

使用ACQUITY UPLC I-Class和Xevo TQ-S分析饲料中的抗球虫剂

Nathalie Gillard¹、Gilles Pierret¹、Philippe Delahaut¹、Marijn Van Hulle²

¹Centre d'Economie Rurale, Marloie (比利时)

²沃特世公司 (比利时)

应用优势

使用ACQUITY UPLC® I-Class系统和Xevo® TQ-S开发出一种检测饲料样品中的11种抗球虫剂的快速、稳健、准确和灵敏的方法。

- 与原有HPLC/MS-MS方法相比，饲料样品提取物可进一步稀释50倍，进样体积只有原来一半。
- 运行时间从16 min (HPLC/MS-MS) 缩短至8 min (UPLC/MS-MS)。
- RADAR™能够提供关于基质效应的相关信息，因此是方法开发的一种重要工具。

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC I-Class

Xevo TQ-S

ACQUITY UPLC BEH色谱柱 MassLynx®软件

TargetLynx™应用管理器

关键词

球虫病，动物饲料，抗球虫药，兽药，
抗球虫剂

简介

球虫病是一种由原生动物球虫引起的动物肠道寄生虫病。这种疾病通过接触受感染的粪便或摄入受感染的组织在动物之间传播。主要症状为腹泻，严重时变为便血。大多数动物感染球虫后无症状；但是动物幼体或免疫力低下的动物可能会出现包括死亡在内的严重症状。其中家养动物、工业化饲养的家禽和兔子为易感群体。

目前，根据欧盟法规2003/1831/EC，11种抗球虫剂经批准可作为饲料添加剂。其它一些法规还规定了可用于特定动物物种的抗球虫剂。由于饲料公司常会用同一生产线生产不同的饲料，因此难以避免残留的抗球虫药发生批次间转移。饲料公司本身努力避免交叉污染，并且欧盟发布指令2005/183/EC规定了抗球虫药的最大残留浓度（2009/8/CE）以保护动物健康并将对消费者的风险降至最低。该指令规定饲料的最大残留浓度：用于敏感动物物种的为1%，相对不敏感的非标靶动物物种为3%。表1中示出的所需LOQ水平取决于药物，根据提取方案做进一步限定。这些LOQ浓度差异较大，难以在一次多残留分析中，分析所有组分并实现良好的灵敏度、准确度和线性范围。

此外，饲料是非常复杂的混合物。通常情况下无法对每种饲料使用基质匹配校准法或标准品加入法，而是采用内标法和只对某一种饲料基质。基于同种饲料基质，在不同浓度下进行加标回收率实验，以验证方法的准确度。

	最大治疗剂量	最大值 (1%残留浓度)	最大值 (3%残留浓度)	要求的LOQ
	[mg/kg]	[µg/kg]	[µg/kg]	[µg/kg]
抗球虫药				
拉沙里菌素	125	1250	3750	312.5
甲基盐霉素	70	700	2100	175.0
沙利霉素	70	700	2100	175.0
莫能菌素	125	1250	3750	312.5
马杜霉素	5	50	150	12.5
赛杜霉素	25	250	750	62.5
DNC, 尼卡巴嗪	50	500	1500	125.0
地克珠利	1	10	30	2.5
癸氧喹酯	40	400	1200	100.0
卤夫酮	3	30	90	7.5
氯苯胍	66	700	2100	175.0

表1. 11种抗球虫药的治疗剂量、残留浓度和规定的LOQ。

众所周知，基质可显著改变电喷雾电离的响应，可能使信号增强，但更可能的是抑制信号。通过减少源区中基质离子的绝对量可以使基质效应最小化。一种途径是通过稀释样品实现（如果所用的方法足够灵敏，则此途径可行），使得加载到色谱柱上的基质减少，在常规食品和饲料检测实验室工作时也无需频繁清洗仪器，从而延长了仪器的正常工作时间，提高了方法的稳健性。

本应用纪要介绍了一种快速、准确且稳健的UPLC/MS-MS方法，该方法利用Waters® ACQUITY UPLC I-Class和Xevo TQ-S系统检测饲料中残留浓度低至0.25 %的11种抗球虫剂。Xevo TQ-S是一种高灵敏的串联四极杆仪器，具有快速转换正/负离子的功能，能够应对颇具挑战性的基质。

实验

样品制备

本方法参考先前应用于HPLC-MS-MS的方法，对其进行了适当的转换以用于UPLC[®]，除此之外还包括最终的稀释步骤。

1. 称取5 g研磨均匀的饲料样品，放至50 mL一次性离心管中。
2. 加入50 μ L内标混合溶液（50 μ g/mL氯苯胍-d8、尼日利亚菌素，25 μ g/mL DNC-d8，5 μ g/mL地克珠利-bis、癸氧喹酯d5）。
3. 加入10 mL 10% Na₂CO₃溶液，手动振荡。
4. 加入15 mL乙腈。
5. 振荡30 min。
6. 在2000 rpm（4 °C）下离心5 min。
7. 将上清液转移至50 mL试管中。
8. 再次用乙腈提取，合并两次所得的有机提取物。
9. 将1 mL提取物转移至玻璃管中，并用初始流动相将样品稀释50倍。

