

应用纪要

## 利用Xevo TQ-S cronos分析食品残留的最佳实践 - 测定虾中的三苯甲烷染料

---

Renata Jandova, Sara Stead

Waters Corporation



---

### 摘要

本应用纪要对Xevo TQ-S cronos（一种串联四极杆质谱仪）的电喷雾(ESI)离子源提供了一系列优化步骤，重

点关注探头定位和锥孔气流速，以在海产品提取物中孔雀石绿及其他染料的测定中实现出色的精密度和灵敏度。结果发现，理想的锥孔气流速接近0 L/h（无气流），因为在该流速下，隐色孔雀石绿和隐色结晶紫的峰面积%RSD更低，方法中其余染料也具有可接受的%RSD值。在离子源正交几何结构内的两个位置对探头进行测试。尽管当喷雾器设置得相对靠近样品锥孔时，虾中的隐色结晶紫和隐色孔雀石绿获得较大信号，但是距样品锥孔最远的理想位置为所有分析化合物的峰面积提供了出色灵敏度和更低的%RSD。利用优化后的方法参数评估方法性能（包括线性、基质效应、测量精密度以及灵敏度）。数据证明了该方法的适用性，包括使用目标化合物标记类似物形式的内标，对虾中处于“行动参考值”（RPA）水平下的染料进行可靠定量。

## 优势

- Xevo TQ-S cronos离子源使用独特的正交几何结构，可以轻松进行优化，以获得可靠的灵敏度
- QuEChERS是一种快速且简便易用的提取物制备方法，适用于分析虾中的染料

---

## 简介

三苯甲烷染料是市面上常见、廉价的织物染料，因其具有抗菌性而被非法用于水产养殖。孔雀石绿(MG)和结晶紫(CV)等染料经酶解消化后迅速代谢为还原隐色体（LMG和LCV），这些隐色体在给药后可持续存在于鱼体内，对水生物种和哺乳动物造成不利影响<sup>1</sup>。根据美国食品药品监督管理局(FDA)、FAO-WHO国际食品法典委员会以及欧盟委员会的规定，MG在主要地区均禁止用于食品动物。欧盟设定的MG行动参考值(RPA)为0.5 μg/kg（MG与LMG的总和），确保有效控制包括进口动物在内的动物源性食品。若动物源性食品中含有的此类物质残留等于或高于RPA，则视为不符合欧盟法律要求<sup>2</sup>。因此，需要采用合适的方法监测是否符合此类法规<sup>3</sup>。

Xevo TQ-S cronos是一款专为常规定量分析开发的系统，其性能非常可靠，沿用了备受用户青睐的ACQUITY QDa质谱检测器的样品锥设计。在这种倒锥形设计中，通道最窄的部分位于样品锥中心，而样品锥入口相对较宽。此设计可确保样品基质和流动相缓冲盐不会在采样孔处积聚并造成堵塞。这样能够延长仪器在两次锥孔清洗之间的正常运行时间，还能提升复杂食品基质分析的灵敏度。

除倒锥形设计外，这项成熟的技术也有助于Xevo TQ-S cronos获得稳定的性能。离子源采用双正交几何结构，以便在将离子高效传输至分析器的同时去除未电离物质（中性物质）。StepWave是一种离轴离子导向装置，可进一步去除中性物质并减少气体负载，主动将离子束提取到平行的“离轴”离子隧道中，从而提高传输率，同时提升灵敏度与稳定性。碰撞池使用行波技术来缩短离子在碰撞池中的驻留时间，从而在不损失信号强度的前提下快速采集多组分MRM数据，同时尽量减少相邻MRM通道之间的交叉干扰。这样可确保与高质量多组分UPLC-MS/MS定量分析所需的高数据采集速率完全兼容。

先前报道了一种使用Xevo TQD系统测定虾中三苯甲烷染料及其代谢物的方法，表明该方法是用于测定此类禁用物质的一种经济有效的解决方案<sup>4</sup>。本应用纪要介绍一种使用全新Xevo TQ-S cronos仪器准确、精密地定量染料及其代谢物的UPLC-MS/MS方法，该方法适用于检查虾产品是否符合欧洲法规。研究中所测染料的化学结构如图1所示。

