

用串联质谱分析法进行实验室玻璃器皿清洗机清洗效率试验

Katrin Georgi化学硕士
Karl-Siegfried Boos教授
慕尼黑Großhadern医科大学
临床化学研究所
慕尼黑 81366

引言

如今，任何一家高效率的分析实验室都必须使用成熟可靠的分析方法，必须满足所用各种方法和仪器的质量控制要求，包括各种结果与所用程序的重复性要求。不论是为了满足法律规定还是为了提高产品及工艺质量，都需要有先进的分析方法。在这些先进分析方法中，需要使用能够检测到试样中微量污染物的高灵敏度传感器。

因此必须确保分析中使用的玻璃器皿不会成为污染源，否则可能会干扰对分析物的检测。另外还有必要测试清洗程序对具体应用的适用性。我们的研究所使用实验室玻璃器皿清洗机G 7883 CD (Miele, Gütersloh)来清洗实验室玻璃器皿。该型号清洗机配备电子控制功能，用于修改和调整各种可用标准程序，从而能够为各种实际应用提供灵活的清洗解决方案。该设备是一种洁净水系统，即在各程序阶段使用洁净冷水、热自来水或完全软化水。根据具体情况，清洗用水需要加热或添加化学制剂，持续一段时间之后再清洗液泵出。清洗物上及清洗液中污染物的减少程度主要取决于各冲洗或清洗阶段末期清洗液的排空程度以及被带入下一清洗阶段的残余水或清洗液的多少。

将实验室玻璃器皿再度用于痕量分析时，需要测试以下相对简单程序序列的清洗效率：首先用冷水预冲洗1分钟，排出冷水且重新注入热水后，将水温加热至40°C，同时自动添加4%(v/v)的碱性液态清洁剂Neodisher FA (Dr. Weigert, Hamburg)；随后将清洗液加热至60°C并保持5分钟；接着排出清洗液并重新注入含0.1%(v/v)中和剂Neodisher Z的热水，持续2分钟之后再次排出清洗液；然后用热水进一步冲洗并保持1分钟；此后便是最终冲洗阶段，方法是使用纯净水加热至80°C并保持3分钟。最终排水结束后，通过清洗设备上集成的风扇使用经过HEPA(高效微粒空气)过滤器过滤的热空气进行干燥。

为了研究玻璃器皿清洗设备的清洗效率，本文选用了两种物理化学特性显著不同的试验物质：Everolimus(依维莫司)(图1a)具有明显的疏水性但无极性，而Ribavirin(利巴韦林)(图1b)则具有很强的极性和亲水性。因此这两种试验物质可代表MS中各种可能的分析物。

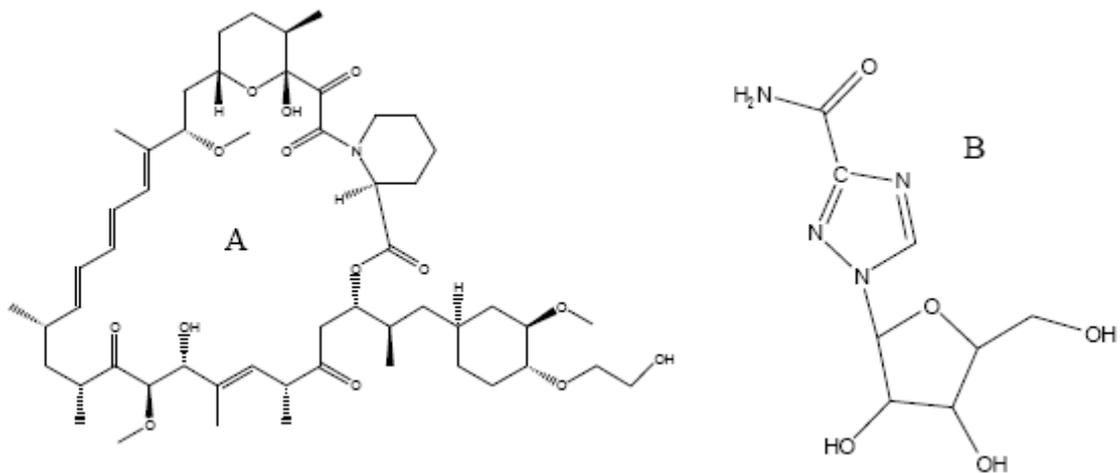


图1: a) Everolimus(依维莫司)

b) Ribavirin(利巴韦林)

