

MSPD-PTV GC/MS 测定动物源性食品中的氯霉素^{*}

奉夏平, 张亮, 张卓恒, 陈卫国
(中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘要: 用GC/MS (负化学电离, NCI) 建立一个高灵敏度、快速测定氯霉素的新方法。在GC/MS上用NCI和选择离子模式进行测定, 提高了测定的灵敏度和抗干扰能力。采用程序升温汽化大体积进样, 进样量为100 μ L, 是常规进样量的100倍, 使得方法的检出限降低了2个数量级, 达到了5 μ g/g。采用基质固相分散替代固相萃取, 大大简化了样品前处理步骤, 提高了方法的准确度和精密度。加标浓度为0.01~10.0 μ g/g时, 回收率在95.88%~107.69%之间, 变异系数小于5.92%。

关键词: 氯霉素; 程序升温汽化; 气相色谱/质谱; 基质固相分散

中图分类号: O657.63; X836 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 02-0065-04

氯霉素(chloramphenicol, CAP)是一种广谱抗生素, 常用于动物疾病的治疗和预防。由于氯霉素容易造成再生障碍性贫血和灰婴综合征, 因此世界各国对食品中氯霉素的残留限量都作了严格规定, 美国规定在动物性食品中不得检出氯霉素, 欧盟规定肉中的氯霉素最高残留量不得超过0.1 μ g/g^[1]。目前, 测定氯霉素的方法很多, 主要是气相色谱法和液相色谱法。这些方法样品前处理复杂繁琐, 且检测限很难达到0.1 μ g/g的要求。所以有必要开发快速可靠、检测限低于0.1 μ g/g的测定氯霉素的新方法。

本文采用基质固相分散(matrix solid phase disperse, MSPD)进行样品前处理, 用GC/MS负化学电离离子源(negative chemical ion, NCI)和选择离子模式(select ion monitoring, SIM)进行分析检测; 用程序升温汽化(programmed temperature vaporization, PTV)实施大体积进样, 进样量为100 μ L, 是常规进样量的100倍, 本方法的检出限为5 μ g/g, 目前国内外尚未见对氯霉素检出限能达到此水平的报道。将基质固相分散和程序升温汽化大体积进样应用于氯霉素的测定, 国内外尚未见报道。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

HP6890 MSD5973N 气相色谱-质谱联用仪(配备程序升温汽化进样口)。高速组织捣碎机, 分散机, 涡旋振荡器, 吹氮浓缩仪, 层析柱: 20 μ m $\times$

15 mm (ID), 玻璃研钵。

所用试剂除注明外均为分析纯。氯霉素标准品(Supelco公司), 衍生反应试剂(Supelco): N,O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA)。十八烷基键合硅胶(C₁₈) (Besp公司, 40~55 μ m), 石墨化碳黑(Besp, 100 μ m²/g, 37~150 μ m), 中性氧化铝(Besp, 70~230目), C₁₈和中性氧化铝固相萃取小柱(Besp公司)。乙酸乙酯, 正己烷, 甲苯。无水硫酸钠: 450 $^{\circ}$ C下烘烤4 h。

1.2 样品预处理

取样50 g, 用高速组织捣碎机打碎, 再用分散机进一步均质成浆。取1.0 g加入研钵中, 加入0.2 g石墨化碳黑混匀, 再加入4 g C₁₈, 研磨5 min, 直至看不到颗粒状样品组织。在层析柱中依次加入2 g无水硫酸钠、1 g氧化铝、0.5 g C₁₈, 敲实、压紧。把研磨的混合物装入层析柱中, 在混合物上再加入1 g无水硫酸钠, 敲实、压紧。用10 mL正己烷预淋洗柱子, 抽干, 弃去淋洗液。用25 mL乙酸乙酯分3次洗涤研钵, 洗涤液转入层析柱中, 控制流速在1 mL/min左右, 收集洗脱液。

用吹氮浓缩仪在40 $^{\circ}$ C下吹干, 加入100 μ L甲苯溶解残渣, 再加入25 μ L衍生试剂BSTFA加盖后于涡旋振荡器上混匀1 min, 置于烘箱内70 $^{\circ}$ C下放置30 min。取出冷却至室温后, 用氮气吹至近干, 用正己烷定容到1 mL, 作为待测溶液。

