应用简报

食品

紫甘蓝中农药残留的同步筛查和定量

用于 EUPT 农药筛查能力验证的全离子 LC/Q-TOF MS/MS 方法

作者

Yujie Xie，Hui Chen，
Chunlin Fan
中国检验检疫科学研究院，
中国北京，邮编 100176

Lijuan Ge 和 Siyu Huo
北京 Usi-Star 检测技术有限公司
中国北京，邮编 100176

Meiling Lu
安捷伦科技（中国）有限公司

摘要

本应用简报介绍了一种 UHPLC-Q-TOF/MS 方法，可同时对紫甘蓝中 415 种农药进行定性筛查和准确定量。按照现行国家标准 GB/T 20769-2008 方法，使用传统 SPE 方法对紫甘蓝样品进行了前处理。用 0.22 µm 膜过滤得到提取液。然后使用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪进行分离，并使用 Agilent 6545 LC/Q-TOF 在全离子 MS/MS 扫描模式下进行了检测。使用基质匹配标曲在 1–200 µg/kg 浓度范围内对紫甘蓝中的 415 种农药进行了评估。大多数农药的筛查限 (SDL) 和定量限 (LOQ) 分别低于 5 µg/kg 和 10 µg/kg，并通过将相应浓度混标添加到基质中进行测定，从而进一步确定 SDL 和 LOQ。所有农药在各自的浓度范围内的线性相关系数 (R^2) 均大于 0.99。在 1 × LOQ、2 × LOQ 和 10 × LOQ 的添加水平下，415 种农药中有 413 种的回收率在 70%–118.8% 之间。仅两种农药在 1 × LOQ 的添加水平下回收率为 65%–70%。所有农药的相对标

准偏差均低于 20%。在参加 2019 年欧盟农药筛查能力验证项目时，该方法用于未知农药残留的筛查和限定范围的农药定量测定。最终对添加的所有农药均实现了准确筛查和定量。结果表明，该方法非常可靠，不仅能够筛查未知农药，还能通过在精确质量 MS 水平和 MS/MS 碎片水平下同时采集数据对农药进行定量。这大大提高了紫甘蓝中农药残留的筛查通量，同时满足筛查标准。该方法可扩展用于其它蔬菜和水果基质中的农药残留筛查。

前言

超高效液相色谱 (UHPLC) 结合高分辨质谱 (HRMS) 具有质量准确度高、质量分辨率高、对化学标准品依赖性小等优点，广泛应用于食品中农药残留的高通量筛查[1,2]。按照 EU SANTE 指南对农药残留筛查的要求，使用高分辨质谱法鉴定农药时，分析必须符合特定的标准。两种离子的精确 *m/z* 必须介于理论值的 ±5 ppm 范围内。除两种离子的保留时间必须一致外，其中一种离子必须为分子加合离子，另一种离子必须为 MS/MS 碎片离子之一[3]。用于食品安全领域的高分辨质谱法通常涉及两种采集工作流程：数据依赖型采集和非数据依赖型采集。数据依赖型 MS/MS 采集模式允许根据母离子的丰度自动选择，同时采集母离子和相应的 MS/MS 碎片离子谱图[4]。然而，质量分析器的占空比可能会限制潜在含有多种分析物的复杂样品的高灵敏度检测。

近年来，非数据依赖型采集模式（例如采用 Q-TOF 质量分析器的安捷伦全离子 MS/MS 筛查工作流程）得到了广泛的应用[5]。通过单次数据采集和可靠的数据挖掘方法可以同时获得分子加合离子和碎片离子的精确 *m/z* 值。结合使用化学标准品，可以进一步定量筛查结果。6545 LC/Q-TOF 的全离子 MS/MS 采集功能可提高 TOF 飞行管前端碰撞池的碰撞能量，从而能够同时获得分子加合离子及其碎片离子。基于我们的最新报告[6]，本应用简报详细介绍了一种方法，使用全离子 MS/MS 扫描模式对紫甘蓝中的 415 种农药残留进行高通量筛查和准确定量。

实验部分

材料与方法

所有农药标准品均购自 Dr.Ehrenstorfer GmbH（德国），纯度 ≥ 95%；甲酸和乙酸铵为质谱纯。乙腈和甲苯为色谱纯，购自 Fisher（美国）。乙酸、氯化钠、无水硫酸钠和无水硫酸镁均为分析纯，购自北京化学品公司（中国）。Carbon/NH_2 SPE 柱 (500 mg/500 mg) 来自安捷伦科技公司（美国）。

样品前处理

使用的样品萃取和净化程序与国家标准 GB/T 20769-2008 方法[7] 类似。

1. 称取 10 g 紫甘蓝样品，并将其转移至 80 mL 离心管中
2. 移取 40 mL 1% 乙酸乙腈加入离心管中
3. 在 13500 rpm 转速下将混合物均质化处理 1 分钟
4. 向混合物中加入 1 g 氯化钠和 4 g 无水硫酸镁。依次振摇混合物 10 分钟，然后以 4200 rpm 的转速离心 5 分钟
5. 在平行浓缩仪中，以 37 °C 和 150 rpm 的转速将得到的上清液 (20 mL) 蒸发并浓缩至约 2 mL，然后进行净化
6. 在净化时，将无水硫酸钠转移至 2 cm 高的 Carbon/NH_2 柱中，然后固定在自动固相萃取器上
7. 将萃取器参数设置为 4 mL 乙腈:甲苯混合溶剂（3:1，V:V）洗脱 SPE 柱。丢弃流出物
8. 将浓缩后的样品转移至 Carbon/NH_2 柱中，用 2 mL 乙腈和甲苯（3:1，V:V）清洗样品容器 3 次，然后将清洗液转移至 Carbon/NH_2 柱中
9. 使用 25 mL 乙腈和甲苯（3:1，V:V）进行洗脱，将洗脱液收集到试管中
10. 使用平行浓缩仪，在 37 °C 下将洗脱液蒸发并浓缩至约 0.5 mL，以 150 rpm 的转速进行离心。用氮气吹至完全干燥

