

使用 Agilent 6470 三重四极杆液质联用系统分析食品中农药残留的全面 LC/MS/MS 工作流程

用于分析高含水量、高含油量和高淀粉含量样品中农药残留的工作流程

作者

Aimei Zou, Sashank Pillai,
Peter Kornas,
Melanie Schober,
Limian Zhao,
Marco Zanotti,
Chee Sian Gan
安捷伦科技有限公司

摘要

为了加速和简化常规实验室食品检测，开发了一套用于定量分析 510 种农药残留的全面 LC/MS/MS 工作流程。基于安捷伦农药动态 MRM 数据库开发了化合物离子对和优化参数，该数据库拥有超过 750 种农药，包括用于快速、轻松地输入分析方法中的精选参数。工作流程包括样品前处理、色谱分离、质谱 (MS) 检测、数据分析和解析。结合使用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统与 Agilent 6470 三重四极杆液质联用系统对三种不同含量类型的食品基质：番茄（高含水量）、小麦（高淀粉含量）和橄榄油（高含油量）进行分析，从而证明该工作流程的适应性。使用 Agilent QuEChERS 试剂盒和 dSPE 净化对番茄和小麦样品进行样品前处理。使用 QuEChERS 试剂盒进行萃取，然后通过 Agilent Captiva EMR-Lipid 净化制备橄榄油样品。

根据 SANTE/12682/2019，基于检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)、校准曲线线性以及回收率和精密度，使用 1–100 $\mu\text{g/L}$ 的基质匹配校准标样对工作流程性能进行评估和验证。超过 95% 的分析物表现出优异的线性 ($R^2 \geq 0.99$ ，校准曲线的绘制浓度从 LOQ 到 50 或 100 $\mu\text{g/L}$)。使用回收率重现性 (RSD_r) 和实验室内重现性 (RSD_{ir}) 评估方法精密度。对 3 种基质浓度为 1、5 和 10 $\mu\text{g/kg}$ 的强化质量控制 (QC) 样品进行评估。90% 的化合物在 10 $\mu\text{g/kg}$ 浓度下的 RSD_r 和 RSD_{ir} 均在 20% 的限值内。番茄、小麦和橄榄油基质的方法性能证明了该方法适用于高含水量、高含油量和高淀粉含量基质以及可能对其他食品基质的使用产生影响的多残留农药的定量分析。

前言

在生产、储存和运输过程中，用于保护作物免受疾病或有害生物侵害的农药具有潜在的毒性。蔬菜、水果、草药、蜂蜜、油籽、谷物和动物源性食品等商品内部或表面的农药残留也会对健康造成不利影响并引发环境问题。世界卫生组织 (WHO)、粮食和农业组织 (FAO)、美国国家环境保护局 (EPA) 和欧盟 (EU) 等组织已经制定并发布了政策声明，以指导农业组织正确使用农药。例如，根据欧盟法规，最大残留限量 (MRL) 是指在使用农药时，食品或动物饲料内部或表面所含法律容许农药残留的最高水平^[1]。食品中允许的农药残留量必须尽可能低，从而确保消费者的食品安全。除明确禁用的化合物外，大多数农药的 MRL 为 10 µg/kg (10 ppb)。这表明对食品基质中多残留农药的高灵敏度分析方法的需求。

高效液相色谱与三重四极杆质谱 (LC/TQ) 的联用是一种得到广泛认可的现代技术，可用于多种农药的定量分析。这是因为它具有高灵敏度、选择性和准确度，可确保获得高质量的数据，满足复杂食品基质的 MRL 要求。我们开发了全面的 LC/MS/MS 工作流程，用于准确、可靠地分析各种植物源性食品基质中的 500 多种农药残留。该工作流程包括样品前处理、色谱分离和 MS 检测目标定量和结果解析，有助于简化常规农药分析，从而提高实验室通量和分析效率。

安捷伦提供 LC/TQ 方法以及包含样品前处理、采集和数据分析步骤详细信息的方法方案^[2]。

实验部分

化学品与试剂

使用安捷伦 LC/MS 级乙腈 (ACN)、甲醇 (MeOH) 和水进行研究。LC/MS 级甲酸和甲酸铵购自 Sigma-Aldrich。使用的所有其他溶剂均为 HPLC 级且购自 Sigma-Aldrich。

标样和溶液

即用型和定制预混合农药标准品购自表 1 中列出的供应商^[3]。

用 ACN 和储备标准溶液制备由 510 种浓度为 1000 µg/L 的目标化合物组成的中间标准混合物，并用于其余的实验。稀释中间标准溶液得到 50 µg/L 和 500 µg/L 的工作标准溶液，用于制备预加标 QC。

表 1. 农药标准品

供应商	货号	部件描述	分析物浓度	基质	样品瓶数量	分析物总数
安捷伦 Ultra (Rhode Island, USA)	5190-0551	LC/MS 农药全套测试混标	100 µg/mL	乙腈	8	254
	CUS-00000635	定制农药测试混标 1	100 µg/mL	乙腈	1	27
	CUS-00000636	定制农药测试混标 2	100 µg/mL	乙腈	1	26
	CUS-00000637	定制农药测试混标 3	100 µg/mL	乙腈	1	27
	CUS-00000638	定制农药测试混标 4	100 µg/mL	乙腈	1	28
	CUS-00000639	定制农药测试混标 5	100 µg/mL	乙腈	1	25
	CUS-00000640	定制农药测试混标 6	100 µg/mL	乙腈	1	26
	CUS-00000641	定制农药测试混标 7	100 µg/mL	乙腈	1	28
	CUS-00000642	定制农药测试混标 8	100 µg/mL	乙腈	1	29
	CUS-00000643	定制农药测试混标 9	100 µg/mL	乙腈	1	30
Accustandard (Connecticut, USA)	ACCU S-85870-R1-10X	定制农药测试混标 10	100 µg/mL	乙腈	1	26

