

# 使用 AOAC 含色素样品 Carbon S dSPE 净化与 LC/MS/MS 联用分析菠菜中的 农药残留

## 作者

Christopher Ferlin 和  
Limian Zhao  
安捷伦科技有限公司

## 摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 含色素水果和蔬菜 Carbon S 分散式固相萃取 (dSPE) 试剂盒，通过 LC/MS/MS 分析新鲜有机菠菜中的 26 种农药残留。选择的分析化合物代表了各种常用的农药类别。与传统 AOAC 含色素样品石墨化炭黑 (GCB) dSPE 试剂盒相比，新型 AOAC 含色素样品 Carbon S dSPE 试剂盒提供了更高的分析物回收率和有效的色素去除。两种规格 (2 和 15 mL) 的新型 AOAC 含色素样品 Carbon S dSPE 试剂盒经证实可提供一致的性能，平均回收率 > 80%，目标化合物 RSD < 20%，菠菜色素基质的色素去除率 > 95%。

## 前言

新鲜水果和蔬菜中的天然色素非常丰富，例如绿色蔬菜中的叶绿素和叶黄素。这些色素可以用有机溶剂轻松萃取。如果不进一步去除色素共萃取物，在检测仪器如 LC/MS/MS 或 GC/MS/MS 上直接进样高色素含量样品萃取物可能会导致多种基质效应。存在的影响包括对 LC/MS/MS 的基质离子抑制效应、对 GC/MS/MS 的基质干扰、对检测流路和质谱离子源的积聚基质沉积等。因此，在仪器分析之前应用有效的净化去除色素共萃取物非常重要。

GCB 通常在 QuEChERS 分散式 SPE 试剂盒中用作净化步骤，以去除不需要的色素基质干扰。虽然 GCB 具有较高的色素去除效率，但会降低某些农药的回收率，尤其是平面结构化合物。Agilent Carbon S 吸附剂是一种先进的混合碳材料，具有优化的碳含量和孔结构。与 GCB 吸附剂相比，这种改进的吸附剂对植物源性样品基质的色素去除具有同等或更好的效果，但显著提高了敏感分析物的回收率。

在本研究中，使用 26 种代表性农药来评估 Agilent Bond Elut AOAC 含色素样品 Carbon S dSPE 试剂盒（带 Carbon S 的 AP-dSPE）用作新鲜菠菜粗提物的基质净化步骤的性能，并与同类产品 Agilent Bond Elut AOAC 含色素样品 GCB dSPE（带 GCB 的 AP-dSPE）进行了比较。所选择的农药通常需要分析并代表多种农药类别。选择菠菜作为基质，用来代表高含量的叶绿素基质，在没有有效净化程序的情况下，高含量的叶绿素基质会给农药分析带来巨大挑战。

## 实验部分

### 化学品与试剂

农药标准品和内标 (IS) 可以作为标准混合储备溶液购自安捷伦科技公司（部件号 5190-0551），也可以作为单独的标准品储备溶液或粉末购自 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)。LC/MS 级乙腈 (ACN) 和试剂级乙酸、乙酸铵和氟化铵也可购自 Sigma-Aldrich。

### 溶液与标准品

用 ACN 配制浓度为 10 µg/mL 的混合标样加标溶液（26 种农药）和 IS 加标溶液，并在 -20 °C 的冰箱中保存。在室温下彻底加热标样加标溶液并在使用前进行超声处理，使用后放回。

将 10 mL 冰乙酸加入 990 mL ACN 中，制成含 1% 乙酸萃取溶剂的 ACN 溶液，并在室温下保存。

### 仪器与材料

本研究采用由 Agilent 1260 Infinity II 全能泵 (G7104C)、Agilent 1260 Infinity II 样品瓶进样器 (G7129C) 和 Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A) 组成的 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统进行。该液相色谱系统与配备安捷伦喷射流电喷雾离子源的 Agilent Ultivo 三重四极杆液质联用系统 (G6465B) 联用。采用 Agilent MassHunter 工作站软件进行数据采集和分析。

