

Xác định thuốc trừ sâu phân cực anion trong chiết xuất bột mì bằng kỹ thuật UPLC-MS/MS với cột Torus DEA

Dimple Shah,¹ Gareth Cleland,¹ Euan Ross,² Eimear McCall,² Benjamin Wuyts,² and Simon Hird²

¹ Waters Corporation, Milford, MA, USA; ² Waters Corporation, Wilmslow, Wuyts

LỢI ÍCH CỦA ỨNG DỤNG

Phương pháp tỏ ra phù hợp với việc xác định nhiều loại thuốc trừ sâu phân cực anion trong chiết xuất bột mì nhằm kiểm soát theo quy định. Phương pháp đem đến thời gian lưu, độ chọn lọc, hình dạng peak và độ ổn định tốt cùng với độ nhạy hiệu quả để xác định dư lượng ở mức nồng độ 0.01 mg/kg (10 ppb) trong dịch chiết thô mà không qua làm sạch.

WATERS SOLUTIONS

[Torus™ DEA Column](#)

[ACQUITY™ UPLC™ H-Class Bio System](#)

[Xevo™ TQ-XS](#)

[MassLynx™ MS Software](#)

[TargetLynx™ Application Manager](#)

KEYWORDS

UPLC-MS/MS, anionic polar pesticides, targeted analysis, wheat flour, glyphosate, Quick Polar Pesticides (QuPPE) method

This Application Note was developed on a Torus DEA Column, but improved performance can now be achieved using the Waters [Anionic Polar Pesticide Column](#). Please contact Waters Chemistry Technical Services with any questions www.waters.com/contact.

GIỚI THIỆU

Mặc dù đã có nhiều phương pháp LC-MS/MS phân tích đa dư lượng thuốc trừ sâu trong thực phẩm, thuốc trừ sâu phân cực anion và các chất chuyển hóa vẫn là một thách thức. Phương pháp QuPPE (Quick Polar Pesticides)¹ cho phép chiết đồng thời nhiều hợp chất phân cực mạnh này. QuPPE thường được sử dụng với thiết bị LC-MS/MS, cung cấp độ nhạy cao khi có ảnh hưởng rõ ràng từ nền mẫu trong dịch chiết thô (không qua làm sạch).

Trước đây, chúng tôi đã báo cáo kết quả thăm định phương pháp sử dụng cột Torus DEA của Waters™ (p/n: [186007616](#)) trong việc phân tích thuốc trừ sâu phân cực và các chất chuyển hóa trong các loại rau cải.² Cột Torus DEA cung cấp tương tác HILIC và WAX, đã được thể hiện là có hiệu quả với những hợp chất phân cực mạnh và những hợp chất ion trong khi cung cấp độ ổn định thời gian lưu, độ chọn lọc và hình dạng peak.

Trong báo cáo này, chúng tôi cung cấp dữ liệu với phương pháp đã qua thay đổi nhỏ cho việc phân tích các thuốc trừ sâu phân cực anion trong chiết suất từ bột mì, một mẫu với hàm lượng tinh bột cao và/hoặc hàm lượng protein thấp, lượng nước và chất béo thấp. Phương pháp LC-MS/MS cũ được thực hiện trên hệ I-Class. Để thu được hiệu năng sắc ký tương tự, phương pháp được chuyển sang hệ H-Class. Để thực hiện trên các nền mẫu phức tạp hơn, báo cáo này thể hiện phương pháp được chuyển giao sang hệ ACQUITY UPLC H-Class Bio. Hệ thống thể hiện ưu thế ở dòng chảy trở, giúp giảm tương tác không mong muốn giữa các chất phân tích anion và kim loại trong hệ UPLC.

THÍ NGHIỆM

Xử lý và chiết mẫu

Mẫu bột mỳ được mua ở các cửa hàng và được trữ đông. Mẫu được chiết bằng phương pháp EURL QuPPE,¹ được cải tiến bằng cách thêm bước làm đông trước khi li tâm. Cụ thể các bước được mô tả ở hình 1.