用 ACN 制备校准标样溶剂，用于评估基质效应^[1]。对 1000 µg/L 的中间标准品进行连续稀释，制备浓度分别为 1、2、5、10、25、50 和 100 µg/L 的七种校准溶液，置于 Eppendorf 离心管中。校准标样溶液必须新鲜配制，如果不立即使用，应储存在 4 °C 的冰箱中。

样品前处理

无农药和有机标记的新鲜番茄、小麦粉和橄榄油购自当地杂货店。用家用搅拌器将番茄搅打均匀，如果不立即分析，则将其储存在 4 °C 的冰箱中。

以下产品和设备用于样品前处理：

- Agilent QuEChERS EN 萃取试剂盒 (部件号 5982-5650CH)
- Agilent QuEChERS 通用分散式固相萃取试剂盒 (部件号 5982-0028)
- Agilent Captiva EMR-Lipid 过滤柱，6 mL (部件号 5190-1004)
- 安捷伦正压处理装置 PPM-48 (部件号 5191-4101)

- Geno/Grinder (SPEX, Metuchen, NJ, USA)
- 离心机 (Eppendorf, 离心机 5804R 和 5430R)
- 涡旋仪和多管涡旋仪 (VWR, Plainfield, NJ, USA)

分别称取 10 ± 0.1 g 均质新鲜番茄、 2 ± 0.1 g 干燥的小麦粉和 5 ± 0.1 g 橄榄油，置于 50 mL 试管中。通过加标适量的农药标准工作溶液，得到预加标的 QC 样品，从而制备 1.0 µg/kg 的低浓度 QC (LQC) 溶液、5.0 µg/kg 的中等浓度 QC (MQC) 溶液和 10.0 µg/kg 的高浓度 QC (HQC) 溶液。在将标准品加入基质后，将样品盖紧，进行涡旋混合，并平衡 15–20 分钟。建议在萃取前向干燥的

小麦粉中加水，提高低含水量商品的萃取效率。使用 QuEChERS 萃取和通用 dSPE 净化进行番茄和小麦样品的前处理，而使用 Captiva EMR-Lipid 净化进行橄榄油样品的前处理，并使用安捷伦正压处理装置 PPM-48 进行辅助洗脱。前处理流程如图 1 所示。

基质匹配校准标样前处理

本研究使用并前处理基质匹配校准标样 (后加标标准品)，进行工作流程性能的评估。使用未加标的番茄、小麦和橄榄油空白样品制备基质空白。基质匹配校准标样的制备方法与溶剂标准品相同，只是用相应的基质空白代替 ACN 溶剂。通过比较基质匹配标样与相应溶剂标准品中的响应来评估基质效应^[1]。

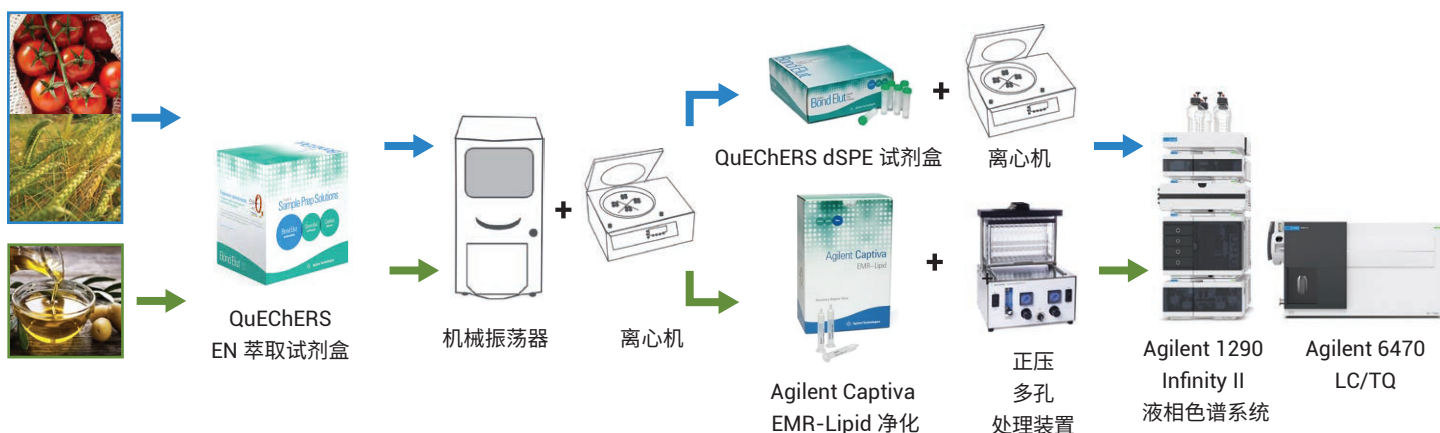


图 1. 番茄、小麦和橄榄油样品的前处理方法

仪器

使用安装于 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统中的 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm 色谱柱 (部件号 959759-902) 进行色谱分离。

