

Application News

No. C136

LC/MS
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

使用 LCMS-8060 对 646 种农药残留进行快速同时分析

Expanding Capabilities in Multi-Residue Pesticide Analysis Using The LCMS-8060

为了提高农作物的产量，在其生长过程中会使用除草剂、杀虫剂、防霉剂等农药，以保护农作物免受病虫害和杂草的危害。农药残留将直接影响人们的健康，所以健全食品中农药残留检测的法律成为当务之急。

目前，美国、欧洲、日本等国家和地区均对食品中农药残留最大残留限量（MRL）或容许量（例如美国）做了规定。实施中，以 0.01 mg/kg 作为最大残留限量的默认值。因此创建高灵敏度分析方法成为农药残留检测中的迫切需求。

我们根据 766 种农药成分的 MRM 数据库（Shimadzu Pesticide MRM Library）创建了 646 种农药残留的快速同时分析方法（正负切换速度：5 msec、1,919 个 MRM 离子对）。本文向您介绍使用 LCMS-8060 对 646 种农药残留进行快速同时分析的示例。

■ 前言

Introduction

目前，全世界在土壤及农作物生产中使用的农药种类大概有 1,000 种以上。随着食品进出口的增加，需要管理的农药种类及各食品中设定的最大残留限量（MRL）也日益增多。根据欧盟农药残留最大限量法规（EC）No.386/2005，对 370 种食品中 500 种以上的农药成分最大残留限量做了规定。¹⁾ 美国环境保护局（EPA）对 450 种以上的农药成分及其他所含物质的容许量进行了设定。²⁾ 日本在肯定列表制度中规定了各种食品中 400 种以上农药成分的最大残留限量。³⁾

随着需要分析的农药和食品种类的日益增多，这就对负责食品安全的相关检测和研究部门提出了新的挑战。

本方法根据收录 766 种农药成分的 MRM 数据库（Shimadzu Pesticide MRM Library）创建而成。使用者利用该方法进行数据采集与定量分析。本方法每种农药最多含 3 对 MRM 离子对，与每种农药仅含 2 对 MRM 离子对的方法相比，数据精确度更高。由于 LCMS-8060 具有数据采集速度快、正负极性切换速度快（5 msec）的特点，该方法能够在短短的 10.5 分钟内检测 1,919 个 MRM 离子对。

向经过 QuEChERS 法预处理的薄荷、西红柿、苹果的乙腈萃取液中添加 646 种农药混标，以此进行方法评估。结果显示，薄荷萃取液中的基质成分比西红柿、苹果的萃取液更为复杂。本方法的评估使用实际样品的萃取液进行。

■ 实验

Experimental

薄荷、西红柿、苹果样品经过 QuEChERS 法进行预处理，萃取溶液为乙腈，由 Phytocontrol（法国）提供。农药标准品自 ACSD（法国）购买。溶剂为 Sigma-Aldrich 的 LCMS 用溶剂。

使用内标法在 0.002~0.1 mg/kg 的浓度范围以 6 个浓度点绘制标准曲线。使用自动进样器的预处理程序进行了内标物质的 2 种成分（Atrazine-d5，Diuron-d6）的添加。

以薄荷、西红柿、苹果基质，浓度 0.05 mg/kg 时的峰面积重复性对 LCMS-8060 的稳定性进行了评估。

LC/MS/MS 方法开发

本实验的 LC/MS/MS 方法“646 种农药同时分析方法”依据 766 种农药成分 MRM 信息表（Shimadzu Pesticide MRM Library）创建而成。Shimadzu Pesticide MRM Library 为 766 种农药的信息数据库。表中包含针对各种农药的多个 MRM 信息（应用报告 No. C135）。

646 种农药同时分析方法中，共包含 1,919 个 MRM 离子对（正离子：1,819、负离子：100），每种农药最多有 3 个 MRM 离子对。正负切换速度为 5 msec。使用本方法可在短短的 10.5 分钟内检测 646 种农药成分。

使用离子源参数优化软件优化离子源参数（例：DL 温度、界面温度、加热块温度、热气流、干燥气流、雾化气流），保证每个分析物的最佳响应。

表 1 分析条件
LC and MS/MS Acquisition Parameters

LC 条件		MS 条件	
UHPLC	Nexera LC system	LC/MS/MS	LCMS-8060
色谱柱	Restek Raptor Biphenyl (2.1 mmI.D. × 100 mmL, 2.7 μm)	离子化模式	加热 ESI
柱温	35 °C	正负极性切换时间	5 msec
流速	0.4 mL/min	停顿时间	1 msec
流动相 A	2 mmol/L ammonium formate + 0.002 % formic acid - Water	MRM 离子对数量	1,919 (1,819 positive; 100 negative)
流动相 B	2 mmol/L ammonium formate + 0.002 % formic acid - Methanol	Dwell 时间	4 msec (定量离子) ; 1 msec (参比离子)
时间程序 (B. Conc)	3 % (0 min) - 10 % (1.00 min) - 55 % (3.00 min) - 100 % (10.50 - 12.00 min) - 3 % (12.01 - 15.00 min)	接口温度	350 °C
进样体积	2 μL sample (plus 40 μL water)	加热块温度	300 °C
		DL 温度	150 °C
		加热气流速	10 L/min
		干燥气流速	10 L/min
		雾化气流速	3 L/min

