

分析复杂基质时气相色谱衬管对实验室分析效率的影响

评估用于中药基质中农药 GC/MS 分析的衬管寿命

作者

Siji Joseph,
Samuel Haddad,
Thierry Jeanneau,
Ruben Garnica 和
Angela Smith Henry
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报比较了三种常用的气相色谱进样口衬管在分析中药 (TCM) 中的农药时的性能。共选择了 35 种农药用于丹参根茎 (*Salvia miltiorrhiza*) 基质研究。使用 QuEChERS 样品前处理方法从基质中萃取目标分析物。使用配置柱中反吹功能的 Agilent 8890 气相色谱仪和 Agilent 7000D 三重四极杆质谱仪 (GC/TQ) 进行分析。使用平均目标物响应和回收率考察带玻璃毛的安捷伦超高惰性不分流单锥衬管、安捷伦超高惰性不分流浅凹坑衬管 (内径 2 mm) 和带有砂芯的安捷伦超高惰性不分流单锥衬管的分析性能, 以选择最合适的衬管, 从而提高复杂 TCM 基质 (如丹参) 痕量分析的实验室效率。

前言

TCM 已有 2000 多年的使用历史。鉴于其应用范围广泛,《中国药典》发布了 TCM 物质中农药检测和监管的指南^[1]。茶、粉末和提取物等 TCM 均取自植物,包括叶子、种子、根、茎和树皮。在不同类型的 TCM 基质中,根茎(如丹参根茎)的分析往往最为复杂,并且会导致农药检测难度增大。先前的 GC/TQ 分析已经表明其在监测 TCM 基质中农药方面的前景,而通过减少基质转移可以优化这些分析方法^[2]。

GC 进样口衬管是进样器和分析柱之间的接口。GC 进样口衬管在高温下将注入的液相样品转化为气相,形成样品和载气的均质混合物。然后,衬管迅速将样品转移到色谱柱柱头。衬管填充有去活填料(如玻璃毛或玻璃砂芯),为样品的快速均匀气化提供了更大的表面积。它们还可以作为屏障,保护 GC 色谱柱和 MS 离子源免受复杂基质残留物的影响。根据基质的物理与化学复杂性、目标物和进样技术,有多种衬管可供选择。

在不分流进样模式下,分流出口关闭,大部分样品转移至分析柱,是痕量分析的常用方法之一。在不分流进样模式下,衬管更容易受到基质组分的污染,需要更加频繁地更换,以确保获得理想的仪器性能。在不影响分析性能的情况下能够实现更多次进样的衬管,对于大幅缩短仪器停机时间并提高实验室分析效率非常重要。本应用简报比较了三种安捷伦衬管在分析复杂 TCM 基质中农药时的性能。通过对基质加标样品进行重复不分流进样,监测 35 种目标农药的响应和回收率,评估了每种衬管的性能。

实验部分

化学品与试剂

35 种目标农药的定制混标和磷酸三苯酯内标 (ISTD) 购自 AccuStandard (New Haven, CT, USA), 浓度均为 500 µg/mL。使用乙腈稀释标准品和 ISTD 以制备工作标准溶液。在未使用时,所有标准品均按照制造商的建议储存于 5 °C 或 -20 °C 条件下。LC/MS 级乙腈购自安捷伦。用于样品前处理的乙酸购自 MilliporeSigma (Burlington, MA, USA)。

样品萃取

丹参根茎基质来自于本地中药店。萃取方案遵循《中国药典》方法 5 (图 1) 中描述的流程^[1]。简而言之,使用搅拌器均质化样品。称取 3 ± 0.1 g 样品,置于 50 mL 锥形聚丙烯管(货号 5610-2049)中。向每个试管中加入 15 mL 1% v:v 乙酸溶液。然后将试管涡旋混合 1 min,并在室温下孵育 30 min。向每个试管中再加入 15 mL 乙腈和两粒陶瓷均质子(货号 5982-9313)。在机械振荡器上以 750 rpm 的转速振荡 5 min,进一步萃取样品。然后,将含有 6 g MgSO₄ 和 1.5 g 乙酸钠(货号 5982-5755)的 Agilent QuEChERS 萃取试剂盒加入 50 mL 试管中。再次将样品置于机械振荡器中,以 750 rpm 的转速振荡 3 min。萃取后,将样品置于冰浴中冷却 10 min,然后在 10 °C 下以 4000 rpm 离心 5 min。然后取 9 mL 上清液转移至含有 90 mg 石墨化炭黑(货号 64100G)的分散式固相萃取管(货号 5982-5156)中并涡旋混合 1 min。然后,在机械振荡器上以 750 rpm 的转速萃取样品 5 min。将样品在 10 °C 下以 4000 rpm 的转速离心 5 min。将 5 mL 上清液转移至试管中,并在温和的氮气流下吹干。使用 1 mL 乙腈复溶干燥的样品残留物,并在 10 °C 下以 4000 rpm 的转速离心 7 min。将上清液转移至安捷伦 1.5 mL 高回收率样品瓶(货号 5183-2073)中以备分析。样品萃取中用到的所有消耗品如附录中的表 A1 所示。

