

Многокомпонентный анализ остаточных количеств пестицидов в авокадо с помощью технологии Agilent Bond Elut EMR—Lipid для ЖХ-МС-МС

Рекомендации по применению

Анализ продуктов питания и сельское хозяйство

Авторы

Лимиан Жао (Limian Zhao) и Дерик (Derick Lucas)
Agilent Technologies, Inc.

Аннотация

Технология улучшенной очистки матрицы Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR—Lipid) компании Agilent является новым поколением материалов для пробоподготовки и используется во время удобной дисперсионной твердофазной экстракции (дТФЭ) для высокоселективной очистки матрицы, которая не влияет на степень извлечения аналита, особенно в пробах с высоким содержанием жиров. В данном испытании демонстрируется применение этой новой продукции для ЖХ-МС-МС анализа содержания в авокадо 44 пестицидов различных классов. В процедуре используется экстракция методом QuEChERS Американской Ассоциации Аналитических Сообществ (AOAC) с последующим применением дТФЭ EMR—Lipid и высаливания EMR—Lipid, что позволяет быстро и эффективно очистить пробы. Степень очистки матрицы оценивалась с помощью определения количества нелетучих коэкстрактивных веществ в экстракте авокадо после применения различных методик дТФЭ, а также с помощью оценки влияния матрицы на хроматографические характеристики целевого вещества. В сравнении с другими продуктами для очистки матрицы дТФЭ EMR—Lipid обеспечивает лучшую эффективность без воздействия на степень извлечения определяемого вещества. Данный оптимизированный метод позволяет добиться высокой точности ЖХ-МС-МС анализа при определении всех 44 пестицидов, поддающихся методу ВЭЖХ. Метод дТФЭ EMR—Lipid полностью соответствует протоколу QuEChERS, обеспечивая быструю, надежную и эффективную пробоподготовку для анализа остатков пестицидов в образцах авокадо с высоким содержанием жиров.



Agilent Technologies

Введение

Во многих лабораториях анализ остатков пестицидов в пищевых продуктах обычно проводится с использованием метода QuEChERS (аббревиатура переводится как «Быстро, просто, бюджетно, эффективно, надежно и безопасно») [1,2]. Это позволяет провести анализ содержания сотен пестицидов в малых концентрациях за одну экстракцию. Хотя этот метод применим для анализа различных фруктов и овощей, такие пищевые продукты с высоким содержанием жиров, как авокадо, орехи и продукты животного происхождения представляют сложности [3,4]. Преодоление этих сложностей является основной задачей лабораторий, стремящихся соответствовать строгим критериям валидации, выставляемых государственными органами для контроля безопасности пищевых продуктов.

В ходе анализа может использоваться комбинация жидкостной и газовой хроматографии, что позволяет анализировать содержание летучих, полунлетучих и нелетучих пестицидов с применением многих методов, с применением методов, рассчитанных на остатки пестицидов различных классов [4]. Несмотря на то, что для большого количества пестицидов подходят и ВЭЖХ, и ГХ, для многих пестицидов это не так. У каждой методики хроматографии есть свои преимущества и недостатки с точки зрения количественного определения аналита и отрицательного воздействия коэкстрактивных веществ в матрице. Удаление таких коэкстрактивных веществ крайне необходимо для точного количественного анализа сложных матриц пищевых продуктов и требует использования таких сорбентов как C18, ПВА (сорбент с первично-вторичным амином) и GCB (графитированная сажа) [5]. В продаже есть другие материалы с содержанием циркония, в целом они удаляют липиды лучше типичных сорбентов для очистки матрицы. Но они не рассчитаны на все классы липидов и могут удерживать определяемое вещество [6, 7]. Для проб с высоким содержанием липидов также может потребоваться очистка с использованием картриджей твердофазной экстракции (ТФЭ) [7,8,9] или гель-проникающая хроматография (ГПХ) [10], что вызывает дополнительные временные и финансовые затраты для в остальном рутинного анализа.

Материалы Agilent Bond Elut EMR—Lipid представляют собой инновационный сорбент, который выборочно удаляет липиды основных классов из матрицы проб без лишних потерь определяемого вещества. Избавление от помех липидов в сложных матрицах особенно важно при использовании таких техник как QuEChERS и при выделении белков, так как в ходе этих процедур вместе с целевым веществом коэкстрагируется большое количество матрицы. В данном испытании рассматривается пробоподготовка для анализа на содержание в авокадо 44 подающихся ВЭЖХ репрезентативных пестицидов с применением экстракции методом QuEChERS AOAC с последующей очисткой материалами для дТФЭ EMR—Lipid.- Пестициды принадлежат к 12 различным химическим классам и таким образом служат примерами всех аналитов, не включенных в данные рекомендации по применению. В таблице 1 перечислены подающихся ВЭЖХ пестициды и их классы.- В данных рекомендациях по применению демонстрируется выдающаяся чистота матрицы, обеспечиваемая методом EMR—Lipid при анализе таких сложных жирных образцов как авокадо, а также высокая степень извлечения и точность при анализе остатков 44 пестицидов различных классов на трех уровнях.

Таблица 1. Подлежащие ВЭЖХ анализу пестициды, используемые в данном исследовании, и их химический класс

Репрезентативный пестицид	Химический класс	Группа пестицидов
Метамидофос	Фосфорорганический	Инсектицид
Ацефат	Фосфорорганический	Инсектицид
Ометоат	Фосфорорганический	Инсектицид
Диметоат	Фосфорорганический	Инсектицид
Малатион	Фосфорорганический	Инсектицид
ЭФН	Фосфорорганический	Инсектицид
ТЭПФ-А	Фосфорорганический	Инсектицид
Монокротофос	Фосфорорганический	Инсектицид
Мексакарбат	Карбамат	Инсектицид
Карбарил	Карбамат	Инсектицид
Пропоксур	Карбамат	Инсектицид
Карбофуран	Карбамат	Инсектицид
Метиокарб	Карбамат	Инсектицид
Хлорпрофам	Карбамат	Инсектицид
Профам	Карбамат	Инсектицид
Аминокарб	Карбамат	Инсектицид
Оксамил	Карбамат	Инсектицид
Метомил	Карбамат	Инсектицид
Альдикарб	Карбамат	Инсектицид
Тербутилазин	Триазин	Альгицид
Симазин	Триазин	Гербицид
Себутилазин	Триазин	Гербицид
Монурон	Мочевина	Гербицид
Хлортолурун	Мочевина	Гербицид
Диурон	Мочевина	Гербицид
Флуометурон	Мочевина	Гербицид
Изопротурон	Мочевина	Гербицид
Метобромурон	Мочевина	Гербицид
Сидурон	Мочевина	Гербицид
Линурон	Мочевина	Гербицид
Небурун	Мочевина	Гербицид
Фенурон	Мочевина	Гербицид
Метоксурон	Мочевина	Гербицид
Карбендазим	Бензимидазол	Фунгицид
Тиабендазол	Бензимидазол	Фунгицид
Триофанат-метил	Бензимидазол	Фунгицид
Ципродинил	Анилинопиримидин	Фунгицид
Имазалил	Имидазол	Фунгицид
Пенконазол	Триазол	Фунгицид
Имидаклоприд	Неоникотиноид	Инсектицид
Метазахлор	Хлорацетанилид	Гербицид
2,4-Д кислота	Хлорофенокси кислота	Гербицид
Дихлорпропен	Хлорофенокси кислота	Гербицид
Бентазон	Без класса	Гербицид

