

ГРУППА КОМПАНИЙ

BCM

БИОХИММАК

закрытое акционерное общество
БиоХимМак СТ

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Сорбционного набора

*Пестициды в продукции растениеводства
(многоостаточный QUECHERS метод)*

Москва 2009

Настоящая Инструкция предназначена для описания условий и способов применения Сорбционного набора в подготовке проб для хроматографического определения уровня остаточных пестицидов в продуктах растениеводства. В Инструкции также изложены рекомендации по работе с анализируемыми пробами, соблюдение которых повышает степень извлечения определяемых компонентов.

Авторы предлагаемых в настоящей Инструкции методических подходов с радостью и огромным вниманием отнесутся к любым замечаниям и предложениям, относящимся к работе с Сорбционным набором.

I. Цель и назначение Сорбционного набора «Пестициды в продукции растениеводства»

1.1. Цель выпуска набора «Пестициды в продукции растениеводства»

Интенсификация растениеводства, вызванная мировым продовольственным кризисом, приводит к массовому применению широчайшего набора пестицидов, в первую очередь, инсектицидов и гербицидов, а также смесевых препаратов. Однако традиционная для РФ методология исследования остаточных количеств пестицидов в продукции основана не на скрининге всевозможных пестицидов, а на отслеживании уровня конкретных препаратов. Это приводит к неоправданно высоким затратам на подготовку проб в тех случаях, когда тип примененных пестицидов заранее не известен, что имеет место при сертификации как отечественной, так и импортируемой растениеводческой продукции.

Целью выпуска Сорбционного набора «Пестициды в продукции растениеводства» является обеспечение реализации европейского стандарта prEN 15662 (далее - стандарта) по подготовке проб овощей, фруктов, зерновых, специй и меда для хроматографического определения разнообразных пестицидов (многоостаточный метод), предельно допустимое содержание которых нормировано какими-либо национальными или международными документами, а также в исследовательских целях.

1.2. Назначение набора «Пестициды в продукции растениеводства»

Сорбционный набор предназначен для подготовки проб многоостаточным методом QUECHERS, впервые предложенном Anastassiades с сотр. в 2003г.:

- Anastassiades, M., S. Lehotay, D. Stajnbaher and F. Schenk (2003). 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**(2): 412-31.

Название метода является аббревиатурой, составленной из первых букв английских терминов, отражающих характерные особенности метода: quick, easy, cheap и т.д. Суть метода QUECHERS в экстракции суммы пестицидов из гомогенатов проб продуктов с помощью ацетонитрила в присутствии высоких концентраций связывающих воду солей, например, MgSO₄. Образующийся после центрифугирования верхний ацетонитрильный слой содержит с почти количественным выходом пестициды всех контролируемых групп: хлорорганические, фосфорорганические, пиретроиды, а также гербициды разных классов.

Универсальность экстракционной процедуры для более чем 250 применяемых на практике пестицидов и высокие коэффициенты извлечения (70-100, а чаще всего 90-100%) в сочетании с хроматографическими методами высокого разрешения (ГХ/МС и ЖХ/МС) позволяют рассматривать QUECHERS как наиболее совершенный из опубликованных многоостаточных (multiresidue) методов. Быстрота, простота и относительная дешевизна метода наряду с высокими метрологическими характеристиками, подтвержденными на протяжении последних 5 лет специальными межлабораторными экспериментами в сотнях лабораторий, сделали его наиболее популярным в мире. Нормативное изложение метода приведено в стандарте prEN 15662: “Foods of plant origin - Determination of pesticide residue using GC-MS and/or LS-MS/MS following acetonitrile extraction/partition and cleanup by dispersive SPE – QuEChERS-method” (2007).

