

应用纪要

使用UPLC-MS/MS系统装配ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱测定阳离子型极性 农药和植物生长调节剂

Hannah Willmer, Janitha De-Alwis, Stuart Adams

Waters Corporation



摘要

本研究旨在介绍一种单次提取LC-MS/MS方法，用于测定多种食品类商品中的强极性阳离子型农药残留和植物生长调节剂是否满足甚至优于欧盟委员会农药数据库的MRL检测要求。方法性能研究在搭配Xevo TQ-S micro质谱仪的ACQUITY UPLC I-Class系统上使用ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱完成，在此之前先用QuPPE法提取样品。方法验证研究针对4种代表商品（即苹果、黄瓜、小麦面粉和马铃薯）进行。方法性能评估中每种分析物均采用0.01和0.05 mg/kg 2个加标浓度（马来酰肼除外，其加标浓度为0.5和1.5 mg/kg），每个浓度重复测定5次。仅野燕枯和氯丙嘧啶酸未经过内标处理。在方法性能方面，所有商品的分析正确度均在92%~108%范围内，但黄瓜的野燕枯分析结果除外，其正确度范围是60%~67%（已确认原因是PVDF过滤器不适用于该分析）。RSD均小于等于12%。对FAPAS QC小麦面粉样品进行2轮提取（间隔1个月），每轮重复提取3次，所有结果均在认定值±20%的范围内，同时也在达到可接受z得分所需的范围内。所有校准曲线的残差均低于20%，R²值均大于等于0.99。所有方法验证研究批次中所有分析物的保留时间稳定性均低于3%。

优势

- 提供一种适用于测定谷物、水果和蔬菜商品中多种强极性阳离子型农药和植物生长调节剂的单次提取(QuPPE)结合LC-MS/MS方法，有助于MRL/容许量合规性监测
- 发挥出色的色谱保留性、选择性、峰形和稳定性，符合SANTE指南要求
- 灵敏度足以测定未净化粗提取物中浓度低至0.01 mg/kg的残留

简介

分析食品中农药残留的方法有很多种，主要是QuEChERS等多残留方法。但极性农药的提取和测定仍然具有相当大的挑战。QuPPE（极性农药快速提取）方法¹由欧盟农药残留参比实验室 - 单残留方法(European Union Reference Laboratory - Single Residue Method, EURL-SRM)开发，可同时提取多种强极性农药及其代谢物以及植物生长调节剂。QuPPE方法侧重于借助LC-MS/MS仪器的高灵敏度来解决基质效应问题，因为目前尚没有能够有效处理所有基质类型的通用净化方法。

本研究中的阳离子型极性农药有各种MRL（见表1所选取的部分），范围介于矮壮素的缺省MRL 0.01 mg/kg~7 mg/kg之间²。此外，还有一些成分目前尚不在官方EU MRL残留定义的范围内，例如三聚氰胺（灭蝇胺的代谢物）、氯丙嘧啶酸、ETU和PTU。出于安全考虑，仍有必要监测上述成分在食物中的浓度。

| 化合物 | | MRL (mg/kg) | | | |
|------|---------|-------------|------|------|------|
| | | 苹果 | 马铃薯 | 小麦 | 黄瓜 |
| 野燕枯 | 除草剂 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| 霜霉威 | 杀真菌剂 | 0.01 | 0.3 | 0.01 | 5.0 |
| 灭蝇胺 | 生长调节剂 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 2.0 |
| 沙蚕毒素 | 杀虫剂 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| 缩节胺 | 生长调节剂 | 0.02 | 0.02 | 3.0 | 0.02 |
| 矮壮素 | 生长调节剂 | 0.01 | 0.01 | 7.0 | 0.01 |
| 杀草强 | 除草剂 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| 三甲基铊 | 草甘膦抗衡离子 | 0.05 | 0.05 | 5.0 | 0.05 |
| 丁酰肼 | 生长调节剂 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 |
| 马来酰肼 | 生长调节剂 | 0.2 | 60 | 0.2 | 0.2 |

表1. EU农药数据库所含化合物在4种代表性基质中的当前MRL^{2,3}。

本应用纪要提供了使用Waters ACQUITY UPLC I-Class系统和Xevo TQ-S micro分析4种商品（代表高含水量、高淀粉含量和低含水量样品类型）所得的性能数据示例。按照QuPpe方法提取有机小麦面粉、黄瓜、苹果和马铃薯，评估UPLC-MS/MS方法的各性能指标，例如校准线性、保留时间稳定性、方法精密度、正确度和分析物鉴定。

