

增强的样品（净化）后处理（步骤） 协同 EMR-Lipid 在 GC/MS/MS 农药 分析中带来的净化优势

应用简报

食品检测

作者

Limian Zhao
安捷伦科技有限公司

摘要

Agilent Bond Elut 增强型脂质去除产品 EMR-Lipid 是一款新一代样品前处理产品，专为多脂样品中脂质的选择性净化而设计。该产品适用于便捷的分散式固相萃取 (dSPE) 步骤，此步骤可在 QuEChERS 和蛋白质沉淀等常用工作流程中实现提取物处理。对该 EMR 方案在 EMR-Lipid 净化后的内容进行了改进，其中无水 $MgSO_4$ 采用盐包形式。无水 $MgSO_4$ 用于水相和乙腈溶剂相的分离以及旨在完全去除残留水分和所有水溶性残留的后续干燥步骤。增强的样品（净化）后处理（步骤）通过提高仪器分析重现性对 GC 类型的应用产生了显著影响，对不稳定的分析物更是如此。本研究重点关注改进的 EMR 方案，该方案用于通过 GC/MS/MS 分析牛油果中适用于 GC 分析的农药。改进的 EMR 方案提高了仪器分析重现性、可靠性和长期可用性，特别对于不稳定的农药，还确保了较高基质去除效率以及合格的分析物回收率。



Agilent Technologies

前言

食品中农药残留的分析是许多实验室的常规分析项目。采用快速、简便、经济、高效、耐用和安全 (QuEChERS) 的方法 [1,2] 可对数百种低浓度农药进行分析。该方法对多种水果和蔬菜均非常有效。然而, 牛油果、坚果等高脂肪含量食品以及动物源食品却带来了新的挑战 [3,4]。而对于希望满足政府机构为确保食品安全而制定的严格验证标准的实验室而言, 克服这些挑战是他们的首要任务。

Agilent Bond Elut 增强型脂质去除产品 EMR-Lipid 是一种新型吸附材料, 能够选择性去除样品萃取物中的主要脂类且不会造成分析物意外损失。之前的一篇应用简报证明了 EMR-Lipid 可为牛油果等复杂的多脂样品提供极高的清洁度。EMR-Lipid 也能够符合多农药残留对回收率和精确度的要求 [5]。样品后处理技术的发展确定了从 Polish 净化盐析萃取步骤去除 NaCl 的多种优势。NaCl 的存在可能会导致少量水分出现, 并使最终萃取液中含有非基质水溶性残留。因此完全去除残留水分对 GC 和 GC/MS 分析至关重要。

增强的样品 (净化) 后处理 (步骤) 将无水 $MgSO_4$ 同时用于相分离和样品干燥。这显著提高了水分和水溶性残留的去除率, 且不会影响 EMR-Lipid 净化中的基质去除效果。本研究证明了采用 EMR-lipid 净化后增强的样品后处理 (步骤) 通过 GC/MS/MS 分析牛油果中农药时所体现出的优势。通过加入敌菌丹、亚胺硫磷、亚胺硫磷、蝇毒磷和唑菌胺酯四种难处理的不稳定农药来评估残留水分对不稳定农药分析造成的影响。

实验部分

试剂与化学品

所有试剂和溶剂均为 HPLC 或分析纯级。乙腈 (ACN) 和甲醇购自 Honeywell (Muskegon, MI, USA)。试剂纯级乙酸 (AA) 购自 Sigma-Aldrich 公司。农药标准品和内标购自 Sigma-Aldrich 公司 (St Louis, MO, USA)。

溶液与标准品

向 990 mL 乙腈中加入 10 mL 乙酸, 制成含 1% 乙酸的乙腈溶液。标准品和内标 (IS) 储备液使用乙腈或甲醇配制, 浓度为 2.0 mg/mL。混合工作溶液采用乙腈制备, 浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合内标工作溶液用乙腈配制, 其中含有 TPP、乙基对硫磷 d10 和 ^{13}C -DDT。

仪器与材料

样品前处理所用的设备和材料包括:

- Geno Grinder (Metuchen, NJ, USA)
- Centra CL3R 离心机 (Thermo IEC, MA, USA)
- Eppendorf 微量离心机 (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA)
- 涡旋仪和多管涡旋仪 (VWR, Radnor, PA, USA)
- 瓶口分液器 (VWR, So. Plainfield, NJ, USA)
- Eppendorf 移液器和连续分液器
- Agilent Bond Elut AOAC 萃取试剂盒 (部件号 5982-5755)
- Agilent Bond Elut EMR-Lipid dSPE 增强型脂质去除净化管 (部件号 5982-1010) 和 EMR- $MgSO_4$ 除脂萃取盐包 (部件号 5982-0102)

仪器条件

采用的 GC 和 MS 条件与之前的应用简报 [5] 相同。分析在配备 Agilent 7693B 自动进样器的 Agilent 7890A GC 和 Agilent 7000C 三重四极杆 GC/MS 系统上完成。建议将色谱柱反吹用于复杂样品混合物的分析中。

气相色谱条件

参数	值
气相色谱:	Agilent 7890A GC
色谱柱:	Agilent J&W DB-5ms 超高惰性柱, 0.25 mm × 15 m, 0.25 μm (部件号 122-5512UI)
载气:	氦气, 恒定压力
气体过滤器:	气体净化载气过滤器套装, 1/8 in (部件号 CP17974)
进样口衬管:	安捷伦单锥形不分流超高惰性衬管, 带玻璃毛 (部件号 5190-2293)
进样口:	MMI 进样口, 冷脉冲不分流模式, 初始 75 °C 保持 0.02 min, 然后以 750 °C/min 升温至 350 °C
脉冲不分流进样:	36 psi 持续 0.75 min
分流出口吹扫流速:	60 mL/min, 0.75 min 时开始
进样口压力:	运行过程 17 psi, 反吹过程 1.0 psi
柱温箱:	60 °C 保持 2.57 min, 然后以 50 °C/min 升温至 150 °C, 再以 6 °C/min 升温至 200 °C, 最后以 16 °C/min 升温至 300 °C 并保持 3 min
后运行:	300 °C, 2 min
微板流路控制技术:	Agilent UltiMetal Plus Ultimate 吹扫接头 (部件号 G3182-61581), 用于反吹分析柱和进样口
自动进样器:	Agilent 7693 自动进样器和样品盘 10 μL 进样针 (部件号 G4513-80220), 进样量 1 μL

MSD 条件

参数	值
MSD:	Agilent 7000C 三重四极杆气质联用系统, 惰性, 配备高性能电子元件
真空泵:	高性能涡轮泵
模式:	MRM
传输线温度:	280 °C
离子源温度:	300 °C
四极杆温度:	Q1 和 Q2 均为 150 °C
溶剂延迟:	2.57 min
质谱分辨率:	MS1 和 MS2 = 1.2 u

表 1 列出了本研究中所用的额外四种不稳定农药的 MRM 离子对。其他农药的 MRM 离子对列于参考文献 [5] 中。

表 1. 本研究所用额外不稳定农药的 GC/MS/MS MRM 参数和保留时间

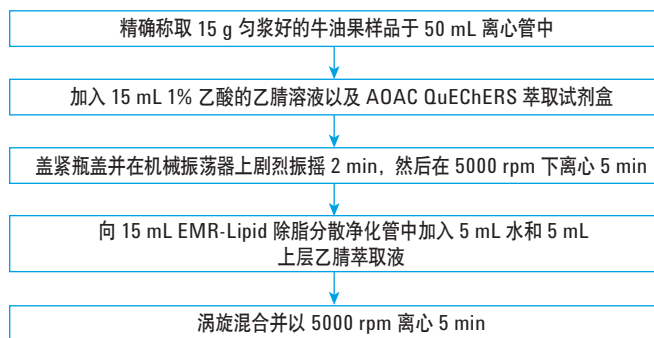
不稳定的分析物	RT (min)	MRM			
		定量通道	CE (V)	定性通道	CE (V)
敌菌丹	18.20	183 → 79	10	150 → 79	5
亚胺硫磷	18.77	160 → 77.1	20	160 → 133.1	20
蝇毒磷	20.67	361.9 → 109	10	210 → 182	10
唑菌胺酯	22.03	132 → 77.1	20	164 → 132	15

