

利用 Agilent 6495 三重四极杆质谱仪筛查和定量分析复杂食品基质中的多种农药残留

应用简报

作者

Dan-Hui Dorothy Yang、Anabel Fandino、Na Pi
安捷伦科技有限公司
Santa Clara, CA

Thomas Glauner
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本应用简报介绍了一种基于 UHPLC/MS/MS 的多残留分析方法，用于测定食品样品中 250 多种农药及农药代谢物。该方法得益于 Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统提升的色谱分离度、安捷伦喷射流离子源的通用电离功能以及 Agilent 6495 三重四极杆液质联用系统固有的高灵敏度。该方法用于分析红茶等复杂基质中的农药残留。在进样前对样品萃取物进行大倍数稀释，可控制电离过程中的基质效应。

我们的结果表明，6495 三重四极杆液质联用系统具有更高的灵敏度，可对浓度低于欧盟委员会规定的最大残留限量 (MRL) 的目标农药（多数目标农药甚至处于稀释比为 1:100 的萃取物中）进行准确的定量分析，并获得更高的精密度和优异的稳定性。



Agilent Technologies

前言

食品中农药残留的筛查和定量分析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，这些物质受到相关机构的监管和控制。欧盟委员会法规 (EC) 396/2005 及其附录规定了食品中 170000 多种基质-农药组合的最大残留限量 (MRL)¹。其他地区也颁布了类似的法规。大多数农药的分析采用涵盖数百种化合物的多残留分析法，这种方法适用于对多种食品进行筛查和定量分析。这样一来，就需要采用快速可靠的分析对多种食品基质中的数百种低浓度农药进行可靠鉴定和定量分析。SANCO/12571/2013² 等指导文件中规定了农药残留的鉴定标准以及在定量分析时方法验证和质量控制流程的要求。

电喷雾电离中的基质效应在不同食品样品之间相差很大，这对农药的准确定量分析带来了重大挑战。可采用一些不同的策略来补偿基质效应，如基质匹配校准、标样添加或内标的使用。然而，基质匹配校准无法完全补偿食品或食品组内基质效应的差异。标样添加法需要对每个样品多次进样，会降低工作效率。同位素标记内标法是最受关注的一种方法，但这种方法并不适用于多残留农药分析方法中的所有目标化合物。样品稀释是另一种可最大程度减小基质效应的方法³，但由于要对浓度低于 EC 规定 MRL 的污染物进行检测，因此需要使用高灵敏度分析仪器。此外，对样品萃取物进行大倍数稀释时，即使极小的偏差与高稀释倍数相乘，也会产生非常大的不准确性，因此需要极高的稀释精度。

本应用简报展示了食品样品中数百种农药的 UHPLC/MS/MS 筛查和定量分析方法的开发。采用农药 tMRM LC/MS 应用套装 (部件号 G1733BA) 进行方法开发。该方法包括了农药综合混标 (部件号 5190-0551) 和其他一些目标农药中所有化合物的离子对。将 Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统与快速极性切换的动态 MRM 模式下运行的高灵敏度 Agilent 6495 三重四极杆液质联用系统联用。对上一代高端三重四极杆质谱仪的设计进行一些改进后，获得了更高的分析性能。

- 提升母离子传输效率的新型第一质量过滤器 (MS1) 离子光学元件
- 改善 MS/MS 谱图保真度的改进型弯曲和锥形碰撞池
- 在高达 20 kV 的打拿极加速电压下运行的新型离子检测器
- 优化速度和灵敏度的全新自动调谐功能

此外，6495 三重四极杆液质联用系统使用了成熟可靠的安捷伦喷射流离子源和二级离子漏斗。更高的灵敏度可提供更高的峰面积响应和改善的峰面积精度，最终使检测限优于之前的设计。灵敏度的提高可用于复杂食品样品萃取物的大倍数稀释，以最大程度减小电喷雾电离时的基质效应。分析方法精密度的提高通过稀释的红茶样品得到了证实。

