



TSQ Quantis 三重四极杆质谱仪性能大提升 完美应对食品安全领域目标定量新挑战

作者

Katerina Bousova,¹ Michal Godula,¹
Claudia Martins,² Charles Yang,²
Ed George,² Neloni Wijeratne²

¹Thermo Fisher Scientific,
欧洲特殊解决方案中心, 德赖艾希, 德国

²Thermo Fisher Scientific,
圣何塞, 加利福尼亚

关键词

Pesticide Explorer Collection,
欧洲法规 396/2005,
委员会指令 2006/125/
EC, 欧洲委员会
2002/657/EC, SANCO/12571/2013,
欧洲委员会 788/2012/
EC, 农药, 食品, QuEChERS,
Vanquish Flex, TSQ Quantis MS,
TraceFinder 软件

目的

为快速耐用地定量 250 余种低于最大残留限 (MRL) 的农药开发一种全面的 LC-MS/MS 分析方法, 且该方法的灵敏度、准确度和精密度均符合欧盟指南的严格要求。

前言

农药为农作物上使用的化学品, 用于保护农作物免受害虫的破坏。由于农药应用不当可导致严重的健康问题, 因此, 检测食品和粮食制品中的农药残留成为常规食品控制中的重要组成部分。欧盟 (EU) 法规 (欧洲法规 396/2005 和委员会指令 2006/125/EC) 是现行最严格的法规, 其规定了植物源和动物源的多种产品中农药的最大残留限。由于一些食品基质要求的定量限 (LOQ) 较低, 因此, 这些法规给分析带来了巨大的挑战。

本应用文档介绍了综合应用液相色谱仪和三重四极杆质谱仪（LC-MS/MS）解决方案以及 Thermo Scientific™ Pesticide Explorer Collection Standard Quantitation 解决方案开发的多残留分析方法，以快速耐用地定量 250 余种低于最大残留限的农药。该解决方案包括 Thermo Scientific™ QuEChERS 样品制备试剂盒、Thermo Scientific™ Vanquish™ Flex UHPLC 二元系统、Thermo Scientific™ TSQ Quantis™ 三重四极杆质谱仪、Thermo Scientific™ TraceFinder™ 软件、Thermo Scientific™ AccuCore™ aQ C18 极性封端 LC 色谱柱以及方法参数，为农药分析提供从始至终的工作流程。该分析方法的结果符合最严格的欧盟指南有关灵敏度、准确度和精密度的要求。

实验

概述

LC-MS/MS 分析期间，样品制备的流程概述见图 1。进样至 LC-MS/MS 系统之前，根据欧洲 EN 15662 QuEChERS 方案对样品进行匀浆和萃取。1,2 即用型 QuEChERS 样品制备试剂盒含萃取管和用于样品制备的相关方案。通过特征离子对的选择反应监测（SRM），基于保留时间和至少两个子离子以及离子比率确认识别农药残留物。

1、称取 10 g 样品，置于 50 mL 萃取管中。

2、加入 10 mL 乙腈（20 mL 水 + 10 mL 乙腈进行润湿）。

3 振摇 10 min，并在 5000 rpm 下离心 5 min。

4、将上清液转移至 LC 样品瓶中，并将其置于自动进样器中。

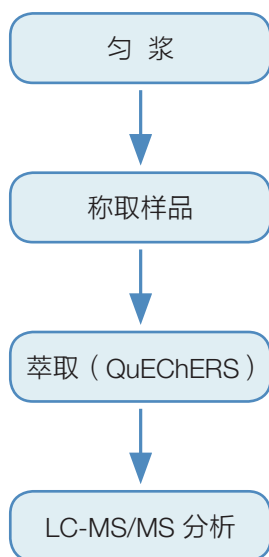


图 1. 工作流程概述

使用基质匹配校正进行定量。根据相关欧盟指南建立所有方法的性能标准。³⁻⁷

分析方法

表 1A-1D 列出了所使用的试剂、设备、耗材和玻璃容器以及离子源，适当情况下还包括 Thermo Fisher Scientific 部件号。除纯化水外，试剂、设备、仪器、耗材和玻璃容器均来自 Thermo Fisher Scientific。农药标准品购于 ULTRA Scientific（美国）。

