

使用UPLC-MS/MS定量测定水果、蔬菜、谷类和红茶中农药的多残留分析方法

Dimple D. Shah, JodiAnn Wood, Gordon Fujimoto, Eimear McCall, Simon Hird, Peter Hancock

Waters Corporation

摘要

在本应用纪要中，我们将ACQUITY UPLC I-Class与Xevo TQ-XS联用，开发出一种UPLC-MS/MS多残留分析方法，用于测定水果、蔬菜、谷类和红茶提取物中的552种农药和相关代谢物

优势

- 将ACQUITY UPLC I-Class与Xevo TQ-XS联用，仅通过一种方法即可测定多种商品中浓度低于欧盟默认最大残留量(MRL)的552种农药
 - 在上述五种基质中，尽管对QuEChERS粗提物进行了稀释，大多数化合物仍可在低于典型的欧盟默认MRL (0.01 mg/kg)下检出
 - 使用进样器后端混合套件维持先洗脱化合物的高斯峰形
-

简介

随着人口增长，食品消费需求以及食品业的全球贸易也在不断增加。在全球范围内，日常用于农作物保护的农药高达数百种，上市商品中遗留的痕量农药称为“残留”。监管机构规定了农药最大残留量(MRL)，即，当按照良好农业规范合理使用农药时，食品和饲料内部或表面可允许存在的农残量。由于复杂基质中使用的农药种类越来越多，并且要求较低的检测限，多残留分析方法因此面临诸多挑战。

我们针对多种食品类商品开发了一种能够检测552农药和相关代谢物的多残留分析方法。通过以下几种代表性商品的提取物来评估UPLC-MS/MS方法的性能：高含水量（菠菜）、高酸和高含水量（草莓）、高油和非常低的含水量（大豆）、高蛋白和低含水量与脂肪量（小麦面粉）商品，以及难以检测的或特殊的商品（红茶）。

实验

样品前处理

选择不同商品类别的几种代表性样品：高含水量（菠菜）、高酸和高含水量（草莓）、高油和非常低的含水量（大豆）、高蛋白和低含水量与脂肪量（小麦面粉）商品，以及难以检测的或特殊的商品（红茶）。从当地零售店购买这些样品。购得样品之后立即使用料理机进行匀浆处理，然后冷冻储存以待提取。使用QuEChERS CEN方法提取样品。对于高含水量样品，如菠菜和草莓，根据欧盟参考实验室(EURL)的水果与蔬菜农药残留分析方法制备样品¹。对于中等含水量或低含水量样品，例如大豆和小麦面粉，使用EURL的谷类和饲料农药残留分析方法制备样品²。对于低水含量和高碳水化合物含量的样品，例如茶，采用QuEChERS萃取方法进行样品净化³。