用于样品前处理的其他仪器包括：Sorvall ST 16R 离心机 (Thermo Scientific Inc., MA, USA)、移液器 (Eppendorf, NY, USA)、Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 萃取试剂盒（部件号 5982-5755）、带 Carbon S 的 Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 含色素水果和蔬菜 dSPE 试剂盒 2 mL 规格（部件号 5610-2062）、带 Carbon S 的 Agilent Bond Elut QuEChERS 含色素水果和蔬菜 dSPE 试剂盒 15 mL 规格（部件号 5610-2064）、安捷伦陶瓷均质子 50 mL 规格（部件号 5982-9313）。

### 仪器条件

表 1 列出了 LC/MS/MS 条件，表 2 列出了靶向 dMRM 参数。图 1 显示了采用 QuEChERS AOAC 萃取，然后用带 Carbon S 的 AP-dSPE 制备的浓度为 100 ng/g 的加标菠菜混合物样品中目标农药的典型 MRM 色谱图。

表 1. LC/MS/MS 方法条件

HPLC 条件				质谱条件	
色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm (部件号 959758-902)			模式	正离子模式
保护柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 plus UHPLC 保护柱, 2.1 × 5 mm, 1.8 μm (部件号 821725-901)			气体温度	120 °C
柱温	35 °C			气体流速	12.0 L/min
进样量	2 μL			雾化器压力	40 psi
流动相	A) 10 mmol/L NH <sub>4</sub> OAc, 0.5 mmol/L NH <sub>4</sub> F 缓冲液, 含 0.125% 甲酸的水溶液 B) 10 mmol/L NH <sub>4</sub> OAc, 0.5 mmol/L NH <sub>4</sub> F 缓冲液, 含 0.125% 甲酸的 95:5 ACN/H <sub>2</sub> O			毛细管电压	4500 V (正离子和负离子模式)
进样针清洗	1:1:1:1 ACN:MeOH:IPA:H <sub>2</sub> O				
梯度	时间 (min)	%B	流速 (mL/min)		
	0.00	15	0.3		
	6.00	95	0.3		
	8.00	100	0.3		
	10.00	100	0.3		
	10.01	15	0.3		
	13.00	停止			
后运行	2 min				
总分析周期	15 min				

表 2. 目标农药 dMRM 参数

分析物	MRM 通道 (m/z)	碎裂电压 (V)	CE (V)	RT (min)	分析物	MRM 通道 (m/z)	碎裂电压 (V)	CE (V)	RT (min)
甲胺磷	1) 142→125	90	13	1.16	残杀威	1) 210.1→110.9	75	13	6.00
	2) 142→94		13			5			
高灭磷	1) 184→142.9	65	9	1.25	酰肼磺隆	1) 370.1→218	104	25	6.09
	2) 184→49		21			10			
吡蚜酮	1) 218.1→104.9	115	21	1.25	甲萘威	1) 202.1→145.1	70	9	6.23
	2) 218.1→78		53			33			
氧化乐果	1) 214→183	100	9	1.36	氯吡脞	1) 248.1→129	72	13	6.26
	2) 214→124.9		21			42			
霜霉威	1) 189.2→102	72	4	1.52	莠去津-d <sub>5</sub> (IS)	1) 220.13→69	76	70	6.38
	2) 189.2→74		26			18			
多菌灵	1) 192.1→132	115	33	2.60	螺环菌胺	1) 298.3→144.1	76	21	6.50
	2) 192.1→159.9		17			54			
噻菌灵	1) 202→131	145	37	3.14	氯虫苯甲酰胺	1) 482→284	72	33	6.89
	2) 202→175.1		29			70			
乙菌定	1) 210.2→140.1	96	17	4.38	戊菌唑	1) 284.1→159	130	37	7.73
	2) 210.2→70.1		34			17			
吡虫啉	1) 256.1→209.1	105	13	4.46	啉菌环胺	1) 226.1→92.9	165	41	7.94
	2) 256.1→175.1		21			53			
乐果	1) 230→199	85	5	4.61	唑菌胺酯	1) 388.1→193.9	72	12	8.40
	2) 230→124.9		25			38			
唑啉磺草胺	1) 326.1→129	72	26	4.98	烟啉磺隆	1) 411.1→209.1	72	10	9.07
	2) 326.1→109.1		62			18			
仲丁威	1) 208.1→115.9	74	2	5.36	丙氧喹啉	1) 373→331	72	13	9.92
	2) 208.1→89		14			62			
噻苯隆	1) 221→51.1	72	80	5.48	螺螨酯	1) 411.1→42.9	72	64	10.05
	2) 221→102.1		14			14			
抑霉唑	1) 297.1→159	140	21	5.87					
	2) 297.1→41.2		37						

