

液相層析質譜於食品分析應用簡介

An Introduction to LC/MS in Food Analysis

詹舜安、吳帝佑、傅明仁

Shun-An Chan, Ti-Yu Wu, Ming-Ren Fuh

食品分析是保障社會大眾安全、健康的一項重要課題，一個靈敏且正確的檢測方法是食品分析成功的重要因素之一。因為食品的基質複雜，容易造成分析上的干擾，影響檢測結果，同時，食品中的殘留物或部分添加劑的濃度極低，亦造成檢測的困難。近年來，液相層析質譜儀已被廣泛地應用於各項分析檢測，本文簡單敘明食品基質對分析所造成的干擾及可能解決的方法，且介紹一些液相層析質譜儀應用於食品分析之範例：(1) 液相層析質譜檢測肉品組織中殘留磺胺劑；(2) 液相層析質譜檢測氯黴素；(3) 液相層析質譜檢測食品中胜肽與蛋白質。本文亦討論液相層析質譜檢測應用於食品分析之優點。

Food analysis is very important to the safety and health of general public. An accurate and sensitive analytical assay is essential to the success of this task. For food analysis, the complexity of sample matrix often interferes with the analysis. Furthermore, sensitivity is an important issue in the food analysis due to the minute amount of residue or additive in food. Recently, liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) has been proven to be a useful analytical tool for various applications. In this article, we briefly introduced some LC/MS applications for the food analysis: (1) LC/MS analysis of residual sulfonamides in meat, (2) LC/MS analysis of residual chloramphenicol in food stuff, (3) LC/MS analysis of protein and peptide in food. In addition, the advantages of LC/MS for the food analysis were discussed.

一、前言

近年來，世界各國對食品添加物及食品中殘留藥物的檢測都極為重視，因為對一般社會大眾而言，食物是農藥、生長性賀爾蒙、抗菌劑、抗生素等對人有害之化學物質的主要來源。這類化合物由於極性較高或受熱不穩定，如以氣相層析儀或氣相層析質譜儀分析檢測，需利用化學衍生法改變待測物之化學性質，加強其熱穩定度，此步驟不但增

加實驗方法之困難度，同時也增加實驗所需之費用和時間。液相層析儀為檢測此類化合物之較好方法，但液相層析常用之可見光／紫外光檢測器因靈敏度不足，無法達到法規之偵測極限；螢光檢測器之靈敏度較好，但並非所有的分析物質皆有發螢光之特性，故需以螢光衍生反應，將分析物衍生成為螢光物方能進行檢測分析，因而增加檢測方法之困難度。且一般食品的基質複雜，其中有許多物質容

液相層析可見光／紫外檢測之缺點	質譜儀可提供之改進
冗長的樣品前處步驟。	各化合物不同的特殊離子進行另一層次的分離，故可減少對樣品前處理的依賴。
靈敏度差。	檢測極限低 (~pg)，可以提升靈敏度
因明確性不足常造成錯誤檢測結果。	化合物具其特殊之質譜圖譜和離子資訊，可用於檢測物之確認，提升檢測結果正確性。

表 1.
液相層析可見光／紫外光 (LC-UV/Vis) 檢測之缺點及質譜儀 (MS) 可提供之改進。

易造成干擾，進而影響分析結果之正確性，因此必須利用各式樣品前處理方法將可能干擾物質去除，同時純化、濃縮待測物以減低樣品基質的影響。但如樣品基質複雜或分析物與基質成份化性相近，則這些樣品前處理方法仍無法完全解決基質干擾，而產生共流出 (co-elution) 的問題，所以只利用滯留時間判定分析結果，其檢測之正確性不足，容易造成誤判，因此需要其他分析方法做為液相層析檢測結果之確認。液相層析檢測常見之缺點整理於表 1。

