

应用通讯

No. C154

液相色谱质谱法

应用“多反应监测谱模式”和谱库检索功能提高常规农药残留分析报告精准度

David R. Baker¹、Chris Titman¹、Jonathan Horner²、Neil Loftus¹, ¹ 岛津公司, 英国; ²Scientific Analysis Laboratories, 英国

■ 摘要

为帮助降低农药残留监测中假阳性和假阴性报告的发生率, 本研究通过增加常规多反应监测 (MRM) 方法中所监测碎片离子对数量, 提高分析方法的准确度和报告精准度。与传统方法仅监测 2-3 个 MRM 碎片离子不同, 本研究采用的分析流程对各目标农药分子的 6-10 个碎片离子对进行监测。通过对更多数量的碎片离子对进行采集, 获得各目标农药分子相应的裂解谱。该裂解谱可用于常规谱库检索, 通过采用其与标准谱库比对的匹配得分可进行化合物确认。应用“MRM 模式”监测 1291 个 MRM 离子对以对 193 种农药进行鉴别和定量分析, 同时不影响检测限、线性和重复性。

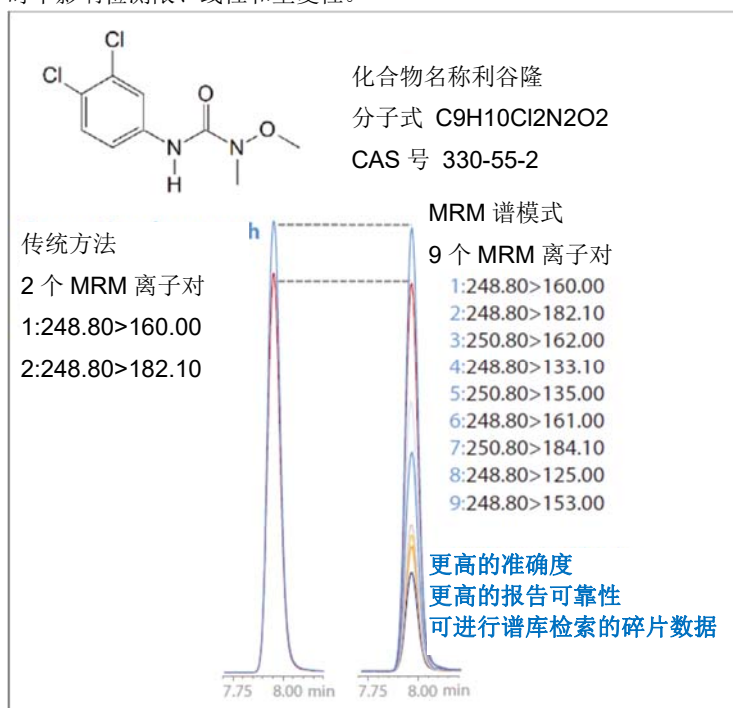


图 1 采集更多数量碎片离子的 MRM 数据提高检测准确度, 并降低假阴性和假阳性报告发生率。本例中, 对利谷隆进行 9 个前体离子-碎片离子对监测, 提高含量测定准确度, 从而提高报告精准度。尽管该方法所监测碎片离子数量增加, 但相较于传统方法, 数据质量并未降低。两种方法所得信号强度、线性和重现性均具有良好的一致性。

■ 前言

基于 LC-MS/MS 技术的多反应监测 (MRM) 具备高选择性、灵敏度和良好耐用性, 因此被广泛用于三重四极杆系统对目标化合物进行定量分析。在食品安全等监管领域中, 越来越需要通过增加单次分析测定的农药数量以加强日常监管能力, 同时尽可能提高化合物鉴别精准度以降低错误检测报告发生率。欧盟农药分析鉴别标准 SANTE/11945/2015 要求至少 2 个 MRM 离子对的保留时间和离子比在可接受容许限度内。^{*1} 然而, 即使执行该标准, 仍有大量报道表明某些农药或农产品分析中会出现假阳性结果。^{*2-4}

为降低假阴性和假阳性报告的发生率, 本研究通过增加各目标农药分子的 MRM 离子对数量, 提高含量测定准确度, 从而提高报告精准度。根据各目标农药分子的化学结构, 对每一化合物的 6-10 个碎片离子进行碎片离子对监测。MRM 模式将传统 MRM 定量方法与高质量 MRM 产物离子谱相结合, 可用于常规谱库检索以及化合物的确认和鉴别。

本应用文章中, 我们将介绍一种通过监测 1291 个 MRM 离子对分析 193 种农药的方法, 其循环时间为 15 分钟。为在如此短的运行时间内采集数量如此庞大的 MRM 离子对数据, 每一 MRM 离子对的驻留时间设为 3 毫秒, 正负极性切换时间为 5 毫秒。平均每一化合物的 MRM 离子对数量为 7。使用岛津农药残留分析方法包快速建立方法。此方法包为含有 750 多种农药和 6000 多个离子对信息的数据库, 专用于缩短方法建立所需时间及帮助化合物确认。为评估增加额外 MRM 离子对数量对数据质量的影响, 本研究还将 MRM 模式与每一化合物仅有 2 个 MRM 离子对 (总共 386 个 MRM 离子对) 的传统农药监测方法进行比较。对数种不同食品进行了分析, 其样品复杂程度各异 (姜黄、李子、薄荷、欧洲防风草、樱桃、青柠、南瓜、番茄、土豆)。使用具备目标 MRM 自动谱库检索功能的 LabSolutions Insight 软件对数据进行处理。