实验

样品描述

有机苹果、黄瓜和马铃薯购自零售商店，在实验室进行精细均质处理后储存于4 °C冰箱中以待分析。有机小麦面粉的购买和储存均处于室温条件下。

经过认证的QC样品(T09127QC)购自FAPAS。该样品中混合有多种极性农药（包括矮壮素和缩节胺），并随附所含化合物的认定值和可接受限值。

方法条件

使用QuPpe方法提取有机苹果、黄瓜、马铃薯和小麦面粉匀浆，如图1所示。其中，小麦面粉的处理还包括其他步骤，即在-20 °C冷冻2 h并减少样品用量（如QuPpe方法所述）。然后先使用0.45 µm PTFE过滤器过滤QuPpe提取物上清液，再进行LC-MS/MS分析。

所有4种商品均进行加标回收率测定，加标浓度为0.01 mg/kg（马来酰肼为0.5 mg/kg）和0.05 mg/kg（高加

标浓度，马来酰肼为1.5 mg/kg），每个浓度重复测定5次。使用相应的空白提取物制备基质匹配标准品并在过滤后加标。苹果、黄瓜和马铃薯分析中所有分析物的校准范围均为0.002~0.2 mg/kg，但马来酰肼除外，其校正范围为0.1~2 mg/kg。小麦面粉分析中所有分析物的校正范围均为0.004~0.4 mg/kg，但马来酰肼除外，其校正范围为0.2~4 mg/kg。加标样品的定量采用基质匹配分段校准法。本应用纪要使用表2中列出的MRM定量并确认残留。

