

使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 和 GC/MS/MS 对三文鱼中的多残留农药进行分析

作者

Pimperlioni J. dos Santos,
Sônia M. V. S. Cardoso,
Osmar D. Prestes,
Martha B. Adaima,
Renato Zanella
Universidade Federal de
Santa Maria, Departamento
de Química, Laboratório de
Análises de Resíduos de
Pesticidas (LARP), Santa
Maria-RS, Brasil, 97105-900

Mariana Baptista
安捷伦科技（巴西）有限公司，
巴西圣保罗州巴鲁埃里，
06455-000

摘要

本应用简报将介绍一种测定三文鱼中多残留农药的分析方法。样品前处理方法基于液相萃取，再利用 Agilent Captiva EMR-Lipid 净化，然后使用 Agilent Intuvo 9000 气相色谱仪和 7010B 三重四极杆质谱 (GC/MS/MS) 进行分析。Captiva EMR-Lipid 净化能够有效去除主要干扰物（如三文鱼中的脂质）。使用 Agilent HP-5ms 超高惰性柱在 20 分钟运行过程中共测定了三文鱼中的 38 种农药，所有化合物均线性良好 ($R^2 \geq 0.990$)，浓度范围为 0.5–25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。总体回收率在 83%–125% 之间， $\text{RSD} < 25\%$ 。

前言

随着水产养殖产品需求的大幅增加，对农药残留进行监测从而确保食品供应安全的需求也随之增加。鱼类样品组成复杂（蛋白质和脂肪含量高），使得样品前处理成为确保获得高质量分析结果所面临的一大挑战。充分的样品前处理要求对目标分析物实现令人满意且一致的萃取，并对基质进行有效去除。

有必要对农药进行大范围筛查，从而确定这些农药的残留水平是否符合法律规定的最大残留限量 (MRL)。三文鱼中富含 ω -3，而 ω -3 中含有约 20% 的蛋白质和 10% 的脂肪。根据联合国粮食及农业组织 (FAO) 的介绍，三文鱼是全球第九大养殖鱼类，由于可能存在寄生虫，因此允许在养殖过程中使用某些农药^[1]。然而，这些化合物即使在食品供应中以痕量水平存在，也会对环境造成不利影响。

本研究的目的是开发一种高效、简单的 GC/MS/MS 分析方法，对三文鱼样品中的 38 种农药残留进行检测和定量。该方法基于固液萃取技术，然后采用 Captiva EMR-Lipid 净化并除水。GC/MS/MS 方法基于动态多反应监测 (dMRM) 技术，并采用高效离子源 (HES) 和 30 m HP-5ms 超高惰性柱。

实验部分

化学品与试剂

- 农药标准品（高纯度 $\geq 95\%$ ）购自 Dr. Ehrenstorfer (Germany) 和 Sigma-Aldrich (USA)
- HPLC 级乙腈 (ACN)、甲醇 (MeOH) 和乙酸乙酯 (EtOAc) 购自 J.T.Baker (USA)
- 试剂级异辛烷购自 Mallinckrodt (Ireland)
- 聚丙烯试管 (15 mL 和 50 mL) 购自 Sarstedt (Germany)
- Eppendorf 微量离心管 (2 mL) 购自 Axygen Scientific (EUA)

溶液与标准品

单独的农药储备溶液 (1000 mg/L) 用适当的溶剂 (ACN、MeOH 或甲苯) 配制，并于 $\leq -5^\circ\text{C}$ 下储存。混合溶液 (10 mg/L) 用 ACN 配制，并于 $\leq -5^\circ\text{C}$ 下储存。

配制 80:20 ACN/EtOAc 萃取溶剂和 16:64:20 ACN/EtOAc/水洗脱溶液，室温储存。

仪器与材料

- 离心机 NT 825 (Novatecnica, São Paulo, Brazil) 和 SL 703 (Solab, São Paulo, Brazil)
- 涡旋振荡器 QL-901 (Microtechnology, São Paulo, Brazil)
- 高精度分析天平 UX-420H 和 AUW 220D (Shimadzu, Kyoto, Japan)
- 超纯水 (18 M Ω cm)，Milli-Q 系统 (France)
- Captiva EMR-Lipid 过滤柱，3 mL，300 mg (部件号 5190-1003)

