

使用保留时间锁定和 GC/MS 对 ppt 级的农药进行定性和定量分析

应用

环境, 食品

作者:

C. Kai Meng
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

在质谱全扫描模式下典型的农药定量限在亚ppm级范围。使用保留时间锁定气相色谱/质谱方法, 选择离子检测, 实验室可以将目标化合物定量限降低至 ppb 级 (pg/ μ L) 以下。如在方法中使用大体积进样, 目标化合物可在 ppt 级进行定量。

专门建立的567种化合物的保留时间锁定农药质谱库, 能够在很短的时间内从采集样品数据文件中自动筛选出这567种化合物。谱库也可以用于选择离子检测方法采集样品的快速筛选。使用化合物谱库信息, 可以在2小时之内建立一个包括80种目标化合物的选择离子检测方法, 而不需运行任何分析过程。

前言

大多数的农药通常使用气相色谱 (GC) 和元素选择性检测器 (ESD)。尽管这些元素选择性检测器能提供低至 ppb 级的检测限并且易于操作, 但是其数据不能提

供足够信息, 以充分证据确认某一化合物的存在。由于质谱仪器检测的通用性, 质谱 (MS) 能够提供额外信息, 增加化合物确认工作的置信度。随着近年来GC/MS硬件和软件的进步以及购买成本的降低, 越来越多的实验室使用质谱检测作为农药残留样品的常规分析手段。

为了与GC/ESD的检测限相匹配, 和/或消除样品浓缩步骤, 用户必须将MS的检测限降低2到3个数量级。本文讨论了以下方法:

- 使用质谱 (MS) 的选择单离子检测模式 (SIM)
- 大体积进样 (LVI)
- 使用更高的电子倍增器电压 (EMV)

对于化合物的定性确认, 特制的567种化合物保留时间锁定 (RTL)[1]农药谱库能够用扫描数据对所有567种化合物进行快速筛选。用该库也能够从SIM数据中进行快速筛选。

实验

农药的混合标样用于比较不分流进样和大体积进样在全扫描 (Scan) 模式和选择离子检测 (SIM) 模式下的最低检测限。



扫描和定量的系统设置

- 6890 GC, 配有程序升温汽化 (PTV)[2,3]进样口
- 5973 质量选择检测器 (MSD)
- 7683 自动液体进样器 (ALS) 托盘及自动进样器
- HP-5MS 毛细管柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), P/N 19091S-433
- G1701BA 版本 B.00.00 MSD ChemStation 软件或更高
- G1049A MSD RTL 农药数据库

表 1. GC 方法参数

炉温	70(2)/25/150(0)/3/200(0)/8/280(10) = 41.87 min
进样口	PTV
进样口压力	17.30 psi (锁定甲基毒死蜱时间为 16.593 min), 恒压模式

表 2. 进样参数

进样模式	溶剂排放	不分流
进样量 (注射器)	25 μL (50 μL - 注射器, 部件号 5183-0318)	1 μL (10 μL - 注射器, 部件号 9301-0713)
进样速度	进样 @ 100 μL/min 提取 @ 300 μL/min 分配 @ 4500 μL/min	快速
进样口温度	40(0.35)/600/320 (3)/50/200 保持至结束	280 °C
排放	排放时间 = 0.29 min 排放流速 = 150 mL/min 排放压力 = 0.00 psi	
清洗	60 ml/min @ 2 min	60 ml/min @ 2 min
衬管	去活, 多阻管 (P/N 5183-2037)	去活, 多阻管 (P/N 5183-2037)
进样口冷却	液体 CO ₂	无

表 3. MS 方法参数

溶剂延迟	3 min
调谐文件	Atune.u
传输管	280 °C
四极杆	150 °C
离子源	230 °C
阈值	150
采样 #	2
扫描范围	35-500 amu (全扫描模式)
40 个 SIM 组 (SIM) 模式	

表 4. SIM 方法的农药筛选参数

Extraction window	± 0.100 minute
Qualifier mode	Absolute
Qualifier%	30
Zero qualifiers	Included
Subtraction mode	Average start/stop
Screen database	Rtlpest.SCD

结果与讨论

RTL[1]可用于:

1. 在重叠格式下加快数据比较;
2. 获取更低的目标化合物检测限
3. 使用 RTL 农药数据库进行快速农药筛选
4. 有助于通过保留时间 (RT) 差异来区分异构体
5. 避免柱维护后 SIM 方法烦琐的保留时间 (RT) 更新过程
6. 简化 SIM 离子组的编辑