样品前处理

仅对 EMR-lipid 净化后的 Polish 净化盐析萃取步骤进行改进。QuEChERS 萃取步骤和 EMR-Lipid 净化步骤则不发生改变。乙腈层与水层在 EMR-Lipid 净化后发生相分离，这时进一步用无水 $MgSO_4$ 进行干燥。图 1 显示了方案图解。针对 EMR-lipid 净化后的改进流程有两点需要强调：

- 第一，向样品中添加 $MgSO_4$ 可最大限度减少 $MgSO_4$ 与水的放热效应，并可减少盐结块现象
- 第二，在 EMR-Lipid 净化后，用 300 mg 无水 $MgSO_4$ （来自 EMR 除脂萃取盐包）将用于 1 mL 乙腈萃取液的干燥管置于 2 mL 试管内进行预称重

QuEChERS 萃取和 EMR-Lipid 净化步骤（未改变）



增强型样品后处理（已改进）

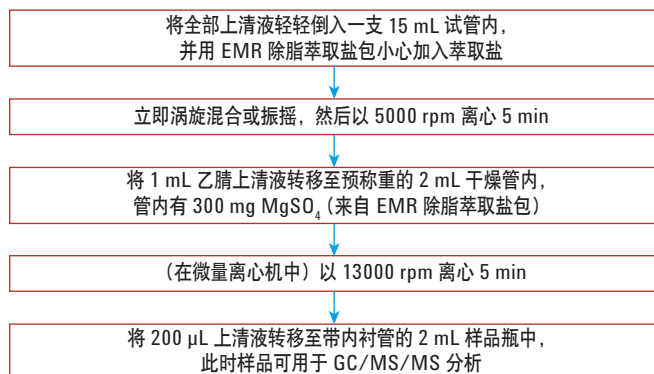


图 1. 展示牛油果中农药 GC/MS/MS 分析推荐方案的样品前处理工作流程，该流程采用未改变的 QuEChERS 萃取以及 EMR-Lipid 净化步骤和增强的样品后处理（步骤）

样品基质对 GC/MS/MS 系统性能的影响

为直接测定样品基质对 GC/MS/MS 仪器性能的影响，应根据原始 Polish 净化盐析萃取步骤和 EMR-Lipid 净化后增强的样品后处理（步骤）制备牛油果基质空白样品。然后用 50 ppb 的农药标准品对基质空白进行后加标，以测定基质效应对 GC/MS/MS 系统性能的影响。

对不稳定化合物的分析物响应（峰面积）、峰形和多次进样的重现性进行了研究。

进样序列依次为四个基质空白样品以及一个后加标样品。重复这一进样模式直至进样次数达到 100 次，因此测试序列中运行了 80 个基质空白样品和 20 个后加标样品。在采用原始 Polish 净化盐析萃取步骤或增强的样品（净化）后处理（步骤）的测试序列之间更换衬管并切割柱头。由于带玻璃毛的超高惰性单锥形不分流衬管以及超高惰性浅凹坑衬管常用于分析复杂的基质样品，因此在对采用增强的（净化）后处理（步骤）的牛油果样品进样 100 次后，需要对以上二者的外观进行评估。

基质去除效率和分析物回收率

通过在 GC/MS 的全扫描模式下运行牛油果基质空白对基质去除效率进行测定，并按前述方法 [5] 根据效率计算结果对整个色谱图进行对比。通过对比每个 50 ppb 分析物的预加标和后加标峰面积来对分析物回收率进行评估。

结果与讨论

更高的分析物响应和更好的峰形

EMR-Lipid 净化后的样品后处理可去除残留水分以及水溶性残留。图 2 展示了采用增强的（净化）后处理（步骤）与原始 Polish 净化盐析萃取步骤的不稳定化合物在 GC/MS/MS 上所得色谱图响