液相層析質譜儀的發展對食品分析有重大的影響，因其有極佳的檢測極限，可提升檢測方法的靈敏度，使食品檢測更為落實，增強對社會大眾的保障。同時，各化合物皆有其特殊之質譜圖及特徵離子，使質譜之檢測結果更具選擇性和正確性。此外，質譜儀本身亦是一個具有分離不同質荷比 (m/z) 離子能力的設備，所以我們可利用質譜儀對共流出物中各化合物不同的特殊離子進行另一層次的分離，以達成分析複雜樣品的目的，進而減少對繁瑣之樣品前處理的依賴。質譜儀對液相層析儀之輔助功能請參見表 1。近年來液相層析質譜儀發展快速，已成為分析檢測各種化合物之一重要儀器設備，廣泛地應用於食品分析、藥物檢測、環境分析、生物分析等領域。本論文僅簡述幾個液相層析質譜儀應用於食品分析之範例，使讀者了解利用液相層析質譜儀於各項食品分析之能力和優點。

二、液相層析質譜儀簡介

1. 電灑游離法與大氣壓力游離法

液相層析質譜儀目前常使用的離子源為電灑游離法 (electrospray ionization, ESI) 及大氣壓力游離法 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) 兩種⁽¹⁾。電灑游離法廣泛應用於較高極性與離子性之分析物，過程中液態分析物流入加高電壓的毛細管中，當分析液在出口端形成液滴時，造成電荷在液滴表面累積，形成不穩定之液滴，並向低電場拉出而造成電灑效應，形成霧狀液珠，帶電液滴受「去溶劑效應」影響而分裂形成離子進入質譜儀中。大氣壓力游離法一般則使用於較低極性與不易離子化之分析物，游離過程和電灑游離法的主要不同是在出口端利用電子探針高壓放電，使分析物帶電進入質譜儀中分析。電灑游離法與大氣壓力游離法於應用上之差異見表 2。

2. 四極柱質譜儀與離子阱質譜儀

質量分析器為質譜儀之主要部分，目前常使用在液相層析質譜儀中的為四極柱 (quadrupole analyzer)、離子阱 (ion-trap analyzer)、飛行時間 (time of flight analyzer) 和場磁場 (magnetic sector) 等數種⁽²⁻³⁾，其中以四極柱和離子阱最為常見，謹此做一簡單說明。四極柱質量分析器原理，主要是利用四支金屬棒間動態電場來改變四極柱的射頻電

電灑游離法	大氣壓力游離法
分析質量範圍大，從小分子到蛋白質體分析。	分析質量較小，一般應用於中、小分子量之分析。
移動相流速小於 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。	移動相流速可達 1.0 mL/min 。
易產生基質效應，影響分析物游離效率，造成分析不準確性。	基質效應影響小。

表 2.
電灑游離法與大氣壓力游離法之比較。

表 3.

四極柱質譜儀與離子阱質譜儀之比較。

四極柱質譜儀	離子阱質譜儀
空間式質譜儀	時間式質譜儀
全離子掃描靈敏度差	全離子掃描靈敏度佳
選擇離子或選擇反應離子掃描靈敏度佳	選擇離子或選擇反應離子掃描靈敏度差
受空間限制，無法具備多段質量器	具備多段質量器之功能

場，使其擁有過濾質量的效果；當離子經過電壓加速進入四極柱中，利用連接四極柱之射頻交流電位交互變化，再配合直流電位，可使四極柱質譜儀進行質量掃描分析。離子阱質量分析器主要由一個環電極 (ring electrode) 加上兩個端蓋電極 (endcap electrode) 所組成，當離子藉由直流偏向電壓將離子拉進質量分析器中，再利用不同交流電壓加在環電極及端蓋電極達成捕捉、斷裂、釋放不同質荷比之離子進行分析。此二種質量分析器之比較整理於表 3。