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)。超纯水产自采用 LC-Pak Polisher 和 0.22 μm 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 公司, St. Louis, MO, USA)，甲酸铵溶液 (5 M) 购自安捷伦公司 (部件号 G1946-85021)。农药包含在安捷伦综合农药混标 (部件号 5190-0551) 中。数量有限的其他几种农药购自 Fluka (Sigma-Aldrich 公司, St. Louis, MO, USA)。使用前，将八种综合农药混标的混合物与其他农药的混合储备液合并，然后用乙腈进一步稀释为最终农药工作溶液，该溶液中含有 250 多种浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的农药。该溶液用于 QuEChERS 萃取物加标和校准样品配制。用纯乙腈配制浓度范围为 0.02-100 ng/mL 的八个校准样品。

样品前处理

茶叶、橙子和番茄样品购自当地食品杂货店。使用 Agilent BondElut QuEChERS 试剂盒 (部件号 5982-5650) 按照柠檬酸盐缓冲的 QuEChERS 方法对样品进行萃取。称取 10 g 均质水果和蔬菜或 2 g 红茶至 50 mL 聚丙烯管中，并加入 10 mL 乙腈，用手剧烈振摇萃取 1 分钟。在萃取前，用 8 mL 超纯水将茶叶样品润湿 2 小时。利用 N-丙基乙二胺 (PSA，部件号 5982-5256) 通过分散式 SPE 对粗萃取液进行净化。也可利用 Agilent BondElut QuEChERS EN 分散式 SPE 管 (部件号 5982-5356H) 中所含的石墨化炭黑 (GCB) 对红茶样品进

行净化。将五种相应浓度的综合农药工作溶液加入空白样品的最终萃取液中，并用乙腈按 1:5、1:10、1:20、1:50 和 1:100 的比例进行稀释。在进样之前立即配制基质匹配标样和稀释液，并用五个技术重复样本进行测定。

设备

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)、样品冷却器 (G1330B) 和 Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)。该 UHPLC 系统与配备安捷伦喷射流电喷雾离子源的 Agilent G6495 三重四极杆液质联用系统联用。采用 Agilent MassHunter 工作站软件 (B.07.00 版) 进行数据采集和分析。

方法

1290 Infinity UHPLC 系统实验条件汇总于表 1 中，6495 三重四极杆质谱仪参数如表 2 所示。利用安捷伦农药 tMRM LC/MS 应用套装进行极性、母离子和子离子的确认以及碰撞能量的优化，并使用 Agilent MassHunter Optimizer 软件进行进一步优化。采用正离子和负离子电喷雾电离，在动态多反应监测 (dMRM) 模式下通过单次运行进行分析。将 2 μ L 最终萃取液进样至 UHPLC/MS/MS。

采用 Agilent MassHunter 定量分析软件对数据进行评估。采用纯标准溶液和线性 1/x 加权校准曲线进行校准。红茶基质中获得的定量下限 (LLOQ) 与仪器检测限 (IDL) 有关。取浓度不超过检测限 2-5 倍的低浓度样品按一系列重复测定结果的相对标准偏差来计算 IDL。IDL 的定义是在 99% 的置信水平

下产生与背景噪音具有统计学差别的信号所需的分析物最小含量。这种方法更适用于常规操作，可以避免信噪比 (S/N) 测定过程中化学噪音的变化和主观性造成的不明确⁴。此外，它与分析方法的精密度直接相关，而精密度在样品萃取液的大倍数稀释中非常重要。

表 1. 仪器参数

Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统		
色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 \times 150 mm, 1.8 μ m (部件号 959759-902)	
柱温	40 $^{\circ}$ C	
进样量	2 μ L	
速度	抽取 100 μ L/min; 推出 200 μ L/min	
自动进样器温度	6 $^{\circ}$ C	
进样针清洗	用乙腈/水 (50/50; v/v) 清洗 10 s	
流动相	A) 5 mM 甲酸铵 + 0.1% 甲酸 B) 5 mM 甲酸铵 + 0.1% 甲酸的甲醇溶液	
流速	0.4 mL/min	
梯度程序	时间	B%
	0	5
	0.5	5
	3.5	50
	17.0	100
	20.0	100
	20.1	5
停止时间	20.1 min	
后运行时间	3 min	

