

使用安捷伦6460三重串联四极杆液质联用仪对春黄菊和生姜提取物中的农药残留进行定性和定量分析

应用报告

作者

Thomas Glauner
安捷伦科技公司
Waldbronn, BW德国

Tiffany Payne
安捷伦科技公司
Santa Clara, CA美国

Guenther Kempe, Stefan Kittlaus,
Daniela Goermer
State Laboratory for Health and
Veterinary Affairs Saxonia,
Pesticide Department
Dresden, Germany

摘要

本应用报告介绍了触发多反应监测模式(tMRM)用于春黄菊和生姜提取物中农药残留的检测。所有的分析均采用Agilent 1290液相色谱/6460三重串联四极杆质谱仪进行,采集模式是触发式多反应监测模式(tMRM)。对两个假阳性结果的例子进行了探讨和分析:春黄菊中的丁噻隆和生姜中的吡螨胺。一次分析就可以对这两个化合物进行定量分析,同时通过谱库匹配进行化合物的确认。通过tMRM采集模式和谱库匹配的方法避免了假阳性结果。



Agilent Technologies

前言

目前用于农药分析的多残留检测方法通常都可以覆盖几百种不同化学类别的化合物。同样的方法一般还可以适用于不同的基质。通常此类分析采用快速扫描仪器—一般为三重串联四极杆质谱—对于每一个组分，一般选择两个MRM离子(一个用于定量，另一个用于确认)。

在欧洲，食品中的农药检测是按照欧盟法规(EC) No 396/2005¹进行的，它的附录列出了不同产品中农药残留的最大限量。截至到2008年3月11号，欧盟对170000种不同基质中的不同农药定义了最大残留限量(MRL)。欧盟指南 SANCO/10684/2009²设定了食品和饲料中农残分析的方法确认和质量控制步骤。对于三重串联四极杆液质分析，化合物鉴定的指标参数包括保留时间，质荷比(m/z)和峰度值。除此之外，每个检测组分的保留时间偏差不能超过2.5%。对于具有2个或更多子离子的多反应监测，根据其于基峰的相对强度不同，离子比例的一致性也应处于±20%到50%之内。

在本文中，使用安捷伦6460三重串联四极杆液质联用仪和tMRM模式分析51种农药残留。我们还重点对过去被报告为假阳性的两个农药进行了分析：丁噻隆(一种近来被报道的用于春黄菊的广谱除草剂)，和吡蚜胺(一个吡啶类杀蚜剂和杀虫剂，在生姜样品中被报道过假阳性)。在应用方法的条件下，这两个农药体现了两个常见的分析情况。丁噻隆与样品基质中相邻内源干扰物很好地分离，其中两个主要的MRM离子比例相近。吡蚜胺与生姜基质中干扰物共流出，它们具有相同的定量MRM离子。在传统的MRM模式下，基质中内源性干扰物将会导致假阳性结果。然而，tMRM采用八个额外的子离子进行干扰匹配将吡蚜胺与生姜中的内源性干扰物区分开。除了丁噻隆的保留时间可能受到样品基质的影响之外，tMRM分析能够将丁噻隆与基质干扰峰彻底区分开，这将大大提高样品分析的准确性。tMRM的功能强大，一次分析就能提供定量和定性的结果。

tMRM分析从对每一个化合物进行主要MRM扫描开始，覆盖所有可能的目标分析物。当某个化合物的主要MRM离子信号达到设定阈值时，二级离子采集会自动启动。在tMRM模式下，每个组分最多可以设置10个MRM，这10个MRM包括主要MRM和任意组合的二级MRM(一个主要MRM和九个二级MRM、两个主要MRM和八个二级MRM等)。这种采集模式在主要MRM扫描阶段，将所有可能的目标待测物的离子驻留时间最大化，然后采集足够MRM数据以生成谱图。生成的子离子谱可以用于谱图检索，因此tMRM分析可以同时获得定量结果和用于化合物确认检索的谱图。通过使用优化的碰撞能量和离子驻留时间，tMRM的灵敏度远远高于传统的子离子扫描模式下的灵敏度。

