

利用 LC-TOF 测试烟用纸张中五氯苯酚

张 某¹ 李某某^{1,2} 王某某² (作者姓名字体用楷体五号)

(广州禾信仪器股份有限公司, 广东 广州 510530)

摘要: 用本公司的 LC-TOF 按中国烟草总公司企业标准 (YQ/T 33-2013) 测量卷烟条包装纸、盒包装纸、卷烟纸等中五氯苯酚的测定。

关键词: 烟草;包装纸;五氯苯酚

1 测试条件

1.1 实验样品信息

表一 五氯苯酚和 2,4,5-涕标准品测试信息

序号	样品	浓度 (mg/L)	分子式	分子量	CAS	检测离子 (±)	主特征峰 (m/z)	来源
1	五氯苯酚	1000	C ₆ HCl ₅ O	265.84698	87-86-5	[M-H] ⁻	264.83916	Accustandard
2	2, 4, 5-涕酸 (内标)	1000	C ₈ H ₅ Cl ₃ O ₃	253.93040	93-76-5	[M-C ₂ H ₃ O ₂] ⁻ [M-H] ⁻	194.91711 252.92258	Accustandard

表二 五氯苯酚在 (YQ/T 33-2013) 中回收率、检出限和定量限要求

化合物名称	回收率 (%)	检出限 (mg/kg)	定量限 (mg/kg)
五氯苯酚	91.6~112.5	0.005	0.018

1.2 实验仪器、试剂和材料

- 1) 仪器: 禾信 ESI-TOF-9(L); 上海伍丰超快速液相色谱仪: EX-1700s-HPLC;
- 2) 分析天平, 感量为 0.1mg
- 3) 超声波清洗器
- 4) 离心机
- 5) 纯净水
- 6) 甲醇: 品牌: Aladdin; LC-MS: ≥99.9%

- 7) 甲酸：品牌：Aladdin；色谱级： $\geq 98\%$
- 8) 高纯氮气： $\geq 99.999\%$

1.3 实验条件

- 1) 液相色谱条件
 - a. 色谱柱：BRISA LC2 C18 $3\mu\text{m}$ ， $10\times 0.46\text{cm}$
 - b. 流动相（等度洗脱）：甲醇（A）：0.1%甲酸水溶液（B）=95:5（体积分数）
 - c. 流速： $300\mu\text{L}/\text{min}$
 - d. 柱温：常温
 - e. 进样量： $5\mu\text{L}$
- 2) 质谱条件
 - a. 离子源，电喷雾电离源（ESI）： -3800V
 - b. 雾化气气压： 0.35MPa ；辅助气气压： 0.05MPa
 - c. 进样口温度： 240°C ；辅助气温度： 380°C
 - d. TDC 采集卡

2 实验方法

2.3 五氯苯酚标准溶液配制

- 1) 一级标准储备溶液：准确移取 $100\mu\text{L}$ 浓度为 $1000\text{mg}/\text{L}$ 五氯苯酚的标准溶液到 10mL 的容量瓶中，用甲醇溶解并定容到 10mL ，配制成浓度为 $10\text{mg}/\text{L}$ 标准储备溶液。
- 2) 二级标准储备溶液：准确移取 1mL 一级标准储备溶液于 10mL 容量瓶中，用甲醇定容，配制成 $1\text{mg}/\text{L}$ 的二级标准储备溶液
- 3) 三级标准储备溶液：准确移取 $100\mu\text{L}$ 一级标准储备溶液于 10mL 容量瓶中，用甲醇定容，配制成 $100\mu\text{g}/\text{L}$ 的三级标准储备溶液。

2.4 2,4,5-涕酸内标储备溶液配制

- 1) 一级内标储备溶液：准确移取 $100\mu\text{L}$ 浓度为 $1000\text{mg}/\text{L}$ 2,4,5-涕酸的标准溶液到 10mL 的容量瓶中，用甲醇溶解并定容到 10mL ，配制成浓度为 $10\text{mg}/\text{L}$ 标准储备溶液。
- 2) 二级内标储备溶液：准确移取 $100\mu\text{L}$ 一级内标储备溶液于 10mL 容量瓶中，用甲醇定容，配制成 $100\mu\text{g}/\text{L}$ 的二级内标储备溶液。

2.5 标准工作曲线的配制

- 1) 按该公司企业标准中 4.7.3 系列配制

分别准确移取 100 μ L、200 μ L、400 μ L、600 μ L、1000 μ L、2000 μ L 三级标准储备溶液（100 μ g/L）于 10mL 容量瓶中，加入 100 μ L 一级内标储备溶液（10mg/L），用甲醇定容，即可得到下表浓度的工作曲线。

曲线点浓度 (μ g/L)	从三级标准储备 溶液（100 μ g/L） 移取体积（ μ L）	内标浓度 (μ g/L)	从一级内标储备 溶液（10mg/L） 移取体积（ μ L）	最终定容体积 (mL)
1	100	100	100	10
2	200	100	100	10
4	400	100	100	10
6	600	100	100	10
10	1000	100	100	10
20	2000	100	100	10

