APP NOTE-6/2018GCMS



Определение остаточных количеств действующих веществ пестицидов в образце табака, с использованием квадрупольного масс-детектора «Maestro-αMS»

Колунтаев Д. А*. к. б. н., научный сотрудник отдела исследований и разработок,*
ООО Интерлаб*, Россия, Москва*

Ключевые слова
Газовая хромато-масс-спектрометрия, пестициды, табак, iDwell®Time, SIM Wizard®, SIM, QuEChERS, SIM библиотека

Резюме

Продемонстрирована возможность детектирования остаточных количеств действующих веществ пестицидов в высушенных листьях табака с помощью хромато-масс-спектрометрической системы Маэстро-αMC.

Введение

Табак выращивают более чем в 125 странах, и им занято более 4 миллионов гектаров плодородных земель. При этом за последние годы площади занятых под табак земель в таких странах как США, Канада и Мексика сократились вдвое, а в Китае, Малави и Танзании, она, наоборот, удвоилась. В настоящее время мировое производство табака превышает 7 млн. тонн в год [1].

Табак – это чувствительное растение, склонное ко многим заболевания. Поэтому уход за растением требует огромного количества химических средств: в течение одного трёхмесячного периода роста рекомендуется до шестнадцати обработок пестицидами [1]. Это требует тщательного контроля и выполнения мер безопасности в ходе применения пестицидов, мониторинга их остаточных количеств, как в вегетативной части растений в процессе роста, так и в конечной продукции. Такой контроль должен гарантировать безопасность и качество табака.

Парадокс контроля химического состава табачной продукции состоит в том, что люди фактически потребляют не те вещества, которые содержатся в самом изделии, а те, которые образуются в результате его сгорания. Однако, даже после переработки и производства табачной продукции некоторые остаточные количества пестицидов всё равно остаются в табаке и тем самым присутствуют в табачном дыме. Подобные факты подтверждаются многочисленными литературными данными. Нельзя не отметить и более серьёзные случаи, в частности, ДДТ и диелдрин, которые широко использовались при выращивании табака до их запрета в 1981 году, но их остатки всё ещё обнаруживаются в почвах и высушенном табачном листе [1].

Всё это побудило мировую табачную промышленность уделить большое внимание рискам, связанным с воздействием остаточных количеств действующих веществ пестицидов в табаке и табачной продукции на организм человека. Для защиты потребителей и контроля загрязнения растительной продукции официально изданы рекомендационные уровни (GRL) для 118 наименований пестицидов [3]. Но реализация подобной программы мониторинга стала возможной только при использовании высокочувствительных аналитических систем, которые позволяют детектировать и количественно определять уровни концентраций остаточных количеств действующих веществ пестицидов ниже рекомендационных. При этом, наиболее эффективный подход к их контролю связан с применением мульти-компонентных методов анализа, в частности таких, как QuEChERS [2], которые позволяют экстрагировать большой диапазон соединений одновременно в одном флаконе.

В настоящей статье продемонстрирована возможность применения мультикомпонентного метода пробоподготовки QuEChERS с использованием набора VetexQ (Интерлаб), в комплексе с применением высокочувствительного масс-детектора Maestro-αMS для решения задачи контроля и анализа остаточных количеств пестицидов в образце высушенного табака.

Экспериментальная часть

Материалы и методы

Все используемые в исследовании реагенты имеют классификацию, как особо чистые или HPLC grade. Стандарты действующих веществ пестицидов были приобретены в компаниях Restek (США) и Supelco (США), в частности: Pesticide Mix A-2 (Supelco 46862-U); GC Multiresidue Pesticide Std#1 – OPP (Restek 32563); 8140/8141 OP Pesticide Calibration Mix A (Restek 32277); внутренний стандарт Triphenylphosphate Standard (Restek 32281).

В качестве объекта исследования использован экстракт модельного образца табака, приготовленный по методу пробоподготовки QuEChERS [2]. Экстракт также использовали для внесения смеси 45 действующих веществ пестицидов с концентрациями 5; 10; 20; 50; 100; 500; 1000 пг/мкл (ppb), с целью построения калибровочной зависимости соединений на фоне матрицы (матричная калибровка). Для апробации используемого метода QuEChERS и для оценки возможности аналитической системы, в сухой образец табака вносили смесь пестицидов с целью получения финальных экстрактов с концентрациями 50 ppb и 500 ppb соответственно.

