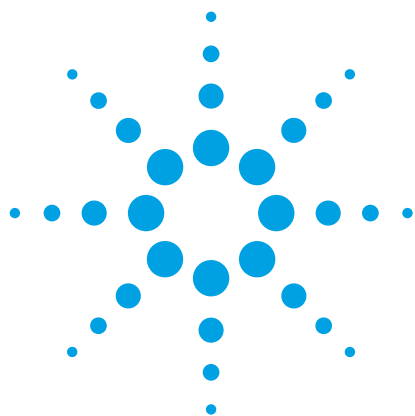




使用 Agilent 6470 三重四极杆质谱仪 进行常规多残留农药分析

应用简报

食品安全

作者

Mark Sartain 和 Anabel Fandino
安捷伦科技公司
Santa Clara, California, USA

Thomas Glauner
安捷伦科技公司
Walbronn, Germany

摘要

本应用简报介绍了一种用于筛查和定量分析食品样品中 250 多种农药及农药代谢物的基于 UHPLC/MS/MS 的方法。该方法利用：

- Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统更高的色谱分离度
- 安捷伦喷射流离子源的通用电离功能
- Agilent 6470 三重四极杆液质联用系统固有的高灵敏度

该方法用于分析复杂食品基质中的农药残留。在进样之前，通过样品稀释最大程度提高方法稳定性并最大程度减小基质效应。

我们的结果表明，6470 三重四极杆液质联用系统具有更高的灵敏度，可对稀释比为 1:10 甚至高达 1:20 的红茶提取物中浓度低于欧盟委员会规定的最大残留限量 (MRL) 的目标农药进行准确而精密的定量分析。



Agilent Technologies

前言

食品安全领域的一项重要应用是利用多残留方法对种类繁多的食品中的数百种农药进行筛查和定量分析。实现准确、精密定量分析的主要挑战包括化合物种类的多样性、基质效应、低浓度以及某些农药较低的电离效率。

本应用简报介绍了使用安捷伦农药 tMRM 液质联用应用套装（部件号 G1733BA）开发出筛查和定量分析复杂食品基质中数百种农药的 UHPLC/MS/MS 方法。该方法包括了农药综合混标（部件号 5190-0551）和一些额外的目标农药中所有化合物的离子对。Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统与动态 MRM (DMRM) 和快速极性切换模式下运行的 Agilent 6470 三重四极杆液质联用系统相联用。对之前的设计进行若干硬件改造，从而获得更高的定量分析性能。通过优化的第一质量过滤器 (MS1) 离子光学、改进的弯曲锥形碰撞池、高达 ± 20 kV 打拿极加速电压下运行的检测器以及速度和灵敏度最优的全新自动调谐功能，实现了上述的进步。此外，使用弯曲碰撞池有助于缩小仪器的占地面积。

因改进设计而提高的灵敏度可转化为更高的峰面积响应和更好的面积精度，最终使检测限低于之前的设计。我们对番茄、橙子和红茶中的低浓度农药残留测定获得了稳定的高性能定量分析结果。此外，我们评估了使用稀释法作为最大程度减小基质效应的手段，并证明本设计所带来的更高灵敏度可允许对样品进行高度的稀释，而仍然能达到欧盟规定的最大残留限量 (MRL)。

实验部分

试剂与化学品

研究采用安捷伦综合农药混标（部件号 5190-0551），几种额外农药则购自 Fluka（Sigma-Aldrich 公司，St. Louis, MO, USA）。将八种综合农药混标的混合物与额外农药混合，然后用乙腈将其稀释为最终农药工作溶液，该溶液中含有 250 多种浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ (10 ppm) 的农药。该溶液用于 QuEChERS 提取物加标和校准样品配制。为测定在溶剂中的仪器检测限 (IDL) 和定量下限 (LLOQ)，采用纯乙腈配制浓度范围为 1 ppt 至 100 ppb 的 13 个校准级别。为计算在基质中的回收率，采用乙腈配制浓度范围为 10 ppt 至 100 ppb 的溶剂校准组。

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)。甲酸和甲酸铵购自 Fluka（Sigma-Aldrich 公司，St. Louis, MO, USA）。

