



APPLICATION NOTE

Жидкостная хроматография / Масс-спектрометрия

Авторы:

Jingcun Wu

Josh Ye

Erasmus Cudjoe

Feng Qin

Shixin Sun

PerkinElmer, Inc.

Woodbridge, Ontario, Canada

Определение пестицидов в рисе методом ВЭЖХ-МС/МС

Введение

Рис является одним из наиболее распространённых продуктов питания в мире. Пестициды используются для борьбы с вредителями, сорняками и различными болезнями, что в конечном итоге, способствует повышению урожайности риса. В разных странах/регионах при производстве риса могут использоваться различные пестициды, что связано не только с климатическими условиями и спецификой производства, но и с различиями в законодательствах. Остаточное содержание пестицидов в конечном продукте не только влияет на его качество, но и может угрожать здоровью потребителя. В связи с этим нормативные требования по использованию пестицидов в сельском хозяйстве приняты практически во всем мире. Например, в США, Китае, Бразилии, Индии, Японии и странах Европейского союза (ЕС) установлены предельно допустимые концентрации (ПДК) (MRLs - maximum residue levels) пестицидов в пищевых продуктах и кормах для животных, включая рис [1-3]. В странах ЕС ПДК пестицидов в рисе варьируются от 10 до 8000 мкг/кг в зависимости от препарата [1]. Для определения низких концентраций пестицидов в конечном продукте необходимы селективные и высокочувствительные аналитические методы. Большое количество разнообразных пестицидов, которые потенциально могут использоваться в производстве риса, требует разработки мультикомпонентных методов их определения, позволяющих определять как можно больше целевых соединений за один анализ. До недавнего времени для определения пестицидов наиболее часто использовался метод газовой хроматографии/масс-спектрометрии (ГХ/МС) [4, 5]. Однако, метод ГХ/МС не подходит для определения нелетучих и термически лабильных (нестабильных) соединений. Благодаря высокой селективности, чувствительности и возможности анализа нелетучих и термически нестабильных соединений метод жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии (ВЭЖХ МС/МС) в настоящий момент широко используется для анализа пестицидов в различных матрицах [6-10].

Пробоподготовка – важный этап анализа, от которого зависит правильность конечного результата. Часто пробоподготовка это дорогой и трудоемкий процесс, поэтому одной из задач, стоящей перед аналитиками при разработке нового метода анализа это оптимизация процесса подготовки пробы для снижения расходов и трудозатрат. Метод пробоподготовки QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe - Быстро, Просто, Дёшево, Эффективно, Надежно и Безопасно) получил широкое распространение в анализе пищевых продуктов, в том числе и риса [4, 8, 9, 10].

Цель данного исследования – разработка быстрого и чувствительного метода количественного определения более 200 пестицидов в рисе с помощью ВЭЖХ-МС/МС и модифицированной процедуры пробоподготовки QuEChERS.

Экспериментальная часть

Оборудование и программное обеспечение

Хроматографическое разделение проводили на ВЭЖХ PerkinElmer с масс-спектрометрическим детектором QSiq 220 (масс-анализатор - тройной квадруполь) с двойным источником ионизации.

Управление прибором, сбор и обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Simplicity 3Q™ (PerkinElmer).

Реактивы, стандартные растворы и пробоподготовка.

Стандартные образцы: стандартные образцы пестицидов производства ULTRA® Scientific (North Kingstown, RI).

Образцы риса: были приобретены в продуктовых магазинах города Онтарио, Канада. Анализируются различные образцы риса: коричневый, черный, белый, включая Жасмин, Басмати, Калроуз (Calrose), и две марки риса категории «органический продукт». Страны происхождения отобранных образцов: Таиланд, Вьетнам, Индия, Италия и США.

Пробоподготовка: пробоподготовку образцов проводили, используя набор QuEChERS для метода АОАС 2007.01, исключая стадию дисперсионной твердофазной экстракции (ДФЭ) [10]. 1 мкл полученного экстракта инжестировали в хроматограф.