Табл. 1. *Параметры инструментального метода.*

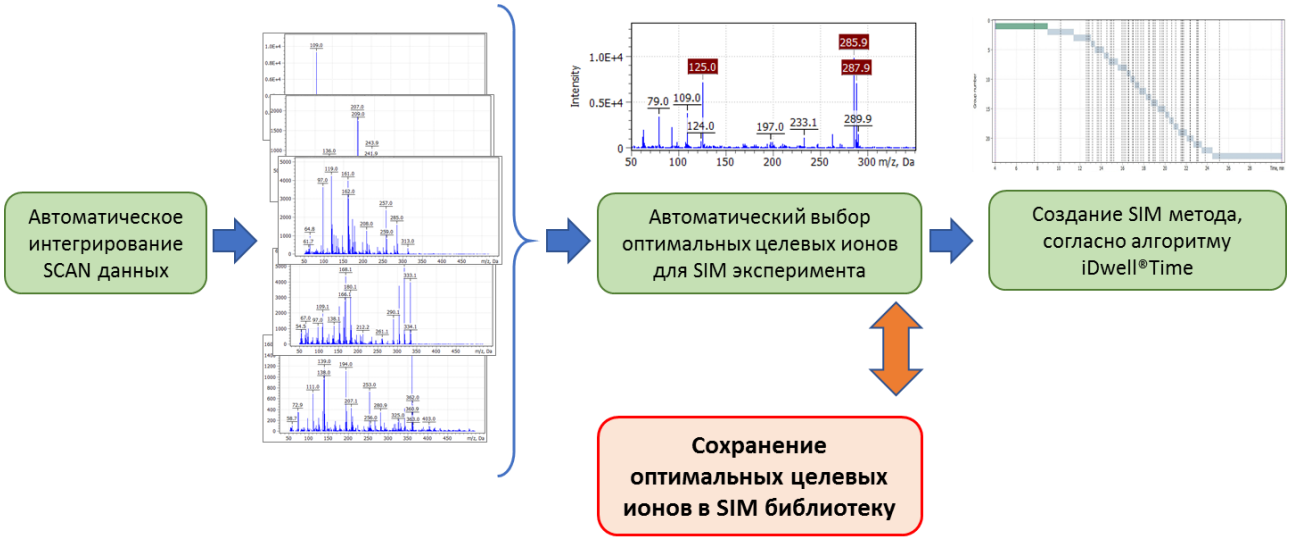
Инструментарий	
ГХ-МС система	Maestro-αMS
Испаритель	Split/Splitless (liner: Restek 4 mm x 6.3 x 78.5)
Хроматографическая колонка	Rtx-5MS (30m x 0.25mm; 250um)
Экспериментальные настройки	
Объём пробы	1 мкл (режим «Sandwitch», 1 слой воздуха – 1 мкл)
Режим работы испарителя	Splitless; Purge 70 мл/мин после 0,7 мин
t° испарителя	250°C
Режим тока газ-носителя	Режим Constant flow
Градиент t° печи	50°C в течение 1,23 мин; 30,0°C/мин до 90°C, удержание 0,0 мин; 9,0°C/мин до 310°C, удержание 4,0 мин;
Тип и скорость газа-носителя	(He) 1,2 мл/мин
t° интерфейса МС	280°C
Условия детектирования	
Источник ионизации	*ЭИ (EI)*
t° источника	250°C
Задержка растворителя	4,0 мин (240 сек)
Режимы сканирования	SCAN 50 – 550 Da / SIM (см. ниже)
Параметр Dwell Time	Режим iDwell® Time

Процесс разработки инструментального метода был разделён на два этапа. На первом этапе использовали режим сканирования полного диапазона ионов (SCAN) для смеси чистых стандартов действующих веществ пестицидов растворённых в гексане с концентрацией 1 ppm. Цель данного этапа заключалась в получение чистых масс-спектров и обработке данных алгоритмом автоматического построения SIM эксперимента *SIM Wizard®*. Такой алгоритм представляет собой комплекс процедур, включающих в себя процедуру автоматического интегрирования полученного профиля SCAN-эксперимента, процедуру выделения присутствующих целевых компонентов на хроматографическом профиле и формирование таблицы спектров всех выделенных компонентов. Завершающей процедурой является автоматическая рекомендация перечня ионов для каждого детектированного действующего вещества и построение оптимальной, высокочувствительной программы SIM-эксперимента. Стоит отметить, что алгоритм полностью автоматизирован и занимает время менее минуты от

момента процедуры интегрирования хроматограммы до получения рекомендованного SIM метода. Схема процесса представлена на рисунке 1.

