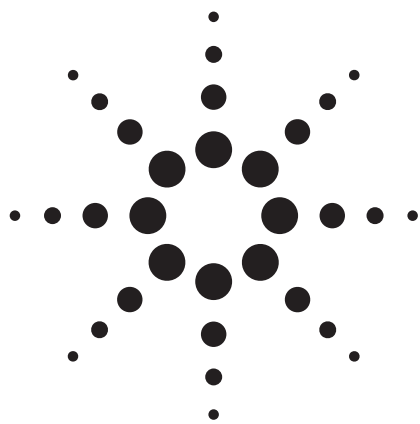




将现有分析肉类中抗生素的方法转换和优化为使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱的 MS/MS 检测分析方法

应用报告

食品

作者

William J. Long, Anne E.
Mack, James R. Evans
安捷伦科技公司
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19809
美国

摘要

本实验评估了检测肉类中抗生素的常规紫外快速梯度分析方法优化中的流动相选择，最终开发出与质谱兼容的方法。评估内容包括 4 种缓冲液和 2 种有机溶剂的选择。实验将可获得最佳分离效果的流动相组合转移到 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 mm × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱上，并进行进一步优化。梯度洗脱时间从 45 min 缩短到 12 min。如果使用 3 mm × 50 mm 色谱柱，此时间还可进一步缩短，但要牺牲一定的分离度。该方法在配备了 Agilent 1200 系列快速分离高分辨率液相色谱的 Agilent 6410 三重四极杆 LC/MS 系统上进行了验证。



Agilent Technologies

表 1. 分别采用不同规格色谱柱的方法参数

	4.6 × 50 mm Poroshell 120 EC-C18	3.0 × 50 mm Poroshell 120 EC-C18	2.1 × 100 mm Poroshell 120 EC-C18
流动相	A: 缓冲液, 多种 B: 有机相, 多种	A: 10 mM 甲酸铵 pH 3.8 B: 乙腈	A: 10 mM 甲酸铵 pH 3.8 B: 乙腈
梯度程序	10-40% B	10-40% B	10-40% B
梯度时间	12 min	12 min	12 min
流速	2 mL/min	0.85 mL/min	0.42 mL/min
进样体积	0.5 µL	5 µL	2.5 µL 或 10 µL
样品	0.1 mg/mL 抗生素	1 µg/mL 抗生素	1 µg/mL 或 10 ng/mL 抗生素
柱温	30 °C	30 °C	30 °C
检测器	DAD: Sig = 270, 4 nm; Ref = 360, 100 nm	MS/MS: 见表 2	MS/MS: 见表 2

前言

抗生素在鸡、猪、牛和鱼类的养殖中是经常使用到的。许多家畜的饲料中都添加了多种抗生素以防控因真菌和细菌感染导致的疾病。很多国家都规定了此类化合物在农畜产品中的残留限量标准。在本文中, 使用全新的表面多孔填料色谱柱替代旧方法中的 5 µm, 250 mm 色谱柱以提高分析速度, 同时采用 MS/MS 检测器代替了 UV 检测器。在分析通量增加了 5 到 10 倍的同时对样品制备条件基本没有影响。由于分析时间大为缩短, 就可以把更多的时间用于流动相的优化选择 (pH 值、缓冲溶液种类和有机改性剂)。

方法转换可以通过修改现有方法或建立一个新方法来实现。本文的目标是在现有的使用 UV 进行检测分离的基础上开发出一种新型的与 MS 检测兼容的分离方法。因而, 流动相必须改变, 这是由于对于 MS 检测器来说, 0.7 % 磷酸溶液显然不是一个合适的溶剂。常规是使用 0.1 % 甲酸溶液进行筛选考察, 但是同时也使用其它的 MS 兼容溶剂系统进行了评估。本文首先是通过使用 Agilent Poroshell 120 短色谱柱并结合 UV 检测器进行不同的流动相组合筛选, 然后将相应方法转移到 Agilent 6410 三重四极杆 LC/MS 系统上。使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱的一个主要优点是该柱使用了与原 5 µm 填料色谱柱相同的 2 µm 筛板, 从而无需再对样品制备方法进行开发。

Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 mm × 50 mm, 2.7 µm 色谱柱拥有与 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 1.8 µm 全多孔填料色谱柱相似的性能, 但由于它们使用了与那些 5 µm 填料色谱柱中同样的 2 µm 筛板, 这就不再需要另外进行样品制备优化, 这就意味着能更加方便的进行方法的转移。使用 Agilent Poroshell 120 色谱柱的一些前期工作是在旧的 Agilent 1100 系统上完成的, 但同样它们也能更理想地在更为先进的 Agilent 1200 或 1260 系列超高压液相色谱系统上运行。

