

使用 6475 三重四极杆液质联用系统 分析食品中多残留农药的方法开发与 评估



作者

Linfeng Wu
安捷伦科技有限公司
Santa Clara, CA, USA

Aimei Zou
安捷伦科技有限公司
Singapore

摘要

本应用简报介绍了使用全面的 LC/MS/MS 方法分析三种食品基质（小麦、橄榄油和红茶）中 500 多种农药的方法开发与评估。将 Agilent 6475 三重四极杆 LC/MS (LC/TQ) 系统与 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 MassHunter Workstation 软件 12.0 搭配使用，完成了这项工作。

Agilent 6475 三重四极杆液质联用仪包含在旧款系统基础上的硬件和软件改进：

- 基于人工智能 (AI) 的调谐和校准
- 具有早期维护反馈 (EMF) 的主动系统监测
- 具有 Intelligent Reflex (iReflex) 的反馈式再进样逻辑
- 维护和方法开发自动化
- 窄分离模式下增强的 MS1 和 MS2 分辨率
- 遵守 21 CFR Part 11 和附录 11 法规合规性指南

前言

农药对于保护农作物起着不可或缺的作用，在大多数农产品的生长环境中，为实现高产量，往往需要使用农药。许多监管机构（例如 US-EPA 和欧盟委员会）要求商品中或商品上残留的农药符合农药残留筛查和报告限值^[1,2]。食品中农药分析的主要挑战包括来自不同化合物类别的多种农药、多种复杂的食品基质、基质效应、目标分析物的较低浓度等。

本应用简报介绍了定量分析三种食品基质中 500 多种农药和农药代谢物的 LC/MS/MS 方法的开发与评估。这些基质包括小麦（高淀粉含量）、橄榄油（高含油量）和红茶（复杂基质）。该分析将 Agilent 6475 三重四极杆液质联用系统 (LC/TQ) 与 Agilent MassHunter Workstation 软件 12.0 搭配使用。LC/TQ 系统使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和安捷伦喷射流 (AJS) 电喷雾离子源。该仪器在动态多反应监测 (dMRM) 模式下运行。使用后加标 0.1 至 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 农药标准品的食品萃取物样品生成基质匹配校准曲线。该分析研究了 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度下基质对分析物响应的影响，结果表明大多数分析物的回收率在 70% 至 120% 之间。此外，还使用加标有 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 红茶萃取物重复进样 ($n = 300$) 测试了系统稳定性。所有结果均表明，6475 LC/TQ 系统在食品分析中具有出色的分析灵敏度、精密度、准确度和稳定性。

实验部分

试剂与标准品

农药标准品包括购自安捷伦的标准混合物 (货号 5190-0551 和货号 CUS-00004663)，以及购自安捷伦或 AccuStandard 的 200 多种单一农药标准溶液。有机小麦、橄榄油和红茶购自当地杂货店。

所有试剂和溶剂均为 HPLC 或 LC/MS 级。超纯水自配备 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)。

样品前处理

将所有农药标准品混合，然后用乙腈将其稀释为最终工作溶液，该溶液中含有 500 多种浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1 ppm) 的农药。该溶液用于食品萃取物加标。

对于小麦萃取物的制备，用 8 mL 水将 2 g 小麦粉润湿，涡旋混合并浸泡 15 分钟。对于红茶萃取物的制备，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。然后分别向小麦和红茶样品中加入 10 mL 乙腈。将每个样品管涡旋混合 1 分钟。对于橄榄油萃取物的制备，将 5 g 橄榄油与 10 mL 乙腈剧烈涡旋混合 2 分钟。然后，加入 6 mL 水并进一步涡旋混合 2 分钟。在每个样品萃取

管中加入一袋安捷伦 EN 萃取盐和一粒陶瓷均质子 (货号 5982-5650CH)。将管剧烈振摇 10 分钟，并在 4 °C 下以 3000 xg 离心 5 分钟。分别收集三种食品样品的上清液。

