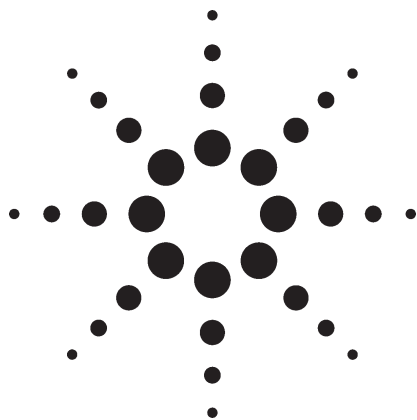




液相色谱 / 大气压化学电离 — 质谱法 检测猪肉中的磺胺药物 应用报告

食品分析

作者

Ralph Hindle
Access Analytical Labs
#3, 2616 - 16 Street N.E.
Calgary, AB. T2E 7J8
Canada

Agilent contact:
Chin-Kai Meng
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

本应用报告报道了一种分析猪肉中磺胺类抗菌素的简便方法。样品用酸化甲醇提取、离心，一部分提取液用水稀释。这部分稀释液用大气压化学电离质谱直接进行分析，所有化合物不到5分钟出峰。使用内标，七种磺胺药物加入量为 50 ppb (ng/g) 时回收率在 84% 到 118%。检测限为 10-25 ppb。与使用固相萃取净化进行了比较，对用质量选择检测器的监测（最大选择性）和确证（更多碎片）设置也进行了比较。安捷伦四级质量选择检测器的高灵敏度使这种稀释净化技术能够实现高通量分析。

引言

肉类、可食用内脏、动物饲料、动物垃圾等都可能含有抗菌素、生长激素和其它能进入食品中的化学物质。加入这些化合物是为了保证动物健康、加快动物生长速度，以及缓解动物焦虑状态。人类可能食用污染的肉类，或接触肥料中的流失物。保健专家警告说，这可能降低青霉素、磺胺等抗菌素治疗疾病的有效性，因为低剂量接触可能使病菌对抗生素产生耐药性。

磺胺类药物是既能用于人也能用于动物的广谱抗菌素。在加拿大磺胺药物的最大残留限量(MRL)是肉类100 ppb (ng/g)、牛奶 10 ppb，而在欧盟这两种基质的 MRL 都是 100 ppb。加拿大食品监察署测定肉类组织中磺胺药物的方法是，用乙酸乙酯萃取，加甘氨酸缓冲液分层，然后用调过 pH 的二氯甲烷反萃取。提取物蒸发后，复溶，然后用薄层色谱(TLC)分离，衍生化，光密度法定量。Alberta 农业部用液相色谱 / 质谱(LC/MS)和大气压化学电离(APCI)方式分析磺胺药物，其定性和定量结果都有了很大提高。Alberta 方法中有许多提取步骤，如果有一种更快速的方法将大大有利于监测食品中残留物的实验室。



Agilent Technologies

本方法的目的是用简单的样品制备,在10分钟左右,对规范限量一半或更低浓度的磺胺药物进行可靠定量。通常尽可能多地形成母离子 $[M+H]^+$,减少其它碎片离子,可以获得最高灵敏度。由于三级四极仪器操作复杂,因此,希望在单级四极质谱上确证阳性结果。使用碰撞诱导解离(CID),增强这些化合物特征碎片离子,可以实现这一目的。

实验

化学试剂和方法

磺胺药物标准品均购自加拿大Sigma Aldrich,最低纯度为99%。除磺胺嘧啶和磺胺喹啉钠盐以外,均配置成2 mg/mL的丙酮储备溶液。加入3 mL 0.2N NaOH以使这些化合物完全溶解。添加和定量用的不同浓度标准溶液用去离子水稀释。

内标(IS): 2 mg/mL的磺胺氯吡酮(SCPD)去离子水溶液。

HPLC级甲醇和丙酮购自Caledon Labs (Georgetown, Ontario)。

甲酸(98%)购自EM Science。

酸化甲醇按100 mL甲醇中加入100 μ L 98%甲酸的方法制备。

带8 mm直径搅拌头的Ultra-Turrax T8高速搅拌器、50 mL聚丙烯离心管、13 mm氟化聚二乙烯(PVDF)针式过滤头(0.2 μ m)购自VWR Scientific。

Oasis HLB (3 cc, 60 mg)固相萃取柱购自Waters公司。

样品制备

1. 在50 mL聚丙烯离心管中直接称量3 g猪肉样品。
2. 样品中加入10 mL酸化甲醇,用Ultra-Turrax搅拌器混匀3分钟。
3. 然后将样品离心10分钟,并将上清液转入干净的试管中。
4. 样品再用10 mL酸化甲醇提取,并再次离心。
5. 合并上清液,并在合并提取物中加入1 mL内标。
6. 提取液用去离子水按1:4稀释(250 μ L提取物 + 750 μ L水),经0.2 μ m PVDF过滤头滤至自动进样器样品瓶中,直接用LC/MS分析。

由于在合并提取液中加入了已知准确量的内标,所以不再需要测量提取液的最终体积。化学工作站内标算法将算出分析物和内标的相对量。从而校正了任何浓缩或稀释过程对样品的影响。