表 2. 抗生素类化合物的 MRM Transitions

化合物名称	母离子	子离子	碎裂电压	碰撞能量
磺胺甲噁唑	265	172	100	25
磺胺甲噁唑	265	108	100	25
甲氧苄啶	338	308	140	10
甲氧苄啶	338	118	140	50
磺胺二甲噁唑	279	124	100	25
磺胺二甲噁唑	279	108	100	30
呋喃唑酮	226	137	140	25
呋喃唑酮	226	122	140	25
磺胺间甲氧嘧啶	281	126	100	25
磺胺间甲氧嘧啶	281	108	100	25
恶喹酸	262	160	100	40
恶喹酸	262	130	100	45
乙胺嘧啶	249	198	140	45
乙胺嘧啶	249	128	140	60
磺胺二甲氧嘧啶	311	156	140	25
磺胺二甲氧嘧啶	311	108	140	55
磺胺喹恶啉	301	129	100	50
磺胺喹恶啉	301	108	100	40
双呋肟脒	361	222	100	15
双呋肟脒	361	154	100	45

实验部分

方法开发是基于一个常规的梯度方法。采用一根短的 4.6 mm × 50 mm Poroshell 120 EC-C18, 2.7 µm 色谱柱, 能很快评估几种不同的流动相。该梯度程序的流速是 2.0 mL/min, 有机相初始比例为 10%, 在 12 min 内升至 40%。之后该方法被转移到 2.1 mm × 100 mm 和 3 mm × 50 mm 色谱柱上, 梯度程序通过方程 1 计算后进行相应改变。所用的三个梯度程序列于表 1, MRM Transitions 列于表 2。实验中使用了与 MS 兼容的挥发性流动相, 其中包含了诸如甲酸、甲酸铵和醋酸铵等挥发性缓冲盐。

本文使用了 Agilent 1200 快速分离高分辨液相色谱(RRLC)系统:

- G1312B SL 型二元泵
- G1367C SL 型自动液体进样器(ALS)
- G1316C SL 型 Agilent 1290 Infinity 柱温箱(TCC)
- G1315C SL 型安捷伦二极管阵列检测器(DAD), 配备 G1315-60024 微量流通池(光程 3 mm, 体积 2 μ L)
- G6410 配备电喷雾离子源(ESI)的 Agilent Triple Quadrupole LC/MS 系统
- B.04.01 版 ChemStation 工作站用于控制 HPLC 和处理数据。2.0 版 Agilent MassHunter 软件也用于控制 Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS 系统, Agilent 1200 快速分离高分辨液相色谱(RRLC), 以及进行数据分析。

本文工作中使用了三根 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱:

- 4.6 mm $\times$ 50 mm, 2.7 μ m 部件号 699975-902
- 3.0 mm $\times$ 50 mm, 2.7 μ m 部件号 699975-302
- 2.1 mm $\times$ 100 mm, 2.7 μ m 部件号 695775-902

图 1 展示的是目标化合物及其各自的结构。化合物配制成 1 mg/mL 浓度的水溶液。取上述溶液等量混合成一个混合样品溶液。化合物购自 Sigma Aldrich 公司(Bellefonte, PA)。另外, 甲醇、乙腈、甲酸铵、醋酸铵、甲酸和冰醋酸均购自 Sigma Aldrich 公司。水为 18 M-W Milli-Q water (Bedford, MA)。

本文使用的缓冲液是用适量的铵盐溶解成的 10 mM 溶液, 加入 950 mL 水溶解铵盐, 并滴加甲酸(甲酸铵缓冲液)或冰醋酸(醋酸铵缓冲液)调节其 pH 值, 加水定容到 1 L。