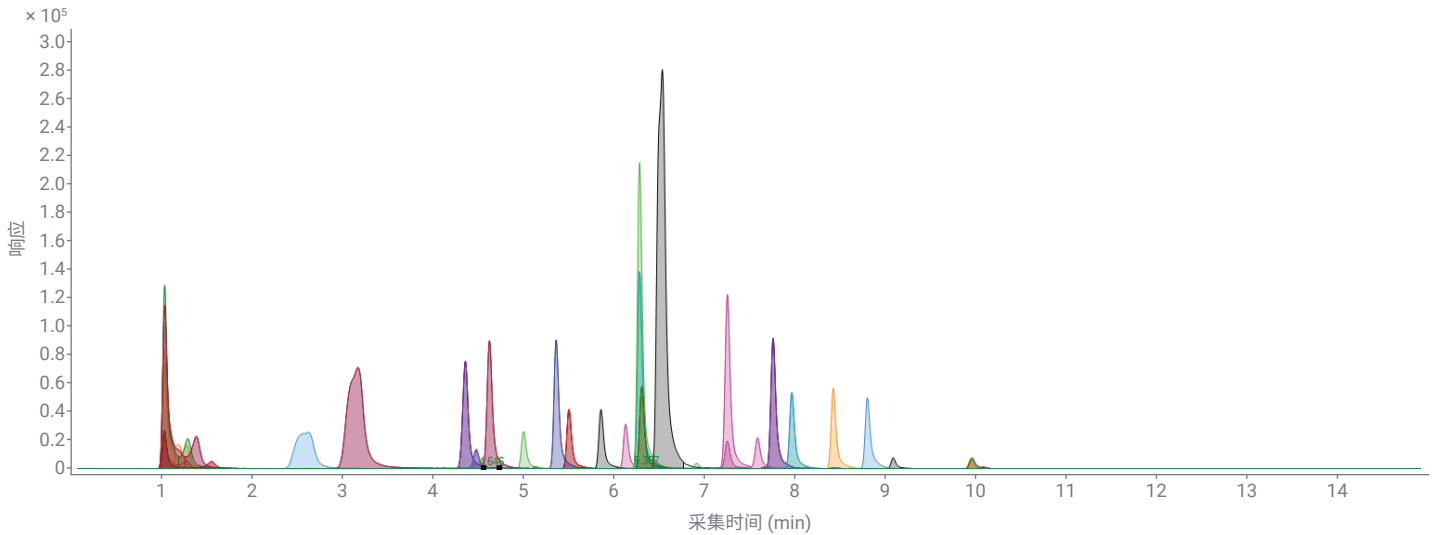


图 1. 加标 100 ng/g 的 26 种目标农药的萃取菠菜样品和 IS 的 LC/MS/MS MRM 色谱图。使用 QuEChERS AOAC 萃取试剂盒，然后使用带 Carbon S 净化的 AP-dSPE 试剂盒制备样品。有关基于洗脱顺序的峰归属，请参阅表 2

### 样品前处理

新鲜有机菠菜购自当地杂货店。样品在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下冷冻过夜，然后用研磨机均质化。然后称取 15 g 研磨过的基质样品，放入 50 mL 离心管中，并保存在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中直至萃取。将称取的加标混合物样品 (15 g) 解冻，然后按照 QuEChERS AOAC 方法进行萃取。在带 Carbon S 的 AP-dSPE 2 mL 管中，移取 1 mL 粗提物等分试样。在带 Carbon S 的 AP-dSPE 15 mL 管中，转移 8 mL 粗提物等分试样。对于带 GCB 的 AP-dSPE，将等体积的相同粗提物转移到 2 mL 或 15 mL 管中。将所有试管盖紧并涡旋混合 2-3 分钟，然后离心。接下来将样品上清液用水稀释五次，用 20:80 的 ACN/水制得最终样品。进样稀释的样品进行 LC/MS/MS 分析。详细的样品前处理流程如图 2 所示。

