

Quantificação de resíduos de paraquat em leite usando o sistema LC/MS Agilent 6470 triplo quadrupolo

Separação cromatográfica de resíduos de paraquat da matriz de leite usando fase estacionária da química da coluna de HILIC-Z



Figura 1. Agilent LC 1290 Infinity II acoplado ao sistema LC/MS Agilent 6470 triplo quadrupolo.

Autores

Prasanth Joseph,
Saikat Banerjee, e Samir Vyas
Agilent Technologies, Inc.

Resumo

O paraquat (íon 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio) é uma amina quaternária amplamente utilizada como herbicida de contato não seletivo. Com toxicidade moderada, o escoamento do paraquat das áreas de aplicação e sua presença em produtos alimentícios têm trazido grandes preocupações para a saúde humana. A presença de resíduo de paraquat é relatada em produtos agrícolas de consumo, como o leite. O uso de espectrometria de massas para a detecção desse resíduo fornece maior sensibilidade e um preparo de amostras mais curto em comparação com outros métodos analíticos. No entanto, a linearidade, precisão e reprodutibilidade do resultado na matriz dependem fortemente da separação cromatográfica do paraquat dos componentes da matriz de amostras. Este estudo descreve um método de LC/MS de alto desempenho para quantificação sensível e seletiva de paraquat na matriz de leite. A cromatografia foi configurada de forma que o paraquat tivesse boa retenção, mas fosse bem resolvido na matriz de amostras endógenas usando a química da coluna Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z. Essa abordagem evita o uso de agentes de par iônico forte, simplificando drasticamente a análise. O método demonstrou ser altamente sensível, reprodutível e mostrou recuperações boas e consistentes em diversos lotes.

Introdução

O leite é considerado um alimento completo, pois apresenta rica densidade de nutrientes, contendo uma boa mistura de proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas e minerais essenciais para manter uma boa saúde. Devido ao consumo generalizado de leite, existem preocupações com pesticidas como o paraquat em produtos agrícolas, devido aos níveis moderados de toxicidade (Figura 2).

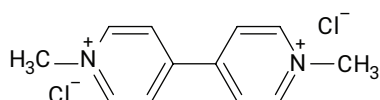


Figura 2. Estrutura química do paraquat.

Uma extração com QuEChERS dos resíduos de pesticida da matriz de leite é considerada um preparo de amostras muito fácil de adotar. Um método de LC/MS/MS altamente seletivo baseado no monitoramento de reações múltiplas (MRM) foi desenvolvido usando um sistema LC/MS Agilent 6470 triplo quadrupolo (LC/TQ).

A química zwitteriônica com uma técnica de ligação proprietária em colunas HILIC-Z oferece uma separação poderosa, estabilidade em um amplo intervalo de pH e excelente formato do pico em comparação às colunas HILIC de fase de sílica simples tradicionais.

Parte experimental

Produtos químicos e reagentes

O padrão de pesticida para LC/MS foi adquirido da Sigma-Aldrich. Esse padrão foi usado para o desenvolvimento de métodos e análise de amostras de leite. O kit de extração Agilent Bond Elut QuEChERS (part number 5982-5650)

e o kit dispersivo (part number 5982-5156CH) foram usados para o preparo de amostras. Solventes de grau LC/MS, como acetonitrila e água, foram adquiridos da Honeywell (Charlotte, NC, EUA). O formiato de amônio foi adquirido da Sigma-Aldrich (agora da Merck). O ácido fórmico de grau MS foi adquirido da Fluka (agora da Honeywell).

Configuração de instrumentos

- Bomba de alta velocidade 1290 Infinity II Agilent (G7120A)
- Agilent Multisampler 1290 Infinity II (G7167B)
- Termostato de múltiplas colunas 1290 Infinity II Agilent (G7116B)
- Sistema LC/MS Agilent 6470 triplo quadrupolo (G6470B)

Tabela 1. Condições cromatográficas.

Parâmetro	Valor
Fase móvel A	20 mM de formiato de amônio em água a pH = 3 (pH ajustado com ácido fórmico)
Fase móvel B	20 mM de formiato de amônio em água/acetonitrila (10/90)
Vazão	0,1 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura da coluna	35°C
Diluyente da amostra	Acetonitrila/água (60/40)
Lavagem da agulha	MeOH/acetonitrila/água (25/50/25)
Coluna	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2,1 × 100 mm, 2,7 µm (p/n 685775-924)

Tabela 2. Gradiente.

