



Многокомпонентный анализ остатков пестицидов в авокадо с помощью Agilent Bond Elut EMR—Lipid методом ГХ-МС-МС.

Рекомендации по применению

Анализ продуктов питания и сельское хозяйство

Авторы

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

Аннотация

Продукты для усовершенствованной очистки матрицы — удаление —липидов (EMR—Lipid) Bond Elut QuEChERS производства Agilent — материалы для пробоподготовки следующего поколения, которые используются в удобной дисперсионной твердофазной экстракции (дТФЭ) для высокоселективного удаления матрицы без влияния на извлечение определяемого вещества, особенно для проб с высоким содержанием жиров. В данном исследовании показана методика применения этих инновационных продуктов для анализа 23 подходящих для ГХ пестицидов в авокадо с помощью ГХ-МС-МС. Процедура включает извлечение по методу QuEChERS, признанному AOAC, с последующей дТФЭ EMR—Lipid и использованием солей для дополнительной очистки. По сравнению с C18/ПВА и сорбентами на основе оксида циркония EMR—Lipid обеспечивает намного лучшую очистку матрицы по весу, полное сканирование ГХ-МС и определение воздействия матрицы. Кроме того, в аналитический тракт попадает меньше матрицы. Полученные данные также демонстрируют значительно повышенную воспроизводимость для определяемых веществ при более чем 100 вводах по сравнению с C18/ПВА и в особенности с оксидом циркония, для которых характерны значительные отклонения откликов. EMR—Lipid имеет высокую селективность для липидов и не оказывает отрицательного воздействия на восстановление определяемых веществ. Степени извлечения определяемых веществ высоки, а точность — выдающаяся. Эта работа демонстрирует, что дТФЭ EMR—Lipid подходит для процесса QuEChERS и позволяет обеспечить быструю, надежную и эффективную пробоподготовку с наиболее полной очисткой матрицы при многокомпонентном анализе пестицидов в авокадо.



Agilent Technologies

Введение

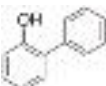
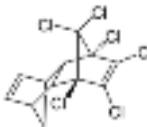
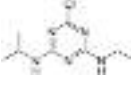
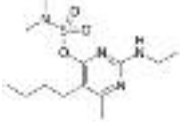
Анализ остаточных количеств пестицидов в пищевых продуктах — рутинный анализ для многих лабораторий, которые используют быстрый, простой, бюджетный, эффективный, надежный и безопасный метод пробоподготовки QuEChERS [1,2]. Это позволяет провести анализ содержания сотен пестицидов в малых концентрациях 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, устанавливаемым государственными органами для контроля безопасности пищевых продуктов.

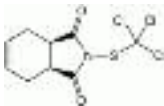
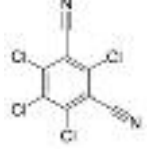
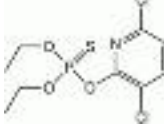
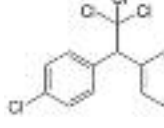
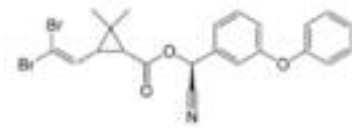
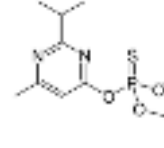
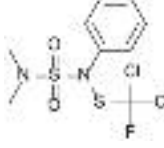
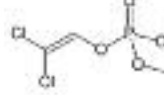
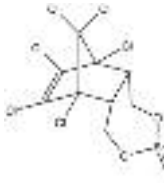
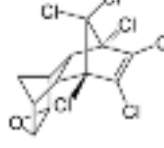
В ходе анализа может использоваться комбинация жидкостной и газовой хроматографии, что позволяет анализировать содержание летучих, полунлетучих и нелетучих пестицидов с применением многих методов, с применением методов, рассчитанных на остатки пестицидов различных классов [4]. Несмотря на то, что для большого количества пестицидов подходят и ЖХ, 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.

Agilent Bond Elut EMR—Lipid — инновационный сорбент, который селективно удаляет основные классы липидов из экстракта пробы без нежелательной потери анализируемого вещества. Удаление помех от липидов в сложных матрицах особенно важно для QuEChERS, где с целевыми веществами экстрактируется большое количество матрицы. Из-за высокого содержания липидов (от 15 до 20%) авокадо известен как сложная матрица, и поэтому он был выбран как показательная проба для оценки EMR—Lipid. В этой работе проводится исследование пробоподготовки для анализа 23 подходящих для ГХ пестицидов в авокадо с применением метода QuEChERS, признанного ассоциацией AOAC, с последующей дТФЭ EMR—Lipid и солей для дополнительной очистки. Для расширения сферы применения были выбраны пестициды из 10 различных классов (таблица 1). В этой методической информации показана исключительная чистота, которая обеспечивается EMR—Lipid для сложных проб с высоким содержанием жиров, таких как авокадо, а также высокая степень извлечения и точность для остатков 23 пестицидов на трех уровнях.

Таблица 1. Целевые вещества, класс, log P, растворимость в воде и химическое строение [11].

Название	Категория	Log P	Растворимость в воде (мг/л)	Молекулярная формула	Структура
2-фенилфенол	Фенол	3,18	560	C ₁₂ H ₁₀ O	
Алдрин	Органохлоридный	6,5	0,003	C ₁₂ H ₈ Cl ₆	
Атразин	Триазин	2,7	33	C ₈ H ₁₄ Cl ₅	
Бупирипат	Пиримидинол	2,2	22	C ₁₃ H ₂₄ N ₄ O ₃ S	

Название	Категория	Log P	Растворимость в воде (мг/л)	Молекулярная формула	Структура
Каптан	Фталимид	2,5	5,1	$C_9H_8Cl_3NO_2S$	
Хлороталонил	Хлорнитрил	2,94	1,0	$C_8H_4N_2$	
Хлорпирифос-метил	Органофосфат	4,0	2,74	$C_7H_7Cl_3NO_3PS$	
ДДТ	Органохлорин	6,91	0,006	$C_{14}H_9Cl_5$	
Дельтамерин	Пиретроид	4,6	0,0002	$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$	
Диазинон	Органофосфат	3,69	60	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	
Дихлорфлуанид	Сульфамид	3,7	1,3	$C_9H_{11}Cl_2FN_2O_2S_2$	
Дихлофос	Органофосфат	1,9	18 000	$C_4H_7Cl_2O_4P$	
Эндосульфана сульфат	Органохлорин	3,13	0,48	$C_9H_6Cl_6O_3S$	
Эндрин	Органохлорин	3,2	0,24	$C_{12}H_8Cl_6O$	

Название	Категория	Log P	Растворимость в воде (мг/л)	Молекулярная формула	Структура
Эталфлуралин	Динитроанилин	5,11	0,01	$C_{13}H_{14}F_3N_3O_4$	
Фолпет	Фталимид	3,02	0,8	$C_9H_4Cl_3NO_2S$	
Ипродион	Дикарбосимид	3,1	12,0	$C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$	
Линдан	Органохлорин	3,5	8,52	$C_6H_6Cl_6$	
Перметрин	Пиретроид	6,1	0,006	$C_{21}H_{20}Cl_2O_3$	
Прозимидон	Дикарбосимид	3,3	2,46	$C_{13}H_{11}Cl_2NO_2$	
Сульфотеп	Органофосфат	3,99	10	$C_8H_{20}O_5P_2S_2$	
Толифлуанил	Сульфамид	3,9	0,9	$C_{10}H_{13}Cl_2FN_2O_2S_2$	
Трихлофон	Органофосфат	0,43	120 000	$C_4H_8Cl_3O_4P$	

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). Химически чистая уксусная кислота, стандарты пестицидов и внутренние стандарты были куплены в корпорации Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США).

