安捷伦科技
食品安全应用文集

Our measure is your success.

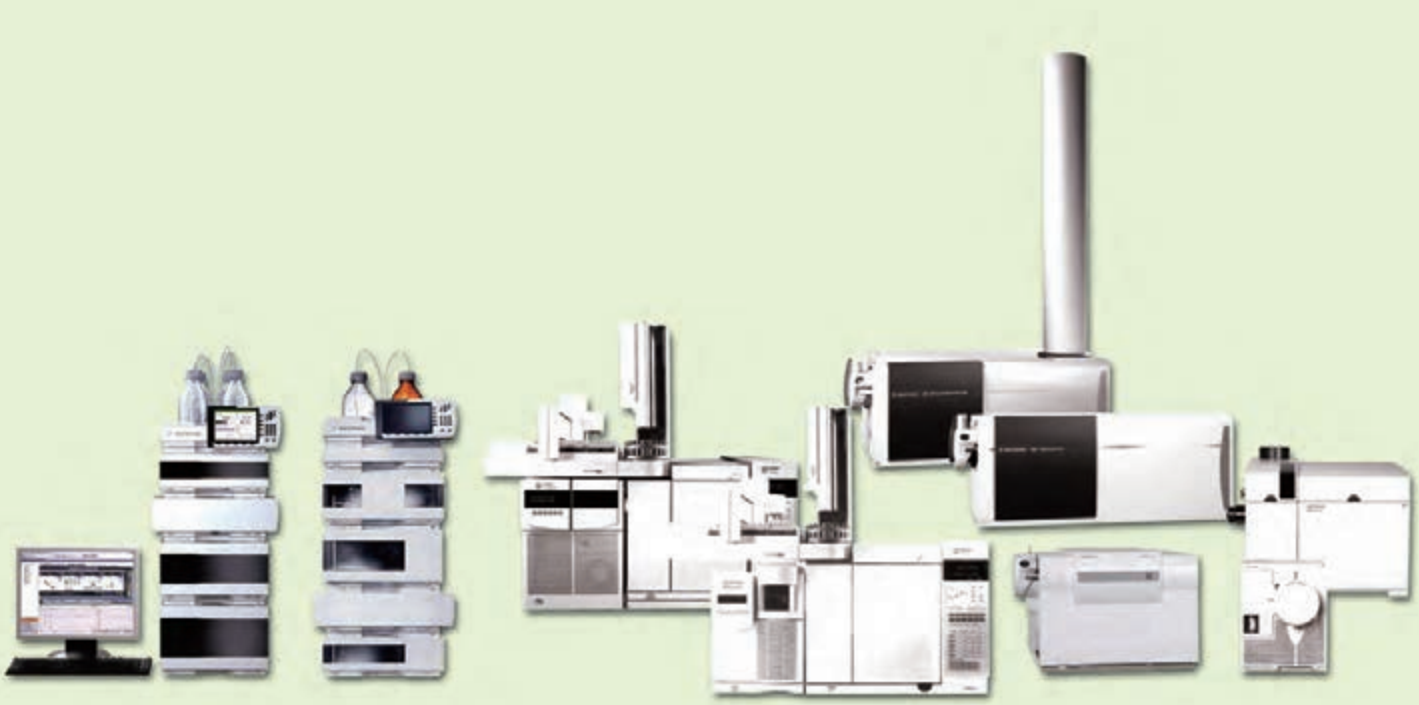
产品 | **应用** | 软件 | 服务

Agilent Technologies

前　言

随着食品安全的受关注程度不断提高，食品安全检测的难度也在日益加大。最直接的挑战是待检测化合物的数目已达到上千种，且随着新法规的不断颁布，检测限量也在逐渐降低，与此同时样品基质却越加复杂，这给分析工作者带来了极大的挑战。更为困难的是，当遭遇突发事件时，分析人员有时需对完全未知的化合物进行最终确证分析，这样的终极挑战给分析工作提出了更高经验和知识要求。

本文集恰好是为了满足分析工作这一需求而编著，围绕完全未知物的确证、多目标化合物的同时定量和定性以及金属的形态分析等热点，详细的介绍了 Q/TOF, LC/TripleQ, GC/TripleQ 以及 ICP/MS 等仪器的相关应用方法、最佳参数设置及仪器使用的经验分享。本文集也可作为农药、兽药残留检测及金属检测方法建立的工具书。



食品中残留物分析的仪器选择介绍

样品制备	仪器选择	筛查	确认	定量
固相萃取或 QuEChERs 法 提取 净化 最佳的消耗品配件农药，兽药多残留分析的最佳选择	***液相色谱/飞行时间质谱，液相色谱/四极杆-飞行时间串联质谱*** ***完全未知化合物分析*** 	• 精确质量数可进一步提高分析的选择性，利用精确质量数进行最大范围的完全未知物筛查分析 • 高分辨率可减少噪音和基质干扰，具有最佳的检测灵敏度 • 先进的安捷伦喷射流离子聚焦技术有效提高分析的灵敏度	• 利用公开的和内置的精确质量数据库进行自动检索 • 分子式生成器减少数据的处理时间	• 离子提取可使用窄质量窗口 • 精确的一级质谱和二级质谱定性信息 • 宽动态范围最大幅度地保障定量分析结果
	液相色谱/三重串联四极杆质谱联用系统：多残留分析的最佳选择 	• 一次进样进行多组分的高选择性、高灵敏度检测 • 二级质谱技术有效去除复杂基质的干扰 • 先进的安捷伦喷射流离子聚焦技术有效提高分析的灵敏度	• 二级质谱可最有效地去除假阳性，提供最佳检测灵敏度，完全满足欧美法规要求 • 高效的扫描速度可最大幅度提高样品分析通量	• 高精度、高灵敏度的定性、定量分析 • 全景式快速浏览定量分析结果
	气相色谱/三重串联四极杆质谱联用系统：多残留分析的最佳选择 	• 一次进样可完成多组分化合物的检测分析 • 二级质谱技术可有效去除复杂基质的干扰 • 先进的 MassHunter 软件有效提升分析效率	• 二级质谱可最有效地去除假阳性 • 500 MRMs/秒的多反应监测 (MRM) 可保证高通量的确证分析	• 500 MRMs/秒的多反应监测 (MRM) 可保证高通量的定量分析 • 专利的碰撞反应池技术可保证离子对间无交叉干扰 (No Cross Talk) 从而保证定量的准确性
	气相色谱/质谱联用系统：多残留筛查分析 	• 反吹提高了保留时间重现性，消除“鬼峰”，缩短分析时间 • 一次进样，可快速筛查分析 927 种农药残留	• 自动解卷积报告软件 (DRS)，快速数据分析 • 原始数据、解卷积和全谱图显示，结果易浏览	• SIM/SCAN 可以同时采集，实现一次进样同时进行定性和定量分析 • 微量离子检测 (TID) 可以降低复杂基质样品的噪音
	液相色谱：多残留分析 	• 无限可能的功能范围 — 高达 1200 bar • 最低延迟体积，实现超快梯度分离 • 主动阻尼实现“无脉动”溶剂输送	• 超快速的分离，最大幅度提高分析效率	• 超快速分离，最大幅度提高分析灵敏度
	气相色谱：多残留分析 	• 反吹功能提高了保留时间重现性，消除“鬼峰”，缩短分析时间 • 第五代 EPC 使 7890 的可靠性达到前所未有的高度	• 最佳的精度，稳定的性能保证最佳的确证结果	• 最佳的精度，稳定的性能保证最佳的定性结果
	ICP/MS：金属形态分析 	• 第三代八极杆碰撞反应池 — 只需要使用氦气的纯物理碰撞，就可以消除常规样品中的干扰	• 超强的去除干扰能力，保证了确证的准确性	• 超强的去除干扰能力，保证了定量的准确性

目 录

前言 3

食品中残留物分析的仪器选择介绍 4

A. 液相色谱/四极杆 - 飞行时间串联液质联用仪 (LC/TOF) 应用 9

5989-5496 LC/TOF MS 分子特征数据库检索方法进行食品中 600 种农药的自动筛选 11

5989-1924 应用 LC/MSD TOF 和离子阱 MS^n 鉴别未知农药 21

5989-2728 用液相色谱/飞行时间质谱和液相色谱/离子阱质谱分析柑橘和橙汁中采后杀菌剂及其代谢物 31

5989-3573 液相色谱 / 离子阱质谱和飞行时间质谱分析橄榄油中的特丁津除草剂 42

5989-2209 LC/MS 飞行时间质谱和 LC/MS 离子阱测定水果和蔬菜中的杀真菌剂 50

5989-5898 用 LC/TOF-MS 鉴定环氧酚类食品罐头涂层中未知的反应副产物和污染物 58

5989-6820 采用 LC/TOF-MS 快速分析真菌粗提物中的次级代谢产物 – 真菌鉴定的新方法 63

5989-5869 LC/TOF-MS 分析消化液中的叶酸 71

B. 液相色谱/三重串联四极杆液质联用仪 (LC/QQQ) 应用 79

5989-5469 采用液相色谱/三重串联四极杆质谱技术进行食品中 100 种农药的多残留分析 81

5989-5459 用 LC/MS/MS 测定食品中 44 种农药的含量 87

5989-5808 Agilent 6410 型三重串联四极杆质谱分析罗非鱼中的硝基呋喃代谢物 98

5989-5807 食品中孔雀石绿和隐性孔雀石绿的 LC/MS/MS 定量分析 103

5989-7615 使用 LC/MS/MS 测定食品中的黄曲霉素 110

5989-7084 快速高分离度 LC/MS/MS 定量测定麦片中的水溶性 B 族维生素 117

5989-7308 快速灵敏的 LC/MS/MS 方法用于咖喱粉和辣椒粉中苏丹红的分析 128

5990-3816 液相色谱-串联质谱联用技术用于牛奶中多残留四环素及其代谢物的检测 137

5988-6635 使用 ESI-、APPI- 和 APCI/MSD 分析苯基脲和氨基甲酸酯农药 150

5989-0596 高效液相色谱 — 电喷雾质谱分析牛肾组织中的氟喹诺酮 163

5989-5403 用液相色谱 — 质谱法 (LC-MS) 快速测定食品中的羟甲基糠醛 173

5989-2912 用 LC/MS 系统以分析模式和半制备模式鉴定和分离 DSP-毒素 179

5968-2124 液质联用方法用于烟曲霉毒素的分析 187

5968-2979 电喷雾和大气压化学电离源液相色谱 — 质谱用于天然食品色素的分析 191

5988-4236 液相色谱/质谱联用分析糖和糖醇类化合物 200
5988-4235 液相色谱/质谱联用分析甘油三酯类化合物 204
5968-0878 大气压化学电离源液相色谱 — 质谱用于食用油中甘油三酸酯的分析 207
5989-5836 改进并简化的液相色谱/大气压化学电离质谱法用于食品中未衍生化游离氨基酸的分析 213
5988-8595 用液相色谱/质谱选择离子检测模式检测饮用水和地下水中苯脲类、三嗪类除草剂的确认方法 218
5988-4708 食品中氨基甲酸酯类杀虫剂的 LC/MSD 的常规分析 223

C. **液相色谱仪 (LC) 应用** 233
5989-5176 高分离度快速液相色谱和在线痕量富集方法用于除草剂的快速分析 235
5988-7630 HPLC 分离具有四环素结构的抗菌药物 240
5988-7135 用 HPLC 分析肉类食品中的残留合成抗生素 242
5989-4857 用高分离快速液相色谱系统进行黄嘌呤类化合物的高通量分离 244
5989-6297 用 1.8 µm 反相 (RP) 色谱柱进行快速氨基酸分析 (AAA) 250
5989-0591 用安捷伦制备 C18 柱放大花青素的分离规模并对收集的馏分进行再分析 263
5989-5177 提高快速高效分离方法转换的效率 266
5988-6686 高效液相色谱分析农业杀菌剂配方中的活性化合物 272
5988-6340 除草剂 键合相选择性差异举例 275
5988-6341 饮用水中杀虫剂的分析 276
5988-6347 快速分离杀虫剂混合物 278
5966-0743 高效液相色谱柱后衍生化法分析水中草甘磷 280
5988-7629 高效液相色谱分析具有青霉素结构的抗菌药物 282
5989-3634 高效液相色谱分离黄曲毒素 284
5966-0632 高效液相色谱分析阿月浑子果中的黄曲霉素 286
5989-5178 快速筛查和分析非酒精饮料中的成分 289
5989-3635 使用反相 HPLC 分离苯甲酸类防腐剂 295
5988-6349 阿斯巴甜的代谢产物与应用 298
5988-6362 花青素的高效快速分离 299
5989-4907 使用 HT 1.8 µm 快速分离色谱柱对甘草根提取物进行高分离度反相 HPLC 分离 301

D. 气相色谱/三重串联四极杆气质联用仪 (GC/QQQ) 应用 307

5990-3578 安捷伦三重串联四极杆 GC/MS/MS 分析 175 种农药残留 309

5990-4071 采用三重串联四极杆 GC/MS 的联用和反吹技术快速筛选和确认婴儿奶粉及大豆产品中的三聚氰胺及其类似物 322

5989-9727 用气相色谱/质谱/质谱联用技术对海洋生物中杀虫剂等复杂样品进行分析 332

E. 气相色谱/质谱联用仪 (GC/MS) 应用 337

5989-5076 使用具有解卷积报告软件和新农药数据库的 GC/MS 筛选 926 种农药和内分泌干扰物 339

5989-4834 利用 GC/MS/ECD/FPD 和包含 731 种化合物的 DRS 数据库检测有关国土安全和环境样品中的有毒化学品 356

5989-3299 一次进样同时使用全扫描、选择离子检测、微池电子捕获检测器和火焰光度检测器对农药进行鉴定 379

5989-1654 用 DRS 对加标和未加标水果提取物中农药残留的盲样测试 389

5989-1157 采用 GC/MSD DRS 对残留农药进行全面筛查 395

5988-4392 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 405

5989-0602 气相色谱/质谱法分析食品中的丙烯酰胺 415

5989-9320 日本肯定列表农药方法的 GC/MS 快速分析解决方案 428

F. 气相色谱仪 (GC) 应用 433

5989-1333 Agilent 6820 GC/NPD 分析氨基甲酸酯类农药残留 435

5989-1335 Agilent 6820 气相色谱/微池电子捕获检测器测定有机氯和拟除虫菊酯类农药残留 439

5989-1334 6820 气相色谱仪/氮磷检测器测定食品中的有机磷农药残留 444

5989-6095 鱼油直接进样用 GC-ECD 分析多氯联苯：使用带反吹的 Deans Switch 的结果 449

5989-6460 用 7890A 气相色谱和毛细管色谱柱反吹分析化妆品中的可疑香精香料致敏源成分 459

5990-3428 采用低热容 (LTM) 柱箱模块独立控制柱温以改善手性化合物的多维分离 466

G. **电感耦合等离子体质谱仪 (ICP/MS) 应用** **471**

5989-7959 碰撞反应池 ICP-MS 测定膳食补充剂中的多种重金属 473

5989-7214 7500cx ICP-MS 测定麦芽酒精饮料（威士忌酒）中的痕量元素 477

5989-4905 安捷伦八极杆反应池 ICP-MS 系统的氦碰撞模式在消除质谱干扰方面的无比高效性 487

5989-2481 离子色谱 (IC) ICP-MS 分析天然水中的铬 494

H. **毛细管电泳系统 (CE) 及其它应用** **501**

5968-8869 液相/离子阱质谱联用仪用于人参皂甙的结构解析 503

5968-5731 毛细管电泳分析有毒食品 509

5988-6355 食品、药品和化妆品的颜色 511

5968-8952 用 CE-ESI-MS 快速筛查食品中的氨基酸 513

5968-5729 CE-MS 分析植物提取物中的黄酮 515

5988-6285 植物激素的快速梯度洗脱分离 517

5968-7715 使用安捷伦碱性阴离子缓冲液同时分析无机阴离子、有机酸、氨基酸和糖类 519

5988-6350 从维生素 D3 和其他脂溶性维生素中分离维生素 D2 527

5988-6363 离子对色谱法快速分离水溶性维生素 529

5988-6364 使用 USP 23 法分离水溶性维生素 530

5988-6365 使用反相色谱分离水溶性维生素 531

5988-5761 快速分析猫粮提取物中的水溶性维生素 532

I. **样品前处理** **534**

孙锦兰综述 从复杂基质中可靠地提取和富集样品，从一开始就确保得到准确、重复的结果 534

液相色谱/四极杆 - 飞行时间串联液质联用仪 (LC/TOF) 应用

6500 系列 QTOF 质谱仪对未知化合物的鉴别和目标化合物的结构确认工作提供了有力的分析手段，6500 系列 QTOF 将灵敏度，质量精确度，扫描间动态范围完美组合，并且操作简单，可靠性高。其强大的分子特征提取（MFE）功能可自动从海量数据中准确提取化合物峰；MFG 软件可自动计算每个峰的化学式以及同位素分布；根据质量精确度、同位素分布等综合信息来确定化合物化学式，结果更为可靠。对不同用户需求，配有专业的应用软件供用户使用，其中 1600 种农药数据库及 7500 种毒物分析库为相关领域工作提供了极大的便利与效率。

液相色谱/四极杆 - 飞行时间串联液质联用仪 (LC/TOF) 应用

5989-5496 LC/TOF MS 分子特征数据库检索方法进行食品中 600 种农药的自动筛选 11

5989-1924 应用 LC/MSD TOF 和离子阱 MS^n 鉴别未知农药 21

5989-2728 用液相色谱/飞行时间质谱和液相色谱/离子阱质谱分析柑橘和橙汁中采后杀菌剂及其代谢物 31

5989-3573 液相色谱 / 离子阱质谱和飞行时间质谱分析橄榄油中的特丁津除草剂 42

5989-2209 LC/MS 飞行时间质谱和 LC/MS 离子阱测定水果和蔬菜中的杀真菌剂 50

5989-5898 用 LC/TOF-MS 鉴定环氧酚类食品罐头涂层中未知的反应副产物和污染物 58

5989-6820 采用 LC/TOF-MS 快速分析真菌粗提物中的次级代谢产物 – 真菌鉴定的新方法 63

5989-5869 LC/TOF-MS 分析消化液中的叶酸 71

LC/TOF MS 分子特征数据库检索方法进行食品中 600 种农药的自动筛选

应用

食品安全

作者

E. Michael Thurman and Imma Ferrer
Pesticide Residue Research Group
University of Almería
04120 Almería,
Spain

Jerry A. Zweigenbaum
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

通过液相色谱/飞行时间质谱在正离子模式下全扫描精确质谱测定，建立了分子特征 (MF) 算法进行数据库检索的方法用于筛选食品提取物中 600 种农药及其降解产物。数据库检索将实际化合物检测和鉴定中得到的离子的精确质量数收集起来，并且将它们与数据库中化合物的单一同位素的准确质量数进行比较。筛选标准包括：± 5 ppm 精确质量窗口；± 0.2 分钟保留时间窗口；最小峰面积计数 1000（信噪比约为 10:1）。检出限和保留时间是由 600 种化合物中的 100 种来确定，其中 34% 的化合物的检出限小于 0.01 mg/kg，95% 的化合物的检出限小于 0.5 mg/kg。与需要几小时到几天的手工方法相比，分子特征算法的优势在于它可以在几分钟内灵敏快速地筛选几百种化合物。

引言

农药污染的食品有可能威胁消费者的健康。现在欧盟立法保护胎儿、婴儿、儿童这些敏感的人群，将婴儿食品中农药含量限定在 0.01 mg/kg [1]。最大残留限量 (MRLS) 应该设定在尽可能最低的水平，其目的是使投放在市场上的产品没有任何可检测到的残留物。然而，由于在水果和蔬菜的运输和储存中杀虫剂的使用，还有保护农作物时农药的使用，这个目标常常难以达到。

婴儿食品中农药含量的分析方法包括 GC/MS 和 LC/MS 法。在传统方法中，GC/MS 一直用于检测挥发性农药，尤其是含氯的杀虫剂和除草剂；而 LC/MS 一直用于检测极性较大的杀虫剂、除草剂和杀菌剂。GC/MS 方法依赖于全扫描和选择离子检测模式。最近，对 GC/MS 采用反向检索方法，使其在几分钟内检索庞大的 NIST 农药谱库成为可能，并且使 GC/MS 方法很容易地进行农药筛分。

遗憾的是，有两个原因使类似的反向检索的方法还不能用于 LC/MS。首先，单四极杆和三重串联四极杆的方法在全扫描模式下灵敏度较低，因此不能用于农药的筛选。第二，可以广泛采用的碰撞诱导解离裂解能量的标准化和保证重现性是困难的，不能得到通用的谱库。近来，LC/TOF MS 的使用表明，这种方法有足够的灵敏度和能力获得 < 1 ppm 精确质量的全扫描谱图并适用于数据库检索。

实验部分

蔬菜和水果的提取 (QuEChERS)

QuEChERS 是提取方法的首字母缩写，它代表着快速、简便、廉价、高效、耐用和安全。这种方法广泛地用于食品中农药的快速提取 [5,6]。

- 称取已预先混匀的样品 15 g 置于 40 ml 聚四氟乙烯离心管中，加入 15 ml 乙腈（含 1% 乙酸），加入 6 g 无水 $MgSO_4$ 和 2.5 g $NaAc•3H_2O$ (三水合乙酸钠)，涡漩混合器以最高速度或用手剧烈振摇 1 分钟，以 3700 rpm 离心 3 分钟
- 取 5 ml 上清液于 15 ml 试管中，加入 250 mg PSA 吸附剂和 750 mg $MgSO_4$，涡漩混合振摇 20 秒，然后在 3900 rpm 下离心 3 分钟。将 1.0 ml 上清液转移至 LC/MS 样品瓶中，然后将其蒸干，溶于 8/92% 的甲醇/水中用于 LC/MSD TOF 和离子阱分析
- 水果和蔬菜提取物的直接分析通过进样 50 µL 完成
- 未污染的样品以同样的量直接用 LC/MS TOF 分析

LC/MS TOF 方法

- 液相色谱泵：Agilent 1100 二元泵，采用标准的安捷伦 1100 自动进样器 (ALS)，进样体积为 50 µL
- 色谱柱：ZORBAX Eclipse® XDB 4.6 x 150 mm C-8，5 µm（部件号 993967-906）
- 流动相：A = 0.1% 甲酸水溶液，B = 乙腈，以 10% B 等度洗脱 5 分钟后开始梯度洗脱，在 30 分钟内线性洗脱至 100% B，流速：0.6 ml/min
- 安捷伦 6210 LC/MS TOF 双喷雾电喷雾源
- ESI 正离子模式，Vcap：4000 V
- 雾化器：40 psig，干燥气 9 L/min，干燥气温度 300 ° C
- 碰撞电压 190 V，锥孔体电压 60 V，Oct DC1 电压 37.5 V，OCT RF 电压 250 V
- 参比质量：质量范围 (*m/z*) 121.0509 和 922.0098，分辨率：在 *m/z* 922.0098 下为 9500 ± 500，*m/z* 50-1000。参比喷雾器 2 以恒速运行

结果与讨论

分子特征数据库检索

使用 Excel 电子表格依据化合物分子式来计算化合物的理论单一同位素精确质量，并将其转为安捷伦 LC/TOF MS 系统的 TOF 软件使用的 csv（逗号分割数值，comma separated values）格式，用于已知由正离子电喷雾离子化的 600 种农药的检索。csv 文件由被称为“公式数据库生成器”（Formula DB Generator）的 Excel 电子表格工具创建在 TOF 软件中。

当样品测定完成后，LC/TOF MS 仪器自动检索 csv 文件，然后生成一个报告，列出在数据库中找到的化合物。检索标准包括 ppm 级的质量限度（5 ppm）、能得到的保留时间窗口（0.2 分钟）、最小峰高计数，也称作化合物阈（计数为 1000 或信噪比约为 10:1，或 0.06 % 相对量）、加合物的形成和中性碎片丢失。

检索程序被称作分子特征提取器，是安捷伦 LC/ TOF MS 仪器最近提供的软件（2005 年 11 月）。分子特征提取器从 LC/ MS TOF 数据文件中找出代表被测样品中实际存在的化合物的离子。噪音和其他无关的离子信号被排除。然后采用选定的标准在 csv 数据库中检索这些离子，将找到的来自全扫描谱图的离子进行列表后，逐一与数据库核对其准确度和保留时间。因为操作简单、检索迅速、分子特征提取方法更适合于大数据库。这样，对数据库中感兴趣的离子就不能象反向检索那样从样品文件中提取。这种处理过程对于以轮廓图模式采集的 LC/ TOF MS 数据文件需要更多的时间。

从这点来看，需要人工核对正向筛选中的匹配保留时间和碎片离子（如果存在）实现确认。样品可以在较高的碰撞电压下再分析以检验碎片离子并采用可靠的标准分析方法进行确认。

检出限

测定了几种基质中检出限（检出限），包括添加标准样品的食品样品和 100 种化合物的溶剂提取物（表 1）。这些化合物包括了在美国和欧洲常用来处理水果和蔬菜作物的主要的农药种类。检出限建立在误差小于 3 ppm 的精确质量和 A+1 和 A+2 同位素信号的校正精确质量的外观基础之上。在不同水平制订农药的检出限，包括欧洲控制婴儿食品时的 0.01 mg/kg，和对不同含量水平食品限制在 0.05，0.1 和 0.5 mg/kg，这都取决于农药和作物的种类。

33 种化合物的检出限等于或小于 0.01 ppm，60 种化合物 (60%) 的检出限等于或小于 0.05 ppm。0.05 mg/kg 的检出限对于监测食品中被禁物质或被控化合物也是一个临界值。食品中 95 % 的化合物，其检出限等于或小于 0.2 mg/kg。对于食物中的检出限为 0.5 mg/kg，只发现 6 种化合物是不灵敏的。不灵敏的化合物有猛杀威 (promecarb) 和涕天威 (aldicarb)。它们是两种氨基甲酸酯类农药，在电喷雾离子源中很容易裂解成碎片，使 MH^+ 丰度变低。同样，马拉硫磷氧化产物 (malathion oxon) 和乐果 (dimethoate) 是两种容易裂解成碎片的有机磷农药。所以，这些化合物采用丰度更大的碎片离子而不是 MH^+ 进行检测可以获得更高的灵敏度。例如，图 1 给出了乐果的质谱图。MH^+ 并不是谱图中的主要碎片离子，事实上其强度比 *m/z* 124.9819 的离子小 3~4 倍。

此外，必须考虑基质对检出限的两种影响。一为离子化抑制作用，二是来自质量数几乎相同的离子的干扰。

我们前期对食物中的一些农药进行的研究中已经发现了离子化抑制作用，食品包括胡椒，花椰菜，番茄，甜瓜，柑桔和柠檬，所以我们积累了那些基质是最难分析基质的经验。例如，图 2 给出无农药胡椒基质的色谱图，此为复杂的色谱图。经 MF 数据库检索从中鉴定出约 3000 种化合物，没有一个是农药。这些峰的信噪比是 10:1 或更高，而且存在极难从中搜寻离子的基质，尤其是在痕量水平。

向这些难分析基质的食品提取物中加入标准品，测定表 1 中所示化合物的检出限。图 3 给出了一个具体实例的打印报告。报告包括分子式、化合物名称、中性分子的准确分子量、以 mDa 和 ppm 为单位表示的误差、以分钟为单位表示的保留时间的误差和作用说明（明确地说明，如杀真菌剂）。化合物的 MH^+ 质谱图和同位素信号也表示出来，这对于分子式的快速核对和部分确认非常有用，尤其是大部分农药会显示来自卤素和硫原子的 A+2 特征离子。

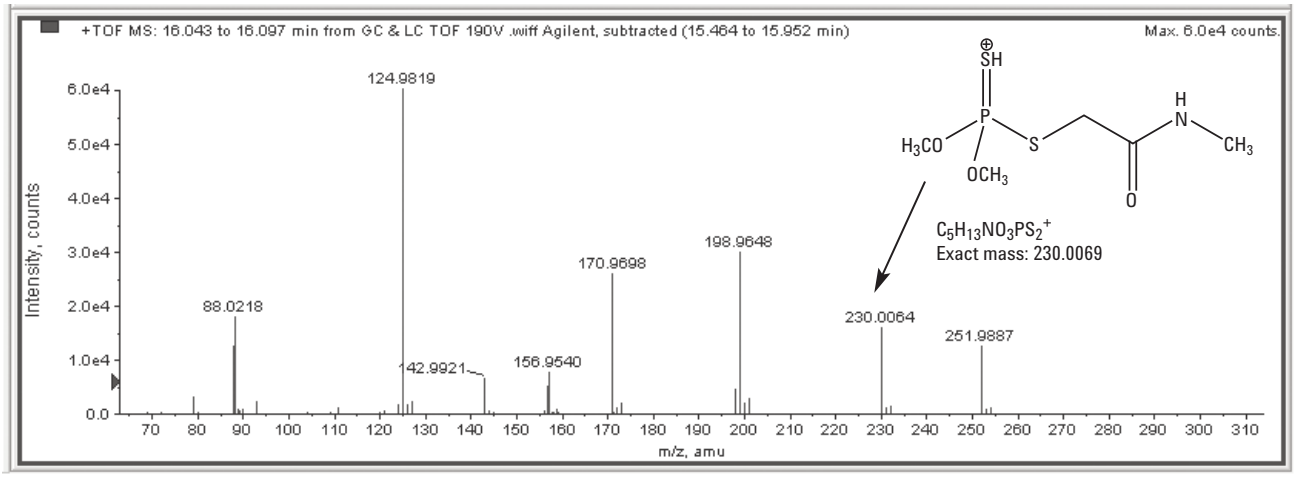


图 1. 乐果质谱图，表明低强度的 MH^+ 离子信号及使用特征碎片离子来降低某些低强度化合物检出限的重要性，本例为 *m/z* 124.9819 离子

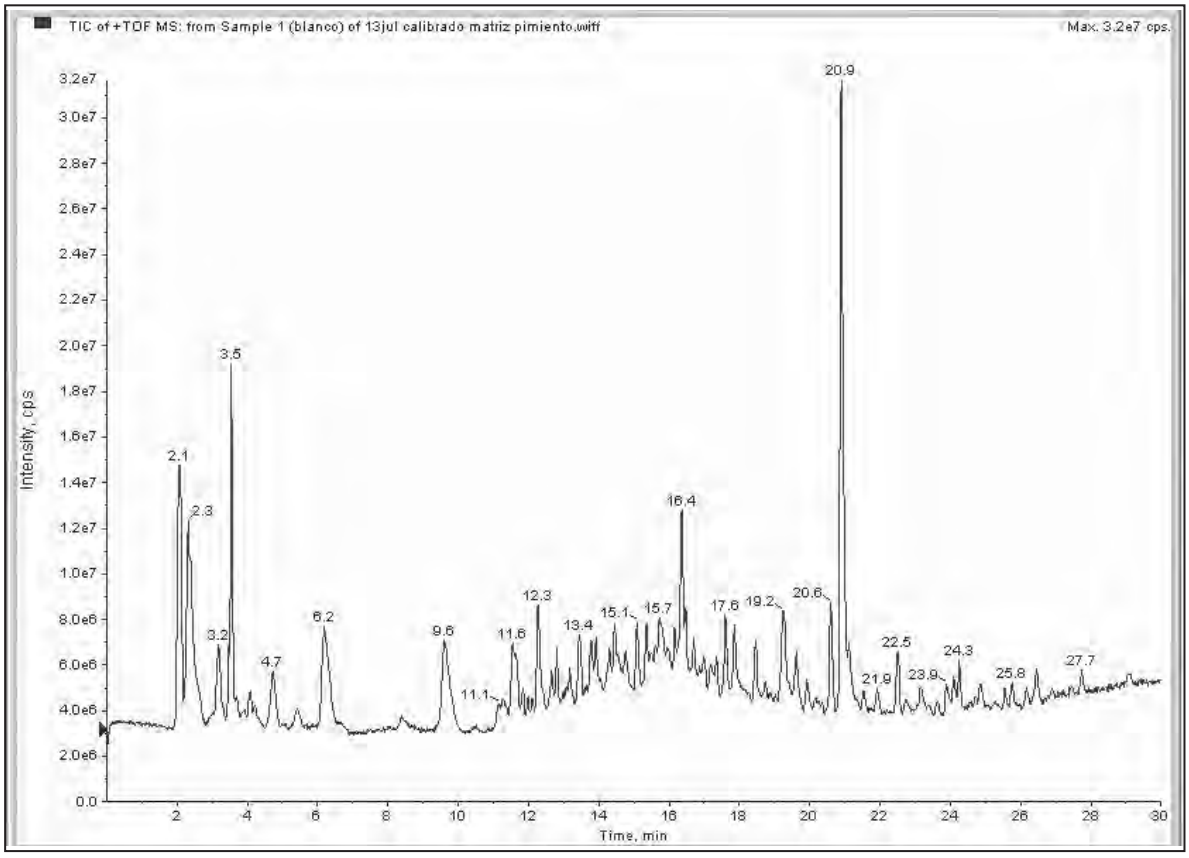


图 2. 空白胡椒样品表明了样品的复杂性，在信噪比大于或等于 10:1 下，样品中检测出约 3000 个准确质量数的色谱峰

A+2 离子和经验式确认

由于 MF 数据库检索是一个筛选程序，所以在质量准确度窗口为 5 ppm 时，其分子式的确认是不准确的。分子式（不是分子鉴定）可以用化合物的 A+2 同位素信号来确认。例如，数据库中 600 个化合物的 70% 含有硫、氯或溴，会给出 A+2 离子的同位素峰。同位素的准确质量及其强度分布可以作为经验式的直接证据。这样，就大大提高了精确分子量筛选数据的可靠性，当然这还不能满足分子鉴定标准的要求，后面将进行讨论。

例如，梨提取物中抑霉唑（imazalil）的同位素信号（图 4）。MH^+ 的质量数是 297.0564，换成同位素 ^{37}Cl 的质量数是 299.0533。质量数之差是 1.997 个质量单位。这是 ^{37}Cl 原子相对于被取代的 ^{35}Cl 之间的质量缺失。而且，A+2 峰的强度约是 A 峰的 2/3，这与分子中含有两个氯原子相一致。这一点又被在 301.0503 处的 A+4 峰进一步证实。于是，这些数据对于抑霉唑分子式的确认是相当充分的（然而这不是为了鉴定抑霉唑）。质量准确度超过 0.8 mDa 或 2.7 ppm 的误差。这就是一个通过数据库筛选来确认农药分子式的实例。数据库报告打印出同位素信号和精确分子量帮助进行数据库检索的手动筛选。

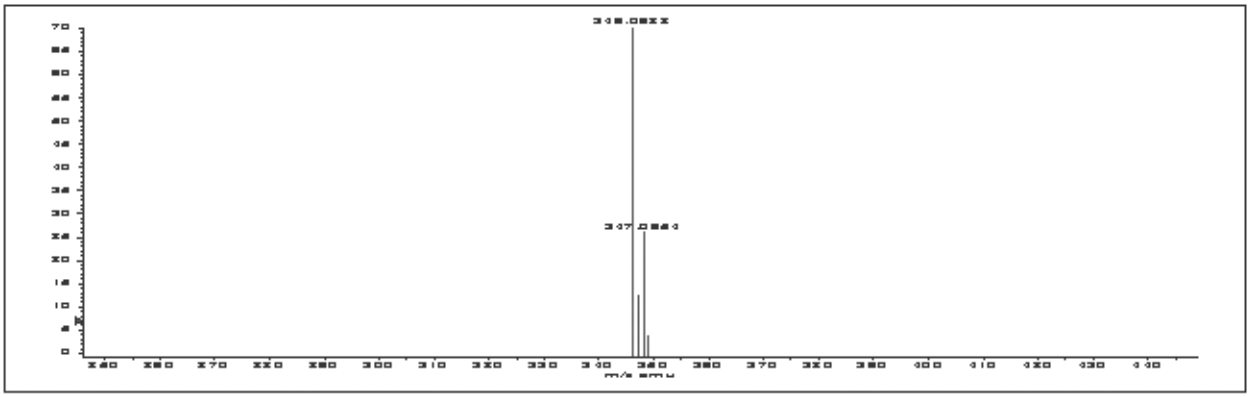
当分子式不含 A+2 原子（也就是仅含 C、H、N、O），用这种方法来确认分子式就不可能了。其原因是只有 A+1 峰存在，而且此峰是由分子中 ^{13}C 信号主导产生，它不足以确认分子式。因此，对于这些农药（占数据库中约 30%）的确认需要更多的数据（具体来讲，保留时间或碎片离子）。

表 1. 食品中农药的检出限及其保留时间和准确质量数

化合物	保留时间	分子式	精确分子量	检出限 mg/kg
阿特拉津	21.1	$C_8H_{14}N_5Cl$	215.0938	0.005
亚托敏	24.0	$C_{22}H_{17}N_3O_5$	403.1168	0.005
苯霜灵	26.8	$C_{20}H_{23}NO_3$	325.1678	0.005
噻嗪酮	27.2	$C_{16}H_{23}N_3OS$	305.1562	0.005
氰草津	22.0	$C_9H_{13}N_6Cl$	240.0890	0.005
二嗪磷	27.6	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	304.1010	0.005
苯醚甲环唑	26.4	$C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$	405.0647	0.005
苯醚甲环唑异构体	26.6	$C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$	405.0647	0.005
枯莠隆	21.3	$C_{16}H_{18}N_2O_3$	286.1317	0.005
烯酰吗啉	22.2	$C_{21}H_{22}NO_4Cl$	387.1237	0.005
苯线磷	23.9	$C_{13}H_{22}NO_3PS$	303.1058	0.005
抑霉唑	18.0	$C_{14}H_{14}N_2OCl_2$	296.0483	0.005
咪唑烟酸	20.0	$C_{13}H_{15}N_3O_3$	261.1113	0.005
灭草喹	20.0	$C_{17}H_{17}N_3O_3$	311.1270	0.005
氨基三嗪	21.2	$C_{11}H_{19}N_5S$	253.1361	0.005
氨基三嗪代谢物	17.0	$C_8H_{15}N_5S$	213.1048	0.005
异丙隆	21.3	$C_{12}H_{18}N_2O$	206.1419	0.005
甲苯达唑	18.2	$C_{16}H_{13}N_3O_3$	295.0957	0.005
异丙甲草胺	25.6	$C_{15}H_{22}NO_2Cl$	283.1339	0.005
嗪草酮	15.0	$C_8H_{14}N_4OS$	214.0888	0.005
烟嘧磺隆	17.0	$C_{15}H_{18}N_6O_6S$	410.1009	0.005
丙氯灵	23.0	$C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$	375.0308	0.005
扑草通	16.6	$C_{10}H_{19}N_5O$	225.1590	0.005
扑草净	19.0	$C_{10}H_{19}N_5S$	241.1361	0.005
扑灭津	23.0	$C_9H_{16}N_5Cl$	229.1094	0.005
丙环唑	25.9	$C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$	341.0698	0.005
丙环唑异构体	26.1	$C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$	341.0698	0.005
西玛津	18.8	$C_7H_{12}N_5Cl$	201.0781	0.005
多杀菌素 A	20.9	$C_{41}H_{65}NO_{10}$	731.4608	0.005
多杀菌素 D	21.9	$C_{42}H_{67}NO_{10}$	745.4765	0.005
螺环菌胺	19.6	$C_{18}H_{35}NO_2$	297.2668	0.005
螺环菌胺异构体	19.7	$C_{18}H_{35}NO_2$	297.2668	0.005
特丁津	23.4	$C_9H_{16}N_5Cl$	229.1094	0.005
特丁净	20.4	$C_{10}H_{19}N_5S$	241.1361	0.005
特富灵	25.9	$C_{15}H_{15}ClF_3N_3O$	345.0856	0.005
啶虫脒	16.3	$C_{10}H_{11}N_4Cl$	222.0672	0.01
乙草胺	23.0	$C_{14}H_{20}NO_2Cl$	269.1183	0.01
甲草胺	23.0	$C_{14}H_2ONO_2Cl$	269.1183	0.01
杀虫磺	21.4	$C_{17}H_{21}NO_4S_4$	431.0353	0.01
糠菌唑	23.8	$C_{13}H_{12}N_3OCl_2Br$	374.9541	0.01
甲奈威	21.3	$C_{12}H_{11}NO_2$	201.0790	0.01
多菌灵	6.2	$C_9H_9N_3O_2$	191.0695	0.01
克百威	20.4	$C_{12}H_{15}NO_3$	221.1052	0.01
杀螟丹	3.1	$C_7H_{15}N_3O_2S_2$	237.0606	0.01
毒虫畏	26.5	$C_{12}H_{14}Cl_3O_4P$	357.9695	0.01
环唑醇	23.4	$C_{15}H_{18}N_3OCl$	291.1138	0.01
噻诺吗嗪	2.9	$C_6H_{10}N_6$	166.0967	0.01
去乙基阿特拉津	15.3	$C_6H_{10}N_5Cl$	187.0625	0.01
去异丙基阿特拉津	12.1	$C_5H_8N_5Cl$	173.0468	0.01
敌敌畏	20.0	$C_4H_7Cl_2O_4P$	219.9459	0.01
二甲吩草胺	24.0	$C_{12}H_{18}NO_2SCl$	275.0747	0.01
乐果	16.3	$C_5H_{12}NO_3PS_2$	228.9996	0.01
敌草隆	21.0	$C_9H_{10}N_2OCl_2$	232.0170	0.01

表 1. 食品中农药的检出限及其保留时间和准确质量数（续）

化合物	保留时间	分子式	精确分子量	检出限 mg/kg
乙硫苯威	21.8	$C_{11}H_{15}NO_2S$	225.0823	0.01
非草隆	15.7	$C_9H_{12}N_2O$	164.0950	0.01
吡虫啉	15.7	$C_9H_{10}N_5O_2Cl$	255.0523	0.01
环草定	19.2	$C_{13}H_{18}N_2O_2$	234.1368	0.01
马拉硫磷1	22.5	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	330.0361	0.01
马拉硫磷2	16.9	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	330.0361	0.01
甲霜灵	21.2	$C_{15}H_{21}NO_4$	279.1471	0.01
灭梭威	23.5	$C_{11}H_{15}NO_2S$	225.0823	0.01
灭多威	12.1	$C_5H_{10}N_2O_2S$	162.0463	0.01
灭草隆	18.7	$C_9H_{11}ClN_2O$	198.0560	0.01
烯啶虫胺	11.9	$C_{11}H_{15}ClN_4O_2$	270.0884	0.01
恶霜灵	19.1	$C_{14}H_{18}N_2O_4$	278.1267	0.01
丙溴磷	28.6	$C_{11}H_{15}BrClO_3PS$	371.9351	0.01
猛杀威	24.0	$C_{12}H_{17}NO_2$	205.1341	0.01
毒草胺	25.6	$C_{11}H_{14}NOCl$	211.0764	0.01
苄草丹	29.0	$C_{14}H_{21}NOS$	251.1344	0.01
噻菌灵	3.7	$C_{10}H_7N_3S$	201.0361	0.01
噻虫啉	17.7	$C_{10}H_9N_4SCl$	252.0236	0.01
杀虫环	4.5	$C_5H_{11}NS_3$	181.0054	0.01
涕灭威	18.5	$C_7H_{14}N_2O_2S$	190.0776	0.05
涕灭威亚砜	6.0	$C_7H_{14}N_2O_3S$	206.0725	0.05
恶虫威	20.6	$C_{11}H_{13}NO_4$	223.0845	0.05
绿麦隆	20.4	$C_{10}H_{13}N_2OCl$	212.0716	0.05
氟噻草胺	25.0	$C_{14}H_{13}N_3O_2SF_4$	363.0665	0.05
羟基阿特拉津	11.5	$C_8H_{15}N_5O$	197.1277	0.05
虱螨脲	28.6	$C_{17}H_8N_2O_3Cl_2F_8$	509.9784	0.05
苯嗪草酮	14.0	$C_{10}H_{10}N_4O$	202.0855	0.05
杀扑磷	24.1	$C_6H_{11}N_2O_4PS_3$	301.9619	0.05
甲硫威砜	17.4	$C_{11}H_{15}NO_4S$	257.0722	0.05
禾草敌	24.8	$C_9H_{17}NOS$	187.1031	0.05
甲基对硫磷	27.3	$C_{10}H_{14}NO_5PS$	291.0330	0.05
敌稗	17.0	$C_9H_9NOCl_2$	217.0061	0.05
三氯卡班	27.5	$C_{13}H_9Cl_3N_2O$	313.9780	0.05
涕灭威砜	11.4	$C_7H_{14}N_2O_4S$	222.0674	0.1
除草定	18.5	$C_9H_{13}N_2O_2Br$	260.0160	0.1
糠菌唑	23.8	$C_{13}H_{12}N_3OCl_2Br$	374.9541	0.1
丁草特	15.0	$C_{11}H_{23}NOS$	217.1500	0.1
除虫脲	25.0	$C_{14}H_9N_2O_2ClF_2$	310.0321	0.1
氟虫脲	29.2	$C_{21}H_{11}N_2O_3ClF_6$	488.0362	0.1
氟草烟	18.8	$C_7H_5N_2O_3Cl_2F$	253.9661	0.1
氟铃脲	27.2	$C_{16}H_8N_2O_3Cl_2F_6$	459.9816	0.1
抑霉唑降解物	14.6	$C_{11}H_{10}N_2OCl_2$	256.0170	0.1
异菌脲	25.4	$C_{13}H_{13}N_3O_3Cl_2$	329.0334	0.1
二甲戊乐灵	25.0	$C_{13}H_{19}N_3O_4$	281.1376	0.1
伏虫隆	27.6	$C_{14}H_6N_2O_2Cl_2F_4$	379.9742	0.1
克菌丹	24.4	$C_9H_8Cl_3NO_2S$	298.9341	0.5
甲基陶斯松	28.2	$C_7H_7Cl_3NO_3PS$	320.8950	0.5
螺甲螨酯	23.0	$C_{23}H_{30}O_4$	370.2144	0.5
杀虫单	3.2	$C_5H_{13}NO_6S_4$	310.9626	0.5



Experiment# : 1　　Compound# : 327　　Mass : 345.08553

Mass Value = 345.08553							
#	Formula	Compound	Mass	Error (mDa)	* Error (ppm)	Ret. Time Error	Description
1	C15H15N3OClF3	Triflumizol	345.08557	-0.04	-0.1	-0.02	

图 3. 分子特征数据库检索报告实例

水果和蔬菜的筛选

表 2 列出了 6 种水果和蔬菜及一种市售橄榄油样品经 MF 数据库检索 600 种农药得出的筛选结果。水果和蔬菜样品包括苹果、梨、番茄、土豆、胡椒和黄瓜均来自附近的菜店。经 MF 数据库检索从各样品色谱图中分别找出了 617 到 2681 个准确质量数峰。样品基质复杂程度最低的是番茄，找到 617 个峰；而苹果是最复杂的样品，找到 2681 个峰。MF 数据库检索的灵敏度设定为信噪比 10:1。当信噪比由 20:1 降至 10:1 时，检索得到的峰个数几乎增加了一倍。选择 10:1 是为了得到化合物较强的同位素信号，即最大仪器灵敏度下得到的 A+1 和 A+2 同位素信号。

MF 数据库检索的准确度窗口设为 5 ppm，以适应 LC/TOF MS 系统的质量准确度，LC/TOF MS 一般< 3 ppm，经常在 1-2 ppm 或小于 0.3 mDa [3]。这些样品中，在 5 ppm 质量窗口下发现的农药数目在 8-41 之间变化。要包括在这种匹配中的唯一标准就是 MH^+ 离子数据库值在 5 ppm 以内。以一个例子说明，胡椒样品有 2402 个峰，但只有 41 个峰满足 5 ppm 准确度窗口的要求（表 2）。

这 41 个峰中仅有三个分子式通过正确地同位素信号和保留时间（对于不含 A+2 同位素的化合物）匹配得到确认，这不仅得到数据库自动匹配的检验，而且还经数据文件手动确认。得到确认的农药结果在不同基质中各不相同：土豆样品中没有检测到，橄榄油中有一种，胡椒和番茄中有三种，黄瓜和苹果中有五种。水果和蔬菜样品中最常见的化合物是抑霉唑，它是一种收后杀菌剂。其他化合物包括有机磷农药，如二嗪磷、亚胺硫磷和马拉硫磷以及马拉硫磷氧化产物。在番茄样品中发现了控制害虫生长的稻虱净，以及甲基硫菌灵和多菌灵，两者都是杀菌剂。

最初用于此工作的软件不能处理饱和峰和高浓度的化合物，如梨样品中的抑霉唑和番茄样品中的稻虱净均不能正确鉴定。最新的软件能够处理饱和峰并对这些化合物进行正确的鉴定。

所有被证实样品的准确度，其平均绝对值为 0.3 mDa 或 1.2 ppm，标准偏差分别为 0.25 mDa 或 1.0 ppm（表 2）。保留时间匹配的平均绝对值为 0.07 分钟，标准偏差为 0.09 分钟。这样，为数据库选择的窗口在满足质量准确度和保留时间准确度两个平均标准偏差值的基础上有足够的误差变化范围，以找到 99% 的化合物。

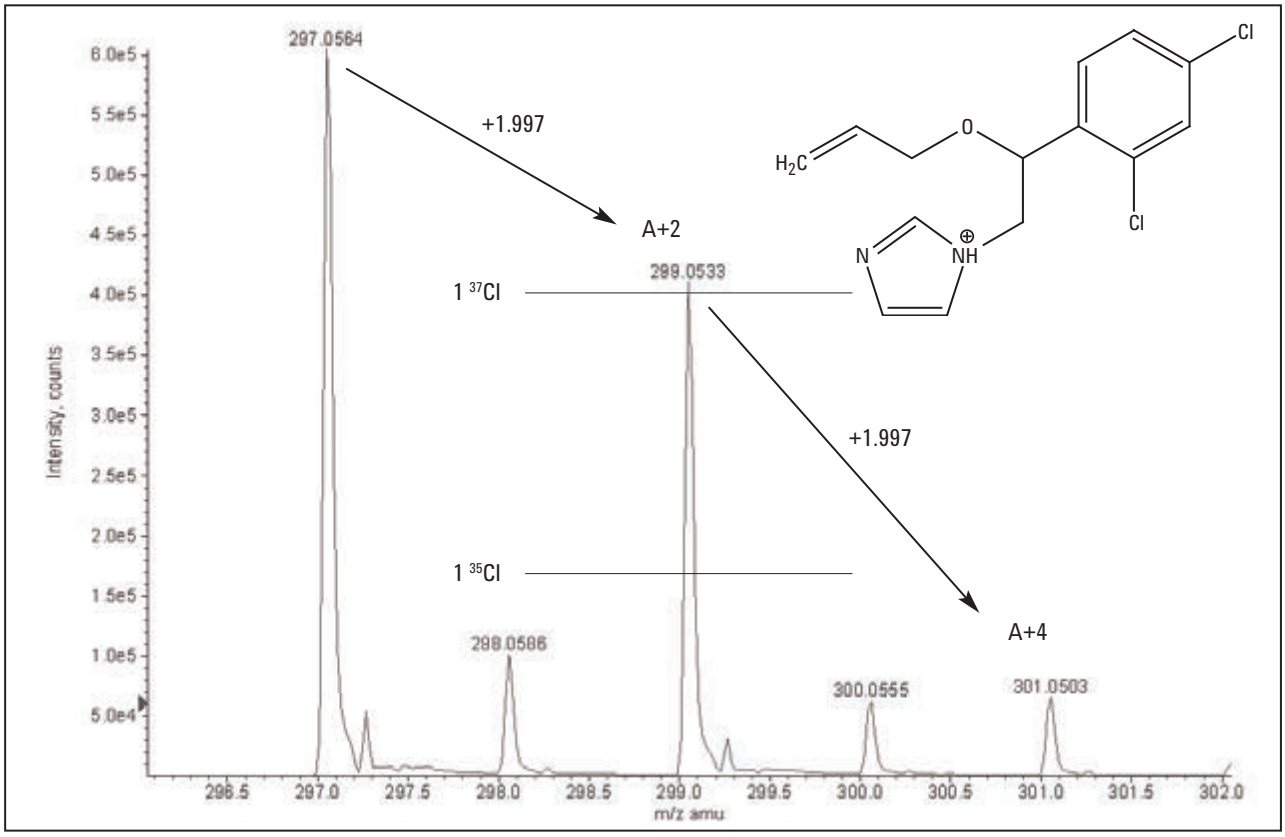


图 4. 梨提取物中 *m/z* 为 297 的离子的同位素峰和抑霉唑的结构

婴儿食物样品的筛选

在 100 种被检测的样品中，有 33 种符合婴儿食品的筛选限 0.01 mg/kg。由数据库检索发现的唯一化合物是梨、香蕉和柑桔浓汁中的痕量抑霉唑。而且，检查标签发现婴儿食品中还用了柠檬汁，这可能是抑霉唑的来源。然而，其浓度大约为 0.0005 mg/kg，远远低于婴儿食品安全限 0.01 mg/kg。抑霉唑很容易被筛选出来，因为它有两个氯原子的特征性 A+2 同位素信号。鉴定误差是 0.3 mDa 或 1 ppm。数据库中的其他化合物没有检测到。由于碎片离子信号低且可能抑霉唑的浓度太低（0.0005 mg/kg），不可能对此样品进行确认。然而，依据婴儿食品健康限量 0.01 mg/kg 进行样品筛选是安全的。对大约 10 种不同的婴儿食品样品进行了筛选，包括各种品牌的蔬菜和水果。幸运的是，除了上面提到的抑霉唑外，在 MF 数据库检索中没有发现农药的阳性检测结果。婴儿食品样品是最难筛选的样品，因为其需要很低的检出限。

MF 数据库检索的不足与优势

数据库检索的唯一缺点是由于基质中的相互干扰或由于一些农药浓度过高造成的质量准确度的降低。这个问题可以通过加入第二种离子（碎片离子）或钠或氨加合离子很容易得到解决，从而排除基质的干扰，增强可信度。

LC/TOF MS 的精确质量数测定与数据库检索的结合应用是一个将新潮的检测技术用于食品和水中农药鉴定的强有力的实例。在 LC/TOF MS 中不需要将经典的碎片裂解谱库与碎片裂解方式进行比较，而是使用分子式和计算的精确质量，尤其是当其与一个或两个有精确质量的碎片离子相结合时，可以鉴定化合物，不必担心碎片离子的强度和可能由仪器之间和基质之间差异造成的不同。

例如，分子捕获软件与分子特征数据库联合使用，根据离子准确的保留时间（在 0.005 分钟内匹配）使

表 2. 使用 MF 数据库从食物样品中筛选出的农药

样品	筛选出的峰	匹配的农药 < 5 ppm	LC/TOF MS 确认的农药	误差 mDa	误差 ppm	保留时间误差 (min.)	假阳性结果 负	假阳性结果 正
苹果	2681	12	抑霉唑				0	0
			抑霉唑降解物	–1	–3.9	–0.08		
			异菌脲	0.22	0.7	–0.12		
			氟喹唑	0.05	0.1			
			苯醚甲环唑	–0.74	–1.8			
橄榄油	1678	10	特丁津	0.06	0.2	0.09	0	0
			(脱异丙基莠去津)					1
胡椒	2402	41	抑霉唑	0.3	1	0.07	0	
			二嗪磷	0.11	0.3	0.12		
			稻虱净	1	3.3	0.1		
番茄	617	8	稻虱净				0	
			(噻嗪酮)					1
			多菌灵					
			甲基硫菌灵					
黄瓜	1619	17	噻苯咪唑	0.2	1	0.01	0	0
			马拉硫磷异构体 1	0.04	0.1	0.05		
			马拉硫磷异构体 2	0.22	0.7	–0.03		
			马拉硫磷氧化物	0.25	0.8	0.08		
			抑霉唑	–0.1	0.3	0.05		
梨	1209	14	抑霉唑				0	0
			多菌灵	–0.21	–1.1	0.05		
			抑霉唑降解物	0.51	2	0.03		
			亚胺硫磷	0.31	1	0.04		
土豆	1150	11	无				0	0
			平均值	0.30	1.20			
			标准偏差	0.25	1.00			

用 .mdh 文件将各组离子联系起来。因此，可能从基质的背景离子中找到并分辨出农药的碎片离子，如抑霉唑。因此，作者认为 LC/MS 数据库中存在的一个大问题即将通过采用准确质量数数据库的方法来解决，这种方法使用 MH^+ 和主要碎片离子的分子特征算法来进行食品中农药的筛选。

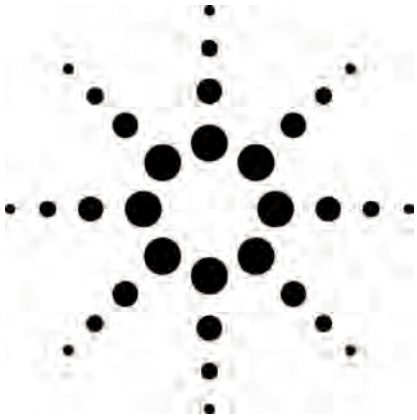
参考文献

1. PAN Europe position on the European Commission Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council on maximum residue levels of pesticides in products of plant and animal origin COM(2003) 117 final, 2003/0052 (COD).
2. Phillip L. Wylie, Michael J. Szelewski, Chin-Kai Meng, and Christopher P. Sandy, Comprehensive Pesticide Screening by GC/MSD using Deconvolution Reporting Software, Agilent Technologies, publication 5989-1157EN.
3. Imma Ferrer, E. M. Thurman, 2005, Measuring the mass of an electron by LC/TOF MS: A study of twin ions, *Analytical Chemistry*, 77, 3394–3400.
4. E. Michael Thurman, Imma Ferrer, 2005, Identification of unknown pesticides in food using both LC/MSD TOF and ion trap MS^n, Agilent Technologies, publication 5989-1924EN.

5. M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, and F. J. Schenck, Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/ Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce, (2003) *Journal of AOAC International*, 86:412–431.

6. S.J. Lehotay, K. Maπtovská, A.R. Lightfield, Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables, (2005) *Journal of AOAC International*, 88:615–629.

7. Imma Ferrer, Juan F. Garcia-Reyes, M. Mezcua, E. M. Thurman, A. R. Fernandez-Alba, 2005, Multiresidue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatography A*, 1082, 81–90.



应用 LC/MSD TOF 和离子阱 MS^n 鉴别未知农药

应用

食品安全

作者

E. Michael Thurman and Imma Ferrer
Pesticide Residue Research Group
University of Almería
04120 Almería
Spain

Agilent Contact: Jerry Zweigenbaum
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610

摘要

监控食品中未知农药的传统做法是使用气相色谱/质谱 (GC/MS) 方法，并使用常规的谱库检索。然而，许多新的极性及热不稳定性农药，即使没有可查询的谱库（除非用户自创谱库），也可以使用液相色谱/质谱 (LC/MS) 方法更快更简便地分析测定。因此，开发 LC/MS 方法测定现实的未知农药势在必行。

本应用开发了使用 LC/MSD TOF 及 LC/MSD 离子阱 (MS^n) 技术测定未知农药的方法，并用精确质量数及 ChemINDEX 或 Merck Index® 数据库检索实验分子式。该方法不同于常规的离子谱库检索方式，包含多重步骤。

首先，使用 LC/MSD TOF 或 LC/MSD 离子阱仪器对市场上的蔬菜（西红柿或其它沙拉蔬菜）提取物中可能的未知农药进行初步检测。

然后应用“双重方法”。这包括，利用经验分子式或分子量（通常含一个 A+2 的同位素标记，如 S 或 Cl）进行精确质量数鉴别，随后用 MS/MS 离子阱确认含硫或含氯的农药及其主要碎片离子和氯、硫同位素。

第三步，使用含 10,000 种化合物的 Merck Index CD 或含 77,000 种化合物的 ChemINDEX CD 及一个手提 PC 进行经验分子式数据库分析。

在给出的范例中，未知农药被鉴定为黄瓜中有机磷杀虫剂，马拉硫磷；及西红柿提取物中昆虫生长抑制剂，布洛吩。

第四步，也就是最后的步骤是用已知标准确认化合物。

简介

鉴定及定量研究蔬菜中杀虫剂对于每个人及健康组织有着重大意义。由于人们对于健康的关注，欧盟建立了蔬菜中低浓度农药的指南。比如，新的法规如欧洲指南 91/414/EEC [1]，或美国食品质量保护法案 (FQPA) [2]，这些法规提高了人们健康，工作及环境保护标准。法规同时要求对以往使用的农药进行重新登记。

另外还取消了许多目前市场上使用的植物保护产品，其中美国 177 种，欧洲 320 种。并且，欧洲还宣布一共 110 种产品将在近期被撤消 [1]。欧洲的这一变动举措规定，现有的超过 450 种活性物质将于 2008 年前被撤出市场，仅留下大约 400 种农药继续使用。

再者，新规则的质量标准包括重新核定蔬菜中农药最大残留限量 (MRL)，EU 指南对于每种食品的每种农药设立了不同的最大残留限量 (MRL)。而且新指南将决定每个 EU 国家是否使用不同的 MRL。EU 新指南规定各个国家的 MRL 将在新计划中被保留。最后，违禁的化合物要设定最低的 MRL，现在定为 0.01 mg/kg (ppm)。由于有许多化合物将计划被除去，所以应用 LC/MS 测定蔬菜提取物中未知农药就显得非常重要甚至必要。因为通常不可能知道是哪一种违禁物质被使用，所以使用一种快速准确的系统监控食品中未知物质对于食品环境监测至关重要。

因此，需要使用新型质谱仪器研究开发食品中未知农药的分析方法，例如联合使用精确质量测定仪器 LC/MSD TOF 及 LC/MS 离子阱 MS/MS。本研究是首次尝试使用新型安捷伦的 LC/MSD TOF 及 LC/MSD 离子阱仪器，及商业数据库如 Merck Index 和 ChemINDEX 数据库，鉴定食品中未知农药。

联用 LC/MSD TOF 和 LC/MSD 离子阱的几个优点在于，可以获得精确质量数和实验分子式，而且结合 MS/MS 谱图或者 MS^n 可以获得光谱信息。应用 LC/MSD TOF 和 LC/MSD 离子阱鉴定未知物包括以下六个步骤。

1. 使用离子阱全扫描方式或 CID 离子源 LC/MSD TOF 分析蔬菜提取物中重要的未知峰。
2. 然后查看 A+2 同位素分布，看是否存在 Cl，Br 或 S。
3. 利用分子量，A+2 同位素和分子式在 Merck Index 或 ChemINDEX 中查找可能的未知物。
4. 继续用离子阱进行二级三级质谱分析。鉴定离子碎片，精准质量碎片和可能的结构。
5. 结合 LC/MSD TOF 测定的碎片离子质量及分子离子的精确质量，作出初步鉴定。
6. 获得并分析合适的标准物进行最后确认。

下面举两个实例，测定的是从商店购买的沙拉蔬菜：黄瓜和西红柿，使用的是上述方法，样品中均含有“未知白色粉末”，随后被上述方法鉴定为不同的“未知农药”。

实验方法

标准蔬菜提取 [3]

1. 从市场购买 2 kg 的西红柿，生菜，大椒和黄瓜，剁碎并混匀。
2. 准确称取 15 g 混匀的蔬菜，置于 200 mL 的 PTFE 离心管中。
3. 加入乙酸乙酯 45 mL 和 6.5 M 的氢氧化钠 1 mL，在 21,000 转/分 [4] 的高速离心下混匀 30 s。然后加入 13 g 无水硫酸钠，重复萃取 30 s。
4. 合并提取物,使之通过 20 g 无水硫酸钠的薄层。固体部分用 50 mL 乙酸乙酯冲洗。合并提取物在 45 ± 5°C 水浴条件下旋转蒸发干。
5. 干燥的残渣用 15 mL 甲醇超声溶解。含 1 g/mL 样品的提取物，过 0.2 µm 的 PTFE 过滤器（Mill-ex® FG，微孔过滤器），再进行 LC/MS 分析。

快速蔬菜提取

1. 从市场上选取含白色粉末的西红柿或黄瓜。
2. 用甲醇仔细洗蔬菜表皮三次，除去白色粉末，回收总量 2 - 5 mL（根据蔬菜量而定）的淋洗液于一个 150 mL 的 Pyrex® 烧杯中。
3. 混匀后，转移至 5 mL 的注射器中，通过 Millex-FH PTFE 过滤器过滤为 0.3 mL 每份。
4. 用 0.6 mL 去离子水稀释。
5. 用 LC/MSD TOF 或 LC/MSD 离子阱分析。

LC/MSD TOF 方法

仪器：安捷伦 LC/MSD TOF 配电喷雾源

使用安捷伦 1100 二元泵，标准安捷伦自动进样器，进样体积 50 µL

色谱柱：ZORBAX Eclipse® XDB-C8，4.6 mm × 150 mm × 5 µm ，部件号 993967-906

流动相：A： ACN，B：0.1% 甲酸水溶液

梯度： 15% A - 100% A，30 min，0.6 mL/min 流速

正模式 ESI ，毛细管电压 4000 V

雾化器 40 psig，干燥气 9 L/min，气体温度 300 °C

裂解电压 190 V，撇除器电压 60 V

八极杆电压 37.5 V，八极杆 RF 电压 250 V

参考质量： *m/z* 121.0509 和 922.0098，分辨率：在 *m/z* 922.0098 处为 9500 ± 500

参考 A 喷雾 2 在测定时设为常规流速

LC/MSD 离子阱方法

为直接比较色谱峰，色谱条件与 LC/MSD TOF 完全一致

仪器： LC/MSD 离子阱

安捷伦 1100 二元泵，标准安捷伦自动进样器，进样体积 50 µL

色谱柱：ZORBAX Eclipse XDB-C8，4.6 mm × 150 mm × 5 µm，部件号 993967-906

流动相：A：ACN ，B：0.1% 甲酸水溶液

梯度：15%A-100%A，30 min，0.6 mL/min 流速

正模式 ESI，毛细管电压 3000 V

雾化器 40 psig，干燥气 9 L/min，气体温度 350 °C

撇除器 1 电压：20 V，撇除器 2 电压：10 V，毛细管出口电压补偿：50 V，毛细管出口电压 70 V

八极杆电压 3 V，八极杆RF电压 100 V，八极杆：2 V，透镜 1 电压：-3V，阱电压：50，透镜 2 电压：-50 V

目标：最大 50,000，滞留时间：200 ms，扫描 *m/z* 50 到 800，平均：5

变动平均：开，MS/MS *m/z* 2.0 分离宽度，幅度: 1.2 V，裂解中止 *m/z* 83

结果与讨论

黄瓜提取物

图 1 显示了店售黄瓜白色粉末快速提取物的离子阱测定总离子流谱图。色谱图中最大峰为 *m/z* 331 和 353 的离子峰，TIC 中加星号的峰 Star*TIC，其谱图在图 1 下给出。*m/z* 相差 22 是和钠离子的加和结果。由于分析在正模式下进行，$[M+H]^+$是 *m/z* 331,而 $[M+Na]^+$是 *m/z* 353。而且，*m/z* 331 还含 A+2 的同位素峰 *m/z* 333，占 *m/z* 331 离子的 8%。这两个重要的 A+2 离子被认为是未知物中含氯或硫（可能含溴）。S - 34 的天然丰度为 4.8 %；因此 8% 这个峰很有可能是未知峰 *m/z* 331 的化合物中含两个 S - 34 原子。

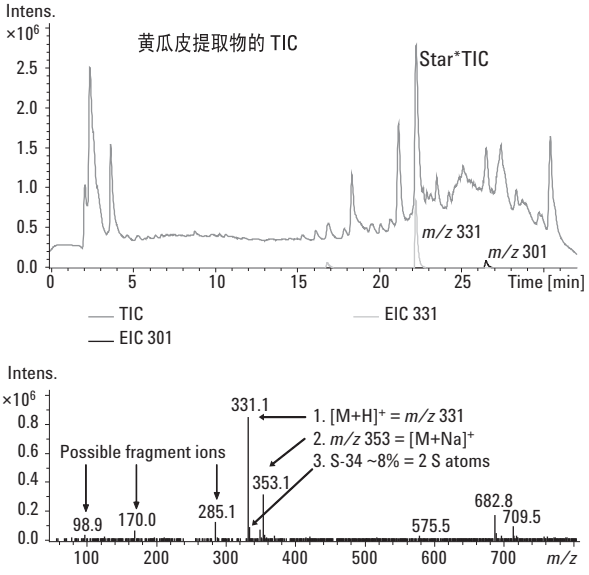


图 1. 上面是黄瓜皮提取物的离子阱 TIC 图; 下面是 *m/z* 331 的 EIC。下图是 Star*TIC 峰的谱图

图 2 显示了 *m/z* 331 离子的 LC/MS/MS。包含：*m/z* 285, 240, 127 和 99。在查阅 Merck Index 数据库找到可能的结构后，可以用这些离子推断鉴别化合物结构。

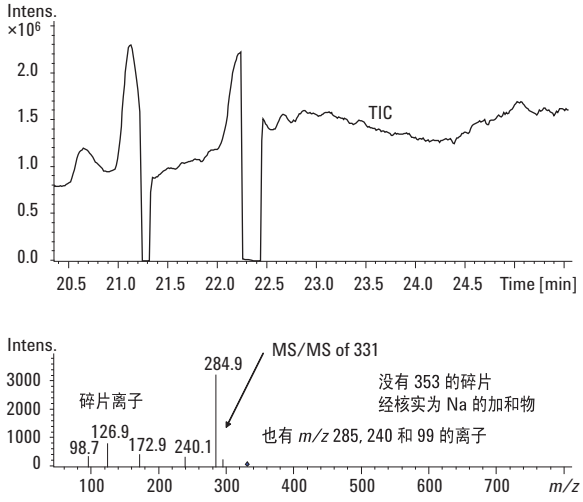


图 2. 离子阱 MS/MS 图和相应的 *m/z* 331 的质谱图

下一步是查找 Merck Index 数据库有关分子量和硫原子含量。图 3 显示了在手提电脑上查询图表的样板。由于离子阱给出分子离子峰 *m/z* 331，在查询时减去一个质子获得 330 的分子量。分子量然后在一个质量单位间搜索至 331。在数据库查询时遵照分子式仅含两个 S 原子。

图 3. 数据库中检索分子量为 330-331

图 4a 和图 4b 显示了 Merck Index 数据查询的两个结果。找到的化合物为潘尼西林 O 和马拉硫磷，分子量分别为 330.43 和 330.36。

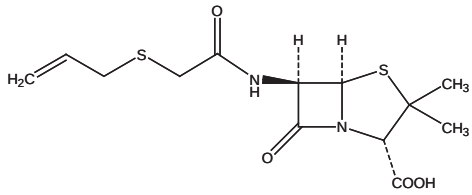
数据库中检索分子量为330-331的结果
分子中含有两个S

MERCK CambridgeSoft

Monograph Number: 7170

Title: Penicillin O

CAS Registry Number: 87-09-2



CAS Name: (2*S*,5*R*,6*R*)-3,3-Dimethyl-7-oxo-6-[[(2-propenylthio)acetyl]amino]-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid

Additional Names: [(allylthio)methyl] penicillin; allylmercaptomethylpenicillin; allylmercaptomethylpenicillinic acid; penicillin AT

Molecular Formula: $C_{13}H_{18}N_2O_4S_2$

Molecular Weight: 330.43.

Percent Composition: C 47.25%, H 5.49%, N 8.48%, O 19.37%, S 19.41%

Literature References: Antibiotic produced by *Penicillium chrysogenum.* Biosynthesis of salts: Behrens *et al., J. Biol. Chem.* **175,** 793 (1948); Rhodehamel, Behrens *et al.*, **US 2528175** and **US 2623876** (1950, 1952, both to Lilly); Ford *et al., Antibiot. & Chemother.* **3,** 1149 (1953); Ford, **US 2647894** (1953 to Upjohn); Palecková, Slechta, *C.A.* **50,** 17309g (1956).

Derivative Type: 2-Chloroprocaine salt monohydrate

Additional Names: Chloroprocaine penicillin O; penicillin O 2-chloroprocaine

Trademarks: Depo-Cer-O-Cillin Chloroprocaine (Upjohn)

Molecular Formula: $C_{26}H_{37}ClN_4O_6S_2.H_2O$

Molecular Weight: 619.20.

Percent Composition: C 50.43%, H 6.35%, Cl 5.73%, N 9.05%, O 18.09%, S 10.36%

Properties: Slender needles from hot water, mp 79-81°. Practically insol in cold water. Stable in dry form at room temp. Aq suspensions are stable at room temp for 1 week, at refrigerator temps for 3 weeks. Calculated activity: 949 units/mg. Solubilities: Weiss *et al., Antibiot. & Chemother.* **7,** 374 (1957).

Melting point: mp 79-81°

图 4a. 数据库检索的第一个结果

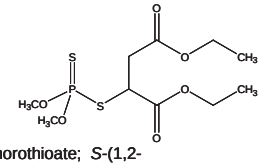
MERCK CambridgeSoft

Monograph Number: 5723

Title: Malathion

CAS Registry Number: 121-75-5

CAS Name: [(Dimethoxyphosphinothioyl)thio]butanedioic acid diethyl ester



Additional Names: diethyl mercaptosuccinate *S*-ester with *O,O*-dimethyl phosphorothioate; *S*-(1,2-dicarbethoxyethyl) *O,O*-dimethyldithiophosphate; insecticide no. 4049; carbofos; malathon (obsolete); mercaptothion; phosphothion

Manufacturers' Codes: ENT-17034

Trademarks: Cythion; Derbac-M (International); Malamar 50; Malaspray; Organoderm (Mundipharma); Prioderm (Coates & Cooper); Suleo-M (International)

Molecular Formula: $C_{10}H_{19}O_6PS_2$

Molecular Weight: 330.36.

Percent Composition: C 36.36%, H 5.80%, O 29.06%, P 9.38%, S 19.41%

Literature References: Cholinesterase inhibitor. Prepn: Johnson *et al., J. Econ. Entomol.* **45,** 279 (1952); Cassaday, **US 2578652** (1951 to Am. Cyanamid). Purification: Usui, **US 2962521** (1960 to Sumitomo). Treatment of *Pediculus humanus* (head lice) infestation: D. Taplin *et al., J. Am. Med. Assoc.* **247,** 3103 (1982). Toxicity data: T. B. Gaines, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **14,** 515 (1969). Review of distribution, transport and fate in the environment: M. S. Mulla *et al., Residue Rev.* **81,** 1-159 (1981); of carcinogenic risk: *IARC Monographs* **30,** 103-129 (1983).

Properties: Deep brown to yellow liq, mp 2.9°. $bp_{0.7}$ 156-157°. Characteristic odor. d_4^{25} 1.23. n_D^{25} 1.4985. Vapor pressure at 30°: 4 ´ 10-5 mm Hg. Slightly sol in water (145 ppm). Misc with many organic solvents including alcohols, esters, ketones, ethers, aromatic and alkylated aromatic hydrocarbons and vegetable oils. Limited soly in certain paraffin hydrocarbons. Petroleum ether is sol to about 35% in malathion. Hydrolyzed at pH >7.0 or <5.0. Stable in an aq soln buffered to pH 5.26. LD_{50} in female, male rats (mg/kg): 1000, 1375 orally (Gaines).

Melting point: mp 2.9°

Boiling point: $bp_{0.7}$ 156-157°

Index of refraction: n_D^{25} 1.4985

Density: d_4^{25} 1.23

Toxicity data: LD_{50} in female, male rats (mg/kg): 1000, 1375 orally (Gaines)

CAUTION: Potential symptoms of overexposure are miosis, aching eyes, blurred vision and lacrimation; eye and skin irritation; salivation; anorexia, nausea, vomiting, abdominal cramps, diarrhea, giddiness, confusion and ataxia; rhinorrhea, headache; tightening of chest, wheezing and laryngeal spasms. *See NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards* (DHHS/NIOSH 97-140, 1997) p 188.

Use: Insecticide.

Therap-Cat: Pediculicide.

Therap-Cat-Vet: Ectoparasiticide.

图 4b. 数据库检索的第二个结果

图 5 显示的碎片离子与图 2 的 *m/z* 331 MS/MS 实验结果相符。所以，马拉硫磷是从 Merck Index 查到的比较可能的判断。

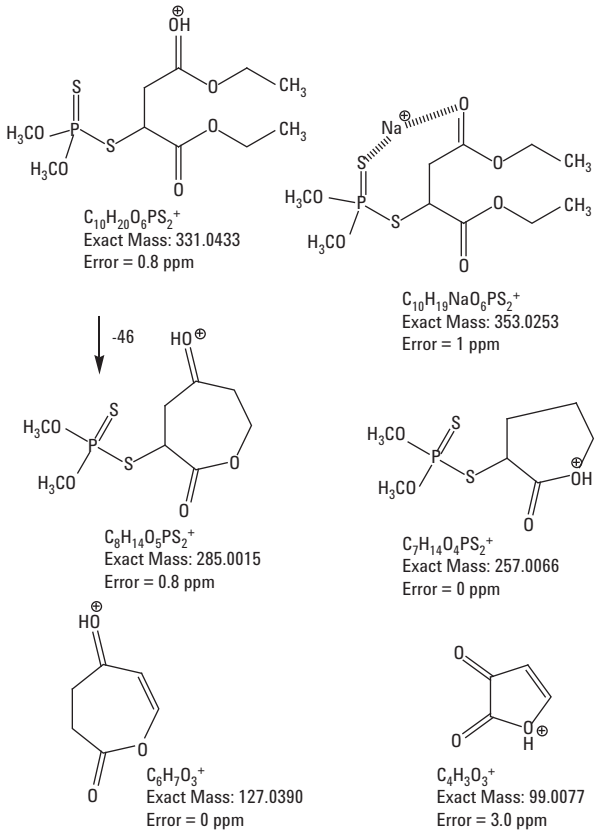


图 5. 马拉硫磷可能的碎片

下一步是用 LC/MSD TOF 获得精确质量。图 6a 是总离子流图，因为使用了相同的 HPLC 柱，两个仪器对于总离子流图中 Star*TIC 获得了非常相近的保留时间。图 6b 显示了精确质量数为 *m/z* 331.0435，只有一种分子式符合，为 $C_{10}H_{19}O_6PS_2$。

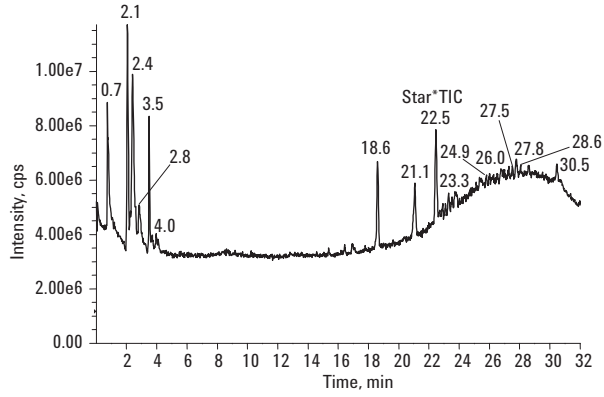


图 6a. 用 LC/MS TOF 分析黄瓜提取物

当该分子式输入 Merck Index 数据库进行查询时，只有马拉硫磷符合（图 7）。

所以，精确质量给出了同样的分子式，与离子阱测定结果相符。另外，图 6b 也给出了可能的未知化合物碎片离子 *m/z* 353.0256, 285.0017, 127.0389 和 99.0081 的精确质量数。这些精确质量的离子与离子阱在 *m/z* 331 的测定结果相符（除去加和离子 *m/z* 353）。这些离子的质量与图 5 的分子式相符，包括 *m/z* 331 的与钠离子的加和离子。因此，鉴定结果具有很高的可信度。

最后与标准鉴别比较。使用离子阱 MS/MS 和 LC/ MS TOF 同时测定；两个仪器均给出了正确的鉴定。马拉硫磷是黄瓜中违禁的物质，所以该鉴定意义重大。基于未知物鉴定方案，该化合物的分子离子获得 2 分，*m/z* 285 的离子获得 2 分，MS/MS 中从 *m/z* 331 变到 *m/z* 285 获得 1.5 分，该化合物共获得 5.5 分。鉴定食品中未知违禁物质需要 4 分（见 Stolker 等的参考文献［5］和 Ferrer 与 Thurman 所著的书［6］）。这两种仪器的互补性也在下面的未知样品分析中给出。

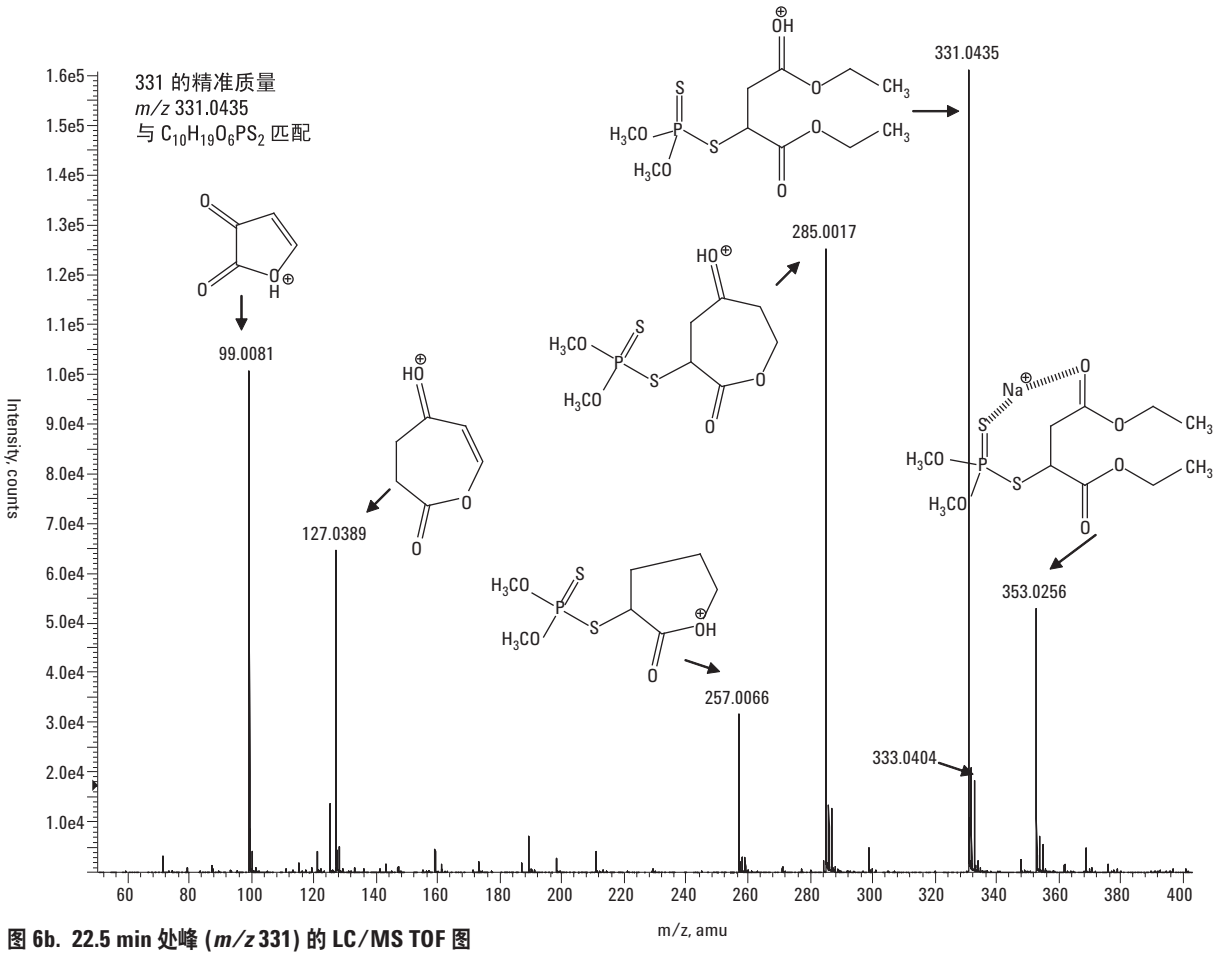


图 6b. 22.5 min 处峰 (*m/z* 331) 的 LC/MS TOF 图

MERCK

CambridgeSoft

Monograph Number: 5723

Title: Malathion

CAS Registry Number: 121-75-5

CAS Name: [(Dimethoxyphosphinothioyl)thio]butanedioic acid diethyl ester

Additional Names: diethyl mercaptosuccinate *S*-ester with *O,O*-dimethyl phosphorothioate; *S*-(1,2-dicarbethoxyethyl) *O,O*-dimethyldithiophosphate; insecticide no. 4049; carbofos; malathon (obsolete); mercaptothion; phosphothion

Manufacturers' Codes: ENT-17034

Trademarks: Cythion; Derbac-M (International); Malamar 50; Malaspray; Organoderm (Mundipharma); Prioderm (Coates & Cooper); Suleo-M (International)

Molecular Formula: $C_{10}H_{19}O_6PS_2$

Molecular Weight: 330.36.

Percent Composition: C 36.36%, H 5.80%, O 29.06%, P 9.38%, S 19.41%

Literature References: Cholinesterase inhibitor. Prepn: Johnson *et al., J. Econ. Entomol.* **45,** 279 (1952); Cassaday, **US 2578652** (1951 to Am. Cyanamid). Purification: Usui, **US 2962521** (1960 to Sumitomo). Treatment of *Pediculus humanus* (head lice) infestation: D. Taplin *et al., J. Am. Med. Assoc.* **247,** 3103 (1982). Toxicity data: T. B. Gaines, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **14,** 515 (1969). Review of distribution, transport and fate in the environment: M. S. Mulla *et al., Residue Rev.* **81,** 1-159 (1981); of carcinogenic risk: *IARC Monographs* **30,** 103-129 (1983).

Properties: Deep brown to yellow liq, mp 2.9°. bp$_{0.7}$ 156-157°. Characteristic odor. d_4^{25} 1.23. n_D^{25} 1.4985. Vapor pressure at 30°: 4 × 10-5 mm Hg. Slightly sol in water (145 ppm). Misc with many organic solvents including alcohols, esters, ketones, ethers, aromatic and alkylated aromatic hydrocarbons and vegetable oils. Limited soly in certain paraffin hydrocarbons. Petroleum ether is sol to about 35% in malathion. Hydrolyzed at pH >7.0 or <5.0. Stable in an aq soln buffered to pH 5.26. LD_{50} in female, male rats (mg/kg): 1000, 1375 orally (Gaines).

Melting point: mp 2.9°

Boiling point: bp$_{0.7}$ 156-157°

Index of refraction: n_D^{25} 1.4985

Density: d_4^{25} 1.23

Toxicity data: LD_{50} in female, male rats (mg/kg): 1000, 1375 orally (Gaines)

CAUTION: Potential symptoms of overexposure are miosis, aching eyes, blurred vision and lacrimation; eye and skin irritation; salivation; anorexia, nausea, vomiting, abdominal cramps, diarrhea, giddiness, confusion and ataxia; rhinorrhea, headache; tightening of chest, wheezing and laryngeal spasms. *See NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards* (DHHS/NIOSH 97-140, 1997) p 188.

Use: Insecticide.

Therap-Cat: Pediculicide.

Therap-Cat-Vet: Ectoparasiticide.

图 7. 在数据库中检索 $C_{10}H_{19}O_6PS_2$

西红柿提取物

在这个例子中，使用基本上相同的方法，只是这次先用 LC/MSD TOF 获得源内 CID 谱图。图 8a 显示了西红柿中白色粉末快速提取物的 Star*TIC。

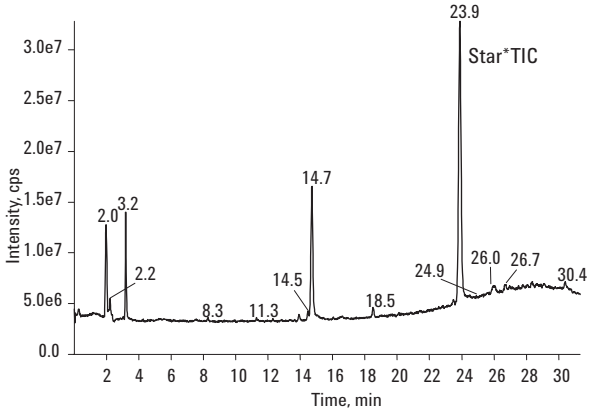


图 8a. 用 LC/MS TOF 分析西红柿提取物

精确质量数为 *m/z* 306.1642，在检查了 A+2 同位素分布后，知道化合物含一个硫原子，而得出两种可能的分子式。然后，A+1 的相对峰面积相当于 *m/z* 306 的 17%，表明含 15 个碳原子。见图 8b。

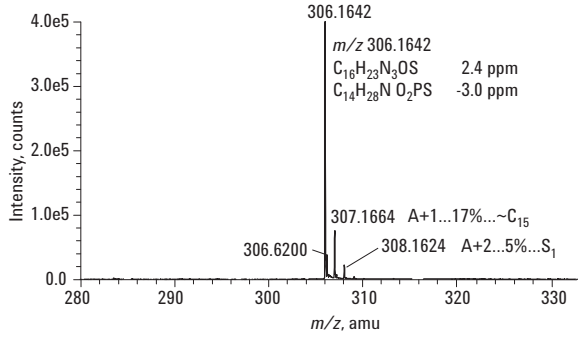


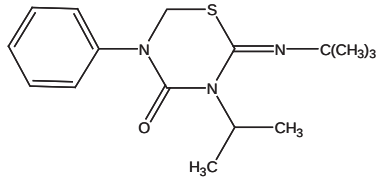
图 8b. 23.9 min 处峰的 LC/MS TOF 图

在 Merck Index 数据库中查询这两种分子式，只有一种分子式符合。这种化合物为 $C_{16}H_{23}N_3OS$，昆虫生长抑制剂布洛吩。根据 Merck Index 数据库得知，布洛吩常广泛用于杀灭白色昆虫（图 9 ）。所以，该化合物的可能性非常大。

MERCK CambridgeSoft

Monograph Number: 1486

Title: Buprofezin



CAS Registry Number: 69327-76-0

CAS Name: 2-[(1,1-Dimethylethyl)imino]tetrahydro-3-(1-methylethyl)-5-phenyl-4*H*-1,3,5-thiadiazin-4-one

Additional Names: 2-*tert*-butylimino-3-isopropyl-5-phenylperhydro-1,3,5-thiadiazin-4-one

Manufacturers' Codes: NNI-750; NNK-758; NN-29285; PP-618

Trademarks: Applaud (Nihon Nohyaku)

Molecular Formula: $C_{16}H_{23}N_3OS$

Molecular Weight: 305.45.

Percent Composition: C 62.92%, H 7.59%, N 13.76%, O 5.24%, S 10.50%

Literature References: Insect growth regulator which inhibits chitin synthesis. Prepn: Z. Grünecker *et al.*, **DE 2824126**; K. Ikeda *et al.*, **US 4159328** (1978, 1979 both to Nihon Nohyaku); H. Kanno, *Pure Appl. Chem.* **59,** 1027 (1987). Mode of action study: T. Asai *et al., Appl. Entomol. Zool.* **20,** 111 (1985). Control of whiteflies and scale insects: I. Ishaaya *et al., Meded. Fac. Landbouwwet., Univ. Gent* **54,** 1003 (1989). GC-MS determn in clementine citrus: P. Cabras *et al., J. Agr. Food Chem.* **46,** 4255 (1998). Persistence in olives and olive oil: *idem et al., Food Addit. Contam.* **17,** 855 (2000). Review of physical properties, activity and field trials: H. Kanno *et al., Proc. Br. Crop Prot. Conf. - Pests Dis.* **1981,** 59-66.

Properties: Crystals from isopropyl alcohol, mp 106.1°. Soly at 25° (g/l): acetone 240, chloroform 520, ethanol 80, toluene 320; water 0.9 mg/l. Vapor pressure at 25°: 9.4 ´ 10-6 mmHg. LD_{50} in mice, rats (mg/kg): 10000, 8740 orally. LC_{50} (48 hr) in carp: 2-10 mg/l (Kanno, 1981).

Melting point: mp 106.1°

Toxicity data: LD_{50} in mice, rats (mg/kg): 10000, 8740 orally; LC_{50} (48 hr) in carp: 2-10 mg/l (Kanno, 1981)

Use: Insecticide.

数据库检索结果… $C_{14}H_{28}NO_2PS$ …没有相符的分子量 = $C_{16}H_{23}N_3OS$

图 9. 在数据库中检索 $C_{14}H_{28}NO_2PS$ 和 $C_{16}H_{23}N_3OS$

注意，在图 10 中 *m/z* 201.1059 这个离子的存在。LC/MSD 离子阱 MS/MS 的 *m/z* 306 离子给出 *m/z* 201 的离子，继续 MS^3 给出 *m/z* 116 的离子。

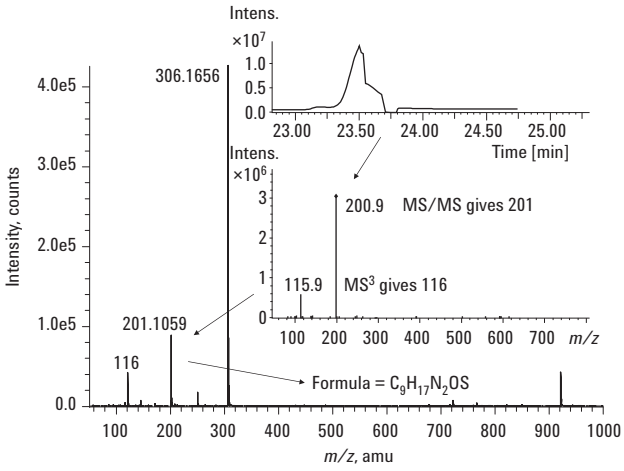


图 10. *m/z* 306 的 LC/MS TOF 和 LC/MS/MS 离子阱色谱图

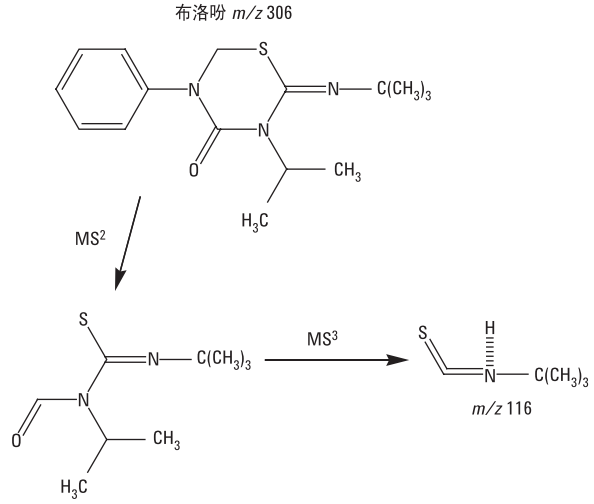


图 11. 从布洛吩结构推论的碎片离子合理结构

另外，预计可获得的 201.1056 碎片离子与 LC/MSD TOF（201.1059）测定值非常匹配（仅差 0.0003 u），说明鉴定的可靠性很高。在获得布洛吩标准物后，最终的实验数据匹配非常完美，进一步说明 LC/MSD TOF 和 LC/MSDv 离子阱鉴定未知物的能力。布洛吩可以在西红柿中使用；所以，它不是个禁用物质。布洛吩的允许量可以用标准提取后测定，继而制定欧盟蔬菜允许标准。

结论

- LC/MSD TOF 和 LC/MSD 离子阱是鉴定蔬菜中农药的互补且有力的工具，并且提供了使用 LC/MS方法解决环境食品化学问题的新方案。
- 两种质谱手段的结合加上农药数据库，Merck Index 或 ChemINDEX，可以经常用于未知农药的鉴定。
- 当与 LC/MSD TOF CID 谱图结合测定时，用 MS^2 和 MS^3 鉴定碎片离子也是个很好的手段。
- 将 TOF 和离子阱结合可以用于鉴定未知物［4，7］！未来的研究将包含色谱数据，有助于鉴定未知物，并且通过经验分子式计算和同位素比率建立简单的农药谱库。

参考文献

1. EU Food Directives, 2002, 91/414/EEC
2. Food Quality Protection Act, 1998 (FQPA)
3. Aguera, A.; Lopez, S.; Fernandez-Alba, A.R.; Contreras, M.; Crespo, J.; Piedra, W., 2004, *J. Chromatogr. A.*, **1045**: 125-135.
4. Imma Ferrer and E. Michael Thurman, "Determination of Chloronicotinyl Insecticides in Salad Vegetables by LC/MS/ESI/TOF and LC/MS Ion Trap", Agilent Technologies publication 5989-1842EN, www.agilent.com/chem
5. A.A.M Stolker, E. Dijkman, W. Niesing, E.A. Hogendoorn, 2003, "Identification of residues by LC/MS/MS" In: Imma Ferrer and E. Michael Thurman, editors Liquid Chromatography/Mass Spectrometry/Mass Spectrometry and Time-of-Flight Mass Spectrometry for the analysis of emerging contaminants, (2003) American Chemical Society Symposium Volume 850.
6. Imma Ferrer and E.M. Thurman, (2003), Liquid Chromatography/Mass Spectrometry/Mass Spectrometry and Time-of-Flight Mass Spectrometry for the analysis of emerging contaminants, American Chemical Society Symposium, 850.
7. E. Michael Thurman, Imma Ferrer, A. R. Fernandez-Alba, (2005), "Matching Unknown Empirical Formulas to Chemical Structure Using LC/MS TOF Accurate Mass and Database Searching: Example of Unknown Pesticides on Tomato Skins" *Journal of Chromatography*, Special Issue on Mass Spectrometry, In press.

用液相色谱/飞行时间质谱和液相色谱/离子阱质谱分析柑橘和橙汁中采后杀菌剂及其代谢物

应用

食品安全

作者

E. Michael Thurman and Imma Ferrer
Pesticide Residue Research Group
University of Almería,
04120 Almería, Spain

Michael Woodman and Jerry Zweigenbaum*
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA
*Agilent contact

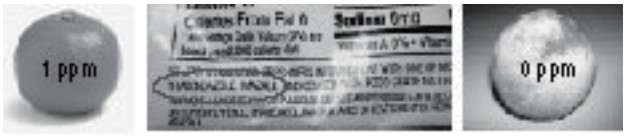
摘要

本应用报告报导了用液相色谱/飞行时间质谱和液相色谱/离子阱质谱技术（LC/TOFMS 和 LC/ITMS），测定橙子及橙汁中两种重要的采后杀菌剂（抑霉唑和噻菌灵）以及抑霉唑的一种代谢产物。包括橙子样品快速制备的详细过程，以及从橙汁中分离杀菌剂和代谢物的固相萃取方法。通过用 LC/ITMS 对元素组成和碎片的精确质量数进行测定，有助于解析降解途径，对这些杀菌剂和代谢物进行鉴定。本报告还包括对来自市场的橙子和橙汁真实样品的分析结果。

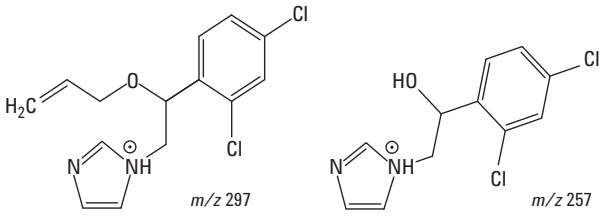
前言

噻菌灵和抑霉唑广泛应用于橙子的采后处理（图 1），其目的是在以后几天或几周的时间内的运输过程中起到保护水果的作用。杀菌剂只对果皮表面进行处理。在欧洲和美国，水果上市之前需要对抑菌唑和噻菌灵的最大残留限（MRL）进行监测 [1, 2]。由于这些化合物无所不在，也经常在进口水果中被检测到 [3]。因此，要确保食品安全，就必须对许多市场样品进行检测。此外，抑霉唑很容易代谢成 1-（2,4-二氯苯）-2-（1H-咪唑-1-）1-乙醇，有时可以在橙子中检测到 [4]。在美国，要求控制抑霉唑及其代谢物的总和，因此，测定母化合物的方法还应当包括对其代谢产物的测定 [5]。

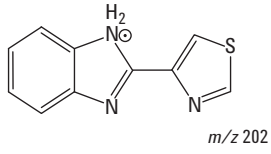
有一些文献报道了抑霉唑和噻菌灵的 LC/MS 分析方法，但涉及抑霉唑代谢产物的较少，用 LC/MS 精确质量分析的方法未见报道 [6]。本应用报告介绍了用电喷雾液相色谱/飞行时间质谱和液相色谱/离子阱质谱 (LC/TOFMS 和 LC/ITMS) 快速、同时测定水果中这两种重要的采后杀菌剂的方法。还可参考较早的一篇关于分析水果和蔬菜中多菌灵和噻菌灵的应用报告 [7]。



处理　　未处理



抑霉唑　　抑霉唑代谢物



噻菌灵

图 1. 抑霉唑、噻菌灵和抑霉唑代谢产物的结构，这些都是柑橘类（橙子和柠檬）所用的采后杀菌剂，所列为 $[M+H]^+$ 离子。上图比较了处理与未处理的橙子

实验方法

水果提取：QuEChERS

QuEChERS（快速、简便、经济、有效、耐用而安全）是从被广泛采用的食品中快速提取杀虫剂的方法 [8]。

1. 称取 15 g 匀浆样品，置 40-mL 聚四氟乙烯离心管中。
2. 加入 15 mL 乙腈（含 1% 醋酸）。
3. 加 6 g 无水 $MgSO_4$。
4. 加入 2.5 g $NaAc{\cdot}3H_2O$（醋酸钠，三个结晶水）。
5. 用涡旋混合器最高速或手动强烈振摇样品 1 分钟。
6. 于 3700 rpm.离心 3 分钟。
7. 取 5 mL 上清液加入 15-mL 试管中。
8. 加入 250 mg PSA 吸附剂和 750 mg 硫酸镁。
9. 涡旋混合振摇 20 秒。
10. 于 3700 rpm 再次离心 3 分钟。
11. 将 1.0 mL 上清液转移到 LC/MS 样品管中。
12. 将 1.0 mL 上清液蒸干，复溶于 8%/92% 甲醇/水中进行液相色谱/飞行时间质谱分析和液相色谱/离子阱质谱分析。

进样 50 µL 进行水果和蔬菜提取物的 LC/TOFMS 分析。未富集样品在同一点同时直接进行 LC/TOFMS 或 LC/ITMS 分析。

果汁提取

用固相萃取 (SPE) 从果汁和果汁型汽水中提取采后杀菌剂。选择 Accubond C-18 SPE 柱芯作为填料（部件号 188-1356）。

1. 5 mL SPE 填料的处理，用 5 mL 甲醇润湿填料，然后用 5 mL 去离子水将甲醇置换出来，以确保杀菌剂的回收率。
2. 将果汁置于室温下平衡，进行 SPE 前先脱气，特别是当气泡存在时。
3. 取 5 mL 果汁离心并过滤（0.2 微米 TYPE 滤膜，去除剩余固体物质），用 5 mL 去离子水稀释。
4. 果汁过固相萃取柱，用 2 mL 去离子水冲洗。
5. 用 5 mL 甲醇洗脱。
6. 用氮气将甲醇吹至 200 µL。
7. LC/TOFMS 或 LC/ITMS 进样前用去离子水 1:3 稀释。

LC/TOFMS 方法

LC 泵	安捷伦 1100 二元泵，进样量 50 µL （用 Agilent 1100 标准自动液体进样器进样）
色谱柱	ZORBAX® Eclipse XDB-C8，4.6 mm x 150 mm，5 µm，产品号 993967-906
流动相	A = 乙腈，B = 0.1% 甲酸水溶液
梯度	10% A 5 分钟等强度洗脱，然后经 30 分钟线性梯度洗脱至 100% A ，流速 0.6 mL/min
仪器	安捷伦 LC/MSD TOF 飞行时间质谱仪，带双电喷雾离子源，正离子 ESI，毛细管 4000 V
雾化器	40 psig
干燥气体	9 L/min 300 °C
电压	裂解器 190 V，锥孔 60 V, Oct DC1 37.5 V，OCT RF V 250 V
参考质量	*m/z* 121.0509 和 922.0098
分辨率	9500±500 @ *m/z* 922.0098
质量范围	50–1000 *m/z*
流速	在分析过程中参考 A 喷雾器 2 为恒定流速

LC/ITMS 方法

色谱	与 LC/MSD TOF 方法一致，进行色谱峰的比较
LC 泵	Agilent 1100，进样量 50 µL
色谱柱	ZORBAX Eclipse XDB-C8，4.6 mm x 150 mm，5 µm，产品号 993967-906
流动相	A = 乙腈， B = 0.1% 甲酸水溶液
梯度	10% A 5 分钟等强度洗脱，然后经 30 分钟线性梯度洗脱至 100% A ，流速 0.6 mL/min
仪器	Agilent LC/MSD 离子阱，正离子 ESI，毛细管 3200 V，雾化器 40 psig， 干燥气体 9 L/min，气体温度 300 °C，毛细管出口 70 V，锥孔 60 V
检测	离子阱捕获，最长捕获时间 200 ms，50,000 次

结果和讨论

橙子中的抑霉唑

图 1 中有两个橙子，一个用采后杀菌剂（抑霉唑和噻菌灵）进行了处理，另一个没有处理。请注意，没有用采后杀菌剂处理的橙子上长了很多霉菌。用采后杀菌剂处理的目的就是要防止水果在运输和销售过程中出现霉变。这种处理是直接撒在果皮上，而不是对整个水果进行处理，因此对消费者危害较小。

图 2 显示了对橘皮提取物的色谱分离，有两个大峰，很可能是采后杀菌剂，抑霉唑和噻菌灵。用下列技术对其进行了鉴定。得到了每个峰的精确质谱图，测定了 A+2 同位素峰（图 2 和图 3）。例如，根据质谱图怀疑 17.9 分钟的峰含氯（图 3）。实际上，从 $^{37}Cl/^{35}Cl$ 信号的相对强度以及两个质量之间的精确质量差，就可以很容易地计算出化合物中的氯原子数。如图3所示，*m/z* 297 峰是 297.0556，^{37}Cl 同位素信号为 299.0527，相对强度为主峰的三分之二。两个信号间的质量差为 1.9971 与 ^{35}Cl (34.9689) 和 ^{37}Cl (36.9659) (1.9970) 之间的质量差非常接近。结合峰面积的证据表明，未知化合物中肯定含氯原子。

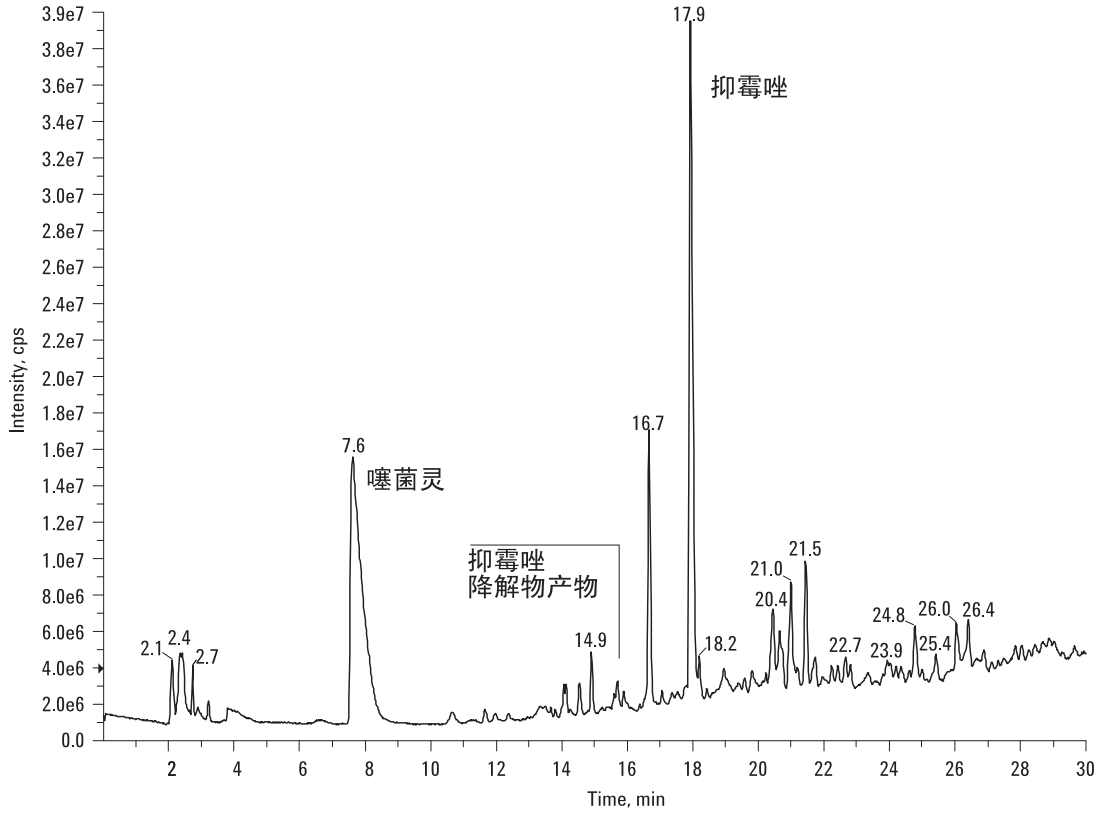


图 2. 橘皮的 LC/MSD TOF 总离子流图 (TIC)，注意，色谱图中的两个大峰是抑霉唑和噻菌灵

此外，同位素信号的相对丰度说明，氯有两个同位素原子（^{35}Cl: ^{37}Cl 的天然分布差不多是 3:1（75.77% ^{35}Cl；24.23 % ^{37}Cl），两个氯原子的特征图谱见图 3。由此可见，对怀疑样品元素组成的认定非常容易。用 TOF 软件的计算器，作为一个严格的标准，我们设定氯原子数为 2。采用精确误差阈值 3 ppm（LC/MSD TOF 的最大误差），只搜索到了一个结构式（$C_{14}H_{15}N_2OCl_2$, 0.3 ppm 偏差）。这个结构式是在“Merck 索引”数据库中找到的。Merck 索引的使用在另一篇应用报告中介绍 [9]。可以认为在测定的离子中还有一个氢原子，因为在结构式输入数据库时，正离子电离模式必须从计算器提供的元素组成中扣除。Merck 索引给出了抑霉唑唯一的结构式。

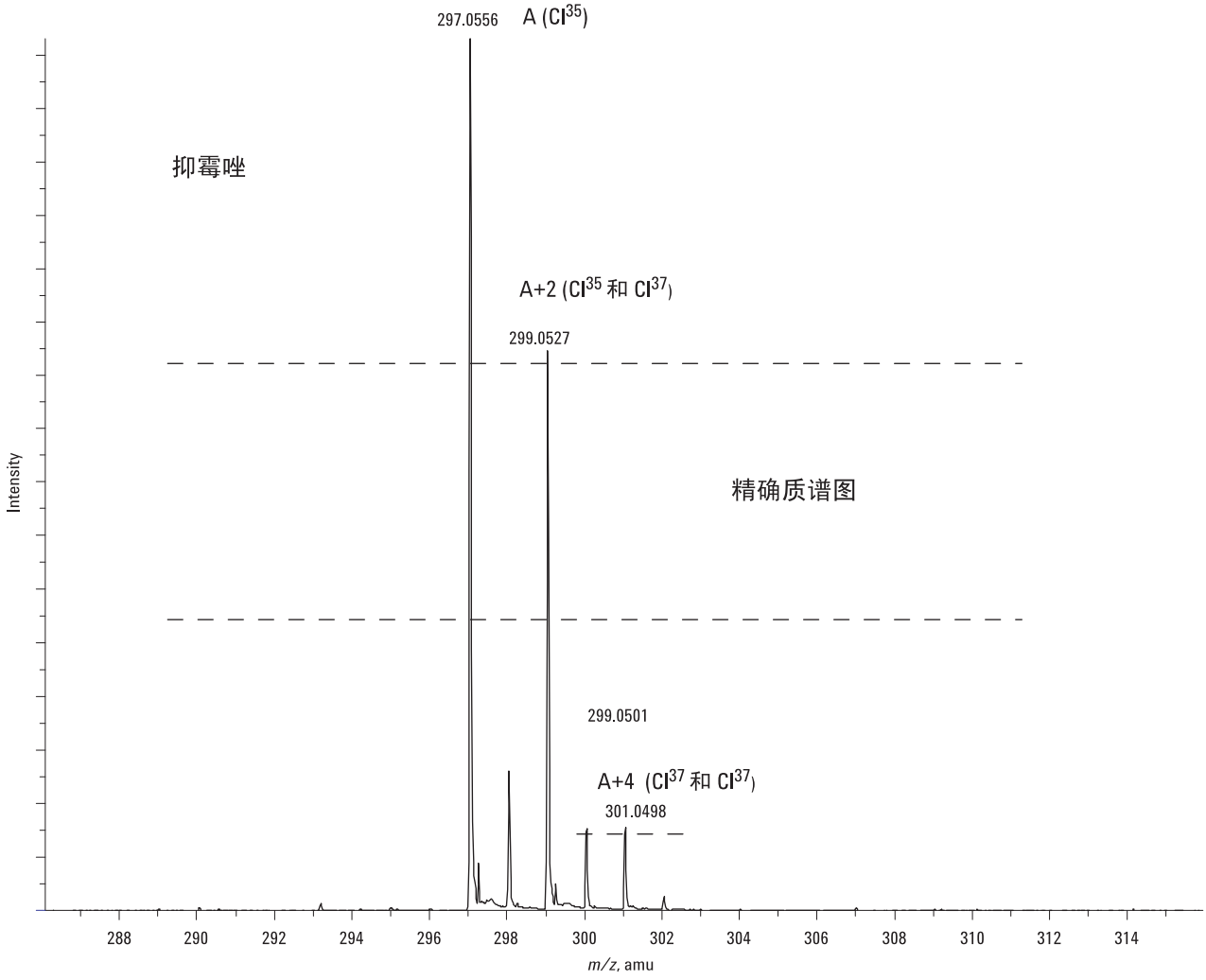


图 3. 橘皮中抑霉唑的检测，测定的精确质量数为 *m/z* = 297.0556，理论质量数为 297.0556，精确度 0.3 ppm，结构式为 $C_{14}H_{15}N_2OCl_2$

同样，7.6 分钟的质谱图见图 2，和图 4，*m/z* 202.0434。同位素信号的相对丰度说明，可能有一个原子的硫。A+2 峰的相对强度是 4.2%，^{32}S (31.9721) 和 ^{34}S (33.9679). 之间差 1.996 道尔顿。图 4 中显示的质谱图质量差为 1.997，峰高为 4.7%，与预测值相当接近。因此，这些数据表明有 1 个硫原子。输入质量数 *m/z* 202.0434，得到唯一的结构式 $C_{10}H_8N_3S$，这是噻菌灵质子化的结构式（根据 Merck 索引）。下一步是用 LC/MS 离子阱检测分子裂解的碎片，以进一步确证结构。

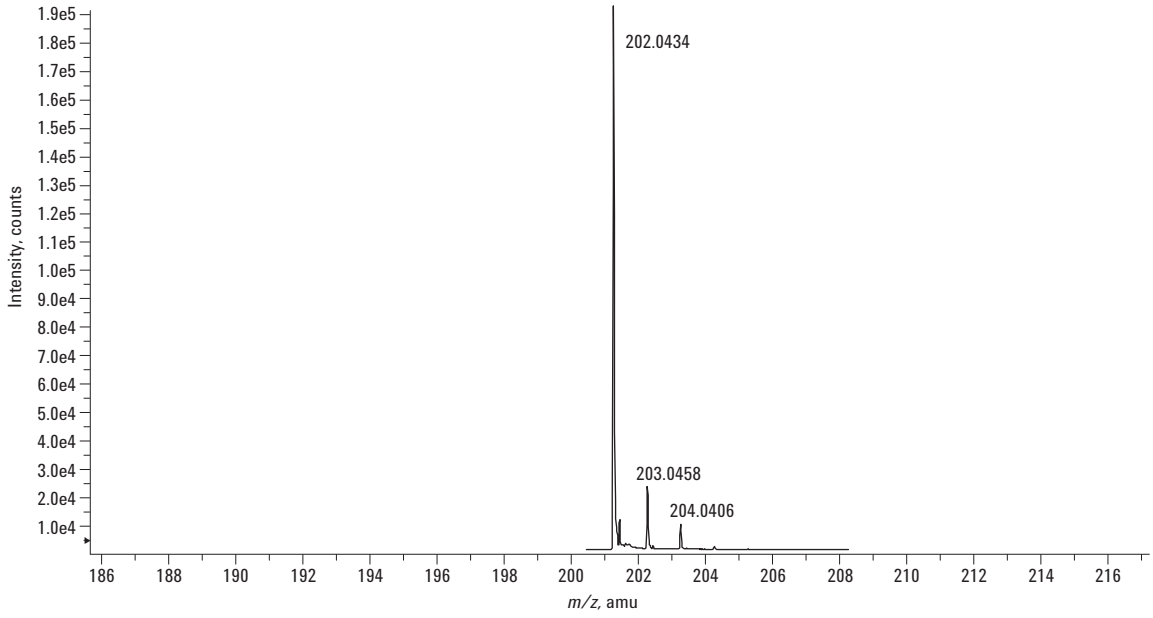


图 4. 噻菌灵的 LC/MSD TOF 质谱图

抑霉唑的裂解

下一步的研究工作是对杀虫剂的特殊碎片离子进行鉴定，以确认抑霉唑的鉴定。用 LC/ITMS 三级 MS 对 17.9 分钟大峰的裂解途径进行了测定。通过裂解途径验证 LC/TOFMS 检测得出的抑霉唑结构是否合理。图 5 显示了未知峰裂解离子的结构。*m/z* 255 离子为丢失 42 的结果。*m/z* 255 的 MS/MS 得到 *m/z* 187 和 159 离子，建议的结构见图 5。*m/z* 159 可能为双氯离子。所有结构都符合抑霉唑的推论。

接下来要用 LC/TOFMS 测定精确质谱图。在这里，质子化分子有两个相对丰度分别为 5% 和 10% 的碎片离子。碎片 1 的精确质量为 255.0084（表 1），和 *m/z* 257.0055 的 ^{37}Cl 信号（未显示数据）。从这两个信号的相对强度和质量差来看，抑霉唑的两个氯在这个碎片中。

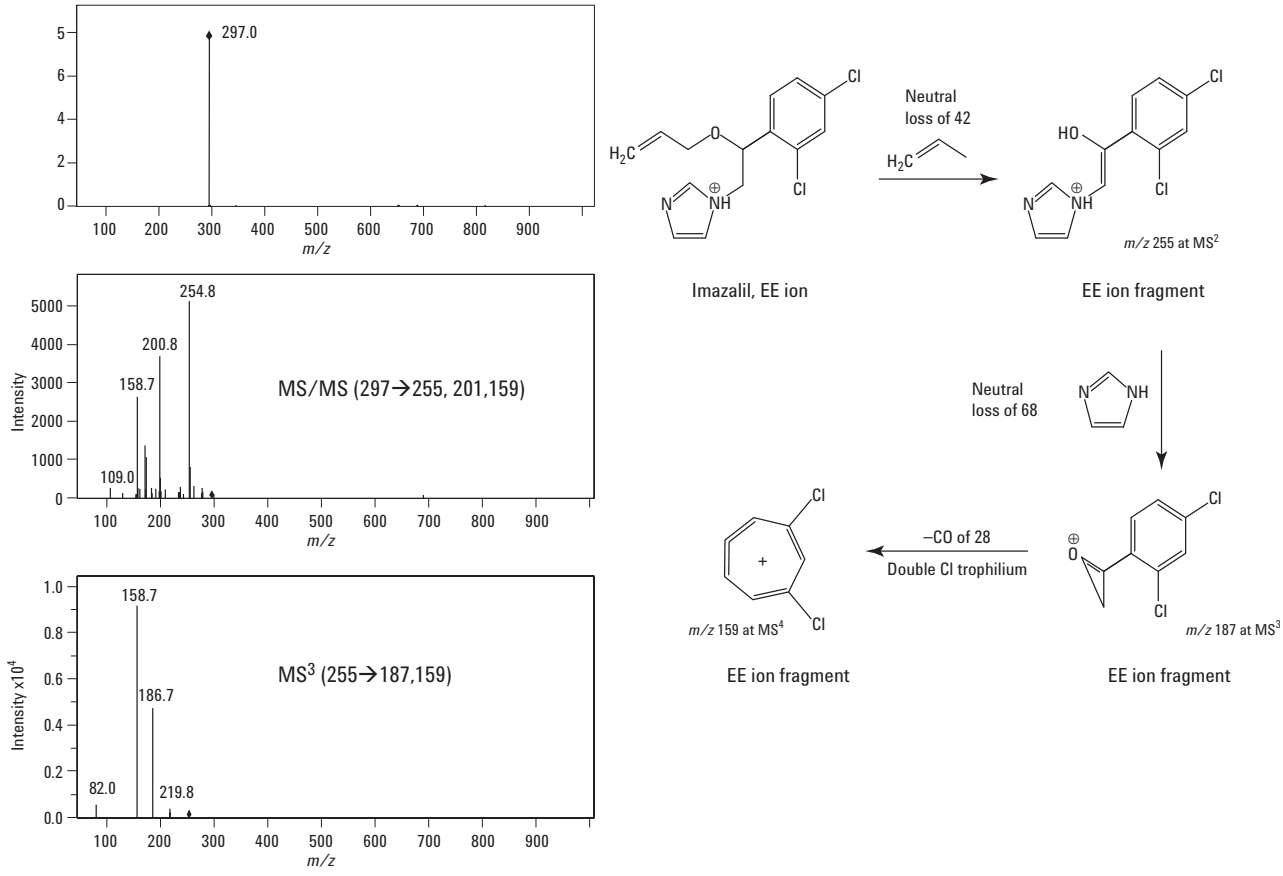


图 5. 二级质谱和三级质谱显示了抑霉唑的裂解途径

从表 1 中可见，这些碎片的精确质量数在计算工具中也给出了三种可能的元素组成。第一种结构式（$C_{11}H_9N_2OCl_2$）（–0.8 ppm 偏差）符合建议的结构，包括丢失与母离子相关的 C_3H_6（精确质量数丢失为 42.0469 对 42.0465 u）。此外，精确质谱图（相对强度和质量差）证明在碎片 2 中有两个氯原子。测出的质量数（*m/z* 158.9762）给出了一个唯一的元素组成（$C_7H_5Cl_2$），与双氯化卓_碎片离子的结构式相当。在此，我们把从 LC/MSD 得到的裂解信息，抑霉唑的建议结构如图 5 所示，和精确质量信息结合起来，对抑霉唑就有了一个完整的匹配鉴定。

来自两方面的证据（LC/TOFMS 和 LC/ITMS）提供了碎片离子和信息，不需要使用对照品，就将根据母离子结构的裂解确证抑霉唑的鉴定。同样，用离子阱检测噻菌灵，得到 *m/z* 175 碎片离子，符合噻菌灵的结构。这里没有列出数据，但对噻菌灵的鉴定可参见以前的应用报告 [9]。然后，我们在用对照品进行最后的确证。

表 1. 抑霉唑的 LC/MSD TOF 碎片离子

m/z 实验	元素组成	*m/z* 计算	偏差 ppm	备注
297.0556	**$C_{14}H_{15}N_2OCl_2$**	297.0556	<0.1	**抑霉唑**
	$C_3H_{15}N_8O_4Cl_2$	297.0588	–8.3	–
	$C_{11}H_{19}N_2OSCl_2$	297.0590	–9.0	–
255.0084	**$C_{11}H_9N_2OCl_2$**	255.0086	–0.8	**碎片 1**
	$C_9H_7N_5Cl_2$	255.0073	4.3	–
	$C_8H_{11}NO_4Cl_2$	255.0060	9.4	–
158.9762	**$C_7H_5Cl_2$**	158.9763	–0.6	**碎片 2**

抑霉唑的代谢物

在橙子提取物中，我们发现有一个峰（保留时间 14.9 分钟，见图 2），与抑霉唑（两个氯原子）的同位素丰度相同。认为它有同样的氯原子数，在抑霉唑之前出峰，我们认为它可能与抑霉唑相关，也许是其代谢产物。该离子的精确质量数是 257.0245，^{37}Cl 信号 259.0216（见图 6）。在计算工具中给出了唯一的元素组成： $C_{11}H_{10}N_2OCl_2$（0.8 ppm 偏差，见表 2）。为了进行确证，我们检索了其他的碎片，但没有找到 TOF 和 LC/TOFMS 的特征碎片离子。然后检索两个数据库（Merck 索引和 ChemIndex）寻找元素组成，没有结果。我们再在 Sigma-Aldrich 商业电子目录中检索元素组成，发现了唯一的匹配：1-（2，4-二氯-苯基）-2-咪唑基-乙醇。这个化合物的结构见图 1，符合抑霉唑的降解（见图 6 *m/z* 255 离子）。提示，这个降解产物是“中性”物质，相对于抑霉唑在同一位点断裂，产生 *m/z* 255 碎片。

对抑霉唑降解产物所得数据和报告的文献检索与我们的结果一致（抑霉唑代谢物，R14832）[4]。实际上，在美国，控制的是抑霉唑和抑霉唑代谢物的总和，所以也需要对抑霉唑代谢物残留进行检测 [4]。最后，我们用标准对照降解产物进行了确证。

表 2. 橘皮甲醇提取物中抑霉唑、抑霉唑降解产物和噻菌灵的精确质量数和元素组成

化合物	结构式	选择离子	实验 *m/z*	计算 *m/z*	偏差 mDa	偏差 ppm
抑霉唑	$C_{14}H_{14}Cl_2N_2O$	$[M+H]^+$	297.0556	297.0556	+0.1	0.3
抑霉唑降解产物	$C_{11}H_{10}Cl_2N_2O$	$[M+H]^+$	257.0245	257.0243	+0.2	0.8
噻菌灵	$C_{10}H_7N_3S$	$[M+H]^+$	202.0434	202.0434	+0.2	<0.1

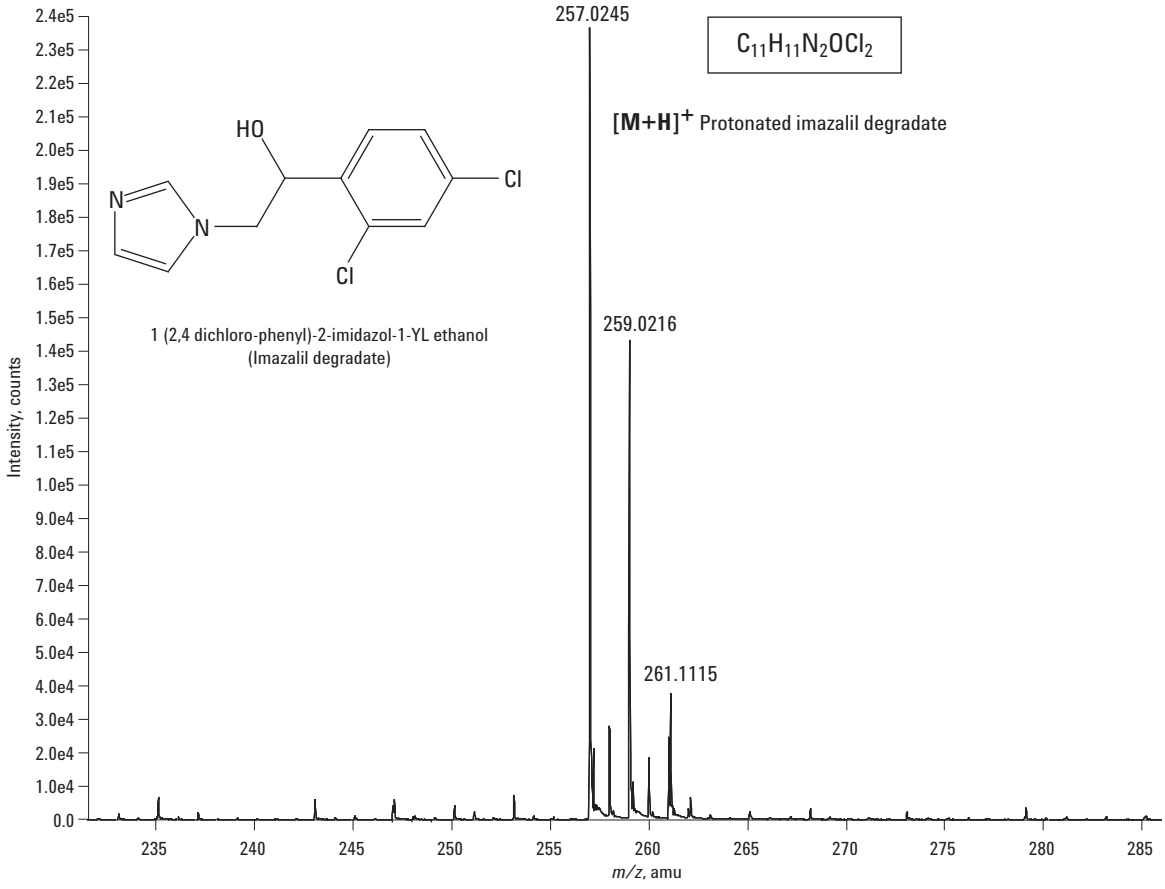


图 6. 抑霉唑降解产物的 LC/MSD TOF 图谱

橙汁中抑霉唑的鉴定

图 7 和图 8 显示了橙汁中 LC/TOFMS 色谱图（见 18.0 分钟的色谱峰）和抑霉唑的鉴定（*m/z* 297.0556）。分析了几个样品，只有这个样品中含抑霉唑。这可能是因为橙汁的制作中通常不会压榨果皮。但是，有些“榨汁机”压榨的是整个橙子，不去皮。在这个例子中，也存在橙汁中包含杀菌剂的可能性。请注意，不管橙汁提取物的基质和色谱图多么复杂，LC/TOFMS 分析都能得到良好的结果。

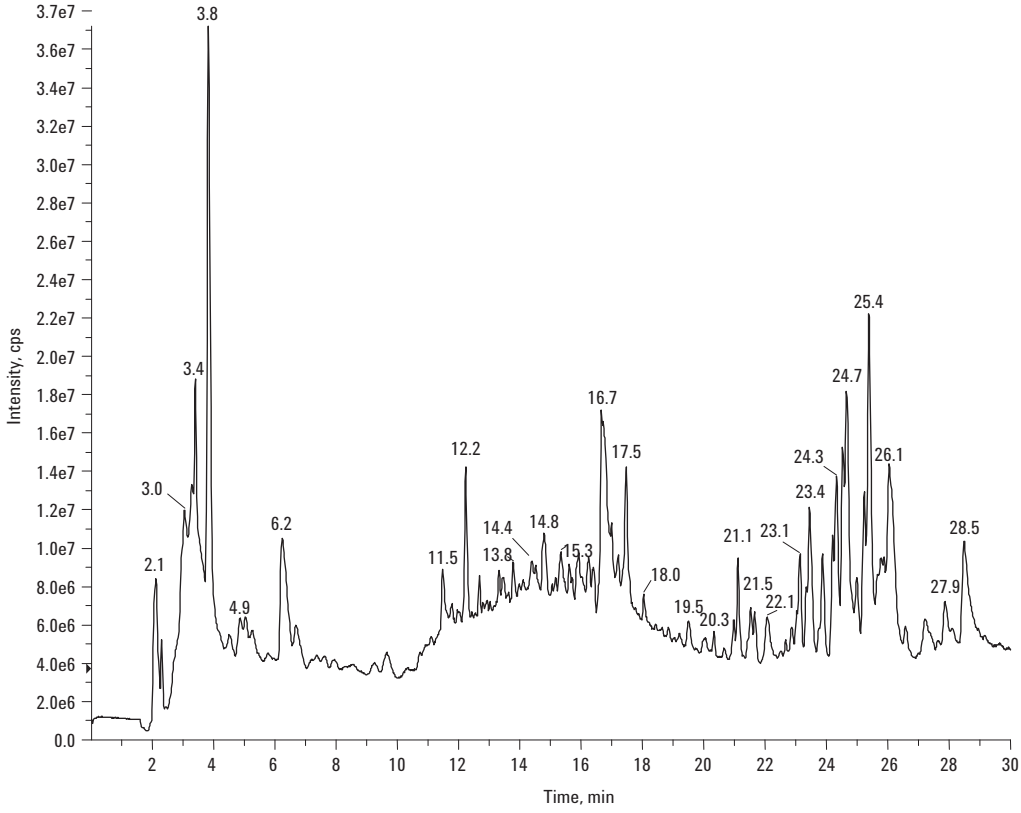


图 7. 橙汁提取物的 LC/MSD TOF 总离子流图

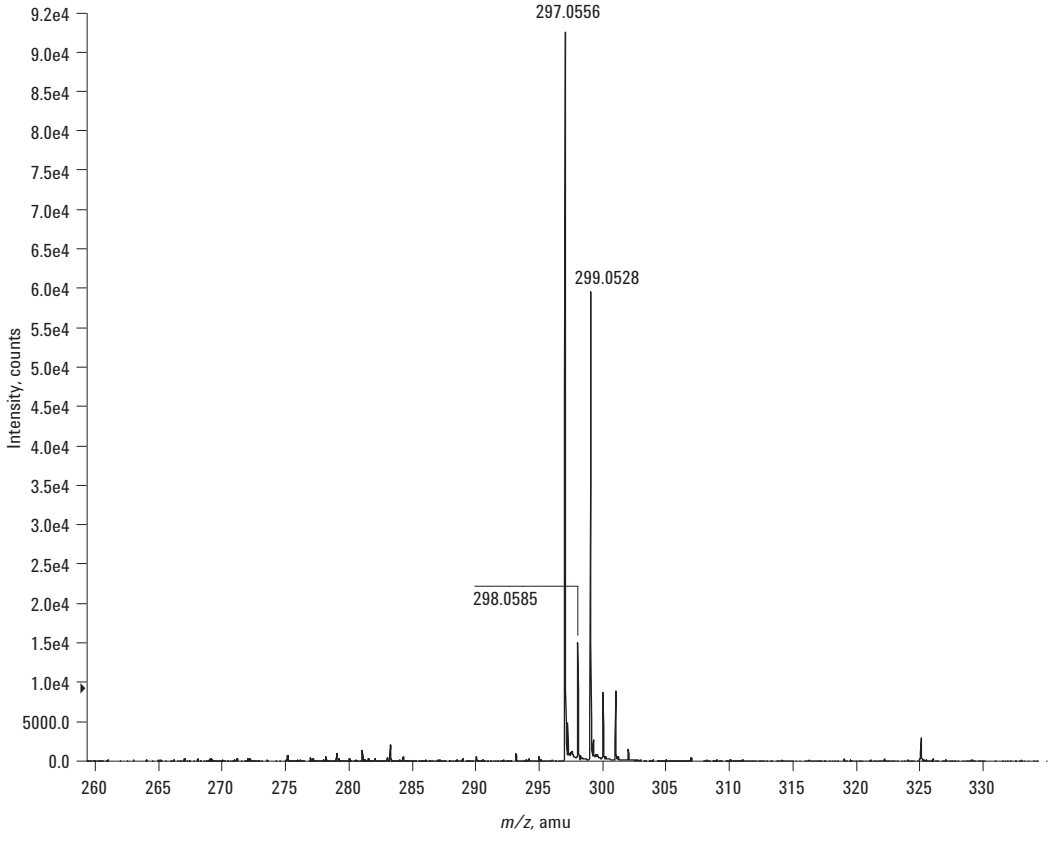


图 8. 由果皮制成的橙汁的 LC/MSD TOF 质谱图

结论

- LC/TOFMS 分析是水果和果汁中杀菌剂及其代谢物的有力分析工具，是环境食品化学的新工具
- 标准和碎片离子的元素组成和结构碎片可以用离子阱 MS/MS 确证
- 在抑霉唑这个例子中，使用 LC/TOFMS 和 LC/ITMS，可以不用标样而进行代谢物的鉴定。浓度与对水果和果汁中杀菌剂控制的 EU 指令性标准相当或更低

参考文献

1. EU Food Directives 2002, 91/414/EEC.
2. Food Quality Protection Act, 1998 (FQPA).
3. M. Fernandez, R. Rodriguez, Y. Pico, J. Manes, (2001) *J. Chromatogr. A* **912**, 301–310.
4. N. Yoshioka, Y. Akiyama, K. Teranishi, (2004) *J. Chromatogr. A,* **1022**, 145–150.
5. http://www.epa.gov./pesticides/registration/imazalil/ImazProductChem.pdf.
6. E. M. Thurman, Imma Ferrer, Jerry A. Zweigenbaum, Juan F. García-Reyes, Michael Woodman, and Amadeo R. Fernández-Alba, (2005) Discovering Metabolites of Post-Harvest Fungicides in Citrus with LC/MS TOF and Ion Trap MS/MS, *J. Chromatogr.*, in press.
7. Determination of Fungicides in Fruits and Vegetables by LC/MS/ESI/TOF and LC/MS Ion Trap, Agilent Technologies, publication 5989-2209EN www.agilent.com/chem
8. M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, and F.J. Schenck, (2003) *J. AOAC Internat.*, **86**, 412–431.
9. Identification of Unknown Pesticides in Food Using Both LC/MSD TOF and Ion Trap MS^n, Agilent Technologies, publication 5989-1924EN www.agilent.com/chem

液相色谱／离子阱质谱和飞行时间质谱分析橄榄油中的特丁津除草剂

应用

食品安全分析

作者

Imma Ferrer and E. Michael Thurman
University of Almería,
04120 Almería, Spain

摘要

本应用摘要介绍了液相色谱／离子阱质谱和飞行时间质谱对橄榄油中的特丁津进行定性定量分析。方法详细介绍了样品处理，包括液－液萃取和用氨基硅胶的基质分散固相萃取法。最后的样品净化采用 Florisil 硅土小柱，用乙腈洗脱溶质。液相色谱／离子阱质谱的 MS/MS 模式采集特征离子 *m/z* 174。而利用液相／飞行时间质谱进行质子化分子离子 ($[M+H]^+$ *m/z* 230) 精确质量数分析，同时得到碎片的精确质量数和特丁津中存在的特征同位素分布。对于飞行时间质谱测得的质量精度小于 2 ppm。此方法具有高灵敏度，线性好及精度高、准确性好、基质作用小的优点。此方法还研究了方法检出限。所以，液相／离子阱质谱和飞行时间质谱可以作为橄榄油中特丁律的常规方法。

引言

橄榄油是地中海国家最普遍的食品。由于橄榄油对人的健康有益，所以越来越来得到大世界的重视。新鲜橄榄油是直接从橄榄树的果实压榨，中间除了机械和物理加工之外，没有任何的处理以保证橄榄油的质量。在地中海国家（希腊，西班牙和意大利）使用的农药主要是除草剂和杀虫剂。尽管除草剂主要是施于土壤中，一些残留农药存留在植物中，导致橄榄被污染。结果一些农药残留会存在于橄榄油中。欧盟和食品法典以及联合国世界粮农组织都规定了橄榄和橄榄油中农药残留的最大限量。现在，橄榄和橄榄油中各种农药残留的法规正在被更新而且比以前更加严格 [1]。这些法规迫使分析实验室使用灵敏度和选择性更高的技术以满足食品如食用油的法规要求。食用油的基质非常复杂，含有大量的脂肪，在分析之前需要样品的提取过程。

多残留分析的样品净化方法根据样品而不同，而且也有几种分析方法检测橄榄油中的农药残留。其中常见的方法是气相色谱法，样品前处理一般先用液液萃取或凝胶过滤将小分子和大分子的脂肪化合物，如甘油三酸脂 [2,3] 分离。气相方法分析油类样品中的农药残留必须去除大分子量的脂肪化合物，以保证气相色谱的正常运行。最近报道了使用基质扩散固相萃取净化，然后用气质联用和离子阱质谱技术检测食品中的三嗪和有机磷农药的分析方法 [4]。在本文中，介绍了液相/离子阱质谱和液相/飞行时间质谱技术检测橄榄有一种常见的农药残留，特丁津。

实验方法

橄榄油提取

基质固相分散方法用于橄榄油中的特丁津提取。在进行基质固相分散之前，先用液液预提取。

1. 液－液提取：
   - 在 100 毫升的分液漏斗中，取橄榄油 5 克（约 5.5 mL）与 15 mL 石油醚混合，用乙腈饱和。采用两部液－液萃取过程。
   - 25 毫升乙腈－饱和石油醚加入到橄榄油中。将分液漏斗剧烈震荡 3 分钟，乙腈与石油醚分层。
   - 另外 10 毫升乙腈饱和石油醚加入到石油醚的提取物液中。将分液漏斗剧烈震荡 3 分钟。乙腈与石油醚分层，将乙腈与前一次的乙腈混合。
   - 最后，7 毫升乙腈提取液转移至 10 毫升的试管中，浓缩至 2 毫升。剩下的 2 毫升转移至玻璃研钵中进行基质固相分散净化。
2. 基质固相分散净化（MSPD）：
   - 将 2 克的氨基吸附剂（Bondesil-NH2，40 微米粒径，Varian）与上面的 2 毫升乙腈萃取液混匀，直到出现细小的颗粒。进行固相萃取。
   - 混合物转移至装有 2 克 Florisil 硅土的小柱上（12 ml Bond-Elute 小柱）。小柱连接在真空上，调节流速在 3 ml/min 左右。
   - 用 5 ml 的乙腈洗脱两次。最后的洗脱液吹干。再用 1:1 的乙腈：水定容。
   - 在进样之前，用 0.45 微米的 PTFE 膜过滤 (Millex FG，Millipore)，最然后进样进行液质分析。

使用基质固相分散净化（MSPD）法，橄榄油样品中特丁津的回收率大于 96%，方法相对标准偏差（RSD）（n=5）小于 6%。

Agilent 1100 液相色谱/飞行时间质谱分析条件

液相色谱条件

液相泵采用 1100 二元泵

进样体积：	50 微升，采用 1100 标准自动进样器
色谱柱：	ZORBAX Eclipse XDB-C8，4.6 mm x 150 mm，5 µm，部件号 993967-906
流动相：	A = 乙腈； B = 0.1% 甲酸水溶液
梯度：	10% A 保持 5 分钟，在 25 分钟内，线性梯度变为 100% A，流速 0.6 ml/min

质谱条件（MS）

LC/MSD TOF

离子源：	ESI 正离子模式
毛细管电压：	4000 V
雾化器压力：	40 psig
干燥气：	9 L/min
干燥气温度：	300 °C
碰撞电压：	190 V
锥孔电压：	60 V
Oct DC1：	37.5 V
Oct RF V：	250 V
参比离子：	*m/z* 121.0509 与 922.0098
分辨率：	9500 ± 500 @ *m/z* 922.0098
扫描范围：	50–1000 *m/z*
参比喷雾器 A：	恒流模式

Agilent 1100 Series LC/MSD Trap 方法

LC/MSD Trap

条件与 LC/MSD TOF 的条件一致.

液相泵：	HP 1100
进样体积：	50 微升
色谱柱：	ZORBAX Eclipse XDB-C-8，4.6 mm x 150 mm，5 µm，部件号 993967-906
流动相：	A = 乙腈 (ACN) B = 0.1% 甲酸水溶液
梯度：	10% A 保持 5 分钟，在 25 分钟内，线性梯度变为 100% A，流速 0.6 ml/min

LC/MSD Trap

ESI（正模式）：	Capillary 3200 V
雾化气：	40 psig
干燥气：	9 L/min，温度为 300 °C
毛细管出口：	70 V
锥孔：	60 V
离子阱积聚：	50000，最大积聚时间 200 ms

结果与讨论

液相/离子阱质谱和液相色谱/飞行时间质谱分析特丁津

由于存在大量的基质，橄榄油是最难分析的样品之一，若使用全扫描模式，将会产生很强的干扰峰。因此，对于离子阱质谱，可以采用 MS/MS 模式来提高信噪比。对于特丁津，0.8 V 的碰撞电压是最佳的条件，主要的特征离子是 *m/z* 174（丢失 56 amu）。

图 1 所示是离子阱液质的 MS/MS 模式分析橄榄油样品（标样添加浓度是 0.025 mg/Kg）。特征离子（*m/z* 174）的提取离子流图及质谱图。解离过程是在特丁津的 C-N 键之间断裂，产生特征的碎片。

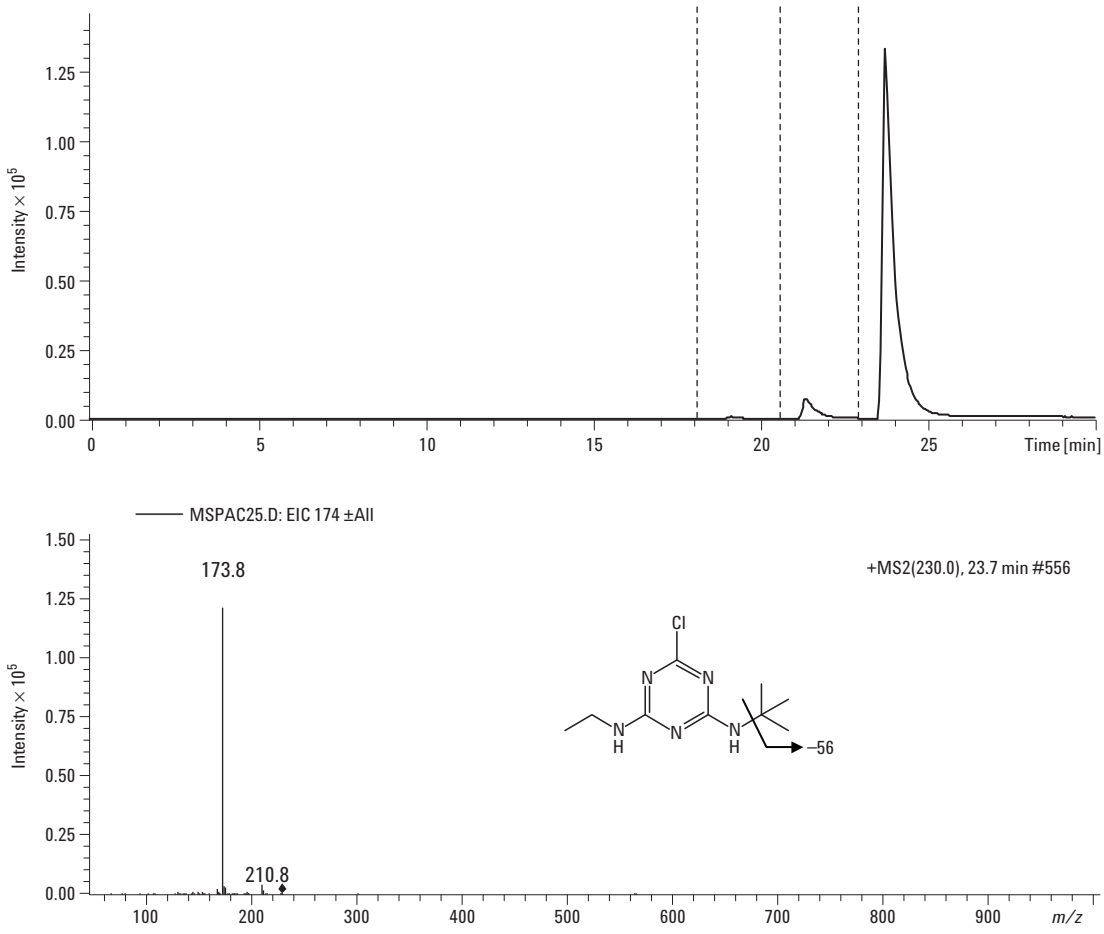


图 1. 在离子阱上，MS/MS 模式的条件下，橄榄油样品添加特丁津（0.025 mg/kg）的特征离子的提取离子流色谱图。下图是特丁津的二级质谱图

除了离子阱质谱之外，也尝试了液相色谱/飞行时间质谱技术用于橄榄油中的特丁津的分析。采用源内碰撞诱导解离（In-source CID）产生碎片。由于在飞行时间质谱获上可以获得精确质量数的分子离子峰和碎片离子，因此更容易进行结构的确认。在三个碰撞电压，160 V，190 V 和 230 V 的条件下，特丁津的准分子离子峰和特征碎片离子的相对丰度总结在表 1 中。为了保证足够的定量灵敏度（一般是用质子化的分子离子峰）和定性质谱信息，最后选择 190 V 的电压。橄榄油中添加的特丁津的分子离子峰和特征碎片的精确质量数参见表 2。

表 1. 碰撞电压对解离效率的影响

***m/z* 离子**	**相对丰度**		
	160 V	**190 V**	**230 V**
230 $[M+H]^+$	100	100	20
174 $[M+H–C_4H_8]^+$	5	30	100

表 2. 液相/飞行时间质谱上得到的橄榄油中特丁津分子离子峰及主要碎片的精确质量数。特丁津的添加水平是 0.025 mg/Kg，碰撞电压是 190 V

元素组成	离子	理论质量	测量质量	偏差	
				mDa	ppm
$C_9H_{16}N_5{}^{35}Cl$	$[M+H]^+$	230.1167	230.1168	0.1	0.4
$C_9H_{16}N_5{}^{37}Cl$		232.1137	232.1134	–0.3	–1.5
$C_5H_9N_5{}^{35}Cl$	$[M+H–C_4H_8]^+$	174.0541	174.0542	0.1	0.6
$C_5H_9N_5{}^{37}Cl$		176.0511	176.0511	–0.05	–0.3

在优化的碰撞电压条件下得到的特丁津的分子离子峰和特征碎片离子信息可以用于特丁津的确认，尤其是含氯原子的分子量的同位素分布。如图 2 所示，特丁津含有一个氯原子。保留时间，准确质量数及同位素分布可以确认其结构并且该分子中只含有一个氯原子。

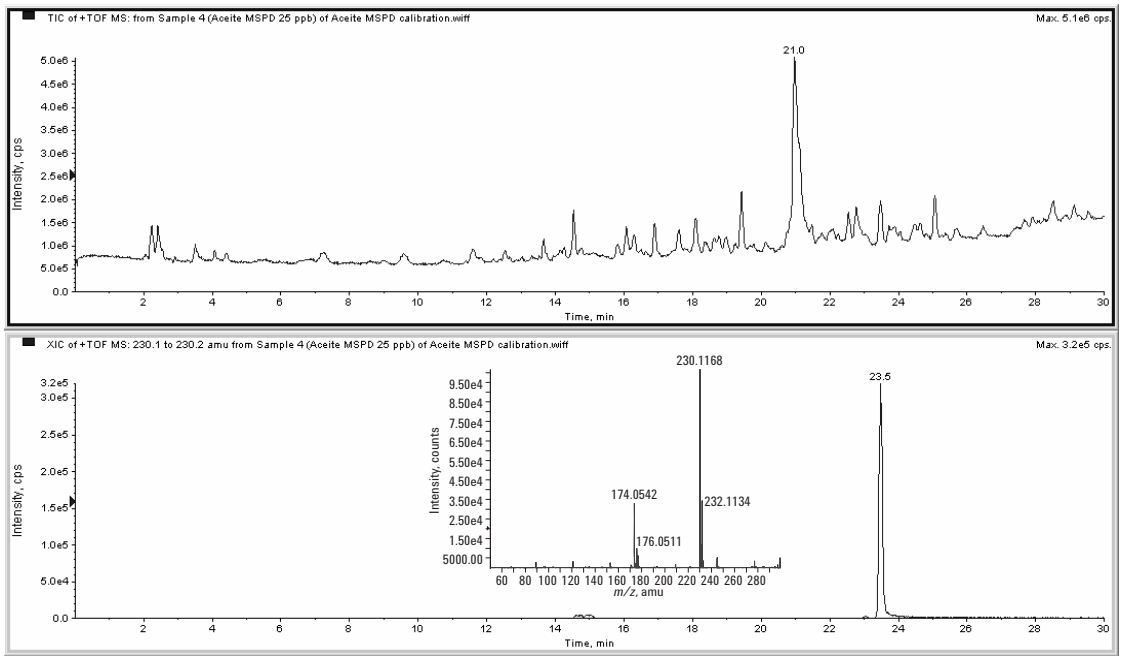


图 2. 添加 0.025 mg/kg 特丁津的橄榄油样品的液相/飞行时间质谱的总离子流图。*m/z* 230 离子的提取离子流图和其相应的质谱图

分析方法验证

为了使分析方法能用于高油脂基质样品中的特丁津的分析，对整个分析方法进行了评价。利用 MSPD 萃取法制备的橄榄油样品为基质制备校正曲线。在 0.005 至 0.5 mg/Kg 的范围内，进行有基质条件下的七点校正。利用离子阱质谱，对 *m/z* 230 离子进行 MRM 模式的定量分析。对于飞行时间质谱，以分子离子峰（质谱窗口的宽度为 0.1Da）为定量离子。图 3 为在飞行质谱上得到有基质和标准溶液条件下的校正曲线。

检测限的测试条件为，在有基质的条件下，得到信噪比是 3 时的进量量。分析结果如表 3 所示。结果表明，得到的检测限远远低于法规要求的最大残留限量。飞行时间质谱可以使用窄质量窗口用于定量分析，而且可以得到更高的信噪比，最终得到更低的检测限。上述结果显示，采用 MSPD 样品处理方法和液相/飞行时间质谱技术适用于含高脂肪基质样品中的农药残留分析。

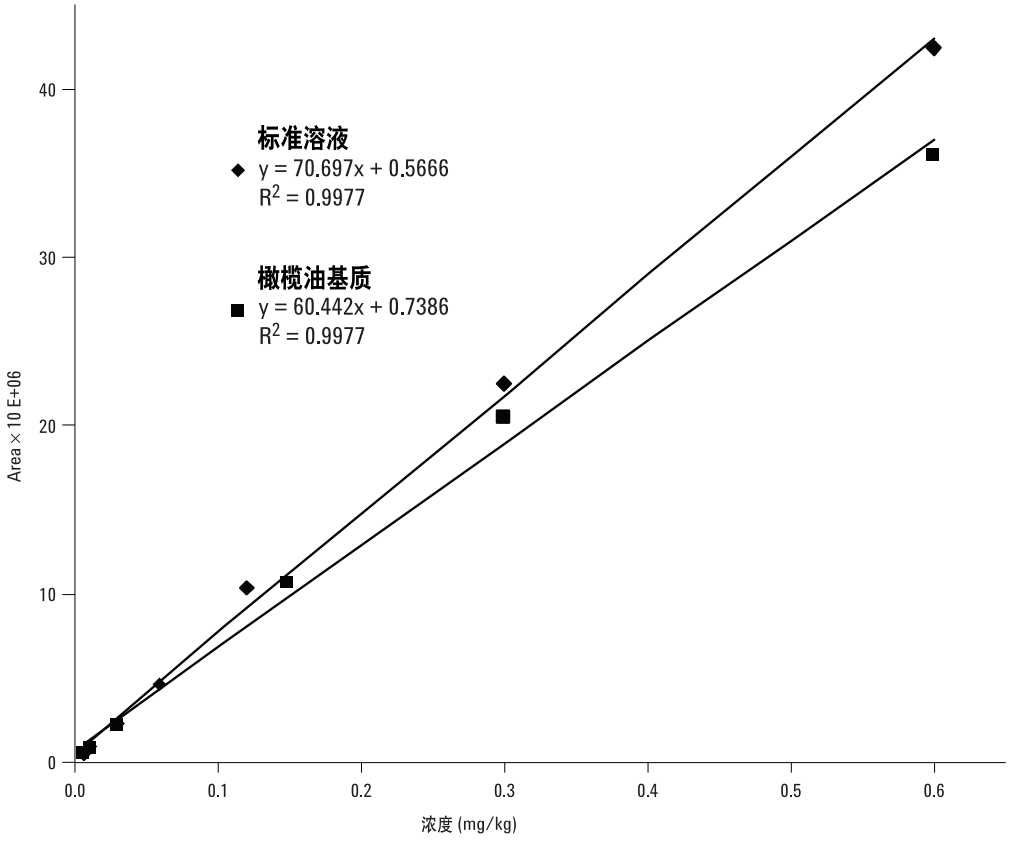


图 3. 在液相色谱/飞行时间质谱上，橄榄油基质和标准溶液的校正曲线

表 3. 离子阱液质和飞行时间质谱技术检测橄榄油中特丁津的方法条件

方法	浓度范围 (mg/kg)	线性 (R^2)	检测限 (µg/kg)	RSD (%) n = 5
LC/ITMS	0.005–0.5	0.991	0.2	5.5
LC/TOFMS	0.005–0.5	0.995	1	2

橄榄油样品的分析

为了验证方法的有效性，将上述方法应用于实际样品。如图 4 所示，在橄榄油中发现微量的特丁津，*m/z* 230 的提取离子流图。这是一个真实的样品，将液相/飞行时间质谱技术用于橄榄油中的微量农药残留化合物，选择性可以通过飞行时间质谱的分辨率来提高。图中所示为质量窗口在 0.05 Da 的条件下，信号离子 *m/z* 230 与类似分子量背景的分辨情况。可以使用氯原子的特征同位素分布对特丁津进行定性定量分析。

结论

液相色谱/离子阱质谱和液相色谱/飞行时间质谱用于橄榄油的农残的定性和定量分析。对于离子阱质谱，采用 MS/MS 模式，对特征离子 *m/z* 174 进行定量分析。对于飞行时间质谱，可以利用分子离子的准确质量数得到的实验分子式和氯原子的特征同位素分布对橄榄油中的微量特丁津进行确认。质量数精度误差一般小于 2 ppm。离子阱液质和飞行时间质谱分析方法灵敏度，线形，精密度，基质干扰和检测限适用于橄榄油中特丁津的常规检测。

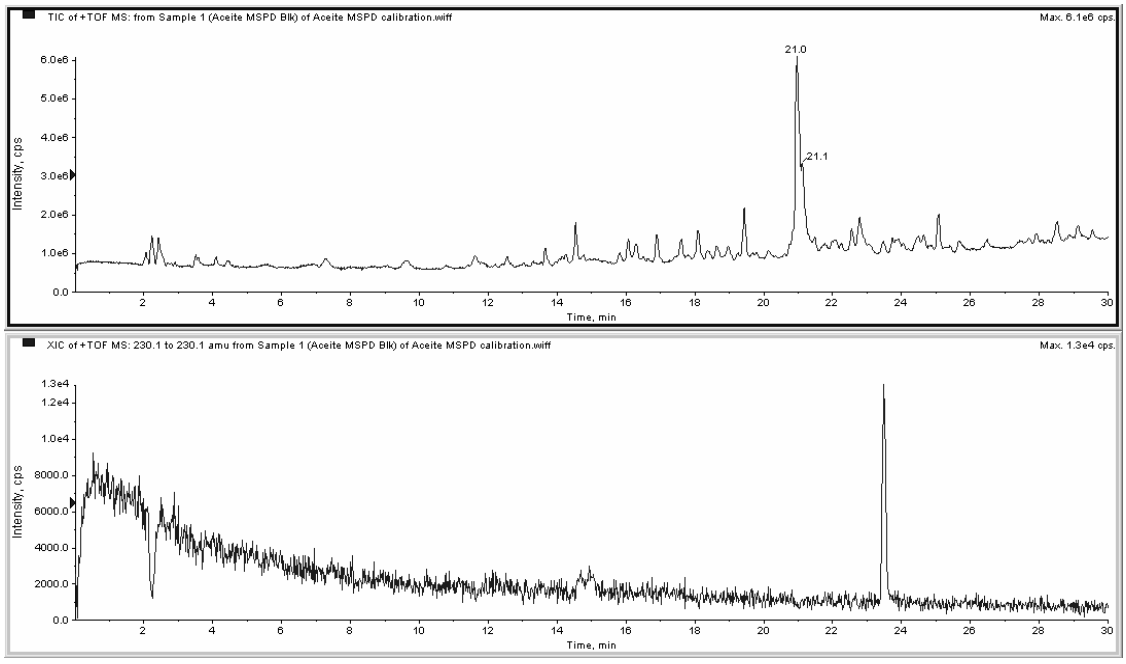


图 4. 上图，橄榄油已“阳性”样品的飞行时间质谱的结果；下图，在质谱窗口为 20 mDa 下，特丁津的提取离子流色谱图

参考文献

1. Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council on maximum residue levels of pesticides in products of plant and animal origin, COM/2003/0117/final – COD2003/0052*/; www.europa.eu.int/pol/food/indexes.htm
2. Ch. Lentza-Rizos, E. J. Avramides, and F. Cherasco, (2001) *J. Chromatogr*. A **912**: 135–142.
3. J. J. Vreuls, R. J .J. Swen, V. P. Goudriaan, M. A. T. Kerkhoff, G. A. Jongenotter, and U. A. Th. Brinkman, (1996) *J. Chromatogr*. A **750**: 275–286.
4. C. Ferrer, M. J. Gómez, J. F. García-Reyes, I. Ferrer, E. M. Thurman, and A. R. Fernández-Alba, (2005) *J. Chromatogr*. A **1069**: 183–194.

LC/MS 飞行时间质谱和 LC/MS 离子阱测定水果和蔬菜中的杀真菌剂

应用

食品安全

作者

Imma Ferrer 和 E. Michael Thurman
西班牙，Almería，Almería 大学，04120
农药残留研究小组

摘要

本应用探讨了新电喷雾仪器与液相色谱/飞行时间质谱 (LC/TOFMS) 和液相色谱/离子阱质谱 (LC/ITMS) 用于分析水果 (苹果,柠檬,瓜和桔子) 提取物和沙拉蔬菜 (西红柿,菜花和柿子椒) 中的五种主要杀真菌剂的可能性。包括不同水果和蔬菜基质中五种主要杀真菌剂（多菌灵、噻苯咪唑、氧化偶氮毒杀芬、烯酰码啉、氟菌唑）的 LC/TOFMS 及 LC/ITMS MS/MS 谱图，TOF 实验分子式，MS/MS 碎片及确认离子。给出了水果及蔬菜中杀真菌剂的样品快速前处理及萃取方法的详细说明的同时提供使用 TOF 和离子阱分析纯溶剂和水果及蔬菜提取物中杀真菌剂的检出限 (LOD)、线性及定量的谱图。最后是市售的实际样品水果及蔬菜：苹果，桔子，柠檬和瓜中杀真菌剂的分析结果。

介绍

本文描述了鉴别和定量分析水果及蔬菜中杀真菌剂的重要性 [1, 2]。欧盟指南中愈来愈多地使用 LC/MS 分析许多常见的杀真菌剂，很快成为了法规监测承认的农药残留分析方法。LC/MS 尤其适用于极性和不稳定的各种杀真菌剂的分析。因此，LC/MS 方法比传统的 GC/MS 方法更加适合使用。比如，Pico 等人对 MS 和 MS/MS 在食品中农药（包括杀真菌剂）分析的应用进行了综述 [3]，目前有大致 100 篇文章涉及食品中农药分析的内容，其中大约 25 篇左右是使用 LC/MS 的，多数文章在 2000 年初发表。因此，LC/MS 是食品分析的新兴技术。然而，很有意思的是，许多最近的文章中，没有一篇使用 LC/TOFMS 和精确质量数分析食品中杀真菌剂。

所以，开发研究 LC/TOFMS 方法，以精确质量数分析食品中的农药显得十分重要 [1, 2]。我们目前的研究报告是最先使用最新的安捷伦 LC/MSD TOF 分析食品中杀真菌剂的方法之一。选择本主题的原因在于这些杀真菌剂在苹果，桔子，柠檬，瓜，西红柿，菜花和柿子椒中的大量使用。并且，LC/ITMS 也将作为 LC/TOFMS 的比较方法用于分析水果及蔬菜中的杀真菌剂。如何同时使用 LC/ITMS 方法细节也有描述 [2]。

本研究的常见杀真菌剂的分子结构见图 1。

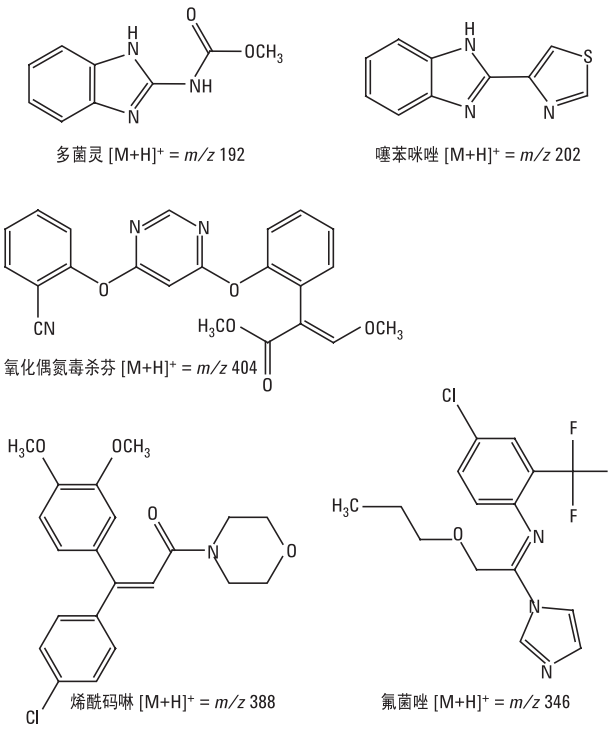


图 1. 水果和蔬菜中的主要杀真菌剂的结构以及相应的 [M+H]+ 离子

实验方法

水果和蔬菜的提取 (QuEChERS)

QuEChERS 是一种提取方法的缩写，字母分别代表快速，简便，经济，有效，持久和安全。该方法在食品中农药分析的快速提取方面得到广泛的认可。是一种提取方法的缩写，字母分别代表快速，简便，经济，有效，持久和安全。该方法在食品中农药分析的快速提取方面得到广泛的认可。

1. 称取 15 g 预先混匀的样品于 40 mL 特氟龙离心管中。加入 15 mL 乙腈（含 1% 乙酸），6 g 无水硫酸镁和 2.5 g 三水乙酸钠，用旋涡振荡器在最大速度或手动振荡样品 1 min。然后，于 3700 rpm 离心 3 min。
2. 取 5 mL 上层清液于 15-mL 试管中，加入 250 mg PSA 吸附剂及 750 mg 硫酸镁，旋涡振荡 20 s。然后，于 3700 rpm 再次离心 3 min。将 1.0 mL 离心液转入自动进样瓶。然后将水果及蔬菜的提取液残留物蒸发至干并用 8/92% 的甲醇/水溶解。

加入 0.01 至 0.5 mg/kg 浓度的五种农药制成标准物，用于安捷伦 LC/MSD TOF 和安捷伦 1100 系列 LC/MSD 离子阱分析。

未加标的样品使用 LC/MSD TOF 或 LC/MSD 离子阱进行直接测定，进样 50 µL。

图 2 概括了提取方法。

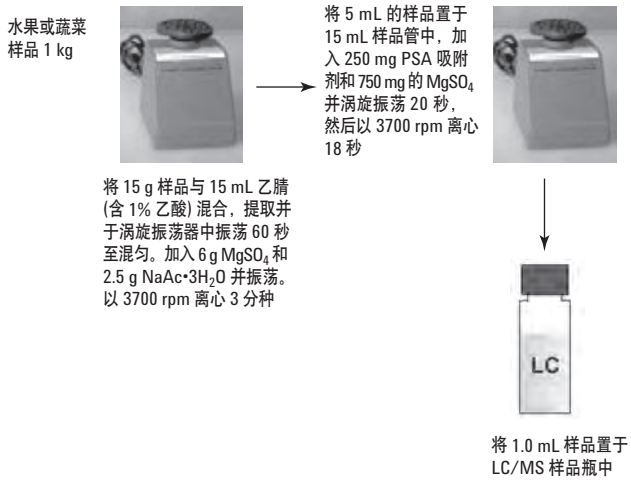


图 2. 用 QuEChERS 提取水果和蔬菜中杀真菌剂的方法

安捷伦 LC/MSD TOF 方法

- LC 泵为安捷伦 1100 二元泵，使用标准安捷伦 1100 自动进样器，进样体积 50 µL
- 色谱柱：ZORBAX® Eclipse XDB-C8, 4.6 mm × 150 mm，5 µm, 部件号 993967-906
- 流动相 A：乙睛；流动相 B：0.1% 甲酸水溶液，梯度：15% A 0-5 min，100% A，25 min，0.6 mL/min 流速
- 安捷伦电喷雾源 - LC/MSD TOF
- 正模式 ESI，毛细管电压 4000 V
- 雾化器 40 psig，干燥气 9 L/min，气体温度 300 °C
- 裂解电压 190 V，撇除器电压 60 V，八级杆直流电压 37.5 V，八级杆 RF 电压 250 V
- 参考质量：*m/z* 121.0509 和 922.0098,分辨率：在 *m/z* 922.0098 处为 9500±500，分析时在喷雾器 2 连续恒流使用参比 A

安捷伦 1100 系列 LC/MSD 离子阱方法

- 为便于直接比较色谱峰，使用与安捷伦 LC/MSD TOF 一致的色谱方法
- LC 泵为安捷伦 1100，进样体积 50 µL
- 色谱柱：ZORBAX Eclipse XDB-C8，4.6 mm × 150 mm，5 µm，部件号 993967-906
- 流动相 A：乙腈；流动相 B：0.1% 甲酸水溶液，梯度：15% A 0-5 min，100% A 25 min，0.6 mL/min 流速
- 安捷伦 1100 系列 LC/MSD 离子阱
- 正模式电喷雾离子源 (ESI) 毛细管电压 3200 V
- 雾化器 40 psig,干燥气 9 L/min，气体温度 300 °C
- 毛细管出口电压 70 V
- 离子滞留，计数 50,000 次

结果与讨论

裂解及质量精度

图 3 显示了五种杀真菌剂的 LC 分离情况。样品含加入柠檬提取物的 0.125 mg/kg (ppm) 杀真菌剂。图 3b 显示了各个化合物的提取离子色谱图。提取物窗口很干净，说明提取离子的质量精度很高，提取离子窗口宽度可窄至 (0.02 amu) 100 ppm。图 3 提取离子的窗口为 0.1 amu。

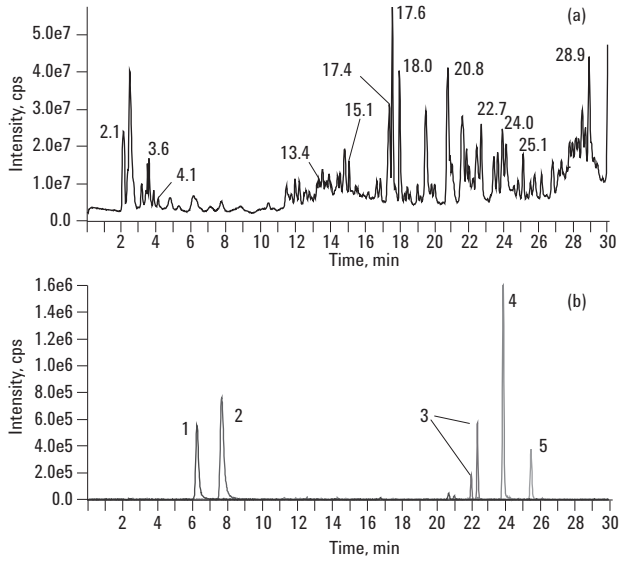


图 3. (a) 柠檬标准物溶液 (0.125 ppm) 总离子流色谱图 (b) 提取离子色谱图：多菌灵 (1)，噻苯咪唑 (2)，烯酰码啉 (3)，氧化偶氮毒杀芬 (4)，氟菌唑 (5)

当浓度低至 0.05 mg/kg 时，提取离子 (*m/z* 192，202，346，388 和 404) 的色谱图仍然很干净，表明精确质量数的重要性及其在很窄的窗口提供干净色谱图的能力。在测定每个杀真菌剂的分子离子精确质量时显示精确质量的窗口。表 1 显示了每个杀真菌剂在 0.50 mg/kg 浓度时的检测结果，包括元素组成，精确质量及误差，分别以 mDa 和 ppm 表示。除烯酰码啉外，在所有水果和蔬菜介质样品的分析中均获得了高于 2 ppm 的质量精度。

表 1. 柠檬基质中五种杀真菌剂的精确质量和元素组成，浓度为 0.50 mg/kg

化合物	分子式	选择离子	m/z 测定	m/z 计算	偏差 mDa	偏差 ppm
多菌灵	$C_9H_9N_3O_2$	$[M + H]^+$	192.0767	192.07675	-0.05	0.27
噻苯咪唑	$C_{10}H_7N_3S$	$[M + H]^+$	202.0430	202.04334	-0.34	1.7
烯酰码啉	$C_{21}H_{22}NO_4Cl$	$[M + H]^+$	388.1321	388.13101	+1.1	2.5
氧化偶氮毒杀芬	$C_{22}H_{17}N_3O_5$	$[M + H]^+$	404.1243	404.1242	0.20	0.50
氟菌唑	$C_{15}H_{15}N_3OF_3Cl$	$[M + H]^+$	346.0925	346.09285	-0.35	1.0

这些结果表明使用连续校正可以在分析测定复杂基质如水果和蔬菜时，在一个数量级范围内获得精确质量数。

根据纯标样在甲醇溶液中精确质量图谱，图 4a–4e 给出了每种杀真菌剂的裂解途径。即使使用相同的色谱条件，LC/MSD TOF 的碎片离子以 LC/MSD 离子阱的二级质谱图进行检验。图 4a 为多菌灵，其二级质谱图显示失去了一个甲醇 (32 Da) 而给出 *m/z* 160 的碎片峰。该碎片离子 *m/z* 160 在 LC/MSD TOF 谱图上也可以看到。

图 4b 为噻苯咪唑的裂解途径，其分子离子峰 *m/z* 202 中性丢失一分子的 HCN *m/z* 27 Da，产生了 *m/z* 175。

图 4c 为氧化偶氮毒杀芬的裂解途径，其分子离子峰 *m/z* 404，在二级质谱中失去一分子甲醇 (*m/z* 32 Da) 而生产 *m/z* 372，在三级质谱中产生的 *m/z* 342 的。

图 4d 为烯酰码啉的裂解途径，分子离子峰 *m/z* 388，二级质谱产生 *m/z* 301，三级质谱产生 *m/z* 165。

图 4e 为氟菌唑的裂解途径，分子离子峰 *m/z* 346，二级质谱产生 *m/z* 278。三级质谱产生 *m/z* 250。将 LC/MSD 离子阱和 LC/MSD TOF 结合使用的好处在于两种仪器均适合于这些化合物的分析，它们的谱图能给出互补的结构信息及鉴定功能。

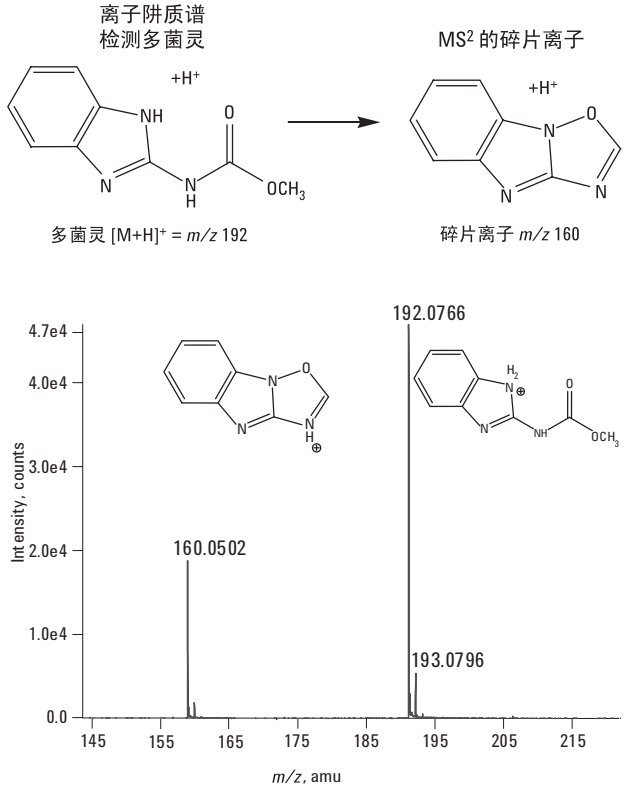


图 4a. 多菌灵的结构和 LC/MSD 离子阱和 LC/MSD TOF 裂解途径。该图是 LC/MSD TOF 图

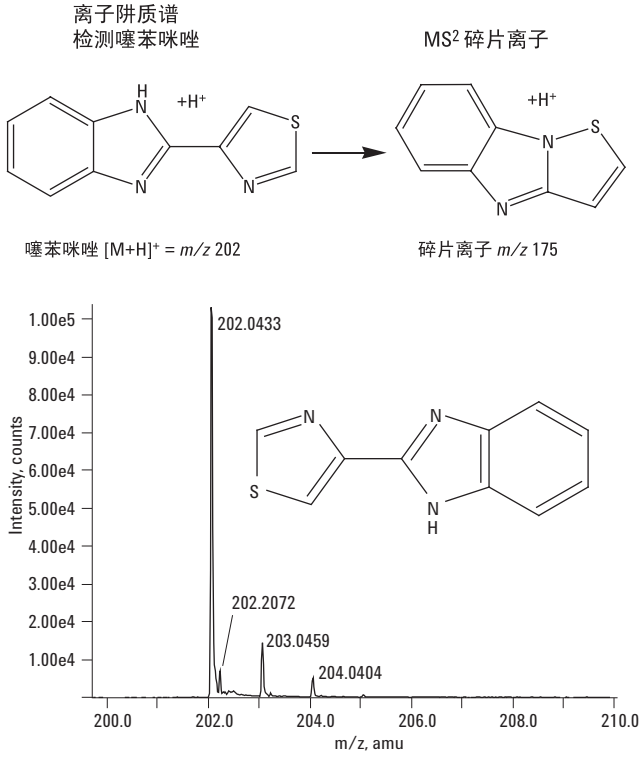
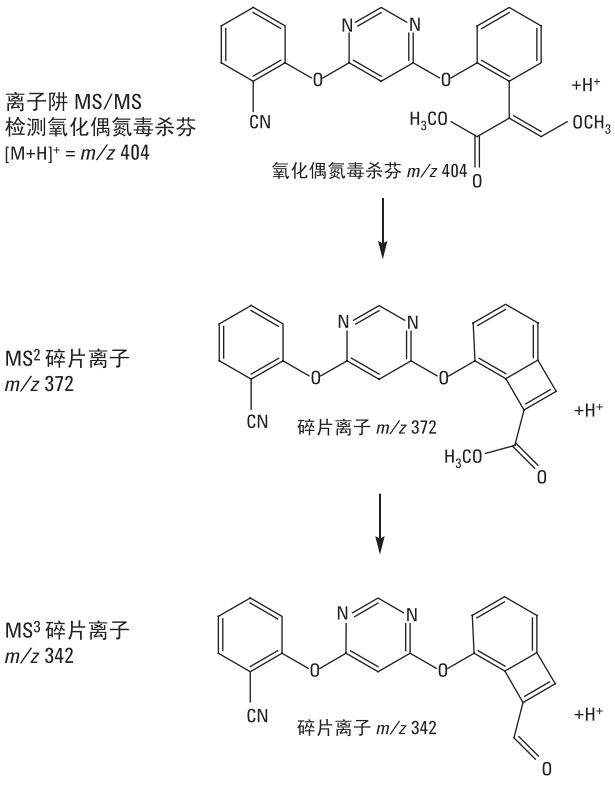


图 4b. 噻苯咪唑的结构和 LC/MSD 离子阱和 LC/MSD TOF 裂解途径。该图是 LC/MSD TOF 图



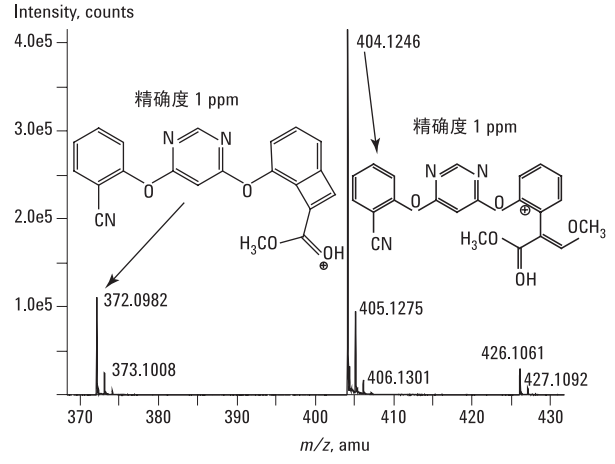
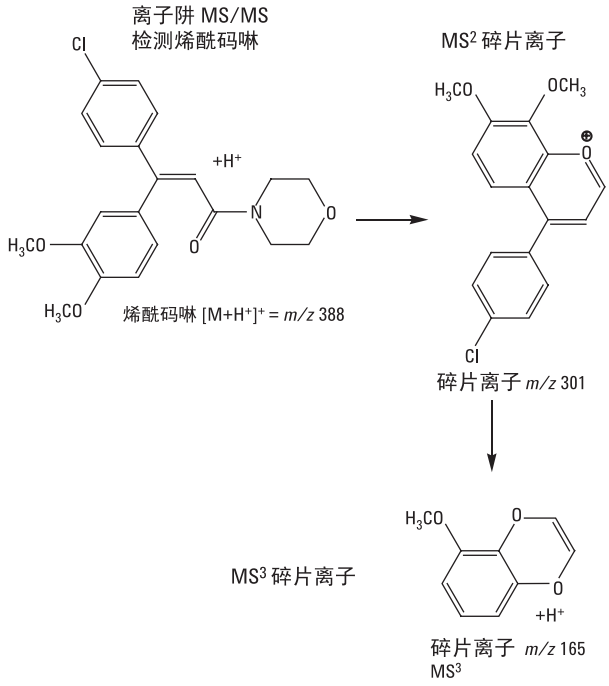


图 4c. 氧化偶氮毒杀芬的结构和 LC/MSD 离子阱和 LC/MSD TOF 裂解途径。该图是 LC/MSD TOF 图



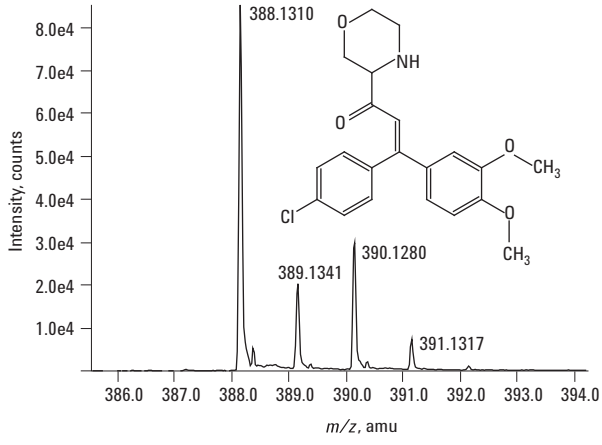
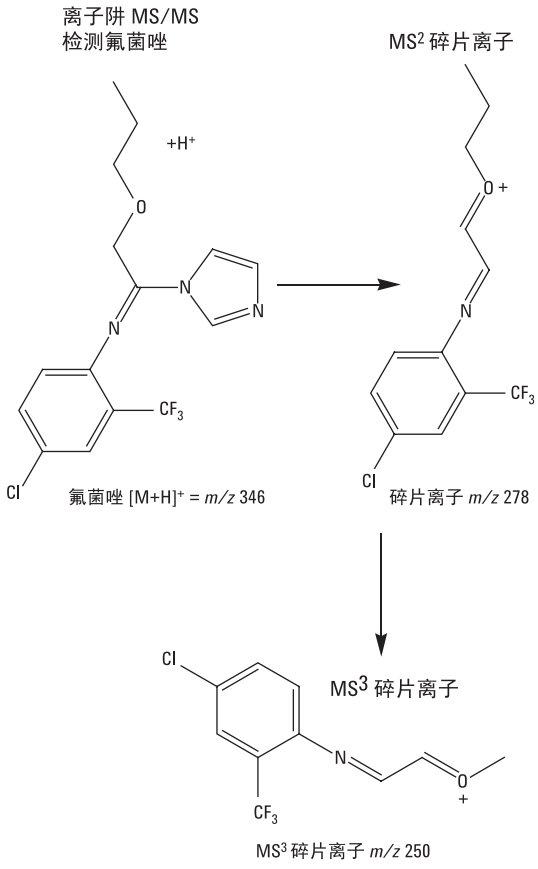


图 4d. 烯酰码啉的结构和 LC/MSD 离子阱和 LC/MSD TOF 裂解途径。该图是 LC/MSD TOF 图



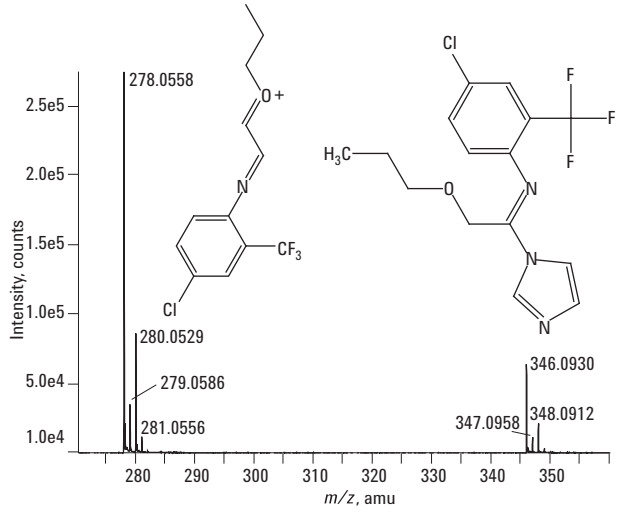


图 4e. 氟菌唑的结构和 LC/MSD 离子阱和 LC/MSD TOF 裂解途径。该图是 LC/MSD TOF 图

线性和检出限

对每种水果和蔬菜基质（桔子，柠檬，瓜，菜花和柿子椒）中待测化合物浓度从 0.01 mg/kg 至 0.5 mg/kg (ppm) 的范围内，建立 LC/MSD TOF 和 LC/MSD 离子阱的五种杀真菌剂的校准曲线。结果显示了 LC/MSD TOF 与 LC/MSD 离子阱测定不同水果与蔬菜基质样品的相似性。比如，图 5a–5b 显示了多菌灵和氧化偶氮毒杀芬的标准曲线。这些图表证实，对于浓度至 0.5 ppm 的氧化偶氮毒杀芬，噻苯咪唑，和氧化偶氮毒杀芬的水果提取物，LC/MSD TOF 系统没有或有非常小的基质抑制效应。然而，噻苯咪唑和烯酰码啉显示了既增加又抑制的信号（数据没在这里显示）。信号增加的情况出现在水果如瓜，桔子和柠檬的提取物测定中。蔬菜青椒的提取物测定无信号增加，而菜花提取物信号受到了抑制。解释这一现象的一种可能性在于，当流动相是大致 80% 的乙睛时，噻苯咪唑出现的保留时间较后后（大约 26 min）。在如此高浓度的有机溶剂中 ESI 信号可能受到基质的抑制，所以在分析未知食品样品时需要选用适当的与基

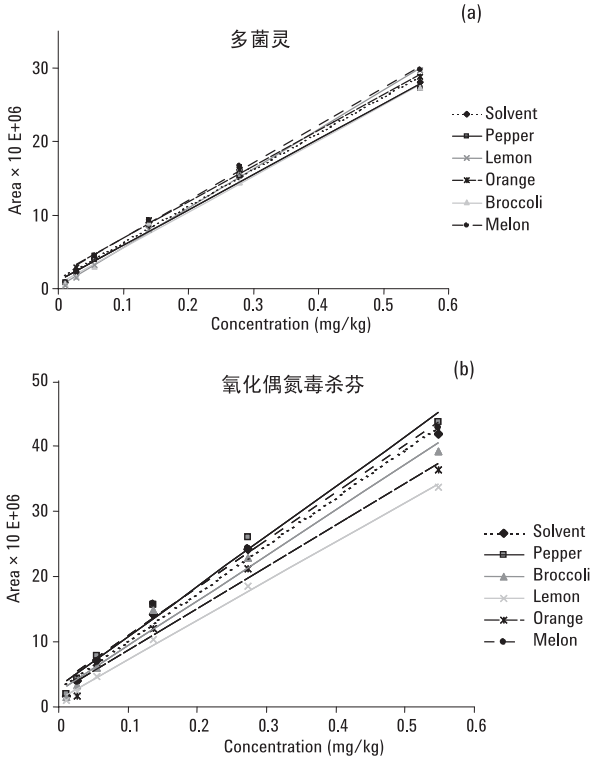


图 5. 多菌灵 (5a) 和氧化偶氮毒杀芬 (5b) LC/MSD TOF 标准曲线的重叠图

质匹配的标准样。因此，报告最准确的样品浓度的关键在于针对每种水果和蔬菜的基质配置相应的标准曲线。测定实际水果和蔬菜中未知样品时使用的就是这一方法。

此外，图 5a–b 表明，所有基质的样品中四种杀真菌剂在测定浓度范围内线性良好，相关系数在 0.990 - 0.999 之间。使用 LC/MSD 离子阱测定是获得了类似结果，相关系数一般在 0.990±0.001 之间。

表 2. 典型水果基质中各种杀真菌剂的标准曲线的相关系数

化合物	桔子	瓜	柠檬
多菌灵	0.998	0.997	0.999
噻苯咪唑	0.999	0.999	0.999
氧化偶氮毒杀芬	0.990	0.990	0.997
氟菌唑	0.996	0.999	0.996

表 3 列出了不同基质样品中杀真菌剂的检出限 (LODs)。表 3 的数值通常在 0.001 ppm - 0.010 ppm 之间浮动。欧洲对于无法规标准的农药设定在 0.010 ppm。所以，LC/MSD TOF 具有足够的灵敏度，可以应用于所有基质化合物的测定分析。使用 LC/MSD 离子阱也获得了近似结果的 LOD (表 4)。水果和蔬菜中各种杀真菌剂的 LOD 结果足以满足欧盟和西班牙的法规限制要求。

表 3. 三种基质中 LC/MSD TOF 分析杀真菌剂的 LOD (mg/kg)

化合物	桔子	瓜	柠檬
多菌灵	0.004	0.005	0.008
噻苯咪唑	0.005	0.010	0.005
烯酰码啉	0.005	0.002	0.008
氧化偶氮毒杀芬	0.001	0.001	0.001
氟菌唑	0.001	0.001	0.001

比如，在西班牙，多菌灵在西红柿中的限量是 0.10 mg/kg，噻苯咪唑在西红柿中限量为 0.50 mg/kg，而氧化偶氮毒杀芬没有限量要求。所以，最大残留限量自动设为 0.01 mg/kg。LC/MSD TOF 对于分析测定不同水果和蔬菜中每种杀真菌剂的检出限均能满足要求。

通过 LC/MSD TOF 分析，LC/MSD 离子阱确认测定食品店中实际水果提取物中杀真菌剂的定量结果显示在表 5 中。所以，这些数据表明，LC/MSD TOF 能够测定水果及蔬菜提取物中杀真菌剂的精确质量数，并能达到 EU 监测所需检出限。

表 4. 三种基质中 LC/MSD 离子阱全扫描模式下杀真菌剂的 LOD (mg/kg)

化合物	桔子	瓜	柠檬
多菌灵	0.005	0.005	0.010
噻苯咪唑	0.005	0.010	0.005
烯酰码啉	0.005	0.003	0.010
氧化偶氮毒杀芬	0.002	0.005	0.010
氟菌唑	0.002	0.002	0.005

表 5. 通过 LC/MSD TOF 和 LC/MSD 离子阱鉴定食品店中的水果中杀真菌剂的浓度 (mg/kg)

化合物	桔子	瓜	苹果	柠檬
多菌灵	0.03	<LOD	0.1	0.5
噻苯咪唑	<LOD	0	0	0.1
烯酰码啉	0	0	0	0
氧化偶氮毒杀芬	0	0	0	0
氟菌唑	0	0	0	0

结论

- LC/MSD TOF 是鉴别水果及蔬菜中杀真菌剂的强大工具，也是环境食品化学研究的新型手段
- 在两个数量级以上范围内轻松实现精确定量，优于 3 ppm，一般少于 2 ppm，而在我们的应用研究中对于多数化合物在正模式 ESI 下达到了令人惊奇的结果 - 1ppm!
- 杀真菌剂的元素组成和碎片离子信息可以通过 LC/MSD TOF 获得，并且可以应用 LC/MSD 离子阱进行确认
- 水果和蔬菜中五种杀真菌剂的检出限在 0.001 - 0.010 µg/g。这些检出限数值与欧盟指南在水果与蔬菜中所控制的杀真菌剂限量标准相当或更好

参考文献

1. Imma Ferrer and E. Michael Thurman, (2004) "Determination of chloronicotinyl insecticides in salad vegetables by LC/MSD TOF and LC/MSD ion trap", Agilent Technologies, publication 5989-1842EN www.agilent.com/chem
2. E. Michael Thurman and Imma Ferrer, (2005) "Identification of unknown pesticides in food using both LC/MSD TOF and Ion Trap MSn", Agilent Technologies, publication 5989-1924EN www.agilent.com/chem
3. Y. Pico, C. Blasco, and G. Font, (2004) *Mass Spectrometry Reviews*, **23**, 45-85.
4. M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, and F.J. Schenck, (2003) *Journal of AOAC International*, **86**: 412-431.
5. E.M. Thurman, I. Ferrer, and A.R. Fernández-Alba, Chapter 8: “LC/MS I. Basic Principles and Technical Aspects of LC/MS for Pesticide Analysis”, in Chromatographic-Mass Spectrometric Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues, Ed. A.R. Fernández-Alba, Elsevier, Amsterdam, 2005.

用 LC/TOF-MS 鉴定环氧酚类食品罐头涂层中未知的反应副产物和污染物

应用

食品安全

作者

M. Driffield, E. L. Bradley, and L. Castle
Central Science Laboratory
Sand Hutton
York, YO41 1LZ
UK

J. Zweigenbaum
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

摘要

本应用介绍了用飞行时间质谱法对食品行业中新型和现有罐头涂层进行安全评价。母体化合物和碎片离子的精确质量信息大大提高了鉴定方法的可信度。

引言

用来包装食品的金属罐头内表面涂层常常在食品和罐头的金属之间形成一层屏障。涂层的配方中可能含有各种成分，如树脂、交联剂、催化剂、润滑剂、润湿剂和溶剂。这些成分或它们相互反应的副产物很可能从罐头涂层中进入食品。因此需要对与食品和饮料接触的现有的，特别是新型的涂料进行安全评价。

我们将以双酚 A 环氧树脂环氧酚类罐头涂层为例子，介绍这种安全评价方法。具体方法是烘烤酚类树脂，产生三维交联网络，得到食品和饮料罐头内的化学和包装残留物。环氧单体双酚 A 二缩水甘油醚（BADGE, 见图 1）通过其活性环氧基团参与这些缩聚反应。而且，它也可以攻击亲和试剂，如水或溶剂，生成分子量更低的产物，这些产物可能进入所包装的食品中 [1-3]。需要对这种可能的浸入进行鉴定。

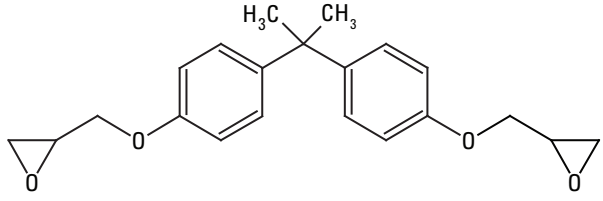


图 1. BADGE，$C_{21}H_{24}O_4$ 的化学结构

飞行时间 (TOF) 质谱 (MS) 能对这些未知化合物进行准确的质量测定，不需要拥有每个可能的微量杂质和反应副产物的标准品，就可以进行鉴定。

实验

样品提取

将一个涂有环氧苯酚漆并在工业条件下烘烤过的金属板 (250 cm^2)，截成小块（约1 cm^2），用乙腈 (100 mL) 浸泡提取。18 小时后将提取物蒸发至很小的体积 (1 mL)。

LC 条件

仪器：	Agilent LC 1200 SL 型
流动相：	A: 水 B: 乙腈
梯度：	25 分钟时，20% B 到 50% B，保持 20 分钟; 60 分钟时 100%B，保持 10 分钟；用 10 分钟回到 20%B
流速：	0.2 mL/分钟
色谱柱：	Agilent ZORBAX Eclipse XDB, 100 mm × 2.1 mm, 3.5-µm 粒径 部件号 961753.902
进样：	5 µL

MS 条件

仪器：	Agilent 6210 LC/MS TOF，ESI 正离子模式
雾化器压力：	30 psi
毛细管：	4000 V
气体温度：	300 °C
干燥气：	7 L/分钟

结果和讨论

因为从涂层中提取的主要是 BADGE 衍生物 [1]，所以用 BADGE 溶剂标样对 TOF-MS 参数进行优化。碰撞池电压先用 150 V，使其不发生裂解，从而得到分子离子加合物。图 2 显示了环氧酚类涂层乙腈提取物的总离子流色谱图。有许多未知峰，本文选取 27.2 分钟处的峰为例。

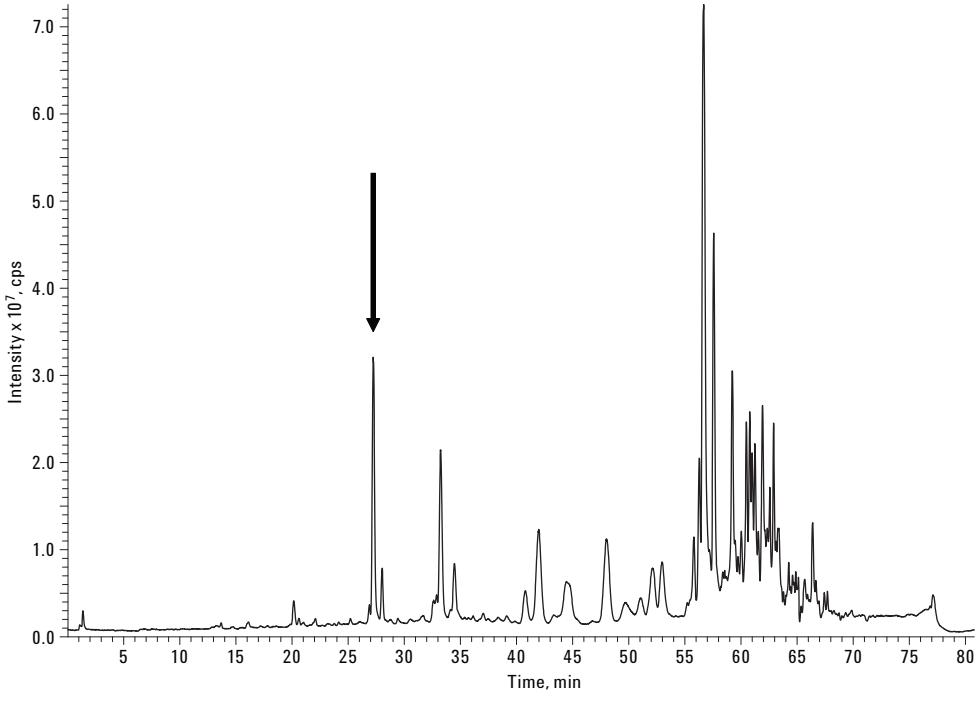


图 2. 环氧酚类涂层乙腈提取物的总离子流图

图 3 是 27.2 分钟处峰的质谱图。离子之间的质量差异是由于分子的质子化、氨基化、钠加合和钾加合峰。然后流动相中并没有加入氨、钠或钾，这些加合物很可能是来自仪器上其它样品测试时的污染，或流动相所用的溶剂。

使用分子式计算工具对这个峰进行鉴定，测定最大峰 $[M+NH4]^+$的精确质量数。在所用的 5 ppm 质量误差限度内，限定为 C、H、O 和一个 N，只有一种可能的结构式。

对于实验得到的质量数 494.3118，提出结构式为 $C_{27}H_{44}O_7N$（理论质量为 494.3112，误差 1.15 ppm）。断定这是氨加合物（减去 NH_4），得到这个未知峰的结构式 $C_{27}H_{40}O_7$。进一步推断这个峰是一个 BADGE 衍生物（从分子式中减去 $C_{21}H_{24}O_4$），认为这个未知峰是 BADGE + $C_6H_{16}O_3$。

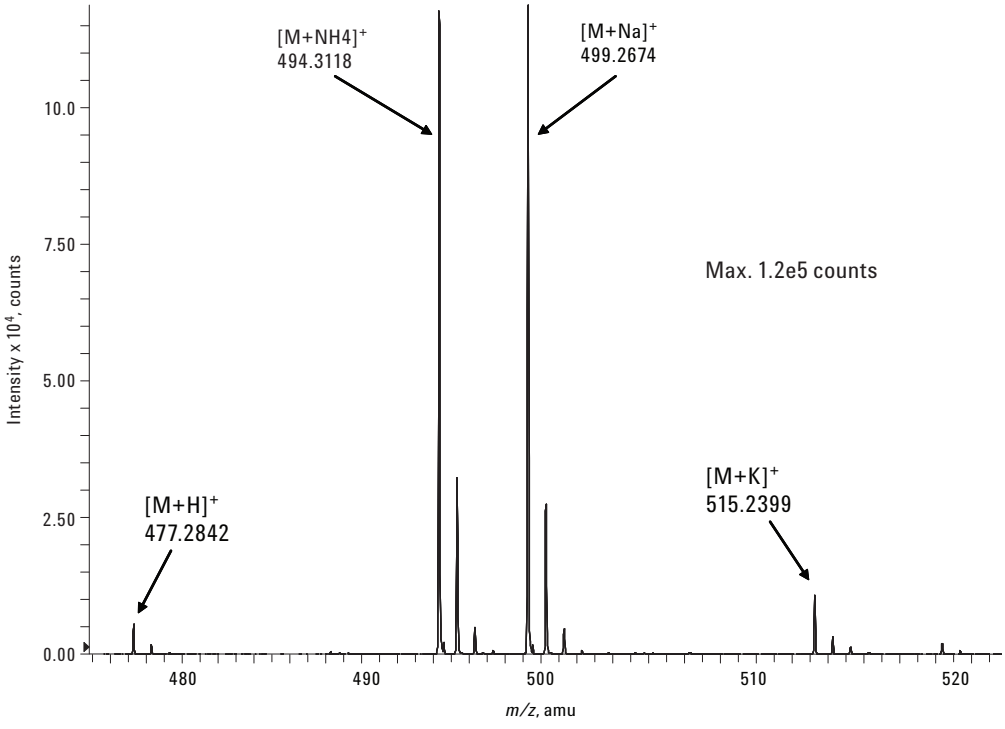


图 3. 27.2 分钟处未知峰的质谱图 (碰撞电压 = 150 V)

用裂解实验进行辅助鉴定，将裂解器值设置为 275 V，把分子的氨加合物裂解成离子，见图 4。

把碎片离子的精确质量输入分子式计算工具，从所提出的经验式中推论出这些离子的结构。确证碎片离子中有 BADGE 单元 (*m/z* 341.1727)，一个环氧环与水反应（碎片离子质量为 *m/z* 209.1149），其它的与丁氧基乙醇 (BuOEtOH, $C_6H_{16}O_3$)反应（碎片离子 *m/z* 309.2036），丁氧基乙醇是涂层生产过程中所用的一种溶剂。图 5 显示了 BADGE.H_2O. BuOEtOH 的结构。

用同样的方法，鉴定出了图 2 中的所有峰，并研究了不同罐头涂料的化学性质。

结论

用 LC/TOF-MS 分析了环氧苯酚类罐头涂料的溶剂提取物，鉴定出了可能渗入食品和饮料中的物质。母化合物及其碎片离子的精确质量数据，能够确切地归属以前未知的峰。使用 LC/TOF-MS 有助于检测现有的罐头涂料，并引导新涂料化学性质的研究。

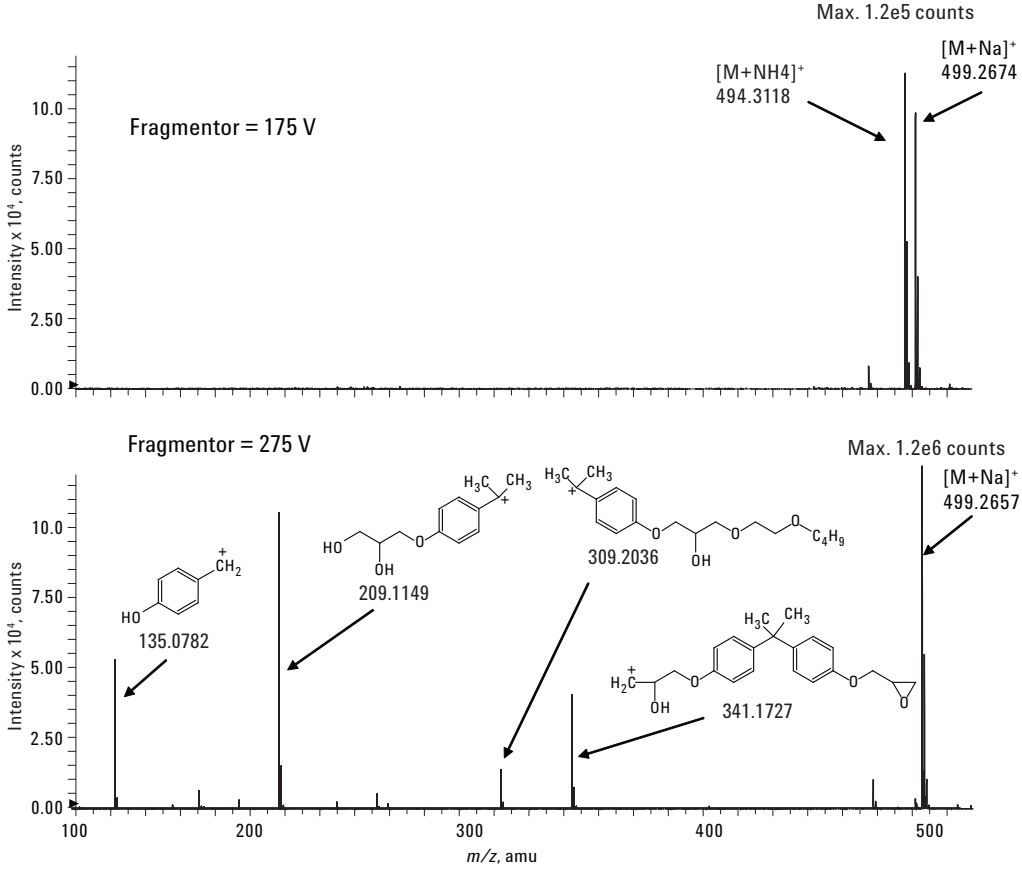


图 4. 27.2 分钟处未知峰的 TOF-MS

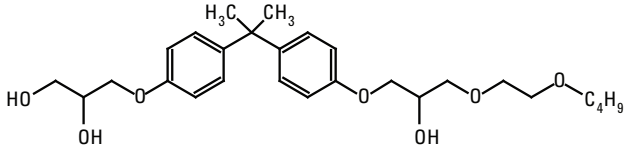


图 5. 鉴定出的化合物结构：BADGE.H_2O.BuOEtOH

参考文献

1. A. Schaefer and T. J. Simat (2004) *Food Additives and Contaminants*, 21, 4, 390–405.
2. N. Leepipatpiboon, O. Sae-Khow, and S. Jayanta (2005) *Journal of Chromatography A*, 1073, 1–2, 331-339.
3. O. Pardo, V. Yusa, N. Leon, and A. Pastor (2006) *Journal of Chromatography A*, 1107, 1–2, 70–78.