Калибровочные растворы: калибровочные растворы для построения соответствующих калибровочных кривых готовили как с использованием чистого растворителя (ацетонитрил), так и с использованием матрицы. В качестве матрицы использовали экстракт образца коричневого риса категории «органический продукт». Для построения калибровочных кривых (с матрицей и без нее) использовали 8 калибровочных растворов. Матричные эффекты оценивались путем сравнения значений откликов детектора на определяемый компонент, рассчитанных из калибровочных кривых, полученных для калибровок с использованием матрицы и без нее. Для корректной идентификации использовали не менее двух MRM переходов для каждого определяемого соединения. Предел количественного определения (ПКО) рассчитывали при соотношении сигнал/шум = 10 для каждого из двух MRM переходов [12].

Для оценки степени извлечения определяемых соединений использовали образцы риса с концентрацией пестицидов 10 и 100 мкг/кг.

Хроматографические условия и параметры масс-спектрометра.

Хроматографические условия и параметры источника ионизации масс-спектрометрического детектора представлены в таблице 1. MRM переходы и оптимизированные параметры масс-анализатора для MRM переходов некоторых определяемых соединений - в таблице 2 (в таблице 2 представлены данные для 27 из 213 определяемых пестицидов).

Таблица 1. Хроматографические условия и параметры источника ионизации масс-спектрометрического детектора.

Хроматографические условия	
Хроматографическая колонка	Brownlee, SPP Phenyl-Hexyl, 100 x 2.1 мм, 2.7 мкм
Подвижная фаза А	5 mM раствор формиата аммония в воде
Подвижная фаза В	5 mM раствор формиата аммония в метаноле
Градиентное элюирование (Скорость потока: 0.4 мл/мин)	10% подвижная фаза В – 1 мин, от 10% В до 95% В за 15 мин, 95% В – 2 мин. Время равновесия при переходе на начальные условия 3 мин.
Температура термостата	40°C
Температура образцов в автодозаторе	15°C
Объем инъекции	1.0 мкл

Параметры источника ионизации	
Напряжение ESI +	5000 В
Напряжение ESI -	-4000 В
Осушающий газ	140 единиц
Распыляющий газ	350 единиц
Температура источника	325°C
Температура HSID интерфейса	200°C

Таблица 2. Параметры MRM переходов для некоторых определяемых соединений*

Компонент	ESI ±	Родительский ион (m/z)	Дочерние ионы (m/z)	CE ¹	EV ²	CCL2 ³
Ацефат	+	184.1	143.1	-12	25	-29
		184.1	125.1	-25	25	-41
Ацетамиприд	+	223.2	126.1	-30	25	-49
		223.2	99.1	-56	25	-73
Азоксистробин	+	404.1	372.1	-18	25	-57
		404.1	344.1	-34	25	-71
Бупрофезин	+	306.2	201.1	-18	25	-47
		306.2	116.2	-24	25	-52
Хлорантранилипрол	+	484	452.8	-20	25	-66
		484	285.8	-18	25	-65
Хлорпирифос	+	351.6	198	-20	25	-53
		351.6	97	-32	25	-64
Клотианидин	+	250.1	169.1	-16	25	-39
		250.1	132.2	-26	25	-48
Кумилурон	+	303.1	185	-20	25	-48
		303.1	125	-43	25	-69
Фенбутатин-оксид	+	519.3	197	-67	25	-112
		519.3	350.9	-50	25	-97
Фенобукарб	+	208	152	-12	25	-32
		208	95	-19	25	-38
Флуопирам	+	397	173	-35	25	-71
		397	145	-70	25	-103
Галофенозид	+	331.1	275	-18	25	-49
		331.1	104.9	-25	25	-56
Имазалил	+	298.1	201	-25	25	-52
		298.1	159.2	-31	25	-58
Имидаклоприд	+	256.2	175.2	-26	25	-49
		256.2	209	-18	25	-42
Изопропиолан	+	291.1	231	-16	25	-44
		291.1	189	-28	25	-54
Малатион	+	331.1	127.1	-22	25	-53
		331.1	99.1	-24	25	-55
Метамидофос	+	142	124.9	-20	25	-32
		142	94.1	-20	25	-32
Пиперонилбутоксид	+	356.2	177	-13	25	-47
		356.2	119	-37	25	-69