Растворы и стандарты

1-процентный раствор уксусной кислоты в ацетонитриле (ACN) готовили путем добавления 10 мл уксусной кислоты к 990 мл ацетонитрила (ACN). Базовые растворы стандартов и внутренних стандартов готовились в ацетонитриле или метаноле при 2,0 мг/мл. Комбинированный рабочий раствор был приготовлен в ацетонитриле при 25 мкг/мл для всех, кроме каптана, фолпета, трихлорфона и бупиримата. Из-за относительно низкого отклика в приборе, концентрация для тех четырех соединений в комбинированном рабочем растворе была сделана в пять раз выше и составила 125 мкг/мл. В ацетонитриле была приготовлена аликвота комбинированного внутреннего стандарта при 25 мкг/мл, включая тиаминпиррофосфат, паратион этил d_{10} и ^{13}C -ДДТ.

Оборудование

Для пробоподготовки использовались следующие оборудование и материалы:

- Geno/Grinder (SPEX, Метучен, Нью-Джерси, США);
- Центрифуга Centra CL3R (Thermo IEC, Массачусетс, США)
- Микроцентрифуга Eppendorf (Brinkmann Instruments, Вестбери, Нью-Йорк, США)
- Обычный вортекс и вортекс для нескольких пробирок (VWR, Раднор, шт. Пенсильвания, США)
- Дозирующая насадка (VWR, Южный Плейнфилд, Нью-Джерси, США)
- Пипетки и автоматический дозатор Eppendorf
- Пробирки Agilent Bond Elut EMR—Lipid (номер по каталогу 5982-1010) и Agilent Bond Elut Final Polish для пробирок Enhanced Matrix Removal—Lipid (номер по каталогу 5982-0101)

Оборудование

Анализ проводился на ГХ Agilent 7890A с установленным пробоотборником Agilent 7693B и системой ГХ-МС Agilent серии 7000 с тройным квадруполом. Использовалась обратная продувка колонки, что настоятельно рекомендуется для матриксов сложного состава [12]. Общее время работы для разбавленных со стандартом проб составило 23 минуты, включая две минуты на обратную продувку колонки.

Параметры оборудования

Параметры ГХ

Автосамплер:	Автосамплер Agilent 7693 и шприц объемом 10 мкл для лотка для проб (номер по каталогу G4513-80220), объем ввода 1 мкл Три промывки после ввода с использованием растворителя А (ацетонитрил) Три насоса для проб Три промывки после ввода с использованием растворителя В (изопропанол)
Колонка:	Agilent J&W DB-5ms Ultra Inert, 0,25 мм Ч 15 м, 0,25 мкм (номер по каталогу 122-5512UI)
Носитель:	Гелий, постоянное давление
Газовый фильтр:	Набор для фильтрации газа Gas Clean, 1/8 дюйма (номер по каталогу CP17974)
Лайнер испарителя:	Лайнер Agilent Ultra Inert с одним сужением, без деления потока, со стекловолокном (номер по каталогу 5190-2293)
Испаритель:	Универсальный многорежимный испаритель (ММИ) в холодном режиме пульсации без деления потока, начальная температура 75 °С, удержание в течение 0,02 мин, затем повышение до 350 °С со скоростью 750 °С/мин.
Давление в режиме пульсации:	36 фунт/кв. дюйм до 0,75 мин
Продувка регулятора деления потока:	60 мл/мин в течение 0,75 мин
Входное давление:	17 фунт/кв. дюйм во время обработки и 1,0 фунт/кв. дюйм по время обратной продувки
Термостат:	60 °С в течение 2,57 мин, затем до 150 °С при 50 °С/мин, до 200 °С при 6 °С/мин, до 300 °С при 16 °С/мин и удержание в течение 3 мин
После испытаний:	2 мин при 300 °С
Технология капиллярных потоков:	Purged Ultimate Union (номер по каталогу G3182-61581) — для обратной продувки аналитической колонки и испарителя.
Вспом. газ в системе электронного управления пневматикой:	Гелий, подведенный к Purged Ultimate Union
Выпускной трубопровод:	Внешний диаметр 0,0625 дюйма x внутренний диаметр 0,010 дюйма x 100 см, 316 послед. соед., поверх термостата
Доп. давление:	4 фунт/кв. дюйм во время обработки и 75 фунт/кв. дюйм по время обратной продувки
Соединения:	Между испарителем и Purged Ultimate Union
Рестриктор:	Инертная трубка из плавленого кварца, 0,65 м x 0,15 мм (номер по каталогу 160-7625-5)
Соединения:	Между Purged Ultimate Union и МСД

Параметры МСД

МСД:	ГХ-МС Agilent серии 7000С с тройным квадруполом, инертный, с электронными компонентами для производительности
Вакуумный насос:	Турбо для производительности
Режим:	MRM
Файл настройки:	Atune.u
Температура транспортной линии:	280 °С
Температура источника:	300 °С
Температура квадруполя:	150 °С для Q1 и Q2
Задержка для устранения эффектов растворителя:	2,57 мин
Поток газа для соударений:	Гелий в качестве гасящего газа с расходом 2,35 мл/мин, газ для соударений N_2 с расходом 1,5 мл/мин
Разрешение МС:	Разрешение MS1 и MS2 = 1,2 ед.

Параметры MRM легко оптимизировались для каждого определяемого вещества с использованием базы данных MRM для пестицидов и экотоксикантов Agilent (G9250AA), которая содержит условия МС-МС и время удерживания для более чем

1070 соединений [13]. В таблице 2 показаны MRM-переходы для всех исследуемых в данной работе целевых веществ. Пример типичной хроматограммы ГХ-МС-МС для 23 исследуемых пестицидов приведен на рис. 1.

Таблица 2. Условия ГХ-МС-МС MRM и время удерживания для анализа пестицидов.