本研究使用的 80 种农药混合标样来自于加利福尼亚食品农业部, 每种农药浓度都是 5000 pg/μL, 作为储备液。混合标样包括氨基甲酸酯、有机氯、有机磷和有机氮农药。图 1 是每种农药进样量为 50、100 和 500 pg 样品的三个总离子流图 (TIC) 的补偿重叠图。这些总离子流图是在全扫描模式下 1 - μL 不分流进样得到的。这些农药中大多数在全扫描模式下定量限约为 500 pg。

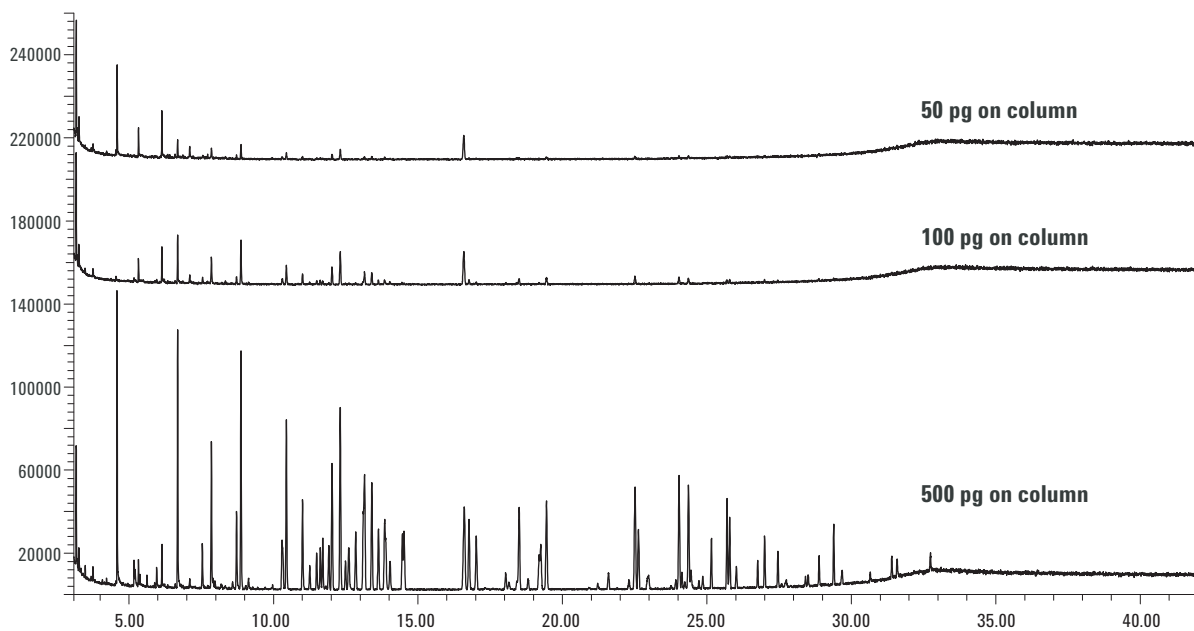


图 1. 80 种农药进样量为 50、100 和 500 pg，1 μ L 不分流进样的总离子流图 (TIC)

SIM 模式

为了降低检测限，创建了 SIM 方法。取代建立 SIM 方法的传统方式，用户不必运行一个分析过程，使用 RTL 农药数据库的信息就可以创建一个 SIM 方法。以下是

编辑 SIM 离子组参数的步骤：

1. 从 ChemStation 中列出 MSD RTL 农药数据库（图 2 是一部分列表），将整个列表粘贴到电子表格中。
2. 在电子表格中删除方法不需要的化合物行。

Cpd#	Compound Name	Tion	Exp_RT	01	02	03
1	Diethylene glycol	45	3.39	75	76	44
2	Aniline	93	3.55	66	65	92
3	p-Dichlorobenzene	146	3.88	148	111	75
4	Dicyclopentadiene	66	4.00	132	67	65
5	Dimetox	44	4.01	110	154	42
6	o-Dichlorobenzene	146	4.09	148	111	75
7	2-Methylphenol	108	4.25	107	77	79
8	4-Methylphenol	107	4.42	108	77	79
9	m-Cresol	108	4.42	107	79	77
10	1,2-Dibromo-3-chloropropane	157	4.53	155	75	159
11	2,4-Dimethylaniline	121	5.19	120	106	77
12	2,6-Dimethylaniline	121	5.20	106	120	77
13	2,4-Dichlorophenol	162	5.19	164	63	98
14	1,2,4-Trichlorobenzene	180	5.29	182	184	145
15	Ethiolate	100	5.41	72	161	44
16	3-Chloroaniline	127	5.45	129	65	92
17	4-Chloroaniline	127	5.48	129	65	92
18	2-Ethyl-1,3-hexanediol	56	5.51	55	73	57
19	p-Nitrotoluene	91	5.57	137	65	107
20	Methamidophos	94	5.66	95	141	47
21	Dichlorvos	109	5.83	185	79	187
22	Allidochlor	41	6.18	56	138	132
23	2,3,5-Trichlorophenol	196	6.63	198	200	160
24	2,6-Dichlorobenzonitrile	171	6.75	173	136	100

