

УДК 54.06 : 543.068

ОПРЕДЕЛЕНИЕ 2,4-Д В ОТДЕЛЬНЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ (МОЛОКО, ЯИЦА, ПЕЧЕНЬ, ПОЧКИ) ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

*В.Н. Ракитский,
Н.Е. Федорова, В.В. Баюшева,
О.Е. Егорченкова,
Л.Г. Бондарева*

ФБУН «Федеральный научный
центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана»
Роспотребнадзора. 1410014,
г. Мытищи, Московская область,
Российская Федерация

Разработана современная методика определения 2,4-Д, отнесенной к глобальным загрязнителям среды обитания, включающая использование новой, для продуктов животного происхождения, технологии подготовки образцов – дисперсионной твердофазно-жидкостной экстракции (QuEChERS). Процедура пробоподготовки включает этапы: предварительное замораживание анализируемого образца, экстракцию ацетонитрилом, содержащим 1% уксусной кислоты, в присутствии $MgSO_4$ и $NaCl$, очистку дисперсионной твердофазной экстракцией с применением смеси сорбентов на основе первично-вторичного амина, октадецилсилана и графитизированной сажи, вымораживание раствора – на последней стадии. С помощью предлагаемой методики появилась возможность выделения с высокой эффективностью искомого компонента из матрицы со значительным содержанием животного жира в выбранный органический растворитель, что позволило существенно расширить арсенал используемого аналитического оборудования для детектирования остаточных количеств 2,4-Д в продуктах питания сельскохозяйственного производства, на примере молока, яиц и субпродуктов (печень, почки): тандемная жидкостная масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС/МС), газожидкостная хроматография с масс-селективным и электронозахватным детекторами (ГЖХ-МСД, ГЖХ-ЭЗД). Нижний предел количественного определения содержаний 2,4-Д: 0,005 мг/кг для молока и яиц, 0,05 мг/кг для печени и почек. Полнота извлечения – 85-94 %, СКО повторяемости – 3,4-11,4 %.

Ключевые слова: пробоподготовка, жидкостная и газожидкостная хроматография, 2,4-Д, продукты сельскохозяйственного производства.

Введение. Одним из важных элементов современных технологий возделывания сельскохозяйственных культур является защита растений от вредителей, болезней и сорняков, так как природно-климатические условия Российской Федерации благоприятны для распространения и развития более 65 видов наиболее опасных вредителей, 100 видов болезней культурных растений и 300 видов сорных растений. Потенциальные потери урожая только от 40 наиболее вредоносных сорняков могут составлять около 30% и более [1-3].

Количественное определение остаточных количеств пестицидов, в том числе гербицидов, в среде обитания человека является достаточно

сложной задачей в аналитической химии. Для решения этой задачи, в целях получения оптимальных результатов, происходит постоянное развитие и усовершенствование методов и методик, которые позволяют минимизировать стадии подготовки образцов к анализу и, тем самым, увеличивают правильность, чувствительность и селективность определения того или иного вещества.

В настоящее время на территории РФ разрешено к применению более пятидесяти препаратов на основе 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты (2,4-Д), рекомендованных на посевах пшеницы озимой и яровой, ячменя и кукурузы [4].

2,4-Д – селективный, системный гербицид, эффективно подавляющий рост и развитие боль-

Ракитский Валерий Николаевич (Rakitskii Valerii Nicolaevich), академик РАН, профессор, И.о. директора ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, pestisidi@yandex.ru

Федорова Наталья Евгеньевна (Fedorova Natalya Evgenievna), доктор биологических наук, заведующая отделом аналитических методов контроля ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, analyt1@yandex.ru

Баюшева Виктория Васильевна (Bayusheva Victoria Vasilievna), младший научный сотрудник отдела аналитических методов контроля ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана», analytic@yandex.ru

Егорченкова Ольга Евгеньевна (Egorchenkova Olga Evgenievna), научный сотрудник отдела аналитических методов контроля ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, analyt1@yandex.ru

Бондарева Лидия Георгиевна (Bondareva Lydia Georgievna), старший научный сотрудник отдела аналитических методов контроля ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, analyt1@yandex.ru

шинства двудольных широколистных сорных растений. У чувствительных к препарату растений происходит угнетение процессов фотосинтеза, стимуляция или угнетение дыхания, нарушение метаболизма азотсодержащих соединений, разобщение процессов окисления и фосфорилирования, снижение синтеза макроэргических фосфорных соединений и другие нарушения. Устойчивые растения обладают большей способностью к детоксикации гербицида регуляторными системами, обеспечивающими стабильность обменных реакций [4].