使用通用分散式 SPE (dSPE) 管 (货号 5982-0028) 清洁小麦上清液。使用用于高色素 EN 方法的 Agilent QuEChERS dSPE (货号 5982-5356) 清洁红茶上清液。使用 Captiva EMR-Lipid 6 mL 柱 (货号 5190-1004) 在温和压力下清洁橄榄油上清液。

向最终萃取物加标九种浓度（浓度范围为 0.1–50 $\mu\text{g}/\text{L}$ ）的农药工作溶液，以生成基质匹配标样。采用小麦和红茶萃取物 1:5 的稀释倍数以及橄榄油萃取物 1:2 的稀释倍数，建立校准曲线。小麦和红茶萃取物的校准曲线最终浓度为 0.5–250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，橄榄油萃取物的最终浓度为 0.2–100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在进样之前配制所有基质匹配标样，并测定六个技术重复样本。

此外，农药工作溶液也以相应浓度加标到乙腈中进行基质效应分析。此外，还配制了加标有 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 农药标准品的大量红茶萃取物，以用于系统稳定性分析。

设备

使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统进行样品分离，该系统由以下模块组成：

- 1290 Infinity II 生物高速泵 (G7132A)
- 配备恒温箱的 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A)
- 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)

该液相色谱系统与配备安捷伦喷射流电喷雾离子源 (G1958-65638) 的 Agilent 6475 三重四极杆液质联用系统 (G6475AA) 联用。使用 Agilent MassHunter Workstation 软件 12.0 进行数据采集。

方法

LC/MS 条件和参数如表 1 和表 2 所示。农药的 MRM 从先前在 6470 LC/TQ 上优化的方法转移得到，或者在 6475 LC/TQ 上使用新的优化工具新优化得到。使用忽略原点的线性拟合以及 $1/x$ 加权进行校准曲线分析。

结果与讨论

方法转移

为了开发大量农药筛查方法，基于实验室现有的农药筛查方法进行研究，该方法是先前开发于 6470 LC/TQ 系统。使用 MassHunter 12.0 软件在全新的 6475 LC/TQ 系统上直接打开该方法并执行。

为了检查每种分析物的原始 MRM 参数（包括碎裂电压和碰撞能量）是否需要重新优化，在 6475 LC/TQ 系统上对 dMRM 方法进行了重新优化。通过总离子流色谱图 (TIC) 叠加，实施并比较了这两种方法

（重新优化之前和之后）。图 1 显示了从两种方法中获得的几乎相同的色谱图，证明从安捷伦旧仪器到 6475 LC/TQ 可轻松进行方法转移，无需改进。

色谱

表 1. 1290 Infinity II 生物液相色谱方法

1290 Infinity II 生物液相色谱系统	
参数	数值
色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 mm × 150 mm, 1.8 μ m (货号 959759-902)
进样器温度	4 °C
流动相	A) 5 mmol/L 甲酸铵 + 0.1% 甲酸水溶液 B) 5 mmol/L 甲酸铵 + 0.1% 甲酸的甲醇溶液
流速	0.4 mL/min
进样量	2 μ L
梯度程序	时间 (min) B (%) 0.00 5 3.00 30 17 100 20.00 100
后运行时间	3 min

质谱

表 2. LC/TQ 参数

6475 三重四极杆质谱仪	
参数	数值
离子源	安捷伦喷射流 (AJS) 离子源
极性	正离子和负离子
气体温度	200 °C
干燥气	11 L/min
雾化器	35 psi
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	+3500 V, -3000 V
喷嘴电压	0 ±V
MS1/MS2 分辨率	Unit/Unit
分析周期	500 ms
MRM 总数	1003
最短/最长驻留时间	1.12 ms/248.28 ms

