

使用 LC/MS 分别通过直接进样和在线 SPE 进行水中痕量除草剂定量分析的比较研究

应用简报

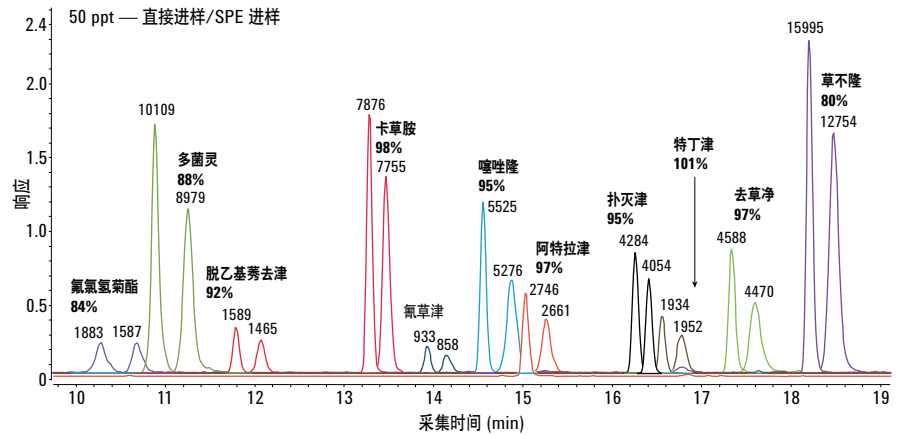
食品检测、农业与环境

作者

Edgar Naegele
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

摘要

本应用简报介绍了通过联用三重四极杆质谱的 Agilent 1200 Infinity 系列在线 SPE 对地表水和饮用水中浓度低至 1 ppt 痕量水平的除草剂进行检测分析。该分析包括对样品进行一系列的校准、质量控制和回收率控制。为了对捕集过程进行控制，通过阀来实现直接柱上进样和在线 SPE 之间的切换。



Agilent Technologies

前言

根据欧盟饮用水指令 98/83/EC 的规定，饮用水里中性除草剂等污染物是必须检测的指标¹。现有的法规要求所有农药的检测限 (LOD) 不得大于 25 ng/L (25ppt)。为了在入门级或中端三重四极杆上实现该检测限，通常需要大于 1 mL 的大体积水样，因而在分析前进行离线样品富集或使用捕集柱进行在线富集。可以使用 Agilent 1200 Infinity 系列在线 SPE 进行在线富集，其 LOD 可低至 0.5-1 ppt，同时获得极好的校正曲线线性和较高的保留时间与峰面积的精度。捕集过程的回收率通常高于 90%²。捕集过程是获得低 LOD 的关键步骤。回收率可能会随着捕集柱的老化而降至规定的阈值以下。为确保在多次进样后捕集过程仍维持较高的回收率，需验证捕集的性能。为满足该要求，可采用阀来实现后续分析柱直接进样与捕集柱进样之间的切换，然后通过检测回收率来监测固相萃取 (SPE) 的性能。

本应用简报描述了使用基于 Agilent 1290 Infinity Flexible Cube 的 Agilent 1200 Infinity 系列在线 SPE 解决方案对地表水和饮用水中浓度低至 1 ppt 的痕量除草剂进行检测。该分析包括对样品进行一系列的校准、质量控制和回收率控制。为了对捕集过程进行质量控制，采用阀来实现直接柱上进样和在线 SPE 之间的切换。

实验部分

仪器

Agilent 1200 Infinity 系列在线 SPE 解决方案 (图 1 所示为系统配置架)。

- Agilent 1260 Infinity 四元泵，配有内部脱气机 (G1311C) 和 LAN 卡 (G1369C)
- Agilent 1260 Infinity 标准自动进样器 (G1329B)，配有 900 μ L 计量头 (G1313-60007)、多次抽取工具包 (G1313-68711) 和样品冷却装置 (G1330B)
- 带两个阀驱动的 Agilent 1290 Infinity Flexible Cube (G4227A)，配有在线 SPE 启动装置 (G4742A) 和带 2 位/10 通快速切换阀与相应毛细管的在线 SPE 直接进样工具包 (G4744A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱

质谱检测

- 具有安捷伦喷射流离子聚焦技术的 Agilent 6460 三重四极杆 LC/MS 系统

分析柱

- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱，2.1 \times 150 mm，3.5 μ m (部件号 959763-902)

捕集柱 (G4742A 中的部件)

- 两个保护柱卡套 (部件号 820999-901)
- Agilent PLRP-S 小柱，2.1 \times 12.5 mm，15-20 μ m (部件号 5982-1271)