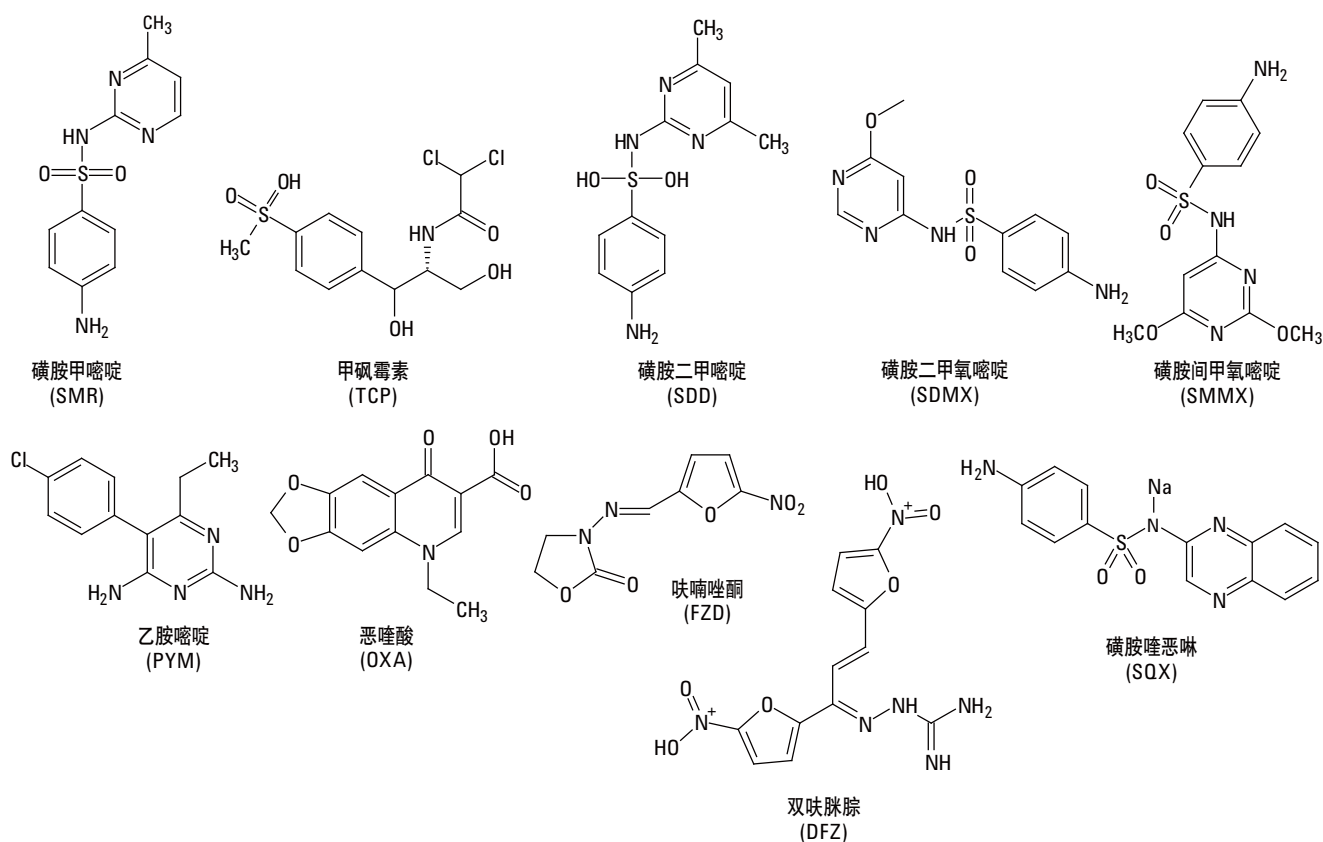


图 1. 目标化合物

结果与讨论

原方法是 2002 年由 Kumagai 和 Onigbinde 开发的采用 UV 检测器分析肉类中抗生素的有效方法。如图 2 所示，该方法在大约 45 min 内完成了所有分析物的分离。然而流动相中所含的非挥发性磷酸与 MS 检测器不兼容。

在许多情况下，简单的方法条件成比例调整将实现快速的方法转移。但在本文中，还要考虑改变流动相使其与 LC/MS 兼容。采用短 Poroshell 120 EC-18, 4.6 mm × 50 mm, 2.7 μm 色谱柱评估流动相变化有一些优势。一个优势是它允许在不牺牲分离度的条件下实现快速分离。此外，因为梯度是在 2 mL/min 流速下运行，残留溶剂能从系统中迅速清除。这就确保溶剂的筛选实验在更换了溶剂瓶后快速进行，而不用担心高效液相色谱泵及脱气机中有残留溶剂。这些色谱柱均能用于 LC/MS，但通常使用小内径如 3.0 mm 或 2.1 mm 的色谱柱。

正如文献 5 所讨论的，一旦根据选择性和保留指数完成了分离优化，我们就可以进一步通过选择不同柱长、填料粒径和流速进一步优化改善色谱分离效果。但 k^* 值必须稳定，当改变这些色谱柱条件时应确保不降低选择性。