Определяемое вещество	Время удерживания (мин)	MRM			Эн. соудар. (В)
		Канал качественной оценки	Эн. соудар. (В)	Канал количественной оценки	
дихлофос	4,70	184,9 → 93	10	109 → 79	5
Трихлорфон	5,94	110,8 → 47	30	81,8 → 47	50
2-фенилфенол	6,39	169 → 115,1	25	170 → 141,1	25
Эталфлуралин	7,58	275,9 → 202,1	15	315,9 → 275,9	10
Сульфотеп	7,83	237,8 → 145,9	10	201,8 → 145,9	10
Атразин	8,69	214,9 → 58,1	10	214,9 → 200,2	5
Линдан	8,83	181 → 145	15	216,9 → 181	5
Хлороталонил	9,20	263,8 → 168	25	265,8 → 231	20
Диазинон	9,22	137,1 → 54	20	199,1 → 93	20
Хлорпирифос-метил	10,30	285,9 → 92,9	20	124,9 → 47	15
Дихлорфлуанид	11,31	223,9 → 123,1	20	123 → 77	20
Альдрин	11,55	262,9 → 192,9	35	254,9 → 220	35
Паратион этил D ₁₀ (IS)	11,96	98,7 → 67	10	114,9 → 82,9	20
Толилфлуонид	12,80	136,9 → 91	20	136,9 → 65	30
Каптан	12,96	151 → 79,1	15	149 → 79,1	10
Форпет	13,13	259,8 → 130,1	15	261,8 → 130,1	15
Процимидон	13,13	282,8 → 96	10	96 → 67,1	10
Бупиримат	15,44	272,9 → 193,1	15	272,9 → 108	5
Эндрин	15,68	316,7 → 280,8	5	244,8 → 173	30
Эндосульфан сульфат	17,44	273,9 → 238,9	15	271,9 → 237	15
¹³ С-ДДТ (IS)	17,69	246,5 → 177,1	15	248,5 → 177,1	15
ДДТ	17,69	235 → 165,2	20	237 → 165,2	20
Тиаминпирозфосфат (IS)	18,20	325,9 → 169	30	325,9 → 233	27
Ипродион	18,82	313,8 → 55,9	20	187 → 124	25
Перметрин	20,68	183,1 → 153,1	15	183,1 → 153,1	15
Дельтамерин	22,51	252,9 → 93	15	181 → 152,1	25

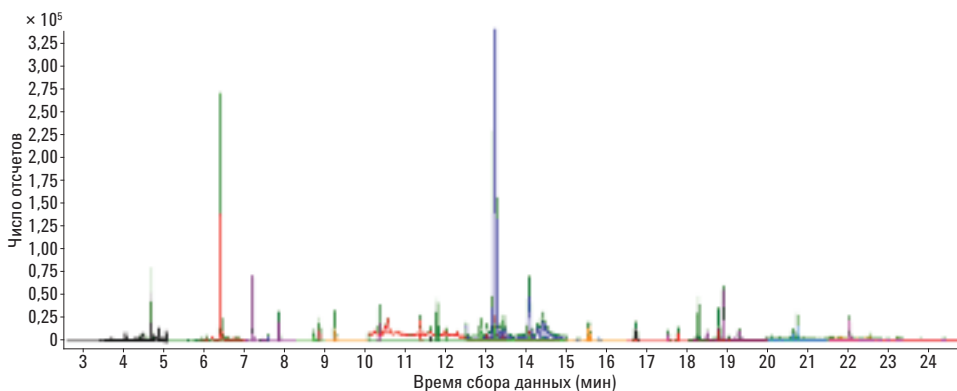


Рис. 1. Типичная хроматограмма для трехквадрупольной ГХ (MRM) для пробы авокадо, обогащенной стандартом пестицида с 50 нг/г. Использовалась пробоподготовка для QuEChERS с последующей очисткой Agilent Bond Elut EMR—Lipid.

Пробоподготовка

Конечная процедура пробоподготовки была оптимизирована следующим образом:

1. Поместить 15 г ($\pm 0,1$ г) гомогенизированного авокадо в центрифужные пробирки объемом 50 мл.
2. Добавить 15 мкл ацетонитрила (1%) и перемешивать в течение 10 секунд.
3. Добавить пакет с солью для экстракции AOAC.
4. Смешивать в механической мешалке в течение 2 минут.
5. Поместить в центрифугу и экстрагировать при 5000 об/мин в течение 5 минут.
6. Добавить 5 мл воды в 15 мл пробирку для дТФЭ EMR—Lipid и поместить 5 мл надосадочной жидкости в пробирку EMR—Lipid.
7. Сразу же перемешать для распределения пробы, а затем в течение еще 60 секунд перемешивать вместе с остальными пробирками в многопробирочном вортексе.
8. Центрифугировать при 5000 об/мин в течение 3 минут.
9. Переместить 5 мл надосадочной жидкости в пробирки для дополнительной очистки 15 мл пробирку EMR—Lipid с 2 г солей (1:4, NaCl:MgSO₄) и перемешивать в течение 1 мин.
10. Центрифугировать при 5000 об/мин в течение 3 минут.
11. Переместить верхний слой ацетонитрила во флакон для проб для ввода ГХ-МС-МС.

На рис. 2 показан полный процесс пробоподготовки.

Калибровочный стандарт и контрольные пробы

После шага 1 предварительно разбавленные контрольные пробы были обогащены стандартным рабочим раствором с соответствующими концентрациями. Это было сделано шесть раз. Контрольные пробы соответствуют 5, 50 и 300 нг/г в авокадо. Контрольные пробы имели 25, 250 и 1500 нг/г для каптана, фолпетта, трихлорфона и бупиримата. Раствор внутреннего стандарта был разведен во всех пробах, кроме холостого раствора матрицы, соответствующего 250 нг/г в авокадо.

Соответствующие матриксу калибровочные стандарты, которые были приготовлены с рабочими растворами стандарта и внутреннего стандарта были добавлены соответственно к холостым пробам матрицы после шага 10, соответствующим 1, 5, 10, 50, 100, 200, 300 и 400 нг/г в авокадо и 250 нг/г внутреннего стандарта. Четыре соединения, использованные в калибровочных стандартах при 5, 25, 50, 250, 500, 1000, 1500 и 2000 нг/г.

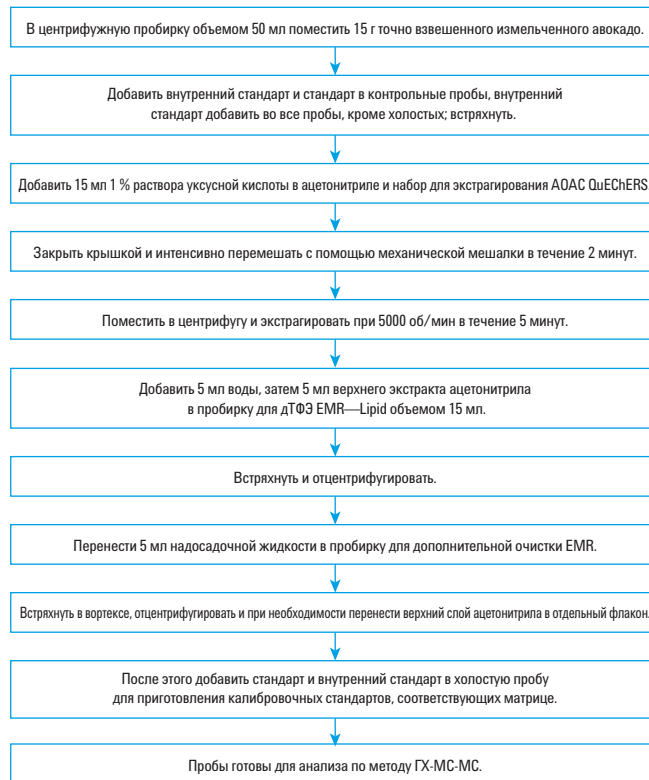


Рис. 2. Процесс пробоподготовки, показывающий экстракцию QuEChERS с очисткой Agilent Bond Elut EMR—Lipid для анализа пестицидов в авокадо с ГХ-МС-МС.