Необходимо также отметить, что программное обеспечение «*Маэстро-Оператор*» позволяет использовать и уже оснащено библиотекой целевых SIM ионов для нескольких десятков различных соединений (рис 1). Источником для наполнения данной библиотеки могут служить как данные, получаемые из множества литературных источников, так и собственные экспериментальные наработки, которые позволяют гарантировать надёжность получаемой информации и обеспечивать метод максимальной чувствительностью. Таким образом, исследователю предоставляется открытая библиотека SIM ионов, которая может быть при необходимости отредактирована, в неё могут быть внесены или исключены те или иные соединения для последующего применения в лабораторной и исследовательской практике.

Рис. 1. Схема создания инструментального метода, с применением библиотеки SIM ионов.



Принцип работы библиотеки следующий. Каждое соединение добавленное в SIM библиотеку ионов представлено в виде информационной карточки (Рис. 2). В карточке содержится информация о перечне целевых ионов соединения (обозначен ион для количественного расчёта (main) и подтверждающие ионы (QC)) и основная информационная составляющая соединения. В частности, молекулярная масса соединения, имя соединения, тип соединения, а также уникальный численный идентификатор вещества – CAS. Последний является основной «связующей нитью» между этапом детектирования вещества в ходе процедуры автоинтегрирования хроматограммы и этапом определением присутствия такого вещества в SIM библиотеке. Следовательно, если CAS номер детектированного соединения совпадает с CAS номером соединения SIM библиотеки, то алгоритм SIM Wizard® предложит использовать именно библиотечный набор данных. В случае же отсутствия детектированных соединений в библиотеке, выбор целевых ионов будет выполнен на основе интеллектуального анализа масс-спектра алгоритмом SIM Wizard®.

После завершения формирования массива целевых ионов, характеризующих каждое искомое соединение, приступают к выполнению второго этапа формирования инструментального метода.

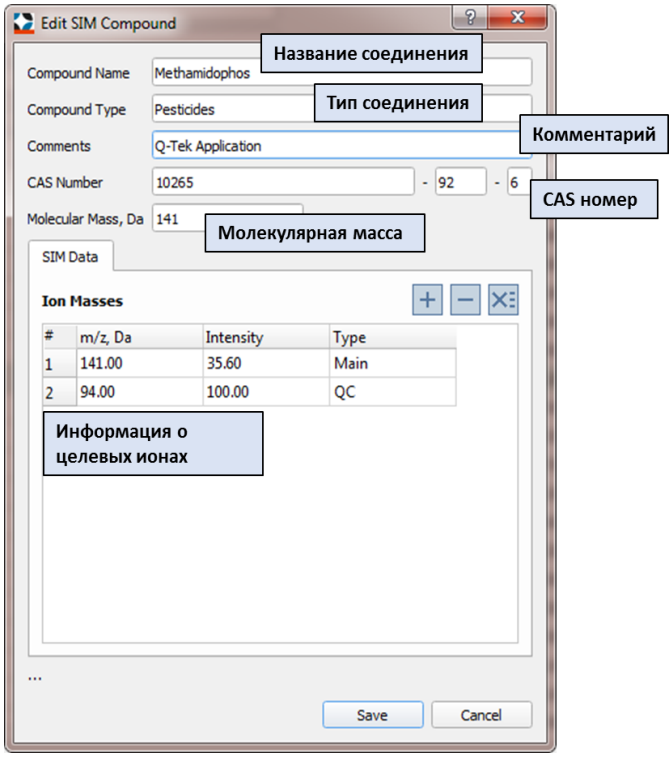
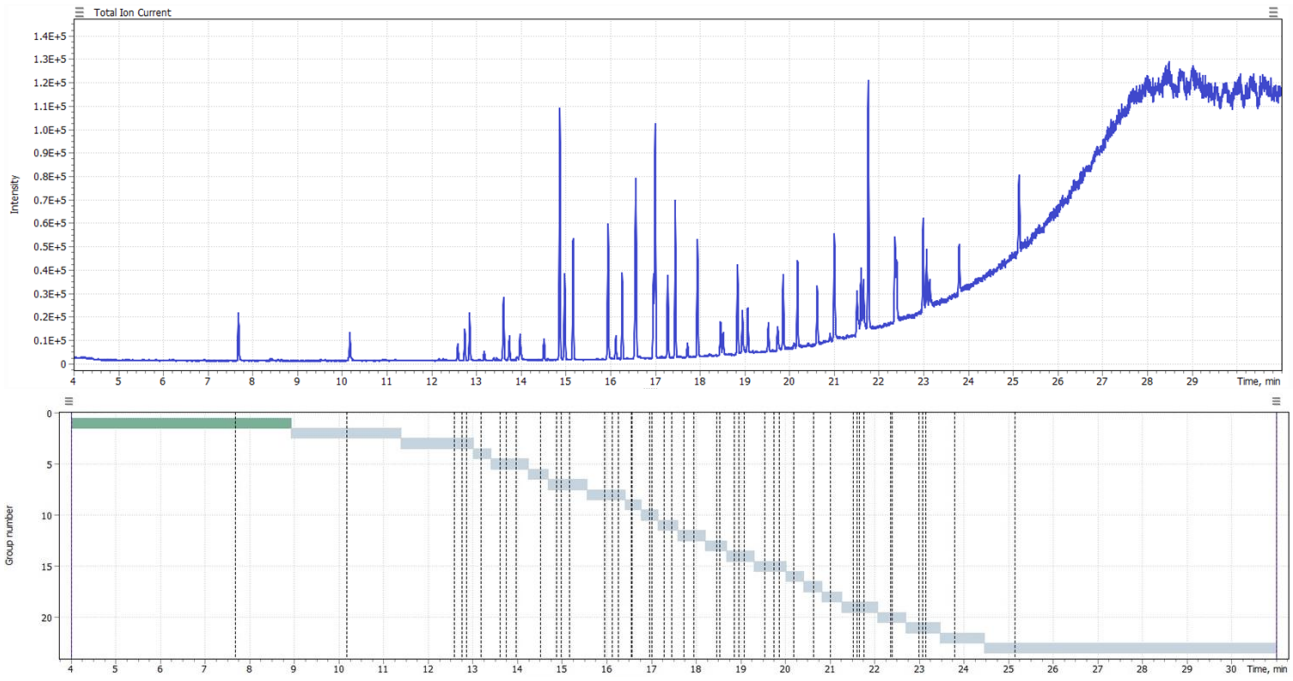