UPLC条件

系统:	ACQUITY UPLC I-Class
色谱柱:	ACQUITY BEH C ₁₈ 2.1 × 100 mm
柱温:	50 °C
样品温度:	10 °C
进样:	10 μ L
流动相:	A 0.1%甲酸水溶液 B 0.1%甲酸和甲醇混合液

梯度如表2所示。

MS条件

MS系统:	Xevo TQ-S
极性:	ES +/-
毛细管电压 (kV):	ES+为1.00, ES-为3.00
源温度:	150 °C
脱溶剂气温度:	500 °C
锥孔气体流速:	150 L/h
脱溶剂气流速:	1200 L/h

UPLC条件

时间	A%	B%	?
0.0	50	50	-
0.5	50	50	6
3.0	0	100	6
5.0	0	100	6
7.0	50	50	1
8.0	50	50	1

使用IntelliStart™软件完成化合物调谐。IntelliStart根据化合物的质量数或元素组成为每个化合物自动生成最多5个MRM通道。这种优势在于可同时选择多个加合物，非常适用于易形成钠加合物的抗球虫剂。IntelliStart向导的屏幕截图如图1所示。马杜霉素提取物的最佳MRM通道见图2。

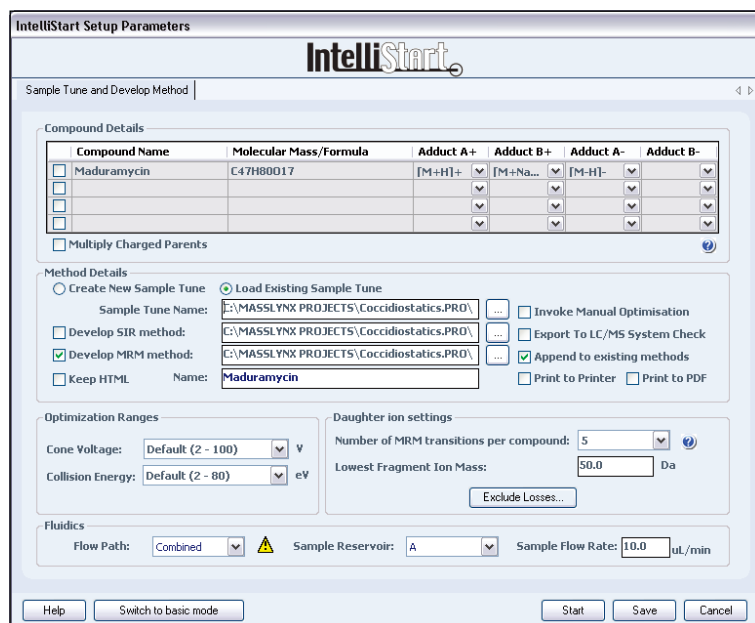


图1. 元素组成为 $C_{47}H_{80}O_{17}$ 的马杜霉素的Intellistart向导屏幕截图。

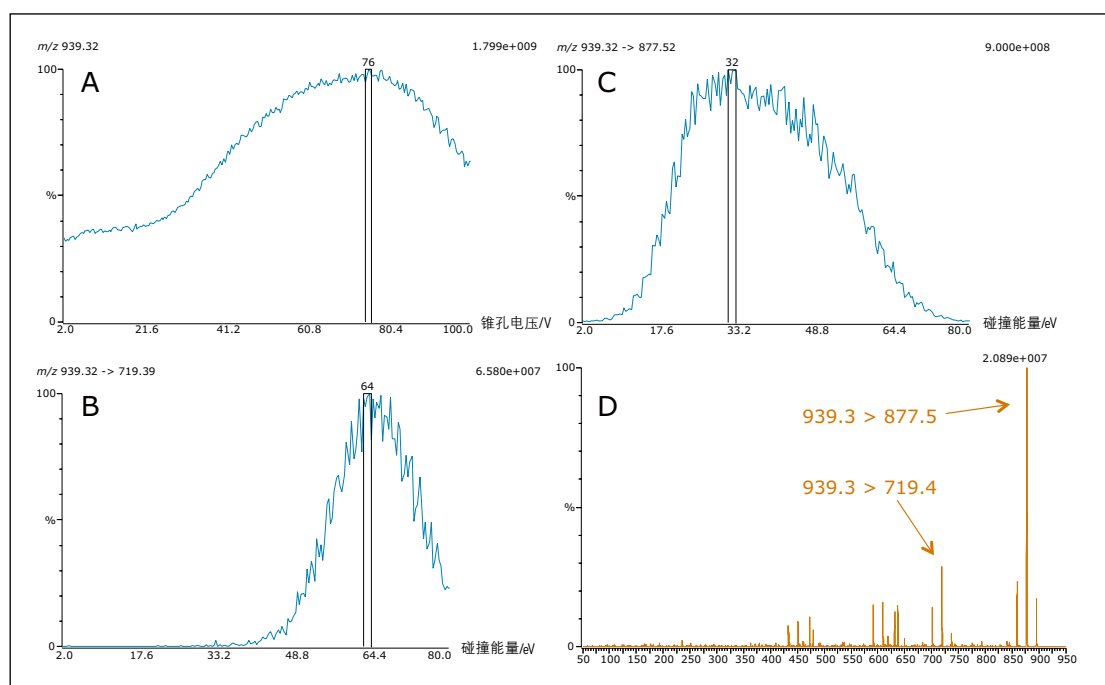


图2. 截取自IntelliStart方法开发报告，显示了马杜霉素钠加合物的优化锥孔电压 (A)，两次跃迁的优化碰撞能量 (B, C) 和产物离子的位置 (D)。