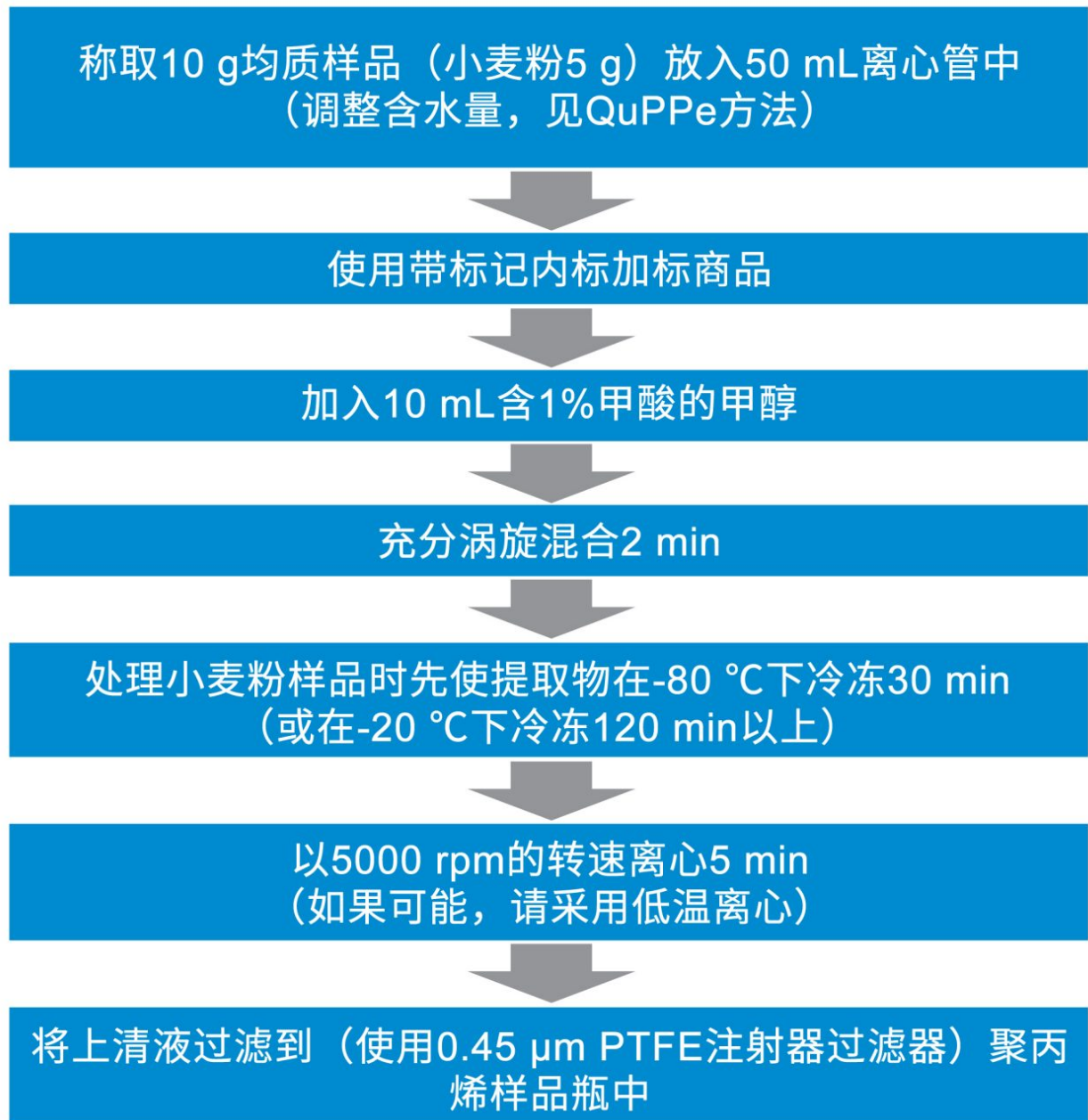


图1. 苹果、黄瓜、马铃薯和小麦面粉的QuPPE样品提取工作流程

液相色谱条件

| | |
|---------|--------------------------------------------------------------------|
| 液相色谱系统: | Waters ACQUITY UPLC I-Class (配备固定环式样品管理器) |
| 检测器: | Xevo TQ-S micro |
| 样品瓶: | 沃特世聚丙烯材质12 × 32 mm螺纹口样品瓶，带瓶盖和预切割PTFE/硅胶隔垫，容积为700 μL (部件号186005222) |
| 色谱柱: | ACQUITY UPLC BEH Amide, 1.7 μm, 2.1 × 100 mm (部件号186004801) |
| 柱温: | 40 °C |
| 样品温度: | 10 °C |
| 进样体积: | 0.5 μL (带针溢出的部分定量环进样) |
| 流速: | 0.5 mL/min |
| 流动相A: | 20 mM甲酸铵 (pH 2.95, 使用LC-MS级甲酸调节) |
| 流动相B: | 乙腈 |

梯度

| 时间(min) | 流速(mL/min) | %A | %B | 曲线 |
|---------|------------|----|----|----|
| 初始 | 0.5 | 3 | 97 | 6 |
| 0.50 | 0.5 | 3 | 97 | 6 |

| 时间(min) | 流速(mL/min) | %A | %B | 曲线 |
|---------|----------------|----|----|----|
| 4.00 | 0.5 | 30 | 70 | 4 |
| 5.00 | 0.5 | 40 | 60 | 6 |
| 6.00 | 0.5 | 40 | 60 | 6 |
| 6.10 | 0.5 | 3 | 97 | 6 |
| 10.00 | 0.5 | 3 | 97 | 6 |

质谱条件

| | |
|---------|-----------------|
| 质谱系统: | Xevo TQ-S micro |
| 电离模式: | 马来酰肼采用ESI+/ESI- |
| 采集范围: | MRM |
| 毛细管电压: | 1.00 kV |
| 脱溶剂气温度: | 600 °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 |

MRM通道

| 化合物 | 保留时间 (min) | MRM通道 | 驻留时间 (s) | 锥孔电压 (V) | 碰撞能量 (eV) |
|-------------------------------------------|------------|-----------------------|----------|----------|-----------|
| 氯丙嘧啶酸 | 2.67 | 214.1>168.0 | 0.009 | 30 | 16 |
| | | 214.1>196.0 | 0.009 | | 13 |
| 杀草强 | 1.95 | 85.0>43.0 | 0.014 | 30 | 15 |
| | | 85.0>57.0 | 0.014 | | |
| 杀草强- ¹⁵ N | 1.95 | 86.0>43.0 | 0.014 | 30 | 15 |