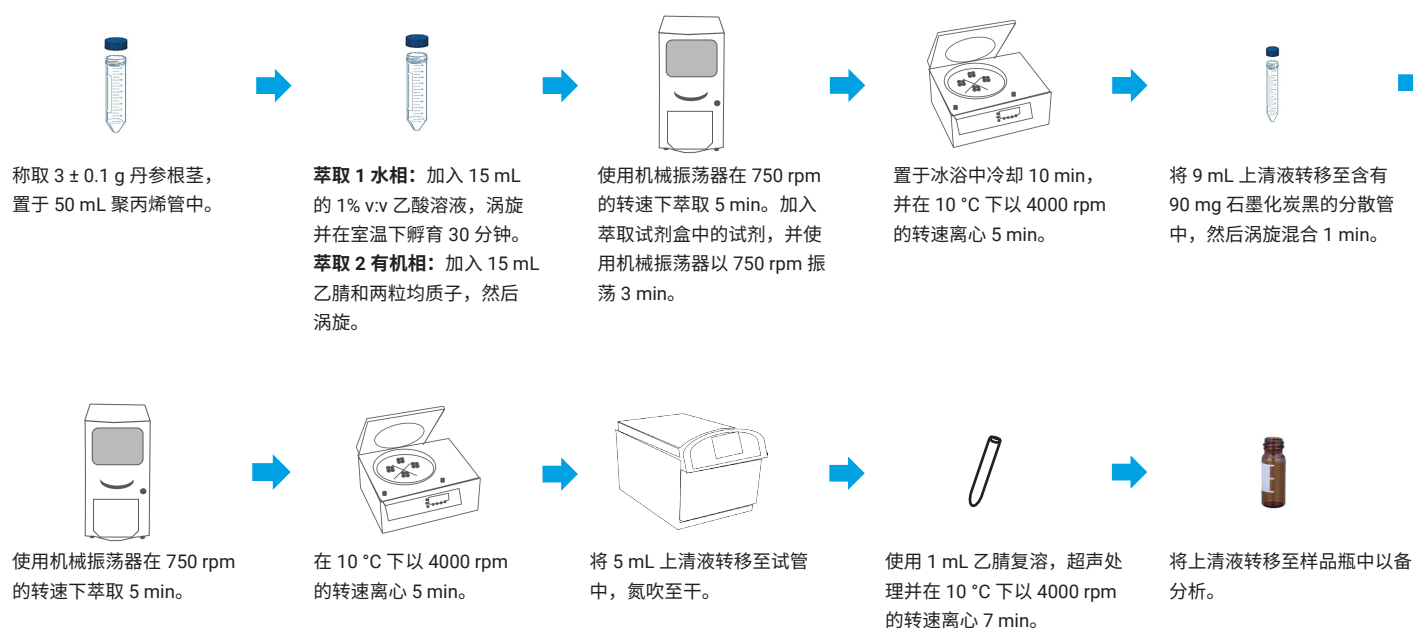


图 1. 丹参根茎的 QuEChERS 样品前处理方案

仪器

使用 8890 GC 和 7000D 三重四极杆 MS 系统进行分析。气相色谱仪配置了柱中反吹（两通接头工具包，货号 G1472A 和 PSD 模块，货号 G3559A），以便使用两根依次连接的 Agilent J&W DB-17, 15 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m 分析柱进行分离和同步反吹。Agilent 7693A GC 自动液体进样器配备安捷伦蓝色系列 10 μ L 聚四氟乙烯 (PTFE) 头推杆锥形进样针（货号 G4513-80203）。在本研究中，对具有不同屏障类型的三种衬管进行了不分流进样测试，如表 1 所示。

表 1. 衬管类型和文中使用的简称

衬管描述	货号	文中使用的名称
安捷伦超高惰性不分流单锥衬管，带玻璃毛	5190-2293	玻璃毛衬管
安捷伦超高惰性不分流浅凹坑衬管，内径 2 mm	5190-2297	浅凹坑衬管
安捷伦超高惰性不分流单锥衬管，带砂芯	5190-5112	砂芯衬管

GC 条件列于表 2，MS 离子源参数列于表 3。采用多反应监测 (MRM) 模式采集数据，并根据《中国药典》的建议选择离子对（表 A2）^[1]。使用保留时间锁定 (RTL) 软件工具避免保留时间偏移，RTL 在之前的出版物中进行了介绍^[3]。使用 100 μ g/L 的农药纯混标将目标分析物水胺硫磷 (MRM 135.7 $\rightarrow$ 108.0) 的保留时间锁定为 14.05 min。利用 Agilent MassHunter 工作站 GC/MS 数据采集软件（10.1.49 版）采集数据，并使用 MassHunter 定量分析软件（10.2 版）进行处理。