11. 将残留物溶于 1 mL 乙腈/水溶液（3:2，V:V）中，充分混合。用 0.22 µm 膜过滤，以备 UHPLC-Q-TOF/MS 分析

表 1. 液相色谱分离条件

参数	值
液相色谱仪	Agilent 1290 Infinity II LC
色谱柱	Agilent ZORBAX SB-C18, 100 mm × 2. 1 mm, 3.5 µm（部件号 861775-902）
流动相	A：0.1% 甲酸/5 mmol/L 乙酸铵； B：乙腈
柱温	40 °C
进样量	5 µL
流速	0.4 mL/min
梯度曲线	时间 (min) %B 0–3 1–30 3–6 30–40 6–9 40 9–15 40–60 15–19 60–90 19–23 90
后运行时间	4 min

表 2. MS/MS 条件

参数	值
MS	配备安捷伦双喷射流电喷雾离子源的 Agilent 6545 LC/Q-TOF
极性	正离子模式
干燥气温度	325 °C
干燥气流速	12 L/min
雾化气压力	35 psi
鞘气温度	375 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	4000 V
MS 扫描范围	*m/z* 50–1000
扫描模式	安捷伦全离子 MS/MS 筛查工作流程
CE 值	0、15 V、35 V
参比离子	*m/z* 121.0509/922.0098

定性筛查方法评估

筛查限 (SDL) 的测定遵循 SANTE/12682/2019 农药筛查指南[3]。将一系列浓度的每种农药添加至紫甘蓝样品中，并将所得浓度为 1、2、5、10、20 和 50 µg/kg 的样品重复测定 20 次。使用实验部分描述的方法对得到的样品进行萃取、净化和分析。定量标准包括化合物的保留时间（±0.35 分钟），以及母离子和至少一种碎片离子的精确质量数（质量准确度在 ±5 ppm 的范围内）方面与数据库一致。对于 *m/z* 小于 200 的农药，允许的最大质量数偏差为 1 mDa。对于来自 EUPT 的未知样品，按照上述步骤（不需要另外加标）进行分析。有关 415 种农药的信息（包括化学名称、CAS 号、保留时间以及定量和定性离子的精确 *m/z*）可参见参考文献[6]。

定量方法评估

首先按照前面所述方法对 6 个紫甘蓝空白样品进行前处理。向得到的空白样品基质残留物中加入一系列农药混标溶液，每种农药的最终浓度为 5.0–100 µg/kg。使用滤膜过滤所得样品，并对其进行 LC-Q-TOF/MS 分析。然后使用基质匹配标准曲线进行定量分析，以避免定量偏差。

根据每种化合物的基质标准曲线的最低浓度，计算得到的定量限 (LOQ) 为 S/N = 10 对应的浓度。为便于方法评估，如果计算得到的 LOQ 小于 1 µg/kg，则将其取整为 1 µg/kg。同样，如果 LOQ 在 1–2 µg/kg 之间，则取整为 2 µg/kg。如果计算得到的 LOQ 在 2–5 µg/kg 之间，则取整为 5 µg/kg。如果计算得到的 LOQ 在 5–10 µg/kg 之间，则取整为 10 µg/kg。通过分析相应浓度水平的加标样品，确保 S/N ≥ 10，进一步验证了取整后的 LOQ 水平。仅当取整的 LOQ 水平经过验证后才能设置为该方法的 LOQ。

对添加水平分别为 LOQ、2 × LOQ 和 10 × LOQ 的紫甘蓝样品进行加标回收率测试，每个添加水平重复测定 6 次，评估方法的准确度和精密度。加标样品采用相同的样品前处理流程，并通过 UHPLC-Q-TOF/MS 进行分析。

结果与讨论

UHPLC-Q-TOF/MS 方法优化

最初，在实验室中按照安捷伦 PCDL 创建指南创建了包含 800 多种农药的 PCDL。使用之前开发的 TOF 扫描模式下的 UHPLC-Q-TOF/MS 方法[4] 分离选定的 415 种农药化合物，对洗脱梯度略作修改，确保所有农药在洗脱时间窗口内相对均匀地分布，从而最大程度降低农药相互之间的干扰。然后对质谱仪的离子源参数进行优化，使所有选定的化合物均有很好的响应。优化后的色谱和质谱条件如实验部分的表 1 和表 2 所示。

全离子 MS/MS 参数优化

Q-TOF 质量分析器可采用全离子 MS/MS 模式进行非数据依赖型采集[8]。由于需要利用多能量通道采集生成全离子 MS/MS 谱图，因此有必要优化碰撞能量和采集速率，确保每种化合物都能生成足够多的定性离子，并且每种化合物都有足够的数据点以实现准确定量。首先，在 2 个和 3 个用于碎裂的碰撞能量通道下，以每秒 2 张谱图的固定采集速率，对一组有 215 种化合物的溶剂标的响应和灵敏度进行了评估。如图 1A 所示，尽管使用两个通道 (0–15 V) 可以鉴定 215 种化合物中的 197 种，但仍有 18 种化合物无法得到灵敏、可靠的鉴定。相比之下，当依次使用 3 个能量通道时，可以观察到所有 3 个能量通道 (0、15 和 30 V 以及 0、15 和 35 V）均能提高可以鉴定的农药的数量。其中，0、15 和 35 V 鉴定得到的农药数量最多 (215 种化合物中的 209 种）。因此，在全离子 MS/MS 模式下，选择 0、15、35 V 的碰撞能量通道进行后续的数据采集速率优化。

