

液相色谱/四极杆-飞行时间串联质谱仪(Q-TOF)用于草莓中非目标农药残留的筛查和确认

应用报告

食品安全

作者

Chin-Kai Meng and Jerry Zweigenbaum
Agilent Technologies Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, Delaware 19808
USA

Peter Fürst and Eva Blanke
Chemisches Landes- und Staatliches
Veterinäruntersuchungsamt
Joseph-König-Straße 40, D-48147
Münster, Germany

摘要

本应用报导了利用水果提取物进行非目标农药残留化合物快速扫描和确认分析的流程。使用液相色谱/电喷雾-四极杆-飞行时间串联质谱仪(Q-TOF)、安捷伦 Masshunter 软件特有的分子特征提取软件(MFE)、及含 600 种农药的数据库对草莓提取物中的农药进行快速筛查和确认。利用分子特征提取检测和识别的每个离子的精确质量与农药数据库的精确质量进行比较。阳性样品的组分再用二级质谱进行结构确认。



Agilent Technologies

前言

随着食品工业的国际化，各国和地区政府对食品安全法规的要求越来越严格。美国已有 1000 多种注册农药。但是，美国环保署 (EPA) 和食品药品监督管理局 (FDA) 对大约 400 种农药设定了限量。由于欧盟具备严格的食品农药法规，所以在欧盟，需要对食品和动物饲料中 1100 多种农药进行监测。而日本对 500 多种农药设定了最大残留限量[1]。公众的关注和法规的要求使得食品中农残的数据信息的需要大大增加。这包括分析工作者研究的目标农药和分析工作者无法预期的非目标农药。

LC/MS/MS 技术将液相色谱仪 (LC) 与三重串联四极杆液质联用仪 (LC/QQQ) 串联在一起，是食品中目标化合物分析的最佳手段。这种技术具有高选择性和高灵敏度，充分证明是分析复杂基质样品中痕量目标化合物的快速而耐用的方法。现在作为 LC/MS/MS 的补充，四极杆-飞行时间液质联用仪 (Q-TOF) 用于快速筛查食品中痕量非目标农药变得切实可行。

三重串联四极杆液质联用仪 (LC/QQQ) 利用多反应监测 (MRM) 基本上能去除复杂基质中的化学背景。然而，单四极杆和三重串联四极杆液质联用仪因为两个原因不适用于非目标化合物的检测。未知化合物的分析需要全扫描模式，但是四极杆的全扫描灵敏度较低。在全扫描模式下，单四极杆和三重串联四极杆液质联用系统不具备通过的多反应模式 (MRM) 方法获得的选择性。如果没有高选择性，被分析物的特征离子色谱峰会被化学背景噪音掩盖。另外由于每个品牌的液质之间很难实现碰撞能量的标准化和重现性，所以无法提供通用的液质标准谱库。相反，四极杆-飞行时间串联质谱 (Q-TOF) 能够采集精确质量数质谱图，因此它具有高选择性和高灵敏度。

90 年代中期推出的液相色谱/四极杆-飞行时间串联质谱仪 (LC/Q-TOF) 在结构上与三重串联四极杆液质联用仪 (LC/QQQ) 有些相似，只是第三个四极杆被换成可以产生精确质量数的飞行时间质量分析器。这种设计由于其高分辨率和精确质量数可以提供出色的选择性[2,3,4]。本应用所采用的安捷伦 6510 液相色谱四极杆-飞行时间串联质谱仪 (Q-TOF LC/MS)，对于小分子检测的质量精确度小于 2 ppm。利用此性能，用户可以检测出质量数差异及其微小的组分。因为分子式可以得出准确质量数或理论值，由四极杆-飞行时间串联质谱仪 (Q-TOF) 上得到的精确质量数可以使您快速获得一个或少数几个可能的分子式。除此之外，同位素分布可以进

一步确认。与质谱碎片指纹图不同，准确质量数计算出的分子式可以更快速而方便地进行检索匹配。

为了进一步地确证鉴别分析，可以使用四极杆-飞行时间串联质谱 (Q-TOF) 的碰撞诱导解离模式 (CID) 对化合物进行进一步分析。通过二级质谱碎片质谱图与化合物结构的分析比对可以进一步对推断出的化合物进行确认。母离子和子离子的准确质量数和同位素分布可以与参比化合物的质谱数据进行比较。如果结果可用，可以用相应的对照品在同样的条件下进行最终的确认。

安捷伦 6510 液相色谱四极杆-飞行时间串联质谱系统 (Q-TOF LC/MS) 几种独特的技术特性使其具备小于 2 ppm 的质量精确度。它具有全自动的参比离子导入及校正。安捷伦 6510 Q-TOF LC/MS 系统通过使用内标参比质量校正调节运行条件的变化。内标校正的工作过程是将两个已知质量的化合物不断导入 Q-TOF 离子源产生离子。质谱工作站软件可以自动地对每一张质谱图进行质量校正。

