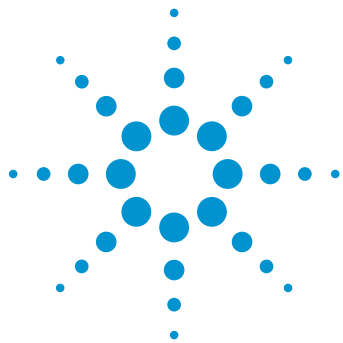




使用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与三重四极杆质谱检测分析蔬菜中的农药

应用简报

食品检测与农业

作者

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

摘要

本应用简报介绍了对分离方法的优化，该方法利用超临界流体色谱 (SFC) 与三重四极杆质谱检测来测定复杂食品基质中的农药。利用不同陡度的多个梯度分析其中加入了不同浓度的多农药标准品的蔬菜基质。利用软件辅助的批次比较确定最佳分离条件，以鉴定具有最低基质影响的梯度。



Agilent Technologies

前言

农药广泛用于各种植物食品（如蔬菜、水果、玉米和谷物）的生产过程，以防止各种害虫。在植物类食品上市之前，必须对其中可能存在的农药残留进行检测，这些农药残留必须满足法定限值要求¹。因此，必须对完整的植物食品样品进行提取并将其转换为可分析的形式，通常是溶于有机溶剂中的溶液。这一提取过程主要通过 QuEChERS 程序完成²。现有技术是利用 HPLC 与三重四极杆质谱检测来分析这类样品。遗憾的是，在样品前处理过程中，不仅提取了残留农药，还提取了组成基质的天然固有化合物。当农药和基质化合物同时从 HPLC 色谱柱上洗脱下来时，它们将在质谱仪的离子源中竞争电离。这妨碍了对复杂食品基质中农药的准确定量分析。如果存在的基质化合物大大过量，则它们可能完全抑制农药的电离。

所有化合物在色谱柱上获得良好的分离可有助于避免这种情况，并能对分析物的质谱检测产生巨大的影响。因此，精心优化分离过程与调整质谱参数同样重要³。为比较几种分离条件，可执行批量分析，并且鉴别出最佳条件以实现最优且最广泛的检测。

在本应用简报中，首先优化了超临界流体色谱 (SFC) 分离并对不同的分离条件进行了批次比较，然后利用 SFC 和三重四极杆质谱检测复杂食品基质中的农药。对使用质谱分析植物食品样品中的农药而言，采用 SFC 作为前端分离技术的优势体现在分离速度、正交选择性以及对样品前处理过程中所用有机溶剂的进样耐受性这几方面。

实验部分

仪器

所有实验均在 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统 (G4309A) 上完成，该系统包括：

- Agilent 1260 Infinity SFC 控制模块
- Agilent 1260 Infinity SFC 二元泵
- Agilent 1260 Infinity 高性能脱气机
- Agilent 1260 Infinity SFC 自动进样器
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱
- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器，配备高压 SFC 流通池
- Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统 (G6460C)
- Agilent 1260 Infinity 等度泵 (G1310B)
- 分流器套装 (G4309-68715)

仪器设置

Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统的推荐配置如图 1 所示。色谱柱直接连接至分流器组件，该分流器组件包含两个组合分流器、一个额外的单向阀用于防止 CO₂ 流回辅助泵以及一个溶剂过滤器。在第一个分流器处，来自等度泵的补偿液被引入流路中。该分流器通过内径为 0.12 mm 的短毛细管连接至第二个分流器。在这里，液流被分为两部分，一部分进入质谱仪，另一部分进入 SFC 模块的反压调节器 (BPR)。利用新开发的内径为 50 μm 且长度为 1 米的不锈钢毛细管实现与质谱仪的连接，该毛细管包含在分流器套装中。分流比取决于该限流毛细管产生的反压和 BPR 所设置的压力。根据经验，SFC 反压为 120 bar 时，分流至离子源的 SFC 流量约 0.45 mL/min，反压为 200 bar 时，分流至离子源的流量约 0.6 mL/min。由于电喷雾质谱检测取决于浓度，因此对信号强度无影响。