采集速率会影响色谱峰的数据点数量，为保证定量准确，每个色谱峰均需要足够多的数据点。采集速率越快，数据点越多。然而，在每个数据点的采集过程中，采集速率还会影响离子脉冲的累积数量。如图 1B 所示，随着采集速率从每秒 2 张谱图提升到 4 张谱图，符合确认标准的化合物数量从 209 种增加到 215 种。当采集速率大于或等于 5 张谱图/秒时，灵敏度略有下降。215 种化合物中有 4 种不完全符合定性标准，因为其碎片离子的灵敏度较低，不足以实现准确鉴定。由于每秒 4 张谱图可以为准确定量提供足够多的数据点，因此选择其作为最佳采集速率。

在优化的碰撞能量和采集速率下，采用 UHPLC-Q-TOF/MS 方法对紫甘蓝中添加的 415 种化合物进行了评估。图 2 显示了 415 种农药化合物的典型提取离子叠加色谱图。各化合物的保留时间、定量和定性离子及其相对质量准确度可参见参考文献[6]。

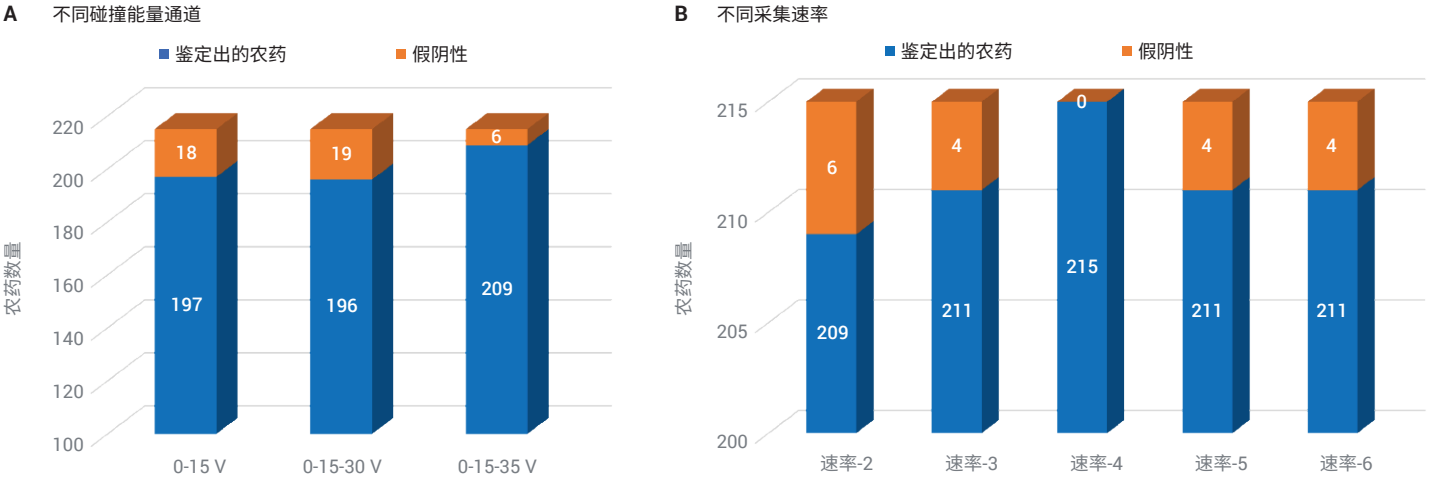


图 1. 使用全离子 MS/MS 模式，在 (A) 不同碰撞能量和 (B) 采集速率下正确鉴定的农药和假阴性农药的数量。注意，溶剂中每种农药的浓度固定为 100 µg/L