Идеология многоостаточных методов контроля пестицидов значительно отличается от принятых в РФ групповых подходов, нашедших свое отражение, например, в известном двухтомном справочнике «Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде», Сост. Клисенко М.А., Калинина А.А., Новикова К.Ф., Хохолькова Г.А., М.: Колос и Агропромиздат, 1992. Системы ГХ/МС и ЖХ/МС из-за

дороговизны мало доступны для отечественных контрольных лабораторий, однако использование в QUECHERS метода внутреннего стандарта делает возможным применение стандартного ГХ - оборудования с селективными детекторами (ЭЗД, ПФД, ТИД и т.д.) при сохранении аттестованных схем экстракции и твердофазной очистки ацетонитрильного экстракта.

Необходимую для реализации метода внутреннего стандарта информацию авторов метода QUECHERS можно найти на www.quechers.com, а также в соответствующем разделе стандарта prEN 15662. Весьма заманчивой представляется попытка замены ЖХ/МС - системы для определения нелетучих кислотных пестицидов типа 2,4-D на стандартный жидкостный хроматограф, снабженный УФ-спектрофотометрическим детектором. Для этой цели в Сорбционный набор введен отдельный ТФЭ - патрон для концентрирования кислот из ацетонитрильного экстракта.

Впервые в отечественной практике Сорбционный набор реализует для экстрактов всех указанных видов продуктов универсальную схему очистки с применением принципов твердофазной экстракции (ТФЭ).

1.3. Особенности набора «Пестициды в продукции растениеводства»

В основу подготовки проб положена приведенная в QUECHERS двухуровневая схема скоростной экстракции суммы пестицидов в ацетонитрил и дальнейшей очистки экстракта методом дисперсивной твердофазной экстракции (ТФЭ). Реализованный в Сорбционном наборе подход обладает следующими характерными особенностями:

□ Простота и дешевизна основной процедуры: 10 г образца гомогенизируют с 10 мл ацетонитрила. После добавления внутреннего стандарта образец встряхивают с солевой смесью (4 г $MgSO_4$ и 1 г $NaCl$), а затем центрифугируют. Супернатант отбирают и вносят анионообменную смесь из расчета 25 мг сорбента и 150 мг $MgSO_4$ на каждый миллилитр, а затем снова встряхивают. После фильтрации или центрифугирования очищенный экстракт вводят в ГХ/МС-систему (газовый хроматограф с селективными детекторами).

□ Для реализации подходов метода QUECHERS по очистке «трудных» образцов, содержащих повышенные уровни хлорофилла и каротиноидов, а также липидов и восков, в наборе предусмотрено изготовление смесевых сорбентов Диасорб Амин-Х, Амин-У₁(У₂) и Амин-З из запасных сорбентов Диасорб Амин, Диасорб-Х, Диасорб-У и Диасорб-З.

□ Концентрирование кислотных пестицидов реализовано на патроне Диапак Амин-М, на котором происходит очистка от нейтральных и основных компонентов пробы, причем его емкости также достаточно для обработки 6 мл супернатанта. Элюат с патрона вводят в ЖХ/МС-систему или жидкостной хроматограф с УФ-детектором, работающий в градиентном режиме элюирования.

□ Описание процедуры подготовки проб изложено в соответствии со стандартом prEN 15662 (см. также www.quechers.com). Приведенные в Приложении В стандарта метрологические характеристики метода, а также рекомендации разд.6 по использованию внутренних стандартов и имитаторов (см. также соответствующий раздел настоящей Инструкции), должны помочь при аккредитации лаборатории по контролю пестицидов.

II. Состав сорбционного набора¹ «Пестициды в продукции растениеводства»

1. Сорбент Диасорб-60-Амин-В, 40-63 мкм, для приготовления смесевых сорбентов Диасорб Амин-Х, У и Z для пробоподготовки методом твердофазной экстракции (ТУ 4215-002-05451931-94), обеспечивающий подготовку не менее 400 проб – 50 мл;

2. Сорбент Диасорб-Х ($MgSO_4$) для приготовления смесевых сорбентов Диапак Амин-Х, - 200 мл;

3. Сорбенты Диасорб-У (MgSO_4 :ГТС-20:1), Z (MgSO_4 :С18-6:1) для приготовления смесевых сорбентов Диапак Амин-У и Z, соответственно, - по 100 мл каждого типа;
- 4 Концентрирующие патроны Диапак Амин-М для пробоподготовки методом твердофазной экстракции (ТУ 4215-002-05451931-94), обеспечивающие подготовку не менее 100 проб – 10 шт.;
4. Инструкция по применению Сорбционного набора.

