

# Анализ остаточного количества пестицидов в рисе с применением наборов Bond Elut производства Agilent для реализации метода QuEChERS, утвержденного Американской ассоциацией официальных химиков-аналитиков (АОАС): детектирование методом жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС)

## Методическая информация

безопасность пищевых продуктов

### Автор

Andy Zhai  
Agilent technologies Co., Ltd.  
412 Yinglun Road  
Shanghai, 200131 (Шанхай)  
Китай

### Аннотация

В этой методической информации описывается применение быстрого, простого, малозатратного, эффективного, надежного и безопасного метода пробоподготовки QuEChERS, утвержденного Американской ассоциацией официальных химиков-аналитиков (АОАС), для экстракции и очистки образцов риса со следовыми количествами 12 пестицидов, представляющих различные классы пестицидов, которые обычно встречаются в рисе. Исходный метод, признанный ассоциацией АОАС, сводится к первичной экстракции в системе «вода–ацетонитрил», обладающей буферными свойствами; к распределительной экстракции при добавлении соли и очистке с помощью дисперсной твердофазной экстракции (дисперсионная ТФЭ). Следовые количества пестицидов в экстрактах риса определяются жидкостным хроматографом, соединенный с тандемным масс-спектрометром с ионизацией в электроспрее (ВЭЖХ-ESI-МС/МС) в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). Метод аттестован по степени извлечения и воспроизводимости для всех интересующих аналитов. Предел количественного анализа (5 нг/г) пестицидов в рисе, показанный в данной методике, был существенно ниже предельно допустимых концентраций (ПДК). Степень извлечения исследовали, пользуясь добавками с концентрациями 10, 50 и 250 нг/г. Средние степени извлечения попадали в диапазон от 76% до 108% (средняя величина 97,8%); погрешность определения (относительное стандартное отклонение [ОСО]) была менее 10% (средняя величина 4,7%).



Agilent Technologies

## Введение

Метод QuEChERS, признанный ассоциацией AOAC, широко используется для анализа содержания пестицидов в пищевых продуктах [1-2]. Метод сводится к экстракции ацетонитрилом и последующему удалению воды с помощью безводного сульфата магния ( $MgSO_4$ ) и буферизации ацетатными солями. Очистка производится методом дисперсионной твердофазной экстракции (ТФЭ) с применением сорбента с первично-вторичным амином (PSA), для удаления органических кислот из образца. Добавление безводного  $MgSO_4$  снижает остаточное количество воды в экстракте. В связи с различиями свойств матриц пищевых продуктов на этом этапе могут быть добавлены вспомогательные реактивы (такие как графитированная сажа [GCB] для удаления пигментов и стирола или C18 для удаления липидов и парафинов).

Для решения обсуждаемой здесь методики были выбраны те одобренные AOAC наборы реактивов для дисперсионной ТФЭ, которые применяются с продуктами, содержащими жиры и парафины. В состав таких наборов, предназначенных для обработки 1 мл объема пробы, входят 50 мг ПВА, 150 мг  $MgSO_4$  и 50 мг C18, разведенные в 1 мл ацетонитрильных экстрактов. В данном исследовании оценка эффективности набора для экстрагирования Agilent Bond Elut AOAC с буферными солями (каталожный № 5982-5755) и набора для дисперсионной ТФЭ Bond Elut QuEChERS AOAC для обработки фруктов и овощей с жирами и восками (каталожный № 5982-5158) производилась по 12 пестицидам. Метод был аттестован по степени извлечения и воспроизводимости. В Таблице 1 приведены данные о химических структурах и нормативных требованиях по концентрациям изучаемых пестицидов в рисе.

## Экспериментальная часть

### Реагенты и растворители

Все использованные реагенты и растворители были аналитической чистоты или предназначены для жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ). Метанол (MeOH) и ацетонитрил (ACN) — производства фирмы Honeywell (Маскигон, Мичиган, США). Муравьиная кислота (FA) была приобретена у фирмы Fluka (Слайнхайм, Германия). Стандарты пестицидов приобретались у фирмы Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США). Внутренний стандарт (трифенилфосфат, ТФФ) был получен от фирмы Agilent Technologies Inc. (Уилмингтон, Делавэр, США).

