

应用纪要

用于分析禁用兽药残留的Xevo TQ-S cronos：测定鸡肉中法规限量水平的硝基 呋喃代谢物和氯霉素

Renata Jandova, Sara Stead

Waters Corporation



摘要

根据欧盟、美国食品药品监督管理局、国际食品法典委员会和联合国粮农组织和世界卫生组织下的食品添加剂联合专家委员会(JECFA)制定的法规，由于担心某些抗菌化合物在全球主要地区的毒性，禁止其用于供人类食用的畜牧和水产养殖中。本文介绍了将ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统与Xevo TQ-S cronos联用，定量分析动物源性食品中禁用兽药残留（氯霉素和四种硝基咪唑代谢物）的方法以及性能特征。校准特性和重复性均表明，该方法适用于测定鸡肉中相应欧盟行动参考值下的残留。性能评估结果表明，Xevo TQ-S cronos在常规操作中非常稳定，即使对于复杂提取物中具有挑战性的小分子强极性分析物，在长时间分析过程中也只需很少的操作员干预或维护。

优势

- 与Oasis固相萃取样品制备产品相结合，对动物源性食品中的禁用药物残留进行可靠、常规的定量分析，以符合严格的欧盟法规
- 在复杂的基质提取物中表现出稳定性能，大幅延长仪器正常运行时间，同时在合规性监测分析过程通常所需的运行时间内尽量减少操作员干预需求

简介

过去，受抗菌残留物污染的动物源性食品的安全性一直受到全球关注。在欧盟内部，针对特定的禁止或未经授权的药物活性物质，根据法规(EU) 2019/1871制定了食品中的行动参考值(RPA)¹。RPA设定为官方控制实验室中可以达到的最低分析水平[法规(EU) 2017/625]²。因此，RPA还定义了对食品中这些物质的最低方法性能要求(MMPR)。如果发现动物源性食品所含的这些残留物浓度等于或高于RPA，将被视为不符合法规要求，不得进入食物链。

2019年，欧盟内部将氯霉素、孔雀石绿、硝基咪唑及其代谢物的RPA分别确定为0.15 µg/kg、0.5 µg/kg和0.5 µg/kg¹。美国食品药品监督管理局、国际食品法典委员会和联合国粮农组织和世界卫生组织下的食品添加剂联合专家委员会(JECFA)制定的法规也禁止将这些抗菌化合物用于全球主要地区的畜牧和水产养殖中³⁻⁵。

硝基咪唑在体内迅速代谢，形成稳定的组织结合代谢物。这些代谢物的片段可能会通过弱酸水解释放出来，作为残留标志物进行监测⁶。例如，将3-氨基-2-恶唑烷酮(AOZ)作为药物咪唑唑酮的残留标志物进行监测。3-氨基-5-吗啉基甲基-2-恶唑烷酮(AMOZ)是咪唑唑酮的残留标志物，1-氨基乙内酰胺(AHD)是咪唑妥因的残留标志物，氨基脲是咪唑西林的残留标志物。为完成分析并提供适合反相色谱的提取物，通常用2-硝基苯甲醛对所得代谢物进行衍生化，得到“NB”衍生物。

Xevo TQ-S cronos仪器是一款可靠的系统，专为对复杂基质样品进行稳定的常规定量分析而开发。Xevo TQ-S cronos沿用了此前曾在ACQUITY QDa中非常受欢迎的类似样品锥设计。除倒锥形设计外，沃特世已获专利的

技术也有助于Xevo TQ-S cronos获得稳定的性能，其中包括采用正交几何结构的离子源、StepWave离轴离子聚焦技术和采用T-Wave技术的碰撞池。之前发表的应用纪要报告了该系统在其他残留定量分析应用（包括农药、丙烯酰胺和三甲基苯基染料）中的优势⁷⁻⁹。

本研究考察了Xevo TQ-S cronos串联四极杆质谱仪与ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统联用测定禁用兽药残留氯霉素(CAP)和硝基呋喃代谢物(NF)的性能。

