

固相萃取-超高效液相色谱三重四级杆质谱联用法测定水中的氯霉素

尹燕敏, 顾海东, 秦宏兵

(苏州市环境监测中心站, 江苏 苏州 215004)

摘要: 建立了固相萃取-超高效液相色谱三重四级杆质谱联用法同时测定水中痕量的氯霉素残留, 该方法采用电喷雾电离源、多重反应监测负离子模式在5 min内完成对氯霉素的分析, 方法检出限为0.2 ng/L, 空白样品和实际样品的加标回收率为76.2%~104%, 该方法具有操作简便, 灵敏度高, 重现性好的特点。

关键词: 氯霉素; 液质联用; 固相萃取

中图分类号: X832

文献标识码: B

文章编号: 1674-6732(2013)-05-0026-03

Determination of Chloramphenicol in Water Samples by Solid Phase Extraction-Ultra Performance Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry

YIN Yan-min, GU Hai-dong, QIN Hong-bing

(Suzhou Environmental Monitoring Central Station, Suzhou, Jiangsu 215004, China)

ABSTRACT: A rapid analytical method for chloramphenicol (CAP) in water samples was developed. Water samples were purified and concentrated by solid phase extraction (SPE) then detected by ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The method used electrospray ionization, multiple reactions monitoring in negative ion mode to analyze CAP residue qualitatively and quantitatively. The analysis of CAP products can be finished in 5 minutes. The limit of determination of this method was 0.2 ng/L. The average recovery rate of real samples was in the range of 76.2%~104%. This method was simple, sensitive and good repeatability.

KEY WORDS: chloramphenicol; UPLC-MS/MS; SPE

氯霉素(chloramphenicol, CAP)是广谱抗生素, 常用于预防与治疗动物疾病^[1]。但氯霉素有严重的副作用, 它能抑制人体骨髓造血功能而引起再生障碍性贫血症和粒状白细胞缺乏症等疾病^[2]。氯霉素使用对人类健康潜在的危害已引起国际组织和世界上许多国家和地区的高度重视。欧盟、美国等均在食品法规中规定CAP残留限量标准为“零容忍量”(Zero tolerance), 即不得检出^[3]。

氯霉素残留的检测方法主要有酶联免疫法(ELISA)、气相色谱法(GC)、液相色谱法(LC)、气相色谱-质谱法(GC/MS)、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)^[4-9]。ELISA在定性、定量的准确性方面有一定的局限性; GC和GC/MS需要衍生, 操作繁琐且存在检出限难以达到要求、背景干扰较大或样品净化不完全以及衍生化难等问题; 高效液相色谱(HPLC)分析较准确且过程相对较简便, 因

而应用较多。LC-MS/MS由于具有特异性强和灵敏度高的特点且抗干扰能力强, 前处理简单, 已被越来越多用于氯霉素残留的分析^[10,11]。

笔者采用了固相萃取-超高效液相色谱三重四级杆质谱联用法测定水中痕量的氯霉素, 优化了前处理条件和分离检测条件, 并应用于实际水样的分析, 该方法具有操作简单、试剂少、分离速度快、灵敏度高、定量准确、线性范围宽等优点。

1 实验部分

1.1 仪器

超高效液相色谱三重四级杆质谱联用仪

收稿日期: 2012-10-18; 修订日期: 2013-04-25

基金项目: 江苏省环境监测基金(1006)。

作者简介: 尹燕敏(1981—), 女, 工程师, 硕士, 从事有机分析工作。

(UPLC-XEVO-TQMS): 美国 waters 公司。色谱柱: UPLC BEH C18, 1.7 μm , 21 $\times$ 50 mm。全自动固相萃取仪 6 位 Caliper Autotrace SPE。氮吹仪 EYELA MG-2200。

1.2 试剂

乙腈(Merck, 色谱纯); 甲醇(Merck, 色谱纯); 甲酸(Tedia, 色谱纯); 氢氧化钠(国药集团化学试剂有限公司, 优级纯); 色谱标准物质氯霉素购于 Dr. Ehrenstorfer GmbH。

1.3 分析

1.3.1 仪器条件

由于氯霉素在水中溶解性较差, 易溶于甲醇、乙腈等有机溶剂。该方法直接采用水-甲醇为流动相, 利用梯度洗脱的方法缩短分离时间, 提高分离效果。

色谱条件: 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 2 μL , 流动相由水和甲醇组成, 梯度洗脱条件见表 1, 流速为 0.4 mL/min。

表 1 氯霉素的梯度洗脱程序

时间/min	A(水)/%	B(甲醇)/%
0	90	10
1.5	75	25
3.0	60	40
3.2	90	10

氯霉素类化合物因含有酚羟基而适合在 ESI 源的负离子模式下离子化, 产生的母离子为 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 。

