



移轉並最佳化現有分析肉類中的抗生素方法至安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱以 MS/MS 檢測

應用註解

食品

作者

William J. Long, Anne E. Mack 和
James R. Evans
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19809
USA

摘要

此分析採用一般的梯度沖提方式，並以紫外光 (UV) 檢測，選擇適當移動相，快速改善測定肉類中抗生素含量的分析方法，以期最終能建立與質譜儀相容的分析法。此評估使用 4 種緩衝液與 2 種有機溶劑。分離結果最理想的移動相組合，將移轉至 2.1 mm × 100 mm、2.7 µm 的安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，並加最佳化。梯度沖提的時間，自 45 分鐘縮短為 12 分鐘，若使用 3 mm × 50 mm 管柱更可進一步縮短時間，但會略微減損解析度。此方法使用於安捷倫 6410 三重四極桿液相層析串聯質譜儀 (LC/MS)，串聯安捷倫 1200 系列快速分離 LC。



Agilent Technologies

表 1. 各種管柱的分析法參數

	4.6 × 50 mm Poroshell 120 EC-C18 管柱	3.0 × 50 mm Poroshell 120 EC-C18 管柱	2.1 × 100 mm Poroshell 120 EC-C18 管柱
移動相	A：緩衝液，濃度不定 B：有機溶液，濃度不定	A：10 mM 醋酸銨，pH 3.8 B：乙腈	A：10 mM 醋酸銨，pH 3.8 B：乙腈
梯度沖提	10-40% B	10-40% B	10-40% B
梯度沖提時間	12 分鐘	12 分鐘	12 分鐘
流速	2 mL/分鐘	0.85 mL/分鐘	0.42 mL/分鐘
注入量	0.5 µL	5 µL	2.5 µL 或 10 µL
樣品	0.1 mg/mL 抗生素	1 µg/mL 抗生素	1 µg/mL 或 10 ng/mL 抗生素
恆溫管柱室 (TCC)			
室溫度	30 °C	30 °C	30 °C
偵測器	DAD：訊號 = 270，4 nm； 參考訊號 = 360，100 nm	MS/MS：見表 2	MS/MS：見表 2

緒論

飼養雞、豬、牛、魚時通常會投予抗生素。許多家中飼養的家畜，飼料中會加入各種抗生素，以預防及控制黴菌及細菌造成的感染，這些化合物在農產品與動物產品中的殘餘量，許多國家都定有容許範圍。此分析將 5 µm、250 mm 管柱的舊分析法，移轉至新表面多孔性顆粒充填的管柱，以加快分析速度，偵測器也從紫外光換成串聯質譜儀 (MS/MS)。結果證實處理量可增加 5-10 倍，且受樣品製備的影響很小。由於分析時間大幅減短，便有時間改善移動相的選擇性 (pH 值、緩衝液種類及有機修飾物)。

若要移轉分析法，可調整現有分析法或開發新的分析法，目標在於利用現有的紫外光分離法開發出與 MS 相容的新分離法，因此需要改變移動相，因為 MS 樣品不可使用 0.7% 的磷酸。在一般的篩選研究中使用 0.1% 甲酸，但在此額外評估與質譜相容的溶劑系統。此分析首先使用安捷倫 Poroshell 120 管柱篩選各種移動相組合並以紫外光檢測，再將該分析法移轉至安捷倫 6410 三重四級桿液相層析串聯質譜儀 (LC/MS) 系統。安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱主要的優點在於使用與舊有 5 µm 管柱相同的 2 µm 濾片，因此不需開發樣品的製備方式。

4.6 mm × 50 mm、2.7 µm 的安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，效能幾乎等同於 1.8-µm 全多孔性顆粒充填的安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱，但因為使用的 2-µm 管柱濾片與 5-µm 管柱的相似，因此不需另外再製備樣品，讓分析法移轉更加順暢。雖然部分之前的分析證實，舊型安捷倫 1100 系統可使用安捷倫 Poroshell 120 管柱，但這類管柱在更新型的系統中使用，也非常理想，如安捷倫 1200 或 1260 系列的 UHPLC 系統。

表 2. 抗生素化合物的 MRM 轉換

化合物名稱	母離子	子離子	碎裂器電壓	碰撞能量
Sulfamerazine	265	172	100	25
Sulfamerazine	265	108	100	25
Thiamphenicol	338	308	140	10
Thiamphenicol	338	118	140	50
Sulfamethazine	279	124	100	25
Sulfamethazine	279	108	100	30
Furazolidone	226	137	140	25
Furazolidone	226	122	140	25
Sulfamonomethoxine	281	126	100	25
Sulfamonomethoxine	281	108	100	25
Oxolinic acid	262	160	100	40
Oxolinic acid	262	130	100	45
Pyrimethamine	249	198	140	45
Pyrimethamine	249	128	140	60
Sulfadimethoxine	311	156	140	25
Sulfadimethoxine	311	108	140	55
Sulfaquinoxaline	301	129	100	50
Sulfaquinoxaline	301	108	100	40
Difurazone	361	222	100	15
Difurazone	361	154	100	45