实验

本研究的样品提取和SPE净化采用内部方法。进行评估研究前，针对分析物优化了UPLC梯度、ESI源和MS/MS条件。根据欧盟对CAP和NF代谢物规定的RPA，使用预衍生化标准品（视情况而定）评估Xevo TQ-S cronos的性能。

制备鸡肉提取物

鸡肉提取物制备的通用工作流程如图1所示。硝基呋喃代谢物需要经过衍生化步骤处理后才能适合反相模式的色谱分离。出于本研究的目的，将预衍生化NF标准品（购自Merck和LGC）添加至鸡肉提取物中以评估Xevo TQ-S cronos的性能。



图1.利用SPE在捕集和洗脱模式下进行样品前处理以测定鸡肉中禁用兽药的工作流程

向鸡肉提取物中添加CAP和NF以制备样品时，使用两种不同的SPE吸附剂填料：对CAP使用Oasis HLB（部件号：WAT094226 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/wat094226-oasis-hlb-3-cc-vac-cartridge-60-mg-sorbent-per-cartridge-30--m-1.html>>）；对NF使用Oasis MCX（部件号：186000254 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/186000254-oasis-mcx-3-cc-vac-cartridge-60-mg-sorbent-per-cartridge-30--m-1.html>>）。两种填料均在捕集和洗脱模式下使用，以浓缩分析物，尽量提高共提取分子的去除率。

对于CAP，将5.0 g空白样品置于50 mL塑料离心管中。加入6 mL eTrac，然后将混合物手动振摇1 min，并在自动振荡器中振摇5 min。将混合物离心，取5 mL溶剂蒸干，复溶于5 mL 10%甲醇水溶液中用于SPE步骤。将SPE小柱用2 mL甲醇和2 mL水活化。取3 mL样品加载至经过活化的小柱上，并用2 mL 5%乙酸洗涤。利用3 mL甲醇/NH₃ 90/10 v/v作为洗脱溶剂，随后蒸干洗脱液。将提取物复溶于1 mL水/甲醇(80/20 v/v)中，在

15,000 rpm下离心，过滤，然后置于自动进样器样品瓶中，进行UPLC-MS/MS分析。

为制备待添加NF的空白鸡肉提取物，将2 g样品置于50 mL塑料离心管中，与10 mL甲醇混合。将样品手动振摇1 min，并在自动振荡器中振摇5 min，离心后用于SPE步骤。将SPE小柱用3 mL乙酸乙酯、3 mL甲醇和3 mL水活化。取3 mL提取物加载至经过活化的小柱上，并用2 mL水和2 mL 30%甲醇水溶液洗涤。利用3 mL乙酸乙酯作为洗脱溶剂，蒸发，复溶于1 mL水/甲醇(60/40 v/v)中，在15,000 rpm下离心，过滤，然后置于自动进样器样品瓶中，进行UPLC-MS/MS分析。

UPLC-MS/MS条件

UPLC系统:	配备FTN样品管理器的ACQUITY UPLC I-Class PLUS
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ (1.7 μm, 2.1 × 100 mm, 部件号: 186002352)
流动相A:	0.5 mM甲酸铵
流动相B:	甲醇
流速:	0.45 mL/min
柱温:	45 °C
样品温度:	10 °C

用于硝基咪喃代谢物的梯度

时间	流速	% A	% B
初始	0.45	80	20
0.2	0.45	80	20
7	0.45	25	75
7.25	0.45	0	100
8.25	0.45	0	100
8.27	0.45	80	20
10	0.45	80	20