方程 1: $k^* = (t_g F) / (d/2)^2 L (\Delta\%B)$

其中：

- t_g 表示梯度洗脱时间
- F 表示流速
- L 表示柱长
- d 表示柱内径
- $\Delta\%B$ 表示梯度中有机相的比例

原方法，Kumagai 和 Onigbinde，5988-7135，2002 年 6 月。
只简要展示了 224 和 360 两个波长。

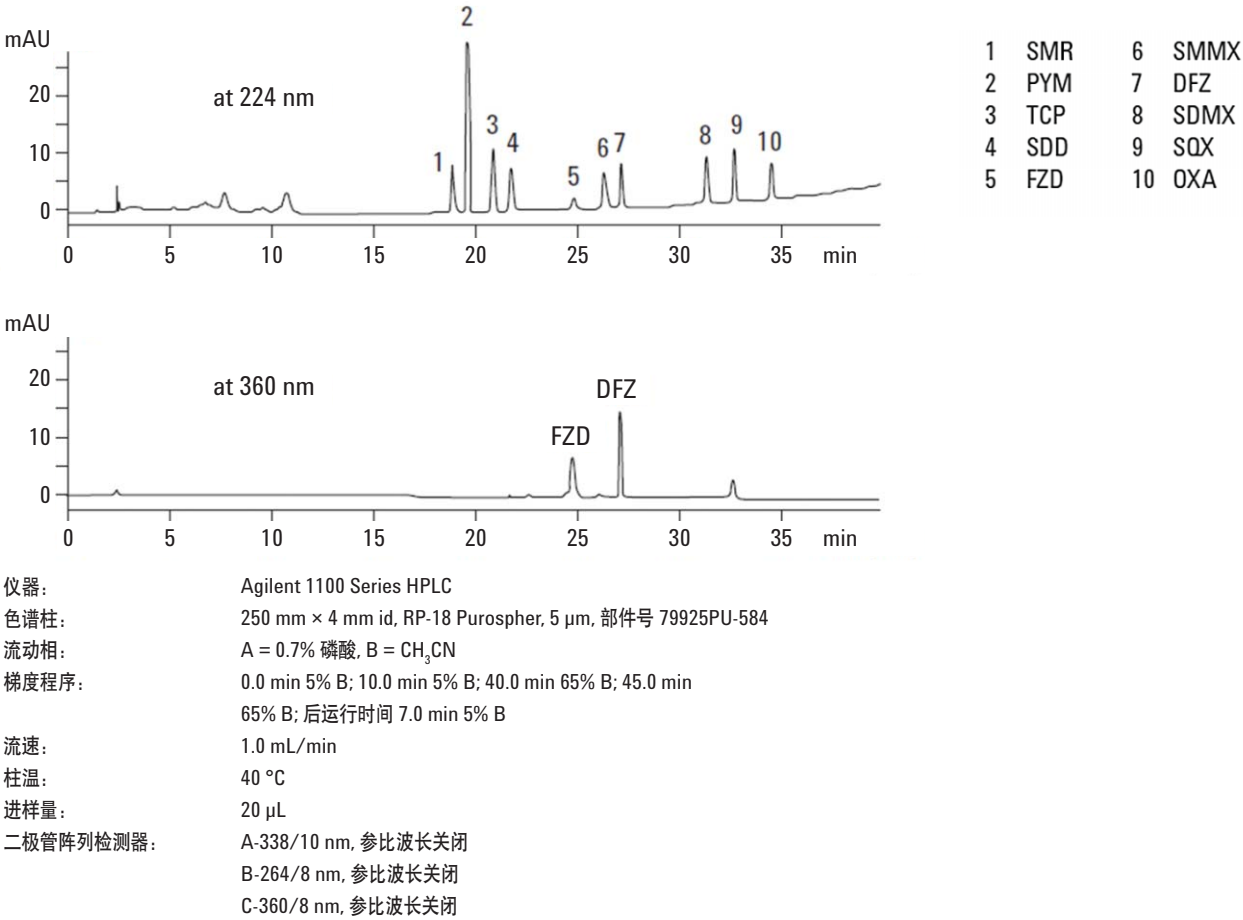


图 2.原方法采用 250 mm 色谱柱并使用 UV 检测器获得了极佳的分析结果

如图 3 所示，使用甲醇或乙腈对目标化合物进行梯度洗脱分离。使用甲醇运行梯度时能产生 50% 的额外高压（200 bar 升为 300 bar）。当然这在使用 50 mm 长色谱柱时显得并不紧要，但在使用 100 或 150 mm 长色谱柱时就变得尤为重要了。

因为具有较低的溶剂强度，在使用甲醇洗脱时，最后一个化合物出峰较晚。甲酸，作为一个便捷的流动相添加剂使用，与 10 mM (pH=3)甲酸铵缓冲盐相比，尤其是对乙胺嘧啶，洗脱效果较差。使用甲酸铵缓冲液除了乙胺嘧啶峰型改善外，其洗脱顺序也明显改变。

许多选择性的改变和提高可通过不同的 pH 值或有机改性剂来实现。如前所述，当使用甲醇时许多碱性化合物的峰型得到改善，而采用 Poroshell 120 EC-C18 分析，本文中所有的化合物都能获得极佳的峰型。对流动相 pH 值稍作调整，就可以改变组分的洗脱顺序和峰间距。如图 3 中所示，甲醇和 pH 值的变化极大地改变了组分洗脱顺序。对于分析本项研究中的化合物最好的流动相组合是乙腈与 pH 3.8 的甲酸铵缓冲液。

采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱快速评估两种低 pH 的 MS 兼容流动相和两种有机改性剂

