

应用纪要

使用UPLC-MS/MS开发并验证一种用于定量水果、蔬菜和大米中农药残留的常规多残留分析方法

Renata Jandova, Sara Stead, Eimear McCall

Waters Corporation



摘要

本应用纪要介绍了一种农药多残留UPLC-MS/MS分析方法的性能。该方法使用ACQUITY UPLC I-Class PLUS/Xevo TQ-S cronos串联四极杆质谱仪联用系统，从Quanpedia数据库中获得通用MS参数，可分析属于SANTE/11813/2017定义的商品类别1和5的食品中适合使用LC分析的多种农药残留。

优势

- 一种能在常规分析中可靠定量食品中农药残留的多残留分析方法，采用精简的QuEChERS样品前处理方案（DisQuE分散固相萃取样品前处理），符合法规限值要求和方法性能指南。
- 在分析基质复杂的样品时展现出稳定的性能，能够大幅延长仪器正常运行时间。

简介

本应用纪要开发并验证了一种能够对多种适合使用LC分析的农药进行常规定量分析的稳定方法，该方法采用QuEChERS方案进行样品前处理（DisQuE分散固相萃取样品前处理），然后将样品进样至沃特世ACQUITY UPLC I-Class PLUS和Xevo TQ-S cronos串联四极杆质谱仪组成的LC-MS/MS联用系统进行分析。

除了具有效率优势（节省成本、时间和人力）之外，多残留农药分析方法还可以解决全球不同国家/地区涉及农药使用和农药滥用、法规限值或农药残留定义的国际贸易和监管难题。对于执行常规监管监测的实验室而言，多残留农药分析是其首选策略。

Xevo TQ-S cronos是一款专为常规定量分析开发的系统，其性能非常可靠，沿用了备受用户青睐的ACQUITY QDa质谱检测器的样品锥设计。在这种倒锥形设计中，通道最窄的部分位于样品锥中心，而样品锥入口相对较宽。这能确保样品基质和流动相缓冲盐不会在采样孔处积聚并造成堵塞。该设计有助于延长仪器在两次锥孔清洗之间的正常运行时间，还能提升分析食品基质样品的灵敏度。

本文证明了Xevo TQ-S cronos系统在灵敏度、LOQ、稳定性、分析复杂基质的精密度、采集速度（快速扫描速率）、极性切换和动态范围方面具有优异的性能，适合应用于同时定量测定多种农药是否符合欧盟MRL要求。

实验

样品前处理

从零售商店购买分别属于SANTE指南商品类别1（高含水量）和5（高淀粉含量）的有机黄瓜、番茄、红椒、青椒和糙米样品，筛查其中是否确实不含目标农药残留。以上商品的选择基于经欧盟协调的多年度控制计划2017/660中规定的产品抽样规则¹。

步骤1.CEN QuEChERS提取

高含水量样品 - 将10 g捣碎的样品[黄瓜、番茄、辣椒]和10 mL乙腈加入50 mL离心管中，涡旋混合20 s，然后大力振摇1 min。

高淀粉含量样品 - 将5 g磨碎的谷物[糙米]和10 mL超纯水加入50 mL离心管中，静置10 min使其形成混合物。加入10 mL乙腈，涡旋混合20 s，然后振摇1 min。

将CEN QuEChERS（P/N：186006813）的DisQuE提取盐包内容物加入各离心管中，然后振摇离心管1 min。提取混合物在环境温度下以5000 rpm（4200 g）离心5 min。取一份上清液用于后续净化。

步骤2. 对适合使用LC分析的碱性/中性多残留农药进行dSPE净化

将QuEChERS上清液(1-6 mL)转移至含有1200 mg MgSO₄和400 mg PSA的15 mL dSPE管[P/N：186008072]中，振摇30 s。然后在环境温度下以≥ 5000 rpm（4200 g）的转速将dSPE管离心5 min。

步骤3.用流动相A稀释提取物

以1:10的比例稀释乙腈提取物，例如，取100 μL步骤2中的乙腈提取物与900 μL流动相A（5 mM甲酸铵水溶液）混合。

通过向提取后的空白基质中添加标准品来配制基质匹配校准标准品，具体操作如下：取100 μL乙腈提取物，加入875 μL流动相A（5 mM甲酸铵水溶液）和25 μL含204种农药，浓度为40 ng/mL的加标溶液，将溶液浓度稀释为1 ng/mL（相当于基质中0.01 mg/kg）。

