

# 使用 Agilent Ultivo 三重四极杆 LC/MS 和 MassHunter Productivity App 进行高通量农药残留分析

## 作者

Mahsan Miladi,  
Dan-Hui Dorothy Yang,  
Tanner Stevenson 和  
Dan Smith

## 摘要

全球范围内使用的农药超过 1000 种，食品安全实验室面临着扩大常规农药监测分析方法适用范围的压力。因此，方法开发和数据分析已成为分析实验室中既耗时又费力的工作。为解决这一日益严重的问题，安捷伦开发了 MassHunter Productivity App，简化了食品检测实验室日常的高通量定量分析工作流程。本应用简报展示了使用 Agilent Ultivo 三重四极杆 LC/MS 和 MassHunter Productivity App 对两种基质中 254 种农药进行多残留筛查的能力。

## 前言

为了确保良好的农业生产方式，并最终确保所生产食品的安全，必须对农药残留进行筛查和定量分析。世界各地的政府机构规定了食品中数百种农药及其代谢物 ppb 级的最大残留限量 (MRL)<sup>[1]</sup>。出于实际原因，在产品中并非对所有上述农药进行了筛查。使用风险评估来确定最佳范围。

政府和行业对上述化合物的关注程度日益增加，检测实验室应对更多上述化合物进行筛查。这促使人们使用更快速、更灵敏的分析技术进行更广范围的农药监测。数据量的增加意味着数据分析现已成为大多数检测实验室的主要瓶颈。开发集成式和自动化数据处理和报告工具有助于实验室在审查数据时更快做出更准确的决策，更快获得分析结果。

MassHunter Productivity App 旨在简化数据采集和数据处理，以实现靶向筛查和定量分析。其目标是为常规 MS 检测实验室节省时间并提高分析效率。该软件能够自动执行常规的繁琐任务，为实验室技术人员提供简便、统一的流程，用以提交样品序列、审查结果并创建报告。

本应用简报展示了 MassHunter Productivity App 的简便易用性，使用由 Ultivo 三重四极杆 LC/MS 获得的数据对西兰花和草莓中的各种农药残留进行靶向定量分析。

## 实验部分

### 试剂

本研究中使用的所有试剂和溶剂均为 HPLC 级。甲酸铵溶液来自安捷伦 (部件号 G1946-85021)。乙腈和甲醇购自 Honeywell (Morristown, NJ, USA)。氟化铵购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。超纯水产自配备 LC-Pak Polisher 和 0.22  $\mu\text{m}$  膜式终端过滤器滤芯的 Milli-Q Integral 系统 (EMD Millipore, Billerica, MA, USA)。甲酸购自 Fisher Chemicals (Fair Lawn, NJ, USA)。

农药标准品来自安捷伦 (LC/MS 农药全套测试混标, 部件号 5190-0551)、AccuStandard (New Haven, CT, USA) 和 Chem Service, Inc (West Chester, PA, USA)。配制含有 254 种化合物的农药储备液，浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，用于加标 QuEChERS 提取物。校准标样浓度范围为 1–100  $\text{ng}/\text{mL}$ 。

### 样品前处理

有机和非有机西兰花和草莓样品购自当地杂货店。有机和非有机样品采用相同的样品前处理程序。称取 10 g 均质化的水果和蔬菜加入 50 mL 聚丙烯管中。然后使用 Agilent BondElut QuEChERS 试剂盒 (部件号 5982-5650)，按照 EN 15662 QuEChERS 方法，用 10 mL 乙腈对样品基质进行萃取。使用安捷伦分散式 SPE (dSPE) 试剂盒 (部件号 5982-5256) 净化西兰花和草莓提取物。

### 设备

将 Agilent 1290 Infinity HPLC 与 Ultivo 三重四极杆 LC/MS 系统联用进行样品分析。Ultivo 配备了安捷伦喷射流 (AJS) ESI 离子源，在动态 MRM (dMRM) 和极性切换模式下运行。表 1 和表 2 列出了 HPLC 和 MS 离子源参数。

### 软件

使用 MassHunter Productivity App 进行数据采集与分析。为简化分析工作流程 (图 1)，该软件为用户提供从运行设置到数据审查和报告的一体化体验。

MassHunter Productivity app 配有一个包含 700 种化合物 (> 2000 MRM) 的全面农药数据库和采集方法，使新手用户能够选择一组所需目标化合物，无需任何方法优化和开发，即可快速进行数据采集和分析。使用该数据库采集和分析本应用简报中提供的数据。

