

# 应用 Agilent J&W DB-35ms 超高惰性 GC 柱对橄榄油中有机磷农药残留量进行 GC/FPD 分析

## 应用报告

环境和食品安全

### 作者

Doris Smith and Ken Lynam  
安捷伦科技公司  
2850 Centerville Road  
Wilmington, DE 19809-1610  
美国

### 摘要

本文详细阐述了一种可快速、高效地测定橄榄油提取物中低至 ppm 及痕量级有机磷 (OP) 农药的分析方法。采用 Agilent J&W DB-35ms 超高惰性 (UI) 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm 柱, 16 min 内完成了了多种目标农药的分离, 即使对分离困难的 OP 农药也得到了完美的峰形。采用火焰光度检测器 (FPD) 的磷检测模式进行气相色谱定量分析, 并通过 GC/MS 确证。大部分农药的检测限为 10 – 15 ng/mL。三个加标浓度 (20、100 和 500ng/mL) 的农药回收率为 63% - 110%, RSD 均低于 9%。

简化的 QuEChERS (快速、简便、经济、高效、耐用、安全) 方法可在保证低浓度分析物检测的同时, 实现样品基质的充分净化。

柱后装有微板流路控制技术 (CFT) 设备, 该装置在 MSD 和 FPD 检测器之间起到分流作用, 可实现自动反吹, 以减少残留样品的交叉污染, 缩短仪器循环分析周期。



**Agilent Technologies**

## 引言

长久以来，人们认为地中海式饮食能给健康带来众多益处，包括从降低心血管疾病及高血压的发病率到预防某些癌症 [1, 2]。橄榄油是地中海式饮食中脂类物质的主要来源。一般来讲，每榨取 1 kg 橄榄油需要 4 kg 橄榄，结果造成残留农药在橄榄油中的富集 [3]。由于橄榄油的高消耗率，其中毒性农药的残留就成为当前备受瞩目的健康问题。

橄榄树种植园中常用的杀虫剂许多都属于有机磷 (OP) 类。我们选择了 16 种广泛应用于杀灭橄榄树害虫的 OP 农药进行重点监测。有机磷农药对人类的毒害可表现为急性和慢性中毒。OP 农药通过抑制在调节神经冲动方面有重要作用的乙酰胆碱酯酶来影响昆虫和哺乳动物的神经系统 [4]。

水果和蔬菜中的农药多残留测定通常包括：从植物基质中对农药进行有机溶剂提取，然后通过净化除去共提物和其它干扰物。先对高脂橄榄油基质中的农药残留运用 QuEChERS 法进行评估 [5]，后将该法用于橄榄油样品的制备提取。该方法简化了传统的、费力的样品提取和净化过程，可为农药残留分析进行彻底的样品基质净化。

色谱活性化合物如有机磷农药，能吸附在样品流路中的活性位点上，尤其在痕量分析时影响分析物的响应。在色谱系统中，这些农药往往会与活性位点相互作用，造成峰拖尾。这使得该类分析工作极具挑战性，尤其对于复杂基质样品更是这样。为确保定量准确，将气相色谱柱的吸附活性降至最低是极为重要的。Agilent J&W DB-35ms 超高惰性 (UI) 色谱柱最大限度地降低了柱活性，使得复杂和活性化合物可在痕量水平得到一致的分析结果。使用中等极性的 DB-35ms 超高惰性固定相比使用非极性固定相有更大的选择性，它可帮助分离潜在的共洗脱峰，或使目标峰与基质干扰峰分离。

样品流路中另一个具有潜在吸附活性的地点是 GC 进样口。在残留分析中，基质样品重复进样，可导致非挥发性基质成分在进样

口衬管和柱头处逐渐积聚，产生活性吸附位点且需要经常处理维护 [6]。这种基质诱导效应能够影响分析物的峰形、响应和保留时间。Agilent 带玻璃毛超高惰性进样口衬管具有最低的吸附活性，通过脱活玻璃毛对非挥发性物质的捕集，防止基质组分在进样口和柱头处的积聚。

另一个常见的基质效应被称为基质诱导信号增强效应 [6]。通过进样含基质溶液与不含基质溶液进行对比，我们可以从敏感分析物峰形和信号的改善观察到这种效应。这种增强效应是由于样品基质成分充当了保护剂，它起到了减少分析物热降解，屏蔽柱活性位点的作用。有机磷农药包含 P=O 键，如甲胺磷、乙酰甲胺磷、氧化乐果等等，经常受益于这种基质效应，使它们在含基质样品溶液中的色谱响应比在无基质标准溶液中的更高，这可导致不准确的加标回收率 [6, 7]。

Anastassiades 等 [8] 建议使用分析物保护剂来最大限度地减少基质诱导信号增强效应引起的误差 [7]。这些分析物保护剂 (APs) 可以添加到基质提取物中，从而保护敏感分析物，避免其降解。Anastassiades 等对多种化合物作为保护剂的可行性进行了评价 [8]。研究表明，古洛糖酸内酯可作为本研究的分析物保护剂。