试剂	部件号
水 UHPLC-MS 级	Fisher Chemical™ Optima™ W8-1
甲醇 UHPLC-MS 级	Fisher Chemical Optima A458-1
甲酸铵 >99%	A115-50
乙腈 UHPLC-MS 级	A956-1
甲酸 >99%	28905

表 1B. 设备 / 仪器

设备 / 仪器	Thermo Fisher Scientific 部件号或来源
Fisher 精密天平	02225102
Sartorius 分析天平	14557812
Barnstead EASYpure II 超纯水机	0905043
ULTRA-TURRAX® S 25 N - 25 G 分散工具	1713300
ULTRA-TURRAX® T 25 数显型分散机	3565000
涡旋振荡器	14505141
涡旋通用盖	3205029
Accu-Jet® 移液器	3140246
卧式振动筛	1069-3391
卧式振动筛筛板	1053-0102
离心机, Thermo Scientific™ Heraeus™ Multifuge™ X3	75004500
TSQ Quantis 三重四极杆质谱仪	TSQ02-10001
Vanquish Flex UHPLC 二元系统	5400.0225

表 1C. 耗材

耗材	Thermo Fisher Scientific 部件号或来源
LC 样品瓶	32051113
LC 样品盖	3151266
移液器, Thermo Scientific™ Finnpiptette™ 100–1000 µL	3214535
移液器, Finnpiptette 20–200 µL	3214534
移液器, Finnpiptette 10–100 µL	3166472
移液器, Finnpiptette 500–5000 µL	3166473
移液器, Finnpiptette 1000–10,000 µL	3214536
移液器支架	3651211
移液器吸头 0.5–250 µL, 500/盒	3270399
移液器吸头 1–5 mL, 75/盒	3270420
移液器吸头 100–1000 µL, 200/盒	3270410
移液器吸头 20,000–10,000 µL, 40/盒	3270425
移液器, 巴斯德钠钙玻璃, 150 mm	FB50251
移液器抽吸装置	3120891
刮刀, 18/10 钢	3458179
刮刀, 尼龙	3047217
样品架 (2 mL)	12211001
离心管架	1066-3721
QuEChERS 萃取管, 50 mL, 250 包	60105-216
Accucore aQ 色谱柱 100 × 2.1 mm, 2.6 µm	17326-102130

表 1D. 玻璃器皿

玻璃器皿	Thermo Fisher Scientific 部件号或来源
容量瓶, 10 mL	FB50143
容量瓶, 25 mL	FB50147
40 mL 螺旋盖样品瓶	1054-1593
40 mL 螺旋盖样品瓶盖	1009-0962
500 mL 瓶	9653640
100 mL 瓶	1006-8060
烧杯, 100 mL	FB-102-100
烧杯, 200 mL	FB-102-200

表 2.LC 条件

进样量	1 µL
柱温	25 °C
流速	300 µL/min
分析柱	Accucore aQ 色谱柱 100 × 2.1 mm, 2.6 µm
运行时间	15 分钟
托盘温度	5°C
喷针清洁溶剂	10% 甲醇水溶液
样品定量环	25 µL
流动相	A: 98% 的水含 2% 的甲醇、5 mM 甲酸铵和 0.1% 甲酸 B: 98% 的甲醇含 2% 的水、5 mM 甲酸铵和 0.1% 甲酸

样品的制备

验证实验使用的空白基质样品 (韭菜 (LK)) 购自本地零售商店, 采用 ULTRA-TURRAX 均质器进行匀化, 并在制备强化样品之前进行萃取。将基质萃取物用作基质空白样品并用于制备基质匹配校正标准。用于样品制备的即用型 QuEChERS 萃取试剂盒含 4 g MgSO₄、1 g NaCl、1 g 二水柠檬酸三钠和 0.5 g 柠檬酸钠, 用于缓冲萃取目标化合物。未使用任意净化步骤。

