

使用具有全离子 MS/MS 技术的 Agilent 6545 Q-TOF 质谱仪对复杂食 品基质中的 240 种农药进行快速筛 查和定量分析

应用简报

作者

Dan-Hui Dorothy Yang、
Christian Klein、Crystal Cody
和 Huy Bui
安捷伦科技有限公司
Santa Clara, CA 95051

摘要

本应用简报介绍了使用安捷伦全离子 MS/MS 技术检测复杂食品基质中 240 种农药和农药代谢物的 UHPLC/Q-TOF/MS 方法。该方法得益于 Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统所提高的色谱分离度，以及由安捷伦喷射流离子源所改进的电离能力。更重要的是，通过 Agilent 6545 Q-TOF LC/MS 系统固有的灵敏度提升和离子传输调谐（有利于易碎有机小分子的最佳离子传输）而成功实现筛查与定量分析。全离子 MS/MS 技术能够进行简便的采集方法设置，并可通过扩展谱库进行回顾性数据查询。选择红茶作为复杂基质，另外选择鳄梨代表脂质含量高的食品基质。

研究结果表明，6545 Q-TOF LC/MS 系统对有机小分子具有更出色的检测能力，使其可以在低于最大残留限量 (MRL) 法规规定值下对多数目标农药进行筛查和定量分析。



Agilent Technologies

前言

食品中的农药残留筛查是食品安全中要求最苛刻的应用之一。食品中存在 1000 多种农药和农药代谢物。欧盟委员会法规 (EC) 396/2005 及其附录中规定了 170000 多种基质-农药组合的最大残留限量 (MRL)¹。其他地区也有类似法规²。因此, 需要采用快速可靠的分析方法对多种不同食品基质中的低浓度农药进行定量。精确质量 LC/MS 之所以能够从从容应对挑战, 是因为通过简单的方法设置检测大量分析物而无需预先了解碎裂条件。对于商业实验室来说, 在可控的成本内扩大测试范围和通量尤其重要。

精确质量 LC/MS 的典型工作流程包括使用 MS 方面的数据筛查和定量农药残留。采用质量精度、同位素丰度、同位素间隔和加合模式验证阳性结果。通常认为保留时间也是化合物匹配的一个关键因素。通过施加适当碰撞能量的自动和靶向 MS/MS 模式, 以及与个人化合物数据库与谱库 (PCDL) 的 MS/MS 谱图之间的对比, 可进一步确定鉴定出的农药残留。这对排除 QuEChERS 萃取物等复杂基质中可能的假阳性结果至关重要。

然而, 选择高丰度的基质化合物进行碎裂时, 通常难以获得红茶和鳄梨等复杂基质中低浓度分析物的有意义的自动 MS/MS 谱图。靶向 MS/MS 可用于农药筛查和结构确认。为了建立靶向 MS/MS 方法, 需要了解特定离子种类的保留时间。不经重新采集数据就对新残留和未知残留的数据进行重新研究, 这是不可能的。为了克服自动和靶向 MS/MS 在存在复杂基质时

的限制, 安捷伦开发了全离子 MS/MS 技术³。

全离子 MS/MS 技术可进行简便的采集方法设置, 无需预先选择母离子, 方法中所有母离子均在高能量通道中裂解。然后通过 MS/MS 谱库的谱图验证子离子。为消除假阳性结果, 需要通过母离子和子离子的色谱共流出确定碎裂的发生, 而碎裂正是确保子离子属于该母离子的关键环节。此外, 用于数据分析的快速 MassHunter 定性/定量分析方法可以简化到工作流程中。MassHunter 定性分析软件中的化合物信息可用于创建以多个子离子作为定性离子的定量方法。这可以满足指导性文件 (如 SANCO/12571/2013⁴) 中规定的农药残留鉴定的方法验证和质量控制程序标准。由于使用具有精确质量数的 TOF 谱图来获取数据, 因此可简单地通过扩展谱库对更多化合物的数据进行重新研究。通过 MassHunter Acquisition B.06.01 的最佳小分子调谐提高了方法灵敏度, 因此可以使用全离子 MS/MS 技术在单次运行中筛查和定量数百种农药, 从而大大提高实验室的检测范围。