■ 实验部分

农药加标样品由英国 Scientific Analysis Laboratories 提供, 采用基于的 QuEChERS 方法提取。为检验 MRM 模式的分析性能, 对若干基质样品进行了数据库和谱库检索, 包括姜黄、李子、薄荷、欧洲防风草、樱桃、青柠、南瓜、番茄、土豆。最终提取物溶解于乙腈, 未经稀释直接注入 LC-MS/MS 系统进行分析。除使用亚 2 微米粒径的色谱柱外, 还使用自动进样器进行水共同进样, 以改善较早洗脱组分的峰形 (表 1)。

在 0.01 至 0.2 mg/kg 范围内建立校准曲线。采用加标 0.1 mg/kg 农药的鳄梨基质考察分析方法的重复性。采用 ESI +/- 电离模式, 正负极性切换时间设为 5 毫秒, 对最终方法样品进行分析。

平均每一化合物的 MRM 离子对数量为 7, 34 个化合物 MRM 离子对数量大于 10。通过 MRM 窗采集所有 MRM 离子对数据, 无需设置扫描触发阈值。该方法包含 193 种农药的共计 1291 个 MRM 离子对, 运行时间仅为 15 min。每一 MRM 离子对的驻留时间为 3 毫秒。为评估 MRM 模式方法的数据质量, 采用相同的采集方法建立每一化合物监测 2 个 MRM 离子对 (总共 386 个 MRM 离子对) 的相应方法 (表 2)。

采用 LabSolutions 软件自动优化所有农药分子裂解参数, 并生成 MRM 模式方法。采用岛津农药残留数据库可轻松、快速建立用于谱库检索和化合物确认的 MRM 模式方法。该数据库包含 750 多种农药的 6000 多个 MRM 离子对信息。

使用 LabSolutions Insight v3.0 软件审查定量数据, 并且通过 MRM 模式谱库检索功能和软件的高级筛选工具可对异常结果进行审查, 从而降低错误检测报告发生率。

表 1 液相采集参数

液相色谱法	
超高效液相色谱分析色谱柱	Nexera 液相色谱系统 HSS T3 (100 x 2.1, 1.7 μm)
柱温	40 °C
流速	0.4 mL/分钟
溶剂 A	5 mmol/L 甲酸铵和 0.004 % 甲酸的水溶液
溶剂 B	5 mmol/L 甲酸铵和 0.004 % 甲酸的甲醇溶液
二元梯度洗脱	时间 (分钟) %B
	1.50 35
	11.50 100
	13.00 100
	13.01 3
	15.00 停止
进样体积	0.1 μL (加 30 μL 水)

表 2 MRM 模式中采用 MS/MS 方法获取数据, 传统 MRM 方法每一化合物仅监测 2 个 MRM 离子对。在此对比研究中, 两种方法采用相同液相条件。

LC-MS/MS 质谱法	MRM 模式: 生成可进行谱库检索的谱	2 MRM 方法
目标化合物数量	193	193
MRM 离子对总数	1291 个离子对 (1229 个 ESI+, 62 个 ESI-)	386 个离子对 (374 个 ESI+, 12 个 ESI-)
延迟时间	1 毫秒/3 毫秒	1 毫秒/3 毫秒
延迟时间/驻留时间		
电离模式	ESI +/-	ESI +/-
正负极性切换时间	5 毫秒	5 毫秒
接口	350 °C	350 °C
温度		
加热模块温度	300 °C	300 °C
DL 温度	150 °C	150 °C
雾化气流速	3 L/分钟	3 L/分钟
加热气流速	10 L/分钟	10 L/分钟
干燥气流速	10 L/分钟	10 L/分钟

■ 结果和讨论

本研究在化学污染监测项目中, 开发出专用于一系列已知分析物的快速、高成本效益分析方法, 并且不会产生假阴性或假阳性结果。欧盟 SANTE/11945/2015 指令中已公布化合物鉴别指南。该鉴别标准要求至少 2 个 MRM 离子对的保留时间和离子比在规定的容许限度内。

为减低农药监测中错误检测报告发生率, 本研究开发出一种 MRM 方法, 通过增加各目标农药分子的 MRM 离子对数量, 提高含量测定准确度, 从而提高报告精准度。通过将某化合物的多个 MRM 离子对与产物离子谱结合, 并与 MS/MS 标准谱库比对确认, 可对农药鉴别进行确认。采用 MRM 模式可显著降低错误检测报告发生率, 且不会影响最优定量和鉴别分析所需数据质量。

图 2 显示采用 MRM 模式测定所得加入 193 种农药的样品 MRM 色谱图, 加标浓度为均 0.010mg/kg。采用该模式测定 193 种农药分子的 1291 个离子对。尽管采用 MRM 模式采集的数据密度极高 (如图 3 所示, 分析中同一时间窗内记录 151 个 MRM 离子对数据), 但高数据采集速率并未影响灵敏度。