Оценка очистки матрицы

Экстракты авокадо были добавлены к трем различным очищающим материалам: для жирной дТФЭ (C18/ПВА), сорбенту с оксидом циркония и EMR—Lipid. В эксперименте сравнивался полный профиль сканирования ГХ-МС конечного экстракта до и после очистки. Хроматограммы были наложены друг на друга, чтобы сравнить очистку матрицы по хроматографическому фону. Для количественной оценки эффективности очистки матрицы хроматограмма полного сканирования ГХ-МС была вручную интегрирована во все окно и эффективность очистки матрицы была рассчитана по уравнению 1.

$$\% \text{ Очистки матрицы} = \frac{\text{Общая площадь пика Проба без очистки} - \text{Общая зона пика Проба с очисткой}}{\text{Общая зона пика Проба без очистки}} \times 100$$

Уравнение. 1

Был опубликован гравиметрический эксперимент, в котором сравнивалась масса одновременно экстрагируемых с авокадо соединений после обработки EMR—Lipid, C18/ПВА и сорбентом с экстрактом циркония [14].

Сравнение и валидация методов

Степень извлечения определяемого вещества в пробах авокадо до и после разведения при 50 нг/г сравнивалась экспериментально. Пробы обрабатывались с использованием метода QuEChERS, признанного AOAC, с последующей очисткой с использованием EMR—Lipid, C18/ПВА или оксидом циркония. При очистке EMR—Lipid выполнялась процедура, указанная на рис. 2. В других материалах применялась та же экстракция QuEChERS с очисткой с помощью C18/ПВА или сорбентом с оксидом циркония. Затем аликвота сырого ацетонитрила объемом 1 мл была перемещена в пробирку для дТФЭ с C18/ПВА объемом 2 мл (номер по каталогу 5982-5122) или флакон объемом 2 мл со 100 мг сорбента с оксидом циркония. Затем все пробы перемешивались в течение одной минуты и обрабатывались в микроцентрифуге при 13 000 об/мин в течение трех минут. Слой ацетонитрила затем перемещался во флакон для проб для анализа ГХ-МС-МС. Соответствующие матричные калибровочные стандарты были подготовлены путем разведения холостого экстракта авокадо стандартами и внутренними стандартами. Степень извлечения оценивалась по соотношению площадей пика аналита в пробах до и после разведения.

Методика EMR—Lipid валидировалась для авокадо на трех уровнях и шести копиях с использованием 8-точечной соответствующей матрице калибровочной кривой. Внутренний стандарт использовался для количественного анализа, и данные представлялись в виде таких параметров как правильность и точность.

Влияние матрицы на производительность системы ГХ-МС-МС

Влияние матрицы на производительность системы ГХ-МС-МС исследовалось путем оценки единообразия отклика определяемых веществ при нескольких вводах проб авокадо. В эксперименте сравнивался отклик определяемых веществ при ГХ-МС-МС в зависимости от времени путем нескольких вводов экстрактов авокадо, которые были обработаны EMR—Lipid, C18/ПВА или сорбентом с оксидом циркония. Каждая тестируемая серия включала холостые растворы матриц и контрольные пробы после разведения до 50 млрд д. Последовательность включала ввод четырех холостых проб с пятым вводом контрольной пробы и выполнялась в общей сложности для 100 вводов. Это было предназначено для определения воздействия не удаленной матрицы, которая накапливается на поверхностях хроматографического тракта ГХ-МС, на отклик прибора при использовании различных возможностей очистки. Для каждой очистки отклик определяемого вещества (площадь пика) использовался для расчета %СО для 100 вводов. Для исключения воздействия хроматографического тракта использовались расходные компоненты Agilent Inert Flow Path, которые включали лайнер Agilent Ultra Inert и колонку для каждого метода очистки.

Результаты и обсуждение

Оценка очистки матрицы

Сложные матрицы оказывают значительное влияние на производительность ГХ-МС, так как матрица формирует активные области на поверхности хроматографического тракта, которые индуцируют влияние матрицы на масс-спектрометр и вносят интерференцию в конечные хроматограммы. В то время как ГХ-МС (SIM) и ГХ-МС-МС (MRM) показывают улучшенную селективность для целевых ионов, не удаленная матрица может стать причиной интерференции и снижать производительность во времени. Для устранения этих отрицательных эффектов для матриц с высоким содержанием жиров, таких как авокадо, должны применяться более сложные методы очистки при пробоподготовке, чтобы пробы лучше подходили для анализа с ГХ-МС.

На рис. 3А показаны наложенные хроматограммы полного сканирования ГХ-МС для холостой матрицы авокадо и полученные для методик с использованием EMR—Lipid, C18/ПВА и сорбента с оксидом циркония хроматографические профили. Хроматограммы для проб без последующей очистки (холостые следовые количества) показывают высокую интенсивность сигнала для влияния посторонних компонентов образца, что затрудняет анализ целевых веществ. Хроматограммы экстрактов, обработанных C18/ПВА (синяя) и сорбентом с оксидом циркония (зеленая) для очистки, показывают очистку матрицы на 36 и 55%, соответственно, что было рассчитано по уравнению 1. При этом следовые количества после дТФЭ EMR—Lipid (красная) показывают почти полное удаление этих воздействий на хроматограмме полного сканирования ГХ-МС, что соответствует очистке матрицы на 95%. Большая степень очистки, полученная с использованием EMR—Lipid, имеет очевидный смысл для анализа пестицидов в авокадо, так как в пробе будет значительно меньше матрицы, которая оказывает влияние на производительность прибора. Кроме того, это достигается путем простой дТФЭ с EMR—Lipid в традиционном процессе QuEChERS.

На рис. 3В показаны наложенные хроматограммы ГХ-МС-МС MRM для проб авокадо, обогащенных 50 млрд д. стандарта пестицидов. Из-за повышенной селективности системы МС-МС матричный фон менее значим, чем при ГХ-МС SIM или на хроматограмме полного сканирования. Несмотря на лучшую селективность интересующих определяемых веществ, на хроматограмме между 11 и 20 минутой все еще присутствуют пики интерференции для C18/ПВА (синяя) и сорбента с оксидом циркония (зеленая). Эти интерференции влияют на точность интеграции сигналов некоторых определяемых веществ. Полученные с использованием EMR—Lipid экстракты имеют значительно более чистый фон, что хорошо видно для красных следовых количеств на рис. 3В, и это значительно улучшает точность интеграции.

