

基于高重现性的色谱方法助力大规模MRM检测方法应用于蔬果农残检测

ExionLC™ 2.0系统的高性能和耐用性的特点

High chromatography reproducibility enables large panel MRM assays for pesticides in fruit and vegetables

Simon Roberts,¹ Adam Latawicz,² Adrian M. Taylor²

¹ SCIEX, USA; ² SCIEX, Canada

农业上杀虫剂的广泛应用是为保护作物受害虫和非目标作物的侵害，使作物损失降到很低，本身也需要强监管来使其对人类和动物健康风险降到低点。获批的杀虫剂有最大食品残留限量，这要求同时定性和定量大批量的杀虫剂残留。LC-MS/MS的多反应检测（MRM）可提供高灵敏度和选择性，但当建立一个检测上百个化合物的方法时，数据质量是尤其重要的，且帮助保证每一个化合物被可靠定量。Scheduled MRM™ Pro算法仅能为一个化合物在它的洗脱时间内智能地监测MRM离子对。这降低了在任意时间点同时出现MRM离子对数量风险，使循环时间和驻留间同时保持在良好状态。首先，检测各化合物洗脱时间，然后使用Scheduled MRM Pro算法建立一个适合的最终方案。

LC-MS/MS解决方案必须可信和灵敏，满足食品检测实验室的需要。当使用Scheduled MRM™ Pro算法时，数据获取方案具有稳

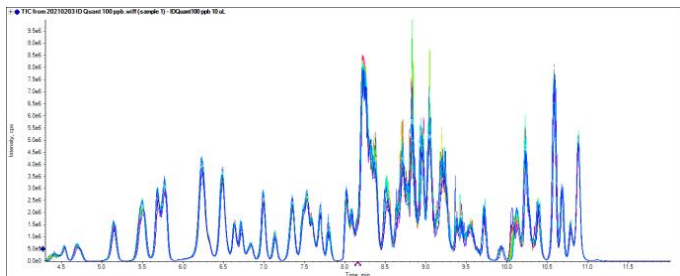


图1. 液相流速和梯度的稳定性。25次重复进样10 μL相同100 ng/mL杀虫剂标准混合物的重叠总离子色谱图。



定的保留时间来高效工作是至关重要的。一个成功的重要检测需要同时保证选择性、可重复性、以及可靠性，获得可以保证稳定保留时间的高质量样本分离。

本实验研究了SCIEX ExionLC™ 2.0系统的流速精确度和保留时间可重复性。使用Scheduled MRM算法来获得428个MRM离子对信息，基于定性和定量以及参与参照标准品匹配的保留时间，精确定性杀虫剂，确认它们的身份。由于包含离子化负模式电离的几个杀虫剂，实施了一个可切换极性的方法。

ExionLC™ 2.0系统的关键特点

- 高压、串联活塞泵，压力达860bar (12,500 psi)，流速最大变化范围为0.001到2 mL/min
- 精确稳定的溶剂流速，低于0.1%的变异系数 (CV) 的保留时间变动，使用Scheduled MRM™算法使监测大批量化合物成为可能，同时保留了数据质量和识别可靠性
- 准确且精密的定量结果，其检测能力的线性系数 (r^2) >0.99，精密度<10%变异系数
- SecurityLink超高效液相色谱手紧型接头和固定管长帮助简化液相系统和柱连接，使用可以防止柱损伤或柱过紧的扭矩限制技术能够提供稳定的效果。

方法

材料和溶液: 所有实验使用iDQuant™标准试剂盒 (SCIEX P/N 4465661) 进行授权标准物质 (ISP Guide 34, IOS/IEC 17025 and ISO 9001:2008) 的杀虫剂分析，包含206种杀虫剂。试剂盒包含20种杀虫剂的10个混合，每种初始浓度为100 µg/mL，溶于100%乙腈。

