



# Wykrywanie za pomocą LC-MS/MS nieupochodnionego glifosfatu i podobnych polarnych pestycydów w żywności pochodzenia roślinnego

Stephen Lock<sup>1</sup> oraz Hermann Unterluggauer<sup>2</sup>

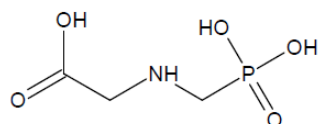
<sup>1</sup> AB SCIEX Warrington (Wielka Brytania)

<sup>2</sup> Austriacka Agencja Zdrowia i Bezpieczeństwa Żywności (AGES GmbH), Innsbruck (Austria)

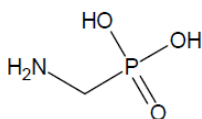
## Wstęp

Glifosfat jest popularnym herbicydem systemowym o szerokim spectrum zastosowania, używanym powszechnie do zwalczania chwastów, zwłaszcza chwastów szerokolistnych oraz traw konkurujących z uprawami. Zwykle przed badaniem bardzo polarny glifosfat poddaje się upochodnieniu przeprowadzając reakcje glifosfatu z chlorkiem fluorenylometyloksykarbonylu (FMOC-Cl). Etap upochodniania znacząco komplikuje badania, w związku z czym roślinie potrzeba stworzenia metody umożliwiającej wykrywanie w stanie natywnym nie tylko glifosfatu (i jego głównego metabolitu AMPA), ale również glufosynatu i innych podobnych wysoce polarnych związków. Dodatkowo, niewątpliwym plusem byłaby możliwość zastosowania uproszczonej procedury przygotowania próbki takiej jak QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe* – Szybka, Prosta, Tania, Wydajna, Niezawodna i Bezpieczna) lub ekstrakcji do fazy ciekłej.

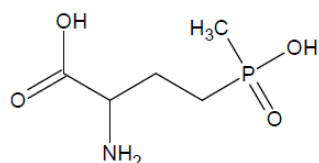
Poniżej prezentujemy wstępne dane zebrane za pomocą nowej metody LC-MS/MS umożliwiającej wykrywanie nieupochodnionego glifosfatu i innych polarnych pestycydów w różnych domieszkowanych matrycach żywności. Metoda bazuje na wykorzystaniu chromatografii typu HILIC oraz systemu AB SCIEX LC/MS/MS. Zastosowano prostą ekstrakcję do fazy ciekłej. Uzyskane wstępne wyniki wskazują na możliwość zastosowania takiego podejścia w badaniach żywności.



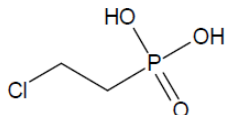
Glyphosate



AMPA



Glufosinate



Ethephon



## Część eksperymentalna

### Przygotowanie próbki

W celu sprawdzenia liniowości i czułości metody użyto roztworów wzorców w mieszaninie 50/50 metanol/woda, w stężeniach od 1 do 500 ng/ml. Próbki matrycy przygotowano dodając polarne pestycydy do 50% metanolowego ekstraktu cebuli, pszenicy, ryżu i winogron przygotowanych według metody QuPPe (Quick Polar Pesticides – Polarne Pestycydy na Szybko) opracowanej przez Laboratoria referencyjne Unii Europejskiej ds. pozostałości pestycydów. W celu zminimalizowania potencjalnego efektu matrycy, przed nastrzyknięciem ekstrakty zostały rozcieńczone 5-krotnie 50% wodnym roztworem metanolu.

### LC

Do analizy wykorzystano system Shimadzu XR LC składający się z dwóch pomp Shimadzu LC20AD, autosamplera SIL 20AC i pieca do kolumn CTO20A. Analizę przeprowadzono w temperaturze 50°C w kolumnie *Obelisc N phase*. Nastrzykiwano 50 µL próbki, a do rozdzielania stosowano gradient przedstawiony w Tabeli 1, gdzie fazą ruchomą A była zakwaszona 85% mieszanina acetonitrylu z wodą zawierającą octan amonu (85/15), zaś fazą B była zakwaszona woda zawierająca octan amonu. Szczegóły gradientu przedstawione są w Tabeli 1.

