

采用高分辨全离子 MS/MS 技术快速 筛查和鉴定农药

应用简报

食品安全

作者

Bernhard Wüst 与 Thomas Glauner
安捷伦科技有限公司
Waldbronn
德国

Stephen Madden, Lester Taylor 与
Tiffany Payne
安捷伦科技有限公司
圣克拉拉, 加利福尼亚
美国

摘要

全离子 MS/MS 技术可用于快速筛查、定量和鉴定食品基质中的农药。该分析方法使用高分辨飞行时间 (TOF) 或四极杆飞行时间质谱仪对样品进行快速分析并生成目标化合物的定量信息。

为验证该新方法在复杂基质分析和低浓度分析中的有效性，将综合农药标准品加标到三种不同的食品基质中，采用全离子 MS/MS 技术对样品进行分析。该技术有助于消除假阳性结果，且快速、准确，显著提高了农药筛查及定量分析的效率。



Agilent Technologies

前言

消费者一直非常关注食品中农药残留对公共健康的影响。尤其是随着食品全球贸易的不断扩大，农药检测已推进了相关法规的制定和完善，如欧盟委员会 (EC) 的规章 396/2005¹ 和美国的 40 CFR Part 180²。然而，农药残留仍然是食品中重要的质量问题。例如，在 2009 年，欧盟有 173 条与农药残留有关的警报通知³ 进入了食品和饲料快速预警系统 (RASFF)⁴。

当前的农药筛查需要考虑 1000 多种农药及其代谢物。其中，大约有 600 至 800 种化合物包含在常规监测程序中，还有约 150 种农药通常在食品类商品中检测。用于农药筛查的分析方法需要经过验证，并且必须遵守 SANCO 12495/2011⁵ 指南中的质量标准。

农药筛查中应用最广泛的样品前处理方法是名为快速 (Quick)、简便 (Easy)、经济 (Cheap)、高效 (Effective)、耐用 (Rugged)、安全 (Safe) 的方法，即 QuEChERS⁶。它已成为一种广为接受的通用提取程序。首选的分析方法首先采用液相色谱进行分离，之后采用三重四极杆质谱进行检测。虽然多反应监测 (MRM) 对于分析复杂基质中的农药来说灵敏度最高，但该技术也存在一些缺点。它要求完备的方法开发、经常性的维护、高度专业的知识，还需要数天繁杂的工作来输入所有化合物的 MRM 离子对并评估其保留时间。另外，鉴定一个化合物需要采集两个或更多具有固定比例的子离子信息，因此，它限制了单一分析方法中可采集的化合物的数目。最重要的是，如果不重新采集数据，它就没有对数据进行再次评估以鉴定新型和预期之外的农药残留的能力。

安捷伦科技已开发出可在单次分析运行中进行农药筛查和鉴定的全离子 MS/MS 技术。该技术使用精确质量 LC/TOF 或 Q-TOF，具有采集方法设置简便、使用 MS/MS 谱库确证农药化合物、母离子和子离子色谱共流出等特征，并能快速开发出一种将子离子作为定性离子的定量方法。用户可以采用高分辨精确质量数据快速验证化合物的鉴定结果，然后在数分钟内建立一种定量分析目标化合物的方法。潜在的假阳性结果可通过评估子离子色谱峰的质量消除。有了这项技术，分析员可在单次分析中对数百种农药进行定量分析。

实验部分

样品制备

采用安捷伦 BondElut QuEChERS 试剂盒 (部件号 5982-5650)，对来自当地一家杂货店的西红柿、鳄梨和柠檬样品按照柠檬酸盐缓冲的 QuEChERS 方法进行制备。采用安捷伦 BondElut QuEChERS EN 分散 SPE 管 (部件号 5982-5256) 对样品提取物进行净化。

在净化前，只对柠檬提取物加入氢氧化钠溶液，将其调为中性。净化后，所有样品用 5% 甲酸乙腈溶液酸化，以提高目标农药化合物的稳定性。用包含 190 多种农药的综合农药标准品以三个相关浓度对样品进行加标。

系统配置

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 高效自动进样器 (G4226A)，和 Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)。