Рис. 2. Индивидуальная карточка вещества метамидофос в библиотеке SIM ионов

Второй этап представляет собой составление SIM эксперимента с использованием алгоритма автоматического расчёта оптимального времени сканирования ионов для каждого искомого соединения **iDwell®Time**. Такой алгоритм также полностью автоматизирован и позволяет корректно разделять хроматограмму на оптимальные временные отрезки, с целью сканирования наименьшего числа целевых ионов в каждом сегменте (рис. 3). Подобный подход позволяет получить максимальную статистику данных, сформировать целостный пик правильной формы, исключить возможные потери ионов в ходе эксперимента и тем самым добиться максимальной чувствительности метода.

Рис. 3. Разделение хроматографического профиля алгоритмом iDwell®Time на оптимальные временные отрезки для сканирования в режиме SIM.



Пробоподготовка

Метод скрининга остаточных количеств пестицидов QuEChERS основан на извлечении растворителем действующих веществ пестицидов из высушенного образца табака с одновременной очисткой экстракта смесью солей и последующей идентификацией, а также количественным определением с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии.

Для выделения искомых веществ применяли экстракцию ацетонитрилом в соотношении 2,0 г пробы к 10,0 мл растворителя. Очистку экстракта осуществляли ионообменным сорбентом Bondesil PSA, после чего полученные аликвоты экстракта табака переносили в виалу автосамплера и исследовали методом селектирования выделенных ионов (SIM). Стадии преобразования образца табака в процессе пробоподготовки представлены на рисунке 4. Таблица целевых ионов искомых пестицидов, представлена в таблице 2.

Рис. 4. Стадии преобразования образца в процессе пробоподготовки по методу QuEChERS.



Табл. 2. *Времена элюирования искомых пиков и параметры их сканирования*

№	Действующее вещество пестицида	*RT, мин*	**Quant**ifier Ion	**Qual**ifier Ion 1	**Qual**ifier Ion 2
1	Dichlorvos	*7.7*	185.0	109.0	-
2	cis-Mevinphos	*10.2*	192.0	127.0	164.0
3	Demeton-O	*12.6*	88.0	171.0	114.0
4	2,4,5,6-Tetrachloro-m-xylene	*12.7*	245.9	243.9	209.0
5	Ethoprophos	*12.9*	200.0	158.0	139.0
6	Naled	*13.2*	185.0	109.0	145.0
7	Phorate	*13.6*	260.0	121.0	97.0
8	α -Lindane	*13.7*	216.9	180.9	219.0
9	Demeton-S	*14.0*	88.0	171.0	114.0
10	δ-Lindane	*14.5*	181.0	217.0	183.0
11	Diazinone	*14.9*	304.1	179.1	137.1
12	Disulfoton	*15.0*	274.0	142.0	88.0
13	Isazophos	*15.2*	257.0	161.0	119.0
14	Chlorpyriphos-methyl	*15.9*	285.9	287.9	125.0
15	Heptachlor	*16.1*	273.9	271.9	100.0
16	Fenchlorphos	*16.3*	284.9	286.9	125.0
17	Fenitrothion	*16.6*	277.1	260.0	274.1
18	Pirimiphos-methyl	*16.6*	290.0	305.1	276.1
19	Fenthion	*16.9*	278.0	245.0	263.0
20	Chlorpyrifos	*17.0*	313.9	199.0	315.9
21	Trichloronate	*17.3*	297.0	269.0	109.0