采用以下步骤进行基质均质化:

- 1、将相对大量的韭菜基质 (~500 g) 置于大小适合的烧杯中并标记。
- 2、将 25 G 分散工具附于 ULTRA-TURRAX 均质器上。(注: 对于一些不稳定的化合物, 为了得到更好的回收率, 建议进行低温均质化。8)
- 3、以中等转速 (转速为 2-3 级) 进行均质化以得到平滑的匀浆。

采用以下步骤进行样品萃取:

- 1、称取 10 g 样品并置于 50 mL QuEChERS 萃取管中。
- 2、将 10 mL 乙腈加入至 LK 样品中。
- 3、将样品置于水平振荡器上振摇 10 min, 并以 5000 rpm 的转速离心 5 min。
- 4、收集上清液并将 1 mL 上清液转移至 LC 样品瓶中进行仪器分析。

LC-MS/MS 分析

采用 Vanquish Flex 二元系统偶联 TSQ Quantis 三重四极杆质谱仪进行 LC-MS/MS 分析。使用 TraceFinder 软件进行仪器控制、分析、数据查看和报告。LC 条件和梯度见表 2 和 3。优化 LC 梯度, 将分析时间缩短至 15 分钟, 同时维持较好的色谱分离。

表 3.LC 梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B
0	0.300	100	0
0.5	0.300	100	0
7	0.300	30	70
9	0.300	0	100
12	0.300	0	100
12.1	0.300	100	0
15	0.300	100	0

TSQ Quantis 三重四极杆质谱仪以定时 -SRM 模式运行。采用 Tune3.0 软件中的新化合物优化工具自动优化 SRM 条件。质谱仪设置见表 4。

表 4. 已优化的离子源和 MS 设置

电离模式	加热电喷雾电离 (HESI)
扫描类型	timed-SRM
极性	正 / 负离子切换
正离子模式下的喷雾电压	3700 V
负离子模式下的喷雾电压	2500 V
鞘气压力	30 任意单位 (Arb)
辅助气压力	6 Arb
吹扫气压力	1 Arb
离子传输管温度	325 ° C
雾化器温度	350 ° C
碰撞诱导解离气体压力	2 mTorr
循环时间	0.5 s
Q1 分辨率 (FWHM)	0.7
Q3 分辨率 (FWHM)	0.7

结果与讨论

图 2 显示了含 250 余种农药的 100 µg/kg 基质加标样品的 LC-MS/MS 色谱图 (进样量为 1 µL)。采用定时 -SRM 模式进行分析时,除色谱运行时间短 (15 分钟) 外,还可对农药化合物进行良好分离和检测。在定时 -SRM 模式下,在已知化合物保留时间周围较窄的保留时间窗口中,对特定目标化合物进行数据采集。定时 -SRM 显著降低了在一定保留时间窗口中平行监测到的 SRM 离子对数量。为了获得可重现且精密的预期定量限,必须在较短驻留时间内具有良好的仪器性能。图 3 突出显示了在短驻留时间内分析低浓度水平的韭菜时 TSQ Quantis 质谱仪的仪器性能。