质谱条件

MS仪器: Xevo TQ-S cronos

电离模式: 电喷雾

脱溶剂气温度: 600 °C

脱溶剂气流速: 1000 L/h

离子源温度: 150 °C

锥孔气流速: 0 L/h

在正离子ESI模式下分析NF，单独在负离子ESI模式下分析CAP。用于CAP和NF的优化后毛细管电压分别为-0.3 kV和+0.5 kV。

用于4种硝基咪喃代谢物和氯霉素的优化后锥孔电压和碰撞能量以及相关的内标汇总于表1中。在MassLynx软

件中使用峰宽=4.5 s、每个峰所需数据点=12自动优化计算正离子模式下最终多重反应监测(MRM)方法的MS运行时间，在TargetLynx中使用Apex Track功能处理结果以在常规分析中实现一致且省时的积分。Apex Track算法使数据处理软件能够通过对比色谱图的二阶导数进行阈值处理来自动定位峰。

结果与讨论

利用UPLC-MS/MS分析添加有硝基咪唑代谢物和氯霉素的鸡肉提取物，并对结果的线性、基质效应、离子丰度比以及保留时间稳定性、精密度和灵敏度进行评估。BEH C₁₈色谱柱提供了优异的保留性和峰形，并且在两种分析中可以使用同一种流动相。所有峰均在1.7~4 min之间洗脱，总运行时间为10 min。

线性和基质效应

为绘制经内标校正的校准曲线，应用加权因子 $1/x$ 。在整个浓度范围内（通常涵盖3个数量级，硝基咪唑代谢物和SCA的浓度范围分别为0.05~10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和0.25~10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）评估线性，发现相关系数 R^2 高于0.99，表示计算值与真实值之间偏差的残差低于20%。对于鸡肉中的氯霉素，发现在0.02~10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的范围内，使用内标校正后的相关系数 $R^2 > 0.99$ 且残差低于15%。所有分析物的多条平均校准曲线的典型示例见图2。

通过计算用基质制备的校准曲线的斜率与用溶剂制备的校准曲线的斜率之比来评估基质效应(ME)。评估两种方法的基质效应，结果汇总于表2中。为了在常规定量LC-MS/MS中补偿ME，可以应用基质匹配校准曲线。但是通常需要使用同位素标记的类似物作为内标，以尽可能精确地定量分析未知样品中的分析物。

ESI+ UPLC-MS/MS	ME
2NP-AOZ	0.80
2NP-AHD	0.76
2NP-AMOZ	0.76
2NP-SCA	0.75
ESI- UPLC-MS/MS	ME
CAP	0.87

表2.在用鸡肉提取物制备的样品中测得的分析物的基质效应

离子丰度比和保留时间稳定性

复杂食品基质中禁用药物的确认性多残留分析涉及对欧盟指令2002/657/EC监管准则中所述多种理化参数的比较¹⁰。在两个浓度水平下的加标样品中，根据两个MRM通道计算出的离子丰度比完全处于通过基质匹配校准系列确定的值的偏差范围内（NF和氯霉素分别在ESI+和ESI-模式下进行分析）。加标样品的保留时间处于根据基质匹配校准系列获得的保留时间的0.2 min偏差范围内。

测量精密度和灵敏度

为考察测量结果的日间重复性，对三个典型批次的基质匹配标准品在两个浓度下（鸡肉中硝基呋喃的浓度为0.5 µg/kg和5.0 µg/kg，氯霉素的浓度为0.15 µg/kg和5.0 µg/kg）进行多次进样分析(n=36)。CAP和NF分析的总运行时间分别为16 h和36 h（3个后续分析批次）。在此期间，未实施离子源清洁或维护等用户干预。

制备并分析空白样品，在目标分析物的预期洗脱区域内未发现显著干扰，由此表明该方法的特异性良好。计算出的NF和CAP峰面积的%RSD列于表3中，所有硝基呋喃代谢物和氯霉素的典型色谱图见3，表明该方法适用于检查鸡肉中这些分析物的合规性。

ESI+ UPLC-MS/MS	%RSD 0.5 µg/kg (进样次数=36)	%RSD 5 µg/kg (进样次数=36)
2NP-AOZ	3.1	3.8
2NP-AHD	7.1	7.1
2NP-AMOZ	3.1	2.5
2NP-SCA	7.1	6.8
ESI- UPLC-MS/MS	%RSD 0.15 µg/kg (进样次数=36)	%RSD 5 µg/kg (进样次数=36)
CAP	2.8	3.0