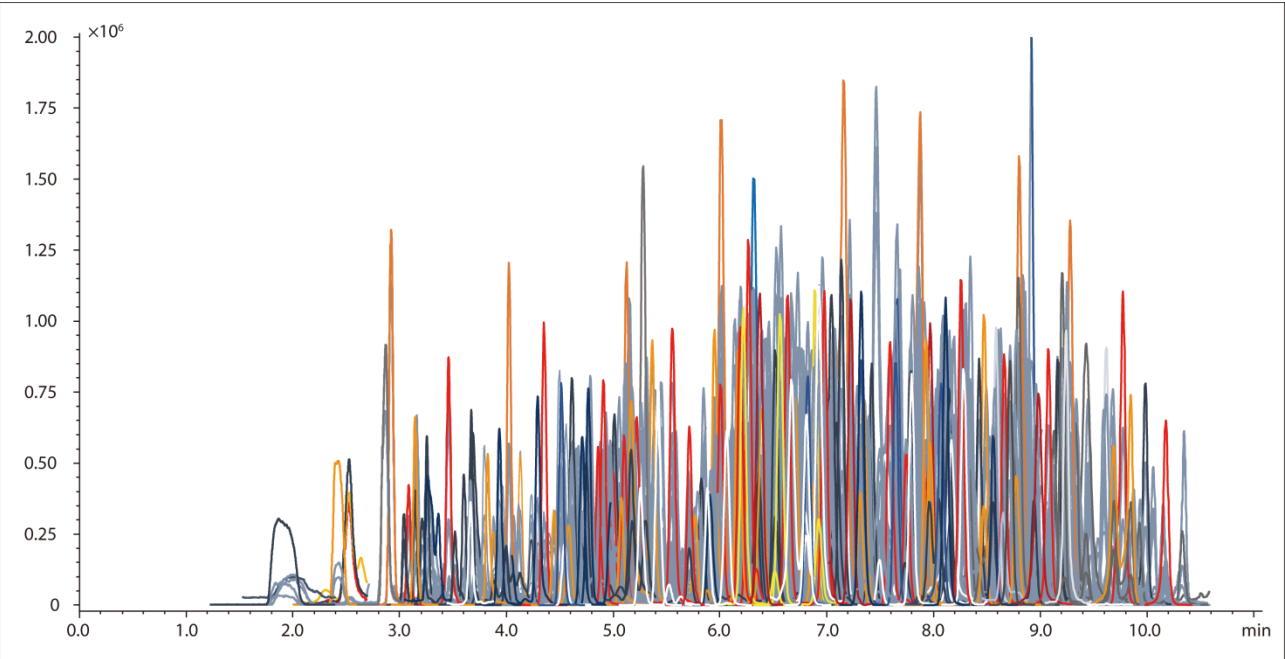


图 1 向薄荷萃取液中添加 646 种农药得到的 MRM 色谱图 (添加浓度: 0.01 mg/kg)
MRM chromatograms of 646 pesticides spiked into a mint extract at 0.01 mg/kg

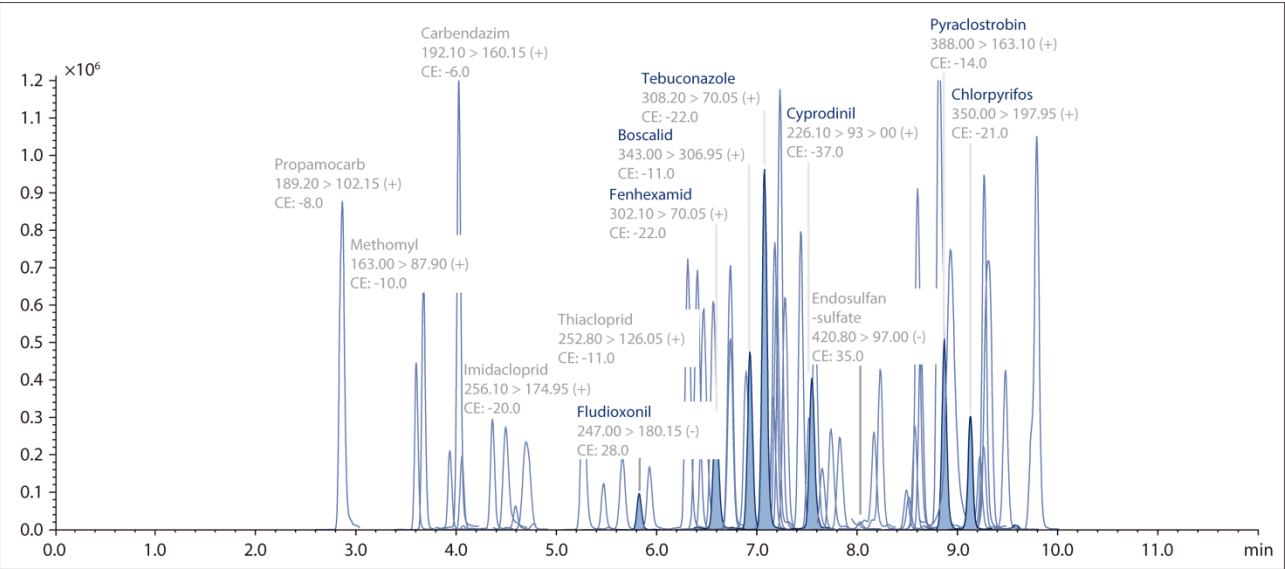


图 2 EU 检测频率高的农作物中所含 58 种农药的 MRM 色谱图 (添加浓度: 0.01 mg/kg; 参照 2015 European Food Safety Journal)
Boscalid、Chlorpyrifos、Cyprodinil、Fenhexamid、Fludioxonil、Pyraclostrobin、Tebuconazole 为检出率在 4 % 以上的农药 (蓝字)
Fludioxonil 和 endosulfan 用负离子模式检测。

MRM chromatograms for pesticides most commonly detected in plant products listed in the 2015 European Food Safety Journal. In this report, residues exceeding the legal limits were related to 58 different pesticides. Compounds such as boscalid, chlorpyrifos, cyprodinil, fenhexamid, fludioxonil, pyraclostrobin and tebuconazole (highlighted in the MRM chromatogram) are some of the most frequently detected compounds present in more than 4 % of the samples analyzed. Fludioxonil and endosulfan were both detected in negative ion mode.

