

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ (МС) ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ, ПОДТВЕРЖДЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТКОВ ПЕСТИЦИДОВ

CAC/GL 56-2005

ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ ИСПЫТАНИЯ

Когда анализы выполняются в целях контроля или соблюдения требований, особенно важно, чтобы подтверждающие данные были получены перед учетом данных о пробах, содержащих остатки пестицидов, которые обычно не связаны с анализируемым сырьем, или в которых максимальные остаточные уровни (MRL), по всей видимости, были превышены. Пробы могут содержать интерферирующие химические вещества, которые могут быть ошибочно идентифицированы как пестициды. К таким примерам в газовой хроматографии относятся отклики электронно-захватных детекторов на эфиры фталевой кислоты и фосфор-селективных детекторов на соединения, содержащие серу и азот.

Анализ остатков пестицидов мультиостаточными методами обычно состоит из двух этапов: отборочного анализа и подтверждения. Схема процесса изображена на рис. 2. Первый этап включает установление тех остатков пестицидов, которые, вероятно, будут присутствовать при интерпретации исходных данных, избегая, насколько это возможно, ложноотрицательных результатов. Второй этап — это подтверждение, в котором основное внимание уделяется пестицидам, обнаруженным на этапе 1. Объем работ на этапе подтверждения определяется целью использования заносимых в отчет результатов и возможными последующими административными решениями. Выбор технического приема для подтверждения зависит от его доступности, времени и стоимости. Они основаны либо на дальнейшей интерпретации хроматографических и масс-спектрометрических данных, либо на альтернативных методах с использованием различных физико-химических свойств соединения, либо на сочетании различных методов разделения и обнаружения. Некоторые альтернативные методики подтверждения приведены в табл. 6.

Всякий раз, когда хроматографические технические приемы используются для отборочного анализа или подтверждения, надлежащая настройка окон времени удержания имеет решающее значение. Перед началом анализа необходимо следить за тем, чтобы прибор был правильно отрегулирован; перед каждой партией анализов следует проводить испытание системы на соответствие требованиям¹. База данных для значений времени удержания должна быть настроена по текущим условиям². На этапе 1 толерантные интервалы от 1,5 до 3% от абсолютного времени удержания могут применяться для капиллярной ГХ в зависимости от формы пика. Для подтверждения времени удержания абсолютные толерантные интервалы увеличиваются с увеличением времени удержания. Толерантный интервал должен быть менее 1 с. для времени удержания (RT, retention time) менее 500 с. Для значений времени удержания от 500 до 5000 с. рекомендуется интервал 0,2% от значения RRT. Для более длительного времени удержания 6 с. является подходящим интервалом.

Подтверждающие испытания могут быть количественными и (или) качественными, но в большинстве случаев потребуются результаты обоих типов. Особые проблемы возникают, когда остатки должны быть подтверждены на уровне или около предела определения, и хотя количественно определить остатки на этом уровне сложно, важно обеспечить адекватное подтверждение как уровня, так и идентификации.

Необходимость подтверждающих испытаний может зависеть от типа пробы или ее известной

¹ Soboleva E. Ambrus A., Application of system suitability test for quality assurance and performance optimization of a gas chromatographic system for pesticide residue analysis, J. Chromatogr. A. 1027. 2004. Стр. 55-65.

² Lantos J., Kadenczki L., Zakar F., Ambrus A. Validation of gas chromatographic Databases for qualitative identification of active ingredients of pesticide residues in Fajgelj A. Ambrus A. (eds) Principles of Method Validation, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2000, стр. 128-137.

предыстории. В некоторых культурах или сельскохозяйственном сырье часто встречаются определенные остатки. Для серии проб аналогичного происхождения, содержащих остатки одного и того же пестицида, может быть достаточно подтверждения идентификации остатков в небольшой пропорциональной части проб, выбранной случайным образом. Точно так же, когда известно, что конкретный пестицид был применен к материалу пробы, возможно, что может не потребоваться подтверждение идентификации, хотя следует подтвердить ряд случайно выбранных результатов. Если доступны «холостые» пробы, их требуется использовать для проверки наличия возможных интерферирующих веществ.