使用能够实现多信号检测的气相色谱系统，可提供互补性数据，一次进样即可实现目标分析物的鉴别、确证和定量。本方法采用 GC/MS/SIM 和 FPD 磷检测模式，通过在 MSD 和 FPD 间对柱流出气按 1:1 比例分流，同时检测有机磷农药。本文使用 GC/MSD/FPD 系统鉴别并确定目标峰的洗脱顺序。

GC/MS 系统同时配备反吹功能。可通过进样口清洗阀反吹掉后洗脱的基质组分残留，缩短仪器循环分析时间。采用此技术可避免进样之间的长时间烘烤。同时反吹通过有效清除系统中的低挥发性组分来延长离子源清洗时间间隔 [9]。

## 实验部分

本系列实验采用配备了火焰光度检测器，以及 7683B 自动进样器的 Agilent 7890 GC/5975C MSD。采用两路吹扫微板流路控制技术 (CFT) 装置对流出气分流，MSD:FPD 分流比为 1:1。同时 CFT 装置可用于柱后反吹。此分析方法的色谱条件见表 1。本实验使用的流路耗材见表 2。

表 1. 色谱条件

GC/MSD:	Agilent 7890/5975C
进样器:	Agilent 7683B, 5.0 $\mu$ L 进样针 (部件号 5181-1273)
CFT 装置:	两路吹扫分流器 (部件号 G3180B), MSD:FPD 分流比 1:1
MSD 限流器:	1.43 m $\times$ 0.18 mm 内径脱活熔融石英毛细管 (部件号 160-2615-10)
FPD 限流器:	0.53 m $\times$ 0.18 mm 内径脱活熔融石英毛细管 (部件号 160-2615-10)
辅助 EPC:	恒压 3.8 psi
进样口:	2 $\mu$ L 不分流; 250 $^{\circ}$ C, 0.25 min 时开始吹扫, 流量 60 mL/min; 节省气流速 20 mL/min, 2 min 时开启
色谱柱:	DB-35ms UI 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 $\mu$ m (部件号 122-3832UI)
载气:	氦气, 恒压模式 28.85 psi, 95 $^{\circ}$ C
柱温箱:	95 $^{\circ}$ C 保持 0.5min, 以 25 $^{\circ}$ C/min 程序升温至 150 $^{\circ}$ C, 再以 10 $^{\circ}$ C/min 升温至 250 $^{\circ}$ C 保持 0.5 min, 最后以 20 $^{\circ}$ C/min 升温至 290 $^{\circ}$ C 保持 4.5 min
后运行反吹:	290 $^{\circ}$ C 保持 7.5 min, 反吹过程中辅助 EPC 压力为 54 psi, 进样口压力为 2 psi
MSD:	传输管线: 300 $^{\circ}$ C, 离子源: 300 $^{\circ}$ C; 四极杆: 150 $^{\circ}$ C
FPD:	230 $^{\circ}$ C, 氦气 75 mL/min, 空气 100 mL/min, 载气 + 补偿气 ( $N_2$ ) 60 mL/min

表 2. 样品流路耗材

样品瓶:	琥珀色螺纹口玻璃瓶 (部件号 5183-4496)
样品瓶盖:	螺纹瓶盖 (部件号 5181-1210)
样品瓶内插管:	250 $\mu$ L 玻璃/聚合物支脚 (部件号 5181-8872)
进样针:	5 $\mu$ L (部件号 5181-1273)
隔垫:	高级绿色隔垫 (部件号 5183-4759)
进样口衬管:	超高惰性带玻璃毛单口径锥不分衬管 (部件号 5190-2293)
密封圈:	内径 0.4 mm 短管; 85/15 聚酰亚胺/石墨 (部件号 5181-3323)
PCT 配件:	内螺母 (部件号 G2855-20530)
PCT 垫圈:	SilTite 垫圈, 内径 0.25 mm (部件号 5188-5361)
20 倍放大器:	20 倍放大环 (部件号 430-1020)

## 试剂和化学药品

所有试剂和溶剂均为 HPLC 级或超低残留级。乙腈 (ACN) 为 Honeywell 公司 (Muskegon, MI, USA) 生产, 甲苯为 Burdick & Jackson 公司生产, 丙酮为 JT Baker 公司生产, 它们均购自 VWR 国际公司 (West Chester, PA, USA); 无水农药标准品购自 Chem Service 公司 (West Chester, PA, USA), 古洛糖酸内酯购自 Aldrich 公司 (St. Louis, MO), 三苯基磷购自 Alfa Aesar 公司 (Ward Hill, MA)。

