

使用 Agilent 6470B 三重四极杆 LC/MS 系统对红茶和橙子基质进行多残留农药分析

作者

Kyle Covert 和 Linfeng Wu
安捷伦科技有限公司
美国加利福尼亚州圣克拉拉市

摘要

本应用简报介绍了一种利用 Agilent 6470B 三重四极杆 LC/MS 系统检测食品基质中 244 种农药残留的 LC/MS/MS 筛查方法。有机橙子和红茶由于所含成分复杂，因此被选择用于评估该方法检测食品基质中农药残留的性能。在橙子基质中，除一种目标农药外，其余所有目标农药均可在小于或等于欧盟委员会规定的默认最大残留限量 (MRL) 10 µg/kg 的水平被检出^[1]。在浓红茶基质中，239 种农药可在小于或等于 10 µg/kg 的浓度被检出。研究人员还研究了基质效应对分析物响应的影响，结果表明，橙子基质和红茶基质中分别有 50% 和 40% 的农药可在 SANTE 指导原则要求的范围内 (80%–120%) 得到回收^[2]。这些结果证明，6470B 三重四极杆 LC/MS 可满足高灵敏度要求，能够对食品基质中的农药进行准确、精密地定量分析。

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。因此，我们十分关心所购买的农产品中是否存在农药及其含量。在如今各类有机产品和无机产品琳琅满目的市场上，这一点尤其值得关注，因为食品真伪或食品污染会影响有机食品的质量。监管机构（例如，美国环保局 (US-EPA)^[1,3] 和欧盟委员会^[4]）制定了相应的法规来限制农药的使用以及允许量，从而保证消费者购买到安全的食品。最大残留限量 (MRL) 是指正确使用农药时（良好的农业生产方式），食品或饲料内部或表面所含法律容许农药残留的最高水平。在食品中，典型的 MRL 约为 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 级（十亿分之一 (ppb)），因此需要使用非常灵敏的仪器来检测化合物。对于红茶等含有多种内源性组分的食品尤其如此，因为这些内源性组分会造成严重基质效应。

本应用简报介绍了一种 LC/MS/MS 筛查方法，该方法可对复杂多样的食品基质中所含的 244 种农药进行检测和定量。将安捷伦农药全套测试混标分别加入有机红茶提取物和全橙提取物中。提取物按照下文所述的 Agilent QuEChERS 萃取和 EN 分散 SPE 方案制备。将 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱与 6470B 三重

四极杆 LC/MS 联用，以动态多反应监测 (dMRM) 方法分析样品。6470B 三重四极杆 LC/MS 进行了多方面的硬件改进，例如采用 VacShield 技术，离子源无需放空即可维护，有利于延长仪器正常运行时间；采用更快速的电子器件，具有改善的稳定时间参数，能够在极低的驻留时间下保证色谱峰重现性。

实验部分

试剂与标准品

本研究使用了安捷伦农药全套测试混标 (部件号 5190-0551)。将农药全套测试混标的八种子混合物进行混合，然后用乙腈 (ACN) 稀释得到最终农药工作溶液，该溶液浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{g}$ 。将该溶液加入 QuEChERS 提取物中用于制备校准样品。为确定样品基质中的方法检测限 (MDL) 和定量下限 (LLOQ)，使用红茶和有机橙样品提取物分别制备了 7 个浓度在 0.5–100 ppb 之间的校准样品。

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 $0.22 \mu\text{m}$ 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