Agilent 6495 三重四极杆液质联用系统	
电离模式	采用安捷伦喷射流技术的正/负电喷雾离子源
扫描类型	动态 MRM
干燥气温度	120 $^{\circ}$ C
干燥气流速	17 L/min
鞘气温度	300 $^{\circ}$ C
鞘气流速	12 L/min
雾化器压力	30 psi
毛细管电压	3500 (正离子/负离子)
喷嘴电压	300 V (正离子) ; 500 V (负离子)
循环时间	500 ms
MRM 总数	532 (正离子: 509/负离子: 23)
最大 MRM 并发数	68
最短驻留时间	5.10 ms
最长驻留时间	249.09 ms
MS1 和 MS2 分辨率	单位

结果与讨论

UHPLC/MS/MS 方法开发

本研究将针对安捷伦农药 tMRM LC/MS 应用套装开发的农药筛查方法转移至 6495 三重四极杆液质联用系统。该方法经过扩展后包括几种相关的酸性除草剂，并采用快速极性切换。对碰撞能量和碰撞池加速电压等依赖于

化合物的参数进行微调，所得到的结果与之前型号仪器的最佳值相比仅有微小的偏离。在仪器的自动调谐过程中，根据质量数对预过滤器和检测器进行调整。使用 MassHunter Source Optimizer 软件对鞘气温度进行优化，使大多数目标化合物获得最高的丰度，同时不受形成铵加合物的不稳定化合物的影响。

图 1 显示了添加浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 250 多种农药的红茶萃取液色谱图，进样前按 1:20 的比例用乙腈稀释。

