

# 使用 Agilent 6545 Q-TOF LC/MS 系统对复杂食品基质中的 240 种农药进行筛查和定量

## 应用简报

### 作者

Dan-Hui Dorothy Yang、Christian Klein、  
Crystal Cody、Huy Bui  
安捷伦科技有限公司  
Santa Clara, CA 95051

### 摘要

本应用简报介绍了一种 UHPLC/Q-TOF/MS 方法，用于筛查复杂食品基质中的 240 种农药及农药代谢物。该方法获益于使用 Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统获得的更高的色谱分离度以及安捷伦喷射流离子源带来的改进的电离能力。更重要的是，分析物的成功筛查通过 Agilent 6545 Q-TOF LC/MS 系统固有的灵敏度改进和离子传输调谐实现，从而促进易碎裂的有机小分子实现最佳的离子传输。采用靶向 MS/MS 采集进行分析物定量分析和确证。选择红茶基质代表复杂基质，并选择鳄梨基质代表脂类含量高的食品。

结果表明 6545 Q-TOF LC/MS 系统可改善对有机小分子的检测，能够对大多数目标农药进行筛查和定量分析，且定量限低于欧盟委员会法规规定的最大残留限量 (MRL)。



Agilent Technologies

## 前言

食品中的农药残留筛查是食品安全领域最重要且最严苛的应用之一。食品中可能存在 1000 多种农药及农药代谢物。欧盟委员会法规 (EC) 396/2005 及其附录规定了 170000 多种基质-农药组合的最大残留限量 (MRL)<sup>1</sup>。类似的法规也存在于其他地区<sup>2</sup>。在食品安全领域中利用精确质量 LC/MS 能够检测大量的分析物。这对于难以获取化学标准品且开发三重四极杆分析方法非常困难的一些代谢物而言尤其重要。精确质量 LC/MS 方法设置相对简单，且无需了解保留时间或碎裂即可完成设置。这对于商业检测实验室扩展检测范围和提高通量尤其重要。

精确质量 LC/MS 的典型工作流程包括使用质谱领域的数据对法规要求的农药残留进行筛查和定量分析。采用质量准确度、同位素丰度、同位素间隔和加合物模式来验证阳性结果。通常，保留时间也被视作化合物匹配的关键因素。使用完善的个人化合物数据库与谱库 (PCDL) 搜索能够揭示可能的农药残留清单。利用适当的碰撞能量进行碎裂并搜索 PCDL，通过自动或靶向 MS/MS 可进一步确证农药残留。这对于排除复杂基质（如 QuEChERS 萃取液）背景下潜在的假阳性结果至关重要。MS/MS 信息有助于实现更可靠的鉴定。

大多数农药采用多残留分析方法进行分析，该方法涵盖施用于各种食品的数百种化合物。因此，需要采用快速且可靠的分析方法对各种食品基质中的低浓度农药进行鉴定。农药残留的鉴定标准以及定量分析的方法验证和质量控制程序的要求在指南文件（如 SANCO/12571/2013）<sup>3</sup>中有详细说明。

本应用简报介绍了用于筛查和定量分析食品样品中的数百种农药的 UHPLC/QTOF/MS 方法的开发。该方法使用农药全套测试混标（部件号 5190-0551）进行开发。将 Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统与 Agilent 6545 Q-TOF LC/MS 系统联用。在正离子模式下采集数据。与 6545 Q-TOF LC/MS 系统有关的几项改进带来了更高的分析性能。硬件改进包括：

- 新型限幅器设计，可选择在高灵敏度或高分辨率模式下操作
- 新型高性能高压电源，提高了高分子量实体的质量分辨率
- 全新增强型增益位移检测器，具有更长的检测器寿命

更重要的是，粒子群优化技术首次商业化应用于优化质谱仪，使仪器调谐更快速（4 倍）且更稳定。小分子离子传输的改善还提高了 100  $m/z$  以下的质量准确度。相比于上一代 Agilent 6540 Q-TOF LC/MS 系统，信号响应大幅提升了 4 倍。