为了与只稀释的提取液相比,样品提取液还经过了SPE净化小柱。60 mg Oasis HLB小柱先用1.5 mL酸化甲醇预处理,再用1.5 mL去离子水清洗。1 mL提取液用去离子水稀释至10 mL,并注入小柱,弃去流出液。然后用1.5 mL酸化甲醇将磺胺药物洗脱下来。洗脱液用氮气吹干。样品用1 mL 25%甲醇水复溶,过滤,用LC/MS进行分析。

为了进一步比较,将1 mL未经SPE净化的甲醇提取液蒸发近干,再用1 mL 25%甲醇水溶液重新溶解,这样做不仅能确保对提取液进行HPLC分析时有合适的溶剂组成,而且由于没有稀释步骤,不会对检出限产生负面影响。

LC/MS 条件

LC/MS 系统由安捷伦科技公司的 1100 系列溶剂脱气机、二元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、四极质量选择检测器(MSD)组成。

化合物鉴定和确证

通常，监测方法的目的是将目标分析物从可能的干扰中分离出来，并在仪器上获得最高的灵敏度。使用质谱法(MS)，最高灵敏度可以通过产生单离子获得，例如，

LC 电喷雾电离或 APCI 目标离子模式中的质子化母离子 $[M+H]^+$ 。但是，一旦检测到阳性结果，就必须进行确证，可疑的峰到底是真正的目标分析物，还是能产生同样离子的共流出化合物。有多种确证方式可以采用：用不同的溶剂系统再次提取样品；进一步净化样品使最终浓度更高，以便能检测到其它的确证离子，或用全扫描模式进行分析；衍生化，并用气相色谱 / 质谱法(GC/MS)进行分析；或用三级四极 LC/MS/MS 对提取物进行再分析。所有这些技术都是有效的，但缺点是需额外的时间和经费，特别是 LC/MS/MS。

表 1. LC/MSD 条件

HPLC

色谱柱	Zorbax Eclipse XDB-C8, 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m (P/N 993967-906)
溶剂 A:	0.1% 甲酸水溶液
溶剂 B:	含 0.1% 甲酸的乙腈
梯度:	$t_0 = 20\% \text{ B}$ $t_1 = 20\% \text{ B}$ $t_2 = 90\% \text{ B}$ $t_{6.5} = 90\% \text{ B}$ Post time = 1.5 min
流量:	1.0 mL/min
进样体积:	50 μ L
柱温:	30 $^{\circ}\text{C}$

MSD

离子源:	APCI (正离子模式)
离子驻留时间:	8 个离子, 每个离子 63 ms
解离电压:	70 V
干燥气体:	6.0 L/min
喷雾器压力:	60 psi
干燥气体温度:	350 $^{\circ}\text{C}$
喷雾器温度:	400 $^{\circ}\text{C}$
毛细管电压:	3000 V
电晕电流:	4 μ A

Agilent 1100 MSD 具有在同一次运行中最多采集 4 种不同 MS 信号的功能, 每个信号既可以是选择离子, 也可以是全扫描图谱。例如, 信号 1, 为了最大限度地提高母离子响应, 使用了低解离电压, 这样可以得到列表中每个目标化合物的 $[M+H]^+$ 离子, 而信号 2, 解离电压较高可以获取确证碎片离子。对于浓度较高的分析物, 信号 1 可以用 SIM 模式采集进行定量, 而信号 2 可以设置为扫描模式进行鉴定。图 1 是上述描述的一个例子, 信号 1 解离电压设置为 70 V (MSD1), 信号 2 为 200 V (MSD2)。

