

Многокомпонентный анализ следовых количеств пестицидов в черном чае и апельсинах с помощью трехквადрупольной системы ВЭЖХ/МС Agilent 6470В

Авторы

Кайл Коверт (Kyle Covert) и
Ли Фен Ву (Linfeng Wu)
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, California, США

Аннотация

Эти рекомендации по применению описывают методику ВЭЖХ-МС скрининга для определения остатков 244 пестицидов в продуктах питания с помощью трехквадрупольной системы ВЭЖХ/МС Agilent 6470В. Для оценки эффективности скрининга пестицидов были выбраны органические апельсины и черный чай из-за сложного состава этих продуктов. Для апельсинов все, кроме одного, искомые пестициды были обнаружены при концентрациях не выше ПДК, составляющей, в соответствии с решением Европейской комиссии, 10 мкг/кг¹. В сложной матрице черного чая 239 пестицидов были обнаружены при концентрациях не выше 10 мкг/кг. В работе также изучалось влияние матрицы на интенсивность сигналов аналитов. Было показано, что для 50% пестицидов в апельсинах и для 40% пестицидов в черном чае степень извлечения соответствовала требованиям руководства SANTE (от 80 до 120%)². Эти результаты показывают, что трехквадрупольная система ВЭЖХ/МС Agilent 6470В соответствует высоким требованиям к чувствительности для точного и надежного количественного определения пестицидов в сложных матрицах, таких как продукты питания.

Введение

Пестициды широко используются для защиты сельскохозяйственных посевов и в большинстве случаев абсолютно необходимы для того, чтобы добиться хороших урожаев. Однако у потребителей появляется все больше опасений по поводу наличия и количества пестицидов в доступных им продуктах питания. Это сильно беспокоит современную торговлю, в которой продукты питания принято делить на «органические» и «неорганические», а подлинность и наличие примесей могут негативно повлиять на качество органических продуктов. Принятые государственными органами (такими как ЕРА США^{1,3} и Европейская комиссия⁴) нормативы ограничивают применение и остаточное количество пестицидов в продуктах питания, чтобы сделать их безопасными для употребления. Предельно допустимая концентрация (ПДК) — это максимальная концентрация пестицида, допускаемая законом в продуктах питания и животных кормах в случае применения пестицида в соответствии с нормами (надлежащая сельскохозяйственная практика). Как правило, ПДК для продуктов питания находится на уровне единиц мкг/кг (миллиардных долей, ppb) и требует от аналитического оборудования очень высокой чувствительности. В особенности это относится к продуктам питания, таким как черный чай, с большим числом эндогенных веществ, которые могут сильно влиять на определение пестицидов.

Эти рекомендации по применению описывают методику скрининга на базе ВЭЖХ-МС/МС для поиска и количественного анализа 244 пестицидов в различных сложных образцах продуктов питания. В данной работе тестовая смесь пестицидов компании Agilent добавлялась в экстракты органического черного чая и цельного апельсина, соответственно. Затем экстракты подготавливались к анализу по описанному ниже протоколу QuEChERS компании Agilent с использованием дисперсивной твердофазной экстракции (ТФЭ) по методике EN 15662. Пробы

анализировались в режиме динамического мониторинга множественных реакций (dMRM) с помощью ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II и трехквадрупольной системой ВЭЖХ/МС Agilent 6470В. Трехквадрупольная система ВЭЖХ/МС Agilent 6470В включает в себя множество конструктивных усовершенствований, таких как технология заслонки для вакуума (VacShield), позволяющая обслуживать источник ионизации без необходимости сброса вакуума и повысить время работы прибора, а также более быстрая электроника с уменьшенным временем стабилизации, что обеспечивает воспроизводимость хроматографических пиков при очень низких временах задержки.

Экспериментальная часть

Реагенты и стандартные растворы

В работе использовалась тестовая смесь пестицидов различных групп компании Agilent (кат. номер 5190-0551). Восемь отдельных компонентов этой смеси объединялись и разводились ацетонитрилом до рабочей концентрации 10 мкг/г. Данный раствор применяли для добавления в экстракты QuEChERS и для приготовления калибровочных стандартов. Для определения пределов обнаружения метода (MDL) и нижнего предела количественного обнаружения (НПКО) в матрицах продуктов питания были приготовлены семь калибровочных стандартов с концентрацией от 0,5 до 100 ppb в экстрактах черного чая и органических апельсинов.

