

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.17.021

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱快速定量有机小分子化合物应用研究*

张培¹, 陈丹²

(1. 河南省食品药品审评查验中心, 河南 郑州 450008; 2. 湖北省武汉食品化妆品检验所, 湖北 武汉 430012)

摘要:目的 建立运输暂养水体中小分子化合物孔雀石绿残留量的基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF/MS)快速定量分析法。方法 在暂养水体中加入内标物,与 α -氰基-4-羟基肉桂酸基质混合后,采用线性阳离子检测模式检测,以内标法定量。结果 样品在5s内完成测定,孔雀石绿质量浓度在2.5~200 ng/mL范围内与峰面积线性良好, $r^2=0.9988$;检测限(LOD)为0.8 ng/mL,定量限(LOQ)为2.5 ng/mL;在10,125,200 ng/mL 3个添加水平下,平均回收率为102.82%~113.43%,RSD低于8.20%($n=6$)。结论 该方法灵敏度、准确度与精密度均高,抗干扰能力强,适用于运输暂养水中孔雀石绿残留量的检测。

关键词:基质辅助激光解析电离飞行时间质谱;孔雀石绿;运输暂养水;有机小分子

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)17-0080-03

Rapid Determination of Small Molecule Compound by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry

ZHANG Pei¹, CHEN Dan²

(1. Henan Provincial Food and Drug Evaluation and Inspection Center, Zhengzhou, Henan, China 450008; 2. Wuhan Institute for Food and Cosmetic Control, Wuhan, Hubei, China 430012)

Abstract: Objective To establish a matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry(MALDI-TOF/MS) rapid quantitative analysis method for the residual amount of the small molecular compound malachite green in aquatic transport water. Methods An internal standard was added to the aquatic transport water, mixed with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix, detected by linear cation detection mode, and quantified by internal standard method. Results Good linearity for malachite green was obtained with a correlation coefficient(R^2) of 0.9988 in the range of 2.5-200 ng/mL. The limit of detection(LOD) and limit of quantification(LOQ) were 0.8 ng/mL and 2.5 ng/mL, respectively. Under the 3 addition levels of 10, 125, and 200 ng/mL, the average recovery was 102.82% - 113.43%, $RSD < 8.20\%$ ($n=6$). Conclusion This method has high sensitivity, accuracy and precision, and strong anti-interference ability, which is suitable for detecting the residual amount of malachite green in the temporary water.

Key words: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; malachite green; aquatic transport water; small molecule compound

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF/MS)技术是软电离方式的质谱,具有快速、高灵敏度、高通量、耗用试剂较少及抗污染等优点,广泛应用于蛋白质组学、基因组学等生命科学领域^[1-3],已用于甘油三酯^[4]、脂肪醇聚氧乙烯醚^[5]等大分子的检测。传统基质自身的质谱碎片干扰小分子物质的检测,且MALDI-TOF/MS质谱信号重复性差,限制了其在小分子物质

的定性定量检测的应用。随着新型基质和内标法的引入,MALDI-TOF/MS技术的应用也逐步向小分子领域拓展^[6-9]。孔雀石绿是一种有毒的三苯甲烷类有机小分子化合物,可用作治理鱼类、鱼卵的寄生虫、真菌或细菌感染,且针对水产品水霉病有特效,常用于鲜活水产品贮运、流通环节^[10]。孔雀石绿有潜在的致癌、致畸、致突变作用,有高度毒性、高残留等副作用^[11]。美国食品药物管理

*基金项目:河南省2018年度科技发展计划[182102310762]。

第一作者:张培,女,硕士研究生,主要从事药品审评、药品注册生产现场检查和研制现场核查工作,(电子信箱)452495186@qq.com。

△通信作者:陈丹,女,博士研究生,主要从事食品药品安全及质谱分析工作,(电子信箱)361174557@qq.com。

Phytochem Lett, 2014, 7(1): 137-142.