第二个特性是安捷伦的 Q-TOF 采用模拟-数字转换器 (ADC) 代替时间数字转换 (TDC) 进行数据采集。传统时间-数字转换 (TDC) 只记录那些其强度超过阈值的离子信号，这种模式的局限在于无论是一个离子或是多个离子信号，其响应一样。因此，TDC 方法无法在宽的动态范围内保持质量的精确度。模拟-数字转换 (ADC) 技术可以产生连续的数字信号代表检测器信号且可以提供三个数量级的动态范围，因此使用户可以同时检测高浓度和浓度的组分[5]。

6510 Q-TOF LC/MS 系统的另一个优点是温度稳定性。此模块的飞行管采用的是热扩散系数极低的合金材料。这种设计有效地避免了温度波动对质量精确度的影响，所以可以实现 1-2 ppm 的质量精确度[5]。

使用确定的二级质谱数据，出色的一级和二级质谱的质量精确度可以助您同时完成上千个化合物的同时扫描[6]，这样产生的数据的数量和复杂性非常重要。因此需要功能强大的软件工具有效地进行数据输出。安捷伦的分子特征提取 (MFE) 算法通过自动寻找低至最低浓度水平的所有样品组分，提取相关的色谱和质谱信息而大大缩短了数据处理时间[6,7]。除此之外，专利的分子式生成计算软件 (MFG) 采用多维的信息导出和计算可能的分子式的列表，实现可靠性高的未知物鉴定。通过使用加合离子和其同位素的精确质量，分子式生成计算软件 (MFG) 减少了假阳性分子式的数量 [6]。

扫描和确认的工作流程

本应用报告以草莓提取物为例介绍了食品中非目标农药“扫描和鉴定”的分析流程。首先是将等体积的样品提取物溶液注入到液相色谱四极杆-飞行时间串联质谱系统(Q-TOF LC/MS)中。样品组分经过色谱柱的分离进入到质谱的离子源中而被离子化,然后通过第一个四极杆到达不带碰撞诱导解离模式(CID)的飞行时间质量分析器。结果数据文件利用分子特征提取(MFE)去除了多余的背景噪音和不相关离子。分子特征提取(MFE)通过呈现出的全部飞行时间质谱数据计算出所有可能的组分并将其列表。然后利用精确质量数据库进行数据的检索,鉴别数据文件中的农药。

为了确认发现的可能农药化合物,采用“目标 MS/MS”方法逐一对分子特征提取并经过数据库检索得到的农药组分进行进一步的确认分析。该方法输入每个目标分析物的保留时间和母离子。方法设定完成之后,再进行一次样品进行目标二级质谱分析。在这次分析中,利用分子式生成(MFG)工具,将获得精确质量离子的分子式计算出来。确认分析不仅包括精确质量和保留时间,而且还包括碎片指纹和同位素分布。图 1 是“扫描和确认”分析的流程图。

实验

液质联用仪

- Agilent 1200 系列高分离度快速分离液相色谱系统包括:
 - Agilent 1200 系列 SL 型二元泵及脱气机
 - Agilent 1200 系列 SL 型高性能自动进样器(ALS SL)
 - Agilent 1200 系列柱温箱配件(TCC)
 - Agilent 1200 系列 SL 型二极管阵列检测器(DAD SL) – 用于方法开发和故障诊断
- 安捷伦 6510 型精确质量数四极杆-飞行时间串联质谱仪
- 色谱柱: 2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm ZORBAX Eclipse Plus C18, RRHT, 600 bar (部件号, 959764-902)