Степень чистоты всех реагентов и растворителей соответствовала чистоте для ВЭЖХ или ВЭЖХ/МС. Ацетонитрил и метанол были приобретены в компании Honeywell (Морристаун, Нью-Джерси, США). Вода высшей степени очистки была получена с применением системы Milli-Q Integral, оборудованной картриджем доочистки LC-Pak и мембранным фильтром с размером пор 0,22 мкм (EMD Millipore, Биллерика, Массачусетс, США). Муравьиная кислота и формиат аммония были приобретены в компании Fluka (Sigma-Aldrich Corp., Сент-Луис, Миссури, США).

Пробоподготовка

Органический листовой черный чай и экологически чистые апельсины были приобретены в местном магазине продуктов. 2 г чая смачивались 8 мл воды и настаивались 2 ч при комнатной температуре. Для гомогенизации апельсинов использовался керамический гомогенизатор (кат. номер 5982-9312). От гомогенизата для дальнейшей экстракции отбирались 10 г. 2 г подготовленного чая и 10 г гомогенизата апельсинов экстрагировались 10 мл ацетонитрила при интенсивном встряхивании в течение 1 мин. К каждой смеси добавлялся один пакет смеси солей Agilent для экстракции по методике EN 15662 (кат. номер 5982-6650), после чего смесь встряхивалась в течение 1 мин и затем центрифугировалась при 3 000 g в течение 5 мин. Для чая: 6 мл надосадочной жидкости (супернатанта) добавлялись в пробирки с дисперсивным сорбентом Agilent для ТФЭ матриц с высоким содержанием пигментов по методу QuEChERS (методика EN 15662) (кат. номер 5982-5356). Для апельсинов: 6 мл надосадочной жидкости (супернатанта) добавлялись в пробирки с дисперсивным сорбентом Agilent для ТФЭ окрашенных фруктов и овощей по методу QuEChERS (методика EN 15662) (кат. номер 5982-5256). Обе пробы встряхивались в течение 1 мин и затем центрифугировались при 3 000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочная жидкость (супернатант) отбиралась и пропусклась через шприцевой фильтр с размером пор 0,45 мкм. Ранее приготовленный рабочий раствор пестицидов добавлялся в экстракты черного чая и апельсинов в концентрации 100 нг/г (ppb, в пересчете на сухую массу исходного продукта). Далее этот экстракт разводился соответствующим количеством экстракта без пестицидов, чтобы получить семь калибровочных растворов с концентрациями 0,5, 1, 5, 10, 20, 50 и 100 ppb. Эти растворы готовились непосредственно перед анализом, и каждый из них анализировался шесть раз. Для проверки влияния обеих матриц рабочий раствор пестицидов разводился чистым ацетонитрилом до концентрации 10 нг/г.

Оборудование

Разделение выполнялось на системе ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II, состоящей из следующих модулей:

- градиентный насос Agilent 1290 Infinity II High-Speed Pump (G7120A);
- автосамплер Agilent 1290 Infinity II Multisampler с термостатом (G7167A, опция № 100);
- многоколоночный термостат Agilent 1290 Infinity II (G7116B).

Система ВЭЖХ была соединена с трехквадрупольной системой ВЭЖХ-МС Agilent 6470В (G6470В), оборудованной источником ионизации с технологией Agilent Jet Stream (G1958-65638). Для сбора и обработки данных использовались программы Agilent MassHunter Acquisition (версии 10.1) и Agilent MassHunter Quantitative Analysis (версии 10.1), соответственно.

Методики

Параметры ВЭЖХ/МС приведены в табл. 1. Параметры режима MRM, такие как полярность, родительские и дочерние ионы, а также энергии соударений, были скопированы из имеющихся методик. Параметры источника ионизации были оптимизированы для некоторых плохо ионизируемых аналитов. Сбор данных производился в режиме dMRM с быстрым переключением полярности. Для анализа в систему ВЭЖХ/МС вводились 2 мкл подготовленного экстракта. Калибровочная кривая строилась с весовым коэффициентом 1/х и без учета точки начала координат.