有机散叶红茶和有机橙购自当地杂货店。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橙子样品，并称取 10 g 样品用于提取。用 10 mL 乙腈通过剧烈振摇对 2 g 固体茶样品和 10 g 固体橙子样品萃取 1 分钟。分别向各混合物中加入一袋安捷伦 EN 方法萃取盐 (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 方法的 Agilent QuEChERS 分散 SPE 管 (部件号 5982-5356) 中。同样，将 6 mL 橙子上清液加入用于含色素的水果和蔬菜 EN 的 Agilent QuEChERS 分散 SPE 管 (部件号 5982-5256) 中。将两者振摇 1 分钟，然后在 $3000 \times g$ 下离心 5 分钟。收集所得上清液，并通过 $0.45 \mu\text{m}$ 针头过滤器过滤。将之前制备的农药工作溶液以相对原固体食物基质干重 $100 \text{ ng}/\text{g}$ (ppb) 的浓度加入红茶和橙子提取物中。用适当的基质进一步稀释样品，获得 0.5、1、5、10、20、50 和 100 ppb 七个浓度水平的农药校准样品，需在进样前立即制备，每个浓度重复进样六次。将农药也加入纯乙腈中，比较 $10 \text{ ng}/\text{g}$ 浓度下两种基质的信号回收率。

设备

使用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统进行色谱分离，该系统由以下模块组成：

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler, 配备样品冷却装置 (G7167B, #100)
- Agilent 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技术离子源 (G1958-65638) 的 Agilent 6470B 三重四极杆 LC/MS (G6470B) 联用。分别使用 Agilent MassHunter 采集软件 (版本 10.1) 和 MassHunter 定量分析软件 (版本 10.1) 进行数据采集和分析。

方法

LC/MS 参数见表 1。极性、母离子和子离子以及碰撞能量等 MRM 参数均从成熟的现有方法中复制而来，并针对所选的弱响应分析物优化了离子源条件。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 LC/MS 系统。使用忽略原点的线性拟合以及 1/x 加权进行校正曲线回归。

表 1. LC/MS 参数

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统															
色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 3.0 × 100 mm, 1.8 µm (部件号 959758-302)														
柱温	40 °C														
进样量	2 µL														
自动进样器温度	4 °C														
进样针清洗	在冲洗口清洗 10 秒 (75/25 甲醇/H ₂ O)														
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	0.400 mL/min														
梯度程序	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间</th><th>B (%)</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0.00</td><td>5</td></tr> <tr><td>0.50</td><td>5</td></tr> <tr><td>2.00</td><td>40</td></tr> <tr><td>13.00</td><td>98</td></tr> <tr><td>14.50</td><td>98</td></tr> <tr><td>14.60</td><td>5</td></tr> </tbody> </table>	时间	B (%)	0.00	5	0.50	5	2.00	40	13.00	98	14.50	98	14.60	5
时间	B (%)														
0.00	5														
0.50	5														
2.00	40														
13.00	98														
14.50	98														
14.60	5														
后运行时间	2 min														

Agilent 6470B 三重四极杆 LC/MS	
离子源	安捷伦喷射流 (AJS)
极性	正离子和负离子
气体温度	225 °C
干燥气 (氮气)	11 L/min
雾化器气体	30 psi
鞘气	350 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	3500 ±V
喷嘴电压	500 ±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
分析周期	500 ms

结果与讨论

动态 MRM 方法可实现快速分离

之前使用安捷伦 LC/TQ 仪器（型号 G6470A）开发的多残留农药筛查方法可直接用于 6470B 三重四极杆 LC/MS 系统

(G6470B)。之前由于液相色谱柱和液相色谱系统不同，保留时间略有偏移，因此使用 MassHunter 软件的动态 MRM 更新选项自动调整所有农药的保留时间。图 1 显示了 244 种农药的叠加 MRM 色谱图，这些农药以 1 ng/g 的浓度加标于

橙子提取物中，Y 轴放大了弱响应农药的信号。使用 14.5 分钟液相色谱梯度，所有化合物的 MRM 色谱图都实现了基线分离。大部分农药的定量浓度为默认 MRL 的 10%。

