

以高数据采集速率和优异的定量性能同步测定香料中的真菌毒素、非法着色剂和农药

应用简报

食品

作者

Mark Sartain、Thomas Glauner、
Behrooz Zekavat 和 Anabel Fandino
安捷伦科技公司
美国加利福尼亚州圣克拉拉市

前言

香料自古以来就被用于食品的调味和着色。欧洲国家发生过很多香料安全性警告事件，涉及不同种类的污染物。因此，通过一种多残留分析方法同时筛查和定量农药、真菌毒素以及着色剂的需求越来越迫切。这类分析面临的主要挑战包括复杂的基质、大量的分析物、化合物种类的多样性，以及分析方法必须覆盖宽泛的浓度范围等。

本应用简报评估了在动态 MRM 和快速极性切换模式下运行的离子漏斗三重四极杆质谱仪对一系列痕量水平分析物进行准确定量分析的性能。此外，我们还评估了旨在优化 MRM 间延迟时间的改良版软件和固件，其能够在低至 0.5 ms 的驻留时间内获取高质量数据。

Agilent 6495B 三重四极杆液质联用系统具有优异的灵敏度，能够精准定量高度稀释的样品中的农药、真菌毒素和着色剂，在降低基质效应的同时提高方法稳定性。



Agilent Technologies

实验部分

样品前处理

黑胡椒和辣椒粉购自当地杂货店，按照 EN 15662 QuEChERS 前处理方法，使用 Agilent BondElut QuEChERS 试剂盒（部件号 5982-6650）进行提取。使用 QuEChERS dSPE EMR-Lipid 增强型脂质去除净化基质试剂盒（部件号 5982-1010）进一步纯化提取物，然后进行 Polish 净化盐析萃取（部件号 5982-0102）。最后，向提取物中加入 2 ppb (10 µg/kg) 安捷伦综合农药混标（部件号 5190-0551）、真菌毒素以及着色剂标准品 (Sigma)，再用乙腈以 1:5、1:10、1:20、1:50 和 1:100 的比例稀释加标后的提取物。

方法设计

使用 Agilent MassHunter 优化软件优化五种真菌毒素和九种着色剂的 MRM 离子对，并使用安捷伦农药触发式多反应监测 (tMRM) LC/MS 应用套装为每种化合物确定至少两个 MRM 离子对及其对应的 MS 条件。采用正离子和负离子电喷雾电离，在动态 MRM (dMRM) 或 tMRM 模式下通过单次运行执行分析。主要的 UHPLC 和 dMRM MS 参数如仪器条件表所示。

结果与讨论

评估经优化的 MRM 间延迟时间

我们开发了以 100 个 MRM 离子对（代表 53 种农药）为分析目标的方法，用于评估优化了 MRM 间延迟时间的改良版软件和固件。图 1 显示了四个不同的驻留时间内两种农药的叠加 MRM 色谱图，表明合适的 MRM 延迟时间对于在短驻留时间内保持离子信号非常重要。

仪器条件

Agilent 1290 Infinity II UHPLC 系统

色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 150 mm, 1.8 µm (部件号 959759-902)
柱温	40 °C
进样量	2 µL
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	95% A 保持 0.5 min, 在 3.5 min 内增至 40% B, 在 17 min 内增至 98% B, 保持 3 min, 在 0.1 min 内降至 5% B, 保持 0.9 min, 停止时间 21.00 min 后运行时间 2 min

Agilent 6495B 三重四极杆质谱仪

离子源	安捷伦喷射流 ESI
极性	正负极切换
干燥气温度	120 °C
干燥气 (氮气) 流速	17 L/min
雾化器气体 (氮气) 压力	30 psi
鞘气 (氮气) 温度	300 °C
鞘气流量	12 L/min
毛细管电压	3500/-3500 V
喷嘴电压	300/-500 V
iFunnel 高/低压力 RF	150/60 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
MRM 总数	542 对 (正: 530, 负: 12)