| 矮壮素 | 2.31 | 122.1>58.1 | 0.009 | 20 | 22 |
| | | 122.1>63.1 | 0.009 | | 18 |
| 矮壮素-D ₄ | 2.31 | 126.1>58.1 | 0.009 | 20 | 22 |
| 灭蝇胺 | 2.27 | 167.2>85.2 | 0.009 | 30 | 20 |
| | | 167.2>68.1 | 0.009 | | 28 |
| 灭蝇胺-D ₄ | 2.28 | 171.1>86.1 | 0.009 | 30 | 20 |
| 丁酰肼 | 1.86 | 161.2>143.2 | 0.014 | 30 | 10 |
| | | 161.2>61.2 | 0.014 | | |
| 丁酰肼-D ₆ | 1.86 | 167.2>149.2 | 0.014 | 30 | 10 |
| 野燕枯 | 1.92 | 249.2>130.1 | 0.014 | 30 | 40 |
| | | 249.2>77.0 | 0.014 | | 45 |
| 乙烯硫脲(ETU) | 0.69 | 103.0>44.0 | 0.014 | 30 | 13 |
| | | 103.0>86.0 | 0.014 | | 25 |
| 乙烯硫脲-D ₄ (ETU-D ₄) | 0.69 | 107.1>48.0 | 0.014 | 30 | 15 |
| 丙烯硫脲(PTU) | 0.64 | 117.1>58.1 | 0.014 | 30 | 13 |
| | | 117.1>60.1 | 0.014 | | 20 |
| N,N-(1,2-丙烯)硫脲-甲基-D ₃ | 0.64 | 120.1>61.1 | 0.014 | 30 | 20 |
| 马来酰肼 | 2.12 | 111.0>82.0 | 0.009 | 25 | 15 |
| | | 111.0>83.0 | 0.009 | | 12 |
| 马来酰肼-D ₂ | 2.12 | 113.2>85.1 | 0.009 | 25 | 12 |
| 三聚氰胺 | 2.92 | 127.0>60.0 | 0.009 | 30 | 18 |
| | | 127.0>85.0 | 0.009 | | 16 |
| 三聚氰胺- ¹⁵ N ₃ | 2.92 | 130.0>87.0 | 0.009 | 30 | 16 |
| 缩节胺 | 2.44 | 114.2>98.2 | 0.009 | 30 | 20 |
| | | 114.2>58.2 | 0.009 | | 20 |
| 缩节胺-D ₁₆ | 2.44 | 130.3>110.2 | 0.009 | 30 | 24 |
| 沙蚕毒素 | 0.95 | 150.0>105.0 | 0.014 | 30 | 15 |
| | | 150.0>61.0 | 0.014 | | 30 |
| 沙蚕毒素-D ₆ | 1.11 | 156.0>105.0 | 0.014 | 30 | 15 |
| 霜霉威 | 2.40 | 189.1>102.0 | 0.009 | 30 | 16 |
| | | 189.1>74.0 | 0.009 | | 25 |
| 霜霉威-D ₇ | 2.40 | 196.1>103.0 | 0.009 | 30 | 16 |
| 三甲基铊 | 2.68 | 77.1>62.1 | 0.009 | 30 | 16 |
| | | 77.1>47.1 | 0.009 | | 10 |
| 三甲基铊-D ₉ | 2.68 | 86.1>68.1 | 0.009 | 30 | 10 |