试样制备

为了检测清洗效率，将装有两种试验物质溶液(依维莫司130微克/毫升，利巴韦林100微克/毫升)的两个10毫升烧瓶(Brand)清空并用上述程序进行清洗。

清洗过程结束后，向每个烧瓶中添加4毫升甲醇并晃动1分钟；然后从每个烧瓶中取样500微升以检测烧瓶中是否存在试验溶液或清洁剂的痕量；15分钟后再次从烧瓶中取样，该试样主要用于检测能否从烧瓶壁上提取试验溶液或清洁剂的痕量。

质谱分析

质谱测量使用Micromass(曼彻斯特)生产的Quattro MicroTM Triple-Quadrupole质谱仪进行。

首先对试样进行全面扫描。用一个注射泵(10微升/分钟)将试样注入质谱仪，扫描所有离子并在100 - 1500m/z区域内绘图。此时使用如下技术参数：毛细管电压3.2千伏，进样锥电压20伏，源温度120°C，脱溶剂温度150°C，脱溶剂气流500升/小时。

图2a所示为甲醇提取试样的扫描质谱，仅在低分子量区域(100 - 300m/z)内检测到确定信号。通过与HPLC-纯甲醇提取试样的扫描质谱(图2b)比较可以发现，大部分信号并非由甲醇产生。因此提取试样中必定含有某些未知的低分子量化合物。这些化合物很可能既不是清洁剂痕量(磷酸盐、硅酸盐)，也不是中和剂痕量(柠檬酸)。这些信号可能由清洗程序所用自来水或纯净水中含有的、不在我们关心检测范围内的物质产生。但是没有检测到试验物质依维莫司或利巴韦林的信号。