[12] 李耿,周秀,赵亚,等. 高效液相色谱法测定鸡骨草胶囊中相思子碱的含量[J]. 广东药学院学报, 2011, 27(3): 271-273.

[13] 陈冉,彭冰,李德慧,等. 鸡骨草中生物碱的提取与测定[J]. 中国医药导报, 2016, 13(36): 145-148.

[14] 钟正贤,李燕婧,陈学芬,等. 相思子碱的药理作用研究[J]. 中医导报, 2009, 15(1): 8-10.

[15] 史柳芝,史恒芝,黄锁义,等. 鸡骨草黄酮体外抗活性氧自由基作用的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(2): 252-254.

[16] 刘美静,张郭惠,黄小桃,等. 夏佛塔苷对高脂饮食诱导小鼠非酒精性脂肪肝的保护作用[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(11): 5078-5081.

(收稿日期:2019-12-12;修回日期:2020-02-25)

局(FDA)未认可其在养殖业中的使用;我国在农业行业标准《NY 5071-2002 无公害食品鱼药使用准则》也将孔雀石绿列为禁用药物。目前,关于孔雀石绿的检测方法有酶联免疫法^[12]、液相色谱法^[13-14]、液相色谱质谱法^[15-17]。免疫法简便快速,但定量准确率低,且有假阳性或假阴性风险;液相色谱法及液相色谱质谱法虽有较好的定量准确度,但前处理复杂,耗时较长,且需消耗大量有机试剂。本研究中采用MALDI-TOF/MS快速定量孔雀石绿在养殖水中的含量,只需5 s即可获得定量结果,探讨了MALDI-TOF/MS在小分子快速定量方面有潜在的应用价值。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(德国Bruker公司);涡旋混合器(美国Scientific Industries公司);MS104TS/02型电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司,精度为万分之一)。

1.2 试剂

α -氰基-4-羟基肉桂酸、2,5-二羟基苯甲酸、芥子酸(德国Bruker公司);石墨烯(南京先锋纳米材料有限公司);丙酮、三氟乙酸(优级纯,国药集团化学试剂有限公司);D5-孔雀石绿(100 mg/L,批号为S039339),孔雀石绿(100 mg/L,批号为1ST7303),均购自美国First Standard公司。

2 方法与结果

2.1 质谱条件

光源:氮激光;波长:337 nm;检测模式:线性阳离子;采集范围:20~1 000 Da。采用仪器配置的Data Explorer 4.0软件对质谱图进行基线改正和默认平滑处理,根据所得峰高比值从标准曲线计算出运输暂养水中的孔雀石绿的残留量。

2.2 溶液制备

基质:按丙酮-水-三氟乙酸(85:15:1, V/V/V)配制Ta85溶液,用涡旋机涡旋1 min,超声处理5 min,待用。取已配制好的Ta85溶液作为溶剂,配制合适质量浓度的 α -氰基-4-羟基肉桂酸溶液。

供试液:精确吸取孔雀石绿标准品(100 mg/L)1.0 mL,置100 mL容量瓶中,加水稀释至刻度,得1.0 mg/L标准中间溶液;精确吸取D5-孔雀石绿(100 mg/L)标准品1.0 mL,置100 mL容量瓶中,加水稀释至刻度,得1.0 mg/L内标中间溶液。精确吸取标准中间溶液(1.0 mg/L),用水逐级稀释,配制系列质量浓度(2.5, 50, 100, 150, 200 ng/mL)的标准工作溶液,同时加入内标中间溶液(1.0 mg/L),使内标工作溶液质量浓度均为50 ng/mL,临用临配。

样品:待测运输暂养水样经0.22 μ m有机滤膜过滤,加入D5-孔雀石绿同位素内标物,使每1 mL样品溶液中含有内标物50 ng,涡旋混合1 min。将混合好的样品溶液与基质溶液各取200 μ L,涡旋混合1 min,微量移液器精确移取2 μ L点在进样板的进样区域,进样板上的样品在常温下自然挥发结晶,上机测试。