1.3 测定条件

1.3.1 色谱条件 毛细管柱: HP 5MS, 0.32 mm $\times$

* 收稿日期: 2004-07-07

基金项目: 广东省重大科技计划资助项目(2004A30404001)

作者简介: 奉夏平(1975年生), 男, 硕士研究生; 通讯联系人: 陈卫国, E-mail: cescwg@zsu.edu.cn

30 m×0.25 μm; 25 μL 进样针; 进样口: 程序升温汽化进样 (开口多折流衬管; 容积 150 μL); 接口温度为 280 ℃; 炉温升温程序: 70 ℃(4 min) 15 ℃/min→275 ℃(5 min); 载气: 高纯氮 (w>99.999%), 柱流量 1.1 mL/min。省气状态时间为 9 min。

1.3.2 PTV 进样参数设计

- (1)溶剂排出模式进样; 制冷气体为液氮。
- (2)进样量为 10 μL×10 次(总进样量为 100 μL); 多次进样之间延迟时间为 6 s;
- (3)排空温度(即进样口初温)为 20 ℃;
进样口升温程序: 20 ℃(1.5 min) 700 ℃/min→265 ℃(2 min) 30 ℃/min→400 ℃(5 min) 30 ℃/min→150 ℃。
- (4)排空流量为 100 mL/min; 排空压力为 0 psi; 进样压力为 7.6 psi; 排空时间为 1.4 min。
- (5)吹扫流量: 50 mL/min; 吹扫时间: 4.0 min。

1.3.3 质谱条件 溶剂延迟时间为 8 min; EM 电压为 1 658 V; 离子源温度为 150 ℃; 四极杆温度为 150 ℃; 反应气为甲烷; 选择监测离子 m/z: 466, 468, 470, 376。

2 结果与讨论

2.1 氯霉素的定性和定量

根据其氯霉素的衍生物(CAP-TMS)的保留时间(图 1)和质谱图来定性(图 2)。用峰面积外标法定量。NCI 对具有电负性的物质有高选择性和高灵敏度, 再结合 SIM 模式能够高效地排除其他离子的干扰(如图 3), 进一步提高灵敏度。

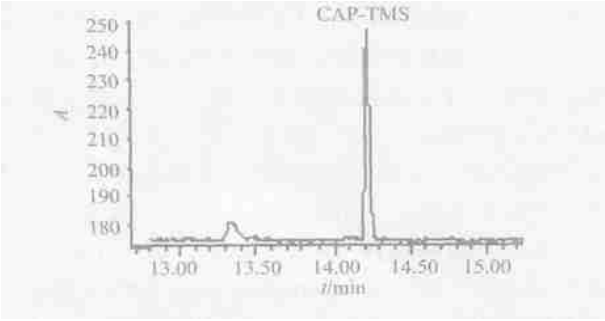


图 1 CAP 标准的衍生物的总离子色谱图
Fig 1 TIC of CAP-TMS

2.2 PTV 大体积进样的优化

在溶剂排空模式下, PTV 进样的基本原理如图 4。PTV 进样器先保持在低温低压, 样品注入进样口时, 分流阀打开(图 4 中分流阀打开以虚线表示开, 实线表示关闭), 此时在大流量的载气吹扫下, 溶剂大部分挥发自分流阀排出, 高沸点的待测物则被冷