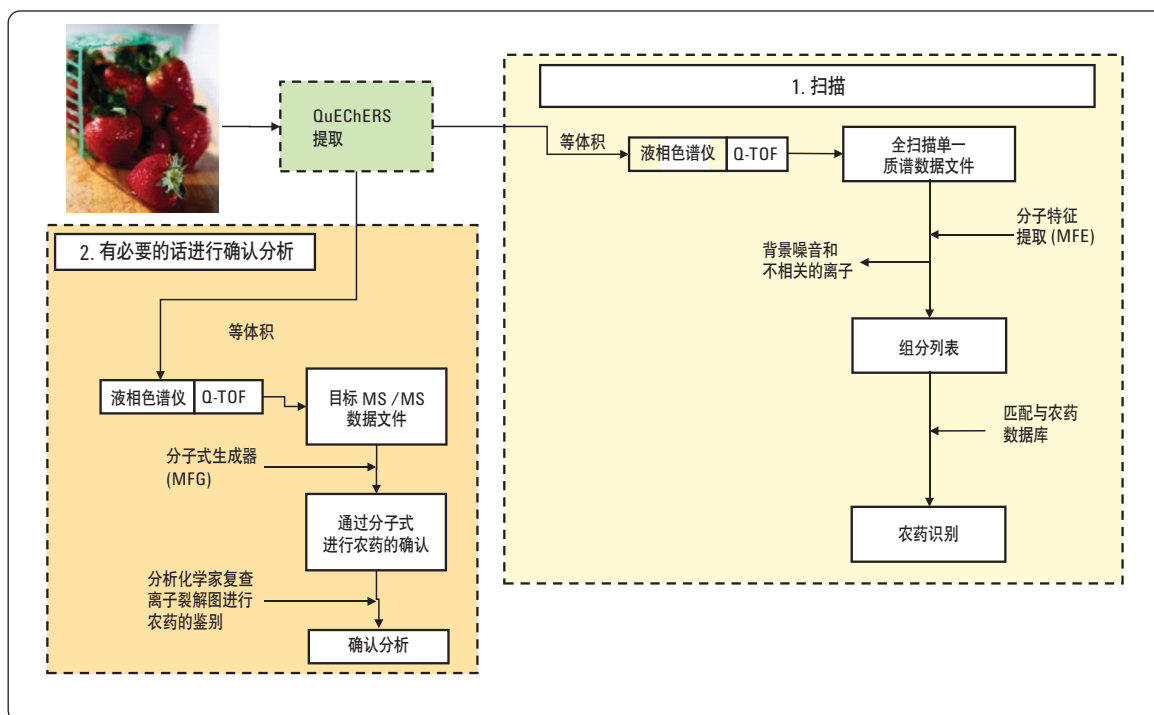


图 1. 扫描和确认-液相色谱/四极杆-飞行时间串联质谱仪和软件的工作流程

QuEChERS 样品前处理方法

QuEChERS 是一种样品前处理方法的缩写，它代表快速、简便、经济、高效、耐用和安全。它是一种被广泛接受的方法，应用于食品中农药残留的快速提取。

提取：

- 在进行样品的研磨之前，将样品切成小块，袋装冷冻过夜。在研磨期间需要加入干冰
- 称 10 g 已经研磨好的样品放入到 50 mL 的特氟隆离心管中
- 加入 10 mL 乙腈（和内标溶液，如果需要的话）
- 加 4 g 无水硫酸镁、1 g 氯化钠、1 g 脱水柠檬酸钠和 0.5 g 水合柠檬酸氢二钠到离心管中
- 用 5N 的氢氧化钠溶液调节 pH 至 5 -5.5
- 使用旋涡振荡器最大速度或手摇将样品剧烈震荡 1 分钟
- 样品离心管在 3000 转下离心 5 分钟

净化：

- 取 6 mL 上清液倒入 12 mL 含有 150 mg PSA 和 900 mg 硫酸镁的聚丙烯离心管中
- 震荡 30 秒
- 在 3000 转下离心 5 分钟
- 如果必要的话，将干净的提取液的 pH 值调至 5.0

液相色谱(1200) 和质谱(6510 四极杆-飞行时间串联质谱仪)参数

液相色谱和质谱在以下条件操作：

流速	0.3 mL/min
进样量	10 μ L
流动相 A	0.1% 甲酸的水溶液
流动相 B	100% 乙腈
梯度(min)	流动相 B
0	10%
20	95%
25	95%
离子源	ESI
干燥气温度	325 $^{\circ}$ C
干燥气流速	10 L/min
雾化器压力	50 psi
毛细管电压	4000 V
碰撞电压	175 V
内标参比离子	121.050873 与 922.009798
采集模式	MS1
最小扫描范围	100
最大扫描范围	1000
扫描速度	1
采集模式	串联 MS/MS
最小扫描范围	100
最大扫描范围	1000
全扫描速度	1.4
二级质谱最小扫描范围	100
二级质谱最大扫描范围	1000
二级质谱扫描速度	0.7
质谱间最大时间	
Max Time Between MS	10
随质量数自动调整碰撞能量(Varied Collision Energy with Mass)	
斜率(Slope)	5
偏置(Offset)	5