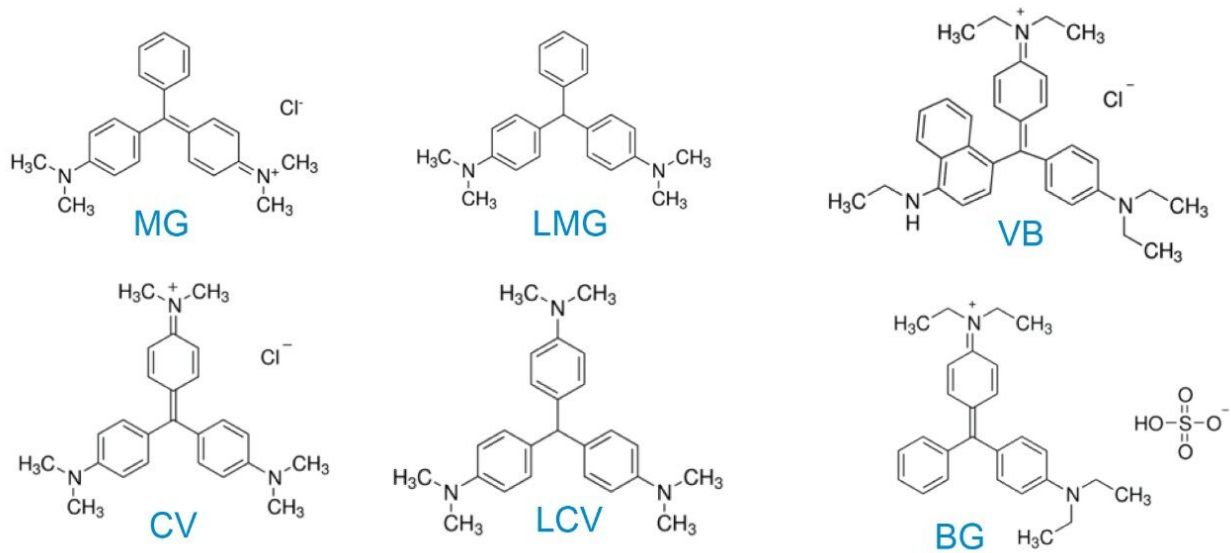


图1. 研究中所测染料的化学结构

## 实验

### 提取与净化

使用改良版QuEChERS制备虾提取物<sup>4</sup>。简言之，用10 mL含1%乙酸的乙腈萃取10 g匀浆样品，手动振摇1 min。加入含1.5 g乙酸钠和6 g硫酸镁的QuEChERS试剂袋（部件号[186006812 < https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/186006812-disque-aoc-method-15-g-sodium-acetate-and-6-g-mgso4-50-ml-pouch.html >](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/186006812-disque-aoc-method-15-g-sodium-acetate-and-6-g-mgso4-50-ml-pouch.html)），并将混合物置于超声水浴中提取10 min，然后离心。将上清液转移至15 mL DisQuE QuEChERS PSA管（部件号[186004833 < https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/186004833-disque-900-mg-mgso4--150-mg-psa-15-ml-tube-50-pk.html >](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/186004833-disque-900-mg-mgso4--150-mg-psa-15-ml-tube-50-pk.html)），管中含有900 mg硫酸镁和150 mg PSA。用手振摇样品1 min，离心，并用于制备八种浓度（0.05、0.1、0.25、0.5、1、2、5、10 ng/mL）的基质匹配标准品，相当于浓度范围0.05~10 µg/kg。完成样品提取后，加入稳定同位素类似物作为内标。为稳定染料，建

议在储存样品之前加入抗氧化剂，例如抗坏血酸(0.05 mM)，或在萃取前加入盐酸羟胺（500  $\mu$ L 9.5 g/L溶液）。

## ESI离子源优化

为获得可靠的灵敏度（由在基质提取物中制备的标准品重复进样得到的峰面积及其%RSD定义），需要优化离子源设置，例如ESI毛细管凸出长度和施加的电压、脱溶剂气流速以及气体和离子源模块的温度。还需要考虑从UPLC色谱柱中洗脱分析物的流动相组成。这些参数的优化会影响溶剂液滴的形成、电荷转移以及离子形成，这些离子从ESI离子源的大气压条件转移至StepWave离子光学元件和MS分析器的高真空条件下。