Необходимые шаги для положительной идентификации — это предмет принятия решения химиком-аналитиком. Особое внимание следует уделять выбору метода, который минимизирует влияние интерферирующих соединений. Выбранный технический прием (или приемы) зависит от наличия подходящих приборов и опыта в испытательной лаборатории.

ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ/ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ (ГХ/МС)

Данные об остатках, полученные с помощью масс-спектрометрии, представляют собой наиболее убедительное основание и, если доступны подходящие контрольно-измерительные приборы, такой технический прием подтверждения является предпочтительным для применения. Этот же технический прием также обычно используется в целях отборочного анализа остатков (этап 1). Масс-спектрометрическое определение остатков обычно проводят в сочетании с процедурой хроматографического разделения, чтобы одновременно получить данные о времени удержания, соотношении массы и заряда иона, а также содержания. Количественная передача лабильных аналитов через хроматографическую систему сопряжена с проблемами, аналогичными тем, которые возникают с другими детекторами. Для количественной оценки контролируемые ионы должны быть теми, которые наиболее специфичны для аналита, подвержены наименьшему влиянию и обеспечивают хорошее отношение сигнал-шум.

При использовании мониторинга выбранных ионов (SIM, selected ion monitoring) на этой стадии уже должны быть установлены толерантные интервалы для соотношений ионов и значений времени удержания, основанные на введении стандарта пестицида в чистом растворителе с концентрацией, близкой к критическому уровню. Толерантные интервалы для соотношений ионов должны быть в пределах $\pm 30\%$ от соотношений абсолютного содержания ионов. Когда 2 (или 3) соотношения выбранных ионов находятся в пределах установленных толерантных интервалов, остаток подтверждается³. Для небольшого количества пестицидов в масс-спектре может обнаруживаться только один конкретный ион. В этом случае следует найти альтернативное подтверждение.

Когда обнаруженные ионы все еще указывают на возможное присутствие остатка, результат может быть учтен как предварительно идентифицированный. Однако, если результат может привести к мерам со стороны контролирующих органов или результаты будут использоваться для других целей (например, для оценки потребления с пищей), необходимо найти дополнительное подтверждение идентификации аналита. Этого можно достичь с помощью того же самого оборудования ГХ-МС путем введения стандартов предполагаемого аналита с согласованной матрицей, чтобы компенсировать влияние матрицы на соотношение ионов. В этом случае необходимо произвести последующие введения стандарта с согласованной матрицей и предполагаемой пробы. Отклонение RRT аналита в стандарте и в предполагаемом пике в пробе обычно должно быть менее 0,1%. Два соотношения ионов, измеренные в пробе, должны находиться в пределах толерантного интервала, рассчитанного на основе соотношений ионов в стандарте с согласованной матрицей. Остаток считается подтвержденным, если он соответствует общему правилу, изложенному выше. Если соотношения ионов выходят за пределы толерантных интервалов, дополнительное подтверждение идентификации может быть получено с помощью альтернативных аналитических технических приемов. Примеры приведены в табл. 6.

³ Soboleva E. Ahad K. Ambrus A. Applicability of some MS criteria for the confirmation of pesticide residues, *Analyst*, 129, 1123-1129, 2004.

Дальнейшее подтверждение масс-спектрометрией может быть выполнено путем получения «полного» масс-спектра электронного удара (на практике обычно от m/z 50 (масса/заряд 50) до зоны за пределами области молекулярных ионов). Отсутствие интерферирующих ионов является важным фактором при подтверждении идентификации. Дополнительное подтверждение идентификации может быть получено: (i) с помощью альтернативной хроматографической колонки; (ii) с помощью альтернативного технического приема ионизации (например, химической ионизации); (iii) путем отслеживания продуктов дальнейшей реакции выбранных ионов с помощью тандемной масс-спектрометрии (МС/МС или МСⁿ); (iv) путем мониторинга выбранных ионов с увеличенной разрешающей способностью масс-спектрометра.

Масс-спектрометрические определения должны удовлетворять критериям аналитического контроля качества, аналогичным критериям, применяемым к другим системам.