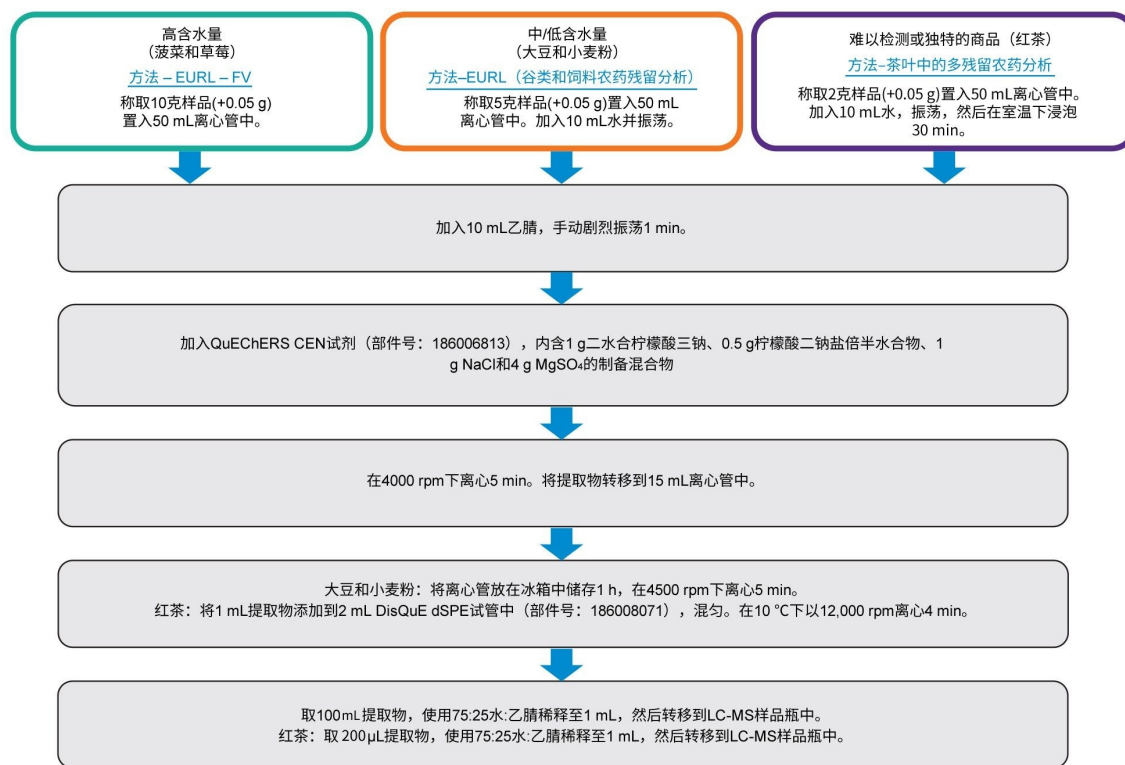


图1.草莓、菠菜、大豆、小麦面粉和红茶的样品制备方法

将256种农药混合物（详见附件）以八种浓度（0.0001至0.1 mg/kg之间）添加到菠菜、草莓、大豆、小麦面粉和红茶提取物中，评估UPLC-MS/MS方法的性能。基质匹配校准标准品的进样方式与批量样品分析类似；校准标准品包括三个基质匹配水平，每个水平重复进样(n=6)。

	样品制备过程中使用的稀释因子	样品浓度目标 (mg/kg)	样品瓶中的当量浓度(ng/mL)
草莓	10	0.01	1
菠菜	10	0.01	1
大豆	20	0.01	0.5
小麦面粉	20	0.01	0.5
红茶	25	0.01	0.4

表1. 举例说明草莓、菠菜、大豆、小麦面粉和红茶的默认MRL 0.01 mg/kg，以及QuEChERS样品制备时的稀释因子和样品瓶中的当量浓度。为便于讨论，本应用纪要中所述标准品、QC和样品的所有浓度均以mg/kg为单位。

UPLC-MS/MS条件

UPLC系统： 配备FL样品管理器的ACQUITY UPLC I-Class

色谱柱： ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱, 1.8 μm, 2.1 × 100 mm (186003539)

进样器后端混合套件： 50 μL扩充定量环 (430002012)

流动相A： 5 mM甲酸铵 + 0.1%甲酸水溶液

流动相B： 5 mM甲酸铵的50:50
乙腈:甲醇溶液+0.1%甲酸

进样体积： 5 μL (PLNO模式)

柱温： 40 °C

样品温度： 10 °C

运行时间： 19 min

数据采集和处理:	MassLynx 4.2和TargetLynx XS
MS仪器:	Xevo TQ-XS
电离模式:	电喷雾
极性:	正离子和负离子模式
毛细管电压:	+2.0/-2.0 kV
脱溶剂气温度:	300 °C
脱溶剂气流速:	1000 L/h
离子源温度:	150 °C
锥孔气流速:	150 L/h
强洗针液(SNW):	0.1%甲酸的乙腈溶液
弱洗针液(WNW):	流动相A
密封件清洗液:	10%甲醇水溶液

梯度：

时间	流速	% A	% B	曲线
初始	0.5	99.0	1.0	初始
0.5	0.5	99.0	1.0	6
3.50	0.5	60.0	40.0	6
12.50	0.5	15.0	85.0	6
12.60	0.5	1.0	99.0	6
15.00	0.5	1.0	99.0	6
15.10	0.5	99.0	1.0	6
19.00	0.5	99.0	1.0	6

使用Quanpedia数据库创建用于552种农药分析的LC-MS/MS方法。Quanpedia数据库使用一系列化合物特定MS参数（例如母子离子对、锥孔电压和碰撞能量）自动创建LC和MS采集方法以及处理方法。本研究使用的MS方法针对每种农药至少包含2个MRM母子离子对，因此一种方法至少有1000个MRM母子离子对。MS方法的Auto-Dwell功能可管理每个母子离子对的驻留时间，确保每个峰都拥有所需的数据点数量(10-14)。图2所示为在Quanpedia中创建多残留分析方法的示例。



图2.使用Quanpedia创建552种农药测定的多残留分析方法。

结果与讨论

色谱分析

本文所述的多残留方法专为分析各种具有不同化学性质的农药而开发。其中一些农药（如甲胺磷和高灭磷）的极性非常强，会在色谱图中较早出现。如果注入的样品含有中等含量(25%)的有机溶剂，先洗脱的化合物通常会出现伸舌峰和/或分叉峰。注入色谱柱之前降低样品稀释剂中的有机溶剂含量可能有助于改善先洗脱分析物的峰形。在进样器端口和色谱柱之间安装进样器后端混合套件，可将典型的QuEChERS提取物注入高含水量流动相中，不会