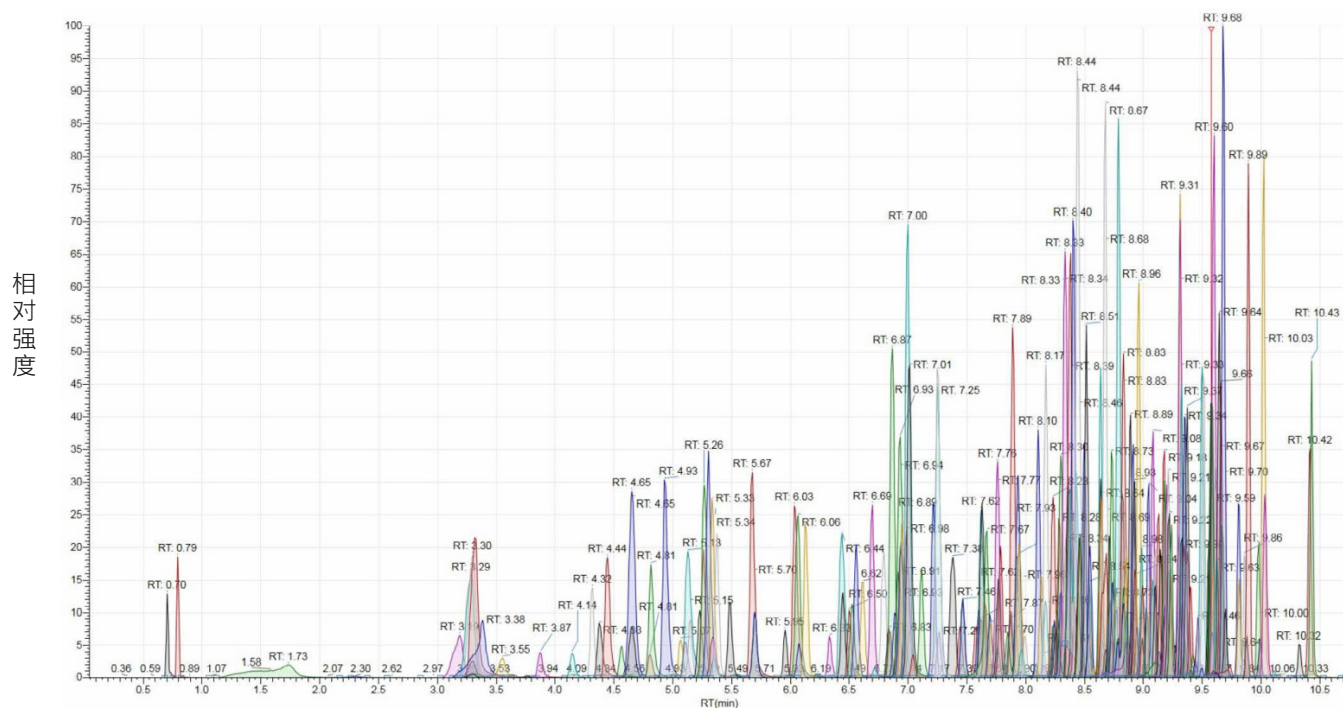


图 2. 100 µg/kg 韭菜萃取物中 250 余种农药的 LC-MS/MS 色谱图。

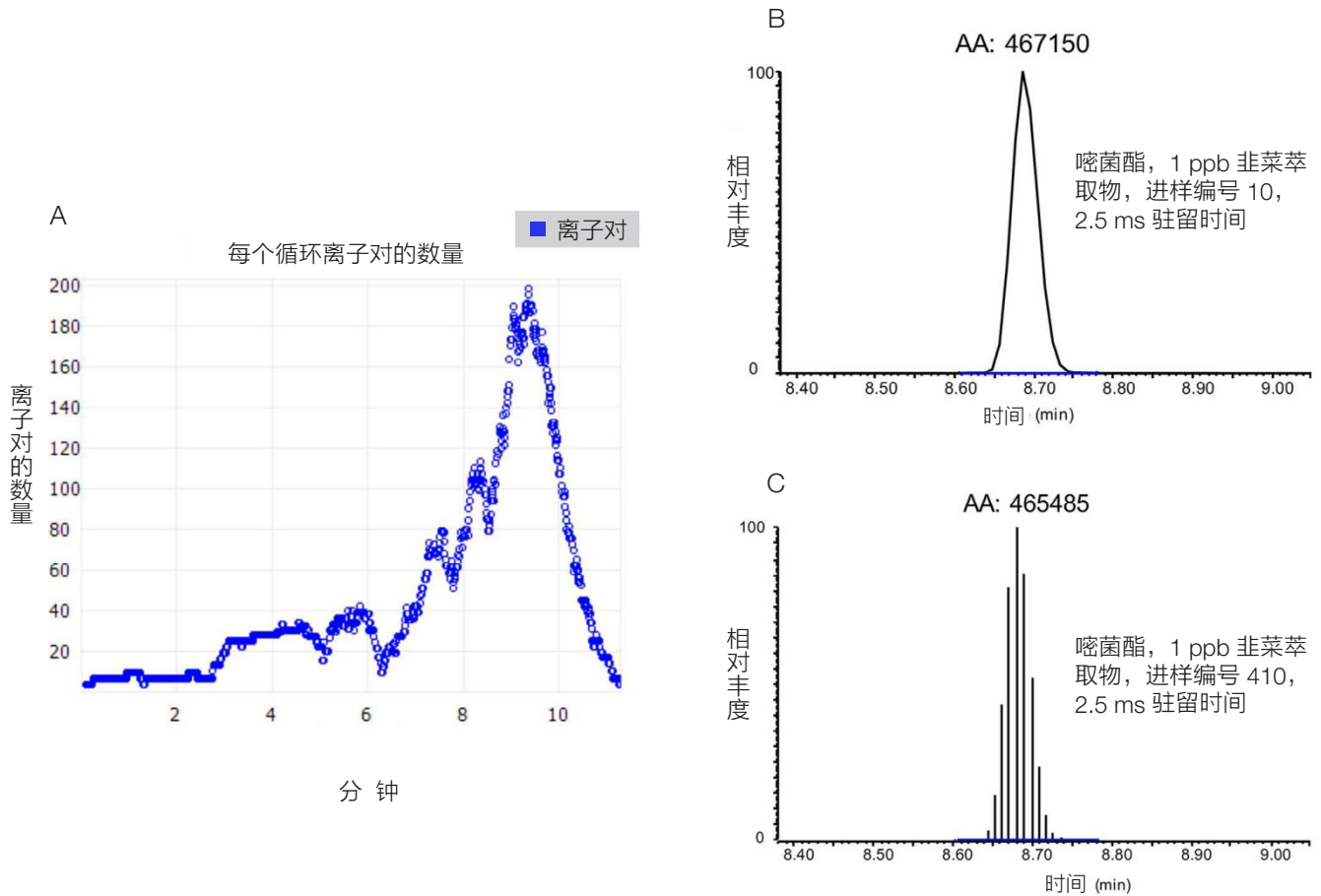


图 3. 速度和重现性示例。图 A 显示了单位时间内的离子对数。吡菌酯在 8.69 min 处洗脱，并与其他 130 个离子对同时采集。图 B 和 C 显示了吡菌酯的重现性，对比第 10 次进样和第 410 次进样。即使在低驻留时间（2.5 ms）时，峰面积也保持一致。图 C 还证实了色谱图复杂区域的峰上含有足够数量的数据点。5