- Manifold Vac Elut 12 位真空萃取装置 (部件号 5982-9115)
- 陶瓷均质子 (部件号 5982-9313)
- 针头过滤器，13 mm，0.22 μm ，尼龙 (部件号 5190-5269)
- 进样口隔垫，流失与温度优化 (BTO)，不粘连，11 mm (部件号 5183-4757)
- 样品瓶，2 mL，透明，螺口，经认证 (部件号 5182-0714)
- 螺口盖，PTFE/红色硅橡胶隔垫，经认证 (部件号 5182-0717)
- ALS 进样针，固定式针头，10 μL ，PTFE 头推杆 (部件号 5183-4730)
- 超高惰性不分流单锥衬管，带玻璃毛 (部件号 5190-3167)
- HP-5ms UI 盘式毛细管柱，30 m \times 0.25 mm，0.25 μm (部件号 19091S-433UI-INT)
- Intuvo SSL 芯片式保护柱 (部件号 G4587-60565)
- 气体净化过滤器套装 — 包括支架、连接单元，以及用于去除水分、氧气和有机物的载气过滤器 (部件号 CP17975)
- 可变体积移液器，购自 Eppendorf (USA)

将 Agilent Intuvo 9000 气相色谱仪与 7010B 三重四极杆 GC/MS 联用进行分析。气相色谱系统配备电子气路控制 (EPC) 和 7693 自动进样器。采用 Agilent MassHunter 工作站软件进行数据采集和分析。

仪器条件

根据评估的化合物确定 GC/MS/MS 仪器条件。表 1 列出了 GC/MS/MS 的最终操作条件。

表 1. Intuvo 9000C 和 7010B GC/MS/MS 条件

参数	值
载气	氮气, 1.2 mL/min
进样量	2 µL (脉冲不分流模式)
进样脉冲压力	50 psi
柱温箱升温程序	60 °C (保持 1 分钟), 以 40 °C/min 升至 170 °C, 以 10 °C/min 升至 310 °C, 并保持 3 分钟
进样器温度	280 °C
芯片式保护柱升温	初始 85 °C 炉温跟踪模式
总线温度	280 °C
传输线温度	290 °C
离子源	电子轰击 (HES)
离子源温度	300 °C
MS1/MS2 温度	150 °C
采集模式	动态 MRM (dMRM)
碰撞气体	氮气, 1.5 mL/min

