

使用 Agilent Bond Elut QuEChERS EN 试剂盒，LC/MS/MS 法分析绿茶中的农药残留

应用报告

食品安全

作者

Chen-Hao Zhai
安捷伦科技（中国）有限公司
中国上海英伦路 412 号，
邮编 200131

摘要

本应用报告介绍了使用快速、简便、经济、高效、耐用和安全(QuEChERS)的 EN 样品制备方法萃取和净化绿茶中具有代表性的 12 种农药。最初的 EN 法包括在缓冲液/乙腈系统中进行的预萃取，加入盐分后的萃取/分配步骤，以及使用分散固相萃取（分散 SPE）的样品净化步骤。采用液相色谱-电喷雾电离串联质谱法(LC-ESI-MS/MS)在正离子多反应监测(MRM)模式下测定绿茶提取物中存在的目标农药。并针对所有目标分析物的回收率和重现性进行了方法验证。本应用绿茶中农药的定量限(LOQ)为 5 ng/g，远低于规定的最大残留限量(MRLs)。回收率实验的加标浓度为 10、50 和 250 ng/g。平均回收率大都在 87%~108% 范围内（平均值为 93.5%），RSD 低于 10%（平均值为 5.2%）。



Agilent Technologies

前言

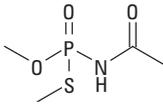
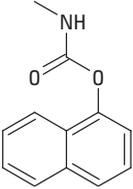
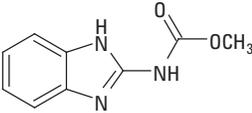
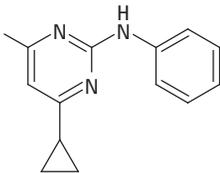
EN QuEChERS 方法已被广泛应用于食品中农药的分析,尤其是在欧洲[1-2]。该方法先用乙腈萃取样品,然后用无水硫酸镁(MgSO₄)、NaCl 和缓冲柠檬酸盐将样品中的水分盐析出来,形成液液分配。净化过程采用分散固相萃取(分散 SPE)以及 N-丙基乙二胺(PSA)除去样品基质中的有机酸,并用无水 MgSO₄ 除去萃取物中残留的水分。根据不同的食品基质,可能还会使用不同的净化成分,如使用石墨化碳黑(GCB)以除去色素和甾醇,或者添加 C18 以除去脂类和蜡。

由于绿茶含有大量的叶绿素,因而属于高色素样品。因此,本应用选择适用于高色素产品的 EN 分散 SPE 试剂盒。该类试剂盒包含 25 mg PSA 和 150 mg MgSO₄, 适用样品体积为 1 mL。每毫升乙腈萃取液还应添加 7.5 mg GCB。GCB 可吸附平面结构分子,如色素和甾醇,因此它有助于净化高色素基质样品,如绿茶。净化

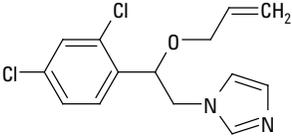
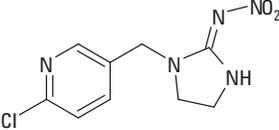
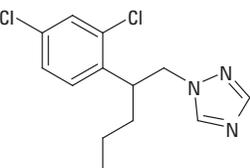
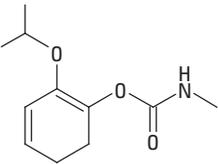
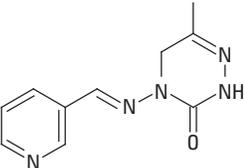
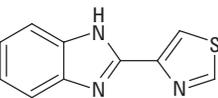
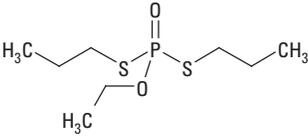
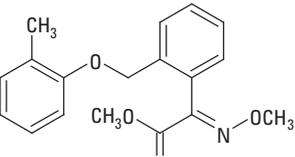
效率取决于 GCB 的用量。GCB 用量越大,可吸附的平面结构分子越多,从而能得到更纯净的样品基质。相对于 AOAC 法中使用相对较多的 GCB (每毫升乙腈萃取液添加 50 mg GCB), EN 法中使用的 GCB 要低得多(处理“含色素”的样品时,每毫升乙腈萃取液添加 2.5 mg GCB; 处理“高色素”样品时,每毫升乙腈萃取液添加 7.5 mg GCB)。平面结构农药的萃取率会受到 GCB 加入量的影响。AOAC 法可得到更为纯净的样品基质,但易造成平面结构农药的大量损失。与此相反,EN 法几乎不会引起平面结构农药的损失,但得到的样品基质会更为复杂。