實驗

分析方法開發採用一般的梯度沖提方式。使用 4.6 mm × 50 mm、2.7 µm 的短型 Poroshell 120 EC-C18 管柱，便能快速評估數種不同的移動相。一般的梯度沖提以 2.0 mL/分鐘的流速進行沖提，最初使用 10% 的有機溶劑，於 12 分鐘內逐漸增加至 40%，再依方程式 1 調整梯度沖提，將此梯度沖提法移轉至 2.1 mm × 100 mm 及 3 mm × 50 mm 的管柱。其中使用的 3 種梯度沖提列於表 1，MRM 轉換則列於表 2。與 MS 相容的移動相含有揮發性緩衝液，如甲酸、甲酸銨緩衝液、醋酸銨緩衝液。

採用安捷倫 1200 快速分離 LC (RRLC) 系統進行此分析：

- G1312B 二元幫浦 SL
- G1367C 自動液體注射器 (ALS) SL
- G1316C 安捷倫 1290 無限系列恆溫管柱室 (TCC) SL
- G1315C 安捷倫光二極體陣列偵測器 (DAD) SL，搭配一個 G1315-60024 微流動液槽（光徑 3 mm，容量 2 μ L）
- G6410 安捷倫三重四級桿 LC/MS 系統，採用電灑法 (Electrospray, ESI)
- ChemStation B.04.01 版軟體，操控 HPLC 並處理數據。也使用安捷倫 MassHunter 2.0 版，控制安捷倫 6410 三重四級桿 LC/MS 系統、安捷倫 1200 快速分離 LC (RRLC)，及分析數據

此分析使用 3 種安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱：

- 4.6 mm $\times$ 50 mm、2.7 μ m，p/n 699975-902
- 3.0 mm $\times$ 50 mm、2.7 μ m，p/n 699975-302
- 2.1 mm $\times$ 100 mm、2.7 μ m，p/n 695775-902

待驗的化合物及其結構，列於圖 1。待驗化合物均溶於水，濃度製備成 1 mg/mL。再各取等量，混合成樣品混合液。待驗化合物皆購自 Sigma Aldrich 公司（賓州 Bellefonte 市），甲醇、乙腈、甲酸銨、醋酸銨、冰醋酸等，也購自 Sigma Aldrich 公司，水則採用 18 M-W Milli-Q 水（麻州 Bedford 市）。

溶解適量的銨鹽製備成 10 mM 的溶液，再加入 950 mL 的水，並以甲酸（製成甲酸銨緩衝液）或冰醋酸（製成醋酸銨緩衝液）調整該溶液，以製備本分析使用的緩衝液。緩衝液的量應配製成 1 L。