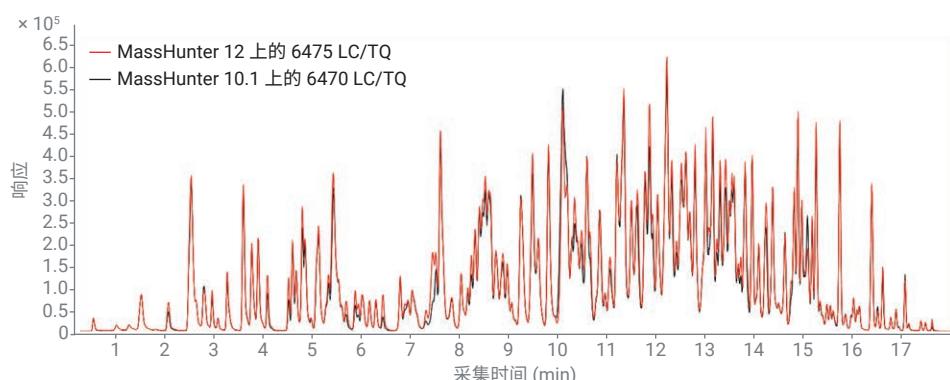


图 1. 通过分别在 6470 和 6475 LC/TQ 上优化的农药筛查方法采集的叠加 TIC

动态 MRM 方法的开发

为了进一步扩展农药筛查方法，在 6475 LC/TQ 系统上添加了新的农药化合物并进行了优化。在 MassHunter 12 软件中，新的优化工具选项可用于化合物优化。该功能可以解决简单的化合物混合物问题，并基于分析柱上的色谱分离，实现多重化合物优化过程。如果针对一种靶向前体检测到多个色谱峰，例如异构体、同质异位化合物或背景干扰，这些峰将用相应的保留时间 (RT) 标记并独立优化（图 2）。在本研究中，使用该新选项优化了含有新化合物的农药标准混合物，以确保 MRM 优化更准确。离子源参数使用 MassHunter 12 中的新离子源优化工具进行了优化，MassHunter 12 中提供了增强的加权优化算法。

最终开发的 dMRM 方法包含 1003 个 MRM，涵盖 500 多种农药（图 3）。液相色谱梯度保持不变以保持实验室数据分析的一致性，这导致 RT 大约为 13 分钟的许多并发 MRM。

图 4 显示了使用最终的 dMRM 综合方法在小麦基质萃取物中后加标 $1 \mu\text{g/L}$ 所有靶向农药的叠加 MRM 色谱图。大多数化合物实现了基线分离，显示出对称的尖峰。对于大多数农药，甚至对于以较短驻留时间 ($< 2 \text{ ms}$) 采集的化合物，也观察到了较高的 MS 信号响应。所有这些结果均表明，6475 LC/TQ 系统在复杂食品分析中具有较高的分析灵敏度。