■ 方法性能

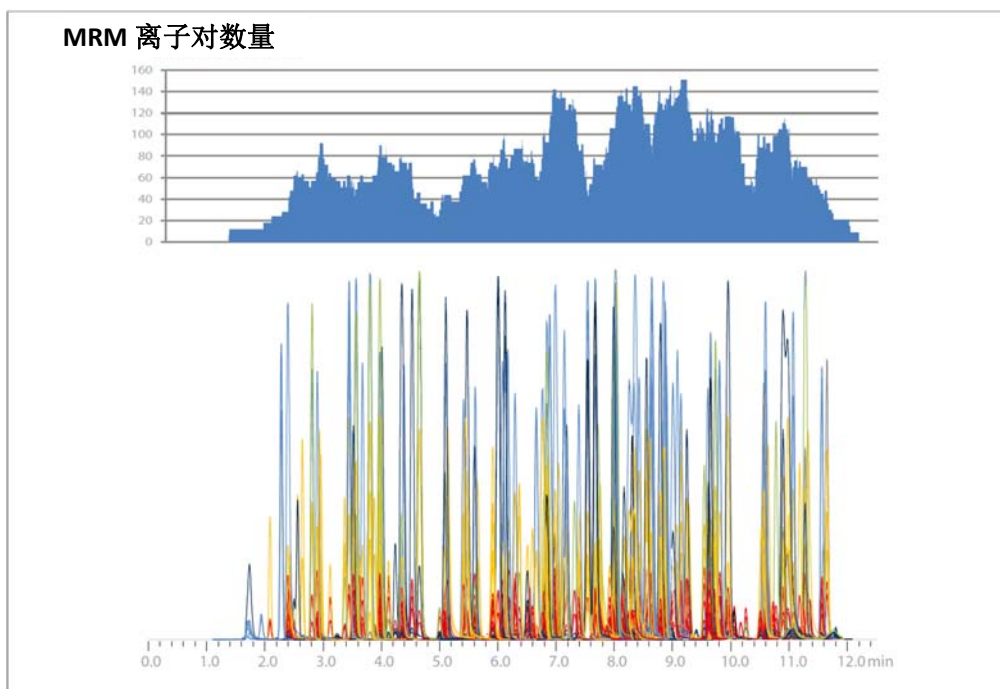


图 2 柱状图显示每一时间点下所监测的 MRM 离子对数量，色谱图显示所有 193 个目标化合物的色谱图。采集得到时间重叠的 MRM 离子对数量最高达 151。即使在如此高的采样频率下，其响应仍与传统 2 个/化合物 MRM 方法一致，峰面积变化低于 5.2% (n=5)。下文图 3 中显示具体数据。

表 3 在 8.80 分钟到 9.30 分钟内，同时监测到 151 个 MRM 正负离子对数据。此时间段内洗脱出的 22 个化合物峰面积的重现性如下所示。

	保留时间	MRM 离子对数量	极性	峰面积 %RSD (n=5)
苯氟磺胺	8.80	6	ESI+	2.2
苯磺磺胺 2	8.80	6	ESI+	3.4
苯磺磺胺 1	8.80	5	ESI+	2.6
氟嘧菌酯	8.82	12	ESI+	2.0
环酰菌胺	8.83	11	ESI+	2.2
丙森锌	8.88	6	ESI+	2.3
螺虫乙酯	8.89	6	ESI+	2.6
乙基谷硫磷	8.90	5	ESI+	3.1
环虫酰肼	8.91	5	ESI+	3.2
灭菌唑	8.93	5	ESI+	2.1
氰霜唑	9.01	5	ESI+	2.1
脱硫丙硫菌唑	9.07	10	ESI+	1.9
二氟脲	9.09	4	ESI+	2.0
啶斑肟	9.11	8	ESI+	2.0
十二环吗啉	9.17	6	ESI+	2.1
苯氧威	9.17	6	ESI+	2.0
鱼藤酮	9.17	6	ESI+	2.4
氟虫腈	9.20	10	ESI-	5.2
联苯吡菌胺	9.25	8	ESI-	2.8
虫酰肼	9.27	6	ESI+	3.9
地散磷	9.27	6	ESI+	2.6
草不隆	9.30	9	ESI+	1.7
		合计		平均
		MRM 离子对数量:		2.6 %
		151		RSD

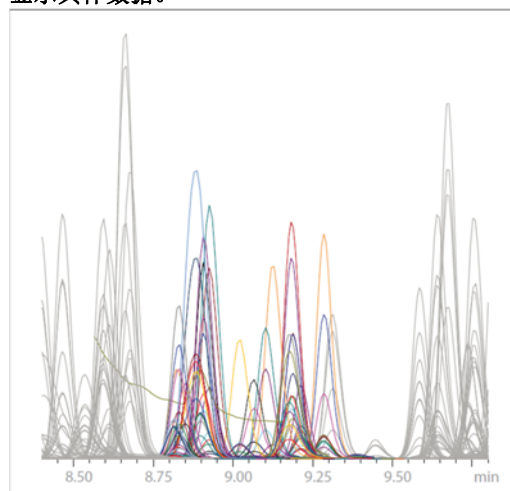


图 3 在 8.80 分钟到 9.30 分钟内，同时监测到 151 个 MRM 正负离子对数据。此时间段内洗脱出的 22 个目标农药峰面积 %RSD 均小于 5.2%。对加标 0.1mg/kg 农药的鳄梨样品基质进行数据采集。