质谱条件: 负离子电喷雾离子源(ESI $^{-}$), 采用多反应监测(MRM)模式。去溶剂气为氮气, 流速 1 000 mL/h 碰撞气为氩气, 流速为 0.15 mL/min。将 1 $\mu\text{g/L}$ 的氯霉素标准溶液通过 Infusion 方式直接引入三重四级杆质谱, 利用 Masslynx 软件 Intel-listart 功能自动选择子离子和优化锥孔电压、碰撞能量等参数。相关质谱条件见表 2。采样上述色谱及质谱条件后氯霉素标样的总离子流见图 1。

表 2 氯霉素的质谱条件

Parent($\text{M}-\text{H}^{-}$)/(m/z)	Daughter/(m/z)	Dwell time/s	Cone/V	Collision energy/V
321.2	152.0	0.1	26	18
194.1	0.1	26	12	
257.2	0.1	26	10	

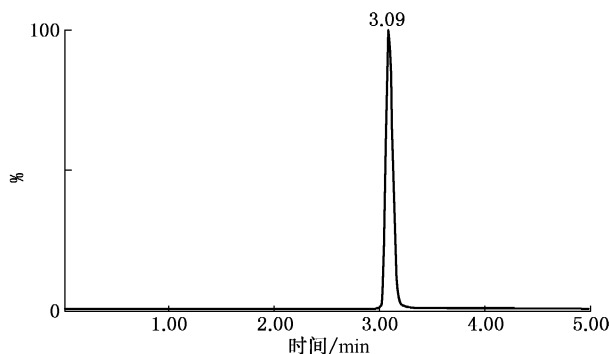


图 1 氯霉素标样的总离子流

1.3.2 样品分析

固相萃取: 500 mL 环境水样经 0.45 μm 滤膜过滤后, 用甲酸调节 pH 至 3.0。固相萃取小柱依次用甲醇 6 mL $\times$ 2、超纯水 6 mL、甲酸溶液(pH = 3) 6 mL 活化后, 以流速 10 mL/min 上样; 用超纯水 6 mL 清洗小柱后, 用高纯氮吹干 20 min; 用甲醇 6 mL $\times$ 2 淋洗, 洗脱液在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下用氮气吹干浓缩至干; 用乙腈定容至 1 mL, 过 0.2 μm 滤膜后上机测定。

2 结果与讨论

2.1 固相萃取条件优化

影响固相萃取富集效率的因素有: 样品 pH、洗脱溶液类型、上样速度等, 采用空白加标对上述因素进行优化。比较了样品 pH 为 3 和 7 的空白加标水样的提取效率。发现在 pH 为 3 时, 提取效率优于 pH 为 7 的时候, 因此水样用色谱纯甲酸调至 pH = 3。

分别用甲醇和酸化的甲醇(0.1% 甲酸)作为洗脱液进行洗脱, 发现使用酸化甲醇洗脱效率略低于甲醇, 因此, 采用甲醇作为洗脱液。

上样流速分别为 5 和 10 mL/min 时, 空白加标的回收率没有显著差异, 选择上样速率为 10 mL/min。

2.2 方法线性范围、检出限和精密度

将氯霉素储备液(200 $\mu\text{g/L}$)用甲醇稀释至标准溶液系列(1 ~ 100 $\mu\text{g/L}$), 按照上述的仪器条件进行分析。以定量离子对的响应面积和对应浓度进行线性回归得到标准曲线。表明在 1 ~ 100 $\mu\text{g/L}$ 范围内具有良好的线性关系。以 10 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液重复进样 7 次验证仪器精密度, 发现 7 次进样的相对标准偏差为 2.4%。以 2 ~ 5 倍基线噪音响应对应的浓度进行空白加标, 计算 7 个测定结果的标准偏差, 以 3.143 倍标准偏差作为检出限, 氯霉素的仪器检出限为 0.1 $\mu\text{g/L}$, 其线性方程、相关系数、线性范围、检出限等见表 3。

表3 氯霉素的回归方程、相关系数及仪器检出限				
保留时间/ min	回归方程	相关系 数 R	线性范围/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	仪器检出限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
3.09	$y = 158.0x - 121.8$	0.999 9	1~100	0.1

2.3 实际水样分析

在空白水样中分别添加了40和400 ng/L的目标化合物进行加标回收实验,采用外标法定量,实验结果显示氯霉素在空白水样中的加标回收率为88.1%~107%。为了考察不同的水体机制对实验结果产生的影响,笔者还进行了实际水样的加标回收实验,实验结果显示氯霉素在实际水样中的加标回收率为76.2%~104%,目标化合物的方法检出限为0.2 ng/L,能够满足实验的需要。具体结果见表4。