LC-MS/MS 工作流程：

卓越的重现性，优异的耐用性

不管样品多么复杂，均希望该分析方法灵敏、可重现且准确。研究表明，采用 TSQ Quantis MS 定量分析韭菜中农药的灵敏度优于前面一代三重四极杆质谱仪。

图 4 总结了 TSQ Endura MS 和 TSQ Quantis MS 分析五种农药的对比结果，涉及电离模式和一个较宽的质量数范围。

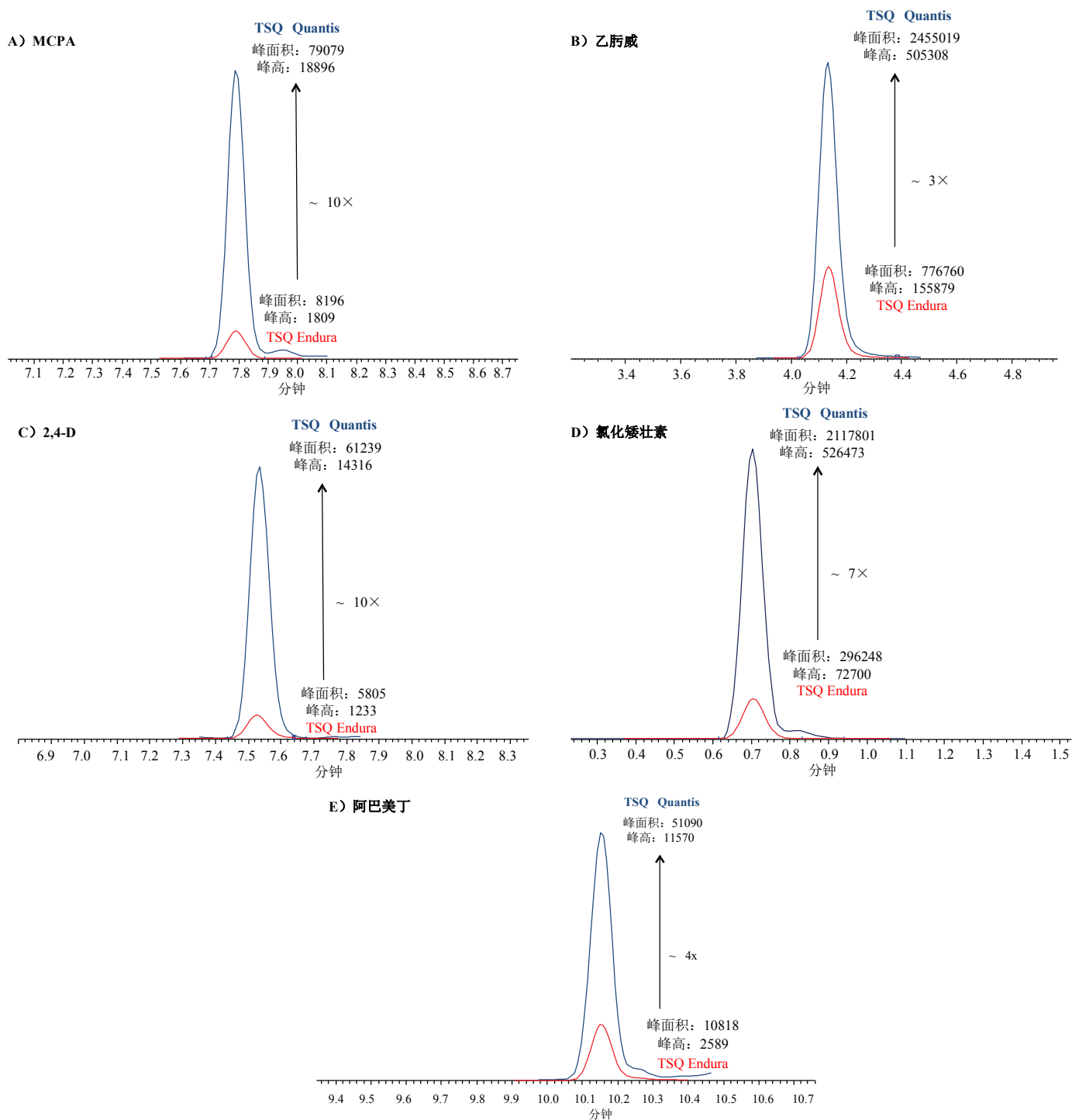


图 4. 采用 TSQ Quantis MS (蓝色线条) 和 TSQ Endura MS (红色线条) 监测五种农药的典型色谱图对比。仪器性能的差异以峰面积和峰高的形式呈现。A) MCPA – 负离子电离模式 (198.9 105, 198.8 141) B) 乙肟威 – 正离子电离模式 (163 88, 163 106) C) 2,4 D – 负离子电离模式 (218.8 160.9, 218.8 125) D) 氟化矮壮素 – 正离子电离模式 (122 63, 122 58) E) 阿巴美丁 – 正离子电离模式 (890.5 305, 890.5 307.1, 890.5 567.1)