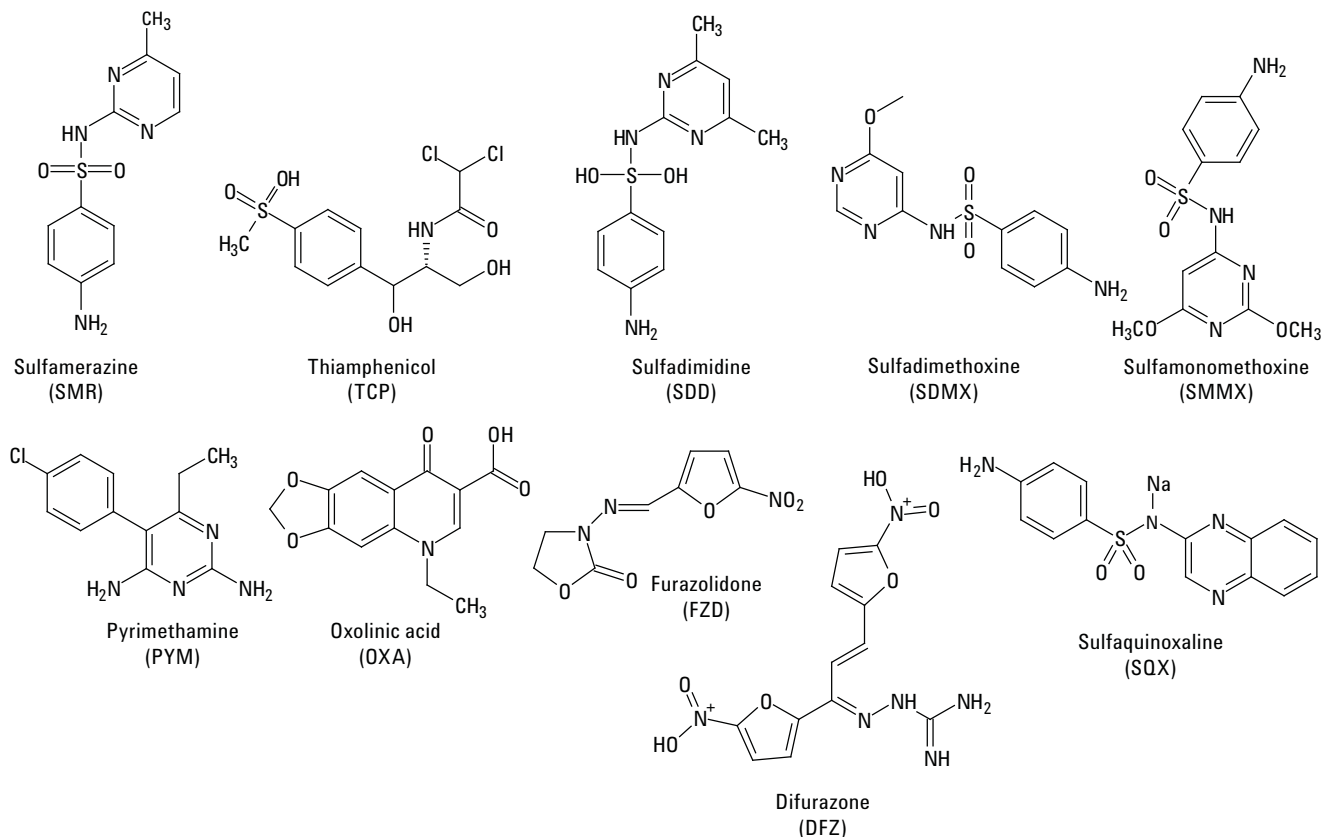


圖 1. 待驗化合物

結果及討論

原本的分析法由 Kumagai 與 Onigbinde 共同於 2002 發表，此分析法以紫外光檢測，可有效分析肉類中的抗生素。如圖 2 所示，此分析法需花費 45 分鐘分離分析物，但移動相中不可揮發的磷酸，與 MS 偵測器不相容。

許多時候，只需將分析法稍做調整便能快速移轉分析法，不過此分析卻需改變移動相，以相容於 LC/MS。使用 4.6 mm × 50 mm、2.7 μm 的短型 Poroshell 120 EC-18 管柱評估移動相的變化，具有數個優點，其中一個優點就是能快速分離，卻不會減損解析力。此外，這類管柱以 2 mL/分鐘的流速進行一般的梯度沖提，溶劑能快速清洗整個系統，因此，更換溶劑瓶後就能快速進行溶劑篩選實驗，不須擔心 HPLC 幫浦或除氣裝置會殘留溶劑。

這類管柱可用於 LC/MS 系統，但一般通常使用直徑較小的管柱，如 3.0 mm 或 2.1 mm 的管柱。

如同參考資料 5 所述，以選擇性與滯留指數最佳化的分離方法，很可能利用改變管柱長度、充填顆粒大小或流速，進一步改善層析法，但 k^* 值必須保持不變，以免改變管柱條件時降低選擇性。

