



## APPLICATION NOTE

### **Жидкостная хроматография / Масс-спектрометрия**

#### **Авторы:**

**Mingli Zhu, Weifeng Zhang**

Guangzhou Agricultural Products  
Quality and Safety  
Guangzhou, China

#### **Lina Tang**

Xiamen Entry-Exit Inspection and  
Quarantine Bureau Fujian  
Province, China

**Lizhong Yang, Xiangdong  
Zhou, Chengyuan Cai,  
Yongming Xie**

PerkinElmer, Inc.  
Shanghai, China

**Feng Qin, Jingcun Wu**

PerkinElmer, Inc  
Toronto, Canada

## **Анализ пестицидов и красителей в вине**

### **Введение**

Вина могут содержать пестициды и фунгициды, которыми обрабатывался виноград в процессе своего роста. Кроме того, вино может содержать различные добавки, которые преднамеренно использовались недобросовестным производителем для улучшения его цвета и вкусовых качеств. Вина, содержащие в своем составе пестициды и запрещенные добавки, могут нанести непоправимый вред здоровью потребителя. В настоящее время для определения этих компонентов в вине используются различные аналитические методы [1 - 4]. Цель данного исследования – разработка простого, быстрого и высокочувствительного метода для одновременного определения пестицидов и красителей в вине.

## Экспериментальная часть

### Оборудование и программное обеспечение

Хроматографическое разделение проводили на УВЭЖХ LX-50 (PerkinElmer) с масс-спектрометрическим детектором QSight™ 220 (масс-анализатор - тройной квадруполь) (PerkinElmer). Управление прибором, сбор и обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Simplicity 3Q™ (PerkinElmer).

### Пробоподготовка

В пробирку для центрифугирования помещали 1.0 мл анализируемого образца и 9.0 мл воды очищенной, содержимое пробирки тщательно перемешивали и центрифугировали со скоростью 6000 об/мин в течение 5 минут. После центрифугирования надосадочную жидкость (супернатант) без дополнительной фильтрации переносили в виалу для автодозатора жидкостного хроматографа и анализировали.

### Хроматографические условия.

Хроматографическая колонка – PerkinElmer Brownlee SPP C18 column (4.6 x 100 мм, 2.7 μм). Температура термостата колонок – 30°C. Подвижная фаза **(А)**: 5 mM ацетат аммония в воде, подвижная фаза **(В)** – ацетонитрил. Скорость потока – 0.8 мл/мин, градиентное элюирование (таблица 1). Объем вводимой пробы – 10 мкл.

### Параметры масс-спектрометра.

Параметры источника ионизации масс-спектрометрического детектора приведены в таблице 2. Времена удерживания, пределы количественного определения (ПКО), MRM переходы и оптимизированные параметры масс-анализатора для MRM переходов определяемых соединений представлены в таблице 3.

Таблица 1. Программа градиентного элюирования

Шаг	Время (мин)	А% 5 mM Ацетат аммония	В% Ацетонитрил
1	0.0	95	5
2	3.0	60	40
3	5.0	50	50
4	8.0	20	80
5	9.0	5	95
6	11.0	5	95
7	11.1	95	5
8	13	95	5

**Таблица 2. Параметры источника ионизации масс-спектрометрического детектора**

<b>Напряжение ESI +</b>	5500 В
<b>Осушающий газ</b>	70 единиц
<b>Распыляющий газ (газ распылителя)</b>	200 единиц
<b>Температура источника</b>	500°C
<b>Температура интерфейса HSID</b>	320°C
<b>Режим работы масс-анализатора</b>	MRM

**Таблица 3. Времена удерживания  $t_R$ , пределы количественного определения (ПКО), MRM переходы и оптимизированные параметры масс-анализатора для MRM переходов определяемых соединений.**