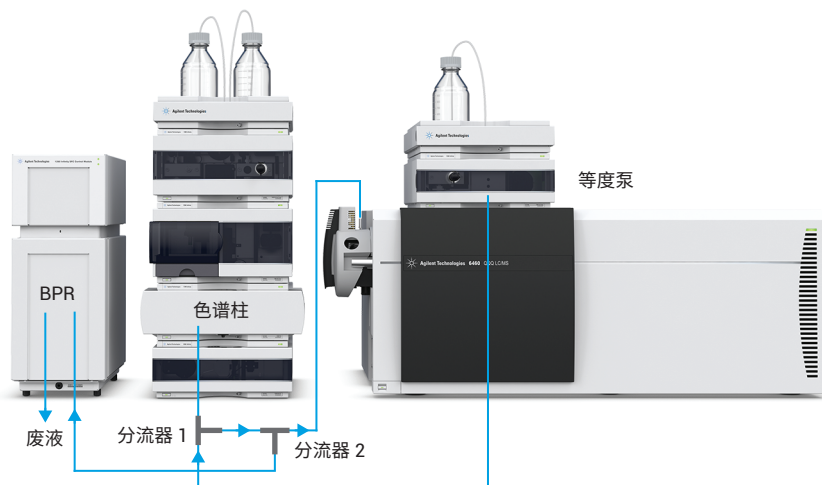


图 1. Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统的配置。色谱柱直接连接至分流器组件中的分流器 1

色谱柱

Agilent ZORBAX NH2, 4.6 × 150 mm, 5 µm (部件号 883952-708)

软件

- 适用于三重四极杆质谱仪的 Agilent MassHunter 数据采集软件, 06.00 版, 包括 SFC 附加软件
- Agilent MassHunter 定性分析软件, 06.00 版
- Agilent MassHunter 定量分析软件, 07.00 版

标准品

包含 17 种农药的乙腈溶液 (各自浓度为 10 ng/µL) 混标购自 LGC Standards GmbH (农药混标 44, 部件号 18000044; Mercatorstrasse 51, 46485 Wesel, Germany)。在本研究中, 未考察固有的农药降解产物脱乙基莠去津, 因为它与蔬菜和水果无关, 而是莠去津在土壤和水中的降解产物。

化学品

所有溶剂均为 LC/MS 级。乙腈和甲醇购自德国 J.T. Baker 公司。新制超纯水产自配置 LC-Pak Polisher 和 0.22 µm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。

SFC 方法

参数	值
SFC 流速	3 mL/min
SFC 梯度 1	0 分钟, 2% B; 5 分钟, 20% B; 5.1 分钟, 50% B 停止时间 7 分钟 后运行时间 2 分钟
SFC 梯度 2	0 分钟, 2% B; 10 分钟, 20% B; 10.1 分钟, 50% B 停止时间 12 分钟 后运行时间 2 分钟
SFC 梯度 3	0 分钟, 2% B; 15 分钟, 20% B; 15.1 分钟, 50% B 停止时间 17 分钟 后运行时间 2 分钟
SFC 梯度 4	0 分钟, 2% B; 8 分钟, 12% B; 8.1 分钟, 50% B 停止时间 10 分钟 后运行时间 2 分钟
改性剂	甲醇
BPR 温度	60 °C
BPR 压力	120 bar
柱温	40 °C
进样量	5 µL, 定量环过量填充 3 倍

通过分流和补偿流将 SFC 连接至 MS

参数	值
补偿流组成	乙腈 + 0.2% 甲酸
补偿流流速	0.5 mL/min
流速梯度	0 min 时, 0.5 mL/min; 5、10、15 或 8 min 时, 0.3 mL/min