¹ Примечание.

Общелабораторное оборудование, реактивы и растворители в состав сорбционного набора не входят, их варианты приведены в www.quechers.com и в разделах 4 и 3 стандарта prEN 15662, соответственно.

III. Порядок проведения пробоподготовки

Порядок проведения подготовки проб продуктов растениеводства описан в полном соответствии с QUECHERS (www.quechers.com) с дополнениями ЗАО «БиоХимМак СТ». Используются реактивы аналитической квалификации, не содержащие посторонних примесей, и бидистиллированная вода.

Отбор продуктов растениеводства осуществляется в соответствии с требованиями ГОСТ`ов на исследуемые продукты.

III.1. Подготовка к проведению определения

III. 1.1. Приготовление солевых смесей для экстракции

Авторами метода QUECHERS разработано и опробовано в межлабораторных экспериментах несколько солевых смесей, учитывающих особенности матрицы пробы и способствующих полноте экстракции пестицидов, а также сохранности наименее стойких из них. Поскольку основным компонентом смесей является безводный MgSO_4 , то следует избегать длительного контакта смесей с атмосферным воздухом как при развешивании солей, так и особенно при хранении готовых порций, поэтому не рекомендуется готовить их с избытком. Ниже приведены составы рекомендованных смесей для экстракции 10 г гомогената пробы 10 мл ацетонитрила:

- а) 4 г MgSO_4 + 1 г NaCl
- б) 6 г MgSO_4 + 1.5 г Na ацетата
- в) 4 г MgSO_4 + 1 г NaCl + 0.5 г Na_2H цитрата * 1.5 H_2O + 1 г Na_3 цитрата * 2 H_2O .

Смесь солей а) является базовой нейтральной смесью, предложенной еще в 2003 г. Она использовалась в ранних межлабораторных экспериментах (см. www.quechers.com). Смесью б) из-за повышенного содержания MgSO_4 лучше связывает воду, а буферные свойства Na ацетата способствуют нейтрализации повышенной кислотности некоторых образцов, например, цитрусовых, что делает ее предпочтительной в случае большинства обычных проб, когда не требуется анализ кислых гербицидов. Смесью в) содержит цитратный буфер, обеспечивающий при экстракции величину pH 5.0-5.5, оптимальной с точки зрения как экстракции, так и сохранности лабильных пестицидов. Поэтому именно она предложена в стандарте prEN 15662 в качестве основной для образцов сложного состава при анализе широкого круга пестицидов.

III.1.2. Приготовление сорбентных смесей для дисперсивной ТФЭ-очистки

Метод QUECHERS предусматривает развитую схему ТФЭ-очистки от нелетучих компонентов матриц, в первую очередь, кислот, пигментов и липидов. Примененный авторами «дисперсивный» вариант обеспечивает их удаление из ацетонитрильного

экстракта и прекрасно сочетается с последующим центрифугированием. Для ТФЭ-очистки используют одну из следующих смесей сорбентов с $MgSO_4$:

- а) $MgSO_4$ (для осушки) + анионообменный сорбент (для вычитания кислот);
 - б) смесь (а) + 1,5% ГТС (графитированной термической сажи) - для вычитания пигментов (каротиноидов и хлорофиллов) при их низком содержании;
 - в) смесь (а) + 4,5% ГТС – для вычитания пигментов при их высоком содержании;
 - г) смесь (а) + 15% С18 – сорбента (для вычитания липидов и восков).
- Приготовить сорбент Диасорб Амин-Х (а) встряхиванием смеси сорбентов Диасорб-Х и Диасорб-60-Амин-В в весовом соотношении 9:1.
 - Приготовить сорбент Диасорб Амин-У₁ (б) встряхиванием смеси сорбентов Диасорб-Х, Диасорб-У и Диасорб-60-Амин-В в весовом соотношении 6:3:1.
 - Приготовить сорбент Диасорб Амин-У₂ (в) встряхиванием смеси сорбентов Диасорб-У и Диасорб-60-Амин-В в весовом соотношении 9:1.
 - Приготовить сорбент Диасорб Амин-З (г) встряхиванием смеси сорбентов Диасорб-З и Диасорб-60-Амин-В в весовом соотношении 10:1.

Приготавливают и хранят сорбентные смеси в сухих, плотно закрывающихся сосудах (например, пенициллиновых флаконах с резиновыми крышками). На практике рекомендуется готовить нужное число порций сорбентов, исходя из дневной потребности.

III.1.3. Подготовка и регенерация патронов Дианак Амин-М

- Кондиционировать патрон прокачиванием 2 мл ацетонитрила с помощью шприца или вакуума, после чего патрон готов к нанесению ацетонитрильного экстракта.
- Регенерация патрона, находящегося после элюирования кислых пестицидов в 2,5% растворе муравьиной кислоты в ацетонитриле, достигается прокачиванием сначала 2 мл ацетонитрила, затем 4 мл смеси ацетонитрил-25% водный аммиак (95:5 по объему) и еще 2 мл ацетонитрила.

III.2. Предварительная подготовка пробы

III.2.1. Подготовка пробы продуктов растениеводства

В методе QUECHERS вопросам предварительного измельчения и гомогенизации проб уделяется повышенное внимание, что связано с малым временем контакта с экстрагентом при скоростной экстракции. На www.quechers.com можно найти подробные рекомендации по криогенному размолу проб овощей и фруктов, предварительно нарезанных на кусочки размером около 3х3 см, а также гомогенизации во время экстракции непосредственно в центрифужной пробирке при комнатной температуре с помощью высокоскоростных диспенсеров, подобных Ultra- Turrax.

Обращается внимание на возможность серьезных потерь пестицидов, вызванных недостаточным измельчением проб, а также даются рекомендации по контролю полноты извлечения методом внутреннего стандарта.

Основным количественным соотношением процедуры экстракции является равенство объема ацетонитрила (мл) навеске измельченного образца (г), например, 10 мл на 10 г, что позволяет впоследствии считать концентрации найденных пестицидов (в каждом мл ацетонитрильного экстракта) как соответствующие массе пробы 1 г.

В то же время следует контролировать общее количество воды во время экстракции и выделении слоя ацетонитрила. Если для сырых овощей и фруктов влажность составляет 75-95% (см. табл.3 в п.5.2.4 стандарта), то для зерновых и зернопродуктов, сухофруктов, специй и меда она конечно же ниже (более точные значения можно найти в справочнике “Химический состав российских пищевых продуктов”, М., ДеЛи принт, 2002). Поэтому в методе QUECHERS приведены такие соотношения навесок проб и добавленной воды:

- Для зерновых и меда - на 5 г пробы добавить 10 мл воды;
- Для сухофруктов – на 5 г пробы добавить 7,5 мл воды на стадии измельчения и гомогенизации и отобрать 12,5 г гомогената на анализ;
- Для фруктов и овощей с влажностью более 80% – на 10 г пробы воду не добавлять;
- Для фруктов и овощей с влажностью 25-80% - на 10 г пробы добавить X г воды, где X = 10 – масса воды в 10 г образца;
- Для специй – на 2 г пробы добавить 10 мл воды.

III.2.2. Экстракция пестицидов водным ацетонитрилом

- В 50 мл центрифужную пробирку отвесить $10 \pm 0,1$ г гомогенизированного и замороженного образца, добавить 10 мл ацетонитрила и нужное количество (например, 100 мкл) раствора одного или нескольких внутренних стандартов в ацетонитриле, закрыть пробирку и интенсивно встряхивать вручную 1 мин.