3. 一次、二次與多次質譜分析法

一次質譜分析 (MS) 主要為全離子掃描 (full scan) 和選擇離子偵測 (select-ion monitoring, SIM) 兩種檢測方式。目前新款質譜儀在前端設計離子源斷裂功能 (source fragmentation)，利用質譜儀毛細管加速電壓差異碰撞產生分析物離子特徵斷片，而對分析物結構作確認。但當分析樣品基質更複雜或一次質譜靈敏度不足，造成分析準確性與質量專一性不足時，發展二次質譜分析法 (MS²) 利用誘導碰撞解離 (collision-induced dissociation, CID) 和不同掃描方式：母離子掃描 (parent scan)、子離子掃描 (daughter scan) 及中性丟失掃描 (neutral loss) 相互配合使用，可提高靈敏度與質量專一性結果。利用這三種掃描方式可以降低基質干擾的問題，並於分析物鑑定上可提供更多質譜斷片資料。由於近年來儀器發展上的進步，離子阱質譜儀能在有限的空間下，提供多次質譜分析 (MSⁿ)，使分析物經過多次撞擊後，得到更多子離子特徵斷片結果，可提高檢測之正確度；同時在定量分析時，亦可降低背景雜訊，提高「訊號／雜訊比」(signal-to-noise ratio) 而提升檢測方法之靈敏度。

三、樣品前處理簡介

由於肉品、動物組織、牛奶等食品檢測殘留藥劑含量低，容易受到樣品複雜基質干擾；這些基質含有大量的脂質，必須去除，否則會影響液相層析滯留時間、質譜儀離子化效率和定量分析結果。所以，於食品檢測時會先以各種樣品前處理方法，進行待測物純化和濃縮，一般常用之前處理方法有：液-液相萃取法 (liquid-liquid extraction, LLE)⁽⁴⁾、固相萃取法 (solid-phase extraction, SPE)⁽⁵⁾ 及基質固相分散萃取法 (matrix solid-phase dispersion, MSPD)⁽⁶⁻⁷⁾。

液-液相萃取早期常用於檢測複雜基質的樣品，其原理係利用待測物與萃取溶液極性相近而溶解之性質，將待測物從複雜基質中萃取出來。此方法操作容易，但其缺點為所需使用的樣品量多、有機溶劑用量大、萃取時間長及無法高倍數濃縮等，故漸漸地被其他方法取代。固相萃取方法即可彌補液-液相萃取的缺點，因其使用方便、有效地去除基質干擾，並以少量樣品即可進行前處理，是目前食品檢測最常使用的方法。固相萃取法主要先利用待測物與固相萃取管中之靜相材質 (如 C18、C8、alumina-N 等) 相互作用，再以不同極性清洗液去除雜質，最後利用低極性有機溶劑 (如甲醇、乙晴等) 沖提待測物並回收、濃縮。近來有文獻報導，利用基質固相分散萃取方法，將欲處理之樣品與適當吸附物質 (如 C18、C8、silica、alumina、diatomaceous earth 等) 混合，再以溫水當作萃取液進行處理。此方法之最大優點是完全不使用有機溶劑，降低環境污染與成本，適合食品工業上大量使用。

有效的樣品前處理方法可減少複雜基質的干擾，並可純化和濃縮待測物，對後續液相層析質譜分析有極大的幫助，是食品檢測不可缺少的步驟。

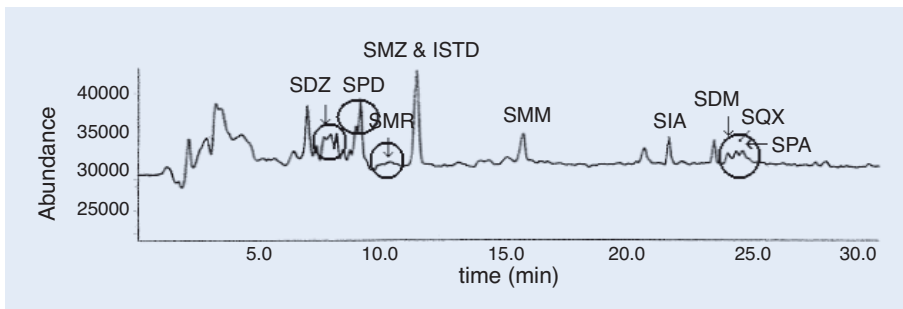


圖 1. 添加九種磺胺劑的肉品之液相層析質譜層析圖。

四、液相層析質譜儀檢測肉品組織中殘留磺胺劑

磺胺劑為一般家禽或家畜之抗生素，此類藥物會隨肉品進入人體，經新陳代謝產生具毒性的衍生物，會形成癌症誘導物質，造成傷害。目前歐洲聯盟 (European Union) 與美國食品藥物管理局 (US Food and Drug Administration) 已明文規定在肉品組織中含量不得高於 100 ng/g。磺胺劑之檢測已有氣相層析質譜儀、液相層析儀/UV-Vis 和毛細管電泳儀等分析方法，但這些方法的靈敏度與正確性不佳，無法應用於肉品組織中殘留磺胺劑之檢測。以下將簡述液相層析質譜儀檢測肉品中殘留磺胺劑之應用。

