		899.7	140	50	多拉菌素
		916.8	130	50	多拉菌素
10.00	3	307.5	140	50	伊维霉素
		551.6	140	50	伊维霉素
		892.8	140	50	伊维霉素

LC/MS 离子阱 SL 方法（阿维霉素残留物的确证）

LC 条件

仪器:	Agilent 1100 LC 系统, 包括脱气机、四元泵、自动液体进样器 (ALS)、色谱柱和柱温箱
色谱柱:	ZORBAX 80 Extend-C18, 4.6 x 75 mm, 3.5 μ m (部件号 766953-902)
柱温:	室温
流动相:	A = 水和三乙胺 (0.1%) B = 乙腈
等梯度洗脱:	78% B
流速:	1.0 mL/min
进样量:	10 μ L

MS 条件

仪器:	Agilent LC/MSD Trap SL
离子源:	Negative APCI
干燥气流量:	5 L/min
雾化器:	60 psig
蒸发温度:	300 $^{\circ}$ C
干燥气温度:	250 $^{\circ}$ C
V_{cap} :	4000 V
电晕电流:	4 μ A
毛细管出口:	160 V

使用 SPS 参数

手动 MSⁿ 参数

(负离子模式):	m/z 638.4, 莫斯达汀 (M-H) ⁻
	m/z 873.5, 伊维霉素 (M-H) ⁻
	m/z 897.5, 乙酰氨基阿维菌素 (M-H) ⁻
	m/z 912.5, 多拉菌素 (M-H) ⁻

ICC 目标:	30000
最长累加时间:	100 ms
扫描范围:	520–920
平均:	5

时间段 (分钟)	母离子	分离宽度	碎裂振幅	化合物
0.0–3.5	912.5	3	1.5	乙酰氨基阿维菌素
3.5–4.3	897.5	3	1.5	多拉菌素
4.3–5.5	638.4	3	1.5	莫斯达汀
5.5–7.0	873.5	3	1.5	伊维霉素

结果与讨论

低浓度标样的提取离子流图 (EIC) 见图 2，多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素的浓度相当于 2.5 ng/L，伊维菌素和莫斯达汀的浓度为 0.5 ng/L。