备注：因 2,4,5-涕酸内标按该公司企业标准 1 μ g/L 来检测其响应偏低，故只能将内标浓度提高到 100 μ g/L。

2) 按方法的定量限（0.018mg/kg）和结合样品前处理稀释情况配制

分别准确移取 45 μ L、90 μ L、180 μ L、270 μ L、450 μ L、900 μ L 三级标准储备溶液（100 μ g/L）于 10mL 容量瓶中，加入 100 μ L 一级内标储备溶液（10mg/L），用甲醇定容，即可得到下表浓度的工作曲线。

曲线点浓度 (μ g/L)	从三级标准储备 溶液（100 μ g/L） 移取体积（ μ L）	内标浓度 (μ g/L)	从一级内标储备 溶液（10mg/L） 移取体积（ μ L）	最终定容体积 (mL)
0.45	45	100	100	10
0.9	90	100	100	10
1.8	180	100	100	10
2.7	270	100	100	10
4.5	450	100	100	10
9	900	100	100	10

2.6 前处理步骤

将白沙牌香烟烟用纸张裁剪成 0.5cm \times 0.5cm 碎片，见图 1，混合均匀，准确称取 0.2g 待测试样，精确至 0.1mg，置于 15mL 离心管中，加入 8mL 甲醇和 80 μ L 一级内标储备溶液

(浓度: 10mg/L), 超声提取 30min。静置 5min, 见图 2。移取 1.5mL 萃取液于离心管中, 以 5000r/min 速率离心 5min, 取 1mL 上清液经 0.22 μ m 有机相滤膜过滤, 滤液上 LC-TOF 检测。



图 1 剪碎后白沙牌香烟用纸张

- 1) 试剂空白: 不加样品, 重复前处理步骤, 做平行。
- 2) 样品空白: 称取样品, 重复前处理步骤, 做平行。
- 3) 样品加标 (样品浓度为 40 μ g/kg, 溶液浓度为 1 μ g/L): 称取样品, 往样品中加入 80 μ L 的五氯苯酚三级储备溶液 (100 μ g/L), 重复前处理步骤, 做平行。
- 4) 样品加标 (样品浓度为 240 μ g/kg, 溶液浓度为 6 μ g/L): 称取样品, 往样品中加入 48 μ L 的五氯苯酚二级储备溶液 (1mg/L), 重复前处理步骤, 做平行。

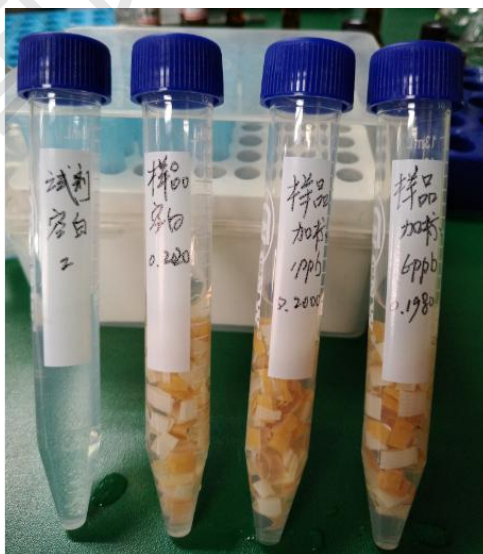


图 2 各样品前处理超声后示意图

3 实验结果

3.1 五氯苯酚和 2,4,5-涕酸标准溶液质谱图分析

100 $\mu\text{g/L}$ 五氯苯酚标准溶液质谱图见图 3，其中主要特征离子峰为【M-H】⁻：264.85732。

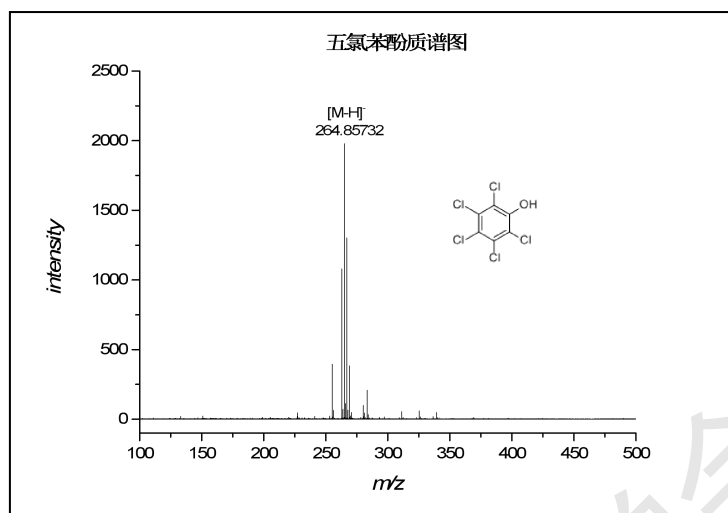


图 3 五氯苯酚标准溶液质谱图

100 $\mu\text{g/L}$ 2,4,5-涕酸标准溶液质谱图见图 4，其主要特征离子峰为【M-C₂H₃O₂】⁻：194.95069 和【M-H】⁻：252.98009，其中 m/z195 为基峰；通过优化离子传输区的电压参数，m/z195 的响应提高一倍，但 m/z253 则未检出，见图 5，后续数据电压都是优化 m/z195 的电压参数。

