

用液相色谱—大气压光电离子质谱(LC-APPI-MS) 测定鱼肉中的氯霉素

应用

食品, 环境

作者

Masahiko Takino and Shigeki Daishima
Yokogawa Analytical Systems Inc
2-11-13, Nakacho, Musashino
Tokyo, 180-8453
Japan

摘要

用液相色谱—大气压光电离子质谱开发出测定鱼肉中的氯霉素抗生素的方法。为优化APPI, 考察了几种离子源参数。使用该优化参数, 得到了简单的质谱图和对应于[M-H]⁻的强信号。样品用乙酸乙酯萃取并挥发至干, 然后用乙腈和正己烷通过液液分配进行纯化。对于加入量为0.1-2 ng/g的样品, 小鲈肉和比目鱼肉中氯霉素的平均回收率分别为89.3%-102.5%和87.4%-94.8%。小鲈肉和比目鱼肉中氯霉素的检测极限(信噪比=3)分别为0.27和0.10 ng/g。

引言

氯霉素(CAP)是一种广谱抗菌素, 对各种好氧和厌氧微生物都有活性, 通过干扰或抑制蛋白质的合成而起作用。然而, 数周或数月的CAP治疗能导致人们熟知的不可逆型骨髓机能降低, 即所谓的发育不全。并进一步产生发育不良贫血症, 虽然不常见, 但一般是致命的。因为健康的考虑, 联合国粮农组织/世界卫生组织(FAO/WHO)食品添加剂联合专家委员会已经宣布, 人类食品供应中的CAP残留是不可接受的[1]。欧洲和美国已经禁止食品中使用CAP。但是, CAP的广谱性、易得和低成本使其在一些第三世界国家仍然使用。无

可否认, 只要可以得到CAP, 就有不加选择和非法使用CAP的潜在问题。事实上, 从某些地方进口的虾中已经检测出CAP, 而这些虾是准备供人类食用的。

液相色谱/质谱(LC/MS)在分析食品中的CAP方面非常有用, 这是因为质谱检测的高选择性和灵敏性[2-7]。以大气压化学电离源(APCI)和电喷雾离子源(ESI)为代表的大气压电离源(API)接口广泛地应用于LC/MS。

大气压光电离子源(APPI)是一种新的用于LC/MS的离子化技术[8, 9]。APPI源是基于一种高通量气体放电灯, 产生10和10.6eV能量的真空—紫外(VUV)光子。该1放电灯的能量通常大于被分析物的第一电离能(IP), 因为许多有机化合物的IP值范围在7-10 eV。另一方面, 大多数用作LC流动相的溶剂有较大的IP值(水, IP = 12.6eV; 甲醇, IP = 10.8 eV; 乙腈, IP = 12.2eV)。这样, 许多具有较低IP值的被分析物的离子化将不受流动相的干扰。就我们所知, APPI还没有用于食品中残留药物的分析。

本应用文摘研究了分析氯霉素时各种参数是如何影响APPI离子化效率的。此外, 还评价了采用APPI技术的LC/MS和液液萃取分析鱼肉中氯霉素的适用性。

实验部分

试剂和溶剂

CAP购自Sigma-Aldrich Japan(东京, 日本), 纯度大于99%。用甲醇配制1 mg/mL的储备液, 并于在4°C下避光贮存, 使用前稀释至所需要的浓度。醋酸铵、农药级乙酸乙酯、无水硫酸钠、乙腈、HPLC级甲醇和正