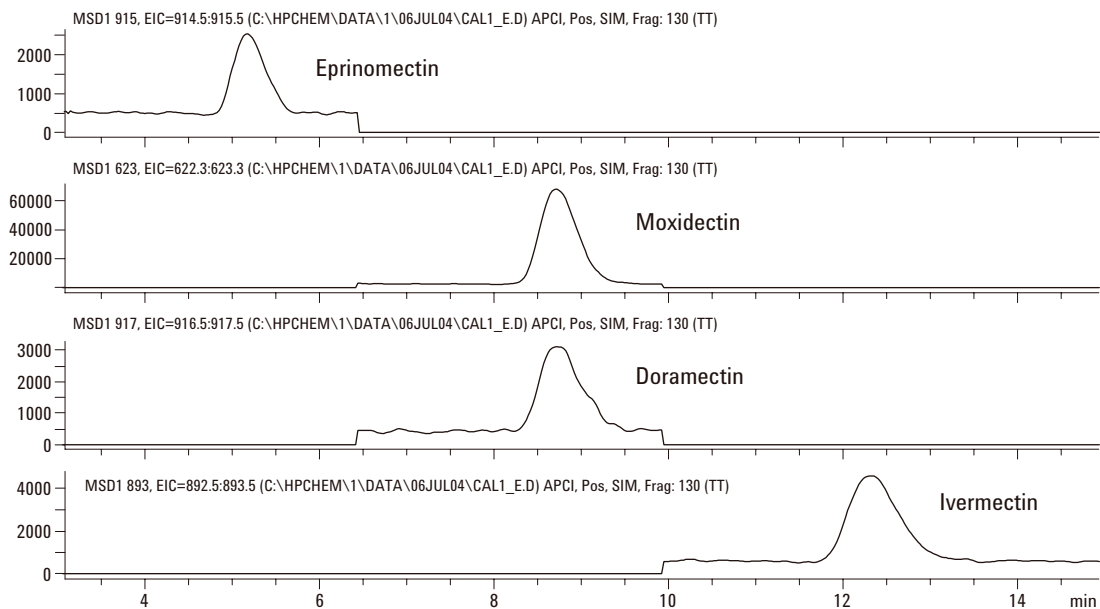


图 2. 低浓度标样的 EIC

图 3 清楚地表明牛粪中有多拉霉素 (112 $\mu\text{g/kg}$)。将样品稀释，使其响应在校正范围之内。

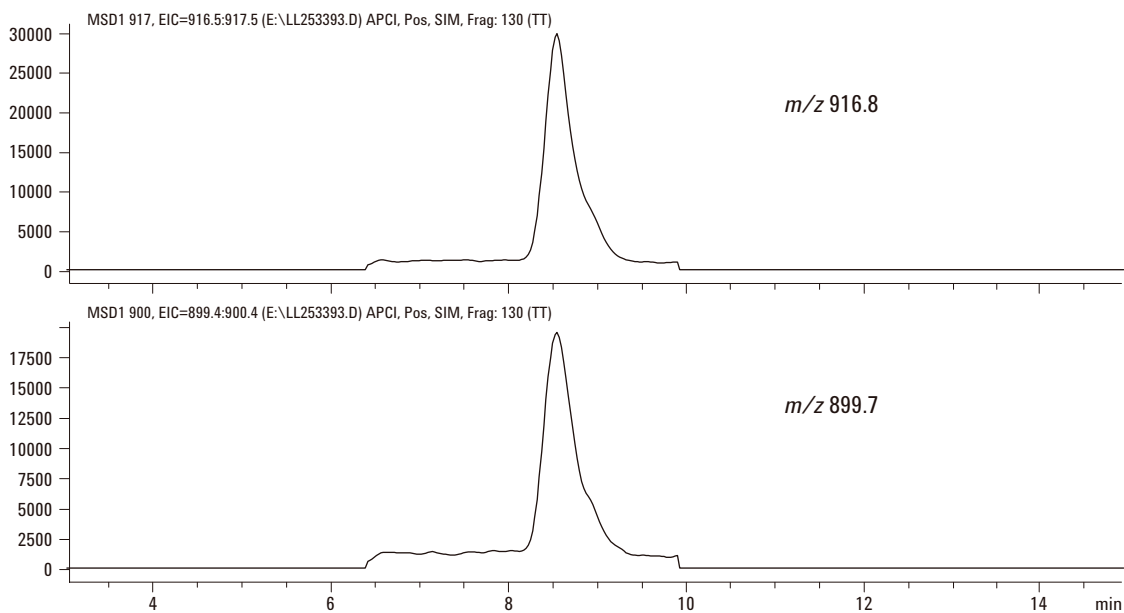


图 3. 牛粪中的多拉霉素

同样，土壤中伊维霉素的 EIC 见图 4 (60 $\mu\text{g/kg}$)。

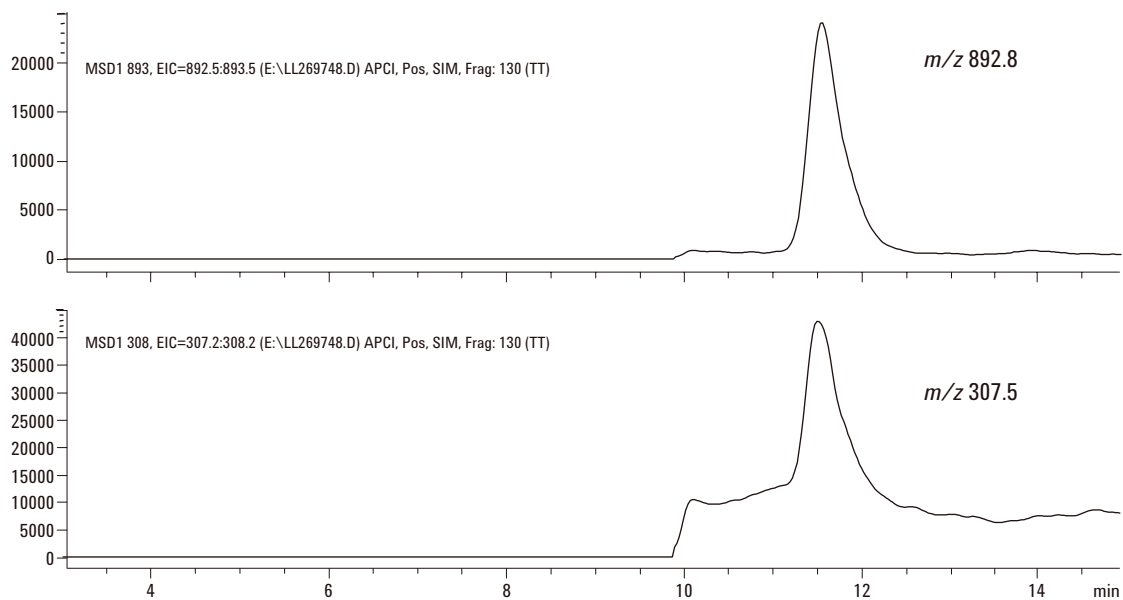


图 4. 土壤中的伊维霉素

多拉霉素的校正曲线见图 5。所有三种标样都按程序处理（经过萃取步骤）。用线性强制过原点的方式对校正曲线进行了处理。所有目标分析物的相关系数都超过了 0.995。