ВЭЖХ И ВЭЖХ-МС

Подтверждение остатков, обнаруженных после разделения с помощью ВЭЖХ, обычно более проблематично, чем при использовании газовой хроматографии. Если обнаружение осуществляется путем поглощения УФ-излучения, получение полного спектра может служить достаточным основанием для доказательства идентификации. Однако УФ-спектры некоторых пестицидов трудно диагностировать, поскольку они аналогичны спектрам, производимым многими другими соединениями, имеющими аналогичные функциональные группы или структуры, а совместное элюирование интерферирующих соединений может создать дополнительные проблемы. Данные об УФ-поглощении, полученные на нескольких длинах волн, могут подтвердить или опровергнуть идентификацию, но, как правило, сами по себе они недостаточно характерны. Данные флуоресценции могут использоваться для подтверждения результатов, полученных с помощью УФ-поглощения. ЖХ-МС может служить хорошим основанием для доказательства подтверждения, но, поскольку полученные спектры, как правило, очень простые и демонстрируют небольшое характерное разделение, полученные с помощью ЖХ-МС результаты редко могут считаться достаточно обоснованными. ЖХ-МС/МС — это более эффективный технический прием, сочетающий избирательность и специфичность и часто обеспечивающий достаточное основание для доказательства идентификации. Технические приемы ЖХ-МС, как правило, подвержены влиянию матрицы, особенно подавлению, и поэтому для количественного подтверждения может потребоваться использование стандартных добавок или изотопно-меченых стандартов. Дериватизация также может использоваться для подтверждения остатков, обнаруженных с помощью ВЭЖХ (табл. 6).

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ (ТСХ)

В некоторых случаях подтверждение результатов газохроматографии удобнее всего осуществлять с помощью ТСХ. Идентификация основана на двух критериях: значении R_f и реакции визуализации. Методы обнаружения, основанные на биопробах (например, ингибирование ферментов, грибкового роста или хлоропластов), особенно подходят для качественного подтверждения, поскольку они специфичны для определенного типа соединений, чувствительны и обычно очень мало подвержены влиянию соэкстрактов^{4,5}. В научной литературе существуют многочисленные упоминания этого технического приема⁶. Количественные характеристики тонкослойной хроматографии, однако, ограничены. Дальнейшее расширение сферы применения этого технического приема включает удаление области на пластине, соответствующей R_f интересующего соединения, с последующим

⁴ Ambrus^{1*} Á., Füzesi² I.; Susán² M.; Dobi³ D., Lantos⁴ J., Zakar⁵ F., Korsós⁴ I., Oláh³ J., Beke³ B.B., and L. Katavics⁵ A cost effective screening methods for pesticide residue analysis in fruits, vegetables and cereal grains, J. Environ Sci. Health B40, 297-339, 2005.

⁵ Ambrus Á.; Füzesi I.; Lantos J.; Korsos I.; Hatfaludi T. Repeatability and Reproducibility of R_f and MDQ Values with Different TLC Elution and Detection Systems. J. Environ Sci. Health B39 **2004** (принято к публикации).

⁶ IUPAC Report on Pesticides (13) (Bátora, V., Vitorovic, S.Y., Thier, H.-P. and Klisenko, M.A.; Pure & Appl. Chem., 53, 1981, 1039-1049

элюированием из материала слоя и дальнейшим химическим или физическим подтверждающим анализом. Раствор стандартного пестицида всегда следует наносить на пластину вместе с экстрактом пробы, чтобы избежать каких-либо проблем, связанных с неповторяемостью R_f . Чрезмерное покрытие экстракта стандартным пестицидом также может дать полезную информацию. Преимущества тонкослойной хроматографии — скорость, низкая стоимость и применимость к термочувствительным материалам. К недостаткам относятся (как правило) более низкие чувствительность и разделительная способность, чем у приборных хроматографических технических приемов обнаружения, и необходимость в более эффективной чистке в случае обнаружения, основанного на цветных реакциях химических веществ.

ДЕРИВАТИЗАЦИЯ

При выборе ионов для подтверждения ГХ/МС на основе дериватизации, выбранные ионы должны быть структурно значимыми для остатка и не представлять собой фрагменты дериватизирующего агента. Хотя дериватизация может быть полезным способом подтверждения идентификации остатка, следует учитывать, что она также добавит дополнительный элемент к неопределенности количественного подтверждения.