Tempo (min)	%A	%B
0	20	80
1	20	80
5	27	73
6	20	80
8	20	80
Pós-corrida	2 minutos	

Tabela 3. Parâmetros da fonte de MS.

Parâmetro	Valor
Fonte de ionização	ESI AJS
Modo de ionização	ESI Positivo
Temperatura do gás	250°C
Fluxo de gás	7 L/min
Nebulizador	30 psi
Gás de impulsão	390°C
Fluxo do gás de impulsão	11 L/min
Voltagem do capilar	3500 V
Voltagem do nozzle	0 V

Tabela 4. Parâmetros do MRM.

ID do composto	m/z do precursor	m/z do produto	Fragmentador (V)	CE	CAV	Ionização
Paraquat	171	155	158	36	4	ESI Positivo
	171	103	158	32	4	ESI Positivo
	171	77,1	158	44	4	ESI Positivo
	171	51,2	158	60	4	ESI Positivo

Preparo de amostras

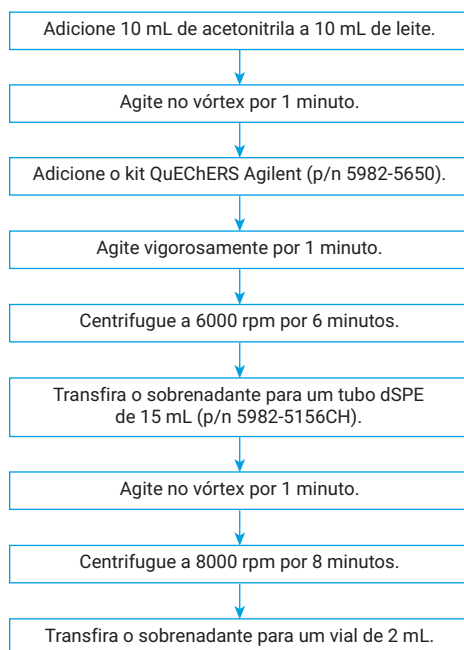


Figura 3. Fluxograma de preparo de amostras.

Aquisição e análise de dados

Todas as amostras foram adquiridas usando o software de aquisição de dados do Agilent MassHunter versão 10.1. Os cromatogramas foram visualizados com auxílio do software de análise qualitativa do Agilent MassHunter versão 10.0. A quantificação de cada lote foi realizada usando o software de análise quantitativa do Agilent MassHunter versão 10.1.

Resultados e discussão

As soluções estoque individuais foram preparadas e misturadas a volumes apropriados para criar padrões de trabalho. Os padrões de trabalho preparados foram de concentrações de 10 e 1 ppm. Volumes individuais de padrões de trabalho foram adicionados a 10 mL de amostras de leite e seguiram-se as etapas de preparo de amostras para gerar pontos de calibração do padrão de procedimento (antes da adição).

Tabela 5. Gráfico de diluição para a curva de calibração antes da adição.

Concentração do padrão de trabalho (ppm)	Volume coletado (μL)	Volume de leite (mL)	Concentração obtida (ng/mL)
1	50	10	5
1	100	10	10
1	200	10	20
10	50	10	50
10	100	10	100
10	200	10	200