影响峰形。进样前，先用高含水量流动相注满扩充定量环，增加进样体积，有助于将样品扩散到水性溶剂中随后转移到色谱柱。在这种方式下，仍然可以使用中等含量的(25%)有机溶剂制备样品，大多数农药仍然可溶于样品中，同时强极性分析物仍然可以呈现良好的峰形。图3展示了使用和未使用进样器后端混合套件时甲胺磷的峰形；安装扩充定量环后获得了良好峰形，定量结果更可靠且灵敏度更高，从而达到更低的检测限(LOD)。

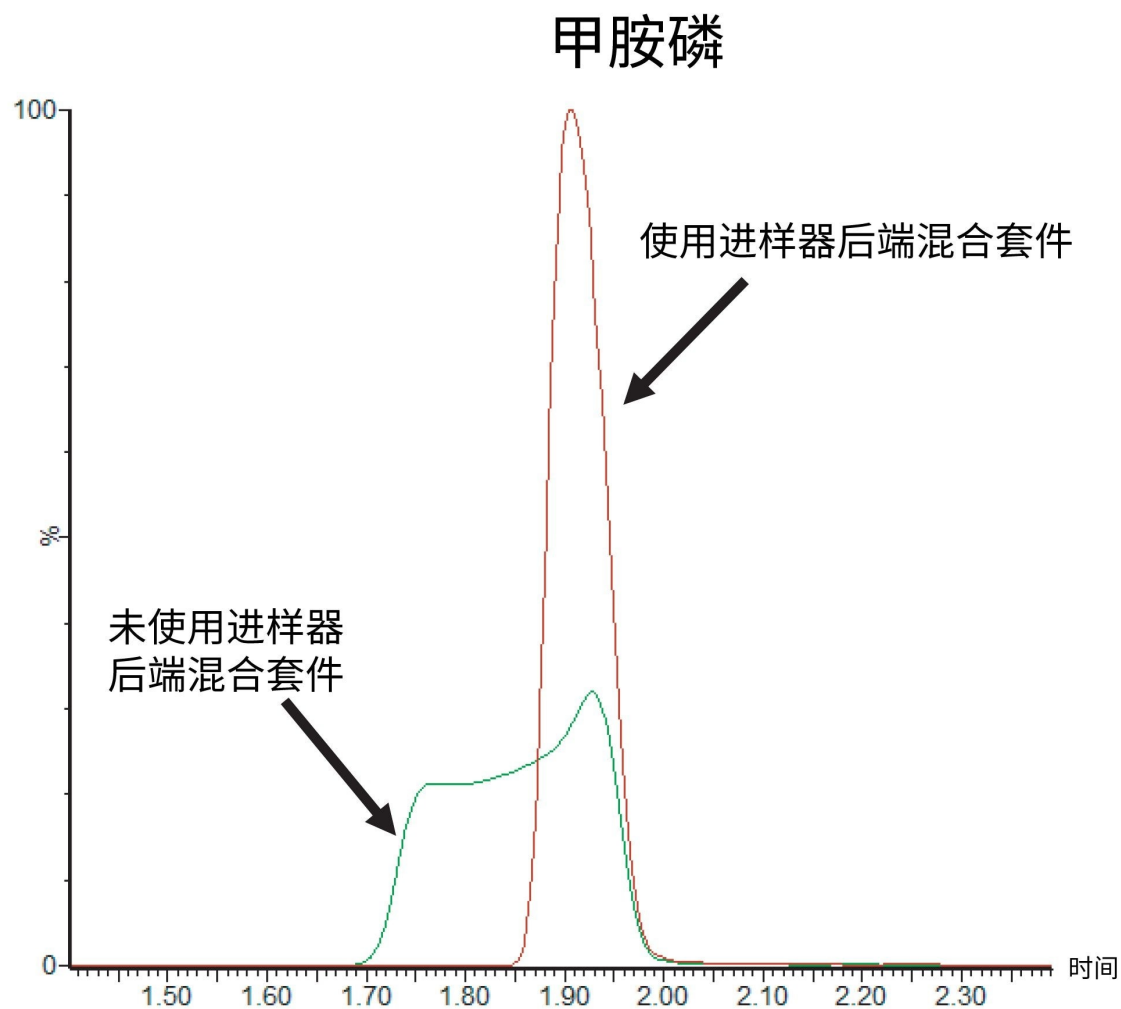


图3.使用（红色迹线）和未使用（绿色迹线）进样器后端混合套件时获得的甲胺磷色谱图

如图4所示，在所有研究的基质中，甲胺磷的保留时间约为1.9 min，基线峰宽约为7 s。甲胺磷的保留时间大于色谱柱死体积对应保留时间的两倍（死体积时间为0.46 min）。