## 溶液和标准品

用丙酮制备成浓度为 1–2 mg/mL 的单个 OP 农药无水标准品溶液。然后再将这些无水溶液用丙酮制备成 50  $\mu$ g/mL 的标准贮备液。用贮备液制备浓度为 1  $\mu$ g/mL 和 5  $\mu$ g/mL 的加标溶液。替代标准品三苯基磷 (TPP) 用甲苯制备成浓度为 1、15 及 100  $\mu$ g/mL 的溶液。用最少量的水和适量的乙腈溶解古洛糖酸内酯, 制备成浓度为 50 mg/mL 的分析物保护剂溶液。将农药和替代标准品加标溶液加入基质提取物中, 并通过适当稀释制备系列溶液, 用于校正曲线的制备。将适量古洛糖酸内酯溶液加入到校正标准溶液中, 并使其浓度均达到 0.5 mg/mL。

## 样品制备

特级初榨橄榄油样品购买于当地商店。利用改进的 QuEChERS 方法进行样品提取。图 1 为样品制备流程图。

称取 3.00g ( $\pm$  0.05 g) 橄榄油样品, 置于离心管中。每份样品加入两个陶瓷均质子 (部件号 5982-9313) 加速样品提取。通过添加适量标准溶液, 制备浓度分别为 20、100 和 500 ng/mL 的质量控制样品。每份 QC 样品均加入试剂级冷水 7 mL, 涡旋 1 min。每个离心管中再加入 10 mL 乙腈, 涡旋 1 min。将安捷伦研制的含有 4 g  $MgSO_4$  和 1 g NaCl 的 QuEChERS 提取盐包 (部件号 5982-5550) 加入每个离心管中。加盖, 在机械振荡器上以 1500 rpm 震荡 1 min。再以 4000 rpm 离心 5 min。

于各离心管中取 8 mL 上层液转移至 15 mL 安捷伦 QuEChERS AOAC 脂肪样品分散 SPE 管 (部件号 5982-5158) 中。先将 dSPE 管涡旋 1 min, 再以 4000 rpm 离心 5 min。然后将大约

5.5 mL 提取物转移到另一支 15 mL 脂肪样品分散 SPE 管中，重复上述涡旋、离心过程，从而完成样品提取。将第二只管的提取物转移至样品小瓶中，加入适量古洛糖酸内酯溶液并使之达到 0.5 mg/mL 的浓度。按照表 1 的色谱条件进行 GC/MS /FPD 分析。