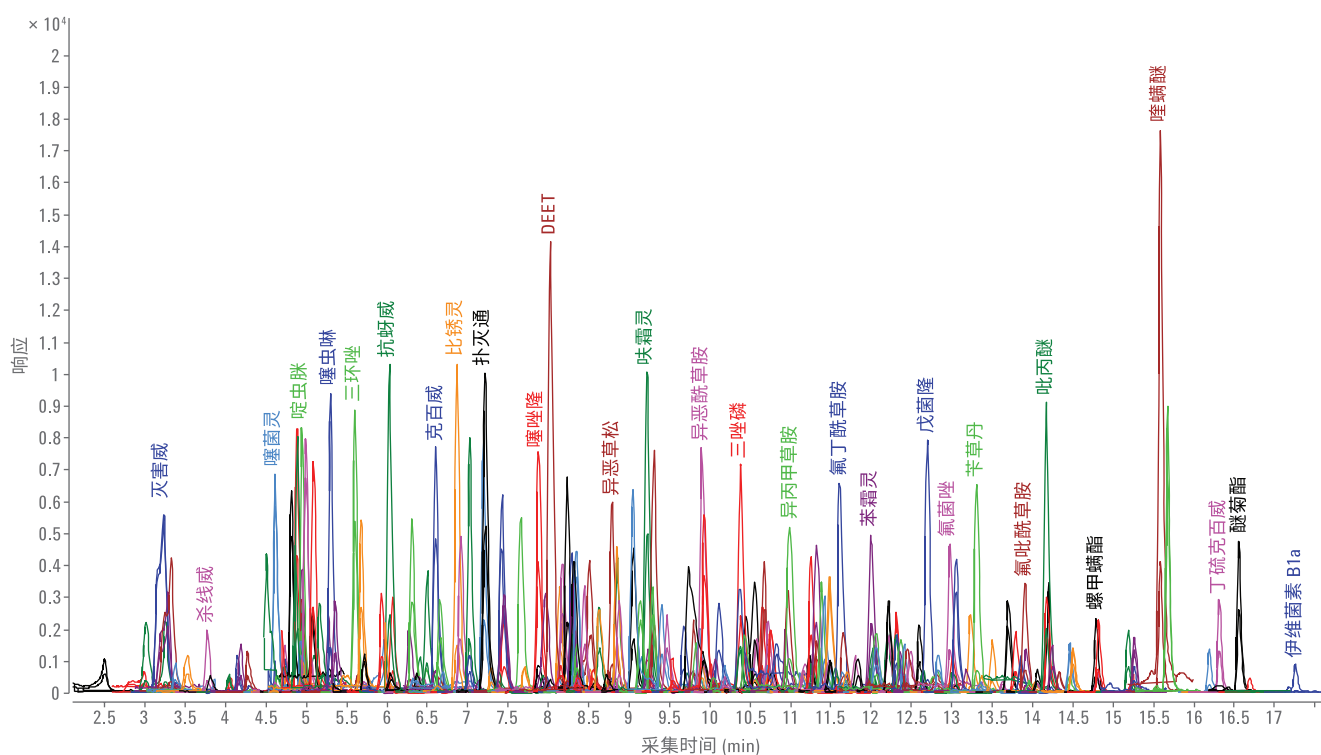


图 1. 红茶中加标浓度为 MRL 并用乙腈稀释 20 倍（对应浓度为 0.1 ng/mL ）的 250 多种农药的色谱图。为清楚起见，图中仅标记出部分色谱峰

仪器性能提升的评估

MS1 离子光学元件显著提升了母离子传输, 根据离子质量数不同, 母离子传输效率最多可增加 2 倍。此外, 检测器的设计使信号得到了增强, 尤其是在宽质量数范围内的大碎片离子和负离子信号。用 6495 三重四极杆系统采集的农药峰面积响应与早期型号仪器得到的结果进行比较, 观察到依赖于化合物的峰面积最多可增加 4 倍。

增强的离子传输能力不仅增加了峰面积响应, 而且改善了峰面积的测定精

密度。性能增强后, 仪器检测限远低于之前仪器的检测限。对于红茶中添加的浓度为 MRL 并用乙腈以不同比例稀释的 50 种农药, 采用 6495 三重四极杆系统获得的峰面积 RSD 与 6490 三重四极杆系统获得的结果相比, 得到支持以上假设的经验观察结果, 如图 2 所示。这 50 种农药的选择以相关性为基础。结果发现其中几种化合物在官方对照样品中的浓度高于 MRL, 因此欧盟将限制这种茶叶的进口。蓝色多边形的面积远小于红色多边形的面积, 表明对于相同稀释水平下的大

多数农药, 6495 三重四极杆系统仪器所改善的离子统计性转换为较低的 RSD 值。一系列低浓度样品平行测定结果的相对标准偏差 (RSD) 可作为衡量离子效率的通用指标, 也可用于估算定量限。低 RSD 值比 S/N 测量结果具有更高的相关性, 因为 S/N 可能随选定的噪音区域和计算所用的软件算法而变化。只要噪音水平对 RSD 值无显著贡献, 特定的 RSD 就能看作是能够可靠检测的最小含量。对于农药残留, SANCO/12571/2013 中将 20% 的 RSD 最大值规定为最低性能要求。