Анализ полярных органических веществ, таких как 2,4-Д, проводится методом жидкостной и газо-жидкостной хроматографии. Однако успешно использовать эти методики для анализа полярных гербицидов в пищевых продуктах, содержащих жировые ткани, достаточно проблематично [5-7].

В процедуре подготовки продуктов питания животного происхождения к определению в них остаточных количеств пестицидов, в том числе и 2,4-Д, используются два пути: 1) жидко-жидкостная экстракция, которая практически всегда требует последующие переэкстракции и дополнительную очистку на колонке с подходящим сорбентом, 2) твердофазно-жидкостная экстракция, которая с высокой эффективностью выделяет искомым компонент из матрицы в выбранный органический растворитель. Ранее вариант дисперсионной твердофазно-жидкостной экстракции использовался главным образом для растительных образцов [8]. Этот подход был успешно использован нами в определении 2,4-Д в молоке, яйцах, некоторых видах субпродуктов сельскохозяйственных животных.

Исходя из выше сказанного, целью настоящих исследований являлась разработка методики определения остаточных количеств 2,4-Д с использованием подготовки продуктов животного происхождения: молоко, яйца, некоторые субпродукты – дисперсионной твердофазно-жидкостной экстракцией (технология QuEChERS [8]), с последующей идентификацией методами ВЭЖХ-МС/МС, ГЖХ-МСД и ГЖХ-ЭЗД.

Материалы и методы исследования.

Объекты исследования

В качестве объектов исследования использовали случайно выбранные образцы яиц, молока и некоторых видов субпродуктов животных фермерских хозяйств, приобретенных на потребительском рынке.

Реактивы и материалы

Использованы аналитический стандартный образец 2,4-Д (ГСО 7648-99), производства НПК «Блок-1» (Россия), вода, уксусная кислота, ацетонитрил, н-гексан, диэтиловый эфир, н-пропанол квалификации для ВЭЖХ фирмы Panreac (Ис-

пания). При пробоподготовке применяли оригинальную смесь солей для экстракции (Agilent Bond Elut., кат. № 5982-5550), смесь сорбентов для дисперсионной твердофазной экстракции в полипропиленовой пробирке на 2 мл (кат. № 5982-5421). Получение N-нитрозо-N-метилмочевины и раствора диазометана выполнено по типичной методике.

Для приготовления модельных проб с внесением вещества использован раствор 2,4-Д в ацетоне, концентрация 0,1 мкг/мл, объем аликвоты 0,05, 0,1, 0,2 и 0,5 мл.

Пробоподготовка образцов

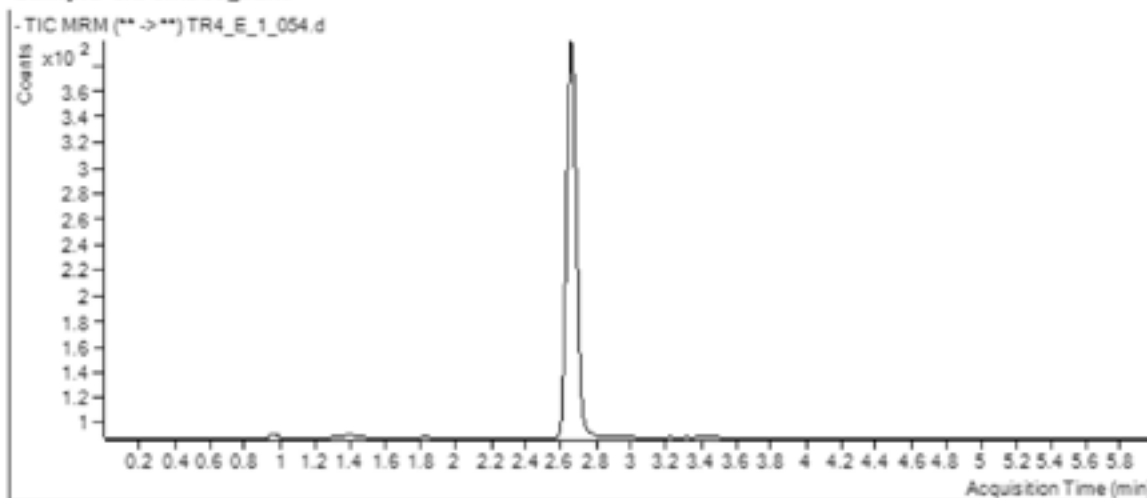
Образцы молока, взбитых яиц, измельченных проб субпродуктов (печень, почки) массой 10 г помещали в центрифужную полипропиленовую пробирку вместимостью 50 мл, замораживали, помещая на 1-2 часа в морозильную камеру при температуре -18°C. Экстрагировали 10 мл раствора уксусной кислоты (0,1 %) в ацетонитриле, в присутствии смеси солей для экстракции (4 г MgSO₄, 1 г NaCl), интенсивно встряхивая в течение 1 мин. Центрифугировали в течение 5 мин (3500 оборотов/мин), аликвоту надосадочной жидкости (1,5 -1,8 мл) очищали с применением дисперсионной твердофазной экстракции с помощью набора сорбентов, содержащего первичный-вторичный амин, октадецилсилан и графитизированную сажу, помещенных в пробирку на 2 мл. После интенсивного встряхивания и последующего центрифугирования пробирку со смесью помещали в морозильную камеру на 15-20 мин при температуре -12÷-18°C. После вымораживания из надосадочной жидкости отбирали аликвоту, для анализа методом ВЭЖХ или предварительной дериватизации 2,4-Д в летучее производное – соответствующий метиловый эфир, при ГЖХ-анализе.

