

# Application News

## No. C154

### Liquid Chromatography Mass Spectrometry

## MRM Spectrum Mode 和库检索在常规农药残留分析中对提升数据可靠性的应用

David R. Baker<sup>1</sup>, Chris Titman<sup>1</sup>, Jonathan Horner<sup>2</sup>, Neil Loftus<sup>1</sup>  
 1Shimadzu Corporation, UK; <sup>2</sup>Scientific Analysis Laboratories, UK

### ■ 摘要

在使用多反应监测 (MRM) 模式对残留农药进行常规分析时, 测量结果呈假阳性和假阴性是一个尚待解决的问题。为解决该问题, 可通过增加监测的碎片离子数量来更简单的鉴定农药, 并报告可靠的数据。

传统的 MRM 法针对一种农药仅可观察 2-3 个的碎片离子, 相对于此, 在 MRM Spectrum Mode 下能观察 6-10 个碎片离子离子对。通过获取多数碎片离子质谱图, 使各农药与库检索中的碎片离子二级谱图一致, 提高了目标农药库检索和使用参考库进行化合物确认的匹配分数。将该 MRM Spectrum Mode 用于 193 种农药的定量和定性, 在不影响检测灵敏度、线性、重现性的情况下使用了 1291 个的 MRM 离子对。

关键词: MRM Spectrum Mode; 假阳性、假阴性的抑制; 农药; 食品安全; LCMS-8060; 高特异性

### ■ 背景

三重四极杆质谱仪的多重反应监测 (MRM) 法被广泛运用于高检测灵敏度、选择性作为定量目的的分析。在食品安全等法规中, 要求尽可能增加在单次测量中分析的农药数量, 并要求提高化合物鉴定的可靠性, 减少误测。EU 在进行农药分析时采用识别标准 SANTE/11945/2015, 要求由保留时间和至少 2 个的 MRM 离子对且必须处于可接受范围内 \*1。然而, 即使采用上述标准, 在某些农药或商品组合测定项目中, 仍然有假阳性的报道。\*2~\*4

为了减少诸如此类的假阴性和假阳性, MRM Spectrum Mode 对一种农药采用多个 MRM 离子对离子对, 提高了化合物的特异性。各个农药中检测出的碎片离子离子对数量均会受到化合物结构的影响, 大约会产生 6-10 个的碎片离子。MRM Spectrum Mode 在传统的 MRM 定量中使用了多个 MRM 离子对。该产物离子质谱可用于需进行的库检索和化合物的验证、鉴定。

我们开发了针对 193 种农药的, 以 1291 个的 MRM 离子对、15 分钟的周期时间进行分析的分析方法。为获取如此多的 MRM 离子对数, 以 3 毫秒的 Dwell time, 5 毫秒的正 / 负切换时间进行了各自的 MRM 离子对。1 种平均农药使用了 7 个 MRM 离子对。并使用岛津公司的农药残留方法包建立了方法。该方法包中的数据库包含 750 种农药和超过 6000 个的 MRM 离子对, 能迅速进行方法的开发和化合物的验证。在方法中追加 MRM 离子对时, 为评估其对数据质量造成的影响, 我们对 MRM Spectrum Mode 和传统的农药分析方法 (每个化合物使用 2 个 MRM 离子对、共 386 个 MRM 离子对) 进行了比较。并对多个种类的食物 (姜黄、李子、薄荷防风草根、樱桃、酸橙、南瓜、番茄、马铃薯) 进行了分析。使用会从库中自动检索对象 MRM 质谱的 LabSolutions Insight 获取了数据。

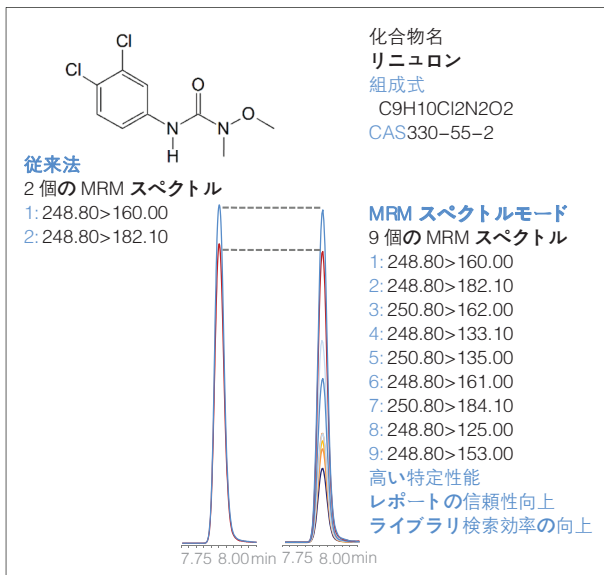


图 1 传统方法与 MRM Spectrum Mode 的比较。可通过获取众多碎片离子的 MRM 离子对来提升鉴定性能, 抑制假阳性和假阴性的出现。测量利谷隆时, 通过使用 9 个离子对提升了结果的可靠性。尽管观察了多个碎片离子, 但相较于传统方法, 其数据的质量并未降低, 信号强度、线性、重现性均未见不同。