表2.1 分析物及相应同位素标记内标的MRM通道，以及使用自动驻留功能自动设定的理想驻留时间（定量通道以粗体显示）

结果与讨论

表2所列出的MRM中突出显示了本研究在定量并确认阳离子型极性农药时所用的优化离子通道。使用自动驻留功能计算驻留时间。该功能可针对下方校准标样采集其峰上至少12个数据点。定量所用的通道在表2中以粗体标注。该通道对于某些分析物/商品组合来说并不一定是最高丰度的通道，但其作用是确保批次间一致性。

方法性能评估使用4个验证批次，涵盖以下具有不同特性的商品：苹果、黄瓜、小麦面粉和马铃薯。上述每个批次均包含2个加标浓度：0.01和0.05 mg/kg（马来酰肼除外，其加标浓度为0.5和1.5 mg/kg），每个浓度各5个加标回收率测定样品。图2所示为在方法验证研究期间使用本方法进行常规分析得到的0.02 mg/kg（马来酰肼为0.5 mg/kg）加标浓度下小麦面粉基质匹配校准标样的典型色谱图。该灵敏度水平的实现得益于0.5 μL的低进样体积，因为此举有助于降低基质效应。

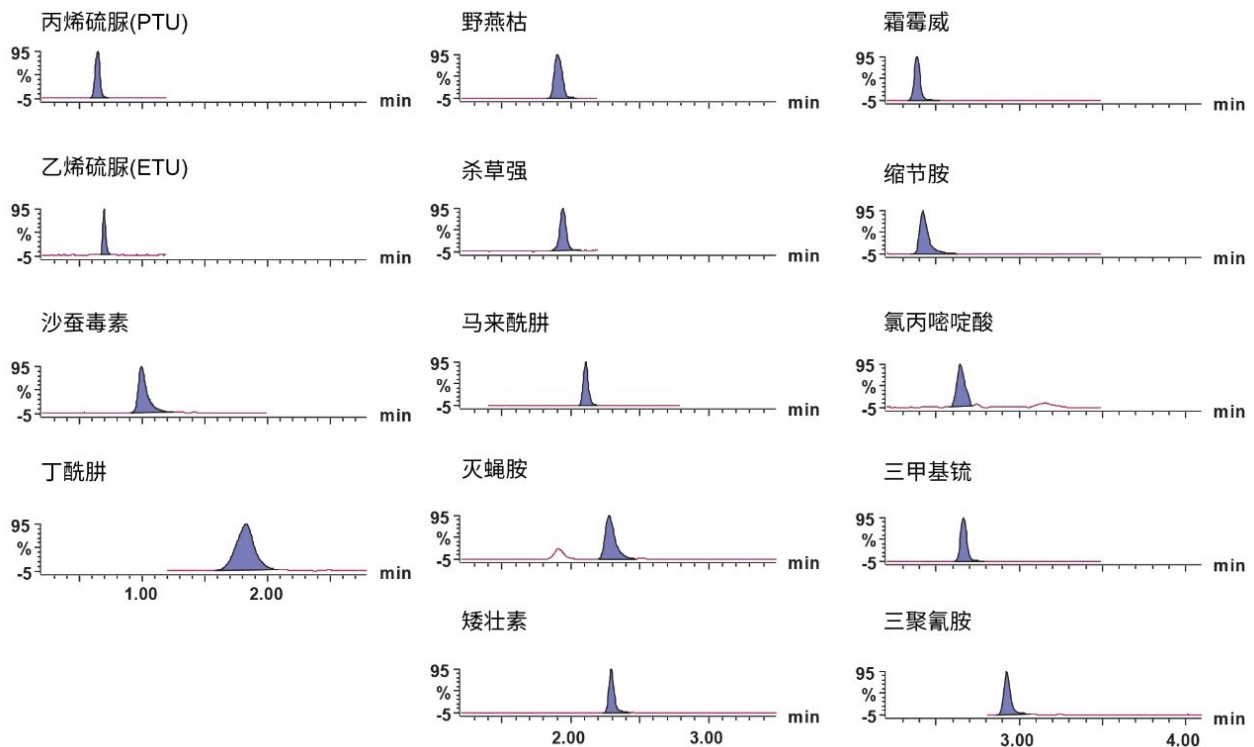


图2.0.02 mg/kg（马来酰肼为0.5 mg/kg）加标浓度下小麦面粉基质匹配校准标样的示例色谱图

如图2所示，ETU和PTU在2个色谱柱死体积前流出，但研究结果表明两者在所有验证批次中均表现出一致的高斯峰形，并且保留时间稳定性良好。因此，针对ETU和PTU研究了基质对先洗脱化合物响应值的影响。在未经内标校正处理的情况下，PTU的基质效应计算结果范围是102%~145%，ETU为95%~191%。对于有可用标记内标的所有分析物，将使用这些内标校正基质效应和分析物回收率。野燕枯和氯丙啶酸无可标记内标，其基质效应范围分别是98%~107%和132%~216%。4个验证批次的结果见图3。在黄瓜空白样品中检出大量三聚氰胺，已从验证数据中排除该残留/商品组合的结果。