雖然樣品前處理方法可以去除大部分的干擾物質，但由於磺胺劑之極性與部分基質物質相近造成共流出現象，進而影響液相層析滯留時間的判定。液相層析質譜儀具有可同時鑑定不同磺胺劑之特徵離子的功能，所以共流出之不同化合物，可依其不同之特徵離子檢測分析，免除共流出之干擾問題，提高分析實驗之靈敏度與正確性。圖 1 為添加磺胺劑 (100 ng/g) 之豬肉樣品萃取液之液相層析質譜重組離子層析圖 (re-constructed ion chromatogram)，其中 SDZ (sulfadiazine)、SPD (sulfapyridine) 和 SMR (sulfamerazine) 都受樣品基質干擾，因此無法明確地鑑定，但可依據 SDZ (m/z : 251)，SPD (m/z : 250) 和 SMR (m/z : 265) 之特徵離子，利用萃取離子層析圖進行定性檢測和定量分析。圖 2 為 SDZ、SPD 和 SMR 的萃取離子層析圖，因為基質干擾物質沒有這些特徵離子，所以可明確地檢定此三種磺胺劑，解決基質干擾的問題。由圖 1 的層析結果得

知，SDM (sulfadimethoxine)、SQX (sulfamonomethoxine) 和 SPA (sulfaphenazole) 三種磺胺劑因極性相近，無法以液相層析法完全分離，造成檢測問題，但我們亦可利用各化合物之特徵離子萃取層析圖 (如圖 3) 達成檢測分析的目的。利用選擇離子偵測的另一優點為偵測極限低 (約 5–15 ng/g)^(4,7)；如果利用二次或多次質譜檢測更可達到 1–5 ng/g 之檢測極限⁽⁶⁾。由此例可知，質譜儀可有效地利用每一化合物皆有其特殊質譜圖和特徵離子，降低基質干擾並提升檢測靈敏度和正確性。

五、液相層析質譜儀檢測氯黴素

氯黴素 (chloramphenicol, CAP) 為一抗菌劑，廣泛地使用於預防或治療家畜與水產養殖物。相關研究證實當人食用後會造成體內殘留與代謝反應，影響人體之健康⁽⁸⁾。歐洲聯盟於 2001 年訂定在肉