本研究采用 12 种农药评估 Agilent Bond Elut EN 缓冲萃取试剂盒(部件号 5982-5650)和用于高色素水果蔬菜的 Bond Elut QuEChERS EN 分散 SPE 试剂盒(部件号 5982-5356)的性能。并对该方法的回收率和重现性进行了验证。表 1 为绿茶中这些农药的化学结构和相关限量信息。

表 1. 农药的化学及限量信息 [3-5]

名称	分类	Log P	pKa	结构	MRLs (ng/g)*
乙酰甲胺磷	有机磷酸酯	-0.89	8.35		20
胺甲萘	氨基甲酸酯	2.36	10.4		50
多菌灵	苯并咪唑	1.48	4.2		100
啉菌环胺	苯氨基嘧啶	4	4.44		500

(接下页)

名称	分类	Log P	pKa	结构	MRLs (ng/g)*
抑霉唑	咪唑	3.82	6.53		20
吡虫啉	新烟碱	0.57	NA		1000
戊菌唑	三唑	3.72	1.51		50
残杀威	氨基甲酸酯	0.14	NA		2000
吡蚜酮	吡啶	-0.19	4.06		600
涕必灵	苯并咪唑	2.39	4.73 12.00		50
灭线磷	有机磷酸酯	2.99	NA		5
醚菌酯	甲氧基丙烯酸酯	3.4	NA		50

实验部分

试剂和化学品

所有试剂和溶剂均为 HPLC 级或分析级。甲醇(MeOH)和乙腈(ACN)均购自 Honeywell 公司(Muskegon, MI, USA)产品；甲酸(FA)购自 Fluka 公司(Sleinheim, Germany)；农药标准品购自 Sigma-Aldrich 公司(St Louis, MO, USA)；内标物（磷酸三苯酯, TPP）由安捷伦科技有限公司(Wilmington, DE, USA)提供。

标准溶液

标准品和内标物(IS)储备液（除多菌灵为 0.5 mg/mL 外，其余均为 2.0 mg/mL）分别用 MeOH、0.1% 甲酸的乙腈溶液和 DMSO 配制，于 -20 °C 储存。以 0.1% 甲酸的乙腈/水(1:1)溶液每天新鲜配制三种 QC 加标溶液，浓度分别为 0.2、1 和 10 µg/mL，并采用同样的溶剂制备 2 µg/mL 的 TPP 溶液作为 IS 加标溶液。

仪器和材料

Agilent 1200 系列 HPLC (Agilent Technologies Inc., CA, USA)

配备电喷雾离子源的 Agilent 6410 三重四极杆 MS 系统 (Agilent Technologies Inc., CA, USA)

Agilent Bond Elut QuEChERS EN Buffered Extraction 缓冲萃取试剂盒，部件号 5982-5650；用于高色素水果蔬菜的 Bond Elut QuEChERS EN 分散 SPE 试剂盒，部件号 5982-5356 (Agilent Technologies Inc., DE, USA)

安捷伦陶瓷匀质子，50 mL 离心管，部件号 5982-9313 (Agilent Technologies Inc., DE, USA)

Eppendorf 微型离心机 (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA)