表 2. Agilent 8890 气相色谱参数

参数	值
进样量	1 µL
进样口	多模式进样口，脉冲不分流模式，265 °C
进样口隔垫	流失性与温度经过优化的不粘连进样口隔垫 11 mm（货号 8010-0223）
进样脉冲压力	30 psi 持续 0.5 min
分流出口吹扫流速	60 mL/min，0.5 min 时
隔垫吹扫流速	3 mL/min
载气	氮气
色谱柱	两根 Agilent J&W DB-17, 15 m × 0.25 mm, 0.25 µm 色谱柱（货号 122-4712）
色谱柱流速	色谱柱 1: 1.2 mL/min 色谱柱 2: 1.5 mL/min 色谱柱 1 在 23.5 min 时以 -1 mL/min 的速率进行反吹，直至 26.75 min（色谱柱升温速率 100 mL/min）
后运行期间的色谱柱流速	色谱柱 1 为 4.15 mL/min，色谱柱 2 为 4.57 mL/min，持续 4 min
柱温箱升温程序	初始：80 °C（保持：1 min） – 温阶 1：以 40 °C/min 升至 200 °C – 温阶 2：以 2 °C/min 升至 230 °C – 温阶 3：以 40 °C/min 升至 300 °C（保持：6 min） 后运行：4 min

表 3. Agilent 7000D 三重四极杆仪器配置与参数

参数	值
传输线	260 °C
离子化	电子电离 (EI)
模式	MRM
离子源温度	230 °C
四极杆温度	150 °C
溶剂延迟	6 min
增益因子	10

基质匹配校准

混合的基质空白提取物用于提供足够的样品量，以制备基质匹配校准标样。通过向基质空白中加标适当浓度的工作标准溶液，制备五个萃取后基质匹配校准标样（5、10、50、100 和 200 µg/L）。在所有校准标样中，ISTD 浓度均保持在 50 µg/L。对于每种衬管类型（表 1），收集基质空白和基质匹配校准物的 MRM 数据，构建经过 ISTD 校正的校准曲线。

衬管评估

萃取前向丹参根茎基质中加入 75 µg/L 的目标分析物，并按照样品前处理方案（图 1）制备基质加标样品，用于每种类型衬管（表 1）的分析。与基质匹配校准标样类似，基质加标样品中的 ISTD 浓度也为 50 µg/L。连续进样基质加标样品，监测每种目标分析物的绝对响应和回收率。使用针对每种衬管类型生成的基质匹配校准曲线方程计算每种目标物的回收率。针对每种衬管类型，使用第一根衬管构建校准曲线，以此来计算回收率。监测重复进样的响应和回收率偏差，确定是否符合可接受性能标准。每种衬管类型的可接受性能标准均为：70% 的目标分析物的峰面积相对标准偏差 (RSD) 为 ± 20% 以及 60% 的目标分析物回收率在 70%–130% 之间。

若不符合可接受性能标准，则对色谱柱进行切割 (20 cm)，并完成进样口维护。维护措施包括使用异丙醇润湿棉签清洁多模式进样口，再更换隔垫和衬管。然后快速调谐仪器，并通过一次 RTL 运行重新锁定方法，使仪器性能恢复到与初始状态相当。如果在更换衬管并进行预防性维护后，结果仍然不可接受，则更换色谱柱 1（连接进样口与吹扫 Ultimate 接头）。

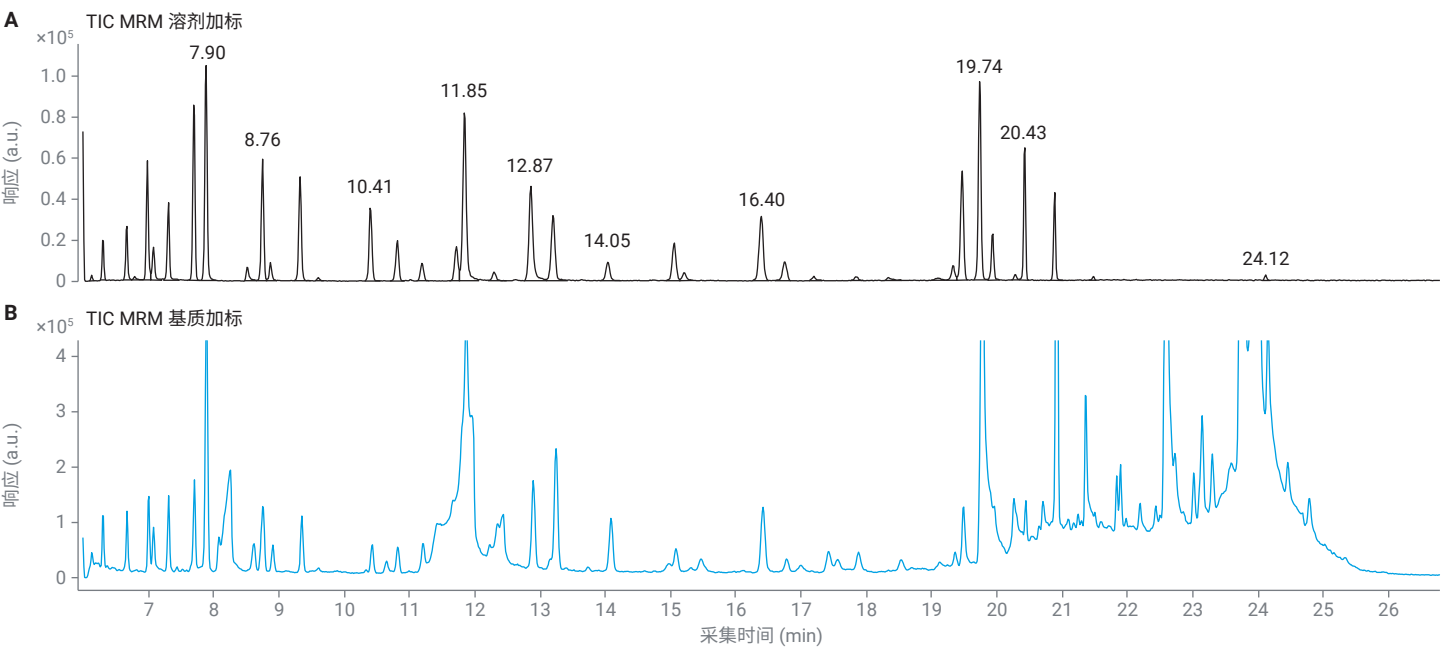
对于每种衬管类型，至少使用三根新衬管重复实验，并通过平均响应和回收率来评估衬管性能。对于浅凹坑衬管，除了收集 1.0 µL 默认进样量下的数据外，还收集了 0.3 µL 进样量下的数据，以考察低蒸气体积下的性能。使用安捷伦蓝色系列 1 µL GC 自动进样器进样针（货号 G4513-80215）进行 0.3 µL 进样。根据蒸气体积计算器的计算结果，1.0 µL 的进样量将膨胀至浅凹坑衬管容量的 138%。在该进样量下进行了测试，以便与其他衬管直接进行比较，因为在使用更低的进样量时，绝对响应会有所不同。选择将进样量调整为 0.3 µL，是因为在 30 psi 压力脉冲下，该进样量仅膨胀至浅凹坑衬管容量的 41%。使用浅凹坑衬管时，两种进样量之间的性能相似，因此，在本研究中，使用 1.0 µL 进样量进行评估。