III.2.3. Распределение и выделение ацетонитрильного экстракта

- Открыть пробирку и добавить одну из солевых смесей по п. III.1.1., быстро закрыть пробирку и интенсивно встряхивать смесь вручную 1 мин. После этого центрифугировать 5 мин при 3000 мин^{-1} .

III.3. Дисперсивная ТФЭ-очистка экстракта

(подробно см. разд. 5 стандарта)

III.3.1. Очистка экстрактов образцов с низким содержанием пигментов и жиров

- Аликвоту экстракта объемом 6 мл перенести в центрифужную пробирку на 10-15 мл, содержащую 1,0 г сорбента Диасорб-Амин-Х по п. III.1.2., интенсивно встряхивать вручную 30 сек и центрифугировать 5 мин при 3000 мин^{-1} ;
- После центрифугирования очищенный экстракт перенести в сосуд с винтовой крышкой (например, в пробирку автосамплера) и подкислить 5% раствором муравьиной кислоты в ацетонитриле из расчета 10 мкл на мл экстракта, что обеспечивает сохранность даже чувствительных к щелочам пестицидов (captan, folpet, dichlofluanid, tolylfluanid, pyridate, methiocarb sulfon, chlorothalonil) в течение нескольких дней;
- Если предполагается контроль наиболее лабильных пестицидов (sulfonyl urea herbicides, carbosulfan, benfuracarb), то сохраняют аликвоту неподкисленного экстракта или проводят ГХ/МС или ЖХ/МС анализ немедленно.

III.3.2. Очистка экстрактов образцов с повышенным содержанием пигментов

- В случае образцов с умеренным содержанием хлорофилла и каротиноидов (морковь, салат латук и подобные) провести дисперсивную ТФЭ-очистку экстракта по п. III.3.1., но в течение 2 мин, заменив сорбент Диасорб-Амин-Х на 1,0 г сорбента Диасорб-Амин-У₁ по п. III.1.2.
- В случае образцов с высоким содержанием хлорофилла и каротиноидов (красный сладкий перец, шпинат и подобные) провести 2 мин дисперсивную ТФЭ-очистку, заменив сорбент Диасорб-Амин-У₁ на 1,0 г сорбента Диасорб-Амин-У₂ по п. III.1.2.
- Контроль качества очистки проводят визуально после центрифугирования.

III.3.3. Очистка экстрактов образцов с повышенным содержанием жиров и восков

- В случае образцов с повышенным содержанием жиров или восков (авокадо или зерновые и цитрусовые, обработанные восками) провести дисперсивную ТФЭ-очистку по п. III.3.1., заменив сорбент Диасорб-Амин-Х на 1,1 г сорбента Диасорб-Амин-З по п. III.1.2.

Самостоятельное приготовление смесевых сорбентов из запасных дает гибкость в подборе состава сорбента для дисперсивной очистки экстрактов особо трудных образцов. Например для одновременно как окрашенных, так и жирных образцов подходит 1.1 г синтетического сорбента по пп. III.3.2. и III.3.3. (т.е. смеси Диасорб-У₂, Диасорб-З и Диасорб-60-Амин-В в соотношении 9:9:2).

III.4. Фильтрационная очистка экстракта

Для некоторых специальных приложений метода QUECHERS удобнее пользоваться не дисперсивным, а фильтрационным вариантом ТФЭ-очистки.

Особенностью сорбционного набора, не приведенной в методе QUECHERS, является концентрирование кислотных пестицидов из ацетонитрильного экстракта, реализованное в фильтрационном варианте на анионообменном патроне Диапак Амин-М (п. III.1.3.).

Ацетонитрильный фильтрат после патрона Диапак-Амин-М свободен от компонентов кислой природы, однако содержит наряду с пигментами другие липофильные компоненты проб, например, полихлорированные бифенилы и полиароматические углеводороды (ПХБ и ПАУ), и может быть использован для их анализа в указанных образцах.