### Растворы эталонного вещества

Базовые растворы эталонного вещества и внутреннего стандарта (с концентрацией 2,0 мг/мл для всех пестицидов, кроме карбендазима [для которого концентрация была равной 0,5 мг/мл]) были получены разбавлением в метаноле, ацетонитриле с добавкой 0,1% муравьиной кислоты или в диметилсульфоксиде (соответственно). Все эти растворы хранились при температуре  $-20$  °С. Три раствора добавок для контроля и обеспечения качества (с концентрацией 0,2, 1 и 10 мкг/мл) получали ежедневным растворением в смеси ацетонитрила с водой (1:1) с добавкой 0,1% муравьиной кислоты. Раствор внутреннего стандарта с концентрацией ТФФ 10 мкг/мл получали растворением в смеси ацетонитрила с водой (1:1) с добавкой 0,1% муравьиной кислоты.

## Оборудование и материалы

Высокоэффективный жидкостной хроматограф Agilent 1200 (Agilent Technologies Inc., Санта-Клара, Калифорния, США)

Трехквартупольная система ВЭЖХ-МС Agilent 6460 с ионизацией в электроспрее (Agilent Technologies Inc., Санта-Клара, Калифорния, США)

Наборы для экстрагирования Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC с буферными солями (каталожный № 5982-5755) и наборы для дисперсионной ТФЭ Bond Elut QuEChERS AOAC для обработки фруктов и овощей с жирами и восками (каталожный № 5982-5158) (Agilent Technologies Inc., Делавэр, США)

Керамические гомогенизаторы Agilent для пробирок объемом 50 мл (каталожный № 5982-9313) (Agilent Technologies Inc., Делавэр, США)

Микроцентрифуга Eppendorf (Brinkmann Instruments, Вестбери, Нью-Йорк, США)

Центрифуга Flying Pigeon (Anting Science Instrument, Шанхай, Китай)

### Условия ВЭЖХ

Колонка	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,1 Ч 100 мм, 2,7 мкм (каталожный номер 695775-902)	
Скорость потока	0,4 мл/мин	
Температура колонки	30 °С	
Объем ввода	5 мкл	
Подвижная фаза	А: 0,1% муравьиной кислоты в воде В: 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле	
Градиент	Время (мин)	%В
	0	5
	1	5
	3	50
	7	90
	8	90
	8,2	5
	9	5
Продолжительность периода после завершения анализа	2 мин	
Время анализа	11 мин	
Условия МС		
Регистрация положительных ионов		
Температура газа	350 °С	
Поток газа	10 л/мин	
Давление в распылителе	40 фунтов на кв. дюйм	
Напряжение на капилляре	3500 В	

Прочие условия, соответствующие обнаружению определяемых веществ, приведены в табл. 2.

Таблица 1. Химические структуры и нормативные требования по концентрациям изучаемых пестицидов [3-5]

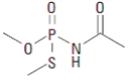
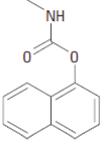
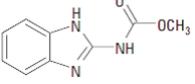
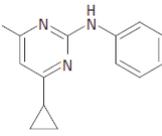
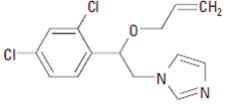
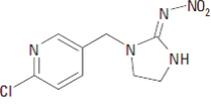
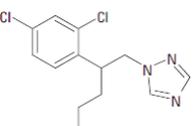
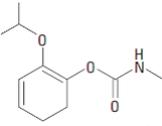
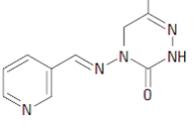
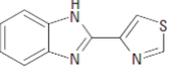
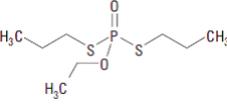
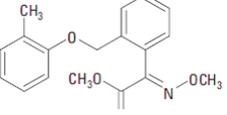
Название	Класс	Log P	pKa	ПДК (нг/г)	Структура
Ацефат	Фосфатное органическое соединение	-0,89	8,35	20	
Карбарил	Карбамат	2,36	10,4	50	
Карбендазим	Бензимидазол	1,48	4,2	100	
Ципродинил	Анилопириимидин 4	4,44	500		
Имазалил	Имидазол	3,82	6,53	20	
Имидаклоприд	Неоникотиноид	0,57	Н/П	1000	
Пенконазол	Триазол	3,72	1,51	50	
Пропоксур	Карбамат	0,14	Н/П	2000	
Пиметрозин	Пиридин	-0,19	4,06	600	
Тиабендазол	Бензимидазол	2,39	4,73 12,00	50	
Этопрофос	Фосфатное органическое соединение	2,99	Н/П	5	
Метилкрезоксим	Стробилурин	3,4	Н/П	50	