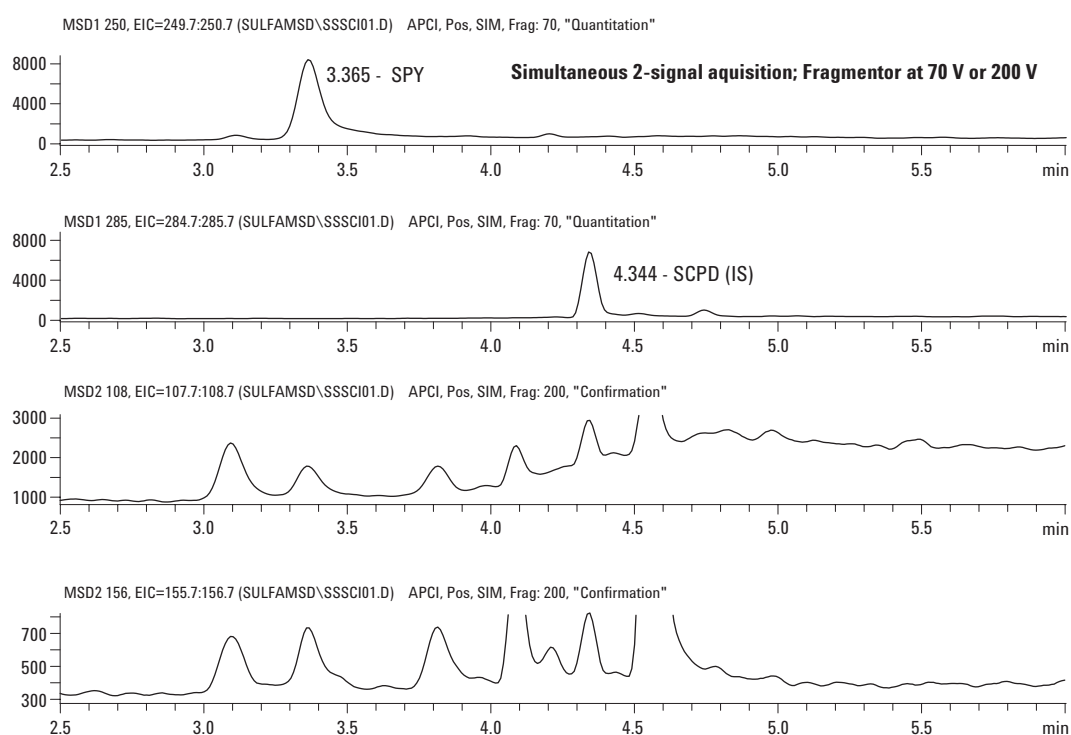


图 1. 双通道 MSD 采集信号 (质量数 108 和 156 都是磺胺药物的特征碎片)。

表2显示了磺胺药物在各种解离电压下的质谱图。质量数 108 和 156 是磺胺药物的特征碎片（分别为 $\text{H}_2\text{N}^+=[\text{C}_6\text{H}_4]=\text{O}$ 和 $\text{H}_2\text{N}^+=[\text{C}_6\text{H}_4]=\text{SO}_2$ ），因此当与质子化的母离子一起采集时，是非常有用的确认离子。

表 2. 磺胺药物的 APCI 图谱，使用各种不同的解离电压

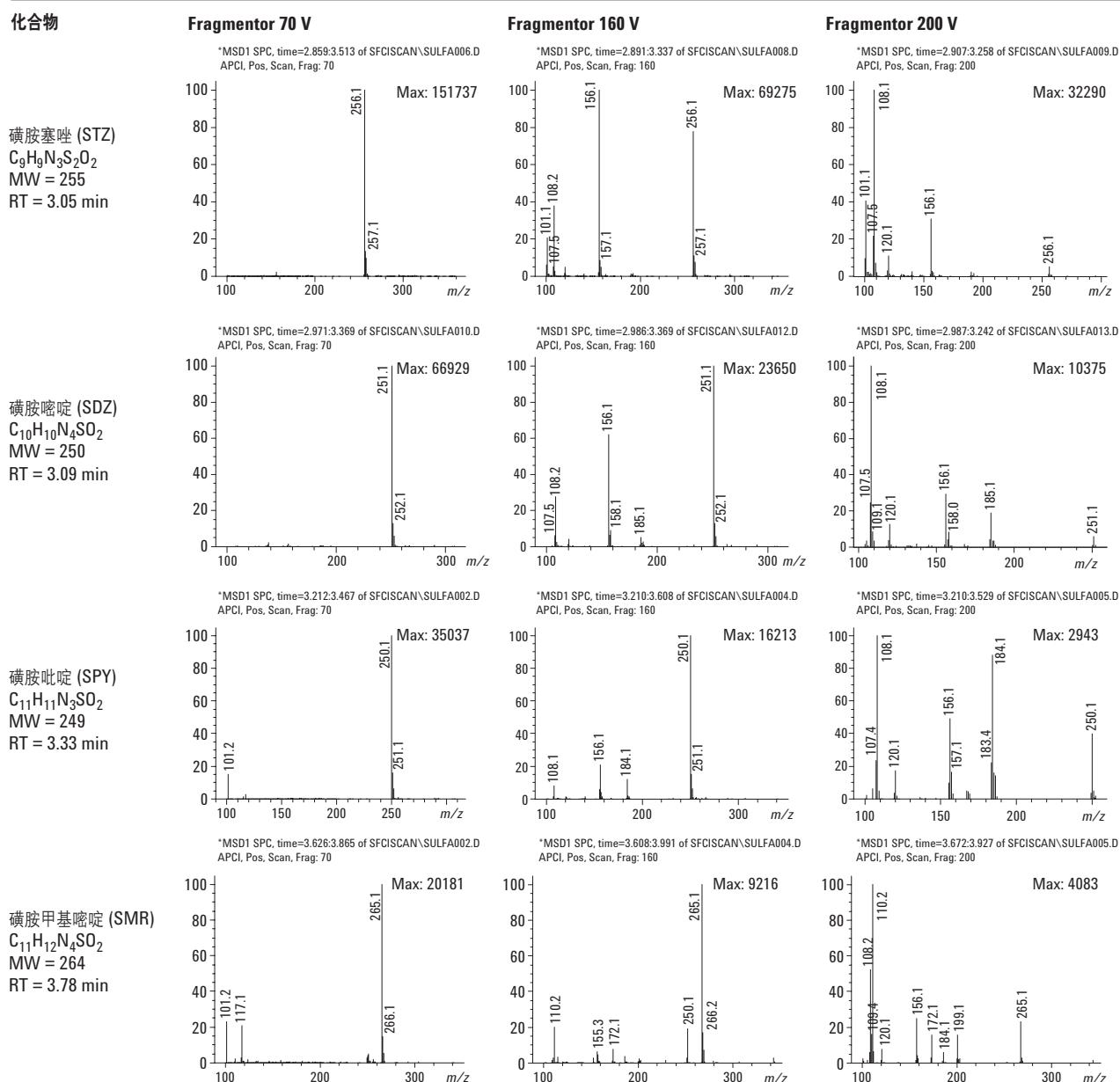
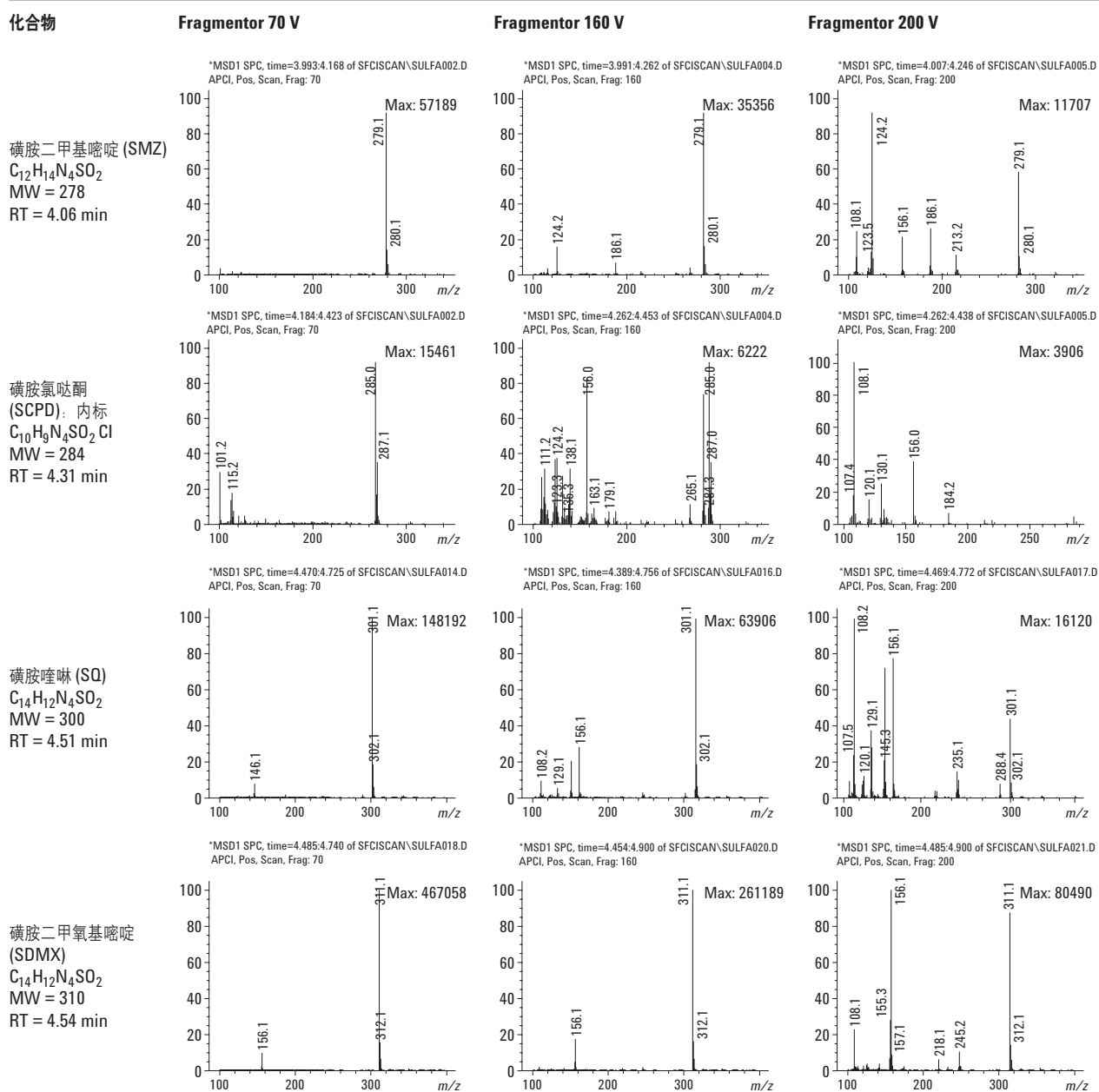