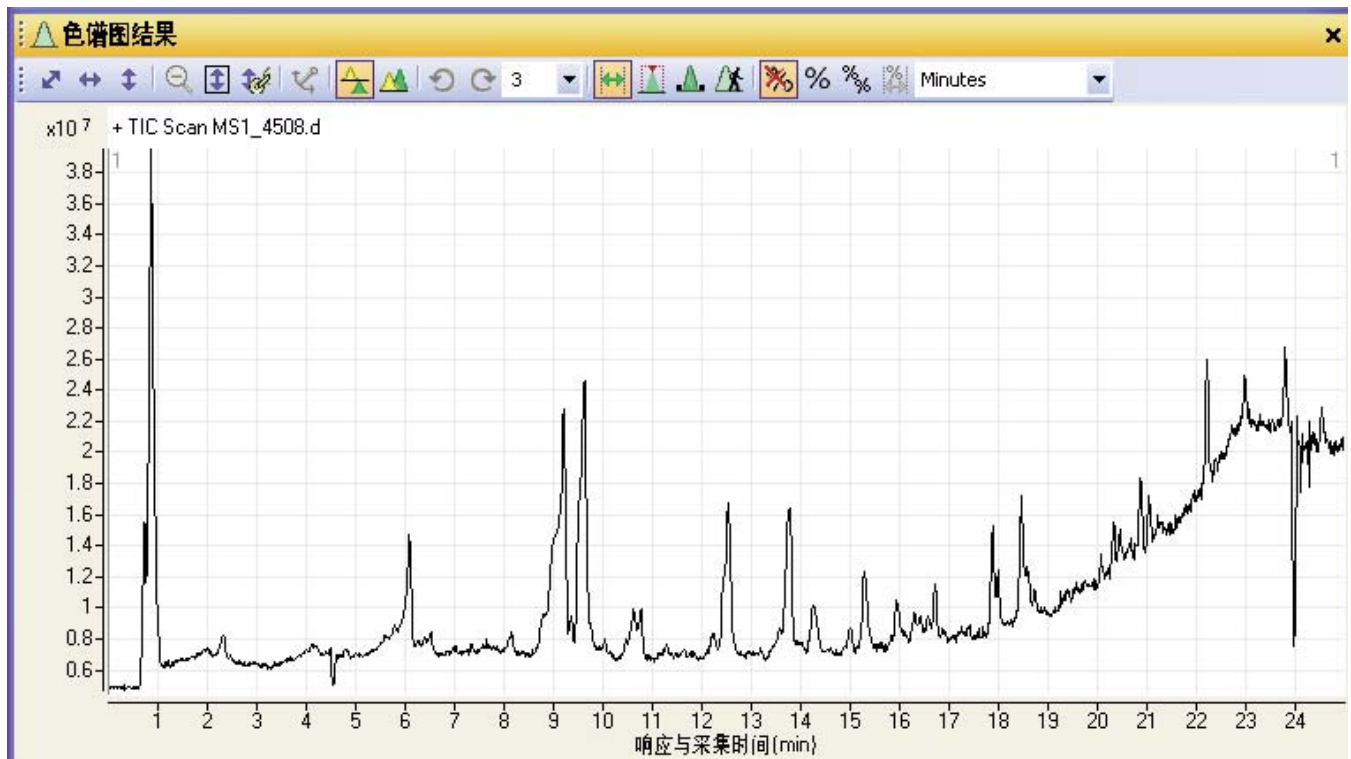


图2. 草莓样品的乙腈提取物的全扫描质谱图

Method Editor: Find Compounds by Molecular Feature

Method Items
📄 🖨

Extraction
Ion Species
Charge State
Compound Filters
Mass Filters
Mass Defect
Results

提取	峰组分过滤器：使用峰高 ≥ 1000 的峰为阈值
离子种类	正离子：H, Na, K, NH_4
价态	峰间隔阈值：0.0025 质核比, 外加 7.0 ppm
	价态的最大值为 1
化合物过滤器	峰的相对高度 $\geq 0.2\%$
质谱过滤器	无
质量亏损(mass defect)	没有使用过滤器
结果	去除之前化合物
	强调所有的化合物

图3. 用于草莓提取物中农药扫描分析的分子特征提取计算的方法编辑菜单及参数设置

结果与讨论

利用 QuEChERS 样品前处理步骤和工作流程里的方法, 使用乙腈对草莓样品进行了提取。全扫描质谱图(MS1 模式)见图 2.利用 MassHunter 质谱工作站中的分子特征提取功能进行数据处理以发现可能的化合物。分子特征提取的目的是找出数据中代表组分化合物的所有离子[7]。图 3 为分子特征提取方法界面和用于草莓分析的参数设置。

分子特征提取产生了 822 个可能的组分峰。图 4 是总离子流图, 超级链接的组分提取色谱图(ECC), 以及每个组分的质谱图。组分提取离子图(ECC)包含了所有组分的离子但是噪音离子则已经被去除。

每一个化合物组分的精确质量可以用含 600 个农药¹的化合物数据库进行检索。检索的参数设置参见图 5 中。822 个组分中发现有 26 个与数据库中农药质谱图匹配(阈值是 3 ppm)。其中发现三

