

高效液相色谱-串联质谱法绘制标准曲线的因素分析

张艳丽, 刘小丽

(鹤壁市农产品检验检测中心, 河南 鹤壁 458030)

摘要: GB 23200.121《食品安全国家标准 植物源性食品中 331 种农药及其代谢物残留量的测定 液相色谱-质谱联用法》中, 要绘制农药的标准曲线, 在实际工作中发现标准曲线的相关系数 R 值很难达到 0.995。通过试验, 发现有离子对及电压值不正确、仪器响应值不同、基质效应等因素影响, 找到了相应的解决方法, 可以让标准曲线的相关系数达到 0.9999 以上, 提高了数据准确性。

关键词: 液质联用仪;标准曲线;离子对;响应值;基质效应

Factor Analysis of Drawing Standard Curve by High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

Zhang Yanli, Liu Xiaoli

(Hebi agricultural products inspection and testing center, Henan University, Hebi 458030)

Abstract: GB 23200.121 National Food Safety Standard - Determination of 331 Pesticides and Their Metabolites Residues in Plant derived Foods - Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS), in order to draw the standard curve of pesticides, it is difficult to find that the correlation coefficient R value of the standard curve can reach 0.995 in practical work. Through the test, it is found that there are incorrect ion pairs and voltage values, different instrument response values, matrix effects and other factors, and corresponding solutions are found, which can make the correlation coefficient of the standard curve reach above 0.9999, and improve the accuracy of the data.

Keywords: LC-MS; standard curve Ion pair; response value; matrix effect

1 问题描述

液质联用仪检测农产品中农残时^[1-5], 需要绘制标准曲线, 工作中发现有些农药的标准曲线相关系数达不到 0.995 以上, 影响它的因素有哪些? 本文从离子对及电压值不正确、仪

器响应值不同、基质效应等三个方面来分析原因，并提出解决办法。

7.5.3 基质匹配标准工作曲线

选择与被测样品性质相同或相似的空白样品按照 7.1~7.4 部分进行前处理,得到空白基质溶液。精确吸取一定量的混合标准溶液,逐级用空白基质溶液稀释成质量浓度为 0.002 mg/L、0.005 mg/L、0.01 mg/L、0.02 mg/L、0.05 mg/L、0.1 mg/L、0.2 mg/L 和 0.5 mg/L 的基质匹配标准工作溶液,根据仪器性能和检测需要选择不少于 5 个浓度点,供液相色谱-质谱联用仪测定。以农药定量离子离子的质量色谱图峰面积为纵坐标,相对应的基质匹配标准工作溶液质量浓度为横坐标,绘制基质匹配标准工作曲线。

图 1 GB 23200.121-2021 标准上的标准曲线浓度点

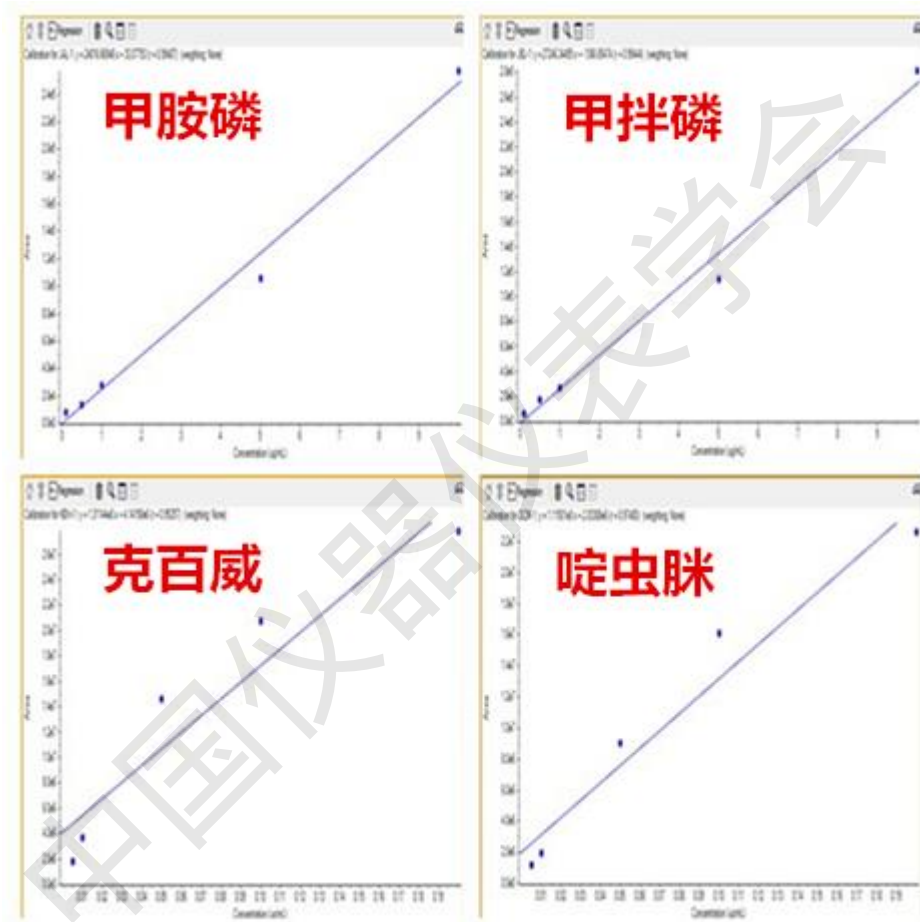


图 2 部分农药标准曲线图

2 解决办法

2.1 获取正确的离子对和电压值

比如阿维菌素,照抄国标方法,做出来的农残标准曲线相关系数很差。选择加铵峰还是加钠峰的离子对,与农药本身性质有关,与流动相也有关系,要经过多次实验才行。选择正离子模式还是负离子模式,要在仪器上测试离子丰度,选择丰度最强、受干扰小的定性离子与定量离子。