在优化复杂基质样品分析灵敏度和重现性的研究中，发现两个重要的可调ESI离子源参数，分别是ESI探头位置和锥孔气流速。Xevo TQ-S cronos的离子源具有双正交几何结构，能够将离子高效传输到分析器，同时去除未电离物质（中性物质）。使用分级游标尺调整ESI探头（包括喷雾器和ESI毛细管）的可调位置（水平和垂直）可同时实现出色的信号强度和良好的精密度。被测水平位置1和2的游标尺如图2所示。

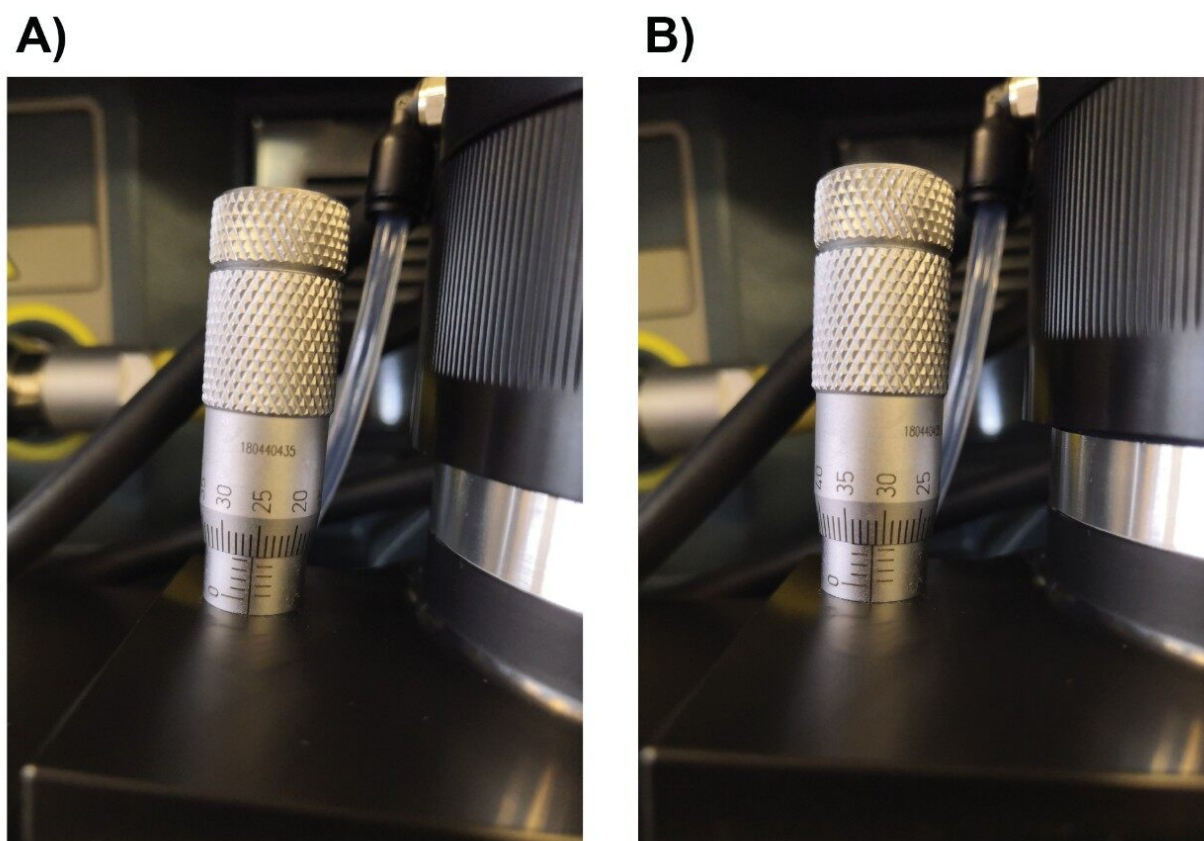


图2.用于分析虾中染料的ESI探头水平位置的游标尺设置。A)用于分析虾中染料的位置1；B)用于使隐色结晶紫获得出色信号的位置2。

本研究考察的第二个参数是锥孔气流速。该氮气流可防止大液滴进入样品锥孔口，离子从此处转移到MS分析器。减少或阻止大滴溶剂进入质谱仪可减少溶剂簇（例如[M + n (H<sub>2</sub>O) + H])的形成，从而简化所得数据的解析工作。本研究考察了探头位置和锥孔气流速对虾提取物中染料测定的信号响应和精密度的影响。