随着复杂基质样品的持续进样，高沸点残留物会沉积在衬管和分析柱柱头，导致峰形不佳、响应降低以及峰标注错误。为了避免这一问题，每次更换衬管时都会对气相色谱柱进行切割。因此，每次更换衬管时色谱柱长度都会有所变化，并可能导致目标物保留时间漂移和峰标注错误，而使用所述的 RTL 程序可以避免这些情况。

结果与讨论

具有相似 MRM 离子对的目标分析物，如氟虫腈和氟虫腈亚砷以及二氯二苯基三氯乙烷 (DDT)、二氯二苯基二氯乙烯 (DDE) 和二氯二苯基二氯乙烷 (DDD)，使用所述的 25 分钟色谱方法实现了良好分离。虽然《中国药典》指南中强调了使用耗时

更长的 51 分钟方法，但使用 25 分钟方法足以分离 o-内吸磷和 s-内吸磷等异构体。更短的持续时间更加有利于之前使用 Agilent Intuvo 9000 GC 和 7000D 三重四极杆质谱仪开展的工作^[2]，此外，RTL 确保了准确的目标峰归属，即使在目标物洗脱时间存在基质影响也是如此。本研究中使用的所有基质匹配校准曲线均呈线性， $R^2 \geq 0.995$ 。



编号	名称	保留时间	编号	名称	保留时间	编号	名称	保留时间	编号	名称	保留时间
1	O-内吸磷	6.32	10	γ-BHC	8.76	19	对硫磷	12.31	27	苯线磷	17.46
2	灭线磷	6.67	11	氟甲腈	8.87	20	p,p'-三氯杀螨醇	12.87	28	甲基硫环磷	18.35
3	杀虫脒	7.00	12	β-BHC	9.34	21	甲基异柳磷	13.20	29	除草醚	19.34
4	治螟磷	7.08	13	δ-BHC	10.41	22	水胺硫磷	14.05	30	o,p'-DDT	19.47
5	甲拌磷	7.32	14	艾氏剂	10.82	23	硫丹 I (α-异构体)	15.06	31	p,p'-DDD	19.74
6	α-BHC	7.70	15	甲基对硫磷	11.19	24	氟虫腈砷	15.20	32	硫丹 II (β-异构体)	19.94
7	特丁硫磷	7.88	16	氟虫腈亚砷	11.72	25	p,p'-DDE	16.40	33	p,p'-DDT	20.43
8	S-内吸磷	7.90	17	氟虫腈	11.83	26	狄氏剂	16.75	34	硫丹硫酸酯	20.89
9	久效磷	8.52	18	o,p'-三氯杀螨醇	11.85				35	蝇毒磷	24.12

图 2. 35 种农药的总离子流色谱图 (TIC) MRM 曲线，显示了洗脱曲线 (A: 在乙腈中加标 200 µg/L; B: 在基质中加标 200 µg/L)。所有 35 种目标分析物的保留时间详细信息如表中所示