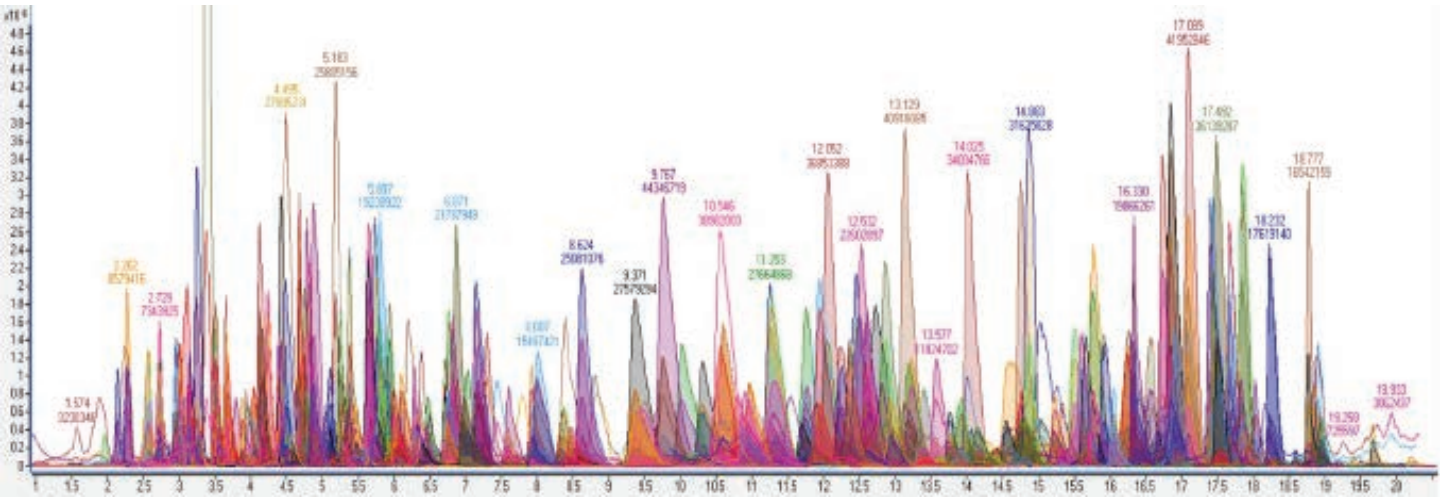


图 2. 实验条件下农药的典型提取离子叠加色谱图

方法性能评估

筛查限 (SDL)

按照 SANTE/12682/2019 指南，制备并分析紫甘蓝中不同添加水平下各化合物的结果，每个浓度的样品重复测定 20 次。然后根据实验部分列出的标准得到每种农药的 SDL。如图 3A 所示，绝大部分代表各农药 SDL 的蓝圈（共 411 个）都小于或等于 5 µg/kg。仅 3 种农药（与橙色三角形重叠 — 氟咯草酮、异丙威和特丁硫磷氧磷）的 SDL 为 10 µg/kg。一种农药（特草灵）的 SDL 为 20 µg/kg。

方法的线性

向紫甘蓝样品中加入不同浓度的混合标准工作液，建立基质匹配标准曲线，每种农药的最终浓度为 5.0–100 µg/kg。如实验部分所述，使用滤膜过滤所得样品，并对其进行 LC-Q-TOF/MS 分析。然后绘制基质匹配标准曲线。415 种农药在各自浓度范围内线性关系非常好，线性回归相关系数 (R^2) 均大于 0.990（图 3B）。其中 368 种农药的线性范围为 5–100 µg/kg，占 88.7%。

定量限 (LOQ)

按照实验部分所述的 LOQ 测定流程，获得每种农药的方法 LOQ。如图 3A 所示，在 415 种农药中，多达 413 种农药的 LOQ 值等于或低于 10 µg/kg。仅二嗪农和特草灵的 LOQ 为 20 µg/kg。值得注意的是，一些农药（特草灵、氟咯草酮、异丙威和特丁硫磷氧磷）的 SDL 和 LOQ 相同。其主要原因在于，在本研究中，SDL 不是通过传统方法确定（通常为信噪比为 3 时对应的浓度），而是根据一组 20 个加标样品的阳性筛查频率确定。

准确度和精密度

通过对 LOQ、2 × LOQ 和 10 × LOQ 三个不同添加水平的紫甘蓝样品进行加标回收率测试，评估方法的准确度和精密度。如图 3C 所示（除乙菌定和矮壮素在添加水平为 LOQ 时回收率分别为 65.7% 和 68.3% 之外），其它化合物在 3 个添加水平下的回收率均在 70%–120% 范围内，相对标准偏差 (RSD) 低于 20%（图 3D）。这表明该方法高度准确和可靠。