Компонент	ESI ±	Родительский ион (m/z)	Дочерние ионы (m/z)	CE ¹	EV ²	CCL2 ³
Примифос-метил	+	306.1	164.1	-28	25	-56
		306.1	108.	-40	25	-67
Профенофос	+	375	304.8	-50	25	-75
		375	346.8	-42	25	-113
Пропиконазол	+	343.1	159.1	-42	25	-72
		343.1	69.1	-26	25	-58
Тебуконазол	+	308	70	-30	25	-58
		308	125	-50	25	-76
Тиаметоксам	+	292	181	-28	25	-54
		292	211	-18	25	-45
Триазофос	+	314.1	161.9	-22	25	-51
		314.1	118.9	-50	25	-76
Трициклазол	+	190	163	-28	25	-44
		190	136	-36	25	-51
Трифлуксистробин	+	409	186	-26	25	-64
		409	206	-20	25	-59
Флудиоксонил	-	246.6	125.9	40	-25	60
		246.6	179.9	39	-25	60

* – в таблице представлены параметры MRM переходов для 27 из 213 определяемых пестицидов.

¹ – CE (Collision energy) – энергия соударений.

² – EV (B) – (Entrance Voltage) – входное напряжение на интерфейсе переноса ионов в масс-анализатор.

³ – CCL2 (Collision Cell Lens 2 voltage) – напряжение на входной линзе ячейки столкновений.

Обсуждение результатов

В качестве растворителя для экстракции пестицидов использовался ацетонитрил, как наиболее подходящий растворитель для экстракции соединений различной полярности. В методе ВЭЖХ градиентное элюирование начинается с подвижной фазы, обладающей наименьшей элюирующей силой, с содержанием воды 90%. Введение большого объема ацетонитрильного экстракта приводит к ухудшению хроматографических параметров пиков рано элюирующихся компонентов, таким образом, оптимальный объем вводимого экстракта составил 1 мкл.

Матричные эффекты (МЭ) являются одной из основных проблем, с которой сталкиваются аналитики при разработке метода ВЭЖХ-МС/МС метода, особенно это актуально для анализа пищевых продуктов, что объясняется сложностью большинства матриц в этой области. Для решения проблемы матричных эффектов обычно используются несколько подходов: разбавление образца, использование внутренних стандартов, калибровка с использованием матрицы, метод добавок, очистка образца в процессе пробоподготовки, применение альтернативных источников ионизации [11]. В данной работе МЭ оценивались путем сравнения значений откликов детектора на определяемый компонент, рассчитанных из калибровочных кривых, полученных для калибровок с использованием матрицы и без нее. Значения матричного эффекта для каждого компонента рассчитывали по изменению (%) откликов детектора, полученных в присутствии матрицы (Y) и без нее (X); $M\% = (Y-X)/X \times 100$. Положительное значение матричного эффекта свидетельствует об усилении аналитического сигнала определяемого компонента в присутствии матрицы, а отрицательное значение - об его уменьшении. Как видно из рисунков 1, 2 и таблицы 3 значения матричных эффектов зависят от определяемого компонента, например, для ацефата и пропиконазола наблюдается усиление аналитического сигнала в присутствии матрицы (положительный МЭ), а для хлорпирифоса и тебуконазола подавление аналитического сигнала (отрицательный МЭ). Полученные значения матричных эффектов для большинства определяемых соединений не превышают 20% (таблица 3), что согласно нормам ЕС (European Commission, SANCO) [12] позволяет без значительных ошибок проводить количественное

определение этих компонентов по калибровочным кривым, построенным с использованием чистых стандартных образцов (без матрицы). В случаях, когда наблюдаются значительные матричные эффекты, например для хлорпирифоса (-55%) данный подход неприемлем. В данной работе количественное определение всех компонентов проводилось по калибровкам, построенным с использованием матрицы.

Все калибровочные кривые определяемых компонентов, построенные как с использованием матрицы, так и без нее, имели хорошую линейность - квадрат коэффициента линейной корреляции (R^2) для всех анализов был больше 0.99 (см таблицу 3). Типичные примеры калибровочных кривых в диапазоне 0.1 – 200 нг/мл представлены на рисунках 2 и 3.