样品前处理

有机番茄、橙子和红茶样品购自当地杂货店。用 8 mL 水将 2 g 茶叶样品润湿，并使样品在室温下温育 2 小时。利用陶瓷均质子（部件号 5982-9312）制出充分混合的均匀水果样品，并称取 10 g 样品。用 10 mL 乙腈通过剧烈振摇对水果和茶叶样品萃取 1 分钟。分别向各混合物中加入一袋安捷伦 EN 萃取盐（部件号 5982-6650），振摇 1 分钟，然后在 3000 $\times g$ 下离心 5 分钟。将 6 mL 茶叶上清液加入用于高色素 EN 的 Agilent QuEChERS 分散 SPE（部件号 5982-5356）中，将 6 mL 番茄上清液加入用于一般水果和蔬

菜 EN 的 Agilent QuEChERS 分散 SPE（部件号 5982-5056）中，并将 6 mL 橙子上清液加入用于含脂肪和蜡质之水果和蔬菜 EN 的 Agilent QuEChERS 分散 SPE（部件号 5982-5156）中，然后振摇 1 分钟，并在 3000 xg 下离心 5 分钟。收集上清液，并通过 0.45 µm 注射式过滤器。以相对于起始基质量 10 ng/g 的浓度将综合农药工作溶液加标至最终提取物中，并按 1:2、1:5、1:10 和 1:20 的比例用乙腈进行稀释。在进样之前配制基质匹配标样和稀释液，并测定五个技术重复样本。

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)
- 安捷伦样品冷却装置 (G1330B)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)

该 UHPLC 与配备安捷伦喷射流电喷雾离子源的 Agilent 6470 三重四极杆质谱仪联用。使用 Agilent MassHunter 采集软件（B.08.00 版）和 Agilent MassHunter 定量分析软件（B.07.00 版）进行数据采集和分析。

方法

LC/MS 条件和参数如下所述。极性、母离子和子离子以及最佳碰撞能量等 MRM 参数由安捷伦农药 tMRM LC/MS 应用套装导入，并针对所选弱响应的分析物使用 Agilent Source Optimizer 软件优化离子源条件。在快速极性切换 DMRM 模式下进行数据采集。将 2 µL 最终提取物进样至液质联用系统。

采用 Agilent MassHunter 定量分析软件对数据进行评估。使用纯标准溶液进行校准。对于校准曲线，采用线性拟合并使权重 = $1/x$ 或 $1/x^2$ 。

色谱

Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统

色谱柱	Agilent EclipsePlus C18 柱, RRHD, 2.1 × 150 mm, 1.8 µm (部件号 959759-902)	
柱温	40 °C	
进样量	2 µL	
自动进样器温度	4 °C	
进样针清洗	放入清洗口 8 秒 (75:25 甲醇/水)	
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	0.400 mL/min	
梯度程序	时间	B (%)
	0.00	5
	0.50	5
	3.50	40
	17.00	98
	20.00	98
后运行时间	20.10	5
	3 min	

质谱

Agilent 6470 三重四极杆质谱仪

离子源	安捷伦喷射流
极性	正负极切换
干燥气温度	140 °C
干燥气（氮气）流速	5 L/min
雾化器压力	30 psi
鞘气温度	375 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	4000 V/-3000 V
喷嘴电压	0 V
扫描类型	动态 MRM (DMRM)
Q1/Q2 分辨率	单位 (0.7 amu)
Delta EMV	200 V
碰撞池加速电压	3 – 7 V
循环时间	500 ms
MRM 总数	525 对 (正: 505, 负: 20)
最短/最长驻留时间	2.3/246.5 ms

结果与讨论

UHPLC/MS/MS 方法开发与性能

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 6470 三重四极杆液质联用系统。将该方法扩展至包括若干种相关的酸性除草剂。采用 DMRM 和极性快速切换模式。利用 MassHunter Source Optimizer 软件优化鞘气温度、干燥气温度、毛细管电压和喷嘴电压，使所选的不稳定和弱响应分析物组获得最高丰度。图 1 显示了 250 多种农药的红茶提取物的 MRM 叠加色谱图，添加浓度为 10 µg/kg，样品在进样前用乙腈稀释十倍。