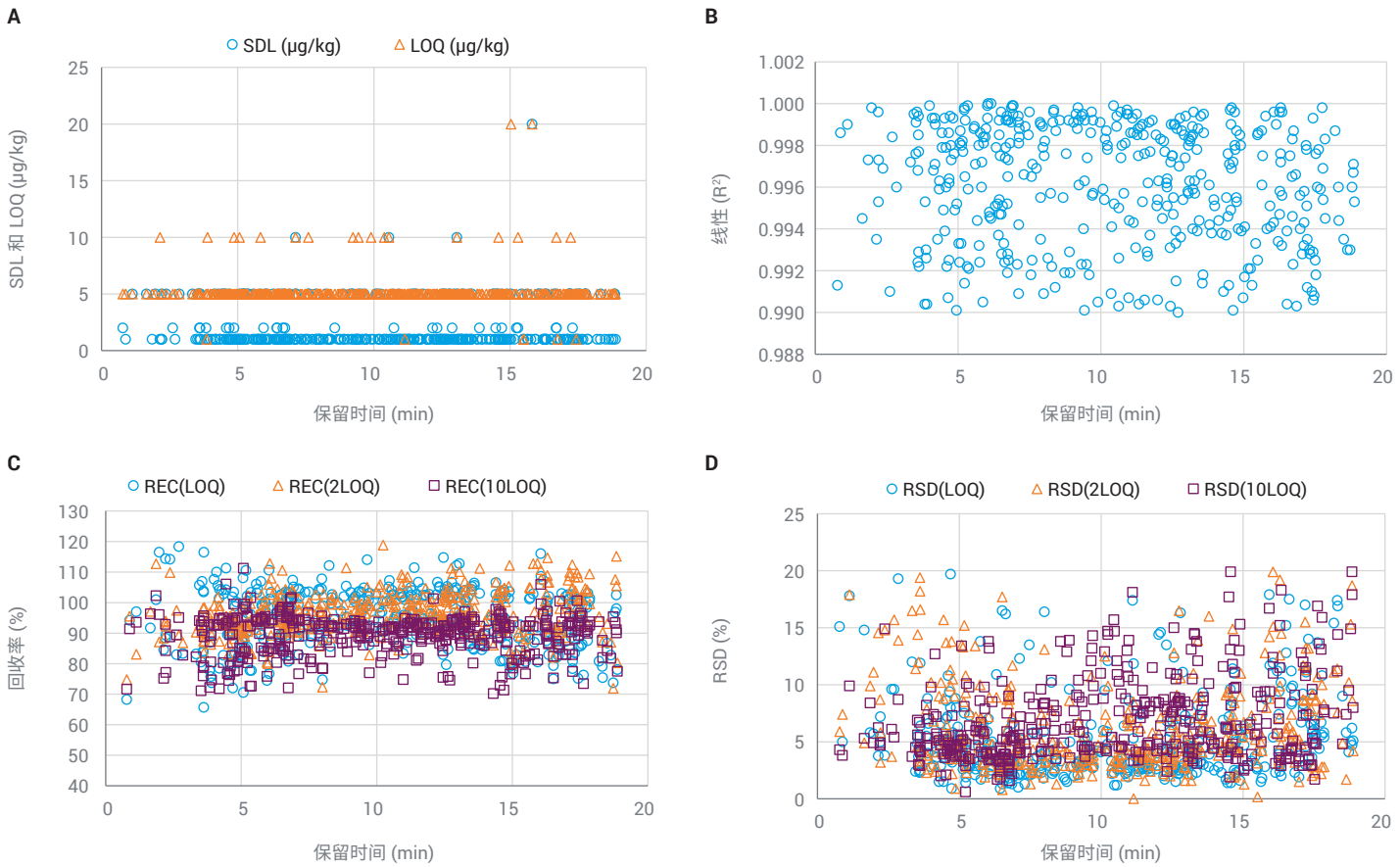
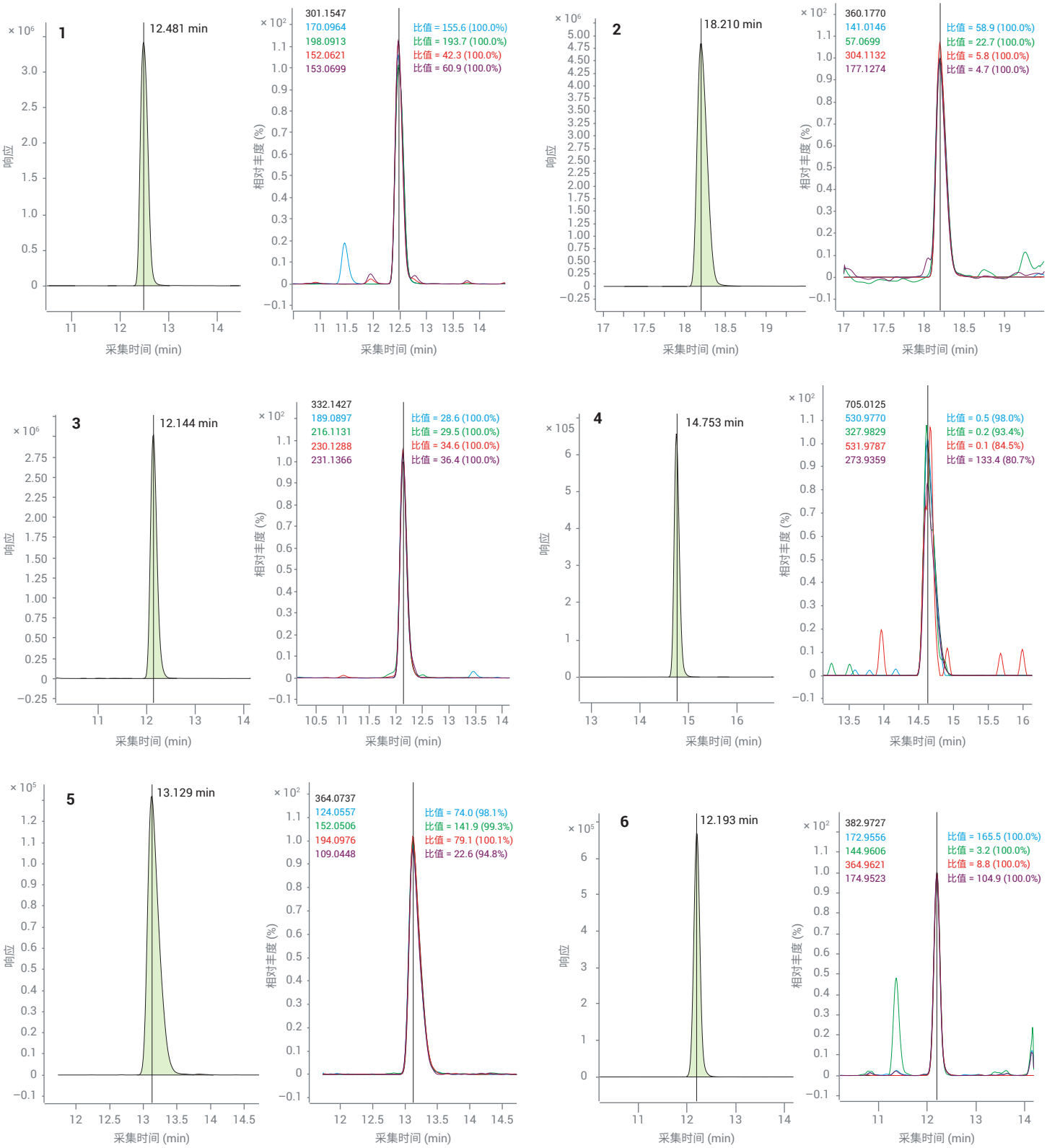