表 2. 磺胺药物的 APCI 图谱, 使用各种不同的解离电压 (续)



色谱

用质谱检测时目标化合物不一定要完全分离，但共有离子存在时必须完全分离。例如，SPY的质子化分子离子是 250 质量单位。由于天然存在 C^{13} 同位素，251 离子将与母离子 250 共存。因此，在优化色谱条件时将 SPY 与 SDZ (m/z 251) 分开很重要，如图 2 所示。虽然色谱分离时间略长一些，但却非常必要，数据分析时峰积分可以更一致；色谱图更容易解释；同时 SDZ 的含量不会由于其与 SPY 共流出而被低估。

一篇最近发表的应用文章报道，使用 2 位 10 通阀，两个分析柱并联，再加一台二元泵，四种磺胺药物的分析时间为 1.1 分钟。由于大多数实验室没有这么高的样品通量需求，本应用报告介绍的方法是用更常规的技术开发的，不需要在硬件上再增加花费。按所设置的条件可以在较短的 6 分钟内达到良好的色谱分离（总循环时间为 10 分钟）。

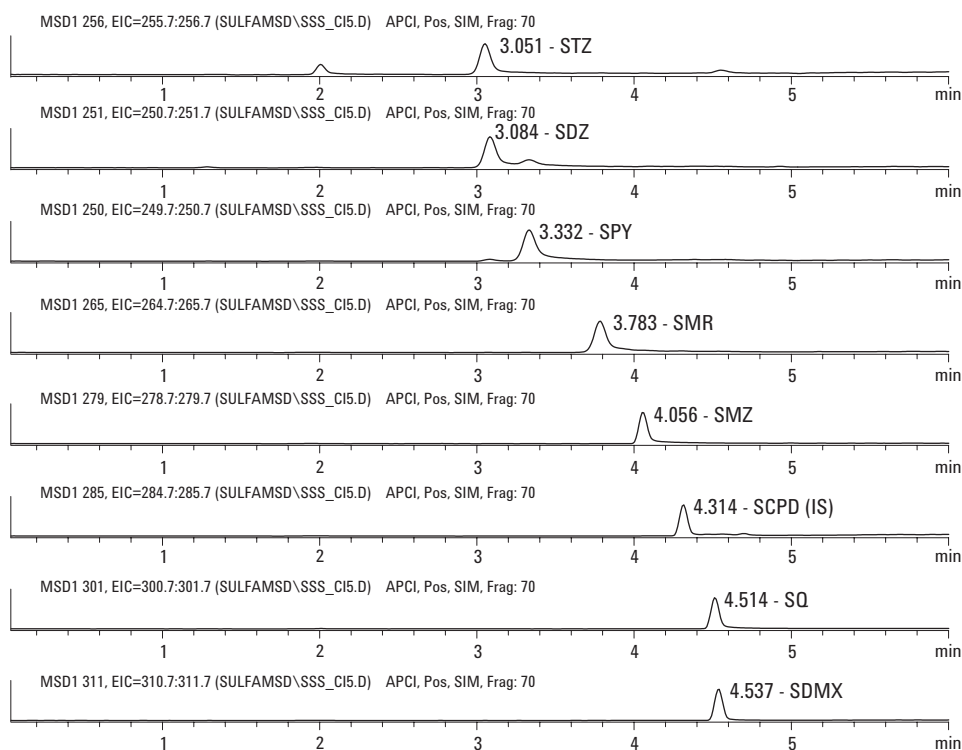


图 2. 磺胺药物标准混合物，各 500 pg (SIM)

样品净化

图 3 的总离子流图(TIC)显示样品有相当强的基质本底。此时可以进行简单的溶剂替换, 1 mL 提取物用氮气吹干后, 再用 25% 甲醇水复溶。仅进行溶剂替换的一个问题是进入到HPLC柱中的基质的量。峰形可能因重叠而受影响, 最终还将使柱效下降。所有这些基质物质还将进入 MSD。需要对 MSD 进行频繁清洗和维护, 从而降低了工作效率。

要开发高通量的方法, 就应当把需要的步骤减到最少。安捷伦液相色谱/ 质量选择检测器(LC/MSD)有足够的灵敏度, 允许将提取物用水进行简单稀释, 以此替代净化技术。从而节省了购买 SPE 小柱的费用, 以及进一步制备样品的分析时间。最少的样品处理还可以提高回收率, 因为前处理的每一步都可能损失目标化合物。

图 3 中第三张色谱图显示了 SPE 净化技术可以去除大部分共提取物, 使最终提取液进一步浓缩, 从而得到更低的 DL。这也使色谱图的积分和解释更简单。

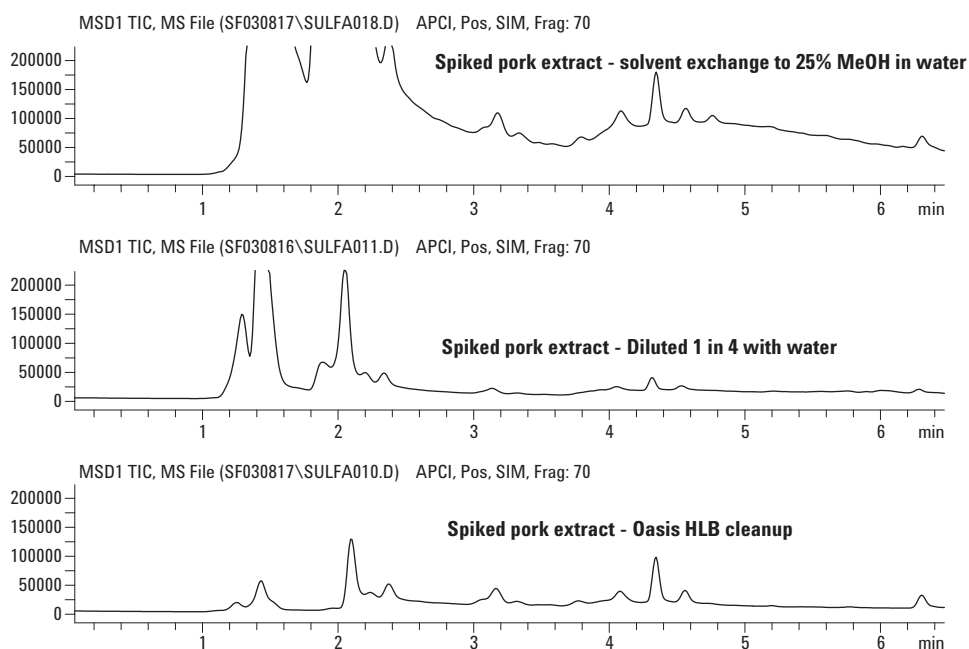


图 3. 用各种净化技术所得 TIC 的比较

但是,分析方法的目的是监测大量样品,以发现其是否超出了MRL规定,此时简单的稀释技术更能被接受。稀释能够为良好的色谱分离提供足够的净化,而稀释后的浓度又能够符合DL的要求。图3中第二张色谱图表明基线已得到了明显改善。图4到6显示了所有目标离子按SIM模式进行的同样分析。