1) 阿维菌素出加铵峰还是加钠峰

(1) 色谱条件

色谱柱: Altantis T3 柱 (150mm×2.1mm, 3.0 μ m); 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流动相: A 相为水 (含 0.01%甲酸 (v/v)和 1mM/L 甲酸铵), B 相为甲醇 (含 0.01%甲酸 (v/v)和 1mM/L 甲酸铵)。柱流速为 0.40mL/min。梯度洗脱程序: 0~2.0min, 90%A; 5.0~12min, 5%A; 12.1~13min, 90%A; 流速: 0.4mL/min; 进样量: 1 μ L。

(2) 质谱条件

离子源: ESI; 扫描方式: 正离子扫描; 扫描方式: 多反应监测 (MRM) 模式; 电喷雾电压: 4500V; 雾化气压力: 50psi; 气帘气压力: 30psi; 辅助加热气: 60psi; 离子源温度: 300 $^{\circ}$ C; 碰撞气压力: 9psi。

(3) 检测离子的选择

阿维菌素的分子式是 C₄₈H₇₂O₁₄,理论分子量为 872.4921。采用母离子扫描(MS Scan),获得一级质谱图,通过分子质量确定阿维菌素多以加合离子[M+NH₄]⁺、[M+Na]⁺、[M+H]⁺形式存在,本实验选择离子丰度极强的[M+NH₄]⁺(m/z890.5)作为母离子。然后,优化毛细管电压等参数,使母离子强度达到最高。

选择母离子后,进行子离子扫描(Daughter Scan),获得二级质谱图,得到 305.2、567 和 145.1。进行 MRM 多反应监测扫描,再次优化离子源温度、脱溶剂气温度等参数,使其离子化效率达到最佳。最终,本实验选择丰度最强、受干扰小的 890.5/567 作为定性离子对,而 890.5/305.2 作为定量离子对。阿维菌素检测的质谱参数见表 1。

表 1 阿维菌素检测的质谱条件

化合物	母离子/ (m/z)	保留时间/min	产物离子/(m/z)	碰撞能量/eV	去簇电压/V
阿维菌素	890.5	7.56	305.2	32	65
			567	19	65

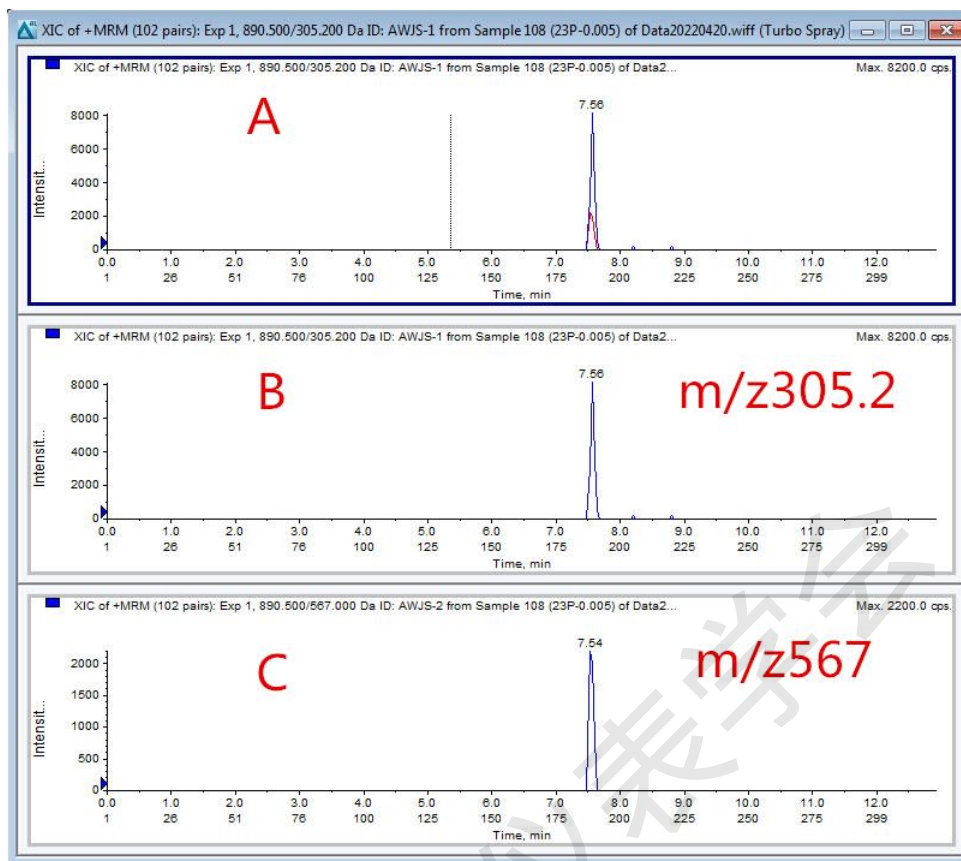


图3 阿维菌素标液的MRM总离子及选择离子的离子流色谱图(10 μ g/L)