1290 Infinity II 液相色谱系统的各个模块包括:

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity II 自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity II 柱温箱 (G1316C)

液相色谱系统条件列于表 2。

配备安捷伦喷射流 (AJS) 电喷雾离子源的 Agilent 6470 LC/TQ 质谱仪在动态 MRM (dMRM) 模式下运行。LC/TQ 自动调谐在单元和宽模式下进行。使用 Agilent MassHunter 软件 (8.0 或更高版本) 完成所有数据的采集和处理。6470 LC/TQ 参数列于表 3。

结果与讨论

LC/TQ 方法的开发

这项研究的主要工作在于开发 510 种农药化合物的动态 MRM 离子对。对于每种化合物, 使用 Agilent MassHunter Optimizer 软件通过流动注射对 MRM 离子对以及碎裂电压、碰撞能量和电离极性进行了优化。针对每种化合物, 自动选择四种丰度最高的产物离子。dMRM 方法存储了来自 510 种农药的 1000 多个 MRM 离子对。根据单个化合物的碎裂行为, 每种农药选择两个或三个目标特异性 MRM 离子对 (EPTC 和腐霉利除外, 它们只有一个

离子对足够稳定, 可以被监测)。这样做是为了满足通过 LC/MS/MS 进行鉴定和确认的法规要求^[1]。两个丰度最高的碎片被定义为在保留时间窗口内采集的主要离子对, 随后被用作定量离子和定性离子。

使用 ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱优化色谱方法, 在 20 分钟 HPLC 梯度内实现了 510 种农药残留的良好分离

和分布。使用 AJS 离子源, 0.4 mL/min 的流速为目标离子提供了有效的去溶剂化。使用周期为 500 ms 的 dMRM 方法。观察到的典型色谱峰宽在 8–12 秒之间。图 2A 显示了在橄榄油基质提取物中后加标浓度为 10 μg/L 的所有 510 种目标农药的代表性 MRM 色谱图。

表 2. 1290 Infinity II 液相色谱仪条件

参数	值															
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															
自动进样器温度	10 °C															
流动相 A	含 0.1% 甲酸的 5 mmol/L 甲酸铵水溶液															
流动相 B	含 0.1% 甲酸的 5 mmol/L 甲酸铵的甲醇溶液															
流动相流速	0.4 mL/min															
梯度程序	<table border="1"><thead><tr><th>时间/min</th><th>%A</th><th>%B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>3</td><td>70</td><td>30</td></tr><tr><td>17</td><td>0</td><td>100</td></tr><tr><td>20</td><td>0</td><td>100</td></tr></tbody></table>	时间/min	%A	%B	0	95	5	3	70	30	17	0	100	20	0	100
时间/min	%A	%B														
0	95	5														
3	70	30														
17	0	100														
20	0	100														
后运行	3 分钟															
进样针清洗	标准清洗: 清洗口 (12 s)															

表 3. Agilent 6470 LC/TQ 参数

参数	值
软件版本	Agilent MassHunter B.08 版
电离模式	使用安捷伦喷射流 (AJS) 技术同时实现正/负离子化 ESI
扫描类型	动态 MRM
分析周期	500 ms (MRM 总数 = 1023 最短/最长驻留时间 = 0.90 ms/248.28 ms)
停止时间	20 min
MS1/MS2 分辨率	Unit/Wide
气体温度	200 °C
气体流速	9 L/min
雾化器	35 psi
鞘气温度	400 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	2500 (+)/3000 (-) V
喷嘴电压	0 V