本应用简报介绍了用于安捷伦农药全套测试混标 (部件号 5190-0551) 中化合物的全离子 MS/MS 方法。将 Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统与 Agilent 6545 Q-TOF LC/MS 系统联用。采用正离子模式进行采集。对 6545 Q-TOF LC/MS 系统进行的几项改进, 使其拥有更高的分析性能。硬件改进包括新的限幅器设计 (带有可在高灵敏度或高分辨率模式下运行的选

项)、新的高性能高压电源 (可提高高分子量分析物的质量分辨率) 以及新的增强型增益位移检测器 (具有更长的检测器使用寿命)。更重要的是, 粒子群优化技术首次在商业上用于优化质谱仪, 从而实现对仪器更快更稳定的调谐。与实现通用型优化的经典自动调谐不同, Swarm 调谐开启了根据应用需求而定制仪器优化的新篇章。根据用户选择, 算法为优化易碎小分子 (如 50-250 m/z 和 50-750 m/z) 的离子传输提供了可能。与 6540 Q-TOF LC/MS 上的经典自动调谐相比, 系统的调谐速度增加三倍。

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)。超纯水产自配备 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 公司 (Sigma-Aldrich 公司, St. Louis, MO, USA), 甲酸铵溶液 (5 M) 来自安捷伦公司 (部件号 G1946-85021)。农药包括在安捷伦农药全套测试混标 (部件号 5190-0551) 中。10 ppm 的农药工作溶液用于 QuEChERS 萃取物加标和校准样品配制。

样品前处理

有机红茶和有机鳄梨购自当地杂货店。根据官方柠檬酸盐的缓冲 QuEChERS 方案, 使用 Agilent BondElut QuEChERS 试剂盒 (部件号 5982-5650)⁵ 萃取样品。称取 10 g 均质鳄梨和 2 g 红

茶，加入到 50 mL 聚丙烯管中，并用 10 mL 乙腈剧烈振荡萃取 1 分钟。在萃取前，将茶样品用 8 mL 超纯水润湿放置 2 小时。分别用分散式固相萃取脂质去除试剂盒（部件号 5982-5158）和分散式固相萃取石墨化炭黑 (GCB) 试剂盒（部件号 5982-5356H）对鳄梨和红茶的粗萃取物进行净化。对最终萃取物加入 1、5、10、20、50 和 100 ng/g 六种浓度的相关农药。在进样前配制基质匹配标样。

仪器与软件

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) 和样品冷却装置 (G1330B)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)

该 UHPLC 系统与配备安捷伦双喷射流电喷雾离子源的 Agilent 6545 精确质量 Q-TOF LC/MS 系统联用。Agilent MassHunter 工作站软件用于数据采集 (B.06.01, build 6.01.6145)、定性分析 (B.07.00, build 7.0.7024.0) 和定量分析 (B.07.00, build 7.0.457.0)。

方法

1290 Infinity UHPLC 条件汇总于表 1。采用正离子模式进行分析。进样 3 μ L 的最终萃取物。采用代表 240 种农药的 14 种农药系列，对离子源参数进行优化。6545 Q-TOF MS 参数汇总见表 2。

采用 MassHunter 定性分析和定量分析软件对数据进行评估。使用 1/x 的加权因子以及包括原点在内的二次拟合生成校准曲线。

表 1. Agilent 1290 UHPLC 参数

参数	值														
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 \times 150 mm, 1.8 μ m (部件号 959759-902)														
柱温	45 $^{\circ}$ C														
进样量	3 μ L														
进样器温度	5 $^{\circ}$ C														
进样针清洗	10 s (80% 甲醇/20% 水)														
流动相	A) 水, 5 mM NH ₄ 甲酸铵 + 0.1% 甲酸 B) 甲醇, 5 mM NH ₄ 甲酸铵 + 0.1% 甲酸														
流速	0.4 mL/min														
梯度程序	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>17</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>20.1</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	时间	%B	0	5	1	5	4	50	17	100	20	100	20.1	5
时间	%B														
0	5														
1	5														
4	50														
17	100														
20	100														
20.1	5														
停止时间	22 min														
后运行时间	1 min														