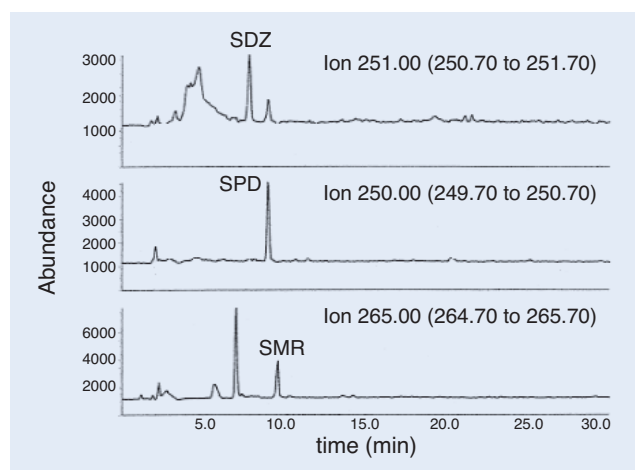


圖 2. 液相層析質譜萃取離子層析圖。

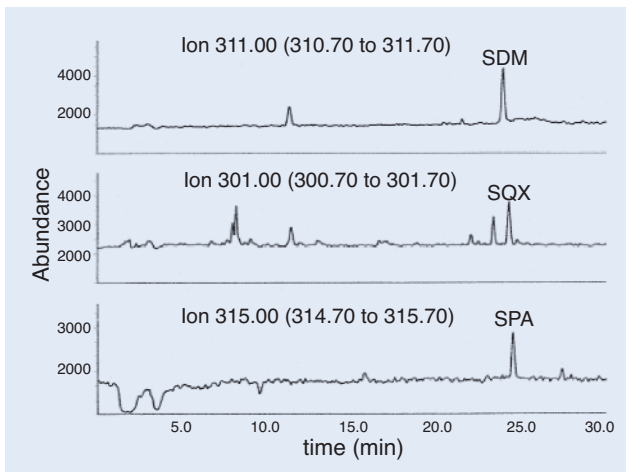


圖 3. 液相層析質譜萃取離子層析圖。

品組織及食品中氯黴素含量須低於 2.0 ng/g，為達到此規定標準，各種檢測方法一一產生，如液相層析、氣相層析、酵素連結免疫分析 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 及免疫放射分析 (radioimmunoassay)。這些方法的檢測靈敏度佳，但無法正確鑑定結構，容易造成誤判，因此需要其他分析方法確認之。由於質譜儀的發展，目前檢測氯黴素含量主要是利用氣相層析質譜和液相層析質譜，不僅可以達到偵測極限標準更可對氯黴素特定離子進行定性與定量分析，以下將對此兩種方法作簡單說明。

氯黴素本身受熱易分解，因此必須利用化學衍

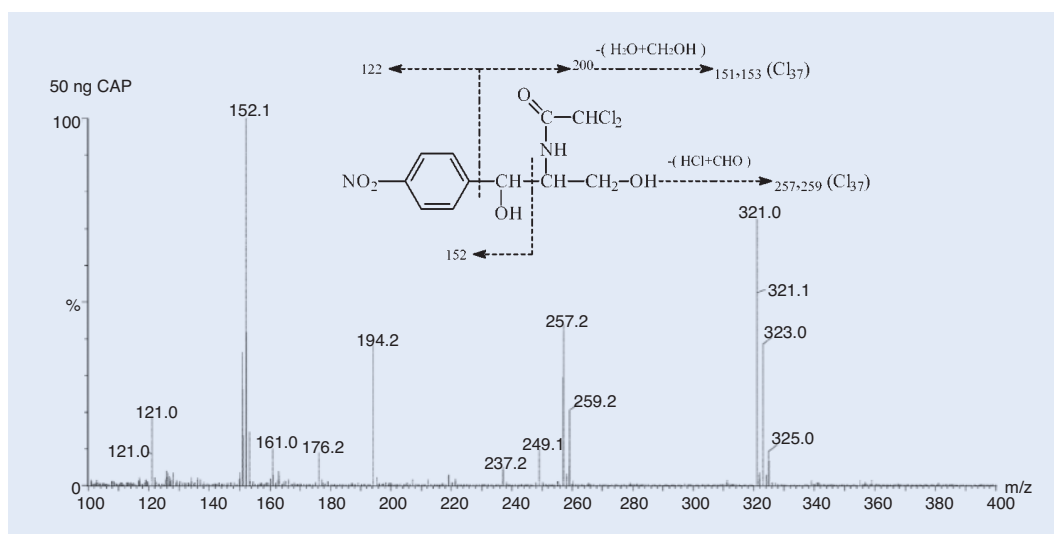
生法，加強其熱穩定性，以利氣相層析質譜檢測。雖然利用衍生反應和 GC/MS 檢測氯黴素之方法相當靈敏 (檢測極限約為 2.0 ng/g)，但因衍生反應複雜且繁瑣，增加檢測之時間和成本，故近來已漸漸被液相層析質譜檢測取代^(9,10)。圖 4 為氯黴素之電灑質譜圖，其中 m/z 為 121、152、194 及 257 者皆為氯黴素之特徵斷裂離子，由此可知，電灑游離雖為軟性游離法，但仍可利用誘導碰撞和加速電壓之改變得其結構訊息，提高檢測之正確性。利用液相層析質譜檢測食品中氯黴素，不但免除衍生反應之步驟，更大大地降低檢測極限 (0.02 ng/g)^(10,11)。