这个试剂盒首先用于优化MRM条件，并用于调整已存在方法的保留时间，用来更新Scheduled MRM Pro算法以达到更好效果。

使用一个 roQ QuEChERS提取试剂盒步骤 [EN 15562 Kit, 飞诺美 (P/N KS0-8909)]对水果和蔬菜样本进行提取。

样本提取: 杀虫剂分析使用的SCIEX iDQuant试剂盒的混合物 J 包括20种化合物，加入到芝麻菜样本中，混合物 C加入到红葡萄样本，并用此验证方法识别和确认的效能。制备浓度为 1000, 500, 200, 100, 50 和 20 ng/mL 的基质校准样本。

芝麻菜和红葡萄在-20°C冷冻，然后在称重和提取前在室温下融化。按以下列举的步骤进行操作：

- 制备10 g匀浆样本
- 加入10 mL乙腈并强烈震荡1 min进行提取
- 加入飞诺美 roQ QuEChERS试剂盒缓冲液-盐混合物 (KS0-8909) 并立即使用涡旋器强烈震荡1 min
- 以 9000 rpm速度离心10 min
- 转移1 mL的样本提取液到一个装有飞诺美 roQ dSPE 试剂 (KS0-8916, 8913, 8914 or 8915 取决于样本类型)的试管

- 使用强烈震荡30 sec并以9000 rpm离心来清洗样本
- 将500 µL洁净的样本提取液加入到自动进样瓶
- 在使用VWR 0.45 µm聚丙烯滤器滤过前使用水稀释2倍，并转移到LC-MS/MS分析的自动进样瓶

色谱条件: 使用SCIEX ExionLC™ 2.0系统和一根飞诺美 Synergi 2.5 µm, 2.0 x 50 mm Fusion-RP色谱柱 (P/N 00B-4423-B0)进行液相分离。用含甲酸铵缓冲液的水和甲醇进行20 min的梯度洗脱，流速有0.4 mL/min，柱温为40。SCIEX ExionLC 2.0系统自动进样器模块包含250 µL的注射器，250 µL缓冲液管路，100 µL 样品环和15 µL的针管。为了优化样本消耗和使进样循环时间降到最低，使用的注射模式是微升增强进样模式，进样量设为2.0 µL。注射器速度设为低，速度因子设为1。加强冲洗模式使用含有0.1%甲酸洗脱溶剂的1000 µL乙腈/甲醇/异丙醇 (2:2:1 v/v/v)，以及含有5mM甲酸铵运载溶剂的1500 µL水/甲醇(9:1 v/v)。

质谱条件: SCIEX Triple Quad™ 3500系统，采取电喷雾离子化 (ESI) 探头。使用Scheduled MRM™ Pro 算法，在40 sec的检测窗，采用极性切换使所有化合物的分析在一个方法得到实现，428个MRM离子对 (其中194个化合物，388个离子对是ESI+模式下检测，20个化合物在ESI-模式下检测，40个离子对)。

数据获取使用Analyst™ 软件 1.7.2结合ExionLC™ 2.0系统的组件进行。值得注意的是，ExionLC 2.0系统也能完全支持数据获取使用SCIEX OS 软件或更新版本软件的仪器。

数据处理: 质谱获得数据的数据处理使用SCIEX OS 软件 2.1来进行，可以生成校准曲线，准确度，精密度统计。

高质量色谱

428个MRM离子对Scheduled MRM™ Pro 算法监测，这使200个杀虫剂在一次LC-MS/MS 分析得到定量和识别。图2显示了一个20 ng/mL基质混合标准品的色谱图举例。获得了非常好的分离，且峰宽度窄，峰对称性好，这在定量时是非常重要的。峰对称性使用对称因子来测量—峰中线和后坡的距离除以峰中线和前坡的距离，10%的最大峰—通常在1.0左右。图3显示的色谱图举例进一步强调了窄峰和对称峰使用LC系统和所选色谱相得到的峰宽。对于图3显示的数据，跨越浓度范围的平均对称因子阿维菌素(emamectin)为1.1，氟氯虫腙(metaflumizone)为1.1，啶虫脒(acetamiprid)为0.9，非草隆 (fenuron) 为0.9。