204种农药加标溶液的详细信息（包括化合物名称和分子式）请参阅《LC多残留农药标准品套装维护和使用手册》（P/N：720005342ZH）²。

UPLC-MS/MS

系统：ACQUITY UPLC I-Class PLUS

系统

色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3, 1.8 μ
m, 2.1 \times 100
mm (P/N: 1860003539)

流动相A: 5 mM 甲酸铵 + 0.1% 甲酸水溶
液

流动相B: 5 mM 甲酸铵 + 0.1% 甲酸的
50:50 MeCN/MeOH 溶液

流速: 0.5 mL/min

进样体积: 3 μ L

柱温: 45 $^{\circ}$ C

样品温度: 10 $^{\circ}$ C

运行时间: 19 min

MS仪器: Xevo TQ-S cronos

电离模式: ESI

极性: +/-

毛细管电压: +0.4/-0.54 kV

脱溶剂气温度: 600 $^{\circ}$ C

| | |
|---------------|-------------|
| 脱溶剂气流速: | 1000 L/h |
| 离子源温度: | 150 °C |
| 锥孔气流速: | 0 L/h |
| 碰撞气体 (氩气) 流量: | 0.14 mL/min |

使用MassLynx 4.2软件采集数据，用TargetLynx XS应用管理软件处理数据。204种农药的UPLC方法、MRM通道和每种化合物的MS参数（锥孔电压和碰撞能量）取自相关Quanpedia数据库，由软件自动创建采集和处理方法。为了进行比较，选取可覆盖多残留套装置理化性质多样性的几种代表性农药，在Xevo TQ-S cronos上对这几种农药的方法参数进行了手动调谐。所选农药的手动优化参数都与Quanpedia数据库中的值非常接近。

为了优化中等质量化合物的离子源条件（毛细管电压和ESI探头位置），在ESI⁻和ESI⁺极性模式下进样含有10种代表性农药的标准品溶液。使用多残留套件中的一种具有中等质量、中等极性的化合物（啶氧菌酯）优化ESI探头条件。对全部204种化合物应用MS实验方法中的Auto-Dwell功能，根据最窄色谱峰的宽度（约3 s）进行设定，所有峰均获得了12-25个数据点。

结果与讨论

根据SANTE/11813/2017中的定量方法相关指南评估此LC-MS/MS多残留分析方法的性能³。该方法的适用范围包括商品类别1（高含水量蔬菜和水果）和商品类别5（高淀粉含量和/或蛋白质含量且低含水量和脂肪含量的商品）。本应用纪要选择了40多种分析物作为代表性分析物，用于比对验证参数标准证明该LC-MS/MS方法的性能。这些代表性分析物的选择依据如下：(a)覆盖理化性质的多样性；(b)包括经欧盟协调的多年度控制计划2017/6601中规定的分析物；(c)2019年依据欧盟食品与饲料快速预警系统被禁止入境的一系列农药⁴。此外，本实验始终满足在MRM采集模式下运行的串联四极杆系统的鉴定标准。对于基质提取物中的所有代表性分析物，每种分析物至少采集两种离子，检测到的S/N ≥ 3，提取离子流色谱图完全重叠，离子丰度比在校准标准品离子丰度比平均值±30%以内。第一个洗脱的分析物（灭蝇胺）的保留时间是分析物色谱柱死体积时间的两倍以上。基质中分析物的保留时间在基质匹配标准品中的分析物保留时间± 0.1 min以内。图1是以10 ng/mL (0.01 mg/kg)的浓度加标至黄瓜提取物中的代表性分析物的典型色谱图，进样的样品以90%水:10%乙腈为溶剂。整个洗脱曲线上获得的峰均为宽度3-6 s的高斯峰。