Экспериментальная часть

Все использованные реагенты и растворители были аналитической чистоты или предназначены для жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ). Ацетонитрил и метанол куплены у компании Honeywell (Маскегон, шт. Мичиган, США). Уксусная кислота аналитической чистоты приобретена у компании Sigma-Aldrich, Corp. (Сент-Луис, шт. Миссури, США). Стандарты пестицидов и внутренние стандарты приобретены у компаний Sigma-Aldrich, Corp. и AccuStandard (Нью-Хэвен, шт. Коннектикут, США).

Растворы и стандарты

Раствор ацетонитрила, содержащий 1% уксусной кислоты приготовлен добавлением 10 мл уксусной кислоты в 990 мл ацетонитрила. Базовые растворы стандартов и внутренних стандартов для некоторых пестицидов приготовлены на основе либо ацетонитрила, либо метанола в концентрации 2,0 мг/мл. Стандарты для остальных пестицидов взяты из смешанных стандартных базовых растворов, доступных на рынке, и получены с помощью непосредственной подготовки рабочего раствора эталонного вещества. Комбинированный рабочий раствор приготовлен на основе ацетонитрила в концентрации 25 мкг/мл. Был приготовлен раствор 25 мкг/мл аликвоты внутреннего стандарта ТФФ в ацетонитриле.

Оборудование

Для пробоподготовки использовались следующие оборудование и материалы:

- Geno/Grinder (SPEX, Метучен, шт. Нью-Джерси, США);
- центрифуга Centra CL3R (Thermo IEC, шт. Массачусетс, США);
- микроцентрифуга Eppendorf (Brinkmann Instruments, Вестбери, шт. Нью-Йорк, США);
- обычный вортекс и вортекс для нескольких пробирок (VWR, Раднор, шт. Пенсильвания, США);
- дозирующая насадка (VWR, Южный Плейнфилд, шт. Нью-Джерси, США);
- пипетки и автоматический дозатор Eppendorf;
- пробирки Agilent Bond Elut EMR—Lipid (номер по каталогу 5982-1010) и пробирки Agilent Bond Elut Final Polish для EMR—Lipid (номер по каталогу 5982-0101).

Оборудование

Анализ выполнялся с помощью системы ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity, включающей в себя:

- четырехканальный насос Agilent 1290 Infinity (G4204A);
- высокоэффективный автосамплер Agilent 1290 Infinity (G4226A) с термостатом Agilent 1290 Infinity (G1330B) и термостатом отсека для колонок Agilent 1290 Infinity (G1316C).

Система УВЭЖХ была подсоединена к трехквартупольной системе ВЭЖХ-МС Agilent 6490, оборудованной электроспреем Agilent Jet Stream в качестве источника ионизации и технологией iFunnel. Для сбора и анализа данных применялась ПО Agilent MassHunter Workstation.

Параметры оборудования

Условия ВЭЖХ

Колонка:	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2,1 Ч 150 мм, 1,8 мкм (номер по каталогу 959759-902); предколонка для ВЭЖХ Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 5 Ч 2,1 мм, 1,8 мкм (номер по каталогу 821725-902)	
Подвижная фаза:	А) 0,1% муравьиной кислоты в воде В) 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле	
Скорость потока:	0,3 мл/мин	
Температура колонки:	35 °С	
Температура автосамплера:	4 °С	
Вводимый объем:	3 мкл	
Промывка иглы:	раствор 1:1:1 ацетонитрил:метанол:изопропиловый спирт:вода с 0,2% муравьиной кислоты	
Градиент:	Время (мин)	%В
	0	10
	15	95
	15,01	100
Время остановки:	16 мин	
Время постобработки:	3 мин	

Условия МС

Режим положительных/отрицательных ионов		
Температура газа:	120 °С	
Расход газа:	14 л/мин	
Давление газа		
распылителя:	40 psi	
Нагреватель		
покрывного газа:	400 °С	
Расход покрывного		
газа (Sheath gas):	12 л/мин	
Капиллярная:	3000 В	
Параметры iFunnel:	Положительные Отрицательные	
Радиочастотное		
излучение с высоким		
давлением:	100 В	90 В
Радиочастотное		
излучение с низким		
давлением:	70 В	60 В

Условия МС в режиме MRM для используемых аналитов перечислены в таблице 2, типичная хроматограмма изображена на рисунке 1.