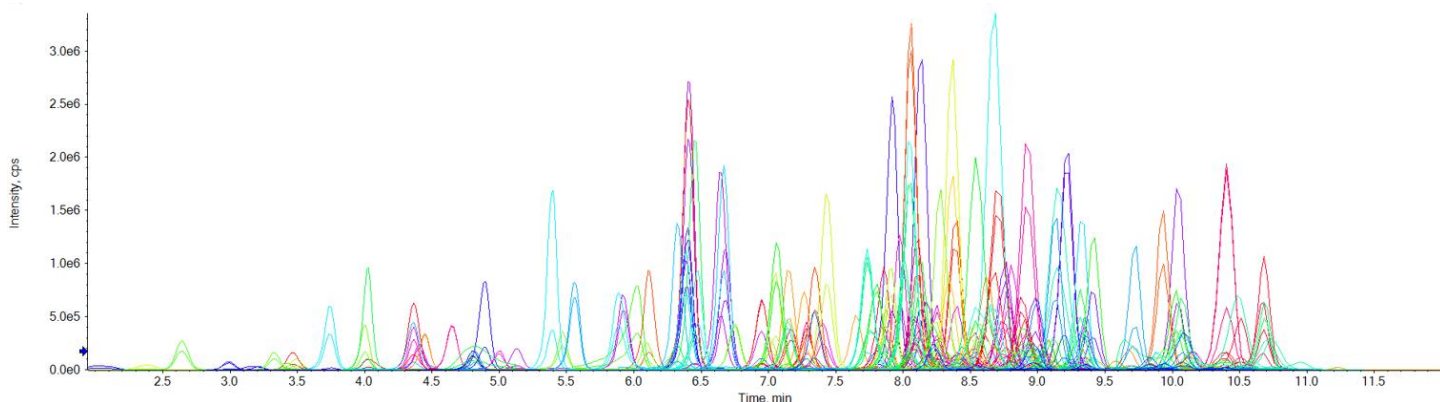


图2.提取离子色谱图显示了杀虫剂的洗脱特点。使用Scheduled MRM™ Pro算法监测的400个MRM离子对大概检测到200个杀虫剂。

保留时间重复性

当保留时间窗口较窄时，良好的保留时间稳定性是非常关键的因子，可以保证色谱峰都能保持在检测窗内。液相色谱泵的稳定性的也是至关重要的，可以在大批量样本检测时保证一致的保留时间。这能降低重新校正方法所花费的时间损耗，来适应保留时间漂移，使任何由于峰位移到目标窗口之外造成的数据丢失风险降到可忽略不计。图1使用25次连续进样获得的重叠色谱图，表明有良好的液相泵稳定性。

如图3所示，在可许的保留时间范围内各个分析物的保留时间精确度均低于0.1%CV，150个化合物平均变异系数为0.066%CV。对于大多数检测的化合物而言，50次进样的最大保留时间差异<1.5秒。

采用40秒的窄保留时间窗，在单次20分钟的时间内检测所有目标物，图4显示了在色谱保留时间窗口中心附近检测峰的保留时间窗宽度。

当保留时间稳定性非常好时，更多的MRM离子对可以在每次进样都能检测到。这个方法中，为了使离子比值可以在定量离子和定性离子间被计算，每个化合物有两个MRM离子对被监测。图4显示了可以被自动计算和在SCIEX OS软件的Analytics作图的离子比值接受标准线。

% CV Retention Times for 150 compounds (50 injections)

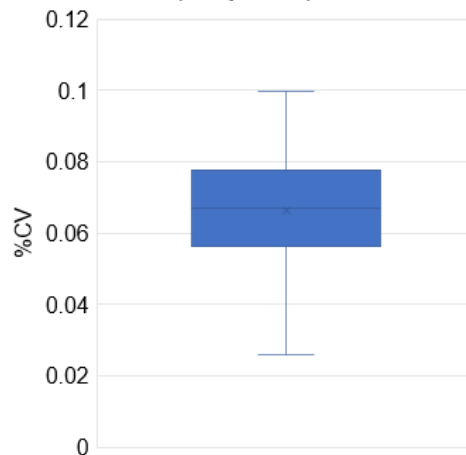


图3. 保留时间精确度。Box 和 whisker曲线显示了150种化合物在50次进样100 ng/mL杀虫剂标准混合物时保留时间%CV的展开

定量性能

进样分析溶剂标准品，浓度范围为20到1000 ng/mL。图5显示了校准线。线性回归使用 $1/x$ 加权。线性系数 (r^2) 通常高于0.99。

计算峰面积重复性也是25次重复进样1 μ L (100 ng/mL) 标准品样本，然后25次重复进样10 μ L。通常变异结果使用选定化合物，不使用内标，如图6所示。