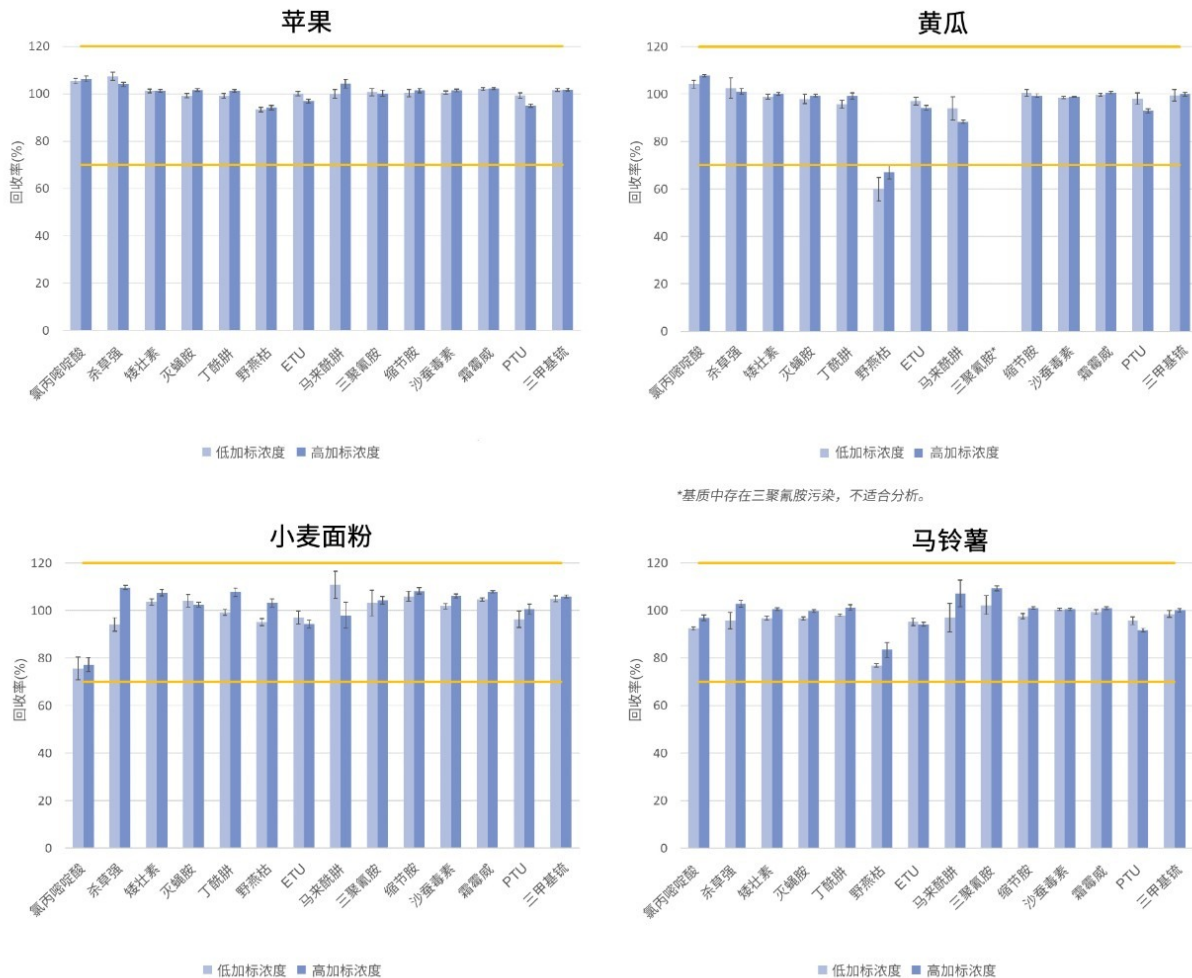


图3.各加标浓度下苹果、黄瓜、小麦面粉和马铃薯的验证批次数据(n=5)。橙色条带代表SANTE的回收率标准⁴，误差条柱代表各浓度下的RSD(%)。

验证批次的结果表明，使用标记内标后ETU和PTU表现出可接受的分析性能。氯丙啶酸的结果优于验证要求，无需使用标记内标。调查发现野燕枯的低回收率问题取决于LC-MS/MS分析前使用的过滤器类型。如使用PTFE过滤器(0.45 μm)，则验证结果优于SANTE的⁴方法验证标准中的要求。所有其他分析物的结果均满足甚至优于方法验证标准。

基质匹配校准的运用贯穿整个方法验证研究，所绘制的校准曲线见图4。验证研究中所有分析物每条校正曲线的决定系数均大于等于0.99，残差均小于20%。这些值均优于SANTE指南中设定的校准要求。