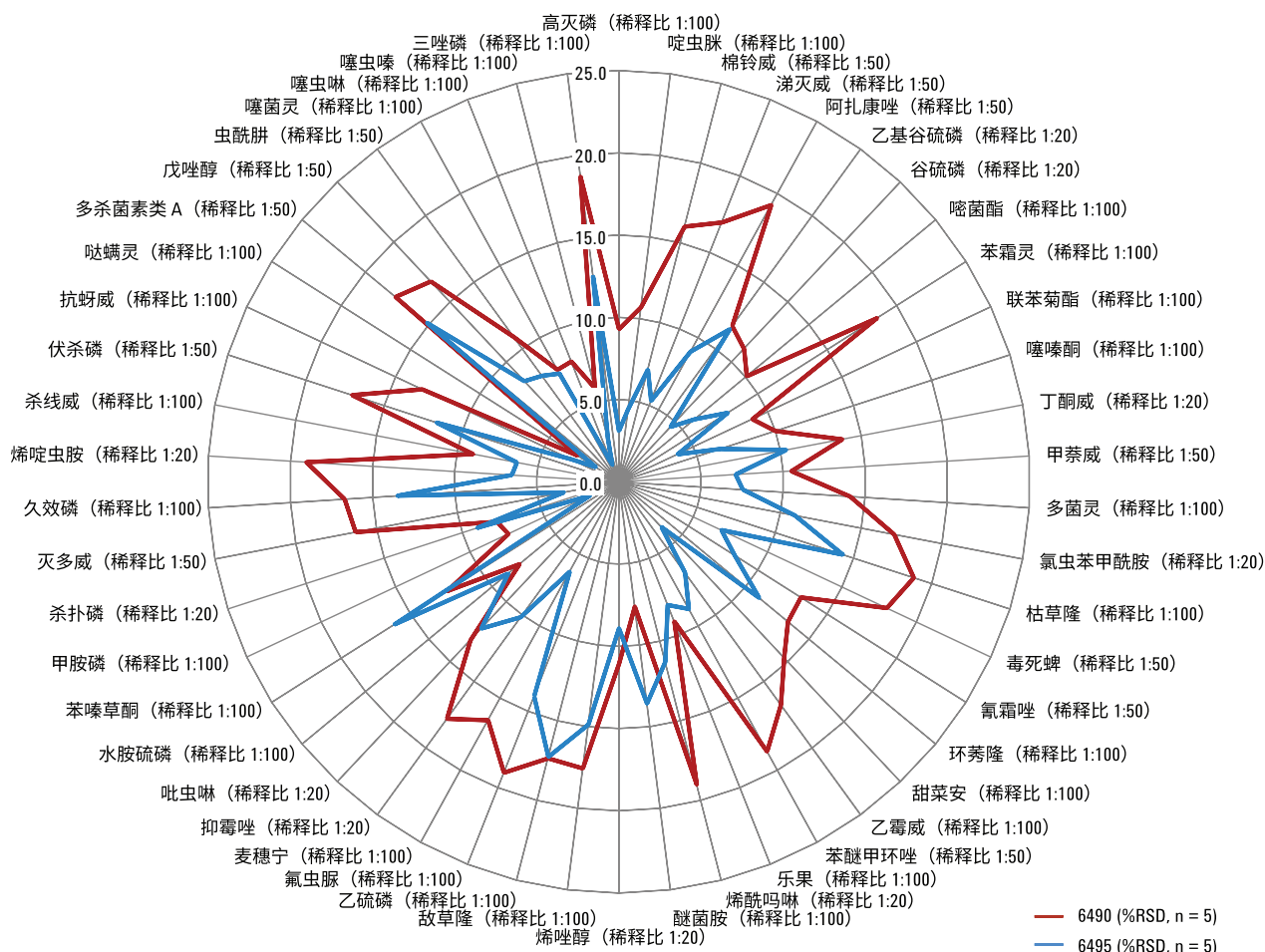


图 2. 红茶中加标浓度为 MRL 并用乙腈以不同稀释比稀释得到的样品在 Agilent 6495 液质联用系统 (蓝色) 和 Agilent 6490 三重四极杆系统 (红色) 上获得的峰面积 RSD 比较

采用最新设计的 6495 三重四极杆液质联用系统，根据 SANCO 指南中规定的质量规范从不同食品的 QuEChERS 萃取物中可检出更多的低浓度农药。在番茄和橙子萃取物中，可轻松检出最低加标浓度为 1 ng/g 的所有农药。而由于样品量仅为上述基质的 1/5 且基质更为复杂，相同浓度下的茶叶基质检出率略小。图 3 显示了红茶基质中不同稀释水平的农药检出率。

在所用的实验条件下，轻松检出 1:100 稀释液中大约 67% 的加标农药，其 RSD 值低于 20%，对应的浓度为 0.02 ng/mL。此外，大约 20% 的加标农药在 1:50 稀释液中检出并获得了可接受的精密度，另外约 10% 的加标农药在 1:20 稀释液中检出。在 72 小时的运行队列中，观察到这些样品的重复进样结果具有优异的精密度。