## 实验方法

使用 QuEChERS 法对农药加标样本进行了提取，样本由 Scientific Analysis Laboratories, UK 提供。为对 MRM Spectrum Mode 的数据库以及库检索功能的运行状况进行确认，我们采用姜黄、李子、薄荷、防风草根、樱桃、酸橙、南瓜、番茄、马铃薯进行了实验。最终提取物以乙腈作为溶剂，直接进行 LC-MS/MS 分析。在测量过程中，为对早出峰的峰形进行改善，使用 Co-injection 功能进行进样，并使用了粒径约为 2  $\mu\text{m}$  的色谱柱以增加峰容量。（表 1）

制备浓度从 0.01 mg/kg 至 0.2 mg/kg 的系列标准溶液，绘制了校正曲线。在重现性试验中，向鳄梨添加了 0.1 mg/kg 的农药，供作样品使用。最后将 ESI 的正负极性切换周期设为 5 毫秒进行了分析。

平均对每种农药使用 7 个 MRM 离子对，并对 34 种农药使用了超过 10 个的 MRM 离子对。在不触发设置阈值的情况下获取了全部 MRM 离子对。对含有 1291 种 MRM 离子对的 193 种农药的分析时间仅为 15 分钟。各 MRM 离子对的 Dwell time 为 3 毫秒。MRM Spectrum Mode 对获取的数据的可靠性进行评估，采用了与传统 MRM 法（针对 1 种农药使用 2 个 MRM、合计 386 个 MRM）相同的分析条件。（表 2）

采用 LabSolutions 软件进行全部农药的碎片自动优化，并创建 MRM Spectrum Mode 的分析方法。通过使用岛津的农药数据库，简便且迅速地完成了以库检索和化合物鉴定为目的、MRM Spectrum Mode 的分析方法的设定。该数据库安装有超过 750 种农药的 MRM 离子对（6000 个以上）。

为评估定量结果，我们使用了 LabSolutions Insight ver.3.0 软件和 MRM Spectrum Mode。MRM Spectrum Mode 的库检索中有高级过滤工具，可降低假阴性结果的出现几率或将其完全除去。

液相色谱		
UHPLC	Nexera LC system	
分析柱	HSS T3 (100 x 2.1, 1.7 $\mu\text{m}$ )	
柱温	40°C	
流速	0.4 mL/min	
流动相 A	甲酸铵 (5 mmol/L) 0.004 % 甲酸+水	
流动相 B	甲酸铵 (5 mmol/L) 0.004 % 甲酸+水	
梯度程序	时间 (min)	%B
	1.50	35
	11.50	100
	13.00	100
	13.01	3
	15.00	Stp
进样量	0.1 $\mu\text{L}$ (与 30 $\mu\text{L}$ 的水一同注入)	

表 2 MRM Spectrum Mode 以及采用了传统 MRM 法的分析模式的 MS/MS 采集参数。采用相同的 LC 条件进行了分析。

LC-MS/MS	MRM 质谱模式：库检索	传统方法 2 个 MRM
农药	193	193
离子对数	1,291 个 (正离子 1,229 个、 负离子 62 个)	386 个 (正离子 374 个、 负离子 12 个)
Pause time / Dwell time	1 毫秒/3 毫秒	1 毫秒/3 毫秒
离子化法	ESI +/-	ESI +/-
极性切换	5 毫秒	5 毫秒
界面温度	350°C	350°C
加热块温度	300°C	300°C
DL 温度	150°C	150°C
喷雾器气体	3 L/min	3 L/min
加热气体	10 L/min	10 L/min
干燥气体	10 L/min	10 L/min

## 实验结果及考察

化学污染的评估法规旨在从已知的化合物列表中确定化合物，在不给出假阳性、假阴性数据的前提下实现高速且高性价比的分析。EU 的 SANTE/11945/2015 中有记载化合物的鉴定指南，该鉴定标准要求至少 2 个 MRM 离子对中的离子比以及保留时间必须处于规定值的范围内。

为减少残留农药评估程序中的误测，我们开发了新的 MRM 法。该 MRM 法通过对一种农药使用更多的 MRM 离子对来提升鉴定性能。通过结合产物离子谱图和农药的 MRM 离子对，无需参考 MS/MS 库便可提升农药鉴定的有效性。通过使用 MRM Spectrum Mode 能显著减少误测，得到最优的定量及定性结果。

空白样品添加 193 种农药 (0.010 mg/kg)，使用 MRM Spectrum Mode 测量的 MRM 色谱图如图 2 所示。采集了 193 种农药的 1291 个 MRM 离子对。其中 151 个 MRM 离子对如图 3 所示。通过使用 MRM Spectrum Mode 进行测量，在不对检测灵敏度造成影响的前提下，高效的获取数据。