## 实验部分

### 试剂与化学品

所有试剂和溶剂均为 HPLC 或 LC/MS 级。乙腈和甲醇购自 Honeywell (Morristown, NJ, USA)。超纯水产自配备 LC-Pak Polisher 和 0.22  $\mu\text{m}$  膜式终端过滤器滤芯的 Milli-Q Integral 系统 (EMD Millipore, Billerica, MA, USA)。甲酸购自 Fluka (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)，甲酸铵溶液 (5 M) 来自安捷伦公司（部件号 G1946-85021）。农药包括在安捷伦农药全套测试混标（部件号 5190-0551）中。使用 10 ppm 的农药工作溶液对 QuEChERS 萃取液进行加标并配制校准样品。

### 样品前处理

有机红茶和有机鳄梨购自当地杂货店。使用 Agilent BondElut QuEChERS 试剂盒（部件号 5982-5650）按照官方柠檬酸盐缓冲 QuEChERS 方法对样品进行萃取<sup>4</sup>。称取 10 g 均质鳄梨和 2 g 红茶加入到 50 mL 聚丙烯管中，并在剧烈振摇的同时，用 10 mL 乙腈萃取 1 min。在萃取前，用 8 mL 超纯水将茶叶样品润湿 2 小时。通过分散 SPE 对原萃取液进行净化，采用脂质去除试剂盒（部件号 5982-5158）净化鳄梨萃取液，并采用石墨化炭黑 (GCB)（部件号 5982-5356H）净化红茶萃取液。向最终萃取液中加入六种相关浓度的农药，其浓度分别为 1 ng/g、5 ng/g、10 ng/g、20 ng/g、50 ng/g 和 100 ng/g。进样前配制基质匹配标样，并在较低浓度下测定五个技术重复样本。

## 仪器与软件

采用 Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统进行分离，该系统包括：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 高性能自动进样器 (G4226A) 和样品冷却装置 (G1330B)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)

将该 UHPLC 系统与配备安捷伦双喷射流电喷雾离子源的 Agilent 6545 Q-TOF LC/MS 系统联用。使用 Agilent MassHunter 工作站软件进行数据采集 (B.06.01, 型号 6.01.6145)、定性分析 (B.07.00, 型号 7.0.7024.0) 和定量分析 (B.07.00, 型号 7.0.457.0)。

## 方法

1290 Infinity UHPLC 条件汇总于表 1 中。在正离子模式下进行分析。最终萃取液的进样量为 3 微升。采用代表 240 个群组的 14 种农药的子集对离子源参数进行优化。6545 Q-TOF LC/MS 系统参数总结列于表 2 中。

采用 MassHunter 定性和定量分析软件对数据进行评估。使用二次拟合、1/x 加权且包含原点来生成校准曲线。

表 1. Agilent 1290 UHPLC 参数

参数	值	
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 2.1 × 150 mm, 1.8 μm (部件号 959759-902)	
柱温	45 °C	
进样量	3 μL	
进样器温度	5 °C	
进样针清洗	10 秒 (80% 甲醇/20% 水)	
流动相	MPA: 水, 5 mM 甲酸铵 + 0.1% 甲酸 MPB: 甲醇, 5 mM 甲酸铵 + 0.1% 甲酸	
流速	0.4 mL/min	
梯度程序	时间	% B
	0	5
	1	5
	4	50
	17	100
	20	100
	20.1	5
	停止时间	22 min
	后运行时间	1 min

表 2. Agilent 6545 Q-TOF LC/MS 系统参数

参数	值
模式	正离子；4 GHz 高分辨率
调谐	50-250 m/z
干燥气温度	150 °C
干燥气流速	10 L/min
鞘气温度	375 °C
鞘气流速	11 L/min
雾化器压力	35 psi
毛细管电压	3500 V
喷嘴电压	200 V
碎裂电压	125 V
锥孔电压	45 V
Oct1 RF Vpp	750 V
采集质量数范围	100-1000 m/z (仅 MS)
采集速率	3 幅谱图/秒
参比质量数离子	121.050873, 922.009798

