

应用安捷伦 Bond Elut QuEChERS AOAC 试剂盒和 LC-MS/MS 进行大米农药残留分析

应用报告

食品安全

作者

Andy Zhai
安捷伦科技公司
412 Yinglun Road
Shanghai, 200131
China

摘要

本文介绍了一种快捷、简便、价廉、高效、耐用、安全的 QuEChERS AOAC 样品制备方法，用于大米中 12 种不同种类的残留农药的提取和净化。采用原版 AOAC 方法，应用缓冲溶液-乙腈系统进行预提取，加入盐类进行提取和分配，再用分散型固相萃取技术达到净化目的。随后用液相色谱-电喷雾离子化串联质谱技术 (LC-ESI-MS/MS) 以正离子多反应监测模式 (MRM) 测定大米提取物中的农药残留量。通过测定所有目标分析物的回收率和重现性，对分析方法进行验证。本应用中大米中农残的定量限 (LOD) 为 5 ng/g，远低于最大残留限度 (MRLs)。10、50 和 250 ng/g 三个浓度水平的加标回收实验，平均回收率在 76%~108% (平均值为 97.8%)，RSD 低于 10% (平均值为 4.7%)。



Agilent Technologies

引言

AOAC QuEChERS 方法已经广泛应用于食品中农药残留的分析 [1-2]。该方法应用乙腈提取，再由无水硫酸镁 ($MgSO_4$) 脱去样品中的水，并以醋酸盐缓冲液促进分配。净化时，联合应用分散型固相萃取小柱与 PSA (N-丙基乙二胺) 小柱以除去样品基质中的有机酸，再用无水硫酸镁除去提取物中的水分。根据食品基质的不同，在这一步骤中可以加入其他成分，如用石墨化碳黑 (GCB) 去除色素和甾醇，或用 C18 去除脂肪和蜡质。

本文中，选用了适用于含脂肪和蜡质样品的 AOAC 分散型 SPE 试剂盒。该试剂盒适用的样品量为 1 mL，包含 PSA 50 mg、 $MgSO_4$ 150 mg、C18 50 mg，可加入每毫升乙腈提取物中。本研究中，采用 12 种农药来评价 Agilent Bond Elut AOAC 缓冲提取试剂盒 (p/n 5982-5755) 和适用于含有脂肪和蜡质的水果和蔬菜的 Bond Elut QuEChERS AOAC 分散型 SPE 试剂盒 (p/n 5982-5158) 的性能。通过回收率和重现性的测定进行了方法验证。表 1 显示了大米中这些残留农药的化学和限量信息。

实验部分

试剂和化学品

所有的试剂和溶剂均为 HPLC 或分析级。甲酸和乙腈来自 Honeywell (Muskegon, MI, 美国)，甲酸来自 Fluka (Sleinheim, 德国)。农药标准品购自 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, 美国)，内标物质磷酸三苯酯 (TPP) 来自安捷伦科技公司 (Wilmington, DE, 美国)。

标准溶液

标准品和内标储备液 (除多菌灵为 0.5 mg/mL 外，其余均为 2.0 mg/mL) 分别由甲醇、含 0.1% 甲酸的乙腈溶液和 DMSO 溶解制成，在 $-20^{\circ}C$ 保存。三种浓度分别为 0.2、1 和 10 $\mu g/mL$ 的 QC 加标溶液每天用 0.1% 甲酸水溶液-乙腈 (1:1) 新鲜配制。TPP 浓度为 10 $\mu g/mL$ 的内标加标溶液用 0.1% 甲酸水溶液-乙腈 (1:1) 配制。

设备和材料

安捷伦 1200 系列 HPLC (安捷伦科技公司, CA, 美国)

带电喷雾的安捷伦 6460 三重四极杆 LC/MS 系统 (安捷伦科技公司, CA, 美国)

Agilent Bond Elut AOAC 缓冲提取试剂盒 (p/n 5982-5755) 和适用于含有脂肪和蜡质的水果和蔬菜的 Bond Elut QuEChERS AOAC 分散型 SPE 试剂盒 (p/n 5982-5158) (安捷伦科技公司, DE, 美国)

安捷伦陶瓷匀浆器, 50 mL 离心管 (p/n 5982-9313) (安捷伦科技公司, DE, 美国)

Eppendorf 微量离心机 (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, 美国) NY, USA)

飞鸽牌离心机 (安亭科学仪器厂, 中国上海)