## 方法性能

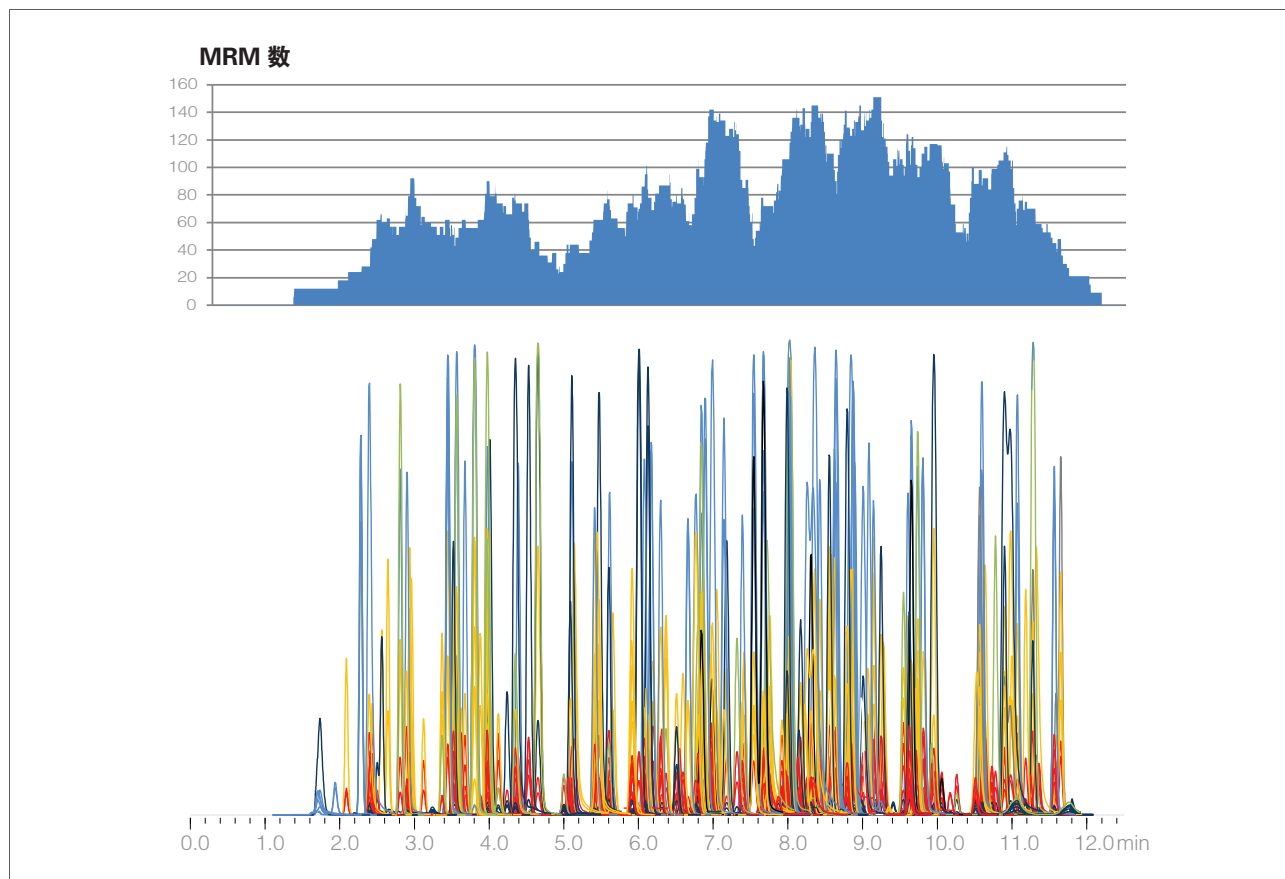


图 2 各时间的 MRM 离子对的柱状图以及 193 种农药的色谱图。最大的重叠 MRM 通道为 151 个。在获取如此密集的数据时，与传统的 MRM 法相比，其峰面积 RSD 值未超过 5.2% (n=5)。详细信息如图 3 所示。

表 3 从保留时间 8.80 分至 9.30 分之间的正离子和负离子模式下的 151 个 MRM 离子对。

	保留时间	MRM 的数量	极性	峰面积 %RSD(n=5)
Dichlofluanid	8.80	6	ESI+	2.2
Dichlofluanid 2	8.80	6	ESI+	3.4
Dichlofluanid 1	8.80	5	ESI+	2.6
Fluoxastrobin	8.82	12	ESI+	2.0
Fenhexamid	8.83	11	ESI+	2.2
Iprovalicarb	8.88	6	ESI+	2.3
Spirotetramat	8.89	6	ESI+	2.6
Azinphos-ethyl	8.90	5	ESI+	3.1
Chromafenozide	8.91	5	ESI+	3.2
Triticonazole	8.93	5	ESI+	2.1
Cyazofamid	9.01	5	ESI+	2.1
Prothioconazole desthio	9.07	10	ESI+	1.9
Diflubenzuron	9.09	4	ESI+	2.0
Pyrifenox	9.11	8	ESI+	2.0
Dodemorph	9.17	6	ESI+	2.1
Fenoxycarb	9.17	6	ESI+	2.0
Rotenone	9.17	6	ESI+	2.4
Fipronil	9.20	10	ESI-	5.2
Bixafen	9.25	8	ESI-	2.8
Tebufenozide	9.27	6	ESI+	3.9
Bensulide	9.27	6	ESI+	2.6
Neburon	9.30	9	ESI+	1.7
合计	151		平均	2.6 %RSD