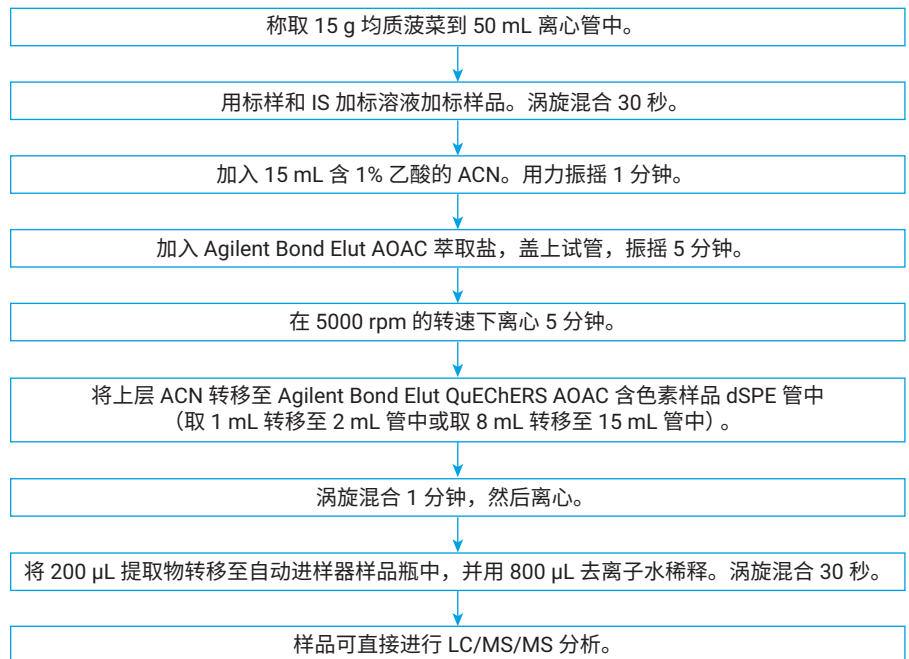


图 2. 使用 QuEChERS AOAC 萃取试剂盒，然后使用 AP-dSPE 净化对新鲜菠菜样品执行的样品前处理程序

## 结果与讨论

### 比较带 Carbon S 的 AP-dSPE 与带 GCB 的 AP-dSPE

将带 Carbon S 的 Bond Elut AP-dSPE 与带 GCB 的相应 AP-dSPE 的目标分析物回收率与重现性进行了比较。考虑到同一样品萃取的粗提物体积，使用 2 mL dSPE 管进行了比较研究。一式六份制备样品。每个样品都预加标有 10 ng/g 的目标分析物和 100 ng/g 的 IS (莠去津-d<sub>5</sub>)。图 3 显示了菠菜基质中 26 个目标分析物的回收率和 RSD (%)。

一般来说，带 Carbon S 的 AP-dSPE 具有更高的平均回收率 (72%)，单个分析物的回收率在 40%–97% 之间。相比之下，带 GCB 的 AP-dSPE 的平均回收率较低 (64%)，介于 9%–106% 之间。典型平面农药的回收率显著提高，例如吡蚜酮、多菌灵、噻菌灵、噻苯隆、氯吡脞、啉菌环胺和丙氧喹啉 (图 3)。然而，值得注意的是，即使经过改进，少数平面分析物仍表现出较低的回收率。这与 dSPE 净化方式有关，因为使用直通式净化可以获得更好的回收率<sup>[1]</sup>。对于非平面农药，回收率相似，只有几种农药有明显差异。