采用与样品相同的处理方法，制备等量水和乙腈提取物作为试剂空白。

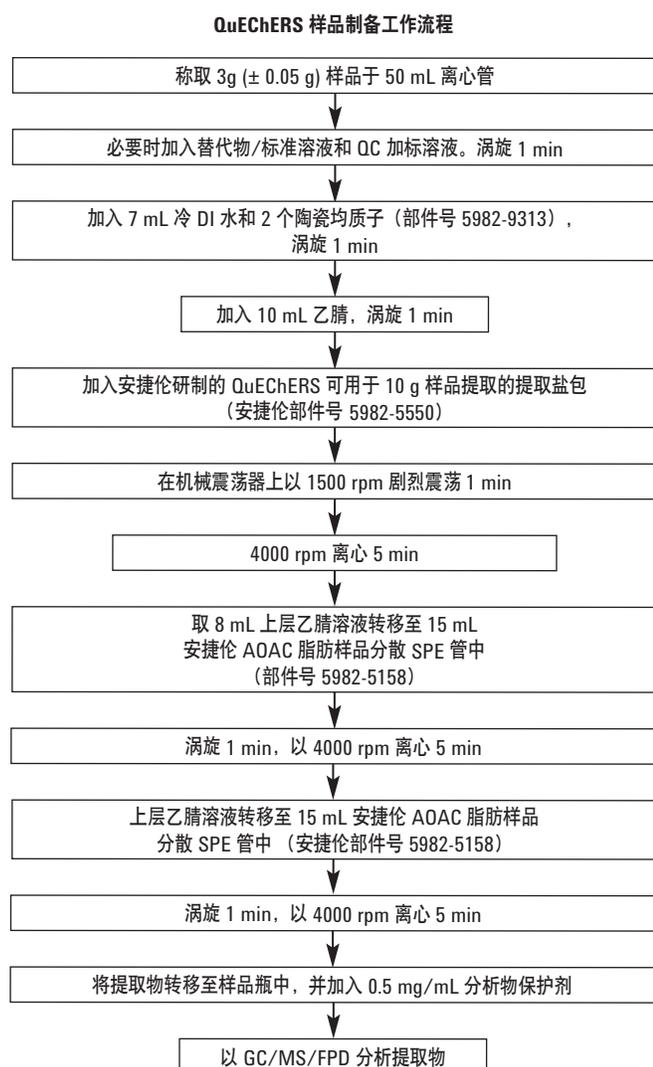


图 1. QuEChERS 法制备橄榄油中农药样品的流程图

## 结果与讨论

采用 Agilent J&W DB-35ms 超高惰性 (UI) 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm 分析柱在 16 min 内实现了 16 种目标有机磷农药的分离。图 2 色谱图展示了基质匹配的农药标准品实现良好分离的同时获得了极佳的峰形。有机磷类农药，尤其是其中极性较大的农药，经常出现峰展宽或严重拖尾问题，很难在低浓度水平进行可靠定量。使用超高惰性的 DB-35ms UI 柱分析可产生更好的峰形、减少样品于色谱柱活性位点上的吸附，确保较低检测限。图 3 显示了采用 DB-35ms UI 柱对 4 种 15 ppb 浓度的极性 OP 农药分析得到的完美峰形。

众所周知，使用气相色谱分析甲胺磷、乙酰甲胺磷、氧化乐果和乐果极具挑战性。这些有机磷农药都含有 P=O 键，易形成氢键，更易受到基质诱导效应的影响。分析物保护剂（古洛糖酸内酯）的使用，有效减小了相关基质效应，改善了被测物的响应。这一改善效果见图 4，该图显示了加入和未加入古洛糖酸内酯的 500 ng/mL 标准液的分析结果。

因为在火焰光度检测器的磷检测模式下只对含磷的被测物具有良好的选择性，故它能在几乎没有基质干扰的情况下，对复杂基质样品如橄榄油中的 OP 农药进行检测。在痕量分析时具有高信噪比，表明本法具有极高的检测灵敏度。图 5 展示了 10 ng/mL 毒死蜱的信噪比。FPD 能检测含量低至 10 ng/mL 的有机磷农药，但氧化乐果、二嗪磷、甲基谷硫磷和乙基谷硫磷在稍高的 15 ng/mL 浓度处才能被检测到。方法对目标 OP 农药的检测限在美国、欧盟及食品法典制定的橄榄油中 0.01 – 2 mg/kg 农药最大残留限量 (MRLs) 的范围内 [10, 11, 12]。迄今为止，很少有关于橄榄油中 MRLs 的报道，因此用橄榄的 MRLs 作为参考。因为橄榄油中残留的农药预计被富集到橄榄油中，橄榄油 MRLs 应高于橄榄的 MRLs。

用 QuEChERS 法能有效提取加标橄榄油样品中的有机磷农药，并能为 GC 分析充分净化样品基质。图 6 显示了用 QuEChERS 法制备添加了有机磷农药的橄榄油样品。

## 采用 Agilent J&W DB-35ms UI 柱 分析 16 种有机磷农药的分离色谱图

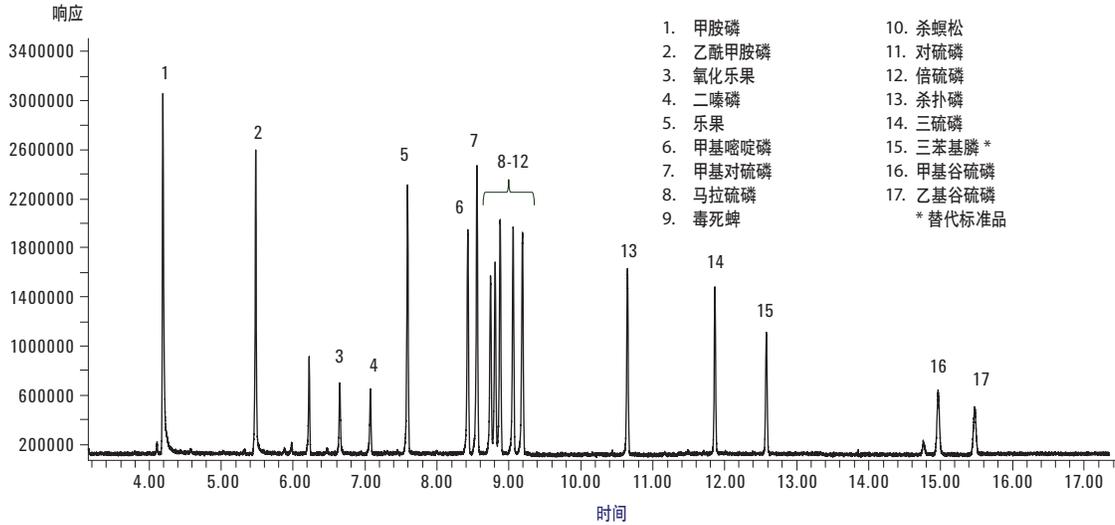


图 2. 采用 Agilent J&W DB-35ms UI 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm 毛细管 GC 柱 (部件号 122-3832 UI) 分析 100 ng/mL 添加了分析物保护剂的基质匹配有机磷农药标准品的 GC/FPD 色谱图。色谱条件列于表 1