软件

- 安捷伦三重四极杆质谱仪 MassHunter 数据采集，版本 06.00
- Agilent MassHunter 优化器软件，版本 06.00
- Agilent MassHunter 定性软件，版本 06.00
- Agilent MassHunter 定量软件，版本 05.02

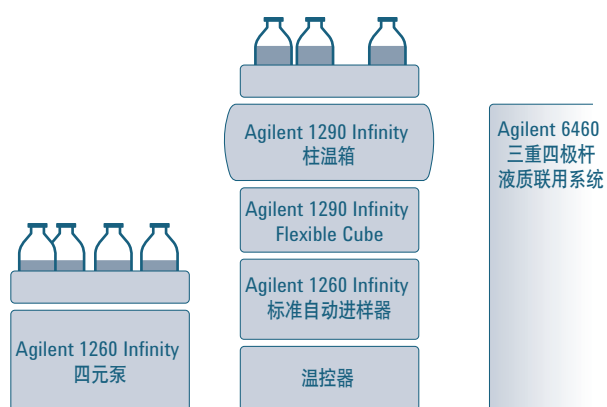


图 1. 联用质谱检测器的 Agilent 1200 Infinity 系列在线 SPE 解决方案配置图 (中间的溶剂瓶用于 SPE 上样、冲洗和平衡)

采用在线 SPE 的 HPLC 方法

Agilent 1260 Infinity 四元泵

溶剂 A: 水溶液 (5 mM 甲酸铵 + 0.1% 甲酸)

溶剂 B: 乙腈 + 5% 水 (5 mM 甲酸铵 + 0.1% 甲酸)

流速: 0.4 mL/min

梯度: 0 min – 5% B,
5 min – 5% B,
20 min – 98% B

停止时间: 25 min

后运行时间: 10 min

Agilent 1290 Infinity 柱温箱

- 柱温: 40 °C

Agilent 1290 Infinity Flexible Cube

- 右阀: 2 位/10 通快速切换阀头, 进行 SPE 捕集柱之间的切换
- 左阀: 2 位/10 通快速切换阀头, 位于 SPE 捕集柱上样的位置
- 泵速: 1.5 mL/min
- 溶剂 A1: 水; 溶剂 B1: 乙腈
- 0 min – 溶剂 A1, 持续 300 s;
- 5 min – 右阀切换位置
- 7 min – 溶剂 B1, 持续 180 s;
- 11 min – 溶剂 A1, 持续 300 s;

Agilent 1260 Infinity 标准自动进样器

- 进样量: 空白样品、水样、校准标样和校准质控样品均为 1800 µL (自动抽取 900 µL, 两次)
- 进样量: 在进行捕集过程的回收率质控时, SPE 柱上进样量为 900 µL
- 样品瓶 (甲醇) 洗针
- 抽取和进样速度: 1000 µL/min
- 样品温度: 10 °C
- 两个 15 位样品盘 (G1313-44513)
- 6 mL 螺纹口样品瓶 (玻璃, 部件号 9301-1377), 螺纹口瓶盖 (部件号 9031-1379), 6 mL 螺纹口样品瓶预穿孔隔垫 (部件号 5188-2758)

采用直接进样的 HPLC 方法

Agilent 1260 Infinity 四元泵

溶剂 A

和 B: 见在线 SPE 方法

流速: 0 min – 0.8 mL/min,
5 min – 0.8 mL/min,
5.1 min – 0.4 mL/min

梯度: 0 min – 5% B,
5 min – 5% B,
20 min – 98% B

停止时间: 25 min

后运行时间: 10 min

Agilent 1290 Infinity 柱温箱

- 柱温: 40 °C

Agilent 1290 Infinity Flexible Cube

- 右阀: 2 位/10 通快速切换阀头, 未使用
- 左阀: 2 位/10 通快速切换阀头, 位于分析柱直接进样的位置

Agilent 1260 Infinity 标准自动进样器

- 进样量: 进行捕集过程的回收率质控时, 分析柱直接进样量为 900 µL
- 进样器程序:
 - 抽取 900 µL 样品
 - 在样品瓶中清洗进样针
 - 进样
 - 等待 5 min
 - 阀切换至旁路
- 抽取和进样速度: 1000 µL/min
- 样品温度: 10 °C
- 两个 15 位样品盘 (同上)
- 6 mL 螺纹口样品瓶 (同上)