Fig.1 MRM chromatograms of abamectin(10 μ g/L)

A: 总离子图谱 (Chromatogram of total ion) B: 定量离子图谱 (Chromatogram of quantitative ion); C: 定性离子图谱 (Chromatogram of qualitative ion)

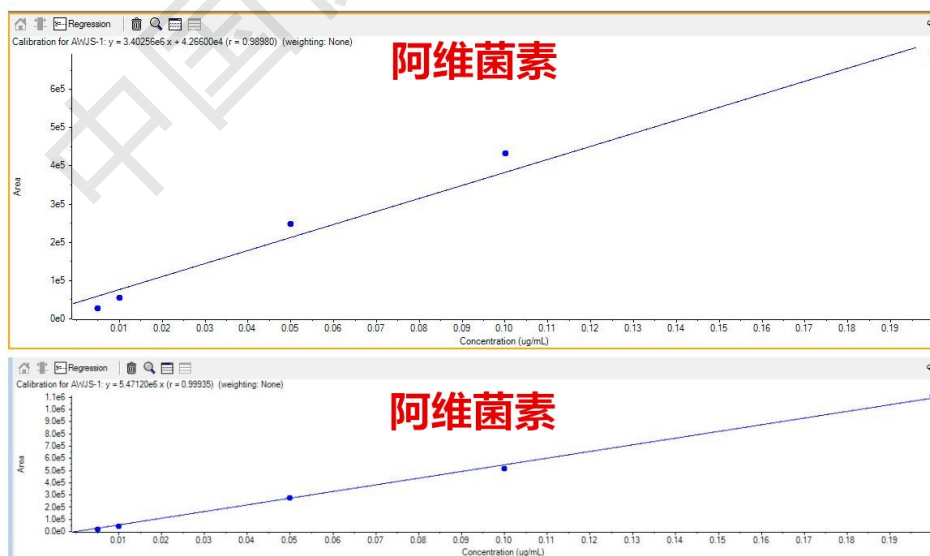


图4 阿维菌素不同离子对的直线对照图

2) 辛硫磷

GB23200.121 标准上辛硫磷的离子对是 299.1/129.0 与 299.1/153.0, DP 电压值是 55V, CE 电压值分别是 18V/10V, 用这个条件来做, 标准曲线的相关系数只有 0.94775。

配制辛硫磷 1.0ug/mL, 选择针泵进样, 选择 SCAN 模式, 选择母离子扫描与子离子扫描, 选择丰度最强、受干扰小的 299.1/77.0 作为定性离子对, 299.1/129.0 作为定量离子对。优化 CE 与 DP 值, DP 值为 61V, CE 值为 42V/18V。