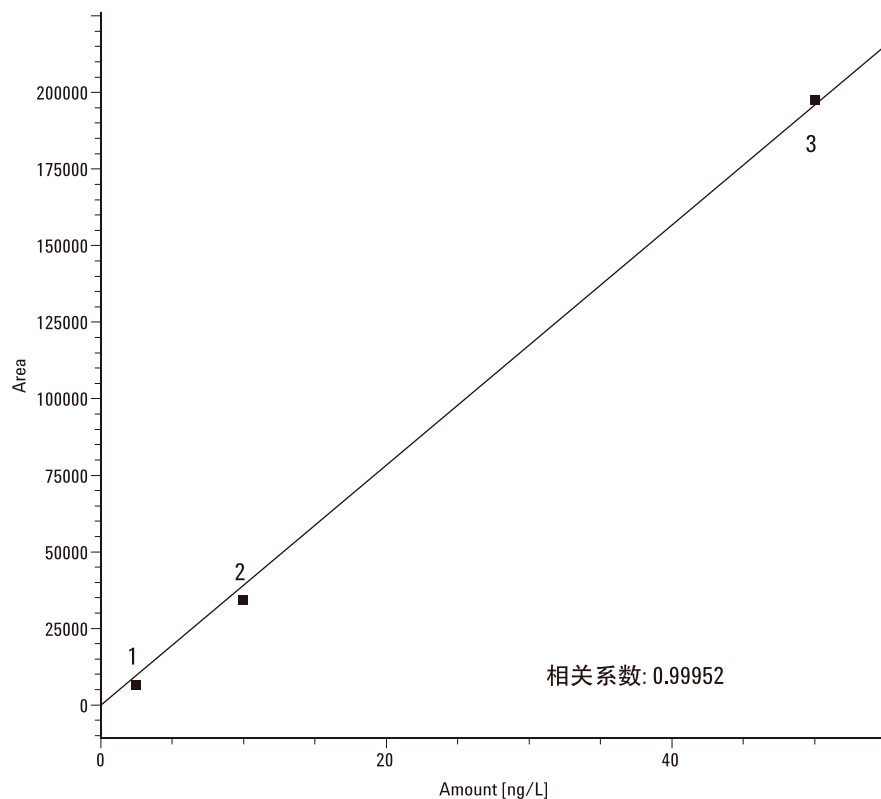


图 5. 多拉霉素校正曲线。标准值 2.5、10 和 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$

图 6 显示了伊维霉素的校正曲线。与多拉霉素相同，标准也按程序进行了处理，并得到了类似的线性结果。

要对用四极杆质谱分析的化合物进行确证，离子阱非常有用。首先，裂解的选择性很强，因为先分离了母离子，然后裂解。因此，碎片离子肯定来自分离的离子，而且不会像四极质谱那样有其它共流出的离子。其次，离子阱的全扫描 MS/MS 模式是其最灵敏的分析模式。结合了离子阱的这些功能将得到最好的化合物确认结果，也能用于建立谱库。