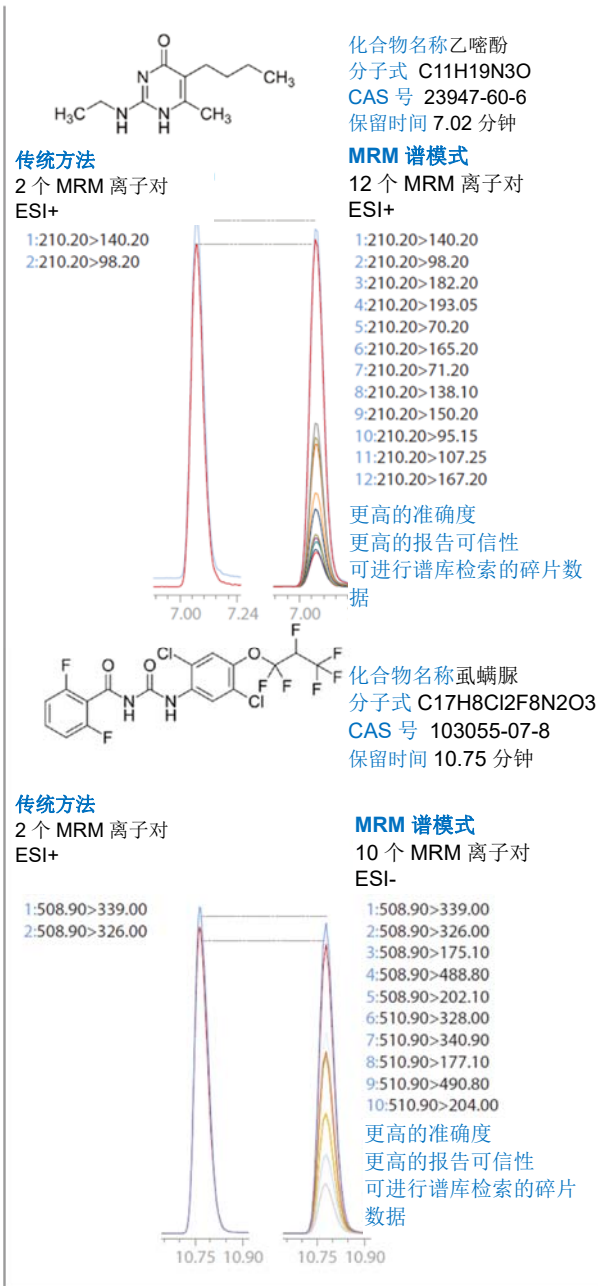


图 4 分别采用仅监测 2 个碎片离子的传统 MRM 方法和监测更多数量前体离子-碎片离子对的 MRM 方法所得的乙嘧酚（正离子）和虱螨脲（负离子）MRM 色谱图的比较。后

一方法可以提高含量测定准确度和报告精准度。

尽管可进行谱库检索的 MRM 方法采集更多数量 MRM 离子对数据（一个方法采集 1291 个离子对数据），其信号强度和仅监测 2 个碎片离子的传统 MRM 方法相同（一个方法采集 386 个离子对数据）。分别采用 2 种 MRM 方法重复进样 5 次加标 0.1 mg/kg 农药的鳄梨提取物以评价各方法下峰面积重现性。2 种 MRM 方法所得的两个化合物的峰面积 %RSD 均小于 3.5%。

为最大程度地降低假阳性和假阴性报告发生率，开发出对每一种农药监测更多数量 MRM 离子对的 LC-MS/MS 方法。将该方法性能与每种农药仅监测 2 个离子对的传统 MRM 方法进行比较。

图 4 中显示使用不同 MRM 方法采集所得相同样品基质中乙嘧酚和虱螨脲 2 个化合物的 MRM 色谱图（鳄梨基质中加标 0.1 mg/kg 农药）。MRM 色谱图显示的是未经平滑处理的数据，各化合物信号强度缩放显示相同。乙嘧酚和虱螨脲分别于 7.02 分钟和 10.75 分钟洗脱，这两个时间点对应数据密度极高的时间窗，此同一时间段内监测到 100 多个 MRM 离子对数据。尽管监测到的碎片离子数量较多，但在正离子和负离子两种模式下，绝对信号强度几乎完全相同。

图 5 显示采用两种不同 MRM 方法所得的各农药分子峰面积相关性线性回归曲线显示，加至样品基质中的各农药采用两种 MRM 方法所得的峰面积均具有良好的一致性。线性回归曲线斜率接近 1，截距接近 0。

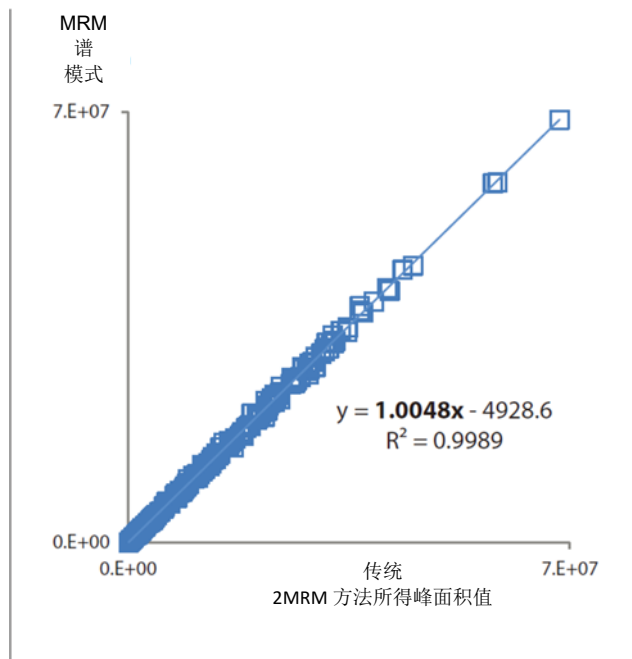


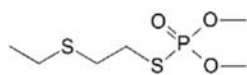
图 5 分别采用监测 386 个离子对的传统 MRM 方法和监测 1291 个离子对的 MRM 方法所得的所有 193 种农药绝对峰面积的比较。后一方法专用于可进行库检索的化合物确认。虽然两种方法用于确认和鉴别各农药的碎片离子数量不同，但是所得峰面积几乎完全相同。