Степень извлечения компонентов (СИ) определяли, используя образцы риса с концентрацией пестицидов 10 и 100 мкг/кг (образцы с добавкой). Как видно из таблицы 3, степень извлечения для большинства пестицидов лежит в пределах 70% - 120% с СКО <20%.

Установленные пределы количественного определения (сигнал/шум = 10) для большинства пестицидов лежат в диапазоне 0.5 – 20 мкг/кг, что значительно ниже значений их ПДК, установленных в странах ЕС.

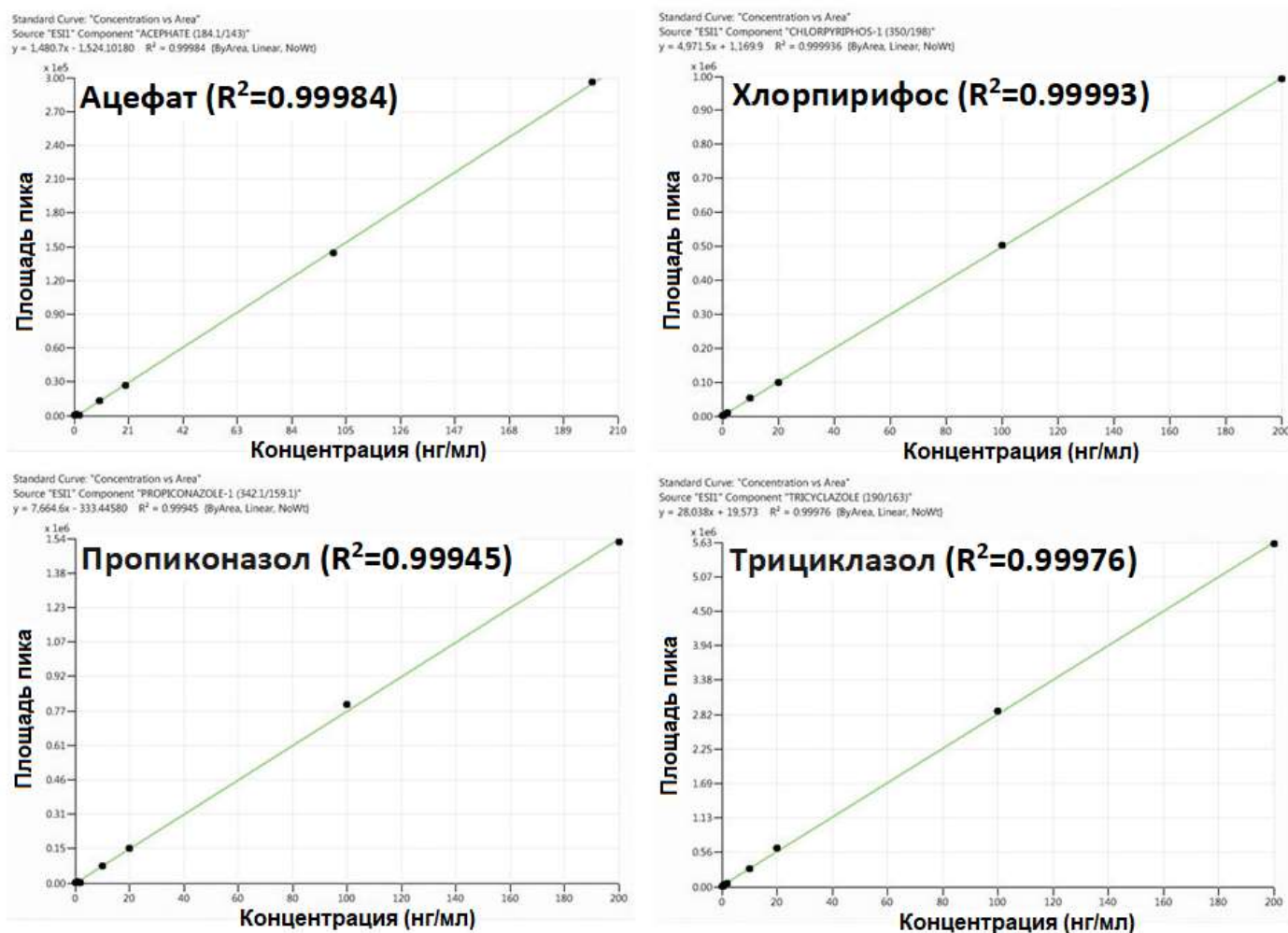


Рисунок 1. Калибровочные кривые (0.1 -200 нг/мл) ацефата, хлорпирифоса, пропиконазола и трициклазола, построенные без использования матрицы.