No	Анализируемый компонент	MRM количественный ион		$t_R$ (мин)	CE/эВ *	EV/В* *	ПКО мкг/л
		MRM подтверждающий ион					
1	Тартразин	468.9	451.0	1.45	-22	23	50
		468.9	200.1		-33	23	
2	Новый красный	545.9	504.0	1.85	-20	24	50
		545.9	341.1		-34	24	
3	Кислотный красный-27	538.8	348.1	1.99	-41	27	50
		538.8	223.0		-37	27	
4	Кармин	538.9	158.2	2.29	-49	30	50
		538.9	223.1		-37	30	
5	Солнечный закат	408.7	392.1	2.56	-26	25	50
		408.7	236.1		-29	25	
6	Красный очаровательный АС	452.9	217.1	2.80	-30	17	10
		452.9	202.2		-54	17	
7	Азорубин	458.8	223.2	3.26	-34	20	10
		458.8	442.0		-22	20	
8	Бриллиантовый голубой	749.2	306.1	3.45	-59	75	10
		749.2	171.2		-71	75	
9	Эритрозин В	836.7	583.0	3.81	-69	67	10
		836.7	329.0		-86	67	
10	Метамидофос	142.0	94.0	1.97	-11	22	10

		142.0	125.0		-18	22	
11	Тиаметоксам	292.0	211.0	3.48	-17	20	0.5
		292.0	181.0		-30	20	
12	Карбендазим	192.0	160.0	3.97	-24	28	0.5
		192.0	132.0		-40	28	
13	Диметоат	230.0	125.0	4.09	-29	22	0.5
		230.0	199.0		-12	22	
14	Ацетамиприд	223.0	126.0	4.19	-29	30	0.5
		223.0	99.0		-54	30	
15	Тиабендазол	202.2	175.2	4.40	-45	33	0.5
		202.2	131.2		-57	45	
16	Диметоморф	388.0	301.0	6.87/7.1 1	-26	40	0.5
		388.0	165.0		-41	40	
17	Пириметанил	200.0	107.0	7.48	-32	50	5
		200.0	82.0		-32	50	
18	Фенгексамид	302.1	97.2	7.97	-32	57	5
		302.1	55.2		-71	77	
19	Азоксистробин	404.0	372.0	7.99	-19	25	0.5
		404.0	344.0		-33	25	
20	Эпоксиконазол	330.0	121.0	8.04	-22	25	0.5
		330.0	101.0		-50	25	
21	Триадимефон	294.0	197.0	8.08	-20	30	0.5
		294.0	225.0		-16	30	
22	Боскалид	343.0	307.0	8.09	-25	25	1
		343.0	140.0		-28	25	
23	Флуквинконазол	376.0	349.0	8.16	-26	25	1
		376.0	307.0		-34	25	
24	Гексаконазол	314.0	70.0	8.44	-24	25	0.5
		314.0	159.0		-36	25	
25	Имазалил	297.1	159.1	8.49	-42	30	1
		299.1	161.1		-42	30	
26	Пенконазол	283.8	70.1	8.51	-23	20	0.5
		283.8	159.1		-48	20	
27	Малатион	331.0	127.0	8.51	-10	20	5
		331.0	285.0		-16	20	
28	Прохлораз	376.0	308.0	8.84	-16	20	0.5
		376.0	70.0		-37	20	
29	Ципродинил	226.3	93.2	8.87	-51	66	0.5
		226.3	108.3		-35	56	
30	Фоксим	299.0	77.0	9.40	-46	20	1
		299.0	129.0		-18	20	

31	Трифлуксистеробин	409.2	186.1	9.52	-43	31	0.5
		409.2	206.2		-33	21	
32	Хлорпирифос	350.0	198.0	10.00	-23	25	0.5
		350.0	97.0		-47	25	

\* **CE** (collision energy) – энергия соударений

\*\* **EV** – (Entrance Voltage) – входное напряжение на интерфейсе переноса ионов в масс-анализатор

### Обсуждение результатов

Хроматограмма на рисунке 1 демонстрирует качественный и количественный анализ при одновременном определении 23 пестицидов и 9 красителей в вине с помощью разработанного метода.

Как видно из таблицы 3, значения ПКО для целевых компонентов в вине находятся в диапазоне от 0.5 до 50 мкг/л.