■ 结果与讨论
Results and Discussion

Shimadzu Pesticide MRM Library (应用报告 No.C135)

使用 Shimadzu Pesticide MRM Library 可加速方法创建，方便化合物管理。

数据库中每个化合物平均包含 8 个 MRM 通道，包括正离子和负离子模式，共有 6,000 个以上的 MRM 离子对。并且，表中还包含 CAS 号、化学式、活性、单同位素质量、加合离子质量、MRM 离子对级别、别名、InChI、InChIKey、化合物名称（日、英、中）、提供更多信息的网页链接（alanwood.net、PAN pesticide database、Chemical Book、ChemSpider），可有效共享农药数据。

轻松进行方法开发

646 种农药同时分析方法可以简便地导入到 LabSolutions LCMS 软件中。且可定制分析方法，例如，在当前方法中添加新的目标成分，或从特定的分析成分中删除一些成分。

LCMS-8060 具备全球最快的扫描速度（30,000 u/sec）、最高的灵敏度、超快速极性切换速度 5 msec，堪称同类产品中的旗舰产品。如果将本数据库与 LCMS-8060 组合使用，即可有助于进行各种农药的分析。

LCMS-8060 的卓越性能

LCMS-8060 的超快速扫描（最高扫描速度 30,000 u/sec）为目标化合物检测数目扩展和高密度数据采集提供了新的可能。

图 3 为在保留时间在 6.45~6.60 分钟内检测出的洗脱 25 种农药的 MRM 色谱图。示例中，在采集高密度数据时，峰面积标准偏差平均值小于 3 %（RSD：1.1 - 5.9 %），较为稳定（表 2）。

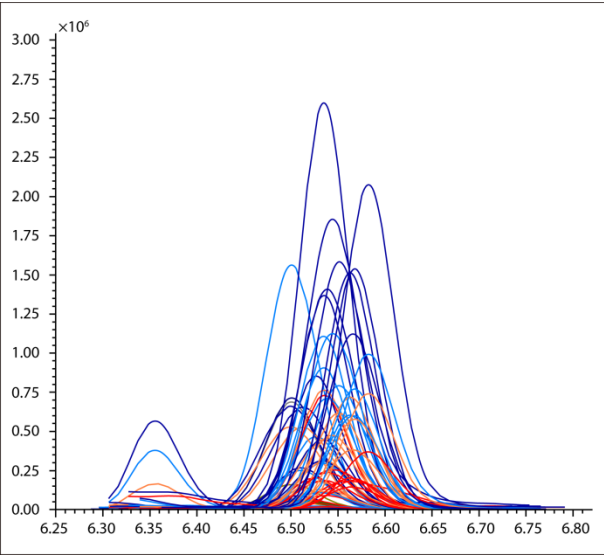


图 3 保留时间 6.45~6.60 分钟内检测出的 25 种农药（表 2）的 MRM 色谱图

The LCMS-8060 can acquire MRM data at a high speeds and enables precise quantitation even with high data density. Between 6.45 and 6.60 minutes 25 compounds were monitored (Table 2).

表 2 9 秒钟（保留时间 6.45~6.60 分钟）内检测出的 25 种农药（在薄荷萃取液中添加 0.01 mg/kg）峰面积重复性（%RSD; n=6）
Peak area variation (%RSD; n=6) for 25 pesticides eluting over a nine-second time window (6.45 - 6.60 minutes) spiked into a mint matrix extract at the reporting limit of 0.01 mg/kg.

化合物名称	CAS 号	分子式	分子量	极性	MRM 定量离子	保留时间 (分钟)	平均峰面积	%RSD (n=6)
Trinexapac-ethyl	95266-40-3	C13H16O5	252.0998	+	252.90> 69.05	6.45	1,780,015	3.1
lprovalicarb	140923-17-7	C18H28N2O3	320.2100	+	321.20> 119.15	6.46	1,442,486	2.8
Dodemorph	1593-77-7	C18H35NO	281.2719	+	282.30> 116.15	6.47	658,920	4.2
Fluopyram	658066-35-4	C16H11ClF6N2O	396.0464	+	397.00> 145.00	6.47	2,439,146	1.9
Flutolanil	66332-96-5	C17H16F3NO2	323.1133	+	324.10> 242.00	6.48	3,372,285	2.7
Trifloxysulfuron	145099-21-4	C14H14F3N5O6S	437.0617	+	438.00> 182.15	6.48	1,822,340	2.5
Azaconazole	60207-31-0	C12H11Cl2N3O2	299.0228	+	300.00> 159.00	6.50	1,580,445	2.0
Terbutryn	886-50-0	C10H19N5S	241.1361	+	242.10> 157.95	6.50	755,446	3.4
Prometryn	7287-19-6	C10H19N5S	241.1361	+	242.10> 158.00	6.50	1,300,193	2.6
Azimsulfuron	120162-55-2	C13H16N10O5S	424.1026	+	425.10> 182.10	6.50	2,498,050	1.8
Metominostrobin	133408-50-1	C16H16N2O3	284.1161	+	285.10> 193.95	6.51	2,929,500	1.7
Thifluzamide	130000-40-7	C13H6Br2F6N2O2S	525.8421	+	528.60> 148.05	6.51	193,982	5.9
Nicarbazin	330-95-0	C13H10N4O5	302.0651	-	301.10> 137.15	6.52	973,101	2.6
Bromobutide	74712-19-9	C15H22BrNO	311.0885	+	312.10> 194.10	6.53	1,829,781	2.1
Saflufenacil	372137-35-4	C17H17ClF4N4O5S	500.0544	+	501.00> 198.00	6.53	465,224	2.3
Cyproconazole	94361-06-5	C15H18ClN3O	291.1138	+	292.10> 70.05	6.54	1,174,967	1.7
Clomazone	81777-89-1	C12H14ClNO2	239.0713	+	239.90> 125.00	6.54	3,409,656	1.7
Fensulfothion	115-90-2	C11H17O4PS2	308.0306	+	309.00> 281.00	6.54	4,267,514	1.4
Oxasulfuron	144651-06-9	C17H18N4O6S	406.0947	+	407.10> 150.15	6.54	2,911,533	1.1
Rimsulfuron	122931-48-0	C14H17N5O7S2	431.0569	+	432.00> 182.00	6.55	4,722,065	1.8
Fenthion-oxon	6552/12/1	C10H15O4PS	262.0429	+	263.10> 231.00	6.55	3,075,195	1.4
Nitrothal-isopropyl	10552-74-6	C14H16NO6Na	317.0875	+	295.10> 230.95	6.56	2,199,581	3.0
Chlorantraniliprole	500008-45-7	C18H14BrCl2N5O2	480.9708	+	483.90> 452.90	6.57	2,407,025	2.7
Fipronil-sulfone	120068-36-2	C12H4Cl2F6N4O2S	451.9336	-	451.00> 414.90	6.57	2,843,708	2.0
Valifenalate	283159-90-0	C19H27ClN2O5	398.1608	+	399.20> 155.00	6.59	3,845,335	1.9

