

使用 Agilent Bond Elut EMR-Lipid 增强型脂质去除产品对牛油果中的农药多残留分析进行 GC/MS/MS 检测

应用简报

食品检测与农业

作者

Limian Zhao 和 Derick Lucas
安捷伦科技有限公司

摘要

Agilent Bond Elut QuEChERS EMR-Lipid 增强型脂质去除产品为新一代样品前处理产品，可用于便捷的分散固相萃取 (dSPE) 中，实现高度选择性的基质去除且不影响分析物回收率，尤其适用于高脂肪含量样品。本研究证明了这款全新产品在牛油果中 23 种适用于 GC 分析的农药残留的 GC/MS/MS 分析中的应用。流程依次为 QuEChERS AOAC 萃取以及 EMR-Lipid 除脂分散净化和盐析萃取。EMR-Lipid 的基质去除效率（以重量计）、GC/MS 全扫描与基质效应测定结果均大大优于 C18/PSA 和氧化锆基吸附剂。此外，引入分析流路的基质也更少。数据同时表明，相对于 C18/PSA 乃至出现明显响应偏差的氧化锆吸附剂，EMR-Lipid 能够显著提升进样超过 100 次分析物的重现性。EMR-Lipid 对脂质具有高度选择性，且不会对分析物回收率产生负面影响；分析物回收率较高，精密度优异。本研究证明 EMR-Lipid 分散固相萃取可轻松融入 QuEChERS 工作流程并完成快速、可靠、高效的样品前处理，通过最彻底的基质去除实现牛油果中农药的多残留分析。



Agilent Technologies

前言

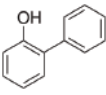
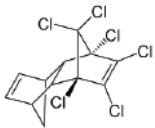
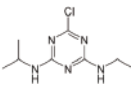
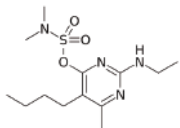
对于许多使用 QuEChERS 样品前处理方法（快速、简便、经济、高效、可靠和安全的样品前处理方法简称）的实验室来说，食品中农药残留的分析是他们的日常工作 [1,2]。这一方法通过一次萃取即可对数百种低浓度农药进行分析。尽管该方法对多种水果和蔬菜非常有效，但牛油果、坚果等高脂肪含量食品以及动物源食品却带来了新的挑战 [3,4]。而对于希望满足政府机构为确保食品消费安全而制定的严格验证标准的实验室而言，克服这些挑战是他们的首要任务。

分析方法通过 LC 和 GC 的结合来适应挥发性、半挥发性和不挥发性农药相关的多种类多残留方法需求 [4]。虽然多数农药同时适用于 LC 和 GC，但也有相当一部分并非如此。从分析物定量和共萃取基质的负面影响来看，每种色谱技术均有其固有优势和劣势。去除这些共萃取物对于复杂食品基质中分析物的准确定量至关重要，因此需要使用 C18、PSA 和 GCB 等基质去除吸附剂对样品进行处理 [5]。与典型基质去除吸附剂相比，市售含氧化锆的一些材

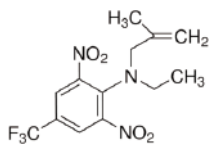
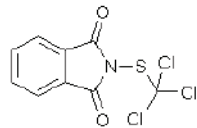
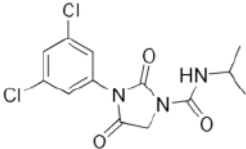
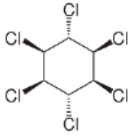
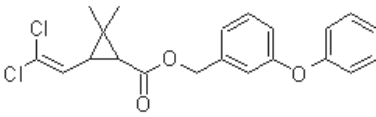
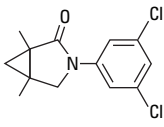
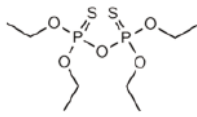
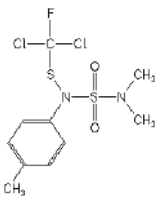
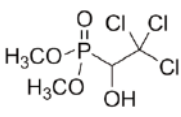
料通常能够提升脂质去除能力。然而，这类材料无法适用于所有脂质类型，并且会保留目标分析物 [6,7]。高脂肪含量样品还需要通过固相萃取小柱 (SPE) [7,8,9] 或凝胶渗透色谱 (GPC) [10] 净化，因此在常规分析的基础上增加了时间和成本。

Agilent Bond Elut EMR-Lipid 增强型脂质去除产品是一种新型吸附材料，能够选择性去除样品萃取物中的主要脂类且不会造成分析物意外损失。去除复杂基质中的脂质干扰对于 QuEChERS 而言尤为重要，因为在此过程中大量基质会随目标分析物一同被萃取出来。牛油果因其较高的脂质含量 (15% - 20%) 而被认为是一种复杂基质，因此将其选为代表性样本来进行 EMR-Lipid 评估。本研究主要考察依次采用 QuEChERS AOAC 萃取与 EMR-Lipid 除脂分散净化和盐析萃取，对牛油果中 23 种适用于 GC 分析的代表性农药进行的前处理过程。研究中选择 10 种不同类型的农药以拓宽应用范围 (表 1)。本应用简报表明 EMR-Lipid 可使复杂多脂样品 (如牛油果) 具有极高的清洁度，并在三种不同的样品浓度下测定 23 种农药残留时获得高回收率和精密度。

表 1. 目标分析物、类别、log P、水溶性和化学结构 [11]

名称	类别	Log P	水中溶解度 (mg/L)	分子式	结构
2-苯基苯酚	苯酚	3.18	560	C ₁₂ H ₁₀ O	
艾氏剂	有机氯	6.5	0.003	C ₁₂ H ₈ Cl ₆	
莠去津	三嗪类	2.7	33	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	
乙噻酚磺酸酯	羟基嘧啶类	2.2	22	C ₁₃ H ₂₄ N ₄ O ₃ S	

名称	类别	Log P	水中溶解度 (mg/L)	分子式	结构
克菌丹	邻苯二甲酰亚胺	2.5	5.1	C ₉ H ₈ Cl ₃ NO ₂ S	
百菌清	氯腈	2.94	1.0	C ₈ Cl ₄ N ₂	
甲基毒死蜱	有机磷	4.0	2.74	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	
DDT	有机氯	6.91	0.006	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	
溴氰菊酯	拟除虫菊酯类	4.6	0.0002	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	
二嗪磷	有机磷	3.69	60	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	
抑菌灵	磺胺类	3.7	1.3	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ FN ₂ O ₂ S ₂	
敌敌畏	有机磷	1.9	18000	C ₄ H ₇ Cl ₂ O ₄ P	
硫丹硫酸酯	有机氯	3.13	0.48	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	
异狄氏剂	有机氯	3.2	0.24	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	