改进的离子光学和检测器可定量分析大多数农药，得到的 LLOQ 分别为各自 MRL 的 10%。在低至 10 ppt 的 LLOQ 到高至 100 ppb 的定量上限 (ULOQ) 的 10 个标样浓度范围内，对测定的精密度和准确度进行了评估，并在每个浓度下对五次重复进样进行计算。该评估获得了优异的分析精度（在 LLOQ 处 RSD (%) < 20%，其余浓度 < 15%）及平均准确度（在 LLOQ 处为 80% - 125%，其余浓度为 85% - 115%）。直至高达四个数量级的线性动态范围时，校准曲线的相关系数 (R^2) 均优于 0.99。这些结果完全符合生物分析方法验证指导原则设定的标准。

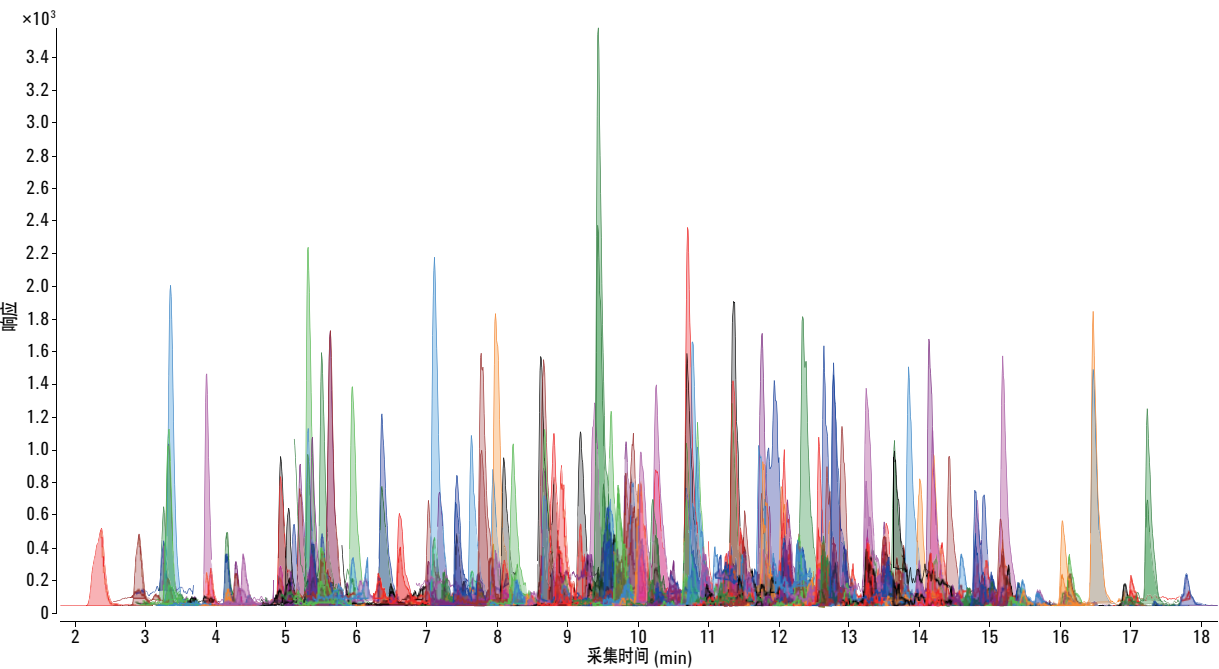


图 1. 添加浓度为 MRL (10 µg/kg) 的 250 多种农药的红茶提取物以及 1:10 的乙腈稀释样品（对应浓度为 0.2 ng/mL）所叠加的 MRM 色谱图

更高仪器性能的评估

6470 三重四极杆液质联用系统与之前的 6460 型三重四极杆系统相比，表现出最高 4 倍的灵敏度提升。具体观察到的灵敏度提升取决于化合物。

增强的离子传输能力不仅增加峰面积的响应，而且能够改善峰面积测定精度。峰面积相对标准偏差 (RSD) 可用于间接衡量色谱峰下的离子相对数量，从而用于估算仪器检测限 (IDL) [1]。在定量分析应用中基于信号响应精度的性能要比信噪比更能明确地指示灵敏度。表 1 显示 6470 系统与之前的仪器设计相比，每种相关

农药的 IDL 均成倍提高。在全部 250 多种农药中，观察到提升倍数的中值为 3.6 倍。

6470 液质联用系统提高的灵敏度能够定量分析番茄、橙子和红茶提取物中浓度低于欧盟委员会规定的默认 MRL 值 (10 µg/kg) 的大多数目标农药。图 2 显示了溶剂标准品和食品提取物中 LLOQ 的直方图。该图表明由于样品量减少 5 倍且基质复杂，因此红茶提取物中的 LLOQ 更高。即使在这种复杂基质中，多数农药仍获得了仅为默认 MRL 约 10% 的 LLOQ。