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

其中：

t_g 為梯度沖提時間

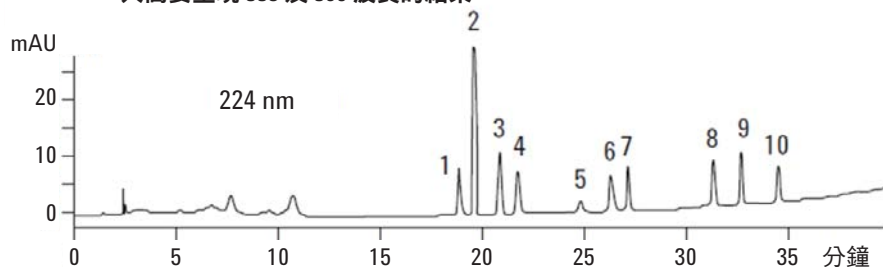
F 為流速

L 為管柱長度

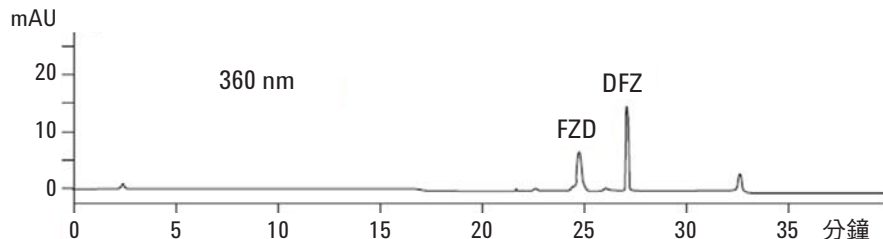
d 為管柱內徑

$\Delta\%B$ 為各段梯度沖提間的有機溶劑變化量

Kumagai 與 Onigbinde 於 2002 年 6 月發表的原有分析法 5988-7135
只簡要呈現 338 及 360 波長的結果。



1	SMR	6	SMMX
2	PYM	7	DFZ
3	TCP	8	SDMX
4	SDD	9	SQX
5	FZD	10	OXA



儀器：安捷倫 1100 系列 HPLC
管柱：250 mm × 4 mm 內徑、5 μm 的 RP-18 Purospher 管柱，p/n 79925PU-584
移動相：A = 0.7% 磷酸，B = CH₃CN
梯度沖提：第 0.0 分鐘時為 5% B，第 10.0 分鐘時為 5% B，第 40.0 分鐘時為 65% B，第 45.0 分鐘時為 65% B，沖提結束後 7.0 分鐘為 5% B
流速：1.0 mL/分鐘
溫度：40 °C
注入量：20 μL
光二極體陣列偵測器：A-338/10 nm，未開啟對照波長
B-264/8 nm，未開啟對照波長
C-360/8 nm，未開啟對照波長

圖 2. 原有方法使用 250 mm 管柱，以紫外光偵測時，產生的結果非常理想

如圖 3 所示，一般的梯度沖提使用甲醇或乙腈，分離待驗化合物，但採用甲醇梯度沖提時，產生的壓力高出 50% (200 bar 上升至 300 bar)。雖然這點在使用 50 mm 的管柱時影響不大，但在管柱增長為 100 mm 或 150 mm 後，影響就變得明顯。

使用甲醇沖提時，最後一個化合物因溶劑強度較弱而較慢沖提出來。甲酸雖然是很方便的移動相添加劑，但產生的結果卻不如 10 mM 甲酸銨緩衝液 (pH =3) 理想，pyrimethamine 的分離結果尤為明顯。pyrimethamine 的分離結果中，除了改善波峰形狀外，最值得注意的是沖提順序也有變化。

調整 pH 值或加入有機修飾物，便能改善或改變大部分的選擇性。如前文所述，使用甲醇沖提，可改善許多基本化合物的波峰形狀，不過本研究分析的所有化合物，以 Poroshell 120 EC-C18 管柱沖提後，都能產生極佳的波形。僅需稍微調整 pH 值，就能改變沖提次序及波峰間距，此點以圖 3 最為明顯，圖中可見甲醇與 pH 值共同改變沖提次序，且改變幅度極大。對於本研究分析的化合物，最佳的移動相為 pH 3.8 的甲酸銨 – 乙腈組合。

使用安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，快速評估 2 種低 pH 值、與 MS 相容的移動相，及 2 種有機修飾物。