## 采用 Agilent J&W DB-35ms UI 柱 分析极性有机磷农药可得到优异的峰形

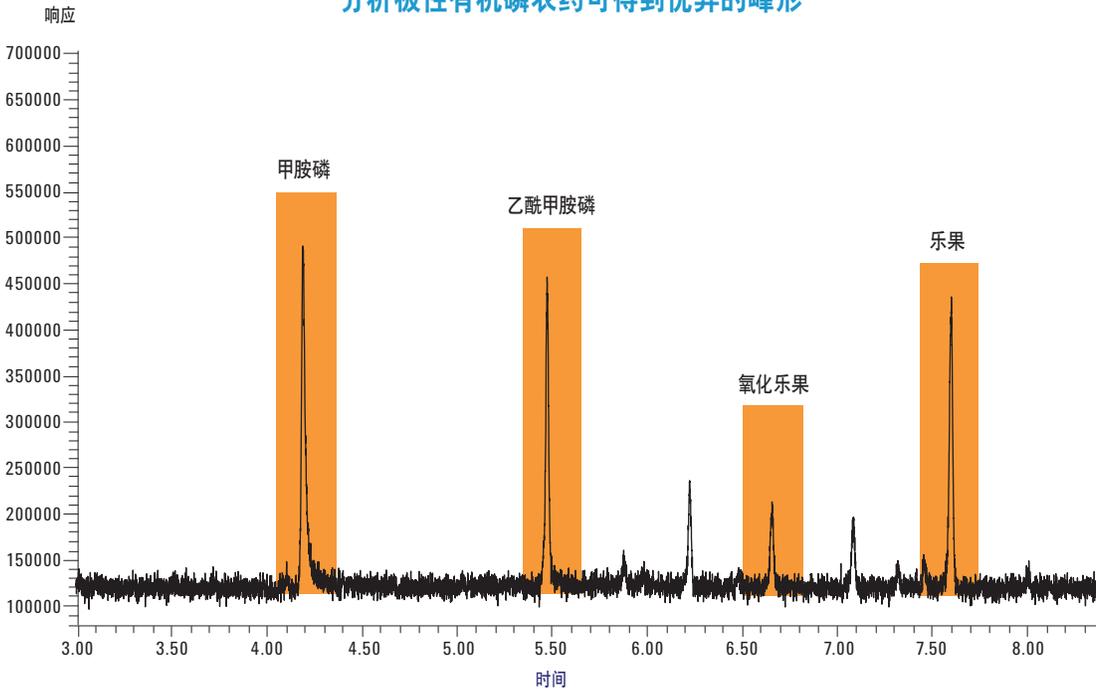


图 3. 采用 Agilent J&W DB-35ms UI 毛细管柱 (部件号 122-3832UI) 分析 15 ng/mL 添加分析物保护剂的基质匹配标准品的 GC/FPD 局部放大色谱图。色谱条件列于表 1