表 2. Agilent 6545 Q-TOF LC/MS 系统参数

参数	值
模式	正离子; 4 GHz 高分辨率
调谐	50-250 <i>m/z</i>
干燥气温度	150 $^{\circ}$ C
干燥气流速	10 L/min
鞘气温度	375 $^{\circ}$ C
鞘气流速	12 L/min
雾化器压力	35 psi
毛细管电压	3500 V
喷嘴电压	200 V
碎裂电压	125 V
锥孔电压	45 V
Oct1 RF Vpp	750 V
采集质量范围	50-1000 <i>m/z</i>
采集速率	3 幅谱图/秒
碰撞能量	0 V、20 V、40 V
参比质量离子	121.050873, 922.009798

结果与讨论

数据处理

使用分子式查找 (FbF) 算法, 依靠含本研究所有农药的定制 PCDL 进行数据文件的处理。FbF 经过更新后可支持全离子 MS/MS 技术。MassHunter 定性分析软件 B.07 通过采用全离子 MS/MS 技术的**碎片离子确认**选项卡, 实现了非常有用的功能。当选择**分子离子选项**复选框时, 强度饱和的母离子或极弱的母离子对全离子 MS/MS 应用中的匹配得分没有影响。这对于多分析物鉴定 (如数百种杀虫剂筛查) 非常重要, 因为化合物间的质量

响应和易碎裂性可能差别很大。首先在 m/z 值相同化合物的 PCDL 中搜索低能量通道中的质谱峰。对于被鉴定的化合物, 将 PCDL 的 MS/MS 谱图中的碎片离子与高能量通道中的离子进行比较, 以确定正确碎片离子的存在。

多数化合物 (240 个中的 224 个) 的 MS/MS 谱图收录在 PCDL 中, 可用于提取丰度最高离子的 EIC。如果 PCDL 中得不到 MS/MS 谱图, 则把该质谱图作化合物鉴定用。在时间区域中根据母离子对每个碎片离子进行色谱评估, 以确保子离子的相关性。

为了匹配的品质和去除不合格碎片离子, MassHunter 定性分析软件允许用户通过化合物细节视图窗口快速浏览化合物。一般布局如图 1 所示, 图中以 5 ppb 的利谷隆为例。软件中列出了化合物, 并可快速搜索。将母离子和子离子色谱图叠加, 并显示共流出得分。使用整个峰数据生成的共流出得分 (而不仅仅是保留时间) 如图 1 左侧所示。谱库匹配结果列在右侧, 包括强度、信噪比 (S/N) 以及施加的碰撞能量。另外还显示了质谱图和碎片离子谱图, 使用彩色标记将与谱库匹配的碎片离子与背景离子加以区分。