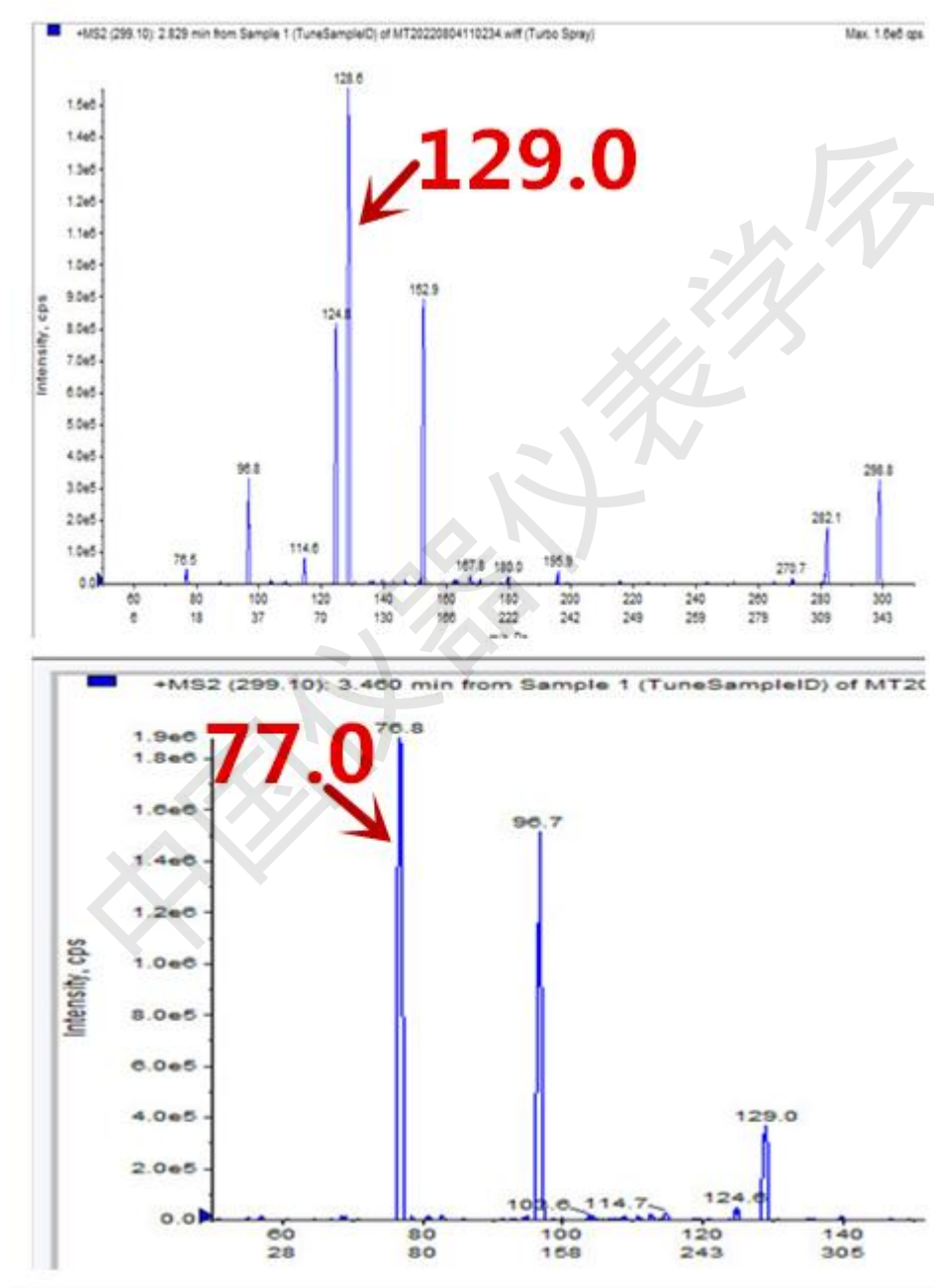


图 5 辛硫磷的 SCAN 模式扫描

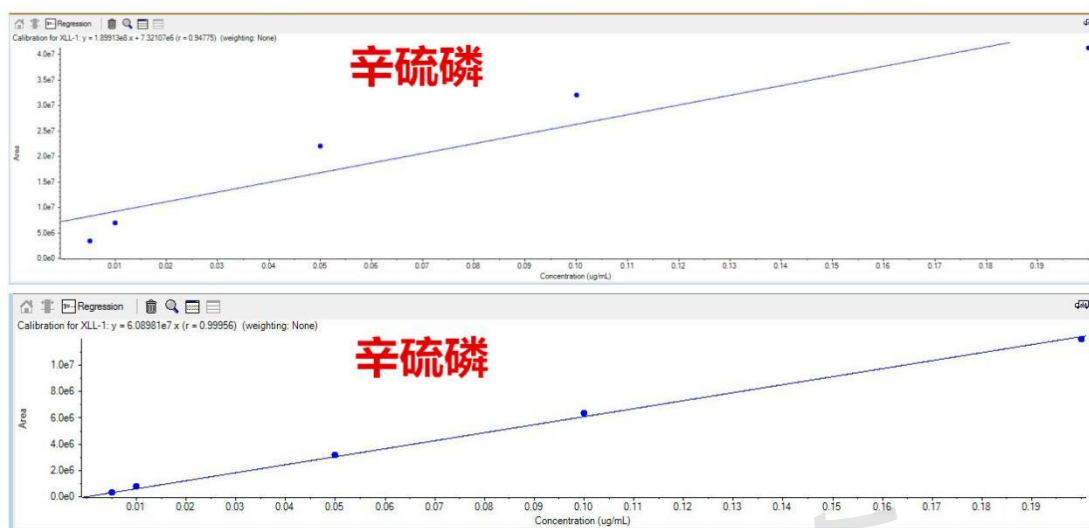


图 6 辛硫磷农药的直线对比

2.2 仪器响应值

农药配制成 2.0ug/mL 的混标，然后按 0.005ug/mL, 0.01ug/mL, 0.05ug/mL, 0.10ug/mL, 0.20ug/mL，查看农药的峰面积达到 7 位数时的浓度，做详细记录。因为当峰面积达到 7 位数的时候，仪器就处于饱和状态，再往上面的浓度点不会成比例增加，这也造成了这条直线做不直。

1) 选择合适的浓度点配制标曲。

根据农药浓度的响应值分组配置标准曲线，仪器的响应度达到 7 位数后，已经饱和，再配更大的浓度，响应度不会成比例增加，这样就造成了标准曲线斜率不好。比如说 0.2ug/mL 的达到了七位数，那么这条直线就只能做到 0.2ug/mL，如果有的农药在 0.01 ug/mL 或者 0.05 ug/mL 的时候已经达到了七位数，那么它的最高浓度点只能做到 0.01 ug/mL 或 0.05 ug/mL，整个直线可以选择更低的浓度来绘制。具体的浓度点与标准曲线见表 2-表 5。

表 2 农药的浓度点与峰面积

化合物	浓度点 ug/mL	峰面积
敌敌畏	0.10	1547657.292
甲基对硫磷	0.20	121470.948
对硫磷	0.20	708592.404
氯氟氰菊酯	0.20	358534.603
氟氯氰菊酯	0.20	353720.684

氰戊菊酯	0.20	230191.620
异菌脲	0.20	453525.497
腐霉利	0.20	455941.264
虫螨腈	0.20	137579.620
杀螟硫磷	0.20	147461.802