表3.利用ACQUITY UPLC I-Class PLUS与Xevo TQ-S cronos联用系统分析获得的鸡肉中NF和CAP的%RSD

图4显示了在TrendPlot (TargetLynx)中绘制的QC图表示例，其中包括由两倍和三倍标准偏差确定的“警告区”。接近/进入“警告区”(>2SD)的进样可以作为调查系统和实施可能的维护（包括离子源的清洁度）的信号

。

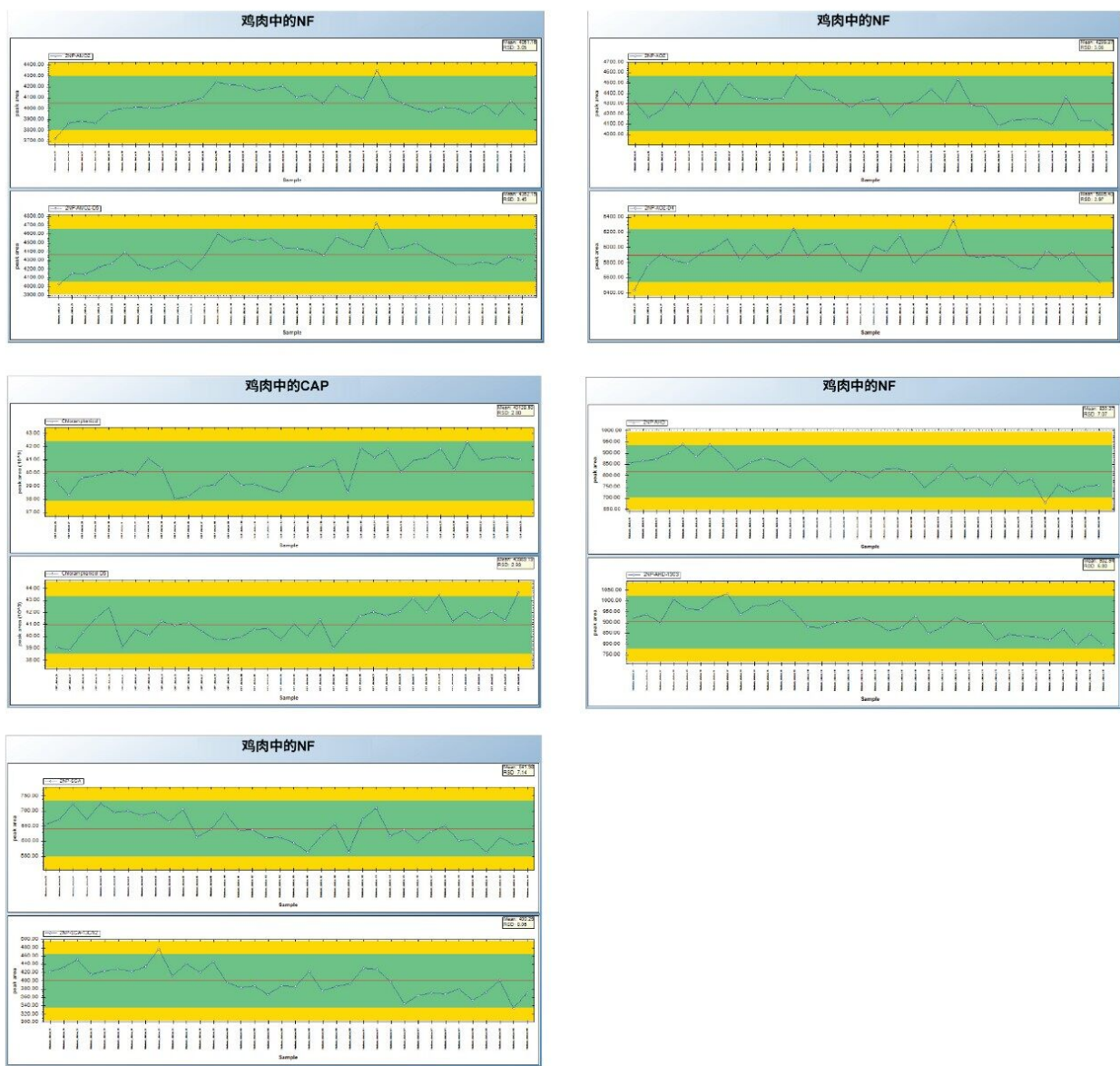


图4.鸡肉中NF (0.5 µg/kg)和CAP (0.15 µg/kg)的TrendPlot图。3个分析批次进样36次。

结论

本应用纪要证明了ACQUITY UPLC I-Class系统与Xevo TQ-S cronos联用的性能，适用于在符合欧盟法规要求所需的浓度水平下定量分析动物源性食品提取物中的禁用兽药残留。

结果表明，校准特性（线性、灵敏度）、离子丰度比标准、保留时间稳定性和日间重复性均处于2002/657方法

验证指导原则中规定的参数范围内。

这一优异的性能（无需操作员维护）可归因于Xevo TQ-S cronos的技术特点，包括倒锥形设计（保护内部样品锥免受污染）、采用正交几何结构的离子源、StepWave离轴离子聚焦技术和采用T-Wave技术的碰撞池。

参考资料

1. EU Commission Regulation (2019/1871) on Reference Points for Action for Non-Allowed Pharmacologically Active Substances Present in Food of Animal Origin and Repealing Decision 2005/34/EC (2019) L289/41-46 Official Journal of the European Union.
2. EU Commission Regulation (2017/625) on Official Controls and Other Official Activities Performed to Ensure the Application of Food and Feed Law, Rules on Animal Health and Welfare, Plant Health and Plant Protection Products (2017) L95/1-142 Official Journal of the European Union.
3. <https://www.fda.gov/media/74810/download> <<https://www.fda.gov/media/74810/download>> , Accessed on 06 April 2021.
4. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/vetdrugs/veterinary-drugs/en/> <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/vetdrugs/veterinary-drugs/en/>> , Accessed on 06 April 2021.
5. <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-vetdrugs/en/> <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-vetdrugs/en/>> , Accessed on 06 April 2021.