飞鸽离心机（上海安亭科学仪器厂）

样品制备

样品粉碎

无农药的有机绿茶购自 Teavana 公司。将绿茶装在干净塑料袋，于 -20 °C 冷冻过夜。时常揉捏袋子以确保茶叶分散。次日，取出所需量

仪器条件 HPLC 色谱条件

色谱柱	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 100 mm, 2.7 µm, (部件号 695775-902)
流速	0.4 mL/min
柱温	30 °C
进样体积	10 µL
流动相	A: 5 mM 甲酸的水溶液 B: 5 mM 甲酸的乙腈溶液
梯度程序	时间 (min) %B
	0 5
	1 5
	3 50
	7 90
	8 90
	8.2 5
	9 5
后运行	2 min
总运行时间	11 min

MS 条件 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	40 psi
毛细管电压	3500 V

与分析物相关的其它条件列于表 2。

的冰冻茶叶彻底粉碎。可能的话，粉碎时加入干冰。将样品彻底粉碎以得到均质样品。检查最终样品，应无可见的明显茶叶碎片。

提取/分散

称取均质样品 2 g (±0.1g)，置于 50 mL 离心管中。加入 100 µL 适当的 QC 标液制成 QC 样品。除空白对照外，所有样品均加入 100 µL IS 溶液（10 µg/mL TPP 溶液），使样品溶液中内标物浓度为 50 ng/g。离心管加盖，涡旋 1 min。后往各离心管中加入 8 mL 水，加盖，涡旋 1 min。然后将 50 mL 离心管的两个陶瓷匀质子（部件号 5982-9313）加至各离心管中。然后往各离心管中加入 10 mL 乙腈，加盖，振摇 1 min。再往各离心管中直接加入 Agilent Bond Elut QuEChERS EN 萃取盐包，含 4 g 无水 MgSO₄、1 g NaCl、1 g 柠檬酸钠和 0.5 g 柠檬酸二钠盐 1.5 水合物。盖紧离心管，剧烈振摇 20 s 以确保溶剂与样品充分接触，并使晶体块完全分散。样品管以 4000 rpm 的转速离心 5 min。

表 2. 用于分析 12 种农药的 LC/MS/MS 仪器采集数据

分析物	MRM 通道 (m/z)	碎裂电压 (V)	CE (V)	RT (min)
乙酰甲胺磷	1) 184.0 > 143.0	60	3	1.66
	2) 184.0 > 95.1		21	
吡蚜酮	1) 218.1 > 105.1	125	21	1.95
	2) 218.1 > 78.1		50	
多菌灵	1) 192.1 > 160.1	110	16	3.25
	2) 192.1 > 132.1		32	
涕必灵	1) 202.0 > 175.1	145	26	3.37
	2) 202.0 > 131.1		38	
吡虫啉	1) 256.1 > 209.1	125	11	4.02
	2) 256.1 > 175.1		17	
抑霉唑	1) 297.1 > 159.0	110	23	4.40
	2) 297.1 > 69.1		17	
残杀威	1) 210.2 > 111.1	70	11	4.81
	2) 210.2 > 93.1		23	
胺甲萘	1) 202.0 > 145.0	50	5	4.98
	2) 202.0 > 127.1		30	
啉菌环胺	1) 226.1 > 93.1	125	40	5.84
	2) 226.1 > 108.1		33	
灭线磷	1) 243.1 > 130.9	125	19	5.98
	2) 243.1 > 173.0		11	
戊菌唑	1) 284.0 > 70.1	120	15	6.20
	2) 284.0 > 159.0		37	
醚菌酯	1) 314.1 > 222.1	90	11	6.62
	2) 314.1 > 235.1		11	
TPP (IS)	1) 327.1 > 77.1	160	49	6.80
	2) 327.1 > 152.1		49	

1) Quantifier transition 通道

2) Qualifier transition 通道

分散 SPE 净化

将 6 mL 乙腈上清液转移至 Agilent Bond Elut QuEChERS EN 分散 SPE 15 mL 管(部件号 5982-5356)中,每个 15 mL 管内含 150 mg PSA、900 mg 无水 MgSO₄ 和 45 mg GCB。盖紧离心管,涡旋 1 min,再用标准离心机以 4000 rpm 的转速离心 5 min。取 1 mL 萃取液转移至 10 mL 试管中,在低于 40 °C 温度下氮气吹干。残渣用 1 mL 乙腈/水(1/9)复溶,再用 0.45 μm 的滤膜(部件号 5185-5836)过滤后进行 LC/MS/MS 分析。