在所述的具备直接进样功能的在线 SPE 液相色谱系统配置中，1290 Infinity Flexible Cube (图 2) 配备了两个 2 位/10 通阀。两根捕集柱位于右阀。左阀则用于直接柱上进样和 SPE 捕集柱进样之间的切换 (图 3A)。另外，Flexible Cube 还包括活塞泵和溶剂选择阀，用于捕集柱上样品的冲洗以及捕集柱的重新平衡 (图 3B 和 3C)。若 SPE 柱上样的阀位置已经选定，Flexible Cube 内部的活塞泵将与自动进样器连接，并将样品直接冲洗至捕集柱 (SPE 1)。另一根捕集柱 (SPE 2) 与分析泵连接，并在反冲模式下将样品洗脱至分析柱 (图 3B)。捕集柱上样完成后，切换右侧的 2 位/10 通阀位置。这样，捕集柱的流路即完成交换 (图 3C)。此时，液相泵开始泵送梯度溶剂，将捕集柱 (SPE 1) 上富集样品洗脱至分析柱。同时，前一次运行中洗脱的捕集柱 (SPE 2) 通过吹扫进一步得到清洗和再平衡。溶剂选择阀选取合适的清洗溶剂并通过 Flexible Cube 的活塞泵完成清洗程序。

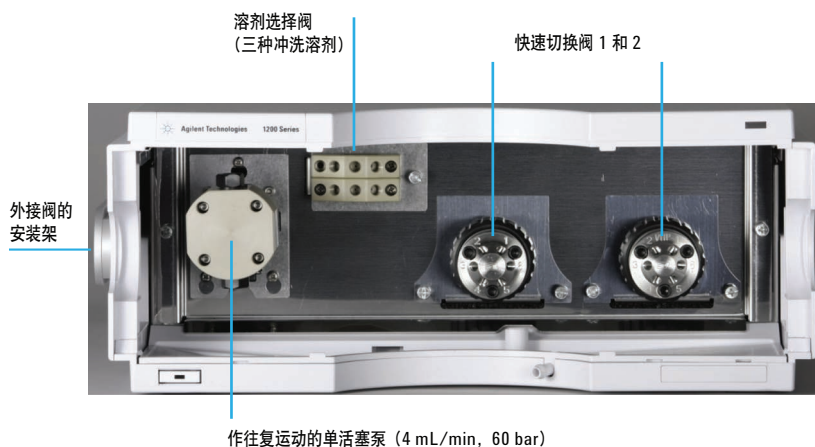


图 2. Agilent 1290 Infinity Flexible Cube 是 Agilent 1290/1260 Infinity 液相色谱系统的附加模块，可最多配备两个 Agilent 1200 Infinity 系列快速切换阀

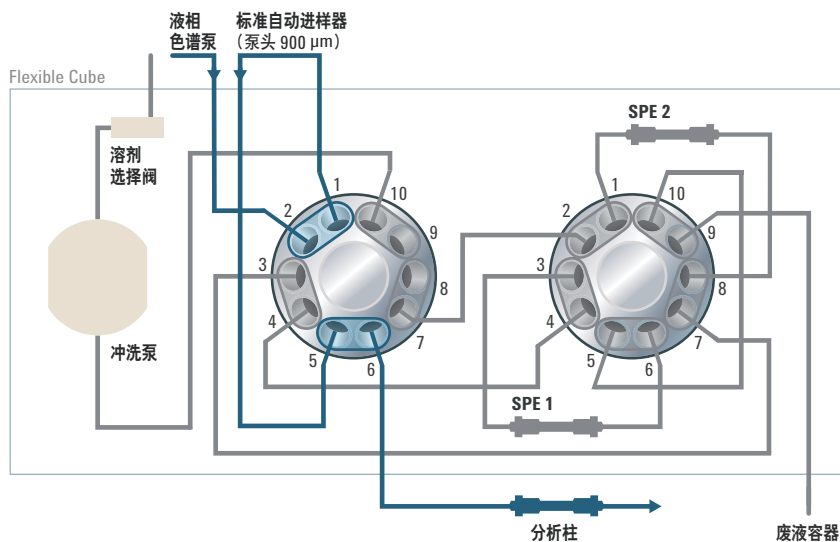


图 3A. Agilent 1290 Infinity Flexible Cube 模块配置图，显示了直接柱上进样和 SPE 捕集柱进样之间切换的管路连接。分析柱直接进样时，Agilent 1260 Infinity 四元泵与 Agilent 1260 Infinity 自动进样器和分析柱相连 (左阀处、蓝色流路、灰色管路未使用)