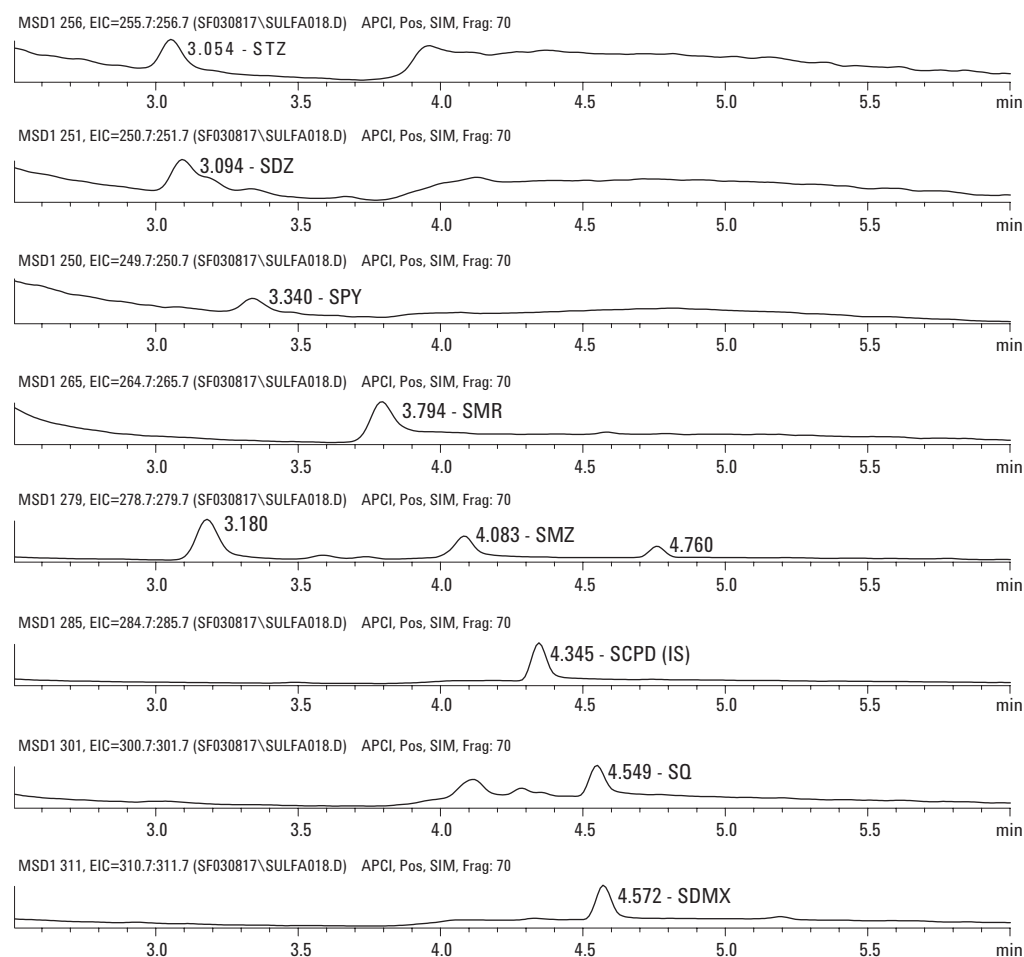


图 4. 只有溶剂替代(SIM)

