

分析保护剂在常规农残分析检测中的应用

邢江涛 王申 赛默飞世尔科技（中国）有限公司色谱质谱部

关键词:

分析保护剂 , Analyte Protectants, 农残

1.前言

分析保护剂（Analyte Protectants,以下简称AP），能够有效解决GC/GCMS在常规农残分析检测中因基质效应（Matrix Effects）导致的诱导增强效应、峰形拖尾、灵敏度差、重现性差以及线性差等问题，不必频繁维护仪器，进而提高分析通量。添加AP具有极高的实用价值，现已成为欧盟等国际法规中推荐的抑制基质效应的有效方法之一。而我国农残常规检测领域，AP普及度不高，基质效应问题并未引起足够的重视，且不能有效简便的解决。文章通过综述前人研究成果，并结合赛默飞的气相色谱、气质联用仪以及气质超高分辨质谱联用仪，对添加AP进行了进一步的验证和讨论，为检测工作者提供了更好更便捷的农残分析检测解决方案。

2.AP简介

基质效应，除了因基质干扰导致在色谱或检测器上发生的目标物与干扰物分不开的现象外，对于GC/GCMS而言，主要是指目标物与系统内活性吸附位点相互作用而导致的基质诱导增强的现象。Jana Hajšlová等人在2003年对基质效应做了较为全面的阐述¹。图1是对基质诱导增强效应简单的说明。

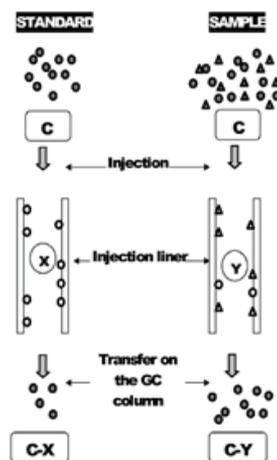


图1 基质诱导增强效应

基质诱导增强效应无法避免。因为完全惰化的系统并不存在。即使采用超高惰化的衬管与色谱柱，也会因基质中非挥发性成分在系统积聚而产生新的活性吸附位点。Ana Lozano等人采用ME（%）来评估基质诱导增强效应（图2），并采用Exactive GCTM超高分辨气质联用仪对婴幼儿食品中农残的基质效应做了进一步研究²，结果见表1。

$$ME(\%) = \frac{\text{slope of calibration curve standard in matrix}}{\text{slope of calibration curve standard in solvent}} \times 100$$

图2 ME计算公式

表1 婴幼儿食品ME计算结果(%)

Compound	Solvent			Apple/pear			ME, % ^a	Peach/banana			ME, % ^a	Six-fruit			ME, % ^a
	Linear range, mg/kg	Slope	R ²	Linear range, mg/kg	Slope	R ²		Linear range, mg/kg	Slope	R ²		Linear range, mg/kg	Slope	R ²	
Aldrin	0.001-0.2	46492	1.0000	0.001-0.2	66495	0.9992	43	0.001-0.2	63796	0.9996	37	0.001-0.2	62418	0.9997	34
Cadusafos	0.001-0.2	62462	0.9998	0.001-0.2	153014	0.9989	145	0.001-0.2	134424	1.0000	115	0.001-0.2	131710	0.9995	111
Dieldrin	0.003-0.2	18813	0.9999	0.003-0.2	32910	0.9996	75	0.003-0.2	28142	0.9999	50	0.003-0.2	29548	0.9983	57
Disulfoton	0.003-0.2	5029	0.9988	0.001-0.2	60392	0.9991	1101	0.001-0.2	36892	0.9993	634	0.001-0.2	34633	0.9967	589
Disulfoton-sulfone	0.001-0.2	52188	1.0000	0.001-0.2	109437	0.9993	110	0.001-0.2	98044	0.9994	88	0.001-0.2	99986	0.9984	92
Disulfoton-sulfoxide	0.001-0.2	52661	0.9995	0.001-0.2	115815	0.9997	120	0.001-0.2	145638	0.9985	177	0.001-0.2	155272	0.9998	195
Endrin	0.003-0.2	12307	1.0000	0.003-0.2	21852	0.9995	78	0.003-0.2	20965	0.9994	70	0.003-0.2	20515	0.9999	67
Ethoprophos	0.001-0.2	51309	0.9996	0.001-0.2	132110	0.9979	157	0.001-0.2	114858	0.9999	124	0.001-0.2	124409	0.9985	142
Fipronil	0.001-0.2	18185	0.9998	0.001-0.2	43870	0.9992	141	0.001-0.2	38166	0.9993	110	0.001-0.2	35995	0.9991	98
Fipronil-desulfinyl	0.001-0.2	31940	0.9997	0.001-0.2	77395	0.9985	142	0.001-0.2	72127	0.9999	126	0.001-0.2	64779	0.9993	103
HCB	0.001-0.2	190045	1.0000	0.001-0.2	248186	0.9990	31	0.001-0.2	232630	0.9998	22	0.001-0.2	242870	0.9989	28
Heptachlor	0.001-0.2	48059	1.0000	0.001-0.2	73280	0.9994	52	0.001-0.2	72292	0.9999	50	0.001-0.2	69012	0.9995	44
trans-Heptachlor epoxide	0.001-0.2	20744	0.9998	0.001-0.2	30049	0.9992	45	0.001-0.2	28397	0.9989	37	0.001-0.2	28540	0.9996	38
Nitrofen	0.001-0.2	17681	1.0000	0.001-0.2	38060	0.9991	115	0.001-0.2	35051	0.9998	98	0.001-0.2	33325	0.9981	88
Terbufos	0.001-0.2	58868	0.9998	0.001-0.2	159362	0.9992	171	0.001-0.2	136597	0.9999	132	0.001-0.2	132976	0.9993	126