图 2. 农药筛选数据库的部分列表。列表包括化合物序号、化合物名称、目标离子、预计保留时间和三个确认离子。

- 利用以下标准将目标化合物分组（参见图 3 的添加“Group#”栏）：
 - 每组一到三个化合物。
 - 相邻两组中相邻化合物保留时间至少相隔 0.2 min。例如，化合物 42 和 51 保留时间间隔超过 0.2 min，它们可以分到不同的组中。化合物 51 和 55 间隔少于 0.2 min，它们分在同一组。
- 使用相邻两组中相邻化合物的平均保留时间作为 SIM 组的保留时间(参见图 3 中添加“Group RT”一栏)。例如，化合物 42 (7.91 min, 第 2 组) 和化合物 51 (8.78 min, 第 3 组) 的平均保留时间为 8.35 min，将这个平均时间作为第 3 组的起始保留时间。当所有的组号以及相应的起始保留时间设定后，将电子表格做硬拷贝以便于下一步“MS SIM/Scan 参数”的输入。
- 将所有化合物的目标离子和确认离子 (Q1, Q2 和/或 Q3) 输入到对应的 ChemStation SIM 分组中 (图 4)。注意建立 SIM 分组的所有信息都来自于图 3。

#	Compound Name	MSD RT	T	Q1	Group #	Group RT
24	2,6-Dichlorobenzonitrile	6.75	171	173	1	3.00
35	Mevinphos	7.60	127	192		
42	Propham	7.91	93	179	2	7.75
51	o-Phenylphenol	8.78	170	169	3	8.35
55	Pentachlorobenzene	8.95	250	252		
76	Propoxur	10.35	110	152	4	9.60
82	Diphenylamine	10.52	169	168		
92	Chlorpropham	11.05	127	213	5	10.76
98	Ethalfuralin	11.28	276	316		
102	Bendiocarb	11.54	151	126	6	11.41
103	Trifluralin	11.64	306	264		
104	Benfluralin	11.73	292	264		
111	Phorate	11.96	75	121	7	
113	BHC alpha isomer	12.09	181	219		
117	Hexachlorobenzene	12.38	284	286		
120	Dicloran	12.56	206	176		
122	Demeton-S	12.63	88	60		
124	Dimethoate	12.68	87	93		
129	Simazine	12.91	201	186		

图 3. 将目标化合物按照相邻组的相邻化合物保留时间至少相差 0.2 min 分为不同 SIM 组的电子表格，通过计算相邻组中相邻化合物的平均 RT 决定每组开始的保留时间。

SIM 方法中使用的确认离子数取决于所要分析物的数目。对于一个检测 20 到 30 个化合物的方法来说，所有三个确认离子都应该用在 SIM 方法中。随着所列目标化合物的增长，应该在方法中使用较少的确认离子，以保持一个合理的、可比较的离子驻留时间和采样速率。

一般说来，用于定量目的，每个色谱峰推荐进行 10 次扫描（循环）。例如，如果某一分析物峰宽为 6 秒，那么该 SIM 离子组应该保持每秒扫描 1.7 个循环。一旦确定了每秒的循环次数，离子驻留时间也随之改变。在输入每个离子的停留时间时，ChemStation 会自动显示每秒循环次数。在图 4 中，第 6 组每秒有 3.03 个循环。

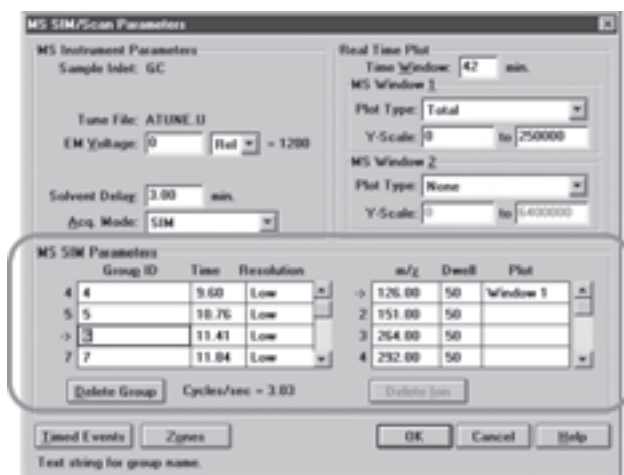


图 4. MSD ChemStation 软件的屏幕截图，显示了 MS 和 SIM 参数。SIM 参数 (组 ID, 组保留时间和离子) 都从图 3 得到。

图 5 显示的是使用全扫描模式和 SIM 模式的 50 pg/μL 样品不分流进样 1- μL 的两个色谱图。全扫描模式的基线噪音比 SIM 模式明显高很多。Scan 模式检测不到某些化合物，特别是晚流出物。当把同样浓度的全扫描方法改变为 SIM 方法时，信噪比 (S/N) 可增加 100 倍。值得指出的是，SIM 方法不记录样品基质的背景离子，因此能降低基线噪音，改善信噪比 (S/N)。