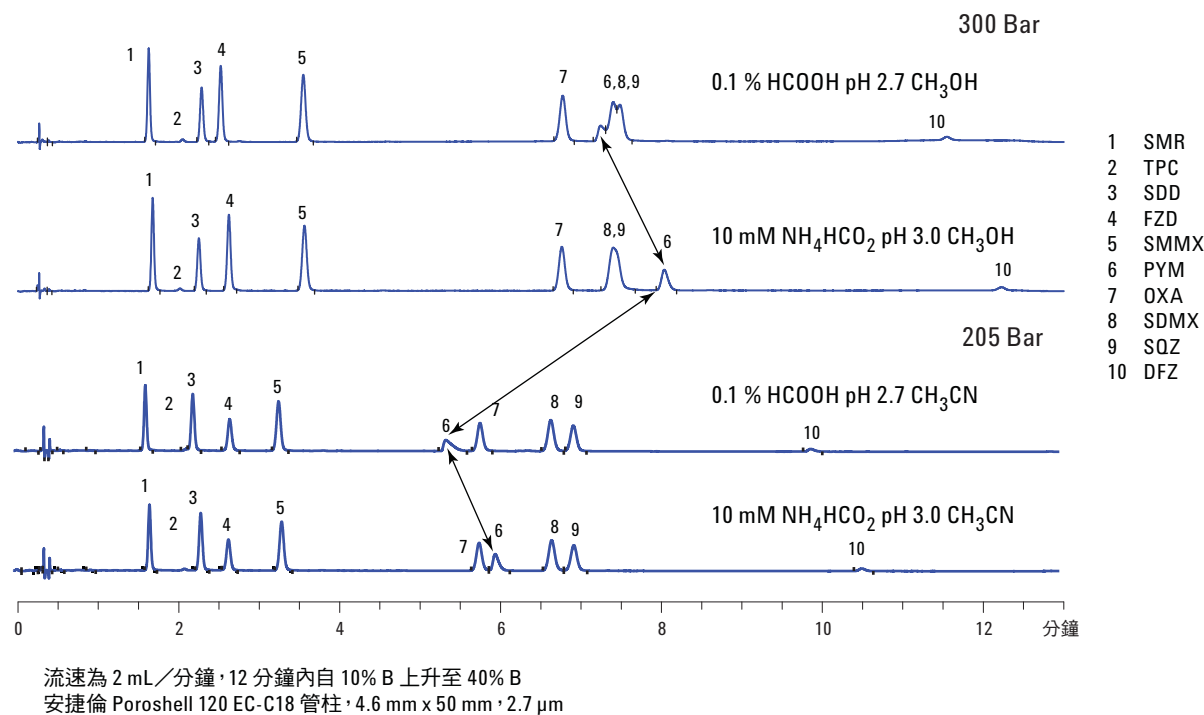
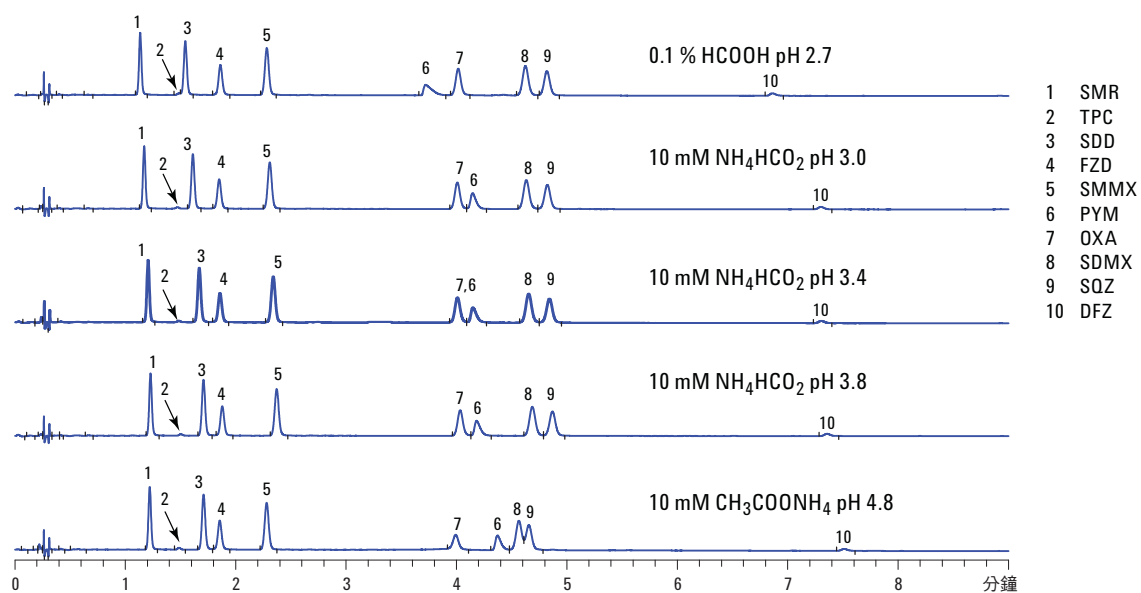