该应用程序使用内置的数据分析功能自动分析采集的数据，以选择正确的色谱峰。此选项根据当前运行中的校准样品结果修改分析方法中的目标物保留时间和定性离子比：

- 根据最高浓度校准样品中最大峰的保留时间 (RT) 自动确定目标物保留时间
- 基于所有校准样品的定性离子比平均值自动确定目标物定性离子比

表 1. Agilent 1290 Infinity HPLC

参数	值																		
保护柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 2.1 × 5 mm, 1.8 μm (部件号: 821725-901)																		
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 3.0 × 150 mm, 1.8 μm (部件号: 959759-302)																		
进样量	2 μL																		
柱温	45 °C																		
流速	0.45 mL/min																		
流动相	A) 水 + 4.5 mmol/L 甲酸铵 + 0.5 mmol/L 氯化铵 + 0.1% 甲酸 B) 甲醇 + 4.5 mmol/L 甲酸铵 + 0.5 mmol/L 氯化铵 + 0.1% 甲酸																		
梯度	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0.00</td><td>2</td></tr> <tr><td>0.50</td><td>2</td></tr> <tr><td>1.00</td><td>50</td></tr> <tr><td>4.00</td><td>65</td></tr> <tr><td>16.0</td><td>100</td></tr> <tr><td>18.0</td><td>100</td></tr> <tr><td>18.1</td><td>2</td></tr> <tr><td>20.0</td><td>2</td></tr> </tbody> </table>	时间 (min)	%B	0.00	2	0.50	2	1.00	50	4.00	65	16.0	100	18.0	100	18.1	2	20.0	2
时间 (min)	%B																		
0.00	2																		
0.50	2																		
1.00	50																		
4.00	65																		
16.0	100																		
18.0	100																		
18.1	2																		
20.0	2																		
后运行时间	4 min																		

表 2. AJS ESI 离子源参数

参数	值
离子模式	正离子和负离子
扫描类型	动态 MRM
干燥气温度	250 °C
干燥气流速	11 L/min
雾化器	40 psi
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	(±ESI) 3500 V
喷嘴电压	(+ESI) 300 V (-ESI) 1000 V

**A Build Sequence**

Name	Position	Type	Level	Volume	Inj/Sample	Comments	Compound Groups	
9	X	Calibration 4	p1a6	Calibration	4	2	6	+
10	X	Double Blank	p1a1	Double Blank	2	3		
11	X	Calibration 5	PLA7	Calibration	5	2	6	+
12	X	Double Blank	p1a1	Double Blank	2	3		
13	X	Calibration 6						
14	X	Double Blank						
15	X	Calibration 7						
16	X	Double Blank						
17	X	Sample						
18	X	Double Blank						
19	X	Sample						
20	X	Double Blank						
21	X	Sample						
22	X	Double Blank						
23	X	Sample						
24	X	Double Blank						
25	X	Sample						
26	X	Double Blank						
27	X	Sample						
28	X	Double Blank						

**B Select Compounds**

Available Compounds (702)

Name	CAS	Formula	Comments
<input type="checkbox"/>	Bioresmethrin	28434-01-7	C22H26O9
<input checked="" type="checkbox"/>	Bispyribac	125401-92-5	C19H18N4O8
<input checked="" type="checkbox"/>	Bisulfuron-Neg	201593-84-2	C16H7O7F8N2O2
<input checked="" type="checkbox"/>	Bisulfuron-Pos	201593-84-2	C16H7O7F8N2O2
<input checked="" type="checkbox"/>	Bitertanol	55179-31-2	C20H23N3O2
<input checked="" type="checkbox"/>	Bixafen-Neg	581809-46-3	C18H12O2F3N3O
<input checked="" type="checkbox"/>	Bixafen-Pos	581809-46-3	C18H12O2F3N3O
<input type="checkbox"/>	Boscalid		
<input checked="" type="checkbox"/>	Boscalid (Nicobife)		
<input type="checkbox"/>	Bromsol		
<input type="checkbox"/>	Bromobutdife		
<input type="checkbox"/>	Bromoxynil		
<input checked="" type="checkbox"/>	Bromuconazole 1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Bromuconazole 2		
<input checked="" type="checkbox"/>	Bupirimate		
<input checked="" type="checkbox"/>	Buprofezin		
<input checked="" type="checkbox"/>	Butachlor		

Analysis Setup (254)

Name	Comments
X	Calibration

**C Review Analysis Results**

Results - Broccoli

Filters: Concentration (Above/Below threshold), Status (Valid/Error/Warning), Flags, Sample Type, Compound Groups.

Compounds: Acephate (calibration 5) 0.57 ng/ml

Review Control Charts: Concentration vs Time, Peak at 2.77 min.