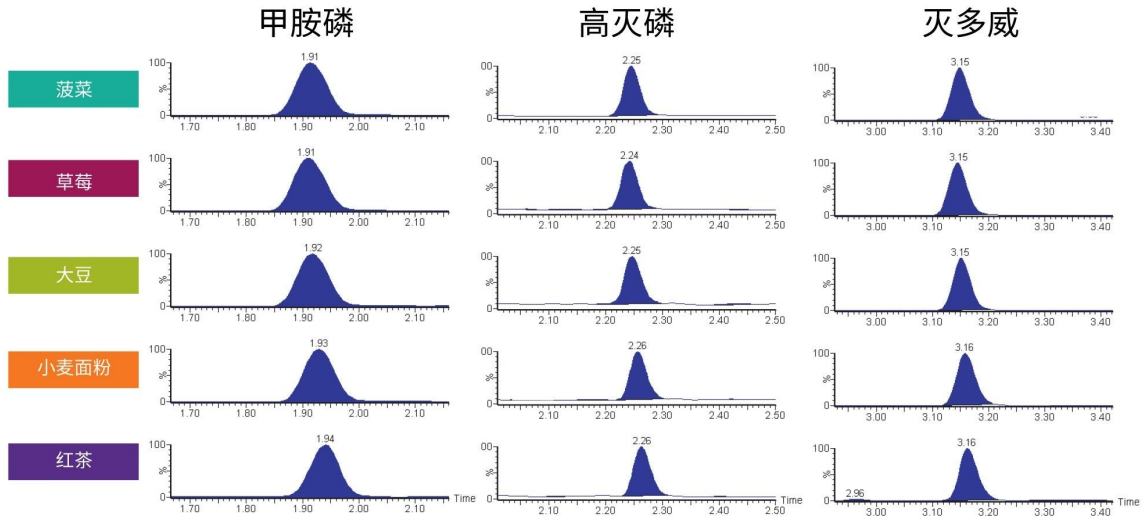


图4.使用进样器后端混合套件时，不同基质中一些强极性分析物的色谱图。

灵敏度、定量、精度和基质效应

在所有基质的256种化合物中，大多数化合物的校准曲线显示，确定系数(R^2)值大于0.99，反算浓度（残留）均在 ± 20% SANTE偏差范围内⁴。图5所示为代表性分析物甲氧隆在五种研究基质中的基质匹配校准曲线。

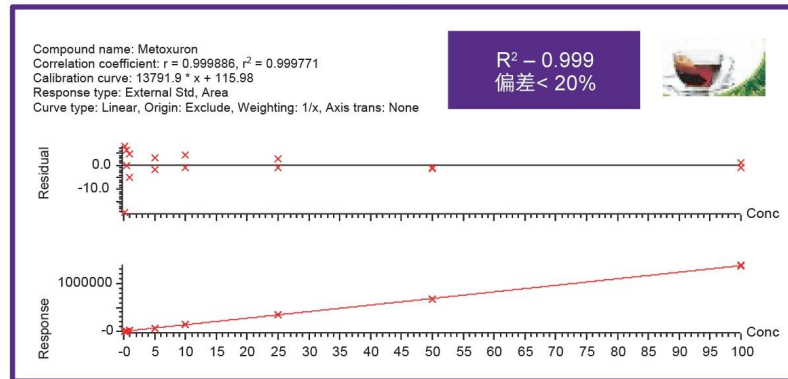
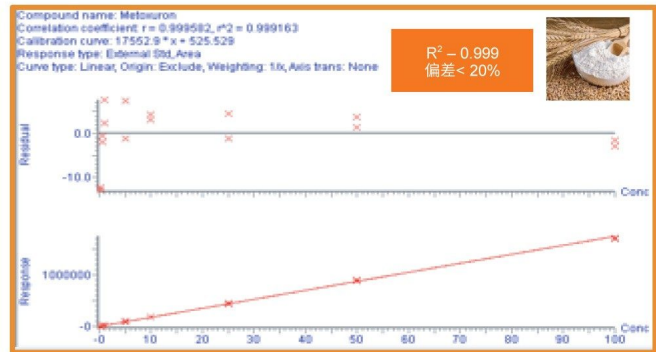
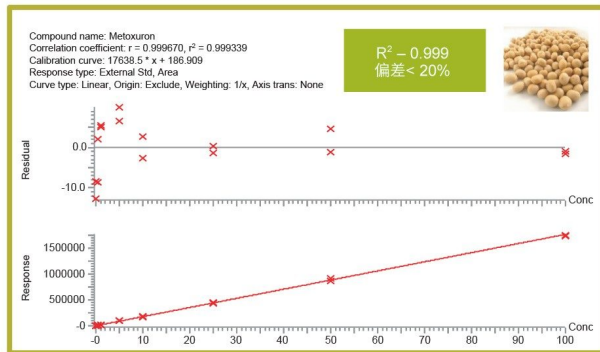
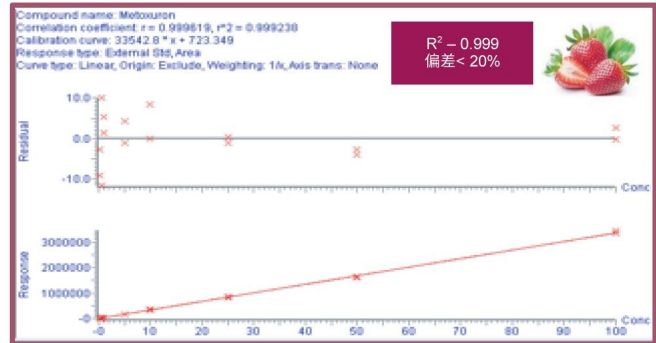
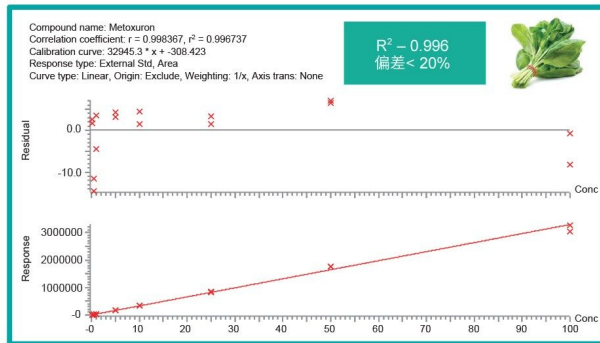