在本工作中，用 LC/MSD 负离子模式分析化合物得到了两个层面的确认。第一，所有四个化合物都得到了强 $[M-H]^-$ 离子，这个负离子是定量所用 $[M+H]^+$ 的假分子离子。这是在负离子模式下通过在喷雾中加入 2% 氧气得到的。第二，用离子阱分析负离子母离子，按照碰撞诱导解离条件下的中性丢失，至少得到了两个产物离子。乙酰氨基阿维菌素的 MS/MS 图谱见图 7。

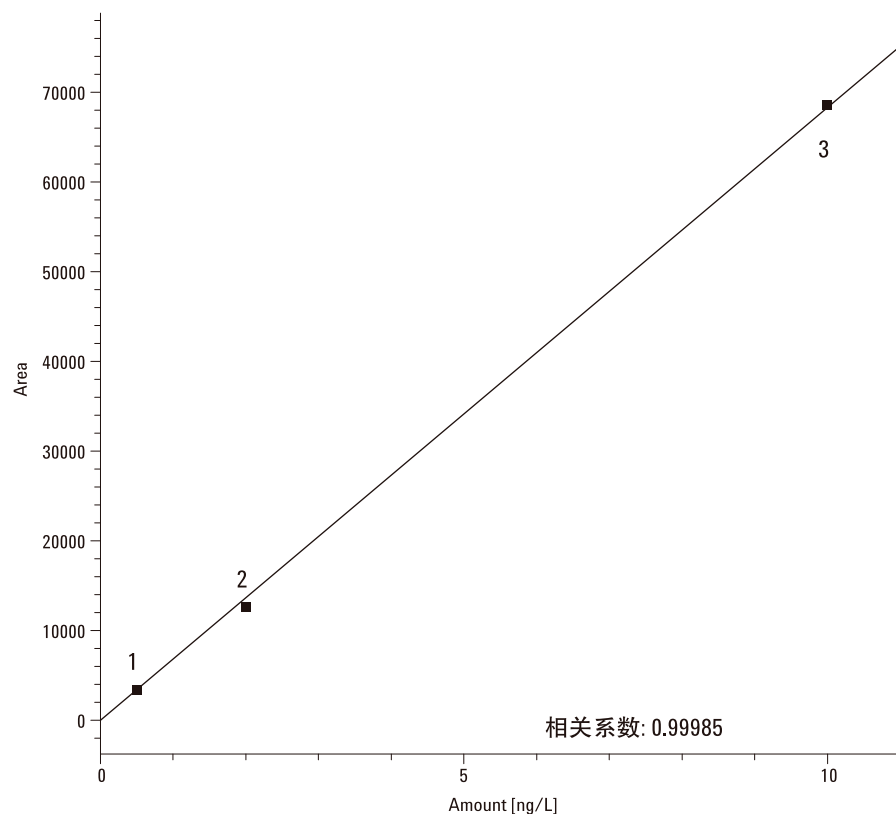


图 6. 伊维霉素校正曲线。标准值 0.5、2 和 10 ng

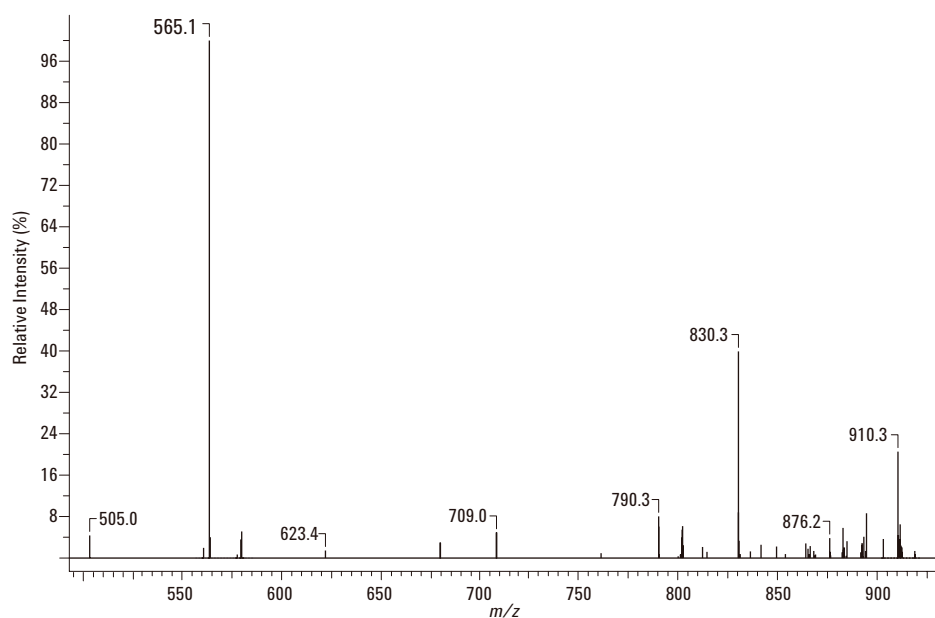


图 7. 乙酰氨基阿维菌素 (SL 离子阱) 的 MS/MS 图谱, 负离子 APCI

用 ACD 8.0 (高级化学开发公司, 加拿大安大略省多伦多) 的 MS 裂解程序将这两个碎片离子 m/z 830.3 和 565.1 进行了解析, 见图 8。