III.4.1. Экстракция кислотных пестицидов

- Для полноты экстракции только кислотных пестицидов подкислить гомогенат пробы уксусной кислотой до pH 4.0, затем добавить ацетонитрил и действовать далее по пп. III.2.2. и III.2.3., используя солевую смесь а) по п. III.1.1.;
- При использовании универсальной цитратной солевой смеси в) по п. III.1.1. следует считаться с возможностью потерь наиболее кислых пестицидов (см. www.quechers.com).

III.4.2. Концентрирование кислотных пестицидов на патроне Диапак Амин-М

- На подготовленный по п. III.1.3. патрон нанести 6 мл ацетонитрильного экстракта по п. III.4.1., а затем 2 мл ацетонитрила, собирая все элюаты в 25 мл отгонную колбу. Упарить ацетонитрил досуха на ротационном испарителе и использовать сконцентрированную пробу для анализа ПХБ и ПАУ.
- Элюировать целевую фракцию кислот 4 мл 2,5% раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле в отгонную колбу на 10 мл, упарить растворитель досуха на ротационном испарителе.
- Использовать сконцентрированную пробу кислот либо после перерастворения в элюенте А при градиентном ВЭЖХ - анализе с МС- или УФ- детектированием, либо после получения летучих метиловых эфиров (с диазометаном или 15% BF₃ / MeOH) – при ГХ-анализе с ЭЗД.

III.4.3. Регенерация и хранение патрона Диапак Амин-М

- Регенерацию патрона проводить по п. III.1.3., а хранить патрон только в среде ацетонитрила в течение 2-х недель, дополнительно кондиционируя его после хранения прокачиванием 2 мл ацетонитрила по п. III.1.3.

IV. Метрологические аспекты метода QUECHERS

Поскольку основным аналитическим методом анализа пестицидов является газовая хроматография на капиллярных колонках, для которой характерен ввод малых объемов проб (обычно 1-3 мкл), то для исключения погрешности дозирования в QUECHERS был выбран метод внутреннего стандарта. Ниже приведена таблица из www.quechers.com, в которой отражены итоги разработки метрологических аспектов метода. Таблица содержит два перечня веществ, рекомендованных в качестве внутренних стандартов для разных видов хроматографических систем и типов детекторов, а также имитаторов, пригодных для оценки коэффициента извлечения при постановке метода в лаборатории.

Name of the compound	Log P (octanol/water)	Chlorine atoms	Exemplary conc. [µg/mL] ¹	GC				LC	
				ECD	NPD	MSD EI (+)	MSD CI (-)	MS/MS ESI (+)	MS/MS ESI (-)
Potential Internal Standards									
PCB 8	5.09	2	50	+++	-	++	+++	-	-
PCB 18	5.55	3	50	+++	-	++	+++	-	-
PCB 28	5.62	3	50	+++	-	++	+++	-	-
PCB 52	6.09	4	50	+++	-	++	+++	-	-
Triphenyl phosphate	4.59	-	20	-	+++	+++	-	+++	-
Tris-(1,3-Dichlorisopropyl)- phosphate	3.65	6	50	+++	+++	+++	+++	+++	+
Triphenylmethane	5.37	-	10	-	-	+++	-	-	-
Bis-nitrophenyl urea (Nicarbazin)	3.76	-	10	-	-	-	-	-	+++
Potential Quality Control Standards									
PCB 138	6.83	6	50	+++	-	++	+++	-	-
PCB 153	7.75	6	50	+++	-	++	+++	-	-
Anthracene (or its d10 analogue)	4.45	-	100	-	-	++	-	-	-

¹ concentrations exemplary, use acetonitrile as solvent

IV.1. Метод внутреннего стандарта

Все вещества, предлагаемые в качестве внутренних стандартов, вводятся в пробу на возможно ранней стадии процесса. Для выявления источников погрешностей желательно добавить в пробу два внутренних стандарта из таблицы для каждого из детекторов, чем и оправдан выбор серии индивидуальных полихлорированных бифенилов (ПХБ). В случае ацетонитрильных экстрактов фруктов или овощей экспериментально доказано, что потеря любого из них не превышает 5%.