表 3 农药的浓度点与峰面积

化合物	浓度点 Ug/mL	峰面积
速灭威	0.05	4223735.276
仲灭威	0.005	1035505.064
异丙威	0.05	2655752.942
二嗪磷	0.05	4312444.440
丙溴磷	0.05	1602324.542
毒死蜱	0.05	723372.840
伏杀磷	0.05	1812691.702
甲基异柳磷	0.01	1838979.206
乐果	0.05	3017434.812
三唑磷	0.01	1753541.133
水胺硫磷	0.05	1729052.699
溴氰菊酯	0.05	349423.829
氟胺氰菊酯	0.05	506694.334
氯氰菊酯	0.05	280313.170
联苯菊酯	0.05	1168856.380
甲氰菊酯	0.05	574362.352
氟氰戊菊酯	0.05	980966.539
三唑酮	0.05	1025991.560
啉霉胺	0.05	1925348.493

噻虫噻	0.05	952889.832
烯酰吗啉	0.05	2504979.375
多菌灵	0.01	1677091.979
3-羟基克百威	0.05	446835.029
甲萘威	0.05	2679651.655
克百威	0.01	1060211.104
灭多威	0.05	1065291.311
涕灭威	0.05	714738.445
涕灭威砒	0.05	531218.961
涕灭威亚砒	0.05	823546.640
甲拌磷亚砒	0.05	1051460.679
甲胺磷	0.05	332761.743
甲拌磷	0.05	861355.063
甲拌磷砒	0.05	1785068.575
马拉硫磷	0.05	456614.839
辛硫磷	0.05	3129555.993
亚胺硫磷	0.05	1560254.915
氧化乐果	0.05	843146.375
乙酰甲胺磷	0.05	774828.353
吡啶醚菌酯	0.05	1393938.989
啶虫脒	0.05	3058428.737
多效唑	0.05	1454041.388
吡虫啉	0.05	501853.823
阿维菌素	0.05	104246.042
氟虫腈	0.05	4026176.575
氟甲腈	0.01	1358847.622
氟虫腈硫磷	0.05	4698198.755
氟虫腈砒	0.01	1434051.286

表 4 高浓度点农药的标准曲线

0. 005ug/mL、0. 01ug/mL、0. 05ug/mL、0. 10ug/mL、0. 20ug/mL

化合物	线性回归方程	相关系数
敌敌畏	$y=1.42 \times 10^7 X + 4.90 \times 10^4$	0.9992
甲基对硫磷	$y=5.79 \times 10^5 X + 6.55 \times 10^3$	0.9993
对硫磷	$y=3.47 \times 10^6 X + 1.94 \times 10^4$	0.9997
氯氟氰菊酯	$y=1.74 \times 10^6 X + 6.65 \times 10^3$	0.9994
氟氯氰菊酯	$y=1.76 \times 10^7 X + 3.79 \times 10^2$	0.9998
氰戊菊酯	$y=1.13 \times 10^6 X + 5.42 \times 10^3$	0.9993
异菌脲	$y=2.12 \times 10^6 X + 3.25 \times 10^4$	0.9991
腐霉利	$y=2.24 \times 10^6 X + 1.13 \times 10^5$	0.9995
虫螨腈	$y=6.79 \times 10^5 X + 1.22 \times 10^3$	0.9997
杀螟硫磷	$y=7.32 \times 10^5 X + 8.00 \times 10^2$	0.99991

表 5 低浓度点农药的标准曲线

0. 0001ug/mL、0. 0005g/mL、0. 001ug/mL、0. 01ug/mL、0. 05ug/mL

化合物	线性回归方程	相关系数
速灭威	$y=8.42 \times 10^4 X + 1.99 \times 10^4$	0.99992
仲灭威	$y=1.80 \times 10^5 X + 5.62 \times 10^4$	0.99993
异丙威	$y=5.28 \times 10^4 X + 2.45 \times 10^4$	0.9997
二嗪磷	$y=8.58 \times 10^4 X + 3.19 \times 10^4$	0.9998
丙溴磷	$y=3.19 \times 10^4 X + 1.26 \times 10^4$	0.9996
毒死蜱	$y=1.40 \times 10^4 X + 2.18 \times 10^4$	0.9997
伏杀磷	$y=3.62 \times 10^4 X + 6.23 \times 10^3$	0.99992
甲基异柳磷	$y=1.66 \times 10^5 X + 5.34 \times 10^4$	0.9998
乐果	$y=6.00 \times 10^4 X + 2.57 \times 10^4$	0.9998
三唑磷	$y=1.71 \times 10^5 X + 2.79 \times 10^4$	0.99999
水胺硫磷	$y=3.44 \times 10^4 X + 8.04 \times 10^3$	0.99998