Agilent Technologies

己烷来自于Wako Chemical公司(日本大阪)。水用Milli-Q系统(Millipore, 日本东京)进行纯化处理。

0.22 μm 尼龙离心过滤器购自Toyo Soda公司(Tokyo, Japan)。

样品制备

待分析的样品(小鲱和比目鱼)购自于一个本地市场。称取5 g鱼肉和5 g无水硫酸钠置于离心管中, 并加入10 mL乙酸乙酯。用Ultra-Turrax TP 18/10 (Janke & Kunkel KG, Staufen, 德国)将混合物进行均相化处理20秒。以6000 rpm的速度离心分离5分钟, 然后, 移上清液并转移至一个圆底烧瓶中。重复2次萃取步骤, 每次都用10 mL乙酸乙酯。合并后的萃取液用旋转蒸发仪在40°C、真空条件下蒸发除去乙酸乙酯。在残留物中加入1 mL乙腈和1 mL正己烷, 并转移至具塞玻璃锥形瓶中进行振荡。然后弃去正己烷, 再加入1 mL正己烷重复上述步骤。最后, 使用加热块在50°C下, 并在干燥氮气流的作用下将乙腈相挥发至干, 重新使之溶解于5 mL含10%乙腈的10 mM醋酸铵水溶液中, 并通过0.22 μm 尼龙离心过滤器进行过滤。均相化处理步骤之后, 在样品中加入0.1-100 ng/mL的CAP, 以建立LC/APPI-MS选择离子检测器(SIM)的校准曲线。

LC/MS

分离采用Agilent 1100系列LC, 包括一个真空溶剂脱气单元、一个二元高压梯度泵、一个标准自动进样器和一个柱温箱。1100系列二极管阵列检测器(DAD)与1100MSD在线连接用于检测和确认, 参见表1。分离采用150X3 mm内径的色谱柱, 填充5 μm Zorbax Eclipse XDB C18填料(安捷伦公司, 美国加州Palo Alto)。用15分钟的线性溶剂梯度进行流动相洗脱, 用m/z 321的SIM, 500毫秒的驻留时间进行定量分析。

采用100 ng/mL的CAP样品用分析柱优化以下6个参数: 源内碎裂电压(碎裂器电压)、毛细管电压(Vcap)、干燥气流速、雾化器压力、流动相组成、流动相流速。采用校准输送系统(Calibrant Delivery System)和自动调谐(AutoTune)程序自动优化MS的离子透镜电压。对于碎裂电压的优化, 采用0.1 amu的步长和2 s一次扫描的扫描速度, 在m/z 100-400的扫描范围内采集了负离子质谱图。

表1 仪器参数

LC:	1100 系列LC
色谱柱:	Zorbax Eclipse XDB C18 (150 mm X 3 mm, 5 μm)
溶剂A:	10 mM醋酸铵水溶液
溶剂B:	甲醇
掺杂剂:	丙酮, 0.05 mL/min
梯度:	15 min内由90/10的A/B到70/30的A/B
柱温:	40 °C
进样量:	20 μL
流速:	0.5 mL/min
MS:	1100 MSD, SL
离子化:	APPI (负离子模式)
扫描范围:	m/z 100–400, 用于优化
选择离子(SIM):	m/z 321; (M-H)
干燥气:	氮气, 7 L/min at 350 °C
喷雾器气体:	氮气, 50 psi
碎裂电压:	120 V
毛细管:	3500 V
蒸发器温度:	350 °C

结果与讨论

APPI参数与优化

为了优化APPI条件, 研究了影响离子化效率的各种参数。在实验部分所述的色谱条件下以m/z 321离子作为目标离子, 使用选择离子检测模式(SIM)对干燥气流速、雾化器压力、蒸发器温度、毛细管电压和流动相组成进行了评价。结果发现: 干燥气流速和雾化器压力的变化不能显著改善CAP的灵敏度。此外, 碎裂器电压也包括在优化条件中, 这是因为它与化合物的相关性以及对质谱响应的显著影响。

毛细管电压的影响

毛细管电压施加于毛细管的入口并影响通过毛细管进样口的离子传输效率。为了建立最优化的毛细管电压, 这个参数在1000至4000V的范围内改变。如图1所示, 1500V证明为最佳值。在不用丙酮作掺杂剂的情况下, 观察到了该参数对CAP强度的巨大影响。另一方面, 当丙酮作为掺杂剂引入APPI源时, 发现3500 V时离子的强度最大。有掺杂剂时在3500V时的离子强度高于无掺杂剂情况下的最大离子强度。基于以上结果, 将毛细管电压设定为3500V, 采用丙酮掺杂剂。