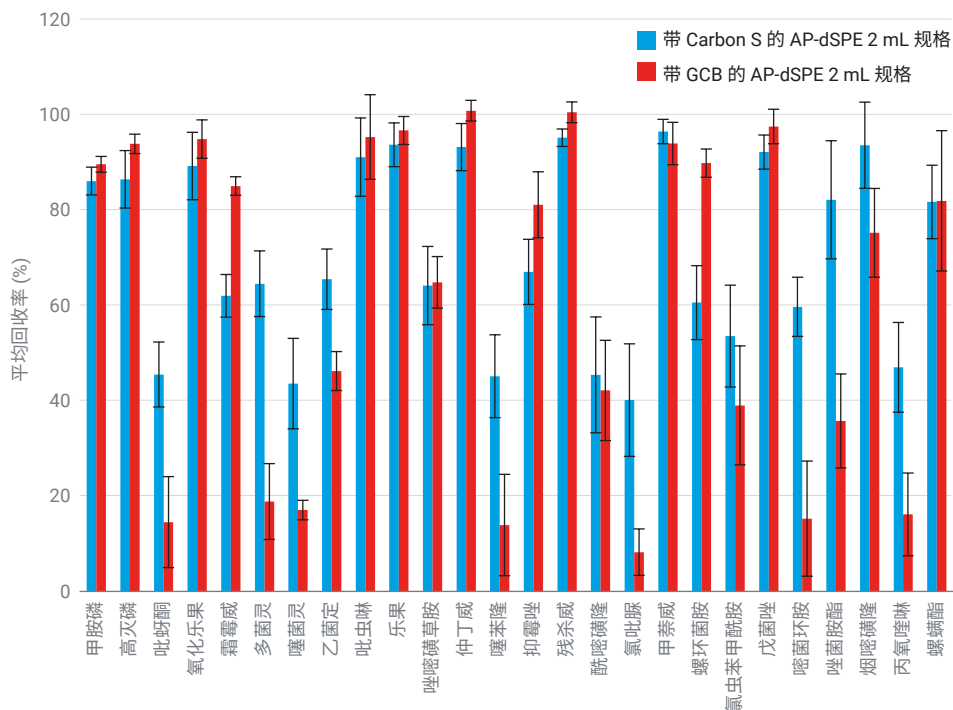


图 3. 带 Carbon S 的 Agilent Bond Elut AP-dSPE 与带 GCB 的 AP-dSPE 用于菠菜中 26 种代表性农药分析的比较

## 带 Carbon S 的 AP-dSPE (2 mL 与 15 mL)

进一步研究了带 Carbon S 的两种规格 (2 和 15 mL) AP-dSPE 的性能一致性。使用 2 mL 试剂盒的目标分析物平均回收率为 80%，而使用 15 mL 试剂盒的目标分析物平均回收率为 81%，平均 RSD <15%。两种规格的平均变异性低于 15% RSD 是可以接受的。两种规格的 Carbon S 的比例相同。图 4 显示了使用两种不同 dSPE 试剂盒时各种农药具有一致的回收率。

### 色素去除

我们开发了带 Carbon S 的 Agilent Bond Elut AP-dSPE，用于去除高色素含量的基质，并评估了菠菜中基质色素的去除效果。图 5 通过样品的颜色可视性比较以及通过 LC-UV 在 450 nm 处收集的 UV 吸附，展示了带 Carbon S 的 AP-dSPE 和带 GCB 的相应 AP-dSPE 对基质色素的去除效果。结果证实，带 Carbon S 的 AP-dSPE 从菠菜基质中去除了 96% 的叶绿素色素，这与带 GCB 的 AP-dSPE 获得的 98% 色素去除率相似。