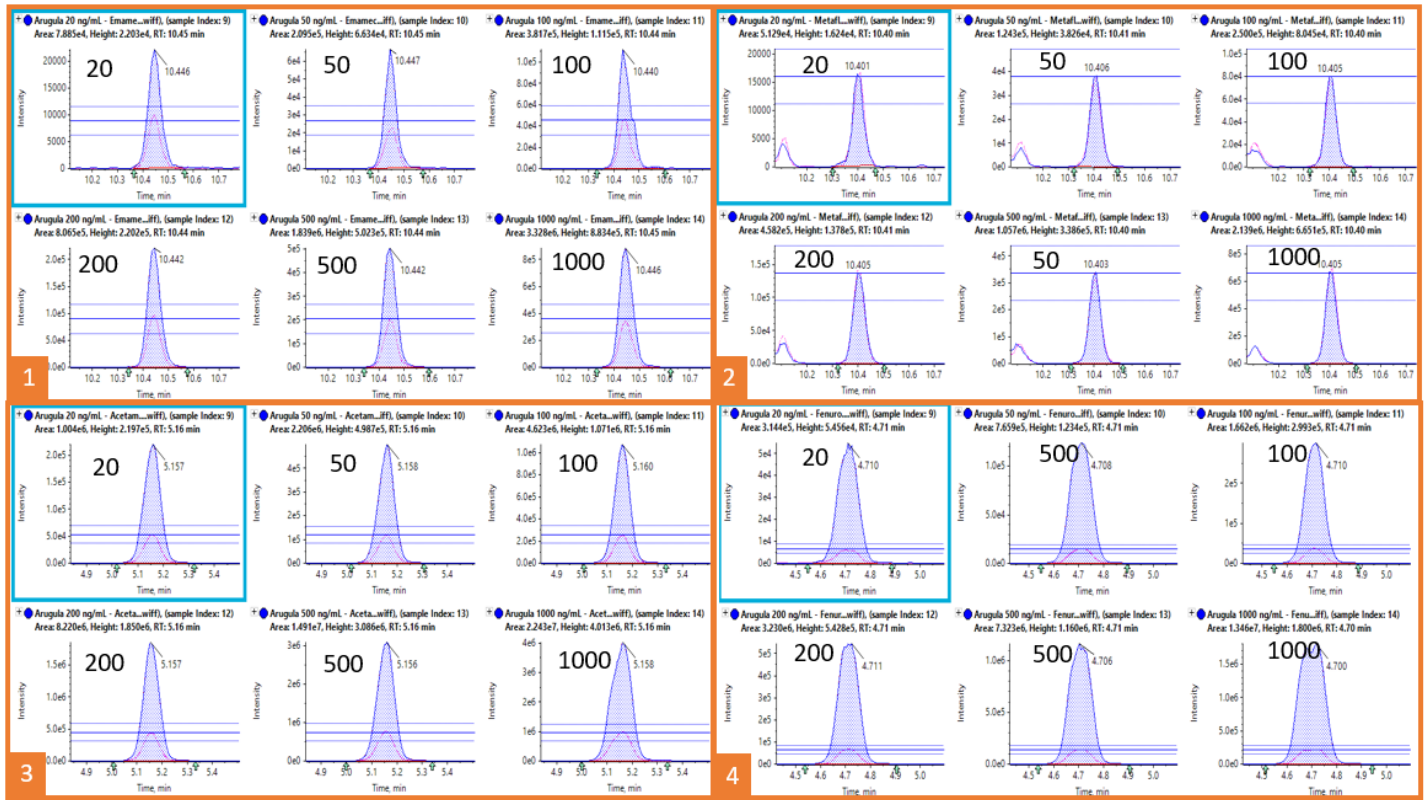


图4. 特定农药的定量和定性MRM离子对。这里显示了四种农药：(1)阿维菌素(emamectin)，(2)氟虱虫脞(metaflumizone)，(3)啮虫脞(acetamiprid)，(4)非草隆(fenuron)。其浓度范围为20-1000 ng/mL。在SCIEX OS软件的Analytics界面进行色谱峰预览时，会自动列出MRM离子比率达到30%的离子对，以帮助确认识别化合物。