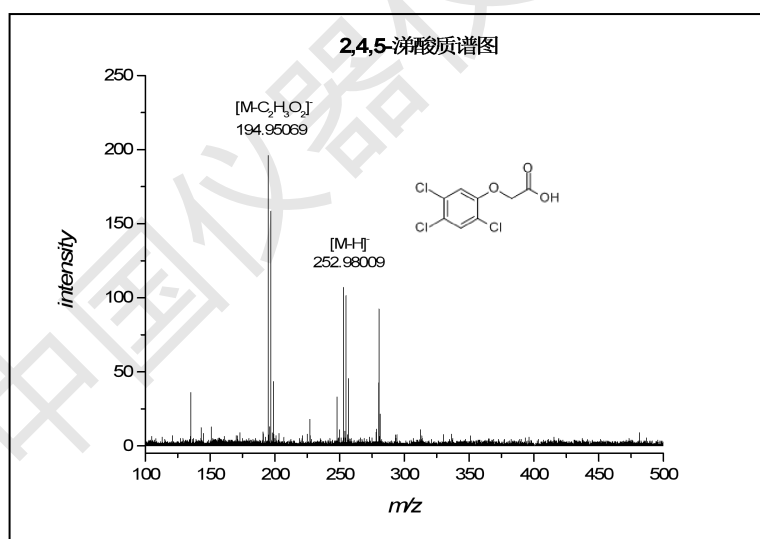


图 4 2, 4, 5-涕酸标准溶液质谱图

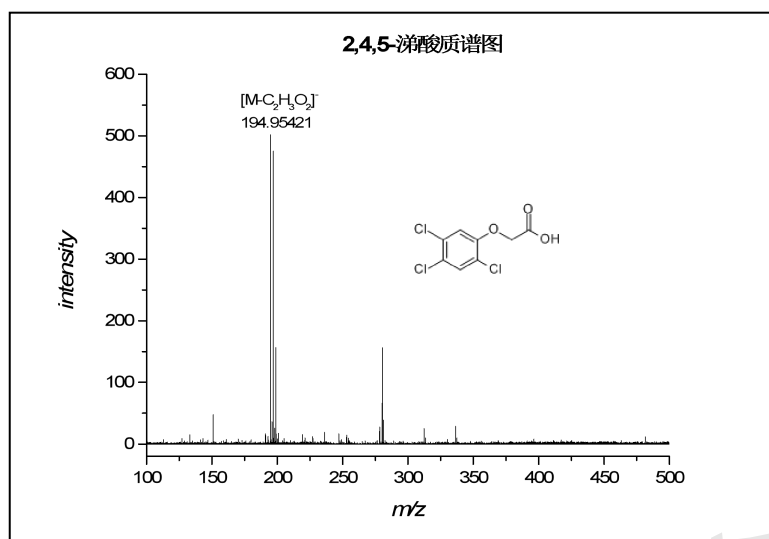


图 5 2, 4, 5-涕酸标准溶液质谱图

3.2 校准曲线的建立

1) 按该公司企业标准中 4.7.3 系列配制

将浓度为 1 μ g/L、2 μ g/L、4 μ g/L、6 μ g/L、10 μ g/L 和 20 μ g/L 的标准溶液以进样量为 5 μ L，流速为 0.3mL/min，色谱柱：BRISA LC2 C18 3 μ m，10 \times 0.46cm，用流动相：甲醇（A）：0.1% 甲酸水溶液（B）=95:5（体积分数）进行等度洗脱，利用 TOF 进行检测分析，结果见图 6 和图 7。