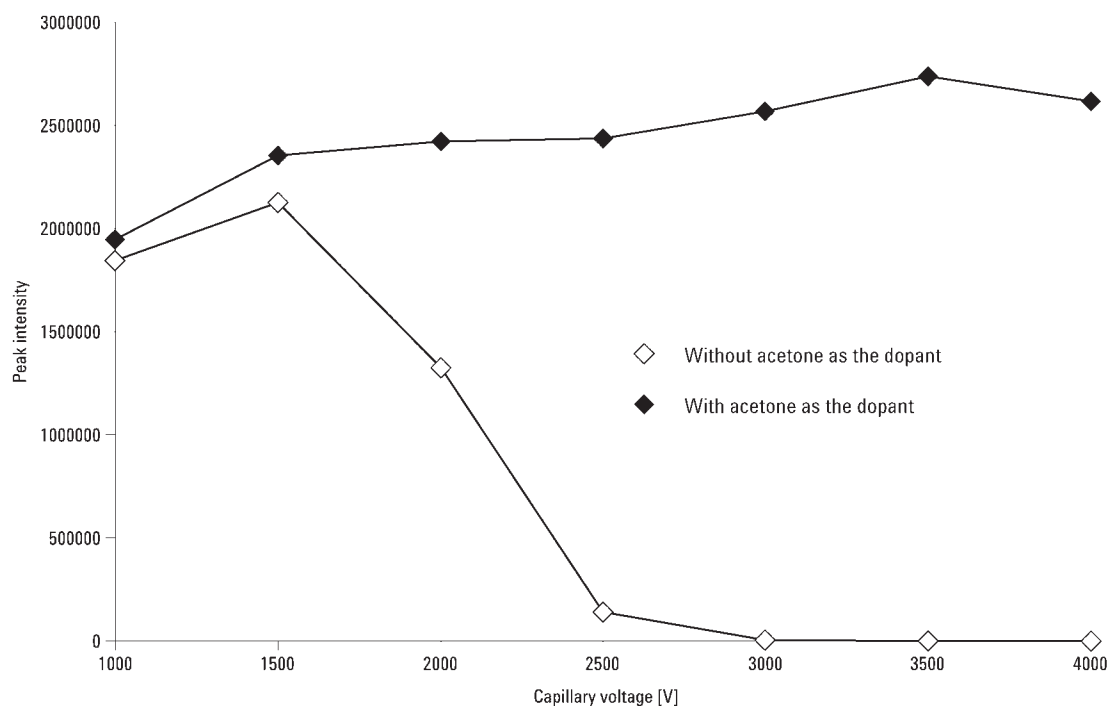


图1. 毛细管电压对于浓度为1 ng/mL的CAP的峰强度的影响。其他条件参见实验部分。

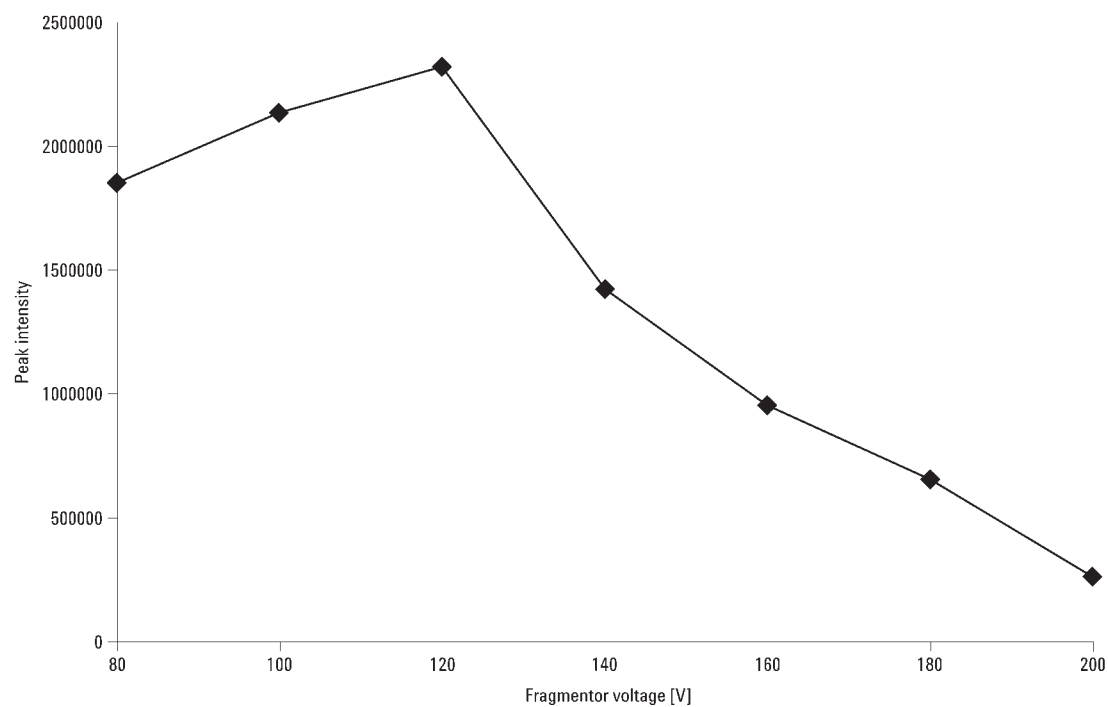


图2. 碎裂器电压对浓度为1 ng/mL的CAP峰强度的影响。其他条件参见实验部分。

蒸发器温度的影响

在APPI中，蒸发器温度对于CAP的完全蒸发起关键作用，因为APPI与APCI类似，离子化发生在蒸气态。这样，采用线性梯度洗脱时，温度必须保持足够高，才能使流动相组成的变化不影响CAP的离子强度。但是，在高温条件下，会有热降解的风险。在本研究中，蒸发器温度在250到450°C之间变化，以便优化离子强度和信噪比。观察发现，CAP最大强度和信噪比的最高温度为350 °C。当蒸发器温度超过400°C时，CAP的强度下降。此外，在400°C时，在质谱图上观察到了剧烈的碎裂。因此，400°C以上强度下降似乎是热降解所致。基于以上结果，蒸发器温度设定为350°C。

碎裂器电压的优化

碎裂器电压施加于毛细管的出口，在相对高的压力下(3托)，影响毛细管出口和锥孔之间样品离子的传输和碎裂。一般情况下，碎裂器电压越高（有助于离子的传输），碎裂发生得越剧烈。为了建立分析CAP的最优化碎裂器电压，在80到200 V之间研究了化合物的离子强度与碎裂器电压之间的关系。如图2所示，最佳碎裂器电压为120 V，当电压值较高时，CAP的离子强度明显下降。而且，在120 V时信噪比也最高。最优化和更高碎裂器电压时的CAP质谱图如图3所示。120 V时，去质子化分子(M-H)⁻为主要离子，包括同位素离子(m/z 321, Cl³⁵Cl³⁵; m/z 323, Cl³⁵Cl³⁷; m/z 325, Cl³⁷Cl³⁷)，因为CAP包含2个氯原子。较高碎裂器电压(180 V)产生与结构有关的碎片离子。m/z 152碎片离子给出最大强度，它可能通过烷基支链上碳—碳