Таблица 2. Параметры MRM трехкврупольной ВЭЖХ и время удерживания используемых в исследовании пестицидов

Аналит	Время удерж. (мин)		Дельта врем.удерж. (мин)		Полярность	
	Родительский ион (m/z)	Ион продукта реакции (m/z)	Эн. соудар. (В)			
Метамидофос	1,83	2	Положит.	142	94,1	9
Аминокарб	2,03	2	Положит.	209,1	137,2	24
Ацефат	2,13	2	Положит.	184	143	9
Ометоат	2,54	2	Положит.	214	124,9	17
Карбендазим	3,40	2	Положит.	192,1	132	33
Тиабендазол	3,89	2	Положит.	202	131,1	41
Мексакарбат	3,99	2	Положит.	223,1	151,1	20
Оксамил	4,24	2	Положит.	237,1	72	12
Монокротофос	4,46	2	Положит.	224,1	127	10
Метомил	4,64	2	Положит.	163,1	106	4
Фенурон	6,17	2	Положит.	165,1	72	20
Имидаклоприд	6,43	2	Положит.	256,1	209,1	13
Диметоат	6,63	2	Положит.	230	199	5
ТЭФФ-А	7,69	2	Положит.	291,1	179	20
Алдикарб	7,87	2	Положит.	213,1	89,1	15
Метоксурон	7,89	2	Положит.	229	46,1	12
Имазалил	7,99	2	Положит.	297,1	158,9	25
Симазин	8,31	2	Положит.	202,1	132	22
Монурон	8,37	2	Положит.	199,1	46,1	16
Триофанат-метил	8,95	2	Положит.	343,1	151,2	4
Пропоксур	9,15	2	Положит.	210,1	111,1	9
Карбофуран	9,30	2	Положит.	222,1	123,1	30
Хлортолурон	9,54	2	Положит.	213,1	72	20
Диурон	9,65	2	Положит.	233	72,1	20
Карбарил	9,73	2	Положит.	202,1	145,1	9
Бентазон	9,73	2	Отрицат.	239	132	15
Изопротурон	9,96	2	Положит.	207,1	46,1	20
2,3-D кислота	10,06	2	Отрицат.	219	161	15
Флуометурон	10,10	2	Положит.	233,1	72	16
Метобромурон	10,48	2	Положит.	259	148	10
Ципродинил	10,53	2	Положит.	226,1	93,1	41
Метазахлор	10,71	2	Положит.	278,1	134,2	15
Профам	10,80	2	Положит.	180,1	138,1	4
Тербутилазин	10,98	2	Положит.	230,1	174,1	15
Дихлорпропен	10,99	2	Отрицат.	233	161	10
Сидурон	11,26	2	Положит.	233,2	137,1	12
Себутилазин	11,47	2	Положит.	230,1	174,1	16
Метиокарб	11,47	2	Положит.	226,1	169	4
Линурон	11,69	2	Положит.	249	160,1	20
Хлорпрофам	12,53	2	Положит.	214,1	172	5
Пенконазол	12,76	2	Положит.	284,1	70	17
Малатион	12,85	2	Положит.	331	126,9	5
Небурон	13,29	2	Положит.	275,1	57,1	20
ТФФ (внутр. стандарт)	13,99	2	Положит.	327,1	51,1	80
ЭФН	14,96	2	Положит.	324,1	296,1	8

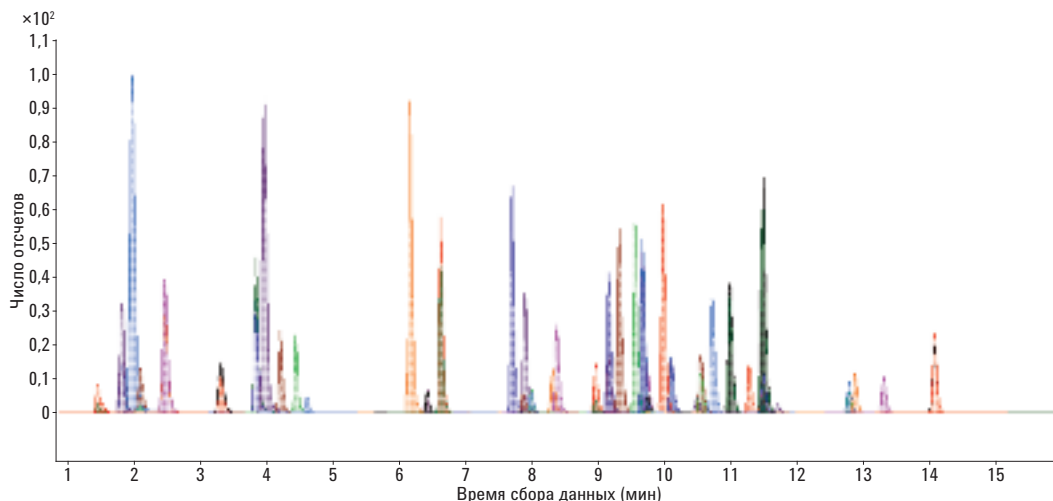


Рис. 1. Типичная хроматограмма ЖХ-МС-МС (MRM) анализа образцов авокадо с содержанием 50 нг/г пестицидов при экстракции методом QuEChERS с последующей очисткой с помощью технологии Agilent Bond Elut EMR—Lipid

Пробоподготовка

Процедура конечной пробоподготовки была оптимизирована с помощью метода QuEChERS, включающего следующие этапы:

1. Поместить 15 г ($\pm 0,1$ г) гомогенизированного авокадо в центрифужные пробирки объемом 50 мл.
2. Добавить 15 мкл ацетонитрила (1% уксусной кислоты) и перемешивать в течение 10 секунд.
3. Добавить упаковку экстракционной соли, рекомендованной AOAC.
4. Смешивать в механической мешалке в течение 2 мин.
5. Поместите в центрифугу и экстрагируйте при 5000 об/мин в течение 5 минут.
6. Добавить 5 мл воды в пробирку дТФЭ EMR—Lipid объемом 15 мл.
7. Перенести 5 мл надосадочной жидкости в пробирку дТФЭ EMR—Lipid.
8. Незамедлительно перемешать для разведения пробы, затем дополнительно в течение 60 сек перемешивать в вортексе для нескольких пробирок.
9. Центрифугировать при 5000 об/мин в течение 3 минут.
10. Перенести 5 мл надосадочной жидкости в полировочную пробирку EMR—Lipid объемом 15 мл, содержащую 2 г солей (1:4, NaCl:MgSO₄) и перемешивать в течение 1 мин.
11. Центрифугировать при 5000 об/мин в течение 3 минут.
12. Смешать в вортексе 200 мкл верхнего слоя ацетонитрила и 800 мкл воды во флаконе для проб объемом 2 мл.

Образец готов к анализу ЖХ-МС-МС. Весь процесс пробоподготовки изображен на рисунке 2.