Это направление в технологиях подтверждения можно рассматривать в виде трех общих подходов.

(a) Химические реакции

Часто используются мелкомасштабные химические реакции, приводящие к разложению, добавке или конденсации продуктов реакции с пестицидами, с последующим повторным исследованием этих продуктов хроматографическими техническими приемами. Реакции приводят к образованию продуктов, имеющих другие значения времени удержания и (или) отклика детектора, чем у исходного соединения. Пробу стандартного пестицида следует обрабатывать вместе с предполагаемым остатком, чтобы можно было напрямую сравнить результаты каждого из них. Также в анализ должен быть включен обогащенный экстракт для доказательства того, что реакция протекает в присутствии материала пробы. Влияние помех может возникать, когда производные соединения обнаруживаются ввиду свойств дериватизирующего реагента. Обзор химических реакций, которые использовались в целях подтверждения, был опубликован Cochrane, WP. (Chemical derivatisation in pesticide analysis, Plenum Press, NY (1981)). Преимущество химических реакций состоит в простоте и скорости их проведения, но может потребоваться приобретение и (или) очистка специализированных реагентов.

(b) Физические реакции

Полезным техническим приемом является фотохимическое изменение остатка пестицида для получения одного или нескольких продуктов с воспроизводимой хроматографической картиной. Пробу стандартного пестицида и обогащенный экстракт всегда следует обрабатывать одним и тем же образом. Пробы, содержащие остатки нескольких пестицидов, могут вызвать проблемы при интерпретации результатов. В таких случаях предварительное разделение конкретных остатков можно проводить с использованием ТСХ, ВЭЖХ или фракционирования на колонке перед реакцией.

(c) Другие методы

Многие пестициды подвержены разложению и (или) трансформации ферментами. В отличие от обычных химических реакций, эти процессы очень специфичны и обычно состоят из окисления, гидролиза или деалкилирования. Продукты конверсии обладают хроматографическими характеристиками, отличными от характеристик исходного пестицида, и могут использоваться в целях подтверждения при сравнении с продуктами реакции с использованием стандартных пестицидов.

Таблица 6. Методы обнаружения, подходящие для отборочного анализа (этап 1) и подтверждения (этап 2) остатков.

		Этап 1 — отборочный анализ							
		ГХ с капиллярной колонкой — ЭЗД, АФД, ПФД, ППФД	ГХ-МС	ЖХ-МС	ЖХ-ДМД или УФ-сканирование	ЖХ-УФ/ВИС (одна длина волны)	ЖХ с детектором флуоресценции	ГХ с наполненной колонкой — ЭЗД, АФД, ПФД	ТСХ — ингибирование ферментов, грибкового роста или хлоропластов
Этап 2 — подтверждение	ГХ с капиллярной колонкой — ЭЗД, АФД, ПФД, ППФД	x ¹	x ¹	x	x	x	x	x	x
	ГХ-МС	x	x ¹²	x	x	x	x	x	x
	ЖХ-МС	x	x		x	x	x	x	x
	Технические приемы с полным сканированием	x	x	x	x	x	x	x	x
	(ГХ) ¹¹ , МСВР, альтернативные технические приемы ионизации	x	x	x	x	x	x	x	x
	ЖХ-ДМД или УФ-сканирование	x	x	x		x	x	x	x
	ЖХ-УФ/ВИС (одна длина волны)	x	x				x	x	x
	ЖХ с детектором флуоресценции	x	x		x	x		x	x
	ТСХ — ингибирование ферментов, грибкового роста или хлоропластов	x	x	x	x	x	x	x	x ²³
	Дериватизация	x	x	x	x	x	x	x	x
	Профиль специфических изомеров	x	x	x	x	x	x	x	

1 — Используется либо колонка с другой полярностью, что приводит к разному порядку элюирования остатков и загрязняющих веществ, элюируемых вблизи интересующего пика, либо другой особый детектор.

2 — Тот же технический прием ГХ-МС можно использовать для этапа 2 (подтверждение), если выбраны разные ионы или установлены толерантные интервалы на основе решений с согласованной матрицей.

3 — Должна использоваться подвижная или неподвижная фаза другой полярности.