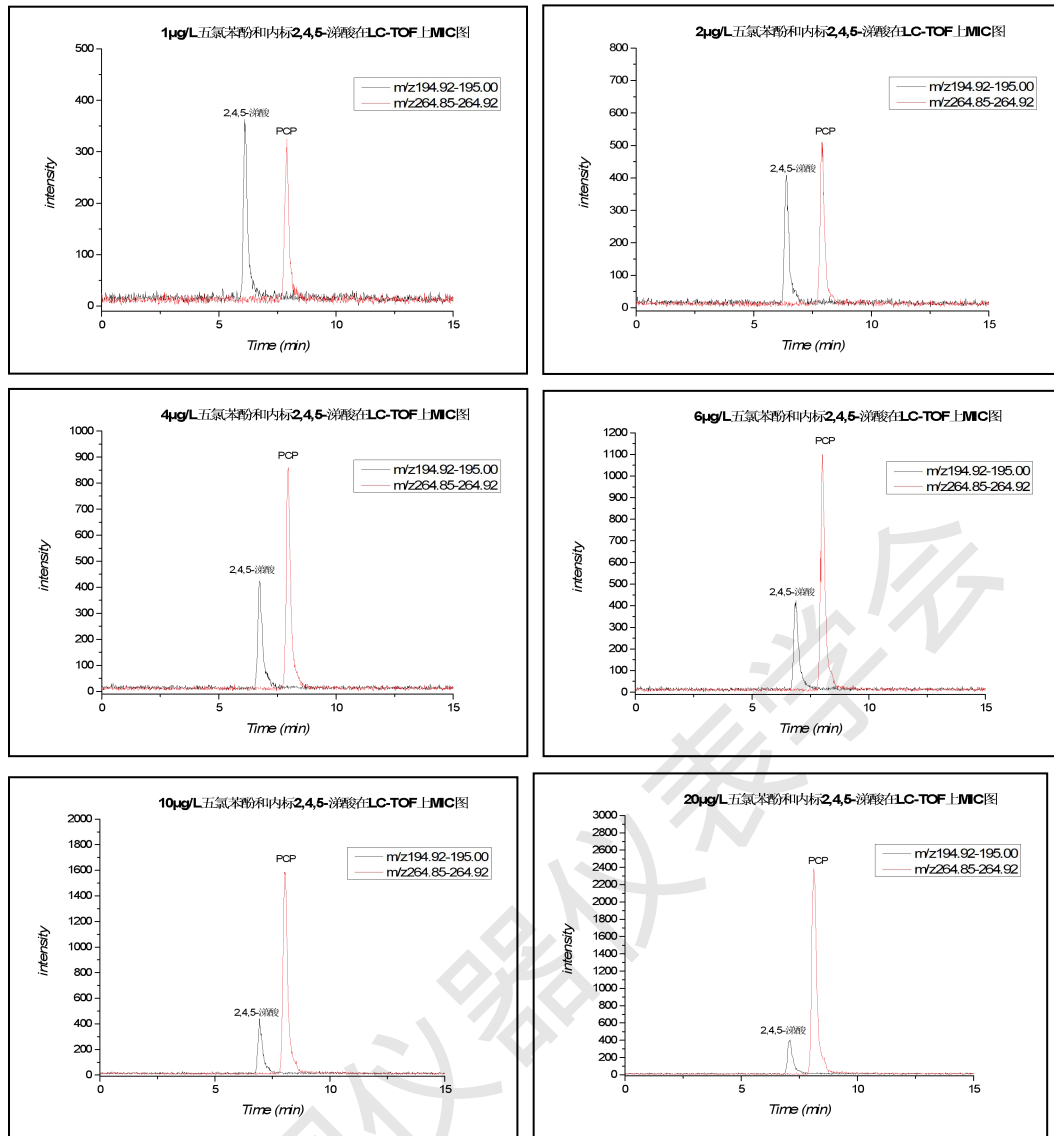


图 6 各浓度点五氯苯酚 (PCP) 和内标 2,4,5-涕酸在 LC-TOF 上 MIC 图

进样量 (ul)	浓度 (pg/ul)	PCP峰面积	内标浓度 (pg/ul)	内标峰面积
5	1	4945	100	5639
	2	7625	100	6584
	4	12489	100	7012
	6	15455	100	6899
	10	24460	100	6965
	20	37517	100	6778
浓度比值	峰面积比值	<p>五氯苯酚校准曲线-内标法</p>		
0.01	0.87693			
0.02	1.15811			
0.04	1.78109			
0.06	2.24018			
0.1	3.51184			
0.2	5.53511			

图 7 五氯苯酚校准曲线-内标法

数据分析：通过对各个浓度点五氯苯酚和内标 2,4,5-涕酸峰面积的积分，建立五氯苯酚对应的内标法校准曲线，其相关系数 R^2 为 0.9913，满足 $R^2 > 0.99$ 的要求。

2) 按方法的定量限 (0.018mg/kg) 和结合样品前处理稀释情况配制

将浓度为 0.45 μ g/L、0.9 μ g/L、1.8 μ g/L、2.7 μ g/L、4.5 μ g/L 和 9 μ g/L 的标准溶液以进样量为 5 μ L，流速为 0.3mL/min，色谱柱：BRISA LC2 C18 3 μ m，10 \times 0.46cm，用流动相：甲醇 (A)：0.1%甲酸水溶液 (B) =95:5 (体积分数) 进行等度洗脱，利用 TOF 进行检测分析，结果见图 8 和图 9。