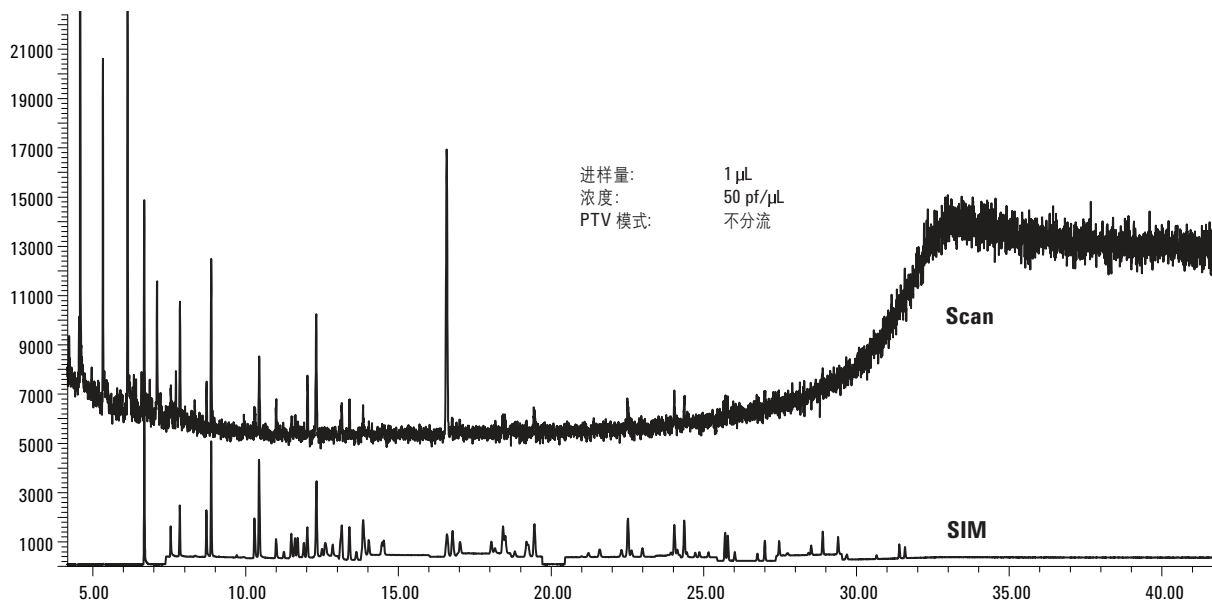


图 5. 50 pg/μL 样品 1 μL 不分流进样的全扫描模式和 SIM 模式色谱图

SIM 方法在柱维护后，离子组的保留时间通常需要更新。通过使用 RTL，用户不但能避免烦琐的保留时间 (RT) 更新过程[4]，而且能够降低检测限。用目标化合物已知的可重现的保留时间 (RT)，每个离子组的开始和结束时间能够优化。通过缩窄离子组的时间窗口，在一段时间内，一次只检测一个或两个化合物，质谱能在每个窗口中检测较少的离子，从而对目标离子的采样时间更长。

理想状态下，SIM 方法应有最大数量的离子组，每组离子数目最少。这样，每个离子组在单位时间内能够得到更多扫描次数，从而得到更好的峰形和更精确的定量结果。

大体积进样 (LVI)

为了进一步降低检测限，用户可以使用大体积进样技术将更多样品进到柱中。典型的“溶剂—排放”方法就是在恰好低于溶剂沸点的温度下，将样品缓慢注入到 PTV 进样口中，在升高进样口温度使化合物进入柱子之前让溶剂挥发。图 6 比较了 25 μL 溶剂排放进样和 1 μL 不分流进样。两种进样方式都将每种 50 pg 的化合物注入柱中。需要注意的是，为了易于与不分流离子色谱图相比较，溶剂—排放离子色谱图在图中倒置。很显然，从图中可以看出，这两种技术给出非常相似的结果。这表明溶剂排放技术作为一种样品导入方法是可行的。