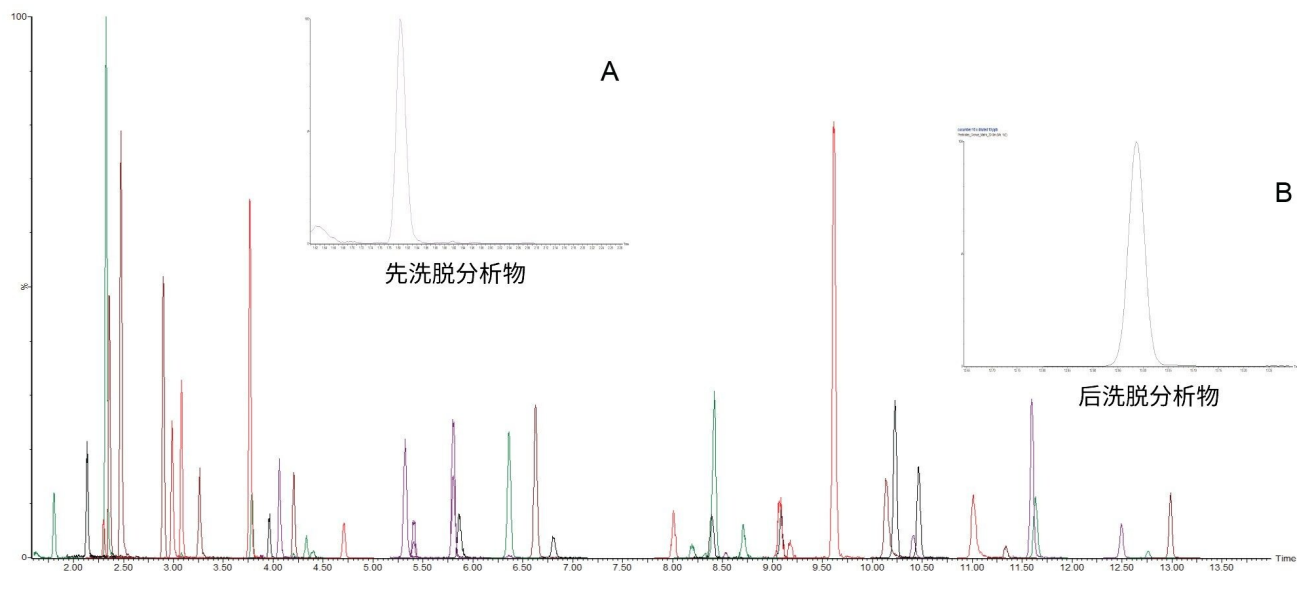


图1.1 ng/mL (相当于 $0.01\ mg/kg$) 的黄瓜基质匹配标准品洗脱曲线中，一系列代表性分析物的典型色谱峰形。插图(A)和(B)分别为先洗脱和后洗脱化合物的放大图。

基质效应

我们研究了验证范围内五种商品LC-MS响应的基质效应。配制浓度为 $0.5\ ng/mL$ 的基质匹配标准品（相当于多残留农药分析“默认”MRL浓度 $0.01\ mg/kg$ 的0.5倍），然后将定量离子通道得到的峰面积与相同浓度溶剂标准品得到的峰面积进行比较，以百分比表示结果。结果（图2）显示，离子增强和离子抑制效应都很明显，具体效应取决于基质/分析物组合。本研究评估的大多数化合物(> 80%)的偏差都在溶剂标准品峰响应 $\pm 20\%$ 范围内。质量数较大的离子（ $m/z\ 886$ 的甲维盐和 $m/z\ 748$ 的乙基多杀菌素-J）观察到的%偏差较大（在20%-28%范围内），因此，建议使用该多残留分析方法时配合使用基质匹配校准标准品，以确保准确定量。