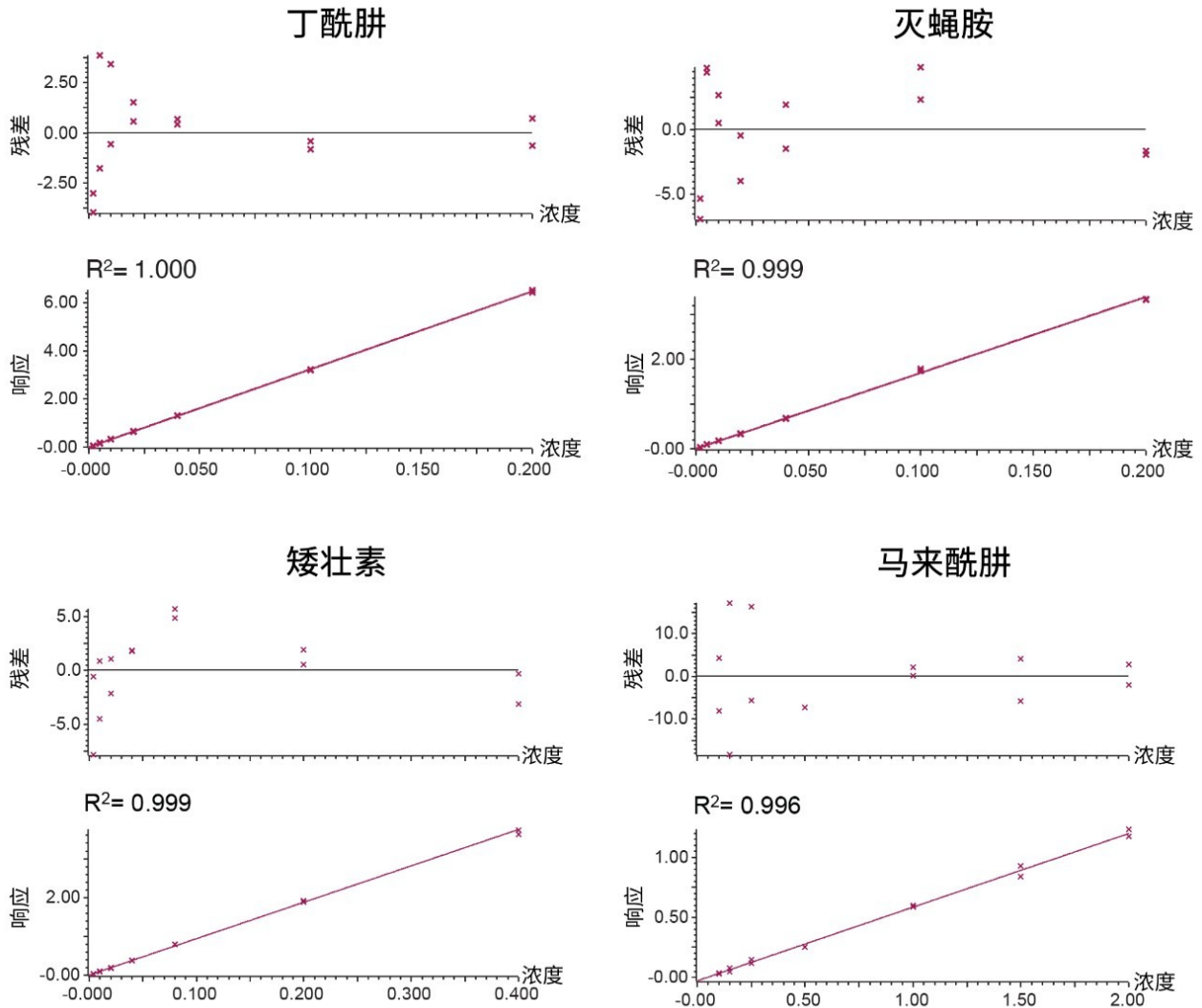


图4.苹果中的丁酰肼和黄瓜中的灭蝇胺在0.002~0.2 mg/kg浓度下、小麦面粉中的矮壮素在0.004~0.4 mg/kg浓度下，以及马铃薯中的马来酰肼在0.1~2 mg/kg浓度下的分段基质匹配校准曲线。

根据SANTE鉴定指南评估结果，并通过离子丰度比和保留时间确认回收率分析样品中的所有分析物。图5所示为4个方法验证批次中所有分析物的保留时间以及验证研究期间确定的保留时间稳定性。此外还对小麦面粉样品进行了保留时间稳定性测试，在无操作人员干预的情况下进样200次0.02 mg/kg基质校准标样。图6所示为第1次和第200次进样选定分析物的色谱图。结果表明保留时间稳定且峰形无显著变化。