## 结果与讨论

### 全新调谐算法：粒子群优化调谐 (SWARM 调谐)

利用模拟鸟群社会学习行为的人工智能优化算法，按照不同的标准优化质谱仪。传统的自动调谐可产生通用的优化结果，与之不同的是，SWARM 调谐开启了根据应用需求定制仪器优化的新篇章。该算法能够根据用户的选择优化易碎裂的小分子（例如，50–250  $m/z$  和 50–750  $m/z$ ）的离子传输。与硬件改进相结合，该优化显著提高了小分子的信号响应。此外，乙腈-钠加合物可用作额外的校准物，在易碎裂离子调谐状态下改善 50–100  $m/z$  范围内的质量准确度。除 6545 Q-TOF LC/MS 系统的灵敏度和质量准确度得到改善之外，调谐和校准的速度也实现大幅提升。与 6540 Q-TOF LC/MS 系统上传统的自动调谐相比，系统调谐时间缩短至四分之一。这种新算法和方法还使系统能够在两种极性下同时对 TOF 和四极杆进行调谐。

图 1 显示了调谐环境下全新的用户界面。

### Agilent 6545 Q-TOF LC/MS 系统性能

硬件和离子传输调谐方法的改进使 6545 Q-TOF LC/MS 系统在选择高分辨率限幅器位置时，信号响应相比于 6540 Q-TOF LC/MS 系统提高了大约 4 倍。图 2 显示了在 6540 Q-TOF LC/MS 系统和 6545 Q-TOF LC/MS 系统上获得的 10 ppb

噻菌灵的色谱图的叠加。噻菌灵的分子量为 201.3，在  $m/z$  50–250 范围内优化的离子传输进一步改善了信号响应。除噻菌灵以外，此项小型研究中的其他 13 种农药也表现出类似的改善趋势。



图 1. 调谐环境下的用户界面：采用 SWARM 调谐并基于应用需求确定离子传输的最优条件

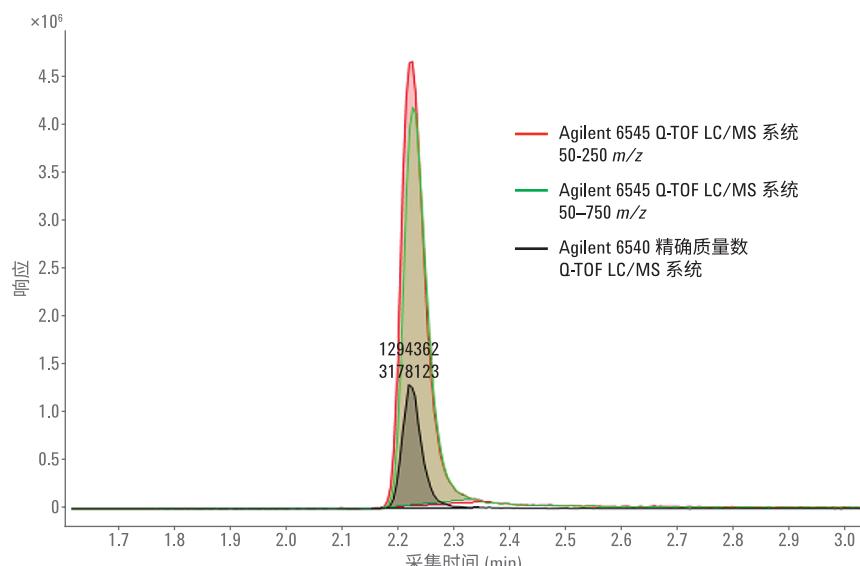


图 2. 溶于乙腈的 10 ppb 噻菌灵在 Agilent 6540 Q-TOF LC/MS 系统和 Agilent 6545 Q-TOF LC/MS 系统上的信号响应的示例性色谱图。与  $m/z$  202.3 处的分析物在 50–750  $m/z$  范围内优化的离子传输相比，50–250  $m/z$  范围内优化的离子传输得到进一步提高