Для дериватизации аликвоту полученного раствора (1 мл) упаривали досуха. К сухому остатку добавляли диазометан (3 мл), оставляли на 30 мин, для освобождения от избытка диазометана вносили в колбу 0,1 г силикагеля, отдували растворитель (предварительно для предотвращения потерь аналита вносили 0,1 мл н-пропанола), остаток растворяли в 1 мл или 10 мл гексана при анализе молока, яиц или субпродуктов, соответственно.

Условия хроматографирования

Количественную идентификацию вещества методом ВЭЖХ выполняли с использованием жидкостного хроматографа «Agilent 1290 Infinity LC» с масс-селективным детектором «Agilent Triple Quad 6460», источник ионизации – электростатическое распыление. Разделение выполняли на колонке ZORBAX Eclipse Plus RRHD C18 (50 мм * 2,1 мм * 1,8 мкм), термостатируемой при 30°C. Использована градиентная бинарная подвиж-

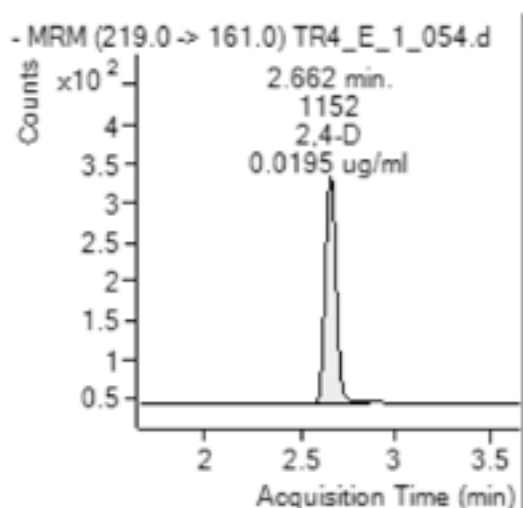
Sample Chromatogram



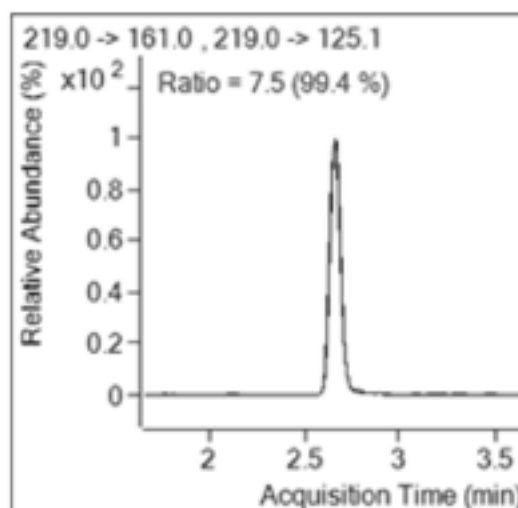
Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc	Accuracy
2,4-D	2.662	1152	0.0195	