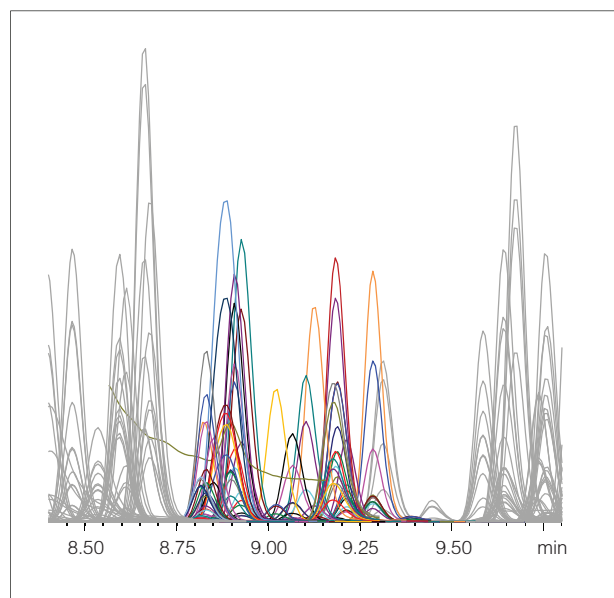
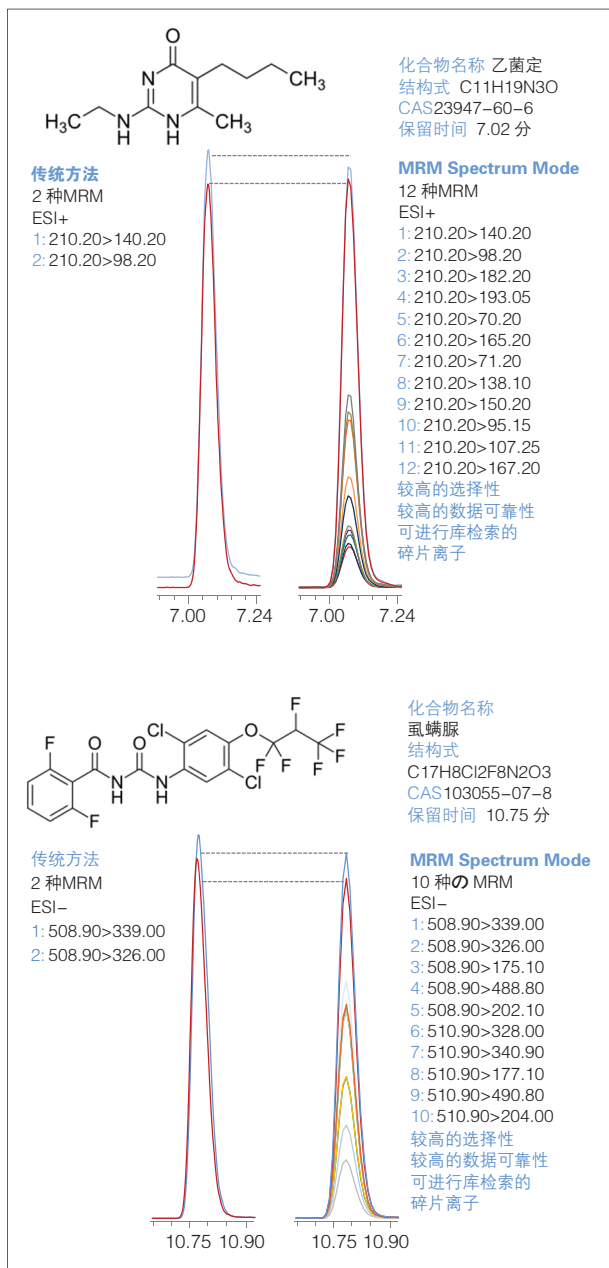


图 3 从保留时间 8.80 分至 9.30 分之间的正离子和负离子模式的 151 个 MRM 离子对。在此时间内溶出的 22 种化合物的峰面积 RSD 为 5.2% 以下。向鳄梨添加了 0.1 mg/kg 的农药进行了分析。

## 方法性能



## 基于谱库的定性

高速极性切换是岛津 LCMS-8050/8060 的高速数据采集系统的优势之一。该方法不仅能增加 MRM 离子对数，还能通过高速极性切换增加单次测量中的覆盖数量。