**D Create Report**

Report Options: Report by Compound

Report Preview: Report by Compound

Report by Compound

Batch Path: D:\MassHunter\DATA\Default\Review\Results\Broccoli\2\Quant\Results\Broccoli\_batch.htm

Analysis Time: 7/19/2018 1:59 PM

Report Time: 7/12/2018 3:51:24 PM

Last Call Update: 7/19/2018 3:58 PM

Quant Batch Version: 8.09.00

Batch State: Processed

Quant Report Version: 8.09.00

Analysis Info: Compound: Acephate, Compound Type: Target, RT Reference: 2.77, STD Compound: N/A

Regression:  $y = 1.02 \times 10^{-5}x + 5.90 \times 10^{-6}$

Sample Name	Sample Type	RT	Peak Area	Area	Area %	Area % Error
Blank (Organic Name)	Sample	2.80	0.00	ng/ml	N/A	N/A
Blank Sample 1	Sample	2.80	0.00	ng/ml	N/A	N/A
Blank Sample 2	Sample	2.80	0.00	ng/ml	N/A	N/A
Blank Sample 3	Sample	2.80	0.00	ng/ml	N/A	N/A

图 1. MassHunter Productivity App 简化了整个农药定量分析工作流程。数据采集、分析和报告分四个步骤进行：(A) 设置样品序列，(B) 设置目标农药和分析参数，(C) 审查分析结果，以及 (D) 创建报告

## 结果与讨论

本研究检测了四个西兰花样品（包括三个非有机和一个有机）以及三个草莓样品（包括两个非有机和一个有机）。

使用该方法分析了涵盖多种类别的 254 种农药，每种化合物至少分析两种 MRM 离子对。总运行时间为 20 分钟。

配制浓度分别为 1、2、5、10、20、50 和 100 ng/g 的基质匹配校准标样，西兰花和草莓基质中大多数农药的相关系数值 ( $R^2$ ) 都高于 0.99。所有农药均以 1/5 MRL 的浓度检测。在这些情况下，对于六次重复测定中的至少四次而言，准确度在

80%–120% 范围内，相对标准偏差小于 10%。这些值在欧盟方法验证指南规定的参数范围内<sup>[2]</sup>。图 2 显示了以 1 ng/g 的浓度加标至有机草莓基质中的农药的代表性色谱图。