圖 3. 層析條件比較：緩衝液，0.1 % formic acid、CH₃OH、CH₃CN

乙腈－甲酸銨緩衝液產生極佳的波形與選擇性，此時pH 3.8 為最適合分析物的 pH 值

各種移動相添加劑，CH₃CN 為溶劑

205 Bar



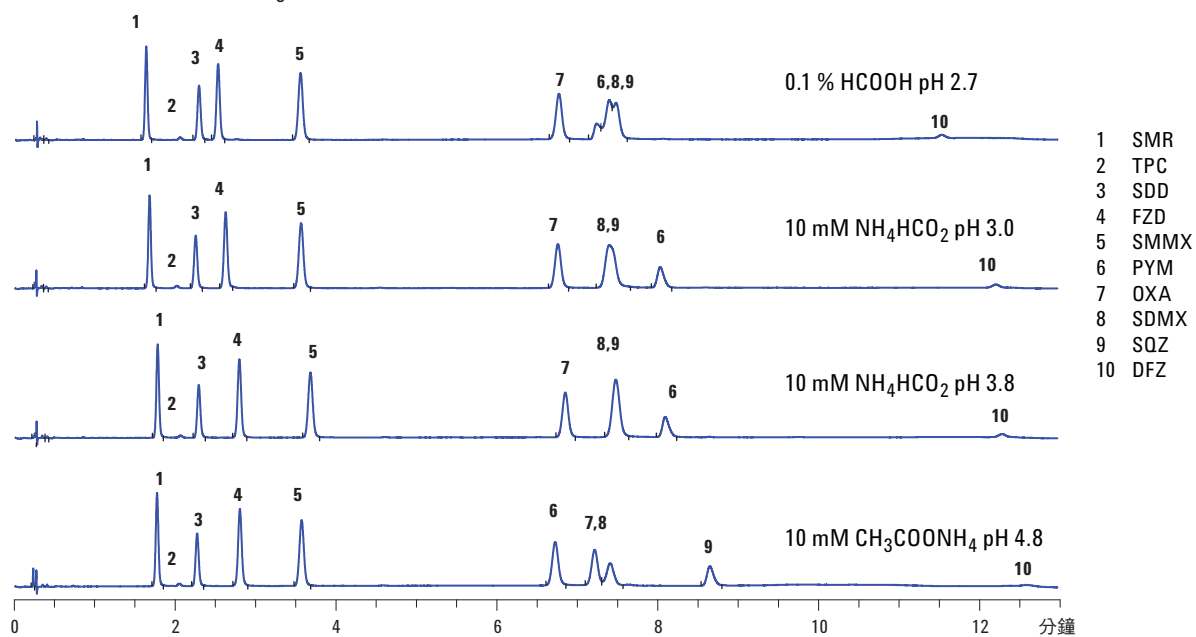
流速為 2 mL/分鐘，12 分鐘內自 10% B 上升至 40% B
安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，4.6 mm x 50 mm，2.7 μm

圖 4. 以 CH₃CN 為溶劑，比較各種緩衝液

甲醇 — 醋酸銨緩衝液產生極佳的波形與選擇性，此時以 pH 4.8 為最適合這些分析物的 pH 值

各種移動相添加劑，CH₃OH 為溶劑

300 Bar



流速為 2 mL/分鐘，12 分鐘內自 10% B 上升至 40% B
安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，4.6 mm x 50 mm，2.7 μm

圖 5. 以 CH₃OH 為溶劑，比較各種緩衝液

圖 6 顯示探索圖 3、4 及 5 的結果，所產生的總離子層析圖 (TIC)。3.0 mm × 50 mm 管柱的層析條件，依方程式 1 調整。此簡單的改變，證實 3 mm 管柱可輕易用於傳統紫外光偵測器及更靈敏的 MS 偵測器。此外，2.1 mm × 100 mm 的管柱也能以相同的梯度沖提方式沖提，只需改變流速。若確實調整梯度沖提方式

後，分析時間將延長為 2 倍，但如圖所示，解析度變得較適當。圖 7 為抗生素混合物的多重反應監測模式(MRM) 層析圖，即使注入管柱的樣品量很大，化合物依然能充分分離。層析條件列於表 1 及表 2。