为每种化合物自动创建其MRM通道。表3显示了所有化合物质谱条件概览，包括最佳锥孔电压和碰撞能量。每种化合物选择了两个或三个MRM通道，内标物除外。

	母离子质量 m/z	产物离子质量 m/z	驻留时间 (s)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
氯苯胍	334.2	155.2	0.017	20	20
	334.2	111.1	0.017	20	40
卤夫酮	416.1	100.2	0.017	20	20
	416.1	120.2	0.017	20	20
癸氧喹酯	418.3	204.1	0.015	20	35
	418.3	372.3	0.015	20	20
拉沙里菌素	613.4	377.4	0.015	20	35
	613.4	577.4	0.015	20	30
莫能菌素	693.5	461.4	0.015	20	50
	693.5	501.4	0.015	20	50
沙利霉素	773.6	431.4	0.015	20	50
	773.6	531.4	0.015	20	40
甲基盐霉素	787.6	431.3	0.015	20	50
	787.6	531.3	0.015	20	45
赛杜霉素	895.5	833.6	0.015	20	30
	895.5	851.6	0.015	20	35
马杜霉素	939.5	877.6	0.015	20	32
	939.5	719.5	0.015	20	64
DNC	301.2	137.1	0.017	20	15
	301.2	107.1	0.017	20	35
地克珠利	407.1	336.1	0.017	50	17
	405.1	334.1	0.017	50	17
地克珠利-bis	421.1	323.1	0.017	50	25
DNC-D8	309.2	141.1	0.017	20	15
氯苯胍-d8	342.2	142.3	0.017	20	25
尼日利亚菌素	747.5	703.5	0.015	20	55
癸氧喹酯-D5	423.3	377.3	0.015	20	20

表3. 11种抗球虫药及其内标的MS方法参数。

图3A显示了MassLynx MS方法编辑器中的每种化合物的保留时间窗口。图3B显示了包含癸氧喹酯及其内标的质谱方法。

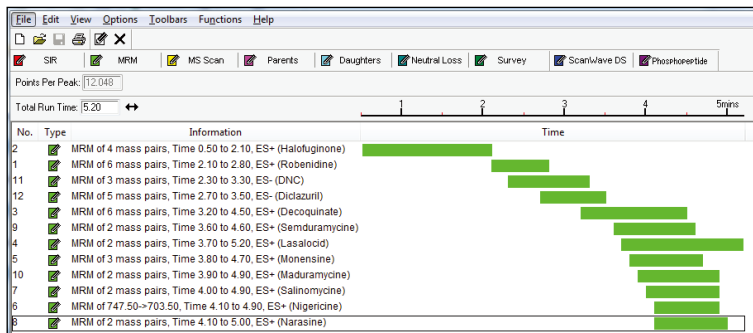


图3A. MassLynx MS方法编辑器中的保留时间窗口。

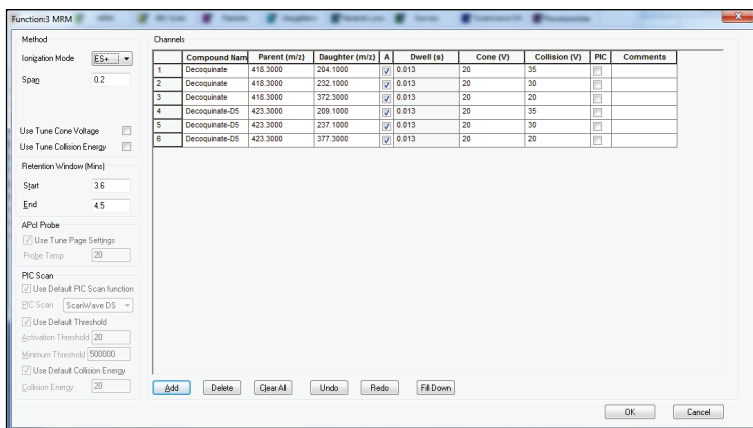


图3B. 癸氧喹酯及其内标的MassLynx MS运行方法。

结果与讨论

原有 HPLC/MS-MS方法

1%交叉污染的样品原有的HPLC/MS-MS色谱图如图4A所示。总运行时间为16 min¹。离子载体类抗球虫药没有完全分离。

然后，将该方法转换为ACQUITY I-Class的方法，运行时间缩短，并且对加标回收率无任何显著影响。交叉污染为1%的基质加标样品采用该方法所得的典型色谱图如图4B所示。在3 min内，11种化合物全部被洗脱。两次连续进样的总运行时间为8 min。除拉沙里菌素和马杜霉素之外，所有化合物均实现基线分离。离子载体类抗球虫药的分离明显改善。