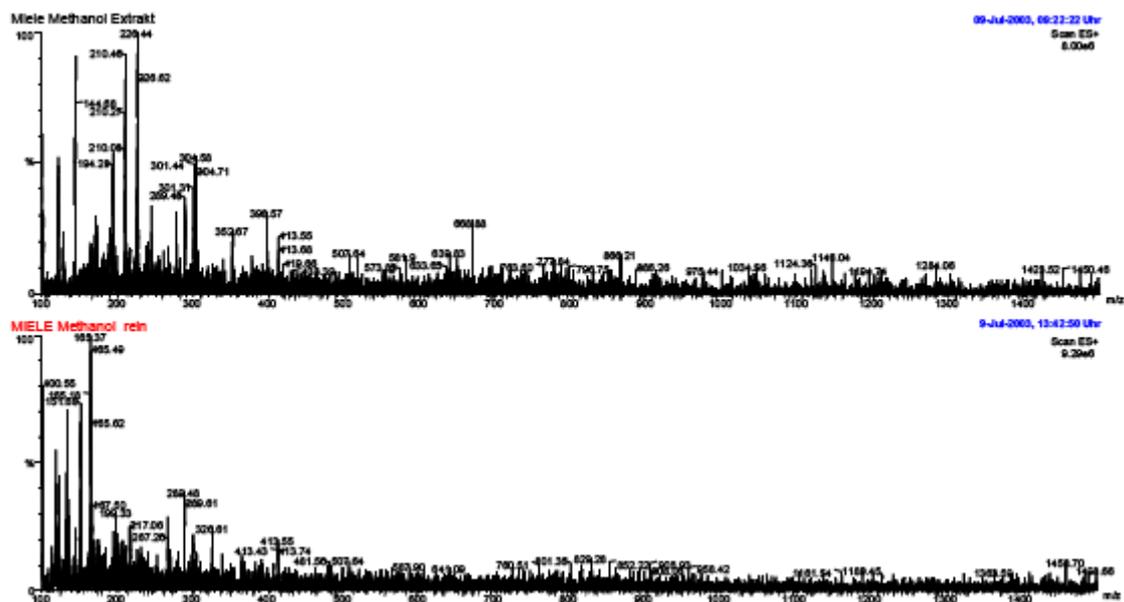


图2 A)甲醇提取试样质谱和B)HPLC-纯甲醇质谱

多反应监测(MRM)实验

全面扫描质谱只能大致反应玻璃容器清洗的干净程度(分子量在100 - 1500m/z范围内), 