**Tabela 1.** Warunki zastosowanego gradientu

Krok	Czas	Przepływ (ml/min)	A (%)	B (%)
0	2	1.2	100	0
1	3	1.2	100	0
2	3.6	1.2	0	100
3	8	1.2	0	100
4	8	1.5	0	100
5	8.2	1.5	100	0
6	13.5	1.5	100	0
7	13.8	1.2	100	0
8	14	1.2	100	0

## MS/MS

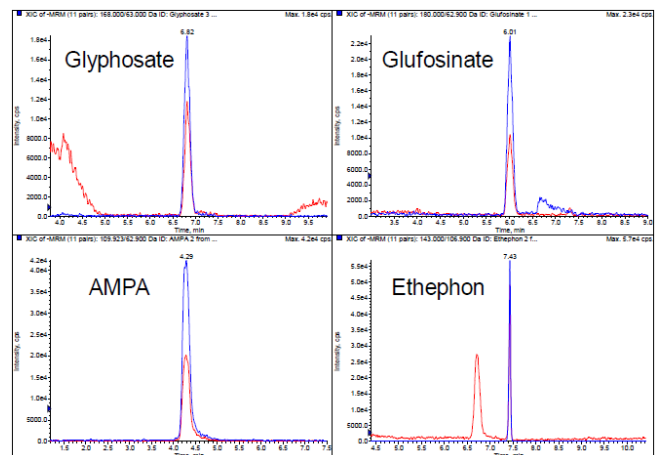
Analizę przeprowadzono na systemie AB SCIEX QTRAP<sup>®</sup> 5500 LC/MS/MS wyposażonym w źródło Turbo V<sup>™</sup> działające w trybie elektrosprej w jonizacji ujemnej, z napięciem IonSpray (IS) -4500 V. Ciśnienie gazu osłonowego ustawione było na 35 psi, gazu rozpylającego (Gas 1) na 60 psi, gazu suszącego (Gas 2) na 70 psi, gazu CAD na wartość średnią, a temperatura wynosiła 650 °C. Wykorzystane pary MRM, jak również czasy retencji dla poszczególnych związków przedstawione są w Tabeli 2. Każda para MRM obserwowana była przez 50 ms.

**Tabela 2.** Parametry LC-MS/MS dla badanych związków

Związek	Czas retencji (min)	Q1 (amu)	Q3 (amu)	DP (V)	CE (V)
AMPA	4.3	110	79	-60	-24
		110	63	-60	-26
Ethephon	7.4	143	79	-45	-26
		143	107	-45	-12
Glufosinate	6.0	180	63	-60	-66
		180	95	-60	-24
Glyphosate	6.8	168	79	-110	-54
		168	63	-110	-32

## Wyniki i dyskusja

Na rycinie 1 przedstawiony jest typowy chromatogram otrzymany po nastrzyknięciu 10 ng/ml roztworu wzorców wszystkich badanych pestycydów. Obserwowanie dwóch par MRM pozwala również na identyfikację związków na podstawie stosunku tychże par MRM.



**Rycina 1.** Nastrzyk 10 ng/ml roztworu wzorców

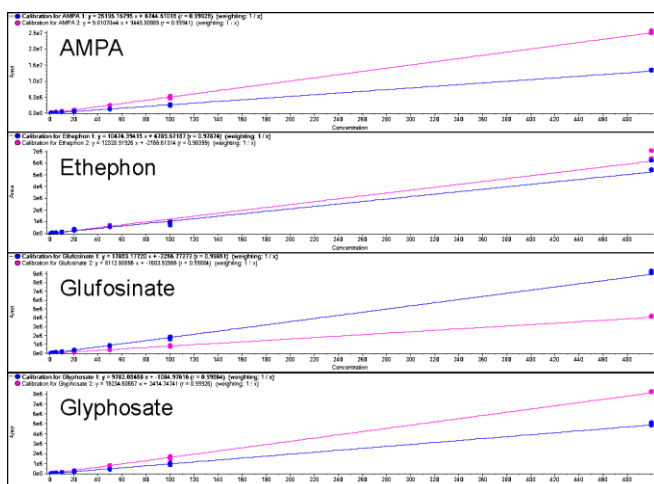
Rycina 2 i Tabela 3 przedstawiają typowe krzywe kalibracji otrzymane dla badanych pestycydów. W badanym zakresie od 1 do 500 ng/ml otrzymano liniową odpowiedź, z wagą 1/x. Wszystkie wartości dokładności mieściły się w zakresie 80 – 120%.

Czułość metody dla różnych pestycydów przedstawiona jest w Tabeli 3. Wszystkie pestycydy były łatwo mierzalne i identyfikowalne na poziomie maksymalnych limitów pozostałości (MRL) ustanowionych przez UE i CODEX Alimentarius wynoszących w przypadku większości owoców i warzyw 0,1 mg/kg.<sup>2,3</sup> Oferowany zapas czułości pozwalał na rozcieńczenie ekstraktów próbek, w celu zminimalizowania potencjalnego efektu matrycy.