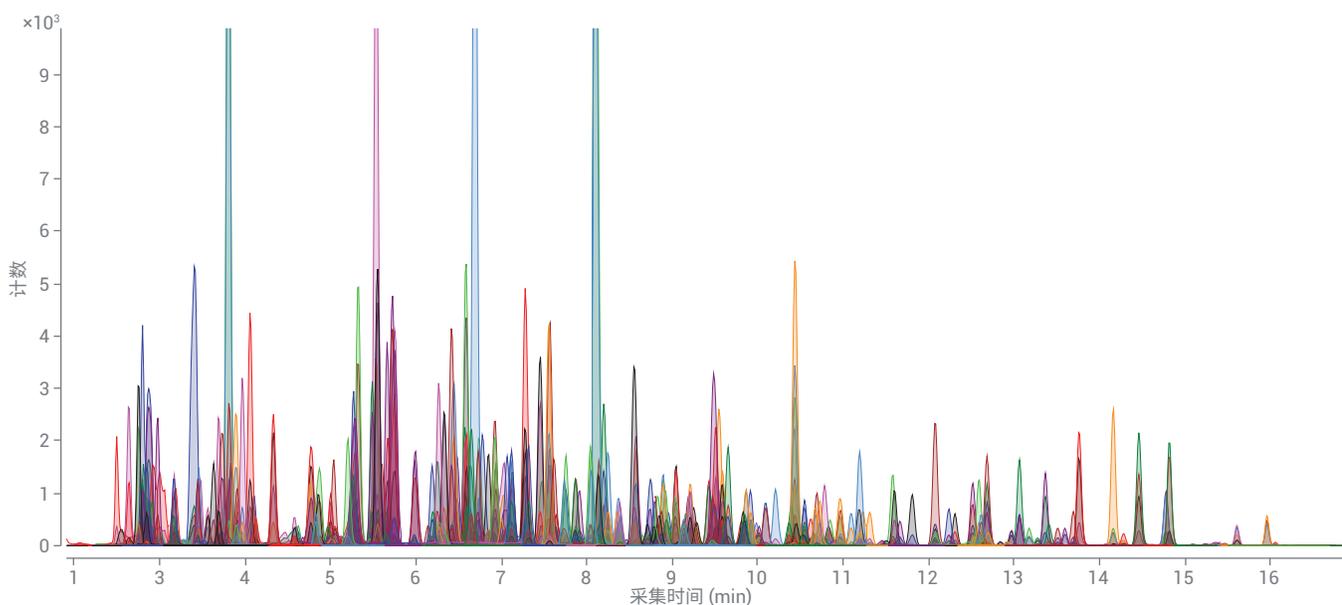


图 2. 草莓提取物基质中 250 多种农药（浓度为 1 ng/g）的 LC/MS/MS 色谱图

## 数据审查

非有机西兰花和草莓基质的分析结果表明存在农药，并且其中一些高于其 MRL。在西兰花和草莓有机基质中检测到少数农药，但均未超过 1/5 MRL 浓度 (2 ng/g)。表 3 展示了在非有机样品中检测到的农药列表，包括远远超过 MRL 值（以及超出校准范围）的结果。

表 3. 在正离子模式下检测到的非有机西兰花和草莓样品中的农药

化合物	浓度 (ng/g)	重复测定次数 (n)	R <sup>2</sup> 值	RSD%
<b>非有机西兰花样品 1</b>				
噻虫嗪	1.33	6	> 0.998	3.53
<b>非有机西兰花样品 2</b>				
吡虫啉	4.90	6	> 0.992	1.2
<b>非有机西兰花样品 3</b>				
啉菌酯	> 100	6	> 0.998	1.21
烯酰吗啉异构体 1	> 100	6	> 0.998	0.933
烯酰吗啉异构体 2	> 100	6	> 0.995	1.06
双炔酰菌胺	> 100	6	> 0.998	1.03
氟霜唑	45.1	6	> 0.995	2.23
啉酰菌胺	39.8	6	> 0.997	1.02
吡虫啉	15.9	6	> 0.992	0.826
双苯氟脲	7.11	6	> 0.991	8.91
唑菌胺酯	6.82	6	> 0.998	1.72
咯菌腈	3.07	6	> 0.994	2.98
甲霜灵	1.58	6	> 0.996	2.41
<b>非有机草莓样品 1</b>				
阿维菌素 B1	23.4	5	> 0.995	3.52
联苯肼酯	18.2	5	> 0.989	2.25
氟醚唑	7.16	5	> 0.981	1.49
<b>非有机草莓样品 2</b>				
氯虫苯甲酰胺	27.9	5	> 0.996	2.32
啉菌环胺	13.3	5	> 0.996	1.02
肟菌酯	13.1	5	> 0.996	2.37
咯菌腈	9.86	5	> 0.993	1.42
多杀菌素 A	2.44	5	> 0.996	4.72
环酰菌胺	2.08	5	> 0.961	3.04

使用 MassHunter Productivity App 查看定量结果，该应用程序允许根据浓度、标记、样品类型、化合物组和错误状态过滤结果。每个过滤后的结果都包含校准曲线图、提取离子色谱图和定性离子比图，有利于快速查看。图 3 展示了使用过滤器查看西兰花样品中检测到的农药的示例。图 3 中应用的过滤器实现了对分析物的

快速、针对性查看，而不是对样品中所有 254 种化合物的结果进行耗时费力的手动查看。

Productivity App 自动计算每种化合物的定量离子与定性离子比，如果不在规定的离子比容差范围内（本研究中设定为 20%），则对该化合物结果进行标记。图 4 显示了非有机草莓样品中检测到的

农药。查看定性碎片离子及其与定量离子峰面积的比值，以验证得到的多杀菌素 D 和氟醚唑鉴定结果。被鉴定为氟醚唑的化合物的定性离子比在目标范围内。然而，多杀菌素 D 的定性离子比超出了目标范围，表明该农药为假阳性鉴定结果。用户可以在单个界面中详细查看色谱图，快速评估潜在的错误鉴定结果。