采用 LC/TOF-MS 快速分析真菌粗提物中的次级代谢产物 – 真菌鉴定的新方法

应用

食品

作者

Hamide Z. Şenyuva
Ankara Test and Analysis Laboratory
Scientific and Technological Research Council of Turkey
Ankara 06330
Turkey

John Gilbert
Central Science Laboratory
Sand Hutton
York YO41 1LZ
UK

摘要

本文开发了 LC/TOF-MS 研究真菌次级代谢产物的新方法。生长于培养基中的真菌经溶剂提取后直接进行 LC/TOF-MS 分析。通过检索对比数据库中 465 种次级代谢产物，能容易地鉴定霉菌毒素及其它感兴趣的化合物。该方法的方法学验证采用在培养基中添加 20 种霉菌毒素标准物，然后再鉴定其溶剂粗提物中的这些毒素的方法。随后，使用来自于菌种保藏机构的 7 种不同真菌在三种不同的培养基上进行 7-14 天的培养，能鉴定预测的代谢产物。

引言

从食品安全的角度考虑需要鉴定从农产品中分离出来的霉菌（真菌），因为它们可能是食品中霉菌毒素污染的潜在来源。鉴定真菌的传统方法以经典的真菌学为基础，包括真菌在不同培养基上的培养和随后依据形态学和生长行为特征进行的分类。然而，这种分类鉴定耗时且带有一定的主观性，并依赖于真菌学家的经验和技艺。此外，这种分类对实际次级代谢产物谱仅能提供参考性证据，因为这些判断是以前人研究的特定种类真菌的次级代谢为基础。这种经验方法由于同种真菌既可能产生毒素又可能不产生毒素这一事实的存在而使人更加困惑，也就是说有些真菌容易产生霉菌毒素，而另外一些与其无差异的同种真菌从遗传上就不能产生毒素。因此，仅靠对真菌物种进行分类不能真正判断霉菌毒素的产生。

过去，直接分析真菌培养基以确定是否存在霉菌毒素必然包括“目标”分析，不可避免地假定能找到那种毒素，而 LC/TOF-MS 提供了一种可能的新方法用于研究真菌产生毒素的行为。即使从基质中有效提取出的毒素表现出较大的极性差别，TOF-MS 的特异性意味着不需要再进行任何样品纯化。而且，也不需要进行目标分析，因为仪器能测定在液相色谱分离中检测到的任何组分分子离子的精确质量数，这些组分可以通过检索数据库中相关次级代谢产物的精确质量数得以鉴定。

本文介绍从培养真菌中提取次级代谢产物的合适条件和随后进行 LC/TOF-MS 分析的条件。方法学验证采用在各种培养基中添加黄曲霉毒素、赭曲霉素 A、单端孢霉烯、玉米赤霉烯酮和腐马素毒素，从低浓度基质中提取具有良好的回收率，随后通过检索比较数据库中 465 种次级代谢产物进行鉴定。本方法已应用于从培养物收藏单位获得的一种*青霉菌*和 6 种*曲霉菌*的代谢物鉴定，其次级代谢产物已与预测的毒素谱进行了比较。

实验部分

所有分析工作均使用 Agilent 6210 TOF-MS 与 Agilent 1200 系列 HPLC 联用完成。霉菌毒素和其它真菌代谢物的分离也采用 HPLC 系统完成（包括真空脱气机、自动调温进样器、二元泵和 DAD 检测器），色谱柱为反相 C18 柱（ZORBAX Eclipse XDB 100 x 2.1 mm，1.8 µm）。TOF-MS 配置了双喷雾器电喷雾源、可以连续导入内标参比标样。仪器的扫描范围对所有样品均为 *m/z* 100 ~ 1,000，扫描速度在 9,429 transient/scan 下为 1 cycle/sec。此质量范围能够涵盖两个内标参比标样产生的离子，即 *m/z* 121.0508 和 922.0097。进样体积 5 µL。

HPLC 分析使用的流动相为乙腈和 2 mM 的乙酸铵的 1% 甲酸水溶液，流速为 0.3 mL/min。梯度洗脱从 15% 乙腈开始经 20 分钟增加到 100% 乙腈。色谱柱采用 100% 乙腈冲洗 5 min，每次进样前平衡 5 min。紫外光谱采用二极管阵列检测器获得，每 0.4 秒从 200 nm 扫描到 700 nm，分辨率为 4 nm。TOF-MS 的优化条件列于表 1。采集的数据采用具有精确质量数应用功能的 Analyst-QS 软件处理。465 种霉菌毒素和其他真菌代谢产物数据库根据参考文献数据采用 Excel 创建 [1,2]，这样创建的文件容易用于 Agilent 软件的检索功能。

表 1. LC/MS-TOF 在 ESI 正离子模式下的操作条件

参数	
毛细管电压	3000 V
喷雾器压力	40 psig
干燥气	10 L/min
干燥气温度	300 °C
碰撞电压	150 V
锥孔体电压	60 V
OCT* RF	250 V
OCT* DC	37.5 V
质量范围 (*m/z*)	100–1000
标准质量	121.050873；922.009798

* 八极杆

真菌提取

已鉴定的 *A. paraciticus (NRRL 2999)* 分离菌来自 USDA 菌种保藏机构，分离菌 *A. flavus*，(200198)，*A. ochraceus* (200700)、*A. oryzae* (200828)、*A. niger* (200807)、*A. fumigatus* (200418) 和 *P. citrinum* (501862) 来自 TÜBITAK Mamara 研究中心的菌种保藏部门。将真菌接种到分别装有麦芽提取物琼脂 (MEA)、马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA)、和酵母提取物蔗糖琼脂 (YES) 培养基的陪替氏培养皿中。在 25 ℃下培养 7 至 14 天，可以在培养基表面观察到典型的真菌菌落大量繁殖生长。取样采用软木塞钻孔器垂直切下两个直径 6 mm 包含真菌菌丝体和其下培养基的塞状样品。将塞状样品转移至 5 mL 的一次性旋盖瓶中。提取条件在文献方法 [3,4] 的基础上进行改进。一个样品依次采用 2 mL 含 1% 甲酸的乙酸乙酯和 2 mL 异丙醇提取两次；另一个样品依次采用 2 mL 含 1% 甲酸的乙酸乙酯和 2 mL 乙腈提取两次，随后旋涡混合 1 min 并进行总计 30 min 的超声振荡。提取物过滤后用氮气吹干。两个样品的残余物溶于 1 mL 甲醇，超声振荡 10 min，经 0.2 µL 一次性过滤器过滤后用于 HPLC 分析。

结果与讨论

LC/TOF-MS 条件优化

最重要的仪器参数，包括毛细管电压、喷雾器压力、干燥气、气体温度和锥孔体电压最初采用自动调谐达到最大灵敏度。然而，碰撞电压也需要优化以提供最多的结构信息，因此常常需要采用折衷方案。本文在不改变其他条件的前提下，通过将碰撞电压由 55 V 逐步增大到 250 V 来进行优化。确定能够产生裂解的最小碰撞电压为 150 V。

整个过程的验证采用 20 种商品化标物（黄曲霉毒素 B_1、B_2、G_1 和 G_2、黄曲霉毒素 M_1、赭曲霉素 A、玉米赤霉烯酮、4 – 脱氧雪腐镰刀菌烯醇、3 – 乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇、15 – 乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇、蛇形菌素、镰刀菌酮 X、新茄病镰刀菌烯醇、伏马菌素 B_1、B_2 和 B_3、雪腐镰刀菌烯醇、HT-2 毒素、T-2 毒素和曲酸）和内标物（苯甲酮）混合物。采用 ESI 正离子模式，每个成分均得到质子化分子离子的精确质量数、保留时间和紫外光谱。

真菌代谢物精确质量数数据库的构建

创建一个 Excel 电子数据表，包含 465 种霉菌毒素和真菌代谢物中每种成分的精确质量数及相应的实验分子式 [1,2]。理论上化合物的单一同位素精确质量数根据其分子式使用 Excel 电子数据表（Agilent TOF 自带的，称为“分子式数据库生成器”）计算得出并转换成 csv (comma-separated values) 格式供 Agilent TOF 数据自动分析软件使用。每次样品测定完后 LC/TOF-MS 仪器自动检索 csv 文件并生成报告给出从数据库中检索到的化合物。数据分析方法是用数据分析编辑器创建的。编辑器允许选择加合物（例如，与正离子 H^+, NH_4^+, Na^+ 等）和中性丢失进行自动检索，也可以进行质量精度和保留时间限度、报告选项和其它检索与测定标准。通常不需要保留时间，除非明确其可增加鉴定的可信度。

我们使用添加了 20 种霉菌毒素混合标物的各种培养基作为样品测定保留时间。反复进样 10 次以确定这些成分保留时间的重现性。鉴定采用的标准需满足如下要求：M+1 离子精确质量数的质量精度为 ±5 ppm; 保留时间匹配为 ±0.2 min（有标样可用）；最小峰高计数，即化合物的阈值为 1000 计数（或信噪比为 ~ 10:1，或 0.06% 相对量）；如果存在预测的成分，则应与预测的加合物和中性碎片丢失有良好的一致性（在 ±5 ppm 以内）。

方法验证和分析

根据上述测定标准，当在培养基中添加 25–100 µg/ kg 浓度的标物时所有 20 种标物均能正确鉴定，分析按上述要求进行。

方法用于测定已鉴定真菌的代谢物

上述技术已应用于各种培养基培养的已鉴定真菌代谢物的测定，而非只是简单地通过添加培养基进行理论上的考察。一种青霉菌种和 6 种曲霉菌种在三种不同的培养基上进行培养后，使用上述简单的溶剂萃取法进行提取，粗提物直接采用 LC/TOF-MS 进行分析。图 1 所示的是 *A. flavus* 提取物的总离子流色谱图，结果表明检测到大约 20 种成分。在 8.9 min 的色谱峰进行数据库检索时采用测定的精确质量 *m/z* 313.0712。按 $M+H^+$ 离子推算与黄曲霉毒素 B_1 一致，与数据库中黄曲霉毒素 B_1 的精确质量数相比，质量匹配仅差 0.2 ppm。

软件使用分子特征 (MFE) 算法去掉所有非真实离子峰并将真实离子分组组成“分子特征”。这些分子特征能够根据他们相互间的关系进行鉴定并推导其加合物、二聚体、三聚体及其同位素（表示为 +1、+2 等）等。将保留时间为 8.9 min 的色谱峰鉴定为黄曲霉毒素 B_1 所依据的分子特征和各离子测定的精确质量数总结于表 2。选择一个分子特征，软件将计算其可能的实验分子式并给出预测的分子式相应的同位素组成的得分；结果列于表 2。得分为 100 的分子式就是黄曲霉毒素 B_1。随后此分子式被自动转化，采用 NIST、ChemIndex 和 Medline 进行网络连接搜索。如图 2 所示，在 NIST 中的检索结果给出黄曲霉毒素 B_1 的分子式和结构。

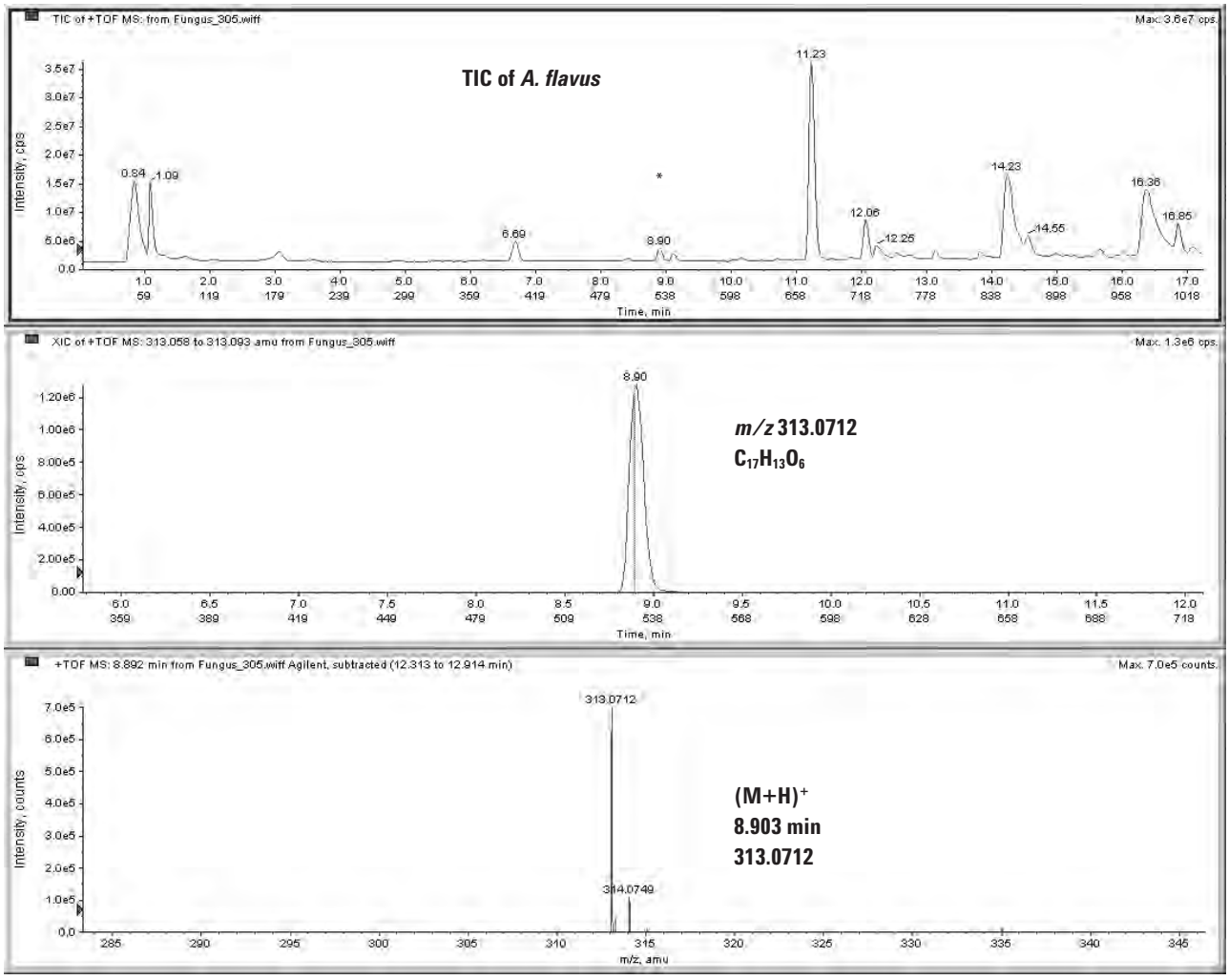


图 1. ***A. flavus*** **提取物的 LC/TOF-MS 分析图解说明：**

(a) 总离子流色谱图 (TIC)，带 * 峰对应与黄曲霉毒素 B_1，

(b) 针对黄曲霉毒素 B_1 的提取离子流色谱图，从 *m/z* 313.058 到 *m/z* 313.093；

(c) 表明精确质量的全扫描质谱，黄曲霉毒素 B_1 的 M+1 离子质量误差为 0.2 ppm。

表 2. 在 ESI+ LC/MS-TOF 中观察到的保留时间为 8.90 min 处的典型峰簇，*m/z* 313.0706

MFE

Feature #27 (RT = 8.903)

Species	RT	*m/z*	Mass	Abundance	Width
M	8.903		312.0633	5541933	0.088
M+H	8.903	313.0706	312.0633	4035186	0.09
M+H+1	8.903	314.0744		622147	0.088
M+H+2	8.902	315.0766		74349	0.09
M+H+3	8.906	316.0795		7943	0.085
M+Na	8.904	335.0529	312.0637	86580	0.094
M+Na+1	8.904	336.0563		15898	0.097
M+Na+2	8.916	337.0593		1848	0.091
2M+H	8.906	625.1357	312.0642	741	0.049
2M+Na	8.902	647.1164	312.0636	226965	0.061
2M+Na+1	8.902	648.1202		65639	0.063
2M+Na+2	8.900	649.1228		14941	0.065
2M+Na+3	8.899	650.1256		2677	0.058
2M+Na+4	8.897	651.1290		257	0.048

MFE

Composition's chemical formula	dm(Da)	dm(ppm)	dm(ppm)	DBE	Score
$C_{17}H_{12}O_6$	0.0001	0.2	0.2	12	100
$C_{18}H_8N_4O_2$	0.0014	4.5	4.5	17	77
$C_{14}H_4N_{10}$	–0.0013	–4.2	4.2	18	68
$C_9H_{16}N_2O_8S$	–0.0006	–1.9	1.9	3	58
$C_{13}H_8N_6O_4$	–0.0026	–8.4	8.4	13	55

NIST National Institute of Standards and Technology

Standard Reference Data Program | Data Gateway | Online Databasis | Chemistry WebBook

Aflatoxin B_1

- **Formula:** $C_{17}H_{12}O_6$
- **Molecular weight:** 312.27
- **IUPAC International Chemical Identifer:**
  - o InChI=1/C17H12O6/c1-20-10-6-11-14(8-4-5-21-17(8)22-11)15-13(10)7-2-3-9(18)12(7)16(19)23-15/h4-6,8,17H,2-3H2,1H3
- **CAS Registry Number:** 1162-65-8
- **Chemical structure:**

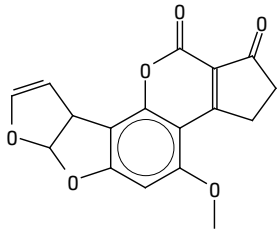


图 2. 在 NIST 数据库中检索实验分子式的检索结果（Medline 和 ChemIndex 数据库的检索结果相同，此处未列出）。注意分子量不能在这些数据库中检索，因为它们通常是“平均”分子量而非单一同位素分子量

作为 *A. flavus* 的次级代谢产物，除了鉴定黄曲霉毒素 B_1，也发现该真菌产生了黄曲霉毒素 B_2、B_3 和 G_1，这与该真菌已知的代谢行为一致。表 3 给出 5 ppm 质量精度内数据库检索的结果，并将一些相应于其他已知化合物的精确质量数一起作为筛选结果表示出来。曲酸和甲氧基柄曲霉素匹配好，两者均为已知的真菌代谢产物，也可以预期能从 *A. flavus* 中找到。匹配好的还有肉桂酸，但不是已知的代谢物。

当将该新方法应用于从菌种保藏机构获得且在三种不同基质中培养的总计 7 种不同真菌的初步研究时，得到了表 4 所示的结果。在大多数情况下找到了预测的代谢产物，这增强了方法学的可信度。一些初步的研究结果表明没有检测到预测的霉菌毒素而发现了未预料到的代谢产物。识别错培养物的可能性或检测到以前未见报道的代谢物的可能性是存在的。虽然这说明了该方法的能力，但这些研究结果需要进一步更深入的研究。

表 3. *A. flavus* 提取物的自动霉菌毒素检索结果（提出的化合物列表按保留时间升序排列误差在 5 ppm 以内。苯甲酮用作内标）

Mass Value = 142.03					
Formula	**Compound**	**Mass**	**Error (mDa)**	***Error (ppm)**	**Ret. Time Error**
$C_6H_6O_4$	Kojic acid	142.03	–0.10	–0.7	–
Mass Value = 148.05					
Formula	**Compound**	**Mass**	**Error (mDa)**	**Error (ppm)**	**Ret. Time Error**
$C_9H_8O_2$	Cinnamic acid	148.05	–0.08	–0.5	–
Mass Value = 328.06					
Formula	**Compound**	**Mass**	**Error (mDa)**	**Error (ppm)**	**Ret. Time Error**
$C_{17}H_{12}O_7$	Aflatoxin G_1	328.06	1.01	1.4	–0.05
Mass Value = 354.07					
Formula	**Compound**	**Mass**	**Error (mDa)**	***Error (ppm)**	**Ret. Time Error**
$C_{19}H_{14}O_7$	5-Methoxysterigmatocystin	354.07	0.99	2.8	–
Mass Value =312.06					
Formula	**Compound**	**Mass**	**Error (mDa)**	***Error (ppm)**	**Ret. Time Error**
$C_{17}H_{12}O_6$	Aflatoxin B_1	312.06	–0.05	–0.2	–0.11
Mass Value =312.06					
Formula	**Compound**	**Mass**	**Error (mDa)**	***Error (ppm)**	**Ret. Time Error**
$C_{17}H_{14}O_6$	Aflatoxin B_2	314.08	0.06	0.2	0.06
Mass Value = 338.08					
Formula	**Compound**	**Mass**	**Error (mDa)**	***Error (ppm)**	**Ret. Time Error**
$C_{19}H_{14}O_6$	Methylsterigmatocystin	338.08	–0.16	–0.5	–
Mass Value = 182.07					
Formula	**Compound**	**Mass**	**Error (mDa)**	***Error (ppm)**	**Ret. Time Error**
$C_{13}H_{10}O$	Benzophenone	182.07	0.73	4.0	–0.15

表 4. 在 MEA、YES 和 PDA 中培养的来自菌种保藏机构真菌的检测到和预测代谢产物的对比

	真菌						
代谢产物	*P. citrinum*	*A. flavus*	*A. paraciticus*	*A. niger*	*A. fumigatus*	*A. oryzae*	*A. ochraseus*
AFB1		* √	* √				
AFB2		* √	* √				
AFB3		* √	*				
AFG1		* √	* √				
AFG2		*	* √				
KA	* √	* √	* √		*	*	
MST		* √	√				
5-MST		√					√
OTA				* √			*
RO-A					√		
FU-B					* √		
MA				* √			
AA		*					√
Nig				* √			
Ter							√
Cit	*						

√ – LC/TOF-MS 检测到的代谢物；* – 预测存在的代谢物

关键词:

AFB1	黄曲霉毒素 B_1 等	FU-B	烟曲霉文乙
KA	曲酸	MA	畸形素（肽类）
MST	甲基杂色曲霉毒素	AA	曲霉酸
5-MST	5-甲氧基杂色曲霉毒素	Nig	Nigragillin
OTA	赭曲霉素 A	Ter	土曲菌酮
RO-A	酪青霉毒素 A (isofumigaclavine A)	Cit	桔青霉素

展望

将 LC/TOF-MS 的精确质量数测定与数据库检索结合使用是新的通用鉴定技术中的一个强有力的工具，能够用于目标物的分析。在真菌代谢物领域，已展现其通过一系列代谢物筛选真菌的潜力，目前尚无其它专门方法可用。本文提供了一种新的可能的用于以代谢物产生为基础的真菌分类和用于以食品安全为目的的农产品中霉菌毒素的快速筛选的方法。尽管 LC/TOF-MS 能给出一些判断，但在检测到文献未报道的代谢产物时需要采用液相色谱/四极杆 – 飞行时间串联质谱联用系统 (LC/QTOF-MS) 进一步进行结构推导。

结论

本文建立了一种简单快速的 LC/TOF-MS 方法用于测定各种培养条件下真菌的次级代谢产物谱。该方法通过在固体培养物中添加典型代谢物进行验证，表明具有良好的回收率且通过检索对比代谢物数据库中精确质量数进行鉴定。一系列来自菌种保藏机构的已鉴定真菌的研究结果表明预测的毒素能够很容易地被检测出来。

参考文献

1. R. J. Cole and R. H. Cox. (1981) Handbook of Toxic Fungal Metabolites, Academic Press Inc. (New York).
2. J. C. Frisvad and U. Thrane (1987) “Standardized High-Performance Liquid Chromatography of 182 Mycotoxins and Other Fungal Metabolites Based on Alkylphenone Retention Indices and UV-VIS Spectra (diode array detection),” *Journal of Chromatography A*, 404:195–214.
3. J. Smedsgaard (1997) “Micro-Scale Extraction Procedure for Standardized Screening of Fungal Metabolite Production in Cultures,” *Journal of Chromatography A*, 760: 264–270.
4. J. Stroka, M. Petz, U. Joerissen, and E. Anklam, (1999) “Investigation of Various Extractants for the Analysis of Aflatoxin B1 in Different Food and Feed Matrices,” *Food Additives & Contaminants*, 16: 331–338.

LC/TOF-MS 分析消化液中的叶酸

应用

食品安全

作者

M. H. Blokland, P. W. Zoontjes, S. S. Sterk, and L. A. van Ginkel,
National Institute of Public Health and the Environment (RIVM)
Laboratory for Food and Residue Analysis
Bilthoven
The Netherlands

Jerry Zweigenbaum
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE
USA

摘要

消化液样品未经进化处理，借助 LC/TOF-MS 的高分辨和准确质量测定能力，进行直接分析。样品来自体外的消化模型。通过方法学验证，本方法可用于这类模型中叶酸摄入量的检测。

引言

众所周知，摄入叶酸对人体健康有益。通常可以通过服用药物或食用富含叶酸的食品来增加叶酸的摄入量。测定消化道中叶酸占总体摄入量的比例，对于研究叶酸的摄入非常重要。目前主要通过一种体外消化模型来研究叶酸的可摄入性。

考虑到消化液成分复杂（例如，唾液、胃液和食糜），在对这类样品中的叶酸进行分析时，通常要求样品的净化程度较高。传统的净化方法包括免疫色谱法和固相萃取法。

利用 LC/TOF-MS 的高分辨能力和独有的准确质量测定性能，可以省去这些净化处理过程，对消化液中的叶酸进行直接检测。这可降低净化过程中叶酸降解的风险，使高通量分析成为可能。本应用报告介绍了直接检测消化液中叶酸的方法。

实验部分

样品制备

唾液、胃液和食糜按文献描述的方法进行准备 [1]。样品制备方法为直接取样，取一份消化液，直接注入 LC/TOF-MS 系统。

LC/MS 条件

LC 条件

仪器：	Agilent LC 1200 SL
色谱柱：	ZORBAX SB-C8，100 mm × 2.1 mm，1.8 µm (部件号 828700-906)
柱温：	80 °C
流动相：	A：1% 甲酸水溶液 B：乙腈-水-甲醇（26:60:14, v/v）
梯度：	0 min 时，流动相 B 的比例为 5% 4 min 时，流动相 B 的比例为 5% 8 min 时，流动相 B 的比例为 40% 8.1 min 时，流动相 B 的比例为 40% 9 min 时，流动相 B 的比例为 5%
流速：	0.5 mL/min
进样量：	10 µL

MS 条件

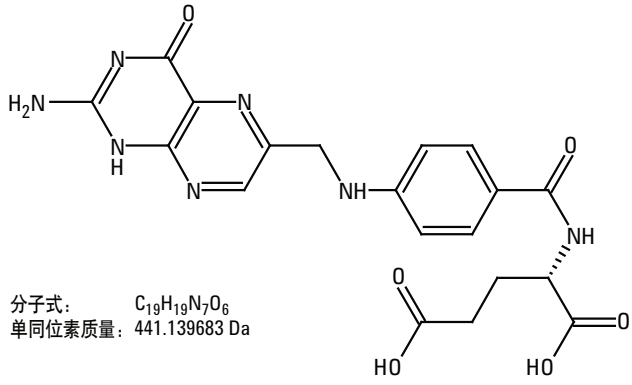
仪器：	Agilent 6210 LC/TOF-MS
离子源：	ESI 正离子模式
干燥气流速：	9 L/min
雾化器压力：	60 psig
干燥气温度：	350 °C
毛细管电压：	4000 V
碰撞诱导解离电压：	150 V
锥孔体：	60 V
扫描方式：	*m/z* 110-940，每秒扫描 1.5 次
内标参比溶液：	含有 2 ml/L 嘌呤和 1 ml/L HP-921 的乙腈溶液 (100 mg/L)，以恒定的速率从第二个喷口喷入
参比质量：	*m/z* 121.020873 和 922.009798

结果与讨论

校正标准品

叶酸的结构见图 1。在本研究的分析条件下，由于不用考虑灵敏度，因此，仅对准确质量分析和预期的样品浓度下的线性进行优化。图 2 为 1 µg/mL 标准品的色谱图。该浓度下的信噪比 (S/N) 通常大于 500。

以在 1 µg/mL～100 µg/mL 范围内建立校正曲线，证明 LC/TOF-MS 具有较宽的线性动态范围。



分子式：$C_{19}H_{19}N_7O_6$
单同位素质量：441.139683 Da

图 1. 叶酸的结构式、精确分子量及分子式

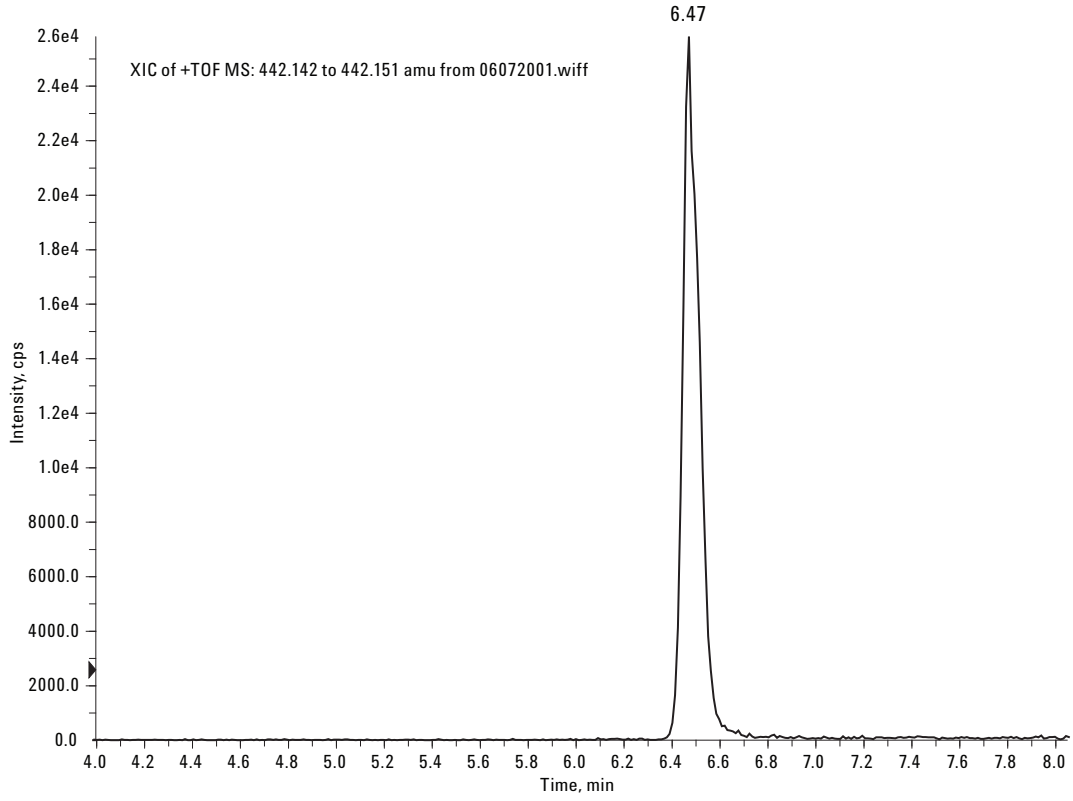


图 2. 1 µg/mL 叶酸标准品的提取离子色谱图（离子提取窗口为 M+H 离子准确质量 ±10 ppm）

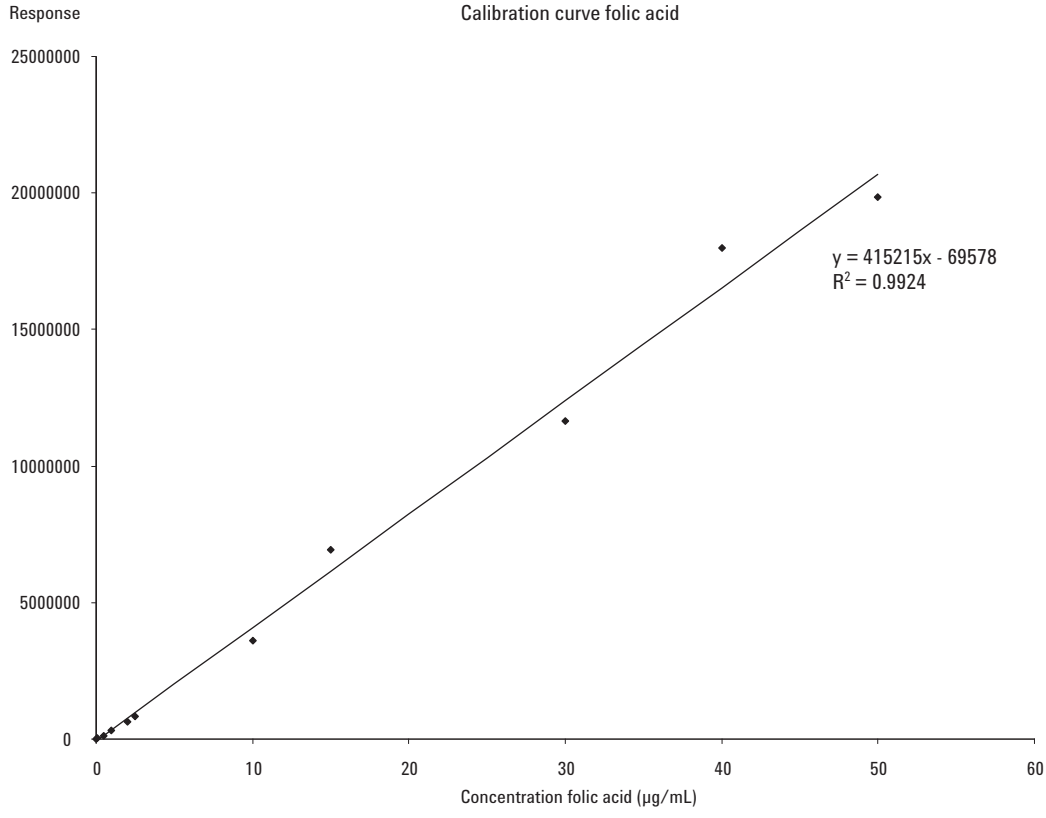


图 3. 1～100 µg/mL 的叶酸校正曲线

方法学验证

图 4～6 分别为 1 µg/mL 消化液加标样品的总离子色谱图 (TIC)、提取离子色谱图 (EIC) 和质谱图。所有样品中目标化合物的质量准确度均优于 3 ppm。EIC 是在 442.1425～442.1515 (±10 ppm) 的质量窗口中提取而得。

基质效应考察

通过测定加标的唾液、胃液和食糜样品考察基质效应。加标浓度为 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75 和 100 µg/mL。图 7 显示了各种基质中目标化合物的响应情况。结果显示，食糜样品的基质抑制效应最小，而唾液和胃液的基质抑制效应相对较高。

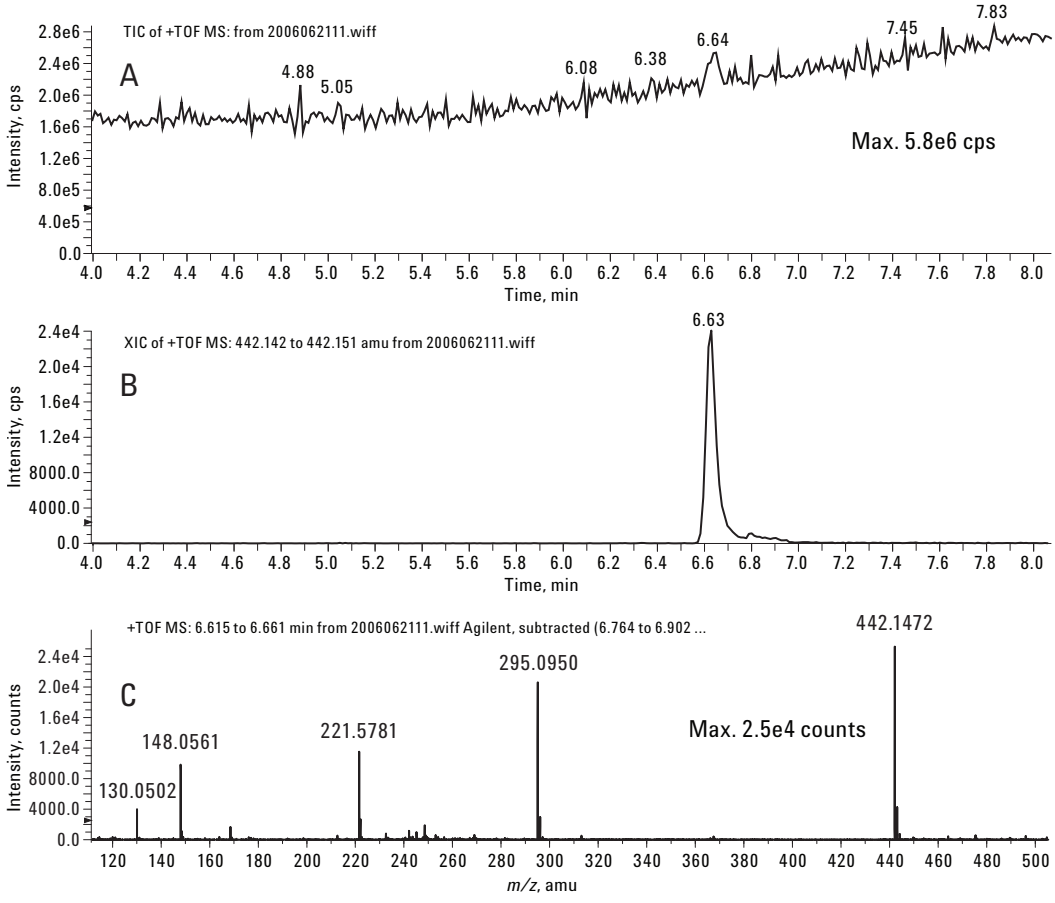


图 4. 1 µg/mL 唾液加标样品中叶酸的 TIC (A)、EIC (B) 和质谱图 (C)

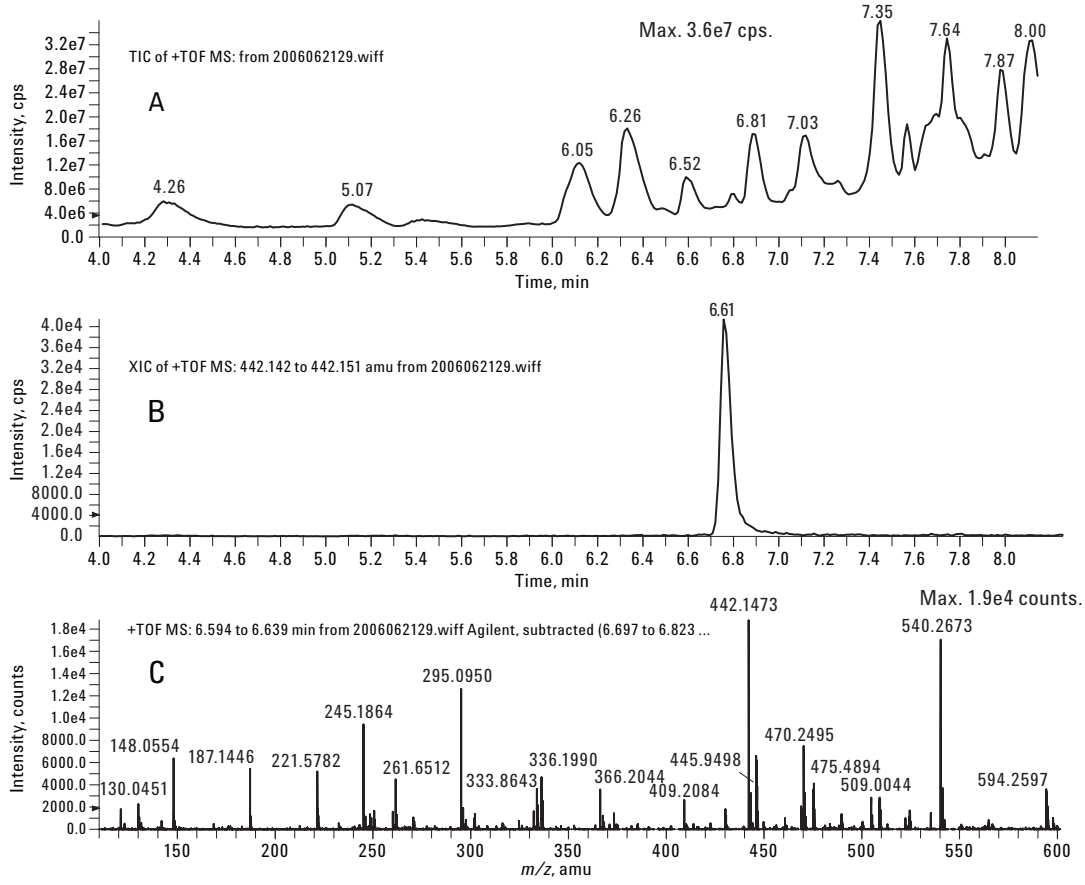


图 5. 1 µg/mL 胃液加标样品中叶酸的 TIC (A)、EIC(B) 和质谱图 (C)

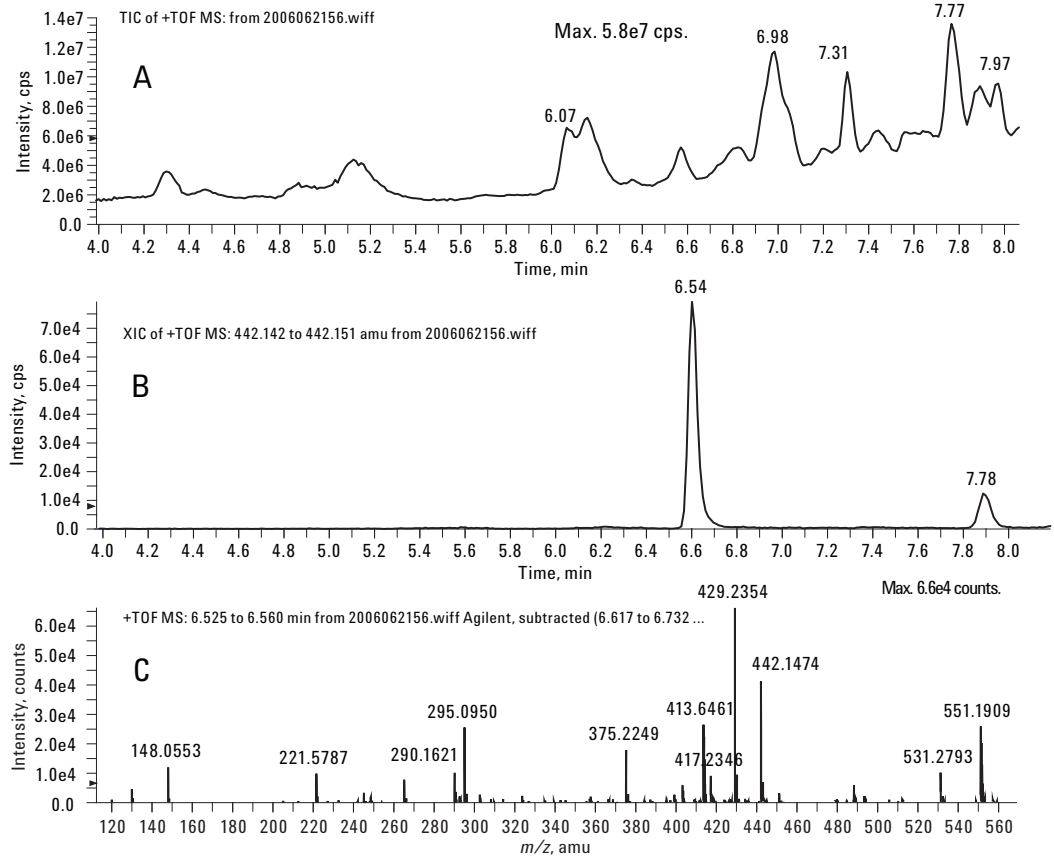


图 6. 1 µg/mL 食糜加标样品中叶酸的 TIC (A)、EIC (B) 和质谱图 (C)

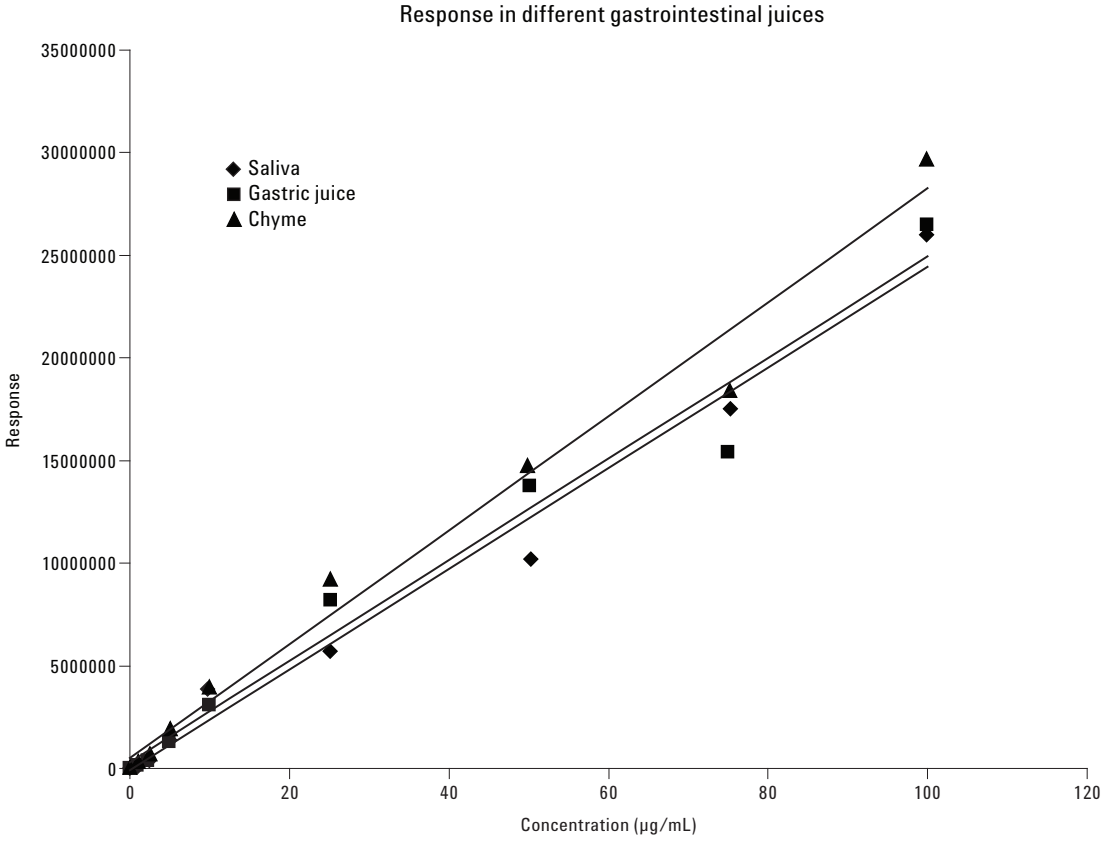


图 7. 不同消化液加标样品中叶酸的校正曲线

为考察方法的准确度和精密度，取 50 µg/mL 的加标胃液和食糜，在 4 天中分别进行分析，每两天之间相隔一个星期，结果见表 1。

通过绘制标准曲线，对唾液、胃液和胆汁中的检测限 (LOD) 进行测定。由校正曲线计算得到 Y 轴截距和斜率。LOD 为 Y 轴截距相应的浓度加上三倍的 Y 轴截距标准偏差。计算结果见表 2。

表 1. 准确度 (%) 和变异性 (%)

	第一周 准确度 (%)	CV (%)	第二周 准确度 (%)	CV (%)	第三周 准确度 (%)	CV (%)	第四周 准确度 (%)
胃液	91.9	1.2	99.3	4.2	82.9	6.0	91.7
食糜	99.9	2.1	102.5	3.7	91.4	4.2	93.3

表 2. 检测限 (LOD) 计算结果

	唾液 (µg/mL)	胃液 (µg/mL)	食糜 (µg/mL)
LOD	0.4	0.7	0.6

结论

本次研究工作的目的是在尽量简化净化处理步骤的基础上，开发一种消化液中叶酸的分析方法。利用 Agilent LC-TOF 的高分辨能力，样品可以不经过任何的净化处理，直接检测。这种检测方法已证明在复杂基质中具有很高的准确度和重现性。在不同基质中响应值均呈线性，基质效应较小，并且在叶酸摄入研究所要求的检测浓度范围内对方法进行了验证。

参考文献

1. C. H. Versantvoort, A. G. Oomen, E. Van de Kamp, C. J. Rompelberg, and A. J. Sips. “Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food.” *Food Chem Toxicol,* 2005 Jan, 43(1).

液相色谱/三重串联四极杆液质联用仪 (LC/QQQ) 应用

针对食品/环境样品基质复杂，组分复杂，灵敏度及重现性要求高等特点，6400 系列三重串联四极杆质谱除硬件性能优异外，在软件功能方面也进行诸多更新：Dynamic MRM 模式免去了时间窗口编程的 MRM，特别适合快速液相色谱中多组分（如多农残）的定性定量分析；软件及数据库方面具有最新的食品安全分析方法包，包括 600 种农药及 130 种毒物的分析方法及 MRM 数据库，用户直接导入液质联用仪进行定性定量分析，无需进行分析方法的优化和建立，使用非常方便。

液相色谱/三重串联四极杆液质联用仪 (LC/QQQ) 应用

5989-5469 采用液相色谱/三重串联四极杆质谱技术进行食品中 100 种农药的多残留分析 81

5989-5459 用 LC/MS/MS 测定食品中 44 种农药的含量 87

5989-5808 Agilent 6410 型三重串联四极杆质谱分析罗非鱼中的硝基呋喃代谢物 98

5989-5807 食品中孔雀石绿和隐性孔雀石绿的 LC/MS/MS 定量分析 103

5989-7615 使用 LC/MS/MS 测定食品中的黄曲霉素 110

5989-7084 快速高分离度 LC/MS/MS 定量测定麦片中的水溶性 B 族维生素 117

5989-7308 快速灵敏的 LC/MS/MS 方法用于咖喱粉和辣椒粉中苏丹红的分析 128

5990-3816 液相色谱-串联质谱联用技术用于牛奶中多残留四环素及其代谢物的检测 137

5988-6635 使用 ESI-、APPI- 和 APCI/MSD 分析苯基脲和氨基甲酸酯农药 150

5989-0596 高效液相色谱 — 电喷雾质谱分析牛肾组织中的氟喹诺酮 163

5989-5403 用液相色谱 — 质谱法 (LC-MS) 快速测定食品中的羟甲基糠醛 173

5989-2912 用 LC/MS 系统以分析模式和半制备模式鉴定和分离 DSP-毒素 179

5968-2124 液质联用方法用于烟曲霉毒素的分析 187

5968-2979 电喷雾和大气压化学电离源液相色谱 — 质谱用于天然食品色素的分析 191

5988-4236 液相色谱/质谱联用分析糖和糖醇类化合物 200

5988-4235 液相色谱/质谱联用分析甘油三酯类化合物 204

5968-0878 大气压化学电离源液相色谱 — 质谱用于食用油中甘油三酸酯的分析 207

5989-5836 改进并简化的液相色谱/大气压化学电离质谱法用于食品中未衍生化游离氨基酸的分析 213

5988-8595 用液相色谱/质谱选择离子检测模式检测饮用水和地下水中苯脲类、三嗪类除草剂的确认方法 218

5988-4708 食品中氨基甲酸酯类杀虫剂的 LC/MSD 的常规分析 223

采用液相色谱/三重串联四极杆质谱技术进行食品中 100 种农药的多残留分析

应用

食品安全

作者

Imma Ferrer and E. Michael Thurman
Pesticide Residue Research Group
University of Almeria
Almeria, Spain

Yanyan Fang, Paul Zavitsanos, and Jerry A. Zweigenbaum
Agilent Technologies, Inc.
USA

摘要

本文使用 Agilent G6410AA 三重串联四极杆质谱仪 (QQQ) 进行了证实 100 种农药在蔬菜和水果样品中是否存在的分析方法学研究。在包含两个时间段的一次色谱操作中，每种母体化合物监测一种转变。方法的灵敏度满足欧盟委员会食品监测计划提出的最大残留限量 (MRLs) 的要求。将本方法应用于不同种类的蔬菜和水果的分析，包括柑桔、西红柿和青椒，以考察方法的分析性能，结果表明基质没有干扰或影响很小。线性范围超过两个数量级 (r > 0.99)。本研究揭示了将 QQQ 应用于蔬菜和水果中农药多种残留物的日常定量分析的潜在价值。

引言

近年来，对商品中最大残留限量 (MRLs) 的规定越来越严格。为了满足对健康的要求，欧盟委员会 (EU) 对蔬菜中低含量的农药作出了新的指示。对于准备用作生产婴儿食品的水果和蔬菜，要求其所含所有农药的 MRL 为 10 µg/kg，没有提出规定的化合物同样也要求达到 10 µg/kg 的最低 MRLs。低的 MRLs 促进了更灵敏分析方法的开发以满足复杂样品分析的需要。从这种意义上讲，具有三重串联四极杆的液相色谱串联质谱 (LC-MS-MS) 采用多反应监测 (MRM) 模式已经成为目前应用最广泛的技术用于食品中农药的监测和定量，文献已有详尽的报道。另一方面，高解析能力的质谱技术，如飞行时间质谱 (TOF-MS) 近来也已用于筛选。然而，使用三重串联四极杆作为检测技术，方法学简单且具有检出限低和 MS/MS 功能，这些优势使该技术成为一种有价值的手段可以在指定的官方实验室用于常规监测计划。对于这些类型的管理机构，缺少能掌握更精密复杂技术，如 TOF-MS 的高技术人员，因此，易于使用有时是必须的。三重串联四极杆技术不是一种有待验证才能用于检测目的的新技术，用于常规分析的基础已经很好地建立起来。

本文研究首次考察了新的安捷伦三重串联四极杆质谱仪用于水果和蔬菜中农药的分析。选择此研究课题是由于这些化合物与其在食品中的大量使用具有相关性。QQQ 的检测灵敏度很容易满足检测食物中农药含量的法规要求。

实验内容

样品制备

农药分析标准品购自 Ehrenstorfer 博士 (德国，Ausburg)。各种农药的储备液 (约 1000 µg/ml)，根据每种化合物的溶解度分别采用纯乙腈或甲醇配制并在 -18 °C 下储存。取上述储备液，通过用乙腈和水稀释配制标准工作液。

蔬菜样品从当地的市场获得，“空白”蔬菜和水果提取物用于制备基质匹配的标准品用于方法学验证。在已报道的研究中，已有用 QuEChERS 方法提取了蔬菜和一种水果（青椒、西红柿和柑桔）两种不同类型基质的报道 [1]。向蔬菜提取物中加入标准品并混合均匀制备成不同浓度的样品（范围为 2 到 100 µg/kg）并依次进行 LC/MS/MS 分析。

结果与讨论

LC/MS/MS 条件的优化

目前，已经完成了每一种化合物最佳 MRM transition 的研究，进行条件优化时将被测物分组进样（每次进样约 10 种待测成分），样品浓度约为 10 µg/mL。改变碰撞能量（5，10，15，20 和 25 V），考察了碰撞能量的影响。选择在谱图中能给出主要碎片离子最佳灵敏度且依照通用规则保留 10 % 母体化合物的能量为最佳能量。对于每一种目标化合物，仅有一种碎片离子被选作最大丰度子离子。研究结果示于表 1。

LC/MS/MS 仪器操作

LC 条件

色谱柱：	Agilent ZORBAX Eclipse® XDB C-8, 4.6 mm x 150 mm, 5 µm, (部件号 993967-906).	
柱温：	25 °C	
流动相：	A = 0.1% 甲酸水溶液 B= 乙腈	
流速：	0.6 mL/min	
洗脱梯度：	时间	%B
	0 min	10% B
	5 min	10% B
	30 min	100% B
进样体积：	1-5 µL	

MS 条件

模式：	ESI 正离子模式，采用 Agilent G6410AA 三重串联四极杆质谱仪
喷雾压力：	40 psig
干燥气流速：	9 L/min
毛细管电压：	4000 V
干燥气温度：	350 °C
Q1 分辨率：	Unit
Q2 分辨率：	Unit
碰撞电压：	70 V
碰撞能量：	5–25 V
MRM:	每个化合物的 transition 条件如表 1 所示
驻留时间：	15 msec

方法中包括 MRM transition，驻留时间为 15 msec，并在一次色谱操作中分成两个不同的时间段进行记录（每个时间段大约包括一半样品）。图 1 为所有被研究的化合物进样量为 100 pg 时色谱图。根据每种成分各自的质子化分子和子离子的 MRM transition，将每一种目标成分的提取离子色谱图叠加在图中。

表 1. 每种被测物的分析条件和检出限 (LOD)

化合物名称	保留时间 (min)	质子化分子离子 $[M+H]^+$	子离子 (*m/z*)	碰撞能量	LOD (pg)
时间段 1					
噻诺吗嗪	2.7	167	125	20	10
杀虫单	2.7	312	232	10	90
杀螟丹	3	150	105	15	10
杀虫环	4.5	182	137	10	8
涕灭威亚砜	6.4	207	89	5	9
多菌灵	6.6	192	160	15	5
噻菌灵	7.9	202	175	25	10
涕灭威砜	10.8	223	148	5	50
烯啶虫胺	11	271	225	10	7
羟基阿特拉津	11.2	198	156	15	3
灭多威	11.5	163	88	5	4
去异丙基阿特拉津	11.9	174	132	15	18
咪唑烟酸	12.5	262	234	15	8
苯嗪草酮	13.9	203	175	15	8
非草隆	14.5	165	72	15	2
去乙基阿特拉津	14.8	188	146	15	4
吡虫啉	14.8	256	209	10	7
乐果	15.4	230	199	5	7
啶虫脒	15.5	223	126	15	6
扑草通	15.7	226	184	20	4
氨基三嗪代谢物	16	214	158	15	0.8
甲硫威砜	16.4	258	122	5	6
烟嘧磺隆	16.9	411	182	15	6
噻虫啉	17	253	126	15	3
抑霉唑	17.2	297	159	15	7
甲苯达唑	17.2	296	264	20	2
涕灭威	17.5	213	89	10	10
灭草喹	17.8	312	284	20	15
恶霜灵	17.9	279	219	10	10
氟草烟	17.9	255	209	10	120
西玛津	18	202	132	15	5
灭草隆	18	199	72	10	2
环草定	18.4	235	153	10	20
氰草津	18.5	241	214	10	70
威灭威	18.5	166	109	5	2
螺环菌胺	18.6	298	144	15	10
敌敌畏	18.7	221	109	15	10
嗪草酮	18.9	215	187	15	5
绿麦隆	19.4	213	72	15	3
扑草净	19.5	242	200	20	2
特丁净	19.5	242	186	15	1
克百威	19.6	222	165	10	2
恶虫威	19.7	224	167	5	2
时间段 2					
多杀菌素 A	20	732	142	5	12
甲奈威	20.1	202	145	5	2
氨基三嗪 1051	20.3	254	198	15	0.1
莠去津	20.3	216	174	15	0.3
甲霜灵	20.4	280	248	10	5
枯莠隆	20.4	287	123	15	5
异丙隆	20.4	207	72	15	1

表 1. 每种被测物的分析条件和检出限 (LOD) (续上)

化合物名称	保留时间 (min)	质子化分子离子 $[M+H]^+$	子离子 (*m/z*)	碰撞能量	LOD (pg)
杀虫磺	20.5	432	290	15	6
敌草隆	20.5	233	72	15	5
多杀菌素 D	20.7	746	558	5	100
乙硫苯威	20.7	226	107	5	5
达灭芬异构体 1	21.3	388	301	20	11
毒草胺	21.6	212	170	10	1
达灭芬异构体 2	21.7	388	301	20	8
丙氯灵	21.9	376	308	10	6
敌稗	22.2	218	162	15	10
环唑醇	22.5	292	70	10	6
灭梭威	22.6	226	169	5	15
特丁津	22.7	230	174	15	0.3
糠菌唑异构体 1	22.8	376	159	20	6
苯线磷	23	304	217	15	0.7
杀扑磷	23	303	145	5	5
亚托敏	23.2	404	372	10	0.4
亚胺硫磷	23.2	318	160	5	2
克菌丹	23.2	300	264	10	50
二甲吩草胺	23.3	276	244	10	1
猛杀威	23.3	208	151	10	5
糠菌唑异构体 2	23.7	376	159	20	6
禾草敌	23.7	188	126	10	5
除虫脲	24.1	311	158	10	9
异菌脲	24.6	330	245	10	8
丙环唑异构体 1	24.7	342	159	20	5
马拉硫磷	24.8	331	127	5	5
丙环唑异构体 2	24.9	342	159	20	5
异丙甲草胺	24.9	284	252	10	2
特富灵	24.9	346	278	10	7
甲草胺	25	270	238	10	8
乙草胺	25.1	270	224	10	8
氟噻草胺	25.2	364	194	5	5
苯醚甲环唑异构体 1	25.3	406	251	20	4
苯醚甲环唑异构体 2	25.4	406	251	20	4
毒虫畏	25.5	359	155	10	8
苯霜灵	25.8	326	294	5	5
甲基对硫磷	26.2	292	236	10	9
三氯卡班	26.4	315	162	15	8
氟铃脲	26.5	461	158	10	7
噻嗪酮	26.7	306	201	10	1
二嗪磷	26.8	305	169	15	1
伏虫隆	26.9	381	158	15	22
甲基毒死蜱	27.1	322	212	15	15
丙溴磷	27.6	373	303	10	7
虱螨脲	27.9	511	158	10	10
苄草丹	28	252	91	15	2
氟虫脲	28.5	489	158	10	6
丁草特	28.7	218	57	10	2
二甲戊乐灵	29.2	282	212	5	5
三氟草灵	29.7	336	236	15	30

线性和检出限

线性是通过分析 5 个不同浓度的标准溶液而获得，浓度范围相应于进样量 2-100 pg。例如，莠去津 (atrazine) 的标准曲线示于图 2。从图中可以看出，线性范围跨越很宽的浓度范围，相关系数为 0.998。其它被测成分也得到了相似的研究结果。

检出限通过测定浓度相应于信噪比为 3 的标准溶液来估计。实验结果也列于表 1。最低检出限由测定三嗪类 (triazines) 农药获得（柱上为 100 fg 到 2 pg），而氟草烟 (fluoroxypyr) 和多杀菌素 D (spinosad D) 的检出限最高（大于 100 pg）。

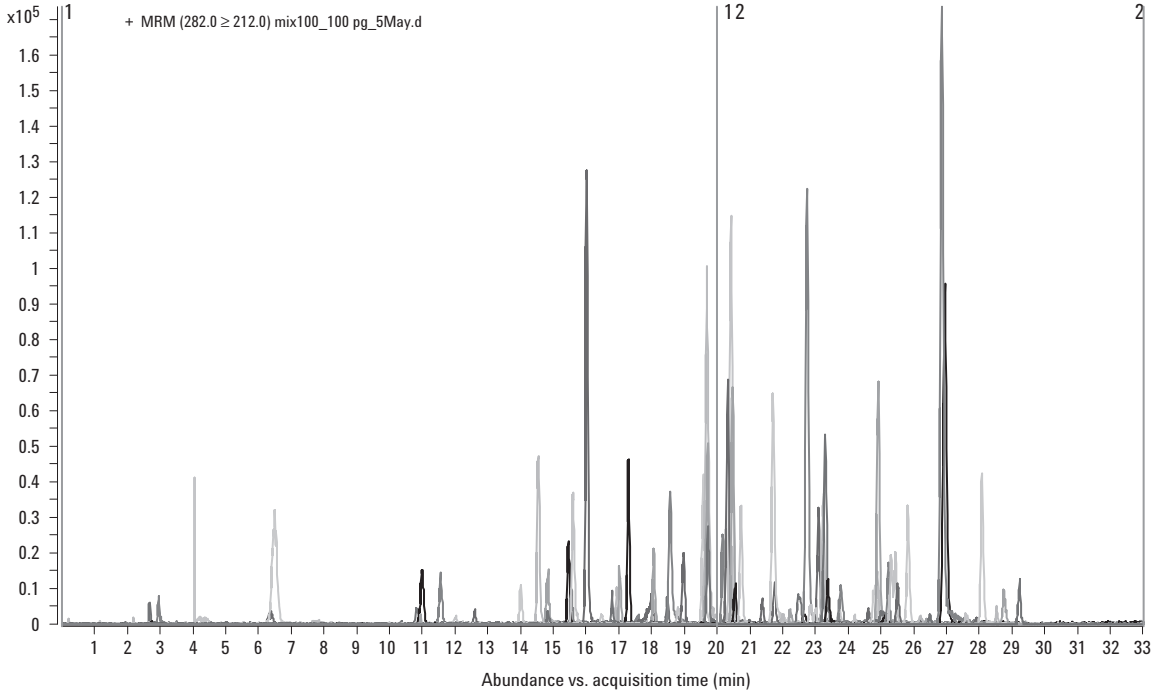


图 1. 100 种农药混合物的子离子色谱图（浓度：进样 100 pg）

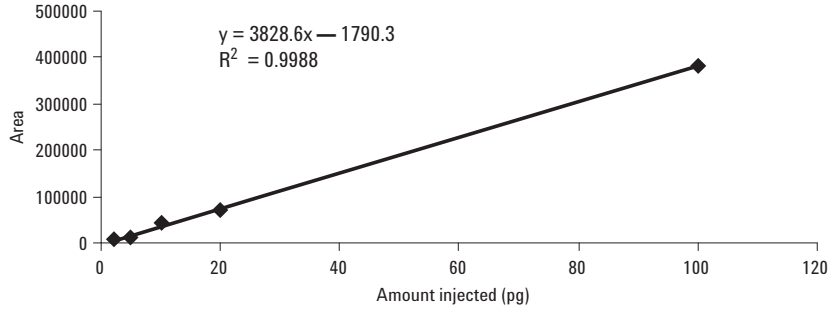


图 2. 莠去津的标准曲线，采用不加权和不过原点校正的线性拟合

蔬菜基质的应用

为了验证本法用于真实样品分析的适用性，分析了三种不同基质，即青椒、西红柿和柑桔，两种浓度水平 (10 和 100 µg/kg) 下的基质匹配标准品。在青椒基质中加入混合农药至 10 µg/kg（即进样 10 pg）所进行的分析示于图 3。正如从乐果 (dimethoate) 和亚托敏 (azoxystrobin) 这两种农药的 MS/MS 提取子离子色谱图看到的那样，依据 MRM transition 的选择性可以很容易地从这些复杂基质中鉴定该类化合物，这样就可以满足欧盟指令强制实行的规定限量的要求。总之，本法获得的 LOD 能够满足现行欧盟条例强制执行的相关 MRLs 的要求。

参考文献

1. Imma Ferrer and E. Michael Thurman, “Determination of Fungicides in Fruits and Vegetables by Time-of-Flight and Ion Trap LC/MS” (2005) Agilent Technologies, publication 5989-2209EN www.agilent.com/chem.

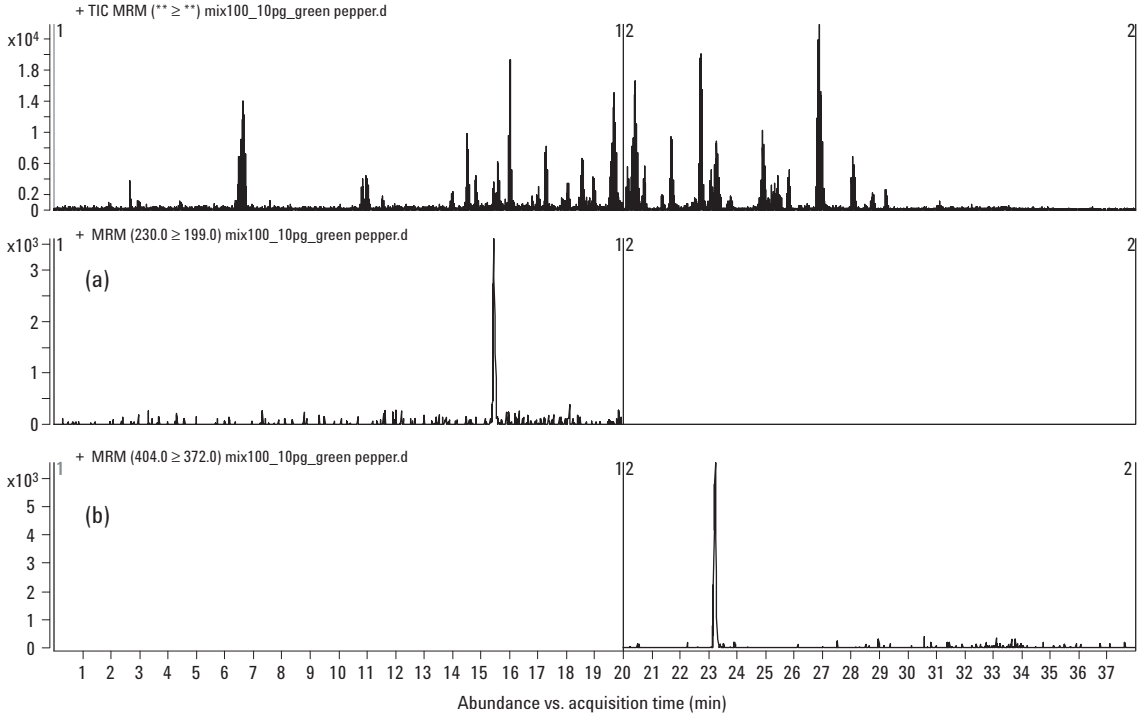


图 3. 加入农药浓度为 10 µg/kg 的青椒基质样品的 MRM 色谱图。子离子色谱图分别为 (a) 乐果和 (b) 亚托敏

用 LC/MS/MS 测定食品中 44 种农药的含量

应用

食品安全

作者

Masahiko Takino
Agilent Technologies, Inc.
Hachioji, Tokyo
Japan

Toshitsugu Tanaka
Kobe Institute of Health
Department of Food Chemistry
Chuo-ku, Kobe
Japan

摘要

本文采用 Agilent G6410AA 型三重串联四极杆质谱 (QQQ) 建立了十多种食物中的 44 种农药残留量的测定方法，方法的灵敏度高、选择性好。食物样品以两种不同的方法进行预处理。再进行 LC/MS/MS 分析，所有待测农药的检出限都低于 10 ng/mL。对这些待测农药，QQQ 系统的灵敏度能够很容易地达到日本食品卫生法规定的要求。

引言

农药在农业活动中应用广泛，主要用于两个方面，即生产和为方便运输进行的农产品处理。而被限制使用的农药是主要用于农业生产的农药。因此，农药最大残留限量 (MRLs) 与食品的安全评价有着紧密的联系。近年来建立的 MRLs 相关法规日趋严格。日本在 2006 年出台了肯定列表制度 (Positive list system)，对食品中 500 余种农药的 MRLs 作了规定。这一制度针对不同农药，按不同食品规定了不同的 MRLs。通常，根据商品和农药种类的不同，MRLs 在 0.01 到 3 µg/g 不等。MRLs 的降低对仪器的灵敏度提出了更高的要求，促使仪器不断发展以满足复杂样品的要求。迄今，带有多反应监测模式 (MRM) QQQ 的高效液相色谱/串联质谱系统 (LC/MS/MS) 是食品中极性农药定量分析最常用的工具。MRM 模式能够对食品这样的复杂基质进行更精确的检测。本文在所用样品分析条件下分两次分析了 44 种农药（见表 1 和表 2），其灵敏度能够很轻易地达到肯定列表制度的相应要求。

实验部分

化学试剂

乙腈（LC/MS 级纯）购自 Wako Pure Chemical Ind.（日本）。甲苯，丙酮，正己烷，甲酸，氯化钠和无水硫酸钠均为分析纯，购自 Wako Pure Chemical Ind.（日本）。SPE 柱购自 Spelco Japan（日本）。各农药标准品购自 Hayashi Pure Chemical（日本）。

样品制备

提取

蔬菜和水果样品均来自本地市场。用食品加工机将 10-500 g 不等的样品切碎，获得完全混合的匀浆液。称量 20 g 的样品匀浆液倒入 200 mL 的 PTFE 离心管中，加入 50 mL 乙腈在 Polytoron 混合器中混匀。将乙腈提取物抽真空过滤，收集滤液。滤渣再以 20 mL 乙腈提取。重复上述操作后合并滤液，倒入 100 mL 容量瓶中，加入乙腈定容。取出 20 mL 提取物倒入 PTFE 离心管中，加入 10 g NaCl 和 20 mL 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0)，振摇 5 分钟。盐析后得乙腈层，向其中加入 5 克无水硫酸钠。去除无水硫酸钠后，使用旋转蒸发仪在 40 °C 下将乙腈提取物蒸干。残渣以 2 mL 乙腈 – 甲苯 (3:1) 溶解。

纯化

第一组 – 将提取物上样到经 10 mL 乙腈 – 甲苯 (3:1) 平衡过的 GCB/氨丙基 SPE 柱 (500 ng/500 mg) 上。以 20 mL 的乙腈 – 甲苯 (3:1) 冲洗。收集洗脱液，以旋转蒸发仪蒸干溶剂。残渣以 4 mL 甲醇溶解。

第二组 – 将提取物上样到经甲醇、丙酮、正己烷各 10 mL 依次平衡过的硅胶 SPE 柱 (500 mg) 上。以 10 mL 的丙酮-三乙胺-正己烷 (20:0.5:80) 洗脱。弃去洗脱液。再以 20 mL 丙酮-甲醇 (1:1) 冲洗，收集洗脱液，旋转蒸发仪蒸干溶剂。残渣以 4 mL 甲醇溶解。

标准溶液配制

配制 1 µg/mL 的各农药标准品的甲醇溶液，以甲醇逐级稀释得 0.001-1 µg/mL 的标准混合液。

空白基质残渣中加入混合农药，浓度为 10 ng/g。

LC/MS/MS 仪器

LC/MS/MS 系统包括 Agilent 1100 系列的真空脱气机，二元泵，自动进样器，柱温箱和 Agilent G6410 型三重串联四极杆质谱，离子源是 ESI 源。本研究的目的是建立一种快速灵敏测定水果和蔬菜中农药残留量的分析方法。为了获得良好的色谱分辨率和灵敏度，需要首先优化流动相组成和选择合适的色谱柱。优化结果为：流动相采用水-乙腈-甲酸-甲酸铵体系，色谱柱采用 1.8 µm 粒径填料的 C18 柱。

LC 条件

仪器：	Agilent 1100 HPLC
色谱柱：	ZORBAX Extend C18, 100 mm x 2.1 mm, 1.8 µm (部件号 728700-902)
柱温：	40 °C
流动相：	A = 0.1% 甲酸 +5 mM 甲酸铵水溶液 B= 乙腈
洗脱梯度：	起始 10% B，at 30 min 80% B
流速：	0.2 mL/min
进样量：	5 µL

MS 条件设置

仪器：	Agilent 6410 QQQ（三重串联四极杆系统）
离子源：	ESI 正离子模式
干燥气流速：	10 L/min
雾化器：	50 psig
干燥气温度：	350 °C
V_{cap}:	4000 V
离子扫描范围：	*m/z* 100-550
碰撞电压：	100 V 可调
MRM 离子：	见表 1 和表 2
碰撞能量：	见表 1 和表 2

LC/MS/MS 方法

以 MRM 模式按时间程序进行定量分析。MRM transition 参数见表 1 和表 2。

表 1. 第一组中各农药的 MRM Transition 实验参数

序号	农药	保留时间 (min)	分子量	母离子 (*m/z*)	子离子 (*m/z*)	碰撞能量 (V)
1	噻菌灵	5.018	201	202	175	20
2	噻虫嗪	6.16	291	292	211	5
3	可尼丁	7.83	249	250	169	10
4	氯草敏	8.19	221	222	104	10
5	吡虫啉	8.39	255	256	209	20
6	二甲嘧酚	8.8	209	210	171	20
7	氧化萎锈灵	11.02	267	268	175	10
8	噻虫啉	11.03	252	253	126	20
9	甲基吡恶磷	12.87	324	325	183	10
10	嘧菌腙 E	13.21	254	255	124	20
11	嘧菌腙 Z	13.7	254	255	132	20
12	苯敌草	17.77	317	318	136	20
13	谷硫磷	17.9	318	132	77	15
14	硅氟唑	18.5	293	294	70	15
15	异唑草酮	18.7	359	360	251	15
16	环酯草醚	18.7	318	319	139	20
17	十三吗啉	19.21	297	298	130	15
18	甲氧虫酰肼	20.06	312	313	149	20
19	环虫酰肼	20.57	394	175	141	20
20	苯氧威	20.63	301	302	88	15
21	萘丙胺	21.27	291	292	171	10
22	氟丙嘧草酯	21.55	491	492	331	20
23	氰唑磺菌胺	21.7	324	325	108	10
24	莎稗磷	22.5	367	368	199	10
25	吡唑特	23.5	438	439	173	15
26	吡草酮	24	430	431	105	20
27	环氟菌胺	24.3	412	413	241	20
28	茚虫威	24.37	527	528	150	15
29	氯甲酰草胺	24.78	372	373	299	5
30	Cloquincet-mexyl	24.8	335	336	238	15
31	呋线威	25.7	365	383	195	15
32	乳氟禾草灵	26.3	478	479	344	15
33	三甲苯草酮	26.7	329	330	284	10

表 2. 第二组中各农药的 MRM Transition 实验参数

序号	农药	保留时间 (min)	分子量	母离子 (*m/z*)	子离子 (*m/z*)	碰撞能量 (V)
1	唑嘧磺草胺	9.96	325	326	129	20
2	噻苯隆	11.95	220	221	102	10
3	灭草喹	12.25	311	312	267	20
4	噻吩磺隆	12.89	387	388	167	10
5	双氟磺草胺	13.75	359	360	129	20
6	甲基氯吡脲	14.63	247	248	129	10
7	氯酯磺草胺	16.41	429	430	398	10
8	双氯磺草胺	16.83	405	406	161	20
9	氟磺胺草醚	18.27	438	456	344	10
10	氟胺磺隆	19.29	492	493	264	15
11	氟吡甲禾灵	19.67	361	362	316	15

结果与讨论

MRM transition 条件的优化

对含 1 µg/mL 的两个农药的混合物标准溶液依次进行全扫描模式和子离子扫描模式的检测，获得各个农药的最佳 MRM transition 参数。两种模式的总离子流图 (TIC) 见图 1 和图 2。在全扫描模式的质谱图中，除了 azinphos-methyl，呋线威和氟磺胺草醚的基峰离子是 $[M+NH_4]^+$ 之外，其余农药的基峰离子都是 $[M+H]^+$。选择这些基峰离子作为母离子进行 MRM 模式监测。采用多重采集 (multiple acquisition) 和时间程序模式，可以得到不同农药的个体子离子 MS/MS 图谱。从表 1 和表 2 中可以看出，第一组的 33 种农药和第二组的 11 种农药分别以 10 个和 7 个时间段进行 MRM 模式监测。

图 3 是最小 MRL 浓度水平 (10 ng/mL) 的农药标准混合液的 TIC 谱图。图中所有的农药都显示了卓越的信噪比 (S/N)。以 MRM 模式分析 1 ng/mL 各农药溶液（结果见表 3），按照信噪比 S/N=3 确定各农药的检出限 (LOD)。同时，分析 0.001-1 ng/mL 的各农药标准溶液，绘制定量标准曲线，评价其线性。表 3 数据显示，所有农药的线性相关系数 r^2 都大于 0.998。

为了考察基质对方法的影响，本文选取柑桔、苹果、马铃薯和卷心菜为基质。向各自的提取物中分别加入 10 ng/mL 的农药标准品后进行分析。图 4 和图 5 是柑桔提取物的 MRM 图谱，其他提取物的分析结果见图 6。通过与农药标准混合液的图谱比较，可以看出，基质的成分对农药的检测没有干扰。这表明，MRM 模式具有很高的选择性。

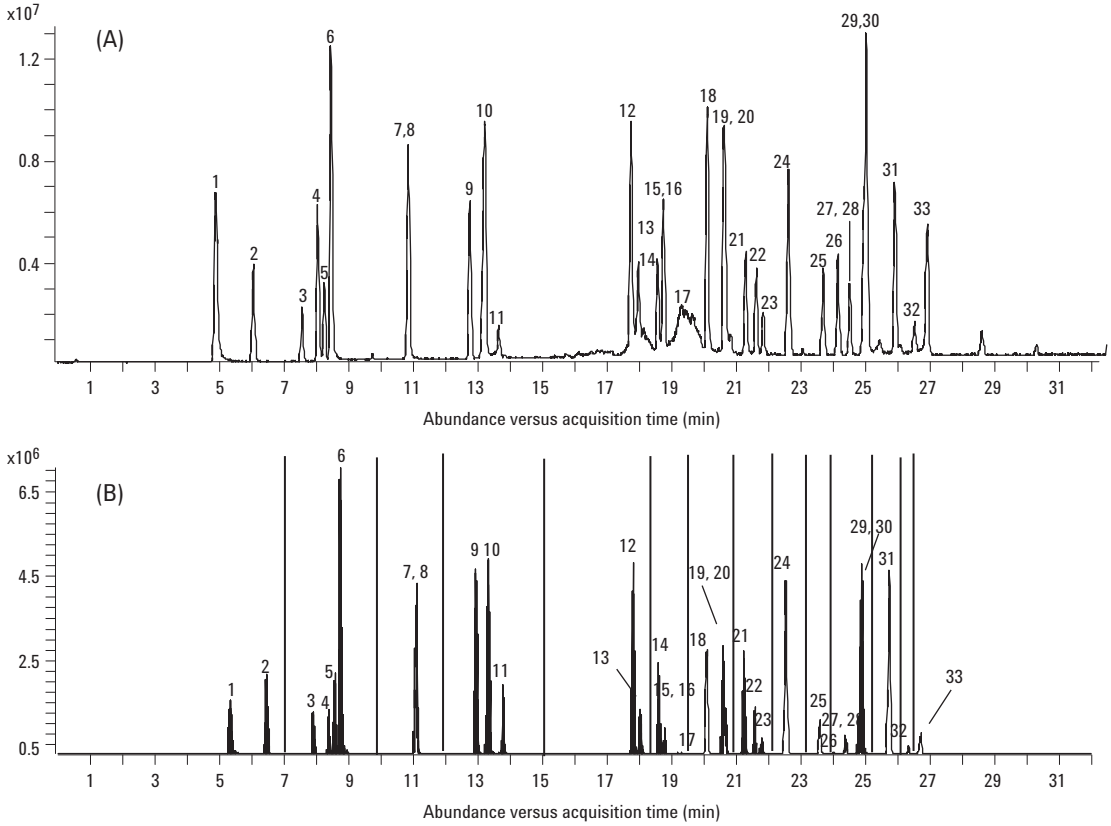


图 1. 33 种农药标准溶液 (1 µg/mL) 的全扫描模式 (A) 和子离子扫描模式 (B) 的 TIC 谱图

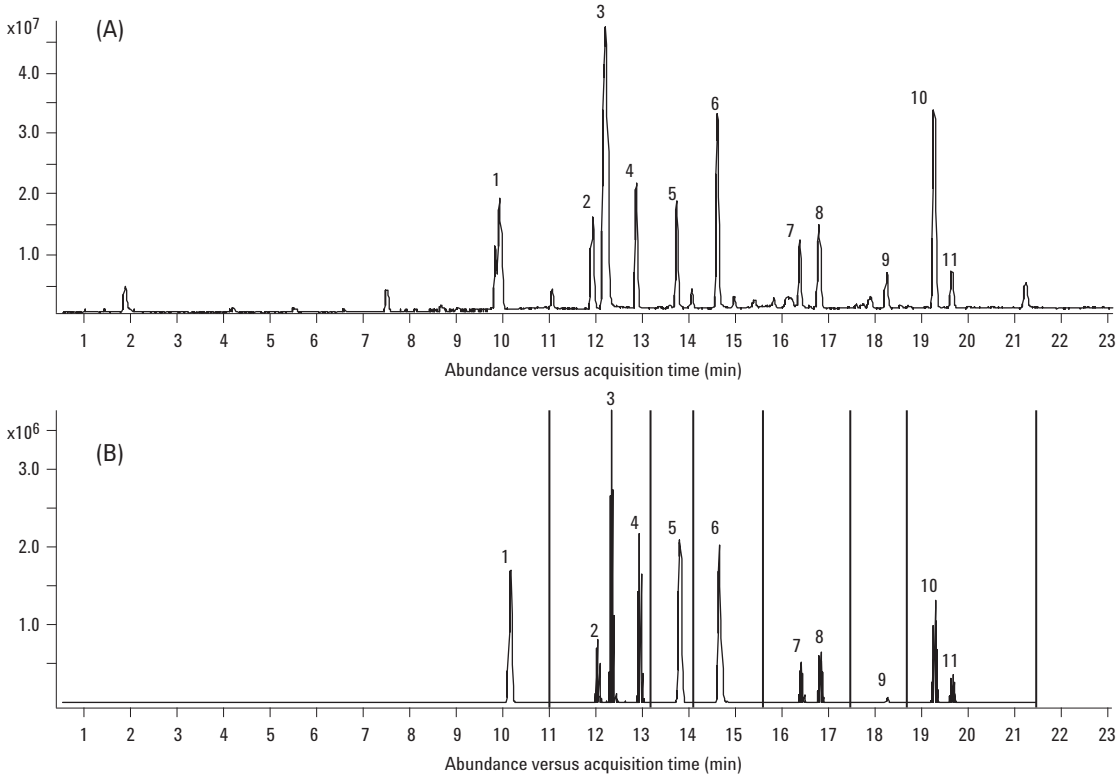


图 2. 11 种农药标准溶液 (1 µg/mL) 的全扫描模式 (A) 和子离子扫描模式 (B) 的 TIC 谱图

此外，本文考察了基质对各农药谱峰强度的影响。通过对比基质样品和标准品的谱图发现，各农药的相对强度在 91 % – 116 % 范围内变动（见表 4）。可以说，基质对农药谱峰强度存在的影响，如离子抑制等，并不大。因此，可直接采用外标法进行定量，不必以基质为空白。表 4 还列出了柑桔提取物中各农药分析的重复性，RSD 为 1.7–5.9 %。

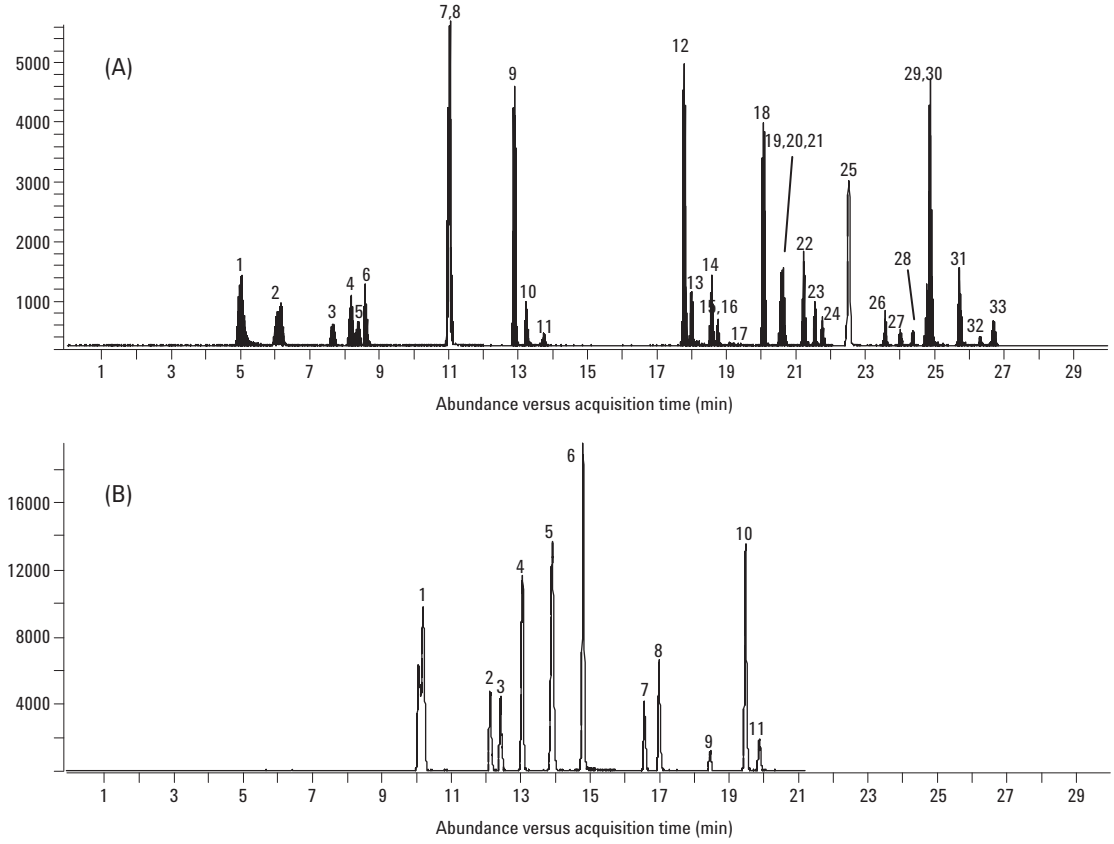


图 3. 10 ng/mL 的 33 种农药标准溶液 (A) 和 11 种农药标准溶液 (B) MRM 模式的 TIC 谱图

表 3. 44 种农药标准溶液的线性和检出限

序号	农药	r^2	检出限 (ng/mL)	序号	农药	r^2	检出限 (ng/mL)
第一组							
1	噻菌灵	0.9999	<0.1	18	甲氧虫酰肼	0.9993	0.55
2	噻虫嗪	0.9992	<0.1	19	环虫酰肼	0.9992	0.49
3	可尼丁	0.9999	<0.1	20	苯氧威	0.9988	<0.1
4	氯草敏	0.9993	<0.1	21	萘丙胺	0.9993	<0.1
5	吡虫啉	0.9995	<0.1	22	氟丙嘧草酯	0.9994	<0.1
6	二甲嘧酚	0.9989	<0.1	23	氰唑磺菌胺	0.9987	0.43
7	氧化萎锈灵	0.9993	<0.1	24	莎稗磷	0.9991	<0.1
8	噻虫啉	0.9991	<0.1	25	吡唑特	0.9990	0.51
9	甲基吡恶磷	0.9988	<0.1	26	吡草酮	0.9982	0.49
10	嘧菌腙 E	0.9993	0.34	27	环氟菌胺	0.9993	0.43
11	嘧菌腙 Z	0.9995	0.53	28	茚虫威	0.9993	0.61
12	苯敌草	0.9993	<0.1	29	氯甲酰草胺	0.9991	1.04
13	谷硫磷	0.9997	<0.1	30	Quinclorac-methyl	0.9988	0.63
14	硅氟唑	0.9992	<0.1	31	呋线威	0.9987	<0.1
15	异唑草酮	0.9991	<0.1	32	乳氟禾草灵	0.9987	1.10
16	环酯草醚	0.9988	<0.1	33	三甲苯草酮	0.9992	0.52
17	十三吗啉	0.9991	1.21				
第二组							
1	唑嘧磺草胺	0.9996	<0.1	7	氯酯磺草胺	0.9987	<0.1
2	噻苯隆	0.9994	<0.1	8	双氯磺草胺	0.9989	<0.1
3	灭草喹	0.9992	<0.1	9	氟磺胺草醚	0.9989	0.32
4	噻吩磺隆	0.9989	<0.1	10	氟磺胺草醚	0.9992	<0.1
5	双氟磺草胺	0.9969	<0.1	11	氟吡甲禾灵	0.9995	0.19
6	甲基氯吡脲	0.9977	<0.1				

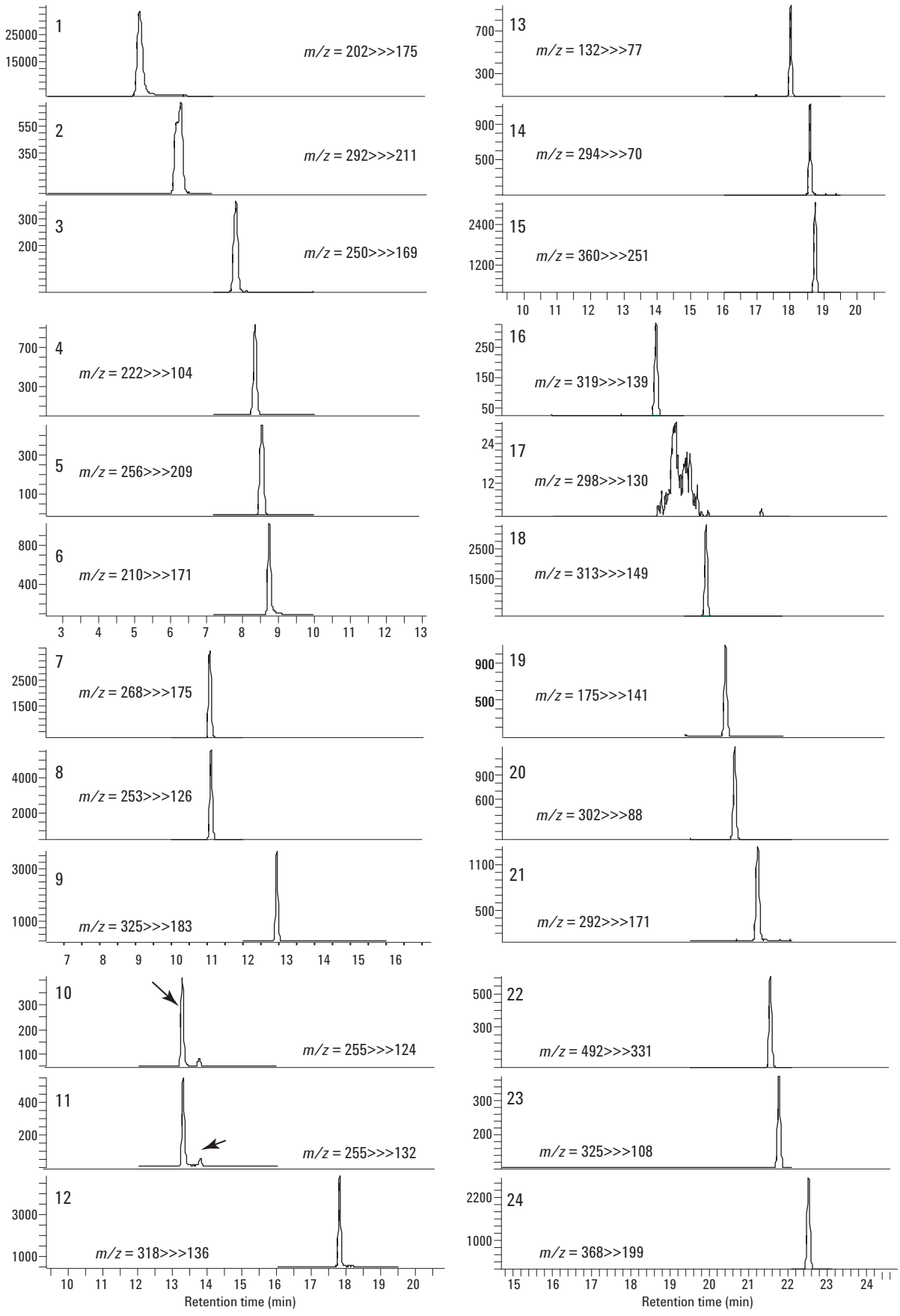


图 4. 33 种农药（加标 10 ng/mL）在柑桔提取物基质的 MRM 模式的 TIC 谱图

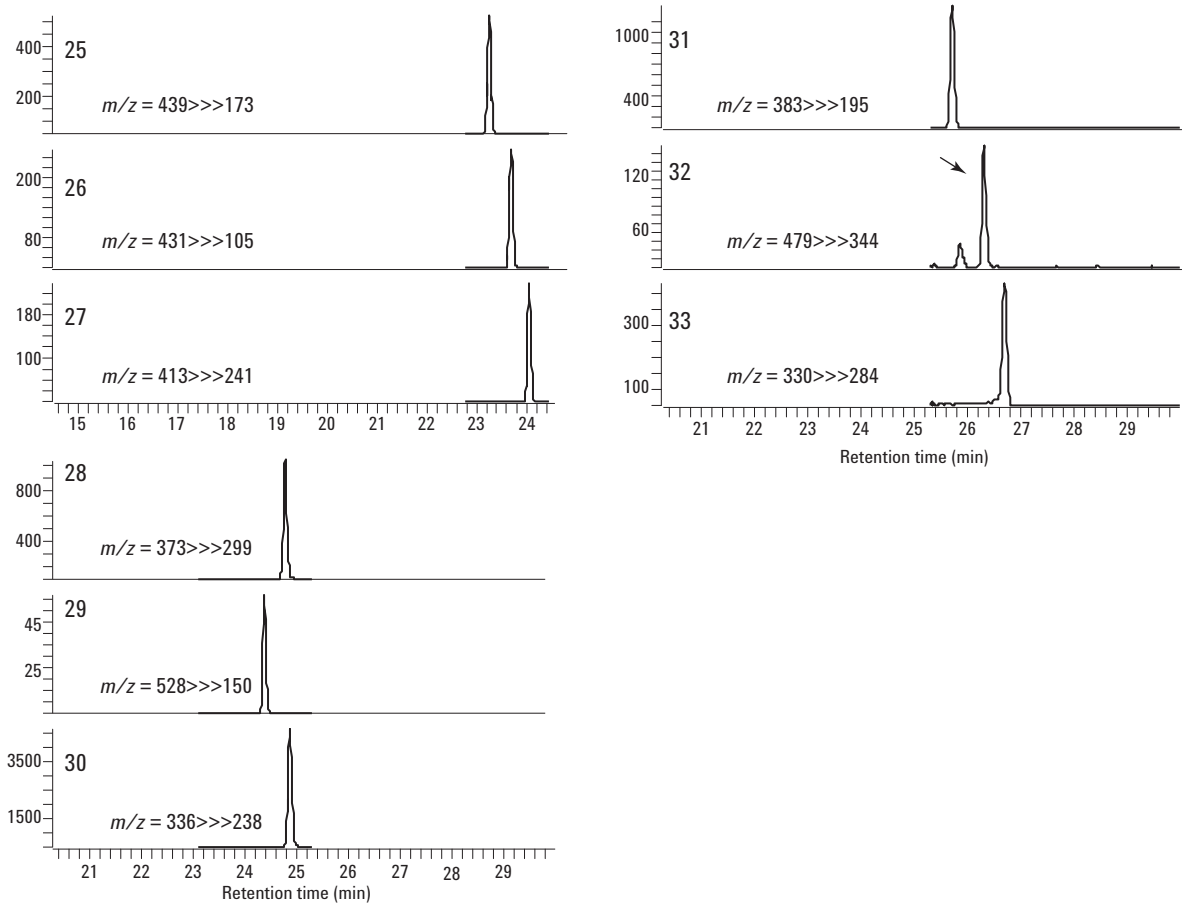


图 4. 33 种农药（加标 10 ng/mL）在柑桔提取物基质的 MRM 模式的 TIC 谱图

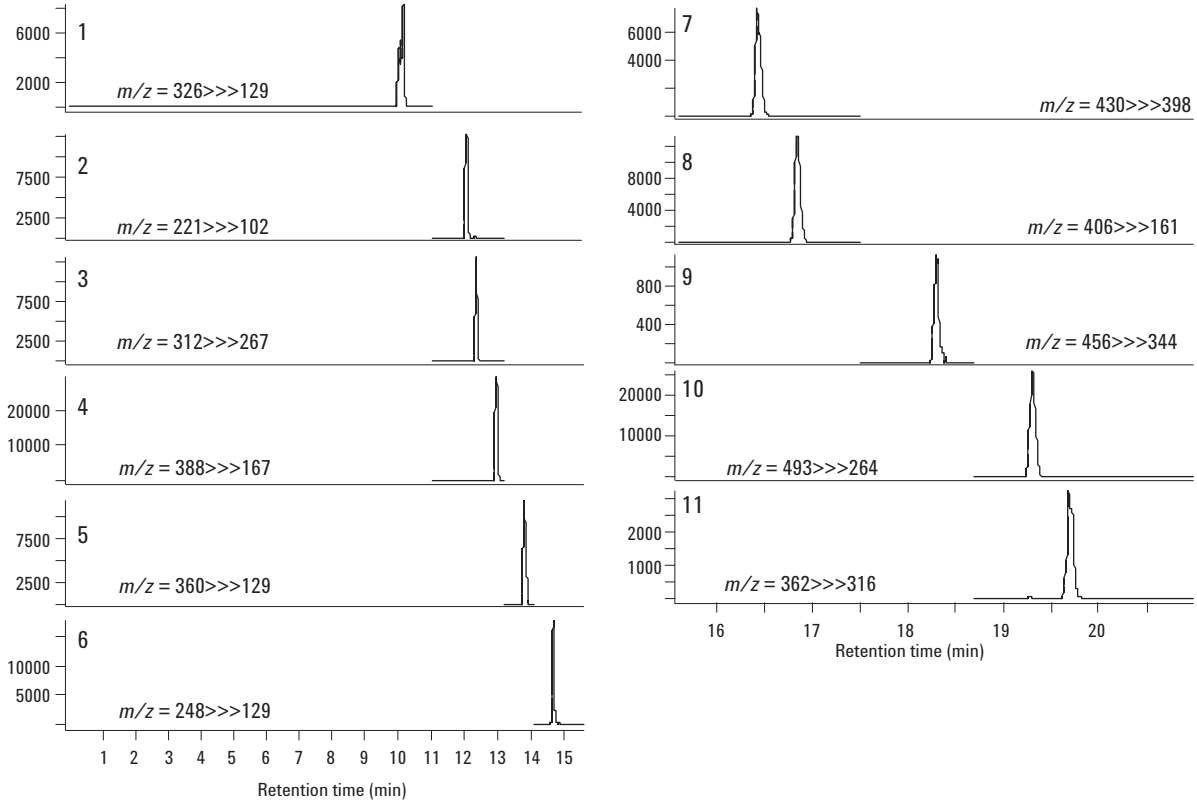


图 5. 11 种农药（加标 10 ng/mL）在柑桔提取物基质的 MRM 模式的 TIC 谱图

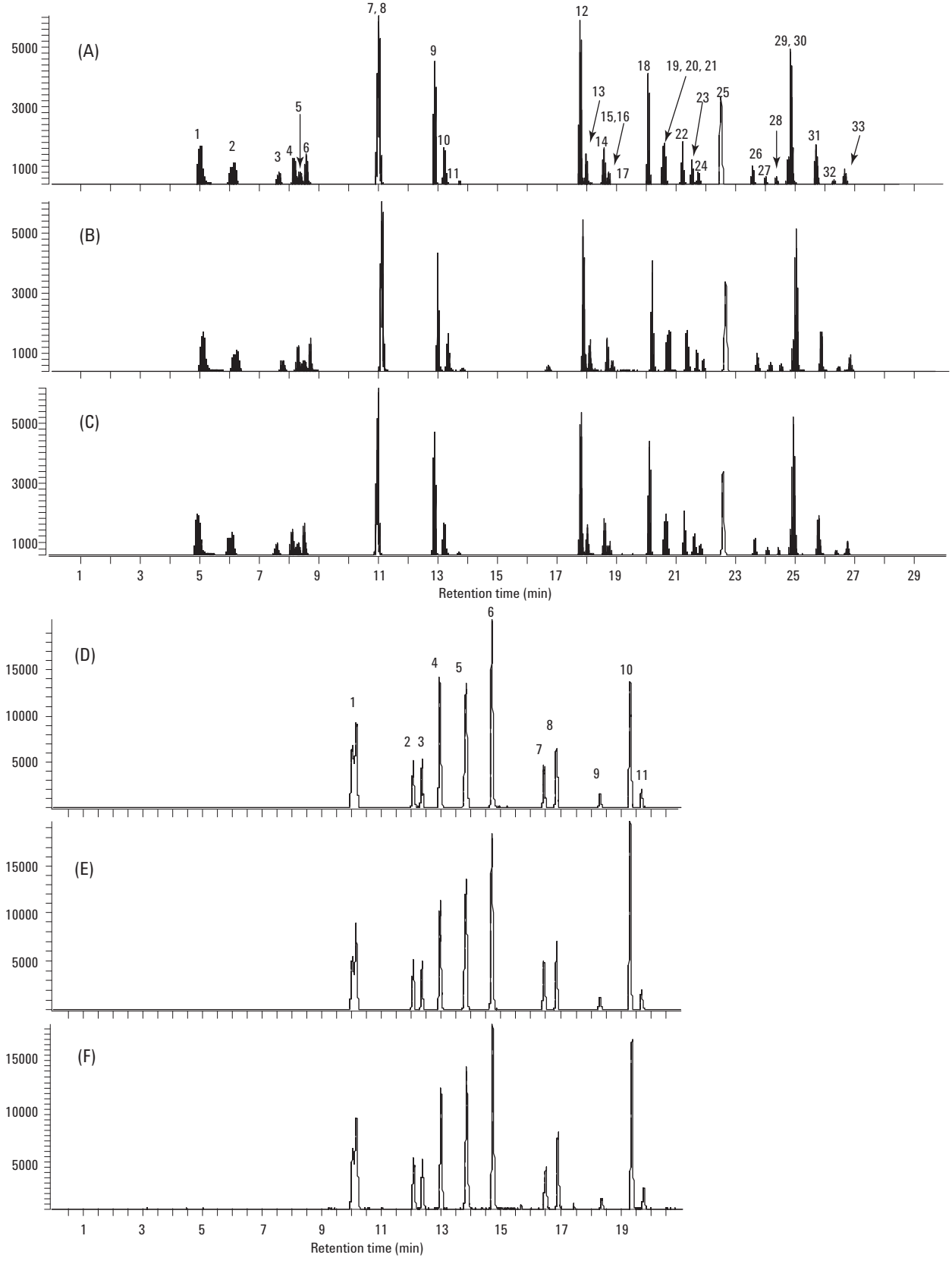


图 6. 分别以苹果、马铃薯和卷心菜提取物为基质的 33 种农药 (A，B，C) 和另外 11 种农药 (D，E，F) MRM 模式的 TIC 谱图

表 4. 食品提取物中各农药的相对强度

序号	农药	相对强度 (%)				
第一组		柑桔*	卷心菜	苹果	马铃薯	
1	噻菌灵	105	(3.2)	101	116	107
2	噻虫嗪	103	(2.1)	98	104	105
3	可尼丁	106	(2.9)	101	109	112
4	氯草敏	105	(3.3)	106	101	109
5	吡虫啉	102	(1.7)	97	102	104
6	二甲嘧酚	103	(4.6)	107	103	108
7	氧化萎锈灵	106	(3.7)	102	104	106
8	噻虫啉	104	(3.1)	104	106	108
9	甲基吡恶磷	93	(4.6)	90	94	84
10, 11	嘧菌胺(E,Z)	116	(4.1)	109	102	112
12	苯敌草	96	(5.3)	99	100	104
13	谷硫磷	90	(2.1)	103	104	110
14	硅氟唑	104	(4.4)	102	106	110
15	异唑草酮	102	(2.7)	104	108	103
16	环酯草醚	97	(4.1)	103	104	93
17	十三吗啉	92	(3.1)	99	104	97
18	甲氧虫酰肼	96	(2.8)	102	103	101
19	环虫酰肼	97	(3.4)	96	100	111
20	苯氧威	99	(2.1)	105	102	101
21	萘丙胺	91	(4.3)	97	98	103
22	氟丙嘧草酯	102	(2.6)	114	104	114
23	氰唑磺菌胺	93	(3.5)	92	87	95
24	莎稗磷	102	(2.7)	105	103	107
25	吡唑特	103	(4.7)	101	103	97
26	吡草酮	108	(5.2)	111	98	108
27	环氟菌胺	108	(3.4)	110	105	101
29	茚虫威	109	(2.6)	105	100	111
28	氯甲酰草胺	105	(4.2)	107	106	104
30	Cuinclorac-methyl	105	(4.1)	104	104	105
31	呋线威	102	(1.8)	104	105	101
32	乳氟禾草灵	100	(3.7)	109	105	112
33	三甲苯草酮	101	(3.3)	111	102	117
第二组						
1	唑嘧磺草胺	97	(2.6)	110	156	104
2	噻苯隆	104	(4.8)	101	102	113
3	灭草喹	105	(3.1)	100	100	101
4	噻吩磺隆	106	(2.9)	112	116	113
5	双氟磺草胺	99	(3.1)	106	103	109
6	甲基氯吡脲	101	(4.4)	103	100	108
7	氯酯磺草胺	94	(3.9)	104	97	142
8	双氯磺草胺	95	(3.3)	102	96	107
9	氟磺胺草醚	99	(5.9)	101	95	109
10	氟胺磺隆	97	(4.1)	111	104	108
11	氟吡甲禾灵	108	(4.8)	114	110	124

*( )：RSD，% 同一天内 5 次重复实验的计算值

结论

本文所建立的基于 LC/MS/MS 的多残留物分析方法具有很高的灵敏度和选择性，可用于不同食物样品中 44 种农药残留的检测。本方法的另一个优点在于，本文所研究的食品均未观察到对待测农药的离子抑制作用。因此，本方法不必配制以基质为本底的标准溶液。大大简化了分析不同产地食品时的样品准备过程。

如需了解本应用的更多细节，请联系 masahiko_takino@agilent.com。

Agilent 6410 型三重串联四极杆质谱分析罗非鱼中的硝基呋喃代谢物

应用

食品安全

作者

梁锋、胡培斌、李平
安捷伦科技有限公司
中国北京

摘要

本文使用 Agilent 6410 型三重串联四极杆质谱对肉类和肉制品中的禁用物质硝基呋喃类抗生素进行 LC/MS/MS 分析，所建立的方法对选用的四个化合物具有很高的灵敏度，均达到 0.01 ppb (10 ppt)。研究按照欧盟的分析方法指标认证标准，建立了 0.1 ppb~10 ppb 浓度范围的标准定量曲线。以罗非鱼提取物为研究对象，考察 LC/MS/MS 技术用于水产品分析的性能。

引言

硝基呋喃类药物是一种革兰氏阳性和阴性菌的抗生素，价格低廉，用于治疗牲畜和鱼类的肠道和皮肤感染。此类药物因其母体及其代谢物都有致癌作用，因此在全世界范围内被禁止使用。但是，2005 年食品与饲料快速警报系统的年报 [1] 显示，在很多的食物样品中仍检测到了这类物质的存在。它们所带来的食品安全问题依旧是需要关注的。呋喃唑酮、呋喃它酮、呋喃妥英和呋喃西林的代谢迅速，且代谢物都与肌肉组织结合紧密，因此，需要在动物源的样品中检测这些药物的代谢产物。

欧盟 (EU) 制订的动物及动物制品中的兽药检测和认证标准 [2] 已被世界上的大部分国家和地区所接受。该标准要求分离技术和光谱测定技术进行联用。对于禁用物质如硝基呋喃类化合物，该标准不设定残留量上限 (MRL)，每个代谢物的最低性能极限要求 (MRPL) 设为 1 µg/kg [3]。能够满足这一标准的只有 LC/MS 技术，并且也有多篇相关的文献报道 [4-6]。但是，目前此类研究应用最多的是三重串联四极杆质谱技术。本文将首次采用新型安捷伦三重串联四极杆 LC/MS 系统进行这些代谢物的分析。

实验部分

化学品

硝基呋喃代谢物的衍生物对照品以及样品制备中使用的化学药品均来自一家食品生产公司。乙腈 (HPLC 级纯）和甲酸 (试剂级）均来自 Merck 公司 (Darmstadt, 德国)。

样品制备

将 2 g 罗非鱼置入 15 mL 0.125 M 的盐酸中，混匀。加入 50 µL 的 50 mM 硝基苯乙醛 (2-NBA) 的 DMSO 溶液，震荡后将溶液在 37 °C 条件下加热 16 小时。然后以 NaOH 和 K_2HPO_4 中和至 pH ~ 7。中和后的衍生化样品以乙酸乙酯提取，浓缩至干，再以 100 µL

的起始液相色谱流动相溶解。将四种代谢物加入 0.125 M 的盐酸中，以上述方法进行衍生化和提取，得标准样品用于定量曲线的测定。

定量

MRM 参数表中的一级 transition 参数用于定量分析，二级 transition 用作确认离子以根据确认标准进行确认。定量结果采用 MassHunter 定量分析软件处理。

LC/MS/MS 方法

LC 条件

仪器：	Agilent 1100 LC
色谱柱：	C18, 2.1 mm x 150 mm, 3 µm
柱温：	40 °C
流动相：	A = 0.1% 甲酸水溶液
	B = 乙腈
洗脱梯度：	起始 22% B
	6 min 99% B
	9 min 99% B
流速：	0.3 mL/min
进样量：	50 µL

MS 条件

仪器：	Agilent 6410 型 LC/MS 三重串联四极杆系统
离子化方式：	ESI 正离子模式
干燥气流速：	10 L/min
雾化器：	35 psig
干燥气温度：	350 °C
V_{cap}：	5000 V

结果与讨论

考虑到四个代谢物，Aminohydantoin (AH)、3-amino-5-morpolinomethyl-2- oxazolidinone (AMOZ)，3-amino-2-oxazolidinone (AOZ) 和氨基脲 (SC) 的衍生化和提取都必须满足 1 ppb 的检测限，仪器的灵敏度是该方法中重要的性能参数。本文分析了 0.1 ppb 的各代谢物的 2-NBA 衍生物，见图 1。图中列出了各代谢物的衍生物的结构，每个信噪比都大于 3。本分析方法的另一个重要指标是线性。图 2 是每个代谢物的 10 ppt 到 10 ppb 浓度范围的标准曲线。

含硝基呋喃类药物的鱼的处理一直是食品安全和欧盟成员国进口的难题。为了测试安捷伦三重串联四极杆 LC/MS 在该检测中的应用，本文将四种代谢物注入罗非鱼中，经水解，衍生化和提取后进行分析。图 3 是 500 ppt 罗非鱼提取物的图谱。由图可见，所得信号仅为 MRPL 的一半。除了满足灵敏度要求外，本研究还必须达到认证标准，要求保留时间与对照品一致，并且定性离子的相对强度比在规定的偏差范围内。偏差范围的设定通过分析对照品，根据其强度比的增减获得。范围从 20% 到 50%，前者对应于相对强度比大于 0.5 % 的离子，相对强度比低于 0.1% 的离子则适用于后者。

多反应监测模式参数

化合物	Transition	驻留时间 (ms)	碰撞电压 (V)	碰撞能量 (V)	MS2 分辨率
AMOZ	335.1 → 291.4	60	100	5	Unit
	335.1 → 262.4	60	100	5	Unit
SC	209.1 → 192.3	60	100	5	Unit
	209.1 → 166.3	60	100	5	Unit
AH	249.1 → 134.2	60	100	5	Unit
	249.1 → 104.2	60	100	5	Unit
AOZ	236.0 → 134.1	60	100	5	Unit
	236.0 → 104.1	60	100	5	Unit

表 1 是加入代谢物后经衍生、提取的罗非鱼样品的分析结果。以加入的代谢物为校准物，通过定量标准曲线得到最终浓度。表中数据均为 MassHunter 软件处理后的结果，蓝色 (偏低) 和红色 (偏高) 的加亮区为异常点。结果显示，空白样品中有一个峰的保留时间与 AMOZ 的保留时间在允许的偏差范围内，而定性离子比率偏低。空白样品中的另两个可疑峰的保留时间均低于 AOZ 和 SC 的标定保留时间。而 0.5 ppb 浓度下 AH 的定性离子比率低于偏差极限设定值的 35%。

结论

本研究表明，Agilent 6410 型 LC/MS 三重串联四极杆系统可高效、灵敏地分析鱼体中的硝基呋喃类代谢物，其系统性能完全满足欧盟委员会的要求。同时，该系统配置了先进的定量计算软件，能够按照欧盟委员会的规定，计算验证指标并提供相关报告。

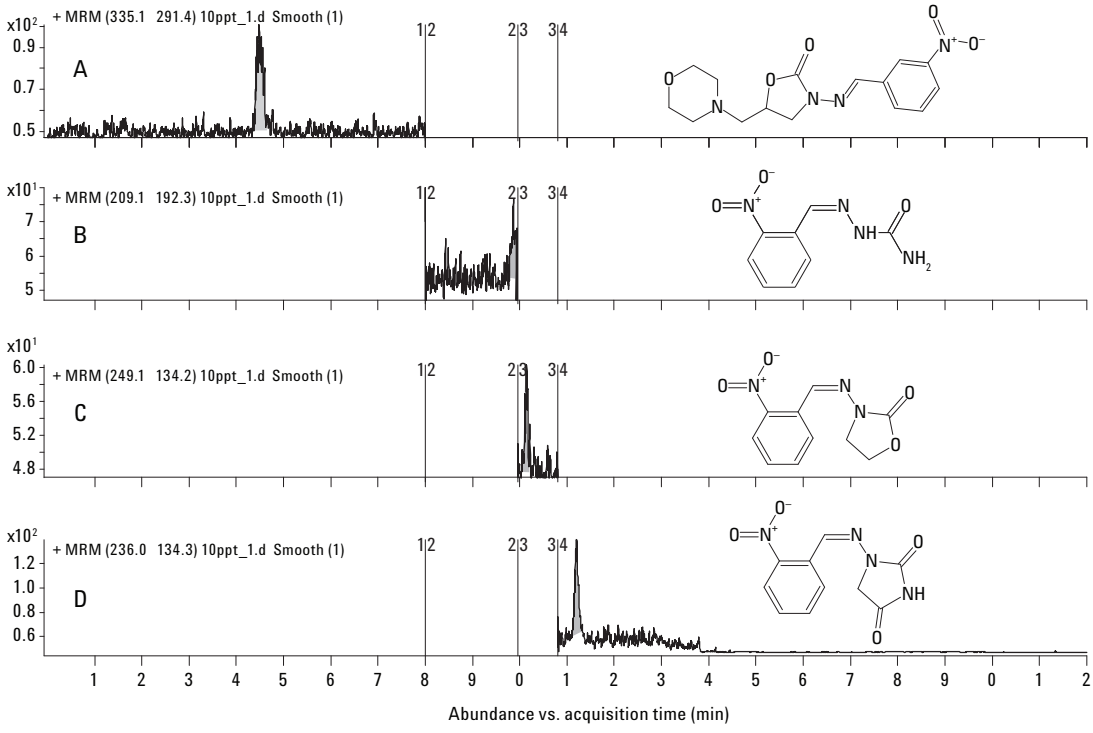


图 1. 含量为 10 ppt 的各衍生化代谢物 MRM 定量离子图谱 A) 2-NBA AMOZ, B) 2-NBA SC, C) 2-NBA AH 和 D) 2-NBA-AOZ

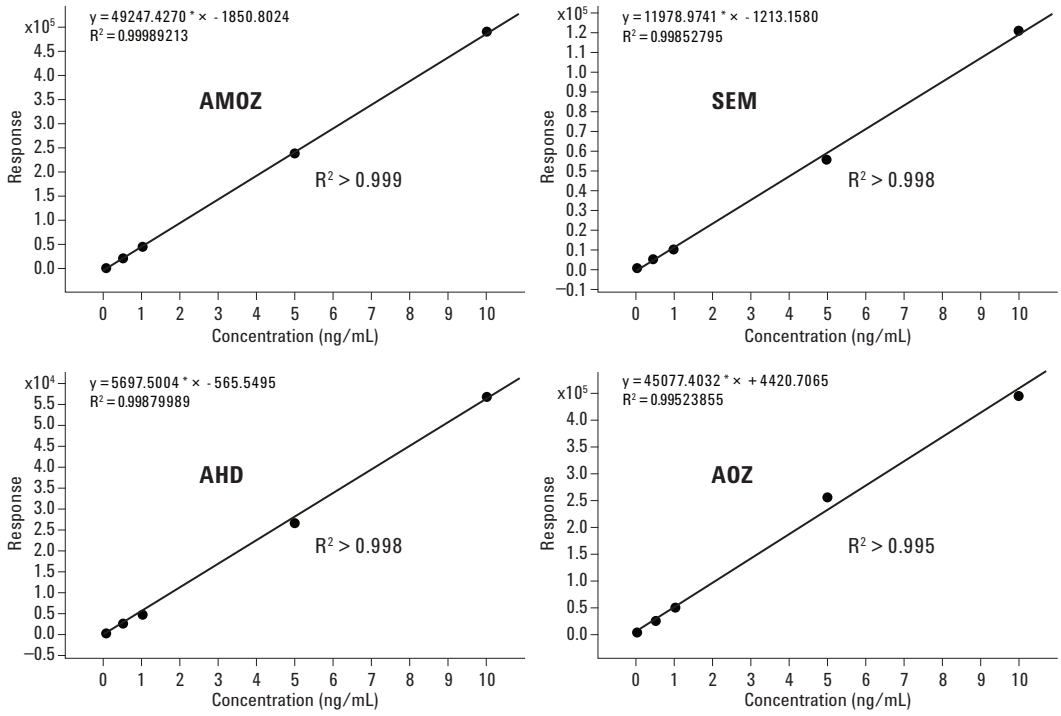


图 2. 硝基呋喃类代谢物的定量标准曲线，线性范围 10 ppt – 10 ppb

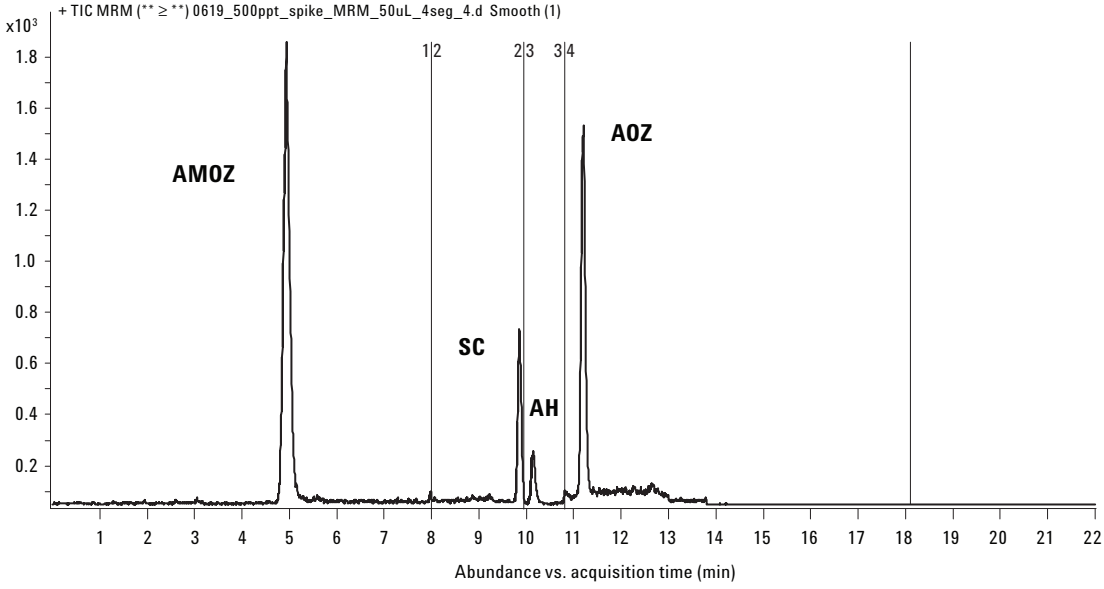


图 3. 加标罗非鱼样品提取物，每种代谢物 500 ppt

表 1. 罗非鱼样品的自校正分析 请注意确认离子强度比和保留时间

		AH	确认离子		AMOZ	确认离子		AOZ	确认离子		SC	确认离子
名称	保留时间	最终浓度	比值	保留时间	最终浓度	比值	保留时间	最终浓度	比值	保留时间	最终浓度	比值
硝基呋喃空白		0.00		2.72	0.02	8.70	8.71	0.00		7.94	0.00	
硝基呋喃 0.5 ppb	8.66	0.54	6.07	2.62	0.51	17.44	9.19	0.37	7.99	8.44	0.50	65.32
硝基呋喃 1 ppb	8.66	1.07	15.83	2.64	0.92	20.42	9.19	1.06	10.19	8.44	1.05	70.85
硝基呋喃 3 ppb	8.67	3.42	13.78	2.65	3.41	18.67	9.20	3.18	9.51	8.44	2.89	67.47
硝基呋喃 5 ppb	8.66	5.71	14.24	2.66	4.66	19.28	9.19	4.89	8.61	8.44	5.05	69.06

参考文献

1. The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) Annual Report 2005, p 29, http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm.
2. E. Commission, 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (Text with EEA relevance) (notified under document number C [2002] 3044) 2002.
3. E. Commission, 2003/181/EC: Commission Decision of 13 March 2003 amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin (Text with EEA relevance) (notified under document number C[2003] 764) 2003.
4. B. Wüst, C. Sauber, and H. J. A. van Rhijn, "Quantitation of Nitrofuran Metabolites in Shrimp and Poultry by LC/MS/MS Using the Agilent LC/MSD Trap XCT," Agilent Technologies publication, 5989-0738EN: March 25, 2004.
5. M. Takino, "Determination of the Metabolites of Antibacterial Drugs in Chicken Tissue by Liquid Chromatography Electrospray Ion ization Mass Spectrometry (LC-ESI-MS)," Agilent Technologies publication, 5988-8903EN: March 19, 2003.
6. F. Mandel, B. Wüst, and C. Sauber, "High Resolution Quantitative Analysis of Nitrofuran Derivatives in Poultry and Shrimp Using a New oa-ESI-TOF," Agilent Technologies publication, 5989-1302EN: July 9, 2004.

食品中孔雀石绿和隐性孔雀石绿的 LC/MS/MS 定量分析

应用

食品安全

作者

梁锋，胡培斌，李平
安捷伦科技公司（中国）

摘要

本研究采用新型的 Agilent 6410 LC/MS 三重串联四极质谱分析系统对鱼中的孔雀石绿和隐性孔雀石绿残留量进行了快速和准确的定量分析。采用电喷雾正电离模式和多反应监测 (MRM)，实现了两种成分的定性和定量分析，并且避免了繁琐的传统 PbO_2 氧化预处理过程。本方法的定量限为 0.01 µg/Kg，可以很容易达到日本和欧盟进口该类产品 2 µg/Kg 的残留限量检测要求。

引言

孔雀石绿 (MG) 为一种外观似金属晶体。它易溶入水，形成蓝绿色溶液。它是一种有毒的化学品，最初用做染料，后来发现它在防治鱼和鱼卵的寄生虫、真菌感染和细菌感染方面非常有效[1]。孔雀石绿会快速转化为隐性孔雀石绿 (LMG) 并且沉积在鱼的脂肪组织里，孔雀石绿本身的残留实际上很少。

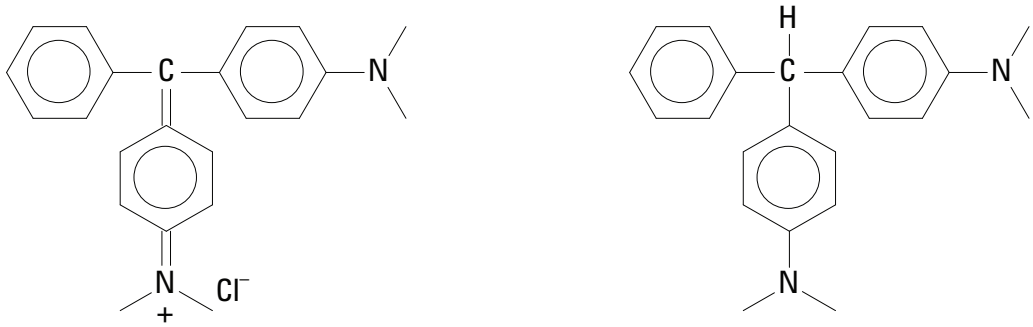
人们食用了受孔雀石绿污染的鱼后会对身体健康造成极大危害。比如，它可使肝脏形成肿瘤，怀疑它具有致癌性[1]。美国、日本、中国、欧盟，以及世界上的其他许多国家已经禁止在渔业上使用孔雀石绿。但是，正如欧洲食品和饲料快速预警系统显示的那样，由于孔雀石绿的廉价和抗真菌的高效性，它仍在被非法使用[2]。

HPLC-UV 目前已被用于分析孔雀石绿和隐性孔雀石绿。图 1 是这两种化合物的结构。双键的氢化导致隐性孔雀石绿结构中共轭作用下降，与孔雀石绿相比，它的颜色变化明显。为了得到两者的总量，常规方法是采用 PbO_2 柱后氧化，使隐性孔雀石绿转变为孔雀石绿[3]。最近，LC/MS 已用于两者的分析，不需要采用柱后氧化反应就可以得到两者的定量结果，并且可以满足欧盟的认证标准要求。本研究提出了一种同时测定孔雀石绿和隐性孔雀石绿的简便灵敏的方法[4、5]，其定量限为 0.01 µg/Kg，可以很容易满足日本和欧盟进口该类产品的残留限量检测要求[6]。

实验部分

试剂

孔雀石绿	Sigma-Aldrich, CAS 569-64-2, USA；
隐性孔雀石绿	Dr. Ehreastorfer's lab, D-86199, 99% 纯, Augsburg, 德国；
乙腈	CAS 75-05-8; Burdick & Jackson; Morristown, 新泽西, 美国；
醋酸	Merck, 德国；
醋酸铵	CAS 631-61-8, Acros Organics, Morris Plains, 新泽西, 美国



孔雀石绿　　隐性孔雀石绿

图 1. 孔雀石绿及隐性孔雀石绿的分子结构

标准溶液

配制浓度为 100 µg/mL 的孔雀石绿和隐性孔雀石绿乙腈储备液，并于 –18 ℃ 避光保存。采用乙腈：水 (50：50) 稀释储备液为系列标准液，浓度分别为 10，50，100，500，1000，5000 和 10,000 fg/µL。

样品制备

在 5 g 罗非鱼组织中加入 1 mL (0.25 mg/mL) 羟胺溶液、2 mL1 mol/L 甲基苯磺酸溶液、2 mL0.1 mol/L 醋酸铵缓冲液 (pH 4.5) 和 40 mL 乙腈。匀浆两分钟后，小心倾去上清液，于沉淀物中加入 20 mL 乙腈。过滤，将滤液并入上清液，然后向合并的乙腈提取液中加入 35 mL 水和 30 mL 二氯甲烷，振摇，收集二氯甲烷层。再用 20 mL 二氯甲烷重复提取一次，取二氯甲烷层与前次二氯甲烷提取液合并。采用氮气小心吹干二氯甲烷，残渣用 100 µL 乙腈复溶解。

仪器

液相色谱：	1100 LC；	
色谱柱：	C18, 2.1 x 150 mm, 5 µm；	
柱温：	40 °C；	
流动相：	A – 10 mmol/L 醋酸铵溶液 (醋酸调 pH 值为 4.5)，B – 乙腈；	
流量：	0.3 mL/min；	
梯度程序：	时间	% B
	0	30
	1	50
	2	95
	8	95
	8.01	30
	13	30
进样量：	10 µL	
质谱：	Agilent 6410 LC/MS 三重串联四极杆系统	
离子源：	ESI(+)	
毛细管电压：	4000 V	
雾化器压力：	35 psi	
干燥气流量：	11 L/min	
干燥气温度：	350 °C	
锥孔体电压：	15 V	
OctDc1 (Skim2)	45 V	
Oct RF	500 V	
Q1 分辨率	Unit	
Q3 分辨率	Unit	
碰撞气	高纯氮气	

MRM 的参数见表 1。

表 1. MRM 方法参数

时间	化合物	母离子	子离子	驻留时间 (ms)	碰撞电压 (V)	碰撞能量 (V)
0	MG	329.3	313.3	40	100	40
		329.3	208.2	40	100	40
7	LMG	331.3	316.3	40	100	30
		331.3	239.2	40	100	30

结果与讨论

为了得到最灵敏的检测结果，碰撞电压的优化非常重要。图 2 显示示了碰撞电压分别为 70 V、90 V 和 100 V 时两个目标化合物的 EICs 图谱。结果显示三种电压对 $[M+H]^+$ 离子响应强度无明显影响，本实验选择 100 V。

另外，对于 MS/MS，碰撞能量的优化也至关重要。图 3 展示了碰撞能量分别为 (a) 20 V、(b) 30 V 和 (c) 40 V 时的 MS/MS 图谱。由于结构上的差异，每种化合物对电压优化的要求是不同的。对于孔雀石绿，最佳电压是 40 V，*m/z* 313 离子是丢失一个中性甲烷分子形成的。*m/z* 208 离子是失去一个中性 N,N-二甲基苯胺后形成的。对于隐性孔雀石绿，最佳电压是 30 V，*m/z* 316 离子是丢失一个甲基形成的。*m/z* 239 离子是继续失去一个苯基后形成的，也可以讲是隐性孔雀石绿失去一个中性甲苯并重排形成的。

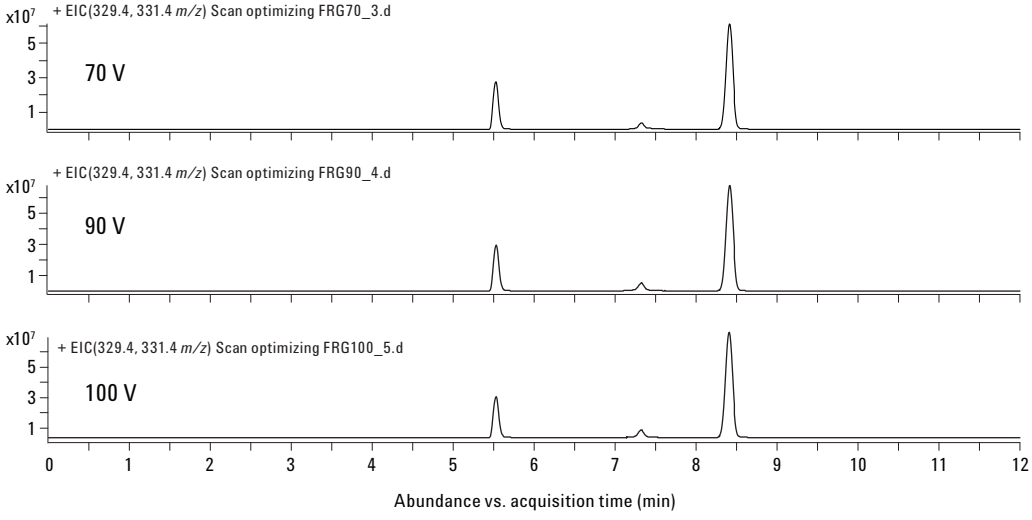


图 2. 碰撞电压分别为 70 V、90 V 和 100 V 时孔雀石绿和隐性孔雀石绿的 EICs 谱图

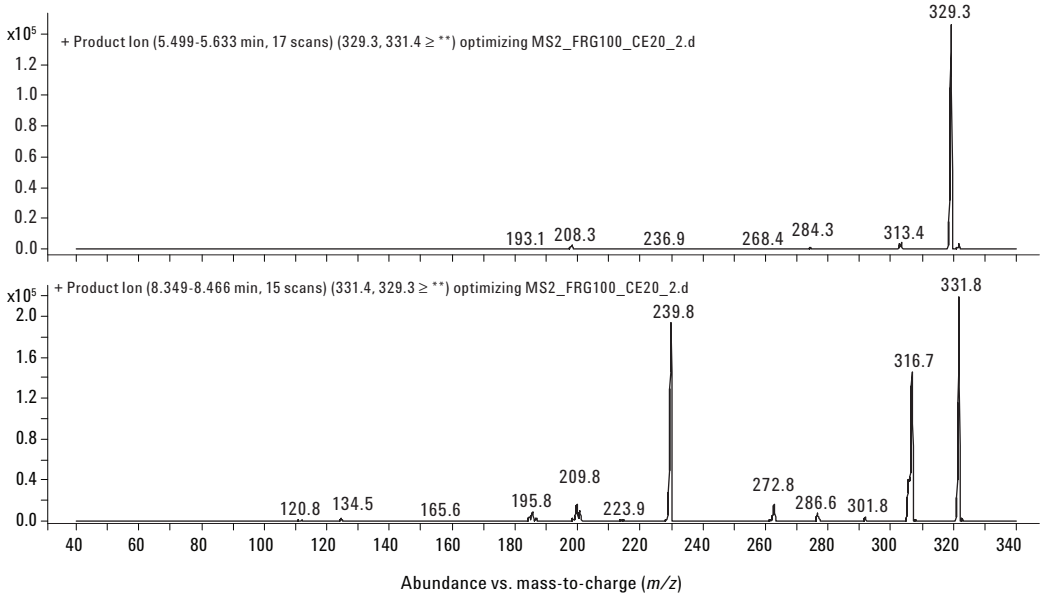


图 3a. 碰撞电压为 20 V 时孔雀石绿和隐性孔雀石绿的 MS/MS 谱图

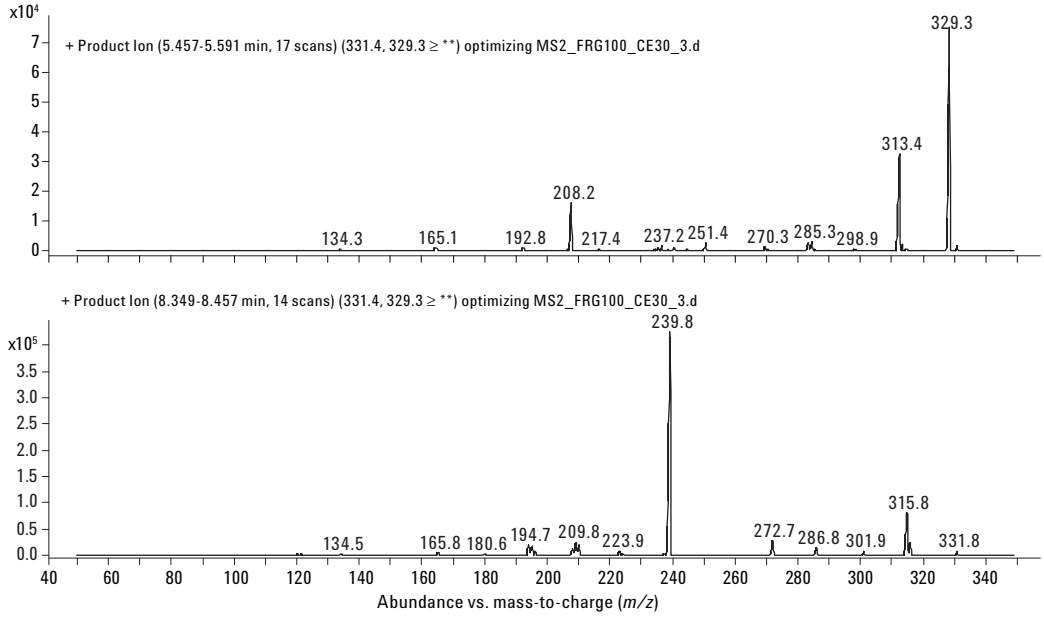


图 3b. 碰撞电压为 30 V 时孔雀石绿和隐性孔雀石绿的 MS/MS 谱图

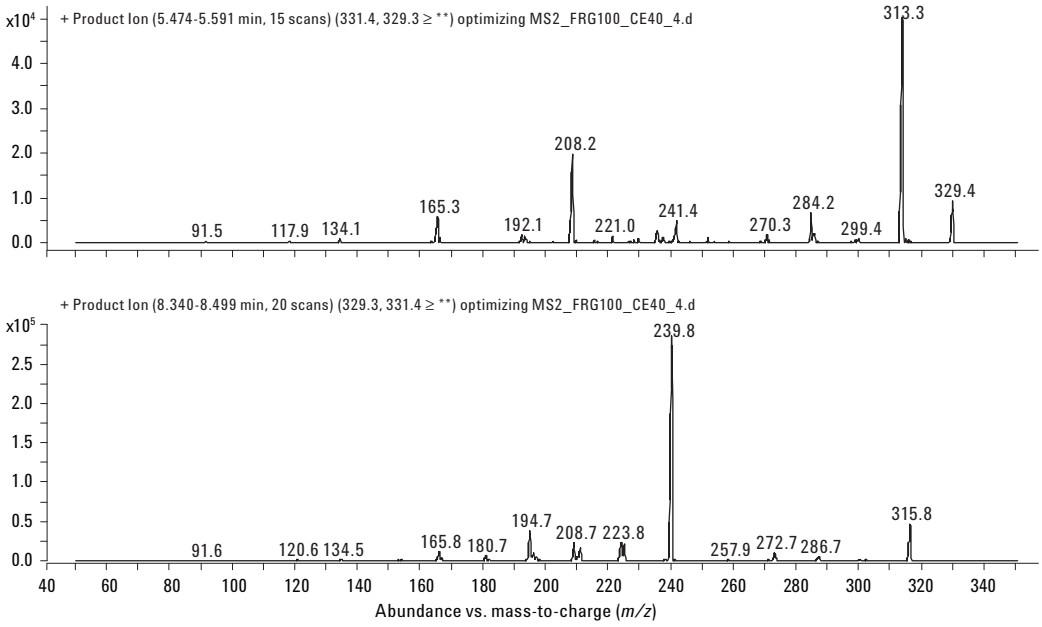


图 3c. 碰撞电压为 40 V 时孔雀石绿和隐性孔雀石绿的 MS/MS 谱图

图 4 为孔雀石绿 (4a) 和隐性孔雀石绿 (4b) 的校正曲线。校正溶液浓度从 10 到 10,000 fg/µL。两化合物的线性范围均为 100 – 100,000 fg，相关系数 R^2 均大于 0.999（原点忽略并且未做加权处理）。图 5 展示了空白样品 (5a) 和添加两者均为 10 ppt 浓度样品的提取物 (5b) 的 MS/MS 图谱，考察并验证了仪器的灵敏度。分别将 100 ppt 孔雀石绿和隐性孔雀石绿的加入罗非鱼样品基质用来进行方法学验证。提取和清洗后的 MRM 结果见图 6。孔雀石绿和隐性孔雀石绿的回收率分别是 48 % 和 23 %，选择 100 fg/µL 浓度的孔雀石绿和隐性孔雀石绿的乙腈-醋酸铵 (50：50) 溶液进行重现性实验研究，计算八次

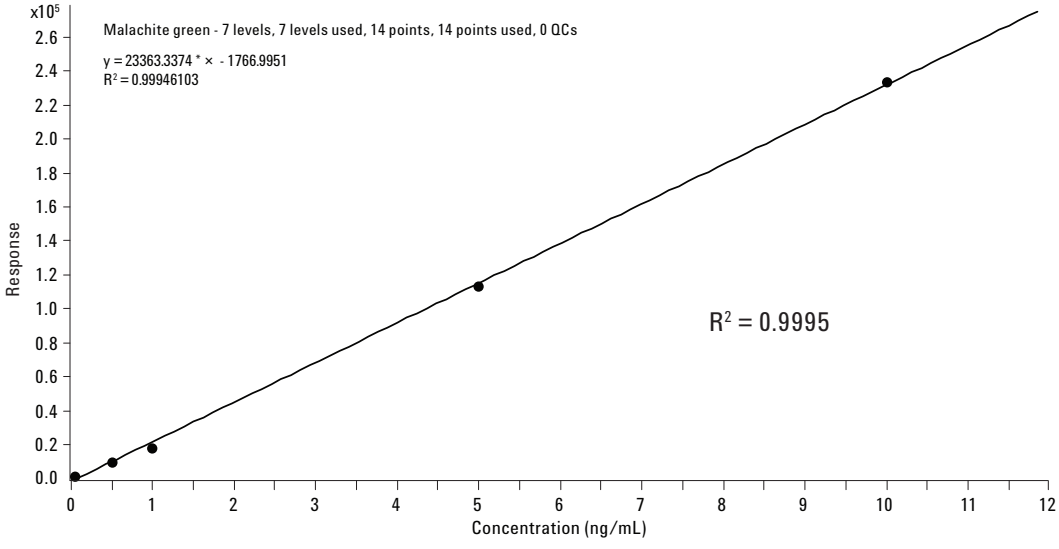


图 4a. 孔雀石绿的校正曲线，线性范围：10 ppt-10 ppb

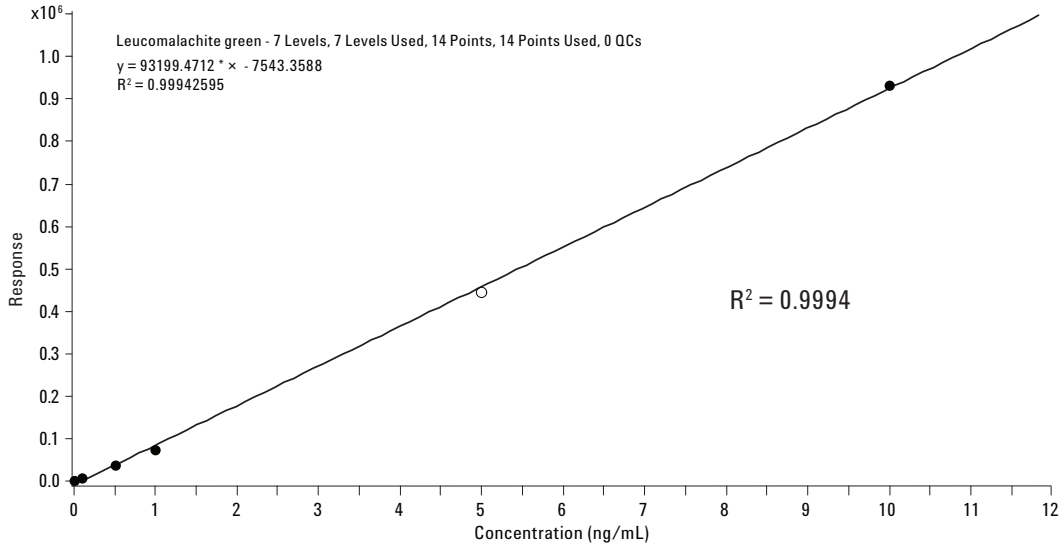


图 4b. 隐性孔雀石绿的校正曲线，线性范围：10 ppt-10 ppb

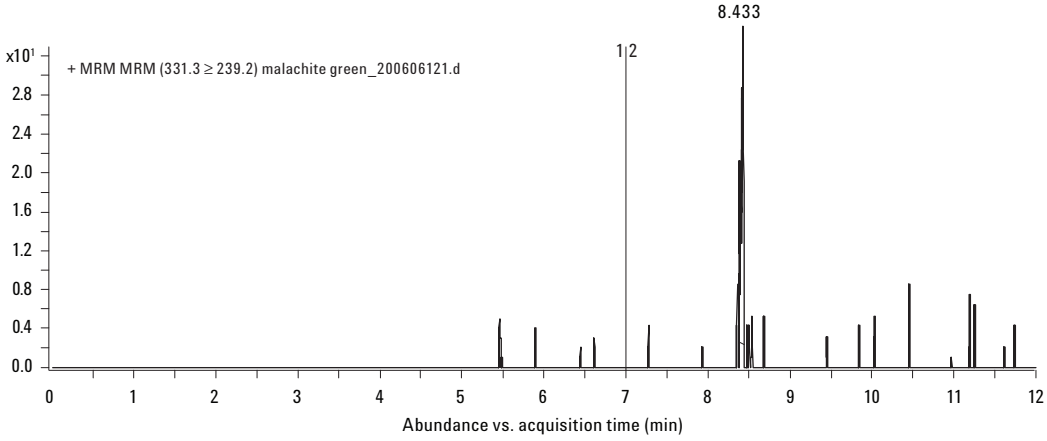
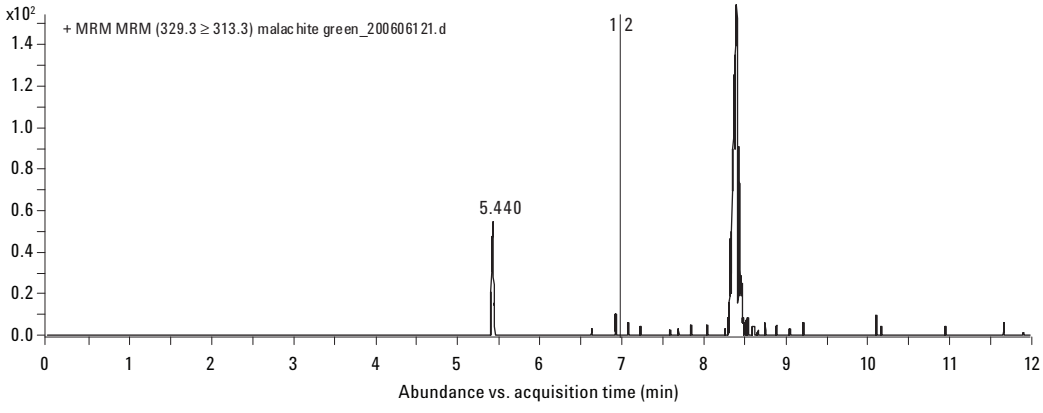


图 5a. 孔雀石绿和隐性孔雀石绿空白样品的 MRM 谱图



ppt spiked sample.

图 5b. 孔雀石绿和隐性孔雀石绿 10 ppt 加标样品的 MRM 谱图

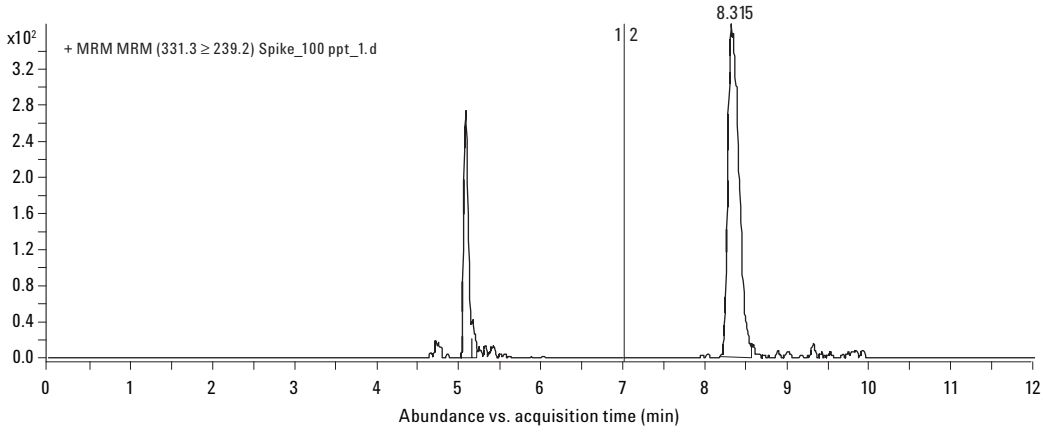


图 6. 100 ppt 孔雀石绿和隐性孔雀石绿加标的罗非鱼提取样品的 MRM 谱图

进样结果的 RSD，孔雀石绿为 3.52 % (S/N > 20)，隐性孔雀石绿为 2.25 % (S/N > 40)。

结论

本文对鱼中的孔雀石绿和隐性孔雀石绿残留量进行了快速而准确的分析。采用电喷雾正电离模式和多反应监测 (MRM) 技术，本 LC/MS/MS 方法的检测限达到 10 ppt，可以很容易达到日本和欧盟进口的残留限量检测要求。

参考文献

1. S. Srivastava, R. Sinha, and D. Roy, Toxicological effects of malachite green. *Aquatic Toxicology* 2004, 66, (3), 319%329.
2. The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) Annual Report 2005. 2005, 29.
3. C. A. Hajee and N. Haagsma, Simultaneous determination of malachite green and its metabolite leucomalachite green in eel plasma using post-column oxidation. *Journal of Chromatography B Biomed Appl.* 1995, 669, (2), 219%227.
4. M. D. Hernando, M. Mezcua, J. M. Suarez-Barcena, and A. R. Fernandez-Alba, Liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry for simultaneous determination of chemotherapeutant residues in salmon. *Analytica Chimica Acta* 2006, 562, (2), 176%184.
5. K.-C. Lee, J.-L. Wu, and Z. Cai, Determination of malachite green and leucomalachite green in edible goldfish muscle by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2006, In Press, Corrected Proof.
6. 2004/25/EC: Commission Decision of 22 December 2003 amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin (Text with EEA relevance) (notified under document number C [2003] 4961). 2003.

使用 LC/MS/MS 测定食品中的黄曲霉素

应用

食品安全

作者

Masahiko Takino
Agilent Technologies
9-1 Takakura-Cho
Hachiouji-Shi, Tokyo
Japan

Toshitsugu Tanaka
Kobe Institute of Health
Department of Food Chemistry
4-6 Minatojima-nakamachi
Chuo-ku, Kobe
Japan

摘要

使用安捷伦 G6410AA LC/MS 三重串联四极杆质谱仪开发了一种灵敏度高而且选择性强的分析方法，用于谷类食物中黄曲霉素 G_1、G_2、B_1 和 B_2 残留量的测定。该方法使用了简单的样品预处理，然后进行 LC/MS/MS 检测。谷类食品中所有黄曲霉素的检测限均低于 1 ng/mL。

引言

黄曲霉素（AFs）属于真菌的次级代谢产物，是一类结构非常类似的化合物。这类霉菌毒素主要是由 *Aspergillus flavus* 和 *A. parasiticus* 产生的毒性非常强的代谢产物，人畜接触后可能致癌 [1]。根据流行病学证据，世界卫生组织和美国环境保护署将黄曲霉素划分为人类肝脏致癌物。因此，为了避免接触黄曲霉素使人致病，并且提高世界范围的食品监督水平，有必要对其进行准确测定。对食品中黄曲霉素的常规检测是通过薄层色谱法 (TLC) 和液相色谱法 (LC)，以荧光检测 (FD) 结合柱前衍生化和柱后衍生化进行的。由于这类方法的高选择性和灵敏度，LC/FD技术得到了常规使用。此外，联用技术在食品的残留量分析方面得到了开发和应用，如 LC 与质谱 (MS) 检测器联用技术。质谱检测的高选择性和灵敏度与液相色谱法的分离能力相结合，对较大分子量范围的物质在痕量水平进行定性和定量分析具有决定性的优势。一些阐述不同类型的质谱方法用于黄曲霉素分析的论文已有发表 [2-4]。

实验部分

样品预处理

待测样品（花生、玉米、肉豆蔻和红椒）来自当地市场并且不含任何黄曲霉素。按 Tanaka [5] 报道的经过验证的方法进行了黄曲霉素的提取和清洗步骤。简单地说，取样品细粉 20 g，置 200 mLv 锥形瓶中，对于玉米和谷类，加乙腈-水（9:1, v/v）40 mL。振摇 30 分钟后，取该混合溶液以 1,650 g 离心 5 分钟。

取上清液，用 GF/B 级玻璃微纤维滤器（Whatman Internation Ltd, Maidstone, 英国）滤过。取滤液 5 mL，用 MultiSep 228 号卡套柱进行样品净化。以 1 mL/min 的流速过柱后，收集最初的 2 mL 洗脱液。将洗脱液置 40℃ 以温和的氮气流进行干燥。取残渣，用含有 10 mM 醋酸铵的甲醇-水（4:6 v/v）1 mL 溶解。

标准溶液制备

取黄曲霉素 G_2（AFG_2）、黄曲霉素 G_1（AFG_1）、黄曲霉素 B_2（AFB_2）和黄曲霉素 B_1（AFB_1）等标准试剂，分别用乙腈溶解并制成 1 mg/mL 的溶液，置暗处于 4℃ 保存备用。等量吸取上述各种贮备液至一样品瓶中，以流动相稀释并制成 LC/MS 分析用工作标准溶液。每种黄曲霉素的最终浓度为 1 ng/mL。

化学品

标准物质 AFG_2、AFG_1、AFB_1 和 AFB_2 来自 Sigma Aldrich Japan（东京，日本）。这些化合物的纯度大于 99%。醋酸铵、甲苯、HPLC 级乙腈和 HPLC 级甲醇来自 Wako Chemical（Osaka, Japan）。水为实验室内部以 Milli-Q 系统（Millipore, Tokyo, Japan）纯化而得。MultiSep 228 号卡套柱购自 Showa Denko（Kanagawa, Japan）。

LC/MS 仪器

本文中使用的 LC/MS/MS 系统包括 Agilent 1200 系列真空脱气机、二元泵、多孔板自动进样器、柱温箱、带有电喷雾离子源 (ESI) 的 Agilent G6410 三重串联四极杆质谱仪。方法研究的目的是为了获得测定食品中黄曲霉素的快速而且灵敏度高的定量分析方法。对不同的试剂和色谱柱进行了优化，以获得最佳的色谱分离度和灵敏度，发现使用水、甲醇、醋酸铵的一种简单溶剂系统和 1.8-µm 粒径的 C18 柱有很好的效果。

LC条件

仪器：	Agilent 1200 HPLC
色谱柱：	ZORBAX Extend C18，100 mm x 2.1 mm，1.8 µm（部件号 728700-902）
柱温：	40 °C
流动相：	A = 10 mM 醋酸铵水溶液 B = 甲醇 40% A/60% B
流速：	0.2 mL/min
进样量：	5 µL

MS条件

仪器：	Agilent 6410 LC/MS 三重串联四极杆
离子源：	正离子模式 ESI
干燥气流速：	10 L/min
喷雾器：	50 psig
干燥气温度：	350 °C
V_{cap}：	4000 V
扫描范围：	*m/z* 100 - 550
碰撞诱导解离电压：	可变的100 V
MRM 离子：	见表1
碰撞能量：	见表1

LC/MS/MS方法

使用 MRM 方式进行定量分析。MRM 的参数见表 1。

表 1. 各种黄曲霉素的 MRM 的数据采集参数

No	霉菌毒素	保留时间 (min)	分子量	母离子 (*m/z*)	子离子 (*m/z*)	碰撞能量 (V)
1	黄曲霉素 G_2	5.21	330	331	245	30
2	黄曲霉素 G_1	6.61	328	329	243	30
3	黄曲霉素 B_2	8.44	314	315	259	30
4	黄曲霉素 B_1	10.89	312	313	241	30

结果与讨论

MRM 的优化

通过使用单级 MS 全扫描模式及随后的子离子扫描模式对 1 µg/mL 的黄曲霉素标准混合液进行分析，实现了对每种黄曲霉素最佳MRM 的测定。这些标准混合液在全扫描模式和子离子扫描模式下的质谱见图 1 和图 2。全扫描模式下，各种黄曲霉素的质谱均显示质子化分子 $[M+H]^+$为基峰离子。选择这些离子作为 MRM 模式的母离子。各个化合物的最佳碰撞能量不同。为了确定最佳碰撞能量，将该参数从 5 V 变化至 40 V，间隔为 5 V。如图 2 所示，观察到 30 V 时，各种黄曲霉素的子离子强度明显最佳。各种强度最大的子离子分别为 *m/z* 245（AFG_2），243（AFG_1），259（AFB_2）和 241（AFB_1）。在上述结果的基础上，碰撞能量设定为 30 V。

表 1 显示每种黄曲霉素 MRM 模式的参数。

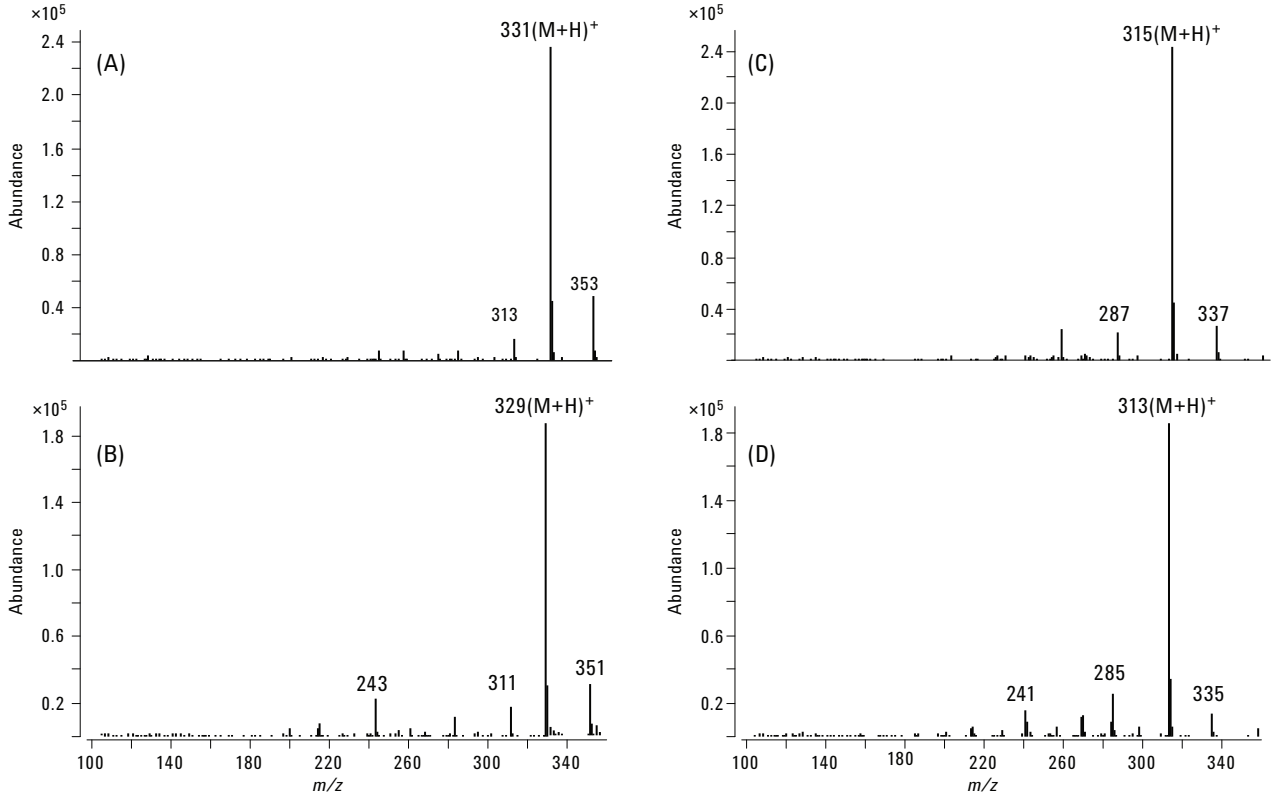


图 1. 单 MS 全扫描模式中四种浓度为 1 µg/mL 的黄曲霉素标准品的质谱图，AFG_2：(A)；AFG_1：(B)；AFB_2：(C)；AFB_1：(D)

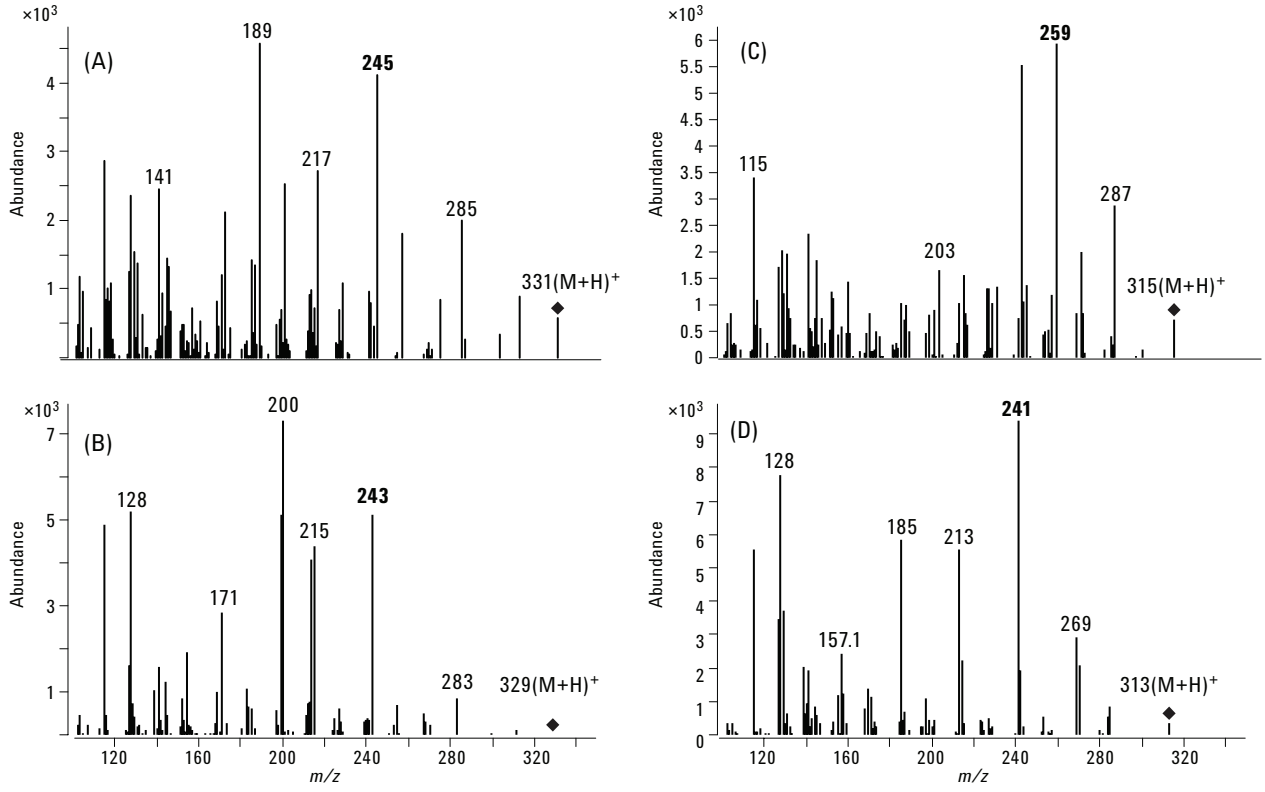


图 2. 子离子扫描模式下四种浓度为 1 µg/mL 的黄曲霉素的质谱图，AFG_2：(A)；AFG_1：(B)；AFB_2：(C)；AFB_1：(D)

各种 0.1 ng/mL 黄曲霉素的 MRM 色谱图如图 3 所示。这些色谱图显示了所有黄曲霉素均具有出色的信噪比（S/N）。各种黄曲霉素的检测限以该 MRM 色谱图信噪比的 3 倍测得，如表 2 所示。为评价校正曲线的线性，对从 0.1 ng/mL 到 100 ng/mL 不同浓度的黄曲霉素标准溶液进行了分析。如图 4 和表 2 所示，所有黄曲霉素的线性均非常好，相关系数（r^2）均大于 0.999。

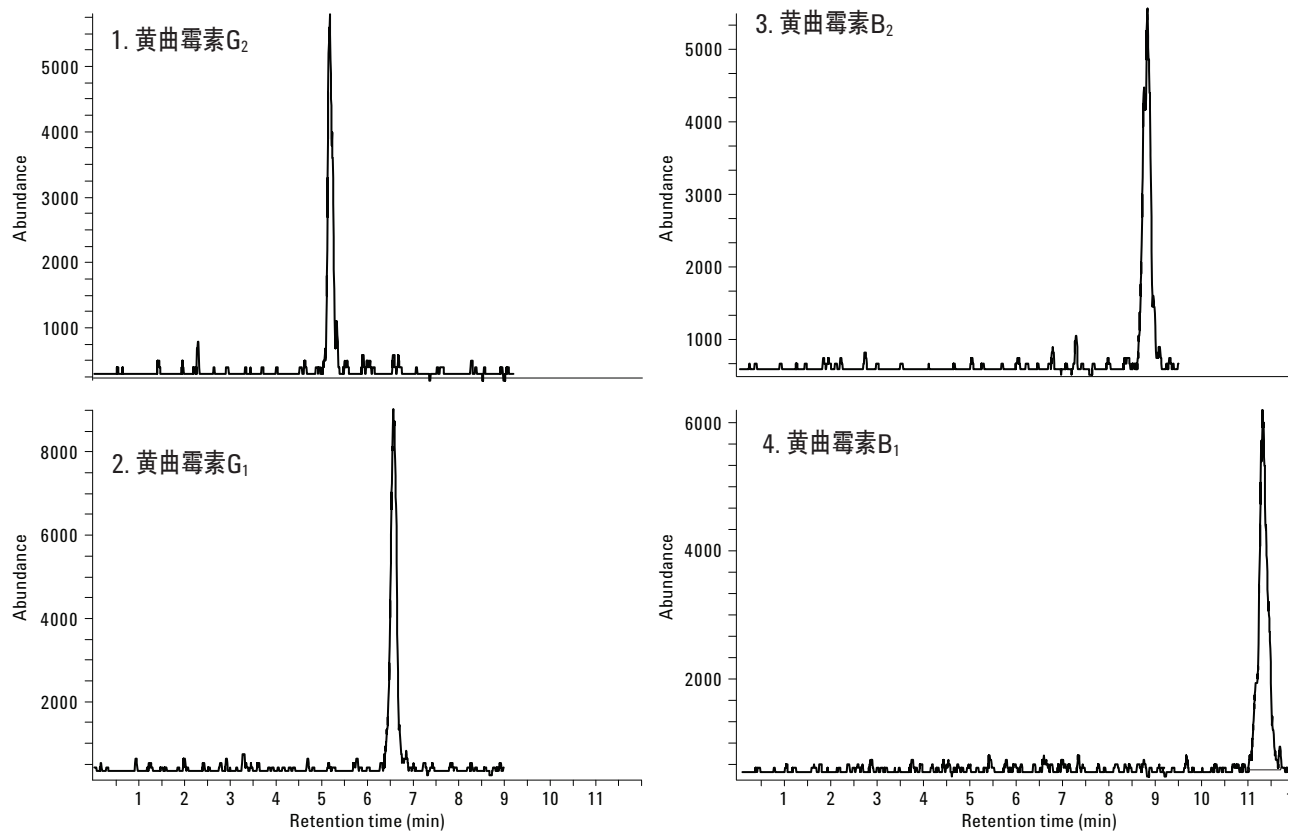


图 3. 四种 0.1 ng/mL 黄曲霉素在 MRM 模式下的 MRM 色谱图

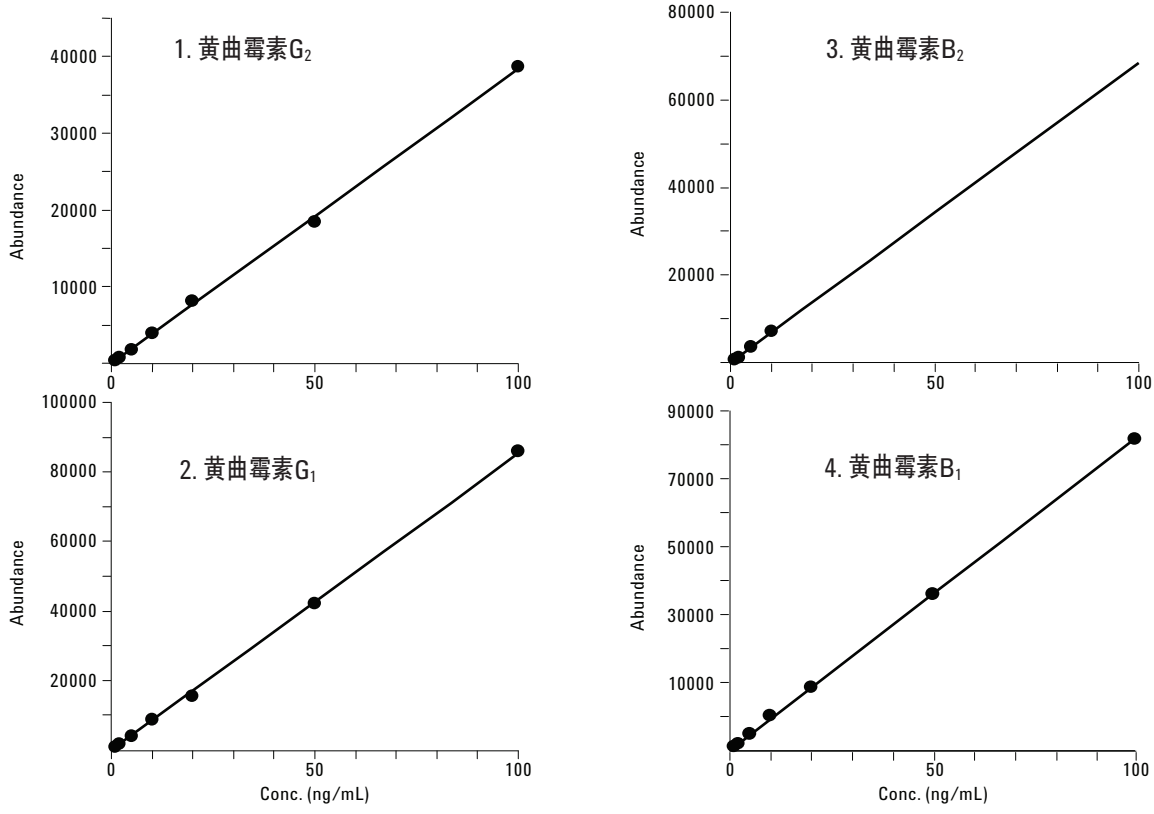


图 4. 四种黄曲霉素从 0.1 ng/mL 到 100 ng/mL 的校正曲线

表 2. 四种黄曲霉素的线性和检测限

No	霉菌毒素	相关系数（r^2）	检测限（ng/mL）
1	黄曲霉素 G_2	0.9999	0.025
2	黄曲霉素 G_1	0.9992	0.020
3	黄曲霉素 B_2	0.9999	0.025
4	黄曲霉素 B_1	0.9993	0.020

通过在谷类和玉米提取物中注入 0.2 ng/mL 的霉菌毒素标准品，对本方法的基质效应进行了考察。谷类和玉米提取物的典型 MRM 色谱图分别如图 5 和图 6 所示。与霉菌毒素标准品混合溶液相比，未见两种食品样品基质带来的其它色谱峰。这些结果显示，MRM 模式具有非常高的选择性。

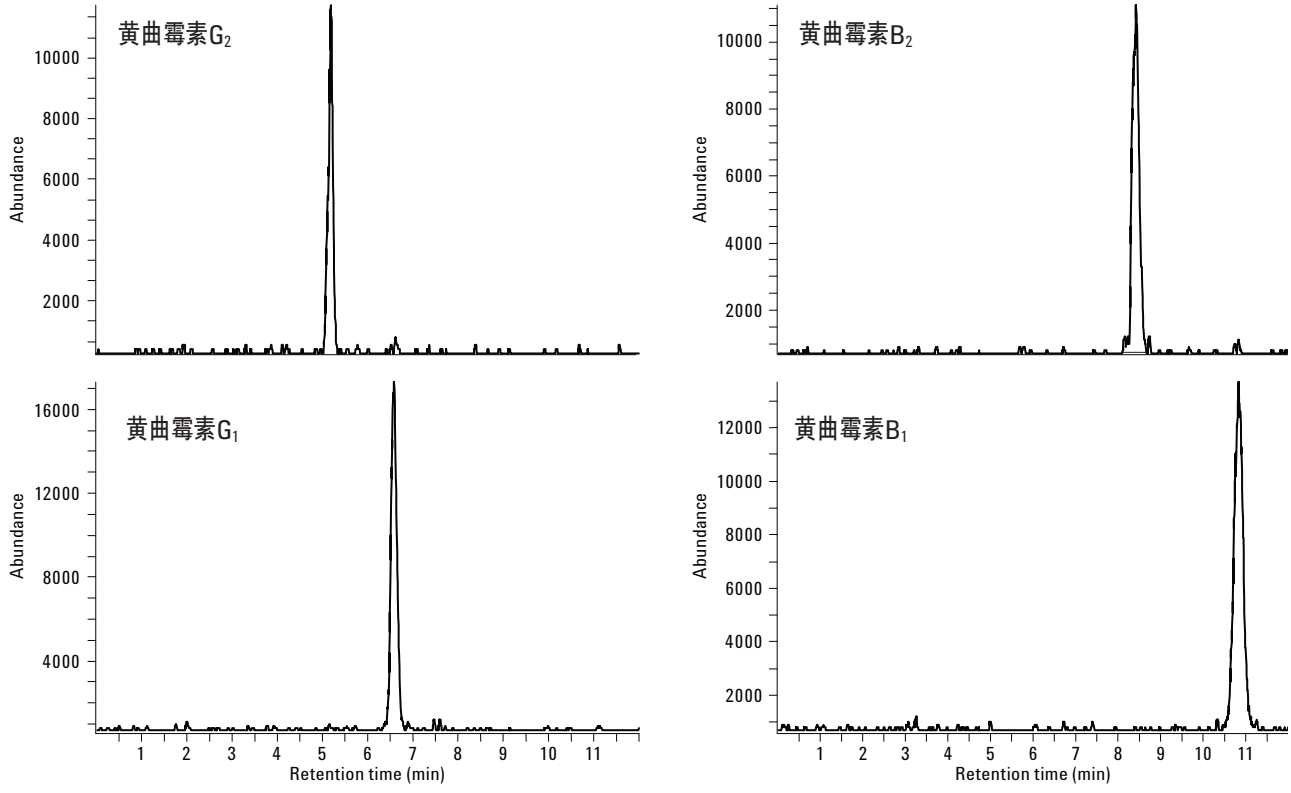


图 5. 在谷类提取物中注入 0.2 ng/mL 黄曲霉素的 MRM 色谱图

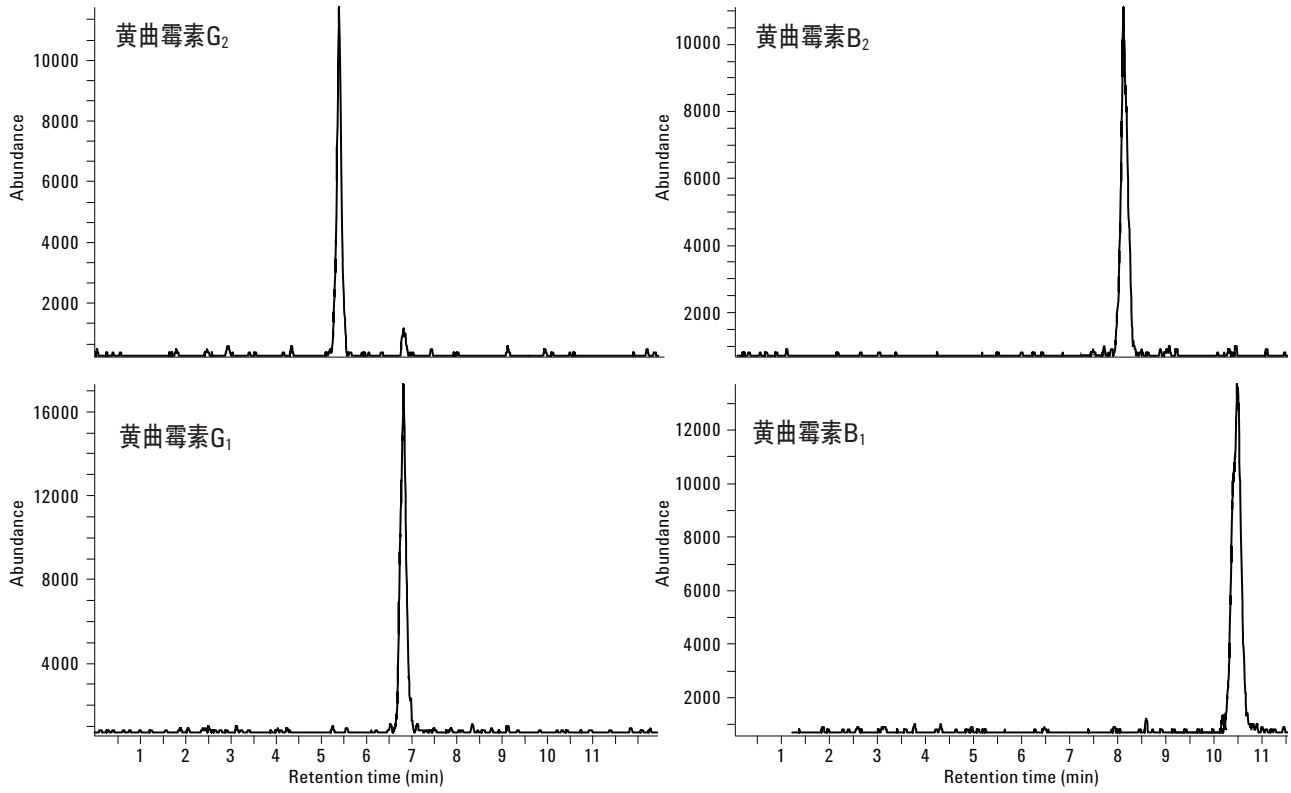


图 6. 在玉米提取物中注入 0.2 ng/mL 黄曲霉素的 MRM 色谱图

此外，与黄曲霉素标准品的色谱峰强度对比，考察了样品基质中各种黄曲霉素峰强度的变化。结果如表3所示，各种成分的相对峰强度为 88%-96%。因此，基质效应（如离子抑制）可能不显著，并且可能使用外标代替与基质相匹配的标准品。

表 3. 样品提取物中各种黄曲霉素的相对强度

No	霉菌毒素	相对强度 (%)	
		谷类	玉米
1	黄曲霉素 G_2	88	91
2	黄曲霉素 G_1	92	94
3	黄曲霉素 B_2	93	96
4	黄曲霉素 B_1	97	95

结论

本文中阐述的使用 LC/MS/MS 测定多种黄曲霉素的方法适合于测定谷类和玉米提取物中的四种黄曲霉素，灵敏度高，选择性强。该方法的另一优点是对于所有研究的食品样品，未发现离子抑制。因此，无需与基质相匹配的标准品，这使得对不同来源样品的分析方法更趋一致。

参考文献

1. K. K. Sinha and D. Bhatnagar, 1998, "Mycotoxins in Agriculture and Food Safety," 1998 (New York: Marcel Dekker)
2. W. J. Hurst, R. A. Martin, and C. H. Vestal, 1991, "The Use of HPLC/Thermospray MS for the Confirmation of Aflatoxons in Peanuts," *J. Liq. Chromatogr.*, **14**, 2541-2540.
3. A. Cappiello, G. Famiglini, and B. Tirillini, 1995, "Determination of Aflatoxins in Peanut Meal by LC/MS with a Particle Beam Interface," *Chromatographia*, **40**, 411-416.
4. M. Vahl and K. Jorgensen, 1998, "Determination of Aflatoxins in Food Using LC/MS/MS," *Z Lebensm Unters Forsch A.*, **206**, 243-245.
5. T. Tanaka, A. Yoneda, Y. Sugiura, S. Inoue, M. Takino, A. Tanaka, A. Shinoda, H. Suzuki, H. Akiyama, and M. Toyoda, 2002, "An Application of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry for Determination of Aflatoxins," *Mycotoxins*, **52**, 107-113.

快速高分离度 LC/MS/MS 定量测定麦片中的水溶性 B 族维生素

应用

食品分析

作者

Sheher Mohsin
Agilent Technologies, Inc.
Schaumburg, Il
USA

Michael Zumwalt
Agilent Technologies, Inc.
9780 S. Meridian Blvd.
Englewood, CO 80112-5910
USA

Indarpal Singh
ConAgra Foods, Inc.
Omaha, NE 68102
USA

摘要

采用 Agilent 6410 三重串联四极杆质谱仪 (QQQ) 分析早餐麦片中的几种水溶性 B 族维生素化合物。在快速分离高通量 SB-Aq 色谱柱上（粒径 1.8 µm）进行简单梯度洗脱，所有化合物在 7.5 分钟内洗脱出来。在 0.5-500 ppb 范围内，除吡哆醇外的化合物都展现出超过三个数量级的良好线性，并且在0.5 ppb 水平上具有良好的峰面积重现性，作为最低定量限。

引言

水溶性维生素极性很强，在反相色谱柱上保留很差。在流动相中加入离子对试剂，如七氟丁酸能够明显改善这类化合物的分离和保留。然而，使用这类离子对也有缺点，它会在质谱仪中产生较高的背景信号。因此，我们使用具有专门保留亲水性化合物键合相的色谱柱，在流动相溶剂中加入甲酸铵，开发出快速灵敏的分析方法。

本文使用的 Agilent 1200 系列液相色谱 (LC) 系统和亚-2-微米填料色谱柱用于快速高分离度分离。该 LC 系统设计降低了延迟体积，增加了压力范围和柱温。将该 LC 系统通过 G1948B 电喷雾离子源与Agilent 6410 三重串联四极杆质谱仪 (QQQ) 相连接。目标化合物采用加入甲酸铵的水-甲醇梯度在 ZORBAX AQ 1.8 µm 色谱柱上实现分离。

测定水溶性维生素的普通的 LC/MS 方法是在流动相溶剂中加入七氟丁酸作为离子对试剂，其分析时间长达 30 分钟。我们开发出快速、灵敏的 LC/MS/MS 方法用于水溶性维生素的测定，该法采用高效 1.8 µm 色谱柱在低扩散、600 bar LC/MS 配置下将允许筛选

和定量的运行时间周期低至 10 分钟。质谱仪的线性响应超过三个数量级，除吡哆醇外的所有被测物具有 0.5 pg/µL 的定量限。吡哆醇的分析具有良好的灵敏度，但良好的线性恰好被局限在三个数量级之内。对于除吡哆醇之外的所有化合物得出了浓度介于0.5～500 pg/µL 之间（吡哆醇介于 0.5～250 pg/µL 之间）的校正曲线和色谱图。

B 族维生素的结构示于图 1。

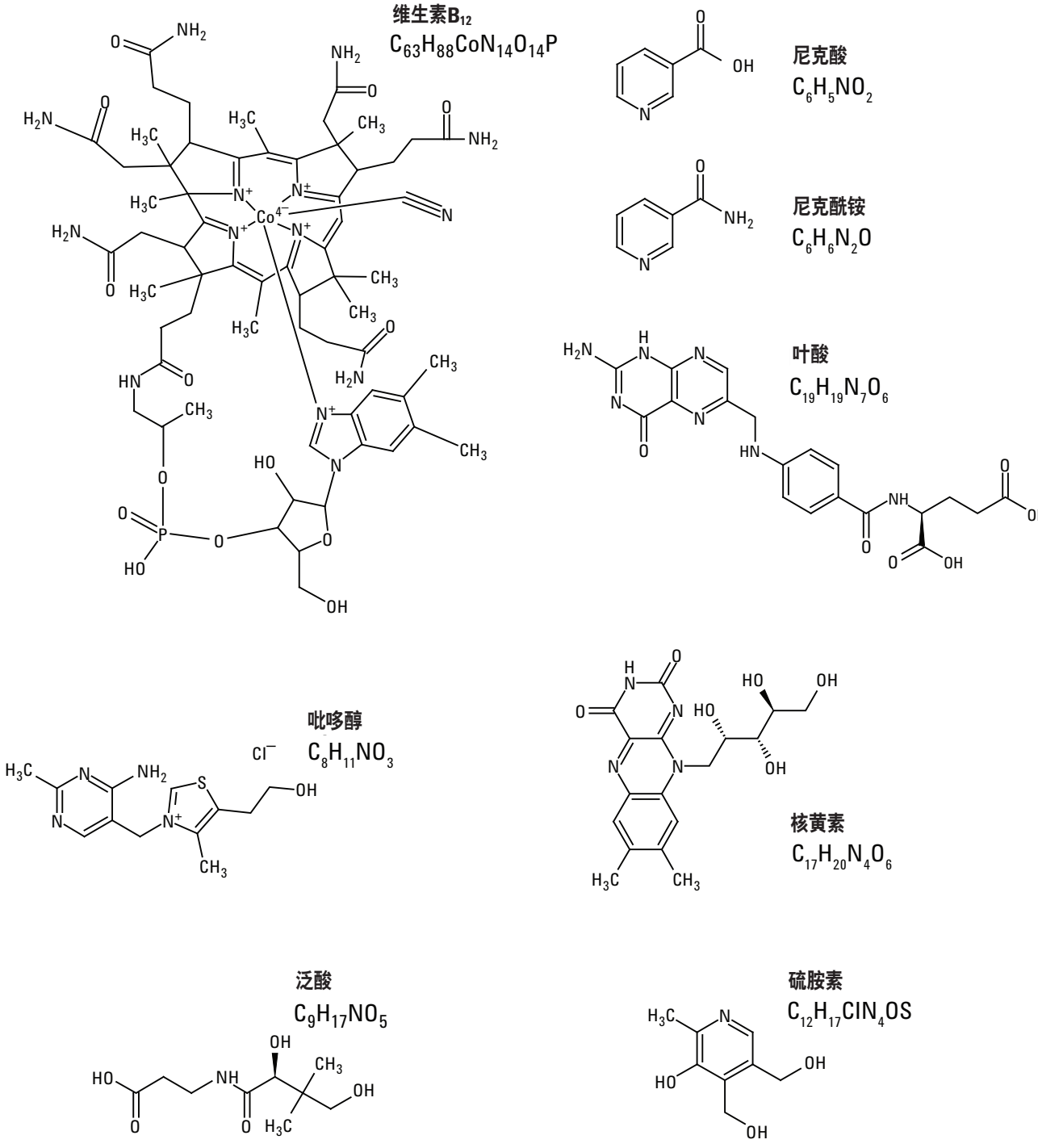


图 1. 本文所分析的 B 族维生素的结构

实验部分

样品制备

含有所有八种化合物的混标甲醇溶液由 ConAgra 食品公司提供，使用含 20 mM 甲酸铵和 0.1% 甲酸的 10% 甲醇水溶液稀释至如下浓度：500、250、100、50、5 和 0.5 pg/mL。这些稀释液用于未知样品的定量测定。

再提供一种按下列方法制备的添加 B 族维生素的样品，制备方法如下：

1. 使用搅拌器将早餐麦片研磨均匀；
2. 称取 1 克研匀的样品转入 50 mL 样品瓶中；
3. 加入 25 mL 0.1 M HCl，在100 °C 水浴中加热20 分钟，以溶解维生素；
4. 冷却至室温；
5. 用去离子水调整体积至 1 L；
6. 用 0.45 µm 玻璃微纤维素膜过滤。

应该指出，提供的添加样品是为测试仪器的灵敏度而研制，以向顾客演示为目的。一种典型的未添加样品的提取由以下步骤组成：取 1 克研匀的样品用酶消化处理以将天然存在的维生素从其结合形式中释放出来，定容至 10 mL，取其体积的 1/100 用于本研究所分析的添加样品。在较高的浓度下，可看到盐和其它基质成分对某些维生素的分析产生干扰。因此，可以采用进一步稀释的办法调节这些样品中的基质效应。

表1. 多反应监测（MRM）模式参数

区段	化合物	MRM转变	裂解电压 (V)	碰撞能量 (V)
1	硫胺素	265.2 > 122.0	85	10
	泛酸	220.2 > 90.0	110	13
	吡哆醇	170.1 > 152.1	100	10
	尼克酸	124.1 > 80.0	100	27
	尼克酰铵	123.1 > 80.0	100	25
2	维生素B_{12}	678.6 > 146.7	130	35
	叶酸	442.2 > 295.1	120	10
	核黄素	377.2 > 243.1	110	25

LC/MS方法

LC 条件

Agilent 1100 系列二元泵、脱气机、多孔板进样器和柱温箱

色谱柱：	Agilent ZORBAX RRHT SB - Aq，3.0 mm × 100 mm，1.8 µm (部件号：828975 - 314)
柱温：	35 °C
流动相：	A = 20 mM 甲酸铵和 0.1% 甲酸水溶液 B = 20 mM 甲酸铵和 0.1% 甲酸甲醇溶液
流速：	0.5 mL/min
进样量：	10 µL
梯度：	时间（分） %B 0.0 10 8.0 55 停止时间： 10 min 8.1 10
进样针冲洗：	75 : 25 甲醇/水（冲洗口 20 秒）

MS条件

MS条件

操作模式：	使用 Agilent G1948B 离子源，ESI 正离子模式
喷雾器：	30 psig
干燥气流速：	10 L/min
干燥气温度：	350 °C
V_{cap}:	1850 V
分辨率（FWHM）：	Q1 = 低分辨；Q2 = 低分辨
驻留时间（对所有MRM）：	200 毫秒

维生素 B12 母离子的质量（*m/z* 678.6）大约是图1中给出的该化合物实验式（$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$）计算值的一半。相信此化合物不太稳定，在离子化过程中发生了裂解。

结果与讨论

所有八个化合物的校正曲线示于图 2A～2H。只有化合物吡哆醇在 500 ppb 水平没有得到良好的线性，本实验未加内标。

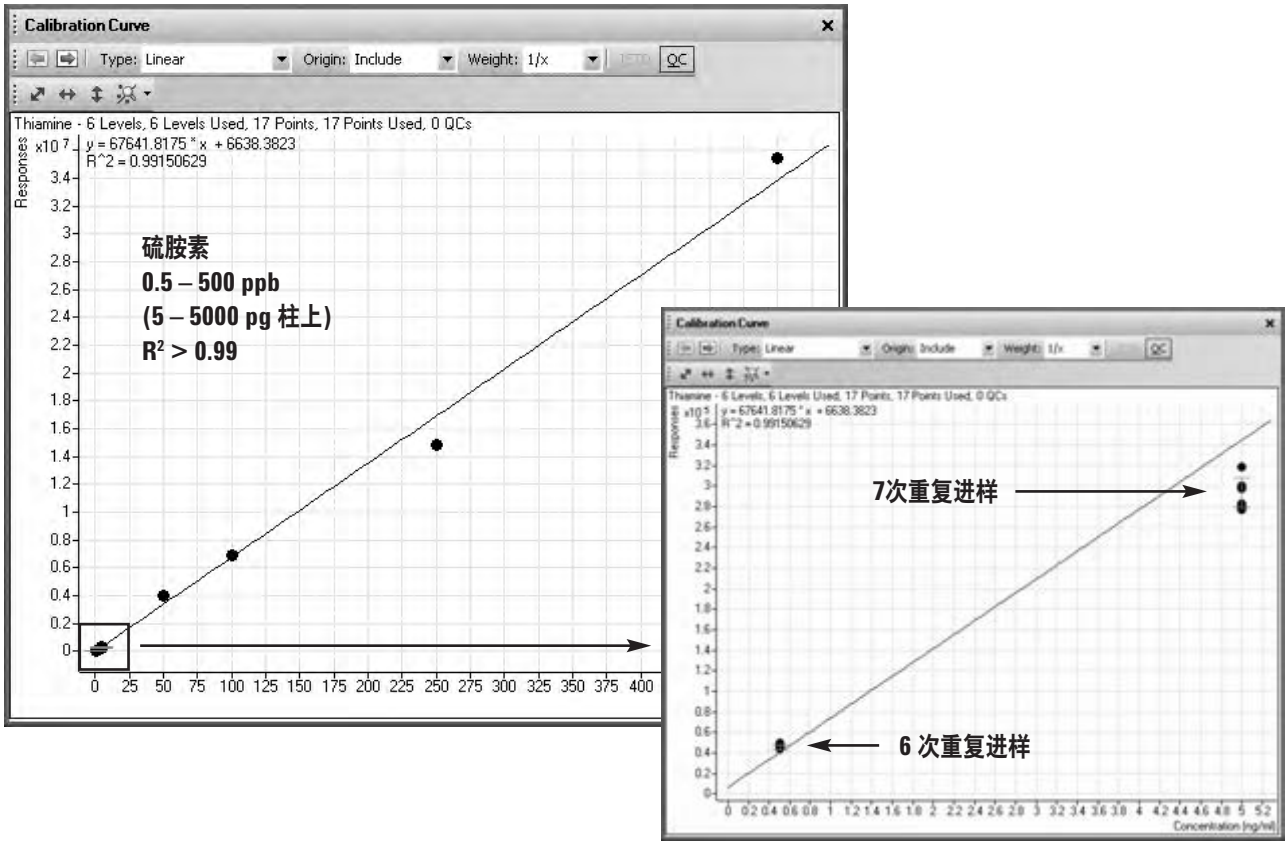


图 2A. 硫胺素超过三个数量级的线性关系

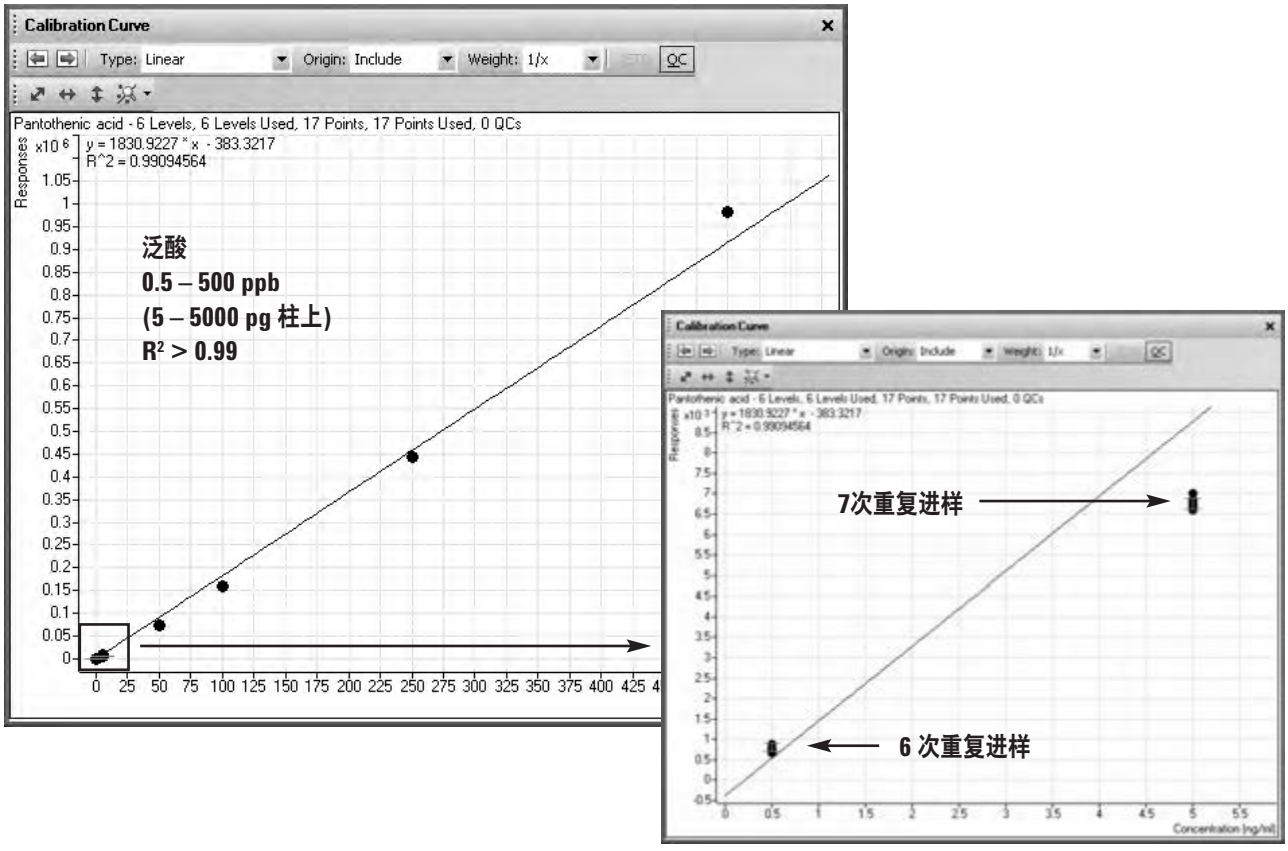


图 2B. 泛酸超过三个数量级的线性关系

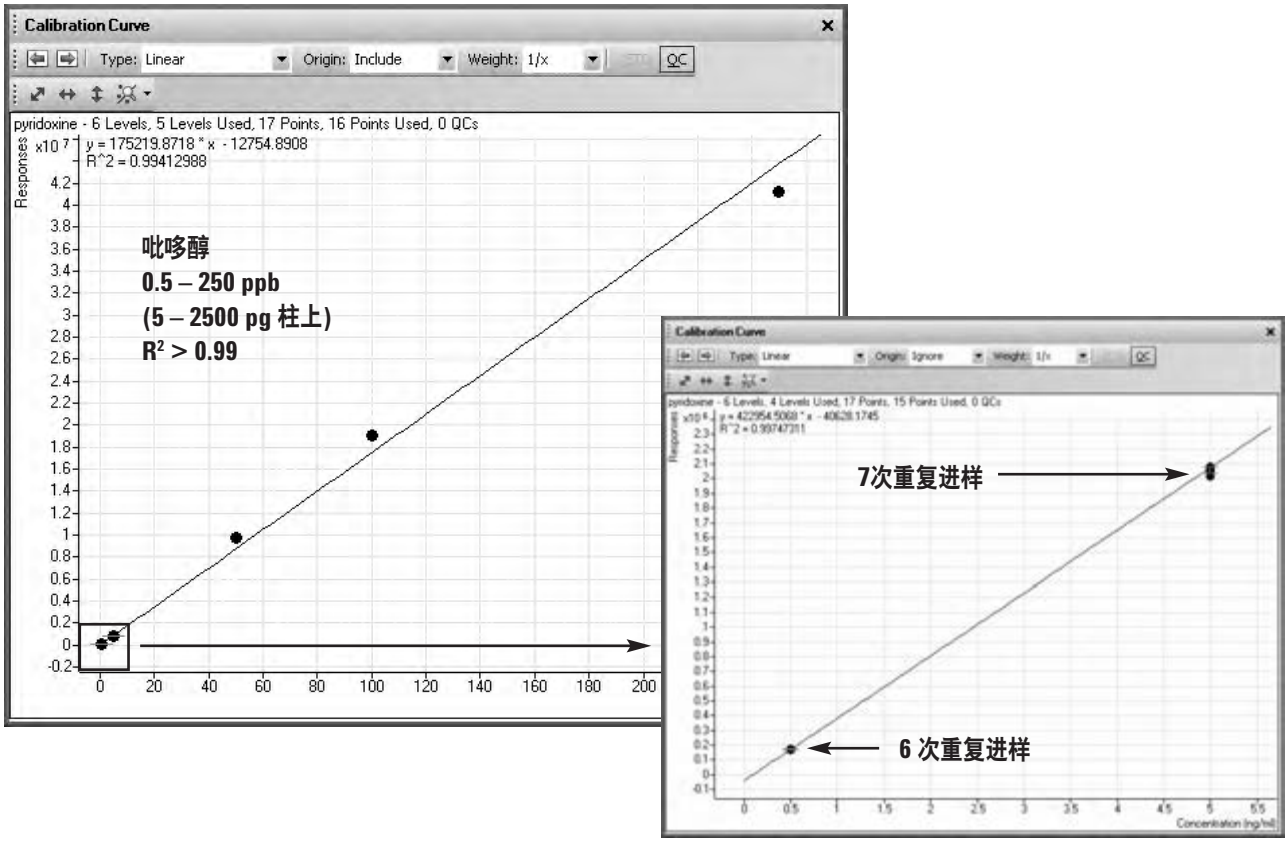


图 2C. 吡哆醇几乎超过三个数量级的线性关系

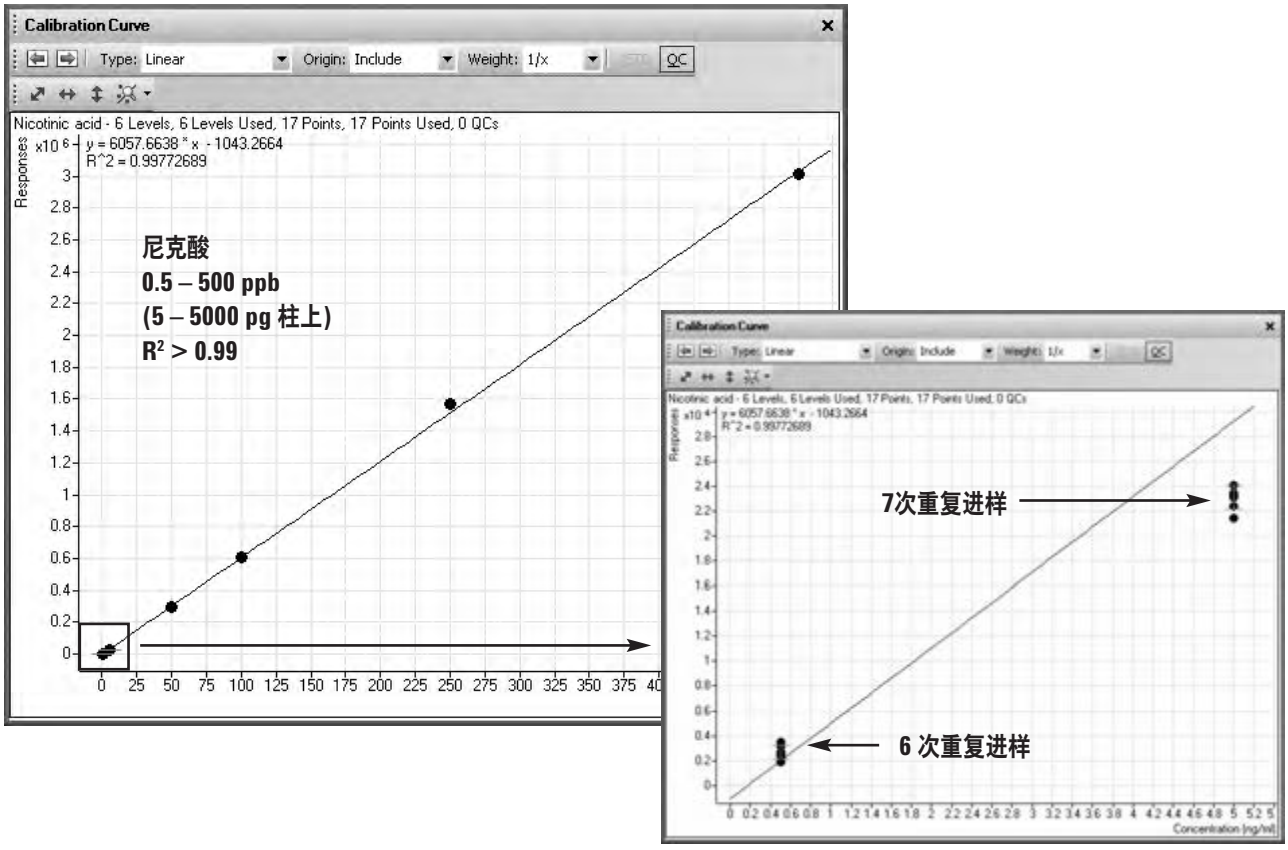


图 2D. 尼克酸超过三个数量级的线性关系

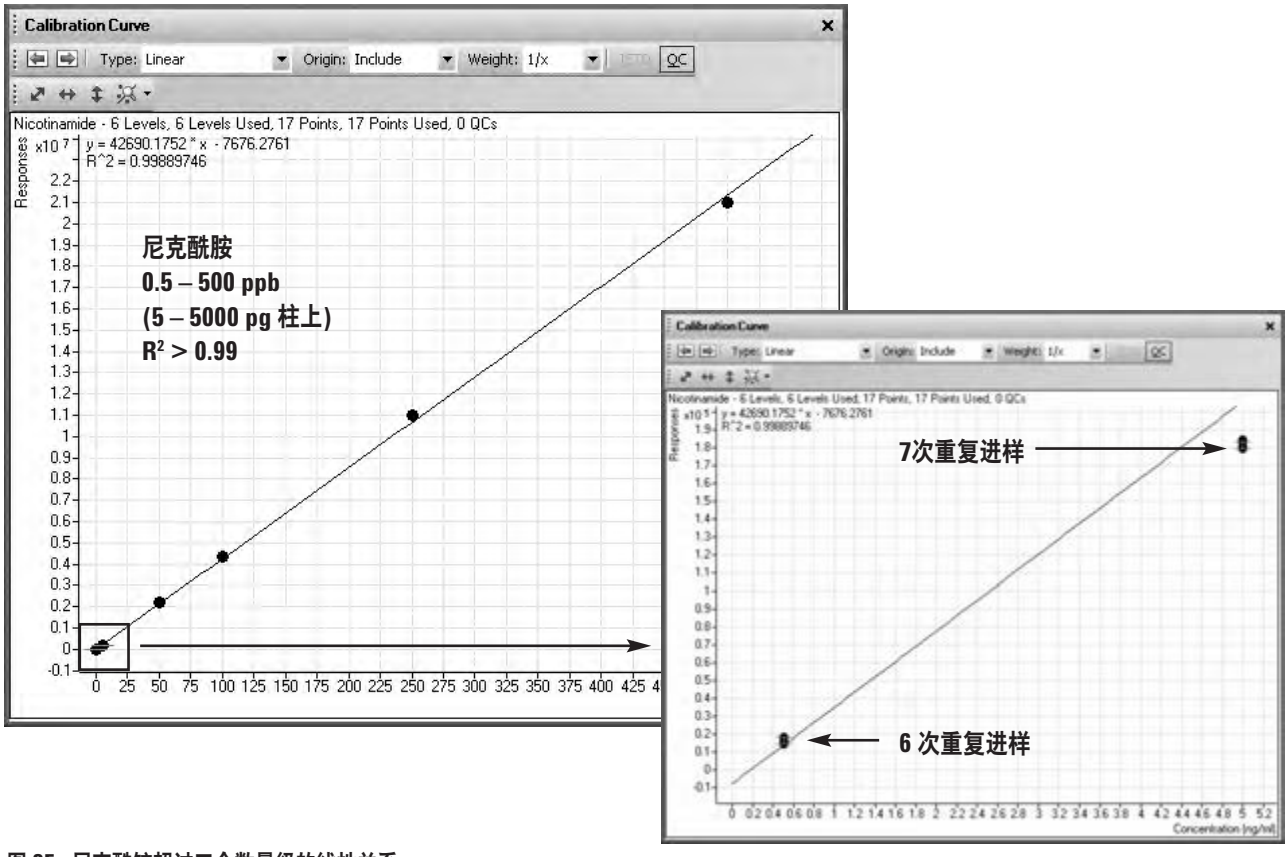


图 2E. 尼克酰铵超过三个数量级的线性关系

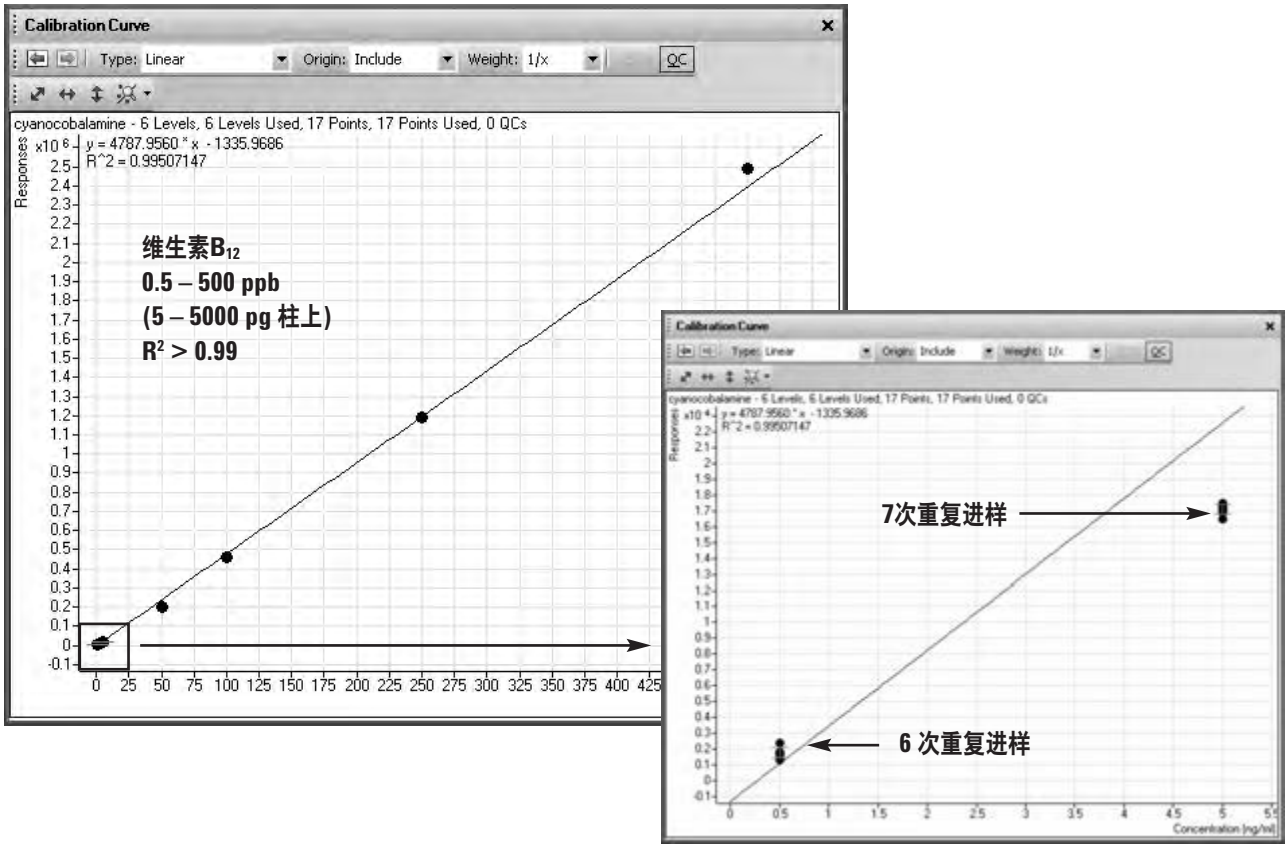


图 2F. 维生素 B_{12}超过三个数量级的线性关系

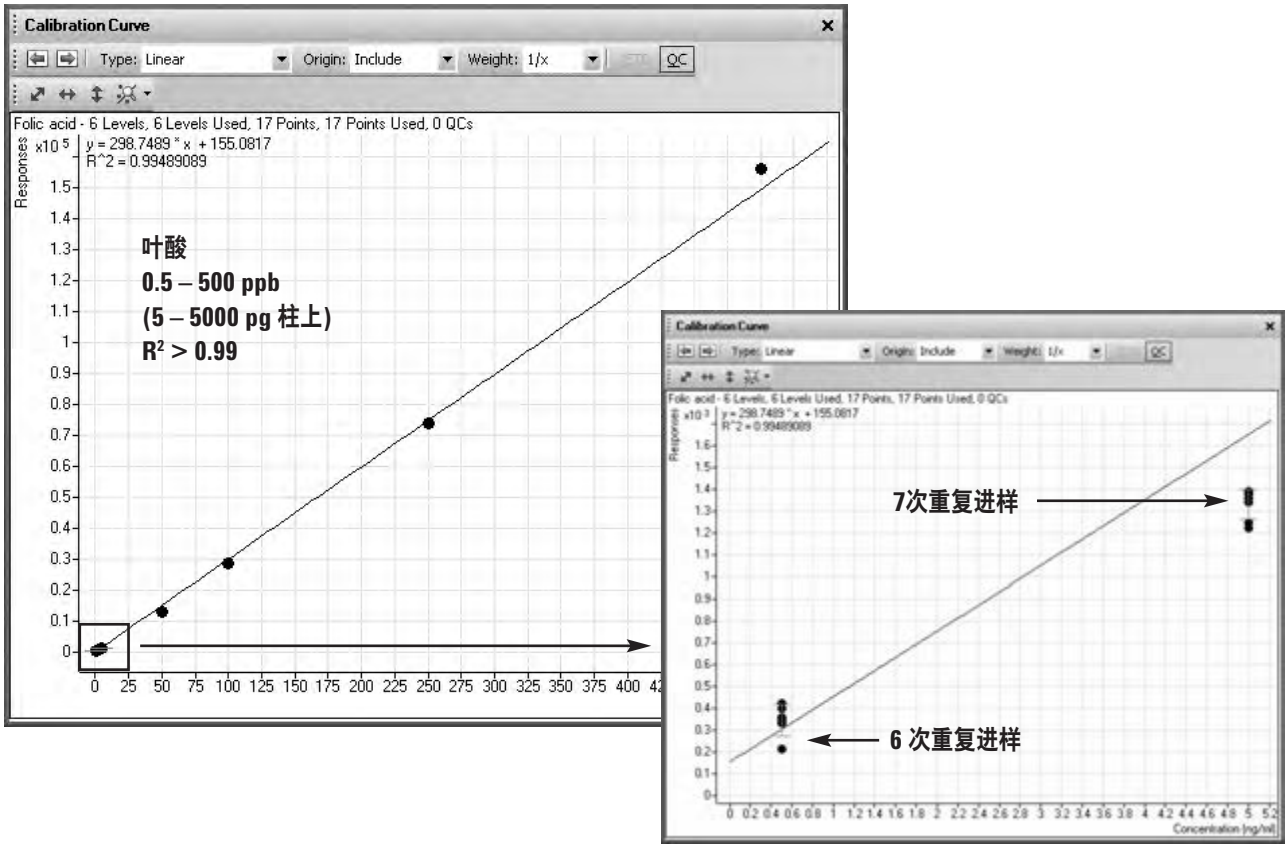


图 2G. 叶酸超过三个数量级的线性关系

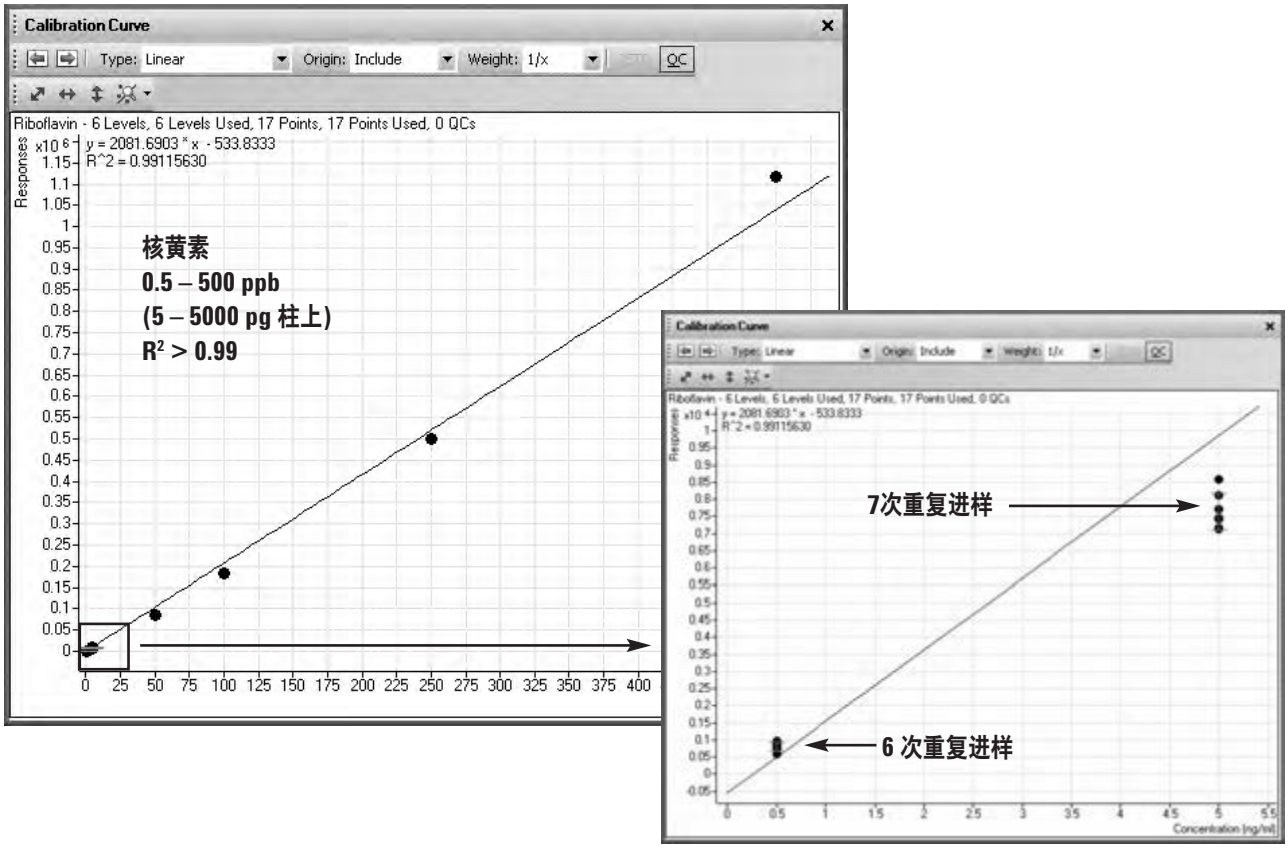


图 2H. 核黄素超过三个数量级的线性关系

所有数据的曲线拟合按线性完成，忽略原点且按1/x加权。

以 0.5 ppb 水平的吡哆醇为例，其重现性示于图 3。所有化合物在 0.5 ppb 水平上的峰面积 %RSD 值列于表 2。

表 2. 每种化合物在最低定量水平，即 0.5 ppb 下的峰面积重现性

化合物	峰面积 (%RSD)
硫胺素	5.6
泛酸	11.6
吡哆醇	2.6
尼克酸	12.9
尼克酰胺	10.1
维生素 B_{12}	19.4
叶酸	13.4
核黄素	17.1

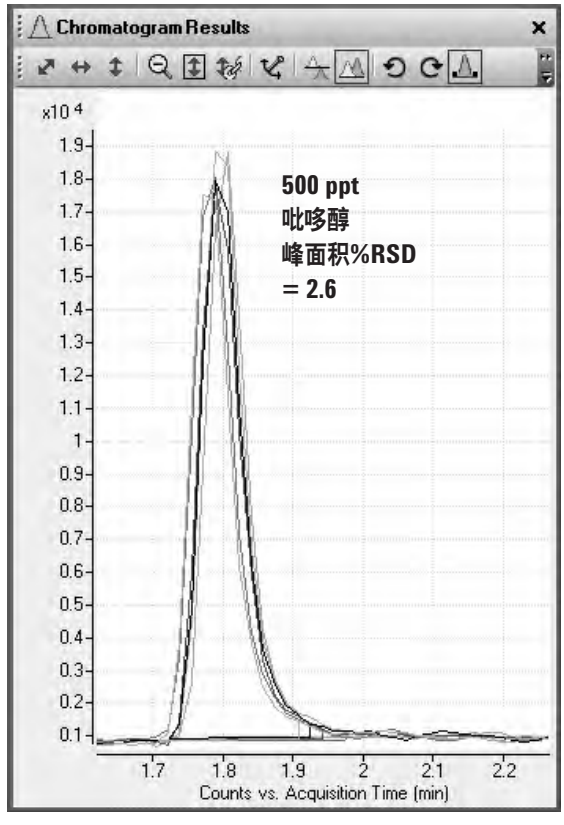


图 3. 吡哆醇在 500 ppt 下的峰面积重现性，进样 6 次

使用如前所述的稀释混合标样，对添加麦片提取物也进行了分析和定量。使用 MassHunter 定量分析得出批处理结果的实例示于图 4。存在于样品中的尼克酰胺的浓度计算为 111.6 pg/µL。

所有化合物在添加提取物中的浓度计算结果列于表 3。

检测添加提取物中八种化合物相应的色谱洗脱图谱示于图 5。

表3. 添加麦片提取物中每种化合物的计算浓度

化合物	计算浓度 (pg/µL)
硫胺素	24.0
泛酸	1.2
吡哆醇	15.5
尼克酸	43.5
尼克酰胺	111.6
维生素 B_{12}	0.4*
叶酸	2.6
核黄素	8.6

* 超出定量限

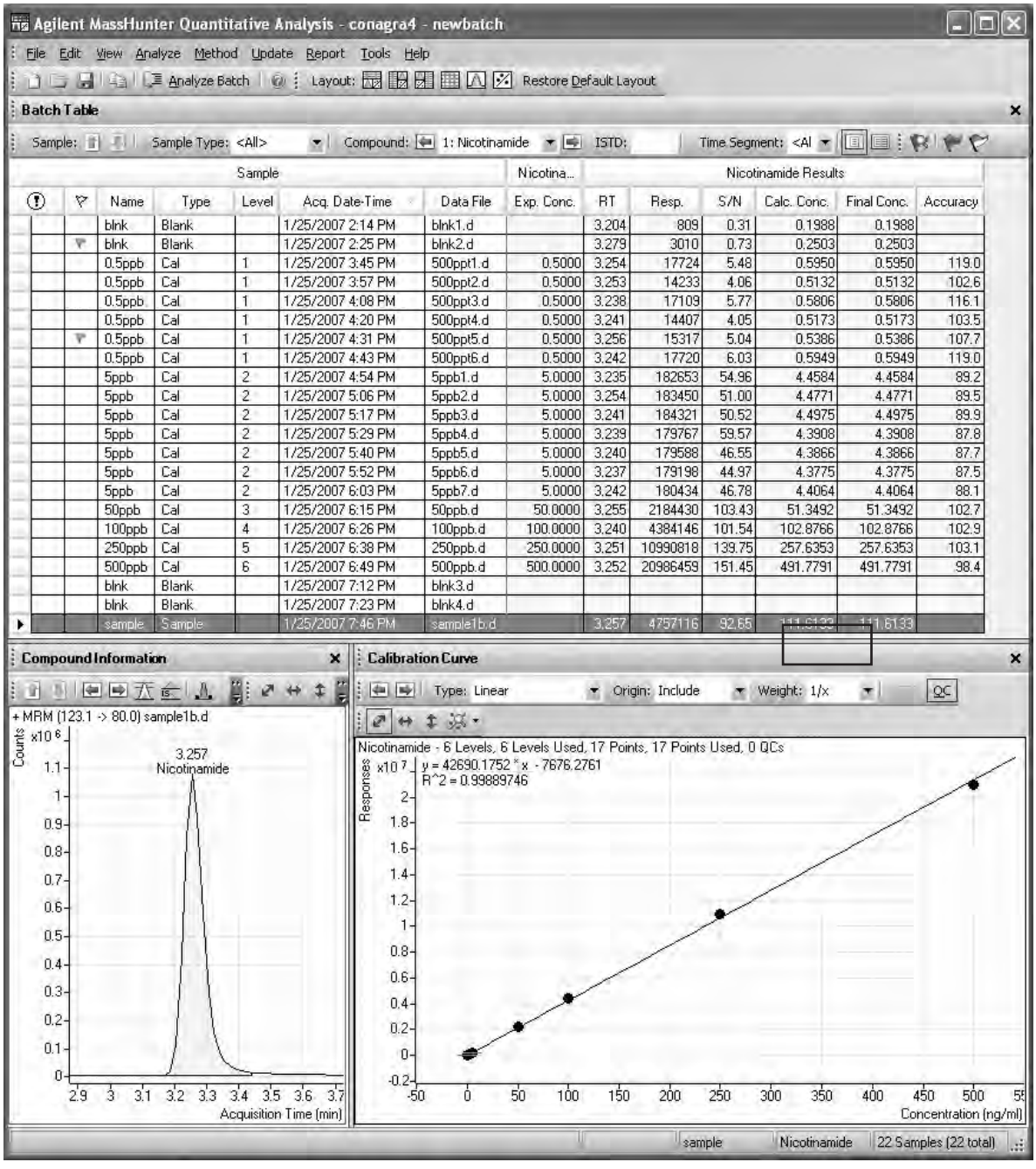


图4. 样品中尼克酰胺的定量批处理结果。浓度计算为 111.6 pg/µL（突出显示）

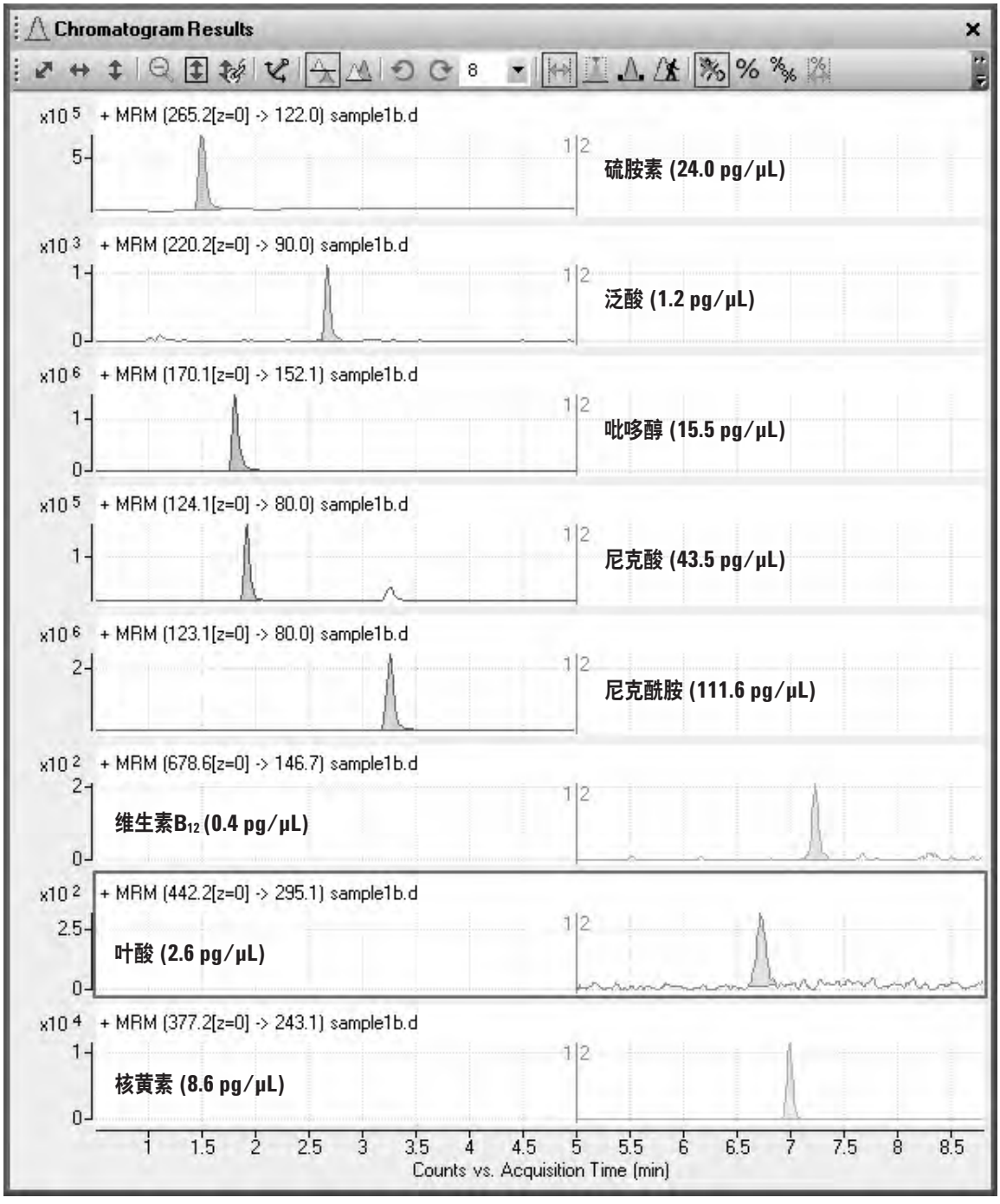


图 5. 添加提取物中各化合物的色谱图和浓度计算结果

结论

采用 LC/MS/MS 成功分析了水溶性 B 族维生素。本方法对所有化合物表现出超过三个数量级的良好线性，$R^2 > 0.99$。在最低定量浓度下测定吡哆醇的重现性低至 2.5% RSD。成功分析了一种添加样品提取物，仅维生素 B12 的浓度低于定量限。