Hiệu quả phương pháp được đánh giá với quy định của SANTE.³ Các dung dịch chuẩn có nền tương tự mẫu được pha từ 0.005 đến 0.250 mg/kg (5 đến 250 ppb) và được phân tích nhằm xác định thuốc trừ sâu anion và chất chuyển hóa, phân tích lặp lại ở mức nồng độ 0.1 mg/kg để đánh giá mức độ ảnh hưởng của thiết bị lên quá trình phân tích định kỳ theo lô. Tiêm lặp lại 15 lần ở mức thêm chuẩn 0.1 mg/kg để đánh giá độ lặp lại

Điều kiện UPLC

Trước khi sử dụng, hệ thống LC và cột cần phải được làm sạch và hoạt hóa nhằm loại bỏ ion kim loại có thể tương tác với thuốc trừ sâu phân cực và ảnh hưởng tới hình dạng peak.⁴ (p/n: [720006156EN](https://doi.org/10.1006/156EN)).

Hệ UPLC:	ACQUITY UPLC H-Class Bio with FTN Sample Manager																								
Cột:	Torus DEA 1.7 μ m, 2.1 x 100 mm																								
Kênh A:	50 mM Ammonium formate + 0.9% formic acid																								
Kênh B:	Acetonitrile + 0.9% formic acid																								
Tốc độ dòng:	0.5 mL/phút																								
Thể tích tiêm:	10 μ L																								
Dung môi rửa yếu:	90:10 acetonitrile:nước																								
Dung môi rửa mạnh:	10:90 acetonitrile:nước																								
Nhiệt độ cột:	50 °C																								
Nhiệt độ mẫu:	10 °C																								
Thời gian chạy:	20 phút																								
Gradient:	<table><thead><tr><th>Time (min)</th><th>%A</th><th>%B</th><th>Curve</th></tr></thead><tbody><tr><td>0.00</td><td>10</td><td>90</td><td>-</td></tr><tr><td>4.00</td><td>60</td><td>40</td><td>2</td></tr><tr><td>5.00</td><td>90</td><td>10</td><td>6</td></tr><tr><td>8.5</td><td>90</td><td>10</td><td>1</td></tr><tr><td>15.5</td><td>10</td><td>90</td><td>1</td></tr></tbody></table>	Time (min)	%A	%B	Curve	0.00	10	90	-	4.00	60	40	2	5.00	90	10	6	8.5	90	10	1	15.5	10	90	1
Time (min)	%A	%B	Curve																						
0.00	10	90	-																						
4.00	60	40	2																						
5.00	90	10	6																						
8.5	90	10	1																						
15.5	10	90	1																						

Điều kiện MS:

Hệ thống MS:	Xevo TQ-XS
Kiểu ion hóa:	ESI-
Thể mao quản:	2.5 kv
Ngưỡng đếm ion:	250
Nhiệt độ desolvate:	600 °C
Tốc độ dòng khí desolvate:	1000 L/Hr
Nhiệt độ nguồn ion hóa:	150 °C
Tốc độ khí cone:	300 L/Hr
Tốc độ khí va chạm:	0.14 mL/min
Áp suất khí đầu phun:	7 Bar

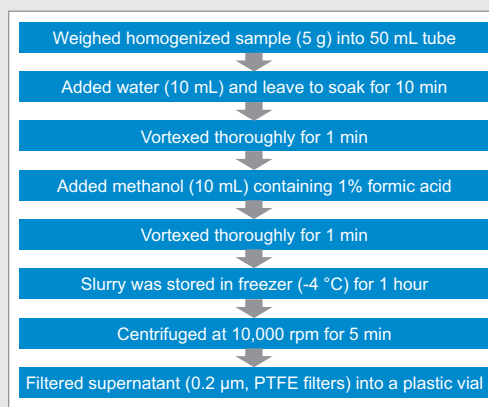


Figure 1. Schematic showing the modified Quick Polar Pesticides (QuPPE) method.

Kết quả được thu thập bằng MassLynx MS 4.2. Việc lựa chọn các bước chuyển MRM và tối ưu hóa các thông số quan trọng bằng cách tiêm từng dung dịch vào hệ thống và được tối ưu bằng IntelliStart™ để tự động lựa chọn phương pháp thu thập và xử lý số liệu. Kỹ thuật ion hóa mềm được dùng cho ethephon. Kỹ thuật ion hóa mềm sử dụng đường gradient thể thoát hơn để truyền ion quang và tăng độ truyền. Kỹ thuật này được xây dựng để giảm độ phân mảnh và tăng độ truyền dẫn của các hợp chất "dễ vỡ". Như trong hình 2, độ nhạy tăng gấp đôi và diện tích peak tăng 1,8 lần với ethephon giúp tăng đáng kể độ nhạy.

Table 1. MRM parameters for anionic polar pesticides (quantitative transitions in **bold**).