样品前处理萃取效率

QuEChERS 样品前处理方案可有效萃取大多数目标农药。一些目标物（如杀虫脒、苯线磷、甲拌磷和特丁硫磷）在使用 QuEChERS 样品前处理方案时回收率降低至 30%–70%，而 o-内吸磷和 s-内吸磷的回收率则 < 30%。

图 2 显示了对溶剂中的样品与萃取基质中的样品进样获得的结果之间的差异。每种衬管类型的可接受性能标准为 60% 的目标分析物的回收率在 70%–130% 之间。所有衬管类型均符合可接受标准，使用玻璃毛衬管、浅凹坑衬管和砂芯衬管时分别有 80%、71% 和 83% 的分析物回收率在 70%–130% 范围内。

衬管响应和回收率重现性

通过对玻璃毛和砂芯衬管进行 120 次基质加标重复进样，对浅凹坑衬管进行 85 次重复进样，考察了目标分析物响应（图 3）。每种衬管类型初始进样的峰对称性值 < 1.5。随着重复进样次数逐渐增加，发现目标分析物响应降低，峰对称性值增加到 1.5 以上，即认定为性能不可接受。例如，如图 4 所示，每种衬管类型中三氯杀螨醇异构体的响应和峰对称性降低。玻璃毛衬管的前 50 次进样、浅凹坑衬管的前 25 次进样以及砂芯衬管的前 75 次进样的峰对称性均在可接受的 1.5 范围内。玻璃毛衬管的前 45 次进样、浅凹坑衬管的前 30 次进样和砂芯衬管的前 70 次进样的响应 RSD 均在 20% 限值范围内。

与获得的响应结果类似，回收率在多次重复进样后有所降低（图 5）。玻璃毛衬管的前 50 次进样、浅凹坑衬管的前 24 次进样和砂芯衬管的前 70 次进样均获得了可接受的回收率。

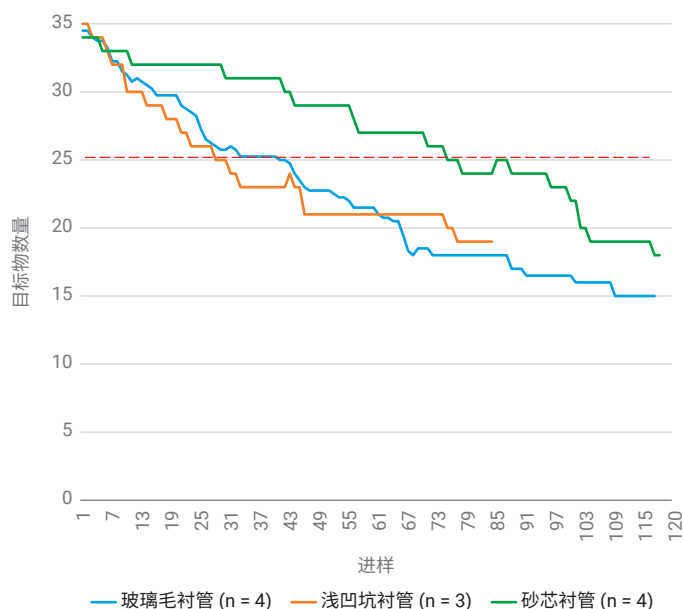


图 3. 当至少 26 种目标分析物符合 20% RSD 可接受标准时，可进行的进样次数。红色虚线为临界值，表示有 26 种目标分析物符合 20% RSD 可接受标准