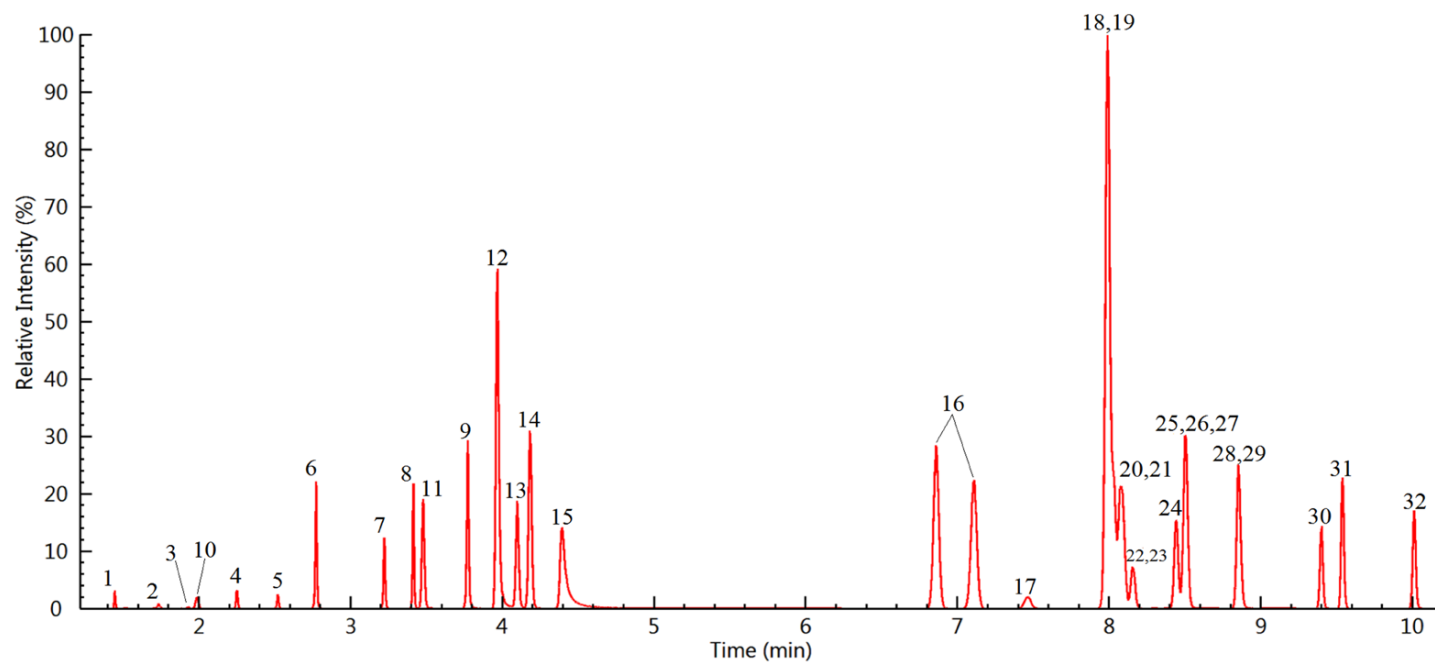
Для выбора оптимальной процедуры пробоподготовки было изучено влияние степени разбавления образцов и матричных эффектов на величину аналитического сигнала (чувствительность метода).

Для этого были проанализированы модельные растворы с содержанием красителей и пестицидов 100 и 10 мкг/л соответственно, при этом в качестве растворителей были использованы образцы вина, разбавленные водой в соотношениях 1:2, 1:5, 1:10 и 1:20, получая, таким образом 4 модельных раствора. Результаты сравнения отклика детектора для каждого компонента в зависимости от степени разбавления образца суммированы на рисунках 2 и 3. Как видно из рисунков 2 и 3 отклик (аналитический сигнал) возрастал с увеличением степени разбавления вина, что свидетельствует об уменьшении матричных эффектов, в основном эффекта подавления ионизации (ионной супрессии), при увеличении степени разбавления. Основываясь на полученных данных, была выбрана степень разбавления образца 1:10.