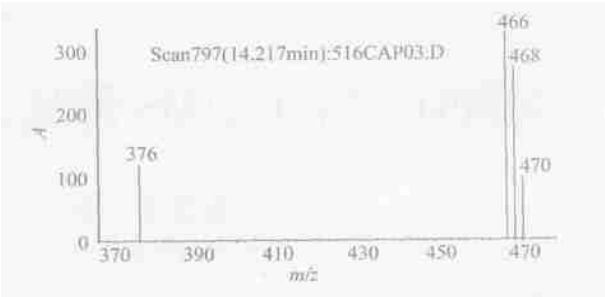


图 2 氯霉素衍生物的负化学电离选择离子质谱图
Fig 2 Selection ion mass spectrum of CAP-TMS by NCI

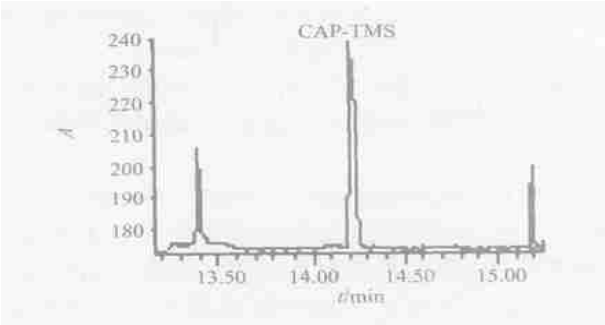


图 3 虾仁中添加 CAP 的 CAP-TMS 总离子色谱图
Fig 3 TIC of CAP-TMS from shrimp spiked with CAP

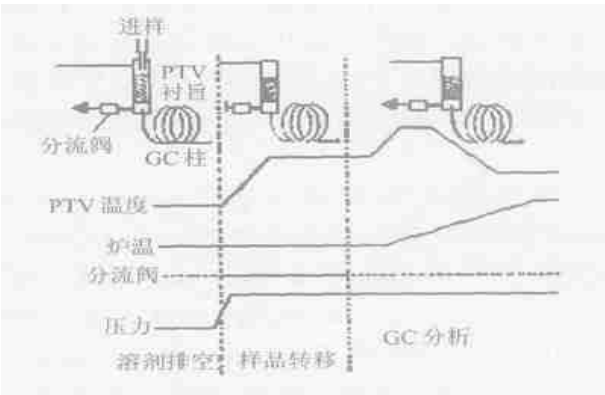


图 4 PTV 大体积进样原理图
Fig 4 The principle graph of PTV large volume injection

捕集定量保留在衬管上; 由于溶剂被排出, 衬管可以容纳再次进样^[3,4]。多次进样结束后, 分流阀关闭, 停止溶剂排出, 进样口压力迅速回升, 快速升温至略超过待测物沸点的设定温度, 留在衬管上的待测物被瞬间汽化、全部转移入色谱柱。转移结束后, 分流阀再度打开, 进样口升至高温(可以升到 400 ℃以上), 衬管内高沸点、难挥发性基体杂质汽化(或分解)从分流阀排出。

由于在 PTV 进样条件下, 进样量可以是常规进样(1 μL)的几十到上千倍, 所以应用 PTV 大体积进样可以将检出限降低 2~3 个数量级^[3,4]。

但是, 如果待测物在进样过程中损失较大, 不能

准确地定量冷捕集在衬管壁上,待测物的峰面积重现性会很差,将严重影响对待测物的定量,甚至无法定量。所以优化 PTV 进样参数,减少待测物的损失,保证待测物准确地定量冷捕集在衬管壁上非常重要。

2.2.1 排空温度和排空压力的选择 在溶剂排空时待测物是通过冷捕集而定量地保留在衬管壁上,因此排空温度一般应低于待测物沸点 250 ℃。排空温度过高,待测物易挥发而损失,从而严重影响定量测定。实验表明,同时考虑加快溶剂的挥发和排空速度,排空温度为 20 ℃时,既能保证 CAP-TMS 定量保留,又能使溶剂快速挥发排出。

减小进样口压力,可以加快溶剂的挥发,且能减少在溶剂排空期间进入色谱柱的溶剂蒸气的量。所以排空压力可以设定到仪器能达到的最低压力即‘0’psi(设定压力为‘0’psi,由于有 100 mL/min 的载气通过所以实际上只能达到 1.3 psi)。

2.2.2 延迟时间和排空流量的影响 延迟时间、排空流量是影响样品注入速度和溶剂挥发排空速度平衡的主要因素。延迟时间是多次进样时,每 2 次进样的间隔时间。一般文献都没有提到这个参数的优化,其实这是一个非常重要的参数。首先,延迟时间决定样品的注入速度。延迟时间短,样品注入速度快。同时,延迟时间也决定每一针样品溶剂的排空时间,延迟时间越短要求溶剂在越短时间内挥发排空,要求排空流量越大,但是排空流量太大,目标分析物会被吹扫损失,特别是易挥发物质。如果延迟时间太短,溶剂排空程度不理想,目标分析物会随液态溶剂从衬管流出而损失,并且容易引起进样量超过衬管容积负荷;延迟时间太长,目标分析物在长时间吹扫下会损失。