在图 6 中，突出显示了内吸磷-S-甲基砒在不同基质中的匹配结果包括：小茴香、马铃薯、黎豆、番茄、黑胡椒、薄荷茶、姜黄。在复杂基质中，内吸磷-S-甲基砒谱依然能获得较好匹配得分。

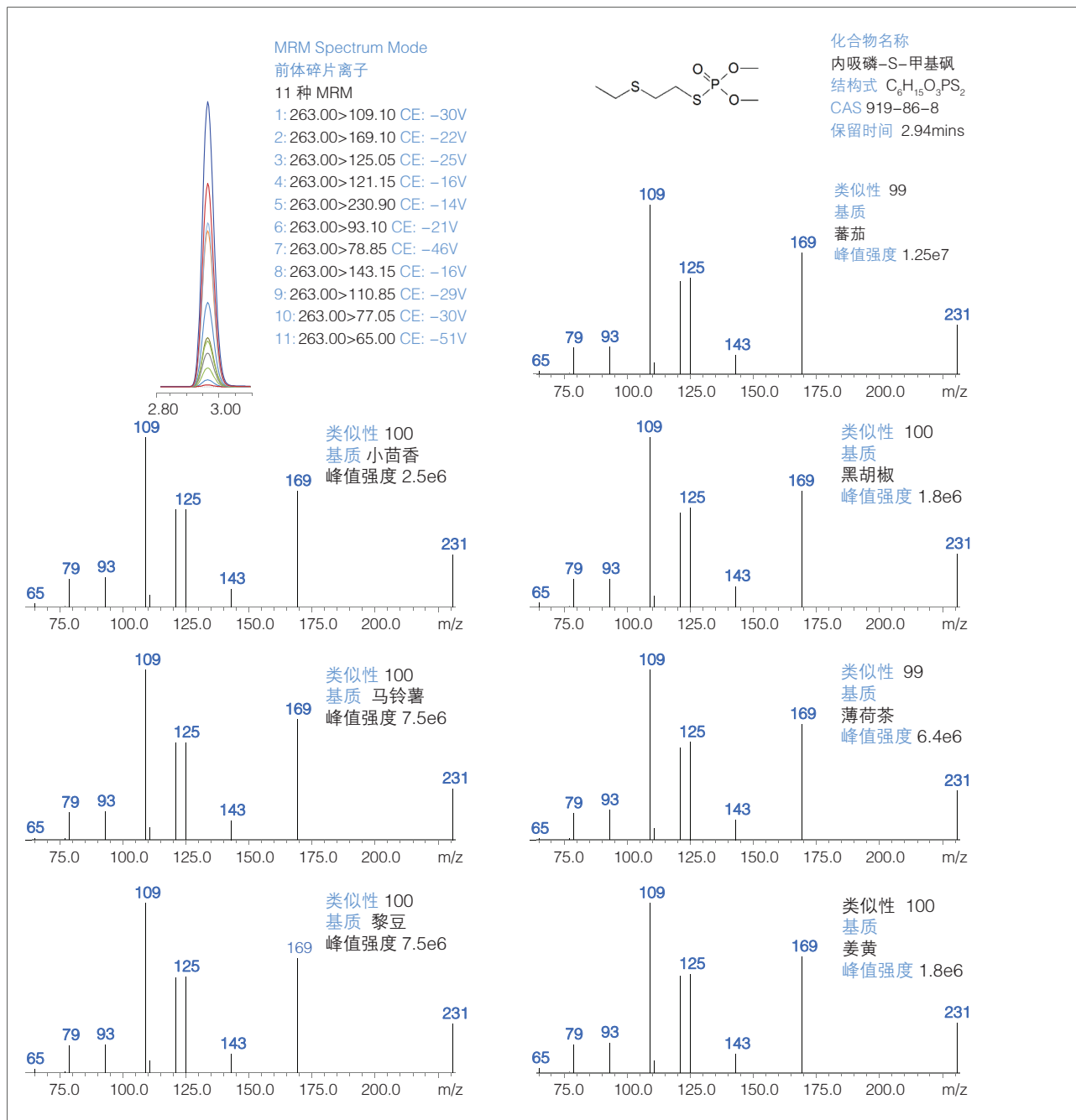
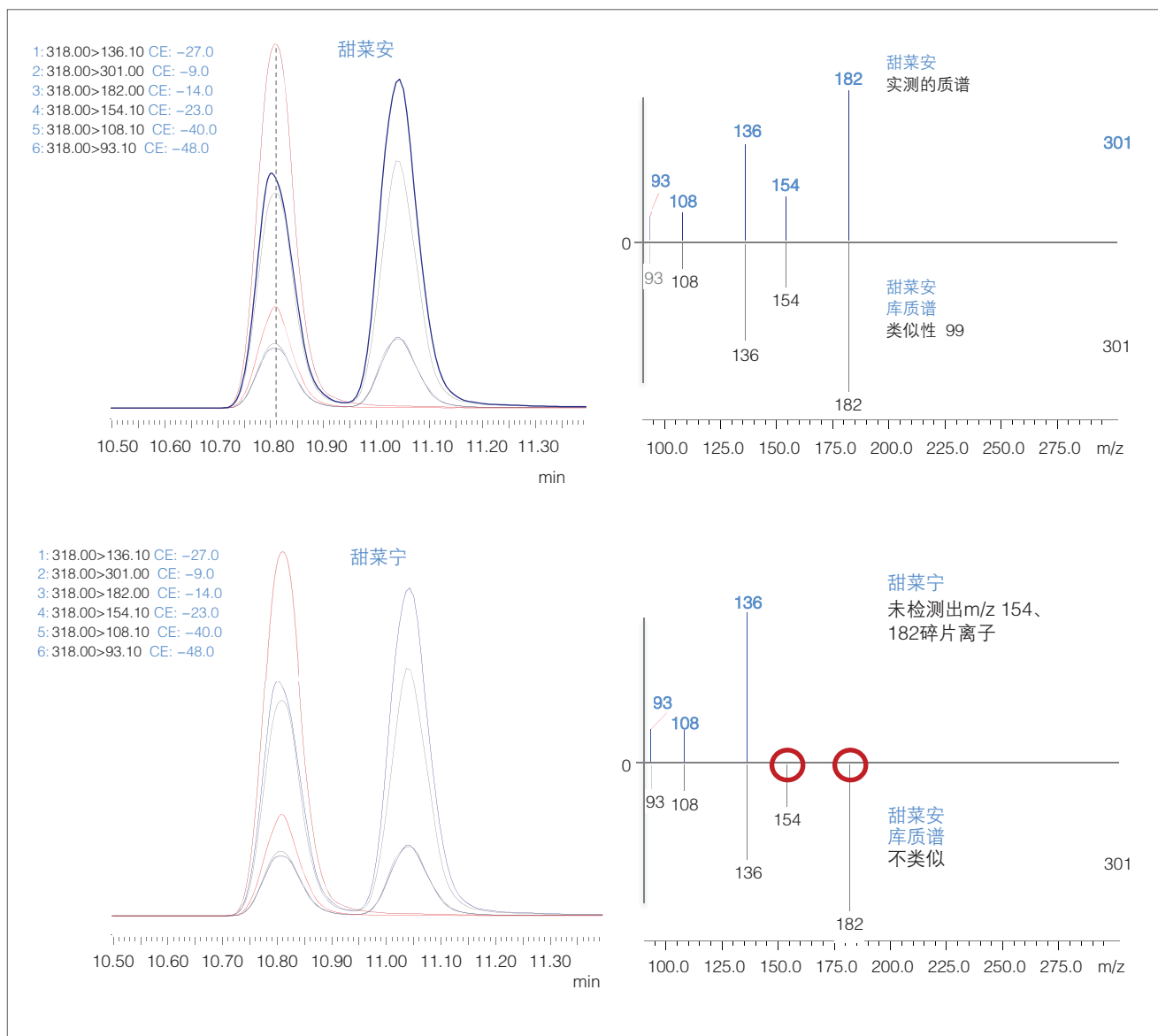