Agilent 6540 UHD Q-TOF 由 MassHunter 采集软件修订版 B.05.01 操控，使用 2 GHz 扩展动态范围模式，MS 采集速率为每秒三次扫描，全离子 MS/MS 方法中采用两个不同的碰撞能量。采用任何碰撞能量的母离子扫描和采用两种碰撞能量的 MS/MS 扫描，可以交替生成只包含母离子的低能量通道和包含母离子和子离子的两个高能量通道的谱图。

色谱条件

UHPLC 色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm	
柱温	30 °C	
流动相	A: 5 mM 甲酸胺 + 0.1% 甲酸溶液 B: 5 mM 甲酸胺 + 0.1% 甲酸甲醇溶液	
梯度程序	Min	% B
	0	5
	0.2	5
	2.2	30
	10.5	100
	13.0	100
	13.5	5
停止时间	15 分钟	
流速	0.50 mL/min	

结果与讨论

采用通过分子式查找 (FbF) 算法进行分析的 MassHunter 定性分析软件 (B.06.00 版) 对数据进行分析。FbF 使用一个分子式进行查找并确定在高分辨质谱数据中是否存在具有该分子式的化合物。该算法已升级, 可支持全离子 MS/MS 技术。首先在农药个人化合物数据库 (PCDL) (B.04.01 版) 中搜索低能量通道中的质量峰, 找出有相同质荷比的化合物。然后它会编辑出一系列推定的鉴定结果。图 1 展示了通过 FbF 算法可从样品中可靠地鉴定出多菌灵。