表4 氯霉素实际水样加标回收实验结果				
加入量/ ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	原含量/ ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收量/ ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	RSD / %	回收率/ %
40	3.8	36.9	9.5	92.2
40	4.1	30.5		76.2
40	4.7	34.4		86.0
400	2.7	405	4.5	101
400	3.5	417		104
400	4.4	381		95.2

3 结语

建立了水中氯霉素的超高效液相色谱三重四级杆质谱联用分析方法。该方法在5 min内完成对氯霉素的分析,实际水样的加标回收率在76.2%~

104%,方法检出限为0.2 ng/L,该法具有快速、简便、灵敏、绿色环保的特点,适用于环保行业对氯霉素的检测。

[参考文献]

[1] 陈君义,孙慧宇,舒永兰,等. 同位素内标-液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中氯霉素残留[J]. 化学分析计量, 2011,20(2):46-48.

[2] MASAHIKO T,SHIGEKI D, TAKETOSHI N. Determination of chloramphenicol residues in fish meats by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A,2003,1011:67-75.

[3] 谢守新,林海丹,秦燕,等. 液相色谱-电喷雾串联质谱内标法测定水产品中氯霉素药物残留[J]. 中国卫生检验杂志, 2006,16(11):1298-1300.

[4] 徐美奕,孟庆勇. 养殖对虾中氯霉素残留的放射免疫分析[J]. 食品科学,2003,204(12):110-112.

[5] 胡莹莹,李爱,叶赛,等. 高效液相色谱法与酶联免疫试剂盒测定海水中痕量氯霉素[J]. 分析试验室,2006,25(3):112-114.

[6] 宫向红,徐英江,张秀珍,等. 水产品中氯霉素残留量气相色谱检测方法的探讨[J]. 食品科学,2006,27(7):222-224.

[7] 何方奕,李铁纯,李学程,等. 固相萃取-高效液相色谱法测定鸡肉中氯霉素的残留[J]. 食品科学,2006,27(12):629-630.

[8] 孙亮,陈海东. GC-MS/MS 测定虾仁中氯霉素的研究[J]. 中国卫生检疫杂志,2003,13(3):293-294.

[9] 张晓燕,张睿,许蔚,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定蜂胶中的氯霉素[J]. 色谱,2012,30(3):314-317.

[10] 顾海东,尹燕敏,秦宏兵. 超高效液相色谱三重四级杆质谱联用法测定水中的苯胺及联苯胺[J]. 环境监测与预警, 2012,4(1):24-26.

[11] 朱勇,陈国,杨挺,等. 同位素稀释超高效液相色谱串联质谱法同时测定牛奶中的克伦特罗、氯霉素与己烯雌酚[J]. 分析测试学报,2011,30(4):430-434.

(上接第21页)

[参考文献]

[1] Organization for Economic Co-operation and Development. Hazard Assessment of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and Its Salts, ENV/JM/RD(2002)17/Final [R]. Paris: OECD, 2002.

[2] GIESY J P, KANNAN K. Perfluorochemical surfactants in the environment [J]. Environmental Science & Technology, 2002, 36(7): 146-152.

[3] LAU C, ANITOLE K, HODES C, et al. Perfluoroalkyl acids: A review of monitoring and toxicological findings [J]. Toxicological Sciences, 2007, 99(2): 366-394.

[4] CONDER J M, HOKE R A, DE WOLF W, et al. Are PFCAs bioaccumulative? A critical review and comparison with regulatory lipophilic compounds [J]. Environmental Science & Technology, 2008, 42(4): 995-1003.

[5] European Union. Directive 2006/122/EC of the European Parliament and of the Council [R/OL]. Brussels: EU, 2006.

[2012-04-16]. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:372:0032:0034;EN;PDF>.

[6] US Environmental Protection Agency. 2010/2015 PFOA Stewardship Program [R/OL]. Washington D. C.: USEPA, 2006. [2012-04-16]. <http://www.epa.gov/oppt/pfoa/pubs/stewardship/index.html>.

[7] WANG B, IINO F, YU G, et al. The Pollution Status of Emerging Persistent Organic Pollutants in China [J]. Environmental Engineering Science, 2010, 27(3): 215-225.

[8] LARSEN B S, KAISER M A. Challenges in perfluorocarboxylic acid measurements [J]. Analytical Chemistry, 2007, 79(11): 3966-3973.

[9] SO M K, MIYAKE Y, YEUNG W Y, et al. Perfluorinated compounds in the Pearl River and Yangtze River of China [J]. Chemosphere, 2007, 68(11): 2085-2095.

[10] JIN Y H, LIU W, SATO I, et al. PFOS and PFOA in Environmental and Tap Water in China [J]. Chemosphere, 2009, 77(5): 605-611.