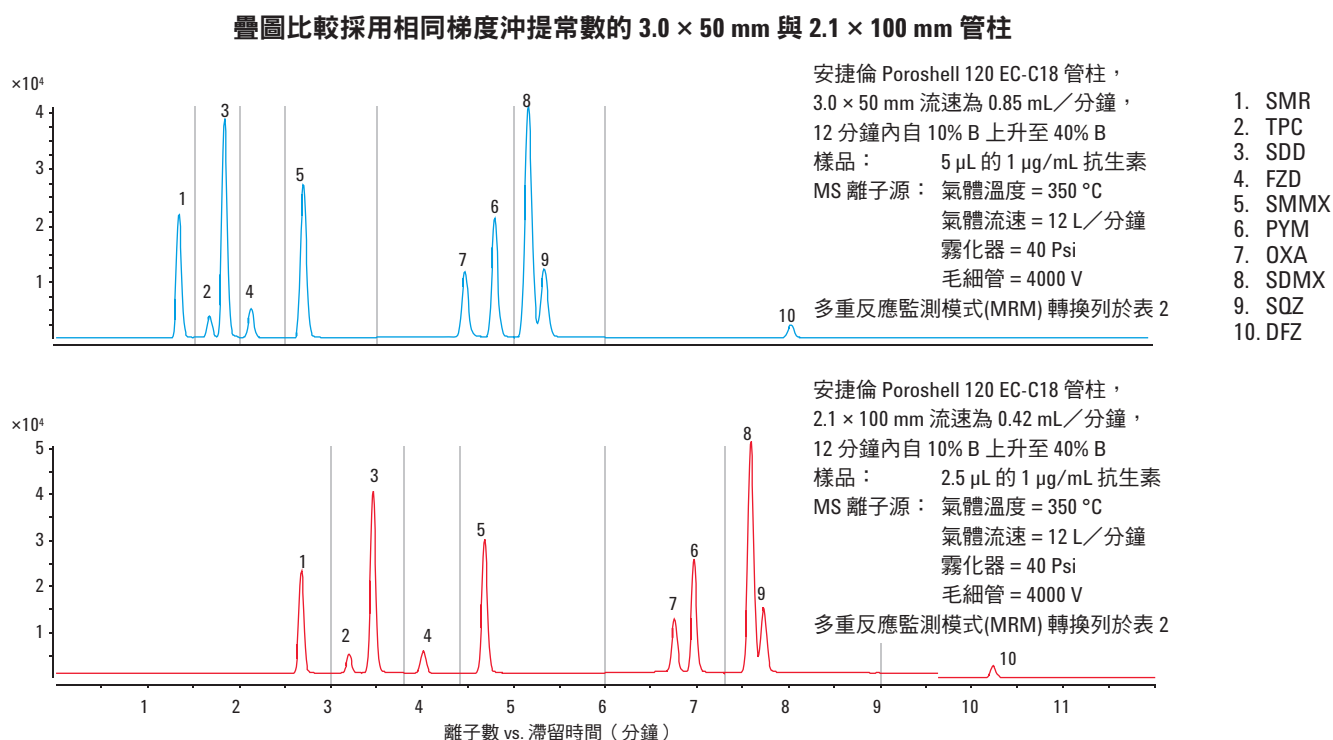
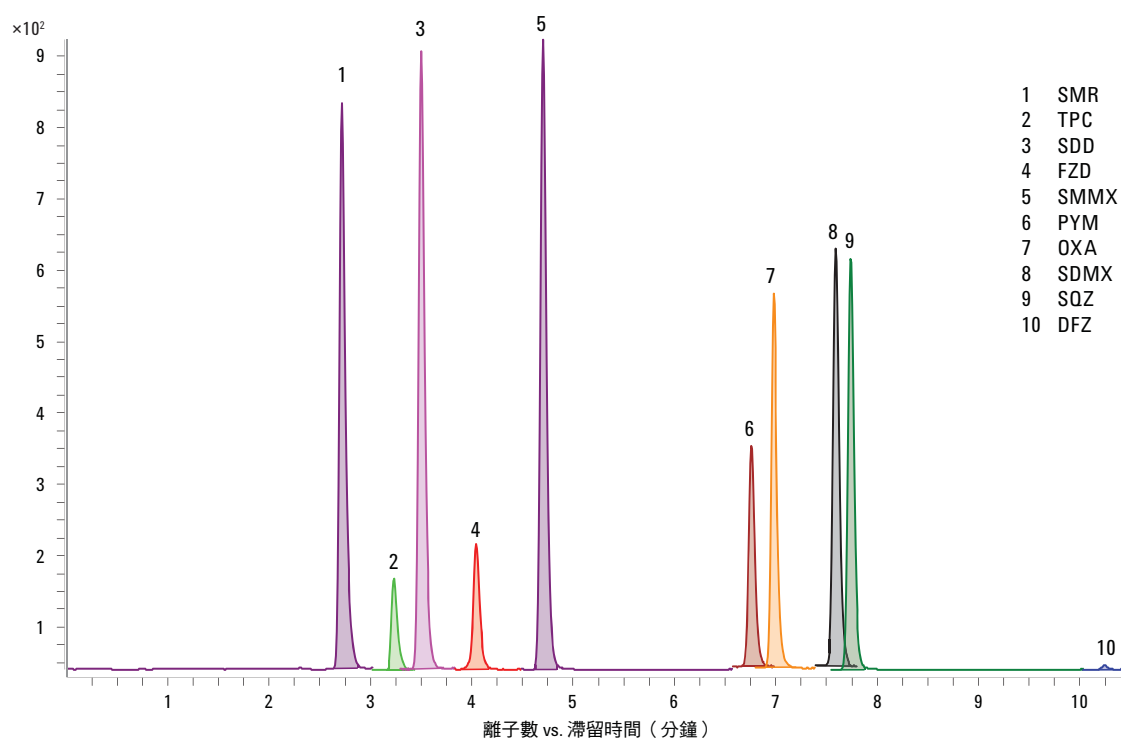