图 6 使用 MRM Spectrum Mode 对不同基质中的内吸磷-S-甲基砒的鉴定

## ■ 基于谱库的定性

为提升采集数据的可靠性，我们增加了对一种农药所使用的离子对数。并通过与MRM离子对相结合，获取了产物离子质谱图。使用该MRM，获取的产物离子质谱图将自动与参照质谱图进行比较，并计算类似性评分。

图7突出显示了利用碎片离子谱库对甜菜安和甜菜宁进行定性定量的优势。甜菜安和甜菜宁具有几乎相同的碎片离子和保留时间。使用MRM Spectrum Mode进行质谱图的比较时，准确地鉴定了甜菜安和甜菜宁。（在甜菜宁的碎片离子质谱图中，未检测出m/z 154、182碎片离子）



制备 0.1 mg/kg 的甜菜安和甜菜宁，并添加小茴香的 MRM 色谱图如图 7 所示。  
甜菜宁、甜菜安具有相同的离子对和保留时间，通过 MRM Spectrum Mode 鉴别了农药，成功避免了误测。

## ■ 定量

以多菌灵为例，设定 3 个不同浓度的基质标进行测定。图 8 显示，浓度为与报告值相同的 0.010 mg/kg 时，全离子对的 S/N 均超过了 10。得到的校正曲线的结果如图 9 所示。在校准范围 (0.010–0.200 mg/kg) 内线性良好。