实验部分

样品前处理

样品前处理完全根据 § 6 4 L F G B QuEChERS³进行, 没有进行任何修改。10克匀浆后的生姜用10毫升乙腈提取。对于春黄菊, 样品量减至2克, 样品在提取之前, 用10毫升水稀释。加入硫酸镁、氯化钠和柠檬酸钠, 然后在3000转下离心5分钟。采用分散固相萃取进行样品的净化。6毫升的上清液转移至已经装有900毫克硫酸镁和150毫克PSA的分散SPE管中。对于春黄菊, 还加入45毫克石墨化碳黑。离心之后, 5毫升的上清液中加入50微升5%甲酸的乙腈溶液。

液质分析

仪器

Agilent 1290 Infinity液相色谱/6460三重串联四极杆质谱仪(图1)。

液相色谱分析条件

表1为用于生姜和春黄菊中农残分析的液相色谱的分析条件

质谱条件

表2为质谱分析参数



图1. 安捷伦1290液相色谱系统和6460三重串联四极杆质谱系统

表1. 液相色谱分析条件

液相色谱柱	ZORBAX Eclipse Plus C-18 RRHD column 100 x 2.1 mm, 1.8 μm 柱温 30 °C
流动相	A = 5 mM 甲酸铵水溶液 B = 5 mM 甲酸铵甲醇溶液
梯度条件	5% B维持0.2 min; 后在0.2 min 的时间内B由5%提升至30%; 后在8.3 min 的时间内提升至100%; 维持2.5 min; 后再降至5%维持2 min
流速	0.500 mL/min
进样体积	2 μL

表2. 质谱条件

离子化模式	安捷伦喷射流离子聚焦, 负模式
干燥气温度和流速	7 L/min @ 200 °C
雾化气压力	35 psi
鞘流气温度和流速	12 L/min @ 375 °C
喷嘴电压	+300/-500 V
毛细管电压	+3500/-3000 V
循环时间	500 ms
扫描间延迟	3.5 ms
MRM总数	390
并行MRM的最大数	84
最小离子驻留时间	3.64 ms
最大离子驻留时间	146.5 ms

结果与讨论

上述的液质方法可以分离和检测51种农药。tMRM模式可以允许每个化合物设置10个MRM离子，在本文分析中，对于每个化合物，采用两个主要MRM和最多七个二级MRM离子。图2显示了在最低报告浓度(MRL)下所有农药的总离子流图和提取离子流图。

为了实现一次进样即可采集定性和定量的信息，方法采用了tMRM功能。

第一个目标分析物是春黄菊提取物中的丁噻隆。春黄菊含有与丁噻隆相同保留时间和分子量的内源干扰物。图3显示了两个谱图：左边是浓度为50ppb的丁噻隆，右边是春黄菊空白样品提取物（已知空白样品不含丁噻隆）。数据显示，丁噻隆具有很好的峰形和信号，51个农药全部可以分离，没有发现共流出峰。即使干扰物的保留时间（其保留时间和质量与丁噻隆类似）超过了SANCO的指导范围，但是仍然可能会被误判为丁噻隆。

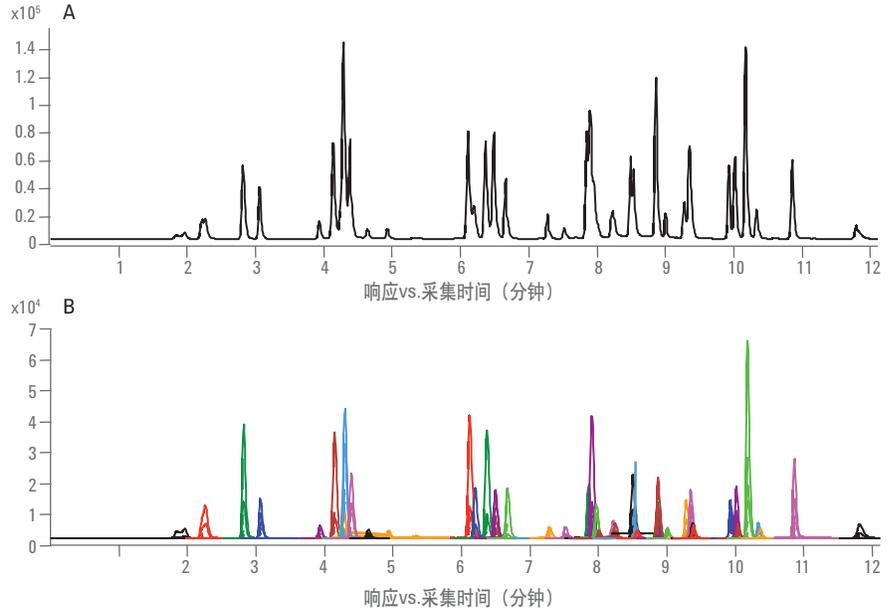


图2. 51种农药在最低报告浓度 (10 ng/mL) 下的总离子流色谱图 (A) 和提取离子流色谱图 (B)