^a Positive values of MEs mean enhancement of the signal. In all cases, residuals of the calibration curve were below 16%.

结果显示, 不同化合物在不同基质中的基质效应强度并不相同, 个别组分ME%大于500%, 即采用溶剂配制的标曲工作液定量样品, 其定量结果及回收率往往会被放大至少5倍左右。

另一方面, 因为与活性吸附位点的相互作用, 一些特殊化合物(含-P=O的有机磷酸酯类、含-O-CO-NH-的氨基甲酸酯类、含-OH的羟基化合物以及含R-NH-的氨基化合物等)则会出现峰形拖尾、线性差及重现性差等问题³。

空白基质匹配标曲、标准加入法及稳定同位素内标法是抑制或消除基质效应的有效技术。其中空白基质匹配标曲应用更为广泛。但这三种技术均需要额外的人力成本和经济成本, 并且可能因为基质的不同、抑制或消除效果的差异导致定量不准确。

AP, 最早以“掩蔽试剂(Masking Reagents)”概念, 由美国农业部Ronald Erney博士与韦恩州立大学Colin F. Poole于1993年提出, 旨在抑制或降低农残与GC系统内的活性吸附位点的相互作用⁴。不过在其研究的8种掩蔽试剂中, 并未取得预期的结果。2003年, QuEChERS发明人之一Michelangelo Anastassiades博士在其研究基础上, 进一步评价了90多种不同的化合物, 目的是找到能够与活性吸附位点发生强烈作用, 实现目标物的响应增强, 且不产生诸如分解或污染系统等不良影响的化合物⁵。Anastassiades博士将这类物质命名为“分析保护剂(Alyte Protectants)”。测试的化合物中, L-古洛糖酸内酯提供了最高的整体增强。为了覆盖更宽的洗脱范围, 应对各种复杂基质的基质效应, Anastassiades博士在2005年的进一步研究中, 评估了AP的多种不同组合, 最终提出适用于农残常规检测的最有效、经济且简便的组合⁶。

AP具有如下特点:

1. 富含羟基或氨基;
2. 易挥发;
3. 多种AP组合优于单种AP;