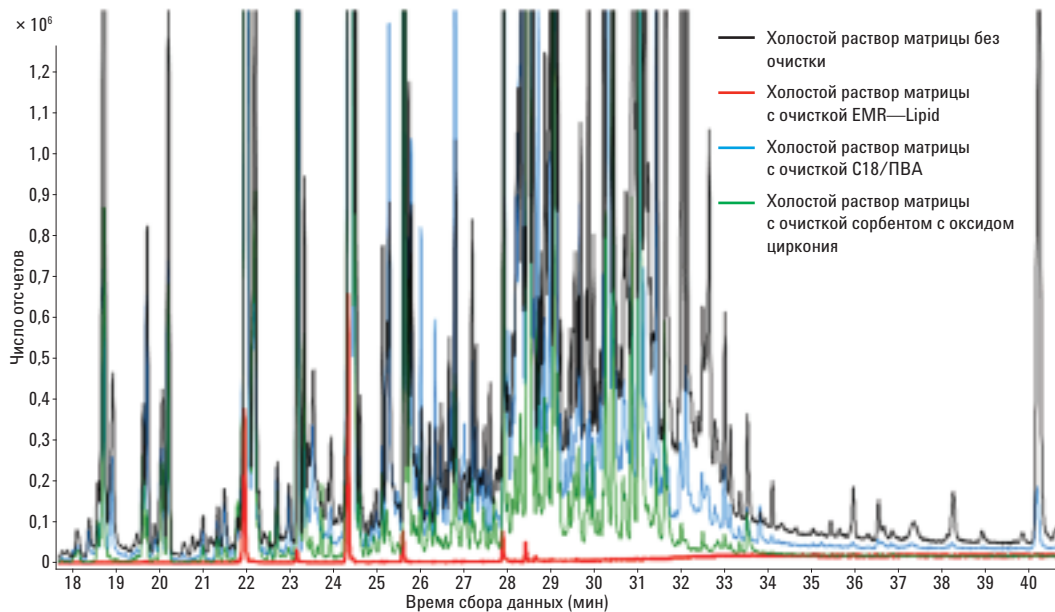


Рис. 3А. Наложение хроматограммы полного сканирования ГХ-МС холостых растворов матриц авокадо, подготовленных с применением метода QuEChERS, признанного ассоциацией AOAC, с последующей дТФЭ EMR—Lipid (красная), сорбентом с оксидом циркония (зеленая), ПВА/С18 (синяя) или без очистки (черная).

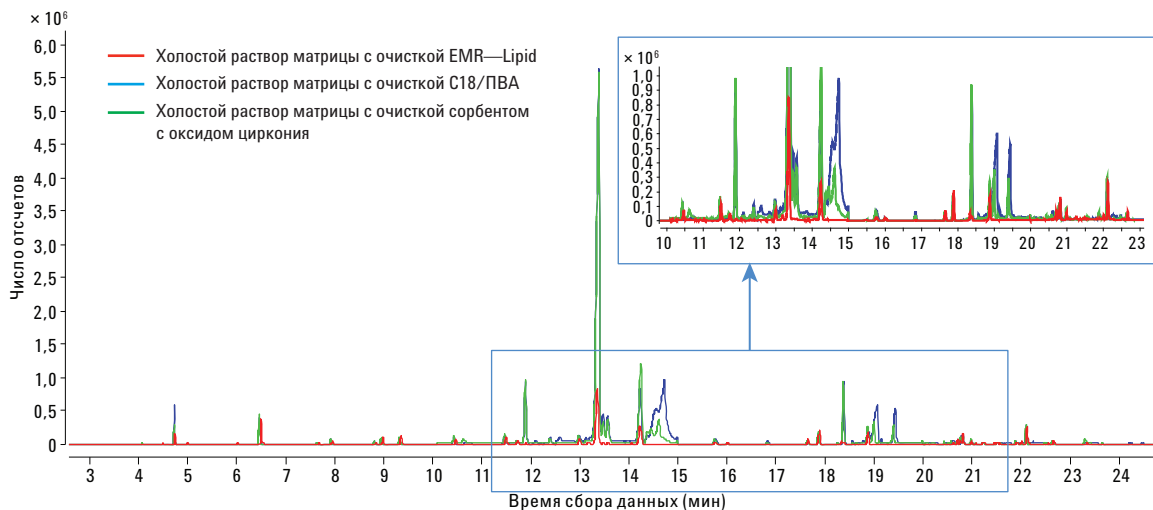


Рис. 3В. Наложение хроматограммы ГХ-МС-МС MRM проб авокадо, подготовленных с применением метода QuEChERS, признанного ассоциацией AOAC, с последующей дТФЭ EMR—Lipid (красная), ПВА/С18 (синяя) и сорбентом с оксидом циркония (зеленая). Все пробы были обогащены 50 млрд д. стандарта пестицидов.

Улучшенная очистка матрицы с использованием EMR—Lipid и положительное влияние на превосходное удаление матрицы для трех определяемых веществ в примере показаны на рис. 4. Во всех случаях хроматограммы для использования очистки с помощью EMR—Lipid показывают меньше пиков интерференции, лучшее соотношение сигнал/шум и единообразную интеграцию базовой линии. Эти улучшения ускоряют и упрощают обработку и проверку данных и позволяют получить большую степень уверенности в аналитическом методе.