Таблица 1. Параметры системы ВЭЖХ/МС.

Система ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II	
Колонка	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 3,0 × 100 мм, 1,8 мкм (кат. номер 959758-302)
Температура колонки	40 °С
Объем вкола	2 мкл
Температура проб в автосамплере	4 °С
Промывка иглы	10 с в порте для промывания (75/25 метанол/Н ₂ О)
Подвижная фаза	А) 5 ммоль/л формиата аммония + 0,1% муравьиной кислоты в Н ₂ О В) 5 ммоль/л формиата аммония + 0,1% муравьиной кислоты в метаноле
Скорость потока	0,400 мл/мин
Программа градиента	Время В % 0,00 5 0,50 5 2,00 40 13,00 98 14,50 98 14,60 5
Время промывки колонки после анализа	2 мин

Трехквадрупольная система ВЭЖХ/МС Agilent 6470В	
Источник ионизации	С технологией Agilent Jet Stream (AJS)
Полярность	Положительная и отрицательная
Температура газа	225 °С
Газ-осушитель (азот)	11 л/мин
Давление в распылителе	30 psi
Фокусирующий газ	350 °С
Расход фокусирующего газа	12 л/мин
Напряжение на капилляре	±3500 В
Напряжение сопла	±500 В
Режим сканирования	Динамический MRM (dMRM)
Разрешение квадруполей Q1/Q2	Одна единица (0,7 а.е.м.)
Дельта напряжения умножителя	±200 В
Ускорительное напряжение ячейки соударений	от 3 до 7 В
Продолжительность цикла измерения	500 мс

Результаты и их обсуждение

Методика с динамическим MRM и быстрым разделением

Методика скрининга на большое количество пестицидов, разработанная для предыдущей модели трехкврупольного ВЭЖХ-МС Agilent (G6470A), была

непосредственно использована и для трехкврупольной системы ВЭЖХ-МС Agilent 6470B (G6470B). Так как раньше колонка и система ВЭЖХ были другими и это вызвало небольшой сдвиг времен удерживания для всех пестицидов, то для их автоматической корректировки была использована функция обновления параметров режима dMRM пакета ПО MassHunter. На рис. 1 показаны наложенные друг на друга хроматограммы MRM

244 пестицидов, добавленных в экстракт апельсина в концентрации 1 нг/г. Для пестицидов со слабым откликом масштаб по оси Y увеличен. Градиент ВЭЖХ продолжительностью 14,5 мин позволил разделить все пики на сложных хроматограммах MRM до базовой линии. Нижний предел количественного определения для большинства пестицидов был равен 10% ПДК по умолчанию.