对于 240 种农药，在加标浓度为 10 ng/g 的红茶和鳄梨基质（分别对应于 2 ppb 和 10 ppb）中观察到类似的改善。对于可在这些浓度下检出的化合物，比值取自每台仪器五次重复测定的平均值。直方图如图 3 所示。灵敏度的提高使 6545 Q-TOF LC/MS 系统相比于 6540 Q-TOF LC/MS 系统可鉴定出更多的化合物。红茶基质中加标浓度为 10 ng/g 棉铃威的分析示例如图 4 所示。6540 Q-TOF LC/MS 系统未能检出该化合物。上述结果采用高分辨率限幅器位置获得。采用高灵敏度限幅器位置时，预期的信号响应可以再提高两倍。

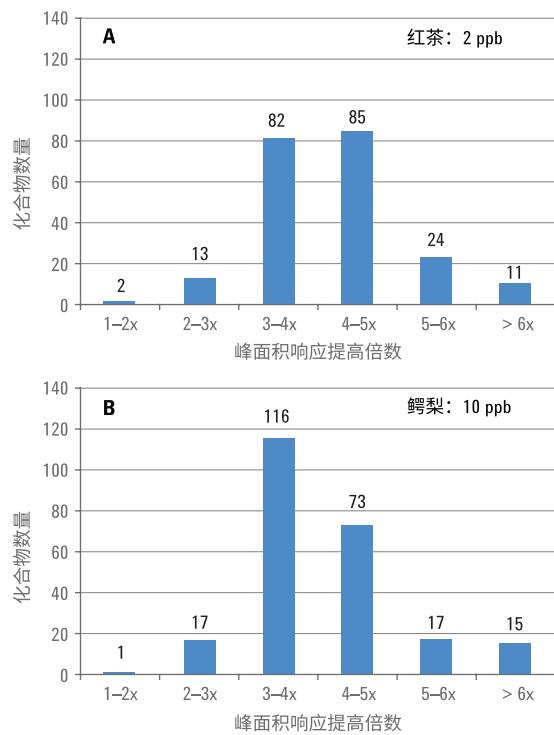


图 3. 红茶和鳄梨基质中约 240 种农药的信号响应改善。Agilent 6545 Q-TOF LC/MS 系统与 Agilent 6540 Q-TOF LC/MS 系统的峰面积响应比值取自每种分析物五次重复测定的平均值。选择高灵敏度限幅器位置时，预期信号响应可以再提高两倍

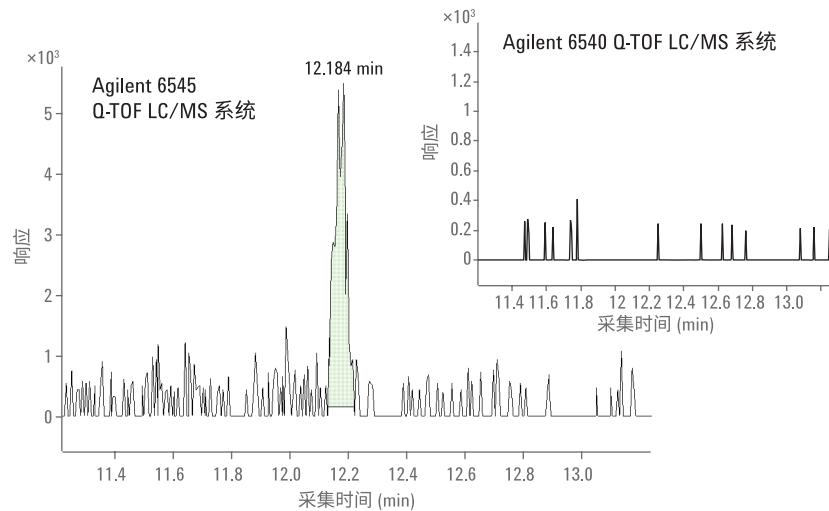


图 4. Agilent 6545 Q-TOF LC/MS 系统灵敏度改善有益于边界处分析物的检测。红茶基质中加标浓度为 10 ng/g 的棉铃威可通过 Agilent 6545 Q-TOF LC/MS 系统检出，但是无法通过 Agilent 6540 Q-TOF LC/MS 系统检出