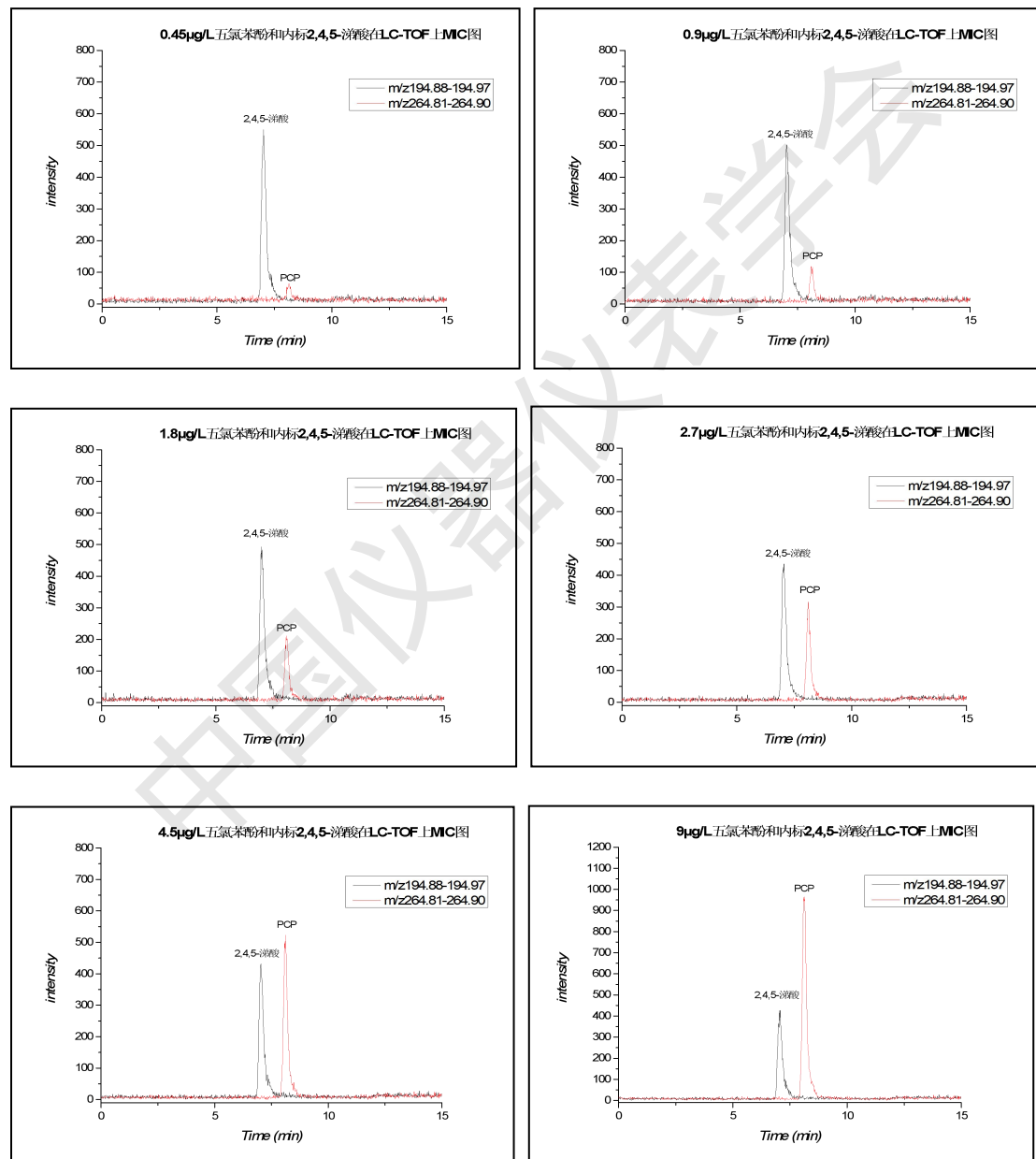


图 8 各浓度点五氯苯酚 (PCP) 和内标 2,4,5-涕酸在 LC-TOF 上 MIC 图

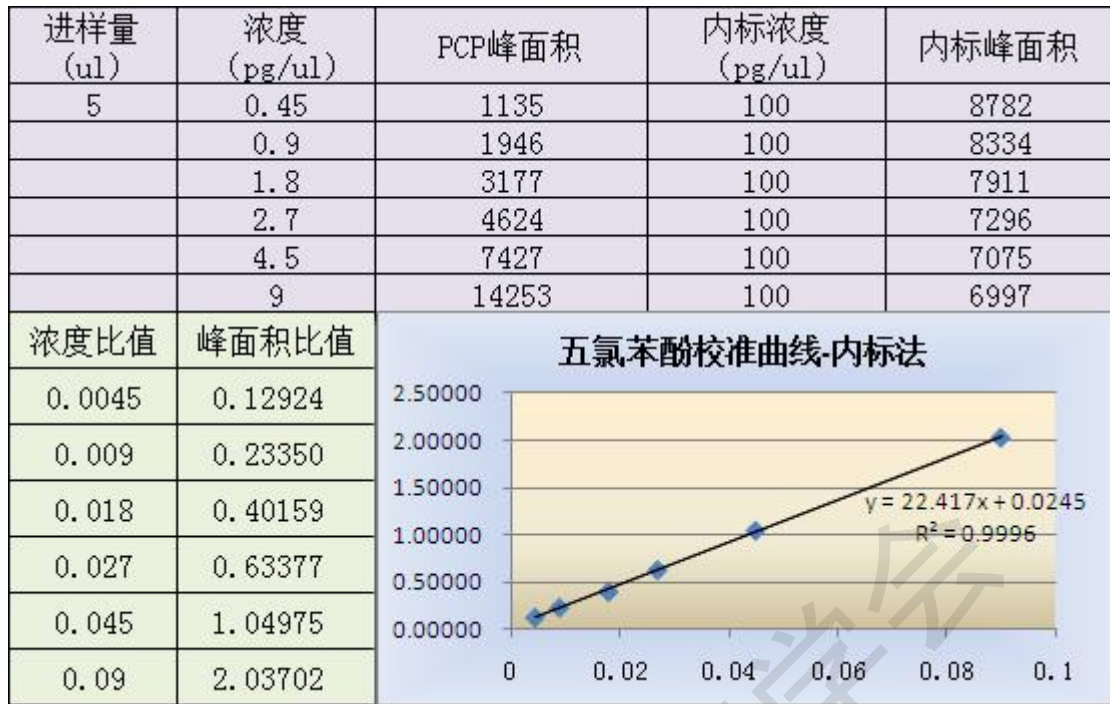


图9 五氯苯酚校准曲线-内标法

数据分析：通过对各个浓度点五氯苯酚和内标 2,4,5-涕酸峰面积的积分，建立五氯苯酚对应的内标法校准曲线，其相关系数 R^2 为 0.9996，满足 $R^2 > 0.99$ 的要求。

3.3 试剂空白和样品空白的测试结果

试剂空白和样品空白（含 0.2g 烟纸样品）中加入 80 μ L 浓度为 10mg/L 2,4,5-涕酸的内标储备溶液，在经过前处理步骤，以进样量为 5 μ L，流速为 0.3mL/min，色谱柱：BRISA LC2 C18 3 μ m，10 \times 0.46cm，用流动相：甲醇（A）：0.1%甲酸水溶液（B）=95:5（体积分数）等色谱条件进行等度洗脱，利用 TOF 进行检测，结果见图 10 和图 11。