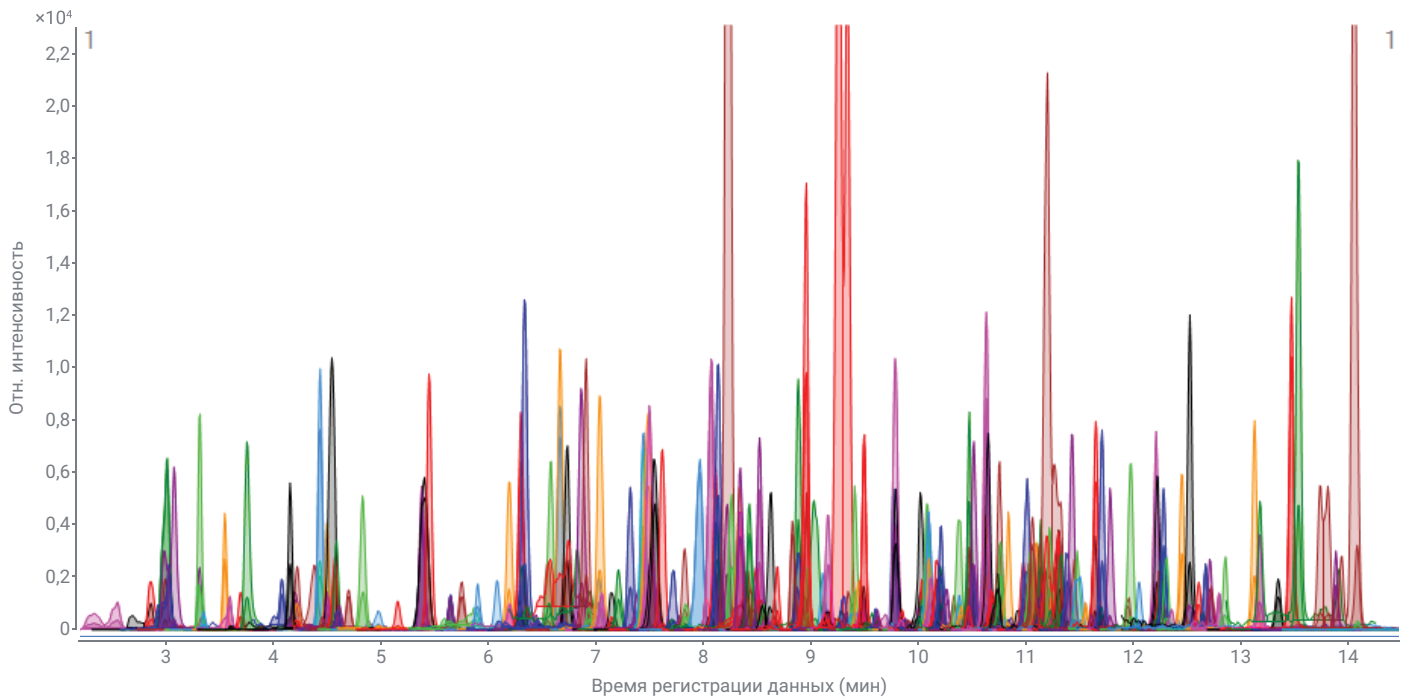


Рис. 1. Наложённые друг на друга хроматограммы MRM 244 пестицидов, добавленных в экстракт апельсина в концентрации 1 нг/г. Для пестицидов со слабым откликом масштаб по оси Y увеличен.

Анализ калибровочной кривой

Точность и разброс результатов многокомпонентного количественного анализа пестицидов оценивались в обеих матрицах, черного чая и апельсина, построением калибровочной кривой для семи стандартов с концентрацией от 0,5 до 100 нг/г, каждый из которых анализировался шесть раз (n = 6). В эксперименте был получен

очень низкий разброс результатов с относительным стандартным отклонением (ОСО) менее 20% для концентраций не ниже нижнего предела количественного определения, а также удовлетворительная точность с рассчитанной концентрацией в диапазоне от 80 до 120% ожидаемой для концентраций не ниже нижнего предела количественного определения. Коэффициенты корреляции (R^2) для

калибровочных кривых были выше 0,99 для всех 244 пестицидов в экстракте апельсина и для 230 из 244 пестицидов в экстракте черного чая. Низкие значения R^2 (< 0,99) для 14 пестицидов в экстракте черного чая указывают на сильное влияние матрицы. Калибровочные кривые для четырех типичных пестицидов в матрице черного чая показаны на рис. 2.