名称	类别	Log P	水中溶解度 (mg/L)	分子式	结构
乙丁烯氟灵	二硝基苯胺类	5.11	0.01	$C_{13}H_{14}F_3N_3O_4$	
灭菌丹	邻苯二甲酰亚胺	3.02	0.8	$C_9H_4Cl_3NO_2S$	
异丙二酮	二甲酰亚胺	3.1	12.0	$C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$	
林丹	有机氯	3.5	8.52	$C_6H_6Cl_6$	
氯菊酯	拟除虫菊酯类	6.1	0.006	$C_{21}H_{20}Cl_2O_3$	
腐霉利	二甲酰亚胺	3.3	2.46	$C_{13}H_{11}Cl_2NO_2$	
治螟磷	有机磷	3.99	10	$C_8H_{20}O_5P_2S_2$	
对甲抑菌灵	磺胺类	3.9	0.9	$C_{10}H_{13}Cl_2FN_2O_2S_2$	
敌百虫	有机磷	0.43	120000	$C_4H_8Cl_3O_4P$	

实验部分

所有试剂和溶剂均为 HPLC 或分析纯级。乙腈 (ACN) 和甲醇购自 Honeywell (美国密歇根州马斯基根)。试剂级乙酸 (AA)、农药标准品以及内标购自西格玛奥德里奇公司 (美国密苏里州圣路易斯)。

溶液与标准品

向 990 mL ACN 中加入 10 mL 乙酸, 制成含 1% 乙酸的乙腈。标准品和内标 (IS) 储备液使用 ACN 或甲醇配制, 浓度为 2.0 mg/mL。除克菌丹、灭菌丹、敌百虫和乙嘧酚磺酸酯外, 其余混合工作溶液均采用 ACN 制备, 浓度为 25 µg/mL。由于上述四种化合物对仪器的响应强度相对较低, 因此将其混合工作溶液的浓度提高至其他农药的五倍, 即 125 µg/mL。25 µg/mL 混合内标工作溶液采用 ACN 配制, 其中含有 TPP、乙基对硫磷 d_{10} 和 ^{13}C -DDT。

设备

样品前处理所用的设备和材料包括:

- Geno/Grinder (SPEX, 美国新泽西州墨图根)
- Centra CL3R 离心机 (Thermo IEC, 美国马萨诸塞州)
- Eppendorf 微量离心管 (Brinkmann 仪器, 美国纽约州韦斯特伯里)
- 涡旋仪和多管涡旋仪 (VWR, 美国宾夕法尼亚州拉德诺)
- 瓶口分液器 (VWR, 美国新泽西州南普兰菲尔德)
- Eppendorf 移液管和重复用吸管
- Agilent Bond Elut EMR-Lipid 增强型脂质去除净化管 (部件号 5982-1010) 和 Agilent Bond Elut EMR-Lipid Polish 反萃管 (部件号 5982-0101)

仪器

分析在配备 Agilent 7693B 自动进样器的 Agilent 7890A GC 和 Agilent 7000C 三重四极杆 GC/MS 系统上完成。强烈建议将色谱柱反吹用于复杂基质的分析中 [12]。加标样品的总分析时间为 23 min, 其中色谱柱反吹 2 min。

仪器条件

气相色谱条件

自动进样器:	Agilent 7693 自动进样器和样品盘 10 µL 进样针 (部件号 G4513-80220), 进样量 1 µL 进样后溶剂 A (乙腈) 清洗次数为 3 次 3 台样品泵 进样后溶剂 B (异丙醇) 清洗次数为 3 次
色谱柱:	Agilent J&W DB-5ms 超高惰性柱, 0.25 mm × 15 m, 0.25 µm (部件号 122-5512UI)
载气:	氦气, 恒定压力
气体过滤器:	气体净化载气过滤器套装, 1/8 英寸 (部件号 CP17974)
进样口衬管:	安捷伦单锥形不分流超高惰性衬管, 带玻璃毛 (部件号 5190-2293)
进样口:	MMI 进样口, 冷脉冲不分流模式, 初始 75 °C 保持 0.02 min, 然后以 750 °C/min 的速度增加到 350 °C
进样脉冲压力:	36 psi 持续 0.75 min
分流出口吹扫流速:	60 mL/min, 0.75 min 时开始
进样口压力:	运行过程 17 psi, 反吹过程 1.0 psi
柱温箱:	60 °C 保持 2.57 min, 然后以 50 °C/min 升温至 150 °C, 再以 6 °C/min 升温至 200 °C, 最后以 16 °C/min 升温 至 300 °C 并保持 3 min
后运行:	300 °C, 2 min
微板流路控制技术:	UltiMetal Plus Ultimate 吹扫接头 (部件号 G3182-61581), 用于反吹分析柱和进样口
辅助 EPC 气体:	氦气通入吹扫 Ultimate 接头
排气管:	0.0625 in 外径 × 0.010 in 内径 × 100 cm, 316 不锈钢管, 柱温箱顶部
辅助气压力:	运行过程 4 psi, 反吹过程 75 psi
连接:	连接进样口与 Ultimate 吹扫接头
限流器:	惰性熔融石英管, 0.65 m × 0.15 mm (部件号 160-7625-5)
连接:	连接 Ultimate 吹扫接头与 MSD

MSD 条件

MSD:	Agilent 7000C 三重四极杆气质联用系统, 惰性, 配备高性能电子元件
真空泵:	高性能涡轮泵
模式:	MRM
调谐文件:	Atune.u
传输线温度:	280 °C
离子源温度:	300 °C
四极杆温度:	Q1 和 Q2 均为 150 °C
溶剂延迟:	2.57 min
碰撞气体流量:	氦淬灭气流速 2.35 mL/min, N ₂ 碰撞气流速 1.5 mL/min
质谱分辨率:	MS1 和 MS2 = 1.2 u

针对每种分析物的 MRM 参数优化可通过安捷伦农药和环境污染
物 MRM 数据库 (G9250AA) 轻松实现, 该数据库包含 1070 余
种化合物的 MS/MS 条件和保留时间信息 [13]。表 2 列出了本