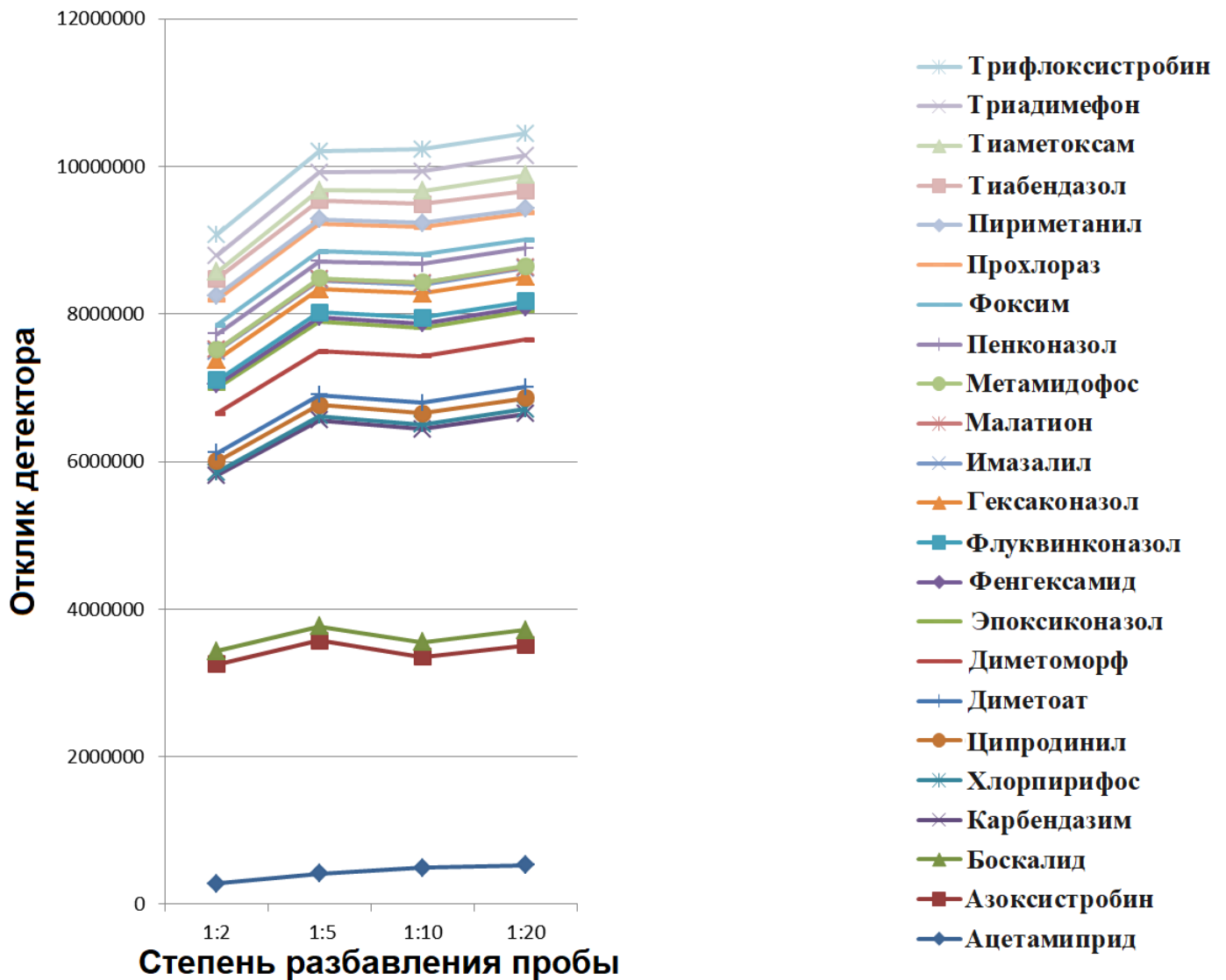
В качестве возможного способа очистки образцов от мешающих примесей был выбран метод дисперсионной твердофазной экстракции (d-SPE – Дисперсионная ТФЭ), применяющийся в методологии QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe - Быстро, Просто, Дёшево, Эффективно, Надежно и Безопасно). Дисперсионную ТФЭ проводили с использованием трех различных сорбентов, которые широко применяются в QuEChERS: анионообменный сорбент на основе первичных и вторичных аминов (PSA), сорбент C18 и графитированная сажа (GCB).

На рисунках 4 и 5 представлены сравнения откликов детектора для компонентов в образцах вин с добавкой красителей и пестицидов в концентрациях 200 мкг/л и 20 мкг/л соответственно в зависимости от пробоподготовки: простое разбавление 1:10; разбавление 1:10 и очистка с помощью PSA, C18 и GCB. Из данных, представленных на рисунках 4 и 5, видно, что наилучший отклик для большинства компонентов был получен при простом разбавлении проб в 10 раз без дополнительной процедуры очистки. Наихудший результат был получен при использовании сорбентов C18 и GCB, что объясняется сорбцией компонентов, имеющих в своей структуре неполярные группы.