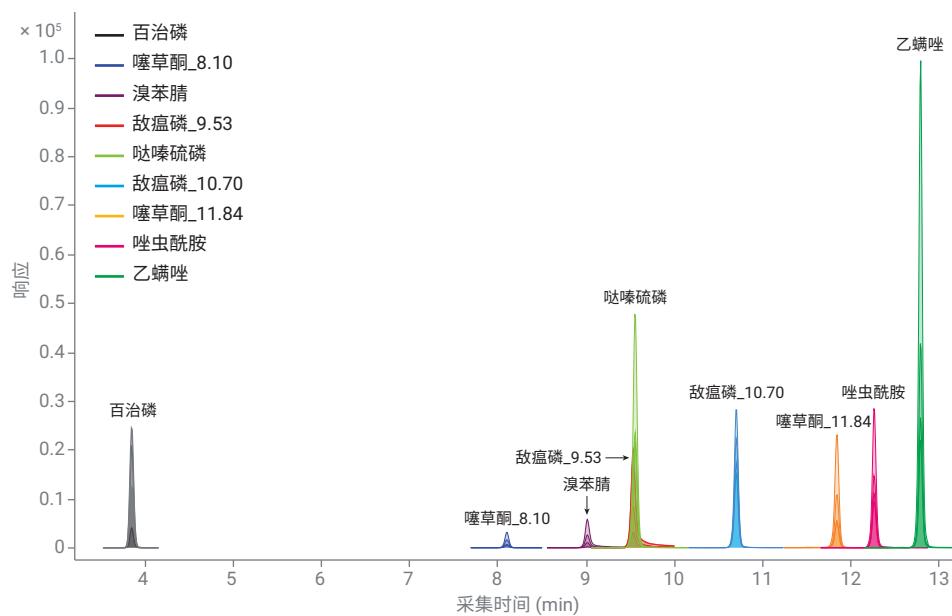


图 2. 使用新的优化工具软件，通过化合物混合物优化的方法采集的代表性 MRM 色谱图

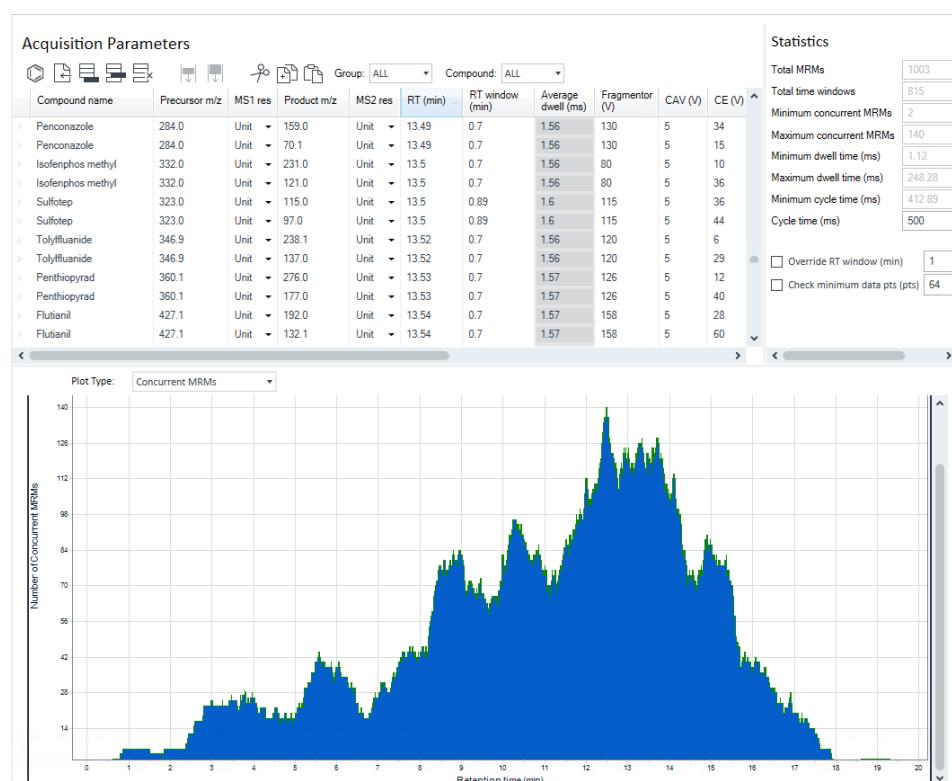


图 3. 如 MassHunter 12 中所示对 1000 多个 MRM 有效管理的农药 dMRM 综合方法

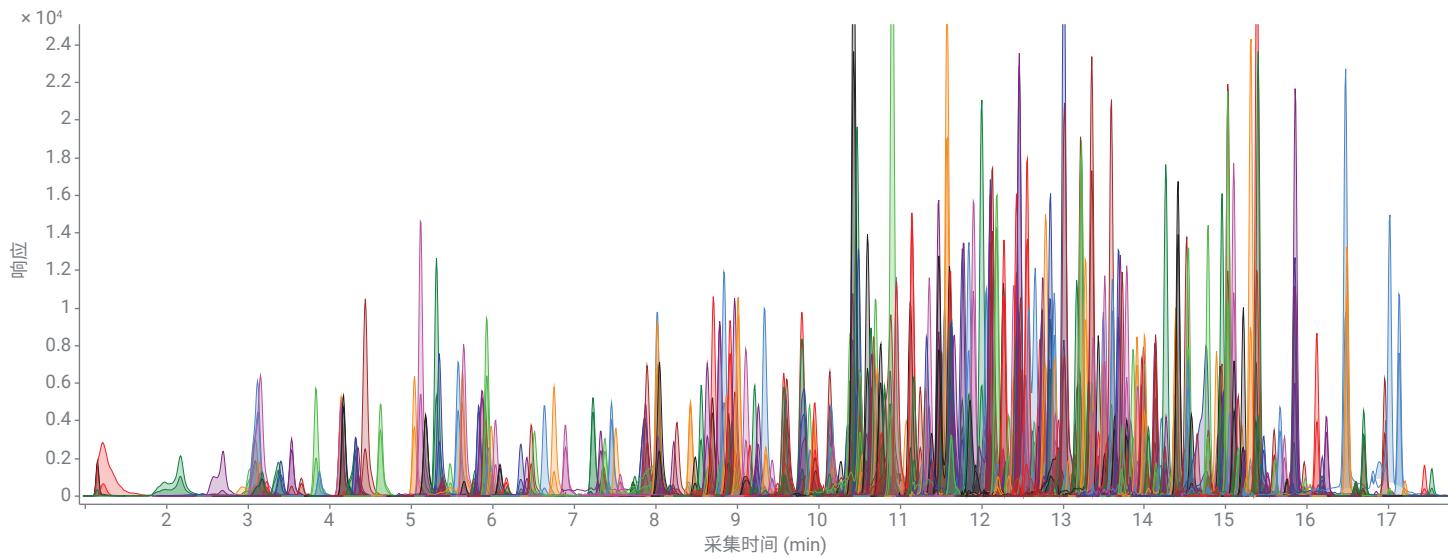


图 4. 小麦基质萃取物中加标 1 µg/L 所有靶向农药的 MRM 叠加色谱图

校准曲线分析

通过每种标样重复进样 ($n = 6$) 生成基质匹配校准曲线，对小麦、橄榄油和红茶基质中的多残留农药测量进行了评估。

定量性能总结如下：

- 基质匹配校准曲线在测试水平内具有出色的线性：小麦中 92% 的农药、橄榄油中 94% 的农药和红茶中 92% 的农药的相关系数 (R^2) 高于 0.99

- 出色的定量灵敏度：大多数农药在三种食品基质中的定量下限 (LLOQ) 低于默认 MRL 10 µg/kg，如图 5 所示 (LLOQ 定义为最低检测限值，准确度在 80% 至 120% 之间， $RSD < 20\%$ ^[3])

- 红茶中四种代表性农药的校准曲线如图 6 所示。校准曲线包括正极性模式下的两种农药（治螟磷和吡噻菌胺）和负极性模式下的两种农药（氟虫双酰胺和氟虫腈砜），它们均以较低的平均驻留时间 (< 2 ms) 采集