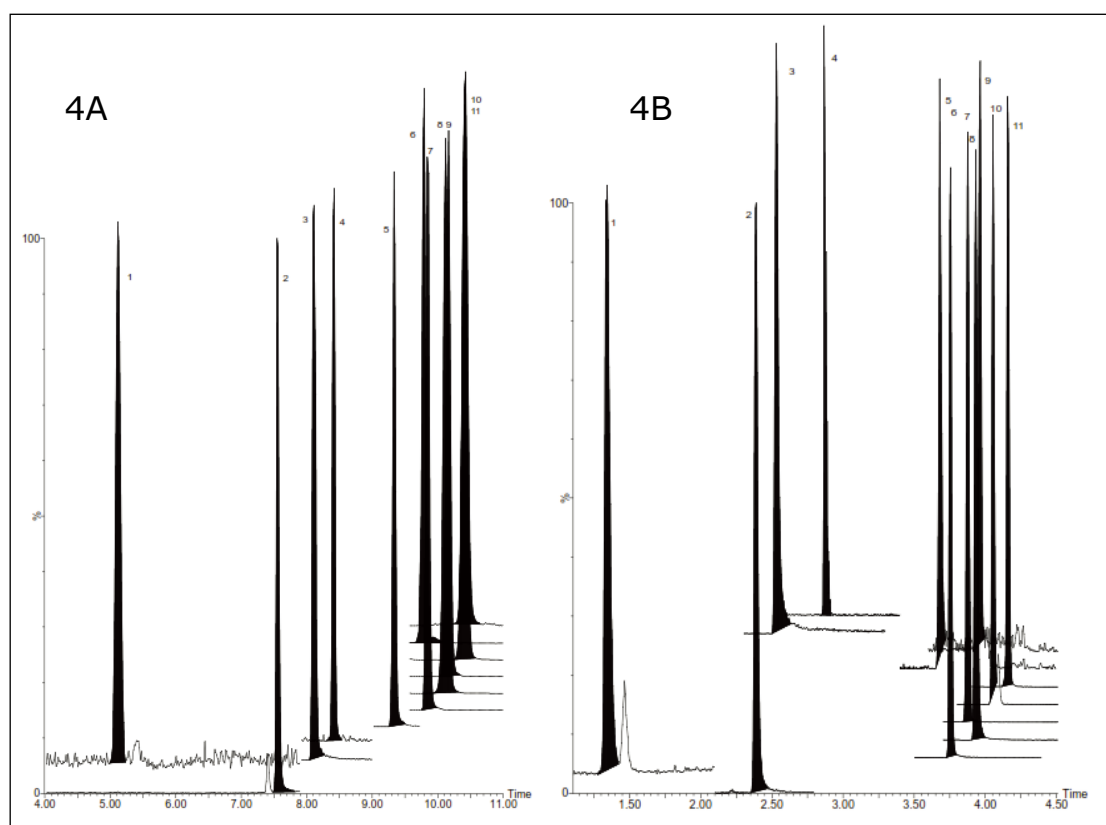


图4A. 残留浓度为1%的基质匹配校准标准品的HPLC/MS-MS色谱图，图中示出了卤夫酮(1)、氯苯胍(2)、DNC(3)、地克珠利(4)、癸氧喹酯(5)、赛杜霉素(6)、拉沙里菌素(7)、沙利霉素(8)、莫能菌素(9)、甲基盐霉素(10)和马杜霉素(11)。
 4B. 残留浓度为1%的基质匹配校准标准品的UPLC/MS-MS色谱图，图中示出了卤夫酮(1)、氯苯胍(2)、DNC(3)、地克珠利(4)、癸氧喹酯(5)、赛杜霉素(6)、拉沙里菌素(7)、沙利霉素(8)、莫能菌素(9)、甲基盐霉素(10)和马杜霉素(11)。

色谱方法开发 – RADAR

将原有Alliance® HPLC系统色谱分离方法转换为ACQUITY UPLC系统的UPLC方法。当使用UPLC方法时，分析时间仅3 min。对于基质加标样品，某些饲料QC样品中的赛杜霉素显示出高达200 %的回收率。使用分析时间6 min时，回收率符合相关标准。在Xevo TQ-S上应用RADAR功能，可同时获得MRM和全扫描色谱图。如图5A所示，基质在与赛杜霉素相同的保留时间处有干扰，可能产生可观测到的基质效应。由图5B可知，较长的梯度时间能让赛杜霉素与基质中干扰组分更好地分离。