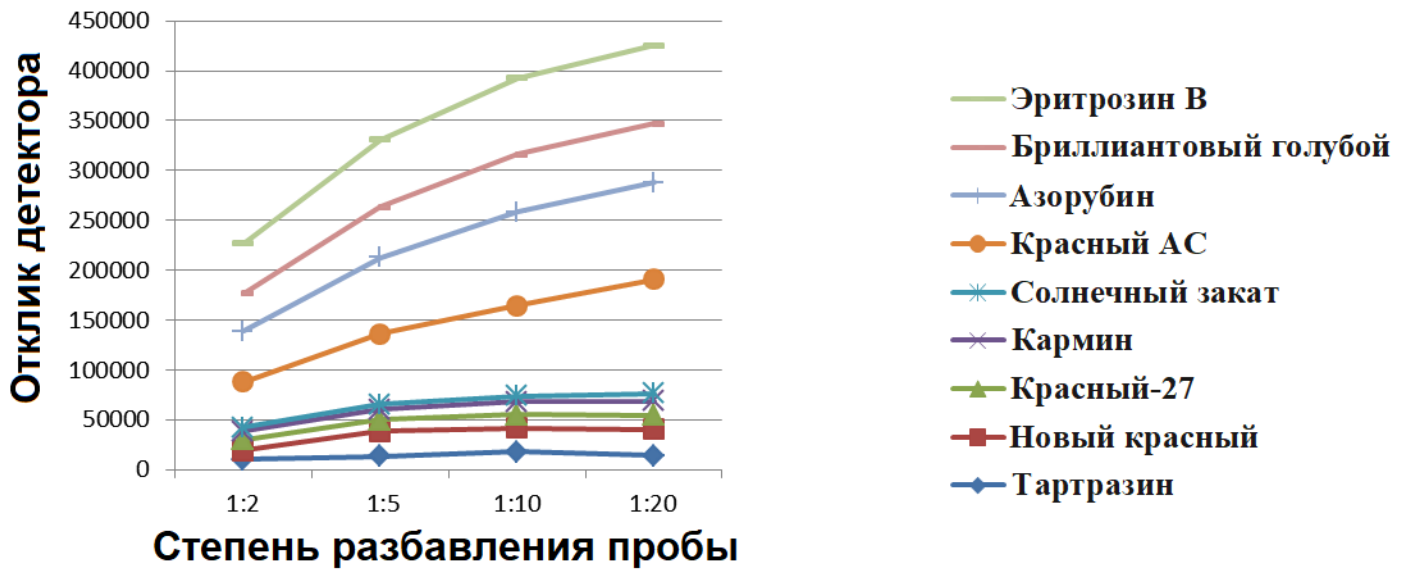
При необходимости анионообменный сорбент на основе первичных и вторичных аминов (PSA) может быть использован для удаления сахаров, жирных кислот, органических кислот и антоциановых красителей.



**Рисунок 1. Хроматограмма образца вина с добавкой 9 красителей (100 мкг/л) и 23 пестицидов (10 мкг/л). Компоненты указаны в таблице 3.**