Таблица 2. Собранные прибором данные, использованные для анализа 12 пестицидов с помощью ВЭЖХ-МС/МС

Аналит	Канал	MRM (масса/заряд)	Фрагментор (В)	Энергия столкновений (В)	Время удерживания (мин)
Пиметрозин	1)	218,1>105	130	20	1,44
	2)	218,1>78,1		50	
Ацефат	1)	184,0>143	65	3	1,59
	2)	184,0>95		20	
Карбендазим	1)	192,1>160,1	110	15	3,19
	2)	192,1>132,1		30	
Тиабендазол	1)	202,0>175,1	160	25	3,32
	2)	202,0>131,1		35	
Имидаклоприд	1)	256,1>209	140	10	4,01
	2)	256,1>175		15	
Имазалил	1)	297,1>158,9	150	20	4,43
	2)	297,1>200,9		15	
Пропоксур	1)	210,2>111	70	10	4,81
	2)	210,2>93		25	
Карбарил	1)	202,0>145	70	15	4,99
	2)	202,0>127		40	
Ципродинил	1)	226,1>93	150	37	5,55
	2)	226,1>77		52	
Этопрофос	1)	243,1>130,9	115	15	6,00
	2)	243,1>96,9		35	
Пенконазол	1)	284,0>70	125	10	6,22
	2)	284,0>158,9		30	
Метилкрезоксим	1)	314,1>222	70	3	6,66
	2)	314,1>116		5	
ТФФ (внутренний стандарт)	1)	327,1>77	170	40	6,85
	2)	327,1>152		45	

1) Канал переходов, используемый для количественного анализа

2) Канал переходов, используемый для качественного анализа

## Пробоподготовка

### Измельчение пробы

Образец риса, выращенный на органических удобрениях и не содержащий пестицидов, был куплен на местном рынке. Рис засыпали в чистый пластиковый пакет и заморозили до температуры  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (ночью выдержали в холодильнике). Пакет время от времени разминали, чтобы рис оставался рассыпчатым. На следующий день нужное количество замороженного риса вынули и тщательно перемешали. В процессе измельчения добавляли сухой лед. Пробы были тщательно измельчены до получения однородной массы. Было проверено, что в окончательной пробе не осталось крупных частиц риса.

### Экстракция/распределение

В центрифужную пробирку объемом 50 мл засыпали 5 г ( $\pm 0,1$  г) однородной пробы. В пробы, использовавшиеся для контроля качества, вносили добавку 100 мкл соответствующего раствора стандартов анализируемого вещества. 50 мкл раствора внутреннего стандарта (10 мг/мл ТФФ) добавляли ко всем образцам (кроме холостой пробы) до достижения концентрации 100 нг/г. Пробирки закрывали крышками и встряхивали в течение 1 минуты. Затем в каждую пробирку дозатором добавляли 10 мл воды. После этого пробирки закрывали крышками и встряхивали в течение 1 минуты. В каждую из пробирок вкладывали два керамических гомогенизатора под пробирки объемом 50 мл (каталожный № 5982-9313). Затем дозатором вносили в каждую пробирку аликвоту 15 мл ацетонитрила (с добавкой 0,1% АА). Пробирки закрывали крышками и встряхивали рукой в течение 1 минуты. Затем в каждую пробирку добавляли смесь для экстракции Agilent Bond Elut QuEChERS, содержащую 6 г безводного  $\text{MgSO}_4$ , 1,5 г ацетата натрия. Затем пробирки плотно запечатывали крышками и интенсивно встряхивали рукой в течение 20 секунд, чтобы растворитель хорошо распределился по пробе пробы, и были успешно разрушены агломераты кристаллов. После этого пробирки центрифугировали при скорости 4 000 об/мин в течение 5 минут.