2.3 方法学考察

线性范围、检测限与定量限考察:为了解决分析物与基质混合不均匀,分析物在进样板区域各位置分布不均匀造成的质谱信号不稳定、重复性差的问题,采用同位素稀释技术。精密吸取内标工作溶液适量,加入标准工作溶液中,使每1 mL混合标准工作溶液中含有内标物50 ng。将配制的2.5, 50, 100, 150, 200 ng/mL孔雀石绿工作溶液上机测定,以目标物和内标物的峰高比值为纵坐标(Y)、孔雀石绿溶液浓度(X)为横坐标绘制标准曲线。结果孔雀石绿质量浓度在2.5~200 ng/mL范围内与峰面积线性关系良好,线性方程为 $Y = 0.0259X + 0.0046$, $r^2 = 0.9988$ 。在空白暂养水中添加不同质量浓度的孔雀石绿标准溶液,依法处理样品。信噪比(S/N)为3时,孔雀石绿的检测限(LOD)为0.8 ng/mL;S/N为10时,孔雀石绿的定量限(LOQ)为2.5 ng/mL。

加样回收试验:采用在空白运输暂养水中添加标准溶液的方法进行回收率试验,分别按低、中、高质量浓度(10, 125, 200 ng/mL)水平进行加样回收试验,平行测定6次,计算回收率。结果见表1。

表1 阴性暂养水中孔雀石绿加样回收试验结果(n=6)

加入量(ng/mL)	测得量	回收率(%)	RSD(%)
10	11.343	113.43	5.07
125	141.550	113.24	8.20
200	205.640	102.82	5.24

精密度试验:取孔雀石绿工作溶液(质量浓度为50 ng/mL)适量,按拟订检测条件连续进样6次。结果的RSD为0.53%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.4 目标化合物含量测定

检测实验室抽检的流通领域的2个多宝鱼、3个黑鱼、2个鳊鱼的运输暂养水,按本研究中已优化的条件进行检测,同时检测质控样品。结果显示,7个运输暂养水中均未检出目标化合物,质控样品的回收率等指标均能达到药物残留分析要求,结果准确、可靠。

3 讨论

基质是MALDI电离过程中必不可少的一种能量传递体,其主要作用是吸收激光的能量,并转移到样品分子上,使样品分子获得能量而电离。由于不同类型的样

品电离所需能量不同,即不同样品需不同的基质。本研究中选择 α -氰基-4-羟基肉桂酸、芥子酸、2,5-二羟基苯甲酸、氧化石墨烯作为基质考察孔雀石绿的电离效果。结果表明,基质为 α -氰基-4-羟基肉桂酸时,孔雀石绿的电离效果最佳,且基质的碎片离子均不干扰孔雀石绿的检测,因此选择 α -氰基-4-羟基肉桂酸基质分析孔雀石绿。

不同质量浓度的基质导致样品电离程度也不同。质量浓度太低,样品所需能量不足,无法发生电离,信号太弱,无法测定目标物质;质量浓度太高,基质与样品会出现共结晶现象,形成许多干扰峰,使目标峰受到干扰,影响样品检测结果,也会使样品打得太碎,使目标物质发生不可预测的电离。本研究中选择1,1.4,1.8,2,3 mg/mL的 α -氰基-4-羟基肉桂酸溶液优化基质浓度。结果表明, α -氰基-4-羟基肉桂酸质量浓度为1.8 mg/mL时,孔雀石绿的响应度最高且不受基质干扰。故选择 α -氰基-4-羟基肉桂酸质量浓度为1.8 mg/mL。

本研究建立了应用MALDI-TOF/MS技术快速定量检测运输暂养水中有机小分子孔雀石绿残留量的方法,其灵敏度、准确度与精密度均高,抗干扰能力强,适用于运输暂养水中孔雀石绿残留量的检测,且不需要前处理复杂样品,不使用流动相及色谱柱,一个样品可在5 s内完成检测。