646 种成分快速同时分析方法的评估

针对 646 种农药快速同时分析方法，我们对其线性、峰面积重复性、长期稳定性进行了评估。

线性

在 0.002~0.1 mg/kg (2~100 pg/μL) 的范围绘制了 6 个浓度点的标准曲线并评估线性。646 种农药在薄荷基质和西红柿基质中均表现出良好的线性 (R^2 : 0.99 以上)。标准曲线的权重设为 1/C。
图 4 为 6 种农药在薄荷萃取液中的基质标准曲线数据。

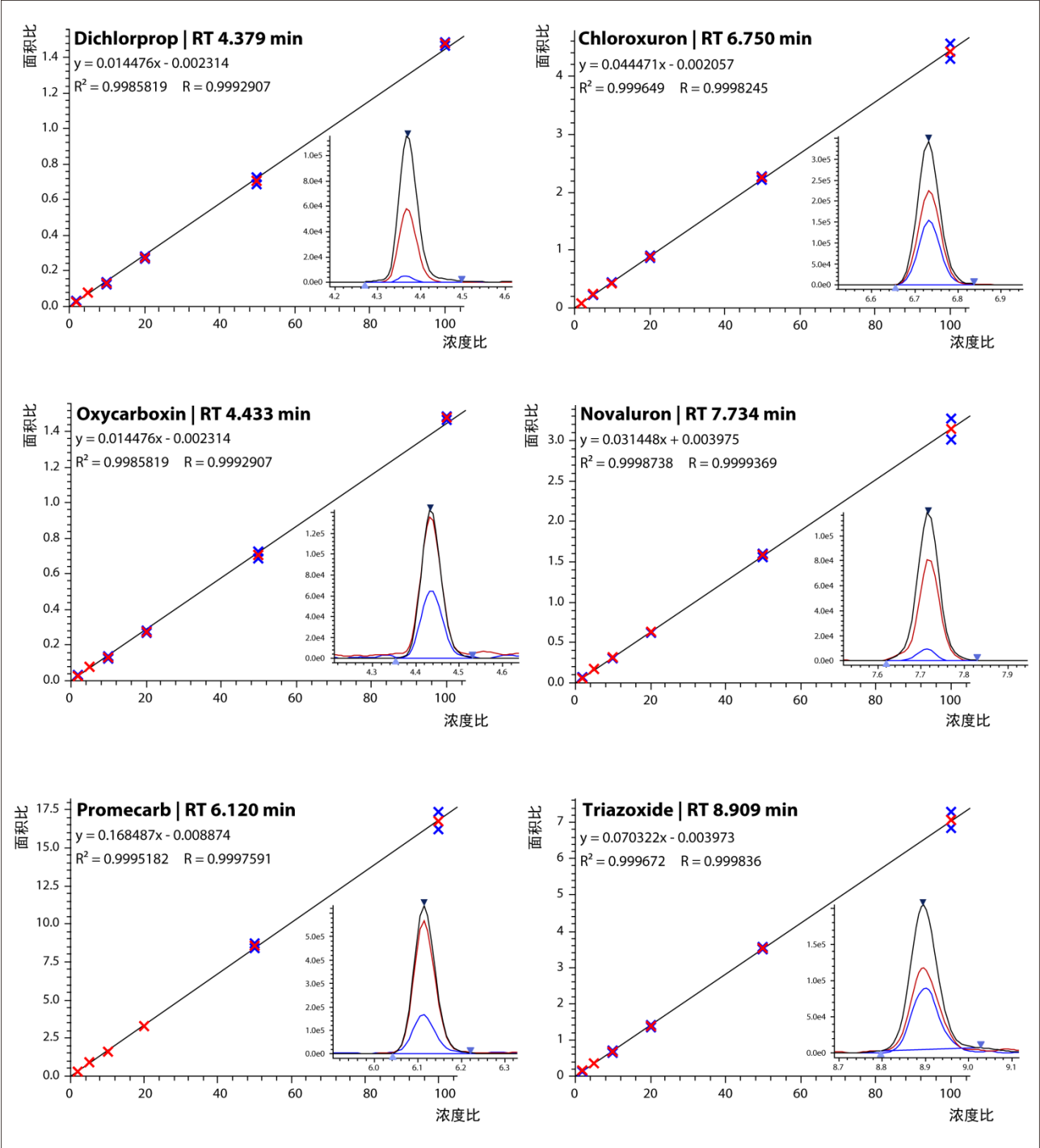


图 4 薄荷基质标准曲线（添加浓度：0.002~0.1 mg/kg）和 MRM 色谱图（黑线：定量离子；红线和蓝线：参比离子）
Calibration curves for selected pesticides spiked into a mint matrix extract in the range 0.002 - 0.1 mg/kg.
The quantitation MRM chromatogram is shown in black (qualifier ion MRM chromatograms are shown in red and blue).