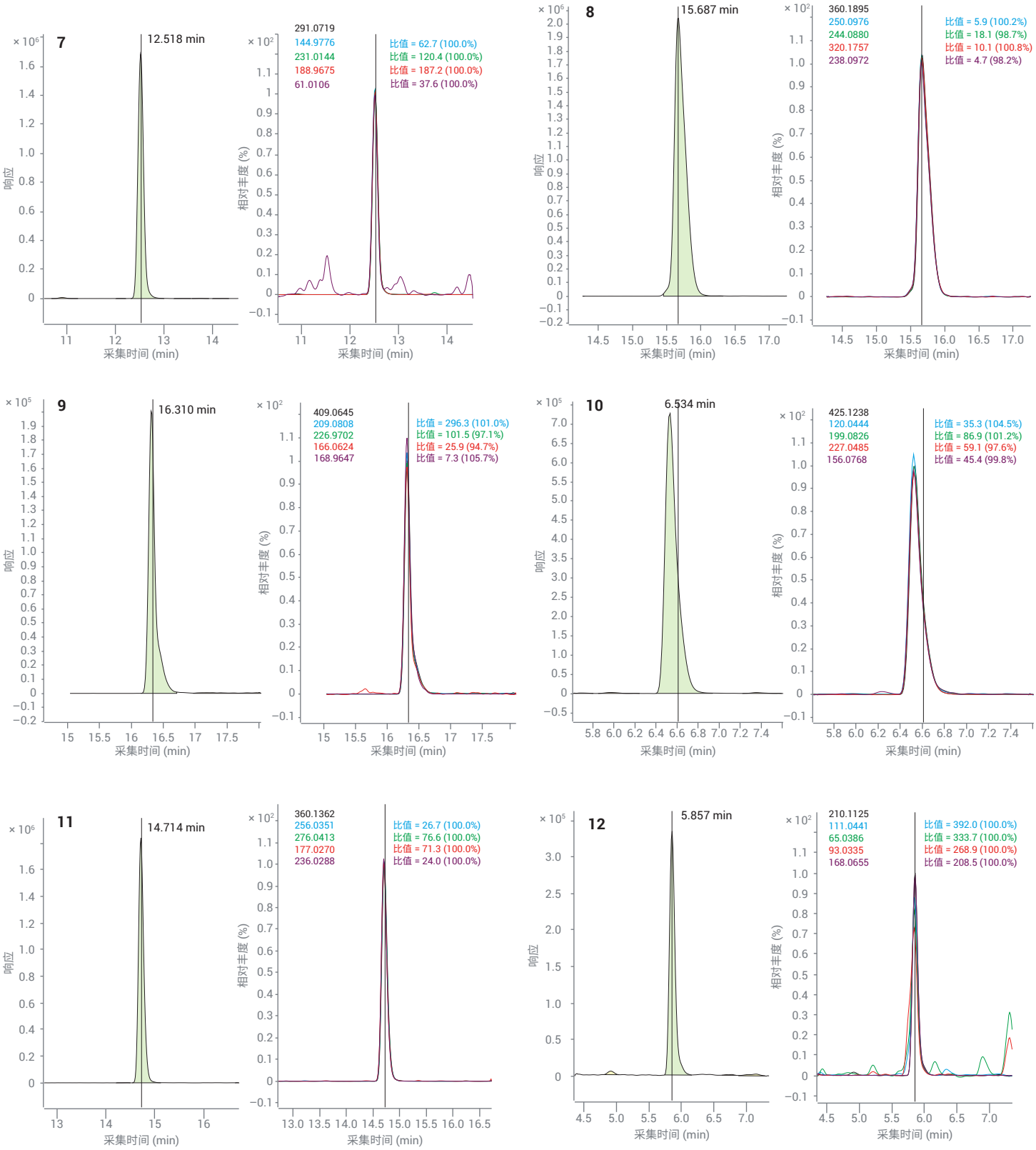
图 3. 方法性能评估：(A) 筛查限 (SDL) 和定量限 (LOQ)，(B) 线性，(C) 方法准确度（回收率），以及 (D) 方法精密度 (RSD)

方法验证

使用建立的定性筛查和定量测定方法，对欧盟农药筛查能力验证项目提供的紫甘蓝样品进行未知物筛查和定量。对于未知农药筛查样品（未指定农药范围），使用自建的 PCDL（包括 800 多种农药）准确筛查出 16 种农药，所有农药均在 415 种农药的清单内。结果与官方公布的添加农药完全一致，没有假阳性/假阴性结果。在鉴定得到的所有 16 种农药化合物中（母离子除外），每种农药至少存在 3 种碎片离子，可用于支持准确定性和定量。这些母离子和碎片离子的 *m/z* 均与 PCDL 参考谱图中的一致，相应的质量准确度不超过 5 ppm。此外，所有鉴定得到的农药化合物的保留时间均在 PCDL 中参考时间的 ±0.2 分钟内。所鉴定的农药化合物的提取离子色谱图及其定性数据如图 4 所示。表 3 还列出了这些化合物的保留时间以及用于确认的强度最高的两种离子。

对于指定农药范围（本应用所述的 415 种农药中的 209 种）的定量样品，正确鉴定出所有 21 种农药化合物，包括氧化乐果。然后使用标准化合物对鉴定得到的农药进行定量分析。由于在注册实验室中，氧化乐果的稳定性较低，因此将其排除在定量评估之外。鉴定得到的其余 20 种农药（表 4）的结果显示，Z 分数的绝对值不大于 1.1，表明实测值与参考值高度一致。对未知农药的成功鉴定以及对指定列表中农药的准确测定，使该实验室的农药筛查能力获评为 A 类（最高）水平。