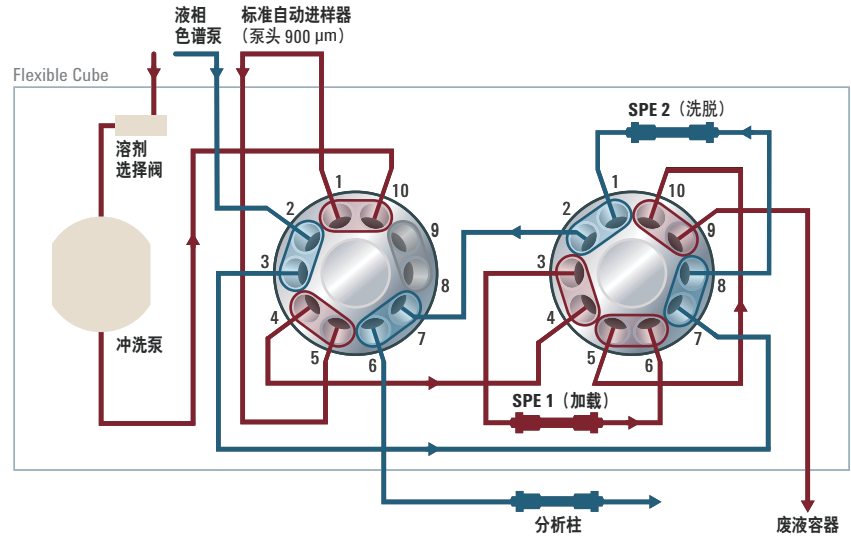


图 3B. Agilent 1290 Infinity Flexible Cube 模块配置图，显示了直接柱上进样和 SPE 捕集柱进样之间切换的管路连接。Agilent 1260 Infinity 四元泵与左阀、捕集柱 (SPE 2) 和分析柱相连 (左阀处，蓝色流路)。分析开始阶段，活塞泵将样品从自动进样器送入捕集柱 SPE 1 (红色流路)

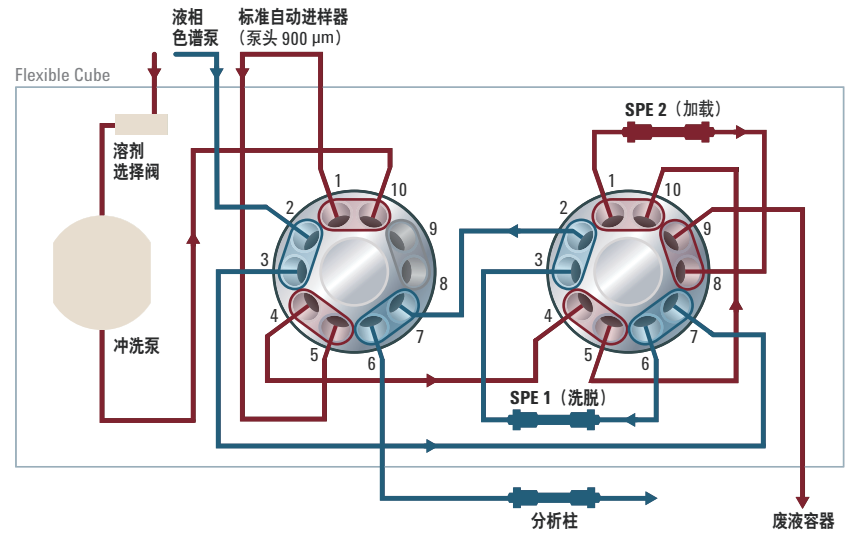


图 3C. Agilent 1290 Infinity Flexible Cube 模块配置图，显示了直接柱上进样和 SPE 捕集柱进样之间切换的管路连接。SPE 进样时，Agilent 1260 Infinity 四元泵与左阀、捕集柱和分析柱相连 (左阀处，蓝色流路)。SPE 1 上样后，切换右阀，使得 SPE 1 捕集柱位于分析柱之前 (蓝色流路)。此时，SPE 2 捕集柱进行清洗和平衡，为下次进样做准备 (红色流路)。

表 1A 和 1B 概述了 Agilent 1200 Infinity 系列在线 SPE 解决方案启动装置 G4742A 和在线 SPE 直接进样工具包 G4744A 的具体部件。

表 1A. Agilent 1200 Infinity 系列在线 SPE 解决方案启动装置 G4742A 和在线 SPE 直接进样工具包 G4744A 的具体部件。G4744A 是 G4742A 的升级版（SST 意为不锈钢）

部件	数量	描述	订单号
2 位/10 通阀头	2	安装在 Flexible Cube 中	5067-4145
保护柱卡套	2	可将捕集柱安装在卡套中（BondElut 在线 SPE 小柱，5982-1271）	820999-901
在线 SPE 毛细管工具包	1	包括启动装置中所需的毛细管	5067-5708
直接进样工具包	1	包括直接进样所需的毛细管	5067-5710