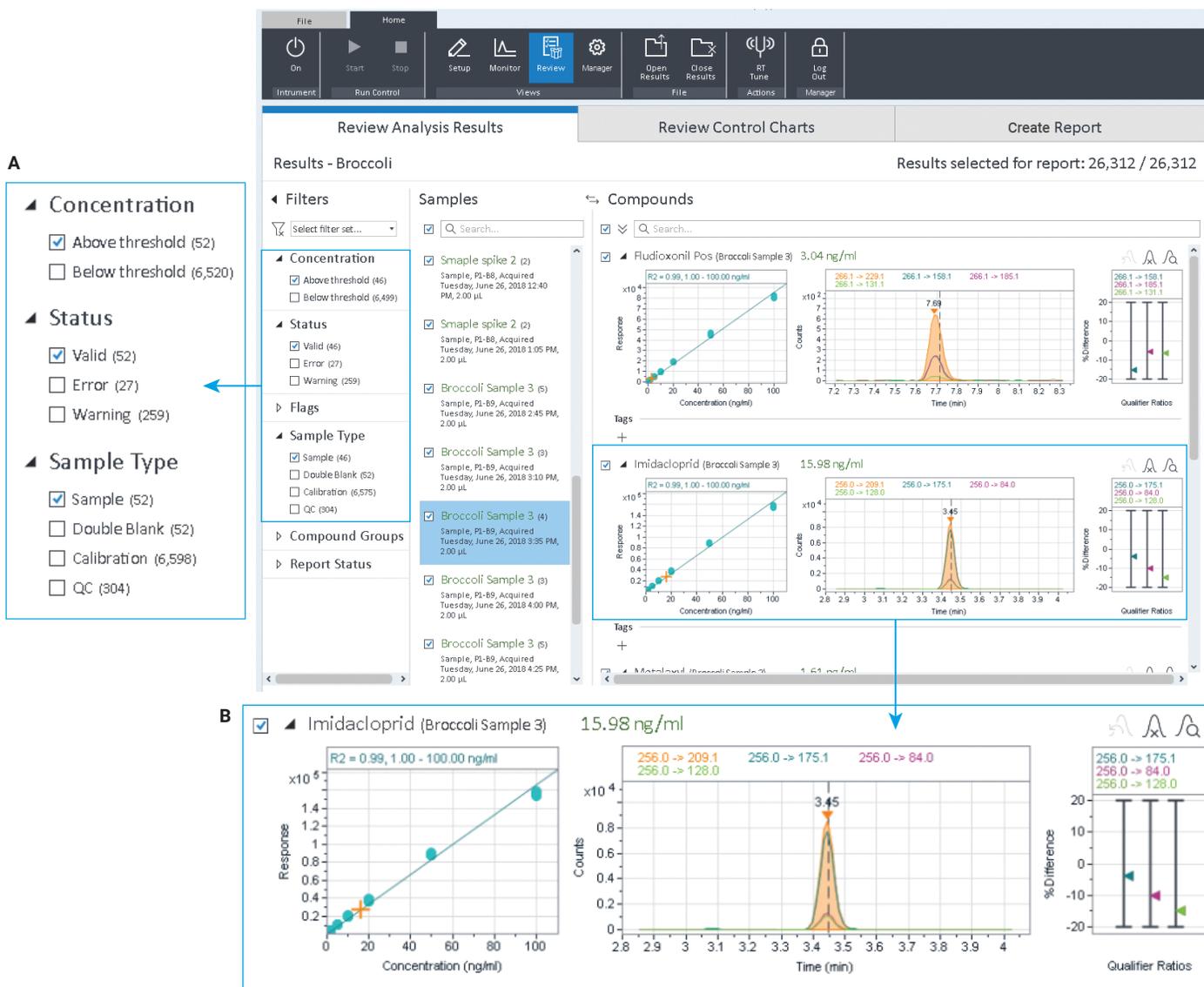


图 3. MassHunter Productivity App，显示了在非有机西兰花样品中检测到的农药。(A) 用于查看结果的过滤器类型。(B) 检测到的吡虫啉的校准曲线、提取离子色谱图和定性离子比



图 4. (A) 在非有机草莓样品中鉴定出的多杀菌素 D 和氟醚唑。(B, C) 非有机草莓和两个校准样品中鉴定出的农药的定量离子叠加图。(B) 与两个校准样品相比, 非有机草莓中多杀菌素 D 定量离子的 RT 不正确 (假阳性鉴定)。(C) 校准样品和非有机草莓样品中氟醚唑的 RT 一致 (真实鉴定)

通过将非有机草莓样品中化合物的定量离子色谱图与校准样品中该化合物的色谱图叠加来进一步评估多杀菌素 D 结果。例如，非有机草莓样品中的氟醚唑定量离子色谱图与两个校准样品的色谱图叠加，具有相似的 RT (图 4C)。相反，校准样品和非有机草莓样品中多杀菌素 D 定量离子色谱图的叠加情况表明鉴定结果不正

确，证实了多杀菌素 D 为假阳性鉴定结果 (图 4B)。

当参数值 (如准确度、RT、离子比和  $R^2$ ) 超出分析方法中用户定义的限值时，MassHunter Productivity App 将会标记分析结果，使用户注意相应参数。此标记功能可帮助用户快速过滤和审查数据，找出有问题的化合物。MassHunter