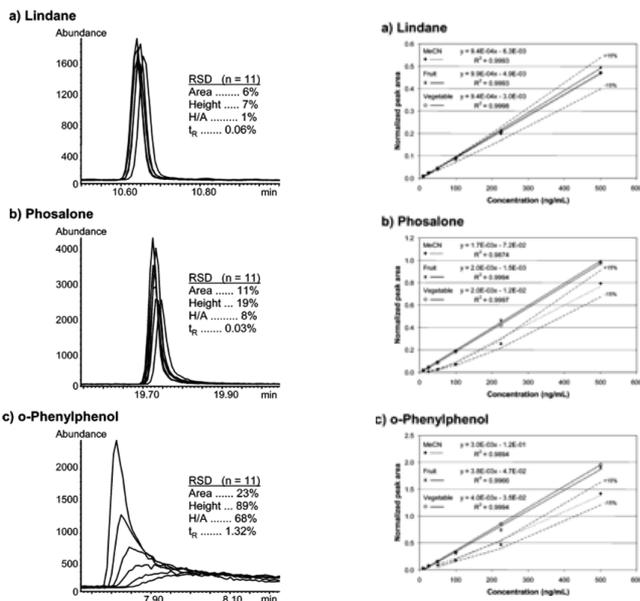


图3 特殊化合物因基质效应导致的问题

- 4.洗脱范围广；
- 5.经济便宜，易获取；
- 6.EL源下，碎片离子质量数小，不易产生干扰；

相比空白基质匹配标曲、标准加入法及稳定同位素内标法三种方法，无论是人力成本、经济成本，又或是实际效果，分析保护剂均体现出了极高的实用价值7。截止目前，SANTE/11813/2017法规中提出添加分析保护剂可作为抑制或消除基质效应的有效手段8。

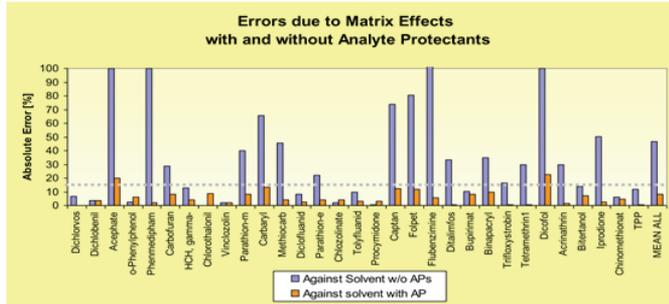


图4 EURL-SRM (EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides) 技术文件

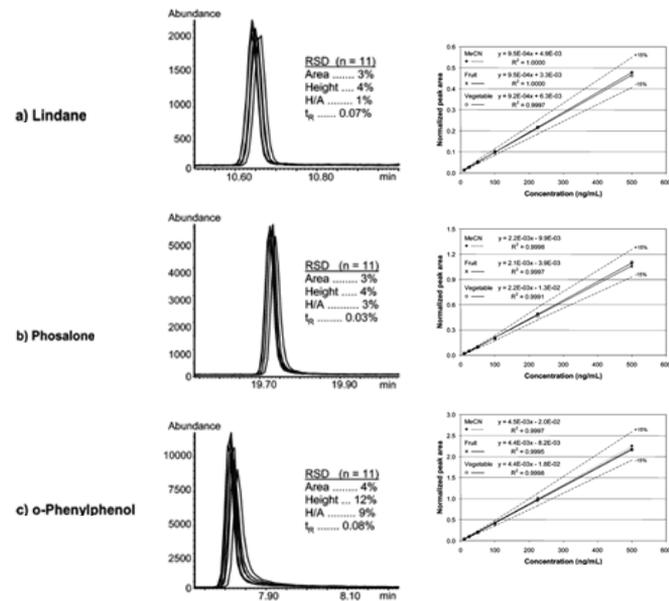


图5 基于图3试验，添加分析保护剂后的改善结果

3.AP配制方法

为了进一步降低成本，提高方法的便捷性与实用性，在不影响试验结果的前提下，结合赛默飞关于农残检测的方法包，同时参考国内农残常规检测的实际情况，在EURL-SRM (EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides) 技术文件基础上，进行了简单的修改。

表2 AP配制方法

EURL-SRM方法	赛默飞推荐方法
步骤一 50mg/mL的Sorbitol溶液，记为A	同前
步骤二 50mg/mL的D-(-)Gluconic acid-6-lactone溶液,记为B	同前
步骤三 50mg/mL的Shikimic acid溶液，记为C	无
步骤四 3-Ethoxy-1,2-propanedio (无需稀释)，记为D	无
步骤五 1mL A + 2mL B + 1mL C + 2g D,定容至10mL	2mL A + 4mL B, 定容至10mL
步骤六 每1mL样品或标品，添加30μL混合AP溶液	每1mL样品或标品，添加40μL混合AP溶液