应用 No. C154

通讯

■ 基于 MRM 的数据分析

本研究中，增加了各农药分子的定性碎片离子数量，并将离子对数据合并用于创建 MRM 产物离子谱。该产物离子谱由 MRM 模式采集所得，用于进行传统谱库匹配，与标准谱比较，生成相似度得分。



化合物名称 磷吸磷
分子式 C₆H₁₅O₃PS₂
CAS 号 919-86-8
保留时间 2.94 分钟

MRM 谱
前体离子-碎片离子

11 MRM's
1:263.00>109.10 CE: -30V
2:263.00>169.10 CE: -22V
3:263.00>125.05 CE: -25V
4:263.00>121.15 CE: -16V
5:263.00>230.90 CE: -14V
6:263.00>93.10 CE: -21V
7:263.00>78.85 CE: -46V
8:263.00>143.15 CE: -16V
9:263.00>110.85 CE: -29V
10:263.00>77.05 CE: -30V
11:263.00>65.00 CE: -51V

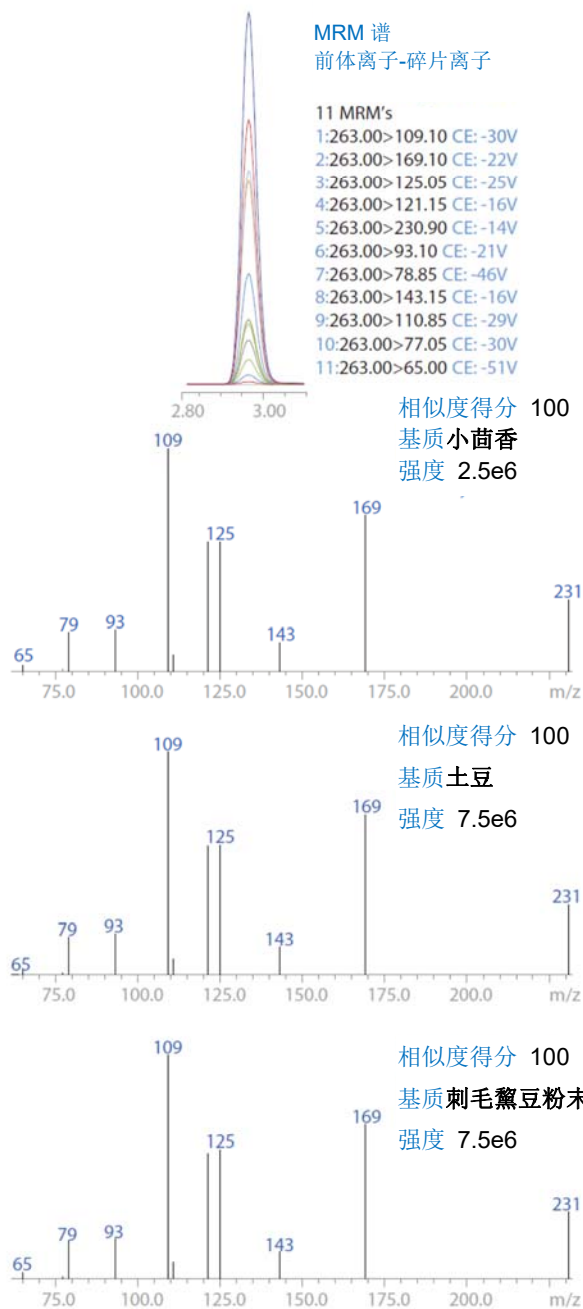


图 6 显示不同基质中磷吸磷的谱库匹配结果，这些基质包括小茴香、土豆、刺毛藜豆粉末、番茄、黑胡椒、薄荷茶和姜黄。即使在复杂的香料基质中，通过谱库匹配方法依然可以以较高的相似度得分和较高的数据报告精准度鉴别出磷吸磷。