Productivity App 中标记功能的另一好处是，能够快速识别超出 MRL 和校准范围的农药。图 5 显示了基于浓度高于 0.5 ng/g 阈值、样品类型和具有超出校准范围标记的化合物的过滤结果。使用上述过滤器，我们能够快速找出非有机西兰花样品中浓度 > 100 ng/g 的化合物烯酰吗啉和双炔酰菌胺。

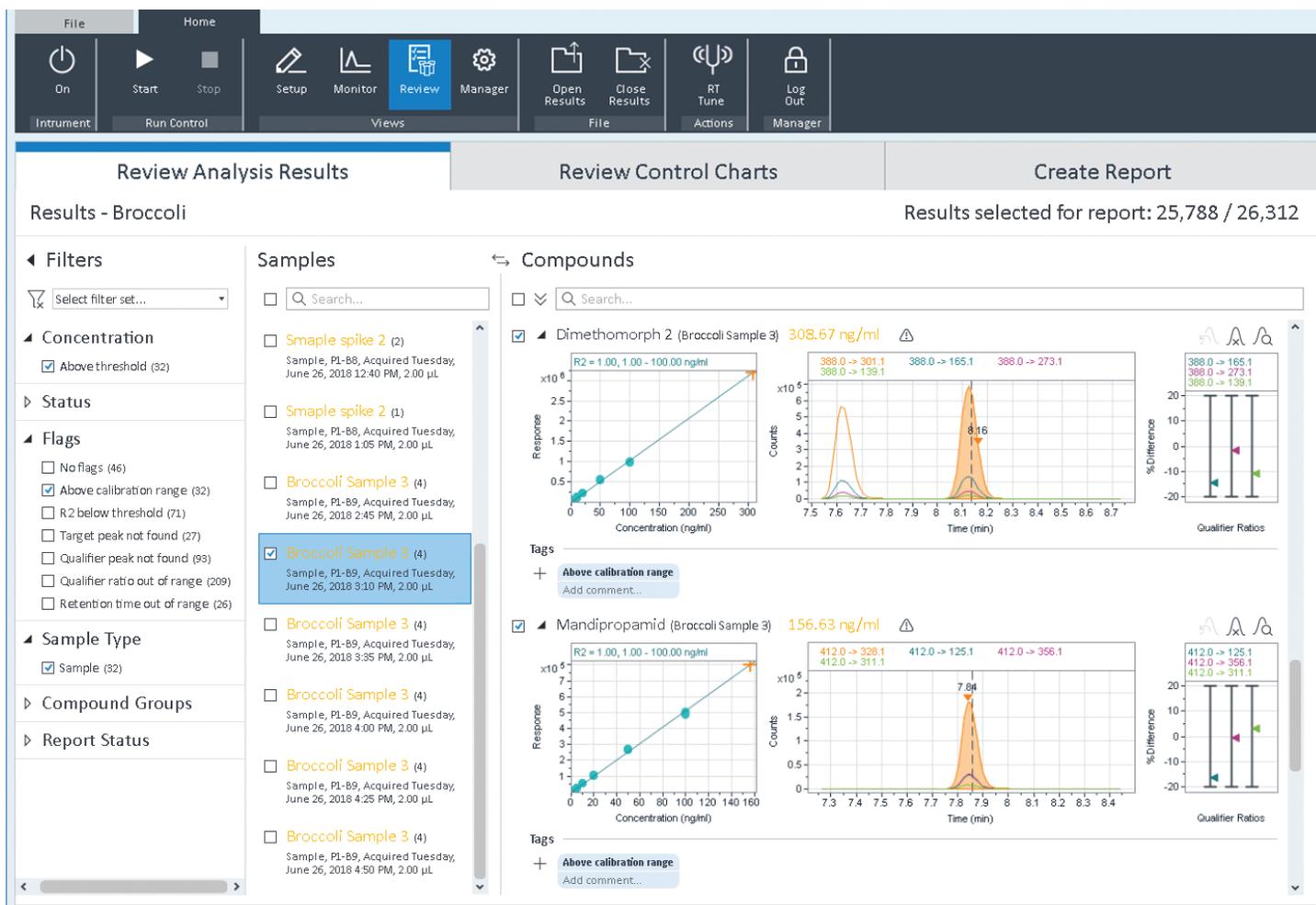


图 5. MassHunter Productivity App 可使用过滤器对分析结果进行快速、针对性查看。图中显示了在非有机西兰花样品中检测到的烯酰吗啉和双炔酰菌胺的分析结果 (基于高于阈值、样品类型和超出校准范围进行了过滤)。检测到这两种化合物浓度超出校准范围 (> 100 ng/g 或 ppb)