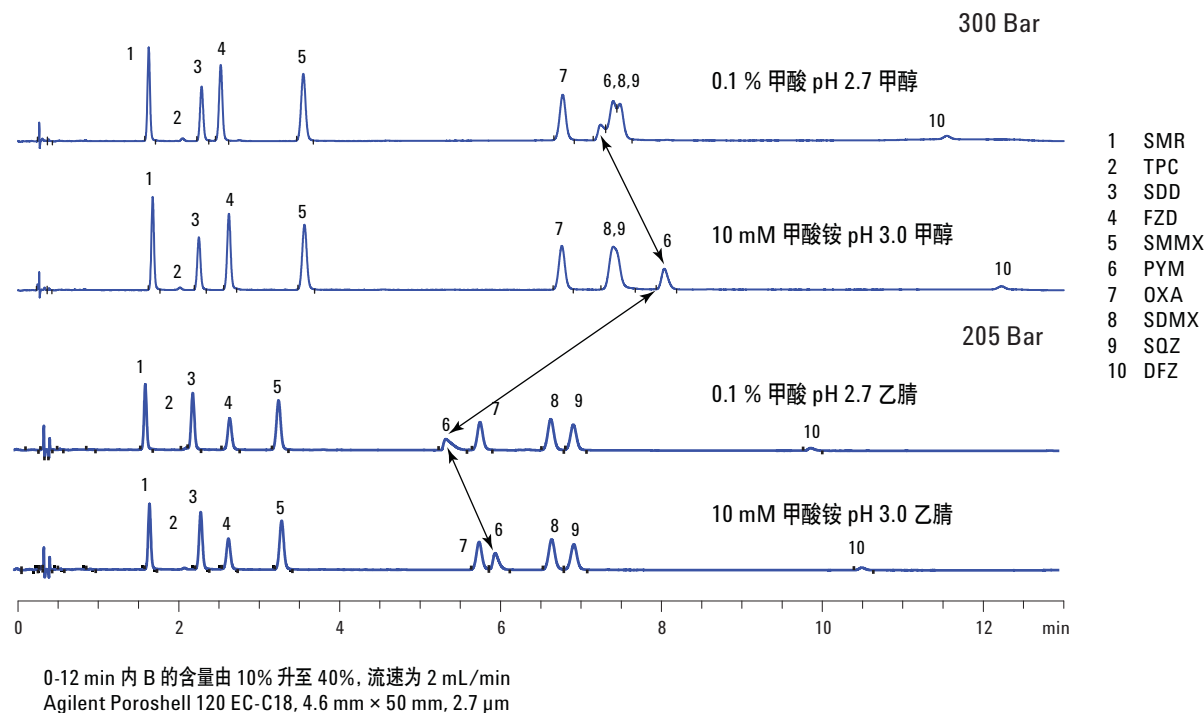


图 3. 色谱条件对比：缓冲液，0.1% 甲酸，甲醇，乙腈

针对这些分析物进行条件优化, 在采用乙腈与 pH 3.8 甲酸铵缓冲液时获得了极优异的峰形和选择性

改变流动相添加剂, 乙腈

205 Bar

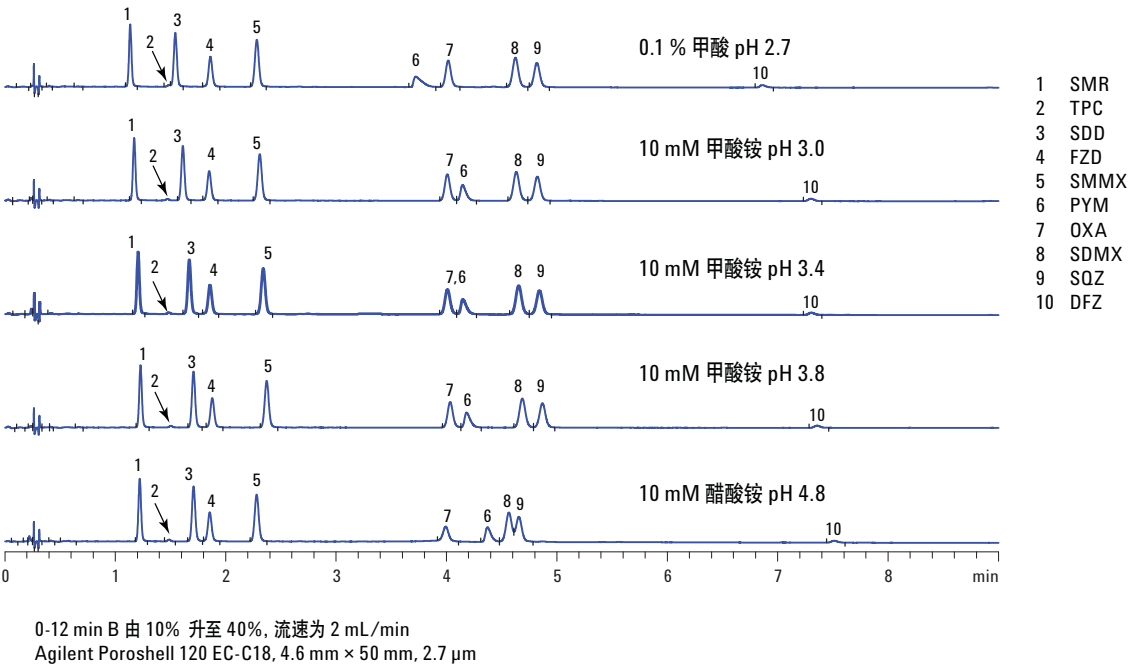
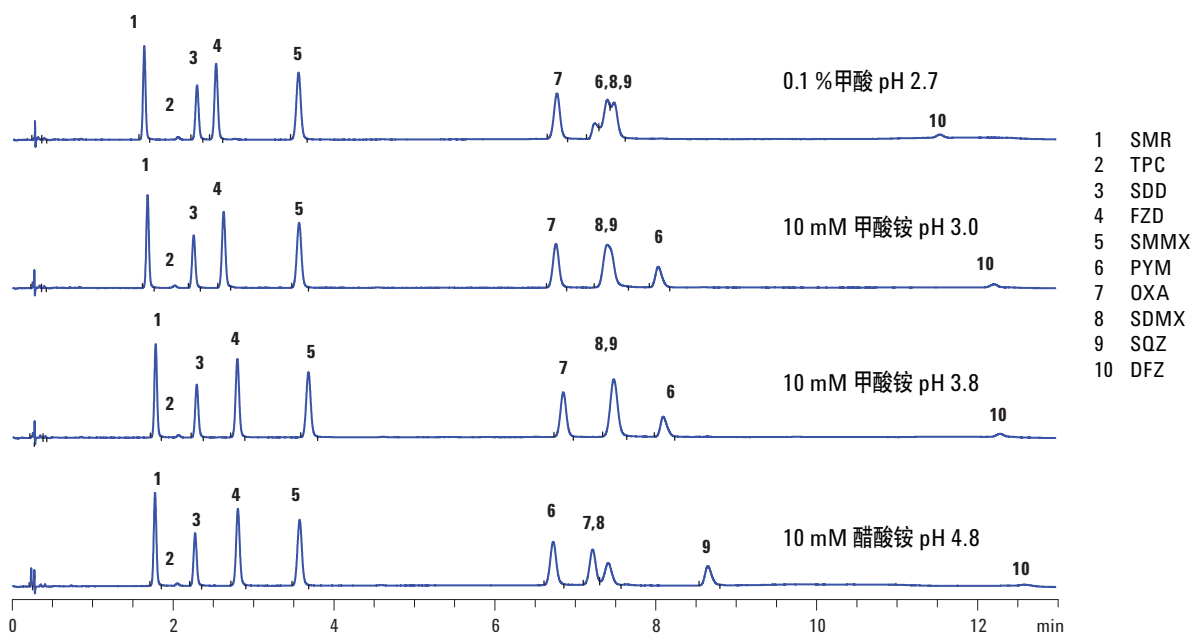


图 4. 与乙腈联用缓冲溶液的对比

针对这些分析物进行优化, 在采用甲醇与 pH 4.8 醋酸铵缓冲液时获得了优异峰型

改变流动相添加剂, 甲醇

300 Bar



0-12 min 内 B 由 10% 升至 40%, 流速为 2 mL/min
Agilent Poroshell 120 EC-C18 4.6 mm × 50 mm, 2.7 μm

图 5. 与甲醇联用缓冲溶液的对比

图 6 显示的是基于图 3、4 和 5 工作基础上的总离子流色谱图。依据方程 1 对采用 3.0 mm × 50 mm 色谱柱的条件进行调整。这个简便的调整表明该 3 mm 内径色谱柱能很容易地满足传统的 UV 检测和更灵敏的 MS 检测。另外，2.1 mm × 100 mm 色谱柱也同

样适用于该梯度，且仅需改变一下流速。如图所示，如果精确地调整梯度程序，分析时间将延长至现在的两倍，但分离度完全满足分析要求。图 7 显示了抗生素混合物的 MRM 色谱图。化合物甚至能够在大大体积进样的条件下彻底分离。色谱条件列于表 1 和表 2。