表 1. 基于用乙腈配制的稀释系列所得到的红茶中 50 种相关农药的 IDL

农药	IDL (ppt)			农药	IDL (ppt)		
	Agilent 6470	Agilent 6460	提高倍数		Agilent 6470	Agilent 6460	提高倍数
高灭磷	7.1	10.4	1.5x	氯苯嘧啶醇	264.5	4023.8	15.2x
啉虫脒	1.8	32.9	18.0x	氟虫脒	74.5	339.7	4.6x
涕灭威	645.0	43.3	0.1x	氟虫脲	58.0	521.6	9.0x
谷硫磷	165.1	278.9	1.7x	氟硅唑	56.1	204.5	3.6x
联苯菊酯	267.5	67.8	0.3x	氟铃脲	1003.8	20771	20.7x
啉酰菌胺	220.2	665.8	3.0x	抑霉唑	30.1	203.2	6.7x
噻嗪酮	6.2	36.0	5.8x	吡虫啉	57.6	191.1	3.3x
丁酮威	645.0	107.3	0.2x	水胺硫磷	14.6	129.5	8.9x
多菌灵	3.7	13.5	3.6x	苯噻草酮	172.6	558.4	3.2x
枯草隆	7.4	98.4	13.3x	甲胺磷	1.7	43.1	25.9x
毒死蜱	68.9	401.1	5.8x	杀扑磷	71.9	340.1	4.7x
环莠隆	8.4	71.1	8.4x	灭多威	4.1	21.5	5.2x
啉菌环胺	182.1	61.9	0.3x	久效磷	10.8	52.3	4.8x
甜菜安	11.2	32.4	2.9x	腈菌唑	10.3	356.2	34.5x
二嗪农	32.1	31.4	1.0x	氧化乐果	2.1	6.1	2.9x
乙霉威	11.1	59.0	5.3x	杀线威	1.0	5.8	5.7x
苯醚甲环唑	315.1	620.7	2.0x	伏杀磷	36.9	2044.3	55.3x
乐果	2.8	32.8	11.8x	抗蚜威	1.3	2.8	2.2x
烯酰吗啉	59.0	310.7	5.3x	哒螨灵	0.8	0.6	0.8x
啉菌胺	6.3	23.6	3.8x	戊唑醇	45.8	41.9	0.9x
烯唑醇	30.9	237.4	7.7x	虫酰肼	175.4	52.3	0.3x
二氧威	103.7	139.1	1.3x	氟苯脲	291.6	2012.1	6.9x
敌草隆	22.6	37.4	1.7x	噻虫啉	1.5	6.0	4.1x
氟环唑	21.4	144.8	6.8x	噻虫嗪	8.7	38.8	4.5x
乙硫磷	11.0	166.3	15.2x	三唑磷	10.1	65.9	6.6x

使用五次重复进样结果进行计算

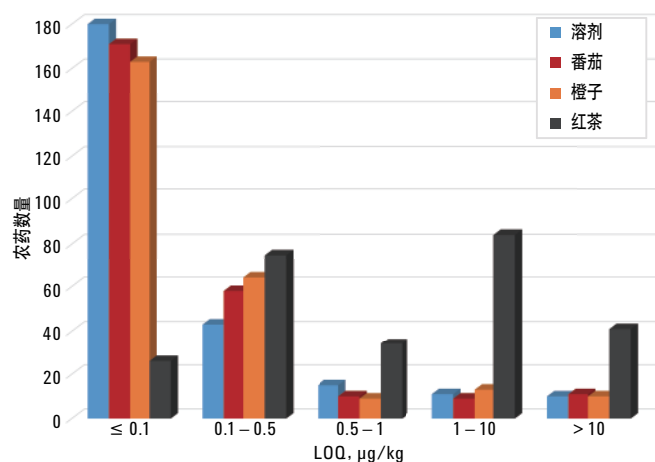


图 2. 溶剂以及番茄、橙子和红茶加标提取物中 250 多种农药的 LOQ。结果分为五个相关的浓度范围，并以直方图显示

通过提取物稀释最大程度减小基质效应

通过比较溶剂校准系列中与加标红茶样品提取物中目标化合物的响应来评估基质效应（基质抑制和基质增强）。本研究中主要观察到信号抑制，大量 ($n = 104$) 目标化合物表现出受到抑制的信号，其中未稀释红茶中的分析物响应不足纯溶剂中分析物响应的 70%。