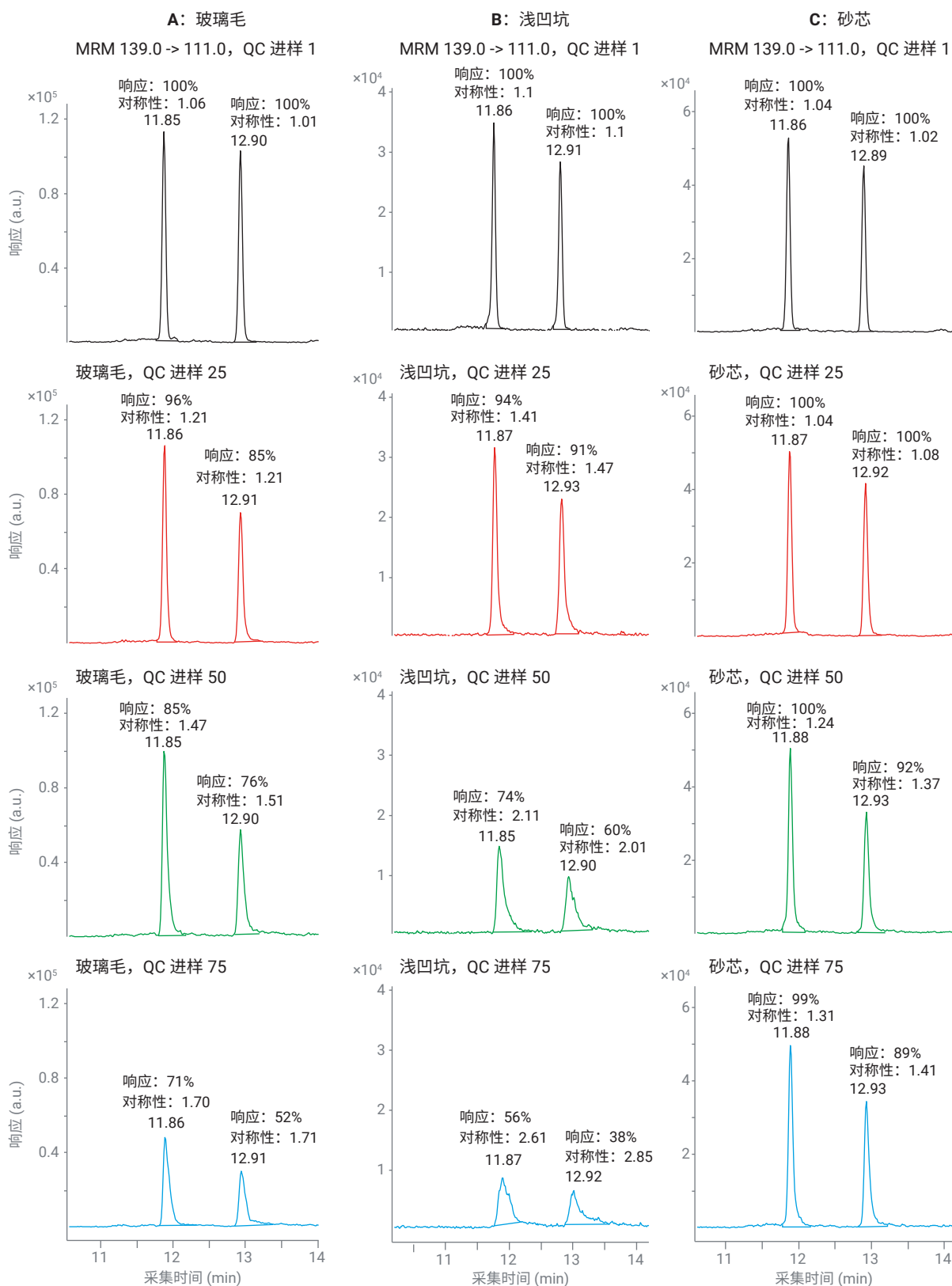


图 4. o,p'-三氯杀螨醇（保留时间：11.8）和 p,p'-三氯杀螨醇（保留时间：12.9）的 MRM 数据（139.0 & 111.0），分别为使用玻璃毛（A-左）、浅凹坑（B-中）和砂芯（C-右）衬管进样 1 次（黑色曲线）、25 次（红色曲线）、50 次（绿色曲线）和 75 次（蓝色曲线）。每个 MRM 窗口都包括响应降低百分比和峰对称性值

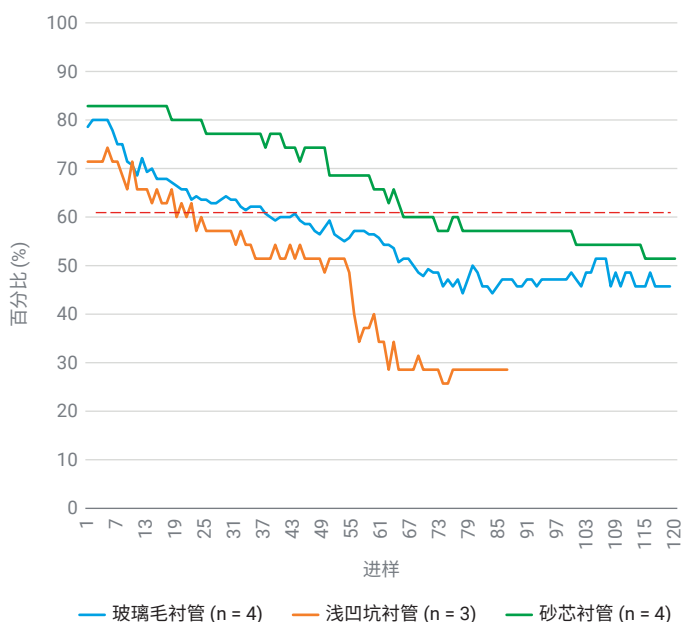


图 5. 根据基质中的回收率，当至少 60% 的目标分析物符合可接受的回收率标准（70%–130%）时，可进行的进样次数。红色虚线为临界值，表示至少 60% 的目标分析物的回收率达到可接受的回收率标准（70%–130%）

图 6 计算并汇总了三种衬管类型的平均使用寿命。在丹参根茎的农药分析中，砂芯衬管优于其他类型的衬管，平均使用寿命为 70 次进样。砂芯玻璃屏障有助于防止基质残留物进入柱头，从而延长色谱柱使用寿命。