## 采用分子式查找算法 (FbF) 进行化合物鉴定

包含所有加标农药的 PCDL 由安捷伦农药 PCDL (G3878-60003 MassHunter 个人农药谱库) 生成。在 PCDL 中对基质中的分析物进行 FbF 搜索, FbF 算法的一些参数设置列于表 3 中。软件自动生成准确质量数据库中目标化合物的预期离子形态的提取离子色谱图。提取峰谱图并将测定结果与计算结果进行比较, 基于质量准确度、同位素丰度和同位素间隔生成匹配得分<sup>5</sup>。

图 5 作为示例显示了加标浓度为 10 ng/g 的红茶基质中的杀扑磷 (其对应于 2 ppb) 的色谱图和峰谱图。红茶作为最复杂的基质之一, 其中所含的化合物在如此低的浓度下获得了优异的信噪比 (S/N)。质子加合物和铵加合物获得了出色的匹配得分, 高达基质中共洗脱背景离子的 400-500 倍。因此,  $\text{H}^+$  加合物的总得分为 99.66 (满分 100), 其中质量准确度得分 99.81 (满分 100), 同位素丰度得分 99.74 (满分 100), 同位素间隔得分 99.26 (满分 100); 且铵加合物的总得分为 97.36 (满分 100), 其中质量准确度得分 99.29 (满分 100), 同位素丰度得分 94 (满分 100), 同位素间隔得分 97.52 (满分 100)。大部分离子形态的质量误差较低, 因此大多数分析物的匹配得分均高于 90 (满分 100)。

表 3. FbF 数据挖掘的参数设置

参数	值
提取数据文件	色谱和谱图提取分析
带电状态	1
同位素模型	常见有机分子
PCDL	G3878CA 子集
加合物	$[\text{M}+\text{H}]^+$ , $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ , $[\text{M}+\text{Na}]^+$
质量容差	6 ppm
保留时间窗口	0.5 min
质量准确度加权因子	100
同位素丰度加权因子	60
同位素间隔加权因子	50

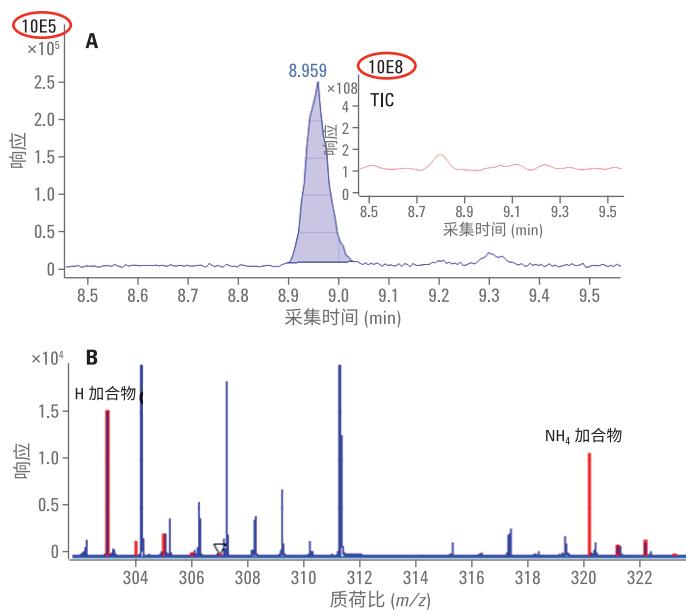


图 5. 红茶 QuEChERS 萃取液中加标浓度为 10 ng/g 的杀扑磷通过 FbF 算法得到的化合物色谱图和峰谱图。即使存在 400-500 倍的共洗脱背景离子, 该化合物也可得到高度可靠的鉴定