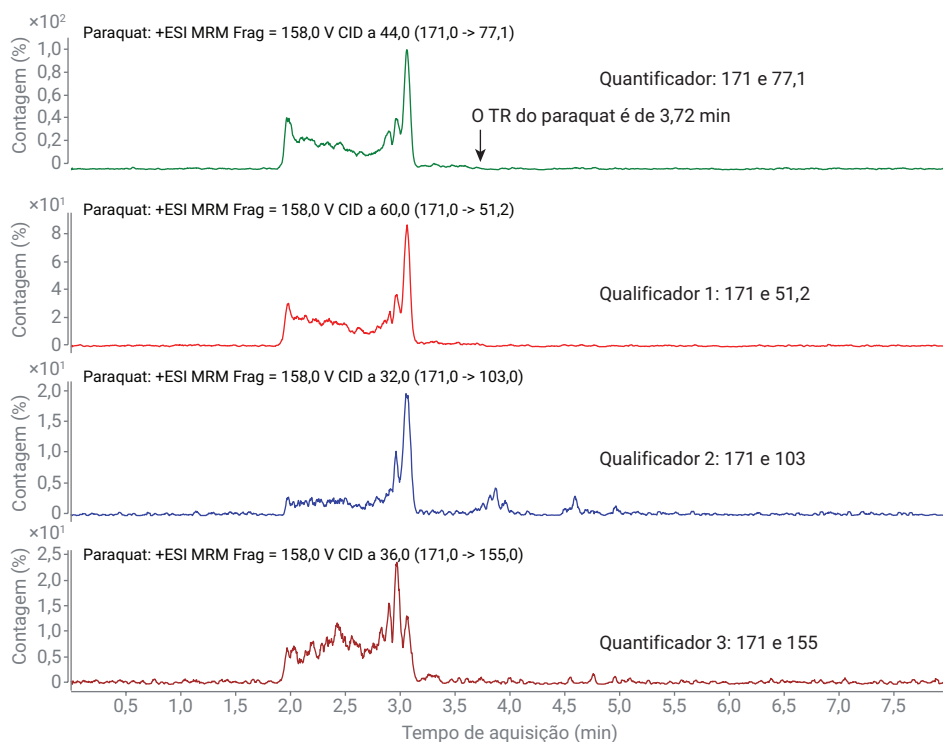


Figura 4. Cromatograma de íons extraído (EIC) da matriz de leite em branco. Cromatogramas mostrando as interferências da matriz entre 2 e 3 minutos.

As curvas de calibração do padrão de procedimento foram criadas e consideradas lineares de 5 a 200 ng/mL tanto na regressão linear quanto em 1/x (Figura 6). Os valores dos coeficientes de regressão ficaram acima de 0,9950.

Os níveis de fortificação foram determinados de acordo com os níveis máximos de resíduos descritos no regulamento do BIS (Bureau of Indian Standards). A % de recuperação foi calculada com base neste experimento. Quatro amostras com adição foram preparadas a 10 ng/mL e injetadas em seis replicatas.

10 ppb = 10 ng/mL de resíduos de pesticida na amostra de leite em 10 mL seriam 100 ng. Portanto, 100 µL de 1 ppm precisam ser adicionados a 10 mL de amostra de leite.

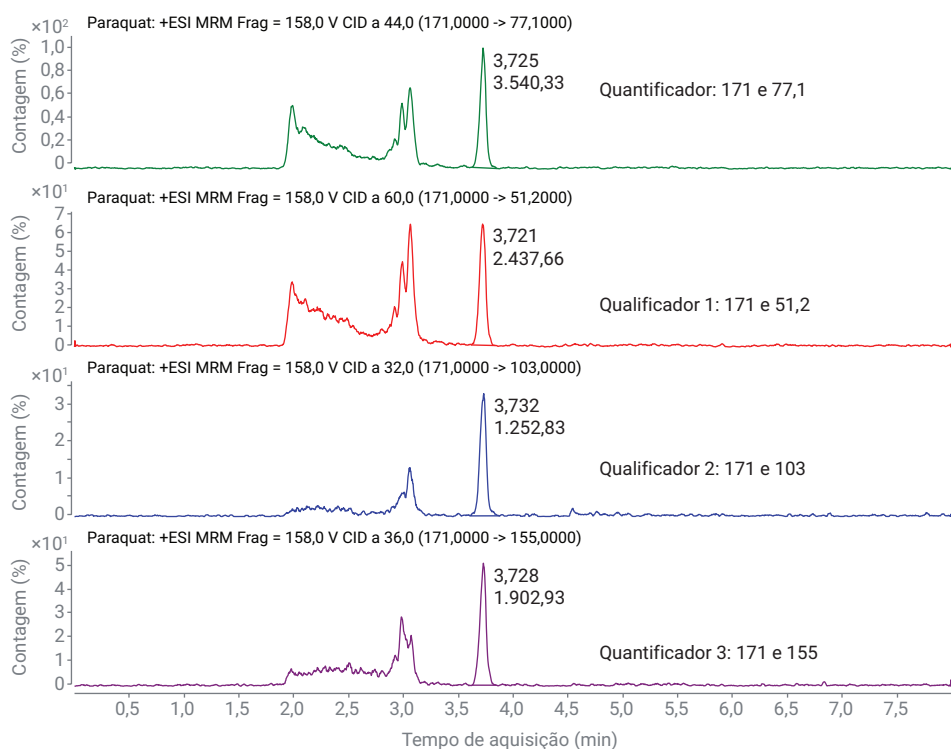


Figura 5. Cromatograma de íons extraído (EIC) do padrão de calibração de procedimento a 10 ng/mL na matriz de leite. Cromatogramas mostrando uma separação clara entre os componentes da matriz e o analito.