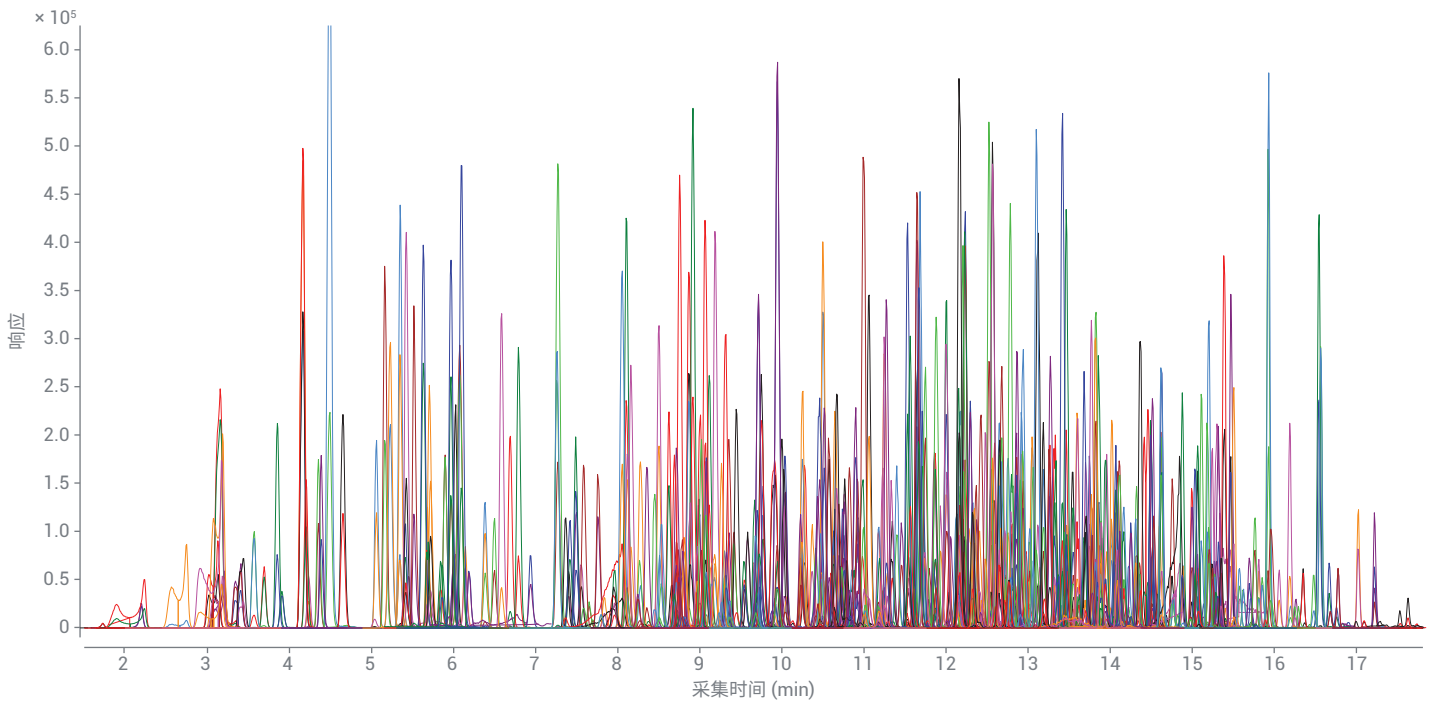


图 2A. 在橄榄油基质提取物中后加标浓度为 10 µg/L 的 510 种农药的代表性 MRM 色谱图。对称而尖锐的色谱峰表明在保留时间窗口内目标分析物实现高效的色谱分离

图 2B 显示了包含 MRM 并发数曲线和最短/最长驻留时间的 dMRM 统计图。表明 dMRM 方法可以在相对较短的 LC 运行时间内准确定量 500 多种分析物。

该方法提供 dMRM 方法中 510 种化合物的完整列表，以及保留时间、碰撞能量、碎裂电压和 MRM 离子对。一些化合物（包括高灭磷、溴鼠灵、苯醚甲环唑、乙环唑、苄嘧啶、丙森锌、氧化乐果、坪草丹、霜霉威、吡蚜酮、苜蓿菊酯、禾草丹、久效威砒和三唑醇）在三种基质中均显示出分裂峰。其他化合物（包括丁草胺、乙氧菊酯、二甲草胺、甲氧咪草烟、甲胺磷、恶霜灵、丙草胺和克啉菌）在三种基质中均显示出峰拖尾或峰展宽。