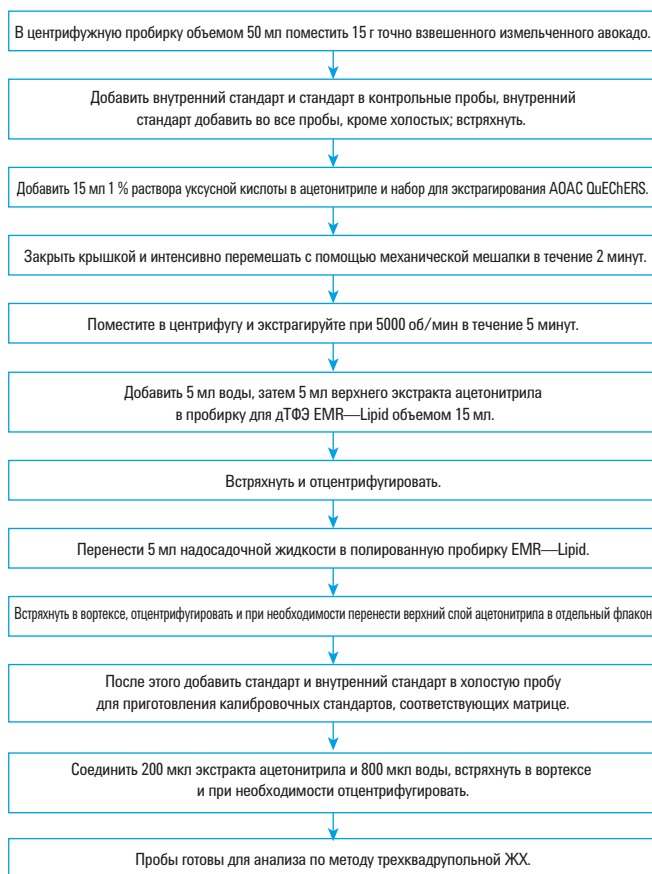


Рис. 2. Процедура пробоподготовки с использованием методики Agilent Bond Elut EMR—Lipid для анализа содержания пестицидов в авокадо

Калибровочные стандарты и образцы для контроля качества

После этапа 1 предварительно разведенные образцы для КК были соответствующим образом обогащены рабочим раствором эталонного вещества для шести повторов. Образцы КК соответствуют количеству вещества в 5, 50 и 200 нг/г в авокадо. Раствор внутреннего стандарта также был добавлен во все пробы кроме холостой матрицы, что соответствует количеству 100 нг/г ТФФ в авокадо.

Подобранные к матрице калибровочные стандарты были подготовлены с помощью растворов стандарта и рабочих растворов внутреннего стандарта. Надлежащие концентрации в пробах холостых матриц после этапа 10 соответствуют количеству вещества 1, 5, 10, 50, 100, 150 и 200 нг/г и 100 нг/г внутреннего стандарта (ТФФ). Мы развели конечный экстракт образца водой, чтобы проба поддавалась анализу с градиентом ЖХ-МС-МС, а также чтобы сохранить неизменную форму пика для первых элюировавшихся аналитов. Система ЖХ-МС-МС обеспечивает отличную чувствительность при использовании описанного конечного разведения и соответствует необходимым пределам обнаружения. Если невозможно добиться необходимой точности прибора с помощью разбавления образца, следует рассмотреть возможность изменения концентрации пробы (путем испарения или разведения), хотя это и не желательно.

Определение количества коэкстрактивных веществ

Количество коэкстрактивных веществ определяется с помощью гравиметрических измерений [2] для трех различных методик очистки: С18/ПВА, циркониевым сорбентом и EMR—Lipid. Пробы были подготовлены в соответствии с указанной ниже процедурой, чтобы данные дублировались.

1. Нагревать стеклянные пробирки в течение примерно 1 ч при температуре 110 °С, чтобы удалить влагу.
2. Остудить пробирки до комнатной температуры.
3. Выполнить предварительное взвешивание пробирок.
4. Аккуратно перенести 1 мл экстракта изначальной холостой матрицы (без очистки) и холостые матрицы после различных очисток, каждую в двойном экземпляре.
5. Сушить все пробы на аппарате CentriVar при температуре 50 °С в течение 1 ч или до высыхания.
6. Нагревать пробирки в течение примерно 1 ч при температуре 110 °С, чтобы удалить влагу.
7. Остудить пробирки до комнатной температуры.
8. Выполнить повторное взвешивание пробирок.

Разность масс между значениями этапа 8 и этапа 3 является количеством коэкстрактивных веществ в пробе. Количество коэкстрактивных веществ, удаленное при очистке, является средней разностью массы коэкстрактивных веществ матрицы до и после очистки.

Оценка влияния матрицы

Дополнительно сравнивался отклик аналита (площадь пика) экстракта авокадо после разведения и эквивалентного беспримесного раствора. Экстракт авокадо после разведения был получен с помощью разведения раствора эталонного пестицида экстрактом холостой матрицы авокадо. Разница в отклике (площади пика) напрямую связана с влиянием матрицы.

Сравнение и валидация методов

Сейчас согласно методу QuEChERS для очистки таких образцов с высоким содержанием жиров как авокадо рекомендуется использовать дТФЭ для содержащих жиры веществ, которая включает ПВА, ЕС-С18 и MgSO₄. Также сообщается, что циркониевый сорбент эффективнее справляется с удалением липидов, чем дТФЭ с использованием сорбентов С18 или ПВА. Нашей основной целью было сравнение очистки EMR—Lipid с очисткой другими методиками. Сравнивались данные, полученные до и после разведения проб, соответствующих количеству вещества 50 нг/г авокадо. Экстракция проводилась в соответствии с процедурой QuEChERS AOAC с последующей дТФЭ по каждому из протоколов очистки: с помощью EMR—Lipid, дТФЭ С18 и ПВА, а также циркониевого сорбента. При очистке EMR—Lipid выполнялась процедура, указанная на рисунке 2. Материалам дТФЭ EMR—Lipid в отличие от традиционных сорбентов для активации дТФЭ требуется больше воды, что значительно улучшает степень очистки матрицы. Надосадочная жидкость EMR—Lipid переносится к полировочным солям EMR—Lipid, чтобы выделить ацетонитрил или воду и удалить растворенные твердые частицы. Для очистки по методу QuEChERS с использованием С18/ПВА и циркониевого сорбента 1 мл сырого экстракта ацетонитрила переносился в пробирку для жирных проб для дТФЭ объемом 2 мл (номер по каталогу 5982-5122) или в пробирку объемом 2 мл, содержащую 100 мг циркониевого сорбента. Затем пробы перемешивались в вортексе и центрифугировались на скорости 13 000 об/мин в течение трех минут в микроцентрифуге. Затем аликвота 200 мкл надосадочной жидкости была перенесена во флакон для проб, содержащий 800 мкл воды. На данном этапе было выполнено осаждение для очистки с помощью сорбентов для дТФЭ С18/ПВА, и циркониевого сорбента; а перед анализом ЖХ-МС-МС пробы необходимо отфильтровать в фильтрующей пробирке с регенерированной целлюлозой 0,45 мкм. Предполагается, что осаждение вызывается липидами, не удаленными в ходе очисток материалами дТФЭ для содержащих жиры веществ и циркониевым сорбентом. При очистке сырого экстракта с помощью материалов EMR—Lipid этого не происходило, и после разведения был получен чистый раствор без осадка. Таким образом, фильтрация не требовалась. Очень важно подготавливать разведенные калибровочные стандарты в соответствующих холостых матрицах и соответствующие матрицам калибровочные стандарты. Степень извлечения оценивалась по соотношению площадей пика аналита в пробах до и после разведения.