快速灵敏的 LC/MS/MS 方法用于咖喱粉和辣椒粉中苏丹红的分析

应用

食品安全

作者

Yanyan Fang
Agilent Technologies, Inc.
412 Ying Lun Road
Pu Dong, Shanghai 200131
China

Jeffry Keever
Agilent Technologies, Inc.
200 Regency Forest Drive, Suite 330
Cary, NC 27518-8695
USA

Dustin Yaworsky and Jerry Zweigenbaum
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

使用安捷伦 G6410 型三重串联四极杆质谱建立了不同基质（包括咖喱粉、红椒粉和辣椒制品）中苏丹红的分析方法。用四种不同基质对该方法的性能进行了评价，结果显示几乎没有基质效应。三个数量级的响应值呈线性（r>0.99）。另外，两种必需的子离子比值具有良好的重现性，符合欧盟关于结构确认所需的鉴定条件。

引言

一类叫做苏丹红染料的色泽添加剂由一系列的红色着色剂组成，包括苏丹红 I 至苏丹红 IV。这类着色剂与其它染料，如对位红，都属于合成偶氮染料。由于它们的降解产物被认为具有致癌和致畸作用，欧盟和美国不允许将这些着色剂用于食品添加剂。然而，在有些国家，这类染料仍偶有用于加强柿子椒和辣椒粉的颜色。

红色染料苏丹红 I、II、III、IV 是在皮革和纺织行业允许使用的脂溶性偶氮染料。世界卫生组织 (WHO) 的国际癌症研究机构 (IARC) 将苏丹红染料评估为第三类遗传毒性致癌物 [1]。工业染料对位红的化学结构与苏丹红 I 相似，同样不允许在食品中使用。

欧盟发布的第 2003/460/EC 号决议要求所有进口的辣椒和辣椒产品均应做过苏丹红 I 检测，并将其作为允许进口的条件之一 [2]。该决议在 2004 年 1 月进行了修订（2004/92/EC），补充了苏丹红II、III 和IV [3]。这一要求目前仍然具有效力。为满足检测要求，使用了高选择性和灵敏度的三重串联四极杆质谱（QQQ）。

实验部分

试剂和材料

乙酸乙酯购自Burdick and Jackson (Morristown, NJ)

HPLC 级甲醇购自 Burdick and Jackson

18MΩ 纯水由 Millipore (Billerica, MA)
的 Milli-Q 合成系统制得

针筒过滤器 (0.2 µm, PTFE) 来自安捷伦，
部件号5185-5843

样品

1. 咖喱粉（House of Spices [India] Inc.）
2. 红椒粉（Korean Farm, Inc.）
3. 红椒粉（Oriental Mascot, Summit Import Corp.）
4. 伍斯特郡辣酱油（Lea & Perrins）

方法概述

标准品制备

1. 标准溶液制备：取对位红、苏丹红 I、苏丹红 II、苏丹红 III 和苏丹红 IV 各 10 mg，分别用乙腈-水 (90:10) 溶解并稀释至 100.00 mL，得到最终浓度为 100 ppm 的溶液。
2. 稀释液制备：用乙腈稀释并制成浓度分别为 1 ppm, 0.1 ppm, 10 ppb, 5 ppb, 2 ppb 和 100 ppt 的溶液。

样品制备

1. ***咖喱粉***取**标准溶液** 10 µL，加入 1 g 咖喱粉中，用乙酸乙酯5 mL稀释，超声处理 10 分钟。该溶液用 0.22 µm 针筒过滤器滤过，并在 40 ℃ 的氮气流中挥干（下同）。残渣溶解于 1 mL 乙腈中，在进样前再次滤过。样品溶液未进行其它的净化处理。获得的加标样品浓度为 1 ppm。重复上述加入标准溶液过程，获得浓度水平为 100, 10, 1 和 0.1 ppb 的加标样品。
2. ***两种红椒粉***使用咖喱粉样品的制备方法制得加标样品。
3. ***伍斯特郡辣酱油***取标准溶液 10 µL，加入 1 mL 辣酱油中。辣酱油的 pH 值约为 3，用乙酸乙酯5 mL稀释，超声处理 10分钟。取该溶液在8000 rpm 离心2 分钟，移取上层溶液（乙酸乙酯层）至一干净试管中，在40 ℃的氮气流中挥干。残渣用 1 mL乙腈重新溶解，并超声1分钟。该溶液在进样前滤过。

LC/MS/MS 条件

所有分析均在 Agilent 6410 型三重串联四极杆质谱仪上进行，配有电喷雾离子源以正离子模式离子化。高效液相色谱仪是Agilent 1200 液相色谱系统，配备二元泵和多孔板自动进样器。LC 和 MS 条件见表 1。

质谱分析分为五个区段，每个区段包含一个被分析物。对于该区段中洗脱的每种被分析物，有其合适的解离电压和碰撞能量。区段 1 始于 0 min，区段 2 始于 2.0 min，区段 3 始于 2.8 min，区段 4 始于 3.6 min，区段 5 始于 4.2 min。

表 1. LC/MS 条件

HPLC	
色谱柱	ZORBAX XDB C18 2.1 mm x 100 mm, 1.8 µm 安捷伦部件号：928700-906
流速	0.4 mL/min
流动相	A: 0.1% 甲酸水溶液 B: 0.1% 甲酸乙腈溶液
梯度	0.1–4 min, 70~98% B 4–5 min 98% B 5–7 min 70%
总运行时间	10 min（包括重新平衡）
温度	40 °C
进样量	5 µL
MS 离子源设置	
离子源	ESI
离子极性	正离子模式
干燥气温度	350 °C
干燥气流速	10 L/min
雾化器压力	45 psi
毛细管电压 (V_{cap})	3500 V
MRM 参数	见表2

结果与讨论

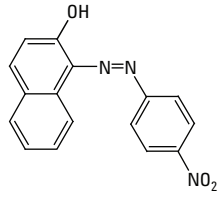
每种染料均以 LC/MS/MS 进行子离子扫描分析，并检查了谱图质量。选择了用于定量分析和结构确证的合适的裂解反应离子。各种化合物的结构式如下所示。偶氮键在碰撞诱导解离条件下裂解，并产生特征碎片离子。

MS 条件的优化

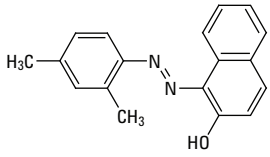
优化通常包括寻找能使母离子丰度最大的解离电压和使裂解反应离子丰度最大的碰撞能量。解离电压的优化是通过逐步调节电压值，同时记录峰强度来进行的，苏丹红 I 的解离电压优化如图 1 所示。其它化合物均以相同的步骤进行优化。图 2 显示了两种碰撞能量 (CE) 条件下苏丹红 I 的裂解离子 MS/MS 谱图。从谱图中可见，*m/z* 156 的裂解离子在 15 V 时强度最大，而 *m/z* 93 的裂解离子在 25 V 时强度最大。一般情况下，选择丰度最大的离子用作定量以获得最小浓度水平下的最佳精密度和准确度，而选择丰度小一些的离子作为定性离子用于结构确证。然而，为了使得选择性最高，需要寻找特征裂解反应离子。例如苏丹红 I，裂解离子 *m/z* 93 是由于偶氮键和氢原子裂解而产生的苯胺自由基阳离子 [4]。这一裂解反应同时产生裂解离子 *m/z* 156，这两种裂解离子都是特征离子。测定不同碰撞能量 (CE) 下所有化合物的两种最大丰度离子的强度，得到的电压值如表 2 所示。其他 MS 设置也包含在表 2 中。

染料结构式

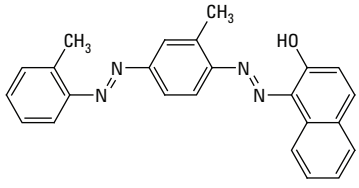
对位红



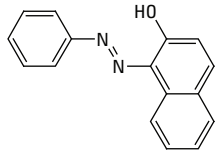
苏丹红II



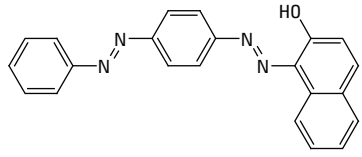
苏丹红III



苏丹红I



苏丹红III



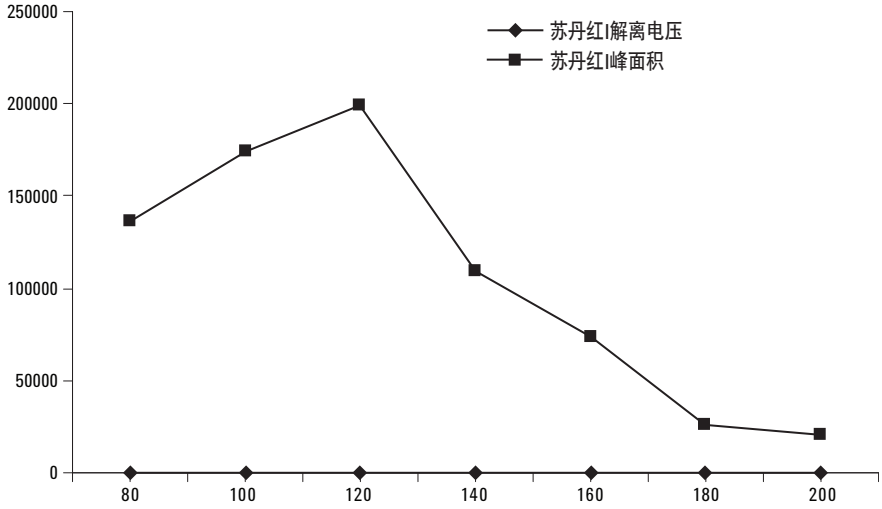


图 1. 苏丹红 I 号解离电压的优化

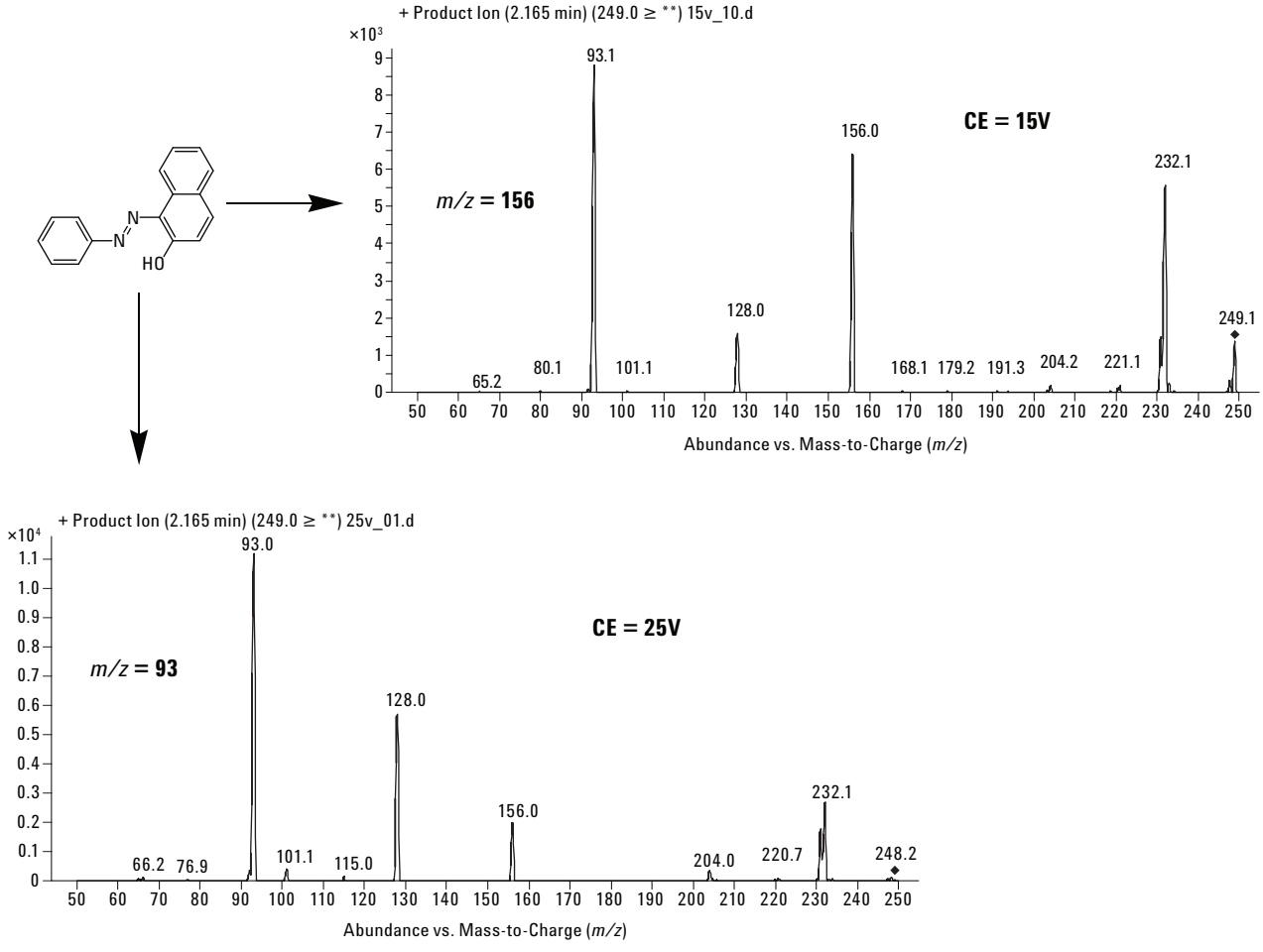


图 2. 碰撞能量 (CE) 为 15 V 和 25 V 条件下苏丹红 I 的 MS/MS 谱图

表 2. MRM MS/MS 参数

被测物	裂解反应	驻留时间 (msec)	解离电压	碰撞能量	MS2 Res.	增益
对位红	294→156	200	120 V	15 V	Unit	1
	294→128	200	120 V	30 V	Unit	1
苏丹红 I	249→156	200	120 V	15 V	Unit	1
	249→93	200	120 V	25 V	Unit	1
苏丹红 II	277→156	200	100 V	10 V	Unit	1
	277→121	200	100 V	20 V	Unit	1
苏丹红 III	353→77	200	120 V	25 V	Unit	1
	353→197	200	120 V	20 V	Unit	1
苏丹红 IV	381→91	200	120 V	30 V	Unit	1
	381→225	200	120 V	15 V	Unit	1

色谱图和选择性

图 3 显示了色谱分离情况，可以分成各个区段，以进行不同 MS/MS 条件的设置。用 1 ppb 的辣椒粉加标样品进行了方法选择性研究。辣椒粉空白样品见图 4，加标样品中所有 5 种被分析物的定量和定性离子裂解反应如图 5 所示。

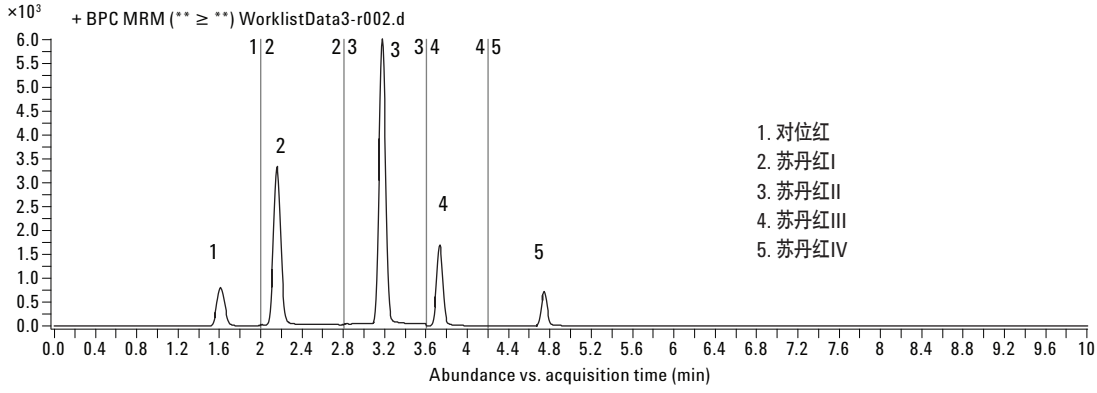


图 3. 苏丹红和对位红的 MRM 色谱图

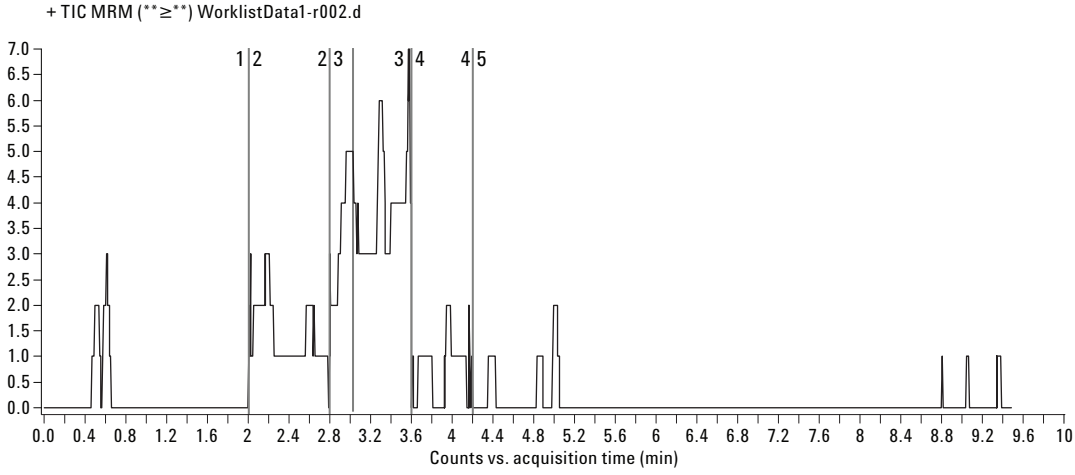


图 4. 空白辣椒粉提取物未见任何被分析物的响应

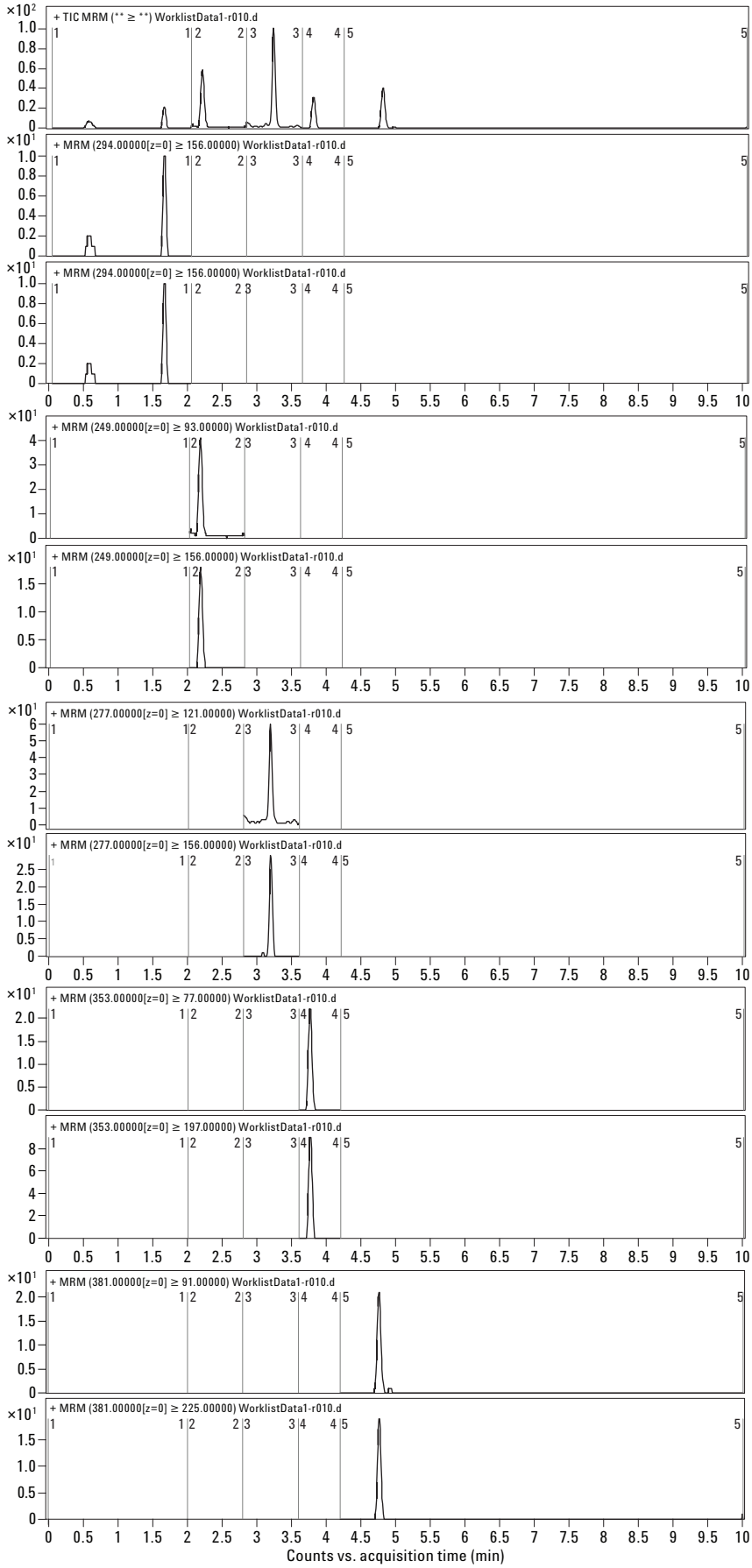


图 5. 1 ppb 辣椒粉加标样品。最上方为总 MRM 色谱图，余下分别为 5 种被分析物的定量和定性裂解离子图

通过离子比值进行结构确证

欧盟的 2002/657/EC 号决议设定了结构确证条件，包括两种 MS/MS 裂解反应离子及其相对比值（丰度最大的两种离子）[5]。这些离子比值的限度标准根据其相对强度给定，如表 3 所示，可见相对比值越高，可接受的允差范围越小。

我们对溶剂和基质中被分析物的离子比值都进行了测定，发现基质对测得的比值几乎没有影响。以苏丹红 I 为例，两种离子的比值见表 4。另外，使用咖喱粉的 1 ppb 加标样品进行了方法的重复性测试。20 次重复测定的结果如表 5 所示，证明方法性能良好，在 25%的允差范围内。所有用于验证研究的样品均满足有关确证标准的要求。

表 3. LC-MS^{n}相对离子强度的最大允许公差

两种裂解反应离子的相对强度（相对于强度最大离子的%）	LC-MS^n 的公差 (%)
> 50	± 20
> 20–50	± 25
> 10–20	± 30
≤ 10	± 50

表 4. 被测基质的100 ppb 加标样品中苏丹红 I 的定量与定性裂解离子比值

基质	比值
溶剂	46.8
咖喱粉（Madras）	48.5
红椒粉（Korean Farm）	46.5
红椒粉（Oriental Mascot）	46.6
伍斯特郡辣酱油（Lea & Perrins）	47.7

表5. 咖喱粉中 1 ppb 苏丹红 I 离子比值的重复性

	定量离子 (249-93)	定性离子 (249-156)	比值
1	130	58	45.0
2	141	65	46.0
3	145	71	48.9
4	152	62	41.0
5	135	66	49.1
6	146	66	45.3
7	134	64	47.7
8	139	69	49.5
9	137	71	51.8
10	147	64	43.9
11	143	61	42.4
12	156	65	41.7
13	147	64	43.5
14	144	64	44.7
15	148	65	44.1
16	152	63	41.2
17	143	68	47.7
18	140	66	46.7
19	141	62	44.2
20	142	62	43.8
平均值	143.1	64.8	45.4
STD (%)	4.49	4.87	6.55

线性、灵敏度和回收率

使用皮尔逊相关系数 (R^2) 作为对标准曲线线性的量度，R^2 值至少为 0.99 才被认为可以接受。各种食品基质中染料的线性均在 0.99 以上，只有 1 ppm 标准溶液例外，表现出饱和性，可能是电喷雾离子流达到了饱和。如果略去该浓度不计，所有基质中所有校正曲线的 R^2＞0.99。其中一个例子见图 6，为红椒粉的苏丹红 I 加标样品。

通过分析浓度为 0.2 ppb 的各个染料标准溶液，对各种染料的检测限进行估计。总 MRM 色谱图如图 7 所示。由于每种信号的噪音都很小，难以准确地确定 3:1 的信噪比。提高电子增倍器的增益，则信号和噪音同时增大，并且使得测定更准确。因此，对于检测限接近这一浓度水平的估计是合理的。

最后，由于伍斯特郡辣酱油的样品制备过程是一种液液萃取，考察了该样品制备过程的回收率。对 100 ppb 和 1 ppb 两种浓度水平分别重复检测三次，回收率测定的结果见表 6，显示了合理的回收率水平。

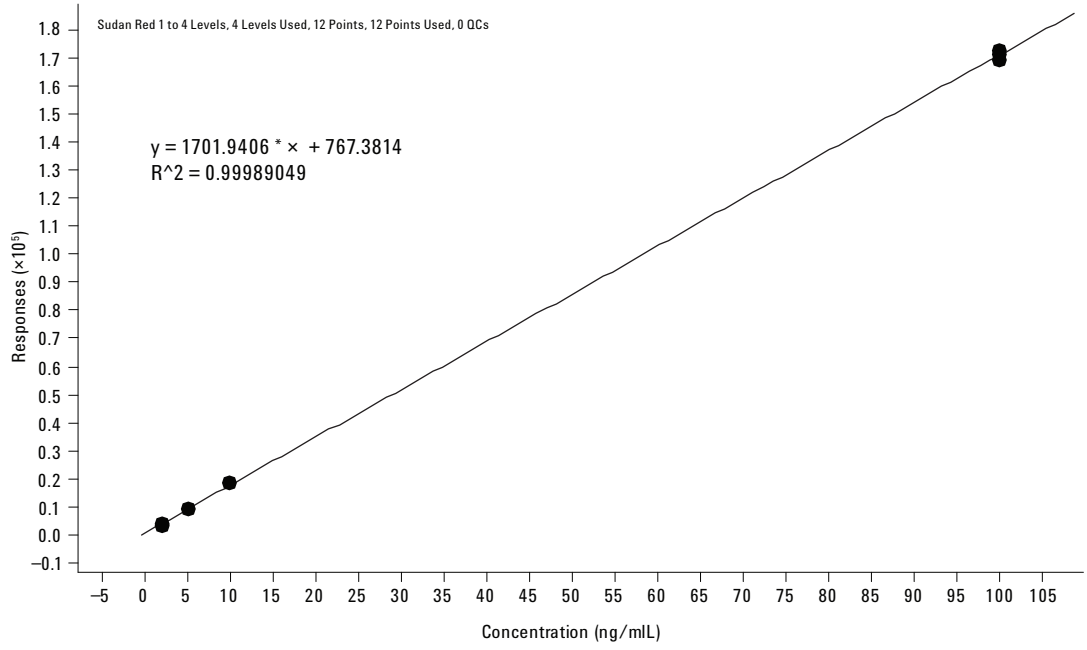


图 6. 辣椒粉中 1 ppb - 100 ppb 苏丹红 I 的标准曲线

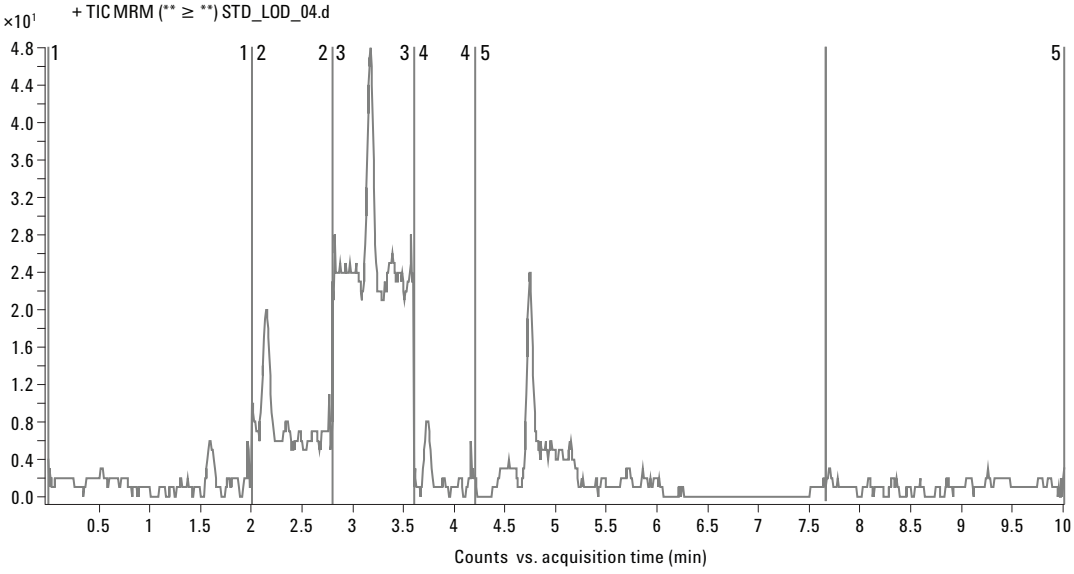


图 7. 溶剂中浓度为 0.2 ppb 的各种染料的 MRM 色谱图，代表接近检测限的响应值

表 6. 伍斯特郡辣酱油中 5 种染料的回收率

	对位红 (%)	苏丹红 I (%)	苏丹红 II (%)	苏丹红 III (%)	苏丹红 IV (%)
100 ppb 回收率 (n = 3)	57.8	71.0	63.4	62.1	70.2
1ppb 回收率 (n = 3)	54.5	66.2	50.1	54.1	51.2

结论

本文中阐述的对四种不同基质中苏丹红类化合物和对位红的分析方法是高效的，符合定量和结构确证的标准。方法优化简单，因为质谱仪的参数很少需要调整。另外，达到了方法确认的基本要求，包括灵敏度、重复性、线性和回收率。这显示 Agilent 6410 型三重串联四极杆质谱系统是用于分析食品调味品中苏丹红和其他偶氮染料的高效仪器。

参考文献

1. IARC *Summaries and Evaluations;* Sudan I; International Agency for Research on Cancer: 1975.
2. 2003/460/EC: Commission Decision of 20 June 2003 on emergency measures regarding hot chili and hot chili products (notified under document number C[2003] 1970) OJ L154/114 (21.6.2003).
3. 2004/92/EC: Commission Decision of 21 January 2004 on emergency measures regarding chili and chili products (notified under document number C[2004] 68) OJ L27/52 (30.1.2004).
4. F. Calbiani, M. Careri, L. Elviri, A. Mangia, I. Zagnoni, “Accurate Mass Measurements for the Confirmation of Sudan Azo Dyes in Hot Chili Products by Capillary Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Quadrupole Orthogonal-Acceleration Time of Flight Mass Spectrometry.” *Journal of Chromatography A* **2004**, 1058, (1–2), 127–135.
5. 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (notified under document number C[2002] 3044), OJ L221/8 (17.8.2002) In 2002; Vol. L221, p 8.

液相色谱-串联质谱联用技术用于牛奶中多残留四环素及其代谢物的检测

应用

食品

作者

Yanyan Fang, Hao Zhai, and Yun Zou
Agilent Technologies (Shanghai), Co.
412 Yin Lun Road 200131
China

Jerry Zweigenbaum
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19809
USA

摘要

四环素类抗生素最频繁地被用于畜牧行业中。本文介绍了液相色谱-串联质谱联用技术同时检测牛奶和动物组织中的 10 种抗生素残留，包括二甲胺四环素、差向土霉素、差向四环素、四环素、差向金霉素、去甲基金霉素、金霉素、甲烯土霉素、多西环素和土霉素。安捷伦固相萃取柱和反相 Agilent ZORBAX RX C8 column (5 µm, 150 mm × 2.1 mm) 色谱柱在此方法中被用于样品的纯化和分离。各组分的检测限介于 0.5 至 10.0 µg/kg 之间，定量限 (LOQ) 小于 50 µg/kg。 线性校正曲线的范围是 5 至 1000 µg/kg。总回收率在 76.4% 至 101% 之间，相对标准偏差 (RSD, n = 6) 小于 8.4%。本方法快速、灵敏、方便、可靠，可以用于牛奶中多残留四环素及其代谢物的同时检测。

前言

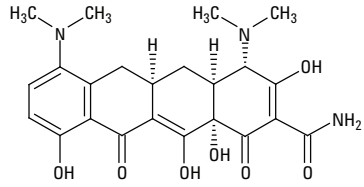
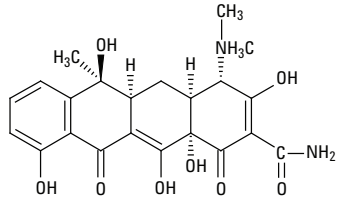
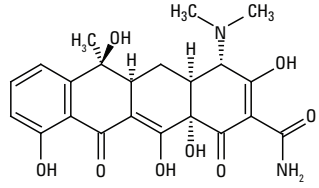
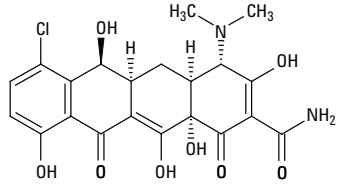
抗生素在世界范围内被广泛地用于控制细菌感染和促进健康家畜的奶产量。四环素类抗生素是一类广普抗生素，因而被广泛使用。但是，在奶及奶制品中含有这些抗生素会影响奶的安全性。

美国食品药品管理局 (FDA) 限定了四环素，包括土霉素和金霉素的日允许摄入量 (ADI) 和牛奶中允许限量。这些化合物总残留的日允许摄入量 (ADI) 是每天每千克体重 25 微克。日允许摄入量 (ADI) 的 60% 是用于牛奶，40% 是可食组织。根据日允许摄入量 (ADI)，牛奶中四环素类，包括土霉素、金霉素和四环素的总残留限量不能超过 300 ppb。四环素的总残留限量被设定为 300 ppb，三种四环素中每个组分的阈值为 300 ppb 也能被接受。

在欧盟，根据欧盟 2377/90 号法令建立的牛奶中四环素的最大残留限量为 100 µg/kg (100 ppb)。在中国，国标 (GB/T 21317-2007) 也设定了牛奶和动物组织中这些化合物的确定方法。该法规于 2008 年 4 月 1 日正式生效。

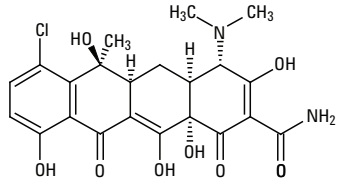
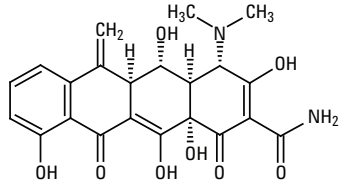
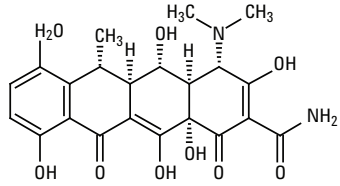
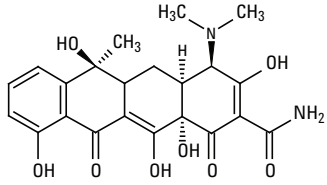
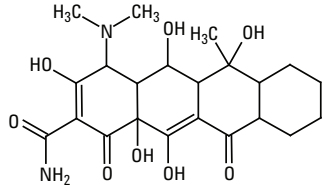
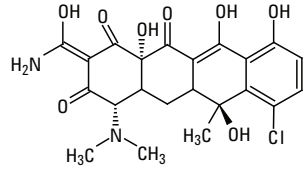
本研究的目的是建立利用 Agilent 6410 LC/MS/MS 系统检测牛奶中四环素及其代谢物的方法。本方法快速而易用。四环素及其代谢物的结构见表 1。

表 1. 本研究中的化合物

序号	化合物名称	CAS 号	结构图
1	二甲胺四环素	10118-90-8	
2	土霉素	6153-64-6	
3	四环素	60-54-8	
4	去甲基金霉素	127-33-3	

(续)

表 1. 本研究中的化合物

序号	化合物名称	CAS 号	结构图
5	金霉素	57-62-5	
6	甲烯土霉素	914-00-1	
7	多西环素	564-25-0	
8	差向四环素	64-75-5	
9	差向土霉素	35259-39-3	
10	差向金霉素	14297-93-9	

实验部分

化学试剂和化学品

液相色谱级的水和甲醇，以及甲酸全部购自 Fluka。标准品都购自 Sigma-Aldrich。

仪器参数

表 2. LC/MS/MS 条件

HPLC	
色谱柱	ZORBAX RX-C8, 2.1 mm × 150 mm, 5 µm (部件号 883700-906)
流速	0.3 mL/min
流动相	A: 水/0.1% 甲酸 B: 甲醇
梯度	0–10 min, B 从 5% 到 30% 10–12 min, B 从 30% 到 40% 12.5–18 min, B 65% 18.5–25 min, B 95% 25.5 min, B 5.0%
运行时间	28 min
运行后时间	5 min
柱温	30 °C
进样量	5 µL
质谱参数	
离子源	电喷雾
离子化模式	正离子模式
干燥气温度	350 °C
干燥气流速	10 L/min
雾化器压力	45 psi
毛细管电压	4000 V

MRM 参数设定

化合物名称	碰撞诱导解离电压 (V)	母离子	子离子	碰撞能量	保留时间 (min)
二甲胺四环素	120	458	352	35	
			441	20	8.58
差向土霉素	120	445	410	20	
			427	10	8.60
差向四环素	120	461	426	20	
			444	15	9.47
四环素	120	445	410	20	
			427	15	9.90
土霉素	120	461	426	20	
			443	10	9.95
去甲基金霉素	120	465	430	25	
			448	15	11.25
差向金霉素	120	479	444	22	
			462	15	11.59
金霉素	120	479	444	22	
			462	15	12.95
甲烯土霉素	120	443	381	25	
			426	15	13.98
多西环素	120	445	154	30	
			428	15	14.08

样品前处理

提取步骤：

1. 称 5 克牛奶样品（精确至 0.01 g）加入到 50 毫升比色管中，溶于 0.1 M/L Na_2EDTA-Mcllvaine 缓冲液，定容至 50 毫升
2. 涡旋震荡 1 分钟，提取液在冰水混合液中超声 10 分钟
3. 将样品转移至 50 毫升聚丙烯离心管中并冷却至 0 °C ~ 4 °C
4. 样品在 15 °C 下， 5000 r/min 离心 10 分钟
5. 快速滤纸过滤

净化：

1. 取 10 毫升提取液（相当于 1 g 样品），倒入安捷伦 SampliQ OPT 型固相萃取柱 (部件号 5982-3036)，速度为每秒一滴
2. 当它完全洗脱后，用三氟乙酸调节 3 mL 水至 pH 4.5 清洗固相萃取柱，然后丢弃所有流出物
3. 在 2.0 kPa 的负压下，抽固相萃取柱 5 分钟
4. 用 10 mL 的 10 mmol 乙二酸的甲醇溶液洗脱
5. 收集洗脱液，在 40 °C 下氮气吹至干
6. 用 1 mL 的初始流动相溶解残留物
7. 用 0.45 µm 的滤膜过滤，然后进样

结果与讨论

优化和分离

碰撞诱导解离电压和碰撞能量 (CE) 优化

众所周知，三重串联四极杆液质联用系统是识别、确认和定量食品基质中目标化合物的最佳工具。为了获得最高的响应，仅仅每个组分的两个参数被用于质谱优化，即碰撞诱导解离电压和碰撞能量。合适的碰撞诱导解离电压是为了将母离子最大化地传输至质量分析器。合适的碰撞能量提供合格子离子的最高丰度的定量。

一种优化方法是在一次运行中设定不同的碰撞诱导解离电压段来多次进样。图 1 是二甲胺四环素采用该方法的图示。结果表明，对于二甲胺四环素，随着电压增加，母离子响应增加很少。采用同样的方式优化碰撞能量，四环素的结果见图 2。

最近安捷伦公司推出了方法自动优化 (Optimizer) 程序，它可以自动进行碰撞诱导解离电压和碰撞能量的优化，最后将最优值存于 Optimizer 数据库中。利用这个程序和带色谱柱或不带色谱柱的流动进样模式，用户只要输入要优化的化合物名称和分子式即可。表面质量会根据分子式自动被计算出来。用户需要指定正模式或负模式下可能的加合物、小质量去除、任何需要排除的离子以及需要采用的方法（流动相条件等）。一旦开始运行，程序通过用户选择的一次进样增加量开始进样，确定母离子并利用步进式的电压梯度进行碰撞诱导解离电压的优化。然后程序选择电压产生最高丰度的母离子。图 3 是四环素采用该方法的结果。

随后二次进样开始进行子离子扫描，然后选择四个最高丰度的子离子。重复进样并运行 MRM 采集每个离子的最优碰撞能量。那些生成最强信号子离子响应的碰撞能量会自动确定并存入数据库。对于四环素最优的碰撞能量的结果列于图 4，图 5 是离子碎裂曲线。带子离子的化合物会直接被导入用户的现有分析方法中。

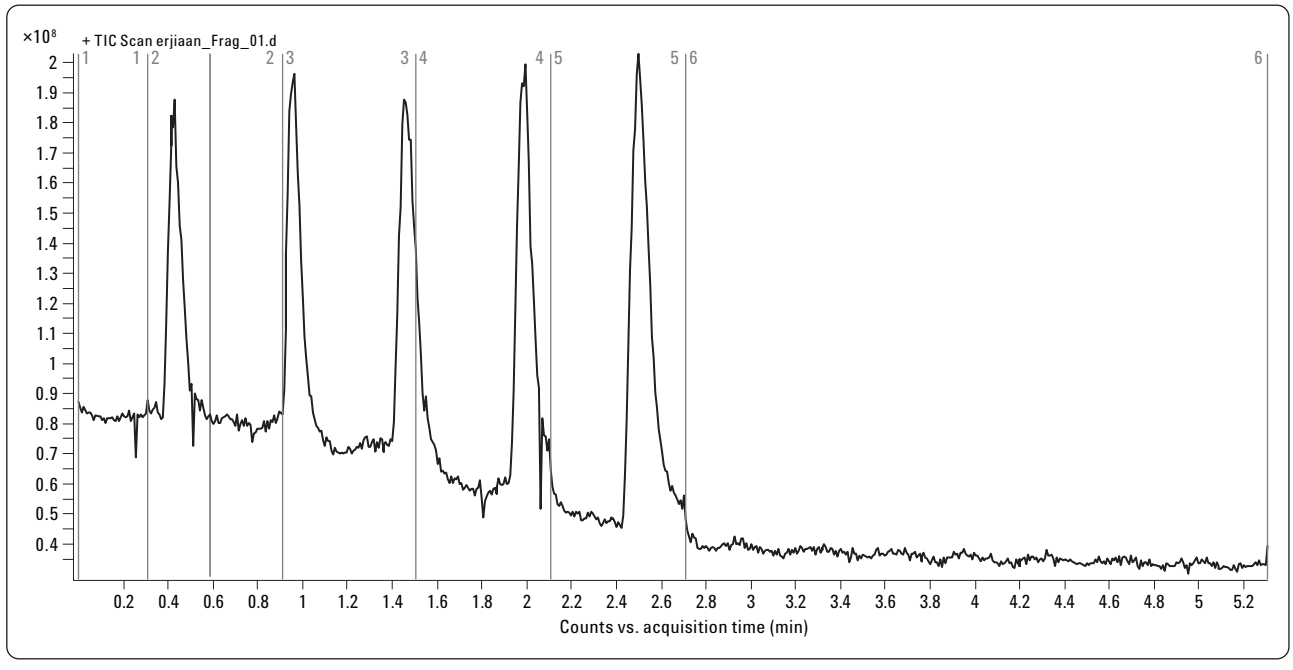


图 1. 对于二甲胺四环素，碰撞电压从 60 至 120，每步 20 V 的优化结果

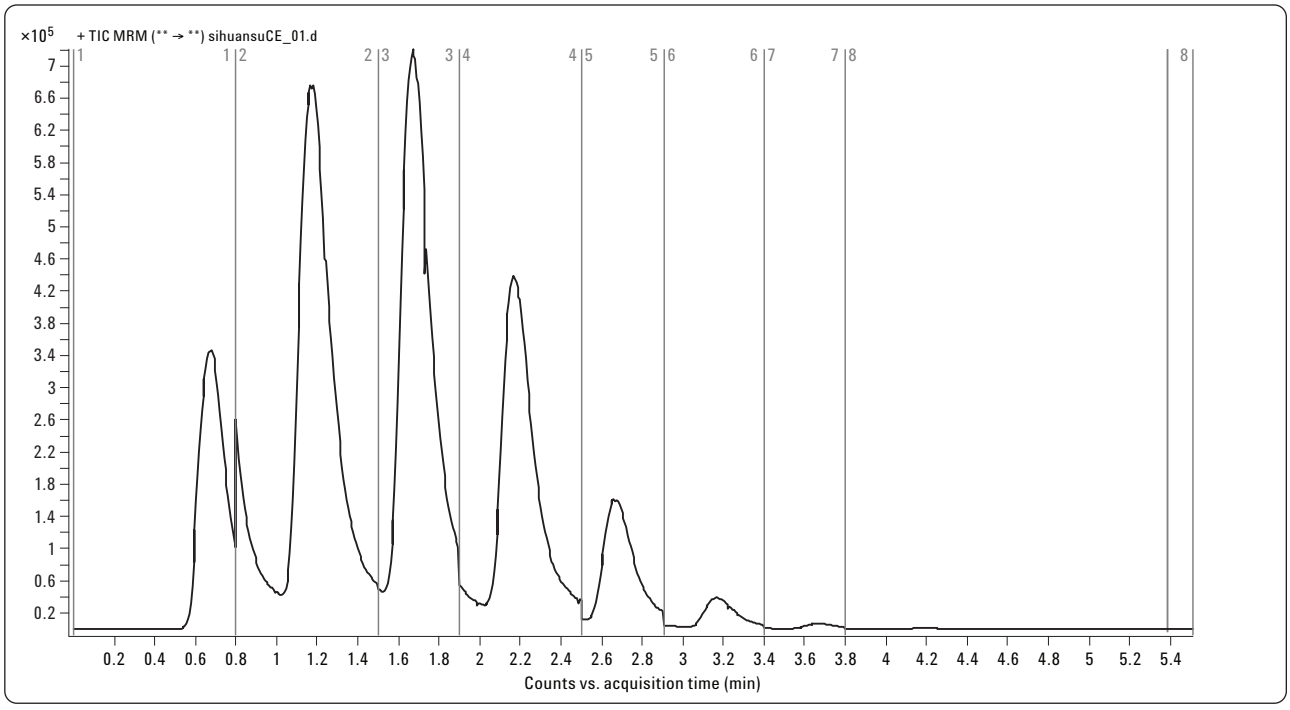


图 2. 四环素最佳碰撞能量的手动优化

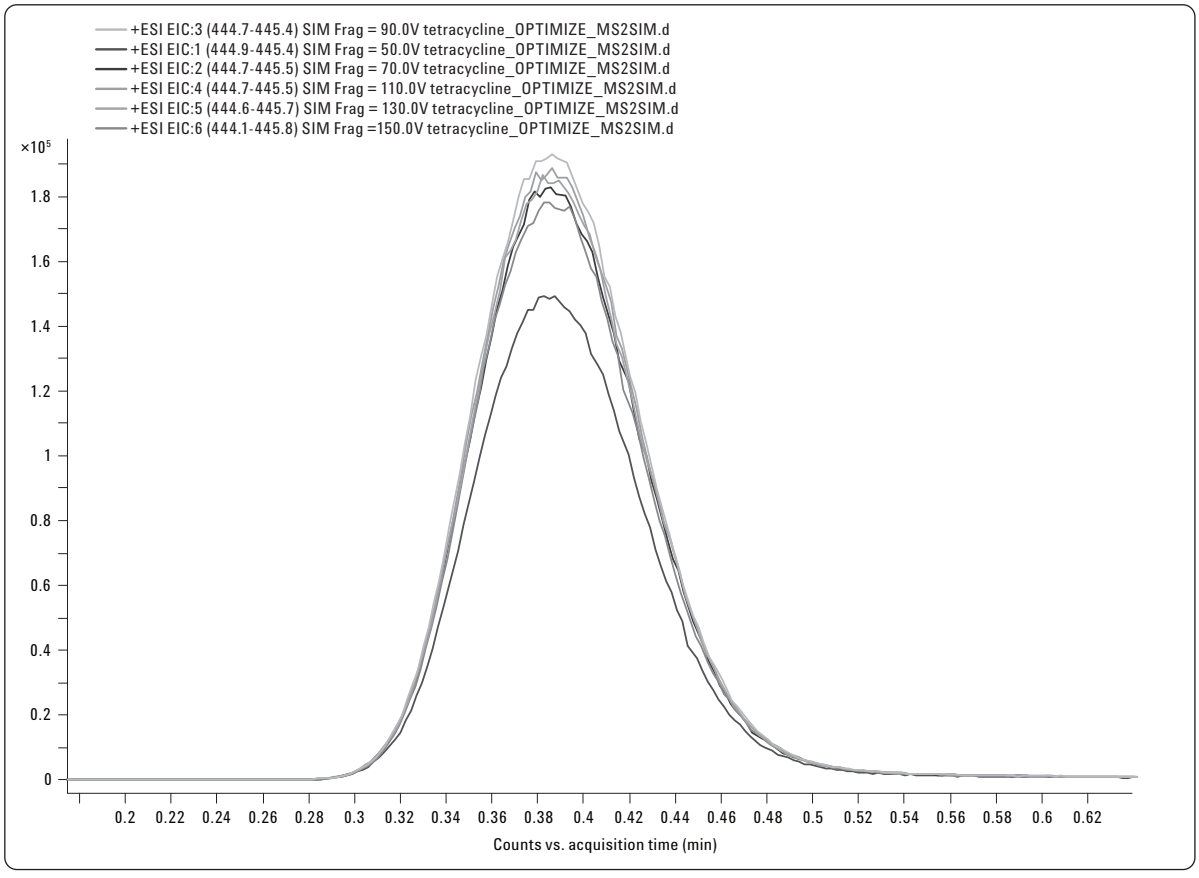


图 3. 使用自动优化 (Optimizer) 程序自动确定四环素一次进样的碰撞诱导解离电压

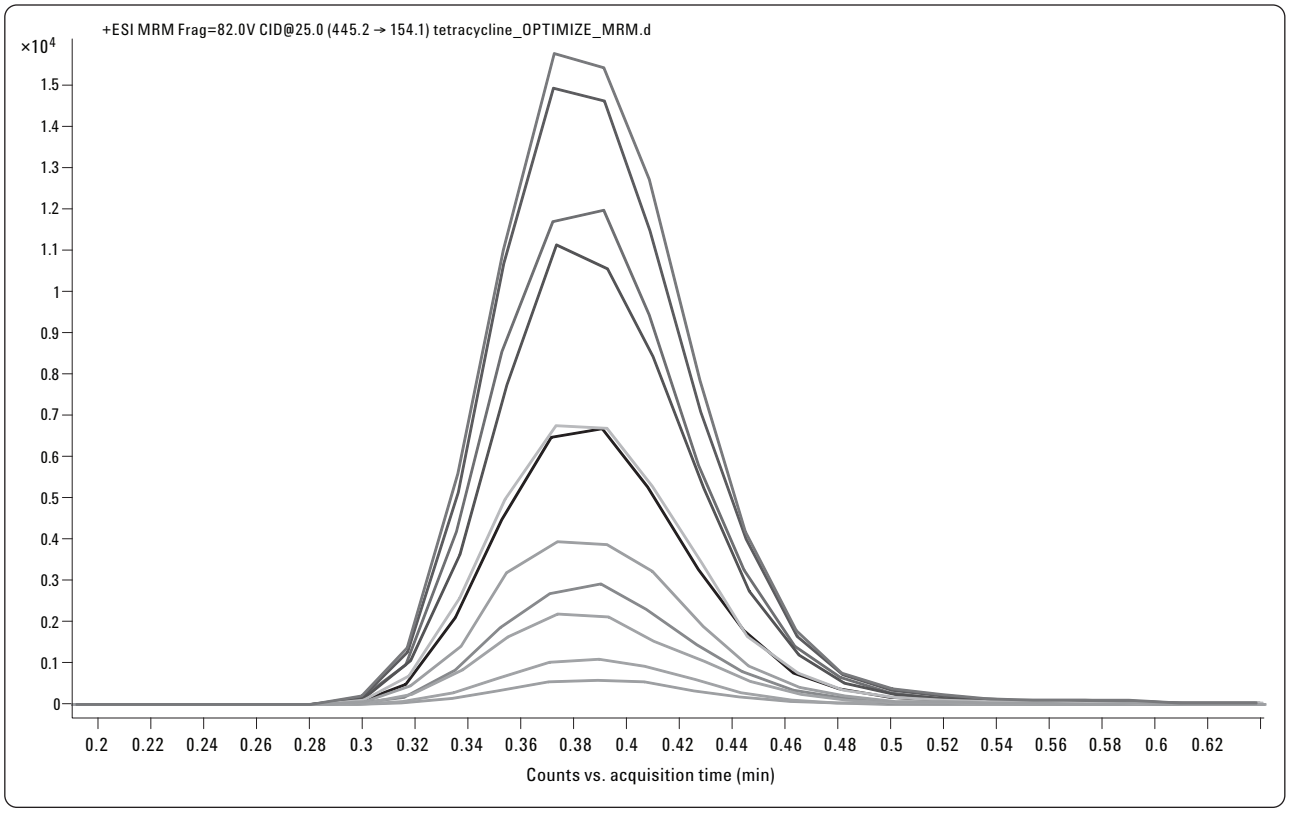


图 4. 使用自动优化 (Optimizer) 程序自动确定四环素一次进样的碰撞能量

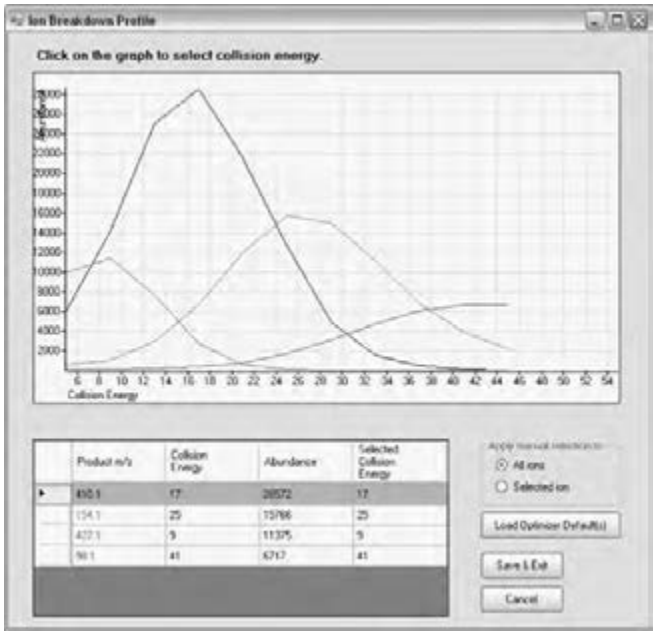


图 5. 自动优化 (Optimizer) 程序得到的离子裂解曲线

分离

四环素、土霉素和金环素的样品处理和分离是非常重要的。这类化合物分离的难点是它们在弱酸、强酸、强碱以及加热的条件下容易发生降解，非对映异构体转化为它的差向异构体。

典型的转化过程参见四环素：

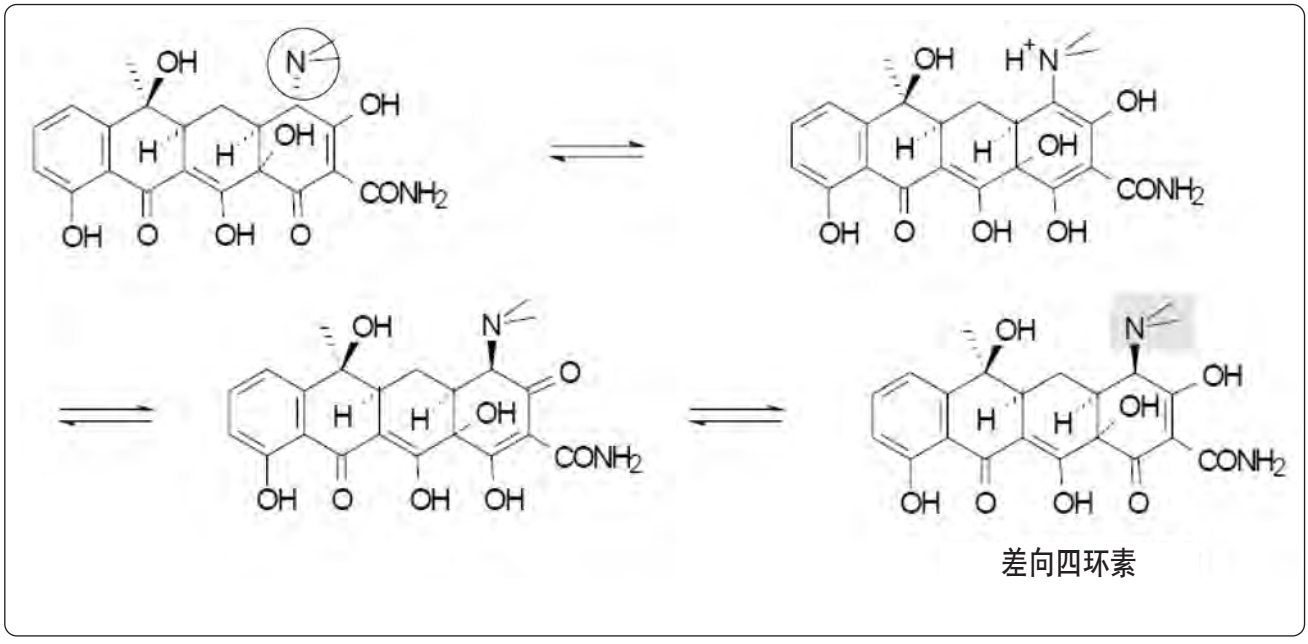


图 6. 四环素到差向四环素的降解过程

四环素及其降解物非对映异构体，它们在串联质谱上具有同样的分子式和同样的碎片离子。因而它们具有相同的母离子、定性离子和定量离子。为了在高分离度快速液相色谱仪 (RRLC) 上识别和确认它们，组分的分离对该分析是重要的。色谱柱采用 ZORBAX Rx-C8, 2.1 mm × 150 mm, 5-µm 和简单的梯度洗脱，结果表明三个异构体得到了很好地分离。参数设置及保留时间见表 2。图 7 是四环素和它的非对应异构体分离的色谱图。

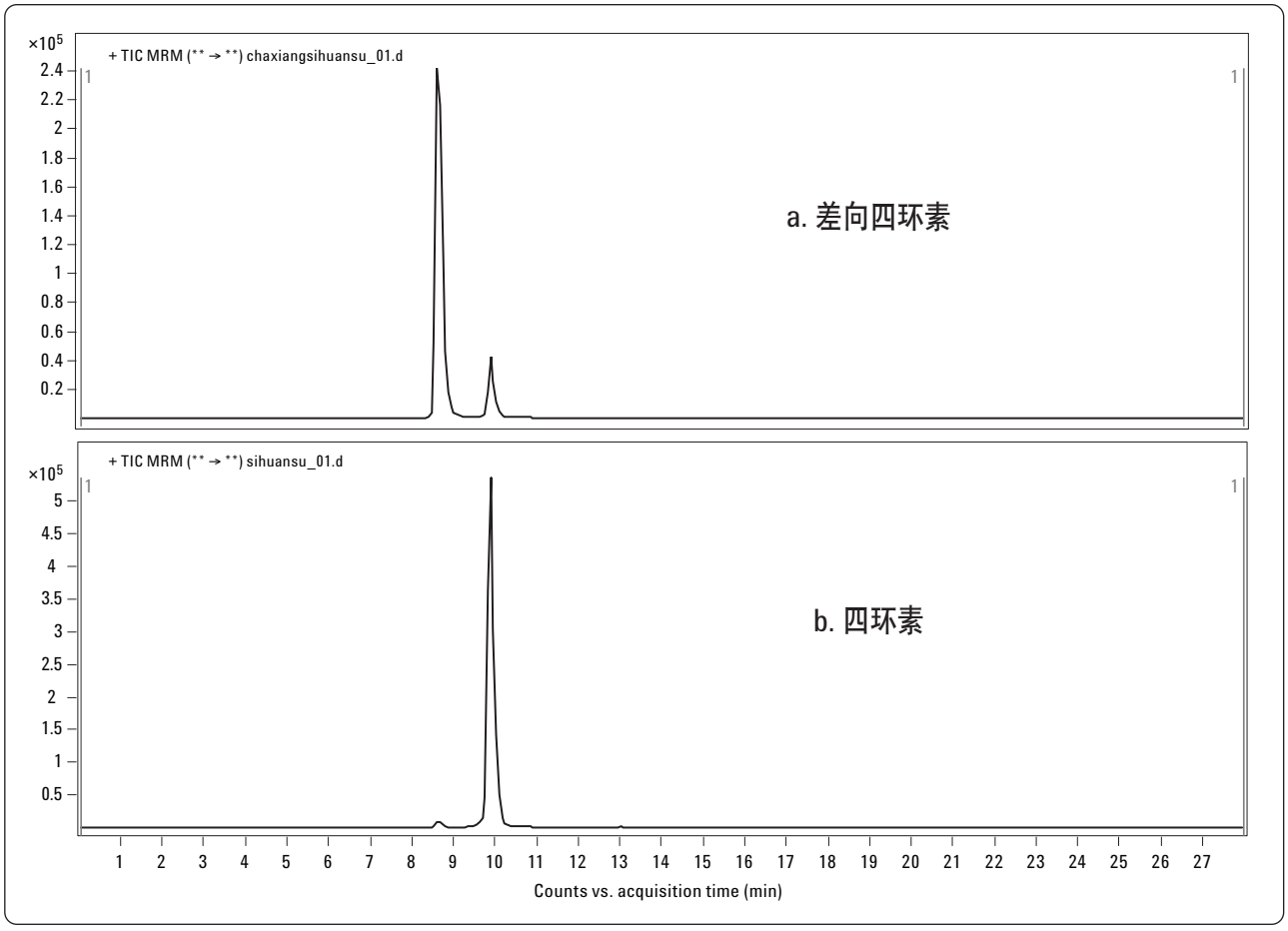


图 7. 四环素和它的降解产物差向四环素的分离色谱图

线性, 检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)

利用标准溶液和牛奶基质考察了线性范围、检测限和定量限。结果列于表 3 中。结果表明标准溶液和牛奶基质的线性相似，线性系数一般都大于 0.99。四环素类化合物在电喷雾离子条件下的离子化不是太好，但仍然可以获得柱上低皮克级水平的检测限灵敏度。定量限是根据信噪比为 10:1 定义的。二甲胺四环素的校正曲线见图 8。

表 3. 溶剂和牛奶基质中四环素的定量结果

	标准溶液*			牛奶基质的标准液*	
化合物	R^2	定量限 (LOQ ,S/N=20) 柱上 pg 级	检测限 (LOD S/N=3) 柱上 pg 级	R^2	检测限 (LOD , S/N=3) 柱上 pg 级
二甲胺四环素	0.999	41.5	6.2	0.990	16.3
差向土霉素	0.991	10.8	1.6	0.994	8.7
差向四环素	0.996	14.7	2.2	0.996	12.8
四环素	0.998	9.4	1.4	0.994	10.2
土霉素	0.996	10.7	1.6	0.991	8.6
去甲基金霉素	0.999	22.8	3.4	0.993	8.1
差向金霉素	0.986	38.2	5.7	0.987	11.9
金霉素	0.986	8.1	1.2	0.994	7.6
甲烯土霉素	0.999	20.8	3.1	0.994	12.3
多西环素	0.999	32.2	4.8	0.995	11.2

注*：校正曲线的范围是 1 ppb-1 ppm ， 进样量 5 uL

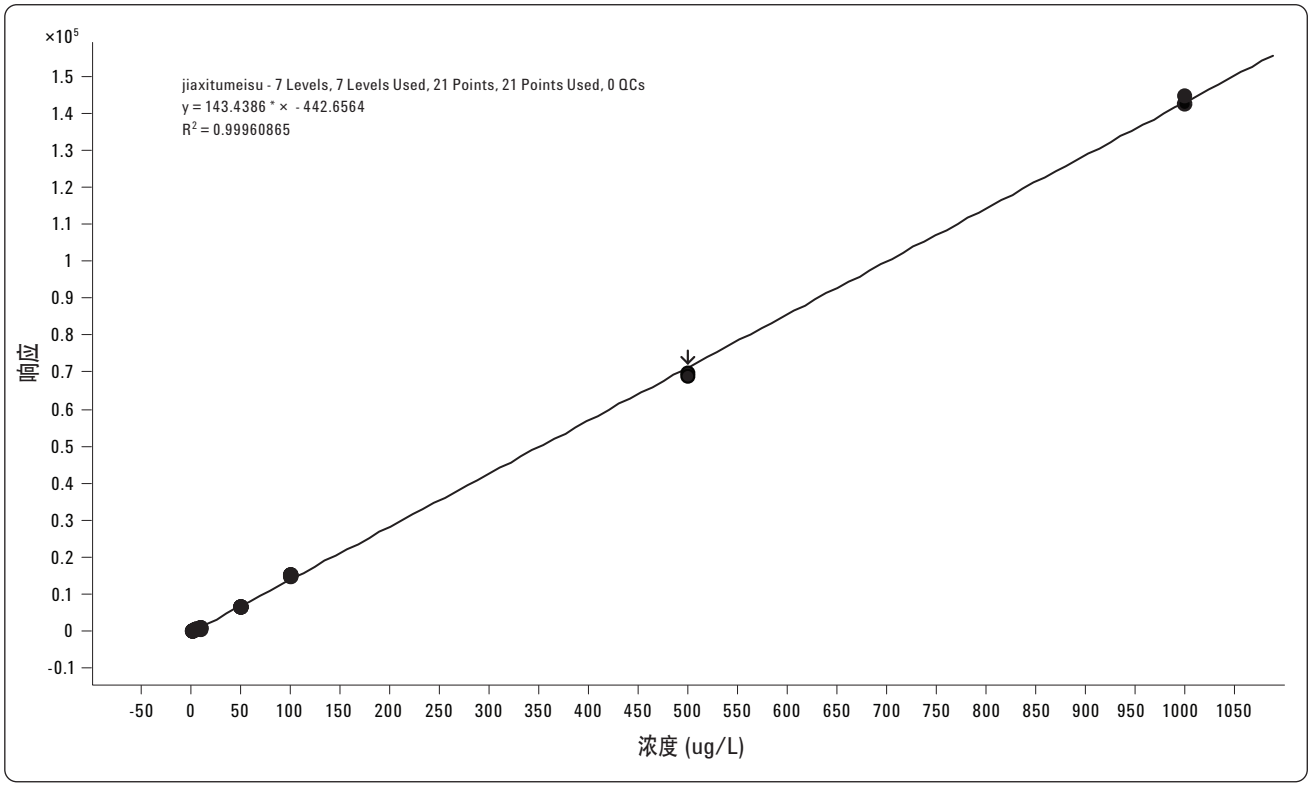


图 8. 四环素的校正曲线，范围是 1 ppb 至 1000 ppb

回收率和重现性

表 4 是方法回收率和重现性考察的结果。所有组分的回收率都大于 80%，这是可以充分接受的。另外表中的精密度在低浓度下一般优于 5%，高浓度下优于 2%。用于化合物确认的离子比例也是非常性能标准，结果显示具有优异的重现性。图 9 是甲烯土霉素离子比例的结果。离子比例和相应的保留时间为化合物的确认提供了必要证据。

表 4. 牛奶基质中样品回收率和重现性

化合物	牛奶基质中的回收率 (浓度 50 ppb n=6)	RSD % (信号响应 n=6)	RSD % (离子比例 n=6)	牛奶基质中的回收率 (浓度. 100 ppb n=6)	RSD % (信号响应 n=6)	RSD % (离子比例 n=6)
二甲胺四环素	96.5	4.9	2.1	101.4	1.6	1.0
差向土霉素	89.2	3.8	1.5	96.3	1.6	0.9
差向四环素	84.4	5.4	1.3	88.2	0.9	0.6
四环素	86.1	2.5	1.2	90.7	1.1	1.2
土霉素	77.6	3.8	1.6	82.5	1.2	0.9
去甲基金霉素	79.2	2.0	3.1	84.7	0.9	0.6
差向金霉素	76.4	5.5	5.4	84.3	1.1	0.5
金霉素	94.3	4.5	1.5	100.9	1.8	1.1
甲烯土霉素	86.3	1.0	1.9	91.2	1.2	0.8
多西环素	78.7	3.6	6.7	82.4	1.0	0.8

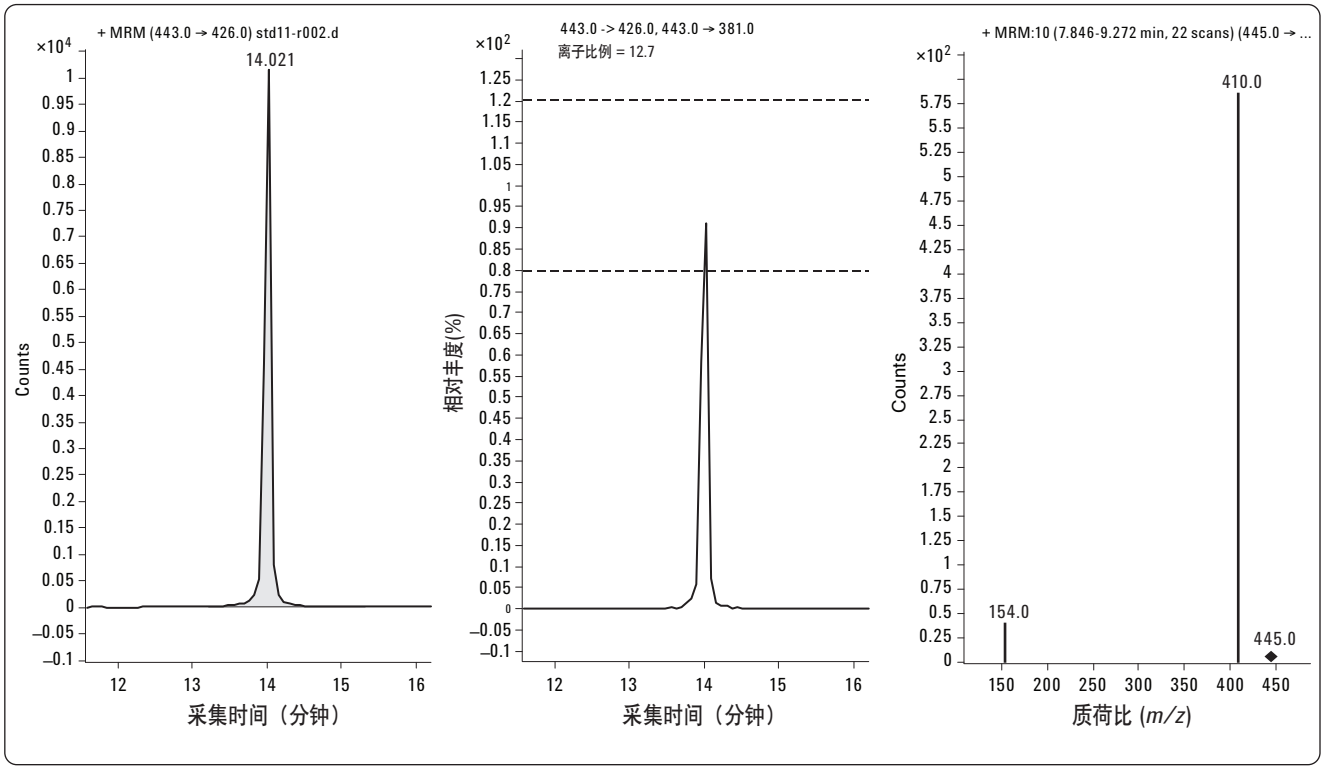


图 9. 甲烯土霉素合格离子和定量离子的离子比例

离子抑制效应的研究

通常串联质谱可以去除化学噪音，获得更“干净”的谱图，即使是分析高基体和复杂基体样品。然而，基体中含有的化合物可能会抑制分析物的离子化。图 10 为甲烯土霉素和四环素在溶剂和牛奶基质中的信号响应的比较。每条曲线斜率的差异表明牛奶基质导致的离子抑制效应。

由于观察到较强的离子抑制，采用外标定量法 (ESTD) 进行校正，因而与基质相匹配的标准溶液应在不含抗生素的牛奶，或者确定不含被分析物的牛奶中制备。这样可以得到与样品相同的基质效应的校正曲线。

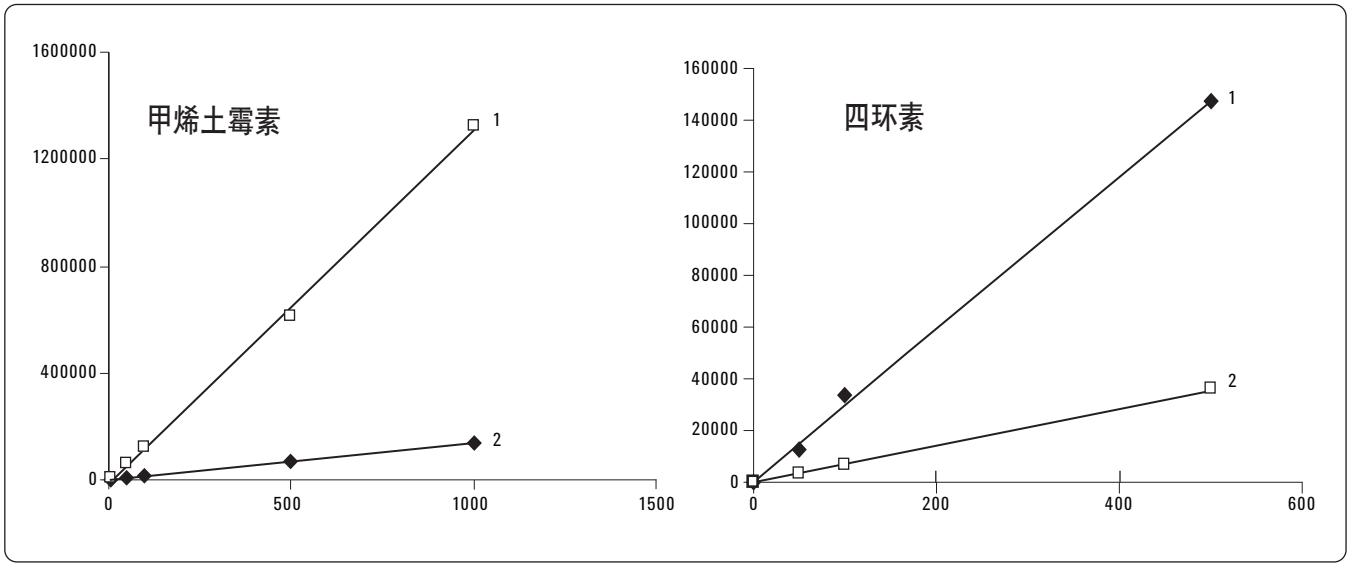


图 10. 牛奶基质中四环素离子抑制效应；1) 纯溶剂的组分响应 2) 牛奶基质中组分响应

结论

结果表明，安捷伦 6410 三重串联四极杆液质联用系统耐用，灵敏度和重复性好，它是牛奶中四环素类抗生素残留检测的理想仪器。中国的国标方法 (GB/T 21317-2007) 要求的检测限是 50 ppb (进样量 100 µL)。本方法轻松满足这些要求。另外，这类抗生素在弱酸、碱性条件下容易降解。而现在采用的方法避免了此降解反应，液相色谱的分离方法将异构体进行分离，获得可靠的定性定量结果。最后，通过抗生素组分在纯溶剂和牛奶基质的信号响应的比较考察了离子抑制效应的影响。对于外标定量分析，即使样品制备的回收率大于 80%，也需要用基质配成的标准溶液建立校正曲线进行定量分析，这样可以获得更准确的结果。

使用 ESI-、APPI-和 APCI/MSD 分析苯基脲和氨基甲酸酯农药

应用

环境与食品

作者

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

摘要

本文使用电喷雾电离源 (ESI) 大气压化学电离源 (APCI) 和大气压光电离源 (APPI) 源的液相色谱/质谱联用技术成功地分析了氨基甲酸酯 (一类高效杀虫剂) 和苯基脲 (一类除草剂)。与 ESI 相比，APPI 和 APCI 检测时背景信号较低和背景峰较少。一般而言，苯基脲用 APCI 或 APPI 分析时比用 ESI 分析得到的信噪比 (S/N) 更高。但是，氨基甲酸酯的情况正好相反，即：用 ESI 分析氨基甲酸酯时得到比用 APCI 或 APPI 更好的 S/N 值。APPI 源需要在柱后加入少量的丙酮作为电离源掺杂剂，用于电荷向待测物的转移。

引言

氨基甲酸酯是一类高效杀虫剂，在全世界广泛用于防止农作物的病虫害。苯基脲则是一类除草剂，是农业除草用的高效化学药品。所有这些农药都会存积在地下水和地表水样品中成为潜在内分泌干扰物。

气相色谱/质谱 (GC/MS) 联用在传统上一直用于分析环境样品中中的杀虫剂。但由于这些化合物的热不稳定性，液相色谱已经成为分离这些农药的一种选择。许多同类的杀虫剂具有类似的紫外 (UV) 光谱图。随着大气压电离源 (API) 技术的发展，液相色谱/质谱 (LC/MS) 联用已经成为分析地下水和地表水污染物的优选方法。LC/MS 比二极管阵列检测器 (DAD) 的选择性和专属性更好，即使待测物不能与相邻的色谱峰完全分开，LC/MS 也能获得良好的分析结果。

本文用 3 种不同的 API 源进行对比研究：电喷雾电离源 (ESI)、大气压化学电离源 (APCI) [1] 和大气压光电离源 (APPI) [2]。在 ESI 中，离子化过程发生在溶剂蒸发过程之前。因此，它是一种用于极性化合物的更通用的离子化技术。在 APCI 和 APPI 中，直到溶剂蒸发之后，被分析质才发生离子化。APCI 包括在离子化反应气体和待测物之间的电荷转移（质子或电子）。APPI 要求待测物和/或一种掺杂剂能从 10.6 eV 氪光中吸收质子而被离子化。随后，掺杂剂将电荷转移到待测物，这可以看作是光致化学电离。

实验

浓度为 10 ppm (ng/µL) 的氨基甲酸酯和脲杀虫剂混合物的乙腈溶液购于 AccuStandard (New Haven, CT)。用乙腈稀释上述溶液得到一系列标准溶液用于研究线性关系。图 1 和图 2 分别显示了这些化合物及其结构。所有实验都在 2 台 G1946D LC/MSD 系统上完成，其中一台配有 ESI，另一台配有 APCI/ APPI。表 1 列出了 LC/MS 条件。

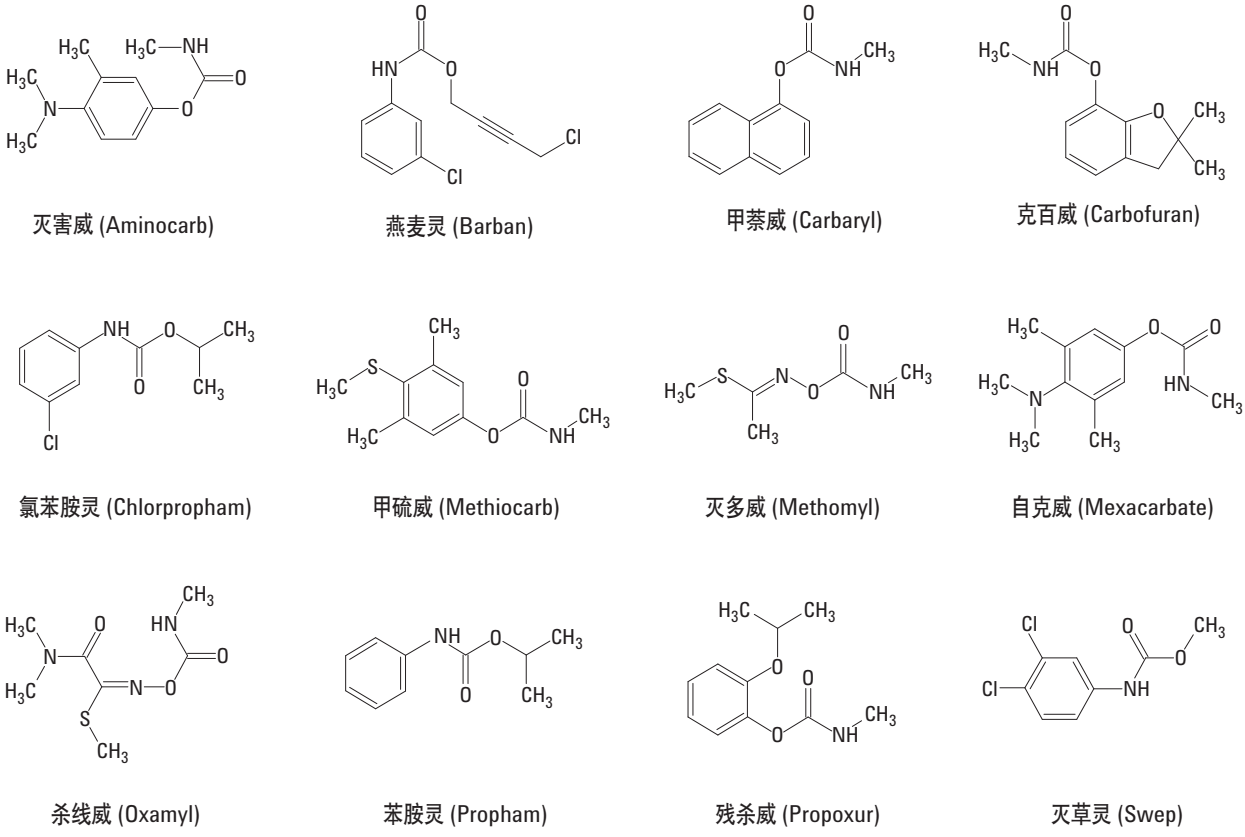


图 1. 本研究使用的 12 种氨基甲酸酯

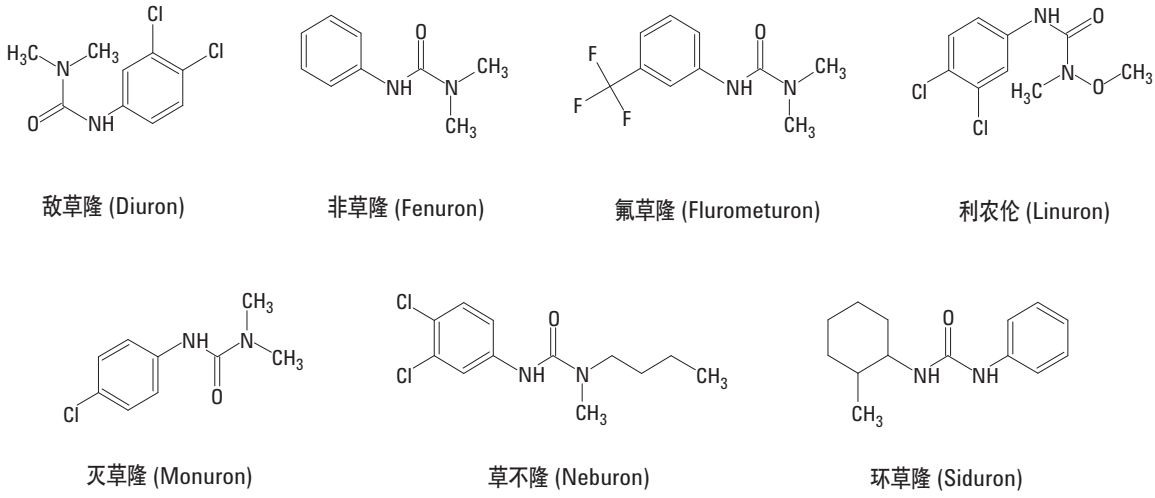


图 2. 本研究使用的 7 种苯基脲

表 1. LC/MS 条件

	ESI	APCI	APPI
色谱柱	Zorbax Eclipse XDB-C8, 4.6 x 50 mm, 3.5 µm (部件号 935967-906)		
柱温	30 °C	30 °C	30 °C
流速	1 mL/min	1 mL/min	1 mL/min
流动相 A	水, 含 0.1% 乙酸或详见文中特别说明	水	水
流动相 B	乙腈，含 0.1% 乙酸或文中特别说明	乙腈	甲醇
柱后	无	无	加入 40 µL/min 丙酮作为掺杂剂
梯度	B: 0 min10%, 4 min 30%, 16 min 80%	B: 0 min 30%, 4 min 40%, 13 min 70%, 16 min 80% 或如图中说明	
进样量	2 µL	2 µL	2 µL
干燥气流速	12 L/min	11 L/min	11 L/min
干燥气温度	350 °C	275 °C	275 °C
碰撞诱导解离电压（CID 电压）	60 V	110 V	110 V
毛细管电压 (Vcap)	3500 V	4500 V	4500 V
雾化器压力	60 psi	35 psi	35 psi
气化器	无	225 °C	225 °C
步长	0.1	0.1	0.1
峰宽 (min)	0.15	0.15	0.15
时间过滤器	关	关	关
扫描范围 (*m/z*)	150-800	115-500	115-500
极性	正	正	正

结果与讨论

图 3 显示在 APPI 中增加柱后掺杂剂（丙酮）可显著改善待测物的响应值。进入雾化器之前，丙酮以 40 µL/min 的流速引入柱流出物。从图可见，某些待测物的峰高增加了 1000 倍。待测物之间的峰高增加倍数不同可能是因为它们的结构不同以及与掺杂剂的电荷转移效率的不同。

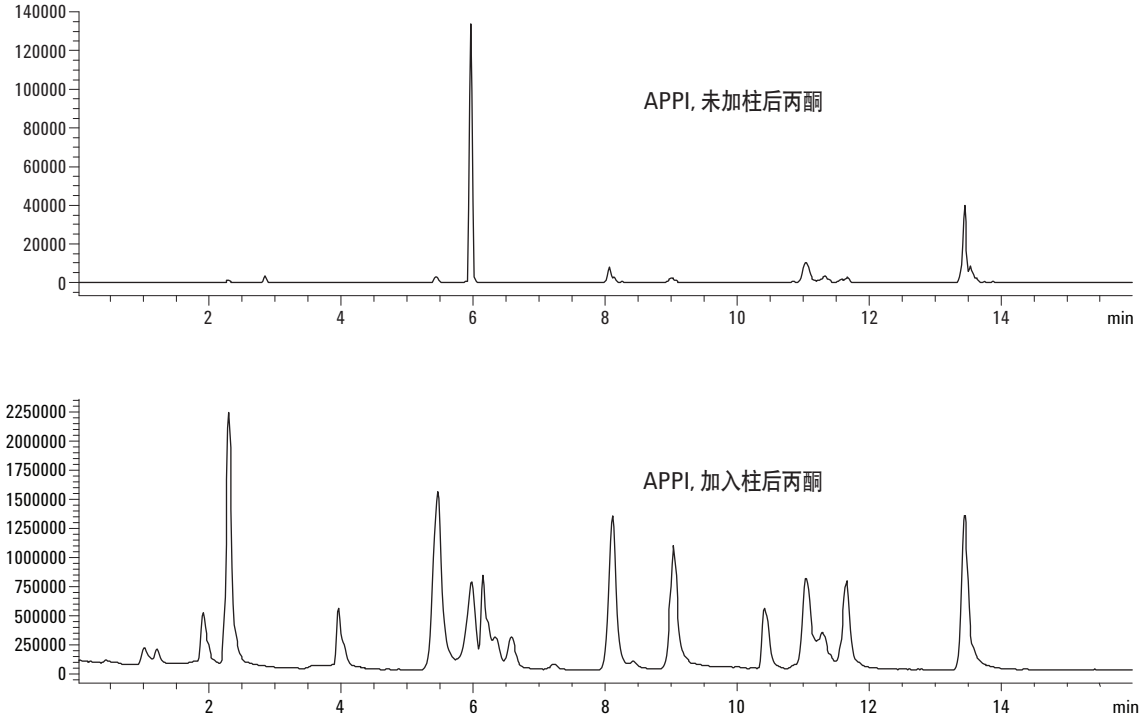


图 3. 总离子流色谱图 (TIC) 显示在 APPI 中柱后引入丙酮可显著改善待测物的信号，两个 TIC 中都使用甲醇作为流动相 B

在 APPI 中，如果溶剂比待测物对质子的亲和力更强，LC 流动相就会干扰离子化。图 4 显示，乙腈对于基线稳定是一个问题，所以在 APPI 中最好也尝试选择使用甲醇。

图 5 显示 3 种离子源 15 和 15.5 min 之间典型的背景质谱图。因为 ESI 是一种更通用的极性化合物离子源，而且在 ESI 中使用了离子改性剂，故基线有更多的峰，噪声通常为 APCI 和 APPI 的 5 到 15 倍。

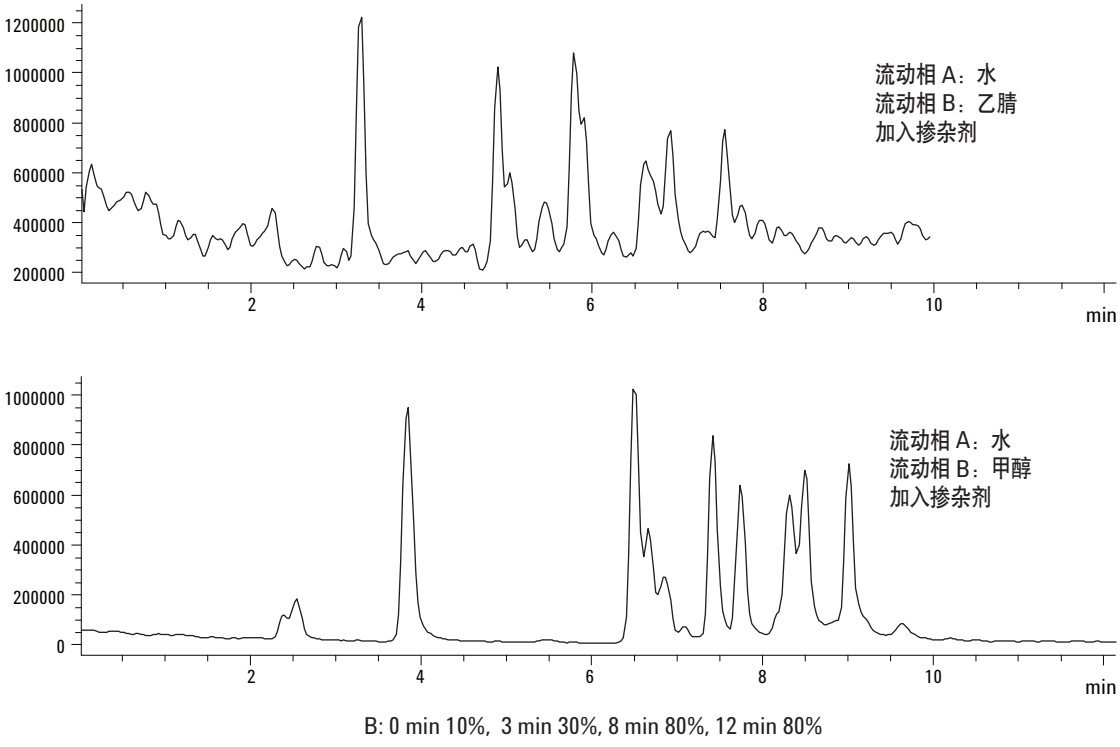


图 4. TICs 显示在 APPI 中，甲醇是比乙腈更好的流动相，丙酮作为掺杂剂

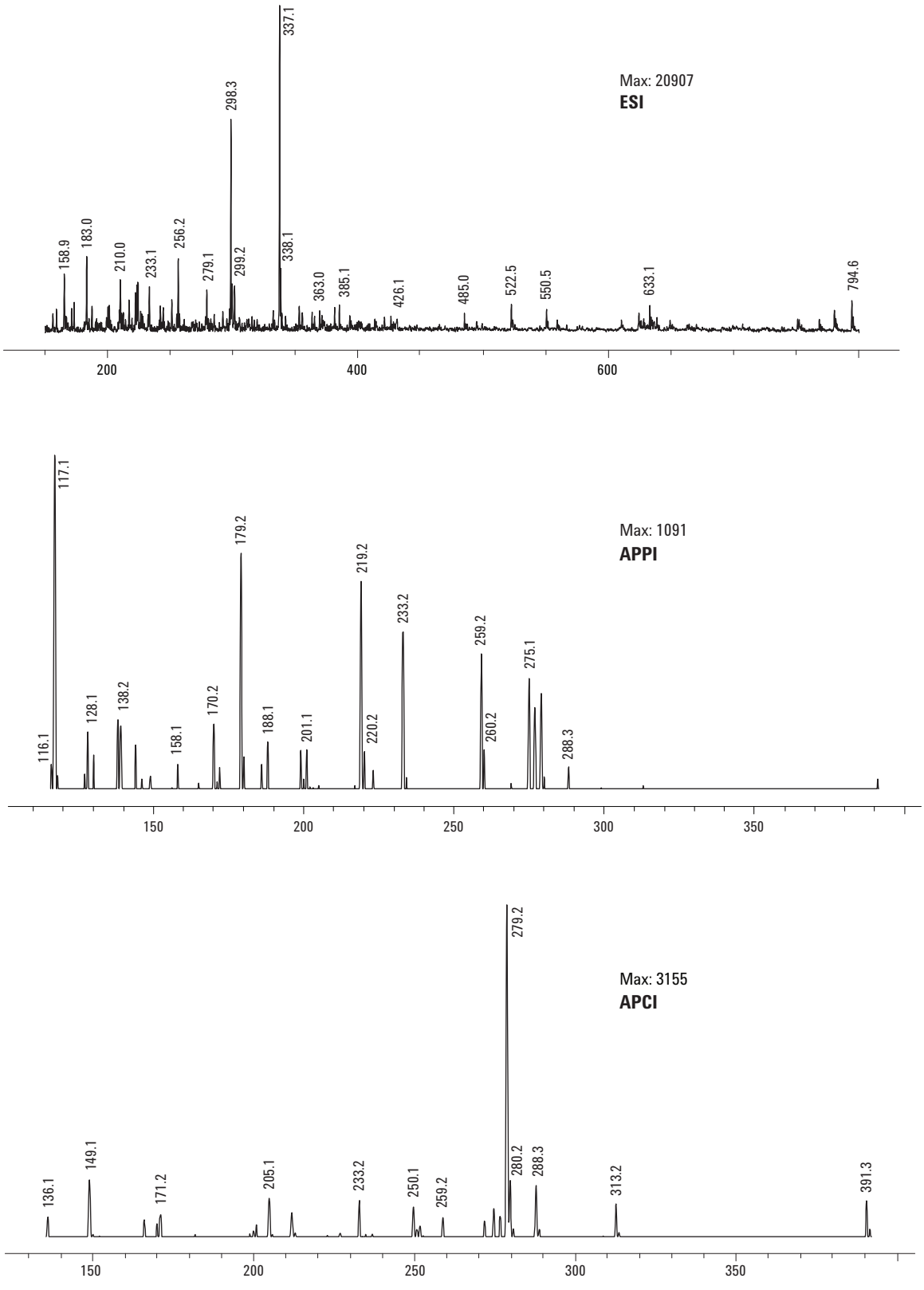
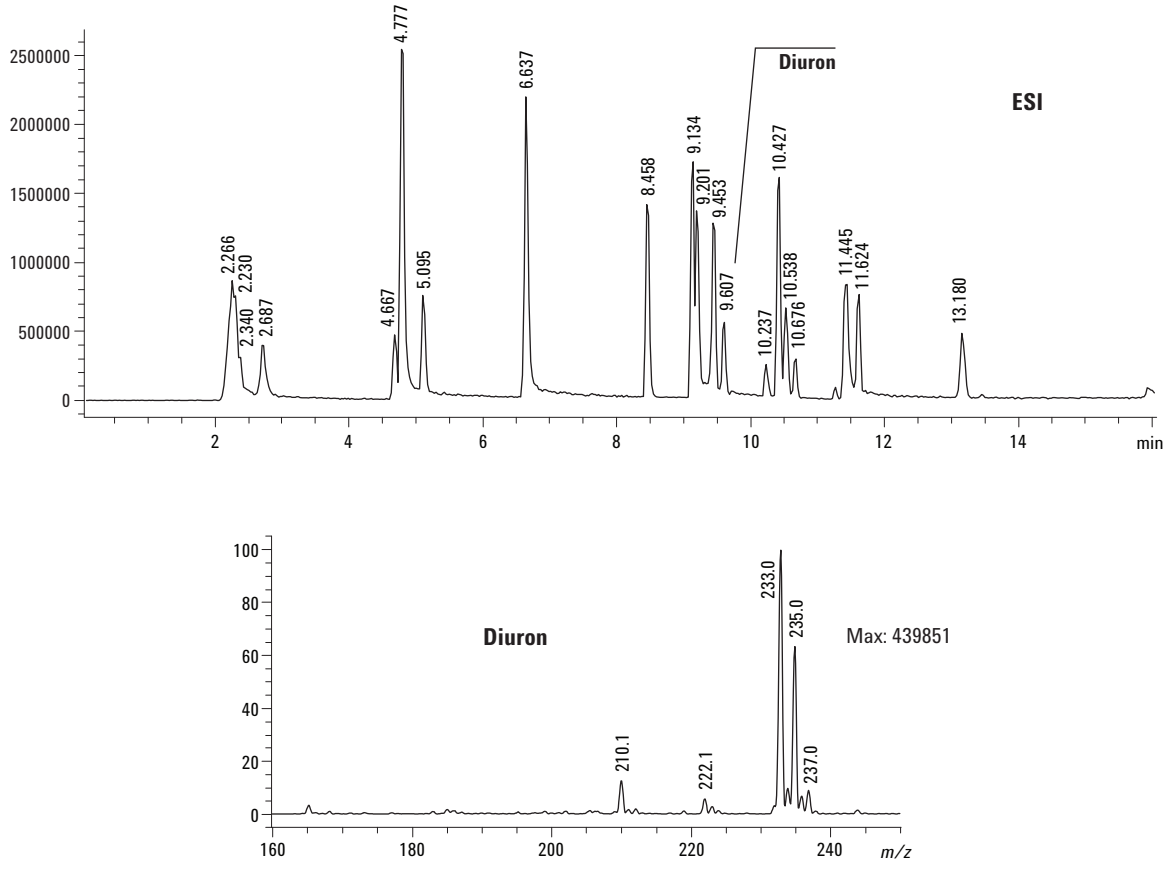


图 5. 3 种离子源的基线噪声比较。ESI 的基线表现了更高的噪声和更多的峰

20 ng 敌草隆经色谱柱分离后在 3 种离子源（ESI、APCI 和 APPI）上的质谱图分别如图 6、图 7 和图 8 所示。在质量为 233 的峰为 $[M+H]^+$ 峰，质量 233、235 和 237 的峰与两个氯原子的同位素峰强度相吻合，这就提供了化合物确认的附加信息。虽然 ESI 比其他两种离子源的响应更好，但 ESI 的信噪比 (S/N) 较低。



在流动相 A 和流动相 B 中各含 0.05% 的甲酸

图 6. ESI 得到的所有目标化合物的 TIC。底部图为 20 ng 敌草隆 (Diuron) 经色谱柱分离后得到的 ESI 质谱图

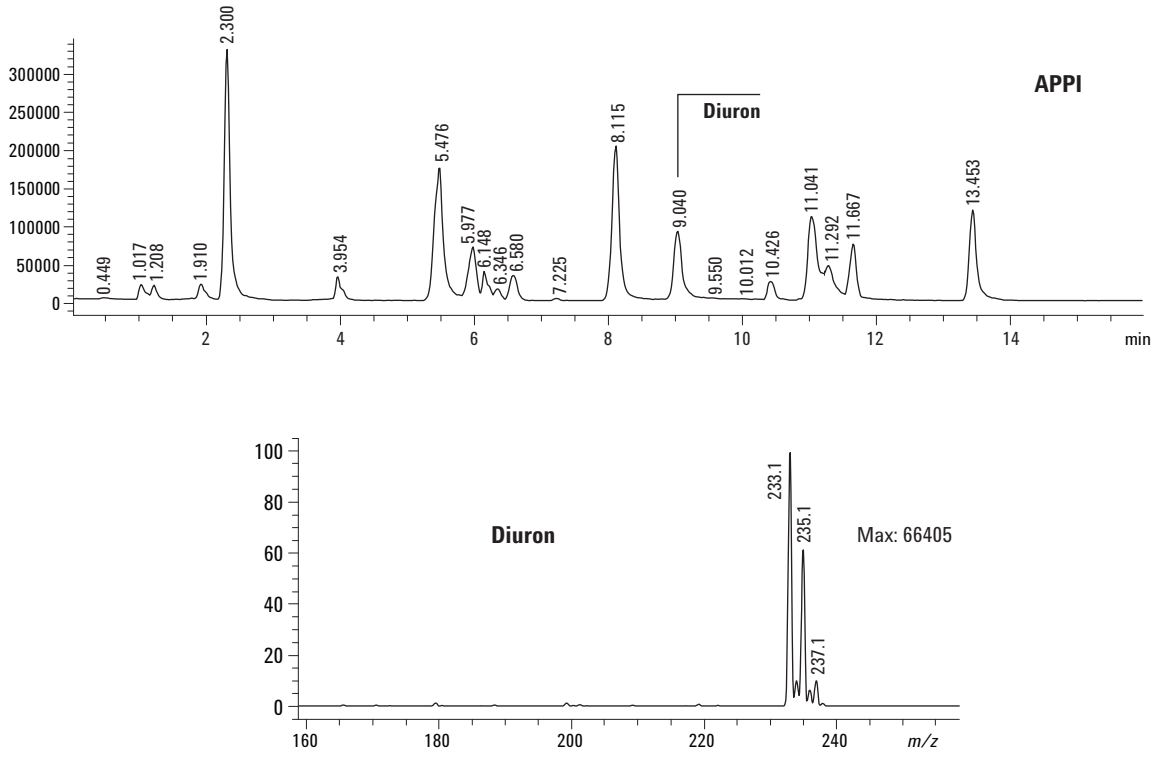


图 7. APPI 得到的所有目标化合物的 TIC。底部图为 20 ng 敌草隆 (Diuron) 经色谱柱分离后得到的 APPI 质谱图

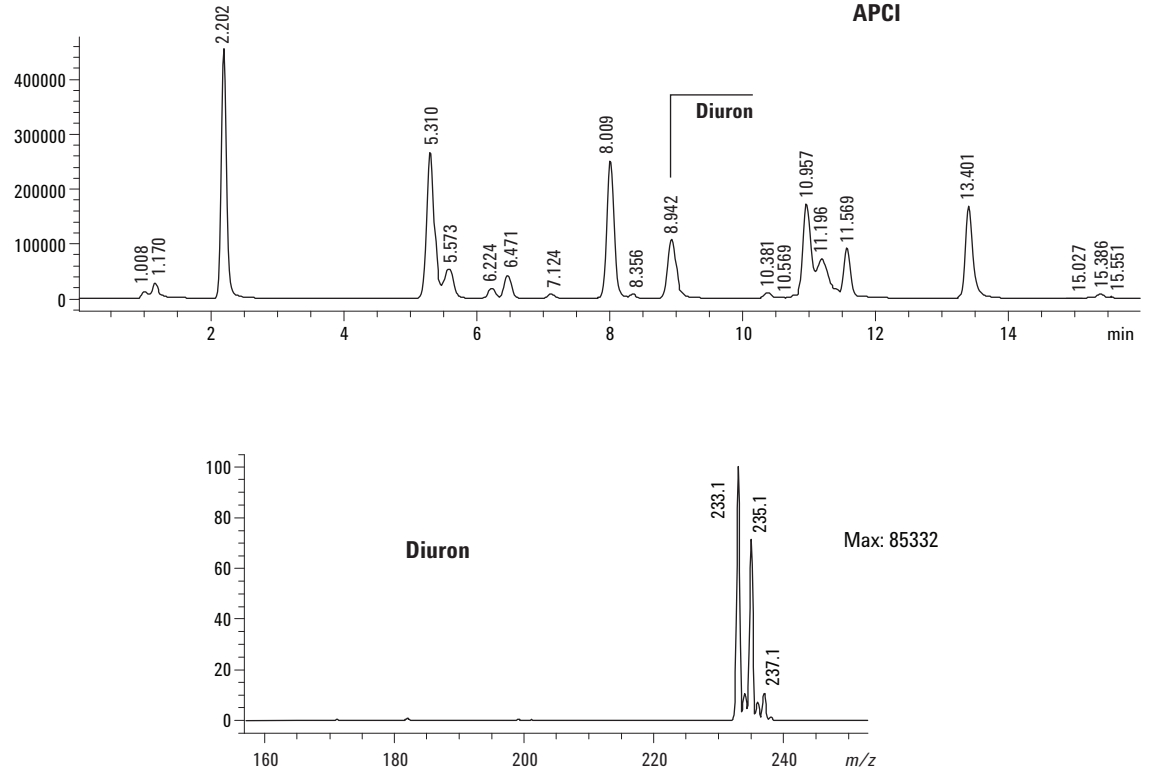


图 8. APCI 得到的所有目标化合物的 TIC。底部图为 20 ng 敌草隆 (Diuron) 经色谱柱分离后得到的 APCI 质谱图

图 9 显示用 3 种离子源得到的环草隆 (Siduron)（在 *m/z* 233 处的质子化离子）的质谱图。在 ESI 质谱图中，环草隆的质子化二聚体（*m/z* 465）和二聚体钠化物（*m/z* 487）的峰非常明显。然而，在 APPI 和 APCI 质谱图中只观察到极少量的质子化二聚体（没有二聚体钠化物）。这主要是因为去溶剂和离子化的步骤不同。在 ESI 中，离子化发生在去溶剂之前，而在 APPI 和 APCI 中，离子化发生在去溶剂之后。

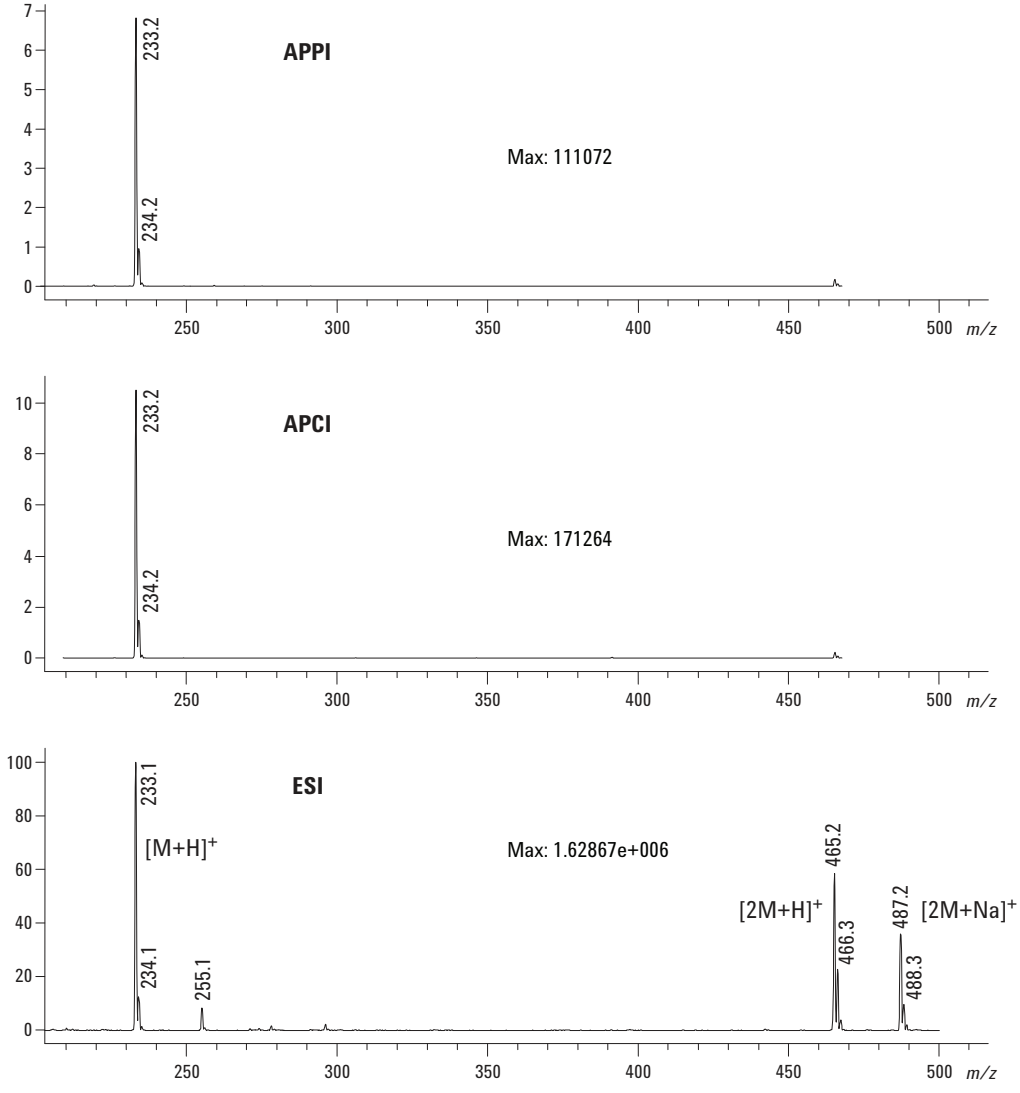


图 9. 用 APPI、APCI 和 ESI 得到的环草隆的质谱图。在 ESI 中观察到明显的二聚体峰

图 10 比较了用 3 种离子源分析某些目标化合物的 S/N。由图可见，用ESI源时氨基甲酸酯的 S/N 一般优于用 APCI 或 APPI 源的 S/N。但是，苯基脲的情况正好相反，比如，从 APCI 或 APPI 得到的 S/N 要优于从 ESI 得到的 S/N。本研究中还有一点也值得注意，APPI 的 S/N 值始终比 APCI 的 S/N 值高。

基于甲灭多威 (Methomyl) $[M+H]^+$（*m/z* 163）离子峰的校准曲线在柱上浓度范围为 20-2000 pg 的范围内线性关系良好。图 11 所示为 ESI 的校准曲线，其相关系数为 0.9996。图 12 显示了用于线性校准的 4 个灭多威峰。

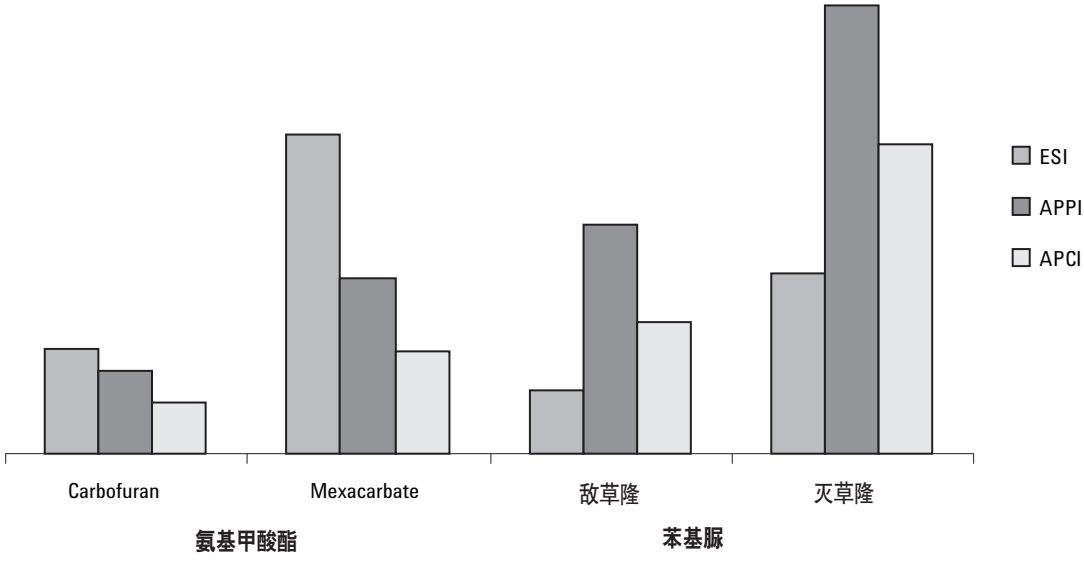


图 10. 4 个待测物从 3 种离子化模式得到的信噪比 (S/N)

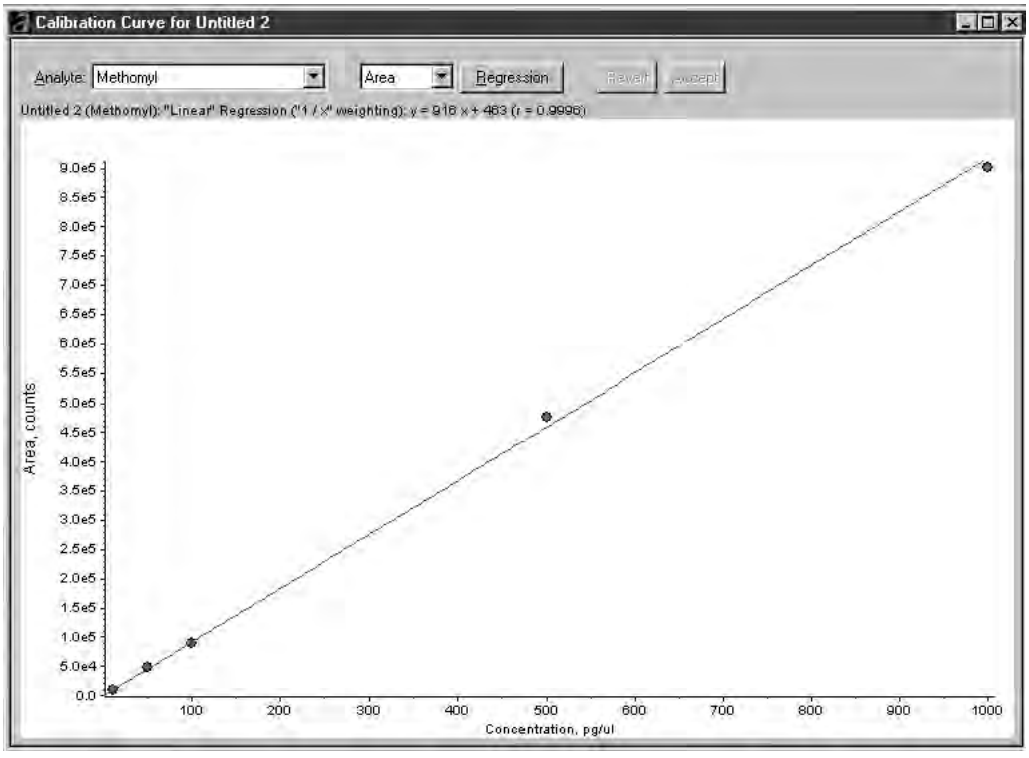


图 11. 用 ESI 源在 SIM 模式（质量 163）得到的灭多威 (Methomyl) 的校准曲线，显示柱上浓度范围为 20-2000 pg 时线性关系良好（进样量为 2 µL）[1]

[1] 校准曲线采用 PE Sciex Analyst™ 软件生成

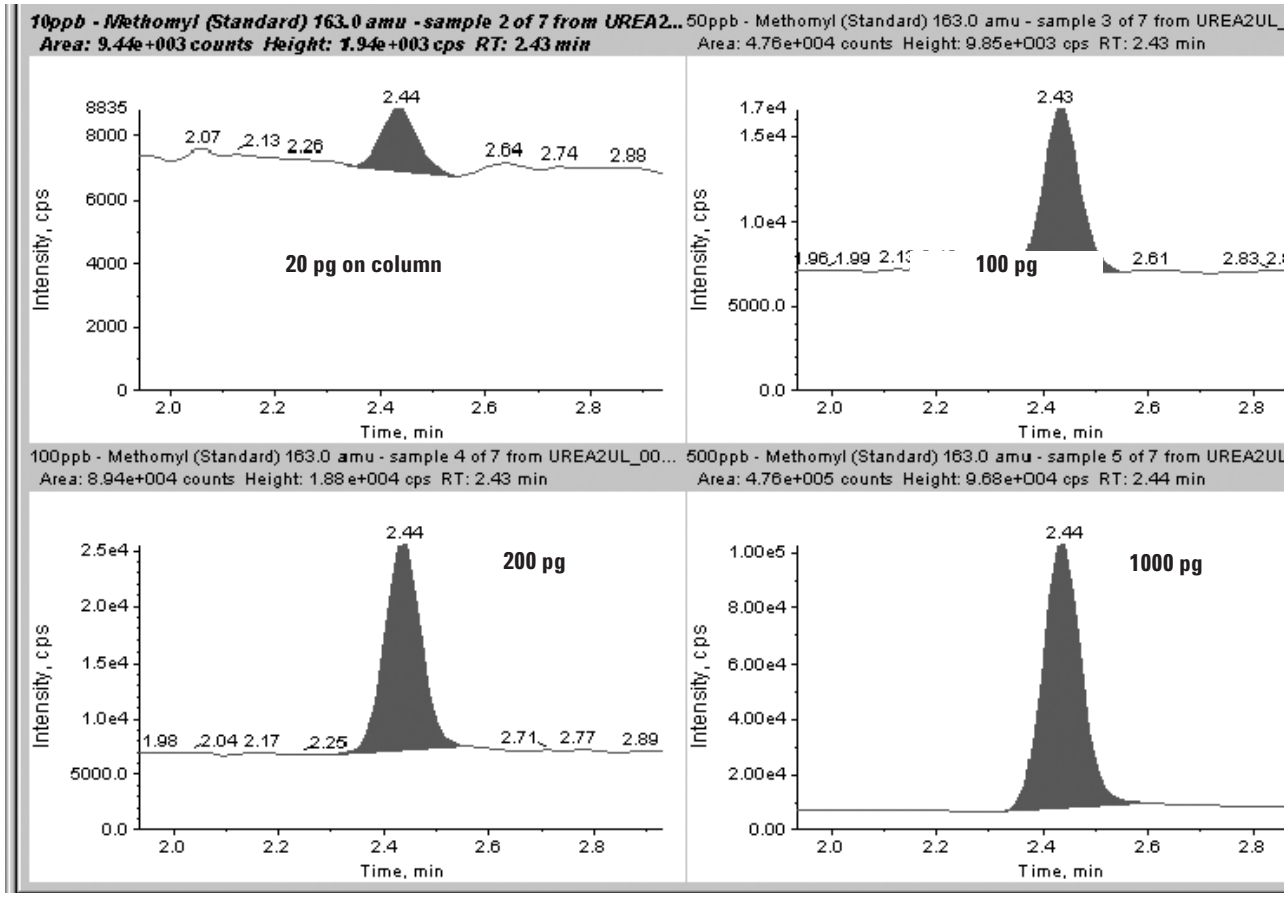


图 12. Analyst™ 软件显示：用于生成图 11 中校准曲线的 4 个灭多威 (Methomyl) 峰 （质量 163）

ESI 模式中使用了 3 种改性剂（甲酸、乙酸铵和乙酸）以比较它们的有效性。图 13 的结果显示：一般而言，3 种改性剂得到的峰强度时可比的。然而，mexacarbate（以及灭害威）峰的出峰顺序是不同的。因此，对于不同改性剂不应当使用单一选择-离子-监测方法（SIM）。

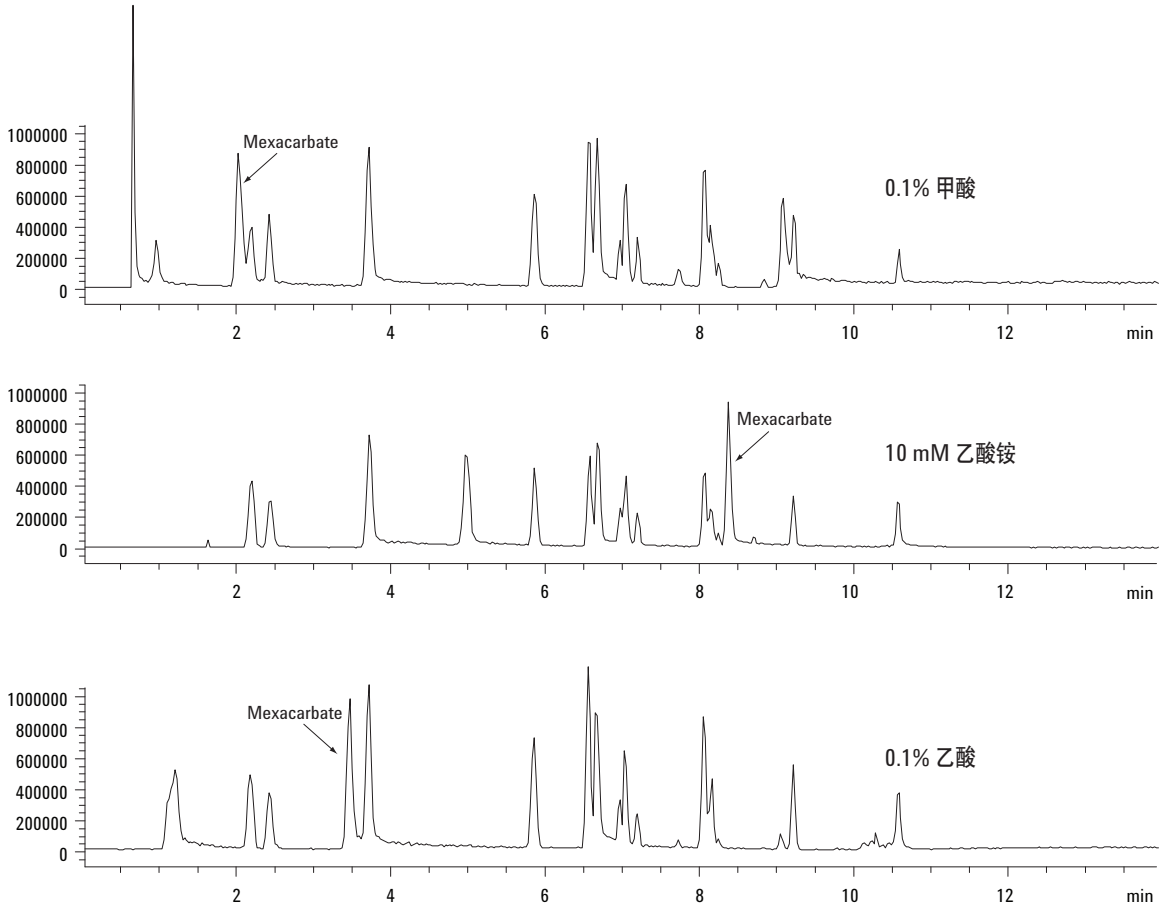


图 13. ESI 中 3 种不同的改性剂得到了可比的峰强度，但改变了峰的出峰顺序

结论

用 ESI、APCI 和 APPI 三种离子源成功地分析了氨基甲酸酯和苯基脲。与 ESI 相比，APPI 和 APCI 背景信号较低和背景峰较少。结果显示，用 ESI 分析氨基甲酸酯时，S/N 值一般比用 APCI 或 APPI 更好，但是，苯基脲的情况正好相反，比如，APCI 或 APPI 得到的 S/N 要优于 ESI 的 S/N 值。APPI 源需要加入少量的柱后丙酮作为离子源掺杂剂，该掺杂剂是可光离子化的，并用于转移电荷到待测物。

使用 SIM，这些化合物的典型 ESI 定量限是在柱上 20 pg。在全扫描的 ESI 谱图上，一些氨基甲酸酯和苯基脲（比如残杀威、克百威和环草隆）具有质子化二聚体和二聚体钠化物。

参考文献

1. "Basics of LC/MS, " Agilent Technologies Pimer, Publication 5988-2045EN, 2001 年 2 月 15 日"
2. “PhotoMate Atmospheric Pressure Photoionization Source from Syagen Technology,” Agilent Technologies Brochure, Publication 5988-3130EN, 2001 年 5 月 25 日。

高效液相色谱 — 电喷雾质谱分析牛肾组织中的氟喹诺酮

食品分析

作者

Ralph Hindle
Access Analytical Lab
#3. 2616 - 16 Street N. E.
Calgary, Alberta T2E 7J8
Canada

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

摘要

一种简便而快速的确认方法用于牛肾组织中氟喹诺酮的检测。样品用酸化甲醇提取离心后，用水稀释，然后过滤。用高效液相色谱 — 电喷雾质谱 (HPLC-ESI-MS) 直接分析稀释的提取物。采用内标定量分析法，在 33 µg/kg (ppb) 抗生素添加水平下，平均回收率为 73%-96%，检测限为 8-19 µg/kg。这一检测限低于欧盟规定的牛肾中 200 µg/kg 恩氟沙星和环丙沙星的最大残留允许量。按照欧盟决议 2002/657/EC 作为确证方法的有关要求对该方法进行了评价。

引言

氟喹诺酮是从萘啶酸衍生出来的合成抗菌素，其作用是治疗对其他抗菌剂有抗药性的动物感染。这是一类广谱抗生素，对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌均有活性。欧盟委员会法规 Annex 1 (EEC) No. 2377/90 规定，牛肾中恩氟沙星的最大残留允许量 (MRL) (恩氟沙星与环丙沙星的总和) 为 200 µg/kg，猪、家禽和兔肉中最大残留限量 (MRL) 为 300 µg/kg。对于所有其他食用动物，最大残留限量 (MRL) 均为 200 µg/kg [1]。

有许多方法涉及分析各种组织中的氟喹诺酮，其中液相／荧光检测和液相质谱检测法最为常用。大部分方法采用酸性或碱性有机溶剂进行萃取，然后用某种样品纯化方法处理，其中最有效的是固相萃取 (SPE)。加拿大食品监督局采用酸化甲醇提取动物组织，然后用强阳离子交换 SPE 进行净化，最后用液相色谱 - 荧光检测分析[2]。Chen 和 Schneider[3]报道了一种鸡肉中恩氟沙星的筛选方法，他们对样品提取和离心之后，不经纯化，用荧光光谱检测萃取物。

欧盟委员会决议 2002/657/EC 允许对 96/23 决议中的 Annex 1 中 B 组物质采用 HPLC- 荧光检测分析 [4]。喹诺酮和其他兽药属于 B 组，用质谱 (MS) 的选择离子 (SIM) 进行鉴定需要有三个鉴定积分点。对于低分辨 HPLC/MS，只要离子比率满足相对强度的指标，每个检测到的离子可获得一个鉴定积分点。本文利用 33 µg/kg 的标样添加样品，根据欧盟决议第 2002/657/EC 号，其要求如下：

- 在萃取时将内标 (IS) 加入到测试样品中
- 为了使用平均回收率校正的数据，允许的回收率范围为 -20% 到 +10%
- 变异系数 (CV) (%) 的重复性预期为 100 µg/kg CV 的一半到三分之二，在允许极限值一半的浓度时，此值为 23%
- 对于液相色谱 / 质谱 (LC/MS) 分析过程，在测试条件下，该目标被分析物的最小可接受保留时间 (RT) 为色谱柱死时间的两倍
- 被分析物的保留时间与内标物的保留时间之比，即 LC 被分析物的相对保留时间应当对应于允许限 2.5% 时校准溶液的相对保留时间的一半
- 分子离子最好是选择的鉴定离子之一
- 相对离子丰度的最大允许波动应当满足表 6 列出的 Annex 的指标（在本文的情况下为 ±25% 或者 30%）

实验部分

试剂与材料

HPLC 级甲醇和乙腈购自 Caledon Lab（加拿大，Ontario 的乔治城）。

98% 的甲酸购自 EM 科学公司。

酸化甲醇溶液：含 30% 甲醇的去离子水，pH 3（每 100 mL 水含 100 µL 甲酸）。

酸化甲醇的制备是将 100 µL 98% 的甲酸加入到 100 mL 甲醇中。

酸化去离子水的制备是将 100 µL 98%的甲酸加入到 100 mL 去离子水中。

Ultra-Turrax T25 均质器、50 mL 的聚丙烯离心管，以及 13 mm 的氟化聚乙烯 (PEDF) 注射过滤头 (0.2 µm) 购自 VWR 科技公司。

所有的氟喹诺酮，包括内标的储备液均由加拿大食品监督局赠送，浓度为 100 ng/mL (ppm)，溶剂为含 1% 乙酸的甲醇。溶液在 4℃ 保存。通过用酸化甲醇溶液稀释得到用于加入样品的不同浓度的标准溶液。选择环丙沙星、恩氟沙星和沙氟沙星为目标化合物，这是由于加拿大食品监督局优先监测样品中包含了这些化合物。这些化合物加标溶液 (1 ng/µL) 的制备是将 100 µL 的每种储备溶液置于 10 mL 容量瓶中，用酸化去离子水稀释至刻度。内标溶液只含 1 ng/µL 的诺氟沙星和达氟沙星，制备方式同上。

样品制备

1. 对于牛肾，直接称取 3 g 样品置于 50 mL 的聚丙烯离心管中。
2. 对于加标样品，加入 100 µL 的 1 ng/µL (100 ng) 加标溶液，得到 33 µg/kg 的含量。在进行萃取之前，让样品静置 1 小时。
3. 对于空白样品，加入 100 µL 的酸化甲醇溶液。
4. 对所有的加标样品，在萃取前加入 100 µL 的 1 ng/µL (100 ng) 内标溶液。在此溶液中含有相同浓度的诺氟沙星，如果由于地诺沙星干扰，需要时用作替代内标。
5. 样品中加入 15 mL 酸化甲醇，用 Ultra-Turrax T25 均一化器处理 2 min。
6. 然后将这些样品离心 10 min，将上清夜移入干净的试管中。

7. 萃取液用酸化去离子水以 1:3 的比例（250 µL 萃取液 + 750 µL 水）稀释，用 0.2 µm 的 PVDF 过滤头过滤后，置于自动进样器样品瓶中，进行 LC/MS 分析。

因为采用内标定量分析，所以就不需要测定萃取物的最终体积，也不用等分稀释。化学工作站进行的内标计算将测定被分析物和内标的相对含量。这就校正了样品的任何浓缩和稀释效应。

标准溶液的制备

采用 5 点校准来测定三种目标化合物，1 点校正用于诺氟沙星和替代内标。表 1 给出了加入到 5 个试管的每个试管中的内标和目标化合物溶液（每种 1 ng/µL）。标准溶液的制备是将 250 µL 空白萃取液和 750 µL 酸化去离子水加入到含有被分析物的试管中，然后用用 0.2 µm 的 PVDF 过滤头过滤。

每个标准溶液的最终含量为 5 pg/µL。进样量 50 µL，即 250 pg 的柱上进样量。5 中溶液的每种溶液中含有目标被分析物的量是不同的，以便制备校准曲线，如表 1 所示。

如表 4 所示，目标化合物的相关系数为 0.9987 到 0.9992。

以本文的方法制备标准溶液将抵消任何由于 MS 离子源存在共流出物可能引起的离子抑制和增强效应。

表 1. 分析标准溶液 (LC/MSD 进样 50 µL) 的制备

标准溶液	加入的内标体积 (µL)	加入的目标化合物体积 (µL)	内标的进样量 (pg)	目标化合物进样量 (pg)
1	5	1	250	50
2	5	2	250	100
3	5	5	250	250
4	5	10	250	500
5	5	20	250	1,000

LC/MS 条件

HPLC 为 Agilent 1100 系列，包括在线脱气器、二元泵、自动进样器、柱恒温箱，二极管阵列检测器 (DAD) 和四级干质量选择检测器 (MSD) (表 2)。

表 2. LC/MS 条件

HPLC	
色谱柱	Zorbax Eclipse XDB-C8, 150 mm × 4.6 mm, 5 µm (部件号 993697-906)
溶剂 A	0.1% 甲酸
溶剂 B	0.1% 甲酸乙腈
梯度	t_0 = 20% B; t_1 = 20% B; t_8 = 90% B t_{15} = 90% B 分析后时间 = 2.0 min
流速	0.4 mL/min
进样体积	50 µL
色谱柱温度	30 °C
MSD	
离子源	电喷雾离子化 (ESI) (正离子模式)
离子采集时间	14 个离子，每个平均 40 毫秒
碰撞电压	随离子而变化（见表 3）
干燥气流速	12 L/min
喷雾气压力	30 psi
干燥气温度	350 °C
毛细管电压	4000 V

表 3. 在 SIM 模式（单采集组）采集的离子的碎裂器电压

化合物	离子	碰撞电压 (V)
诺氟沙星 (内标)	320	120
	302	200
	276	200
环丙沙星	332	120
	314	200
	288	200
达氟沙星(内标)	358	120
	340	220
恩氟沙星	360	120
	342	220
	316	220
沙氟沙星	386	120
	368	220
	342	220

所有离子均包含在从进样（时间 = 0）开始的单一采集组中。另一种方法是将采集组开始时间设定为第一个化合物流出之前半分钟左右的时刻，因为这将使流出液尽可能长时间地排入废液管路。这也会减少进入离子源的共萃取物质，从而减少污染。

另一种选择是在方法中增加额外的时间编程采集组，只包含采集组时间内流出的化合物的离子。随着方法中化合物的总数增加，这一点将更为重要。要做确证性鉴定是每个化合物需要 3 个离子。

碎裂器电压的选择是使每个选择离子进行优化。对于每种氟喹诺酮，120 V 的碎裂电压只产生质子化的母离子，要产生确证离子就需要较高的碎裂电压。其子离子主要是母离子丢失水和二氧化碳离子。

需要指出，尽管对恩氟沙星和沙氟沙星均采集了质量数为 342 的离子，但在 MSD 采集表中只增加了一次。

色谱

所有化合物均在 5 到 9 min 之间流出，但总的运行时间设置为 15 min，最后采用含 90% 的有机溶剂的流动相将共萃取物从色谱柱中流出。否则，它们最后流出可能干扰后续的进样分析。当方法只有简单的纯化步骤时，如只采用了稀释，这种干扰将使潜在的问题。下面的图对空白牛肾样品和含量为 33 µg/kg 的样品进行了比较。在每个图中，所选择的离子都是母离子的质子化形式，以及母离子丢失水 (M-18) 和二氧化碳 (M-44) 形成的碎片离子。

本研究用作内标的化合物达氟沙星的确认离子，其质荷比为 340。基质引起的一个干扰峰也在质量数 340。如图 1 所示，牛肾空白样品的干扰是一个小峰。由于确认离子不会用于内标计算，故对结果没有影响。然而，样品中却是有共萃取物的流出，并没有进行进一步的纯化，离子抑制效应可能信号响应。为了补偿这些潜在的影响，所有标准样品均用空白牛肾萃取物制备。

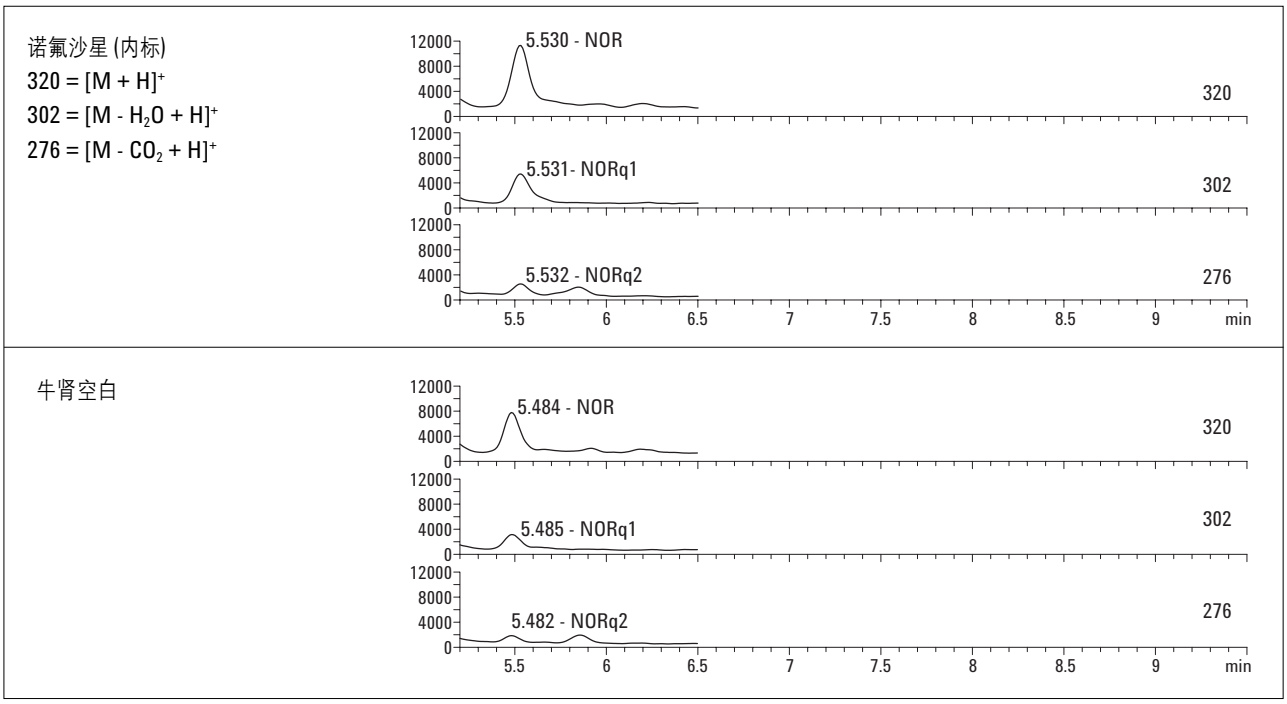
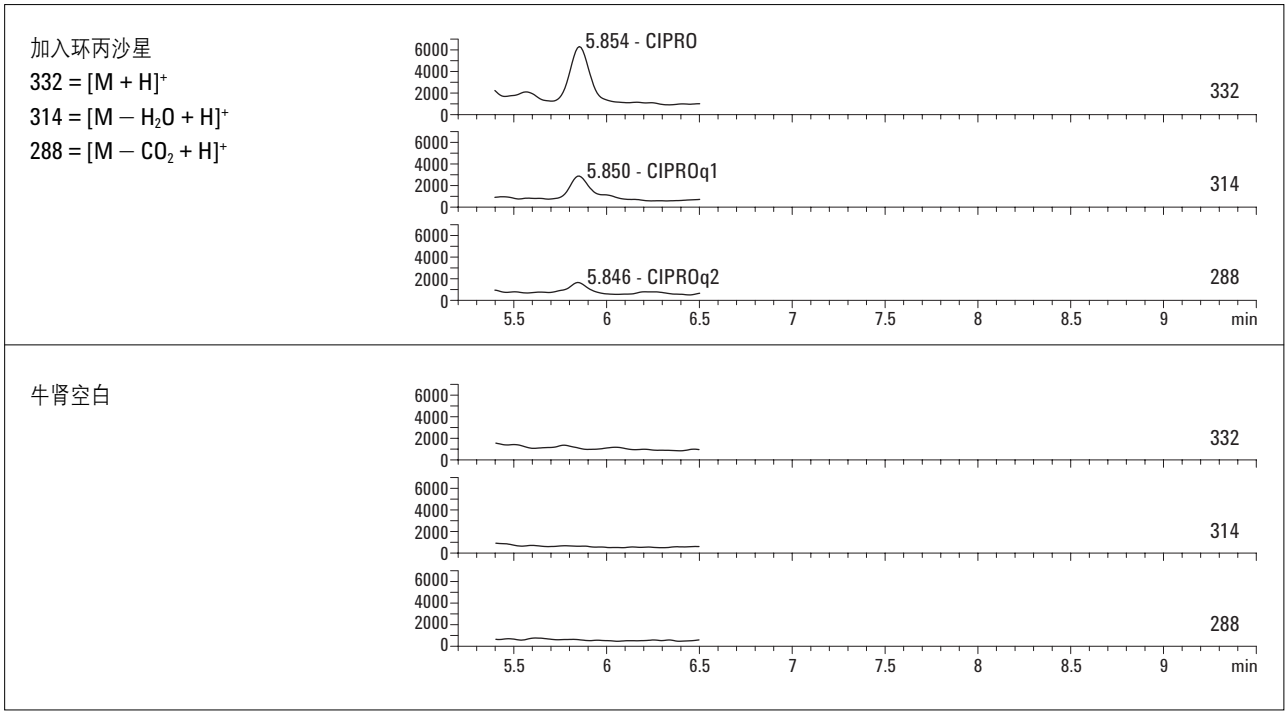


图 1. 牛肾中加入氟喹诺酮的萃取离子色谱图的比较



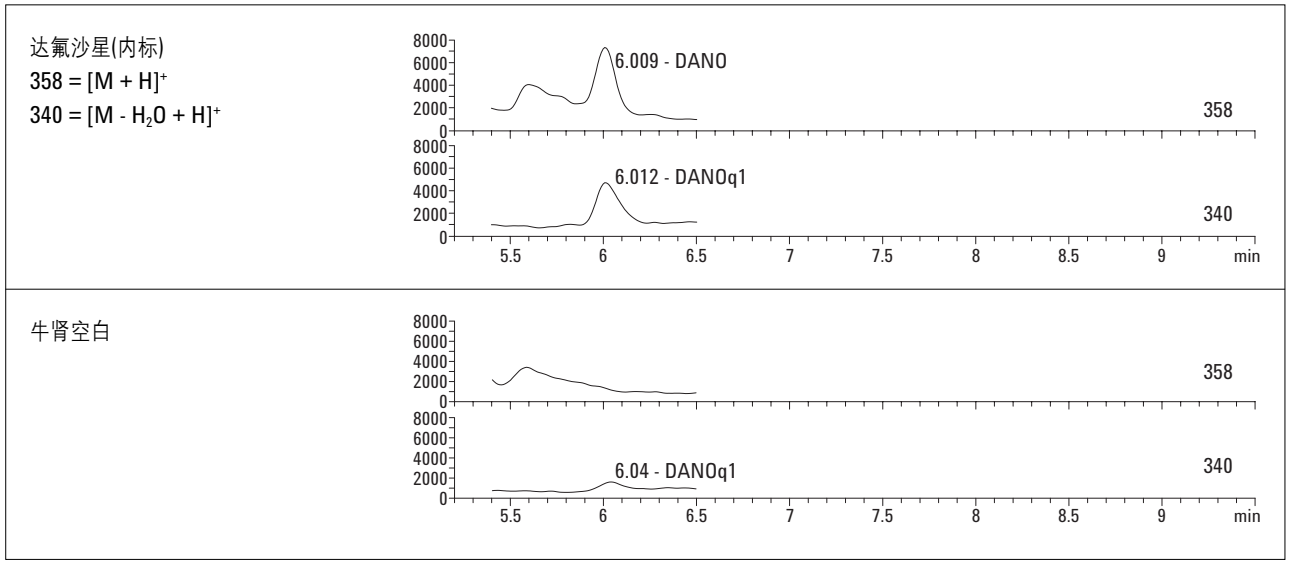
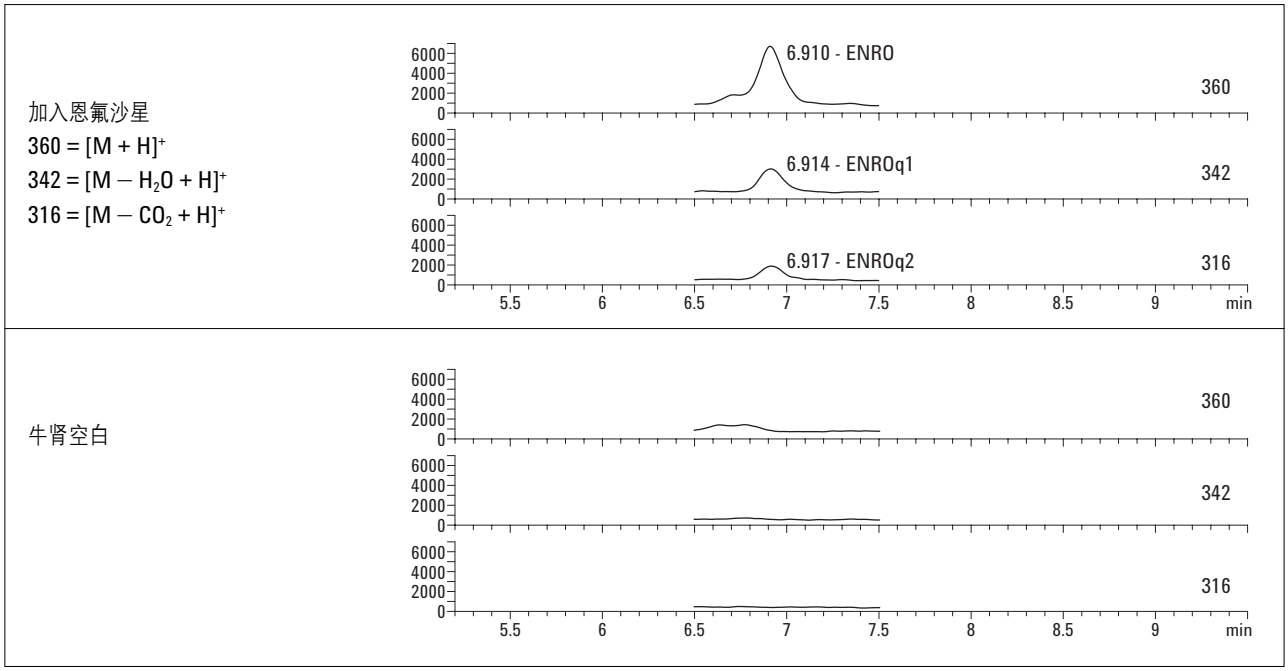


图 1. 牛肾中加入氟喹诺酮的萃取离子色谱图的比较（续图）



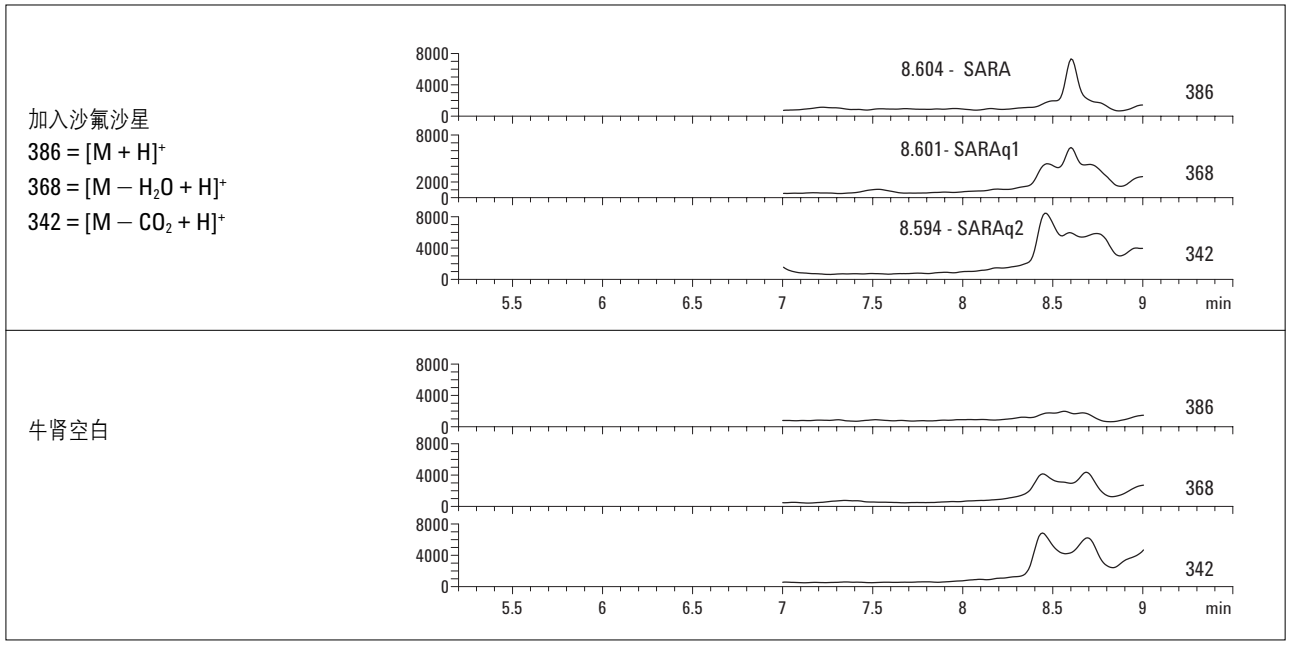


图 1. 牛肾中加入氟喹诺酮的萃取离子色谱图的比较（续图）

沙氟沙星与多个其它共萃取物的流出处于相同的保留时间区域，这使得定性和定量分析更为困难。然而，如表 7 所示，定量离子的相对响应仍然满足鉴定指标，所以不必对样品作进一步的纯化。这些共萃取物的作用在高残留量情况（更接近于欧盟的最大限量标准）下会进一步降低。

回收率

为了对结果进行回收率校正，即用测定的结果除以法定的参比样品或标准加入样品得到的百分比回收率，Annex 的表 2 要求含量大于 10 µg/kg 的被分析物的回收率在 80% 到 110% 之间。表 4 的数据表明环丙沙星和恩氟沙星的回收率分别为 96.3% 和 86.0%，满足上述要求。但是，沙氟沙星的平均回收率只有 72.6%，不能满足这一要求。由于这一化合物的变异系数 (CV) 只有 8%，故本方法仍然可能获得用于筛选目的令人满意的结果，不过，要得到更高的回收率，还需要做更多的研究工作。由于本研究只包含了标准加入样品，故未采用回收率校正计算。

诺氟沙星也作为内标与达氟沙星一起加入样品。然而，本研究分析的空白牛肾样品表明，诺氟沙星的含量并没有超标，其浓度大约是加入量的一半。假设线性回归曲线过原点，这将意味着检测到的诺氟沙星约为 15-20 µg/kg，这大约是牛肾中诺氟沙星允许量的 10%。表 4 列出了诺氟沙星的回收率，尽管是单点校准计算所的，也没有对残留进行矫正。然而，因为用于校准的标准样品是通过在空白牛肾萃取物中加入目标化合物而制备的，故对此有所补偿。

表 4. 牛肾中氟喹诺酮的回收率

	回收的量 (ng)			
说明	**诺氟沙星**	**环丙沙星**	**恩丙沙星**	**沙氟沙星**
牛肾加标样品 1	111.8	96.3	84.9	68.5
牛肾加标样品 2	93.1	94.0	85.6	74.1
牛肾加标样品 3	88.0	89.6	83.8	77.6
牛肾加标样品 4	98.9	95.4	86.2	75.2
牛肾加标样品 5	82.2	93.8	85.4	82.1
牛肾加标样品 6	143.0	109.3	87.9	72.9
牛肾加标样品 7	102.6	101.3	83.3	73.0
牛肾加标样品 8	110.6	90.8	91.0	67.7
加入量 (ng)	100.0	100.0	100.0	100.0
平均值	103.8	96.3	86.0	72.6
标准偏差 SD (精密度) ng	18.9	6.3	2.5	5.8
检测限 (SD × t-stat) ng	56.7	19.0	7.6	17.4
定量限 (SD × 10) ng	189.1	63.4	25.4	58.1
变异系数 CV (SD/ 平均值)%	18.2	6.6	3.0	8.0
准确度 (%)	103.8	96.3	86.0	72.6
线性相关系数 (R^2)	0.9895	0.9987	0.9992	0.9987
t-stat (N = 8)	3.00	3.00	3.00	3.00

化合物鉴定

对于色谱分离，Annex 2002/657/EC 的 2.3.3.1 部分要求被测定的物质的最小保留时间起码是相应于色谱柱死体积保留时间 (k'=1) 的两倍。在本文的条件下，第一个流出的化合物是诺氟沙星，其 k'=2.6，所以，这一条件是容易满足的。第二个条件是，对于 LC 分析，被测物质的保留时间与内标保留时间之比，既相对保留时间应相应于校准溶液在 ±2.5% 容许范围的值。表 5 列出了加标样品中每个被分析化合物的保留时间与标样保留时间的比较，它们完全处于允许范围之内。

表 5. 样品中被分析物相对于标样的相对保留时间

化合物	标样中的平均相对保留时间 (N = 15)	标样中的相对保留时间的变异系数 CV (N = 15)	样品中被分析物相对于标样的相对保留时间 (N = 8)
诺氟沙星	0.922	0.12%	99.8%—100.1%
环丙沙星	0.975	0.05%	99.9%—100.1%
恩氟沙星	1.150	0.16%	99.8%—100.2%
沙氟沙星	1.439	0.47%	99.5%—100.3%

化合物确证

Annex 2002/657/EC 的 2.3.3.2 部分给出了相对离子强度的最大允许限。表 6 列出了这些数据。

表 6. 使用质谱技术的相对离子强度的最大允许限

相对强度 (基峰的百分数)	GC/MS(EI) (相对)	GC/MS(CI), GC/MS^n, LC/MS, LC/MS^n (相对)
>50%	±10%	±20%
>20% – 50%	±15%	±25%
>10% – 20%	±20%	±30%
≤10%	±50%	±50%

注：当 n = 2 时，MS^n 等于 MS/MS

表 7 给出了三个目标化合物以及诺氟沙星和达氟沙星（一个离子）的定性离子的相对强度。可见，8 个加标样品中，诺氟沙星都满足了要求，即使残留量不超标。额外的诺氟沙星的存在对定性结果不会有负面影响。然而，达氟沙星对检测的单个定性离子却有干扰，所以，该信号的相对量预期会在较大的程度上变化，变化程度取决于制备稀释样品和标样所用的空白萃取物的确切量。如前所述，标准样品的制备是通过准确量取目标和内标化合物的相对量置于试管或样品瓶中制备的，然后加入空白牛肾萃取物和水。由于在测定未知样品的浓度时，内标计算使用相对含量和相对响应值，而不是绝对含量和绝对响应值，所以，并不一定要知道萃取物和水的精确比率。但是，准确测定萃取物和水的体积可以降低干扰的波动。

表 7. 与允许值相比，牛肾中氟喹诺酮的定性离子的相对强度

	定性离子的相对强度(%)								
	诺氟诺酮		环丙沙星		达氟沙星	恩氟沙星		沙氟沙星	
样品	Q1 = 302	Q2 = 276	Q1 = 314	Q2 = 288	Q1 = 340	Q1 = 342	Q2 = 316	Q1 = 368	Q2 = 342
加标 1	49	15	47	17	64	44	28	50	15
加标 2	45	15	48	17	58	46	24	41	17
加标 3	48	16	46	20	63	44	28	45	14
加标 4	42	15	46	17	60	43	30	43	13
加标 5	49	17	45	21	65	44	26	45	11
加标 6	50	19	39	17	72	45	29	43	12
加标 7	49	17	41	18	65	46	29	46	13
加标 8	47	17	42	19	62	39	24	46	12
标样平均	49	20	44	20	86	43	26	47	15
标样标准偏差	2	1	3	2	22	2	2	6	1
允许限 (表 7)	25	30	25	30	20	25	25	25	30
下限（计算值）	**37**	**14**	**33**	**14**	**69**	**32**	**19**	**35**	**11**
上限（计算值）	**62**	**26**	**55**	**25**	**103**	**53**	**32**	**59**	**20**

结论

对用于测定牛肾中三种氟喹诺酮 (环丙沙星，恩氟沙星和沙氟沙星) 的快速而灵敏的单级四极杆 LC/ESI/MS 方法进行了认证。样品萃取物用水稀释后直接分析所得检测限为 8-19 µg/kg (ppb)。所有定性指标均满足 Annex 2002/657/EC 的要求，三个化合物中两个满足回收率的定量要求。沙氟沙星的回收率稍低于允许报告结果中对回收进行校正的要求。

参考文献

1. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines and Inspections, EMEA/MRL/820/02-FINAL, January 2002.
2. Determination of Fluoroquinolones in Bovine, Porcine and Avian Tissues by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection, FQL-SP04, Canada Food Inspection Agency, Saskatoon, Saskatchewan, Canada; 2001/03.
3. Chen, G., Schneider, M. J., (2003) A Rapid Spectrofluorometric Screening Method for Enrofloxacin in Chicken Muscle, *J. Agric. Food Chem.,* **51**(11), 3249-3253.
4. Annex of Commission Decision 2002/657/EC, Commission Decision of 12 August 2002, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Official Journal of the European Communities, 17.8.2002, L 221/8-36, Table 5, Footnote 4.

用液相色谱 — 质谱法 (LC-MS) 快速测定食品中的羟甲基糠醛

应用

食品行业

作者

Vural Gökmen
Food Engineering Department
Hacettepe University, Beytepe Campus
06800 Beytepe
Ankara, Turkey

Hamide Z. Senyuva
Ankara Test and Analysis Laboratory
Scientific and Technical Research Council of Turkey
Ankara 06330, Turkey

摘要

羟甲基糠醛是食品腐烂的产物，对其可能产生的毒性作用仍在研究之中。它可被用来监测食品的质量。本文报道了一种用于监测这种化合物的高灵敏度和高选择性的 LC/MS 方法。这种方法能够定量测定食品中的羟甲基糠醛，检测限为 0.005 µg/g。本文还报告了样品制备和分析条件。

引言

对于大部分食品而言，羟甲基糠醛 (HMF) 是一种公认的腐化指示剂。它是 Maillard 反应的一个中间体，也可以在酸催化己糖脱水过程中产生。食品中 HMF 的形成与温度和 pH 尤为相关 [1]。

近年来，食品中的 HMF 已经从毒理学上引起了人们的关注：该化合物及其类似的衍生物显示出具有细胞毒性、遗传毒性和致癌作用。然而，进一步研究表明，HMF 不会造成严重的健康威胁，但对这一问题仍有争论。

已有几种 HPLC 技术测定各种食品中 HMF 的报导。由于糠醛类化合物在 280 到 285 nm 波长处有强吸收，这些技术都采用的是 UV 检测。但是，许多天然存在的或在食品加工中形成的化合物也可能在这段波长下有吸收。这些化合物的色谱分离差，可能对 UV 检测中的 HMF 定量有影响。

我们建立了快速可靠测定食品中的 HMF 的液相色谱/质谱 (LC/MS) 方法。方法包括，用水溶液提取 HMF，固相萃取 (SPE) 净化，用 LC/MS 分析。为了缩短色谱分离时间，采用窄径柱进行分离。

实验

LC/MS 实验在一套 Agilent 1100 系列 HPLC 系统上进行分析，该系统包括二元泵、自动进样器、柱温箱，连接 Agilent 1100 的 MS 检测器，配备大气压化学电离接口 (APCI)。

数据采集采用选择离子检测 (SIM 模式，接口参数为：干燥气体 (N_2, 100 psig)，流量 4 L/min，雾化器压力

LC/MS	
流速：	0.2 mL/min
色谱柱：	ZORBAX Bonus RP, 100 mm × 2.1 mm, 3,5 µm
流动相：	0.2% 甲酸水溶 0.01 mM 醋酸
进样：	20 µL 进样 1000 µL
MS 条件	
电离模式：	正 APCI
雾化器压力：	60 psi
干燥气流量：	4 L/min
干燥气温度：	325 °C
汽化室温度：	425 °C
椎孔电压:	20 V
毛细管电压：	4 kV
碰撞诱导解离电压：	55 eV
驻留时间：	439 ms

60 psig，干燥气温度 325 °C，选择汽化室温度 425 °C，毛细管电压 4 kV，电晕电流 4 µA，碰撞诱导解离电压 55 eV，驻留时间 439 ms。HMF 监测离子 *m/z* 109 和 *m/z* 127。根据 *m/z* 109 离子信号的响应进行定量。

色谱分离在 ZORBAX Bonus RP 窄径柱 (2.1 mm × 100 mm, 3.5 µm) 上进行，流动相为含 0.2% 甲酸水溶液的 0.01 mM 醋酸，流速 0.2 mL/min，温度 40 °C。

方法

样品制备

称取研细的样品 (1g) 置 10 mL 带塞的玻璃离心管中。将 15g 铁氰化钾和 30g 硫酸锌分别溶于 100 mL 水中，配制成 Carrez I 和 II 溶液。将 100 µL Carrez I 和 100 µL Carrez II 溶液加入样品中，并加 0.2 mM 醋酸至 10 mL。用旋涡混合器混合试管 3 分钟提取 HMF。并于 0 °C 5,000 rpm 离心 10 分钟。上清液用 Oasis HLB SPE 小柱进一步净化。使用前，SPE 小柱用一个 2 mL 塑料注射器，以大约每秒钟两滴的速度，先用 1 mL 甲醇处理，再用 1 mL 水平衡。用 2 mL 空气赶出剩余的水。将 1 mL 水提取物注入预先处理过的小柱，使用塑料注射器，流速大约为每秒 1 滴，弃去洗脱液。用 0.5 mL 水冲洗小柱。再用缓和的氮气流吹干小柱。最后用一个 2 mL 塑料注射器以大约每秒1滴的速度，用 0.5 mL 乙醚将 HMF 从小柱上洗脱下来。洗脱液收集在一个尖底玻璃试管中，在 3 psig 氮气流下于 40 °C 水浴（Zymark Turbo Vap® LV 蒸发器）蒸干。残渣立刻溶于 1 mL 水中，用旋涡混合器混合 1 分钟。取 20 mL 溶液注入 HPLC 系统。

结果和讨论

HMF 的正离子模式 APCI-MS 分析表明，即有母离子 [M+1]，也有从质子化的分子上丢失水后的特异性离

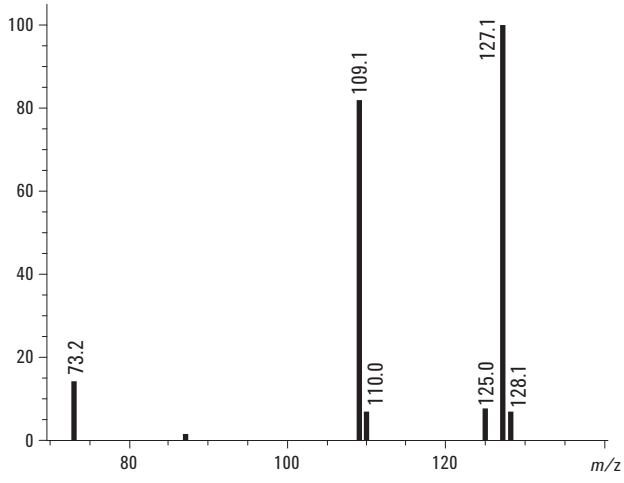


图 1. 用正模式 APCI 获得的 HMF 质谱图

子 [$C_6H_5O_2$]。见图 1。在 SIM 模式中，用 *m/z* 127 和 109 这些特征离子对 HMF 进行监测。用这些离子的比值（127 离子的响应 / 109 离子的响应 = 1.12）确证 HMF 峰的纯度。两个离子的信号响应在 0.05 到 2.0 µg/mL 浓度范围内呈线性，相关系数大于 0.99。以信噪比为 3 进行测定，*m/z* 127 和 *m/z* 109 离子的检测限 (LOD) 分别为 0.005 µg/mL 和 0.006 µg/mL。配备 APCI 的 LC/MS 是一种功能强大的工具，可以灵敏而精确地测定 HMF。

HMF 的色谱分离在 ZORBAX Bonus RP 窄径柱上进行。用含 0.2% 甲酸的 0.01 mM 醋酸水溶液作流动相，流速为 0.2 mL/min，使 HMF 在柱上与共提取的干扰基质完全分离，增加了 MS 检测的离子化。在此条件下，HMF 于 5.087 min 洗出，保留时间重复性良好 (5.09 ± 0.04 min, n=10)。见图 2。在死时间为 1.55 min 的条件下，测得 HMF 的容量因子 (k^1) 为2.33。

从固体食品基质中提取游离糠醛的一般方法是，先用水提取，然后再用 Carrez I 和 II 试剂进行净化。将水相提取物直接进行 LC/MS 分析，显示存在干扰化合物。Oasis HLB 小柱填充了大孔径亲脂的二乙烯苯和亲水的 N-乙烯基吡咯烷酮聚合物，因此，可用于 LC 分析前的提取。让净化的水相提取物通过预处理

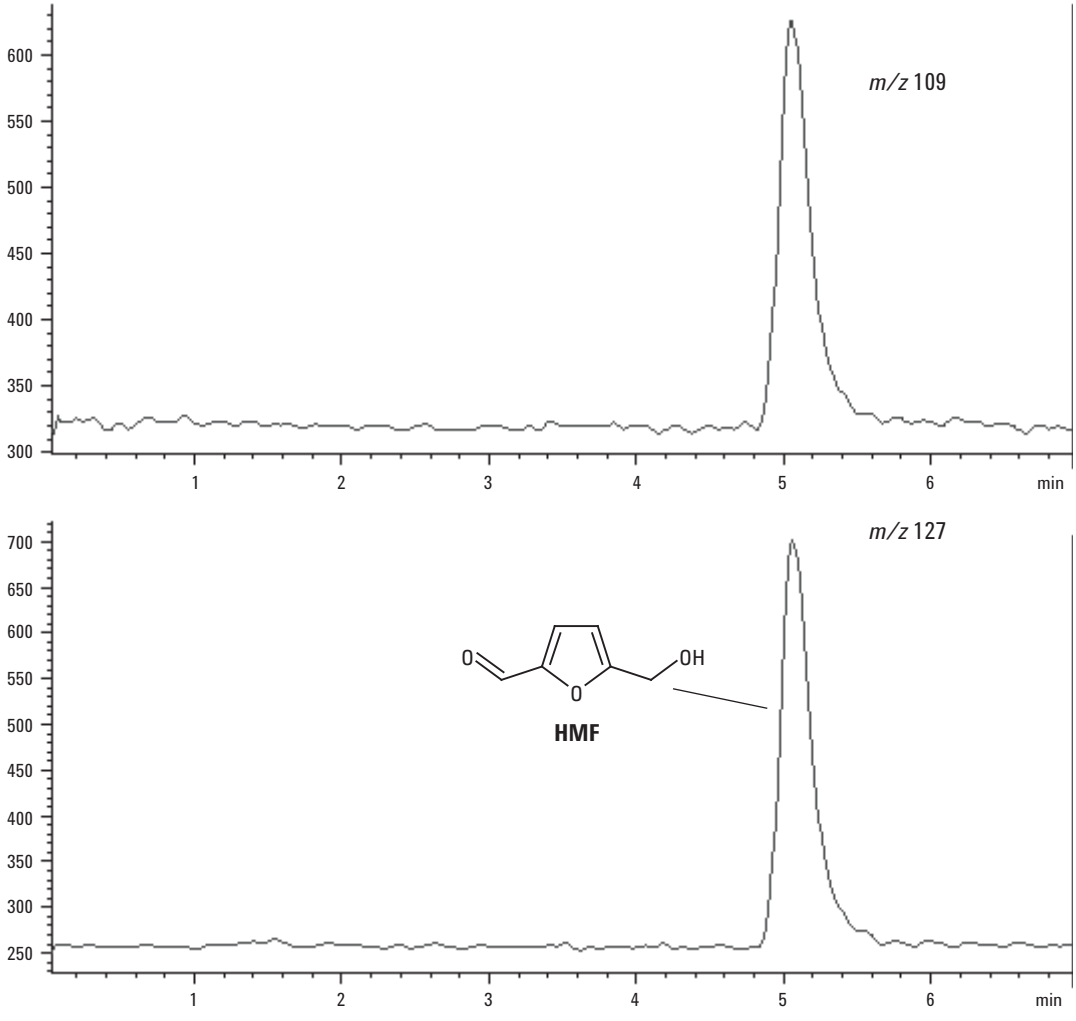


图 2. HMF 标准品 (HMF 浓度为 100 ng/mL) 的提取离子色谱图 (EIC)

过的小柱。提取物中存在的 HMF 与吸附材料发生强烈相互作用，而大部分共提取的物质则不发生作用。HMF 被保留在小柱上，然后再用乙醚洗脱。经测定，0.5 mL 乙醚就可以使小柱上的 HMF 完全洗脱。

通过 SPE 净化，对 MS SIM 模式的检测有明显改善。总离子流色谱图显示样品中有三个主要峰。通过对比保留时间和质谱数据，鉴定出了 HMF 峰。*m/z* 127 和 *m/z* 109 特征离子的比值还可以确证 HMF 峰的纯度。我们发现，*m/z* 109 化合物特征离子 [$C_6H_5O_2$] 比化合物母离子选择性更强，因此，采用这个离子的信号响应对 HMF 进行定量。

对谷类婴儿食品中标准添加标样的样品进行分析，从而验证方法的准确度。每个标准添加样品进行 4 次 HMF 分析，以测定方法的回收率，添加浓度范围为 0.25 到 5.0 µg/g。所有浓度水平的样品平均回收率超过 90%。

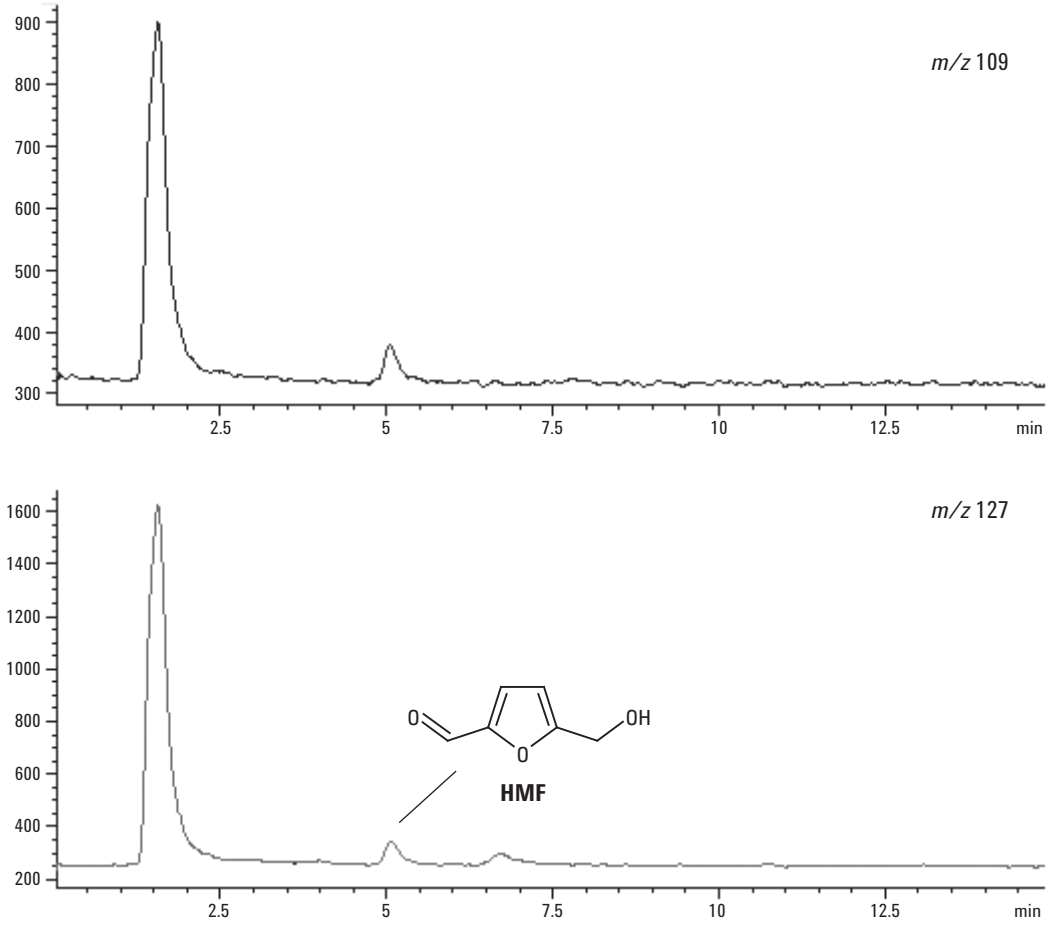


图 3. 果味酸奶样品的提取离子色谱图 (HMF 浓度为 0.2 µg/g)

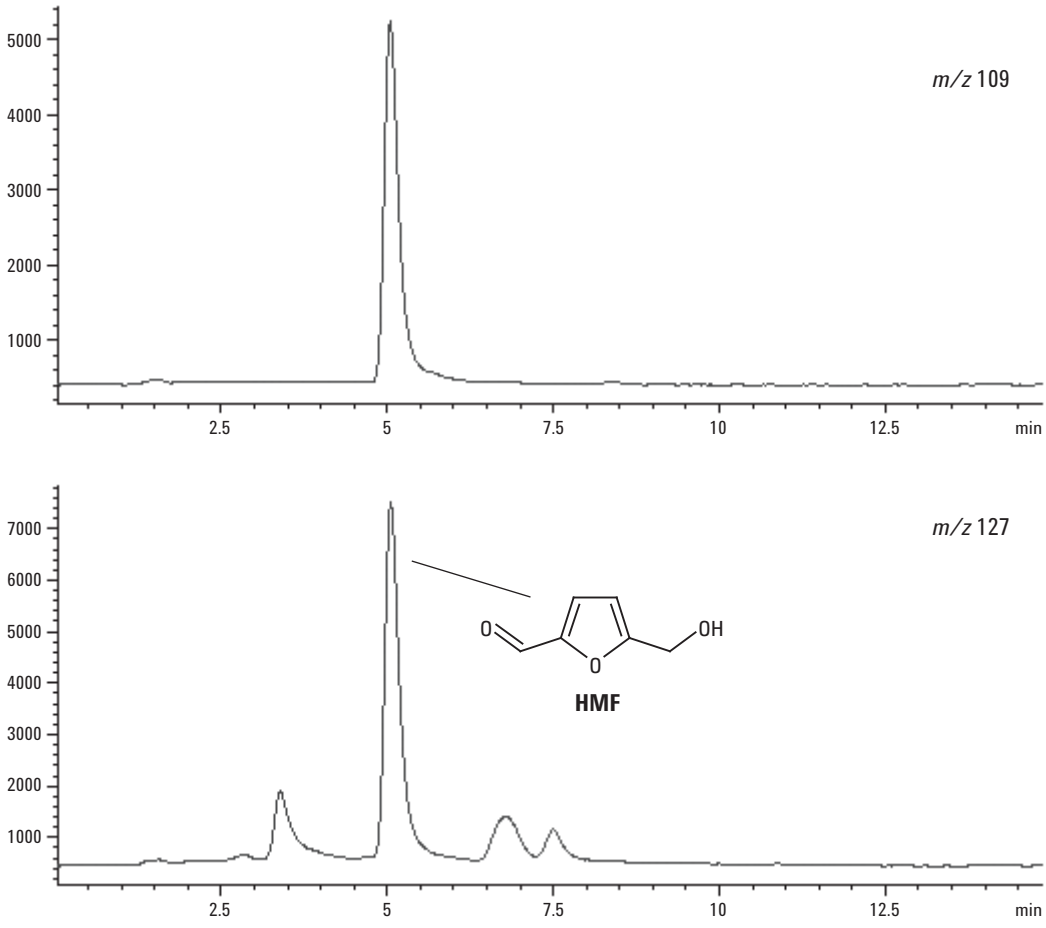


图 4. 薄脆饼干样品的提取离子色谱图 (HMF 浓度为 17.5 µg/g)

本方法可以精密而准确地测定食品中低浓度和高浓度的 HMF。图 3 显示了一个含 HMF 0.2 µg/g 的果味酸奶样品的提取离子色谱图。用 LC-UV 检测方法很难测定如此低浓度的 HMF。图 4 显示了含 HMF 17.5 µg/g 的薄脆饼干样品的提取离子色谱图。

结论

科学界对 HMF 的潜在毒性越来越关注，需要努力建立测定真实基质中 HMF 的快速、可靠而灵敏的新方法。以前常用的方法所分析的食品中 HMF 含量偏高，常用的提取方法不能在 LC 分析之前去除可能的干扰化合物。干扰化合物的存在可能造成一些问题，尤其是在测定婴儿食品等 HMF 浓度低的样品时，LC 分离后的 UV 检测过程中。本应用报告所介绍的方法具有如下特点，1)用一个窄径柱将 HMF 从基质共提取物中快速分离，2)用 SPE 有效地净化提取物，3)用 MS 选择性地检测 HMF。

参考文献

1. V. Gökmen, H. Z. Senyuva, Improved method for the determination of hydroxymethylfurfural in baby foods using liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54, 2845–2849.

用 LC/MS 系统以分析模式和半制备模式鉴定和分离 DSP-毒素

应用

食品安全

作者

Norbert Helle
TeLA GmbH
Bremerhaven, Germany

Sebastian Lippemeier
BlueBioTech Microalgen Biotechnologie
Ellerbek, Germany

Jürgen Wendt
Agilent Technologies Sales and Support GmbH
Waldbronn, Germany

摘要

本文介绍了鉴定和分离 DSP-毒素的液相色谱/质谱 (LC/MS) 联用系统的配置与操作方法。在分析模式中，与 LC 荧光检测方法相比，LC/MS 联用系统监测岗田酸 (OA) 和鳍藻毒素-1 (DTX-1) 的选择性和灵敏度更好。采用更简单的样品处理步骤，根据基质不同，检测限可以降低 3 到 5 倍。在半制备模式中，用基于质量的馏分收集器，从*利玛原甲*藻类植物的粗提取液中分离出了 OA 和 DTX-1，纯度 >98%。由于有了该方法，现在可以购买到 DSP 毒素的参考标准品。

前言

蛤贝中毒 (DSP) 是人食用了双壳类软体动物如扇贝、蛤贝、蚌、牡蛎后而导致的肠胃综合症。其症状包括腹部疼痛、呕吐、恶心、头疼、腹泻、感冒、发烧。DSP 毒素可以划分成三类：岗田酸 (OA) 类，包括岗田酸和鳍藻毒素 (DTX)，海扇毒素类 (PTX) 和扇贝毒素类 (YTX)。

在 OA 类中，OA 和 DTX-1 是导致 DSP 发生的主要毒素。这种病的爆发促使很多国家建立了海产品生物毒素的控制计划。在德国，蚌类中 DSP 毒素的残留量目前被控制在 2000 年 6 月的第八次 Fischhygiene-Verordnung 会议所规定的允许量之下。这个规定要求通过动物检测（老鼠活体鉴定）或化学分析程序检测甲壳类动物中的毒素。液相色谱-荧光检测器联用是一种已建立的方法，但它要求对本身无荧光特性的 DSP 毒素进行荧光衍生化。使用 LC/MS 电喷雾离子化 (ESI) 可以在更简单的样品制备条件下得到更灵敏、更有选择性的结果。

与监测 DSP 毒素的分析方法相关的最大问题是纯的参考标样要易得。DSP 毒素 OA 和 DTX-1 可以用基于质量的馏分收集的半制备模式从利玛原甲藻类植物的粗提取液中分离得到。本文介绍了 LC/MS 联用系统以分析模式和半制备模式进行分析的配置、设置及操作方法。

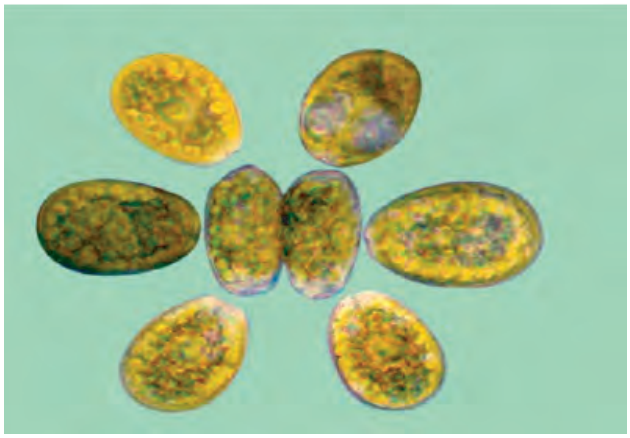
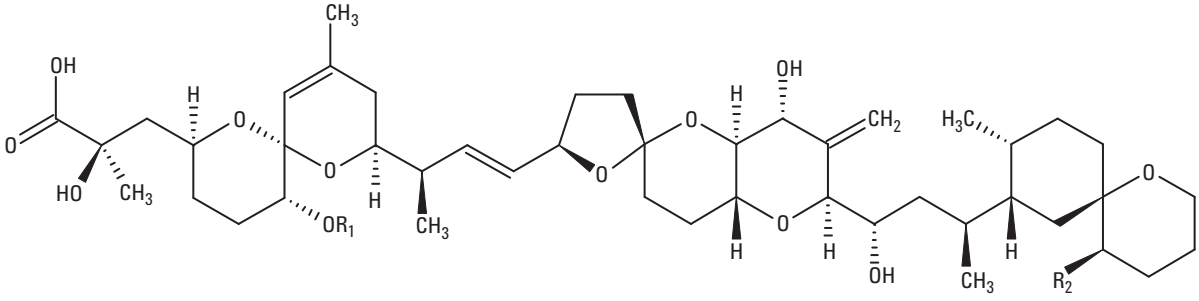


图 1. 显微镜下的*利玛原甲*藻类植物

实验

图 2 是本文工作中分析的 DSP 毒素的结构。分析以两种模式进行：分析模式和半制备模式。



OA: R_1 = H, R_2 = H $C_{44}H_{68}O_{13}$
DTX-1: R_1 = H, R_2 = CH_3 $C_{45}H_{70}O_{13}$

物理化学性质：多醚结构，亲脂性羧酸，无发色团

图 2. DSP 毒素

LC/MS 方法具体条件 – 分析模式

LC 条件

仪器：	Agilent 1100 HPLC（四元泵）
色谱柱：	150 × 3.0 mm ZORBAX SB-C18，5 µm
流动相：	A 水（含 0.1% 甲酸） B 甲醇
梯度：	0 min 20% B 5 min 20% B 20 min 80% B
停止时间：	28 min
运行后时间：	4 min
流速：	0.6 mL/min
进样量：	10 µL

质谱条件

仪器：	Agilent LC/MSD
离子源：	ESI 正离子化/负离子化模式切换
干燥气流速：	12 L/min
雾化器：	60 psig
干燥气温度：	350 °C
V_{cap}：	3000 V（正电压和负电压）

LC/MS 方法具体条件 – 半制备

LC 条件

仪器 1:	Agilent 1100 HPLC（四元泵）
色谱柱：	50 × 9.4 mm ZORBAX SB-C18，5 µm
流动相：	A 水（含 0.1% 甲酸） B 甲醇
梯度：	0 min 20% B 5 min 20% B 20 min 80% B
停止时间：	28 min
运行后时间：	4 min
流速：	7.0 mL/min
进样量：	100 µL （250 µL 使用多次抽取模式）
仪器 2：	Agilent 1100 HPLC（等度泵）补充流量
流速：	0.8 mL/min（50% H_2O + 50% MeOH + 0.1% 甲酸）
分流器：	分流比 271:1

质谱条件

仪器：	Agilent LC/MSD
离子源：	负离子化模式电喷雾离子源
干燥气流速：	12 L/min
雾化器：	60 psig
干燥气温度：	350 °C
V_{cap}：	3000 V（正电压）

MSD 馏分收集设置

FC 模式：	方法所用目标离子；加合离子：$(M–H)^-$

结果与讨论

分析工作

在 LC/MS 系统分析模式（图 3）中，使用了 ESI 正/负离子化模式切换监测了 DSP 毒素。正离子化模式比负离子化模式的灵敏度好四倍多（图 4）。从 OA 和 DTX-1 的质谱图可以得到加钠后的分子离子而不是质子化的分子离子，特征的碎裂离子是 $[M+H– nH_2O]^+$，n = 1–4，它们是由连续地失去水分子而形成的。负离子模式中，只有 $[M–H]^-$ 被检测到。LC/MS 提供了一个比 LC 荧光检测方法的灵敏度、选择性优于 3–5 倍的方法来监测 DSP 毒素（图 5）。

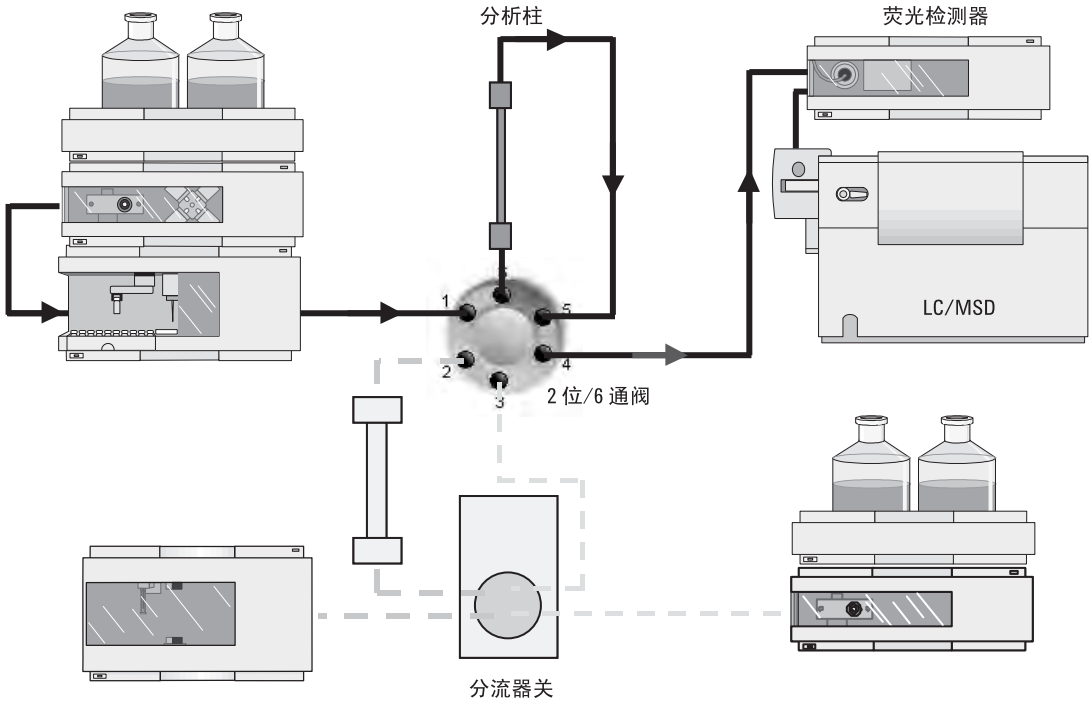


图 3. 系统图示（分析工作）

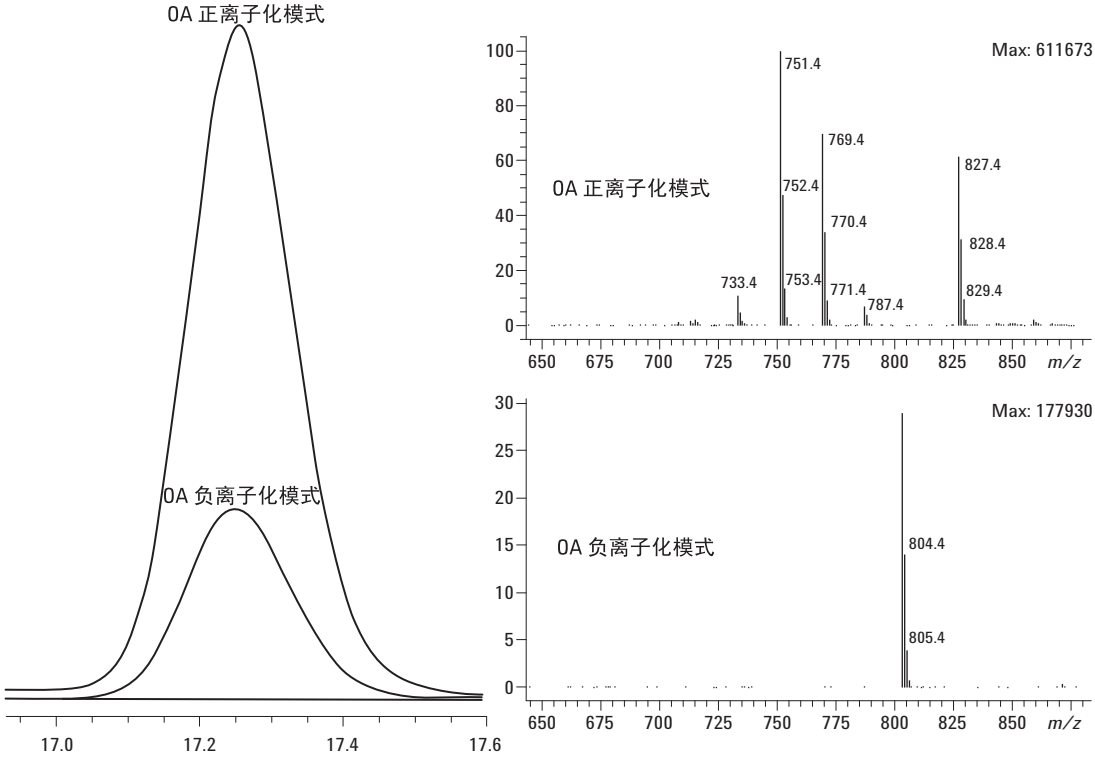


图 4. LC/MS 分析 OA

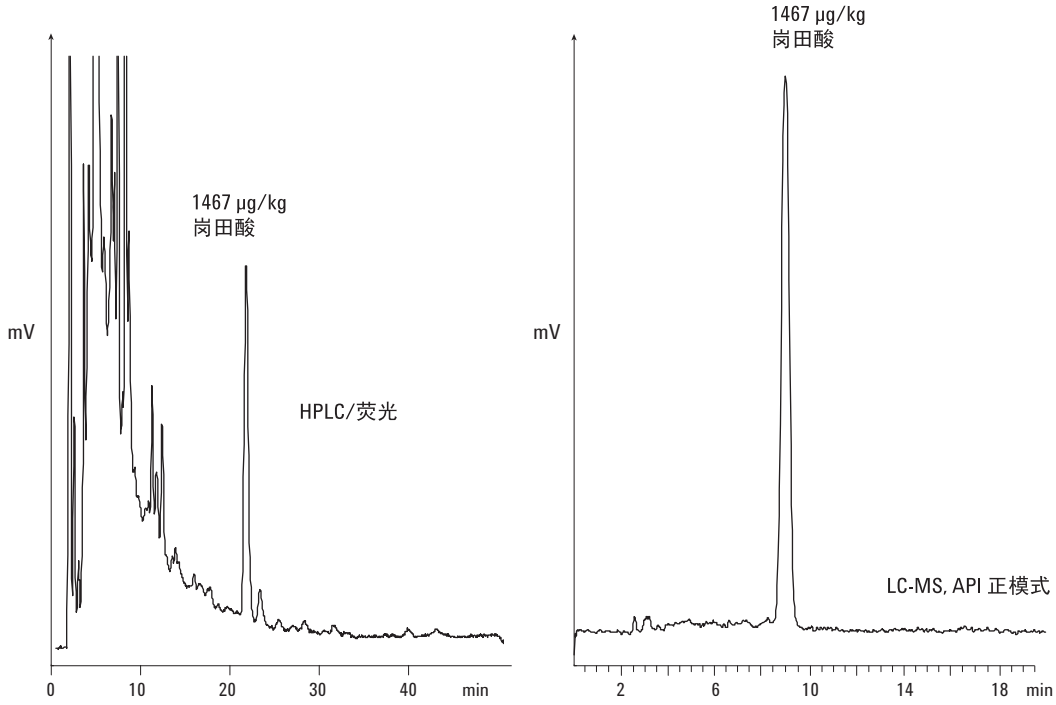


图 5. 甲壳类动物中 DSP 毒素的对比分析

半制备工作

通过把系统切换成半制备模式可以得到参考标样（图 6）。把阀转到位置 2，使主液流通过半制备柱，然后经过分流流到馏分收集器（AS）。补充流量流过分流器，将从主流中分流得到的部分化合物带向质谱检测器（MSD）。

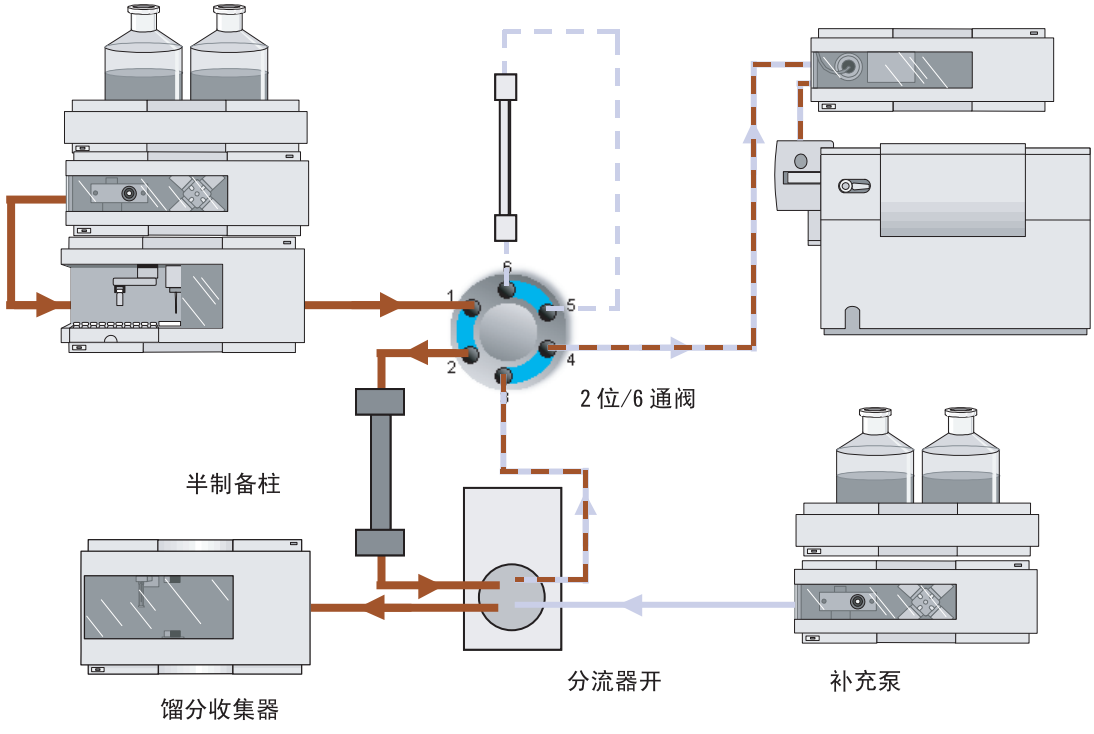


图 6. 系统图示（半制备工作）

除了 OA 和 DTX-1，用基于质量的馏分收集器从利玛原甲藻类植物的粗提取液中分离得到了一种有类似质谱特性的新的 OA 毒素（图 7）。用基于质量的馏分收集器从利玛原甲藻类植物的甲醇提取液中得到了三种组分：OA，DTX-1 和一种未知毒素。从 MS^n 实验中可以判定未知毒素的分子结构与 OA 和 DTX-1 非常相似。

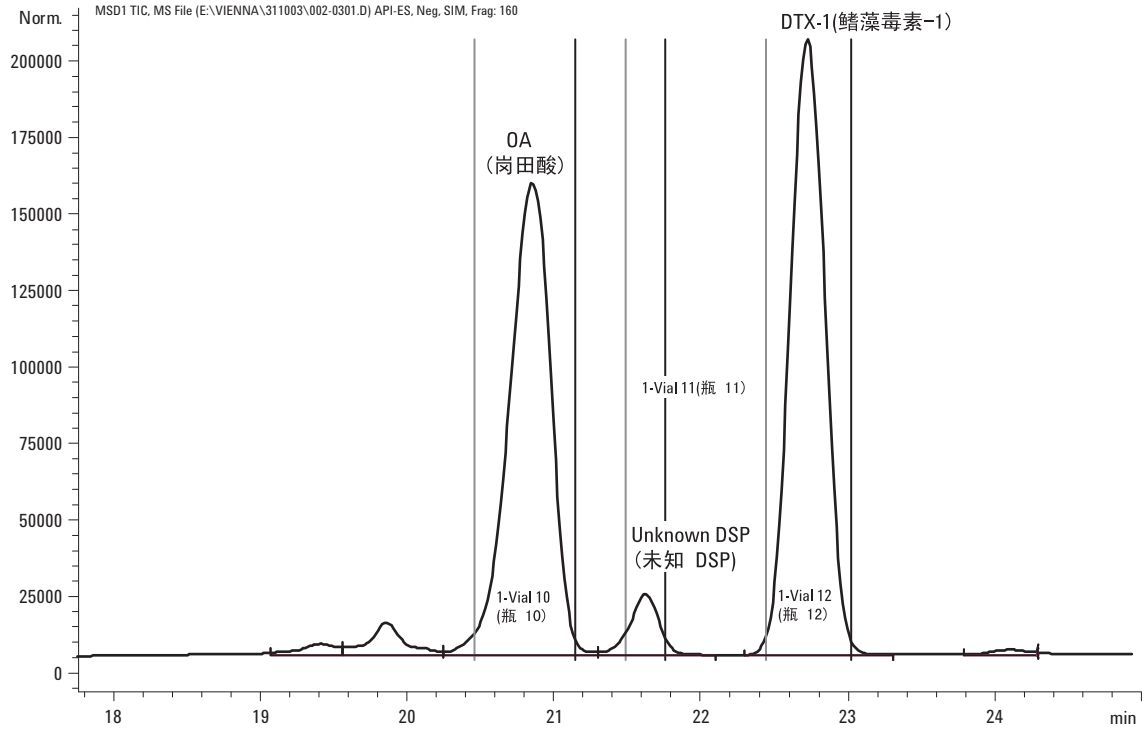


图 7. DSP 毒素的质量成分收集图

由于目标化合物的浓度低，必须多次运行同一样品，这个过程通常叫做 pooling（图 8）。重新分析收集的馏分能得到纯度 >98% 的化合物。这个方法高效，并且现在由这种方法制备的 DSP 毒素的标准品已经商品化。

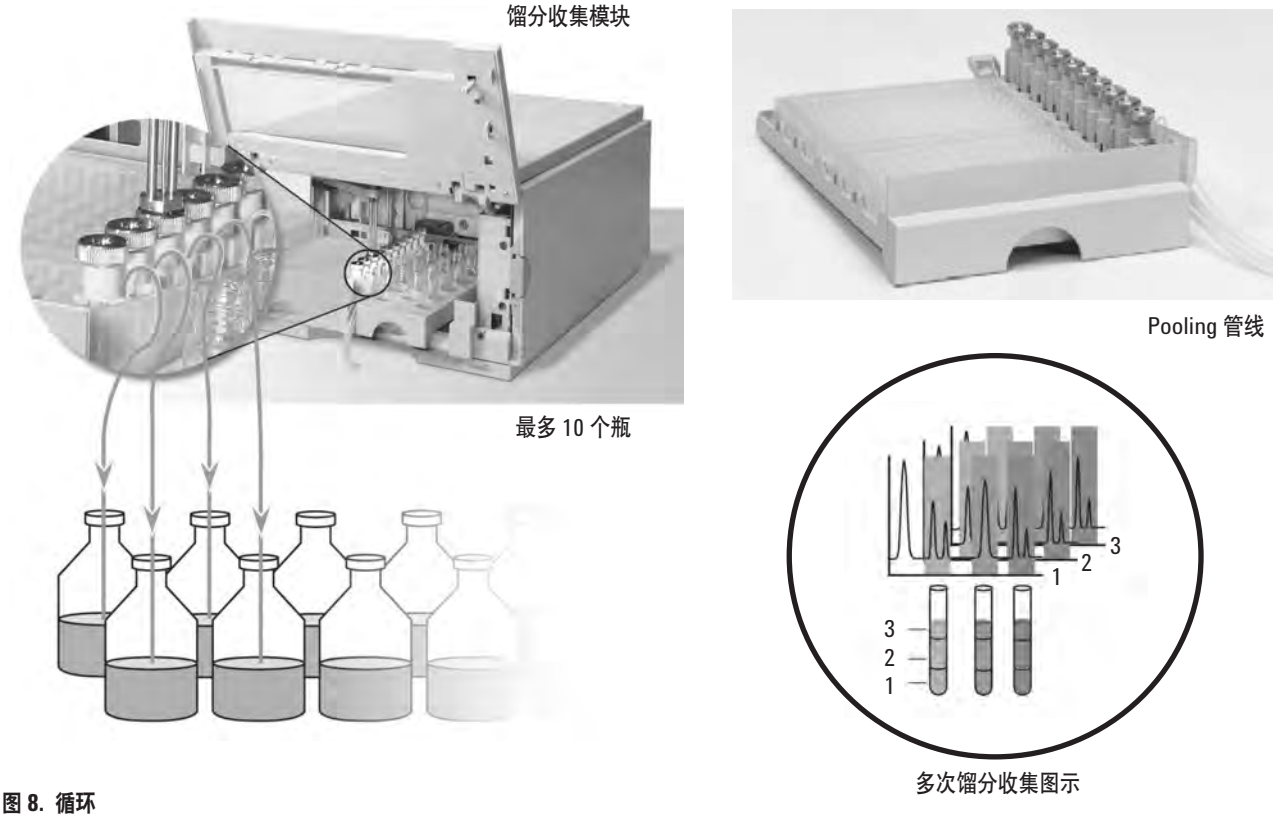


图 8. 循环

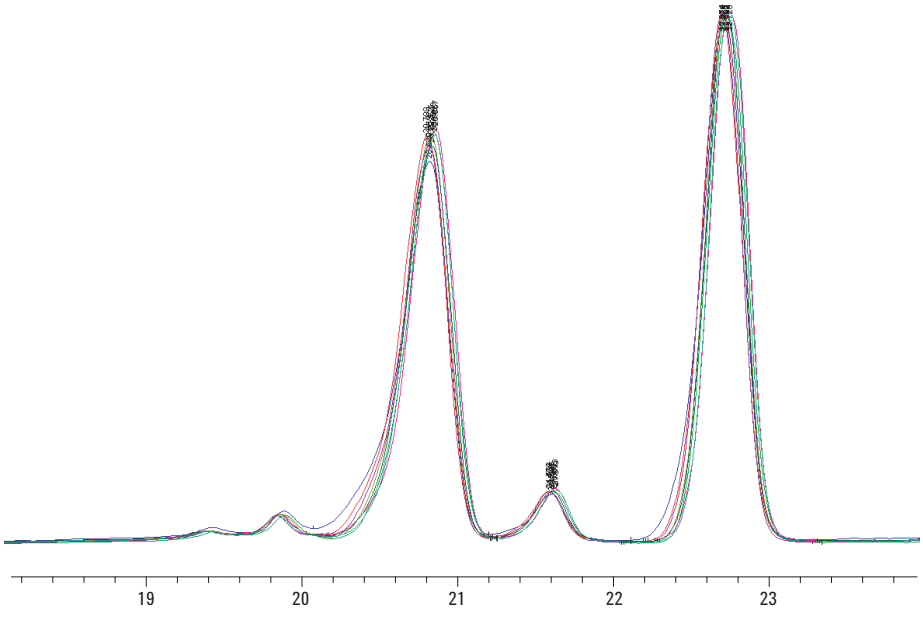


图 9. 方法的高度重现性－10 次基于质量的馏分收集图的叠加

总结

本文介绍了鉴别和分离 DSP 毒素的 LC/MS 联用系统的配置及操作。在分析模式中，对于监测 OA 和 DTX-1，LC/MS 联用方法比 LC 荧光检测方法更灵敏，更有选择性。由于所需的样品制备步骤较简单，根据基质不同，检测限可以降低三到五倍。在半制备模式中，用基于质量的馏分收集方法从利玛原甲藻类植物的粗提取液中分离 OA 和 DTX-1，纯度 >98%。正是基于这个方法，DSP 毒素的标准品目前已经商品化。

参考文献

1. M.A. Quilliam, A. Gago-Martinez, and J.A. Rodriguez-Vasquez, “Improved method for preparation and use of 9-anthryldiazomethane for derivatization of hydroxycarbolic acids - Application to diarrhetic shellfish poisoning toxins”, (1988), *Journal of Chromatography A*, **807**, 229–239.
2. A.G. Bauder; A.D. Cembella, V.M. Bricelj, and M.A. Quilliam, “Uptake and fate of diarrhetic shellfish poisoning from the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the bay scallop *Argopecten irradians*", (2001), *Marine Ecol. Progr. Ser.*, **213**, 39–52.