质谱方法

参数	值
电离模式	正离子
毛细管电压	2500 V
喷嘴电压	2000 V
气体流速	8 L/min
气体温度	220 °C
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	380 °C
雾化器压力	25 psi
MRM 条件	见表 1

表 1. 所用混合物中固有农药化合物的 MRM 条件，由 MRM 优化程序获得（驻留时间 10 ms，碰撞池加速电压 5 V）

	母离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	子离子 1 (m/z)	碰撞能量 (eV)	子离子 2 (m/z)	碰撞能量 (eV)
异丙甲草胺	284.1	90	252.1	12	176.1	24
吡啶草胺	278.1	70	210.1	4	134.1	20
溴谷隆	259.0	85	170.0	16	148.1	12
环嗪酮	253.1	85	171.1	12	71.1	32
利谷隆	249.0	85	181.1	12	159.9	16
氟草津	241.1	100	214.1	12	104.1	32
敌草隆	233.1/235.1	95	72.1	20	72.1	20
甲氧隆	229.1/231.1	135	72.1	16	72.1	16
特丁津	230.1	55	174.1	12	104.1	32
另丁津	230.1	85	174.1	12	104.1	36
噻唑隆	222.1	65	165.1	12	150.0	36
莠去津	216.1	85	174.0	16	104	28
绿谷隆	215.1	95	148.0	16	125.9	12
绿麦隆	213.1/215.1	65	72.1	20	72.1	20
异丙隆	207.1	95	165.0	12	72.1	20
西玛津	202.1	105	132.1	16	124.1	16

样品前处理

芝麻菜购自当地蔬菜水果店。根据官方的柠檬酸盐缓冲 QuEChERS 方案，使用 Agilent BondElut QuEChERS 试剂盒（部件号 5982-5650）萃取样品。称取 10 g 均质芝麻菜样品至 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。加入包含 4 g 无水 MgSO_4 、1 g NaCl 和 1.5 g 缓冲柠檬酸盐的萃取盐包后，将混合物再次振摇 1 分钟，然后以 3000 rpm 的转速离心 5 分钟。

在相分离后，将 6 mL 上层乙腈相转移至 Agilent BondElut QuEChERS EN 分散式 SPE 管（部件号 5982-5256），该管中包含用于样品净化的 150 mg N-丙基乙二胺 (PSA) 和 15 mg 石墨化炭黑以及用于除水的 900 mg 无水 MgSO_4 。将管密封，并再次振摇 1 分钟。然后，以 3000 rpm 的转速将管离心 5 分钟。将 4 mL 最终提取物转移至干净的聚丙烯样品瓶中。为改善目标农药的稳定性，将 40 μL 甲酸加入最终提取物中。

结果与讨论

为评估基质效应，在芝麻菜样品的最终 QuEChERS 提取物中加入农药溶液，并使浓度达到 10、20 和 100 ppb。选择 10 ppb 作为最低加标浓度，因为在所采用的所有梯度条件下，能够对标准溶液中各自浓度为 10 ppb 的所有农药实现正确的检测。10 ppb 的浓度也是蔬菜和水果中农药检测的典型性能要求。所用的芝麻菜基质是蔬菜和水果分析中比较复杂的基质之一。在此次对比中，采用梯度 1 作为参比分离。为了进行比较，将分析时间从 10 分钟增加至 15 分钟，由此生成梯度较低的其他两种梯度，同时保持有机改性剂的最终最高含量。在最平缓的梯度（梯度 3）下，采用约 10% 的有机改性剂时，具有最高保留特性的农药化合物在 7.5 分钟时洗脱。因此，在最佳梯度 4 下，有机物含量在 8 分钟内增加至最终浓度，即 12% 的甲醇。随后，将有机物含量增加至 50%，以除去色谱柱中剩余的基质化合物。图 2 显示了在梯度 4 的条件下，混标中浓度为 10 ppb 的 16 种标准农药混合物的分离结果。