表 2. 农药列表、MRM 质量离子对和碰撞能量

化合物	MRM 离子对				RT (min)
	定量离子 (m/z)	CE (V)	定性离子 (m/z)	CE (V)	
氟丙菊酯	228.9 → 92.8	10	207.8 → 181.1	10	14.762
甲草胺	188.1 → 160.1	10	188.1 → 132.1	20	9.224
莠去津	214.9 → 200.2	5	214.9 → 58.1	10	8.069
硫线磷	158.8 → 131.0	5	158.8 → 97.0	15	7.183
顺式氯丹	372.8 → 300.9	10	372.8 → 265.9	25	11.099
溴虫腈	328.0 → 247.0	20	247.1 → 227.1	20	11.914
毒虫畏	294.9 → 266.9	5	266.9 → 159.0	20	10.438
毒死蜱	313.8 → 257.8	15	198.9 → 171.0	15	9.881
甲基毒死蜱	285.9 → 93.0	25	124.9 → 47.0	15	9.120
λ-氯氟菊酯	208.1 → 181.1	10	181.1 → 152.1	30	14.657
氟环唑	192.0 → 138.1	10	192.0 → 111.0	25	12.919
灭线磷	157.9 → 114.0	5	157.9 → 97.0	15	7.183
乙啶硫磷	292.1 → 181.1	5	181.1 → 153.1	10	8.560
杀螟硫磷	277.0 → 260.1	5	125.1 → 79.0	5	9.118
丁苯吗啉	128.1 → 110.1	5	128.1 → 86.1	10	9.990
倍硫磷	278.0 → 109.0	15	124.9 → 79.0	5	9.974
氟虫腈	366.8 → 212.8	25	350.8 → 254.8	15	10.488
精吡氟禾草灵	382.9 → 282.0	10	281.9 → 238.0	15	12.049
氟啶唑	340.0 → 298.0	15	340.0 → 107.8	40	15.798
α-六六六	218.9 → 183.0	5	216.9 → 181.0	5	7.766
β-六六六	218.9 → 183.1	5	216.9 → 181.1	5	7.866
六氯苯	283.9 → 248.8	15	283.8 → 213.9	30	7.834
茚虫威	202.9 → 134.0	15	202.9 → 106.0	25	17.900
马拉硫磷	172.9 → 99.0	15	157.8 → 125.0	5	9.734
杀扑磷	144.9 → 85.0	5	144.9 → 58.1	15	11.033
异丙甲草胺	240.0 → 162.2	10	238.0 → 162.2	10	9.866
二甲戊乐灵	251.8 → 162.2	10	251.8 → 161.1	15	10.449
抗蚜威	238.0 → 166.2	10	166.0 → 96.0	15	8.699
甲基嘧啶磷	290.0 → 125.0	20	232.9 → 151.0	5	9.533
吡菌磷	232.0 → 204.1	10	221.0 → 193.1	10	15.031
啉霉胺	198.0 → 183.1	15	198.0 → 158.1	20	8.451
啉硫磷	157.0 → 129.1	15	146.0 → 118.0	10	10.757
螺甲螨酯	273.0 → 255.1	5	272.0 → 254.2	5	13.611
特丁磷	230.9 → 175.0	10	230.9 → 129.0	20	8.256
氟醚唑	336.0 → 217.9	20	336.0 → 203.8	30	10.049
肟菌酯	172.0 → 145.1	15	116.0 → 89.0	15	12.830
氟乐灵	306.1 → 264.0	5	264.0 → 206.0	5	7.269
乙烯菌核利	212.0 → 172.1	15	197.9 → 145.0	15	9.158

样品前处理

基于此前报道的用于测定三文鱼中多环芳烃 (PAH) 的方法建立了样品前处理方法^[2]。三文鱼样品购自巴西南里奥格兰德州圣玛丽亚当地的杂货店。将样品切成小块，经均质化处理后储存于 $\leq -10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中。该方法分为三个主要部分进行：

- 1. 固-液萃取
- 2. Captiva EMR-Lipid 净化
- 3. 除水

称取 2.5 g 均质样品置于 50 mL 离心（聚丙烯）管中，根据需要进行加标，将其涡旋混合 1 分钟，并平衡 15-20 分钟。完整的样品处理流程如图 1 所述。