对于已鉴定的化合物, 将来自 PCDL 的 MS/MS 谱中的碎片离子与高能量通道中的离子进行比较, 以证实正确碎片的存在 (图 2)。

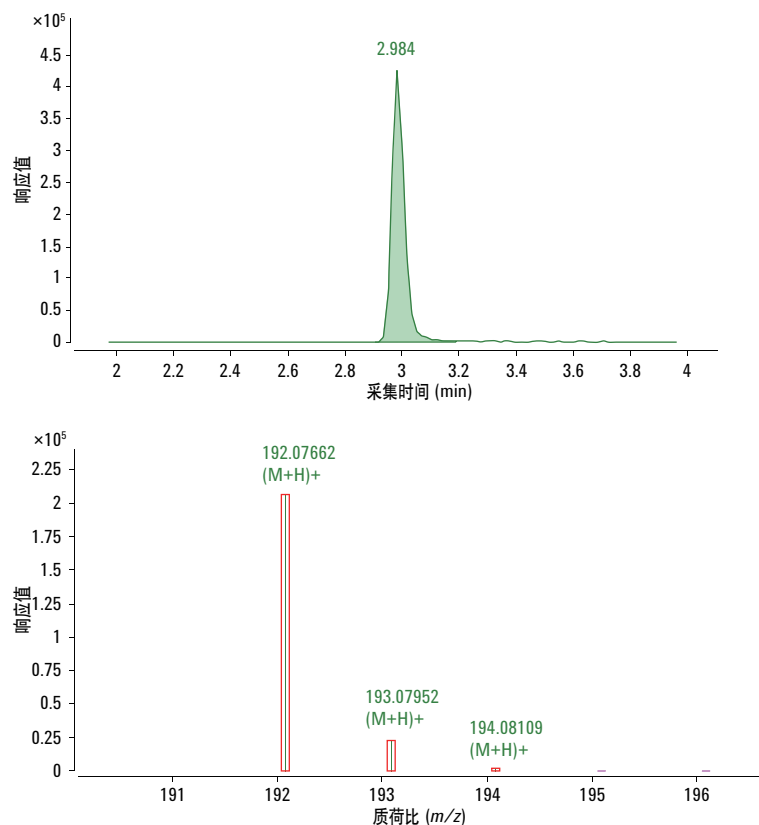


图 1. 采用通过分子式查找 (FbF) 算法鉴定多菌灵

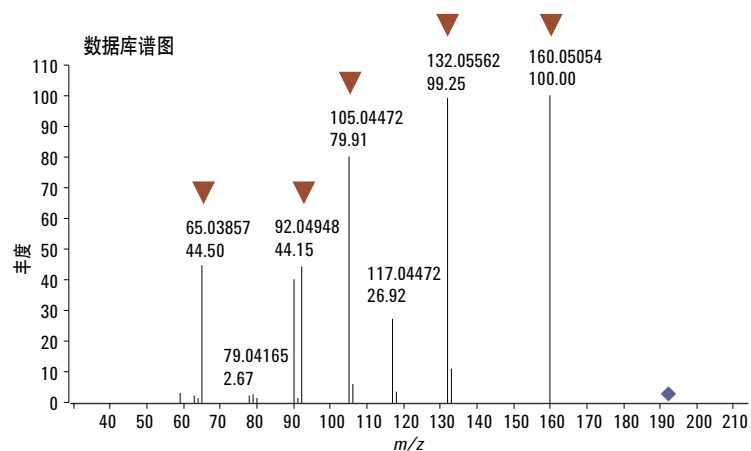


图 2. 多菌灵的高能量 (40 eV) 谱图

母离子和子离子均经过提取形成相应色谱图 (图 3A), 并采用共流出得分对其进行评价。共流出得分源自一项与 UV 色谱峰纯度相似的技术, 该技术根据对多个因素的综合考虑, 如丰度、峰形 (对称性)、峰宽和保留时间等, 计算出一个数值。对这些得分作图即可得到一个容易观察的共流出曲线 (图 3B)。

软件分析表明, 来自 PCDL MS/MS 谱库的五种有效定性离子碎片证实了多菌灵的存在 (图 4)。

对在低能量通道中发现的所有其它推定母离子进行类似分析, 并采用 MS/MS 谱在农药 PCDL 的 741 种化合物中进行搜索。

作为验证研究, 将 190 种农药以依次升高的浓度加标到不同的三种基质 (西红柿、柠檬和鳄梨) 中。表 1 列出了 50 种重要的、经常检测出的农药的鉴定结果。在最低浓度的所有基质中均发现了大多数化合物, 他们的存在通过至少一种额外碎片离子得到了证实 (如绿色单元格所示)。在有些情况下, 化合物由 FbF 算法发现, 但没有对其碎片离子进行定性分析 (黄色单元格)。

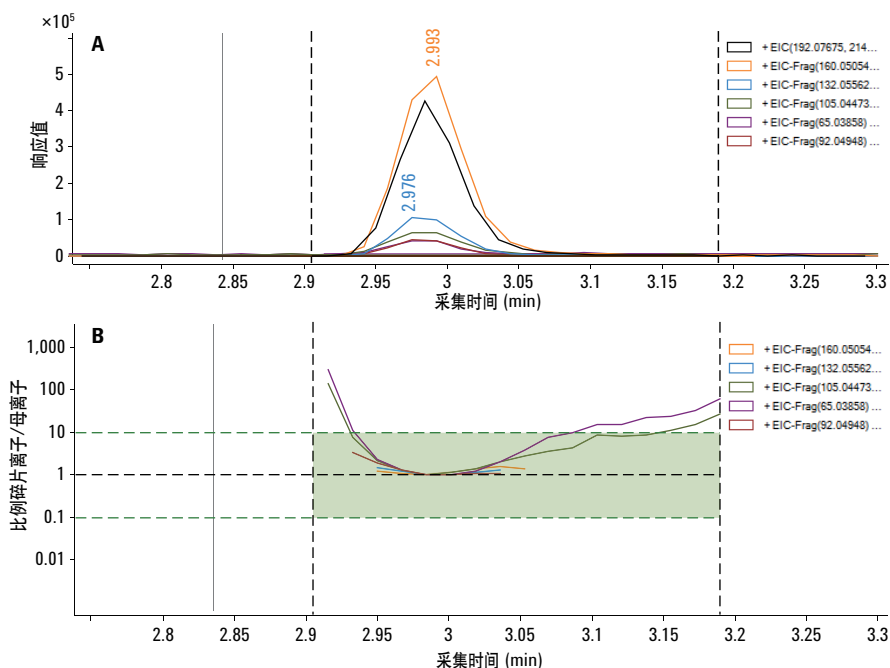


图 3. 叠加离子色谱图 (A) 和计算的共流出曲线 (B)

ID Techniques Applied										
FbF										
Name	Species	Formula	m/z	Score	Diff (ppm)	CAS ID	Best	Mass	RT	Hits (DB)
Carbendazim	(M+H) ⁺ (M+Na) ⁺	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	192.07662 214.05833	99.37	0.67	10605-21-7		191.06935	2.984	
Coelution Score										
Coelution Score	m/z	SNR	CE	Flags (FIs)	Height	Compound Name				
99	132.05562	273.6	40	Qualified	104535	Carbendazim				
98.8	160.05054	2286.2	20	Qualified	493827.6	Carbendazim				
97.7	105.04473	7.9	40	Qualified	62636.4	Carbendazim				
97.3	92.04948	45.7	40	Qualified	44105.7	Carbendazim				
97.2	65.03858	11.8	40	Qualified	36319.8	Carbendazim				