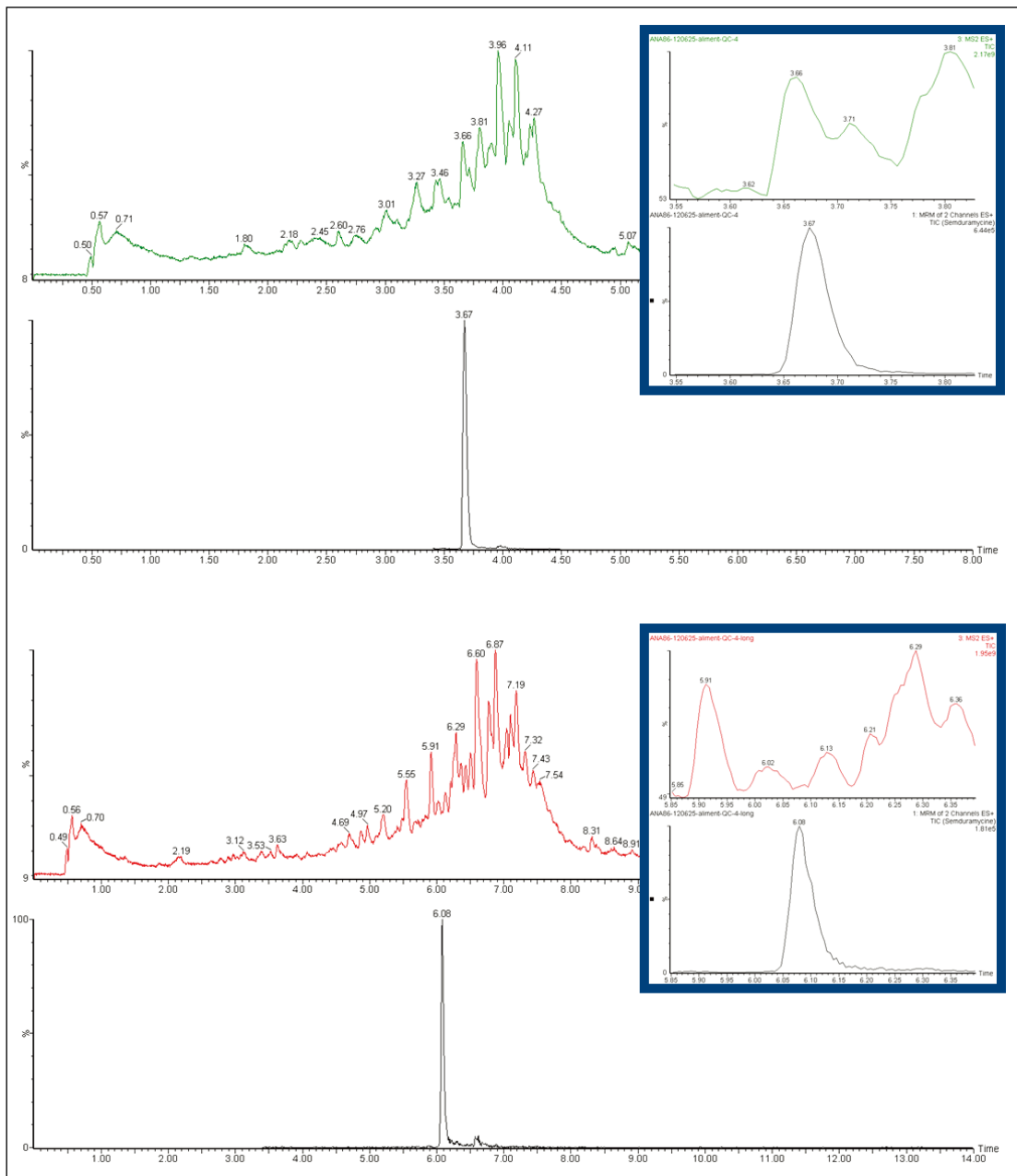


图5A. 赛杜霉素的MRM色谱图(下方迹线)和全扫描TIC(上方迹线)以及目标物保留时间区域的放大图，显示了赛杜霉素在保留时间处的色谱干扰。

图5B. 赛杜霉素的MRM色谱图(下方迹线)和全扫描TIC(上方迹线)以及目标物保留时间区域的放大图，显示了在赛杜霉素保留时间处的色谱分离干扰。

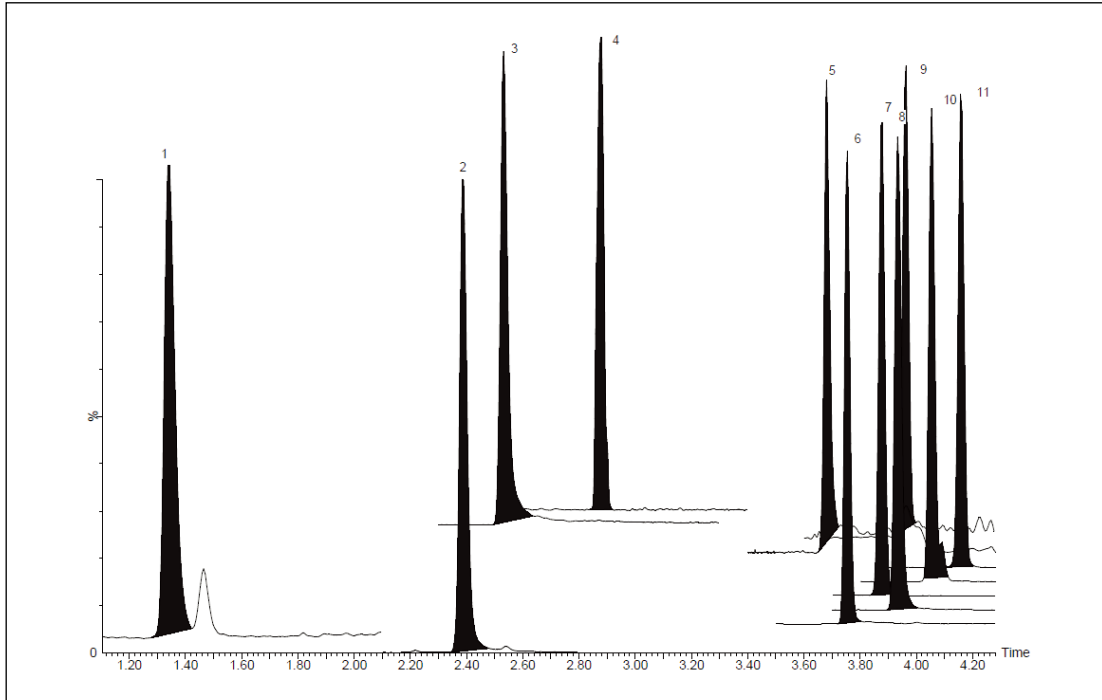


图6. 残留浓度为1%的基质匹配校准标准品的UPLC-MS-MS色谱图，图中示出了卤夫酮(1)、氯苯胍(2)、DNC(3)、地克珠利(4)、赛杜霉素(5)、癸氧喹酯(6)、莫能菌素(7)、拉沙里菌素(8)、马杜霉素(9)、沙利霉素(10)和甲基盐霉素(11)。

基质效应 – RADAR

我们通过实验探讨了稀释50倍的样品受基质效应影响的程度。稀释50倍的提取物在无基质效应的情况下，可以使用溶剂配制的标准曲线而不必用基质加标校准曲线。为实现这一点，在空白饲料提取物和溶剂中均加入相同浓度的抗球虫药，0.25%的交叉污染水平。两份等量的加标样品都稀释50倍，然后，按照基质加标样品中不同化合物的峰面积除以溶剂标准液中相应化合物的峰面积，所得的比值计算两种稀释状态下的基质效应。结果如表4所述。

化合物	保留时间 (min)	基质效应 (未稀释样品)	基质效应 (稀释50倍的样品)
卤夫酮	1.1	79 %	45 %
氯苯胍	2.1	73 %	12 %
DNC	2.5	11 %	-2 %
地克珠利	2.9	22 %	5 %
赛杜霉素	3.7	50 %	-5 %
癸氧喹酯	3.8	36 %	-6 %
莫能菌素	3.9	48 %	5 %
马杜霉素	4.0	75 %	2 %
拉沙里菌素	4.0	28 %	-21 %
沙利霉素	4.1	3 %	7 %