表 2. 红茶中所选相关农药的回收率，基于溶剂校准计算不同稀释比

分析物	不稀释	稀释比 1:2	稀释比 1:5	稀释比 1:10	稀释比 1:20
高灭磷	57 ± 1.6	68.9 ± 1.9	78.5 ± 3.9	83.6 ± 3.4	90 ± 1.9
涕灭威	24.1 ± 5.8	37.5 ± 4.6	58.3 ± 8.9	68.5 ± 4	84 ± 6.1
卡巴呋喃	45.3 ± 0.5	60.6 ± 2.9	74.5 ± 4	81 ± 1.6	96.9 ± 7.2
枯草隆	75.4 ± 2.3	78.5 ± 9.5	81.8 ± 5.8	83.9 ± 9.4	97.8 ± 7
乐果	25.1 ± 2.2	37.9 ± 2.7	57.8 ± 3.8	70.4 ± 6.5	84.9 ± 6.4
氟环唑	66.1 ± 3.6	75.5 ± 6.4	73.4 ± 12.6	84.6 ± 11	89.3 ± 11.9
乙硫磷	54 ± 3.1	73.3 ± 4.3	81 ± 5.8	83 ± 5.3	88.2 ± 9
甲胺磷	42.6 ± 0.8	54.9 ± 1	67.9 ± 1	76.7 ± 1	88.2 ± 1.2
杀扑磷	67.3 ± 4.1	79.3 ± 7.8	83.3 ± 9.5	88.8 ± 5	108.6 ± 3.3
灭多威	10.4 ± 3.2	20.9 ± 2.7	42.1 ± 1.2	60.7 ± 2.6	76.4 ± 11.2
久效磷	5.5 ± 5.6	9.9 ± 9.4	18.7 ± 6.9	31.4 ± 14.5	48.4 ± 8.7
腈菌唑	84.6 ± 4.8	84.6 ± 3.8	86.8 ± 9	90.3 ± 13.4	99.7 ± 9.7
杀线威	14.1 ± 1.6	23.4 ± 2.2	44.1 ± 1.8	60.2 ± 1.7	76.8 ± 4
抗蚜威	50.7 ± 1.2	62.9 ± 2	75.2 ± 1.7	81.9 ± 1.5	88.9 ± 2.4
吡蚜灵	50.8 ± 1	60.4 ± 1.7	71.3 ± 1	79.4 ± 2	89.8 ± 2.9
噻虫啉	24.1 ± 0.5	37.3 ± 0.7	56.8 ± 1.9	69.3 ± 2.7	82.4 ± 1.2

绿色阴影的单元格内数据符合 SANCO/12571/2013 的要求

通过稀释复杂样品基质，最大程度减小了基质效应的影响力，它要比溶剂校准更能实现准确的定量分析，且对许多常规检测实验室而言是一种极具吸引的能力。电喷雾电离中基质效应的可能原因之一是多余电荷的数量以及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，进入液质联用系统的基质量有限，最大程度减小了仪器污染，从而延长了仪器正常运行时间并提高了分析方法的稳定性。表 2 显示了稀释的有益效果，其中红茶中的农药回收率随样品进一步稀释而得以提高。枯草隆和腈菌唑等化合物仅观察到较弱的基质效应，而涕灭威和灭多威等化合物则表现出明显的信号抑制，需要稀释 20 倍才能获得可接受的回收率。久效磷等几种化合物需要更高等度的样品稀释才能获得可接受的回收率，此前曾利用 Agilent 6495 三重四极杆液质联用系统获得过这一结果 [2]。

图 3 表明红茶中添加的多数农药在稀释比为 1:20 时均获得了可接受的回收率。在稀释比为 1:20 时, 93% 的可检测农药表现出可接受的回收率, 基本显示出极低的信号抑制。