### Очистка способом дисперсионной ТФЭ

Аликвоту 8 мл ацетонитрильного супернатанта переносили в пробирку объемом 15 мл для ТФЭ Agilent Bond Elut QuEChERS АОАС (каталожный № 5982-5158). В пробирке объемом 15 мл содержались 400 мг ПВА, 1 200 мг безводного  $\text{MgSO}_4$  и 400 мг С18. Пробирки плотно закрывали крышками и встряхивали с помощью механического устройства в течение 1 минуты. Затем пробирки центрифугировали с использованием стандартной центрифуги со скоростью 4000 об/мин в течение 5 минут. 1 мл экстракта переносили в пробирку объемом 10 мл, после чего содержимое высушивали потоком азота при температуре ниже  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Получаемый осадок растворяли и доводили до постоянного объема 1 мл смесью ацетонитрила с водой (1:9). После этого осадок пропускали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (каталожный № 5185-5836) и анализировали с помощью системы ВЭЖХ-МС/МС.

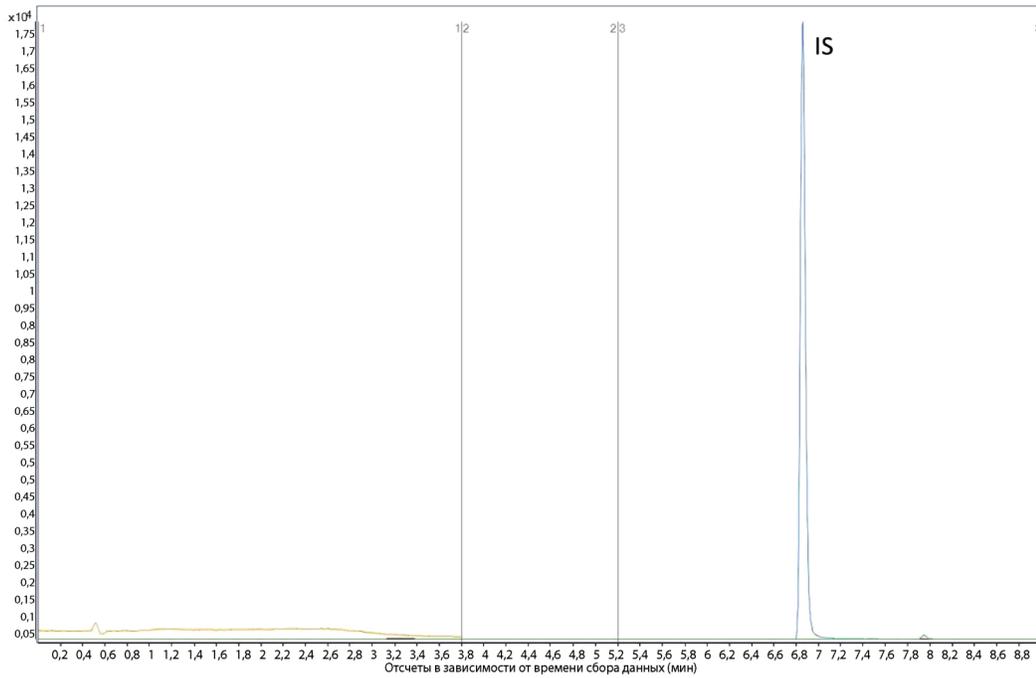


Рис. 1. Хроматограмма, полученная при разделении холостой матрицы риса, не содержащего пестицидов. Использовался режим мониторинга множественных реакций (MRM)