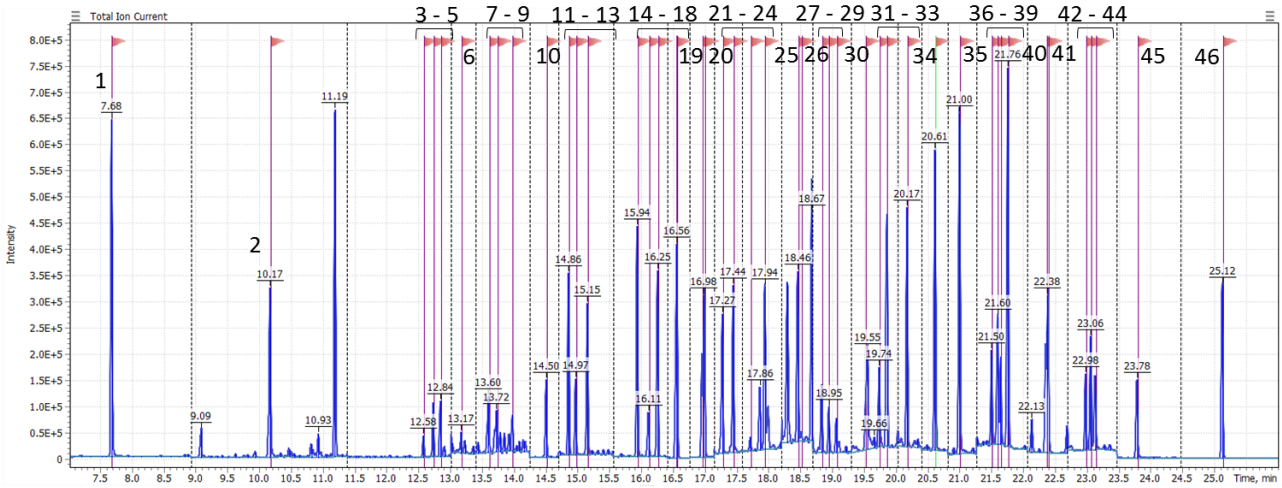
22	Pirimiphos-ethyl	*17.5*	331.1	318.1	304.1
23	Merphos	*17.7*	298.1	153.0	209.0
24	Quinalphos	*17.9*	298.1	146.0	157.1
25	Tetrachlorvinphos	*18.5*	330.9	328.9	109.0
26	α-Endosulfan	*18.5*	338.8	240.9	263.9
27	Prothiofos	*18.8*	309.0	311.0	239.0
28	Tribufos	*18.9*	169.0	285.1	202.0
29	Dieldrin	*19.1*	379.9	262.9	243.0
30	Endrin	*19.5*	279.0	243.0	245.0
31	Fensulfothion	*19.7*	293.1	292.1	140.0
32	p,p'-DDD	*19.9*	236.9	165.1	234.9
33	Sulprofos	*20.2*	322.0	139.0	140.0
34	p,p'-DDT	*20.6*	236.9	165.1	234.9
35	*Triphenyl phosphate (ISTD)*	*21.0*	*326.0*	*170.0*	*215.1*
36	Pyridafenthion	*21.5*	340.0	199.1	188.1
37	Phosmet	*21.6*	76.1	160.0	161.0
38	EPN	*21.7*	185.0	157.0	169.0
39	Methoxychlor	*21.8*	227.1	228.2	274.1
40	Phosalone	*22.4*	366.9	182.0	184.0
41	Azinphos-methyl	*22.4*	160.0	132.1	77.0
42	Pyrazophos	*23.0*	232.1	265.1	373.1
43	Azinphos-ethyl	*23.1*	132.1	160.0	77.0
44	Pyraclofos	*23.2*	360.0	139.0	194.0
45	Coumaphos	*23.8*	361.9	363.9	228.1
46	Decachlorobiphenyl	*25.1*	497.8	427.8	493.8

Результаты и обсуждение

Линейность

Апробация и количественное определение действующих веществ пестицидов проводили методом матричной калибровки с использованием внутреннего стандарта трифенилфосфат (концентрация 1,0 ppm). Избирательность используемого метода была основана на том, что масс-спектрометрическое детектирование действующих веществ пестицидов специфично для каждого искомого вещества, что обосновывается различной степенью их разделения на хроматографической колонке, а также характерной фрагментацией ионов действующих веществ в ионном источнике электронного удара.