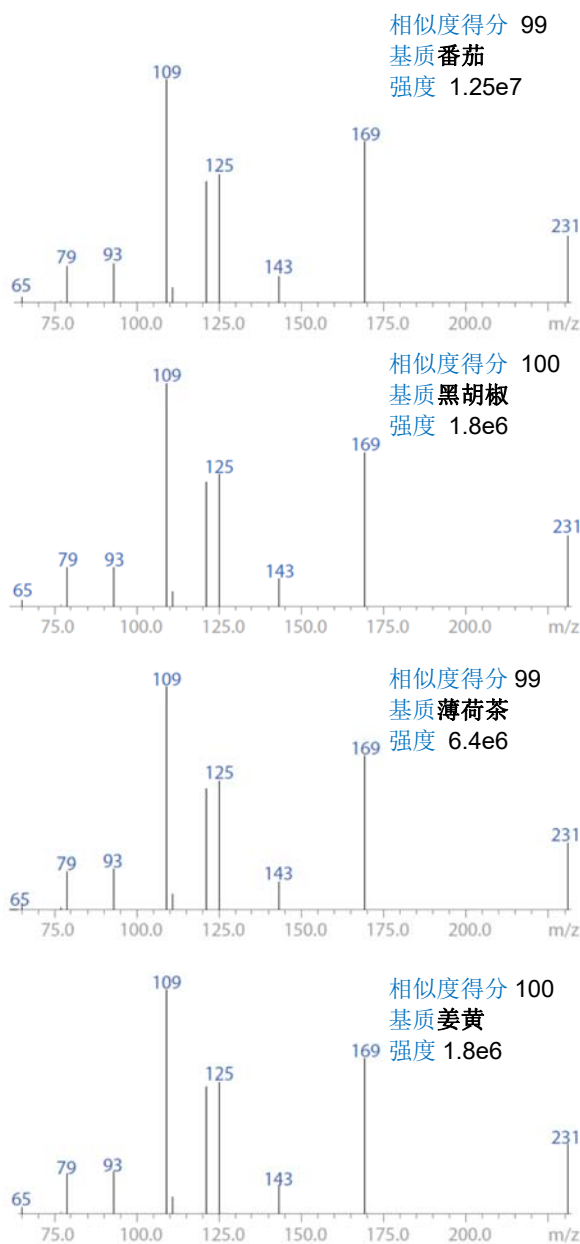


图 6 不同基质中的磷吸磷 MRM 分析

应用 No. C154

通讯

■ 基于 MRM 的数据分析

为提高报告结果的精准度，增加了各农药分子的定性碎片离子数量，并将 MRM 离子对数据合并用于创建产物离子谱。通过传统谱库匹配，该 MRM 产物离子图谱可自动与标准谱比较，生成产物离子谱匹配得分。

图 7 显示可进行谱库检索的碎片离子谱在甜菜安和甜菜宁的鉴别和定量分析中的优势。甜菜安和甜菜宁具有数个共同的碎片离子，且保留时间相近。采用 MRM 模式并与可进行谱库检索的谱比较，可明确进行鉴别甜菜安和甜菜宁（甜菜宁的产物离子谱中未出现 m/z 154 和 m/z 182 的碎片离子）。

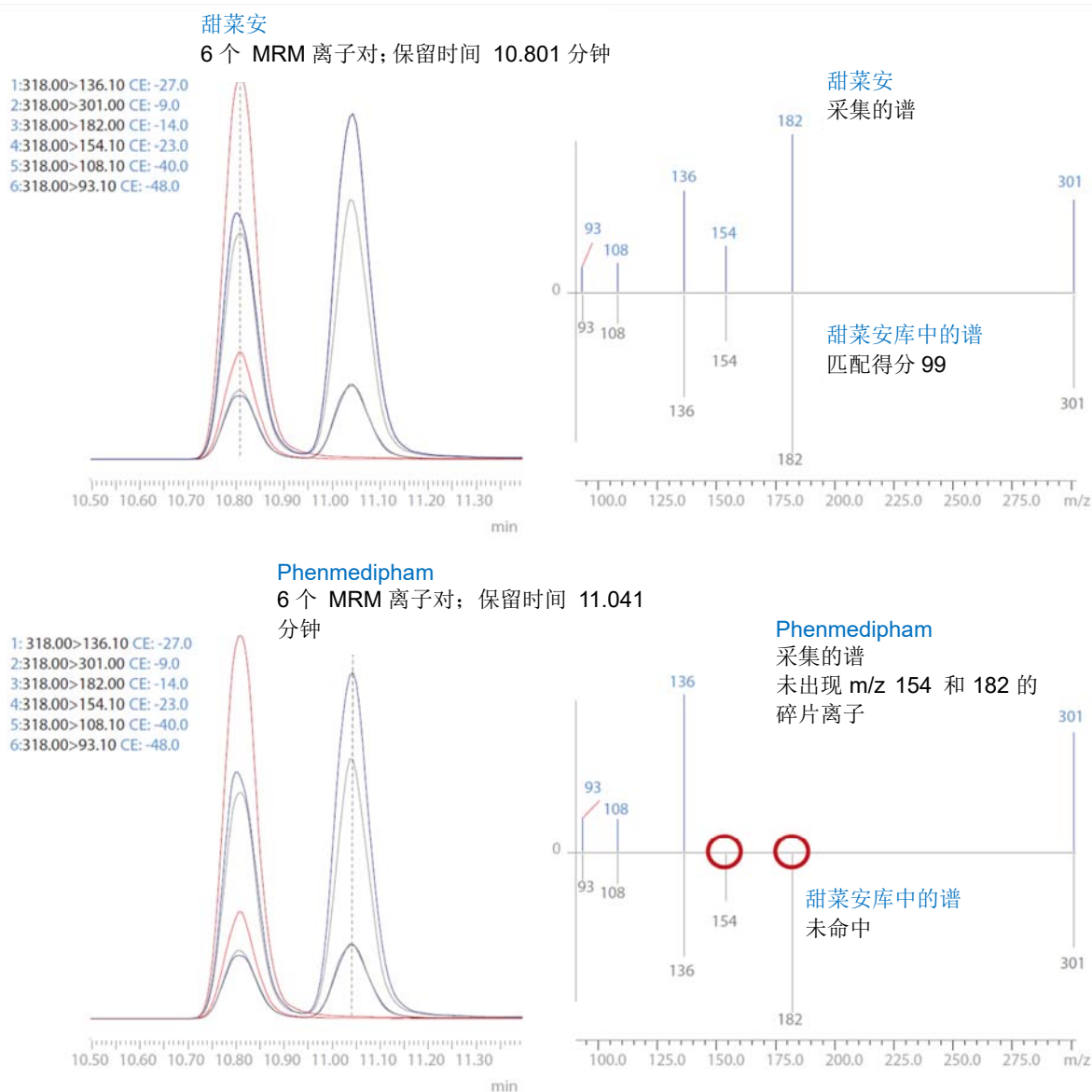


图 7 分别加标 0.1 mg/kg 甜菜安和甜菜宁的小茴香提取物的 MRM 色谱图。由于甜菜安和甜菜宁具有共同离子对，且以相近保留时间洗脱，因此 MRM 数据可用于两者的辨别，避免出现假阳性报告。