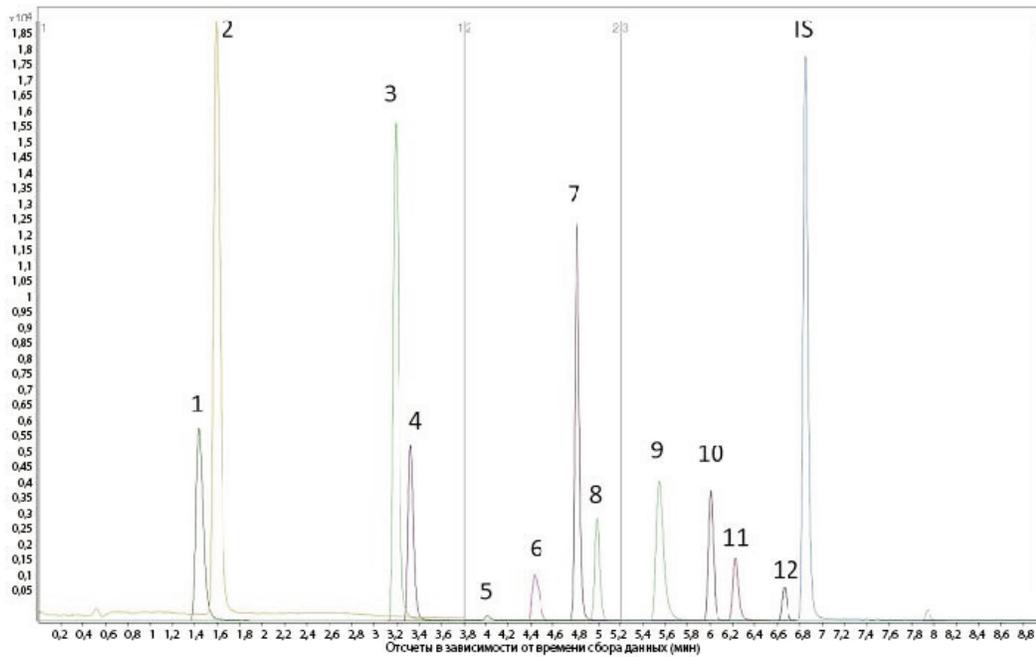


Рис. 2. Хроматограмма, полученная при разделении экстракта с добавкой пестицидов в концентрации 10 нг/г. Обогащенная проба была очищена согласно методике, утвержденной ассоциацией AOAC. Использовался режим мониторинга множественных реакций (MRM). Идентификация пиков: 1. пиметрозин, 2. ацефат, 3. карбеназим, 4. тиабендазол, 5. имидаклоприд, 6. имазалил, 7. пропоксур, 8. карбарил, 9. ципродинил, 10. эпопрофос, 11. пенконазол, 12. метилкрезоксим, IS: ТФФ.

## Результаты и обсуждение

Согласно рекомендациям в исследовании использовался одобренный ассоциацией АОАС набор для дисперсионной ТФЭ для очистки образцов экстрактов из риса от жиров и восков. При высокой селективности ВЭЖХ-МС/МС на хроматограмме холостой матрицы в режиме MRM не обнаруживалось никаких посторонних пиков, кроме пиков целевых веществ. На рис. 1 и 2 показаны хроматограммы ВЭЖХ-МС/МС, полученные при разделении холостой пробы (пробы внутреннего стандарта) и экстракта из риса с искусственной добавкой стандартов пестицидов в концентрации 10 нг/г с помощью одобренного АОАС метода дисперсионной ТФЭ.

Таблица 3. Линейность содержания пестицидов в рисовом экстракте

Название	Регрессионное уравнение	R <sup>2</sup>
Пиметрозин	$Y = 1,0525x + 0,3331$	0,997
Ацефат	$Y = 1,2109x + 0,0897$	0,998
Карбендазим	$Y = 1,9011x + 0,2080$	0,998
Тиabendазол	$Y = 0,8764x + 0,1622$	0,999
Имидаклоприд	$Y = 0,0778x + 0,0135$	0,991
Имазалил	$Y = 0,3765x + 0,0552$	0,997
Пропоксур	$Y = 1,8122x + 0,6237$	0,993
Карбарил	$Y = 0,5832x + 0,0042$	0,999
Ципродинил	$Y = 1,0002x + 0,3903$	0,998
Этопрофос	$Y = 0,4793x + 0,0783$	0,992
Пенконазол	$Y = 1,3872x + 0,0117$	0,996
Метилкрезоксим	$Y = 0,3921x + 0,0058$	0,996