HPLC 条件

色谱柱	安捷伦 Poroshell 120 EC-C18, 2.1×100 mm, 2.7 μm (p/n 695775-902)	
流速	0.4 mL/min	
柱温	30°C	
进样体积	5 μL	
流动相	A: 0.1% 甲酸水溶液 B: 0.1% 甲酸乙腈溶液	
梯度	时间 (分钟)	%B
	0	5
	1	5
	3	50
	7	90
	8	90
	8.2	5
	9	5
后运行时间	2 min	
总运行时间	11 min	
MS 条件		
正离子模式		
气体温度	350°C	
气体流速	10 L/min	
雾化器压力	40 psi	
毛细管电压	3500 V	

与被分析物有关的其他条件列于表 2。

图 1. 农药的化学和限量信息 [3-5]

名称	类别	Log P	pKa	最大残留限量 (ng/g)	结构式
乙酰甲胺磷	有机磷	-0.89	8.35	20	
甲萘威	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	苯胺嘧啶	4	4.44	500	
抑霉唑	咪唑	3.82	6.53	20	
吡虫啉	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	
噻苯达唑	苯并咪唑	2.39	4.73 12.00	50	
丙线磷	有机磷	2.99	NA	5	
苯氧菌酯	嗜球果伞素	3.4	NA	50	

表 2. 使用 LC-MS/MS 分析 12 种农药的仪器数据采集参数

被分析物	裂解途径	MRM (m/z)	碎裂电压 (V)	CE (V)	保留时间 (min)
吡蚜酮	1)	218.1>105	130	20	1.44
	2)	218.1>78.1		50	
对乙酰甲胺磷	1)	184.0>143	65	3	1.59
	2)	184.0>95		20	
多菌灵	1)	192.1>160.1	110	15	3.19
	2)	192.1>132.1		30	
噻苯达唑	1)	202.0>175.1	160	25	3.32
	2)	202.0>131.1		35	
吡虫啉	1)	256.1>209	140	10	4.01
	2)	256.1>175		15	
抑霉唑	1)	297.1>158.9	150	20	4.43
	2)	297.1>200.9		15	
残杀威	1)	210.2>111	70	10	4.81
	2)	210.2>93		25	
甲萘威	1)	202.0>145	70	15	4.99
	2)	202.0>127		40	
啉菌环胺	1)	226.1>93	150	37	5.55
	2)	226.1>77		52	
丙线磷	1)	243.1>130.9	115	15	6.00
	2)	243.1>96.9		35	
戊菌唑	1)	284.0>70	125	10	6.22
	2)	284.0>158.9		30	
苯氧菌酯	1)	314.1>222	70	3	6.66
	2)	314.1>116		5	
TPP (内标)	1)	327.1>77	170	40	6.85
	2)	327.1>152		45	

1) 定量离子裂解途径

2) 定性离子裂解途径

样品制备

样品粉碎

不含农药的有机生长大米购自当地市场。将该大米置于干净塑料袋中，-20°C 冷冻过夜。时常揉捏塑料袋，以保证大米颗粒不结块。第二天，取出所需用量的冷冻大米，完全混匀。边粉碎边加入干燥大米。样品完全粉碎以保证其均匀性。在最终制成的样品中无肉眼可见大米颗粒，证明粉碎完全。

提取/分配

取 5 g (±0.1 g) 均匀样品，置于 50mL 离心管中。用 100 µL 适宜浓度的 QC 标准溶液制成加标的 QC 样品。除空白样品外，其余所有样品中均加入 50 µL 内标溶液，制成内标浓度为 100 ng/g 的样品溶液。盖上离心管，涡旋混合 1 分钟。用移液器往每管中加水 10 mL，加盖，涡旋混合 1 分钟。每管中放入两个适用于 50 mL 离心管的陶瓷匀浆器 (p/n 5982-9313)。用移液器往每管中加入 ACN (0.1% AA) 15 mL。盖上离心管，用手振摇 1 分钟。每管中直接加入安捷伦 Bond Elut QuEChERS AOAC 提取盐 1 包，其中含无水硫酸镁 6 g，醋酸钠 1.5 g。将离心管密封，用手剧烈振摇 20 秒，确保溶剂与样品相互作用完全，同时块状结晶充分散开。样品管以 4000 转/分的转速离心 5 分钟。