Метод EMR—Lipid прошел валидацию для анализа содержания в авокадо 5, 50 и 200 нг/г вещества в шести повторных испытаниях с использованием соответствующей матрицы калибровочной кривой с 7-точками. Для количественного анализа использовался внутренний стандарт, а данные оценивались с точки зрения точности и прецизионности.

Результаты и обсуждение

Количество коэкстрактивных веществ

Результаты определения массы коэкстрактивных веществ в пробе приведены в таблице 3. Очевидно, что дТФЭ методом EMR—Lipid обеспечивает наилучшую очистку матрицы по массе.

Таблица 3. Масса коэкстрактивных веществ в авокадо после экстракции QuEChERS и использования различных материалов для очистки (n = 2)

Методика очистки	Эффективность удаления коэкстрактивных веществ на коэкстрактивного	
	1 мл конечного экстракта ацетонитрила (мг)	вещества матрицы при очистке (%)
Без последующей очистки	14,7	—
Очистка EMR—Lipid	4,2	71,4
Очистка цирконием	7,0	52,4
Очистка C18/ПВА	9,5	35,4

Эффективность удаления коэкстрактивного вещества матрицы (%)

$\left(\frac{\text{количество коэкстрактивного вещества без очистки} - \text{количество коэкстрактивного вещества с очисткой}}{\text{количество коэкстрактивного вещества без очистки}} \right) \times 100$

Оценка влияния матрицы

Для оценки влияния матрицы сравнивался отклик аналита холостых матриц после разведения и чистых стандартов. Так как большинство коэкстрактивных липидов элюируется в конце градиента ВЭЖХ (обращенно-фазовый, % органичности от меньшего к большему), матрица проб больше влияет на гидрофобные аналиты. В результате обычно наблюдается ионная супрессия, связанная с малым откликом аналита. Вследствие неэффективности сорбентов C18/ПВА и циркониевого сорбента при удалении липидов из матрицы наблюдался намного больший уровень ионной супрессии для поздно элюирующихся соединений. На рисунке 3 в качестве примеров приведены результаты уменьшения ионной супрессии при использовании очистки EMR—Lipid для трех соединений. Эти три пестицида являются соединениями с достаточно большим значением log P: хлорпрофам (log P 3,6), пенконазол (log P 3,7) и ЭФН (log P 4,5). Чем больше значение log P, тем сильнее гидрофобность соединения. Для данных пестицидов ионная супрессия составила 80% и была вызвана влиянием посторонних компонентов образца, особенно липидов, которые не были удалены при использовании сорбентов дТФЭ C18/ПВА и циркониевого сорбента. Для данных соединений метод EMR—Lipid привел к сильному влиянию матрицы, как показано на рисунке 3.

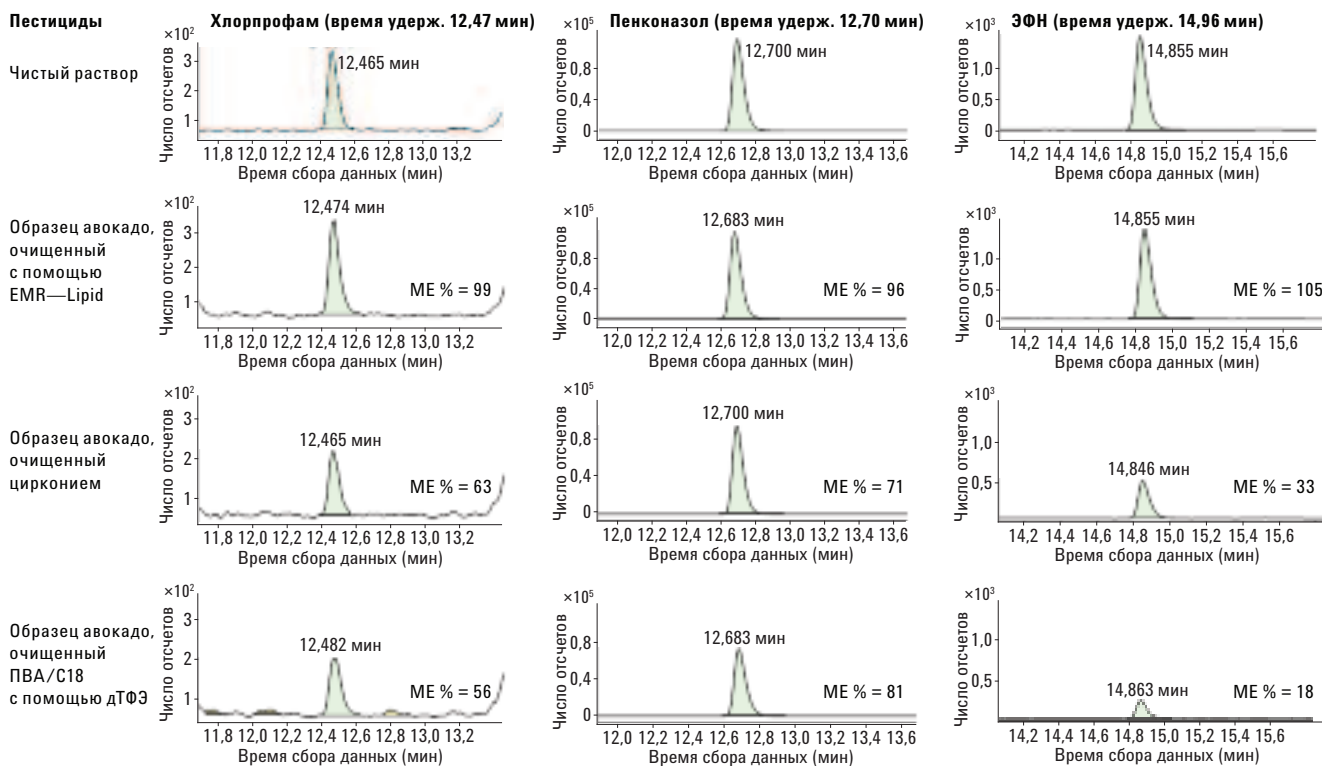


Рис. 3. Сравнение влияния матрицы в гидрофобных аналитах. Образцы матрицы были доведены до концентрации 50 нг/г с помощью стандартов пестицидов в холостой матрице