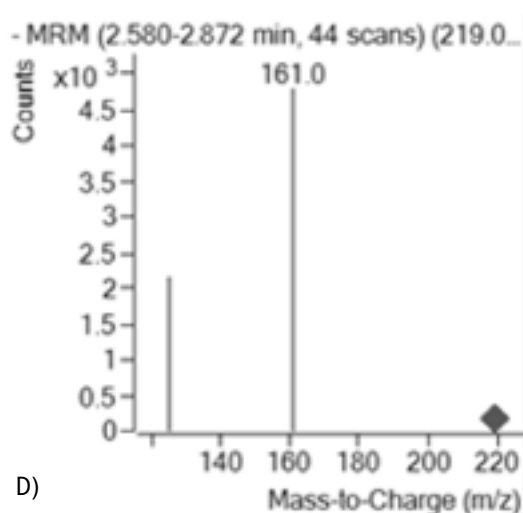
A)



B)



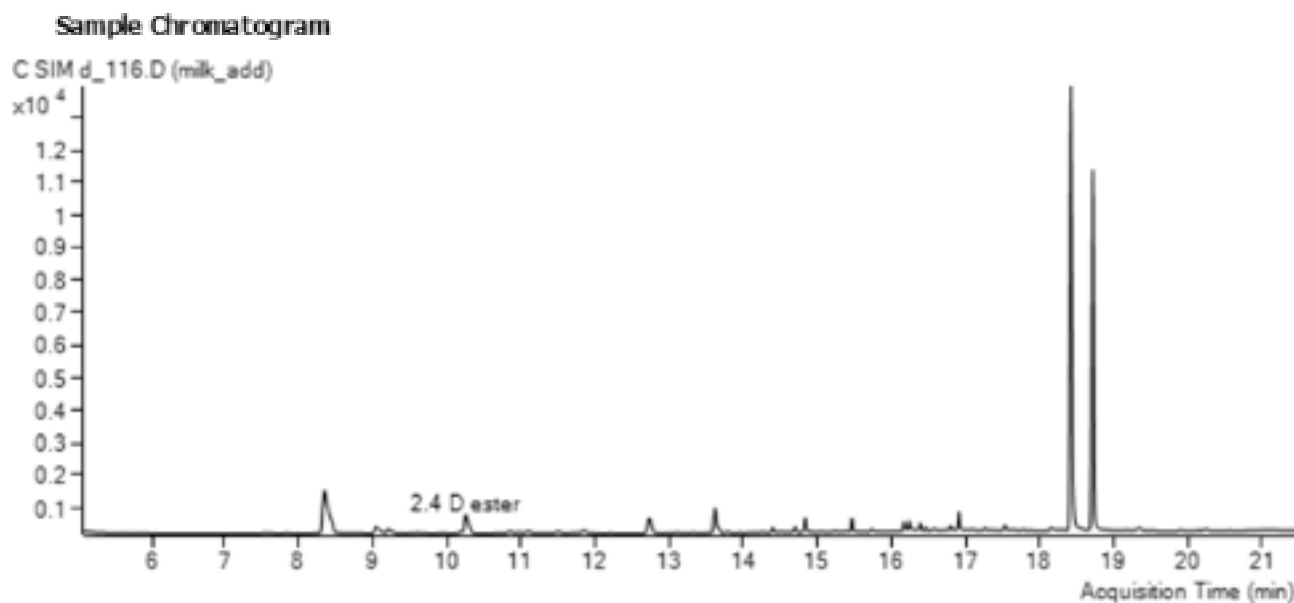
C)



D)

Рис. 1: Хроматограмма и масс-спектр образца яиц с внесением 0,02 мг/кг 2,4-Д, соответствует градуировочному раствору с концентрацией 0,02 мкг/мл:
 А) Хроматограмма образца яйца;
 В) Количественный переход 219,0 →161,0*;
 С) Переход подтверждения 219,0 →125,1;
 Д) Масс-спектр 2,4-Д.