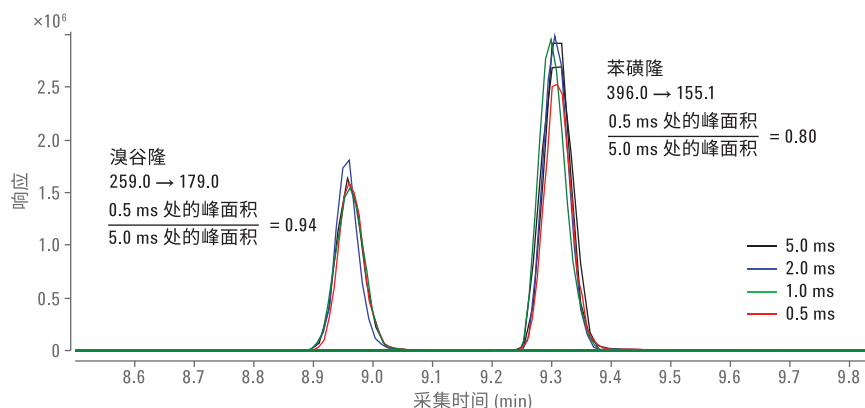


图 1. 采用经优化的 MRM 间延迟时间，以 5.0 ms、2.0 ms、1.0 ms 和 0.5 ms 的驻留时间得到的溴谷隆和苯磺隆 (100 ppb) 叠加 MRM 色谱图

方法开发及性能

我们首先采用针对目标真菌毒素和着色剂化合物进行了优化的新离子对开发了 MRM 方法。随后，使用新的化合物离子对和观察到的保留时间数据更新以 250 多种农药为目标的 dMRM 方法。

UHPLC 与经过优化的 6495B 三重四极杆质谱仪相结合，能够在大多数分析物最大残留限量 (MRL) 10% 的定量下限 (LLOQ) 水平对其进行定量分析。在低至 2 ppt 的 LLOQ 到高至 100 ppb 的定量上限 (ULOQ) 范围内，采用 13 个浓度水平的标样评估方法的精度和准确度，每个浓度执行五次重复进样。所得结果表明，分析的精度 (LLOQ 处的 RSD% < 20%，其余浓度水平 < 15%) 和平均准确度 (LLOQ 处为 80%-125%，其余浓度水平为 85%-115%) 都很出色。校准曲线的相关系数 (R^2) 大于 0.99。

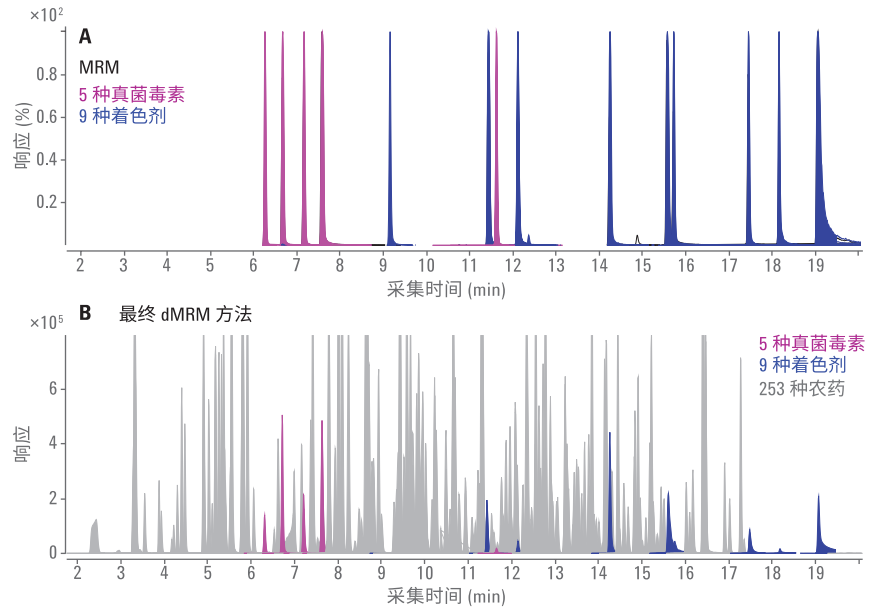


图 2. 真菌毒素和着色剂的叠加 MRM 色谱图 (A)。以总共 267 种化合物为目标的最终 dMRM 方法分析 10 ppb 混合标样所得的叠加 MRM 色谱图 (B)