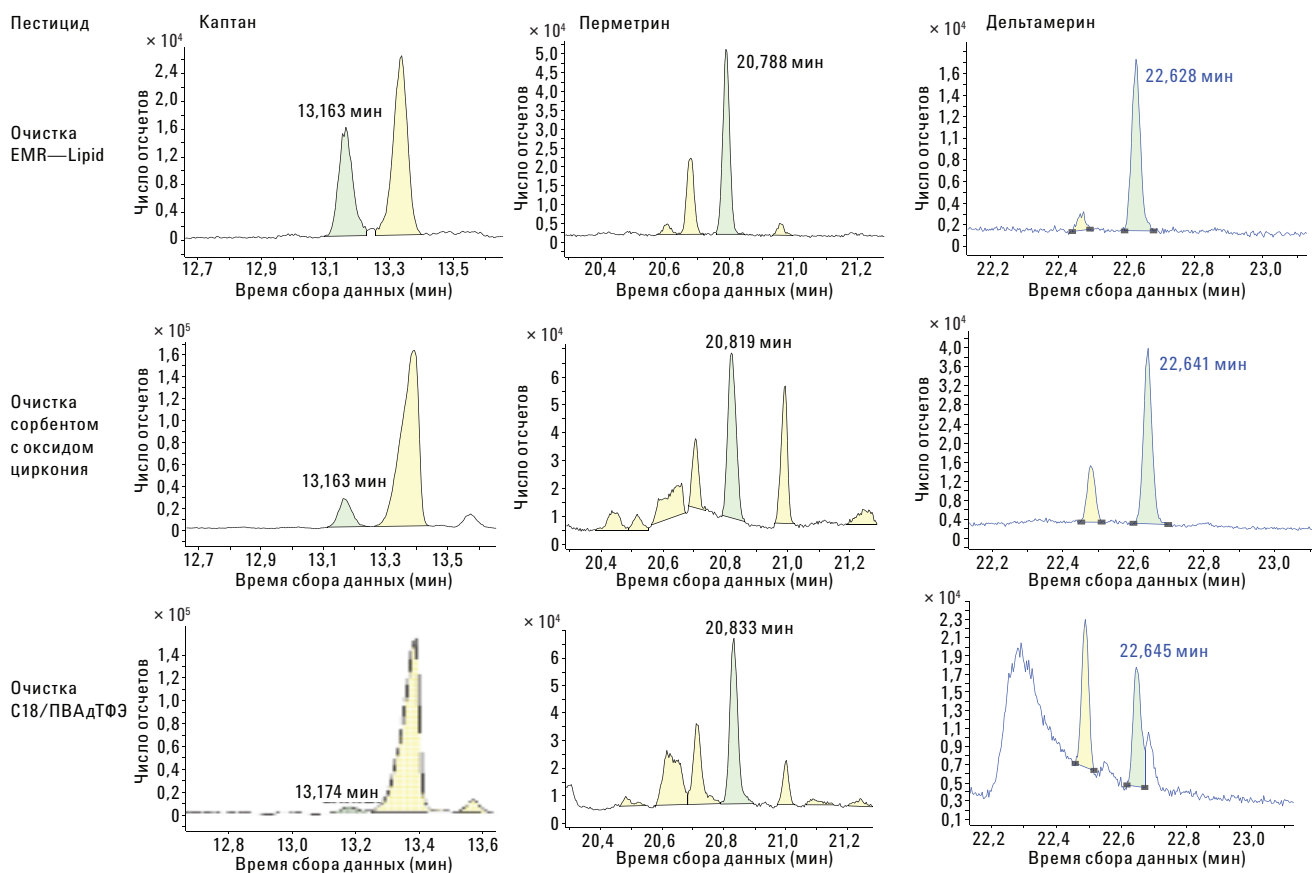


Рис. 4. Сравнение хроматограмм для интересующих определяемых веществ и влияние матрицы на пиковый отклик, пиковое качество и интерференцию в окне MRM. Холостые пробы обрабатывались Agilent Bond Elut EMR—Lipid, сорбентом с оксидом циркония или C18/ПВА, а затем конечная проба разбавлялась 50 млрд д. стандарта пестицидов.

Сравнение методов определения степени извлечения определяемого вещества

Затем оптимизированная методика с использованием EMR—Lipid сравнивалась с традиционной методикой QuEChERS, использующей C18/ПВА или сорбент с оксидом циркония. На рис. 5 показано сравнение извлечения для все 23 пестицидов при использовании этих различных материалов для очистки. Результаты показывают, что очистка с помощью EMR—Lipid не является причиной удерживания определяемых веществ и поэтому обеспечивает сравнимые с очисткой с помощью C18/ПВА результаты извлечения. Однако мы показали, что C18/ПВА и сорбенты с оксидом циркония не обеспечивают эффективную очистку матрицы.

Имеются некоторые определяемые вещества с более низким абсолютным извлечением, которое не зависит от методики очистки. Алдрин, эндрин и ДДТ имели извлечение менее 60%, а перметрин и дельтамерин — 63 и 75% соответственно. Очистка с использованием C18/ПВА обеспечивает немного более высокое извлечение по сравнению с EMR—Lipid и сорбентами с оксидом циркония. Эти пестициды очень липофильны (высокий log P) и очень плохо растворимы в воде, поэтому легко внедряются в пробы матриц с высоким содержанием жиров, такие как авокадо, что делает трудным их извлечение с помощью полярных растворителей, таких как ацетонитрил. Использование более сильных растворителей может повысить эффективность извлечения этих липофильных определяемых веществ в жирных матрицах, что может повысить эффективность экстракции и абсолютное извлечение. В будущих работах будет выполнено исследование эффективности экстракции липофильных соединений в матрицах с высоким содержанием жиров с последующим усиленным удалением матрицы.

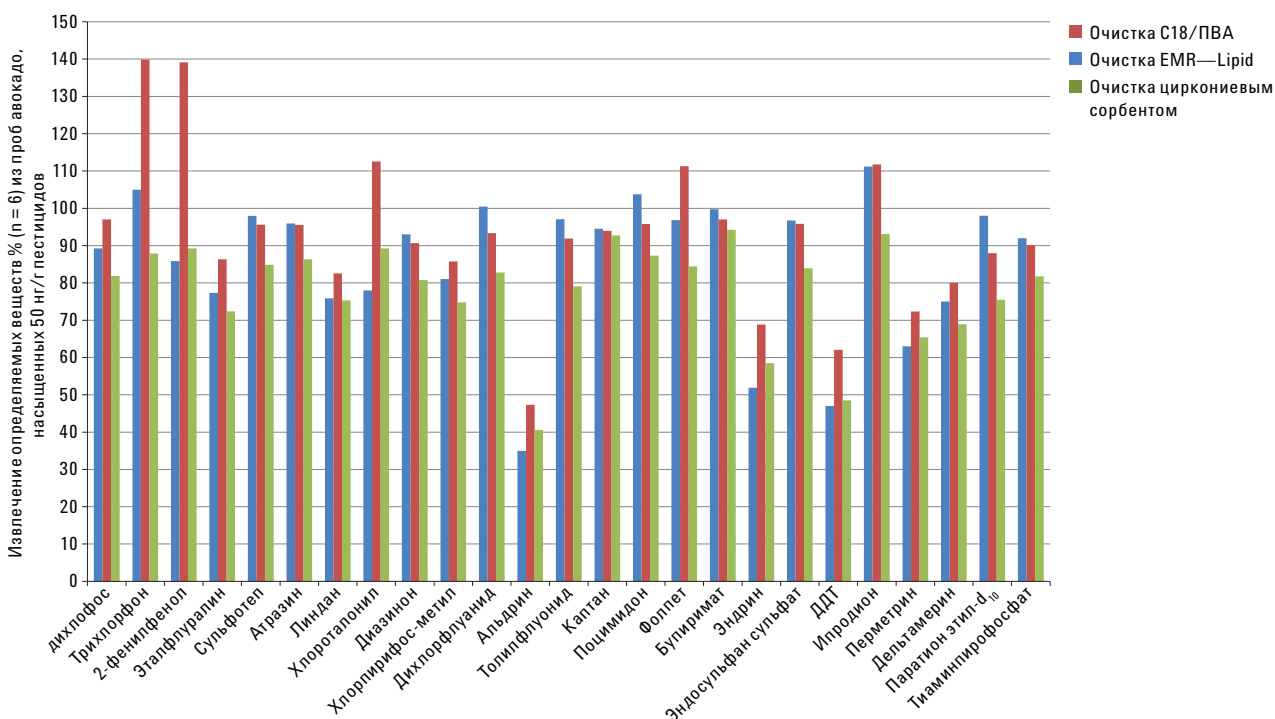


Рис. 5. Сравнение извлечения для очистки Agilent Bond Elut EMR—Lipid, C18/ПВА и сорбентом с оксидом циркония при 50 млрд д. в авокадо.

Для коррекции для этих соединений с низким абсолютным извлечением был использован стабильный отмеченный внутренний стандарт, ¹³C-ДДТ, чтобы повысить точность конечных количественных результатов для ДДТ, алдрина и эндрина. Использование в качестве внутреннего стандарта для перментина и дельтамерина тиаминпирофосфата подходило для количественного анализа.

Валидация методики

Валидация методики EMR—Lipid была выполнена путем обработки серии полного количественного анализа. Внутренние стандарты использовались для количественного анализа, и результаты представлялись в виде таких параметров как правильность и точность. Для количественного анализа использовались три внутренних стандарта: паратион этил-D₁₀, ¹³C-ДДТ и тиаминпирофосфат. Определяемые вещества с временем

удержания до 12 минут использовали в качестве внутреннего стандарта паратион этил-D₁₀, а после 12 минут — тиаминпирофосфат. Как было сказано ранее, ¹³C-ДДТ использовался в качестве внутреннего стандарта для алдрина, эндрина и ДДТ, чтобы исправить потерю определяемых веществ из-за низкой эффективности экстракции.