MassHunter Productivity App 使分析人员在查看分析结果时能够进行对比查看。例如，用户可以在“样品”和“化合物”视图之间切换，显示该化合物在所有样品中的鉴定结果。图 6 显示了在不同非有机西兰花样品中吡虫啉农药的对比视图示例。此功能可快速比较多个样品的化合物响应。

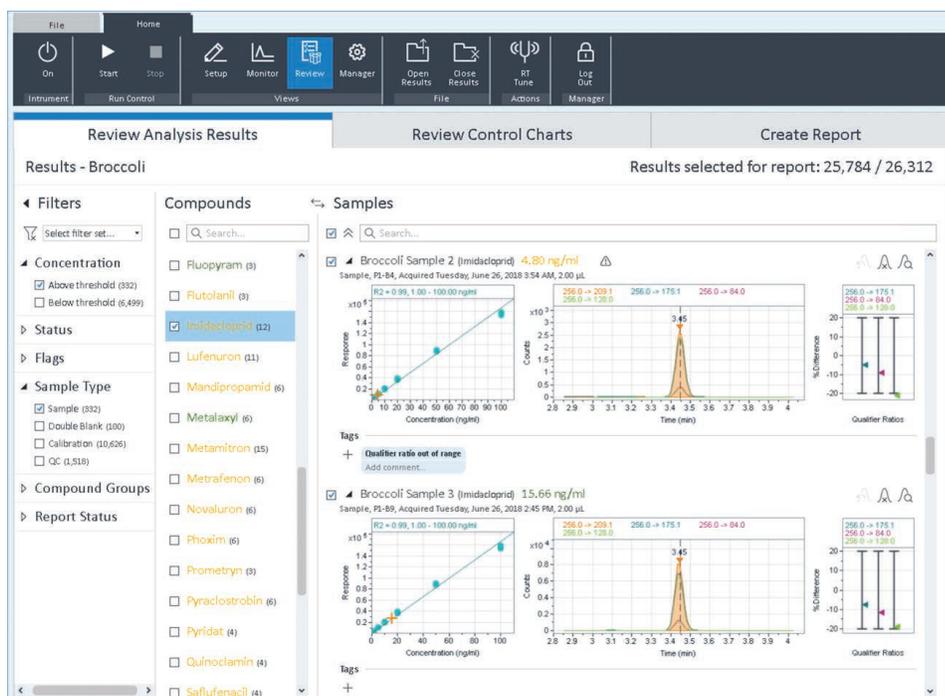


图 6. MassHunter Productivity App 提供可自定义的用户界面，通过在“样品”和“化合物”视图之间切换来查看定量结果。本例中，可以在同一批次中查看两种不同非有机西兰花样品中的吡虫啉结果

此外，MassHunter Productivity App 提供了化合物 RT、质量控制 (QC) 浓度和不同样品内标 (ISTD) 响应的度量图，以便快速轻松地评估数据质量和仪器性能。图 7 显示了 QC 样品的度量图示例。

## 生成报告

审查数据后，MassHunter Productivity App 允许用户为整个批次或选定结果生成自定义报告。默认报告还会显示用于数据分析和审查的所有标记和相关注释。图 8 所示为 MassHunter Productivity App 生成的报告示例，显示了在非有机西兰花样品中检测到的农药。