Сравнение методов определения степени извлечения определяемого вещества

Оптимизированный метод QuEChERS с дТФЭ EMR—Lipid также сравнивался с очисткой дТФЭ с использованием C18/ПВА и циркониевого сорбента. На рисунке 4 изображены результаты сравнения степени извлечения, на рисунке 5 — результаты отдельных проблематичных сравнений анализов.

Процедура EMR—Lipid в целом позволяет добиться отличной степени извлечения и точности для большинства пестицидов. Только два пестицида показали результаты меньше допустимого предела степени извлечения (от 70 до 120%) — ципродинил (64%) и 2,4-D кислота (65%), относительное стандартное отклонение составило менее 10%. Поэтому на основании рекомендаций SANCO [11] результаты считаются допустимыми, так как соответствуют допустимым пределам воспроизводимости. Степень извлечения при очистке с помощью C18/ПВА для дТФЭ была высокой для всех пестицидов кроме двух кислых соединений. Дихлорпропен и 2,4-D

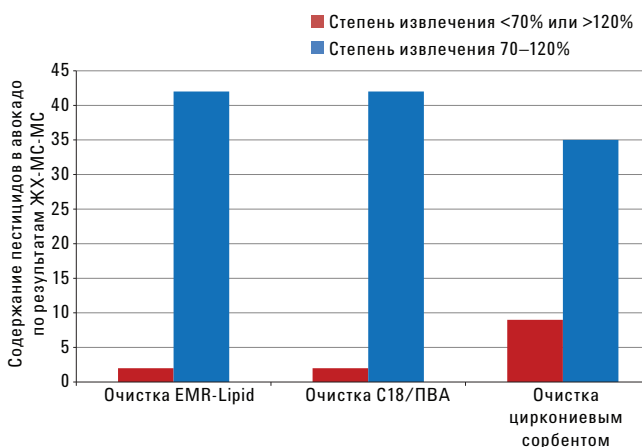


Рис. 4. Статистически результаты извлечения аналита при сравнении использования методики Agilent Bond Elut EMR—Lipid, дТФЭ с C18/ПВА и циркониевого сорбента

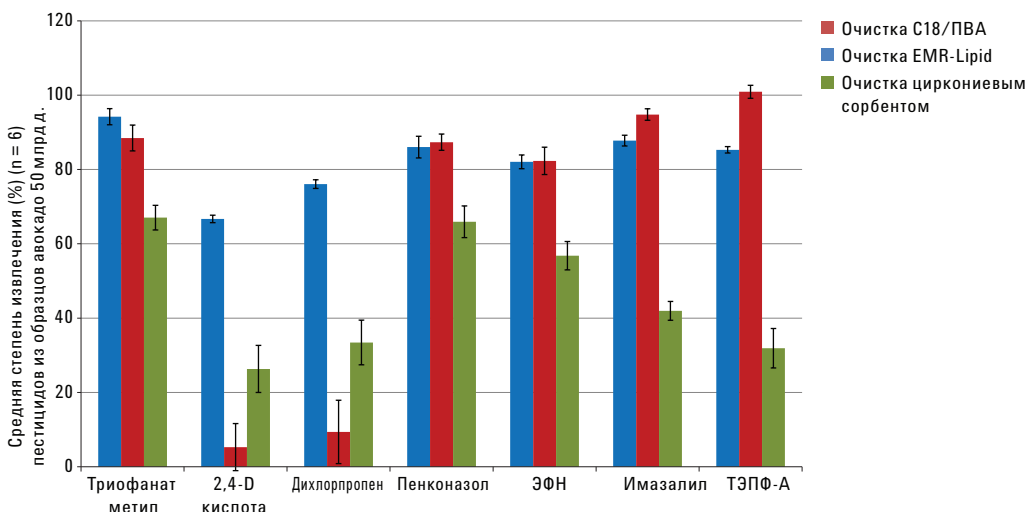


Рис. 5. Результаты сравнения степени извлечения при очистке методом Agilent Bond Elut EMR—Lipid (синий цвет) и дТФЭ с C18/ПВА (красный цвет) и циркониевым сорбентом (зеленый цвет)

кислота имели очень низкую степень извлечения (<10%) из-за ПВА. При анализе степени извлечения циркониевый сорбент привел к повышенному удерживанию аналита, и у девяти пестицидов степень извлечения составила менее 70%.

Валидация методики

Протокол EMR—Lipid прошел валидацию при полном серийном количественном анализе. Методология описана в разделе о пробоподготовке. Для количественного анализа использовался внутренний стандарт (ТФФ), а количественные результаты оценивались с точки зрения точности и прецизионности. Но абсолютная степень извлечения внутреннего стандарта (ТФФ) составила 90%, поэтому результаты оценки точности соответствуют показателям абсолютной степени извлечения.

Подробные результаты валидации приведены в таблице 4, а краткие — на рисунке 6 в виде графика средней точности и прецизионности, рассчитанных на основе 18 параллельных вводов предварительно разбавленных образцов КК в трех различных концентрациях. Анализ показал, что точность 95% 44 пестицидов составляет 70–120%, за исключением 2,4-D кислоты и ципродинила, степень извлечения которых составила чуть меньше 70% при хорошем относительном стандартном отклонении. Воспроизводимость метода оказалась превосходной, относительное стандартное отклонение составило менее 10% (n = 6) для 91% пестицидов при концентрации 5 нг/г, для 100% при концентрации 50 нг/г и для 98% при концентрации 200 нг/г. Остальные значения относительного стандартного отклонения при использовании протокола EMR—Lipid были значительно меньше 20%. При минимальном разведении увеличение степени отклонения для данных соединений до более чем 10% скорее всего вызвано пределом обнаружения прибора. Также этап высаливания без буфера при использовании EMR—Lipid (NaCl, MgSO₄) является потенциальной причиной отклонений, поэтому применение полировочных солей с буферным раствором будет рассмотрено в дальнейших исследованиях.