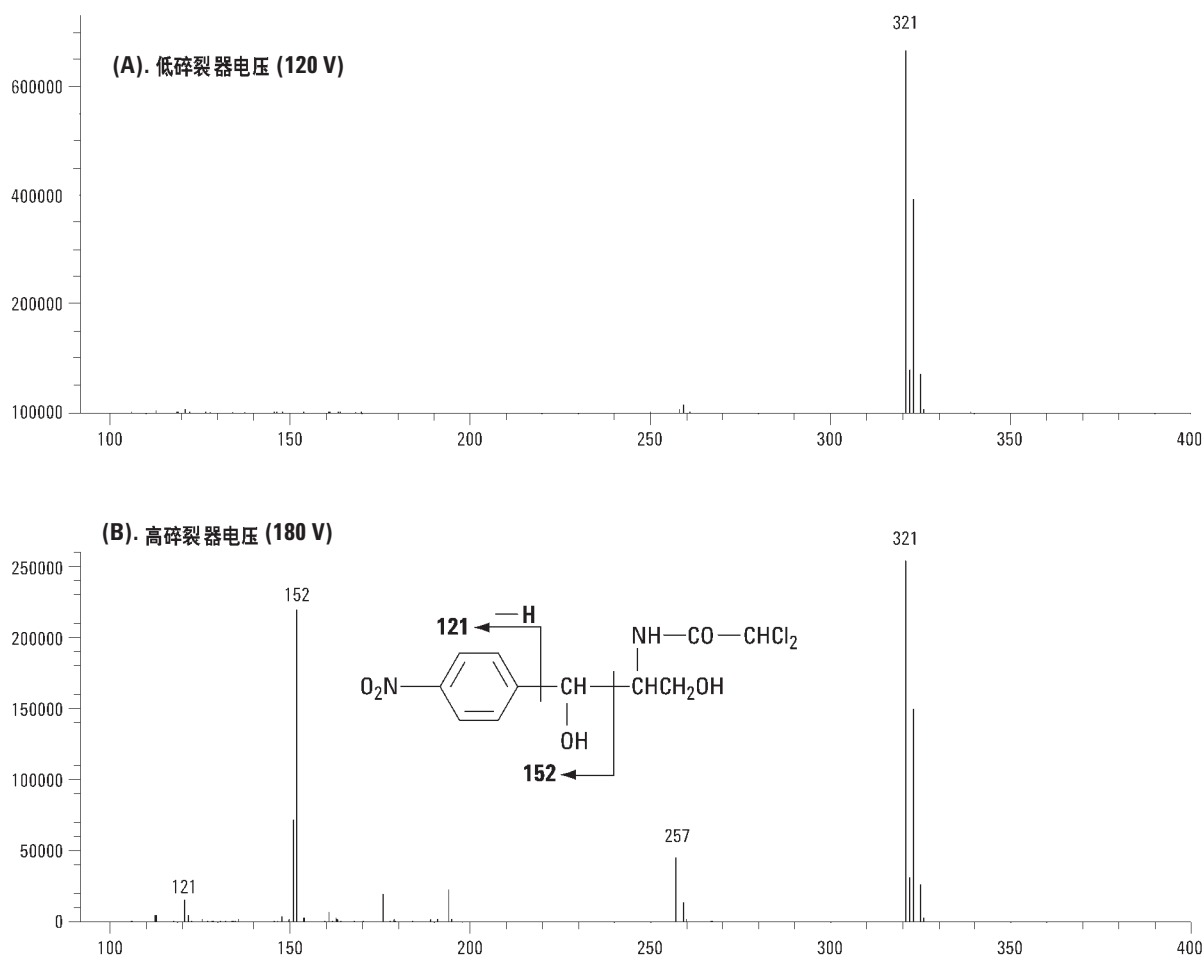


图3. 2个不同碎裂器电压值下CAP的质谱图

键的断裂而产生的,如图3所示。其他碎片离子有 m/z 121 和 257。 m/z 121可能是硝基苯基碎片。 m/z 257碎片可能是由于氢原子的电荷移动,协同失去HCl和CO而产生的。APPI源中观察到的这些碎片离子与ESI源和APCI源中的碎片离子是一致的。基于以上结果,碎裂器电压设定为120 V。