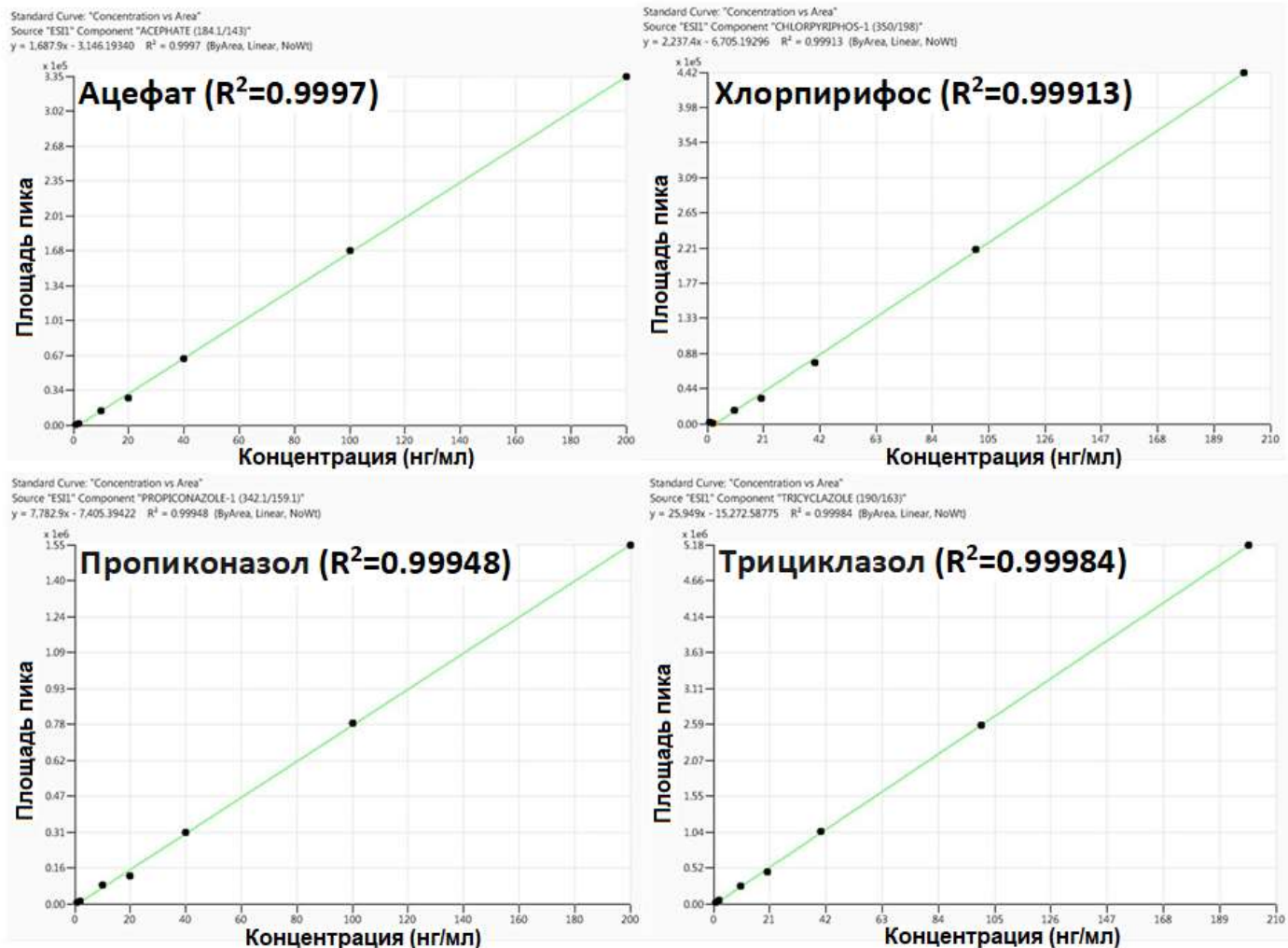


Рисунок 2. Калибровочные кривые (0.1 -200 нг/мл) ацефата, хлорпирифоса, пропиконазола и трициклазола, построенные с использованием матрицы.