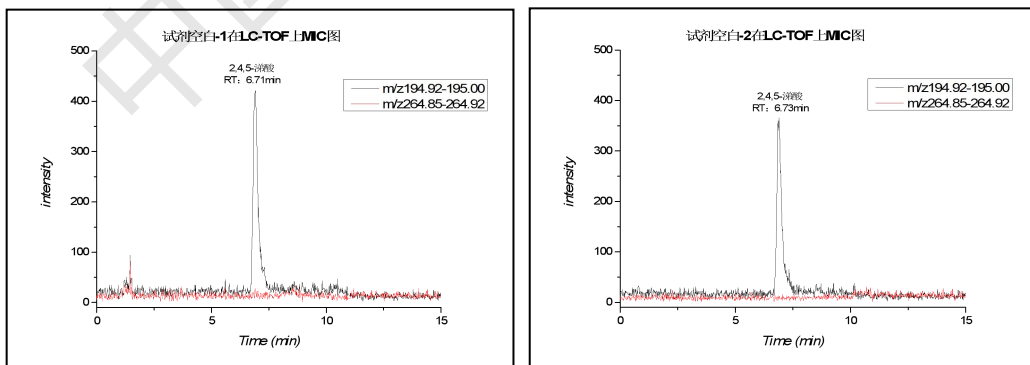


图10 试剂空白在 LC-TOF 上 MIC 图

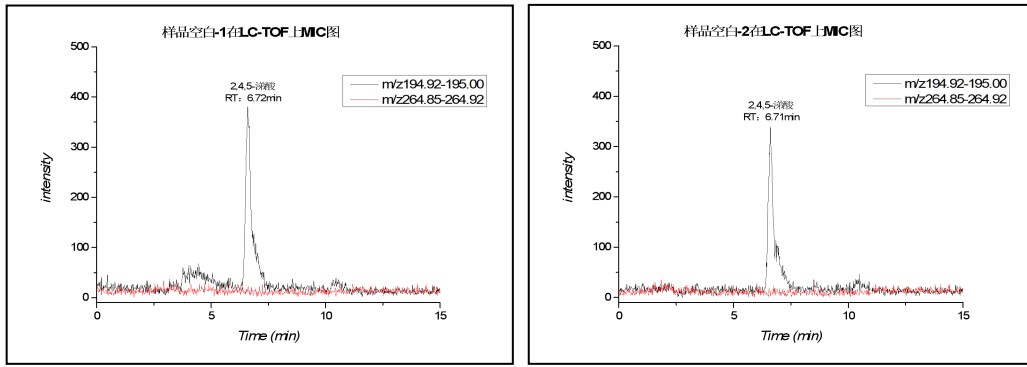


图 11 样品空白在 LC-TOF 上 MIC 图

数据分析：通过提取 2,4,5-三羧酸和五氯苯酚目标离子 m/z 195 和 m/z 265 的色谱峰，可以看出试剂空白和样品空白中都未检出有五氯苯酚目标物。

3.4 0.125 $\mu\text{g/L}$ 五氯苯酚标准溶液的测试结果

配制 0.125 $\mu\text{g/L}$ 五氯苯酚标准溶液（内含 100 $\mu\text{g/L}$ 2,4,5-三羧酸），然后取 5 μL 在 LC-TOF 上进行检测分析。