分散型 SPE 净化

移取 8 mL 上层乙腈液，置于 15 mL 安捷伦 Bond Elut QuEChERS AOAC 分散型 SPE 试管 (p/n 5982-5158) 中。该 15 mL 试管中包含 PSA 400 mg，无水硫酸镁 1200 mg，以及 C18 400 mg。将试管盖紧，涡旋混合 15 分钟，并以 4000 转/分的标准转速离心 5 分钟。移取 1 mL 提取液，置于 10 mL 试管中，在 40°C 用氮气吹干。所得残渣用乙腈-水 (1:9) 溶解并定容至 1 mL，用 0.45 µm 滤膜 (p/n 5185-5836) 滤过，取滤液用 LC-MS/MS 进行分析。

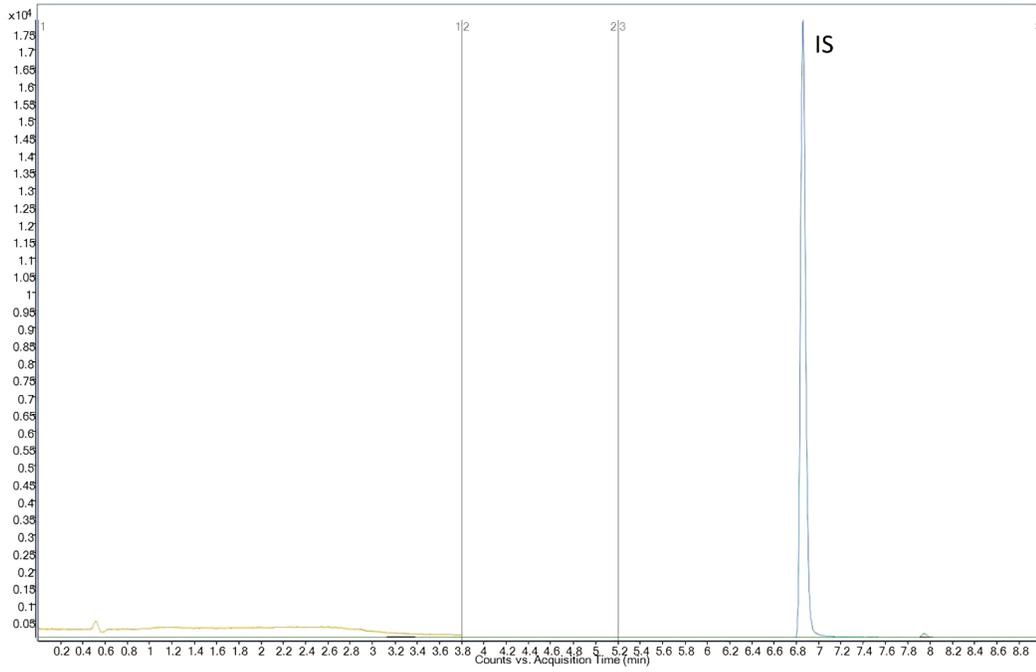


图 1. 空白大米基质的 MRM 色谱图

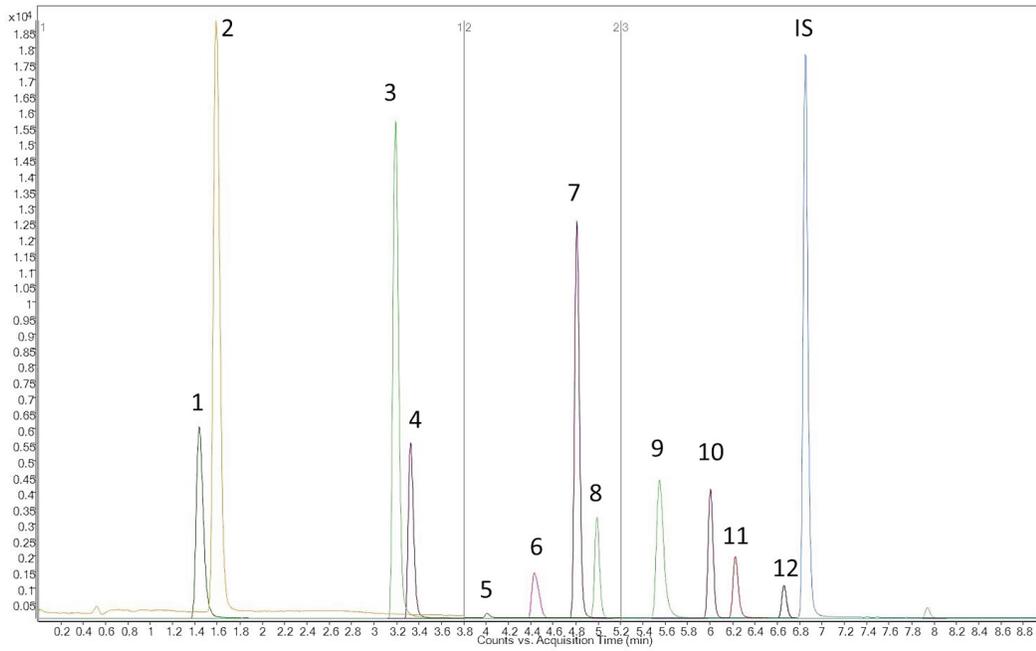


图 2. 用 AOAC 方法处理 10 ng/g 加标样品所得 MRM 色谱图。色谱峰归属：1. 吡蚜酮；2. 对乙酰甲胺磷；3. 多菌灵；4. 噻苯达唑；5. 吡虫啉；6. 抑霉唑；7. 残杀威；8. 甲萘威；9. 啞菌环胺；10. 丙线磷；11. 戊菌唑；12. 苯氧菌酯；内标：TPP

结果与讨论

根据推荐, 本次研究选用了适合含脂肪与蜡质样品的 AOAC 分散型 SPE 试剂盒对大米进行处理。由于 LC-MS/MS 的高选择性, 空白基质样品的 MRM 色谱图显示其对目标化合物没有干扰峰。图 1 和图 2 分别为加内标的空白基质和用 AOAC 分散型 SPE 方法处理的 10 ng/g 加标大米样品提取物的 LC-MS/MS 色谱图。

表 3. 大米提取物中加标农药的线性

名称	回归方程	R ²
吡蚜酮	$Y = 1.0525x + 0.3331$	0.997
对乙酰甲胺磷	$Y = 1.2109x + 0.0897$	0.998
多菌灵	$Y = 1.9011x + 0.2080$	0.998
噻苯达唑	$Y = 0.8764x + 0.1622$	0.999
吡虫啉	$Y = 0.0778x + 0.0135$	0.991
抑霉唑	$Y = 0.3765x + 0.0552$	0.997
残杀威	$Y = 1.8122x + 0.6237$	0.993