液质联用方法用于烟曲霉毒素的分析

应用

食品分析

前言

众所周知，镰刀霉菌类常存在于玉米及玉米产品中，产生一种被称之为烟曲霉毒素的霉菌毒素。最常见的是烟曲霉毒素 B_1、B_2 和 B_3，其毒性已被广泛地研究。这些化合物对人类具有致癌的作用。烟曲霉毒素的特征结构是 19 碳的氨基多羟基烷基长链，其丙烷的三个碳上带有 3 个羧酸。其异构体 B_1，B_2 和 B_3 只是羟基的数量及位置的差别 (见图 1)。烟曲霉素 B_2 和 B_3 是同分异构体。

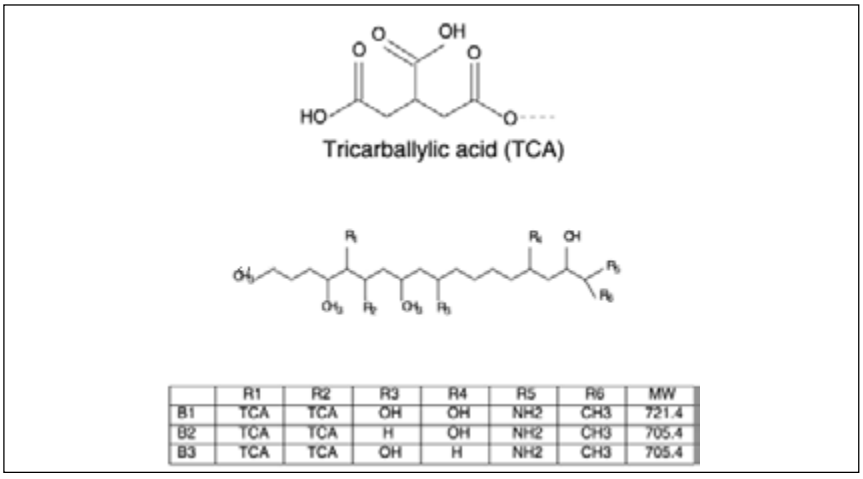
大多数的分析方法只能分析已知烟曲霉素中的一个或几个。常规的液相方法需要对氨基进行衍生化才能分析。在此应用文章中，利用 Agilent 1100 液质联用技术可以直接检测烟曲霉素，而无需进行衍生化。

实验条件

Agilent 1100 液质系统由二元梯度泵、真空在线脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器和质谱仪组成。液质联用采用电喷雾离子源。整个数据采集及数据分析由安捷伦化学工作站完成。

结果和讨论

利用液质的全扫描模式分析较高浓度下的烟曲霉素同系物，以得到分子离子峰及特征碎片锋。优化起始条件使得质谱只产生分子离子峰 $(M+H)^+$，而无明显的碎片离子。通过调节碰撞诱导解离 (CID) 电压来产生特征碎片离子以进行结构确认。如图 2 所示，烟曲霉素 B_2 和 B_3 由于是同分异构体，无法在质谱图上分离，但是在色谱上，可以得到很好的分离。



	R1	R2	R3	R4	R5	R6	MW
B1	TCA	TCA	OH	OH	NH2	CH3	721.4
B2	TCA	TCA	H	OH	NH2	CH3	705.4
B3	TCA	TCA	OH	H	NH2	CH3	705.4

图 1. 烟曲霉毒素的结构图

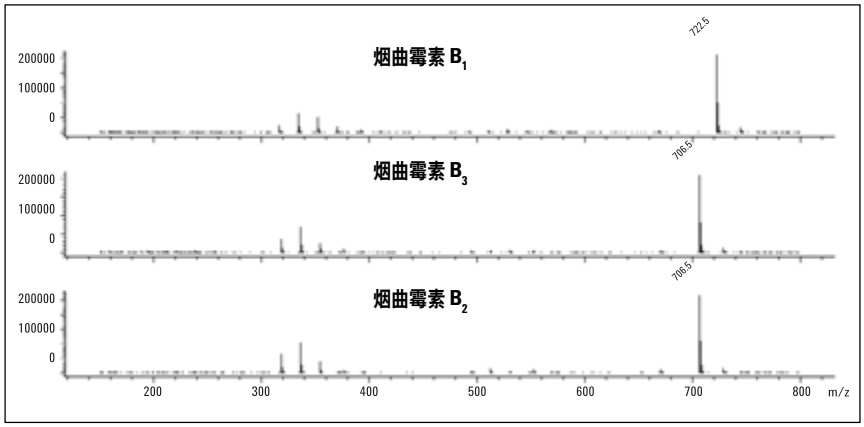


图 2. 烟曲霉毒素同系物的质谱图

图 3 所示为样品量为 25 ng 的烟曲霉素的总离子流图，可以看出液质分析具有很好的灵敏度。要更进一步提高检测灵敏度，可用选择离子扫描 (SIM) 模式。

液相色谱条件

色谱柱:	150 x 2.1 mm Zorbax Eclipse XDB, C 18, 5 μm
流动相:	A = 5 mM 醋酸铵溶液 pH = 3.0
	B = 乙腈
梯度:	开始 33% B
	在 8 分钟，至 60% B
	在 9 分钟，至 33% B
流速:	250 μl/min
进样量:	5 μl
柱温:	40 °C
二极管阵列:	220 nm, 4 nm
	参比 550 nm, 100 nm

质谱条件

离子源:	电喷雾 (ESI)
离子化模式:	正离子化 (Positive)
毛细管电压:	4000 V
雾化气压力:	30 psig
干燥气流量:	10 L/min
干燥气温度:	350 °C
扫描范围:	120-820 aum
步长:	0.1
峰宽:	0.15 min
时间过滤器:	On
碰撞电压:	可变 230 V(100-680 amu)
	100 V(380-800 amu)

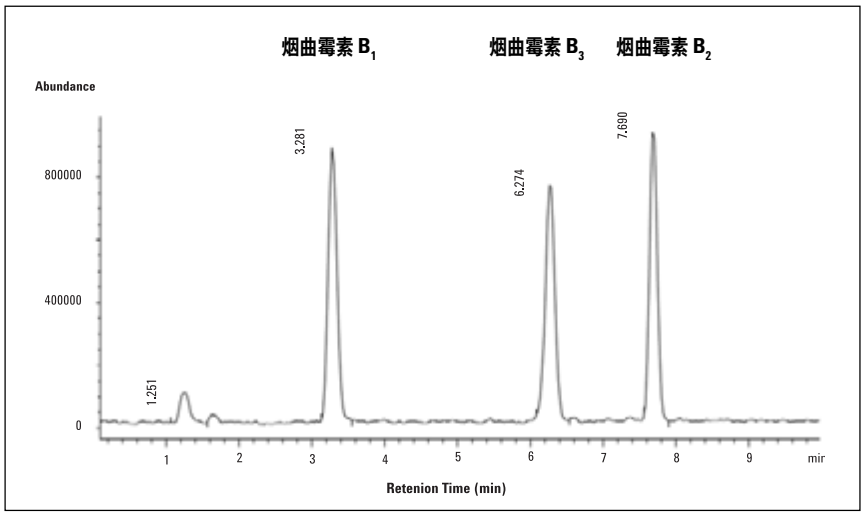


图 3. 25 ng 的烟曲霉毒素的色谱图

图 4 所示为 250 pg 的烟曲霉素添加在玉米萃取物基质中的萃取离子流图。质谱图选取了分子离子峰和特征碎片峰以增加定性的可信度及定量的准确度。

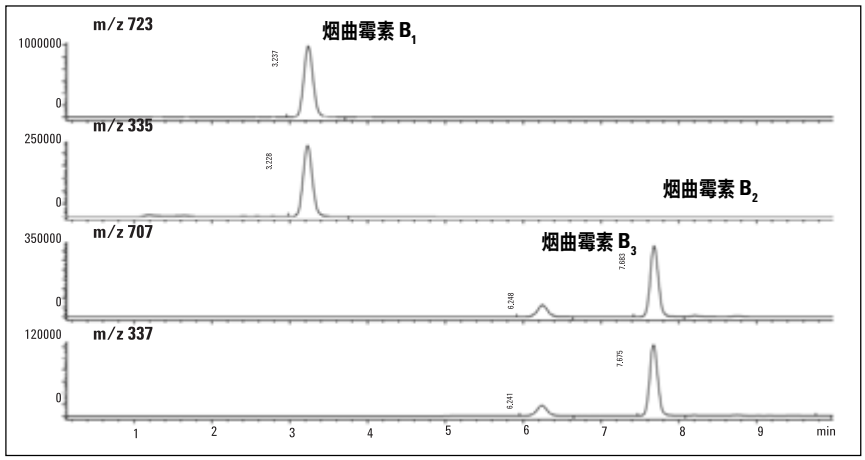


图 4. 添加内标的玉米萃取基质中的烟曲霉毒素的分子离子及特征碎片离子的选择离子扫描图

液相色谱条件

色谱柱:	150 x 2.1 mm Zorbax Eclipse XDB, C 18, 5 μm
流动相:	A = 5 mM 醋酸铵溶液 pH = 3.0 B = 乙腈
梯度:	开始 33% B 在 8 分钟，至 60% B 在 9 分钟，至 33% B
流速:	250 μl/min
进样量:	5 μl
柱温:	40 °C
二极管阵列:	220 nm, 4 nm 参比 550 nm, 100 nm

质谱条件

离子源:	电喷雾 (ESI)
离子化模式:	正离子化 (Positive)
毛细管电压:	4000 V
雾化气压力:	30 psig
干燥气流量:	10 L/min
干燥气温度:	350 °C
选择离子扫描:	at 0 min, 334.4, 352.4, 370.4, 722.5 at 5 min 336.4, 354.4, 706.5
步长:	0.1
峰宽:	0.15 min
时间过滤器:	On
碰撞电压:	可变 230 V(334.5, 352.4, 370.4) 100 V(706.5, 722.5)

结论

Agilent 1100 液质联用系统可以检测极低浓度下的烟曲霉素，而且样品无需衍生化。利用质谱图，可以分析复杂基体中的烟曲霉素，如玉米萃取物，其选择性及灵敏度都很高。

电喷雾和大气压化学电离源液相色谱 — 质谱用于天然食品色素的分析

应用

食品分析

前言

各种各样的天然色素已被广泛地用于饮料，果冻食品和糖果。在许多国家，食品法规已经将天然食品色素与合成食品色素纳入同等程度的检测要求。因此，有必要开发出一种可靠的检测方法用于天然食品色素的分析。本文利用配有电喷雾或大气压化学离子化的液相-质谱联用技术，进行分析鉴定四种天然色素中的主要色素成份，它们分别是：红甘蓝、红辣椒、红曲霉和紫胶。

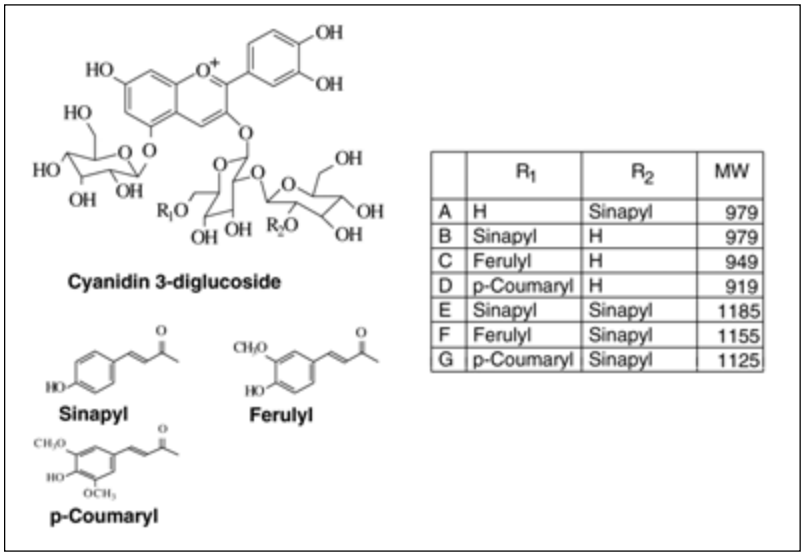
实验条件

红辣椒和红曲霉着色剂溶解于丙酮之中，其它两种溶于去离子水中。每一种溶液用 0.2 微米的滤膜过滤。10 微升样品注入分析系统。整个液相-质谱联用仪由 Agilent 1100 二元泵、柱温箱、真空脱气机、自动进样器和质谱仪组成。离子源选择电喷雾或大气压化学电离源。安捷伦化学工作站来进行仪器检测、数据采集及数据分析。对于每一个样品进行分析条件优化。

结果与讨论

红甘蓝色素

图 1 所示为红甘蓝中七种主要的色素的化学结构。七种色素的基本结构为 3-二糖苷花青素，只是基团 R1 和 R2 不同。图 2 为红甘蓝色素的总离子流图和萃取离子流图。虽然含 10% 甲酸的流动相可以分离每一种色素，但是对于质谱来说，酸浓度过高，会导致灵敏度下降。因此，在液-质分析中，采用含 10% 的甲酸的流动相。萃取离子流色谱图是色素化合物中的基峰离子。



	R_1	R_2	MW
A	H	Sinapyl	979
B	Sinapyl	H	979
C	Ferulyl	H	949
D	p-Coumaryl	H	919
E	Sinapyl	Sinapyl	1185
F	Ferulyl	Sinapyl	1155
G	p-Coumaryl	Sinapyl	1125

图 1. 红甘蓝色剂中主要色素成份的结构

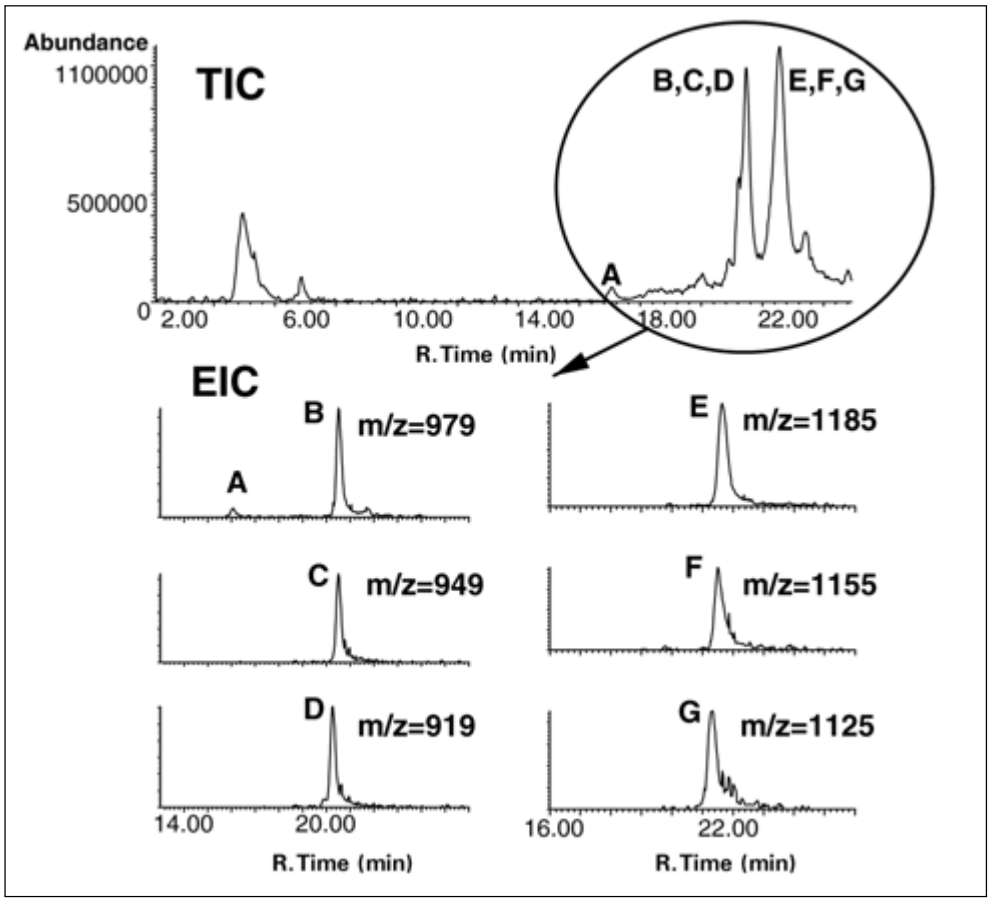


图 2. 红甘蓝中色素化合物的总离子图和选择离子流图

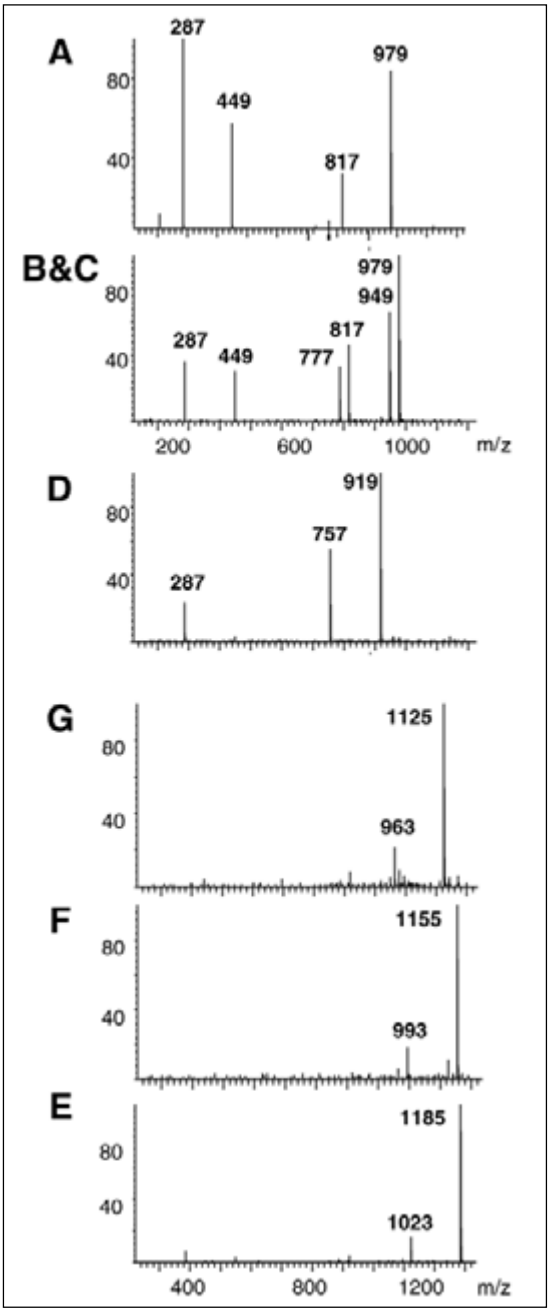


图 3. 在红甘蓝色素中主要色素成份的质谱图

液相条件

色谱柱:	250 x 2.1 mm Intersil ODS3, 5 μm
流动相:	A = 1 % 甲酸 B = 乙腈
梯度:	起始 5% B 在 30 分钟为 50% B
流速:	0.2 μl/min
柱温:	40 °C
进样量:	10 μl

质谱条件

离子源:	电喷雾离子化 (ESI)
离子化模式:	正离子模式 (Positive)
毛细管电压:	4000 V
雾化气压力:	50 psig
干噪气流量:	10 L/min
干噪气温度:	350 °C
电晕针:	4 μA
汽化器温度:	350 °C
扫描范围:	100-1200 aum
步长:	0.1
峰宽:	0.15 分钟
时间过滤器:	On
碰撞电压:	200 V

图 3 为红甘蓝中七种色素化合物的质谱图。对于这些化合物，只生成单电荷分子离子峰(M^+)，而不是一般的质子化的准分子离子峰，$[M+H]^+$，这是因为花青素基团上已经带有正电荷。通过内源碰撞诱导解离技术，可以得到特征碎片离子，然后进行结构分析确认。在碰撞诱导解离质谱中发现，这些色素化合物有一个共性，就是丢失一个葡萄糖基团和花青素 (m/z 287) 及 3-糖苷-花青素 (m/z 449) 离子。

红曲霉色素

红曲霉含有 6 种主要色素成份，其结构如图 4 所示。四种色素可以从总离子流图中的得到相应的质谱图得到确认，如图 5。

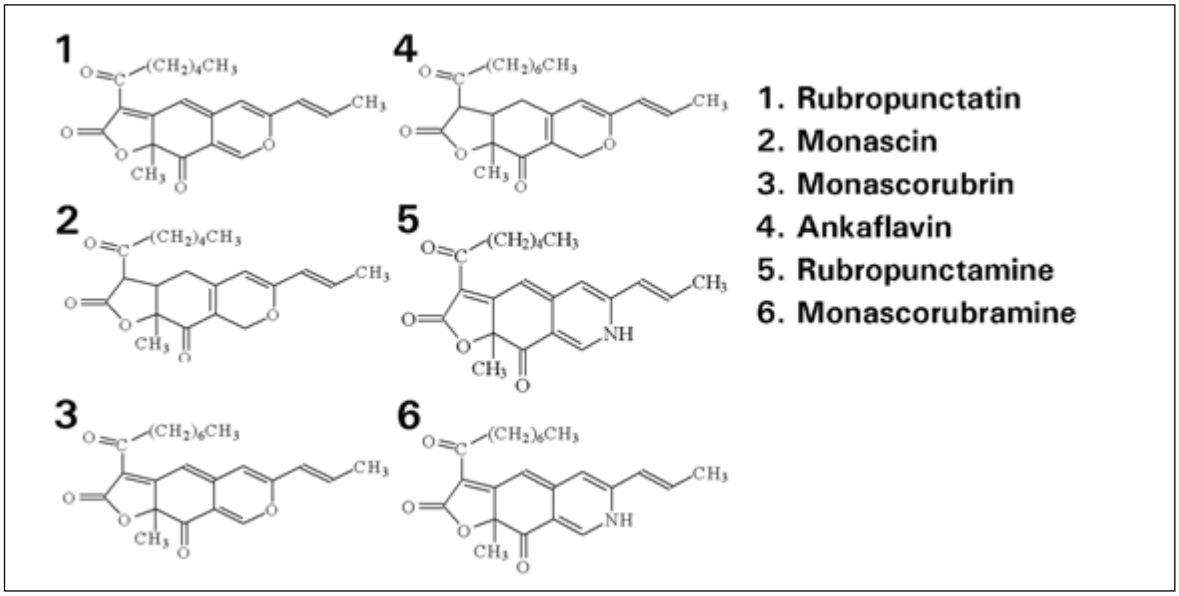


图 4. 红曲霉中着色剂的主要色素成份的结构

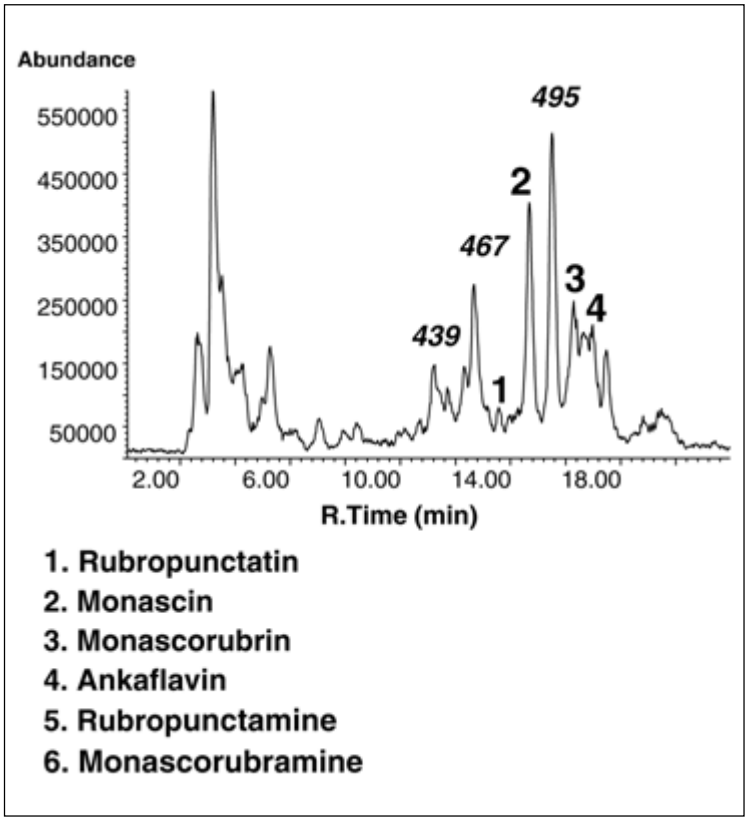


图 5. 梦那红色素成份的总离子流图

液相条件

色谱柱:	250 x 2.1 mm Intersil ODS3, 5 μm
流动相:	A = 1 % 甲酸 B = 乙腈
梯度:	开始 50% B 在 10 分钟为 90% B
流速:	0.2 μl/min
柱温:	40 °C
进样量:	10 μl

质谱条件

离子源:	电喷雾离子化 (ESI)
离子化模式:	正离子模式 (Positive)
毛细管电压:	4000 V
雾化气压力:	50 psig
干噪气流量:	10 L/min
干噪气温度:	350 °C
电晕针:	4 μA
汽化器温度:	350 °C
扫描范围:	100-1200 aum
步长:	0.1
峰宽:	0.15 分钟
时间过滤器:	On
碰撞电压:	100 V

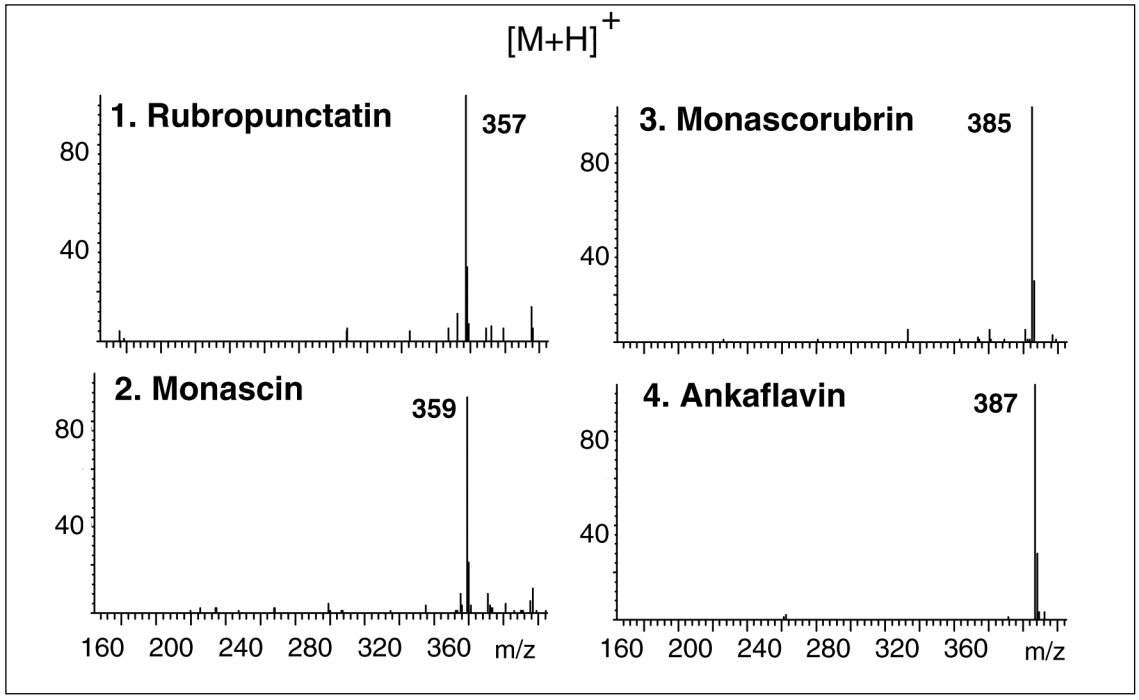


图 6. 在梦那红色素中主要成份的质谱图

三个基峰其质荷比分别为 m/z 439，467 和 495 没有得到确定。图 6 所示为得到确定的色素的质谱图，四个被鉴定的色素化合物的基峰都是质子化的准分子离子峰，即$[M+H]^+$离子。

红辣椒着色剂

辣椒红和辣椒红脂肪酸的单脂以及双脂是红辣椒色素的主要成份。其结构参见图 7。在本研究中，分析鉴定了辣椒红的两个单酯及 5 个双酯化合物。图 8 为总离子流图。其质谱图如图 9 所示。主要是质子化的准分子离子峰，即$[M+H]^+$离子。只有 Monoeicosanoat $[M+H]^+$离子为基峰，其它几种化合物 $[M+H]^+$离子的强度都很低。而且碎片离子都是由于丢失一个或两个脂肪酸。它们共同都产生一个峰，其质荷比为 m/z 567。

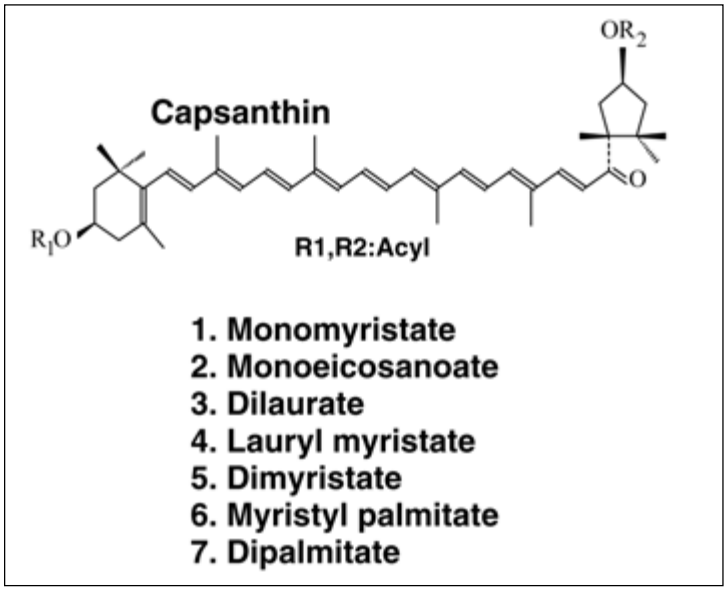


图 7. 红辣椒色素中主要成份的结构

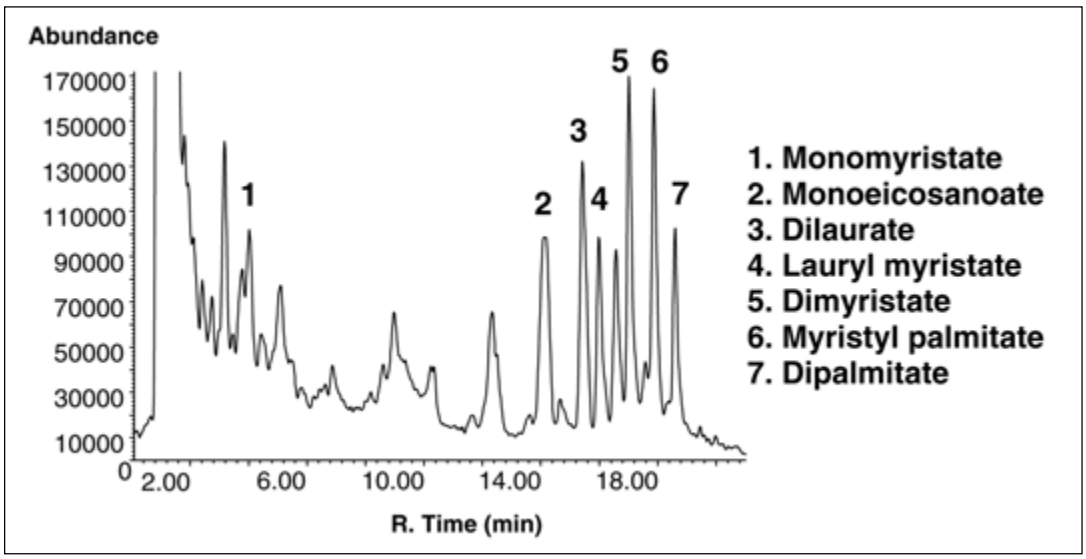


图 8. 红辣椒色素成份的总离子流图

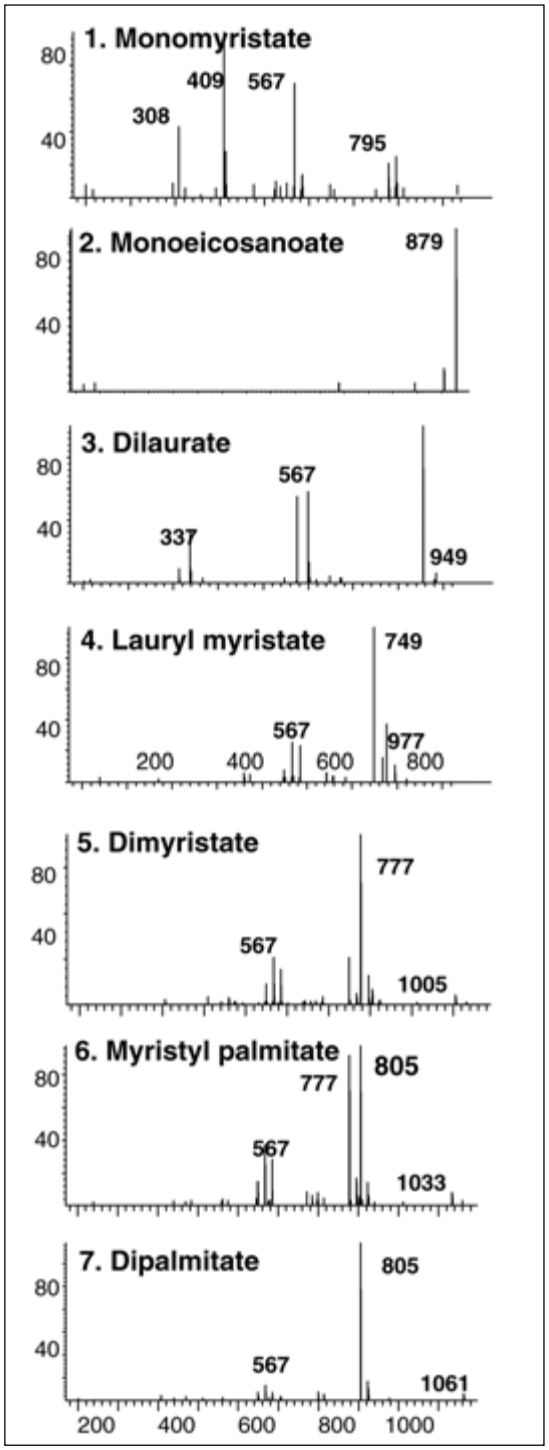


图 9. 红辣椒中色素成份的质谱图

液相条件

色谱柱:	250 x 2.1 mm Intersil ODS3, 5 μm
流动相:	A = 丙酮 B = 甲醇
梯度:	起始 10% B 在 10 分钟为 90% B
流速:	0.2 μl/min
柱温:	40 °C
进样量:	10 μl

质谱条件

离子源:	大气压化学电离源 (APCI)
离子化模式:	正离子 (Positive)
毛细管电压:	4000 V
雾化气压力:	50 psig
干燥气流量:	5 L/min
干燥气温度:	350 °C
电晕针:	4 μA
汽化器温度:	350 °C
扫描范围:	100-1200 aum
步长:	0.1
峰宽:	0.15 分钟
时间过滤器:	On

紫胶着色剂

图 10 为紫胶着色剂中主要色素成份的化学结构。已知 Laccaic 酸 A, B, C 是紫胶着色剂中的主要色素成份。这些化合物具有相同的蒽醌结构，只是不同 R 基团。图 11 中是三种化合物的总离子流图中的基峰。虽然 Laccaic 酸 A, B 已经被鉴定，但是 A 和 B 无法被分离。

图 12 所示为两个峰的质谱图，一个是 Laccaic的酸 C，另一个是 A 和 B 的共流出。产生离子化的准分子离子峰，分别为 m/z 495, 536 和 538。碎片峰分子分别为 m/z 451, 492 和 494 相当于丢失二氧化碳分子。

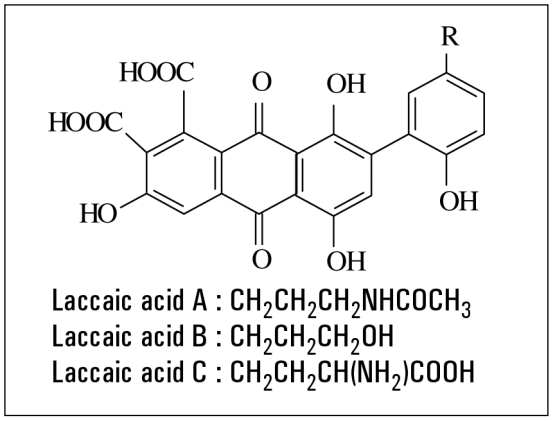


图 10. 紫胶着色剂中色素主要成份的结构

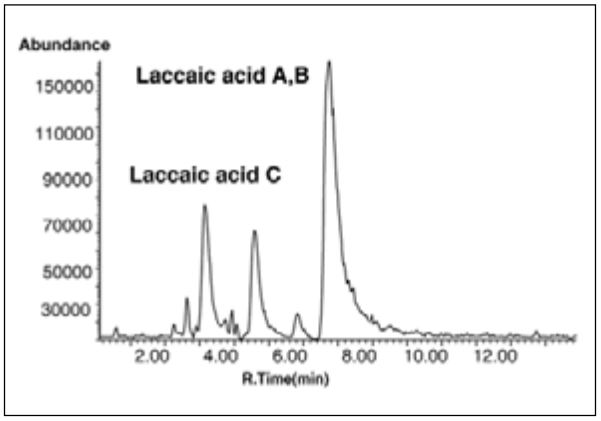


图 11. 紫胶着色剂中色素主成份的总离子流图

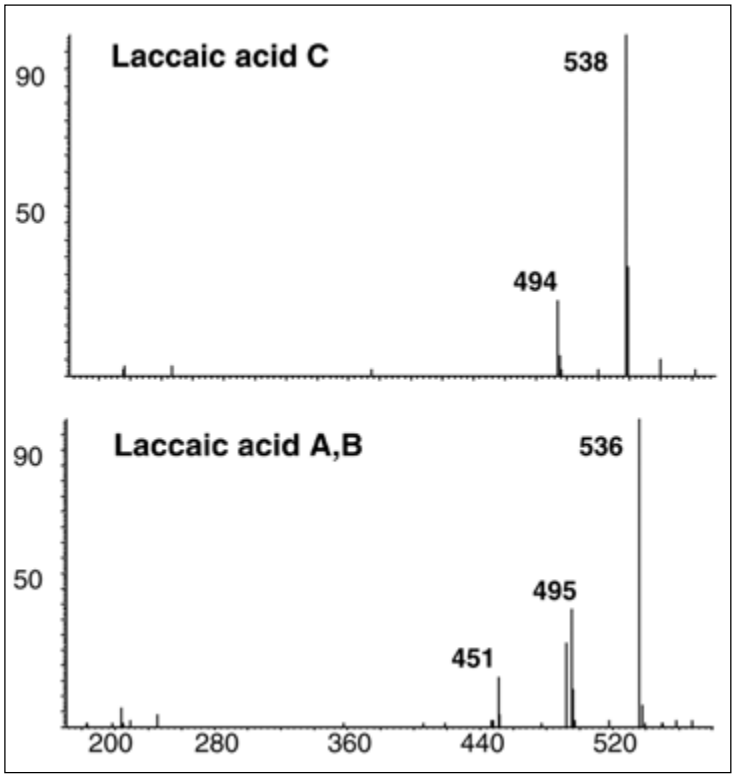


图 12. 紫胶着色剂中色素成份的质谱图

液相条件

色谱柱:	250 x 2.1 mm Intersil ODS3, 5 μm
流动相:	30% 乙腈, 5 mM 二丁胺溶液, 等梯度
流速:	0.2 μl/min
柱温:	40 °C
进样量:	10 μl

质谱条件

离子源:	电喷雾离子化 (ESI)
离子化模式:	负离子 (Negative)
毛细管电压:	4000 V
雾化气压力:	50 psig
干噪气流量:	10 L/min
干噪气温度:	350 °C
扫描范围:	100-1200 aum
步长:	0.1
峰宽:	0.15 分钟
时间过滤器:	On
碰撞电压:	100 V

结论

利用电喷雾和大气压化学电离源液相 - 质谱联用技术分析了四种已经商业化的天然着色剂，通过分析质谱图可获得色素的分子量和有用的结构信息。

液相色谱 / 质谱联用分析糖和糖醇类化合物

食品分析

作者

Hiroki Kumagai
Agilent/Yokogawa Analytical System, Tokyo, Japan

前言

碳水化合物，地球上数量最多的有机化合物，广泛地分布于植物和动物中。植被和海藻中也含有大量的碳水化合物，节肢动物，如蟹和虾的壳也由多糖化合物，即壳质组成的。

虽然糖代表了大量的生物质；但是在某些生物体中的含量较少。各种糖在生物体内具有各种功能，如体内能源。碳水化合物在纺织品，食品加工和医药工业中被用作原材料。

碳水化合物可以用以下的方法进行分析:

- 气相色谱 / 质谱 (GC/MS) 法，但是需要对碳水化合物进行衍生化反应。
- 液相色谱法 (HPLC)，此方法有一定的限制，如检测器的灵敏度。一般有两种检测器用于碳水化合物的分析，示差折光检测器和经柱前或柱后衍生之后，用紫外检测器。
- 液相色谱 / 电喷雾 / 质谱，在特定的条件下可以通过柱前或柱后衍生化之后获得更高的灵敏度。
- 液相色谱 / 大气压化学电离源 / 质谱法，此方法无需柱前或柱后衍生化。但是需要柱后添加氯仿或二氯甲烷。

衍生化分析方法非常灵敏，具有最低的检测限。几个至几十个皮克。大气压化学电离源 / 质谱方法，尽管需要柱后添加氯仿或二氯甲烷，也具有较低的检测限，几百皮克，而且简单，重复性好，其主要的峰为$[M+Cl]^-$。

实验方法

- 仪器: Agilent 1100 液相色谱 / 质谱,
  带大气压化学电离源 (APCI) 负离子模式
  干燥气: 氮气, 13 L/min, 350°C
  雾化气: 氮气, 40 psi
  Corona 电流: 30 微安
  碎片电压: 20 V
  质量范围: 100-500 amu
  选择离子模式 (SIM)
  山梨醇：217,219
  葡萄糖、果糖：215,217
  木糖醇：187,189
  蔗糖：377,379
- 液相色谱条件:
  流动相: $CH_3CN/H_2O(75/25)$
  流速: 0.2 mL/min
  柱温: 40°C
  进样体积: 10 µl
  柱后添加: $CH_3CN/CHCl_3$, 流速为 0.2 mL/min
- 色谱柱: AshipakNH_2-50 2D, 2.0 mm × 150 mm, 5 µm

样品分析

利用液相色谱/大气压化学电离源/质谱分析某些糖及糖醇化合物。图 1，图 2 和图 3 显示了液相色谱/大气压化学电离源 / 质谱分析方法的灵敏度。

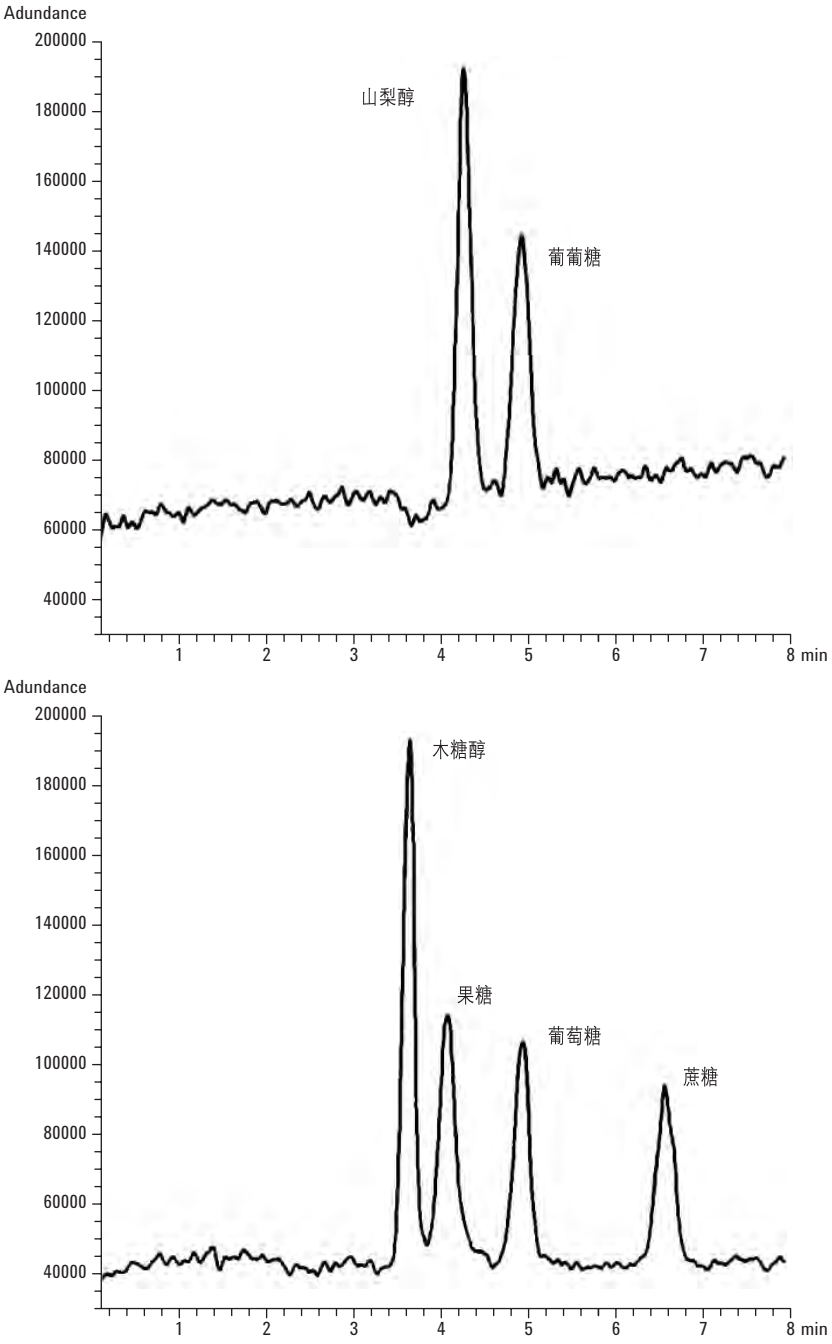


图 1. 糖及糖醇化合物的选择离子流 (SIM)，每一个糖的浓度为 1 µg/mL

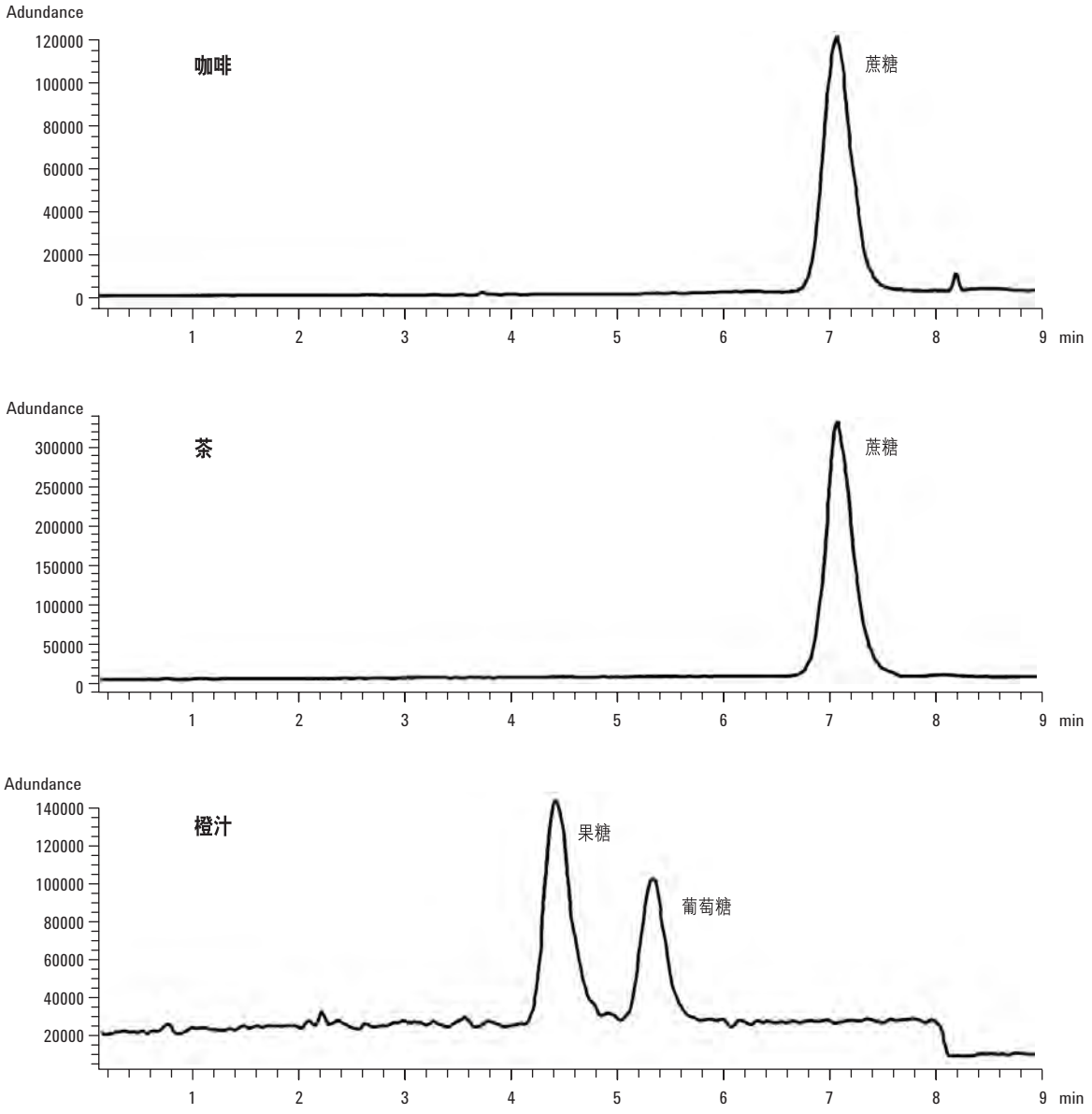


图 2. 在三种最常用的饮料中所含有糖的选择离子流 (SIM) 图

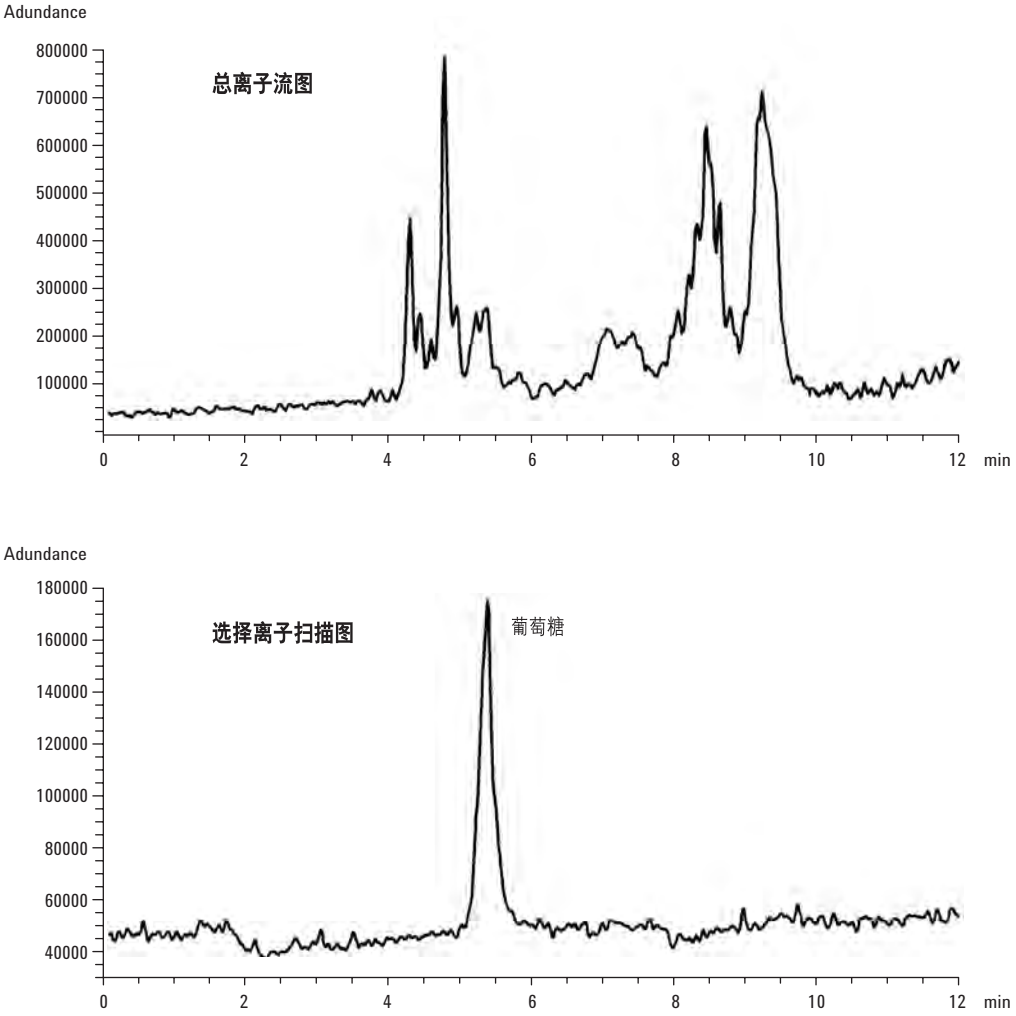


图 3. Sake 酒 (一种日本米酒) 中的化合物的液相色谱 / 大气压化学电离源 / 质谱的总离子流 (TIC) 和选择离子流 (SIM) 图

结论

利用液相色谱/大气压化学电离源/质谱技术可以成功地分析糖和糖醇化合物，而无需对样品进行衍生化，方法简单而且灵敏度高。

液相色谱 / 质谱联用分析甘油三酯类化合物

食品分析

作者

Hiroki Kumagai
Agilent/Yokogawa Analytical System, Tokyo, Japan

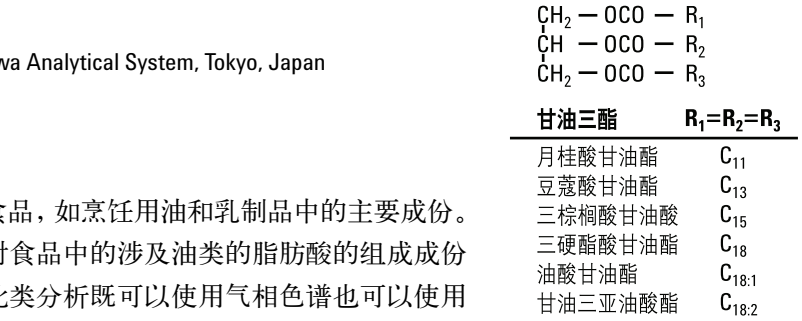
前言

油酯是许多食品，如烹饪用油和乳制品中的主要成份。因此，需要对食品中的涉及油类的脂肪酸的组成成份进行分析。此类分析既可以使用气相色谱也可以使用液相色谱，但是气相色谱方法有一定的限制，如样品处理复杂，而且需要皂化反应。

而使用液相色谱，可以直接分析此类化合物，但是由于某些活性组份没有紫外吸收，因此检测灵敏度很低，而且在某些情况下，分离不完全，出现共流出峰，也会影响分析结果。

在本文中，使用液相色谱 / 大气压化学电离源 / 质谱分析了六个甘油三酯类化合物，这六个化合物具有相同的脂肪酸的组成。

表 1. 甘油三酯的化学结构



甘油三酯	$R_1=R_2=R_3$
月桂酸甘油酯	C_{11}
豆蔻酸甘油酯	C_{13}
三棕榈酸甘油酸	C_{15}
三硬酯酸甘油酯	C_{18}
油酸甘油酯	$C_{18:1}$
甘油三亚油酸酯	$C_{18:2}$

实验方法

- 仪器: Agilent 1100 液相色谱 / 质谱，
  带大气压化学电离源 (APCI)
  干燥气: 氮气, 4 L/min, 350°C
  雾化气: 氮气, 50 psi
  气化器: 400°C
  碎片电压: 160 V
  质量范围: 100-1000 amu
- 液相色谱条件:
  流动相: $(CH_3)_2CO/H_2O(98/2)$
  流速: 1 ml/min
  柱温: 40°C
  进样体积: 15 µL
- 色谱柱: Develosil ODS OG-3, 4.6 mm × 75 mm, 5 µm

结果

图 1, 2 及 3 是甘油三酯标样的的总离子流 (TIC)，选择离子流图和每一个化合物质谱图。

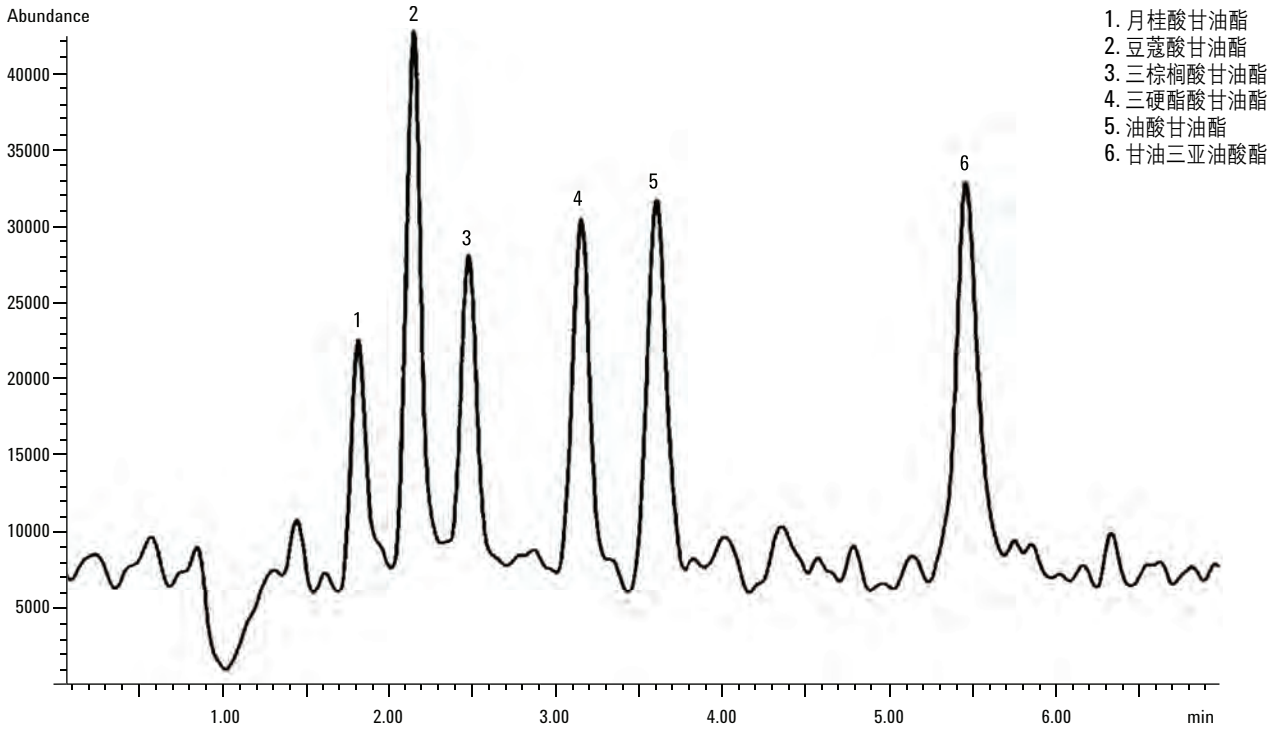


图 1. 甘油三酯标样的总离子流 (TIC)，每一个农药的浓度为 0.2 ppm

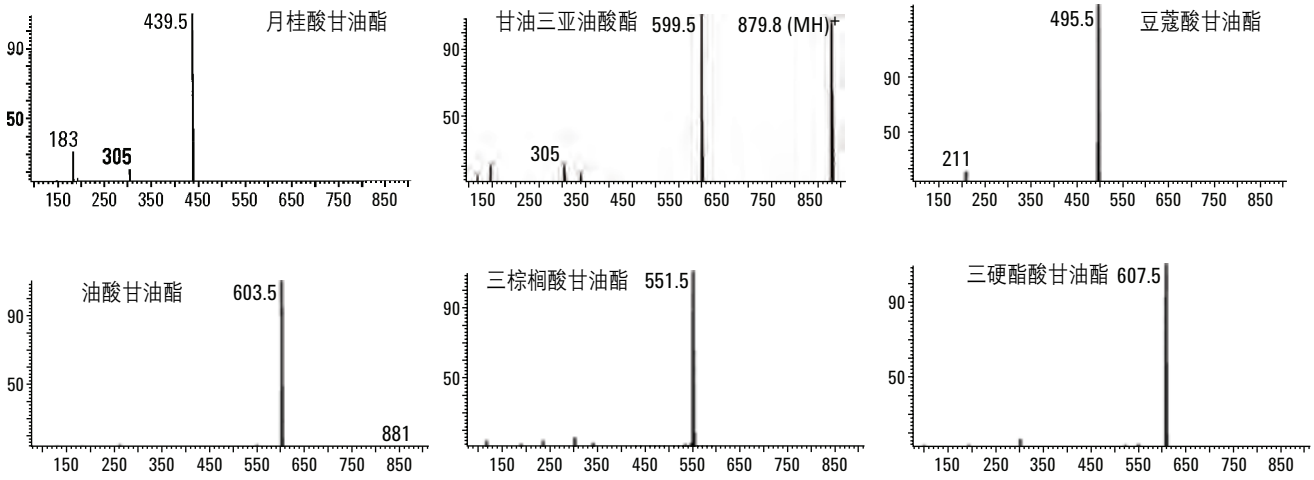


图 2. 甘油三酯标样中每一个化合物的质谱图，每一个农药的浓度为 0.2 ppm

每一个化合物的质谱基峰为分子离子峰减去一个脂肪酸基团，即[MH-HOOCR]$^+$。除了甘油三亚油酸酯之外，都没有产生质子化的分子离子峰。

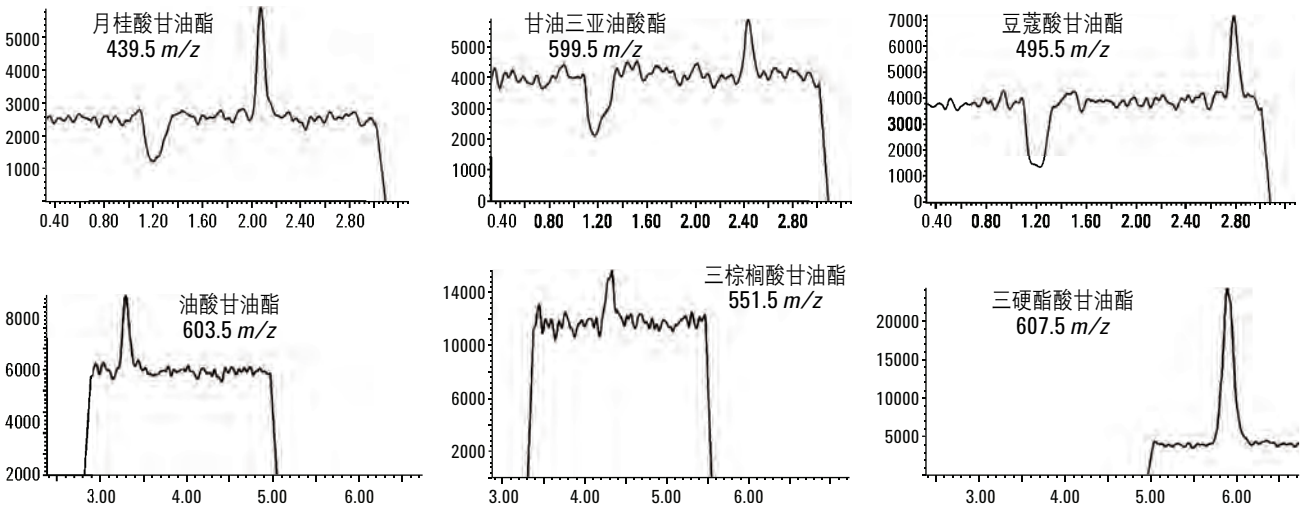


图 3. 甘油三酯标样的选择离子流 (SIM)，每一个化合物的浓度为 1 ppb

在全扫描模式的条件下，可以检测到低至 0.2 ppm 的甘油三酯，而在选择离子模式的条件下，其检测限可到 1 ppb。利用此方法，可以分析检测脂溶性的甘油三酯类化合物，其灵敏度很高。

结论

液相色谱/大气压化学电离源/质谱技术可以用于甘油三酯的分析质谱的基峰是质子化的分子离子峰减去一个脂肪酸基团的碎片离子峰。

大气压化学电离源液相色谱 — 质谱用于食用油中甘油三酸酯的分析

应用

食品分析

摘要

甘油三酸酯是食用油中的主要成份。本文介绍了液－质联用技术用于甘油三酸酯的分析以及相关的有用信息。

前言

甘油三酸酯存在于植物油和动物脂肪中。由于其营养价值的原因，它们的特性一直受到人们的重视，而且不饱和化合物的数量必须要求调查清楚，而且必须已知其中不饱和度及不饱和化合物的数量，因为这些因素决定了油品的其它特性，如产品纯度及是否可用于深度油炸制作工艺之用途。

传统的分析方法是利用水解的方法将甘油三酸酯水解生成脂肪酸，然后衍生化生成甲酯，最后用气－质方法分析[1]。这是一种间接分析方法。甘油三酸脂可以直接由高效液相色谱进行分离，但是它们没有紫外发光基团，因此检测很困难[2]。另外，如果要鉴定油品中每一个甘油三酸酯的化合物，需要大量的标准品，这些工作常常是很困难的，而且分析时间很漫长。

液－质联用结合高效液相色谱分离效率和高选择性高灵敏度的质谱检测两大优点，使得甘油三酸酯很方便地被检测。甘油三酸酯是非极性化合物，因此用大气压化学离子化技术 (APCI) 来进行甘油三酸酯的分析。

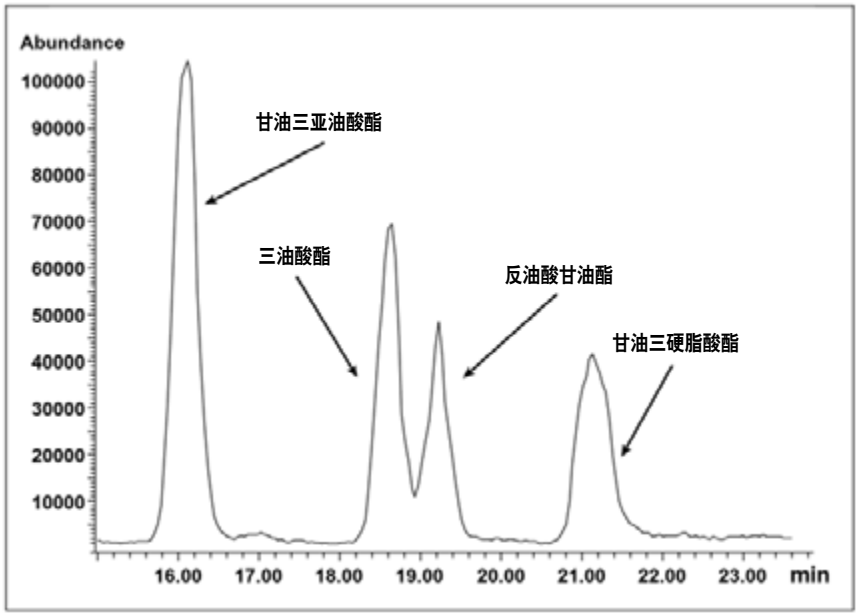


图 1. 四种十八碳甘油三酯标准品的液质分析的总离子流图。可以看出，顺式和反式的同分异构体可以完全分离

色谱条件	
色谱柱：	200 x 2.1 mm Hypersil MOS, 5 µm
流动相：	A = 60:40 (水：异丙醇) + 25 mM 甲酸铵 B = 10:10:80 (水：异丙醇：正丁醇) + 25 mM 甲酸铵
梯度：	起始 30% B 在 1.5 分钟 30% B 在 25 分钟 60% B 在 28 分钟 100% B
流速：	0.25 ml/min
柱温：	50 °C
进样量：	1.5 µl
质谱条件	
离子源：	大气压化学电离源(APCI)
离子化模式：	正离子
毛细管电压：	4000 V
雾化气压力：	50 psig
干燥气流速：	4 L/min
干燥气温度：	325 °C
电晕钟电流：	4 µA
汽化器温度：	325 °C
扫描范围：	300-1100 aum
步长：	0.1 m/z
峰宽：	0.3 min
时间过滤器：	On
碰撞电压：	80 V

实验条件

整个分析系统由 1100 系列的二元泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱和质谱仪组成。液 - 质联用仪使大气压化学电离源 (APCI)。由安捷伦化学工作站进行液 - 质系统的数据采集及分析。以前的分析是在 Agilent 1090 液相和装有 5981A 型电喷雾源及 G1075A 大气压化学电离源(APCI) 的 5989B 质谱仪上完成的。

各种植物油和动物的脂肪 (如黄油)，是在当地市场上购买的。所有样品都可以溶解在异丙醇中，浓度为 20 µl 油 /10 ml 异丙醇或 20 毫克脂肪 /10 ml 异丙醇。甘油三酸脂标准品是从 Sigma 公司购买的，溶解并且配制成 10 mg 标准品 /5 ml 氯仿的储备液，然后用异丙醇进一步稀释。

结果和讨论

样品分离和离子化

使用 Hypersil MOS (C8) 色谱柱来分离非极性的甘油三酸酯化合物。在分离过程中，必须使用异丙醇和正丁醇来洗脱更大的甘油三酸酯。最终的梯度可以洗脱 C18:1 甘油三酸脂中的顺式 – 及反式 – 同分异构体，详见图1。

结果发现，在流动相添加了甲酸铵缓冲液之后，可以生成 $[M+18]^+$ 的准分子离子峰，它比不添加甲酸铵的 $[M+1]^+$ 的离子稳定，如图 2 所示。另外，雾化器温度应该低于 300℃，以降低分解温度增强全信号强度。可以利用调节内源碰撞诱导解离 (CID) 电压，从 80 伏到 150 伏，进行结构分析。

谱图的定性信息

在这些分析条件下，每一个甘油三酸酯的质谱图都产生 $[M+18]^+$ 离子的主峰和少量的特征离子峰。由于在植物中存在的甘油三酸酯主要由偶数碳数的脂肪酸组成 (C12，C14 等) 和每一个酸含有 0，1 或 2 个双键。建立分布图来测定可能的双键组成和碳链长度。这些关系可

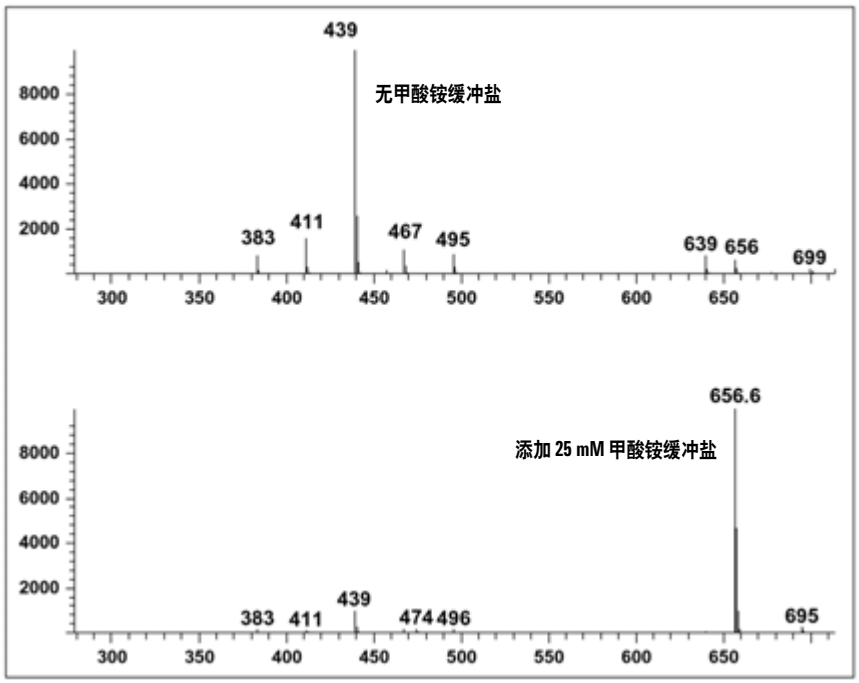


图 2. 甲酸铵缓冲盐对椰子油中的甘油三月桂酸酯质谱图的影响

以由下面的关系式来表达：

$M = 218.03 + 28.03^{*}m + 26.02^{*}n$

M：测得的附加离子的质荷比
m：次乙基的数目 ($-CH_2-CH_2-$)
n：乙烯基的数目 (-CH=CH-)

因为所有基团的数目只能是整数的，因此可能结果的数目就很少。如果假设脂肪酸的长度相同以及不饱和度相同，结果的可能性就进一步减少。例如，含有两个油酸的不饱和酸是不可能的。图 3 所示，是椰子油中基峰的离子总离子流图。将得到每个离子的质荷比输入表格 1。若需要进一步确认，可以通过内源碰撞诱导解离来完成，如图 4。

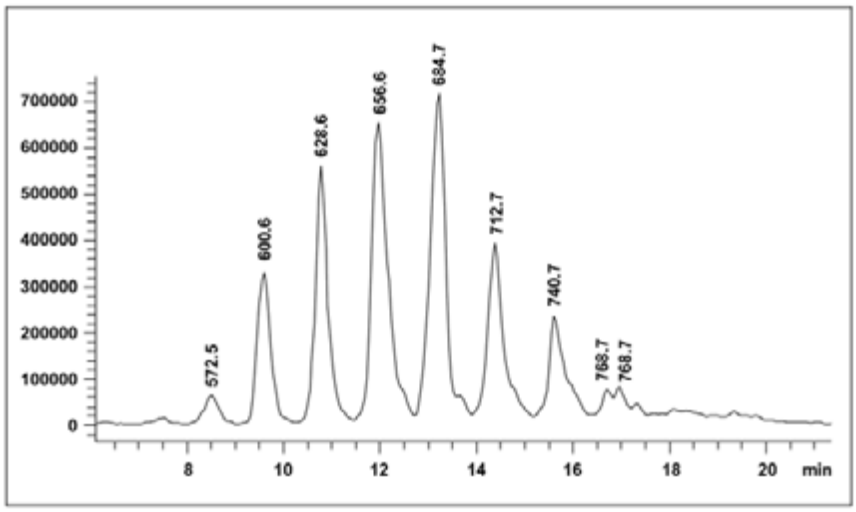


图 3. 每个色谱峰的基峰的总离子流图。峰与峰之间的 28 amu 的差别相当于是化合物侧链上的次乙基 – (CH_2CH_2) – 的数量的差别

色谱条件

色谱柱：	200 x 2.1 mm Hypersil MOS, 5 μm
流动相：	A = 60:40，(水：异丙醇) + 25 mM 甲酸铵 B = 10:10:80，(水：异丙醇：正丁醇) + 25 mM 甲酸铵
梯度：	起始 30% B 在 1.5 分钟 30% B 在 25 分钟 60% B 在 28 分钟 100% B
流速：	0.25 ml/min
柱温：	50 °C
进样量：	1.5 μl

质谱条件

离子源：	大气压化学电离源 (APCI)
离子化模式：	正离子
毛细管电压：	4000 V
雾化气压力：	50 psig
干燥气流速：	4 L/min
干燥气温度：	325 °C
电晕钟电流：	4 μA
汽化器温度：	300 °C
扫描范围：	300-1100 aum
步长：	0.1 m/z
峰宽：	0.3 min
时间过滤器：	On
碰撞电压：	80 V

表 1. 椰子油中主要的质谱峰的结构计算结果

测量的离子	计算的分子量	除去主链	m	n	可能的侧链	双链数目
516.50	498.52	280.42	10	0	C8,C8,C10	0
544.55	526.52	308.42	11	0	C8,C10,C10 或 C8,C8,C12	0
572.55	554.52	336.42	12	0	3 X C10	0
600.55	582.52	364.44	13	0	C10,C10,C12	0
628.55	610.52	392.44	14	0	C10,C12,C12 或 C10,C10,C14	0
656.70	638.67	420.59	15	0	3 X C12	0
684.75	666.72	448.64	16	0	C12,C12,C14	0
712.75	694.72	476.64	17	0	C12,C14,C14 或 C12,C12,C16	0
740.80	722.77	504.69	18	0	3 X C14	0
768.75	750.72	532.64	19	0	C14,C14,C16	0
796.75	778.72	560.64	20	0	C14,C16,C16 或 C14,C14,C18	0

大多数的油品都不会出现像椰子油所生成的那样简单的总离子流图。图5所示，为两个牌号的橄榄油的总离子流图，但结果显示有用的信息很有限。然而，若用萃取离子流图，可以获得较多的结构信息。图6为质荷比为908.8, 906.8, 904.8, 902.8, 900.8和888.8的萃取离子流图。这些离子相当于由分别含有0, 1, 2, 3, 4和5个双链的3个18碳链的脂肪酸组成的甘油三酸酯。结果所示，基峰离子是902.8，是铵盐离子 ($NH4^+$) 附加的三油酸酯离子 (3 C18:1)。油酸是橄榄油中脂肪酸的主要成份。通过比较，萃取离子流图，可以对不同牌号的油进行比对，最后确定它们之间不饱和度的差别。

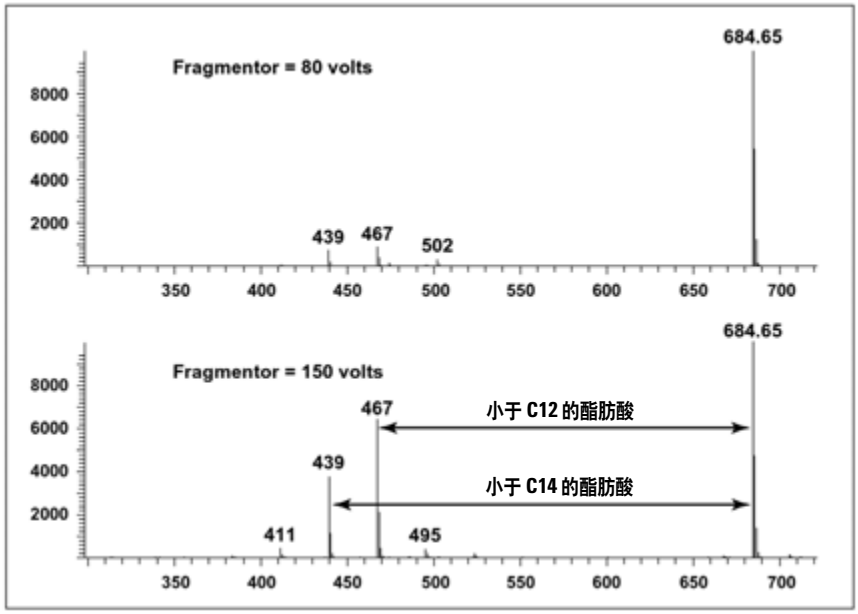


图 4. 碰撞电压值对椰子油中混合甘油三酯的质谱图的影响。碎片离子的质荷比和比率相当于两个十二碳脂肪酸和一个十四碳脂肪酸

色谱条件

色谱柱:	200 x 2.1 mm Hypersil MOS, 5 μm
流动相:	A = 60:40 , (水：异丙醇) + 25 mM 甲酸铵 B = 10:10:80 , (水：异丙醇：正丁醇) + 25 mM 甲酸铵
梯度:	起始 30% B 在 1.5 分钟 30% B 在 25 分钟 60% B 在 28 分钟 100% B
流速:	0.25 ml/min
柱温:	50 °C
进样量:	1.5 μl

质谱条件

离子源:	大气压化学电离源 (APCI)
离子化模式:	正离子
毛细管电压 :	4000 V
雾化气压力:	50 psig
干燥气流速:	4 L/min
干燥气温度:	325 °C
电晕钟电流 :	4 μA
汽化器温度:	325 °C
扫描范围:	300-1100 aum
步长:	0.1 m/z
峰宽:	0.3 min
时间过滤器:	On
碰撞电压:	80 V

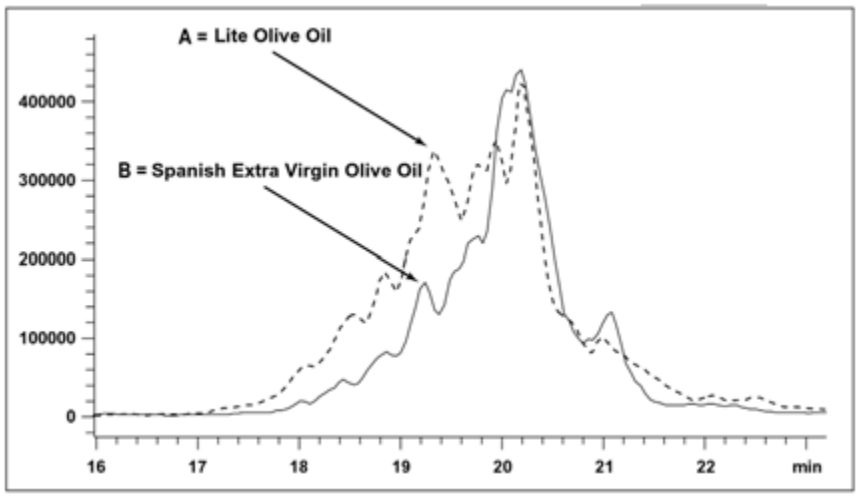


图 5. 两种橄榄油的总离子流图。结果显示，A 油的不饱和度高或脂肪酸的链短。需要用萃取离子流模式对不饱和度进行确认

色谱条件

色谱柱：	200 x 2.1 mm Hypersil MOS, 5 µm
流动相：	A = 60:40 , (水：异丙醇) + 25 mM 甲酸铵 B = 10:10:80 , (水：异丙醇：正丁醇) + 25 mM 甲酸铵
梯度：	起始 30% B 在 1.5 分钟 30% B 在 25 分钟 60% B 在 28 分钟 100% B
流速：	0.25 ml/min
柱温：	50 °C
进样量：	1.5 µl

质谱条件

离子源：	大气压化学电离源 (APCI)
离子化模式：	正离子
毛细管电压：	4000 V
雾化气压力：	50 psig
干燥气流速：	4 L/min
干燥气温度：	325 °C
电晕钟电流：	4 µA
汽化器温度：	300 °C
扫描范围：	300-1100 aum
步长：	0.1 m/z
峰宽：	0.3 min
时间过滤器：	On
碰撞电压：	80 V

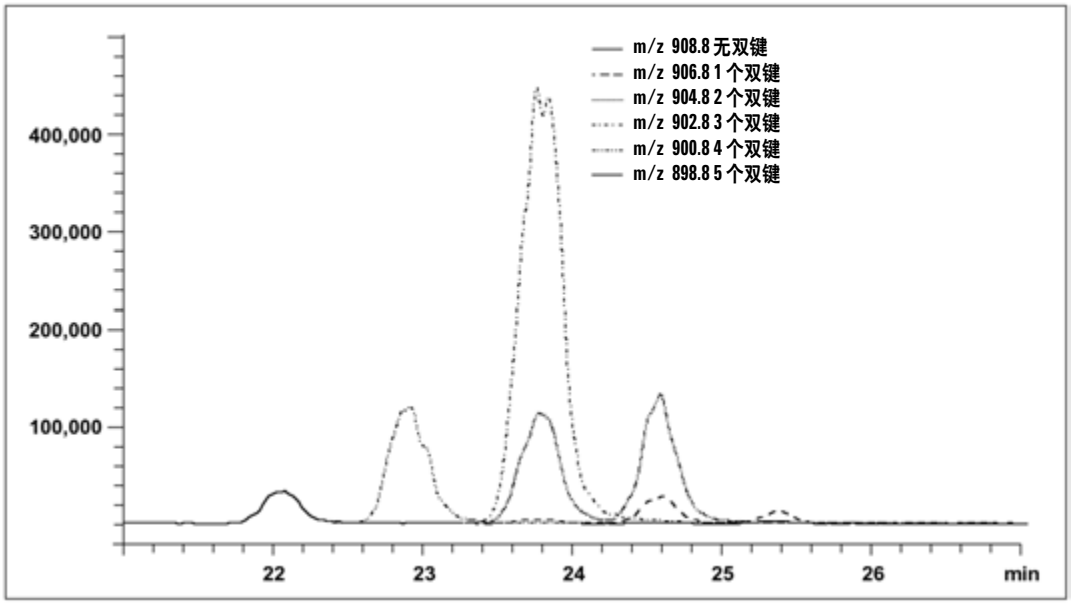


图 6. 相应的 3 个碳 18 链的化合物的萃取离子流图。三油酸酯是主要成份

结论

大气压化学电离源液相-质谱技术提供了一种全新而简便的方法，用于油品和脂肪中的甘油酸酯的分析。无需衍生化，直接分析就可以获得包括不饱和度在内的各种脂肪酸的信息。这些信息可以用来评估各种油及脂肪的营养价值和其它物理性质。这种技术也可以检测可以改性的油的数量。极少甚至无需样品净化过程，就可以进行样品的快速分析。

参考文献

1. M. M. Mossoba and D. Firestone, *Food Testing and Analysis*, **1996**, 2 (2), 24-32.

2. R.Schuster, “Multicomponent Analyses of Fats and oils using Diode-Array Detection,” *Hewlett-Packard Application Note*, **1987**, publication number 12-5954-6269.

改进并简化的液相色谱/大气压化学电离质谱法用于食品中未衍生化游离氨基酸的分析

应用

食品

作者

Süreyya Özcan
Food Engineering Department
Hacettepe University
06532 Beytepe, Ankara
Turkey

Hamide Z. Şenyuva
Ankara Test and Analysis Laboratory
Scientific and Technical Research Council of Turkey
Ankara 06330
Turkey

摘要

本文报道了一种改进的分析方法用于多种基质中 22 种氨基酸的快速、准确测定和鉴定。采用酸水提取基质中的氨基酸，液相色谱/质谱法 (LC/MS) 同时测定 22 种未衍生化的氨基酸。窄径柱的使用使液相色谱/大气压化学电离 (APCI) 质谱法在正离子模式下能够实现快速筛选和定量分析。

引言

测定的 22 种氨基酸依据其官能团，或称“R”基团进行分类。此 22 种氨基酸中有 8 种被认为是必需氨基酸，即组氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和苏氨酸；人体必须从饮食中摄取一定量的这 8 种氨基酸才能保证正常功能。由于营养标识的要求，氨基酸的测定对食品工业显得非常重要。

基于柱前或柱后衍生化技术的氨基酸分析取得了一些进展，表现出较好的结果。但是，这些方法存在着分析时间长或重现性差的不足。除本方法外的其他分析方法，大多数都涉及氨基酸衍生化前或后的色谱分离及衍生化产物中紫外吸收或荧光官能团的检测。尽管这些方法通常比经典的离子交换法（该法采用茚三酮和邻苯二甲醛 (OPA) 衍生化后定量）快，并能得到更低的检出限 (LOD)，但这些方法仍然很费时 (20-75 分钟)、不易重复和难于操作。

本文研究目标为：1) 采用改进的 LC/APCI-MS 技术，开发简便、快速、准确且可重复的分析方法用于各种食品中 22 种游离氨基酸的测定；2) 开发简便且不需纯化的氨基酸水提取方法；3) 在窄径柱上，短时间内完成筛选和定性定量分析。

方法

LC 条件

色谱柱：	ZORBAX Bonus-RP，窄径 (100 mm x 2.1 mm，3.5 µm)
流速：	0.2 mL/min
流动相：	0.01 mM 乙酸的 0.2% 甲酸水溶液
进样量：	从 1000 µL 中取 20 µL

MS 条件

离子化模式：	APCI 正离子模式
雾化气压力：	55 psi
干燥气流速：	4 L/min
干燥气温度：	320 ºC
汽化室温度：	425 ºC
锥孔体电压：	20 V
毛细管电压：	3 kV
碰撞电压：	55 V
驻留时间：	27 ms

实验部分

LC/MS 实验采用 Agilent 1100 系列 HPLC 系统，包括二元泵、自动进样器、柱温箱和带有大气压化学电离接口 (APCI) 的 Agilent 1100 质谱检测器。

数据采集在选择离子监测 (SIM) 模式下完成，接口参数为：干燥气 (N_2，100 psig) 流速为 4 L/min，雾化气压力为 55 psig，干燥气温度为 320 °C，汽化室温度为 425 °C，毛细管电压为 3 kV，电晕针电流为 8 µA，碰撞电压为 55 V，驻留时间为 27 ms。22 种未衍生化氨基酸的监测离子列于表 1。

色谱分离使用 ZORBAX Bonus-RP 窄径柱 (100 mm × 2.1 mm，3.5 µm) 完成，流动相为等度混合物，即 0.01 mM 乙酸的 0.2% 甲酸水溶液，流速为 0.2 mL/min，柱温为 40 °C。

样品制备

根据样品基质的不同将样品磨碎（使用搅拌器，过 2 mm 筛）或混合 (Ultra Turrax)。婴儿食品、早餐谷物和饼干等干状固体样品要磨碎；像西红柿样的软样品和果汁等液体样品采用 Ultra Turrax 搅拌器混合。样品制备前要测定每种样品混匀后的 pH 值，然后从中取样放入带塑料旋塞盖子的高密度聚乙烯瓶中置于 -20 °C 保存。称取研匀或混匀的样品（鲜重 [FW] 1g）于 10 ml 带盖玻璃离心管中。在漩涡混合器上混合 2 分钟后，在 5000 rpm 和 -5 °C 下离心 10 分钟。将上清液定量转移至一小瓶中，避免带入可能存在的上层油层。上清液在用于 LC/MS 分析前用 0.45 µm 的注射器式尼龙过滤器过滤。

表 1. 22 种氨基酸的特征碎片离子和用于选择离子监测模式 (SIM) 鉴定的离子

氨基酸	碎片离子 *m/z*	选择离子 *m/z*
丙氨酸(ala)	90, 73	90
精氨酸(arg)	175, 129	175
天冬酰胺(asn)	133, 116, 87, 74	133
天冬氨酸(asp)	134, 116, 88	134
半胱氨酸(cys)	122, 105, 87, 73	122
胱氨酸(cys-cys)	241, 122	241
谷氨酸(glu)	148, 130, 102	148
谷氨酰胺(gln)	147, 130, 101	147
甘氨酸(gly)	76, 59	76
组氨酸(his)	156, 110, 96, 73, 59	156
羟脯氨酸(hyp)	132, 86	132
亮氨酸-异亮氨酸(leu-ile)	132, 86	132
赖氨酸(lys)	147, 130, 84	147
蛋氨酸(met)	150, 133, 104	150
苯丙氨酸(phe)	166, 149, 120	166
脯氨酸(pro)	116, 70	116
丝氨酸(ser)	106, 88, 60	106
苏氨酸(thr)	120, 102, 74	120
酪氨酸(tyr)	182, 165, 136, 123	182
色氨酸(trp)	205, 188, 130	188
缬氨酸(val)	118, 72	118

结果与讨论

质谱裂解和色谱分离条件的优化

质谱裂解方式在两种模式下均可重复，并且对单一碎片离子进行检测就能够完成定量。在 55、70 和 100 V 下的源内碰撞诱导解离均用于所有氨基酸，结果表明最佳条件为 55 V，正离子模式。通过 MS 参数的优化，所有氨基酸均出现最大丰度的裂解碎片。在本文正离子 APCI 条件下，选择离子监测质谱分析在总运行时间 7.5 分钟内具有极好的鉴定和定量效果。

特性

质谱检测的优点是能够提供被洗脱化合物的结构信息。而且，通过选择不同质荷比的离子进行监测可以分辨共洗脱化合物。本研究采用了一种简单、快速和经济的样品制备方法。在使用 0.2 mM 乙酸溶液进行提取过程中，溶于水中的胶体（淀粉）通过离心被同时沉淀下来。食物样品中可能存在的脂肪通过低温离心分离除去。图 1 表明单次进样下，青豆中 22 种氨基酸特征质荷比离子的 MS 信号。

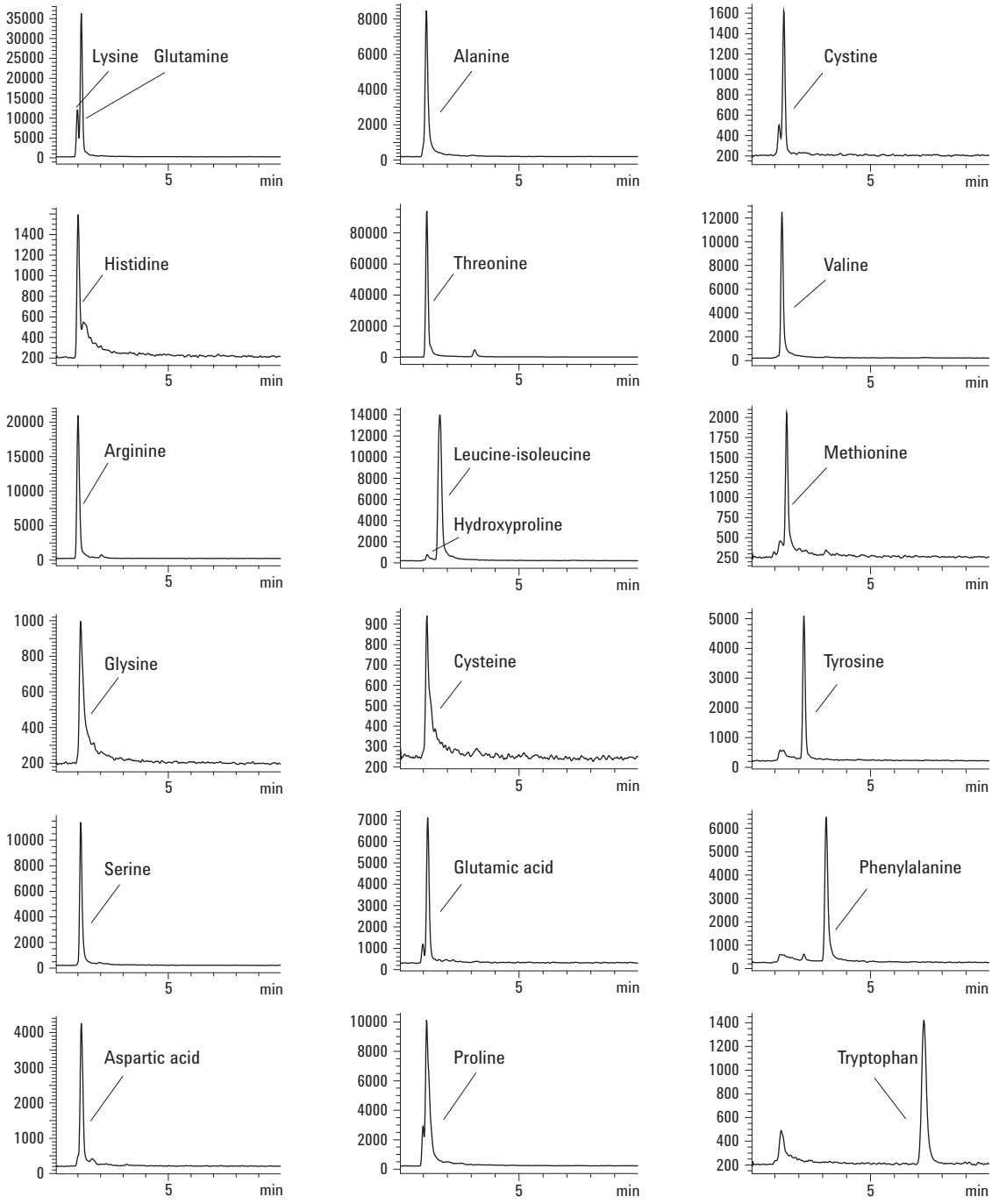


图 1. LC/APCI-MS 测定未衍生化的游离氨基酸。LC 条件：色谱柱，ZORBAX Bonus RP，(2.1 mm × 100 mm, 3.5 µm)；流速，0.2 mL/min；流动相组成，0.01 mM 乙酸的 0.2 % 甲酸水溶液；青豆中 22 种氨基酸特征质荷比离子的 MS 信号

食物样品

本文分析了 22 种食物样品中氨基酸的含量。食物按如下方式进行分组：婴儿食品、蔬菜、水果、果汁、坚果、葡萄酒、啤酒、牛奶、鸡肉和蜂蜜。每种食物中氨基酸的平均浓度列于表 2。

在每种食物中氨基酸的含量变化很大。氨基酸浓度的这种变化可能是由于化学式组成的差异和/或加工条件的不同引起。蛋白质的组成也能引起食物中游离氨基酸组成的轻微变化。在提取前对样品的 pH 值进行

表 2. 各种食物中 22 种游离氨基酸的测定结果，单位：mg/100 g FW

食物类型	Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Cys-Cys	Glu	Gln	Gly	His	Hyp
婴儿食品	3.59	1.25	1.07	0.50	0.17	9.77	0.37	1.06	0.52	0.30	1.42
西红柿	10.07	3.94	11.02	36.86	1.31	1.52	85.94	49.64	2.03	0.34	0.73
豌豆	69.84	37.26	112.10	30.22	6.96	3.62	15.78	57.49	7.92	3.27	1.17
梨	< LOD	1.81	45.27	17.01	0.60	13.58	8.19	86.33	1.14	< LOD	< LOD
苹果酱	< LOD	1.40	3.80	3.56	0.30	16.04	2.18	23.46	< LOD	< LOD	< LOD
苹果汁	2.03	1.79	12.80	10.58	0.98	12.52	4.82	39.89	< LOD	0.13	0.43
酸樱桃汁	1.53	1.62	24.10	7.30	0.38	10.95	7.11	52.45	< LOD	1.01	0.32
橙汁	3.95	8.30	8.08	15.15	0.70	9.99	5.10	3.36	1.38	1.11	0.53
石榴汁	15.66	1.99	13.58	17.33	0.27	16.53	17.23	42.35	< LOD	0.17	0.44
桃汁	3.38	1.64	78.57	21.52	0.84	12.26	3.38	10.05	1.44	0.14	0.35
白葡萄汁	6.54	2.18	10.50	16.08	0.50	16.06	8.34	41.50	1.26	0.11	0.43
红葡萄汁	8.58	0.60	5.32	5.54	0.74	17.60	7.98	4.17	1.52	1.46	0.52
啤酒	4.00	0.88	2.98	1.15	< LOD	5.33	1.89	1.54	1.48	0.26	8.59
牛奶	7.02	16.50	8.99	4.00	0.36	16.12	9.06	4.85	1.38	0.75	0.36
葡萄酒	4.49	1.35	0.94	0.55	0.66	0.92	0.73	0.42	1.69	0.46	0.24
蜂蜜	12.23	< LOD	4.16	8.43	< LOD	203.22	7.93	18.90	2.93	1.26	0.76
生咖啡	41.06	2.38	31.36	70.26	43.19	14.82	57.18	3.89	3.43	3.27	< LOD
榛子	12.98	1.28	2.21	13.05	< LOD	6.02	21.01	0.51	2.57	< LOD	< LOD
核桃	6.56	2.71	0.71	7.42	< LOD	4.90	46.80	3.55	1.72	0.38	0.74
杏仁	11.39	4.14	57.51	44.92	0.73	4.50	3100	6.31	3.76	0.34	0.46
开心果	25.15	7.58	14.45	27.40	1.36	5.82	35.64	39.28	2.88	< LOD	7.26

食物类型	Leu-ile	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Trp	Val
婴儿食品	0.30	< LOD	0.20	0.26	0.78	0.40	1.66	0.50	0.12	1.21
西红柿	0.96	< LOD	0.63	3.25	6.30	3.38	2.70	2.05	0.74	2.43
豌豆	26.84	17.41	4.44	13.52	21.50	55.52	0.03	15.45	3.31	38.60
梨	1.38	< LOD	< LOD	0.44	17.92	3.86	1.23	0.68	0.48	5.25
苹果酱	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.57	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
苹果汁	0.32	< LOD	< LOD	< LOD	4.48	0.78	0.33	< LOD	< LOD	1.70
酸樱桃汁	0.23	< LOD	4.52	0.14	6.52	1.29	0.53	0.25	< LOD	2.62
橙汁	0.37	1.76	4.72	0.99	30.55	6.07	1.13	0.99	0.58	3.64
石榴汁	1.37	< LOD	0.53	0.94	8.52	3.01	1.94	1.76	0.64	4.62
桃汁	< LOD	< LOD	< LOD	0.45	12.89	2.48	1.17	0.33	< LOD	2.18
白葡萄汁	1.54	1.21	0.89	0.81	8.94	2.80	1.75	1.80	0.64	5.10
红葡萄汁	1.80	1.39	0.64	1.88	14.05	4.30	5.33	3.90	0.75	5.03
啤酒	< LOD	1.17	0.30	0.15	0.84	< LOD	0.32	0.27	< LOD	3.84
牛奶	2.04	1.43	1.80	0.61	11.61	3.14	3.12	2.33	0.65	5.40
葡萄酒	0.23	1.28	0.25	0.25	30.50	0.36	0.31	2.37	1.86	0.88
蜂蜜	2.06	4.80	< LOD	11.18	81.32	6.31	2.65	8.63	< LOD	6.34
生咖啡	6.37	4.35	1.66	14.31	32.30	20.48	3.63	13.58	7.66	8.61
榛子	3.24	2.06	< LOD	2.41	5.38	3.84	2.38	3.69	2.16	4.08
核桃	1.81	1.64	0.52	1.09	5.50	1.44	1.12	1.71	1.75	3.01
杏仁	7.21	4.93	1.93	6.08	33.65	7.82	3.34	4.07	2.28	10.33
开心果	2.75	3.64	1.43	381	55.98	3.80	3.71	6.00	1.51	5.73

了测定，结果表明果汁、啤酒和葡萄酒的 pH 值在 2 ~ 3 之间、西红柿约为 4、豌豆约为 6、牛奶约为 7。众所周知，氨基酸的测定在许多领域都是非常重要的，譬如：

1）通过氨基酸浓度间的比值可确定蜂蜜的产地来源；

2) 进行新生儿首月氨基酸供给的营养分析，确保氨基酸在质和量上充分满足这一关键时期婴儿的需要；

3) 某些重要的游离氨基酸，如天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸和谷氨酸是各种产品中丙烯酰胺的前体。

结论

本文建立了一种简单、可靠和快速的 LC/MS 方法用于食品中 22 种游离氨基酸的测定。该方法可应用于多种食品。我们的目标是建立进行一次 LC/APCI-MS 分析就能在正离子模式下灵敏检测未衍生化氨基酸的方法。该方法通过进一步酸化 LC/MS 流动相，在很短的时间内（大约 7.5 分钟）完成测定。样品制备和随后的色谱分离检测在 25 分钟内完成。以前的研究，采用常规液相色谱柱、长时间的提取纯化后进行衍生化，预计需要一天的时间才能分析 5 个样品，而采用本文建立的简化、快速的新方法，一批 20 个样品能够同时完成测定。

参考文献

S. Özcan, H. Şenyuva, Improved and simplified liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry method for the analysis of underivatized free amino acids in various foods, J. Chromatogr. A (2006), Doi:10.1016/j.chroma.2006.09.039

用液相色谱/质谱选择离子检测模式检测饮用水和地下水中苯脲类、三嗪类除草剂的确认方法

应用

环境

作者

Neil Cullum & Paul Stephens

摘要

本文描述了一种使用液相色谱/质谱联用仪检测饮用水和地下水中苯脲类、三嗪类除草剂的确认方法，离子源采用大气压电喷雾源（同时应用正离子及负离子模式）。方法所研究了 16 种除草剂。分析结果完全符合饮用水监察员所设立标准偏差、偏差及总误差的要求。

前言

本文描述了一个分析一系列除草剂的方法，它们分别是五个苯脲类除草剂、八个三嗪类除草剂、长杀草（氨基甲酸酯类除草剂）、杀草敏（哒嗪酮类除草剂）和苯嗪草（三嗪酮类除草剂）。苯脲类除草剂，如异丙隆，广泛应用于作物的杂草防治。三嗪类除草剂，如莠去津，是一类应用极为广泛的杂草控制剂。这两大类除草剂在环境样品和饮用水中均被检测到。

在英国，自来水（水质）法令所规定的饮用水中一个单独农药的法定浓度或法定值 (PCV) 被设定为 0.1 µg/L。理想的分析方法应该能够检测出 PCV 的 10% 到 20%，也就是 0.01～0.02 µg/L。

检测水基质中的除草剂的标准方法一般使用液液萃取或近年来更流行的固相萃取制备方法，然后使用高效液相色谱 (HPLC)，紫外检测器 (UV) 或二极管阵列检测器来检测；但对于三嗪类除草剂，气相色谱/氮磷检测器 (GC/NPD) 或气相色谱/质谱联用 (GC/MS) 更为常用。苯脲类除草剂由于热不稳定，不适合气相色谱分析。本文详细描述了固相萃取和液相色谱/质谱联用技术分析方法，用于水中的除草剂。

实验

所有分析均使用 Agilent 1100 系列液质联用，包括四极杆质谱与 1100 液相系统由二元泵、自动进样器、柱温箱及真空脱气机组成。

LC 条件

色谱柱：Zorbax Eclipse XDB-C8
50 mm 长 × 2.1 mm 内径，填料粒径 3.5 μm，40 °C

流速：0.5 mL/min

进样体积：25 μL

流动相：A = 0.001% 甲酸水溶液
B = 甲醇

梯度程序：

	A	B
初始	90%	10%
2.0 min	90%	10%
15.0 min	30%	70%
15.1 min	90%	10%
22.0 min	90%	10%

质谱条件

离子化模式：正离子 / 负离子 API-ES

干燥气流速：13.0 L/min

喷雾压力：40 psig

干燥气温度：350 °C

锥孔电压：3000 V（正离子），2500 V（负离子）

在表 1 列出了选择离子检测 (SIM) 的离子和碰撞电压。所有的参数采用流动注射分析 (FIA) 进行优化。每种除草剂的 10 mg/L 标准溶液用于流动注射分析，使用扫描模式 (150-400 amu)，碰撞电压从 70 V 到 150 V，以 5 V 步进。

样品制备

固相萃取 (SPE) 使用自动设备和 Baker SDB1 200 mg，3 mL的固相小柱。固相萃取柱依次用 5 mL 乙酸乙酯、5 mL 甲醇和 2 mL 色谱纯水进行活化。将 50 mL 样品用去离子水稀释到 200 mL。将 100 mL 稀释的样品以 10 mL/min 的速度泵入活化的固相小柱中，继续抽真空干燥固相小柱 25 min，用 1 × 1.5 mL 和 1 × 1 mL 乙酸乙酯进行洗脱。最终的提取液在 45℃ 加热块中用

表 1. SIM 表参数，正离子模式

化合物序号	化合物	时间	分组	SIM 离子，定量，定性 (q)	碰撞电压
1	苯嗪草	2.50	1	203.0, 204.0q	70
2	杀草敏			222.0, 224.0q	100
3	灭草隆	7.50	2	199.0, 201.0q	115
4	西玛津			202.0, 204.0q	70
5	长杀草			237.0, 238.0q	95
6	草净津			241.0, 243.0q	130
9	异丙隆	10.25	3	207.0, 208.0q	140
7	绿麦隆			213.0, 215.0q	130
8	氘代异丙隆 莠去津			216.0, 218.0q	135
12	扑灭津	12.40	4	230.0, 232q	130
13	特丁津				
15	草达津				
14	扑草净			242.0, 243.0q	130
16	去草净				
SIM 表参数，负离子模式					
10	敌草隆	2.50	1	231.0, 233.0q	130
11	利谷隆			247.0, 249.0q	115

q 定性离子

空气流慢慢蒸发至干。残渣用 250 µL 90:10 的色谱纯水/甲醇重新溶解。最终的溶液组成包含浓度为 0.1 µg/L 的内标物。内标使用氘代异丙隆。在校正标准曲线中，所有校正水平都包含以上浓度的氘代异丙隆。

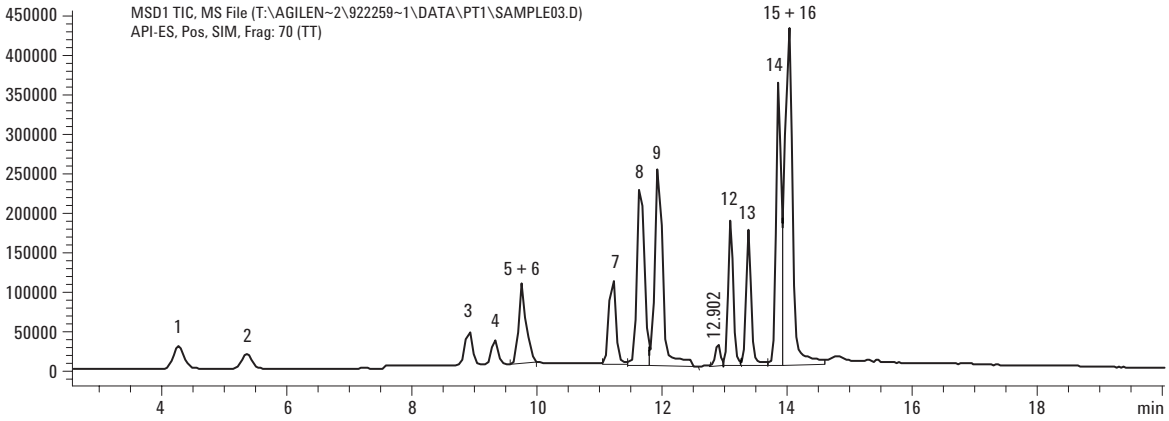


图 1. 正离子模式，低浓度标样色谱图

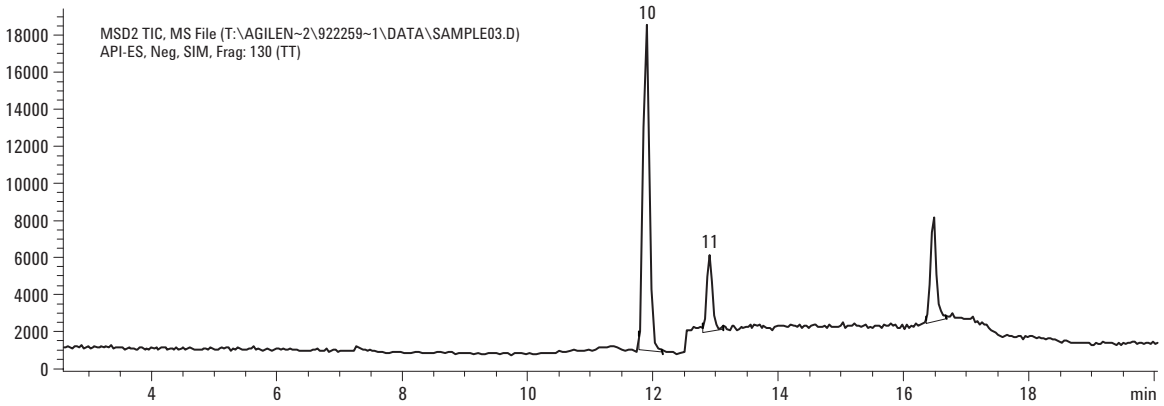


图 2. 负离子模式，低浓度标样色谱图

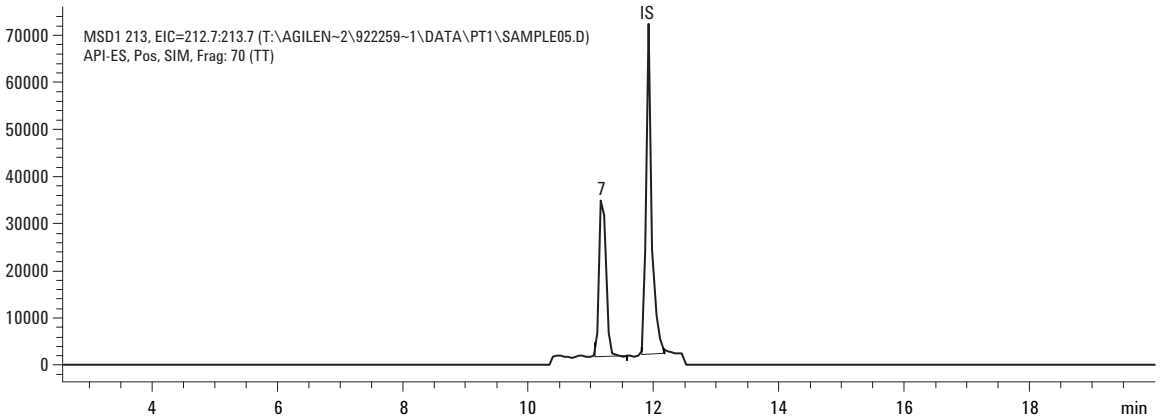


图 3. 含 0.10 µg/L 绿麦隆的自来水添加样品的提取离子色谱图。内标氘代异丙隆 (IS) 也在图中

结果

低浓度标样（每个化合物浓度均为 0.1 µg/L）的正离子模式和负离子模式的典型色谱图依次分别为图 1 和图 2。图 3 所示为一个添加了 0.10 µg/L 绿麦隆和氘代异丙隆内标的自来水样品的提取离子色谱图。

方法的确认由 11 批样品得到。标准化合物添加分为三个水平：0.01、0.10 和 0.40 µg/L。未处理的地下水添加两个水平：0.01 和 0.10 µg/L。可饮用的自来水（来自地表水源）也添加两个水平：0.01 和 0.10 µg/L。所有的样品按随机顺序分析，每一批样品重复两次。参看表 2。

每个除草剂的检测限 (LOD) 按照添加标样水平为 0.01 µg/L 的批内标准偏差进行计算。地下水和饮用水样品的回收率均由 0.10 µg/L 添加样品扣除 0.01 µg/L 后进行计算，因此回收率的值是基于 0.09 µg/L 计算的。

校正曲线是用三个校正水平：0.1、0.3 和 0.5 µg/L 计算得到。校正曲线均使用二次方拟合、强制过原点，并参照内标进行。一系列除草剂的典型相关系数值为 0.9997 或更好。

讨论

所有的 16 个化合物均可在正离子电离模式下进行分析；但是敌草隆和利谷隆使用负离子电离模式进行分析，原因是在 0.01 µg/L 水平附近有某些干扰存在。而这两个化合物在负离子电离模式下没有干扰，并且可得到良好的检测限。

在不同水基质中所检测的所有化合物的回收率值均保持一致。这表明本方法不存在其他方法中提到的离子化抑制作用 [1]，即指在某些基质中有单个化合物电离被抑制，从而导致回收率的降低。

本方法无法将 16 种化合物的完全分离。化合物 5 和 6、15 和 16 都是共流出的。然而，共流出化合物由于分子量的差异均可进行定量分析。例如，化合物 5（西玛津）的分子量为 201 amu（$[M+H]^+$ = 202 *m/z*），化合物 6（草净津）的分子量为 240 amu（$[M+H]^+$ = 241 *m/z*），二者可以用选择离子质谱来区分。同样可以用选择离子质谱区分化合物 15 和 16。化合物 12、13 和 15 这三个是同分异构体，分子量均为 229，但是这三个化合物有良好的色谱分离情况。

表 2. 结果

	地下水样品		饮用水样品		
化合物	**回收率 %**	**RSD %**	**回收率 %**	**RSD %**	**LOD µg/L**
莠去津	83.4	5.1	83.3	5.6	0.00146
长杀草	92.0	7.5	88.5	7.8	0.00544
杀草敏	94.8	5.8	94.0	4.6	0.00293
绿麦隆	89.5	3.9	89.5	4.6	0.00219
草净津	95.1	4.3	96.3	4.7	0.00352
敌草隆	92.7	4.6	94.3	4.5	0.00348
异丙隆	93.0	2.6	93.2	3.3	0.00209
利谷隆	89.4	4.9	91.0	4.6	0.00330
苯嗪草	102.4	2.8	102.8	3.1	0.00257
灭草隆	96.6	4.6	97.3	4.8	0.00221
扑草净	81.8	4.6	82.6	4.4	0.00208
扑灭津	85.8	5.8	85.6	6.2	0.00218
西玛津	91.0	4.7	91.1	4.8	0.00179
特丁津	78.1	8.3	80.2	6.8	0.00397
去草净	81.9	4.4	83.6	4.6	0.00268
草达津	79.1	4.7	78.7	4.8	0.00179

图 4 给出了化合物 12、13 和 15 的 *m/z* 230（[M+H]⁺）提取离子色谱图。另外两个化合物 14 和 16 也有相同的分子量 241 amu（[M+H]⁺），它们也可用色谱分离。

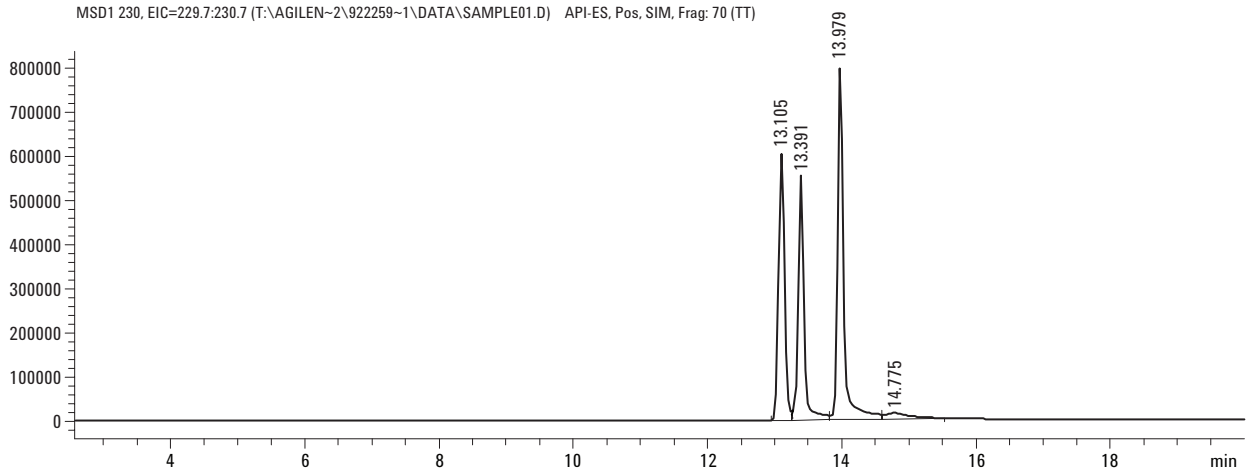


图 4. 化合物 12、13 和 15 的提取正离子色谱图，*m/z* 230

结论

以上的数据表明本方法能够用于 16 种除草剂作为一个单系列的定量分析。方法的表现能完全满足饮用水监察员 (DWI) 所设立每一种除草剂的标准偏差、偏差及总误差的要求。尽管添加回收率在 90-110% 之间的目标未能完全达到，但是在应用中，可以通过结果数据计算得到的回收因子来进行补偿。

参考文献

1. N. Cullum, P. Stephens and S.Evans, “Determination of Acidic Herbicides in Groundwater and Potable Water by LC/MSD Using Selective Ion Monitoring.” Agilent Technologies, publication 5988-5882EN www.agilent.com/chem

食品中氨基甲酸酯类杀虫剂的 LC/MSD 的常规分析

应用

食品、环境

作者

Masahiko Takino
Agilent Technologies, Inc.
3-3-11, Niitaka,
Yodogawa-ku, Osaka, 532-0033
Japan

摘要

文章介绍了 9 种氨基甲酸酯类化合物的 LC/MSD 检测方法，并对该方法的线性、灵敏度和重复性进行了系统的评价。该方法对花椰菜提取物中 9 中目标化合物的检测限为 3～10 ppb。结果表明所建立的 LC/MSD 检测方法是一种有效的分析方法，可以替代非专属性的柱后衍生荧光检测法。

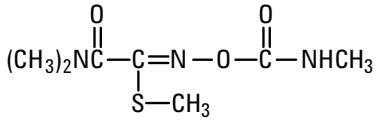
引言

食品中的杀虫剂是人类接触有害物质的一个重要途径。除了具有毒性以外，大多数的杀虫剂，包括 N- 甲基氨基甲酸酯类，还可能引起人体的内分泌紊乱。氨基甲酸酯类杀虫剂常用的检测方法是采取柱后衍生荧光检测法。该方法有以下缺点：专属性差，易导致假阳性；需要额外的硬件和管路；检测限不能满足要求。已有研究表明，经荧光检测器为阳性的样品，经证实为假阳性。[1]

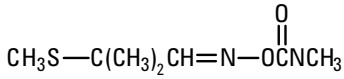
本文的研究目的是开发一种常规的液相色谱/质谱检测分析方法，不经衍生化处理，对食品中亚 ppb 级的氨基甲酸酯类杀虫剂进行检测。

实验部分

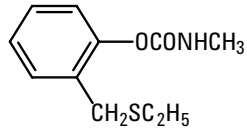
制备 9 种目标化合物标准品（见图 1）的甲醇混合溶液，用于评价方法的线性、灵敏度和重复性。用加标的花椰菜提取物评价基质效应的影响。实验用 LC/MSD 系统为 Agilent 1100 MSD SL Quad 系统。



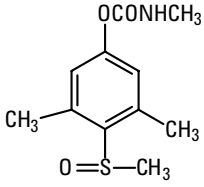
杀线威



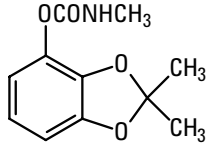
涕灭威



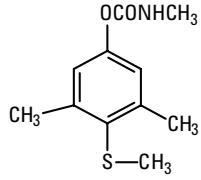
乙硫苯威



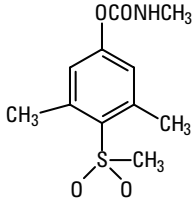
Methiocabsulfoxide



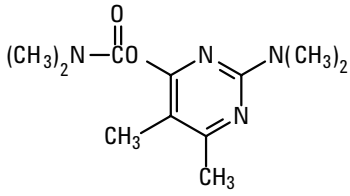
恶虫威



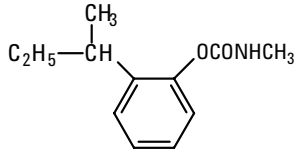
灭虫威



Methiocabsulfone



抗蚜威



仲丁威

图 1. 待测物的结构式

表 1. 液相色谱和质谱条件

液相色谱条件	
色谱柱	Inertsil ODS3 (150 mm x 2.1 mm，5 µm) Zorbax Eclips XDB C18 (150 mm x 2.1 mm，5 µm)
流动相	A: 乙腈 B: 10 mM 乙酸氨水溶液 30 min 内，溶剂 A 的比例由 20% 上升至 100%
流速	0.2 mL/min
柱温	40 °C
进样量	10 µL
质谱条件	
离子化	ESI (+)
扫描范围	*m/z* 100 ~ 500
SIM 离子	基峰
干燥气	10 L/min, 350 °C
雾化气	50 psi
碎裂电压	60 V
EM 增益	7

结果与讨论

TIC 和 SIM

图 2 显示所有 9 个目标化合物在 1 ppm 的总离子色谱图 (TIC)。目标化合物多产生 $[M+H]^+$ 或 $[M+NH_4]^+$，只有涕灭威 (Aldicarb) 除外，从 N-O 键处断裂成为碎片。这些基峰在表 2 中列出。

图 3 和图 4 是所有 9 个目标化合物在 0.2 ppb 的选择性离子监测 (SIM) 图。目标化合物的信噪比 (S/N) 在 7～56。

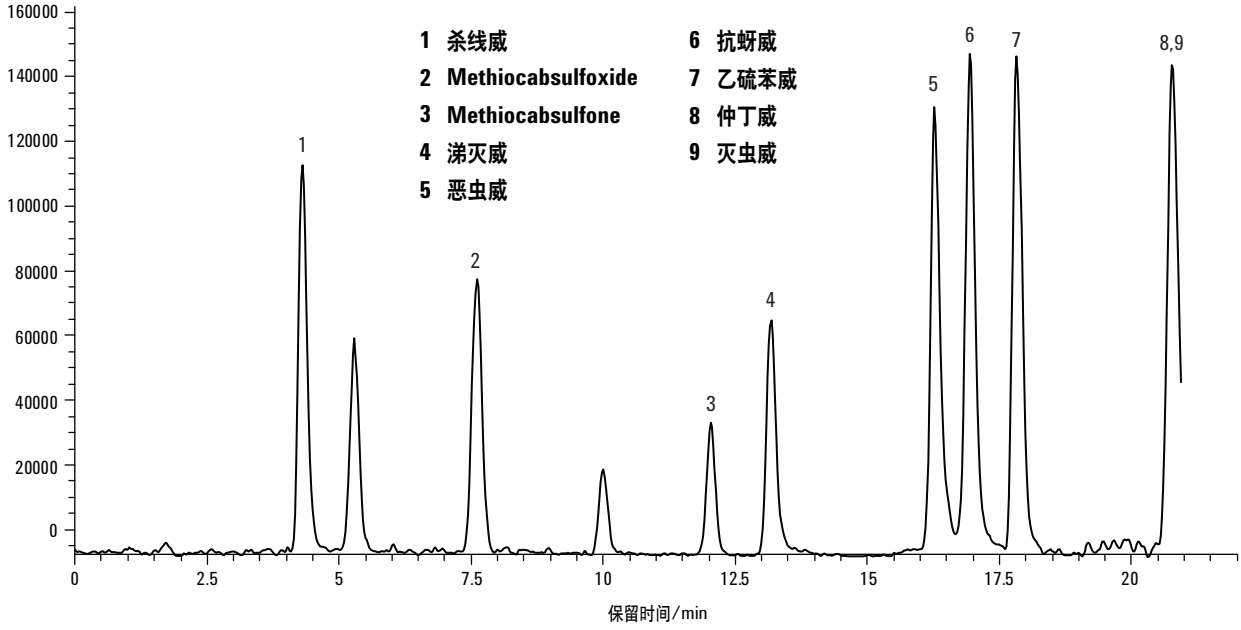


图 2. 1 ppm 的氨基甲酸酯标准品的总离子色谱图 (TIC)

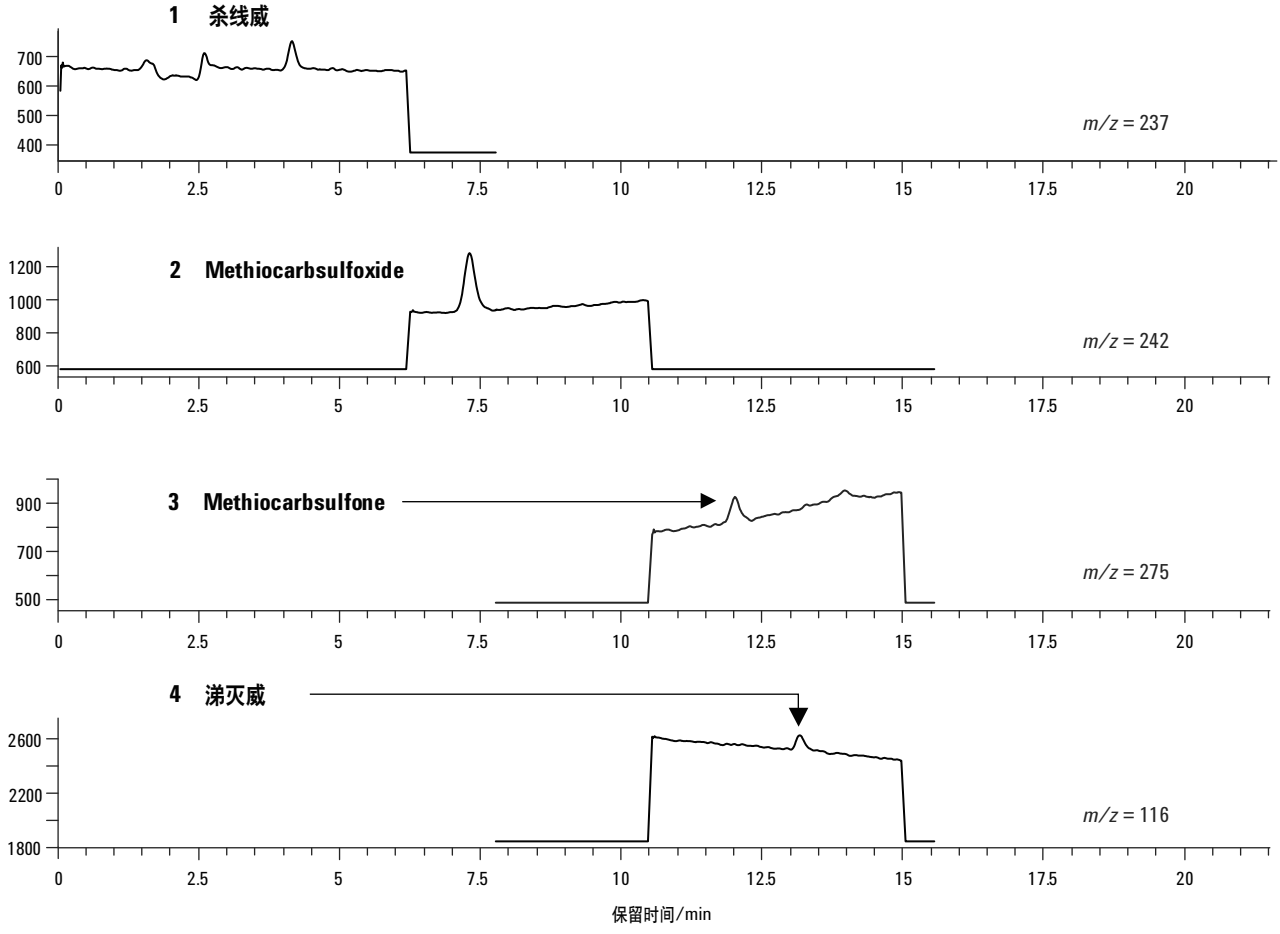


图 3. 0.2 ppb 的氨基甲酸酯标准品的 SIM 色谱图

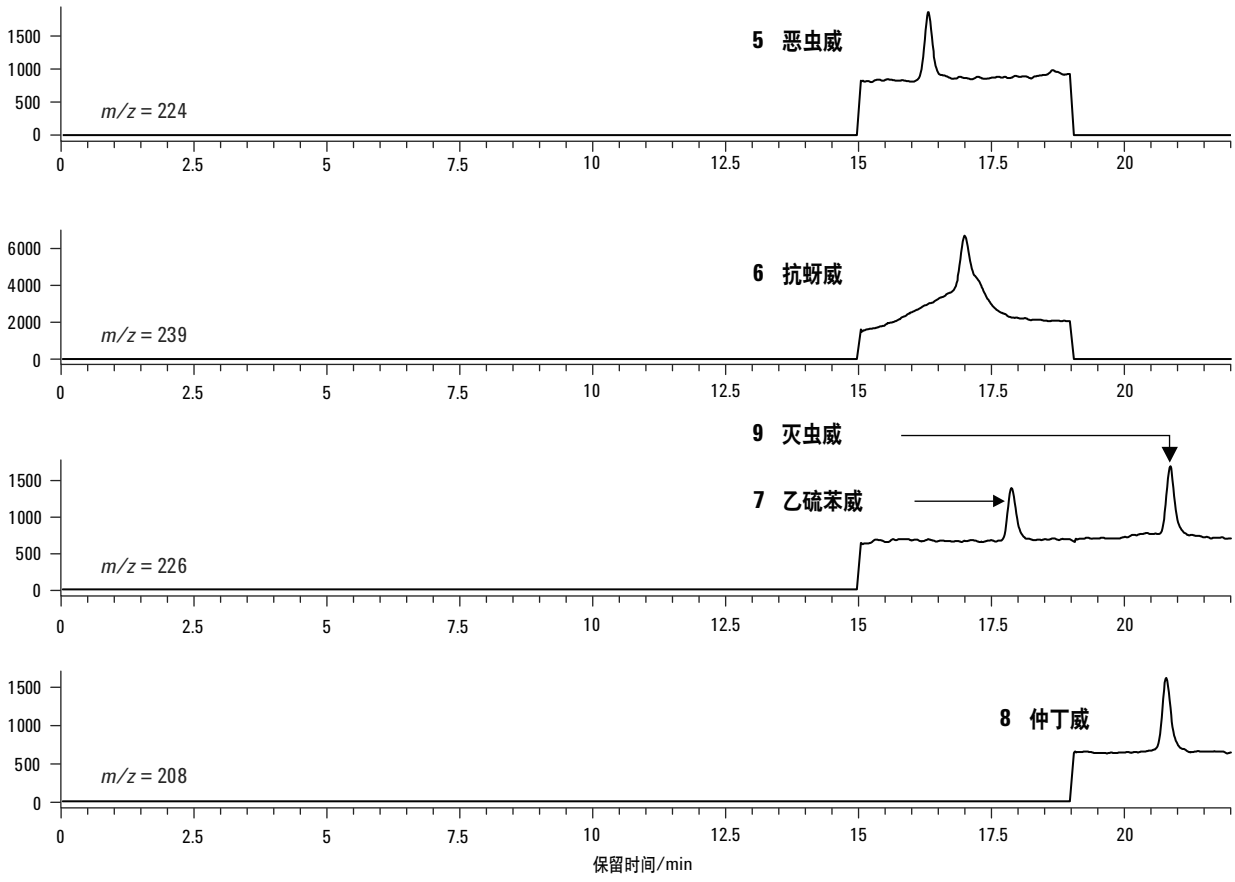


图 4. 0.2 ppb 的氨基甲酸酯标准品的 SIM 色谱图

电离方式

电喷雾是一种软电离技术，可产生大量的分子离子峰或准分子离子峰，通常是质子化的分子离子峰 $[M+H]^+$。本次研究中，$[M+H]^+$ 和 $[M+NH_4]^+$ 均为主导的加成离子。碰撞诱导解离电压加在毛细管的出口端，并通过在这一部位的源内碰撞诱导解离，影响样品离子的传输和裂解。随着诱导解离电压的改变，可能产生不同程度的裂解。在低电压时，几乎不发生裂解。随着电压的升高，分子离子或准分子离子产生裂解的可能性增大。

图 5 中是在 40 V～120 V 之间不同的诱导解离电压下采集的 5 份不同的 SIM 色谱图。以 40 V 时氨基甲酸酯类的丰度为参照，在图 6 中显示了 4 种不同的诱导解离电压下氨基甲酸酯类的相对丰度变化。对于不易裂解的化合物，其离子传输能力在较高的电压下得到了提高，这是由于诱导解离电压给了这些离子一个推动力，帮助他们在毛细管出口和截取锥间相对压力较高的区域内穿行。对于稳定的化合物，诱导解离电压升至 100 V 时，基峰丰度最大。将诱导解离电压设置为 60 V 或 80 V 时结果最佳。

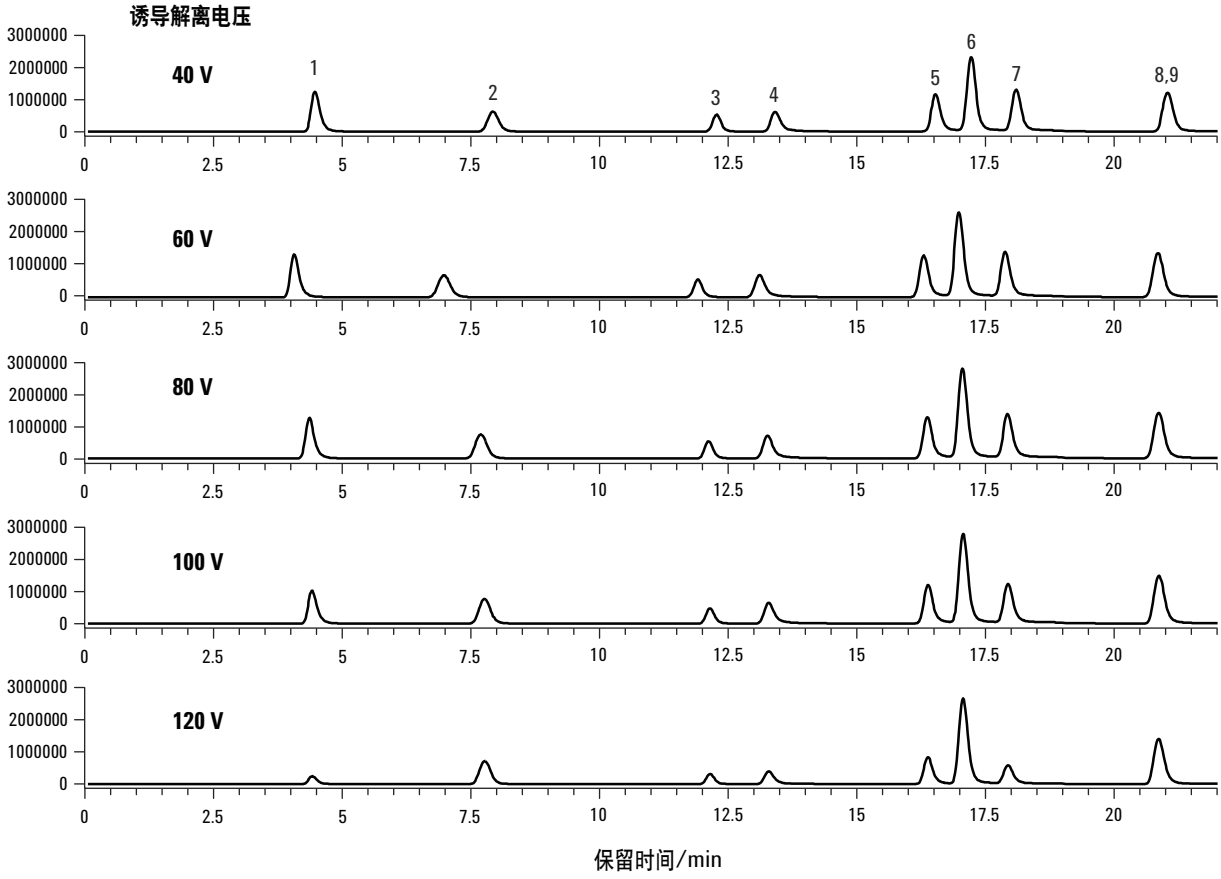


图 5. 不同诱导解离电压下氨基甲酸酯类标准品的 SIM 色谱图

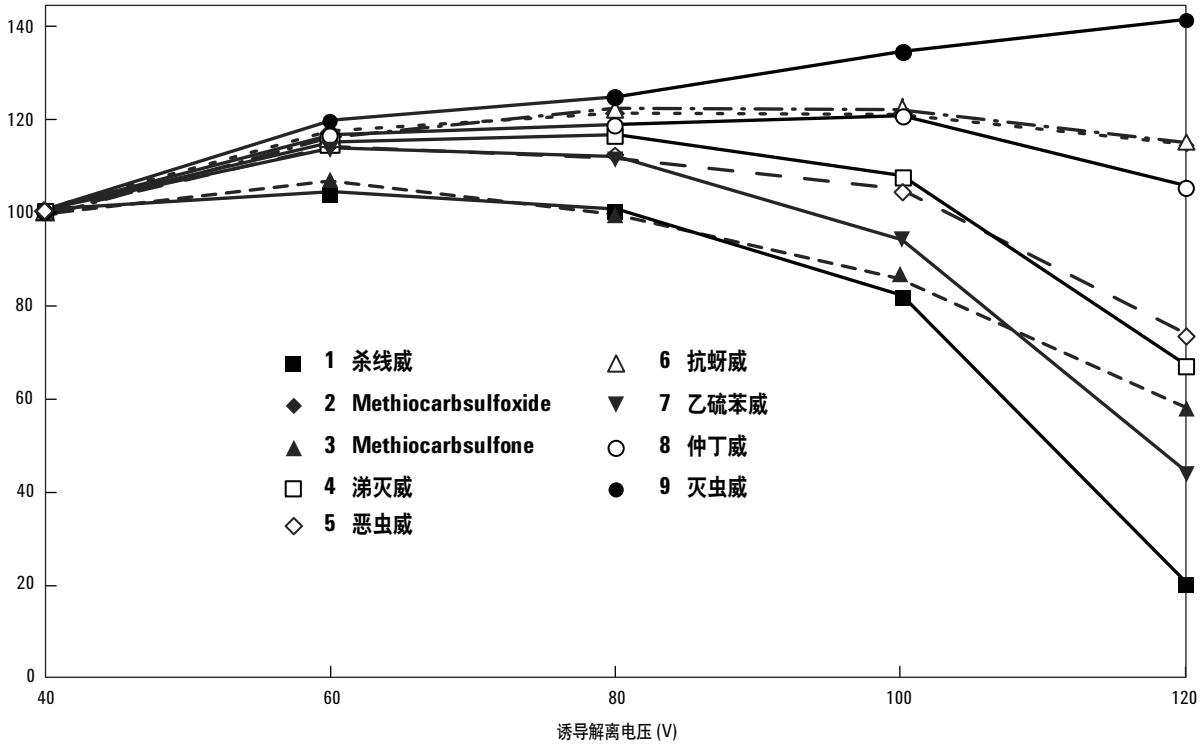


图 6. 不同诱导解离电压下氨基甲酸酯标准品的相对丰度，以 40 V 时的丰度为参比值

重复性和线性

图 7 显示 5 ppb 的氨基甲酸酯标准品连续 5 次进样的重复性。目标化合物的 RSD（%）在 1.4～13% 之间。Methiocarbsulfone 的 RSD（%）为 13%，反映了低浓度下色谱峰的响应值相对较弱。

图 8 显示了部分氨基甲酸酯标准品的校正曲线。目标化合物的响应值在较宽的浓度范围内呈线性。在 0.2～1000 ppb 的浓度围内，所有目标化合物的相关系数均大于 0.998（见表 2）。

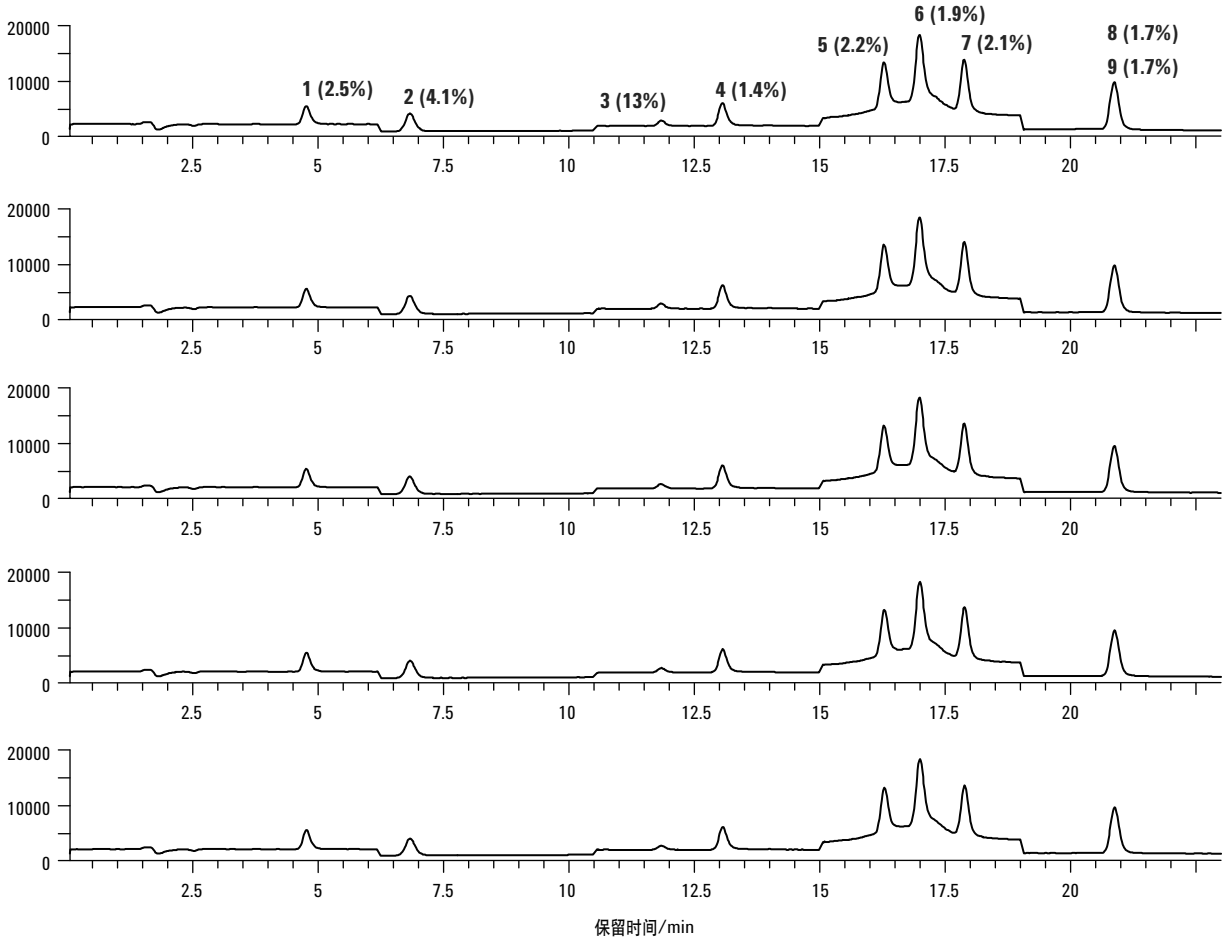


图 7. 氨基甲酸酯 (5 ppb) 5 次进样的重复性，括号内的百分比为色谱峰的 RSD%

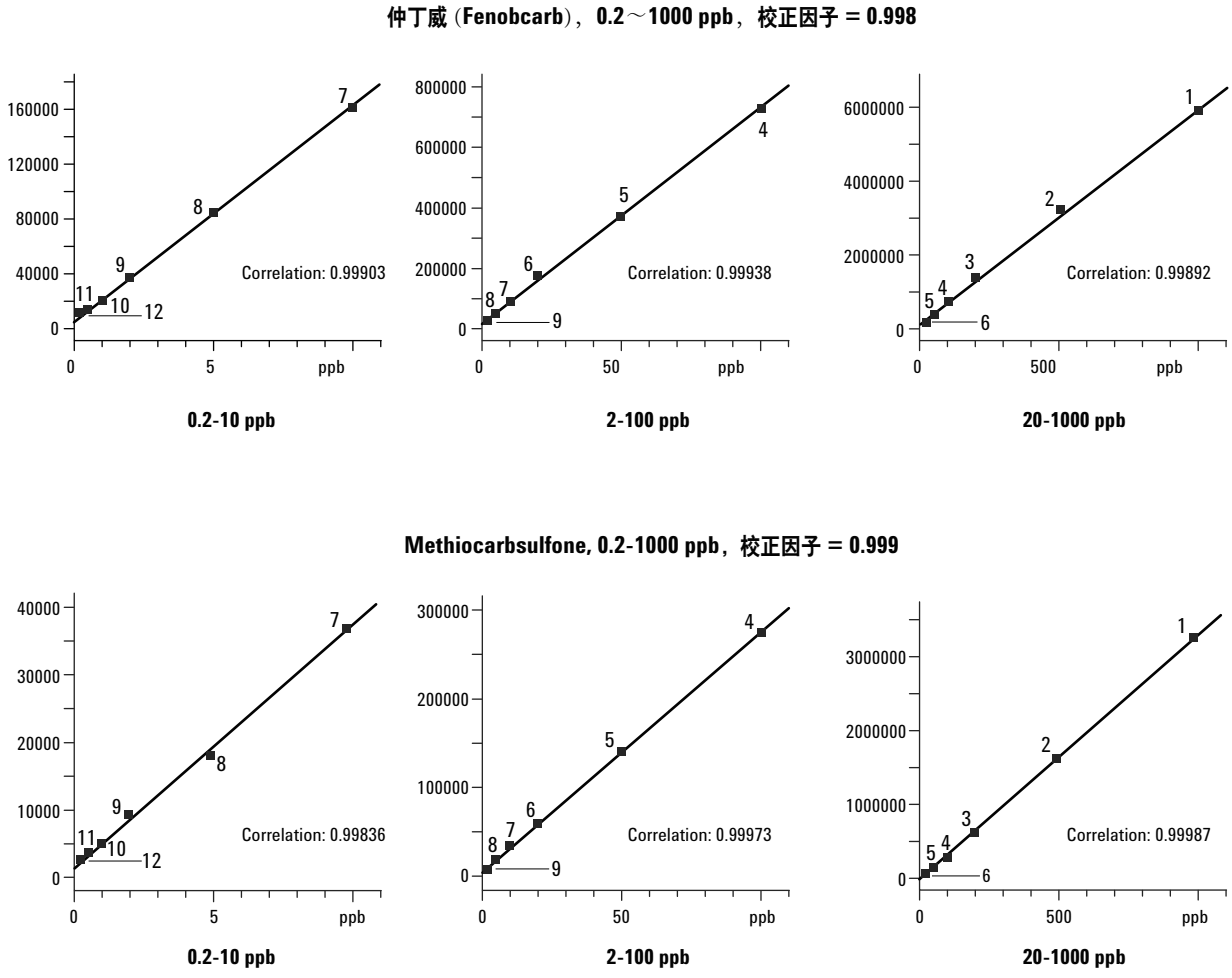


图 8. 部分氨基甲酸酯标准品的校正曲线

色谱柱的选择

图 9 是 10 ppb 氨基甲酸酯分别用 2.1 mm 和 4.6 mm 色谱柱获得的色谱图。当色谱柱的长度和粒径相同时，即使流速高出 5 倍，4.6 mm 色谱柱的响应值任大约为 2.1 mm 色谱柱的 40%。

基质效应和检测限 (LOD)

许多情况下，样品基质会干扰待测物的响应。SIM 模式采集的背景信号更低。图 10 为花椰菜提取物中 10 ppb 氨基甲酸酯的 SIM 色谱图。2.1 mm 色谱柱的进样量为 5 µL。括号中的百分比是花椰菜提取物中待测物的响应值相对于甲醇中标准品的响应值百分比。多数的响应值与标准品相当 (98～115%)，只有 Methiocabsulfoxide 除外，它的响应值只有甲醇中标准品的 71%。

检测限 (LOD) 的定义是信噪比 (S/N) 等于 3 时，花椰菜提取物中待测物的浓度的样品浓度。9 种氨基甲酸酯的 LOD 值列于表 2。

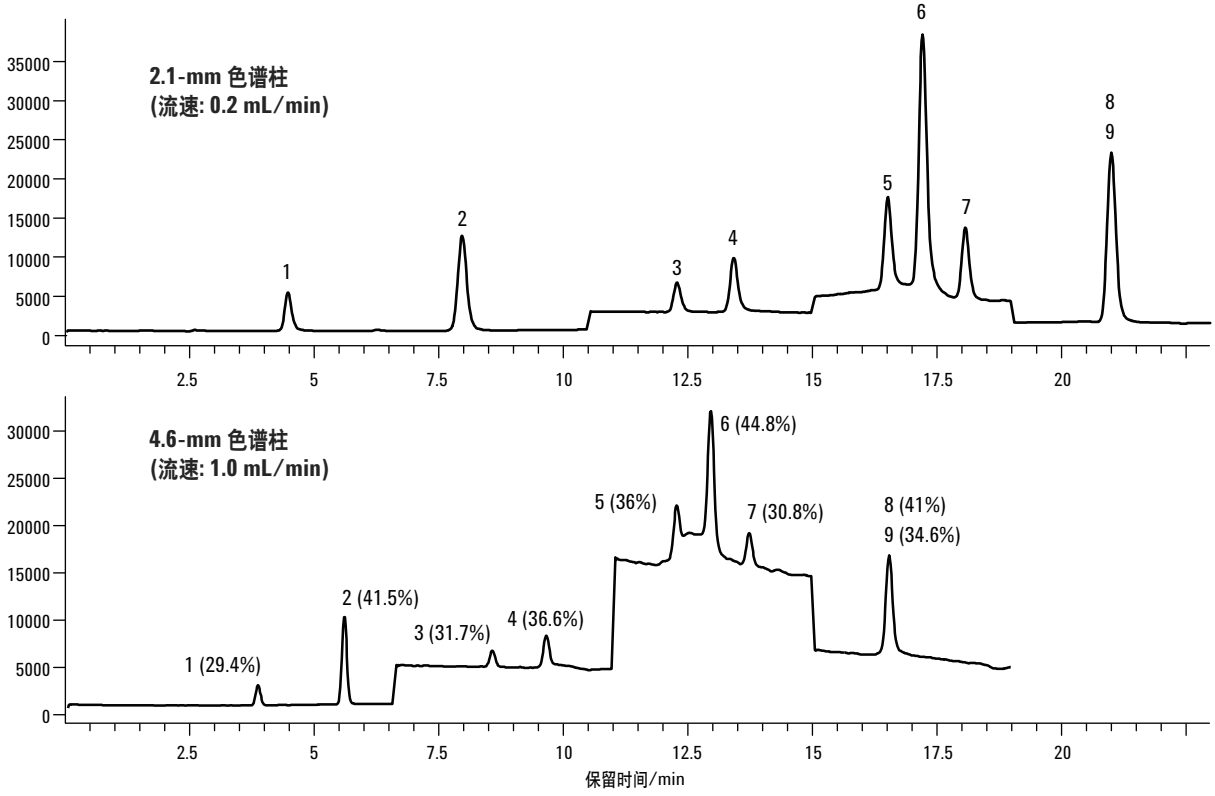


图 9. 10 ppb 氨基甲酸酯在 2.1 mm 和 4.6 mm 色谱柱上的色谱图比较。括号中的百分比为 4.6 mm 色谱柱相对于 2.1 mm 色谱柱的峰强度比值

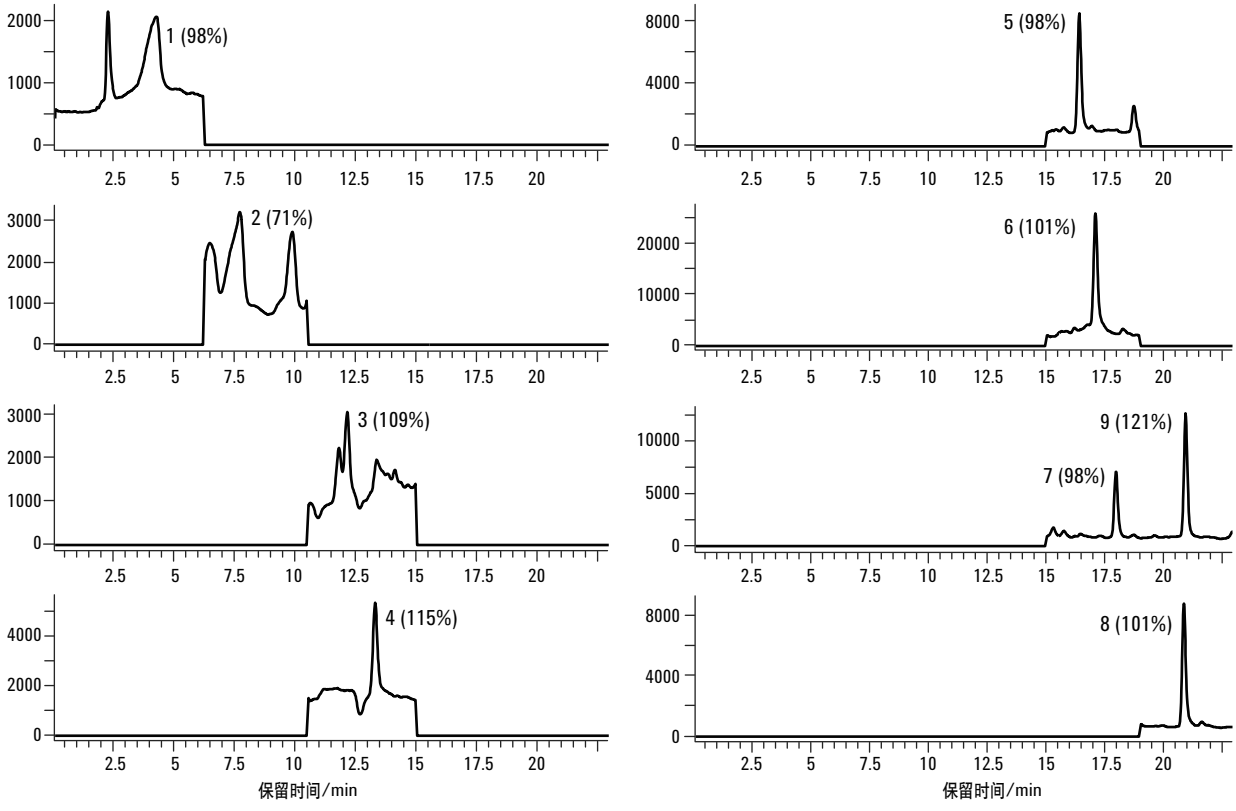


图 10. 花椰菜提取物中 10 ppb 氨基甲酸酯的 SIM 色谱图

表 2. 氨基甲酸酯的基峰、相关系数和花椰菜提取物的检测限 (LOD)

#	化合物	基峰	相关系数 (0.2-1000 ppb)	LOD (花椰菜提取物 S/N=3)
1	杀线威	237 $[M+NH4]^+$	0.999	3 ppb
2	Methiocarbsulfoxide	242 $[M+H]^+$	0.999	10
3	Methiocarbsulfone	275 $[M+NH4]^+$	0.999	10
4	涕灭威	116 (fragment)	0.999	2
5	恶虫威	224 $[M+H]^+$	0.999	1
6	抗蚜威	239 $[M+H]^+$	0.999	3
7	乙硫苯威	226 $[M+H]^+$	0.999	2
8	仲丁威	208 $[M+H]^+$	0.998	1
9	灭虫威	226 $[M+H]^+$	0.998	2

结论

可以用 LC/MSD 对一些氨基甲酸酯类杀虫剂进行常规分析，其在花椰菜提取物中的检测限可达亚 ppb 级，良好实验结果表明，LC/MSD 方法可替代非专属性的柱后衍生荧光检测法对氨基甲酸酯类杀虫剂进行常规检测。

参考文献

1. *Detection of Low Levels of Carbaryl in Food Using Agilent LC/MSD Trap System*, Agilent Application Note, 5980-0332, April, 2000.

液相色谱仪 (LC) 应用

无论您的液相色谱需求和预算是什么，您都可以在安捷伦的液相色谱系列产品中找到适合于您的解决方案。超高性能液相色谱解决方案包括 Agilent 1290 Infinity 液相色谱、高分离度快速液相色谱 (RRLC) 和低流速液相色谱应用。对于常规的标准 HPLC 应用，选择 Agilent 1200 系列液相色谱仪，以获得更大的灵活性，或者选择 Agilent 1120 一体式液相色谱仪，它提供更紧凑的设计和简化的操作。基于应用的解决方案完善了产品系列，以应对特殊的挑战。

液相色谱仪 (LC) 应用

5989-5176 高分离度快速液相色谱和在线痕量富集方法用于除草剂的快速分析 235

5988-7630 HPLC 分离具有四环素结构的抗菌药物 240

5988-7135 用 HPLC 分析肉类食品中的残留合成抗生素 242

5989-4857 用高分离快速液相色谱系统进行黄嘌呤类化合物的高通量分离 244

5989-6297 用 1.8 µm 反相 (RP) 色谱柱进行快速氨基酸分析 (AAA) 250

5989-0591 用安捷伦制备 C18 柱放大花青素的分离规模并对收集的馏分进行再分析 263

5989-5177 提高快速高效分离方法转换的效率 266

5988-6686 高效液相色谱分析农业杀菌剂配方中的活性化合物 272

5988-6340 除草剂 键合相选择性差异举例 275

5988-6341 饮用水中杀虫剂的分析 276

5988-6347 快速分离杀虫剂混合物 278

5966-0743 高效液相色谱柱后衍生化法分析水中草甘磷 280

5988-7629 高效液相色谱分析具有青霉素结构的抗菌药物 282

5989-3634 高效液相色谱分离黄曲毒素 284

5966-0632 高效液相色谱分析阿月浑子果中的黄曲霉素 286

5989-5178 快速筛查和分析非酒精饮料中的成分 289

5989-3635 使用反相 HPLC 分离苯甲酸类防腐剂 295

5988-6349 阿斯巴甜的代谢产物与应用 298

5988-6362 花青素的高效快速分离 299

5989-4907 使用 HT 1.8 µm 快速分离色谱柱对甘草根提取物进行高分离度反相 HPLC 分离 301

高分离度快速液相色谱和在线痕量富集方法用于除草剂的快速分析

应用

环境

作者

Michael Woodman
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

环境和食品的安全管理机构正在不断地更新方法来改进检测限和解决干扰化合物的分析问题。EPA 555 作为一种特殊的方法被用于分析饮用水中氯酚氧酸类除草剂。其中强制要求的痕量富集步骤对此方法的易用性和可靠性具有显著的影响。该方法使用 5-µm 的分析柱和在线痕量富集方法。这里改为采用较小的 3.5 和 1.8-µm ZORBAX 快速分离高通量色谱柱和一个安装在柱温箱中带自动切换阀的 autoSPE（固体萃取）小柱。用直接将样品注射到 autoSPE 小柱的进样模式方法，取代 EPA 方法中指定的上样泵，我们可以显著的减少总体的分析时间并在实际上消除可能存在的样品交叉污染的问题。

引言

在相对干净的基质中进行痕量分析检测是在线 SPE 方法的极好应用。使用一次性的 SPE 小柱手动上样，需要在分析之前将样品洗脱到样品瓶内的步骤，相比之下，在线 SPE 可以确保 100% 的样品被转移到分析柱，并可以通过增加转移到色谱柱中待测物的质量来显著的提高灵敏度。在 EPA 555 方法中，20 毫升饮用水经过泵被加载到高效液相色谱系统中一个装有高压切换阀的 SPE 小柱上。因为很少有自动进样器（如果配置）能够注射这么大的体积，因此样品也必须被泵入小柱中。先前的样品对加样泵的污染是被始终关注的问题，而且足够的冲洗和进空白样就成为整个方法过程中的一个重要部分。

减少取样体积能够满足可用的自动制备型进样器的要求，为了不损失方法的灵敏度，有必要减少分析柱的尺寸，同时保持分离能力。另外使用较小的色谱柱通常还可以减少分析时间和溶剂消耗，以及与质谱检测器离子源之间的兼容性更好。

如果不同色谱柱的长度与粒径的比是相等的，则被认为具有相同的分离能力。通过减少色谱柱的长度和/或内径来可以大大降低色谱柱容积。在后面的例子中，流速通常将会被降低，如等式 1 所示。

$$Flow_{col.\,1} \times \left[\frac{Diam._{column2}}{Diam._{column1}}\right]^2 = Flow_{col.\,2} \quad \text{(eq. 1)}$$

减少长度和内径的综合结果可以体现为溶剂消耗的减少。我们通常是按照色谱柱的尺寸调节进样量，一定比例的进样体积的计算是通过将两个色谱柱的空容积之比乘以最初色谱柱的进样体积得来的，如下面等式 2 所示。

$$Inj.\ vol._{col.\,1} \times \left[\frac{Volume_{column2}}{Volume_{column1}}\right] = Inj.\ vol._{col.\,2} \quad \text{(eq. 2)}$$

小粒径的短色谱柱通常在高的线速度下运行。洗脱速度的提高将会减少绝对峰宽，而且可能需要使用者调节数据采集速率，降低信号过滤参数，从而确保色谱分离在采集的数据文件中被准确的记录下来。

对于梯度洗脱分离，从分析开始，逐渐增加流动相的组成，直到被关注的分析物从色谱柱中洗脱出来，将这种方法成功的转移到较小的色谱柱，需要保持原先的梯度斜率。我们可以表达梯度的斜率如等式 3 所示。

$$\%\ 梯度斜率 = \left[\frac{(End\% - Start\%)}{\#Column\ volumes}\right] \quad \text{(eq. 3)}$$

需要注意的是，使用的是每个色谱柱容积改变的百分比而不是每分钟改变的百分比，这样可以让使用者摆脱通过改变梯度的时间和/或梯度的流速来控制梯度斜率。较大的梯度斜率会产生非常快的梯度且具有最小的分离度，然而较小的梯度斜率会使分离度提高，但同时增加溶剂消耗，灵敏度有所下降。除非在可以接受的操作压力范围内通过增加流速来降低梯度斜率，而不是通过增加梯度时间降低梯度斜率，否则较长的分析时间可能会提高分离度。

因为有效容量因子 k* 的增加，较小的梯度可以提高分离度。与等度分离中的容量因子 k' 非常相似，较高的k值可以直接提高分离度。当 k 值大约达到 5–10 时的分离度提高的效果是非常显著的，在此之后，提高幅度很小。在随后的例子中，我们将会见到与前面讨论的计算有关的结果。

实验条件

参数见图 1。

系统

Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱组成如下：
G1379B 微量脱气机
G1312B 二元泵 SL
G1312A 配置溶液选择阀选件的二元泵，或
G1354A 四元泵
G1367C HiP ALS 自动进样器 SL，和
G2258A 双定量环制备自动进样器 5 ml
G1316B 配置 6 通或 10 通 2 位切换阀的 SL 型柱温箱
G1315C SL 型 UV/VIS DAD，流通池分别如每个色谱图所示
32 位 ChemStation，版本号 B.02.01

色谱柱

Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 × 250 mm, 5 µm
Agilent ZORBAX SB-C18, 3.0 × 150 mm, 3.5 µm
Agilent ZORBAX SB-C18, 2.1 × 80 mm, 1.8 µm
Agilent ZORBAX SB-Aq, 4.6 × 12.5 mm, 5 µm

流动相条件

有机相：	乙腈
水相：	25 mm 磷酸的 Milli-Q 水溶液

梯度条件

梯度斜率：	如图中所标示的，7.8 或者是每个色谱柱容积的 2.3%。流速和时间分别见每个色谱图。

样品

EPA 555 A 组为氯酚氧酸类除草剂（包括毒莠定，草灭平，麦草畏，苯达松，2,4-滴，2,4-滴丙酸，2,4,5-三氯苯氧乙酯，三氟羧草醚），100 µg/mL 的甲醇溶液或稀释为 20 ng/L（20 ppb）的水溶液并经 25 mm 磷酸酸化。

结果

分离最初是在 ZORBAX SB-C18 色谱柱 (4.6 × 250 mm, 5-µm）上用浓缩的标样直接进样，柱温为 25 °C，使用的条件参考 US EPA 555 方法（图 2）。采用 A 泵作为上样泵来完成上述痕量富集过程（图 3）。然后，按照比例将方法中的流量和时间精确转换到 3.0 × 150 mm，3.5-µm 色谱柱（图 4）并使用 5 mL 痕量富集进样。最后采用 2.1 × 80 mm，1.8-µm 的色谱柱（50 mm 加 30 mm 系列柱）验证在少于 1.5 mL 进样的痕量富集条件下这种分离的可行性。（图 5）

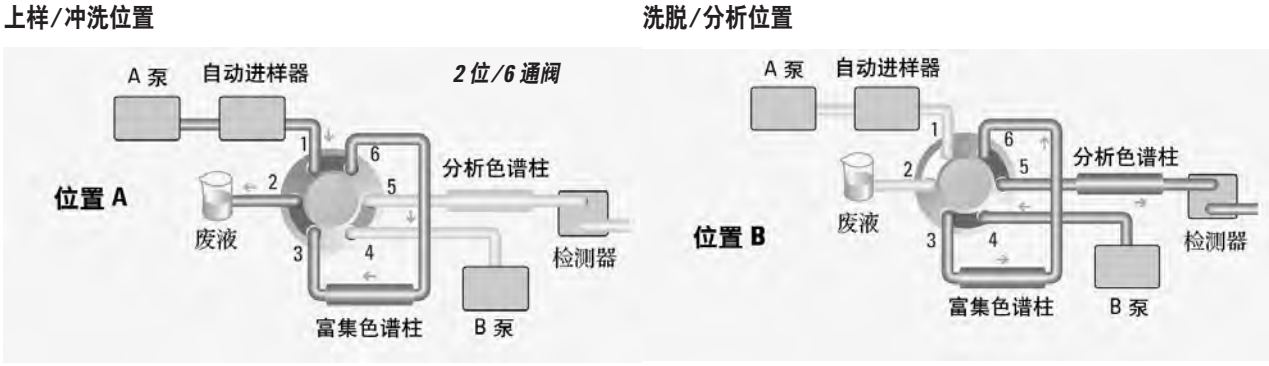


图 1. autoSPE 痕量富集图解

图 1 为系统中的组件和色谱柱结构。A 泵为上样泵，为了防止进样体积超过 G2258A 双定量环自动进样器的容量 (5 mL)，所以A泵使用一条通路进样，另一条通路为 25 mm 磷酸水溶液。如果使用自动进样器直接进样，A 泵将输送出 25 mm 磷酸。如果 A 泵配备了脱气机，则样品通路将绕开脱气机组件从而使样品溶液的污染减到最小。为使样品通过 A 泵，当新的样品流经 A 泵的时候，阀应该是在 B 的位置。然后，切换阀到 A 的位置，再上样所需的 20 mL 样品。当阀回到 B 的位置时，分析开始，这时 A 泵的样品通路将被水或下一个样品适当的冲洗。

图 2 和 3 分别显示了直接进样和通过泵进行痕量富集的标准分离。包括色谱柱再生阶段在内，总的分析时间共需要 60 分钟。将梯度转换到 3.0 × 150 mm 色谱柱时，因内径变小需要降低流速，而且因为色谱柱长度的变短需要减少梯度时间。由此分析时间从 60 分钟减少到 36 分钟，溶剂消耗也按比例从 60 mL 减少到 15.5 mL。

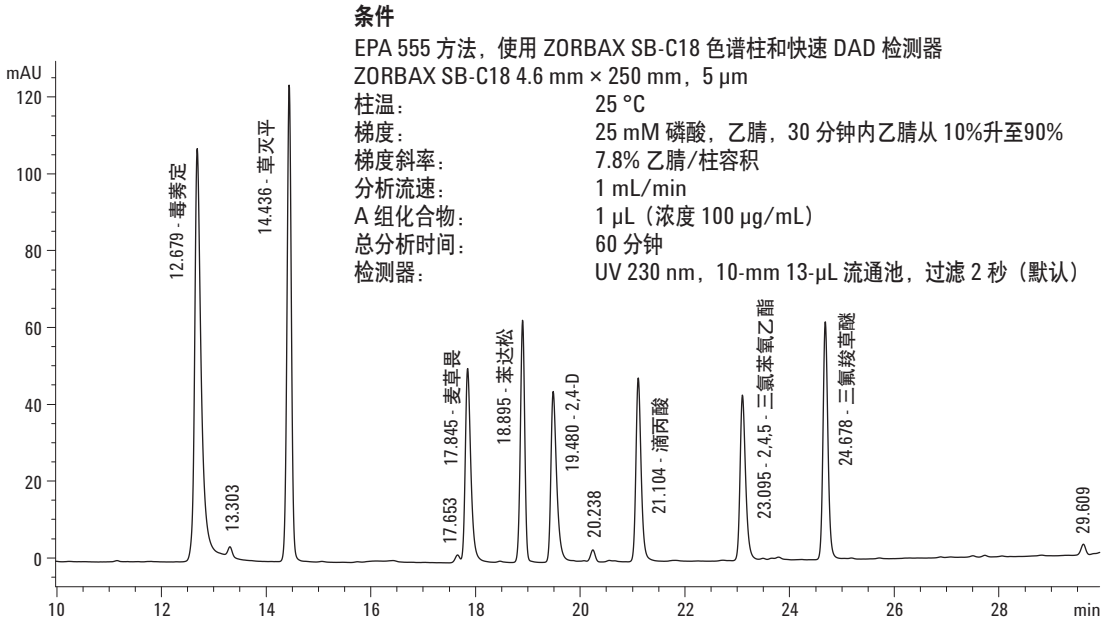
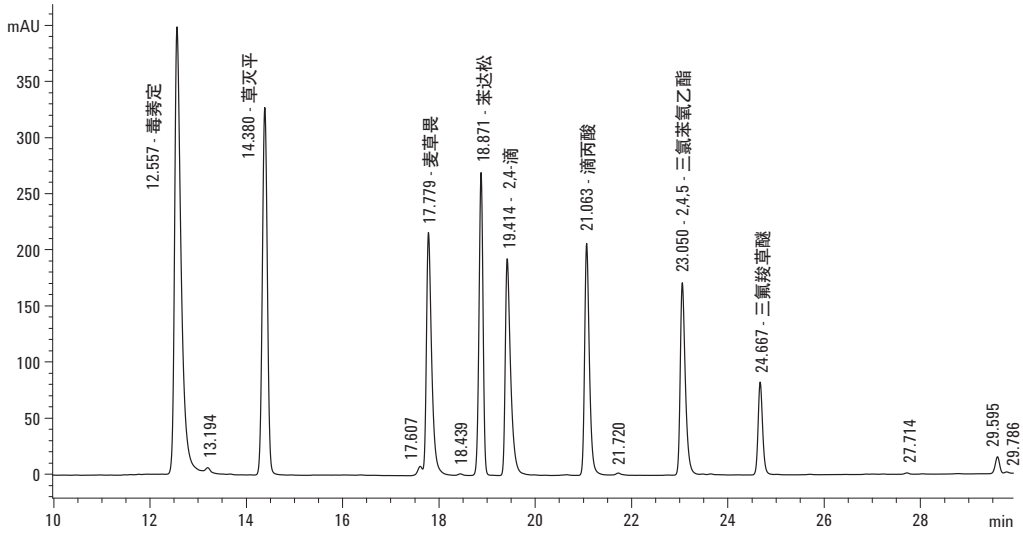


图 2. 采用 4.6 mm×250 mm，5 µm ZORBAX SB-C18 色谱柱对氯酚氧酸类除草剂梯度分离



条件

EPA 555 方法，使用 ZORBAX SB-C18 色谱柱和快速 DAD 检测器
ZORBAX SB-C18 4.6 mm × 250 mm，5 µm

柱温：	25 °C
梯度：	25 mM 磷酸，乙腈，30 分钟内乙腈从 10% 升至 90%
梯度斜率：	7.8% 乙腈/柱容积
分析流速：	1 mL/min
A 组化合物：	20 mL（浓度20 µg/L）痕量富集
总分析时间：	60 分钟
检测器：	UV 230 nm，10-mm 13-µL 流通池，过滤 2 秒（默认）

图 3. 用 4.6 mm×250 mm，5-µm ZORBAX SB-C18 色谱柱痕量富集 20-ppb 溶液（20 mL）

条件：

EPA 555 方法，使用 ZORBAX SB-C18 色谱柱和快速 DAD 检测器
ZORBAX SB-C18 3 mm × 150 mm，3.5 µm

柱温：	25 °C
梯度：	25 mM 磷酸，乙腈，18 分钟内乙腈从 10% 升至 90%
梯度斜率：	7.8% 乙腈/柱容积
分析流速：	0.43 mL/min
A 组化合物：	5 mL（浓度 20 µg/L，20 ppb）痕量富集
检测器：	UV 230 nm，3-mm 2-µL 流通池，过滤 0.2 秒
总分析时间：	36 分钟

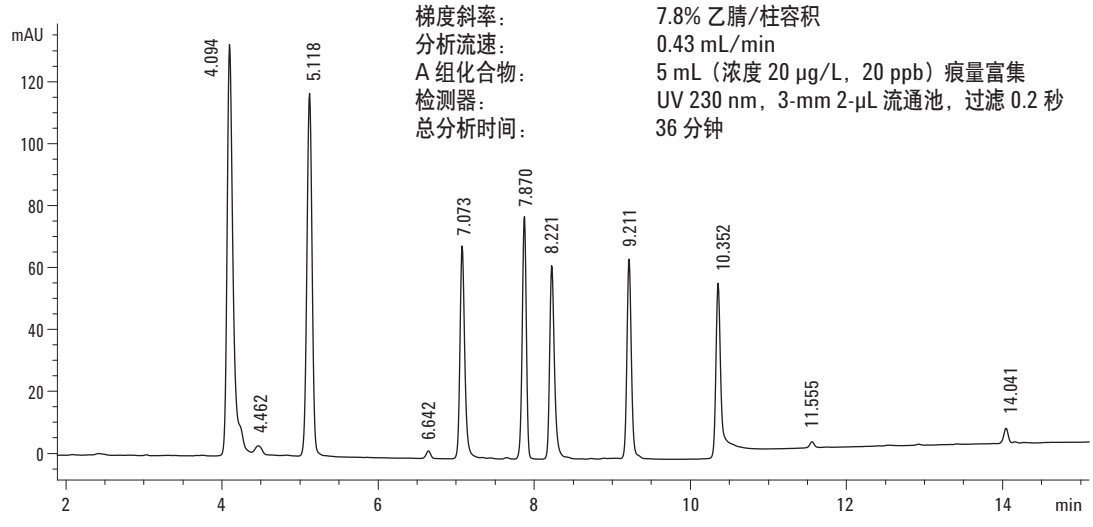


图 4. 3.0×150 mm，3.5-µm ZORBAX SB-C18 色谱柱痕量富集 20-ppb 溶液（5 mL）

图 4 中最后的色谱峰由于阀的定时错误而丢失，这个错误直到实验工作完成后才被发现。8 号峰在阀切换到离线状态进行再生和平衡之前没有从痕量富集色谱柱中被洗脱出来的。需要注意的是，发生在 7 号峰之后的基线漂移在其它的 autoSPE 例子中没有被发现。

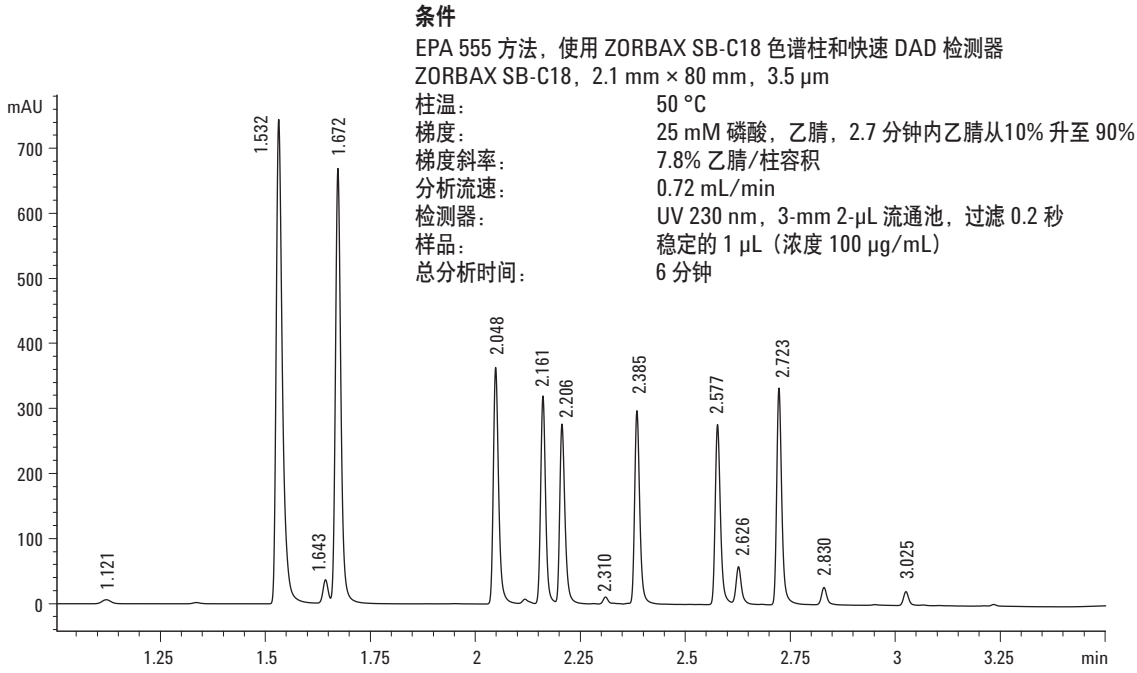


图 5. 2.1×80 mm，1.8-µm ZORBAX SB-C18 色谱柱高速梯度分离除草剂

在图 5 中表明使用 1200 高分离度快速液相所有功能所得到的最高分析速度和分离度。操作压力最高大约在 520 bar 处。我们保持与最初的 4.6 × 250 mm，5-µm 色谱柱运行 60 分钟时相当的分离度，只需要 6 分钟的分析时间。

结论

通过对许多现有的方法进行改进而提高效率和总体性能是可行的。这里我们看到了可以提高分析速度 10 倍的潜在可能，并除去了最初方法中设计的上样泵。只需要使用 2.1 × 80 mm 色谱柱将大约 1.3 mL 样品溶液注入到 autoSPE 装置中，就能够替换先前所需的通过泵上样 20-mL。该方法能大大改善分析效率而且确保最小的样品交叉污染。

HPLC 分离具有四环素结构的抗菌药物

药物分析

作者

Udo Huber, Adebayo O. Onigbinde

四环素天然地存在于某些链霉菌中。除了用于人类药物和兽药之外，四环素还用做猪和家禽的营养抗生素。因为四环素的半衰期长且抗药性强，在一些欧洲国家，如德国，其使用受到严格的限制。图 1 所示为 Zorbax SB-C18 反相柱对三种常见的四环素类似物的 HPLC 分离。

本应用表明在分离抗菌药物时，可以不使用离子对试剂和三氟乙酸 (TFA)，而选用的另一种流动相进行分析。

重要提示

- SB-C18 色谱柱分离碱性抗菌药物具有极好的峰型和选择性
- 在低 pH 范围，SB-C18 色谱柱具有优异的稳定性
- 在低 pH 范围和缓冲浓度下，SB-C18 色谱柱可以快速分离抗生素药物
- HPLC 方法易于分析抗菌素药，且具有较高的可靠性和精密度
- 检测限 (LOD)、保留时间 (RT) 和峰面积精密度显示了 HPLC 分析的优良性能

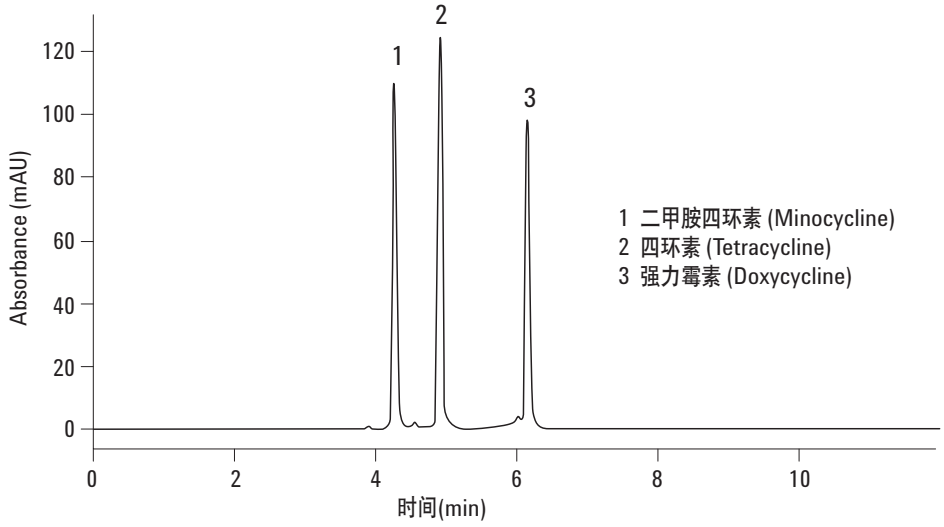


图 1. 三种具有四环素结构的抗菌药的分离

实验条件

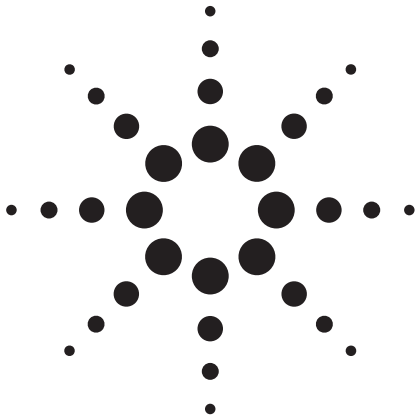
仪器: Agilent 1100 系列 HPLC, **UV检测器**: 可变波长检测器, 350 nm, 标准流通池; **色谱柱**: Zorbax SB-C18, 3.5 µm, 4.6 × 75 mm (部件号866953-902); **流动相**: A = 0.025 M KH_2PO_4 水溶液 (pH = 3), B = 乙腈; **进样量**: 5 µL; **温度**: 25°C; **流速**: 1.0 mL/min; **梯度**: 10 min 内由 5% B 到 60% B; **柱清柱**: 2 min 内由 60% B 到 5% B

表 1. 具有四环素结构的抗菌药的 HPLC 方法性能

化合物	检测 S/N=2 (mg/L)*	保留时间精密度 (10 次运行的相对标准差) (100 mg/L)*	峰面积的精密度 (10 次运行的相对标准偏差) (100 mg/L)*
二甲胺四环素	0.1	0.06	0.14
四环素	0.1	0.05	0.13
强力霉素	0.1	0.04	0.21

*进样量: 5 µL

用 HPLC 分析肉类食品中的残留合成抗生素



食品分析

作者

Hiroki Kumagai, Adebayo Onigbinde

许多家养牛的饲料中有各种抗生素以防止和控制因真菌和细菌导致的疾病。在由这些动物制成的肉类食品中发现有抗生素的残留物。由于许多抗生素是有毒性的，许多国家法规规定了在农业和动物产品中允许的此类抗生素残留量限量标准。许多 C18 烷基色谱柱对碱性化合物有拖尾，而且当 pH 值较低时，柱寿命较短。Purospher®色谱柱分离碱性抗生素具有良好的分离度、峰形和柱效。

要点提示

- 在较低 pH 值条件下，分离了10 种抗生素
- 在低的样品浓度时，对抗生素具有出色的分离度和较快的分析速度
- 从色谱柱流出的抗生素具有良好的峰形和较窄的峰宽
- 用 Purospher®色谱柱, 可以在一次分析中完成对低含量的多种不同结构药物实现分离

被分析的化合物

- 磺胺甲嘧啶 (SMR)
- 磺胺二甲嘧啶 (SDD)
- 磺胺间甲氧嘧啶 (SMMX)
- 磺胺二甲氧基嘧啶 (SDMX)
- 磺胺喹噁啉 (SQX)
- 乙胺嘧啶 (PYM)
- 甲砜霉素 (TPC)
- 呋喃唑酮 (FZD)
- Difurazone (DFZ)
- 奥索利酸 (OXA)

样品: 牛肌肉的萃取物

样品制备：日本根据日本食品卫生法的法规制备方法

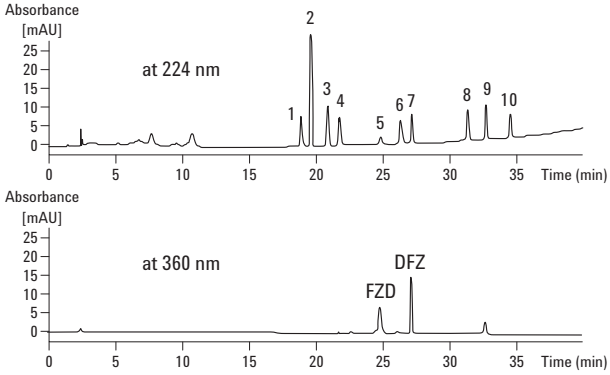


图 1. 标准溶液的色谱图，每个被分析物的浓度为 2 µg/mL

1 SMr
2 PYM
3 TCP
4 SDD
5 FZD
6 SMMX
7 DFZ
8 SDMX
9 SQX
10 OXA

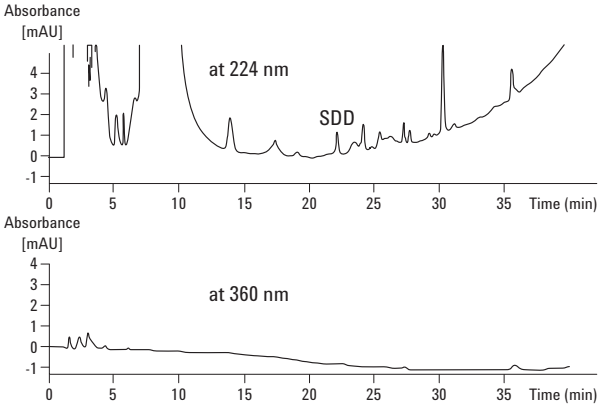


图 1. 牛肌肉萃取物的色谱图

仪器: Agilent 1100 系列 HPLC;

色谱柱：250 mm X 4 mm id, RP-18 Purospher®, 5 µm,

部件号：79925PU-584;

流动相：A = 0.7 % 磷酸, B = CH_3CN;

梯度： 0.0 min 5% B; 10.0 min 65% B; 40.0 min 65% B; 45.0 min 65% B;

分析后停留时间：7.0 min 5% B;

流速： 1.0 mL/min;

温度： 40 °C;

进样量：20 µL;

二极管阵列检测器：A–338/10 nm, 参比波长关闭; B–264/8 nm, 参比波长关闭; C–360/8 nm, 参比波长关闭

用高分离快速液相色谱系统进行黄嘌呤类化合物的高通量分离

应用

生化、食品饮料、医药

作者

John W. Henderson and Ronald E. Majors
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

黄嘌呤类化合物最好采用 C18 柱进行反相 HPLC 分离。研究发现，缩短柱长、减小粒径将使黄嘌呤类混合物的分离时间从 8 分钟缩短到 1.5 分钟，而分辨率没有明显损失。采用简单的等梯度 HPLC 方法分析了液体饮料（茶、巧克力饮料和可可饮料）中的可可碱、茶碱和咖啡因。

前言

黄嘌呤类化合物是一类生物碱，常被用作轻度兴奋剂和支气管扩张剂，对哮喘症状有明显疗效。最常见的黄嘌呤类化合物是咖啡因，主要存在于如咖啡豆、茶、柯拉果等食品中，可可豆中也含有少量咖啡因。不可思议的是，由于巧克力中含有可可碱、茶碱和咖啡因（都属于甲基茶碱类），因此，巧克力也是一种弱兴奋剂。这些黄嘌呤类化合物及其代谢物的化学结构见图 1。

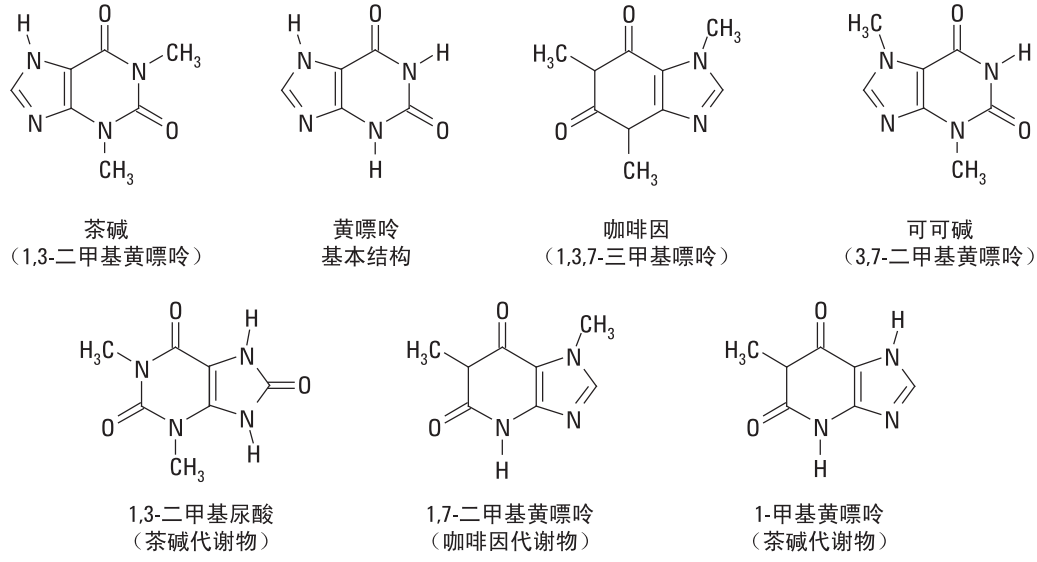


图 1. 选用的黄嘌呤类化合物及其代谢物的结构

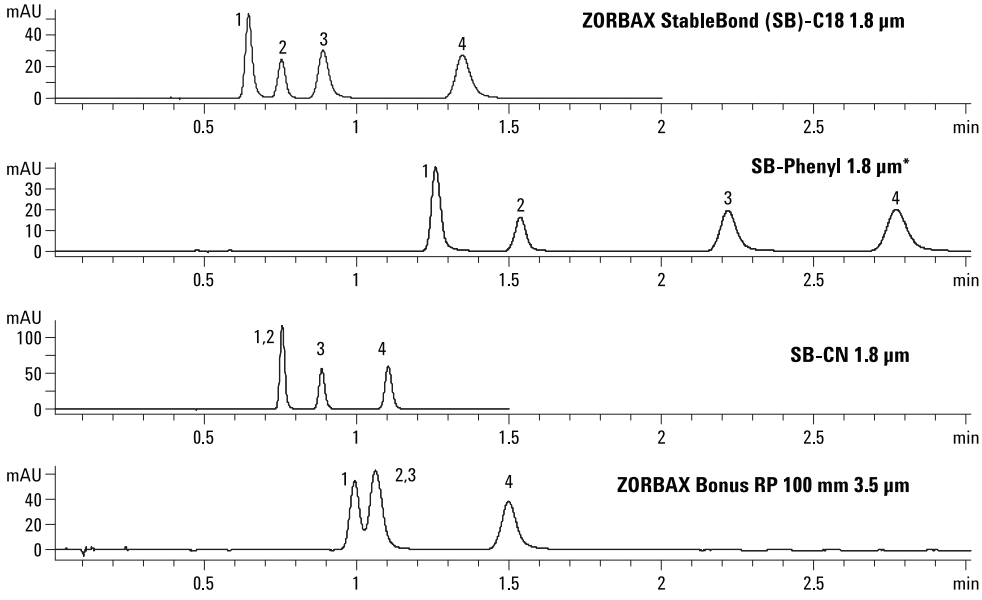
黄嘌呤类化合物在体内几乎 100% 被吸收，摄入后几分钟内出现在血液中。黄嘌呤类化合物刺激中枢神经系统，可作用于循环系统，松弛支气管平滑肌。众所周知，咖啡因具有减轻睡意、缓解疲劳和醒脑的作用。这些常见的黄嘌呤类化合物在体内代谢成可能对人体有生理作用的各种化合物。

黄嘌呤类化合物常用反相 HPLC（RP-HPLC）在 C18 柱上分离 [1–3]。虽然离子对色谱已被用于黄嘌呤的分离 [2]，但使用水和乙腈作为缓冲液的 RP-HPLC 需要的流动相系统更简单。本篇应用报导了不同固定相对黄嘌呤类化合物分离选择性的影响，并探讨了粒径和柱长对分离速度的影响。最后，报告了巧克力型饮料中咖啡因和可可碱的分析方法。

黄嘌呤类化合物分离固定相的选择

HPLC 可以让感兴趣的峰在尽可能短的时间内得到分离。选择合适的固定相是方法开发的重要步骤。最初，我们对几种不同的固定相进行了选择，以找到本研究最适合的固定相。图 2 显示了用 ZORBAX StableBond 固定相 [氰基（CN）、苯基、C18] 和一种极性嵌入固定相（ZORBAX Bonus RP）对试验混合物中黄嘌呤类化合物的分离。

虽然 Bonus 柱的粒径不同，但这里我们的目的是选择具有最佳选择性和最短保留时间的固定相。在所用的条件下，CN 柱的保留最短（因为其烷烃链较短），但在这个柱子上，有两种黄嘌呤化合物没有分开。SB-C18 柱在最短的时间内得到了最佳分离，因此成为选定的固定相。



化合物：	色谱柱：	SB-C18，4.6 × 50 mm，1.8 µm
1 1-甲基黄嘌呤		SB-phenyl，4.6 × 50 mm，1.8 µm
2 1,3-二甲基尿酸		SB-CN，4.6 × 50 mm，1.8 µm
3 3,7-二甲基黄嘌呤		Bonus-RP，4.6 × 100 mm， 3.5 µm
4 1,7-二甲基黄嘌呤	流动相：	A = 0.2% FA
* 预制备批次		B = AcCN 含 0.2% FA
	等梯度组分：	98% A 2% B（v/v）
	流速：	1.5 mL/min
	进样体积：	分别为 2、4、6 µL
	检测器：	DAD，254 nm
	流通池：	3 µL， 2-mm 光程

图 2. ZORBAX 固定相对黄嘌呤类化合物分离选择性的比较

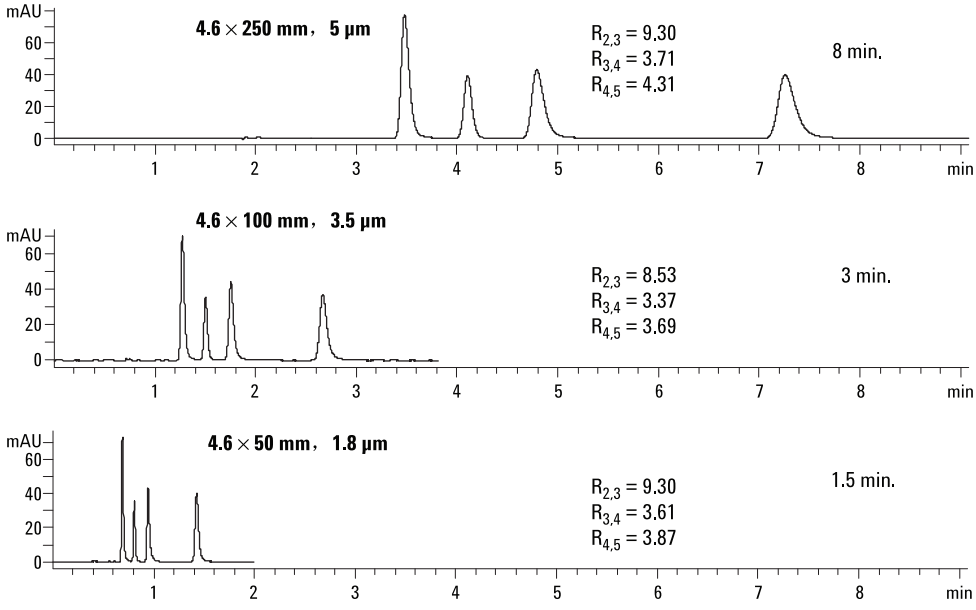
为后续实验所选定的色谱条件如下：

LC 条件

色谱柱：	ZORBAX SB-C18 （各种长度和粒径见各色谱图）
流动相：	A= 0.2% 甲酸（FA） B=乙腈含 0.2% FA
等梯度组分：	98% A 2% B（v/v）
流速：	1.5 mL/min；进样体积见各色谱图
检测：	DAD，254 nm
流通池：	3 µL，2-mm 光程

粒径和柱长对黄嘌呤类化合物分离的影响

最近 HPLC 分离趋向于使用更小粒径的较短色谱柱。分离度相同或类似，而分离速度更快。图 3 显示了黄嘌呤类测试混合物在三根不同柱子上（250 mm、100 mm 和 50 mm）的等梯度分离结果，这三根柱子分别填充了三种不同粒径的 ZORBAX StableBond C18 填料（分别为 5 µm、3.5 µm、1.8 µm）。我们预计随着柱长变短，保留时间将更短，保留时间的缩短与柱长减少成正比。从图 3 中的确可以清楚地看到整个分离时间的缩短，从 8 分钟到 1.5 分钟。



溶质：	色谱柱：	ZORBAX SB-C18（柱尺寸和粒径见色谱图）
1 1-甲基黄嘌呤	流动相：	A = 0.2% FA
2 1,3-二甲基尿酸		B = AcCN 含 0.2% FA
3 3,7-二甲基黄嘌呤	等梯度组分：	98% A 2% B（v/v）
4 1,7-二甲基黄嘌呤	流速：	1.5 mL/min
	进样体积：	分别为 2、4、6 µL
	检测器：	DAD， 254 nm
	流通池：	3 µL， 2-mm 光程

图 3. 色谱柱的可扩展性：保持分辨率的情况下，改变色谱柱配置以提高速度

另一方面，我们还估计柱效也将下降。但是，随着粒径的减小，整个柱效和分离度却几乎不变。对所有黄嘌呤类化合物的分离度计算结果见图 3。这就是快速分离的概念，更短色谱柱与更小填料颗粒的组合，在保持分离效率的同时大大缩短了分离时间。由于流速相同（在这里是 1.5 mL/min），溶剂的使用与柱长成比例地减少，从而降低了分析成本。改用更短色谱柱的另一个好处是，色谱峰变窄了。因此，如果用同样质量的样品进样，峰高将明显增加，从而提高了灵敏度。在图 3 中，进样体积随柱长变短而减少，还能保持峰高基本不变。

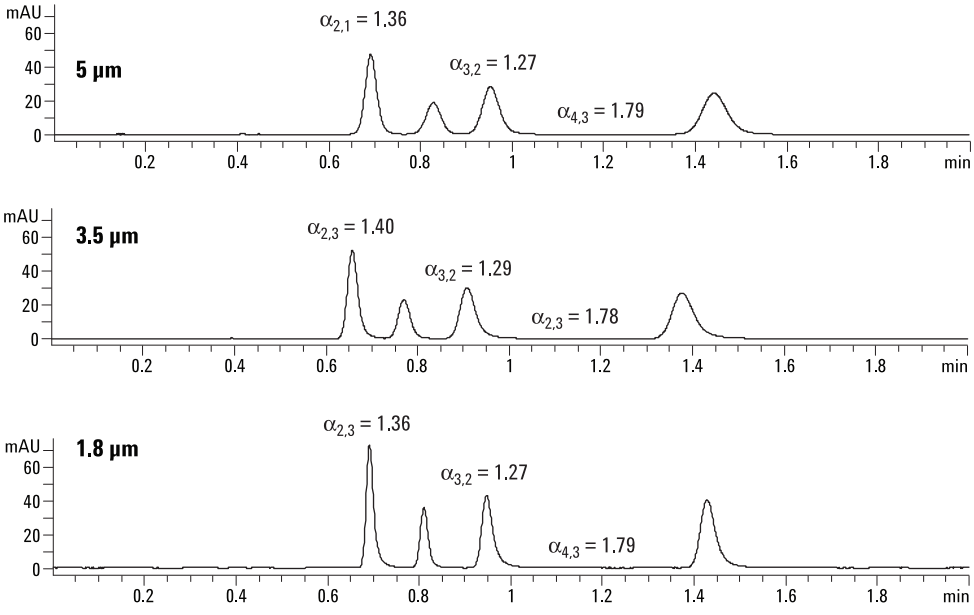
当然，如果色谱柱的填料粒径减小，色谱柱的反压将以粒径平方的倒数增加。因此，如果使用同样的柱长，在同样流速（更准确的说是线速度）下的压力将会随粒径减小而增加，3.5 µm 粒径的柱子压力将比 5.0 µm 柱增加 2 倍，而 1.8 µm 粒径的柱子将比 5.0 µm 柱增加 8 倍。所以，随着粒径的减小，理论塔板数的增加，色谱柱可以缩短，实际压力增加的数值可参见表 1。安捷伦设计的粒径分布有助于使压力保持比 1.8 µm 柱的预计压力要低。

表 1. 压力与粒径和柱长的关系*

粒径	柱长	压力	压力增加（相对于 5.0 um 柱）
um	mm	bar	
5	250	181	1.0
3.5	100	155	0.86
1.8	50	264	1.46

* 条件见图 3

为了说明色谱柱填料粒径的改变对选择性的影响很小，我们用同样柱长的不同粒径色谱柱对黄嘌呤类测试混合物进行了等梯度分离。图 4 显示，从 5 µm 到 1.8 µm 柱，保留时间基本不变，但峰宽明显变窄。换言之，1.8 µm 柱的柱效更高，分离度更高，但选择性几乎没有改变。HPLC 条件见图 4 的色谱图。



溶质：
1 1-甲基黄嘌呤
2 1,3-二甲基尿酸
3 3,7-二甲基黄嘌呤
4 1,7-二甲基黄嘌呤

色谱柱：ZORBAX SB-C18
流动相：A = 0.2% FA；B = 含 0.2% FA 的 MeCN
等梯度组成：98% A 2% B（v/v）
流速：1.5 mL/min
进样体积：2 µL
流通池：2 µL，3-mm 光程

图 4. 柱选择性与粒径的关系

液体饮料中黄嘌呤类化合物的分析

三种最常见的黄嘌呤类化合物是咖啡因、茶碱和可可碱。这些黄嘌呤类化合物可能存在于各种饮料中，作为调味剂，或用于增加口味或提神。我们建立了一种分析巧克力饮料和茶中黄嘌呤类化合物的等梯度方法。用前面提到的色谱条件，使标准黄嘌呤类混合物得到很好的分离。见图 5。

接下来，按照说明在容器中配制三种不同的液体饮料—热可可、巧克力饮料和红茶（袋装），然后超声混匀。制备后，对所有溶液进行离心分离，水相部分经 0.45 微米滤膜过滤，去除可能堵塞 HPLC 柱的颗粒。尤其是，热可可有一层特殊的脂类，要进行分析的只是水层。每个样品取 3 µL 水提取物进样。结果见图 6。

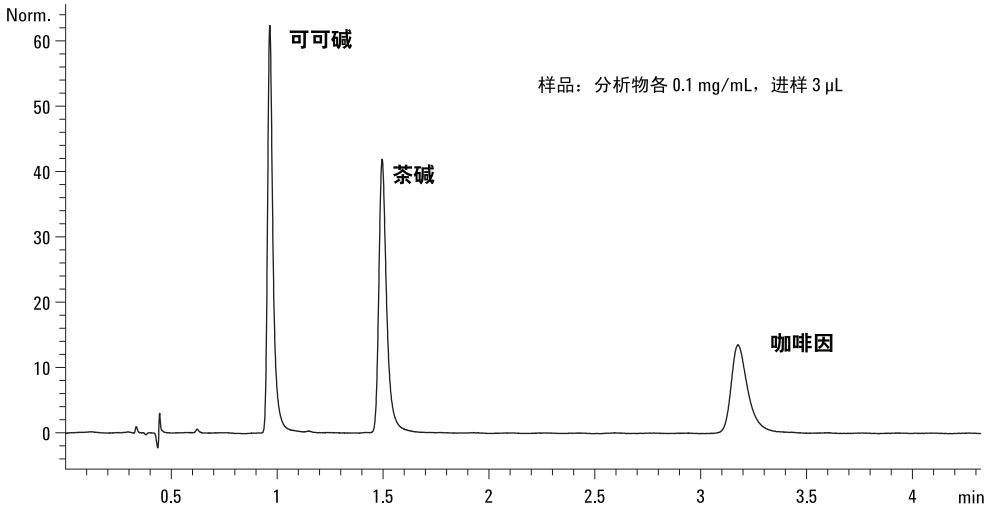
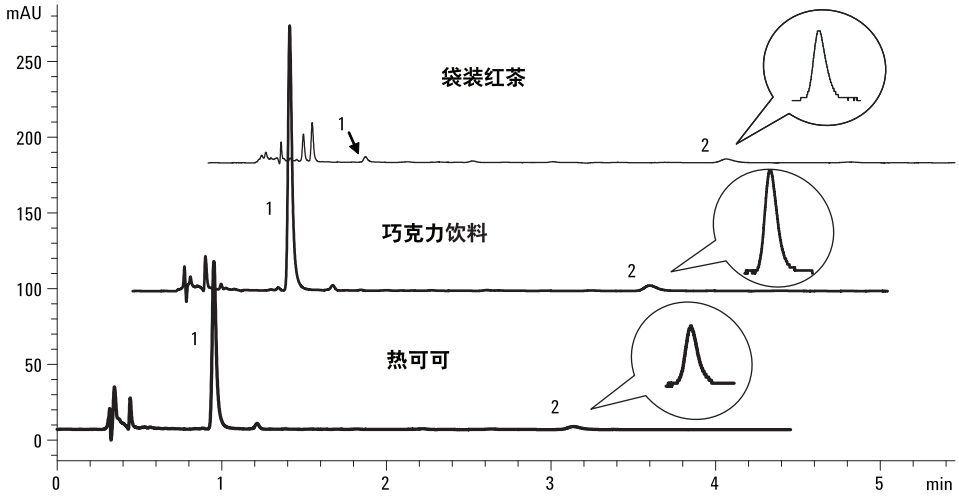


图 5. 黄嘌呤类标样的分离



峰 1：可可碱
峰 2：咖啡因（编号显示吸光度放大了 10 倍）

图 6. 液体饮料中黄嘌呤类化合物的分析

我们可以进行饮料中这三种黄嘌呤的半定量分析（单点校正）。从表 2 中可以看出，巧克力饮料中有大量可可碱，咖啡因含量比较少，而茶样品中，咖啡因含量非常高。表 2 的结果是按重量之比计算的，并非其在饮料溶液中的总毫克数。这些结果都在厂商标识的浓度范围内。这些饮料中都没有检测出茶碱。

表 2. 液体饮料中黄嘌呤类化合物的测定

饮料	可可碱（%，wt/wt）	咖啡因（%，wt/wt）
热巧克力	0.15	0.011
巧克力糖浆	0.13	0.011
茶	0.056	0.17

结论

黄嘌呤类化合物最好采用反相 HPLC 在 C18 柱上分离。随着柱长和粒径减少，所测黄嘌呤类混合物的分离时间从 8 分钟缩短到 1.5 分钟，而分离度没有损失。用一种简单的等梯度 HPLC 方法，对液体饮料（茶、巧克力、可可）中的可可碱、茶碱和咖啡因进行了分析。

参考文献

1. U. Huber, “Analysis of Antiasthmatic Drugs by HPLC”, Agilent Technologies, publication 5988-2523EN, www.agilent.com/chem.
2. R. Ricker, “High Speed Separation of Analgesics”, Agilent Technologies, publication 5988-6414EN, www.agilent.com/chem.
3. Q. Wang, “Analysis of Xanthines in Serum”, Agilent Technologies, publication 5988-2523EN, www.agilent.com/chem.