此外，结果表明，在 1 μ L 的进样量下，浅凹坑衬管会在重复运行中将更多的基质残留物转移到色谱柱中，与使用其他两种衬管相比，需要更频繁地更换色谱柱。砂芯衬管的响应数据表明，衬管老化对各种化合物的影响不同。但是，当安装了新的衬管并按照前述的步骤进行了预防性维护后，在大多数情况下，仪器性能都可以恢复到初始状态（图 7）。

p,p'-DDD 响应稳定，100 次进样后性能仍可接受。p,p'-三氯杀螨醇的响应缓慢降低，且每次更换衬管后即可恢复。甲基硫环磷的响应对衬管老化非常敏感，在每次重复进样时，响应迅速降低。但是，与 p,p'-三氯杀螨醇类似，甲基硫环磷的响应在更换衬管后即可恢复到初始值。与其他目标分析物不同的是，甲拌磷的响应在 100 次重复进样中持续降低，且更换衬管后信号强度并未恢复。甲拌磷的这一结果可能是由于衬管性能以外的其他因素造成的，如切割后色谱柱的健康状况、离子源清洁度或所研究基质中目标物的稳定性。

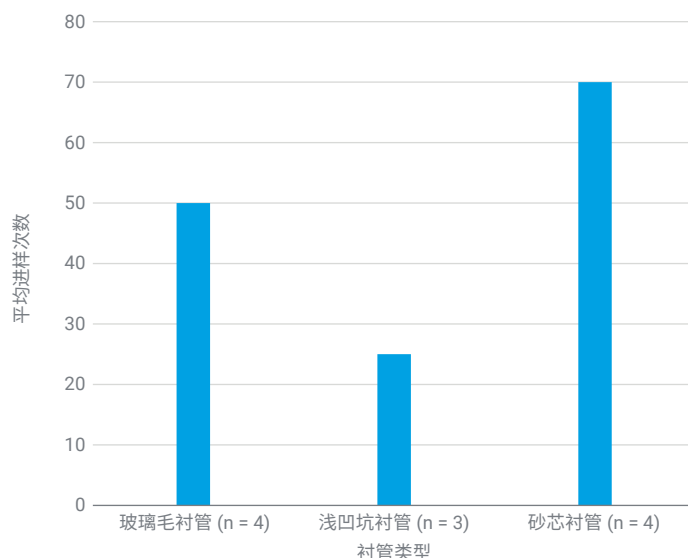


图 6. 衬管性能无法达到可接受标准之前的平均进样次数

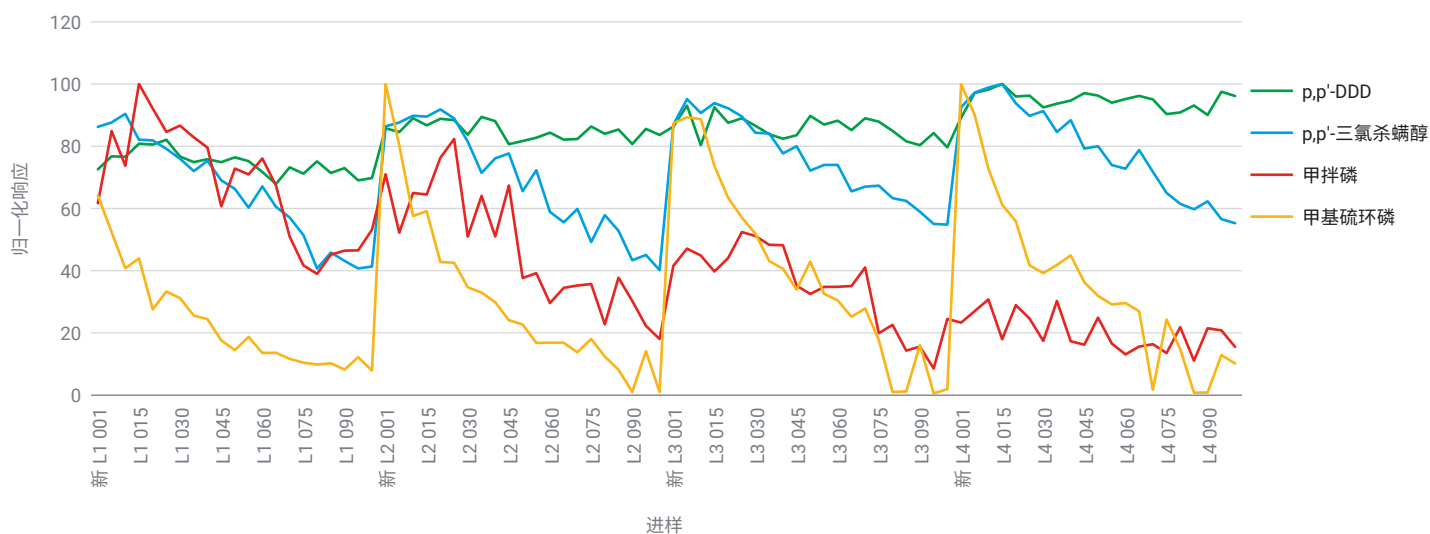


图 7. 使用砂芯衬管对基质萃取样品进行 100 次重复进样，4 种目标分析物的归一化响应。每 100 次进样后更换一次衬管，总共进行 400 次进样

结论

本应用简报重点介绍了在分析复杂 TCM 基质时，选择合适的气相色谱进样口衬管对于实验室效率和分析结果质量的重要性。选择用于复杂基质常规分析的衬管尤其重要，如果衬管选择不当可能会导致农药检测的难度增大。分析结果表明，带有砂芯的安捷伦超高惰性不分流单锥衬管的使用寿命最长，可提供 70 次基质进样以及非常可靠的结果，有助于对丹参根茎等复杂的中药基质进行可靠的分析。整个分析工作流程有助于提高实验室分析效率，并提供可靠的分析结果。与本文所述方法相似的可靠的样品前处理方法也是必要的。