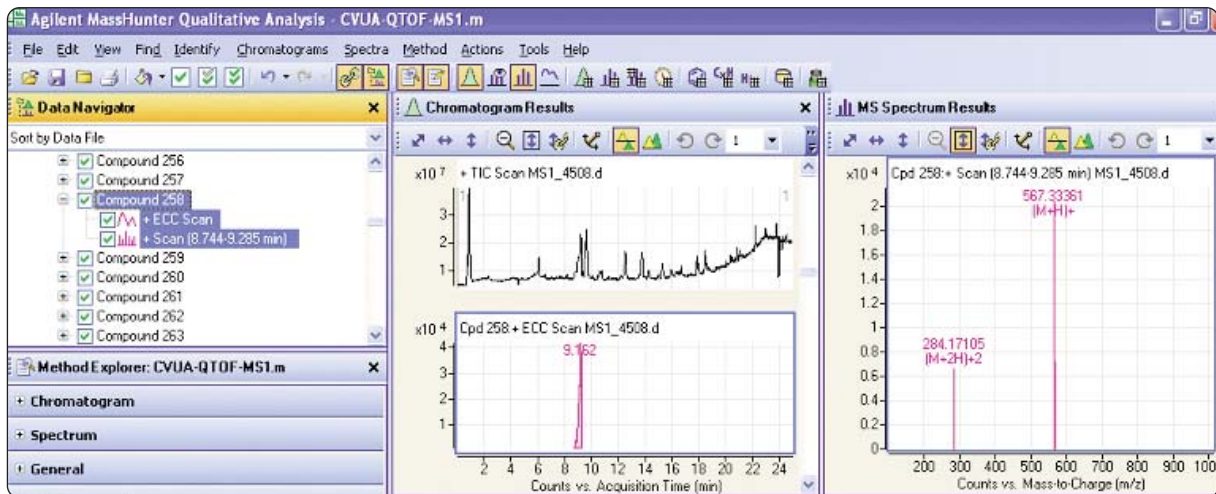


图 4. 用分子特征提取软件处理总离子流图之后得到的提取色谱图和质谱图

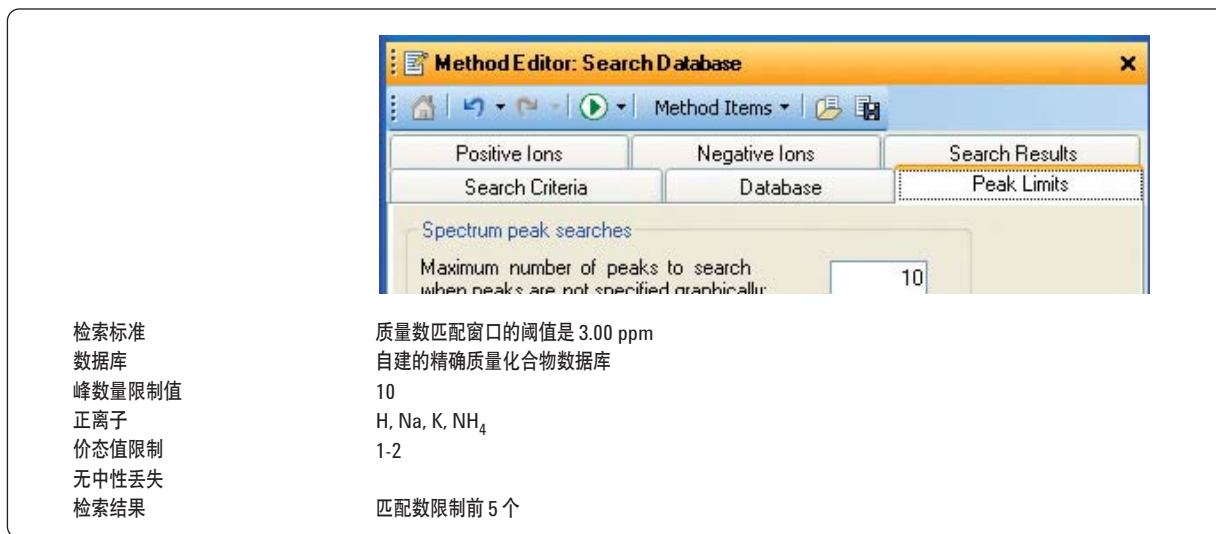


图 5. 精确质量数据库检索菜单界面和参数设置

¹ A 含 1600 农药的 Mass Hunter 个人农药数据库 (G6854AA)可用于精确质量数检索

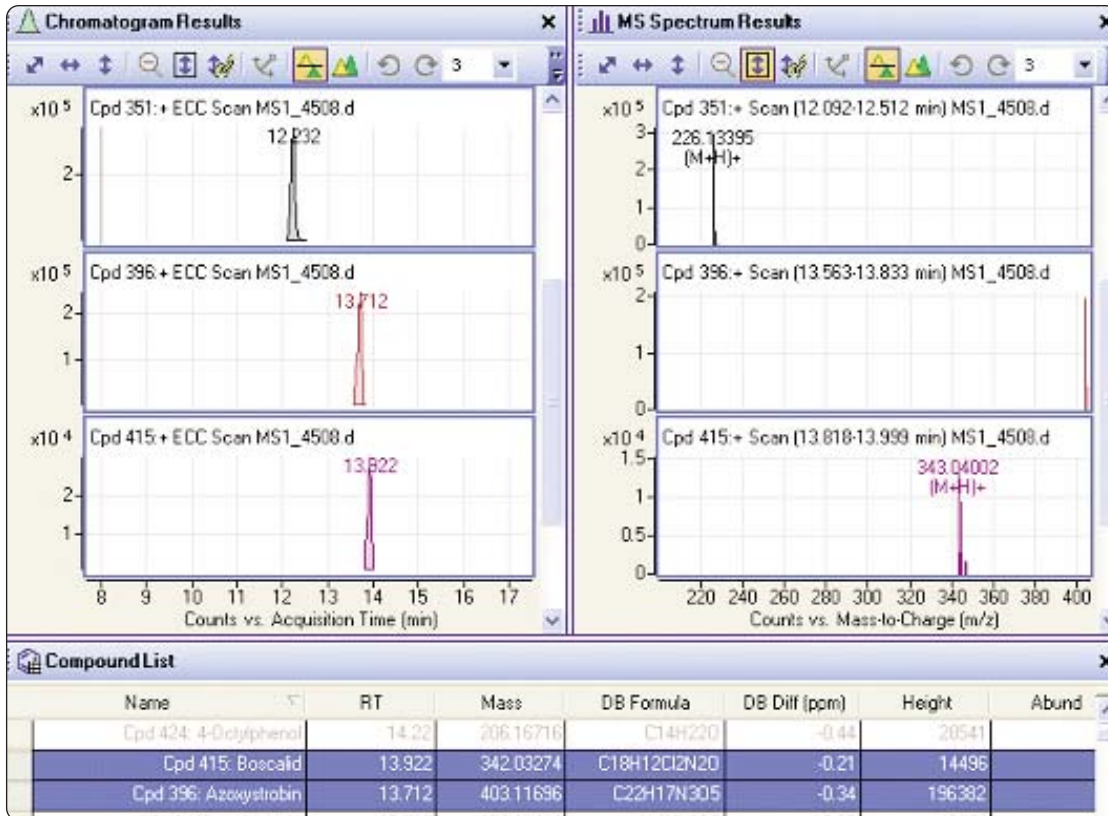


图 6. 草莓提取中三个检出农药啮菌环胺、啮菌酯和啮菌胺的提取离子流图和质谱图以及精确质量数据库检索结果（部分结果显示）

积分器

MS/MS 积分器

数据处理

最大的色谱峰宽是 0.25 min

化合物总离子流图中组分峰过滤器

基于峰面积的过滤器

阈值（峰高）：强度最大的前 10 个峰

组分峰的质谱图

包含平均扫描 > 10%峰高的质谱图

如果超出 40.0%的饱和则排除该处的飞行时间质谱图

二级质谱组分峰谱图背景：无

结果

去除之前的化合物

突出所有的化合物

提取 MS/MS 离子流图

提取 MS/MS 质谱图

图 7. “利用目标 MS/MS 分析发现化合物”的软件参数设置