Compound	Retention time (min)	MRM	Cone (V)	CE (eV)	Dwell time (s)
Aminomethyl-phosphonic acid (AMPA)	2.02	110>63	35	13	0.125
		110>79	35	14	0.125
3-Methylphosphinico-propionic acid (MPPA)	2.44	151>133	20	11	0.050
		151>107	20	14	0.050
Glufosinate	2.58	180>85	30	16	0.050
		180>95	30	16	0.050
N-Acetyl glufosinate (NAG)	2.98	222>136	30	20	0.020
		222>69	30	15	0.020
Fosetyl aluminium	3.01	109>81	20	10	0.010
		109>63	20	16	0.010
Ethephon	3.03	143>107	15	7	0.090
		143>79	15	7	0.090
Glyphosate	3.16	168>63	25	18	0.120
		168>150	25	9	0.120
Phosphonic acid	3.56	81>79	25	11	0.010
		81>63	25	13	0.010
N-Acetyl glyphosate	5.59	210>150	25	13	1.100
		210>192	25	9	1.100

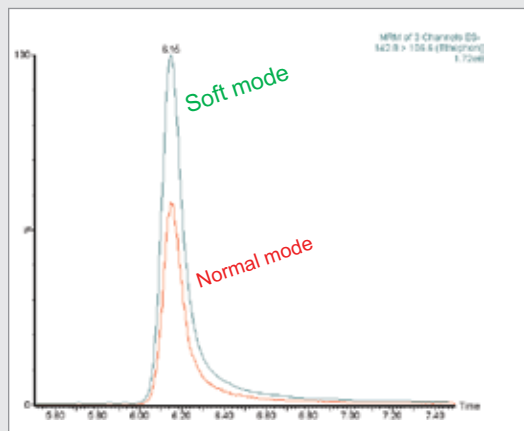


Figure 2. An overlay chromatograms of ethephon with soft ionization mode (green) and normal mode (red). Increased in intensity (2X) and peak area (1.8X) were observed for Ethephon with soft ionization mode.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Độ nhạy và độ chọn lọc tốt được thể hiện bằng việc phân tích các dung dịch chuẩn có nền tương tự mẫu. Hình 3 cho thấy sự đáp ứng với chất phân tích là 0.01 mg/kg. Việc tách được AMPA khỏi Fosetyl AL và Fosetyl AL khỏi acid phosphonic là cần thiết do các chất này có cùng phân tử khối và đều bị phân hủy.

Các thông số hiệu chuẩn được đánh giá trong khoảng đường chuẩn, thể hiện ở hình 4. Hệ số tương quan ($r^2 > 0.99$) và dư lượng (tính toán theo quy định của SANTE: $< 20\%$)^{*} đều đáp ứng tốt, thể hiện tính lặp lại trong trường hợp thiếu chất chuẩn. Hình dạng peak không đổi trong quá trình phân tích. Độ chụm của phương pháp tốt với RSD $< 5\%$ trừ fosetyl -AI là 5,4% và AMPA là 9,6% sau khi tiêm lặp lại 15 lần.

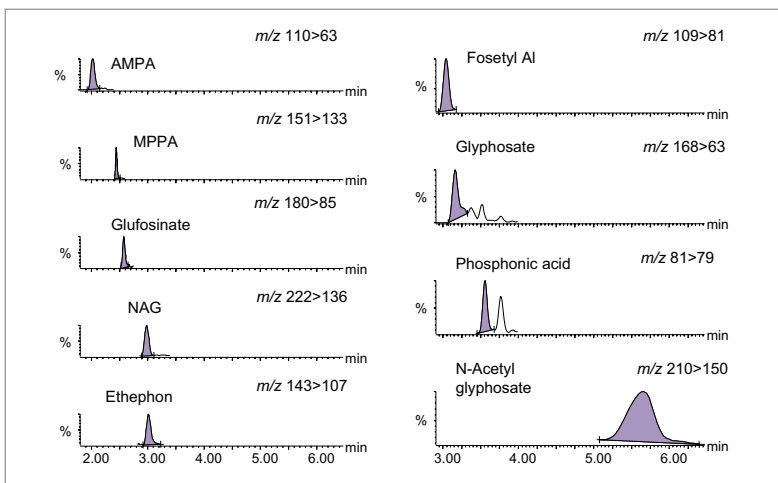


Figure 3. Typical chromatograms showing anionic polar pesticides from analysis of matrix-matched standard at 0.01 mg/kg (10 ppb) in wheat flour.