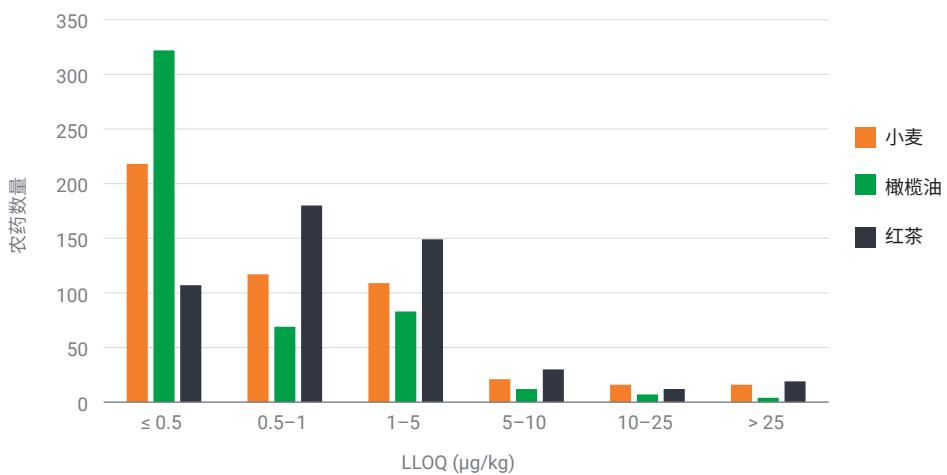


图 5. 小麦、橄榄油和红茶中加标农药的 LLOQ 分布

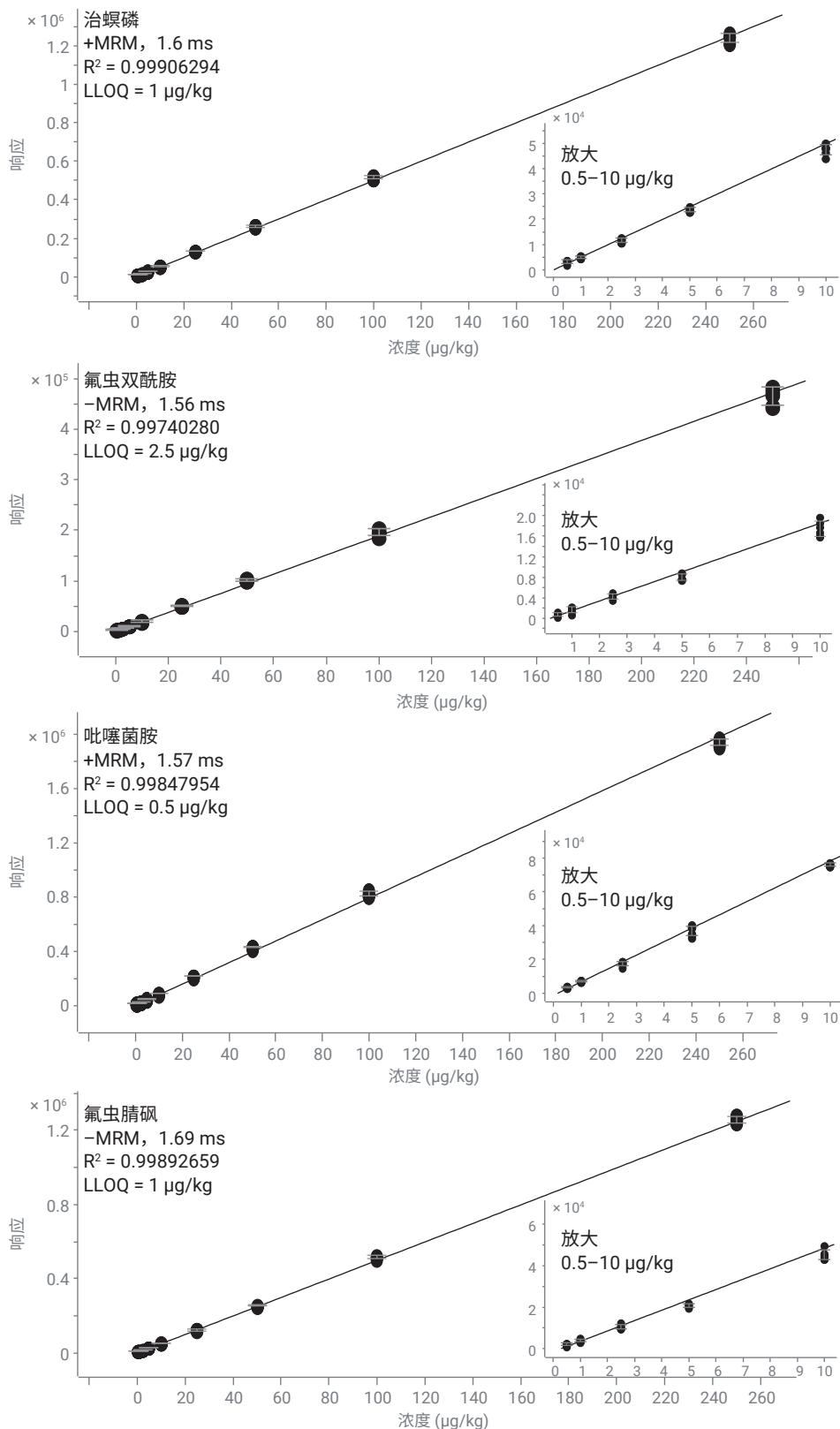


图 6. 红茶萃取物中加标的四种代表性农药的校准曲线

食品基质回收率

为评估基质效应（离子抑制或增强），研究人员比较了基质与纯溶剂中的相应响应，并计算出农药回收率。比较在 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的默认 MRL 下进行（图 7）。大多数农药的信号回收率在 70% 至 120% 之间，该范围是 SANTE 方法验证指南建议的可接受标准^[1]。