可使用质谱领域的数据获得加标农药的定量信息。定量分析方法的最佳离子来源于在纯溶剂中使用 20 ppb 农药通过 MassHunter 定性分析软件所提取的化合物结果。结果导出为用于定量分析的化合物交换文件 (.cef)。基于相对丰度从观察到的加合物形态和同位素信号中自动选择定量离子和定性离子。除克螨特以外，鳄梨基质中加标浓度为 10 ng/g 的所有农药均能够检出，而克螨特以较高浓度存在于纯溶剂中时仍无法检出，可能由于发生了降解。由于浓度降低了 5 倍且存在严重的基质效应，我们无法检出红茶中 20 种浓度为 10 ng/g 的化合物。然而，6545 Q-TOF LC/MS 系统改善的灵敏度仍可在 1 ng/g (对应于 0.2 ppb) 的加标浓度下检出红茶基质中约 70% 的分析物。在不同加标浓度下检出的化合物数量如图 6 所示。

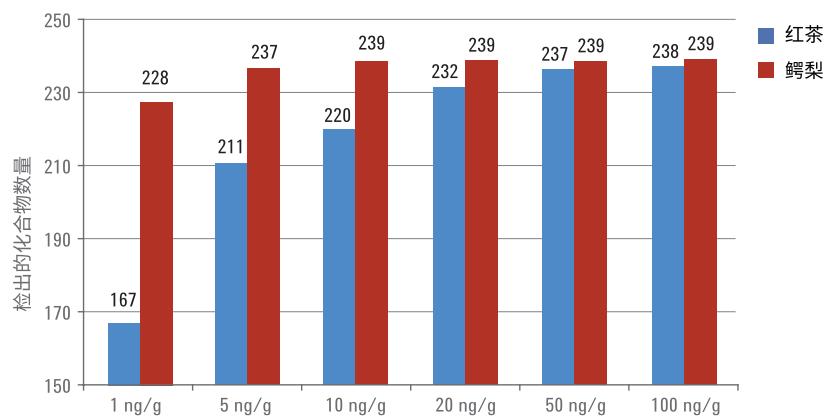


图 6. 在每种加标浓度下，从红茶和鳄梨基质中检出的的化合物数量。Agilent 6545 Q-TOF LC/MS 系统的灵敏度改善使更多化合物得以检出

## 利用靶向 MS/MS 进行定量分析和确证

靶向 MS/MS 是一种重要的数据采集功能，适用于分析物定量分析以及通过比较碎裂模式与数据库和谱库进行结构确证。需要了解特定离子形态的保留时间才可设置采集方法。保留时间从质谱领域的数据中获取，而质谱领域的数据可通过 Agilent MassHunter 定性分析软件提取得到。保留时间窗口 ( $\Delta$  RT) 设置为 1 min。从 MS/MS 谱

图中排除参比离子。MS 的采集速率为 15 幅谱图/秒，MS/MS 的采集速率为 12 幅谱图/秒。根据目标离子的分子量不同，将碰撞能量设置为  $4 + 6 \times$  质量数/100 的线性回归结果。从而，应用  $\pm 20$  eV 的碰撞能量搜索过滤器，将测得的谱图与具有相似碰撞能量的谱库条目进行比较。红茶基质中的大多数化合物通过反向匹配在等于或低于 MRL 的浓度下实现确证和定量。在质谱领域检出的大多数化合物

可通过靶向 MS/MS 进行检测。图 7 显示了加标浓度为 10 ng/g 的红茶基质中的溴谷隆（上图）和鳄梨基质中的乐果（下图）的校准曲线和谱库匹配结果。预计在基质存在下得到的实测 MS/MS 谱图的噪音将高于在相对较高浓度的纯溶剂中采集得到的谱库谱图。在 MassHunter 定量分析中，用户可通过 PCDL 设置参比谱库，或通过化合物交换文件在相同的 LC/MS 条件下使用纯溶剂中的标准品。