Таблица 3. Значения времен удерживания (t_R), степени извлечения (СИ), матричного эффекта (МЭ) и квадрата коэффициента линейной корреляции (R^2) для наиболее часто встречающихся пестицидов в рисе.

Компонент	t_R мин	СИ, % (СКО%) 10 мкг/кг	СИ, % (СКО%) 100 мкг/кг	МЭ, %	R^2
Ацефат	1.88	101.1 (11.8)	81.9 (4.3)	14.0	0.9997
Ацетамиприд	8.15	106.5 (2.6)	98.7 (2.3)	2.7	0.9996
Бупрофезин	15.05	103.3 (2.9)	98.8 (3.5)	-3.1	0.9996
Хлорпирифос	15.54	109.6 (10.4)	98.7 (5.0)	-55.0	0.9991
Клотианидин	6.70	105.7 (5.9)	111.2 (8.6)	17.0	0.9995
Кумилурон	12.74	98.9 (7.2)	96.1 (2.5)	-2.6	0.9984
Фенбутатин-оксид	16.90	69.5 (18.6)	78.8 (12.7)	13.1	0.9997
Фенобукарб	11.20	101.6 (2.9)	94.8 (1.9)	2.6	0.9976
Флуопирам	13.00	104.8 (3.6)	101.1 (3.1)	-2.7	0.9991
Галофенозид	12.26	89.4 (15.2)	88.3 (11.4)	-4.4	0.9980
Имазалил	14.33	89.6 (13.6)	95.3 (4.1)	-6.1	0.9996

Компонент	t_R мин	СИ,% (СКО%) 10 мкг/кг	СИ,% (СКО%) 100 мкг/кг	МЭ,%	R ²
Имидаклоприд	7.57	77.5 (10.8)	112.2 (7.9)	-5.7	0.9991
Изопротиолан	13.01	111.5 (2.7)	101.1 (2.3)	-0.4	0.9983
Малатион	13.25	92.0 (12.0)	86.0 (4.3)	-9.9	0.9995
Метамидофос	1.41	82.8 (10.1)	76.4 (14.3)	13.3	0.9978
Пиперонилбутоксид	15.26	106.0 (5.0)	105.2 (3.4)	-6.3	0.9977
Примифос-метил	14.71	107.5 (3.7)	98.8 (5.3)	-0.1	0.9997
Профенофос	14.82	110.7 (6.9)	103.0 (6.5)	-2.5	0.9988
Пропиконазол	14.32	106.6 (7.1)	98.3 (2.8)	1.5	0.9994
Тебуконазол	13.72	102.2 (6.9)	104.2 (5.5)	-18.9	0.9993
Тиаметоксам	6.43	116.4 (10.0)	114.0 (14.9)	1.9	0.9991
Триазофос	13.46	117.8 (5.7)	99.5(3.0)	2.7	0.9979
Трициклазол	9.27	84.2 (5.8)	80.7 (7.8)	-7.5	0.9998
Трифлуксистробин	14.91	106.7 (2.4)	106(4)	-5.8	0.9991

Анализ образцов.

Разработанный метод использовали для определения пестицидов в различных продуктах питания, включая одиннадцать образцов риса, образце пшеницы и образе вегетарианской соломки. На рисунке 3 показано наложение MRM хроматограмм, полученных при анализе образца коричневого риса.

В таблице 4 приведены данные, полученные при анализе 11 образцов риса (концентрации обнаруженных пестицидов) и их ПДК в странах ЕС (мкг/кг). Из таблицы 4 видно, что образцы 4 и 10 содержали практически одинаковый набор пестицидов, что объясняется их одинаковым географическим происхождением.