### Линейность и предел количественного обнаружения LOQ

Для всех пестицидов линейный калибровочный график охватывал диапазон от 5 до 500 нг/г. Необходимые точки калибровочных кривых получали внесением пестицидов (5, 10, 50, 250 и 500 нг/г) в соответствующие холостые пробы. В качестве внутреннего стандарта использовался трифенилфосфат (ТФФ) в концентрации 50 нг/г. Калибровочные кривые отображают зависимость относительного отклика на определяемые вещества (результата деления площади пика аналита на площадь пика внутреннего стандарта) от концентрации этих веществ (итога деления концентрации каждого из аналитов на концентрацию внутреннего стандарта). Минимальные пределы количественного анализа (5 нг/г или 5 миллиардных долей), установленные для всех пестицидов, оказываются существенно ниже предельно допустимых концентраций этих пестицидов во фруктах и овощах. Уравнение линейной регрессии и коэффициент корреляции (R<sup>2</sup>) приведены в табл. 3.

Таблица 4. Степени извлечения и воспроизводимость для анализа пестицидов в рисовой муке с искусственными добавками согласно методу QuEChERS

Аналит	10 нг/г образцы для КК		50 нг/г образцы для КК		250 нг/г образцы для КК	
	Извлечение	ОСО*	Извлечение	ОСО*	Извлечение	ОСО*
Пиметрозин	80,3%	4,5%	76,3%	3,8%	90,1%	4,2%
Ацефат	85,0%	2,3%	92,8%	3,2%	96,3%	1,9%
Карбендазим	102,3%	8,3%	99,0%	2,0%	108,2%	5,8%
Тиabendазол	94,6%	5,4%	89,4%	4,7%	83,9%	6,1%
Имидаклоприд	100,5%	10,2%	105,4%	2,8%	91,7%	8,2%
Имазалил	99,2%	4,4%	92,6%	5,5%	93,8%	5,3%
Пропоксур	96,7%	3,7%	103,6%	1,1%	108,2%	2,7%
Карбарил	88,0%	5,6%	100,7%	3,0%	108,1%	3,9%
Ципродинил	90,3%	1,9%	92,5%	8,9%	92,4%	5,1%
Этопрофос	104,1%	3,4%	105,8%	4,8%	110,5%	6,1%
Пенконазол	103,9%	2,2%	93,9%	6,9%	90,5%	3,0%
Метилкрезоксим	100,6%	2,7%	107,5%	10,3%	94,7%	2,5%

\*ОСО (n = 6)

### Степень извлечения и воспроизводимость

Степень извлечения и воспроизводимость оценивались с помощью добавки стандартов пестицидов в перемолотую пробу (с концентрациями 10, 50 и 250 нг/г). Количественное определение в этих стандартах качества проводили по калибровочной кривой. Для каждого уровня концентраций проводили 6 параллельных анализов. Данные о степени извлечения и воспроизводимости, оцениваемой по проценту относительного стандартного отклонения (ОСО), приведены в табл. 4 и на рис. 3. Результаты показывают, что для всех 12 пестицидов отмечены исключительно высокие степени извлечения и воспроизводимости.

## Выводы

Предлагаемые фирмой Agilent наборы для экстрагирования Bond Elut для реализации метода QuEChERS, утвержденного ассоциацией АОАС, и наборы для дисперсионной ТФЭ для работы с овощами и фруктами с жирами и восками, представляют простой, быстрый и эффективный способ очистки ряда типичных пестицидов, анализируемых в рисе. Данные о степени извлечения и воспроизводимости, полученные при использовании метода добавок, показывают пригодность такого способа для анализа пестицидов, относящихся ко многим классам химических соединений, и для исследования содержания остаточного количества целого ряда пестицидов в рисе. Влияние примесей и компонентов матрицы не мешает количественному анализу целевых соединений. Пределы количественного анализа пестицидов были ниже нормативных предельно допустимых концентраций в рисе. Поскольку обсуждаемые пестициды принадлежат к разным классам химических соединений и обладают разными свойствами, можно сделать вывод, что предлагаемые фирмой Agilent наборы реактивов с сорбентом Bond Elut для реализации метода QuEChERS, признанного ассоциацией АОАС, и наборы для дисперсионной ТФЭ могут быть эффективно использованы для анализа других пестицидов в аналогичных пищевых продуктах.