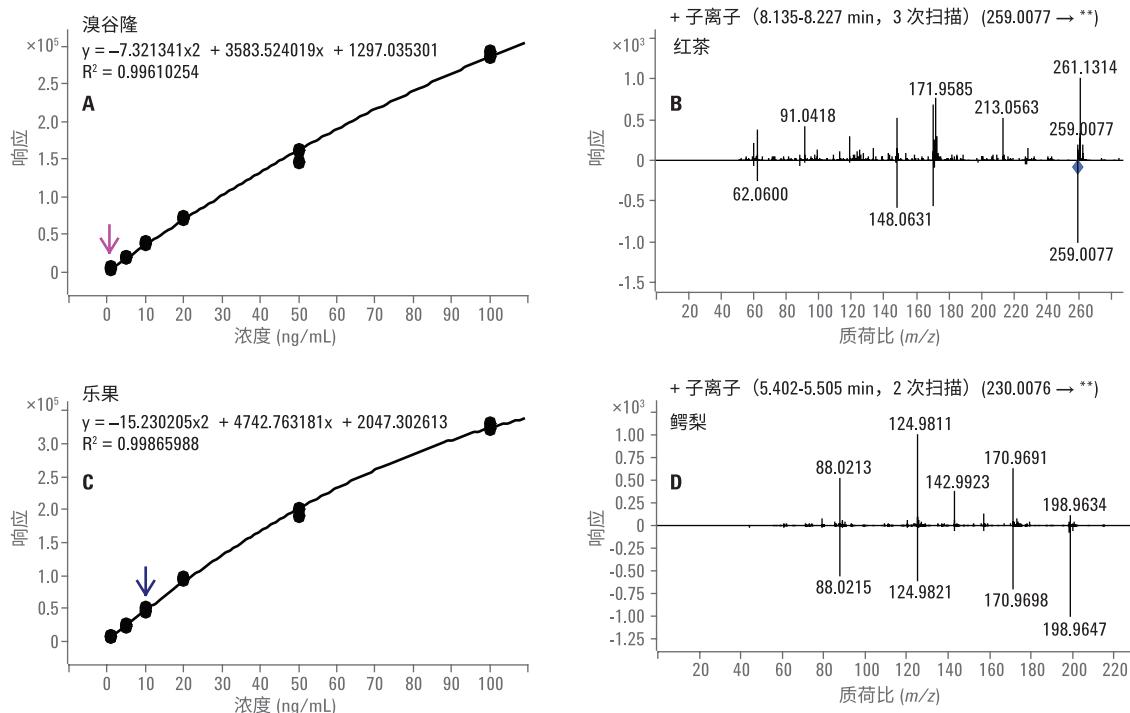


图 7. 靶向 MS/MS 可通过比较碎片离子与 PCDL 谱图对农药进行定量分析并确证其结构。质谱领域检出的大多数化合物均可通过靶向 MS/MS 进行定量分析。加标浓度为 10 ng/g 的红茶中的溴谷隆（上图）和鳄梨中的乐果（下图）作为示例示出

## 利用自动 MS/MS 进行结构确证

自动 MS/MS 是常用于非靶向分析的一项功能。在农药筛查中，为消除红茶和鳄梨等复杂基质中的假阳性结果，需要进行进一步结构确证。通过比较实测 MS/MS 谱图与谱库谱图进行化合物确证。应谨慎设置自动 MS/MS 方法。有时，需要采用优选离子列表消除基质干扰并获得有意义的 MS/MS 谱图。离子形态及相关保留时间可以从 MassHunter 定性分析软件的质谱领域数据中导入。自动 MS/MS 相比于靶向 MS/MS 的优势在于，如果更多的样品中所存在的分析物被更新至谱库中，则自动 MS/MS 能够进行回顾性的数据挖掘。采集通常仅持续 2–3 个循环，即可获得更高的化合物覆盖率。因此，不建议采用自动 MS/MS 进行分析物定量分析。图 8 中显示了与加标浓度为 10 ng/g 的红茶中的毒虫畏 (II) 和鳄梨中的乙霉威的结构确证有关的两个示例。