圖 6. 以 3 × 50 mm 及 2.1 × 100 mm 的安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，沖提抗生素混合物的總離子層析圖

以安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，將 10 種抗生素的 MRM 改善至低於 11 分鐘



安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，2.1 mm x 100 mm，2.7 μm

t₀ 時為 10% CH₃CN，12 分鐘內調高為 40% CH₃CN（緩衝液：10 mM NH₄HCO₂，pH 3.8，以濃甲酸調整），流速為 0.42 mL/分鐘

樣品：10 μL 的 10 μg/mL 抗生素

** MS/MS 採用動態多重反應監測模式 (MRM) 模式 **

圖 7. 安捷倫 Poroshell 120 管柱沖提抗生素混合物的動態多重反應監測模式 (MRM) 結果

結論

本分析顯示，移轉分析法時，新型管柱及快速液相層析法，可讓從頭開發分析法變得更容易。以一般梯度沖提方式沖提短型管柱，便能快速評估 10 種移動相組合。依據基礎的分析法調整方程式，就能輕易將分析法移轉至不同尺寸的管柱。以實驗室常用的儀器搭配紫外光偵測器改良移動相，開發出部分的分析法，而非由較不容易取得的較貴重儀器，這些較貴重儀器，是分析法移轉的目標。

若要在承受壓力不高時使用 LC/MS 檢測複合樣品，則 Poroshell 120 管柱為適當的選擇。無論三重四級桿質譜儀的分析能力，較佳的分離結果可讓數據分析較容易進行，進而縮短分析的循環時間。分離的化合物基準，也能延長質譜儀對特定波峰的掃描時間 (dwell time)，產生更正確且再現性更高的結果，確保能取得最佳的定量結果。此外化合物一起沖提出來，可能會降低離子抑制的機率。

其他數個因素的影響，也已獲得證實。利用快速探索法，發現此混合物的最佳層析條件為 pH 3.8 的乙腈－甲酸銨緩衝液（8 分鐘），而使用甲醇加上 pH 4.8 的醋酸銨，也能完成本分析（13 分鐘），此法在改變梯度沖提後可更快沖提出最後一個波峰，輕鬆縮短分析時間，例如在沖提末端時調高有機溶劑濃度的時間間隔，加快為 1 秒鐘，不過這可能會升高背壓。使用「真正的緩衝液」，如相較於相同 pH 值的 0.1% 甲酸等緩衝液，10 mM 的甲酸銨產生的基準波峰形狀較佳。本文所述的分析已改善為最適合層析條件的分析法，且仍持續改善，以符合檢測條件。

參考資料

1. W. Long 和 A. Mack。《以安捷倫 1100 系列 LC 搭配安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，快速分析磺胺類藥物》(Fast Analysis of Sulfa Drugs using the Agilent 1100 Series LC with Agilent Poroshell 120 EC-C18 columns)。安捷倫科技出版品 5990-5572EN。2010 年。
2. A. Gratzfeld-Hüsken 和 E. Naegelé。《使用安捷倫 Poroshell 120 管柱提升效率》(Maximizing efficiency using Agilent Poroshell 120 columns)。安捷倫科技出版品 5990-5602EN。2010 年。
3. W. Long 和 A. Mack。《使用表面多孔性顆粒充填的安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，快速以低壓分析食品及飲料的添加劑》(Fast, Low Pressure Analysis of Food and Beverage Additives Using a Superficially Porous Agilent Poroshell 120 EC-C18 Column)。安捷倫科技出版品 5990-6082EN。2010 年。
4. A. Mack 和 W. Long。《使用安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，快速分析環境中的酚類》(Fast Analysis of Environmental Phenols with Agilent Poroshell 120 EC-C18 columns)。安捷倫科技出版品 5990-6156EN。2010 年。
5. Snyder、Kirkland、Glach。《實用高效液相層析法開發》(Practical HPLC Method Development) 第二版，第 8 章。約翰威立 (John Wiley & Sons) 出版社。1997 年。
6. 安捷倫 1200 系列快速分離液相層析法轉換器及成本節約計算器 (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>

詳細資訊

有關本公司產品與服務的其他資訊，請造訪本公司的網站：
www.agilent.com/chem

www.agilent.com/chem

本文內容如有任何錯誤，或是因為提供、實行或使用本資料，造成附帶或衍生損害，安捷倫恕不負責。

本文件中的資訊、說明和規格可能隨時變更，恕不另行通知。

© 安捷倫科技公司，2010 年
於美國印製
2010 年 8 月 31 日
5990-6238CHTW



Agilent Technologies