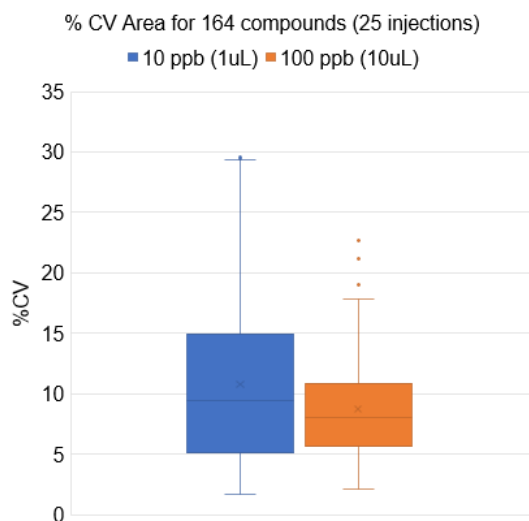


图6. 峰面积精确度。Box和whisker图显示了从25次进样100 ng/mL的杀虫剂标准混合物得来的164个化合物峰面积%CV的范围，使用1 μ L进样量（蓝色）或10 μ L进样量（橘色）。

化合物确认

化合物确认通常是以保留时间匹配以及定量离子和定性离子的比值计算来实现的。未知样本中检测杀虫剂的离子比值与标准样本中的比值进行比较，采用容错水平确认目标杀虫剂的检出。这些容错水平在几个指导原则下确认，可在SCIEX OS软件中用户进行自定义。

MRM比值在SCIEX OS软件中自动定义。未知样本中，定量离子对和定性离子对峰面积自动与所有纳入的样本的平均比值相比较来进行化合物确认。容错水平显示在Analytics的峰检查窗口。这里，按照指导方针1SANCO/12682/2019，使用一个通用的容错30%。