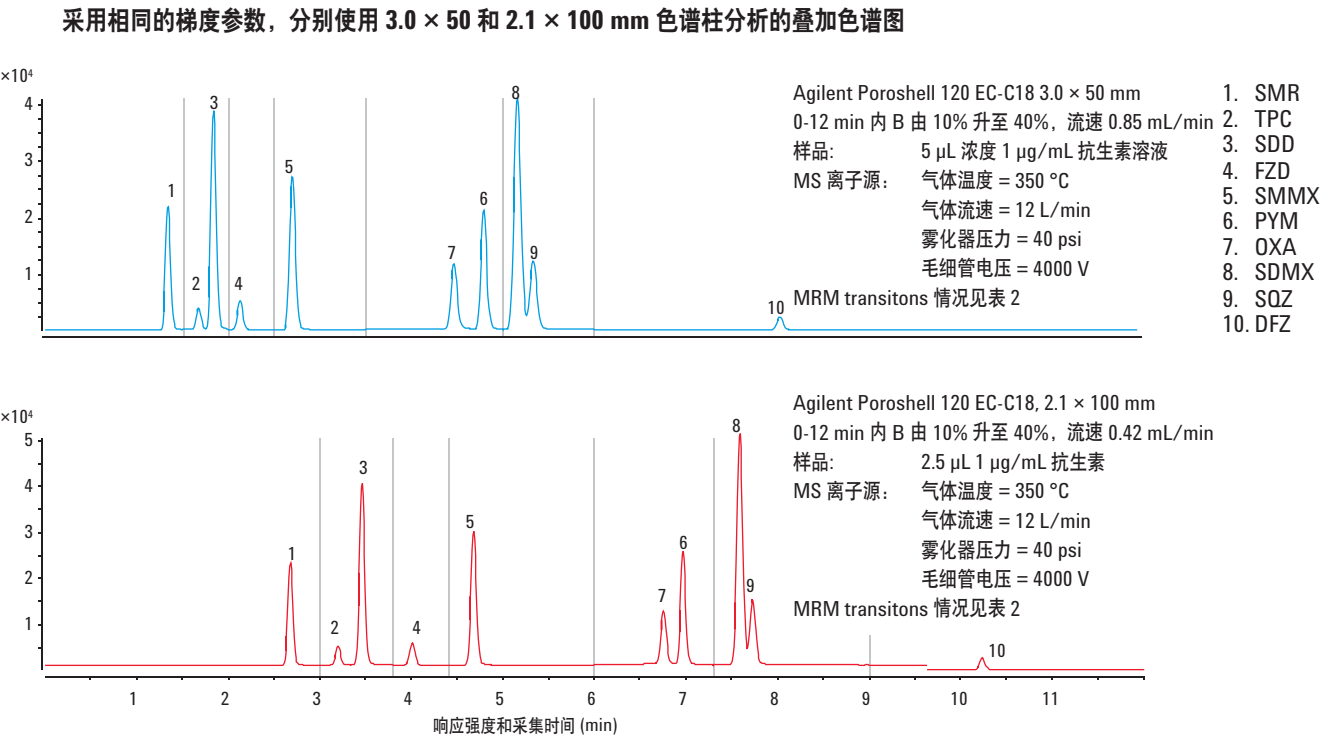
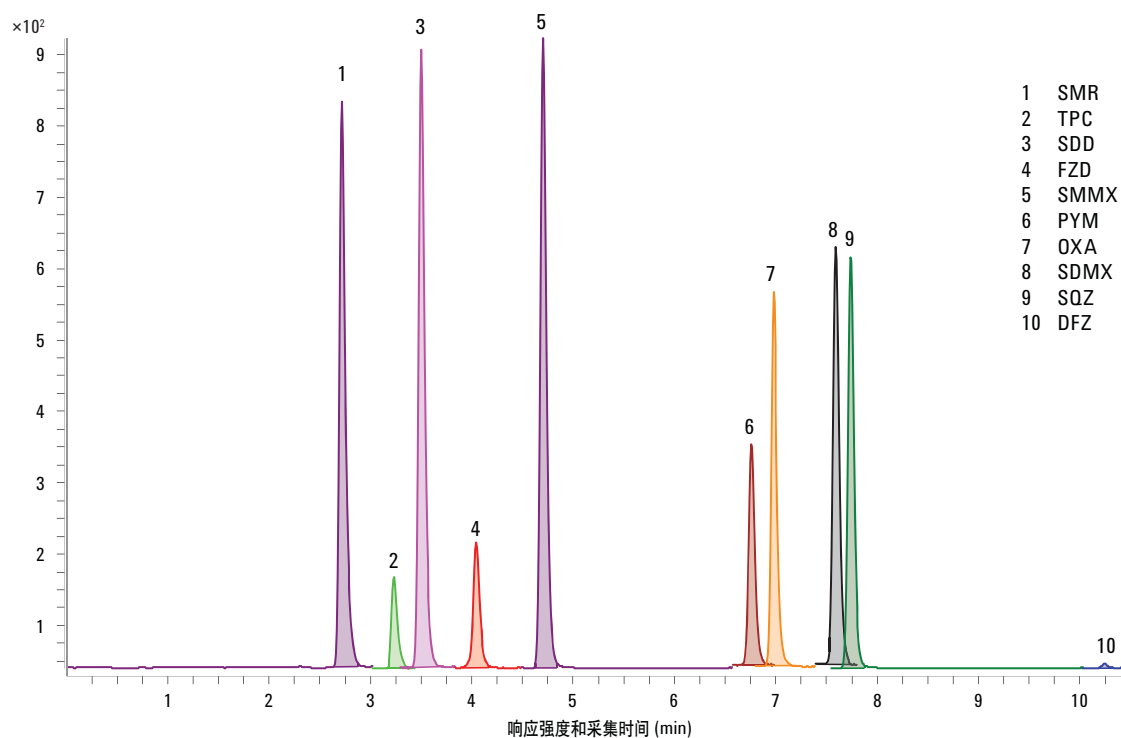