个似合理的精确质量匹配化合物，嘧菌环胺、嘧菌酯和啶酰菌胺，然后用相同仪器的 MS/MS 模式 (TOF) 进行进一步的分析确认。提取离子流图和每个化合物的质谱图参见图 6，其中包括数据库检索结果，结果显示实验结果数据与数据库数据相差小于 1 ppm。在草莓提取物样品中，用于 MS/MS 分析的母离子 $[(M + H)^+]$ 分别是 226.13395, 404.12410 和 343.03995，其对应的化合物是嘧菌环胺，嘧菌酯和啶酰菌胺。对二级质谱图的检索的参数设置参见图 7。使用精确质量数的二级质谱的碎片离子，可以计算出相应的分子式。

嘧菌酯的确认分析将在下面的举例中进一步讨论。如图 8 所示，利用目标 MS/MS 分析得到最佳匹配 (质量精确度 0.26 ppm 及同位素分布) 的分子式为 $C_{22}H_{17}N_3O_5$ ，是嘧菌酯。当和预期的分子式 $C_{22}H_{17}N_3O_5$ 的碎片离子质量数比较，发现这个峰的两个相关碎片质量相差不到 1 ppm (0.31 和 0.2 ppm)。另外，该分子离子峰的三个同位素质量数相差也都小于 1 ppm。图 8 中列出了这三个同位素的同位素测量值与理论值的结果非常匹配。图 9 中的长方形方框表示同位素的理论值。