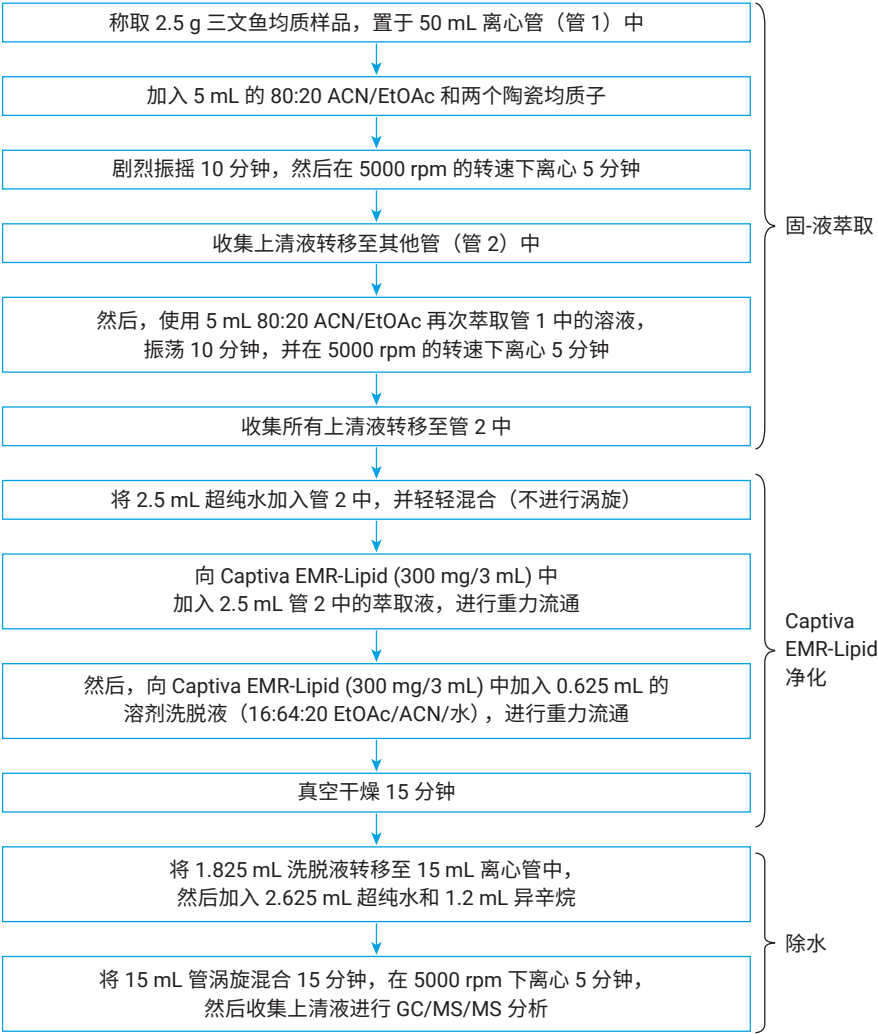


图 1. 基于固液萃取的三文鱼样品前处理与后续 Captiva EMR-Lipid 净化流程

方法验证

对定量限 (LOQ)、线性、精度和准确度等参数进行了评估。校准曲线标样包括 5 个不同的点 (2、4、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。对 3 种加标浓度 (25、50、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 的回收率和 RSD% ($n = 3$) 进行了评估。由保留时间和 MRM 离子对确定分析物鉴定和定量结果。

结果与讨论

GC 方法

动态 MRM 是用于多残留方法的实用工具。通过在可检测的分析物保留时间窗口 (ΔRT) 中构建基于保留时间 (RT) 的 MRM 自动表, 能够以更高的精度鉴定和定量化合物。此外, 使用超高惰性 (UI) 衬管和色谱柱防止因不稳定农药 (例如有机磷和有机氯) 与气相色谱流路表面活性位点发生相互作用而导致不良结果。高灵敏度化合物与仪器流路中活性位点的相互作用可导致峰形和重现性变差, 并使灵敏度显著降低^[3, 4]。图 2 显示了以 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的浓度加标至三文鱼空白样品中的所有 38 种化合物的 MRM 色谱图。