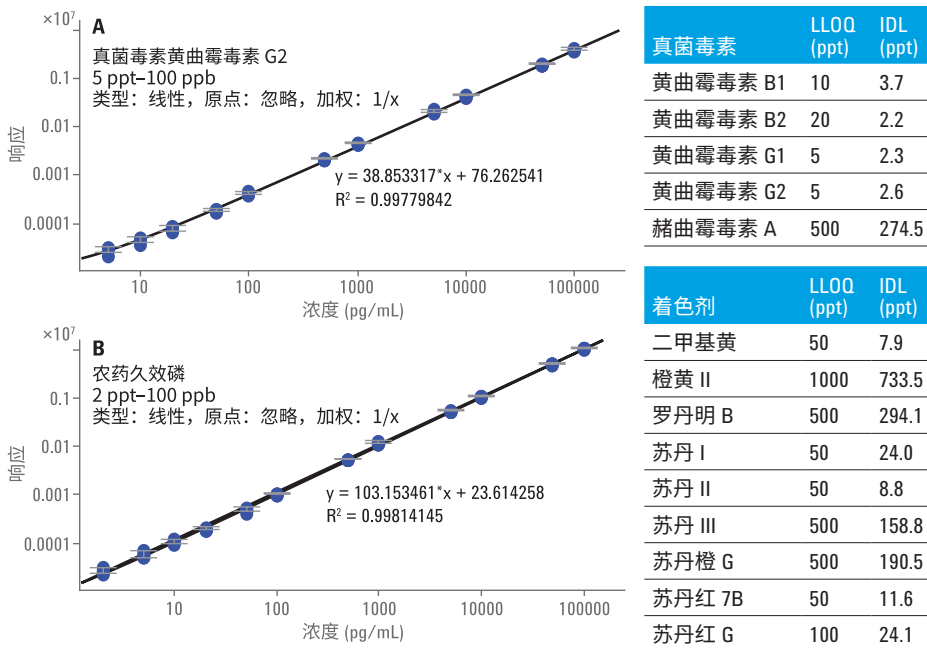


图 3. 最终 dMRM 方法的动态范围和线性示例。表格中示出了真菌毒素和着色剂的 LLOQ 和仪器检测限 (IDL)

通过稀释提取物最大限度降低基质效应

对复杂样品提取物进行稀释能够最大限度降低基质效应，使得定量分析更加准确，同时还能减少液质联用系统所受的污染，从而提高分析稳定性。表 1 显示了稀释操作对分析结果的改善，其中黑胡椒样品中化合物的回收率随着样品被进一步稀释而提高。

香料是一类非常具有挑战性的食品基质，它们的性质很复杂，因而离子抑制效应极为显著。由于观察到了着色剂化合物损失，我们不能利用传统分散式固相萃取净化来去除干扰性基质化合物，这又导致基质效应进一步增强。因此，稀释提取物对于降低离子抑制效应而言十分关键，图 4 中的对比结果表明，不同类型的香料适用的稀释比例差别非常大。

我们所分析的样品中最具挑战性的香料基质是黑胡椒。图 5 表明，要使化合物回收率达到 > 90% 的可接受标准，需要使用乙腈以 1:100 的比例稀释提取物。6495B 液质联用系统固有的灵敏度能够有效分析以最适合比例 1:100 稀释的黑胡椒样品，同时仍能检出大多数化合物，且峰面积 RSD < 20%。

表 1. 根据溶剂校准计算出的不同稀释比例下指定化合物的回收率。绿色单元格中的数据符合 SANCO/12571/2013 标准

分析物	未稀释	稀释比 1:5	稀释比 1:10	稀释比 1:20	稀释比 1:50	稀释比 1:100
啉虫脒	47.1±3.7	88.5±2.3	94.6±3	99.2±6.8	104.5±6.4	116.7±5.9
黄曲霉毒素 B1	31.1±0.9	80±1.3	90±3.8	92.1±7.7	110.2±8.8	112±3.4
噻嗪酮	4.1±0.3	16.6±1.1	32.1±1.2	47.3±5.8	84.6±9	109.8±9.9
氯虫苯甲酰胺	8.2±0.7	31.1±1.1	50.9±5.2	65.5±10.9	94.2±10.2	101.9±20.4
环草定	16.9±1.8	57.7±5.9	75.7±5.4	82.4±3.6	97.5±9.2	106.9±11.5
灭多威	24.9±1.9	51.3±3.5	65.3±6.5	77.1±7.5	107.3±10.7	113.3±14.6
丙溴磷	2.6±0.3	12.5±0.6	20.4±2.1	34.2±1.7	59±8.3	88.5±15.5
霜霉威	105.9±8	102.4±3.4	101±3	100.2±2.8	114.5±3.4	111.5±6.8
丙氧嗪啉	11.4±0.6	42.8±0.9	57.9±1	68.3±3.9	96±11.6	111.3±6.8
苏丹红 7B	19.8±2.5	57.4±4.2	61±6.9	70.5±2.4	84±5	81.5±7.2