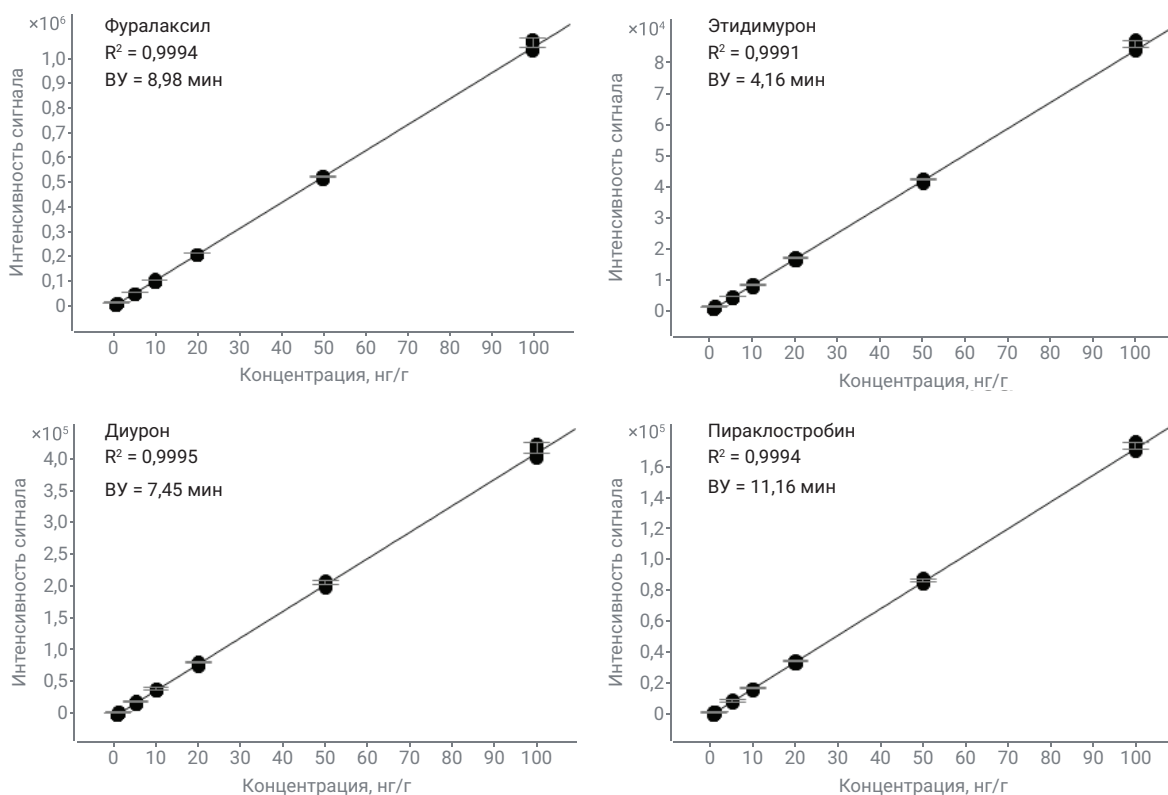


Рис. 2. Калибровочные кривые фурааксила, этидимурона, диурона и пиракlostробина в матрице черного чая.

В данном исследовании при использовании описанного протокола скрининга трехквартупольная система ВЭЖХ-МС Agilent 6470В была способна обнаружить все пестициды (отношение сигнал-шум выше 3) в матрице апельсина при концентрации ниже 10 мкг/кг. В матрице черного чая при концентрации не выше 10 мкг/кг были обнаружены все соединения за исключением одного (босклид). Из калибровочных кривых определялся нижний предел количественного определения каждого из пестицидов в исследованных матрицах, в качестве которого бралась концентрация самого разведенного из калибровочных стандартов, для которого точность была в диапазоне от 80 до 120%, а ОСО — менее 20% для площадей пиков во всех шести повторениях. На рис. 3 показана сводная диаграмма нижних пределов количественного определения для пестицидов в матрицах черного чая и апельсина. Улучшенная трехквартупольная система ВЭЖХ/МС Agilent 6470В позволяет проводить количественный анализ большинства исследованных пестицидов в матрицах черного чая и апельсина в концентрациях ниже ПДК 10 мкг/кг, определенного Европейской комиссией⁴: 239 из 244 пестицидов в черном чае и 243 из 244 пестицидов в апельсинах имели нижний предел количественного определения не выше 10 нг/г. Все соединения, для которых ЕРА США установило определенные ПДК³, определялись количественно в концентрациях не выше этого ПДК.