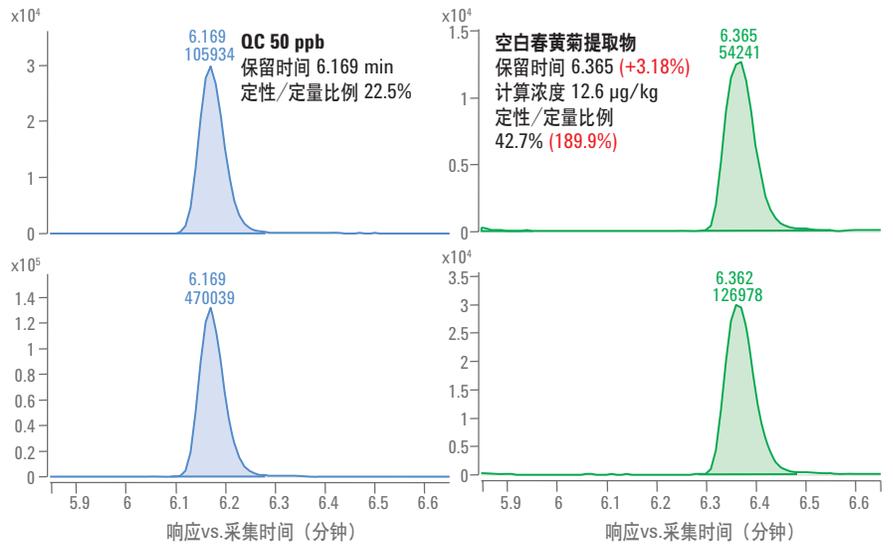


图3. 50 ppb质控标样丁噻隆(左)和空白洋甘菊提取物(右)的主要MRM离子流图。上图代表丁噻隆第一个定性离子($m/z > 116.0$), 下图代表定量离子($m/z > 172.1$)

基质中干扰物的保留时间与丁噻隆标准保留时间相差3.18%(最大允许偏差2.5%),定性/定量的离子比例189.9%(SANCO截取期望值是120%)。而春黄菊提取物中的干扰物与丁噻隆相近,根据SANCO指导标准,将有可能被判定为假阳性。在这种情况下,tMRM分析提供了确认的证据证明基质中的内源干扰物是不是丁噻隆,根据这两个化合物的保留时间差异即可按照SANCO指导标准判定正确结果。

通过谱库检索,tMRM分析可以定性地确认春黄菊中的内源干扰物。此外,tMRM分析可以确认春黄菊中的内源化合物是不是丁噻隆。然而,tMRM除了可以进行定性分析之外,还可以获得三重串联四级杆的高性能定量结果,这一点我们可以利用向空白春黄菊样品中添加丁噻隆的样品进行说明。即使这些化合物彼此间的保留时间非常接近,以及在相邻化合物都启动二级离子采集,空白洋甘菊添加丁噻隆样品

的分析获得了很好地线性校正曲线, R^2 为0.9997(见图4)。

春黄菊样品提取物10ppb加标的5次进样分析的%RSD=0.94。51个农药的春黄菊样品提取物10ppb加标的5次进样分析的%RSD为1.10。本方法的线性和定量重现性都非常好。