甲基盐霉素	4.2	-5 %	6 %

表4. 交叉污染水平为0.25%的未稀释和稀释50倍的饲料加标提取物的基质效应。

对于未稀释的样品，后洗脱下来的化合物似乎具有较低的基质效应，基质效应对各种组分的影响差异较大，可能几乎没有（甲基盐霉素、沙利霉素和DNC），也可能非常强（卤夫酮和马杜霉素）。在提取物未进行稀释的情况下显然必须使用基质加标校准曲线。

对于稀释50倍的样品，除早洗脱的卤夫酮（45%）和氯苯胍（12%）之外，基质效应明显减弱，均低于7%。在稀释50倍的饲料提取物中，拉沙里菌素显示其信号增强20%。当然，仍然是：最好采用基质加标校准曲线。

结果如预期，在样品未稀释的情况下，总离子流（TIC）基线显著高于样品稀释50倍时TIC色谱图中的基线。由此可得出结论：饲料提取物稀释50倍时，基质效应明显减弱。凭借Xevo TQ-S的灵敏度，这些稀释后的饲料样品，仍可进行分析，表现出良好的灵敏度。分析少量的稀释样品时，无需频繁清洗仪器，这使得仪器的正常运行时间延长，提高了方法的可靠性。

灵敏度

交叉污染为0.25%时，即使是最难分析的组分（卤夫酮、地克珠利、马杜霉素和赛杜霉素），依然能被检出，且信噪比在20以上。信噪比通过原始数据和峰间噪音定义测得。考虑到所采用的提取步骤，交叉污染0.25%时，相对的柱上进样量见表5。交叉污染为0.25%的基质加标样品的色谱图及相应信噪比水平见图7。

残留浓度为0.25%的校准标准品		
名称	浓度 (µg/kg)	柱上进样量 (pg)
卤夫酮	7.5	1.875
氯苯胍	175	43.75
DNC	312.5	78.125
地克珠利	2.5	0.625
马杜霉素	12.5	3.125
莫能菌素	312.5	78.125
沙利霉素	175	43.75
甲基盐霉素	312.5	78.125
拉沙里菌素	312.5	78.125
赛杜霉素	62.5	15.625
癸氧喹酯	100	25