图 6. 采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3 × 50 mm 和 2.1 × 100 mm 色谱柱分析抗生素的总离子流色谱图

采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱, 在 11 min 内 MRM 模式优化分离了 10 种抗生素



Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 mm × 100 mm, 2.7 μm
 0-12 min 内乙腈由 10% 升至 40% (10 mM 甲酸铵缓冲液, 用甲酸调至 pH 3.8), 流速 0.42 mL/min
 样品: 10 μL 浓度为 10 ng/mL 抗生素溶液
 采用动态 MRM 模式 MS/MS

图 7. 采用 Agilent Poroshell 120 色谱柱得到的抗生素混合物的动态 MRM 色谱图

结论

本研究表明在方法转移中, 使用新型色谱柱和快速液相色谱仪能更容易实现方法更新。在一根短色谱柱上运行常规梯度能很快对 10 种流动相进行评估。依据基本的计算方程, 方法能便捷地转移到其它不同规格的色谱柱上。与其采用更昂贵或不太适用的仪器, 还不如使用 UV 检测器优化流动相后将方法转移至实验室普遍使用的仪器上进行分析。

采用 Poroshell 120 色谱柱能在低压下很好地对复杂样品进行 LC/MS 分析。不论三重四极杆质谱仪的分析能力如何, 更好的分离在简化了数据分析的同时也可以缩短分析循环时间。对于一个给定峰, 基线分离化合物也能使质谱仪给出最大的驻留时间, 从而获得更加准确和重现性更高的结果。这就能确保最佳的定量分析数据。此外, 共流出物引起离子抑制的可能性也会降低。

另外还对几个因素进行了论证。运用快速扫描方法进行考察后发现, 分析该混合物的最佳色谱条件是乙腈与 pH 3.8 的甲酸铵缓冲液(8 min)。该分析也能采用甲醇与 pH 4.8 的醋酸铵缓冲液(13 min)。这很容易通过改变梯度程序使洗脱最后的组分峰更快, 从而缩短整个分析时间。例如, 在第二步梯度程序中使有机相比例快速上升即可实现, 但这会进一步增加柱压。在相同 pH 条件下分析碱性化合物时, 使用一种“真正的缓冲液”如 10 mM 甲酸铵缓冲液比使用一般缓冲液如 0.1 % 甲酸缓冲液能获得更好的峰型。可见, 本文工作已经进行了色谱条件优化, 检测条件的优化工作正在进行中。

参考文献

1. W. Long, and A. Mack, “使用 Agilent 1100 系列液相色谱配合安捷伦 Poroshell 120 EC-C18 色谱柱对磺胺类药物进行快速分析,” 安捷伦出版物 5990-5572CHCN, 2010.
2. A. Gratzfeld-Hüsken, and E. Naegele, “Maximizing efficiency using Agilent Poroshell 120 columns,” Agilent Technologies publication 5990-5602EN, 2010.
3. W. Long, and A. Mack, “使用安捷伦 Poroshell 120 EC-C18 表面多孔色谱柱对食品和饮料添加剂进行快速低压分析,” 安捷伦出版物 5990-6082CHCN, 2010.
4. A. Mack, and W. Long, “使用安捷伦 Poroshell 120 EC-C18 色谱柱快速分析环境中的分类,” 安捷伦出版物 5990-6156CHCN, 2010.
5. Snyder, Kirkland, Glach “Practical HPLC Method Development,” Chapter 8, 2nd ed. John Wiley & Sons, 1997
6. The Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC Method Translator and Cost Savings Calculator
<http://www.chem.agilent.com/en-us/products/instruments/lc/pages/gp60931.aspx>

更多信息

如需了解我们产品和服务的更多信息, 请访问我们的网站 www.agilent.com/chem。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦公司对本材料所包含的错误, 或由于提供、展示或使用本材料造成的直接或间接损失概不负责。

本文中的信息、说明及性能指标等如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2010
中国印刷
2010 年 8 月 31 日
5990-6238CHCN



Agilent Technologies