### 极性 OP 农药使用分析物保护剂的效果色谱图

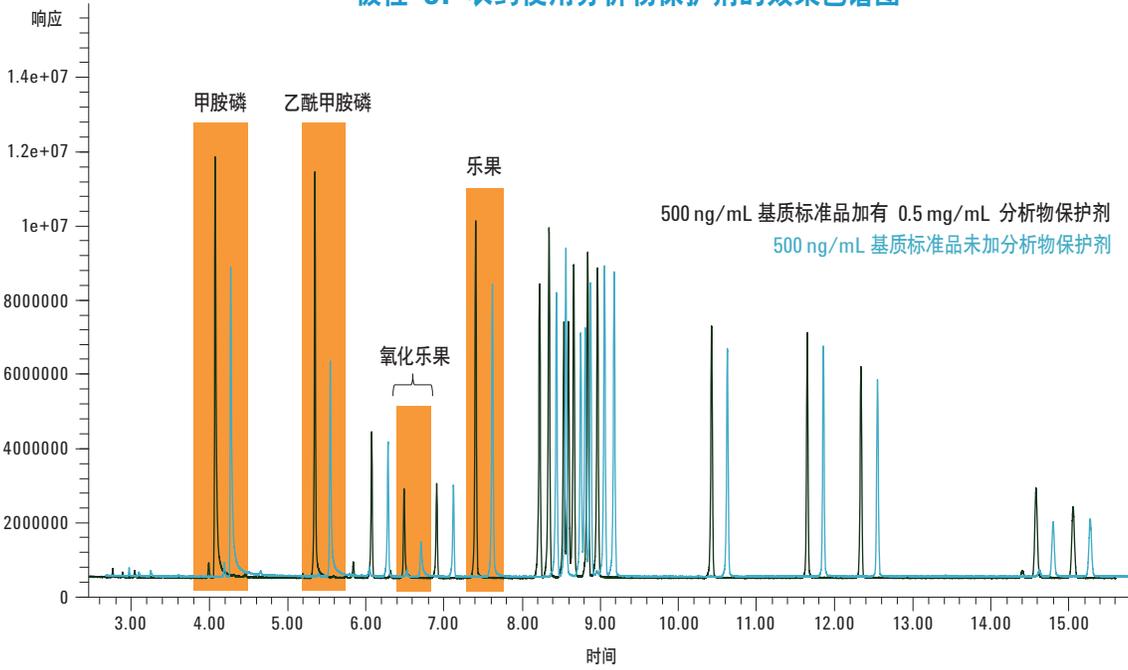


图 4. 采用 Agilent J&W DB-35 ms UI 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm 毛细管 GC 柱 (部件号 122-3832 UI) 分析 500 ng/mL 添加和不添加分析物保护剂的基质匹配标准品的 GC/FPD 色谱对比图。为了更好地展示效果, 对不添加分析物保护剂的标准品的保留时间做了校正。色谱条件列于表 1

### 采用 Agilent J&W DB-35ms UI GC 色谱柱 分析痕量水平的有机磷农药, 具有出色的检测灵敏度

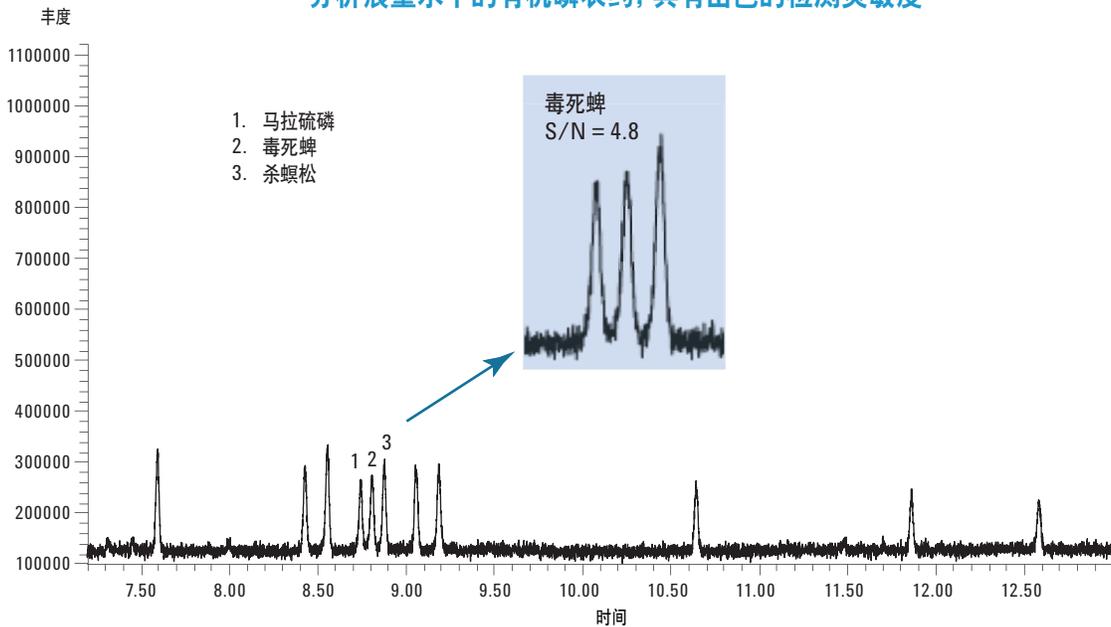


图 5. 采用 Agilent J&W DB-35 ms UI 毛细管柱 (部件号 122-3832UI) 分析 10 ng/mL 添加了分析物保护剂的基质匹配标准品的 GC/FPD 局部放大色谱图。色谱条件列于表 1