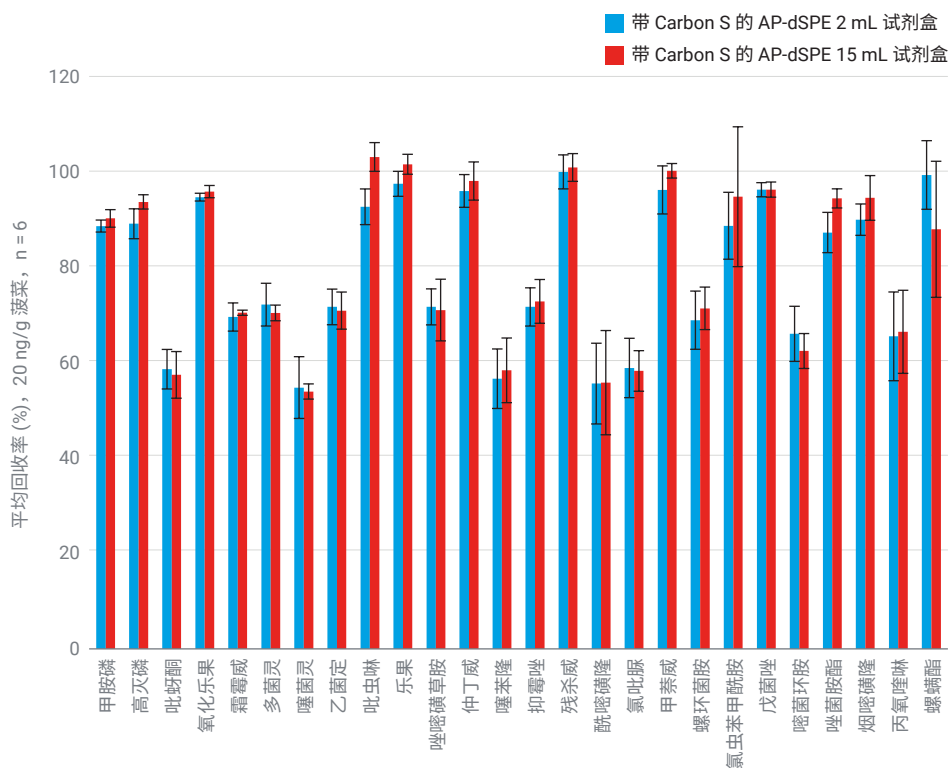


图 4. 使用带 Carbon S 的 AP-dSPE 2 mL 和 15 mL 试剂盒分析菠菜中的农药具有一致的性能

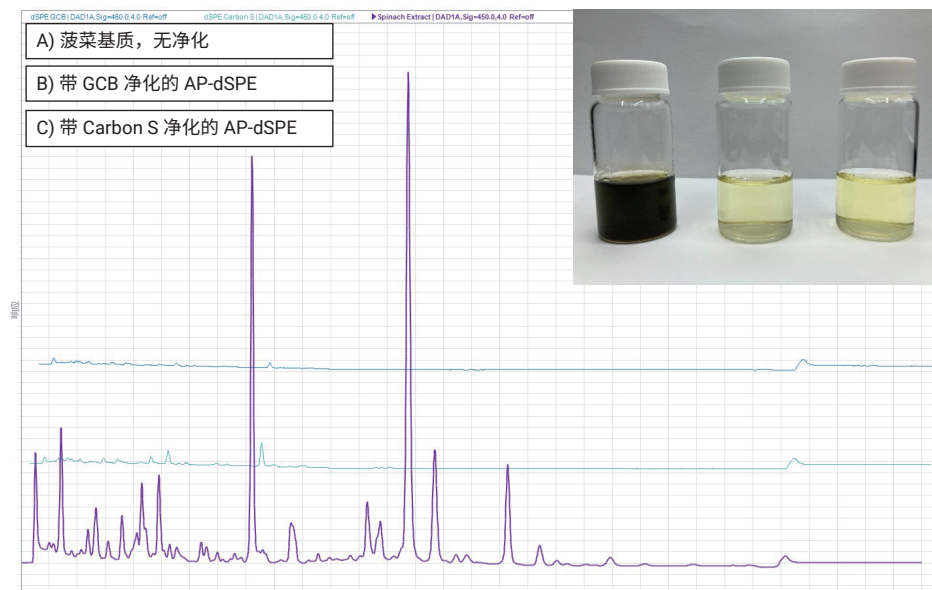


图 5. 使用带 Carbon S 的 Agilent Bond Elut AP-dSPE 和带 GCB 的 AP-dSPE 对基质色素去除的比较。通过 LC-UV 在 450 nm 采集色谱图

## 方法验证

在菠菜中以 10 和 100 ng/g 的两个预加标水平验证该方法，重复四次。莠去津-D<sub>5</sub> 用作 IS，每个 QC 样品的加标浓度为 100 ng/g。使用带 Carbon S 的 15 mL Bond Elut AP-dSPE 制得基质空白，然后用以制备 9 种校准标样，菠菜中浓度范围为 5–2500 ng/g。使用 7 个或更多校准水平来生成每种化合物的校准曲线。每条曲线使用线性回归和 1/x<sup>2</sup> 加权。大多数目标分析物的目标校准曲线线性的相关系数 (R<sup>2</sup>) > 0.99，如表 3 所示。