用 1.8 µm 反相 (RP) 色谱柱进行快速氨基酸分析 (AAA)

应用

制药与食品

作者

Cliff Woodward and John W. Henderson Jr.
安捷伦科技公司
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

Todd Wielgos
Baxter Healthcare Corp.
Round Lake, IL 60073
USA

摘要

氨基酸分析 (AAA) 常被用作蛋白质组学和食品质量检测中测定样品中氨基酸 (AA) 准确组成的工具。为了及时分析样品，需要分析周期短；为了测定有限量的样品需要高灵敏度的方法；为了提高实验室效率，需要自动化的方法。本文报道了用新开发的 1.8 µm 粒径色谱柱测定氨基酸的新方法。这种专利的填料经过专门设计，其产生的反压比市场上任何其它亚 2 微米填料都小，可以在 400 bar HPLC 系统以及耐压更高的仪器上使用。我们采用惠普/安捷伦公司 1988 年首次推出的 OPA/ FMOC 化学衍生法，并改善了以前方法的精密度、分析时间、柱寿命和耐用性 [1-4]。

引言

氨基酸的检测和定量分析一直是蛋白质和食品分析的重要部分，1951 年 Moore 和 Stein 研制出了第一台氨基酸分析仪，将未衍生的氨基酸 (AAs) 用离子交换色谱分离后，用茚三酮进行柱后衍生，在可见区检测 [5]。1958 年由 Beckman 开发并推出了全自动分析仪。它成为蛋白质分析的里程碑，并在 1972 年诺贝尔化学奖核糖核酸酶的研究中发挥了重要作用。以前需要几周完成的分析，用该方法不到 1 天就可以完成。Beckman 新一代的氨基酸分析仪已将分析时间缩短到大约 110 分钟，但用茚三酮灵敏度仍然有问题。

用邻苯二甲醛 (OPA) 和巯基乙醇进行柱后衍生反应有一些可能，但却只能检测一级氨基酸（见图 1a）。1971 年首次报道了用 OPA 对氨基酸进行柱前衍生 [6]。衍生物相当不稳定，但这一过程可以实现自动化。灵敏度得到了提高，特别是使用荧光检测 (FLD) 时。OPA 不发荧光，其衍生物有很强的荧光，但二级氨基酸仍不能检测。另一种衍生化试剂氯甲酸 9-芴基甲酯 (FMOC) 和一级、二级氨基酸都能反应生成稳定的衍生物，但其本身却具有很强的 UV 吸收和荧光（见图 1b）[7]。衍生反应结束后还需要进行提取或与疏水性很强的胺进行反应，以除去过量的 FMOC 和

反应副产物 [8]。这种方法也可以作为自动化柱前衍生方法 [9]，但商品化时存在问题，与没有使用反提取的系统相比，相对标准偏差 (RSD) 较高。

1986 年惠普/安捷伦将这两种化学反应依次结合，不用反提取实现了蛋白质水解液氨基酸的全自动衍生、色谱分离、检测和报告 [1]。1988 年开发并销售了商品化的分析仪，总分析时间只有 36 分钟，灵敏度达到飞摩尔水平。这对于生物技术公司和大学的研究人员来说，无疑是迈向正确方向的一步，因为他们的样品非常有限，尤其是在药物研发的早期阶段。

为了使其在商业上可行，需要进行一些化学上的改进：将硫醇换成 3-巯基丙酸 (MPA) 使 OPA 衍生物更稳定；所有一级氨基酸先与 OPA 反应，将一级氨基酸从下一步的反应中定量除去；然后加入 FMOC，FMOC 只与二级氨基酸反应。由于 FMOC、FMOC 衍生物和反应副产物比任何 OPA 衍生物的疏水性都强，所以它们不会干扰任何一级氨基酸的检测。因为只有几种 FMOC 衍生物，所以可以使用简单的两段梯度将这些氨基酸与反应副产物和 FMOC 分离 [1]。详见图 1 和图 2。相应于各个色谱峰的化合物名称见表 1。

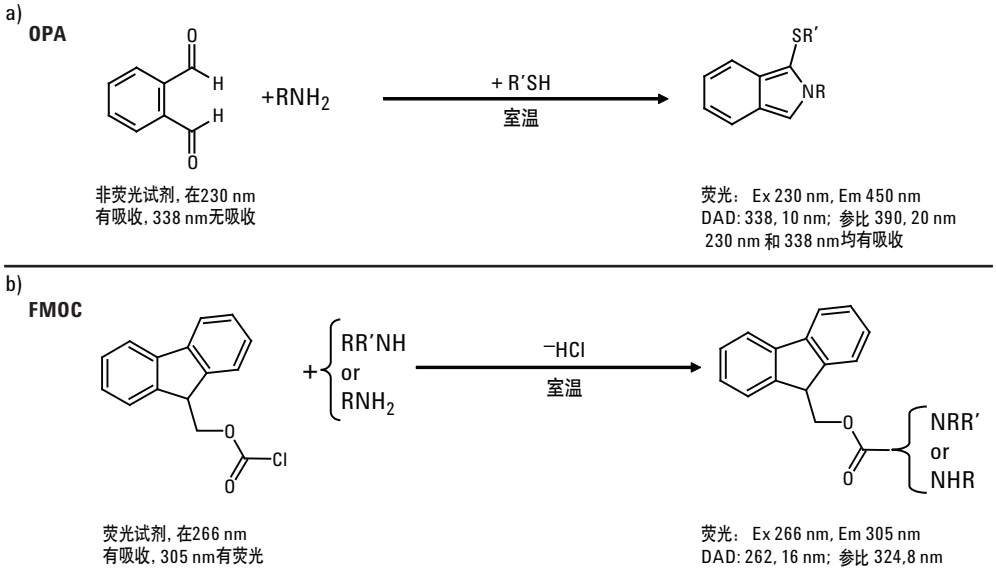


图 1. 邻苯二甲醛 (OPA) 与氯甲酸 9-芴基甲酯 (FMOC) 与胺的反应

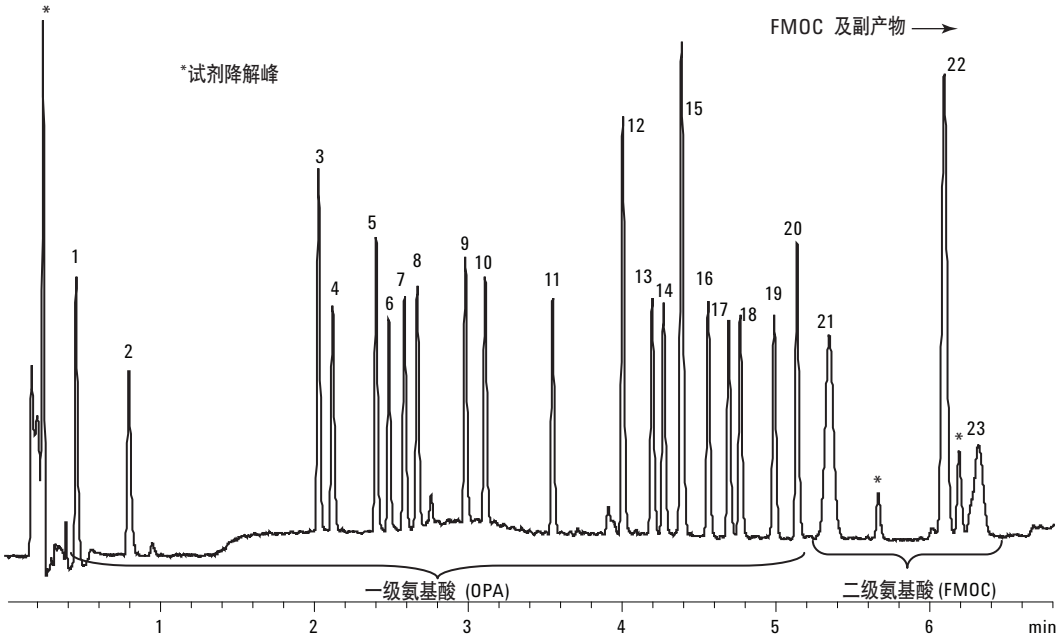


图 2. 用快速分离高通量 Eclipse Plus C18 柱 (4.6 x 50 mm，1.8-µm) 进行氨基酸分析：DAD 检测。柱上浓度为 125 pMoles

表 1. OPA 和 FMOC 氨基酸衍生物的名称和洗脱顺序

峰号	氨基酸名称	氨基酸缩写	衍生物类型
1	天门冬氨酸	ASP	OPA
2	谷氨酸	GLU	OPA
3	天门冬酰胺	ASN	OPA
4	丝氨酸	SER	OPA
5	谷氨酰胺	GLN	OPA
6	组氨酸	HIS	OPA
7	甘氨酸	GLY	OPA
8	苏氨酸	THR	OPA
9	精氨酸	ARG	OPA
10	丙氨酸	ALA	OPA
11	酪氨酸	TYR	OPA
12	胱氨酸	CYS-CYS	OPA
13	缬氨酸	VAL	OPA
14	蛋氨酸	MET	OPA
15	正缬氨酸†	NVA	OPA
16	色氨酸	TRP	OPA
17	苯丙氨酸	PHE	OPA
18	异亮氨酸	ILE	OPA
19	亮氨酸	LEU	OPA
20	赖氨酸	LYS	OPA
21	羟脯氨酸	HYP	FMOC
22	肌氨酸†	SAR	FMOC
23	脯氨酸	PRO	FMOC

† 内标

实验部分

仪器

本文中的结果都是在 Agilent 1200SL HPLC 系统上测定得到的，该系统包含以下组件：

G1312B，SL 型二元泵
G1379B，微量脱气机
G1367C，高性能多孔板自动进样器 (WPS)，配置 54 x 2 mL（前面）和 15 x 6 mL 样品盘（后面）
G1316B，SL 型柱温箱 (TCC)，安装低扩散组件
G1315C，SL 型二极管阵列检测器 (DAD)，配置半微量流通池
G1321A，荧光检测器 (FLD)

仪器上的所有管线内径均为 0.12 mm（0.005 英寸）。

虽然还没有试验过，但较旧的仪器，如 1100 二元泵系统，以及 1100 和 1200 四元泵系统也可以在 4.6 mm 内径柱上完成这些分析。建议没有经过广泛试验不要在这些系统上使用 3.0 mm 和 2.1 mm 内径的柱子，因为使用这些系统延迟体积较大；由于延迟体积效应可能使较早洗脱的峰出现异常。

仪器配置

泵参数：混合器和脉冲阻尼器用 100 mm 长的管线 (0.12 mm 内径)旁路连接，程序设置通过旁路（进样命令 0.1 分钟后；见下面的WPS参数），压缩性设置采用：A = 35，B = 80

流速：2.1 mm 内径柱采用 0.42 mL/min；3.0 mm 内径为 0.85 mL/min；4.6 mm 内径为 2.00 mL/min

梯度时间表：

时间（分钟）	%B
0.0	2.0
1.0	2.0
7.0	57.0
7.1	100.0
8.4	100.0
8.6	2.0
停止时间 8.7	

DAD：PW 0.01 分钟；狭缝 4 nM；停止时间 7 min（根据应用调整）；流通池体积= 5 µl，6 mm 光程（安捷伦部件号 G1315-60025）

信号 A：338，10 nm；参比 390，20 nm

信号 B：262，16 nm；参比 324，8 nm

信号 C：338，10 nm；参比 390，20 nm

信号 D：230，16 nm；参比 360，100 nmM

表 2. 低灵敏度氨基酸标准溶液的配制（按下表步骤稀释样品，配制三种低灵敏度标准溶液）

	氨基酸溶液的最终浓度(pMoles/µL)		
	900	**225**	**90**
取 5 mL 18 nMoles EAA	5 mL	5 mL	5 mL
用 0.1 N HCl 稀释		15 mL	45 mL
稀释的 EAA 混合液	**5 mL**	**20 mL**	**50 mL**
取 5 mL 稀释的 EAA 混合液	5 mL	5 mL	5 mL
加入 10 nMoles 内标溶液	5 mL	5 mL	5 mL
EAA-内标混合液	**10 mL**	**10 mL**	**10 mL**
取 100 µL EAA - 内标混合液	100 µL	100 µL	100 µL
加入 1000 pMoles AA 标准溶液	900 µL	—	—
加入 250 pMoles AA 标准溶液	—	900 µL	—
加入 100 pMoles AA 标准溶液	—	—	900 µL
含 EAA 和 500 pMoles/µL 内标的最终 AA 溶液	**1 mL**	**1 mL**	**1 mL**

信号时间表 C)：0.00 分钟 338，10 nm；参比 390，20 nm；5.53 min 262，16 nm；参比 324，8 nm（根据需要调整；3.0 mm 内径柱大约 5.45 分钟时切换，4.6 mm 内径柱大约 5.4 分钟切换）

FLD：PW 0.01 分钟；停止时间 7 分钟（根据需要调整），流通池易碎，千万不要将这种检测器串联在其它检测器之前 Ex 230 nm；Em 450 nm；滤光片 295 nm（默认滤光片）信号时间表：0.00 分钟 Ex 230 nm，Em 450 nm，PMT Gain 9（根据需要）5.53 分钟 Ex 266 nm，Em 305 nm；PMT Gain 9（根据需要，波长切换时间见 DAD，约增加 0.03 分钟）

TCC：使用时安装低扩散组件；柱子一侧 T = 40 °C，出口侧 30 °C。两侧都使用低扩散组件。

WPS：默认体积设置为 0.5 µl，进样器程序中均采用默认进样速度 200 µl/min

进样器程序

1) 从硼酸盐瓶（安捷伦部件号 5061-3339）中吸取 2.5 µl
2) 从样品瓶中吸取 0.5 µl
3) 在清洗口 5X 混合 3 µl
4) 等待 0.2 分钟
5) 从 OPA 瓶（安捷伦部件号 5061-3335）中吸取 0.5 µl
6) 在清洗口 6X 混合 3.5 µl
7) 从 FMOC 瓶（安捷伦部件号 5061-3337）中吸取 0.4 µl
8) 在清洗口 10X 混合 3.9 µl
9) 从进样稀释液瓶中吸取 32 µl
10) 在清洗口 8X 混合 20 µl
11) 进样
12) 等待 0.10 分钟
13) 不通过阀

表 3. 高灵敏度氨基酸标准溶液的配制（按下表所示配制三种高灵敏度标准溶液）

	氨基酸溶液的最终浓度(pMoles/µL)		
	900	**225**	**90**
取 5 mL 1.8 nMoles EAA	5 mL	5 mL	5 mL
用 0.1 N HCl 稀释	—	15 mL	45 mL
稀释的 EAA 混合液	**5 mL**	**20 mL**	**50 mL**
取 5 mL 稀释的 EAA 混合液	5 mL	5 mL	5 mL
加入 10 nMoles 内标溶液	5 mL	5 mL	5 mL
EAA-内标混合液	**10 mL**	**10 mL**	**10 mL**
取 100 µL EAA-内标混合液	100 µL	100 µL	100 µL
加入 100 pMoles AA 标准溶液	900 µL	—	—
加入 25 pMoles AA 标准溶液	—	900 µL	—
加入 10 pMoles AA 标准溶液	—	—	900 µL
含 EAA 和 50 pMoles/µL 内标的最终 AA 溶液	**1 mL**	**1 mL**	**1 mL**

用于绘制校正曲线的氨基酸混合液

为了建立校正表和校正曲线，将 17 种氨基酸加上 4 种扩展氨基酸组合在一起，配制成各种浓度氨基酸的混合物溶液，内标的量一定。内标 (IS)（正缬氨酸和肌氨酸）是氨基酸辅助试剂盒（部件号 5062-2478）的一部分。这个试剂盒里的其它氨基酸（谷氨酰胺 [GLN]、天门冬酰胺 [ASN]、色氨酸 [TRP]和羟脯氨酸 [HYP]）组成了扩展氨基酸 (EAA)。参见表 2 和表 3，分别配制成相应的低和高灵敏度溶液。

氨基酸标准溶液（10 pMoles/µL 到 1 nMoles/µL）：
将各 1-mL 安瓿的标样（部件号从 5061-3330 到 5061-3334）分成每份 100-µL，置锥形内插管中，加盖，4 °C 冷藏保存。根据实验需要，校正曲线可以用 2 到 5 种标准品制成。

扩展氨基酸 (EAA) 储备液：
该溶液是用氨基酸辅助试剂盒 (部件号 5062-2478) 中 6 种氨基酸中的 4 种配制的。最终浓度为含 18 nMoles/µL 谷氨酰胺、天门冬酰胺、色氨酸和 4 – 羟基脯氨酸的 25 mL 去离子水溶液，用做低灵敏度标准溶液（表 2）。超声振荡使其溶解。4 °C 下保存。将 5 mL，18 nMoles/µL 标样用 45 mL 去离子水稀释，配成 1.8 nMoles/µL 的溶液，用做高灵敏度标准溶液（表 3）。

内标储备液：该溶液是用氨基酸辅助试剂盒（部件号 5062-2478）中 6 种氨基酸中的 2 种配制的。最终浓度为含 10 nMoles/µL 正缬氨酸和肌氨酸的 25-mL 去离子水溶液，用做低灵敏度内标（表 2）。超声振荡使其溶解，在冰箱中保存 (4 °C)。将 5 mL. 10 nMoles/µL 标准溶液用 45 mL 去离子水稀释，配成 1 nMoles/µL 溶液，用做高灵敏度标准（表 3）内标，4 °C 下保存。

HPLC 柱

ZORBAX 快速分离高通量 Eclipse Plus C18，
2.1 x 50 mm，1.8 µm，部件号 959741-902
ZORBAX 快速分离高通量 Eclipse Plus C18，
3.0 x 50 mm，1.8 µm，部件号 959941-302
ZORBAX 快速分离高通量 Eclipse Plus C18，
4.6 x 50 mm，1.8 µm，部件号 959941-902

流动相和进样稀释液

流动相 A：10 mM Na_2HPO_4: 10 mM $Na_2B_4O_7$，pH 8.2: 0.5 mM NaN_3（5.6 克无水 Na_2HPO_4 +15.2 克 $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 溶于 4 L 水 + 32 mgNaN_3）。用 6 mL 浓盐酸将 pH 粗调至 9 左右，然后进一步调至 pH 8.2。***使用强酸时需小心***。用 0.45 µm 再生纤维素膜过滤（安捷伦部件号 3150-0576）。在室温下约 1.5 周内稳定。

流动相 B：乙腈：甲醇：水（45:45:10，体积比）。所有流动相溶剂必须为 HPLC 级。

进样稀释液：100 ml 流动相 A + 1，500 µL 浓 H_3PO_4 置于 100-mL 瓶中。4 °C 保存。用前分装至 6-mL 样品瓶中。***使用强酸时需小心***。

氨基酸分析所用的所有消耗品名称和部件号见*订购信息*。

衍生化试剂

硼酸盐缓冲液：安捷伦部件号 5061-3339
0.4 N 水溶液，pH 10.2。4 °C 保存。必要时可分装。

FMOC 试剂：安捷伦部件号 5061-3337
从 1-mL FMOC 试剂中吸取每份 200-µL，置锥形内插管中，立刻加盖，冷藏 (4 °C)；分装后如保存在 4 °C，最多 7 到 10 天内可用；如在室温下保存，1 天内可用。

OPA 试剂：安捷伦部件号 5061-3335
从 1-mL OPA 试剂中吸取每份 200-µL，置锥形内插管中，立刻加盖，冷藏 (4 °C)；分装后如保存在 4 °C，最多 7 到 10 天内可用；如在室温下保存，1 天内可用。

水：去离子水，HPLC 级。

氨基酸分析所用的所有消耗品名称和部件号见*订购信息*。

样品制备

本文所分析的各种瓶装啤酒样品从当地获得。制备时只需简单的超声脱气。由于碳酸饮料超声时可能引起瞬间爆炸，操作时必须小心。建议将啤酒倒入比其体积大得多的广口烧杯中，以便容纳产生的大量泡沫。

结果与讨论

分离条件的选择

在本应用中，我们采用了新的方法，使氨基酸分析可以在范围更广泛的色谱柱上进行。我们报告的结果是在快速分离高通量 Eclipse Plus C18 柱上得到的，这些 4.6-、3.0-和 2.1-mm 内径柱的填料粒径都是 1.8-µm，柱长都是 50-mm。每个方法的唯一区别是流速，从而可以保持相同的线速度、检测器波长切换时间，这样，二级氨基酸可以包含在同一个的色谱图中。

我们也用快速分离高通量 Eclipse Plus C8 柱和快速分离高通量 Eclipse XDB-C18 柱与 C8 柱上进行了分离，这些柱子都填充了 1.8-µm 填料，规格也相同（本文未给出数据）。所有柱子都得到了与快速分离高通量 Eclipse Plus C18 柱非常相似的结果（本文未给出

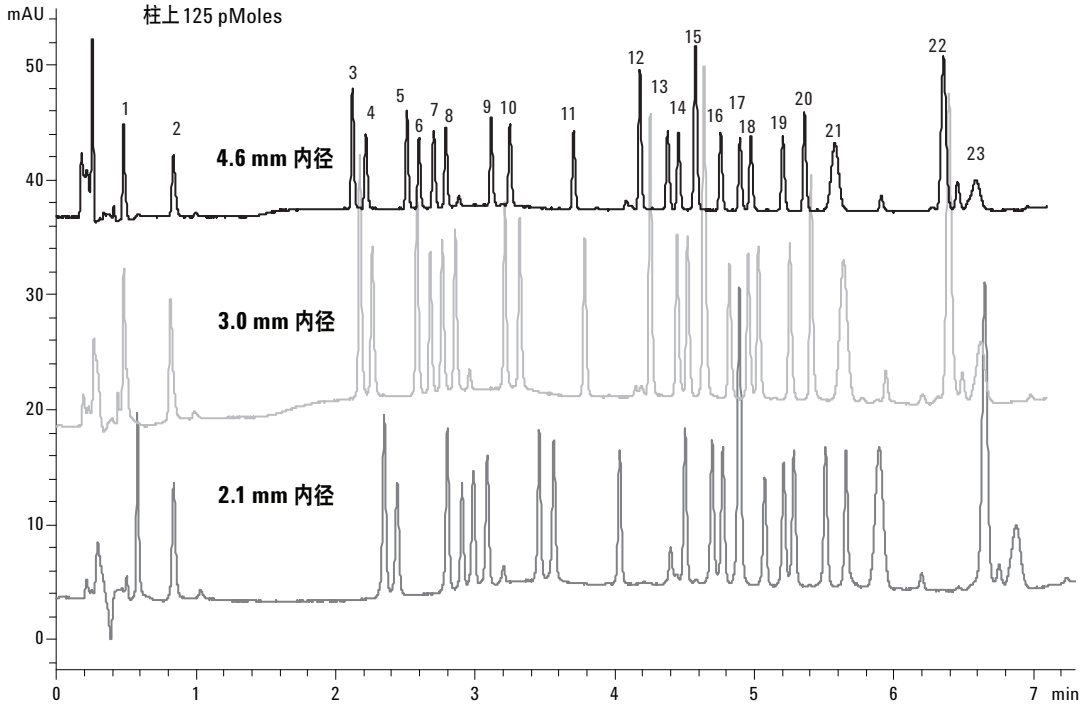


图 3. 用各种不同内径快速分离高通量 Eclipse Plus C18，50 mm 长，1.8-µm 粒径色谱柱进行氨基酸分析，DAD 检测

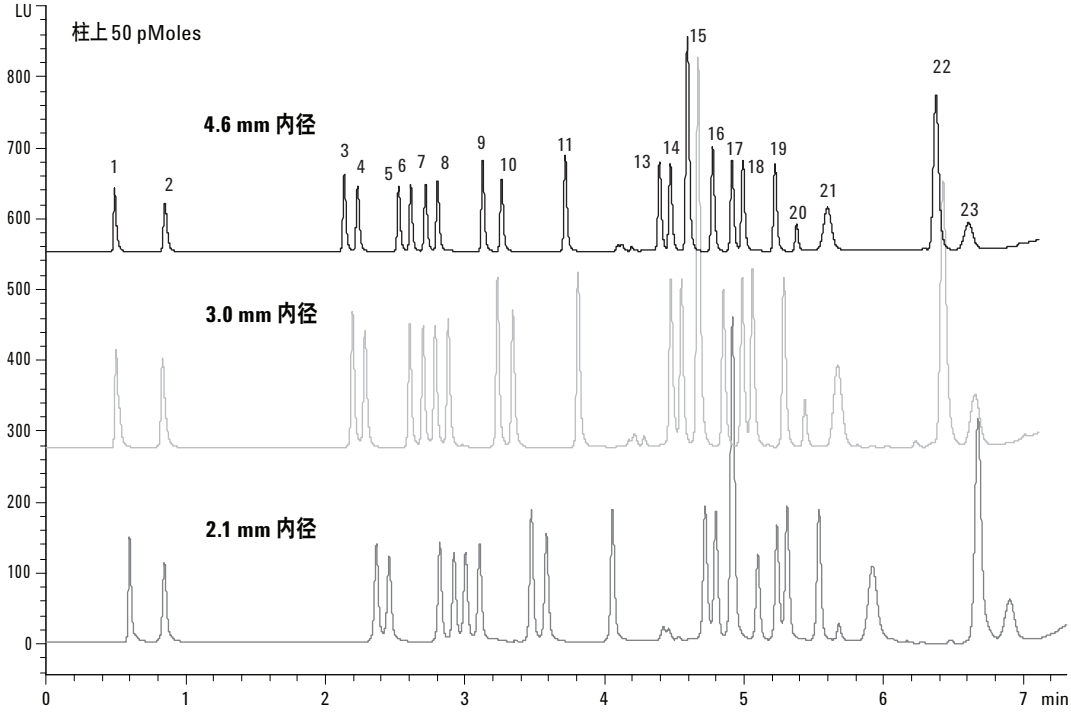


图 4. 用各种不同内径快速分离高通量 Eclipse Plus C18，50 mm 长，1.8-µm 粒径色谱柱进行氨基酸分析，FLD 检测

数据）。在不同尺寸快速分离高通量 Eclipse Plus C18 柱上得到的相应的分离结果见图 3 和图 4，分别为 DAD 和 FLD 检测。可以看出，不管用哪种规格的色谱柱，所有色谱图的保留时间只有微小的变化。这些变化是由三种不同尺寸柱子延迟时间的微小差异造成的。因为延迟体积是恒定的，所以流速越高延迟时间越短。

重复性和线性

在以前的这类分析中，二级氨基酸的重复性总是比一级氨基酸差 [1-4]。本文报道的方法中，我们提高了二级氨基酸的重复性，使其与一级氨基酸相当。在 ZORBAX Eclipse Plus-C18，2.1-mm 内径柱上分析所得到的相关数据见表 4 和表 5（不带内标），4.6-mm 内径柱见表 6（带内标）。表 4 中的绝对峰面积重复性好，所有氨基酸的平均 RSD 低于 2%，只有 2 个在 3% 以上。请注意，表 5 和表 6 中显示所有氨基酸的线性也非常好，所有氨基酸 R^2 都接近 1.00，加内标的要更好一些。用 Eclipse Plus-C18，3.0-mm 内径柱不加内标的分析结果见图 5 和图 6。图 7 可见在 Eclipse Plus-C18，2.1 内径柱上进行低浓度氨基酸分析（柱上 5.0 pMoles）的色谱重复性。上下重叠的图谱可以很容易地比较保留时间的重复性和色谱峰大小。这些是原始数据，没有校正，也没加内标。

表 4. 用 Agilent 1200SL HPLC 系统在快速分离高通量 Eclipse Plus C18，2.1 x 50 mm，1.8-µm 色谱柱，不加内标的绝对峰面积重复性

检测器重复性 50 pMoles FLD；125 pMoles DAD；原始数据峰面积			
		FLD RSD	DAD RSD
氨基酸名称	缩写	(n = 10)	(n = 12)
天门冬氨酸	ASP	1.1	0.8
谷氨酸	GLU	0.8	2.3
天门冬酰胺	ASN†	1†	1.6†
丝氨酸	SER	0.9	1
谷氨酰胺	GLN*	2.9*	2.1*
组氨酸	HIS	0.8	2.1
甘氨酸	GLY	1	1.4
苏氨酸	THR	1.2	0.9
精氨酸	ARG	1	1.9
丙氨酸	ALA	0.9	.3
酪氨酸	TYR	1	1
胱氨酸	CYS-CYS	NA	1.1
缬氨酸	VAL	1.5	0.9
蛋氨酸	MET	2.7	0.8
正缬氨酸	NVA	3.3	2.3
色氨酸	TRP	1.3	1.1
苯丙氨酸	PHE	1	0.9
异亮氨酸	ILE	0.9	1.5
亮氨酸	LEU	2.1	0.7
赖氨酸	LYS	4.4	0.8
羟脯氨酸	HPA	1.8	1.7
肌氨酸	SAR	1.9	2.3
脯氨酸	PRO	3.0	2.2
平均 RSD =		1.7	1.4

†天门冬酰胺在溶液中不太稳定
*谷氨酰胺在溶液中非常不稳定

表 5. Agilent 1200SL HPLC 系统在快速分离高通量 Eclipse Plus C18，2.1 x 50 mm，1.8-µm 色谱柱上，不加内标进行氨基酸分析的线性

	用峰面积原始数据	
	DAD	FLD
氨基酸	线性相关系数 (r^2)	线性相关系数 (r^2)
ASP	0.9949	0.9992
GLU	0.9976	0.9995
ASN†	0.9928†	1.0000†
SER	0.9933	0.9997
GLN*	0.9966*	0.9937*
HIS	0.9951	0.9996
GLY	0.9931	0.9996
THR	0.9942	0.9996
ARG	0.9960	0.9998
ALA	0.9965	0.9996
TYR	0.9936	0.9997
CYS-CYS	0.9818	NA
VAL	0.9952	0.9998
MET	0.9944	0.9997
NVA	0.9989	0.9991
TRP	0.9923	0.9987
PHE	0.9925	0.9996
ILE	0.9934	0.9993
LEU	0.9944	0.9994
LYS	0.9857	0.9957
HYP	0.9980	0.9924
SAR	0.9975	0.9960
PRO	0.9981	0.9969

†天门冬酰胺在溶液中不太稳定
*谷氨酰胺在溶液中非常不稳定

表 6. Agilent 1200SL HPLC 系统在快速分离高通量 Eclipse Plus C18，4.6 x 50 mm，1.8-µm 色谱柱上，加内标进行氨基酸分析的线性

	用峰面积原始数据	
	DAD	FLD
氨基酸	线性相关系数 (r^2)	线性相关系数 (r^2)
ASP	0.99995	0.99887
GLU	0.99916	0.99879
ASN†	1.00000†	0.99581†
SER	0.99982	0.99880
GLN*	0.99996*	0.99549*
HIS	0.99978	0.99993
GLY	0.99982	0.99681
THR	0.99996	0.99941
ARG	0.99993	0.99946
ALA	0.99984	0.99924
TYR	0.99991	0.99946
CYS-CYS	0.99992	NA
VAL	0.99992	0.99886
MET	0.99992	0.99996
NVA	IS+	IS+
TRP	0.99997	0.99687
PHE	0.99988	0.99943
ILE	0.99973	0.99910
LEU	0.99986	0.99932
LYS	0.99956	0.99979
HYP	0.99991	0.99751
SAR	IS+	IS+
PRO	0.99998	0.99979

†天门冬酰胺在溶液中不太稳定
*谷氨酰胺在溶液中非常不稳定
+DAD 检测时内标的柱上浓度为 250 pMole，FLD 检测时内标的柱上浓度为 25 pMole

扩展氨基酸 (EAA) 和内标 (IS)

有几种氨基酸在蛋白质酸水解过程中会被破坏（天门冬酰胺、谷氨酰胺和色氨酸），还有一种氨基酸除了结构蛋白（羟脯氨酸）外，在其它地方几乎不存在。此外，许多分析人员愿意在样品中使用内标，以改善准确度和重复性。为了得到最好的结果，需要谨慎选择内标。通常在下列两种样品处理步骤中加入内标：

1. 在进行任何样品处理之前加到样品中（如，酸水解之前）。它将较正可能发生的所有改变，当然，内标应对水解稳定，并与样品中的其它组分进行相同的衍生化反应。为了正确地使用这种方法，标准品也应该水解；但这通常会带来更多的变数，因为各种氨基酸的稳定性不同。丝氨酸就是一个例子，它随着水解时间的延长逐渐被破坏。因此使用内标非常有用。
2. 仅在分析前加入，将较正体积量取误差和自动进样器的偏差，同样假设内标和样品组分具有同样的反应性。本应用中采用的是这种方法。

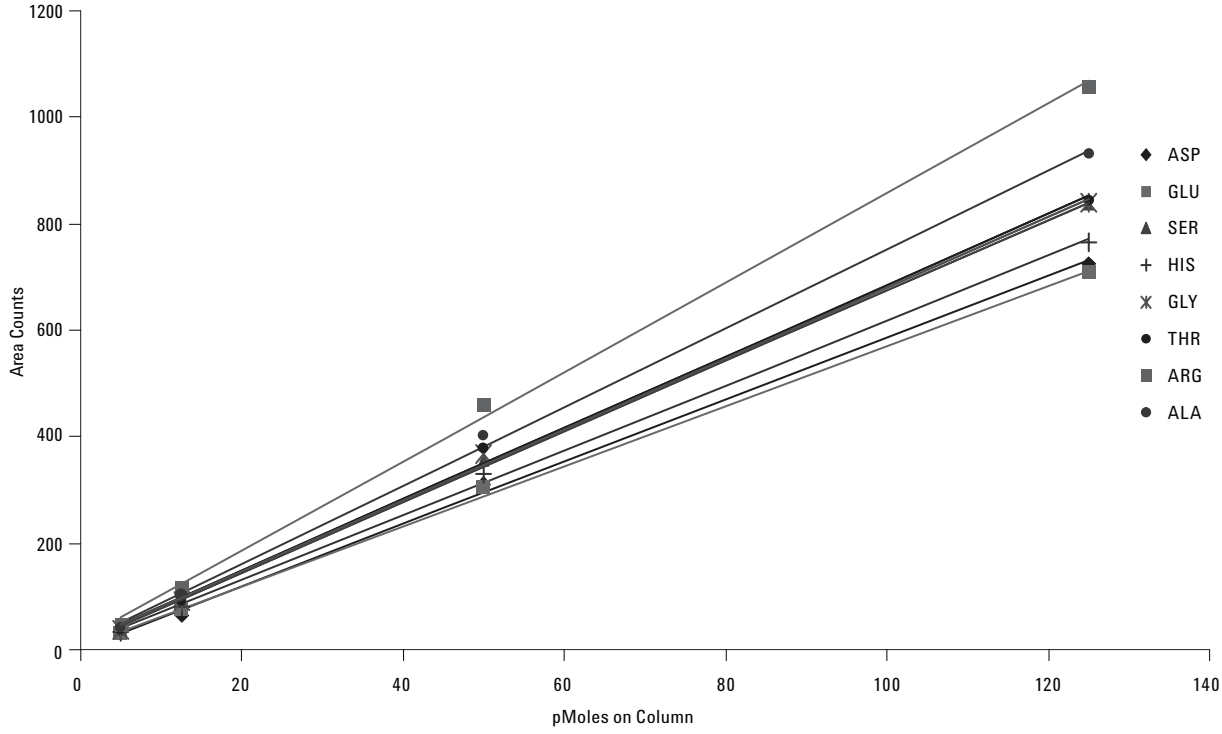


图 5. 在快速分离高通量 Eclipse Plus C18，3.0 x 50 mm，1.8 µm 色谱柱上，用 FLD 检测的氨基酸线性

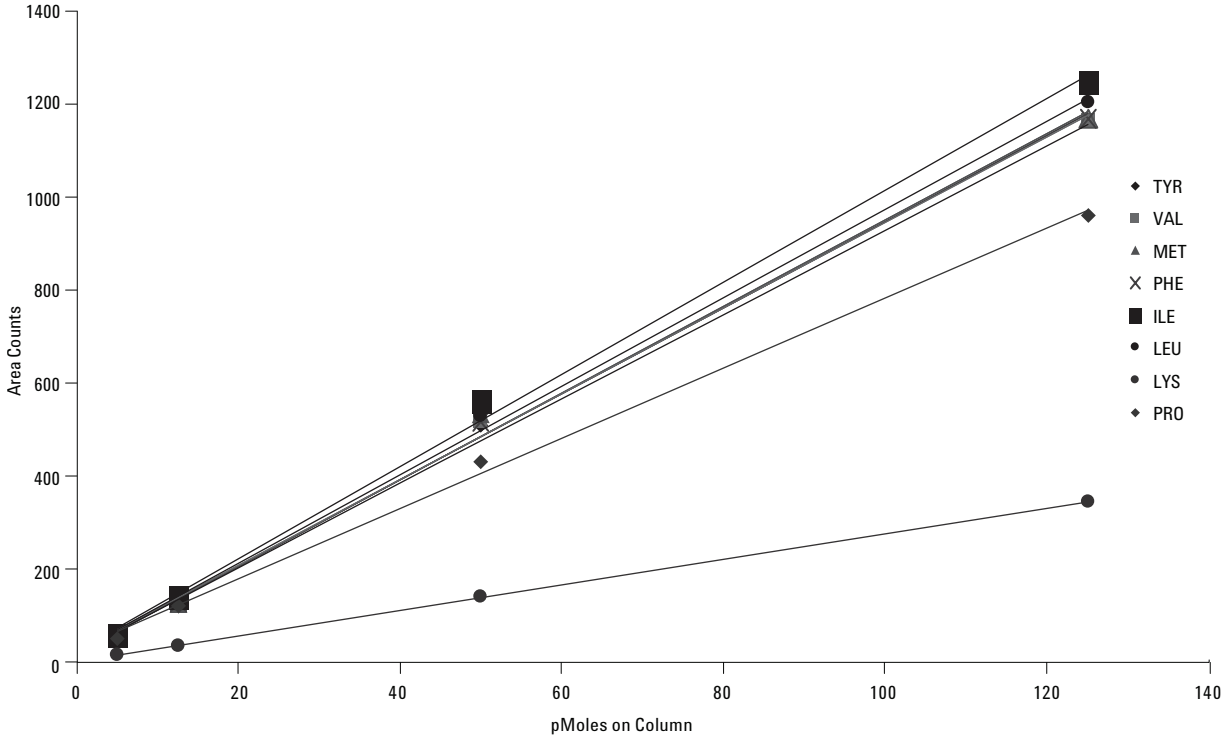


图 6. 在快速分离高通量 Eclipse Plus C18，3.0 x 50 mm，1.8 µm 色谱柱上，用 FLD 检测的氨基酸线性

这里报道的 OPA/FMOC 分析中，可以使用两种内标：一级氨基酸用正缬氨酸，二级氨基酸用肌氨酸。两种方法都可以用这些氨基酸作为内标（未列出数据），但方法 2 肯定是首选方法。上述 4 种氨基酸 (EAA) 都包含在安捷伦氨基酸辅助试剂盒 (P/N 5062-2478) 的标准品内。这些氨基酸用本文介绍的氨基酸分析新方法都可以完全分离。在快速分离高通量 Eclipse Plus C18，2.1，3.0，或 4.6 x 50 mm，1.8-µm 色谱柱上的分离见图 3 和图 4。这两张图都包含内标正缬氨酸和肌氨酸，FLD 色谱图中的柱上浓度是 100 pMole，DAD 的柱上浓度是 250 pMole，图中均有显示。添加 EAA 和内标的步骤已有报道 [4]。这一步骤可用于绘制实际样品定量分析的内标校正表。这一步骤在实验部分已做介绍，并列于表 2 和表 3 中。

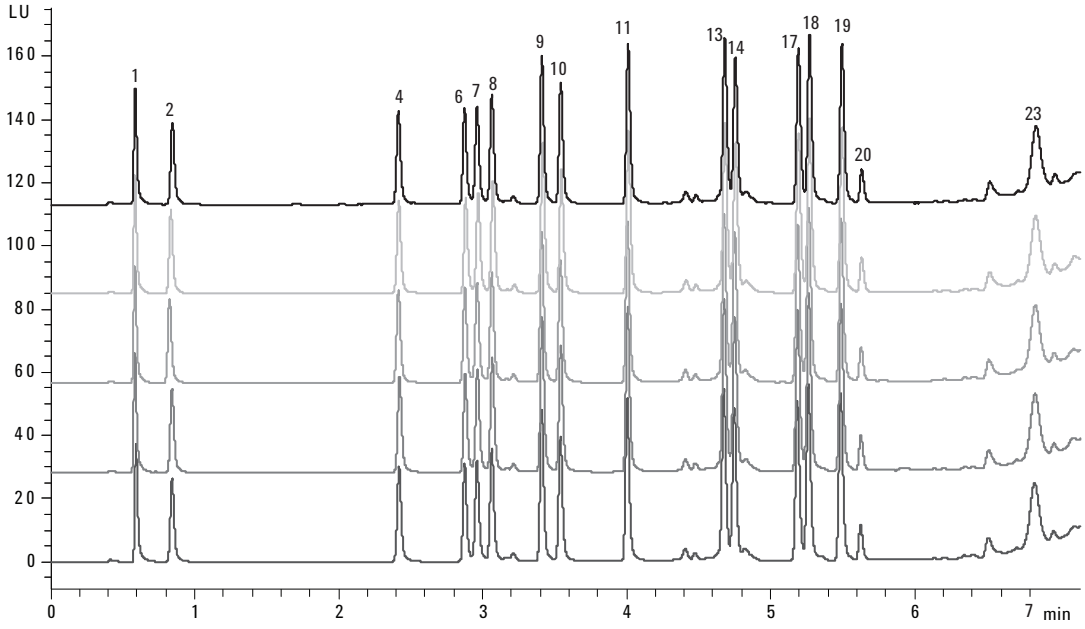


图 7. 快速分离高通量 Eclipse Plus C18，2.1 x 50 mm，1.8 µm 色谱柱，FLD 检测，不加内标柱上 5.0 pMole 氨基酸分析的重复性

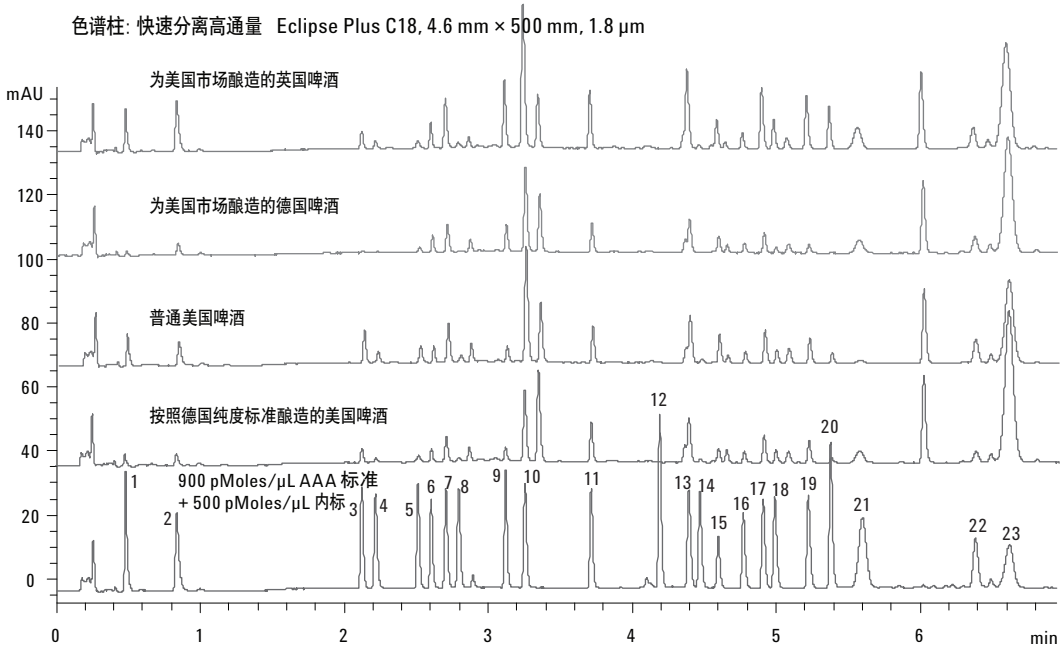


图 8. 用 1200 SL 系统，DAD 检测，加内标比较美国市场上的各种啤酒

实际样品

图 8 显示了各种窖装啤酒的比较结果。每种啤酒中均加入了 500 pMoles/µL 的内标，从而可以比较计算出的相对氨基酸含量。比较结果显示，这些啤酒的相对氨基酸含量与人们感觉并不一致，人们认为“普通”美国啤酒的氨基酸含量比传统德国啤酒要低。结果显示，至少有一些德国和英国啤酒生产商现在酿造符合美国口味的啤酒销往美国。有可能这种美国的微酿啤酒与为德国销售酿造的啤酒更一致，因为它的酿造符合德国纯度标准，因此，“传统的”德国酿造更有代表性。结果列于表 7。

酸水解和后续的氨基酸分析在蛋白质分析中普遍使用。在实验室和目前生物技术和制药公司都在执行的新的过程分析技术 (PAT) 中，也对细胞培养基进行监测。有关这些领域氨基酸分析的文章将随后发表。

表 7. 各种啤酒氨基酸含量的比较

氨基酸	普通美国啤酒 µMoles /mL	按照德国纯度标准酿造的美国啤酒 µMoles /mL	为美国市场酿造的德国啤酒 µMoles /mL	为美国市场酿造的英国啤酒 µMoles /mL
ASP	1.06	0.73	0.26	1.15
GLU	1.07	0.93	0.80	1.98
ASN	1.19	0.98	0.14	0.54
SER	0.45	0.40	0.12	0.26
GLN	0.67	0.76	0.38	0.33
HIS	0.68	1.00	1.07	0.89
GLY	1.54	2.00	1.61	1.57
THR	0.30	0.34	0.74	0.20
ARG	0.48	0.94	1.29	1.83
ALA	4.28	5.14	4.56	4.60
TYR	1.36	2.86	1.65	1.77
CYS-CYS	0.08	0.10	0.08	0.05
VAL	1.92	3.35	1.93	2.83
MET	0.17	0.27	0.11	0.16
NVA	IS	IS	IS	IS
TRP	0.58	1.07	0.80	0.67
PHE	1.33	2.21	1.23	2.07
ILE	0.54	0.97	0.34	0.94
LEU	1.02	1.71	0.55	1.75
LYS	0.30	0.32	0.08	0.90
HYP	0.20	1.74	1.17	1.26
SAR	IS	IS	IS	IS
PRO	8.65	34.84	15.88	10.29
合计 =	27.9	62.7	34.8	36.0

结论

本工作对氨基酸分析方法进行了各方面的改进。使用 1.8-µm 粒径色谱柱可使分析周期缩短一半，从 35 分钟左右缩短到 13.5 分钟左右。最早洗脱的天门冬氨酸和谷氨酸的峰形都得到了改善。提高了二级氨基酸，以及反应最慢的氨基酸，如赖氨酸的重复性。线性良好（r^2 接近 1），平均峰面积重复性低于 2%。报道了各种内径（从 2.1 到 4.6 mm）的新快速分离高通量 Eclipse Plus C18，1.8-µm 柱的使用。新的流动相和进样器条件非常简单，只要简单地改变流速就可以在 2.1-到 3.0-或 4.6-mm 内径柱之间进行转换。也可以使用快速分离高通量 Eclipse Plus C8 或快速分离高通量 Eclipse XDB-C18 或-C8 柱（数据未显示）。

参考文献

1. Rainer Schuster and Alex Apfel, Hewlett-Packard App. Note, **5954-6257** (1986)
2. Rainer Schuster, *J. Chromatogr.*, **431**, 271-284 (1988)
3. Herbert Godel, Petra Seitz, and Martin Verhoef, LC-GC International, **5(2)**, 44-49 (1992)
4. John W. Henderson, Robert D. Ricker, Brian A. Bidlingmeyer, and Cliff Woodward, Agilent App. Note, **5980-1193E** (2000)
5. S. Moore and W.H. Stein, *J. Biol. Chem.*, **192**, 663 (1951)
6. M. Roth, *Anal Chem*, **43**, 880-882 (1971)
7. S.B. Einarsson, B. Josefsson, and S. Lagerkvist, *J. Chromatogr.*, **282**, 609-618 (1983)
8. I. Betnér and P. Földi, LC-GC International, **2(3)**, 44-53 (1989)
9. B. Gustavsson and I. Betnér, *J. Chromatogr.*, **507**, 67-77 (1990)

ZORBAX 快速分离高通量 Eclipse Plus C18 HPLC 柱

说明	尺寸 (mm)	粒径 (µm)	安捷伦部件号
Eclipse Plus C18	4.6 x 50 mm	1.8 µm	959941-902
Eclipse Plus C18	3.0 x 50 mm	1.8 µm	959941-302
Eclipse Plus C18	2.1 x 50 mm	1.8 µm	959741-902

衍生化试剂

说明	安捷伦部件号
硼酸盐缓冲液 0.4 M 水溶液 pH 10.2，100 mL	5061-3339
FMOC 试剂，2.5 mg/mL 乙腈溶液，10 x 1 mL 安瓿	5061-3337
OPA 试剂，10 mg/mL 溶于 0.4 M 硼酸盐缓冲液 和 3-mercaptoproprionic acid，6 x 1 mL 安瓿	5061-3335
用于半胱氨酸分析的 DTDPA 试剂，5 g	5062-2479

流动相和进样稀释液成分

说明	厂商	厂商部件号
Na_2HPO_4，无水磷酸氢二钠	Sigma	71639
$Na_2B_4O_7.10H_2O$，硼砂	Sigma	S 9640
NaN_3，叠氮钠	Sigma	S 2002
H_3PO_4，磷酸	Sigma	79617

样品瓶

说明	安捷伦部件号
100-µL 带聚合物支脚的锥形内插管，100/pk	5181-1270
棕色，广口，带书写标签的螺口样品瓶，2 mL, 100/pk	5182-0716
蓝色聚丙烯盖，PTFE/硅树脂隔垫，100/pk	5182-0721
透明玻璃螺纹口样品瓶，6 mL, 16 mm 盖，100/pk	9301-1377
螺纹盖，16 mm, 100/pk	9301-1379
PTFE/硅树脂隔垫，16 mm, 100/pk	9301-1378

氨基酸标样

说明	安捷伦部件号
氨基酸标准溶于 0.1 M HCl, 10 x 1 mL 安瓿	
1 nMoles/µL	5061-3330
250 pMoles/µL	5061-3331
100 pMoles/µL	5061-3332
25 pMoles/µL	5061-3333
10 pMoles/µL	5061-3334
氨基酸辅助试剂盒：Nva, Sar, Asn, Gln, Trp, Hyp，各 1 g 5062-2478	5062-2478

用安捷伦制备 C18 柱放大花青素的分离规模并对收集的馏分进行再分析

应用

生物化学

作者

Cliff Woodward

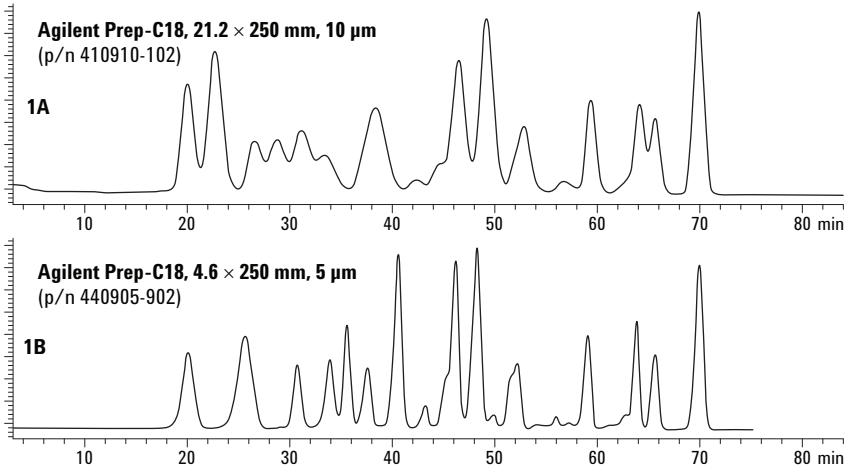
花青素是一种有效的抗氧化剂，现在已被公认为是很多食品中所含有的有益健康的重要成分。而在所有天然食物中，蓝莓的花青素含量最高。要弄清楚究竟什么成分对人类的健康最有利，对不同来源的花青素的纯化和鉴定是非常重要的。花青素在 C18 柱上有强保留；并且，他们需要高浓度的有机溶剂来萃取。为了能够分离某些成分并得到足够的量以作为标样或进行结构鉴定，分析工作者可能会遇到溶解性问题，而这一问题限制了上样量。过去曾进行过花青素上样量影响因素的研究工作[1]。

提示

- 安捷伦制备 C18 柱具有优异的放大能力，提供相应的分析柱进行方法开发
- 安捷伦制备 C18 柱具有高分离度、保证获得高度纯化的馏分
- 安捷伦化学工作站的纯化软件和安捷伦制备 C18 柱使复杂的馏分纯化工作变得简单

Agilent 1100 高效液相色谱系统和制备 C18 柱

分离纯化的第一步就是证明它确实能够放大分离规模。一旦弄清楚，进行色谱分离就非常简单了。被收集的馏分可以重新进行色谱分析以证明它的纯度。图 1 给出安捷伦制备 C18 柱的分离结果。当然，分析柱比制备柱的分离度要更好一些。



1A
Agilent Prep-C18 柱，21.2×250 mm，10 µ

温度：	室温
DAD 波长：	525 nm
进样量：	2000 µL
样品：	蓝莓提取物，46.1 mg/mL 总溶解物 (~5 mg/mL 花青素)
流量：	21.2 mL/min

1B
Agilent Prep-C18 柱，4.6×250 mm，5 µ

温度：	室温
DAD 波长：	525 nm
进样量：	100 µL
样品：	蓝莓提取物，46.1 mg/mL 总溶解物 (~5 mg/mL 花青素)
流量：	1.0 mL/min

流动相

A = 0.1%三氟乙酸水溶液
B = 0.1%三氟乙酸甲醇溶液

梯度时间表

时间 (min)	%溶剂 B
0.00	23.0
35.00	26.0
85.00	53.5

图 1. 在安捷伦制备柱上的放大

通过化学工作站的馏分收集软件，得到的馏分比预想的要纯得多。见图 2。馏分 1 是翠雀苷-3-半乳糖苷，纯度 >99%，馏分 2 是翠雀苷-3-葡糖苷，纯度 >97%。这一纯度是利用软件中阈值和斜率的设定适当切取馏分而获得的。馏分的定性是通过液相色谱/质谱联用来实现的(没有给出数据)。

下面的在 Agilent Prep-C18 柱上的分离条件同图 1。

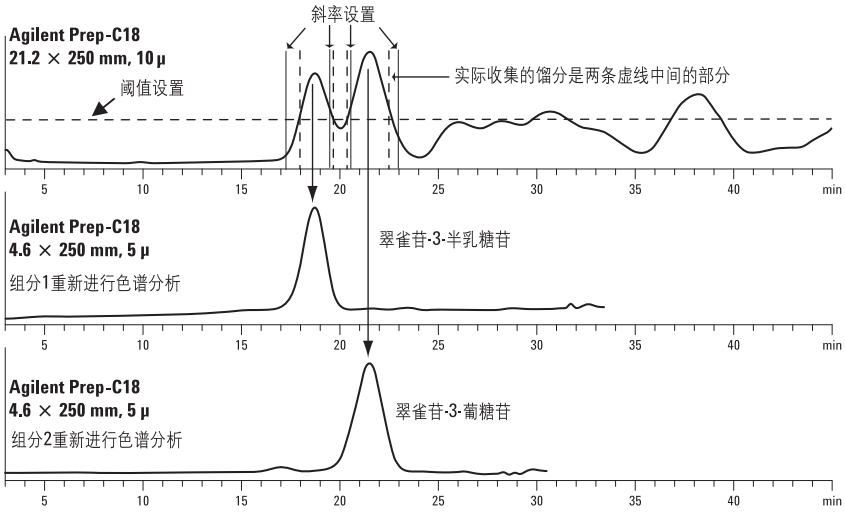


图 2. 馏分收集和重新进行色谱分析以验明纯度

参考文献

1. "Scalability and Volume Loadability for Highly Retentive Compounds - Anthocyanins", (2004) *Separation Times*, **17**, 1.

提高快速高效分离方法转换的效率

应用

作者

Michael Woodman
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

由于亚二微米色谱柱的日益普及，以及对质谱友好方法的需求不断增加，亟需将已有的 HPLC 方法转化到直径和粒径较小的色谱柱上运行。尽管这种转化只是通过简单的数学运算按比例调整流速、梯度时间和进样量，仍有很多用户无法得到最佳结果。本文中，我们仔细分析了这个问题，并给出能够以更可预测和更有效的方式提高分析速度和/或分离度的计算方法。

引言

在填充有大粒径的 5 或 10 µm 填料的老色谱柱上开发的方法，经常可以通过改用粒径和直径更小的色谱柱而使方法更加现代化。它具有缩短分析时间，降低溶剂消耗，提高灵敏度，更易与质谱仪的离子源兼容等潜在的优点。简而言之，一根 5 µm 粒径、250 mm 柱长的色谱柱可以被 3 µm 粒径、150 mm 柱长的色谱柱所取代。如果长度与粒径的比例相等，则认为这两根色谱柱具备相同的分离能力。溶剂消耗量减少的比例为 L1/L2，在这里，每次分析的溶剂耗量降低 1.6 倍。如果可以成功注入相等质量的被分析物，由于其以相同的柱效在一根较小的色谱柱中运行，色谱峰的稀释作用降低了，因而灵敏度也将提高至 1.6 倍。

已经得到证实，与一般的 LC/UV (UV/Vis 光学检测) 方法相比，LC/MS（液相色谱/质谱）离子源在较低的流速下灵敏度更高，电喷雾离子化方式尤其如此。因此，如能减小色谱柱的内径，则将有助于在较低的流速下提高单位时间的分析能力。不同色谱柱直径与流速的变化关系见式 1。

$$\text{流速}_{\text{柱 1}} \times \left[\frac{\text{直径}_{\text{柱 2}}}{\text{直径}_{\text{柱 1}}}\right]^2 = \text{流速}_{\text{柱 2}} \qquad \text{(式 1)}$$

柱长和直径减小的联合效应表现在降低溶剂消耗量，并且如果假设可以将相同质量的被分析物注入较小的色谱柱，色谱峰响应将有相应比例的提高。不过，我们一般根据色谱柱的大小来按比例调整进样量。进样

量的调整比例可以通过原色谱柱的进样量乘以两根色谱柱的空体积比值计算得到。

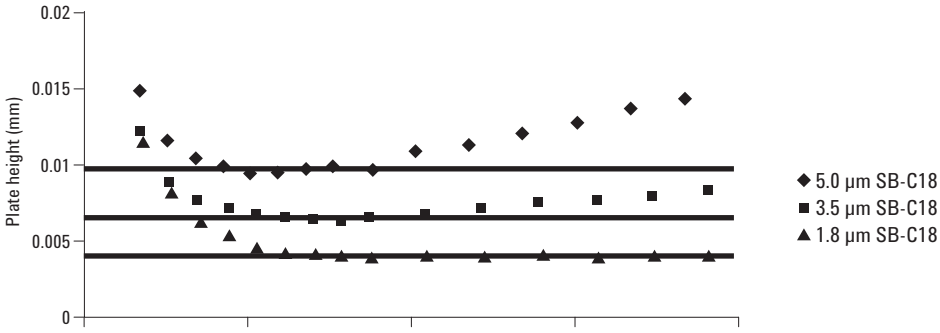
$$\text{进样量}_{\text{柱 1}} \times \left[\frac{\text{空体积}_{\text{柱 2}}}{\text{空体积}_{\text{柱 1}}}\right] = \text{进样量}_{\text{柱 2}} \quad \text{(式 2)}$$

对于等度洗脱，在上述条件下一般可以得到很好的方法转换结果，总体分离度没有或几乎没有变化。然而，如果希望改善方法转换的效果，还应考虑其它参数的影响。第一，是柱效与流速的关系，或者更确切地说，柱效与 van Deemter [1] 和他人所提出的线速度之间的关系；第二，是通常被忽略的柱外扩散效应对实际柱效或经验柱效的影响。

Van Deemter 发现并给出了柱效与一系列参数之间关系的数学表达式，但是这里我们最感兴趣的，是对于任何一个给定粒径的 HPLC 填充柱，其存在最佳线速度，并且最佳线速度随着粒径的减小而提高。直观起见，常以图 1 代表 van Deemter 图，这是在原图基础上修改后的版本 [2]。

由图 1 可见，在作者设定的条件下，5 µm 填料在 1 毫米/秒时具有最佳的线速度。3.5 µm 填料的最佳线速度约为 1.7 毫米/秒，并且没有特别明显的最优值，表明 3.5 µm 填料在更大的流速范围内可以获得更稳定的柱效。对于 1.8 µm 填料，其最小板高（或最高柱效）的范围很宽，从 2 mm/秒开始，所有的数据都一样。这一信息对于实际应用而言，就是之前讨论的，可以通过提高线速度进一步缩短分析时间，从而常常可以进一步优化小颗粒填料的色谱方法。洗脱速度的提高，使得绝对峰宽降低，可能要求用户提高数据采集速率，减小信号过滤参数，以确保色谱分离被准确记录于采集的数据文件中。

第二点重要的考虑是通常被忽略的柱外扩散效应对实际柱效或经验柱效的影响。随着柱体积的降低，色谱峰洗脱体积也成比例地降低。如果同时还应用了较小粒径的填料，预期的峰体积会进一步降低。液相色谱是由许多毛细管和接头组成的，被分析物通过的区域尤其如此，这些将产生可测量的峰展宽。从进样器到流通池，所累积的扩散将降低色谱柱的性能，并且使



Lin. vel.	mm/sec	1	2	3	4	5
4.6 mm	mL/min	0.7	1.4	2.1	2.8	3.5
3 mm	mL/min	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5
2.1 mm	mL/min	0.14	0.29	0.44	0.58	0.73
1 mm	mL/min	0.033	0.066	0.1	0.133	0.166

图 1. 用不同流速和填料粒径测得的 Van Deemter 曲线

得实测柱效远远低于由纯理论的方式得到的估计值。在一个 HPLC 系统中，检测到 20～100 µL 的扩散量是相当普遍的。对于最小的色谱柱和最小的粒径，两者应该得到最小的峰体积，而扩散效应对其色谱峰的影响是不成比例的。用户应注意减小柱外体积，即在实际使用时，可减少连接接头的用量以及进样阀和检测器流通池的体积。

对于梯度洗脱分离，从分析的开始阶段直到目标被分析洗脱，流动相的组成不断增加，成功地将方法转换到较小的色谱柱上时，要求保持梯度斜率不变。尽管许多出版物都以每分钟的变化量 (%) 来表示梯度斜率，以相对于柱体积的变化量 (%) 来表示更为有用。这样，能够准确地把方法转换中产生的柱体积变化考虑进新的梯度条件中。如果我们把梯度表中的每一段变化看作一个区段，可以通过下式来表示梯度斜率：

$$\text{梯度斜率} = \left[\frac{(\text{结束 \%} - \text{开始 \%})}{\text{\# 柱容量}} \right] \quad \text{(式 3)}$$

注意，对于用户而言，与每分钟的变化量%相比，使用相对于柱体积的变化量 % 更容易通过改变梯度分离时间或流速来调节梯度斜率。如梯度斜率大，则梯度变化大且分离度较小，而较小的梯度斜率可得到较高的分离度，但在同时，溶剂消耗量增加，灵敏度降低。如果梯度时间增长，分析时间也会更长，除非是在允许的运行压力范围内通过增加流速来降低梯度斜率。

分离度随梯度斜率的减小而提高，这是因为有效体积因子 k^* 增大了。和等度分离类似，体积因子称为 k’，该值增大，将直接导致分离度的提高。k 值约在 5～10 之间时，这一效应非常明显，而超出这一范围后的影响极为有限。以下的例子中，我们将看到与上述讨论相关的计算结果。

实验条件

系统

Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱，包括：
G1379B 微量脱气机
SL 型 G1312B 二元泵
SL 型带温控的 G1367C 自动进样器
SL 型 G1316B 柱温箱
SL 型 G1315C UV/VIS 二极管阵列检测器，流通池条件在各色谱峰中列出
32 位 ChemStation，B.02.01 版

色谱柱

Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 mm × 250 mm, 5 µm
Agilent ZORBAX SB-C18, 3.0 mm × 150 mm, 3.5 µm

流动相条件

有机相： 乙腈

水相： 25 mM 磷酸的 Milli-Q 水溶液

梯度条件

梯度斜率：以柱体积计，7.8% 或 2.3%，如图所示。流速和时间见各色谱图

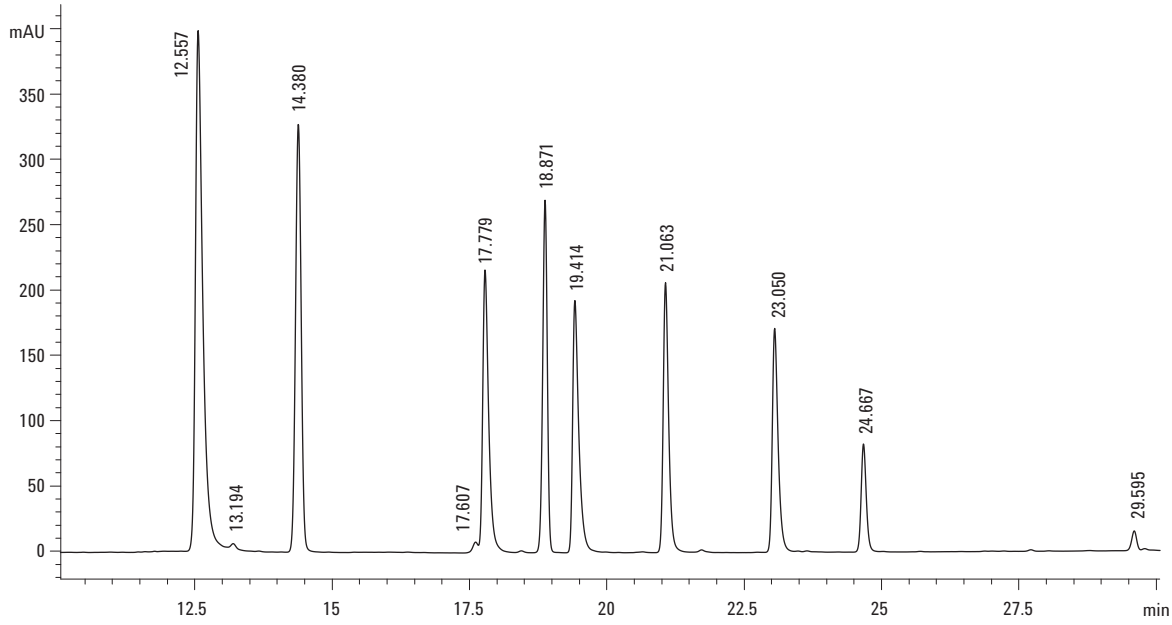
样品

氯代苯氧酸型除草剂标准品的甲醇混合溶液，浓度为 100 µg/mL

结果

最初，在标准的 4.6 mm × 250 mm、5 µm Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱上参照 US EPA 方法 555 的条件运行分析，柱温为 25 ℃，分析结果见图 2。然后，按比例调整流速和时间，把方法转换到 3.0 mm × 150 mm、3.5 µm 色谱柱上，结果见图 3。每次分析的溶剂消耗量由 60 mL 降低至 15.5 mL。

接着，为加快分离速度，对分离条件进行再优化，在相同的斜率 7.5% 下，把流速从 0.43 mL/min 提高至 1.42 mL/min，同时按比例降低了梯度时间，结果见图 4。最后，在保持图 3 的原有时间不变的条件下提高流速，证明其可以提高分离度（见图 5）。这样，得到了相同时间条件下的梯度，梯度斜率降低为 2.3%。4、5 号色谱峰的分离度增加得相当显著。



条件：

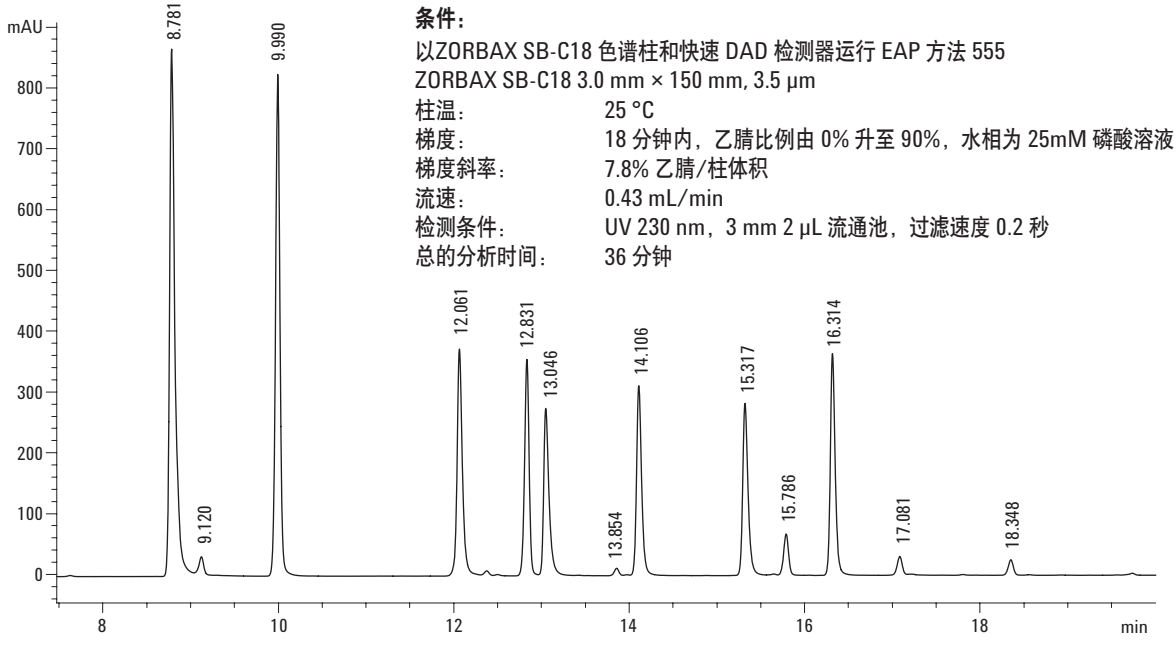
以 ZORBAX SB-C18 色谱柱和快速 DAD 检测器运行 EAP 方法 555
ZORBAX SB-C18 4.6 mm × 250 mm, 5 µm

柱温：	25 °C
梯度：	乙腈比例由 10% 升至 90%，水相为 25mM 磷酸溶液
梯度斜率：	7.8% 乙腈/柱体积
流速：	1 mL/min

A组化合物

总的分析时间：	60 分钟
检测条件：	UV 230 nm，10 mm 13 µL 流通池，过滤速度 2 秒（缺省值）

图 2. 除草剂在 4.6 mm × 250 mm 5 µm ZORBAX SB-C18 色谱柱上的梯度分离



条件：

以ZORBAX SB-C18 色谱柱和快速 DAD 检测器运行 EAP 方法 555
ZORBAX SB-C18 3.0 mm × 150 mm, 3.5 µm

柱温：	25 °C
梯度：	18 分钟内，乙腈比例由 0% 升至 90%，水相为 25mM 磷酸溶液
梯度斜率：	7.8% 乙腈/柱体积
流速：	0.43 mL/min
检测条件：	UV 230 nm，3 mm 2 µL 流通池，过滤速度 0.2 秒
总的分析时间：	36 分钟

图 3. 除草剂在 3.0 mm × 150 mm 3.5 µm ZORBAX SB-C18 色谱柱上的梯度分离

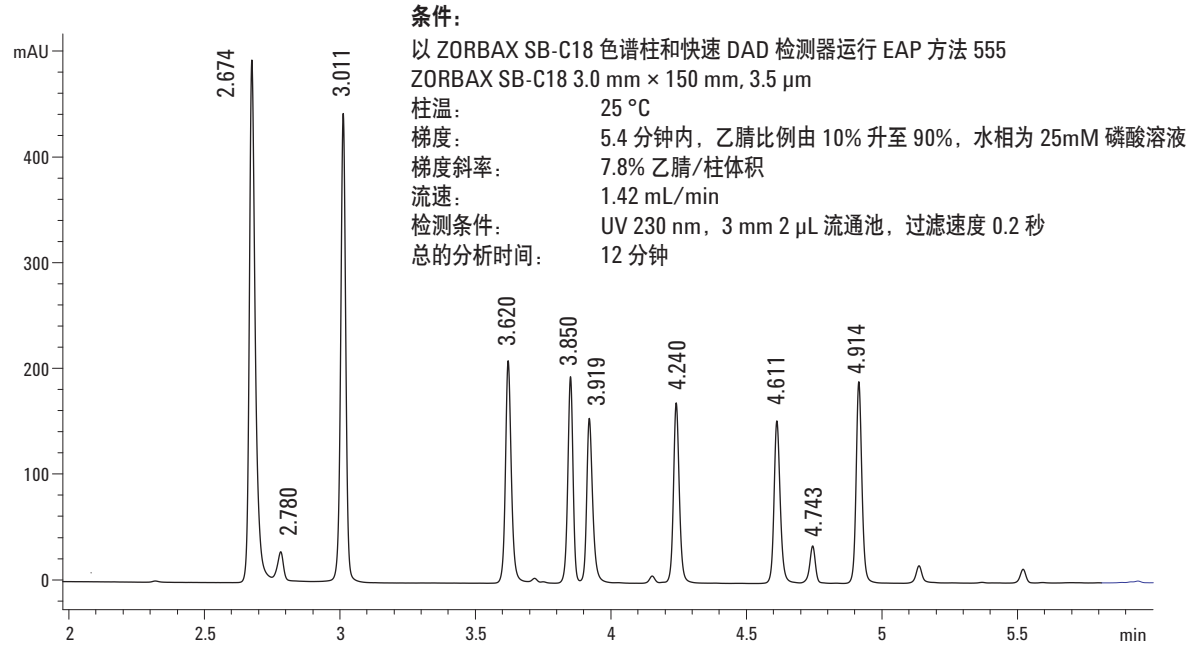


图 4. 除草剂在 3.0 mm × 150 mm 3.5 µm ZORBAX SB-C18 色谱柱上的高速梯度分离

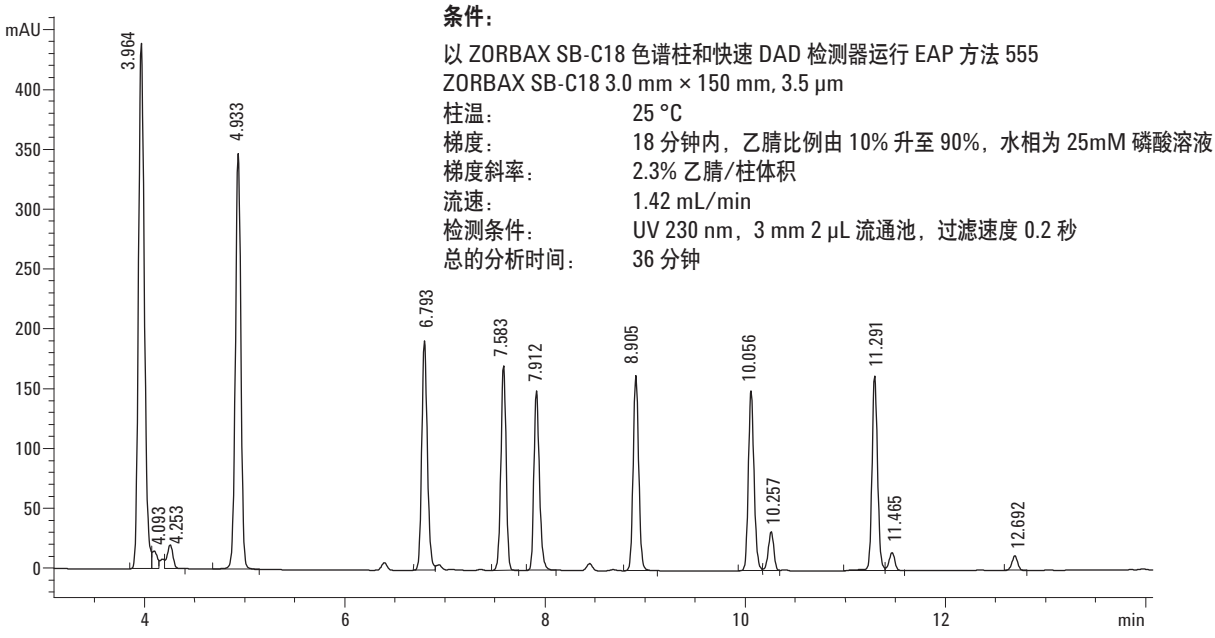


图 4. 降低梯度斜率后，除草剂在 3.0 mm × 150 mm 3.5 µm ZORBAX SB-C18 色谱柱上的分离

图 4 的条件中，以 7.8% 的斜率加上 3.0 mm × 150 mm、3.5 µm 填料所增加的线速度，得到了与原来 4.6 mm × 250 mm 色谱柱相当的分离度，但是总的分析时间缩短成 12 分钟。这对于高通量筛选和大量样品的定量分析是非常有利的。图 5 中，梯度斜率减小为 2.3%，把在 7.5～8 分钟内洗脱的最难分离的一对化合物的分离度由 1.9 提高至 3.3，达到了很好的分离效果。

表 1 中，用低死体积两通取代色谱柱，并在进样器到检测器之间使用连接 0.12 µm 内径毛细管。注入 1 µL 的稀丙酮，测试系统中不同流通池对峰展宽的贡献。

表 1. 不同流通池的容量检测

流通池	洗脱量 (µL)	半峰宽 (µL)	5σ 峰宽 (µL)
新型 SL 2 µL 3 mm	11	5	12
微量 6 mm 1.7 µL (n = 2)	14	6	18
半微量 6 mm 5 µL (n = 2)	13	6.5	18.5
标准 10 mm 13 µL	26	11	26
新型 SL 10 mm 13 µL	27	11	25

对多种流通池进行了测试，并报告了平均结果。洗脱量代表了系统中所有管路的总体积。尽管 2 µL 与 13 µL 流通池的容量只相差 11 µL，我们观察到，洗脱量增加了 15～16 µL，因为较大体积流通池内置的入口管线内径比较大，这也使得洗脱量有所增加。

结论

对现有的梯度条件进行仔细分析，同时具备如何准确计算新流速和梯度条件的相关知识，这样，就能简便而且可靠地将已有的方法转换成更加快速、分离度更高的新方法。另外，对柱外扩散的了解，对于高分离度、小色谱柱而言，有利于确保获得良好柱效，这对于成功的方法转换是非常重要的。

参考文献

1. J. J. van Deemter, F. J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, Chemical Engineering Science 1956, 5, 271–289
2. The Influence of Sub-Two Micron Particles on HPLC Performance, Agilent Technologies, application note 5989-9251EN, May 2003

高效液相色谱分析农业杀菌剂配方中的活性化合物

应用

农业，特殊化学，环境，农业化学

作者

James D. McCurry
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

液相色谱已成为农业杀菌剂配方中活性组分常规分析的强大工具。使用常规的反相条件和紫外/可见光检测器，不需要大量的样品制备或纯化方法来分离活性组分和其余样品基质，就可以轻易分离和检测活性组分。

前言

农用化学品配方通常含有一种活性组分和若干种非活性组分，如用来增强产品效果的表面活性剂。活性组分的极性或者热不稳定性以及表面活性剂的高分子量和极性等特性限制了气相色谱对此类配方的分析。因此，液相色谱为农用配方中活性组分的常规分析提供了最佳解决方案。

实验样品为一种商业杀菌剂配方，其活性组分是 N, N-[1,4-piperazinediylbis (2,2,2-trichloroethylidene)] bisformamide，重量含量为 6.5%。上述化合物也叫嗪氨灵 (CAS 注册号为 26644-46-2)，其结构如图 1 所示。配方中的非活性组分为环己酮、N-甲基-吡咯烷和 Atlox 3406-F。Atlox 3406-F 是一种农用分散剂，它由离子型和非离子型表面活性剂以及芳香溶剂组成。电喷雾/液质联用分析能够轻易分离和鉴定出该配方中的嗪氨灵 [1]。

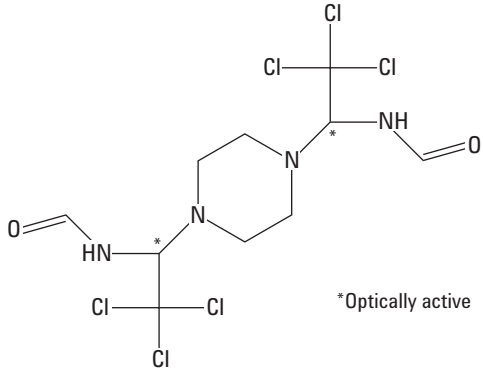


图 1. 嗪氨灵的化学结构，是一些商品杀菌剂配方中的活性组分

实验部分

制备 10%（v/v）杀菌剂配方的乙腈溶液，用于安捷伦 1100 系列液相系统分析。该系统由真空脱气机，二元泵，自动进样器，柱温箱，二极管阵列紫外/可见光检测器组成。液相分析条件如表 1 所示。

表 1. 液相分析条件

液相色谱条件	
色谱柱：	Zorbax® XDB-C8,150 × 4.6 mm, 5 µm (p/n 993967-906)
流动相A：	0.1% 甲酸水溶液
流动相B：	乙腈
流动相梯度：	0 分钟 30% B；7 分钟 50% B；10 分钟 95% B
流速：	1.0 mL/min
进样量：	1 mL
柱温：	30 °C
检测器：	二极管阵列
信号波长：	254 nm
信号峰宽：	10 nm
参考波长：	500 nm
参考峰宽：	40 nm

结果与讨论

图 2 为杀菌剂配方的色谱图。该配方的活性组分，嗪氨灵，在 7.5 分钟和 7.8 分钟之间以两个色谱峰流出。嗪氨灵这两个色谱峰的出现可以从结构的立体化学来解释。图 3 为嗪氨灵的四种立体异构。这四个结构可以分为两对互为镜像的非对映异构体。S，R 和 R，S 结构是镜像重叠的，形成没有光学活性且物理性质不同的内消旋化合物。因此，由于 S，R 和 R，S 结构是一样的，在色谱上它们是以一个峰共流出的。第二组镜像是 R，R 和 S，S 结构，它们不能镜像重叠，所以对映异构体具有不同光学活性，但物理性质相同。常规的反相色谱不能分离这些对映异构体，它们会以一个峰共流出。但是，这些对映异构体和内消旋化合物可以在反相色谱中分离。这就是为什么只有两个嗪氨灵峰，一个是内消旋化合物，一个是对映体。如果没有标准品，就不能确认色谱上的两个峰。

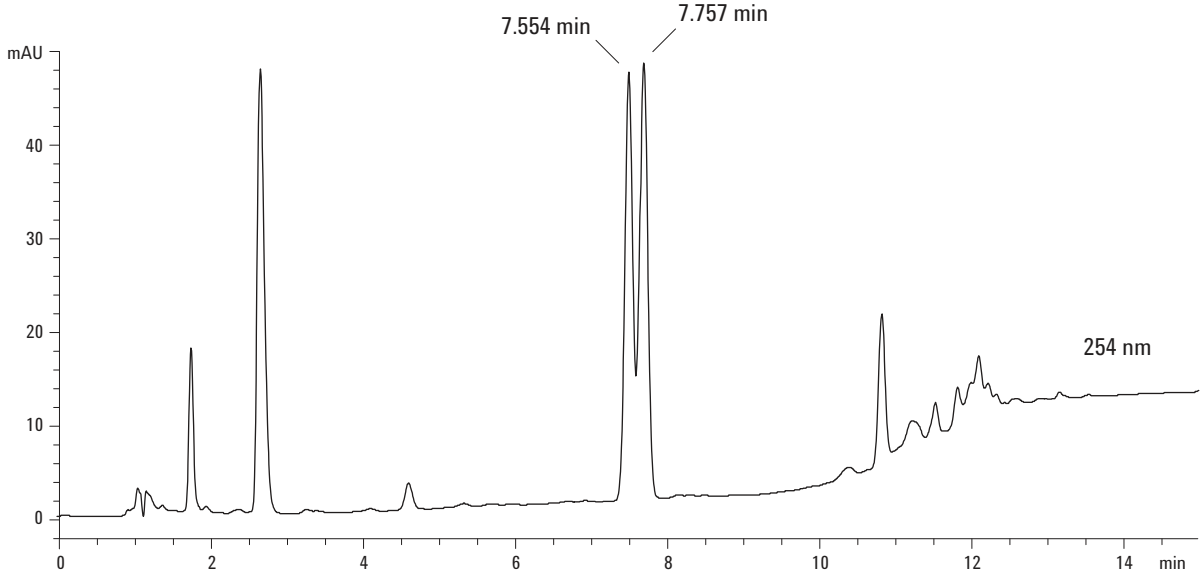


图 2. 含有嗪氨灵活性组分的农业杀菌剂配方的色谱图。保留时间为 7.554 分钟和 7.757 分钟的两个峰为嗪氨灵的光学异构体

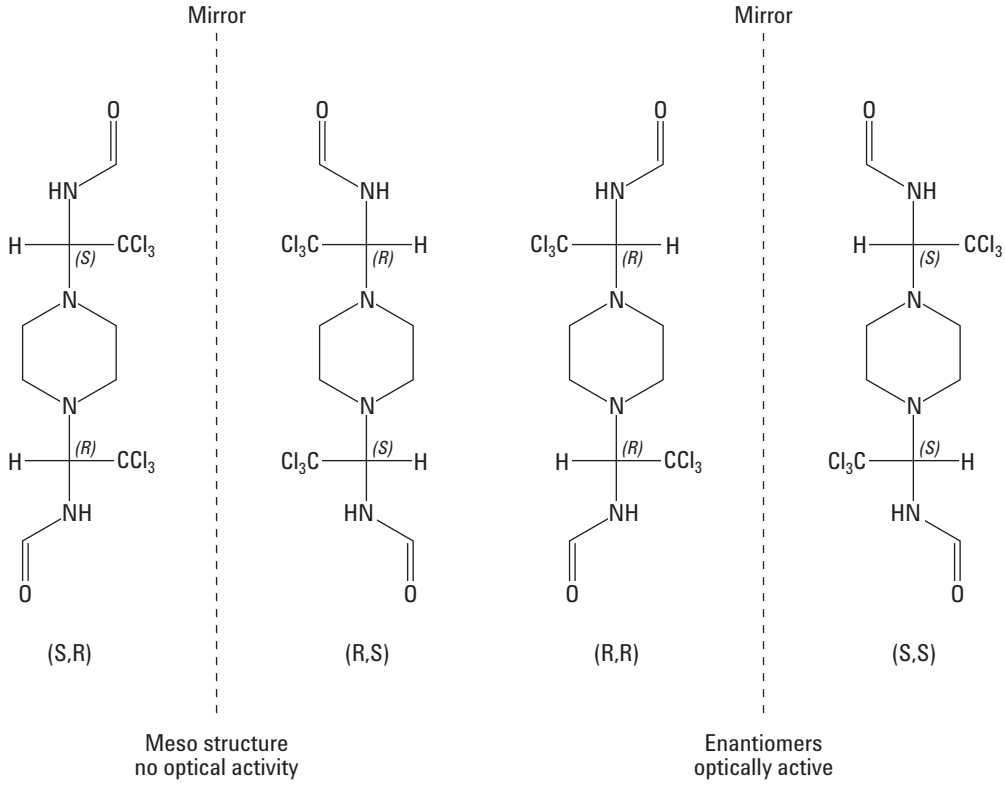


图 3. 由两个手性碳原子产生的四个嗪氨灵立体结构。这两组镜像即色谱图上观察到的两个嗪氨灵峰

结论

液相色谱已成为一种农业杀菌剂配方中活性组分常规分析的杰出工具。不需要繁多的样品制备或纯化方法来分离活性组分和其余样品基质，使用常规的反相条件和紫外/可见光检测器就可以轻易分离和检测活性组分。

参考文献

1. McCurry, J.D., and Zavitsanos, P., “Analysis of Components, Contaminants, and Impurities in Fungicide Chemical Formulations by GC/MS and LC/MS,” Agilent Technologies Application Note, Publication 5988-6085EN, April 2002.

除草剂
键合相选择性差异举例
应用

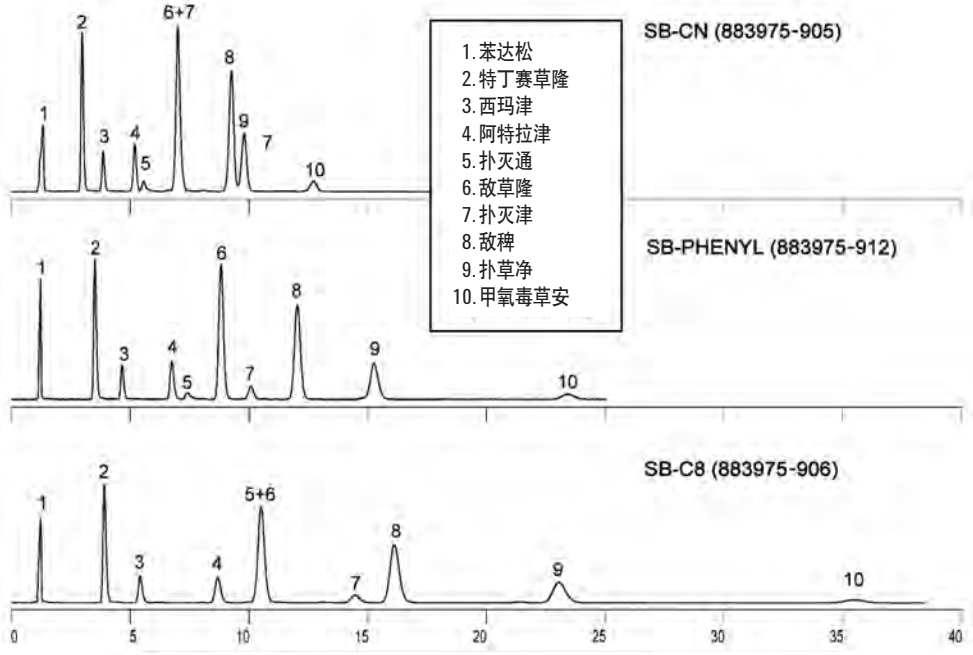
环境

作者

Robert Ricker

要点提示

- 保持流动相条件不变，通过改变色谱柱，经常可以得到有意义的谱带间距的变化
- 流动相不变，对于采用了空间位阻键合工艺的 StableBond 键合相，其保留能力由大到小的顺序依次为 C8>Phenyl>CN
- ZORBAX StableBond 色谱柱能提供长期稳定性和重现性
- 多种杀虫剂同时获得了出色的分离度和峰形



条件:
ZORBAX StableBond® 色谱柱 (4.6 x 150 mm) (安捷伦部件号: 如上)
流动相: 35% 乙腈, 65% 水, 1 mL/min

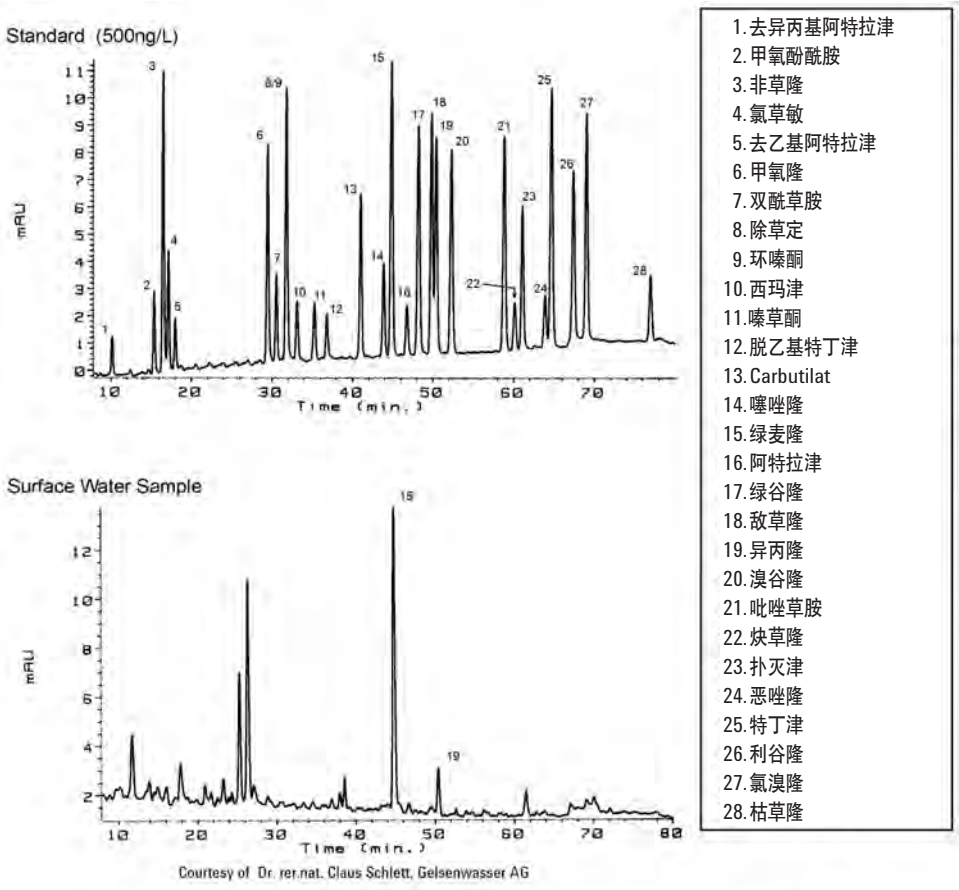
饮用水中杀虫剂的分析

应用

环境

作者

Robert Ricker



1. 去异丙基阿特拉津
2. 甲氧酚酰胺
3. 非草隆
4. 氯草敏
5. 去乙基阿特拉津
6. 甲氧隆
7. 双酰草胺
8. 除草定
9. 环嗪酮
10. 西玛津
11. 嗪草酮
12. 脱乙基特丁津
13. Carbutilat
14. 噻唑隆
15. 绿麦隆
16. 阿特拉津
17. 绿谷隆
18. 敌草隆
19. 异丙隆
20. 溴谷隆
21. 吡唑草胺
22. 炔草隆
23. 扑灭津
24. 恶唑隆
25. 特丁津
26. 利谷隆
27. 氯溴隆
28. 枯草隆

条件:
ZORBAX SB-C18 (3.0 x 250 mm) (安捷伦部件号: 880975-302)
流动相: A=2mM 醋酸钠 (pH 6.5) 的 5% 乙腈 B=100% 乙腈 (ACN)
梯度洗脱: 0 分钟, 10% B; 70 分钟内 10% 到 45% B.
进样量 25 µL, 流速 0.35 mL/min, 柱温 40 °C, 检测: 紫外 (245 nm)

要点提示

- 3 mm 内径的小体积色谱柱与标准的 4.6 mm 内径的色谱柱相比显示出极大的优越性:

  - 检测灵敏度提高 2 倍 – 减少了所需样品量

  - 节约一半溶剂 – 减少了溶剂处理的成本

- 具有空间位阻键合相的 ZORBAX SB-C18 色谱柱经过多次使用后仍能提供可靠的结果
- 使用简单流动相在一次分析中就能以优异的分离度和峰形使 28 种杀虫剂得到分离

总结

过去的二十年里，各种各样的杀虫剂在世界上许多国家得到广泛应用。这些化合物如今存在于地表水中，浓度很低，需要进行分析。高效液相色谱连接二极管阵列检测器成为分析这些化合物的强大工具。

技术细节

目前许多地区通过规定饮用水中杀虫剂的最大允许限量来加强饮用水管理，因此亟需一种可靠的方法来监测这些物质的浓度，尤其希望这些工作能在一次分析中完成。经过固相萃取操作，高效液相色谱连接二极管阵列检测器能满足这种需求。通常，能被检测到的物质的浓度都低于 0.1 mg/L。（例如，德国的饮用水管理规范中规定的杀虫剂最高浓度）

快速分离杀虫剂混合物

应用

环境

作者

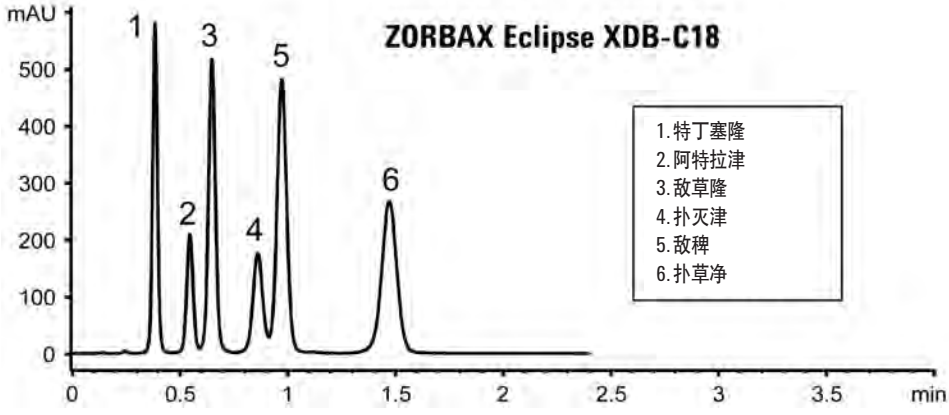
Robert Ricker

粒径小于 5 µm 的填料和比标准柱体积小十倍以上的色谱柱非常适合快速分析。本实验采用的色谱柱装填了更小粒径的填料并有更小的柱体积，能在不到 2 分钟时间内分离出 6 种杀虫剂。

当使用小体积色谱柱时，死体积成为影响色谱性能的关键因素。本实验中，不需要对当前仪器（管路和流通池）进行任何改装。

操作条件:

高效液相色谱系统：	Agilent 1100，配有四元泵
色谱柱：	ZORBAX Eclipse XDB-C18 快速分离 (3.5 µm) 色谱柱, 4.6 x 30 mm 安捷伦部件号： 931975-932
流动相：	甲醇：水(60:40)
检测：	254 nm 紫外光，使用标准检测池 (13 µL)
流速：	2 mL/ min
温度：	室温



要点提示

- 同时缩短柱长和减小填料粒径能够:
  - 缩短分析时间
  - 保持分离度不变
  - 减少溶剂消耗
- 使用 ZORBAX 快速高分离度色谱柱能降低柱压，因而可以使用更高流速

Robert Ricker 是安捷伦科技公司（Wilmigton，特拉华州）的一名应用化学家。

如需进一步了解我们的产品和服务信息，请访问 www.agilent.com/chem/cn。

高效液相色谱柱后衍生化法分析水中草甘磷

食品

作者

Rainer Schuster

摘要

本文介绍用于直接分析水中草甘磷的高效液相色谱柱后衍生化法。

高效液相色谱方法性能

检测限	1 ppb
重现性	保留时间 <0.8 %（10 次以上运行） 峰面积 <2.2 %（10 次以上运行）

色谱条件

色谱柱：	150~4 mm 阳离子交换, K^+(Pickering), 8 µm
流动相：	A = 5 mM KH_2PO_4, pH=2.0, B = 5 mM KOH
流速：	0.4 ml/min
梯度：	15 分钟 0% B；17 分钟 100% B
柱温箱：	55 °C
进样量：	50 µl 标准进样

荧光检测器

激发光波长：	230 nm 或者 330 nm,
发射光波长：	425 nm
激发光狭缝宽度：	2 mm (25 nm)

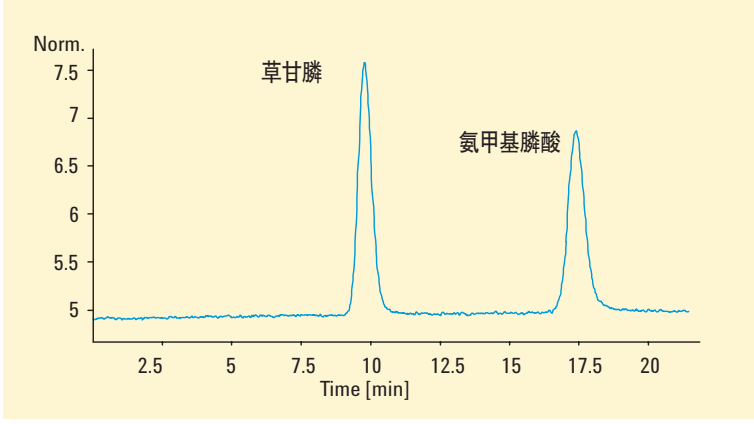


图 1. 痕量胺类标准品的色谱图

发射光狭缝宽度 1： 4 mm (50 nm)

发射光狭缝宽度 2： 4 mm (50 nm)

光电倍增管增益： 2

截止波长： 370 nm

荧光灯： 55 Hz (常开)

响应时间： 4 s

衍生化试剂泵

水解剂流速： 0.3 ml/min (OCl-)

衍生剂流速： 0.3 ml/min (邻苯二甲醛)

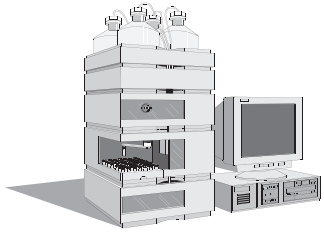
样品制备： 无

仪器

Agilent 1100 系列

- 脱气机
- 四元泵
- 自动进样器
- Pickering 柱后衍生化系统
- 荧光检测器

安捷伦化学工作站+软件



高效液相色谱分析具有青霉素结构的抗菌药物应用

药物分析

作者

Udo Huber, Adebayo O. Onigbinde

青霉素可以从 Penicillium notatumor 和 P. chrysogenum 等某些产生天然青霉素的真菌培养基中分离出来，其也可以通过半合成或者前体诱导生物合成方法得到，而全合成并不经济。

青霉素能够抑制维持细菌细胞壁稳定性的 murin 的聚合。由于很多抗菌药物具有毒性，许多国家都严格控制农业、兽医、乳制品和肉类产品中的抗菌药残留水平。

图 1 所示为 SB-C18 反相色谱柱对四种常见的青霉素结构的抗菌药物进行的高效液相色谱分离。

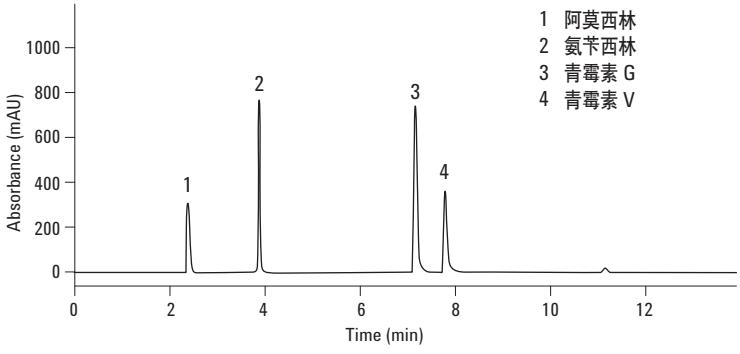


图 1. 四种青霉素类似物的分离

实验条件

仪器: Agilent 1100 系列高效液相色谱仪；**紫外检测器:** 可变波长检测器，204 nm，标准流通池；**色谱柱:** Zorbax SB-C18，4.6×75 mm, 3.5 µm, (部件号 866953-902)；**流动相:** A = 0.025 M KH_2PO_4 水溶液 (pH = 3)，B = 乙腈；**进样量:** 5 µL；**温度：** 40 °C；**流速:** 1.0 mL/min；**梯度:** 10 分钟内由 5% 到 60% B 相；**柱平衡:** 2 分钟内由 60% 到 5% B 相；**停止时间:** 12 min；**后运行时间:** 5 min

重要提示

- 在没有离子对试剂的情况下青霉素类似物仍获得了极好的分离度
- 在低 pH 范围和缓冲液浓度下，SB-C18 色谱柱可以快速分离青霉素类似物
- 青霉素以既好又窄的峰形被从色谱柱中洗脱出来
- 稳定的空间保护的 SB-C18 键合相保证了其在低 pH 下优异的分离
- SB-C18 色谱柱分离抗菌药具有极好的峰形和选择性
- 高效液相色谱方法易于分析抗菌素药物，且具有较高的可靠性和精密度
- 检测限 (LOD)，以及保留时间 (RT) 峰面积的精密度显示了高效液相色谱分析的优良性能

表 1. 具有青霉素机构的抗菌药的 HPLC 方法性能

化合物	检测限 S/N = 2 (mg/L)*	保留时间精密度 (10 次运行的相对标准偏差) (100 mg/L)*	峰面积的精密度 (10 次运行的相对标准偏差) (100 mg/L)*
氨苄西林	1.0	0.32	0.54
阿莫西林	1.0	0.32	0.55
青霉素 G	1.0	0.32	0.49
青霉素 V	1.0	0.25	0.48

*进样量: 5 µL

高效液相色谱分离黄曲毒素

应用

环境，食品安全

作者

Coral Barbas
Facultad de CC Experimentales y de la Salud
Universidad San Pablo-CEU
Urbanización Montepríncipe
Boadilla del Monte, 28668 Madrid
Spain

Andre Dams*
Agilent Technologies, Inc.
Amstelveen
The Netherlands

Ronald E. Majors
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

*现在地址:
Andre Dams
Analytical Consultancy, Amstelveen
The Netherlands

摘要

本实验采用以水、甲醇和乙腈为三元均匀混合流动相和以 365 nm 为紫外检测波长的高效液相色谱方法在不到 5.5 分钟时间内对四种黄曲毒素目标化合物（B_1，B_2，G_1 和 G_2）实现了基线分离。

前言

黄曲毒素是由多种黄曲霉菌产生的真菌毒素。这些化合物不仅有极强的毒性，而且具有致突变，致畸形（引起胎儿畸形）和致癌作用。不幸的是，黄曲毒素是一种在热带和亚热带国家常见的霉菌而且已形成黄曲毒素污染。这种污染是由于作物储存条件不当引起的，如花生、谷物种子、干果等农作物以及阿月浑子树果、山胡桃、核桃、杏仁等树类坚果和红胡椒、黑胡椒、丁香、肉桂等草类种子。因为其毒性和致癌作用，食品中对黄曲毒素的最低检测限要求非常低。

化学性质

目前已鉴定出 18 种黄曲毒素，但最常见的仍然是黄曲毒素 B_1，B_2，G_1 和 G_2，他们的化学结构示于图 1。黄曲毒素 B_1 是已知的其中最强烈和丰富的环境诱变剂和致癌物质，它在食品中非常稳定而且不易降解。纯的黄曲毒素 B_1 是一种灰白色到黄色结晶，无臭固体，它易溶于氯仿、甲醇、二甲亚砜等中极性溶剂，并且在水中的溶解度是 10-20 mg/L，其甲醇溶液在 265 nm 和 360-362 nm 处有极强的吸光系数（约 10000）。由于黄曲毒素在紫外激发下能产生荧光，因此在高效液相色谱痕量分析中经常用荧光检测。利用黄曲毒素 B_1，B_2，G_1 和 G_2 各自荧光效率的差异，将紫外和荧光检测联合起来应用非常有效。黄曲毒素没有极性官能团，因而可以利用其疏水性进行分离。

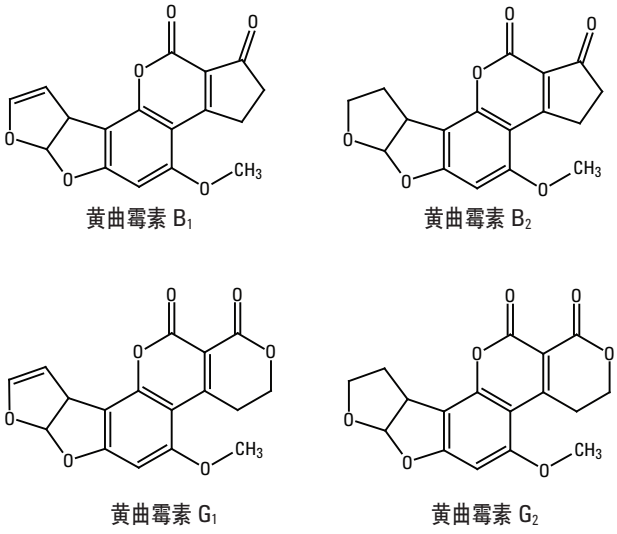


图 1. 目标化合物黄曲毒素的化学结构

高效液相色谱方法学

在过去，薄层色谱法得到广泛应用，如今，由于高效液相色谱简便的操作方法和更好的定量能力，使它逐渐得到应用。目前，在已发表的高效液相色谱方法中，大部分是利用黄曲毒素的疏水性在 C18 键合相上进行的反相色谱分离 [1-4]，而且大多使用 5 微米粒径填料的 25 厘米长的色谱柱。如今常用的是更小粒径填料、更短长度的色谱柱，这种色谱柱能在更短的分析时间内达到与 5 微米粒径填料色谱柱相同的分离效果和相似的分离度。在本研究中，我们拟使用这种色谱柱得到比以前方法更好的结果来证明其优越性，见图 2。

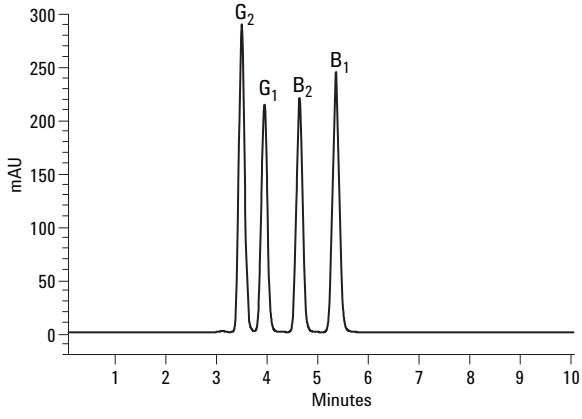


图 2. 使用 ZOEBAX XDB-C18 快速分离色谱柱对目标化合物黄曲毒素进行反相分离

实验条件

化合物：	黄曲毒素，购于 Sigma Aldrich (马德里, 西班牙)
液相色谱条件	
色谱柱：	ZORBAX Eclipse XDB-C18，4.6 mm x 150 mm, 3.5 µm
流动相 A：	水/甲醇/乙腈；50/40/10（V/V/V）
流速：	0.8 mL/min
柱温：	室温
检测器：	365 nm 紫外光检测
进样量：	10 微升 (0.044 mg/mL)

结果与讨论

所有四种黄曲毒素以水、甲醇、乙腈为三元均匀混合流动相，在不到 5.5 分钟内实现了基线分离。尽管文中提到紫外检测，但仍需使用荧光（λ_{ex} = 365 nm, λ_{em} = 455 nm）来检测更低水平的黄曲毒素 B_2 和 G_2。质谱检测方法也可使用。

参考文献

1. R. Schuster, G. Marx, and M. Rothaupt, “Analysis of Mycotoxins by HPLC with Automated Spectroscopic Confirmation by Spectral Library”, Agilent Technologies, publication 5091-8692E, www.agilent.com/chem
2. A. Gratzfeld-Heusgen, “HPLC Analysis of Aflatoxins in Pistachio Nuts”, Agilent Technologies, publication 5966-0632E, www.agilent.com/chem
3. I. Ferreira, E. Mendes, and M. Oliveira, (2004) *J. Liquid Chromatog.*, **27** (2), 325–334.
4. E. Chiaavaro, C. Dall'Asta, G. Galaverna, A. Biancardi, and E. Gambarelli, (2001) *J. Chromatogr. A,* **937** (1–2), 31–40.

高效液相色谱分析阿月浑子果中的黄曲霉素

食品

作者

Angelika
Gratzfeld-Heusgen

摘要

本研究分析了以下几种真菌毒素: 黄曲霉素 G_2、G_1、B_2、B_1、M_1、赭曲霉素 A、玉米赤霉烯酮和棒曲霉素。

真菌毒素是由真菌产生的高毒性化合物。当食品贮存条件适合真菌生长时它们会引起食品污染。这些毒素具有高分子量并含有一个或多个含氧脂肪环。对真菌毒素及其代谢物进行分析很困难，因为目前已知的该类化合物就有上百种，而且任何一种毒素在高度复杂的有机基质中含量非常低。大部分真菌毒素都是用薄层色谱 (TLC) 进行分析的，然而高效液相色谱具有更好的分离能力和更短的分析时间的优点，使其得到越来越多的应用。使用适当的样品富集方法和灵敏的检测手段即可达到 ppb 级 [1,2,3] 的检测水平。

样品制备

样品是根据法定方法[2]制备而成的。不同种类的化合物需要不同的样品制备方法和液相分离条件。下一页的表格中列举了食品中真菌毒素的各种分析条件。

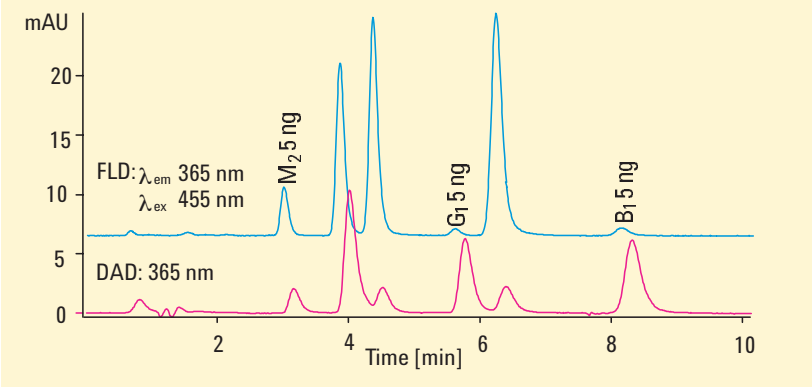


图 1. 使用紫外和荧光检测器分析黄曲霉素

色谱条件

本文介绍的分析坚果、香料、动物饲料、牛奶、谷物、面粉、无花果和苹果中真菌毒素的高效液相色谱方法主要基于反相色谱、多信号紫外-可见光二极管阵列检测器和荧光检测器。紫外光谱被作为一种附加的鉴定工具。

高效液相色谱方法性能

检测限 1-5 g/kg

重现性 保留时间 <0.12 %（运行 10 次）
峰面积 <1.5 %（运行 10 次）

线性 紫外-可见光二极管阵列检测器 1–500 ng
荧光检测 30 pg 到 2 ng

色谱柱类型	基质	样品制备	色谱条件
黄曲霉素 G_2、G_1、B_2、B_1、M_2、M_1	坚果、香料、动物饲料、牛奶、乳制品	• 根据 Para. 35, LMBG*[4,5] 方法提取	Hypersil ODS, 100 ~ 2.1 mm id, 3 µm 粒径填料 水/甲醇/乙腈 (63:26:11) 三相均匀混合 (推荐用 100% 乙腈清洗色谱柱) 流速: 0.3 ml/min， 25 °C 二极管阵列检测器: 365/20 nm 荧光检测器 (FLD): 激发光波长为 365 nm, 发射光波长为 455 nm
赭曲霉素 A	谷物、面粉、无花果	• 根据 Para. 35, LMBG*[4,5] 方法提取 • 盐酸酸化 • 甲苯提取 • SiO_2 净化 • 甲苯/乙酸（9:1）洗脱	Lichrospher 100 RP18, 125 ~ 4 mm id, 5 µm 粒径填料 2% 乙酸/乙腈 (1:1)* 流速: 1ml/min，40 °C FLD: 激发光波长为 347 nm, 发射光波长为 480 nm
玉米赤霉烯酮	谷物	• 甲苯提取 • Sep-pak净化 • 甲苯/丙酮 (9:1) 洗脱 • AOAC 985.18:[3] α-玉米赤霉烯醇和玉米赤霉烯酮	Hypersil ODS, 100 ~ 2.1 mm id, 3 µm 粒径填料 水/甲醇/乙腈 (5:4:1) 三相均匀混合 流速: 0.45 ml/min，45 °C 二极管阵列检测器: 236/20 nm FLD: 激发光波长为 236 nm, 发射光波长为 464 nm
棒曲霉素	苹果制品	• Extrelut 净化 • 硅胶清除 • 甲苯/乙酸乙酯 (3:1) 洗脱	Supersher RP18, 125~4 mm id, 4 µm 粒径填料 水 5%-95% 乙腈 流速：0.6 ml/min，40 °C 二极管阵列检测器：270/20 nm，或者 Lichrospher diol, 125 ~ 4 mm id, 5 µm 粒径填料 己烷/异丙醇 (95:5) 均匀混合 流速：0.6 ml/min，30 °C 二极管阵列检测器：270/20 nm

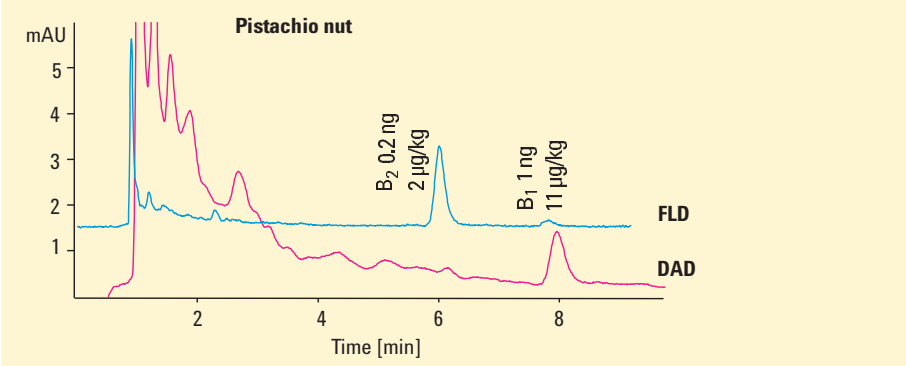


图 2. 使用紫外和荧光检测器分析阿月浑子果中的黄曲霉素

仪器

Agilent 1100 系列

- 脱气机
- 单元泵
- 自动进样器
- 柱温箱
- 二极管阵列检测器
- 荧光检测器

安捷伦化学工作站+软件

Angelika Gratzfeld-Heusgen 是安捷伦科技公司德国 Waldbronn 的一名应用化学家

参考文献

1. R. Schuster, G. Marx, G, M.Rothaupt, “Analysis of mycotoxins by HPLC with automated confirmation by spectral library”, *Agilent Application Note* 5091-8692, **1993**.
2. Lebensmittel- und Bedarfsgegenstandegesetz, Paragraph 35, Germany.
3. *Official Methods of Analysis, Food Compositions; Additives, Natural Contaminants*, 15th ed; AOAC: Arlington, VA, 1990, Vol. 2.; AOAC Official Method 980.20: aflatoxins in cotton seed products; AOAC Official Method 986.16: Aflatoxins M_1, M_2 in fluid milk; AOAC Official Method 985.18: α-zearalenol.
4. Farrington et. al., “Food Additives and Contaminants, **1991**, Vol. 8, No. 1, 55-64”.
5. *Official Methods of Analysis*; Horwitz, W., Ed.; 14th ed.; AOAC: Arlington, VA, **1984**; secs 12.018–12.021.

快速筛查和分析非酒精饮料中的成分

应用

食品

作者

Michael Woodman
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

软饮料、果汁和预先制好的茶饮料都是很流行的饮料，它们都有很严格的配方，以使其具有独特的香味，并确保产品的稳定性。许多最终产品的生产厂具有监测重要成分的方法，如测定糖分、香味、着色剂、防腐剂等，但可能会发现在需求量大的季节，分析速度无法跟上生产需求。这里，我们选择一种添加剂和甜味剂的经典分析方法，把它转换为能够提高样品通量和分离度的新方法，同时还能降低溶剂消耗量。

引言

质量控制 (QC) 实验室总是面临这样的挑战，要以较少的仪器和人员满足越来越高的样品负荷，但在分析处理过程中，数据质量不能受到影响。尽管一些实验室已经成功地采用了更为自动化的样品制备和数据处理方式，他们仍在寻找机会进一步提高色谱通量。在 5 或 10 µm 粒径色谱柱上的方法，如改用装填有小粒径填料的直径较小的色谱柱，就可以实现方法的更新。从事添加剂、防腐剂、香精和甜味剂等小分子分析的饮料 QC 实验室就面临极好的机会。在方法开发和研究实验室，与质谱仪离子源的兼容性也是减小色谱柱的大小、支持低流速运行的一大驱动力。

在缩短分析时间的同时，为了使得分离度不受影响，我们可以同时减小色谱柱的长度和填料粒径。如果考虑梯度延迟体积和实际的柱外扩散效应，对 HPLC 系统进行合理的优化，很容易获得平衡的效果。例如，一根 5 µm 粒径、250 mm 柱长的色谱柱可以被 3 µm 粒径、150 mm 柱长的色谱柱所取代。换而言之，如果长度与粒径的比例相等，则认为这两根色谱柱具备相同的分离能力。溶剂消耗量成比例减少，并且，如果可以成功注入相等质量的被分析物，由于其以相同的效率在一根较小的色谱柱中运行，色谱峰的稀释作用降低了，因而灵敏度也将得到提高。

已经得到证实，与一般的 LC/UV (UV/Vis 光学检测) 方法相比，LC/MS（液相色谱/质谱）离子源在较低的流速下灵敏度更高，电喷雾离子化方式尤其如此。

在 MS 检测模式下，通过减小内径来降低柱容量是非常有利的。同时，将根据色谱柱的直径和横断面的大小成比例地降低流速。不同色谱柱直径与流速的变化关系见式 1。

$$流速_{柱1} \times \left[\frac{直径_{柱2}}{直径_{柱1}}\right]^2 = 流速_{柱2} \quad (式\ 1)$$

柱长和直径减小的联合效应表现在降低溶剂消耗量，并且如果假设可以将相同质量的被分析物注入较小的色谱柱，色谱峰响应将有相应比例的提高。不过，我们一般根据色谱柱的大小来按比例调整进样量。进样量的调整比例可以通过原色谱柱的进样量乘以两根色谱柱的空体积比值计算得到，见式 2。

$$进样量_{柱1} \times \left[\frac{空体积_{柱2}}{空体积_{柱1}}\right] = 进样量_{柱2} \quad (式\ 2)$$

对于等度洗脱，在上述条件下一般可以得到很好的方法转换结果，总体分离度没有或几乎没有变化。还有其它一些参数也应考虑。第一，是柱效与流速的关系，或者更确切地说，柱效与 van Deemter [1] 和他人所提出的线速度之间的关系；第二，是通常被忽略的柱外扩散效应对实际柱效或经验柱效的影响。

Van Deemter 发现并给出了柱效与一系列参数之间关系的数学表达式，但是这里我们最感兴趣的，是对于任何给定的粒径的 HPLC 填充柱中，存在最佳的线速度，并且最佳线速度随着粒径的减小而提高。直观起见，常以 van Deemter 图来表示板高与线速度之间的关系。一般说来，粒径减小导致柱效升高，线速度升高，最高柱效的范围扩大，可以在更宽的流速范围内获得好的分离效能。

第二点重要的考虑是通常被忽略的柱外扩散效应对实际柱效或经验柱效的影响。随着柱容量的降低，色谱峰洗脱容量也成比例地降低。如果同时还应用了较小粒径的填料，预期的峰容量会进一步降低。用户应注意减小柱外体积，即在实际使用时，减少连接接头的用量以及进样阀和检测器流通池的体积。

对于梯度洗脱分离，从分析的开始阶段直到目标被分析洗脱，流动相的组成不断增加，成功地将方法转换到较小的色谱柱上时，要求保持梯度斜率不变。最为有用的是以相对于柱容量的变化量 (%) 表示梯度斜率。这样，能够准确地把方法转换中产生的柱容量变化考虑进新的梯度条件中，而无需考虑流速或色谱柱的直径和长度。我们用式 3 来表示梯度：

$$梯度斜率 = \left[\frac{(结束\ \% - 开始\ \%)}{\#\ 柱容量}\right] \quad (式\ 3)$$

如梯度斜率大，则梯度变化大且分离度较小，而较小的梯度斜率可得到较高的分离度，但在同时，溶剂消耗量增加，灵敏度降低。在分析时间和运行压力允许的范围内，可以通过延长梯度时间或加大流速，使得梯度斜率降低，也可以同时改变梯度时间和流速。

分离度随梯度斜率的减小而提高，这是因为有效容量因子 k^* 增大了。和等度分离类似，容量因子称为 k’，该值增大，将直接导致分离度的提高。k 值约在 5～10 之间时，这一效应非常明显，而超出这一范围后的影响极为有限。以下的例子中，我们将看到与上述讨论的计算相关的结果。

实验条件

系统

Agilent 1200 系列快速分离 LC，包括：

G1379B 微脱气机

G1312B 二元泵 SL

带温控的 G1367C HiP 自动进样器 SL

G1316B 柱温箱 SL

G1315C UV/VIS 二极管阵列检测器 SL，流通池条件在各色谱图中列出

32 位 ChemStation，B.02.01 版

色谱柱

Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 mm × 250 mm, 5 µm
Agilent ZORBAX SB-C18, 3.0 mm × 50 mm, 1.8 µm

流动相条件

有机相： 乙腈或含有 1% 甲酸的乙腈

水相： 20 mM 磷酸的 Milli-Q 水溶液，以氨水调节 pH 至 3.65，或 0.1% 甲酸的 Milli-Q 水溶液

梯度条件

梯度斜率： 2.8%/柱容量。流速和时间见各色谱图。

样品

1. 糖精钠、咖啡因、阿斯巴甜、香草醛、苯甲酸、山梨酸、苯甲醛的标准混合物，以甲醇-水 (1:1) 溶解并制成 50 µg/mL 的溶液
2. 各种软饮料，需要时除去碳酸 applicable

结果

图 1 为在柱温 30℃ 的 4.6 mm × 250 mm、5 µm ZORBAX SB-C18 色谱柱上使用磷酸盐缓冲液运行的结果。在该 pH 条件下，以乙腈为有机改性剂，苯甲酸盐和山梨酸盐在 SB-C18 柱上获得了足够的分离。而以甲酸为改性剂，在 pH 2.5 的条件下，这两种化合物的分离度较差，尽管其他化合物的选择性和峰形都相对较好。另外，在较低的 pH 条件下，观察到苯甲醛发生了柱上降解，可能降解为苯甲酸盐。在其他实验中也观测到这一情况（数据未在此显示），当柱温升高时尤其明显。用氨水调节 pH，形成甲酸铵缓冲液，达到与磷酸相同的 pH 值，很可能同时解决以上问题，并且适合于 MS 检测。

然后，根据计算，按比例调整流速和时间，把方法转换到 3.0 mm × 100 mm 3.5 µm 和 1.8 µm 色谱柱上 (数据未在此显示)。重新计算了 3.0 mm × 50 mm 1.8 µm 填料色谱柱上的梯度，结果见图 2。通过进一步的梯度计算，提高了运行速度，而分离度并没有损失 (见图 3 和图 4)。

条件

ZORBAX SB-C18 4.6 mm × 250 mm, 5 µm
柱温： 30 °C
梯度： 乙腈浓度在 25 分钟内由 10% 升至 50%，水相为 20 mM 磷酸溶液，以氨水调节 pH 至 3.65
梯度斜率： 2.8% 乙腈/柱容量
流速： 1.41 mL/min
样品： 标准品以甲醇-水 (1:1) 溶解并制成 50 µg/mL，进样量为 15 µL
总的分析时间： 37.5 分钟
检测条件： UV 230 nm，10 mm 13 µL 流通池，过滤速度 2 秒（缺省值）
(数据文件 SDADDS000006.D)

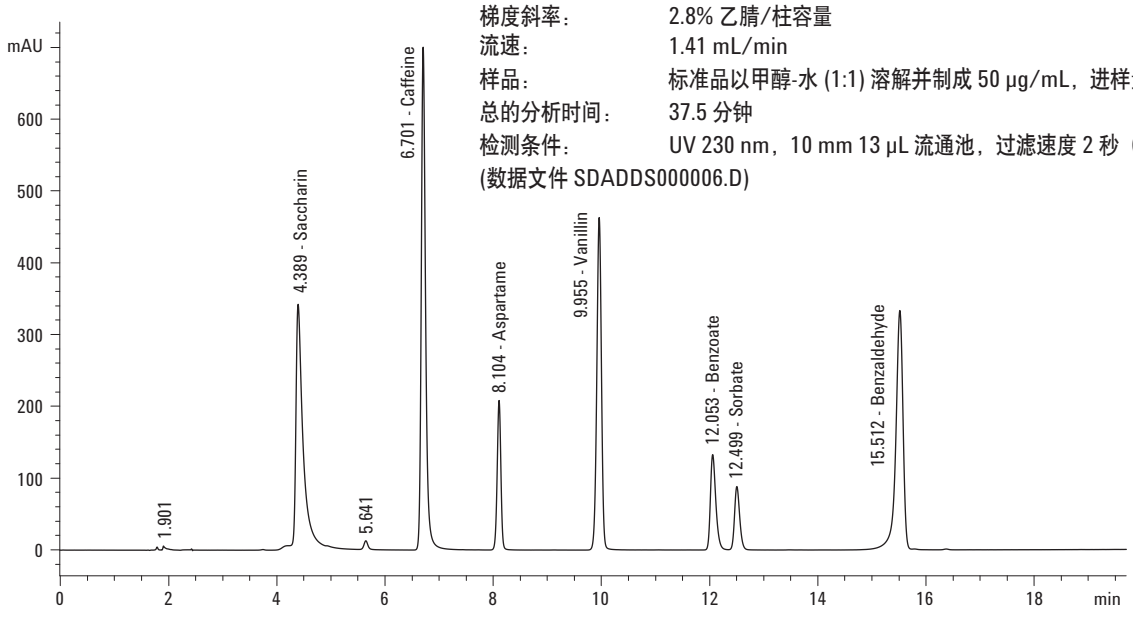
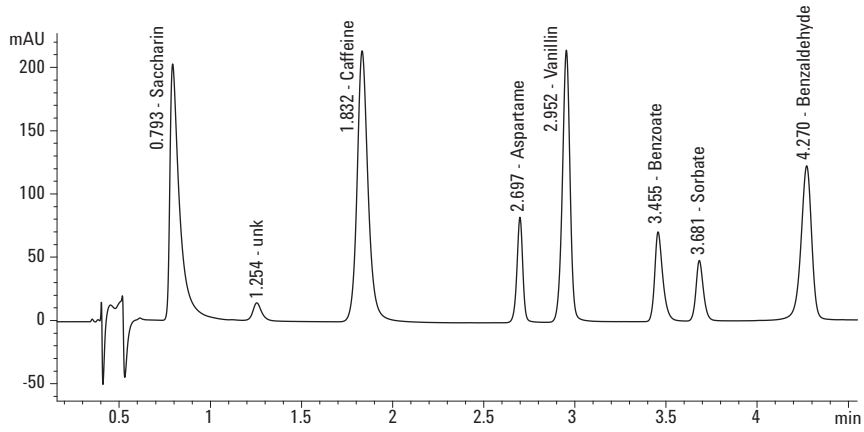


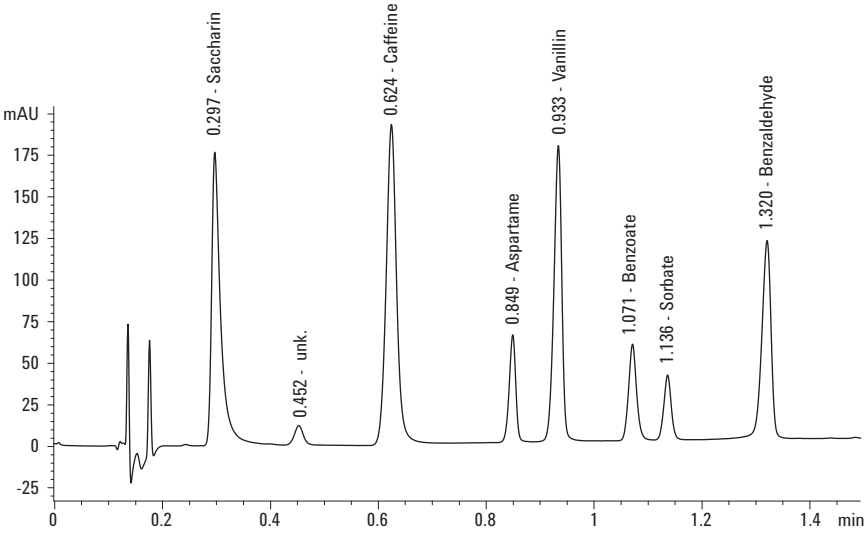
图 1. 软饮料添加剂在 4.6 mm × 250 mm 5 µm ZORBAX SB-C18 色谱柱上的梯度分离



条件

ZORBAX SB-C18 3.0 mm × 50 mm, 1.8 µm
柱温： 45 °C
梯度： 乙腈浓度在5分钟内由 10% 升至 50%，水相为 20 mM 磷酸溶液，以氨水调节 pH 至 3.65
梯度斜率： 2.8% 乙腈/柱容量
流速： 0.6 mL/min
样品： 标准品以甲醇-水 (1:1) 溶解并制成 50 µg/mL，进样量为 2.5 µL
总的分析时间： 9 分钟
检测条件： UV 210 nm，6 mm 5 µL 流通池，带 0.12 mm 内径内接管的热交换器，过滤速度 2 秒（缺省值）
(数据文件 SDADDS_3MM21004.D)

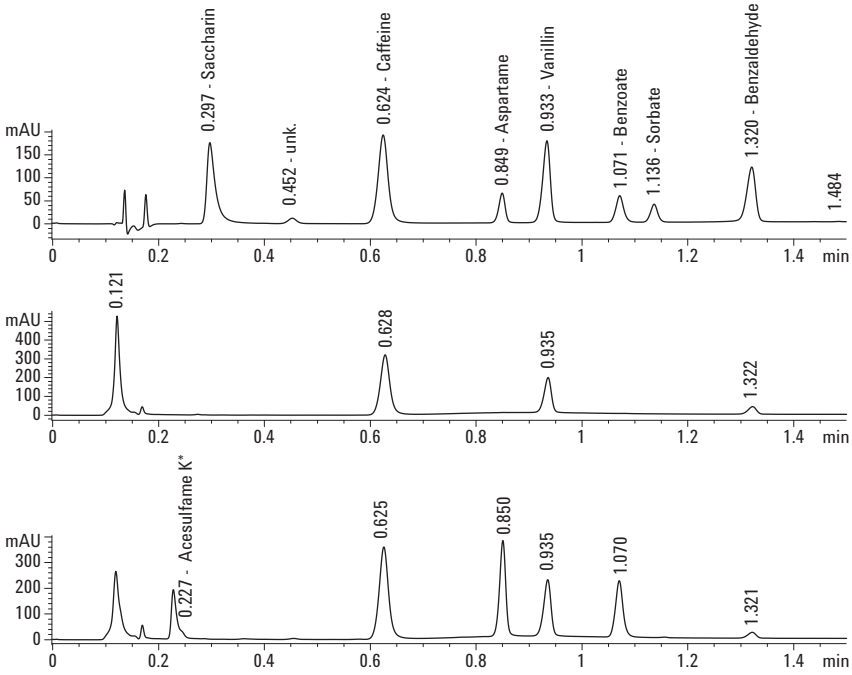
图 2. 软饮料添加剂在 3.0 mm × 50 mm 1.8 µm ZORBAX SB-C18 色谱柱上的梯度分离



条件

ZORBAX SB-C18, 3.0 mm × 50 mm, 1.8 µm
柱温： 45 °C
梯度： 乙腈浓度在 1.5 分钟内由 10% 升至 50%，水相为 20 mM 磷酸溶液，以氨水调节 pH 至 3.65
梯度斜率： 2.8% 乙腈/柱容量
流速： 2.0 mL/min
样品： 标准品以甲醇-水 (1:1) 溶解并制成 50 µg/mL，进样量为 2.5 µL
总的分析时间： 3 分钟
检测条件： UV 210 nm，6 mm 5 µL 流通池，带 0.12 mm 内径内接管的热交换器，过滤速度 2 秒（缺省值）
(数据文件 SDADDS_3MM31029.D)

图 3. 软饮料添加剂在 3.0 mm × 50 mm 1.8 µm ZORBAX SB-C18 色谱柱上的高速梯度分离



条件

色谱条件见图 3

*参照其他样品的相同分析条件和产品标签声明对安赛蜜进行试验性的鉴别

样品：　上图为标准混合液

中图为黑莓香草可乐，20-oz 聚合物瓶装，除去碳酸，进样量 2.5 µL

下图为健怡黑莓香草可乐，20-oz 聚合物瓶装，除去碳酸，进样量 2.5 µL

(数据文件 SDADDS_3MM31029.D，SDADDS_3MM31043.D，SDADDS_3MM31044.D)

图 4. 软饮料添加剂在 3.0 mm × 50 mm 1.8 µm ZORBAX SB-C18 色谱柱上的高速梯度分离

图 3 和图 4 的色谱图中，梯度斜率为 2.8%，加上 3.0 mm × 50 mm 1.8 µm 色谱柱增加的线速度，分离度与在 4.6 mm × 250 mm 色谱柱上运行时相比有很大的提高。按照一般的计算，1.8 µm 色谱柱的绝对塔板数为 12000，低于 250 mm 5 µm 色谱柱的 24000，分离度的增加很可能与运行温度的提高有关，它降低了溶剂的粘度，以及非专属性的色谱柱与被分析物的相互作用，另外，也与 1.8 µm 填料所提高的线速度有关。总的分析时间仅需 3 分钟，这对于高通量筛选和大量样品的定量分析是非常重要的。

结论

对梯度斜率进行认真的转换计算，并结合亚 2 µm 填料的最佳线速度，有助于用户很好地应用小规格色谱柱，在保持分离度不受影响的同时能够缩短分析时间。对柱外体积的优化有助于避免影响柱效的分离度损失，确保获得最大的分离度，并缩短分析时间。我们已经证明这种方法转换可以用于分析典型饮料中复杂的添加剂混合物。如果用户对本应用报告或其他方法转换有任何问题，欢迎与我们联系。

参考文献

1. J. J. van Deemter, F. J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, *A. Chemical Engineering Science* 1956, **5**, 271–289
2. The Influence of Sub-Two Micron Particles on HPLC Performance, Agilent Technologies, application note 5989-9251EN, May 2003

使用反相 HPLC 分离苯甲酸类防腐剂

应用

食品、饮料和化妆品

作者

Coral Barbas and Javier Rupérez
Facultad de CC Experimentales y de la Salud, Universidad San Pablo-CEU
Urbanización Montepríncipe
Boadilla del Monte, 28668 Madrid
Spain

Andre Dams*
Agilent Technologies, Inc.
Amstelveen
The Netherlands

Ronald E. Majors
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

*现地址：
Andre Dams
Analytical Consultancy, Amstelveen
The Netherlands

摘要

本文介绍了方便快速的苯甲酸类防腐剂分析方法，它是通过反相 HPLC 和 ZORBAX Eclipse XDB-C18 快速分离色谱柱实现的。

引言

防腐剂是一类化学试剂，常用于防止食品、饮料和化妆品中的细菌生长。苯甲酸类防腐剂（对羟基苯甲酸酯类）的应用最为广泛。19 世纪 30 年代人们研发了这类防腐剂用来保持奶油的稳定。由于能够同时作为化妆品和食品防腐剂，而且价格便宜，由苯甲酸衍生而来的合成的苯甲酸甲酯、乙酯和丙酯被公认为有效和经济的防腐剂。估计 99% 的化妆品和身体护理类产品中含有某种苯甲酸类防腐剂。苯甲酸甲酯和丙酯被公认为安全物质 (GRAS)。然而，最近由于在肿瘤组织尤其是胸腔组织中发现了这些物质，这一防腐剂体系开始出现了问题。

药物科学杂志 (Journal of Pharmaceutical Science) 的一项研究揭示，6 名婴儿在接受含有苯甲酸防腐剂的多剂量庆大霉素制剂后，尿样中的苯甲酸含量最高可达 82.6%。

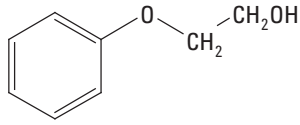
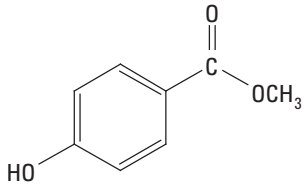
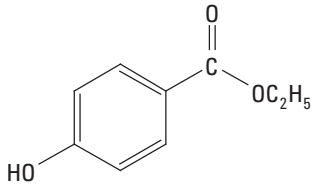
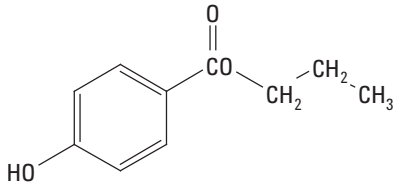
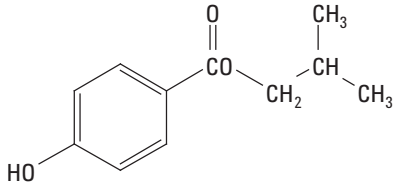
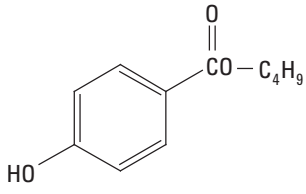
英国的布鲁内尔大学 (Brunel University) 生物和生物化学系的研究人员发现，对于苯甲酸类，最值得关注的是其对实验动物的类雌激素作用。另外，在一些疫苗中也用作防腐剂的 2-苯氧乙醇 (2PX)，有时也与苯甲酸类联合使用。苯甲酸类混合物具有广谱抑菌的优点，可以降低库存量水平，节约成本。处理一份足够量的液体比几份少量的粉末或液体更为方便。英国利兹 Horsforth 的 Clariant Ltd 公司有一种产品 Phenonip，是苯甲酸混合物的 2PX 溶液。该产品可能是最有名的苯甲酸混合物，经常被仿制。

食品和化妆品中存在哪些种类的苯甲酸类防腐剂，以及如何在痕量水平下进行分析，这是很有意义的。HPLC 就是一种分离和分析这类物质的理想方法。

化学性质

2PX 和苯甲酸类化合物的结构见表 1。由于苯环的存在，这些化合物在极低的浓度下均能被紫外检出。因为不含离子性的官能团，这些化合物被认为是亲脂性的。因此，可以预见，这类化合物可能在脂肪组织中蓄积。苯甲酸酯类在水中微溶，溶解度随着酯的碳链长度增加而降低。例如，苯甲酸甲酯在 20℃ 时的溶解度为 0.25% (w/w)，而苯甲酸丁酯的溶解度仅为 0.02% (w/w)。绝大多数苯甲酸酯类易溶于乙醇、丙酮、乙醚和许多其他有机溶剂。由于这一溶解特性，非常适合应用反相色谱法 (RPC) 进行分离。在色谱文献中可以看到许多有关苯甲酸酯类反相分离方法的报道 [1-4]。

表 1. 防腐剂的结构式和浓度

2PX：	2-苯氧乙醇	
MEP：	对羟基苯甲酸甲酯	
ETP：	对羟基苯甲酸乙酯	
PRP：	对羟基苯甲酸丙酯	
IBP：	对羟基苯甲酸异丁酯	
BTP：	对羟基苯甲酸丁酯	

色谱条件

色谱柱：	ZORBAX Eclipse XDB-C18 快速分离色谱柱，4.6 mm × 150 mm，3.5 µm
流动相：	溶剂 A：水 溶剂 B：甲醇
梯度：	时间　甲醇 % 0　38 5　38 6　60 16　60 17　62 20　38
流速：	0.8 mL/分钟
柱温：	40 °C
检测器：	UV 254 nm
进样量：	5 µL

结果与讨论

苯甲酸类混合物中各组分及 2PX 的分离情况如图 1 所示。

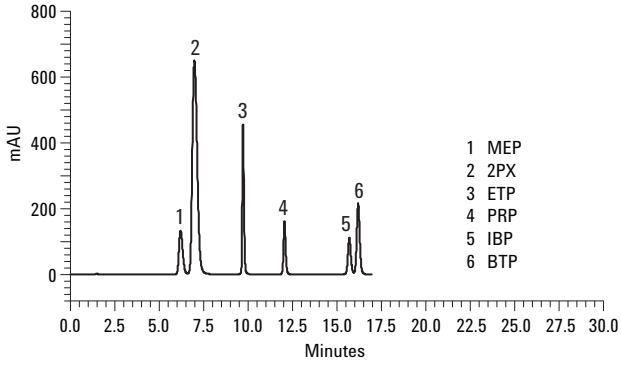


图 1. 防腐剂的反相 HPLC 分离结果

样品制备只涉及甲醇对样品混合物的溶解。所有组分达到基线分离。在其它色谱柱中，MEP 和 2PX 以及 IBP 和 BTP 通常很难分离，尤其是在如此短的分析时间内（16 分钟）。本方法可重现，并且具有良好的分离效能。

结论

使用反相 HPLC 和 ZORBAX Eclipse XDB-C18 快速分离色谱柱 (4.6 mm × 150 mm，3.5 µm) 能够方便快速地进行苯甲酸类防腐剂的分析。

参考文献

1. Robert Ricker, “High-Speed Separation of Parabens”, Agilent Technologies, publication 5988-6356EN www agilent.com/chem.
2. M. Borremans, J. van-Loco, P. Roos, and L. Goeyens, (2004) *Chromatographia.*, **59**(1–2), 47–53.
3. E. Marengo, M.C. Gennaro, and V. Gianotti, (2001) *J. Chromatogr. Sci.*; **39**(8), 339-344.
4. J. E. Koundourellis, E. T. Malliou, and T. A. Broussali, (2000) *J. Pharm. Biomed. Anal.,* **23**(2–3), 469–475.

阿斯巴甜的代谢产物与应用

应用

食品分析

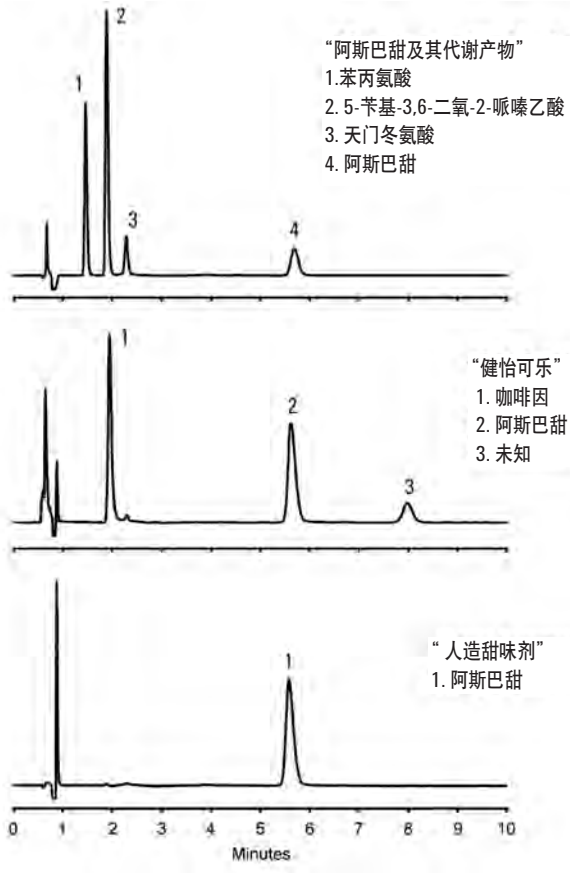
作者

Robert Ricker

阿斯巴甜是一种食品工业常用的添加在无糖饮料和清淡食品中的人工甜味剂。因为没有糖精和甜蜜素的苦味，它也被用作糖的替代品。对于经常进行食品中阿斯巴甜及其代谢产物测定的质量控制实验室，快速分析显得尤其重要。

要点提示

- 使用更短的色谱柱 (75 mm) 和更小粒径 (3.5 µm) 的填料实现了快速分析（保持了阿斯巴甜及其代谢产物的分离度不变）
- 对于液体样品，只需经过稀释即可注入色谱柱分析，最大限度的减少了样品制备步骤。对于固体样品，只需用水提取后就可注入色谱柱分析



条件:
ZORBAX SB-C18 (4.6 x 75 mm, 3.5 µm)
(安捷伦部件号: 866953-902)
流动相: 85:15, 0.1% 三氟乙酸: 乙腈
1 mL/min, 35 °C, 紫外检测波长 (210 nm)

花青素的高效快速分离

应用

食品分析

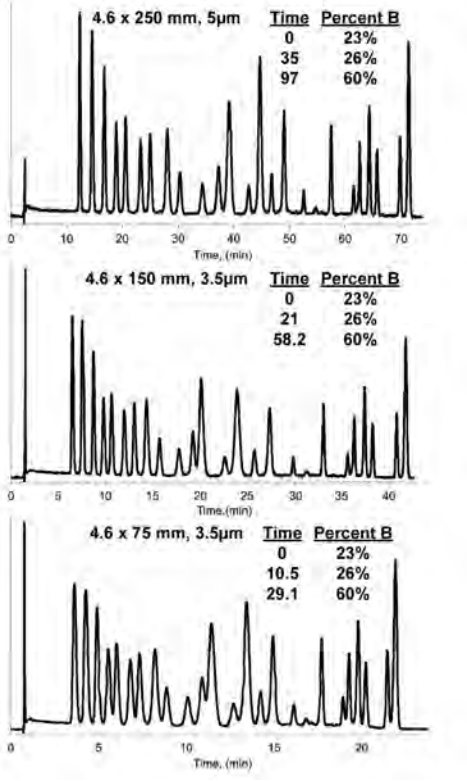
作者

Robert Ricker

花青素是存在于许多水果和花朵中使之呈现亮红色和蓝色（和紫色）的天然色素。蓝莓的颜色就是由水果中许多不同的花青素形成的。对花青素进行定性和定量分析可以用来区分蓝莓植物的品种和鉴定其品质。因此，花青素的色谱分离在农业和制酒业越来越受到重视。最近，对花青素作为抗氧化/抗癌剂医药作用的兴趣促使了人们研究其色谱分离的兴趣。

要点提示

- 通常，在这些分离中使用低 pH 值的流动相（含有甲酸）会造成色谱柱键合相降解和分离改变 (Goiffon, J.-P., Brun, M., and Bourrier, M.-J., J. Chromatogr. 537 101-121, 1991)。但 ZORBAX StableBond SB-C18 色谱柱能在很低 pH 值的反相色谱分离条件下提供长期的稳定性
- 实验中使用磷酸取代传统流动相中添加的甲酸，结果在 ZORBAX SB-C18 色谱柱上实现了大于 25 种花青素的更好的分离
- 鉴于产品的重复性和拥有窄粒径分布的更小色谱填料 (3.5 µm)，分析人员可以通过系统地改变色谱柱规格来节约时间和溶剂



条件:
ZORBAX SB-C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm; 4.6 x 150 mm, 3.5 µm; 4.6 x 75 mm; 3.5 µm)
(安捷伦部件号分别为: 880975-902, 863953-902, 866953-902)
流动相: A: 3% 磷酸 B: 100% 甲醇, 梯度: (见各自色谱图)
进样: 20 µL, 1 mL/min, 30 °C,
检测: 紫外波长 (525 nm),
样品制备: (见背面)

制备蓝莓提取物的方法 *

开始混合: 10 g 蓝莓

10 ml 溶剂（ 70:28:2, 甲醇:水:甲酸）

冰上混合 10 分钟

通过玻璃棉过滤至 10 ml 注射器

滤液静置 1 小时

过 0.2 µm 滤膜

立即注入 50 µL 进行高效液相色谱分析

* 蓝莓提取方法和提取物由加拿大农业和农业食品部（位于加拿大新斯科舍省肯特维市）的 Willy Kalt 和 Jane McDonald 博士友情提供

使用 HT 1.8 µm 快速分离色谱柱对甘草根提取物进行高分离度反相 HPLC 分离

应用

食品添加剂，天然产物和药物

作者

Bernard Permar and Ronald E. Majors
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

对甘草、甘草水解产物和市售甘草样品进行的高分离度反相 HPLC 分析研究表明，ZORBAX 1.8 µm 柱的分离度和通量都远远超过常规 5.0 µm 柱。

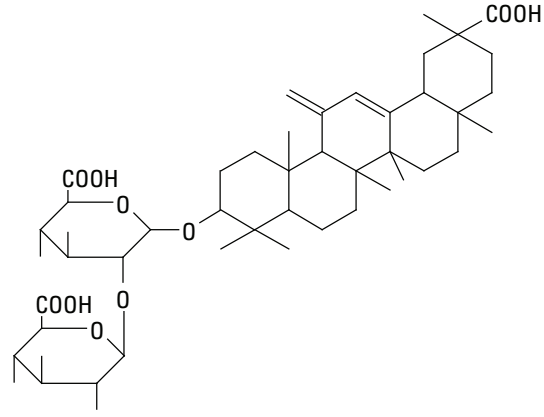


图 1. 甘草次酸的结构

引言

甘草是洋甘草的根部，这种植物是 4 至 5 英尺高的木质灌木，生长于欧洲、中东和西亚。已知这种植物的根含有约 4% 的甘草素，即甘草酸的钾盐或钙盐。甘草酸是带有两分子葡萄糖醛酸的五环三萜羧酸（18-β-甘草次酸）的糖苷（图 1）。

甘草素比蔗糖（甘蔗糖）甜 50 倍左右，但高剂量的甘草素具有毒性。水解后，这种糖苷会失去甜味，转化成糖苷配基甘草次酸和两分子葡萄糖醛酸。

从这类植物的很多品种得到的提取物成分都很复杂，包含 100 多种化合物。其中，有几种化合物可用作添加剂增加糖果的甜度，或用作止咳糖浆的增味剂，或用于中和药物的苦味；此外，它们还具有治疗疾病的功效，这主要体现在中药里 (TCM)。在中国以及印度、埃及、希腊和罗马，几百年前人们就知道甘草具有药用价值。用途包括止咳、通便和治疗胃溃疡、早期 Addison 病和肝病。最新的研究表明，甘草素对 DNA 和 RNA 病毒（流行性感冒 A 和 B、HIV、VZV、乙肝和丙肝病毒）具有抗病毒活性 [1]。甘草还可用于局部化妆。

具体化合物的丰度可能会有很大差异，取决于植物的品种、收获的时间和提取方法。因此，需要能够监测活性成分的分析方法。已经发现，梯度洗脱反相 HPLC 是分离甘草中一些重要化合物的有效方法 [2]。本文对传统的 HPLC 方法与较新的快速分离高通量 (RRHT) 柱进行对比。我们将使用这些 HPLC 技术研究两种市售甘草根提取物之间的差异。

实验

本研究使用两个反相 (RP) 柱：

- 常规的 ZORBAX StableBond (SB)-C18，4.6 mm × 250 mm，5 µm
- ZORBAX SB-C18 RRHT，4.6 mm × 150 mm，1.8 µm

RRHT 的粒径较小，因此可以使用更短的色谱柱获得与较长的常规色谱柱相同的分离度，同时加快分离速度。

HPLC 条件

仪器：	Agilent 1200 系列高分离度快速系统
检测器：	多波长检测器 (MWD)，254 nm/100 BW，450 nm 参比波长
流动相：	A = 1% 乙酸水溶液 B = 1% 乙酸的乙腈溶液

ZORBAX SB-C18 色谱柱的梯度条件：

常规：	4.6 mm × 250 mm，5 µm 50 分钟内，B 由 5% 递增至 100%
RRHT:	4.6 mm × 150 mm，1.8 µm 30 分钟内，B 由 5% 递增至 100%
流速：	1.0 mL/min
温度：	室温
标准品：	购自 Sigma Aldrich

- (G) 0.1-mg 甘草次酸铵盐，~75 %，溶于 0.5-mL 流动相 B 中，然后加入 0.5 mL 流动相 A 至 1.0 mL
- (GA) 0.1-mg 18-β-甘草次酸，97%，溶于 0.5-mL 流动相 B 中，然后加入 0.5 mL 流动相 A 至 1.0 mL

样品：

- 甘草根提取物 A（HERB FARM牌）
- 甘草根提取物 B（Newark 天然食品）

进样前，对两种提取物进行旋涡振荡，然后过滤（0.2 微米）。

进样量： 5 µL 提取物

结果

普通甘草提取物中发现的最重要的化合物是 G，其次是其水解产物，GA。这些物质都能在市场上买到。虽然在甘草中鉴定出了一些其他组分，而且这些组分也能在市场上买到，但是它们非常昂贵。因为我们的主要目的是要证明使用更短的高分离度 HPLC 柱的优势，所以我们只使用两种标准品 (G 和 GA) 来建立初始方法。图 2a 显示使用梯度洗脱在常规色谱柱 (ZORBAX SB-C18，4.6 mm × 250 mm，5 µm) 上梯度分离 G 和 GA。因为待检验的甘草提取物非常复杂，等强度条件不能分离所有的组分。G 因为比 GA 多了葡萄糖基团而极性更强，因此 G 先洗脱，而 GA 的洗脱要晚得多。使用这一梯度，42 分钟以内就可以洗脱 GA。换成更短的 ZORBAX SB-C 18 RRHT 色谱柱 (4.6 × 150 mm，1.8 µm)，分离效果几乎相同，如图 2b 所示。然而，分离时间只有 25 分钟多一点，节省了约 40% 的时间。

为了研究这些色谱柱对真正的甘草根提取物的分离效果，图 3 和 4 描绘了加入过滤的提取物后观察到的复杂的色谱图，实验部分对这些提取物进行了说明。图 3a 显示使用 5 µm 250-mm 柱获得的复杂的色谱图。断面表示提取物中存在少量 GA。因为 GA 是 G 的水解产物，所以它在甘草提取物中的浓度应该低得多，除非对提取物进行了处理以增加水解产物的浓度。根据面积计数，提取物 A 中 GA 浓度低于 G 浓度的 0.5%。

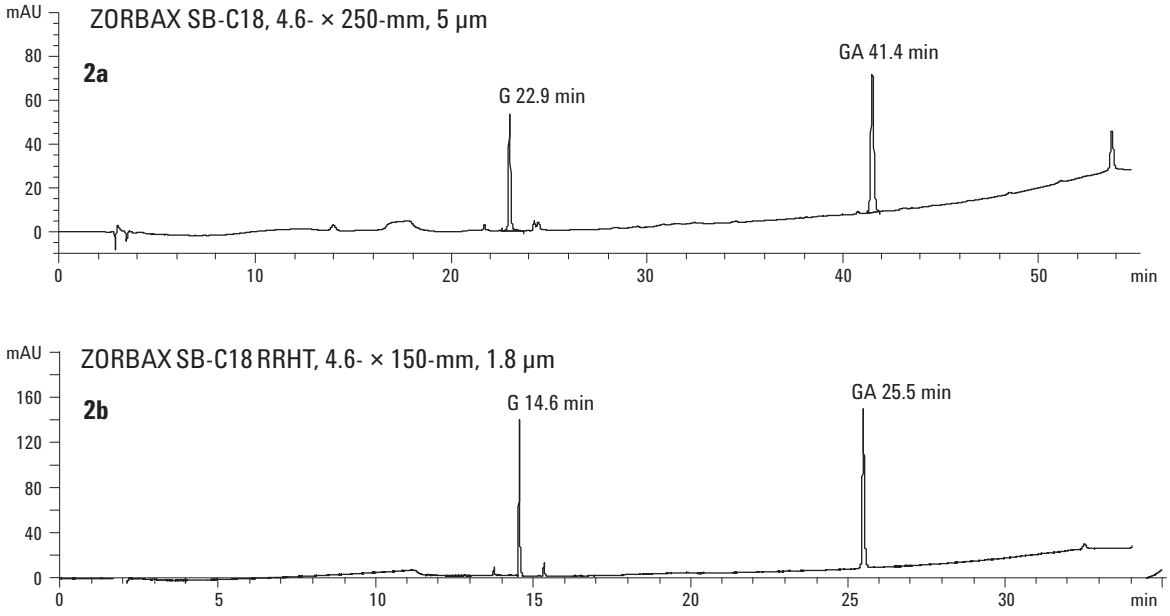


图 2. 在 5.0 µm 和 1.8 µm 测试柱上进行的 G 和 GA 梯度反相分离

虽然未对实际的峰进行计数，但 5-µm 柱的峰容量计算值 (3) 为 290（分离度：1.0). 在 1.8-µm 150-mm 柱上对相同的提取物 A 进行分离，可以看到结构更精细（即分离度更高）的色谱图（图 3b）。这种效率更高的色谱柱具有 442 的峰容量计算值，比较长的 5-µm 柱高 50% 以上。因此，使用这种较短的快速分离色谱柱能更轻松地确定含量较少的组分。1.8-µm 柱的单位时间峰数（分离度 = 1.0）计算值为 17.7 个峰/分钟，5-µm 柱为 7.1。

图 4a 和 4b 显示使用提取物 B 进行类似的分离。通过比较图 3b 和图 4b 的高分离度色谱图，可以发现该提取物比提取物 A 还要复杂。同样，1.8-µm 柱的每分钟峰数计算值远远超过 5-µm 柱（分别为 17 和 7.5）。根据 GA 的峰面积计数，提取物 B 中 GA 的浓度大约为 G 的 1%。

结论

并未尝试对甘草提取物的组分进行定量分析。根据我们的研究，很明显，1.8-µm 柱的分辨率和通量都远远超过 5.0-µm 常规柱。因为要处理更复杂的天然产物，研究者需要更精确的组分分析，因此高分离度小颗粒柱将得到更广泛的应用。在对甘草根、其他天然产物和 TCM 进行的研究中，梯度分离功能和灵敏的检测是必不可少的。

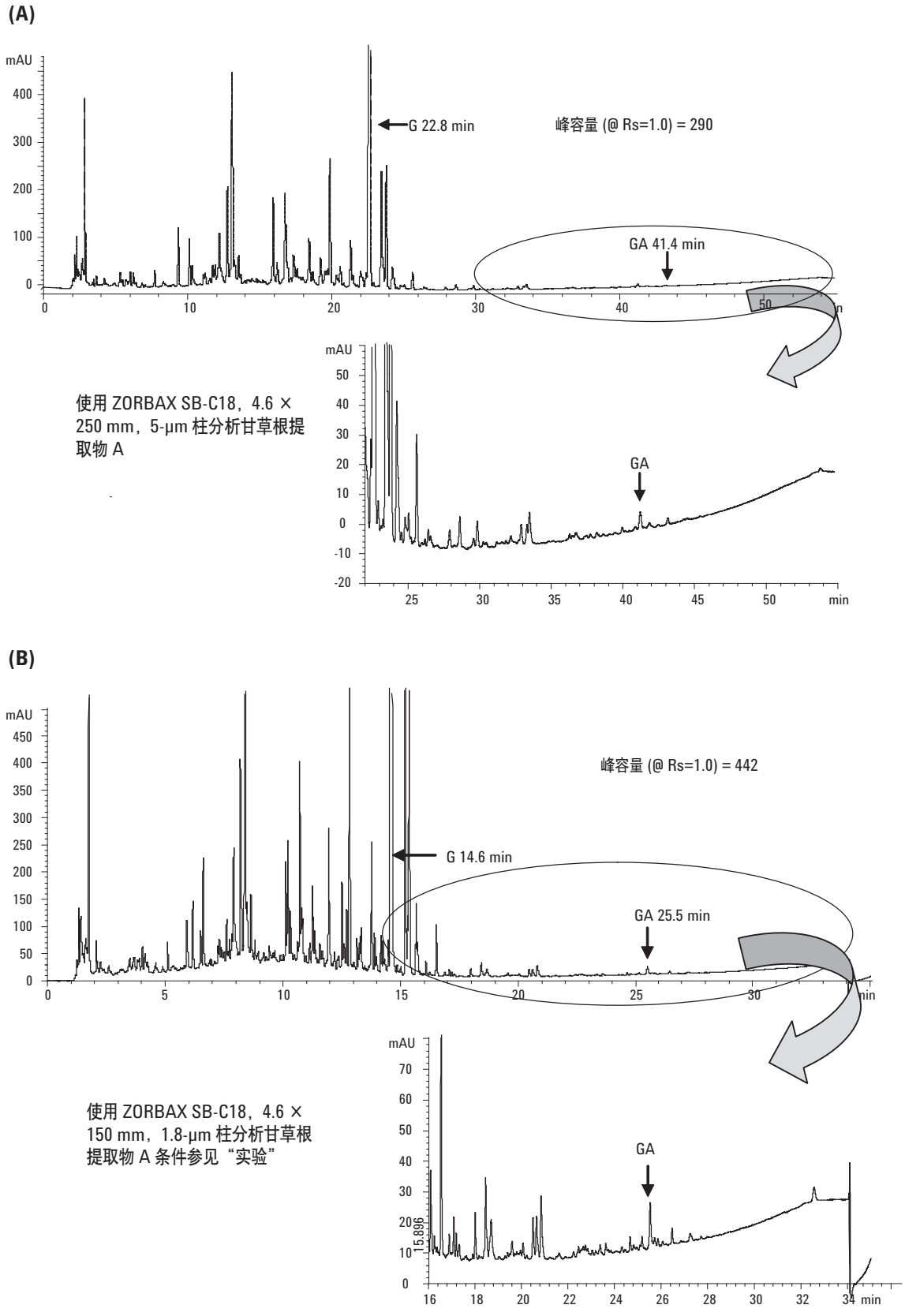


图 3a 和 3b. 在 5.0-µm 柱 (A) 和 1.8-µm 柱 (B) 上对甘草根提取物 A 进行梯度反相分离

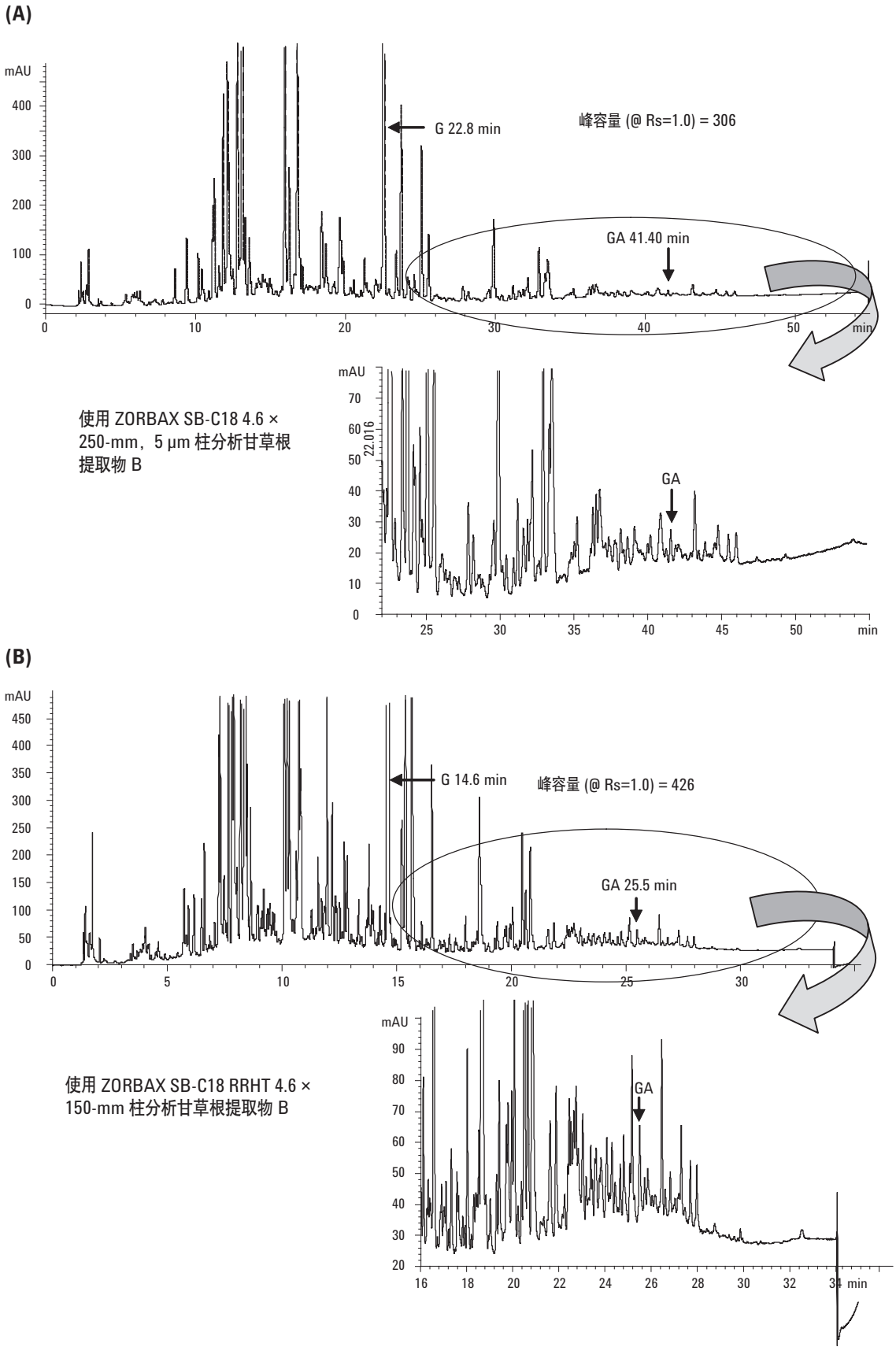


图 4a 和 4b. 在 5.0-µm 柱 (A) 和 1.8-µm 柱 (B) 上对甘草根提取物 B 进行梯度反相分离

参考文献

1. S. Fanali, Z. Aturki, G. D'Orazio, M. A. Raggi, M. G. Quaglia, C. Sabbioni, and A. Rocco, (2005) *J. Sep. Sci.*, **28**, 982–986.
2. I. Kitagawa, (2002) *Pure Appl. Chem.* **74** (7), 1189–1198.

气相色谱/三重串联四极杆气质联用仪 (GC/QQQ) 应用

Agilent 7000B 完美地融合了 7890 气相色谱仪的前端分离技术和微板流控技术，可快速处理具有挑战性的色谱分离工作。独有的专为气相设计的惰性离子源，有效地消除了来自于复杂基质的干扰，保证仪器具有最佳的耐受性。创新的双曲面四极杆和碰撞反应池技术，具有业界最快的质谱扫描速度（500 MRMs/秒），可轻松地完成几百种化合物的同时分析工作，引领了复杂基质中农兽药多残留分析的发展方向。Agilent 7000B 三重串联四极杆气质联用仪凭借其优良的稳定性，超高的灵敏度和极强的选择性，成为食品、环境中痕量污染物（农药残留、兽药残留、持久性污染物）分析的首选利器。

气相色谱/三重串联四极杆气质联用仪 (GC/QQQ) 应用

5990-3578 安捷伦三重串联四极杆 GC/MS/MS 分析 175 种农药残留 309

5990-4071 采用三重串联四极杆 GC/MS 的联用和反吹技术快速筛选和确认婴儿奶粉及
大豆产品中的三聚氰胺及其类似物 322

5989-9727 用气相色谱/质谱/质谱联用技术对海洋生物中杀虫剂等复杂样品进行分析 332

安捷伦三重串联四极杆 GC/MS/MS 分析 175 种农药残留

应用

食品安全

作者

Philip L. Wylie and Chin-Kai Meng
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Rd.
Wilmington, DE 19808
USA

摘要

本文介绍了用安捷伦的 7890A/7000A GC/MS/MS，采用多反应监测模式 (MRM) 分析 175 种常用农药残留的方法。使用这个分析方法分析了大量蔬菜、水果样品，同时我们用单四极杆 GC/MS (GC/Q) 也做了同样的样品以便进行数据的比较。GC/Q 运用选择离子检测 (SIM) 和全扫描方式。全扫描方式测定结果运用安捷伦的解卷积报告软件 (DRS) 及 RTL 农药及内分泌干扰物数据库进行评价。GC/Q 配置有多模式进样口，采用不分流 (splitless) 模式，进样量为 5 µL。相同的样品，GC/QQQ 的进样量为 1 µL。分析发现 GC/QQQ 的灵敏度和选择性比 GC/Q 的任何模式都高，主要是由于它受萃取液基质干扰少得多。然而，GC/QQQ 在 MRM 模式下只能对目标化合物进行分析，所以仍然需要 GC/Q 方法和 DRS 软件对 900 种以上的农药和其它污染物进行筛选。

引言

农残检测是一项很复杂的任务。需要对各种各样的农作物基质中几十种甚至几百种化合物进行检测。样品的提取技术，如 QuEChERS 方法（见1－3），其提取液中仍然存在大量基质，如果增加净化步骤，在去除干扰化合物的同时，又存在更多需要检测农药丢失的风险。很多农残的检测限在 10 µg/KG (10 ppb) 或更低。所以需要更可靠的分析手段进行分析。

对于适合 GC 分析的农药，很多实验室采用两种辅助技术进行筛选和确认。对于浓度范围为 5－100 ppb 的农药，使用 GC/单四极 (GC/Q) 全扫描方式和 DRS 以及 RTL 农药及内分泌干扰物数据库 (4－6) 进行大范围的筛选，依据基质和进样体积的不同，大多数农药的检出限为 5－100 ppb。对于很多复杂基质中目标农药的分析，安捷伦 7890A/7000A GC 三重四极杆 (GC/QQQ) 要优越得多。

本文比较了三种质谱分析技术对多种农作物中农药残留的分析。加标和未加标样品中的农药用 GC/Q 选择离子检测 (SIM) 和全扫描加 DRS 进行分析。同样的样品用 GC/QQQ 运用多反应监测 (MRM) 模式对 175 种农药进行分析。这样做可以对 GC/Q 和 GC/QQQ 分析不同农作物基质中低含量农药的检出情况进行比较。

实验

样品

加标与未加标新鲜样品提取液由食品与药物管理部门 (U.S. FDA, CFSAN, College Park, MD) 和美国农业局 (USDA ARS, ERRC, Wyndmoor, PA) 提供。样品通过 QuEChERS [1–3] 方法提取并且经石墨化碳黑净化。最终的甲苯液含 4.5 克样品/毫升。USDA 提供的样品依照 QuEChERS 方法萃取。每毫升乙腈含 1 克样品。

仪器

实验用 GC/Q 和 GC/QQQ 条件参数在表 1 和 2 中列出。

表 1. GC/Q仪器分析条件

GC	安捷伦 7890A 系列
自动进样器	安捷伦 7693A 进样器及样品盘
进样口	多模式
载气	氦气
进样压力	运行期间 18.420 psi (恒压模式) 2 psi (反吹时)
不分流模式进样口参数	
温度	250 °C
衬管	Helix 双锥去活化 (部件号 5188-5398)
进样体积	1 µL
分流阀开启时间和分流出口流量	30 mL/min，0.75 min
冷不分流模式进样口参数	
升温程序	60 °C (0.01 min), 以 700 °C/min 升至 280 °C (保持)
衬管	Helix 双锥去活化 (部件号 5188-5398)
进样体积	5 µL
分流阀开启时间和分流出口流量	30 mL/min / 1.25 min
炉温升温程序	70 °C (1 min), 以 50 °C/min 升至150 °C (0 min), 以 6 °C/min 升至 200 °C (0 min), 以 16 °C/min 升至 280 °C (5 min)
微板控制技术	2 路分流器，其中一路封闭 — 用来反吹分析柱和保护柱
气流控制模块 (PCM)	氦气，连接到 2 路分流器
PCM 压力	运行时 4.0 psi，反吹时 60.0 psi
分析柱	Agilent J&W HP-5ms UI 15 m × 0.25 mm × 0.25 µm (部件号 19091S-431UI)
连接	在保护柱与双路分流器之间
保护柱	2.0 m × 0.25 mm Siltek 去活化石英柱 (Restek, Bellefonte, PA)
连接	进样口与分析柱之间使用一个接头 (部件号 G3182-61580)，与保护柱相连
限流器	80 cm × 0.15 mm 去活化石英柱 (Agilent)
连接	双路分流器与 MSD 之间
初始柱流量	2.705 mL/min
保留时间锁定	甲基毒死蜱锁定在 8.298 分钟
质量选择检测器	安捷伦 5975c 系列，分子涡轮泵
模式	EI
传输线温度	280 °C
离子源温度	230 °C
四极杆温度	150 °C
阈值	100
采样频率	A/D=4
增益因子	1
SIM 驻留时间	4-25 ms
痕量离子检测	开启
溶剂延迟	2.5 分钟

(接下页)

表 1. GC/Q 仪器及分析条件(续)

反吹条件	
时间	后运行时持续 5 分钟
炉温	280 °C
辅助 EPC 压力	60 psi
进样口压力	2 psi
软件	安捷伦 GC/MS 化学工作站控制与分析软件 (部件号 G1701EA E.02.00 SP1)
DRS 软件	Agilent 部件号 G1716AA (Ver. A.04.00)
谱库检索	NIST MS 检索 (Ver 2.0d)
去卷积软件	自动质谱解卷积及识别软件 (AMDIS) (AMDIS_32 版 2.62 或更高, 与 NIST 质谱库一起 – Agilent 部件号 G1033A)
质谱库	NIST08 (Agilent 部件号 G1033A) 杀虫剂及内分泌干扰物数据库 (Agilent 部件号 G1672AA)

表 2. GC/QQQ 仪器分析条件

GC	安捷伦 7890A 系列
自动进样器	安捷伦 7683A 进样器及样品盘
进样口	分流/不分流
衬管	Helix 双锥去活化 (部件号 5188-5398)
载气	氦气
进样压力	运行期间 18.350 psi (恒压模式) 1.0 psi (反吹)
温度	250 °C
进样体积	1 µL
分流阀开启时间和分流出口流量	30 mL/min，0.75 min
节省载气	开 (20 mL/min，2.0 min)
升温程序	70 °C (1 min), 以 50 °C/min 升至 150 °C (0 min), 以 6 °C/min 升至 200 °C (0 min), 以 16 °C/min 升至 280 °C (5.5 min)
毛细管柱流量技术	可吹扫柱接头 (部件号 G3186B) – 用于分析柱和保护柱反吹
辅助 EPC 气	氦气，连接至可吹扫接头
辅助 EPC 压力	运行时 4 psi，反吹时 80 psi
分析柱	Agilent J&W HP-5ms UI 15 m × 0.25 mm × 0.25 µm (部件号 19091S-431UI)
连接	一端接保护柱，另一端接可吹扫柱接头 (部件号 G3186B)
保护柱	2.0 m × 0.25 mm Siltek 去活化石英柱 (Restek, Bellefonte, PA)
连接	一端接进样口，另一端接柱接头 (部件号 G3182-61580)
限流器	65 cm × 0.15 mm 去活化石英管 (Agilent)
连接	一端接可吹扫柱接头 (部件号 G3186B)，另一端接质谱
进样口流速	2.688 mL/min
保留时间锁定	甲基毒死蜱锁定于 8.298 min
三重串联四极杆质谱仪	Agilent 7000A 系列
模式	EI
传输线温度	280 °C
溶剂延迟	2.3 min
离子源温度	300 °C
四极杆温度	Q1 和 Q2 = 150 °C
MRM 模式条件	
MS1 分辨率	1.2 u
MS2 分辨率	1.2 u
碰撞气流量	氮 1.5 mL/min, 氦 2.35 mL/min
反吹条件	
时间	后运行时持续 3 min
炉温	280 °C
辅助 EPC 压力	80 psi
进样口压力	1 psi
软件	
数据采集	Agilent MassHunter 数据采集软件 (Ver. B.04.00)
定性分析	MassHunter Workstation 定性分析软件 (Ver. B.03.01)
定量分析	MassHunter Workstation 定量分析软件 (Ver. B.03.01)

结果与讨论

色谱配置

两个 GC 系统都使用了 15-m × 0.25 mm × 0.25 µm Agilent J&W HP-5ms UI 柱子。并且以两倍速度运行安捷伦标准农残分析方法。这个方法的初始温度为 70 °C 对于多数 GC 溶剂不需要保护柱。但是，1 微升的甲苯进样量会导致峰形很差，而在柱前安装 2 米去活化的保护柱可以使峰形得到改善。

柱反吹对于食品基质 (4,8-9) 分析是必要的，因为这类样品中通常含有高沸点化合物。仅仅数次进样就会导致这些物质残留在柱头（或保护柱）中，造成峰拖尾、保留时间偏移。再后来它们会由柱子进入离子源导致离子源必须清洗。

安捷伦的毛细管流量技术通过几段不同的毛细管流量设置造就了反吹流程 (4，8－9)。GC/QQQ 系统用了可吹扫柱接头，GC/Q 系统运用双路分流器。两种系统中，分析柱都连接在毛细管流量装置中。两系统中都用了一个短的限流器连接质谱。图 1 介绍了每种仪器的配置。

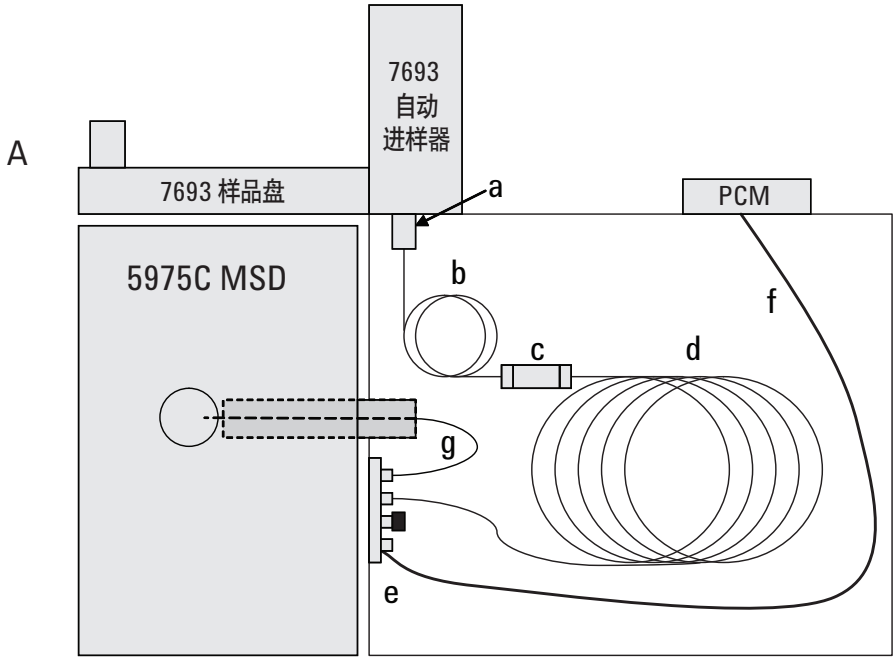


图 1A. 用于 scan 和 SIM 的 GC/MS 配置有 a) 多模式进样口，b) 2 m× 0.25 mm 去活化保护柱，c) 柱接头，d) 15 m × 0.25 X 0.25 µm Agilent J&W HP-5ms UI 柱，e) 双路可吹扫分流器，其中一路密封，f) 气流控制模块 (PCM) 控制氦气吹扫流量，g) 80 cm × 0.15 mm 去活化限流柱

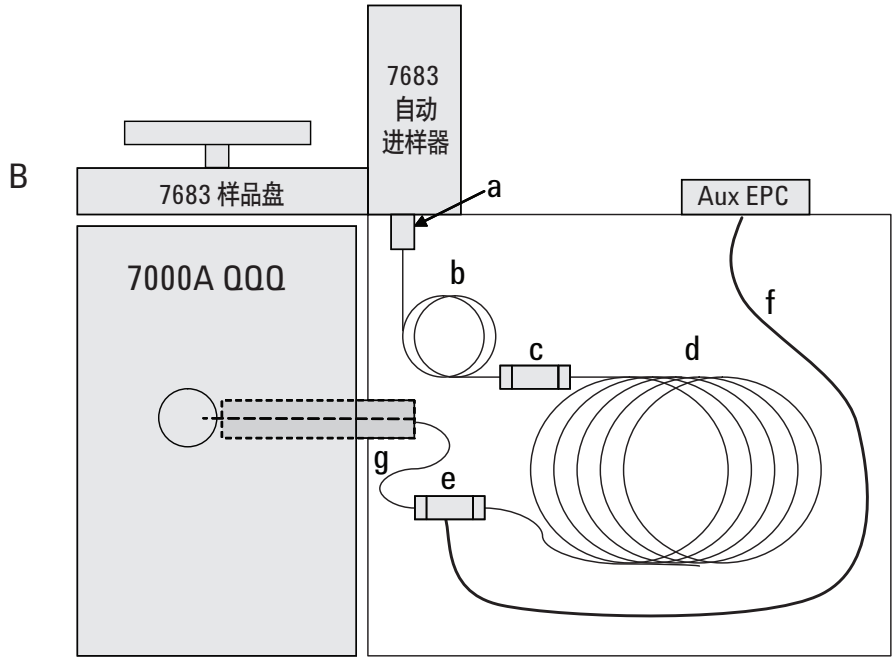


图 1B. GC/QQQ 使用 MRM 分析。配置有 a) 分流、不分流进样口，b) 2 m × 0.25 mm 去活化保护柱，c) 柱接头，d) 15 m × 0.25 × 0.25 µm Agilent J&W HP-5ms UI 柱子，e)可吹扫柱接头，f) 氦吹扫流量，g) 65 cm × 0.15 mm 去活化限流柱

MRM方法

这个多反应监测方法可以对 175 种常用农药进行分析。每种化合物使用两个 transitions 检测，并且优化了各自的碰撞电压。

表 3. 175 种农药 transitions 的目标离子与定性离子

		定量转换			定量转换		
化合物名称	保留时间	前体离子	子离子	CE	前体离子	子离子	CE
氟丙菊酯	15.371	181.1	152.1	25	181.1	127.1	30
阿米卡星水合物	11.403	282.9	219.0	10	282.9	184.0	25
甲草胺	8.507	188.1	130.1	40	188.1	160.1	10
艾试剂	9.247	262.9	192.9	40	262.9	190.9	40
丙稀除虫菊酯	10.908	123.1	81.1	10	123.1	79.1	20
莠去津	6.581	200.1	122.1	10	200.1	104.0	20
甲安菲他明	13.248	215.0	171.0	15	215.0	128.0	30
甲基谷硫磷	14.835	160.1	77.1	20	160.1	132.1	0
氟草胺	5.842	292.1	264.0	10	292.1	160.1	20
α-六氯环己烷	6.025	181.0	145.0	15	181.0	109.0	30
ß-六氯环己烷	6.595	181.0	145.0	15	181.0	109.0	30
δ-六氯环己烷	7.266	181.0	145.0	15	181.0	109.0	30
苯菊酯	14.428	181.1	165.1	30	181.1	166.1	15
除草定	9.186	205.0	132.0	30	205.0	187.9	20
溴硫磷	10.020	330.9	315.9	20	330.9	285.9	35
乙基溴硫磷	11.261	358.9	302.9	15	358.9	284.8	35
菊螨酯	14.320	183.0	155.0	15	183.0	76.0	35
克菌丹	10.617	79.1	77.1	10	79.1	51.1	25
卡波硫磷	13.316	157.0	121.0	25	157.0	75.1	40
氯丹-*顺*	11.410	372.9	265.9	40	372.9	263.9	30
氯丹-*反*	11.010	372.9	265.9	20	372.9	263.9	25
α-氯丹	8.562	230.0	160.0	40	230.0	195.0	25
ß-氯丹	9.376	230.0	160.0	35	230.0	195.0	25
γ-氯丹	9.314	230.0	160.0	40	230.0	195.0	25
ß-毒虫畏	10.779	267.0	159.0	20	267.0	81.0	40
杀螨酯	12.706	139.0	111.0	15	139.0	75.0	30
地茂散	4.323	191.0	113.0	15	191.0	141.0	10
百菌清	7.395	265.9	133.0	40	265.9	230.9	20
毒死蜱	9.606	196.9	168.9	15	196.9	107.0	40
甲基毒死蜱	8.284	286.0	93.0	25	286.0	270.9	20
对硫磷	13.051	268.9	205.0	15	268.9	177.0	25
香豆磷	15.859	362.0	109.0	15	362.0	81.0	40
草净津	9.694	212.1	123.1	20	212.1	151.1	10
杀螟腈	6.887	243.0	109.0	10	243.0	79.0	30
百树菊酯 1	16.144	163.0	127.1	5	163.0	91.1	15
百树菊酯 2	16.212	163.0	91.1	15	163.0	127.1	5

(接下页)

化合物名称	保留时间	定量转换 前体离子	子离子	CE	定量转换 前体离子	子离子	CE
百树菊酯 3	16.273	163.0	127.1	5	163.0	91.1	15
百树菊酯4	16.307	163.0	127.1	5	163.0	91.1	15
λ-氯氟氰菊酯	15.208	181.1	152.1	30	181.1	127.1	35
氯氰菊酯 1	16.381	181.1	152.1	25	181.1	127.1	35
氯氰菊酯 2	16.463	181.1	152.1	30	181.1	127.1	35
氯氰菊酯 3	16.531	181.1	152.1	25	181.1	127.1	30
氯氰菊酯 4	16.558	181.1	152.1	25	181.1	127.1	30
敌草索（二甲基敌草索）	9.721	300.9	222.9	25	300.9	166.9	40
DDD, o,p'-	12.170	235.0	165.1	30	235.0	199.1	15
DDD, p,p'-	12.841	235.0	165.1	25	235.0	199.1	20
DDE, o,p'-	11.241	246.0	176.1	40	246.0	211.0	20
DDE, p,p'-	12.007	246.0	176.1	40	246.0	175.1	40
DDT, o,p'-	12.882	235.0	165.1	30	235.0	199.1	20
DDT, p,p'-	13.492	235.0	165.1	30	235.0	199.1	20
脱叶磷	12.054	169.0	57.1	5	169.0	112.9	5
敌杀死	18.016	181.1	152.1	25	181.1	127.1	25
内吸磷-S	6.303	88.1	60.0	5	88.1	59.0	20
甲基内吸磷-S	5.230	88.1	60.0	5	88.1	59.0	15
氯亚胺硫磷	15.432	208.0	102.1	40	208.0	89.0	40
燕麦敌 1	5.957	234.1	150.0	20	234.1	192.0	10
燕麦敌 2	6.127	234.1	150.0	20	234.1	192.0	10
二嗪农	7.226	179.1	121.1	40	179.1	137.2	20
异氯磷	9.694	262.0	216.0	15	262.0	123.0	40
敌草腈	8.067	279.0	223.0	15	279.0	205.0	30
苯氟磺胺	9.199	123.0	77.1	20	123.0	51.1	40
4,4'-二氯苯甲酮	9.593	139.0	111.0	15	139.0	75.1	30
敌敌畏	2.905	109.0	79.0	5	109.0	47.0	15
二氯苯甲酰胺	3.367	171.0	100.0	25	171.0	136.0	15
氯硝铵	6.269	206.0	176.0	10	206.0	124.0	30
狄氏剂	11.926	262.9	192.9	40	262.9	190.9	35
二甲草胺	8.080	134.1	105.1	15	134.1	77.1	30
敌杀磷	15.934	125.0	97.0	5	125.0	65.0	25
乙拌磷	7.260	88.1	60.0	5	88.1	59.0	25
灭菌磷	11.586	130.0	102.1	15	130.0	75.0	30
克瘟散	13.377	173.0	109.0	15	173.0	65.1	40
硫丹醚	7.660	240.9	205.9	20	240.9	203.9	20
硫丹 I	11.308	240.9	205.9	15	240.9	136.0	40
硫丹 II	12.570	195.0	125.0	25	195.0	159.0	10
硫丹硫酸盐	13.377	271.9	236.9	20	271.9	116.9	40
异狄氏剂	12.366	262.9	193.0	35	262.9	190.9	35
异狄氏剂醛	12.956	249.9	214.9	35	249.9	141.9	40
异狄氏剂酮	14.116	316.9	101.0	20	316.9	245.0	20
苯硫磷	14.333	157.0	77.1	25	157.0	110.0	15
烯氟灵	5.632	276.1	105.1	35	276.1	202.0	20
乙硫磷	12.997	231.0	128.9	25	231.0	174.9	10
灭克磷	5.357	158.0	97.0	15	158.0	114.0	5
土菌灵	3.963	183.0	139.9	20	183.0	108.0	40

(接下页)

化合物名称	保留时间	定量转换			定量转换		
		前体离子	子离子	CE	前体离子	子离子	CE
胺磺磷	13.329	218.0	109.0	15	218.0	79.0	30
苯线磷	11.803	303.1	80.0	40	303.1	154.0	20
氯苯嘧啶醇	15.222	139.0	111.0	15	139.0	75.0	35
皮蝇硫磷	8.650	284.9	269.9	15	284.9	239.9	35
杀螟松	9.030	277.0	109.0	20	277.0	260.0	5
甲氰菊酯	14.503	181.1	152.1	30	181.1	127.1	35
丰索磷	12.780	292.0	156.0	25	292.0	109.0	20
倍硫磷	9.552	278.0	109.0	20	278.0	125.0	20
氰戊菊酯 1	17.202	167.1	125.0	15	167.1	89.1	40
氰戊菊酯2	17.412	167.1	125.0	10	167.1	89.1	35
氟消草	7.321	306.1	264.1	5	306.1	206.0	15
氟氰菊酯1	16.571	199.1	107.1	30	199.1	157.1	10
氟氰菊酯2	16.741	199.1	107.1	25	199.1	157.1	5
氟啶酮	16.944	328.1	259.0	30	328.1	189.1	40
氟胺氰菊酯 τ- 1	17.412	250.1	55.1	15	250.1	200.1	20
氟胺氰菊酯 τ- 2	17.480	250.1	55.1	15	250.1	200.1	25
灭菌丹	10.807	147.1	103.1	5	147.1	76.0	30
地虫硫磷	6.934	246.1	109.0	15	246.1	137.0	5
环氧七氯	8.379	271.9	236.8	25	271.9	116.9	40
环氧七氯 A	10.474	183.0	118.9	30	183.0	154.9	15
环氧七氯B	10.352	352.9	262.8	25	352.9	281.9	20
六氯苯	6.168	283.9	213.9	35	283.9	248.8	25
敌草灵	13.702	171.1	71.1	15	171.1	85.1	15
异稻瘟净	7.660	204.0	91.1	10	204.0	121.0	40
异菌脲	14.211	187.0	124.0	25	187.0	159.0	15
氯唑磷	7.517	161.1	119.0	10	161.1	146.0	5
甲基异柳磷	10.813	213.1	121.0	20	213.1	185.0	5
碘硫磷	11.776	376.9	361.9	20	376.9	93.0	35
对溴磷	14.876	171.0	77.1	25	171.0	124.1	10
林丹	6.710	181.0	145.0	15	181.0	109.0	30
马拉息昂	9.396	173.1	99.0	15	173.1	117.0	10
杀扑磷	11.146	145.0	85.1	5	145.0	58.1	15
o,p'-甲氧滴滴涕	13.730	227.1	121.1	15	227.1	91.1	35
p,p'-甲氧滴滴涕	14.442	227.1	141.1	40	227.1	169.1	30
异丙甲草胺	9.450	162.1	133.1	15	162.1	132.1	25
速灭磷	3.782	127.0	109.0	10	127.0	95.0	15
灭蚁灵	14.923	271.9	236.9	15	271.9	116.9	40
顺式九氯	12.848	408.8	109.0	20	408.8	299.9	25
反式九氯	11.539	408.8	299.8	25	408.8	301.8	30
恶草酮	12.210	175.0	112.0	15	175.0	76.1	40
对硫磷	9.633	291.1	109.0	10	291.1	81.0	40
甲基对硫磷	8.284	263.0	109.0	10	263.0	79.0	35
五氯苯胺	7.761	264.9	193.9	30	264.9	155.9	30
五氯苯	4.459	249.9	214.9	25	249.9	142.0	40
五氯苯甲腈	6.866	274.9	239.9	20	274.9	204.9	35
五氯苯基甲基酯	6.283	264.9	236.9	10	264.9	142.9	40
甲基五氯苯基硫	9.016	295.9	245.8	40	295.9	262.9	15

（接下页）

化合物名称	保留时间	定量转换			定量转换		
		前体离子	子离子	CE	前体离子	子离子	CE
顺式百灭宁	15.703	183.1	153.1	15	183.1	168.1	15
反式百灭宁	15.798	183.1	155.1	10	183.1	165.1	10
菲-d10	6.863	188	160	10	188	186	10
苯醚菊酯	14.713	183.1	153.1	15	183.1	168.1	15
稻丰散	10.861	274.0	121.0	10	274.0	125.0	20
甲拌磷	5.961	231.0	128.9	25	231.0	174.9	10
伏杀硫磷	14.855	182.0	111.0	15	182.0	75.1	40
酞胺硫磷	14.259	160.0	77.1	30	160.0	133.0	15
乙基嘧啶磷	10.332	318.1	166.1	15	318.1	182.1	15
甲基嘧啶磷	9.138	290.1	125.0	25	290.1	233.0	10
腐霉利	10.983	283.0	96.1	10	283.0	67.1	40
丙溴磷	11.953	207.9	63.1	40	207.9	99.0	25
毒草胺	5.164	120.1	77.1	20	120.1	92.1	5
炔螨特	13.858	135.1	107.1	15	135.1	77.1	30
扑灭津	6.676	214.1	172.0	10	214.1	104.0	20
巴胺磷	6.948	138.0	110.0	5	138.0	64.0	15
戊炔草胺	6.975	173.0	145.0	15	173.0	109.0	35
丙硫磷	11.878	162.0	63.1	40	162.0	98.0	20
吡唑硫磷	15.439	360.0	96.9	35	360.0	194.0	15
定菌磷	15.351	221.1	193.1	10	221.1	149.1	15
哒嗪硫磷	14.272	340.1	199.1	5	340.1	97.0	40
喹硫磷	10.827	146.1	118.1	10	146.1	91.1	30
五氯硝基苯	6.832	236.9	118.9	25	236.9	142.9	30
苄氟菊酯	13.994	123.1	81.1	5	123.1	95.1	5
西玛律	6.473	201.1	173.1	5	201.1	138.1	10
硫酸二乙酯	5.902	322.0	146.0	25	322.0	65.0	40
甲丙硫磷	13.180	322.0	97.0	30	322.0	156.0	5
丁基嘧啶磷	7.687	261.1	137.1	15	261.1	153.1	20
四氯硝基苯	5.110	202.9	83.0	25	202.9	142.9	20
七氟菊酯	7.524	177.1	127.1	20	177.1	137.0	20
双硫磷	20.525	125.0	47.0	20	125.0	79.0	10
叔丁磷	6.890	231.0	128.9	25	231.0	174.9	10
草净津	6.907	214.1	104.0	20	214.1	132.0	10
2,3,5,6-四氯苯胺	5.293	230.9	158.0	25	230.9	122.0	40
杀虫威	11.478	329.0	109.0	25	329.0	79.0	35
胺菊酯I	14.299	164.1	107.1	15	164.1	135.1	10
胺菊酯II	14.421	164.1	107.1	10	164.1	135.1	5
甲基乙拌磷	6.161	125.0	47.0	20	125.0	79.0	10
甲基立枯磷	8.392	265.0	250.0	15	265.0	93.0	25
Tolyfluanid	10.623	137.0	91.1	20	137.0	65.1	35
野麦畏	7.470	268.0	183.9	25	268.0	226.0	15
三唑磷	13.241	161.0	134.1	10	161.0	91.1	20
氟乐灵	5.808	306.1	264.0	5	306.1	160.0	30
磷酸三苯酯	13.865	326.1	169.1	35	326.1	233.0	10
乙烯菌核利	8.311	212.0	145.0	25	212.0	109.0	40

胡萝卜提取液

带有农残的胡萝卜提取液通过 GC/Q 做全扫描和 SIM 检测。通过安捷伦新的多模式进样口每次进样 5 微升，用不分流模式进样 SIM 方式要检测 170 多个化合物，每个方法大约检测 60 个农药，每个化合物监测 4 个离子。Scan 方式自动运用 DRS 软件及 927 个化合物 RTL 农药及内分泌干扰物数据库处理。

同样的胡萝卜样品在 7890A/ 7000A GC/QQQ 系统运用 MRM 按表 3 所列的参数进行检测。胡萝卜提取液中 170 种农药的标准曲线已经准备好了，共计 11 个点，浓度从 3.33 µg/kg (ppb) 至 6670 µg/kg。表 4 列出分析结果。

表 4. 显示胡萝卜汁中的农残检测结果，分别由 GC/MS 全扫描加 DRS 分析、SIM 方式采集和 GC/QQQ 加 MRM 方式检测。(其中 X 表示该化合物被检测到)

	GC/Q 5 µL（多模式进样口）		GC/QQQ[a] 1 µL
杀虫剂	冷不分流 scan+DRS	冷不分流 SIM	热分流/不分流进样口
二氯苯甲酰胺			0.38[b]
五氯苯			0.75[b]
氟乐灵			2.3[b]
七氟菊酯			0.53[b]
4,4'-二氯苯甲酮			1.2[b]
毒死蜱			24.7
o,p'-DDE			3.7
p,p'-DDE	X	X	240
o,p'-DDD			9
p,p'-DDD	X		
o,p'-DDT	X		
p,p'-DDT	X	X	Sum = 45
130			
喹螨醚	X	非方法内	非方法内

a. 化合物的真实浓度是由计算值乘以浓缩因子，因为鲜胡萝卜样品中的含量为 4,5 g/mL 汁
b. 报告结果低于校正表最低级别点

单四极杆的方法没有进行定量，所以表 4 中仅仅标注该化合物是否通过 DRS 或手动在 SIM 数据中检出 (检出者标记 X)。由于三重四极杆方法有校正表，所以对每种农药做了定量分析。该定量报告是在萃取液中做的。由于样品进行了浓缩，浓缩因子为 4.5:1 (4.5 克胡萝卜浓缩至 1.0 mL 萃取液)，所以鲜胡萝卜样品的实际浓度是经过这个因子计算而降低了。

全扫描方法运用了 DRS 软件，数据库中有 927 种化合物。SIM 和 MRM 中仅仅限于 175 个目标化合物。表 3 中 DRS 检测到 fenazaquin，SIM 和 MRM 当中不包含这个农药。这也证明 GC/MS 运用 DRS 作为 GC/MS/MS 目标化合物检测的筛选手段是必要的。

无论胡萝卜汁浓度如何，GC/QQQ 检测出三个浓度低于 1 ppb (µg/kg) 的化合物，三个浓度远远低于 5 ppb 的化合物。校正曲线中最低级别的浓度是 3.33 ppb，因此报告中计算出的含量是外推的。优化的 p,p'-DDD 和 o,p'-DDT 的 MRM transitions 相同。由于色谱分离不好，所以两个化合物计算总量。

图 2 显示，在胡萝卜样品全扫描数据中提取 p,p'-DDE 的定量离子 (m/z 246) 时，必须先经过去卷积才能得到好的峰形。去卷积之后 (图2B) 化学工作站积分尚可。图 2C 显示同一样品用 GC/MS SIM 检测的 EIC (m/z 246) 图。信噪比大约 10 倍于前者。

不难看出 GC/QQQ 在分析目标化合物中的优势。在这个仪器上将胡萝卜汁 1 µL 进样给出很干净的 MRM 色谱峰 (图2D)。比 GC/Q SIM 5 µL 进样 (信噪比 375) 给出更好的信噪比 (434) (图 2C)。

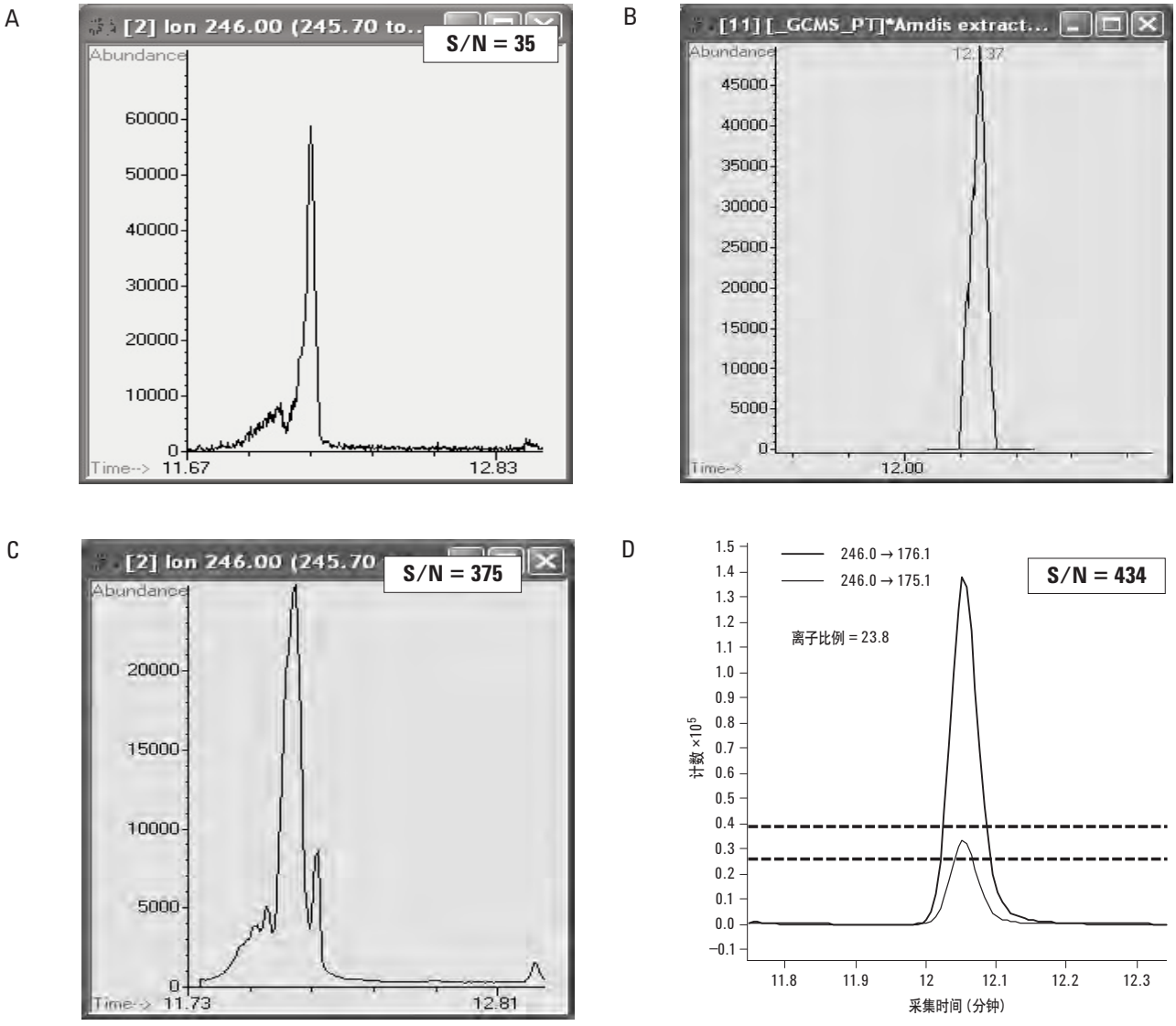


图 2. A) p,p′-DDE 定量离子 (m/z 246) 由 scan 色谱提取，加农药的胡萝卜汁 5 µL 冷不分流进样。B) 与 A 相同但是经过解卷积。C) p,p′-DDE 定量离子（m/z 246）由 SIM 方式获得。加农药的胡萝卜汁 5 µL 冷不分流进样。D) GC/MS/MS 分析中定量与定性 transition（分别是 246.0 和 176.1 与 246.0 和 175.1），相同样品 1 µL 热不分流进样。提取离子的 PK-PK 信噪比和定量 transition 显示在图中。D 中两个 transition 离子的比例为 23.8。确认检出 p,p′-DDE

各种基质中 GC/MS SIM 与 GC/MS/MS MRM 比较

图 3 比较了各种基质中 10 ppb p,p'-DDE 用 GC/MS SIM 和 GC/MS/MS MRM 分别检测的结果。左侧是 SIM m/z 246 的 EIC，基质分别是苹果、甘蓝、人参、柑橘和菠菜，可以看到基质的干扰情况逐渐增强。右侧是 GC/MS/MS 检测 p,p'-DDE 的 transition 与之对照。用于定量的 transition 246.0 与 176.1 的信噪比非常大，预示可以在低于 ppb 的水平上检测 p,p'-DDE。

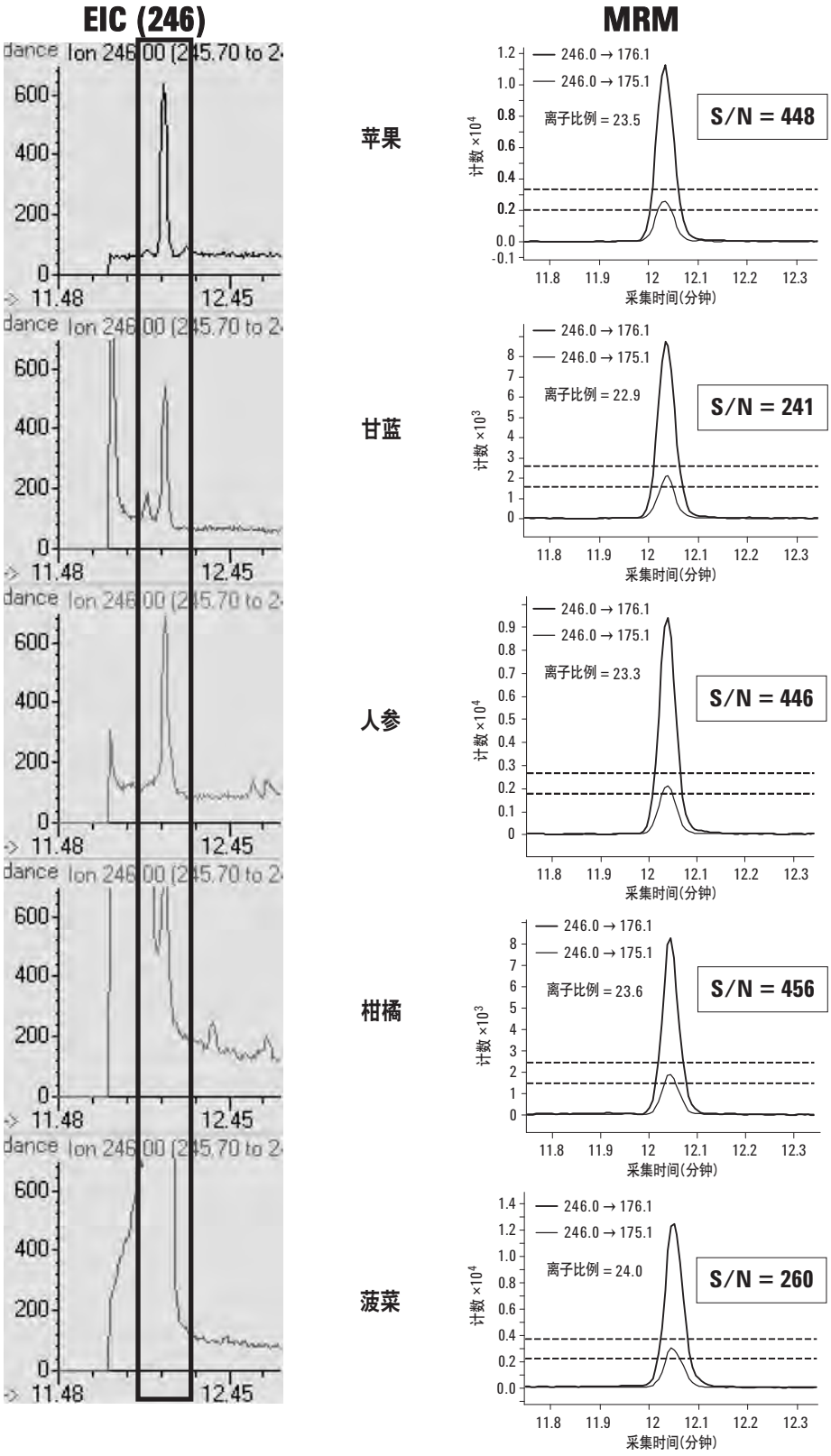


图 3. 对照 5 种基质中 10 ppb（10 µg/kg） p,p'-DDE 用 GC/MS SIM 和 GC/MS/MS MRM 分别检测的结果对照。左侧是 SIM m/z 246 的 EIC，基质干扰越来越多。右侧是 GC/MS/MS 检测与之对照。在定量 transition 中（246.0 与 176.1 和 246.0 与 175.1）p,p'-DDE 的峰非常干净，PK-PK 信噪比从 241 至 448，进样量只有 1 µL

番茄提取物

三种技术都检出了番茄汁中的 1 ppm 百菌清。可是只有 GC/QQQ 检测到五氯苯腈，它是百菌清的代谢物，浓度只有 9.3 ppb。图 4 显示 3.3 ppb 至 6670 ppb 的五氯苯腈校正曲线。

反吹柱子

标准方法中分析较脏的样品需要经常更换衬管和截短柱子。另外，累积在衬管和柱子中的基质污染物还会造成色谱退化，时间长了会污染到离子源，于是需要清洗离子源。这个问题更困扰着 GC/QQQ，因为 QQQ 当中会很少看到基质，导致忽略对仪器的维护，直到离子源严重污染（有时甚至是第一级四极杆）需要清洗的时候才会察觉。

安捷伦 7000A 系列质谱使用与 5975C 同样的惰性离子源和石英镀金四极杆。可以分别加热至 350 °C 和 200 °C。即使每次进样含有高沸点基质化合物也很少需要清洗。

防止色谱退化、减少离子源清洗次数最好的方法是每次运行之后反吹柱子。构造如图 1 所示。所谓反吹即是在样品运行结束之后，用 3－5 分钟时间把毛细管流量装置（双路分流器或带吹扫柱接头）的压力加大，同时减小柱头压。这个反方向的气流在高温下把高沸点的基质化合物从进样口的分流出口排放出去。

在完成这个工作时，大约 100 次 1 µL 进样至 GC/QQQ 系统，柱子和 MS 没有出现任何问题。将近 300 次 GC/Q 进样后，分析柱和进样口都需要维护，在双路分流器存在的情况下，这些操作无需放空质谱仪。

结论

安捷伦的 7890A/7000A 三重串联四极杆质谱系统对于目标农药分析是高灵敏度并且稳定的。它比单四极杆方法受基质干扰少得多。因而更容易达到当今立法在低 ppb 水平对农药残留定量的检测需求。很多案例中 GC/QQQ 1 µL 进样比 GC/Q 5 µL 进样效果还要好。然而，还需要有查找上百个农药的筛选方法。为此，我们推荐安捷伦新的多模式进样口进行大体积进样。在 GC/Q 全扫描模式数据分析运用 DRS 软件及 900 余种农药及内分泌干扰物数据库。通过 GC/MS 加 DRS 从 900 余污染物中筛选，然后用 GC/QQQ 对少数目标化合物定量，这二者结合是最好的分析超痕量农残的方法。二者都要具备反吹功能，特别是在分析类似于食品这样复杂基质样品的时候。

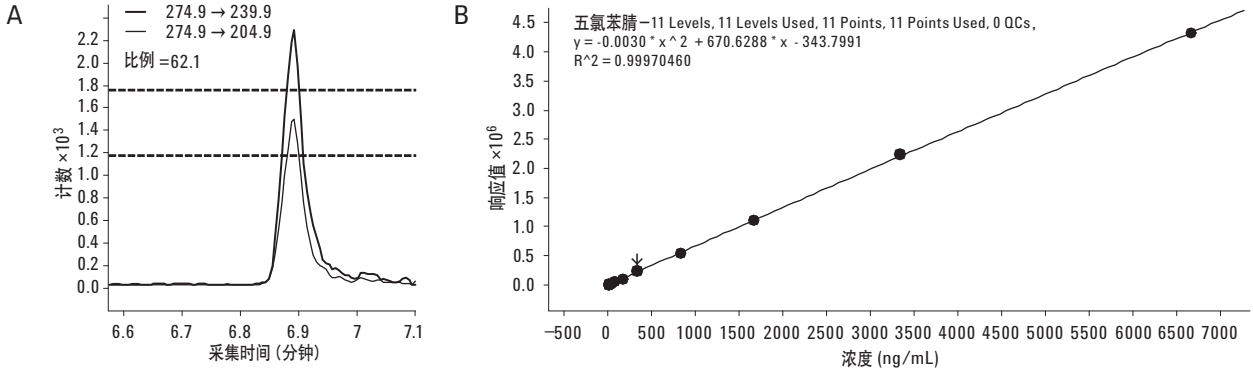


图 4. A) MRM transitions 检测到番茄基质中 9.3 ppb 五氯苯腈 B) 五氯苯腈的标准曲线，从 3.33 ppb-6670 ppb，二次曲线拟合 > 0.999

参考文献

1. M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, and F. J. Schenck, *J AOAC Int*, 86 (2003) 412.
2. S.J. Lehotay, A. de Kok, M. Hiemstra, and P. Bodegraven, *J AOAC Int*, 88 (2005) 595.
3. QuEChERS Web site, http://www.quechers.com
4. M. Mezcua, M. A. Martínez-Uroz, P. L. Wylie, and A. R. Fernández-Alba, "Simultaneous screening and target analytical approach by GC-q-MS for pesticide residues in fruits and vegetables," Accepted for publication by *J. AOAC Int*.
5. Chin-Kai Meng and Mike Szelewski, "Replacing Multiple 50-minute FPD/ELCD/SIM Analyses with One 15-Minute Full-Scan Analysis for 10X Productivity Gain," Agilent Technologies publication 5989-7670EN.
6. Philip L. Wylie, "Screening for 926 Pesticides and Endocrine Disruptors by GC/MS with Deconvolution Reporting Software and a New Pesticide Library," Agilent Technologies publication 5989-5076EN.
7. Bruce D. Quimby, Leonid M. Blumberg, Matthew S. Klee, and Philip L. Wylie, "Precise Time-Scaling of Gas Chromatographic Methods Using Method Translation and Retention Time Locking," Agilent Technologies publication 5967-5820E.
8. Chin-Kai Meng, "Improving Productivity and Extending Column Life with Backflush," Agilent Technologies publication 5989-6018EN.
9. Philip L. Wylie, "Direct Injection of Fish Oil for the GC-ECD Analysis of PCBs: Results Using a Deans Switch with Backflushing," Agilent Technologies publication 5989-6095EN.