Таблица 4. Результаты валидации протокола EMR—Lipid для анализа содержания 44 в авокадо в концентрации 5, 50 и 200 нг/г (n = 6).

Аналит	Калибровочная кривая		Диап. кал. (нг/г)	Точность и прецизионность метода					
	Регрессия/соотношение	R ²		5 нг/г (КК)		50 нг/г (КК)		200 нг/г (КК)	
				Извл., %	ОСО	Извл., %	ОСО	Извл., %	ОСО
Метамидофос	Квадратичная, 1/x	0,9993	1-200	69,1	9,5	93,8	8,4	109,8	6,0
Аминокарб	Линейная, 1/x	0,9990	1-200	74,6	8,4	88,0	2,7	87,0	2,0
Ацефат	Линейная, 1/x	0,9948	1-200	55,8	12,4	88,8	2,3	86,6	4,0
Ометоат	Линейная, 1/x	0,9996	1-200	84,5	6,0	85,3	1,4	84,4	2,6
Карбендазим	Линейная, 1/x	0,9995	1-200	87,1	6,3	86,2	2,2	85,4	1,2
Тиабендазол	Линейная, 1/x	0,9995	1-200	49,4	24,3	76,7	1,7	79,0	2,0
Мексакарбат	Линейная, 1/x	0,9993	1-200	83,6	7,8	90,4	3,3	89,0	2,1
Оксамил	Линейная, 1/x	0,9991	1-200	81,1	7,6	96,7	2,6	94,4	3,5
Монокротофос	Линейная, 1/x	0,9979	1-200	85,2	6,1	85,1	1,9	101,5	4,6
Метомил	Линейная, 1/x	0,9993	1-200	77,8	8,2	88,6	3,3	92,8	4,5
Фенурон	Линейная, 1/x	0,9969	1-200	86,5	9,9	103,4	2,5	91,7	1,7
Имидаклоприд	Линейная, 1/x	0,9996	1-200	81,7	5,9	94,1	2,6	87,9	2,5
Диметоат	Линейная, 1/x	0,9993	1-200	83,3	8,0	99,2	3,1	94,8	2,5
ТЭПФ-А	Линейная, 1/x	0,9989	1-200	50,2	6,5	88,3	1,6	78,4	3,1
Алдикарб	Линейная, 1/x	0,9989	1-200	88,6	5,6	101,2	3,5	76,2	1,9
Метоксурон	Линейная, 1/x	0,9987	1-200	102,0	5,4	105,8	2,5	89,9	2,6
Имазалил	Линейная, 1/x	0,9988	1-200	81,4	6,9	86,2	2,0	82,5	2,7
Симазин	Линейная, 1/x	0,9984	1-200	91,8	5,4	93,8	1,9	85,4	1,6
Монурон	Линейная, 1/x	0,9990	1-200	82,5	9,9	96,0	3,7	88,4	1,8
Триофанат-метил	Линейная, 1/x	0,9977	1-200	89,4	10,8	104,6	5,5	86,0	7,1
Пропоксур	Линейная, 1/x	0,9993	1-200	84,7	8,1	97,6	1,4	94,5	2,2
Карбофуран	Линейная, 1/x	0,9993	1-200	88,3	8,5	98,9	5,1	97,2	2,4
Хлортолурон	Линейная, 1/x	0,9990	1-200	96,3	5,0	97,9	3,1	89,9	2,0
Диурон	Линейная, 1/x	0,9995	1-200	86,6	6,7	98,7	2,8	97,5	3,5
Карбарил	Линейная, 1/x	0,9991	1-200	80,7	7,4	101,1	3,2	90,5	2,1
Бентазон	Квадратичная, 1/x	0,9993	1-200	111,2	5,5	102,3	4,7	97,4	7,9
Изопротурон	Линейная, 1/x	0,9993	1-200	98,7	4,1	98,9	2,3	92,1	2,6
2,3-D кислота	Линейная, 1/x	0,9985	1-200	64,3	7,6	65,4	5,1	65,6	2,6
Флуометурон	Линейная, 1/x	0,9975	1-200	86,2	5,7	87,8	3,9	88,0	3,0
Метобромурон	Линейная, 1/x	0,9977	1-200	96,0	6,6	100,3	4,6	92,4	4,5
Ципродинил	Линейная, 1/x	0,9986	1-200	60,3	8,3	67,0	2,6	65,5	3,6
Метазахлор	Линейная, 1/x	0,9992	1-200	99,8	5,7	99,4	3,4	94,3	2,8
Профам	Линейная, 1/x	0,9985	1-200	85,8	9,7	89,3	3,8	87,0	3,8
Тербутилазин	Линейная, 1/x	0,9993	1-200	90,7	6,5	91,1	2,6	85,8	2,0
Дихлорпропен	Линейная, 1/x	0,9992	1-200	75,6	9,7	73,3	4,6	76,9	2,3
Сидурон	Линейная, 1/x	0,9990	1-200	90,2	8,6	92,4	3,5	91,5	2,2
Себутилазин	Линейная, 1/x	0,9992	1-200	95,3	4,8	89,5	2,5	83,7	2,1
Метиокарб	Линейная, 1/x	0,9984	1-200	77,6	8,8	94,7	3,2	86,3	1,9
Линурон	Линейная, 1/x	0,9984	1-200	84,7	7,4	85,2	3,6	84,6	3,6
Хлорпрофам	Линейная, 1/x	0,9994	5-200	91,6	10,0	84,3	9,3	81,1	3,8
Пенконазол	Линейная, 1/x	0,9992	1-200	83,0	6,3	81,1	2,4	80,7	1,5
Малатион	Линейная, 1/x	0,9991	1-200	76,2	7,1	100,5	2,2	100,0	1,0
Небурон	Линейная, 1/x	0,9994	1-200	66,9	6,8	83,0	1,6	84,8	1,3
ЭФН	Линейная, 1/x	0,9995	1-200	76,4	4,7	73,8	3,9	62,9	13,2