研究中所用目标分析物的 MRM 离子对。23 种待测农药的典型
GC/MS/MS 色谱示例如图 1 所示。

表 2. 用于农药分析的 GC/MS/MS MRM 条件和保留时间

分析物	RT (min)	MRM			
		定量通道	CE (v)	定性通道	CE (v)
敌敌畏	4.70	184.9 → 93	10	109 → 79	5
敌百虫	5.94	110.8 → 47	30	81.8 → 47	50
2-苯基苯酚	6.39	169 → 115.1	25	170 → 141.1	25
乙丁烯氟灵	7.58	275.9 → 202.1	15	315.9 → 275.9	10
治螟磷	7.83	237.8 → 145.9	10	201.8 → 145.9	10
莠去津	8.69	214.9 → 58.1	10	214.9 → 200.2	5
林丹	8.83	181 → 145	15	216.9 → 181	5
百菌清	9.20	263.8 → 168	25	265.8 → 231	20
二嗪磷	9.22	137.1 → 54	20	199.1 → 93	20
甲基毒死蜱	10.30	285.9 → 92.9	20	124.9 → 47	15
抑菌灵	11.31	223.9 → 123.1	20	123 → 77	20
艾氏剂	11.55	262.9 → 192.9	35	254.9 → 220	35
乙基对硫磷 D ₁₀ (内标)	11.96	98.7 → 67	10	114.9 → 82.9	20
对甲抑菌灵	12.80	136.9 → 91	20	136.9 → 65	30
克菌丹	12.96	151 → 79.1	15	149 → 79.1	10
灭菌丹	13.13	259.8 → 130.1	15	261.8 → 130.1	15
腐霉利	13.13	282.8 → 96	10	96 → 67.1	10
乙嘧酚磺酸酯	15.44	272.9 → 193.1	15	272.9 → 108	5
异狄氏剂	15.68	316.7 → 280.8	5	244.8 → 173	30
硫丹硫酸酯	17.44	273.9 → 238.9	15	271.9 → 237	15
¹³ C-DDT (内标)	17.69	246.5 → 177.1	15	248.5 → 177.1	15
DDT	17.69	235 → 165.2	20	237 → 165.2	20
TPP (内标)	18.20	325.9 → 169	30	325.9 → 233	27
异丙二酮	18.82	313.8 → 55.9	20	187 → 124	25
氯菊酯	20.68	183.1 → 153.1	15	183.1 → 153.1	15
溴氰菊酯	22.51	252.9 → 93	15	181 → 152.1	25

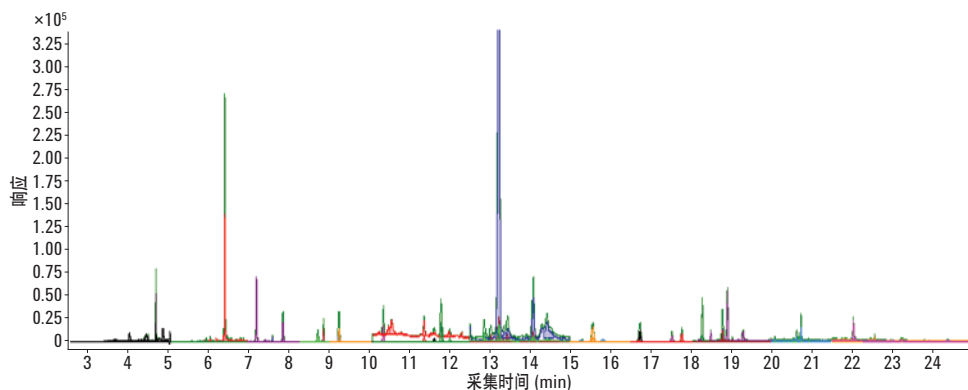


图 1. 添加 50 ng/g 农药标准的牛油果样品的典型 GC 三重四极杆色谱图 (MRM)。
样品采用 QuEChERS 进行前处理, 之后采用 Agilent Bond Elut EMR-Lipid 进行净化

样品前处理

最终样品前处理流程按照以下步骤进行优化：

1. 称取 15 g (± 0.1 g) 均质牛油果样品于 50 mL 离心管中
2. 加入 15 mL 乙腈 (1% AA) 后涡旋混合 10 s
3. 加入 AOAC 萃取盐包
4. 使用机械振荡器混合 2 min
5. 在 5000 rpm 下离心 5 min
6. 向 15 mL EMR-Lipid 分散固相萃取管中加入 5 mL 水，然后移取 5 mL 上清液至 EMR-Lipid 管中
7. 立即涡旋混合使样品分散，然后在多管涡旋混合器中将整批样本额外混合 60 s
8. 在 5000 rpm 下离心 3 min
9. 移取 5 mL 上清液至 15 mL 含有 2 g 盐 (1:4 NaCl:MgSO₄) 的 EMR-Lipid Polish 反萃管中，并漩涡混合 1 min
10. 在 5000 rpm 下离心 3 min
11. 移取上层 ACN 相至样品瓶中用于 GC/MS/MS 分析

完整的样品前处理流程如图 2 所示。

校准标样和质控样品

在步骤 1 之后添加相应浓度的混合标准工作溶液到样本中得到预加标 QC 样品，进行 6 次重复测定。QC 样品的浓度对应于 5、50 和 300 ng/g 的农药残留牛油果样品。克菌丹、灭菌丹、敌百虫和乙嘧磺酸酯的 QC 样品浓度分别为 25、250 和 1500 ng/g。除空白基质外的所有样品中均加入内标溶液，浓度相当于 250 ng/g 的牛油果样品。

将标准品和内标工作溶液在步骤 10 之后加入相应空白基质样品中配制基质匹配校准标样，分别对应 1、5、10、50、100、200、300 和 400 ng/g 牛油果样品以及 250 ng/g 内标。四种化合物用作校准标样时均分别采用 5、25、50、250、500、1000、1500 和 2000 ng/g 的浓度。

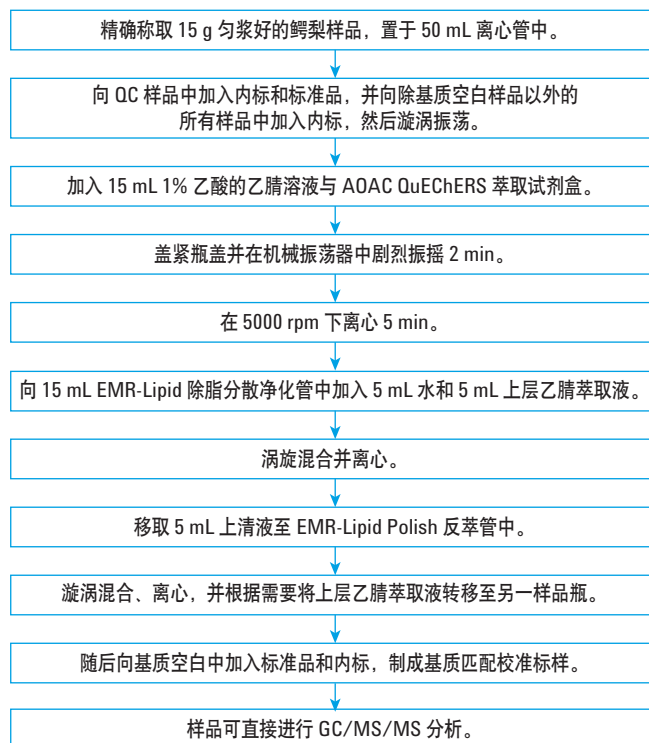


图 2. 牛油果中样品 GC/MS/MS 分析的样品前处理工作流程，包括 QuEChERS 萃取与 Agilent Bond Elut EMR-Lipid 净化

基质净化评估

研究采用三种不同净化材料对牛油果萃取物进行处理，分别为除脂 dSPE (C18/PSA)、氧化锆吸附剂和 EMR-Lipid。实验对净化前后最终萃取物的 GC/MS 全扫描图谱进行了对比。将色谱图叠加后根据色谱图背景对比基质净化量。为对基质净化效率进行定量评估，本研究对整个窗口中的 GC/MS 全扫描色谱图进行了手动积分，并根据公式 1 计算得出了基质去除效率。

$$\% \text{基质去除} = \frac{\text{总峰面积}_{\text{未经净化样品}} - \text{总峰面积}_{\text{净化后样品}}}{\text{总峰面积}_{\text{未经净化样品}}} \times 100$$