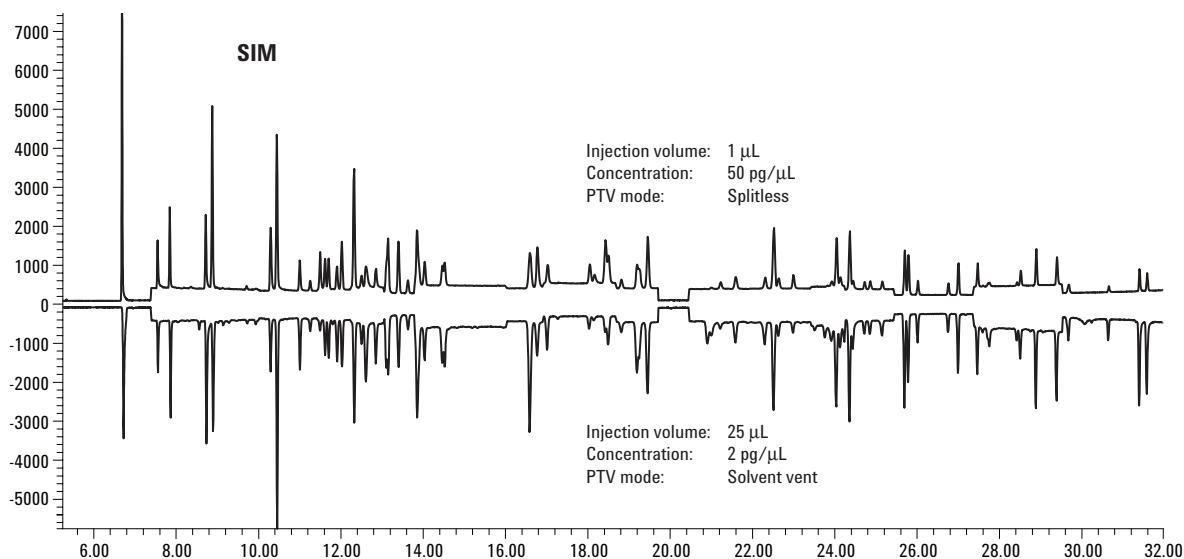


图 6. 50 pg 柱头进样，分别使用 1 µL 不分流进样或 25 µL 溶剂排放进样的 SIM 方法结果

提高电子倍增器电压 (EMV)

众所周知，质谱 (MS) 的电子倍增器电压 (EMV) 升高会使信号随之增加。图 7 中，上面是在调谐电压下，经过 10 倍放大的 25 µL, 0.5 pg/µL 样品大体积进样的信号。下端是同样进样，将电子倍增器电压比调谐电压调高 400 V 后的信号。电子倍增器电压 (EMV) 增加