通过稀释样品萃取物最大程度减小基质效应

对许多常规检测实验室而言，通过大倍数稀释样品萃取物除去基质效应是一种十分重要的能力。与溶剂校准相比，这种方法能更轻松地实现对复杂样品的准确定量分析。电喷雾电离中产生基质效应的可能原因之一是多余电荷的数量和带电液滴表面上的空间均受限。稀释基质可释放表面空间，使目标化合物得到更有效的电离。此外，进样至液质联用系统的基质数量受限，从而提高分析方法的稳定性，最大程度减小仪器污染，并延长仪器正常运行时间。

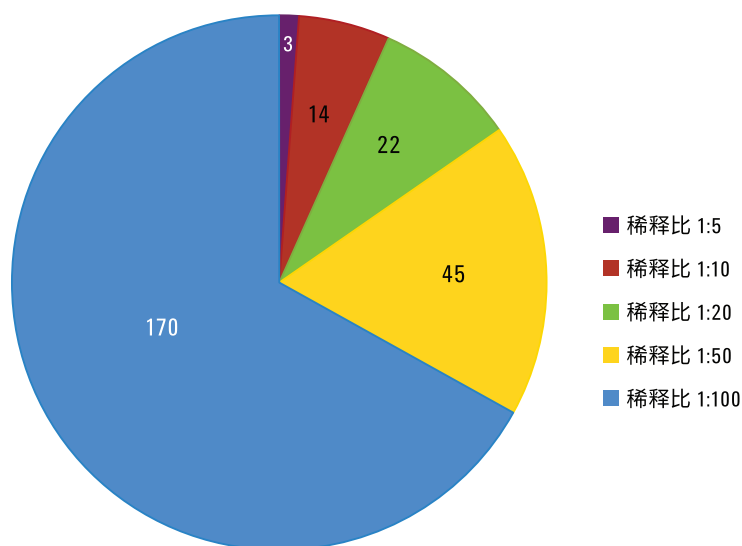


图 3. 红茶萃取物中加标浓度为 2 ng/mL 并按不同的量级稀释农药。170 种农药在 1:100 的稀释水平下被检出，峰面积 RSD < 20%。其他化合物在更高浓度（即较低稀释水平）下检出

图 4 显示了红茶萃取物中添加的棉铃威和杀线威色谱图，加标农药的浓度相当于 10 µg/kg，并在进样前用乙腈按不同比例进行稀释。

稀释比为 1:5 时，棉铃威的信号增强。对于杀线威和稀释倍数更高的棉铃威，峰面积减小的程度低于目标化合物的稀释程度。稀释通常会使农药的最终浓度降低至达到完全回收的浓度。表 3 显示了红茶萃取物中 10 种农药在不同稀释比下得到的回收率。

敌草隆和氟虫脲表现出较弱的基质效应，而未稀释茶叶样品中的久效磷和棉铃威的信号抑制非常显著。然而，当最终萃取液的稀释比为 1:10 时，一半以上的化合物表现出高于 70% 的回收率，这个数字满足方法要求。极少的化合物需要采用 1:50 甚至 1:100 的稀释比来最大程度减小基质效应，以便在溶剂校准中获得可接受的回收率。在 1:100 的稀释比下，所有可检出的农药均达到完全回收，基本不存在信号抑制。这一结果与已发表的结果一致，表明安捷伦喷射流电离技术与同等技术相比，只需较低的稀释倍数即可消除基质效应³。