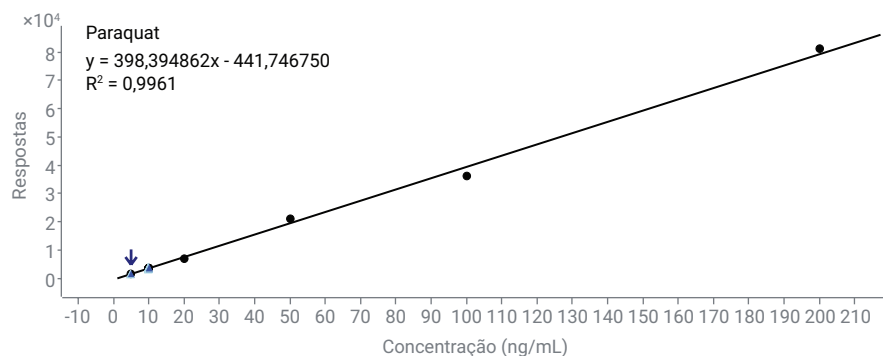


Figura 6. Curvas de calibração do padrão do procedimento de 5 a 200 ng/mL.

Batch Table

Sample: MATRIX BLANK

Sample Type: <All>

Compound: < PARAQUAT

ISTD:

Sample					PARAQUAT...	PARAQUAT Results					Qualifier (171.0 -> 155...		Qualifier (171.0 -> 103...		Qualifier (171.0 -> 51.2...	
①	▼	Name	Type	Level	Exp. Conc.	RT	Resp.	MI	Calc. Conc.	Accuracy	Ratio	MI	Ratio	MI	Ratio	MI
		SOLVENT BLANK	Blank			3.576	8		1.12811532		62.7		57.6			
		MATRIX BLANK	MatrixBlank			3.714	24		1.17023590				60.8			
		MATRIX BLANK	MatrixBlank			3.694	32		1.18887582						126.4	
		MB 5 PPB	Cal	1	5.00000000	3.728	1616		5.16497380	103.3	51.1		23.0		70.7	
		MB 10 PPB	Cal	2	10.00000000	3.732	3532		9.97397532	99.7	55.5		34.9		71.5	
		MB 10 PPB	Cal	2	10.00000000	3.725	3574		10.07974127	100.8	51.5		34.9		68.1	
		MB 10 PPB	Cal	2	10.00000000	3.728	3552		10.02425245	100.2	54.6		32.9		70.4	
		MB 10 PPB	Cal	2	10.00000000	3.725	3630		10.21961238	102.2	52.3		34.2		66.9	
		MB 10 PPB	Cal	2	10.00000000	3.728	3567		10.06315914	100.6	55.2		33.7		67.7	
		MB 10 PPB	Cal	2	10.00000000	3.728	3577		10.08765126	100.9	52.2		31.8		64.4	
		MB 10 PPB	Cal	2	10.00000000	3.728	3491		9.87230830	98.7	55.3		33.2		69.5	
		MB 10 PPB	Cal	2	10.00000000	3.728	3529		9.96707273	99.7	53.9		31.7		68.7	
		MB 20 PPB	Cal	3	20.00000000	3.732	6843		18.28420486	91.4	55.8		33.4		69.2	
		MB 50 PPB	Cal	4	50.00000000	3.725	20971		53.74810549	107.5	52.8		33.1		68.0	
		MB 100 PPB	Cal	5	100.000000...	3.728	36329		92.29618552	92.3	52.3		32.7		68.4	
		MB 200 PPB	Cal	6	200.000000...	3.728	81316		205.218757...	102.6	52.0		31.7		67.8	
		SOLVENT BLANK	Blank			3.770	24		1.16948037				12.9		180.3	
		SOLVENT BLANK	Blank			3.628	8		1.12829932				13.4			
		MATRIX BLANK	MatrixBlank			3.721	20		1.15959948		150.3		41.4		144.3	
		MATRIX BLANK	MatrixBlank			3.718	15		1.14695631		48.2		297.6			
		BRACKETING STD	QC	1	5.00000000	3.728	1543		4.98309177	99.7	56.5		35.7		72.5	
		BRACKETING STD	QC	1	5.00000000	3.728	1505		4.88575379	97.7	58.9		34.4		73.9	
		SPIKE 1-1	QC	2	10.00000000	3.725	3506		9.90841182	99.1	51.0		34.6		68.9	