表 1B. 在线 SPE 工具包 G4742A 和 G4744A 包括所有必需配件，比如毛细管等（SST 意为不锈钢）

毛细管和部件	数量	描述	订单号
120 mm，内径 0.12 mm，不锈钢	5	将阀连接至小柱，以及连接阀接口之间	5067-4652
BondElut 在线 PLRP-S，15-20 μ m，2.1 \times 12.5 mm，3 个/包	1	BondElut 在线 SPE 小柱	5982-1271
340 mm，内径 0.12 mm，不锈钢	2	将阀连接至色谱柱，以及将阀连接至自动进样器	5067-4647
废液管路	2 m	将阀连接至废液容器	0890-1713
500 mm，内径 0.25 mm，不锈钢	1	将 Flexible Cube 泵连接至自动进样器	5067-5713
700 mm，内径 0.17 mm，不锈钢	1	将液相色谱泵连接至阀	5067-4648
手紧接头	1	用于废液管路	0100-1516
280 mm，内径 0.12 mm，不锈钢	3	连接两个阀	5067-4687
250 mm，内径 0.25 mm，不锈钢	1	将 Flexible Cube 泵直接连接到阀	5067-5709
长堵头 10-32	2	堵住空闲的阀头	5043-0277

表 2 总结了直接柱上进样和 SPE 捕集柱进样的液相色谱方法主要模块的程序参数。

表 2. 液相色谱方法中 Agilent 1260 Infinity 标准自动进样器、Agilent 1260 Infinity 四元泵和 Agilent 1290 Infinity Flexible Cube 的方法参数

A) SPE 捕集柱进样方法																																	
Agilent 1260 标准自动进样器	多次进样 1800/900 µL 样品	进样																									后运行						
Agilent 1260 Infinity 四元泵			5% 溶剂 B						梯度程序 B 从 5% 升到 98%												98% 溶剂 B												
Agilent 1290 Infinity Flexible Cube	处于 SPE 左阀位置		泵送溶剂 A1 300 s				将右阀切换至下一位置		泵送溶剂 A2 180 s		泵送溶剂 A1 300 s																						
Min			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	10				
B) 分析柱直接进样法																																	
Agilent 1260 标准自动进样器	进样器程序	进样	等待 5 min				阀切换至旁路																										后运行
Agilent 1260 Infinity 四元泵			5% 溶剂 B						梯度程序 B 从 5% 升到 98%												98% 溶剂 B												
Agilent 1290 Infinity Flexible Cube	左阀处于直接进样位置																																
Min			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	10				

A) 捕集柱进样的方法参数

B) 分析柱直接进样的方法参数

三重四极杆质谱方法

安捷伦喷射流离子热梯度聚焦技术

气体温度:	325 °C
气体流速:	9 L/min
雾化器压力:	35 psi
鞘气温度:	350 °C
鞘气流速:	12 L
毛细管电压:	4000 V
喷嘴电压:	0 V

表 3 列出了每种农药定性离子和定量离子相应的最优碎裂和碰撞能量值。使用保留时间来建立动态 MRM 方法，保留时间窗口为 ± 3 倍该化合物的峰宽。对于某些含氯化合物，如果其它反应离子对的丰度均较低，则采用产生相同碎片离子的两个含氯同位素母离子的反应离子对（碎裂能量 = 电压 [V]，rt. = 保留时间 [min]，CE = 碰撞能量 [eV]）。

使用 MassHunter 优化软件开发 MRM 和动态 MRM 三重四极杆质谱方法。优化时，将每种农药标准溶液 (10 ng/ μ L) 流动注射至质谱仪中，优化完成后可确定每种化合物生成相应定性和定量离子的最佳碎裂电压以及最佳碰撞能量（表 3）。使用开发的 MRM 方法分析包含所有标样的 100 ng/L (100 ppt) 混标，确认每种化合物在最终 SPE 液相色谱方法中的保留时间。根据得到的数据文件建立动态 MRM 方法，每种化合物的保留时间窗口为 ± 3 倍该化合物相应的峰宽²。