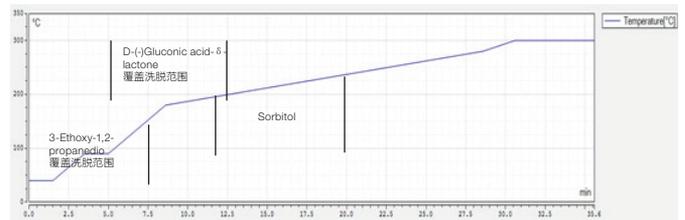


图6 常见AP在农残方法包下的覆盖洗脱范围

注: Shikimic acid 主要是为了降低诸如克菌丹，灭菌丹及百菌清等对碱敏感农药的降解。

实验结果和讨论

1基于NY761-2008的气相色谱法 (赛默飞Trace 1310 GC)

NY761-2008因前处理简单，方法灵敏度高而被广泛采用。但往往因基质种类繁多，且较为简单的前处理方式，会造成基质在系统内积聚而进一步形成活性吸附位点，从而影响分析测定。

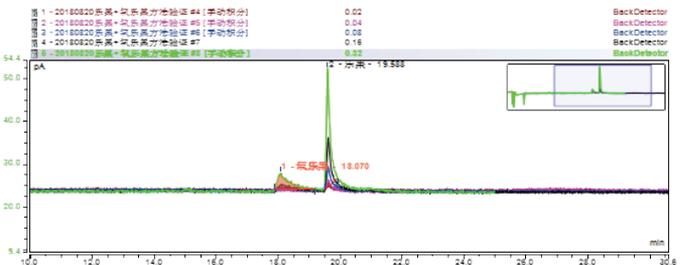


图7 未添加分析保护剂的标品色谱图

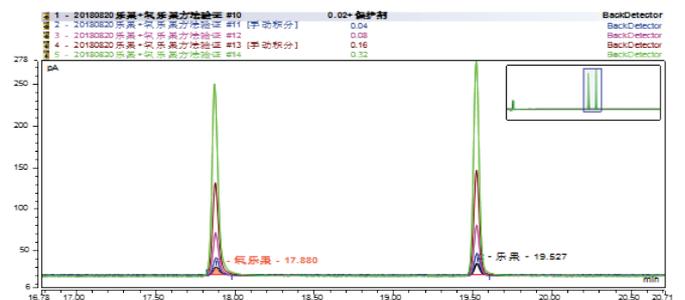


图8 添加分析保护剂的标品色谱图

图7和图8比较可知，添加分析保护剂对于氧乐果及乐果峰形及灵敏度有极大改善。

表3添加分析保护剂的溶剂标与苹果基质匹配响应对比

进样序号	进样名称 所选峰:	类型	保留时间 min	样品量		相对峰面积 %		峰面积 pA*min		峰高 pA	
				BackDetector 氧乐果							
10	0.02+保护剂	校正标准品	17.880	0.0240	46.13	0.4862	9.60				
11	0.04	校正标准品	17.882	0.0365	44.57	0.9291	20.63				
12	0.08	校正标准品	17.877	0.0797	48.21	2.4578	51.97				
13	0.16	校正标准品	17.875	0.1590	49.15	5.2632	111.49				
14	0.32	校正标准品	17.870	0.3208	49.97	10.9902	231.15				
15		未知	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.				
16	0.02基质	未知	17.877	0.0263	41.64	0.5683	11.66				
17	0.04基质	未知	17.877	0.0451	45.88	1.2316	25.09				
18	0.08基质	未知	17.872	0.0790	47.11	2.4311	51.53				
19	0.16基质	未知	17.872	0.1602	48.00	5.3082	104.59				
20	0.32基质	未知	17.867	0.3082	47.71	10.5447	207.24				

数据结果表明，对于苹果基质而言，添加分析保护剂的溶剂标与基质匹配响应几乎一致，可有效消除基质效应。

2 血液中农药残留测定 (赛默飞ISQ 7000 & TSQ 9000)

在公安刑侦行业，样品的获取、保存及分析时效性是分析检测的重要挑战。往往血液样品经过简单的液液萃取并过滤后直接上机分析。样品中的基质会在衬管及色谱柱内积聚，形成新的吸附位点，并且造成系统过快污染，从而影响重现性及分析通量。以下是有无分析保护剂的对比结果。