Иначе дело обстоит с экстрактами образцов с повышенным содержанием жира, когда внутренний стандарт частично распределяется в отдельный липидный слой. Найдено, что для самых неполярных пестицидов (гексахлорбензол, ДДТ) при количестве жира выше 0.5 г на 10 мл ацетонитрила выход может упасть ниже 70%. Поэтому в методе QUECHERS принято правило, по которому для образцов с содержанием жира выше 0.3 г на 10 мл ацетонитрила вводят внутренние стандарты в ацетонитрильный экстракт, полученный после добавления смеси солей и центрифугирования.

IV.2. Имитаторы критических ситуаций (суррогатные образцы)

Потери некоторых компонентов (малополярных или имеющих планарную структуру) могут иметь место и при дисперсивной ТФЭ-очистке сорбентами по п. III.3.2. и III.3.3.

При отработке метода в лаборатории подходящими для ГХ имитаторами неполярных пестицидов могут быть ПХБ 138 или 153 (Log P 6.83 и 7.75, соответственно). Получив по любому из них выход более 70%, можно быть уверенным в получении такого уровня с наиболее неполярными пестицидами.

В качестве имитатора планарных пестицидов, имеющих высокое сродство к ГТС, выбран антрацен, удобный для ГХ/МС или для ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием. Добившись выхода антрацена более 70%, можно рассчитывать на получение такого результата с наиболее планарными из пестицидов (hexachlorobenzene, chlorothalonil, thiabendazole).

IV.3. Метрологические характеристики точности метода

Метрологические характеристики метода, установленные в соответствии с основным стандартом ISO 5725:1994, обсуждены в п.6.4 стандарта. Межлабораторный эксперимент показал, что при уровнях добавок от 0.01 до 0.25 мг конкретного пестицида на кг продукта коэффициент извлечения составил 70-110% при величине стандартного отклонения менее 10%. Экспериментальные данные приведены в табл.В1. Данные по внутрिलाбораторному эксперименту (табл.В2) могут помочь при аккредитации контрольной лаборатории.

V. Практика проведения хроматографического анализа

За последние годы накоплен значительный опыт практического использования метода QUECHERS для анализа остаточных количеств пестицидов в продукции растениеводства. Рекомендации авторов по проведению хроматографического анализа изложены на сайте www.quechers.com. Здесь приведены лишь некоторые из них, наиболее важные для практического освоения метода.

V. 1. Повышение чувствительности ГХ-анализа

Эквивалентная масса пробы в случае фруктов и овощей составляет 1 г/мл экстракта, а в случае зерновых, сухофруктов и специй и того меньше. Для современных капиллярных ГХ-систем с обычными инжекторами (split/splitless) типичный объем вводимой пробы составляет 1 мкл, что часто приводит к недостаточной чувствительности и, как следствие, невозможности определения данного пестицида на уровне, соответствующем его предельно допустимому содержанию.

Поэтому настоятельно рекомендуется пользоваться инжекторами, допускающими ввод проб объемом не менее 3 мкл и системами продувки, например, PTV- программируемый температурный испаритель. Системы продувки защищают азотно-фосфорный (NPD) детектор как, впрочем, и задержка подачи водорода в первые минуты после ввода пробы.

Если по каким-то причинам ввод повышенных объемов проб невозможен, а нужная чувствительность анализа не достигнута, следует прибегнуть к концентрированию пробы и/или замене растворителя. Для ГХ-МС систем достаточно 4-кратного концентрирования, для чего 4 мл подкисленного (рН 5) экстракта помещают в пробирку и отдувают до 1 мл в токе азота при температуре не выше 40°C.