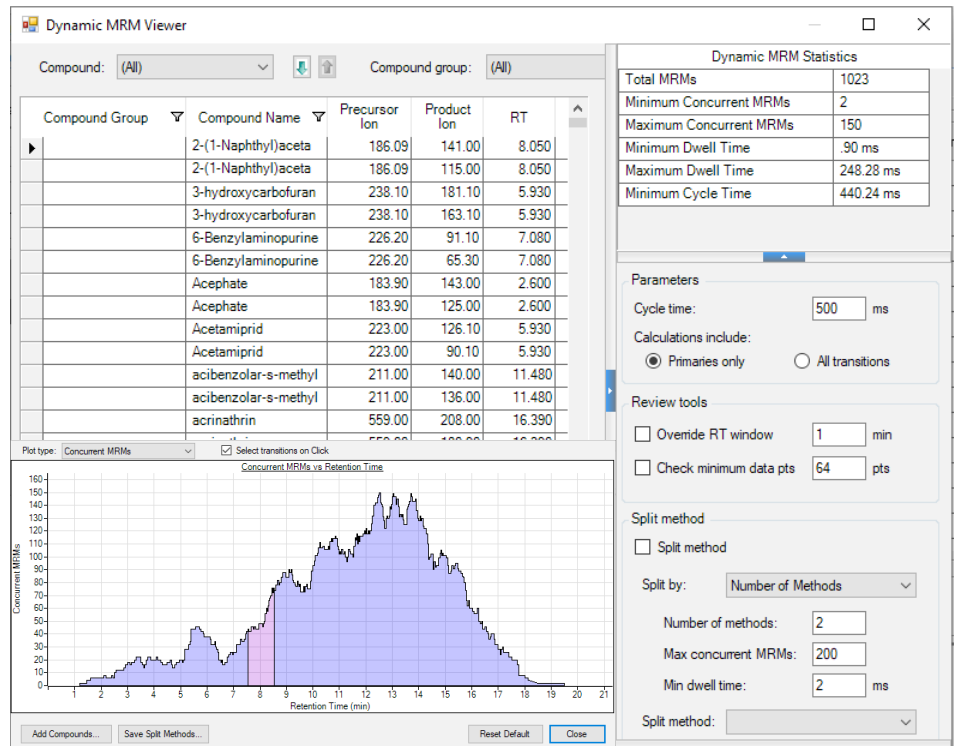


图 2B. 动态 MRM 查看器软件中显示的 510 种化合物采集方法表明 1000 多个 MRM 的高效管理

基质效应评估

由样品基质引起的基质效应 (ME) 非常常见, 表现为 MS 检测系统的响应抑制或增强^[1]。通过基质匹配标样中的目标响应与相应溶剂标准品中的目标响应之比来评估 ME。通常, 没有严格要求可接受的 ME 标准, 因为通过基质匹配校准曲线可以校正 ME。然而, ME 是评估方法灵敏度和可靠性的重要参数, 造成低于 20% 的信号抑制或增强的 ME 通常可以忽略不计^[1]。在本研究中, 使用 7 种浓度的基质匹配校准标样与相应的相同浓度溶剂标准品进行了比较, 对 ME 进行了研究。在最终的报告中, 我们讨论了校准浓度 4 (10 µg/L) 的 ME, 即本研究中所有 510 种农药的 MRL。

在 10 µg/L 的浓度下, 番茄 510 种目标分析物中的 70%–90% 的 ME 不明显。对于番茄基质中 ME 相对明显的分析物, 它们中的大多数表现出基质增强。对于干燥的小麦粉, 在 10 µg/L 的浓度下, 510 种目标分析物中的 90%–95% 的 ME 不明显。对于橄榄油, 在 10 µg/L 的浓度下, 510 种农药中的 70%–85% 的 ME 不明显。由于油基质的复杂性, 离子抑制对更多的目标分析物产生了不利的影响。根据番茄、小麦和橄榄油中 10 µg/L 目标分析物的 ME 结果, 在本研究中最终使用基质匹配校准标样来补偿 ME。

例如, 图 3 中绘制了校准标样溶剂和基质匹配标样中 2-(1-萘基)乙酰胺的校准曲线。这表明溶剂标准品与番茄、小麦和橄榄油基质具有良好的一致性。

工作流程性能的验证

基于线性、方法灵敏度、回收率和精密度验证了工作流程的性能标准。考虑到样品前处理过程中对小麦和橄榄油进行了 1:5 和 1:2 的稀释, 根据稀释倍数对最终结果进行了相应的修正。对每种基质进行了两个批次的分析。每种样品基质的批次运行包括溶剂空白、基质匹配校准标样、基质空白、后加标 QC 样品和预加标 QC

样品。为每种浓度的预加标 QC 至少制备 6 个技术重复样品^[1]。每个样品至少进样一次到 MS 中。

1. 线性: 大多数目标分析物的校准曲线由 LOQ 定义为 100 µg/L 的基质匹配标样生成, 而一些化合物在 100 µg/L 时达到饱和, 因此 LOQ 定义为 50 µg/L。为了确定最佳线性响应函数, 对各种回归模型进行了评估, 确定最佳校正模型为类型: 线性; 原点: 忽略, 加权: $1/X^2$, 而少数化合物在加权: $1/x$ 的情况下具有更好的线性回归。超过 95% 的目标分析物满足 $R^2 \geq 0.99$ 的校准曲线线性要求。