表 3. MRM 和动态 MRM 质谱方法

名称	母离子	前体离子	碎裂电压	碎片离子 (定量离子)	CE	碎片离子 (定性离子)	CE
氟氯氢菊酯	173.05	174.1	105	96.1	16	104.0	24
多菌灵	191.07	192.1	110	160.0	16	132.0	32
苯噻草酮	202.10	203.1	105	175.1	12	104.1	20
非草隆	164.09	165.1	85	72.1	16	46.1	12
脱乙基莠去津	187.06	188.0	105	146.0	16	104.0	28
杀草敏	221.04	222.0	125	104.0	20	92.1	24
卡草胺	236.12	237.1	75	118.1	8	192.1	4
甲氧隆	228.07/230.07	229.1/231.1	110	72.1	20	72.1	20
灭草隆	198.06/200.06	199.1/201.1	95	72.1	16	72.1	16
西玛津	201.08	202.1	120	132.0	16	124.0	16
氟草津	240.09	241.1	120	214.1	12	104.0	32
噻唑隆	221.06	222.1	95	165.0	12	150.0	36
绿麦隆	212.07/214.07	213.1/215.1	100	72.1	16	72.1	16
敌草净	213.10	214.1	115	172.1	12	82.1	32
阿特拉津	215.09	216.1	125	174.0	12	104.0	28
异丙隆	206.14	207.1	100	72.1	16	46.1	16
敌草隆	232.02/234.02	233.02/235.02	100	72.1	20	72.1	20
绿谷隆	214.05	215.1	85	126.0	12	148.0	8
扑灭津	229.11	230.1	120	146.0	20	188.0	12
利谷隆	248.01	249.0	90	159.9	16	182.0	12
特丁津	229.11	230.1	110	174.0	15	104.0	32
枯草隆	290.08/292.08	291.1/293.1	120	72.1	20	72.1	20
Irgarol 1051	253.14	254.1	120	198.1	16	83.1	28
扑草净	241.14	242.1	125	158.0	20	200.1	16
除虫脲	310.03	311.0	90	158.0	8	141.0	32
去草净	241.14	242.1	110	186.0	16	68.1	48
草达津	229.11	230.1	125	99.0	24	132.0	20
草不隆	274.06	275.1	120	88.1	12	57.1	24

化学试剂

所有溶剂均为 LC/MS 级。乙腈购自德国 J.T. Baker 公司。新制超纯水产自配置 LC-Pak Polisher 和 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。

所有农药标样购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司，浓度为 100 mg/L (溶于乙腈溶液)。

样品

水样分别来自莱茵河、自来水和德国卡尔斯鲁厄地区的泉水。使用针头过滤器 (0.45 μm) 过滤水样后直接进样，无需其它前处理步骤。

样品序列

(所有样品重复进样两次)

1. 空白样品 (SPE 柱 1 和柱 2 进样)
2. 空白样品 (SPE 柱 1 和柱 2 进样)
3. 莱茵河水样 (SPE 柱进样)
4. 自来水样 (SPE 柱进样)
5. 泉水样 (SPE 柱进样)
6. 加标 25 ppt 农药混标的莱茵河水样 (SPE 柱进样)
7. 加标 25 ppt 农药混标的自来水样 (SPE 柱进样)
8. 加标 25 ppt 农药混标的泉水样 (SPE 柱进样)
9. 空白样品 (SPE 柱 1 和柱 2 进样)

10. 校准质控样品: 20 ppt 农药标样 (SPE 柱进样)
11. 捕集回收率样品: 加标 50 ppt 农药混标的超纯水 (SPE 柱进样 900 μL)
12. 直接进样样品: 加标 50 ppt 农药混标的超纯水 (分析柱进样 900 μL)
13. 空白样品 (分析柱直接进样)
14. 空白样品 (SPE 柱 1 和柱 2 进样)

结果与讨论

采用以上描述的方法依次分析水样、空白样品以及控制样品，并使用 28 种除草剂的混标进行校准来评估所得到的数据文件²。为检验现有样品批次的可靠性，加入了使用 SPE 捕集方法分析 20 ppt 校准质控样品。校准质控样品的浓度 20 ppt 位于校准曲线上，表明与此前获得的数据具有极好的拟合度 (图 4)。这也证明了使用该方法在对实际水样中除草剂进行定性检测时具有较高可靠性。样品取自于莱茵河水、自来水和泉水。

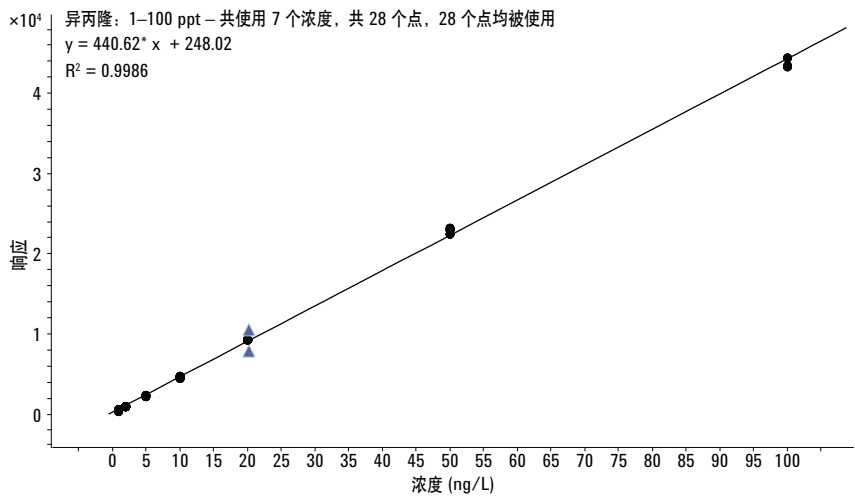


图 4. 1-100 ppt 浓度范围内的异丙隆的校准曲线 (7 个浓度, 均被使用; 28 个点, 均被使用), 线性相关系数为 0.9986, 定量限 (LOQ) 为 1 ppt。蓝色三角形指示校准质控样品