Замена растворителя пробы применяется, если характеристики ГХ не достигаются на ацетонитриле (отсутствует PTV) или используется NPD. Тогда ацетонитрил упаривают при 40°C досуха (предварительно добавив несколько капель додекана для исключения потерь наиболее летучих пестицидов), а затем растворяют в подходящем растворителе. Бланковый экстракт (требуется для приготовления калибровочных растворов) обрабатывается аналогично.

V. 2. Схемы проведения ВЭЖХ-анализа

Стандарт prEN 15662 приводит в Приложении А несколько рекомендованных схем проведения ВЭЖХ-анализа. Они рассчитаны, в первую очередь, на МС/МС-детекторы, чем и вызван малый размер ВЭЖХ-колонок – диаметр 2 мм, а длина 150 и даже 50 мм. Однако в тех случаях, когда нужно анализировать кислые пестициды (типа 2,4-D) в сконцентрированных пробах, приготовленных по п. III.4, можно применить обычный УФ-спектрофотометрический детектор (лучше диодноматричный) и проводить градиентный ВЭЖХ-анализ по схеме 3 (А.4 стандарта).

При наличии ЖХ-МС/МС или ГХ-МС систем, отвечающих требованиям стандарта по п.п. 3.14 и 3.15, применяют одну из рекомендованных схем анализа пестицидов: ВЭЖХ-1 (А.2), ВЭЖХ-2 (А.3), ВЭЖХ-3 (А.4), ВЭЖХ-4 (А.5) или ГХ (А.1), соответственно.

V.3. Подготовка калибровочных растворов

Для приготовления калибровочных растворов требуется бланковый экстракт матрицы образца, не содержащего детектируемых количеств искомого пестицида. Матрица для бланкового экстракта выбирается того же типа, что и анализируемая, и обрабатывается тем же образом. В аликвоту бланкового экстракта вводят желаемую добавку пестицида или смеси нескольких пестицидов, а также известное количество внутреннего стандарта с примерно таким же уровнем концентрации.

Добавление внутреннего стандарта важно проводить возможно ближе к процедуре приготовления образца (тот же дозатор и тот же объем), что способствует снижению систематической погрешности. Это означает, что необходимо разбавление внутреннего стандарта. Например, к 1 мл бланкового экстракта следует добавить 0.1 количества внутреннего стандарта, добавляемого к экстракту образца.

Для уменьшения влияния на результаты ВЭЖХ- или ГХ-анализа экстрагируемых компонентов матрицы, их концентрация должна быть примерно одинаковой для калибровочных растворов и проб образца. На www.quechers.com приведена схема калибровочного эксперимента и таблица добавок в случае определения тиабендазола на ГХ/МС-системе, снабженной автосамплером.

Additions	Vial 1	Vial 2	Vial 3	Vial 4
Sample extract	1000 µL (1 g sample)	1000 µL (1 g sample)	1000 µL (1 g sample)	1000 µL (1 g sample)
ISTD	Already included	Already included	Already included	Already included
Thiabendazole standard solution, (2 µg/mL)	-	100 µL (0.4 µg)	200 µL (0.8 µg)	300 µL (1.2 µg)
Solvent	300 µL	200 µL	100 µL	-
Final volume	1300 µL	1300 µL	1300 µL	1300 µL

(exemplary for an expected thiabendazole concentration of 0.8 mg/kg – or 0.8 µg thiabendazole/1 g sample)

Содержание конкретного пестицида в образце рассчитывается с использованием метода линейной регрессии по градуировочной зависимости отношения площадей пиков аналита и ISTD от концентрации добавленного внутреннего стандарта, полученной в результате вышеописанного градуировочного эксперимента. Соответствующая информация также приведена на www.quechers.com.

Разработал: /Васияров Г.Г./

“ “ 2008 г

Закрытое Акционерное Общество “БиоХимМак СТ”

Россия, 119992, Москва, Ленинские горы, МГУ им.М.В. Ломоносова д.1 стр.11
тел. (495) 939-59-67 /офис/, факс (495) 939-58-06.