图5.菠菜、草莓、大豆、小麦面粉和红茶中甲氧隆浓度范围0.0001到0.1 mg/kg (相当于0.1到100 ng/mL) 的基质匹配校准曲线

通过重复测定(n=6)三种浓度 (0.005、0.01和0.05 mg/kg) 的基质匹配标准品, 计算出256种代表性农药的LC-MS/MS测量精度。该方法的测量精度良好, 85%以上检出农药的峰面积RSD都小于10% (见图6)。

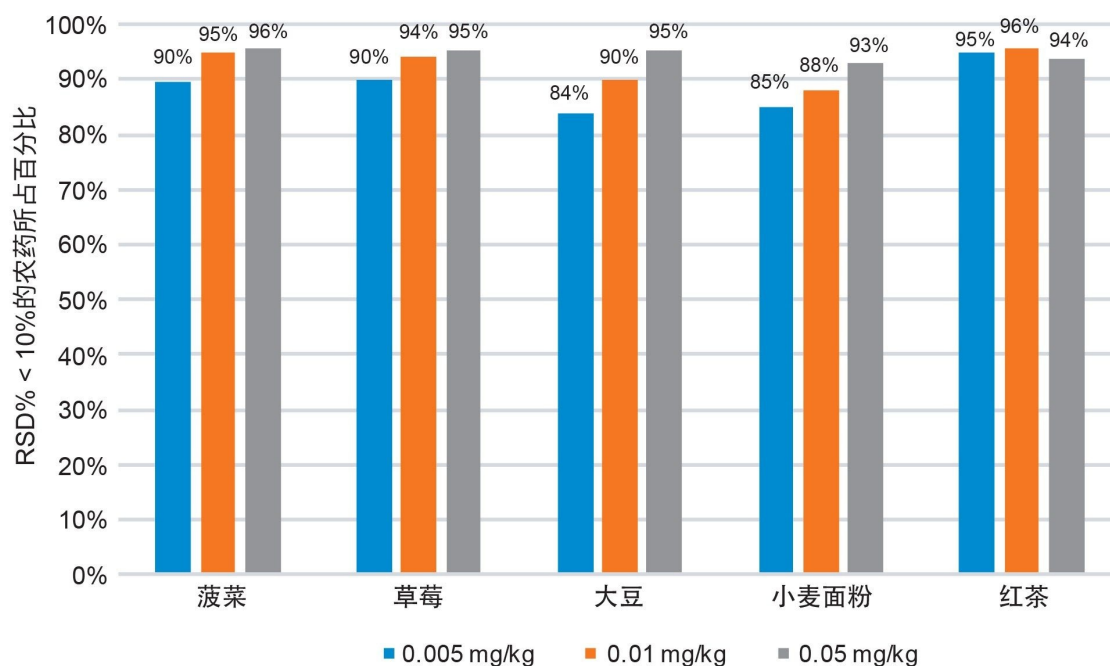


图6.0.005 mg/kg、0.01 mg/kg和0.05 mg/kg浓度下，各种基质中RSD小于10%的农药所占百分比。

通过比较每种商品的基质匹配校准曲线斜率与溶剂校准曲线斜率，计算各种基质中256种化合物的基质效应。图7汇总了每种商品中观察到的基质效应的范围。所有商品都表现出一定程度的基质抑制作用（响应抑制>20%）和基质增强作用（分析物响应增加>20%），因此建议进行基质匹配校准。也可选择程序校准或标准加入法，补偿基质效应和回收率损失。