表5. 交叉污染为0.25%的校准标准品的绝对柱上进样量。

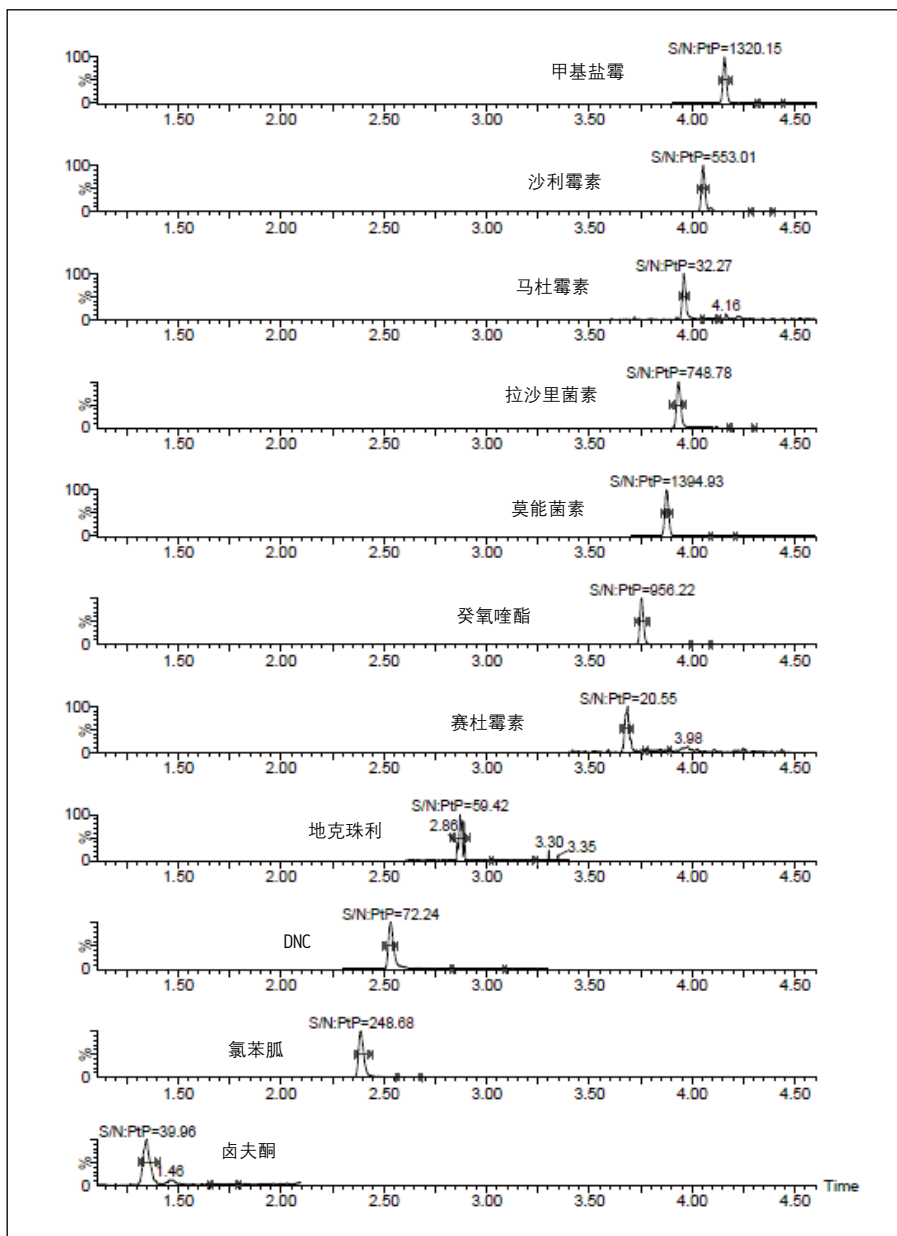


图7. 残留浓度为0.25%的基质匹配校准标准品的色谱图及信噪比数值。

加标回收率和重复性

通过在最大许可交叉污染0.25 %至6 %的八点基质加标校准曲线，分析交叉污染为0.5 % (n=1)、1 % (n=4) 和3 % (n=3) 的八份样品。加标回收率和重复性的测定结果均符合欧盟指令2002/657/CE的要求。

平行分析六次作重现性实验。结果见表6。交叉污染为1 %时的重现性的CV %值良好（低于10 %），但地克珠利除外（CV值为15 %）。

化合物	CV (%)
卤夫酮	7.7
氯苯胍	2.2
DNC	2.6
地克珠利	15.0
马杜霉素	3.4
莫能菌素	4.2
沙利霉素	2.9
拉沙里菌素	5.6
赛杜霉素	3.6
癸氧喹酯	2.3

表6. 所有11种抗球虫药的CV %值。

这些值与采用最初的HPLC/MS-MS方法得出的结果具有良好的一致性¹。

为考察准确度，进行了加标回收率实验。回收率结果均符合欧盟指令2002/657/CE的规定。

线性

通过进样，建立八点校准曲线，以考察11种化合物的线性。在研究范围内，相关系数的测定值均在0.995以上，表明线性良好。所有88个校准点的偏差基本在±10 %范围之内，其中只有3个点除外，其最大偏差为+14 %。氯苯胍、卤夫酮和地克珠利的残留偏曲线和校准曲线如图8所示。由于Xevo TQ-S在LOQ水平下的采样点数任较高，使得进行低浓度检测时的准确度和精密度较其它仪器更出色。