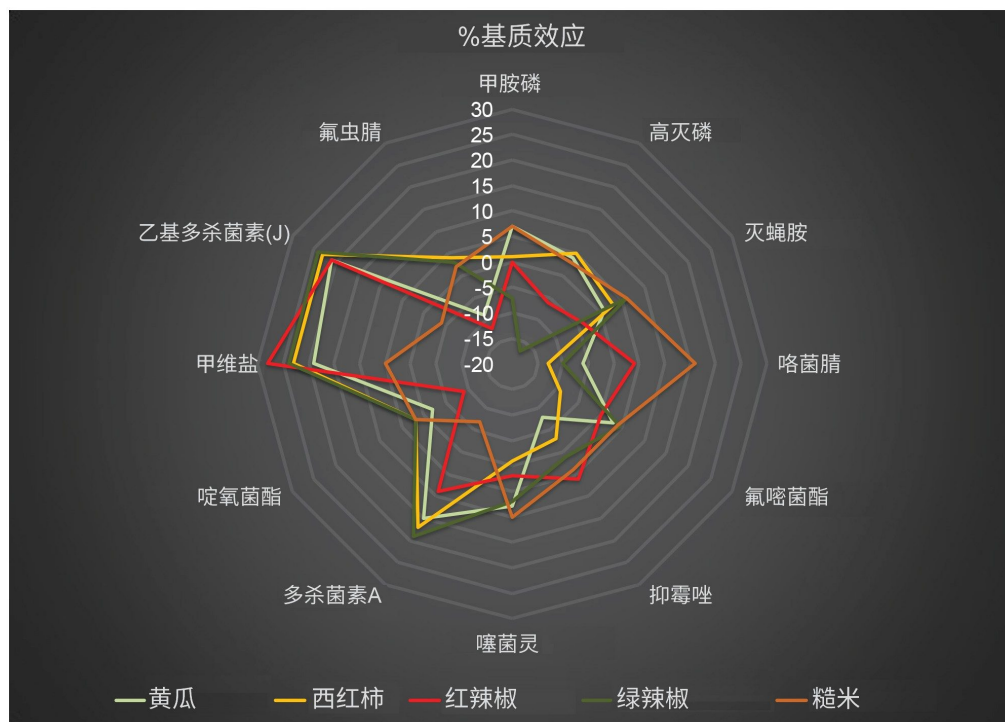


图2.加标浓度为0.5 ng/mL (相当于0.005 mg/kg) 的黄瓜、红椒、青椒、番茄和糙米基质匹配标准品中的平均%基质效应($n=3$)的组合示意图。

灵敏度和线性

使用黄瓜和糙米提取物配制七种浓度 (0.1、0.25、0.5、1.0、2.5、5.0和10.0 ng/mL, 相当于基质中0.001-0.1 mg/kg的残留浓度范围) 的基质匹配标准品(MMS), 用于确定该方法的线性工作范围。

表1列出了 R^2 值为0.99 (或更高) 且反算浓度与真实浓度的偏差 (TargetLynx %残差) < 20%的代表性化合物的线性范围。图3A和3B展示了黄瓜提取物MMS的示例标准曲线, 以及按“默认”MRL当量浓度加标的样品中, 代表性ESI⁺化合物 (高灭磷) 和ESI⁻化合物 (氟虫腈) 的两个离子通道的提取离子流图。