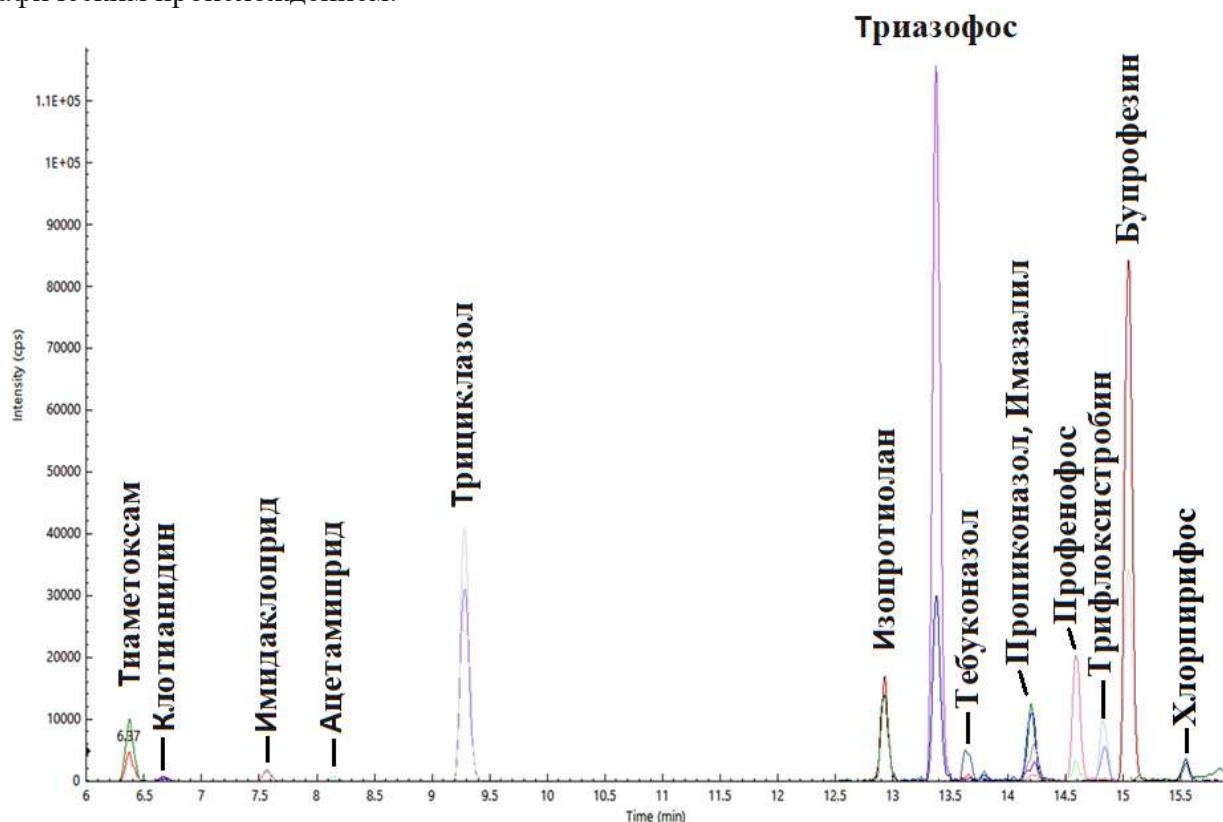


Рисунок 3. Наложение MRM хроматограмм, полученных при анализе образца коричневого риса (образец №10).

Таблица 4. Концентрации пестицидов (мкг/кг) в проанализированных образцах риса и их ПДК в странах ЕС.

Компонент	Образец риса											ПДК
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Ацефат				2.0								10
Ацетамиприд							0.3			0.8		10
Бупрофезин				9.1						46.5		500
Хлорпирифос				0.5	0.3		1.4			8.7		50
Клотианидин				7.0						3.0		500
Фенобукарб				4.1								*
Флуопирам					0.5							10
Галофенозид						5.0						*
Имазалил	1.4			2.5		4.6				2.6	1.6	50
Имидаклоприд				2.8			1.1			9.2		1500
Изопротиолан				4.4	9.3		2.9			14.7		5000
Малатион							1.8		2.2			8000
Метамидофос				0.5								10
Пиперонилбутоксид		0.6	1.3					0.8				*
Примифос-метил			1.4									500
Профенофос										5.2		10
Пропиконазол				8.3	8.4	6.7	4.1			18.1		1500
Тебуконазол				5.9	5.2		0.9			12		1000
Тиаметоксам				10.6						11		10
Триазофос				0.6			0.5			17.6		20
Трициклазол			16.4	5.8	7.6	20.6	0.6			40.2		1000
Трифлуксистробин										1.6		5000