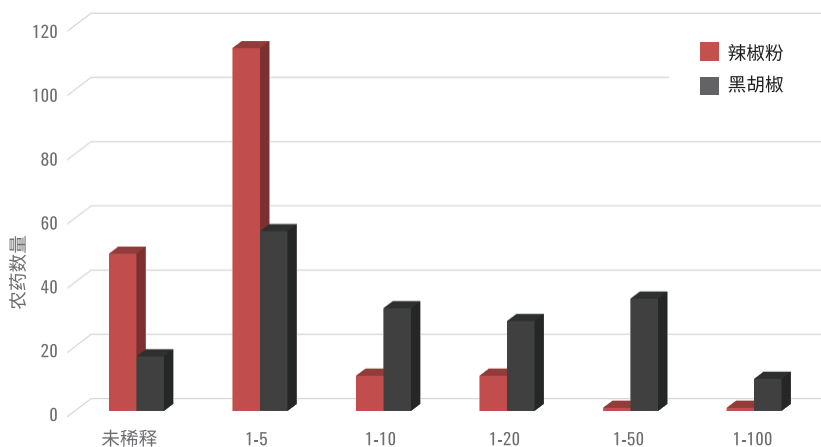


图 4. 辣椒粉和黑胡椒提取物稀释液中的 194 种化合物中，将回收率在可接受范围内 (70%-120%) 的化合物进行对比

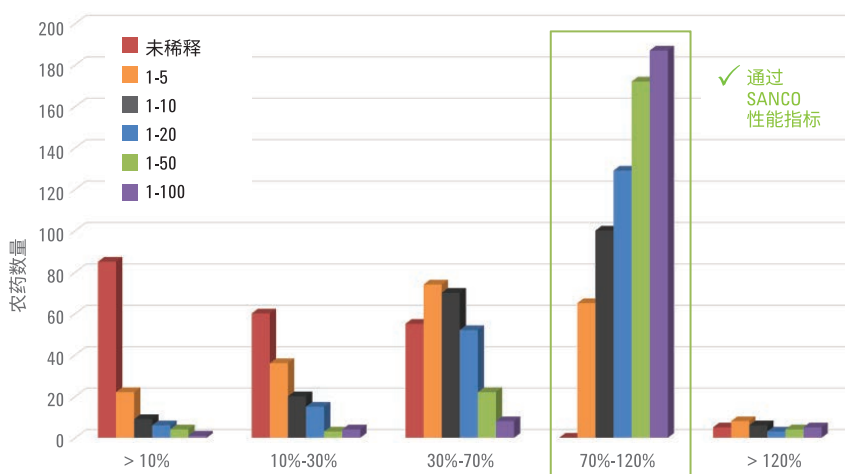


图 5. 分析加标 2 ppb (10 µg/kg) 农药、真菌毒素和着色剂并用乙腈稀释的黑胡椒样品所得的回收率直方图。205 种化合物均表现出较强的离子抑制效应，稀释之后回收率得到了明显改善

使用触发式多反应监测 (tMRM) 进行确证分析

使用 dMRM 方法评估基质效应时，我们发现辣椒粉的空白提取液（未加标）中存在 20 多种农药和真菌毒素。为了进一步确认此对照样品中的这些化合物，我们使用 tMRM 方法，在一个主要离子对的基础上采集了多达六

个离子对，然后将完整的化合物谱图与采用纯标准品创建的谱库进行比对。定量分析也使用相同的数据。在图 6 所示的例子中，以 1:20 比例稀释的辣椒粉提取物中赭曲霉毒素 A 和黄曲霉毒素 B1 的计算结果分别为 28 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 8.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