Степень обнаружения пестицидов в матрицах продуктов питания

Чтобы оценить влияние матрицы (подавление и усиление ионизации), для каждого пестицида рассчитывалась степень извлечения. Для этого отклик пестицида в матрице при концентрации 10 мкг/кг (ПДК по умолчанию) сравнивался с откликом этого же пестицида в чистом ацетонитриле при этой же концентрации (рис. 4). В матрице апельсина порядка 50% соединений показали степень обнаружения, соответствующую требованиям руководства SANTE (от 80 до 120%). Для матрицы черного чая этим требованиям соответствовали около 40% соединений². Как и ожидалось, влияние матрицы черного чая оказались намного сильнее, чем в случае апельсина. Поэтому для образцов с сильным влиянием матрицы, как правило, рекомендуется готовить калибровочные стандарты в этой же матрице для учета ее влияния. Согласно данным холостого анализа матрицы, 12 пестицидов уже присутствовали в оригинальных образцах черного чая и апельсинов, несмотря на то что в местном супермаркете они были куплены как органические.

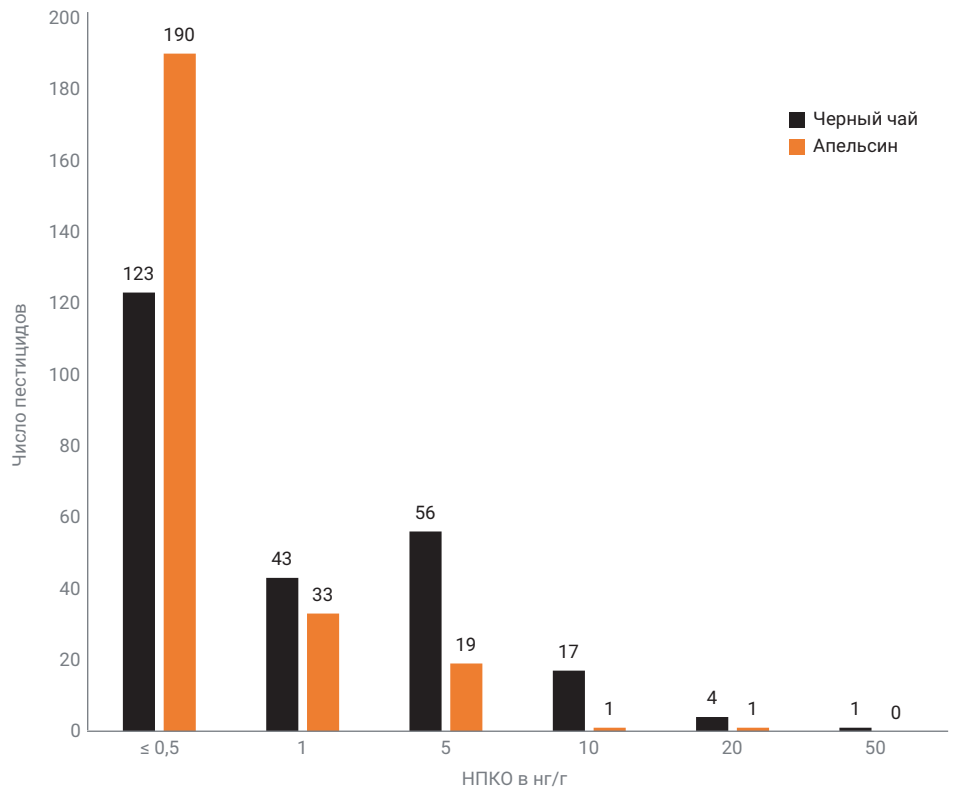


Рис. 3. Нижний предел количественного определения пестицидов в матрицах черного чая и апельсина.