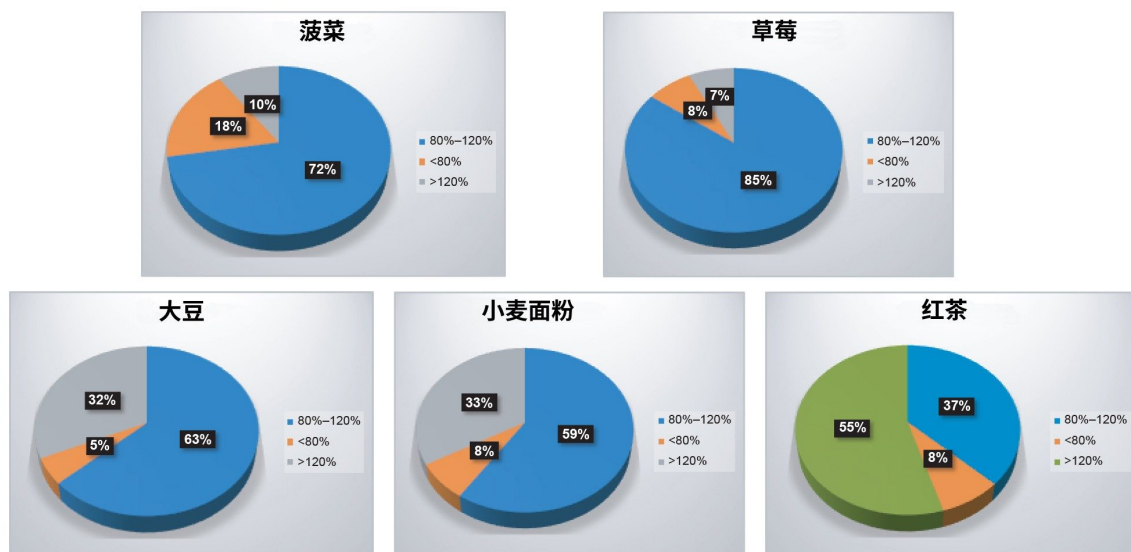


图7.对菠菜、草莓、大豆、小麦面粉和红茶表现出明显基质效应的农药所占百分比。

为了进一步研究基质效应，使用QuEChERS制备大豆样品，并对提取物进行稀释（稀释5倍和10倍）。使用粗提取物和稀释后的提取物制备0.02 mg/kg的基质匹配校准品，并进行分析。为研究共提物的影响，对552种目标化合物启用了全扫描RADAR采集方法和MRM母子离子对。图8展示了各种大豆提取物的RADAR总离子流(TIC)叠加色谱图。在粗提取物谱图（蓝色）的3.9 min处观察到一个明显的峰。根据该LC梯度，目标化合物3-羟基咪喃丹也在色谱图的3.9 min处洗脱。