采用三重串联四极杆 GC/MS 的联用和反吹技术快速筛选和确认婴儿奶粉及大豆产品中的三聚氰胺及其类似物

应用

食品

作者

Stephan Baumann
Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd
Santa Clara CA 95051
USA

摘要

通过利用安捷伦 7890A/7000A 系列带 Ultimate Union 吹扫的三重串联四极杆 GC/MS 联用和反吹技术，开发了一种快速筛选和确认婴儿奶粉和豆制品中的三聚氰胺、三聚氰酸一酰胺、三聚氰酸二酰胺和氰尿酸的方法。该方法中的提取及衍生过程与 FDA（美国食品和药物管理局）的 GC/MS 方法相同。在 0.16 到 2.5 ppm 的浓度范围内可获得卓越的线性度（R^2>0.99），且运行时间不到 15 分钟。

前言

由于在美国生产的奶粉、分布于加拿大市场的巧克力、在荷兰销售的饼干、在泰国销售的炼乳以及在香港销售的鸡蛋中均检测到了三聚氰胺，在食品中搀杂三聚氰胺已迅速成为一个国际问题。对此，许多国家已经建立了针对三聚氰胺的许可浓度限制，如 FDA 要求婴儿奶粉中三聚氰胺的最高残留限量 (MRL) 为百万分之一 (1 ppm)，其他产品则为 2.5 ppm。FDA 的 GC-MS 筛选法 [1] 能够检测的三聚氰胺及其类似物 (三聚氰酸一酰胺、三聚氰酸二酰胺和氰尿酸) 的灵敏度为 2.5 ppm。然而，FDA 在 2009 年 2 月的进口警报要求所采用的测试方法对于三聚氰胺及其类似物的检测灵敏度必须达到 0.25 ppm，以保证检测结果符合 MRL 规定。因此，在新的规定下，FDA 的 GC-MS 筛选法已不能适用于筛选三聚氰胺及其类似物，其确认也需要通过额外的正交法进行。

本应用中说明的方法对 FDA 的 GC–MS 筛选法进行了改进，采用了新型 Agilent 7000A 系列三重串联四极杆 GC/ MS 联用技术。改进后的新方法不改变样品的提取和衍生程序，通过使用带吹扫接头的气相色谱柱和反吹技术，使得运行时间在 15 分钟以内。该方法可以使三聚氰胺及其类似物的检测精度达到 0.25 ppm，其定量也具有高度的重现性和准确性。最重要的是，这种方法经一次短时间运行就能实现三聚氰胺及其类似物的筛选、定量和确认。

实验

标样和试剂

所使用的标样和试剂列于表 1 中。三聚氰胺、三聚氰酸一酰胺、三聚氰酸二酰胺和氰尿酸分别制成 DEA/H20（体积比为 20/80）混合溶剂的溶液，浓度均为 1000 µg/mL，储存温度为 4 °C。内标物（2,6-二氨基-4-氯嘧啶，DAPC）配制成浓度为 57.7 ng/mL 的吡啶溶液，该溶液用于制备 FDA 方法 [1] 中的基质匹配标准物。基质样品由 FDA 无偿提供。

仪器

实验所采用的仪器包括配置分流/不分流毛细管进样口的安捷伦 7890A 气相色谱仪、配置三重离轴检测器的安捷伦 7000A 系列三重串联四极杆 GC/MS 联用仪以及安捷伦 7683B 全自动液体进样器 (ALS)。分流/不分流进样口装有一个长寿命隔垫 (部件号 5183-4761) 和一个去活的分流单锥形注射衬管 (部件号 5181-3316)。用 10 µL 注射器 (部件号 9301-0714) 注射。各仪器使用条件列于表 2。

表 1. 标样与试剂

标样	三聚氰胺	Sigma-Aldrich	>99% 纯度
	氰尿酸	TCI-America	>98.0%
	三聚氰酸一酰胺	TCI-America	>98.0%
	三聚氰酸二酰胺	TCI-America	>95.0%
	内标†	Sigma-Aldrich	98%
溶剂	二乙胺 (DEA)	Sigma-Aldrich	Sigma 超纯级
	吡啶	Fisher Scientific	认证的 A.C.S. 试剂
	乙腈	Fisher	高效液相色谱级
甲基硅烷化试剂	BSTFA 含 1% TMCS* (SYLON BFT)	Sigma-Aldrich	衍生化级

† DAPC （2,6-二氨基-4-氯嘧啶）
* BSTFA：双（三甲基硅烷基）三氟乙酰胺, TMCS：三甲基氯硅烷

表 2. 气相色谱仪和质谱仪条件

气相色谱运行条件	
色谱柱	两根 15 m × 0.25 mm × 0.25 µm HP-5ms 色谱柱 (p/n 19091S-431)
进样温度	280 °C
进样压力	12.9 psi
载气	氦气，恒流模式，1.2 mL/min
脉冲不分流	25 psi at 0.5 min
柱箱升温程序	100 °C (保持 1 min)，以 10 °C/min 升至 210 °C
柱流速	41 cm/s
注射体积	1 µL
传输线温度	290 °C
气相色谱后运行条件	
反吹装置	由压力控制模块（部件号 G3476-60501）控制的吹扫 Ultimate Union（部件号 G3186-60580）
反吹装置条件	–3.6 mL/min，于 300 °C 保持 1.3 min
质谱运行条件	
调谐方式	自动调谐
Delta 电子倍增器电压	400 V
采集参数	EI; 选择性反应监测
溶剂延迟	6 分钟
质谱温度	离子源温度 230 °C；四极杆温度 150 °C

样品制备

称取 0.5 g 样品于 50 mL 聚丙烯离心管中。用 DEA / 水/乙腈按体积比 10:40:50 配制提取溶剂，并取 20 mL 加入到称量好的样品中。其中，DEA 能够分离三聚氰胺-氰尿酸混合物，从而降低了假阴性检测的风险。DEA 还提高了三聚氰酸一酰胺和三聚氰酸二酰胺的溶解度，而在传统的提取溶剂中，它们的溶解度是极低的。将样品密封好，进行涡旋混合后经超声波处理 30 分钟。然后以 5000转/min 或更高的速度下离心分离样品 10 分钟后，将上层清液通过 0.45 µm 孔径尼龙过滤器过滤。

衍生处理

取 160 µL 滤液到一个 GC 玻璃样品瓶中，在 70 °C 的氮吹蒸发干燥，加入 600 µL 的 ISTD 和 200 µL 含 1%TMCS 的 BSTFA。样品在注入前，经涡旋混合，并在 70 °C 下恒温 45 分钟。

分析参数

三聚氰胺及其类似物以及内标的相关分析参数列于表 3 中。

表 3. 分析参数

		三重串联四极杆气相色谱/质谱联用		
化合物	RT	SRM	驻留时间 (ms)	碰撞能量 (EV)
三聚氰胺	12.467	327 → 171	20	17
		342 → 285	150	20
		342 → 213	150	22
三聚氰酸一酰胺	10.801	344 → 171	50	22
		344 → 214	50	15
		329 → 171	50	20
三聚氰酸二酰胺	11.748	328 → 171	50	25
		343 → 214	50	20
		343 → 171	50	30
氰尿酸	9.613	345 → 215	50	8
		345 → 188	50	12
		330 → 215	50	4
DACP (ISTD) 2,6-Diamino-4-chloropyrimidine	11.185	273 → 237	150	12
		273 → 99	150	20

结果与讨论

带 Ultimate Union 吹扫系统的反吹技术

反吹技术可以从色谱柱中除去高沸点物质，通过将后流出的组分从进样口的分流放空口中反吹出去，而使高沸点组分不经过整个色谱柱，也不进入 MSD。反吹可以降低化学噪音和分析周期时间，从而提高检测效率。由于减少色谱柱和质谱检测器的维护时间，系统的正常运行时间也有所增加。安捷伦微板流路控制技术模块包括一个专有的解决方案，能够快速简便地实现反吹，死体积小，从而提高分离度。该模块还包含垫圈和接头以消除漏气。所有微板流路控制技术模块都需要使用辅助电子气动控制 (EPC) 模块或气动控制模块 (PCM) 来提供精确控制的第二气源，以引导色谱柱气流能流向正确的色谱柱或检测器。在正常操作时，PCM 的压力等于或略高于通过色谱柱的载气压力。在反吹过程中，进口压力下降到 1 psi，而 PCM 压力增加，从而驱使色谱柱气流反向流经色谱柱，并吹扫出进样口。

一个替代反吹的独特方法是在分析柱的中部使用微板流路控制技术装置。此时，采用两个 15 米色谱柱替代 30 米色谱柱，两个色谱柱由超低死体积吹扫 Ultimate Union 连接（如图 1 所示），PCM 则只提供足够的补充气与从第一个色谱柱中的气体流量相匹配。由于只有最优的载气流量进入质谱仪，因此需要增加的气流很小，不会发生灵敏度降低。该配置的反吹过程，是通过降低第一个色谱柱的流量和压力，增加第二个色谱柱的流量和压力来完成的。

图 2 给出了具有吹扫终端配置的反吹的例子。图中上端的图谱显示了六个标样，其中第三个峰被认为是最后一个感兴趣的峰，第四个峰是第一个高沸点组分干扰物。中图显示了 (a) 相同标样在 10.1 分钟开始反吹，其中流量在第一个 15 米色谱柱中下降，(b) 在第

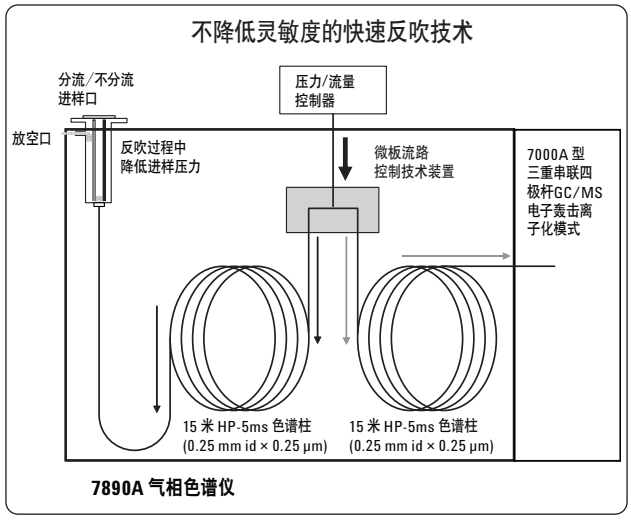


图 1. 带 Ultimate Union 吹扫的 GC/MS 配置示意图

二个色谱柱上升。a 和 b 点之间的时间是最后要分析的组分在第二个色谱柱中的停留时间。最后的组分被保留，但后洗脱物不会进入到质谱检测器中。下图说明在接下来的空白运行中没有交叉污染。或者，可以在最后一个感兴趣的峰被流出（b 点）后开始反吹。这就避免了需要通过实验来确定最后流出的目标化合物在第二色谱柱中的停留时间，从而缩短运行时间周期。

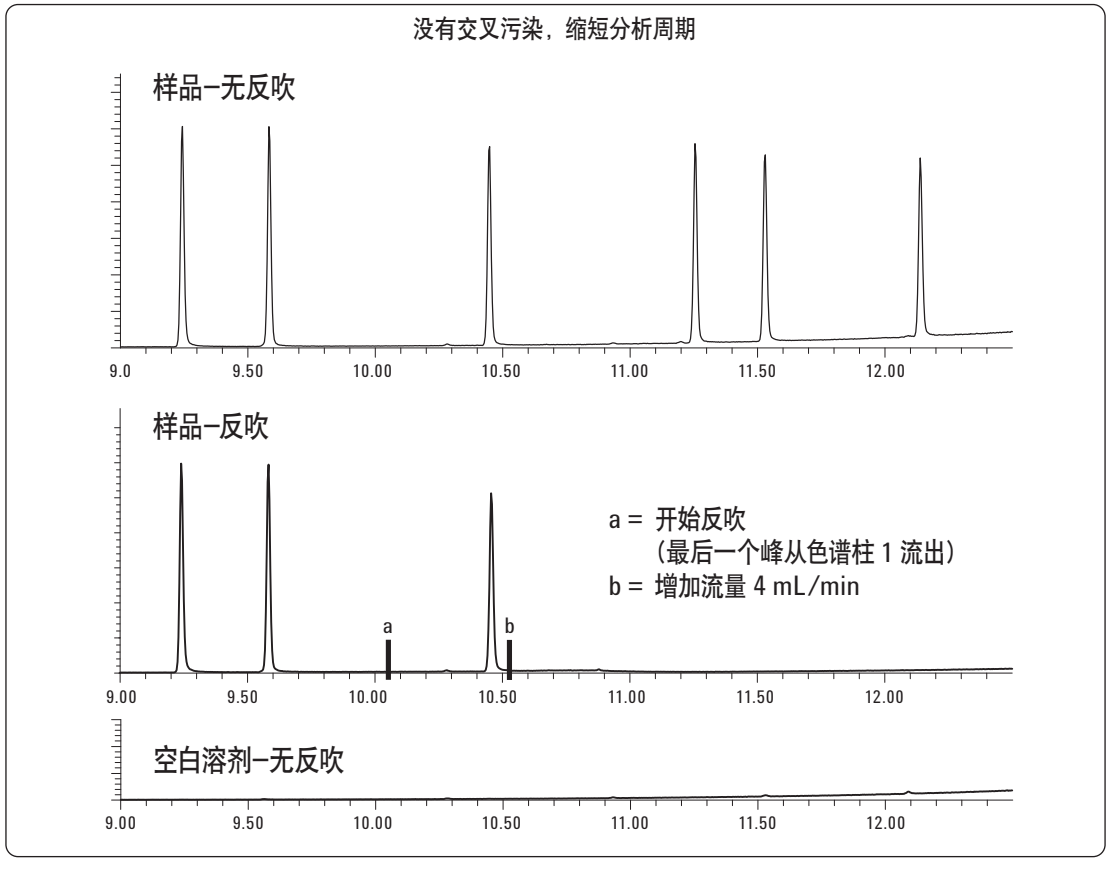


图 2. 带 Ultimate Union 吹扫反吹示意图。上图：没有进行反吹。中图：10.1 min 开始反吹 (a) 直到第三个组分从第二色谱柱中洗脱 (b)。下图：空白进样显示没有交叉污染

三聚氰胺及其类似物的分析

基于三重串联四极杆 GC/MS 联用系统，我们开发了一种一次运行就能出色的分离和分析三聚氰胺、三聚氰酸一酰胺、三聚氰酸二酰胺和氰尿酸的新方法，且运行时间不到 15 分钟 (图 3)。新的三重串联四极杆 GC/MS 法显著提高了检测灵敏度和选择性，图 4 给出了其与 GC/MS 选择离子检测 (SIM) 的对比。新方法能够在 0.25 ppm 灵敏度下对三聚氰胺进行非常干净地定量 MRM 分析，而不管采用何种 SIM 离子，GC/MS SIM 法都难以在 2.5 ppm 灵敏度下有效地减少化学噪音。

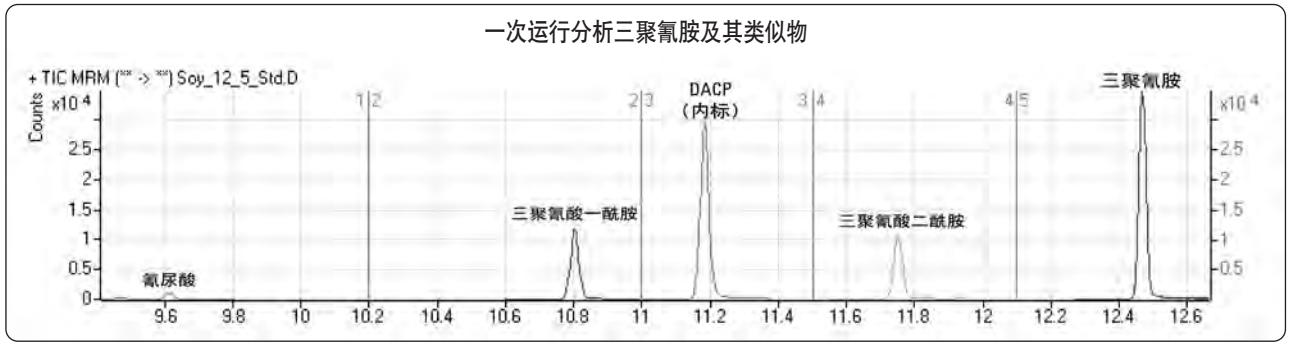


图 3. 由 SRM 分析得到的重构总离子流色谱 (RTICC)，表明对三聚氰胺及其类似物的分辨率

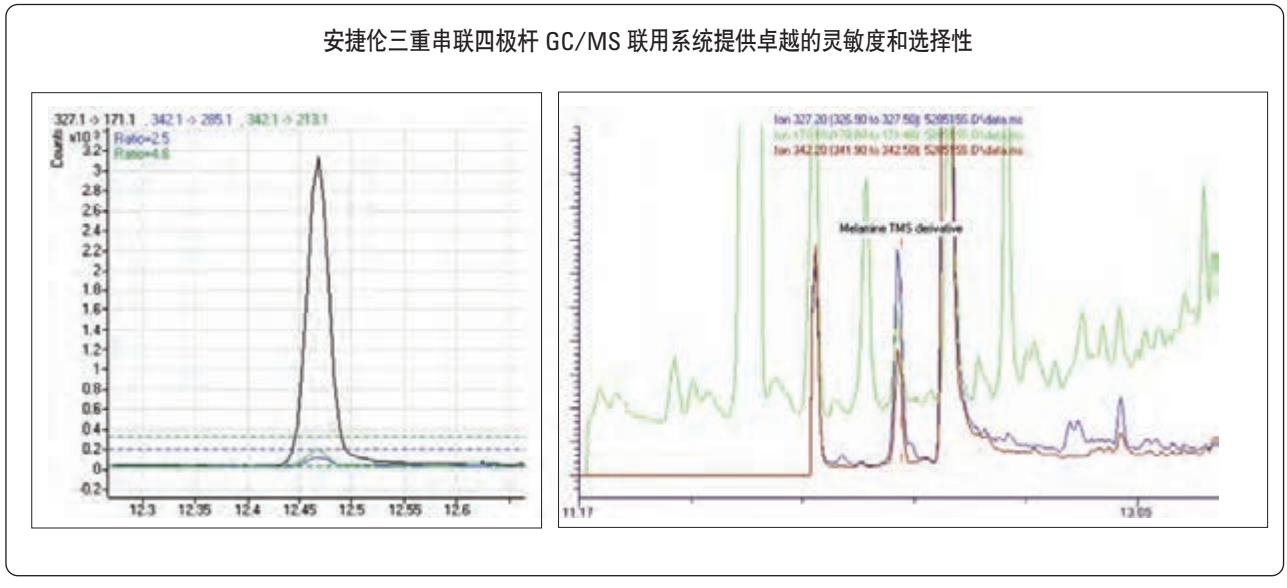


图 4. 分别采用三重串联四极杆 GC/MS(a) 和 GC/MS SIM 法检测豆粉中 0.25 ppm 三聚氰胺的结果对比。采用三重串联四极杆 GC/MS 法的定量离子通道为 m/z 327.1→171.1，而定性离子通道为 m/z 342.1→295.1（定量离子峰面积的 2.5%）和 m/z 342.1→217.1 (峰面积的 4.8%)。不确定性范围也列于 (a) 中。GC/MS 法中使用的 SIM 离子则为 m/z 342.2、327.2 和 171.1 (b)

灵敏度与定量

在基质（包括婴儿奶粉和豆粉）中分别加入三聚氰胺及其三种类似物的标准品，浓度分别为 0.78 、1.25、3.9 和 12.5 ng/mL，对应于 0.16 到 2.5 ppm 的检测水平。并针对每种基质中的四种化合物建立校准曲线。图 5 和图 6 表明，三聚氰胺及其三个类似物的曲线均显示出了极好的线性，R2 的值非常接近 1.00。表 4 和表 5 表明，对两种基质中四种化合物的定量准确性也非常高。

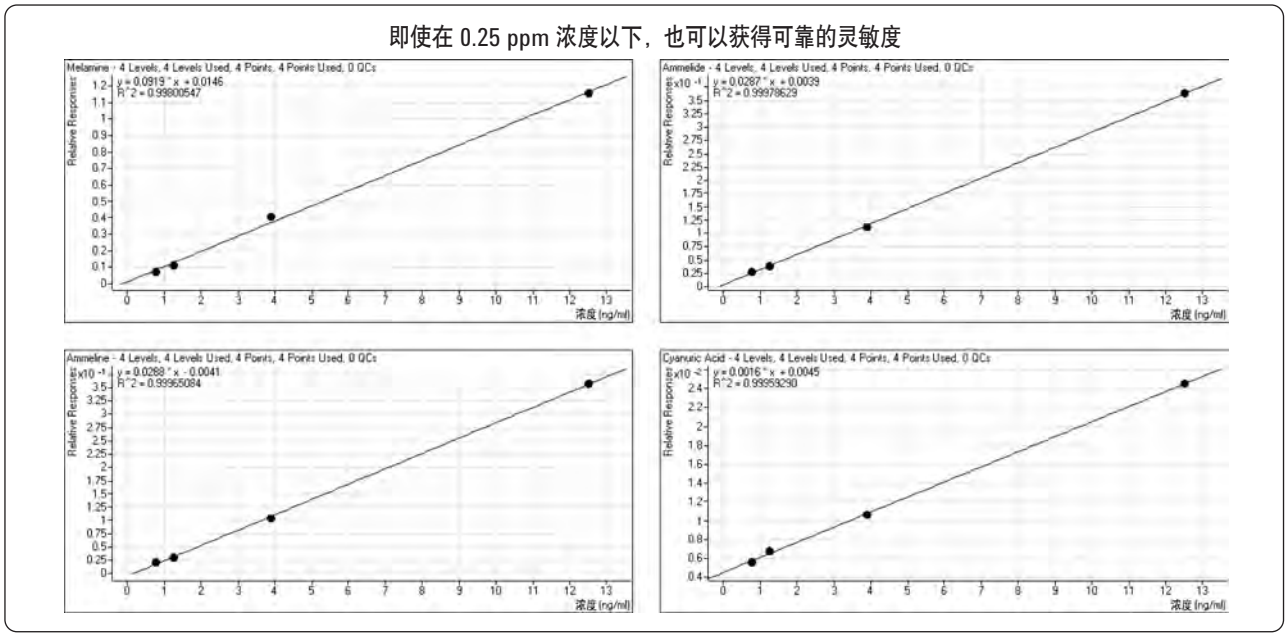


图 5. 在婴儿奶粉中的三聚氰胺及其衍生物的定量校准曲线线性拟合

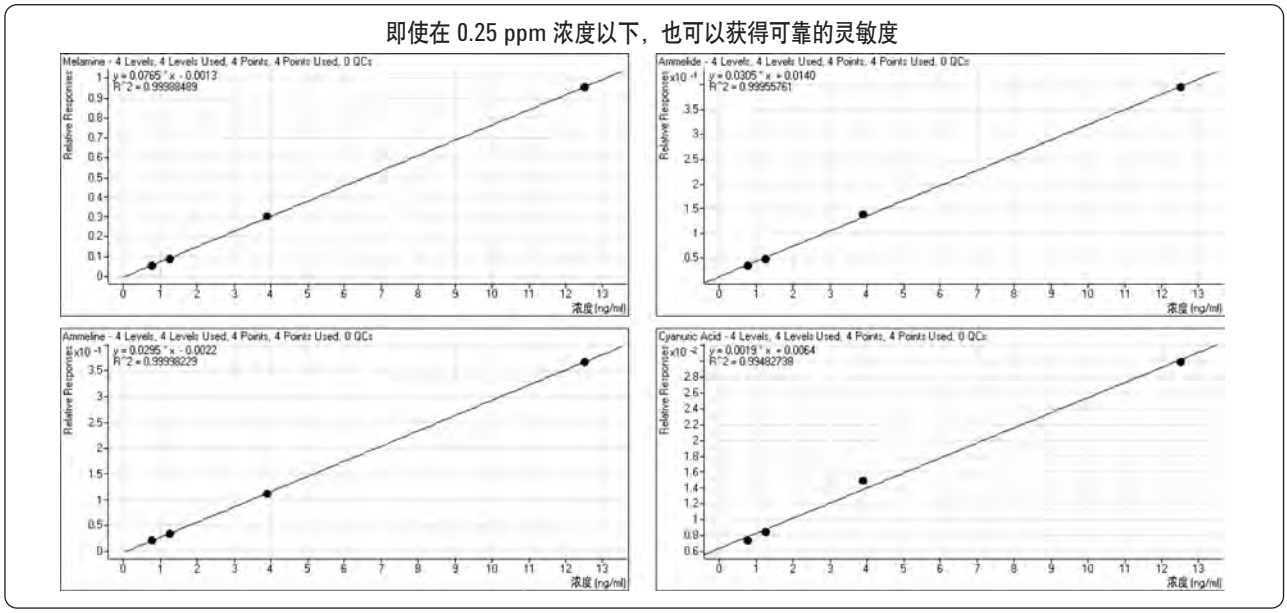


图 6. 在豆粉中三聚氰胺及其衍生物定量的校准曲线线性拟合

表 4. 婴儿奶粉中的三聚氰胺及其衍生物基于基质匹配标样的定量校准数据

	标样浓度 (ng/mL)	测试物浓度 (ng/mL)	定量准确度 (%)
三聚氰胺	0.78	0.79	101.3
	1.25	1.23	99.1
	3.90	4.39	112.5
	12.5	12.50	100.0
聚氰酸一酰胺	0.78	0.86	110.3
	1.25	1.25	99.9
	3.90	3.79	97.2
	12.5	12.52	100.2
三聚氰酸二酰胺	0.78	0.90	115.5
	1.25	1.22	97.2
	3.90	3.78	97.0
	12.5	12.52	100.3
氰尿酸	0.78	0.67	86.1
	1.25	1.40	111.9
	3.90	3.85	98.8
	12.5	12.51	100.1

表 5. 豆粉中基于基质匹配标样的三聚氰胺及其衍生物定量校准数据

	标样浓度 (ng/mL)	测试物浓度 (ng/mL)	定量准确度 (%)
三聚氰胺	0.78	0.76	97.7
	1.25	1.20	96.3
	3.90	3.98	102.2
	12.5	12.48	99.8
三聚氰酸一酰胺	0.78	0.72	92.9
	1.25	1.18	94.2
	3.90	4.07	104.4
	12.5	12.46	99.7
三聚氰酸二酰胺	0.78	0.81	103.7
	1.25	1.22	97.9
	3.90	3.90	99.9
	12.5	12.50	100.0
氰尿酸	0.78	0.71	91.3
	1.25	1.22	94.5
	3.90	4.49	115.1
	12.5	12.01	96.1

确认

为了确定一套可广泛接受的程序来对限定物质进行科学确认，欧盟科学家开发了“识别点”系统。分析方法提供的识别点越多，越能肯定所确认的化合物的存在。确定化合物的 MRL 要求有三个识别点。当由于化合物的毒性而无法界定其 MRL 时，则该化合物在所有级别上都是被禁止的。这些化合物要求有四个识别点。当 GC/MS 需要监测四个离子以提供四个识别点时，使用三重串联四极杆的 GC/MS/MS 联用仪则只需监测两个选择反应监测 (SRM) 通道。利用三重串联四极杆 GC/MS 系统分析三聚氰胺及其类似物需要利用至少两个 SRM 通道，可以在单次运行中获得有效筛选和完全确认。

图 7 和图 8 显示了婴儿奶粉和豆粉中的四种化合物 GC 分离的定量和定性离子通道的色谱图。每一种情况定性离子都对定量离子进行了归一化处理，以便从两个离子的轮廓图中能更好的显示出一致的峰形。因此，这些离子轮廓图为每个样品基质中的四种化合物都给出了完全的确认。

结论

为了在一次短时间运行中就实现对三聚氰胺、三聚氰酸一酰胺、三聚氰酸二酰胺和氰尿酸的筛选、定量和确认，通过应用安捷伦科技公司的三重串联四极杆 GC/ MS 联用系统，对 FDA 的 GC/MS 筛选方法进行了改进。该方法不改变原有的提取或衍生程序，且其运行周期时间仅约为 15 分钟。此外，该方法符合新的 FDA 测试要求，即测试灵敏度应达到 0.25 ppm，并且在 2.5 ppm 的浓度范围内表现出了优异的定量线性，定量精度达到 97% 以上。为了对阳性确认提供有效的识别点，分别给出了四种化合物的两个 SRM 通道。

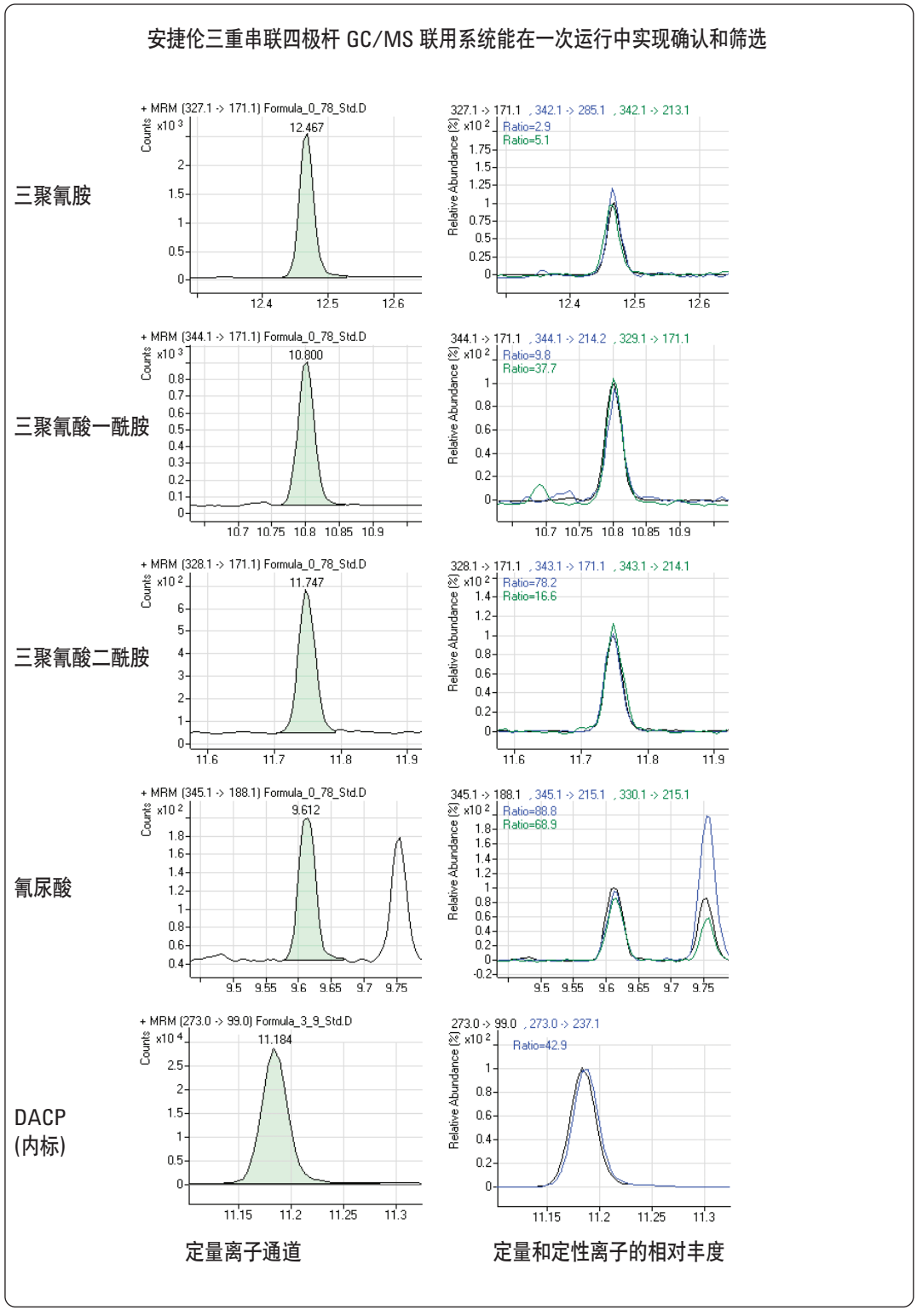


图 7. 安捷伦三重串联四极杆 GC/MS 联用系统能在一次运行中实现确认和筛选：婴儿奶粉中浓度为 0.78 ng/mL 的三聚氰胺及其类似物的定量离子和归一化定性离子

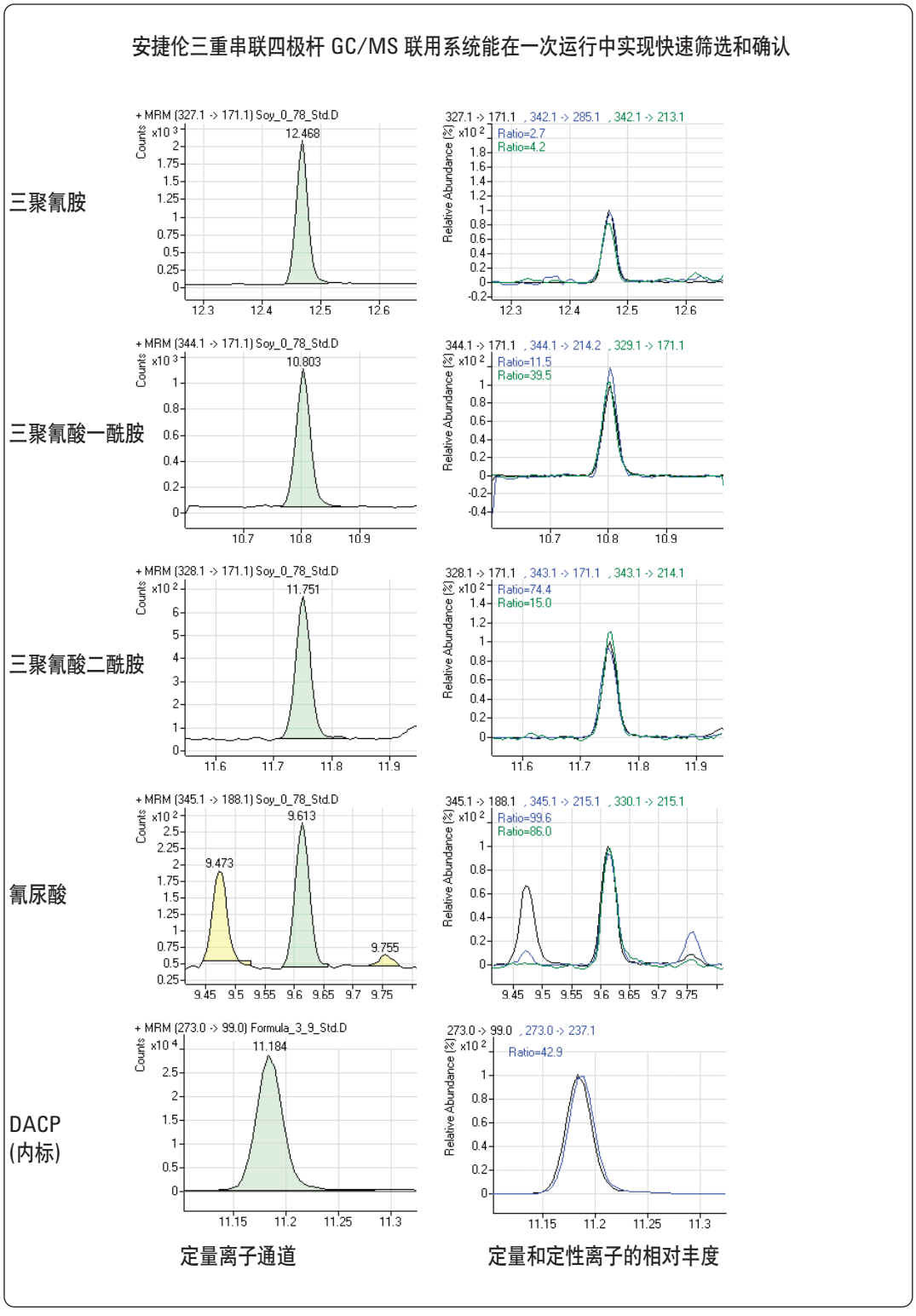


图 8. 豆粉中浓度为 0.78 ng/mL 的三聚氰胺及其类似物的定量离子和归一化的定性离子

参考文献

1. U.S. Food and Drug Administration, “GC-MS Screen for the Presence of Melamine, Ammeline, Ammelide, and Cyanuric Acid,” LIB No. 4423, Volume 4, October 2008.

2. H. Prest, C. Foucault and Y. Aubut, “Capillary Flow Technology for GC/MS: Efficacy of the Simple Tee Configuration for Robust Analysis Using Rapid Backflushing for Matrix Elimination,” Agilent Technologies publication 5989-9359EN.

3. H. Prest, Capillary Flow Technology for GC/MS: “A Simple Tee Configuration for Analysis at Trace Concentrations with Rapid Backflushing for Matrix Elimination,” Agilent Technologies publication 5989-8664EN.

用气相色谱/质谱/质谱联用技术对海洋生物中杀虫剂等复杂样品进行分析

应用

作者

Chris Sandy
Agilent Technologies, Inc.
UK and Ireland Sales Headquarters
710 Wharfedale Road
Winnersh Triangle
Wokingham, Berkshire, RG41 5TP
UK

摘要

用气相色谱/质谱联用技术对海洋生物样品（贻贝，蚌类）中的有机氯农药残留进行检测是极具挑战性的。虽然可以用快速溶剂萃取技术，同时使用尺寸排阻色谱以及氧化铝萃取技术处理样品，但提取样品中仍然含有大量基质。采用单四极杆气相色谱/质谱联用系统时，在选择离子检测模式下，这些基质不仅干扰定量分析，而且会造成衬管以及气相色谱柱问题。导致气相色谱保留时间漂移和信号强度衰减。同时，质谱离子源会很快被污染。

采用气相色谱/三重串联四极杆多反应监测分析模式时，因为复杂多重残留分析需要对多反应监测的分段时间进行认真设置，所以采集数据时避免保留时间漂移尤其重要。

本篇应用简要将介绍如何用安捷伦 7000A 三重串联四极杆气相色谱/质谱联用系统多反应监测模式，结合安捷伦微板流路控制技术对高沸点组分的反吹技术来对海洋生物样品进行分析。

分析挑战

图 1 是海洋生物样品的全扫描总离子流图 (TIC)，质量数范围设置为 50-550 amu。当所有分析物从柱中洗脱后，仍有大量基质存留于色谱系统中。

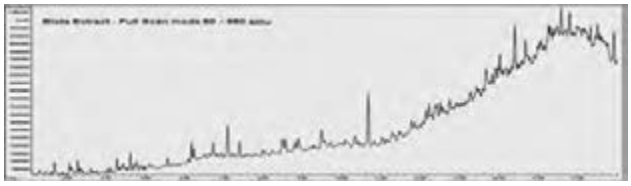


图 1. 海洋生物样品的全扫描总离子流图（质量数范围：50-550 amu）

如图 2 所示，在选择离子检测模式下纯溶剂在两个提取物注射前后的总离子流图对比显示了气相色谱中化学背景的积累。

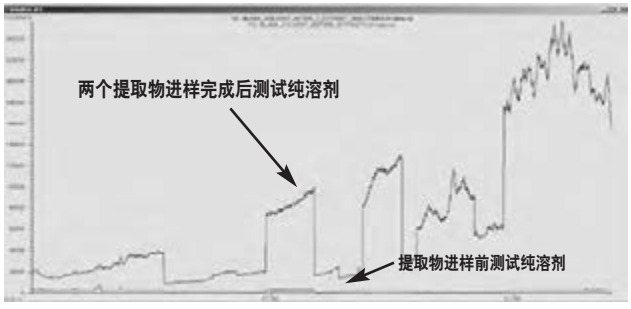


图 2. 纯溶剂在提取物注射前后的选择离子模式总离子流图显示气相色谱化学背景的积累

实验

图 3 所示安捷伦方法转换软件可以用于生成两倍于安捷伦保留时间锁定法提供的杀虫剂常规 42 分钟分析法。所用色谱柱为 15 m × 0.25 mm id × 0.25 µm HP-5MS 超高惰性柱 (1909 1 s-431UI)。

转换柱头压使微板流路控制设备上的 4.0 psig 辅助压力施于柱末端，系统在恒压模式下运行（如图 4 所示）。不分流进样 2 µL。

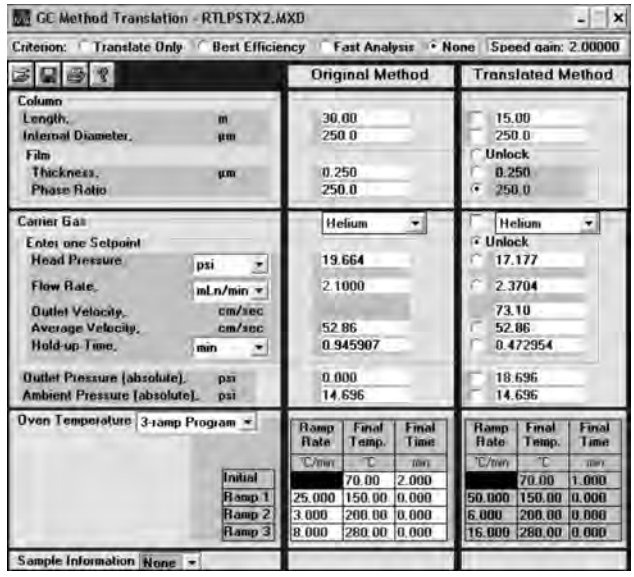


图 3. 安捷伦气相色谱方法转换软件

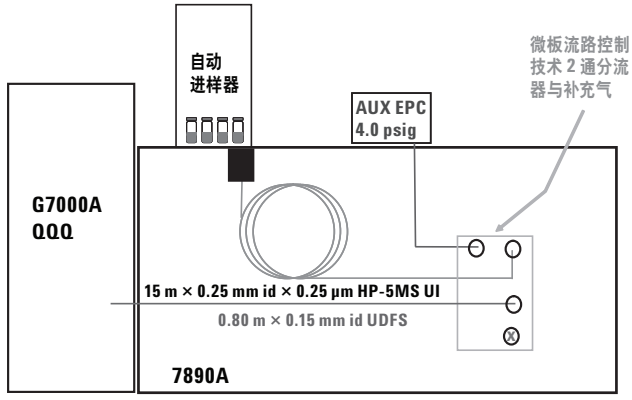


图 4. 多反应监测模式下的安捷伦 7000A 三重串联四极杆气相色谱/质谱系统

在多反应监测分析模式下运行 7000A 质谱仪。表 1 列出了每种分析物的保留时间，离子对以及碰撞电压。

表 1. 分析物的保留时间，离子对以及碰撞电压

TS	目标化合物	保留时间	母离子 m/z	定量离子 m/z	确认离子 m/z	CV
1	α-HCH	6.19	219	147	183	20
2	β-HCH	6.76	219	147	183	20
3	Lindane	6.89	219	147	183	20
4	δ-HCH	7.45	219	147	183	20
3	PCB 28	8.25	256	186	151	20
3	PCB 52	9.15	292	220	257	20
4	Aldrin	9.47	263	193	228	30
5	Isodrin	10.24	193	123	157	30
6	PCB 155 (ISTD)	11.28	360	290		20
7	PCB 101	11.51	326	256	291	20
8	Dieldrin	12.18	263	193	228	30
	Endrin	12.56	263	193	228	30
9	PCB 118	12.84	326	256		20
10	PCB 153	13.25	360	290	325	20
	PCB 138	13.72	360	290	325	20
11	PCB 180	14.75	394	324	359	20
12	Mirex (ISTD)	15.09	272	237		20

使用碰撞池时，氮气压力设置为 2.60 psi，氦气压力设置为 6.25 psi。多反应监测分析总离子流图如图 5 所示。灰白线标记每一个多反应监测分析段。

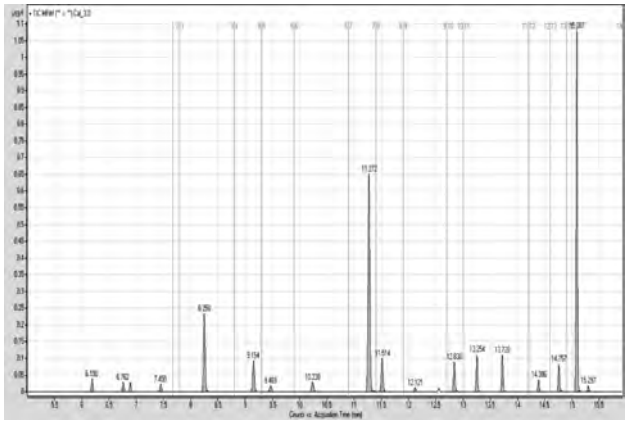


图 5. Agilent 7000A 三重串联四极杆在多反应监测分析模式下得到的总离子流图

校准

内标物校准范围是 0.8-200 ppb。低浓度标准物狄氏剂和异狄氏剂的多反应监测分析定量离子对示例如图 6 所示。

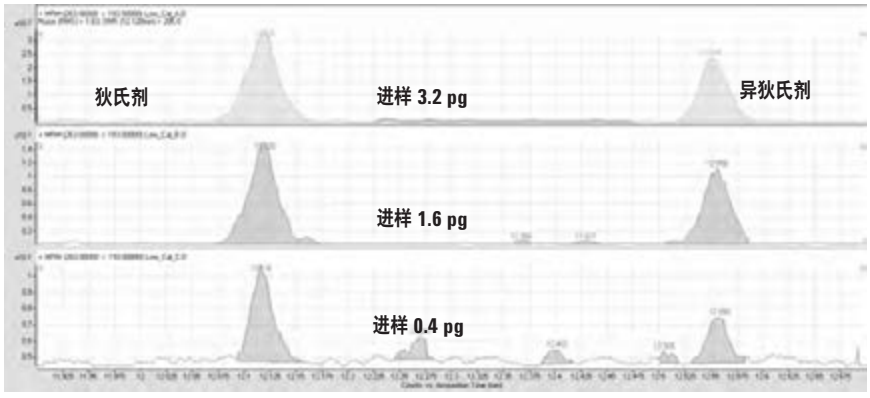


图 6. 低浓度标准物狄氏剂和异狄氏剂的多反应监测分析定量离子对示例

定量结果

表 2 列出了海洋生物提取物三次重复测定的定量结果 (ppb)。鉴定了两种有机氯杀虫剂（狄氏剂和 β-六六六）并对其定量。

表 2. 对海洋生物提取物进行三次重复测定得到的平均定量结果

样品	a-HCH	b-HCH	g-HCH	d-HCH	艾氏剂	异艾氏剂	狄氏剂	异狄氏剂
提取的生物样品空白	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
提取物	ND	0.69	ND	ND	ND	ND	0.56	ND
提取物	ND	0.90	ND	ND	ND	ND	0.55	ND
提取物	ND	0.82	ND	ND	ND	ND	0.47	ND
平均值 (ppb)		0.80					0.53	

结论

安捷伦 7000A 三重串联四极杆气相色谱/质谱联用系统多反应监测分析模式的高选择性和高灵敏性，结合安捷伦微板流路控制技术以及反吹模式，为海洋生物提取物中痕量有机氯杀虫剂的分析提供了一种强有力的工具。

气相色谱/质谱联用仪 (GC/MS) 应用

新一代 Agilent 5975C 系列 MSD — 一直是业界最受欢迎的 GC/MS。Agilent 5975C 系列 MSD — 配备三轴 HED-EM 检测器 — 结合了创新设计特点以提高您实验室的工作效率，先进的分析功能可帮助您更快地获得更好的结果。与新的 7890A GC 的完美配合，使这一平台集所有创新技术为一体，使化学分析达到最佳境界 — 出色的性能、无与伦比的可靠性、更高的工作效率和更简便的操作。

气相色谱/质谱联用仪 (GC/MS) 应用

5989-5076 使用具有解卷积报告软件和新农药数据库的 GC/MS 筛选 926 种农药和内分泌干扰物 339

5989-4834 利用 GC/MS/ECD/FPD 和包含 731 种化合物的 DRS 数据库检测有关国土安全和环境样品中的有毒化学品 356

5989-3299 一次进样同时使用全扫描、选择离子检测、微池电子捕获检测器和火焰光度检测器对农药进行鉴定 379

5989-1654 用 DRS 对加标和未加标水果提取物中农药残留的盲样测试 389

5989-1157 采用 GC/MSD DRS 对残留农药进行全面筛查 395

5988-4392 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 405

5989-0602 气相色谱/质谱法分析食品中的丙烯酰胺 415

5989-9320 日本肯定列表农药方法的 GC/MS 快速分析解决方案 428

使用具有解卷积报告软件和新农药数据库的 GC/MS 筛选 926 种农药和内分泌干扰物

应用

食品和环境

作者

Philip L. Wylie
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Rd.
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

本文介绍了一种最新扩展的质谱数据库，来代替安捷伦的保留时间锁定农药数据库和解卷积农药应用。新的数据库包括了 926 种农药、内分泌干扰物质和相关化合物 — 比原来的数据库多了 359 种化合物，包括了日本的“肯定列表（Positive List）”中用 GC/MS 分析的所有化合物。所有保留时间锁定的化合物，都可以在安捷伦的 GC/MS 保留时间锁定软件中精确重复。新的数据库可以作为标准的 GC/MS 数据库来确证化合物，或者结合安捷伦筛选软件在保留时间和质谱谱图匹配的基础上定性检测化合物。当这些数据库与安捷伦新版本的解卷积报告软件（部件号 G1716AA 版本 A.03.00）结合使用时，可以得到最大的收益。本方法对所有 926 种农药和内分泌干扰物进行 GC/MS 筛选，大约只需要 2 分钟。解卷积帮助确证谱图中隐藏在共流出物中的农药。本文比较了新的数据库和较小的数据库，通过解卷积报告软件分析 17 个地表水样品。在新的数据库的协助下，解卷积报告软件找到了 99 种农药、代谢物、阻燃剂和相关污染物，而这些在以前的农药和内分泌干扰物保留时间所定数据库中是不包含的。

引言

几年前安捷伦科技在气相色谱 (GC) 和气相色谱 — 质谱 (GC-MS) 联用上引进了保留时间锁定 (RTL) 的概念。只要使用相同的初始方法和相同的色谱柱，RTL 软件使得世界上任何实验室的任何安捷伦 GC 或者 GC/MS 上的保留时间再现成为可能 (1)。既然任何实验室都可以重复另外一个实验室的保留时间，那么就可能创建包含保留时间锁定的质谱数据库。通过在数据库上锁定方法，使用者可以在 GC/MS 文件中筛选数据库中的所有化合物。通过“命中数”(Hits) 来确定正确的保留时间和正确的谱图，从而排除假阳性结果，提供更精确的化合物确证 (2)。

最近，安捷伦引入了解卷积报告软件 (DRS)，结合了质谱解卷积和传统的数据库检索和定量技术。解卷积报告软件是三种不同 GC/MS 软件包的结合：

1) 安捷伦 GC/MS 化学工作站

2) 结合 NIST '05 质谱库的 NIST 质谱搜索程序

3) 同样来自 NIST 的 AMDIS 软件

以前的解卷积报告软件作为一种广泛的农药分析解决方案，包括了 567 种农药和可疑内分泌干扰物的质谱图（AMDIS 格式）和锁定的保留时间 (3)。

最近，安捷伦推出了一种最新扩展的农药和内分泌干扰物数据库（部件号 G1672AA），包括 926 种化合物。在以前的数据库基础上，增加了 359 种新的化合物到。同时，安捷伦也推出了解卷积报告软件的新版本（部件号 G1716AA 版本 A.03.00），可以在任何安捷伦推出的或者用户自建的解卷积报告软件数据库上使用。

农药和内分泌干扰物数据库的内容

G1672AA 农药和内分泌干扰物数据库包含所有可用 GC 分析的农药，包括最近推出的农药。另外，还包括大量的代谢物，更多的内分泌干扰物，重要的多氯联苯和多环芳烃，一些染料（如苏丹红），人造的麝香化合物以及一些有机磷阻燃剂。

新的数据库包括：

- 安捷伦 GC/MS 化学工作站的常规分析质谱数据库
- 筛选数据库，集成到安捷伦 GC/MS 化学工作站上的安捷伦功能强大的筛选软件
- 所有 926 种化合物锁定的保留时间，安捷伦 5975 或 5973 的 GC/MS 用户可以在自己的实验室重现
- 用于安捷伦 G1716AA (A.03.00) 解卷积报告软件的文件
- 可以装载到安捷伦的 G1701DA（D.02.00 SP1 版本或更高）的电子方法，包含 GC/MS 文件所需的仪器参数和解卷积报告软件处理的数据。这些参数列于表 1
- 实例文件
- 应用报告

2005 年 11 月 29 日，日本政府公布了“肯定列表”(Positive List) 制度来规范农药、食品添加剂和兽药。设置了 758 种化学品的最大残留限量 (MRL)，同时从列表中除去了 65 种化合物。15 种物质的残留不得被检出。其他未提及的农用化学品的最大残留限量 (MRL) 一致定为 0.01 ppm (4)。新的列表于 2006 年 5 月 29 日实施。

在日本的肯定列表里有 265 种农药是用 GC/MS 分析。新的 G1672AA 农药数据库包含了所有这些化合物的质谱图和锁定的保留时间。因此，一个实验室可以在 GC/MS 运行后的 1–3 分钟内筛选这 265 种“肯定列表”中的化合物和其他几百种更多的农药。

实验

表 1 列出了安捷伦用于农药分析的仪器，软件和分析参数。根据所需的进样量的不同，可以使用程序升温汽化进样 (PTV) 或者分流/不分流进样方式。

表 1. 分析仪器与条件

气相色谱仪	**Agilent 6890N**
自动进样器	Agilent 7683 进样器和自动进样器
进样口	Agilent PTV 溶剂放空模式或分流/不分流
色谱柱	Agilent 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm HP-5MSi （部件号 19091S-433i）
载气	氦气，恒压模式
保留时间锁定	Chlorpyrifos-methyl 锁定在 16.596 min（公称柱头压 = 17.1 psi）
炉温程序	70 °C（保持 2 min），以 25 °C/min 升温至 150 °C（保持 0 min），以 3 °C/min 升温至 200 °C（保持 0 min），以 8 °C/min 升温至 280°C（保持 10–15 min）
PTV 进样口参数	温度程序：40 °C（保持 0.25 min），以 1600 °C/min 升温至 250 °C（保持 2 min）；放空时间：0.2 min; 放空流速：200 mL/min；放空电压：0.0 psi；吹扫流速：60.0 mL/min；吹扫时间：2.00 min
进样量	15 uL（用 50 uL 的注射器）
质谱仪	**Agilent 5975 inert**
调谐文件	Atune.u
模式	扫描（或用 SIM DRS 库选择离子检测）
扫描范围	50–550 u
离子源、四极杆、传输线温度	分别为 230，150 和 280 °C
溶剂延迟	4.00 min
倍增器电压	自动调谐电压
软件	
GC/MSD 化学工作站	安捷伦部件号 G1701DA（D02.00 sp1 版或更高版本）
解卷积报告软件	安捷伦部件号 G1716AA（A.03.00 版）解卷积报告软件
谱库检索软件	NIST MS 检索（2.0d 版或更新版本）（与 NIST '05 质谱库合在一起 — 安捷伦部件号 G1033A）
解卷积软件	自动质谱解卷积和鉴定软件（AMDIS_32 2.62 版或更高版本；与 NIST '05 质谱库合在一起 — 安捷伦部件 G1033A）
MS 谱库	NIST '05 质谱库 （安捷伦部件号 G1033A） Agilent RTL 农药和内分泌干扰物库（Agilent 与 NIST 格式）（部件号 G1672AA）

结果和讨论

关于以前发表的文章（3，5，6）中介绍过的解卷积报告软件，总结如下：

解卷积报告软件结合了三个相互独立的数据分析步骤。首先，GC/MS 化学工作站软件根据目标化合物的一个目标离子和三个确认离子，对目标农药化合物进行一般的定量分析。报告给出检测到并经过校正的化合物的含量。对于数据库中的其他化合物，将根据解卷积报告软件中提供的农药平均响应因子来估计浓度。然后解卷积报告软件把数据文件发送给 AMDIS 解卷积图谱，使用解卷积后的全谱在安捷伦 RTL 农药数据库中检索。在 AMDIS 可以设置一个过滤器，从而使分析物的保留时间落在用户指定的时间窗口内。由于保留时间锁定的作用就是高精确度地再现保留时间，这个窗口一般比较小 — 一般为 10–20 秒。最后，通过 AMDIS 解卷积的所有目标化合物的质谱图在 NIST 质谱库的 147，000 种化合物中检索确证；这一步没有保留时间要求。

此方法很快就被许多实验室采用，正是由于此方法可以在高含量共流出物基质的干扰下能够在复杂的色谱图中确证农药。事实上，这个解决措施十分有用，好多用户开始创建自己的解卷积报告软件数据库 (7)。因此，解卷积报告软件从农药数据库中分离出来，可用于安捷伦提供的或者用户自建的数据库。

原来的 567 种化合物 RTL 农药数据库 (G1049A) 包括在当时已有的农药，少量代谢物及大部分可用 GC 分析的内分泌干扰物质。新版数据库包括更多的农药，内分泌干扰物和代谢物。此次更新还包括在食品和水中发现的其他种类的污染物。包括 18 种多氯联苯 (PCBs)，4 种多溴联苯 (PBBs)，一些多环芳烃 (PAHs)，一些有机磷的阻燃剂，三种重要的毒杀芬同系物和三种苏丹染料。

解卷积的优势

图 1 显示了 AMDIS 的一个界面，说明了解卷积软件的强大功能。图 1A 中的白线是总离子流色谱图，其他三条线是解卷积峰（AMDIS 中的术语）的提取离子流图。注意总离子流色谱图中的峰和提取离子峰不在一个位置，这个化合物实际上被共流出物所掩盖。图 1B 把化合物的解卷积谱图（白色线）同未解卷积的谱图（黑色线）重叠放置。很明显，共流出物掩盖了这个化合物，使分析不清晰。图 1C 显示了解卷积的峰（白色谱图）同数据库中的哒草伏（黑色谱图）匹配良好。RTL 农药数据库中哒草伏的保留时间是 26.933 分钟，同这个色谱图中看到的保留时间仅仅相差 2.3 秒。谱图的解卷积和锁定的保留时间结合使化合物的确证更加明确。

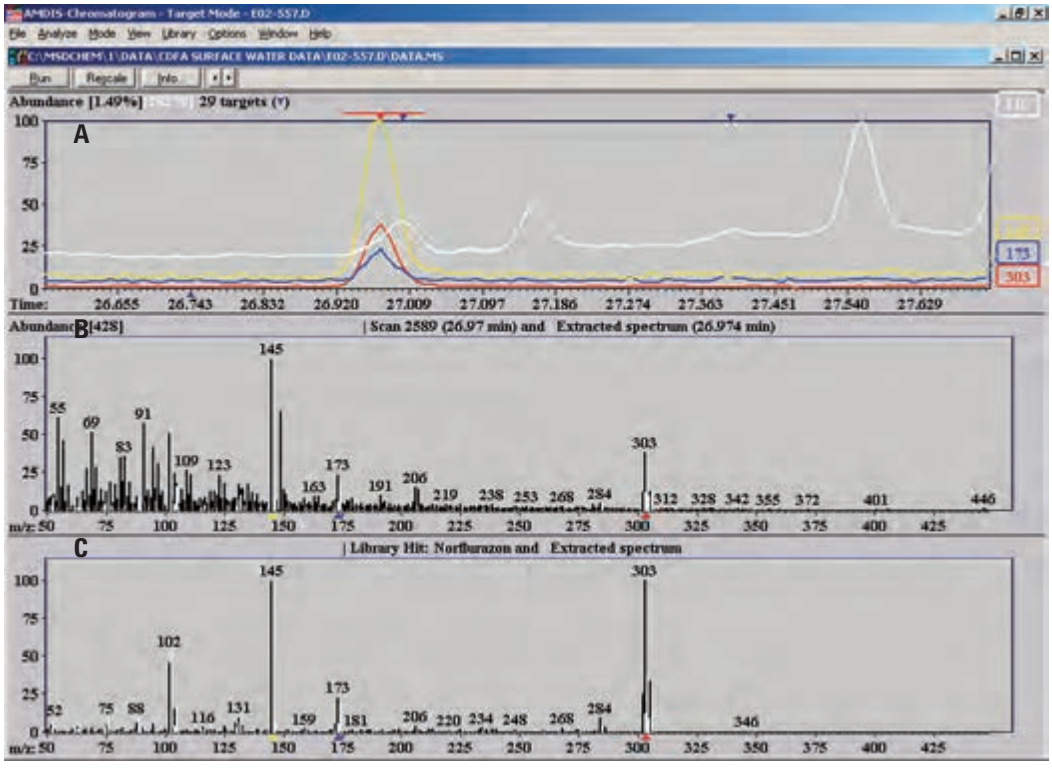


图 1. 确定哒草伏的 AMDIS 界面

A) 哒草伏洗出的总离子流图和提取离子流图

B) 重叠放置化合物的解卷积谱图（白线）同 26.972 分钟处的谱图（黑线）

C) 解卷积后的谱图与数据库中哒草伏的谱图一致

地表水分析 — 重复早期的研究

较早的研究中，比较了安捷伦的解卷积报告软件和常规的农药分析 (3)。加州农药管理局 (CDFA) 提供了在他们实验室分析的 17 种地表水提取物的数据文件。采用安捷伦的农药分析方法对 GC/MS 谱图进行时间锁定，从而使得用解卷积报告软件分析这些文件而不用重新进样。原来的解卷积报告软件分析使用的是 567 种化合物 RTL 农药数据库。为了比较，用新的 926 种化合物 RTL 农药数据库重新分析了相同的化合物。下面是其中一个样品的色谱图（图 2）和解卷积报告软件报告（图 3）。

除了邻苯二甲酸盐，926 种化合物数据库确证了 7 种新的化合物（图 3 中粗体表示）：4-氯苯异氰酸酯（一种苯基脲类除草剂的代谢物）；3,4-二氯苯异氰酸酯（敌草隆代谢物）；磷酸三（-2-氯乙酯）（一种阻燃剂）；咖啡因（一种刺激物）；嘧菌环胺（一种杀菌剂）；去甲基哒草伏（哒草伏的代谢物，一种除草剂）；四丁氧基乙基磷（一种阻燃剂）。虽然一般认为咖啡因不会有危险，之所以包括在数据库中是因为经常在污水中发现，在下水道中和各种药物或农药在一起 (8)。

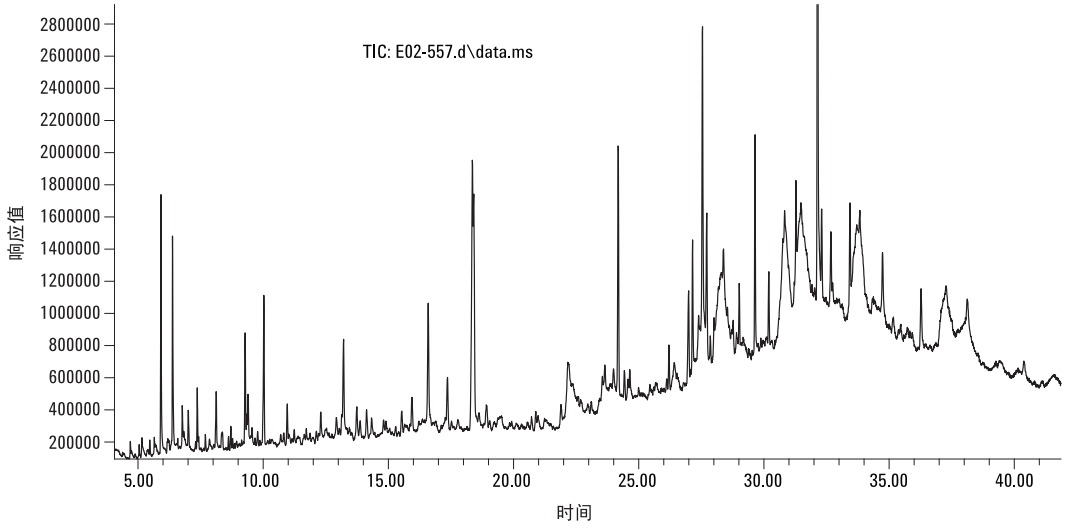


图 2. 通过解卷积报告软件采用新的 RTL 农药和内分泌干扰物数据库分析地表水提取物的色谱图。分析结果如图 3 所示

MSD 解卷积报告
Sample Name: **E02-557**
Data File: **C:\MSDChem\1\DATA\CDFA surface water data\E02-557.d**
Date/Time: **11:24 AM Tuesday, Apr 4 2006**

The NIST library was searched for the components that were found in the AMDIS target library.

RT	Cas #	Compound name	Agilent ChemStation amount (ng)	AMDIS match	RT Diff (sec.)	NIST reverse match	Hit number
4.4689	106445	4-Methylphenol		62	3.2		
4.4689	0000	3-Carbobenzyloxy-4-ketoproline				48	1
4.8840	104121	**4-Chlorophenyl isocyanate**		84	–1.8	86	2
6.3879	102363	**Diuron Metabolite [3,4-Dichlorophenyl isocyanate]**		99	3.1	95	1
6.8357	759944	EPTC		84	2.0	85	1
7.6988	95761	3,4-Dichloroaniline		93	2.1	89	2
7.9342	131113	Dimethylphthalate		67	1.7	84	2
8.1112	25013165	Butylated hydroxyanisole		63	–7.7		
8.1112	0000	7-Methoxy-2,2,4,8-tetramethyltricyclo [5.3.1.0(4,11)]undecane				62	1
8.941	29878317	Tolyltriazole [1H-Benzotriazole, 4-meth-]	1.29				
9.7903	134623	N,N-Diethyl-m-toluamide		85	2.2	84	2
10.0019	84662	Diethyl phthalate		98	2.6	92	1
10.7109	119619	Benzophenone		86	2.6	88	2
10.9684	126738	Tributyl phosphate		96	3.0	90	1
11.6491	1582098	Trifluralin		83	0.7	74	1
12.9326	122349	Simazine		88	1.4	86	2
13.4309	115968	**Tris(2-chloroethyl) phosphate**		79	1.0	78	1
13.7478	1517222	Phenanthrene-d10		95	1.3	83	1
15.4048	58082	**Caffeine**		80	1.6	74	1
15.9474	84695	Diisobutyl phthalate		90	3.2	88	4
16.5988	5598130	Chlorpyrifos Methyl		97	0.4	90	1
17.3653	7287196	Prometryn		90	1.5	84	1
18.4213	84742	Di-n-butylphthalate		99	0.4	94	1
18.9214	51218452	Metolachlor		90	0.7	87	1
20.5633	121552612	**Cyprodinil**		69	–0.1		
20.5633	76470252	9,9-Dimethoxy-9-sila-9, 10-dihydroanthracene				70	1
26.4247	23576241	**Norflurazon, Desmethyl-**		87	–4.5	69	2
26.9700	27314132	Norflurazon		87	1.5	79	1
26.9992	85687	Butyl benzyl phthalate		94	–0.5	94	1
27.3984	51235042	Hexazinone		89	0.8	83	1
28.0127	78513	**Tris(2-butoxyethyl) phosphate**		75	3.3	83	1
29.6537	117817	Bis(2-ethylhexyl)phthalate		98	0.3	90	3
33.9298	84764	Di-n-nonyl phthalate		65	–1.9		
33.9298	0000	Phthalic acid, 3,4-dichlorophenyl propyl ester				71	1
13.739		Phenanthrene-d10	10				

图 3. 地表水样品分析解卷积报告软件报告。粗体字表示的化合物在新的RTL农药数据库中被找到，原来的数据库由于不包括这些而没有发现

这个样品中，化学工作站在 8.941 分钟只发现了甲基苯骈三氮唑，但是 AMDIS 不能确证，包括手动也无法确证。AMDIS 以低的匹配度暂时性确证了叔丁基-4-羟基茴香醚，但是保留时间偏离了 –7.7 秒，比其它大多数命中的化合物都要多。这个化合物不在 NIST 库中，所以不能被确证。化学工作站方法要求所有三个确证离子峰在 ±20% 以内（相对），这对于一个复杂的样品是很严格的。这就解释了为什么化学工作站找到的化合物很少了。

AMDIS 确证了嘧菌环胺（20.563 分钟），但是 NIST 数据库没有检索出来。下面一行显示最好的 NIST 匹配是蒽的衍生物，不是嘧菌环胺。当设置 AMDIS “可使用未确定峰”时就会出现这种结果，如图 4 所示。当在解卷积报告软件化合物确证配置中关闭这个选项时，NIST 检索出的最好的匹配物质就是嘧菌环胺。当化合物的确证中出现像嘧菌环胺这样不明确的化合物时，同时执行两种解卷积报告软件检索方式并且比较结果是很有效的一种方法。

在以前介绍的比较中 (3)，解卷积报告软件可以确证所有的 CDFA 化学家发现的 37 种农药。然而，解卷积报告软件完成 17 个样品的测试花费大约 20 分钟，而手动操作需要 8 个小时（表 2）。而且，解卷积报告软件发现了 CDFA 报告中的一个假阳性结果，并且发现了另外 34 种农药和相关化合物。

使用新的 926 种化合物数据库，只需要 32 分钟即可完成分析所有样品，解卷积报告软件发现了另外的 99 种农药、代谢物、阻燃剂和相关化合物（表 2）。

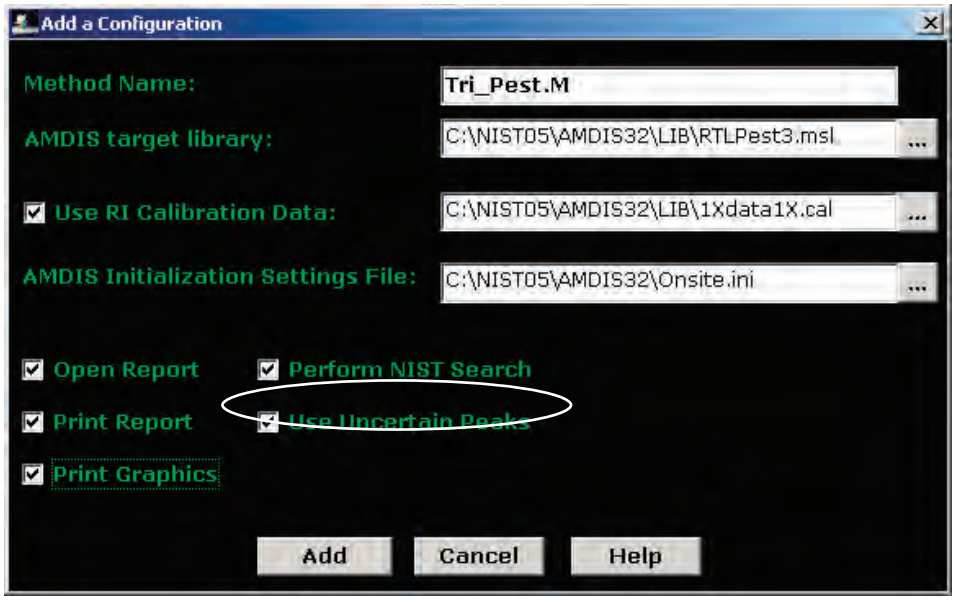


图 4. 方法名为 Tri_Pest 的解卷积报告软件配置界面。当方格中钩上“可使用未确定峰”时，AMDIS 将会使用未确定峰检索数据库。如果未钩上该项，AMDIS 就会忽略未确定峰。有时候，这个选项将会影响到与数据库的匹配质量

表 2. 采用传统方法 (CDFA) 和使用带两种数据库（包含 567 种化合物的 G1049A 和包含 926 种化合物的 G1672AA）的解卷积报告软件检测 17 种地表水提取物的结果比较

	CDFA	Agilent DRS (原来的 G1049A 数据库)	Agilent DRS (G1672 AA 数据库)
匹配的农药数目	37	同样的 37 种加上另外的 34 种化合物	同样的 37 种加上另外的 99 种化合物
不匹配农药数目	1	0	0
处理所需时间	~8 小时（只用化学工作站）	20 分钟	32 分钟

立体异构体的处理

很多化合物有多个立体异构体，具有相同的质谱图。例如，氟氯氰菊酯有三个手性中心产生了四对非对映异构体。很难而且有时也不可能确定这些异构体的洗脱顺序，大部分分析工作者按异构体的总量来报告。安捷伦的 G1049A RTL 农药数据库任意将这些异构体按罗马字母分配，I 是最早流出的异构体，II 是第二个，依次类推。所有这些异构体都有着相同的 CAS 号。一般采用 CAS 号来确定“不稳定的立体化学品”。这将导致 AMDIS 的一些不兼容问题，说明如下。

AMDIS 软件利用“化学品鉴别号”来区别这些化合物。最简单的和最一致的方法是使用美国化合物的 CAS 号。AMDIS 默认的设置就是在分析 GC/MS 数据文件时，每个 CAS 号只使用一次。这样看上去更合理，要求数据库的每个条目都有一个不同的 CAS 号。在 AMDIS 的分析/设置/确证的下拉菜单中选择条目，可以允许每个化合物有多个匹配。这样，就会使多个峰具有相同的化合物名称。

在新的 RTL 农药数据库（G1672AA）中，仍然保留罗马数字名称，给系列中的第一个异构体真正的 CAS 号。给系列中其它的异构体一个统一的安捷伦编制的 CAS 号。真正的 CAS 号在条目中化合物的名字之后。例如，氟氯氰菊酯异构体在数据库中的条目如表 3 所示。

表 3. 新 G1672AA RTL 农药数据库中多个立体异构体的排列方法

保留时间	化合物名称*	CAS 号**
32.218	氟氯氰菊酯 I	68359-37-5
32.359	氟氯氰菊酯 II {CAS # 68359-37-5}	999028-03-4
32.477	氟氯氰菊酯 III {CAS # 68359-37-5}	999029-03-7
32.536	氟氯氰菊酯 IV {CAS # 68359-37-5}	999030-03-4

* 在一个系列中，最早流出的异构体后面加上 I，并配以真正的 CAS 号。后面的同分异构体用唯一的、但是由安捷伦编制的 CAS 号（见注释**）.它们的实际 CAS 号在化合物名称后面的括号里。

**氟氯氰菊酯 I 已经给出了真正的 CAS 号。氟氯氰菊酯 II 给出了唯一号，能够与实际 CAS 号区出来，因为它们都是在第一个连字符前有 6 个数字（共 9 个数字）并且开头都是 999。

图 5 说明了两个数据库是如何使用 AMDIS 配置（每个化合物一对一匹配）来确证在菠菜样品中的氯菊酯的。使用旧的 567 种化合物数据库 (G1049A) 因为只用一次 CAS 号，所以只确认了一个氯菊酯异构体。使用新版的 926 种化合物 RTL 农药数据库 (G1672-AA)，确证了氯菊酯的两个异构体。不出所料，用氯菊酯 II 的编制 CAS 号在 NIST 数据库上没有匹配。因此，软件在接下来的一行打印出匹配最好的化合物。这个化合物，环丙基甲酸衍生物就是氯菊酯的异构体。

现在，只要在解卷积报告软件中开启 NIST 数据库检索，报告就会在编制 CAS 号化合物之后打印出另外一行。注意这些编制 CAS 号一般是以 999 开头的 9 位数字。

A)

			Agilent			NIST	
RT	**Cas #**	**Compound name**	**ChemStation amount (ng)**	**AMDIS match**	**RT Diff (sec.)**	**reverse match**	**Hit number**
31.6158	52645531	Permethrin II		88	3.9	91	3

B)

			Agilent			NIST	
RT	**Cas #**	**Compound name**	**ChemStation amount (ng)**	**AMDIS match**	**RT Diff (sec.)**	**reverse match**	**Hit number**
31.4127	52645531	Permethrin I		78	2.6	81	3
31.6088	999046036	Permethrin II {CAS # 52645-53-1}		65	3.5		
31.6088	51877748	Cyclopropanecarboxylic acid, 3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethyl-, (3-phenoxyphenyl)methyl ester, (1R-trans)-				95	1

图 5. A) 当 AMDIS 不允许一个化合物有多重匹配时，解卷积报告软件使用 G1049A 的 567 种化合物数据库只检测到氯菊酯的一个异构体
B) 相同环境下解卷积报告软件使用 G1672AA 的 926 种化合物数据库检测到两种氯菊酯的异构体

结论

新的 G1672AARTL 农药和内分泌干扰物数据库比它的早期版本包括了更多的目标化合物，增加了 359 种新的化合物，是目前最全面的数据库。增加了许多新的农药、代谢物和内分泌干扰物，例如重要的多氯联苯，多溴联苯，多环芳烃，人造麝香化合物，苏丹染料以及有机磷阻燃剂。此数据库包括新的日本“肯定列表”制度中所有使用 GC/MS 检测的分析物。

结合完整的解卷积报告软件方法，可以在约两分钟的时间内，在每个样品的 GC/MS 数据文件中筛选所有的 926 种化合物。对于检测食品和环境样品中的这些化合物，这是一种最快、最全面、最精确、最简单的方法。

参考文献

1. V.Giarocco，B.Quimby，和 M.Klee，“保留时间锁定：概念和应用”，安捷伦科技，印刷号 5966-2469E，www.agilent.com/chem
2. H.Prest，P.Wylie，K.Weiner，和 D.Agnew，“使用6890/5973 GC/MSD 系统有效筛选农药和内分泌干扰物质”，安捷伦科技，印刷号 5968-4884E，www.agilent.com/chem
3. P.L.Wylie，M.J.Szelewski，C.-K.Meng，C.P.Sandy，“GC/MSD 使用解卷积报告软件全面筛选农药”，安捷伦科技，印刷号 5989-1157EN，www.agilent.com/chem
4. “农用化学品残留的肯定列表制度介绍，食品安全管理局，健康劳动社会安全部” http://www.mhlw. go.jp/english/topics/food-safety/positivelist060228/introduction.html
5. C.P.Sandy，“使用解卷积报告软件对添加和未添加的水果提取物中农药残留的盲检”，安捷伦科技，印刷号 5989-1564EN，www.agilent.com/chem
6. C.Lesueur 和 M.Gartner，“全扫描，选择离子检测，解卷积报告软件对水果和蔬菜样品中农药多残留的常规定性和定量”，2005 *Ernährung/Nutrition*，**29** (11) 466–471
7. X.Ping，C.-K.Meng 和 M.Szelewski，“安捷伦 GC/MSD 解卷积报告数据库的应用”，安捷伦科技，印刷号 5989-2249EN，www.agilent.com/chem
8. “环境中新的污染物的分布和突发事件的方大规模研究 — 探索研究”， *USGS，Contaminant Occurrence Studies，* http://toxics.usgs.gov/topics/reconnaissance_studies.html

数据库中化合物列表

1,2,4-三氯苯
1,2-二溴-3-氯丙烷
1,3,5-三溴苯
1,3-二氯苯
17a-乙炔基雌二醇
1-萘酚
2-(1-萘)乙酰胺
2-(2-丁氧基乙氧基)乙基硫氰酸盐
避虫醇
2,3,4,5-四氯硝基苯
2,3,4,5-四氯苯酚
2,3,4,6-四氯苯酚
2,3,5,6-四氯苯酚
2,3,5,6-四氯对联三苯
2,3,5-三氯苯酚
2,3,5-混杀威
2,3,6-三氯苯甲醚
2,3,7,8-四氯二苯骈呋喃
2,3,7,8-四氯二苯异呋喃
2,4,5,6-四氯间二甲苯
2,4,5-涕甲酯
2,4,5-三氯苯按
2,4,5-三氯苯酚
2,4,5-三氯-对三联苯
2,4,5-三甲基苯按
2,4,6-三溴苯甲醚
2,4,6-三溴苯酚
2,4,6-三氯苯甲醚
2,4,6-三氯苯酚
2,4-滴甲酯
2,4-滴正丁酯
2,4-滴丁酸甲酯
2,4'-二氯二苯甲酮 (2,4'-三氯杀螨醇降解产物)
2,4-二氯苯酚
2,4-二氯苯基苯磺酸酯
2,4-二甲基苯胺
2,4-二甲基苯酚
2,6-二氯苯甲酰胺
2,6-二氯氰苯
2,6-二甲基苯胺
2-[3-氯苯氧基]丙酰胺
2-氯苯酚
2-乙基-1,3-己二醇
2-乙基-6-甲基苯胺
2-羟雌甾二醇
2-甲基-4,6-二硝基苯酚
2-甲基苯酚
2-硝基苯酚
2-苯氧丙酸
3,4,5-混杀威
3,4-二氯苯胺
3,5-二氯苯胺
3-氨基苯酚
3-氯-4-氟苯胺
3-氯-4-甲氧苯胺
3-氯苯胺
3-羟基呋喃丹
3-吲哚乙腈
3-三氟甲基苯胺
4,4'-二氯苯甲酮
4,4'-二氨基二苯醚
4,6-二硝基-邻甲酚
4-氨基联苯
4-溴苯胺
4-氯-2-甲基苯胺
4-氯-3-甲基苯酚
4-氯苯胺
4-氯苯基异氰酸酯
4-异丙基苯胺
4-甲基苯酚
4-硝基苯酚
4-壬基苯酚
5,7-二羟基-4'-甲氧基异黄酮
9,10-蒽醌
威杀灵
威杀灵
乙酰甲胺磷
灭螨醌
吡虫清
乙草胺
三氟羧草醚
苯草醚
氟酯菊酯
甲草胺
艾氏剂
草毒死
莠灭津
赛果
灭害威
虫螨脒
虫螨脒代谢物[甲脒，N-(2,4-二甲基苯基)-N'-甲基-]
嘧啶醇
敌菌灵
苯胺
莎稗磷
蒽
杀螨特 I
杀螨特 II {CAS#140-57-8}
阿特拉通
阿特拉津
去乙基阿特拉津
戊环唑
唑啶磷
Azibenzolar-S-methyl
乙基谷硫磷
谷硫磷
叠氮津代谢物[2-氨基-4-异丙基氨基-6-甲硫基-1,3,5-三嗪]
叠氮津
偶氮苯
氧化偶氮苯
腈嘧菌酯
燕麦灵
Beflubutamid
苯霜灵
草除灵
恶虫威
氟草胺

丙硫克百威
呋草黄
麦锈灵
解草酮
苯达松
苯达松甲基衍生物
杀草丹
苯，1,3-二 (溴甲基)-
苯磺酰胺
联苯胺
苯并[a]蒽
苯并[a]芘
苯并[b]萤蒽
苯并[ghi]苝 (二萘嵌苯)
苯并[k]萤蒽
苯甲酮
苯螨特
新燕灵
苯甲酸苄酯
β-雌二醇
α-六六六异构体
β-六六六异构体
δ-六六六异构体
ε-六六六异构体
联苯肼酯代谢物 (5-苯基-邻-茴香胺)
治草醚
氟氯菊酯
乐杀螨
反丙烯除虫菊
反丙烯除虫菊-S-环戊烯基异构体
右旋反灭虫菊酯
联苯
二 (2,3,3,3-四氯丙基) 醚
*邻*苯二甲酸双 (2-丁氧基乙) 酯
*邻*苯二甲酸双 (2-乙基己基) 酯
双酚 A
双苯三唑醇 I
双苯三唑醇 II {CAS # 55179-31-2}
啶酰菌胺 (BAS510)
除草定
溴苯烯磷-(E)
溴苯烯磷-(Z)
溴丁酰草胺
溴烯杀
溴硫磷
乙基溴硫磷
溴螨酯
溴苯腈
溴苯腈辛酸酯
糠菌唑 I
糠菌唑 II {CAS # 116255-48-2}
合杀威
磺嘧菌灵
噻嗪酮
丁草胺
氟丙嘧草酯
草胺磷
氧丁叉威
地乐胺
邻苯二甲酸丁苄酯
苏达灭
叔丁基-4-羟基茴香醚
硫线磷
苯酮唑
咖啡因
敌菌丹
克菌丹
西维因
长杀草
呋喃丹
呋喃丹-3-酮
呋喃丹-7-苯酚
三硫磷
丁硫克百威
萎锈灵
氟酮唑草
氯环丙酰胺
香芹酮
Cashmeran
Cekafix
萨利麝香
灭螨猛
草灭平甲酯
地快乐
氯杀螨
氯杀螨砜
冰片丹
氯溴隆
氯草灵
开蓬
*反式*六氯
杀虫脒
壤虫氯磷
氟唑虫清
杀螨醇
燕麦酯
杀螨酯
毒虫畏
*顺式*毒虫畏
*反式*毒虫畏
氯甲丹
氯甲磷
草枯醚
乙酯杀螨醇
地茂散
丙酯杀螨醇
百菌清
绿麦隆
氯苯胺灵
毒死蜱
甲基毒死蜱
敌草索
草克乐
氯硫磷
氯甲硫磷
氯甲硫磷砜
氯甲硫磷亚砜
乙菌利
蒀
瓜菊酯 I
瓜菊酯 II
吲哚酮草酯
顺式氯丹
炔草酯
异恶草酮
喹氧乙酸
蝇毒磷
鼠立死
丁烯磷
育畜磷
草净津
苯腈磷
杀螟腈
环糠酰胺
草灭特
Cyclopentadecanone
环莠隆

环氟菌胺
氟氯氰菊酯 I
氟氯氰菊酯 II {CAS # 68359-37-5}
氟氯氰菊酯 III {CAS # 68359-37-5}
氟氯氰菊酯 IV {CAS # 68359-37-5}
氰氟草酯
氯氟氰菊酯 I (λ)
氯氟氰菊酯 (γ)
甲基异丙苯基吡咯
霜脲氰
氯氰菊酯 I
氯氰菊酯 II {CAS # 52315-07-8}
氯氰菊酯 III {CAS # 52315-07-8}
氯氰菊酯 IV {CAS # 52315-07-8}
*顺*式苯醚氰菊酯
*反*式苯醚氰菊酯 {CAS # 39515-40-7}
环丙津
环丙唑醇
嘧菌环胺
酯菌胺
灭蝇胺
右旋-(*顺反*) 苯醚菊酯 I
右旋-(顺反) 苯醚菊酯 II {CAS#260002-80-2}
棉隆
DDMU [1-氯-2,2-二 (4'-氯苯基)]
十氯代联苯
溴氰菊酯
田乐磷
内吸磷
砜吸磷
去溴-溴丁酰草胺
异苯敌草
敌草净
氯亚磷
燕麦敌 I
燕麦敌 II {CAS # 2303-16-4}
邻苯二甲酸二戊酯
二嗪磷
牛津郡二嗪磷
二苯并[a,h]蒽
麦草畏
麦草畏甲酯
异氯磷
除线磷
抑菌灵
抑菌灵代谢物 (DMSA)
二氯萘醌
抑害胺
双氯酚
2,4-滴丙酸
2,4-滴丙酸甲酯
敌敌畏
苄氯三唑醇
双氯氰菌胺 I
双氯氰菌胺 II {CAS # 139920-32-4}
禾草灵
氯硝胺
百治磷
邻苯二甲酸二环己酯
双环戊二烯
狄氏剂
安塔
乙霉威
二乙基苯并噻唑 (硫逐甲酸) (EXD)
邻苯二甲酸二乙酯
二甘醇
乙底酚
恶醚唑 I
恶醚唑 II {CAS # 119446-68-3}
枯莠隆
吡氟草胺
邻苯二甲酸二异丁基酯
甲氟磷
哌草丹
克草胺
戊草津
噻吩草胺
噻节因
乐果
烯酰吗啉-(E)
烯酰吗啉-(Z) {CAS # 110488-70-5}
驱蚊酯
甲基毒虫畏
敌蝇威
醚菌胺
邻苯二甲酸二正丁酯
邻苯二甲酸二正己酯
烯唑醇
敌乐胺
邻苯二甲酸二正壬酯
敌螨通
敌螨普 I
敌螨普 II {CAS # 39300-45-3}
敌螨普 III {CAS # 39300-45-3}
敌螨普 IV {CAS # 39300-45-3}
邻苯二甲酸二正辛酯
地乐酚
地乐酯
地乐酚甲酯
地乐消酚
地乐消
邻苯二甲酸二正丙酯
恶茂醚 I
恶茂醚 II {CAS # 63837-33-2}
杀抗松
二氧威
敌杀磷
敌鼠
草乃敌
邻苯二甲酸二苯酯
二苯胺
杀草净
Dipropyl isocinchomeronate
乙拌磷
二氧乙拌磷
灭菌磷
氟硫草定
敌草隆
敌草隆代谢物 [3,4-二氯苯异氰酸酯]
吗菌灵 I
吗菌灵 II {CAS # 1593-77-7}
敌菌酮
克瘟散
烯炔菊酯 I
烯炔菊酯 II {CAS # 54406-48-3}
烯炔菊酯 III {CAS # 54406-48-3}
烯炔菊酯 IV {CAS # 54406-48-3}
烯炔菊酯 V {CAS # 54406-48-3}
硫丹 (α 异构体)
硫丹 (β 异构体)
硫丹乙酯
硫丹内酯
硫丹硫酸盐
异狄氏剂
异狄氏剂醛
异狄氏剂酮

苯硫磷
氧唑菌
扑草灭
抑草蓬
高氰戊菊酯
禾草畏
乙环唑
丁氟消草
噻二唑隆
苯虫威
抑草威
乙硫磷
醚菊酯
乙呋草黄
乙呋草黄，2-酮
灭克磷
氯氟草醚乙酯
促长啉
乙撑硫脲
特苯噁唑
氯唑灵
氯唑灵，去氯-(5-乙氧基-3二氯甲基-1,2,4-噻二唑)
氧嘧啶磷
丁子香酚
环十五内酯 (15-十五内酯)
噁唑酮菌
伐灭磷
咪唑菌酮
克线磷亚砜
克线磷砜
异嘧菌醇
抗螨唑
抗螨唑代谢物
喹螨醚
腈苯唑
解草唑乙酯
皮蝇磷
牛津郡皮蝇磷
解草啶
呋菌胺
环酰菌胺
杀螟硫磷
牛津郡杀螟硫磷
丁苯威
2,4,5-涕丙酸
2,4,5-涕丙酸甲酯
苯硫威
稻瘟酰胺
噁唑禾草灵
双氧威
拌种咯
甲氰菊酯
苯锈啶
除螨酯
丰索磷
牛津郡丰索磷
牛津郡丰索磷砜
丰索磷砜
倍硫磷
倍硫磷亚砜
倍硫磷砜
非草隆
氰戊菊酯 I
氰戊菊酯 II {CAS # 51630-58-1}
Fepropimorph
氟虫腈
氟虫腈，去亚硫酰基
氟虫腈硫化物
氟虫腈砜
强氟燕灵
甲氟燕灵
嘧螨酯
精吡氟禾草灵
氟啶胺
异丙吡草酯
噻唑螨
氯消草
氟氰戊菊酯 I
氟氰戊菊酯 II {CAS # 70124-77-5}
氟噁菌
氟噻草胺
氟节胺
酰亚胺苯氧乙酸戊酯
氟噁嗪酮
呋草隆
荧蒽
芴
消草醚
乙羧氟草醚
氟菌安
菌唑灵
氟嘧菌酯
喹唑菌酮
抑草丁
抑草丁甲酯
氟草同
氟咯草酮 I
氟咯草酮 II {CAS # 61213-25-0}
氟咯草酮，去氯
氟草烟-1-甲基庚基酯
调嘧醇
呋草酮
氟硅唑
达草氟
氟酰胺
粉唑醇
氟胺氰菊酯 I
氟胺氰菊酯 II {CAS # 102851-06-9}
灭菌丹
地虫磷
安果
噻唑磷 I
噻唑磷 II {CAS # 98886-44-3}
麦穗宁
呋霜灵
呋氨丙灵
呋线威
解草呋
拌种胺
卤醚菊酯
吡氟氯禾灵
七氯
环氧七氯异构体 A
环氧七氯异构体 B
庚虫磷
六溴苯
六氯苯
菌螨酚
己唑醇
六嗪同
己烷雌酚
蒙五一二
烯菌灵
咪草酯 I
咪草酯 II {CAS#81405-85-8}
酰胺唑
酰胺唑-去苄基

茚苯[1,2,3-cd]芘
噁二唑虫和二氧威降解产物[苯酚，2-(1,3-二氧戊环-2-基)-]
碘苯腈
碘苯腈辛酸酯
环戊唑醇
异稻瘟净
异菌脲
缬霉威 I
缬霉威 II {CAS # 140923-25-7}
Irgarol
氯唑磷
碳氯灵
敌稻瘟
丁环隆
水胺硫磷
异艾氏剂
异柳磷
牛津郡异柳磷
噻丁草
异丙威
异乐灵
稻瘟灵
异丙隆
异恶草胺
双苯恶唑酸
异噁氟草
异噁唑磷
茉莉菊酯 I
茉莉菊酯 II
碘硫磷
蒙七七七
亚胺菌
乳氟禾草灵
环草定
对溴磷
牛津郡对溴磷
林丹
利谷隆
马拉硫磷
马拉硫磷-O-同系物
2 甲 4 氯甲酯
2 甲 4 氯丁氧基乙酯
2 甲 4 氯丁酸甲酯
间甲酚
灭蚜磷
2 甲 4 氯丙酸甲酯
苯噻草胺
吡咯二酸二乙酯
氟草磺
灭蚜松
醚菌胺
二噻磷
丙氧灭绣胺
甲霜灵
苯嗪草
甲基一零五九硫醇
吡草胺
环戊唑菌 I
环戊唑菌 II {CAS # 125116-23-6}
噻唑隆 (降解产物)
虫螨畏
甲胺磷
甲呋菌胺
杀扑磷
灭虫威
灭虫威砜
灭虫威亚砜
灭多虫
蒙五一五 I
蒙五一五 II {CAS # 40596-69-8}
盖草津
甲氧滴滴涕
甲氧滴滴涕烯烃
乙酸 (2-萘氧) 甲酯
甲基对氧磷
甲基对硫磷
乙酸-1-萘甲酯
苯丙隆
秀谷隆
异丙甲草胺
速灭威
叉氨苯酰胺- (E)
叉氨苯酰胺- (Z) {CAS # 133408-50-1}
苯菌酮
赛克津
速灭磷
灭蚁灵
草达灭
杀草利
久效磷
绿谷隆
葵子麝香
麝香酮
伞花麝香
三甲苯麝香 (moschustibeten)
二甲苯麝香
腈菌唑
N,N-二乙基-间-甲苯酰胺
N-1-萘乙酰胺
二溴磷
萘
萘二甲酐
萘丙胺
草萘胺
烟碱
磺乐灵
氯定
除草醚
异丙消
N-甲基-1-萘乙酰胺
*顺式*九氯
*反式*九氯
达草灭
达草灭，去甲基
氟苯嘧啶醇
o,p'-DDD
o,p'-DDE
o,p'-DDT
八氯苯乙烯
邻联茴香胺
邻二氯苯
甲呋酰胺
氧乐果
邻苯基苯酚
坪草丹
*邻*氨基偶氮甲苯
黄草消
解草腈
恶草灵
噁霜灵
甲氨叉威
氧化萎锈灵
氧化氯丹
砜吸磷
乙氧氟草醚

p,p'-DDD
p,p'-DDE
p,p'-DDM [二 (4-氯苯) 甲烷
p,p'-DDT
p,p'-二溴苯甲酮
p,p'-开乐散
多效唑
对氧磷
对硫磷
PBB 52 四溴联苯
PBB 101
PBB 15
PBB 169 六溴联苯
PCB 101
PCB 105
PCB 110
PCB 118
PCB 126
PCB 127
PCB 131
PCB 136
PCB 138
PCB 153
PCB 169
PCB 170
PCB 180
PCB 30
PCB 31
PCB 49
PCB 77
PCB 81
对二氯苯
克草猛
戊菌唑
胺硝草
五氯苯胺
五氯苯甲醚
五氯苯
五氯硝基苯
五氯苯酚
蔬草灭
氯菊酯 I
氯菊酯 II {CAS # 52645-53-1}
乙滴滴
粉檀麝香
克线磷
菲
菲-d10
芬硫磷
苯酚
吩噻嗪
苯醚菊酯 I
苯醚菊酯 II
苯氧乙酸
稻丰散
甲拌磷
甲拌磷砜
甲拌磷亚砜
牛津郡甲拌磷
伏杀磷
棉安磷
亚胺硫磷
磷胺 I
磷胺 II {CAS # 13171-21-6}
四氯苯酞
酞酰亚胺
毒莠定甲酯
氟吡酰草胺
啶氧菌酯
杀鼠酮
粉病灵
增效醚
哌草磷
抗蚜威
乙基虫螨磷
虫螨磷
蚊蝇灵
对硝基甲苯
扑打散
*顺*式炔酮菊酯
*反*式炔酮菊酯 {CAS#23031-36-9}
丙草胺
噻菌灵
丙氯灵
杀菌利
氨基丙氟灵
丙溴磷
丙溴磷代谢物 (4-溴-2-氯苯酚)
卡乐施
茉莉酸诱导体 I
茉莉酸诱导体 II {CAS # 158474-72-7}
猛杀威
人造猛杀威 [5-异丙基-3-甲基苯酚]
扑灭通
扑草净
毒草安
百维灵
敌稗
丙虫磷
克螨特
克螨特代谢物 [环己醇，2-(4-特丁基苯氧基)]
扑灭津
烯虫磷
苯胺灵
丙环唑 I
丙环唑 II {CAS # 60207-90-1}
异丙草胺
残杀威
拿草特
苄草丹
丙硫菌唑-去硫基
丙硫磷
发果
比锈灵
吡唑硫磷
氟唑草酯
杀草敏
定菌磷
苄草唑
茚
除虫菊酯 I
除虫菊酯 II
稗草畏
哒螨酮
打杀磷
达草止
病定清
啶斑肟 I
啶斑肟 II {CAS # 88283-41-4}
环酯草醚
二甲嘧菌胺
嘧胺苯醚
肟啶草 (E)
肟啶草 (Z) {CAS # 136191-64-5}

蚊蝇醚
咯喹酮
喹嗯磷
灭藻醌
喹氧灵
五氯硝基苯代谢物 (五氯苯基甲基硫化物)
喹禾灵
吡咪唑菌
灭虫菊
灭虫菊 I
灭虫菊 II {CAS # 10453-86-8}
鱼藤酮
S,S,S-三丁基三硫赶磷酸酯
八甲磷
另丁津
去乙基另丁津
密草通
灭虫硅醚
硅噻菌胺
西玛津
硅氟唑
西草津
季酮螨酯
季酮甲螨酯
螺嗯茂胺 I
螺嗯茂胺 II {CAS # 118134-30-8}
螺嗯茂胺代谢物 (4-特丁基)
苏丹 I
苏丹 II
苏丹红
草克死
对氨基苯磺酰胺
磺胺草唑
硫特普
硫
乙丙硫磷
灭草灵
他莫昔芬
清菌噻唑
戊唑醇
吡螨胺
嘧丙磷
丙戊草胺
丁唑隆
四氯硝基苯
*顺*式七氟菊酯
双硫磷
特草定
芽根草
特丁磷
牛津郡特丁磷砜
特丁磷砜
甲氧去草净
Terbuthylazine
Terbuthylazine-desethyl
Terbutryne
杀虫畏
氟醚唑
三氯杀螨砜
特普
四氢邻苯二甲酰亚胺，*顺*式1,2,3,6-
胺菊酯 I
胺菊酯 II {CAS # 7696-12-0}
硫代二磷酸四丙基酯
杀螨仔
噻醚草胺
可可豆碱
涕必灵
噻氟啶草
溴氟唑菌
特氨叉威
甲基乙拌磷
硫磷嗪
麝香草酚
丁草威 I
丁草威 II {CAS # 36756-79-3}
甲基立枯磷
唑虫酰胺
对甲抑菌灵
对甲抑菌灵代谢物 (DMST)
甲基苯骈三氮唑 [1H-苯并三唑，4-甲基-]
甲基苯骈三氮唑 [1H-苯并三唑，5-甲基-]
吐纳麝香
毒杀芬 Parlar 26
毒杀芬 Parlar 50
毒杀芬 Parlar 62
*反式*氯丹
四氟菊酯
Traseolide
三唑酮
唑菌醇
野麦畏
三唑磷胺
抑芽唑
唑蚜威
三唑磷
磷酸三丁酯
三硫代亚磷酸三丁酯
杨菌胺
敌百虫
壤虫磷
绿草定甲酯
三氯生
三氯生-甲基
磷酸三甲苯酯，*间位*
磷酸三甲苯酯，*邻位*
磷酸三甲苯酯，*对位*
三环唑
十三吗啉，4-十三烷基
灭草环
草达津
三乙基磷酸酯
蜗螺杀
肟菌酯
氟菌唑
氟乐灵
三苯基磷酸酯
磷酸三 (-2-丁氧基乙基) 酯
磷酸三 (-2-氯乙基) 酯
磷酸三 (-2-乙基己基) 酯
戊叉菌唑
Tryclopyrbutoxyethyl
Tycor (SMY 1500)
高烯效唑
蚜灭多
灭草蜢
烯菌酮
XMC (3,4-Dimethylphenyl N-methylcarbama
XMC (3,5-Dimethylphenyl N-methylcarbama
苯酰菌胺
苯酰菌胺降解产物

利用 GC/MS/ECD/FPD 和包含 731 种化合物的 DRS 数据库检测有关国土安全和环境样品中的有毒化学品

应用

国土安全，环境

作者

Bruce Quimby
Mike Szelewski
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
UASA

摘要

当涉及到国土安全和环境问题中的有害的化学品时，首先应该考虑的是对这些化学成分进行快速精确的鉴定，然后是在大批量样品中定量检测这些化学成分的含量来帮助解决问题。由于经常会遇到未知的天然产物和复杂的基质样品，从而使得开发这个分析方法具有挑战性。本文介绍的方法是应用在柱末端增加一个微流控分流器的 GC/MS 系统，该分流器把柱流出物分流到质谱检测器和双波长火焰光度检测器（DFPD）或微池电子捕获检测器（μECD）和单波长火焰光度检测器（FPD）上。该方法可以通过一次进样同时采集到质谱和两个选择性气相色谱检测器的数据。这种多信号的采集可提供：可供谱库检索的全扫描质谱数据，可供痕量分析的 SIM 数据，在复杂基质中具有优越选择性和灵敏度的 μECD 和 FPD 数据。该系统采用保留时间锁定（RTL）技术确保同 731 种有害化学品数据库中的标准物质相匹配。运用解卷积报告软件（DRS）更快更精确地处理质谱数据，尤其是对复杂基质中的样品。选择性气相色谱检测器，SIM/Scan（选择离子检测/全扫描）和解卷积的完美结合组成了一个强有力的分析有害化学品的分析系统，是该类分析方法的一大进步。

前言

近年来，意外的或者人为的有毒化学品的泄露引起了越来越广泛的引起关注。国土安全部和环境署都意识到非常有必要建立对此类事件作出快速反应的分析实验室。对有毒化学品，国土安全部所采用的术语是有毒工业化学品（TIC）或有毒工业原料（TIM），而环境署则采用不同的术语比如危险品。无论哪种情况，都需开发实验室的分析方法，从而鉴定事故中的危险品，并能测定所采集样品中这些物质的含量。

这项分析的方法开发面临着较大的挑战，要使这些方法能够：

- 快速精确地鉴定所含的有毒试剂
- 在事故中心区域能准确测定高含量的试剂浓度（高的检测上限）
- 在周边区域和净化过程中能准确测定低含量的试剂浓度（低的检测限）

- 在有复杂基质干扰的情况下（如冒烟的木头，燃料，燃烧的轮胎等等）有高的选择性，降低假阳性和假阴性的发生
- 尽可能多的鉴定有毒试剂
- 能够处理大量的样品

很明显，没有哪一种单一的分析技术能够检测所有可能的危险品。但是，一种广泛的能对大量危险品进行定性和定量分析的方法就是 GC/MS。在全世界的实验室中，GC/MS 广泛用于分析几千种不同的化学品。

GC/MS 方法一般是用于分析 10 到 100 个化合物。如果在指定的保留时间窗口内检测到特定丰度的目标离子和两三个确认离子，具有特定的丰度比，那么就可以认为含有目标化合物。目标化合物还可以通过对峰的顶点的扫描和谱库中参考谱图对比进一步确证。

通常可以通过优化样品的制备、设置气相色谱和质谱参数来降低基质干扰。因为大部分的方法最多只是处理某几种基质类型，所以能够选择确证的离子来降低基质的干扰。对于方法中有限数目的目标化合物，可以通过进样分析几种标正混合物来再校正响应因子、保留时间、确认离子的丰度比率。

从不同复杂基质中筛选大量目标化合物，使分析方法开发者面临一系列新的挑战。当筛选数百种的目标化合物时，应该考虑到以下几个因素：

- 应用样品制备来降低基质干扰是非常有限的，因为复杂的净化步骤有可能会除掉目标化合物。而减少净化步骤又增加了基质干扰
- 由于目标化合物数目繁多，因此响应因子、保留时间和特征离子比率的再校正也是很难进行
- 应该开发即使在不具备所有目标化合物标准品的实验室也能够应用的方法
- 从复杂基质中数百种目标化合物的数据处理所需要的时间难以想象的长
- 即使数据库中拥有大量化合物，也有可能样品中的有毒化合物不包括在数据库化合物列表中

最近，一些分析技术已经被开发出来解决以上的问题。保留时间锁定技术使保留时间能够精确地在仪器与仪器之间，以及仪器与数据库中的数据相匹配 [1]。这种技术的使用可以不必对单个化合物的保留时间时间事件进行重新校正。可靠且惰性的微流控分流器的使用允许同时采集质谱和例如磷，硫与/或电子捕获的数据 [2]。即使化合物不在质谱目标化合物列表中，选择性检测器谱图也能够突出可疑化合物。它们也可以提供目标化合物的另一个定量手段。

同步 SIM/Scan 的特点允许一次进样可以同时获取全扫描和 SIM 数据 [2，3]。全扫描数据用于在数据库中筛选所有目标化合物，选择离子检测数据用于测定需要确认的响应低的化合物。

针对复杂基质开发的最有效的工具之一是安捷伦公司的 DRS 软件 [4]。应用高端的计算机技术从重叠的复杂基质峰中提取出目标化合物的谱图，然后把提取出的谱图同数据库中的标准谱图相比较，从而确定是否含有目标化合物。每个点都用 NIST 质谱数据库进行搜索确认。这个过程是全自动化的，节省了大量的数据解析所需要的时间。因为 DRS 处理的是全谱而不只是所选择的 4 个离子，所以与传统方法相比能够更准确地在复杂基质中确认出目标化合物，大大降低了假阳性和假阴性结果的发生。

本篇应用文章介绍了以上技术同 731 种有毒化学品数据库（安捷伦 HCD）相结合来监测有毒化学品。选择这些化合物是因为它们对于环境和食品安全具有重要意义。因为如果这些有毒物质被大量生产，在环境

分析方法中就应该包括它们。至于其中包括很多农药是因为它们的毒性。

列表包括：

- 氯代二噁唠和呋喃：EPA 8280A，10 种化合物
- 多氯联苯：EPA 8082，19 种化合物
- 挥发物：EPA 502/524，60 种化合物
- 半挥发物：EPA 8270C 附录 IX，140 种化合物
- 农药：安捷伦保留时间锁定农药数据库（修订版），567 种化合物
- 总共：796 种化合物，包括分成两组的 65 种化合物和 731 种化合物

数据库中所有化合物的名称见本文后面的附录 A。

上面列出的化合物不可能包括我们所能遇到的所有化合物。但是可以检测大量的已知危险品，同时选择性检测器的应用也可以突出显示出我们感兴趣的非目标化合物。

通过色谱条件的选择来扩展数据库，可普遍用于天然和列表之外的其它类型化合物。例如，拥有化学战剂（CWA）校正标样的实验室可以把化学战剂的数据添加到列表中从而进行检测。

数据库中的化合物的保留时间是通过微流控分流器控制柱流出压力在 3.8 psi 时测定的。使用微流控分流器或者 QuickSwap 能够使样品分析中的保留时间数据更接近数据库中的数据。

数据库中的色谱条件的选择与方法转换技术一致。在 GC 进样口使用恒压模式能够使方法转换更加符合方法的时间测量，加快分析速度 [5]。安捷伦有毒化学品 DBL 使分析速度提高了 3 到 7 倍。同时，每一种三倍提升速度的方法中数据库的变化有两种途径：一种是用全部的 731 种化合物，另一种是去除 36 种芳烃化合物。后者用于含有燃料的已知样品，而燃料不是我们测定的目标。下面的例子就是以燃料为原始材料，在数据库中除去这些芳烃类的化合物。

系统配置

系统配置见图 1A 和图 1B。

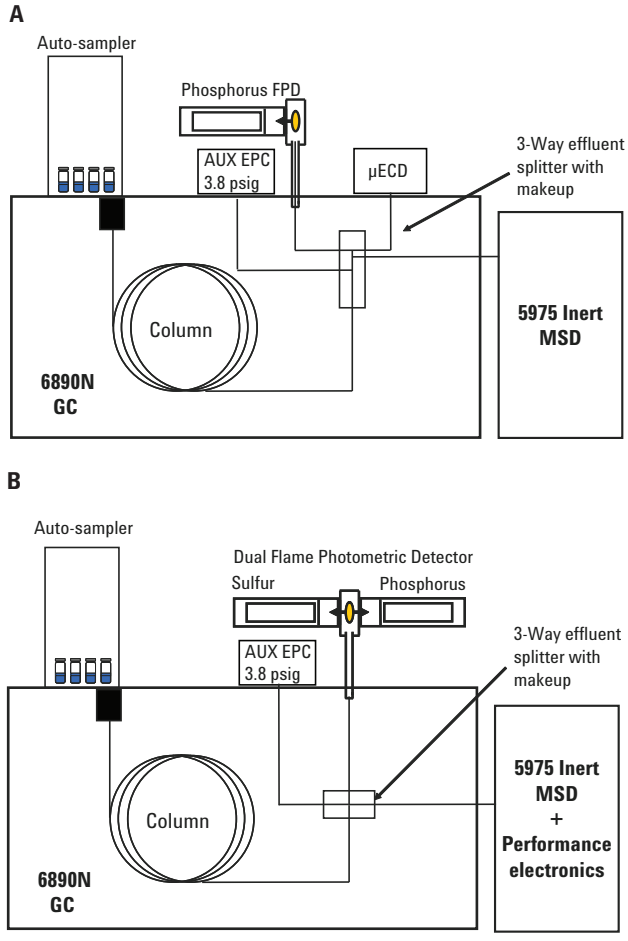


图 1. 系统配置。A）使用 1 倍方法和 3 倍方法检测分析的 GC/MS/ECD/FPD 系统。B）使用 7 倍方法检测分析的 GC/MS/DFPD 系统

主要构造如下：

快速柱温箱

初始的 1 倍方法只需要 120V 的柱箱。如果使用 15 米的 HP-5MS 柱，配合 6890N 的 240V 的柱箱（选件 002），检测方法可以快 3 倍（14.33 分钟）。如果使用 240V 的气相色谱柱箱配置 SP1 2310-0236（把

MSD 的接口接在后进样口的下面），并使用 G2646-60500 柱箱插件，当使用 5 米 HP-5MS 柱时，分析速度可以提高 7 倍（6.14 分钟）。要注意的是使用柱箱插件就不能用前进样口和检测器。只有一个检测器可以进行分流。该配置下使用 DFPD 比较好，因为它占用一个检测器的位置但是可以产生两种信号。

μECD

6890N 的选件 231 就是 μECD。运用 MS 化学工作站，采集 MS 数据的同时采集、存储 ECD 的信号。ECD 是选择性检测器，对含卤素的化合物灵敏度高，对于多卤素化合物的检测限达到 1 pg 以下。同时对其它官能团如硝基化合物也有响应，而且对很难检测到的化合物如酞酸酯有响应。ECD 的数据有很多用途：能显示出非目标化合物的含卤素和硝基的化合物；通过对已知化合物的保留时间的鉴定可以对化合物进行确证。另外因为响应因子是依化合物而定的，对不同类型的化合物有很大的变化，所以 ECD 的数据只能在经过标样校正后才可以用于定量分析。

单 FPD

6890N 选件 240 就是单 FPD，用于选择性检测磷或硫。磷模式通常用于检测有机磷农药和神经制剂。检测器在磷模式对磷的选择性 $>10^6$，检测限低至约 0.050 pg。FPD 对于检测非目标的有机磷化合物如新农药或新研制的神经制剂非常有效。对已知化合物中磷的保留时间的检测可以确证化合物。由于化合物之间单位质量的磷信号响应的相对一致，FPD 可以在没有校正标准物质时对化合物进行半定量。

双 FPD

6890N 选件 241 就是 DFPD，可以两个通道同时检测磷和硫。DFPD 对硫的选择性 $>10^4$，检测限 <10 pg，比磷要差一些。硫的信号同硫的含量的平方相关。常常用于检测含硫的芥子气制剂，和确证含硫的农药。化合物之间单位质量的硫的响应也是一致的，但是比磷的信号变化要大一些。

微流控分流器

6890N 选件 890（3 路分流器）和选件 889（2 路分流器），采用扩散结合平板技术结合金属柱密封圈，使得分流器具有惰性，便于使用，无渗漏的特点，可以对高温的柱流出物进行分流。该分流器采用辅助 EPC保持恒压尾吹（6890N 选件 301）。辅助 EPC 尾吹压力可以在运行结束时程序升压，而同时进样口的压力降低至和周围压力相近，使柱流改变方向，反吹未汽化的物质到进样口的分流阀外。反吹可以大大减少含高沸点基质的化合物的分析时间 [6]。辅助 EPC 也用于在不放空质谱的情况下更换柱子和维护。当柱子从分流器取下时，尾吹装置提供的氦气继续通入分流阀，使空气不能进入质谱检测器。如果色谱柱只与进样口断开而保持同分流器的连接，则氦气反吹经过色谱柱，从进样口末端出去。进样口维护或柱子切割都可以在不对质谱检测器降温和放空的情况下进行，而使空气不进入热源。

MSD 系统

使用配置 EI 离子源、高性能涡轮泵（G3243A）的 5975 inert MSD，或者使用配置 EI 源、高性能电子线路与高性能涡轮泵（G2579A）的 5973N inert MSD。这些配置在保持灵敏度的前提下提高了全扫描的速度。扫描速度同快速气相色谱产生的窄峰相兼容。检测方法要求涡轮泵提供方法所需的高流速。

同步 SIM/Scan

安捷伦 MSD 化学工作站 D.02.00（或更高）版本支持 SIM/Scan 的同步采集。在整个色谱分析过程中每隔一个循环采集 SIM 数据，另一个循环采集 Scan 数

据。所采集的 SIM 和 Scan 的数据的信噪比实质上同单独 SIM 和单独 Scan 得到的数据是一样的。在传统的 SIM 方法中，由于要求每一个 SIM 组之间时间的分离，所以 731 种目标物不可能在一次运行都检测出来。一般，SIM 数据用于分析低含量的优先检测的目标化合物，如氯化二噁唉和化学战剂等。

DRS 软件（G1716AA）

质谱数据的解卷积能够在重叠基质峰中确认出分析物 [4]，大大降低了对色谱分离能力的要求，使复杂基质中目标化合物的检测可以用快速气相色谱完成，从而缩短分析时间。DRS 使用的是 NIST 研制的 AMDIS 解卷积 n 程序，最初应用于复杂样品中微量化学武器的检测。DRS 对于化合物的确证有 3 个方面明显优势：

- 基于保留时间和 4 个确证离子的化学工作站
- 基于完全离子匹配的“净化后的质谱图”和保留时间锁定的 AMIDS
- 含有 163000 种化合物的 NIST05 库

有害化学品的数据库（G1671AA）

包括了 731 种化合物的质谱图谱、方法和 DRS 文件。

仪器操作参数

仪器操作参数见表 1，此为初始条件，可以根据需要进行优化。

分流/不分流进样口的使用比较灵活，对于干净样品用不分流模式，复杂和高浓度的样品用分流模式。同样适合柱反吹。一般情况下（室温顶空进样除外）进样口衬管使用直径 4 毫米的 Siltek Cyclospitter（Restek，部件号 20706-214.1）。这种衬管没有玻璃毛，活性很低。衬管内部的几何设计确保分流进样时样品精确混合。除了特殊情况，分流进样均采用 10:1 的分流比。对于高基质的样品，进样量要严格同柱容量相匹配。如果进样过量的基质，目标化合物的保留时间则会发生漂移。分流进样也是监测从天然气中挥发性成分到样品中大分子多环芳烃（PAHs）最早最有效的方法。由于溶剂问题，不分流进样一般不适合低沸点的挥发物，但可以用于低基质样品中半挥发性物质的分析。

对于室温顶空分析 [7]，分析条件在表 1 底部单独列出。室温顶空分析使用内径 1 毫米的衬管（没有玻璃毛），Siltek 涂层（Restek，产品部件号 20973-214.5）。表 1 列出了顶空自动进样器参数。顶空分析的挥发性样品的制备在参考文献 7 中有介绍。

表中的化合物涵盖了非常宽的沸点范围的化合物，很难在一次运行中同时监测，因为半挥发性的化合物所使用的溶剂阻碍了表中低沸点挥发性物质的分析。同样的，低沸点化合物的分析方法也不适合高沸点化合物。表中 MSD 的溶剂延迟是根据半挥发性物质分析时用的异辛烷溶剂来设置的。如果使用低沸点的溶剂，应该相应地降低溶剂延迟的时间。

对于一些很高沸点的化合物应该升高进样口和检测器的温度。比如高分子量的多环芳烃、多氯二噁唉，多氯呋喃。分析这些化合物时，进样口、检测器和传输线温度都升高至 300 度。如果温度不升高，化合物就会表现为拖尾并且有时信号降低。权衡温度时也应该考虑到一些热不稳定化合物在高温下分解。

表 1 列出的样品质谱数据扫描速度只是对于全扫描模式而言。对于挥发性物质的分析可以加快第一个步骤的扫描速度。使用 SIM/Scan 模式时也可以加快第一个步骤的扫描速度。SIM/Scan 模式下，SIM 对每个离子的的驻留时间是 40 毫秒。

针对使用的检测器的需要，选择微流控分流器的参数来优化检测器之间的分流比。一个最基本的考虑就是采集数据时进入 MSD 的流速不超过 4 mL/min。在 DFPD 和 MSD 之间通过 2 路分流器装置平均分配流出物。由于 μECD 检测器的高灵敏度，通过 3 路分

表 1. 气相色谱仪和质谱仪条件

	原始 1 倍方法	3 倍方法	7 倍方法
气相色谱			
安捷伦科技 6890N			
7683 自动进样器和样品瓶盘			
进样口	EPC 分流/不分流	EPC 分流/不分流	EPC 分流/不分流
模式	恒压	恒压	恒压
进样类型	分流	分流	分流
进样量（uL）	1.0	1.0	1.0
进样口温度（°C）	250	250	250
公称压力（psig）	31.17	23.96	8.84
保留时间锁定化合物	三丙基磷酸酯	三丙基磷酸酯	三丙基磷酸酯
保留时间锁定时间（min）	12.874	4.291	1.839
分流比	10:1	10:1	10:1
载气节省	关	关	关
载气类型	氦气	氦气	氦气
柱温箱			
电压（VAC）	120 或 240	240	240（和 pillow）
初始柱温（°C）	40	40	40
初始柱温保持时间（min）	2	0.667	0.286
升温速率（°C/min）	10	30	70
最终温度（°C）	300	300	300
最终柱温保持时间（min）	15	5	2.143
总运行时间（min）	43.00	14.33	6.14
平衡时间（min）	0.5	0.5	0.5
色谱柱			
类型	HP 5-MS inert	HP 5-MS	HP 5-MS
安捷伦部件号	19091S-433i	19091S-431	定制
长度（m）	30	15	5
直径（mm）	0.25	0.25	0.25
液膜厚度（um）	0.25	0.25	0.25
出口压力（辅助 EPC，psi）	3.8	3.8	3.8
FPD 或 DFPD			
类型	单，磷	单，磷	双，硫和磷
温度（°C）	250	250	250
氢气流速（mL/min）	75	75	75
空气流速（mL/min）	100	100	100
模式：恒定尾吹			
氮气尾吹流速（mL/min）	60	60	60
数据采集速率（Hz）	5	10	10
μECD			
温度（°C）	30 0	300	N/A
氮气尾吹流速（mL/min）	60	60	N/A
模式：恒定尾吹			
数据采集速率（Hz）	5	10	N/A
辅助 EPC 压力			
压力（psig）	3.8	3.8	3.8
载气类型	氦气	氦气	氦气

表 1. 气相色谱仪和质谱仪条件（续表）

MSD			
安捷伦科技	5975 inert MSD	5975 inert MSD	5975 inert MSD，配置高性能电子线路
调谐文件	Atune.U	Atune.U	Atune.U
模式	全扫描	全扫描	全扫描
溶剂延迟（min）	2.20	0.82	0.40
电子倍增电压	自动调谐电压	自动调谐电压	自动调谐电压
低质量数（amu）	35	35	35
高质量数（amu）	565	565	565
阈值	0	0	0
进样	1	1	0
扫描/秒	5.23	5.23	9.46
四极杆温度（°C）	150	150	150
离子源温度（°C）	230	230	230
传输线温度（°C）	280	280	280
分流器			
类型	3 通	3 通	2 通
6890N 选件号	890	890	889
分流比	1:1:0.1 MSD:FPD:ECD	1:1:0.1 MSD:FPD:ECD	1:1 MSD:DFPD
[去活的熔融石英管]			
MSD 节流管长度（m）	1.44	1.44	1.44
MSD 节流管内径（mm）	0.18	0.18	0.18
FPD/DFPD 节流管长度（m）	0.53	0.53	0.53
FPD/DFPD 节流管内径（mm）	0.18	0.18	0.18
ECD 节流管长度（m）	0.51	0.51	N/A
ECD 节流管内径（mm）	0.10	0.10	N/A
室温顶空			
进样口	EPC 分流/不分流		
模式	恒压		
进样类型	分流		
进样口温度（°C）	200		
公称压力（psig）	31.17		
保留时间锁定化合物	三丙基磷酸酯		
保留时间锁定时间（min）	12.874		
分流比	1:1		
载气节省	关		
载气种类	氦气		
自动进样器			
样品清洗	0		
样品泵	3		
进样量（µL）	50		
注射器型号（µL）	100		
溶剂 A 进样前清洗	0		
溶剂 B 进样前清洗	0		
溶剂 A 进样后清洗	1		
溶剂 B 进样后清洗	3		
粘度延迟（s）	5		
活塞速度	快速		
进样前停留（min）	0		
进样后停留（min）	0		
进样深度（mm）[关键！]	20		

流器装置使进入 μECD 的流速为进入到 MSD 和 FPD 的十分之一。检测器的限流器的长度和直径需要经过分流器的电子数据表计算器精确计算。

安捷伦化学工作站应用的峰确认宽度是 ±0.2 min，AMDIS 设置的是 12 s。这些设置完全考虑到了保留时间漂移，而减少假阳性结果。AMDIS 中的最低匹配因子设置为 45。这个值可以尽可能的减少假阳性和假阴性的结果。

结果

挥发性物质

选择顶空进样评价 HCD 方法分析挥发性物质。顶空进样器通常设计为能够自动加热样品。室温顶空 [7] 技术则不同，它采用液体自动进样器上密封的注射器从 2 mL的样品瓶中吸取上部空间的气体进样。该方法不加热，适用于分析室温下的挥发性化合物。室温顶空技术适合于分析水中相对非极性的挥发性物质。对于需要分析挥发性物质的实验室，即使没有专用的顶空进样器，也可以很方便地进行分析。只需很容易地更换进样衬管和自动进样注射器，即可完成从液体进样到室温顶空进样的改变。

图 2 是图 1A 系统分析的一张色谱图。14 种含卤素的挥发性物质以 2 ppm 的浓度添加到水中。样品瓶中大约 1 mL 上部空间中的 50 μL 气体进入色谱系统。除了峰 3 和 4 同时流出外，其他化合物都得到了很好地分离。倒置的 ECD 色谱图同全扫描的总离子流质谱图相比较。虽然化合物 1，2 和 8 的响应比其他峰明显低，但是所有的挥发物在 ECD 上都有响应。一般，ECD 上化合物的响应会随着分子中卤素个数的增加而明显增大。因为所有的化合物都不含磷，所以 FPD没有响应。

图 3 是样品的 DRS 报告。确证的化合物都列出了保留时间、CAS# 和化合物名称。如果一种化合物能够在安捷伦化学工作站或者 AMDIS，或者两者中检索到，则会写在报告中。

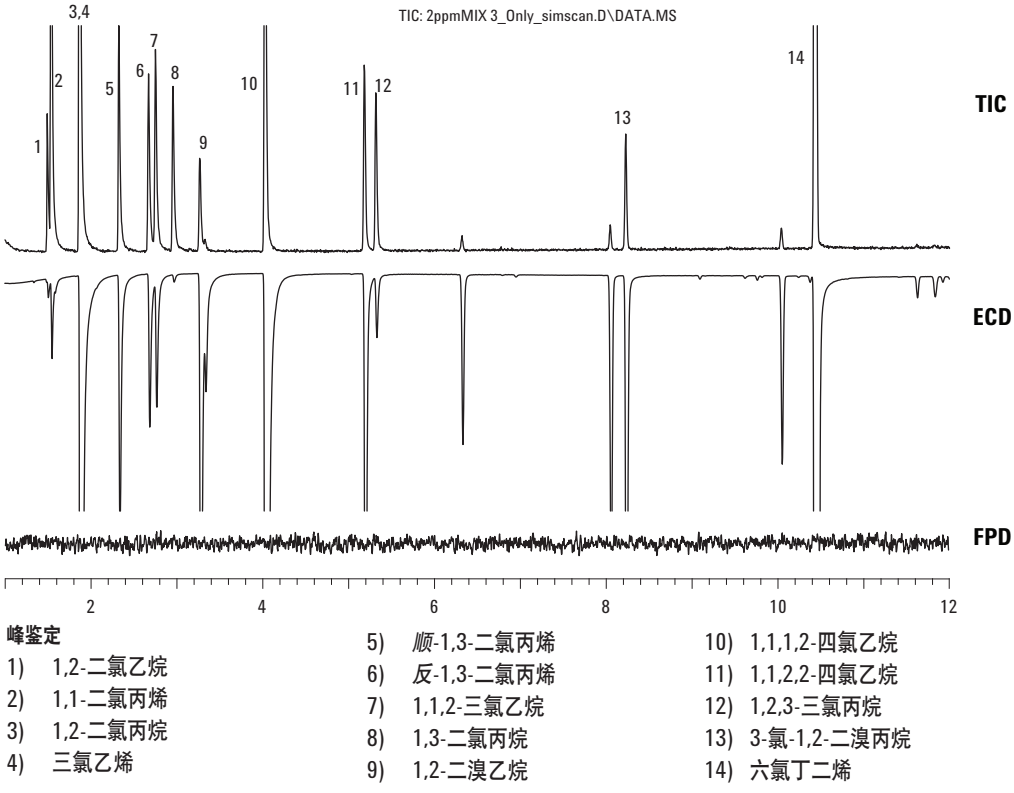


图 2. 水中添加 2 ppm 挥发性有机物的室温顶空进样分析

MSD Deconvolution Report
Sample Name: 2 ppmVOA MIX 3 Only
Data File: C:\msdchem\1\DATA\042205AMHS_SimScan\2ppmMIX 3_Only_simscan.D
Date/Time: 05:13:03 PM Friday, Dec 9 2005

The NIST library was searched for the components that were found in the AMDIS target library.

			Agilent	AMDIS		NIST	
R.T.	Cas #	Compound Name	ChemStation Amount (ng)	Match	R.T. Diff sec.	Reverse Match	Hit Num.
1.497	107062	1,2-Dichloroethane	2.27	97	0.6	94	1
1.540	563586	1,1-Dichloropropylene	7.6	100	0.5	96	1
1.867	78875	1,2-Dichloropropane	4.92	95	0.7	90	1
1.871	79016	Trichloroethylene	7.58	99	0.6	91	1
2.330	10061015	cis-1,3-Dichloropropylene	4.39	98	1.0	92	2
2.677	10061026	trans-1,3-Dichloropropylene	3.3	97	1.5	94	1
2.758	79005	1,1,2-Trichloroethane	2.82	99	1.7	92	1
2.961	142289	1,3-Dichloropropane	3.39	98	1.5	92	1
3.273	106934	1,2-Dibromoethane	2.6	91	1.5	76	4
4.032	630206	1,1,1,2-Tetrachloroethane	5.15	100	1.9	94	1
5.187	79345	1,1,2,2-Tetrachloroethane	2.38	99	2.3	89	1
5.322	96184	1,2,3-Trichloropropane	1.89	98	2.5	94	1
6.323	76017	pentachloroethane	0.08	63	2.0	76	1
8.232	96128	3-Chloro-1,2-dibromopropane	1.62	93	1.6	87	1
10.439	87683	hexachlorobutadiene	16.46	94	0.9	95	1

图 3. 图 2 分析的 DRS 报告

如果报告中安捷伦化学工作站 Amount 一栏中有数值，则表明这个化合物是通过安捷伦化学工作站检测到的。这意味着在方法的数据分析部分已经设定了确证标准。典型的标准是检测到目标离子和 3 个特征离子，且离子比率中的不确定数据小于设定的范围。

安捷伦化学工作站对化合物的定量很粗略，而质谱测定可达到 ng 级。这是基于采集 HCD 表的数据时测得原始的响应因子。由于有效的定量必须通过对特定仪器近期的响应因子的校正，所以这栏的数字不能作为确证分析物的报告浓度。这些值很容易有 10 倍或者更高的误差。列出这些值的目的是给出一个大概的量，从而对配制化合物的校正标准溶液有所帮助。

AMDIS 栏中列出的数值是在解卷积后的图谱同 HCD AMDIS 目标库中的保留时间图谱比较之后计算出来的匹配度。这个值越高，谱图的匹配度就越好。“R.T. Diff sec.”一栏中列出的是检测到的保留时间同 AMDIS 化合物库中的保留时间的偏差。这个值越低说明保留时间匹配的越好。

NIST 一栏中列出的是提取的质谱图同 NIST05 主库中相同 CAS 号图谱的反匹配度。“Hit Num.”一栏是在 NIST 库检索与需要确证的化合物具有相同的 CAS 号的结果时匹配的命中数。反匹配度值越高，命中数越低，同 NIST05 库的谱图匹配的就越好。NIST 一栏中提供了提取谱图确证的另一种证明。

当然，图 2 的分析是比较简单的，只是为了说明系统是如何工作的。所有添加的 14 种化合物在安捷伦工作站和 AMDIS 都能检测到。确证的确定度非常高是因为：

- 安捷伦化学工作站能在合适的时间位置检测到有合适比率的目标离子和三个确证离子
- 解卷积谱图和保留时间能够精确地匹配 AMDIS 化合物库中的数据

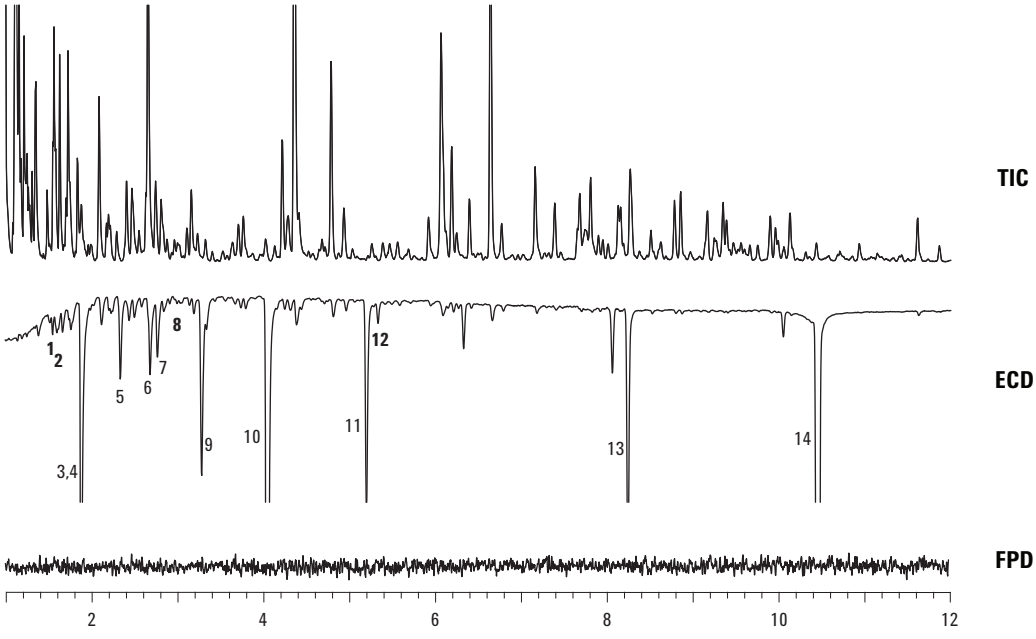
- 提取的谱图同 NIST05 库中相同 CAS 号化合物的图谱精确匹配
- ECD 上明显的响应表明这些化合物都含有卤素。

为了在更实际的情况下考察系统，研究了基质的影响和低浓度分析物的情况。准备以下的样品：含有相同 2 ppm 的分析混合物和 100 ppm 的汽油；只含 100 ppb 的分析物；含有 100 ppb 分析物和 100 ppm 的汽油混合物。

图 4 是含有 100 ppb 分析物和 100 ppm 汽油的混合物样品谱图。总离子流图的复杂性表明上千倍的汽油的基质干扰很大。ECD 谱图上也有一些干扰。不过，除了峰 1，2，8 和 12 受严重干扰外，其他分析物的峰仍然清晰可见。

表 2 总结了基质和低浓度实验的结果。在添加 2 ppm 分析物的 100 ppm 汽油的样品中，安捷伦的化学工作站（Quant 栏）找到了除了两个化合物之外的其他目标物。由于基质的干扰，这两个化合物的离子比率超出设定范围。AMDIS 成功地找到了 14 个化合物。另外，除了化合物 8 没检测到外，ECD 的谱图明显检测到其他的分析物。

在只含有 100 ppb 的分析物的样品中，工作站检测到 14 个化合物中的 7 个。全扫描数据中的 100 ppb 分析物大部分的信噪比都十分低。在定量校正表中很难找到在指定范围内的离子比率的确认离子。AMIDS 找到了其中 11 种化合物。峰 3 和峰 4 的共流出物相重叠，没有检测到峰 3。由于峰 9 和 13 的信噪比太低，AMDIS 没有找到这两个化合物。



峰鉴定

1) 1,2-二氯乙烷
2) 1,1-二氯丙烯
3) 1,2-二氯丙烷
4) 三氯乙烯
5) *顺*-1,3-二氯丙烯
6) *反*-1,3-二氯丙烯
7) 1,1,2-三氯乙烷
8) 1,3-二氯丙烷
9) 1,2-二溴乙烷
10) 1,1,1,2-四氯乙烷
11) 1,1,2,2-四氯乙烷
12) 1,2,3-三氯丙烷
13) 3-氯-1,2-二溴丙烷
14) 六氯丁二烯

图 4. 室温顶空分析水中的挥发性有机物。含有 100 ppb 的分析物 100 ppm 的汽油

表 2. 基质的影响和 DRS 浓度结果

保留时间(min)	化合物	峰编号	只含 2 ppm 标准物质 定量 (ng)	AMDIS (匹配度)	2 ppm 标准版物质+100 ppm 汽油 定量 (ng)	AMDIS (匹配度)	只含 100 ppb 标准物质 定量 (ng)	AMDIS (匹配度)	100 ppb 标准物质 +100 ppm 汽油 定量 (ng)	AMDIS (匹配度)
1.491	1,2-二氯乙烷	1	2.27	97	2.47	93		73		65
1.536	1,1-二氯丙烯	2	7.60	100	7.34	98	0.37	89		85
1.793	1,2-二氯丙烷	3	4.92	95	5.59	64	0.21	**Overlap**		**Overlap**
1.863	三氯乙烯	4	7.58	99	7.71	97	0.40	90	0.30	82
2.317	*顺*-1,3-二氯丙烯	5	4.39	98	4.81	98	0.21	88	0.23	74
2.658	反-1,3-二氯丙烯	6	3.30	97		84		53		**Overlap**
2.735	1,1,2-三氯乙烷	7	2.82	99	3.05	96	0.12	72		**Overlap**
2.938	1,3-二氯丙烷	8	3.39	98	3.50	97		66	0.22	46
3.250	1,2-二溴乙烷	9	2.60	91		95		**S/N**		66
4.003	1,1,1,2-四氯乙烷	10	5.15	100	5.32	99		89	0.31	88
5.151	1,1,2,2-四氯乙烷	11	2.38	99	2.41	98		48	0.19	53
5.283	1,2,3-三氯丙烷	12	1.89	98	1.85	98	0.07	79	0.14	75
8.208	3-氯-1,2-二溴丙烷	13	1.62	93	2.40	90		**S/N**		59
10.435	六氯丁二烯	14	16.46	94	3.54	89	0.65	75	0.36	52
	合计找到		14	14	12	14	7	10	7	11

在添加 100 ppb 分析物和 100 ppm 汽油的样品中，工作站发现了其中的 7 个化合物，AMDIS 找到了 11 个。奇怪的是，没有基质时丢失的化合物反而被找到了。很可能是基质的存在增加了顶空时某些分析物的浓度。化合物的丢失同样是由于的信噪比过低和/或相互干扰。AMDIS 中 3 个峰的丢失是因为汽油基质的干扰。同上面提到的一样，10 个化合物在干扰存在的情况下仍然有明显的 ECD 响应。

SIM/Scan

表 2 中的定量数据来源于全扫描模式。峰 13 由于信噪比很低没有检测到。SIM/Scan 模式可在采集全扫描数据的同时采集 SIM 数据。添加 100 ppb 分析物和100 ppm 汽油的样品在 SIM/Scan 模式下运行，SIM 表中包括了 14 种化合物。图 5 比较了峰 13 的 Scan、SIM 和 ECD 响应信号的不同。

目标离子的信噪比（峰对峰）从全扫描模式的 34 提高到 SIM 模式下的 433。在全扫描模式下由于信噪比低而丢失的化合物在 SIM 模式下都重新找到。这个例子阐明了在检索低含量化合物时 SIM/Scan 模式的优势。如果必要的话，ECD 也可以以其高信噪比和抗干扰的优势用于定量。

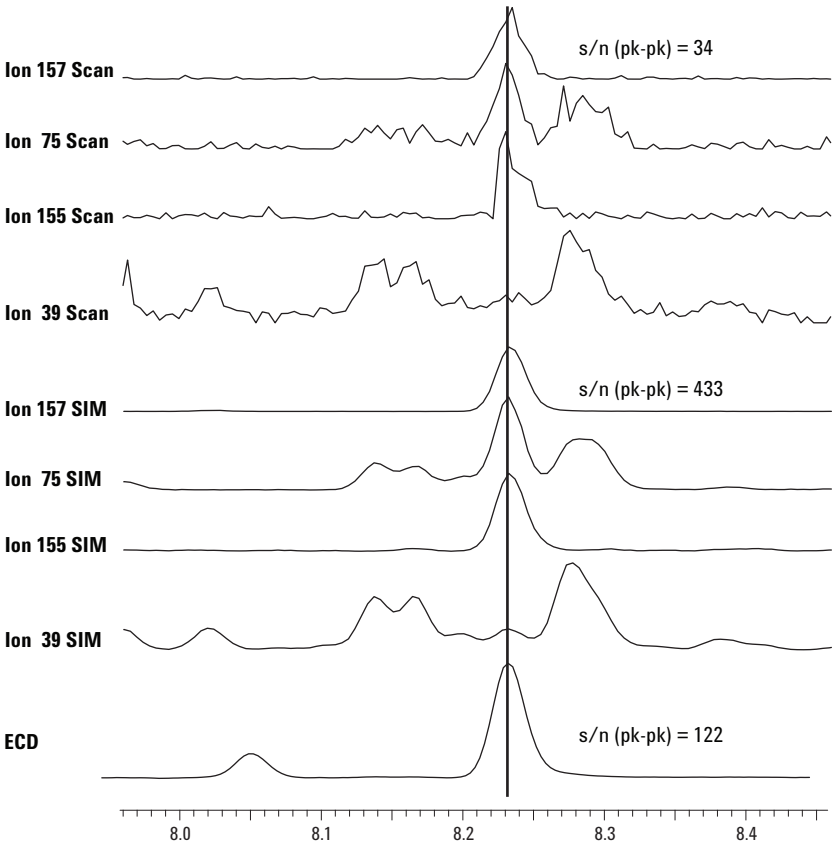


图 5. 图 4 中峰 13（3-氯-1,2-二溴丙烷）的目标离子和确认离子的提取离子流图，包括同时采集的 SIM、Scan 和 ECD 数据

AMDIS

图 6 展现了 AMDIS 从分析物的谱图中净化干扰离子的能力。图 6 上部的原始谱图是添加 100 ppb 分析物和 100 ppm 汽油的样品中峰 13 的顶点的谱图。当使用 NIST 搜索程序在 NIST05 库中搜索时，实际的化合物（3-氯-1,2-二溴-呋喃）是第 70 个匹配的化合物检索结果 。如果在安捷伦化学工作站上手动扣除附近谱图能显著提高谱图质量，从而将在 NIST 检索列表里的匹配度提高到第二。但是在处理大量样品时，手动扣除背景干扰是一个很复杂的的过程。AMDIS 解卷积后的谱图在图 6 NIST05 库谱图的上面。按这个谱图进行检索时，这个化合物是第一个检索到的结果。全自动的 AMDIS 在数据处理时节省了大量的时间。

快速方法

在建立保留时间锁定数据库时，应用中所采用的保留时间数据是（或者至少应该）在最高分辨条件下采集到的。如果数据是在恒压模式下采集的，那么方法的转换可以通过调整方法速度适应不同的条件。

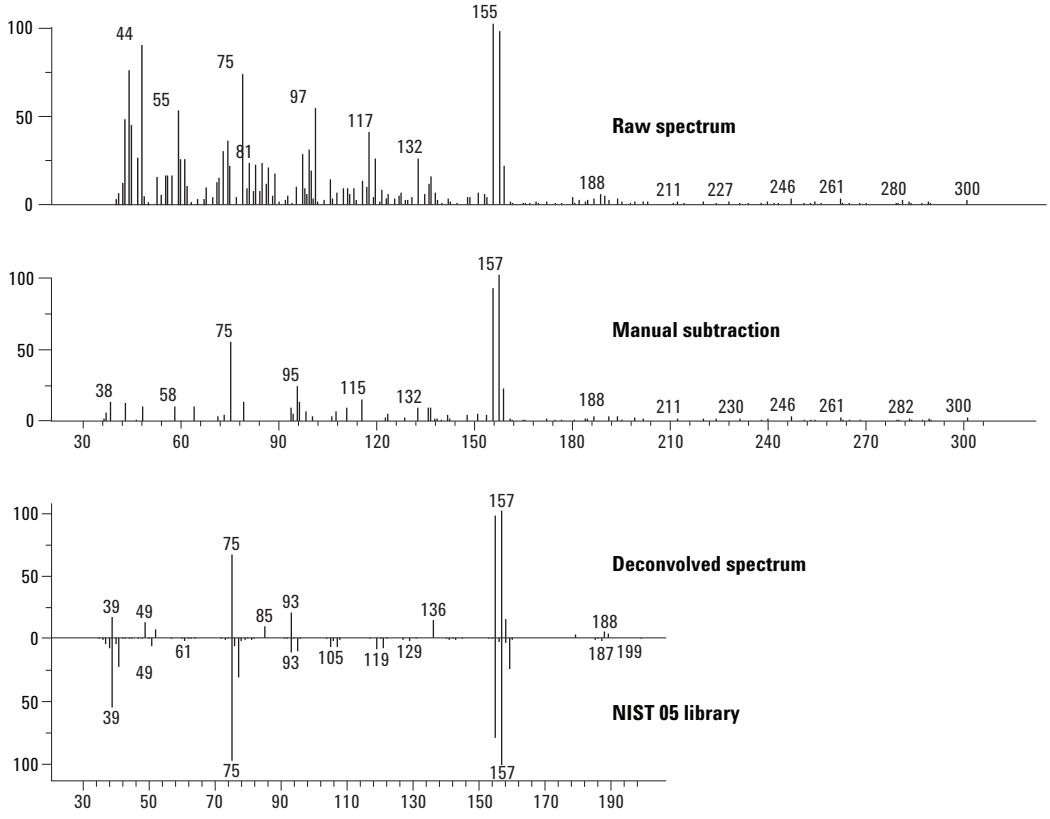


图 6. 图 4 中峰 13（3-氯-1,2-二溴丙烷）的原始谱图，手动扣除背景后的谱图，AMDIS 解卷积谱图和 NIST05 库中标准谱图的比较

保留时间锁定数据库中的保留时间在 3 倍方法中只是 1 倍方法除以 3。7 倍方法中的保留时间是原始数据库的七分之一。图 7 展现了两个新的快速方法与独立的新数据库中保留时间的匹配度。采用两种方法运行了 3 组不同的包含 13 种氯代烃和 36 种农药的混合物样品。得到的保留时间与两个新的数据库中的数据进行了比较。图 7 是以数据库的保留时间为 X 轴，测 定的保留时间与数据库中保留时间的差值为 Y 轴做图得到的。

如果保留时间匹配的好，曲线会是一条过 Y 轴零点的水平线。3 倍方法中最大的偏离值是 –0.047 min，从而表明峰的确证窗口在 ±0.1 min 内是足够的。7 倍方法（图 7，下图）中最大的偏离值是 +0.032 min，与 3 倍方法相同的峰的确证窗口范围同样可行。一般情况下，测定的保留时间与预期的保留时间吻合得非常好。

在保证相同柱容量的前提下，优化两个快速方法提高速度的条件。柱容量对于定量的动态范围和减少复杂基质样品中保留时间的漂移是很重要的。众所周知，气相色谱中速度、分辨率和容量是三角关系，保持柱容量，提高速度，分辨率就会降低。

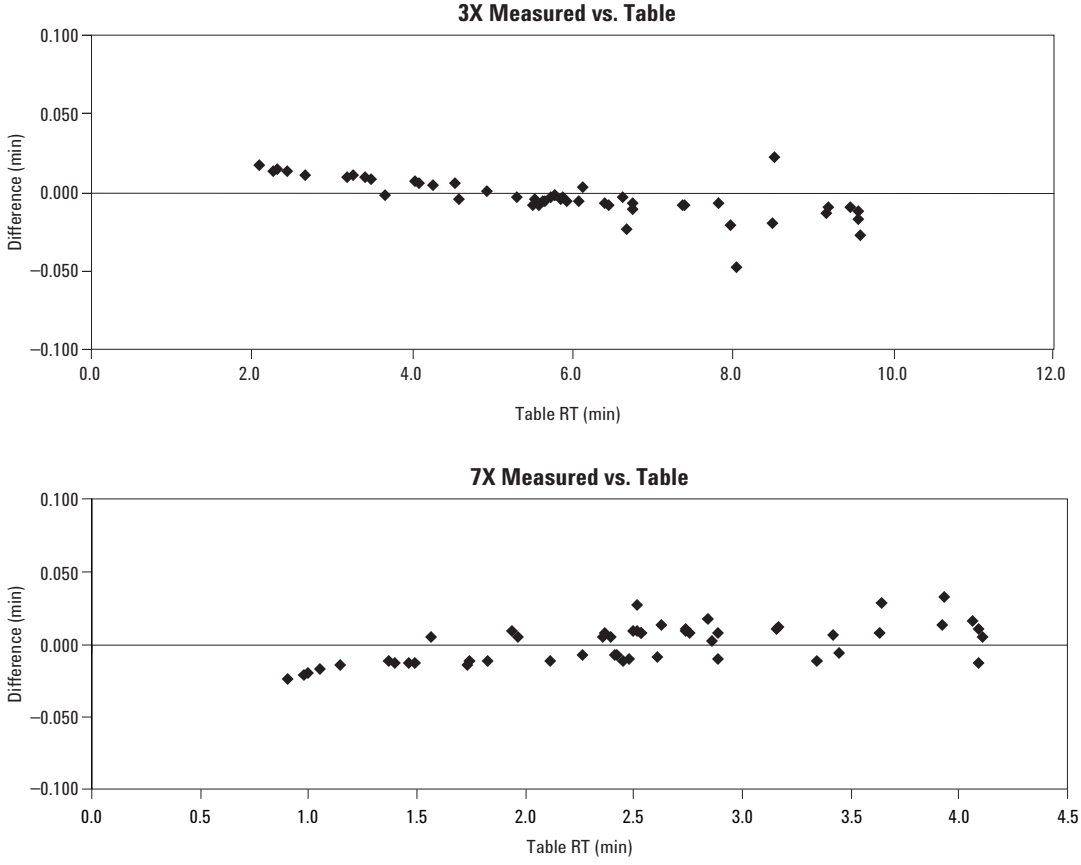
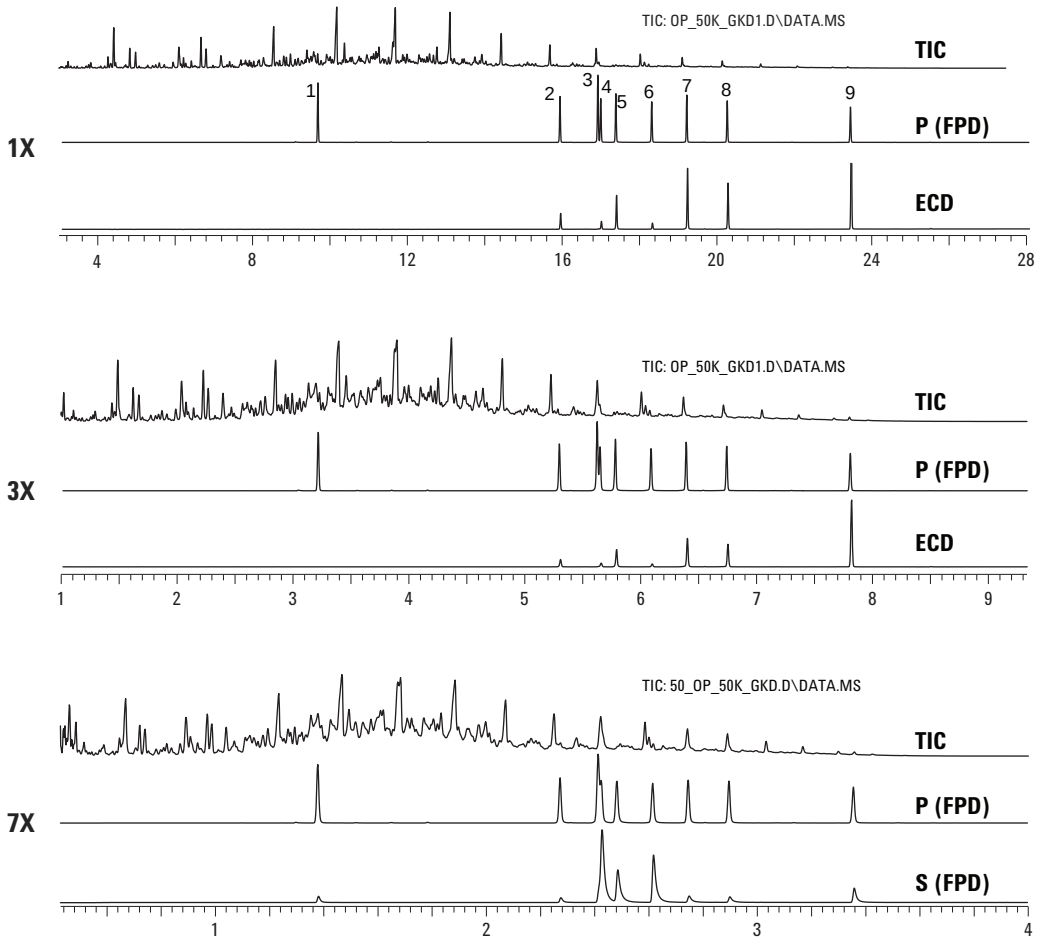


图 7. 50 种化合物在实际测定和 HCD 表中保留时间的差异。Y 轴是数据库中的值减去实际测定值，X 轴是化合物的保留时间。上图是 3 倍方法，下图是 7 倍方法

图 8 是 HCD 数据库中三种不同速度下的三套色谱图。样品中含有 50 ppm 的 9 种有机磷农药（图 8 标题中有说明）以及相同体积的 50,000 ppm 的汽油、煤油、柴油。1 倍和 3 倍方法的数据在 3 路分流器的仪器上检测，7 倍方法用 DFPD 检测。从图 8 下部的硫的色谱图可以看出 9 种有机磷农药都含有硫。同磷谱比较，硫谱的峰有些拖尾。



峰鉴定

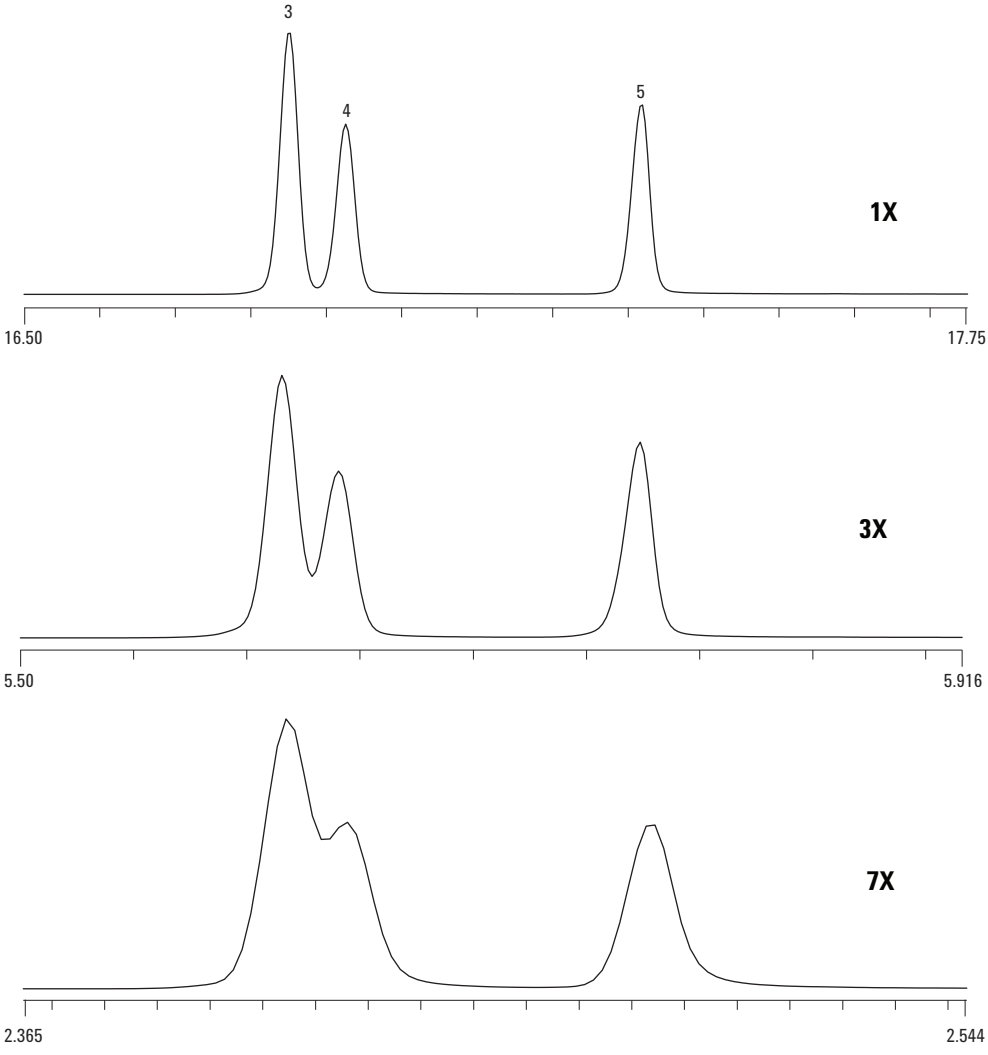
1) O,O,O-硫代磷酸三乙酯
2) 硫磷嗪
3) 硫特普
4) 甲拌磷
5) 乐果
6) 乙拌磷
7) 甲基对硫磷
8) 对硫磷
9) 氨磺磷

图 8. 1 倍、3 倍、7 倍方法的色谱图比较。1 倍和 3 倍方法在 GC/MS/ECD/FPD 系统上运行。7 倍方法在 GC/MS/DFPD 系统上运行

图 9 是图 8 中峰 3，4 和 5 色谱图的保留时间放大图。很明显，随着速度的提高，分辨率降低了。

如果只使用标准的目标化合物和三个确认离子，分辨率的丢失是一个很大的难题。1 倍方法中检测了所有的 9 种被分析物，同时报告了 8 个假阳性结果。3 倍方法也检测了 9 种被分析物，但是报告了 25 个假阳性结果。7 倍方法中的分辨率大大降低，只确证了 7 种被分析物，报告了 48 个假阳性结果。

但是应用我们介绍的方法结果会大大不同。即使在最差的条件下使用 7 倍方法，AMDIS 也能找到所有 9 种高匹配度的被分析物，仅有 3 个假阳性结果。7 倍分析方法的 DRS 报告见表 3。为了简化表格，仅在 quant 一栏才显示的 48 个假阳性结果在这里不显示。被分析化合物用黑体标明。所有化合物都列出了同 AMDIS 目标化合物数据库和 NIST05 数据库的接近的保留时间和高质量谱图。



峰鉴定

3) 硫特普
4) 甲拌磷
5) 乐果

图 9. 图 8 中 1 倍，3 倍，7 倍方法的 FPD 磷色谱图的比较

表 3. 在含 50，000 ppm 汽油/煤油/柴油基质中运行 7 倍分析方法检测 50 ppm 农药的 DRS 报告

保留时间	Cas #	化合物名称	Agilent 化学工作站含量 (ng)	AMDIS 匹配度	保留时间偏差 (sec.)	NIST 反匹配度	命中数
0.973	98862	苯乙酮		71	–9.5	74	50
1.380	**126681**	**O,O,O-硫代磷酸三乙酯**	**13.92**	**69**	**0.7**	**71**	**1**
1.520	94597	黄樟油精		46	–7.6		
1.520	52417502	à,2,5-三甲基-苯乙醛				74	1
2.113	132649	氧芴	0.35	64	0.6	80	3
2.138	90437	邻苯基苯酚		55	2.3		
2.138	2131411	1,4,5-三甲基-萘				85	1
2.275	**297972**	**硫磷嗪**	**89.2**	**91**	**0.5**	**85**	**1**
2.417	**3689245**	**硫特普**		**88**	**0.5**	**83**	**1**
2.427	**298022**	**甲拌磷**	**23.31**	**90**	**0.6**	**85**	**1**
2.485	**60515**	**乐果**	**27.34**	**84**	**0.7**	**85**	**1**
2.619	**298044**	**乙拌磷**	**22.7**	**92**	**0.6**	**88**	**1**
2.748	**298000**	**甲基对硫磷**	**25.12**	**92**	**0.6**	**82**	**1**
2.901	**56382**	**对硫磷**		**91**	**0.7**	**85**	**1**
3.360	**52857**	**氨磺磷**		**93**	**0.8**	**85**	**1**
		(48 个假阳性结果在这里不显示)					

0.973 min 的峰同苯乙酮的谱图匹配度较高，但是保留时间偏差太大，而其在 NIST05 库中第 50 个化合物才检索到，所以排除这个化合物。1.520 min 的峰的谱图匹配和保留时间差别都很大。NIST 反匹配度和命中数的空白说明在 NIST 库检索到的前 100 个化合物中没有检索到列出的化合物。第二个 1.520 min 的峰同 NIST 库的第一个化合物相匹配。很明显不含有黄樟油精。

2.113 min 的峰氧芴不是添加到样品中的被分析物。很可能来自柴油基质。同数据库中合理的谱图匹配和保留时间匹配都证明这个化合物是存在在样品中的。

2.138 min 的峰也是有疑问的。保留时间不太符合，NIST 库检索也不相符。

所有的 9 种被分析物均在 FPD 的磷谱和硫谱上检测到了。除了峰 1 外，其他的化合物在 ECD 上均具有较好的选择性。

结果表明，由于分辨率的丢失，不能采用传统的方法提高 7 倍的速度，而使用本文介绍的方法可作为一个替代。结合 DRS 软件和选择性检测器，假阳性和假阴性的结果会明显减少。有些情况下如发生国土安全突发事件时，速度显得尤为重要，快速方法就是其中的一个选择。

对大部分实验室而言，3 倍方法是一个很好的选择：分辨率比 7 倍方法高，速度比 1 倍方法快，也允许同质谱检测器平行使用气相色谱检测器。而且只需要 240V 柱温箱，不需要重新将质谱检测器配置到后位。

结论

当检测含有有毒化学品的样品时，采用本文介绍的系统有很多优点，主要是因为各种高科技技术的结合，使分析速度更快，检测结果更准确。

- 731 种有毒化合物保留时间锁定结合质谱数据库
- 微流控分流器 — MS 数据结合选择性检测器定性和定量，找出非目标化合物但是值得怀疑的化合物
- SIM/Scan — 全扫描的同时获得高选择性的 SIM 数据。节省了两种模式下分别进样分析的时间
- DRS — 全自动解卷积软件提高了在复杂基质中的目标化合物的定性准确度。数据处理时间从小时级减少到分钟级，尤其在有毒化学品突发事件中有很大帮助
- 缩短柱长，快速柱温箱以及反吹技术的应用减少了运行时间

这些技术的结合对有毒化学品的分析提供了有利的解决方法。

参考文献

1. Retention time locking (RTL), Vince Giarrocco, Bruce Quimby, and Matthew Klee, “Retention Time Locking: Concepts and Applications”, Agilent Technologies, publication 5966 - 2469E www.agilent.com/chem
2. Chin Kai-Meng and Bruce Quimby, “Identifying Pesticides with Full Scan, SIM, µECD, and FPD from a Single Injection”, Agilent Technologies, publication 5989 - 3299EN www.agilent.com/chem
3. Chin-Kai Meng, “Improving Productivity with Synchronous SIM/Scan”, Agilent Technologies, publication 5989 - 3108EN www.agilent.com/chem
4. Philip Wylie, Michael Szelewski, Chin-Kai Meng, Christopher Sandy, “Comprehensive Pesticide Screening by GC/MSD using Deconvolution Reporting Software”, Agilent Technologies, publication 5989 - 1157EN www.agilent.com/chem
5. B. D. Quimby, L. M. Blumberg, M. S. Klee, and P. L. Wylie, “Precise Time-Scaling of Gas Chromatographic Methods Using Method Translation and Retention Time Locking”, Agilent Technologies, publication 5967 - 5820E www.agilent.com/chem
6. Michael J. Szelewski and Bruce Quimby, “New Tools for Rapid Pesticide Analysis in High Matrix Samples”, Agilent Technologies, publication 5989 - 1716EN www.agilent.com/chem
7. Michael J. Szelewski and Bruce D. Quimby, “Ambient Headspace GC and GC-MSD Analysis of Nonpolar Volatiles in Water”, Agilent Technologies, publication 5968 - 9455E www.agilent.com/chem

数据库中化合物列表

挥发物：

EPA 502/524，60 个化合物

1,1,1,2-四氯乙烷
1,1,1-三氯乙烷
1,1,2,2-四氯乙烷
1,1,2-三氯乙烷
1,1-二氯乙烷
1,1-二氯乙烯
1,1-二氯丙烯
1,2,3-三氯苯
1,2,3-三氯丙烷
1,2,4-三氯苯
1,2,4-三甲基苯
1,2-二溴乙烷
1,2-二氯苯
1,2-二氯乙烷
1,2-二氯丙烷
1,3,5-三甲基苯
1,3-二氯苯
1,3-二氯丙烷
1,4-二氯苯
2,2-二氯丙烷
2-氯甲苯
3-氯-1,2-二溴丙烷
4-氯苯
苯
溴苯
溴氯甲烷
溴二氯甲烷
溴仿
溴甲烷
四氯化碳
氯苯
氯二溴甲烷
氯乙烷
氯仿
氯甲烷
顺-1,2-二氯乙烯
顺-1,3-二氯乙烯
二溴甲烷
二氯二氟甲烷
乙苯
四氯丁二烯
异丙基苯
二氯甲烷
间二甲苯
萘
丁基苯
丙基苯
邻二甲苯
对异丙基甲苯
对二甲苯
苯乙烯
*叔*丁基苯
四氯乙烯
甲苯
反-1,2-二氯乙烯
反-1,3-二氯丙烯
三氯乙烯
三氯氟甲烷
氯乙烯

半挥发物：

EPA 8270C 附录 IX，
140 个化合物

1,2,4,5-四氯苯
1,2,4-三氯苯
1,2-二氯苯
1,3,5-三硝基苯
1,3-二氯苯
1,4-二氯苯
1,4-萘醌
1-萘胺
2,3,4,6-四氯苯酚
2,4,5-三氯苯酚
2,4,6-三氯苯酚
2,4-二氯苯酚
2,4-二甲基苯酚
2,4-二硝基苯酚
2,4-二硝基甲苯
2,6-二氯苯酚
2,6-二硝基甲苯
2-乙酰氨基芴
2-氯萘
2-氯苯酚
2-甲基-4,6-二硝基苯酚
2-甲基萘
2-萘胺
2-硝基苯胺
2-硝基苯酚
2-甲基吡啶
3,3′-二氯二氨基联苯
3,3′-二甲基二氨基联苯
3-甲基胆蒽
3-硝基苯胺
4,4'-DDD
4,4'-DDE
4,4'-DDT
4-氨基联苯
4-溴苯基二苯醚
4-氯-3-甲基苯酚
4-氯苯胺
4-氯苯基二苯醚
4-硝基苯胺
4-硝基苯酚
4-硝基喹啉-1-氧化物
5-硝基-邻甲苯胺
7,12-二甲基苯并蒽
a,a-二甲基苯乙基胺
苊
苊烯
丙酮
苯乙酮
艾氏剂
α-六六六
苯胺
蒽
异黄樟（杀螨特）
苯并[a]蒽
苯
苯并[a]芘
苯并[b]萤蒽
苯并[ghi]苝
苯并[k]萤蒽
苯甲醇
ß-六六六
双（2-氯乙氧基）甲烷
双（2-氯乙基）醚
双（2-氯异丙基）醚
双（2-乙基己基）邻苯二甲酸酯
邻苯二甲酸丁苄酯
杀螨酯
䓛
δ-六六六
燕麦敌
二苯蒽
氧芴
狄氏剂
邻苯二甲酸二乙酯
乐果
邻苯二甲酸二甲酯
邻苯二甲酸二丁酯

邻苯二甲酸二辛酯
地乐酚
二苯胺
乙拌磷
硫丹I
硫丹II
硫酸硫丹
异狄氏剂
异狄氏剂醛
甲磺酸乙酯
氨磺磷
萤蒽
芴
γ-六六六（林丹）
七氯
环氧七氯-异构体B
六氯苯
六氯丁二烯
六氯环戊二烯
六氯乙烷
六氯丙烯
Hexachloropropene
茚并[1,2,3-cd]芘
异艾氏剂
异佛乐酮
异黄樟油精
十氯酮
间甲酚（3-甲基苯酚）
间二硝基苯
噻吡二胺
甲氧氯
甲基甲磺酸酯
甲基对硫磷
萘
硝基苯
N-亚硝基二乙胺
N-亚硝基二甲胺
N-亚硝基-二丁胺
N-亚硝基-二丙胺
N-亚硝基-二苯胺
N-亚硝基-甲基乙胺
N-亚硝基-吗啉
（4-亚硝基吗啉）
N-亚硝基哌啶
（1-亚硝基哌啶）
N-亚硝基吡咯烷（1-亚硝基吡咯烷）
O,O,O-硫代磷酸三乙酯
邻甲苯酚（2-甲基苯酚）
邻甲苯胺
对-（二甲胺基）偶氮苯
对硫磷
对-甲苯酚（4-甲基苯酚）
五氯苯
五氯乙烷
五氯硝基苯
五氯苯酚
乙酰对氨苯乙醚
菲
苯酚
甲拌磷
对苯二胺
拿草特
芘
嘧啶
黄樟油精
硫特普
硫磷嗪

氯代二噁唍和呋喃：
EPA 8282，19 个化合物

2,3,7,8-四氯二苯并-对-二噁唍
1,2,3,7,8-五氯二苯并-对-二噁唍
1,2,3,4,7,8-六氯二苯并-对-二噁唍
1,2,3,4,6,7,8-七氯二苯并-对-二噁唍
八氯二苯并-对-二噁唍
2,3,7,8-四氯二苯并呋喃
1,2,3,7,8-五氯二苯并呋喃
1,2,3,4,7,8-六氯二苯并呋喃
1,2,3,4,6,7,8-七氯二苯并呋喃
八氯二苯并呋喃

多氯联苯：
EPA 8082，19 个化合物

2-氯联苯
2,3-二氯联苯
2,2′,5-三氯联苯
2,4′,5-三氯联苯
2,2′,5,5′-四氯联苯
2,2′,3,5′-四氯联苯
2,3′,4,4′-四氯联苯
2,2′,4,5,5′-五氯联苯
2,2′,3,4,5′-五氯联苯
2,3,3′,4′,6-五氯联苯
2,2′,3,5,5′,6-六氯联苯
2,2′,4,4′,5,5′-六氯联苯
2,2′,3,4,5,5′-六氯联苯
2,2′,3,4,4′,5′-六氯联苯
2,2′,3,4′,5,5′,6-七氯联苯
2,2′,3,4,4′,5′,6-七氯联苯
2,2',3,4,4',5,5'-七氯联苯
2,2',3,3',4,4',5-七氯联苯
2,2',3,3',4,4',5,5',6-九氯联苯

农药：
安捷伦保留时间锁定农药数据库
567 种化合物
1,2,4-三氯苯
1,2-二溴-3-氯丙烷
17a-乙炔基雌二醇
2-（1-萘基）乙酰胺
2-（2-丁氧乙氧基）乙基 硫氰酸酯
2-（辛硫基）乙醇
2,3,4,5-四氯苯酚
2,3,4,6-四氯苯酚
2,3,5,6-四氯苯酚
2,3,5-三氯苯酚
2,3,5-（N-甲基氨基甲酸）三甲苯酯
2,3,5-三甲苯基甲基氨基甲酸酯
2,3,7,8-四氯二苯并呋喃
2,3,7,8-四氯二苯并-对-二噁唍
2,4,5-T 甲酯
2,4,5-三氯苯酚
2,4,6-三氯苯酚
2,4-D甲酯
2,4-D 2-丁基酯
2,4-DB甲酯
2,4-二氯苯酚
2,4-二氯苯基苯磺酸酯
2,4-二甲基苯胺
2,6-二氯氰苯
2,6-二甲基苯胺
2-[3-氯苯氧基]丙酰胺
2-乙基-1,3-己二醇
2-羟雌甾二醇
2-甲基苯酚
2-苯氧基丙酸
3,4,5-（N-甲基氨基甲酸）三甲苯
3,4-二氯苯胺
3,5-二氯苯胺
3-氯苯胺
3-羟基呋喃丹
4,4'-二氯苯甲酮
4,6-二硝基-邻-甲酚（DNOC）
4-氯苯胺
4-甲基苯酚
5,7-二羟基-4'-甲氧基异黄酮
9,10-蒽醌
乙酰甲胺磷
乙草胺
三氟羧草醚甲酯
草不绿
艾氏剂
草毒死
莠灭净
赛果
灭害威
双甲脒
嘧啶醇
敌菌灵
苯胺
阿特拉通
阿特拉津
阿扎康唑
甲基吡恶磷
乙基谷硫磷
谷硫磷叠氮津
偶氮苯
燕麦灵

苯霜灵
草除灵
恶虫威
氟草胺
呋草黄
麦锈灵
苯达松
苯达松甲基衍生物
杀草丹
苯并（a）芘
苯甲酮
新燕灵
b-雌二醇
α-六六六异构体
ß-六六六异构体
δ-六六六异构体
治草醚
氟氯菊酯
乐杀螨
反丙烯除虫菊
反丙烯除虫菊左旋环戊烯基异构体
右旋反灭虫菊酯
联苯
邻苯二甲酸二（2-乙基己基）酯
双酚 A
双苯三唑醇 I
双苯三唑醇 II
除草定
溴丁酰草胺
溴烯杀
溴硫磷
乙基溴硫磷
溴螨酯
溴苯腈
溴苯腈辛酸酯
噻嗪酮
丁草胺
草胺磷
氧丁叉威
地乐胺
邻苯二甲酸丁苄酯
苏打灭
丁化羟基茴香醚
敌菌丹
克菌丹
西维因
长杀草
呋喃丹
呋喃丹-3-酮
三硫磷
丁硫克百威
萎锈灵
灭螨猛
草灭平甲酯
地快乐
氯杀螨
氯溴隆
氯草灵
开蓬
杀虫脒
杀螨醇
燕麦酯
杀螨酯
毒虫畏
氯甲丹
氯甲磷
草枯醚
乙酯杀螨醇
地茂散
丙酯杀螨醇
百菌清
绿麦隆
氯苯胺灵
毒死蜱
甲基毒死蜱
敌草索
草克乐
氯硫磷
氯甲硫磷
氯甲硫磷砜
氯甲硫磷亚砜
乙菌利
顺-氯丹
异恶草酮
蝇毒磷
杀鼠嘧啶
丁烯磷
育畜磷
草净津
苯腈磷
杀螟腈
草灭特
环莠隆
氟氯氰菊酯 I
氟氯氰菊酯 II
氟氯氰菊酯 III
氟氯氰菊酯 IV
氯氟氰菊酯 I (lambda)
清菌脲
氯氰菊酯 I
氯氰菊酯 II
氯氰菊酯 III
氯氰菊酯 IV
环草津
酯菌胺
灭蝇胺
苯醚菊酯 I
苯醚菊酯 II
棉隆
十氯联苯
溴氰菊酯
田乐磷
一零五九
磺吸磷
溴丙酸
异苯敌草
敌草净
氯亚磷
燕麦敌 I
燕麦敌 II
邻苯二甲酸二戊酯
二嗪农
二溴磷
麦草畏
甲麦草畏
异氯磷
除线磷
抑菌灵
二氯萘醌
抑害胺
双氯酚
2,4滴丙酸
2,4滴丙酸甲酯
敌敌畏
苄氯三唑醇
氯甲草
氯硝胺
百治磷
邻苯二甲酸二环己基酯
双环戊二烯
狄氏剂
安塔
乙霉威
Diethyl dithiobis(thionoformate) (EXD)
邻苯二甲酸二乙酯
二甘醇
二乙基己烯雌醇
恶醚唑 I
恶醚唑 II
吡氟草胺
甲氟磷
克草胺
戊草津
噻节因
乐果
邻苯二甲酸二甲酯
甲基毒虫畏
敌蝇威
邻苯二甲酸二丁酯
烯唑醇
敌乐胺
敌螨通
敌螨普 I
敌螨普 II
敌螨普 III
敌螨普 IV

地乐酚
地乐酯
地乐酚甲酯
地乐消酚
地乐消
邻苯二甲酸二正丙酯
二氧威
敌杀磷
磺吸磷
敌鼠
草乃敌
二苯胺
杀草净
乙拌磷
灭菌磷
氟硫草定
敌草隆
吗菌灵 I
吗菌灵 II
敌菌酮
克瘟散
硫丹（α异构体）
硫丹（ß异构体）
硫丹乙酯
硫丹内酯
硫丹硫酸盐
异狄氏剂
异狄氏剂醛
异狄氏剂酮
苯硫磷
氧唑菌
扑草灭
抑草蓬
高氰戊菊酯
禾草畏
乙环唑
丁氟消草
苯虫威
抑草威
乙硫磷
乙呋草黄
灭克磷
促长啉
乙烯硫脲
氯唑灵
氧嘧啶磷
氨磺磷
异嘧菌醇
抗螨唑
腈苯唑
皮蝇磷
赛克津
杀螟硫磷
丁苯威
2,4,5-涕丙酸
2,4,5-涕丙酸甲酯
双氧威
甲氰菊酯
除螨酯
丰索磷
倍硫磷
亚砜化倍硫磷
非草隆
杀灭菊酯 I
杀灭菊酯 II
Fepropimorph
氟燕灵
甲氟燕灵
精吡氟禾草灵
噻螨唑
氟消草
氟氰戊菊酯 I
氟氰戊菊酯 II
氟节胺
伏草隆
消草醚
菌唑灵
抑草丁
抑草丁甲酯
氟草同
氟咯草酮 I
氟咯草酮 II
氟草烟-1-甲基庚酯
氟硅唑
氟酰胺
粉唑醇
氟胺氰菊酯 I
氟胺氰菊酯 II
灭菌丹
地虫磷
安果
麦穗宁
呋氨丙灵
呋线威
拌种胺
七氯
环氧七氯
外环氧七氯异构体 B
庚虫磷
六溴苯
六氯苯
菌螨酚
己唑醇
六嗪同
己烷雌酚
烯菌灵
碘苯腈
异稻瘟净
异丙定
氯唑磷
碳氯灵
敌稻瘟
丁环隆
异艾氏剂
丙胺磷
嗪丁草
异丙威
异乐灵
稻瘟灵
异丙隆
异恶草胺
异恶唑磷
碘硫磷
蒙七七七
环草定
对溴磷
对溴磷氧化物
林丹
利谷隆
马拉硫磷
马拉硫磷-O-相似物
2甲4氯甲酯
2甲4氯丁酸甲酯
间甲酚
灭蚜磷
2甲4氯丙酸甲酯
苯噻草胺
氟草磺
灭蚜松
二噻磷
丙氧灭绣胺
甲霜灵
苯嗪草
甲基一零五九硫醇式异构体
吡草胺
虫螨畏
甲胺磷
甲呋菌胺
杀扑磷
灭虫威
灭虫威砜
灭虫威亚砜
灭多虫
蒙五一五 I
蒙五一五 II
盖草津
甲氧滴滴涕
甲基对氧磷
甲基对硫磷
乙酸甲基-1-萘酯
苯丙隆
秀谷隆
异丙甲草胺
速灭威
赛克津
速灭磷
灭蚁灵
草达灭
杀草利
久效磷
绿谷隆

腈菌唑
N,N-二乙基间甲苯甲酰胺
N-1-萘乙酰胺
萘二甲酐
草萘胺
烟碱
磺乐灵
氯定
除草醚
异丙消
N-甲基-N-1-萘乙酰胺
达草灭
氟苯嘧啶醇
o,p'-DDD
o,p'-DDE
o,p'-DDT
八氯苯烯
邻二氯苯
氧乐果
联苯酚
黄草消
解草腈
恶草灵
恶霜灵
甲氨叉威
氧化萎锈灵
氧化氯丹
砜吸磷
氟硝草醚
p,p'-DDD
p,p'-DDE
p,p'-DDT
多效唑
对氧磷
对硫磷
对二氯苯
克草猛
戊菌唑
胺硝草
五氯苯胺
五氯苯甲醚
五氯苯
五氯硝基苯
五氯苯酚
蔬草灭
氯菊酯 I
氯菊酯 II
乙滴滴
克线磷
芬硫磷
苯氧乙酸
稻丰散
甲拌磷
伏杀磷
棉安磷
亚胺硫磷
磷胺 I
磷胺 II
四氯苯酞
毒莠定甲酯
杀鼠酮
粉病灵
增效醚
哌草磷
抗蚜威
乙基虫螨磷
虫螨磷
三氯杀虫酯
对硝基甲苯
丙草胺
噻菌灵
丙氯灵
杀菌利
丙溴磷
卡乐施
猛杀威
扑灭通
扑草净
毒草安
百维灵
敌稗
克螨特
扑灭津
烯虫磷
苯胺灵
丙环磷 I
丙环磷 II
残杀威
拿草特
丙硫磷
发果
比锈灵
杀草敏
定菌磷
苄草唑
稗草畏
哒螨酮
打杀磷
达草止
病定清
啶斑肟 I
啶斑肟 II
二甲嘧菌胺
咯喹酮
喹恶磷
灭藻醌
喹禾灵
苄呋菊酯
S,S,S-三丁基三硫赶磷酸酯
另丁津
密草通
西玛津
西草净
硫特普
硫（S8）
乙丙硫磷
灭草灵
三苯氧胺
清菌噻唑
戊唑醇
丙戊草胺
四氯硝基苯
双硫磷
特草定
芽根灵
特丁磷
甲氧去草净
特丁津
去草净
杀虫威
三氯杀螨砜
特普
胺菊酯 I
胺菊酯 II
硫代二磷酸四丙基酯
杀螨好
噻醚草胺
涕必灵
特氨叉威
甲基乙拌磷
硫磷嗪
丁草威 I
丁草威 II
甲基立枯磷
对甲抑菌灵
顺式氯丹
三唑酮
三唑醇
野麦威
三唑磷胺
三唑磷
磷酸三丁酯
三硫代亚磷酸三丁酯
敌百虫
壤虫磷
三氯吡啶氧乙酸甲酯
三环唑
灭草环
草达津
氟菌唑
氟乐灵
Tryclopyrbutoxyethyl
乙嗪草酮
高烯效唑
蚜灭多
灭草猛
烯菌酮

一次进样同时使用全扫描、选择离子检测、微池电子捕获检测器和火焰光度检测器对农药进行鉴定

应用

食品安全，环境

作者

Chin-Kai Meng 与 Bruce Quimby
安捷伦科技公司
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
美国

摘要

本应用报告说明了在气质联用系统 (GC/MS) 中使用一次进样能同时获得四信号的技术。在色谱柱的末端安装上一个三路微流体分流器后，一次进样获得 MS 数据的同时，还可以从 GC 检测器上获得另外两个信号。这个多种信号的配置可提供：全扫描数据用于谱库检索、选择离子检测数据用于痕量分析、对复杂基质的样品有极好的选择性和灵敏度高的微池电子捕获检测器 (μECD) 和火焰光度检测器 (FPD) 数据。元素选择性检测器、选择离子检测/全扫描 (SIM/Scan) 和解卷积报告软件的联合，可以形成一个强有力的农药分析系统。本文讨论了对痕量化合物的定量/确认或筛查的实例。

前言

为了保护人类健康，世界各国的实验室都在对食品和环境中的农药进行残留分析，其过程通常有样品的匀浆、农药的提取、然后根据化合物的性质决定使用气相色谱或液相色谱来分析目标化合物。能使用气相色谱测定的化合物，具有极好灵敏度和选择性的常规检测器是氮磷检测器 (NPD)，微池电子捕获测器 (μECD) 和火焰光度检测器 (FPD)。但是使用这些检测器，即使是双柱确认分析，对化合物的识别也不可能具有很高的可信度。

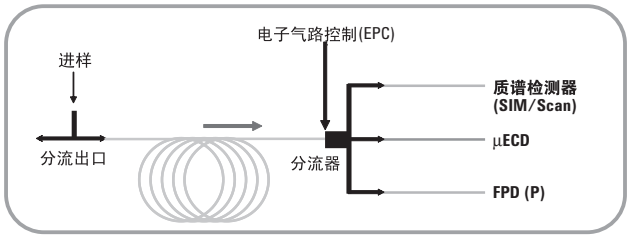
全扫描质谱数据和谱库检索是可用来对最终化合物确认的典型的手段。但是全扫描分析的检测限比 GC 的选择性检测器差，为了改进检测限，通常使用选择离子检测模式 (SIM)。在采用 SIM 模式进行质谱测定时，在每个目标化合物从色谱柱流出的这段保留时间内只检测少数特征离子。由于只检测少数特定离子，其信噪比 (S/N) 得到了明显提高。所选择的检测离子是根据目标化合物的保留时间采用时间程序来分组的。对于从色谱柱流出非常接近的目标化合物，需要将其色谱保留时间与选择离子检测的时间程序精确地定位。使用保留时间锁定 (RTL) 技术可以在色谱柱维护或更换时，不需调整 SIM 组的时间窗口。

在本篇应用报告中，说明了在 GC/MS 系统中使用一次进样能同时提供四种信号的技术。多种信号检测的优点有：

- 信息的确认－全扫描数据的谱库检索能力
- 灵敏度最高－选择离子检测 (SIM) 数据用于痕量分析
- 卓越的选择性－μECD 和 FPD 可以检测复杂基质样品中痕量的杂环化合物

实验

在近期的一篇技术报告“同步选择离子检测/全扫描”中，说明了在 5975 inert MSD 上采用高性能电子线路可以在一次运行中同时获得 SIM 和全扫描的信号而对其他性能没有影响 [1]。SIM 方法可以很容易地利用化学工作站 (ChemStation) 的 AutoSIM 软件来建立 [2]。仅需要选择该方法中的一个复选框，就可以同时获得 SIM 和全扫描数据。要实现这种功能需要付出的代价是使每秒的循环数有所减少，但可在整个分析中获得一个附加信号（全扫描或 SIM 数据）。正确地选择测量参数，例如增加扫描速率，减少每秒的循环数等是不重要的，不会影响峰的定量或结果的质量（如信噪比）。



在柱的末端，根据使用的毛细管（限流器）的长度与内径，流出物分三路流出

图 1. 多种信号配置的示意图
注释：EPC 流量加上柱流量一起进入分流器

除了 SIM/Scan 数据，化学工作站软件还可以得到另外两个 GC 检测器的信号，如 FPD（磷或硫模式）和氮磷检测器 (NPD) 的信号或者从一个双波长火焰光度检测器 (DFPD) 得到磷和硫的信号。（见图 1）。

图 1 是多种信号检测的示意图，在柱子的末端装有一个三路微流体分流器，可将色谱柱的流出物分流至不同的检测器 [3]。本研究是安装了一个 FPD 和一个 μECD。请注意在此图中有一个辅助电子气路控制 (Aux EPC) 的气体通道与分流器相连以保持柱末端的压力，可以使每一次运行中分流比/流速 (split ratios/flow) 保持恒定。图 2 是安装在 6890GC 柱箱中三路微流体分流器。

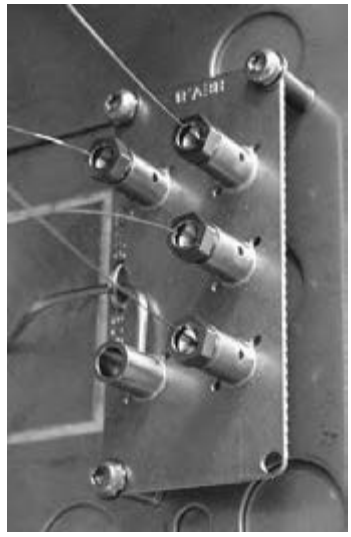


图 2. 6890 GC 柱温箱中三路微流体分流器的近视图

微流体控制板的尺寸是 1.25 寸 (3.2 cm) 宽和 2.5 寸 (6.4 cm) 高。这个装置是为了消宽除大量热物质、过量的死体积和由于柱箱温度循环造成的接口泄漏等共同问题而设计的。分流器的流路和连接点布置好后，用照相平板印刷术和化学蚀刻技术刻在一块薄的不锈钢板上。在板上用扩散焊接法焊上柱连接器，表面经过钝化，形成一个整体的和紧凑的微流体分流器。在连接器上使用金属垫圈，这些垫圈在温度循环变化情况下也不会泄漏，同时也不会吸附溶剂或样品基质，可以改进微量分析的灵敏度。

在分流器和每一个检测器中间装上去活的毛细管柱，作为流路的限流器。辅助电子气路控制器提供的压力和限流器的尺寸可以使用一个类似电子表格的计算器程序来确定，从而使所有检测器得到较为合适的分流比。当有一个连接器关闭时，三路分流器可以很容易地转为两路分流器。

分流器的其他优点还有返冲洗 [3] 和快速转换。辅助电子气路控制可以通过对运行时间编程以达到较高的压力，而进样口的压力此刻降低到接近环境条件。这样可以使色谱柱的液体反向流动，将不容易挥发的物质反吹出进样口的分流口。在分流器上辅助电子气路控制也可以在 MSD 不降低温度和放空 MSD 的条件

下进行柱转换和进样口维护。分流器的流路和连接点被设计成当柱子的接头取下时，氦气可以从辅助电子气动控制吹出清洗接头，并防止空气进入分流器/质谱仪。见表 1 中硬件详细资料与设置。

表 1. 气相色谱仪，质谱仪和三路分流器的操作参数

GC	安捷伦科技 6890		
进样口	电子气动控制（EPC），分流/不分流		
模式	不分流，进样 1.0 µL（7683 ALS）		
进样口温度	280 °C		
压力	~27 psi（将甲基毒死蜱的保留时间锁定在 16.596 min）		
吹扫流量	50.0 mL/min		
吹扫时间	0.75 min		
总流量	55.3 mL/min		
载气节省	关闭		
载气类型	氦气		
进样口衬管	Siltek Cyclosplitter，4 mm 内径，Restek 部件号 20706-214.1		
柱箱			
柱箱程序温控	°C/min	最终（°C）	保持（min）
初始温度		70	2.00
阶 1	25	150	0.00
阶 2	3	200	0.00
阶 3	8	280	15
总运行时间		46.87 min（最后一个标准品在约 35 min 流出）	
平衡时间		0.5 min	
柱箱最高温度		325 °C	
色谱柱		安捷伦科技 HP 5-ms，部件号 19091S-433	
长度		30.0 m	
内径		0.25 mm	
膜厚		0.25 µm	
模式		恒压	
标称的初始流速		2.5 mL/min	
出口		未指明	
出口压力		3.8 psi（辅助电子气路控制压力到分流器）	
前检测器（FPD）			
测磷模式		**测硫模式**	
氢气流速：	75.0 mL/min	氢气流速：	50.0 mL/min
氧化气流速：	100.0 mL/min	氧化气流速：	60.0 mL/min
温度：	250 °C		
氧化气类型：	空气		
模式：	尾吹气恒定流速		
尾吹气流速：	60.0 mL/min		
尾吹气类型：	氮气		
点火补偿	2.00		
数据采集速率：	5 Hz		

表 1. 气相色谱仪，质谱仪和三相微流体分流器的操作参数（续）

后检测器（μECD）	
温度：	300 °C
模式：	尾吹气恒定流速
尾吹气流速：	60.0 mL/min
尾吹气类型：	氮气
数据采集速率：	5 Hz
辅助加热区 2	
应用：	MSD 传输线加热器
初始温度：	280 °C
辅助压力 5	
气体类型：	氦气
初始压力：	3.80 psi
初始时间：	0.00 min（此时间将根据柱箱的程序升温而定）
MSD	安捷伦科技 5975 inert MSD
调谐文件	Atune.U
模式	扫描
溶剂延迟	3.00 min
EM 电压	Atune 伏特
低质量	45 amu
高质量	555 amu
阈值	100
进样	2
A/D Samples	4
每秒扫描数	2.89
四极杆温度	150 °C
离子源温度	230 °C
三路分流器	安捷伦 6890N 选件 890，在工厂组装时安装在 GC 上
分流比	10:10:1 MSD:FPD:μECD
MSD 限流器	1.444 m x 0.18-mm id 去活熔融石英毛细管
FPD 限流器	0.532 m x 0.18-mm id 去活熔融石英毛细管
μECD 限流器	0.507 m x 0.10-mm id 去活熔融石英毛细管
到 MSD 的流速（280 °C）	1.53 mL/min
到 FPD 的流速（280 °C）	1.53 mL/min
到 μECD 的流速（280 °C）	0.153 mL/min
尾吹气流速（280 °C）	1.38 mL/min

在本应用中使用的软件	
GC/MSD 化学工作站	G1701DA
解卷积报告软件（DRS)	G1716AA
NIST 信息库	G1033A
AMDIS（包含在 NIST 信息库中，免费提供）	

结果和讨论

图 3 显示一次注射农药混合标样可同时得到的四种信号。由于 µECD 的灵敏度特别高，三个检测器的分流比设定在 MSD:FPD:µECD = 10:10:1。这个分流比是指将 1 µL 1 ppm 样品以不分流方式注射进样后进入不同检测器的比例 (如图 3 中标明)。

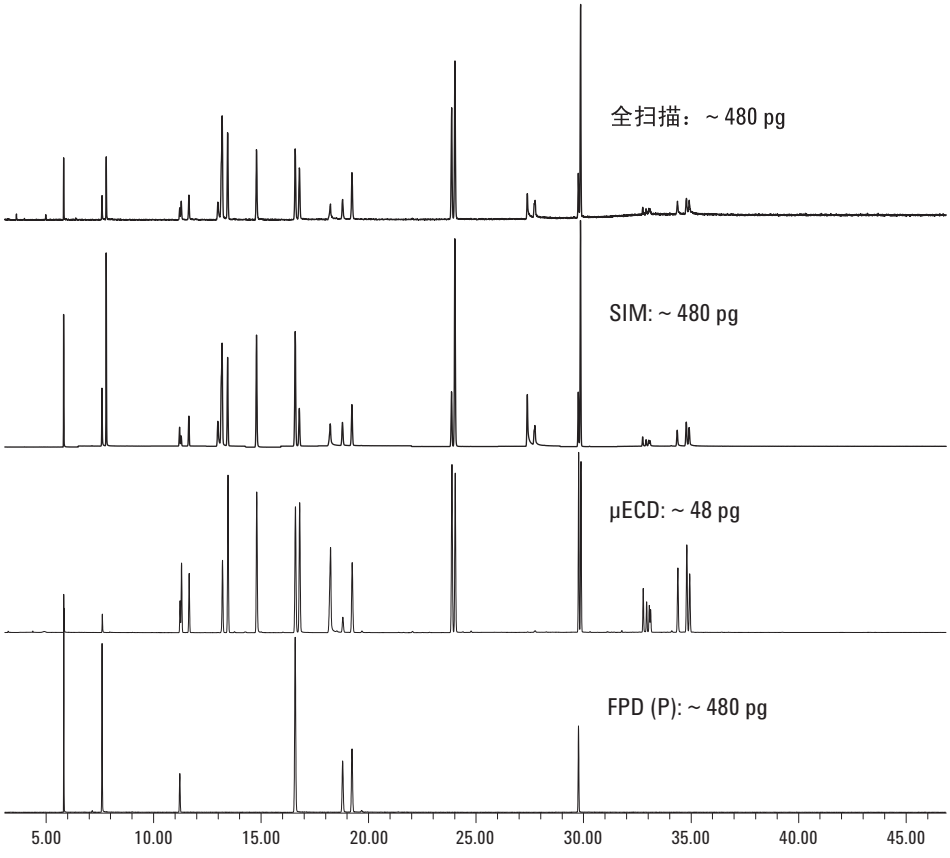


图 3. 1 ppm 标样进样 1 µL 获得的四种信号。分流比 MSD:FPD:µECD = 10:10:1

图 4 是将上述农药混合标样在农产品基质中稀释 100 倍得到的信号。由于灵敏度较低，未列出全扫描的总离子流色谱图 (TIC)。FPD(P) 和 μECD 两个检测器可以检测出所有添加到该提取液中的农药。对于痕量水平的目标化合物分析，SIM 的信号可以用作定量分析，而 GC 的信号可以作为进一步确证。

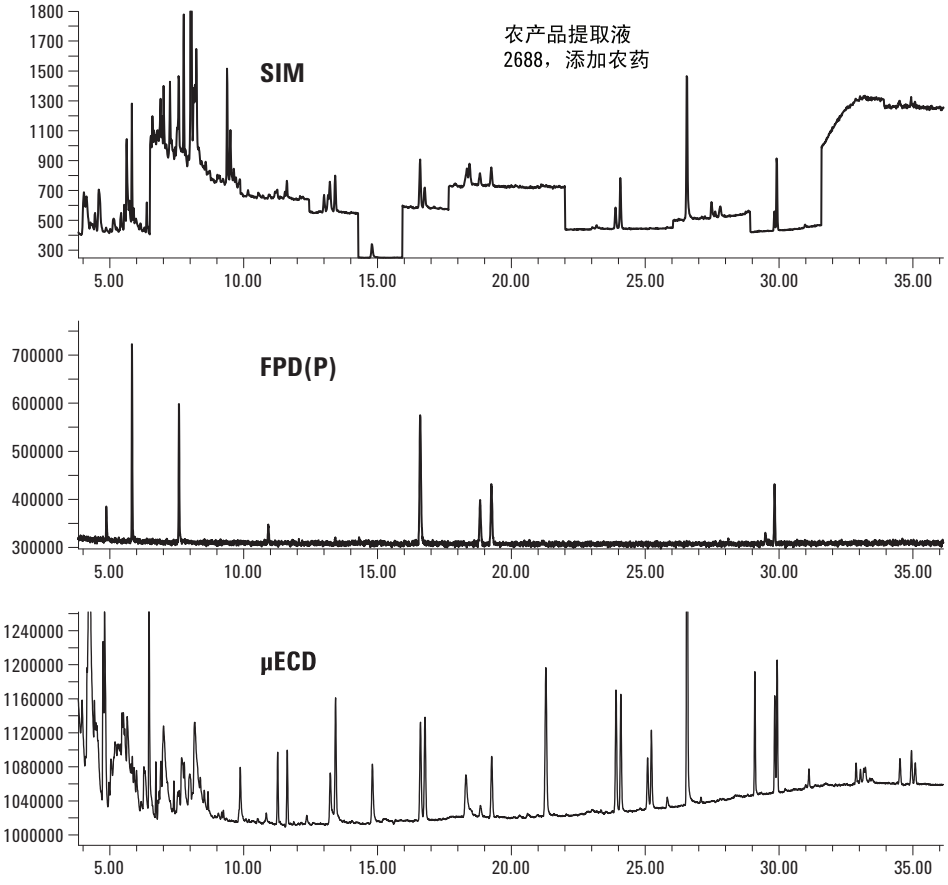


图 4. 农产品提取液中添加 10 ppb 混合农药标样溶液的数据。FPD 和 μECD 可以检测出添加的各个农药标样

多信号系统的另一个用途是可对农产品中的残留农药进行筛查，在筛查试验中，没有目标农药的名单，因此不可能使用 SIM 检测或 MS/MS 。图 5 显示一个样品提取液的三种信号（没有 SIM）。

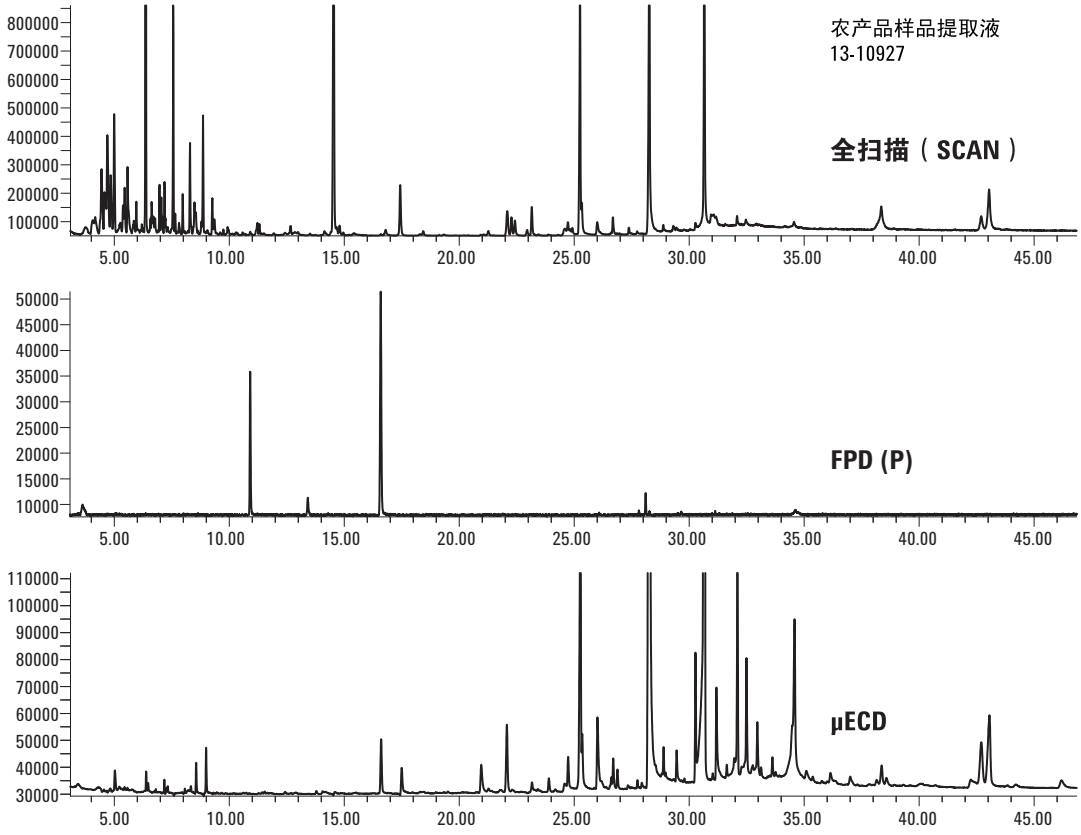
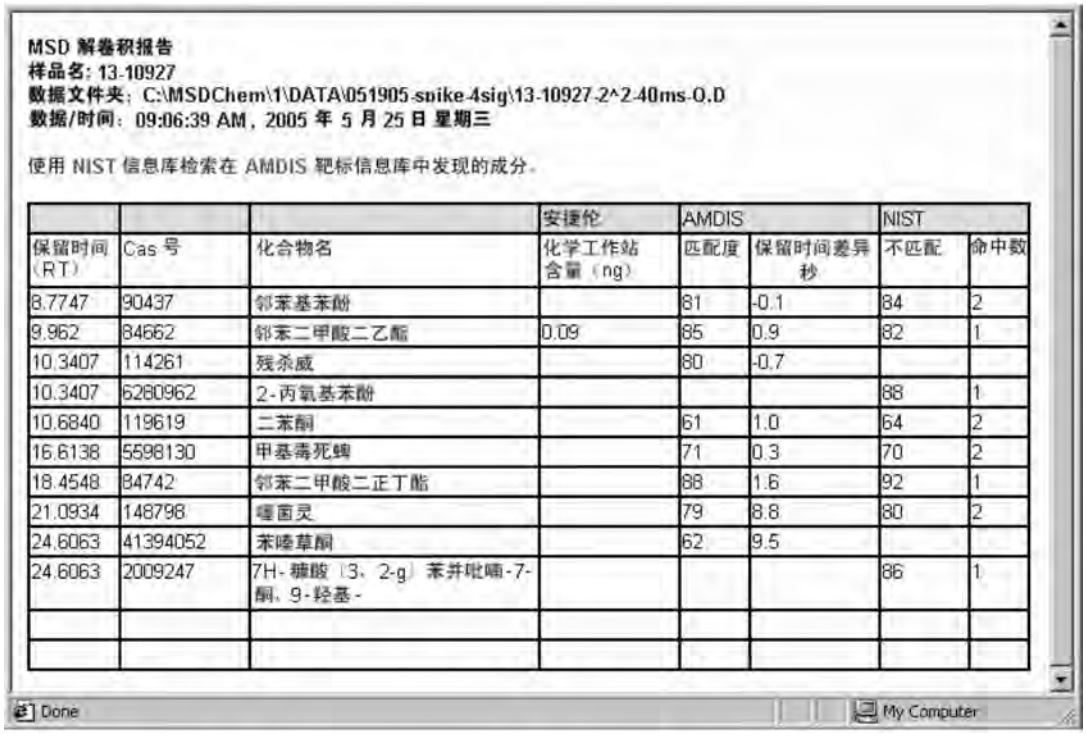


图 5. 农产品样品提取液 13-10927 的全扫描，FPD(P) 和 μECD 的谱图

解卷积报告软件 (DRS) [3, 4] 可以在总离子流谱图中发现几个农药，见图 6。



MSD 解卷积报告
样品名: 13-10927
数据文件夹: C:\MSDChem\1\DATA\051905-spike-4sig\13-10927-2^2-40ms-0.D
数据/时间: 09:06:39 AM, 2005 年 5 月 25 日 星期三

使用 NIST 信息库检索在 AMDIS 靶标信息库中发现的成分。

			安捷伦	AMDIS		NIST	
保留时间 (RT)	Cas 号	化合物名	化学工作站含量 (ng)	匹配度	保留时间差异秒	不匹配	命中数
8.7747	90437	邻苯基苯酚		81	-0.1	84	2
9.962	84662	邻苯二甲酸二乙酯	0.09	85	0.9	82	1
10.3407	114261	残杀威		80	-0.7		
10.3407	6280962	2-丙氧基苯酚				88	1
10.6840	119619	二苯酮		61	1.0	64	2
16.6138	5598130	甲基毒死蜱		71	0.3	70	2
18.4548	84742	邻苯二甲酸二正丁酯		88	1.6	92	1
21.0934	148798	噻菌灵		79	8.8	80	2
24.6063	41394052	苯嗪草酮		62	9.5		
24.6063	2009247	7H-糠酸 (3, 2-g) 苯并吡喃-7-酮, 9-羟基-				86	1

Done　　My Computer

图 6. 13-10927 样品提取液的解卷积报告

样品中可能存在的化合物是二苯酮、甲基毒死蜱和噻菌灵。残杀威和苯嗪草酮并没有同时被 AMDIS 和 NIST 确认，因此它们很可能是假阳性。

由于样品基质和其他干扰物的复杂性，有时总离子流图 (TIC) 中的峰很难与信息库有很高的匹配度，即使将背景干扰去除也达不到，因此元素选择性检测器对化合物的确认可以提供有效的信息和支持。这个多信号系统是保留时间锁定的，因此，将保留时间和 FPD(P) 和 μECD 响应的色谱峰联系起来分析，甲基毒死蜱（$C_7H_7Cl_3NO_3PS$）是可以确认的。

通常不到三分钟即可关掉 FPD 的光电倍增管，将磷滤光片换成硫滤光片，然后重新开启光电倍增管，换好滤光片后，调节检测器的气体流速使测磷或测硫模式的响应最优化。上述提取液在 FPD(S) 模式下再进样一次。将 FPD(S) 模式与原来的 FPD(P) 模式下的色谱图列于图 7。在 FPD(S) 的色谱图上可以看到两个主峰。从它们的保留时间看，可以认为两个峰分别是甲基毒死蜱和噻菌灵 ($C_{10}H_7N_3S$)。但注意全扫描的总离子流图 (TIC) 上，没有该两化合物相应的色谱峰，说明用传统的数据分析不可能鉴定这两个化合物。FPD(S) 模式的选择性是非常好的，但灵敏度不如 FPD(P) 模式。虽然 μECD 是很灵敏的，但选择性不如 FPD。将 GC 检测器、SIM/Scan 数据和解卷积报告软件 (DRS) 结合应用，可以成为强有力的农药分析系统。

结论

同步 SIM/Scan 可以在一次分析中给用户提供用于谱库检索的全扫描谱图和痕量水平检测的 SIM 数据。当一个三路微流体分流器加在色谱柱的末端，就可以在一次进样得到 MS 数据的同时获得另外两个元素选择性检测器的信号。这种配置对分析食品和环境样品中痕量农药残留是非常有吸引力的。

这个多信号配置可提供：用于谱库检索的全扫描数据信息，用于痕量分析的选择离子检测信息和在复杂基质中具有卓越选择性和灵敏度的 μECD 和 FPD 数据。本应用报告以实例介绍了对痕量化合物进行定量/确认或筛查时，一次进样后可获得 μECD 和 FPD（测磷或测硫模式）信息的同时，还可获得 SIM/Scan 信息的技术。

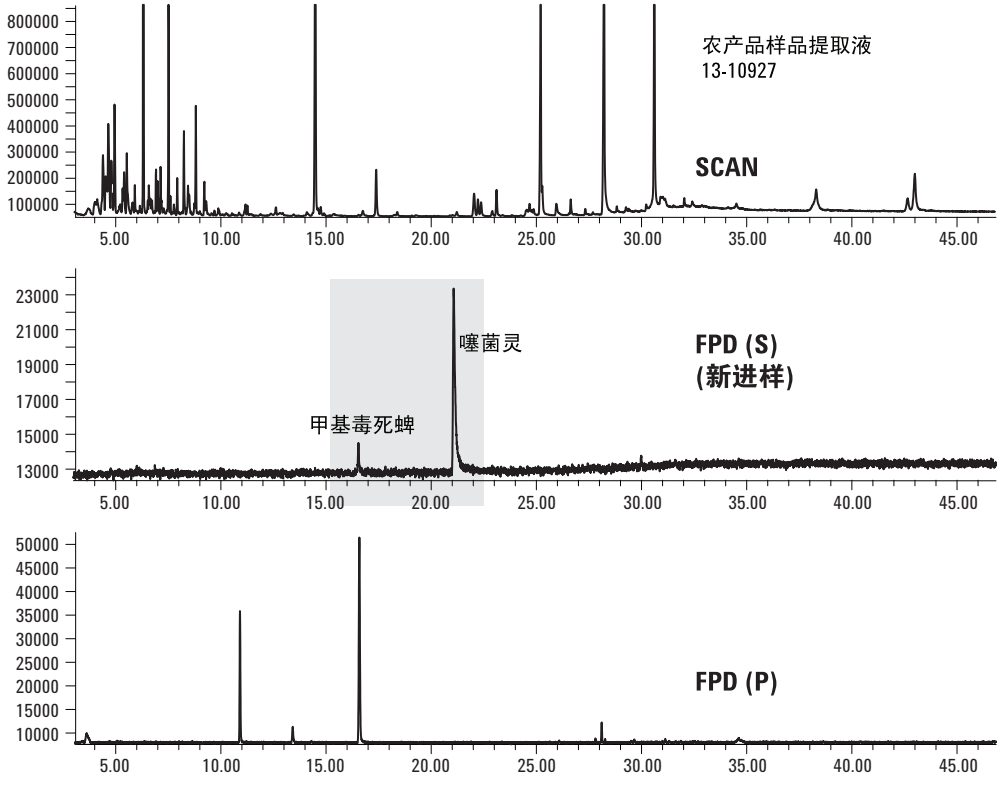


图 7. 提取液 13-10927 的全扫描、FPD(S) 和 FPD(P) 的数据

参考文献

1. Chin-Kai Meng, “Improving Productivity with Synchronous SIM/Scan”, Agilent Technologies, publication 5989-3108, www.agilent.com/chem
2. Harry Prest and David W. Peterson, “New Approaches to the Development of GC/MS Selected Ion Monitoring Acquisition and Quantitation Methods”, Agilent Technologies, publication 5988-4188, www.agilent.com/chem
3. Michael J. Szelewski and Bruce Quimby, “New Tools for Rapid Pesticide Analysis in High Matrix Samples” Agilent Technologies, publication 5989-1716, www.agilent.com/chem
4. Philip L. Wylie, Michael J. Szelewski, Chin-Kai Meng, and Christopher P. Sandy, “Comprehensive Pesticide Screening by GC/MSD Using Deconvolution Reporting Software” Agilent Technologies, publication 5989-1157, www.agilent.com/chem

用 DRS 对加标和未加标水果提取物中农药残留的盲样测试

应用

食品

作者

Christopher P. Sandy
Agilent Technologies, Inc.
Block A, CSC Eskdale Road
Winnersh Triangle Estate
Wokingham, Berk RG41 5DZ
United Kingdom

摘要

安捷伦公司的质量选择检测器 (MSD) 和 DRS，为 MSD 化学工作站软件增加了有力的数据处理功能。处理全扫描气相色谱/质谱数据对农药残留物进行确证，这是一项繁琐、费时的工作，需要有经验的分析人员具备极高的技术、倾注巨大的精力。DRS 可以在 1 分钟左右处理一张复杂的食品提取物离子色谱图，而有经验的分析人员要得到同样质量的结果可能需要 30 多分钟。这篇报告中的大量数据说明，分析人员可以用 DRS 迅速得到高度可信的结果。

前言

对农药残留的质谱分析一般需要找到目标离子，并核对辅助定量离子的比例。有时要从高度复杂的基质背景中确证目标化合物是非常困难的，因为基质影响了目标化合物的离子比例，或者增加的离子使图谱变得更复杂了。要使结果更明确，经常需要扣除背景和进行手工积分。所以，从复杂基质中确证目标化合物是一个费时的过程。有经验的分析人员一般要花 15 到 30 分钟去处理/确证一个数据文件。

有两项强大的气相色谱/质谱 (GC/MS) 技术—保留时间锁定 (RTL) 和 Deconvolution，二者结合构成了一种定量、监测工具，能够在 1-2 分钟内从一次分析中鉴定出 567 种农药和内分泌干扰物。安捷伦科技公司的 GC/MSD-DRS 为 MSD 化学工作站提供了辅助功能。

实验

DRS 概述

在应用报告 5989-1157EN[1] 中有关于 DRS 的详细介绍，可以从 www.agilent.com/chem 中下载。DRS 的工作原理见图 1。

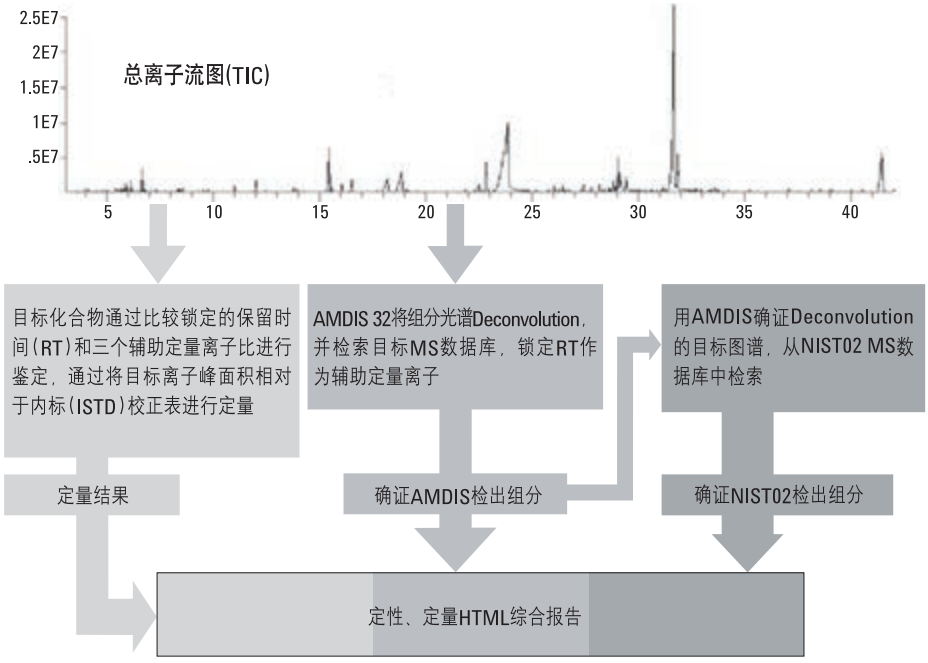


图 1. GC/MS DRS 示意图

MSD 化学工作站的定量功能，与来自 NIST 的行业标准 AMDIS 程序的 Deconvolution 功能相结合。在分析农药样品时，ADMIS 可以将目标图谱从脏的基质图谱中分离出来。把 Deconvolution 图谱输入 NIST01 145000 个化合物谱库中进行检索，使可信度又提高了一级。大约 1 分钟就可以产生一份全面报告。

样品

六份溶解在 90/10 异辛烷/甲苯中的水果提取物样品，进行 GC/MS 分析。样品由斯堪的纳维亚一个可靠的食品农药实验室制备。三份样品加入了一些不同浓度的农药。虽然已经知道每份样品中所加农药的浓度范围，但是既没有提供每份控制样品中**农药的真正数量**，也没有提供这些**农药的名称**。样品的详细情况列于表 1。另外三份样品是“真正”未加标的提取物。

表 1. 盲样测试实验中的样品情况

样品号	提取基质	农药数量	浓度范围 (mg/Kg)	注释
1	柑橘	20–40	0.02–0.20	控制样品—加标
2	莴苣	20–40	0.02–0.20	控制样品—加标
3	苹果	20–40	0.01–0.20	控制样品—加标
4	葡萄	2–4	0.1–1.0	实际样品
5	柑橘	2–4	0.2–5.0	实际样品
6	苹果	2–4	0.05–2.0	实际样品

仪器

用表 2 中给出的分析条件对样品进行全扫描 GC/MS 分析。用 DRS 提供的默认设定参数进行数据处理和报告。

表 2. 水果提取物样品 RTL GC/MS 分析条件

气相色谱	**Agilent 6890N**
色谱柱	30 m x 0.25 mm id x 0.25 µm HP-5MS (部件号 19091S-433)
载气	氦气
流量	1.9 mL/min，70 ºC
柱头压力	18 psi 恒压模式 方法 RTL 锁定甲基毒死蜱为 16.593 分钟
进样器类型	PTV 无隔垫头
进样器温度 (ºC)， 持续时间 (分钟) 和升温速率 (ºC/min)	90 ºC (0.3 min) - 1720 ºC/min - 250 ºC
放空时间	0.2 min
放空流量	30 mL/min
放空压力	0 psig
吹扫流量	60 mL/min
吹扫时间	1.0 min
注射器体积	50 µL
进样量	15 µL
衬管	有多阻板的空衬管
炉温升温程序：温度 (ºC)， 持续时间 (分钟) 和升温速率 (ºC/min)	70(2)-25-150(0)-3-200(0)-8-280(10)
MSD	**Agilent 5973 inert**
MS 接口	280 ºC
MS 离子源	230 ºC
MS 四极杆	150 ºC
检测模式	EI 扫描 40-550 amu
EM 电压	ATUNE 值

结果

三份加标提取物的分析结果见表 3，注意，在结果提供给用户之前，并不知道加入农药的详细情况。表中由 DRS 确证的农药用浅色背景颜色，安捷伦 RTL 农药数据库中没有的成分用深色背景颜色。余下的无背景颜色的成分是没有确证的。

表 3. 三种加标水果提取物样品的 MSD-DRS 结果

	样品 1： 控制－柑橘，加标		样品 2： 控制－莴苣，加标		样品 3： 控制－苹果，加标	
	农药	加入量 mg/kg	农药	加入量 mg/kg	农药	加入量 mg/kg
1	甲胺磷*	0.10	二苯胺	0.10	速灭磷	0.05
2	敌敌畏*	0.10	HCB	0.02	敌百虫	0.05
3	乙酰甲胺磷*	0.10	林丹	0.04	庚虫磷	0.02
4	氧(化)乐果	0.10	二嗪农	0.04	四氯硝基苯	0.01
5	毒草胺	0.20	Chlortalonil	0.04	六六六-α	0.01
6	氯苯胺灵	0.10	乙烯菌核利	0.04	六六六-ß	0.02
7	久效磷	0.10	西维因	0.20	氯双脲	0.05
8	乐果	0.04	甲霜灵	0.10	嘧霉胺	0.02
9	五氯硝基苯	0.02	甲基密啶磷	0.10	乙嘧硫磷	0.02
10	硝苯硫磷甲酯	0.10	马拉松	0.10	苯虫威	0.10
11	抑菌灵	0.10	毒死蜱	0.10	嗪草酮	0.05
12	丁苯吗啉	0.10	赛普洛	0.04	甲基立枯磷	0.01
13	三唑酮	0.04	戊菌唑	0.04	利谷隆	0.05
14	涕必灵	0.10	克菌丹	0.10	爱耳德林	0.02
15	甲苯氟磺胺	0.04	福尔培**	0.10	毒壤磷	0.02
16	灭蚜磷	0.10	腐霉利	0.04	三唑醇	0.02
17	久效磷	0.10	硫丹-a	0.04	二硫松亚砜	0.05
18	蚜灭多	0.10	pp-滴滴伊	0.04	二硫松砜	0.20
19	抑霉唑	0.10	白特粉	0.04	氟啶胺	0.02
20	腈菌唑	0.10	硫丹-b	0.04	Chlorbenzilate	0.05
21	苯氧菌酯	0.10	苯草醚	0.04	恶霜灵	0.05
22	戊唑醇	0.10	乙硫磷	0.04	苯霜灵	0.05
23	亚胺硫磷	0.10	三唑磷	0.04	三氯杀螨醇	0.05
24	甲氰菊酯	0.04	硫酸硫丹	0.04	喹螨醚	0.05
25	四氯杀螨砜	0.04	异菌脲	0.04	定菌磷	0.02
26	谷速松	0.10	溴螨酯	0.10	氟丙菊酯	0.05
27	咯菌灵	0.10	甲氧滴滴涕	0.10	联苯三唑醇	0.02
28	乙基谷硫磷	0.10	伏杀硫磷	0.10	高效氟氯氰菊酯	0.05
29	咪鲜安	0.10	氯氟氰菊酯	0.04	顺式氯氰菊酯	0.05
30	氟氰戊菊酯	0.10	二氯苯醚菊酯	0.10	α 氯氰菊酯	0.05
31	顺式氰戊菊酯 (来福灵)	0.04	氯氰菊酯	0.10		
32	嘧菌酯	0.04	氰戊菊酯	0.04		
33			溴氰菊酯	0.10		

* 见讨论 1

** 见讨论 2

三份“实际”提取物的结果见表 4。用 DRS 确证的农药用浅色背景表示。深色背景的分析物是安捷伦 RTL 农药数据库中没有的。余下的没有背景颜色的成分是没有确证的。分析物的浓度由用户用 NPD/ECD 确证。未标浓度的浅色背景分析物用 DRS 检测和确证，但用户没有定量。

表 4. 三份“实际”水果提取物样品的 MSD-DRS 结果

样品 4：葡萄
0.68 mg/Kg 克菌丹
0.21 mg/Kg 赛普洛
0.27 mg/Kg 咯菌腈
N-苯基苯胺
样品 5：柑橘
2.5 mg/Kg 抑霉唑
0.25 mg/Kg Medidathion
3.0 mg/Kg 噻菌灵
样品 6：苹果
0.86 mg/Kg N-苯基苯胺
0.05 mg/Kg 毒死蜱
0.79 mg/Kg 噻菌灵
乐果
甲基对硫磷
乙氧基奎宁
硫酸硫丹
炔螨特

讨论

1. 控制－柑橘加标提取物

这份控制样品加入了 32 种农药，浓度在 0.02 到 0.1 mg/ kg。用 DRS 软件检测并确证了 26 种农药，另两种由于安捷伦农药数据库中没有，所以没有报告，有四种没有检测到。标样是直接加入到原始基质中，而不是提取物中的。极性农药 (甲胺磷和乙酰甲胺磷) 的提取回收率在 20%-30%，由 NPD/ECD 确证。这就是用 DRS 未检测到的原因。

2. 控制-莴苣加标提取物

这份控制样品中加入了 33 种农药，浓度在 0.02 到 0.20 mg/kg。用 DRS 软件检测并确证了 29 种农药，另外三种由于安捷伦农药数据库中没有，所以没有报告，有一种没有检测到。如果将 AMDIS Deconvolution 程序灵敏度设得更高，没有检测到的那一种分析物(福尔培，在表 3 中标了 2 个星)将被检测和确证。

3. 控制－苹果加标提取物

这份控制样品中加入了 30 种农药，浓度在 0.01 到 0.20 mg/kg。用 DRS 软件检测并确证了 22 种农药，另外六种由于安捷伦农药数据库中没有，所以没有报告，有两种没有检测到。

总之，三份控制样品中加入的 95 种分析物，有 93% 是安捷伦 RTL 农药数据库中有的，能够通过 Deconvolution 质谱图的全扫描库检索检测和确证。

4. “实际”葡萄提取物

用户在葡萄提取物样品中检测并确证了三种农药残留物—赛普洛、咯菌腈和 N-苯基苯胺。在这三种分析物中，赛普洛是通过 DRS 确证的，而咯菌腈和 N-苯基苯胺在安捷伦 RTL 农药数据库中没有。但 DRS 还确证有另一种其它的农药残留- N-苯基苯胺，这是用户没有报告的。

5. “实际”的柑橘提取物

用户在柑橘提取物样品中检测并确证了三种农药残留物—抑霉唑、medidathion 和噻菌灵。这三种农药都是用 DRS 软件确证的，没有确证出其它分析物。

6. “实际”的苹果提取物

用户在苹果提取物样品中检测并确证了三种农药残留物—N-苯基苯胺、毒死蜱、噻菌灵。所有这三种农药都是用 DRS 软件确证的。另外，用 DRS 还确证有另外五种农药—乐果、乙氧基奎宁、甲基对硫磷、硫酸硫丹、炔螨特。这些农药是用户没有报告的。

结论

安捷伦科技公司 MSD-DRS 为 MSD 化学工作站软件增加了强大的数据处理功能。处理全扫描气相色谱/质谱数据对农药残留物进行确证，这是一项繁琐、费时的工作，需要有经验的分析人员具备极高的技术、倾注巨大的精力。

DRS 可以在一分钟内对复杂的食品提取物 TIC 进行处理，而有经验的分析人员要得到同样质量的结果则需要 30 多分钟。实验证明 DRS 软件能在最短的时间内提供具有最少假阳性和假阴性结果的报告。

虽然在扫描方式方面，检测限不如选择离子检测 (SIM) 模式低，但 DRS 不需要事先了解任何目标分析物方面的信息（保留时间或特征离子等）。

这份报告中显示的大量数据是在完全为盲样的情况下获得的，表明分析人员可以用 DRS 在几分钟内得到高度可信的结果。

参考文献

1. Philip L. Wylie, Michael J. Szelewski, Chin-Kai Meng, and Christopher P. Sandy, “Comprehensive Pesticide Screening by GC/MSD Using Deconvolution Reporting Software”, Agilent Technologies, publication 5989-1157EN, www.agilent.com/chem

采用 GC/MSD DRS 对残留农药进行全面筛查

应用

食品安全

作者

Philip L. Wylie, Michael J. Szelewski, and Chin-Kai Meng
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

Christopher P. Sandy
Agilent Technologies, Inc.
Block A, CSC Eskdale Road
Winnersh Triangle Estate
Wokingham, Berk RG41 5DZ
United Kingdom

前言

根据农药手册，目前世界上正在使用的农药有 700 多种[1]。大约 600 种农药是过去使用的，但现在已经禁用或不再销售。有一些农药早已不再使用，但它们仍然存在于环境中，还可能在植物和动物体内生物富集。在食品和饮料、在土壤、水和大气、在水生和陆生的动植物、在人类血液、脂肪组织和乳汁中，都能检测到痕量的农药或它们的代谢物。世界卫生组织根据农药对人的急性毒性将农药分成五类[2]。所分成的类别从“有急性毒性”到那些“正常使用时没有急性毒性”的种类。一些农药被归类为持久性有机污染物 (POP)，致癌、致畸或内分泌干扰物。现在分析食品和环境样品中的农药，跟踪它们在环境中的分布以保证食品安全，是一项日常工作。

目前很多分析方法仅仅针对一部分可能存在的化合物。无论是食品还是环境样品，由于其中一些天然产物能够被一起提取出来，分析工作变得较为复杂。食品或组织提取物是非常复杂的样品基质，在分析之前需要进行若干样品净化步骤[3]。即便如此，在残余基质存在的情况下检测痕量的污染物也很困难。

为了提高效率，必须采用多残留方法 (MRM) 分析更多的农药。通常这些方法都采用带有元素选择性检测器的气相色谱仪 (GC) 来确定不同基质中的农药[4,5,6]。气质联用 (GC/MS) 已广泛地用于命中峰的确证。液相色谱 (LC) 常用于分析那些不能采用 GC 分析的化合物[2]。现在，越来越多的农药实验室利用液质联用 (LC/MS) 和气质联用 (GC/MS) 作为基本的分析工具[7,8]。许多多残留方法 (MRM) 仍然是针对部分目标农药而建立的方法。但采用这种多残留方法，任何不在目标化合物列表中的农药都可能会被漏掉。

本文采用保留时间锁定 (RTL)[9，10，11]和谱图解卷积技术[12]，建立了一种能够筛查 567 种农药和可疑内分泌干扰物的简单的 GC/MS 分析方法。谱图解

卷积能够帮助识别农药化合物，即使农药被共流出的基质化合物所包埋，同样也可以被识别。保留时间锁定能够消除假阳性，使结果更可靠。需要时，使用者很容易在该方法中加入新的化合物。

实验部分

表 1 列出了安捷伦公司在农药分析中采用的仪器、软件和分析参数。根据进样量的需要，可以采用 PTV 进样或分流/不分流进样。

样品

蔬菜提取物由美国加州食品农业局 (CDFA；Sacramento，CA USA) 的 Mark Lee 和 Stephen Siegel 博士和新西兰 TNO 营养和食品研究所 (Zeist，The Netherlands) 的 J.G.J.Mol 博士提供。17 个地表水的 GC/MS 分析数据文件也由 CDFA 提供，并在本实验室采用 DRS 进行了处理。17 个作物提取物的 GC/MS 数据文件 (锁定在安捷伦农药分析方法中) 由英国 NRM 实验室 (Berkshire，UK) 提供。

表 1. 分析仪器及条件

气相色谱仪	**Agilent 6890N**
自动进样器	Agilent 7683
进样口	Agilent PTV，溶剂放空模式
色谱柱	Agilent 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm HP-5MS (部件号 19091S-433)
载气	氦气，恒压模式
保留时间锁定	甲基毒死蜱锁定为 16.596 min (额定柱前压=17.1 psi)
柱箱温度程序	70 °C (2 min)，25 °C/min 到 150 °C(0 min)，3 °C/min 到 200 °C (0 min)， 8 °C/min 升至 280 °C (10-15 min)
程序升温汽化 (PTV) 进样口参数	温度程序：40 °C(0.25 min)，1600 °C/min 到 250 °C(2 min)；放空时间：0.2 min； 放空流速：200 mL/min；放空压力：0.0 psi；Purge 吹扫流速：60.0 mL/min； 吹扫时间：2.00 min
进样量：	15 µL (使用 50-µL 注射器)
质量选择检测器 (MSD)	**Agilent 5973 inert**
扫描范围	50–550 amu
离子源，四极杆，传输管线温度	分别是 230，150 和 280 °C
溶剂延迟	4.00 min
倍增器电压	电压自动调谐
软件	
GC/MSD 化学工作站	Agilent p/n G1701DA (Version D01.00 sp1)
DRS	Agilent p/n G1716AA
谱库检索软件	NIST MS 检索 (2.0 版)(包括 NIST'02 质谱谱库， Agilent 部件号 G1033A)
解卷积软件	自动质谱解卷积和识别软件 (AMDIS) (包括 NIST'02 质谱谱库， Agilent 部件号 G1033A)
MS 谱库	NIST '02 质谱谱库 (Agilent p/n G1033A)；Agilent RTL 农药库 (部件号 G1049A)

结果与讨论

保留时间锁定 (RTL) 和 RTL 数据库

保留时间锁定 (RTL) 是由安捷伦公司开发的一种技术，采用这种技术使用者可以在世界上任何一个实验室的任何一台 Agilent 6890 GC 上使分析物的保留时间相匹配，前提是采用相同的常规 GC 方法和毛细管柱[13]。采用 RTL 技术，安捷伦公司开发了几个用于 GC 和 GC/MS 的保留时间锁定数据库，包括每一次进样的锁定保留时间、化合物名称、CAS 号、分子式、分子量和质谱图 (只在 GC/MS 数据库中提供) [14]。安捷伦 RTL 农药库包含了几乎所有可用于 GC 分析的农药和一些内分泌干扰物的信息，共 567 个化合物。要采用以下讨论的 DRS，这个信息库需要转换成 NIST 格式 [15]。AMDIS 所使用的包含有保留时间和化合物信息的谱库是由原来的 RTL 农药库生成得来的。使用者可以很容易在这些库中加入新的农药或其它感兴趣的化合物[15]。

解卷积的基本知识

在 GC/MS 中，解卷积是一种数学技术，它可以将重叠的质谱图“分开”成为“清晰”的单个组分的谱图。图 1 是这个过程的简单示意图。这里分别是总离子流色谱图 (TIC) 和质谱图。与常见的情况一样，这个色谱峰包含了多个重叠在一起的组分，而最高点质谱图实际上也是这些组分的组合图。质谱谱库检索只可能给出一个较差的匹配，而且不能识别所有构成这种组合谱图的单个化合物组分。

解卷积过程是在寻找那些单个丰度在谱图中上下一起波动的离子。它首先校正了四极杆质谱固有的谱图偏斜，为每一个色谱峰得到了一个更准确的顶点保留时间。如图 1 所示，解卷积为每个重叠的组分提供了“清晰”的谱图。在用谱库检索时这些单个谱图就可能得到良好匹配。

这种包括在安捷伦 DRS 软件中的 AMDIS 软件由国家科学技术研究所 (NIST) 提供[12]。

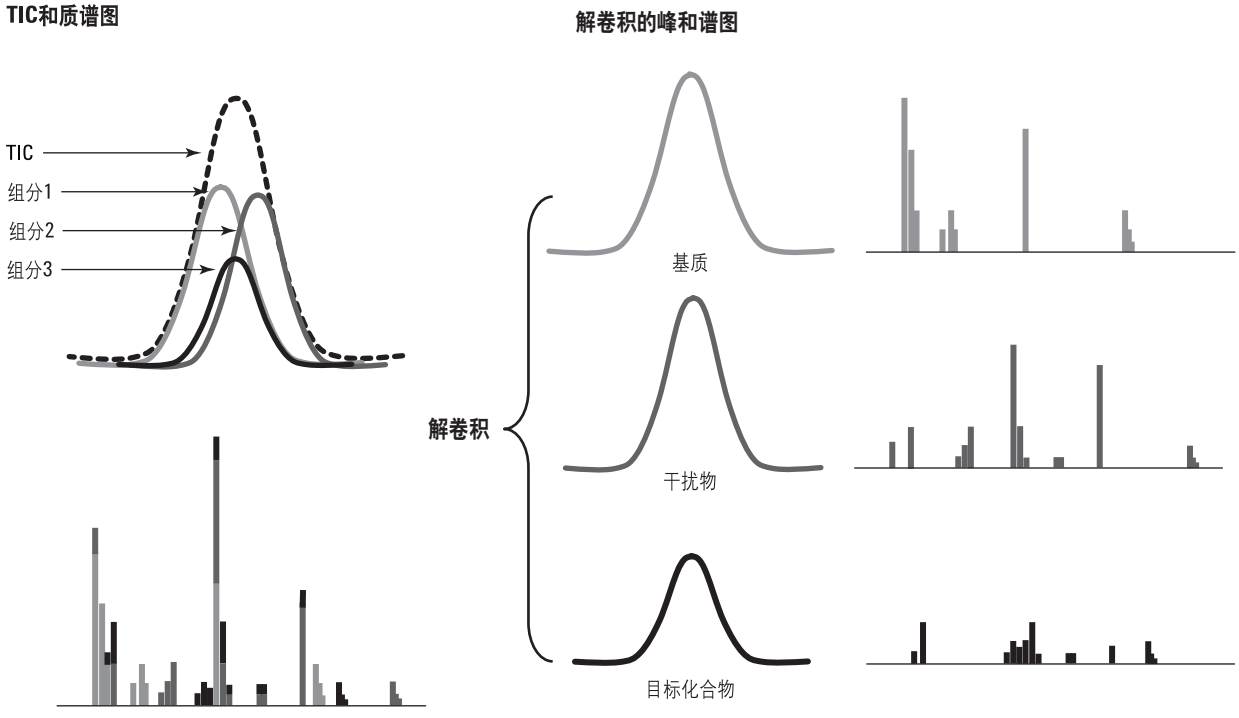


图 1. 质谱图解卷积过程示意图

DRS

安捷伦公司的 DRS 是由三个不同的 GC/MS 软件包组合而成的：1) 安捷伦 GC/MS 化学工作站，2) 带有 NIST‘02 质谱谱库的 NIST 质谱检索程序，3) AMDIS 软件，也来自 NIST。在 DRS 软件中包含有 567 种农药和可疑内分泌干扰物的质谱图和锁定保留时间信息库。

DRS 包括三个独立但互补的数据分析步骤。首先，GC/MS 化学工作站软件采用一个目标离子和 3 个以上的定性离子对目标农药进行常规的定量分析，并报告所检测的校正化合物的含量。对于数据库中的其它化合物，可以采用 DRS 软件提供的平均农药响应系数 (RF) 估算它们的含量值并报告结果。然后，DRS 将数据文件发送到 AMDIS 软件，进行谱图的解卷积并采用解卷积的全谱图在安捷伦锁定保留时间RTL 农药库中进行检索 (以 AMDIS 格式)。在 AMDIS 中可设置一个过滤器，要求分析物的保留时间必须落在由使用者规定的时间窗口。由于 RTL 是用来给出高精度的 RTL 数据库保留时间的，这个窗口可以设得很小，通常为 20 秒或更短。最后，由 AMDIS 找到的所有目标化合物的解卷积的谱图在 147,000 个化合物的 MIST 质谱谱库中进行检索确证。在这一步骤中，不需要保留时间。

一旦建立合适的方法，只需要简单的点击鼠标，DRS 报告就可以生成，如图 2 所示。这个软件可以在每次分析完成时或在分析之后对一个单独的文件或一批文件自动运行。

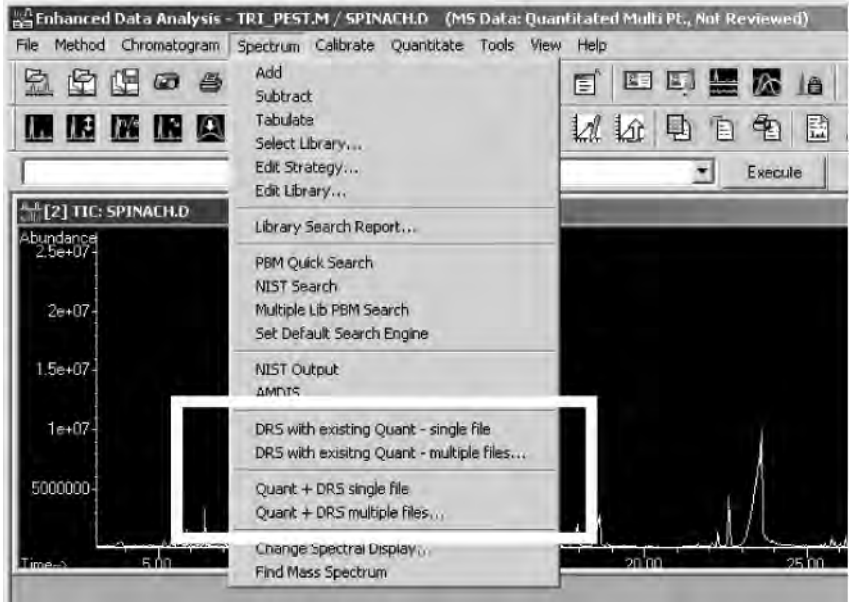


图 2. 化学工作站下拉菜单，示意 DRS 运行单个或多个文件时的选项

中草药混合物中的农药

图 3 是一个中草药混合物的提取液的总离子流色谱图。图 4 是该样品的 MSD 解卷积报告，该报告是以 HTML 格式形成的，以便于通过电子邮件发送或拷贝到电子表格中。选择这个样品是因为草药属于最难分析的植物样品。它们的提取液中含有大量的天然产物会影响农药的分析。

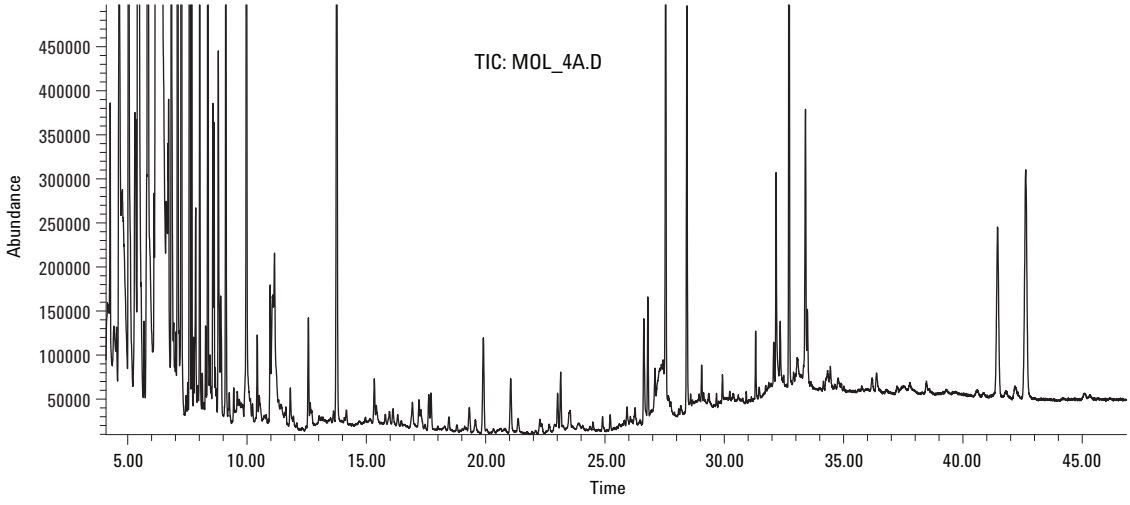
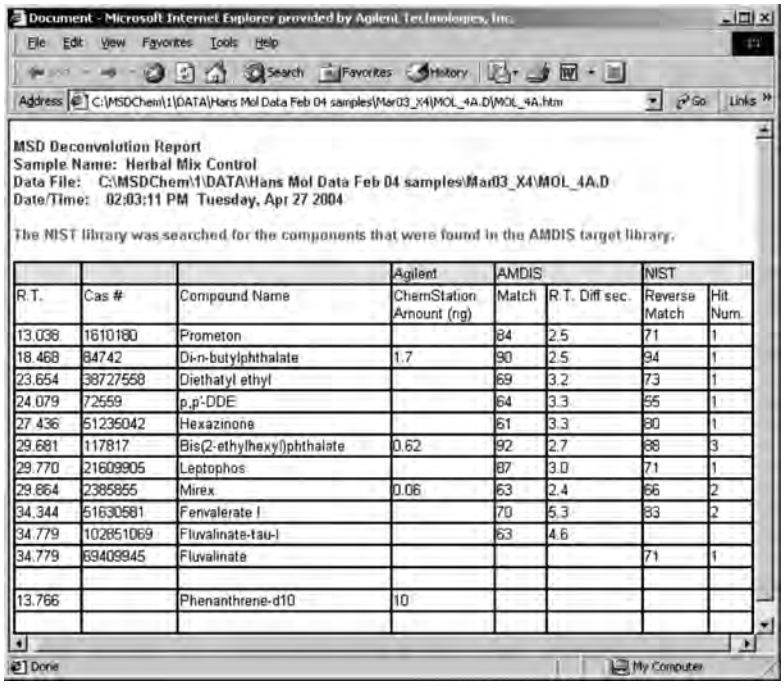


图 3. 一个中草药混合物的总离子流色谱图


Document - Microsoft Internet Explorer provided by Agilent Technologies, Inc.