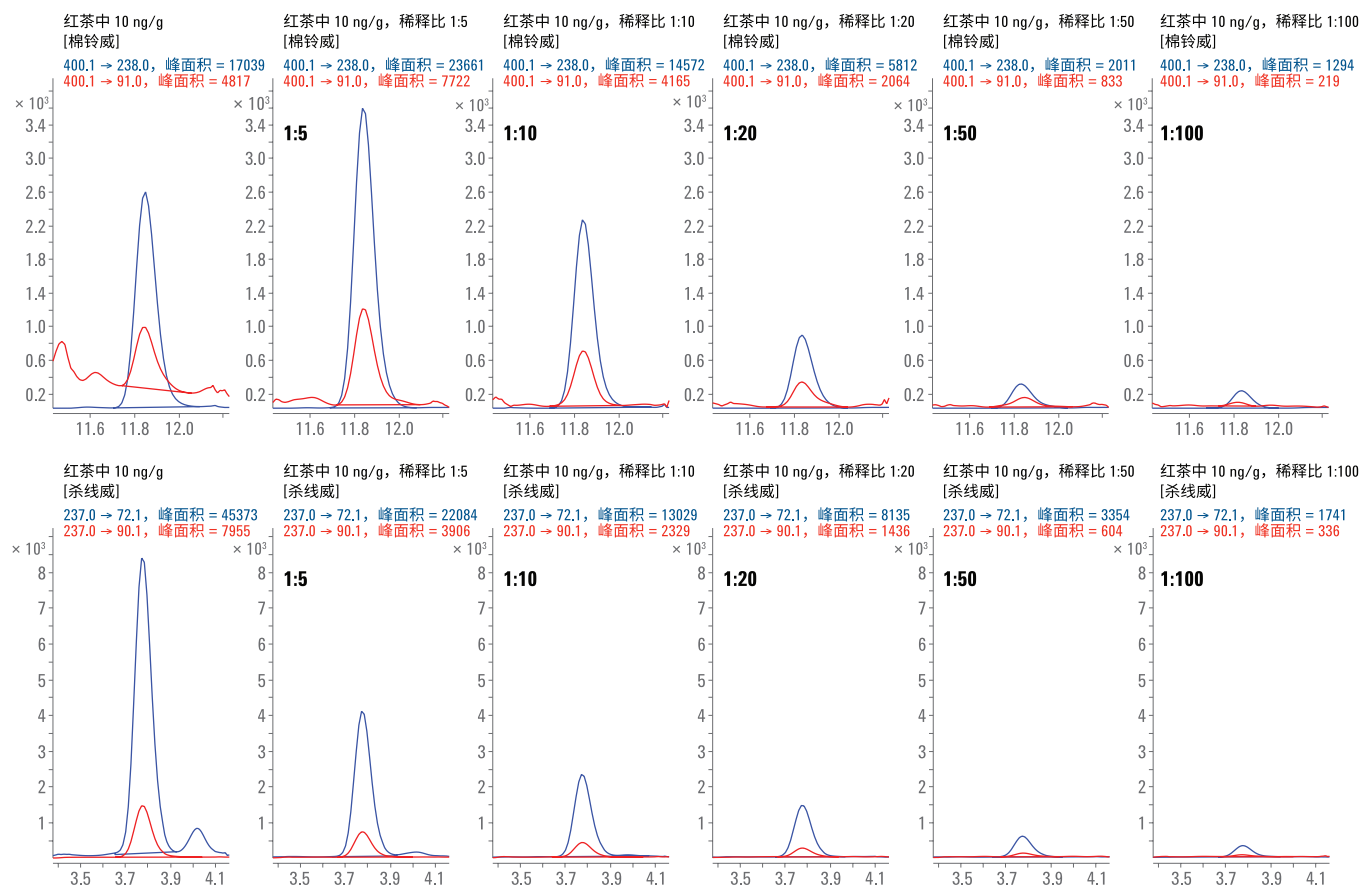


图 4. 红茶中添加的并在进样前用乙腈以 1:5、1:10、1:20、1:50 和 1:100 稀释的棉铃威和杀线威的峰面积比较

表 3. 在不同稀释比下计算得出的所选农药的回收率。绿色单元格中的数据符合 SANCO/12571/2013 的要求

分析物	未稀释 (n = 5)	稀释比 1:5 (n = 5)	稀释比 1:10 (n = 5)	稀释比 1:20 (n = 5)	稀释比 1:50 (n = 5)	稀释比 1:100 (n = 5)
啉虫脒	29.4 ± 0.8	57.3 ± 1.4	67.5 ± 3.7	79.9 ± 2.9	91.8 ± 5.2	109.5 ± 3.4
棉铃威	10.4 ± 1.3	73.9 ± 2.2	81.5 ± 14.3	85.7 ± 11.1	87.6 ± 4.7	121.7 ± 10.8
涕灭威	36.9 ± 1.0	69.9 ± 1.4	78.0 ± 3.5	91.0 ± 4.2	95.2 ± 8.8	104.9 ± 14.1
甲萘威	56.9 ± 1.8	80.1 ± 3.8	80.8 ± 4.1	96.1 ± 7.2	102.6 ± 6.6	116.4 ± 9.6
乐果	33.9 ± 1.7	68.6 ± 2.4	84.1 ± 5.4	89.0 ± 7.9	88.2 ± 8.8	84.7 ± 7.5
敌草隆	79.7 ± 4.0	90.4 ± 7.0	91.7 ± 4.9	94.9 ± 7.2	89.2 ± 7.3	100.9 ± 13.5
氟虫脲	95.4 ± 1.1	88.8 ± 1.6	89.4 ± 3.8	93.3 ± 5.8	100.0 ± 6.1	119.2 ± 13.9
久效磷	4.6 ± 0.3	13.9 ± 0.3	21.8 ± 0.8	33.8 ± 1.1	58.5 ± 2.0	95.1 ± 5.7
杀线威	20.8 ± 0.7	52.6 ± 1.9	65.0 ± 2.0	79.7 ± 3.0	91.2 ± 4.6	110.6 ± 5.2
噻虫嗪	40.0 ± 1.4	45.9 ± 0.9	46.6 ± 3.8	52.2 ± 1.7	70.9 ± 2.9	97.3 ± 2.0

结论

本文基于 UHPLC/MS/MS 的多残留分析法开发出一种用于测定 250 多种农药及农药代谢物的方法。该方法充分利用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统的低延迟体积及其能够在 UHPLC 分离中承受高压的优势,从而提高了色谱分离度。该方法得益于高灵敏度 Agilent 6495 三重四极杆质谱仪以及安捷伦喷射流离子源的通用电离功能。利用动态 MRM 采集和快速极性切换最大程度缩短了每种化合物的驻留时间。离子源参数得到优化,使整套目标化合物获得了良好的灵敏度。