实验表明一次进样 10 μL、溶剂为正己烷的样品,100 mL/min 的排空流量可以有足够的溶剂挥发排空速度而又能保证 CAP-TMS 的定量保留。作者在 100 mL/min 的排空流量下,再对延迟时间进行了优化。用 1.0 ng/mL 的标准衍生后,延迟时间分别设为 2,4,6,8,12,16 s 进行对比实验^[3,4](其他参数同 1.3 测定条件),结果如图 5。实验表明,延迟时间为 6 s 时既能保证氯霉素的定量保留又能使溶剂有很好的挥发排空效果。

2.3 固相基质分散的优化

基质固相分散是 Barker 等^[2]于 1989 年在固相萃取(SPE)的基础上提出并给予理论解释的样品预处理方法。基质固相分散包括基质分散和色谱分离两种过程。在固相基质分散中吸附剂(一般是 C₁₈、Al₂O₃、Florisil、硅胶等固相萃取填料)与样品一起混

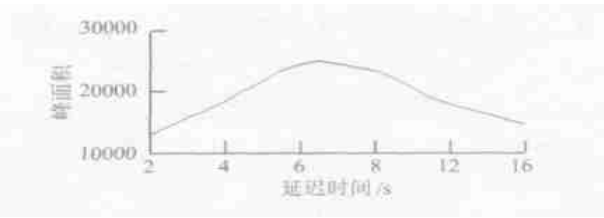


图 5 延迟时间优化曲线图

Fig 5 Carve graph of delar time

合研磨,样品均匀分散于吸附剂键合相,形成一个独特的色谱固定相。吸附剂同时起着支持剂、分散剂、吸附剂、净化剂的作用,待测物在吸附剂、洗脱液与样品基质之间进行吸附与分配,最终达到萃取与净化双重效果。C₁₈对动物性样品基质吸附强,而对氯霉素保留较弱,有利于提取和净化。加入少量石墨化碳黑能有效吸附脂肪酸、甾醇、维生素和色素等杂质。中性 Al₂O₃ 对共洗脱物有很好的净化效果。

吸附剂与样品的量的比例既影响提取、净化效果,又影响洗脱液的用量。选择样品与 C₁₈ 的比例分别为 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 进行对比实验^[3](样品的量都取 1.0 g)。结果如表 1。吸附剂的量太少,不足以使样品基质完全分散,从而不利于待测物从基质中分离、洗脱,所以回收率低;吸附剂量太多,需要大量洗脱液才能洗脱,且成本增加。实验表明样品与 C₁₈ 的比例为 1:4 时,既能取得好的回收率和净化效果,成本也较低。

洗脱溶剂通常为乙酸乙酯、乙腈。实验表明,乙酸乙酯洗脱杂质多,洗脱液颜色较深,但乙酸乙酯洗脱效率高,毒性小。本方法中要完全洗脱氯霉素需要 25 mL 乙酸乙酯。

表 1 不同样品与吸附剂比例时氯霉素的回收率

Tah 1 Percent recoveries of chloramphenicol using different ratio of sample and sorbent

比例	V(乙酸乙酯)/mL			
	10	20	30	40
1:2	45	52	63	70
1:4	76	97	106	114
1:6	58	86	97	102
1:8	42	78	89	92

2.4 回收率、相对标准偏差、检出限

向空白虾仁和鳗鱼中分别添加 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 ng/g 共 4 个浓度的氯霉素,按方法 2.2 处理后,用 PTV-GC/MS 测定回收率,每个浓度做 10 个平行测试,结果如表 2。

表 2 氯霉素的平均回收率和相对标准偏差¹⁾

Tah 2 The recovery and relative standar deviation of chloramphenicol

ρ (氯霉素) (ng·g ⁻¹)	虾仁		鳗鱼	
	平均回	相对标准	平均回	相对标准
	收率/%	偏差/%	收率/%	偏差/%
0.01	95.88	5.53	97.35	5.92
0.1	107.69	4.17	105.92	4.59
1.0	99.62	2.68	104.27	2.76
10.0	98.64	2.72	99.83	2.57