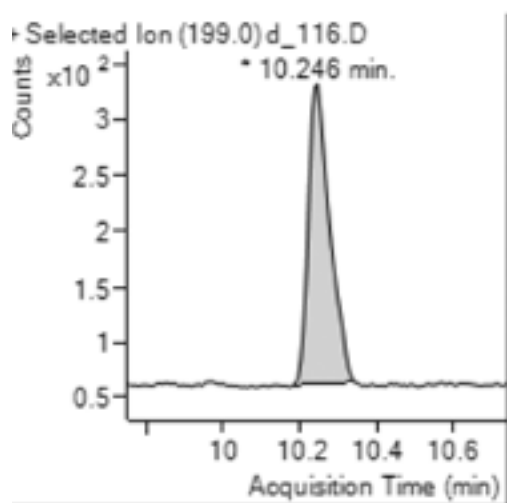
Жидкостный хроматограф Agilent 1290 Infinity LC» с масс-селективным детектором «Agilent Triple Quad 6460» (фирмы «Agilent Technologies», США), колонка стальная (50 мм x 2,1 мм), содержащая Eclipse XDB C18, зернение 1,8 мкм; подвижная фаза: компонент А - 0,04% (объем) раствор уксусной кислоты в воде; компонент Б - ацетонитрил, градиентное элюирование, скорость потока элюента - 0,3 мл/мин. Хроматографируемый объем 2 мкл.



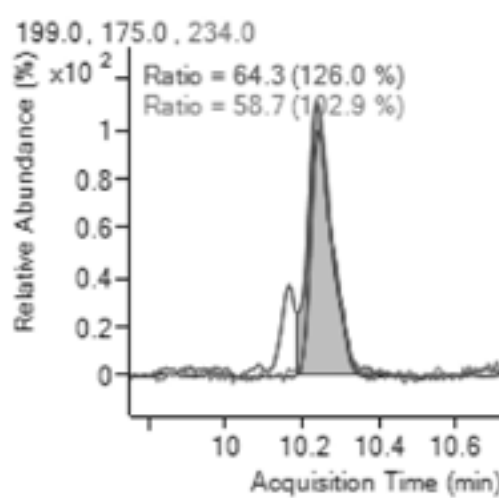
Quantitation Results

Compound	RT	Response	Conc	Accuracy
2,4 D ester	10,246	1054	0,0050	

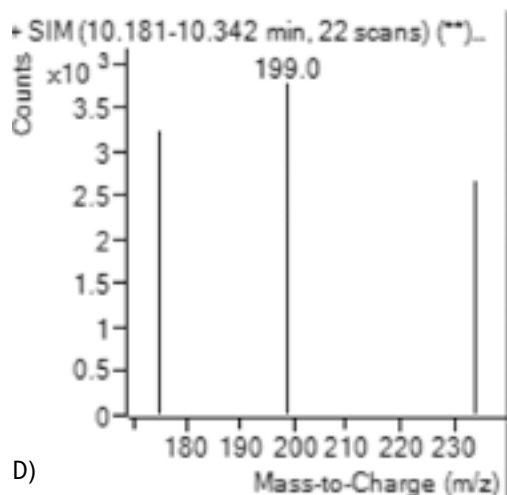
A)



B)



C)



D)

Рис.2. Хроматограмма и масс-спектр образца молока с внесением 0,005 мг/кг 2,4-Д, соответствует градуировочному раствору с концентрацией 0,005 мкг/мл:
 А) Хроматограмма образца молока;
 В) Количественный ион 2,4-Д-эфира;
 С) Подтверждающие ионы 2,4-Д-эфира;
 D) Масс-спектр 2,4-Д-эфира.

Хроматограф газовый «Agilent Technologies-6890N» с масс-селективным детектором «Agilent 5975С», колонка капиллярная HP-5MS, длиной 30 м, внутренним диаметром 0,32 мм, толщина пленки сорбента 0,25 мкм; объем вводимой пробы 1 мкл

ная фаза, состоящая из 0,04% уксусной кислоты в воде (компонент А) и ацетонитрила (компонент Б): 100% компонента А (старт), 60% компонента А (1 мин), 40% компонента А (2 мин), 100% компонента Б (3-4 мин), 100% компонента А (6 мин, финиш). Скорость потока элюента – 0,3 мл/мин, объем вводимой пробы 2 мкл. МС/МС-детектор был оптимизирован в режиме отрицательной ионизации и мультиреакционного мониторинга (МРМ) для обеспечения максимальной специфичности и чувствительности разрешения и детектирования фрагментных масс молекулы 2,4-Д: материнский ион (масса/заряд): 219, дочерние ионы 161 (количественный), 125,1.