结果与讨论

根据推荐,本研究中绿茶处理采用适用于高色素样品的 EN 分散 SPE 试剂盒。采用 EN 法处理的最终样品仍呈现绿色,但是,LC/MS/MS 选择性非常强大,空白基质的 MRM 谱图表明目标分析物无任何干扰峰。图 1 和图 2 分别为 EN 分散 SPE 法处理的空白基质(添加 IS)和加标 50 ng/g 绿茶提取物的 LC/MS/MS 谱图。

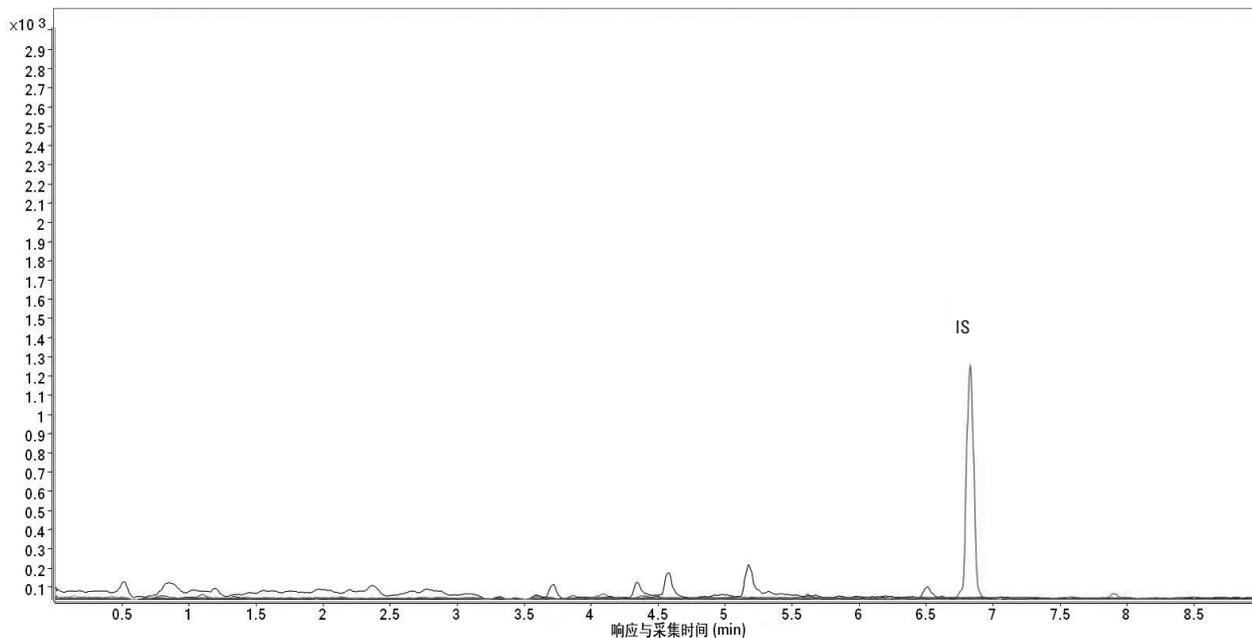


图 1. 绿茶空白基质的 MRM 谱图。峰鉴别: IS: TPP

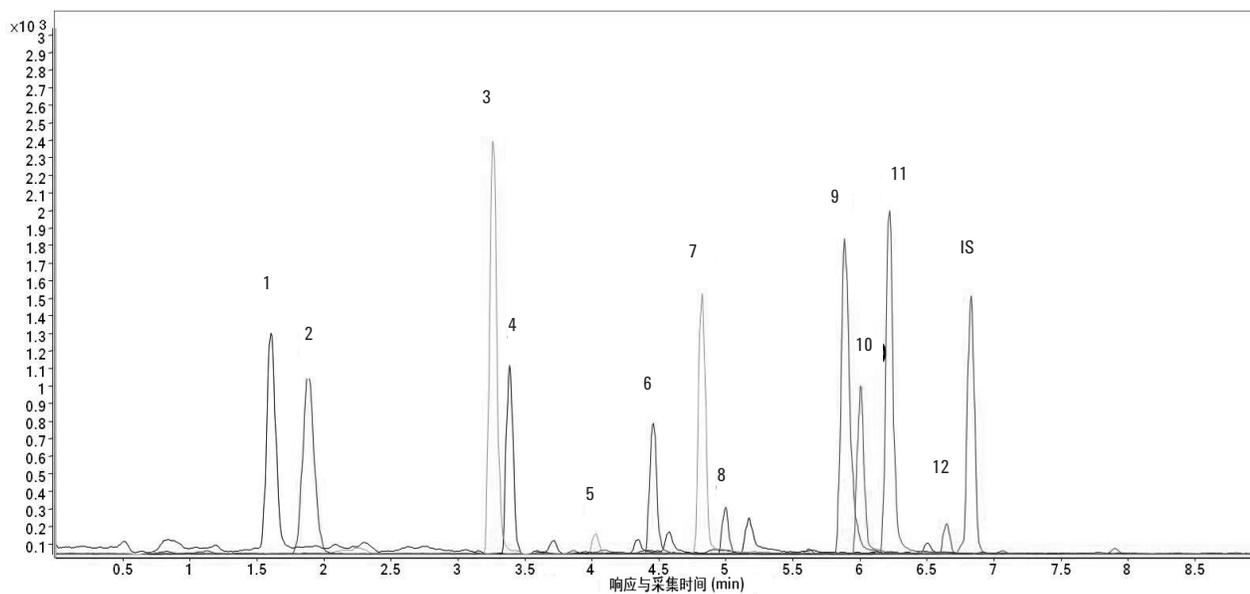


图 2. EN 法处理的加标 50 ng/g 样品的 MRM 谱图。峰鉴别: 1. 乙酰甲胺磷, 2. 吡蚜酮, 3. 多菌灵, 4. 涕必灵, 5. 吡虫啉, 6. 抑霉唑, 7. 残杀威, 8. 胺甲萘, 9. 啉菌环胺, 10. 灭线磷, 11. 戊菌唑, 12. 醚菌酯, IS: TPP

线性和定量限(LOQ)

所有检测农药的线性校准范围为 5-500 ng/g。通过向空白基质加标制成浓度为 5、10、50、250 和 500 ng/g 的一系列校准曲线溶液, 用 50 ng/g 的 TPP 溶液作为内标。通过分析物的相对响应值(分析物峰面积/内标物峰面积)与分析物的相对浓度(分析物浓度/内标物浓度)绘制标准曲线。所有农药的定量限 LOQ 为 5 ng/g,

表 3. 绿茶萃取物中农药的线性

名称	回归方程	R ²
乙酰甲胺磷	$Y = 2.0260 \times + 0.0347$	0.9995
吡蚜酮	$Y = 2.3741 \times - 0.0141$	0.9999
多菌灵	$Y = 2.9630 \times + 0.1685$	0.9991
涕必灵	$Y = 1.5021 \times - 0.0034$	0.9998
吡虫啉	$Y = 0.0625 \times - 0.0002$	0.9998
抑霉唑	$Y = 0.9445 \times + 0.0190$	0.9997
残杀威	$Y = 1.8301 \times + 0.0362$	0.9998
胺甲萘	$Y = 0.3677 \times - 0.0014$	0.9999
啉菌环胺	$Y = 3.0000 \times + 0.0809$	0.9991
灭线磷	$Y = 1.2764 \times + 0.0425$	0.9986
戊菌唑	$Y = 2.7559 \times + 0.0259$	0.9999
醚菌酯	$Y = 0.1976 \times + 0.0119$	0.9969