## UPLC-MS/MS条件

UPLC系统:	配备FTN样品管理器的ACQUITY UPLC I-Class PLUS
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C <sub>18</sub> 色谱柱 (1.7 μm, 2.1×100 mm, 部件号186002352)
流动相A:	5 mM甲酸铵, pH 4.5
流动相B:	0.1 %甲酸的乙腈溶液
流速:	0.25 mL/min
进样体积:	5 μL
柱温:	40 °C
样品温度:	10 °C

## 梯度

时间	流速	% A	% B	曲线
初始	0.25	60	40	初始
1	0.25	10	90	6
6	0.25	10	90	6
7	0.25	60	40	6
11	0.25	60	40	6

MS仪器: Xevo TQ-S cronos

电离模式：	电喷雾
极性：	正
毛细管电压：	0.3 kV
脱溶剂气温度：	600 °C
脱溶剂气流速：	1000 L/h
离子源温度：	150 °C
锥孔气流速：	0 L/h

被测染料适用的优化后锥孔电压和碰撞能量汇总见表1。正离子模式下最终MRM方法的MS运行时间计算已使用MassLynx软件中的自动驻留功能自动优化，其中峰宽为5 s，每个峰需要12个数据点。

化合物名称	保留时间 (min)	极性	Q (q)的MRM $m/z$	CV [V]	CE [eV]
孔雀石绿	1.89	ESI+	329.3 > 208.1 (329.3 > 313.4)	60	30 35
孔雀石绿苦味酸盐d5	1.89		334.2 > 318.2	65	32
隐色孔雀石绿	2.95		331.3 > 239.2 (331.3 > 316.4)	45	30 20
隐色孔雀石绿d5	2.93		336.3 > 239.2	35	30
结晶紫	2.12		372.3 > 251.3 (372.3 > 356.3)	100	25 30
结晶紫d6三水合物	2.11		378.2 > 362.2	65	35
隐色结晶紫	2.93		374.3 > 238.1 (374.3 > 358.2)	50	28 30
隐色结晶紫d6	2.89		380.3 > 364.3	40	30
亮绿	2.31		385.3 > 297.2 (385.3 > 341.2)	70	50 35
维多利亚蓝	2.61		478.3 > 329.2 (478.3 > 434.3)	60	35 40

表1.用于虾中三苯甲烷染料检测的优化后MRM条件

## 结果与讨论

ESI探头位置对虾提取物中一系列三苯甲烷染料的峰面积以及平均峰面积精密度的影响（进样次数n=6）如图3所示。对于考察的ESI探头的两个不同水平位置，显示了各分析物总和的归一化峰面积。尽管位置1经证明是测定虾中大多数染料的最佳设置，但发现位置2使隐色结晶紫获得了更强信号。将探头优化位置设置为位置1，评价Xevo TQ-S cronos分析虾中染料的性能，因为该位置使所有化合物均实现了低一至两倍的%RSD，同时使隐色结晶紫和隐色孔雀石绿保持良好的峰面积，从而获得出色的灵敏度，因为这两种分析物具有更低的相对响应。