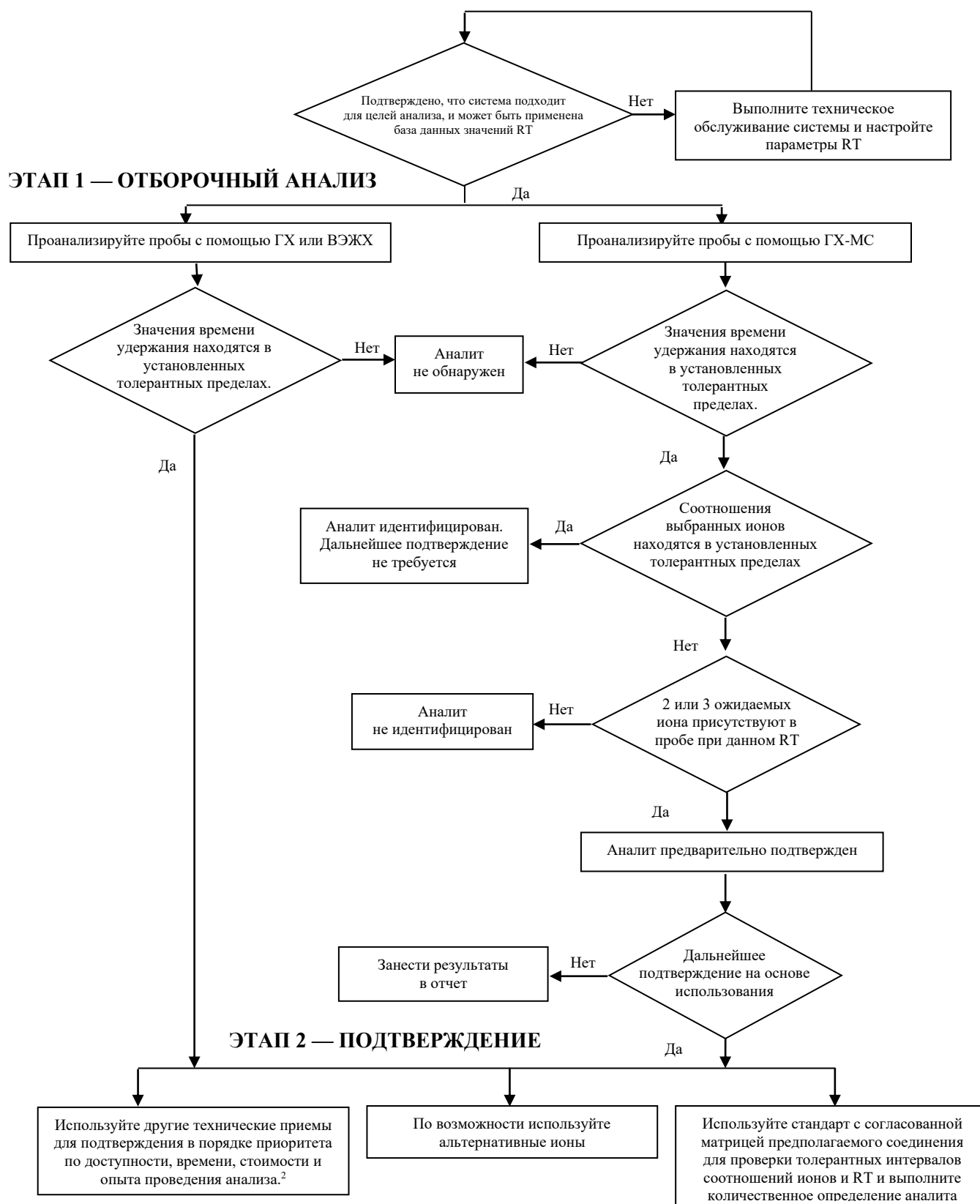


Рис. 2. Схематическое изображение отборочного анализа и подтверждения (этап 1 и этап 2) остатков пестицидов

1 — Несвойственные значения, включая запрещенные вещества, нарушение MRL или требований к исследованиям, как, например, при оценке воздействия

2 — См. другие способы подтверждения в табл. 6

3 — Для небольшого количества пестицидов в масс-спектре может обнаруживаться только один конкретный ион. В этом случае следует найти альтернативное подтверждение.