六、液相層析質譜檢測食品中胜肽與蛋白質

蛋白質 (protein) 為人類所需之重要營養物質之一，食物中蛋白質種類極多，而不同的蛋白質所發揮的功能也不一樣，故食物中蛋白質的研究一直是重要的課題。胜肽 (peptide) 則是蛋白質組成架構中的一部分。研究食物蛋白質以及胜肽時，最重要的是建立這些化合物結構與其功能的關係，所以目前的相關研究都以此為目標。

液相層析質譜儀是食物蛋白質分析的重要工具之一，由於電灑的過程中能使分析物帶多電荷 (multiple charge)，因此可分析如蛋白質之大分子。已有文獻報導，以液相層析質譜測定食品中的胜肽

圖 4. 氯黴素電灑質譜圖。



和蛋白質，應用於食品開發和成分檢測⁽¹²⁾，分析牛乳消毒的過程中胜肽含量的變化⁽¹³⁾以及檢測羊乳中所蛋白質的含量⁽¹⁴⁾。

七、結論

由前述的幾個範例，可知利用液相層析質譜於食品分析之優點包括：(1) 直接檢測容易受熱分解的化合物，無須經衍生化反應之複雜程序；(2) 質譜儀之靈敏度較其他偵測器佳，故降低分析方法的檢測極限；(3) 利用各化合物的特徵離子偵測，達到避免基質干擾和解決共流出物偵測的問題；(4) 可檢測如蛋白質等大分子。液相層析質譜已漸漸地成為食品分析檢測的主要工具，將使食品分析更簡單、精確。

參考文獻

1. E. Rosenberg, *J. Chromatogr. A*, **1000**, 841 (2003).
2. D. A. Skoog and J. J. Leary, *Principles of Instrumental Analysis*, 4th ed., Permissions Department, Harcourt Brace & Company, Orlando, Florida (1992).
3. R. B. Cole, *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, Inc., New York (1997).
4. M. R. Fuh and S.A. Chan, *Talanta*, **55**, 1127 (2001).
5. D. H. Kim and D.W. Lee, *J. Chromatogr. A*, **984**, 153 (2003).
6. S. Bogialli, R. Curini, A. Di Corcia, M. Nazzari, and M. Sergi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 1146 (2003).
7. S. Bogialli, R. Curini, A. Di Corcia, M. Nazzari, and R. Samperi, *Anal. Chem.*, **75**, 1798 (2003).
8. E. H. Allen, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 990 (1985).
9. T. L. Li, Y. J. Chung-Wang, and Y. C. Shih, *J. Food Sci.*, **67** (1), 21 (2002).
10. A. Gantverg, I. Shishani, and M. Hoffman, *Anal. Chim. Acta*, **483**, 125 (2003).
11. M. Ramos, P. Munoz, A. Aranda, I. Rodeiguez, R. Diaz, and J. Blanca, *J. Chromatogr. B*, **791**, 31 (2003).
12. S. Sforza *et al.*, *Food Chemistry*, **75**, 267 (2001).
13. F. Gaucheron *et al.*, *Int. Dairy J.*, **9**, 515 (1999).
14. A.-J. Trujillo, I. Casals, and B. Guamis, *J. Chromatogr. A*, **870**, 371 (2000).

-
- 詹舜安先生為東吳大學化學碩士，目前服務於台北榮總教學研究部。
 - 吳帝佑先生為東吳大學化學系碩士班學生。
 - 傅明仁先生為美國西雅圖華盛頓大學分析化學博士，現任東吳大學化學系教授。
 - Shun-An Chan received his M.S. in analytical chemistry from Soochow University. He is currently a staff in the Department of Medical Research and Education at Veterans General Hospital Taipei.
 - Ti-Yu Wu is a M.S. student in the Department of Chemistry at Soochow University.
 - Ming-Ren Fuh received his Ph.D. in analytical chemistry from the University of Washington-Seattle, Washington, USA. He is currently a professor in the Department of Chemistry at Soochow University.