400 V 后，信号强度增加了 10 倍，这使积分结果更精确；但同时基线噪音也增加 10 倍，所以信噪比 (S/N) 相同。

尽管增加电子倍增器电压 (EMV) 的确有助于小峰进入检测阈值，但也会缩短电子倍增器的寿命。一般来说，EMV 应该保持在调谐电压状态。

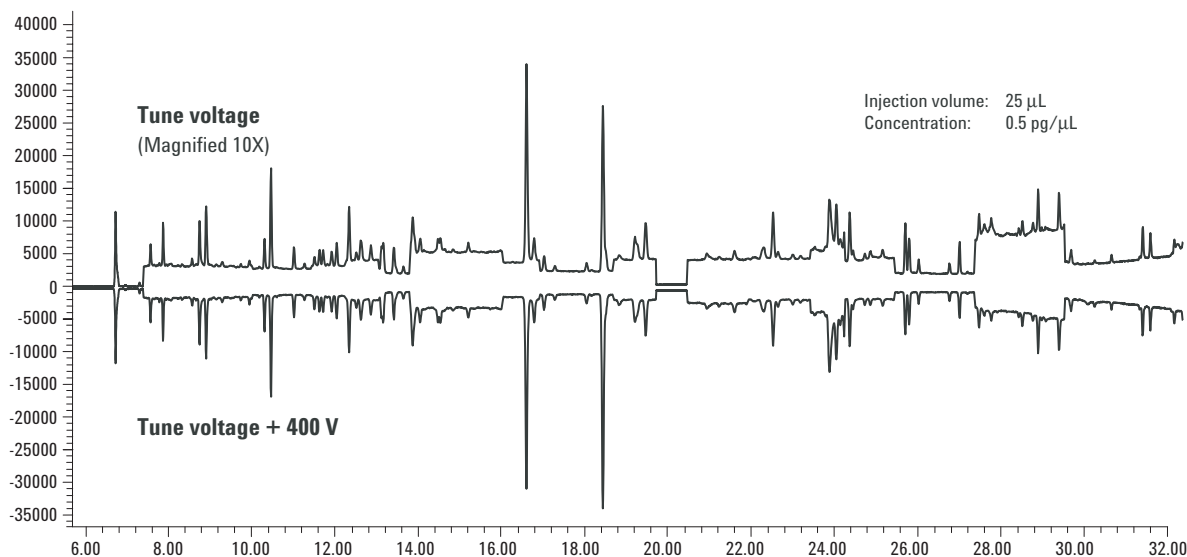


图 7. 12.5 pg 柱头进样，使用 EMV 调谐电压或增加 400 V 的 SIM 方法结果

大体积进样 (LVI) 和 SIM 方法结合使用

同时应用 LVI 和 SIM, 图 8 和图 9 显示了三个化合物在低至 5 pg 时柱头进样的定量峰。图 8 显示的是浓度为 0.2 pg/ μL 与 500 pg/ μL 的硫丹硫酸盐和 p,p'-DDT 样品离子色谱图。上图是 25 μL 溶剂排放进样 SIM 方法; 下图是 1 μL 不分流进样全扫描方法。通过使用 LVI 和 SIM, 有趣地发现, 即使将样品浓度降低 2500 倍 (从 500 pg/ μL 到 0.2 pg/ μL), 仍然能得到相似的信噪比 (S/N)。

通过将进样体积增加到 100 μL , 样品浓度低至 0.05 pg/ μL 时仍然可以进行定量, 如图 9 所示。图的上半部分显示了 100 μL 敌草索样品全扫描运行后的 m/z 299 和 m/z 301 的提取离子色谱图 (EIC); 下半部分是 100 μL 样品 SIM 方法运行后同样离子的提取离子色谱图。SIM 方法显示出了更好的峰形以及更低的基线噪音。

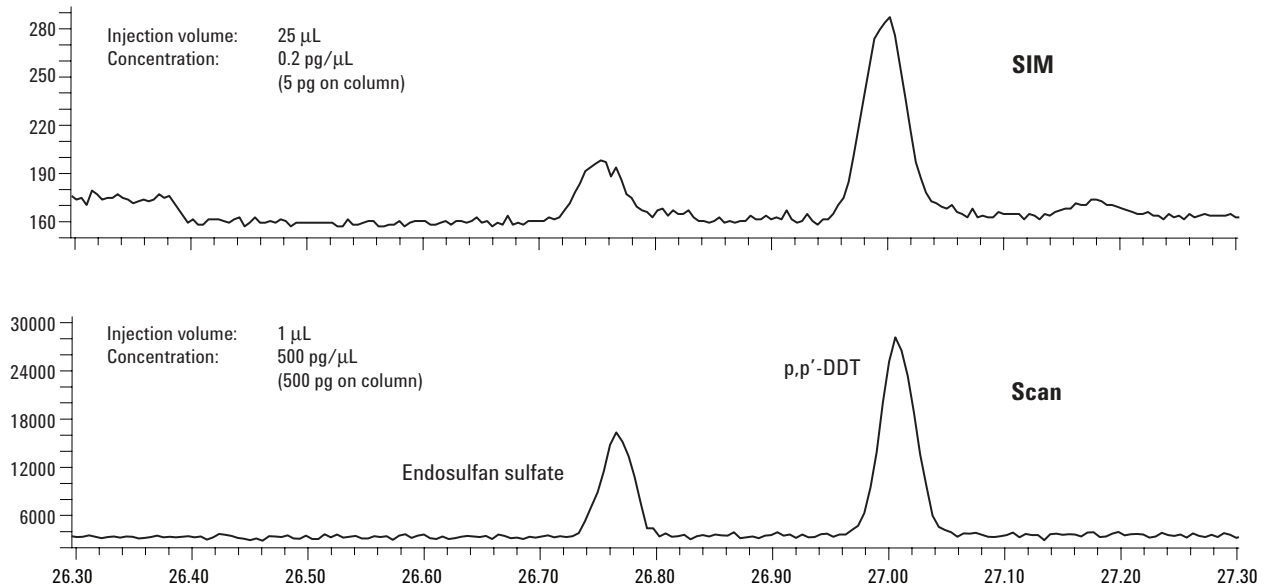


图 8. 浓度为 0.2 pg/ μL 与 500 pg/ μL 的硫丹硫酸盐和 p,p'-DDT 样品离子色谱图。上半部分色谱图为 25 μL 溶剂一排放进样 / SIM 方法; 下半部分色谱图为 1 μL 不分流进样 / 全扫描方法