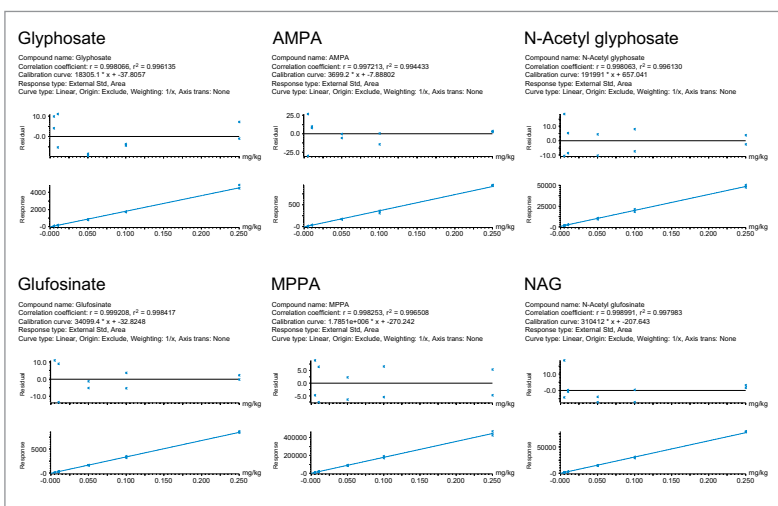


Figure 4. Calibration graphs for a selection of anionic polar pesticides, over the range in 0.005-0.250 mg/kg (5-250 ppb), in wheat flour.

Thời gian lưu phù hợp với các giá trị tham khảo, sai số chấp nhận được (+/- 0.1). Tỷ lệ ion nằm trong khoảng cho phép (+/- 30%) với các dung dịch chuẩn trên nền mẫu. Mẫu và chuẩn phân lớn đáp ứng được yêu cầu về sai số. Tuy nhiên, độ nhạy và độ chọn lọc của bước chuyển thứ hai bị ảnh hưởng của mức nồng độ ≤ 0.010 mg/kg (10 ppb).

Acid phosphonic được phát hiện với nền sử dụng cho dung dịch chuẩn. Nồng độ được tính bằng bảng tính năng thêm chuẩn của TargetLynx XS và ở mức 0.002 mg/kg (2 ppb). Tỷ lệ ion và thời gian lưu sẽ đáp ứng quy định của SANTE.

Hiệu năng của UPLC-MS/MS tỏ ra phù hợp với các hợp chất mục tiêu trong bột mì, phù hợp với cả các yêu cầu xác định dư lượng. Mặc dù quy định trên thế giới là khác nhau, tuy nhiên vẫn xoay quanh cỡ ppm, vì vậy dịch chiết cần phải pha loãng trước khi phân tích. Phương pháp cũng tỏ ra phù hợp khi cùng phân tích với các chất khác.

KẾT LUẬN

Cột Torus DEA cung cấp hiệu năng sắc ký hoàn hảo với thuốc trừ sâu phân cực anion và chất chuyển hóa, kể cả các nền phức tạp như bột mì. Khi kết hợp với độ nhạy cao của Xevo TQ-XS, những hợp chất khó có thể được phân tích mà không cần dẫn xuất hóa hay thiết bị đặc biệt. Khi kết hợp với quy trình chiết đã công bố. Mặc dù kết quả công bố khi phân tích mẫu bột mì đáp ứng quy định của SANTE, nhà phân tích sẽ phải thẩm định lại để kết hợp quy trình chiết của mình, phù hợp với nhu cầu.

References

1. http://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPPE-PO_EurlSRM.pdf
2. Wuyts B et al. Determination of Anionic Polar Pesticides in Spinach using a Novel Application of Torus DEA Column Chemistry by Liquid Chromatography-Tandem Quadrupole Mass Spectrometry. Waters application note no. [720006213EN](#), February, 2018.
3. European Union (2017). Document No. SANTE 11813/2017. Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed.
4. Torus DEA Column Startup Guide for Polar Pesticide Separations. Waters support document no. [720006156EN](#) (2017).

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters, ACQUITY, UPLC, Torus, Xevo, MassLynx, TargetLynx, IntelliStart, StepWave, and The Science of What's Possible are trademarks of Waters Corporation. All other trademarks are the property of their respective owners.

©2018 Waters Corporation. Produced in the U.S.A. August 2018 720006335EN AG-PDF

Waters Corporation
34 Maple Street
Milford, MA 01757 U.S.A.
T: 1 508 478 2000
F: 1 508 872 1990
www.waters.com