1
12.481 min
× 10⁶
响应
采集时间 (min)
301.1547
170.0964
198.0913
152.0621
153.0699
比值 = 155.6 (100.0%)
比值 = 193.7 (100.0%)
比值 = 42.3 (100.0%)
比值 = 60.9 (100.0%)
× 10²
相对丰度 (%)
2
18.210 min
360.1770
141.0146
57.0699
304.1132
177.1274
比值 = 58.9 (100.0%)
比值 = 22.7 (100.0%)
比值 = 5.8 (100.0%)
比值 = 4.7 (100.0%)
3
12.144 min
332.1427
189.0897
216.1131
230.1288
231.1366
比值 = 28.6 (100.0%)
比值 = 29.5 (100.0%)
比值 = 34.6 (100.0%)
比值 = 36.4 (100.0%)
4
14.753 min
× 105
705.0125
530.9770
327.9829
531.9787
273.9359
比值 = 0.5 (98.0%)
比值 = 0.2 (93.4%)
比值 = 0.1 (84.5%)
比值 = 133.4 (80.7%)
5
13.129 min
× 10⁵
364.0737
124.0557
152.0506
194.0976
109.0448
比值 = 74.0 (98.1%)
比值 = 141.9 (99.3%)
比值 = 79.1 (100.1%)
比值 = 22.6 (94.8%)
6
12.193 min
382.9727
172.9556
144.9606
364.9621
174.9523
比值 = 165.5 (100.0%)
比值 = 3.2 (100.0%)
比值 = 8.8 (100.0%)
比值 = 104.9 (100.0%)


7
12.518 min
291.0719
144.9776
231.0144
188.9675
61.0106
比值 = 62.7 (100.0%)
比值 = 120.4 (100.0%)
比值 = 187.2 (100.0%)
比值 = 37.6 (100.0%)
8
15.687 min
360.1895
250.0976
244.0880
320.1757
238.0972
比值 = 5.9 (100.2%)
比值 = 18.1 (98.7%)
比值 = 10.1 (100.8%)
比值 = 4.7 (98.2%)
9
16.310 min
409.0645
209.0808
226.9702
166.0624
168.9647
比值 = 296.3 (101.0%)
比值 = 101.5 (97.1%)
比值 = 25.9 (94.7%)
比值 = 7.3 (105.7%)
10
6.534 min
425.1238
120.0444
199.0826
227.0485
156.0768
比值 = 35.3 (104.5%)
比值 = 86.9 (101.2%)
比值 = 59.1 (97.6%)
比值 = 45.4 (99.8%)
11
14.714 min
360.1362
256.0351
276.0413
177.0270
236.0288
比值 = 26.7 (100.0%)
比值 = 76.6 (100.0%)
比值 = 71.3 (100.0%)
比值 = 24.0 (100.0%)
12
5.857 min
210.1125
111.0441
65.0386
93.0335
168.0655
比值 = 392.0 (100.0%)
比值 = 333.7 (100.0%)
比值 = 268.9 (100.0%)
比值 = 208.5 (100.0%)
响应
相对丰度 (%)
采集时间 (min)