## 采用安捷伦 QuEChERS 法和分散 SPE 提取的空白橄榄油样品 相对于加标样品的色谱图

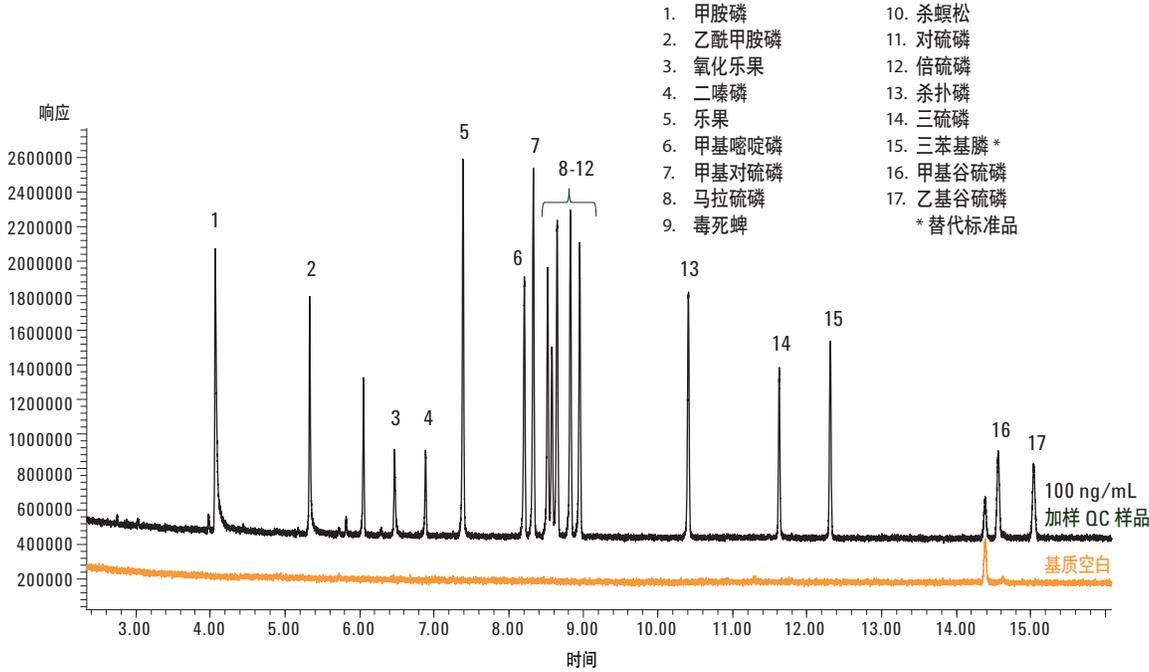


图 6. 采用 Agilent J&W DB-35 ms UI 色谱柱 (部件号 122-3832UI) 分析均添加了分析物保护剂的橄榄油空白提取物和 100 ng/mL 加标样品的 GC/FPD 色谱图。色谱条件列于表 1

色谱图中空白基质谱线低于被分析物谱线，说明了基质干扰对目标分析物的干扰状况。有机磷农药实现了良好分离且峰形尖锐，显示了 DB-35ms UI 柱对橄榄油样品分析具有极佳的色谱性能。

被测物的非线性响应表示分析物分解或在色谱柱上产生吸附。而采用 DB-35ms UI GC 柱分析，在方法校准浓度范围内可得到极佳线性。所有有机磷农药校准曲线的  $R^2$  值均大于 0.999。单个有机磷农药的数据见表 3。

在 20、100 和 500 ng/mL 浓度水平进行了 GC/FPD 分析的回收率测定。除了乙酰甲胺磷的回收率略低于 66% 外，其它有机磷农药的回收率均大于 70%，且 RSD 均低于 10%。单个有机磷农药的回收率数据列于表 4。

表 3. 使用 GC/FPD 分析添加了分析物保护剂的基质匹配标准有机磷农药的相关系数

### 采用 Agilent J&W DB-35ms UI 柱 分析 OP 农药具有良好的线性

	$R^2$
甲胺磷	0.9997
乙酰甲胺磷	0.9997
氧化乐果 *	0.9996
二嗪磷 *	0.9992
乐果	0.9995
甲基嘧啶磷	0.9996
甲基对硫磷	0.9995
马拉硫磷	0.9995
毒死蜱	0.9996
杀螟松	0.9995
对硫磷	0.9995
倍硫磷	0.9994
杀扑磷	0.9994
三硫磷	0.9993
三苯基膦	0.9995
甲基谷硫磷 *	0.9995
乙基谷硫磷 *	0.9990

在 10、15、25、50、100、250 和 500 ppb 系列校准水平时的  $R^2$  值

\* 在 15、25、50、250 和 500 ppb 系列浓度时校准

表 4. 采用 Agilent J&W DB-35ms UI 柱 (部件号 122-3832UI) 分析加标 OP 农药橄榄油样品的回收率和重现性

采用 J&W DB-35ms UI 柱分析 OP 农药的回收率和重现性

分析物	1 x 加标		5 x 加标		25 x 加标	
	20 ng/mL 回收率 %	加标 QC 样品 RSD (n=6)	100 ng/mL 回收率 %	加标 QC 样品 RSD (n=6)	500 ng/mL 回收率 %	加标 QC 样品 RSD (n=6)
甲胺磷	82.1	4.2	77.5	2.2	79.3	1.2
乙酰甲胺磷	70.9	3.6	64.1	3.2	62.7	1.9
氧化乐果	71.3	8.8	87.0	3.2	92.5	3.1
二嗪磷	73.8	6.6	93.8	4.1	98.4	1.0
乐果	97.2	3.9	101.6	3.0	107.2	1.7
甲基嘧啶磷	79.2	3.7	81.6	2.2	86.0	1.2
甲基对硫磷	93.2	6.0	92.4	2.7	97.2	1.8
马拉硫磷	102.8	5.1	104.5	2.5	109.3	1.1
毒死蜱	72.9	4.9	72.4	1.6	76.1	1.2
杀螟松	94.9	4.9	95.9	3.1	101.1	1.5
对硫磷	104.2	7.0	104.8	2.8	110.6	1.2
倍硫磷	90.2	6.1	92.7	2.3	96.4	1.2
杀扑磷	99.5	5.6	100.6	3.2	106.5	1.3
三硫磷	75.8	4.2	72.9	3.0	75.6	1.4
三苯基磷*	108.8	1.2	106.4	2.5	115.6	1.3
甲基谷硫磷	91.5	4.7	97.1	3.2	100.7	2.8
乙基谷硫磷	81.7	6.1	101.8	4.0	110.7	1.3