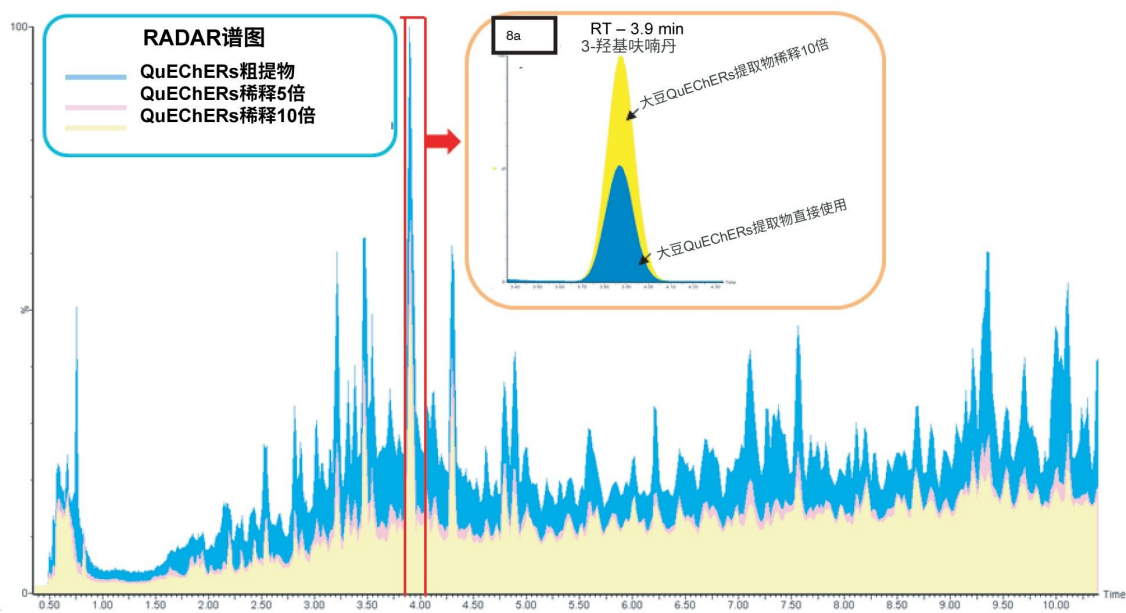


图8.大豆QuEChERS粗提取物（蓝色）、5倍稀释提取物（粉红色）和10倍稀释提取物（黄色）的RADAR谱图。图8a显示了QuEChERS粗提取物（蓝色）和10倍稀释提取物（黄色）中3-羟基苧喃丹的色谱图。

共流出基质的共提取物可能会引起离子增强/抑制作用或同量异位物质干扰。从插图8a可以看出，与大豆QuEChERS粗提取物（蓝色）相比，将QuEChERS粗提取物稀释10倍（黄色）时，3-羟基苧喃丹的峰面积几乎翻倍。这些QuEChERS粗提取物经稀释后（如图8所示）可减少基质效应，同时仍然能达到所需的LOD，而无需净化样品。稀释还可以减少共提取物进入系统的载量，延长UPLC色谱柱的使用寿命，减少仪器日常维护频率，同时提高分析效率。

鉴定标准

使用TargetLynx XS计算并标记鉴定标准、保留时间和离子丰度比。样品中检出的每种分析物的保留时间和离子丰度比应与校准标准品的保留时间和离子丰度比相符⁴。在研究的全部基质中，所有256种代表性农药的保留时间均在 ± 0.1 min的偏差范围内。对于所有256种化合物，基质匹配校准品分析的离子丰度比均在参比值的 $\pm 30\%$ 范围内。

结论

- 我们开发出一种UPLC-MS/MS多残留分析方法，可在农药残留分析中测定552种农药和相关代谢物。
- Quanpedia是一款可扩展且可搜索的数据库，可以生成色谱、MS和TargetLynx处理方法，高效测定552种农药。Quanpedia可快速简便地生成和维护方法。
- 我们评估了UPLC-MS/MS方法测定各种商品提取物中256种代表性分析物的性能。
- 进样器后端混合套件可通过可靠的方式将典型的QuEChERS提取物注入高含水量流动相中，不会影响先洗脱分析物的峰形。
- 稀释QuEChERS粗提物可减少共提物进入系统的载量，减少仪器日常维护频率。
- 在五种基质中检出的大多数基质匹配校准品化合物的浓度都低于典型欧盟默认MRL (0.01 mg/kg)。

参考资料

1. EURL-FV Multiresidue Method using QuEChERS followed by GC-QqQ/MS/MS and LC-QqQ/ MS/MS for Fruits and Vegetables.https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/fv/CRLFV_Multiresidue_methods.pdf <https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/fv/CRLFV_Multiresidue_methods.pdf>
2. EURL for cereals and feeding stuff: Determination of pesticide residues in wheat, rye, oat and rice by LC-MS/MS and GC-MS/MS (QuEChERS method).[https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/\(23B\)%20Appendix7_2017_dec_Validation%20report%2023B%20samstik%20H_cereals.pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/(23B)%20Appendix7_2017_dec_Validation%20report%2023B%20samstik%20H_cereals.pdf) <[https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/\(23B\)%20Appendix7_2017_dec_Validation%20report%2023B%20samstik%20H_cereals.pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/(23B)%20Appendix7_2017_dec_Validation%20report%2023B%20samstik%20H_cereals.pdf)>
3. Multi-Residue Pesticide Analysis in Tea: Optimized Cleanup After QuEChERS Extraction for UPLC-MS/MS and GC-MS/MS Analysis.https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134775094&locale=en_US <https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134775094&locale=en_US>
4. SANTE/12682/2019: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2019-12682.pdf <