**Tabela 3.** Liniowość z wagą 1/x (w zakresie od 1 do 500 ng/ml) oraz stosunek sygnału do szumu (S/N\*) dla nastrzyku 1 ng/ml wzorca

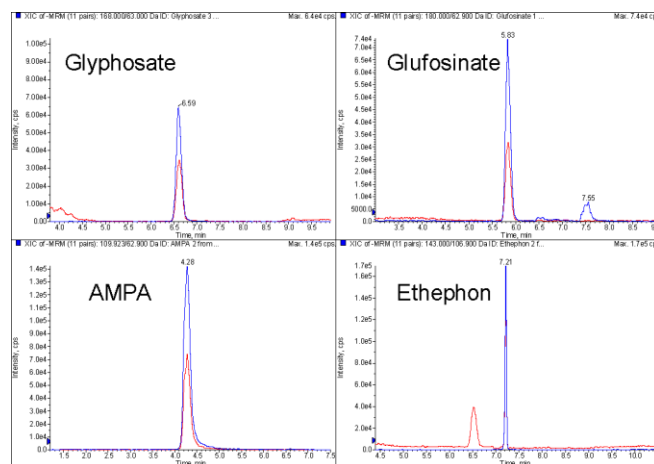
Związek	para MRM	dopasowanie liniowe (wartość r)	S/N dla 1 ng/mL
AMPA	110/79	0.999	131
	110/63	0.999	234
Ethephon	143/79	0.979	58
	143/107	0.984	155
Glufosinate	180/63	1.000	88
	180/95	0.999	47
Glyphosate	168/79	0.999	52
	168/63	0.999	102

\* wartości stosunku sygnału do szumu obliczono w programie MultiQuant<sup>™</sup>

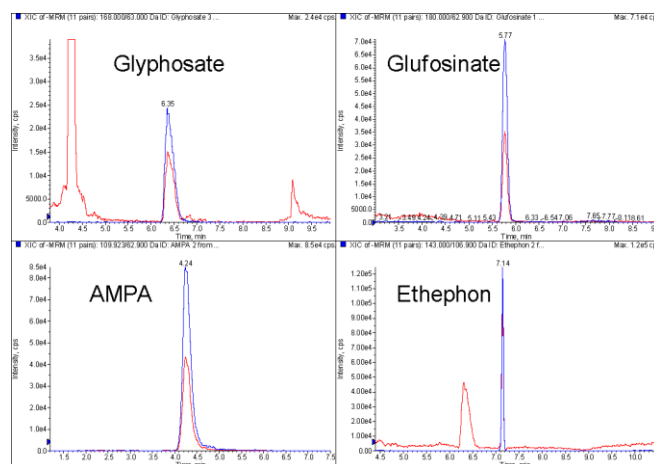


**Rycina 2.** Krzywe kalibracji (na podstawie 2 par MRM) dla badanych pestycydów w zakresie stężeń od 1 do 500 ng/ml

Metodę zastosowano również do fortyfikowanych matryc. Ryciny 3 i 4 pokazują, że wszystkie polarne pestycydy mogą zostać wykryte w różnych matrycach na poziomie wartości MRL (0,1 mg/kg). W Tabeli 4 przedstawiony jest również stosunek sygnału do szumu w czterech różnych matrycach. Wynik pokazuje, że nawet po 5-krotnym rozcieńczeniu ekstraktów żywności, efekt matrycy jest nadal widoczny w postaci niewielkiego przesunięcia czasów retencji, oraz w formie wzmocnienia/łumienia sygnału. Z tego też powodu do badań ilościowych zalecane jest stosowanie znakowanych izotopowo wzorców.



**Rycina 3.** Ekstrakt ryżu fortyfikowany na poziomie 100 µg/kg, rozcieńczony 5 krotnie acetonitrylem



**Rycina 4.** Ekstrakt winogrona fortyfikowany na poziomie 100 µg/kg, rozcieńczony 5 krotnie acetonitrylem

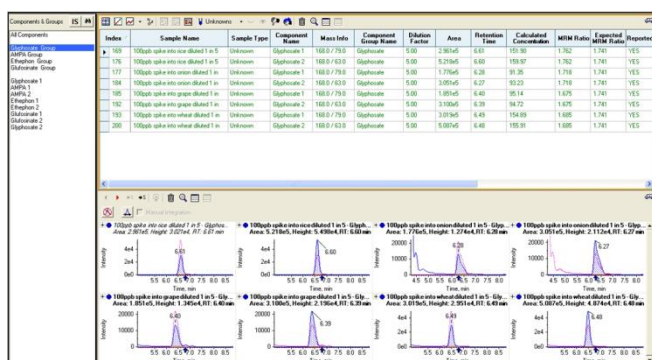
**Tabela 4.** Stosunek sygnału do szumu (S/N\*) obserwowany dla próbek matryc fortyfikowanych na poziomie 0,1 mg/kg wskazuje na tłumienie lub wzmocnienie sygnału przez matrycę nawet po uprzednim rozcieńczeniu próbek.