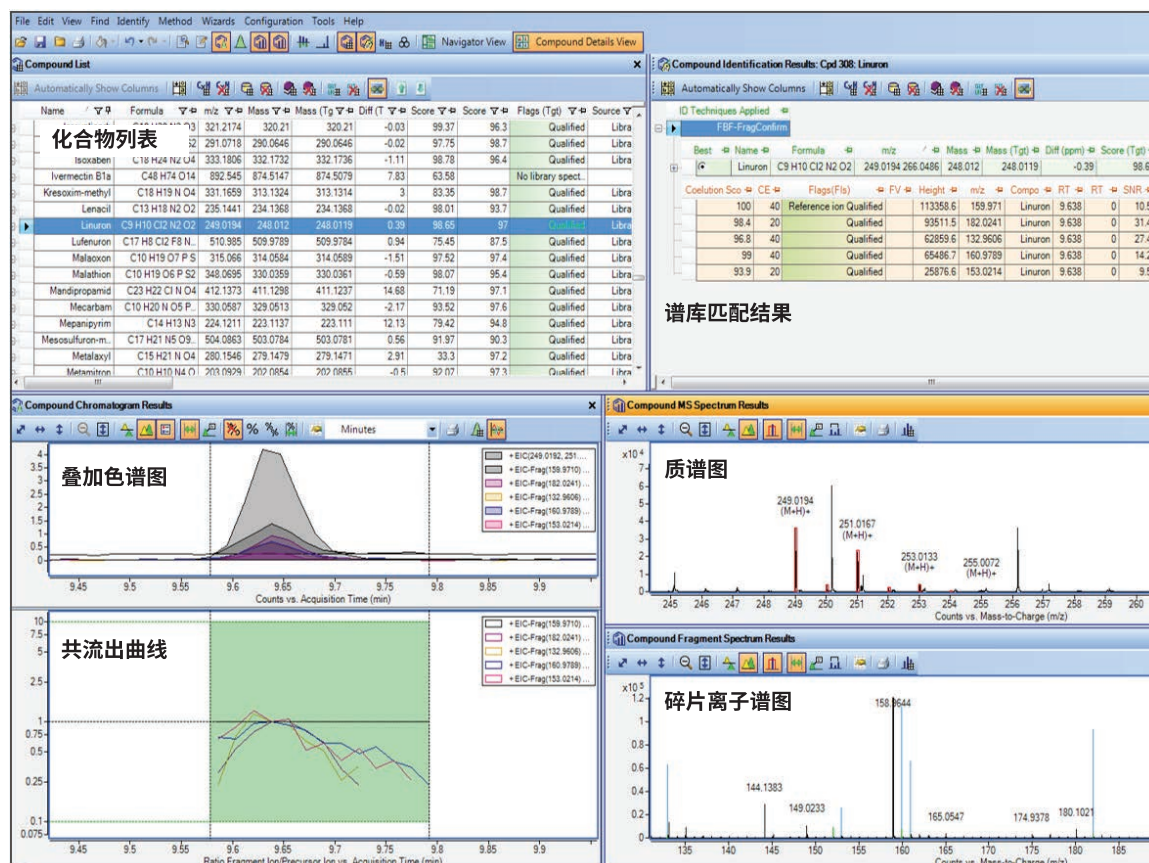


图 1. Agilent MassHunter 定性分析软件中采用全离子 MS/MS 技术得到的数据浏览窗口。用户可根据共流出得分、谱库匹配和质谱图轻松评估每个化合物的数据质量

可以生成包含相关化合物信息（名称、RT、子离子 m/z 值以及与碰撞能量值相关的子离子 m/z 值）的化合物交换文件 (.cef)，并将其导出至 MassHunter 定量分析软件中。随后，通过添加校准浓度即可生成批次分析方法。使用这一工作流程，可在批处理模式下进行数百种杀虫剂的定量分析。

对复杂基质中 240 种农药的检测能力

几种化合物因为子离子的信噪比低、共流出分数低、保留时间位于保留时间窗口 (± 0.2 min) 外或以上情况的任意组合而未满足条件。不合格的化合物不包括在用于定量分析的 .cef 文件中。图 2 显示了红茶基质中苯霜灵和鳄梨基质中酰啉磺隆的典型校准曲线。选择两种丰度最高的子离子作为定性离子。在 10 ng/g 的加标浓度下（分别对应于红茶基质中的 2 ppb 和鳄梨基质中的 10 ppb），红茶基质和鳄梨基质中可以定量分析的农药分别为 72% 和 80%。

系统稳定性

6545 Q-TOF LC/MS 的相应硬件改变使系统能更好地耐受复杂基质。在由红茶和鳄梨基质进样的为期一周的食品安全测试期间，作为系统 QC 运行，在质谱范围内对 240 种农药的 20 ppb 乙腈溶液进行测量。分别对 7 个 QC 样品重复进样分析（共得到 14 个数据文件）。在去除饱和/分裂峰后，90% 以上化合物的 CV 小于 10%。即使某个 CV 偏大，通常无明显的下降趋势，而只是一两个随机离群值。分析七个 QC 样品得到的平均 CV 为 7.6% 左右，表明连续进样复杂基质时系统仍具有良好的稳定性。