公式 1

安捷伦已经发布了一种对比采用 EMR-Lipid、C18/PSA 和氧化锆吸附剂处理前后牛油果共萃取物重量的失重测定实验 [14]。

方法对比与验证

分析物回收率实验对牛油果中 50 ng/g 预加标和后加标样品进行了对比。样品采用 QuEChERS AOAC 萃取流程后用 EMR-Lipid、C18/PSA 或氧化锆进行净化处理。采用 EMR-Lipid 净化时，方案如图 2 所示。其他样本采用相同 QuEChERS 萃取流程，并使用 C18/PSA 和氧化锆吸附剂净化。将 1 mL ACN 粗提物移取至 2 mL C18/PSA dSPE 管（部件号 5982-5122）或含有 100 mg 氧化锆吸附剂的 2 mL 样品瓶中。随后将样品涡旋混合 1 分钟，并使用微量离心机以 13000 rpm 的转速离心 3 分钟。最后将 ACN 层移取至样品瓶中进行 GC/MS/MS 分析。基质匹配校准标样的制备方法是标准品与内标后加标至牛油果空白萃取物中。将分析物峰面积预加标和后加标样品的峰面积相比即可计算出回收率。

EMR-Lipid 方法验证采用 8 点基质匹配校准曲线，在 3 个不同牛油果农残含量下通过 6 次重复测定进行。内标用于定量分析，同时数据以准确度和精密度的形式列出。

基质对 GC/MS/MS 系统性能的影响

研究通过评估牛油果样品多次进样过程中的分析物响应一致性，来考察基质对 GC/MS/MS 系统性能的影响。通过对经 EMR-Lipid、C18/PSA 或氧化锆吸附剂处理的牛油果萃取物多次进样，实验对 GC/MS/MS 中随时间变化的分析物响应进行了对比。各检测批次均包括空白基质和 50 ppb 后加标 QC 样品。进样顺序为前四次空白基质，第五次 QC 样品，共计 100 次进样。此举目的在于确定采用不同净化手段时，积累在 GC/MS 流路表面的未去除基质对分析物仪器响应的影响。对于每种净化技术，分析物响应（峰面积）可用于计算超过 100 次进样的 %RSD。为排除 GC 流路的影响，实验在每种净化方法中均采用了安捷伦惰性流路消耗品以及全新安捷伦超高惰性衬管与色谱柱。

结果与讨论

基质净化评估

复杂基质会显著影响 GC/MS 性能，因为基质会在 GC 流路表面形成活性位点、引发质谱仪中的基质效应，并对最终色谱图产生干扰。尽管 GC/MS (SIM) 和 GC/MS/MS (MRM) 能够提高对目标离子的选择性，但未去除的基质仍会产生干扰并随时间推移使仪器性能降低。如需消除牛油果等高脂肪含量基质带来的负面影响，则必须采用更加彻底的样品前处理净化方法，使样品更适用于 GC/MS 分析。

图 3A 显示牛油果空白基质以及经 EMR-Lipid、C18/PSA 和氧化锆净化法处理样品的 GC/MS 全扫描色谱图叠加。未经进一步净化样品的色谱图（黑色迹线）显示出大量基质干扰，这将妨碍目标分析物的分析。经 C18/PSA 和氧化锆吸附剂净化处理的萃取物色谱图（分别为蓝色和绿色）显示其基质去除率分别为 36% 和 55%（根据公式 1 得出）。而临近基线的 EMR-Lipid 除脂分散净化迹线（红色）则显示出 GC/MS 全扫描色谱图中的干扰去除效果，对应于 95% 基质去除率。EMR-Lipid 获得的较大净化量对牛油果中农药分析的意义重大，因为样品中影响仪器性能的基质含量实现了大幅减少。而且，仅仅在传统 QuEChERS 工作流程中采用 EMR-Lipid 分散固相萃取即可实现这一目的。

图 3B 为添加 50 ppb 农药标准品的牛油果样品的 GC/MS/MS MRM 叠加色谱图。由于 MS/MS 系统的选择性得到了提高，因此基质背景并没有 GC/MS SIM 或全扫描色谱图中明显。尽管对目标分析物具有优异的选择性，但 C18/PSA 和氧化锆得到的色谱图（分别为蓝色和绿色）在 11 - 20 分钟之间仍存在干扰峰。这些干扰会影响部分分析物信号的积分准确性。通过图 3B 中红色迹线可明显看出 EMR-Lipid 萃取能够大大提升背景洁净度，从而显著提升积分准确性。

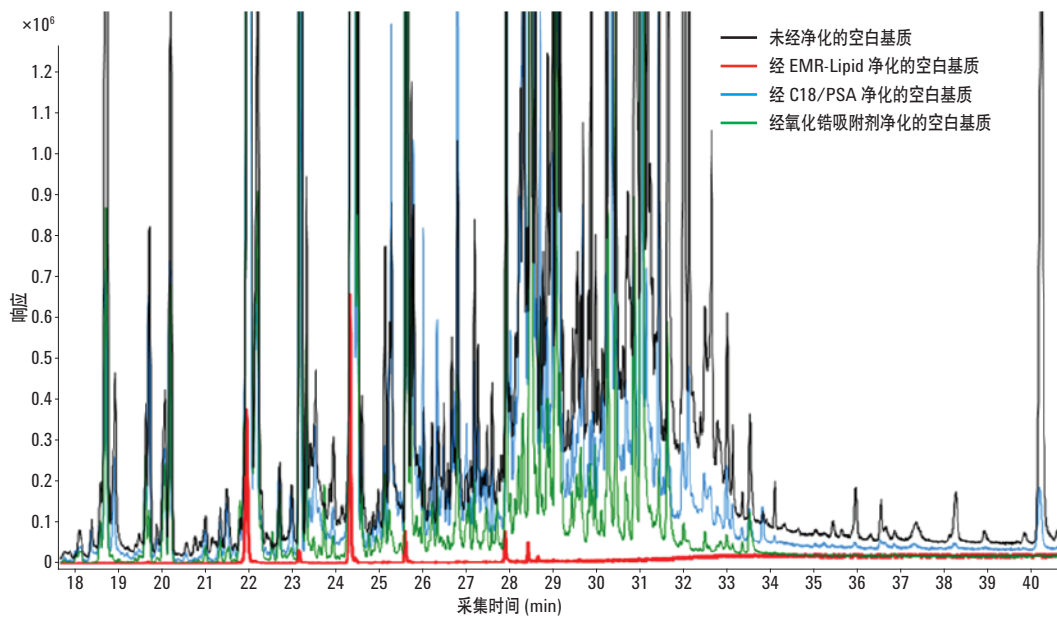


图 3A. QuEChERS AOAC 萃取后采用 Agilent Bond Elut EMR-Lipid (红色)、氧化锆 (绿色)、PSA/C18 (蓝色) 进行 dSPE 或未经净化 (黑色) 得到的牛油果空白基质的 GC/MS 全扫描叠加色谱图