峰面积重复性

为了评估常规分析时定量数据的稳定性，对添加了农药的薄荷基质溶液（添加浓度 0.05 mg/kg）连续进样，进行了 24 小时以上的连续分析。

图 5 为 8 种农药峰面积的变动。

这 8 种农药的保留时间间隔相等（选择保留时间接近 3、4、5、6、7、8、9、10 分钟的成分）。

由于同时含有正离子检测和负离子检测的农药，因此以极性切换速度 5 msec 进行正负离子的同时测定（表 3）。

由图可知，在 100 次连续分析的结果中，8 种农药的峰面积重复性（RSD）均在 5.7 %以下。

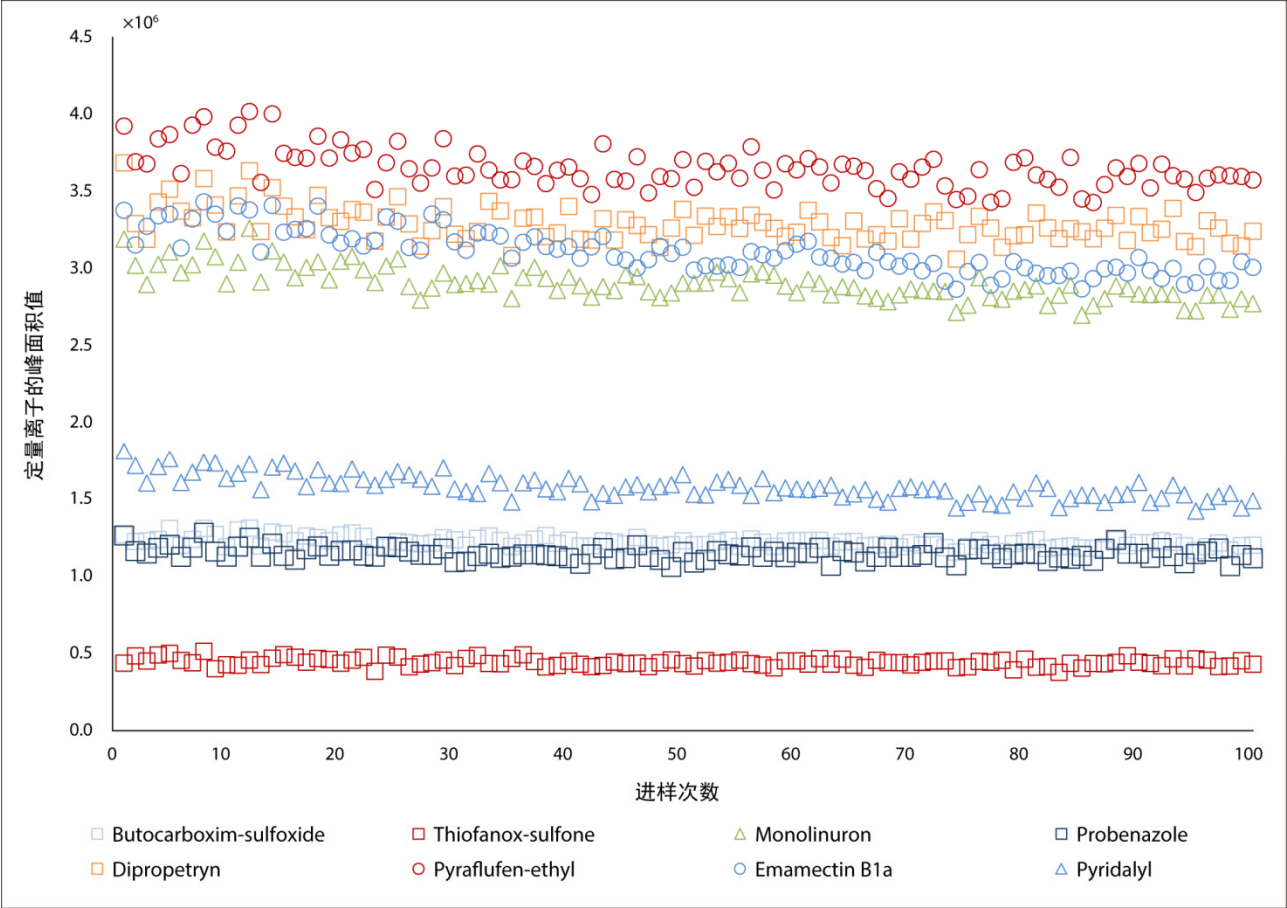


图 5 薄荷萃取液中 8 种农药的峰面积图（添加浓度: 0.05 mg/kg，连续分析 100 次）
Peak area response for several pesticides following 100 repeat injections of a 0.05 mg/kg spiked into mint matrix extract.

表 3 薄荷萃取液中 8 种农药的峰面积重复性（添加浓度: 0.05 mg/kg，连续分析 100 次，连续分析 24 小时）
Peak area variance for selected following the repeated injection of a 0.05 mg/kg spiked into mint matrix extract
(number of sample replicates was 100; the analysis sequence was 24 hours).