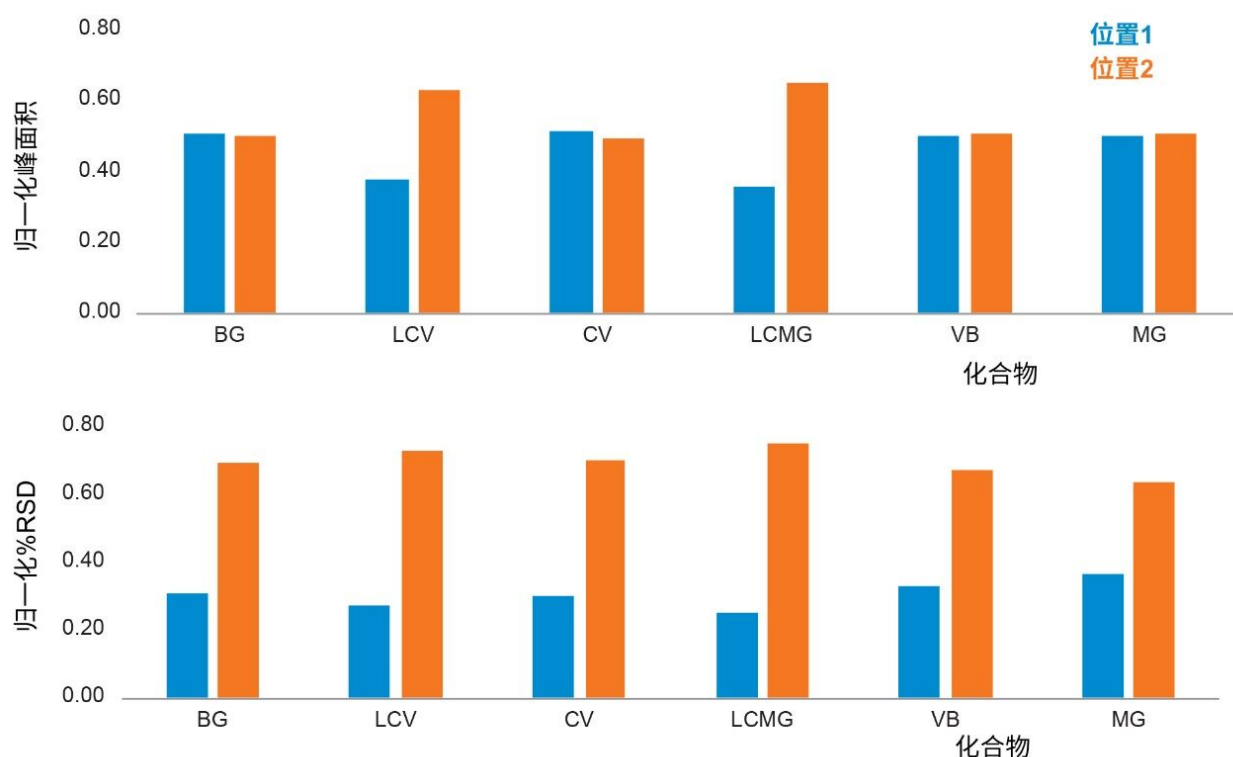


图3. ESI探头位置对Xevo TQ-S cronos测定虾提取物中0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三苯甲烷染料的灵敏度的影响

锥孔气流速对虾提取物中染料测定的精密度的影响如图4所示。结果表明，将锥孔气流速设置为0 L/h可显著改善隐色孔雀石绿和隐色结晶紫的精确度，同时使其余目标化合物保留可接受的精确度。在整个检测范围内，化合物的总体响应无显著差异。先前在Xevo TQ-S cronos上实施的实验表明，>50 L/h的锥孔气流速可能导致信号下降<sup>5</sup>。Xevo TQ-S cronos、Xevo TQ-S micro和Xevo TQD仪器的锥孔气流速设置范围为0~300 L/h。理想气体流速由采样锥孔口的直径决定：理想流速随直径的增加而增加。同时，高于实验最佳值的锥孔气流速可能导致显著的信号损失。在这种情况下，可施加更高的毛细管电压以促进气溶胶的产生及随后的离子形成，从而

恢复信号。但毛细管电压过高可能导致意外发生还原或氧化过程以及由放电效应（可以观察到毛细管发光）引起的信号强度下降。这种效应可能发生在负离子模式下约2.3 kV以上和正离子模式下3.5 kV以上的条件下，具体取决于毛细管凸出长度。通常，如果毛细管凸出较长，则在较低电压下观察放电效应。