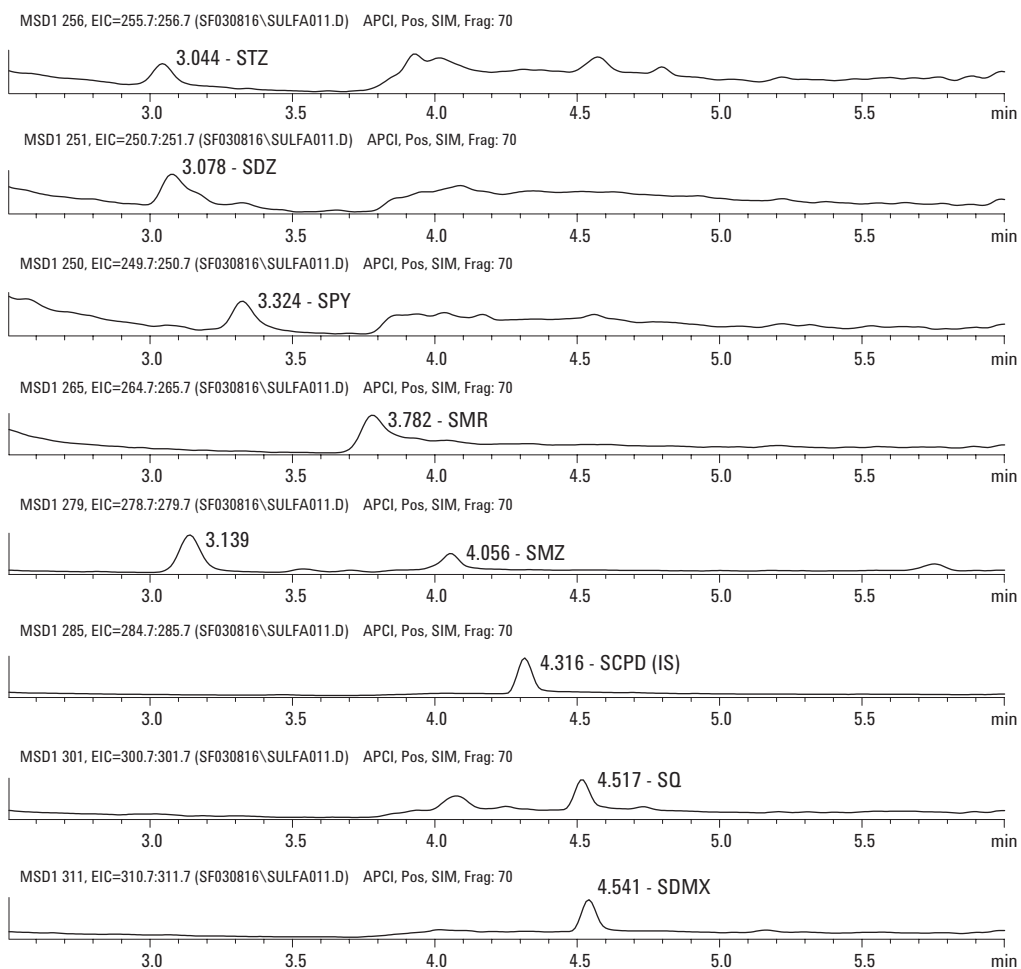


图5. 按 1:4 用水稀释

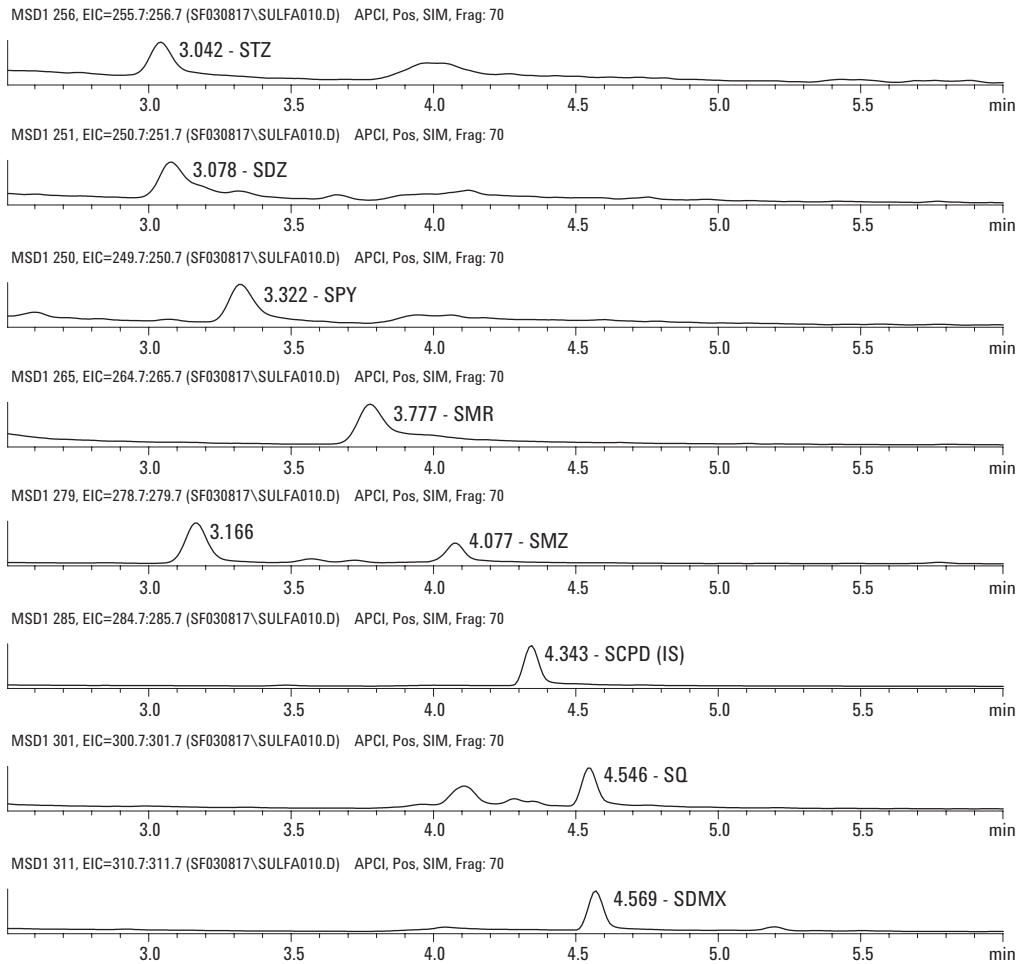


图 6. 用 HLB 净化后(SIM)

结果和讨论

7 个样品分别添加 50 ppb 混标后 (3 g 样品中每种磺胺药物各 150 ng) 其回收率见下表。添加在搅拌前进行, 并在提取前至少放置 30 分钟。在搅拌前分别各加入 300 ng 的 SMR (磺胺甲基嘧啶), 作为代用品。只用水简单稀释 4 倍后所得的结果见表 3 (回收率 84%-118%), 提取物经过 SPE 净化后所得的结果见表 4 (回收率 79%-104%)。

在这两种情况下, 都用 SCPD 作为内标, 进行 5 点校正, 每个目标化合物的进样量从 20 到 200 pg, 再加上 2000 pg 的 SCPD。五个标准都分别在 7 种标准加入溶液分析前后进样, 用两套标准的平均响应值绘制曲线。因为这些化合物有明显的拖尾, 峰高比峰面积波动小, 所以用峰高测定响应值。线性结果(R^2)列于表 3 和表 4。