Рис. 5. Масс-хроматограмма смеси действующих веществ пестицидов (1 ppm) в матрице табака.



1-Dichlorvos; **2**-cis-Mevinphos; **3**-Demeton-O; **4**-(2,4,5,6)-Tetrachloro-m-xylene; **5**-Ethoprophos; **6**-Naled; **7**-Phorate; **8**-α-Lindane; **9**-Demeton-S; **10**-δ-Lindane; **11**-Diazinone; **12**-Disulfothon; **13**-Isazofos; **14**-Chlorpyrifos-methyl; **15**-Heptachlor; **16**-Fenchlorphos; **17**-Fenitrothion; **18**-Pirimifos-methyl; **19**-Fenthion; **20**-Chlorpyrifos; **21**-Trichloronate; **22**-Pirimiphos-ethyl; **23**-Merphos; **24**-Quinalphos; **25**-Tetrachlorvinphos; **26**-α-Endosulfan; **27**-Prothiofos; **28**-Tribufos; **29**-Dieldrin; **30**-Endrin; **31**-Fensulfothion; **32**-p,p'-DDD; **33**-Sulprofos; **34**-p,p'-DDT; **35**-Triphenylphosphate (ISTD); **36**-Pyridafenthion; **37**-Phosmet; **38**-EPN; **39**-Methoxychlor; **40**-Phosalone; **41**-Azinphos-methyl; **42**-Pyrazophos; **43**-Azinphos-ethyl; **44**-Pyraclofos; **45**-Coumaphos; **46**-Decachlorobiphenyl.

С целью расчёта предела детектирования всех 45 пестицидов с помощью системы Маэстро-αMC были выполнены три повторных инжекции каждой калибровочной точки табачной матрицы с известными уровнями концентраций действующих веществ пестицидов. Расчёт проводили согласно утверждённой Европейской AOAC директиве [4]. Данные, полученные в результате исследования, представлены в таблице 3.

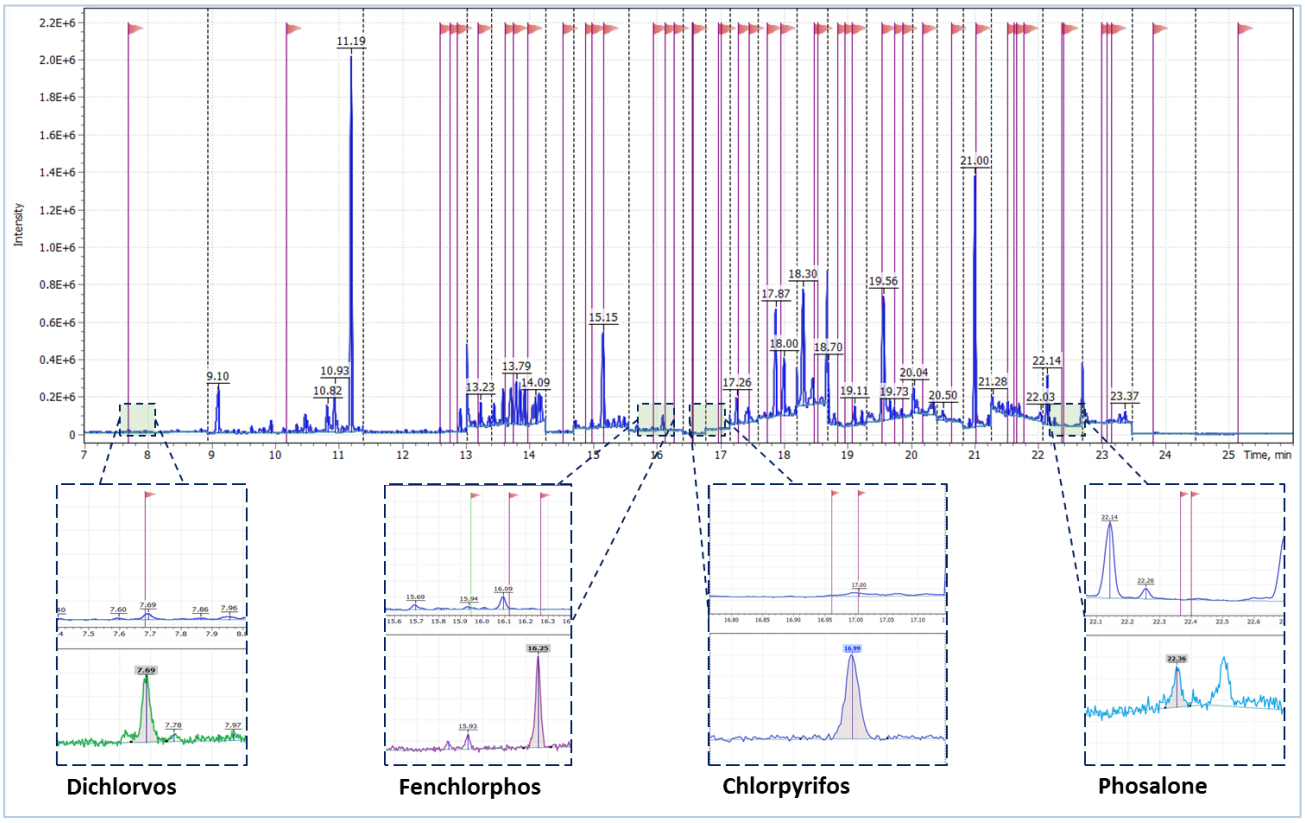
Коэффициент достоверности аппроксимации калибровочной кривой (R^2) для 40 из 45 соединений составил ≥ 0,998 (табл. 4), только соединения Demeton-O, Naled, EPN, Merphos и Methoxychlor показали значения $0{,}998 > R^2 > 0{,}984$.

Обсуждение результатов

Согласно полученные данным 41 из 45 наименований пестицидов могут быть детектированы на уровне ниже или равным 0,1 ppm, при этом степень извлечения действующих веществ пестицидов методом пробоподготовки QuEChERS составляет от 40 до 130%. Такой широкий разброс степени извлечения компонентов напрямую связан с определенными проблемами очистки экстракта из-за сложности и комплексности матрицы табака. Согласно литературным данным табак содержит порядка 4000 наименований химических элементов [1]. При этом, множество различных физиологических процессов активно проходят именно в процессе подготовки табачной продукции, а именно на стадии естественного или искусственного старения. Эти данные подтверждены исследованиями (Lili Li & Jieyu Zhao и др.), в которых отмечено резкое изменение содержания пигментов, липидов, аминокислот, полиаминов и множества вторичных метаболитов в составе табака, а также накопление сложных эфиров стеринов и алкалоидов на стадии производства продукта. Следовательно, все эти соединения проявляются в виде многочисленных интерференций в ходе масс-спектрометрического детектирования с искомыми компонентами, что выражается в виде усиления или подавления искомых хроматографических пиков в профиле, а это соответственно проявляется в неоднозначности идентификации.

При этом, необходимо также учитывать необходимость снижения предела детектирования искомых соединений, так как первоначальную навеску образца экстрагируют в 5-ти кратном объёме растворителя, в следствие чего, масс-спектрометрическая система должна детектировать концентрации в 5 раз ниже ожидаемой. Такой эффект может существенно влиять на пределы качественного и количественного определения методики.

Рис. 6. Профиль масс-хроматограммы модельного образца табака, с внесением группы действующих веществ пестицидов в концентрации 5 ppb.



Другой причиной низкого предела качественного обнаружения для некоторых соединений также может являться их способность к деградации, даже при комнатной температуре. Например, налед, как и трихлоран деградируют до дихлофоса даже при комнатной температуре, следовательно, такие три пестицида иногда анализируются вместе и количественно их определяют только по пику дихлорфоса.

Табл. 3. *Пределы обнаружения и степени извлечения соединения в эксперименте.*

№	Действующее вещество пестицида	R^2, *Линейность*	LOD, ppm	МДУ, ppm (АСАС)	Степень извлечения, %	
					0.05 ppm	0.5 ppm
1	Dichlorvos	*0.999*	0.029	0.1	67.3	63.3
2	cis-Mevinphos	*0.998*	0.045	0.04	73.0	92.2
3	Demeton-O	*0.996*	0.07	Не нормир	n/a	105.3
4	2,4,5,6-Tetrachloro-m-xylene	*0.999*	0.011	Не нормир	74.7	62.3
5	Ethoprophos	*0.998*	0.040	0.1	93.2	113.2
6	Naled	*0.986*	0.143	0.1	n/a	n/a
7	Phorate	*0.999*	0.040	0.05	102.0	106.32

8	α -Lindane	*0.999*	0.017	0.05	77.4	88.5
9	Demeton-S	*0.998*	0.05	0.1	31.6	136.7
10	δ-Lindane	*0.999*	0.013	0.05	n/a	n/a
11	Diazinone	*0.999*	0.010	0.1	105.8	109.8
12	Disulfoton	*0.999*	0.015	0.1	99.2	102.4
13	Isazophos	*0.999*	0.017	Не нормир	105.3	94.72
14	Chlorpyriphos-methyl	*0.997*	0.082	0.2	98.1	91.5
15	Heptachlor	*0.999*	0.013	0.02	113.1	90.0
16	Fenchlorphos	*0.997*	0.059	Не нормир	88.7	104.5
17	Fenitrothion	*0.999*	0.048	0.1	81.8	106.1
18	Pirimiphos-methyl	*0.998*	0.064	0.1	93.2	108.0
19	Fenthion	*0.997*	0.067	0.1	n/a	111.58
20	Chlorpyrifos	*0.998*	0.132	0.5	96.6	113.1
21	Trichloronate	*0.998*	0.052	Не нормир	101.3	112.42
22	Pirimiphos-ethyl	*0.997*	0.073	Не нормир	110.0	65.8
23	Merphos	*0.978*	0.181	Не нормир	n/a	n/a
24	Quinalphos	*0.999*	0.037	Не нормир	113.7	90.05
25	Tetrachlorvinphos	*0.997*	0.057	Не нормир	83.8	63.6
26	α-Endosulfan	*0.999*	0.015	1.0	n/a	102.3
27	Prothiofos	*0.999*	0.027	Не нормир	94.7	102.83
28	Tribufos	*0.998*	0.047	Не нормир	108.9	96.9
29	Dieldrin	*0.999*	0.034	0.02	n/a	94.2
30	Endrin	*0.999*	0.04	0.05	n/a	n/a
31	Fensulfothion	*0.998*	0.058	Не нормир	60.9	74.2
32	p,p'-DDD	*0.998*	0.061	0.2	78.5	73.8
33	Sulprofos	*0.998*	0.039	Не нормир	94.7	108.8
34	p,p'-DDT	*0.999*	0.026	0.2	145.3	97.9
35	Pyridafenthion	*0.998*	0.065	Не нормир	56.3	58.5
36	Phosmet	*0.999*	0.036	Не нормир	n/a	n/a
37	EPN	*0.992*	0.135	Не нормир	n/a	n/a
38	Methoxychlor	*0.984*	0.077	0.05	107.1	89.6
39	Phosalone	*0.999*	0.022	0.1	66.2	53.7
40	Azinphos-methyl	*0.999*	0.073	0.3	n/a	n/a
41	Pyrazophos	*0.999*	0.026	Не нормир	86.5	57.8
42	Azinphos-ethyl	*0.998*	0.050	0.1	49.1	45.4
43	Pyraclofos	*0.999*	0.029	Не нормир	52.4	41.5
44	Coumaphos	*0.999*	0.025	Не нормир	61.8	45.3
45	Decachlorobiphenyl	*0.999*	0.029	Не нормир	45.8	40.0

Реализация и выполнение подобных экспериментов является крайне важным аспектом для быстрого контроля и при необходимости реагирования в секторе табачной промышленности, для мониторинга правильного и безопасного применения средств защиты

растений в процессе выращивания культуры, а также контроля влияния окружающей среды в районах возделывания табачных культур.

Выводы

Хромато-масс-спектрометрическая система Маэстро-αMC позволяет детектировать остаточные количества пестицидов в табаке и является надёжным инструментом, в решении поставленной задачи целевого поиска пестицидов в сложной матрице. Корректная настройка метода сканирования, а также использование библиотечных данных оптимальных SIM ионов позволяет достигать уровней детектирования пестицидов ниже рекомендационных по ACAC директиве.

Высокая линейность сигнала детектора, а также высокие степени извлечения при использовании метода QuEChERS позволяет надёжно детектировать большинство целевых компонентов внесённых в модельный образец табака, не смотря на сложность и комплексность матричного экстракта.

Литература

1. *Андреева Т.И., Красовский К.С. Табак и здоровье. – Киев, 2004. – 224 с.*

2. *Anastassiades M., Lehotay S.J, Stajnbaher D, and F.J. Schenck //*The Journal of AOAC International *V. 86. P. 412–431(2003).*

3. *CORESTA Guide No. 1 - The concept and implementation of CPA guidance residue levels, July 2013. Agro-Chemical Advisory Committee (ACAC) of the Cooperation Center for Scientific Research Relative to Tobacco (CORESTA), Paris, France.*

4. *Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food, 2016*

5. *Картинка для обложки была использована с Web-ресурса: https://jfcinternationalwholesale.com/products/good-times-pipe-tobacco-oz*