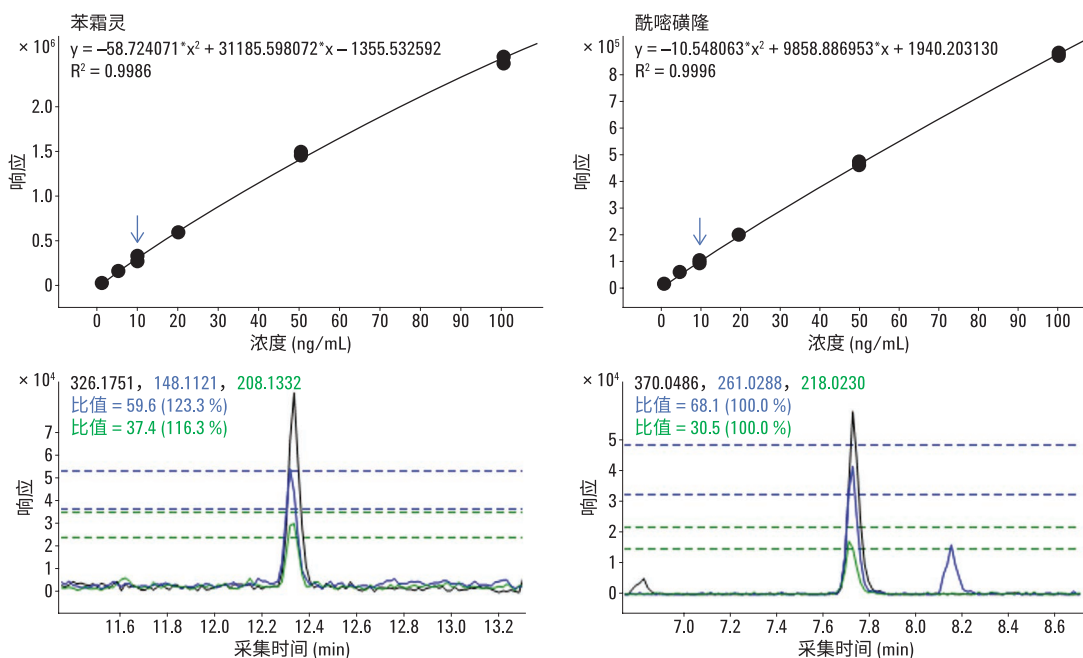


图 2. 红茶基质中苯霜灵（左）和鳄梨基质中酰啉磺隆的典型性校准曲线（右）。在红茶基质和鳄梨基质中分别检出 72% 和 80% 加标浓度为 10 ng/g 的农药

结论

全离子 MS/MS 技术对于检测食品、血浆、尿液等复杂基质中的数百种分析物非常有用，而靶向 MS/MS 或自动 MS/MS 对这些基质的分析存在局限性。这种技术可轻松进行方法设置，无需了解母离子选择和碎裂条件。此外还可以重新研究新分析物的数据文件，无需重新运行样品。得分系统很直观，可以轻松地在 MassHunter 定性分析软件中查看每个化合物的碎片离子谱库匹配和母离子与子离子的色谱共流出情况。MassHunter 定量分析软件中还提供了简化的 MassHunter 定性/定量分析方法用于批量分析，用户只需输入校准浓度，即可在一个批次中分析数百种农药。此外，Agilent 6545 Q-TOF LC/MS 系统凭借其灵敏度改进以及针对易碎裂有机分子的最佳离子传输，成为了应用市场中产品系列的有力补充。实验结果证明，系统能够对复杂基质中浓度低于或等于法规规定最大残留限量 (MRL) 的多数农药和农药代谢物进行检测。从完整试剂盒、UHPLC/MS、PCDL 到 MassHunter 定性/定量分析软件，安捷伦全套解决方案能够帮助最终用户进行方法开发和验证。

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. US Regulation 40 CFR part 180 Tolerance Information for Pesticide Chemicals in Food and Feed Commodities
3. Wuest, B; Glauner, T; Madden, S; Taylor, L; Payne, T, 采用高分辨全离子 MS/MS 技术快速筛查并鉴定农药。安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-2295CHCN
4. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document N° SANCO/12571/2013. http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2013_12571.pdf
5. Zhao, L; Stevens, J, 使用 Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 试剂盒以 LC/MS/MS 法分析菠菜中的农药残留。安捷伦科技公司应用简报，出版号 5990-4248CHCN, 2012

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, 2015

2015 年 2 月 27 日, 中国出版

5991-5552CHCN



Agilent Technologies