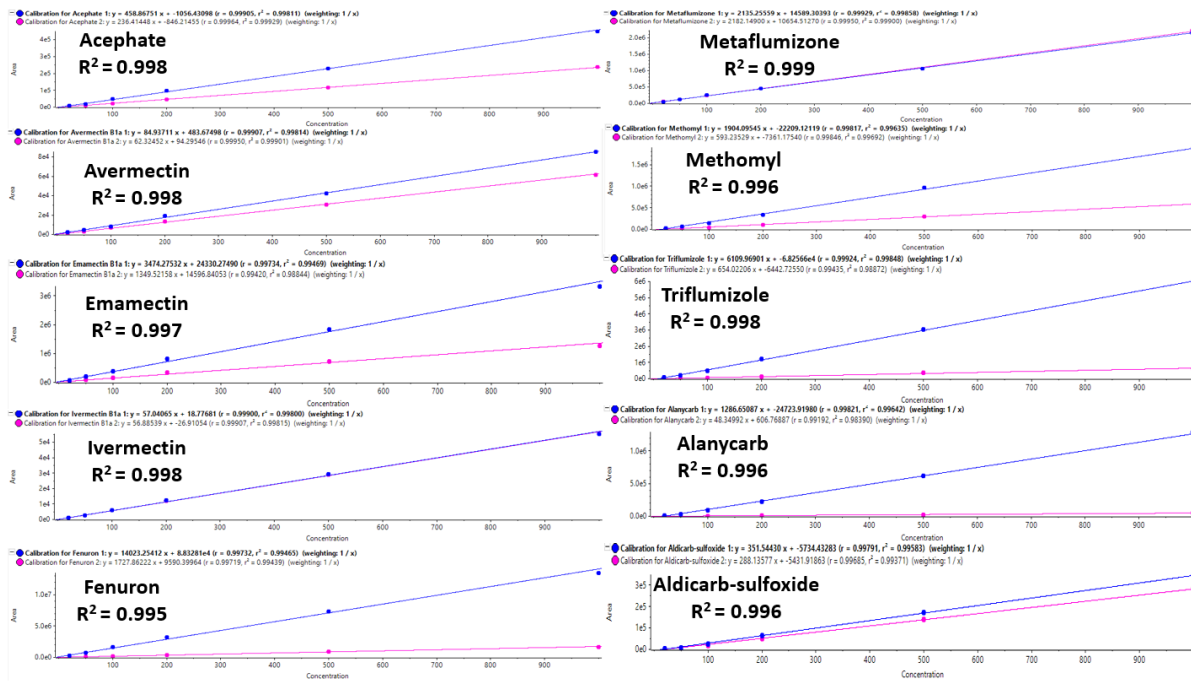


图5. 选定杀虫剂的浓度曲线。使用建立的方法，生成溶剂中杀虫剂混合物的浓度曲线，浓度范围为20 ng/mL到1000 ng/mL。观测到良好的线性， r^2 值高于0.995。

表1. 杀虫剂确认。杀虫剂使用添另到实物样本基于保留时间 (RT) 匹配来确认，容错为0.2 min，MRM比值比较进行定性方法验证。

Pesticide in grape	RT (min)	RT error (%)	MRM ratio	% Ratio error
Benalaxyl	9.21	0.06	0.93	3.44
Benzoximate	9.41	0.02	0.42	2.71
Bifentazate	8.52	0.06	1.93	7.60
Cyazofamid	8.80	0.07	0.17	1.46
Fenamidon	8.10	0.26	0.69	2.85
Fenazaquin	10.67	0.18	0.25	1.45
Fenhexamid	8.52	0.18	0.57	2.61
Fenoxycarb	8.88	0.06	1.23	-1.50
Flufenacet	8.70	0.08	1.17	7.82
Furathiocarb	9.92	0.28	0.66	1.90
Indoxacarb	9.68	0.12	0.19	-0.28
Mepronil	8.36	0.19	1.53	10.42
Piperonyl-butoxide	10.02	0.28	0.49	-0.52
Quinoxifen	10.06	0.29	1.02	4.53
Thiobencarb, Benthocarb	9.33	0.36	0.25	-0.47
Zoxamide	9.13	0.22	0.49	0.48

定性表现的验证

SCIEX iDQuant™ 试剂盒的Mix J 用于杀虫剂分析，包含20个化合物添加到芝麻菜样本中，Mix C添加到红葡萄样本中，浓度均为10 μg/kg。

除了MRM比值比较，化合物也基于保留时间匹配进行确认。良好的保留时间稳定性更加的关键，这可以通过良好的样本前处理，色谱条件以及梯度泵稳定性共同获得。表1总结了基于保留时间匹配和MRM比值比较进行的确认结果。所有20个杀虫剂从添加到样本中进行可靠的确认。平均保留时间偏差在0, 017%到0.355%之间，平均MRM比值偏差在-1.50到10.42%之间。

结论

SCIEX ExionLC™ 2.0系统已经成功应用于LC-MS/MS 方法来分析食品样本中多于200个杀虫剂，其样本的前处理是基于 QuEChERS方法进行的。

SCIEX ExionLC™ 2.0 系统的关键表现因素，是流速精确度，和获得的保留时间重复性，这可以使Scheduled MRM™ Pro 算法工作流程使用于同时识别和定量大批量杀虫剂残留。这已经能在不牺牲数据质量的前提下实现，使循环时间和处理时间都保持良好平衡。

这个方法可以提供足够的速度和灵敏度来定量所有的杀虫剂（约200种），在20到200ng/mL浓度范围内具有良好的线性，线性系数（ r^2 ）通常高于0.99，且变异系数通常都能低于10%。

定量方法可靠性被20个化合物确证，在两种基质中的浓度为1010 µg/kg。所有的化合物在所有样本中能可靠地检出和确认。部分原因是 ExionLC™ 2.0系统提供了精良的泵稳定性，这从在一定保留时间范围内的各个分析物保留时间精密度低于0.1%CV可以看出。保留时间误差均低于± 0.1 min。

参考文献

1. SANCO/12682/2019 guidelines. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-13312-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：SCIEX-China