甲萘威	$Y = 0.5832x + 0.0042$	0.999
啉菌环胺	$Y = 1.0002x + 0.3903$	0.998
丙线磷	$Y = 0.4793x + 0.0783$	0.992
戊菌唑	$Y = 1.3872x + 0.0117$	0.996
苯氧菌酯	$Y = 0.3921x + 0.0058$	0.996

线性和定量限(LOD)

所有待测农药的线性校正范围为 5-500 ng/g。用空白基质加标的校正曲线其浓度水平分别为 5、10、50、250 和 500 ng/g, 内标物质 TPP 的浓度为 50 ng/g。用待测组分的相对响应值(待测组分峰面积/内标物峰面积)对待测组分的相对浓度(待测组分浓度/内标物浓度)作图, 得到校正曲线。所有农药的定量限为 5 ng/g, 低于这些农药在水果和蔬菜中的最高残留限量(MRL)。表 3 列出线性回归方程和相关系数(R²)。

表 4. 用 QuEChERS 方法检测加标大米中农药的回收率和重现性

待测组分	10 ng/g 加标 QC		50 ng/g 加标 QC		250 ng/g 加标 QC	
	样品回收率	RSD*	样品回收率	RSD*	样品回收率	RSD*
吡蚜酮	80.3%	4.5%	76.3%	3.8%	90.1%	4.2%
对乙酰甲胺磷	85.0%	2.3%	92.8%	3.2%	96.3%	1.9%
多菌灵	102.3%	8.3%	99.0%	2.0%	108.2%	5.8%
噻苯达唑	94.6%	5.4%	89.4%	4.7%	83.9%	6.1%
吡虫啉	100.5%	10.2%	105.4%	2.8%	91.7%	8.2%
抑霉唑	99.2%	4.4%	92.6%	5.5%	93.8%	5.3%
残杀威	96.7%	3.7%	103.6%	1.1%	108.2%	2.7%
甲萘威	88.0%	5.6%	100.7%	3.0%	108.1%	3.9%
啉菌环胺	90.3%	1.9%	92.5%	8.9%	92.4%	5.1%
丙线磷	104.1%	3.4%	105.8%	4.8%	110.5%	6.1%
戊菌唑	103.9%	2.2%	93.9%	6.9%	90.5%	3.0%
苯氧菌酯	107.5%	10.3%	94.7%	2.5%	100.6%	2.7%

*RSD (n=6)