■ 定量测定

举一例进行说明，将多菌灵以三种不同浓度水平加入基质。如图 8 所示，即使在 0.010 mg/kg 的报告水平时，仍可检测到所有 MRM 离子对，且所有碎片离子对色谱峰的信噪比均大于 9。如图 9 所示，校准范围 (0.010- 0.200mg/kg) 内，所有离子对的响应强度均与其浓度成线性相关。

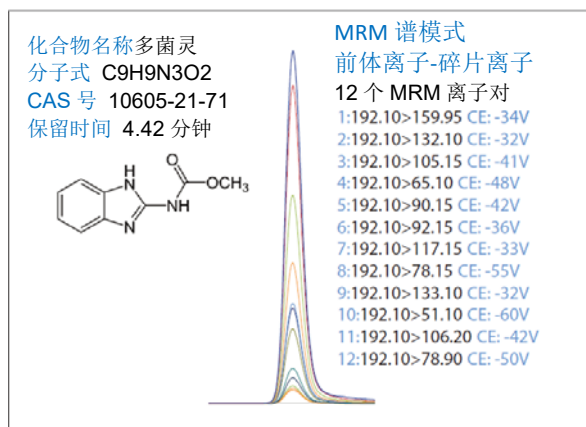


图 8 多菌灵在一系列不同大小的碰撞能量下生成 12 个前体离子-碎片离子对。选择 MRM 192.10>159.95 离子对进行灵敏度高、耐用性良好的定量分析，同时将包含 12 个碎片离子信息的产物离子谱用于峰鉴别的确认。

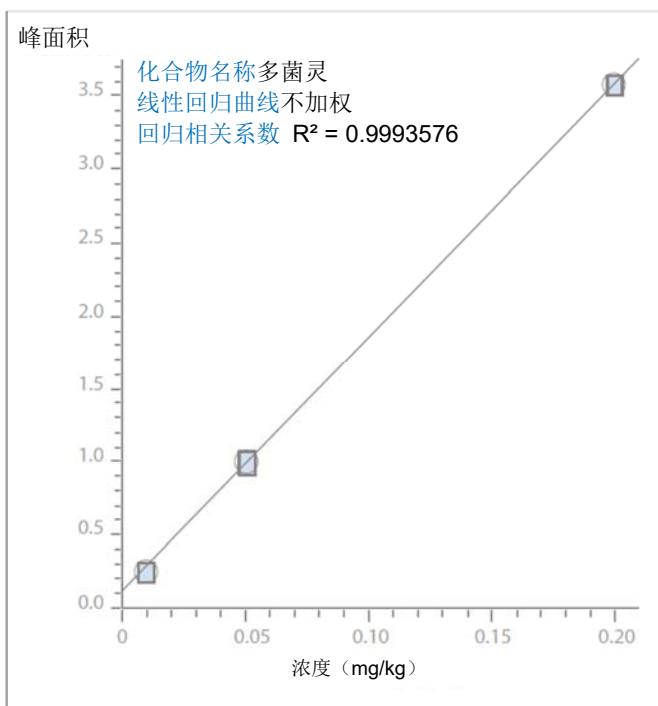


图 9 采用最优定量离子对 (MRM 192.10>159.95) 绘制的多菌灵的校准曲线。校准曲线所有浓度水平样品和质控样品的响应均与其浓度呈线性相关。即使在 0.010 mg/kg 的报告水平时，12 个碎片离子的信噪比均大于 10。

用于生成产物离子谱的 MRM 离子对数量多少取决于目标农药分子的化学结构。对于多菌灵，其某些化学键在 10-60V 的碰撞能量下会发生断裂，产生 12 个碎片离子的产物离子谱。如图 10 所示，产物离子谱可用于谱库检索和分析物确认。0.010-0.200mg/kg 范围内，各校准水平样品的谱库相似度得分均大于 99，精准确认目标分析物。该技术的优势在于将可进行谱库检索的产物离子谱用于目标化合物的鉴别，且不影响定量数据报告的灵敏度、准确度和耐用性。

