

ОСНОВНІ ПУБЛІКАЦІЇ

*МЕЛЬНИЧУК С. Д., БАРАНОВ Ю. С., ЗЕМЦОВА О. В.,
ПАВЛИНЧУК В. И., МАКСИМЧУК И. С., ШИМКО Н. Н.,
ГОНЧАРЕНКО В. С.*

МИНИ-MRM МЕТОД (QUECHERS) И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТКОВ ПЕСТИЦИДОВ В ОВОЦАХ И ФРУКТАХ

Апробована сучасна методика (QuChERS) визначення залишкових кількостей 9 пестицидів (ХОП, ФОС, триазини, динітроаніліни) в овочах та фруктах. Використовувався метод ГРХ з ДЕЗ та ТІД, а також ГРХ/МС (іонна пастка). Екстракцію заморожених проб проводили водним ацетонітрилом, очистку – методом дисперсійної твердофазної екстракції на PSA, GCB. Повернення складало 70-120%, СКВ в межах 25 %.

Апробирована современная (QuChERS) методика определения остаточных количеств 9 пестицидов (ХОП, ФОС, триазины, динитроанилины) в овощах и фруктах. Использовался метод ГЖХ с ДЭЗ и ТИД, а также ГЖХ/МС (ионная ловушка). Экстракцию замороженных проб проводили водным ацетонитрилом, очистку методом – дисперсионной твердофазной экстракции на PSA, GCB. Возврат составлял 70-120%, СКО около 25 %.

The methodology of multiresidues GLC /ECD/NPD/MC determination for 9 pesticides (organochlorine, organophosphate, triazine, dinitroaniline) in vegetables and fruits was approved. Methods used: extraction of acetonitril in frozen condition, clean-up by dispersive SPE employing bulk sorbents (e.g. PSA, GCB)/ Recovery 70-120%<, RSD near 25%.

Ужесточение требований к содержанию остаточных количеств пестицидов в сельскохозяйственных культурах при нынешних уровнях загрязнения окружающей среды и неуклонном расширении ассортимента агрохимикатов определили одну из важнейших проблем аналитической химии ксенобиотиков – повышение надежности идентификации микроколичеств пестицидов в присутствии других токсиантов путем разработки методик определения множественных остатков пестицидов в одном образце матрицы.

Некоторое время на Украине эту проблему достаточно успешно решали путем разработки и применения методик систематического и группового анализа микроколичеств комбинаций пестицидов в различных матрицах, основанных на сочетании жидкостной экстракции и различных видов хроматографии [1,14], (школа хи-

миков-аналитиков проф. Клисенко М.А). Зарубежные аналитики сконцентрировали усилия на возможности определения максимально большего числа аналитов в одной пробе за счет использования возможностей аналитических приборов; появился термин MRM (multiresidues methods).

По мере появления высокоселективных, чувствительных, комбинированных методов анализа: GLC/MS, HPLC/MS, капиллярного электрофореза, ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), и т.д.), основанных на использовании высокопроизводительного лабораторного оборудования и современных приборов, разработка MRM методик определения микроколичеств пестицидов получила новый импульс. Было создано большое количество различных MRM методик для различных матриц, основанных на разных методах экстракции, очистки и количественного определения [2-9,17]. В итоге сформировалась классическая MRM, основанная на экстракции матрицы органическим растворителем, очистке методами твердофазной экстракции (SPE), гель проникающей хроматографии (GPC), идентификации и количественном определении методами капиллярной ГЖХ/МС и ВЭЖХ/МС, а также с использованием различных селективных детекторов [10,19]. В серийном рутинном анализе при использовании классического MRM продолжительность определения комплекса микроколичеств пестицидов (до 280) в 12 образцах различных матриц составляла в среднем 19 часов [10].

В 2003 г S. J. Lehotay, M. Anastassiades [11, 12, 22, 23] предложили мини MRM для определения микроколичеств пестицидов в овощах и фруктах. Суть метода состоит в экстракции пробы водным ацетонитрилом или этилацетатом в присутствии высаливающего комплекса, очистке методом дисперсионной SPE и хроматографическом анализе методами капиллярной ГХ/МС, ГХ/ТИД/ДЭЗ и ВЭЖХ/МС/МС. Таким образом, принцип метода сводится к упрощению и/или слиянию некоторых классических приемов пробоподготовки, а также к уменьшению количества пробы, за счет чего достигается значительная экономия реактивов и времени анализа. Комплексный подход к объединенному применению экстракции, разделения и очистки экстракта дают возможность проводить пробоподготовку с минимальными потерями аналита на лабораторной посуде, на фильтре, при концентрировании на ротационных испарителях, на сорбентах или обезвоживающих реагентах. Использование современных методов идентификации и количественного определения остатков пестицидов делают QuEChERS метод общим методом анализа множественных остатков пестицидов и иных ксенобиотиков, что соответствует современным тенденциям аналитической химии пестицидов.

Преимущество метода QuEChERS в том, что он позволяет проводить пробоподготовку быстро и без потерь, что обусловило успешное использование модифицированных схем QuEChERS для анализа образцов различной природы (вода, почва, растения, овощи/фрукты, зерновые, продукты пищевой промышленности). Достигнутая большая экономия реактивов, материалов, энергоресурсов, времени проведения анализа (менее 1 часа для анализа 12 образцов овощей или фруктов) определила название методики: QuEChERS (аббревиатура важнейших преимуществ методики: quick, easy, cheap, effective and safe) или мини-MRM. В дальнейшем QuEChERS методика была использована для определения, как пестицидов, так и других ксенобиотиков в различных матрицах [13, 15, 16].

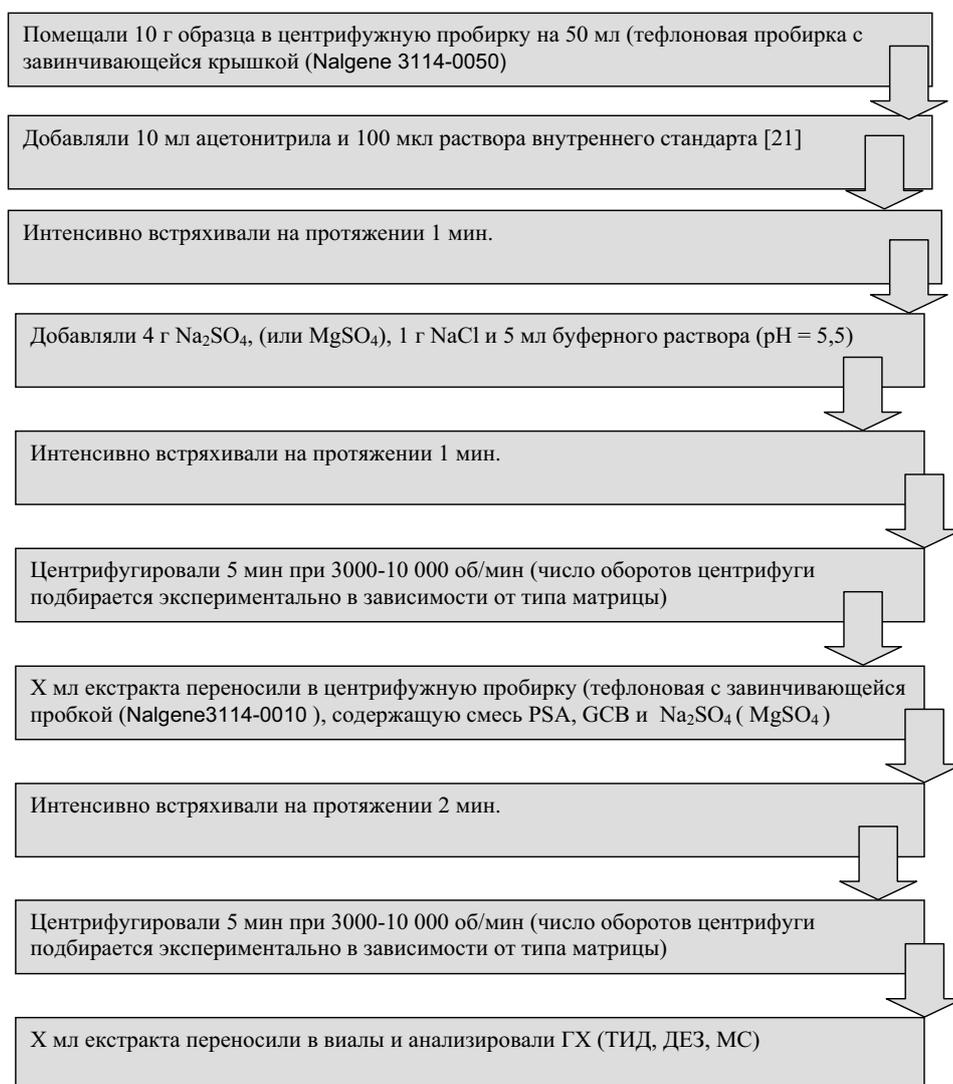
В Украинской лаборатории качества и безопасности продукции АПК (УЛЯБП АПК) целенаправленно разрабатываются MRM для определения микроколичеств пестицидов в объектах системы "почва – продукция АПК" [1, 14, 20], с целью их применения для мониторинга продукции АПК и объектов окружающей среды. QuEChERS методика определения микроколичеств пестицидов в овощах и фруктах

[22] была апробирована и модифицирована в УЛЯБП АПК в 2007 г под руководством ведущих специалистов ФАО.

Результаты апробации представляют, на наш взгляд, практическую ценность и могут вызвать интерес у химиков-аналитиков, занимающихся как определением пестицидов, так и иных загрязнителей в различных объектах окружающей среды. В настоящей работе представлены ключевые моменты методики QuEChERS для овощей и фруктов, блок-схема с элементами модификации и результаты применения методики в УЛЯБП АПК. Полностью методика представлена в журнале AOAC [21], и рекомендована AOAC как официальная методика анализа микроколичеств пестицидов (First Action Method 2007.01.) [22].

Особое место в методике отведено процессу подготовки пробы, собственно QuEChERS и есть оригинальная методика подготовки пробы, значительно сокращающая потери анализируемого препарата.

Овощи и фрукты нарезают кусками (3 x 3 см) и выдерживали в морозильнике в течение суток при -18°C . Затем крупные куски пробы переносили в универсальный блендер UMC 5 Stephan (300-3000 об/мин) и измельчали в среде сухого льда до состояния муки. Отбирали навеску (10г) и последовательно выполняли все операции согласно блок-схемы методики (step-by-step).



Блок-схема определения микроколичеств пестицидов методом QuEChERS в овощах и фруктах

Хроматографический анализ проводили с использованием хроматографов: Кристаллюкс 4000М (ДЭЗ/ГИД) и Thermo Finnigan Trace GC Ultra (МС). Условия хроматографирования представлены в таблицах 1, 2.

При апробации методики в качестве матрицы использовали яблоки, свеклу, капусту, морковь, картофель. В матрицу вносили стандартные растворы 9-ти пестицидов относящихся к хлор-, фосфор- и азотсодержащим соединениям (таблицы 3, 4), в ацетонитриле в концентрациях на уровне 1-4 MRL (Minimal Risk Level), при этом расчетный LOQ (limit of quantitation) обеспечивал определение на уровне 0,5 MRL; в качестве внутреннего стандарта использовали трис-(1.3 дихлоризопропил)-фосфат (TDCPP). При экстракции учитывали влажность образца (в образцы с влажностью выше 80% добавляли воду по формуле $X = 10 - A$; где X количество добавляемой воды, A – количество воды в навеске (при массе навески 10г). В качестве буферного раствора использовали фосфатный буфер с pH 5,5. Авторы QuEChERS [21] рекомендуют использовать цитратный буфер с аналогичным pH, (смесь сухих солей) кроме того, в оригинальной методике использовали сульфат магния. Центрифугирование выполняли на оборудовании фирмы Heraeus – Multifuge 3S (15000 об/мин). В качестве метода очистки использовали дисперсионную SPE на смеси сорбентов PSA. (Bondesil-PSA 40 μ m), GCB (Supelclean Envi-Carb), представляющих собой ионообменную смолу (первичный, вторичный амин) и графитированную сажу соответственно.

Таблица 1.

Условия хроматографирования ГЖХ/МС

Газовый хроматограф Детектор (в режиме полного сканирования масс и в режиме селективного ионного мониторинга)	Trace GC Ultra (Thermo Electron Corp.) масс-селективный Polaris Q (ионная ловушка)
Хроматографическая колонка	DB-5MS 30м x 0.25мм x 0.25мкм
Газ-носитель	Гелий (в режиме постоянного потока) 1.0 мл/мин
Инжектор	250 °С в изотермическом режиме
Объём введенной пробы	1мкл (автосамплер AS3000)
Программа термостата колонок	60 °С (1мин), 10 °С/мин до 280 °С, удерживание 280 °С (7 мин)
Температура трансфер-лайн	275 °С
Диапазон сканирования масс (поз.)	От 45 до 550 а.е.м.
Задержка выхода растворителя	4 мин
Програма библиотечного поиска	NIST MS Search версия 2.0
Библиотека масс-спектров	NIST 2005

Таблица 2.

Условия хроматографирования ГЖХ/ТИД/ДЭЗ

Детектор	ТИД	ДЭЗ
Хроматографическая колонка	Zebtron ZB-5 (30 м x 32 мм x 0,5 мкм)	Zebtron ZB-1 (30 м x 32 мм x 0,5 мкм)
Газ-носитель	Азот (в режиме постоянного давления) P = 1 атм	Азот (в режиме постоянного давления) P = 1 атм
Инжектор	220 °С	250 °С
Колонка	200 °С в изотермическом режиме	200 °С в изотермическом режиме
Детектор	250 °С	250 °С
Водород	10,5 мл/мин	-
Сжатый воздух	180 мл/мин	-
Объем введенной пробы	1 мкл	1 мкл
Програмное обеспечение	Метахром	Метахром

Эксперименты по апробации методики QuEChERS в овощах и фруктах предусматривал выполнение анализа следующих образцов:

- чистый ацетонитрил (выполняли все процедуры согласно блок-схемы);
- контрольный образец без пестицидов;
- рабочий образец в смеси со стандартным раствором 9 пестицидов + TDCPP;
- контрольный образец без пестицидов (выполняли все процедуры согласно блок-схеме, затем перед хроматографированием добавляли в конечный экстракт стандартный раствор 9 пестицидов, такой же концентрации, как и в рабочих образцах.)

Таблица 3.

Определение пестицидов в овощах и фруктах (ГЖХ/МС)

Пестицид	картофель		свекла		капуста		морковь		яблоки	
	Rec.,%	RSD	Rec.,%	RSD	Rec.,%	RSD	Rec.,%	RSD	Rec.,%	RSD
4,4'-ДДТ *	65.8	34.9	84.37	17.3	59.3	3.3	110.5	6.7	100.0	16.5
γ-ГХЦГ	85.2	19.2	100.0	5.1	91.4	4.1	90.0	7.2	103.9	8.9
Трефлан	82.7	17.9	100.0	6.8	79.2	5.7	77.8	12.9	100.0	9.4
Пендиметалин	62.2	18.7	100.0	4.1	69.6	2.1	92.2	9.3	99.9	10.1
Прометрин	82.4	19.1	100.0	6.0	84.2	3.5	90.8	3.5	100.0	11.7
Атразин	92.6	15.1	99.9	5.8	98.7	1,7	92.7	2.6	99.9	19.9
Хлопирифос	92,2	22.0	100.0	4.2	95.0	6.8	106.9	6.4	100.0	6.7
Ацетохлор	109.3	16.8	100.0	4.0	107.7	5.3	-	-	100.0	7.5
Диазинон	98.7	21.7	100.0	7.7	66.8	52.5	104.3	4.9	100.0	5.1

* Возможна дегградация ДДТ в инжекторе.

Таблица 4.

Определение пестицидов в овощах и фруктах (ГЖХ/ТИД/ДЭЗ)

Пестицид	картофель		свекла		капуста		морковь		яблоки	
	Rec.,%	RSD	Rec.,%	RSD	Rec.,%	RSD	Rec.,%	RSD	Rec.,%	RSD
4,4'-ДДТ	91.5	12.3	100.1	1.0	94.3	3.8	99.5	8.5	59.7	27.0
γ-ГХЦГ	78.1	11.0	93.3	11.0	101.5	3.5	109.4	20.6	63.1	28.4
Трефлан	82.9	10.4	90.9	11.0	97.1	3.5	98.0	20.6	60.3	27.3
Пендиметалин	83.5	9.3	90.0	9.7	37.6	9.4	116.2	21.3	63.1	26.0
Прометрин	79.6	16.7	131.1**	8.20	135.0**	10.4	132.0**	14.7	98.9	5.6
Атразин	78.8	32.4	98.1	7.6	132.9**	25.5	132.2**	8.0	78.9	21.8
Хлопирифос	83.1	11.0	94.8	8.1	103.4	5.3	112.2	19.3	60.4	25.9
Ацетохлор	77.8	13.3	92.8	10.3	96.7	4.8	117.2	16.8	67.7	27.3
Диазинон	77.8	20.4	106.8	17.8	135.0**	10.4	132.0**	14.7	59.7	17.0

** Возможно завышение результатов из-за мешающего влияния ацетонитрила на ТИД

Полученные результаты свидетельствуют о достаточно высоком уровне определения (% Rec) анализируемых пестицидов из матриц и удовлетворительном разделении аналитов проб и стандартных растворов в использованных хроматографических условиях (рис.1, 2, 3,).

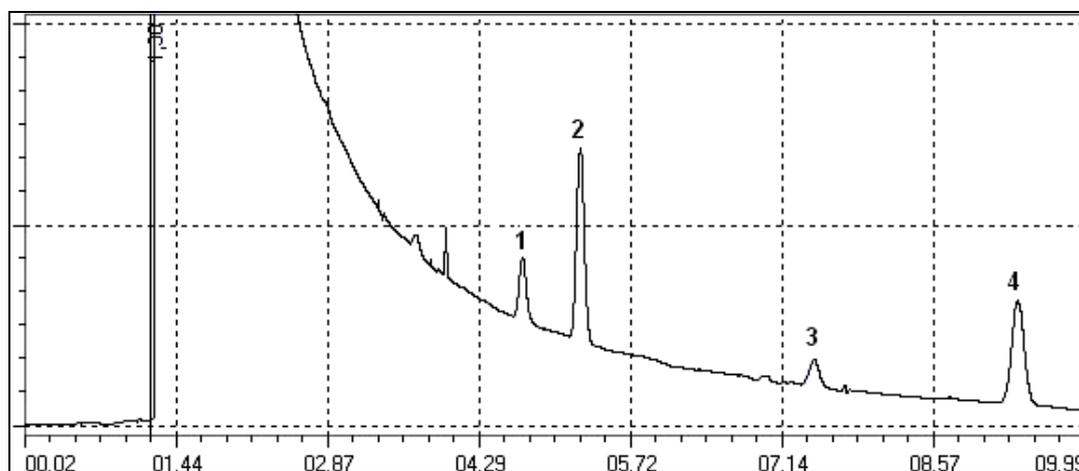


Рис. 1. Хроматограмма образца моркови, ГЖХ/ТИД

1 – атразин; 2 – диазинон; 3 – прометрин; 4 – хлопирифос

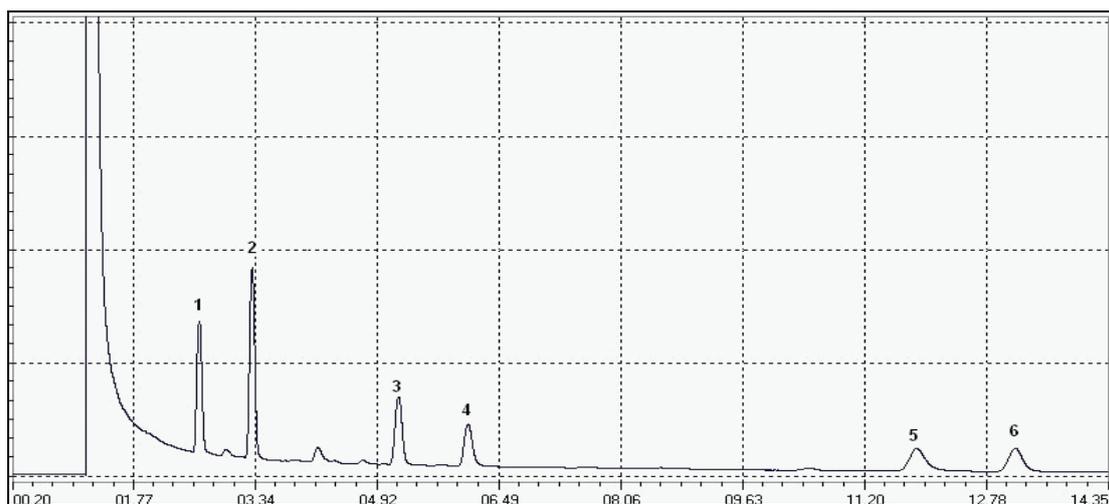


Рис. 2. Хроматограмма образца свеклы, ГЖХ/ДЭЗ

1 – трефлан; 2 – линдан; 3 – ацетохлор; 4 – хлорпирифос; 5 – стомп; 6 – TDCSP; 7 – ДДТ

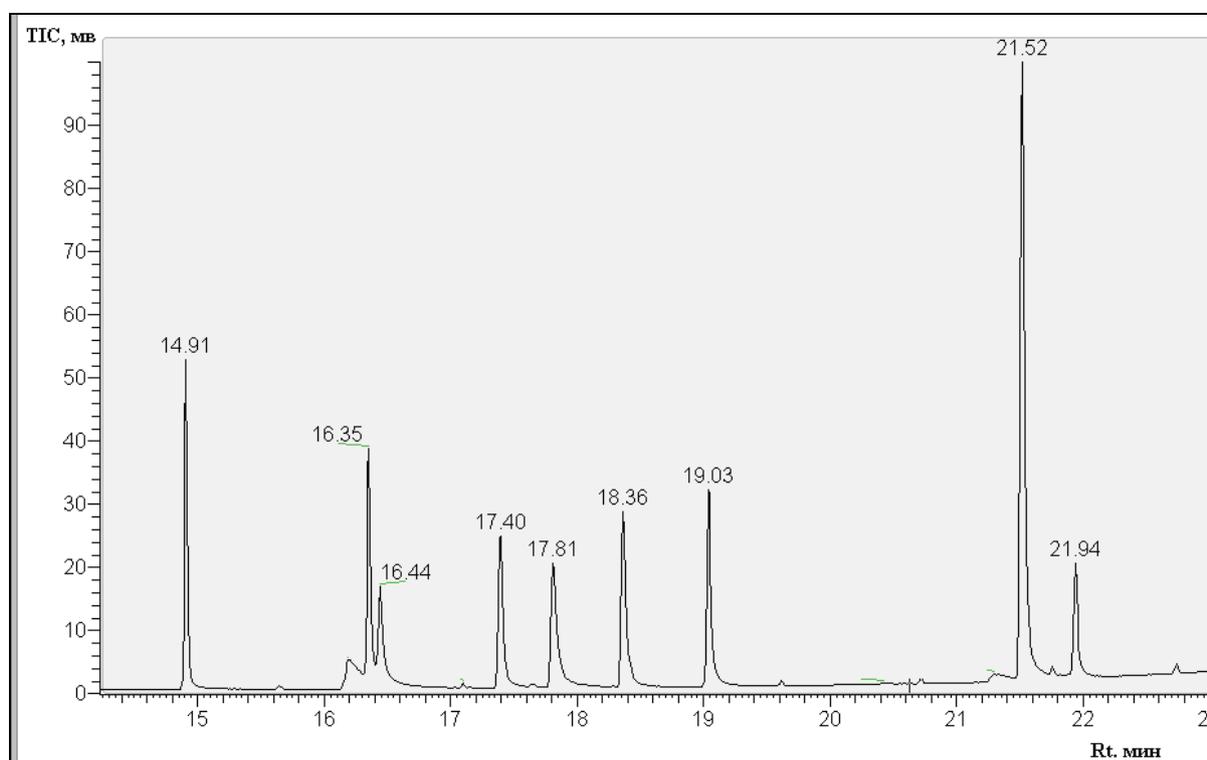


Рис. 3. Хроматограмма стандартной смеси по полному ионному току (TIC)

14.91 – трефлан; 16.35 – диазинон; 16.44 – линдан; 17.40 – ацетохлор; 17.81 – прометрин; 18.36 – хлопирифос; 19.03 – пендиметалин; 21.52 – TDCPP; 21.94 – 4,4'-ДДТ.

Исключение составляет низкий процент извлечения пестицидов из яблок (таблица 4). Относительное стандартное отклонение результатов анализа (RSD), в большинстве случаев, находилось в пределах нормированного значения 20%. Полученные негативные результаты (завышенные Recovery и RSD) объясняются деградацией ДДТ в инжекторе хроматографа, наличием концентрационного эффекта ввиду длительного хранения экстрактов перед анализом ГЖХ/ГИД и негативным влиянием ацетонитрила на уровень сигнала ГИД рис. 1. Последний артефакт может быть устранен заменой ацетонитрила на этилацетат.

Предел количественного определения в настоящем эксперименте не рассчитывался, однако запас по LOQ в методике с использованием ГЖХ/МС (с учетом фортификации проб на уровне 1–4 MRL) составил около 10 без учета возможности концентрирования финальной пробы. Если возникает необходимость концентрирования пробы, после очистки методом дисперсионной SPE, аликвоту (1–10 мл) концентрируют в слабом токе чистого азота до 1 мл. Таким образом, LOQ может быть поднят еще в 10 раз.

При использовании хроматографического анализа методом ГЖХ/ТИД, предел обнаружения фосфор- и, особенно, азотсодержащих пестицидов ограничен возможностями ТИД, однако и в этом случае обеспечивается определение пестицидов на уровне MRL. Время анализа серии из шести образцов (шесть – возможность используемой центрифуги), независимо от характера матрицы, не превышало 1 часа.

Таким образом, первая апробация методики QuEChERS в овощах и фруктах на Украине показала бесспорное её преимущество перед большинством используемых методик по основным показателям и требованиям санитарно-гигиенического контроля.

Валидация методики, проводящаяся в настоящее время в УЛЯБП АПК НАУ позволит определить все метрологические параметры этой методики и рекомендовать ее к применению для санитарно-гигиенического контроля микроколичеств пестицидов на Украине.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде. – М.: ВО Колос. – 1992. т. 2. – С. 74-106.
2. **Shuling S., Xiaodong Ma., Chongjiu Li.** Multi-residue determination method of pesticides in lek by gel permeation chromatography and solid phase extraction followed by gas chromatography with mass spectrometric detector. // *Food Control*, May 2007. – V. 18, Is. 5. – P. 448-453.
3. **Diez C., Traag W.A., Zommer P., Marinero P. and Atienza J.** Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. // *Journal of Chromatography A*, October 2006. – V. 1131, Is. 1-2. – P. 27, 11-23.
4. Official Methods of Analysis of AOAC International. – 2005. – 18th ed. – ch. 10.
5. **Ferrer I., Juan F., Garcia-Reyes, Milagros Mezcuca, E. Michael Thurman and Amadeo R. Fernandez-Alba.** Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography-time-of-flight mass-spectrometry. // *Journal of Chromatography A*, 29 July 2005. – V. 1082, I. 1. – P. 81-90.
6. **Carro A.M., Lorenzo R.A., Fernandez F., Rodil R. and Cela R.** Multi-residue screening of chlorinated and brominated compounds from aquaculture samples using matrix solid-phase dispersion – gas chromatography – mass spectrometry. // *Journal of Chromatography A*, April 2005, – V. 1071, I. 1-2, 15. – P. 93-98.
7. **Francisco Javier Egea Gonzalez, Maria Elena Hernandez Torres.** Internal quality-control and laboratory-management tools for enhancing the stability of results in pesticide multi-residue analytical methods. // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, May 2004. – V. 23, I. 5. – P. 361-369.
8. **Christer Jansson, Tuija Pihlstrom, Bengt-Goran Osterdahl.** A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. // *Journal of Chromatography A*, January 2004. – V. 1023, I. 1, 9. – P. 93-104.
9. **Clovis L. da Silva, Elizabete C. de Lima and Marina F. M. Tavares** Investigation of preconcentration strategies for the trace analysis of multi-residue pesticides in real samples by capillary electrophoresis. // *Journal of Chromatography A*, 3 October 2003. – V. 1014, I. 1-2. – P. 109-116.

10. **Hajshlova J.** Benefits of GC x GC/TOFL-MS in analysis of food/environmental contamination. // workshop LECO, June 14, 2006, Moscow.
11. **Steven J. Lehotay.** Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. // U.S. Dept. of Agriculture, Agricultural Research Service, Eastern Regional Research Center; 600 East Mermaid Lane; Wyndmoor, PA 19038; USA.
12. **Michelangelo Anastassiades, Ellen Scherbaum and Dorothea Bertsch.** Validation of a Simple and Rapid Multiresidue Method (QuEChERS) and its Implementation in Routine Pesticide Analysis. // Chemisches und Veterinaruntersuchungsamt Stuttgart, Schaflandstrasse 3/2, 70736 Fellbach Poster presented at the MGPR Symposium (May 2003, Aix en Provence, France)
13. **Sara C. Cunha, Steven J. Lehotay, Katerina Mastovska, Jos O. Fernandes, Maria Beatriz.** Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. // J.Sep.Sci., 2007, 30, 620-632.
14. **Клісенко М. А., Александрова Л. Г., Демченко В. Ф., Макаручук Т. Л.** Аналітична хімія залишкових кількостей пестицидів. // Київ, 1999. – 238 с.
15. **M. Anastassiades.** CVUA Stuttgart. QuEChERS, A Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Low-Fat Products.
16. **M. Anastassiades.** Recovery Studies using the QuEChERS Method.
17. **Чмилъ В.Д.** Современные тенденции развития методов анализа остатков пестицидов (по материалам 10-го Международного конгресса ИЮПАК по химии защиты растений). // Современные проблемы токсикологии, 2004. – № 2. – С. 56-62.
18. **S. H. B. Wan, M. K. Wong, P. Y. Lim.** Small-scale multi-residue method for the determination of organochlorine and pyrethroid pesticides in vegetables. // Journal of Chromatography A, February 1994. – V. 662, I. 1, 18. – P. 147-152.
19. **Paul D. Johnson, Duncan A. Rimmer.** Adaptation and application of a multi-residue method for the determination of a range of pesticides, including phenoxy acid herbicides in vegetation, used on high-resolution gel permeation chromatographic clean-up and gas chromatographic analysis with mass-selective detection. // Journal of Chromatography A, March 1997. – V. 765, I. 1, 21. – P. 3-11.
20. **Мельничук С. Д., Лоханская В. И., Баранов Ю. С., Цвилюховский В. И., Земцова О. В., Жук Е. В.** Определение множественных остатков пестицидов в почвах прикладских территорий. // Журнал Хроматографічного товариства, 2005. – т.5, № 3, С. 4-10.
21. **Anastassiades M., Lehotay S. J., Stajnbauer D., Schenck F. J.** Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce. // J. AOAC Int., 86 (2003) 412-431 Page 1 of 12.
22. OMA 18-th Ed. Current Trough Revision 2, 2007 Ch. 10 First Action 2007.01. (10.1.04).
23. **Ronald E. Majors.** QuEChERS – A New Sample Preparation Technique for Multiresidue Analysis of Pesticides in Foods and Agricultural Samples. // Chrom. Online, may 2007, LCGC North America.
24. **Anastassiades M., Lehotay S. J.** QuEChERS Method Catches Pesticide Residues // Agr., Res., June, 2.

Авторский коллектив выражает благодарность сотрудникам ФАО д-ру К. Циллеру и д-ру Р. Пателю за помощь в проведении экспериментов.

*Национальный аграрный университет
Украинская лаборатория качества и безопасности продукции АПК
г. Киев*

Поступило в редакцию 18.03.2008