		SPIKE 1-1	QC	2	10.00000000	3.725	3744		10.50758374	105.1	52.6		33.9		66.1	
		SPIKE 1-1	QC	2	10.00000000	3.725	3641		10.24684913	102.5	52.7		32.6		67.5	
		SPIKE 1-1	QC	2	10.00000000	3.728	3542		10.00009885	100.0	55.9		32.4		67.8	
		SPIKE 1-1	QC	2	10.00000000	3.728	3560		10.04435924	100.4	51.2		36.2		72.2	
		SPIKE 1-1	QC	2	10.00000000	3.725	3617		10.18743517	101.9	51.8		34.4		65.8	
		SPIKE 1-2	QC	2	10.00000000	3.728	3710		10.42198936	104.2	53.5		33.7		68.9	
		SPIKE 1-2	QC	2	10.00000000	3.725	3577		10.08806116	100.9	54.2		37.6		69.9	
		SPIKE 1-2	QC	2	10.00000000	3.728	3518		9.94033772	99.4	57.8		32.8		70.5	
		SPIKE 1-2	QC	2	10.00000000	3.728	3660		10.29570883	103.0	55.0		34.5		68.3	
		SPIKE 1-2	QC	2	10.00000000	3.728	3566		10.06056524	100.6	54.3		33.3		68.7	
		SPIKE 1-2	QC	2	10.00000000	3.725	3551		10.02289310	100.2	52.8		33.6		71.0	
		SPIKE 1-3	QC	2	10.00000000	3.718	4027		11.21807930	112.2	50.9		32.8		70.3	
		SPIKE 1-3	QC	2	10.00000000	3.718	3817		10.69052749	106.9	52.8		32.2		67.4	
		SPIKE 1-3	QC	2	10.00000000	3.718	3622		10.19949171	102.0	55.4		35.5		70.4	
		SPIKE 1-3	QC	2	10.00000000	3.718	3784		10.60788915	106.1	55.4		34.6		67.3	
		SPIKE 1-3	QC	2	10.00000000	3.721	3846		10.76191930	107.6	52.5		34.3		69.7	
		SPIKE 1-3	QC	2	10.00000000	3.721	3600		10.14402026	101.4	52.3		35.1		73.5	
		SPIKE 1-4	QC	2	10.00000000	3.721	3732		10.47674266	104.8	50.9		32.5		70.1	
		SPIKE 1-4	QC	2	10.00000000	3.718	3724		10.45714244	104.6	58.1		36.7		69.6	
		SPIKE 1-4	QC	2	10.00000000	3.714	3770		10.57094762	105.7	55.6		35.1		67.9	
		SPIKE 1-4	QC	2	10.00000000	3.718	3667		10.31215809	103.1	53.7		35.9		70.0	
		SPIKE 1-4	QC	2	10.00000000	3.714	3435		9.73073688	97.3	59.7		39.4		73.1	
		SPIKE 1-4	QC	2	10.00000000	3.718	3700		10.39485800	103.9	58.9		35.2		72.4	

Figura 7. Tabela de calibração mostrando a precisão, recuperação e razão de íons MRM do paraquat em padrões de calibração de procedimento, padrões de suporte e amostras com adição.

Todas as quatro amostras com adição e suas seis replicatas de injeção mostraram uma % de recuperação que varia entre 97% e 112% (Figura 8).