| 化合物名称 | 保留时间 (min) | 极性 | MRM <i>m/z</i> | 线性校准范围 (mg kg ⁻¹) | 斜率 | 黄瓜LOQ (mg kg ⁻¹) | 糙米LOQ (mg kg ⁻¹) |
|-----------|---------------|------|---------------------------|----------------------------------|--------|---------------------------------|---------------------------------|
| 高灭磷 | 2.1 | ESI+ | 183.9>142.9 (183.9>125.0) | 0.001=0.1 | 1296.3 | <0.005 | <0.005 |
| 啶虫脒 | 4.0 | ESI+ | 223.0>126.0 (223.0>56.1) | 0.001=0.1 | 537.6 | <0.005 | <0.005 |
| 啉菌酯 | 8.0 | ESI+ | 404.0>329.0 (404.0>372.0) | 0.001=0.1 | 769.6 | <0.005 | <0.005 |
| 乙噻酚磺酸酯 | 9.1 | ESI+ | 317.0>108 (317.0>166.0) | 0.001=0.1 | 999.2 | <0.005 | <0.005 |
| 多菌灵 | 3.0 | ESI+ | 192.1>160.0 (192.1>132.1) | 0.001=0.1 | 2853.5 | <0.005 | <0.005 |
| 克百威 | 5.4 | ESI+ | 222.1>165.1 (222.1>123.0) | 0.001=0.1 | 470.0 | <0.005 | <0.005 |
| 啉菌环胺 | 8.7 | ESI+ | 226.0>93 (226.0>108.0) | 0.001=0.1 | 548.8 | <0.005 | <0.005 |
| 环唑醇I | 8.0 | ESI+ | 292.2>70.2 (292.2>125.0) | 0.005=0.1 | 219.3 | 0.005 | 0.005 |
| 灭蝇胺 | 1.8 | ESI+ | 167.0>68.1 (167.0>55.04) | 0.0025=0.1 | 619.3 | <0.005 | <0.005 |
| 乐果 | 3.9 | ESI+ | 230.1>125.0 (230.1>199.0) | 0.005=0.1 | 44.3 | <0.010 | <0.010 |
| 甲维盐 | 11.7 | ESI+ | 886.6>158.0 (886.6>126.0) | 0.0025=0.1 | 1771.4 | <0.005 | <0.005 |
| 乙菌定 | 4.1 | ESI+ | 210.1>140.0 (210.1>98.0) | 0.0025=0.1 | 995.6 | <0.005 | <0.005 |
| 咪唑菌酮 | 8.0 | ESI+ | 312.1>92.0 (312.1>236.1) | 0.0025=0.1 | 910.8 | <0.005 | 0.005 |
| 啉啉醚 | 12.5 | ESI+ | 307.2>57.2 (307.2>161.0) | 0.001=0.1 | 3484.5 | <0.005 | <0.005 |
| 氟虫腈 | 9.5 | ESI- | 434.8>329.9 (434.8>249.8) | 0.0025=0.1 | 218.1 | <0.005 | <0.005 |
| 氟啉菌酯 | 9.1 | ESI+ | 459.0>427.0 (459.0>188.0) | 0.001=0.1 | 902.8 | <0.005 | <0.005 |
| 啉菌腈 | 7.5 | ESI- | 247.0>180.0 (247.0>126.0) | 0.005=0.1 | 78.9 | 0.005 | 0.005 |
| 氟硅唑 | 9.0 | ESI+ | 316.0>247.0 (316.0>165.0) | 0.005=0.1 | 143.2 | 0.005 | 0.005 |
| 伐虫脒 | 2.3 | ESI+ | 222.0>165.0 (222.0>46.0) | 0.001=0.1 | 4828.8 | <0.005 | <0.005 |
| 抑霉唑 | 5.9 | ESI+ | 297.0>69.0 (297.0>159.0) | 0.001=0.1 | 724.0 | <0.005 | <0.005 |