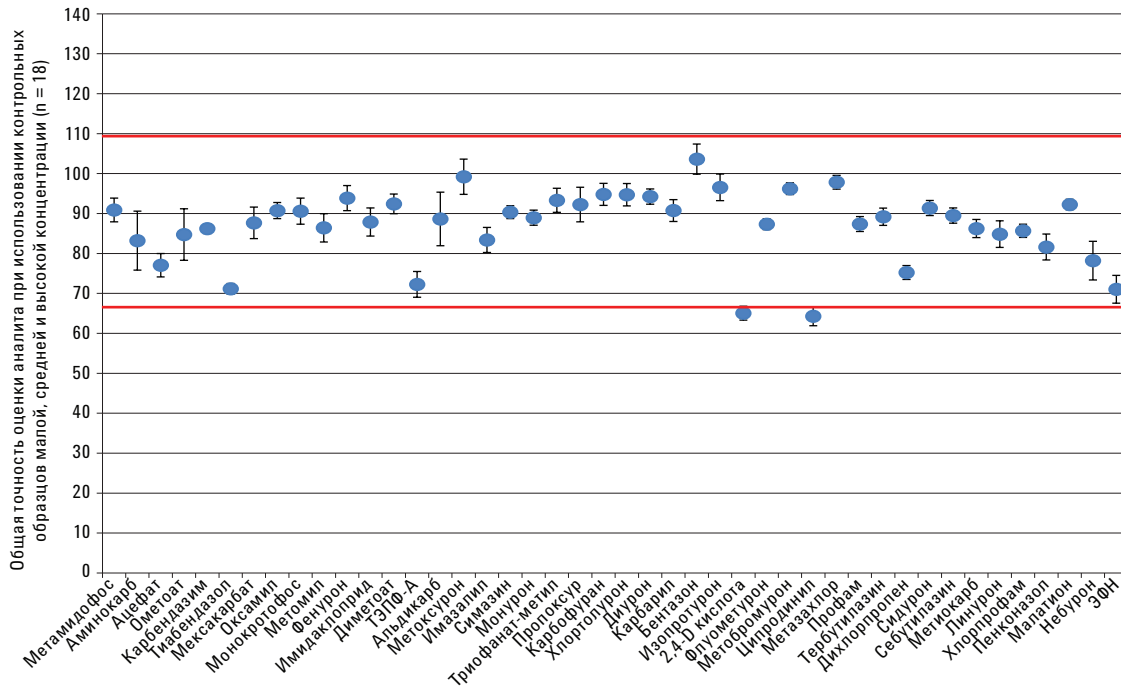


Рис. 6. Количественные результаты анализа содержания 44 репрезентативных пестицидов в авокадо с использованием процедуры Agilent Bond Elut EMR—Lipid. Точность и прецизионность оценивались на основе 18 параллельных вводов в трех различных концентрациях

Выводы

Быстрый, надежный и эффективный метод экстракции с технологией QuEChERS AOAC и последующей очисткой с помощью технологии дТФЭ Agilent Bond Elut EMR—Lipid был разработан и проверен применительно анализа 44 поддающихся ВЭЖХ пестицидов, содержащихся в авокадо. - Была проведена тщательная оценка влияния матрицы, а результаты сравнивались с традиционной очисткой сорбентами для дТФЭ C18/ПВА и циркониевым сорбентом. Результаты показали, что по массе и влиянию матрицы метод EMR—Lipid превосходит очистку сорбентами для дТФЭ C18/ПВА и циркониевым сорбентом. Степень извлечения определяемого вещества и точность метода подробно оценивались в сравнении всех трех методик очистки. Технология очистки EMR—Lipid позволяет добиться сравнительно высокой степени извлечения определяемого вещества относительно использования C18/ПВА для дТФЭ и намного меньшего количества коэкстрактивных веществ. Обе методики очистки — EMR—Lipid и дТФЭ для содержащих жиры соединений обладают лучшей степенью извлечения, чем циркониевый сорбент вследствие неселективного взаимодействия аналита с цирконием. Полученные данные показывают, что метод EMR—Lipid позволяет очистить большую часть матрицы без значительного воздействия на степень извлечения определяемого вещества.

В данной работе было доказано, что при использовании в рамках метода QuEChERS очистка EMR—Lipid в качестве сорбента для дТФЭ позволяет добиться превосходной чистоты. Высокая селективность сорбента относительно коэкстрактивных липидов делает этот метод идеальным для анализа проб с высоким содержанием жиров вне зависимости от количества жиров и списка целевых веществ. Метод EMR—Lipid при количественном анализе пестицидов в авокадо обеспечивает высокую степень извлечения, точность, превосходную очистку матрицы и является простым в использовании. В дальнейших исследованиях многокомпонентный анализ остаточного количества сложных соединений в пробах с повышенным содержанием жиров будет рассмотрен подробнее.-

Литература

1. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Љbtajnbaher, D.; Schenck, F. S. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412-431.
2. Lehotay, S. J.; Mastovskб, K.; Light eld, A. R. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 615-629.
3. Chamkasem, N.; Ollis, L. W.; Harmon, T.; Mercer, G. J. *Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 2315-2329.
4. Hildmann, F.; Gottert, C.; Frenzel, T.; Kempe, G.; Speer, K. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1403*, 1–20.
5. Lehotay, S. J. *Mass Spec. in Food Safety Methods in Mol. Biol.* **2011**, *747*, 65-91.
6. Sapozhnikova, Y.; Lehotay, S. J. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *758*, 80–92.
7. Morris, B. D.; Schriener, R. B. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 5107–5119.
8. Wong, J. W. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 7636-7646.
9. Hayward, D. G.; Wong, J. W. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 4686-4693.
10. Saito, K.; Sјudin, A.; Sandau, C. D.; Davis, M. D.; Nakazawa, H.; Matsuki, Y.; Patterson Jr., D. G. *Chemosphere* **2004**, *57*, 373–381.
11. Anon. *Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, SANCO/12571/2013, 19 November 2013*; European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Brussels, Belgium.

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/chem.

www.agilent.com/chem

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, описани и спецификации в настоящем документе могут быть изменен без предупреждения.

компания Agilent Technologies, Inc., 2015
Напечатано в США
4 августа 2015 г.
5991-6098RU



Agilent Technologies