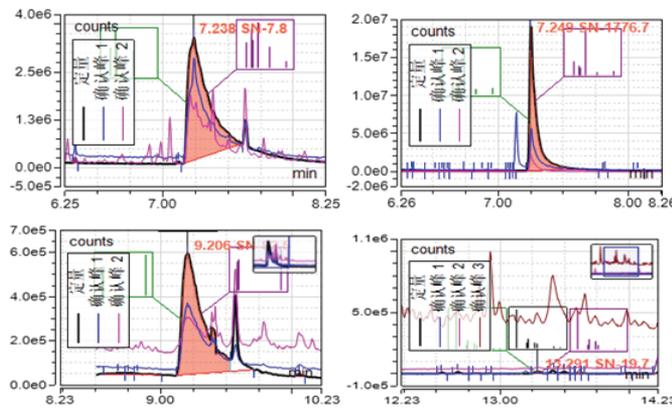


图9 未添加分析保护剂的血样中甲胺磷、敌敌畏、乙酰甲胺磷及毒鼠强

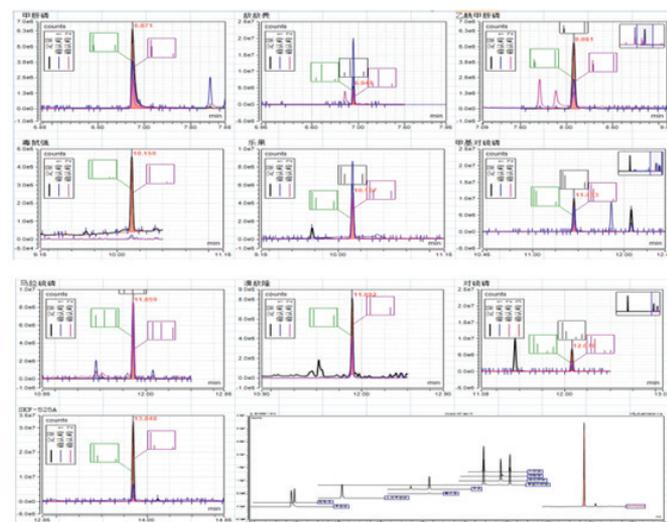


图10 添加分析保护剂的血样中各组分色谱图

表4分析保护剂对血样精密度的影响 (n=8*3d, *为添加AP溶液)

	第一天	第二天	第三天	连续三天	第一天*	第二天*	第三天*	连续三天*
对硫磷	6.5	12.3	2.9	9.8	2.68	4.73	2.56	3.69
马拉硫磷	9.1	13.1	3.8	9.8	4.91	5.2	2.93	6.19
溴敌隆	11.9	12.8	2.1	12.5	7.4	5.05	8.35	8.84
甲基对硫磷	10.8	17.6	2.9	11.5	2.61	3.94	2.12	4.12
乐果	10.1	11.5	4.2	9.3	3.13	5.54	3.59	5.42
毒鼠强	9.2	30.3	8	19.9	3.51	4.77	2.8	5.03
乙酰甲胺磷	17.3	18.8	8.7	15.3	3.29	4.97	3.85	6.64
敌敌畏	8.5	6.6	2.6	6.8	2.55	2.68	1.43	2.6
甲胺磷	12.1	11.7	5.6	18.9	4.65	3.73	4.96	4.44

3 果蔬中多农残的筛查与定量 (赛默飞Exactive GC)

应用Exactive GC可同时完成多农残的筛查与定量。与三重四极杆气质联用仪不同的是，Exactive GC为高分辨率、高质量精度的全扫描数据，不需要额外的方法编辑，不受数据库化合物数目的限制，具有高灵敏度，高度选择性及可追溯性等特点。

赛默飞Exactive GC气质超高分辨质谱在分辨率R=60000(m/z 200)下，全扫描的选择性可媲美三重四极杆气质联用仪的SRM扫描 (见图11)。

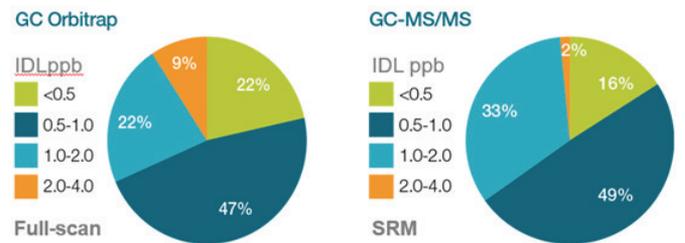


图11 混合果蔬基质中150种农残IDL对比

为了进一步验证添加AP对方法耐用性及分析通量的改善，选取葡萄作为基质，采用Quechers方法做前处理，依照每10个样品+1个质控样 (空白基质加标100ppb) (添加100ppb) 为一个循环，共循环进样30次，共计300余针 (未更换衬管，未清洗离子源)。计算30针质控样结果的RSD值。结果如下：