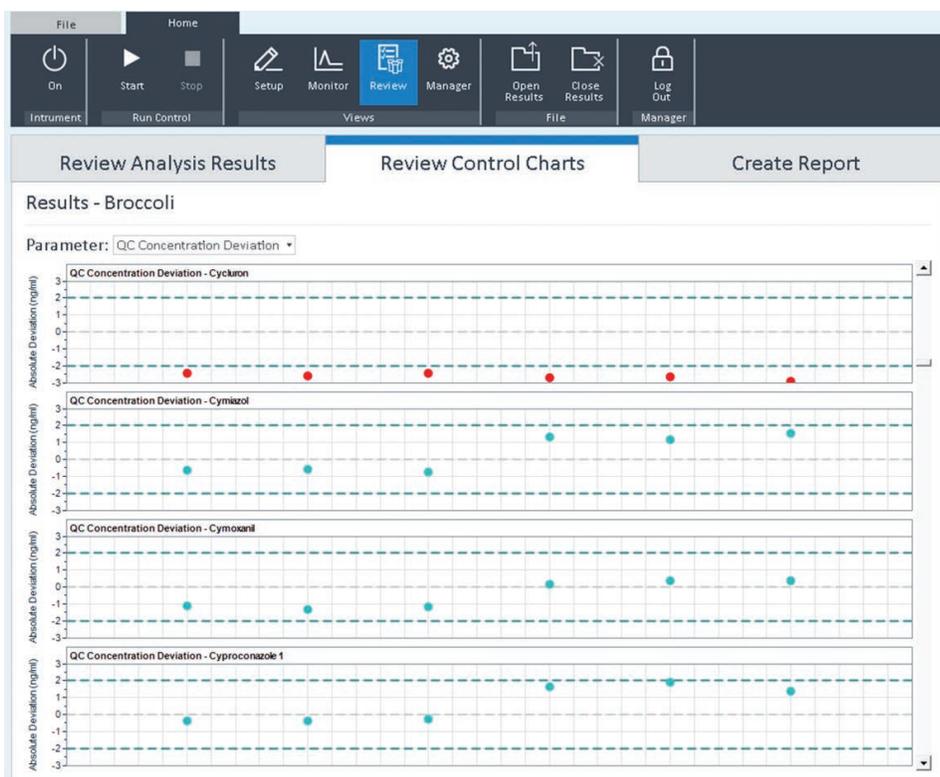


图 7. QC 样品中每种化合物的 QC 浓度偏差图。每个实心圆圈代表 QC 样品。蓝色圆圈是浓度在预定义限值内的 QC 样品，红色圆圈是浓度超出预定义限值的 QC 样品。虚线表示  $\pm 2$  ng/g 的预定义浓度偏差

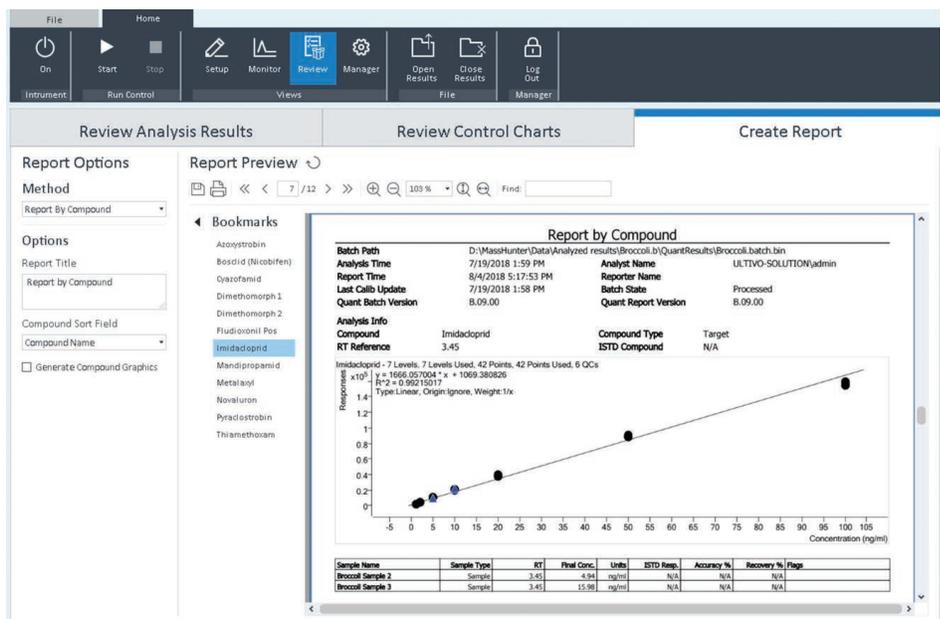


图 8. 根据不同的非有机西兰花样品的化合物结果，由 MassHunter Productivity App 生成的报告预览。此预览显示了不同样品中吡虫啉的分析结果汇总

## 结论

Ultivo 三重四极杆 LC/MS 和 MassHunter Productivity App 可对复杂食品基质中的农药进行高通量定量分析。大多数农药是在加标基质中检测到的，浓度低于 MRL。MassHunter Productivity App 专为高通量实验室的常规分析而设计，能够加速运行设置和数据审查。Productivity App 通过以下功能提高分析通量：

- 使用单一、直观的用户界面简化分析实验室的整个工作流程
- 使用内置的采集和分析方法，缩短方法开发时间
- 提供运行进度和仪器状态的实时监控
- 自动化批处理创建和数据分析
- 自动标记分析结果
- 通过分组、过滤和标记功能，加快数据审查速度
- 灵活生成分析报告

## 参考文献

1. Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin (including amendments as of 18 March 2008) and complying with regulation (EC) 1107/2009
2. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues and analysis in food and feed, SANTE/11813/2017, 21-22 November 2017. [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides\\_mrl\\_guidelines\\_wrkdoc\\_2017-11813.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf)

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。