Заключение

В данном исследовании разработан простой и чувствительный мультикомпонентный метод количественного определения более 200 пестицидов в рисе с помощью ВЭЖХ-МС/МС QSight 220 (PerkinElmer). Установленные значения ПКО для всех определяемых веществ значительно ниже ПДК, а упрощенная методика пробоподготовки QuEChERS обеспечивает высокую степень их извлечения. Как показывает практика, данный метод может быть легко адаптирован для быстрого скрининга и количественного определения пестицидов в других продуктах питания.

Список литературы

- [1] Commission Regulation (EC) 396/2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin, J. Eur. Union. L70/1 (2005).
- [2] U.S. Environmental Protection Agency, Electronic code of federal regulation: Title 40: part 180-tolerance and exemptions for pesticide chemical residues in Food. http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?c=ecfr&tpl=/ecfrbrowse/Title40/40cfr180_main_02.tpl
- [3] China National Standard GB 28260-2011. 2011. Maximum residue limits for 85 pesticides in food, Ministry of Health of the People's Republic of China.
- [4]. X. Hou, M. Han, X. Dai, X-F. Yang and S. Yi, A multi- residue method for the determination of 124 pesticides in rice by modified QuEChERS extraction and GC-MS/MS. Food Chemistry, 2013, 138, 1198-1205.
- [5] M. Kirchner, E. Matisova, S. Hrouzkova, and J. D. Zeeuw, Possibilities and limitations of quadrupole mass spectrometric detector in fast gas chromatography. J. Chromatogr. A, 2005, 1090 (1-2), 126–132.
- [6] J. Wu, Quantitative Method for the Analysis of Tobacco-Specific Nitrosamines in Cigarette Tobacco and Mainstream Cigarette Smoke by Use of Isotope Dilution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, Anal. Chem., 2008, 80 (4), 1341–1345.
- [7] K. Zhang, M.R. Schaab, G. Southwood, E.R. Tor, L.S. Aston, W. Song, B. Eitzer, S. Majumdar, T. Lapainus, H. Mai, K. Tran, A. El-Demerdash, V. Vega, Yanxuan Cai, J.W. Wong, A.J. Krynitsky, and T.H. Begley, A Collaborative Study: Determination of Mycotoxins in Corn, Peanut Butter, and Wheat Flour Using Stable Isotope Dilution Assay (SIDA) and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS), J. Agric. Food Chem. 2017, 65 (33), 7138-7152.
- [8] A. Wilkowska and M. Biziuk, Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology, Food Chemistry, 2011, 125, 803-812.
- [9] L. Pareja, A.R. Fernandez-Alba, V. Cesio and H. Heinzen, Analytical methods for pesticide residues in rice, Trends in Anal. Chem. 2011, 30 (2), 270-291.
- [10] L. Pareja, V. Cesio, H. Heinzen and A.R. Fernandez-Alba, Evaluation of various QuEChERS based methods for the analysis of herbicides and other commonly used pesticides in polished rice by LC-MS/MS, Talanta, 2011, 83, 1613-1622.
- [11] A. J. Krynitsky, J. W. Wong, K. Zhang and H. Safarpour, Focus on Food Analysis: Important considerations regarding matrix effects when developing reliable analytical residue methods using mass spectrometry, LCGC North America, 2017, Vol. 35, No. 7, 444-451.
- [12] European Commission, SANCO. 2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed, SANTE/11945/2015 https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945.pdf.

Scheltec авторизованный дистрибьютор PerkinElmer в странах СНГ, Грузии и Монголии

<http://www.scheltec.ru>

PerkinElmer, Inc.
940 Winter Street
Waltham, MA 02451 USA
P: (800) 762-4000 or
(+1) 203-925-4602
www.perkinelmer.com



For a complete listing of our global offices, visit www.perkinelmer.com/ContactUs

Copyright © 2017, PerkinElmer, Inc. All rights reserved. PerkinElmer® is a registered trademark of PerkinElmer, Inc. All other trademarks are the property of their respective owners.