参考文献

1. Method No. 5, Multi-Residue Determination Method for Banned Pesticides in Medicinal Materials and Decoction Pieces (Plants), *the Chinese Pharmacopoeia*, **2020**
2. Zhang, J. Screening of Pesticide Residues in Traditional Chinese Medicine with the Agilent Intuvo 9000 GC (使用 Agilent Intuvo 9000 气相色谱仪筛查中药中的农药残留)，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5994-4044EN，**2021**
3. Retention Time Locking with the MSD Productivity ChemStation (使用 MSD 高效 ChemStation 实施保留时间锁定)，*安捷伦科技公司*，出版号 5989-8574EN，**2008**

附录

表 A1. 用于样品前处理的消耗品

消耗品	货号
Agilent QuEChERS 萃取试剂盒	5982-5755
分散式 SPE 试剂盒	5982-5156
GCB Bond Elut Carbon, 散装	64100G
陶瓷均质子, 50 mL, 100/包	5982-9313
50 mL 锥形聚丙烯管	5610-2049
高回收率样品瓶, 1.5 mL, 100/包	5183-2073
PTFE/红色硅橡胶固定螺口盖, 100/包	5190-7024

表 A2. 目标分析物和 ISTD 的 MRM 参数 (MS1 和 MS2 分辨率: 低分辨率)

化合物名称	母离子	子离子	驻留时间 (ms)	CE (ev)
艾氏剂	254.9	220	10	20
艾氏剂	262.7	192.7	10	30
α - β - γ - δ -BHC	181	145	10	15
α - β - γ - δ -BHC	218.7	182.9	10	5
杀虫脒	117	90	10	20
杀虫脒	152	117	10	15
杀虫脒	196	181	10	5
蝇毒磷	361.8	225.8	10	15
蝇毒磷	361.8	109	10	15
p,p'-DDE	316	246	10	25
p,p'-DDE	246	176	10	30
o,p'-DDT/p,p'-DDT/p,p'-DDD	235	199	10	15
o,p'-DDT/p,p'-DDT/p,p'-DDD	235	165	10	25
p,p'-DDT/p,p'-DDD	237	165	10	25
o,p'-/ p,p'-三氯杀螨醇	139	111	10	15
o,p'-/ p,p'-三氯杀螨醇	250	139	10	15
狄氏剂	262.9	193	10	35
狄氏剂	276.8	240.7	10	10
硫丹 I (α -异构体)	240.8	205.6	10	15
硫丹 I (α -异构体)	194.9	159	10	10
硫丹 II (β -异构体)	206.8	171.8	10	15
硫丹 II (β -异构体)	194.8	159	10	10
硫丹硫酸酯	273.8	238.9	10	15
硫丹硫酸酯	271.8	141	10	40
硫丹硫酸酯	271.8	236.7	10	15
灭线磷	199.7	157.8	10	5
灭线磷	157.8	96.7	10	20
苯线磷	217	202.1	10	10
苯线磷	303.1	153.9	10	30
苯线磷	303.1	122	10	20
氟虫腈	367	255	10	25
氟虫腈	351	255	10	20
氟虫腈	367	213	10	35

化合物名称	母离子	子离子	驻留时间 (ms)	CE (ev)
氟甲腈	388	281	10	35
氟甲腈	388	333	10	20
氟虫腈亚砷	420	255	10	20
氟虫腈亚砷	420	351	10	12
氟虫腈砷	383	255	10	20
氟虫腈砷	383	213	10	32
水胺硫磷	120.7	65	10	20
水胺硫磷	135.7	108	10	15
甲基异柳磷	199	65	10	40
甲基异柳磷	199	121	10	15
久效磷	192	127.1	10	10
久效磷	127	109	10	12
除草醚	201.8	138.7	10	28
除草醚	282.8	253	10	10
除草醚	282.8	201.8	10	15
o-/s-内吸磷	88	45	10	25
o-/s-内吸磷	88	60	10	4
对硫磷	139	109	10	10
对硫磷	291	81	10	30
对硫磷	291	109	10	25
甲基对硫磷	263.1	79	10	35
甲基对硫磷	263.1	109	10	13
甲拌磷	260	75	10	5
甲拌磷	230.8	128.6	10	25
甲基硫环磷	167.8	109	10	10
甲基硫环磷	91.9	63.8	10	10
治螟磷	321.8	201.9	10	20
治螟磷	322	174	10	15
特丁硫磷	230.9	129	10	25
特丁硫磷	230.9	175	10	13
磷酸三苯酯 (TPP) ISTD	326	233	10	18
磷酸三苯酯 (TPP) ISTD	326	215	10	25

www.agilent.com

DE75217917

本文中的信息、说明和指标如有变更,恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2022
2022 年 11 月 30 日, 中国出版
5994-5546ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