6. K.M. Cooper and D.G. Kennedy (2005) Nitrofurantoin Antibiotic Metabolites Detected at Parts per Million Concentrations in Retina of Pigs - A New Matrix for Enhanced Monitoring of Nitrofurantoin Abuse. *The Analyst* 130, 466–468.
7. 使用UPLC-MS/MS开发并验证一种用于定量水果、蔬菜和大米中农药残留的常规多残留分析方法。(2019)应用纪要720006637ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/multi-residue-method-for-quantitative-determination-pesticide-residues-fruits-vegetables-rice-uplc-ms-ms.html>> , 可以从waters.com获取.
8. Investigation of the Robustness of the Xevo TQ-S cronos System for the Determination of Acrylamide in Processed Potato Chips.(2019)应用纪要720006701EN <

<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/investigation-of-the-xevo-tq-s-cronos-system-robustness-for-the-determination-of-acrylamide-in-processed-potato-chips.html> , 可以从waters.com获取.

9. Best Practice for the Use Of the Xevo TQ-S cronos for Residue Analysis in Food – Example for Detection of Triphenylmethane Dyes in Seafood.(2021)应用纪要720007202EN <
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2021/best-practice-for-the-use-of-xevo-tq-s-cronos-for-residue-analysis-in-food-determination-of-triphenylmethane-dyes-in-shrimps.html>> , 可以从waters.com获取.

10. EU Commission Decision (2002/657) Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results (2002) L221/8-29 Official Journal of the European Union.

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-S cronos三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135027354>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

TrendPlot <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10148068>>

720007233ZH, 2021年4月