稳定性测试

为测试 6475 LC/TQ 系统的稳定性，使用农药 LC/MS/MS 综合方法对加标 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 农药标准品的红茶基质进行重复进样 ($n = 300$)。每 50 次进样的 TIC 叠加表明其在 LC 分离和总体 MS 信号响应方面具有出色的重现性（图 8A）。仪器连续运行约 115 小时（约 5 天）。此外，还选择了四种代表性农药来评估 MS 信号稳定性。评估包括一种早期洗脱的农药（环丙氨嗪，RT = 1.25 分钟）和三种在时间窗内洗脱同时具有最多 MRM 并发数的农药（吡噻菌胺、氟虫腈砜和戊菌唑）。图 8B 显示了这四种农药的 MS 响应，其 %RSD 范围为 3.7%–5.2% ($n = 300$)，包括正离子和负离子 MRM。所有这些结果均表明，6475 LC/TQ 系统在复杂食品样品分析中具有出色的稳定性。

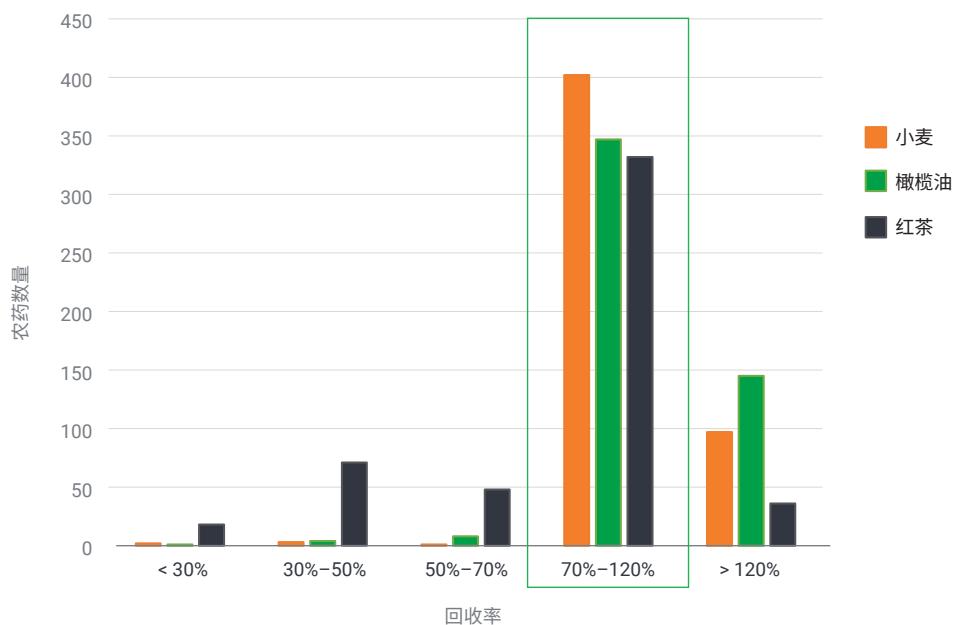


图 7. 小麦、橄榄油和红茶中添加 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 农药的响应回收率直方图。绿色框表示 SANTE 指标规定的可接受回收率