全面扫描模式的灵敏度不足以准确判断玻璃容器中是否存在试验物质痕量, 因此需要对试验物质进行MRM实验。

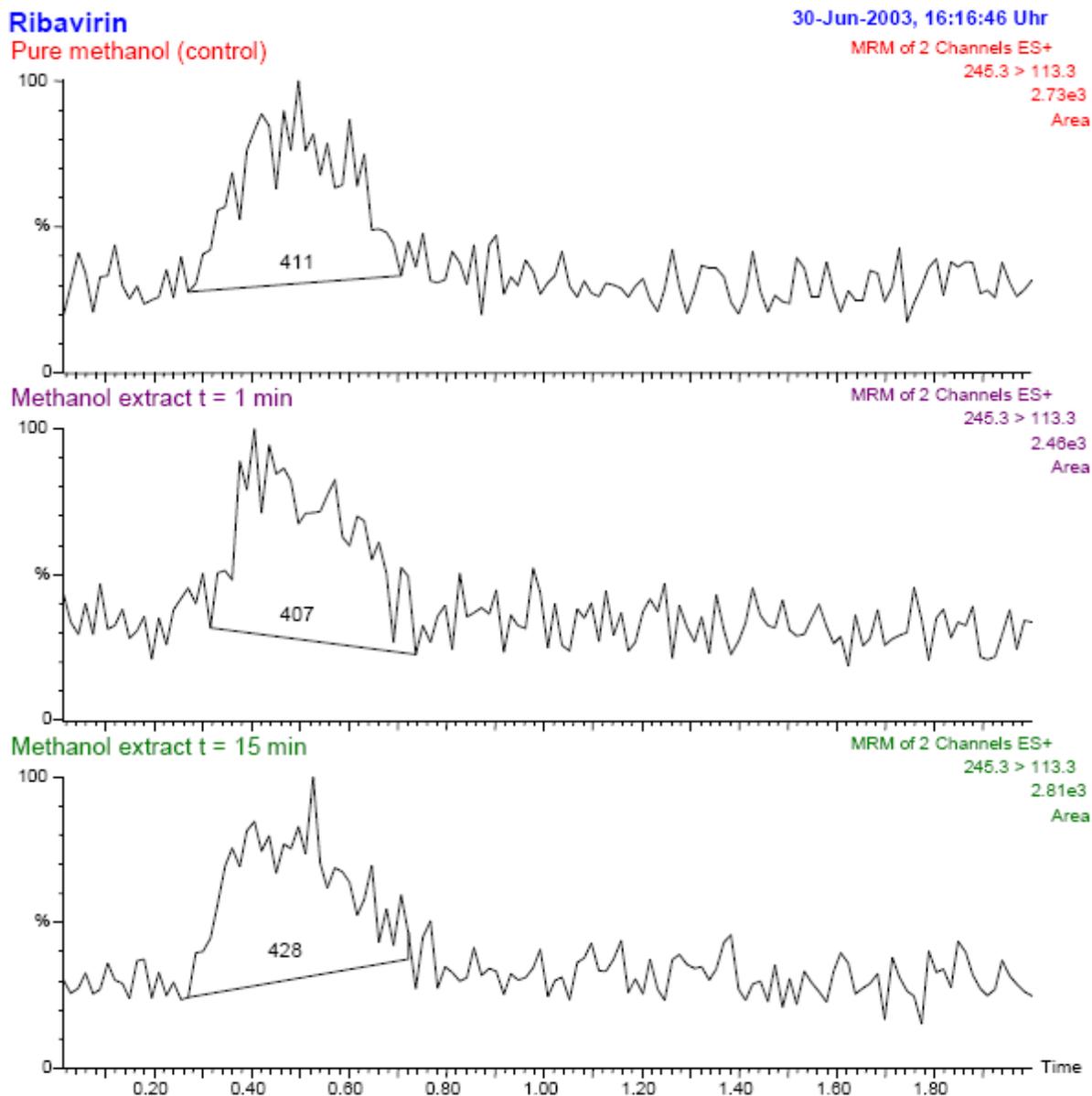
每种物质只检测到具体的一种质量变化(原质量碎片离子), 观测到的MRM变化以及使用的MS参数如表1所示。