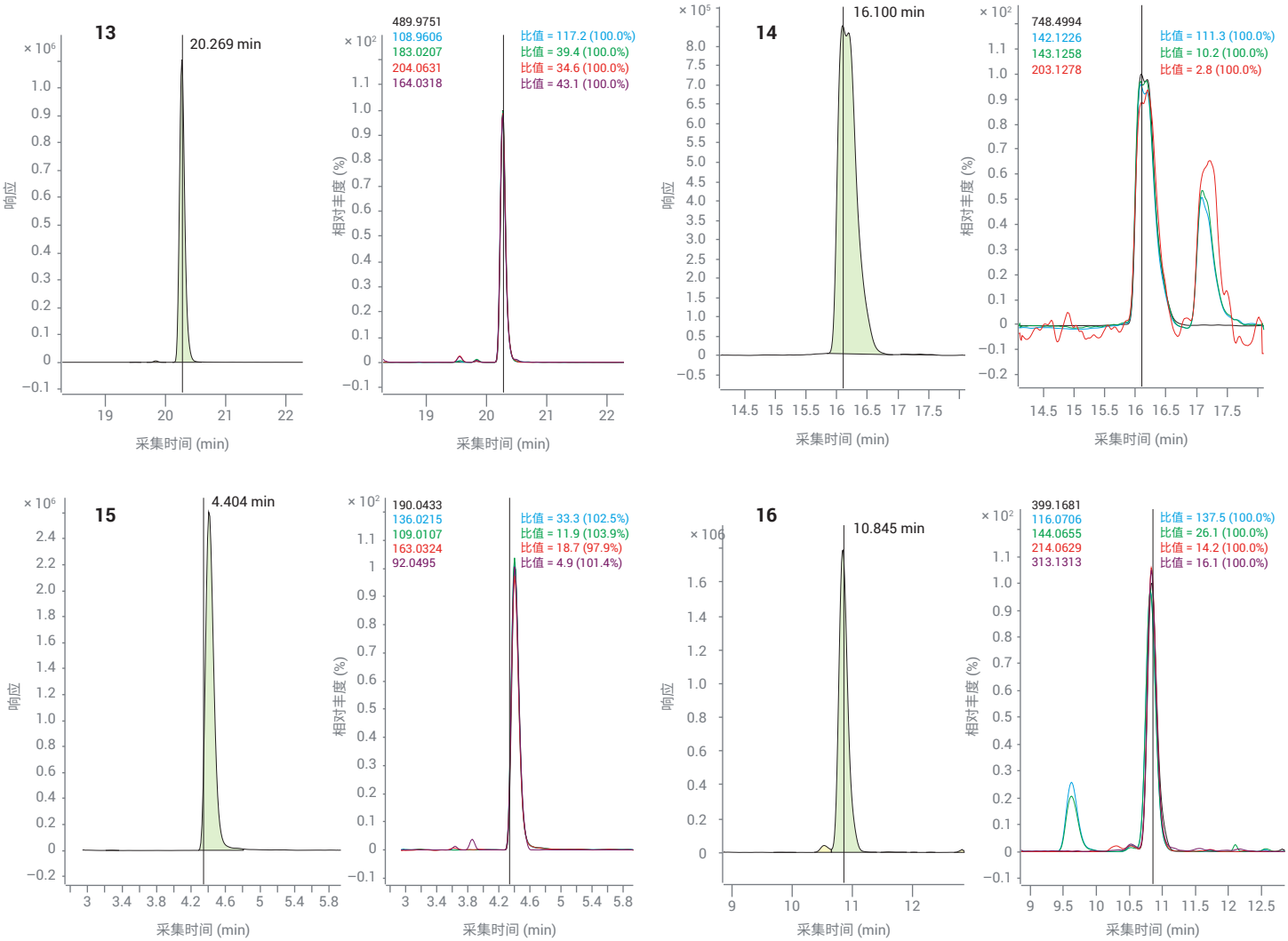


图 4. 欧盟农药残留能力验证项目提供的未知紫甘蓝样品中，每种鉴定出的农药化合物的定量和定性离子的提取离子色谱图。每种农药的识别号见表 3。对于每种农药 ID，左图为定量离子色谱图，右图为提取定量和定性离子叠加色谱图

表 3. 在未知紫甘蓝样品中鉴定出的农药化合物，每种化合物都列有一个母离子和一个主要碎片离子以用于确认（左边为母离子）

编号	鉴定出的农药	RT (min)	主要定性离子	编号	鉴定出的农药	RT (min)	主要定性离子
1	联苯肼酯	12.48	301.1547，198.0913	9	苯菌酮	16.31	409.0645，209.0808
2	乙螨唑	18.21	360.1770，141.0146	10	嘧苯胺磺隆	6.54	425.1238，120.0444
3	胺苯吡菌酮	12.14	332.1427，189.0897	11	吡噻菌胺	14.71	360.1362，256.0351
4	氟虫双酰胺	14.75	705.0125，530.9770	12	残杀威	5.86	210.1125，111.0441
5	氟噻草胺	13.13	364.0737，124.0557	13	啶虫丙醚	20.27	489.9751，108.9606
6	氟吡菌胺	12.19	382.9727，172.9556	14	乙基多杀菌素	16.10	748.4994，142.1226
7	稻瘟灵	12.52	291.0719，144.9776	15	三环唑	4.40	190.0433，136.0215
8	吡唑萘菌胺	15.69	360.1895，250.0976	16	缬菌胺	10.85	399.1681，116.0706

表 4. 指定筛查范围的紫甘蓝样品中鉴定出的农药的实测值和 Z 分数*

编号	化合物	结果 (mg/kg)	Z 分数	编号	化合物	结果 (mg/kg)	Z 分数
1	啶虫脒	0.1510	−0.5	11	氰氟虫腙	0.1527	−1.1
2	氯虫苯甲酰胺	0.1160	−0.6	12	霜霉威	0.1671	−0.1
3	氯苯胺灵**	0.0676	−0.8	13	戊炔草胺	0.0715	−0.6
4	毒死蜱	0.0406	−0.8	14	唑菌胺酯	0.0668	−0.5
5	噻虫胺	0.0481	−0.3	15	氟苯脲	0.0941	−0.6
6	二嗪农	0.0597	−0.6	16	肟菌酯	0.1863	−0.2
7	苯醚甲环唑	0.1282	−0.9	17	杀铃脲	0.4360	−0.3
8	乐果	0.0980	−0.6	18	吡噻菌胺	0.1936	−0.1
9	咪唑菌酮	0.5334	−0.1	19	乙基多杀菌素	0.0531	−0.2
10	氟唑菌酰胺	0.4264	−0.2	20	三氟甲磺隆	0.0538	−0.7

* 其 Z 分数请参见 EUPT 网站 (https://www.eurl-pesticides.eu/)，由于氧化乐果的稳定性较低，EUPT 将其排除在评估之外，** 表示采用另一种方法报道[9]

结论

本应用简报介绍了一种使用 Agilent 6545 LC-Q/TOF 同时筛查和定量紫甘蓝中 415 种农药残留的方法。针对紫甘蓝基质开发的方法具有灵敏、可靠的筛查性能，大多数 SDL ≤ 5 µg/kg。该方法还能实现准确、稳定的定量分析，绝大多数 LOQ ≤ 10 µg/kg，RSD < 20%。该方法还可扩展用于许多其它植物源性食品基质中的农药残留定性和定量筛查。

参考文献

1. Wang Z. *et al. Anal. Methods* **2015**, *7(15)*, 6385
2. Gómez-Ramos M. M. *et al. J. Chromatogr. A* **2013**, *1287*, 24
3. SANTE/12682/2019. https://www.eurl-pesticides.eu
4. 安捷伦科技公司应用简报出版号 5994-0322EN，**2018**
5. Naz.S. et al. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 7933–7942
6. Xie Y., et. al. *Chin. J. Chromatogr.* **2021**, *39*, 301–315
7. GB 20769-2008
8. 安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-6651EN，**2016**
9. Xie, Y. et. al. *Chin. J. Food Safety & Quality* **2020**, *11*, 6437–6443

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

DE44265.795162037

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，2021

2021 年 3 月 16 日，中国出版
5994-3123ZHCN

Agilent
Trusted Answers