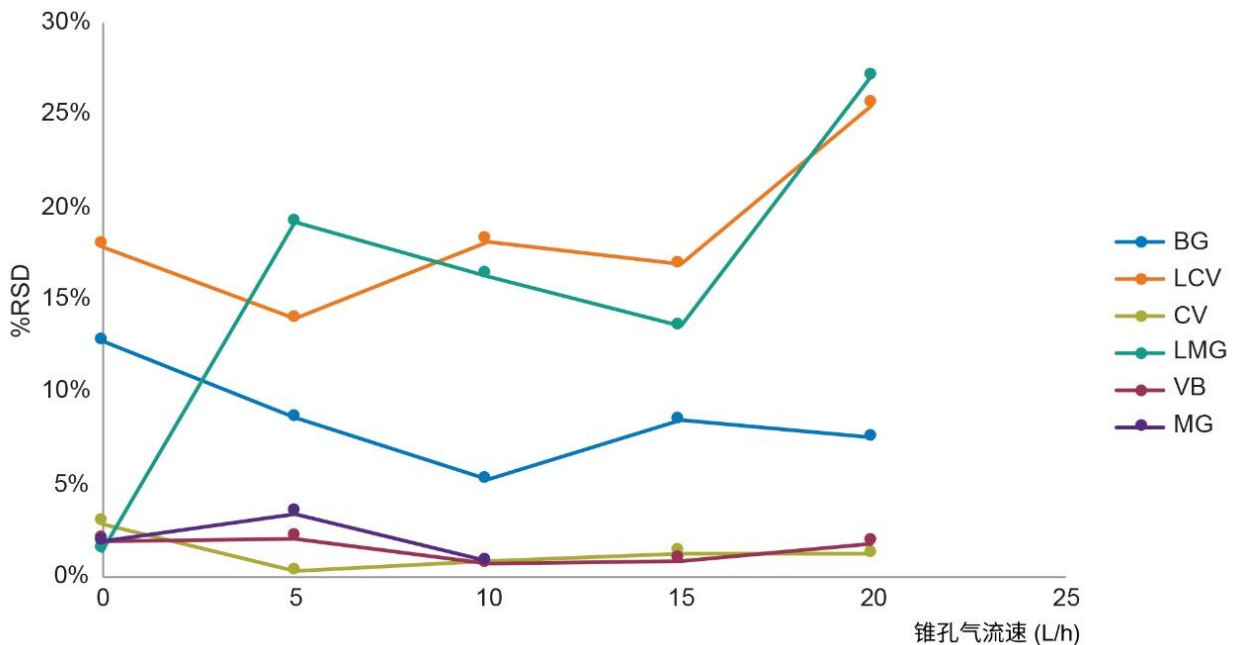


图4.使用不同锥孔气流速(L/h)得到的虾提取物中染料峰面积的%RSD (n=6)

## 线性和基质效应

为绘制校准曲线，应用了 $1/x$ 的加权因子。在整个浓度范围内评估线性，发现使用内标法时，大多数分析物的 $R^2$ 因子大于0.99，且表示计算值与真实值之间偏差的残差低于20%。

评估在MS离子源的电离过程中发生的基质效应(ME)应当是任何定量ESI-LC-MS方法验证过程中的常规步骤之一，因为这些基质效应会影响准确度和灵敏度<sup>6</sup>。虾中染料的ME用在基质中制备的校准曲线斜率与其在溶剂中的等效结果的比率表示：

$$ME = a_M/a_S$$

其中 $a_M$ 和 $a_S$ 表示基质和溶剂中校准曲线斜率的系数。计算得出的ME越接近1，表明基质效应越低。ME < 1表示信号抑制，ME > 1表示信号增强。

在常规定量LC-MS/MS中，为补偿ME，可以生成基质匹配校准曲线。另一种补偿由ME引起的响应变化的方法是使用同位素标记的类似物作为内标。如果在提取程序之前添加标记的标准品，它们将补偿回收率和ME。这样ME的程度将反映：从样品中提取分析物的过程中所发生的分析物损失，以及在ESI离子源中由共流出分子引起的电离过程中所发生的ME。ME的定量示例如图5所示，虾中染料的实测基质效应汇总表2。仅LCV表现出