应和峰形的对比。分析物响应增加了三倍以上，尤其是啉菌胺酯和敌百虫的响应分别增加了 10 倍。色谱质量也得到了提高，峰形对称性提高且拖尾减少，使得数据处理更加轻松。种种改进表明这些不稳定化合物在通过 GC 流路时没有与流路表面发生明显的相互作用。

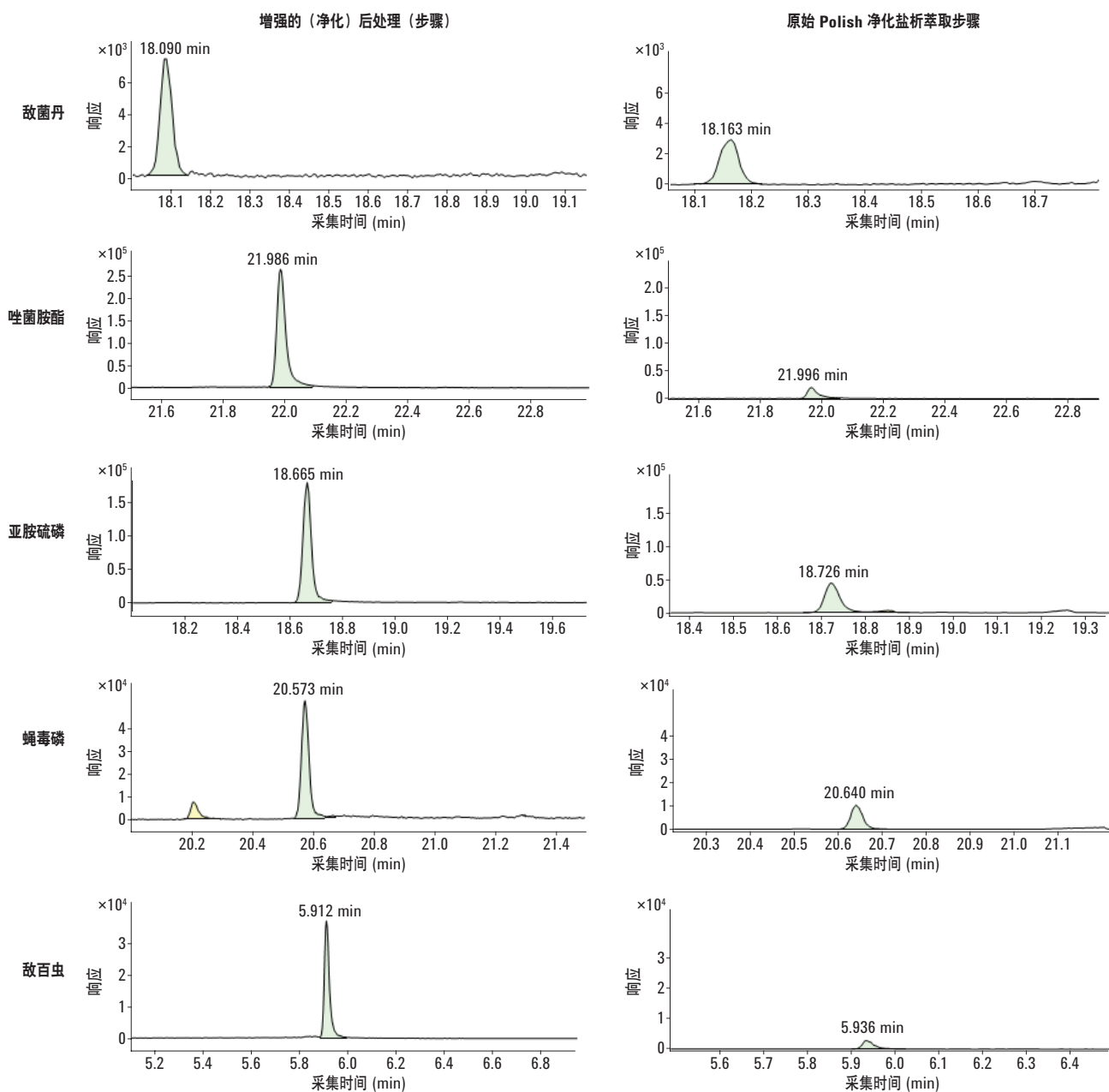


图 2. 采用 EMR-Lipid 净化后增强的后处理（步骤）与原始 Polish 净化盐析萃取步骤得到的不稳定化合物的 GC/MS/MS 响应和峰形的色谱图对比