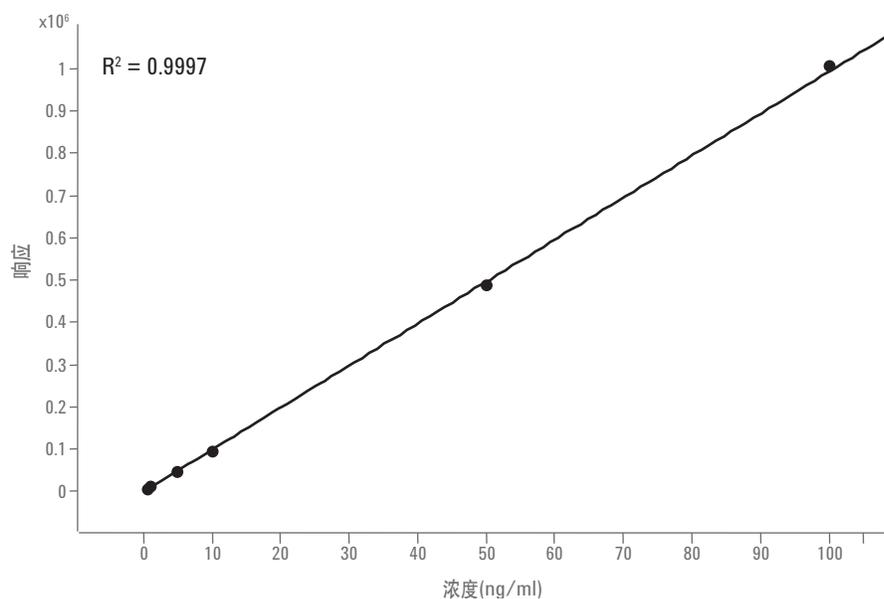


图4. 空白春黄菊样品提取物为基质的丁噻隆的校正曲线,浓度范围为1ppb到100ppb。线性相关系数 R^2 为0.9997

对于生姜提取物中的吡螨胺分析，即使按照SANCO指导标准，如需避免假阳性结果tMRM分析也是至关重要的。图5是浓度为50ppb质控标准品吡螨胺的主要MRM离子(左图)和不含吡螨胺的生姜空白样(右图)的离子流图。

在这种情况下，生姜基质中的内源干扰物(图5中右侧图)保留时间与吡螨胺的保留时间的误差只有0.47%(完全符合法规的要求)。生姜基质中的内源干扰物的定性/定量的比例是吡螨胺的离子比例的123.1%，而SANCO指南的要求是120%。

这个内源干扰物与吡螨胺非常相似，因此传统的分析方法很容易导致假阳性结果。但是，tMRM分析利用谱库匹配获得准确的定性结果。

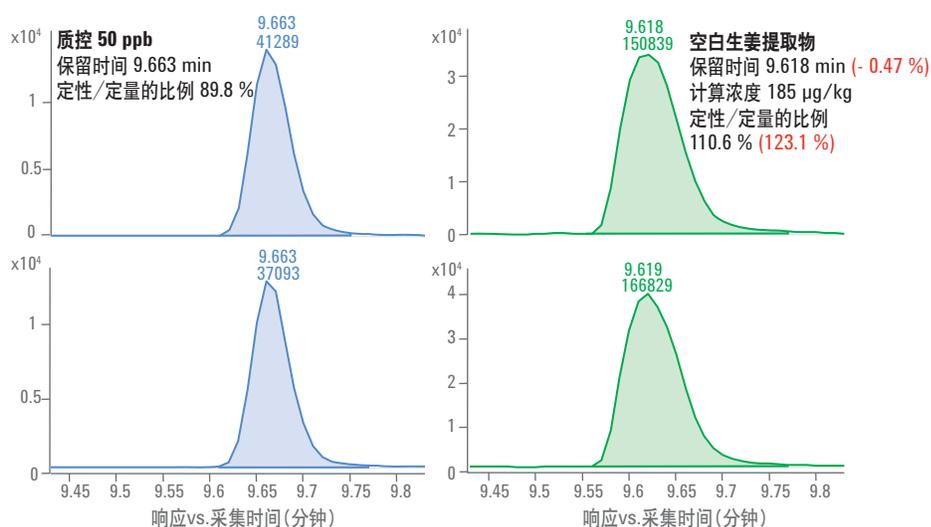


图5. 浓度为50ppb质控标准品的吡螨胺(左图)和生姜提取物(右图)的主要MRM离子流图。上图是吡螨胺的定量离子(m/z 334.1 > 117.1), 下图是第一个定性离子(m/z 334.1 > 145.1)

图6显示生姜样品中内源干扰物与吡螨胺相比具有相似保留时间，定性离子和定量离子。下面的窗口是谱库中的标准谱图，上面的窗口是采集的生姜内源干扰物谱图。中间窗口中的谱图是分析所得谱图与谱库中的谱图比较。在使用传统方法时这种共流出物常常导致假阳性结果，而对于tMRM分析，吡螨胺的很多质谱峰在生姜内源干扰物没有出现。结果，谱库匹配的分值为70.34，满分是100，因此我们可以断定不是吡螨胺。