色谱条件的优化

使用乙腈、甲醇、水和醋酸铵等流动相优化了样品基体峰与CAP的分离。结果表明,甲醇和醋酸铵的组合对于分离CAP为最佳流动相。当用乙腈取代甲醇时,观察到明显的信号强度和信噪比的降低。这一结果说明,甲醇可能是从CAP中吸取氢原子的电子源。因此,本研究中采用甲醇和10 mM醋酸铵作为流动相。考虑到所使用色谱柱的尺寸,流速设定为0.5 mL/min。

LC/APPI-MS系统的线性、检测限和精确度

采用在纯溶剂中的CAP标准溶液首次测定了优化的LC/APPI-MS的分析性能特征,参见图4。为了达到最佳灵敏度,所有实验都使用对应于CAP的[M-H]⁺离子的质量在SIM模式下完成。为了测定校准曲线的线性,分析了0.1 至 100 ng/mL浓度范围的CAP。APPI的校准曲线显示良好的线性,其相关系数(r^2) = 0.9998。对于标准溶液的APPI重复性,同一天采取浓度为0.5 ng/mL的标准溶液,重复进样5次进行统计计算。检测限(LOD)采用浓度为0.1 ng/mL的样品,信噪比为3计算得到。图4显示用APPI分析CAP的SIM色谱图(该谱图的信噪比为4.2), LOD 和 RSD 分别为0.07 ng/mL 和 2.1%。