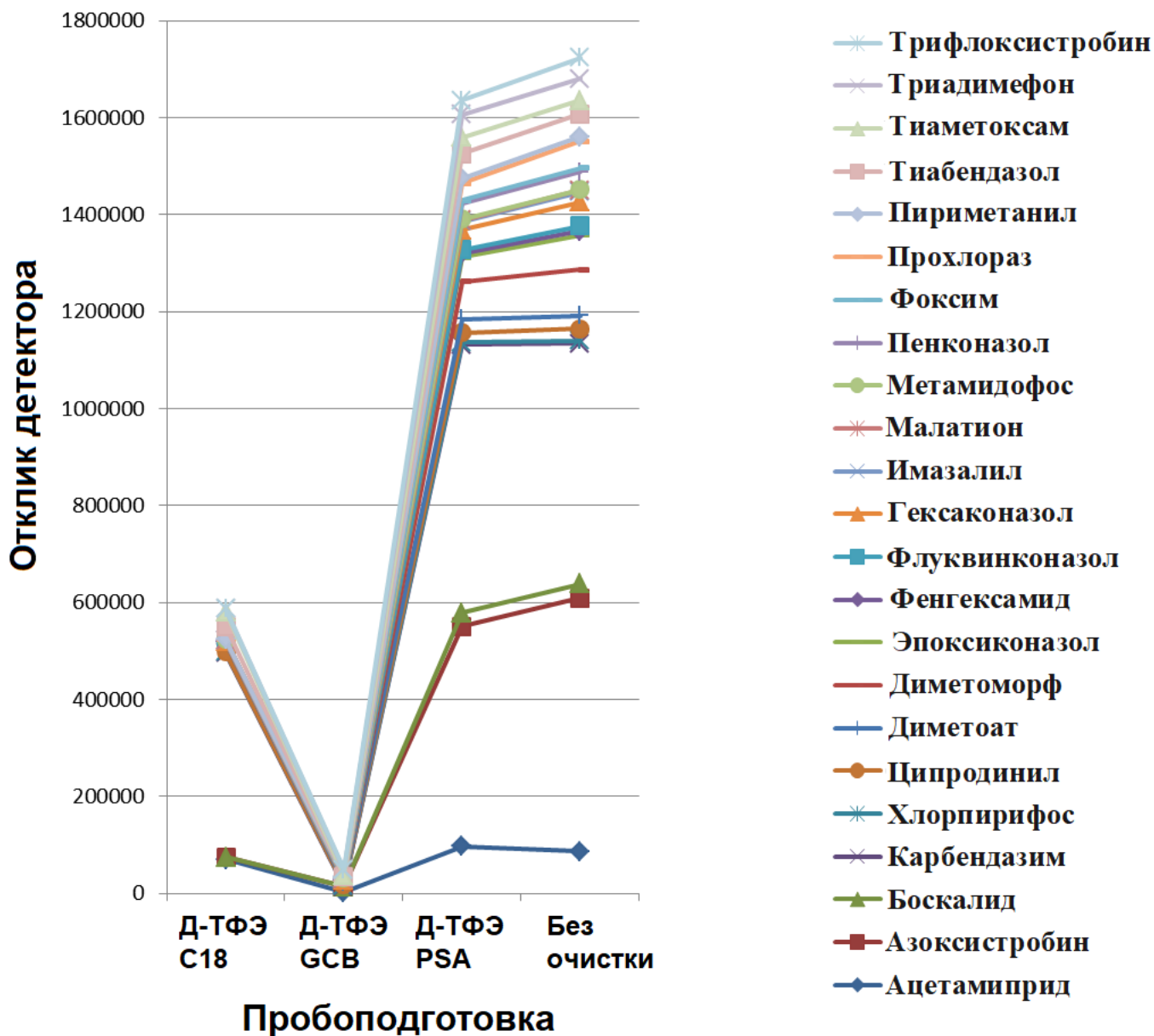


**Рисунок 2. Зависимость откликов детектора для компонентов от степени разбавления пробы при концентрации пестицидов (10 мкг/л).**