https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2019-12682.pdf>

附录

2,4-D	环唑醇I
阿维菌素B1b	环唑醇II
高灭磷	啞菌环胺
啶虫脒	灭蝇胺
苯并噻二唑	甲基内吸磷
甲草胺	砒吸磷
涕灭威	亚砒吸磷 (亚砒磷)
涕灭威砒	甜菜安
涕灭威亚砒	丁醚脲
啞啞菌胺	滴丙酸
啞啞磺隆	苜氯三唑醇
黄草灵	乙霉威
甲基谷硫磷	苯醚甲环唑
阿特拉津	伏虫脲
啞菌酯	乐果
恶虫威	E-烯酰吗啉
苯噻菌胺	Z-烯酰吗啉
双草醚	二甲氨基磺胺酸(DMSA)
联苯三唑醇	醚菌胺
啞啞菌胺	烯唑醇
溴苯腈	呋虫胺
糠菌唑I	乙拌磷
糠菌唑II	乙拌磷砒
丁草胺	乙拌磷亚砒
丁酮威	敌草隆
丁酮威亚砒	多果定
丁酮砒威	甲维盐B1a
西维因	甲维盐B1b
长杀草	氟环唑
克百威	乙硫苯威
3-羟基吡喃丹	乙硫苯威砒
萎锈灵	乙硫苯威亚砒
氯虫苯甲酰胺	乙菌定
毒虫畏	醚菊酯
氯草敏	乙螨唑
绿麦隆	咪唑菌酮
环虫酰肼	苯线磷
烯草酮	苯胺磷砒
四螨嗪	苯胺磷亚砒
噻虫胺	氯苯啞啞醇
氟霜唑	苯丁锡
噻草酮	腈苯唑
环氟菌胺	环啞菌胺
霜脲氟	苯氧威

丁苯吗啉
唑磷酯
丰索磷
氧丰索磷
氧丰索磷砒
丰索磷砒
倍硫磷
倍硫磷砒
倍硫磷亚砒
氟虫腈
氟啶虫酰胺
稳杀得
精稳杀得
氟啶胺
氟虫双酰胺
咯菌腈
氟噻草胺
氟虫脲
伏草隆
氟吡密胺
氟啉菌酯
氟啶唑
氟硅唑
粉唑醇
氟唑菌酰胺
地虫磷
盐酸杀螨脒
噻唑磷
吡啶威
茂谷乐
氯虫酰胺
氯吡啶砒
吡氟氯禾灵（自由酸）
庚烯磷
己唑醇
噻嗪酮
抑霉唑
吡虫啉
茚虫威
碘苯腈
啶霉威
氯唑磷
水胺硫磷
异柳磷
甲基异柳磷
异丙威

稻瘟灵
异丙隆
异恶草胺
异恶唑草酮
醚菌酯
环草定
利谷隆
氯酚双隆
马拉硫磷
双炔酰菌胺
灭蚜磷
噁菌胺
甲基二磺隆
灭锈胺
氟氟虫脒
甲霜灵
灭它通
叶菌唑
噻唑隆
甲胺磷
甲硫威
甲硫威砒
甲硫威亚砒
灭多威
甲氧虫酰胺
秀谷隆
异丙甲草胺
速灭威
磺草唑胺
甲氧隆
苯菌酮
甲磺隆
速灭磷I
禾草敌
速灭磷II
久效磷
灭草隆
腈菌唑
单甲脒
新苦楝素
烯啶虫胺
氟苯啶啉醇
甲呋酰胺
氧化乐果
恶霜灵
草氨酰

多效唑
戊菌唑
戊菌隆
甜菜宁
稻丰散
甲拌磷
甲拌磷砷
甲拌磷亚砷
磷胺
膈胍磷
氟吡酰草胺
啶氧菌酯
增效醚
抗蚜威
脱甲基抗蚜威
咪鲜胺
丙溴磷
猛杀威
扑草净
霜霉威（自由碱）
恶草酸
丙环唑
戊炔草胺
残杀威
氟磺隆
脱硫丙硫菌唑
吡蚜酮
吡菌胺酯
除虫菊酯I
除虫菊酯II
啉霉胺
吡丙醚
苦木素
氯甲喹啉酸
喹氧灵
玉啉磺隆
鱼藤酮
多杀菌素A

多杀菌素D
螺甲螨酯
螺虫乙酯
螺虫乙酯BYI08330烯醇糖苷
螺虫乙酯BYI08330醇酮
螺虫乙酯BYI08330羟基
螺虫乙酯BYI08330烯醇
螺环菌胺
磺草酮
戊唑醇
虫酰肼
吡螨胺
丁噻隆
氟苯脲
特丁磷
特丁磷砷
特丁磷亚砷
氟醚唑
噻菌灵
噻虫啉
噻虫嗪
硫双威
甲基托布津
唑虫酰胺
三氯吡氧乙酸
三唑酮
三唑醇
醚苯磺隆
唑蚜威酸
三唑磷
三环唑
肟菌酯
氟菌唑
杀虫隆
噻氮灵I
噻氮灵II
灭菌唑
苯酰菌胺

特色产品

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

[Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <https://www.waters.com/134889751>](https://www.waters.com/134889751)

[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)

720006886ZH, 2021年2月修订

© 2022 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