\* 替代标准品

## 结论

采用 Agilent J&W DB-35ms UI 毛细管柱成功分离分析了目标 OP 农药, 并且得到了极性农药的优异峰形, 确保了在低浓度水平更加可靠的定量。本法对橄榄油中 OP 农药的检测限低于欧盟、食品法典和美国对橄榄中 OP 农药的最高残留限量 (MRLs) 或与之相当。基质匹配标准溶液的线性回归相关系数  $R^2$  大于 0.999, 其加标回收率在 63% - 107% 之间, 平均 RSD < 9%, 进一步证明了采用 Agilent J&W DB-35ms UI 柱进行农药残留检测的高效性。

本实验成功论证了一种高效、快速的监测橄榄油中残留的低浓度和痕量 OP 农药的分析方法。通过将色谱柱流出气在 MSD 和 FPD 间分流, 仅通过一次进样即可实现有机磷农药的选择、鉴别和确认, 从而提高了实验室的工作效率。OP 农药通过 GC/MS - SIM

进行选择和确证, 而进一步的确认和定量分析则通过 FPD 的磷检测模式实现。

Agilent QuEChERS 方法可实现样品的充分净化, 在最大程度降低基质干扰的同时, 确保低浓度分析物的测定。简便的 QuEChERS 样品提取方法制备样品速度更快, 可获得更高的样品制备通量。本法采用反吹技术来去除残留样品基质, 无需烘烤, 显著地缩短了分析运行时间。

## 致谢

作者感谢 Joan Stevens 在用 Agilent QuEChERS 法制备样品过程中给予的帮助和建议。

## 参考文献

1. J. Brill Bond, “地中海饮食方式和您的健康,” 美国医学杂志, 2009; 3: 44
2. T. Psaltopoulou, A. Naska, P. Orfanos, D. Trichopoulos, T. Mountokalakis, A. Trichopoulou, “橄榄油、地中海饮食方式和动脉血压: 希腊欧洲癌症与营养前瞻性研究” 美国营养学会会刊, 2004; 80: 1012-18
3. E. G. Amvrazi and T. A. Albanis “应用配备 NPD 和ECD 检测器的 GC 以及液液萃取和固相萃取净化技术测定初榨橄榄油中 35 农药多残留的检测方法” 食品农业化学期刊, 2006, 54, 9642-9651
4. L. G. Sultatos, “有机磷农药对哺乳动物的毒性影响” 毒理学和环境健康期刊, 1994; 43(3): 271 – 289
5. S. C. Cunha, S. J. Lehotay, K. Mastovska, J. O. Fernandes, M. Beatriz, and P. P. Oliveira, “使用 QuEChERS 样品制备法对橄榄油中农药残留分析的评估”, 分离科学期刊, 2007, 30, 20-632
6. D. R. Erney, A. M. Gillespie, D. M. Gilvydis, C. F. Poole, “在使用配备不分流进样或热柱上进样, 以及 FPD 检测器的开管柱气相色谱进行有机磷农药测定的过程中, 产生基质引导信号增强效应的原因,” 色谱, 1993; 638, 57-63
7. M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Štajnbaher, F. J. Schenck, “使用乙腈萃取/分层以及 ‘分散固相萃取’ 进行快速、便捷的多残留提取, 用于农产品中农药残留测定的方法,” 美国分析化学家学会期刊, 2003; 86, 412-431
8. M. Anastassiades, K. Mastovska, and S. J. Lehotay “分析物保护剂对气相色谱分析农药改进的评价,” 色谱 A, 2003; 1015, 163-184
9. C. K. Meng, “用反吹技术提高柱效和延长柱寿命,” 安捷伦科技出版号 5989-6018CHCN
10. <http://www.mrlDatabase.com/>
11. [http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/index.cfm](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm)
12. <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/index.html>

## 更多信息

如需了解更多有关我们产品和服务的信息, 请访问我们的网站 [www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)。

[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

安捷伦对本材料可能存在的错误，或由于提供、展示或使用该材料造成的直接或间接损失概不负责。

本出版物所含信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011  
2011年3月21日 中国印刷  
5990-7722CHCN



**Agilent Technologies**