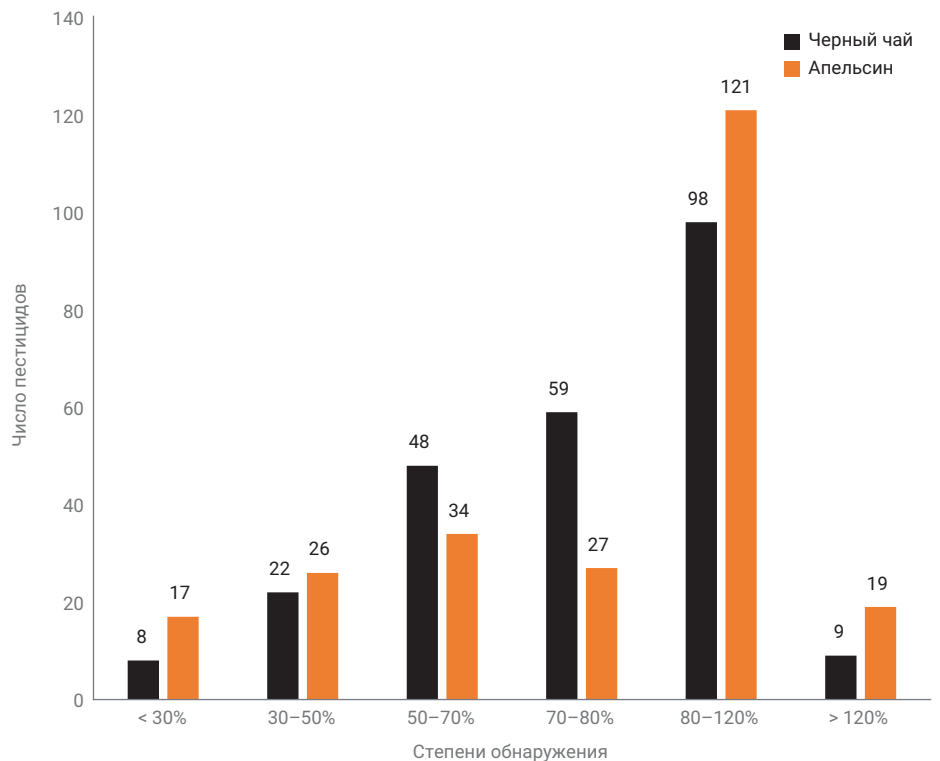


Рис. 4. Гистограмма степеней извлечения пестицидов в матрицах черного чая и апельсина при концентрации 10 мкг/кг (ПДК по умолчанию).

Выводы

В эксперименте были исследованы параметры количественного анализа 244 пестицидов в матрице продуктов питания методом ВЭЖХ-МС с использованием системы ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II с трехкврупольной системой ВЭЖХ/МС Agilent 6470В с высокочувствительным источником ионизации с технологией Jet Stream (AJS). Кроме того, трехкврупольная система ВЭЖХ/МС Agilent 6470В оснащена технологией заслонки для вакуума (VacShield) и улучшенной тонко настроенной электроникой, которые превращают ее в надежную и легко обслуживаемую систему для продолжительной работы и для случаев, требующих исключительной надежности и чувствительности.

В работе исследовались матрицы двух продуктов питания: черного чая и апельсинов. К нашему удивлению, продукты, купленные в местном супермаркете как органические, содержали ряд синтетических пестицидов. Для обоих продуктов при сравнении откликов аналитов с откликами этих же аналитов в чистом ацетонитриле влияние матрицы было очевидным.

В сложной матрице более 98% из 244 исследованных пестицидов имели нижний предел количественного определения не ниже 10 мкг/кг (ПДК по умолчанию, определенный Европейской комиссией), показывая тем самым высокую чувствительность используемой платформы ВЭЖХ/МС. Степень обнаружения рассчитывалась путем сравнения отклика пестицида в матрице по сравнению с откликом этого же пестицида в чистом ацетонитриле. В матрице апельсина порядка 50% соединений показали степень извлечения, соответствующую требованиям руководства SANTE (от 80 до 120%). В матрице черного чая этим требованиям соответствовали около 40% соединений.

Литература

1. Свод федеральных законоположений США, том 7, часть 205. Агентство по охране окружающей среды США (EPA). <https://www.ecfr.gov/> по сост. на 9 апреля **2020 г.**
2. SANTE/12682/2019, Европейская комиссия. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf по сост. на 20 апреля **2020 г.**
3. Свод федеральных законоположений США, том 40, часть 180. Агентство по охране окружающей среды США (EPA). <https://www.ecfr.gov/> по сост. на 9 апреля **2020 г.**
4. Регламент (ЕС) № 396/2005. Европейская комиссия. <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/> по сост. на 9 апреля **2020 г.**

www.agilent.com/chem

DE.6638541667

Информация в этом документе может быть изменена
без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2020
Напечатано в США 14 мая 2020 г.
5994-1973RU