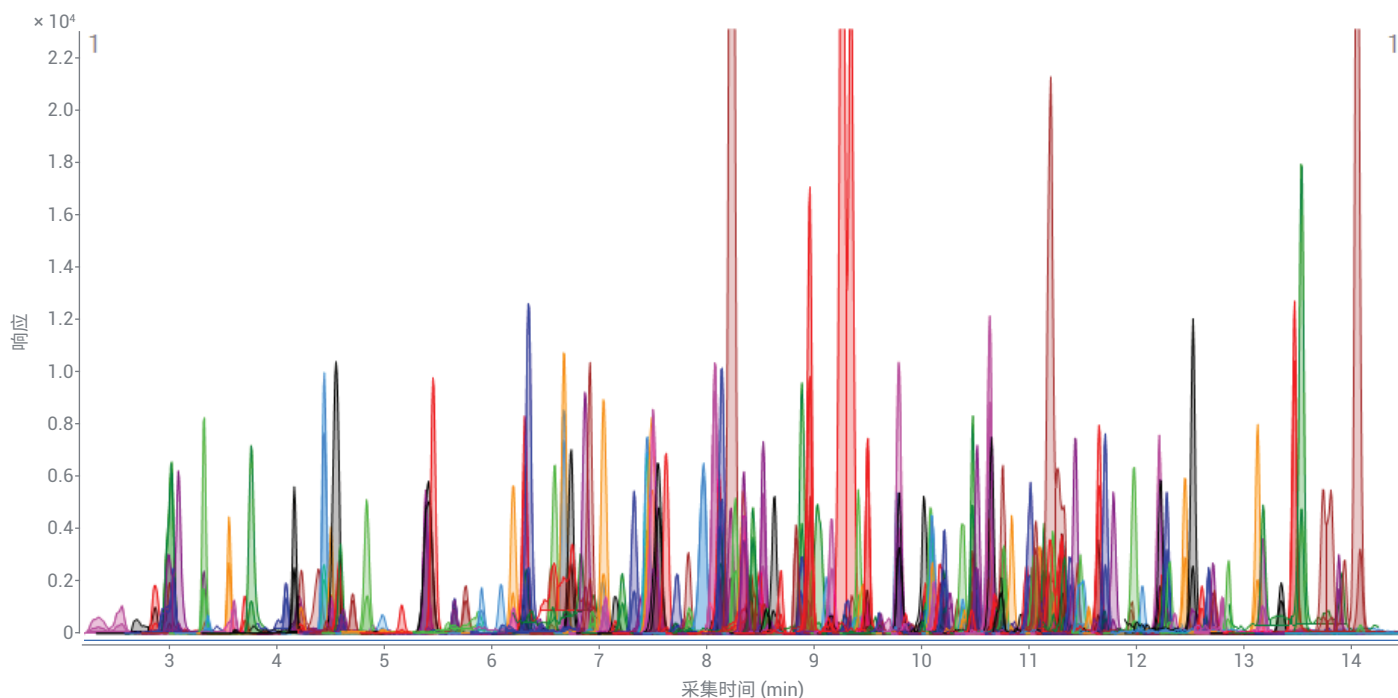


图 1. 244 种农药的叠加 MRM 色谱图，这些农药以 1 ng/g 的浓度加标于橙子中，Y 轴放大了弱响应农药的信号

标准曲线分析

在红茶基质和橙子基质中，通过重复进样 ($n = 6$) 7 个浓度在 0.5–100 ng/g 范围内的校准品得到校正曲线，评估多残留农药测定的精密度和准确度。结果表明

获得了优异的分析精密度 (LLOQ 及以上浓度下的相对标准偏差 (RSD) < 20%) 和平均准确度 (LLOQ 及以上浓度下的计算浓度/预期浓度介于 80%–120% 之间)。橙子提取物中所有 244 种农药和红茶提

取物中 230 种农药 (共 244 种) 的校正曲线的相关系数 (R^2) 均大于 0.99。红茶中 14 种农药的低相关系数 R^2 (<0.99) 反映出严重的基质效应。红茶基质中四种代表性农药的校正曲线如图 2 所示。