溴氰菊酯	$y=6.99 \times 10^3 X + 1.69 \times 10^3$	0.9991
氟胺氰菊酯	$y=1.02 \times 10^4 X + 1.79 \times 10^3$	0.9991
氯氰菊酯	$y=5.61 \times 10^3 X - 1.65 \times 10^3$	0.9994
联苯菊酯	$y=2.33 \times 10^4 X - 3.29 \times 10^3$	0.9998
甲氰菊酯	$y=1.14 \times 10^4 X + 4.59 \times 10^3$	0.9994
氟氰戊菊酯	$y=3.41 \times 10^3 X + 2.84 \times 10^3$	0.9991
三唑酮	$y=2.03 \times 10^4 X + 1.10 \times 10^4$	0.9995
嘧霉胺	$y=3.83 \times 10^4 X + 2.07 \times 10^4$	0.9996
噻虫噻	$y=1.90 \times 10^4 X - 1.61 \times 10^4$	0.9996
烯酰吗啉	$y=5.00 \times 10^4 X + 1.11 \times 10^4$	0.9998
多菌灵	$y=1.46 \times 10^5 X + 9.87 \times 10^4$	0.9996
3-羟基克百威	$y=8.93 \times 10^3 X + 4.43 \times 10^2$	0.9997
甲萘威	$y=5.36 \times 10^4 X - 3.36 \times 10^3$	0.99997
克百威	$y=9.96 \times 10^4 X + 2.31 \times 10^4$	0.99994
灭多威	$y=2.13 \times 10^4 X + 2.39 \times 10^3$	0.9998
涕灭威	$y=1.23 \times 10^4 X - 4.55 \times 10^3$	0.9993
涕灭威砒	$y=1.06 \times 10^4 X + 3.49 \times 10^3$	0.9994
涕灭威亚砒	$y=1.65 \times 10^4 X - 9.73 \times 10^2$	0.9996
甲拌磷亚砒	$y=2.10 \times 10^4 X + 2.84 \times 10^3$	0.9996
甲胺磷	$y=6.63 \times 10^3 X + 1.92 \times 10^3$	0.9992
甲拌磷	$y=1.72 \times 10^4 X - 1.65 \times 10^3$	0.9996
甲拌磷砒	$y=3.56 \times 10^4 X + 6.63 \times 10^3$	0.99994
马拉硫磷	$y=8.57 \times 10^3 X + 2.90 \times 10^4$	0.9992
辛硫磷	$y=6.24 \times 10^4 X + 5.00 \times 10^3$	0.99996
亚胺硫磷	$y=1.65 \times 10^5 X + 1.53 \times 10^4$	0.9994
氧化乐果	$y=1.68 \times 10^4 X + 5.15 \times 10^3$	0.9997
乙酰甲胺磷	$y=1.55 \times 10^4 X - 5.61 \times 10^2$	0.9998
吡啶醚菌酯	$y=2.76 \times 10^4 X + 9.97 \times 10^3$	0.9995
啶虫脒	$y=6.12 \times 10^4 X - 1.67 \times 10^3$	1.0000

多效唑	$y=2.90 \times 10^4 X + 2.10 \times 10^3$	0.99994
吡虫啉	$y=1.00 \times 10^4 X - 8.31 \times 10^2$	0.9997
阿维菌素	$y=1.21 \times 10^4 X - 6.53 \times 10^3$	0.9997
氟虫腈	$y=8.03 \times 10^4 X + 1.52 \times 10^4$	0.99995
氟甲腈	$y=1.47 \times 10^5 X - 3.16 \times 10^4$	0.9998
氟虫腈硫磷	$y=9.39 \times 10^4 X + 2.70 \times 10^3$	1.0000
氟虫腈砒	$y=1.38 \times 10^5 X + 1.39 \times 10^4$	0.99997