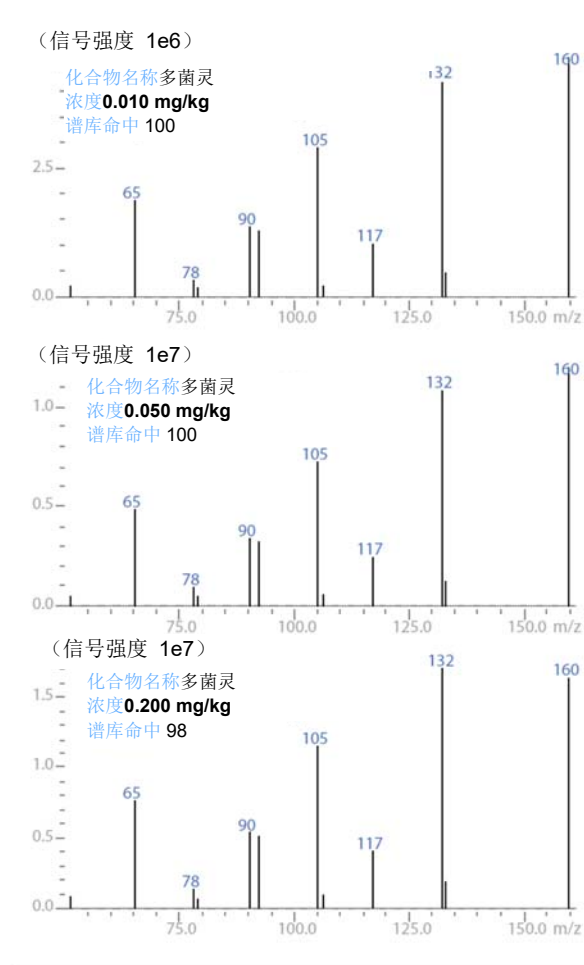


图 10 加标 3 种不同浓度 (0.010-0.200mg/kg) 多菌灵

的食品基质 MRM 产物离子谱与多菌灵标准谱的比较。所有校准水平样品谱库检索的相似度得分均大于 99，表明化合物确认和报告的具有极高精度。

数据报告

采用 LabSolutions Insight 软件可以轻松查看自动匹配的标准谱库和定量结果（图 11）。

LabSolutions Insight 软件可通过谱库匹配得分和样品与校准标准品保留时间的差异值对化合物鉴别进行确认，帮助审查异常数据和降低假阳性报告发生率。

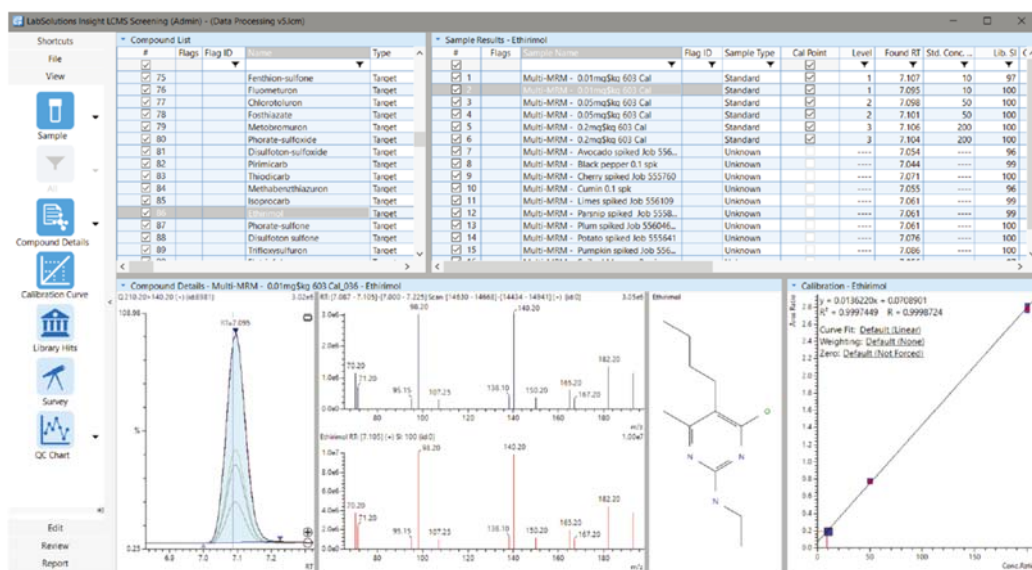


图 11 LabSolutions Insight 软件帮助快速轻松审查定量和标准谱库匹配结果。使用灵活的筛选和排序工具对与标准谱库产物离子谱匹配的相似度得分结果进行筛选，可帮助降低错误检测报告的发生率，这一优势对高通量实验室尤为明显。

结论

假阳性结果是所有农药残留监测实验室面临的一大主要问题。欧盟法规要求至少 2 个 MRM 离子对的保留时间和离子比在规定范围内。然而，即使执行该标准，某些农药或农产品分析中仍会出现假阳性结果。

本应用文章中，采用 MRM 模式对若干不同的样品基质中 193 种目标农药进行鉴别和定量分析。增加谱库匹配得分作为鉴别标准以提高鉴别精准度。

传统方法对每一化合物仅监测 2 个 MRM 离子对（总共 386 个 MRM 离子对），与此相比，采用 MRM 模式方法进行采集（总共 1291 个 MRM 离子对）不会影响数据质量，两种方法的信号响应和重现性保持一致。研究证明不同基质中农药的 MRM 产物离子在线性范围内保持一致。本方法同时采集正离子和负离子模式数据，正负极性切换时间为 5 毫秒，以此可缩短循环时间并保证较高的数据采集速率。

通过 MRM 窗采集到所有 1291 个离子对数据。由于采用 LCMS-8060 设置的驻留时间很短，因此无需对 MRM 离子对扫描进行“触发”。因此，必要时，可切换不同的定性离子作为 MRM 离子对，并对增加的 MRM 离子对色谱峰形进行评估。

参考文献

*1 European Commission SANTE/11945/2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed.

*2 Schurmann A., Dvorak V., Cruzar C., Butcher P., Kaufmann A., False-positive liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmation of sebuthylazine residues using the identification points system according to EU directive 2002/657/EC due to a biogenic insecticide in tarragon. Rapid Communications Mass Spectrometry, Volume 23, Issue 8, April 2009, Pages 1196-1200.

*3 Kaufmann A., Butcher P., Maden K., Widmer M., Giles K., Uria D.. Are liquid chromatography/electrospray tandem quadrupole fragmentation ratios unequivocal confirmation criteria? Rapid Communications, Mass Spectrometry, Volume 23, Issue 7, April 2009, Pages 985-998.

*4 Pozo Ó., Sancho J., Ibáñez M., Hernández F., Niessen W., Confirmation of organic micropollutants detected in environmental samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Achievements and pitfalls, TrAC Trends in Analytical Chemistry, Volume 25, Issue 10, November 2006, Pages 1030-1042.



岛津企业管理（中国）有限公司

岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；

* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。如有变动，恕不另行通知。