化合物名称	CAS 号	分子式	分子量	极性	MRM 定量离子	保留时间 (分钟)	平均 峰面积	%RSD (n=6)
Butocarboxim-sulfoxide	34681-24-8	C7H14N2O3S	206.0725	+	207.10> 75.10	3.042	1,220,391	2.6
Thiofanox-sulfone	39184-59-3	C9H18N2O4S	250.0987	+	268.10> 57.00	4.001	442,724	5.7
Monolinuron	1746-81-2	C9H11ClN2O2	214.0509	+	215.10> 99.10	4.985	2,904,116	3.7
Probenazole	27605-76-1	C10H9NO3S	223.0303	+	224.00> 41.05	5.995	1,145,189	3.5
Dipropetryn	4147-51-7	C11H21N5S	255.1518	+	256.20> 144.05	6.999	3,289,597	3.4
Pyraflufen-ethyl	129630-19-9	C15H13Cl2F3N2O4	412.0204	+	413.00> 339.00	8.004	3,653,333	3.5
Emamectin B1a	138511-97-4	C56H81NO15	1007.5606	+	886.40> 158.20	9.008	3,109,562	4.5
Pyridalyl	179101-81-6	C18H14Cl4F3NO3	488.9680	-	491.90> 109.05	10.171	1,579,422	5.0

不同基质中的响应

在 LC-MS/MS 分析食品中农药残留时基质效应一个主要挑战。因共存的化合物或基质成分将使目标分析物的离子化被抑制或促进。基质效应还会影响峰面积。不同食品的基质成分不同，峰面积的值也会不同。在同一基质内将面积的变动控制到最小程度为理想状态。但是同一基质下峰面积的重复性（RSD%）应该较小。

在示例中，对添加了 646 种农药成分的 3 种样品（苹果、薄荷、西红柿）分别进行了 100 次分析，3 种样品共计进行了 300 次连续分析。图 6 为 3 种样品中农药成分的连续分析结果（添加浓度：0.05 mg/kg）。由图可知，同一基质中，所有农药的峰面积相对标准偏差均小于 5.9 %。

此外，我们还对 Probenazole 和 Dipropetryn 第 1 次进样和第 100 次进样得到的 MRM 色谱图进行了比较。图 7 为不同样品之间由于基质效应导致的峰面积变动。在同一样品中，第 1 次和第 100 次的峰面积变动率为 5.7 %RSD，控制在较小范围内（图 7）。

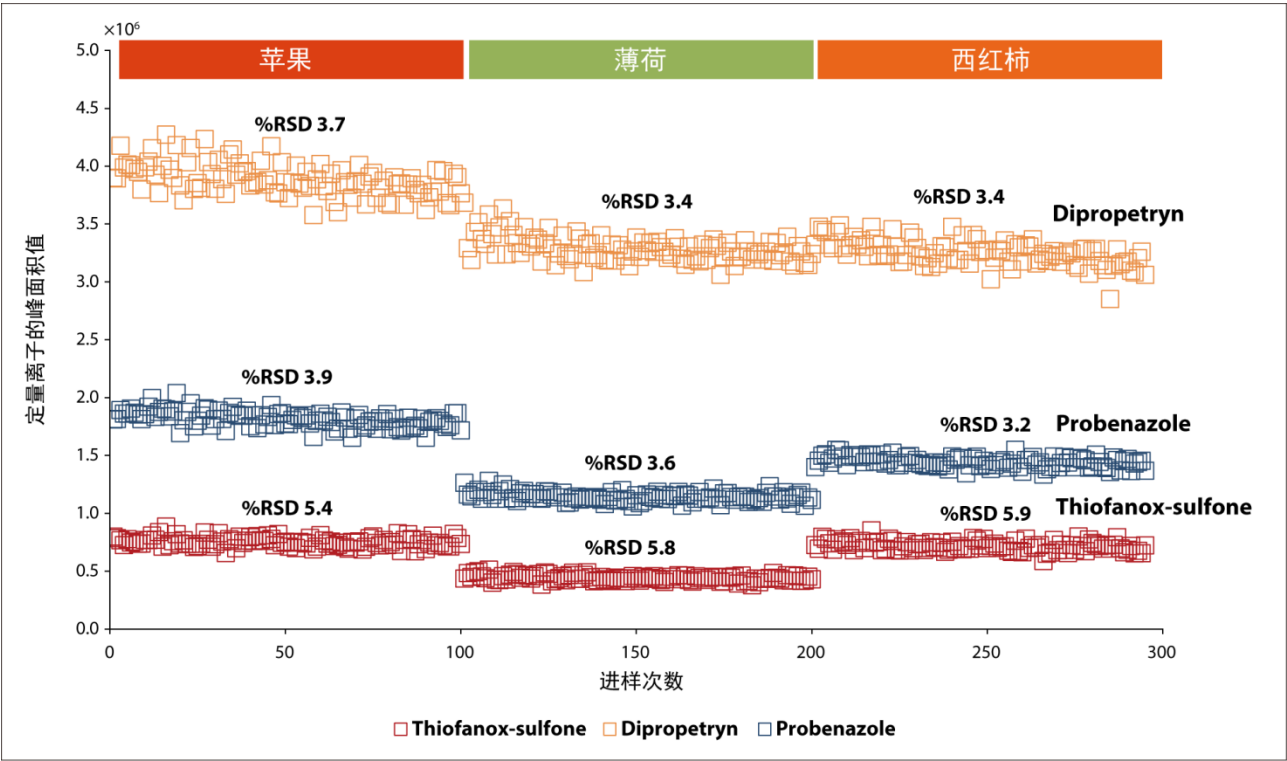


图 6 苹果、薄荷、西红柿萃取液中 3 种农药的峰面积图（添加浓度: 0.05 mg/kg，分析时间: 72 小时以上）
Peak area response for three pesticides spiked into apple, mint and tomato matrix extracts at 0.05 mg/kg over 72 hours.