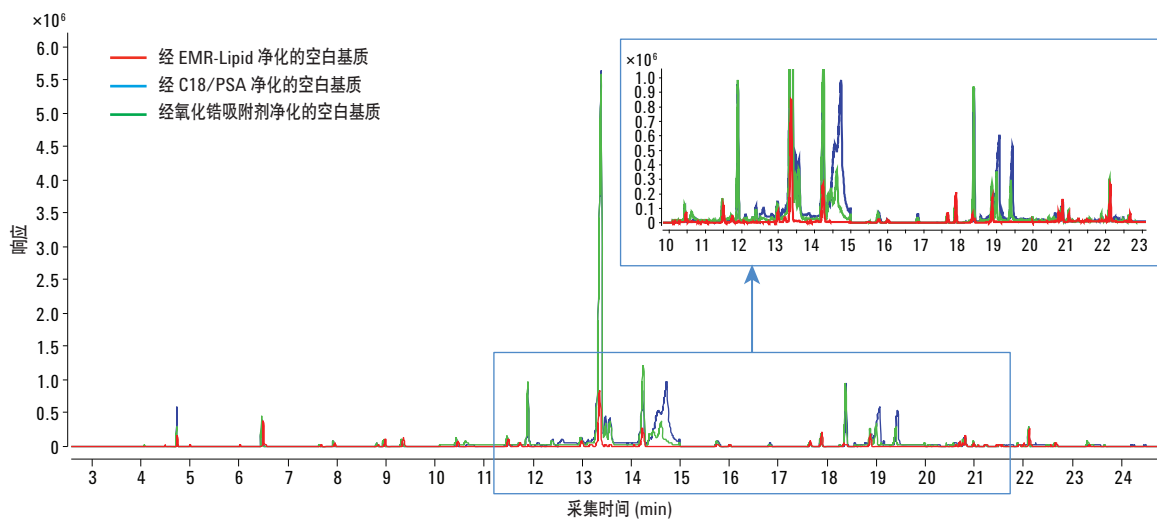


图 3B. 依次采用 QuEChERS AOAC 萃取与 Agilent Bond Elut EMR-Lipid (红色)、PSA/C18 (蓝色) 和氧化锆吸附剂 (绿色) 净化得到的牛油果样品的 GC/MS/MS MRM 叠加色谱图。所有样品均添加 50 ppb 农药标准品

图 4 表明 EMR-Lipid 具有出色的基质净化功能，并使三种示例分析物达到了优异的基质去除效率。采用 EMR-Lipid 净化的色谱图在所有情况下均表现出更少的干扰峰、更出色的信噪比和一致的基线积分。这些改进使数据处理和审查更快速、更轻松，同时还使分析方法更加可靠。

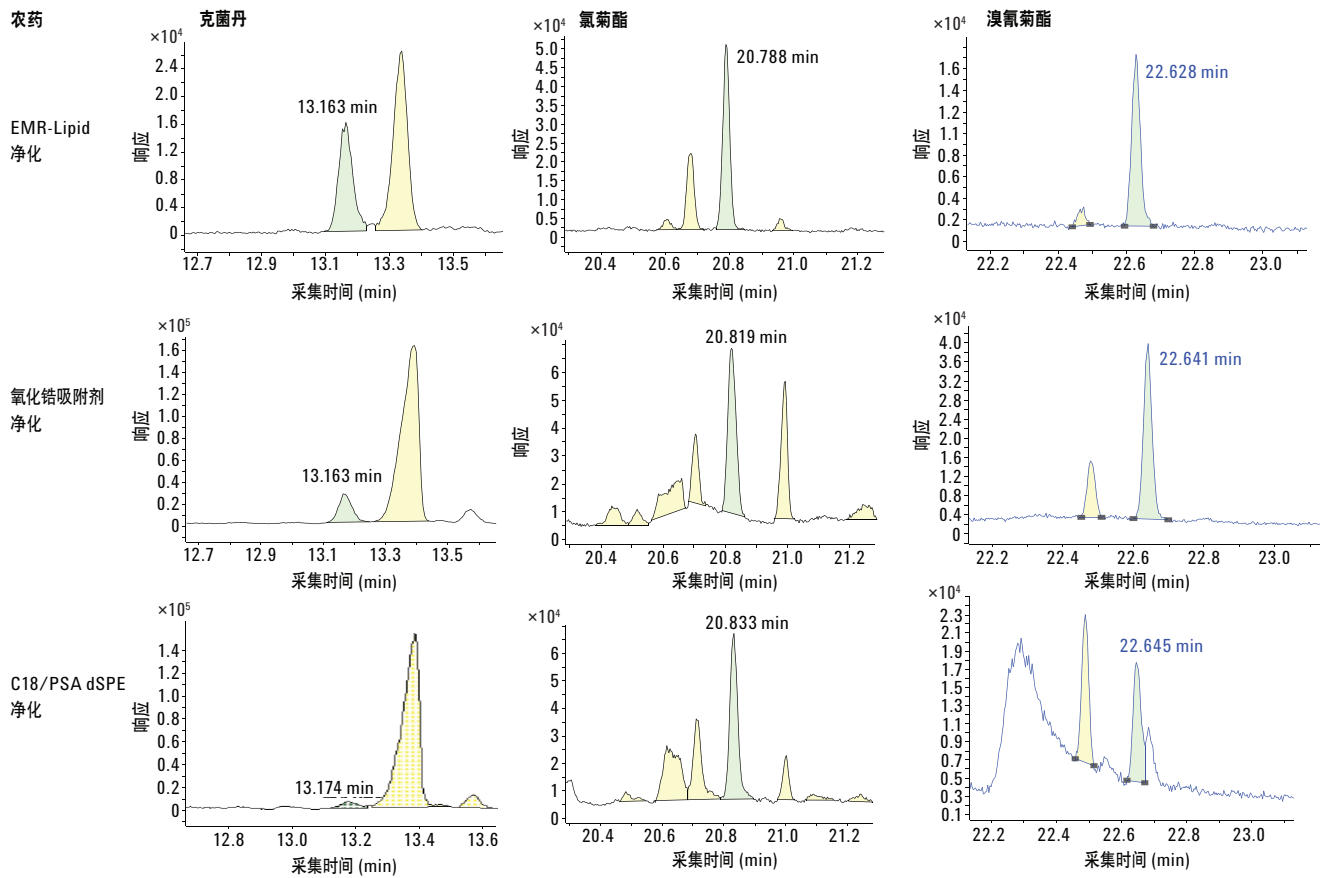


图 4. 目标分析物的对比色谱图以及基质对 MRM 窗口中峰响应、峰质量与干扰的影响。空白样品采用 Agilent Bond Elut EMR-Lipid、氧化铝或 C18/PSA 中的任意一种进行，并向最终样品中后加标 50 ppb 的农药标准品