更高的系统重现性

方法重现性可对定量分析结果的可靠性产生直接影响，因此其无疑是分析过程最重要的方面。多次进样后基质会在流路内聚集，因此分析物响应可能会在多次进样后发生改变，不稳定化合物尤其如此。这些不一致的响应会增加定量分析的难度并降低其可靠性。我们之前的结果证明，采用 EMR-Lipid 净化制备的复杂样品在 GC/MS/MS 系统中经过多次进样后重现性有显著提高 [5]。尽管有这些改进，但某些不稳定化合物在多次进样后仍会产生变异性。这一变异性很可能由最终样品萃取液中存在的残留水分造成。EMR-Lipid 净化后增强的后处理（步骤）、MgSO₄ 盐析和干燥步骤用于去除最终样品萃取液内的残留水分和水溶性固体残留，从而提高 GC/MS/MS 系统的重现性。

图 3 以唑菌胺酯为例展示了牛油果样品进样后重现性的提高，样品通过 EMR-Lipid 净化后增强的后处理（步骤）进行制备。研究对采用 EMR-Lipid 净化后增强的后处理（步骤）与原始 Polish 净化盐析萃取步骤，以及传统 PSA/C18 净化制备的样品结果进行了对比。数据清晰表明，采用 EMR-Lipid 净化后增强的后处理（步骤）制备的样品中唑菌胺酯的响应重现性显著提高。采用传统 PSA/C18 净化或 EMR 原始方案制备样品时，唑菌胺酯的信号在进样 100 次后降至初始值的 30%-40%。这种不一致将使此化合物的定量分析失败。然而，在采用 EMR-Lipid 净化后增强的后处理（步骤）时，唑菌胺酯信号获得了极佳的重现性（偏差为 ±10%）。采用 EMR-Lipid 净化后增强的后处理（步骤）可获得更高的重现性，从而提高了不稳定分析物定量分析的可信度与可靠性。

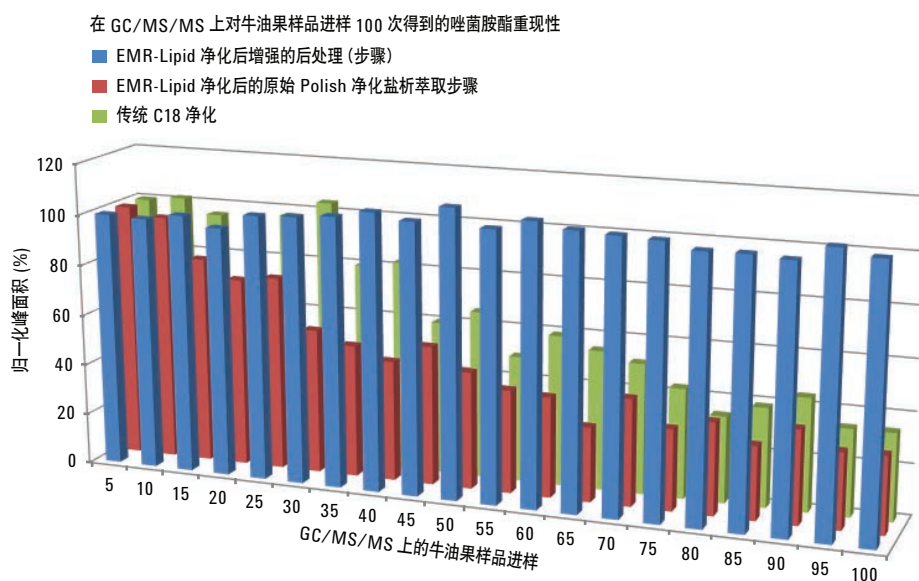


图 3. 采用 EMR-Lipid 净化后增强的后处理（步骤）与原始 Polish 净化盐析萃取步骤，以及传统 PSA/C18 净化制备的牛油果样品在 GC/MS/MS 上进样 100 次后获得的不稳定化合物唑菌胺酯的响应重现性