Подробные результаты валидации приведены в таблице 3. На рис. 6 представлены сводные данные, сгенерированные с использованием средних правильности и точности, рассчитанных для 18 копий контрольных проб (три уровня, n = 6). Правильность для пестицидов составила от 70% до 120% для всех, кроме одного определяемого вещества (67%), а точность для всех определяемых веществ была с менее 20% ОСО, с 80% менее 10% ОСО. Правильность для алдрина была несколько меньше 70%, но точность была хорошей (ОСО < 6%) и приемлемой в соответствии с указаниями SANCO [15].

Таблица 3. Количественные результаты для пестицидов в авокадо, разведенных до уровня 5, 50 и 300 нг/г для шести копий.

Определяемое вещество	Калибровочная кривая		Правильность и точность метода (контрольные пробы нг/г ¹)						
	Регрессия/масса R ²	Диап. кал. (нг/г)	5 (25)		50 (250)		300 (1 500)		
			Извл., %	ОСО	Извл., %	ОСО	Извл., %	ОСО	
дихлофос	линейная, 1/x	0,9967	1–400	97	8,2	108	4,9	111	12,7
Трихлорфон	линейная, 1/x	0,9964	5-2000 ¹	98	7,8	95	7,3	84	4,7
2-фенилфенол	линейная, 1/x	0,9996	10-400 ²	97	14,0	104	1,7	105	5,1
Эталфлуралин	линейная, 1/x	0,9969	1–400	109	3,2	98	7,6	110	6,5
Сульфотеп	линейная, 1/x	0,9958	1–400	96	5,8	76	3,9	85	9,8
Атразин	линейная, 1/x	0,9967	1–400	91	5,0	80	2,1	76	3,9
Линдан	линейная, 1/x	0,9991	1–400	92	6,7	104	4,0	98	12,5
Хлороталонил	линейная, 1/x	0,9944	1–400	89	13,5	103	8,6	92	19,4
Диазинон	линейная, 1/x	0,9993	1–400	102	6,8	116	5,1	108	8,9
Хлорпирифос-метил	линейная, 1/x	0,9984	1–400	101	6,2	123	4,5	113	15,0
Дихлорфлуанид	линейная, 1/x	0,9989	1–400	96	10,2	85	5,1	91	4,3
Альдрин	линейная, 1/x	0,9982	1–400	76	4,8	59	2,3	65	5,1
Толилфлуонид	линейная, 1/x	0,9990	10–400	108	10,0	93	6,2	93	5,4
Каптан	линейная, 1/x	0,9959	25-2000 ^{1,2}	89	8,2	109	11,0	87	18,1
Фолпет	линейная, 1/x	0,9897	5-2000 ¹	76	9,5	79	9,9	87	13,2
Процимидон	линейная, 1/x	0,9977	1–400	87	5,0	76	1,9	79	7,2
Бупиримат	линейная, 1/x	0,9957	5-2000 ¹	101	6,5	100	5,6	85	10,3
Эндрин	линейная, 1/x	0,9967	1–400	75	10,8	88	6,7	80	13,6
Эндосульфат сульфат	линейная, 1/x	0,9996	1–400	96	9,9	97	6,4	95	4,9
ДДТ	линейная, 1/x	0,9995	1–400	103	4,5	105	2,6	107	4,6
Ипродион	линейная, 1/x	0,9995	1–400	97	6,7	105	2,7	97	4,2
Перметрин	линейная, 1/x	0,9992	1–400	87	6,6	97	4,3	84	14,0
Дельтамерин	линейная, 1/x	0,9963	1–400	89	13,8	92	8,3	98	11,5

¹ Из-за низкого отклика соединения подготавливались в комбинированном внутреннем стандарте в концентрации в пять раз выше. Поэтому уровни разбавления контрольных проб и калибровочного стандарта были в пять раз выше, чем таковые для других соединений.

² Повышенное значение ПКО имело место либо из-за плохой чувствительности, либо из-за интерференции пика матрицы при обнаружении определяемого вещества при исходном ПКО.

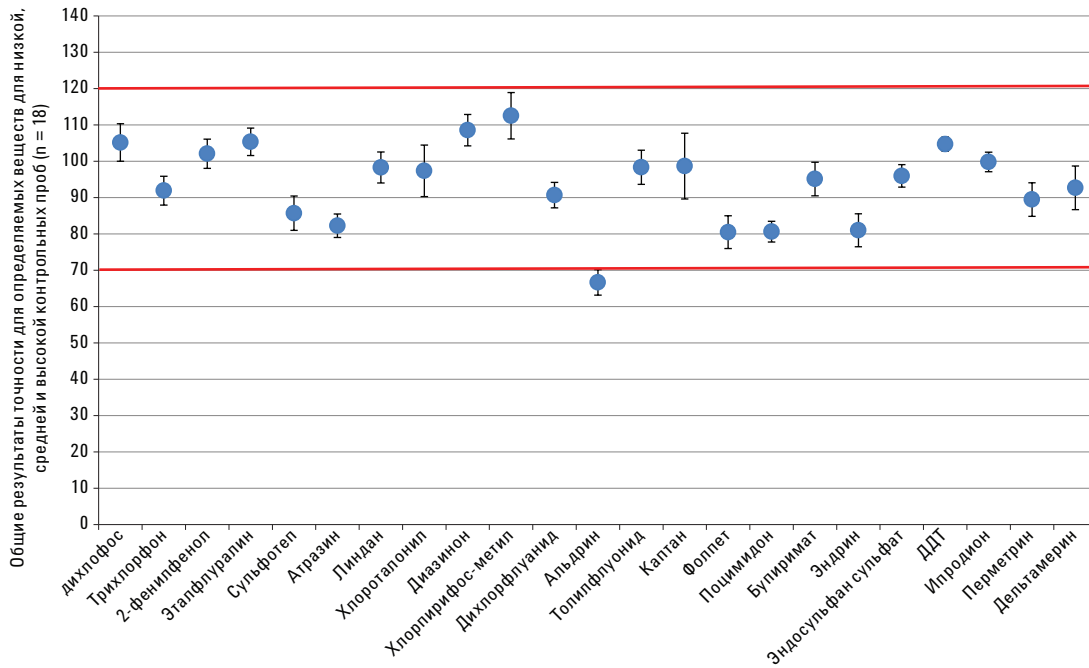


Рис. 6. Количественные результаты для 23 пестицидов в авокадо с использованием извлечения QuEChERS с Agilent Bond Elut EMR—Lipid, дТФЭ. Точки данных представляют правильность и точность и рассчитаны на трех уровнях для шести копий. Планка погрешностей = 95% CI.

Влияние матрицы на производительность системы ГХ-МС-МС

Влияния посторонних компонентов образца оказывают воздействие на производительность системы ГХ-МС-МС с течением времени, так как в систему вводится все больше проб. Активные части хроматографического потока могут оказать отрицательное влияние на производительность прибора. Компоненты Agilent Inert Flow Path обеспечат наилучшую деактивацию всего хроматографического потока и значительно снизят взаимодействия между определяемыми веществами и активными частями, которые приводят к потере определяемых веществ и хроматографическим аномалиям. Однако, если матрица насыщена высококипящими соединениями (с большим количеством жиров), она будет скапливаться на поверхности потока и создавать новые активные части. Со временем это может привести к отклонениям в откликах определяемых веществ, что окажет значительное влияние на надежность методики и снизит количество вводов на партию. Для устранения данной проблемы лабораториям необходимо выполнять техническое обслуживание приборов в большем объеме, например замену лайнера или балансировку/смену, что снижает производительность лаборатории.