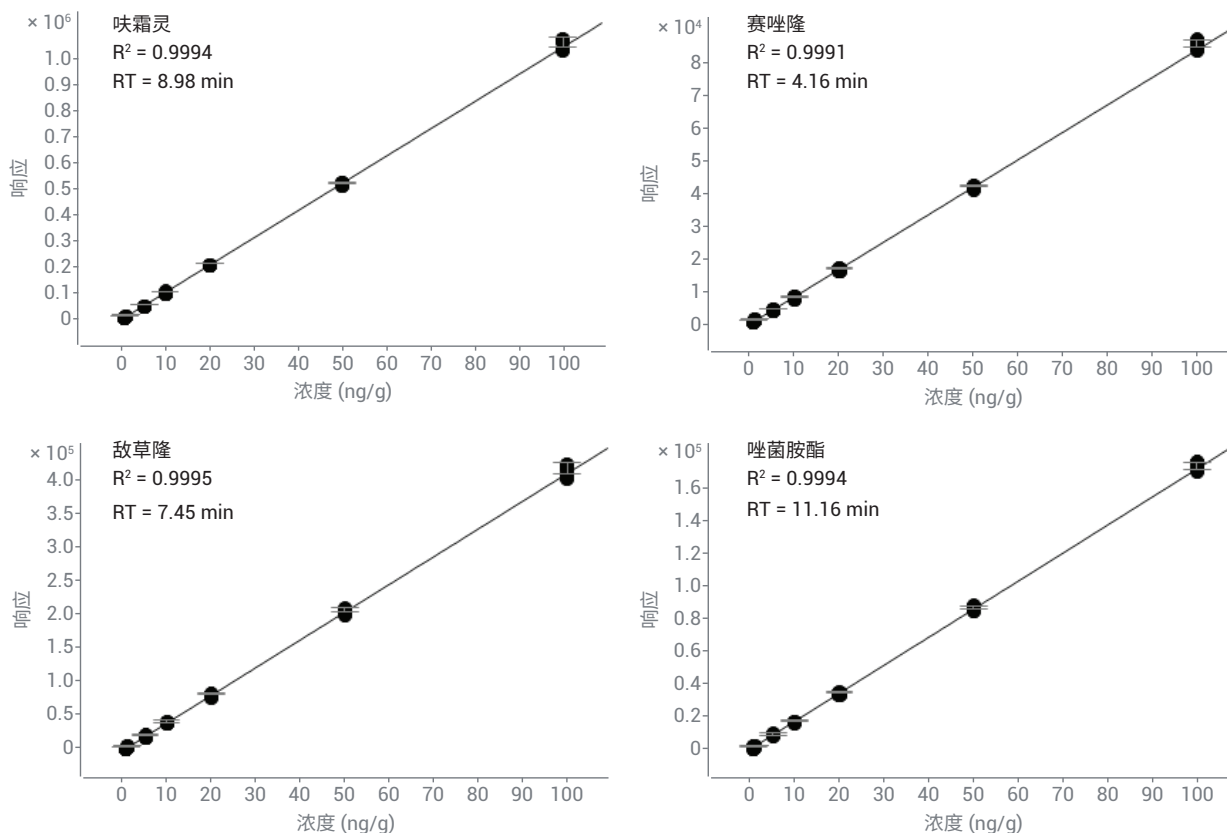


图 2. 红茶中加入的呋霜灵、赛唑隆、敌草隆和唑菌胺酯农药残留的校正曲线

在本研究中，6470B 三重四极杆 LC/MS 可以检出橙子基质中的所有农药（信噪比 > 3），浓度均低于 10 µg/kg，可用于筛查方案。而红茶基质中除了一种化合物（啉酰菌胺）外，其余所有化合物的残留量均小于或等于 10 µg/kg。用校正曲线确定基质中各农药的 LLOQ，定义为 6 次重复进样测得的最低浓度，峰面积的准确度介于 80%–120% 之间，RSD 小于 20%。图 3 显示了红茶基质和橙子基质中农药化合物的 LLOQ。改进后的 6470B 三重四极杆 LC/MS 系统可以定量红茶和橙子中的大多数目标农药，浓度低于欧盟委员会规定的默认 MRL 值 10 µg/kg^[4]：红茶和橙子样品中，分别有 239 种农药（共 244 种）和 243 种农药（共 244 种）的 LLOQ 小于或等于 10 ng/g。对于 US-EPA^[3] 规定的具有特定容差的化合物，其定量浓度均小于或等于 MRL 值。