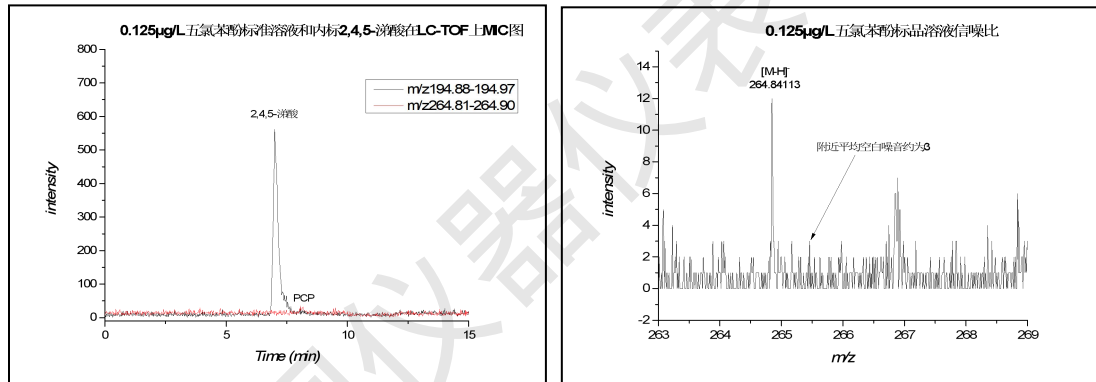


图 12 0.125 $\mu\text{g/L}$ PCP 标准溶液的 MIC 图和信噪比

数据分析：通过提取五氯苯酚和 2,4,5-三羧酸目标离子 m/z 195 和 265 的特征离子峰，得出各自的 MIC 图，结合五氯苯酚 MIC 图顶点位置的质谱图可以看出 PCP 目标峰 m/z 265 的信号强度为 12，附近噪音为 3，信噪比大于 3。

3.5 样品加标评估检出限的测试结果

将经前处理后的样品加标溶液（样品浓度为 40 $\mu\text{g/kg}$ ，溶液浓度为 1 $\mu\text{g/L}$ ）与样品空白溶液分别按比例 1:7 和 1:3（体积比）进行稀释，分别得到样品浓度为 5 $\mu\text{g/kg}$ ，溶液浓度为 0.125 $\mu\text{g/L}$ 的样品加标溶液和样品浓度为 10 $\mu\text{g/kg}$ ，溶液浓度为 0.25 $\mu\text{g/L}$ 的样品浓度，然后各取 5 μL 上 LC-TOF 进行测试，结果见图 13 和图 14。

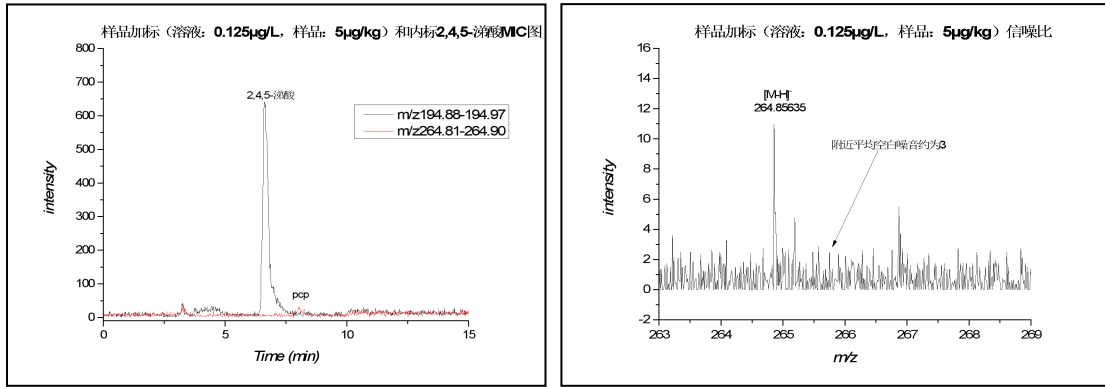


图 13 样品加标（溶液浓度为 0.125µg/L 和样品浓度为 5µg/kg）的 MIC 图和信噪比

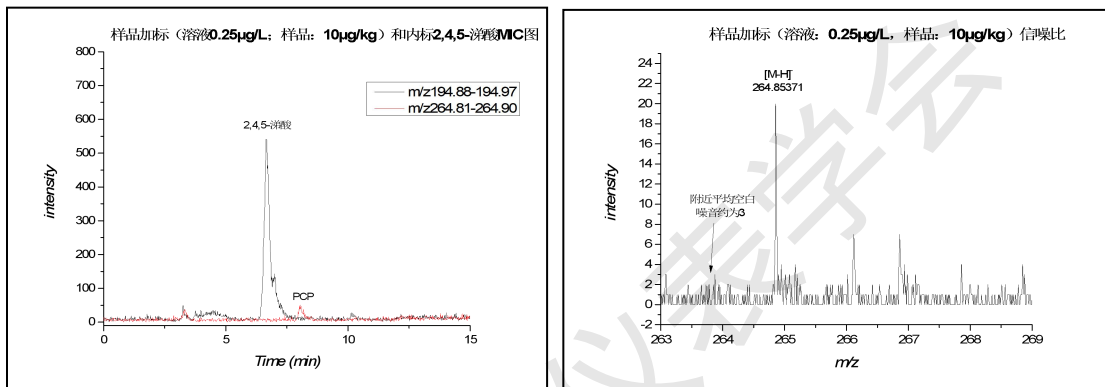


图 14 样品加标（溶液浓度为 0.25µg/L 和样品浓度为 10µg/kg）的 MIC 图和信噪比

数据分析：通过提取五氯苯酚 m/z265 的特征离子色谱峰，同时结合其 MIC 图顶点位置的质谱图可知样品浓度为 5µg/kg 和 10µg/kg 的信噪比分别为 3.7（信号强度约为 11.2，噪音为 3）和 6.7（信号强度为 20，噪音为 3）。