Как показано в оценке очистки матрицы и гравиметрическом определении [14], обработанные с использованием EMR—Lipid пробы давали значительно более чистый фон, что доказывает факт намного меньшего внесения матрицы в систему ГХ-МС-МС. Количество активных частей накопления в тракте ГХ-МС снижается, что способствует сохранению аналитической целостности прибора. Это показывается большей аналитической точностью (ОСО) для более 100 вводов проб авокадо в ГХ-МС-МС (таблица 4). Для обработанных с использованием EMR—Lipid проб было достигнуто ОСО <15% для более 91%, по большей части в однозначных числах. Для двух соединений, каптана (ОСО 29,9%) и ДДТ (ОСО 21,6%) были получены более высокие ОСО для 100 вводов, но 11,1% и 6,4% ОСО для первых 50 вводов, соответственно.

Таблица 4. Сравнение воспроизводимости для определяемых веществ (ОСО) для 50 и 100 вводов проб авокадо, обработанных Agilent Bond Elut EMR—Lipid, C18/ПВА или сорбентом с диоксидом циркония с ГХ-МС-МС. Пробы были обогащены до 50 нг/г. Площади пиков определяемых веществ использовались для расчета ОСО результатов.

Пестициды	ОСО для определяемых веществ при 100 вводах (n = 20)			ОСО при 50 вводах (n = 10)		
	EMR—Lipid, очистка	C18/ПВА, очистка	циркониевым сорбентом, очистка	EMR—Lipid, очистка	C18/ПВА, очистка	циркониевым сорбентом, очистка
дихлофос	6,2	10,5	16,8	2,2	9,4	6,3
2-фенилфенол	7,0	13,6	19,5	5,0	12,4	8,4
Эталфлуралин	12,4	18,8	32,0	5,8	10,3	7,9
Сульфотеп	7,1	11,8	17,2	3,1	6,4	10,8
Атазин	6,8	12,2	19,1	3,2	12,2	5,2
Линдан	8,5	10,8	20,0	4,6	10,9	5,1
Хлороталонил	12,5	11,7	37,4	8,0	12,9	11,0
Диазинон	6,6	11,7	16,9	4,4	10,5	5,6
Хлорпирифос-метил	8,4	8,9	14,9	3,8	8,6	6,6
Дихлорфлуанид	11,7	9,0	25,9	5,4	9,9	5,5
Альдрин	9,8	19,3	25,7	8,6	19,3	7,1
Толилфлуонид	10,5	6,6	17,8	4,2	6,9	6,6
Каптан	29,9	51,9	47,1	11,1	24,9	21,7
Процимидон	6,8	14,3	22,5	5,6	13,8	4,8
Бупиримат	6,8	10,4	20,7	7,6	11,0	6,2
Эндрин	8,3	12,6	24,1	5,9	13,8	5,4
Эндосульфат	8,5	12,1	22,4	5,3	12,7	6,4
ДДТ	21,6	22,4	42,6	6,4	12,0	11,8
Ипродион	11,0	10,7	40,0	8,2	10,9	16,3
Перметрин	6,8	11,8	18,8	5,2	11,2	8,6
Паратион этил-d ₁₀ (IS)	11,8	7,2	13,0	4,7	6,8	7,0
Тиаминпирозинфосфат (IS)	9,1	19,9	28,3	9,0	22,5	12,8

Для сравнения, при использовании С18/ПВА были получены ОСО <15% для 74% определяемых веществ, а для сорбентов с диоксидом циркония — значительно меньше, всего для 9%. Обработанные сорбентом с диоксидом циркония экстракты были особенно проблемными, для 100% указанных выше определяемых веществ ОСО составило более 10%, для 57% из которых значительно больше 20% при 100 вводах. Это указывает на отрицательное влияние высоких остаточных уровней матрицы при очистке с использованием С18/ПВА и сорбента с оксидом циркония, что отрицательно воздействует на производительность прибора и приводит к значительной большей вариабельности отклика определяемых веществ. Эти результаты подтверждают превосходное удаление матрицы при использовании EMR—Lipid, что приводит к меньшей активности хроматографического потока, большей точности при нескольких вводах и обработке большего количества проб перед проведением технического обслуживания.

Выводы

Была разработана и валидирована быстрая, надежная и ясная методика использования QuEChERS, признанного AOAC, с последующей очисткой с использованием Agilent Bond Elut EMR—Lipid для анализа 23 подходящих для ГХ- пестицидов в авокадо. Была выполнена оценка влияния матрицы, а также сравнение с очисткой традиционными С18/ПВА и сорбентом с оксидом циркония. Результаты показывают, что EMR—Lipid обеспечивает лучшую хроматографическую чистоту для ГХ-МС и ГХ-МС-МС по сравнению с С18/ПВА и сорбентом с оксидом циркония. Внедрение очистки с использованием EMR—Lipid упрощает использование ГХ-МС для анализа проб матриц с высоким содержанием жиров. Сравнение извлечения показывает, что очистка с использованием EMR—Lipid дает сравнимые с С18/ПВА и лучшие, чем с сорбентом с оксидом циркония, результаты. Наибольшее преимущество EMR—Lipid в этом применении заключалось в высокой степени очистки матрицы, что обеспечивало выдающуюся воспроизводимость для 100 вводов при ГХ-МС-МС. Отклики определяемых веществ для обработанных С18/ПВА и особенно сорбентом с оксидом циркония проб имели очень большую вариабельность в эксперименте со 100 вводами. Таким образом, использование EMR—Lipid в качестве материала для очистки дТФЭ в процессе QuEChERS повышает общую производительность лаборатории, повышает пробопоток, снижает затраты на обработку и проверку данных, снижает повторные обработки партий и необходимость обслуживания приборов. В будущих работах будет выполнено исследование улучшенного удаления матрицы для других сложных, содержащих большое количество жиров проб и целевых веществ.

Литература

1. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Ёbtajnbaher, 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.; Sjudin, A.; Sandau, C. D.; Davis, M. D.; Nakazawa, H.; Matsuki, Y.; Patterson Jr., D. G. *Chemosphere* **2004**, *57*, 373–381.
11. Kegley, S.E.; Hill, B.R.; Orme, S.; Choi, A. H. *PAN Pesticide Database; Pesticide Action Network, North America, Oakland, CA, USA*, **2014**. http://www.pesticideinfo.org/Search_Chemicals.jsp
12. Szelewski, M. J.; Quimby, B. *New Tools for Rapid Pesticide Analysis in High Matrix Samples; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5989-1716EN*, **2004**.
13. Meng, C-K. *The GC/MS/MS Analyzer and the Pesticides and Environmental Pollutants MRM Database; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-9453EN*, **2011**.
14. Zhao, L.; Lucas, D. *Multiresidue Analysis of Pesticides in Avocado with Bond Elut EMR—Lipid by LC/MS/MS; Application Note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-6098EN*, **2015**.
15. 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, описания
и спецификации в настоящем документе могут быть изменены
без предупреждения.

компания Agilent Technologies, Inc., 2015
Напечатано в США
4 августа 2015 г.
5991-6097RU



Agilent Technologies