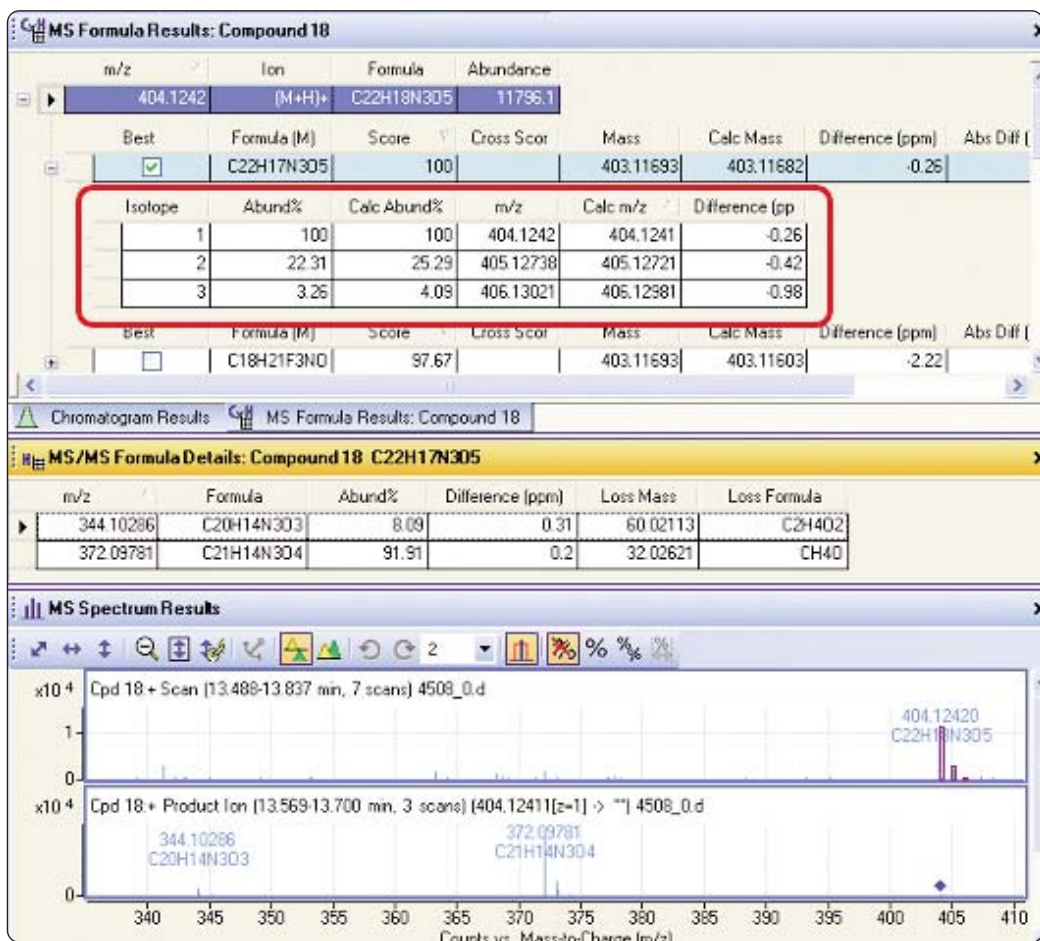


图 8. 草莓提取物中化合物组分(嘧菌酯)的质谱和二级质谱分子式分析结果

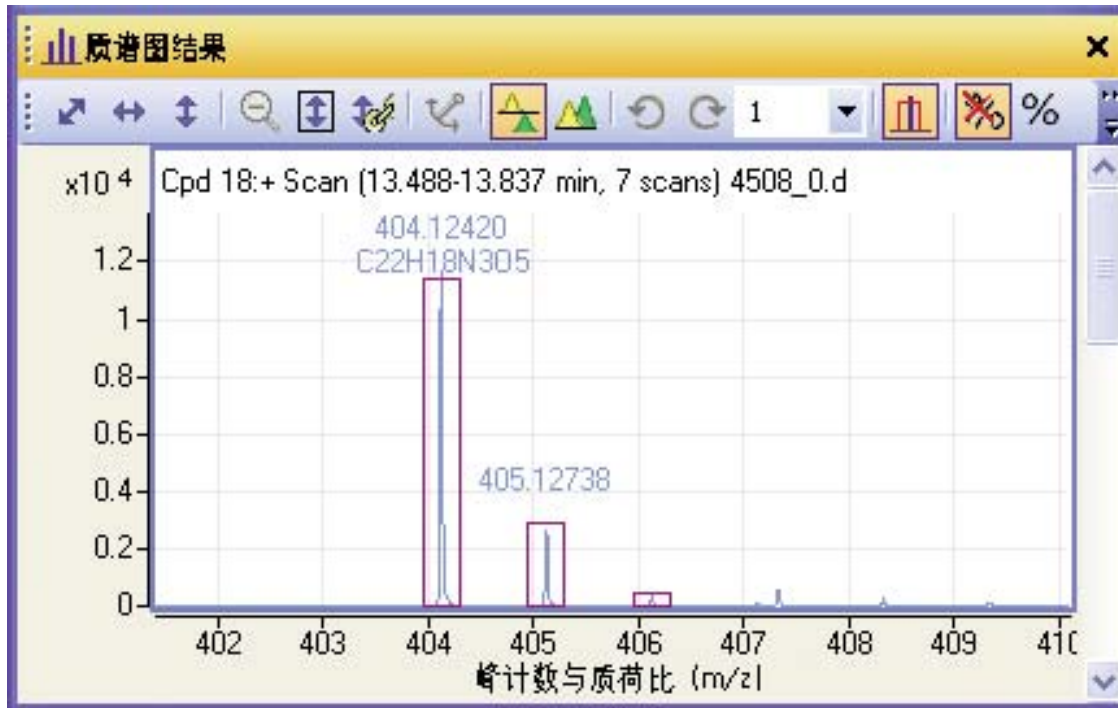


图9. 组分的三个同位素的同位素测量值与理论值的匹配非常好（矩形框是理论值）

通过碎片离子的测量与理论值的比对进行结构的最后确认分析。如图10所示，结构分子式显示两个最可能的碎片，其质量分别是344.10351和372.09843，这与MS/MS数据中两个碎片离子的质量数344.10286和372.09781 amu非常匹配。测量值与理论值分别相差0.31和0.20 ppm。分析比较的结果，以及质谱数据鉴定和二级质谱的分子式计算都可毫无疑问地确定草莓提取物中含有啉菌酯。

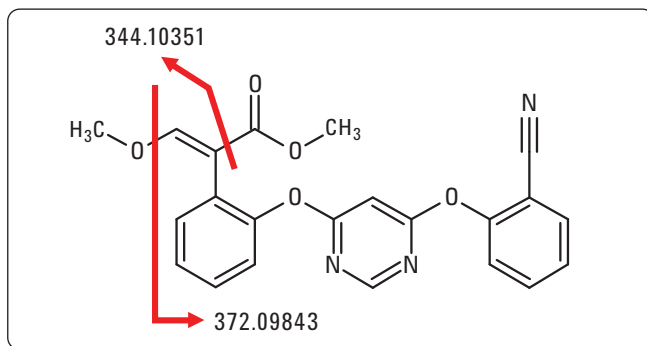


图10. 啉菌酯碎片的结构分析

结论

本应用证明了高精度精确质量数（和选择性）和功能强大的数据检索工具成功用于食品中非目标农药的鉴定分析。测量的质量数可以生成相应的分子式从而使分析工作者不再从事劳动密集的对碎片离子指纹质谱图进行人工比对。得到的组分的分子式和精确质量数的碎片离子可以被用于食品中非目标化合物的快速而准确地扫描和确认分析。

参考文献

1. P. Wylie, J. Zweigenbaum, M. Churley, C.-K. Meng, and C. Zhe, "Comprehensive Screening, Confirmation, and Quantification of Organic Pesticides in Foods by GC-MS and LC-MS," (2008) *Current Trends in Mass Spectrometry*, November.
2. I. V. Chernushevich, A. V. Loboda, and B. A. Thomson, "An Introduction to Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry," (2001) *J. Mass Spectrom.* 36: 849-865.
3. H. R. Morris, T. Paxton, A. Dell, J. Langhorne, M. Berg, R. S. Bordoli, J. Hoyes, and R. H. Bateman, "High Sensitivity Collisionally-activated Decomposition Tandem Mass Spectrometry on a Novel Quadrupole/Orthogonal-acceleration Time-of-flight Mass Spectrometer," (1996) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10: 889.