表 3. 磺胺药物提取液按 1:4 用水稀释后测得的回收率

类别	回收量(ng)							
	STZ	SDZ	SPY	SMR	SMZ	SCPD(IS)	SQ	SDMX
猪肉添加 1	167	172	164	317	151	2,000	148	130
猪肉添加 2	168	197	68	343	164	2,000	169	137
猪肉添加 3	160	183	158	315	157	2,000	133	121
猪肉添加 4	158	189	167	336	156	2,000	138	129
猪肉添加 5	151	169	154	295	169	2,000	133	129
猪肉添加 6	147	161	144	322	143	2,000	120	112
猪肉添加 7	144	72	141	272	151	2,000	124	125
添加量(ng)	150	150	150	300	150	2,000	150	150
平均值	156	178	157	314	156	2,000	138	126
SD (精密度)	9	13	11	24	9	—	17	8
MDL (SD × t-stat) ng	29	40	34	77	28	—	53	26
LOQ (SD × 10) ng	94	126	108	245	88	—	167	82
RSD (SD × 100/Mean)	6	7	7	8	6	—	12	7
准确度(%)	104	118	104	105	104	100	92	84
线性(R ²)	0.9997	0.9996	0.9997	0.9972	0.9996	1.0000	0.9984	0.9992
t-stat (N=7)	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14

表 4. 磺胺药物用 Oasis HLB 净化小柱处理后的回收率

类别	回收量(ng)							
	STZ	SDZ	SPY	SMR	SMZ	SCPD(IS)	SQ	SDMX
猪肉添加 1	161	157	132	273	149	2,000	139	126
猪肉添加 2	154	156	132	293	157	2,000	153	131
猪肉添加 3	149	158	124	267	155	2,000	132	113
猪肉添加 4	145	152	122	279	144	2,000	119	111
猪肉添加 5	151	162	127	294	149	2,000	127	121
猪肉添加 6	136	147	127	274	136	2,000	116	108
猪肉添加 7	148	161	128	275	155	2,000	124	116
添加量(ng)	150	150	150	300	150	2,000	150	150
平均值	149	156	127	279	149	2,000	130	118
SD (精密度)	8	5	4	10	7	—	13	8
MDL (SD × t-stat) ng	24	17	11	33	23	—	40	26
LOQ (SD × 10) ng	76	53	36	104	73	—	128	82
RSD (SD × 100/Mean)	5	3	3	4	5	—	10	7
准确度(%)	99	104	85	93	100	100	87	79
线性(R ²)	0.9994	0.9994	0.9997	0.9979	0.9998	1.0000	0.9989	0.9989
t-stat (N=7)	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14

表 5 比较了用水稀释和用 Oasis HLB 小柱净化后的回收率结果。一般来说,早流出的化合物回收率有较大区别,但有一个例外。因为加载到小柱上的样品大部分是水相(10% 甲醇水),水溶性基质成分将通过小柱作为废液丢弃。由于这些先流出的化合物在HPLC进样前已被除去,所以色谱图更干净,重复性也更好,回收率的标准偏差更小。用 HLB 净化的结果显示了更小的标准偏差和更低的检测水平(MDL)。

结论

本文介绍了一种快速而灵敏的单级四极 LC/APCI/MS 方法,并已确证能够检测猪肉中残留的磺胺药物。对组织提取液简单稀释后分析的DL范围在10到25 ng/g之间,使用SPE净化后,在4到13 ng/g之间。用常规柱和大部分实验室具备的条件,在设定的仪器条件下分析循环时间为10分钟。

参考文献

1. TLC-Densitometric Procedure for Sulfonamide Residues in Animal Tissue, SUL-SP08, Canadian Food Inspection Agency, Saskatoon, Saskatchewan, Canada; 2001/04.
2. Sulfonamides in Tissue by LC/MS, Alberta Agriculture, Edmonton, Alberta, Canada, Standard Operating Procedure TX-0278-01.
3. Mark Stahl, "High-throughput analysis with the Agilent 1100 Series high-throughput LC/MS system", Agilent Technologies, publication 5988-9638EN. www.agilent.com/chem

了解更多信息

要进一步了解我们产品和服务的信息,请访问我们的网站 www.agilent.com/chem。

表 5. 稀释法和 Oasis HLB 净化法所得回收率的比较

类别	STZ	SDZ	SPY	SMR	SMZ	SCPD(IS)	SQ	SDMX
准确度 % (1:4 稀释)	104	118	104	105	104	100	92	84
SD (精密度)	9.4	12.6	10.8	24.5	8.8	—	16.7	8.2
MDL (ng)	29	40	34	77	28	—	53	26
准确度 % (HLB 净化)	99	104	85	93	100	100	87	79
SD (精密度)	7.6	5.3	3.6	10.4	7.3	—	12.8	8.2
MDL (ng)	24	17	11	33	23	—	40	26

安捷伦对本文中存在的错误，以及因使用本材料造成的任何损失和后果不承担法律责任。

本文中的信息、说明及规格如有更改恕不另行通告。

© 安捷伦科技公司，2003

中国印刷
2003 年 10 月 20 日
5989-0182CHCN



Agilent Technologies