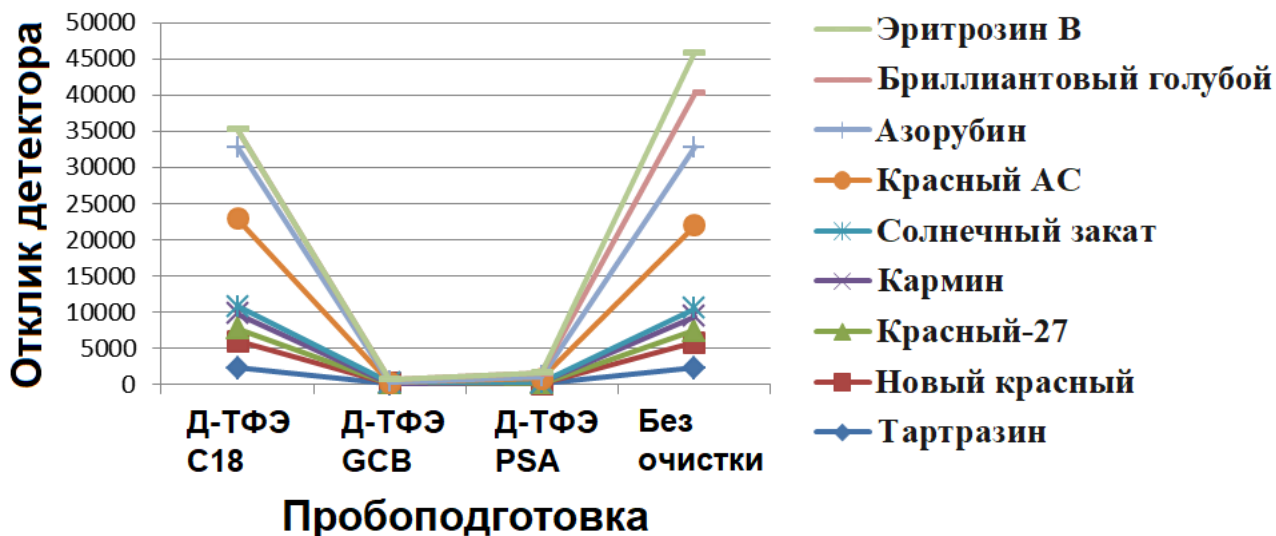


**Рисунок 3. Зависимость откликов детектора для компонентов от степени разбавления пробы при концентрации красителей (100 мкг/л).**





**Рисунок 4. Зависимость отклика детектора для компонентов от способа пробоподготовки при концентрации пестицидов (20 мкг/л).**



**Рисунок 5. Зависимость отклика детектора для компонентов от способа пробоподготовки при концентрации красителей (200 мкг/л).**

Калибровочные кривые для количественного определения компонентов строили на винной матрице (в качестве растворителя для калибровочных растворов использовалось вино, разбавленное в 10 раз). Калибровочные графики строили в диапазоне концентраций от 1 до 1000 мкг/л для красителей и от 0.5 до 100 мкг/л для пестицидов. Калибровочные графики для всех компонентов имели хорошую линейность (квадрат коэффициента корреляции  $R^2$  больше 0.99).

Для оценки степени извлечения компонентов использовались образцы вина с концентрациями целевых компонентов 50, 100 и 500 мкг/л. Степень извлечения для всех компонентов составила 85 – 115% при СКО менее 11%. Разработанный метод использовали для анализа 10 реальных вин, полученные результаты представлены в таблице 4.

**Таблица 4. Результаты анализа (мкг/л) десяти различных вин.**

Обнаруженный компонент	Номер образца									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ацетамиприд	-	-	4.1	10	-	-	-	-	-	-
Азоксистробин	-	-	11.5	-	-	-	-	-	-	-
Боскалид	-	33.5	173.1	87.3	53.1	345.8	10.7	245.5	16.1	42.4
Карбендазим	2.8	-	-	-	-	-	164	16	-	-
Хлорпирифос	3.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ципродинил	33.9	-	-	10.8	-	82.6	-	-	-	-
Диметоат	-	-	-	5.7	-	-	27	-	-	-
Диметоморф	-	-	-	-	-	134.	90.	100.	-	-

						<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>		
<b>Фенгексамид</b>	-	-	-	<b>180.3</b>	-	<b>275.8</b>	-	<b>434.4</b>	-	-
<b>Пириметанил</b>	-	-	-	<b>43.2</b>	-	-	<b>115</b>	<b>136.4</b>	-	-
<b>Тиабендазол</b>	-	-	-	<b>6.1</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Тиаметоксам</b>	-	-	-	-	-	<b>20.2</b>	-	-	-	-

## Заключение

Разработан и валидирован быстрый, чувствительный и селективный метод для одновременного определения 23 пестицидов и 9 красителей в вине. Преимущество данного метода заключается в одновременном определении пестицидов и красителей и простейшей пробоподготовки по принципу «разбавляй и анализируй». Полученные результаты показали, что правильность и повторяемость (воспроизводимость) метода соответствует требованиям аналитических лабораторий, занимающихся рутинным мониторингом вин.

## Список литературы

- [1]. Guo J, Zhu K, Zheng S, Chen Q, Lin M. Food and Fermentation Industries 2017, 43(1):1
- [2]. Wang J, Chow W, Leung D. Anal. Bioanal. Chem., 2010, 396:1513–1538.
- [3]. Li Y, Zheng Y, Xiong C, Zeng Y, Chen S. Chinese Journal of Chromatography 2013, 31(8)
- [4]. Gui Q, Liu H, Xu W, Gong Y. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2015, 36(2)

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



**For a complete listing of our global offices, visit  
[www.perkinelmer.com/ContactUs](http://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.