表 2 列出了本研究测试的所有农药以及采用所述方法对牛油果进样 100 次后各自的 RSD。在依次经过 EMR-Lipid 净化以及增强的后处理（步骤）后，29 种化合物中有 24 种的相对标准偏差低于 10%。克菌丹、灭菌丹、敌菌丹和 DDT 是难以利用 GC/MS/MS 进行分析的化合物，较高的 RSD 表明 100 次进样

中产生了显著的信号变化，通过 PSA/C18 净化得到的样品尤为明显。然而，利用 EMR-Lipid 净化以及增强的后处理（步骤）制备样品的信号降低有所好转，这四种不稳定农药在 50 次进样中的重现性 RSD 小于 10%，符合验收标准。

表 2. 牛油果样品在 GC/MS/MS 中进样 100 次后得到的分析物重现性（峰面积 RSD%）

农药	100 次进样的分析物 RSD (n = 20)		
	采用增强的后处理（步骤）的 EMR-Lipid 净化	采用原始 Polish 净化盐析萃取步骤的 EMR-Lipid 净化	C18/PSA 净化
敌敌畏	8.5	6.2	10.5
敌百虫	9.2	35.0	73.0
2-苯基苯酚	2.5	7.0	13.6
乙丁烯氟灵	4.6	12.4	18.8
治螟磷	3.1	7.1	11.8
阿特拉津	2.1	6.8	12.2
林丹	3.1	8.5	10.8
百菌清	2.2	12.5	11.7
二嗪农	2.6	6.6	11.7
甲基毒死蜱	2.6	8.4	8.9
抑菌灵	5.4	11.7	9.0
艾氏剂	2.1	9.8	19.3
对甲抑菌灵	6.6	10.5	6.6
克菌丹	29.8	29.9	51.9
灭菌丹	22.0	53.8	52.2
腐霉利	2.1	6.8	14.3
乙噻酚磷酸酯	3.1	6.8	10.4
异狄氏剂	4.0	8.3	12.6
硫丹硫酸酯	3.6	8.5	12.1
DDT	16.1	21.6	22.4
敌菌丹	38.5	53.8	63.7
异丙二酮	3.7	11.0	10.7
亚胺硫磷	6.2	24.0	12.5
蝇毒磷	4.3	19.8	9.7
氯菊酯	3.0	6.8	11.8
唑菌胺酯	3.7	43.7	38.8
溴氟菊酯	8.7	22.5	9.8
乙基对硫磷 d10 (内标)	4.9	11.8	7.2
TPP (内标)	2.1	9.1	19.1

更长的 GC 进样口衬管和色谱柱寿命

采用 EMR-Lipid 净化后增强的后处理（步骤）的另一个优势是减少可溶于痕量残留水分中的非挥发性盐残留。通过对牛油果样品进样 100 次来测试带玻璃毛的安捷伦超高惰性单锥形不分流衬管（部件号 5190-2293）和安捷伦超高惰性浅凹坑衬管（部件号 5190-2297）这两种类型的超高惰性衬管。在测试结束后通过外观检查查看衬管上的残留物沉积。图 4 表明了两个衬管在 100 次进样后仍几乎保持洁净。这些结果证实，采用 EMR-Lipid 净化以及增强的后处理（步骤）可获得出色的洁净度。此方法延长了衬管和色谱柱的寿命，并减少了系统维护需求。