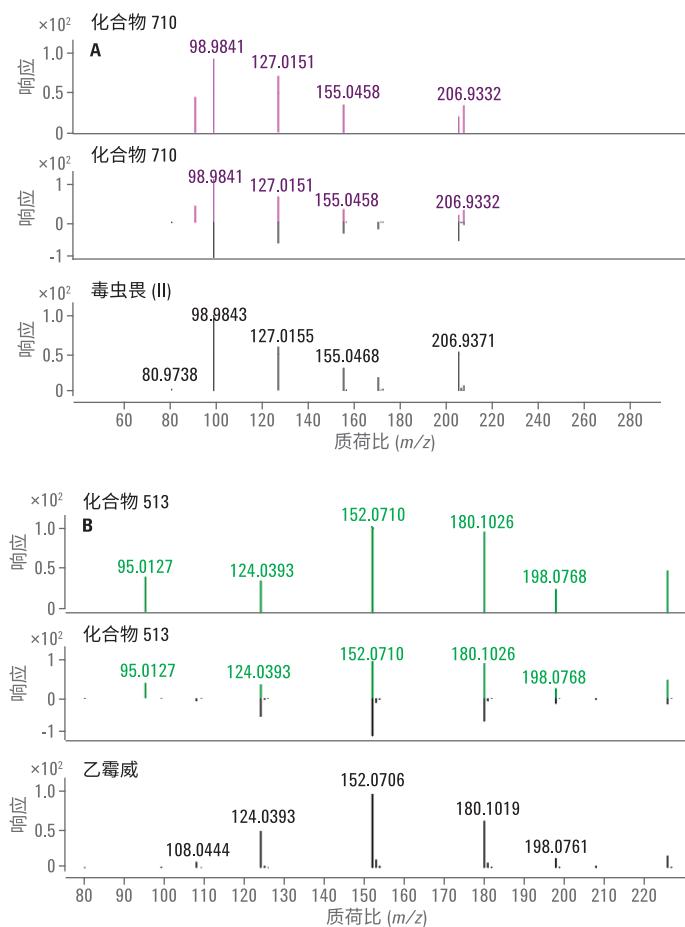


图 8. 自动 MS/MS 通过比较测定谱图与谱库谱图实现结构确证。该示例显示了红茶中的 10 ng/g 毒虫畏 (II) (A) 和鳄梨中的 10 ng/g 乙霉威 (B)

## 结论

Agilent 6545 Q-TOF LC/MS 系统是应用市场领域产品系列的重要补充，对于易碎裂的有机分子具有更高的灵敏度和更好的离子传输调谐。本研究表明复杂基质中的大多数农药及农药代谢物能够以远低于 MRL 的浓度检出。该方法可轻松扩展至更多分析物的筛查和定量分析。其可以帮助实验室扩展检测规模并提高分析通量。安捷伦全套解决方案包括完善的试剂盒、UHPLC/MS、PCDL 以及 MassHunter 定性/定量分析软件，使我们能够针对终端用户进行方法开发和验证。

## 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 (including amendments as of 18 March 2008) and complying with regulation (EC) 1107/2009
2. US Regulation 40 CFR part 180 Tolerance Information for Pesticide Chemicals in Food and Feed Commodities
3. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document N° SANCO/12571/2013. Implemented by 01/01/2014. [http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance\\_Sanco\\_2013\\_12571.pdf](http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2013_12571.pdf)
4. Zhao, L; Stevens, J, 采用 Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 试剂盒测定菠菜中农药残留的 LC/MS/MS 分析, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5990-4248CHCN, 2012
5. Kempe, G; Spitzbarth, F; Glauner, T. Development and Application of an Exact Mass LC/MS/MS Library for the Accurate Mass Screening and Quantitation of Pesticides in Fruits and Vegetables (用于对水果和蔬菜中的农药进行精确质量筛查及定量分析的精确质量 LC/MS/MS 谱库的开发与应用), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-2227EN, 2013

查找当地的安捷伦客户中心：

**[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)**

在线询价：

**[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)**

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

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, 2015  
2015 年 1 月 23 日, 中国出版  
5991-5485CHCN



**Agilent Technologies**