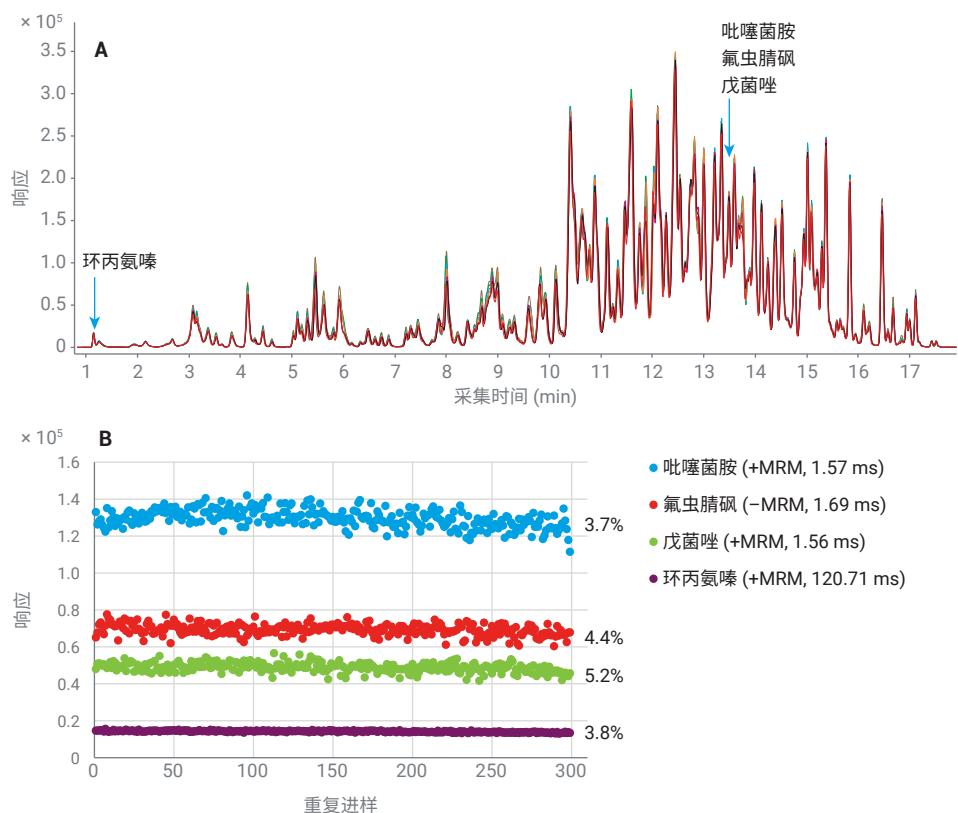


图 8. 加标 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度的红茶萃取物重复进样 ($n = 300$) 的重现性(A) 每 50 次红茶萃取物进样的叠加 TIC。列出了四种代表性农药（环丙氨嗪、吡噻菌胺、氟虫腈砜和戊菌唑）的液相色谱洗脱时间。(B) 绘制了来自 300 次重复进样的四种选定农药的 MS 响应

结论

一种用于农药筛查和定量分析的 LC/MS/MS 综合方法直接从安捷伦旧 LC/TQ 系统转移而来，并在更新的系统上进行了进一步扩展。将 Agilent 6475 三重四极杆液质联用系统与 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 Agilent MassHunter 12.0 软件搭配使用，实现方法转移。新的优化工具可确保自动化工作流程以改进化合物和离子源优化。本研究开发了用于定量 500 多种农药和农药代谢物的最终多残留农药方法，然后在小麦、橄榄油和红茶这三种食品基质中进行了评估。

研究结果表明：

- 从安捷伦旧系统到 6475 LC/TQ 系统，可轻松进行方法转移，无需重新优化
- Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统具有出色的色谱分离度
- 在分析灵敏度、精密度和准确度方面对食品基质具有出色的定量性能
- 大多数农药基质效应都在可接受的范围内
- 展示了液相色谱和质谱信号的系统稳定性

参考文献

1. SANTE/11312/2021 European Commission. https://food.ec.europa.eu/document/download/d4786faf-c574-4222-a5c6-45086b3920b8_en?filename=pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2021-11312.pdf
2. Tolerances and Exemptions for Pesticide Chemical Residues in Food. Title 40 U.S. Code of Federal Regulations, US-EPA.
3. 关于 MRL 的欧盟法规。https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/maximum-residue-levels/eu-legislation-mrls_en

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

DE45374366

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, 2022
2022 年 9 月 20 日, 中国出版
5994-5296ZHCN