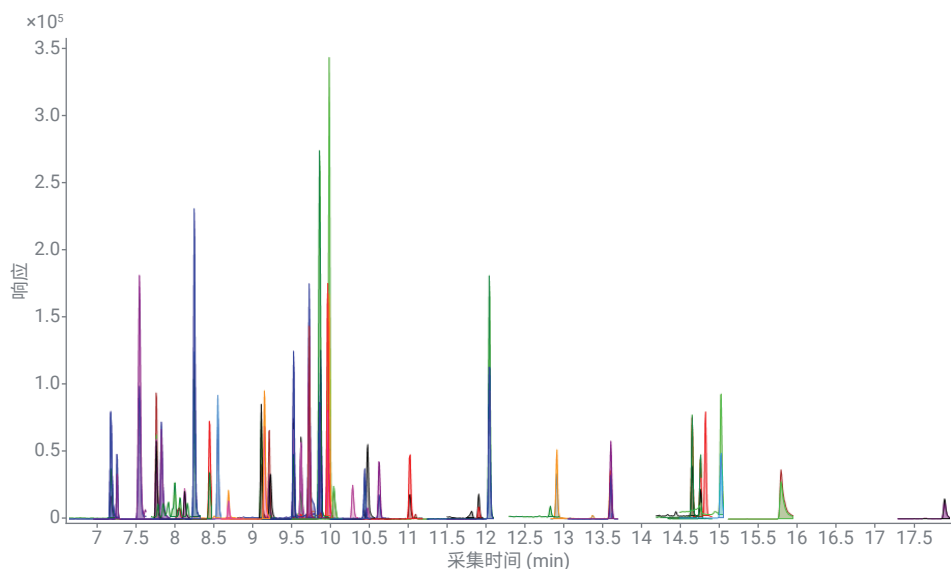


图 2. 采用 GC/MS/MS 在 20 分钟内分离 38 种农药得到的 MRM 色谱图

所有 38 种农药的验证结果列于表 3。所有化合物的校准曲线线性系数 R^2 均高于 0.9900。除 λ -氯氟氰菊酯和丁苯吗啉的方法定量限 (LOD) 为 50 $\mu\text{g/kg}$ 外，其余化合物均为 25 $\mu\text{g/kg}$ 。当加标浓度为 25 $\mu\text{g/kg}$ 时，分析物回收率为 80%–125%，50 $\mu\text{g/kg}$ 时为 93%–119%，100 $\mu\text{g/kg}$ 时为 83%–107%。3 种加标浓度下相对标准偏差 (RSD) 的精度均低于 25%。

表 3. 所有农药的方法校准曲线线性、回收率 RSD (n = 3) 和定量限 (LOQ)

化合物	R^2	回收率 % (RSD%, n = 3)			LOQ ($\mu\text{g/kg}$)
		25 $\mu\text{g/kg}$	50 $\mu\text{g/kg}$	100 $\mu\text{g/kg}$	
氟丙菊酯	0.9922	92 (7)	101 (9)	101 (2)	25
甲草胺	0.9966	100 (5)	111 (8)	101 (9)	25
莠去津	0.9959	113 (2)	106 (1)	92 (9)	25
硫线磷	0.9938	107 (9)	119 (8)	105 (13)	25
顺式氯丹	0.9900	95 (5)	104 (3)	83 10	25
溴虫腈	0.9941	88 (1)	101 (7)	97 1	25
毒虫畏	0.9918	109 (14)	114 (2)	95 14	25
毒死蜱	0.9951	83 (9)	105 (14)	96 3	25
甲基毒死蜱	0.9973	93 (2)	107 (9)	96 14	25
λ -氯氟氰菊酯	0.9986	125 (25)	104 (6)	94 (8)	50
氟环唑	0.9919	105 (1)	103 (5)	95 (9)	25
灭线磷	0.9934	108 (9)	119 (9)	106 (13)	25
乙嘧硫磷	0.9967	99 (3)	110 (9)	100 (8)	25
杀螟硫磷	0.9985	88 (4)	102 (12)	93 (13)	25
丁苯吗啉	0.9926	80 (25)	100 (8)	103 (15)	50
倍硫磷	0.9955	95 (3)	106 (4)	95 (5)	25
氟虫腈	0.9907	99 (7)	110 (5)	93 (15)	25
精吡氟禾草灵	0.9939	92 (5)	103 (7)	98 (1)	25
氟啶唑	0.9917	108 (12)	113 (3)	97 (14)	25
α -六六六	0.9901	100 (3)	116 (4)	100 (16)	25
β -六六六	0.9930	100 (3)	116 (4)	100 (16)	25
六氯苯	0.9917	84 (13)	93 (5)	98 (7)	25
茚虫威	0.9999	93 (5)	114 (4)	99 (12)	25
马拉硫磷	0.9981	97 (7)	106 (7)	88 (3)	25
杀扑磷	0.9968	97 (13)	107 (5)	92 (21)	25
异丙甲草胺	0.9909	98 (5)	109 (4)	96 (7)	25
二甲戊乐灵	0.9946	94 (0)	109 (8)	100 (3)	25
抗蚜威	0.9937	114 (6)	112 (9)	103 (20)	25
甲基嘧啶磷	0.9985	92 (2)	105 (4)	96 (5)	25
吡菌磷	0.9954	91 (6)	114 (8)	97 (13)	25
啉霉胺	0.9924	96 (3)	104 (9)	94 (9)	25
啉硫磷	0.9909	92 (1)	106 (7)	95 (6)	25
螺甲螨酯	0.9970	92 (2)	108 (6)	97 (8)	25
特丁磷	0.9960	93 (3)	108 (10)	99 (2)	25
氟醚唑	0.9915	110 (12)	113 (2)	95 (14)	25
肟菌酯	0.9978	108 (9)	109 (8)	100 (11)	25
氟乐灵	0.9920	96 (1)	113 (9)	107 (6)	25
乙烯菌核利	0.9988	91 (3)	107 (7)	98 (5)	25