表 4. 采用 QuEChERS 法测得加标绿茶的回收率和重现性

分析物	QC 加标浓度 10 ng/g		QC 加标浓度 50 ng/g		QC 加标浓度 250 ng/g	
	回收率	RSD (n=6)	回收率	RSD (n=6)	回收率	RSD (n=6)
乙酰甲胺磷	80.5%	5.4%	91.7%	2.9%	88.9%	8.2%
吡蚜酮	43.1%	3.0%	42.2%	3.4%	43.4%	9.8%
多菌灵	114.6%	11.6%	97.6%	2.0%	105.0%	6.2%
涕必灵	98.1%	6.9%	90.4%	2.4%	81.7%	5.8%
吡虫啉	104.3%	11.7%	108.6%	2.5%	93.9%	7.9%
抑霉唑	97.5%	4.4%	87.8%	5.6%	92.4%	4.6%
残杀威	98.1%	2.4%	110.2%	1.7%	107.8%	3.9%
胺甲萘	89.7%	11.4%	104.9%	3.3%	108.1%	5.2%
啉菌环胺	84.9%	2.1%	92.5%	3.7%	93.9%	5.5%
灭线磷	103.4%	3.1%	111.2%	3.2%	104.9%	5.7%
戊菌唑	108.7%	2.9%	94.3%	4.5%	89.8%	3.3%
醚菌酯	105.7%	12.4%	96.4%	2.5%	99.2%	5.5%

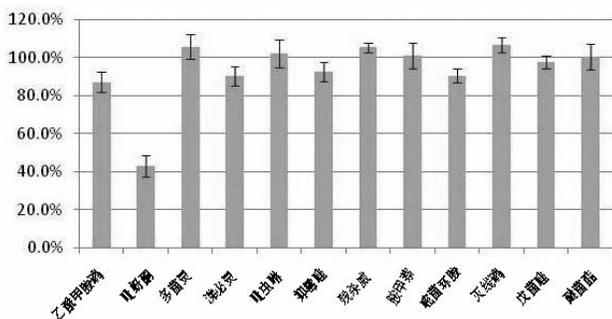


图 3. 绿茶中 12 种农药的回收率和精密度结果

均低于水果蔬菜中这些农药规定的 MRLs。表 3 为相应的线性回归方程和相关系数(R²)。

回收率和重现性

通过在粉碎的样品中加入农药标准品对回收率和重现性进行评价, 加标浓度分别为 10、50 和 250 ng/g。通过空白基质加标绘制的校准曲线进行这些 QC 样品的定量, 每一浓度平行测定六次。回收率和重现性(以 RSD 表示)数据分别见表 4 和图 3。结果显示, 11 种农药展现出极佳的回收率和精密度。吡蚜酮的回收率较低但精密度良好。这是由于吡蚜酮受 pH 的影响较大, 在 pH 5-5.5 范围内, 易受提取过程中 pH 的影响。多菌灵、涕必灵和啉菌环胺与吡蚜酮一样都是平面结构的农药, 在 d-SPE 阶段, 由于使用了少量的 GCB, 导致其回收率有所损失。

结论

Agilent Bond Elut QuEChERS EN 缓冲液萃取试剂盒和用于高色素水果蔬菜的分散 SPE 试剂盒给我们提供了一种简便、快速和高效的用于绿茶中具有代表性农药的净化方法。分散 SPE 中使用的少量 GCB 基本不影响平面结构农药的萃取。基质加标测得的回收率和重现性表明，该方法可用于绿茶中多类型、多农药残留的测定。

参考文献

1. European Committee for Standardization/Technical Committee CEN/TC 275 (2007), Foods of plant origin: Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and cleanup by dispersive SPE-QuEChERS method. European Committee for Standardization, Brussels.
2. P. Paya, M. Anastassiades; "Analysis of Pesticide Residues Using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) Pesticide Multiresidue Method in Combination with Gas and Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometric Detection", Anal Bioanal Chem., 2007, 389, 1697-1714.

3. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/index.htm>
4. <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/search.html>
5. <http://www.mrl database.com/?selectvetdrug=0>

更多信息

如需了解更多有关我们产品和服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦公司对本材料所包含的错误，或由于提供、展示或使用本材料所造成的直接或间接损失概不负责。

本文中的信息、说明及性能指标等如有变更，恕不另行通知。

©安捷伦科技（中国）有限公司，2010
中国印刷
2010年9月3日
5990-6400CHCN



Agilent Technologies