针对分析物回收率的方法对比

随后将 EMR-Lipid 优化方法与采用 C18/PSA 或氧化锆吸附剂的传统 QuEChERS 方法进行对比。图 5 为采用上述不同净化材料时所有 23 种农药回收率的对比结果。结果表明 EMR-Lipid 净化不会引起明显的分析物损失，因此能够获得与 C18/PSA 净化相当的回收率。然而之前的结果显示，C18/PSA 和氧化锆吸附剂无法实现有效的基质去除。

一些分析物具有较低的绝对回收率，与净化方法无关。艾氏剂、异狄氏剂和 DDT 的回收率低于 60%，苯氯菊酯和溴氰菊酯的回收率分别为 63% 和 75%。C18/PSA 净化的回收率比 EMR-Lipid 和氧化锆吸附剂净化的回收率稍高。这些农药均具有较高的亲脂性（高 log P），在水中溶解性非常低并且很容易与牛油果等高脂样品基质结合，这使它们更难以使用乙腈等极性溶剂进行萃取。而使用更强的溶剂也许能够提高这些亲脂分析物在多脂基质中的萃取效率，从而提高分析物萃取效率与绝对回收率。未来将进一步研究亲脂化合物在高脂基质中的萃取效率以及增强型脂质去除。

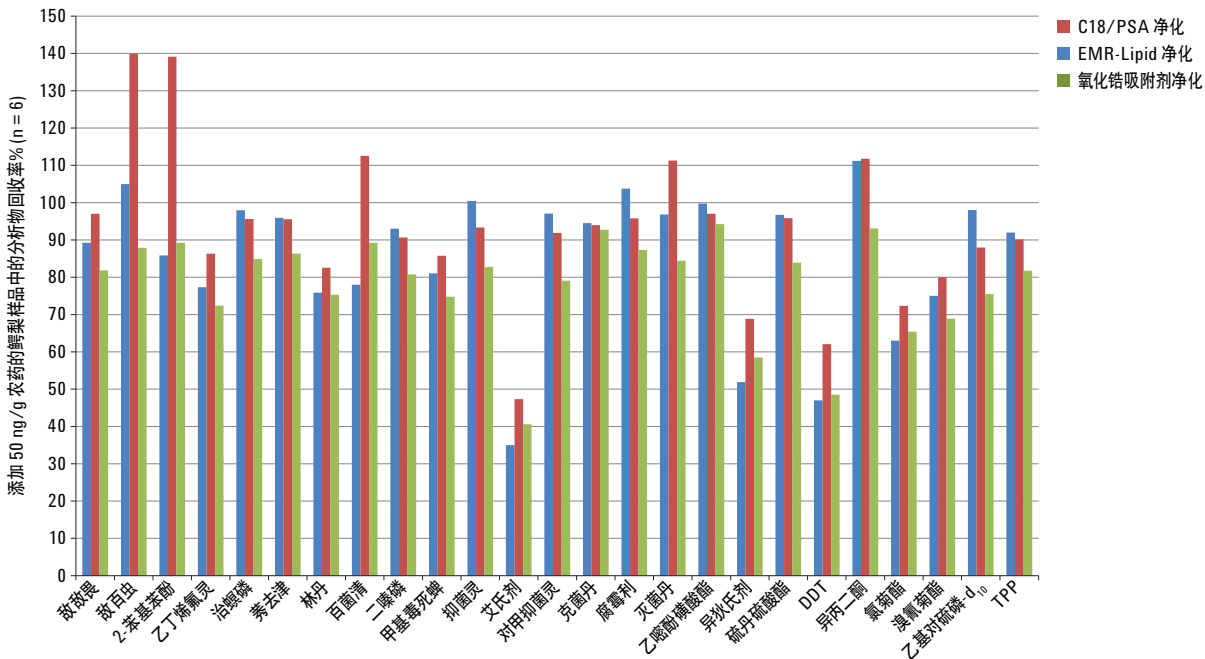


图 5. 经 Agilent Bond Elut EMR-Lipid、C18/PSA 和氧化锆净化法处理的 50 ppb 牛油果样品的回收率对比结果

为对这些绝对回收率较低的化合物进行校正，研究中采用稳定的标记内标 ^{13}C -DDT 来提升 DDT、艾氏剂和异狄氏剂最终定量结果的准确性。TPP 内标适用于苯氯菊酯和溴氰菊酯的定量分析。

方法验证

实验通过运行完整的定量批处理实现 EMR-Lipid 方法的验证。内标用于定量分析，同时数据以准确度和精密度形式列出。三种用于定量分析的内标分别为乙基对硫磷 D_{10} 、 ^{13}C -DDT 和 TPP。保留时间在 12 分钟以内的分析物以乙基对硫磷 D_{10} 为内标，而 12 分钟以后的则以 TPP 为内标。如前所述， ^{13}C -DDT 用于艾氏

剂、异狄氏剂和 DDT 的内标时，可校正萃取效率低所导致的分析物损失。

详细的验证结果列于表 3。图 6 为采用共计 18 次 QC 重复分析（三种浓度，每个浓度 $n = 6$ ）计算得出的平均准确度和精密度的汇总图。除一种分析物 (67%) 之外，所有农药的准确度均介于 70% - 120% 之间，且所有农药的精密度 RSD 均小于 20%，其中 80% 的 RSD 低于 10%。艾氏剂的准确度仍略低于 70%，但具有良好的精密度 (RSD < 6%)，根据 SANCO 指南认为是可接受结果 [15]。