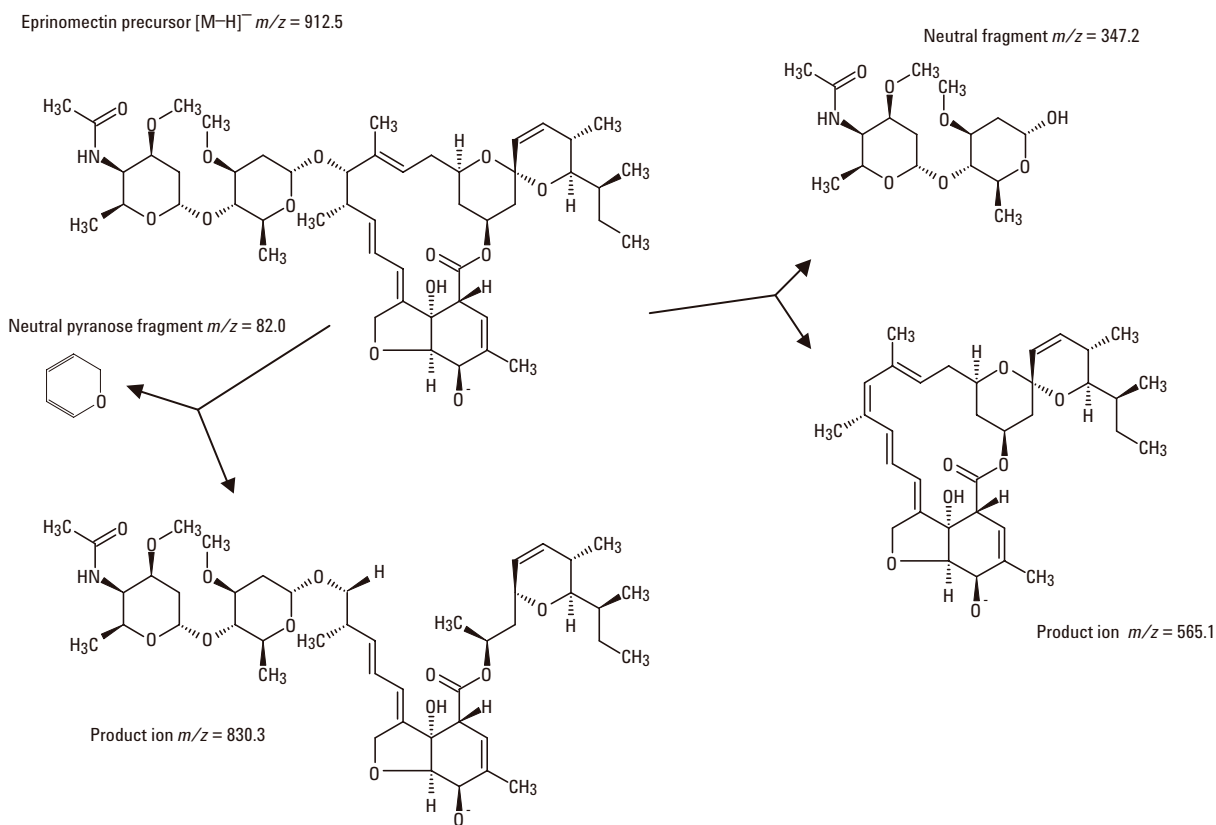


图 8. 伊维菌素的裂解途径

再回到 LC/MSD SL 四极质谱上，对水、沉积物、土壤中伊维霉素、多拉霉素的分析确证结果分别列于表 2、表 3 和表 4。检测限（LOD）的计算方法是， $LOD = 4.65 \times SD$ ，在这里 $SD =$ 标准差。MRV 是最低报告值。

表 2. 对河水样品的确证结果

分析物	N	添加浓度 (ng/L)	回收率 (%)	±SD	%RSD	LOD (ng/L)	MRV (ng/L)
多拉霉素	9	10	96	0.19	2.45	0.87	1.0
	11	40	79	1.78	5.65	NA	NA
伊维霉素	9	2	100	0.05	2.29	0.21	0.21
	11	8	88	0.22	3.11	NA	NA
乙酰氨基阿维菌素	9	10	96	0.85	8.87	3.97	4.0
	11	40	103	2.72	6.58	NA	NA
莫斯达汀	9	2	102	0.18	9.05	0.86	0.3
	11	8	94	0.66	8.74	NA	NA

NA 未检测

河水中多拉霉素和伊维霉素的相对标准差低于 6%，而乙酰氨基阿维菌素和莫斯达汀的相对标准差低于 10%。所有化合物的回收率在 88% 和 103% 之间。多拉霉素、伊维霉素和乙酰氨基阿维菌素的 LOD 分别为 1.0 ng/L、0.21 ng/L 和 3.97 ng/L。莫斯达汀的目标 LOD 值 0.30 ng/L 没有达到。

表 3. 对河水沉积物样品的确证结果

分析物	N	添加浓度 (µg/L)	回收率 (%)	±SD	%RSD	LOD (µg/L)	MRV (µg/L)
多拉霉素	11	5	80	0.83	20.8	3.9	5.0
	11	20	84	2.14	12.7	NA	NA
伊维霉素	11	5	89	1.03	23.1	4.8	5.0
	11	20	91	2.47	13.6	NA	NA

NA 未检测

表 4. 对土壤样品的确证结果

分析物	N	添加浓度 (µg/L)	回收率 (%)	±SD	%RSD	LOD (µg/L)	MRV (µg/L)