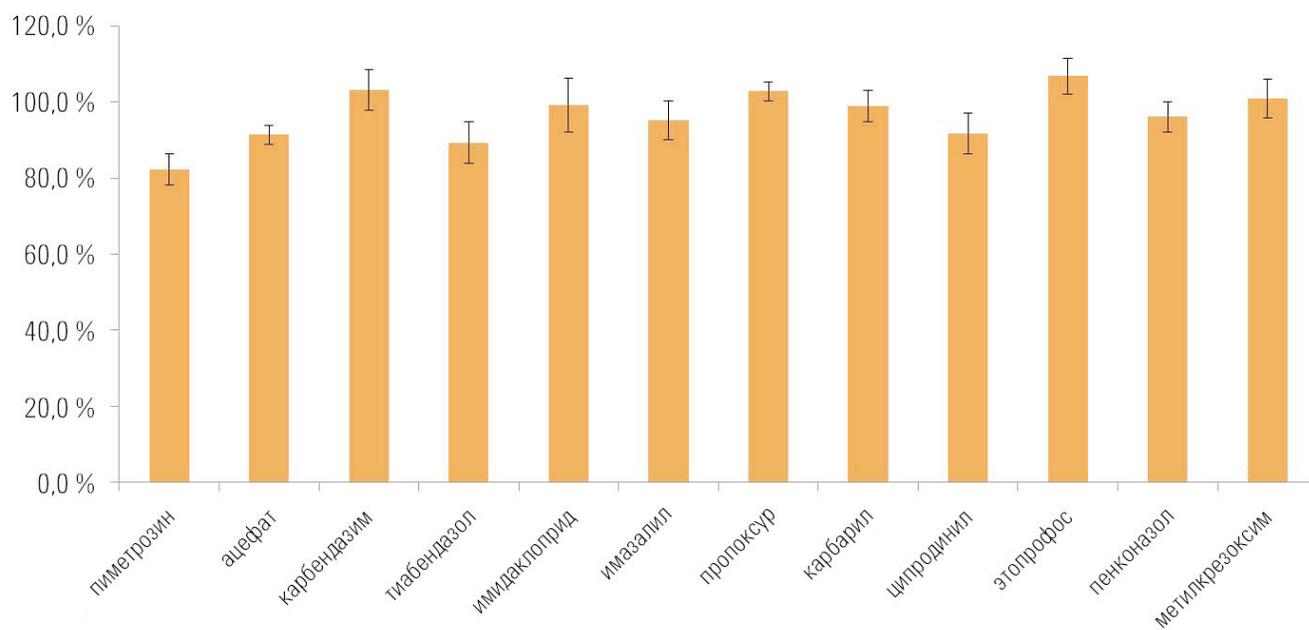


Рис. 3. Результаты оценки степени извлечения и воспроизводимости обнаружения следовых количеств 12 пестицидов в рисе

## Литература

1. M. Anastassiades, S. J. Lehotay, Fast and Easy Multiresidue Method Employment Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce, J. AOAC Int., 2003, 86, 412-431.
2. S. J. Lehotay, et al, "Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables," J. AOAC Int., 2005, 88, 615-629.
3. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/index.htm>
4. <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/search.html>
5. <http://www.mrlatabase.com/?selectvetdrug=0>

## Дополнительная информация

Представленные данные являются стандартными значениями. Для получения дополнительной информации о наших продуктах и услугах посетите наш веб-сайт по адресу: [www.agilent.com](http://www.agilent.com).

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

Компания Agilent не несет ответственности за возможные ошибки в настоящем документе, а также за убытки, связанные или являющиеся следствием получения настоящего документа, ознакомления с ним и его использования.

Информация, описания и спецификации в настоящем документе могут быть изменены без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2011  
Напечатано в США  
11 мая 2011 г.  
5990-8034RU



**Agilent Technologies**