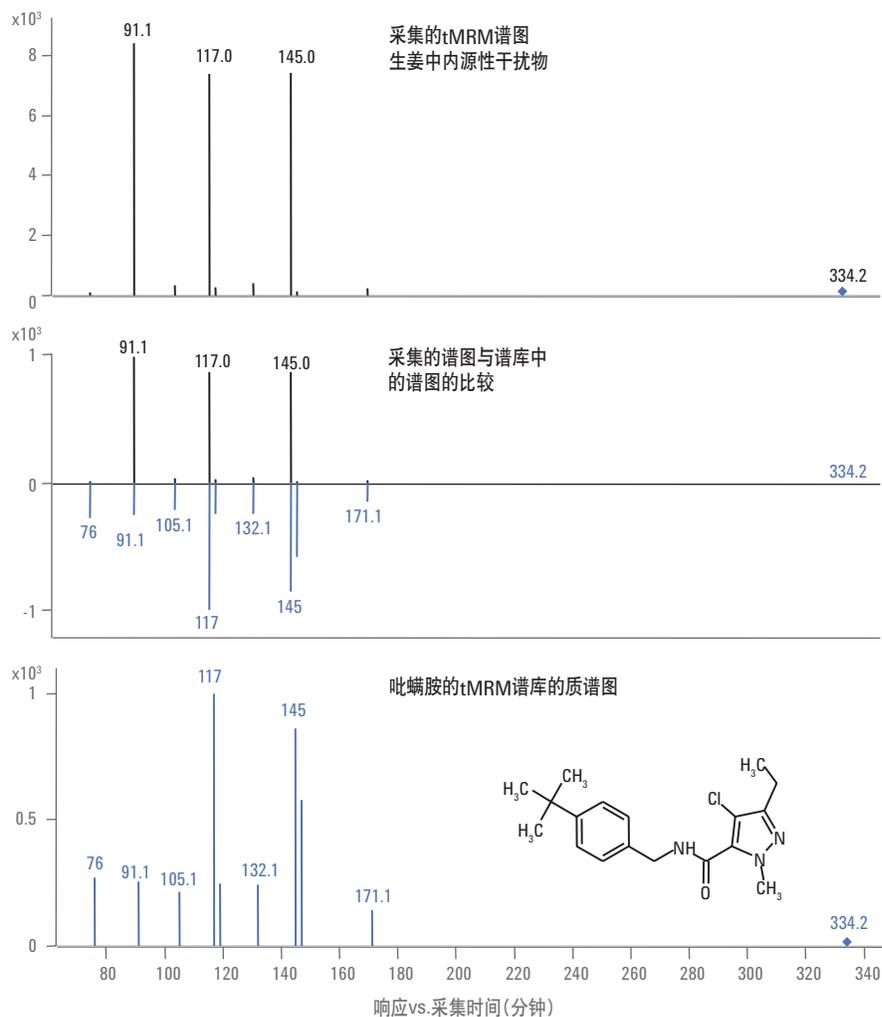


图6. 生姜中内源干扰物在tMRM谱库检索匹配结果，与吡螨胺的匹配分值为70.34，可以判定化合物不是吡螨胺，所以避免了假阳性结果

结论

一次进样，tMRM就可以对春黄菊和生姜提取物中的农药进行准确的定量，并提供可靠的定性结果。丁噻隆和吡螨胺都能与样品基质中的内源性干扰物区分，因而避免了假阳性结果。tMRM采集是一种数据依赖的扫描功能，一次进样分析，即可同时提供定量和定性的数据结果。

参考文献

1. Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC (including amendments as of 18 March 2008).
2. European Guideline SANCO/10684/2009: Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.
3. Official collection of test procedures according to § 64 law on food and animal feed (LFGB), Beuth-Verlag.

www.agilent.com/chem/QQQ:cn

本应用只用于研究目的，不可用于诊断。本文中的信息、描述和指标如有更改，恕不另行通知。

安捷伦不对本文可能存在的错误或由于提供、展示或使用本文所造成的间接损失承担任何责任。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2011
2011年7月20日 中国印刷
5990-8460CHCN



Agilent Technologies