除了检测纯水样外，还使用在线 SPE 方法检测加标了 25 ppt 除草剂标样的水样（图 5）。自来水和泉水中没有检测到除草剂。在加标的自来水样品中，检测到的除草剂比如异丙隆为 23 ppt。来自于莱茵河的水样中，检测到的残留异丙隆浓度为 16 ppt。因此，加标的莱茵河水样中异丙隆的总浓度则为 40 ppt。

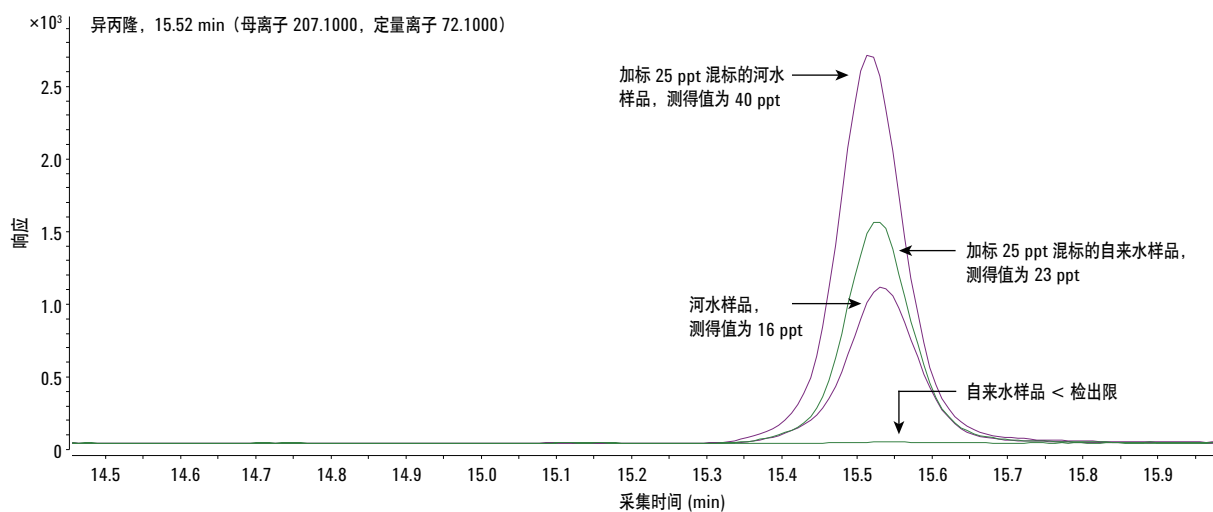


图 5. 测定莱茵河水和自来水中除草剂异丙隆的浓度。还测定了加入 25 ppt 除草剂混标的莱茵河水和自来水中异丙隆的浓度

基于上述仪器配置，可通过切换 Flexible Cube 中左边的 10 通阀，实现捕集柱进样或分析柱直接进样。捕集过程是该方法的关键环节，可通过对比分析柱直接进样和 SPE 捕集柱进样来控制捕集过程。通过两种进样方式的比较，将捕集过程的回收率作为控制标准。该过程可通过加入浓度为 50 ppt 的 28 种

除草剂混标的超纯水样来完成。将 900 μL 样品进样到捕集柱，将另一份 900 μL 样品直接进样到分析柱。通过比较每种化合物的峰面积，计算捕集柱的回收率，从而监测捕集过程的质量（图 6）。如果回收率因为捕集柱的老化而下降到规定阈值以下，则需要更换捕集柱。图 7 所示为本研究中所有除草

剂的回收率。除了用于捕集柱性能控制的回收率实验，直接进样方式还可实现低进样量高浓度样品的校准和分析。自动进样器可精确进样 μL 级浓度（精确到小数点后一位）的样品³。