表1: MRM实验的MS条件

	依维莫司	利巴韦林
原离子(m/z)	976	245
碎片离子(m/z)	908.5	113
碰撞电压(kV)	3.20	3.20
进样锥电压(V)	20	15
源温度(°C)	120	120
脱溶剂温度(°C)	220	220
脱溶剂气流(L/Hr)	700	700
停留时间(s)	0.4	0.4

进行MRM实验时, 将20微升试样注入0.2毫升/分钟的甲醇/2mM乙酸铵(90/10; v/v)洗出液流中。除试样之外, 还将HPLC-纯甲醇作为控制基准进行分析。

图3所示为得到的利巴韦林质量痕量分析色谱图。

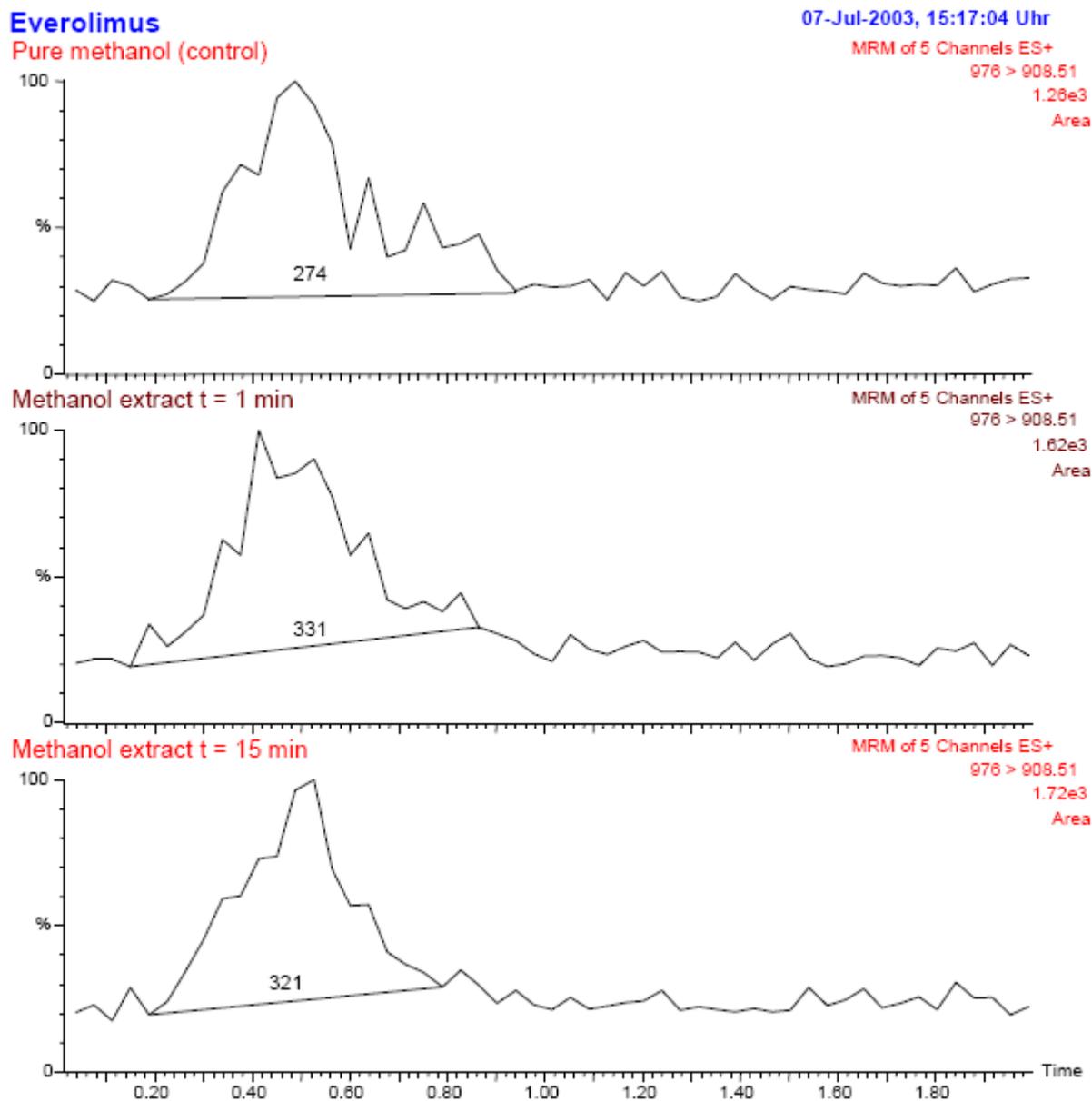


Ribavirin利巴韦林 Pure methanol(control)纯甲醇(控制基准) Methanol extract甲醇提取试样

图3: 利巴韦林色谱图a)纯甲醇; b)甲醇提取试样t=1分钟; c)甲醇提取试样t=15分钟

将第1次甲醇提取试样质量痕量与纯甲醇质量痕量(控制基准)比较, 发现两个信号之间并无显著区别, 第2次甲醇提取试样(15分钟后)的信号强度与另外两个信号也没有什么不同, 因此我们可以认为 G 7833 CD清洗程序已经将烧瓶中的所有利巴韦林清洗干净。

图4所示为得到的依维莫司质量痕量分析色谱图。



Everolimus依维莫司 Pure methanol(control)纯甲醇(控制基准) Methanol extract甲醇提取试样

图4: 依维莫司色谱图a)纯甲醇; b)甲醇提取试样t=1分钟; c)甲醇提取试样t=15分钟

对于试验物质依维莫司，两次甲醇提取试样与纯甲醇的信号区域略有区别。为确定这种区别的半定量关系，将甲醇与已知数量的依维莫司混合并进行分析，得到的区域如表2所列。

表2: 信号区域比较

试样	信号区域
纯甲醇	274
甲醇提取试样t=0分钟	331
依维莫司1.3ng/ml	1746
依维莫司13 ng/ml	19535

用纯甲醇(控制基准)质量痕量和两次甲醇提取试样质量痕量的信号区域可以绘制一条标定线($y = 1497 x + 49.445$)。

根据信号区域差计算得到的试验物质回收量为0.021pmol，该数值表明量瓶中试验溶液残留量为0.000002%。

这表明通过清空以及实验室玻璃器皿清洗机的清洗，玻璃烧瓶中试验溶液能够得到有效清除。因此对分析物进行质谱分析时可以使用实验室玻璃器皿自动清洗，并且可以得到具有重复性的分析结果。