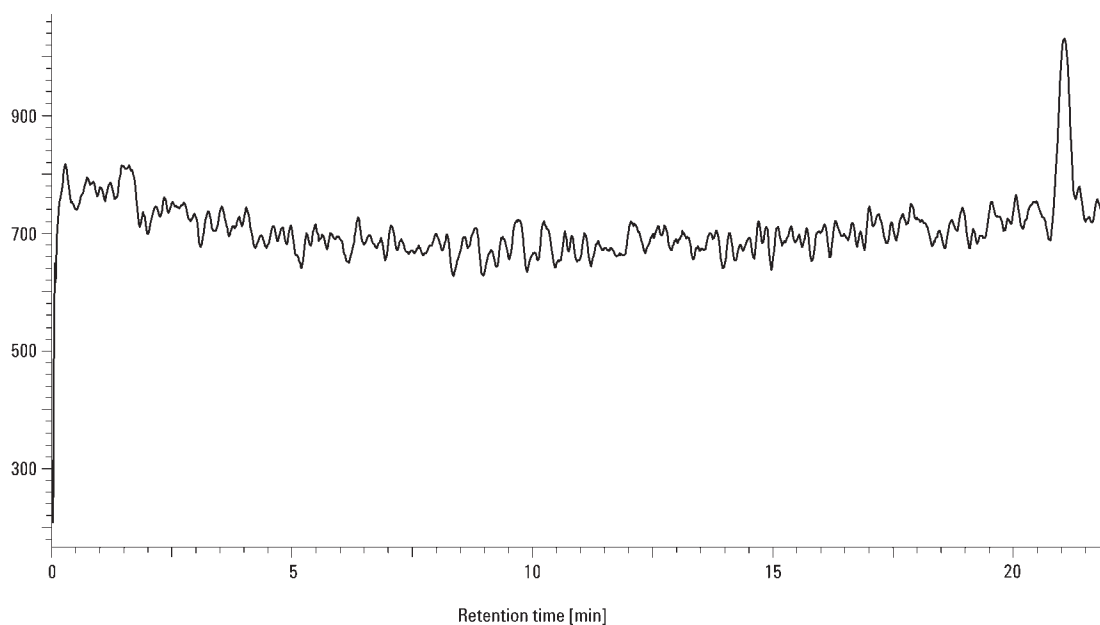


图4. 用APPI测定纯溶剂中CAP浓度为0.1 ng/mL时的SIM色谱图

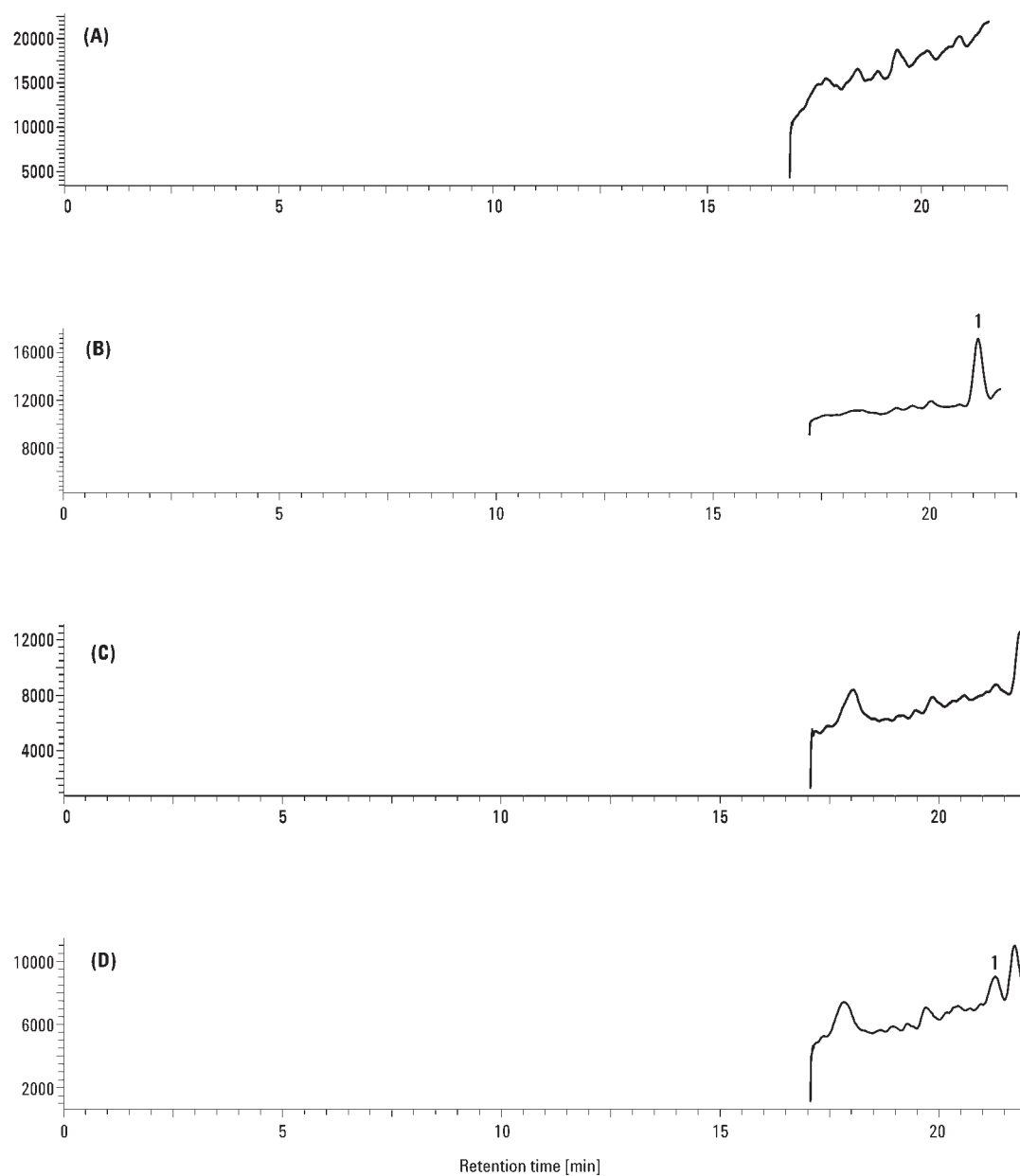


图5. 鱼肉样品的SIM色谱图, A) 小鲱肉, B) 加入1 ng/g CAP的小鲱鱼肉, C) 比目鱼肉, D) 加入1 ng/g CAP的比目鱼肉。

APPI 方法评价

表2 加入CAP的鱼肉样品的回收率

加入量 (ng/g)	回收率[$\pm$ RSD (%)]*	比目鱼
0.1	89.3 $\pm$ 5.1	87.4 $\pm$ 6.1
0.5	102.5 $\pm$ 4.9	94.8 $\pm$ 6.7
2.0	96.1 $\pm$ 4.3	91.8 $\pm$ 4.9