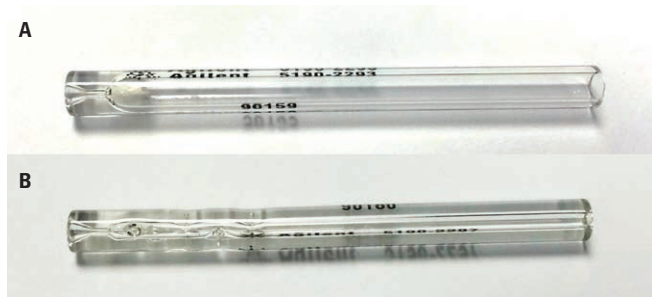


图 4. 采用 EMR-Lipid 净化以及增强的后处理（步骤）制备的牛油果样品进样 100 次后的典型 GC 进样口衬管外观。A) 带玻璃毛的安捷伦超高惰性单锥形不分流衬管，B) 安捷伦超高惰性浅凹坑衬管

相同的基质去除效率和分析物回收率

采用净化前后的 GC/MS 全扫描谱图对比对基质去除效率进行了评估 [5]。结果表明，采用 EMR-Lipid 净化后增强的后处理（步骤）与原始 Polish 净化盐析萃取步骤获得的基质去除效率相同（图 5）。

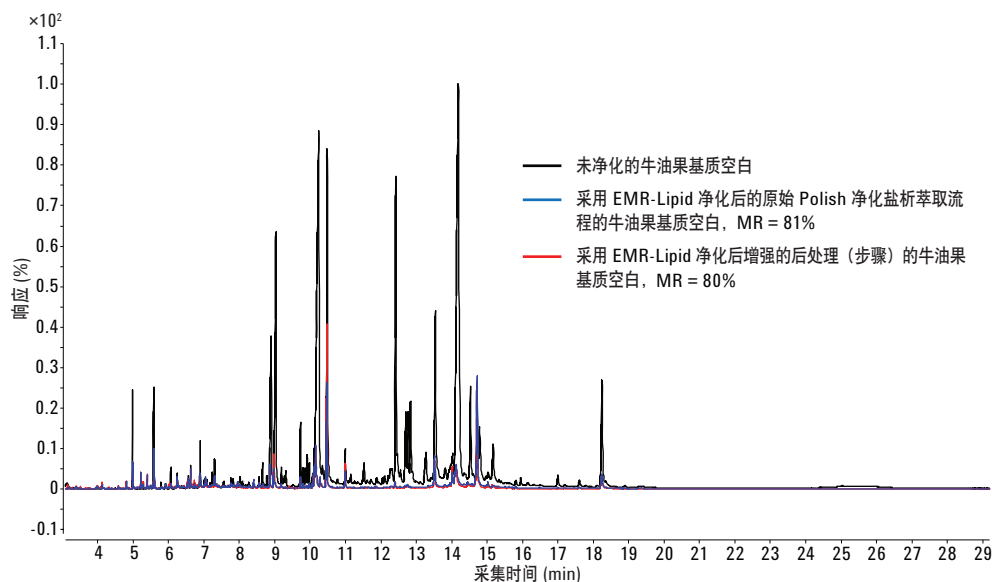


图 5. GC/MS 全扫描色谱图对比结果证明了 EMR-Lipid 净化后增强的后处理（步骤）和原始 Polish 净化盐析萃取步骤具有相同的基质去除效率

图 6 展示了分别采用 EMR-Lipid 净化后增强的后处理（步骤）以及原始 Polish 净化盐析萃取步骤制备的 50 ppb 加标牛油果样品 (n = 6) 的农药回收率对比。一些采用增强的（净化）后处理（步骤）的分析物呈现出较低的回收率。然而，所有化合物的重现性都有大幅提高，RSD 均低于 5%。