非平面分析物的目标物准确度范围为 43%–110%，平面农药的目标物准确度为 35%–69% (表 3)。平面目标分析物的低准确度结果必然与 dSPE 净化的低回收率有关，即使用 Carbon S 吸附剂替代 GCB 也具有显著改善。通过改进规格和方法，可以获得更出色的敏感农药定量结果<sup>[1]</sup>。所有分析物的 RSD 均 < 16%，许多目标分析物的 RSD 为个位数。另一个优势是，在 dSPE 试剂盒中使用 Carbon S 吸附剂代替 GCB 时，重现性得到改善。

结果表明，带 Carbon S 的 Bond Elut AP-dSPE 为菠菜中农药分析提供了更高的方法准确度和重现性，因此可以直接替代目前使用的带 GCB 的 AP-dSPE。

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://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, 2022  
2022 年 5 月 5 日, 中国出版  
5994-4769ZHCN

表 3. 使用带 Carbon S 的 AP-dSPE 对菠菜中两个加标水平的校准范围和准确度

分析物	校准范围 (ng/g)	R <sup>2</sup>	10 ng/g 准确度 (%)	RSD (n = 4)	100 ng/g 准确度 (%)	RSD (n = 4)
甲胺磷	5–1250	0.9920	87.2	2.5	97.7	6.1
高灭磷	5–1250	0.9927	88.0	2.4	93.0	6.1
吡蚜酮	5–1250	0.9956	62.3	4.5	40.2	6.2
氧化乐果	5–500	0.9962	95.4	2.6	100.6	6.3
霜霉威	5–500	0.9942	71.6	3.1	69.6	7.0
多菌灵	5–500	0.9920	68.6	3.5	54.7	6.8
噻菌灵	5–500	0.9907	49.2	4.3	45.0	5.5
乙菌定	5–1250	0.9882	70.6	2.8	64.7	6.8
吡虫啉	5–1250	0.9885	100.7	6.1	107.0	5.3
乐果	5–2500	0.9840	97.8	2.3	99.2	6.6
啶啉磺草胺	5–1250	0.9891	71.1	5.2	65.3	7.0
仲丁威	5–1250	0.9850	106.6	1.1	110.5	6.1
噻苯隆	5–1250	0.9933	53.9	3.5	45.3	4.4
抑霉唑	5–2000	0.9901	75.5	4.7	83.2	4.4
残杀威	5–1250	0.9904	104.4	2.1	110.1	6.6
啶啉磺隆	5–2000	0.9952	87.6	6.9	67.9	8.0
氯吡脞	5–2000	0.9989	41.8	4.9	35.1	7.4
甲萘威	5–2500	0.9979	97.1	4.8	108.6	5.6
螺环菌胺	5–1250	0.9894	69.3	4.1	62.8	5.7
氯虫苯甲酰胺	5–1250	0.9947	94.8	4.1	69.5	8.5
戊菌唑	5–2000	0.9985	94.1	1.9	105.9	6.1
啶菌环胺	5–500	0.9948	59.9	5.6	51.3	7.9
啶菌胺酯	5–500	0.9982	81.1	6.3	70.0	5.7
啶啉磺隆	5–500	0.9977	82.5	4.7	87.7	6.2
丙氧喹啉	5–2000	0.9960	43.1	6.2	33.2	7.4
螺螨酯	5–2000	0.9881	107.5	10.6	90.5	6.2

## 结论

与带 GCB 的传统 Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 含色素水果和蔬菜 dSPE 试剂盒相比，带 Carbon S 的 Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 含色素水果和蔬菜 dSPE 试剂盒对高叶绿素基质色素的去除效果相当，平面农药的回收率提高。因此，我们认为可以直接替代带 GCB 的 AP-dSPE 试剂盒。结果证实，使用带 Carbon S 的 AP-dSPE (2 mL 和 15 mL 规格) 均得到一致的目标分析物定量结果和色素去除效果。

## 参考文献

1. Zhao, L.; Wei, T. 使用 Capiva EMR-HCF 直通式净化和 LC/MS/MS 测定春季沙拉菜中的多类别多残留农药, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5994-4765ZHCN, 2022