样品前处理方法

基质干扰通常会导致数据偏差、消耗品使用寿命缩短以及系统维护频率增加，因此有效的基质去除对于复杂食品基质中多残留农药分析的成功至关重要。Captiva EMR-Lipid 净化是一种能够以轻松、快速的方式选择性去除干扰物的解决方案。在方法开发过程中发现，之前使用的三文鱼 PAH 萃取方法同样适用于三文鱼中的农药分析。

该方法的两个重要部分有助于获得良好的分析物回收率：

1. 重复液相萃取可提高脂肪基质中分析物的萃取效率
2. 样品通过过滤柱后的二次洗脱可确保分析物洗脱更完全

可以改变洗脱溶液，但其中必须含有 10%–20% 的水，以防止残留脂质被抽出。在本分析方法中，使用 16:64:20 EtOAc/ACN/水混合溶剂进行二次洗脱^[2]。

在将样品上样到 Captiva EMR-Lipid 过滤柱前，将少量水加入粗提取物中。这对于在 EMR-Lipid 吸附剂上实现目标脂质保留

非常重要。通常，建议在样品混合物中加入 20% 的水。对于 GC/MS/MS 检测，水分的完全去除对于确保良好的色谱性能以及一致的 GC/MS/MS 分析物响应至关重要。在本研究中，异辛烷溶剂反萃取不仅用于除水，还用于部分样品再浓缩。然而，LC/MS/MS 检测则无需除水。经 EMR-Lipid 净化后，样品可以直接运行或通过 LC/MS/MS 稀释后进行分析。仅当检测灵敏度不能满足要求时，才需要在 LC/MS/MS 分析之前执行干燥和复溶步骤，将样品浓缩。