* 分析了相同量的3个加入CAP的样品。

为了评价回收率,在本来不含CAP的小鲱和比目鱼肉样品中加入CAP,采用本文方法进行分析。2种不同的鱼共18个样品,每一种鱼都加入CAP,每一个样品被加入3个不同浓度的CAP,加入CAP的浓度变化范围为0.1 至 2 ng/g。加入浓度分别为1 ng/g和0.1 ng/g的鱼肉萃取物的典型色谱图见图5。

表2 列出了18个加入CAP的样品得到的回收率和RSD。平均回收率变化范围为87.4% 到102.5%, RSD为4.3%到6.7%。采用信噪比为3,浓度为1 ng/g 和 0.1 ng/g加入CAP的样品的SIM色谱图来测定鱼肉中CAP的检测限,结果如表3显示。日内精密度(重复性)通过在同一天工作日内对加入CAP浓度为0.1 ng/g的同一鱼肉萃取物进行5次分析来评价。日间精密度(重现性)通过在5个工作日分析相同样品来评价。分析鱼肉中CAP的重复性和重现性分别为4.8%, 9.4%和2.1%, 7.3%。这些结果说明, LC/APPI-MS方法适合于分析鱼肉中的残留CAP。

表3 使用APPI分析标准溶液中CAP的检测限、重复性和重现性

鱼肉	检测限(LOD)* (ng/g)	重复性** (RSD, %)	重现性*** (RSD, %)
小鲱	0.27	4.8	9.4
比目鱼	0.10	2.1	7.3

* 检测限LOD定义为浓度为0.1 ng/mL的样品在信噪比=3时对应的浓度值。

** 重复性是基于一天之内对浓度为0.5 ng/mL的样品进行5次重复分析进行计算。

*** 重现性是采用加入CAP浓度为0.1 ng/mL的鱼肉样品,根据5天内每天分析一次得到的结果进行计算。

结论

因为具有高灵敏度和选择性, APPI是一种理想的测定鱼肉中CAP残留的离子化技术。使用APPI测定鱼肉中CAP残留量的一个重要优势在于样品基体不明显影响CAP的离子强度。本研究所得数据证明,这一方法可方便地用于鱼肉中痕量CAP残留的常规分析,对于不同的样品,可得到很好的回收率和精密度。

参考文献

1. A. H. Allen *J. AOAC Int.* 1985, **68**, 990.
2. T. L. Li; Y.J. Chung-Wang; Y. C. Shih *J. Food Science* 2001, **67**, 21.
3. B. Roudaut *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 1994, **19**, 1097.
4. C. N. Kenyon; A. Melera; F. Mrmi *J. Anal. Toxicol.* 1981, **5**, 216.
5. V. Hormazabal; M. Yndestad *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 2001, **24**, 2477.
6. K. Richard; V. Kruff; H. Sommer *LaborParaxis* 2000, **24**, 91.
7. D. G. Kennedy; R. J. McCracken; A. Cannavan; S. A. Hewitt *J. Chromatogr. A.* 1998, **812**, 77.
8. D. B. Robb; T. R. Covey; A. P. Bruins *Anal. Chem.* 2000, **72**, 3653.
9. J. A. Syage; M. D. Evans; K. A. Hanold *Amer. Lab.* 2000, **32**, 24.

安捷伦科技公司生命科学与化学分析部用户服务中心免费热线:
800-820-3278

如需了解我们产品和服务的详细信息请访问我们的网站

<http://www.agilent.com/chem>.

安捷伦将在此材料包含的错误或与本材料的供应、性能或使用相关的损失不承担责任。

本出版物的信息、说明和规格如果变更，恕不另行通知。

安捷伦科技公司©, 2003

2003年4月9日

出版号5988-8999CHCN