表 3. 加标浓度为 5、50 和 300 ng/g 的牛油果中农药 6 次重复测定的定量分析结果

分析物	校准曲线		校准范围 (ng/g)	方法准确度和精密度 (ng/g QC ¹)					
	回归拟合/权重	R ²		5 (25)		50 (250)		300 (1500)	
				回收率%	RSD	回收率%	RSD	回收率%	RSD
敌敌畏	线性拟合, 1/x	0.9967	1-400	97	8.2	108	4.9	111	12.7
敌百虫	线性拟合, 1/x	0.9964	5-2000 ¹	98	7.8	95	7.3	84	4.7
2-苯基苯酚	线性拟合, 1/x	0.9996	10-400 ²	97	14.0	104	1.7	105	5.1
乙丁烯氟灵	线性拟合, 1/x	0.9969	1-400	109	3.2	98	7.6	110	6.5
治螟磷	线性拟合, 1/x	0.9958	1-400	96	5.8	76	3.9	85	9.8
莠去津	线性拟合, 1/x	0.9967	1-400	91	5.0	80	2.1	76	3.9
林丹	线性拟合, 1/x	0.9991	1-400	92	6.7	104	4.0	98	12.5
百菌清	线性拟合, 1/x	0.9944	1-400	89	13.5	103	8.6	92	19.4
二嗪磷	线性拟合, 1/x	0.9993	1-400	102	6.8	116	5.1	108	8.9
甲基毒死蜱	线性拟合, 1/x	0.9984	1-400	101	6.2	123	4.5	113	15.0
抑菌灵	线性拟合, 1/x	0.9989	1-400	96	10.2	85	5.1	91	4.3
艾氏剂	线性拟合, 1/x	0.9982	1-400	76	4.8	59	2.3	65	5.1
对甲抑菌灵	线性拟合, 1/x	0.9990	10-400	108	10.0	93	6.2	93	5.4
克菌丹	线性拟合, 1/x	0.9959	25-2000 ^{1,2}	89	8.2	109	11.0	87	18.1
灭菌丹	线性拟合, 1/x	0.9897	5-2000 ¹	76	9.5	79	9.9	87	13.2
腐霉利	线性拟合, 1/x	0.9977	1-400	87	5.0	76	1.9	79	7.2
乙啶磺酸酯	线性拟合, 1/x	0.9957	5-2000 ¹	101	6.5	100	5.6	85	10.3
异狄氏剂	线性拟合, 1/x	0.9967	1-400	75	10.8	88	6.7	80	13.6
硫丹硫酸酯	线性拟合, 1/x	0.9996	1-400	96	9.9	97	6.4	95	4.9
DDT	线性拟合, 1/x	0.9995	1-400	103	4.5	105	2.6	107	4.6
异丙二酮	线性拟合, 1/x	0.9995	1-400	97	6.7	105	2.7	97	4.2
氯菊酯	线性拟合, 1/x	0.9992	1-400	87	6.6	97	4.3	84	14.0
溴氰菊酯	线性拟合, 1/x	0.9963	1-400	89	13.8	92	8.3	98	11.5

¹ 响应低的化合物在混合标准工作溶液中的浓度提高至原来的五倍。因此，QC 和校准标样的加标浓度也提高至其他化合物的五倍

² 由于较差的灵敏度或基质干扰峰而升高的 LOQ 会干扰原有 LOQ 下分析物的检测结果

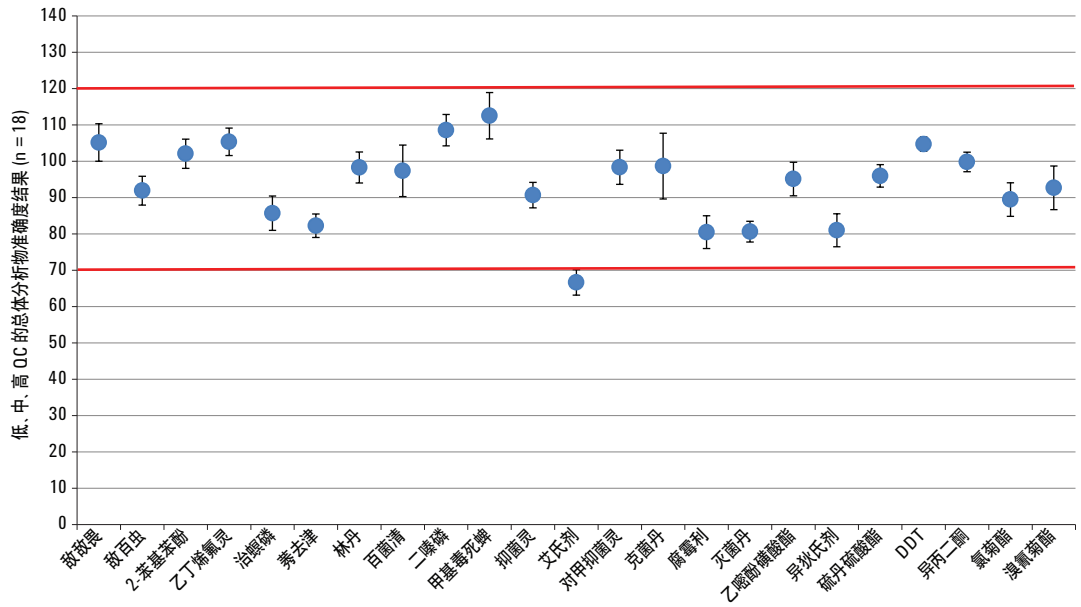


图 6. 采用包括 QuEChERS 萃取的 Agilent Bond Elut EMR-Lipid 分散固相萃取包对牛油果样品中 23 种农药的定量结果。数据点代表准确度和精密度，由三个不同浓度下的六次重复测定计算得出。误差线 = 95% CI

基质对 GC/MS/MS 系统性能的影响

由于系统接受越来越多的样品进样，因此基质干扰将随时间推移影响 GC/MS/MS 系统性能。GC 流路活性位点会对仪器性能产生负面影响。安捷伦惰性流路组件使整个 GC 流路实现彻底的去活化，并能够显著降低分析物与活性位点之间造成分析物损失和色谱异常的不利相互作用。但如果基质含有大量高沸点化合物（高脂肪含量），则这些物质将在流路表面积聚并产生新的活性位点。随着时间推移，这将造成分析物响应偏差并严重影响方法的可靠性，同时还会减少每个批处理的进样次数。为解决这一问题，实验室必须进行更频繁的仪器维护，例如更换衬管或切割/更换色谱柱，而这将实验室分析效率降低。

正如基质净化评估和基质去除失重测定所得出的结论 [14]，经 EMR-Lipid 处理的样品背景明显更洁净，表明引入 GC/MS/MS 系统的基质质量大大减少。这减少了 GC/MS 流路中累积的活性位点数量，从而确保了仪器的分析完整性。牛油果样品在 GC/MS/MS 中 100 次以上的进样具有更出色的分析物精密度 (RSD)，从而充分印证了以上观点 (表 4)。经 EMR-Lipid 处理的样品中有 91% 分析物的 RSD 小于 15%，其中绝大多数小于 10%。在 100 次以上的进样实验中，克菌丹和 DDT 的 RSD 较高 (分别为 29.9% 和 21.6%)，而前 50 次进样的 RSD 则分别为 11.1% 和 6.4%。