该方法用于分析红茶等复杂基质中的农药。灵敏度的增强有利于更灵活地选择样品稀释倍数。通过稀释降低液质联用系统中引入的基质量,由此不仅可减小基质效应,而且能够改善方法的稳定性并延长仪器正常运行时间。对样品萃取物进行大倍数稀释,最大程度减小了基质效应,还可在 70%-120% 的回收率接受范围内按溶剂校准对所有农药进行定量分析。高灵敏度 6495 三重四极杆液质联用系统能够对 100 倍稀释萃取物中浓度低于欧盟委员会规定最大残留限量的大多数目标农药进行定量分析,并获得更高的精密度和优异的稳定性。

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. 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
3. Stahnke, H., *et al.* Reduction of Matrix Effects in Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Mass Spectrometry by Dilution of the Sample Extracts: How Much Dilution is Needed? *Anal. Chem.* **2012**, *84*, pp 1474-1482 (incl. supporting information)
4. Parra, N.P., Taylor, L. Why Instrument Detection Limit (IDL) is a Better Metric for Determining the Sensitivity of Triple Quadrupole LC/MS Systems (仪器检测限 (IDL) 为何是用于检测三重四极杆液质联用系统的更优指标)。安捷伦科技公司技术概述, 出版号 5991-4089EN, **2014**

查找当地的安捷伦客户中心:

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

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

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, 2014
2014 年 6 月 13 日, 中国出版
5991-4687CHCN



Agilent Technologies