File Edit View Favorites Tools Help

Address C:\MSDChem\1\DATA\Hans Mol Data Feb 04 samples\Mar03_X4\MOL_4A.D\MOL_4A.htm

MSD Deconvolution Report
Sample Name: Herbal Mix Control
Data File: C:\MSDChem\1\DATA\Hans Mol Data Feb 04 samples\Mar03_X4\MOL_4A.D
Date/Time: 02:03:11 PM Tuesday, Apr 27 2004

The NIST library was searched for the components that were found in the AMDIS target library.

			Agilent	AMDIS		NIST	
R.T.	Cas #	Compound Name	ChemStation Amount (ng)	Match	R.T. Diff sec.	Reverse Match	Hit Num.
13.036	1610180	Prometon		84	2.5	71	1
18.468	84742	Di-n-butylphthalate	1.7	90	2.5	94	1
23.654	38727558	Diethatyl ethyl		69	3.2	73	1
24.079	72559	p,p'-DDE		64	3.3	55	1
27.436	51235042	Hexazinone		61	3.3	80	1
29.681	117817	Bis(2-ethylhexyl)phthalate	0.62	92	2.7	88	3
29.770	21609905	Leptophos		87	3.0	71	1
29.864	2385855	Mirex	0.06	63	2.4	66	2
34.344	51630581	Fenvalerate I		70	5.3	83	2
34.779	102851069	Fluvalinate-tau-I		63	4.6		
34.779	69409945	Fluvalinate				71	1
13.766		Phenanthrene-d10	10				

Done My Computer

图 4. 图 3 所示中草药提取物的质谱解卷积报告

图 4 中的 DRS 报告列出了每个命中峰的保留时间、CAS 序号和化合物名称。报告下端列出的菲 -d_{10} 是内标物 (ISTD)，化学工作站利用它来估算所检出的每个化合物的含量。由于所有的 567 种目标化合物都采用了一个平均农药响应因子，因此第 4 列列出的含量值仅仅是估算值。实验表明，报告中大多数采用平均农药响应因子得到的含量估算值都落在它们真实值的 10 倍范围内。准确的定量要求采用常规的农药标准品进行校正，但对于数据库中所有的农药进行逐一校正是很难实现的。在实验室通常可以对一部分目标农药制备校正曲线，对数据库中的其它化合物则采用它们的平均响应因子来进行计算。采用这种方法，当一种新的化合物被检出，实验室很快可以得到其含量的估算值并决定是否需要将它加入校正列表。

报告的第 5 列列出了利用 AMDIS 进行去卷积并采用解卷积的全谱图在保留时间锁定 (RTL) 农药库中进行检索得到的匹配系数。在本例中，AMDIS 比化学工作站软件识别出了更多的目标化合物 (如扑灭通和 p,p'-DDE)，这是一个典型的复杂样品。当得到锁定的保留时间后，在 AMDIS 软件中可设置一个保留时间范围是一个重要的优点。此时，那些落在数据库保留时间 RT ± 10s 范围之外的峰被去掉。第 6 列列出了化合物的信息库 RT 值和它们在色谱图上的真实保留时间值之间的差别 (单位是秒)。

图 4 说明除农药以外，该软件还识别了两个邻苯二甲酸酯类 (可疑的内分泌干扰物)。邻苯二甲酸酯类在环境中普遍存在，极难从背景中除去。在这种情况下，没有采取措施去确定这些邻苯二甲酸酯类是从样品中提取出来的还是在实验中引入的。

DRS 报告中的最后两列列出了所有的 AMDIS 峰在 NIST 147,000 个化合物质谱谱库中进行检索的结果。当 NIST 谱库检索发现一个化合物属于匹配的前 100 个 (可由使用者设定)，与 AMDIS 的结果一致，它的匹配系数就被列在第 7 列。命中峰的序号列在最后一列，在 NIST 中“1”表示是最好的匹配 (匹配系数最高值)。有时 NIST 谱库检索找不到谱图匹配前 100 名的 AMDIS 命中峰。这时，报告中的下一行列出了该谱图的最佳谱库匹配。氟胺氰菊酯 (图 4) 就是一个例子，该化合物在 34.779 min 流出。下一行列出了氟胺氰菊酯，它是那个谱图的最佳 NIST 谱库匹配。此时，在 NIST 质谱谱库中没有化合物与氟胺氰菊酯有相同的 CAS 序号。事实上，氟胺氰菊酯 -tau-I 是一个 D 型异构体，而氟胺氰菊酯是 DL 异构体混合物。

DRS 和传统数据处理进行盲样的比较

比较表明，从复杂样品例如食品和环境基质中识别目标化合物方面 DRS 比传统方法优越得多。下面是两个相关的研究。第一例情况，英国 Berkshire 的 NRM 实验室采用安捷伦保留时间锁定农药方法分析了 17 个未添加农药的作物样品。将得到的数据文件 (不是他们所列出的农药命中峰) 发送到安捷伦采用新的 DRS 进行分析。表 2 比较了两个实验室的分析结果。采用手动数据处理，NRM 从 17 个样品中检出了 28 种农药，其中 4 种低于它们的最低校正水平。采用同样的数据文件，DRS 检出了 33 种农药。

安捷伦的自动方法没有识别春季洋葱样品中的嘧菌酯，因为它不包括在 RTL 农药库中。但是它能够被 NIST 谱库找到，它在 403 amu 处有分子离子，而 NRM 采用的方法只扫描到 400 amu。DRS 方法确证了所有四种低于 NRM 校正范围的农药，并找到了在它们的方法中没有包括的另外五种化合物 (特草定、嘧霉胺、甲硫威、哒螨灵和霜霉威)。

手动和自动方法的一致性很好。但是，DRS 能找到更多的农药，它能够找到那些被手动方法漏掉的化合物。此外，采用手动数据处理分析 17 个样品需要花费一个化学家大约 7 小时，而 DRS 只需要计算机花 50 分钟即可完成。

表 2. 在 17 个空白作物样本中采用传统数据处理和安捷伦 DRS 软件检出的农药对比。只有一种方法检出的农药加有下划线

样品	Agilent DRS 结果*	NRM 手动分析**
芫荽	炔苯酰草胺	炔苯酰草胺
	氯酞酸甲酯	氯酞酸甲酯
	p,p'-DDE	p,p'-DDE
迷迭香	特草定	未检出***
	抗蚜威	抗蚜威
	氯酞酸甲酯	氯酞酸甲酯
春季洋葱	炔苯酰草胺	炔苯酰草胺
	嘧霉胺	未检出***
	抗蚜威	抗蚜威
	甲霜灵	甲霜灵
	异菌脲	异菌脲
	不在 DRS 谱库†	嘧菌酯
细香葱	甲硫威	未检出***
	异菌脲	异菌脲
樱桃番茄	腐霉利	腐霉利
	哒螨灵	未检出***
小胡瓜	霜霉威	未检出***
茄子	腐霉利	腐霉利
	噻嗪酮	噻嗪酮
	硫丹硫酸盐	硫丹硫酸盐
	异菌脲	异菌脲
平叶欧芹	氯酞酸甲酯	氯酞酸甲酯
生菜	异菌脲	异菌脲†††
生菜	乐果	乐果
	甲霜灵	甲霜灵
	腐霉利	腐霉利
	戊唑醇	戊唑醇
	氧乐果††	氧乐果
细菊苣	腐霉利	腐霉利
	高效氯氟氰菊酯	高效氯氟氰菊酯
红马铃薯	氯苯胺灵	氯苯胺灵
	抗蚜威	抗蚜威†††
细菊苣	抗蚜威	抗蚜威†††

* 采用安捷伦 DRS 软件重新分析 NRM 数据文件找到的农药。

** NRM 采用目标农药分析和手动确认找到的农药。

*** 不在 NRM 目标化合物列表中的化合物。

† 不包括在安捷伦 RTL 农药库或 DRS 软件中的化合物。

†† 安捷伦化学工作站找到的化合物，但在去卷积之后的 AMDIS 或 NIST 谱库检索中未被找到。经过仔细研究，判断样品中不含氧乐果。

††† 检出但低于校正范围的化合物。

地表水样品的分析：在另一个研究中，CDFA 分析了 17 个地表水提取物中的农药。图 5 是两个典型样品的 TIC 总离子流色谱图。CDFA 采用保留时间锁定 (RTL) 和 RTL 数据库检索，但没有使用谱图解卷积。同样的数据文件采用 DRS 进行对比分析。

表 3 列出了对 17 个 CDFA 样品的手动分析和 DRS 分析的对比结果。CDFA 在 17 个样品中检出 38 种农药命中峰，一些命中峰是在不同样品中的相同农药。一个熟练分析人员花费了大约 8 小时进行结果分析，包括去掉假阳性并确证所有的命中峰。DRS 找到了 CDFA 检出的 37 种化合物并识别了 CDFA 的一个假阳性的命中峰。此外，还检出了另外 34 种农药，17 个样品中一共识别了 71 个命中峰。这个过程完全自动化，仅仅是计算机花费了大约 20 分钟时间处理所有的数据文件。

表 3. 采用 GC/MS 分析 17 个地表水样品的结果比较。CDFA 采用 RTL 和 RTL 数据库检索，但没有去卷积。相同的数据文件也采用安捷伦 DRS 软件进行了分析

	CDFA	DRS
农药命中峰的个数	37 个	相同的 37 个+另外 34 个
假阳性个数	1	0
分析所需时间	~8 小时	20 分钟

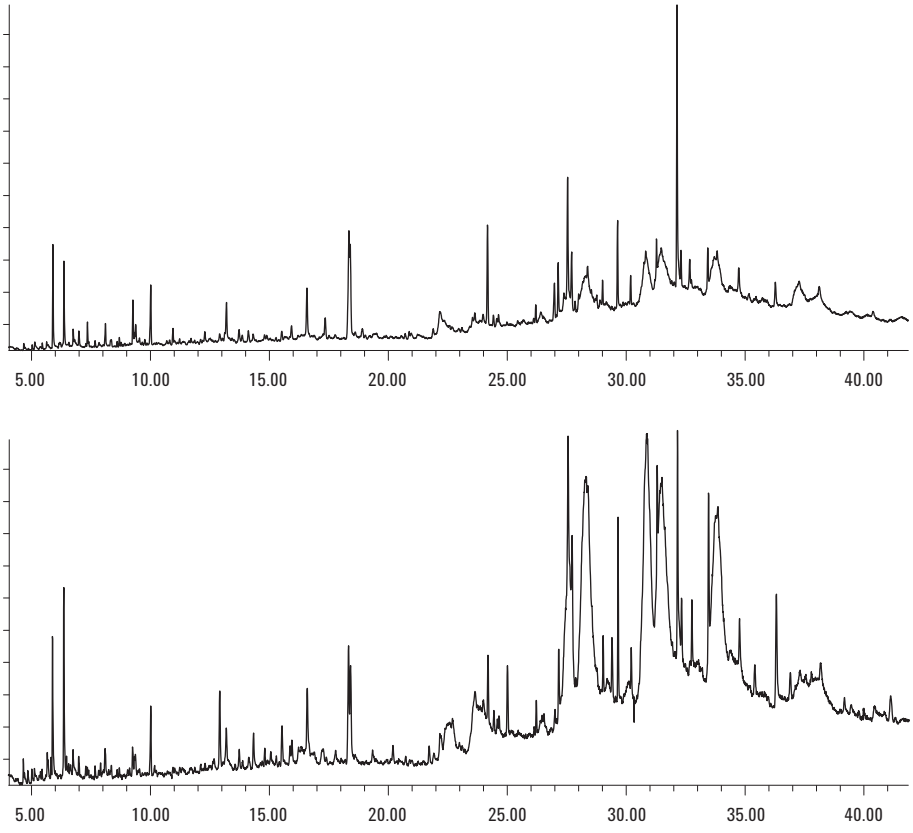


图 5. 典型的地表水提取物的 TIC 谱图 (CDFA 提供)

结论

安捷伦公司新的农药分析 DRS 给实验室带来了一些真正的便利。

- **容易使用：**该软件使用十分简单，不会比使用 6890N/5973 inert GC/MS 系统需要更多的技术。使用者不需要学习有关复杂的解卷积知识或掌握一个新的软件包
- **自动化：**解卷积报告能够在每运行一次后自动生成，也可以将一批样品一起处理
- **节约时间：**数据处理的时间从几小时缩短为几分钟
- **质量：**它给出的报告假阳性和假阴性最少
- **重现性：**分析结果不取决于操作者的技术或经验
- **准确度：**本文讨论中进行的比较说明 DRS 在识别农药方面比手动数据分析具有更高的准确度。它对于相对复杂一些的样品尤其适用，因为这些样品的共提物基质组分可能会掩盖痕量的目标农药
- **全面：**该方法采用一次简单的 GC/MS 运行即可筛查几乎所有可采用 GC 分析的农药和一些可疑的内分泌干扰物。该方法共包括 567 种化合物，是现有的最全面的农药筛查工具。在需要时使用者还可以在方法中加入更多的化合物
- **提供定量、半定量和定性结果：**所有校正化合物都可以定量检测。其它任何一种化合物的含量都可以采用由软件提供的平均农药响应因子进行估算

DRS 的使用并不仅仅局限于农药分析中。其它目标化合物质谱谱库也可以转成 AMDIS 格式来使用这个软件。例如，可以利用已有的毒物、香精香料、有机污染物等的谱库。使用者甚至可以利用 DRS 建立自己的谱库。虽然并不是必需要求，但对每一次进样都建立一个包含有锁定保留时间的 RTL 信息库是很有好处的，因为这样将给出最少的假阳性结果。

参考文献

1. C.D.S Tomlin，编著.农药手册，第 13 版，英国作物保护署，Surry，英国 (2003)。
2. http://www.who.int/pcs/docs/Classif_Pestic_2000-02.pdf
3. J. Cook，M.P. Beckett，B. Reliford，W. Hammock，and M.Engel(1999)*J. AOAC Int.*，**82**(6)，1419-1435。
4. M.A. Luke，J.E. Froberg，and H.T. Masumoto，(1975) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **58**，1020-1026。
5. M. Luke，J. Froberg，G. Doose，and H. Masumoto，(1981) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **64**，1187-1195。
6. B. McMahon，N.Hardin (1994) 农药分析手册，第 1 卷，第 3 版，美国食品药品管理局 (FDA) Washington，DC。
7. J. Fillion，R. Hindle，M. Lacroux，and J. Selwyn(1995)*J. AOAC Int.* **78**，1252-1266。
8. J. Fillion，F. Sauvé，and J. Selwyn (2000) *J AOAC Int.*，**83**，698-712。
9. P. Wylie and B. Quimby，“一种筛查 567 种农药和可疑内分泌干扰物的方法”，安捷伦科技，publication 5967-5860E www.agilent.com/chem。
10. H. Prest，P. Wylie，K. Weiner，and D. Agnew，“采用 6890/5973 GC/MSD 系统有效筛查农药和内分泌干扰物。安捷伦科技，publication 5968-4884E www.agilent.com/chem。
11. K. Weiner and H. Prest，“保留时间锁定：创建用户保留时间锁定筛查信息库”，安捷伦科技，publication 5968-8657E www.agilent.com/chem。
12. 国家标准和技术研究所 (NIST)，AMDIS 文化和下载网站：http://www.amdis.net/What_is_AMDIS/AMDIS_Literature_and_Downloads/amdis_literature_and_downloads.html.

13. V. Giarocco，B. Quimby and M. Klee，“保留时间锁定：概念和应用”，安捷伦科技，publication 5966-2469E www.agilent.com/chem.

14. http://www.chem.agilent.com/cag/servsup/usersoft/main.html#RTL.

15. M. Szelewski and C.K. Meng，“创建和编辑保留时间锁定筛查数据库和信息库”，安捷伦科技，publication 5989-0916EN www.agilent.com/chem.

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/µL) 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	Lncluded
Subtraction mode	Average start/stop
Screen database	RtIpest.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。

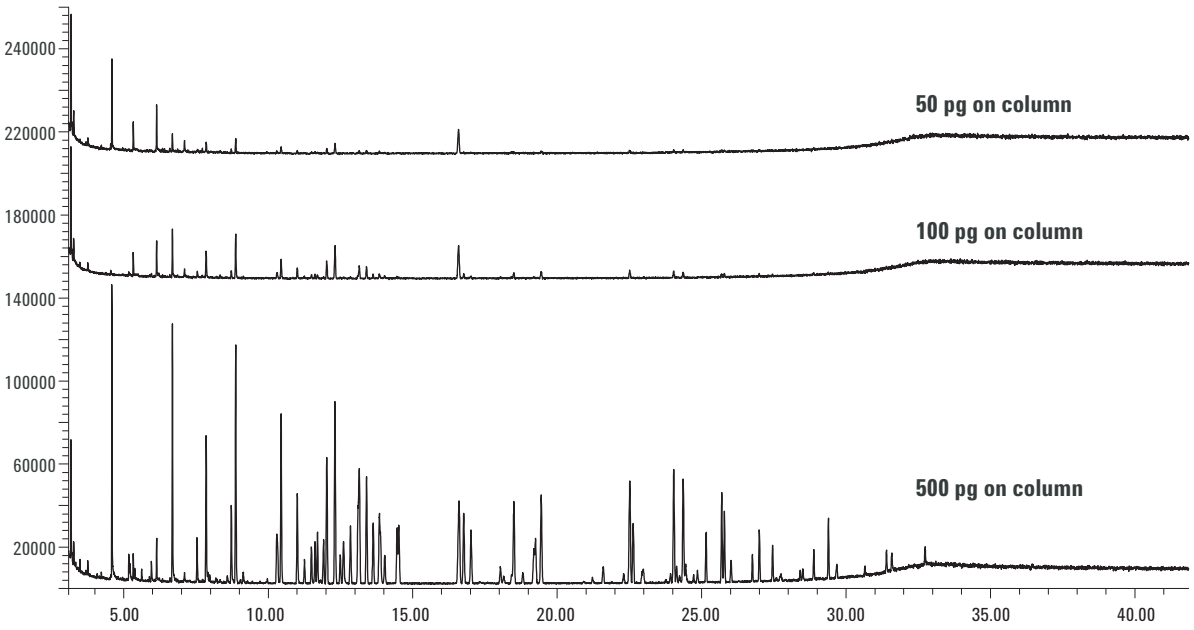


图 1．80 种农药进样量为 50、100 和 500 pg，1 µL 不分流进样的总离子流图 (TIC)

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。

Scdlist.txt - Notepad

File Edit Search Help

SCD Compound List Report

Screen Database : C:\DATABASE\RTLPEST.SCD
Total SCD Cpnds : 567

Cpd#	Compound Name	TIon	Exp_RT	Q1	Q2	Q3
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	Dimefox	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

3. 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。

4. 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。

5. 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	Ethalfluralin	**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。

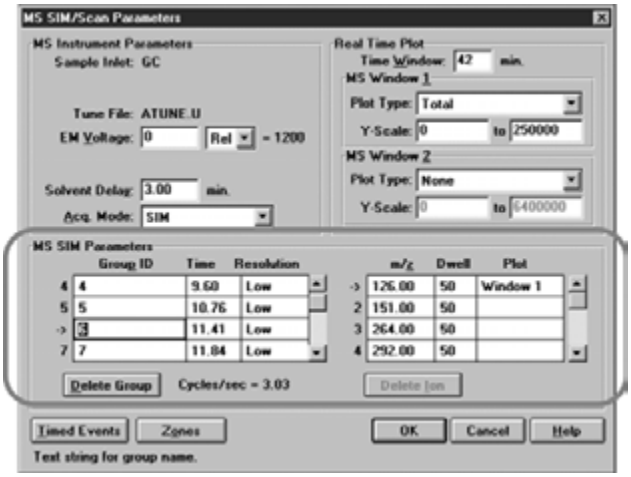


图 4. MSD ChemStation 软件的屏幕截图，显示了 MS 和 SIM 参数。SIM 参数（组 ID，组保留时间和离子）都从图 3 得到

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)。

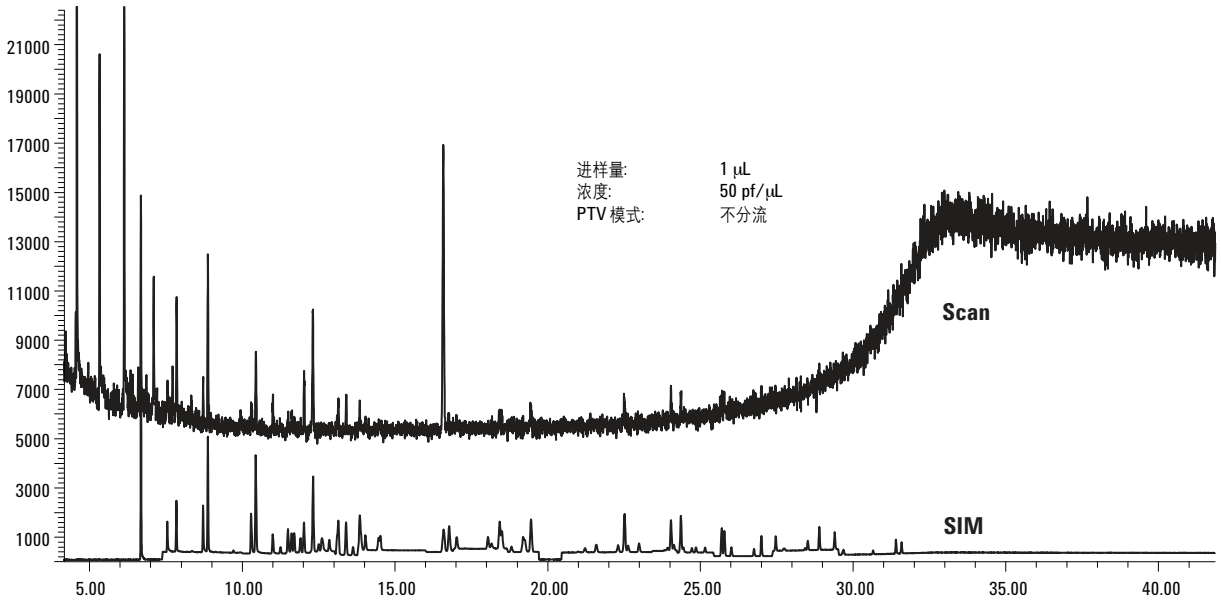


图 5. 50 pg/µL 样品 1 µL 不分流进样的全扫描模式和 SIM 模式色谱图

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。

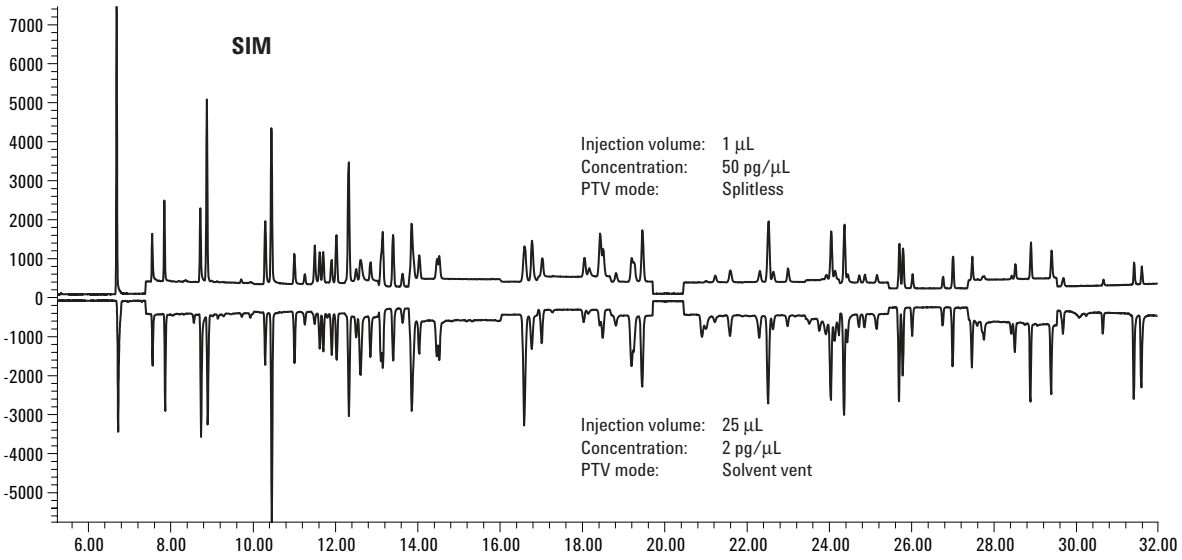


图 6. 50 pg 柱头进样，分别使用 1 µL 不分流进样或 25 µL 溶剂排放进样的 SIM 方法结果

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。

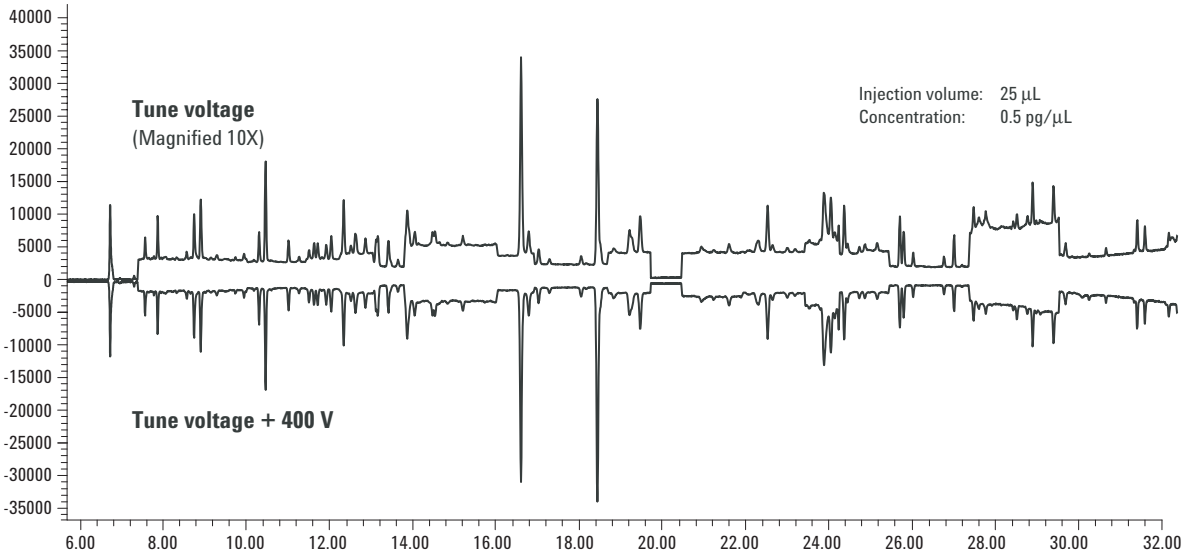


图 7. 12.5 pg 柱头进样，使用 EMV 调谐电压或增加 400 V 的 SIM 方法结果

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。

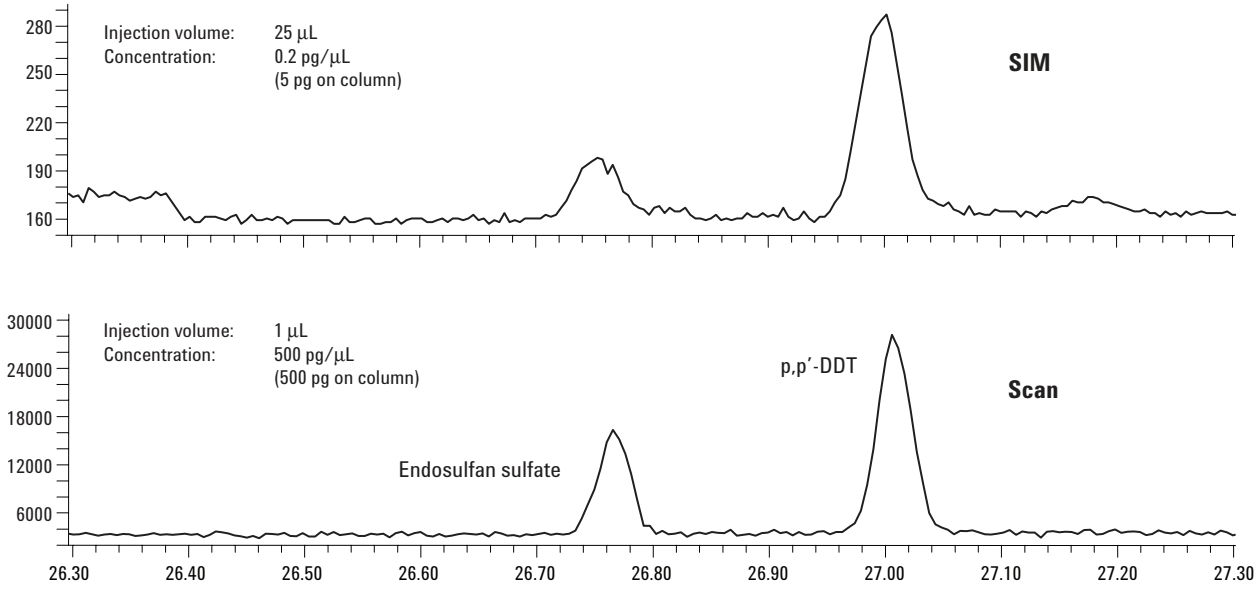


图 8. 浓度为 0.2 pg/µL 与 500 pg/µL 的硫丹硫酸盐和 p,p'-DDT 样品离子色谱图。上半部分色谱图为 25 µL 溶剂—排放进样 /SIM 方法；下半部分色谱图为 1 µL 不分流进样 / 全扫描方法

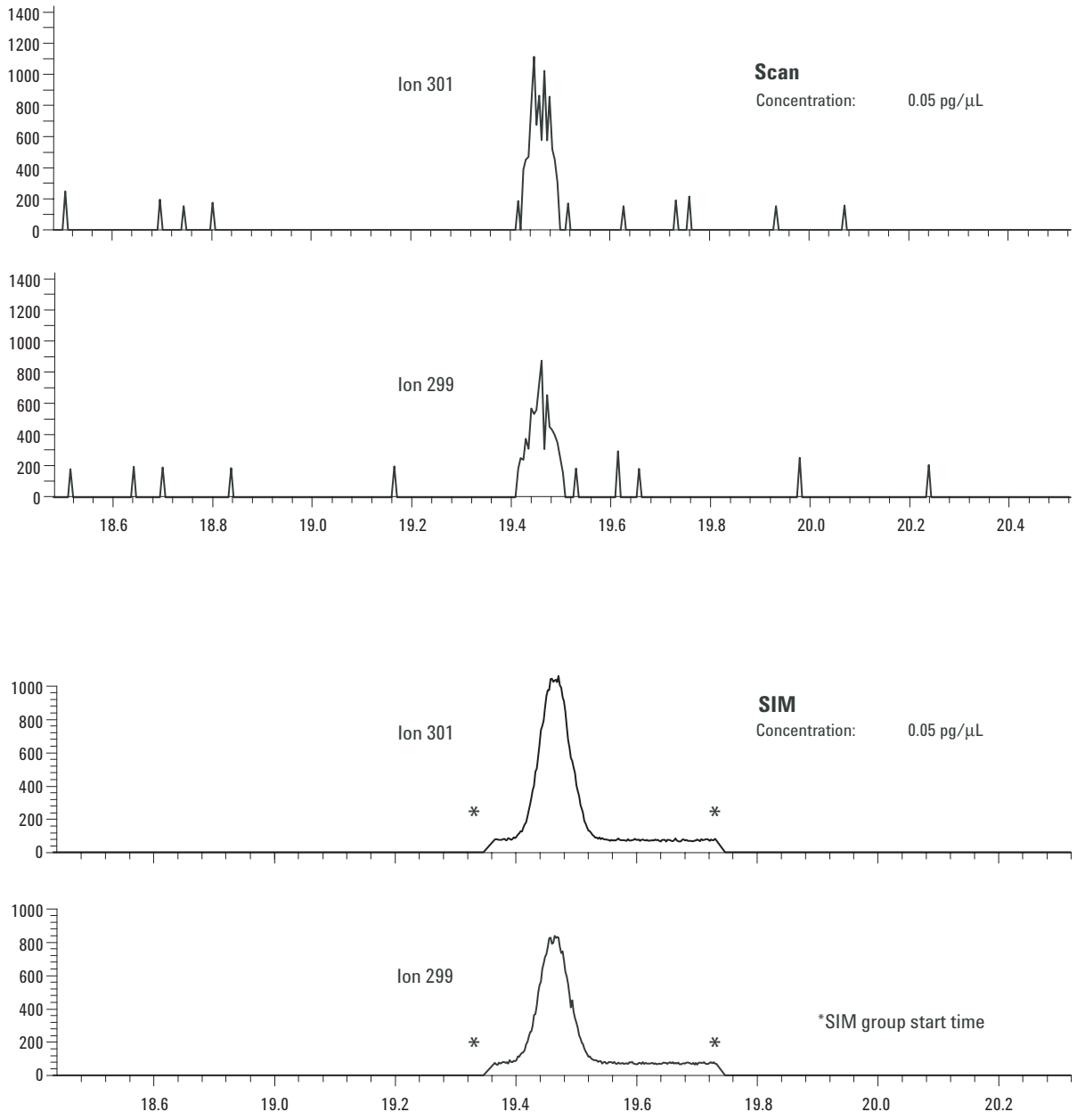
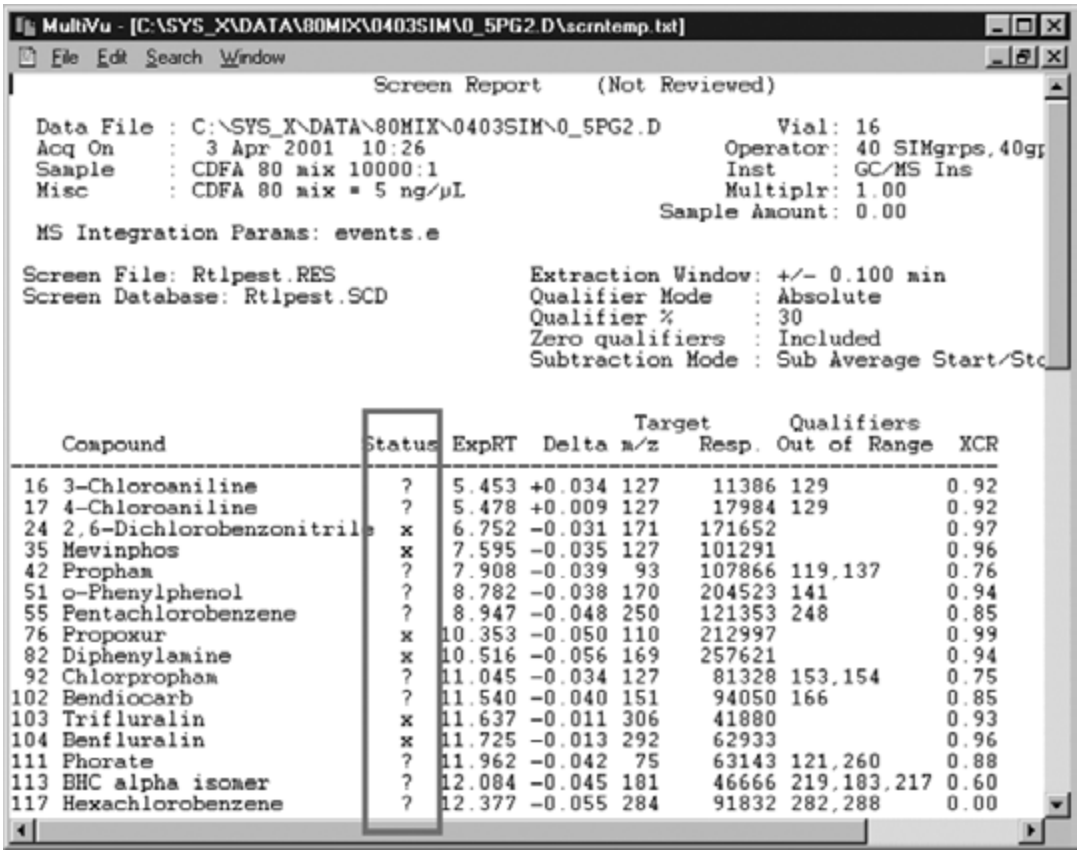


图 9．进样 100 µL 的 0.05 pg/µL 敌草索样品的离子色谱图。上面部分为全扫描运行方法运行，下面部分为 SIM 方法运行

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 ChemStation 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 pg/µL 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\scrntemp.txt]

File Edit Search Window

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/µL 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	Propham	?	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/µL）的目标化合物也可以定量。

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

气相色谱 / 质谱法分析食品中的丙烯酰胺

应用

食品安全

作者

Bernhard Rothweiler
Agilent Technologies
Deutschland GmbH
Hewlett-Packard Strasse 8
76337 Waldbronn
Germany

Eberhardt Kuhn
Agilent Technologies, Inc.
91 Blue Ravine Road
Folsom, CA
USA

Harry Prest
Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd.
Santa Clara, CA
USA

摘要

要揭示烹调食物中有无丙烯酰胺，需对可疑食品进行检测。经典的方法是用水从食品中提取出丙烯酰胺，再将其转化成溴化衍生物。本文描述了这些衍生物的电子轰击和正离子化学电离响应和谱图。另外，还介绍了一种更直接、更简便的方法，包括丙烯酰胺提取和直接进样，并用正离子化学电离进行分析。这种监测方法快速、可靠、检测限低。

引言

2002 年 4 月瑞典国家食品管理部的科学家们宣布，油炸和烤制食品中丙烯酰胺 (2-propenamide) 的量超过水中许可量的许多倍，说明对人体暴露量比过去预计的要大得多[1-3]。丙烯酰胺（图 1），一种已知的神经毒素，对人类很可能是一种致癌物质。世界卫生组织认为水中丙烯酰胺的量最多不能超过 0.5 µg/L。但是，食品如炸薯条、烤薯片、烤面包片以及其它常见烹制食品中丙烯酰胺含量却在 100 到 1000 µg/kg。生的食品中没有发现丙烯酰胺，煮制食物中的量也没有达到检测限。最近的研究表明，丙烯酰胺是通过 Maillard 反应形成的，当氨基酸和糖（例如，天门冬酰胺和蔗糖）一起加热时就会发生这种反应。如此高浓度丙烯酰胺的发现，引发了对各种食品中丙烯酰胺的研究。

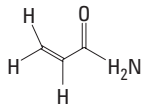


图 1. 丙烯酰胺（2- 丙烯酰胺），CH_2=CHCONH$_2$，71.08 g/mole，CAS 号 79-06-1

丙烯酰胺分析方法

已经有许多种仪器分析方法用于测定丙烯酰胺。最近

的方法是用液相色谱接串联质谱 (MS-MS) 检测，大约能测定 50 µg/kg (ppb) 或更低，用 72 到 55 *m/z* 转换 (例如,[5])。这个方法由于样品制备简便，很有吸引力。用电子轰击 (EI) 电离 MS 检测的气相色谱法，通常因分子较小而需要衍生化。本文介绍的是另一种气相色谱 / 质谱 (GC/MS) 方法，能够更快地进行筛查，象常规方法一样，最后定量也要通过衍生化。这是丙烯酰胺快速、相对简便的分析方法。

用 GC/MS-SIM 正离子化学电离进行快速筛查

丙烯酰胺 EI 电离质谱（图 2）得到的都是很低质量数的离子：71、55、44 *m/z*。虽然在低于 ng 水平有较高的强度，但这些离子容易受食品样品的干扰。正离子化学电离 (PCI) 质谱图是用氨气得到的，离子化选择性更高，比 EI 更适合于食品基质的分析，图 3。氨 PCI 产生两个离子：72 *m/z*，质子化分子，$[M+H]^+$，和加合离子 89 *m/z*，$[M+NH_4]^+$。PCI 对丙烯酰胺的分析具有良好的选择性和灵敏度 - 能检测到 pg 水平。

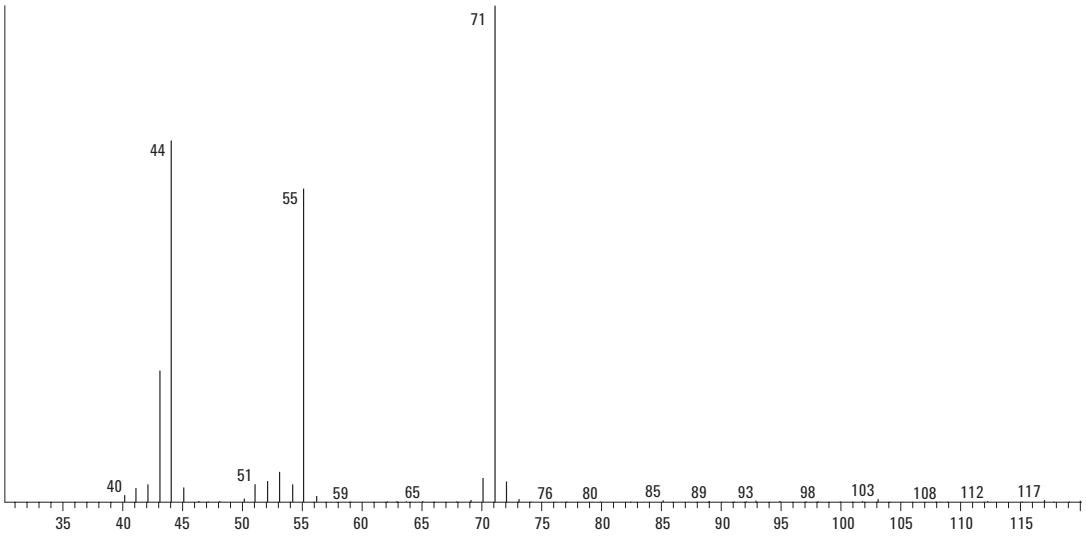


图 2. 丙烯酰胺的 EI 电离质谱图 (40-120 amu)

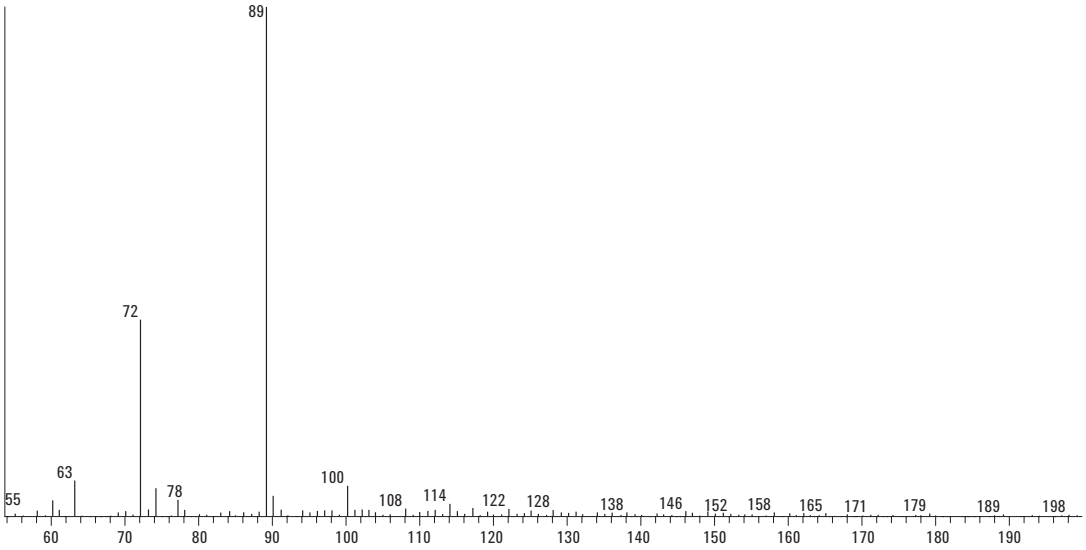


图 3. 丙烯酰胺与氨反应气（简称氨气）的 PCI 质谱图 (60-200 amu)

图 4 显示了仪器参数一节中提到的方法所得 100 pg - 10 ng 的校正曲线

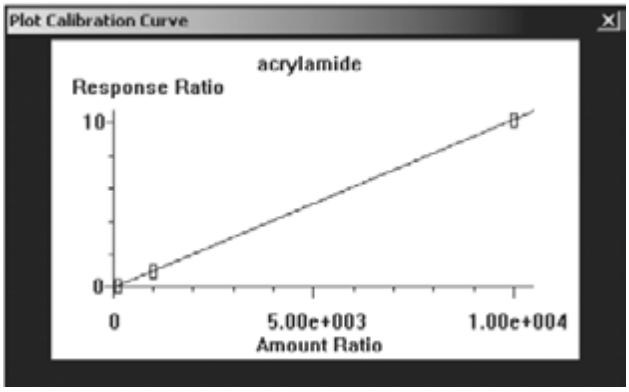


图 4. 100 pg 到 10 ng PCI- 氨 SIM 校正曲线 (R^2=1.00)

PCI 提高了特异性，用这种方法可以进行快速筛查，只需要对样品进行非常简单而快速的净化。食品样品均质、磨碎后，取 0.4 g 样品转入离心管中。样品用 1 mL 甲醇：水 (9:1 v/v) 溶液在超声清洗器中提取 10 分钟。超声前，先将 1 µg 标记的 $^{13}C_3$- 丙烯酰胺加到 1 mL 溶液里。超声后，样品在 8000 rpm 下离心 5 分钟。取出上清，液转移到样品瓶中，进样，用 GC/MS-PCI 选择离子检测 (SIM) 分析。丙烯酰胺 PCI 监测方法的参数见表 1。

表 1. PCI 监测丙烯酰胺的 GC/MS 仪器方法参数

进样口参数		
衬管：		安捷伦部件号 5062-3587，单锥形，带玻璃毛
温度：		220 °C
模式：		脉冲不分流
脉冲压力：		30.0 psi
脉冲时间：		1.20 分钟
吹扫流量：		50.0 mL/min
吹扫时间：		1.20 分钟
总流量：		54.7 mL/min
省气模式：		关闭
柱箱参数		
柱箱最高温度：		260 °C
柱箱平衡时间：		0.20 分钟
初始温度：		60 °C
初始时间：		1.00 分钟
升温速率	温度	时间
12 °C/min	230 °C	10.00 分钟
运行时间		25.17 分钟
柱参数		
毛细管柱		安捷伦 19091X-136 HP-INNOWax
最高温度：		260 °C
长度：		60.0 m
直径：		250.00 µm
膜厚：		0.25 µm
载气：		氦气
模式：		恒流 2.0 mL/min
出口和压力：		MSD 真空
MSD 参数		
溶剂延迟		7.00 分钟
调谐：		PCI 氨气 (1.2 mL/min)
EM 设置：		PCI 自动调谐 + 400 V
离子源温度：		250 °C
四极杆温度：		150 °C
SIM 参数		
分辨率：		高
组离子		驻留时间 (ms)
72.0		60
75.0		60
89.1		60
92.1		60

筛查方法结果与讨论

图 5 显示了一种白面包样品的萃取离子流图。由于 PCI 的选择性，在丙烯酰胺附近的基线几乎没有波动。提取浓度大约为 34 ng/mL 或每克白面包 85 ng。当氨基酸和糖在一起加热时会生成丙烯酰胺，因而有理由怀疑进样过程中在进样口内也可能生成丙烯酰胺。为了试验这种可能性，在白面包提取物中添加 100 ng 丙烯酰胺，再进行分析。测定结果是 135 ng/mL，表明，由于进样口温度相对较低或者脉冲压力进样方式使样品在内衬管中滞留时间较短，减缓了样品中丙烯酰胺的形成，或衬管中生成的丙烯酰胺重复性。这可能不代表所有提取物或所有相似条件下的情况。

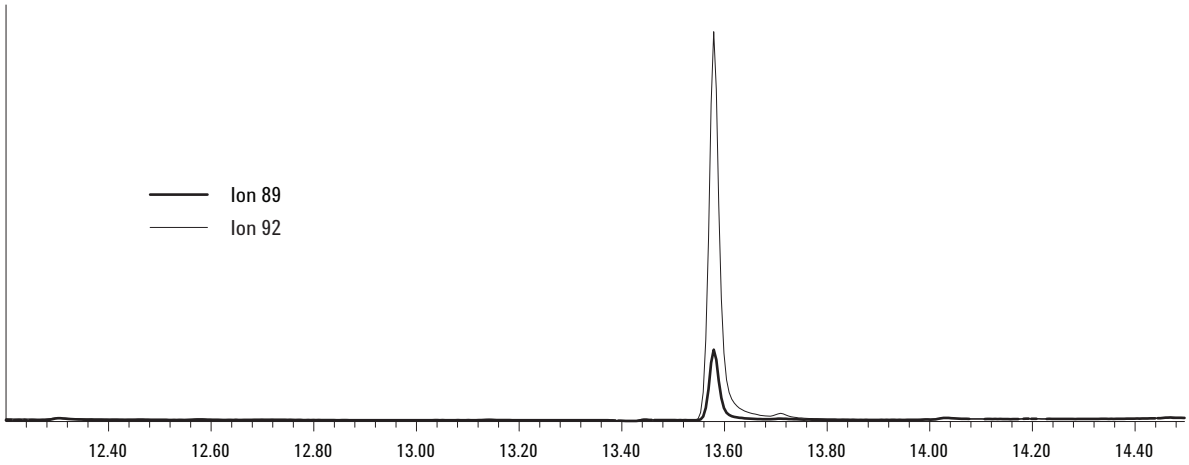
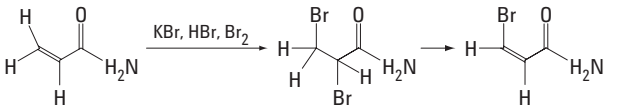


图 5. 白面包样品中丙烯酰胺 (84 ng/g) 的萃取离子流图

丙烯酰胺及其衍生物的 GC/MS 方法

另一种方法是用水从食品中提取，原位衍生，液液萃取[6,7]。在这一方法中，用（热）水按 1 g : 10 mL 的比例从均质化样品中提取丙烯酰胺。随后加入一种强溴化试剂，使其发生反应。反应将丙烯酰胺转变成2,3-二溴丙酰胺。加入硫代硫酸钠去除剩余的溴化试剂，并将溶液离心和/或过滤。2,3-二溴丙酰胺经提取进入乙酸乙酯层。一种选择是进一步处理这种衍生物，使其形成更稳定的分析物 2-溴丙酰胺。全部化学反应见方程式 1。甲基丙烯酰胺，CH_2=CH(CH_3)$CONH_2$常被用作回收替代物，所以这里对其行为有所报导。



2,3-dibromopropionamide
$C_3H_5Br_2NO$
mol. wt. 230.9 g/mole

2-bromopropenamide
C_3H_4BrNO
mol. wt. 150.0 g/mole

方程式 1

实验

丙烯酰胺和甲基丙烯酰胺纯品 (Sigma-Aldrich公司) 溶于 HPLC 级甲醇。1 mg/mL标记的丙烯酰胺，1,2,3-$^{13}C_3$ 丙烯酰胺，甲醇溶液（剑桥同位素实验室，Andover，MA）。溴化剂溶液按文献[6]，用试剂级 KBr、HBr 和溴水（VWR 旧金山，CA）制备。1N 硫代硫酸钠（VWR，旧金山，CA）。衍生化反应也按文献[6]进行，将 1 mL 溴化剂加至含丙烯酰胺的溶液中；衍生化过夜，用 1 滴 1N 硫代硫酸钠中和，再用 1 mL 乙酸乙酯（农药级，VWR）提取。二溴衍生物直接进样。加三乙胺生成单-溴衍生物。

表 2 和表 3 列出了分析二溴丙烯酰胺和溴化丙烯酰胺的仪器条件。所有数据是以 2 µL 进样量采集的。

表 2. 用 EI 和甲烷与氨 PCI 分析二溴丙烯酰胺（丙烯酰胺的二溴化衍生物）的 GC/MS 仪器方法参数

进样口参数		
衬管：		安捷伦部件号 5181-315，双锥形
温度：		250 °C
模式：		脉冲不分流
脉冲压力：		30 psi
脉冲时间：		1.20 分钟
吹扫流量：		50.0 mL/min
吹扫时间：		1.20 分钟
总流量：		54.7 mL/min
省气模式：		打开
柱箱参数		
柱箱最高温度：		325 °C
柱箱平衡时间：		0.50 分钟
初始温度：		50 °C
初始时间：		1.00 分钟
升温速率	温度	时间
45 °C/min	300 °C	2.00 分钟
运行时间		8.56 分钟
柱参数		
毛细管柱		安捷伦 122-3832 DB-35 ms
最高温度：		340 °C
长度：		30 m
直径：		250 µm
膜厚：		0.25 µm
载气：		氦气
模式：		恒流
		1.2 mL/min
出口和压力：		MSD 真空
EI 和 PCI MSD 参数		
溶剂延迟		5.00 分钟
EI 参数		
EI 调谐		自动调谐
EM 设置		自动调谐 + 400 V
离子源温度		230 °C
四极杆温度		150 °C
EI SIM 参数		
分辨率		低

（待续）

表 2. 用 EI 和甲烷与氨 PCI 分析二溴丙烯酰胺（丙烯酰胺的二溴化衍生物）的 GC/MS 仪器方法参数 (续)

组离子	驻留时间 (ms)
2,3 二溴丙烯酰胺	丙烯酰胺分析物
149.9	10 ms
151.9	10 ms
106.0	10 ms
$^{13}C_3$-2,3- 二溴丙烯酰胺	内标
152.9	10 ms
154.9	10 ms
109.9	10 ms
2,3- 二溴 -2- 甲基丙烯酰胺	辅助替代物
120.0	10 ms
122.0	10 ms
164.0	10 ms
166.0	10 ms
PCI 参数	
PCI 调谐：	PCI 自动调谐
EM 设置：	PCI 自动调谐 + 400 V
离子源温度：	250 °C
四极杆温度：	150 °C
PCI SIM 参数	
甲烷反应气（简称甲烷气）	MFC 20% (1.0 mL/min)
分辨率：	低
组离子	驻留时间 (ms)
2,3 二溴丙烯酰胺	丙烯酰胺分析物
231.9	10 ms
233.9	10 ms
149.9	10 ms
151.9	10 ms
$^{13}C_3$-2,3- 二溴丙烯酰胺	内标
234.9	10 ms
236.9	10 ms
2,3- 二溴 -2- 甲基丙烯酰胺	辅助替代物
245.9	10 ms
247.9	10 ms
氨气：	MFC 20% (1.0 mL/min)
分辨率：	低
组离子	驻留时间 (ms)
2,3 二溴丙烯酰胺	丙烯酰胺分析物
248.9	10 ms
246.9	10 ms
250.9	10 ms
$^{13}C_3$-2,3- 二溴丙烯酰胺	内标
251.9	10 ms
249.9	10 ms
253.9	10 ms
2,3- 二溴 -2- 甲基丙烯酰胺	辅助替代物
262.9	10 ms
260.9	10 ms
264.9	10 ms

表 3. 2- 溴丙烯酰胺（丙烯酰胺的单溴衍生物）GC/MS EI 仪器方法参数

进样口参数		
衬管：		安捷伦部件号 5062-3587，单锥形，带玻璃毛
温度：		250 °C
模式：		脉冲 不分流
脉冲压力：		30.0 psi
脉冲时间：		1.20 分钟
吹扫流量：		50.0 mL/min
吹扫时间：		1.20 分钟
总流量：		54.7 mL/min
省气模式：		关
柱箱参数		
柱箱最高温度：		325 °C
柱箱平衡时间：		0.5 分钟
初始温度：		50 °C
初始时间：		1.00 分钟
柱参数		
毛细管柱		安捷伦 122-5533 DB3-5MS
升温速率	温度	时间
25 °C /min	140 °C	0.00 分钟
45 °C /min	300 °C	1.50 分钟
运行时间		9.66 分钟
最高温度：		350 °C
长度：		30.0 m
直径：		250 µm
膜厚：		1.00 µm
载气：		氦气
模式：		恒流
		1.2 mL/min
出口和压力：		MSD 真空
EI 和 PCI 的 MSD 参数		
溶剂延迟		5.00 分钟
EI 参数		
EI 调谐		自动调谐
EM 设置		自动调谐 + 400 V
离子源温度		230 °C
四极杆温度		150 °C
EI SIM 参数		
分辨率		低
组离子		驻留时间 (ms)
2- 溴丙烯酰胺		丙烯酰胺分析物
148.9		20 ms
150.9		20 ms
105.9		20 ms
$^{13}C_3$-2- 溴丙烯酰胺		内标
151.95		20 ms
153.95		20 ms
2,3- 二溴 -2- 甲基丙烯酰胺		辅助替代物
120.0		10 ms
122.0		10 ms
164.0		10 ms
166.0		10 ms

结果和讨论

EI 离子化

图 6 和图 7 分别显示了 2，3-二溴丙烯酰胺和 2-溴丙烯酰胺的 EI 质谱图。请注意这两种丙烯酰胺溴化衍生物有相似的质谱图。在 EI 中，2,3- 二溴丙烯酰胺丢失了一个溴产生 C_3H_5ONBr 离子，同位素丰度与其单溴同类化合物相当。在溶液中加入三乙胺（碱），使其失去 HBr，产生单溴化物 C_3H_4ONBr，比二溴衍生物少含一个氢，在 EI 中以分子离子形式出现。 质谱图共有 C_2H_3Br 离子，归属为碎片 105.9 和 107.9 *m/z*。请注意，用 $^{13}C_3$- 丙烯酰胺作内标时，由于有这个 C_2H_3Br 碎片，所以不能用 107.9 离子进行丙烯酰胺定量。二溴衍生物比单溴化合物的响应更大，没有 149 碎片，它来自溶剂和食品包装中普遍存在的邻苯二甲酸酯干扰物。这两种化合物的 EI-SIM 在 10 到 500 pg/µL 范围内都呈良好的线性，见图 8 和图 9，但较好的 EI 检测和在较高的柱箱温度流出，使二溴衍生物比单溴衍生物更具吸引力。但是，大家早就知道 2,3-二溴丙烯酰胺在进样口里会分解，形成 2- 溴丙烯酰胺。这种成分的转化与进样口活性有关，因此，分析二溴丙烯酰胺要使用双锥形衬管，而分析溴化丙烯酰胺时则使用带玻璃棉的单锥形衬管。有必要用 ^{13}C 标记的替代物校正二溴衍生物的降解，但甲基丙烯酰胺替代物也可以很好的校正单溴代丙烯酰胺的回收率。由于上述原因和文献中提到的用途，图 10 中显示了溴代甲基丙烯酰胺的 EI 图谱，离子列于方法表中。按 GC 程序，2,3- 二溴 -2- 甲基丙烯酰胺，这一替代物正好在 2,3- 二溴丙烯酰胺之前出峰，并远在 2- 溴丙烯酰胺之后。

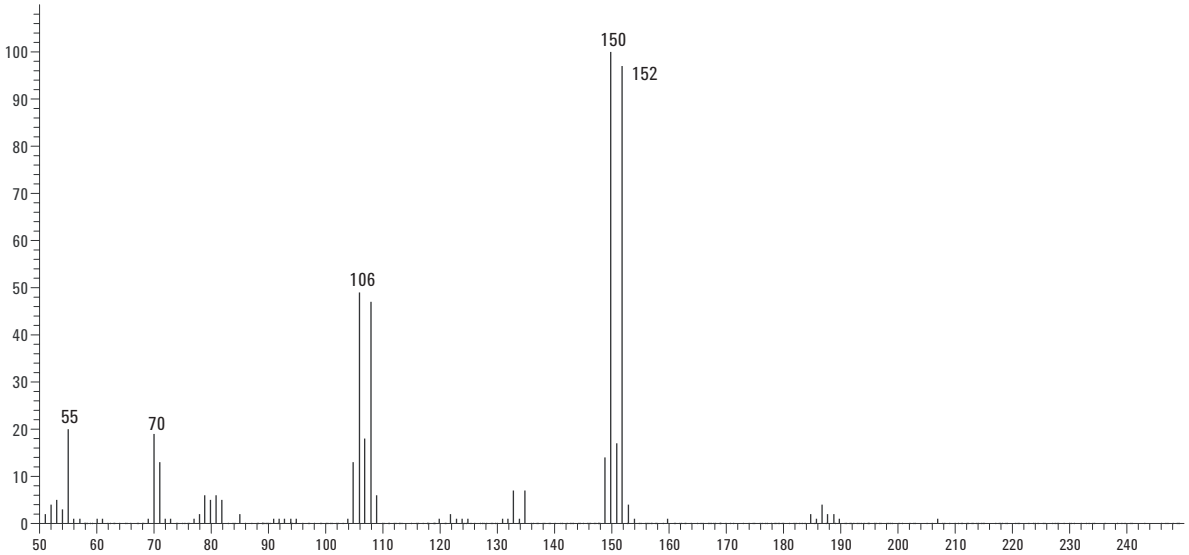


图 6. 2, 3- 二溴丙烯酰胺的 EI 电离谱图

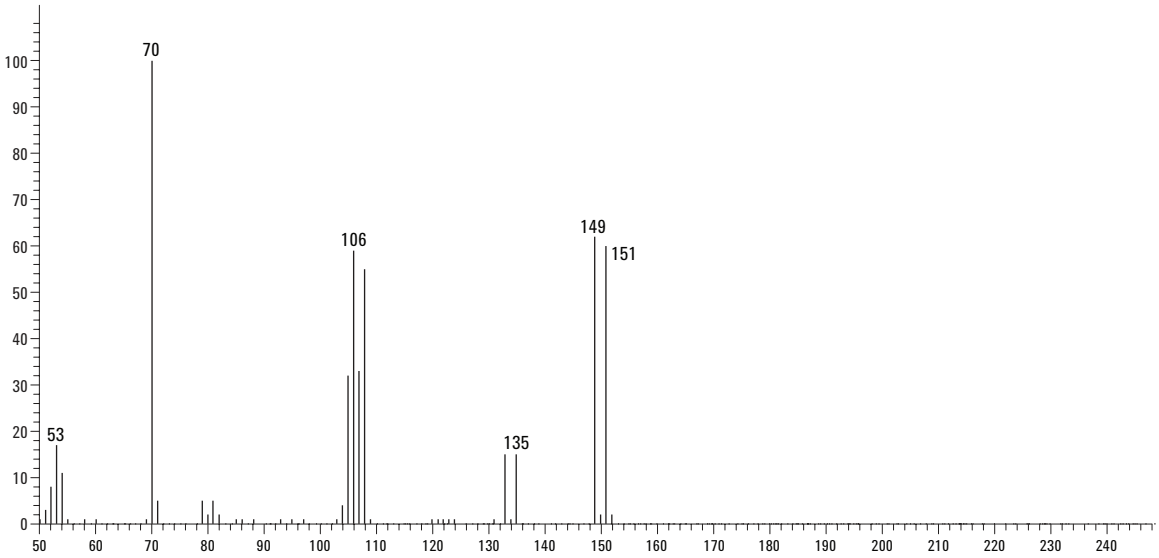


图 7. 2- 溴丙烯酰胺的 EI 电离谱图

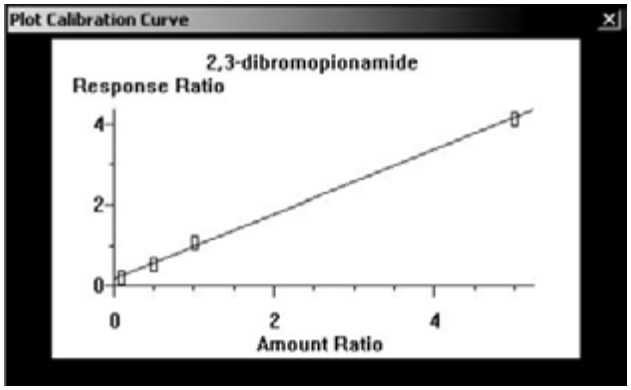


图 8. 2,3- 二溴丙烯酰胺从 10 到 500 pg/μL 的校正曲线 (R^2=0.998)

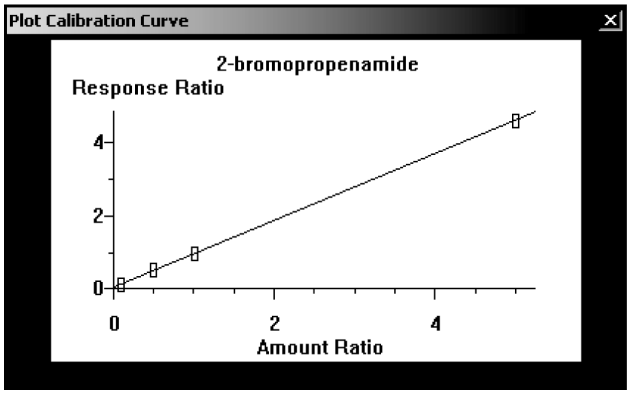


图 9. 2- 溴丙烯酰胺从 10 到 500 pg/μL 的校正曲线 (R^2=0.999)

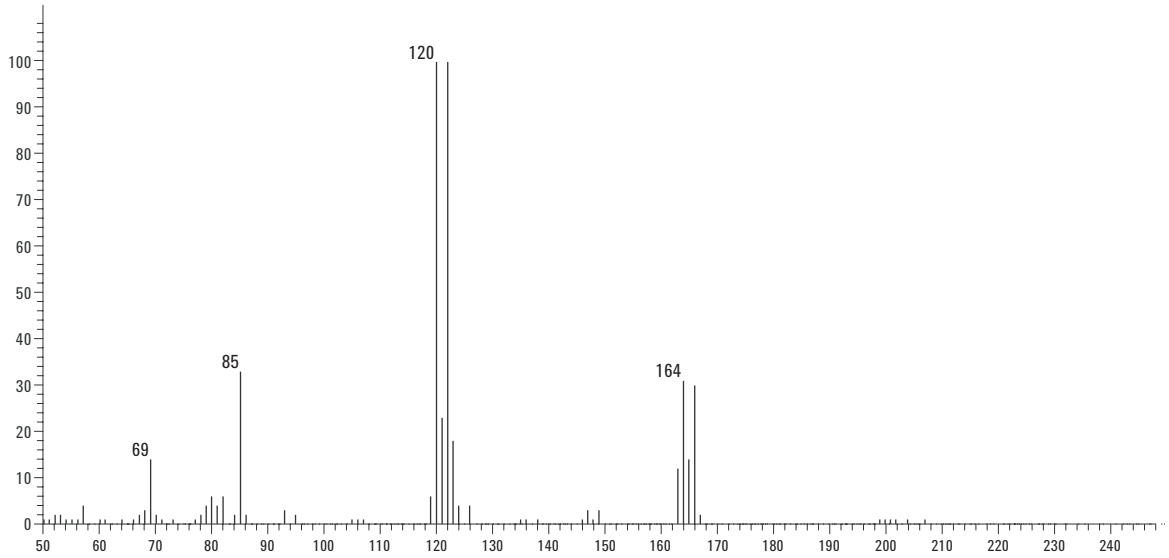


图 10. 甲基丙烯酰胺替代物，2,3- 二溴 -2- 甲基丙烯酰胺的 EI 电离谱图

PCI

用甲烷和氨气得到的 2,3- 二溴丙烯酰胺 PCI 谱图见图 11 和图 12。用甲烷，最高质量碎片是$[M+H]^+$；用氨气，是 $[M+NH_4]^+$。用甲烷的响应比用氨要高，如果食品样品的背景不成为问题，丙烯酰胺定量将会有很好的选择性。用甲烷和氨气在 10-500 pg/µL 之间的校正与 EI 相似（R^2>0.998）。重要的是，在甲烷和氨 PCI 中，较低质量碎片 *m/z* 72 和 89，不能用于 SIM 定量。这些很强的碎片显然是丢失 Br_2产生的，与上面提到的离子不同。

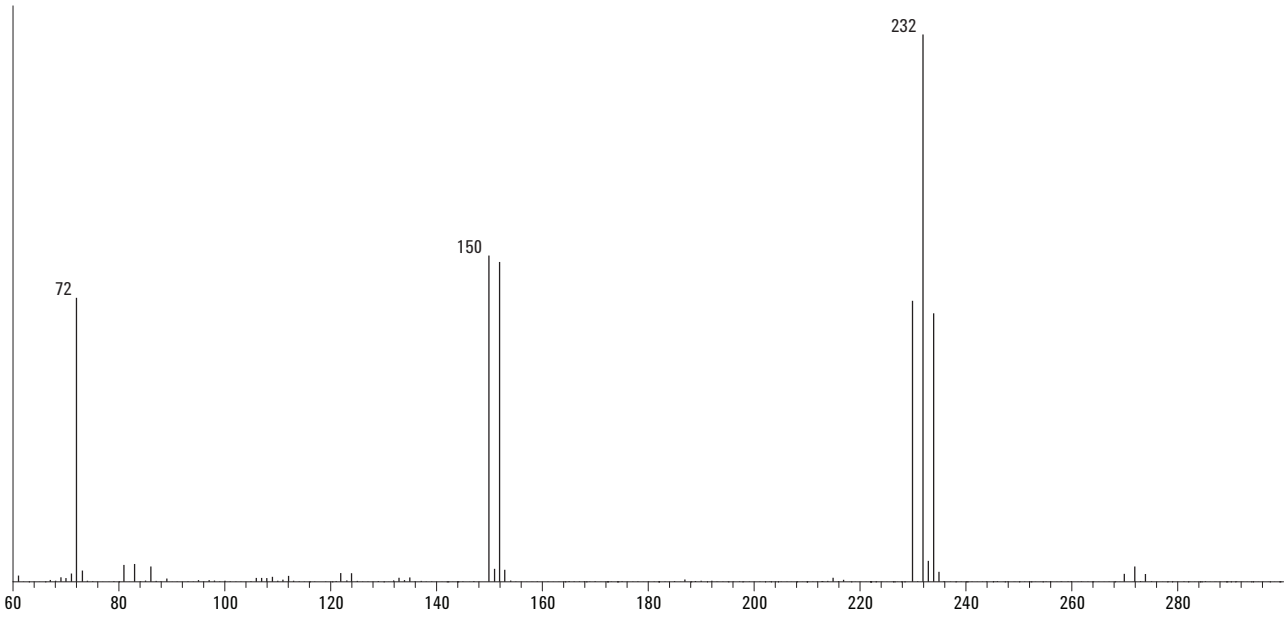


图 11. 用甲烷气体得到的 2,3- 二溴丙烯酰胺 PCI 谱图 (60-300 amu)

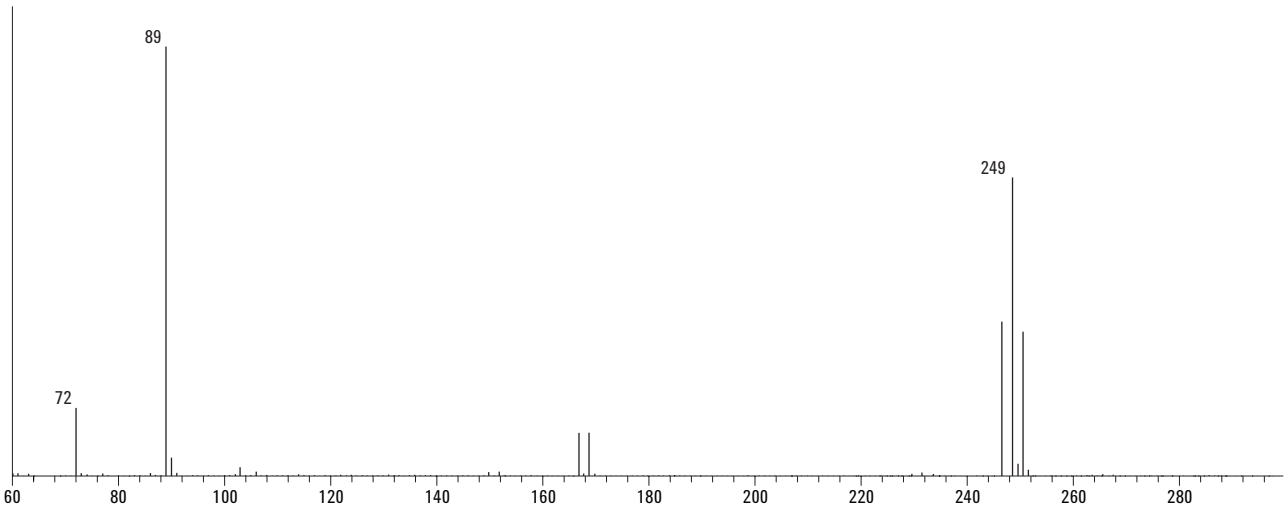


图 12. 用氨气得到的 2,3- 二溴丙烯酰胺 PCI 谱图 (60-300 amu)

与 EI 的情况相似，用这两种气体 2,3- 二溴丙烯酰胺的 PCI 响应都要超过 2- 溴丙烯酰胺。用甲烷和氨得到的谱图，见图 13 和 图 14。2- 溴丙烯酰胺最高质量碎片，用甲烷也是$[M+H]^+$，用氨是$[M+NH_4]^+$。为了更完整，也做了溴代甲基丙烯酰胺替代物的谱图，见图 15 和图 16。

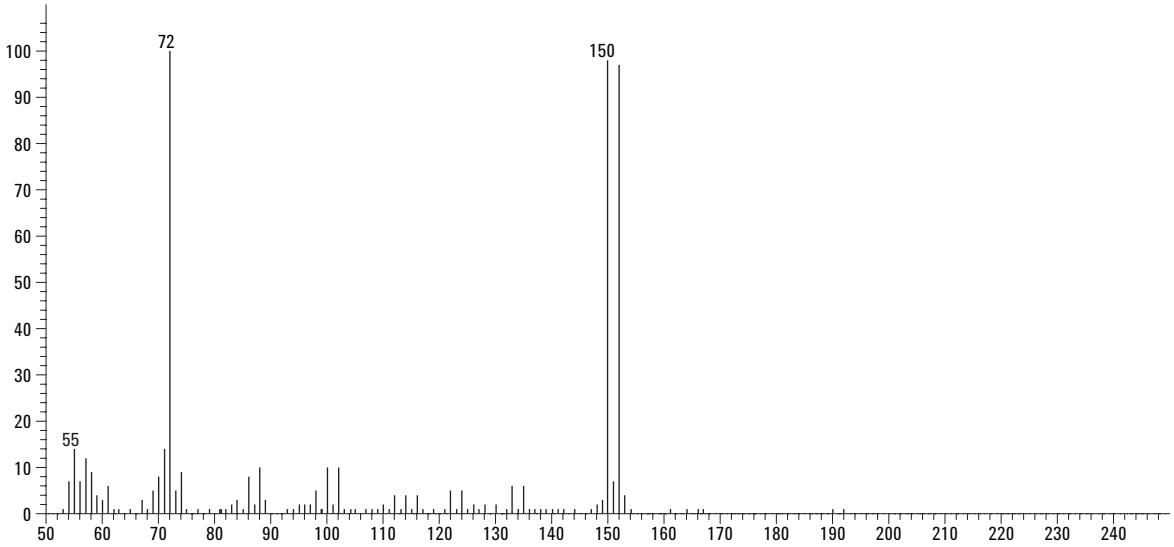


图 13. 用甲烷气体得到的 2- 溴丙烯酰胺 PCI 谱图 (50-250 amu)

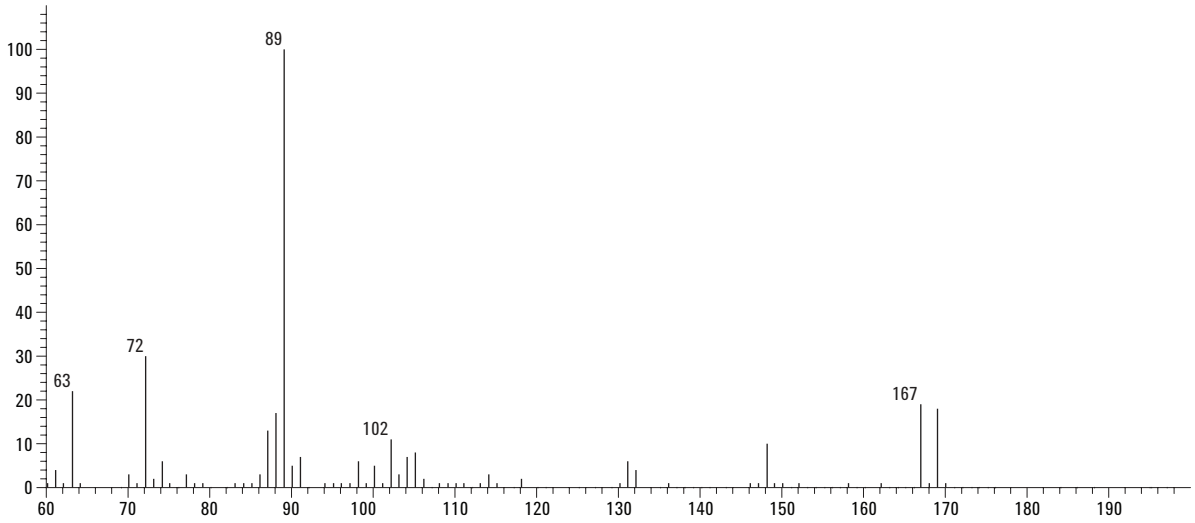


图 14. 用氨气得到的 2- 溴丙烯酰胺 PCI 谱图 (60-200 amu)

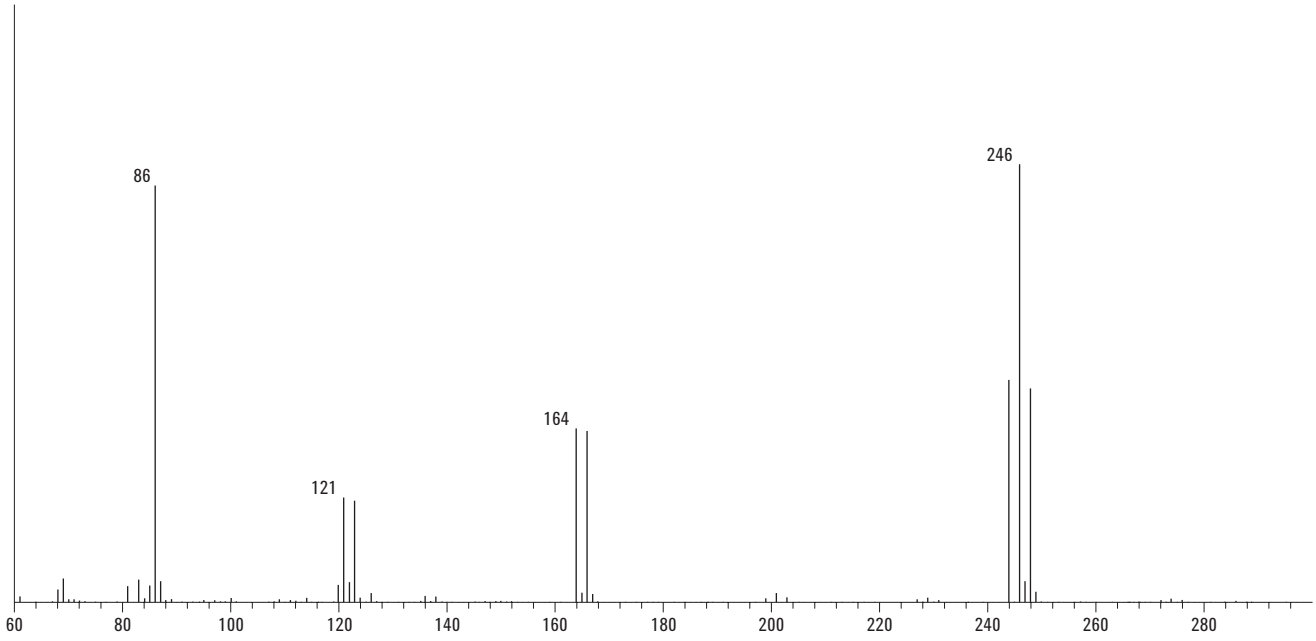


图 15. 用甲烷气体得到的 2,3- 二溴 -2- 甲基丙烯酰胺 (甲基丙烯酰胺衍生物) PCI 谱图 (60-300 amu)

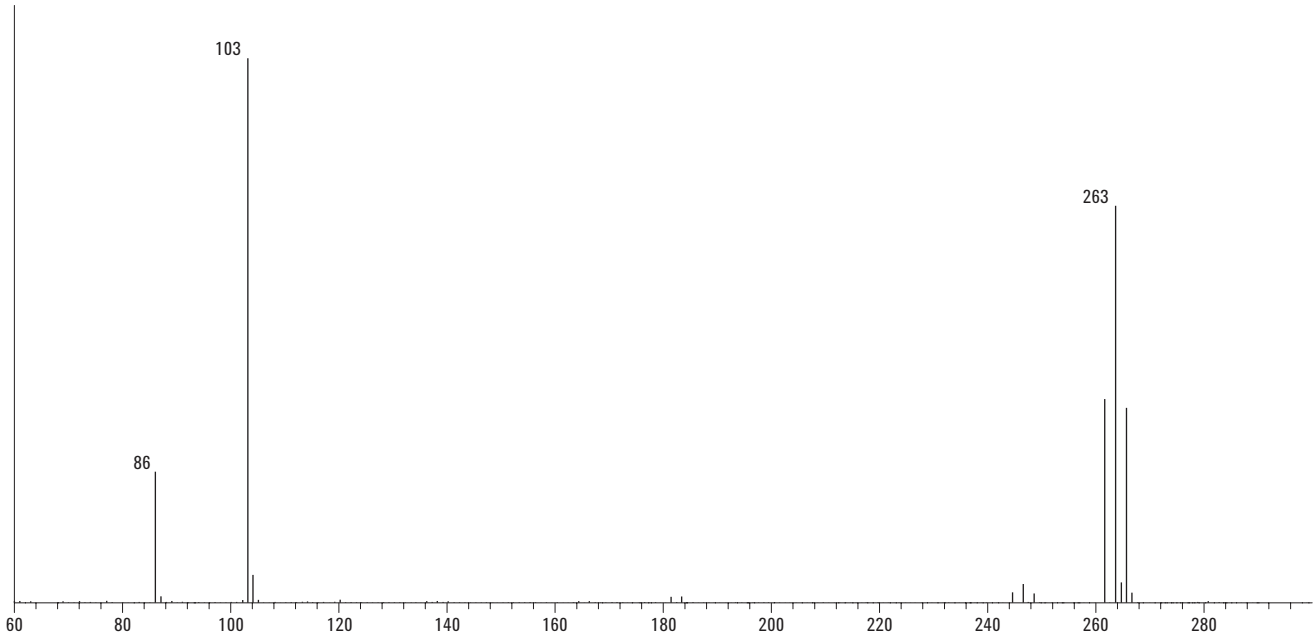


图 16. 用氨气得到的 2,3- 二溴 -2- 甲基丙烯酰胺 PCI 谱图

结论

由于丙烯酰胺在食品中广为发现，这里介绍了多种方法。用 PCI 快速扫描丙烯酰胺是一种直接而简便的方法，检测灵敏，而且能够定量。在使用溴代衍生物的方法中，研究表明二溴代丙烯酰胺比 2- 溴丙烯酰胺检测和定量效果更好。如果对某些食品使用 EI 测定出现问题，PCI 是一种值得探索的方法。甲烷气比氨气响应要高约 2 倍。二溴丙烯酰胺可能降解，必须用相应的标记内标化合物进行定量计算。甲基丙烯酰胺替代物也可用于回收率计算。用薯片做实验得到的数据，尽管没有列在这里，证实上述结论是正确的。

参考文献

1. “Swedish researchers report acrylamide found in starchy foods,” (2002) Chemical & Engineering News. p. 38.
2. Hileman, B., “Acrylamide worries experts,” (2002) Chemical & Engineering News, **80** (27): p. 9.
3. Hileman, B., “Acrylamide found in cooked foods.” (2002) Chemical & Engineering News, **80**(19): p. 33.
4. Yarnell, A., “Acrylamide mystery solved.” (2002) Chemical & Engineering News, **80**(40): p. 7.
5. Rosen, J. and K. E. Hellenas, “Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry.” (200) Analyst (Cambridge, UK), **127**(7): p. 880-882.
6. Castle, L., M. J. Campos, and J. Gilbert, “Determination of acrylamide monomer in hydroponically grown tomato fruits by capillary gas chromatography/mass spectrometry.” (1991) *J Sci Food Agric,* **54**(4): p. 549-555.
7. Castle, L., “Determination of acrylamide monomer in mushrooms grown on polyacrylamide gel.” (1993) *J Agric Food Chem,* **41**(8): p. 1261-1263.

日本肯定列表农药方法的 GC/MS 快速分析解决方案

应用

作者

Philip L. Wylie

2006 年，日本厚生劳动省发布了农药、饲料添加剂和兽药的法规新体系。这一“肯定列表体系”保证食品中只能使用批准表上列出的化合物，它提供一个规范这些化合物的框架。这些新的法规已经增加了能够检测各种食品中这些化学品残留的分析方法的需求。这些法规限定的大部分化学品是农药，其残留最常用的检测方法是带质谱检测器的气相色谱或液相色谱法 (GC/MS 或 LC/MS)。为了应对日本市场上快速和全面分析食品的需求，安捷伦已经推出了新的使用解卷积报告软件 (DRS) 的日本肯定列表农药数据库。采用这一新的数据库和 DRS，分析人员可以针对现在日本政府限定的 430 种 GC 可分析的农药进行 GC/MS 数据文件筛查。这一过程是完全自动化的，每个样品只需要约 2 分钟的时间。

分析农药残留的食品萃取物通常很脏，因为如果使用复杂彻底的样品净化步骤，在除去内生化合物的同时也可能除去农药。所以，要检测含有大量干扰物的样品中的痕量农药就是一个挑战。DRS 帮助分析人员“透过”干扰物来鉴定目标化合物—在此情况下就是农药。DRS 的核心是一个来自美国国家标准研究所 (NIST) 的软件，即自动质谱图解卷积和鉴定系统软件 (AMDIS)。AMDIS 分析背景噪声、校正质谱峰、在扫描之间内插，以发现每个质谱图上每个离子的更准确的保留时间。然后寻找同时增大和减小且具有相同保留时间的离子。这些离子被分组归入一个“组分”的质谱图，再用该质谱图在日本肯定列表农药数据库中检索。AMDIS 可从背景中找出干净的、可进行数据库检索的质谱图。

为了说明解卷积的功能，在绿色胡椒粉萃取物中加入 229 种农药，其中约 148 种是可以用 GC/MS 分析的。图 1 是这一萃取物的总离子流色谱图。图 2 是 17.840 min 处未解卷积（上图）和解卷积（中图）的质谱图。解卷积的质谱图与环酰菌胺的谱库质谱图（下图）匹配的很好。

要点

- 解卷积可以从共流出峰中提取干净的、可进行谱库检索的质谱图
- 安捷伦的日本肯定列表农药数据库和解卷积报告软件 (DRS) 能够在一次运行中筛查日本政府限定的 430 种农药的 GC/MS 数据文件
- 保留时间锁定消除了几乎所有假阳性匹配结果
- 全自动化的过程，每个样品只需 2-3 min，比传统的 GC/MS 方法更可靠
- DRS 总结报告可以根据校准化合物的未解卷积和解卷积质谱图对其进行定量分析

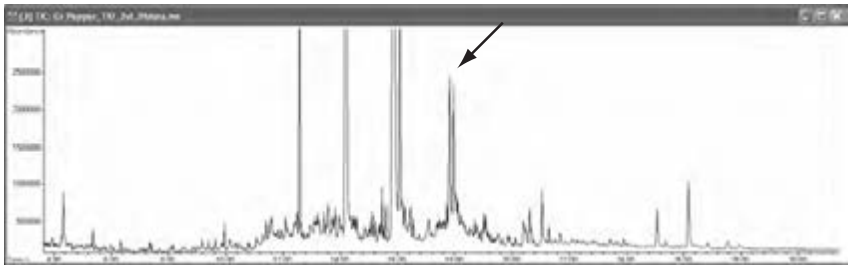


图 1. 添加了浓度各为 100 ppb 的 229 种农药的绿色胡椒粉萃取物的 GC/MS 总离子流色谱图。箭头所指是农药环酰菌胺流出的位置。该农药被包埋在一个大得多的未分离峰中

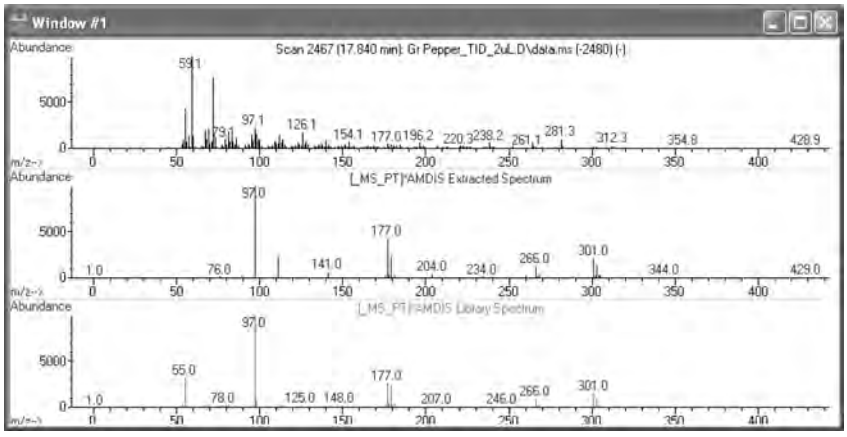


图 2. 上图：图 1 所示绿胡色椒粉萃取物在 17.840 min 处的未解卷积质谱图
中图：17.840 min 处解卷积的质谱图。下图：日本肯定列表农药数据库中的环酰菌胺的质谱图

图 3 所示为添加农药的绿胡椒粉萃取物的 DRS 报告的一部分。表格的大部分没有显示，只是为了简单地说明表格的格式和所提供的信息。

前三栏给出了 DRS 软件发现的每个目标分析物的保留时间、CAS 编号和名称。接下来的两栏是安捷伦 GC/MS 化学工作站测定的计算含量。第一个值（第 4 栏）是使用未解卷积目标离子测定的，代表从标准 GC/MS 校准方法得到了典型结果。在“AMDIS”标题下的含量是采用解卷积目标离子计算所得。

注意，图 3 所示的定量结果只是基于平均响应因子估算的，即对校准表中的所有农药采用了平均响应因子，没有对每个化合物单独校准。许多实验室对一系列目标农药采用多级校准，而对其余农药则采用平均校准因子。

质谱解卷积报告

样品名称： 绿胡椒粉
数据文件： C:\MSData\Sept 04_07 Lehotay samples using TID & Japanese method\Gr Pepper_TID_2uL.D
日期/时间： 2008 年 7 月 14 日，星期一，下午 1:59:58

相邻峰扣除 = 2
分辨率 = 高
灵敏度 = 很高
峰形要求 = 低

对AMDIS目标库中发现的组分进行了NIST 谱库检索。

			含量 (ng/uL)		AMDIS		NIST	
保留时间	CAS 编号	化合物名称	化学工作站	AMDIS	匹配	保留时间差 (s)	反匹配度	匹配数
6.4699	10265926	甲胺磷	0.19	0.17	82	2.4	88	1
6.6154	62737	敌敌畏	0.13	0.10	84	1.2	86	1
7.2062	1563388	克百威-7-苯酚	0.07	0.05	88	1.0	80	1
15.397	32809168	腐霉利	0.28	0.22	87	–0.5	83	1
15.407	148798	噻菌灵	0.46	0.37	67	–1.5	66	1
18.217	51036	增效醚	1.02	0.15	97	–0.6	90	1
18.354	106325080	氟环唑	0.35	0.16	86	–0.3	–	–
18.355	52669928	1-丁酮，4-[4-(4-氯代苯基)-1,2,3,6-四氢-1-吡啶基]-1-(4- 氟代苯基)-	–	–	–	–	59	1
18.532	36734197	异菌脲	0.04	0.07	44	–0.5	58	11
18.539	119120	哒嗪硫磷	0.25	0.20	82	–0.2	66	1
18.573	135410207	啶虫脒	0.05	0.03	46	–0.1	52	1
18.696	82657043	联苯菊酯	1.39	1.06	96	–0.7	90	1
20.674	96489713	哒螨灵	1.04	0.84	92	–0.7	90	1
20.682	67747095	咪鲜胺	0.10	0.04	69	–0.8	60	1
24.042	110488705	烯酰吗啉-(E)	0.16	0.15	88	–1.4	86	1
12.578		菲-d10	10.00	–	–	–	–	–

图 3. 添加了浓度各为 100 ppb 的 229 种农药的绿色胡椒粉萃取物的部分 DRS 报告。其中有些农药是不能用 GC 分析的。在添加的 229 种农药中，156 种可以用 GC/MS 方法。图示只是部分报告。第 4 和第 5 栏所示定量结果只是基于平均响应因子的估算值。没有对每个化合物单独校正

标为 AMDIS/Match 的栏下显示了解卷积质谱图与日本肯定列表农药数据库中谱图的匹配质量。用户可以设置报告阈值。低于阈值的匹配将不报告。

日本肯定列表农药数据库包含使用发布的日本列表方法所得每种农药的保留时间。采用保留时间锁定 (RTL)，用户很容易重复数据库的保留时间。如果化合物的保留时间落在用户设置的窗口之外（一般为 ±10 s），AMDIS 可以设置为拒绝“匹配”。这一功能大大减少了假阳性结果。

图 3 的下一栏标为 AMDIS/R.T. Diff sec，表示色谱图上分析物的保留时间与日本肯定列表农药数据库中所存保留时间之差。在 DRS 鉴定的 156 种农药中，保留时间偏离数据库值超过 2 s 的不到 10 种农药。在极脏的样品中，峰可能有一些漂移，但是，可以加大保留时间窗口以便适合这些峰的鉴定。即使这样，保留时间匹配的要求消除了几乎所有假阳性结果。

按照一般的规律，匹配系数大于 60 就是非常可靠的了，尤其是与 NIST 谱库有良好的匹配。对于图 3 所示的 DRS 报告，最小的匹配系数设置为 40。报告的几种农药的 AMDIS 匹配因子都在 40 到 60 之间。对于这些化合物，最好在 Qedit 中检查结果，Qedit 现在（使用 DRS 版本 A.04 或更高版本）包含与化学工作站结果相结合的 AMDIS 结果。

作为确证步骤，DRS 取每个“匹配”的解卷积谱图，采用 NIST 谱库检索算法在整个 NIST 质谱库中检索。如果在 NIST 谱库中发现有匹配，将报告其匹配值和排序。命中数为 1 意味着 AMDIS 鉴定的化合物在 NIST 谱库中也有最好的匹配。

在早些时候的安捷伦应用 [1] 中可以找到这一方法的更多信息。最近的安捷伦分离时代电子版上有一篇文章 [2] 讨论了 DRS 版本 A.04 的优点。

总结

- 该应用文摘简单讨论了日本厚生劳动省 (MHLW) 的肯定列表体系限定的、GC 能够分析的农药的一种筛查方法
- 新的日本肯定列表农药数据库包含 430 种农药的质谱图及其锁定的保留时间
- 使用解卷积可从共流出峰中提取干净的、可进行谱库检索的质谱图
- 解卷积报告软件 (DRS) 对所有解卷积质谱图和日本肯定列表农药数据库的谱图进行比较，以发现任何匹配的谱图。匹配还必须落在窄的保留时间窗口内，使用保留时间锁定可以实现这一点
- 筛查每个数据文件需要 2 到 3 分钟，且比传统的 GC/MS 方法更为可靠
- DRS 生成一个总结报告，列出化学工作站、AMDIS 和 NIST 谱库检索鉴定的化合物。校准的化合物可以依据它们的未解卷积和解卷积质谱图实现定量分析
- 这一方法在一次运行中筛查 MHLW 列出的所有 430 种农药
- 参考文献 1 完整地介绍了该方法

参考文献

1. Philip L. Wylie, “Screening for Pesticides in Food Using the Japanese Positive List Pesticide Method: Benefits of Using GC/MS with Deconvolution Reporting Software and a Retention Time Locked Mass Spectral Database,” Agilent Technologies publication 5989-7436EN, www.agilent.com/chem.
2. Mike Szelewski, “I'm interested in quantitation using deconvolved areas. Are the advantages of DRS Version A.04 great enough to justify learning this new software?” *eSeparation Times*, 21(2), www.agilent.com/chem.

气相色谱仪 (GC) 应用

安捷伦在业界提供最宽范围的气相色谱和气-质联用仪，同时对产品提供应用支持和售后服务。无论您是需要灵活、可靠的硬件和软件搭配用来完成研究工作，或者是简单耐用的系统用于常规生产，或者是能够在现场或者野外恶劣条件下工作的便携式解决方案，我们都能够提供对应的解决方案帮助您迎接分析方法的挑战。

气相色谱仪 (GC) 应用

5989-1333 Agilent 6820 GC/NPD 分析氨基甲酸酯类农药残留 435

5989-1335 Agilent 6820 气相色谱/微池电子捕获检测器测定有机氯和拟除虫菊酯类农药残留 439

5989-1334 6820 气相色谱仪/氮磷检测器测定食品中的有机磷农药残留 444

5989-6095 鱼油直接进样用 GC-ECD 分析多氯联苯：使用带反吹的 Deans Switch 的结果 449

5989-6460 用 7890A 气相色谱和毛细管色谱柱反吹分析化妆品中的可疑香精香料致敏源成分 459

5990-3428 采用低热容 (LTM) 柱箱模块独立控制柱温以改善手性化合物的多维分离 466

Agilent 6820 GC/NPD 分析氨基甲酸酯类农药残留

作者

姚卫军，涂传鸿
安捷伦科技（上海）有限公司
上海市浦东新区外高桥保税区英伦路 412 号，200131

摘要

本应用介绍了用 Agilent 6820 气相色谱仪 / 氮磷检测器测定氨基甲酸酯农药残留的方法。七种常见的氨基甲酸酯在 HP-5 ms 毛细管柱上得到很好的分离。各个化合物在 10-1000 ppb 内有良好的线性。各个化合物的检出限均低于 10 ppb，比国家农药残留限量所规定的浓度低 10-200 倍。

前言

氮磷检测器 (NPD) 是含氮/磷有机化合物灵敏度高，专一性好的检测器，广泛用于痕量有机含氮或磷农药的分析。氨基甲酸酯是常用的一类高效的有机合成农药，广泛地用于防止农作物的病虫害。这些农药都有可能残留在农作物中进入人类的食物链中，给人们的健康带来潜在的危害，我国对克百威、抗蚜威和甲萘威制定了最高残留限量。GB/T 5009.104-2003（原 GB14877-1994）是基于填充柱气相色谱 / 氮磷检测器测定 6 种氨基甲酸酯国家标准推荐方法[1]。由于毛细管柱的分离能力远远优于填充柱，近年来，填充柱方法逐渐有被毛细管柱方法替代的趋势。本应用使用 Agilent 6820 毛细管柱气相色谱/氮磷检测器测定常见的速灭威、异丙威、仲丁威、残杀威、克百威、抗蚜威和甲萘威等 7 种氨基甲酸酯。

实验部分

本实验在配置有分流 / 不分流毛细管柱进样口，氮磷检测器 (NPD) Agilent 6820 气相色谱仪 (GC) 上进行。分流 / 不分流进样口使用 Agilent 脱活不分流衬管（部件号 5183-4696）和适合手动进样的 Agilent 高级绿色进样隔垫（部件号: 5183-4759）。Agilent Cerity NDS 色谱软件用于 6820 GC 的仪器控制，信号采集和数据处理。10 μL 微量注射器手动进样。色谱条件见表 1。本实验中，所有氨基甲酸酯农药配制在丙酮溶液中。

表 1. 色谱分析条件

色谱仪	Agilent 6820
仪器控制及数据采集	Cerity NDS (中文版本)
进样口	分流 / 不分流进样口
进样口温度	250 °C
进样方式	不分流进样
进样体积	1 μL
吹扫时间	0.75 min
色谱柱	HP-5 ms 30 m x 0.32 mm x 0.25 μm （部件号: 19091S-413）
载气	氮气，进样口恒定压力：5 psi，1.0 mL/min (50 °C)
柱温	50 °C 保持 1 min，20 °C/min 升至 100 °C，5 °C/min 升至 150 °C， 保持 5 min，10 °C/min 升至 200 °C，保持 10 min
检测器	氮磷检测器，325 °C，白色铷珠（部件号: G1534-60570） 氢气：3 mL/min；空气：60 mL/min；
检测器气体	尾吹气：氮气，10 mL/min

结果与讨论

速灭威，异丙威，仲丁威，残杀威，克百威，抗蚜威，甲萘威七个化合物在所用毛细管色谱柱上得到很好的分离。其中仲丁威和残杀威的结构相近，但在该条件下也能很好的分离（分离度 R=1.0）结果见图 1。

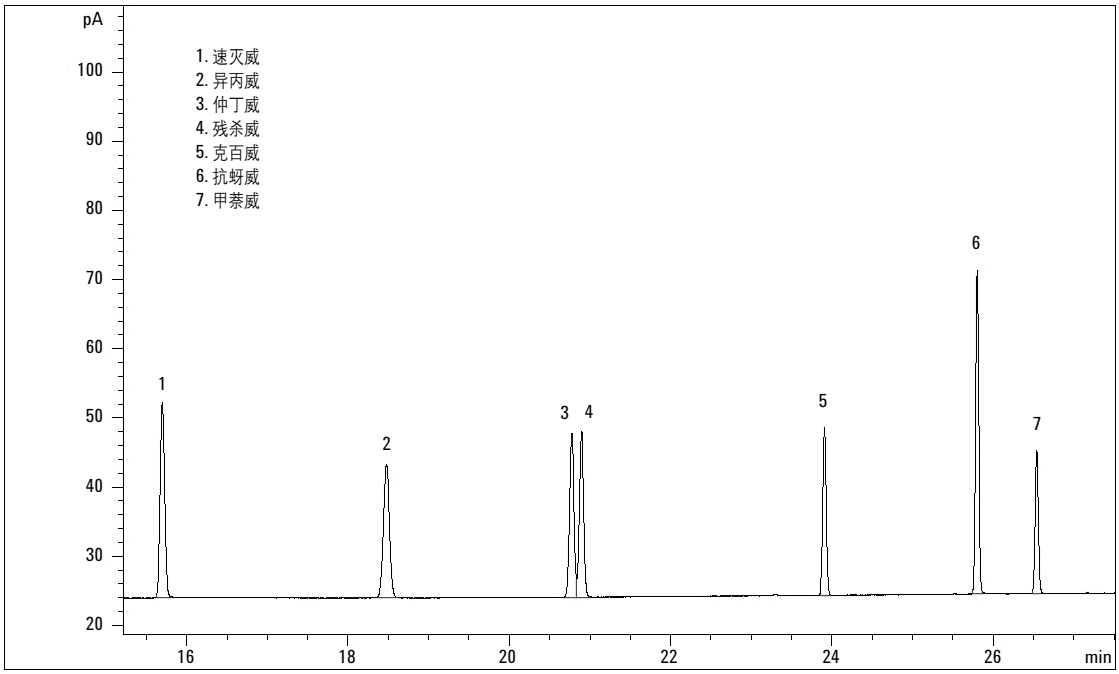


图 1. 七种氨基甲酸酯的在 Agilent 6820/NPD 上的色谱图

图 2 是抗蚜威和克百威的工作曲线。七种待测化合物
在 10～1000 ppb 范围内呈现良好的线性。

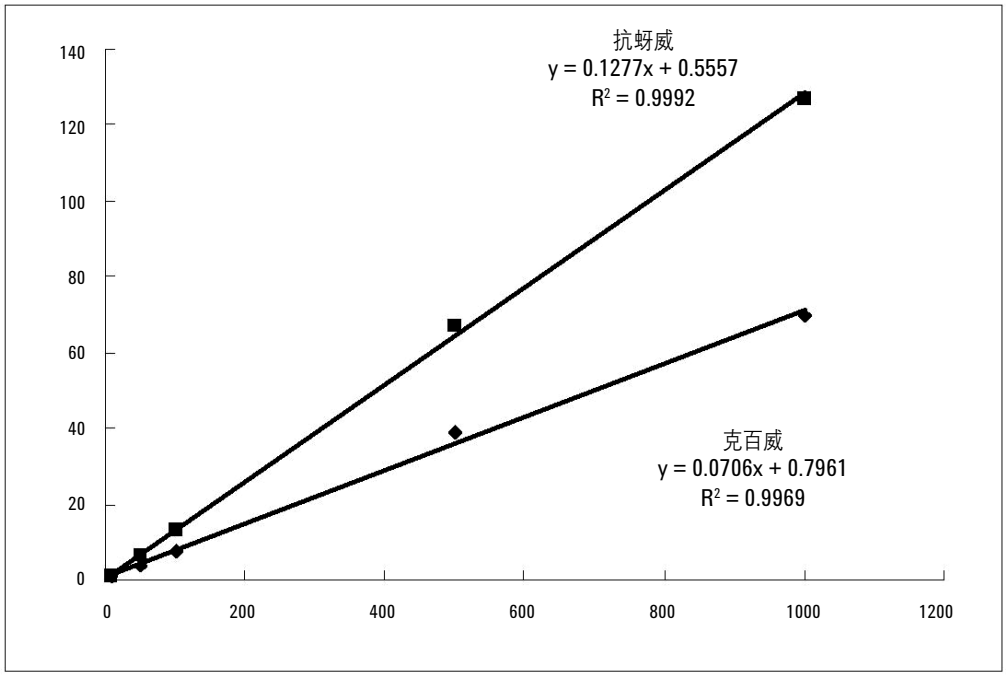


图 2. 抗蚜威和甲萘威在 Agilent 6820/NPD 上的线性

图 3 是 10 ppb 氨基甲酸酯标准溶液在氮磷检测器上的响应。10 ppb 化合物的信噪比约为 6-12。按照信噪比为 3 (S/N=3) 来计算检出限，氨基甲酸酯在氮磷检测器上的检出限为 4-6 ppb。国家标准 GB14928.2-94、GB14928.7-94 和GB14971-94 中规定氨基甲酸酯残留限量为 50 ppb（粮食中的抗蚜威）-5000 ppb（粮食中的甲萘威），所以 Agilent 6820 GC/NPD 系统的检出限比氨基甲酸酯残留限量低 10-1000 倍，可以满足农药残留实验室的对氨基甲酸酯常规检测要求。

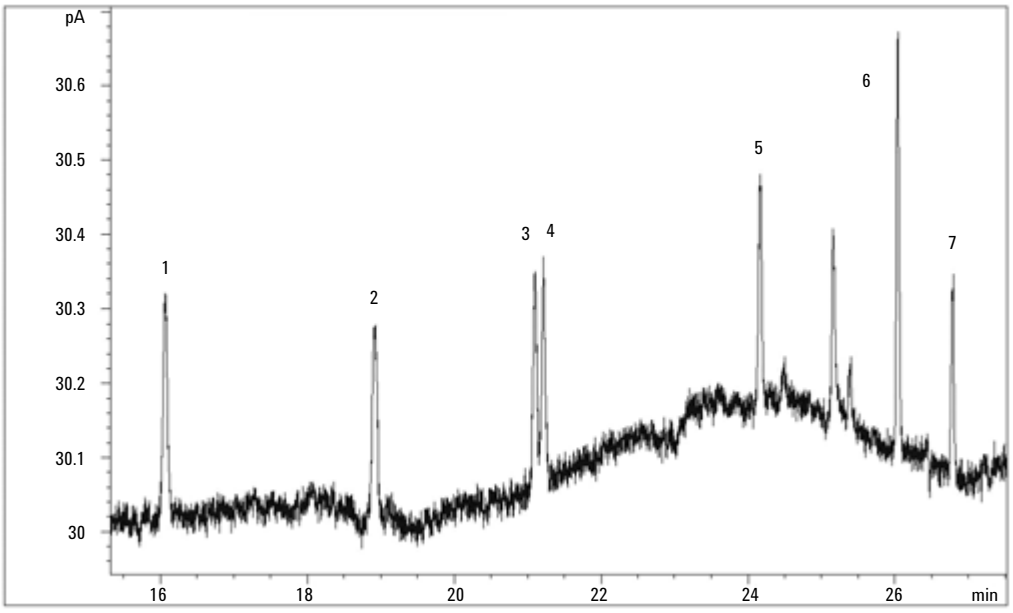


图 3. 10 ppb 氨基甲酸酯的在 Agilent 6820/NPD 上色谱图

结论

Agilent 6820 GC/NPD 系统对食品中氨基甲酸酯类农药残留的最低检出限远低于最高残留限量所规定的浓度。7 种氨基甲酸酯在 HP-5ms 毛细管柱得到良好的分离。该方法线性范围宽，满足农药残留分析实验室的常规分析要求。

参考文献

1. GB/T 5009.104-2003 植物性食品中氨基甲酸酯类农药残留量的测定。

Agilent 6820 气相色谱 / 微池电子捕获检测器测定有机氯和拟除虫菊酯类农药残留

作者

涂传鸿
安捷伦科技（上海）有限公司
上海市浦东新区外高桥保税区英伦路 412 号，200131

摘要

本应用介绍了 Agilent 6820 气相色谱仪 / 微池电子捕获检测器测定有机氯和拟除虫菊酯化合物。各个化合物在所测定的浓度范围内均有良好的线性。方法的灵敏度远优于该类化合物残留分析的要求。

前言

电子捕获检测器 (ECD) 是一种对含卤素等电负性强的化合物有很高灵敏度和选择性的一种检测器。但是，电子捕获检测器 (ECD) 本身有其局限性，例如，线性范围窄，对超出校正曲线范围的样品需要稀释后重新测定。另外，传统的电子捕获检测器的设计中，检测池体积较大，导致灵敏度降低。

针对以上问题，安捷伦公司设计了微池电子捕获检测器 (micro-ECD)，用于 6890 系列气相色谱仪上[1]。微池电子捕获检测器 (micro-ECD) 是专门为毛细管柱设计。与传统的电子捕获检测器 (ECD) 相比，检测池体积小,灵敏度提高了约数十倍，而且线性范围也得到了明显的改善。

本应用介绍了基于国家推荐标准方法 GB/T 5009. 146-2003 [2],使用配有微池电子捕获检测器的 Agilent 6820 气相色谱仪同时测定有机氯和拟除虫菊酯农药的方法。

实验部分

本实验在配置有分流 / 不分流毛细管柱进样口, 微池电子捕获检测器 (micro-ECD) Agilent 6820 气相色谱仪 (GC) 上进行。分流 / 不分流进样口使用 Agilent 脱活不分流衬管 (部件号 5183-4696) 和适合手动进样的 Agilent 高级绿色进样隔垫 (部件号：5183-4759)。Agilent Cerity NDS 色谱软件用于 6820 GC 的仪器控制, 信号采集和数据处理。10 μL 微量注射器手动进样。色谱条件见表 1。本实验中, 所有有机氯和拟除虫菊酯农药配制在正己烷溶液中。

表 1. 色谱分析条件

色谱仪	Agilent 6820
仪器控制及数据采集	Cerity NDS (中文版本)
进样口	分流 / 不分流进样口
进样口温度	250 °C
进样方式	不分流进样
进样体积	2 μL
吹扫时间	0.75 min
色谱柱	HP-1 30 m x 0.32 mm x 0.25 μm (部件号: 19091Z-413)
载气	氮气，进样口压力: 6.0 psi，1.2 mL/min (60 °C)
柱温	60 °C 保持 1 min，30 °C/min 升至 180 °C， 5 °C/min 升至 250 °C，保持 5 min， 3 °C/min 升至 280 °C，保持 10 min
检测器	微池电子捕获检测器(micro-ECD)，330 °C。 尾吹气：氮气，60 mL/min

结果与讨论

微池电子捕获检测器 (micro-ECD) 的灵敏度

图 1 是常见的有机氯农药和拟除虫菊酯化合物的在 HP-1 毛细管柱上的色谱图。其中四种六六六、艾氏剂、七氯、环氧七氯和六种拟除虫菊酯浓度为10 ppb, p,p’－滴滴依、狄氏剂、异狄氏剂、硫丹 I、II 为 20 ppb，p,p’－滴滴滴、p,p’－滴滴涕、异狄氏剂醛、硫丹硫酸酯为 60 ppb。除异狄氏剂和p,p’－滴滴滴外，其他二十种化合物都达到了基线分离。拟除虫菊酯类化合物中，分离出两种氯菊酯、四种氯氰菊酯和两种氰戊菊酯的同分异构体。当样品浓度为 10-60 ppb 时，所有待测化合物的信噪比均大于 40 倍,因此可以很容易地被定量分析。而有机氯和拟除虫菊酯在食品中的残留限量通常为 10 ppb 或者更高。因此，微池电子捕获检测器的灵敏度很容易满足农药残留分析时的定量要求。

线性和响应系数

通过逐级稀释得到一系列标准溶液，用 Agilent 6820 微池电子捕获检测器来测定。图 2 和图 3 以 gamma-六六六和氯菊酯为例说明微池电子捕获检测器对有机氯和拟除虫菊酯化合物均有良好的线性。表2列出了各个化合物的线性范围和在此范围内的响应系数,响应系数的相对标准偏差和线性相关系数。其中响应系数为浓度和其对应的色谱峰峰面积之比。响应系数的相对标准偏差小于20%，满足美国环保署 (USEPA) 合同实验室项目 (CLP) 中对响应系数的精度的要求。各个化合物的校正曲线的相关系数均大于 0.99。

结论

Agilent 6820/ 微池电子捕获检测器对常见的有机氯和拟除虫菊酯化合物均有良好的灵敏度和线性，远远优于日常农药残留分析的要求。

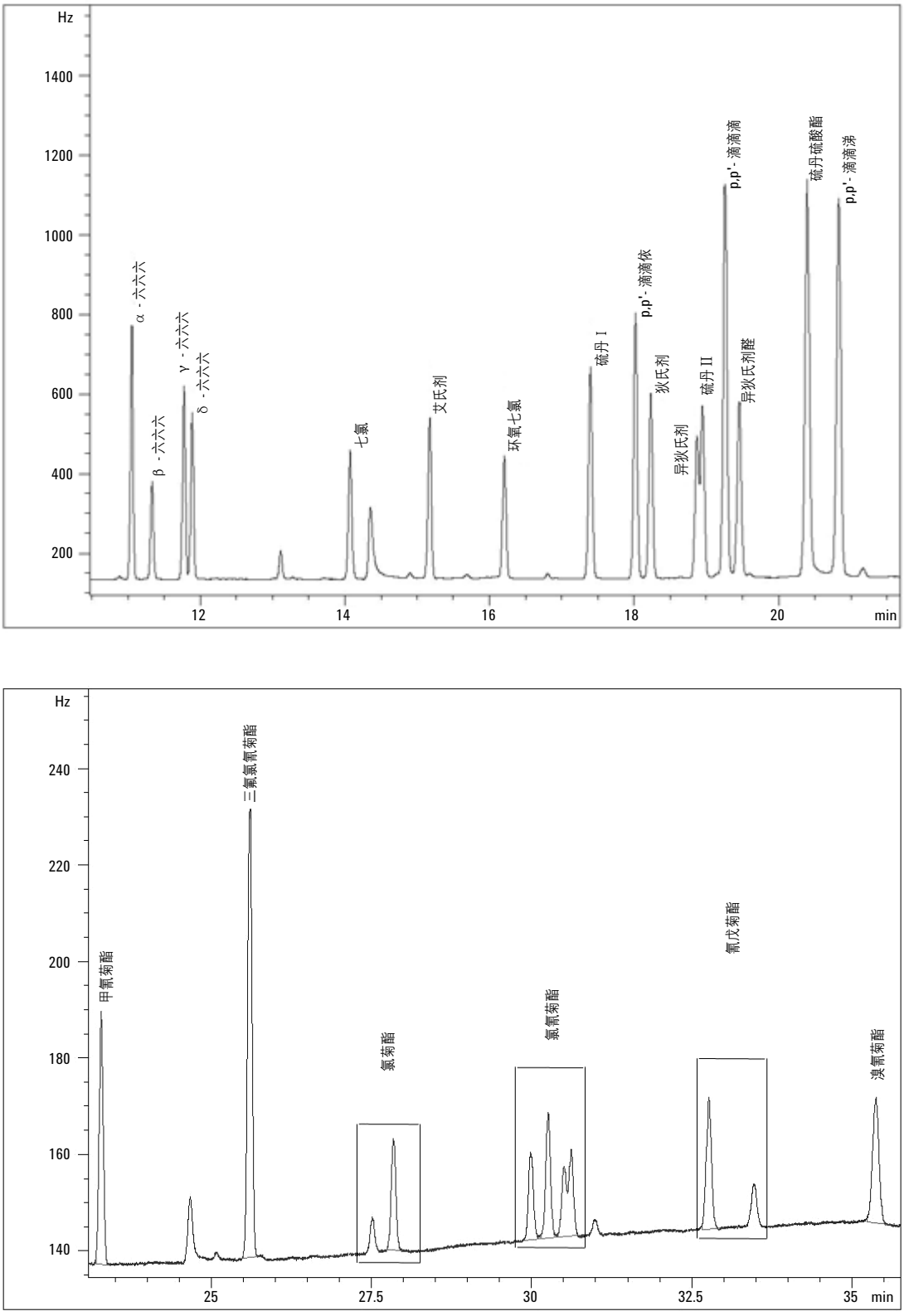


图 1. 有机氯和拟除虫菊酯化合物在 HP-1 柱上的色谱图

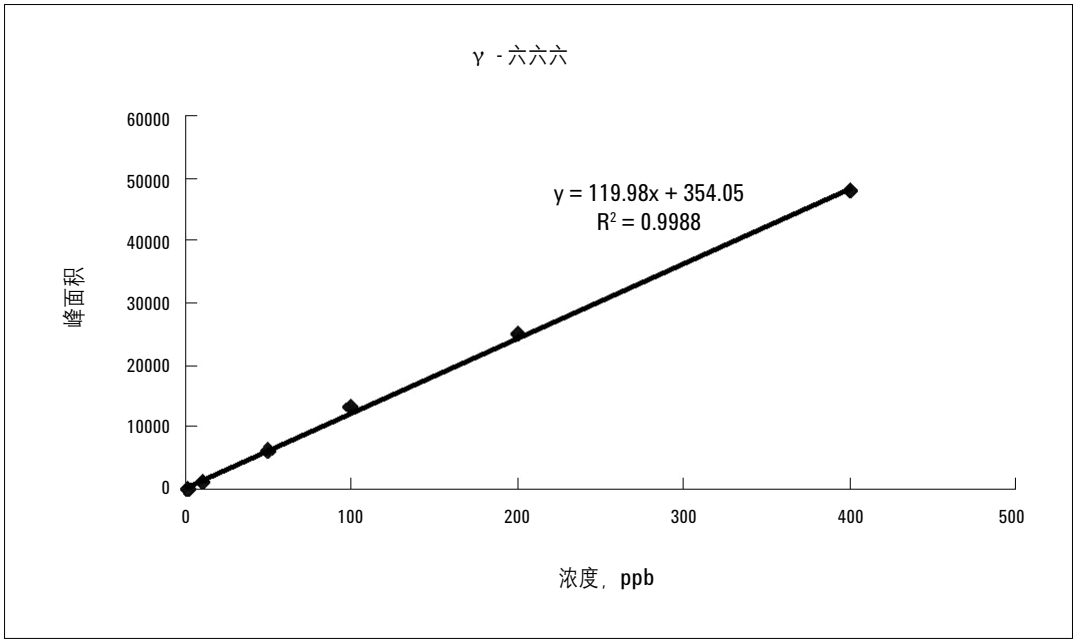


图 2. γ - 六六六的校正曲线

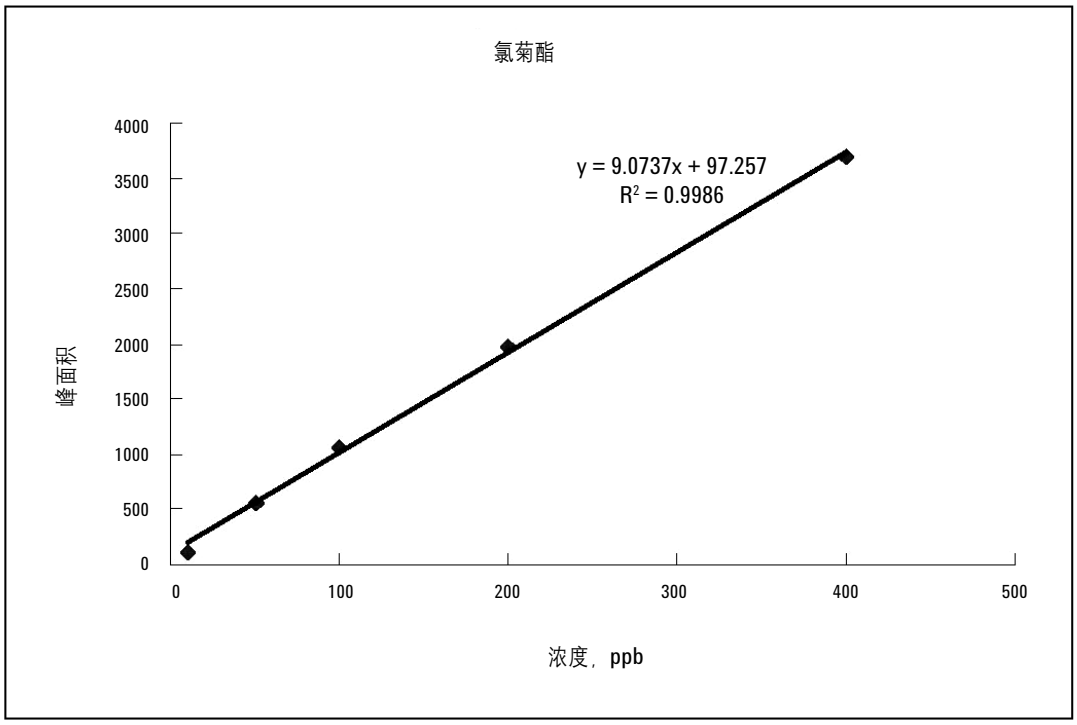


图 3. 氯菊酯的校正曲线

表 2. Agilent 6820 GC/Micro-ECD 分析有机氯和拟除虫菊酯的线性结果

化合物名称	平均响应系数	响应系数的相对标准偏差 (%)	线性范围 (ppb)	相关系数
α - 六六六	0.0064	7.5	1-400	0.9983
β - 六六六	0.0159	18.1	1-400	0.9984
γ - 六六六	0.0078	9.4	1-400	0.9988
δ - 六六六	0.0087	8.8	1-400	0.9986
七氯	0.0097	13.2	1-400	0.9987
艾氏剂	0.0078	8.0	1-400	0.9982
环氧七氯	0.0100	11.7	1-400	0.9983
硫丹 -I	0.0109	11.7	2-800	0.9983
p,p'- 滴滴依	0.0088	11.0	2-800	0.9948
狄氏剂	0.0123	13.0	2-800	0.9981
异狄氏剂	0.0152	16.3	2-800	0.9991
硫丹 -II	0.0121	15.8	2-800	0.9987
p,p'- 滴滴滴	0.0379	8.7	6-2400	0.9983
p,p'- 滴滴涕	0.0175	15.8	6-2400	0.9972
异狄氏剂醛	0.0139	10.6	6-2400	0.9989
硫丹硫酸酯	0.0140	10.0	6-2400	0.9988
甲氰菊酯	0.0500	18.0	1-400	0.9951
三氟氯氰菊酯	0.0225	8.6	1-400	0.9982
氯菊酯	0.1007	10.2	10-400	0.9986
氯氰菊酯	0.0809	7.2	10-400	0.9991
氰戊菊酯	0.0728	6.9	10-400	0.999
溴氰菊酯	0.0461	15.0	10-400	0.9996

参考文献

1. Channel, I., and Chang, I. L., “Analysis of Organochlorine Pesticides and PCB Congeners with the Agilent 6890 Micro-ECD”, Agilent Technologies, Application Note 228-384, Publication No. (23) 5965-8556E, June 1997.
2. GB/T 5009. 146-2003，“植物性食品中有机氯和拟除虫菊酯类农药多种残留的测定”，2003 年 8 月。

6820 气相色谱仪 / 氮磷检测器测定食品中的有机磷农药残留

作者

涂传鸿
安捷伦科技（上海）有限公司
上海市浦东新区外高桥保税区英伦路 412 号，200131

摘要

Agilent 6820 气相色谱仪/氮磷检测器用来测定有机磷杀虫剂。1-500 ppb 有机磷农药在氮磷检测器上呈良好的线性。浓度为 10 ppb 有机磷农药在色谱图上有良好的信噪比，大部分化合物检出限低于 ppb 级，远低于国家农药残留限量标准规定的各个化合物的浓度。

前言

为了提高粮食产量，有机合成农药广泛地应用于现代农业生产中。由于农药稳定的化学性质或不适当使用，农药残留超标现象经常发生。近年来由于蔬菜中农药残留过高引发的食物中毒屡见报道，使得人们对农药残留引发的食品安全问题十分关注。在中国，有机磷农药占全部农药使用量的 70% 以上，广泛的用于粮食，蔬菜和水果等作物[1]。我国已经对二十七个有机磷农药设定最高残留限量，并制定了相应的测定方法[2]。国家标准方法 GB/T 5009.145-2003 使用气相色谱/氮磷检测器测定了 16 种有机磷农药和 4 种氨基甲酸酯。本文介绍了使用安捷伦带氮磷检测器的 6820 气相色谱仪测定了常用的甲胺磷等 15 种有机磷农药。

实验部分

本实验在配置有分流 / 不分流毛细管柱进样口，氮磷检测器 (NPD) Agilent 6820 气相色谱仪 (GC) 上进行。分流 / 不分流进样口使用 Agilent 脱活不分流衬管（部件号 5183-4696）和适合手动进样的 Agilent 高级绿色进样隔垫（部件号：5183-4759）。Agilent Cerity NDS 色谱软件用于6820 GC的仪器控制，信号采集和数据处理。10 µL 微量注射器手动进样。色谱条件见表 1。本实验中，所有有机磷农药配制在丙酮溶液中。

表 1. 色谱分析条件

色谱仪	Agilent 6820
仪器控制及数据采集	Cerity NDS (中文版本)
进样口	分流 / 不分流进样口
进样口温度	250 °C
进样方式	不分流进样
进样体积	1 μL
吹扫时间	0.75 min
色谱柱	HP-5 ms 30 m x 0.32 mm x 0.25 μm (部件号：19091S-413)
载气	氦气，进样口压力：12 psi，2.5 mL/min (60 °C)
柱温	60 °C 保持 1 min，10 °C/min 升至 200 °C，5 °C/min 升至 250 °C，保持 5 min
检测器	氮磷检测器，325 °C，白色铷珠 (部件号：G1534-60570)
检测器气体	氢气：3 mL/min；空气：60 mL/min；尾吹气：氮气，10 mL/min

结果和讨论

校正曲线

图 1 是按表 1 中所列色谱条件下 1 ppm 15 种有机磷农药的色谱图。15 种有机磷农药基本得到分离，但毒死蜱和对硫磷在 HP-5ms 色谱柱上不能分离。各个色谱峰所对应的化合物见表 2。图 2 是以敌敌畏为例的校正曲线，所有化合物在 1-500 ppb 范围内均有良好的线性关系。

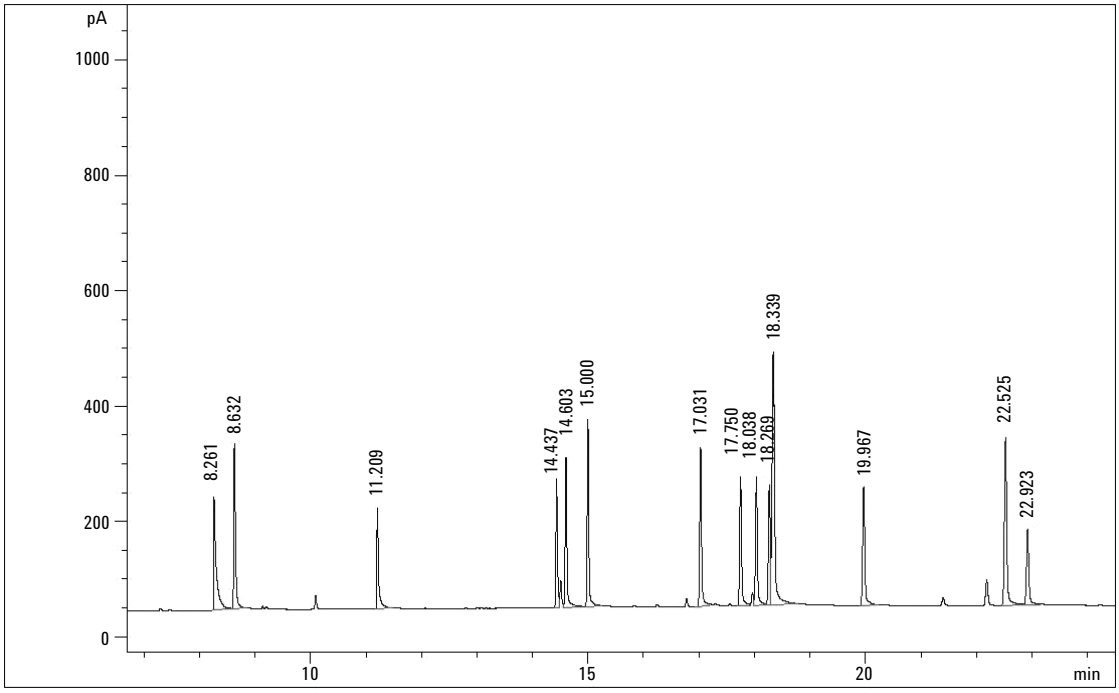


图 1. 15 种有机磷农药的色谱图

表 2. 有机磷化合物的保留时间

序号	保留时间	中文名称	英文名称
1	8.261	甲胺磷	Methamidophos
2	8.632	敌敌畏	Dichlorvos
3	11.209	乙酰甲胺磷	Acephate
4	14.437	久效磷	Monocrotophos
5	14.603	甲拌磷	Phorate
6	15.000	乐果	Dimethoate
7	17.031	甲基对硫磷	Parathion-methyl
8	17.750	杀螟硫磷	Fenitrothion
9	18.038	马拉硫磷	Malathion
10	18.269	倍硫磷	Fenthion
11	18.339	对硫磷	Parathion
12	18.339	毒死蜱	Chloropyrifos
13	19.967	杀扑磷	Methidathion
14	22.525	三唑磷	Triazophos
15	22.923	乙硫磷	Ethion

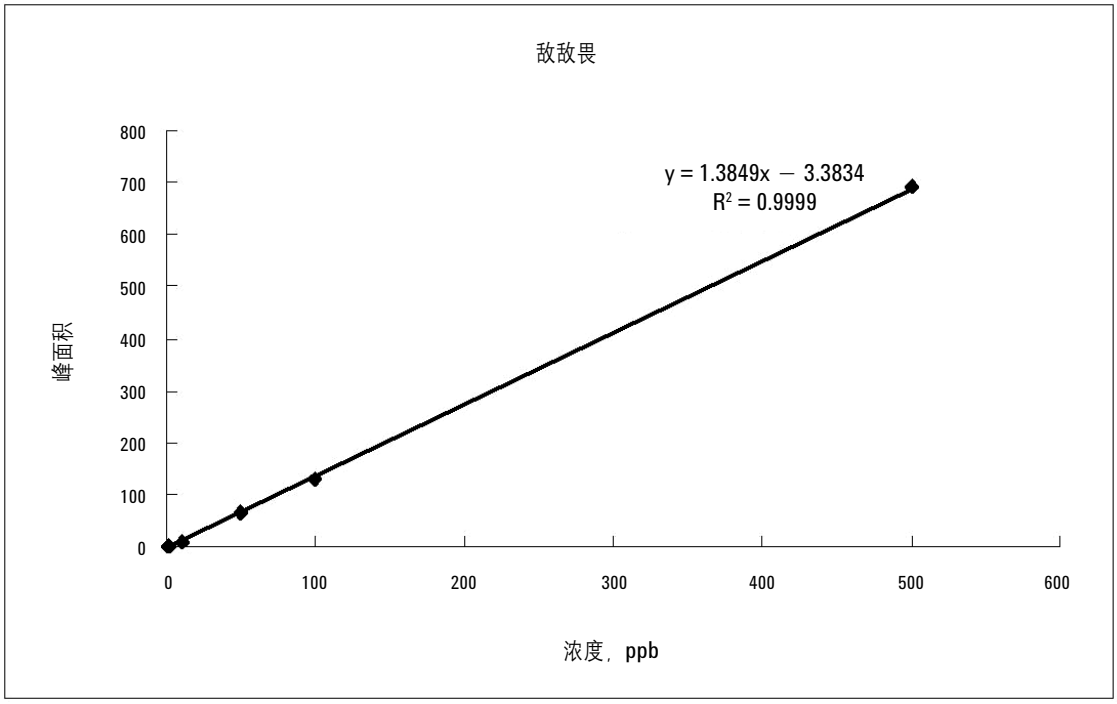


图 2. 敌敌畏的工作曲线

检出限

图 3 是 10 ppb 有机磷农药的色谱图，所有的化合物信号都很容易地定量。事实上，除活性较强的甲胺磷，乙酰甲胺磷和久效磷外，大部分化合物在 1 ppb 都有明显的峰。响应系数最低的乙酰甲胺磷在 10 ppb 浓度下还有足够的信噪比。氮磷检测器的检出限能够满足食品中有机磷农药残留限量测定的要求。

进样溶剂

样品处理过程中经常使用含卤素的有机溶剂。由于含卤素的有机溶剂能改变铷珠周围的化学环境，导致测定随后流出的待测的分析物的灵敏度急剧降低。虽然该灵敏度会逐渐恢复，但影响铷珠寿命[3]。如果待测物在样品处理最后一步是溶解在含卤素的溶剂中，在进样分析前，最好将溶剂置换为丙酮或者正己烷。

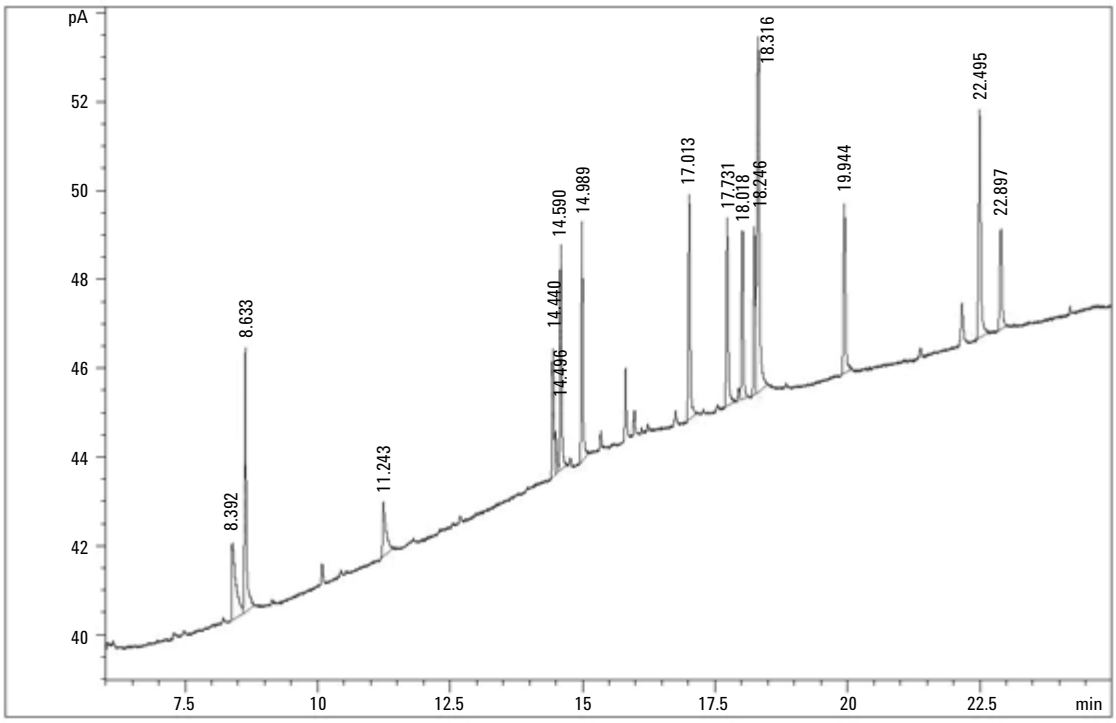


图 3. 10 ppb 有机磷农药在 Agilent 6820 GC/NPD 上的色谱图

结论

Agilent 6820 气相色谱仪 / 氮磷检测器能够满足有机磷农药残留限量所要求的测定灵敏度。在 1-500 ppb 浓度范围内，峰面积对浓度呈现良好的线性关系。

参考文献

1. 孙鑫贵等，北京市蔬菜、水果中有机磷农药残留现状调查，中国食品卫生杂志，15 卷，第 6 期，2003 年。
2. 叶纪明等，中国农药残留限量国家标准情况介绍，农药科学与管理，2000 年 4 月。
3. Kai Meng, Yeugeny Kaplun, Rich White, “The New Features of the HP 6890 Nitrogen-Phosphorus Detector to Deal with Hostile Solvents,” Agilent Application Note, 228-306, Publication No. (23) 5963-6808E.

鱼油直接进样用 GC-ECD 分析多氯联苯：使用带反吹的 Deans Switch 的结果

应用

环境和制药行业

作者

Philip L. Wylie
安捷伦科技公司
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
美国

摘要

在配置双电子捕获检测器 (ECD) 的 Agilent 7890A 气相色谱仪上配置安捷伦的微板流路控制技术 Deans Switch。开发了一个分析鱼油中多氯联苯 (PCB) 污染物的方法。Deans Switch 用于从第一支色谱柱 DB-XLB 上中心切割 7 个标志性 PCB（IUPAC 同系物 28、52、101、118、138、153 和 180）到第二支色谱柱 DB- 200 上进行进一步分离。来自补品胶囊的鱼油用异辛烷只稀释 10 倍，然后直接进样。在这些分析中，用配置火焰离子化检测器的气相色谱仪 (GC/FID) 分析鱼油，没用反吹。从这些实验中估计有约三分之二的鱼油成分经过 17.4 min GC/ECD 运行后仍然保留在色谱柱上。为了防止记忆效应、污染和保留时间漂移，采用 Deans Switch 在每次运行结束时反吹第一支色谱柱。结果证明，反吹清除了可能很快降低色谱性能的鱼油残留物。

前言

鱼油含有大量的二十一碳五烯酸 (EPA) 和二十二碳六烯酸 (DHA)，omega-3 脂肪酸，这些成分被认为有益于健康。除了吃鱼之外，很多人在日常饮食中将鱼油作为补品食用。但是，鱼，特别是处于食物链高端的水产品，能够生物富集脂溶性污染物。多氯代二噁唔 (PCDD)，多氯代苯并呋喃 (PCDF) 和多氯联苯（PCB）就是这样的污染物。所以，作为补品的鱼油要进行各种分析，包括测定卤代污染物。

质量保证的一项检测手段之一是分析鱼油中的 PCB 污染物。这一分析是复杂的，因为鱼油是非常复杂的混合物，含有高沸点脂肪酸和脂肪酸的甘油三酸酯；链长大部分在 14 到 22 个碳之间。鱼油还含有各种磷脂、甘油脂、蜡酯和脂肪醇。PCB 有 209 种可能的同系物，其本身的分析也是复杂的。其中，在叫做 Aroclors 的商品 PCB 中观察到了 140 到 150 种同系物。PCB 分析一般集中在 12 种平面结构的、类似于二噁唔的 PCB 和/或 7 种标志性 PCB（IUPAC 编号 28、52、101、118、138、153 和 180）。

为了获得分析这些化合物足够的灵敏度和选择性，以前曾采用成本很高的技术，如高分辨质谱 (HR/MS) 或 HR/MS/MS。鱼油的分析一般遵循一系列萃取和净化步骤。本文集中分析鱼油中 7 种标志性 PCB，仪器为配置 Deans Switch 的 Agilent 7890A GC，用两支不同选择性的色谱柱和两个电子捕获检测器 (ECD)。市售补品中的鱼油用异辛烷只稀释 10 倍后直接进入 GC 分析，不用任何净化步骤。

实验部分

鱼油购自本地药店。根据包装袋的标签，每个胶囊含有 1.0 g 鱼油，其中 180 mg 为 EPA，120 mg 为 DHA。从胶囊除去油，然后用异辛烷（农药级，购自美国 Sigma-Aldrich，Milwaukee，WI）稀释成 10% 的溶液。该溶液再加入各种 Aroclors（Supelco，Bellefonte，PA，USA）或单个 PCB 同系物（AccuStandard，New Haven，CT，USA）。

表 1 列出了这一分析的仪器和实验条件。

表 1. 仪器和实验条件

仪器和软件	
气相色谱仪	Agilent 7890A
自动进样器	Agilent 7683B 系列进样器和样品盘
第一支色谱柱	J&W 30-m×0.18-mm×0.18-µm DB-XLB （部件号 121-1232）
第一支色谱柱连接	分流/不分流进样口连接到 Deans Switch
第二支色谱柱	J&W 30-m×0.25-mm×0.50-µm DB-200（部件号 122-2033）
第二支色谱柱连接	Deans Switch 连接到后 ECD
限流器	76.8-cm×0.100-mm 脱活熔融石英管
限流器连接	Deans Switch 到前 ECD
进样口衬管	安捷伦脱活的、单细径锥，带玻璃毛 (部件号 5062-3587)
辅助压力控制	Agilent 7890A 气路控制模块（PCM）选项# 309
Deans switch 计算器软件	安捷伦科技 Deans Switch 计算器 (版本 A.01.01)
数据采集和分析软件	安捷伦 GC 化学工作站 (版本 B.03.01)
仪器分析条件	
进样口	分流/不分流 330 °C
柱箱升温程序	80 °C (1 min)，50 °C/min 到 200 °C (0 min)，10 °C/min 到 290 °C（保持 5 min）
检测器	双 ECD 340 °C
ECD 尾吹气	N_2 60 mL/min
进样口压力	H_2 41.040 psig（恒压模式）
PCM 到 Deans Switch 的压力	H_2 20.610 psig（恒压模式）
后运行反吹条件	
后运行时间	2.4 min
进样口压力	H_2 0 psig
PCM 压力	H_2 80 psig
反吹时柱温	290 °C 保持 2.4 min

结果与讨论

若不用反吹，鱼油的高沸点组分可以保留在 GC 柱中，从而对下一次分析造成严重的交叉污染问题。几次进样之后，累积在色谱柱中的鱼油残留物已有很多，导致 PCB 的保留时间漂移 1 分钟甚至更多。保留时间漂移这么大，不可能使用 Deans Switch，因为中心切割宽度只有几秒钟。

Deans Switch–中心切割

Deans Switch 是采用微板流路控制技术的安捷伦新装置之一。这些装置有极其低的死体积、惰性、不泄漏，即使在柱箱大幅度升降温，反复循环也是如此。Dean Switch 安装在色谱柱箱侧面（图 1），很容易安装色谱柱。

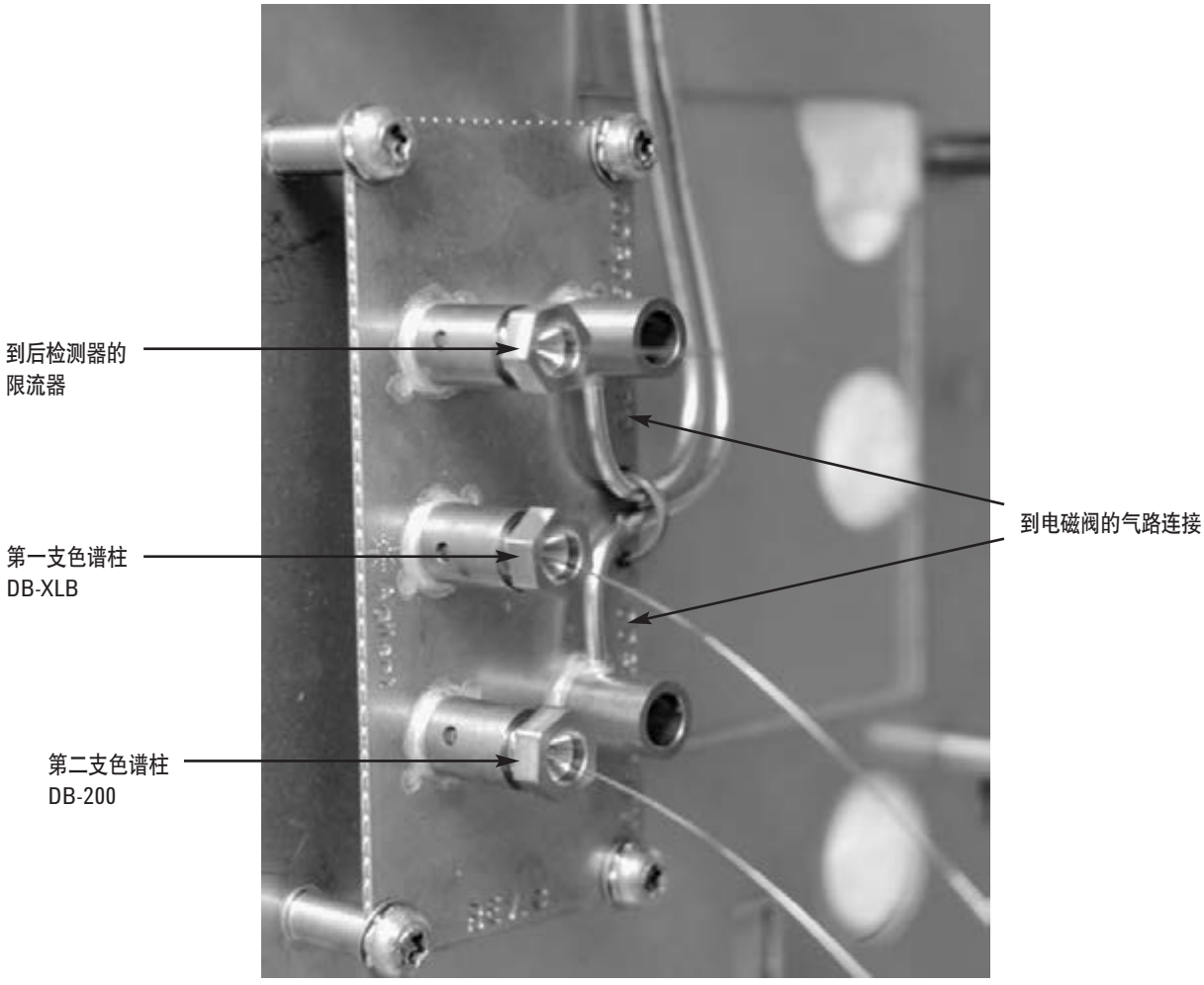


图 1. 安装在 7890A GC 柱温箱侧面的 Deans Switch 的照片。在图 2a 中用*表示色谱柱和限流器的连接

如图 2a 所示，30-m × 0.18-mm × 0.18-µm DB-XLB 色谱柱连接在分流/不分流进样口和 Deans Switch 之间。一个短的脱活熔融石英毛细管（76.8 cm × 0.100 mm）将 Deans Switch 连接到前 ECD。第二支色谱柱的选择（30-m × 0.25-mm × 0.5-µm DB-200）是因为它比 DB-XLB 色谱柱的极性强，且对 PCB 有不同的选择性。其使用温度上限为 300 °C，足以洗脱感兴趣的 PCB。

图 2a 所示为“正常”模式的 Deans Switch，电磁阀在 off 位置。在此模式下，第一支色谱柱 DB-XLB 的流出物直接通过限流器进入前 ECD。当电磁阀切换后，流出物通过第二支色谱柱 DB-200 进入后 ECD（图 2b）。7 种标志性 PCB 的保留时间在阀处于 off 位置时初步测定。使用化学工作站的时间编程事件表可以精确控制电磁阀在每个 PCB 峰之前切换到 on 位置，PCB 峰之后立即切换到 off 位置。这样就产生了 7 个中心切割，导入 DB-200 色谱柱分离，并被后 ECD 检测。

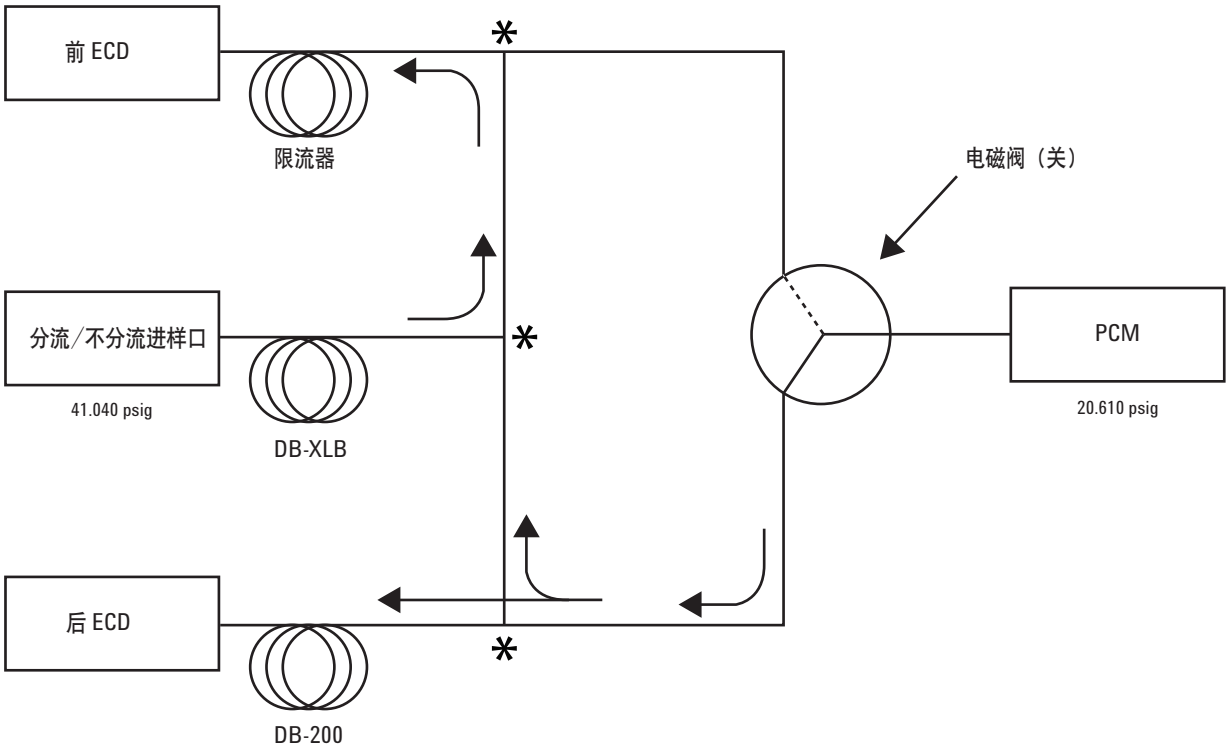


图 2a. Deans Switch 在“no cut（不切割）”位置。来自 DB-XLB 色谱柱的流出物经过短的限流器直接进入前 ECD。连接点标有*的是色谱柱和限流器，连接到 Deans Switch 板（图 1）

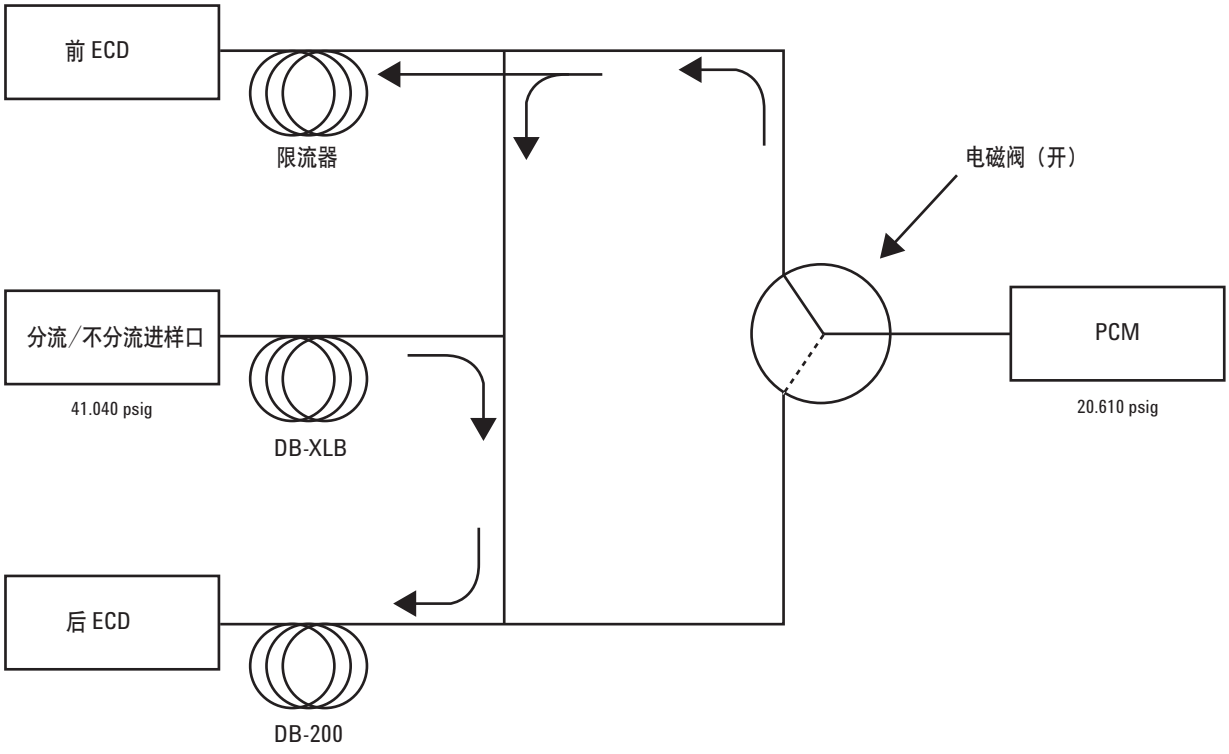


图 2b. Deans Switch 在“cut*（切割）”位置。来自 DB-XLB 色谱柱的流出物进入 DB-200 色谱柱，然后进入后 ECD

在某些 Deans Switch 系统中，第二支色谱柱置于另一个独立的 GC 柱箱，或采用制冷方法将中心切割组分捕集在第二支色谱柱的柱头。在本文的分析下，两支色谱柱都安装在 7890A 柱箱内，不必用冷却来将化合物聚焦到色谱柱 DB-200 的柱头。

图 3a 所示为加入 Aroclor 1260 的鱼油的色谱图。PCBs 28、52、101、118、138、153 和 180 从主色谱图（图 3b）上切割到第二支色谱柱（图 3c）。DB-200 色谱柱的目的是将目标 PCB 与其它 PCB 以及在 DB-XLB 色谱柱上同目标 PCB 共流出的基质组分相分离。7 种 PCB 中的 6 种在 DB-200 色谱柱上获得了良好分离，只有 PCB 118 是部分分离的。

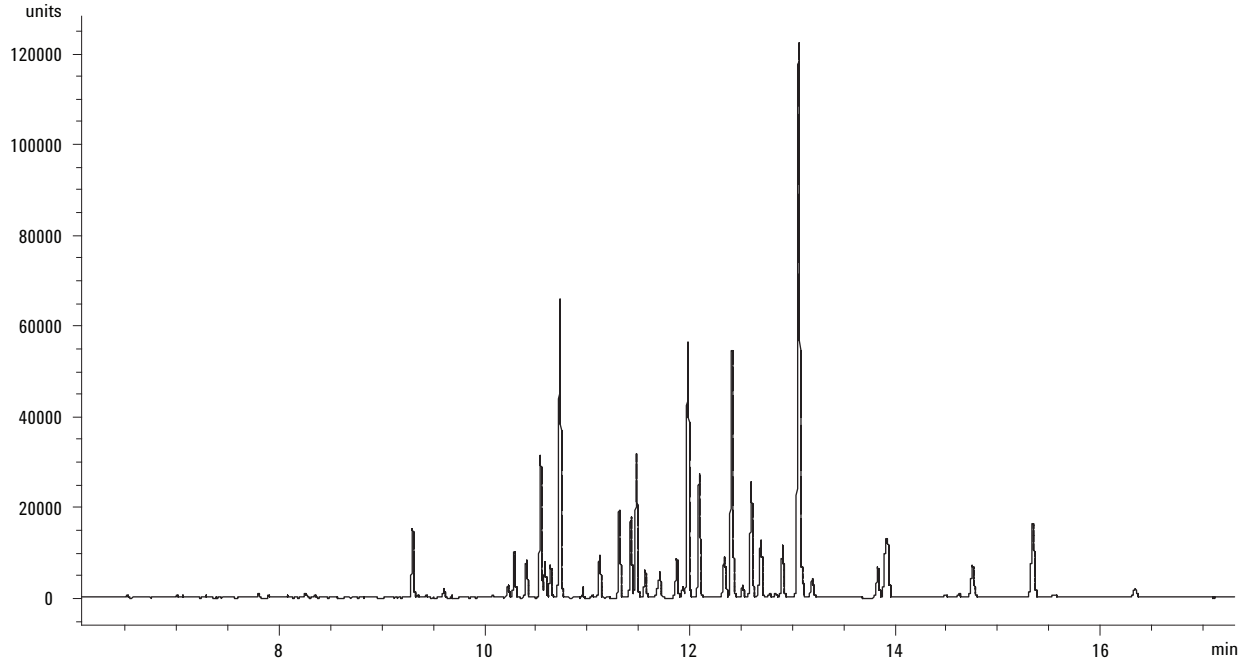


图 3a. 加入 Aroclor 1260 的鱼油的 GC/ECD 色谱图。这是从第一支色谱柱 DB-XLB 上 7 次中心切割的流出物

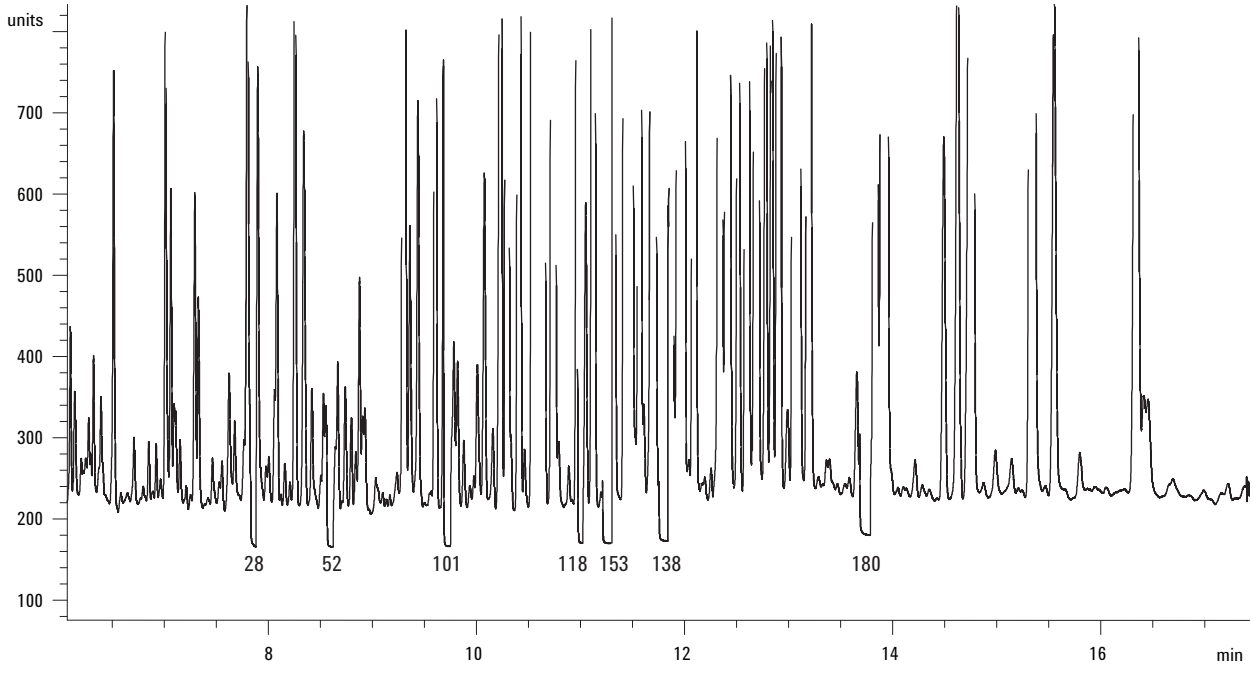


图 3b. 图 3a 色谱图的放大图，显示 7 个目标 PCB 中心切割的位置

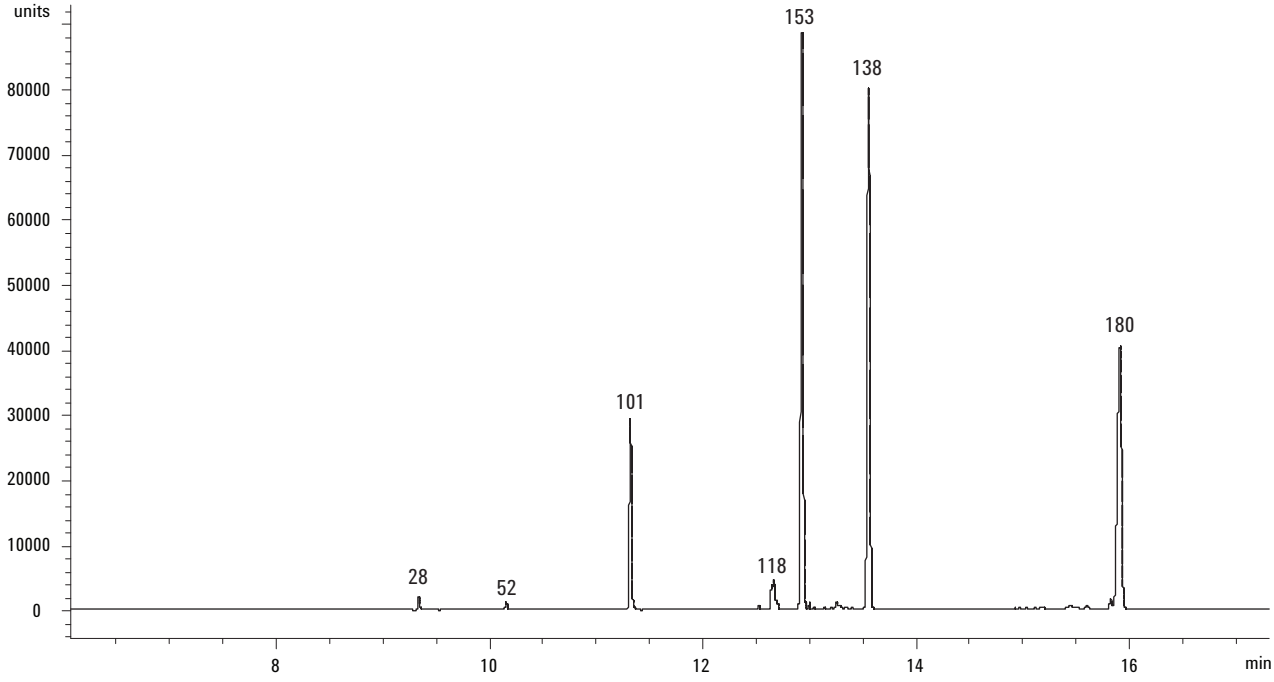


图 3c. DB-200 色谱柱的 GC/ECD 色谱图。该色谱图上的峰是从 DB-XLB 色谱柱上中心切割来的。除了同系物 118，目标 PCBs 在 DB-200 色谱柱上与共流出物分离得很好

Deans Switch–反吹

Deans Switch 系统的数据采集在柱温 290 °C 时于 17.4 min 结束。虽然假设在此条件下大部分鱼油组分保留在色谱柱上，但是不可能确认这一点，因为 ECD 对这些化合物的响应很低。鱼油在色谱图上确实表现出某种小峰（正峰和负峰），但不可能看到鱼油的全部峰。所以，采用单一 DB-XLB 色谱柱、火焰离子化检测器 (FID)、不用 Deans Switch 分析了鱼油样品。温度在 290 °C 再保持 25 min，以确定是否仍然有高沸点组分流出。

图 4 说明在 17.4 min 之后仍然有大量的鱼油组分流出（见图中箭头）。当在最终温度 310 °C 的条件下运行空白样品时，更多的鱼油组分从色谱柱流出（图 4，中间色谱图）。第二次空白运行（图 4，上图）显示，还有鱼油组分从色谱柱流出。实际上，在 Deans Switch 条件下，只有约三分之一的鱼油流出色谱柱。这就是为什么其它鱼油分析方法开始要进行溶剂萃取，然后用固相萃取净化样品的缘故。

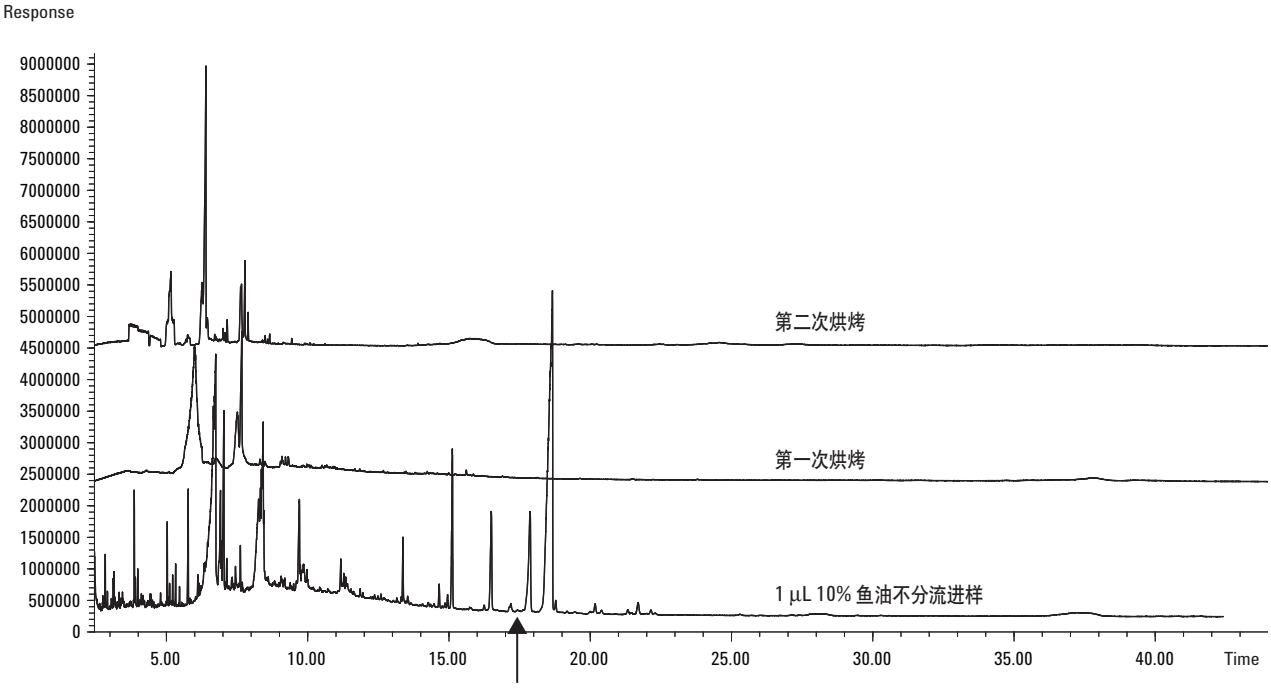


图 4. 1 µL 10% 的鱼油样品不分流进样的 GC/FID 色谱图，色谱柱为 30-m×0.18-mm×0.18 µm DB-XLB 毛细柱。箭头表示 GC/ECD 方法的结束点，此时开始后运行反吹。在此情况下，没有反吹，故柱温在 290 °C 再保持 25 min。运行不进样重复两次，运行结束时在 310 °C 再保持 30 min。鱼油进样的残留物甚至在第二次烘烤步骤中还继续从色谱柱流出

7890A 的设计将色谱柱反吹作为常规操作。经验已经证明，反吹应当持续的时间是最终温度保持时间的 5 倍。在本文的分析中，运行后反吹过程中色谱柱保持在 290 °C。同时，进样口压力降低到 0 psig，而 PCM 压力则升高到 80 psig。使用安捷伦的 GC 压力/流速计算器软件，反吹色谱柱的 H_2 流速是 3.81 mL/ min，保持时间是 0.466 min。所以，反吹持续 2.4 min，这比计算的保持时间值的 5 倍稍多一些。图 5 所示为反吹模式的 Deans Switch。

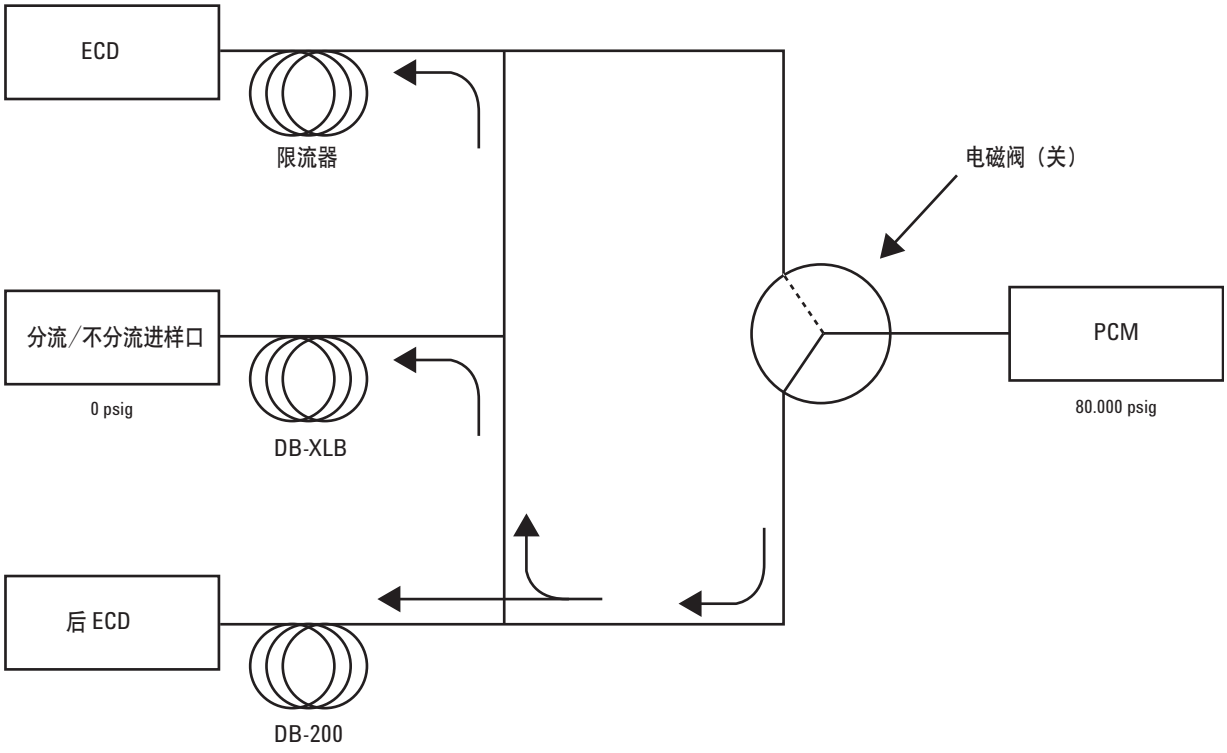


图 5. “反吹”模式下的 Deans Switch。进样口压力降为 0（或 1）psig，而 PCM 压力则升高到 80 psig。这使得载气反向流过 DB-XLB 色谱柱。反向的气流将高沸点鱼油组分吹出色谱柱头，并通过分流出口放空

如前所述，只是几次鱼油进样就造成了 PCB 保留时间的很大漂移。反吹迫使残留的鱼油成分反向通过第一支色谱柱从分流出口放空。这就防止了鱼油在色谱柱上的累积，因而消除了记忆效应和保留时间漂移。图 6a 比较了连续 6 次运行的第一次和最后一次的色谱图。10% 的鱼油加入 Aroclor 1260 后不分流进样 1-µL。这一序列分析是这一方法在许多次鱼油进样之后进行的，很显然，保留时间不再漂移。

图 6b 所示为从图 6a 的两次分析中中心切割的 7 个 PCB。图 6b 说明第一次和最后一次切割的色谱图没有不同，进一步证明了 PCB 的保留时间没有明显的漂移。每个中心切割的宽度只有 4 到 5 秒钟，所以，第一支色谱柱上很小的保留时间漂移会明显影响第二支色谱柱的结果。

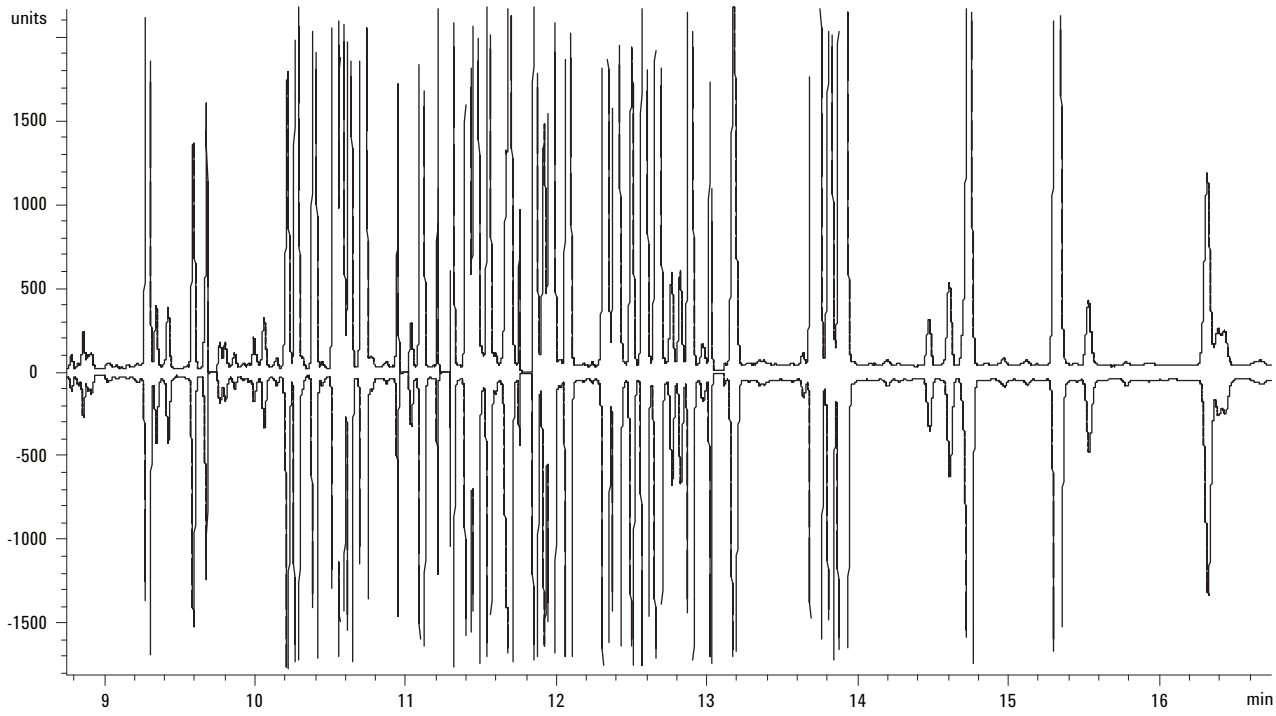


图 6a. 10% 的鱼油加入 Aroclor 1260 的第一次（上图）和第六次（下图）进样结果。为了分离 PCB 28、52、101、118、138、153 和 180，从 XDB-XLB 色谱柱设定了 7 个 Deans Switch 中心切割。每次运行后反吹 DB-XLB 色谱柱，以防止了鱼油残留成分的累积。比较结果显示没有鱼油聚集造成的保留时间漂移

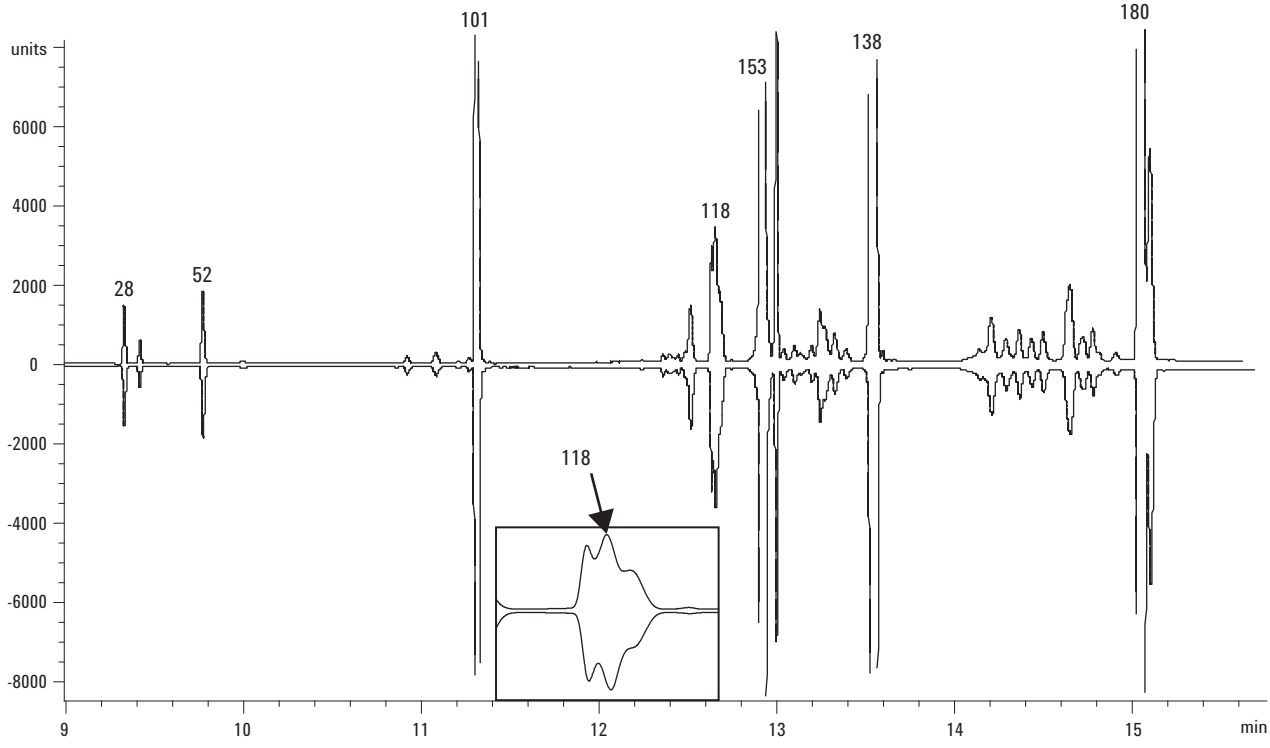


图 6b. 从 DB-XLB 色谱柱切割的 7 种 PCB 同系物和干扰物在 DB-200 色谱柱上的色谱图。第一个色谱图（上图）和第六个色谱图（反过来的图）是一致的，进一步证明保留时间的稳定性。第一支色谱柱上的任何保留时间漂移都将严重影响第二支色谱柱的分离结果

结论

本文的研究说明，在 GC 进样前，不需要进行费力的样品制备和净化步骤就可以分析鱼油中的 PCB。Deans Switch 用于从 DB-XLB 色谱柱中心切割 7 种目标 PCB（28、52、101、118、138、153 和 180），随后用 DB-200 色谱柱进行进一步分离。这使目标 PCB 近乎基线分离。只有同系物 118 没有同共流出的 PCB 完全分离。为分离这一 PCB，可能需要进一步细调柱温程序。

有人估计，运行结束时大约有三分之二的鱼油保留在第一支色谱柱上。运行结束时通过将 Deans Switch 设定为反吹模式，只用 2.4 min 的反吹就可将这些组分反吹出色谱柱，并通过分流出口放空。运行与运行时间不再有保留之间漂移或记忆效应。

用 7890A 气相色谱和毛细管色谱柱反吹分析化妆品中的可疑香精香料致敏源成分

应用

化学品

作者

Frank David
Research Institute for Chromatography
Pres. Kennedypark 26
8500 Kortrijk
Belgium

Matthew S. Klee
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

使用气相色谱/质谱联用仪测定化妆品中的香精香料致敏源成分。通过简单的无选择性样品萃取/稀释样品前处理后，在快速筛选条件下采用保留时间锁定进样分析萃取物。通过稀释目标待测物，低挥发性的样品基质成分，例如洗涤剂，可以被有效地从毛细管色谱柱中反吹出去。色谱柱和检测器的受污染程度可以得到极大的降低。样品分析通量可显著提高。

引言

按照欧盟指令2003/15/EC[1], 有27种香精成分，如果其浓度高于100 ppm（mg/kg）（对于洗涤产品，例如洗浴用凝胶或香皂），或高于10 ppm（对于涂抹、喷洒物质例如香水或膏霜），则它们的含量必须标示在化妆品标签上。定性定量检测各种化妆品中的此类目标化学成分成为了一种必然趋势。

根据不同的样品基质和待测物浓度需要采用不同的样品前处理方法[2]。对于检测化妆品中的香精香料致敏源成分，一个主要的难题就是挥发性弱或不挥发的成分，例如洗涤剂（非离子化的和离子化的），蜡质，脂质等等。如果样品不经过选择性的样品前处理进入分析仪器则会严重污染分析仪器。选择性样品萃取或选择性样品前处理并不容易，然而，由于目标待测物具有非常宽的挥发性范围（从柠檬烯到安息香苯甲酯）和极性范围（从相对强极性的苯甲醇到非极性的安息香苯甲酯）。方法的选择必须顾及到两个方面，一方面是 ppm 级的灵敏度要求，另一方面需要避免目标待测物的相对挥发性和极性差异造成的样品歧视。还有，对于常规质量控制中的样品分析，样品前处理应当简化，避免繁琐步骤。无选择性的溶剂或萃取物直接进样是最有效的方法。最近，液体样品通过非挥发性成分在填充后的 PTV 衬管中的选择性保留以及衬管自动更换组合已经得到开发以及方法验证[3]。此技术需要采用更加精密设计的进样器。

本文采用了一种替代方法，即使用标准分流/不分流进样口和微板流路控制技术。一个 Quick Swap 安置被安装在色谱柱的末端（与质谱仪传输线相联），从而可使色谱柱出口的压力通过辅助电子气路控制装置 (EPC) 而得到控制。在最后一个目标待测组分流出色

谱柱后，通过降低进样口压力以及提高出口压力，剩余在色谱柱中的成分可以被迫从色谱柱头通过分流进样口进入分流放空阱中。

本分析采用了具有保留时间锁定的 GC-MS 技术。参考分析方法: 氦气条件下，30 m X 0.25 mm内径X 0.25 µm 的 HP-5MS 色谱柱[2]，为提高分析通量，本文采用了快速筛选分析法，即使用一支15 m色谱柱以及氢气作为载气。目标分析物达到完全分离的分析时间从 24 min 缩短到了 8 min （速度提高3倍）。挥发性较弱的样品基质成分从色谱柱中反吹出去，避免色谱柱和检测器受到污染，基线漂移或残留污染物对于随后的样品分析造成的杂质峰影响。

样品制备

将样品用适当的溶剂（通常用丙酮或二氯甲烷）稀释至 5% (50 mg/mL)。将样品置于超声池中 15 分钟直至目标溶质在溶剂中完全溶解。经萃取和溶解后，离心，将上清液转移到自动进样器的样品瓶中。

在本应用中，采集的洗发水样品数据包括香精化合物和非离子型洗涤剂。

GC 条件

所有分析均在 Agilent 7890A GC -5975 MSD 上进行。用 7683 自动进样器进样。GC-MS 条件如下：

GC-MS条件

色谱柱：	15 m X 0.25 mm 内径X 0.25 µm HP-5MS	安捷伦部件号：19091-431
载气和压力：	氢气	11. 050 psi 恒压
色谱柱出口和压力：	Quick Swap	4 psi 辅助 EPC
进样口：	分流/不分流进样口分流模式	250 °C，分流比=50:1
柱温：	快速分析（速度提高 3 倍）*	50 °C（0.33min），以 24 °C/min 升温至 240 °C
质谱仪设定：	传输线温度：	250 °C
	离子源温度：	300 °C
	四极杆温度：	150 °C
调谐：	自动调谐	EMV+0V
Quick Swap 限流器：	17 cm X 110 µm 内径（4psi）	部件号：G3185-60063
检测器：	质谱仪扫描模式	40-350 amu，样品 = 2[1]
质谱仪事件设定：	溶剂延迟	1.5 min.
	关闭检测器（反吹期间）	8.0 min.

* 在以上条件下，α-异甲基紫罗兰酮在 5.17 min. 出峰，与先前公布的保留时间锁定方法 [2] 中的保留时间相比，分析速度提高了 3 倍。

反吹条件（最初的 8 min.）

进样口压力：	2 psi
辅助气压力：	70 psi
反吹时间：	2.75 min.
反吹温度：	240 °C

结果

首先，在常规分析条件下-不反吹并且程序升温到 320 °C 以确保最后的成分也流出色谱柱来分析洗发水萃取物。图 1，将 10 次连续进样的样品的总离子流图重叠在一起。在谱图的前半部分显示出了优异的保留时间和峰面积的重现性。

此样品中，检测出了部分致敏源成分，包括柠檬烯（峰 1），芳樟醇（峰 2），丁香酚（峰 3），铃兰醛（峰 4），己基肉桂醛（峰 5），安息香苯甲酯（峰 6），水杨酸苄酯（峰 7）。8 min 后目标化合物不再流出，相应的非离子化的洗涤剂开始出峰。尽管使用了 320 °C 的高温，这些化合物仍然不能完全从色谱柱中流出。这就导致了杂质峰的出现（例如 11.7 min 箭头所指）。杂质峰和其他的由于柱内残留成分增加会随运行的样品数增加而逐渐增加，显而易见不是所有的低挥发成分都能流出色谱柱。因此 10 min. 以后基线明显升高。值得注意的是此 14 分钟的样品分析中，全部目标致敏源成分在最初的 8 分钟已经达到了必要的分离与定量分析要求。剩余时间无非是常规地升高色谱柱温度将强保留成分赶出色谱柱，正如例中所示，完成此目标并非容易。

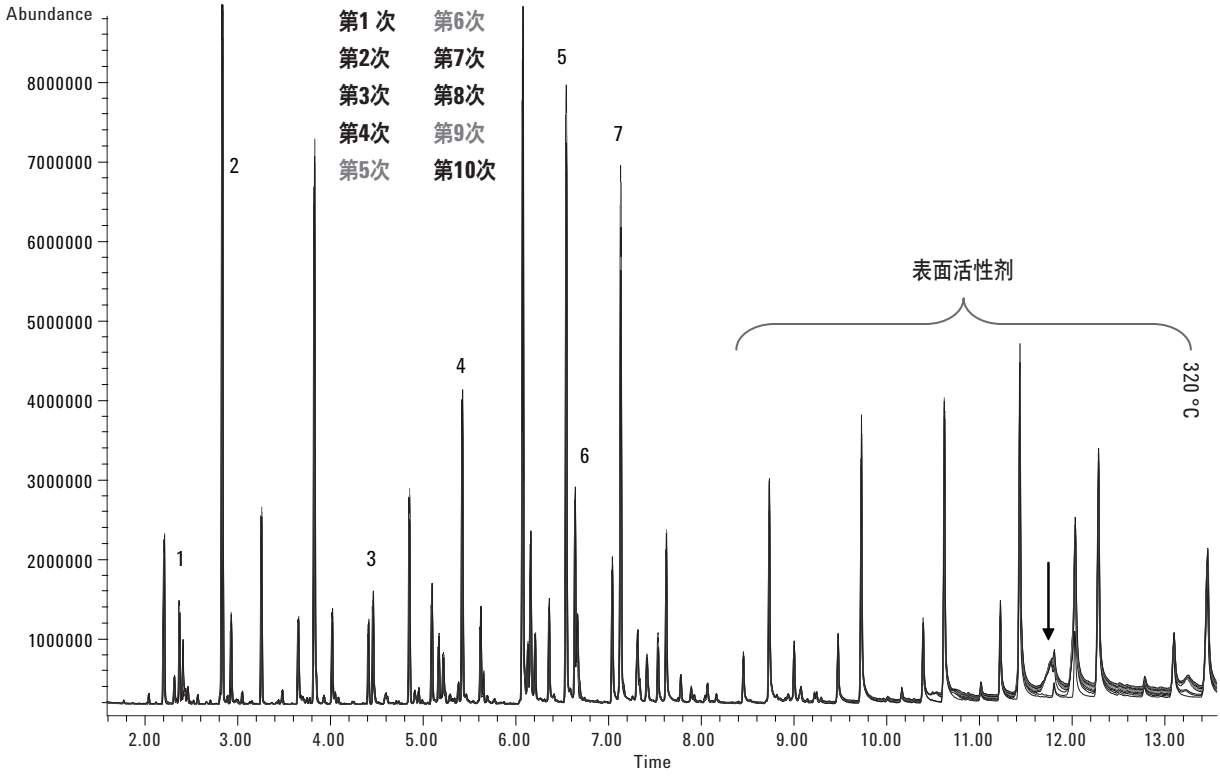


图 1. 洗发水萃取物总离子流图的 10 次连续进样的样品谱图重叠（不反吹并且程序升温度到 320 °C）

10 次连续进样的样品分析后运行 2 次空白，参见图2。两次空白样品谱图中 6 至 8 min. 内重复出现部分污染物色谱峰（可能由于多次重复穿刺样品瓶隔垫所导致）。在10 min. 后较大的色谱峰流出色谱柱，非常明确地表明大分子量成分能在色谱柱中累积，甚至升温至 320 °C 仍然无法从色谱柱中去除掉。

随后的实验中，连续运行了 6 次洗发水萃取物。对于每一次的分析，分析时间停留在 8 min. 处，全部强保留的目标致敏源成分均已流出。6 次样品分析后，运行 2 次空白样品：一次空白采用与样品分析完全相同的分析条件在 8 min 240 °C 时结束。另一次空白则程序升温至 320 °C。将 6 次样品分析、第一次空白（停留在 8 min. 240 °C）、第二次空白（程序升温至 320 °C）的总离子流图的谱图叠加在图 3 中。

即使在第一次空白谱图中一些杂质峰也出现在 8 min 内。第二次空白升温至 320 °C，非常明确地表明每次进样时挥发性较弱的成分都累积在色谱柱中。样品在色谱柱中的积累会快速导致色谱柱受损以及逐步降低微量待测样品成分的检测限和定量限。使用常规的升至高温去除色谱柱中的强保留成分（清洁色谱柱）的方法，不仅导致色谱柱由于氧化和固定相聚合物流失造成色谱柱提前老化，而且色谱柱中的污染物会进入质谱仪离子源，降低质谱仪性能，增加清洗离子源的频率。

接下来，使用反吹方法运行 10 次样品，然后运行 1 次空白，样品分析谱图见 4。

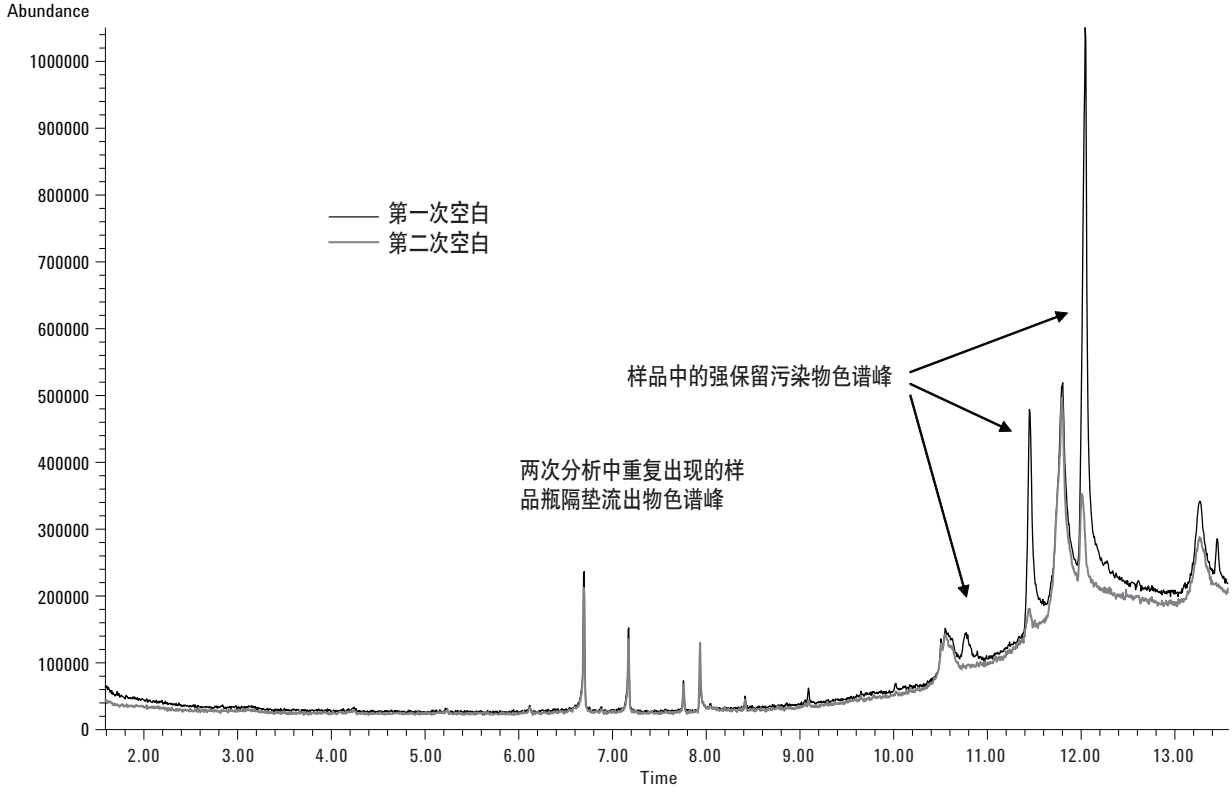


图 2. 洗发水萃取物样品分析后运行 2 次空白

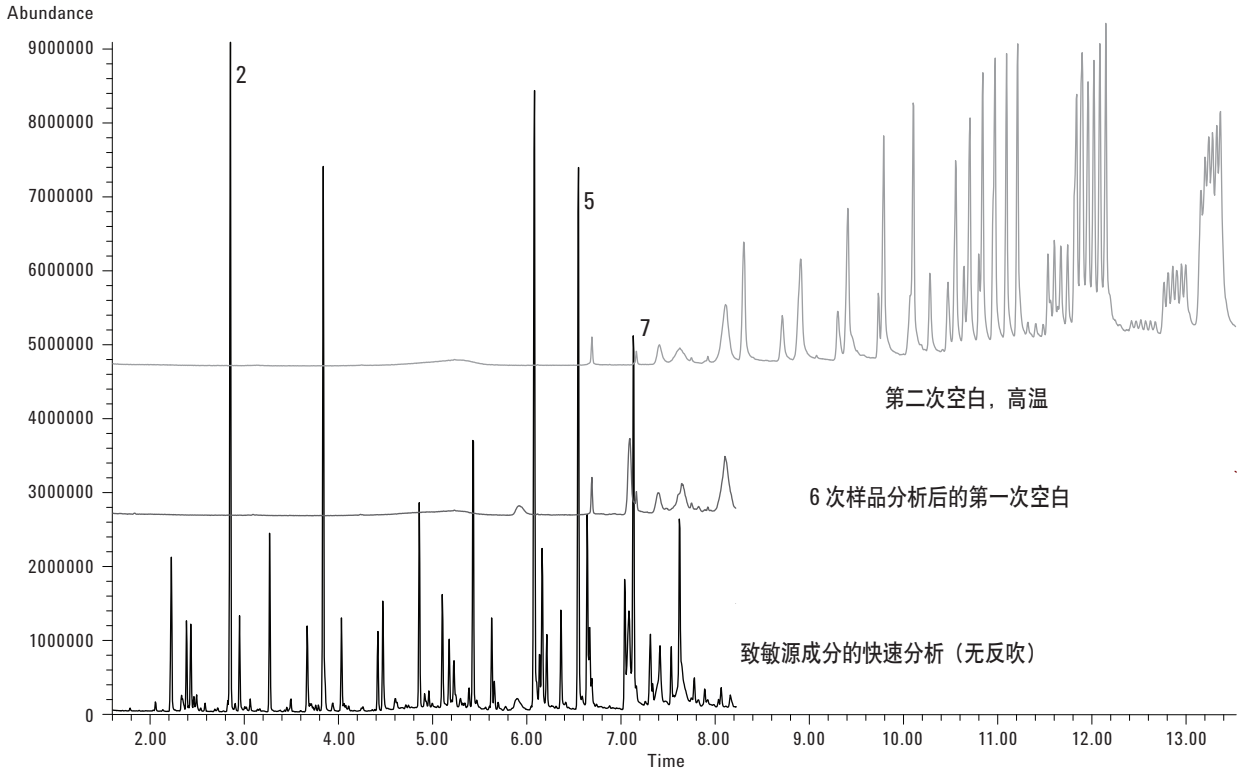


图 3. 6 次分析洗发水萃取物样品总离子流图的叠加，升温至 240 °C（下方），第一次空白后升温至 240 °C（中间），第二次空白升温至 320 °C（上方）

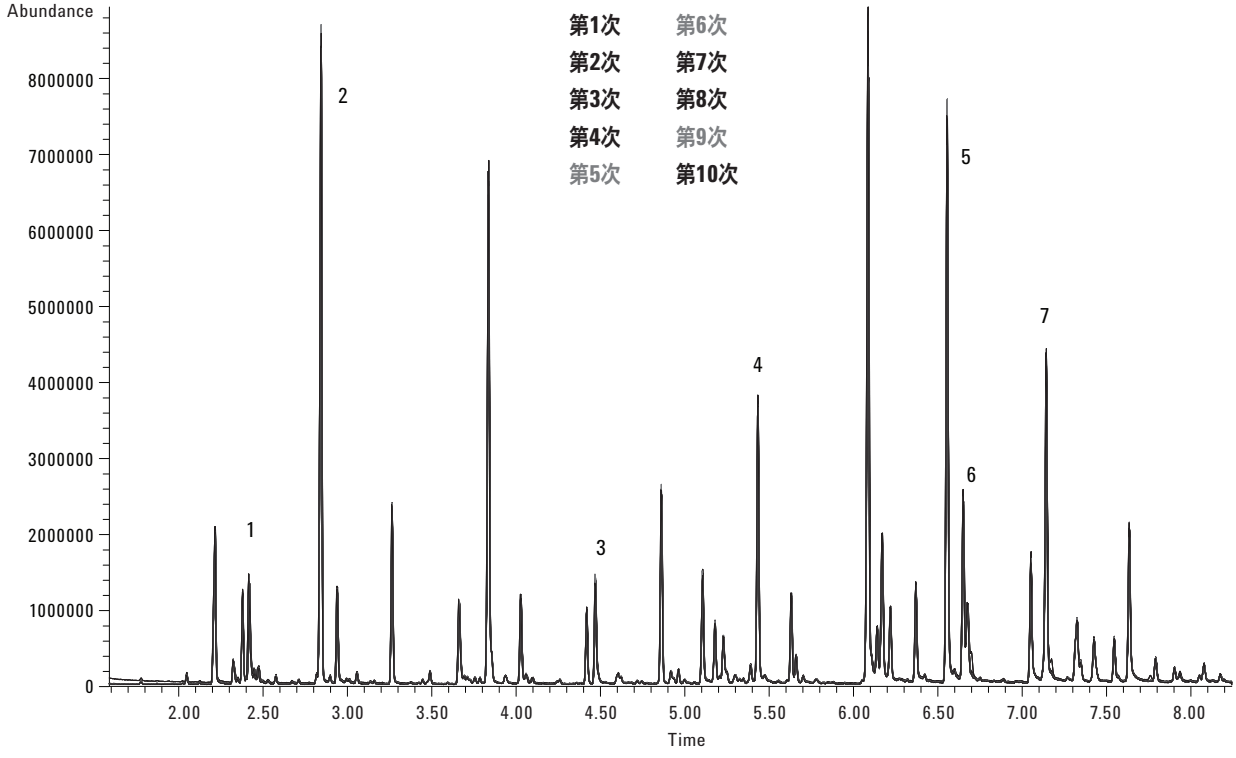


图 4. 10 次连续分析洗发水萃取物样品总离子流图的叠加（反吹，程序升温至 240 °C）

图 4 非常明确地表明了优异的保留时间和色谱峰峰面积的重现性，没有柱内残留物流出痕迹：没有出现杂质峰，基线也没有升高。

图 5 中第 10 次样品后紧接着一次空白样品。空白样品谱图中，仅有样品瓶隔垫流出物杂质峰。洗涤剂组分被非常有效地吹出色谱柱。

总共分析时间从 13.6 min（程序升温到 320 °C，定温保持 2 min.）缩短到 11 min.（程序升温到 240 °C，2.75 min. 反吹）。并且所有低挥发性组分都已经方吹出了色谱柱，因此没有延长分析时间的必要。额外的好处在于由于色谱柱终温降低了，因此柱温箱的冷却时间和平衡时间也得到了相应的缩短。

7 个已知的致敏源组分的保留时间和色谱峰面积的重现性系数参见表 1。保留时间的标准偏差优于 0.002 min.（RSD<0.03%）。再者色谱峰面积的重现性也非常高。

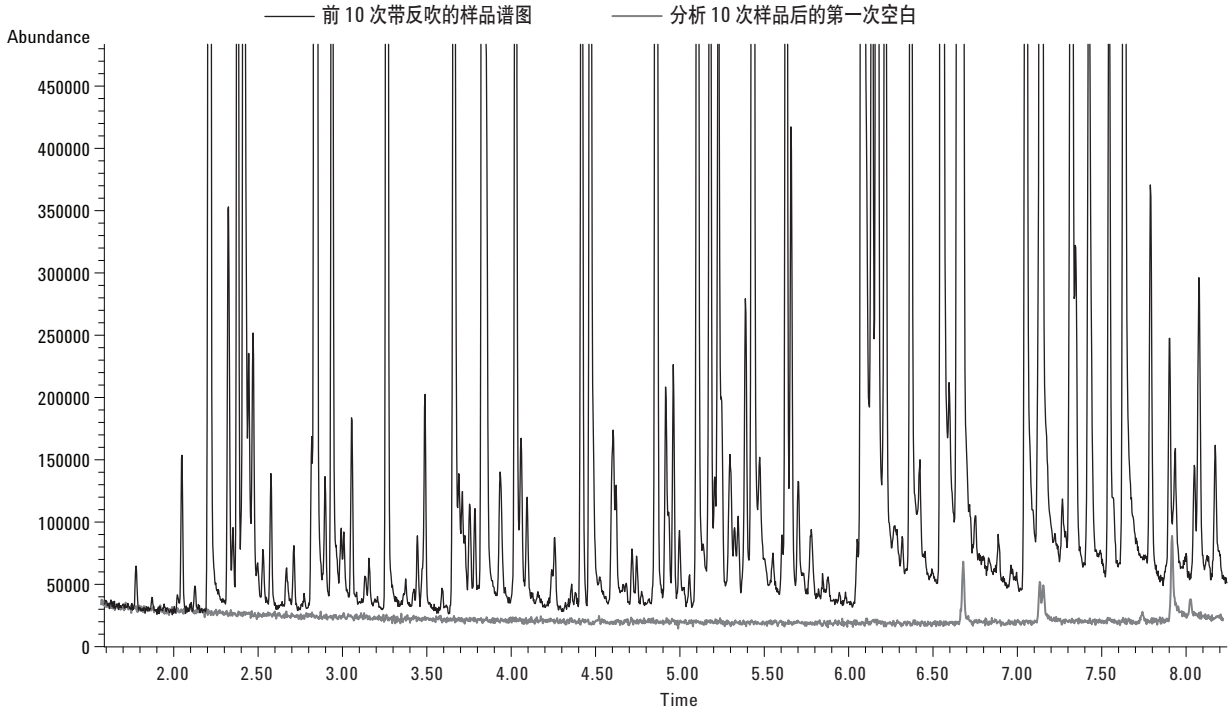


图 5. 10 次连续分析洗发水萃取物样品总离子流图的叠加（反吹，程序升温至 240 °C）（上方）以及随后的一次空白（底部）

表 1. 得到定性的 7 个致敏源成分

	保留时间 min.	保留时间标准偏差 min.	保留时间相对标准偏差 %.	峰面积相对标准偏差 %
柠檬烯	2.3771	0.0005	0.020	1.80
芳樟醇	2.8372	0.0004	0.015%	1.60
丁香酚	4.4671	0.0003	0.007	1.60
铃兰醛	5.4312	0.0015	0.028	1.53
已基肉桂醛	6.5514	0.0016	0.022	2.00
安息香苯甲酯	6.6467	0.0000	0.000	2.00
水杨酸苄酯	7.1405	0.0013	0.018	2.98
平均值		**0.0008**	**0.015**	**1.95**

结论

分流/不分流进样口直接进样法可以应用于分析化妆品中的香精香料致敏源成分。与先前公布的保留时间锁定的方法相比，由于使用了更短的色谱柱，氢气作为载气，以及 5975 GC/MS，分析时间得到了3倍的提高。通过使用 7890A 气相色谱反吹方法，色谱柱和检测器的污染程度得到了明显改善。分析时间缩短了 20%，样品分析周期也加快了。先前样品在色谱柱中的残留成分导致的杂质峰被有效避免了。保留时间和色谱峰面积的重现性系数也提高了。

由于香精香料的分析通常在极性色谱柱上运行，并且受限于色谱柱的操作温度上限（MAOT 250 °C），例如，聚乙二醇色谱柱。采用 7890A 气相色谱的微板流路控制技术反吹毛细管色谱柱可以实现在中等温度条件下去除强保留样品成分。

参考文献

1. Directive 2003/15/EC, Official Journal of the European Union, L 66/26, 11.3.2003.
2. F. David, C. Devos, and P. Sandra, LC. GC Europe, 19, 602-616, November 2005.
3. F. David, C. Devos, D. Joulain, A. Chaintreau, and P. Sandra, *J. Sep. Science*, 29, 1587-1594 (2006).