图 4. 化合物鉴定结果

表 1. 化合物确证结果

化合物	西红柿			柠檬			鳄梨					
	空白	0.005	0.01	0.05	空白	0.005	0.01	0.05	空白	0.005	0.01	0.05
啶虫脒												
涕灭威												
嘧菌酯												
联苯肼酯 (D 2341)												
稻虱净												
西维因												
多菌灵 (氮杂茂)												
毒虫畏 (I)												
枯草隆												
毒死蜱												
甲基毒死蜱												
嘧菌环胺												
苯醚甲环唑 (I)												
乐果												
烯酰吗啉 (E)												
醚菌胺												
呋虫胺												
二氧威												
乙氧喹												
苯线磷												
环酰菌胺												
氟啶唑 (I)												
粉唑醇												
抑霉唑 (II) (恩康唑)												
吡虫啉												
甲霜灵												
杀扑磷												
腈菌唑												
戊菌唑 (I)												
二甲戊灵 (二甲戊乐灵)												
亚胺硫磷 (酰胺硫磷)												
抗蚜威												
霜霉威												
丙环唑 (II)												
吡唑醚菌酯												
啶螨灵												
喹恶磷 (喹硫磷)												
多杀菌素 A												
螺环菌胺												
甲磺草胺												
戊唑醇 (II) (立克秀)												
吡螨胺												
噻苯达唑												
噻虫啉												
噻虫嗪												
三唑酮												
三唑磷												
肟菌酯												
烯效唑-P(I)												
蚜灭多												
苯酰菌胺												

然后将数据以化合物交换格式 (CEF) 文件格式导出到 MassHunter 定量分析软件修订版 B.05.02。CEF 文件包含了快速建立一个定量分析方法所需的信息，包括化合物名称、保留时间、母离子、碎片离子（生成规章要求的定性离子）、碰撞能量和相对丰

度。定量分析软件可以自动选择每个化合物的主要母离子和相对丰度在 10% 以上的碎片离子，省去了繁杂的人工操作和时间。软件选择和使用具有不同碰撞能量的碎片离子（图 5）。

定量分析软件分别提取准分子离子的定量离子（目标离子）、定性离子和同位素簇的色谱图。同位素模式可以通过与理论模式的重叠进行确证（图 6）。

Sample							
Name	Data File	Type	Level	Acq. Method File	Acq. Date-Time		
Comprehensive...	Comprehensive...	Cal	3	Pesticides_Allion...	9/10/2012 6:04		
Quantifier							
Name	TS	Transition	Scan	Type	Precursor Ion	Product Ion	Uncertainty
Azoxystrobin	7.41240	404.1240	Ms1Scan	Target	0.0000	404.1240	Relative
Qualifier							
Precursor Ion	Product Ion	Transition	Collision Energy	Rel. Resp.	Uncertainty	Area Sum	
0.0000	372.0979	372.0979	20.0	151.0	20.0		
0.0000	329.0795	329.0795	40.0	54.7	20.0		
0.0000	405.1269	405.1269	0.0	24.4	20.0		