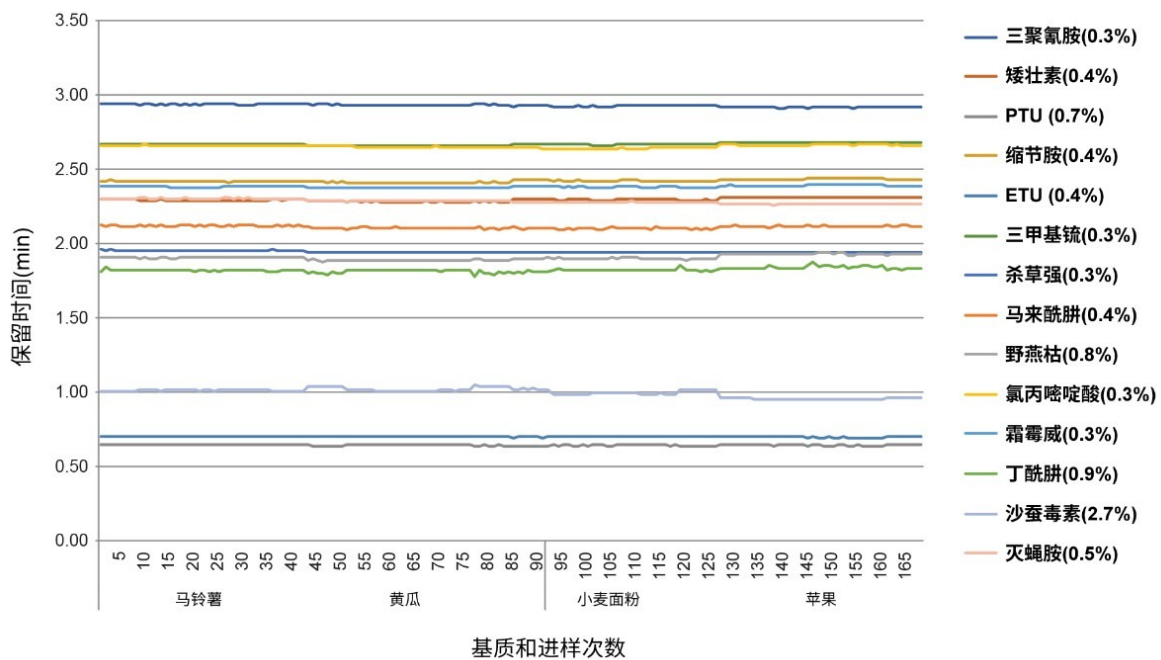


图5.4个单独批次和商品的保留时间稳定性（括号中为整组的RSD%值）

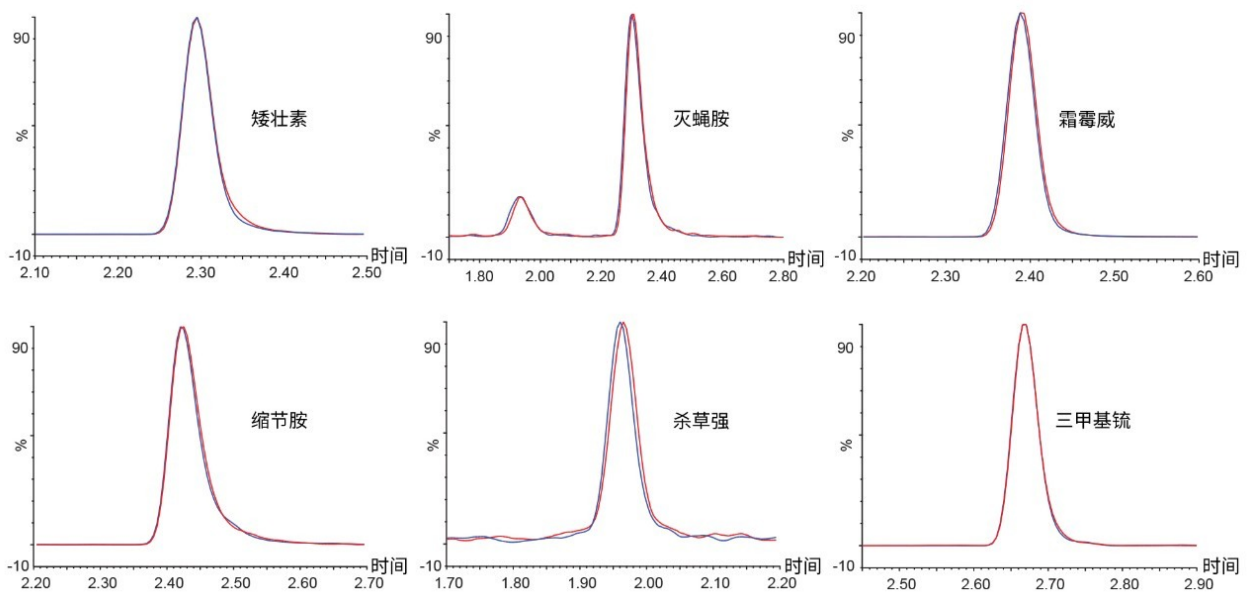


图6.有机小麦面粉基质标准品（加标浓度0.02 mg/kg，样品瓶中的浓度为5 ng/mL）第1次和第200次进样的示例色谱图（分别为蓝色和红色迹线）。这是一组没有操作人员干预的连续进样。整个运行中所有化合物的保留时间RSD均在±0.3%范围内。

使用含矮壮素和缩节胺的FAPAS QC样品（T09127，小麦面粉）测试方法性能，对样品进行2轮提取（间隔1个

月)，每轮重复提取3次。研究结果见表3。所有重复测定结果均在质控品范围内，平均浓度在两分析物认定值±20%的范围内，同时也在达到可接受z得分所需的范围内。6次重复测定的实验室内重复性(RSD) <2%。根据SANTE指南，两种分析物通过所有重复测定中的保留时间和离子丰度比确认⁵

。

| | 认定值 (µg/kg) | z ≤2时的 可接受范围 (µg/kg) | 计算浓度 (µg/kg) | 平均计算浓度 (µg/kg) | 与认定值 之间的差异 (%) | RSD (%) |
|-----|----------------|----------------------------|-----------------|-------------------|----------------------|------------|
| 矮壮素 | 210 | 125-295 | 180 | 177 | -15.6 | 1.8 |
| | | | 173 | | | |
| | | | 179 | | | |
| | | | 182 | | | |
| | | | 179 | | | |
| | | | 181 | | | |
| 缩节胺 | 100 | 56-144 | 81.1 | 80.5 | -19.5 | 1.7 |
| | | | 78.6 | | | |
| | | | 81.7 | | | |
| | | | 79.3 | | | |
| | | | 82.1 | | | |
| | | | 81.0 | | | |

表3.FAPAS T09127QC (小麦面粉) 的分析结果

结论

方法验证研究表明，将现有的QuPpe提取方案、装配ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱的ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统以及Xevo TQ-S micro质谱仪配合测定阳离子型极性农药是一种稳定耐用的分析方法。大多数化合物的结果均优于SANTE指南中的方法验证要求。该LC-MS/MS方法在2个基质QC浓度下以5次重复进样检测所有化合物的结果正确度和精密度均可接受。在研究过程中证明了保留时间稳定性和方法稳定性：在所有方法性能研究批次中，所有化合物的RSD均低于2%。在大多数情况下，定量限值均优于MRL要求。由于方法运行时间短(10 min)并且采用了QuPpe提取方法，因此可在分析多种食品类商品中的阳离子型极性农药时实现高样品通量。

科学家必须在其实验室内验证分析方法，证明方法性能适合预期用途，并且满足相关分析控制保证体系的要求

。

参考资料

1. QuPpe Method V11.European Commission (2020).[https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPpe_PO_V11\(1\).pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPpe_PO_V11(1).pdf) <[https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPpe_PO_V11\(1\).pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPpe_PO_V11(1).pdf)> (Accessed online December 2020).
2. EU Pesticide Database.European Commission (2020) [Online] https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-db_en <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-db_en>
3. International Experts Limit Melamine Levels in Food.World Health Organization (2010) http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/melamine_food_20100706/en/ <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/melamine_food_20100706/en/> (Accessed online 06 January 2021).
4. Document No.SANTE 12682/2019.Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed European Union (2019, Implemented by 01/01/2020).

特色产品

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

Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134798856>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

720007201ZH, 2021年3月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.