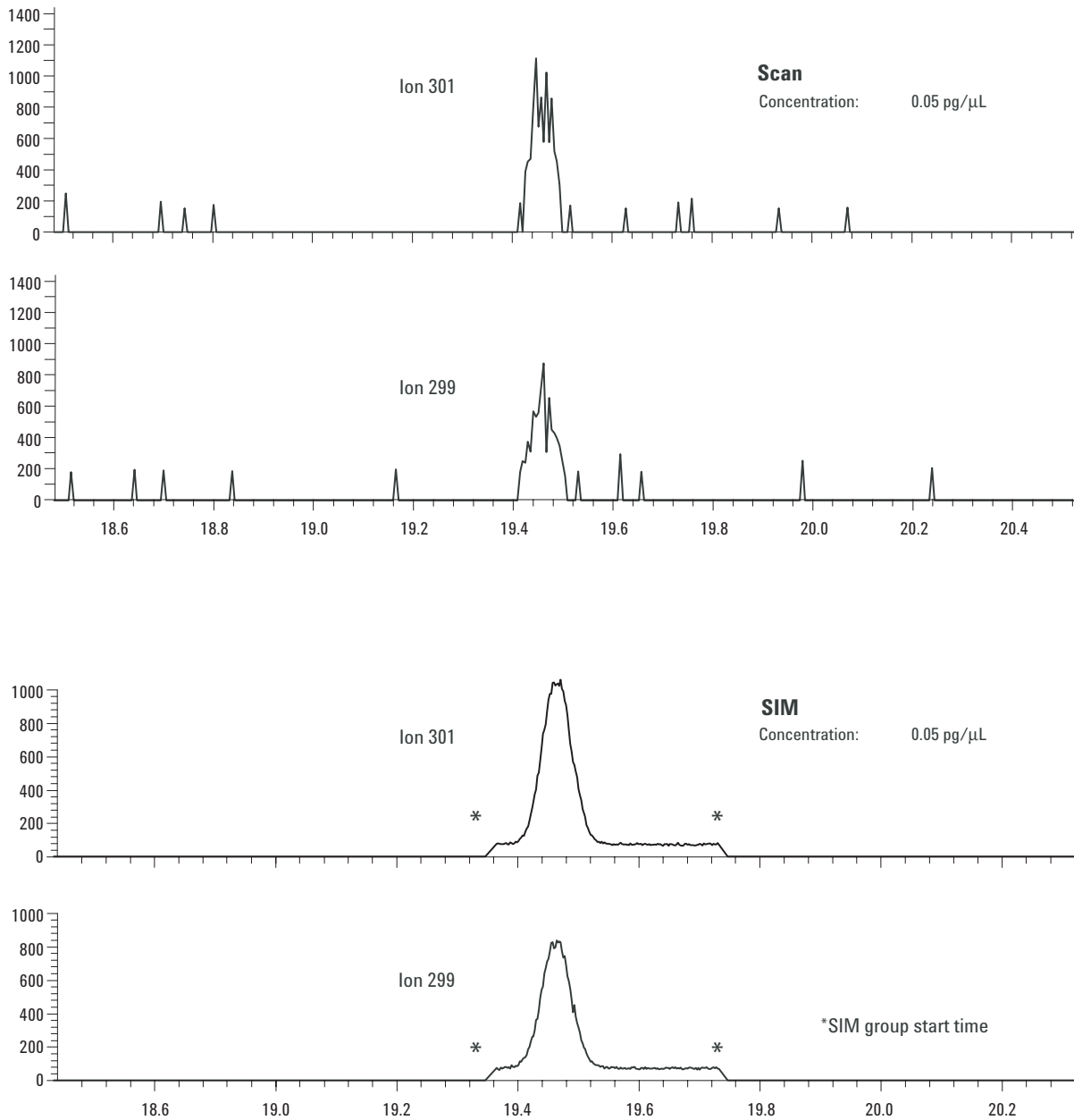


图 9 . 进样 100 μL 的 0.05 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 敌草索样品的离子色谱图。上面部分为全扫描运行方法运行，下面部分为 SIM 方法运行

目标化合物筛选

结合使用 RTL 和 G1049A MSD RTL 农药数据库，用户可以筛选 567 种农药，而且可以从任何全扫描运行数据中筛选出可疑的内源性干扰物 [5]。用户也可以使用 SIM 方法进行谱库筛选来提高灵敏度。MSD Chem-

Station 能在少于 30 秒的时间内自动生成 567 种化合物的筛选报告。图 10 即为 0.5 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 样品 (SIM 模式，进样 25 μL) 的报告，其中列出了“确认结果” (用 x 标出) 和“可疑结果” (用 ? 标出)。在柱头进样 12.5 pg 水平，所有的目标化合物用这个软件都能找到。

MultiVu - [C:\SYS_X\DATA\80MIX\0403SIM\0_5PG2.D\scntemp.txt]

Screen Report (Not Reviewed)