为评估不同梯度下的基质效应，对加标芝麻菜提取物与校准标样的分离进行比较。在 MassHunter 定量分析软件中，将浓度为 10 ppb 的标准溶液设置为 100%，并用作单点校准。通过这种方式，在批处理表格中标记出加标样品的峰值强度变化以进行快速批量查看。将该表格转换为图 3 所示的柱状图，一目了然地显示出结果。在比较通过梯度 1 分析的纯标准溶液与通过相同梯度分析的基质中的加标样品时，由于存在基质抑制，因此化合物的强度通常有所降低。

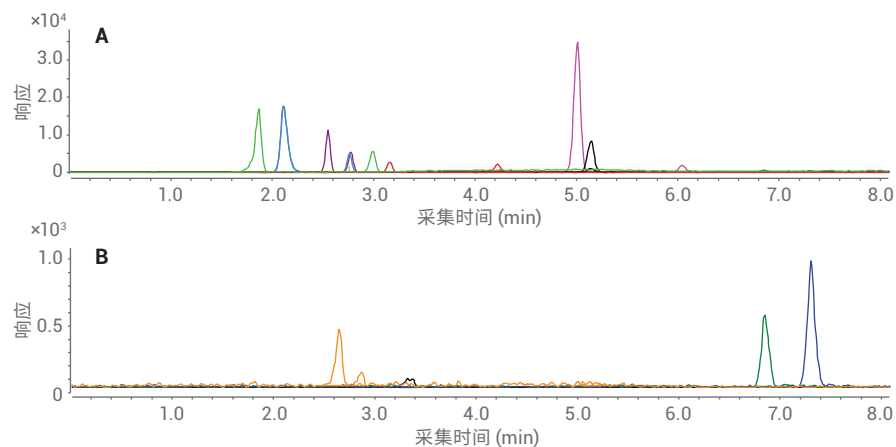


图 2. A) 利用梯度 4 对浓度为 10 ppb 的所有 16 种标准农药化合物的分离。B) 浓度为 10 ppb 时，丰度最低的五种农药化合物

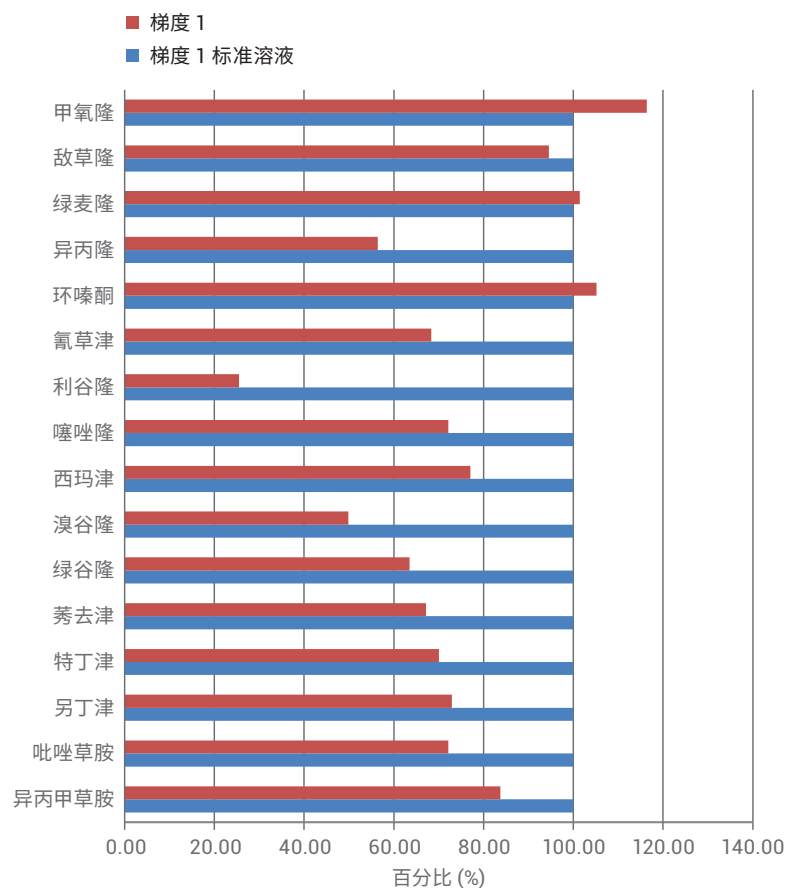


图 3. 芝麻菜基质（红色）与标准溶液（蓝色）中 16 种农药化合物的基质抑制效应对比

将梯度改为有机改性剂以较低的陡度增加，可以改善目标化合物与基质化合物的分离，并减小由高丰度基质化合物引起的抑制效应，从而获得更高的信号强度。

为了证明这一点，还采用梯度 2、3 和 4 对所述加标样品和标准品进行了分析。利用 MassHunter 定性分析软件对完整批次的样品和标准品进行比较。利用在各个梯度下获得的标准品的峰面积值作为单点校准的基础，对加标样品进行比较。基质效应的比较显示在图 4 所示的图表中。从中可以看出，对于大多数化合物而言，平缓的梯度 2、3 和 4 相比于最快的梯度 1 信号强度有所改善。通常，最平缓的梯度 4 可提供最高的信号强度。例如，农药化合物异丙隆的色谱图显示，采用梯度 2 至 4 获得的加标基质样品的响应相比于采用初始梯度 1 所获得的色谱图有所增强（图 5）。这种信号增强可能是由于目标化合物与基质背景获得了更出色的分离，由此实现了更高的电离产率。氟草津、莠去津和特丁津这三种化合物除外，它们在采用梯度 1 时获得了更高的强度。然而，由于采用梯度 4 使大多数化合物获得了更高的强度，并且大多数化合物的回收率介于 70% 和 120% 之间，因此利用该梯度进行后续实验。