| 异丙菌胺I/II | 8.4 | ESI+ | 321.1>119.1 (321.1>203.1) | 0.001=0.1 | 3405.8 | <0.005 | <0.005 |
| 啉菌胺 | 8.3 | ESI+ | 224.1>106 (224.1>77.0) | 0.001=0.1 | 903.8 | <0.005 | <0.005 |
| 甲霜灵 | 6.7 | ESI+ | 280.1>220.1 (280.1>192.1) | 0.001=0.1 | 2115.9 | <0.005 | <0.005 |
| 甲胺磷 | 1.8 | ESI+ | 142.0>93.9 (142.0>124.9) | 0.001=0.1 | 672.3 | <0.005 | <0.005 |
| 久效磷 | 3.1 | ESI+ | 224.1>127.1 (224.1>109.0) | 0.005=0.1 | 2537.1 | <0.005 | <0.005 |
| 氧化乐果 | 2.4 | ESI+ | 214.1>183.1 (214.1>125.1) | 0.001=0.1 | 1993.6 | <0.005 | <0.005 |
| 草氨酰 | 2.9 | ESI+ | 237.0>72 (237.0>90.0) | 0.001=0.1 | 3491.5 | <0.005 | <0.005 |
| 戊菌唑 | 9.2 | ESI+ | 284.0>70.1 (284.0>159.0) | 0.005=0.1 | 485.4 | 0.005 | 0.005 |
| 啉菌酯 | 9.6 | ESI+ | 368.0>205.1 (368.0>145.1) | 0.001=0.1 | 4385.0 | <0.005 | <0.005 |
| 抗蚜威 | 4.9 | ESI+ | 239.1>72 (239.1>182.1) | 0.001=0.1 | 6007.4 | <0.005 | <0.005 |
| 咪鲜胺 | 9.7 | ESI+ | 375.8>307.9 (375.8>70.1) | 0.0025=0.1 | 492.3 | <0.005 | <0.005 |
| 吡蚜酮 | 2.3 | ESI+ | 218.0>105 (218.0>79.0) | 0.0025=0.1 | 492.4 | <0.005 | <0.005 |
| 啉啉灵 | 13.0 | ESI+ | 365.1>147.1 (365.1>309.1) | 0.001=0.1 | 892.9 | <0.005 | <0.005 |
| 啉霉胺 | 6.8 | ESI+ | 200.0>82 (200.0>107.0) | 0.0025=0.1 | 295.9 | <0.005 | <0.005 |
| 丙环唑 | 9.6 | ESI+ | 342>69.0 (342.0>159.0) | 0.005=0.1 | 298.6 | 0.005 | 0.005 |
| 吡丙醚 | 11.6 | ESI+ | 322.1>96.0 (322.1>227.1) | 0.001=0.1 | 4050.1 | <0.005 | <0.005 |
| 啉氧灵 | 11.4 | ESI+ | 308.0>197.0 (308.0>161.9) | 0.005=0.1 | 254.3 | <0.005 | <0.005 |
| 多杀菌素A | 10.2 | ESI+ | 732.6>142.0 (732.6>98.1) | 0.001=0.1 | 2440.1 | <0.005 | <0.005 |
| 乙基多杀菌素(J) | 11.0 | ESI+ | 748.5>142.1 (748.5>98.1) | 0.001=0.1 | 2210.8 | <0.005 | <0.005 |
| 螺甲螨酯 | 12.8 | ESI+ | 371.1>273.1 (371.1>255.1) | 0.005=0.1 | 111.1 | <0.010 | <0.010 |
| 戊唑醇 | 9.2 | ESI+ | 308.0>70.1 (308.0>125.0) | 0.005=0.1 | 517.6 | 0.005 | 0.005 |
| 啉菌灵 | 3.3 | ESI+ | 202.0>175.0 (202.0>131.0) | 0.001=0.1 | 552.8 | <0.005 | <0.005 |
| 啉虫嗪 | 3.3 | ESI+ | 292.0>211.2 (292.0>132.0) | 0.001=0.1 | 387.0 | <0.005 | <0.005 |
| 三环唑 | 4.2 | ESI+ | 190.0>163.0 (190.0>136.0) | 0.001=0.1 | 912.7 | <0.005 | <0.005 |