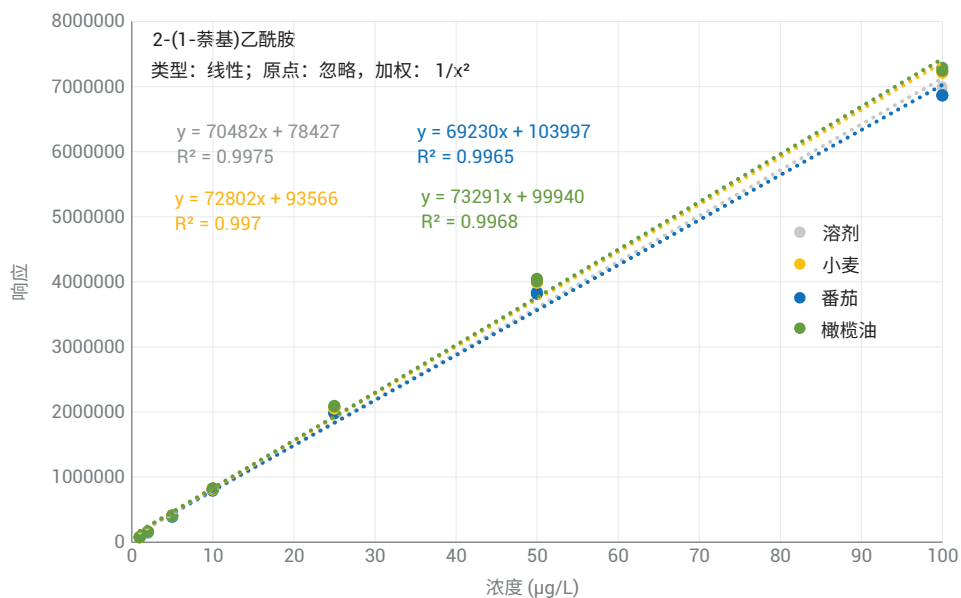


图 3. 溶剂标准品、番茄、小麦和橄榄油基质的校准曲线叠加图

2. 定量限 (LOQ) 和仪器检测限 (LOD): 灵敏的农药残留分析工作流程有利于用户按照各种法规指南执行常规操作。工作流程 LOQ 和仪器 LOD 用于评估方法灵敏度。仪器 LOD 基于信噪比 (S/N) 为 3 及以上的基质匹配校准标样建立, 而工作流程 LOQ 则通过 S/N 为 10 及以上的整个工作流程从预加标样品中获得。使用 Agilent MassHunter 定量分析软件中内置的峰高和自动 RMS 算法定义 S/N。为了确定 LOQ, 还考虑了其他评估, 包括样品基质中的目标分析物选择性, 以及分析物响应和分析物回收率的精密度。这是因为 LOQ 对于定量分析方法更为重要。根据欧盟 (EU) 指南, 本研究将符合鉴定和方法性能标准的校准范围内的最低加标浓度称为 LOQ^[1]。从预加标 QC 样品的 6 次重复测定中获得精密度, %RSD 小于或等于 20%。图 4A 和 4B 分别显示了 2-(1-萘基)乙酰胺和啉虫脒在预加标 QC 1 µg/kg 和 5 µg/kg 下进行六次技术重复测定得到的 MRM 色谱叠加图。这表明三种基质的 LOQ 浓度具有较高的灵敏度和良好的精密度。

3. 方法精密度和回收率: 根据三种基质的两批 10 µg/kg 预加标 QC 样品技术重复测定得到的回收率值变化, 使用回收率重现性 (RSD_r) 和实验室内重现性 (RSD_R) 对方法精密度进行了评估。通过使用一个批次内的 6 个 HQC 技术前处理样品计算回收率的相对标准偏差百分比 (%RSD) 来确定 RSD_r。测量两个批次共 12 个 HQC 技术前处理样品的回收率 %RSD 作为 RSD_R。

通常, 在 10 ppb 下, 可接受的 RSD_r 限值为 20%。三种不同基质中超过 91% 的目标分析物的 RSD_r 值在 20% 以内, 表明各技术前处理样品的表现一致。这些结果证实了使用安捷伦通用 QuEChERS dSPE 和 Agilent Captiva EMR-Lipid 样品前处理得到的分析物回收率的高度重现性。

考虑到样品前处理和分析的潜在变量 (包括不同批次的样品基质和用于萃取的消耗品、不同分析柱和不同时间), 分两个批次对三种基质的实验室内重现性进行了评估。从分两个批次运行的共 12 个技术前处理样品中获得所有基质的 RSD_R。在 510 种目标分析物中, 超过 90% 的结果在 20% RSD_R 以内。这些结果证实了不同实验条件下工作流程性能的精密度。

此外, 还监测了三种基质的不同批次中所有目标分析物的保留时间 (RT) 变化, 从而评估色谱方法的精密度。三种不同基质中所有目标分析物的 RT 容差在 ±0.1 分钟的范围内。RT 的精密度结果证实了洗脱曲线和 MS 检测的可靠性。

本实验中使用回收率评估定量分析工作流程对于 500 多种农药的性能^[1]。使用三种浓度 (包括 1、5、10 µg/kg) 的预加标 QC 样品评估三种不同基质中的分析物回收率。根据预加标 QC 样品与相应的基质匹配校准标样浓度之间的分析物响应比计算回收率。通过 6 个技术重复样品获得各加标浓度下的平均回收率。根据大多数农药的 MRL, 使用 10 µg/kg 加标浓度的回收率结果报告工作流程的回收率性能。根据 SANTE/12682/2019, 如果它们一致 (RSD_r ≤ 20%), 平均回收率在 40%–120% 的范围内可接受。根据这些标准, 番茄、小麦和橄榄油中分别有 92%、82% 和 86% 的目标分析物在 10 µg/kg 下的平均回收率结果符合可接受标准。