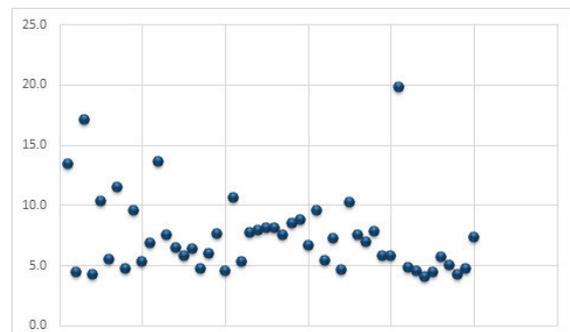


图12 50种农药RSD分布图

表5 50种农药清单

Methamidophos	Vinclozoline	Isofenphos-methyl	Permethrin
Dichlorvos	Parathion-methyl	Fipronil	Pyraclostrobin
Acephate	Metalaxyl	Pendimethalin	Pyridaben
Etofenprox	Fenitrothion	Procymidone	Cypermethrin
Phorate	Malathion	Paclobutrazol	Flucythrinate
BHC, alpha	Chlorpyrifos	Profenofos	Fluvalinate
Dimethoate	Phorate sulfone	Chlorfenapyr	Fipronil sulfone
BHC, beta	Parathion	Triazophos	Difenoconazole
Quintozen	Phorate sulfoxide	Iprodione	Cyfluthrin
BHC, delta	Triadimefon	Bifenthrin	Deltamethrin
Diazinone	Isocarbophos	Fenpropathrin	Fenvalerate
BHC, gama	Dicofol	Phosalone	
Fipronil desulfinyl	Fipronil sulfide	Cyhalothrin	

结论

1. 分析保护剂已被证明能够有效解决GC/GCMS在常规农残分析检测中因基质效应导致的诱导增强效应、峰形拖尾、灵敏度差、重现性差以及线性差等问题，不必频繁维护仪器，进而提高分析通量。添加AP具有极高的实用价值，现已成为欧盟等国际法规中推荐的抑制基质效应的有效方法之一。

2. 结合赛默飞农残分析方法包，针对性的提出了添加分析保护剂的解决方案，并分别通过GC、GCMS以及GC-Orbitrap三个案例进行了验证，结果均达到预期目的。

参考文献

- [1]Hajšlová, J. and J. Zrostliková (2003). "Matrix effects in (ultra) trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices." *Journal of Chromatography A* 1000(1-2): 181-197.
- [2]Lozano, A., et al. (2018). "Pesticide Residue Analysis in Fruit- and Vegetable-Based Baby Foods Using GC-Orbitrap MS." *J AOAC Int* 101(2): 374-382.
- [3]Katerina Mas'tovska, S. J. L., and Michelangelo Anastassiades (2005). "Combination of Analyte Protectants To Overcome Matrix Effects in Routine GC Analysis of Pesticide Residues in Food Matrixes." *Anal. Chem.* 77: 8129-8137.
- [4] Erney, D. R. (1993). "A Study of Single Compound Additives to Minimize the Matrix Induced Chromatographic Response Enhancement Observed in the Gas Chromatography of Pesticide Residues." *Journal of High Resolution Chromatography* 16: 501-503.
- [5] Anastassiades, M., et al. (2003). "Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides." *Journal of Chromatography A* 1015(1-2): 163-184.
- [6] Katerina Mas'tovska, S. J. L., and Michelangelo Anastassiades (2005). "Combination of Analyte Protectants To Overcome Matrix Effects in Routine GC Analysis of Pesticide Residues in Food Matrixes." *Anal. Chem.* 77: 8129-8137.
- [7] EURL-SRM." Use of Analyte Protectants in GC-Analysis a way to improve peak shape and reduce decomposition of susceptible compounds." 22.04.2013
- [8] EUROPEAN COMMISSION." Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed." SANTE/11813/2017



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC