

Определение содержания остаточных пестицидов в зерновых культурах



Китай — одна из первых стран в мире, которая начала использовать пестициды для борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур. Обширная территория с более чем 100 млн га пахотных земель, сложные природно-географические и климатические условия, большое разнообразие сельскохозяйственных культур обуславливают такие проблемы, как возникновение болезней растений, распространение сорняков, насекомых-вредителей и грызунов, что представляет серьезную угрозу сельскохозяйственному производству. Используя пестициды как оружие, люди накопили богатый опыт многолетней борьбы с вредителями и сорняками. Вместе с тем, широкое использование пестицидов уничтожает и естественных врагов вредителей, что приводит к усилению зависимости от пестицидов в сельскохозяйственном производстве и, таким образом, вызывает ряд проблем с безопасностью сельскохозяйственной продукции и пищевых продуктов. В настоящее время во всем мире усиливается контроль за содержанием остатков пестицидов в продукции, повышаются требования к чувствительности и эффективности обнаружения остатков пестицидов, а также все больше внимания уделяется разработке новых технологий быстрого обнаружения следовых остатков пестицидов.

В настоящее время существует множество методов экстракции пестицидов из сельскохозяйственной продукции, в том числе гомогенная экстракция, вибрационная экстракция, ультразвуковая экстракция, однако для таких культур, как рис и кукуруза, эффективность обычных методов экстракции ниже, т.к. органическим растворителям трудно проникнуть в матрицу. В технологии жидкостной экстракции под давлением используется нагрев и давление, чтобы привести экстракционный растворитель в субкритическое состояние. В этом состоянии вязкость и коэффициент диффузии растворителя приближаются к показателям газообразной среды, а плотность и растворимость - остаются как у жидкости, что значительно увеличивает эффективность экстракции.

Поэтому мы разработали быстрый, эффективный и точный метод обнаружения остатков более, чем 30-ти пестицидов в зерне с использованием высокопроизводительного экстрактора жидкости под давлением серии Raykol HPFE.

Оборудование, расходные материалы и реактивы

Оборудование	Raykol Auto EVA 80 Высокопроизводительный автоматический параллельный концентратор
	Raykol HPFE Высокопроизводительный экстрактор жидкости под давлением
	Raykol Fotector Plus Высокопроизводительный автоматический твердофазный экстрактор
	Полностью автоматизированная рабочая станция Raykol AP 300 для обработки жидких проб
	Тандемный газовый хроматомасс-спектрометр
Расходные материалы	Колонка для твердофазной экстракции C18 (RayCure C18, 500 мг/6 мл), кат.№ RC-204-16004
	Колонка для твердофазной экстракции GCB/NH2 (RayCure GCB/NH2, 500 мг/6 мл), кат.№ RC-204-13822
Реактивы	Ацетонитрил (CH ₃ CN, хроматографически чистый)
	Диатомит (SiO ₂ , высшей степени чистоты)
	Безводный сульфат натрия (Na ₂ SO ₄ , ч. ч.): прокалить при 650°C в течение 4 ч, охладить; готовый к использованию хранить в эксикаторе.
	Толуол (C ₇ H ₈ , высший сорт)
	Ацетон (CH ₃ COCH ₃ , ч.д.а.)
Дихлорметан (CH ₂ Cl ₂ , хроматографически чистый)	

Приготовление стандартных образцов

Используйте рабочую станцию для обработки жидких проб Raykol AP 300 для приготовления рабочих растворов стандартов пестицидов. Приготовьте смешанный стандарт пестицидов групп А и В (50 мкг/мл) с помощью модуля подготовки органических жидкостей рабочей станции: сначала приготовьте исходный раствор смешанного стандарта групп А и В в смеси 1 мкг/мл (А+В). Далее приготовьте рабочий раствор смешанного стандарта с концентрациями 10,0 мкг/л, 20,0 мкг/л, 50,0 мкг/л, 100,0 мкг/л и 200,0 мкг/л. Конкретный метод приготовления показан на рисунке 1. После высушивания азотом в высокопроизводительном автоматическом параллельном концентраторе Ruike Auto EVA 80 к "пустому" матричному раствору добавьте 1 мл вышеупомянутого смешанного стандартного рабочего раствора, и приготовьте серию смешанных матричных стандартных рабочих растворов, пропустите через микропористую мембрану 0,22 мкм. Определяйте методом тандемной газовой хроматомасс-спектрометрии.



Raykol AP 300 Полностью автоматическая рабочая станция для обработки жидких проб

A 盘

B 盘

C 盘

D 盘

序号	命令	源液位	源液浓度	源液体积(mL)	目标位	目标浓度	目标体积(mL)	溶剂	洗剂溶剂
1	填充管路								
2	配液	A1-2	50000.00	1.00	A11	1000.00	3.00	乙腈-乙醇	乙腈-乙醇
3	抽吐混匀				A11		0.10		乙腈-乙醇
4	直接稀释	A11	1000.00	1.00	A22	10.00	1.00	乙腈-乙醇	乙腈-乙醇
5	直接稀释	A11	1000.00	1.00	A23	20.00	1.00	乙腈-乙醇	乙腈-乙醇
6	直接稀释	A11	1000.00	1.00	A24	50.00	1.00	乙腈-乙醇	乙腈-乙醇
7	直接稀释	A11	1000.00	1.00	A25	100.00	1.00	乙腈-乙醇	乙腈-乙醇
8	直接稀释	A11	1000.00	1.00	A26	200.00	1.00	乙腈-乙醇	乙腈-乙醇
9									

Обработка образцов

Экстракция



На слой кварцевого песка высотой 1 ~ 2 см положите 10 г подготовленного образца кукурузы и 5 г диатомита. Перемешайте и поместите в экстракционную камеру.

Экстракция: используйте ацетонитрил в качестве экстракционного растворителя, статическая экстракция при 10,34 МПа, 80 °С в течение 180 с, циклическая экстракция дважды, время продувки и время промывки 90 с и 60 с.

Загрузите кварцевый песок так, чтобы высота образца в резервуаре составляла 0,5-1 см от горловины резервуара и с помощью щетки тщательно очистите образец в горловине резервуара для экстракции, установите верхний фильтр и переместите резервуар в нагревательный бассейн для экстракции.

После завершения процесса соберите экстракт. Для образцов с небольшим содержанием масла возьмите половину объема экстракта (эквивалентно объему образца 5 г) а для образца с большим содержанием масла возьмите четверть объема экстракта (эквивалентно объему образца 2,5 г) для дальнейшей очистки.

Первый этап очистки



Установите колонку C18 в высокопроизводительный автоматический прибор для твердофазной экстракции Fotector Plus и активируйте колонку 10 мл ацетонитрилом перед загрузкой образца.

Полученный экстракт нанесите на колонку для твердофазной экстракции C18, и элюируйте 10 мл ацетонитрила, соберите элюат.



Сконцентрируйте собранный элюат примерно до 1 мл с помощью высокопроизводительного автоматического параллельного концентратора в токе азота Auto EVA 80 и проведите очистку на композитной колонке GCB/NH.

Второй этап очистки



Установите композитную колонку GCB/NH 2 в Fotector Plus. Перед загрузкой образца активируйте композитную колонку в Fotector Plus используя 4 мл смеси ацетонитрил-толуол (3+1), отбросьте полученную жидкость.

Перенесите полученный ранее концентрат на композитную колонку, дважды промойте пробирку с образцом 6 мл ацетонитрил-толуола (3+1) и также перенесите на композитную колонку.

Промойте композитную колонку 25 мл смеси ацетонитрил-толуол (3+1) и соберите полученный элюат.

Процедура	Растворитель	Загрузка	Скор. пот. (мл/мин.)	Объем, (мл)	Время, (мин.)
Очистка канала образца	C ₂ H ₅ N			2.8	
Активация	C ₂ H ₅ N	Орг. отходы	5	10	2.6
Загрузка образца		Собрать	5	40	10.3
Промывка флаконов	C ₂ H ₅ N	Собрать	30	5	2
Элюирование	C ₂ H ₅ N	Собрать	3	10	3.9
Продувка		Собрать	20	10	1.3

Рисунок-1. Метод первого этапа ТФЭ с помощью Fotector Plus для определения остатков пестицидов в зернах

Процедура	Растворитель	Загрузка	Скор. пот. (мл/мин.)	Объем, (мл)	Время, (мин.)
Активация	C ₂ H ₅ N+C ₇ H ₈ ...	Орг. отходы	5	5	1.4
Загрузка образца		Собрать	2	2	1.4
Промыв. флакон.	C ₂ H ₅ N+C ₇ H ₈ ...	Собрать	60	3	2.3
Промыв. флакон.	C ₂ H ₅ N+C ₇ H ₈ ...	Собрать	60	3	5.1
Элюирование	C ₂ H ₅ N+C ₇ H ₈ ...	Собрать	2	25	13.4
Продувка		Собрать	60	10	1

Рисунок-2 Метод второго этапа ТФЭ с помощью Fotector Plus для определения остатков пестицидов в зернах

Условия анализа

Газовый хроматограф

Объем ввода: 1 мкл
 Температура на входе: 280 °C
 Режим ввода: ввод без деления потока
 Поток 60мл/мин
 Газ-носитель: гелий
 Программа нагрева: начальная температура 40°C, поддерживается 1 мин, затем повышается до 120°C со скоростью 40°C/мин, затем повышается до 240°C со скоростью 5°C/мин, затем повышается до 300°C со скоростью 12°C/мин и выдерживали 6 мин.

Масс-спектрометр

Температура источника ионов: 230 °C
 Температура масс-анализатора: 150 °C
 Дополнительный нагрев: 280 °C
 Метод регистрации: режим динамического мониторинга множественных реакций (dMRM), напряжение электронного умножителя: относительное напряжение 200 В, общее напряжение 1671 В

Результаты и обсуждение

Для проверки степени извлечения этого метода, к образцу (10 г) добавили указанный выше стандарт (200 мкл, 1 мг/л). Данные представлены в таблице 1: степень извлечения более 90 % соединений превышала 80 %, а значения RSD находились в пределах 15 % (n=3). Это показывает, что данный метод может успешно применяться для обнаружения остатков многих пестицидов в зерне.

Таблица 1. Степень извлечения и значение RSD при определении остатков некоторых пестицидов в кукурузе (0,02 мг/кг)

Наименование	Время (мин.)	Степ. извл.(%)			Ср.коэфф. извл. (%)	RSD (%)
		образец 1	образец 2	образец 3		
Метамидофос	10.33	62.92	60.36	57.71	60.33	2.61
Метидатион	12.69	59.48	67.51	63.77	63.58	4.02
Хлорфенвинфос	13	90.35	98.35	99.69	96.13	5.05
Хлорфенезин	13.09	66.33	67.42	61.01	64.92	3.43
Грамоксон	13.39	75.1	65.12	69.19	69.8	5.02
Тетрахлор-нитробензол	14.63	67.93	60.47	62.55	63.65	3.85
Циклоат	14.97	57.51	67.28	68.17	64.32	5.91
Гексахлорбензол	15.5	53.61	62.65	64.71	60.32	5.9
Нематофос	15.72	61.47	71.85	71.28	68.2	5.84
Дифенфос	16.06	71.91	79.01	78.12	76.35	3.87
Дифениламин	16.22	66.45	72.06	73.99	70.83	3.91
Эталфлуралин	16.47	71.1	81.26	78.88	77.08	5.31
Байкарб	16.5	78.65	85.32	85.47	83.15	3.89
Бенфлуралин	16.9	70.33	81.87	83.01	78.4	7.01
Форат	17.14	70.91	83.3	87.74	80.65	8.72
Сульфотеп	17.21	64.22	76.15	77.23	72.53	7.22
Хлорпрофам	17.46	84.43	89.76	86.48	86.89	2.69
Альфа-ГХЦБ	17.7	66.92	76.96	74.35	72.74	5.21

Наименование	Время (мин.)	Степ. извл.(%)			Ср.коэфф. извл. (%)	RSD (%)
		образец 1	образец 2	образец 3		
Пропазин	19.6	99.55	100.43	94.86	98.28	2.99
Карбофуран	19.62	90.4	95.11	91.62	92.37	2.44
Атразин	19.73	99.58	101.61	96.99	99.39	2.32
Аминопиралид	19.8	80.23	83.96	84.08	82.76	2.19
Арезин	19.81	81.86	84.11	79.65	81.87	2.23
Симазин	19.84	102.11	103.3	97.63	101.01	2.99
Тербутилазин	20	93.83	98.55	92.86	95.08	3.04
Ипробенфос	20.41	91.39	94.7	91.41	92.5	1.91
Изазофос	20.45	115.7	117.81	102.97	112.16	8.03
Пентахлоранилин	20.48	86.26	91.58	87.15	88.33	2.85
Пронамид	20.5	86.54	72.4	87.97	82.3	8.6
Дихлофентион	20.51	84.04	87.31	86.43	85.92	1.69
Монокротофос	20.58	100.33	99.19	91.21	96.91	4.97
Примикарб	20.6	103.11	105.7	100.19	103	2.76
Диметоат	20.98	88.57	89.84	89.96	89.46	0.77
Хлорпирифос-метил	20.98	83.97	88.32	85.23	85.84	2.24
Алдрин	21.22	78.4	84.1	80.21	80.9	2.91
Ацетохлор	21.45	85.34	90.88	87.15	87.79	2.83

Итоги

· За счет повышенных давления и температуры в процессе жидкостной экстракции под давлением, растворитель остается в жидком состоянии, тогда как его коэффициент диффузии увеличивается и повышается способность растворять остатки пестицидов. Добавление небольшого количества диатомовой земли дает два эффекта: (1) диатомовая земля за счет способности впитывать и удерживать воду может поглощать часть воды из образца и (2) диатомит за счет адсорбирующих свойств может также использоваться для удаления части жирорастворимого пигмента.

· Образцы зерна обычно содержат большое количество масла, которое успешно удаляется на колонке ТФЭ С18. Композитная колонка GCB/NH2 удаляет из экстракта пигмент и органическую кислоту .

· В процессе пробоподготовки извлечение пестицидов из образцов проводили на высокопроизводительном приборе для экстракции жидкости под давлением Raykol HPFE 06, для очистки экстракта использовали высокопроизводительный автоматический прибор для твердофазной экстракции Fotector Plus, а концентрирование экстракта проводили с помощью высокопроизводительного автоматического параллельного концентратора Auto EVA 80. И, наконец, использовалась рабочая станция автоматической обработки жидких проб AP 300 для приготовления смешанных стандартных растворов. Это обеспечило автоматизацию всего процесса предварительной обработки образцов для обнаружения остатков пестицидов в зерне. Данное решение позволило сократить время контакта экспериментаторов с органическими растворителями, повысило эффективность экспериментов и снизило количество ошибок, вызванных человеческим фактором.