采用低热容 (LTM) 柱箱模块独立控制柱温以改善手性化合物的多维分离

应用

食品和香料

作者

Frank David
色谱研究所
Pres. Kennedypark 26
B-8500 Kortrijk
比利时

Matthew S. Klee
安捷伦科技公司
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808

摘要

本文报导了采用多维毛细管 GC 系统，配备 Deans switch 中心切割和独立柱温控制改善了芳樟醇异构体的手性分离。香水样品和熏衣草油样品中的芳樟醇先用安装在标准 GC 柱箱中非手性非极性色谱柱 (Agilent J&W HP-5ms) 分离。芳樟醇峰中心切割到手性环糊精色谱柱上，该色谱柱具有低热容 (LTM) 组件，安装在一个低热容色谱柱模块中，在较低温度下实现了对映异构体的更好的分离。使用具有独立柱温控制的二维 LTM 配置，手性分离效果更好、环糊精固定相流失更少、分析时间更短。此外，避免了可能污染色谱柱、降低方法性能和缩短色谱柱寿命的低挥发样品组分进入手性柱。

前言

芳樟醇是许多精油，包括熏衣草油、天竺葵油和香柠檬油中的重要组分，具有令人愉快的花香气味。天然精油和香水中芳樟醇含量的正确表征包括测定对映异构体的组成，特别是在试图揭示假冒伪劣产品时要测定对映体组成。芳樟醇的 (+) 和 (–) 异构体的手性分离可以采用基于环糊精的毛细管GC色谱柱，无需衍生化处理[1]。

在基于环糊精的色谱柱上实现对映体的气相色谱分离在很大程度上取决于柱温：柱温越低，分离度越高。当然，还必须考虑过长的分析时间的平衡，保证使低温下可能滞留在色谱柱中的样品组分洗脱色谱柱，以避免影响后续分析。基于环糊精的色谱柱具有有限的最高允许操作温度 (MAOT)，流失较高，耐用性（更容易氧化降解）不及标准极性毛细管色谱柱固定相，因此，在高温加热较长时间以洗出高沸点样品组分是不现实的。遗憾的是，与大部分基于硅氧烷的固定相不同，环糊精固定相被污染后，是不能通过溶剂清洗来再生的。

鉴于这些原因，排除低挥发组分、减少色谱柱暴露在高柱箱温度的时间的更好的办法就是采用多维 GC 配置[2, 3]。为此，我们采用非选择性色谱柱进行预分离以使感兴趣的峰与大部分其他样品组分分离。通过将目标峰中心切割到第二维手性色谱柱上，实现对映体的完全分离。为了优化结果，两支色谱柱的温度独立控制。完成这一任务的一个途径是在实验室使用两台串联的 GC。虽然这是有效的，但由于成本和实验室空间的需求，这一途径常常是不宜使用的。另一个选择就是使用集成到 GC 柱箱门上的低热容 (LTM) 模块，从而最大程度地减小了仪器所占空间，减低了仪器成本，同时仍然能提供完全独立的色谱柱温度区域[4]。

本应用文摘报导了使用配置 Deans switch 中心切割和 LTM 色谱柱独立温度控制组件的二维毛细管气相色谱 (CGC) 分离香水和熏衣草油样品中的芳樟醇对映体。

实验部分

样品

制备了三个样品：参比样品为含有 0.1% (合成) 芳樟醇的二氯甲烷溶液，用于校准；市售香水样品用二氯甲烷稀释至 5% (50 mg 稀释在 1 mL 溶剂中)；天然熏衣草油样品用二氯甲烷稀释至 2% (20 mg 稀释在 1 mL 溶剂中)。

仪器配置

所有分析在 Agilent 7890A GC 系统与 Agilent 5975C 系列联用 GC/MSD 上进行。GC 配置有分流/不分流进样口、火焰离子化检测器 (FID)、气路控制模块、微板流路技术 Deans switching 系统 (部件号 G2855B)、Agilent LTM 系统控制器套件 (部件号 G6579A)，以及 Agilent J&W LTM 色谱柱模块 (为了最快速的冷却，采用标准 5 英寸规格)。

第一维色谱柱是 30 m × 0.25 mm id × 0.25 µm 的 Agilent J&W HP-5MS，安装在 GC 柱箱中(从分流/不分流进样口到 Deans switch)。一支 30 m × 0.25 mm id × 0.25 µm 的 Agilent J&W CycloDex-B (部件号 112-2532) 手性色谱柱带有 LTM 直接加热和传感组件，安装在 LTM 色谱柱模块 (部件号 112-2532 LTM 色谱柱) 上进行加热。一支 0.5 m × 250 µm id 的脱活熔融石英毛细管用来连接 LTM 色谱柱到 Deans switch，另一支 1 m × 250 µm id 的脱活石英管用作为传输管线，连接 LTM 色谱柱到质量选择检测器 (MSD)。还有一支 63 cm × 100 µm 的脱活熔融石英毛细管连接 Deans switch 到 FID。

图 1 所示为配置示意图。

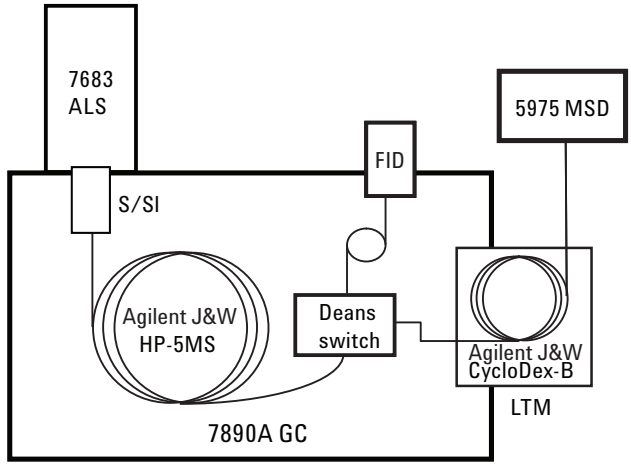


图 1. 二维中心切割带独立色谱柱温度控制的系统配置

分析条件

进样:	1 µL，280 °C，1:100 分流比
载气:	氦气，1 mL/min 恒流模式 (色谱柱入口 = SSL；出口 = PCM1) (179 kPa，70 °C)
GC 柱箱温度:	70 °C (1 min) 以 10 °C/min 升温至 250 °C (11 min)
PCM 1:	2 mL/min 恒流模式 (128 kPa，70 °C)
LTM 柱箱:	80 °C, (9 min = 中心切割终点) 以 1 °C/min 程序升温至 100 °C (1 min)
总运行时间:	30 min
FID 检测器:	300 °C，氢气 30 mL/min，空气 400 mL/min
Deans switch 阀:	初始关闭，8.5 min 开启，8.9 min 关闭 (8.5 min 到 8.9 min 的馏分转移到第二色谱柱)
MS:	扫描模式，40 amu 到 300 amu，采样速率= 2[1]

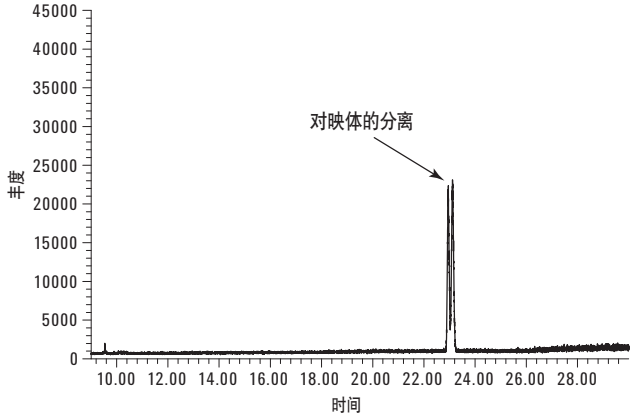


图 3. 参比芳樟醇样品中心切割到 LTM 模块 (第二维环糊精色谱柱)，采用较慢的温度程序：80 °C 恒温 9 min，然后以 1 °C/min 升温至 100 °C。芳樟醇对映体在 94 °C 的洗脱温度下得到了分离

结果与讨论

通过分析含有合成芳樟醇（两种异构体之比为 50/50）的参比样品可以说明温度对环糊精柱上芳樟醇对映体分离结果的影响。图 2 所示为环糊精色谱柱上采用程序升温 (70 °C 恒温 1 min，然后以 10 °C/min 升温至 200 °C) 所得色谱图。从色谱图可见，芳樟醇对映体在 165 °C 的洗脱温度下未能分离，在 190 °C 以上有明显的柱流失。

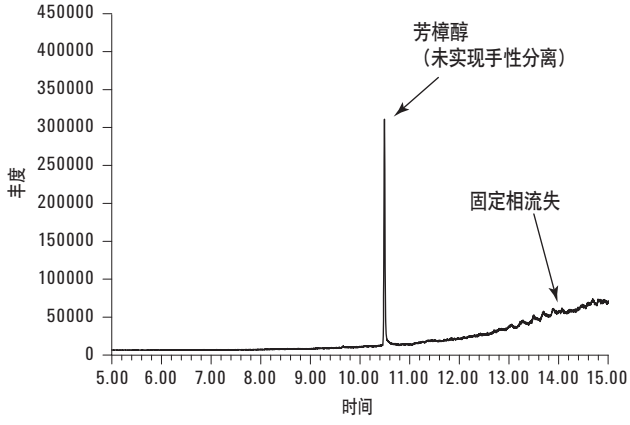


图 2. 参比芳樟醇样品中心切割到 LTM 模块。第二维环糊精色谱柱采用程序升温：70 °C (1 min)，以 10 °C/min 升温至 250 °C (11 min)。在 10.5 min，165 °C 的洗脱温度下芳樟醇对映体没有得到分离

使用更慢的温度程序 (80 °C 恒温 9 min，然后以 1°C/min 升温至 100 °C），可以分离对映体，如图 3 所示（在 23 min 洗脱 = 94 °C 洗脱温度）。

图 4 的色谱图显示为什么这些条件不适合分析实际样品。图中显示了使用原来的温度程序在手性色谱柱上直接分离香水样品。需要在最终温度 200 °C 保持 16 min 才能使所有样品组分洗脱。此外，从图中可见很高的柱流失，说明色谱柱受到了热应力。同样可见许多其它样品组分在芳樟醇附近洗脱，这会使定量变得复杂，甚至使得对映体无法分离。如果采用较慢的温度程序，分析时间会很长，而且会增加样品不能完全洗脱的可能性。

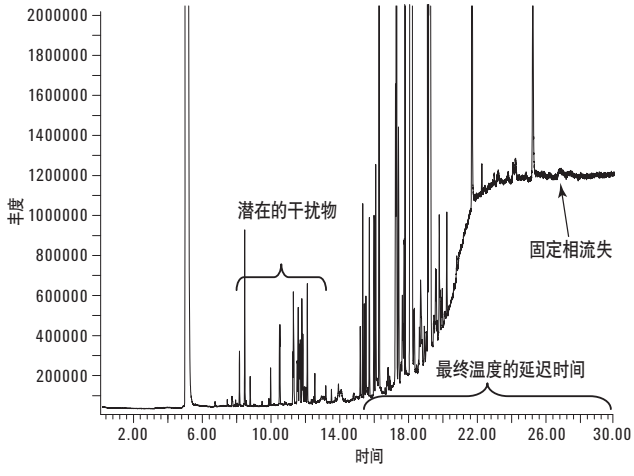


图 4. 香水样品只在手性色谱柱上的一维分离，温度程序: 70 °C (1 min)，然后以 10 °C/min 升温至 200 °C (16 min)。芳樟醇对映体未得到分离，且有明显的潜在干扰和较高的固定相流失

为了有效地分析芳樟醇对映体，同时防止污染手性柱和使其受到热应力，我们发展了二维 GC 分离方法。样品先在第一维的非选择性、非极性 Agilent J&W HP-5MS 色谱柱上进行初步分离。这一色谱柱基于挥发性分离样品组分，比手性色谱柱的更耐用，流失较低。然而，在这一固定相上无法实现手性分离。图 5a 所示色谱图是 FID 监测的第一维色谱柱在未经中心切割的情况下的洗脱物。芳樟醇的保留时间为 8.7 min。

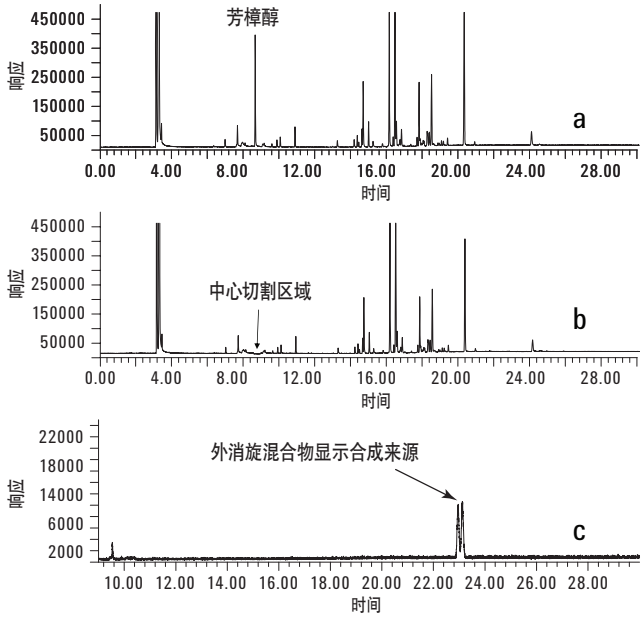


图 5. (a) 香水样品在 Agilent J&W HP-5ms 第一维色谱柱上未经中心切割的分离情况。(b) 香水样品中心切割（8.5 到 8.9 min）到第二维色谱柱上的色谱图。(c) 芳樟醇在第二维环糊精色谱柱上的色谱图 (MSD)

然后在 8.5 到 8.9 min 之间 (包含芳樟醇峰) 中心切割到较低温度的手性色谱柱。可以看到，图 5b 中相应于中心切割区域的 FID 监测色谱图基线稳定。芳樟醇的峰与其它样品组分，包括未被引入第二维手性色谱柱的迟洗脱溶质，得到了分离。

图 5c 所示为手性色谱柱上同时分离芳樟醇馏分的结果。由此图显见，在较低温度下出现了两个对映体的峰，而且没有共洗脱的峰。在此情况下，显然是一个外消旋混合物 (两个对映体含量相同)，说明该芳樟醇是合成样品。

对薰衣草油样品重复了上述多维分析。图 6a 到图 6c 显示了整个样品在第一维色谱柱和第二维色谱柱上中心切割手性分离的色谱图。在此情况下，芳樟醇的峰几乎含有单一的光学异构体，说明该芳樟醇样品是天然来源。

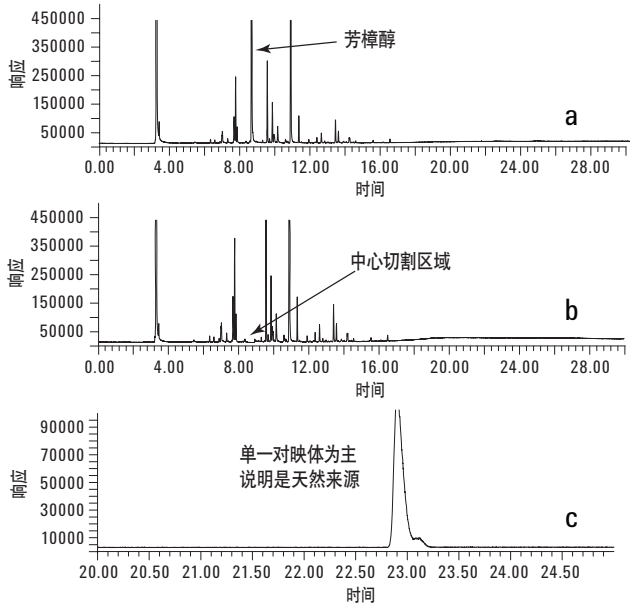


图 6. (a) 薰衣草样品在 Agilent J&W HP-5ms 第一维色谱柱上未经中心切割的色谱图。(b) 薰衣草样品中心切割 (8.5 min 到 8.9 min) 到第二维色谱柱上的色谱图。(c) 芳樟醇在第二维环糊精色谱柱上的色谱图 (MSD)，显示主要成分是一个对映异构体

结论

这一应用说明独立柱温控制对于二维 GC 分离的好处。对于像环糊精这样的手性固定相，柱温的控制尤为关键。使用 LTM 色谱柱模块控制第二温度区为 Agilent 7890A GC 系统提供了一种增加独立温度区的低成本方法，同时几乎不占用实验室空间。

研究证明，采用较低的温度和较慢的升温程序（恒温分析也许是可行的）改善了芳樟醇光学异构体的分离度。对于 GC 能够分析的其它手性化合物有望获得类似的分离度改善。

采用多维系统，配置 Deans switch 从非选择性第一维色谱柱中心切割到第二维手性色谱柱，分析市售香水和天然薰衣草油样品。该方法的好处包括成本更低、数据质量更高（芳樟醇峰的更好分离和与潜在干扰物的分离)、对耐用性较差的手性色谱柱的热应力和化学应力更小。

参考文献

1. W.A. König, Gas Chromatographic Enantiomer Separation with Modified Cyclodextrins, Hüthig, Heidelberg, 1992, VIII + 168 pp., ISBN 3-7785-2026-1
2. C. Bicchi, A. D'Amato, P. Rubiolo, *J. Chromatogr. A*, 843 (1999) 99
3. V. Schurig, Trends in analytical chemistry, 21 (2002) 647
4. E.A. Pfannkoch, J.A. Whitecavage, V.R. Klinton, J. Christenson, Gerstel application note, May 2004 (www.gerstel.com/p-gc-an-2004-05.pdf)

电感耦合等离子体质谱仪 (ICP/MS) 应用

作为世界上销售最好的电感耦合等离子体质谱的升级换代产品，安捷伦 7700 系列电感耦合等离子体质谱帮助您在日益复杂的样品分析中能以更高的灵敏度检测更多的元素。全新的 7700 系列电感耦合等离子体质谱能提供无与伦比的数据完整性，同时具有操作简易性和业界最小的仪器体积。

安捷伦的八极杆反应池 (ORS) 是用于基体背景消除的最可靠和最有效的手段，尤其是复杂和未知样品的分析。全新的第三代反应池 (ORS^3) 提高了氦气模式的效率，几乎所有应用都去除了使用反应池气（如氢气）的需要。这样的设计大大简化了操作，同时通过消除由于反应模式而导致的假阳性而显著地提高了数据质量。全新碰撞/反应池和安捷伦独有的高盐样品进样技术使得 7700 ICP-MS 适合复杂的样品分析，如食品、污水和土壤消化物。

电感耦合等离子体质谱仪 (ICP/MS) 应用

5989-7959 碰撞反应池 ICP-MS 测定膳食补充剂中的多种重金属 473

5989-7214 7500cx ICP-MS 测定麦芽酒精饮料（威士忌酒）中的痕量元素 477

5989-4905 安捷伦八极杆反应池 ICP-MS 系统的氦碰撞模式在消除质谱干扰方面的无比高效性 487

5989-2481 离子色谱 (IC) ICP-MS 分析天然水中的铬 494

碰撞反应池 ICP-MS 测定膳食补充剂中的多种重金属

应用

食品

作者

Emma Peachey, Ruth Hearn, and Selvarani Elahi
LGC, Queens Road
Teddington, Middlesex, TW11 0LY
UK

摘要

采用 ICP-MS 测定了英国消费的膳食补充剂中 11 个金属元素（包括砷、铬、汞、铁、铜、镍、锌、硒、铅、镉和铊）。使用的仪器是安捷伦的 7500ce，配有碰撞反应池（八极杆反应池系统），在一个方法中用无气体模式、氦气模式和氢气模式测定。样品用硝酸/过氧化氢/氢氟酸体系微波消解，外标法定量。用两个标准参考物质（LGC7160 和 SRM1577b）对方法进行了评价，所有元素的回收率都在给定值的 100 ± 15% 之内。

引言

重金属是地壳的天然组分，被广泛用于农业、建筑、制造业、食品/原料加工业。痕量重金属元素是人体新陈代谢所必需的，而浓度过高则变得有毒性。靠近污染源的环境空气和饮用水的污染、或通过食物链的摄入都可能引起重金属中毒。

另一方面，我们的生活越来越繁忙，缺少时间准备或吃一些营养平衡的食物，我们的日常饮食正面临着营养缺乏的危险。而胶囊、片剂或液体的膳食补充品，简单便利，为我们的饮食提供了很好的补充，降低了营养缺乏的危险。

在英国，大多数膳食补充品纳入按食品管理，需遵守《食品安全法规 1990》总则，同时遵守安全和标签的从属立法（食品标签法 1996（修正案）以及食品补充剂标准 2002/46/EC）。过去的研究表明，有些食品补充剂含有高浓度的金属和其它元素。有些金属，比如硒、铁、铜、铬和锌在低浓度时是有益元素[1]，而有些元素，比如砷、镉、铅和汞则是有毒元素[2]。在英国，砷是食品中唯一允许的元素，但对其有限量要求。砷的含量遵守《食品砷（修正案）法规 1959》，该法规规定了在“普通”食品中As 的限定值为1 mg/kg [3]。特定食品中镉、铅、汞和锡遵守《法规委员会 1881/ 2006》[4]。

现已获得的在英国消费的食品补充剂中金属和其它元素含量的最新信息, 为评价膳食补充品中所含元素对消费者是否安全有重要的作用。本研究的目的是为食品标准协会 (FSA) 提供有关英国消费的食品补充剂中所含的金属元素浓度可靠的最新的信息。

本实验中，样品制备采用微波消解的方法，然后用碰撞反应池电感耦合等离子体质谱仪 (CRC-ICP-MS) 测定多种元素，利用氦模式和氢气模式消除质谱干扰。测定的元素包括砷 (As)，铬 (Cr)，铁 (Fe)，铜 (Cu)，镍 (Ni)，锌 (Zn)，硒 (Se)，铅 (Pb)，汞 (Hg)，镉 (Cd)，铊 (Tl)。大多数元素是用标准模式（无气体模式）测定的，因为对于食品样品，可以获得无显著多原子干扰的多同位素 ICP-MS 数据。但是，有三个元素的检出限受到多原子离子的严重干扰，其中两个是必需元素（铁和硒），一个是有毒元素（砷）。本研究工作的目的是证明安捷伦 7500ce 的八极杆反应池系统 (ORS) 消除这些干扰（表 1）的能力，为食品补充剂中这三个元素提供准确的测定方法。

实验

样品

本实验共测定了英国的两百个食品补充剂（片剂、胶囊、液体或粉末）。用电子天平称量每片/胶囊的平均重量。

样品制备

片剂用研钵压碎。将压碎的片剂，液体或粉末充分混匀后再取样。油剂胶囊整个消解。准确称取大约 0.7g 样品，分别加入 7 + 3 + 0.2 mL 的硝酸+ 过氧化氢+氢氟酸，用微波消解法消解样品。微波消解程序：样品在不少于 20 min 时间加热到 180°C，保持10 min。样品冷却后，将消解液用去离子水稀释到100 g，即可用 ICP-MS 进行元素测定。抽取 10% 的样品作平行样消解。每次最多消解 12 个样品，包括一个空白和一个质控 (QC) 标准。

质控 (QC) 标准

测定了两个标准参考物质来评价方法的准确度。一个是牛肝 SRM 1577b（NIST, Gaithersburg, USA），Se 含量为 0.73 ± 0.06 mg/kg，Fe 含量为 184 ±15 mg/kg; 另一个是蟹酱 LGC7160 (LGC, Teddington, UK)，As 含量为 11 ± 1 mg/kg。

仪器

采用 Mars 5 微波消解仪（CEM, Buckingham, UK）消解样品，Agilent 7500ce CRC-ICP-MS 测定元素，Se 和 Fe 用氢气模式，As 用氦气模式消除质谱干扰（表 1）。其它所有元素在同一个方法内用标准模式（无气体模式）测定。表 1 列举的是典型操作条件。为了减少接口的基体沉积、优化样品通量，本实验采用智能进样系统 (ISIS)，并将分析和清洗期间的泵速设为 0.1 rps。

表 1. 7500ce ORS 碰撞/反应池模式的仪器条件

参数	ORS池模式	
	He	H_2
测量元素	As	Se, Fe
质谱干扰ORS气体消除的干扰	$^{40}Ar^{35}Cl^+$ 对 $^{75}As^+$ $^{40}Ca^{35}Cl^+$ 对 $^{75}As^+$	$^{38}Ar^{40}Ar^+$ 对 $^{78}Se^+$ $^{40}Ar^{37}Cl^+$ 对 $^{77}Se^+$ $^{40}Ca^{37}Cl^+$ 对 $^{77}Se^+$ $^{40}Ar^{16}O^+$ 对 $^{56}Fe^+$ $^{40}Ca^{16}O^+$ 对 $^{56}Fe^+$
RF 功率 (W)	1520	
载气 (L/min)	0.9	
补充气 (L/min)	0.26	
雾化器	玻璃同心, MicroMist	
雾室	石英冷却到 2 °C	
接口锥	Ni	
池气体	He	H_2
池气体流速 (mL/min)	2.5	2.2
每峰点数	3	
重复次数	10	
积分时间每个质量 (sec)	0.3	

测量

采用美国国家标准技术所（NIST, Gaithersburg, USA）的标样，用 5 点外标校准法定量消解液中的元素。铑（Rh）为内标并在线加入（和样品 1:1 比例）。内标溶液含有 4% 的丙醇以提高 As 和 Se 的信号，补偿样品中残留的碳对 As 和 Se 的影响。每次运行 ICP-MS 期间，采用水质研究委员会 (WRC) 提供的已知浓度的 (660.3 ng/g Fe, 12.6 ng/g As, 13.27 ng/g Se) 测试溶液（用于能力测试项目）来检查准确度和精密度。

结果和讨论

全部样品测量结果和法定限值和/或 FSA 限定范围进行了比较。砷、铅和镉的限值是 1 mg/kg，汞是 0.5 mg/kg。超过限值的样品重新分析加以确认。

如表 2 所示，有 5 个样品中的砷含量已超过 1959 修正案 [3] 所推荐的食品中砷的允许限 1 mg/kg。还有两个样品中的砷浓度在 0.75 mg/kg 和 1 mg/kg 之间。需指出的是，有些食品补充剂源自海洋动物，其所含的砷的形态很可能是无毒的砷甜菜碱。大多数食品补充剂（> 75%）的砷含量< 0.1 mg/kg，Fe > 20 mg/kg。

表 2. 砷浓度超过推荐法定限值的样品

产品	形式	样品中砷 (mg/kg)
产品 1	片剂	3.3 ± 0.7
产品 2	胶囊	2.5 ± 0.6
产品 3	胶囊	20.5 ± 4.8
产品 4	胶囊	1.5 ± 0.4
产品 5	胶囊	7.3 ± 1.7

法定限 = 1 mg/kg [3]
给出的不确定度是按照覆盖因子为 2（其置信度大约95%）计算的扩展不确定度。不确定度的计算基于 Eurachem Guide [5] 原理。

没有 Cd 浓度超出法定限值的样品，只有一个样品中的汞接近法定限值。有 10 个样品中 Pb 的浓度超过 1 mg/kg。

为了便于比较，将 mg/kg 表示的结果换算为 mg/片。发现部分补充剂中 Se, Fe, Zn, Cu, Cr, 或 Ni的测定结果和标签上标示值是有差别的。这说明 FSA 仅依靠这类补充品的标示值很难准确评价这些元素的膳食摄入量，这也证明了本项调查测量的必要性。

本文的方法检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 是依据理论和应用化学联合会 (IUPAC) 指南 [6] 计算的，结果列于表 3。所检测的食品补充剂中，25% 的样品中 Se 浓度小于 LOD。

表 3. Se, Fe, 和 As 的检出限和定量限

	浓度 (mg/kg)[1]		
	Se	Fe	As
LOD	0.009	0.072	0.006
LOQ	0.029	0.240	0.022

[1] 所示值是基于所消解的保健品补充剂片/液体/胶囊的平均重量

QC 标准和测试溶液的回收率结果非常好，所有元素都落在了标准值/预期值的 100 ± 15% (n = > 9) 范围之内。图 1 是标准参考物质的回收率图示结果。有些样品和空白在微波消解之前也加入了 Se, Fe, 和 As。得到的回收率介于预期值的 100 ± 10% (n = > 5) 之内。为了检查方法的重现性，对大约10%的样品从消解到测定进行单独的平行样品分析。分析结果表明，以 7500ce ICP-MS 的碰撞反应池模式测量的所有三个元素的变异系数都 < 5%。

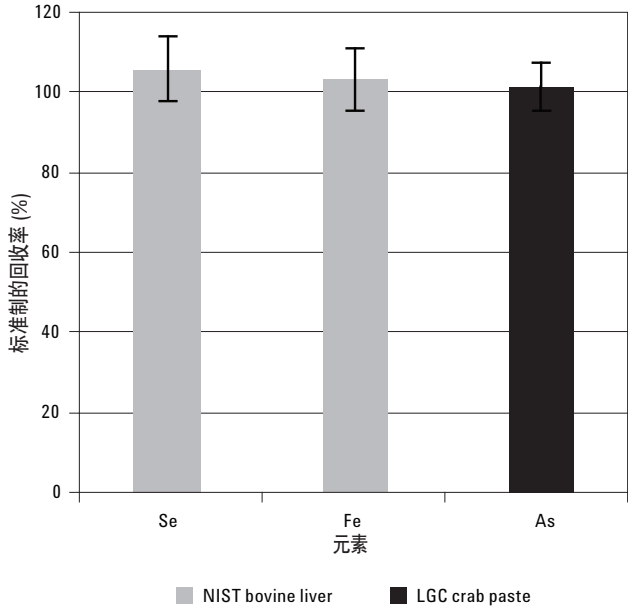


图 1. CRMs 中Se, Fe 和 As 的回收率

结论

本工作表明，微波消解 ICP-ORS- MS 是分析营养补充品和食品中痕量元素的一个简单、可靠的多元素测定方法。分析结果表明，有些膳食补充品中 Se, Fe, Zn, Cu, Cr, 和 Ni 的含量和标示值有差别。其中，5 个样品中的砷、10 个样品中的铅含量超出推荐值 1 mg/kg。本调查资料为食品标准协会 (FSA) 提供了部分食品补充剂中金属浓度的最新结果。这些结果有助于评价食品补充剂中金属的毒性，并发表于食品标准局的《食品监测信息》 [7]。

参考文献

1. World Health Organization, Trace Elements in Human Nutrition and Health, Geneva, 1996
2. The Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (1982), Survey of Arsenic in Food. Food Surveillance Paper No. 8, Published by HMSO
3. The Arsenic in Food Regulations 1959 (S.I. [1959] No. 831), as amended by The Arsenic in Food (Amendment) Regulations 1960 (S.I. [1960] No. 2261) and The Arsenic in Food (Amendment) Regulations 1973 (S.I. [1973] No. 1052). The Stationery Office.
4. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
5. Eurachem, Quantifying uncertainty in analytical measurement. Laboratory of the Government Chemist. London 1995 (ISBN 0 948926- 08).
6. “A Statistical Overview of Standard (IUPAC and ACS) and New Procedures for Determining the Limits of Detection and Quantification: Application to Voltammetric and Stripping Techniques,” *Pure & Appl. Chem.* Vol 69, No. 2, pp 297–328, 1998
7. Food Standard Agency’s Food Surveillance Information sheet No 85/05 December 2005, Survey of Metals and Other Elements in Dietary Supplements.

7500cx ICP-MS 测定麦芽酒精饮料（威士忌酒）中的痕量元素

应用

食品

作者

Glenn Woods
Agilent Technologies UK Ltd.
Lakeside Business Park
Cheadle Royal, Cheshire, SK8 3GR
UK

摘要

介绍了一个麦芽酒精饮料（威士忌酒）中痕量元素的分析方法，分析了 6 种不同样品。采用配置八极杆反应池系统 (ORS) 的 Agilent 7500cx ICP-MS 进行分析。7500cx 能确保使用一种方法和一组条件的简单操作就能消除无论源于何处的各种干扰。对样品简单稀释后获得了很好的加标回收率（97-107%之间）。5 小时稳定性实验对几乎所有元素都得到了极好的精密度 (< 2%)。本研究表明，7500cx 可以用于饮料中痕量元素的常规分析。

引言

无论是产品质量控制需要，还是法规的要求，都需要测定酒精饮料中痕量元素。

金属元素可能来自原料（比如水或谷物）以及制作过程（比如来自在发酵或蒸馏设备）。例如，由于蒸馏容器是用质量较差的铜制作的，所以饮料中含有高浓度的砷。痕量元素的含量水平也会对威士忌的味道有很大影响。因此，最终饮料产品需要测量其中痕量元素浓度。虽然 ICP-MS 对于许多元素具有高灵敏度和极好的检出限，但酒精成分对一些关键元素的干扰以及所需的样品制备都存在着一些问题。

7500cx 的特点是具有八极杆碰撞/反应池系统 (ORS)，它使用一组池条件（氦模式）就能消除基体产生的各种多原子干扰。对于酒精分析，来自样品的主要干扰就是碳基干扰（比如，$^{40}Ar^{12}C$ 对 ^{52}Cr 的干扰）。许多元素在氯化物基体中的稳定性要远大于用简单的硝酸酸化。鉴于此，样品中加入了盐酸。加入盐酸后产生了新的干扰（比如，$^{35}Cl^{16}O$ 对 ^{51}V; $^{40}Ar^{35}Cl$ 对 ^{75}As，等），但这些干扰可以通过氦模式 ORS 消除。

7500cx 有一个备选的反应池气体管线，可供在氢气反应模式使用，氢气反应模式可用于超痕量级硒的测定。在本工作中，由于几个溶液稀释后 Se 的含量小于 40 ng/L（有的低更多），所以也使用了 H_2 反应模式。

实验部分

样品制备以及仪器条件

分析了以下几种酒：四种苏格兰威士忌酒（Highland, Speyside, Islay, and a blend），一种爱尔兰威士忌酒，一种美国bourbon，以及储存在铅晶玻璃瓶中的一种苏格兰威士忌酒和一种美国样品用 1% HNO_3 和 0.5% HCl (v/v) 稀释 5 倍制备。使用混合酸比单独使用硝酸明显改善了许多元素的稳定性，尤其是 Hg 和 Sn。多元素混合标准溶液用 1000 ppm 的单标贮备液制备。为了补偿样品传输影响以及溶剂蒸发速率，在标准溶液中加入 8% 的乙醇（相当于原样品稀释 5 倍，原样品酒精含量为 40% v/v）以使标准溶液中的酒精含量和样品匹配，同时也能够补偿高碳浓度时As和Se的电离增强效应。为了进一步改善 Hg 的稳定性，标准和样品溶液中还加入了 Au（400 µg/L）。

表 1 列举了分析所用的仪器条件。采用 Agilent ASX-520 配套的自动进样器，样品采样提升速率大约 150 µL/min。另配了化学淋洗体系[1]，并使用化学工作站软件的预清洗功能对溶液泵程序进行了最佳化。采用 7500cx 的标准条件，内标（Ge, Rh, 和 Ir）采用系统的蠕动泵在线自动加入。对此类样品，无须其它特殊注意的问题。

表 1. Agilent 7500cx 操作条件

RF 功率	1550 W
采样深度	8 mm
载气流速	0.68 L/min
补充气体流速	0.33 L/min
雾室温度	15 °C
氦池气流速	5.5 mL/min
氢池气流速	4.0 mL/min

数据采集

数据采集采用了三种 ORS 模式：氦 [He] 模式，氢模式[H2]以及无气体模式。氦模式是 7500cx 的默认操作模式。惰性 He 池气体条件消除干扰是基于它们的离子横截面而不是与 He 的反应。事实上，ICP-MS 中几乎所有的干扰都是多原子离子，它们比相同质量的单原子离子具有更大的横截面，所以，在池内与反应气发生碰撞的机会多。由于每次碰撞都要损失能量，且干扰离子比待分析离子的能量损失更多，因此可通过质谱的能量过滤将两种不同能量的离子分开（称为能量甄别）。由于能量甄别与分析物－干扰物之间结合无关，所以单一的一组条件可以用于所有的分析物。

由于稀释后的样品溶液中硒的浓度降至 ppt 级，所以 Se 采用氢气模式测定。虽然 Se 可以在氦模式中测定，但氢气模式消除氩基干扰的效果更好，能改善硒的检出限，所以它是低－ppt 级测定的更好选择。有些元素在氦气和氢气两种模式下进行了测定，以提供池性能的比较数据。当然，对于常规分析，就不必这样做了。所有池模式的数据都是在一次性的样品通过和采集中获得的。

结果和讨论

表 2 概括了检出限 (DLs)，背景等效浓度值 (BECs)，以及不同池模式下（默认模式用粗体字突出）所研究的同位素的校准回归数据。对于那些受碳和氯化物基体干扰的元素，当采用无气体模式（即常规 ICP-MS）时，BECs 和 DLs 受到严重影响。从 Cr 的测定结果可以清楚地看出：^{52}Cr 的 BEC 在无池条件下是 526 µg/L，而在氦模式下是 0.07 µg/L。由于干扰被有效消除至背景水平，所以 Cr 的两个同位素 BECs 非常接近。对 V, Fe 和 ^{65}Cu 的改善也是显著的（在这类相对简单基体中，^{63}Cu 不受干扰），所有这些元素都是在氦模式下测定的。

图 1 至 3 显示了选定的被干扰元素在使用和不使用池气体时的校准曲线。图 4 和图 5 是 Be（低质量，难电离元素）和 Hg（高质量，难电离，低丰度同位素）的校准曲线。可见，那些受干扰元素的校准曲线没有通过原点，偏离很明显。Be 和 Hg 曲线很好地说明了对于难电离的元素也提供了极好的灵敏度。为了获得低检出限，将等离子体的电离效率最大化是十分必要的。这可通过最优化样品引入系统（低浓度和低气体流速，宽直径的注入炬管）和等离子体发生器的设计（27.12 MHz 固态固定频率以及高效数字驱动）加以实现。所有这些要素结合起来就可以增加中心通道的温度，改善电离效率。这与一种为改善低质量离子传输效率而设计的离子透镜系统联合，可进一步改善那些重要的但比较难分析的元素的检出限。

Ge, Rh 和 Ir 用做内标元素，在线加入。

表 3 是所有样品的定量数据，包括一个 Islay 威士忌酒的加标回收。给出了首选池气体模式（通常为氦模式）的数据。虽然有些元素采用无气体和有气体两种模式进行了测定，但是为了简化数据组只列出了最合适的池模式数据。以 Cr 为例，在无气体模式中，两个同位素的数据不一致，并显著大于用氦模式测定的数据，这是因为受到强烈的基于 C- 和 Cl- 干扰的缘故。氦模式获得的 Cr 的两个同位素的数据相当，这说明数据的准确度很好。

储存在铅晶玻璃瓶中的两个样品，Pb 的浓度明显高于其它样品。其它样品 Pb 平均浓度大约 1.3 µg/L，而铅晶玻璃瓶中两个样品 Pb 浓度几乎高 10 倍。UK 对饮用水中 Pb 的最大允许限值是25 µg/L（井水），虽然该样品中 Pb 的浓度没有超出此规定范围，但是到 2013 年允许限值将要降低到 10 µg/L，这样的话，储存在铅晶玻璃瓶中的产品就不符合饮用水质量标准了。

表 2. 分析同位素的检出限、背景等效浓度值以及回归系数（数据单位是 ng/L [ppt]，已乘稀释系数）

元素	质量数	模式	回归系数	检出限	背景等效浓度
Be	**9**	**无气体**	**1**	**0.5**	**0.3**
V	**51**	**He**	**1**	**26.8**	**12.2**
V	51	无气体	0.9999	495	5220
Cr	**52**	**He**	**1**	**50.4**	**73.7**
Cr	52	无气体	0.985	48600	526000
Cr	**53**	**He**	**1**	**38.6**	**71.3**
Cr	53	无气体	0.9997	2020	52100
Mn	**55**	**He**	**1**	**7.8**	**20.8**
Mn	55	无气体	1	17.5	30.4
Fe	**56**	**He**	**0.9999**	**17.8**	**406**
Fe	56	无气体	1	1160	58300
Co	**59**	**He**	**1**	**0.5**	**3.7**
Co	59	无气体	1	5.6	6.7
Ni	**60**	**He**	**1**	**13**	**38.7**
Ni	60	无气体	1	15.2	73.6
Cu	**63**	**He**	**1**	**10.4**	**41.5**
Cu	63	无气体	1	16.6	59.6
Cu	**65**	**He**	**1**	**18.1**	**36.9**
Cu	65	无气体	1	58.6	230
Zn	**66**	**He**	**1**	**33.9**	**119**
Zn	66	无气体	1	22	171
As	**75**	**He**	**1**	**2.0**	**3.8**
As	75	无气体	1	46.1	382
Se	**78**	**H_2**	**1**	**3.6**	**13**
Se	78	无气体	1	135	1390
Cd	**111**	**He**	**1**	**5.7**	**5.3**
Cd	111	无气体	1	3.3	6.1
Sn	**118**	**无气体**	**1**	**7.8**	**50.5**
Sb	**121**	**无气体**	**1**	**7.1**	**30.8**
Ba	**137**	**无气体**	**1**	**2.8**	**5.3**
Hg	**201**	**无气体**	**1**	**1.7**	**10.7**
Pb	**208**	**无气体**	**1**	**2.1**	**10.2**
U	**238**	**无气体**	**1**	**0.1**	**0.2**

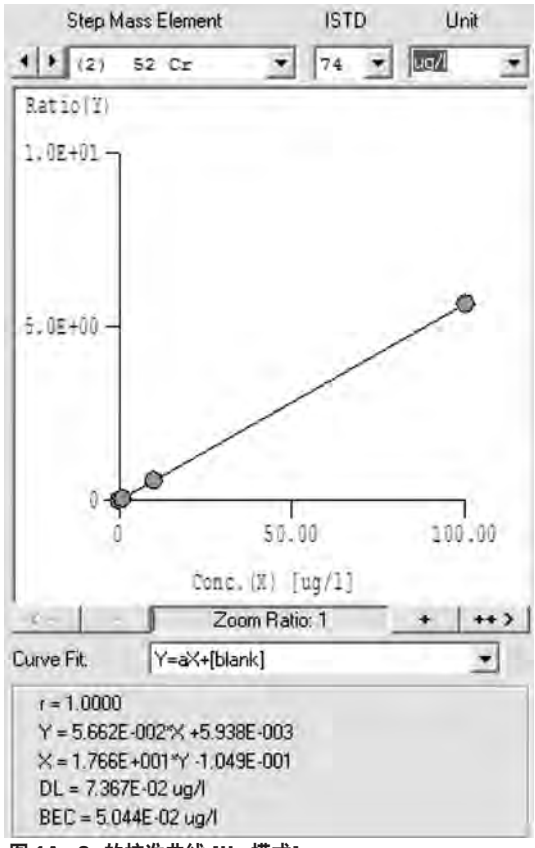


图 1A. Cr 的校准曲线 [He 模式]
注 BEC 0.0504 µg/L.

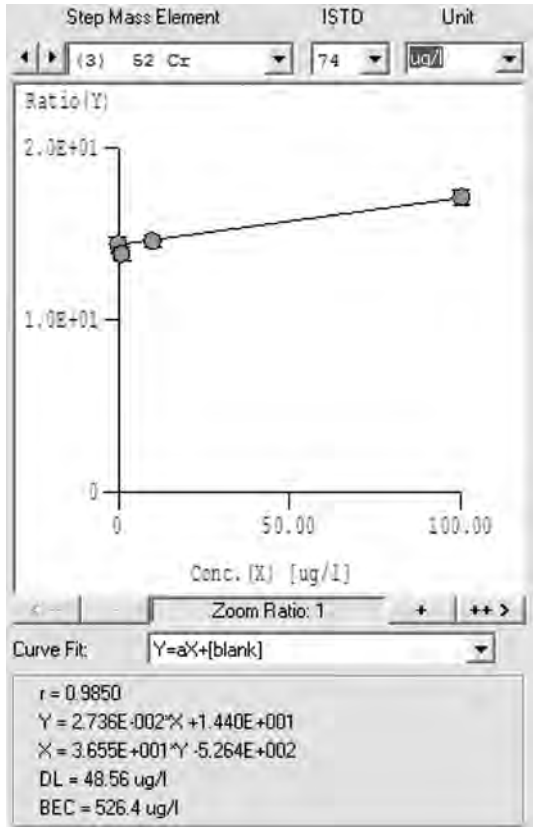


图 1B. Cr 的校准曲线
注 BEC 526 µg/L.

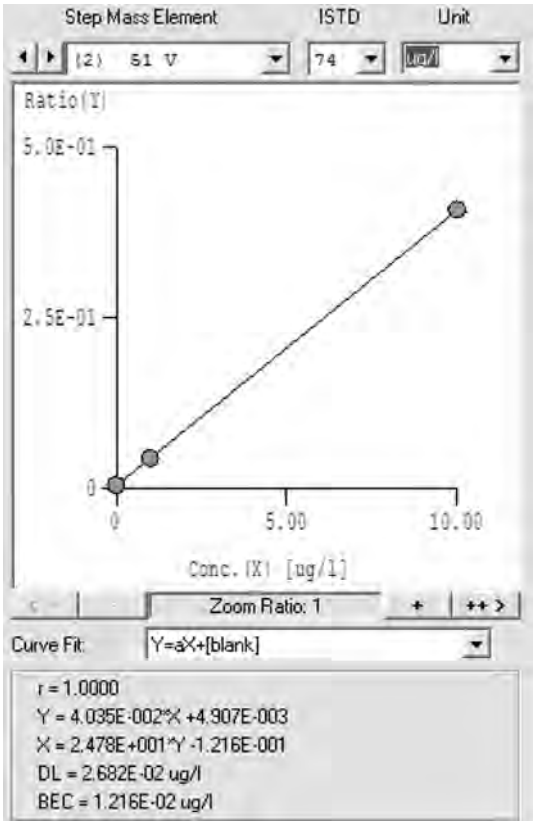


图 2A. V 的校准曲线 [He 模式]
注 BEC 0.0122 µg/L.

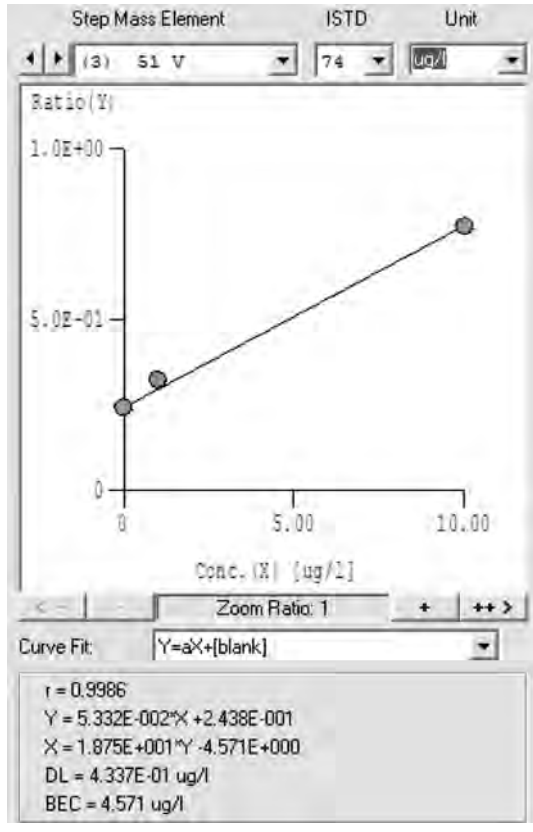


图 2B. V 的校准曲线 [无气体模式]
注 BEC 4.57 µg/L.

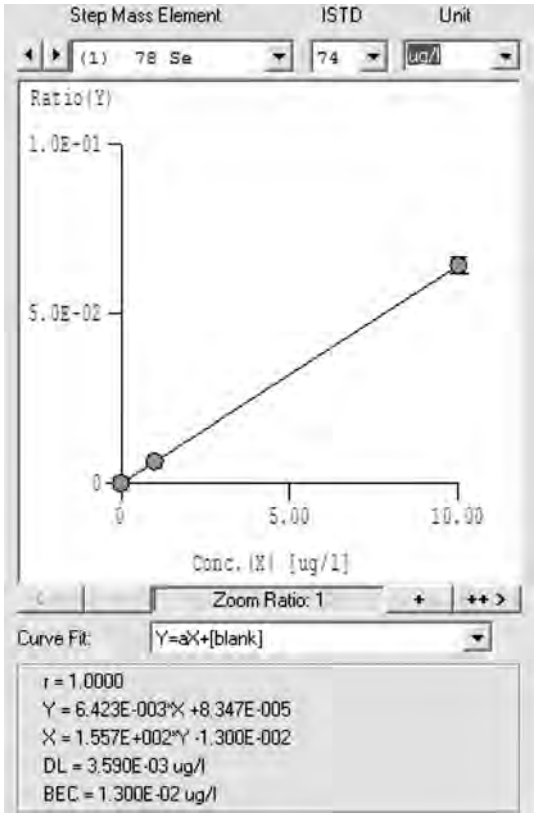


图 3A. Se 的校准曲线 [H_2 模式]
注 BEC 0.013 µg/L.

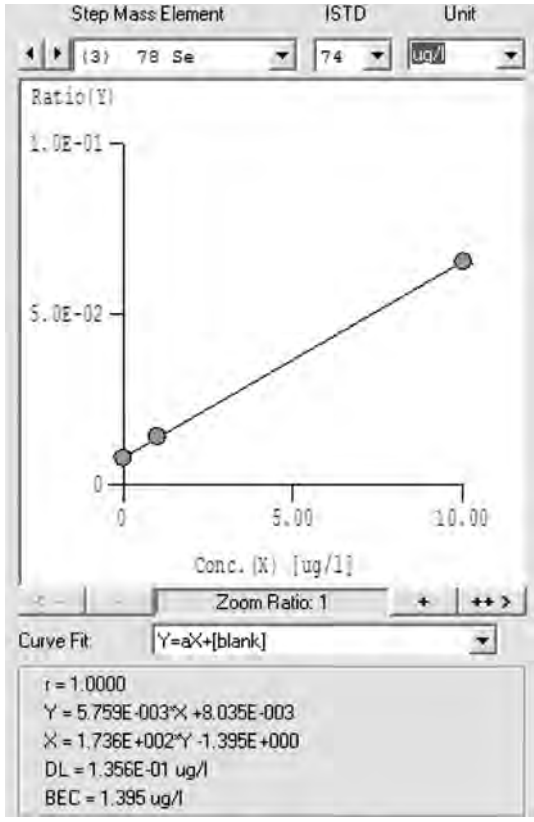


图 3B. Se 的校准曲线 [无气体模式]
注 BEC 1.4 µg/L.

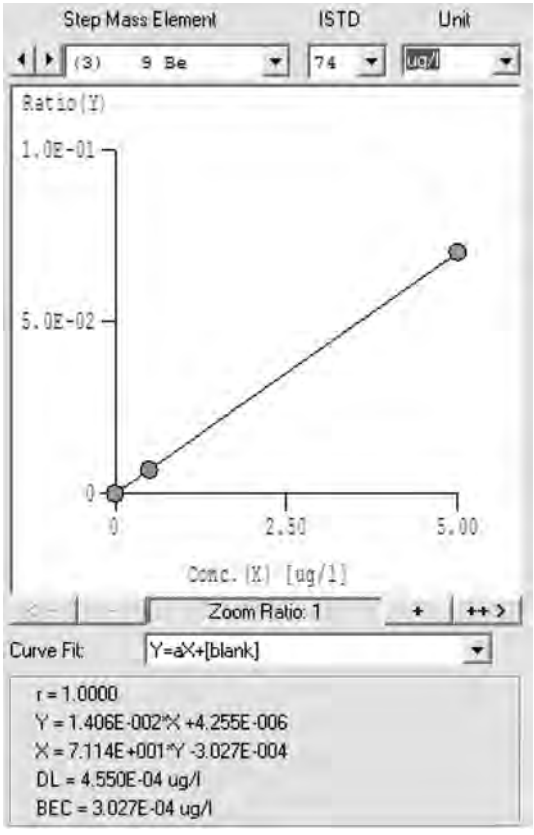


图 4. Be 的校准曲线 [无气体模式]
注 检出限 0.303 µg/L.

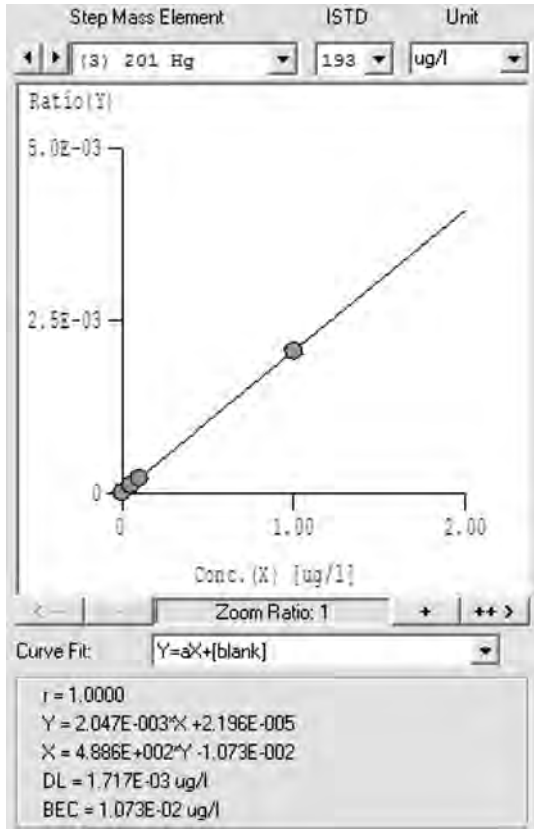


图 5. Hg 的校准曲线 [无气体模式]
注 检出限 0.0107 µg/L.

表 3. 首选池模式对酒精样品的定量数据以及 Islay 样品的加标回收率（样品回收普遍很好，所有结果都乘了稀释因子，以 µg/L 表示）

样品			Highland	Speyside	Islay	Blend	Irish	Bourbon	Bourbon decanter	Whisky decanter	加标	加标量	% 回收率
Be	9	无气体	0.140	0.052	0.037	0.008	0.035	0.015	0.042	0.048	13.09	12.5	104.4
V	51	He	1.564	0.443	0.344	0.073	0.431	6.321	1.693	0.14	25	25	98.6
Cr	52	He	27.39	14.05	4.064	12.62	22.71	4.077	31.87	4.331	30.95	25	107.5
Cr	53	He	26.15	13.7	3.955	12.57	22.61	3.661	31.52	4.114	30.81	25	107.4
Mn	55	He	54.51	31.76	13.52	12.22	26.95	9.753	90.4	30.54	38.19	25	98.7
Fe	56	He	1125	191.2	99.76	583.8	250.5	131.4	1114	67.03	232.2	125	106.0
Co	59	He	1.097	0.376	0.180	0.130	0.336	0.172	0.323	0.368	12.83	12.5	101.2
Ni	60	He	14.02	3.586	1.442	5.065	3.078	2.274	12.88	1.992	25.91	25	97.9
Cu	63	He	542.9	370.8	454.4	258	38.45	22.2	445.5	367.6	579.8	125	100.3
Cu	65	He	525.5	359.2	441.6	251.4	37.4	21.43	430.8	355.9	568.6	125	101.6
Zn	66	He	21.02	18.54	8.414	14.18	8.149	13.69	68.27	21.9	137.5	125	103.3
As	75	He	0.503	0.427	0.272	0.256	0.164	2.192	0.434	0.424	25.72	25	101.8
Se	78	H_2	0.458	0.357	0.190	0.073	0.045	0.497	0.069	0.293	26.54	25	105.4
Cd	111	He	0.036	0.024	0.012	0.010	0.024	0.036	0.193	0.028	12.55	12.5	100.3
Sn	118	无气体	9.18	14.82	16.68	5.161	2.245	1.681	0.239	15.12	41.3	25	98.5
Sb	121	无气体	0.817	0.514	0.397	0.308	0.311	0.765	0.316	0.188	24.87	25	97.9
Ba	137	无气体	3.282	3.05	1.426	2.001	3.37	3.303	1.396	2.41	25.71	25	97.1
Hg	201	无气体	0.013	0.011	0.010	0.011	0.010	0.018	0.008	0.009	0.252	0.25	97.0
Pb	208	无气体	1.13	0.898	0.903	1.902	1.21	0.912	12.59	11.15	25.33	25	97.7
U	238	无气体	0.295	0.049	0.051	0.026	0.060	0.104	0.028	0.049	24.38	25	97.3

对于那些易受干扰元素来讲，使用仪器的氦模式的好处是显而易见的。由于氦是一种惰性气体，所以没有副反应发生或新的干扰产物形成-这有利于在全质量范围内获得无干扰的定性或半定量分析数据。所有样品采用如上所述的同样方法制备（尽管是在不同天分别制备的）。表 4 是在和前面数据一样的氦模式条件下给出的品的半定量数据。

全质量谱图（图 6）来自铅晶玻璃瓶储存的 bourbon 样品。图中插入了一个放大的区域，用以说明对于那些受干扰最严重的元素，同位素非常吻合。Cr 的吻合尤其突出，因为在这种含碳基体中，所有三种 Cr 同位素（50，52 和 53）的比值都与同位素天然比值很一致。^{50}Cr 受 $^{38}Ar^{12}C$, $^{13}C^{37}Cl$, $^{36}Ar^{14}N$, 以及 $^{35}Cl^{15}N$ 的干扰; ^{52}Cr 受 $^{36}Ar^{16}O$, $^{40}Ar^{12}C$, $^{35}Cl^{17}O$, 以及 $^{37}Cl^{15}N$ 的干扰; ^{53}Cr 受 $^{40}Ar^{13}C$, $^{37}Cl^{16}O$, $^{35}Cl^{18}O$, 以及 $^{35}Cl^{17}O^{1}H$ 的干扰。还可能有一些其它干扰，但这些干扰实质上都是多原子干扰，因此通过相同的过程使用单一的氦模式条件就可以消除。

为了证明仪器的稳定性（图 7），对一个加标的 Highland 麦芽威士忌酒样品进行了 54 次独立测量。总测量时间为 5 小时 18 分钟。大多数元素的稳定性 < 2% RSD，表明该方法可用于常规分析。

表 4. 氦模式对酒精样品的半定量数据（除标出的单位外，其它数据为 µg/L [ppb]，已乘稀释因子）

		Highland	Speyside	Islay	Blend	Irish	Bourbon	Bourbon decanter	Whisky decanter
7	Li	0.24	0.2	0.049	0.084	0.16	0.16	0.34	0.26
9	Be	0.15	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
11	B	46	44	42	49	62	69	75	51
12	C	53000 ppm	55000 ppm	55000 ppm	55000 ppm	54000 ppm	76000 ppm	55000 ppm	57000 ppm
23	Na	1400	2100	1600	1600	1000	12000	540	2100
24	Mg	61	48	23	30	63	120	45	48
27	Al	3.9	1.8	1.8	2.3	2.4	1.9	2.5	1.6
29	Si	1300	1400	1300	1300	1300	2000	1500	1400
31	P	13	9.7	6.2	11	86	200	33	18
34	S	100	190	120	240	250	520	210	250
35	Cl	450 ppm	440 ppm	420 ppm	420 ppm	420 ppm	430 ppm	410 ppm	430 ppm
39	K	150	150	100	130	320	470	460	160
43	Ca	60	49	5.5	10	37	18	26	22
47	Ti	0.51	1.6	0.77	0.51	1.5	1.7	0.99	0.8
51	V	0.8	0.54	0.11	0.6	0.6	6.5	1.2	0.21
52	Cr	26	14	5.1	13	23	5.1	27	5.4
55	Mn	54	32	13	14	27	11	90	32
56	Fe	1200	210	100	630	260	150	1100	76
59	Co	1.1	0.47	0.16	0.18	0.36	0.24	0.4	0.4
60	Ni	13	3.5	1.8	5.7	3.4	2.4	13	2.3
63	Cu	530	380	450	260	39	22	440	380
66	Zn	22	18	9	15	8.9	14	71	25
69	Ga	0.65	0.45	0.27	0.39	0.66	0.52	0.3	0.51
75	As	0.44	0.3	0.21	0.2	0.19	2	0.4	0.42
78	Se	N/D	0.48	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0.47
79	Br	160	150	140	130	120	150	150	150
85	Rb	0.9	1.4	0.92	1	2.2	8.1	6.1	1.5
88	Sr	1.3	0.84	0.22	0.36	1.4	1.7	0.57	0.78
89	Y	0.046	0.03	0.024	0.0084	0.1	0.034	0.0056	0.035
90	Zr	0.18	0.019	0.12	0.064	0.22	0.093	0.069	0.0097
93	Nb	0.0024	0.0076	0.005	0.0051	0.091	0.014	0.0077	0.005
95	Mo	0.7	0.31	0.37	0.41	0.33	1.5	0.76	0.13
101	Ru	0.01	0.02	N/D	0.021	N/D	N/D	0.01	0.02
105	Pd	0.0072	N/D	N/D	0.0075	N/D	0.025	N/D	N/D
107	Ag	0.017	0.027	0.0034	0.0035	0.014	0.0039	0.021	0.01
111	Cd	N/D	0.047	0.047	0.024	0.024	0.1	0.14	0.071
118	Sn	10	18	20	6	3.7	2.2	0.6	17
121	Sb	0.32	0.3	0.27	0.3	0.39	0.8	0.3	0.21
125	Te	N/D	0.38	0.38	0.19	0.19	N/D	N/D	0.18
127	I	0.46	0.42	0.65	0.41	0.5	0.89	0.45	0.47
133	Cs	0.052	0.15	0.026	0.0092	0.063	0.24	0.045	0.15
137	Ba	4.6	3.2	1.3	2.2	3.8	3.8	1.3	2.4
139	La	0.16	0.07	0.063	0.086	0.28	0.15	0.035	0.087
140	Ce	0.47	0.24	0.17	0.11	0.61	0.24	0.04	0.36
141	Pr	0.042	0.028	0.019	0.02	0.063	0.02	0.0044	0.024
146	Nd	0.21	0.12	0.045	N/D	0.3	0.14	0.022	0.14
147	Sm	0.074	N/D	0.01	0.033	0.098	0.037	0.032	0.032
153	Eu	0.0027	0.0083	0.0055	0.011	0.016	0.0063	0.0056	N/D
157	Gd	0.071	0.04	0.048	0.016	0.11	0.056	0.016	0.024
159	Tb	0.0024	0.005	0.0025	N/D	0.012	0.0029	N/D	0.0037
163	Dy	0.071	0.0096	0.024	0.029	0.083	0.028	0.0049	0.029
165	Ho	0.0045	0.0057	0.0057	0.0011	0.012	0.0013	0.0046	0.0034
166	Er	0.1	0.081	0.081	N/D	0.046	0.0075	0.0032	0.078
169	Tm	0.0059	0.003	0.004	0.001	0.0061	0.0046	0.001	0.001
172	Yb	0.055	0.013	0.0043	0.0089	0.013	0.02	0.0044	0.017
175	Lu	0.0018	0.00096	N/D	N/D	N/D	N/D	0.00097	0.00096
178	Hf	0.0096	0.0032	0.0032	0.0033	0.019	N/D	0.0066	0.0032
181	Ta	0.0038	N/D	0.0019	N/D	0.021	0.0011	0.0019	0.00098
182	W	0.11	0.065	0.11	0.13	0.07	0.31	0.07	0.077
185	Re	0.012	0.0049	0.012	0.0051	0.0025	0.0058	0.0076	N/D
189	Os	0.0049	N/D	0.01	0.0051	0.005	0.011	0.005	0.015
195	Pt	0.021	0.026	0.0044	0.018	0.013	0.0051	0.017	0.017
202	Hg	0.057	0.019	0.029	0.029	0.059	0.022	0.039	0.058
205	Tl	0.1	0.084	00.064	0.04	0.041	0.039	0.038	0.052
208	Pb	1.2	0.95	0.94	2	1.3	0.93	12	10
232	Th	0.02	0.0088	0.012	0.0079	0.009	0.027	0.0056	0.0067
238	U	0.26	0.045	0.044	0.023	0.073	0.094	0.032	0.05

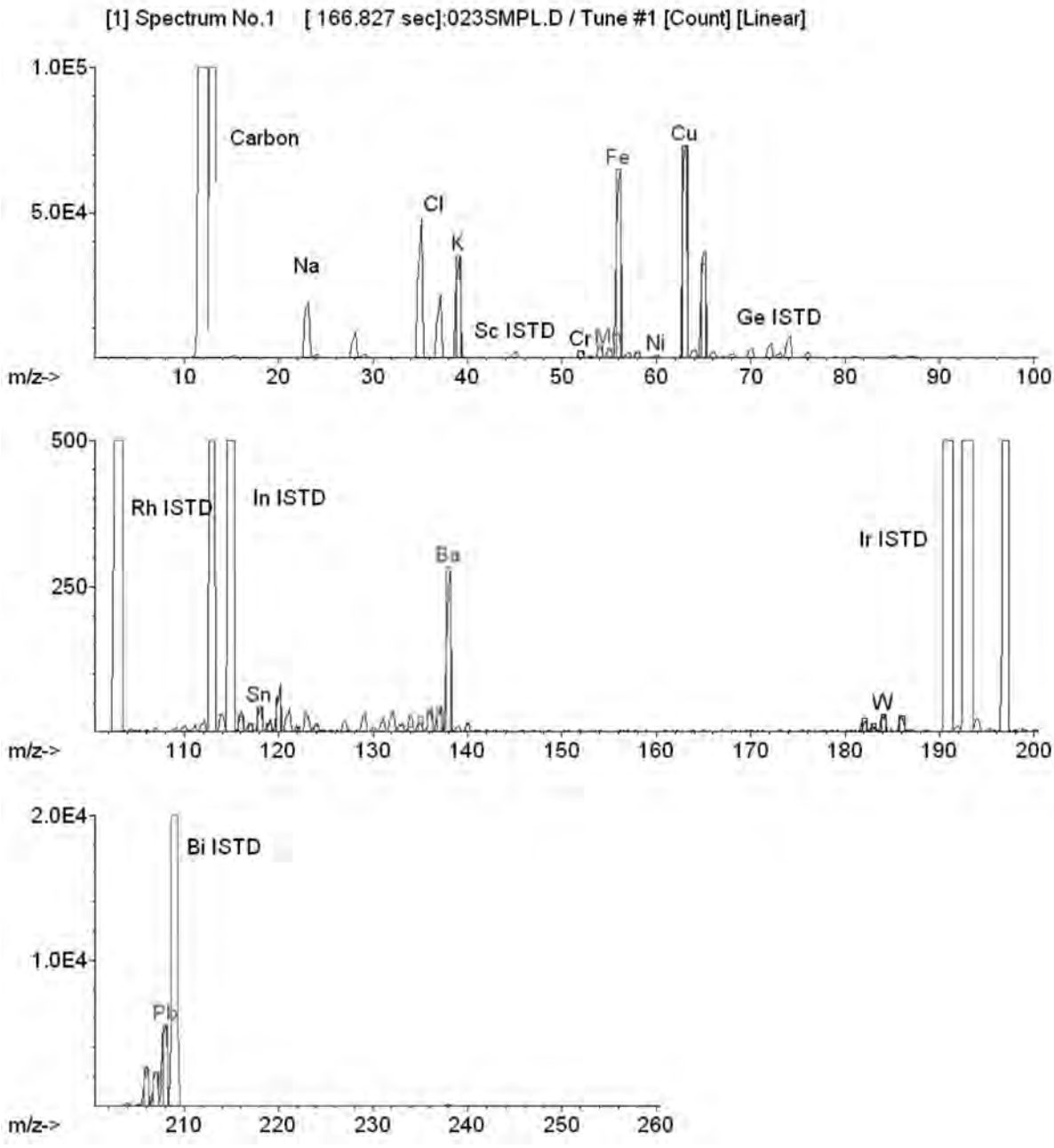


图 6a. 铅晶玻璃储存的 bourbon 样品的全谱扫描（He 模式）。对“主要”峰加了标注，包括较高强度峰的质谱拟合

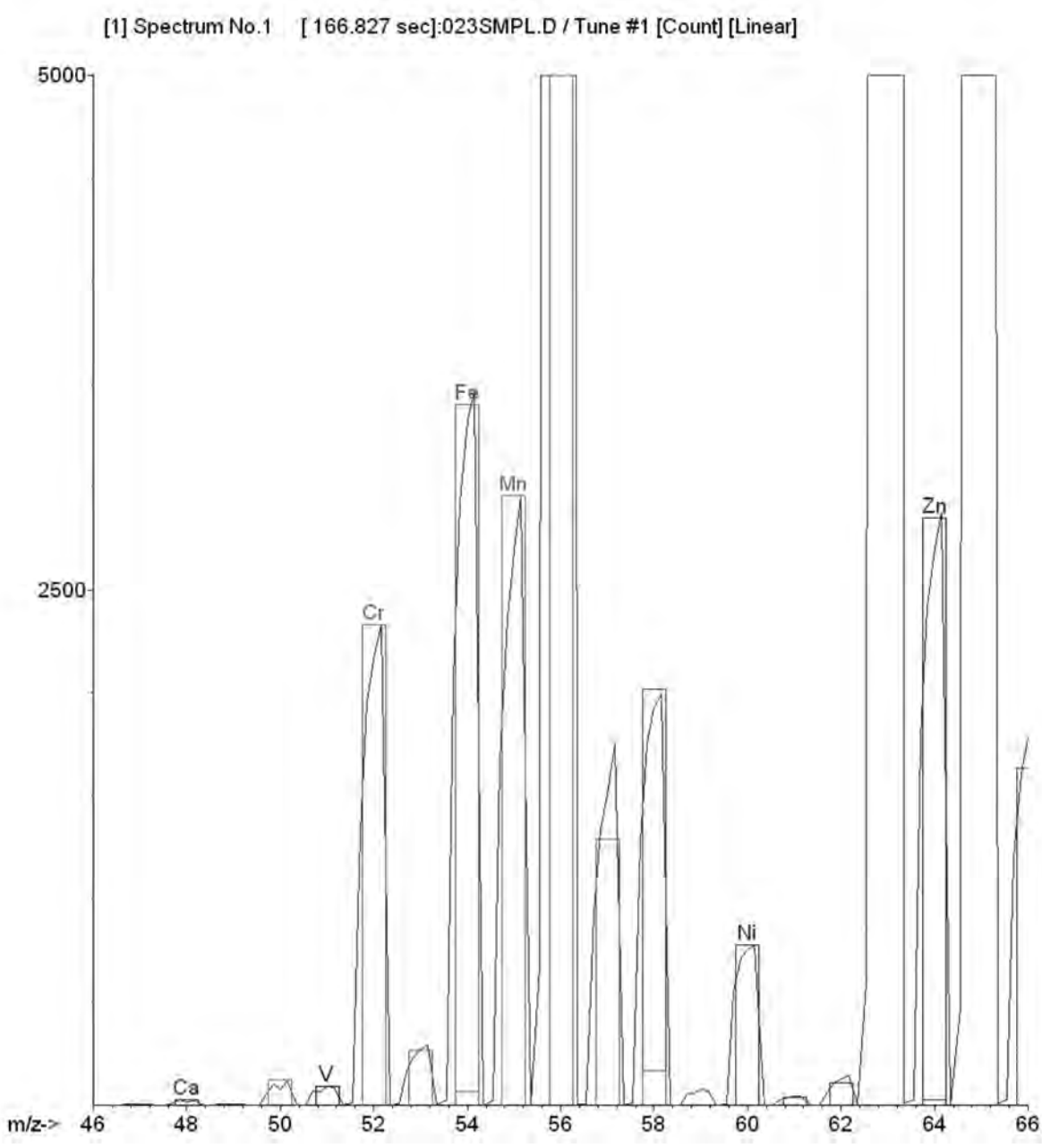


图 6b. 受基体干扰元素的放大质谱图。注意其良好的质谱吻合性，尤其是 Cr（受 ArO, ArC, 以及 ClO 干扰）

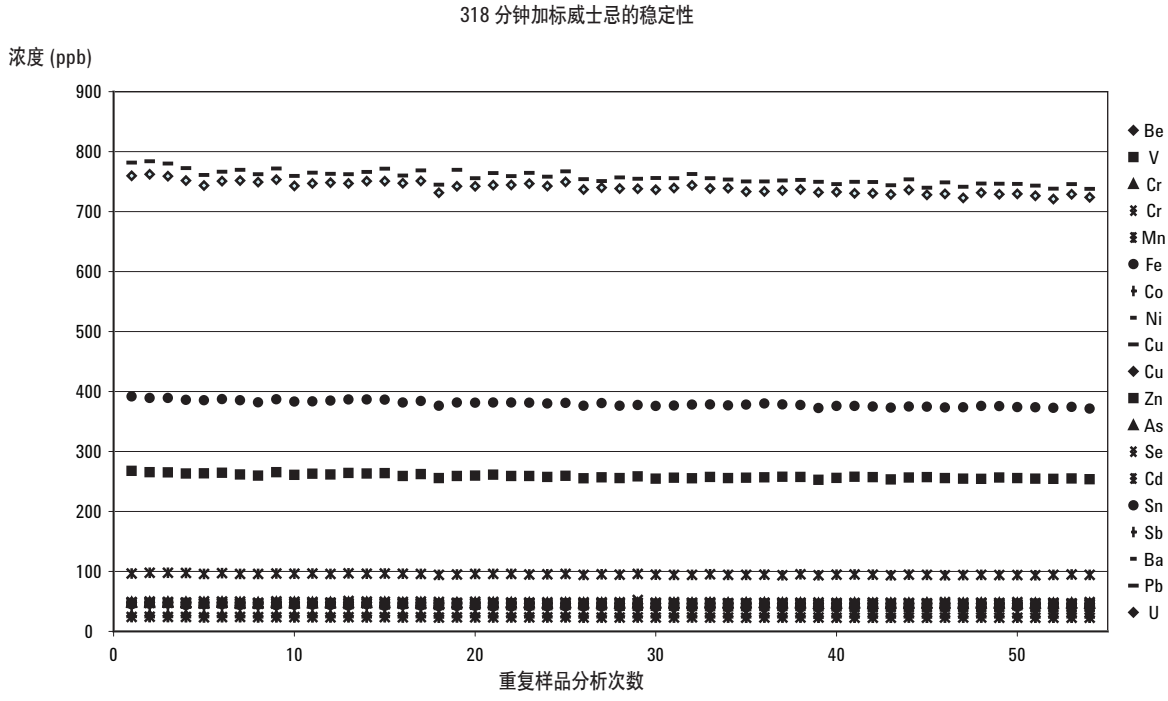


图 7. 加标的 Highland 麦芽酒精样品（已校正稀释）5 小时 18 分钟时间内的稳定性（54 次重复测量），所有元素的测量精密度< 2%

结论

高百分含量的酒精饮料样品经简单酸化/稀释后，采用 7500cx ICP-MS 测定成为了常规分析方法。使用合适气体模式的 ORS，可以有效消除等离子体和基体产生的各种干扰，因此只用一套简单的条件就可改善检出限和分析可靠性。氦模式的使用也可以实现无干扰半定量分析，允许更宽的元素覆盖范围和快速筛选作用。

参考文献

1. Achieving Optimum Throughput in ICP-MS Analysis of Environmental Samples with the Agilent 7500ce ICP-MS, Agilent ICP-MS Journal 27, page 4; May 28, 2006, 5989-5132EN

安捷伦八极杆反应池 ICP-MS 系统的氦碰撞模式在消除质谱干扰方面的无比高效性

应用

元素分析

作者

Ed McCurdy, Glenn Woods and Don Potter
Agilent Technologies
Lakeside Business Park
Cheadle Royal, Cheshire
UK

摘要

由于 ICP-MS 具有多元素同时分析能力，操作简单，许多常规分析实验室采用它作为元素分析的主要技术。其中，新兴的 ICP-MS 的碰撞/反应池 (CRC) 技术对一些特定的质谱干扰具有很好的消除性能，然而，就 CRC 技术的多元素同时分析能力而言，它仍仅仅是一种替补分析技术。本研究的工作应用 Agilent 7500ce ICP-MS 碰撞/反应池的单一 He 气工作条件，同时有效消除难分析的基体复杂的样品中多种干扰，证明了其多元素同时分析的强大能力。

前言

ICP-MS 是一个非常强有力的多元素分析技术，但长期研究也证明了它的确受到一些特定的质谱干扰，尤其是当样品基体复杂、类型多变时更成问题。ICP-MS 中大多数干扰是来源于等离子体中产生的分子（或多原子）离子与目标元素的名义质量相同而发生质谱重叠。常见于报道的干扰主要可分为两组：来源于等离子体本身和水的干扰（基于等离子体的），如 ^{40}Ar，$^{40}Ar^{16}O$，和 $^{40}Ar^{38}Ar$ 等；来源于样品基体组分的干扰（基于样品基体的），如 $^{35}Cl^{16}O$，和 $^{32}S^{34}S$ 等。基于等离子体的多原子离子干扰是可预知的而且基本不发生改变，它与样品基体无关。而基于样品基体的多原子离子干扰很难预知，并且干扰大小和类型随着样品基体组分和它们的相对浓度的不同而变化。

碰撞反应池（CRC）技术的最新发展，使得在某些样品基体中以前被证明很难或无法检测的低浓度受干扰元素的分析取得重大改进。在 CRC ICP-MS 中，一般在反应池中压入一种反应气体与干扰物反应（称作反应模式）。反应模式有多种工作机理，其中某一种反应过程机理可使干扰粒子减弱，这取决于所选择的气体类型和干扰类型。不过，在实际工作中，只使用高活性气体的“纯反应模式”的 CRC 系统一般仅应用于分析特定的目标元素，清除已知的特定一种干扰离子 [1–8]。另一些仪器使用“更简单”或较少活性的反应池气体，如 H_2，但是它主要用于消除基于等离子体本身的分子离子干扰，因为它与难消除的基于基体的分子离子反应慢或根本不反应。

氦 (He) 碰撞模式

安捷伦八极杆反应池系统 (ORS) 引进了一个新的更强有力的 CRC 操作模式—He 碰撞模式。它可以用一种惰性气体碰撞消除所有多原子粒子。它的消除干扰的原理是基于干扰粒子与目标元素的直径大小，而不

是它们与反应气的相对反应活性不同。因为所有的多原子干扰都比同等质量的分析物离子直径大，它们较大的横截面意味着它们在碰撞池中与碰撞气有更多的碰撞几率，所以当它们通过加入气体的碰撞池前进时将损失更多动能。当到达碰撞池出口处时，（由于它们与 He 碰撞池气的碰撞）大横截面的多原子粒子的离子能量都比分析物离子的离子能量明显低，这样，用一个适当的截止电压（形成势能壁垒）即可阻止它们离开碰撞池，而只容许能量较高的分析物离子通过碰撞池到达分析器。这个分离过程叫做动能歧视效应（KED），这个简单但极为有效的方法比反应模式具有许多重要的分析优点。

He 碰撞模式的优点：

- 与反应池气相比，He 是惰性气体，因此不与样品基体反应，在碰撞池中不形成新的干扰物
- 由于 He 是惰性气体，它不与分析物或内标离子反应并引起它们的信号损失
- 所有干扰（基于等离子体本身的和基于样品基体的）均可被清除或极大减弱，因此有效干扰消除功能可以与多元素同时扫描或半定量分析功能相结合
- 因为 He 碰撞模式不是仅针对某种特定的干扰，所以可以同时消除对同一个目标元素的多种可能的干扰（或同一基体产生的对多个元素的不同干扰）[9，10]
- 不需要预先知道样品基体情况，并且不需要建立特定的消除干扰方法；与此相反，应用强反应气体模式来消除干扰时，必须针对不同的目标元素，以及不同的样品基体分别建立不同的消除干扰的反应条件，使操作参数相当复杂 [11]
- He 碰撞模式可以应用于不同样品目标元素、不同样品基体，而却只采用相同的工作参数（如气体及流速）
- 不用设置或优化碰撞池电压等参数
- 不用建立干扰校正方程

为什么其他 CRC-ICP-MS 不能使用 He 碰撞模式?

为了适当地消除干扰，He 碰撞模式需要采用动能歧视效应 (KED) 提供的高效率的目标元素/干扰离子的分离，这需要满足两个条件：第一，所有进入碰撞池的离子（初始离子）的能量必须受到严格的控制（动能基本相同并且不发生能量扩散）。安捷伦独特的屏蔽炬 (Shield Torch) 接口确保进入碰撞池的离子能量扩散很窄 (1 eV)；与其它类型的电子接地的等离子体设计（象平衡的、中心抽头的或交错的线圈）相比，屏蔽炬的物理接地原理提供了更好的初始离子能量控制。第二，在碰撞池中，多原子粒子必须经历足够多次数的碰撞（以尽量降低动能），以便在碰撞池出口处与目标元素离子分开，在 Agilent ORS 碰撞池中（唯一使用八极杆碰撞池的 ICP-MS），这是通过采用八极杆进行离子聚焦与导引来实现的。使用八极杆碰撞池有两个主要好处：

- 八极杆池的内径小。因此，碰撞池的入口和出口就小—所以碰撞池的工作压力比四极杆或六极杆碰撞池的操作压力高，增加了离子/气体的碰撞次数
- 八极杆比六极杆和四极杆离子导引系统具有更好的聚焦效率。离子束紧密聚焦，确保了其在高碰撞池工作压力下仍然保持较好的离子传输效率，目标离子损失少，灵敏度高

只有 Agilent ORS 将屏蔽炬接口技术与八极杆碰撞池技术紧密相结合起来，所以只有 Agilent ORS 才可以有效地使用 He 碰撞模式。

He 碰撞模式性能测试—最困难的基体情况设想

本试验制备了一个合成样品基体以产生多种常见的对多个目标元素的多种干扰，测试 He 碰撞模式消除所有的多原子粒子干扰的能力。制备一个标准溶液，含 1% HNO_3，1% HCl 和 1% H_2SO_4（全部为 UpA 级超纯试剂，Romil，剑桥，英国），1% Butan-1-ol（SpS 超纯级，Romil，剑桥，英国），100 mg/L（ppm）的 Na 和 Ca（它们都从 10,000 mg/L Spex CertiPrep Assurance 单一元素标样制备）。该标准溶液模拟一个非常复杂的天然样品基体。表 1 列出了此样品基体中可能产生的各种多原子粒子干扰及受干扰的元素。实际上，在这一样品中，在中等质量数区域（从 50 到 80 amu），几乎每个元素都会受到多种干扰。这使得复杂样品基体中的这些元素的准确测定对常规的 ICP-MS 极具挑战性，因为多种干扰同时存在的复杂性意味着数学校正将根本不可靠。这也同时说明为什

么采用强反应气体的反应池对复杂样品基体中的多元素分析不适合；因为每一个多原子离子干扰对任何给定的反应池气体都有不同的活性，所以没有一个单一反应气体对一批多原子离子同时是有效的。然而，表 1 显示的每种干扰都是多原子的离子，因此采用 He 碰撞 KED 模式的一套条件就可以有效地消除干扰。本试验采集了两组质谱图来说明 He 碰撞模式消除多重干扰的能力：一个是无气体模式下采集，第二种是将 He 加入到碰撞池后采集。不用数据干扰校正或背景扣除等数学校正方法。最后，在该样品基体中加入 5 ng/L（ppb）的多元素标准溶液，采集（加 He 时）质谱图，计算目标元素的回收率，同时验证目标同位素比与天然同位素比的一致性（从而验证消除干扰能力）。

表 1. 含 N，S，Cl，C，Na 和 Ca 的水溶液基体中的主要多原子干扰

同位素	主要干扰粒子
^{51}V	$^{35}Cl^{16}O$, $^{37}Cl^{14}N$
^{52}Cr	$^{36}Ar^{16}O$, $^{40}Ar^{12}C$, $^{35}Cl^{16}OH$, $^{37}Cl^{14}NH$
^{53}Cr	$^{36}Ar^{16}OH$, $^{40}Ar^{13}C$, $^{37}Cl^{16}O$, $^{35}Cl^{18}O$, $^{40}Ar^{12}CH$
^{54}Fe	$^{40}Ar^{14}N$, $^{40}Ca^{14}N$
^{55}Mn	$^{37}Cl^{18}O$, $^{23}Na^{32}S$
^{56}Fe	$^{40}Ar^{16}O$, $^{40}Ca^{16}O$
^{57}Fe	$^{40}Ar^{16}OH$, $^{40}Ca^{16}OH$
^{58}Ni	$^{40}Ar^{18}O$, $^{40}Ca^{18}O$, $^{23}Na^{35}Cl$
^{59}Co	$^{40}Ar^{18}OH$, $^{43}Ca^{16}O$
^{60}Ni	$^{44}Ca^{16}O$, $^{23}Na^{37}Cl$
^{61}Ni	$^{44}Ca^{16}OH$, $^{38}Ar^{23}Na$, $^{23}Na^{37}ClH$
^{63}Cu	$^{40}Ar^{23}Na$, $^{12}C^{16}O^{35}Cl$, $^{12}C^{14}N^{37}Cl$
^{64}Zn	$^{32}S^{16}O_2$, $^{32}S_2$, $^{36}Ar^{12}C^{16}O$, $^{38}Ar^{12}C^{14}N$, $^{48}Ca^{16}O$
^{65}Cu	$^{32}S^{16}O_2H$, $^{32}S_2H$, $^{14}N^{16}O^{35}Cl$, $^{48}Ca^{16}OH$
^{66}Zn	$^{34}S^{16}O_2$, $^{32}S^{34}S$, $^{33}S_2$, $^{48}Ca^{18}O$
^{67}Zn	$^{32}S^{34}SH$, $^{33}S_2H$, $^{48}Ca^{18}OH$, $^{14}N^{16}O^{37}Cl$, $^{16}O_2{}^{35}Cl$
^{68}Zn	$^{32}S^{18}O_2$, $^{34}S_2$
^{69}Ga	$^{32}S^{18}O_2H$, $^{34}S_2H$, $^{16}O_2{}^{37}Cl$
^{70}Zn	$^{34}S^{18}O_2$, $^{35}Cl_2$
^{71}Ga	$^{34}S^{18}O_2H$
^{72}Ge	$^{40}Ar^{32}S$, $^{35}Cl^{37}Cl$, $^{40}Ar^{16}O_2$
^{73}Ge	$^{40}Ar^{33}S$, $^{35}Cl^{37}ClH$, $^{40}Ar^{16}O_2H$
^{74}Ge	$^{40}Ar^{34}S$, $^{37}Cl_2$
^{75}As	$^{40}Ar^{34}SH$, $^{40}Ar^{35}Cl$,$^{40}Ca^{35}Cl$
^{77}Se	$^{40}Ar^{37}Cl$, $^{40}Ca^{37}Cl$
^{78}Se	$^{40}Ar^{38}Ar$
^{80}Se	$^{40}Ar_2$, $^{40}Ca_2$, $^{40}Ar^{40}Ca$

仪器

试验采用 Agilent 7500ce 型 ICP-MS 仪器，工作条件优化于针对高基体和复杂基体样品分析的典型调谐条件（即等离子体条件采用仪器标准情况的最佳化调谐，达到约 0.8% CeO/Ce 低氧化物干扰水平）。没有对任何仪器参数进行特别的额外的优化以消除特定的干扰。碰撞模式测量时，5.5 mL/min 单一的 He 被加入到碰撞池中来消除干扰。

质谱图比较

在无气体模式采集的背景质谱图示于图 1a，在 He 碰撞模式条件下，同区的质谱图（同样的质量范围和强度坐标）示于图 1b。在图 1a 无气体模式的谱图中可以清楚地看到，等离子体 Ar 气和水的背景组分（Ar，O，H），以及加入的合成样品基体组分（HNO_3，HCl，H_2SO_4，丁醇，Ca 和 Na）所形成几个高强度的背景峰，其中最显著的是来自等离子体的 $^{40}Ar^{16}O^+$ 和 $^{40}Ar_2{}^+$，以及来自基体的 $^{40}Ar^{12}C^+$，$^{32}S_2{}^+$，$^{35}Cl^{16}O^+$ 等高背景。这些高强度背景峰说明了几个受干扰元素（如高含碳的样品基体中的 ^{56}Fe，^{78}Se 和 ^{80}Se，^{52}Cr；高含硫基体样品中的 ^{64}Zn 等）以前为什么一直被认为是 ICP-MS 分析的困难元素。

当氦被加入到碰撞池时（He 碰撞模式条件），所有质谱图中这些高强度背景峰就消失了（图 1b—与图 1a 为同样的样品，同样的强度坐标），这说明了 He 碰撞模式的高性能和对多种干扰消除的普遍适用性。图 2a 和 2b 是与图 1 是一样的条件的两个谱图，只是将纵坐标扩大 100 倍。其中可以观察到更多的、强度较低的、源于基体的多原子粒子。这些干扰离子，尽管比基于等离子体的多原子离子干扰处于更低的强度水平，但在常规样品分析中有可能引起更为严重的试验偏差，因为它们的出现与否和强度大小依赖于样品基体组成，而样品基体组成在常规实验室中是未知的和多变的。在这个放大坐标的谱图里，可以清楚地看到

使用 He 碰撞模式可以把背景干扰粒子减少到极低的水平，包括原来高强度的 ArO^+ 和 Ar_2^+。在这个 He 碰撞模式（图 2b）的谱图上可清楚显示的质谱峰是 Fe 和 Zn（天然同位素强度比对谱图证实了这些质谱峰的确为 Zn 的同位素 *m/z* 64，66 和 68），这是合成样品基体组分中的痕量杂质污染所带来的。与之相反的是，在无气体模式中（图 2a），在这个质量区域的几乎每个元素的每个同位素都有来自至少一个源于基体的多原子重叠干扰。

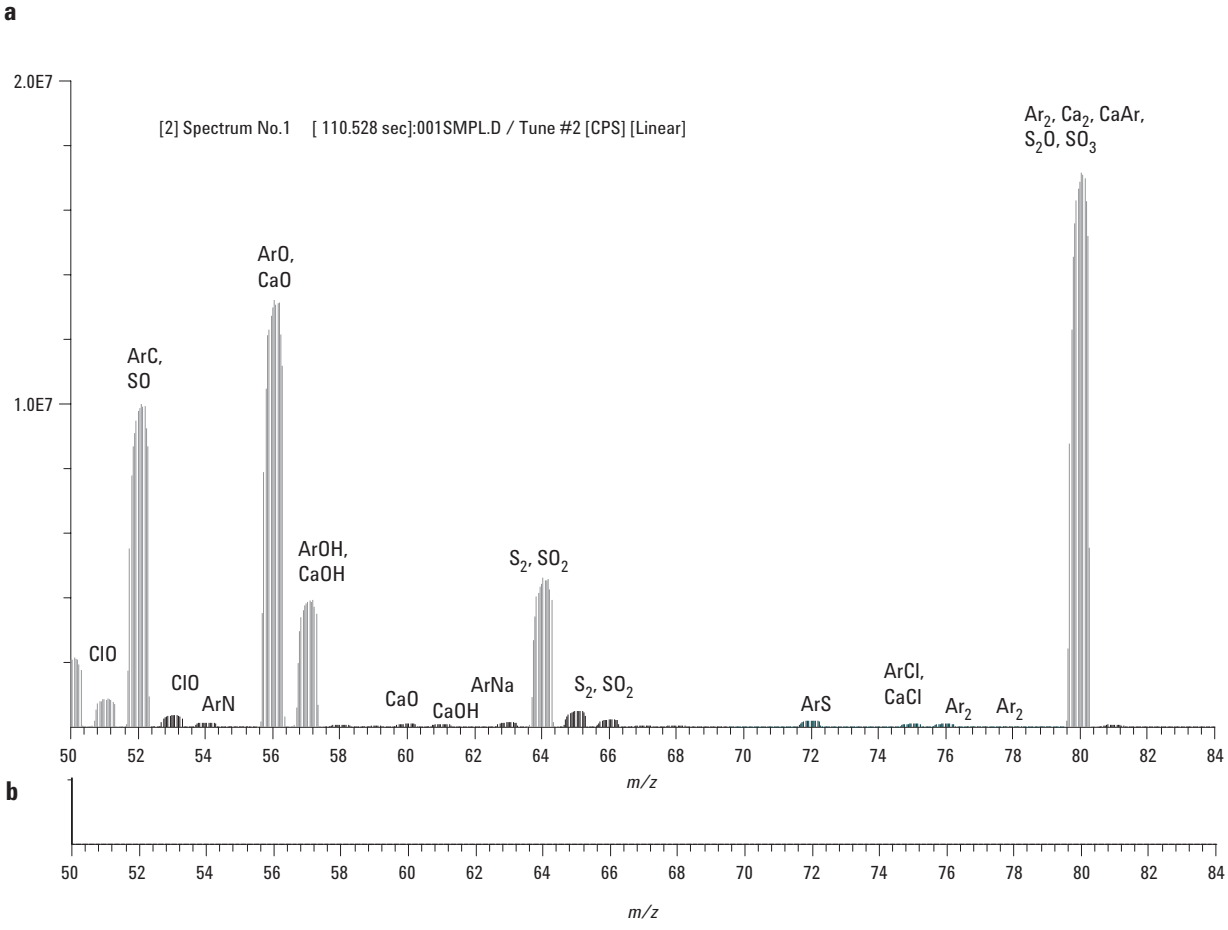


图 1. 复杂基体样品（组成见正文）形成的高强度干扰多原子离子在 (a) 无气体模式和 (b) He 碰撞气体模式下的表现，两种模式谱图采用同样的强度坐标 (2.0E7)

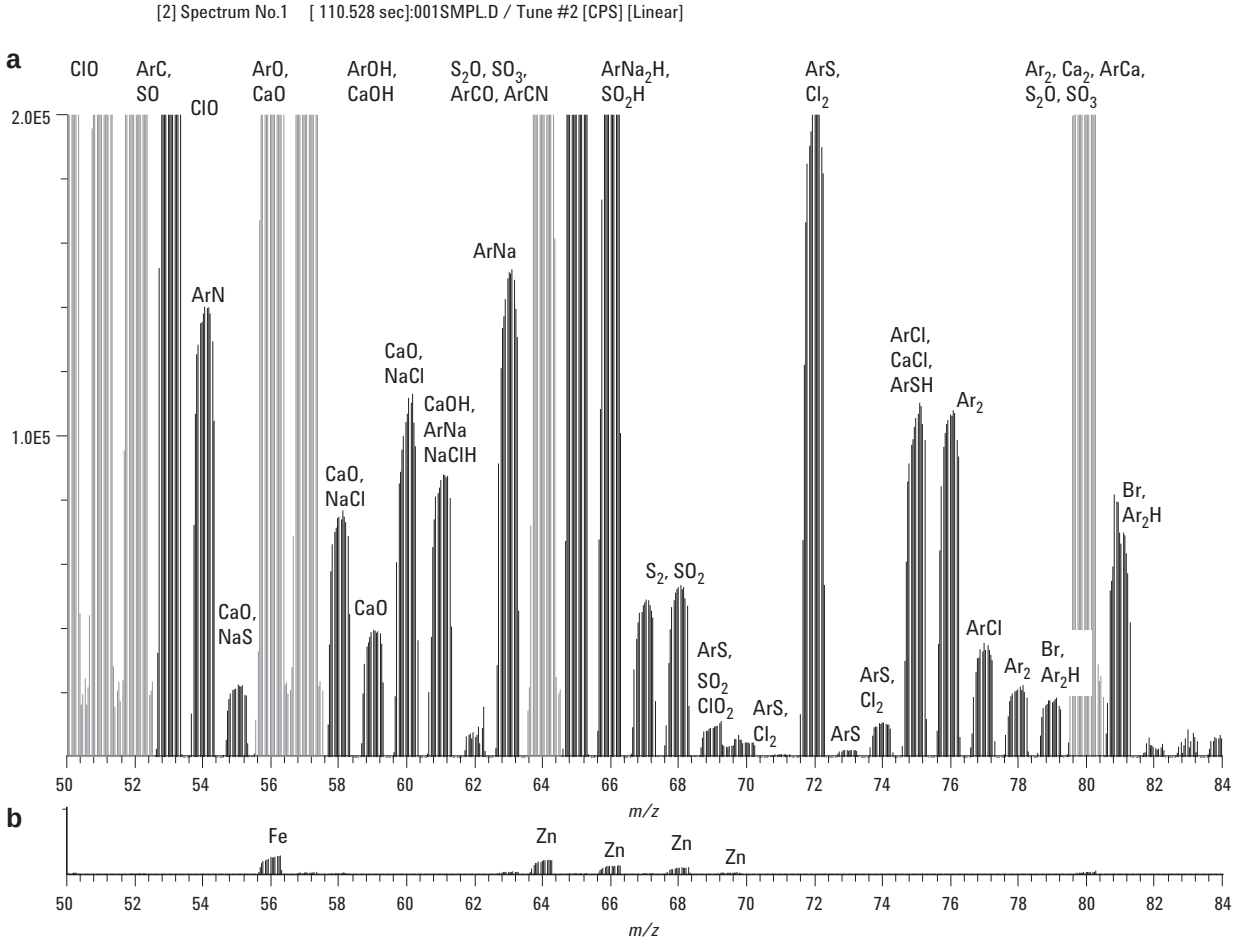


图 2. 复杂基体样品形成的低强度的干扰多原子离子在 (a) 无气体模式和 (b) He 碰撞气体模式下的表现（两种模式谱图采用同样的强度坐标 (2.0E5)，纵坐标比图 1 放大 100 倍）

存在样品基体时的分析物测量

在（图 1b 和 2b）中证明了可以仅仅用 He 碰撞模式能同时有效减少基于等离子体的和基于基体的多原子离子之后，分析了第二个样品。这个样品包括同样的多组分基体，但其中加入了 5 ppb 多元素标样。用 He 碰撞模式采集数据，确保用同样的碰撞池条件消除干扰，得到足够的分析物灵敏度，以便可以测量在这个质量区域以前受干扰的痕量元素。加标元素为 5 ppb 的 V，Cr，Mn，Fe，Co，Ni，Cu，Zn，Ge，As 和 Se。所有这些元素至少有一个不受同质异位干扰的可用于分析的同位素，这些同位素在此基体中，在无气体模式时受多原子重叠干扰。

用 He 碰撞模式采集空白（未加标）基体和加标后的基体的谱图，分别在图 3a 和 3b 中进行比较。注意这些谱图显示的强度坐标，比图 2a 和 2b 的还要低 4 倍，这样就可以在它们的天然同位素比对谱图上证实观察到的的确是杂质元素（Fe，Ni，Cu，Zn）（图 3b）。图 3a 显示的谱图可清楚地说明 He 碰撞模式对该复杂和具挑战性的样品基体中亚 ppb 水平的多元素进行测量的能力。对每个待分析元素均显示了良好的天然同位素比对一致性。观察到的唯一残余干扰是在质量 57 和 80 处的基于等离子体的粒子 ArOH 和 Ar_2。在质量 80 处的 Ar_2 信号相当于～5 µg/L Se。然而，对其他 Se 同位素 *m/z* 77，78 和 82 的多原子干扰被完全清除，允许选择这些同位素的任何一个进行 Se 的测定（^{76}Se 也可用，但加标溶液混合物中它与 ^{76}Ge 重叠）。

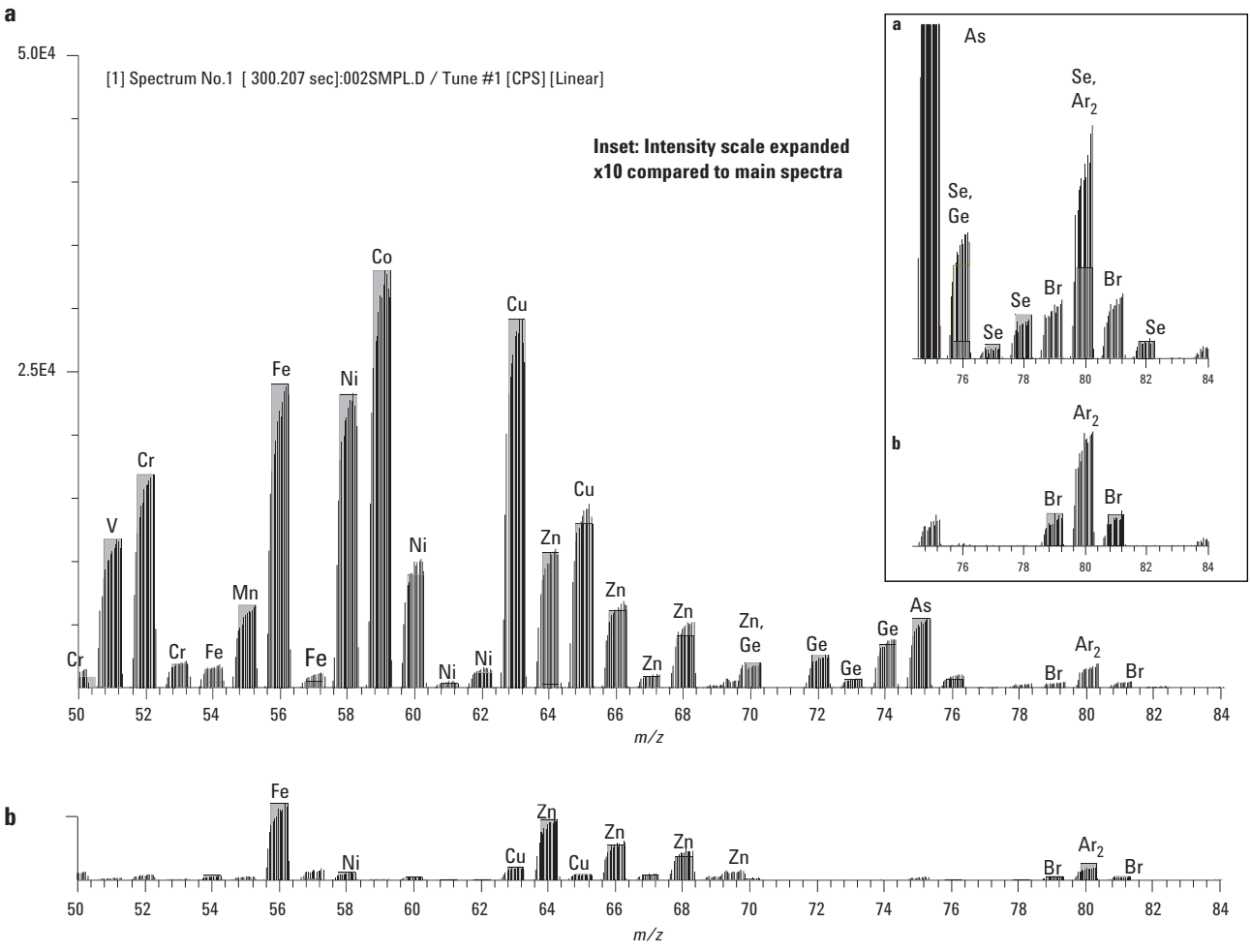


图 3. 用 He 碰撞模式分析复杂基体样品的谱图，(a) 加入 5 ppb 的 V，Cr，Fe，Mn，Ni，Co，Cu，Zn，Ge，As，和 Se 及 (b) 未加标的合成溶液。强度坐标为 5.0E4（小插图坐标为 5.0E3）

结论

采用仅仅同一条件就能消除所有多原子干扰，意味着 He 模式是普遍高效适用的—适合于任何样品基体中任何元素的任何同位素。He 碰撞模式的使用提供了一种独特的新操作模式，在这个模式中，每个分析物的所有同位素都是可以使用的。换言之，这意味着以前由于干扰而不能用于测定的主要同位素（比如：碳基体中的 ^{52}Cr，任何水溶液样品中的 ^{56}Fe，钠基体中的 ^{63}Cu，和硫酸盐基体中的 ^{64}Zn）现在可以使用了，这对分析人员是一个很大的优点。如果有需求，测定结果还可通过测量元素的首选同位素和第二个“确认”同位素来证实。因为当用 He 碰撞模式测量时这两种同位素都不受多原子干扰，采用两个独立测量的结果对报出结果的准确性很有价值。

这个强有力分析模式带来的另一个好处是样品制备的简化。在一般（非-CRC）ICP-MS 中，样品制备与稀释主要选择为硝酸，受限制。因为氯或硫的基体存在多原子干扰问题，所以不能使用盐酸和硫酸。分析人员现在可以选择更适合的样品消解技术，任何新的可能的多原子干扰都能在现有的、标准 He 模式条件下被清除。

He 碰撞模式在 7500ce 上的使用已被证明，在一组条件下对所有多原子干扰提供有效清除，因此能够准确分析复杂的未知样品中多元素组成。与使用反应性池气体的仪器相比，使用惰性碰撞气体可保证没有因为反应而造成的分析信号的损失，而且也不会形成新的未知的干扰粒子。

因为没有由于反应而造成的分析信号的损失并且没有新干扰产生，未受干扰的元素（和内标）可以与潜在受干扰的元素在相同的条件下测量；使用一组对所有分析物适合的碰撞池条件，允许瞬时信号（比如那些来自色谱或激光烧蚀样品引入）的多元素分析，以及半定量筛查分析。

He 碰撞模式适合于受多原子离子干扰的所有分析物，而且碰撞池条件不需要特别为每个元素设置，因此同样的碰撞池条件可被应用到其它所有元素，不需要再建立方法。此外，因为 He 模式条件不是为清除单个干扰而特别设置的，完全相同的碰撞池条件可被用于变化大或完全未知的样品基体，它大大简化了常规实验室的操作。ORS 使 ICP-MS 不需要方法开发，完全可靠地应用于最复杂的、真实样品基体的痕量多元素测定。

参考文献

1. G. K. Koyanagi, V. I. Baranov, S. D. Tanner and D. K. Bohme, (2000), *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **15**, 1207.
2. P. R. D. Mason, K. Kaspers and M. J. van Bergen, (1999), *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **14**, 1067.
3. J. M. Marchante Gayon, I. Feldmann, C. Thomas and N. Jakubowski, (2000), *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **16**, 457.
4. E. H. Larsen, J. Sloth, M. Hansen and S. Moesgaard, (2003), *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **18**, 310.
5. H-T. Liu and S-J. Jiang, (2003), *Anal. Bioanal. Chem.*, **375**, 306.
6. D. R. Bandura, S. D. Tanner, V. I. Baranov, G. K. Koyanagi, V. V. Lavrov and D. K. Bohme, in *Plasma Source Mass Spectrometry: The New Millennium*, eds. G. Holland and S. D. Tanner, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2001, p. 130.
7. C. C. Chery, K. DeCremer, R. Cornelis, F. Vanhaecke and L. Moens, (2003), *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **18**, 1113.
8. F. Vanhaecke, L. Balcaen, I. Deconinck, I. De Schrijver, C. M. Almeida and L. Moens, (2003), *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **18**, 1060.
9. N. Yamada, J. Takahashi and K. Sakata, (2002), *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **17**, 1213.
10. E. McCurdy and G. Woods, (2004), *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **19**, 607.
11. J. W. Olesik and D. R. Jones, (2006), *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **21**, 141.

离子色谱 (IC) ICP-MS 分析天然水中的铬

应用

环境

作者

Tetsushi Sakai
Agilent Technologies
Musashino Center Building
1-19-18 Naka-cho Musashino-shi
Tokyo 180-0006
Japan

Ed McCurdy
Agilent Technologies
Lakeside, Cheadle Royal Business Park
Stockport
United Kingdom

Steve Wilbur
Agilent Technologies, Inc.
3380 146th PI SE Suite 300
Bellevue, WA 98007
USA

摘要

痕量元素铬的分析在很多不同基体物质分析应用中非常热门。铬在环境中以两种不同的氧化态存在，即三价 Cr(III) 阳离子和六价 Cr(VI) 阴离子。在哺乳动物体中，Cr(III) 在葡萄糖调节过程中是一个基本元素。然而，已证明较低含量水平的六价铬形式具有诱导有机体突变和致癌效应。由于铬元素的这种二元性，总铬浓度并不能提供充分的信息以确定其潜在的毒性。为了评价样品的潜在毒性，不能仅测量其总浓度，必须测量 Cr(VI) 的含量。本工作采用离子色谱和八极杆反应池 ICP-MS 联用技术，建立了一个简单可靠的测定 Cr(III) 和 Cr(VI) 的方法，为样品中有毒铬的含量提供了准确信息。该方法由于样品制备和色谱条件的最优化，可以分析高基体样品，比如硬质饮用水。另外，由于反应池中消除了一些潜在的背景干扰离子，ICP-MS 方法提供了卓越的信噪比，可以准确测量对于毒理学有用的 Cr(VI) 含量，即低于 0.1 µg/L 的浓度。

引言

需要检测铬毒性的样品种类范围很宽，包括饮用水、食品以及临床样品（临床样品主要用于职业暴露评价）。不过，有毒的只是铬的六价形式 Cr(VI)，而三价形式的铬则是人体营养的基本元素。因此，要想确定铬的毒性，必须测量其 Cr(VI)，而不是简单的总铬浓度。

有两个途径可以解决这个问题：首先，如果测量的总铬浓度低于有毒的 Cr(VI) 水平，那么即使所有的铬都是以 Cr(VI) 存在，也有理由得出该样品中铬的浓度不具有毒性。不过，这种方法对于含有高浓度 Cr(III) 的样品来讲，会导致大量的假阳性现象，因此比较准确的方法是分离后测定 Cr(VI) 本身。理想的方法是对两种铬的形态分离和测定，一次分析可以得到总铬和有毒的 Cr(VI) 的含量。

元素的不同形态的分离和检测通常是一个直面的挑战。而铬的形态分析却不寻常。这是因为天然样品，比如水中铬的一般形态是 Cr(VI) 的铬酸盐 (CrO_4^{2-}) 以及 Cr(III) 的铬离子(Cr^{3+})。铬酸盐是一种阴离子，而三价铬离子是阳离子。所以在相同条件下，采用一种离子交换方法是不能对这两种离子都起作用的。还有一个问题是在诸如水这样的样品中，Cr(III) 是最稳定的氧化态，而 Cr(VI) 离子则是强氧化剂，在酸介质或有机物存在时，很容易被还原。因此，在样品采集、储存和制备过程中都必须非常小心，以保证原始样品中铬的形态分配在分析之前保持不变。因此，在样品采集、储存和制备过程中都必须非常小心，以保证原始样品中铬的形态分配在分析之前保持不变。

实验

本文介绍的方法采用一种最优化的样品稳定方法，将样品与 EDTA 放在 40 °C 恒温箱中，EDTA 与 Cr(III) 形成一种络合物，然后用一个简单的色谱法分离 Cr(III)EDTA 络合物和 Cr(VI)。形成 Cr(III)EDTA 络合物的反应取决于保温时间和温度。在 60 °C 1 个小时之内或 40 °C 3 小时条件下，反应完全。在室温条件下，即使放置 7 小时，反应也不会完全。

注意该方法对于天然水样品，需要加入比较高浓度的 EDTA。因为其它一些离子，比如 Ca 和 Mg，通常在硬质饮用水中的浓度为 10's 或 100's mg/L，也会和 Cr(III) 竞争形成 EDTA 的络合物，如 EDTA 量不够，导致 Cr(III) 的回收率随基体偏低。

采用离子色谱 (IC) 分离 Cr 的形态，ICP-MS 测定的联用技术是一种理想的分析方法。用一种简单的、低成本的离子色谱装置就可以分离铬的不同形态。ICP-MS 可以实现相当低浓度的铬形态的测量，提供准确的暴露水平评价浓度，甚至可以测量天然的或背景水平浓度的铬。

ICP-MS 具有卓越的灵敏度，因此是许多元素很好的检测器。碰撞/反应池的引入，消除了基体有关的 ArC 和 ClOH 的干扰，所以 ICP-MS 可以更为准确和灵敏的测定主同位素 ^{52}Cr。铬形态分离所用的样品制备方法，色谱柱类型以及色谱条件列于表1。注意，除了样品用 EDTA 钠盐稳定外，流动项中也要加入 EDTA，在分离期间稳定 Cr(III) 的络合物。另外，必须将溶液调到 pH 7，以利于铬形态的稳定和最优化的色谱分离。

表 1. 铬形态分离的色谱条件

Cr 色谱柱	安捷伦部件号 G3268A, 30 mm × 4.6-mm id
流动相	5 mM EDTA (2Na)，用 NaOH 调至 pH 7
流速	1.2 mL/min
柱温	室温
进样体积	50~500 µL
样品制备	
反应温度	40 °C
保温时间	3 h
EDTA 浓度	5~15 mM，用 NaOH 调至 pH 7

图 1 是本工作所用的离子色谱的结构。注意，采用非金属离子色谱泵（Metrohm 818 IC 泵）传输流动相，用安捷伦 7500ce ICP-MS 的可选集成样品引入系统 (ISIS) 填载和切换样品环。这种结构维持高精密度和较高的 IC 泵压力，比完整的 IC 或 HPLC 系统更为简单且成本低。因为除了 ICP-MS 项系统，只需要配上 IC 泵模块即可。

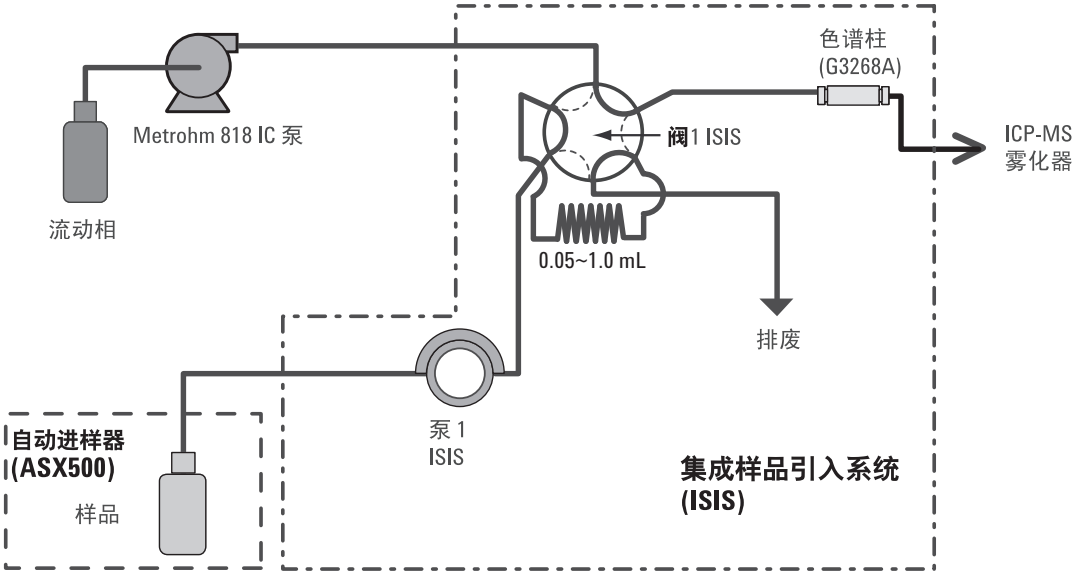


图 1. 铬分离所用的 IC-ICP-MS 结构图

结果和讨论

在上述条件下，用安捷伦 7500ce 的 H_2 池模式去除 ArC 和 ClOH 对 ^{52}Cr 的干扰，铬形态分析的检出限 (DLs) <20 ng/L，见表 2。 许多有关六价铬的国际规范中指定的最大允许浓度是 1 µg/L，要求的检出限是其十分之一(100 ng/L)。本工作即使采用少至 100 µL 的进样体积，也还是很容易满足这些要求的。不过，将进样体积增加到 500 µL，检出限降低到 13.2 ng/L Cr(III)，15.8 ng/L Cr(VI)。

表 2. IC-ICP-MS 分析铬形态的检出限

进样/µL	保留时间/min		峰高/counts		峰面积/counts		检测限(ng/L)*	
	Cr(III)	Cr(VI)	Cr(III)	Cr(VI)	Cr(III)	Cr(VI)	Cr(III)	Cr(VI)
50	0.79	2.09	8548	4261	1082295	914804	69.5	139.4
100	0.79	2.09	13688	7173	1704312	1525147	43.4	82.8
250	0.85	2.21	33967	20830	4939876	4546219	17.5	28.5
500	0.97	2.39	44870	37502	10268086	9398651	13.2	15.8

*检测限按照标准色谱图中 3 倍信噪比来计算

如图 2 所示，对于这些条件下简单的标准溶液，两种铬形态的信噪比都很好。该色谱图给出了浓度为 0.1 µg/L (ppb)，进样体积为 500 µL 的两种铬形态的分离情况。从图中可以看出，在总时间大约 3 分钟时，两种铬形态的峰很容易在背景和分离基线以上被检测。

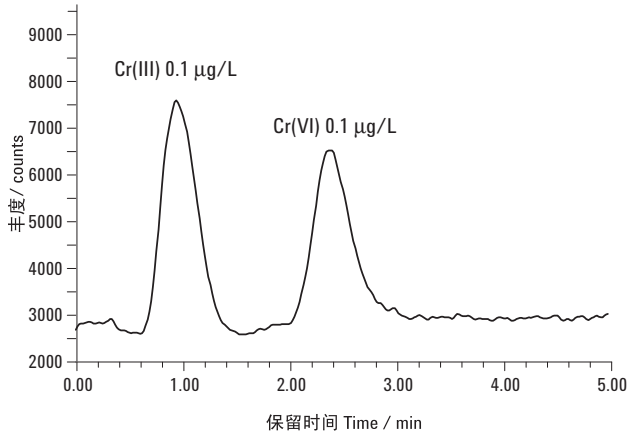


图 2. 浓度为 0.1 µg/L Cr(III) 和 Cr(VI) 的分离和检测

用低浓度的人工合成标准溶液建立了不同铬形态的校准曲线。定量分析基于峰面积测量。Cr(III) 和 Cr(VI) 的校准曲线分别示于图 3 和图 4。两个校准曲线都具有极好的灵敏度和线性。

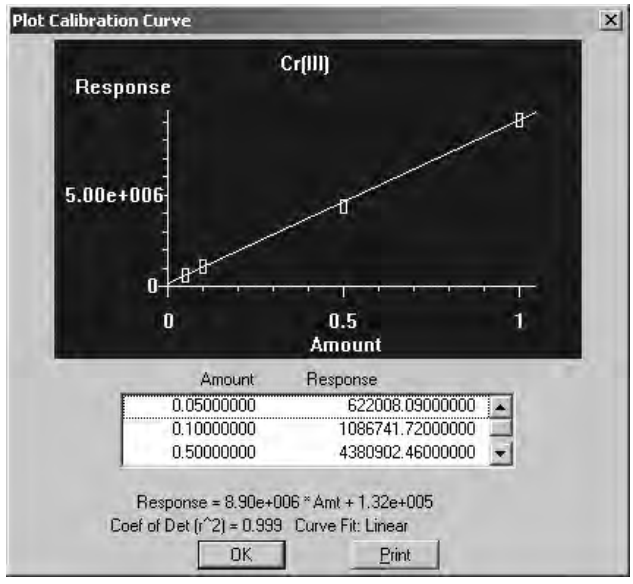


图 3. Cr(III) 浓度为 0.05, 0.1, 0.5 和 1.0 µg/L 的校准曲线

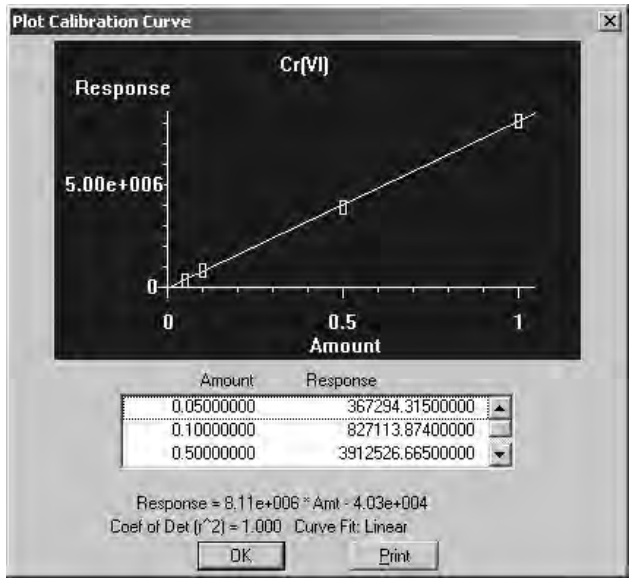


图 4. Cr(VI) 浓度为 0.05, 0.1,0.5 和 1.0 µg/L 的校准曲线

对于适合于常规分析的方法，除了灵敏度外，形态的稳定性、色谱分离以及校准的线性，要求能提供可接受的长期稳定性。在色谱分析中，稳定性受控于两个因素，即保留时间 RT 和峰面积的稳定性。表 3 的数据证明了这些参数的稳定性，说明该方法的稳定性可以被常规分析所接受。

常规分析

对于天然水样品中铬形态的常规分析来讲，更为重要的是在含有高浓度的其它离子的实际样品中能够保持这种极好的灵敏度、稳定性和色谱分离。为了检验方法对真实样品的的适应性，用该方法测定了加标和未加标的矿泉水样品中铬的两种形态。

第一个用于评价的样品是一个有名的法国矿泉水，本研究标示为矿泉水 A。图 5 是对这个矿泉水 A 加标和未加标的两种铬形态的色谱图。水的主要因素成分也示于图的插入表格中。一般饮用水大约含 100 mg/L Ca ； K, Mg 和 Na 等其它元素在 5 mg/L 和 20 mg/L 之间。

表 3. 不同铬形态在 500 µL 进样体积时 RT 和峰面积的稳定性

	RT/min		峰高/counts		峰面积/counts	
次数	Cr(III)-EDTA	Cr(VI)	Cr(III)-EDTA	Cr(VI)	Cr(III)-EDTA	Cr(VI)
1	0.969	2.338	23514	18437	5331427	4621752
2	0.969	2.338	22642	18784	5280683	4758462
3	0.969	2.338	22832	18615	5220349	4742259
4	0.952	2.338	24104	19944	5470760	4800723
5	0.969	2.372	22797	19203	5287094	4726640
6	0.969	2.405	23830	19328	5498172	4760285
7	0.985	2.338	23971	19479	5481984	4824934
8	0.969	2.338	23393	19675	5474510	4883193
9	0.969	2.355	23070	20097	5355106	4892160
10	0.969	2.372	23826	19896	5428247	4886400
平均	0.97	2.38	23398	19346	5382833	4789681
STD	0.008	0.014	534.45	581.88	100413.18	85782.42
RSD%	**0.80**	**0.57**	**2.28**	**3.01**	**1.87**	**1.79**

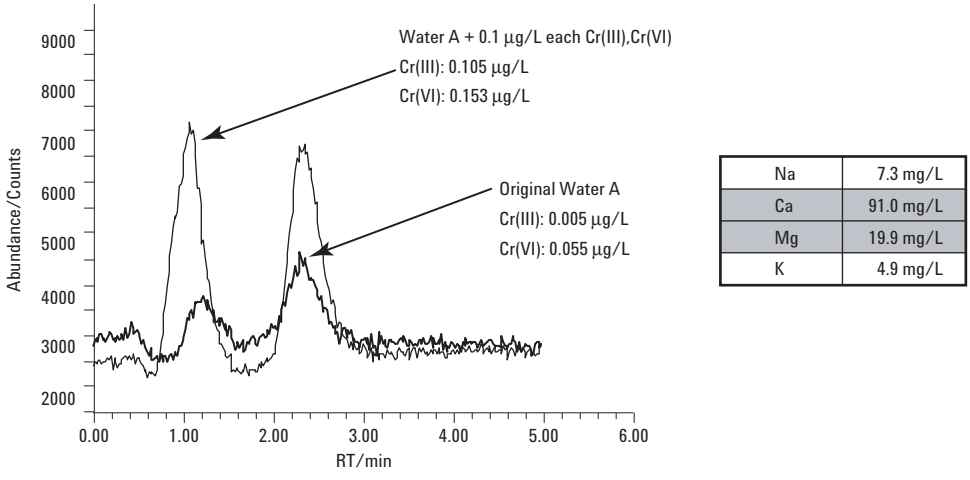


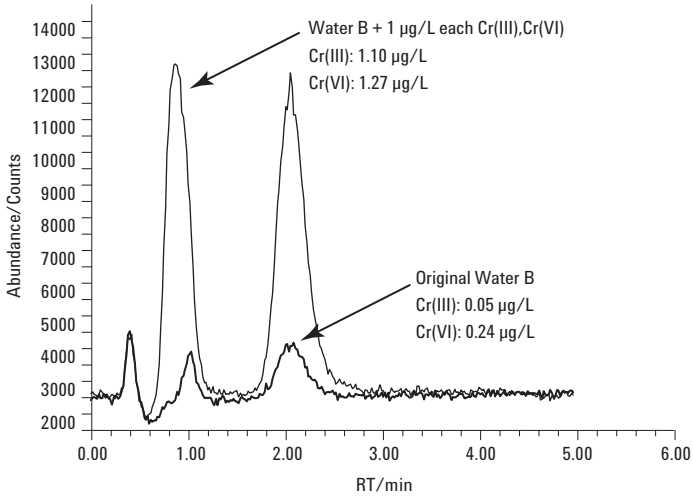
图 5. 矿泉水 A 加标和未加标的主要元素成分和色谱图

矿泉水 A 的加标回收率示于表 4。从表中结果可以看出，铬形态定量分析的浓度很低 (对于 Cr(III) 和 Cr(VI) 分别为 0.005 µg/L 和 0.055 µg/L)，这个样品的低浓度加标回收率很好，两种形态分析的误差小于 5%。

表 4. 矿泉水A Cr(III) 和 Cr(VI) 在 0.1 µg/L 的加标回收率数据

		测定值 (µg/L)		
元素	原始矿泉水 A	加标量	加标测定值	回收率 (%)
Cr(III)	0.005	0.10	0.105	100.0
Cr(VI)	0.055	0.10	0.150	95.0

第二个矿泉水样品也是一个法国矿泉水，标示为矿泉水 B。该矿泉水与一般矿泉水相比，含钙和硫酸盐较高（超过 450 mg/L Ca；大于 1000 mg/L 的硫酸盐）。和矿泉水 A 一样，也进行了加标和未加标实验。分析得到的色谱图示于图 6，加标回收数据列于表 5。



Na	9.1 mg/L
Ca	486.0 mg/L
Mg	84.0 mg/L
K	3.2 mg/L

图 6. 矿泉水 B 加标和未加标的主要元素成分和色谱图

如同矿泉水样品 A，矿泉水 B 的主要元素成分示于色谱图的插入表中，可以看出其中的矿物质含量很高。尽管如此高的主要元素存在，但由于采用了最优化的样品制备和色谱方法，仍然获得了很好的色谱分离和极好的加标回收率结果。在这个样品中，由于铬的基础浓度（未加标）较高，所以采用了较高的加标量。

高基体样品中低浓度铬形态的回收能力证明了样品稳定过程所采用的最优化方法的有效性，即加入了足够浓度的 EDTA 以保证即使存在高含量的其它竞争离子，Cr(III) 也能被完全络合。

此外，两种铬形态在低浓度的准确加标回收率表明，通过对样品稳定化期间以及流动相选择合适的 pH，避免了可能存在的形态之间的转化问题（Cr(VI) 还原为 Cr(III)）。见表 5。

结论

建立了一个天然高基体水样中 Cr(III) 和 Cr(IV) 的最佳稳定化和测定的新方法。检出限在 100-µL 进样体积时为 0.05 µg/L；500-µL 进样体积为 0.015 µg/L。

每个样品可靠稳定分离 Cr(III) 和 Cr(VI) 需要大约 3 分钟的时间。对于含有高浓度竞争离子的样品，比如 >500 mg/L 的矿物元素的矿泉水，也能够获得准确的形态分离和定量分析结果。

采用 Agilent 7500ce 的氢气反应池模式，可以实现国际规则所要求的低浓度铬（0.1 µg/L）的准确无干扰分析。

表 5. 高度矿化水 (B) 中 Cr(III) 和 Cr(VI) 的加标回收率

		测定值 (µg/L)		
元素	**原始矿泉水 B**	**加入量**	**加标回收值**	**回收率(%)**
Cr(III)	0.05	1.0	1.10	105
Cr(VI)	0.24	1.0	1.27	102

毛细管电泳系统 (CE) 及其它应用

新的 Agilent 7100 毛细管电泳系统对于广泛的分析挑战带来了无可匹敌的、与 HPLC 相当的灵敏度。该系统具有业内最佳的分析性能，是业内可配置监测器类型最多的毛细管电泳系统，而且与安捷伦 6000 系列质谱仪完全兼容。享有盛誉的安捷伦可靠性、熟悉的化学工作站软件和同一供货商解决方案，所有这些都使 Agilent 7100 CE 物超所值，成为您实验室下一台（或第一台）CE 或 CE/MS 系统的首选。

毛细管电泳系统 (CE) 及其它应用

5968-8869 液相/离子阱质谱联用仪用于人参皂甙的结构解析 503

5968-5731 毛细管电泳分析有毒食品 509

5988-6355 食品、药品和化妆品的颜色 511

5968-8952 用 CE-ESI-MS 快速筛查食品中的氨基酸 513

5968-5729 CE-MS 分析植物提取物中的黄酮 515

5988-6285 植物激素的快速梯度洗脱分离 517

5968-7715 使用安捷伦碱性阴离子缓冲液同时分析无机阴离子、有机酸、氨基酸和糖类 519

5988-6350 从维生素 D3 和其他脂溶性维生素中分离维生素 D2 527

5988-6363 离子对色谱法快速分离水溶性维生素 529

5988-6364 使用 USP 23 法分离水溶性维生素 530

5988-6365 使用反相色谱分离水溶性维生素 531

5988-5761 快速分析猫粮提取物中的水溶性维生素 532

液相/离子阱质谱联用仪用于人参皂甙的结构解析

液相 / 离子阱质谱

应用

作者

Linda L. Lopez is an applications chemist at Agilent Technologies in Palo Alto, CA.

前言

人参，一种传统的中药，它包含有十几种具有生物活性的皂角苷类化合物，即被称为人参皂甙。这类化合物被认为在防止和治疗许多疾病中起了重要的作用，如动脉粥样硬化，关节炎，哮喘，糖尿病，脑卒中，多种硬化和内毒素肝损伤等[1-3]。人参皂甙是一类发展很快的草药和维生物产品。由于它们具有治疗作用，因此对人健康有其药理作用。约有 150,00000 人对草药与药之间的作用可能产生反效果[4]，因此分离及鉴定这些化合物越来越来引起人们的兴趣。

人参皂甙在结构上，被称为糖甙，是由甙元，主要是三萜类或类固醇类，以及共价键结合的一个或多个糖组成。因为大多数的人参皂甙含有多个不同位置的寡糖，因此结构解析就非常复杂。串联质谱已被用于人参萃取物中的人参皂甙的结构分析[5]。然而，在串联四极杆质谱上得到的质谱 / 质谱太复杂，因此很难解析。这是因为在第一级得到的子离子会进一步同背景气碰撞，产生进一步的断裂，最终无法与第一级得到的子离子图区分开。

在离子阱质谱中 N 级质谱 (MS^n) 可以进行多个离子分离选择和解离，这样就可以保证了每一级的子离子质谱图都只与其母离子有关。这种步进式的解离具有很多优点，可以推断什么母离子产生那样的子离子。

本文叙述了用 N 级质谱 (MS^n) 进行人参萃取物中的人参皂甙的结构分析。

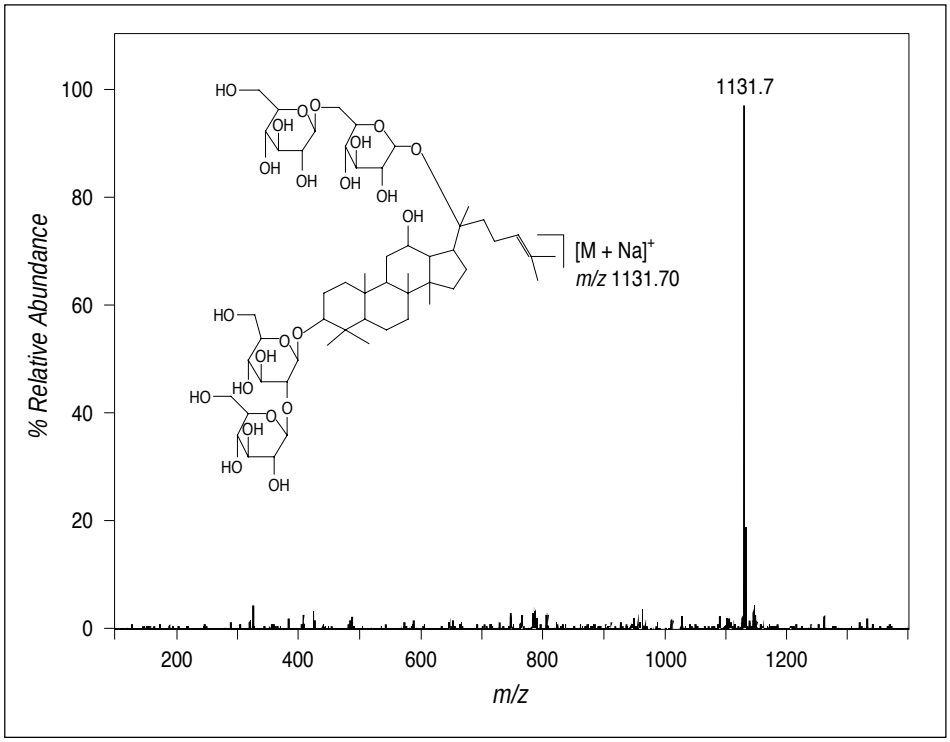
实验条件

所有的实验都是在 1100 液相 / 离子阱质谱 (LC/MSD Trap) 上进行的，其中液相包括二元泵，自动进样器，柱温箱和真空在线脱气机。离子阱质谱采用的是正离子模式的电喷雾电离源 (ESI)。

试剂纯的化学药品和液相色谱级的溶剂，用于标样和流动相。

结果与讨论

图 1a-c 是利用直接进样方式，人参皂甙的全扫描，质谱 / 质谱及三级质谱图。Rb1 的质谱图如图 1a 所示，主峰是其准分子离子峰，[M+Na] +，*m/z* 1131.7，几乎没有碎片离子，质谱条件是电喷雾电离源，干燥气温度为 350℃。但是以前的大气压离子源要得到这样的谱图，需要常温稳度。



分析方法

直接进样方式
流速：5 µl/min

质谱条件

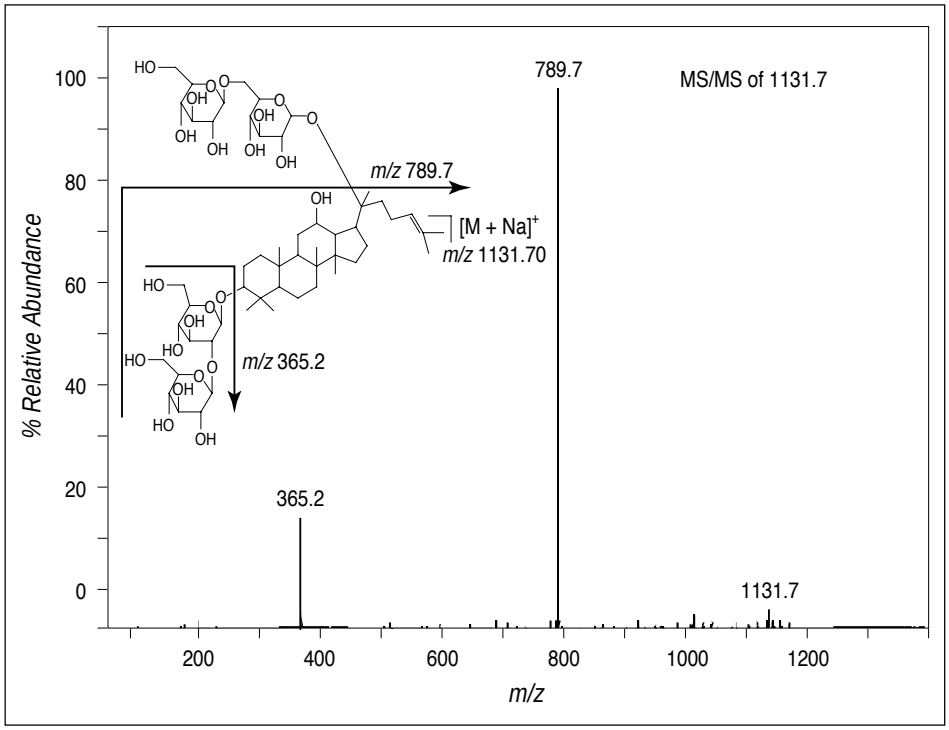
电离源模式：	电喷雾电离源
干燥气：	6 L/min
雾化气压力：	10 psi
干燥气温度：	300 °C
锥型体 1：	25 V
毛细管出口补偿：	50 V
平均：	5
ICC:	on
最大积聚时间：	200 ms
目标：	40000
离子化模式	正离子化

图 1. 人参皂甙 Rb1 标准品的全扫描质谱图

图 1b 是加钠离子的 Rb1 的准分子离子的二级质谱图，*m/z* 789.6 是一个糖苷键断裂产生的子离子。对于 Rb1，有两个同分异构体的寡糖链，任意位置的断裂都会产生 *m/z* 789.6 的碎片离子。图 1c 所示为选择 *m/z* 789.6，然后再作质谱 / 质谱分析，产生两个子离子：(1)一个是减去 -Glc2-Glc 糖链，*m/z* 365.1 的碎片离子；(2)一个是减去脱氧己醣的子离子，*m/z* 626.5。在离子阱中的步进式碰撞解离过程，可以得到更加清晰的结构信息。但是，在这种情况下，无法得到分子中起始的糖苷键断裂位置。

作为参照品，根据人参皂甙 Rb1 特征碎片谱图的解析结果，利用液相 / 离子阱质谱对人参皂甙同类物进行了分析。例如如图 2 所示，为美国洋参的 LC/MS^3 的总离子流图，以及每一个色谱峰的分子离子峰的萃取离子图。图 3a 和 3b 是含有两个不同糖链的人参皂甙 Rb2 的子离子谱图。选择准分子离子 *m/z* 1101.6 进行解离分析，产生 *m/z* 789.7 的子离子 (丢失 -Glc6-Ara，二糖)，将 Rb1 与 Rb2 的子离子谱图进行比较，结果与图 1 的人参皂甙 Rb1 的裂解机理相符合。而且 *m/z* 789.7 是所有被分析人参皂甙的主要碎片离子，这可以为 Rb1 与 Rb2 的裂解模式提供了亚结构模板。

选择子离子为 *m/z* 789.7 母离子，进行 MS/MS 分析，既 MS3 谱图，如图 3b 所示。



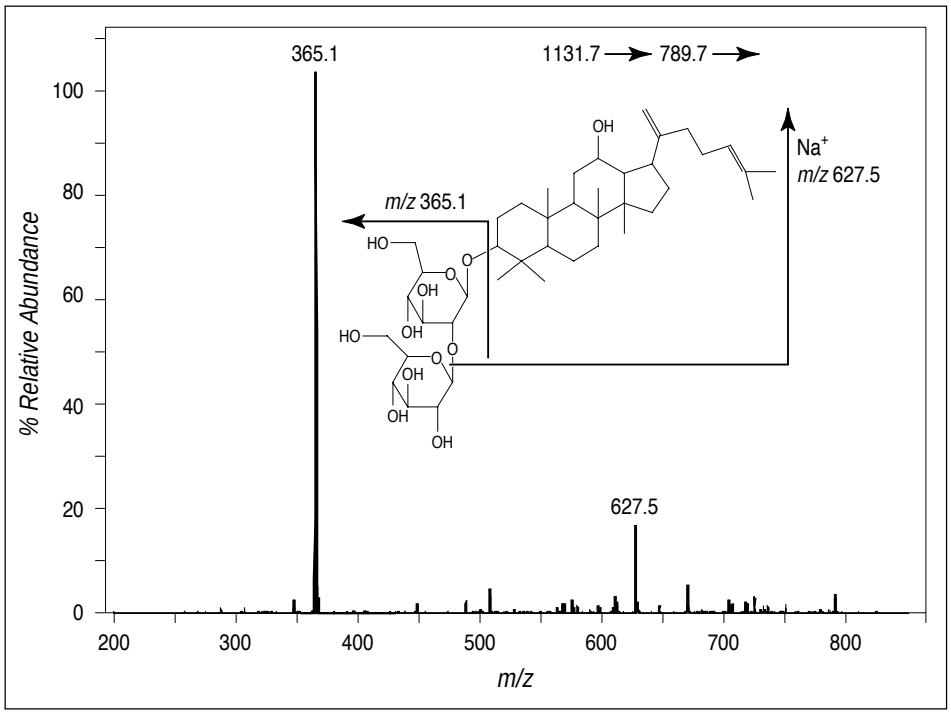
分析方法

直接进样方式
流速：5 µl/min

质谱条件

电离源模式：	电喷雾电离源
干燥气：	6 L/min
雾化气压力：	10 psi
干燥气温度：	300 °C
锥型体 1：	25 V
毛细管出口补偿：	50 V
平均：	5
ICC:	on
最大积聚时间：	200 ms
目标：	40000
离子化模式	正离子化

图 1b. 人参皂甙 Rb1 标准品的准分子离子，*m/z* 1131.7 [M+Na]+ 的质谱 / 质谱图



分析方法

直接进样方式
流速：5 µl/min

质谱条件

电离源模式：	电喷雾电离源
干燥气：	6 L/min
雾化气压力：	10 psi
干燥气温度：	300°C
锥型体 1：	25 V
毛细管出口补偿：	50 V
平均：	5
ICC:	on
最大积聚时间：	200 ms
目标：	40000
离子化模式	正离子化

图 1c. 人参皂甙 Rb1 标准品的准分子离子，*m/z* 1131.7 [M+Na]+ 的三级质谱图(MS3)

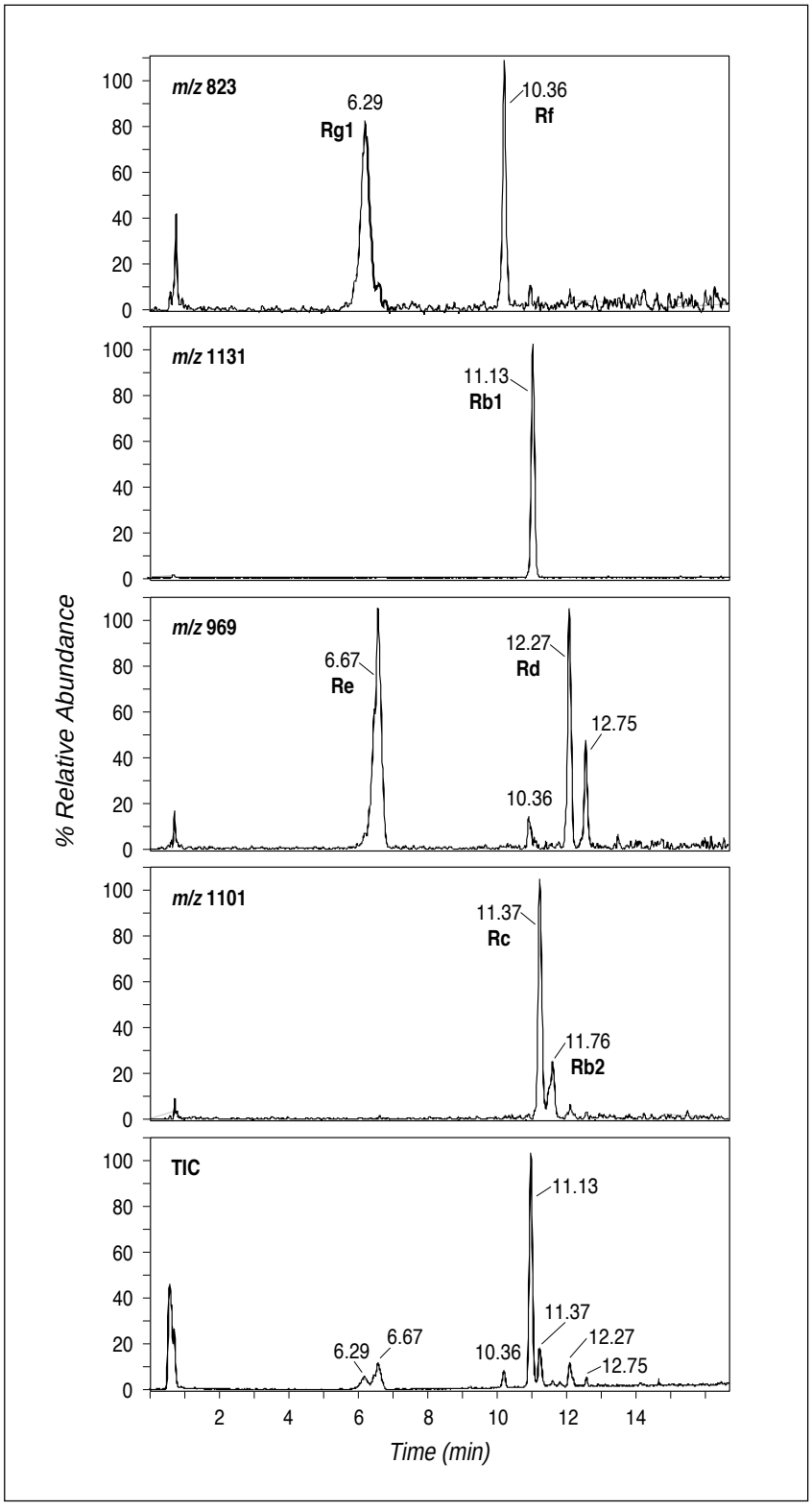


图 2. 人参萃取物的液相 / 多极质谱的总离子流图和分子离子峰的萃取离子流图

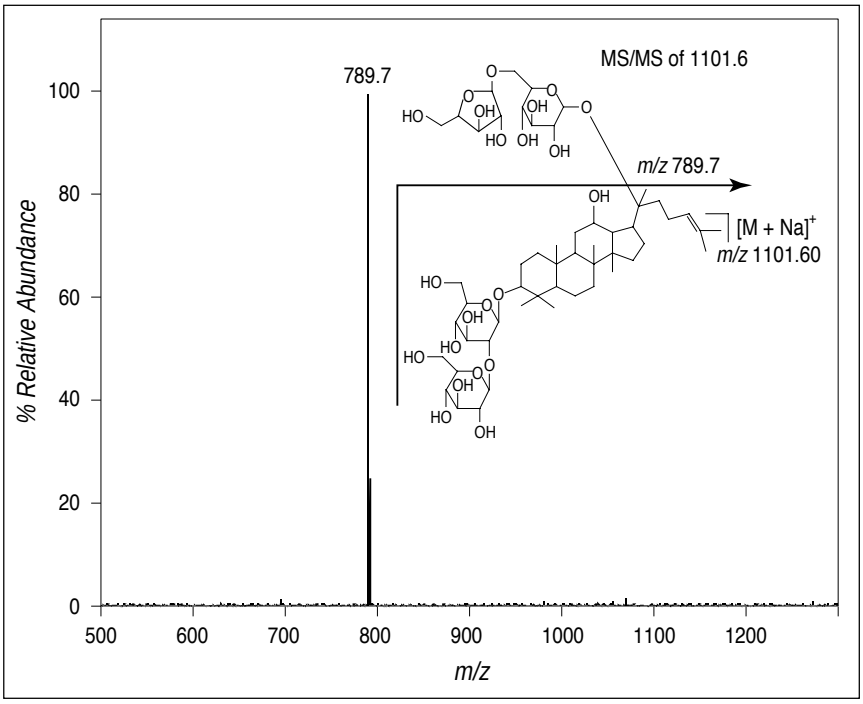


图 3a. 人参皂甙 Rb2 标准品的准分子离子，*m/z* 1101.6 $[M+Na]^+$ 的液相 / 多极质谱图

分析方法

液相 / 质谱 / 质谱

色谱柱:	Zorbax® SB-C18, 50 x2 mm, 3.5 μm (p/n 863954-302)
流速:	0.3 ml/min
进样体积:	10 μl
流动相:	A = 0.01% 醋酸溶液 B = 乙氰
梯度:	梯度 20 % B 1 分钟， 在 1 分钟内至 90 % B， 在 11 分钟内至 90 % B

质谱条件

电离源模式:	电喷雾电离源
干燥气:	7 L/min
雾化气压力:	30 psig
干燥气温度:	300 °C
锥型体 1:	25 V
毛细管出口补偿:	50 V
平均 :	5 V
ICC:	on
最大积聚时间:	200 ms
目标:	40000
离子化模式	正离子化

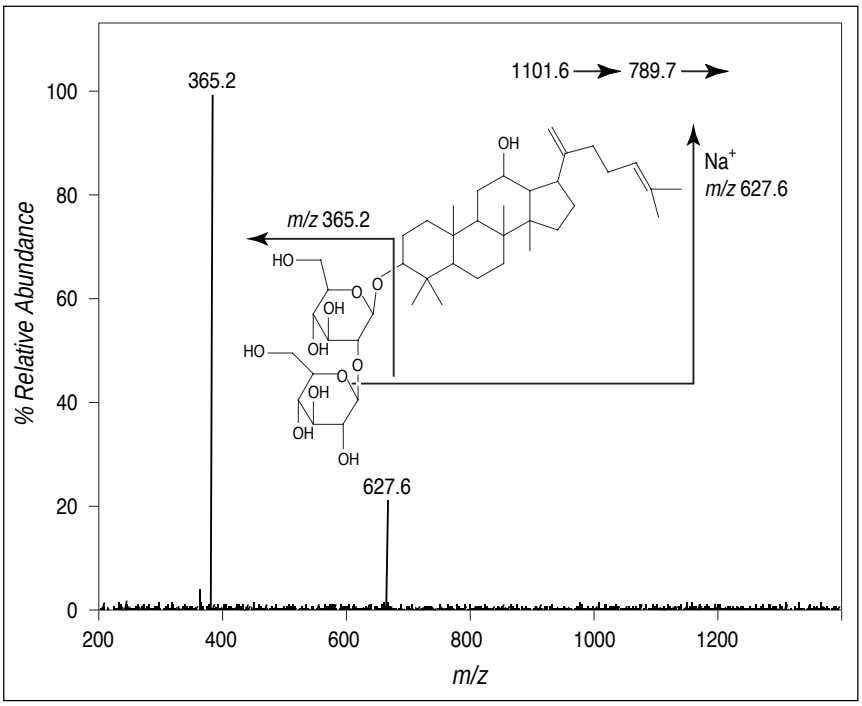


图 3b. 人参皂甙标准品的子离子，*m/z* 789.7 的液相 / 多极质谱图

分析方法

液相 / 质谱 / 质谱

色谱柱:	Zorbax® SB-C18, 50 x 2 mm, 3.5 μm (p/n 863954-302)
流速:	0.3 ml/min
进样体积:	10 μl
流动相:	A = 0.01% 醋酸溶液 B = 乙氰
梯度:	梯度 20 % B 1 分钟， 在 1 分钟内至 90 % B， 在 11 分钟内至 90 % B

质谱条件

电离源模式:	电喷雾电离源
干燥气:	7 L/min
雾化气压力:	30 psi
干燥气温度:	300 °C
锥型体 1:	25 V
毛细管出口补偿:	50 V
平均:	5 V
ICC:	on
最大积聚时间:	200 ms
目标:	40000
离子化模式	正离子化

结论

安捷伦 1100 LC/MSD Trap 离子阱质谱的多极质谱功能 (MSn) 可以选择任一个母离子进行解离分析，产生特征碎片离子。因此是一种极强的化合物结构解息工具。电喷雾电离是一种电离技术，它主要产生准分子离子峰，而无碎片离子。离子阱的质谱 / 质谱功能只产生只来自母离子的特征碎片峰，不会发生像在碰撞池 (CID cell) 内的子离子的再裂解的反应。而多极质谱功能 (MSn) 更可以进行步进式解离分析，得到更多的结构信息。

参考文献

1. Kim Y. C., Kim S. R., Markelonis G. J., Oh T. H., *J. Neurosci. Res.* **53**, 1998, 426–32.
2. Kim H. S., Hong Y. T., Jang C. G., *J. Pharm. Pharmacol.* **50**, 1998, 555–60.
3. Yokozawa T.; Liu Z. W.; Dong E., *Nephron*. **78**, 1998, 201–6.
4. Smolinske S. C., *J. Am. Med. Womens Assoc.* **54**, 1999, 191–2.
5. Wang X., Sakuma, T., Asafu-Adjaye, E., Shiu, G.K., *Anal. Chem*. **71**, 1999, 1579–84.

毛细管电泳分析有毒食品

应用

食品

作者

Tomoyoshi Soga 和 Maria Serwe

摘要

在食物中毒的案件中，需要一种快速而准确地鉴定毒物的分析工具。 这能够是使医务人员尽快采取医治措施，且有助于警察破案。采用毛细管电泳 (CE)-间接 UV 检测可以实现对伪劣食品和饮料中阴离子毒物的快速测定。只需要很少的样品处理过程，就可以在 15 min 内检测到氰化物、亚砷酸盐、砷酸盐、叠氮化物和其它阴离子化合物。

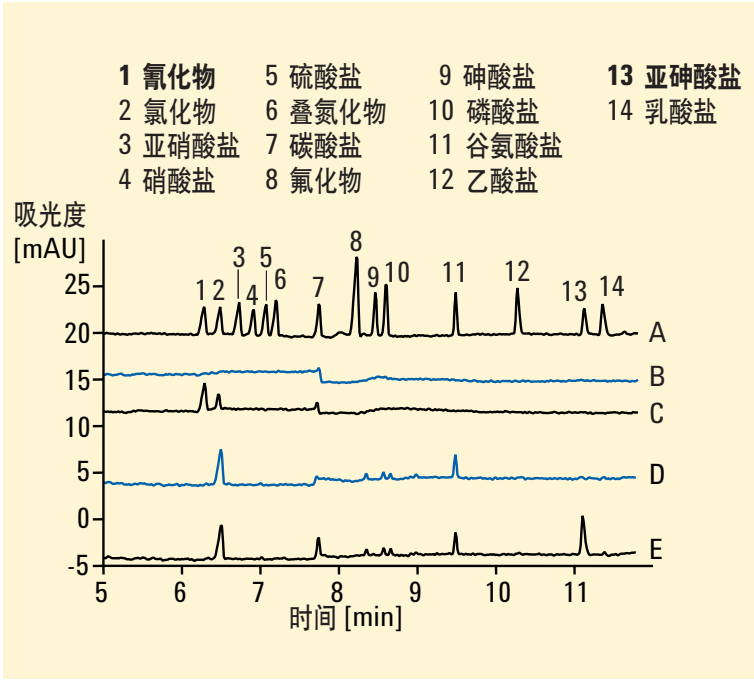


图 1. 食品中氰化物和亚砷酸盐的分析
A = 阴离子标准溶液 (每种含量 50 ppm)，B= 乌龙茶 (用 H_2O 1:100 稀释)，C = 在 B 图样品的基础上加入 100 ppm NaCN，D= 咖哩 (用 H_2O 1:100 稀释，并用 0.22 µm 滤膜过滤)，E= 在 D 图样品的基础上加入 100 ppm $NaAsO_2$

条件

进样：6 s @ 50 mbar
毛细管：熔融石英毛细管
总长度：112.5 cm
有效长度：104 cm
内径：50 µm
缓冲液：安捷伦碱性阴离子缓冲液
电压：-30 kV
温度：30 °C
检测：信号 350/20 nm
参比 275/10 nm

实验部分

阴离子分析采用安捷伦配有二极管阵列检测器的毛细管电泳系统进行，通过安捷伦化学工作站进行计算机控制。该分析基于安捷伦的法医阴离子分析试剂盒 (部件号 5064-8208)。

第一次分析之前，新的毛细管要用运行缓冲液冲洗 15 min (压力为 1 bar)。两次分析之间，要对毛细管从出口 (OutHome) 样品瓶到废液瓶冲洗 2 min，再从进口样品瓶 (InHome) 到废液瓶冲洗 2 min。这一冲洗程序可防止因缓冲液消耗而导致的基线波动。Buffer 使用 2 ml 样品瓶时，10 次分析之后更换冲洗液样品瓶，使用 1 ml 样品瓶时，5 次分析之后就更换缓冲液样品瓶。样品制备只包括用水稀释，或者稀释后再用 0.22 µm 滤膜过滤，如图 1 所示。

结果

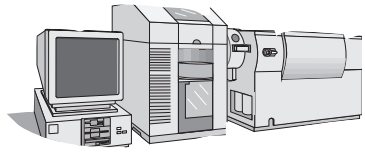
图 1 所示为添加了氰化物和亚砷酸根的食品的分析。根据这些快速分析结果，我们对样品进行了更详细的分析。

该测定在 10-100 ppm 的范围内是线性的，$r^2 > 0.999$。方法检测限是 5-10 ppm。对于咖哩的分析，亚砷酸根的重复性为 (n = 6)：迁移时间的 RSD 为 0.06%、峰面积的 RSD 为 2.7%。对于乌龙茶中氰化物的分析，迁移时间的 RSD 为 0.13% (n = 10)，峰面积为 4% (样品用 0.01 N NaOH 稀释)。

可以测定的其他有毒阴离子是砷酸盐、叠氮化物和硒酸盐 (它的迁移时间在叠氮化物和碳酸盐之间)。与离子色谱 (IC) 相比，CE 用于此类分析的优点是分析时间短，以及对于复杂基质样品（如咖哩）所需的样品制备步骤简单。此外，采用 IC 不可能一次完成对叠氮化物、砷酸盐、氰化物和亚砷酸盐的分析。

仪器

- 安捷伦的毛细管电泳系统
- 安捷伦化学工作站
- 安捷伦法医阴离子分析试剂盒



食品、药品和化妆品的颜色

应用

食品分析

作者

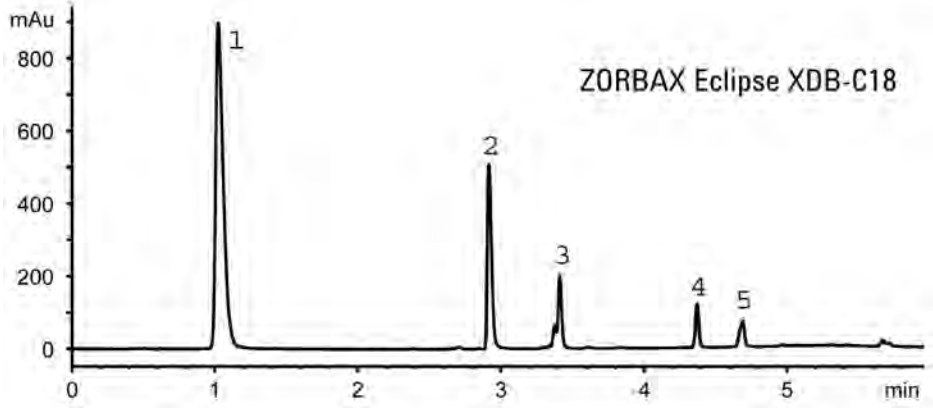
Robert Ricker

食品、药品和化妆品中经常使用色素。本实验分析发现尼泊金丙酯是食品色素混合物中使用的一种防腐剂。食品的绿色着色剂中包含 5 号黄和 1 号蓝。由于化合物的性质差异较大，本实验采用离子对色谱和梯度高效液相色谱方法进行分析。请注意分子式。

操作条件:

液相色谱系统:	Agilent 1100，配有四元泵
色谱柱:	ZORBAX Eclipse XDB-C18 快速分离色谱柱 (3.5 µm), 4.6 x 50 mm 安捷伦部件号：935967-902
流动相:	A: 0.1% 三氟乙酸, 三乙胺调至 pH 4.4，B: 甲醇
梯度:	17% 到 100% B / 4 分钟
检测:	紫外光 254 nm
流速:	1 mL/ min.
温度:	室温

1. 5号黄	$C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$	MW= 534
2. 40号红	$C_{18}H_{14}N_2Na_2O_8S_2$	MW= 496
3. 1号蓝	$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$	MW= 760
4. 尼泊金丙酯	$C_{10}H_{12}O_3$	MW= 180
5. 3号红	$C_{20}H_4I_4Na_2O_5$	MW= 878



要点提示

- ORBAX Eclipse-XDB 色谱柱是专为中等 pH 条件下延长柱子寿命而设计的
- 同时缩短柱长和减小填料大小能够:
  - 缩短分析时间
  - 保持分离度不变
  - 减少溶剂消耗

用 CE-ESI-MS 快速筛查食品中的氨基酸

应用

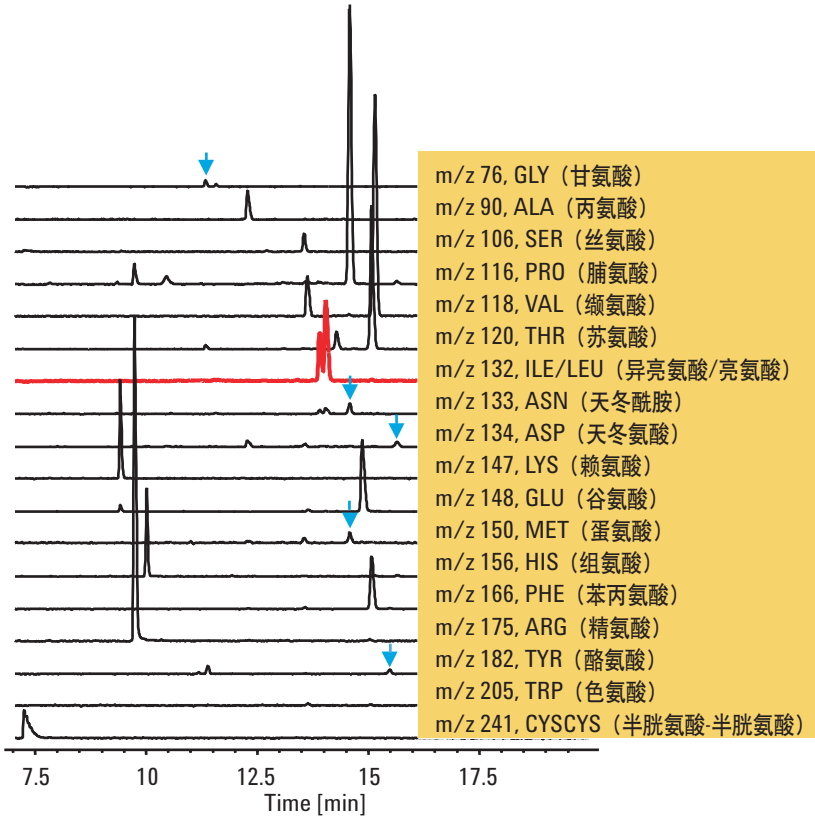
食品工业

作者

Tomoyoshi Soga 和 Maria Serwe

摘要

在食品工业中，要测定氨基酸来预测产品味道趋势、监测发酵过程，并评估最终产品的质量。虽然氨基酸最常用的分析方法是柱前或柱后衍生化的 HPLC，毛细管电泳与电喷雾质谱的联用 (CE-ESI-MS) 非常适合于快速筛查复杂基质中含量在低水平 mg/L 级的游离氨基酸。



条件

样品：酱油，1:100 稀释并经超滤
进样：3 s @ 50 mbar
毛细管：熔融石英毛细管 L= 100 cm, 50 µm 内径
缓冲液：1 M 甲酸
电压：30 kV
温度：20 °C
预处理：用缓冲液在 1 bar 压力下冲洗 4 min
鞘液体：5 mM 乙酸铵，溶剂为 50% 的甲醇水溶液，10 µL/min
雾化气：氮气，10 psi
干燥气：氮气，10 L/min, 300 ° C
数据采集：正模式，毛细管电压 -4 kV, 碎裂器电压 70 V
扫描范围：50 – 350 m/z

图 1. 酱油中氨基酸的分析 (选择离子图)

实验部分

CE-ESI-MS 分析采用安捷伦毛细管电泳仪系统配以 CE-MS 毛细管卡盒，连接到配以电喷雾离子源和用于 CE-MS 的正交雾化器的安捷伦 1100 LC/MSD。安捷伦的化学工作站软件用于仪器控制。方法参数见图 1。新的毛细管用运行缓冲液冲洗 20 min。

包含 17 种氨基酸的标样 (2.5 mmol/L 的 0.1 N HCl 溶液，半胱氨酸为 1.25 mmol/L，不含甘氨酸) 购自美国 Pierce 公司。天冬氨酸和色氨酸购自日本 Wako 公司（日本，大阪），用 0.1 N NaOH 配制，浓度为 2.5 mmol/L。氨基酸标样混合后用去离子水稀释到最终浓度 250 µmol/L (半胱氨酸为 125 µmol/L)。

样品制备简单，包括用去离子水稀释，然后用截止分子量为 30 kDa 的过滤器过滤以除去多肽和蛋白质。

结果

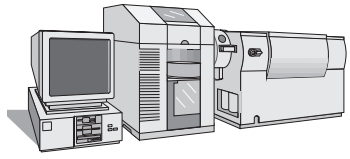
建立了采用 CE-ESI-MS 快速分析氨基酸的优化方法。使用 pH 值低于被分析物等电点 (< 2.77) 的电解质能够以正的分子离子形式同时测定碱性和酸性氨基酸。在本研究中未观察到半胱氨酸的离子 m/z 122。但是，m/z 241 离子代表半胱氨酸-半胱氨酸，提示其由于暴露于空气而导致了氧化。

当分析含有 19 种氨基酸的标样时，在 10 – 500 µmol/L 范围内是线性的。碱性氨基酸的检测限为 0.3 - 1.1 µmol/L，酸性氨基酸的检测限为 6 – 11 µmol/L。迁移时间的重现性 < 1.2 % RSD (n = 8)，峰面积的 RSD 为 2.0 – 4.7 % (Met 除外，它由于被氧化而使峰面积减小)。

食品中氨基酸的分析很重要。监测氨基酸有助于跟踪发酵代谢产物，可用于预测产品味道趋势。图 1 是 CE-ESI-MS 分析酱油的结果。除了氨基酸外，酱油还含有大量含氨基的有机化合物。使用衍生化方法会导致非常复杂的分离。本文不用衍生化，可以得到很清晰的提取离子图，能在 13 min 内检测出氨基酸。迁移时间的重现性 RSD < 0.4 % (n = 5)。峰面积的重现性为 RSD1.1–6.0 %，蛋氨酸除外。该方法已经用于啤酒和米酒中氨基酸的分析。

仪器

- 安捷伦毛细管电泳系统
- 安捷伦的 CE-MS 连接装置工具包
- 安捷伦 1100 系列 LC/MSD 模组，配有 API 电喷雾离子源
- 安捷伦 CE-ESI-MS 雾化器套件
- 安捷伦化学工作站和 CE-MS 加载软件



参考文献

1. Soga, T., Heiger, D., J. Anal. Chem.2000, 72, 1236-1241.

CE-MS 分析植物提取物中的黄酮

食品

作者

Martin Greiner 和 Gordon Ross

摘要

复杂的植物提取物常常需要非常有效的分离技术才能实现明确的化合物鉴定。MS 检测能够特异鉴定这种复杂的、难以分析的样品基质中的分析物。本文通过对桔子提取物中黄酮的分析，来说明电喷雾质谱 (ESI-MS) 的专属性和灵敏度，它与毛细管电泳分离联用可以为之增加一维新的技术。

橙皮苷是一种葡糖苷黄酮，存在于绿色桔皮中，而柚皮苷是一种鼠李葡糖苷黄烷酮，是桔皮中一种苦味成分。如果控制不好，在桔汁生产过程中作用在桔子上的高压榨力会使之产生高含量的这种黄酮，这会使桔汁带有苦味。监测桔汁生产过程中的这些指标为监测产品质量提供了一种方法。

CE 为样品的快速和有效的分离提供了一种技术选择，而且它还能够在离心和过滤桔汁的过程中减少样品制备步骤。

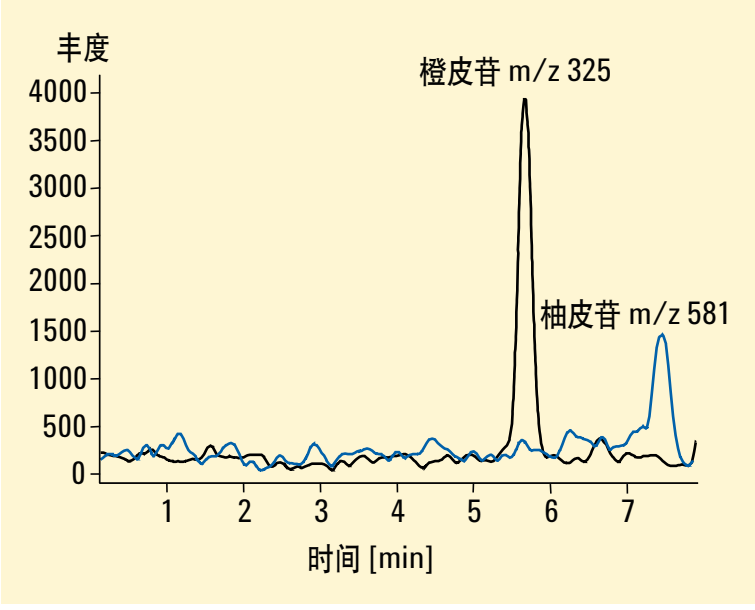


图 1. 橙皮素和柚皮苷的分析

条件

样品: 添加标准品的桔汁
进样: 3s @ 50 mbar
毛细管: 75 cm (22 cm UV) x 50 µm 内径
缓冲液: 5 mM 硼酸盐缓冲液 pH 9.3
电压: 30 kV
温度: 25 °C
鞘液体: 4 µl/min, 50 % MeOH/H_20, 1 % 甲酸
雾化气: 20 psi
干燥气: 6.0 l/min
采集: 正离子模式
SIM: 325 m/z，581 m/z

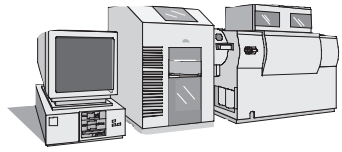
实验部分

所有的实验是在安捷伦的毛细管电泳系统上进行的，配置有 DAD 检测器，并由安捷伦的 CE 化学工作站软件控制。用于 CE-MS 的安捷伦毛细管是 50 µm 内径，总长度 75 cm。这种毛细管的 UV 检测窗口在 22 cm 处。缓冲液为 50 mM 的硼砂，pH 9.3，用安捷伦的 CE 级水稀释 10 倍 (均为安捷伦科技产品，产地为德国的 Waldbronn)。鞘液体 (4 µl/min) 用安捷伦的 1100 等度 HPLC 泵输送，流速 400 µl/min，采用安捷伦的分流装置，分流比 1:100。鞘液体是 1 % 甲酸的 50% 甲醇溶液，用于正离子模式检测。

图 1 所示为橙皮素 (一种橙皮苷的糖苷)，其质荷比为 m/z 325 (Na 加合物的质量)。在此条件下柚皮苷是一个质子化的加合物，质荷比为 m/z 581。CE-MS 除了能进行化合物的定性鉴定外，还可以提供定量信息。图 2 所示的校准曲线来自稀释的柚皮苷标样，浓度范围为 200 到 2 µg/ml。这里所用的最低浓度仍然给出了高于 5:1 的信噪比。图 3 为 2 µg/ml 柚皮苷的质谱图。

仪器

- 安捷伦毛细管电泳系统
- 安捷伦 CE-MS 套件工具包
- 安捷伦 1100 系列 LC/MSD 模块，配 API 电喷雾离子源
- 安捷伦 CE-ESI-MS 喷雾器套件
- 安捷伦化学工作站 +CE-MS 加载软件



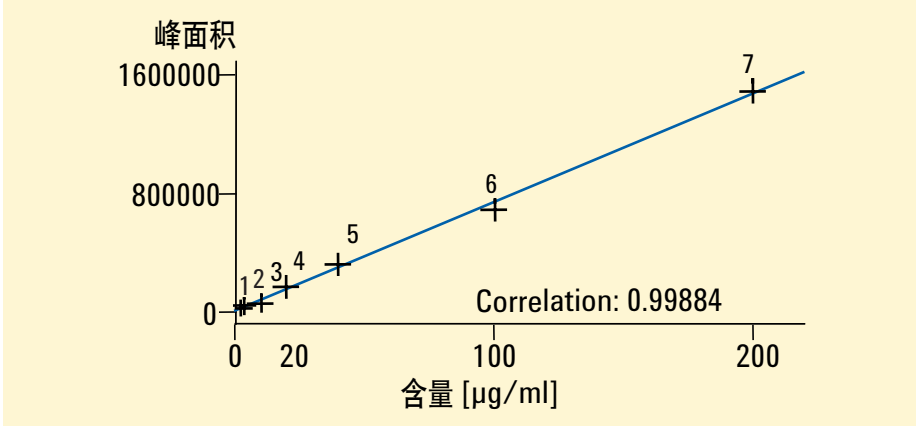


图 2. 采用 MS 检测的柚皮苷的线性

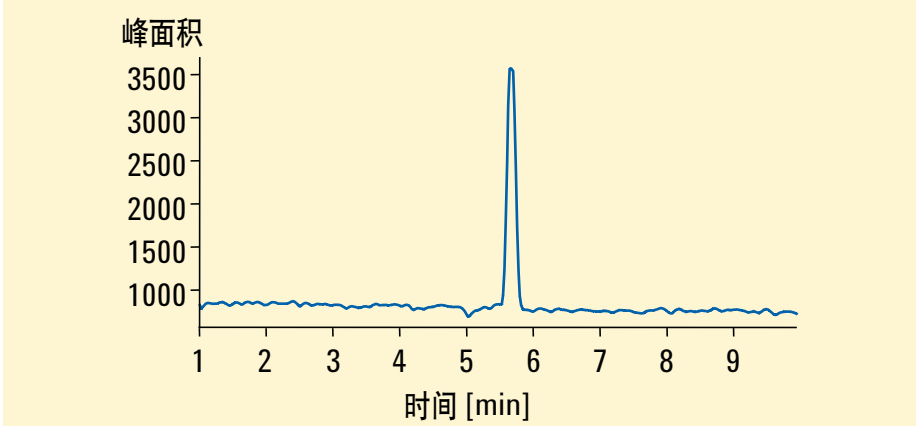


图 3. 2 µg/ml 柚皮苷的分析

植物激素的快速梯度洗脱分离

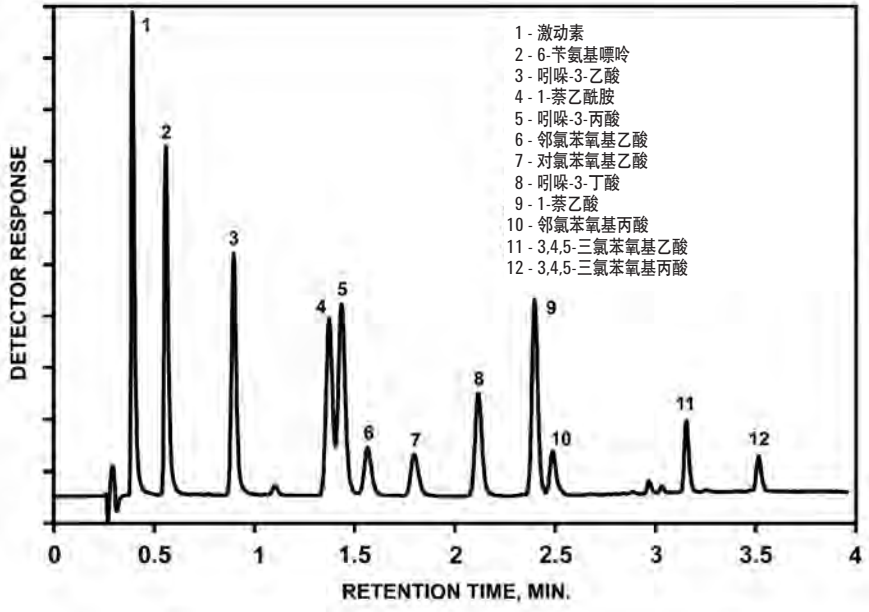
应用

农业化学

作者

Robert D. Ricker

在植物物种的生长和发育的过程中，植物激素起着重要的作用。用 HPLC 对这类化合物进行的快速分析，可应用于植物的代谢和疾病机制的常规研究。HPLC 还可用于植物控制研究，无论是为了获得较大较强壮的植物而进行的生长刺激，还是用植物农药（除草剂）使植物停止生长。由于这类化合物分子的类别和分子结构多种多样，应用梯度洗脱更为合适，可以缩短运行时间并增加通量。



色谱条件：液相色谱仪：Hewlett Packard 1050
色谱柱：ZORBAX SB-C8, 4.6 x 75 mm (Agilent 部件号 866953-906)
流动相：
溶剂 A：0.1% TFA 水溶液
溶剂 B：含 0.1% TFA 的乙腈
梯度：1.5 min 内溶剂 B 的比例由 22% 升至 50%
UV：254 nm; 流速：3.0 mL/min ； 60 °C

要点提示

- 立体保护键合相使柱寿命更长，在低 pH 值条件下峰形良好 (0.1% TFA)
- 使用高柱温 (60 °C) 和短柱 (75 mm)，允许在较高的流速下 (如 3.0 mL/min) 以适当的反压运行
- Agilent ZORBAX 3.5 µm 填料用于色谱柱填充，可以在分离速度和分离度之间达到极好的平衡

使用安捷伦碱性阴离子缓冲液同时分析无机阴离子、有机酸、氨基酸和糖类

应用

食品

作者

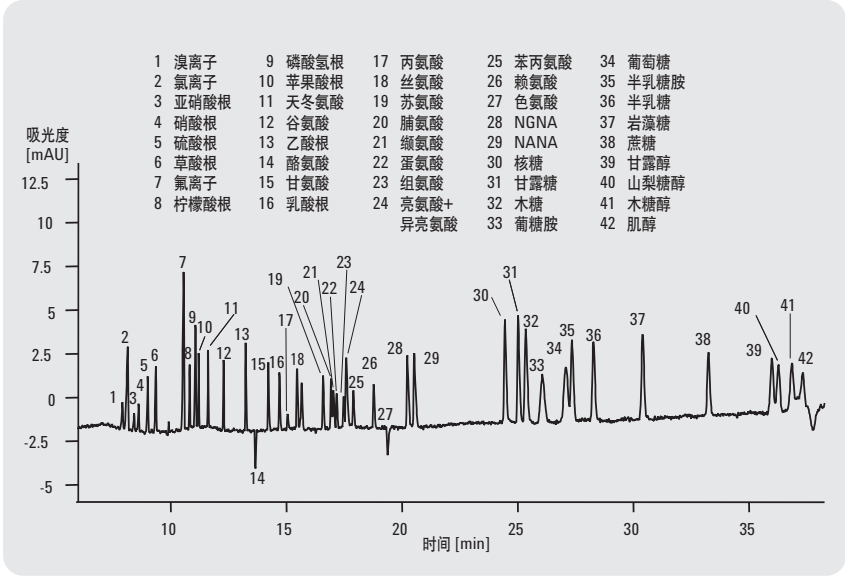
Tomoyoshi Soga

前言

本应用文摘介绍安捷伦碱性阴离子缓冲液的扩展应用。它使许多阴离子的分析更为容易，包括无机阴离子、有机酸、氨基酸和糖类。这里所介绍的方法可用于筛查分析食品和饮料中的阴离子。

要同时分离这些阴离子，采用了强碱性 pH 条件，不仅使无机和有机阴离子，而且使氨基酸和糖类带上负电荷，促使它们向阳极迁移。通过在电解质中加入季铵盐使电渗流 (EOF) 的方向反转，即指向阳极。这是使阴离子和电渗流在同一个方向（指向阳极）迁移并保证阴离子通过检测器所必需的。

在该方法中，采用了间接 UV 检测，以便能检测到几乎没有生色团的阴离子。安捷伦的碱性阴离子缓冲液是预先配制好的，pH 已经调节好，所以，无需任何进一步的配制工作。本文提供了详细的方法参数和某些典型的电泳图。



必要的备件

下面的部件是同时分析阴离子所必需的：

部件	数量	部件号
安捷伦碱性阴离子缓冲液*	50 ml	5064-8209
产品资料	1	5968-7715E

* 只有 50-µm 内径的直毛细管可用此缓冲液

当使用安捷伦的 CE 系统时，下面的安捷伦部件应分开订购：

部件	数量	部件号
熔融石英毛细管 (内径 = 50 µm, l=104 cm L=112.5 cm)	1/包	G1600-64211
CE 缓冲液瓶 2 ml (玻璃*)	100/包	5182-9697
CE 样品瓶，(聚丙烯) 100 µl	1000/包	9301-0978
CE 瓶盖 (聚氨酯)	100/包	5181-1512
CE 级水	500 ml	5062-8578

* 建议使用玻璃瓶而不是聚丙烯瓶

实验过程

缓冲液配制

碱性阴离子缓冲液是预配制的，购来即可用。

不要让溶液瓶敞开，因为该缓冲液是强碱性的溶液，将很容易吸收大气中的气态碳酸。这将导致其 pH 值立刻降低。使用后确保盖好瓶盖。

不要保留只有或不满三分之一容量的敞开溶液瓶。这样的溶液应当弃去，因为瓶中溶液可以吸收气态碳酸，造成残留缓冲液的 pH 下降。

该缓冲液应该在室温储存 (不要低于 20 °C，因为在低温下某些缓冲液组分可能会结晶)。

缓冲液和废液瓶

准备 3 个样品瓶 (一个用于冲洗，两个用于分析)。当使用 2 ml 玻璃瓶 (部件号 5182-9697) 时，每个瓶子装 1.4 ml 缓冲液。再准备一个废液瓶 (装 300 ml CE 级水或去离子水）。

由于用于间接 UV 检测的缓冲液缓冲容量有限，当使用 2 ml 的玻璃瓶 (部件号 5182-9697) 时，每运行 8 次就应该更换缓冲液。

由于本应用未使用更新系统更新缓冲液，缓冲液瓶加压会使溶解的碳酸根浓度增加，导致 pH 下降。还有，缓冲液的结晶可能堵塞管路。

标准溶液制备

无机和有机阴离子应该以其钠盐或游离酸形式分别保存制备。因为糖不稳定，它们应当在使用前制备。

对于氨基酸，络氨酸、半胱氨酸-半胱氨酸、天冬氨酸、色氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和苯丙氨酸的储备液应当以 0.1 M NaOH 溶液中制备，浓度为 10 g/l。其它氨基酸应当以 0.01 M HCl 溶液中制备。标准工作混合物溶液应当用去离子水稀释储备液配制。

如果使用市售氨基酸标准混合物的 0.1 M HCl 溶液，Arg 可能检测不到，原因是其 pKa 值为 10.76。Arg 在 0.1 M HCl 溶液中带正电，其迁移方向与检测器的方向相反。在此情况下，标准溶液应该用 0.01 M NaOH 来稀释。

为了得到好的峰形和灵敏度，标准混合物的浓度应当在 50 到 1000 mg/l 之间。

样品制备

对于实际样品，为了减少样品的电导率，需要用去离子水稀释，比如酱油要 1:50 稀释。

如果样品含有蛋白质，迁移时间会逐次增加，建议用截止分子量为 30 kDa 的滤膜离心过滤以除去蛋白质。

毛细管

只有 50 µm 内径的直毛细管适合于本方法。如果使用 75 µm 内径的毛细管，由于缓冲液有高的 UV 吸收，会显著增加基线噪声。泡状池毛细管和高灵敏度检测池都不适合于本方法。建议使用 50 µm 内径的毛细管 (L=112.5 cm, l=104 cm)。

毛细管老化处理

避免使用氢氧化钠处理毛细管，因为这会降低本方法的性能。

第一次使用前，新的毛细管应当只用运行缓冲液冲洗 15 min。

两次分析之间，建议用冲洗瓶中的缓冲液冲洗毛细管 4 min。

毛细管保存

如果毛细管从仪器上取下不用，应当用去离子水冲洗 10 min，再用空气冲洗 10 min。当重新安装毛细管时，需要用运行缓冲液冲洗至少 15 min。

方法总结

下面的方法可以用于同时分离大部分无机阴离子、有机酸、氨基酸和糖类。下面是一般分析条件。下面列出了输入到安捷伦化学工作站的方法参数。

毛细管	熔融石英 内径 = 50 µm, l=104 cm, L=112.5 cm (G1600-64211)
进样	1. 压力：50 mbar 进样 6 s，用于样品瓶
	2. 缓冲液进样后，用入口（InHome）瓶, 50 mba 进样 4 s
电源电压：	- 30 kV
毛细管温度	15 °C
检测波长	信号 350/20 nm，参比 230/10 nm
预处理	每次运行前用缓冲液冲洗 4 min，压力 1 bar

方法编程

HPCE 模式: CE

分析起始值:

毛细管到瓶底距离	4	
卡盒温度	15.00 °C	
进样瓶	10	*在 10 和 11 位置放置缓冲液瓶*
出口瓶	11	*瓶子的位置仅是示例*

缓冲液更新和预处理:

序列处理

缓冲液更新输入:

不用更新	*不使用更新。溶解的碳酸浓度可能增加，因为缓冲液瓶加压会导致 pH 下降*

预处理输入:

功能参数

1 冲洗 4.00 min, I: 9, O:1	*将冲洗瓶置于位置 9，废液瓶置于 1。要求检查废液瓶中液体体积以防止溢出*

预处理输入:

不用预处理

进样表输入:

功能参数

1 加压 50.0 mbar, 6.0 sec, I: InjectVial（进样瓶），O:OutHomeVial（出口瓶）	*根据样品的浓度可能增加或减少*
2 加压 50.0 mbar, 4.0 sec, I: InjectVial（进样瓶），O:OutHomeVial（出口瓶）	*进样后再注入缓冲液有助于最大程度地减少施加电压时的样品损失。采用电压梯度也是为了同一目的*

电路:

电路	开	
电极	负	*由于 EOF 反向，故要用负极性*
电压	30.0 kV	
电流	150.0 mA	*电流限度不是必需的，但也可用于防止在使用错误的瓶子时产生过大的电流*
功率		系统最大值
低电流限		2 µA

储存数据:

收集电压数据 是	
收集电流数据 是	*建议每次分析都要储存电流数据。 本方法的电流显示为 -30 到 -40 µA*
收集功率数据	否
收集压力数据	否
收集温度数据	是

时间输入:

停止时间	40.00 min
	当运行实际样品时根据需要调节
运行后时间	关
时间表是空的	

二极管阵列检测器

设置:

停止时间	与 HPCE 相同: 40.00 min
运行后时间	关
响应时间 1.3 s	*建议使用该设置可减少基线噪声*
峰宽 >	0.1 min
运行前自动平衡	开
运行后自动平衡	关

质谱图:

储存	不

信号:

储存	参比
信号，带宽	参比，带宽 [nm]
A: 是 350/20	230/10

结果与讨论

同时分析无机阴离子、有机酸、氨基酸和糖类

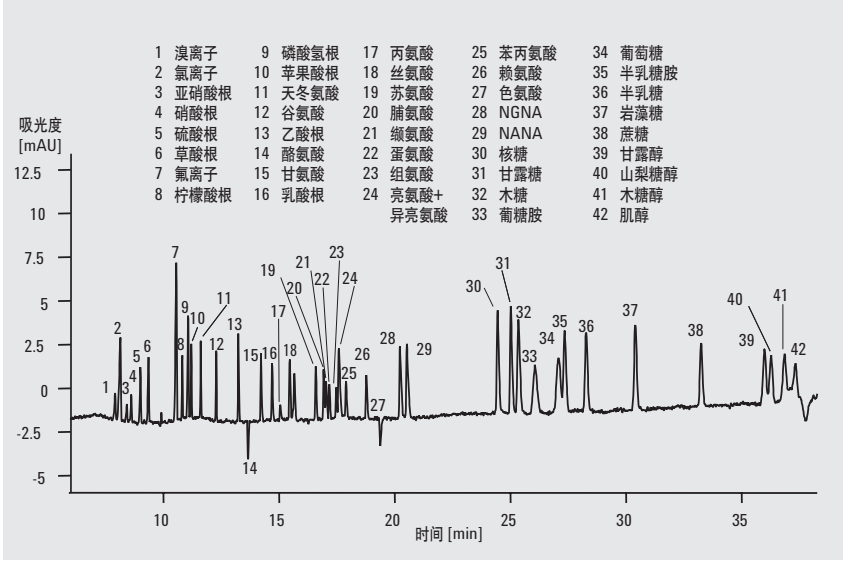
图 1 所示为使用标准方法分析 43 种组分的阴离子样品的典型电泳图，样品包括 7 种无机阴离子、5 种有机酸、16 种氨基酸和 15 种糖。如果您的分析结果与此不同，请参考本文的故障排除部分。

用此方法可以分离大部分无机阴离子和糖。然而，几种有机酸如酒石酸根、琥珀酸根、苹果酸根和 α-酮戊二酸根的迁移时间很接近。 通过使用安捷伦科技公司的有机酸分析试剂盒 (部件号 5063-6510) 可以改善这一分离。

就氨基酸而言，亮氨酸和异亮氨酸不能分离。虽然图1 中没有检测到天冬氨酸，但如果样品溶于碱性溶液，就可以在约 35 min 检测到它。由于络氨酸和色氨酸在 320 nm 有 UV 吸收，故它们以负峰出现。 丝氨酸刚好在系统峰之前出峰。

20 °C 时的电泳淌度

使用此方法测定了 82 种化合物在 20 °C 的有效淌度，包括 9 种无机阴离子、23 种有机酸、18 种氨基酸和 32 种糖，数据列于表 1。如果感兴趣的化合物的淌度值相互接近，则它们难以分离。在此情况下，建议研究通过改变温度或 pH 来优化分离。



缓冲液	安捷伦碱性阴离子缓冲液 (部件号 5064-8209)
样品	氯离子 110 mg/l，糖类各 200 mg/l，其他种类各 50 mg/l
毛细管	熔融石英，l=104 cm, L=112.5 cm, 内径= 50 µm
进样	300·mbar·s
温度	15 °C
电压	-30 kV
检测	信号 350/20 nm，参比 230/10 nm

图 1. 43 组分阴离子标准混合物的分析

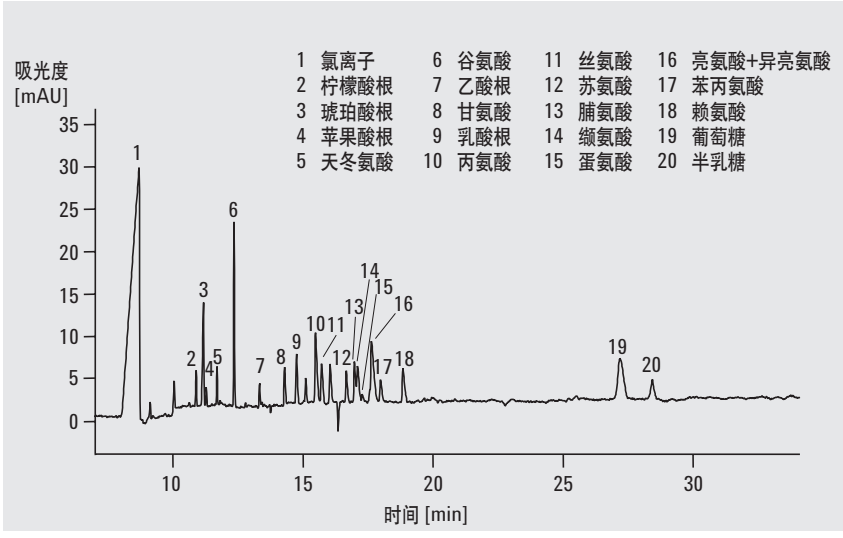
表 1. 阴离子在 20 °C 时的电泳淌度

化合物	淌度 ($x10^{-4}$ cm^2/vs)	化合物	淌度 ($x10^{-4}$ cm^2/vs)	化合物	淌度 ($x10^{-4}$ cm^2/vs)	化合物	淌度 ($x10^{-4}$ cm^2/vs)
溴离子	-7.181	乙酸根	-3.589	正己酸根	-2.385	葡糖胺	-0.846
氯离子	-6.983	丙酮酸根	-3.540	半乳糖醛酸根	-2.337	甘露糖胺	-0.832
亚硝酸根	-6.648	半胱氨酸-半胱氨酸	-3.514	组氨酸	-2.310	乳糖	-0.774
硝酸根	-6.442	乙二醇酸根	-3.495	亮氨酸	-2.300	阿拉伯糖	-0.764
硫酸根	-6.140	络氨酸	-3.493	异亮氨酸	-2.300	葡萄糖	-0.761
草酸根	-5.784	甘氨酸	-3.260	苯丙氨酸	-2.220	麦芽糖	-0.731
抗坏血酸根	-5.409	正丙酸根	-3.111	正庚酸根	-2.149	半乳糖胺	-0.725
丙二酸根	-5.093	乳酸根	-3.041	葡糖酸根	-2.060	乳果糖	-0.676
氟离子	-4.990	硼酸根	-2.963	赖氨酸	-2.026	半乳糖	-0.659
甲酸根	-4.911	丙氨酸	-2.858	色氨酸	-1.910	岩藻糖	-0.485
柠檬酸根	-4.775	色氨酸	-2.795	NGNA	-1.719	蔗糖	-0.291
焦磷酸根	-4.760	正丁酸根	-2.781	正辛酸根	-1.707	棉籽糖	-0.284
磷酸根	-4.677	3-乙酰丙酸根	-2.729	NANA	-1.675	甘露醇	-0.134
酒石酸根	-4.584	甘露糖醛酸根	-2.674	ManMac	-1.221	海藻糖	-0.121
琥珀酸根	-4.565	焦谷氨酸根	-2.631	核糖	-1.037	山梨糖醇	-0.118
苹果酸根	-4.520	正戊酸根	-2.578	果糖	-0.983	半乳糖醇	-0.104
a-酮戊二酸根	-4.513	苏氨酸	-2.542	N-乙酰葡糖胺	-0.975	木糖醇	-0.086
天冬氨酸	-4.418	葡糖醛酸根	-2.497	甘露糖	-0.966	赤藓糖醇	-0.076
戊二酸根	-4.196	脯氨酸	-2.450	木糖	-0.935	肌醇	-0.064
谷氨酸	-4.084	缬氨酸	-2.444	N-乙酰半乳糖胺	-0.919		
己二酸根	-3.934	蛋氨酸	-2.389	鼠李糖	-0.904		

应用

酱油分析

图 2 所示为酱油的分析。样品用 CE 级水 1:50 稀释。用截止分子量为 30 kDa 的滤膜过滤以除去蛋白质和多肽。得到了非常清晰的电泳图，没有来自其他基质化合物的干扰。所有化合物的重现性都令人满意，迁移时间的 RSD (n=5) 优于 0.3%，峰面积的 RSD 在 0.6% 到 5.4% 之间。



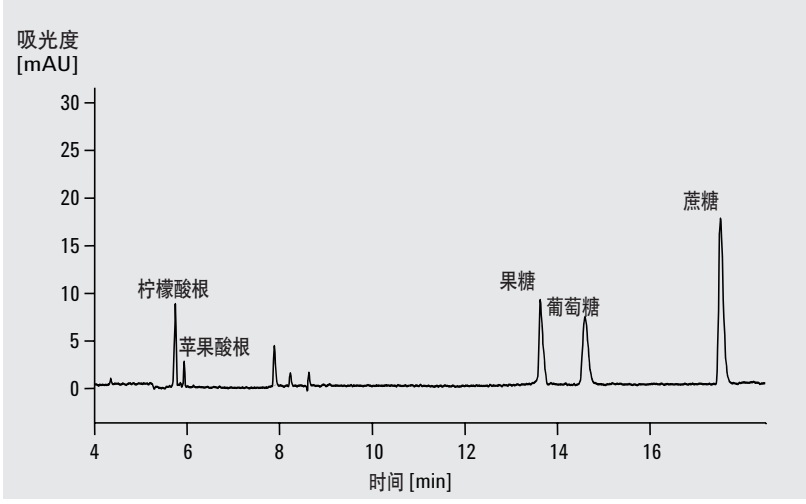
缓冲液	安捷伦碱性阴离子缓冲液 (部件号 5064-8209)
样品	酱油，用水 1:50 稀释，经截止分子量为 30-kDa 的滤膜超滤
预处理	运行缓冲液冲洗 4 min
毛细管	熔融石英，I=104 cm, L=112.5 cm, 内径= 50 µm
进样	300·mbar·s
温度	15 °C
电压	-30 kV
检测	信号 350/20 nm，参比 230/10 nm

图 2. 酱油的分析

菠萝的分析

这一方法用于分析菠萝中的有机酸和糖。在农业上，技术专家正在开发新的杂交水果。由于有机酸和糖的含量决定了菠萝汁的味道，故分析这些物质有助于鉴定产品质量。

如果柠檬酸根和苹果酸根的含量高，味道就会趋于酸。如果糖的浓度高，味道就甜。 这些化合物的测定传统上采用两种 HPLC 方法。然而，本文所述的方法能够以一次运行在很短的时间（小于18 min）内同时分析有机酸和糖。为了缩短分析时间，可以使用更短的毛细管分析该样品。进样前，用 CE 级水对新榨的菠萝汁稀释 50 倍。图 3 是分析结果。



缓冲液	安捷伦碱性阴离子缓冲液 (部件号 5064-8209)
样品	菠萝，用水 1:50 稀释，
毛细管	熔融石英，I=72 cm, L=80.5 cm, 内径= 50 µm
进样	300·mbar·s
温度	20 °C
电压	-25 kV (反极性)
检测	信号 350/20 nm，参比 275/10 nm

图 3. 菠萝的分析

故障排除

故障	可能的原因	解决方案
分离度差或宽/分裂峰	缓冲液旧了 毛细管损坏了 样品过载 毛细管太短	使用新的缓冲液 更换毛细管 稀释样品 更换毛细管
前延峰	缓冲液吸收了碳酸根	使用新的缓冲液
无信号	没有进样 毛细管损坏了 所用缓冲液不正确 电源极性设置错误 检测波长不正确	确证样品瓶底部没有滞留空气泡 确证毛细管入口设置正确 更换毛细管 确证缓冲液 检查极性是否设置为负 确证信号: 350/20, 参比: 230/10 nm
基线噪声大	响应时间设置不对 没有调整好毛细管的检测窗口 毛细管窗口脏了 氘灯老化 缓冲液的 pH 高于 12.3	验证响应时间是 1.3 s DAD 检查毛细管窗口 检查并用无纤维纸/甲醇擦洗干净 更换氘灯 验证缓冲液 pH
重现性差	缓冲液使用时间太长	更换缓冲液
电流不稳定	毛细管断裂 毛细管没有充满缓冲液	更换毛细管 增加冲洗时间

参考文献

1. Soga, T. and Ross, G. A. “Capillary Electrophoretic Determination of Inorganic and Organic Anions using 2,6-pyridinedicarboxylic Acid: Effect of Electrolyte’s Complexing Ability”(毛细管电泳使用 2,6 -吡啶二羧酸测定无机和有机阴离子：电解质络合能力的影响), *J. Chromatogr. A,* **1997**, 767, 223-230, 安捷伦出版物编号 5965-8067E。

2. Soga, T. and Heiger, D. N. “Simultaneous Determination of Monosaccharides in Glycoproteins by Capillary Electrophoresis”(毛细管电泳同时测定糖蛋白中的单糖), *Anal. Biochem.,* **1998**, 261, 73-78, 安捷伦出版物编号 5968-0772E.

3. Soga, T. and Ross, G. A. “Simultaneous Determination of Inorganic Anions, Organic Acids, Amino Acids and Carbohydrates by Capillary Electrophoresis”（毛细管电泳同时测定无机阴离子、有机酸、氨基酸和糖） *J. Chromatogr. ,* **1999**, 837, 231-239, 安捷伦出版物编号 5968-4470E.

从维生素 D3 和其他脂溶性维生素中分离维生素 D2

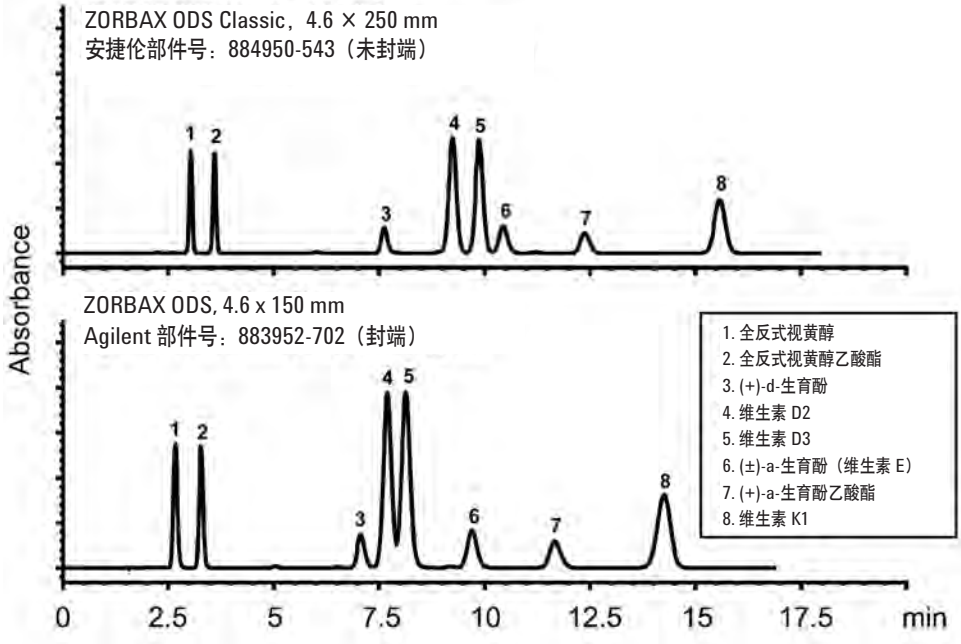
应用

食品分析

作者

Robert Ricker

脂溶性维生素分析在临床诊断、常规研究和食品分析等广泛领域中具有重要意义。维生素 D2 和 D3 的分离特别困难。图中示出了用 Agilent ZORBAX ODS 封端柱和与之对应的老式未封端柱进行分离时，这些 D 族维生素和其他维生素在保留时间和分离度上的变化。键合相封端的目的是将极性样品成分与柱填料之间的次级相互作用降至最低。



条件：
LC：Hewlett Packard HP 1050
流动相：75% ACN : 25% MeOH
检测：UV：325 nm 检测 4 分钟，然后
采用 280 nm 检测
流速：1.0 mL/min；40 °C
进样量：5 µL（10 µg / µL）

要点

- 在分离维生素 D2 和 D3 时，未封端 ZORBAX ODS 柱的分离度优于封端 ODS
- 封端和未封端的 ZORBAX ODS 柱都能分离多种脂溶性维生素，但二者选择性不同（参见峰对 3-4 和 5-6）

离子对色谱法快速分离水溶性维生素

应用

食品分析

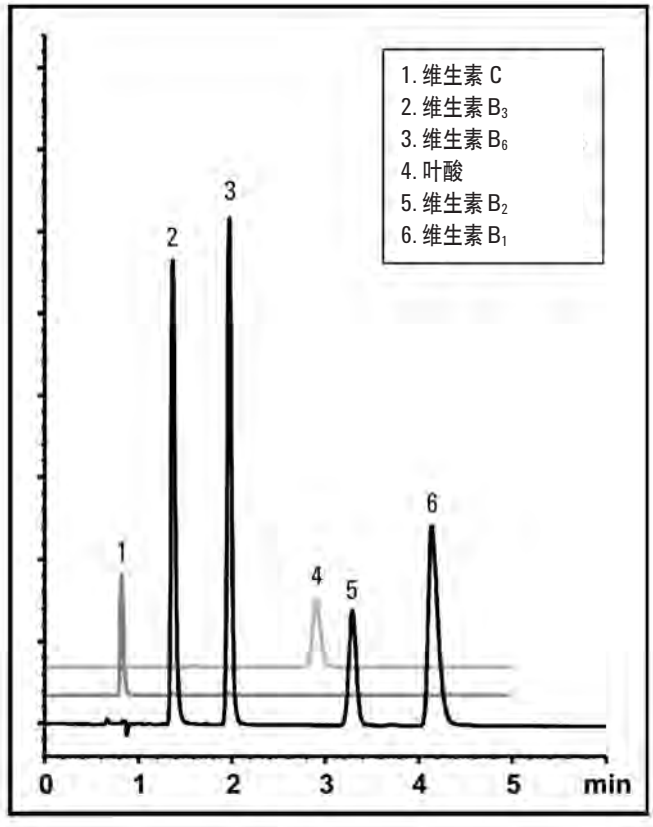
作者

Robert Ricker

对于食品业、制药业以及基础研究而言，维生素的快速分离和检测正变得日益重要。反相离子对色谱能轻松分离水溶性维生素。使用 75 mm SB-C8 柱，不到 5 分钟之内便分析了四种维生素 B、叶酸和维生素 C。

要点

- 使用低 pH 流动相和小粒径填料 (3.5 µm) 的 ZORBAX SB-C8 短柱 (75 mm) 分离水溶性维生素，可缩短运行时间，获得理想的峰形
- 即便是在低 pH (0.1% 磷酸) 和存在离子对试剂的条件下，ZORBAX StableBond 技术仍能保证可重复性和柱稳定性



条件:
ZORBAX SB-C8 (4.6 x 75 mm, 3.5 µm) (Agilent P/N: 866953-906)
流动相: 0.1% 磷酸的 10 mM 己烷磺酸盐: 甲醇(74:26)
进样量: 10 µL，1 mL/min，室温，检测: UV(245 nm)

使用 USP 23 法分离水溶性维生素

应用

食品分析

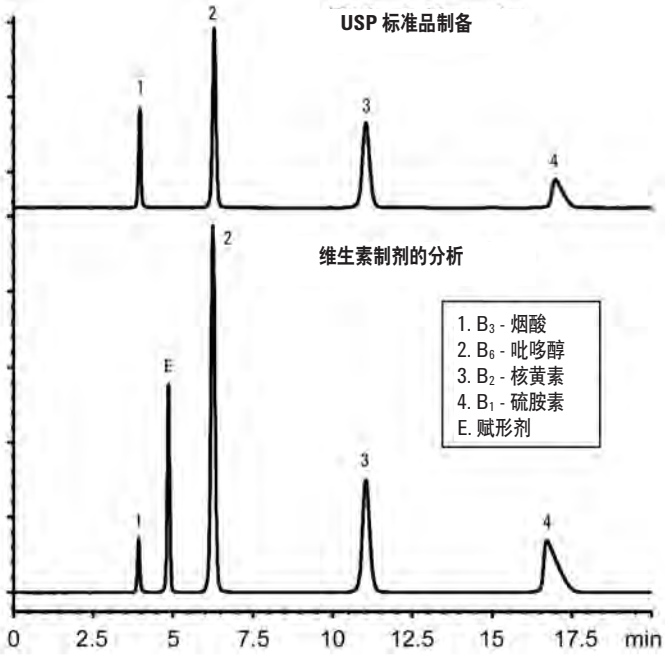
作者

Robert Ricker

近来，USP 推荐的维生素分析方法发挥着日益重要的作用。如果色谱柱的性能不是十分可靠，使用 USP 推荐的色谱方法对水溶性维生素进行分析和定量可能会相当困难。制药行业分析人员需要使用可重复且稳定性高的色谱柱进行常规分析。

要点

- StableBond 柱为分析人员提供长期稳定性和可靠性，满足 USP 方法的要求
- StableBond 柱填料的批间可重复性可确保 USP 方法的一致性
- 关于 USP 方法的详细内容，参见 USP 23 第 2168 页



条件:
ZORBAX SB-C18 (L1 填料) (4.6 × 250 mm) (Agilent P/N：880975-902)
流动相: 7.2 mM 己烷磺酸盐: MeOH: 乙酸 (73:27:1) (总共 101%)
进样量: 20 µL, 1 mL/min，30 °C，检测: UV (280 nm)

使用反相色谱分离水溶性维生素

应用

食品分析

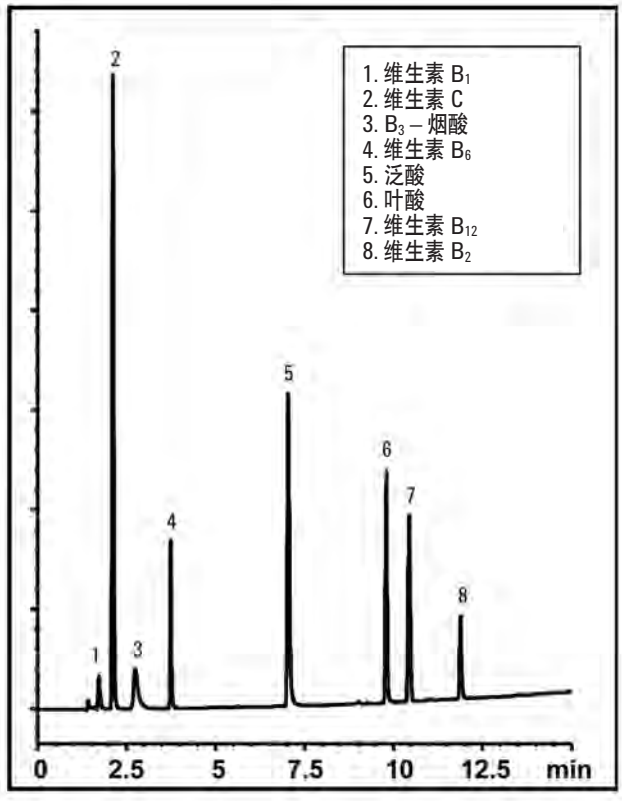
作者

Robert Ricker

近来，水溶性维生素的分析和定量在制药领域受到越来越多的关注。反相梯度（无离子对）分离可替代常规的等度分离，能够分析包含 B 族维生素、泛酸、叶酸和维生素 C 等物质的 8 组分样品。本研究使用 ZORBAX SB-C8 柱进行分析。

要点

- 使用 ZORBAX SB-C8 色谱柱（150 mm）和低 pH 流动相，实现了 8 种水溶性维生素的高速梯度分析
- 在梯度反相分离中，除了一般的水溶性维生素外，维生素 B_{12} 和泛酸的峰形也很理想
- StableBond 填料在低 pH 条件下能够确保可重复性和稳定性



条件

ZORBAX SB-C8 (4.6 x 150 mm)（安捷伦部件号：883975-906）
流动相：A=50 mM 磷酸钠，pH 2.5: 甲醇（90:10）
B=50 mM 磷酸钠，pH 2.5:MeOH（10:90）；梯度 0-70% B/18 min。
进样量：10 µL，1 mL/min，室温，检测：UV（245 nm）

快速分析猫粮提取物中的水溶性维生素

应用

食品与香料

作者

Robert D. Ricker*
Thomas Schellenberger**

在医药和食品相关科学领域，维生素定性和定量分析的重要性正日益凸显。此类分析的对象可以是各种基质中的维生素，包括片剂、饲料与食品、药物和化妆品以及饮料等。为了确保宠物食品符合内部（企业）质量标准以及政府质量标准，分析食品中的水溶性维生素显得非常重要。本研究介绍猫粮中水溶性维生素的分析，这种方法同样适用于分析多种来源的此类维生素。

本研究的目的建立一种高通量分析猫粮中水溶性必需维生素的方法。

要点

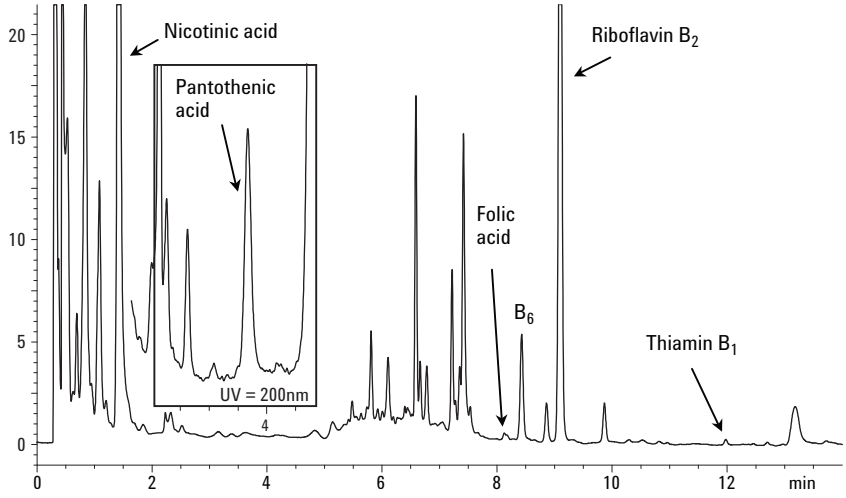
- 将猫粮提取后，可在 20 分钟内分析并灵敏地检测出背景基质中的六种水溶性维生素
- Agilent Zorbax 3.5 µm 填料短色谱柱（本研究中为 75 mm）可提供快速、高分离度的分析
- 短色谱柱易于获得高流速，从而实现快速的等度或梯度分析

流动相： A = 1 L H_2O、2.5 g 己烷磺酸盐、2.5 mL 醋酸、4 g NaH_2PO_4、50 µL 三乙胺

B = 600 mL H_2O、2.5 g 己烷磺酸、2.5 mL 醋酸、50 µL 三乙胺、400 mL 乙腈

梯度时间表

时间（分）	%溶剂 B
0.00	0.0
3.60	0.0
6.00	20.0
13.50	55.0
14.40	90.0
16.50	90.0
16.80	0.0
20.00	0.0



条件

仪器	Agilent 1100 三维高效液相色谱系统
色谱柱	Agilent Zorbax SB-C18，4.6 × 75 mm，3.5 µm 粒径，部件号：866953-902
流速	1.9 mL/min
温度	室温
进样量	20 µL
检测	275 nm 紫外光检测及光谱图

样品制备

使用厨用搅拌机或通过捣磨将整罐 (125 g) 猫粮粉碎成均匀颗粒。从样品中称取 10.0 g，转移到 250 mL 棕色容量瓶中。加入大约 120 mL 饱和 Titriplex-V（二乙烯三胺五乙酸）溶液（Titriplex-V 溶于甲醇/水中，HPLC 级），在 90 °C 的水浴中搅拌样品 5 分钟整。然后向容量瓶中加入饱和 Titriplex-V 溶液，直至接近刻度线，并冷却至室温。加入饱和 Titriplex-V 溶液至刻度线后，混合样品，使用针式过滤器（如亲水 Teflon 膜，孔径 0.45 µm）过滤。采用合适的样品瓶将等分样品放入 Agilent 1100 自动进样器中，进样 20 µL。

检测到的水溶性维生素

1. 烟酸
2. 泛酸
3. 叶酸
4. 吡哆醇 B_6
5. 核黄素 B_2
6. 硫胺素 B_1

从复杂基质中可靠地提取和富集样品，从一开始就确保得到准确、重复的结果

Agilent SampliQ 高品质固相萃取产品

Agilent SampliQ SPE 产品严格遵循 ISO-9001 标准，采用与安捷伦 HPLC 色谱柱填料相同的工艺在美国生产，具备了您希望从行业领先的色谱仪器、柱子和备件厂家获得的高品质和高性能。SampliQ SPE 具有以下特点：

- 可广泛选择聚合物、硅胶和其它吸附剂类型，从多种规格的小柱到 96 孔板等形式
- 丰富的吸附剂选择，适于最广泛的应用范围。吸附剂包括：反相、正相、离子交换、复合模式等多种机理吸附剂
- 三官能团硅胶键合与单键合相比，提高了稳定性，同时也改善了重现性和溶剂兼容性
- 行业领先的质量，确保粒径等规格的一致性，能使您获得卓越的流动性和重现性
- 新型安捷伦 SampliQ 聚合物技术，简化 SPE 方法开发，改善结果，从而使分析灵敏度和数据质量得到了提高
  - 高度保留、极佳的回收率和卓越的重现性
  - 强吸附剂的耐用性：如果在 SPE 过程中小柱偶尔干涸，也不用担心损失分析物和/或影响重现性
  - 无键合相或其它可滤物会污染您珍贵的提取物
  - 在 pH 0 到 14 范围与水溶液和大多数有机溶剂兼容
  - 球形颗粒，窄粒径分布，确保了流量性能的可重现性
  - 降低了检测限和减少树脂体积
  - 与硅胶类吸附剂不同的是，没有残留硅醇基，简化方法开发过程

Agilent SampliQ QuEChERS 试剂盒简化农药与兽药分析制备样品方法，节省时间和经费

Agilent SampliQ QuEChERS 试剂盒为能充分利用 QuEChERS 方法的优势 -快速 (Quick)、简便 (Easy)、经济 (Cheap)、高效 (Effective)、耐用 (Rugged) 和安全 (Safe)，提供了简便方法 — 因为该试剂盒是预包装，所以能使您的效率更高，方法更可靠。

Agilent SampliQ QuEChERS 试剂盒帮助您利用 QuEChERS 方法的所有优势：

- 无需预测工作或测试
  - 预包装的萃取试剂盒和分散固相萃取试剂盒适用于相应的食品类型和筛查方案 (EN 15662 或 AOAC 2007.01)，提升实验室工作效率

- 萃取试剂盒的独特包装，确保每次都能获得最佳结果
  - Agilent SampliQ QuEChERS 萃取试剂盒与市场上其它试剂盒不同的是，预先称重的无机盐独立包装在防水包装中，在有机溶剂加到样品中之后，您可以在适当的时间加入这些盐。如此就可以避免直接把盐加到食品样品中引起放热反应而导致的分析物回收率损失
- 选择正确的 Agilent SampliQ QuEChERS 分散试剂盒非常简单
  - 根据现在所用的不同 QuEChERS 方法，分散固相萃取的吸附剂和盐置于 2 mL 或 15 mL 离心管两种规格，分别适用于 1 mL、6 mL 或 8 mL 的样品量。另外还有适合您所分析食品类型的不同试剂盒
- 安捷伦的高品质，确保您获得高质量的分析结果
  - 安捷伦严格的质量控制确保所有 QuEChERS 盐、吸附剂和消耗品都没有任何杂质，使分析获得最准确的结果
- 如果您想自己装填 QuEChERS 萃取管，以便灵活多变地进行方法开发，我们同样提供高质量的散装盐和吸附剂

Agilent SampliQ SPE 及 QuEChERS 产品广泛应用于食品安全检测，包括农药、兽药等有毒有害物质的提取与净化。以下是部分应用文献，敬请参考

应用文章	SPE吸附剂	分析方法	参考方法	出版号
猪肉中的β2-受体激动剂（瘦肉精）	OPT	LC/QQQ	GB/T 21313-2007 SN/T 1924-2007	5990-4180EN
菠菜中的农药多残留	QuEChERS Kit (PSA\GCB)	LC/QQQ GC/MSD LC/QQQ GC/MSD LC/QQQ	AOAC 2007.01 (优化了平面结构农药） AOAC 2007.01 AOAC 2007.01 EN 15662	5990-4247EN 5990-4248EN 5990-4305EN 5990-4395EN
蜂蜜中的22种兽药残留	OPT	LC/QQQ	GB/T 20757-2006 GB/T 22966-2008	Customer
茶叶中的30种农药残留	QuEChERS (PSA\GCB)	GC/MSD		Customer
牛奶中的磺胺药物	SCX	LC/QQQ		5990-3713EN
牛奶中的四环素	OPT	HPLC	GB/T 21317-2007	5990-3816EN
草莓中的农药多残留	QuEChERS (PSA)	LC/Q-TOF	EN 15662	5990-3935EN
苹果中的农药多残留	QuEChERS Kit (PSA)	LC/QQQ LC/QQQ GC/MSD GC/MSD	AOAC 2007.01 EN 15662 AOAC 2007.01 EN 15662	5990-3937EN 5990-3938EN 5990-4068EN 5990-4073EN
乳制品中的三聚氰胺	SCX	HPLC	FDA GB/T 22388-2008	5989-9949EN
牛奶及乳制品中的三聚氰胺	SCX	LC/QQQ		5989-9950EN
奶制品中的三聚氰胺	SCX	GC/MSD	GB/T 22388-2008	5990-3282EN
鸡蛋奶粉中的三聚氰胺	SCX	HPLC	GB/T 22388-2008	5990-3365EN
鸡肉中的四环素	OPT	HPLC	GB/T 21317-2007	5989-9735EN
苹果汁中的苯并咪唑杀菌剂	SCX	HPLC	SN/T 1753-2006	5990-3235EN
肉中的青霉素	OPT	HPLC LC/QQQ		5990-3364EN
蜂蜜中的氯霉素	OPT	LC/QQQ	GB/T 18932.19-2003	5990-3615EN
鱼肉中的激素	OPT	HPLC		5990-3845EN
水产品、肠衣和蜂王浆中的硝基呋喃类代谢物	OPT	LC/QQQ	GB/T 21311-2007 GB/T 21167-2007	Customer

www.agilent.com/chem/cn

如需详细信息

了解更多：
www.agilent.com/chem/cn

查找当地的安捷伦客户中心：
www.agilent.com/chem/contactus:cn

安捷伦客户服务中心：
免费专线：800-820-3278
400-820-3278（手机用户）

联系我们：
customer-cn@agilent.com

在线购买：
www.agilent.com/chem/store

在线询价：
www.agilent.com/chem/quote:cn

仅用于研究。本文中涉及的信息、描述和规格，如有变更，恕不另行通告。

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担责任。

© 安捷伦科技公司
2009 年 9 月 10 日中国印刷
5991-3689CHCN

Agilent Technologies