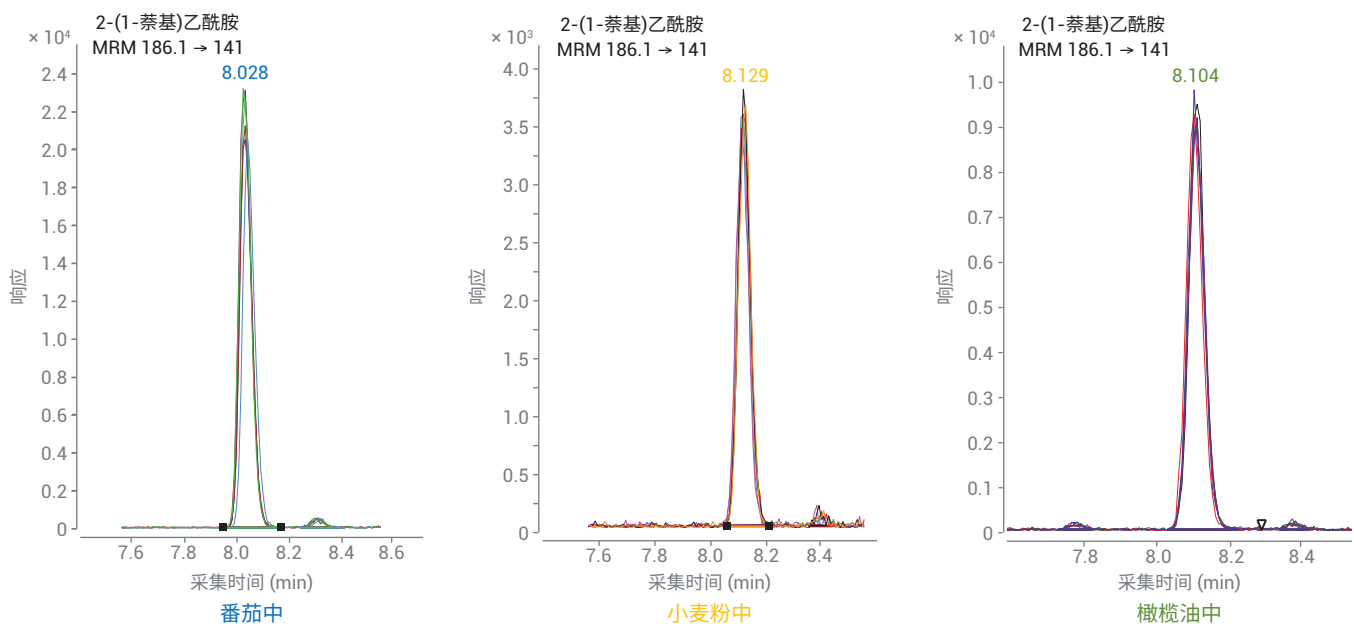


图 4A. 在 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (预加标 QC) 下对三种基质中的 2-(1-萘基)乙酰胺进行六次技术重复测定得到的 MRM 色谱叠加图

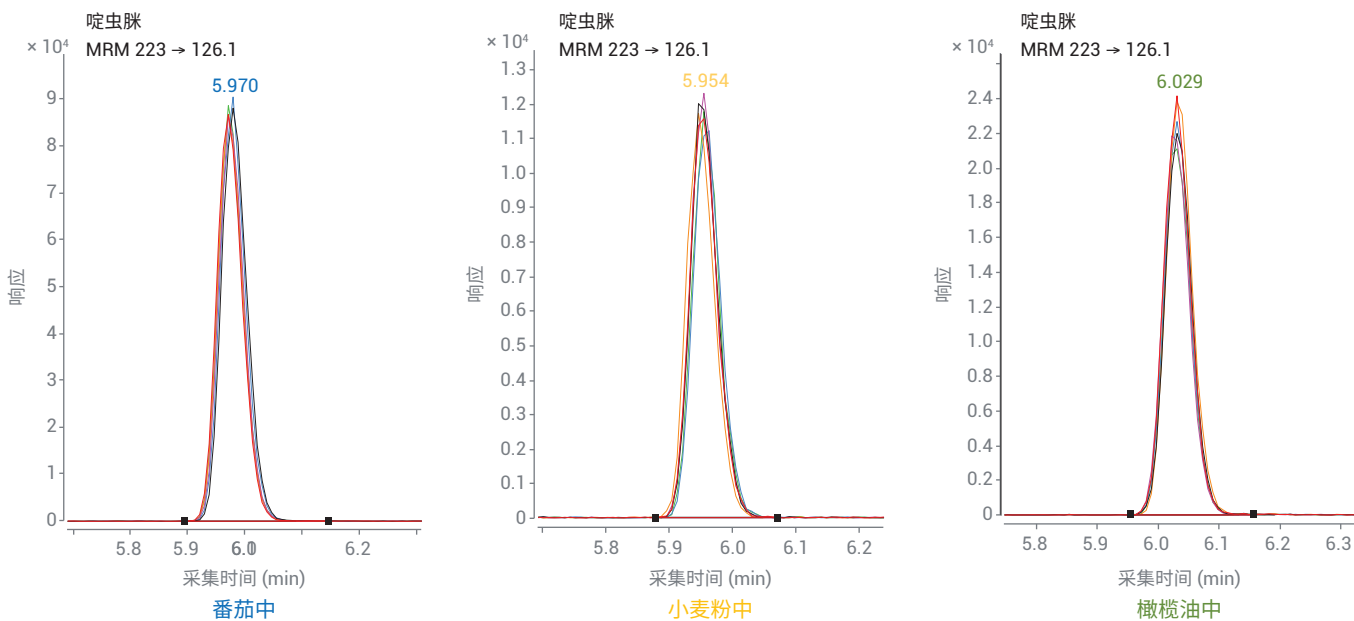


图 4B. 在 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (预加标 QC) 下对三种基质中的 啉虫脒进行六次技术重复测定得到的 MRM 色谱叠加图

4. 稳定性评估：稳定性是指当实验室需要长时间运行时，系统和方法产生可靠响应和结果的能力。在本研究中，通过两天（48 小时）连续进样农药加标浓度为 50 $\mu\text{g/L}$ 的橄榄油提取物来评估稳定性。选择 9 种化合物，分别代表杀菌剂、杀虫剂、除草剂、杀螨剂和杀线虫剂的不同类别农药。这 9 种化合物的保留时间窗

口从 12.5 分钟到 15.0 分钟，这是最“繁忙”的窗口，其 MRM 并发数为 150（最大 MRM 并发数）。同一时间需要分析的 MRM 离子对数量较多，导致该窗口内各化合物的驻留时间缩短。因此，我们选择了这 9 种驻留时间较短的化合物来评估动态 MRM 方法的长期性能。9 种代表性化合物在超过 100 次进样后的分析

物响应如图 5 所示。在两天的连续运行后，观察到分析物响应具有良好的一致性 ($\text{RSD} < 3.5\%$)。这表明使用 dMRM 模式可以在非常短的驻留时间内产生一致的响应，为大量样品进样提供可靠的方法稳定性。