综上所述,MALDI-TOF/MS在小分子分析检测领域有诸多优势,可为运输暂养水体中孔雀石绿残留量的风险评估提供一种快速、高效的分析手段,但现有辅助离子化的基质适用范围较窄,不能很好地满足其他小分子化合物的离子化需求,有待开发具有广谱适用性的小分子基质。

参考文献:

[1] YONEYAMA T, OHTSUKI S, TACHIKAWA M, et al. Scrambled Internal Standard Method for High-Throughput Protein Quantification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Tandem Mass Spectrometry[J]. Journal of Proteome Research, 2017, 16(4):1556.

[2] ZHOU M, YANG Q, KUDINHA T, et al. Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) Complemented with Selected 16S rRNA and gyrB Genes Sequencing to Practically Identify Clinical Important Viridans Group Streptococci (VGS)[J]. Front Microbiol, 2016, 7:1328.

[3] DAPUETO C. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. Journal of Microbiological Methods, 2017, 139(2):54-60.

[4] HE XM, DING J, YU L, et al. Black phosphorus-assisted laser desorption ionization mass spectrometry for the determination of

low-molecular-weight compounds in biofluids[J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2016, 408(22):6223.

- [5] HU L, XU S, PAN C, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry with a matrix of carbon nanotubes for the analysis of low-mass compounds in environmental samples[J]. Environmental Science & Technology, 2005, 39(21):8442-8447.
- [6] ZHANG J, DONG X, CHENG J, et al. Efficient Analysis of Non-Polar Environmental Contaminants by MALDI-TOF MS with Graphene as Matrix[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2011, 22(7):1294.
- [7] 张森,倪或,李树奇,等. 适用小分子化合物MALDI分析的基质研究[J]. 化学进展, 2014, 26(1):158-166.
- [8] 杨梦瑞,王敏,汤晓艳,等. ZnO、CuO和NiO纳米颗粒在基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱分析小分子化合物中的应用[J]. 分析化学, 2015, 43(7):1058-1062.
- [9] 董美花,孙士美,金彪. 氧化硅介孔材料在基质辅助激光解析飞行时间质谱分析有机小分子中的应用[J]. 分析化学, 2014, 42(9):1235-1239.
- [10] 李旭. 孔雀石绿的应用现状、危害及检测方法[J]. 养殖技术顾问, 2015(7):189.
- [11] SRIVASTAVA S, SINHA R, ROY D. Toxicological effects of malachite green[J]. Aquatic Toxicology, 2004, 66(3):319-329.
- [12] CHOWDHURY S, MISHRA R, SAHA P, et al. Adsorption thermodynamics, kinetics and isosteric heat of adsorption of malachite green onto chemically modified rice husk[J]. Desalination, 2011, 265(1-3):159-168.
- [13] GUO Z, GAI P, HAO T, et al. Determination of Malachite Green Residues in Fish Using a Highly Sensitive Electrochemiluminescence Method Combined with Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2011, 59(10):5257-5262.
- [14] 孙协军,谢田雨,郭永健,等. 液相色谱紫外/荧光检测法测定水产品中孔雀石绿和隐性孔雀石绿[J]. 包装与食品机械, 2016, 34(2):52-56.
- [15] XIE J, PENG T, CHEN DD, et al. Determination of malachite green, crystal violet and their leuco-metabolites in fish by HPLC-VIS detection after immunoaffinity column clean-up[J]. Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences, 2013, 913-914(2):123-128.
- [16] KAPLAN M, OLGUN EO, KARAOLGU O. A rapid and simple method for simultaneous determination of triphenylmethane dye residues in rainbow trouts by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2014, 1349:37-43.
- [17] NEBOT C, IGLESIAS A, BARREIRO R, et al. A simple and rapid method for the identification and quantification of malachite green and its metabolite in hake by HPLC-MS/MS[J]. Food Control, 2013, 31(1):102-107.

(收稿日期:2019-12-28;修回日期:2020-04-15)