图 3 显示了在 3 种加标浓度下三文鱼中 38 种农药的回收率。

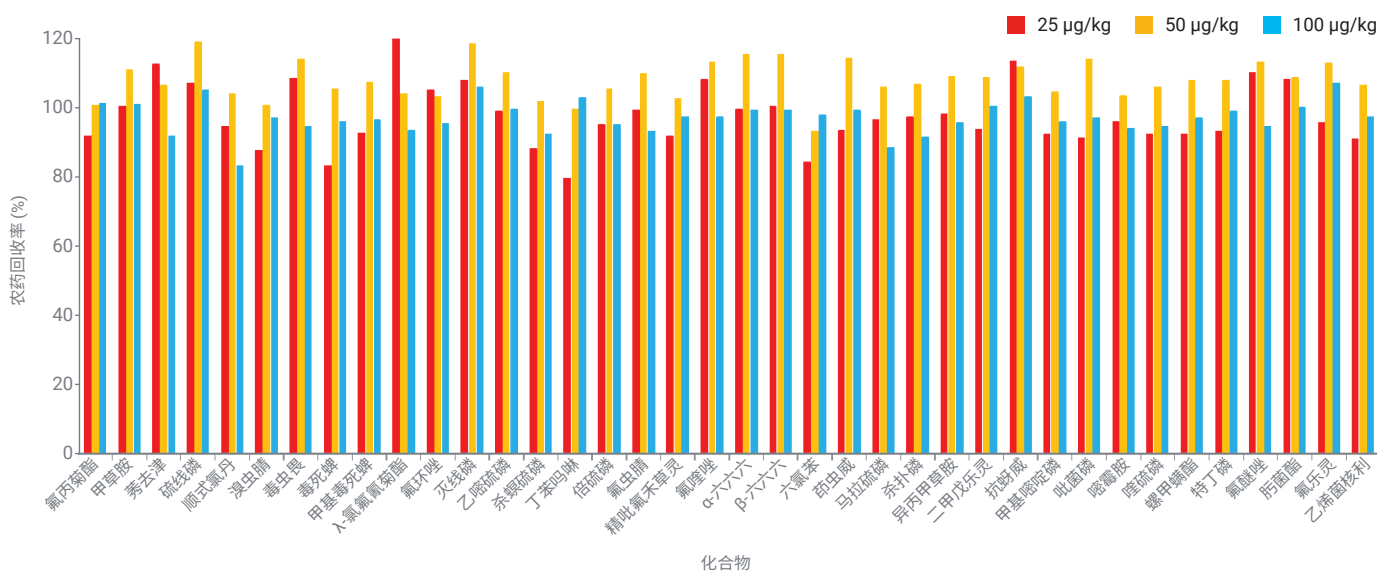


图 3. 评估 25、50、100 µg/kg 加标浓度下所有农药的回收率

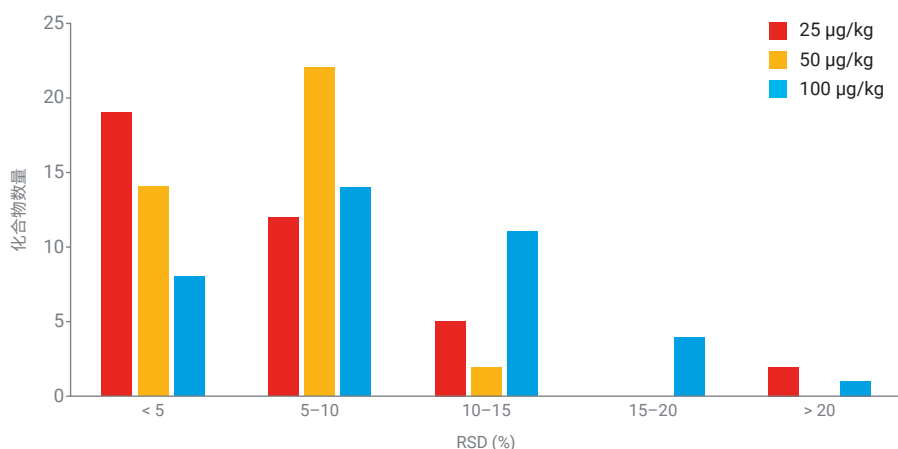


图 4. 以 RSD% 表示每种加标浓度下三文鱼中农药分析的方法重现性, n = 3

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

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 2 月 10 日, 中国出版

5994-1717ZHCN

DE.5752546296

结论

开发并验证了一种使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 净化和 Agilent Intuvo GC/MS/MS 分析三文鱼中 38 种农药的方法。成功验证了样品前处理方法在适用于 GC 的农药分析中的适用性。它是用于在脂肪食品基质中进行多类别化合物萃取的独特方法, 可实现高效的样品基质净化, 为食品检测实验提供了一种简单的常规分析方法。需要重点说明的是, Agilent Captiva EMR-Lipid 净化与 LC/MS/MS 技术兼容。

参考文献

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), The state of world fisheries and aquaculture, **2018**. <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>
2. 测定三文鱼和牛肉中的 19 种多环芳烃化合物, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5994-0553ZHCN, **2019**
3. 使用 Agilent J&W DB-35ms 超高惰性气相色谱柱进行具有挑战性的农药分析, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5990-6595ZHCN, **2010**
4. Better Pesticide Analysis with Agilent J&W Ultimate Plus Tubing in an Inert Flow (在惰性流路中利用 Agilent J&W Ultimate Plus 管线更好地分析农药), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-5404EN, **2014**