图 5. 采用多种碰撞能量建立的定量分析方法

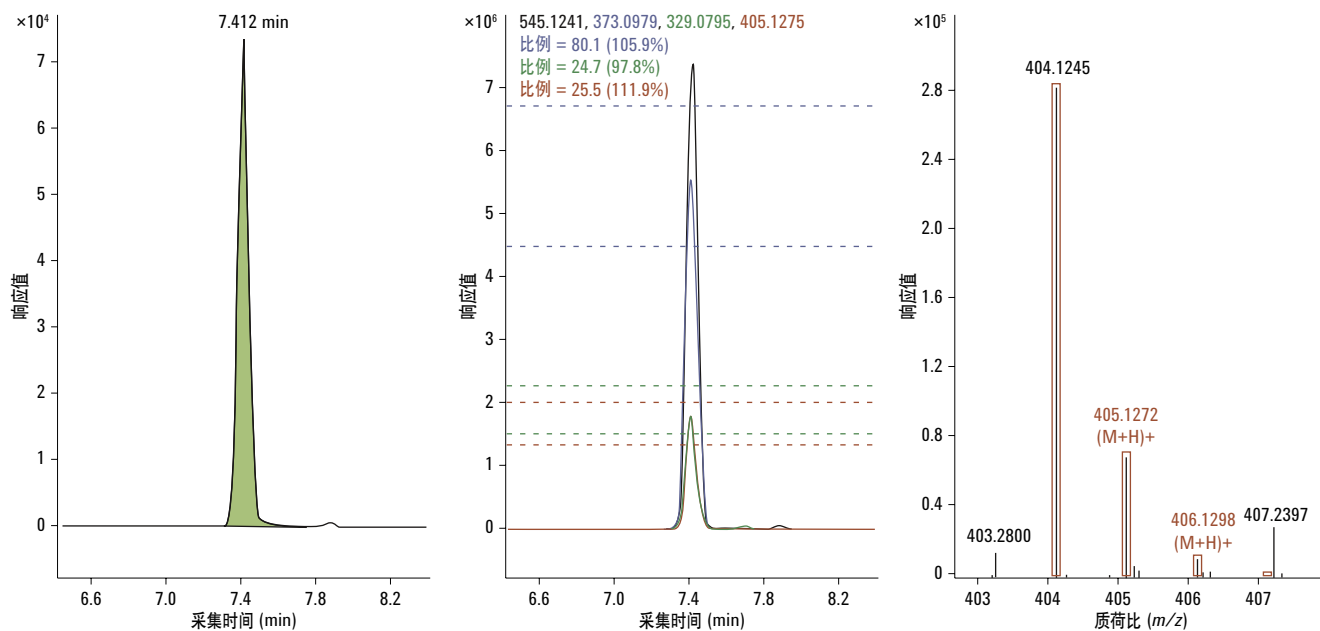


图 6. 包含定量离子、定性离子和同位素簇的化合物信息

在分析了大量样品之后，可以通过化合物一览模块中的样品和化合物来检查分析结果。图 7 展示了化合物的色谱图，其中用红色标注的是超出用户设定异常值限制的化合物。

结论

使用包含加标农药的食品基质样品快速建立了一个 Q-TOF 质谱仪的定量数据处理方法。在建立定量分析方法之前，使用全离子 MS/MS 技术筛查化合物的存在。全离子 MS/MS 技术无需输入数百化合物的名称或选择特定的子离子，从而提高了分析效率，

让分析员受益匪浅。此外，可方便地同时查看大量样品的结果。通过使用扩展的 PCDL 向筛查中加入更多化合物，以后仍可对这些数据重新审查。通过提供观察定量离子和定性离子的界面，包括采用精确质量指标对鉴定质量进行评分，定量分析软件可提供一个更加可靠的结果。



图 7. 化合物一览视图

参考文献

1. European Union. (2009). 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. Official Journal of the European Union.
2. Indexes to Part 180 Tolerance Information for Pesticide Chemicals in Food and Feed Commodities. (**2012**, 12 1). Retrieved 02 26, 2013, from U.S. Environmental Protection Agency: <http://www.epa.gov/pesticides/regulating/part-180.html>
3. EU Commission. (2012, 10 1). SANCO/12495/2001. Retrieved 02 26, **2013**, from EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides: <http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/fv/SANCO12495-2011.pdf>
4. EU Commission. (2013, 02 26). Rapid Alert System for Food and Feed. Retrieved 02 26, **2013**, from European Commission, Health and Consumers, Food: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm
5. EU Commission. (**2012**, 01 01) SANCO/12495/2011. Method Validation and Quality Control Procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Retrieved 02 26, 2013, from European Commission, Health and Consumers, Food: http://ec.europa.eu/food/plant/plant_protection_products/guidance_documents/docs/qualcontrol_en.pdf
6. Payá, P., & Anastassiades, M., 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, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 1697-714., **2007**.
7. Sievert, H.P., Drouen, Anton C.J.H. Spectral matching and peak purity in Diode Array Detection in High Performance Liquid Chromatography. New York: Marcel Dekker, 51, **1993**.

www.agilent.com/chem/QQQ

本信息如有变更，恕不另行通知。
仅用于研究。不用于诊断程序。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013
中国印刷，2013年5月6日
5991-2295CHCN



Agilent Technologies