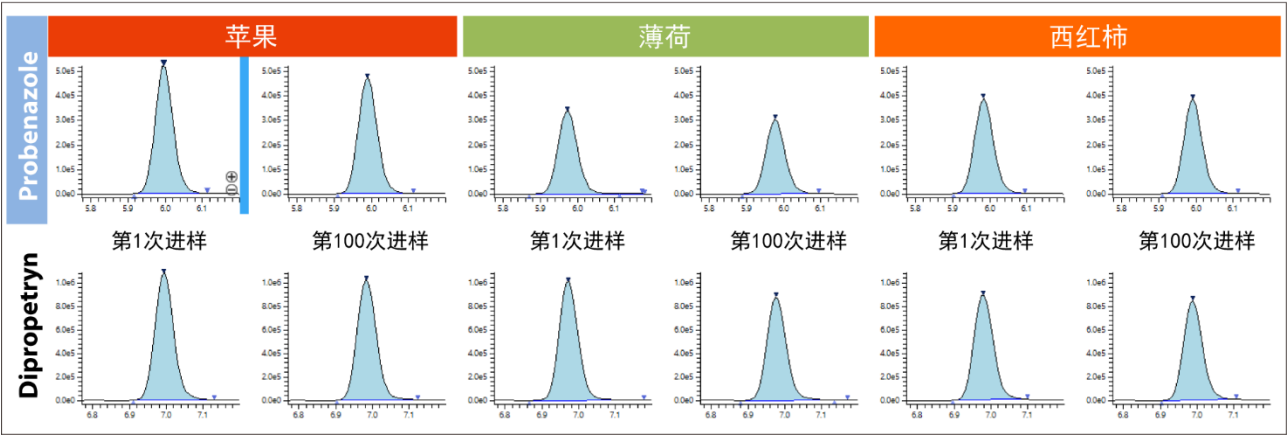


图 7 苹果、薄荷、西红柿萃取液中的 Probenazole（保留时间 5.995 分钟）和 Dipropetryn（保留时间 6.999 分钟）的
第 1 次进样和第 100 次进样得到的 MRM 色谱图
MRM chromatograms for probenazole (RT 5.995 minutes) and dipropetryn (RT 6.999 minutes) for injection 1 and
injection 100 spiked into apple, mint and tomato matrix extracts.

基质效应的抑制

在开发能够高灵敏度高精度的对多种农药成分进行测定的方法的过程中，由样品基质带来的基质效应会引发离子化抑制或离子化促进是一个难题。离子化抑制可能影响仪器的检测能力、数据的准确性和精度。

为了降低复杂的基质样品对目标分析物的干扰，常规分析中稀释法被越来越多的应用。预处理的稀释操作比较普遍，方法简单，且性价比高。并且，样品稀释后可减少进样体积，有助于降低仪器损耗，提高测定数据的精度，还能减少维护频率。

图 8 为添加了 0.005 mg/kg 农药的薄荷萃取液用水分别按照 1:5、1:10、1:20、1:50、1:100 比例稀释后，得到的 MRM 色谱图。表 4 为各稀释比例的回收率。

由此可知，对样品进行 10 倍（1:10）稀释后，几乎所有成分的基质效应均得以降低，并且回收率达 70~120%，重复性（RSD）小于 20%，大部分分析物的相对标准偏差（RSD）小于 10%，说明结果良好。将样品稀释 20 倍或 50 倍，即可将基质效应抑制在容许范围内。