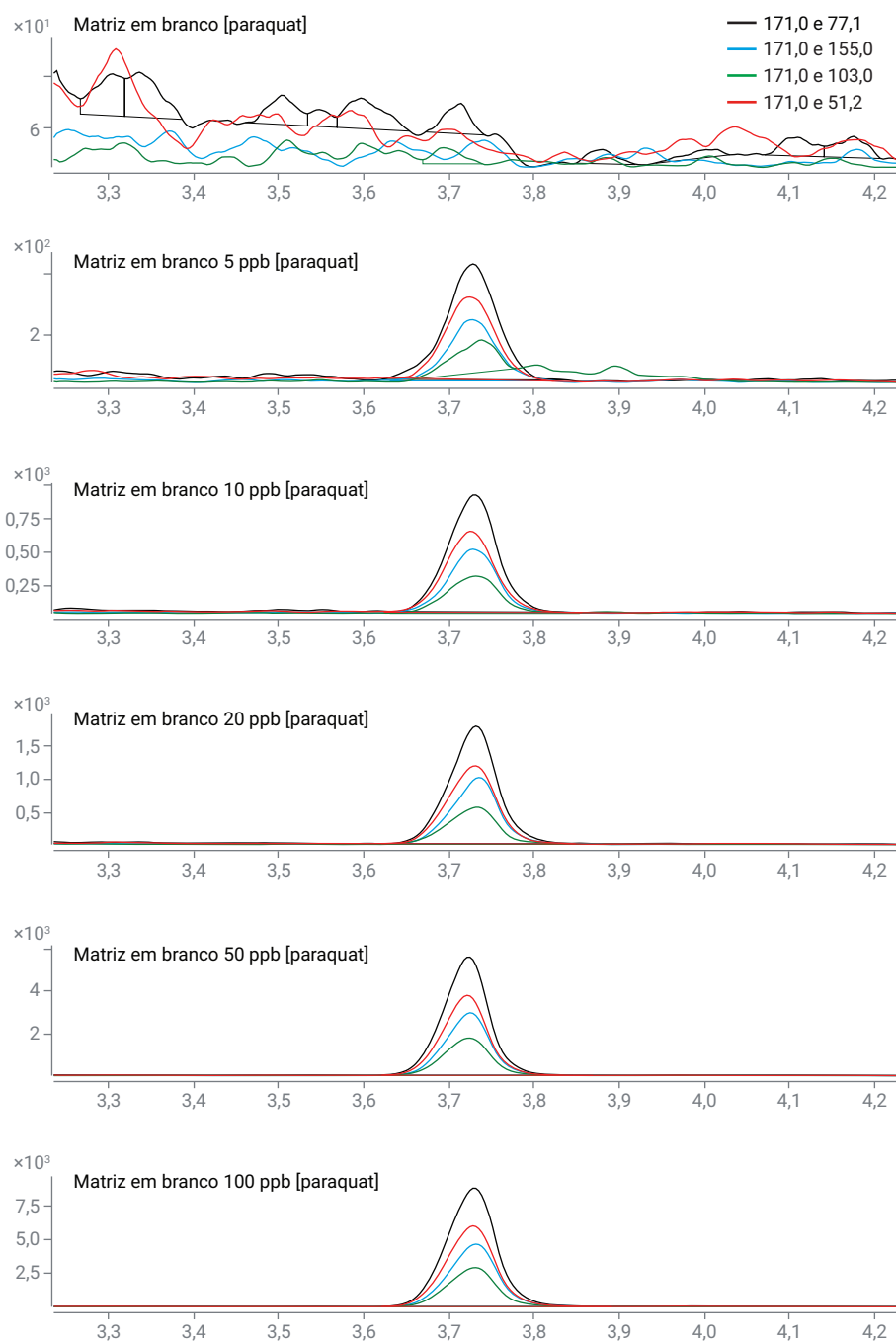


Figura 8. Recurso de visualização rápida de compostos mostrando cromatogramas dos quantificadores e qualificadores dos padrões de calibração usados em linearidade baseada na matriz.

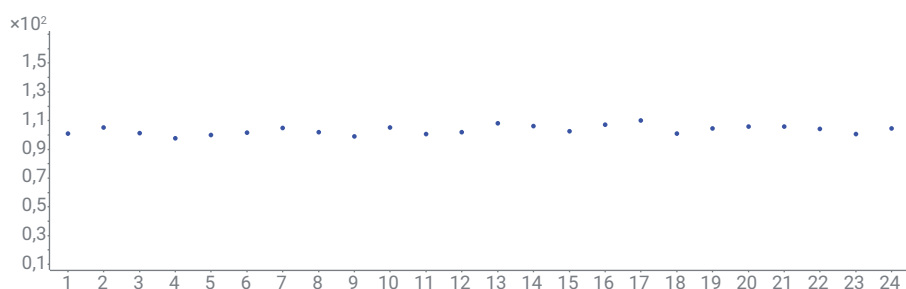


Figura 9. Gráfico de matriz de % de recuperação para quatro amostras com adição preparadas e injetadas em seis replicatas.