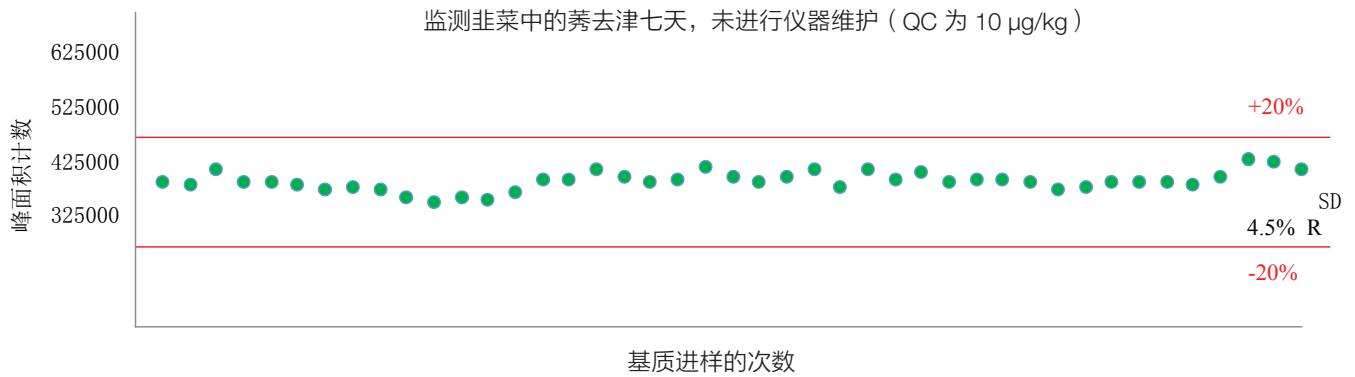


图 5. 韭菜中的莠去津 QC 监测，进样次数超过 400 次，RSD 为 4.5%。红线表示 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度下莠去津的响应值 $\pm 20\%$ 。黄线显示将系统置于待机模式下 12 h 的精确时刻（未进行仪器维护）。

图 5 显示了 400 余次基质空白进样和 10 ppb QC 韭菜样品进样时莠去津的总体响应。将系统置于待机模式下

24 h (2 \times 12h)，以证实仪器在待机模式下启动时性能可靠。数据表明，至少进样 400 次时，响应值在预期值 $\pm 20\%$ 范围内。每次进样之间未进行仪器维护。

结论

欧盟法规规定了食品中农药的最大残留限，但由于必须达到复杂基质中低定量限的要求，因此，该法规给分析带来了挑战。本应用文档介绍了一种多残留 LC-MS/MS 分析方法，该方法采用基于 TSQ Quantis 三重四极杆质谱仪的 Pesticide Explorer Collection Standard Quantitation 解决方案，在小于等于最大残留限水平上快速耐用地定量韭菜中的 250 余种农药。

该 LC-MS/MS 系统的选择性和灵敏度可用于分析仅 1 μL 的样品，而不需要进行分散 SPE 样品净化或样品稀释，同时增加了耐用性和通量。

参考文献

<http://www.thermoscientific.com/content/tfs/en/product/hypersep-dispersive-spe-extraction-products-quechers.html>

Anastassiades et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. Chromatogr. A*. 2003. 1015, 163–184.

Official Journal of the European Communities, COMMISSION DECISION of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. [Online] <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002D0657&from=EN> (accessed April 20, 2017).

Official Journal of the European Union, COMMISSION DIRECTIVE 2006/125/EC of 5 December 2006 on processed cereal-based foods and baby foods for infants and young children. [Online] <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006L0125&from=EN> (accessed April 20, 2017).

European Commission Directorate-General for Health and Food Safety, Safety of the Food Chain, Pesticides and biocides, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANCO/11945/2015. [Online] https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945.pdf (accessed April 20, 2017).

Official Journal of the European Union, COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) No 788/2012 of 31 August 2012 concerning a coordinated multiannual control programme of the Union for 2013, 2014 and 2015 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. [Online] <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012R0788&from=EN> (accessed April 20, 2017).

European Commission. Plants EU Pesticides database. [Online] <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN> (accessed April 20, 2017).

Fussell et al. *Food Additives & Contam.* 2007, 24, 1247–1256.