食品基质回收率

为评估基质效应（离子抑制和增强），研究人员在 10 µg/kg 的默认 MRL 下，比较了基质与纯溶剂中的农药响应，并计算出农药回收率，如图 4 所示。橙子基质中大约有 50% 的化合物实现了 SANTE 指导原则要求的 80%–120% 范围内的回收；红茶基质中大约有 40% 的化合物实现了这一范围内的回收^[2]。与预期一致，红茶基质相较橙子基质表现出更强的基质效应。因此，通常建议采用基质匹配校正曲线分析有严重基质效应的样品。由基质空白样品的分析结果可知，虽然原始红茶或橙子样品是从当地超市购买的“有机”产品，但它们仍含有 12 种农药。

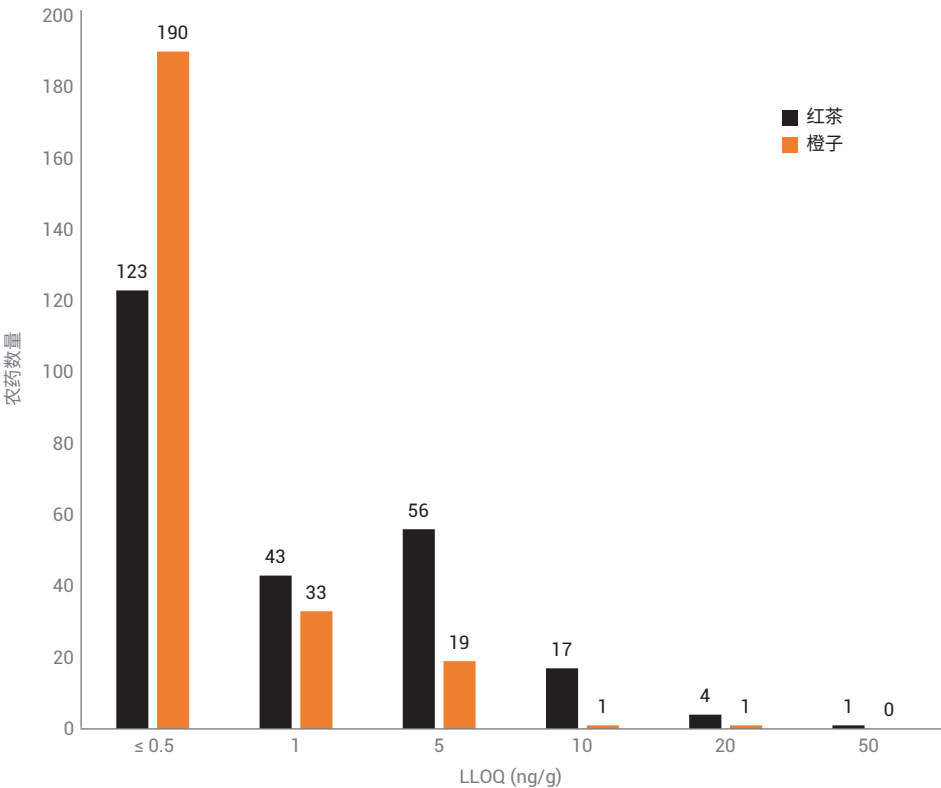


图 3. 红茶和橙子中加标农药的 LLOQ

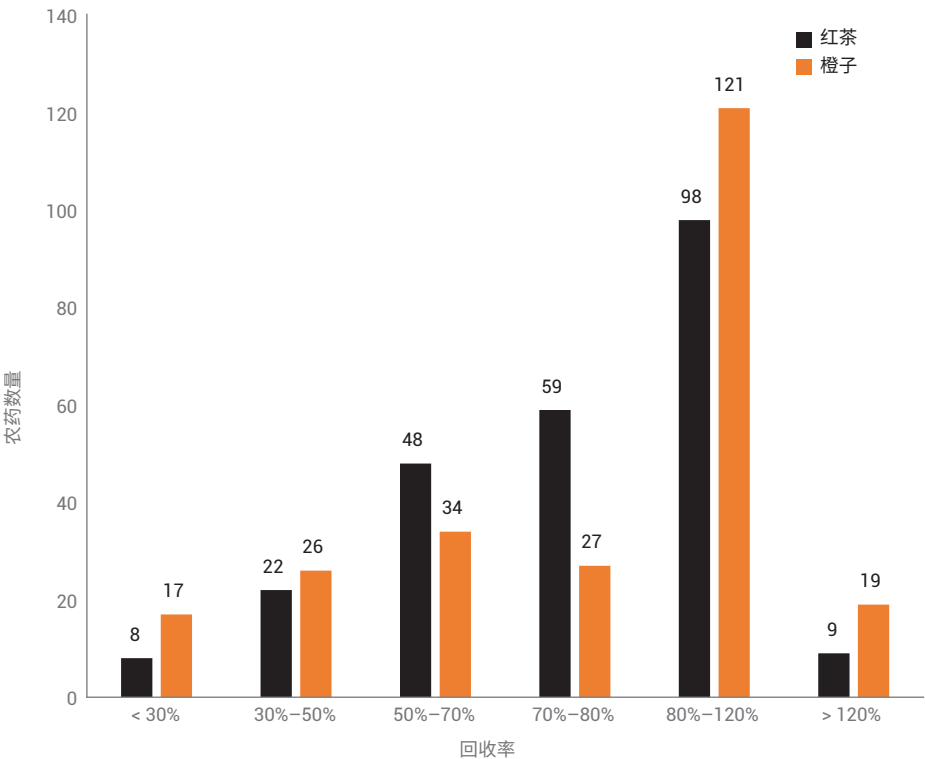


图 4. 以默认 MRL 值 (10 µg/kg) 加标到红茶和橙子中的农药回收率直方图

结论

利用超高效 1290 Infinity II 液相色谱系统与配备高灵敏度喷射流技术离子源 (AJS) 的 6470B 三重四极杆 LC/MS 联用的 LC/MS 平台, 评估食品基质中 244 种农药残留的定量性能。这套 6470B 三重四极杆 LC/MS 系统还增加了 VacShield 和经过改进的精密调谐的电子器件, 易于维护且性能稳定, 可实现长时间运行, 同时保持极佳的稳定性和灵敏度。

本应用简报中使用了两种食品基质, 红茶和橙子提取物。出人意料的是, 在当地超市购买的有机产品中也含有一些合成农药。与纯乙腈相比, 两种食品基质的在分析物响应方面的差异均表现出明显的基质效应。即使在复杂基质中, 也有超过 98% 的目标农药 (共 244 种) 的 LLOQ 处于或小于欧盟委员会规定的默认 MRL 值 10 µg/kg, 证明该 LC/MS 平台具有高灵敏度。根据基质中的农药响应与纯乙腈中的农药响应计算化合物回收率。橙子基质中大约有 50% 的化合物实现了 SANTE 指导原则要求的 80%–120% 范围内的回收; 红茶基质中大约有 40% 的化合物实现了这一范围内的回收。

参考文献

1. Title 7 U.S. Code of Federal Regulations – Part 205. US-EPA. <https://www.ecfr.gov/> Retrieved 9 April **2020**
2. SANTE/12682/2019 European Commission. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf Retrieved 20 April **2020**
3. Title 40 U.S. Code of Federal Regulations – Part 180. US-EPA. <https://www.ecfr.gov/> Retrieved 9 April **2020**
4. Regulation (EC) No 396/2005. European Commission. <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/> Retrieved 9 April **2020**

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

DE.6638541667

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，2020
2020年5月14日，中国出版
5994-1973ZHCN