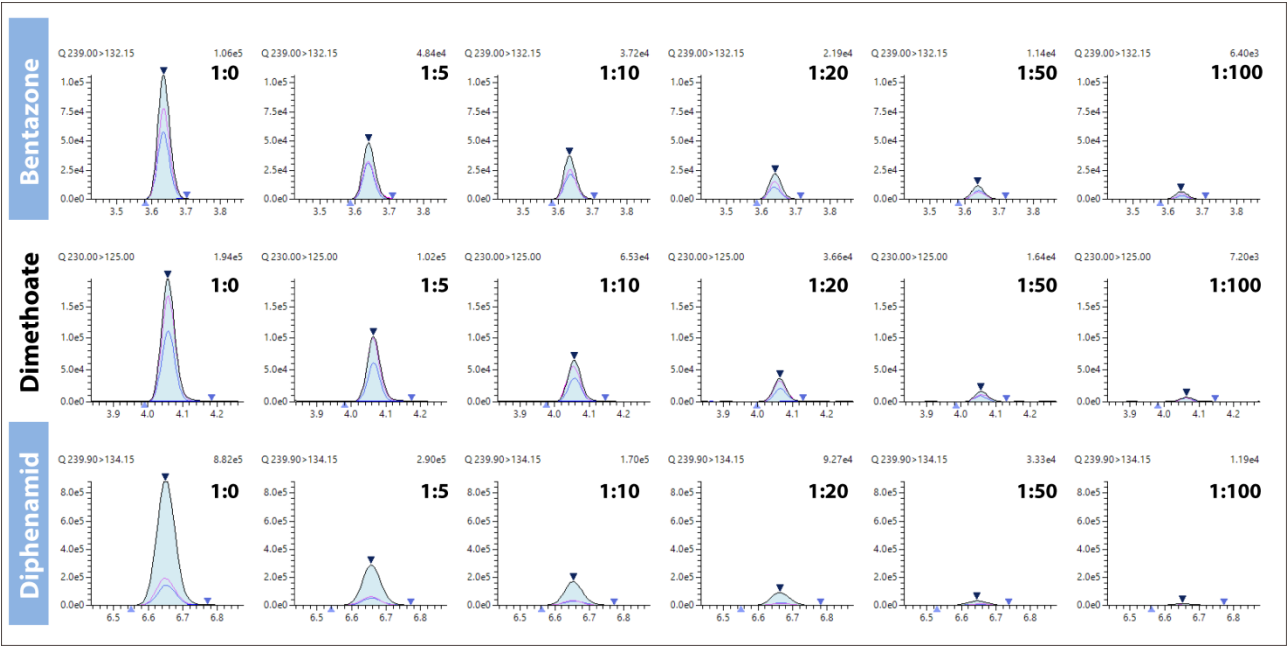


图 8 向薄荷萃取液中添加 3 种农药成分得到的 MRM 色谱图（添加浓度：0.005 mg/kg）样品用水按照 1:5、1:10、1:20、1:50、1:100 稀释。
MRM chromatograms for 3 selected compounds spiked into a mint extract at 0.005 mg/kg and diluted 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 and 1:100 with water.

表 4 薄荷萃取液用水稀释时的稀释比例和回收率（添加浓度：0.005 mg/kg）
Diluting a sample matrix extract spiked with 0.005 mg/kg with water reduced matrix ion suppression.

				稀释比例					
化合物名称	CAS 号	分子式	分子量	0	1:5	1:10	1:20	1:50	1:100
				回收率					
Bentazone	25057-89-0	C10H12N2O3S	240.0569	32.1	44.6	65.5	72.7	91.7	98.1
Demeton-S-methyl-sulfone	17040-19-6	C6H15O5PS2	262.0099	51.1	78.5	89.6	91.1	114.2	116.8
Dimethoate	60-51-5	C5H12NO3PS2	228.9996	36.2	65.3	88.5	92.2	92.4	94.2
Isocarbamid	30979-48-7	C8H15N3O2	185.1164	28.8	57.1	81.8	98.7	102.5	96.4
Vamidothion	2275-23-2	C8H18NO4PS2	287.0415	53.6	76.3	98.2	98.5	101.5	114.1
Thiazafluron	25366-23-8	C6H7F3N4OS	240.0293	32.8	62.9	80.5	84.2	87.1	97.4
Demeton-S-methyl	919-86-8	C6H15O3PS2	230.0200	57.8	82.1	93.1	87.6	108.5	102.4
Sebuthylazine	7286-69-3	C9H16CIN5	229.1094	28.7	53.3	69.8	79.8	88.5	95.8
Flutriafol	76674-21-0	C16H13F2N3O	301.1027	27.3	46.1	71.4	76.1	81.8	87.3
Furametpyr	123572-88-3	C17H20CIN3O2	333.1244	48.3	69.8	86.9	86.2	97.6	101.9
Fenobucarb	3766-81-2	C12H17NO2	207.1259	60.9	79.2	100.7	96.1	102.8	103.9
Benodanil	15310-01-7	C13H10INO	322.9807	50.9	69.8	86.3	96.5	102.4	94.8
Terbutylazine	5915-41-3	C9H16CIN5	229.1094	50.4	66.6	83.2	87.2	89.8	91.0
Dimethachlor	50563-36-5	C13H18CINO2	255.1026	75.1	86.1	106.0	107.1	106.2	108.0
Dimethenamid	87674-68-8	C12H18CINO2S	275.0747	72.6	84.9	102.9	100.0	103.6	97.3
Furalaxyl	57646-30-7	C17H19NO4	301.1314	82.2	89.1	106.6	108.6	106.2	102.4
Bixafen	581809-46-3	C18H12Cl2F3N3O	413.0310	66.8	79.3	99.0	95.6	103.7	97.1
Triflumuron	64628-44-0	C15H10ClF3N2O3	358.0332	54.2	71.8	95.5	84.9	95.3	101.7
Epoxiconazole	133855-98-8	C17H13ClFN3O	329.0731	61.6	77.2	98.8	95.3	90.0	101.2
Teflubenzuron	83121-18-0	C14H6Cl2F4N2O2	379.9742	41.8	50.9	80.1	86.8	100.0	97.7

■ 结论

Conclusion

综上所述,使用 LCMS-8060 对 646 种农药残留同时定量分析方法(每种成分最多有 3 对 MRM 离子对,共 1,919 个 MRM 离子对),可在短短的 10.5 分钟内对所有成分进行检测,实现了快速且高灵敏度的分析。并且,利用 LCMS-8060 拥有的全球最快正负极切换速度 5 msec,在一次测定中即可检测 34 种负离子成分和 612 种正离子成分。

另外,由于 LCMS-8060 的高灵敏度性能,对样品进行稀释,可降低基质效应。大部分化合物稀释 20 倍或 50 倍后,可得到 70~120 % 的回收率。



■ 参考文献

References

1. Commission Regulation (EC). 2005. No 396/2005 of the European Parliament and of the Council, maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin. Official Journal of the European Union, L 70: 1-16
2. US Environmental Protection Agency, Electronic code of federal regulation: Title 40: Part 180 - tolerances and exemptions for pesticide chemical residues in food.
http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?c=ecfr&tpl=/ecfrbrowse/Title40/40cfr180_main_02.tpl
3. Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare, Department of Food Safety. 2006. Director Notice about Analytical Methods for Residual Compositional Substances of Agricultural Chemicals, Feed Additives, and Veterinary Drugs in Food (Syoku-An No. 0124001 January 24, 2005; amendments May 26, 2006).



岛津企业管理(中国)有限公司
岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

免责声明:

※本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;
※本资料中的所有信息仅供参考,不予任何保证。
如有变动,恕不另行通知。

第一版发行日: 2016 年 10 月