显著的基质效应，因此需要使用内标或基质匹配校准曲线。

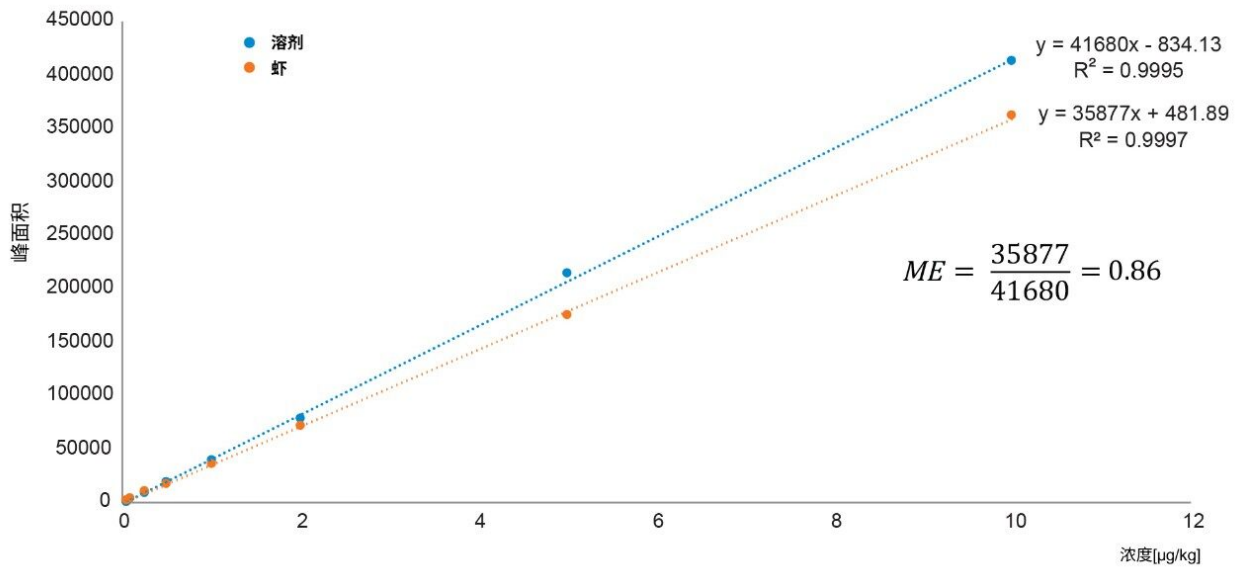


图5. 虾提取物中结晶紫的基质效应计算示例

化合物	ME
BG	0.77
LCV	10.00
CV	0.86
LCMG	0.20
VB	0.68
MG	0.91

表2. 虾提取物中目标化合物的实测基质效应

## 测量精密度和灵敏度

为研究测量的重复性，多次进样(n=10)分析虾的两种基质匹配标准品（0.5 µg/kg和5.0 µg/kg）。计算得出的染料峰面积%RSD见表3，所有分析物的典型色谱图如图6所示，表明该方法适用于检查虾中这些染料的法规依从性。

化合物	0.5 µg/kg (n = 10)	5 µg/kg (n = 10)
BG	2.1%	0.9%
LCV	6.1%	3.4%
CV	1.1%	0.5%
LCMG	2.2%	2.6%
VB	1.1%	1.8%
MG	1.8%	0.6%

表3.利用TQ-S cronos在虾提取物中检测到的染料峰面积%RSD，加标浓度为0.5 µg/kg和5 µg/kg。

## 结论

包括孔雀石绿在内的三苯甲烷染料为高毒性化合物，根据欧盟法规，需要对动物源性食品中的这些染料进行监测。调整ESI探头在Xevo TQ-S cronos离子源正交几何结构内的位置以获得最佳灵敏度(%RSD <6%)，从而检测虾提取物中RPA水平的孔雀石绿及其他目标染料。将锥孔气流速优化为设定值0 L/h，以实现合适响应与精密密度之间的完美平衡。评估基质效应，发现隐色结晶紫的基质效应显著。使用基质匹配标准品和同位素标记的内标可以减轻这些基质效应。证明该方法适用于检查海产品中这些染料的法规遵从性。

## 参考资料

1. Penninks A, et al. Scientific report on the dyes in aquaculture and reference points for action. EFSA Journal 2017;15(7):4920, 43 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4920> <  
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4920>> .
2. Commission Regulation (EU) 2019/1871. on reference points for action for non-allowed pharmacologically active substances present in food of animal origin.
3. Verdon E. et al. The Monitoring of Triphenylmethane Dyes in Aquaculture Products Through the European Union Network of Official Control Laboratories. J AOAC Int. (2015) 98(3):649–657.
4. Determination of Triphenylmethane Dyes and their Metabolites in Shrimp using QuEChERS

Extraction and the ACQUITY UPLC H-Class System with Xevo TQD.获取链接:

<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005307en.pdf> <

<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005307en.pdf>> .

5. Investigation of the Xevo TQ-S cronos System' s Robustness for the Determination of Acrylamide in Processed Potato Chips.获取链接:

<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006701en.pdf> <

<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006701en.pdf>> .

6. 关于复杂食品样品中基质效应及其测定的博客.获取链接: [https://blog.waters.com/understanding-](https://blog.waters.com/understanding-sample-complexity-determining-matrix-effects-in-complex-food-samples)

[sample-complexity-determining-matrix-effects-in-complex-food-samples](https://blog.waters.com/understanding-sample-complexity-determining-matrix-effects-in-complex-food-samples) <

<https://blog.waters.com/understanding-sample-complexity-determining-matrix-effects-in-complex-food-samples>> .

---

## 特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-S cronos三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135027354>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

720007202ZH, 2021年3月