图 7 高浓度点农药标准曲线

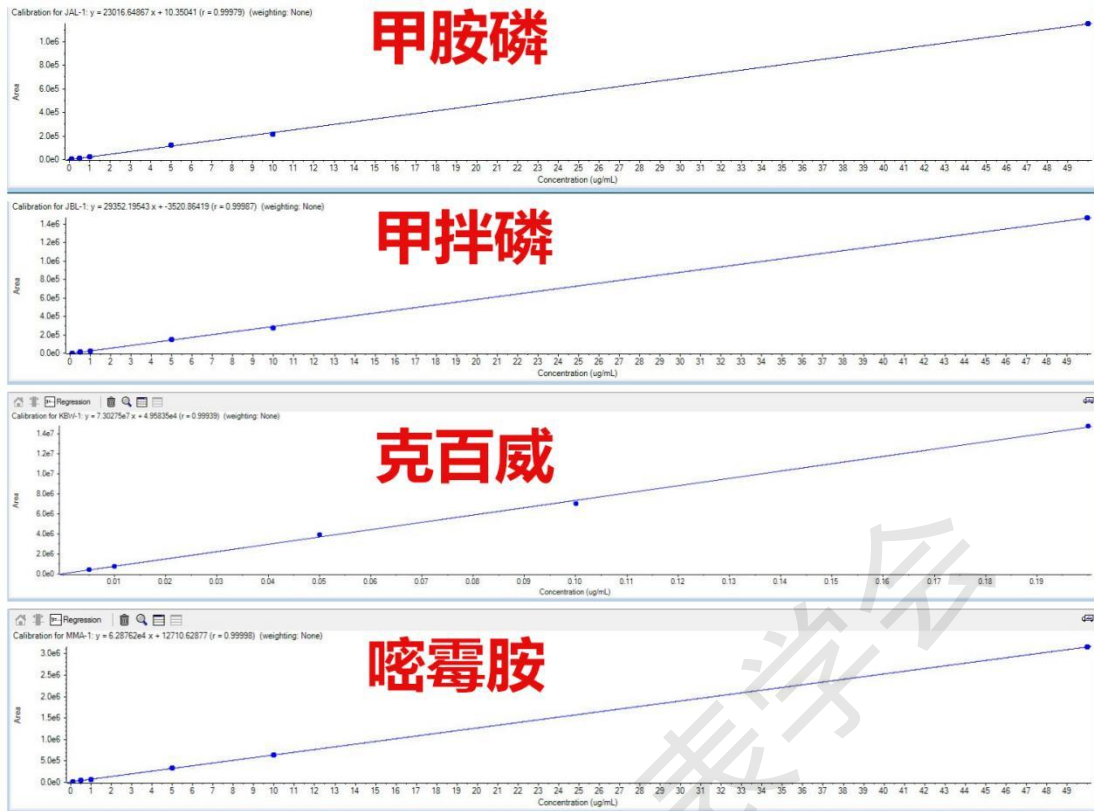


图 8 低浓度点农药标准曲线

2) 基质效应

基质效应在农残中一直存在，在液质联用仪上表现的是基质抑制效应，各农药的基质效应也不相同。比如甲拌磷 0.05ug/mL 用甲醇配制和用 1: 1 甲醇水配制，用笋瓜基质来配制，响应值比例大概为 1:0.79:0.75。而啞霉胺这三者的比例为 1:0.78:0.66。

Sample Name	Area	Calculated Concentration
6P-50 啞	6747283.546	107.1085
6PX-50 霉	5241441.095	83.1592
6PLeek-50 胺	4267846.643	67.6748
6P-50 甲	2713091.825	92.5523
6PX-50 拌	2136820.533	72.9193
6PLeek-50 磷	2026640.301	69.1656

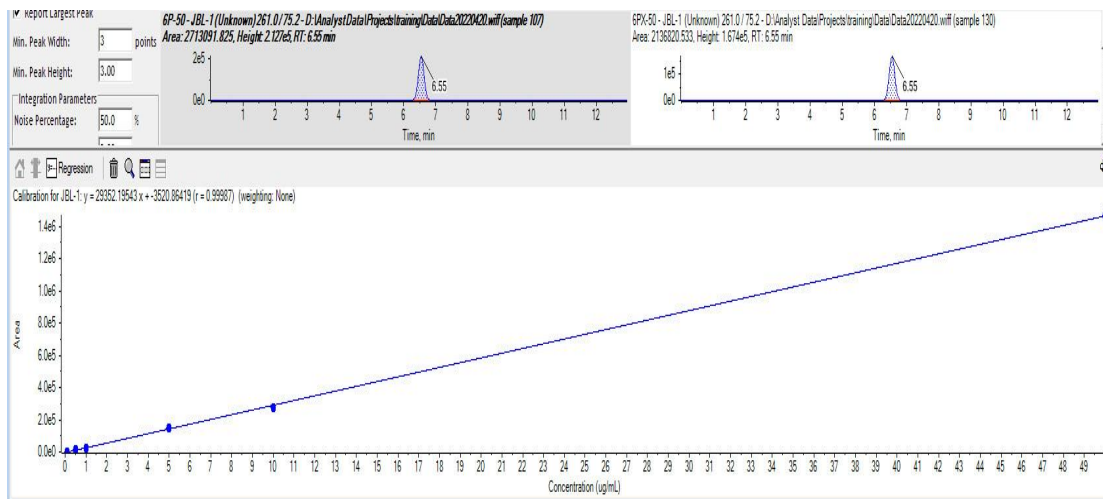


图9 不同溶剂配制的峰面积

为了数据准确可以用基质配标准曲线，每种蔬菜的干净基质都要收集，工作量很大。如
 果要做 200 个样品，各种蔬菜水果食用菌的品种比较多，那么用哪一种基质来配制标线呢？
 这都是一个很难的问题，在做大批量检测的时候，还是建议用甲醇配制标准曲线，如果有检
 出数据，再使用同品种的干净基质配标准曲线得出准确的数据。

3) 样品检测

当做大批量样品的时候，可以分别用上面两组直线去计算样品含量，如果用高浓度的那
 条直线，可能样品的含量不会超过直线的浓度点，但是如果用低浓度的那条直线来计算样品
 的含量，大多数都会超过最高的浓度点 0.05µg/mL，如何解决这个问题呢？

先将所有的样品用两条直线计算出来含量，如果发现样品含量已经超过最高的浓度点，
 可以采取两个办法，一是对样品进行稀释，不能超过直线的最高点；二是根据样品的含量，
 用相同的样品基质配相近的浓度点进行单点校正，得出准确的数据。