1) n=10

检出限的计算采用产生信号值等于空白样品相对标准偏差的 3 倍时对应的氯霉素的浓度,对鳗鱼和虾仁计算结果分别是 4.6 pg/g、4.1 pg/g。

以上各个浓度的加标样品,参照参考文献[5],取样 1.0 g,用乙酸乙酯提取,脂肪用正己烷去除,用 C₁₈和中性氧化铝固相萃取小柱纯化样品,BSTFA 衍生后,在 SIM 模式下进行 GC/MS (NCI)测定^[5],结果如表 3。对鳗鱼和虾仁的检出限分别是 0.17 ng/g、0.21 ng/g。

表 3 作常规方法测定氯霉素的平均回收率和相对标准偏差¹⁾

Tah 3 The recovery and relative standar deviation of chloramphenicol with common method

ρ (氯霉素) (ng·g ⁻¹)	虾仁		鳗鱼	
	平均回	相对标准	平均回	相对标准
	收率/%	偏差/%	收率/%	偏差/%
0.01	未检出	—	未检出	—
0.1	未检出	—	未检出	—
1.0	69.31	16.72	74.29	14.67
10.0	88.55	5.34	92.31	4.17

1) n=10

对比表 2 和表 3 结果可知:由于本方法采用 MSPD 一步完成样品的提取、过滤、净化,样品前处理步骤大大少,避免了样品均化、转溶、乳化带来的损失,大大提高了方法的准确度和精密度;用 PTV 大体积进样的进样量是常规进样的 100 倍,检出限比常规方法低了 2 个数量级。

3 结 论

通过优化 PTV 进样技术避免了高沸点、难挥发性杂质进入色谱柱,而且负化学电离和选择离子模式具有高选择性和高灵敏度,使得本方法适合分析复杂动物源性样品,且检出限低,前处理步骤简单。

参考文献:

[1] GEORGE W C. Food safety[J]. First Advocate, 2002, 5 (1): 2—4.

[2] MONIKA M, BOFUSLAW B. Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for determination analysis of carbendazim residues in plant material[J]. J Chromatography B, 2004, 800: 309—314.

[3] NORLOCK F M, JANG J K. Large volume injection PTV-GCMS analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in air and sediment samples[J]. J Air & Waste Manag Associa, 2002, 52(1): 19—26.

[4] TOLLBACK P, BJROKLUND J, OSTMAN C. Large-volume programmed-temperature vaporiser injection for fast gas chromatography with electron capture and mass spectrometric detection of polybrominated diphenyl ethers [J]. J Chromatography A, 2003, 991(2): 241—253.

[5] 徐继林, 严小军, 徐年军, 等. 对虾中残留氯霉素的负化学源 GC/MS 分析[J]. 中国水产科学, 2004, 11(2): 111—115.

Determination of Chloramphenicol in Animal Food
by MSPD and GC/MS Using PTV Large Volume Injection

FENG Xia ping, ZHANG Liang, ZHANG Zhuo heng, CHEN Wei guo

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat sen University, Guangzhou, China 510275)

Abstract: A new method based on GC/MS with negative chemical ion (NCI) for determination of chloramphenicol is studied. Higher sensibility and better tolerance of disturbance of matrix are achieved through negative chemical ion (NCI) and selection ion monitoring model. By optimizing of programmed temperature vaporization (PTV) large volume injection, the total injection volume reaches 100 μ L which is 100 times of ordinary injection volume. Thus, the detection limit can reduce to 5 pg/g. As matrix solid phase disperse (MSPD) can do extracting, filtering and cleaning in the same time, the sample preparation becomes very simple and efficient. Furthermore, higher recovery and lower relative standard deviation are obtained. The recovery range is 95.88%~107.69% with relative standard deviation below 5.92% when the fortified level is 0.01~10.0 ng/g.

Key words: chloramphenicol; programmed temperature vaporization; GC/MS; matrix solid phase disperse