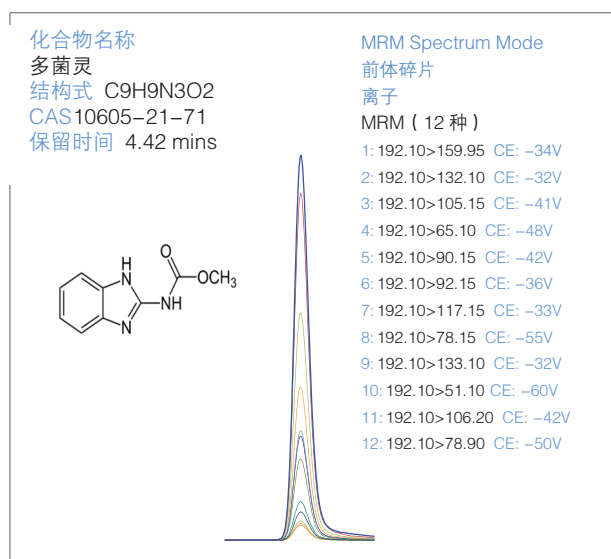
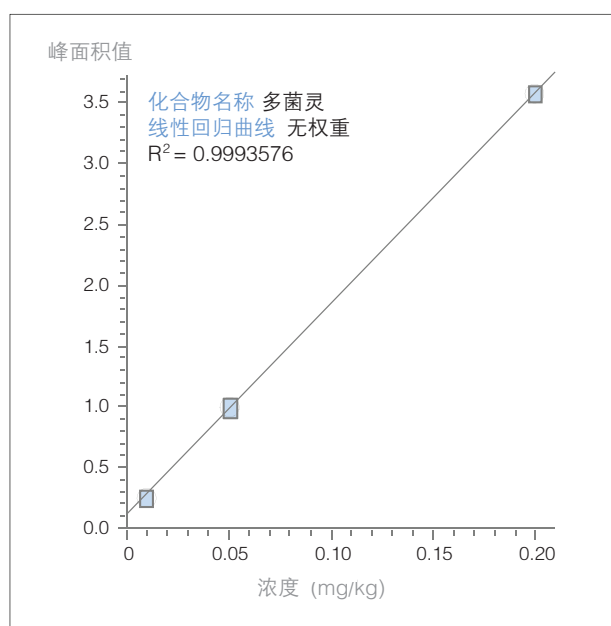
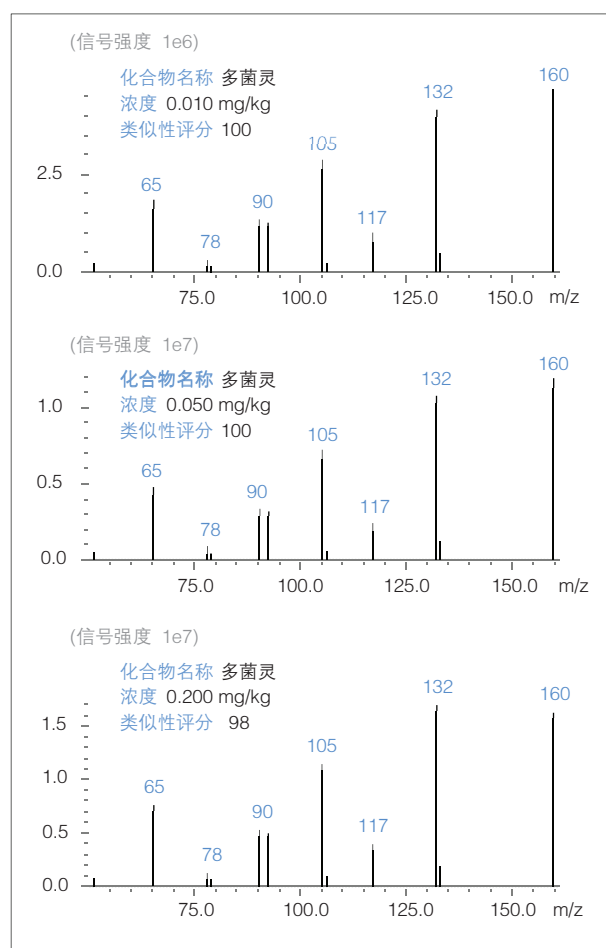


图 8 通过应用广范围的 CE，检测出了 12 个多菌灵的前体碎片离子。将 MRM 192.10>159.95 用于灵敏度和定量的评估，并将 12 个碎片离子用于了峰值的鉴定。



使用了经优化的离子对 (MRM 192.10>159.95) 的多菌灵的校正曲线如图 9 所示。添加 0.010 mg/kg 的多菌灵，结果全 12 个碎片离子均得到了超过 10 的 S/N。

产物离子谱图所需的 MRM 离子对的数量因农药的化学结构而异。使用多菌灵时，将 CE 设为 10–60 V 后会有多个键断开，生成 12 个的产物离子。产物离子谱图被用于库检索，在如图 10 那样的分析的确证中使用。在 0.010–0.200 mg/kg 的浓度范围内，各浓度的类似性评分均超过了 98。该技术的优点在于可通过使用可进行库检索的产物离子质谱图，在保证定量性数据报告中的灵敏度、精度、耐用性无任何损失的前提下鉴定测量对象。