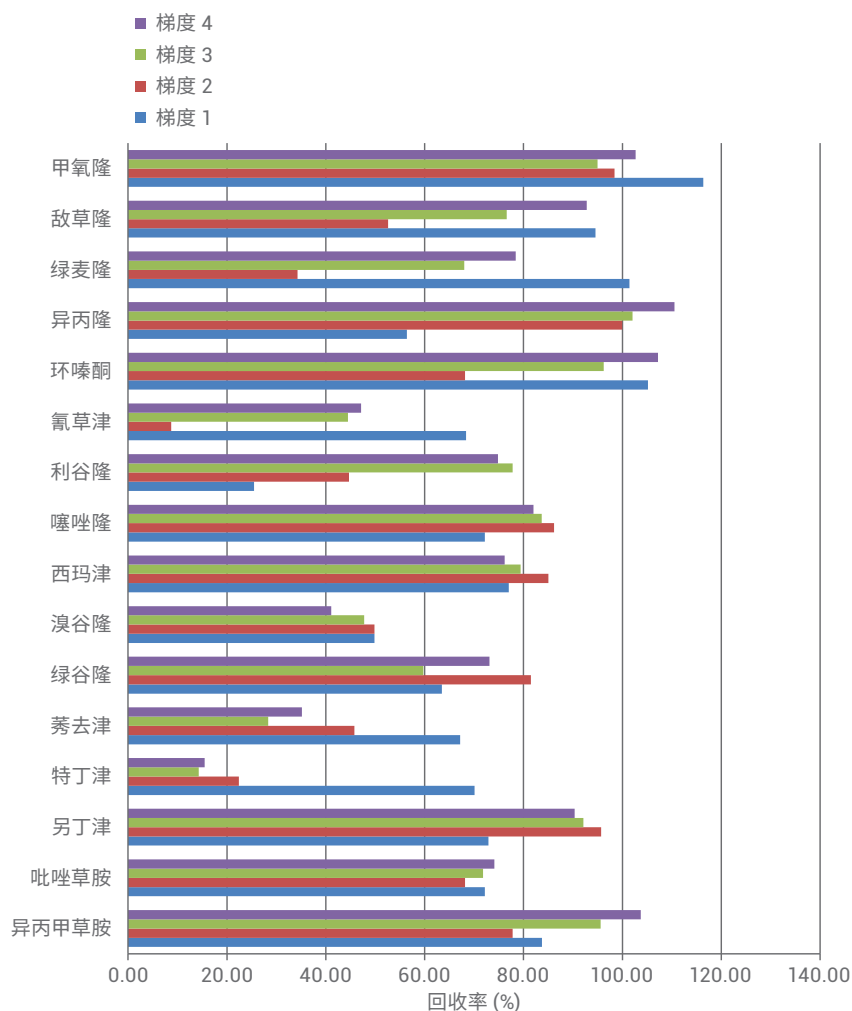


图 4. 在不同陡度的不同梯度下获得的基质效应对比。对于大多数化合物而言，采用梯度 4 所获得的基质效应最低

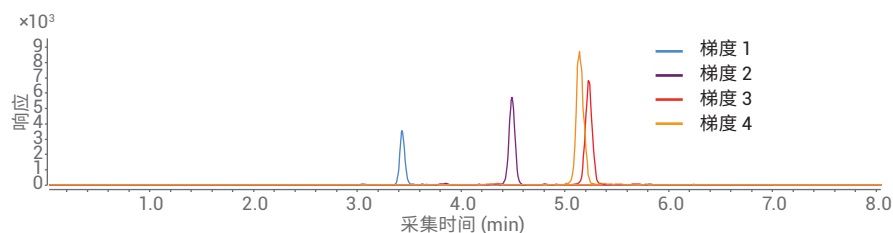


图 5. 在所用的四种不同陡度的梯度下获得的异丙隆的信号强度

最后，在梯度 4 的条件下，基于浓度为 10、20 和 100 ppb 的溶剂校准完成对芝麻菜提取物的定量分析。利用芝麻菜基质中加标浓度相同的化合物作为样品。对实测浓度的比较显示出以相对百分比表示的基质效应（图 6）。根据 SANCO 指南 SANCO/12571/2013，表观回收率 70%–120% 是可接受的⁴。在考察的浓度范围内，每种化合物的基质效应非常类似（图 6）。与溶剂校准进行比较时，所检测的大多数化合物的回收率都处于 70%–120% 的可接受范围。两种化合物莠去津和特丁津的定量分析回收率低于 50%。稀释是最大程度减小复杂样品中基质效应的通用方法。以 1:10 的比例使用乙腈对农药加标浓度为 100 ppb 的 QuEChERS 提取物进行稀释，莠去津和特丁津的回收率分别为 87% 和 85%，处于可接受的范围。所有化合物的校准线性、计算得出的定量限 (LOQ) 和检测限 (LOD) 汇总于表 2 中。

结论

本应用简报证明了在利用 SFC 与三重四极杆质谱仪测量蔬菜和水果样品中的农药时，优化 SFC 分离对样品基质的影响的重要性。优化所用的梯度可改善分析物与高丰度基质化合物之间的分离，有助于降低检测限。检测的所有农药均满足所需的 10 ppb 的 LOQ，并且基于溶剂校准，大多数化合物定量分析的回收率均处于所需的 70%–120% 范围内。此外，SFC 仪器的优势在于，分离速度更快，并提高了直接来自 QuEChERS 样品前处理的溶于纯有机溶剂中的样品的可用性。