表1. 黄瓜和糙米提取物中代表性农药的LC-MS/MS参数、线性动态范围(LDR)和LOQ估算值。

*SANTE指南LOQ是满足方法正确性和精密性能要求（重复性数据的%RSD < 20）的最低加标浓度。
LDR在0.1-10 ng/mL范围内，%残留偏差 < 20%且 $R^2 > 0.99$ 。

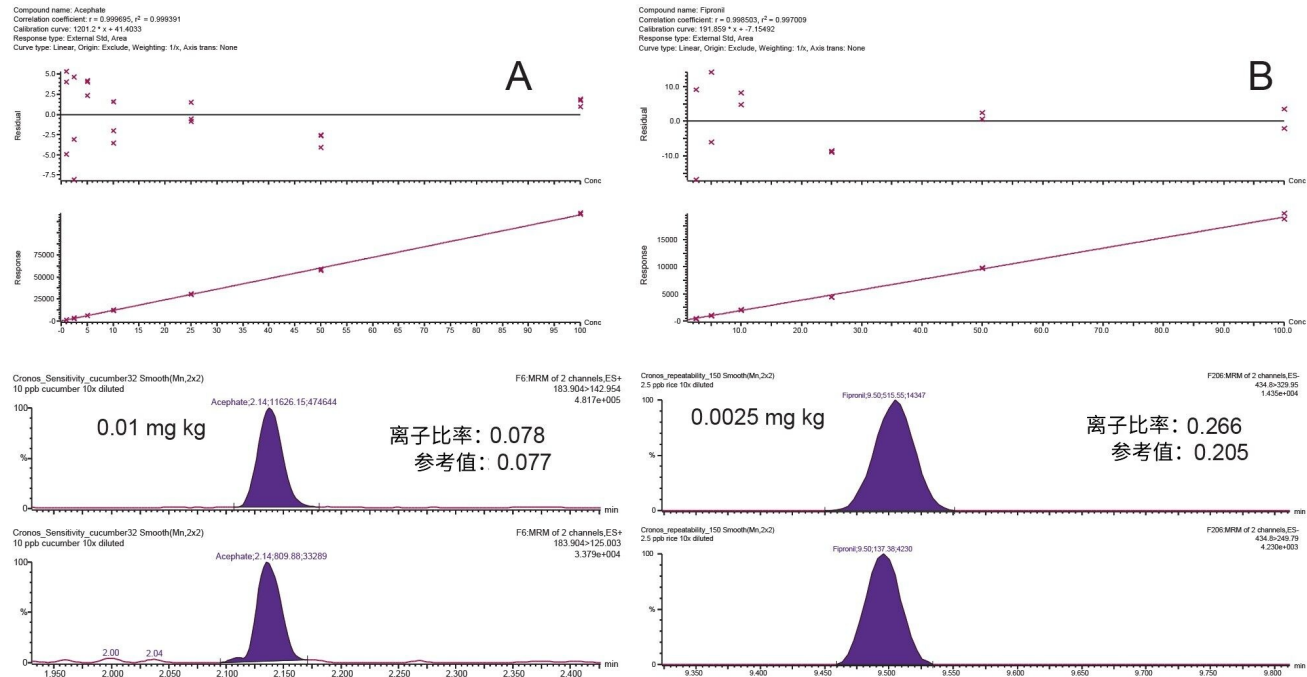


图3.提取物加标浓度为1-100 ng/mL(0.001 - 0.1 mg/kg)时的方法线性, (A)为黄瓜提取物中的ESI⁺化合物高灭磷, (B)为糙米提取物中的ESI⁻化合物氟虫腈。显示了两个离子通道的提取离子流色谱图。

方法正确度定义为使用DisQuE提取方案得到的平均回收率，我们已在之前的研究中评估了方法正确度，分析多种商品得到的结果都在可接受范围内(70%-120%)，因此本研究对此未作评估⁵。

使用日间（连续三天）重复性数据来估算黄瓜和糙米提取物中代表性分析物的LOQ。LOQ定义为相对标准偏差(RSD) ≤ 20% (n=18)的最低基质匹配标准品浓度。结果表明，所有LOQ均小于等于MRL (0.01 mg/kg)，且93%的代表性分析物的LOQ估算值对应的基质浓度仅相当于 ≤ 0.5倍默认MRL。在可能的情况下，计算了LOQ浓度下的S/N，所有分析物的S/N均>10:1。

测试实验室通常会将多残留方法中所有目标农药的报告限值(RL)都设定为0.5倍MRL。本研究观察到的灵敏度表明，该方法可以检测和定量基质中浓度等于甚至低于0.5倍MRL的多种农药。

效磷和多杀菌素A) 的定量离子通道峰面积的控制图。由图5可以看到, 峰面积在控制限值范围内 (运行平均值 ± 3 标准偏差), 而且总体%RSD ≤ 3 。

结论

本应用纪要介绍了一种农药多残留UPLC-MS/MS分析方法的性能。该方法使用ACQUITY UPLC I-Class PLUS/Xevo TQ-S cronos串联四极杆质谱仪联用系统, 从Quanpedia数据库中获取通用MS参数 (包括极性切换), 可分析属于SANTE/11813/2017定义的商品类别1和5的食品中适合使用LC分析的多种农药残留。内部验证结果表明, 该方法的性能符合关于农药官方质控和责任检测的法规指南。校准特性、线性、灵敏度和实验室内重现性结果均显示, 该分析方法适合与CEN QuEChERS相配合, 用于检测农药残留是否符合欧盟MRL要求。此外, 该系统在常规运行中展现出可靠的性能, 长时间运行分析只需极少的用户干预。

脚注

分析人员必须在其实验室内验证分析方法, 证明方法性能适合预期用途, 并且满足相关分析控制保证体系的要求。

参考资料

1. Regulation (EU) 2017/660 concerning a coordinated multiannual control programme of the Union for 2018, 2019 and 2020 to ensure compliance with maximum residue levels of pesticides and to assess the consumer exposure to pesticide residues in and on food of plant and animal origin.(2017) *Official Journal of the European Union*, L94/12–24.
2. LC多残留农药标准品套装. 沃特世维护和使用手册, 720005342ZH (2015).
3. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed.SANTE/11813/2017.2017.
4. Rapid Alert System for Food and Feed portal – Europa EU (accessed on June 20,

2019).<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/>.

5. QuEChERS website (accessed on June 20, 2019).<http://quechers.cvua-stuttgart.de/index.php?nav1o=3&nav2o=0&nav3o=0>.

特色产品

[ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/134613317>](https://www.waters.com/134613317)

[Xevo TQ-S cronos三重四极杆质谱仪 <https://www.waters.com/135027354>](https://www.waters.com/135027354)

[MassLynx MS软件 <https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)

[TargetLynx <https://www.waters.com/513791>](https://www.waters.com/513791)

720006637ZH, 2019年8月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)