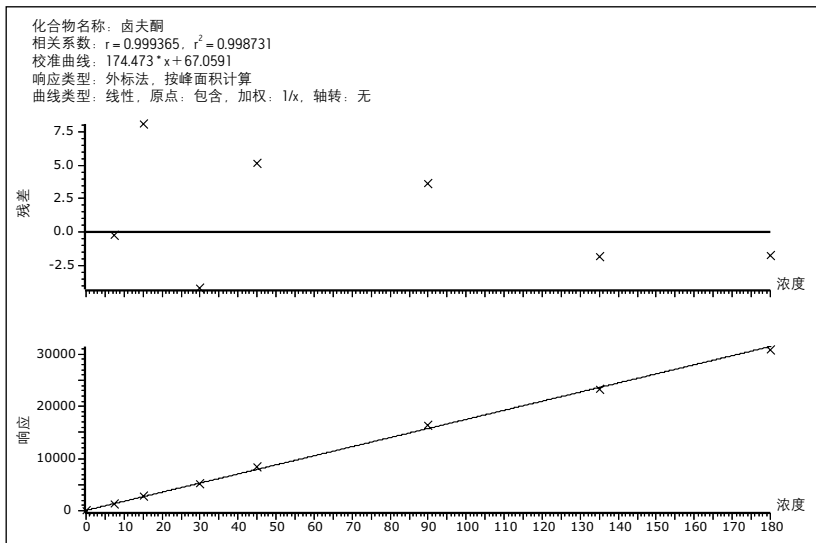


图8A. 卤夫酮的残留偏差曲线和校准曲线。

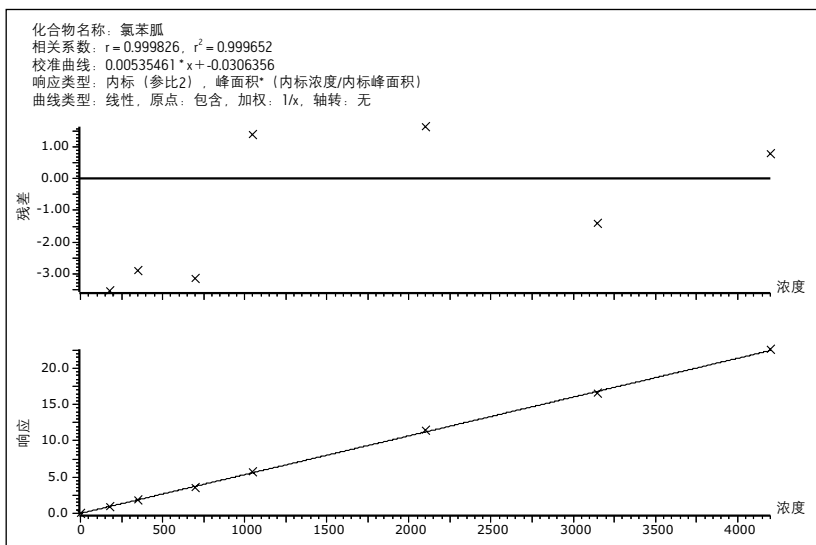


图8B. 氯苯胍的残留偏差曲线和校准曲线。

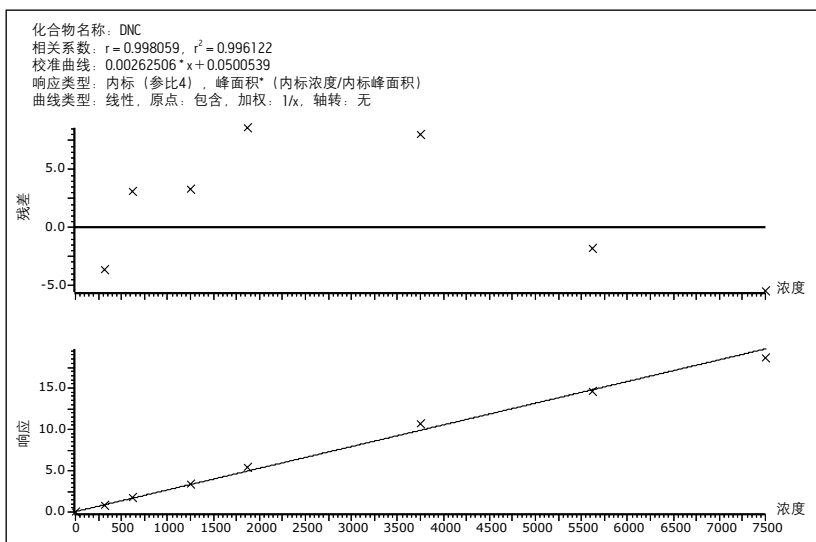


图8C. DNC的残留偏差曲线和校准曲线。

结论

利用ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ-S系统，开发出一种快速、稳健、准确和灵敏的分析方法，用于检测饲料样品中11种抗球虫药。与原有HPLC/MS-MS方法相比，饲料样品提取物可稀释50倍，进样体积只需原来的一半。这使清洗仪器的频率降低，延长了仪器的正常运行时间，提高了检测的可靠性。RADAR功能能够提供关于基质效应的信息，是方法开发的一种重要工具。

参考文献

1. PH Delahaut, G Pierret, N Ralet, M Dubois and N Gillard. Multi-residue method for detecting coccidiostats at carry-over level in feed by HPLC-MS/MS. Food Additives and Contaminants. 27: 6, 801-809, June 2010.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, ACQUITY UPLC, UPLC, Xevo, MassLynx, Alliance和The Science of What's Possible 是沃特世公司的注册商标。TargetLynx 和IntelliStart 是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2013 年沃特世公司。印制于中国
2013年8月 720004769ZH AG-PDF

沃特世中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com