多拉霉素	11	5	75	0.71	18.9	3.3	5.0
	11	20	81	1.96	12.1	NA	NA
伊维霉素	11	5	71	0.75	21.1	3.5	5.0
	11	20	87	1.89	10.9	NA	NA

NA 未检测

土壤和沉积物样品的多拉霉素和伊维霉素的 %RSD 在 10.9 和 23.1 之间，回收率分别为 71% 和 91%。两个化合物的 LOD 均低于 5.0 µg/kg。

结论

本工作和确证数据表明，本方法可以在极低浓度对河水中的四种阿维霉素、土壤和沉积物中的两种阿维霉素进行定量分析。并具有良好的回收率和 RSD。除莫斯达汀外，都能够满足目标 LOD。残留物的确证采用离子阱 MS/MS。

参考文献

1. Merial® Technical Bulletin: Ivermectin/Doramectin/Moxidectin - Structure and Generation
http://us.merial.com/Pdf/page_pdf/Ivermectin_Doramectin_Moxidectin_Structure_and_Generation.pdf
2. D. Boxall, B. Kolpin, Halling-Sørensen, and J. Tolls, Are Veterinary Medicines Causing Environmental Risks (2003), *Environmental Science and Technology*, **37**, No.15, 286A–294A.

了解更多信息

如需了解有关本应用的详细信息，请按如下电子邮件地址联系：

anthony.gravell@environment-agency.wales.gov.uk

要了解有关我们产品和服务的更多信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的有关损失不承担责任。

本资料中所涉及的信息、说明和指标，如有更改，恕不另行通告。

© 安捷伦科技公司，2005

中国印刷
2005 年 5 月 31 日
5989-2980CHCN



Agilent Technologies