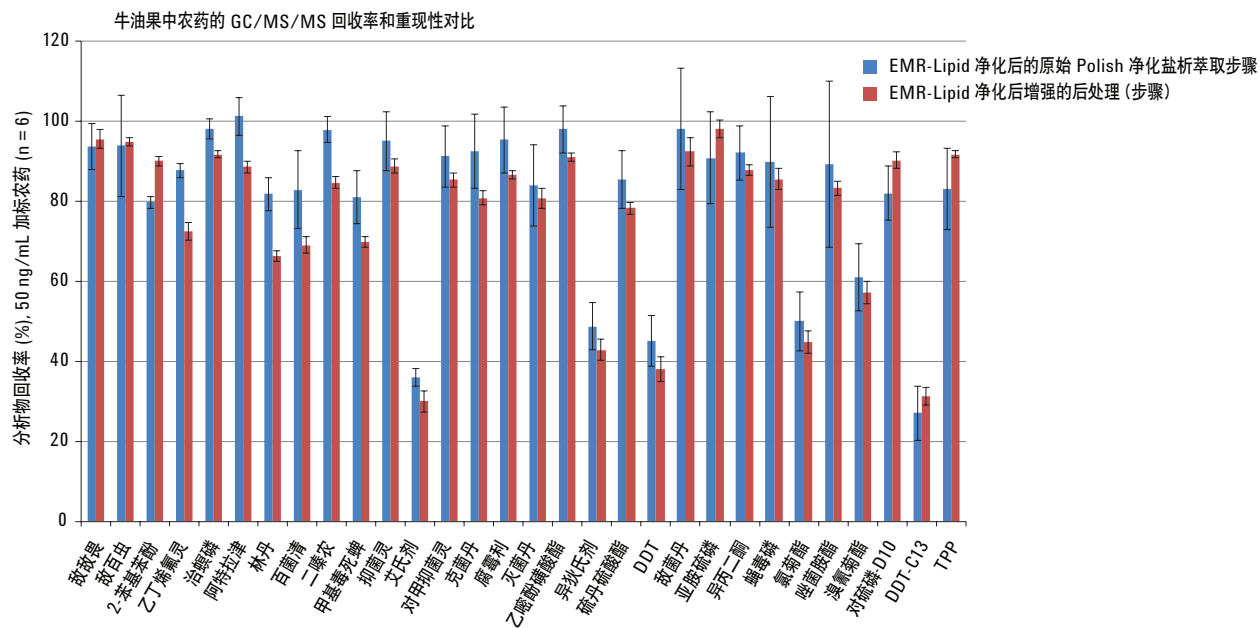


图 6. 通过 EMR-Lipid 净化后增强的后处理（步骤）与原始 Polish 净化盐析萃取步骤制备的 50 ng/mL 加标牛油果样品中的农药回收率

结论

将样品进样至 GC/MS/MS 前, EMR-Lipid 净化后增强的后处理 (步骤) 通过 Polish 净化盐析萃取步骤和使用无水 $MgSO_4$ 的干燥步骤去除残余水分和水溶性残留。该方法可通过更高的分析物响应、更好的峰形、出色的仪器重现性以及更长久的进样口衬管与色谱柱寿命改进 GC/MS/MS 的分析性能。该方法适用于寻求改善复杂多脂样品前处理的分析人员, 在目标分析物不稳定时尤其适用。EMR-Lipid 净化后增强的后处理 (步骤) 同样使复杂样品获得了较高的基质去除效率, 并对多残留农药分析提供了合格的分析物回收率。萃取盐 (无水 $MgSO_4$) 采用袋装形式, 易于分散至样品中并易于保存。

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

参考文献

1. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Steinbahr, D.; Schenck, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412
2. Lehotay, S. J.; Mastovská, K.; Lightfield, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 615 & 60A
3. Chamkasem, N.; Ollis, L. W.; Harmon, T.; Mercer, G. Analysis of 136 Pesticides in Avocado Using a Modified QuEChERS Method with LC-MS/MS and GC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61(10)*, 2315-2329
4. Hildmann, F.; Gottert, C.; Frenzel, T.; Kempe, G.; Speer, K. Pesticide residues in chicken eggs - A sample preparation methodology for analysis by gas and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1403*, 1-20
5. Zhao, L.; Lucas, D. 使用 Agilent Bond Elut 增强型脂质去除产品 EMR-Lipid 对牛油果中的农药多残留进行 GC/MS/MS 分析; 应用简报, 安捷伦科技公司, 出版号 5991-6097CHCN, **2015**

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。

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, 2016
2016 年 4 月 20 日, 中国出版
5991-6707CHCN



Agilent Technologies