表 4. 50 和 100 次牛油果样品进样的分析物重现性 (RSD) 对比，样品经 Agilent Bond Elut EMR-Lipid、C18/PSA 或氧化锆吸附剂处理，采用 GC/MS/MS 测定。样品中加标浓度为 50 ng/g。分析物峰面积用于计算 RSD 结果

农药	100 次进样的分析物 RSD (n = 20)			50 次进样的 RSD (n = 10)		
	EMR—Lipid 净化	C18/PSA 净化	氧化锆吸附剂 净化	EMR—Lipid 净化	C18/PSA 净化	氧化锆吸附剂 净化
敌敌畏	6.2	10.5	16.8	2.2	9.4	6.3
2-苯基苯酚	7.0	13.6	19.5	5.0	12.4	8.4
乙丁烯氟灵	12.4	18.8	32.0	5.8	10.3	7.9
治螟磷	7.1	11.8	17.2	3.1	6.4	10.8
莠去津	6.8	12.2	19.1	3.2	12.2	5.2
林丹	8.5	10.8	20.0	4.6	10.9	5.1
百菌清	12.5	11.7	37.4	8.0	12.9	11.0
二嗪磷	6.6	11.7	16.9	4.4	10.5	5.6
甲基毒死蜱	8.4	8.9	14.9	3.8	8.6	6.6
抑菌灵	11.7	9.0	25.9	5.4	9.9	5.5
艾氏剂	9.8	19.3	25.7	8.6	19.3	7.1
对甲抑菌灵	10.5	6.6	17.8	4.2	6.9	6.6
克菌丹	29.9	51.9	47.1	11.1	24.9	21.7
腐霉利	6.8	14.3	22.5	5.6	13.8	4.8
乙噻酚磺酸酯	6.8	10.4	20.7	7.6	11.0	6.2
异狄氏剂	8.3	12.6	24.1	5.9	13.8	5.4
硫丹	8.5	12.1	22.4	5.3	12.7	6.4
硫酸酯	21.6	22.4	42.6	6.4	12.0	11.8
DDT	11.0	10.7	40.0	8.2	10.9	16.3
异丙二酮	6.8	11.8	18.8	5.2	11.2	8.6
氯菊酯	11.8	7.2	13.0	4.7	6.8	7.0
乙基对硫磷-d ₁₀ (内标)	9.1	19.9	28.3	9.0	22.5	12.8
TPP (内标)						

相比之下, C18/PSA 结果中 74% 分析物的 RSD 小于 15%, 而氧化锆则要低得多, 仅有 9%。经氧化锆处理的萃取物问题尤为突出, 在超过 100 次进样中, 所有分析物的 RSD 均高于 10%, 其中有 57% 的 RSD 甚至超过了 20%。这表明 C18/PSA 和氧化锆净化萃取物中较高的残留基质浓度会对仪器性能产生负面影响, 从而导致分析物响应出现显著变异。上述结果表明 EMR-Lipid 具有出色的基质去除效果, 它能够降低 GC 流路中的活性, 提高多次进样的精密度, 并使更多样品可在仪器维护前得到分析。

结论

安捷伦开发出一种依次采用 QuEChERS AOAC 萃取和 Bond Elut EMR-Lipid 净化的快速、可靠与稳定的方法, 经验证后该方法适用于牛油果样品中 23 种适用于 GC 分析农药的分析。研究中对该方法的基质效应进行了评估, 并与传统 C18/PSA 和氧化锆吸附剂净化技术的基质效应进行了对比。结果表明, 与 C18/PSA 和氧化锆吸附剂相比, EMR-Lipid 能够为 GC/MS 和 GC/MS/MS 分析提供更高的色谱清洁度。采用 EMR-Lipid 净化有助于 GC/MS 在高脂基质样品中完成更出色的分析。回收率对比结果表明 EMR-Lipid 净化得到的分析物回收率与 C18/PSA 相当, 并优于氧化锆吸附剂。EMR-Lipid 在本应用中的最大优势在于较高的基质去除效率, 因此在 GC/MS/MS 中超过 100 次的进样期间表现出优异的重现性。而经 C18/PSA (尤其是氧化锆处理) 的样品在这一进样实验中的分析物响应变化程度较大。因此, 将 EMR-Lipid 作为 dSPE 净化材料用于 QuEChERS 工作流程可从整体上提高实验室分析效率、提高样品通量、简化数据处理和审查、减少批处理的重新运行的情况并能减少仪器维护。未来将进一步研究增强型脂质去除产品用于其他复杂高脂肪含量样品和目标分析物时的优势。

参考文献

1. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F. S. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412-431
2. Lehotay, S. J.; Mastovská, K.; Lightfield, A. R. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 615-629
3. Chamkasem, N.; Ollis, L. W.; Harmon, T.; Mercer, G. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 2315-2329
4. Hildmann, F.; Gottert, C.; Frenzel, T.; Kempe, G.; Speer, K. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1403*, 1-20
5. Lehotay, S. J. *Mass Spec. in Food Safety Methods in Mol. Biol.* **2011**, *747*, 65-91
6. Sapozhnikova, Y.; Lehotay, S. J. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *758*, 80-92
7. Morris, B. D.; Schriener, R. B. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 5107-5119
8. Wong, J. W. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 7636-7646
9. Hayward, D. G.; Wong, J. W. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 4686-4693
10. Saito, K.; Sjödin, A.; Sandau, C. D.; Davis, M. D.; Nakazawa, H.; Matsuki, Y.; Patterson Jr., D. G. *Chemosphere* **2004**, *57*, 373-381
11. Kegley, S.E.; Hill, B.R.; Orme, S.; Choi, A. H. *PAN Pesticide Database; Pesticide Action Network, North America, Oakland, CA, USA, 2014.*
http://www.pesticideinfo.org/Search_Chemicals.jsp
12. Szelewski, M. J.; Quimby, B. *New Tools for Rapid Pesticide Analysis in High Matrix Samples (高基质效应样品中快速农药分析的新工具)*, 应用简报, 安捷伦科技公司, 出版号 5989-1716EN, **2004**
13. Meng, C-K. *GC/MS/MS 分析仪和农药与环境污染物质 MRM 数据库*, 应用简报, 安捷伦科技公司, 出版号 5990-9453CHCN, **2011**
14. Zhao, L.; Lucas, D. *Multiresidue Analysis of Pesticides in Avocado with Bond Elut EMR-Lipid by LC/MS/MS (配备 Bond Elut 增强型脂质去除产品 EMR-Lipid 的 LC/MS/MS 进行牛油果的农药多残留分析)*, 应用简报, 安捷伦科技公司, 出版号 5991-6098EN, **2015**
15. Anon. *Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, SANCO/12571/2013, 19 November 2013*; European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Brussels, Belgium

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品和服务的详细信息，请访问我们的网站：www.agilent.com。

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2015

2015年8月4日，中国出版

5991-6097CHCN



Agilent Technologies