向食品基质添加 3 个水平的浓度 (0.010、0.050、0.200 mg/kg) 的多菌灵后的 MRM 产物离子质谱如图 10 所示。与库光谱进行比较后，成功得到了相似性超过 99 的高鉴定精度。

## 数据报告

通过使用 LabSolutions Insight 软件 (图 11), 可自动地简单评估参照库和定量结果。

根据库的类似性和标准物质优化了保留时间, 通过使用了该保留时间的化合物鉴定方法, 成功地减少了 LabSolutions Insight 的误测。

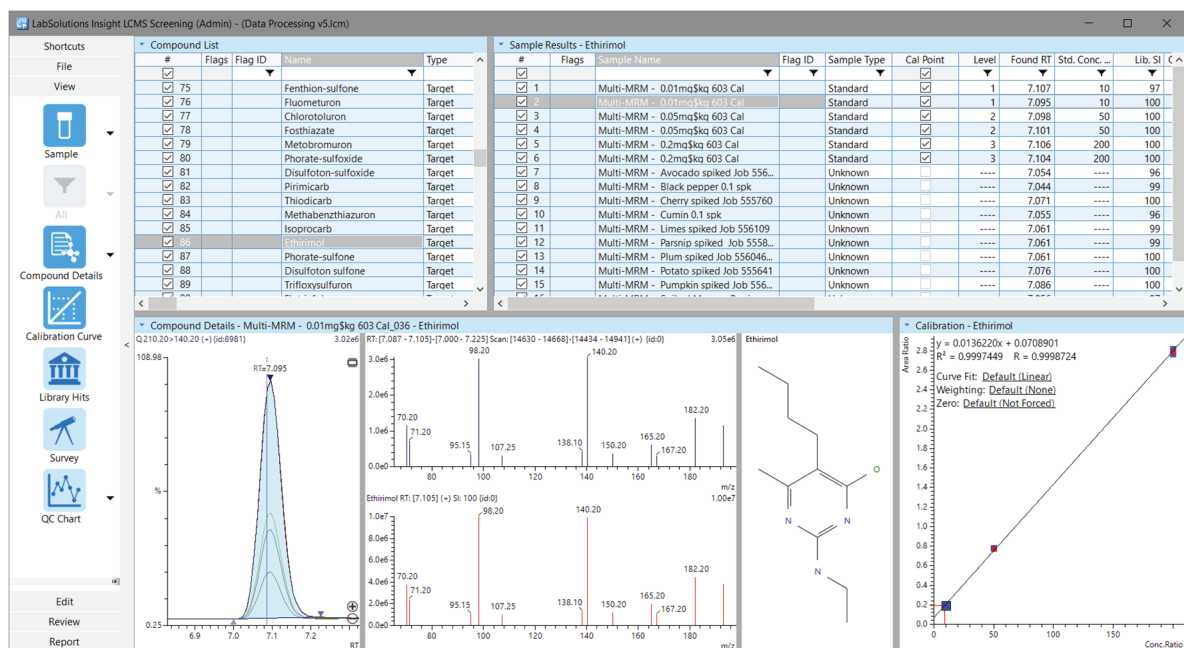


图 11 通过使用 LabSolutions Insight, 能高速且简单地对定量和库类似性评分的结果进行评估。通过过滤和排序功能减少误测, 通过产物离子质谱的类似性评分使过滤功能实现了更高的通量。

## 总结

农药的误测是残留农药评估研究中的一大课题。EU 法规要求保留时间与 2 个 MRM 离子对的比不得超出规定值范围。但有报告显示, 向特定的食品使用特定农药时, 会出现假阳性的数据。

于是我们使用多种食物作为基质, 采用 MRM Spectrum Mode 对 193 种农药进行了定性和定量分析。为提升所得数据的可靠性, 我们使用了库的类似性评分作为识别标准。

对 MRM Spectrum Mode 的数据采集 (1291 个 MRM 离子对) 同以往对一种农药使用 2 个 MRM 的传统方法 (386MRM) 进行比较时, 得到了同等程度的信号强度和再现性。通过 MRM Spectrum Mode 获取的 MRM 质谱成功地在不同的食物基质中得到了稳定的线性。使用该方法在正离子和负离子模式下采集数据, 通过以 5 毫秒的速度进行极性切换实现了较高的数据采集率。

1291 对离子均使用 MRM Spectrum mode 进行采集, 无需使用“触发产物离子”扫描模式, 以节省 LCMS-8060 宝贵的驻留时间。因此, MRM Spectrum mode 模式下, 可以实现各离子对间的切换以及评估各离子对的峰形。

## References

- \*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 Schürmann A., Dvorak V., Crüzer C., Butcher P., Kaufmann A., False-positive liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmation of sebutylazine 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., Uría 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。

第一版发行日: 2017 年 3 月