4. A.A. Shevchenko, I.V. Chernushevich, W. Ens, K.G. Standing, B. Thomson, M. Wilm, and M. Mann, "Rapid 'de novo' peptide sequencing by a combination of nanoelectrospray, isotopic labeling and a quadrupole/time-of-flight mass spectrometer," (1997) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11: 1015.
5. K. Imatani, "Advances in Accurate-Mass TOF and Q-TOF LC-MS Systems," (2008) *American Laboratory*, 40:12-16.
6. "Achieving Unmatched Speed and Confidence for Complex Sample Analyses: Agilent True High-Definition TOF Technology," Agilent Technologies, publication 5990-3168EN.
7. E. M. Thurman, I. Ferrer, and J. A. Zweigenbaum, "Automated Screening of 600 Pesticides in Food by LC/TOF MS Using a Molecular-Feature Database Search," Agilent Technologies, publication 5989-5496EN.
8. 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.
9. S. J. Lehotay, K. Maštovská, and 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.

更多信息

如需了解更多有关产品和服务的信息, 请浏览我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

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任何责任。

本资料中涉及的信息、描述和规格, 如有变更, 恕不另行通告。

© 安捷伦科技有限公司版权所有, 2009 年
2009 年 5 月 5 号中国印刷
5990-3935CHCN



Agilent Technologies