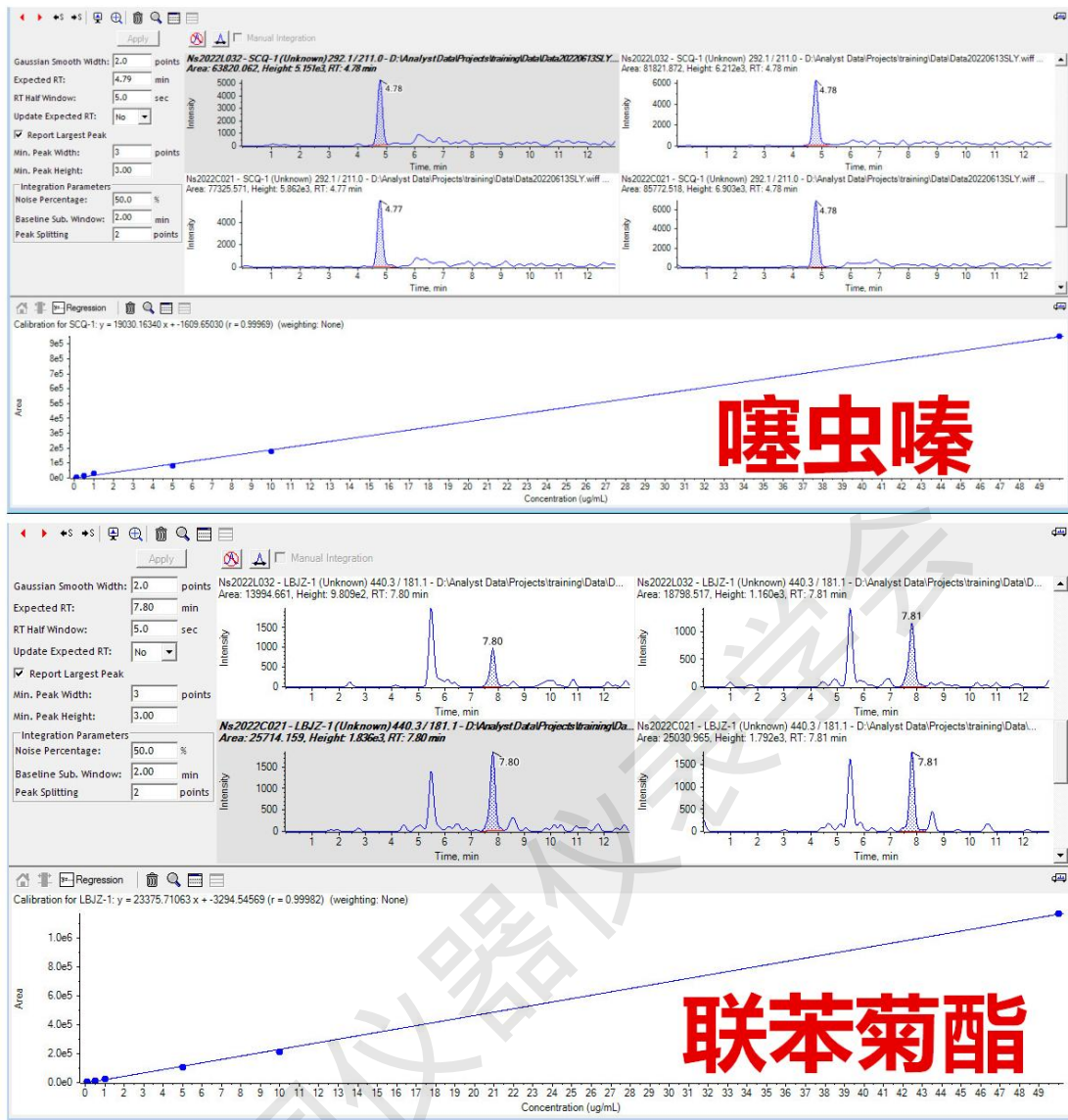


图 10 样品的色谱图

3 结论

按照标准方法来配制标准曲线的时候，如果发现直线的相关系数 R 做不到 0.99 以上，要找到相应的解决办法。

3.1 不同厂家的液质联用仪在农药的响应值上略有差异，要在使用的仪器上找到响应值最高的离子对和合适的碰撞电压和去簇电压值。

3.2 当仪器的响应值饱和以后，会导致直线做不直，这时候要根据仪器响应值选择相应的浓度点配制，标曲的最高点不得超过仪器的响应值。

3.3 样品检测的时候也要对样品进行稀释，使样品含量落在标准曲线的范围之内。

3.4 样品在液质联用仪上呈现的是液质抑制效应，如果用基质配标准曲线，要根据响应值来确定浓度点是高浓度，还是低浓度，可能会与用溶剂标的浓度点不相同。

3.5 在应对标准曲线的相关系数达不到要求的时候，一定要灵活掌握，找到合适的办法，做出准确的数据。

参考文献：

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会 中华人民共和国农业农村部 国家市场监督管理总局.食品安全国家标准植物源性食品中 331 种农药及其代谢物残留量的测定液相色谱-质谱联用法:GB23200.121-2021[S].北京:中国标准出版社, 2021:9.
- [2] 董静, 潘玉香, 朱莉萍, 等. 果蔬中 54 种农药残留的 QuEChERS/GC—MS 快速分析[J]. 分析测试学报,2008,27(1):66-69.
- [3] 曹赵云, 牟仁祥, 应兴华, 等. 液相色谱-串联质谱法测定蔬菜、水果中 80 种农药残留 [J].分析测试学报,2010,29(10):1030-1035.
- [4] 林涛, 汪禄祥, 杨东顺, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定蔬菜水果中的 40 种农药残留[J]. 分析实验室, 2014, 33(10):6.
- [5] 石焱芳, 王征, 吴丽荣, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定蔬菜中 30 种农药残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2020(3):11.