	AMPA			Etefon		Glufosynat		Glifosat	
	110/79	110/63	143/79	1	143/107	180/63	180/95	168/79	168/63
<i>Ryż</i>	2900	5483	998	998	3058	653	911	3110	
<i>Cebula</i>	761	1379	281	2514	2310	373	249	1312	
<i>Winogrono</i>	1187	2344	133	1149	2892	440	534	1799	
<i>Pszenica</i>	1636	3117	174	1014	3062	557	588	2708	

**Tabela 5.** Odzyski obserwowane dla próbek różnych matryc fortyfikowanych na poziomie 100 µg/kg bez używania standardów wewnętrznych. Z przedstawionych danych wynika, że w celu zmniejszenia efektu matrycy prowadzącego do zmiany odzysków w zależności od matrycy konieczne jest stosowanie bądź to standardów wewnętrznych bądź krzywych kalibracji wykonanych dla poszczególnych matryc.

	AMPA	Etefon	Glufosynat	Glifosat
Ryż	151%	159%	148%	156%
Cebula	48%	243%	99%	92%
Winogrono	110%	167%	145%	95%
Pszenica	106%	213%	155%	155%

Dane przetwarzane były w programie MultiQuant™ wersja 2.1 z użyciem kwerendy „Multicomponent”. Kwerendy są konfigurowalnymi plikami umożliwiającymi przeprowadzenie niestandardowych zapytań w tabeli wyników. Kwerenda „Multicomponent” automatycznie oblicza i porównuje stosunki par MRM w celu identyfikacji związków, jak również zaznacza stężenia powyżej zadanego poziomu. Przykład wyników i podglądu pików uzyskany po uruchomieniu pliku kwerendy przedstawione są na Rycinie 5.



**Rycina 5.** Automacyjny raport dla pestycydów z wykorzystaniem kwerendy 'Multicomponent' w programie MultiQuant™: kwerenda oblicza stosunek par MRM oraz zaznacza próbki przekraczające dopuszczalne wartości MRL.

## Podsumowanie

Przedstawione tutaj badania pokazują że Glifosfat oraz inne polarne pestycydy mogą być wykrywane bez upochadniania nawet w niskich stężeniach za pomocą wysokoczułego systemu LC-MS/MS takiego jak AB SCIEX QTRAP® 5500, po uprzednim rozdzielaniu próbki w kolumnie typu HILIC,. Dzięki szczególnym właściwościom źródła jonów Turbo V™, umożliwiającym pracę z podawanymi z prędkościami powyżej 1 ml/min mieszaninami o dużej zawartości wody, wykrywanie tych związków jest szybkie, nawet wtedy gdy używana jest nieoptymalna, zakwaszona faza ruchoma. Oznacza to że do skutecznej analizy nie są już wymagane ani upochadnianie FMOc ani zajmująca dużo czasu chromatografia jonowa.

Wszystkie związki zostały zidentyfikowane i zbadane ilościowo na poziomie 0,1 mg/kg, po 5-krotnym rozcieńczeniu ekstraktów QuPPE, w oparciu o dwie pary MRM. Należy jednak zauważyć, że w rutynowych badaniach obserwowano efekt matrycy, w związku z czym zaleca się stosowanie krzywych kalibracji wykonanych w matrycach, lub jeszcze lepiej, izotopowo znakowanych standardów wewnętrznych.

## Odnosiniki

- 1 [http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/srm/meth\\_QuPPE.pdf](http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/srm/meth_QuPPE.pdf)
- 2 Rozporządzenie (EU) 'dotyczące wprowadzania na rynek środków ochrony roślin' No 1107/2009
- 3 Rozporządzenie Komisji (EU) 'dotyczące maksymalnych ilości pozostałości' No 441/2012

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

© 2013 AB SCIEX. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

Publication number: 6940213-01

**Headquarters**  
500 Old Connecticut Path, Framingham, MA 01701 USA  
Phone 508-383-7700  
[www.sciex.com](http://www.sciex.com)

**International Sales**  
For our office locations please call the division headquarters or refer to our website at [www.absciex.com/offices](http://www.absciex.com/offices)