6470 液质联用系统增强的灵敏度使它能够在所要求的红茶稀释水平上进行分析, 同时仍能保持检测大多数农药的能力。图 4 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 1:20 稀释液中大约 67% 的加标农药, 其 RSD 值低于 20%, 对应的浓度为 0.1 ng/mL。此外, 大约 7% 的加标农药在 1:10 稀释液中检出并获得了可接受的精密度, 另外约 9% 的加标农药在 1:5 稀释液中检出。

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。所获得的结果证明 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统具有更高的色谱分离度、Agilent 6470 三重四极杆液质联用系统具有高灵敏度, 以及安捷伦喷射流离子源具有久经考验的电离增强功能。

在 DMRM 和快速极性切换模式下进行采集, 能够最大程度延长每种化合物的驻留时间。离子源参数的优化可以改善对弱响应分析物的检测能力。

该方法可应用于包括红茶在内的复杂基质中的农药分析, 方法的更高灵敏度允许对样品进行适当的稀释, 从而最大程度减小离子抑制效应。通过稀释将较低的基质量引入液质联用系统, 由此不仅可减小基质效应, 而且能够改善方法的稳定性、提升仪器正常运行时间和实验室的分析效率。稀释样品提取物可最大程度减小基质效应, 同时仍可基于溶剂校准在 70% - 120% 的可接受回收率范围内对大多数农药进行定量分析。高灵敏度 6470 三重四极杆液质联用系统能够对 20 倍稀释提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, 并获得更高精密度和方法稳定性。

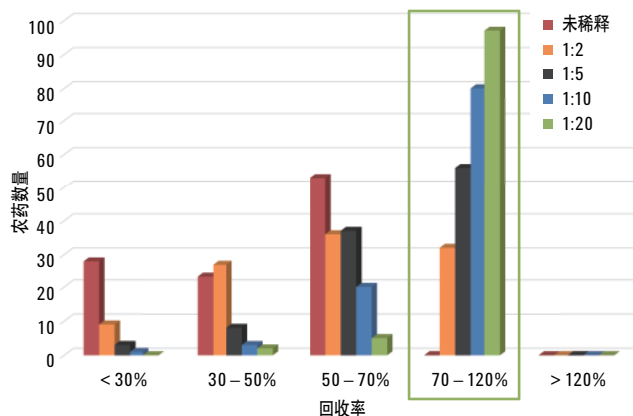


图 3. 以 MRL 值 (10 µg/kg) 加标到红茶中并用乙腈稀释得到的农药回收率的直方图。104 种农药表现出较强的离子抑制, 经稀释后得到了明显好的回收率。绿框表示 SANCO 指标规定的可接受回收率

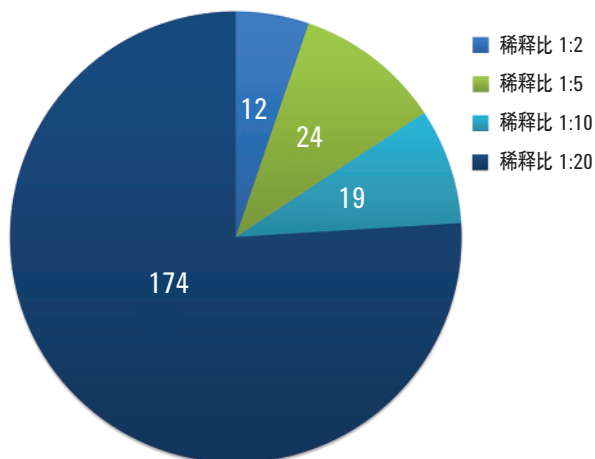


图 4. 以 MRL 值 (10 µg/kg) 加标到红茶提取物中并用乙腈稀释得到的农药检出率。174 种农药在 1:20 的稀释水平下被检出, 且峰面积 RSD < 20%。其他化合物在较低稀释水平（较高浓度）下检出

参考文献

1. N. P. Parra、L. Taylor, 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) 为何能够更准确地衡量三重四极杆液质联用系统的灵敏度)。安捷伦科技公司技术概述, 出版号 5991-4089EN (2014)
2. D. D. Yang 等, Multi-Residue Pesticide Screening and Quantitation in Difficult Food Matrixes Using the Agilent 6495 Triple Quadrupole Mass Spectrometer (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)。安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-4687EN (2014)

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的信息, 请访问我们的网站 www.agilent.com

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

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2015
2015 年 11 月 19 日, 中国出版
5991-6357CHCN



Agilent Technologies