3.6 样品加标（样品浓度为 240µg/kg，溶液浓度为 6µg/L)的测试结果

通过在约 0.2g 的烟纸样品中加入 48µL 浓度为 1mg/L 五氯苯酚标准溶液和 80µL 浓度为 10mg/L 2,4,5-涕酸的内标储备溶液，经过样品的前处理步骤后，样品中理论含量应为 240µg/kg，溶液浓度为 6µg/L，以进样量为 5µL 上 LC-TOF 进行检测，结果见图 15。

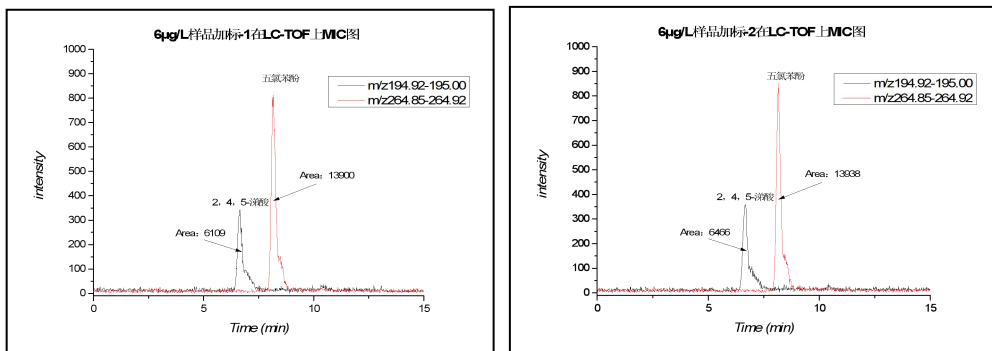


图 15 6µg/L 样品加标在 LC-TOF 上 MIC 图

数据分析：通过提取五氯苯酚和 2,4,5-涕酸目标离子 m/z 195 和 265 的特征离子峰，并对各自的 MIC 峰进行积分，分别得到样品加标 1 的 $Area_{PCP}$:13900; $Area_{涕酸}$: 6109 和样品加标 2 的 $Area_{PCP}$:13938; $Area_{涕酸}$: 6466。根据五氯苯酚内标法的线性曲线: $Y=24.651X+0.7506$ ，涕酸内标浓度为 100ng/mL，可以算出样品加标 1 的实际溶液浓度为 6.2 μ g/L，样品浓度为 248 μ g/kg；样品加标 2 的实际溶液浓度 5.7 μ g/L，样品浓度为 228 μ g/kg，它们各自的加标回收率分别为 $Recovery_{样品1}=6.2/6*100\%=103\%$ ； $Recovery_{样品2}=5.7/6*100\%=95\%$ 。

4 测试结论

通过利用 TOF 对五氯苯酚和 2,4,5-涕酸特征离子峰的检测，可以发现五氯苯酚中有特征离子峰【M-H】⁻265，未发现碎片离子峰 m/z 35 和 37；涕酸中有特征离子峰【M-H】⁻:253 和【M-C₂H₃O₂】⁻:195，但因在该电压条件下影响其灵敏度，通过对两者的优化发现 m/z 195 灵敏度相对较高些。（因本仪器结构的不同，可能有些目标化合物未能产生相应的碎片离子峰）

分别根据按该公司企业标准中 4.7.3 系列配制和按方法的定量限（0.018mg/kg）和结合样品前处理稀释情况配制所绘制出来的五氯苯酚的内标法校准曲线，它们的相关系数 R^2 值分别为 0.9913 和 0.9996，都大于 0.99，满足该公司的企业标准对线性条件的要求（ $R^2>0.99$ ）。

通过对试剂空白和样品空白检测，都未发现五氯苯酚的目标峰，可以排除前处理过程带来的污染。目前对五氯苯酚标准溶液最低检出限进行测试，其最低浓度为 0.125 μ g/L，信噪比为 4，刚刚满足仪器对定性标准要求（ $S/N\geq 3$ ）。同时利用样品加标（样品浓度分别为 5 μ g/kg 和 10 μ g/kg）进行测试，其目标物 m/z 265 的信噪比都大于 3，也能满足该公司企标的方法检出限要求（5 μ g/kg）。

利用线性曲线 $Y=24.651X+0.7506$ 对样品加标（溶液理论浓度为 6 μ g/L，样品理论浓度为 240 μ g/kg）进行回收率计算，两个平行样品的回收率分别为 103%和 95%，也能满足该企标对回收率的要求（91.6%~112.5%）。