Data File : C:\SYS_X\DATA\80MIX\0403SIM\0_5PG2.D Vial: 16
 Acq On : 3 Apr 2001 10:26 Operator: 40 SIMgrps.40gr
 Sample : CDFA 80 mix 10000:1 Inst : GC/MS Ins
 Misc : CDFA 80 mix = 5 ng/ μ L Multiplr: 1.00
 Sample Amount: 0.00

MS Integration Params: events.e

Screen File: Rtlpest.RES Extraction Window: +/- 0.100 min
 Screen Database: Rtlpest.SCD Qualifier Mode : Absolute
 Qualifier % : 30
 Zero qualifiers : Included
 Subtraction Mode : Sub Average Start/Stc

Compound	Status	ExpRT	Delta	Target m/z	Resp.	Qualifiers Out of Range	XCR
16 3-Chloroaniline	?	5.453	+0.034	127	11386	129	0.92
17 4-Chloroaniline	?	5.478	+0.009	127	17984	129	0.92
24 2,6-Dichlorobenzonitrile	x	6.752	-0.031	171	171652		0.97
35 Mevinphos	x	7.595	-0.035	127	101291		0.96
42 Prophan	?	7.908	-0.039	93	107866	119,137	0.76
51 o-Phenylphenol	?	8.782	-0.038	170	204523	141	0.94
55 Pentachlorobenzene	?	8.947	-0.048	250	121353	248	0.85
76 Propoxur	x	10.353	-0.050	110	212997		0.99
82 Diphenylamine	x	10.516	-0.056	169	257621		0.94
92 Chlorpropham	?	11.045	-0.034	127	81328	153,154	0.75
102 Bendiocarb	?	11.540	-0.040	151	94050	166	0.85
103 Trifluralin	x	11.637	-0.011	306	41880		0.93
104 Benfluralin	x	11.725	-0.013	292	62933		0.96
111 Phorate	?	11.962	-0.042	75	63143	121,260	0.88
113 BHC alpha isomer	?	12.084	-0.045	181	46666	219,183,217	0.60
117 Hexachlorobenzene	?	12.377	-0.055	284	91832	282,288	0.00

图 10. GC/MS 农药扫描软件的典型报告，显示出了“确认结果”（用 x 标出）和“可疑结果”（用 ? 标出）。其他信息包括谱库保留时间及其与本次色谱图保留时间的差异、目标离子及其丰度、超出设定范围的确认离子和谱库质谱图的交互相关值。

结论

利用 RTL 农药数据库中的信息（化合物名称、保留时间和离子质量）在 2 小时之内建立了一个含 80 种目标化合物的 SIM 方法，而不需要运行任何分析过程。例子显示的 LVI 和 SIM 技术是将目标化合物的定量限从亚 ppm 级降低到 ppt 级的有效手段。

任何实验室都能将定量限降低 100 倍，而不需要更改任何硬件。使用 SIM 方法和 RTL 技术可以将柱头进样的定量限从 500 pg 降低到 5 pg。如果在系统中增加 LVI，飞克 / 微升 (femtogram/ μ L) 的目标化合物也可以定量。

致谢

作者感谢加州食品与农业部的 Alex Chung 和 Mark Lee 提供了研究使用的农药混合标准品。

参考文献

1. Vince Giarrocco, Bruce Quimby, and Matthew S. Klee, *Retention Time Locking: Concepts and Applications*, Agilent Technologies Application note, 5966-2469E, printed March 2000, www.agilent.com/chem
2. Bill Wilson, Philip L. Wylie, and Matthew S. Klee, *Large Volume Injection for Gas Chromatography Using a PTV Inlet*, Agilent Technologies Application note, 5965-7770E, printed February 2000, www.agilent.com/chem

3. Philip L. Wylie, *Trace Level Pesticide Analysis by GC/MS Using Large-Volume Injection*, Agilent Technologies Application note, 5966-1214E, printed April 2000, www.agilent.com/chem
4. Prest, H. and p. Cormia, *Retention Time Locking: Advantages in GC/MS SIM Analysis*, Agilent Technologies Application note, 5968-3797E, printed December 1999, www.agilent.com/chem
5. Harry Prest, Philip L. Wylie, ken Weiner, and Doug Agnew, *Efficient Screening for Pesticides and Endocrine Disrupters Using the 6890/5973 GC/MSD System*, Agilent Technologies Application note, 5968-4884E, printed December 1999, www.agilent.com/chem

其他信息

如需了解更多我们的产品和服务信息，请访问

www.agilent.com/chem

安捷伦科技公司对本文中可能有的错误，或与装置、性能即材料使用有关内容而带来的意外伤害和问题不负任何责任。

本文内容如有变动，恕不另行通知。

© 安捷伦科技有限公司，2004

中国印刷
2004年5月8日
5988-4392CHCN