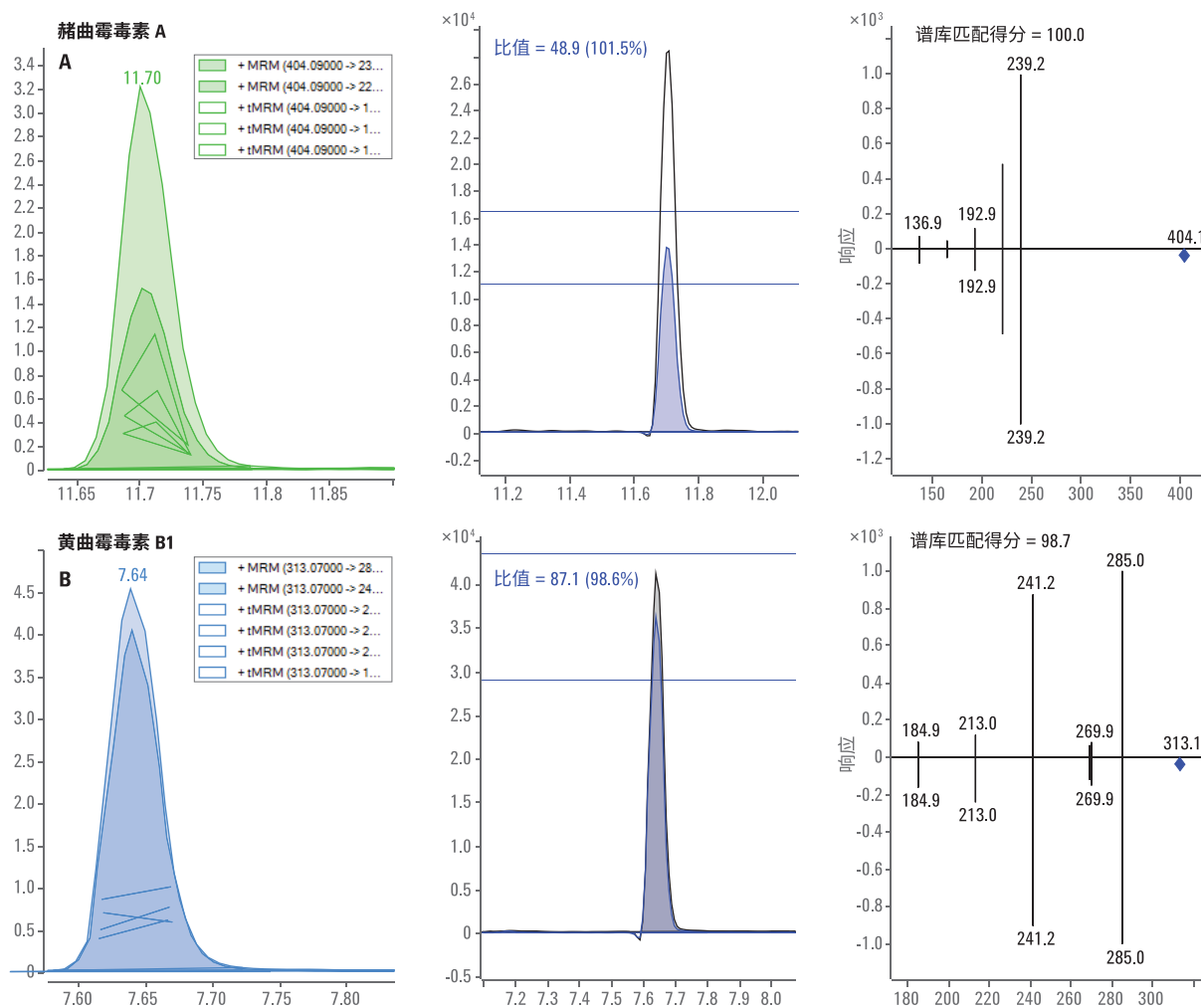


图 6. 辣椒粉提取物中赭曲霉毒素 A (A) 和黄曲霉毒素 B1 (B) 的触发式 MRM 数据，图中从左至右为化合物色谱图、定性离子详细信息和参比谱库匹配结果

结论

- 使用优化的 MRM 间延迟时间能够将所用 MRM 驻留时间缩短至 0.5 ms，同时最大限度减小分析物信号损失
- 真菌毒素和着色剂化合物被成功纳入 UHPLC/MS/MS 农药方法的目标分析物中，用于测定 260 余种化合物
- 使用 Agilent 6495B 液质联用系统可提高分析灵敏度，精准定量高度稀释的香料提取物中的化合物，同时降低基质效应并提高方法稳定性
- 本文还给出了香料中真菌毒素化合物的确证分析所用的 tMRM 采集参数

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

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

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，2016

2016 年 12 月 15 日，中国出版

5991-7300CHCN



Agilent Technologies