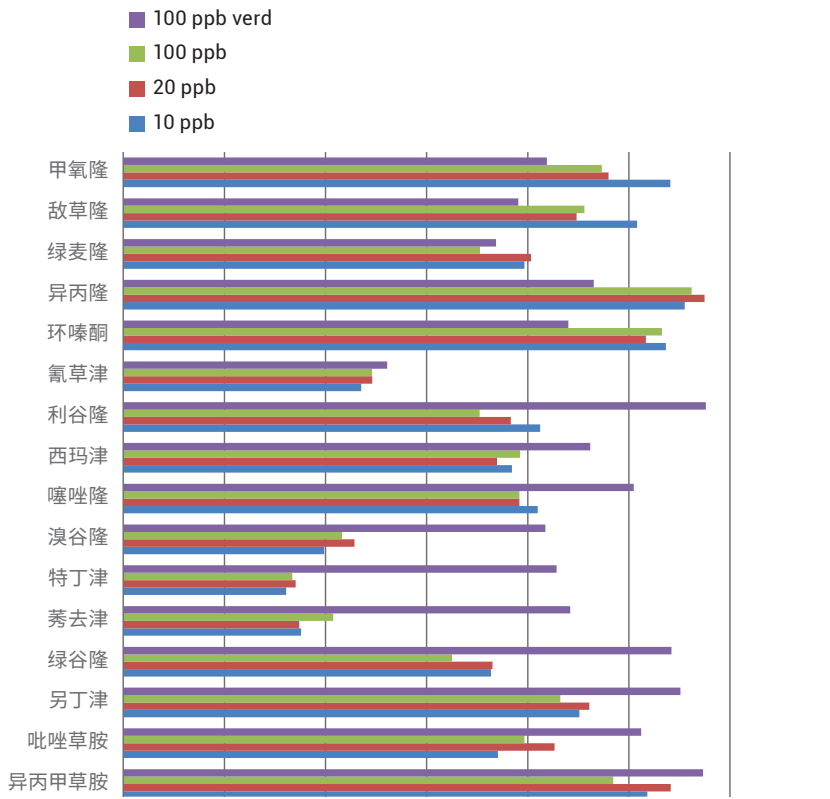


图 6. 加标样品与标准溶液校准的对比。基质效应通常在 70%–120% 范围内。另外，可通过样品稀释最大程度减小基质效应

表 2. 校准结果汇总，显示了各种化合物的线性、LOQ 和 LOD

10 ppb	RT	LOD	LOQ	R ²
异丙甲草胺	1.869	0.08	0.25	0.9991
吡啶草胺	2.117	0.12	0.40	0.9990
另丁津	2.554	0.55	1.83	0.9993
绿谷隆	2.647	1.77	5.90	0.9993
莠去津	2.754	0.06	0.20	0.9993
特丁津	2.776	0.08	0.25	0.9995
溴谷隆	2.866	2.49	8.30	0.9991
噻唑隆	2.993	0.05	0.18	0.9994
西玛津	3.158	0.24	0.80	0.9995
利谷隆	3.307	3.00	10.00	0.9990
氟草津	4.219	0.20	0.66	0.9992
环嗪酮	5.006	0.03	0.10	0.9995
异丙隆	5.142	0.04	0.13	0.9998
绿麦隆	6.046	0.23	0.77	0.9991
敌草隆	6.846	0.87	2.90	0.9992
甲氧隆	7.287	0.30	1.00	0.9992

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. Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., Schenk, F.J., Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and Dispersive Solid-Phase Extraction for the Determination of Pesticide Residues in Produce, *Journal of AOAC International* **2003**, Vol. 86, No. 2, 412-431
3. Naegele, E., Analysis of Pesticides by Supercritical Fluid Chromatography/Mass Spectrometry - Optimizing the Agilent 1260 Infinity Analytical SFC System in Combination with the Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS (利用超临界流体色谱/质谱分析农药 — 优化 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统的组合), *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-5256EN, **2014**
4. European Commission: Health & Consumer Protection Directorate – Safety of the Food Chain: Chemicals, Contaminates and Pesticides, Guidance Document on analytical quality control and validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed, SANCO/12571/2013, rev.0

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, 2017
2017 年 10 月 15 日, 中国出版
5991-5443ZHCN



Agilent Technologies