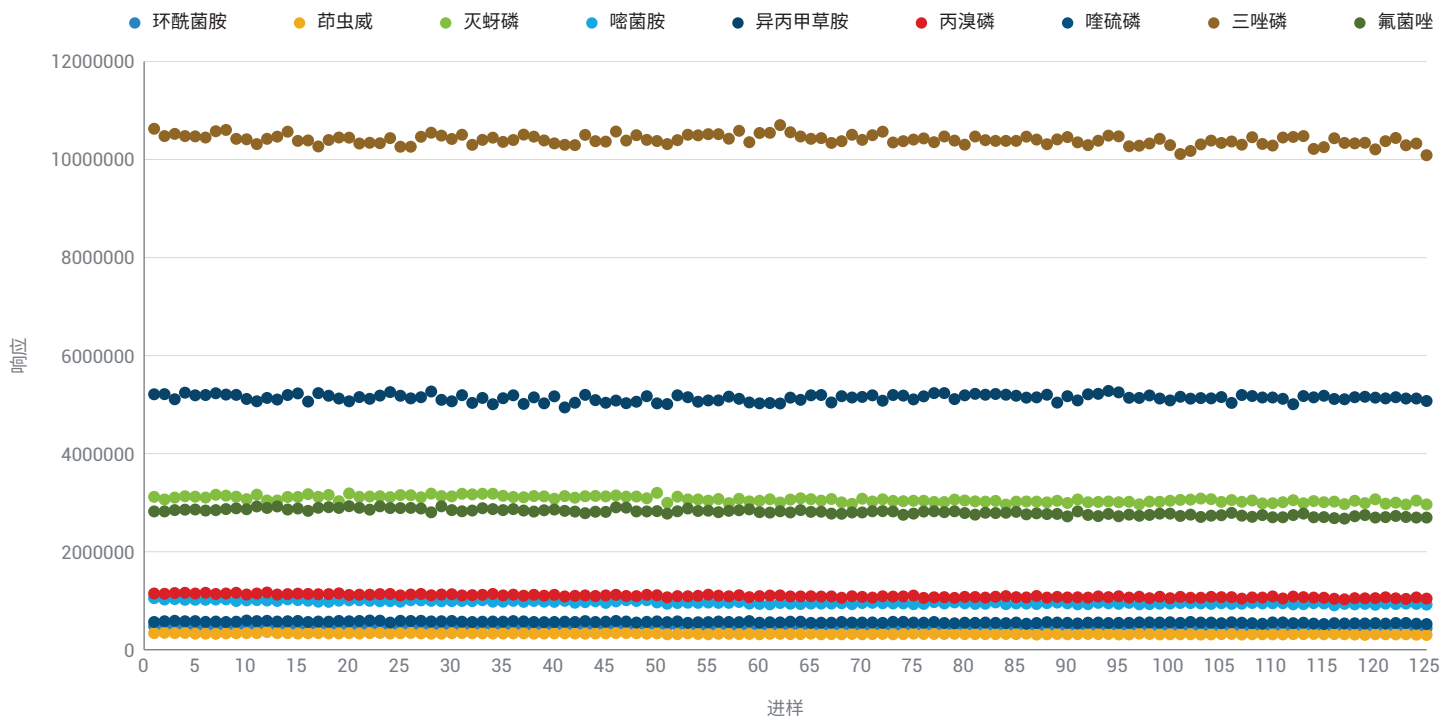


图 5. 48 小时连续进样加标浓度为 50 $\mu\text{g/L}$ 的橄榄油提取物得到的代表性化合物响应

结论

本研究介绍了一种高度灵敏且可重现的工作流程，用于对番茄、小麦和橄榄油基质中的 510 种农药残留进行快速、可靠的定量分析。基于安捷伦农药数据库创建并开发了 dMRM 方法，该数据库中超过 750 种农药，它们可以保存为任何名称，通过重新优化数据库中的化合物或添加/删除现有化合物进行定制。简化的样品前处理方案包括使用 Agilent QuEChERS 试剂盒进行萃取，然后使用 Agilent Bond Elut dSPE 通用净化前处理番茄和小麦粉样品。使用 QuEChERS 萃取和 Agilent Captiva EMR-Lipid 净化前处理橄榄油样品，提供高效、选择性且可重现的农药萃取以及复杂食品基质的净化。

结合使用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪与 Agilent 6470 三重四极杆液质联用系统（根据需要可轻松扩展至 Agilent 6495 以提高灵敏度）分析 500 多种农药残留。使用 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱的 20 分钟液相色谱梯度法为所有目标分析物提供了良好的色谱分离以及均匀的 RT 分布。在 dMRM 模式下进行 LC/TQ 数据采集，同时提供快速极性切换功能，可高效利用仪器周期。

基于基质匹配校准曲线线性、仪器 LOD 和工作流程 LOQ、回收率和精密度，在三种不同基质中验证了工作流程性能。两个批次的比对结果表明，定量分析工作流程适用于高含水量、高含油量和高淀粉含量基质中的 500 多种农药残留，并有望扩展到其他各种食品基质。

参考文献

1. SANTE/12682/2019: Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed
2. Quantitative Analysis of Multi-Residue Pesticides in Food Matrices Using Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS System – Method Protocol, **2020**
3. www.agilent.com/chem/standards

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.7437037037

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10月2日, 中国出版
5994-2370ZH-CN