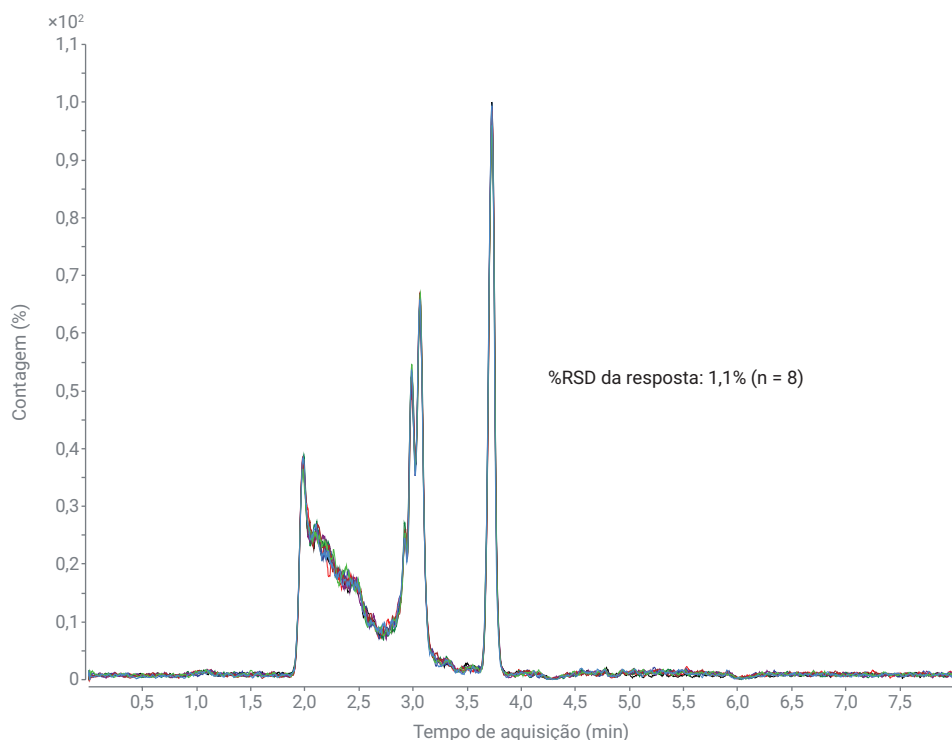


Figura 10. Cromatograma de íons totais sobrepostos do paraquat no padrão de calibração de procedimento a 10 ng/mL em amostra de leite, com %RSD de 1,1% (n = 8).

Conclusão

Um método altamente sensível, seletivo e reprodutível baseado em MRM foi desenvolvido para quantificar resíduos de paraquat na matriz de leite. A extração com QuEChERS e a limpeza de amostras com dSPE foram adotadas para o preparo de amostras. A cromatografia baseada na química HILIC-Z proporcionou uma boa separação entre os componentes da matriz e o analito, o que é essencial para alcançar o desempenho do método. Foi obtida uma recuperação aceitável, com resultados consistentes no nível máximo de resíduos. Este método pode ser adotado para análises de rotina de amostras de leite para a quantificação de resíduos de paraquat.

Referências

1. Paraquat, Diquat, and Mepiquat Analysis in Environmental Water. Nota de aplicação da Agilent Technologies, número de publicação 5994-1307EN, **2019**.
2. Rapid Separation of Paraquat and Diquat Using Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) with LC/MS Detection. Nota de aplicação da Agilent Technologies, número de publicação 5991-8830EN, **2017**.
3. Comprehensive LC/MS/MS Workflow of Pesticide Residues in Food Using the Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS System. Nota de aplicação da Agilent Technologies, número de publicação 5994-2370EN, **2020**.
4. Bedi, J. S. *et al.* Pesticide Residues in Milk and their Relationship with Pesticide Contamination of Feedstuffs Supplied to Dairy Cattle in Punjab (India). *J. Anim. Feed Sci.* **2019**, 27, 18–25.
5. Paraquat and Diquat Analysis in Tea. Nota de aplicação da Agilent Technologies, número de publicação 5994-1453EN, **2019**.

www.agilent.com/chem

DE44314.5761574074

Estas informações estão sujeitas a alterações sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
Impresso nos EUA, 21 de junho de 2021
5994-3596PTBR