回收率和重现性

通过在粉碎的样品中加入农药标准品制成 10、50 和 250 ng/g 的不同浓度水平的加标样品, 对方法的回收率和重现性进行了评价。用标准加入曲线对这些 QC 样品进行定量分析。每个浓度水平重复测定 6 次。回收率和重现性(用 RSD 表示)数据见表 4 和图 3。可以看出, 12 种农药组分均得到了很好的回收率和精密度。

结论

安捷伦 Bond Elut QuEChERS AOAC 缓冲提取试剂盒和用于含脂肪和蜡质的果蔬的分散型 SPE 试剂盒为大米中有代表性的农残测定提供了一种简便、快速而有效的方法。基质加标样品的回收率和重现性显示, 该方法可用于大米中多类别、多组分农药残留的检测。大米中的杂质和基质效应不干扰目标化合物的定量分析。农药组分的定量限低于监管要求的大米中最高残留限量。由于本研究中所选择的农药代表了广泛的农药类别和性质, 对于类似食品基质中其他农药残留的检测, 安捷伦 Bond Elut QuEChERS AOAC 提取和分散型 SPE 试剂盒也是一种极佳的选择。

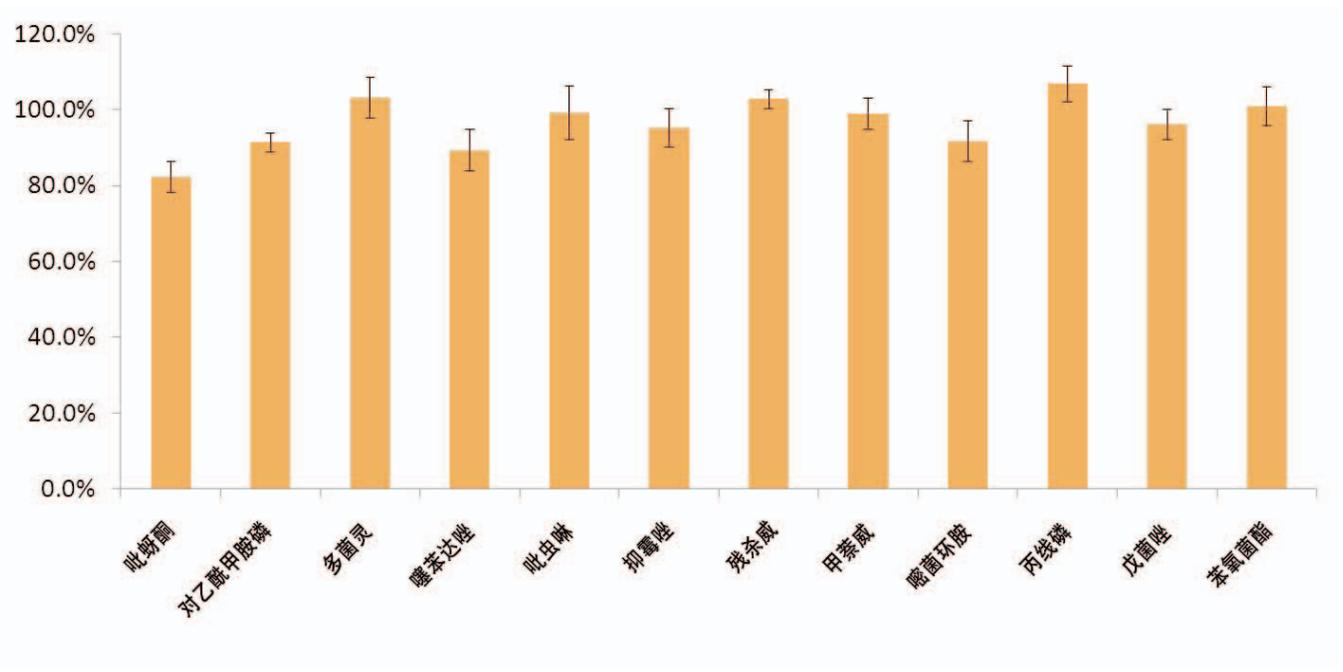


图3. 大米中12种农药的回收率和精密度

参考文献

1. M. Anastassiades, S. J. Lehotay, Fast and Easy Multiresidue Method Employment Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce, J. AOAC Int., 2003, 86, 412- 431.
2. S. J. Lehotay, et al, "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," J. AOAC Int., 2005, 88, 615-629.
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.mrldatabase.com/?selectvetdrug=0>

更多信息

这些数据代表了一般的结果。如需了解我们产品和服务的更多信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com

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有关损失不承担责任。

本资料中的信息、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，2011

2011年5月11日，中国印刷

5990-8034CHCN



Agilent Technologies