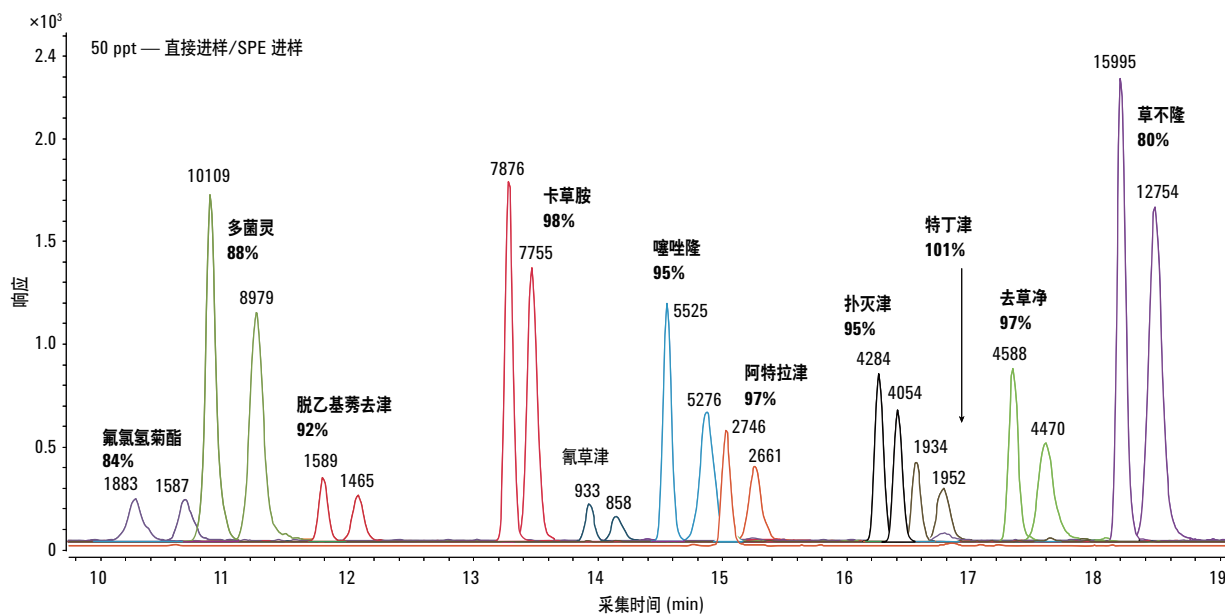


图 6. 通过直接进样和 SPE 进样方法对比测定除草剂化合物的回收率（直接进样法的保留时间较短）

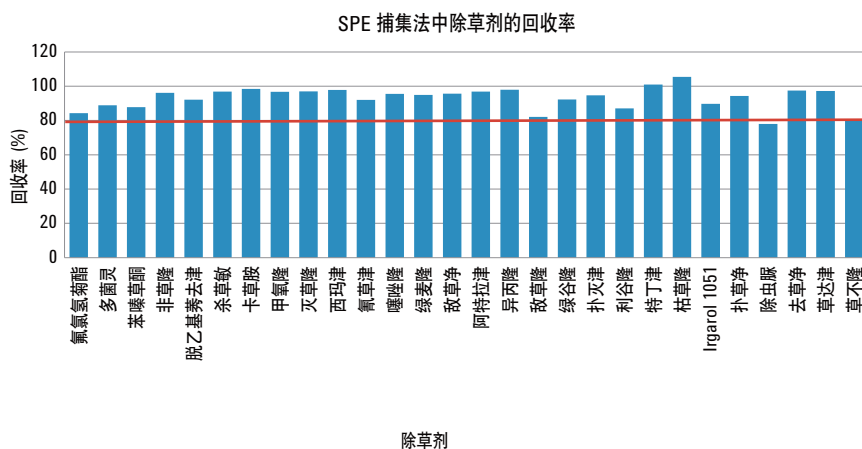


图 7. 本研究中所有农药化合物的回收率

结论

本应用简报描述了地表水、泉水和饮用水中 ppt 浓度水平的除草剂检测。所使用的仪器可进行 SPE 捕集柱上样和分析柱直接进样的切换。通过相同样品捕集柱上样和分析柱上样之间的比较，从而对捕集过程的性能进行控制。所得的回收率基本都在 90% 以上。两种进样模式通过本文所述配置中 10 通阀的切换，即可很容易地实现。

参考文献

1. 欧盟饮用水指令 98/83/EC

http://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/index_en.html

2. “Quantification of trace-level herbicides in drinking water by online enrichment with the Agilent 1200 Infinity Series Online-SPE Solution and Triple Quadrupole MS Detection”

(Agilent 1200 Infinity 系列在线 SPE 解决方案联用三重四极杆质谱仪实现在线 SPE 富集以定量检测饮用水中的痕量除草剂)，安捷伦应用简报，出版号 5991-1738EN, **2013**

3. “Injecting large sample volumes with the Agilent 1100 Series using the multi-draw and 900- μ L injection upgrade kits”

(使用具有多次进样模式和 900 μ L 进样升级包的 Agilent 1100 系列进行大体积进样)，安捷伦技术简报，出版号 5968-8101E,

1999

www.agilent.com/chem/1290

本资料中的信息如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013
2013 年 11 月 1 日，中国印刷
5991-2140CHCN



Agilent Technologies