Количественную идентификацию метилового эфира 2,4-Д методом ГЖХ выполняли с применением газового хроматографа Agilent Technologies 6890N (США) снабженного электрозахватным (ЭЗД) и масс-селективным детектором (МСД) серии 5975. Использованы капиллярные колонки: DB-1701 (30 м*0,32 мм*0,25 мкм), температура детектора (ДЭЗ): 300°C, испарителя – 260°C. Температура термостата колонки программированная – начальная температура 110°C (2 мин), нагрев по 10 градусов в минуту до 180°C (5 мин), нагрев по 20 градусов в минуту до 240°C (10 мин); а также HP-5MSUI (30 м*0,25 мм*0,25 мкм). Температура детектора (МСД) – 150°C, источника – 230°C, переходной камеры – 280°C, испарителя: 250°C. Температура термостата колонки программированная – начальная температура – 120°C (2 мин), нагрев по 8 градусов в минуту до 180°C (3 мин), нагрев по 20 градусов в минуту до 260°C (5 мин). Хроматографируемый объем 1 мм³.

Для МСД-идентификации был использован режим регистрации индивидуальных ионов (SIM), ионы (отношение: масса/заряд): 199 (количественный), 175, 234.

Результаты и обсуждение. Сочетание применения различных методов детектирования позволяет доказать, что обнаруженная реакция (сигнал детектора) обусловлена именно аналитом, и, при необходимости, оптимизировать условия хроматографирования в направлении получения надежных результатов. Так, известно, что положительные находки в анализе с применением электрозахватного детектора могут быть связаны с присутствием посторонних ингредиентов матричной основы образцов, растворителей, материалов, используемых в исследовании. В этой связи в разработанную методику измерений для обеспечения достоверности результатов по разделу ГЖХ включен масс-селективный детектор (метод подтверждения).

Зависимость интенсивности сигнала от содержания вещества в растворе линейна в диапазоне концентраций 0,005 – 0,1 мкг/мл (коэффициент

корреляции более 0,999), что соответствует диапазону определяемых содержаний в молоке и яйцах 0,005 – 0,1 мг/кг, субпродуктах – 0,05 – 1 мг/кг. Среднее квадратичное отклонение повтрянности варьирует от 3,4 до 11,4 %, полнота извлечения – 85-94 %.

Включение в процедуру пробоподготовки, предусмотренную QuEChERS [8], 2-х этапного вымораживания образца, позволило освободиться от мешающего влияния коэкстрактивных веществ, использование в качестве экстрагента ацетонитрила, содержащего 1% уксусной кислоты, минимизировало потери 2,4-Д кислоты вследствие сорбции на трехкомпонентной смеси сорбентов для дисперсионной твердофазной экстракции.

Показатели качества методики (в виде характеристики погрешности и ее составляющих) оценены на основе статистической обработки экспериментальных данных, полученных по результатам исследования модельных проб продуктов с внесением 2,4-Д на 4-х уровнях: 0,005, 0,01, 0,02 и 0,05 мг/кг для молока и яиц, и 0,05, 0,1, 0,2 и 0,5 мг/кг.

Установленный нижний предел определения – 0,005 мг/кг (молоко, яйца), 0,05 мг/кг (печень, почки млекопитающих), в 2 и более раз ниже величин МДУ: 0,01 мг/кг (молоко, яйца), 5,0 мг/кг (субпродукты млекопитающих), 0,05 мг/кг (субпродукты птицы) в соответствии с ГН 1.2.3111-13 [9]. Существующий официальный метод «Методические указания по определению 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) в воде, почве, фураже, продуктах питания растительного и животного происхождения хроматографическими методами» (утв. 20.12.1976, № 1541-76 [10]), основанный на ГЖХ-ДЭЗ и хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ), имеет нижний предел определения в молоке 0,04 мг/л (ГЖХ), 0,1 мг/л (ТСХ), мясе – 0,08 мг/кг (ГЖХ), 0,15 мг/кг (ТСХ), и не включает анализ субпродуктов, что свидетельствует о важности выполненного исследования.

С применением разработанной методики были исследованы 10 случайных образцов яиц, молока, печени и почек крупного рогатого скота, приобретенных на потребительском рынке. Показано соответствие продукции по уровню 2,4-Д установленным гигиеническим нормативам согласно ГН 1.2.3111-13 [9].

Заключение. Таким образом, нами впервые в отечественной практике была использована технология QuEChERS, включающая дисперсионную твердофазно-жидкостную экстракцию, в подготовке образцов сельскохозяйственных продуктов животного происхождения, при определении действующего вещества целого ряда пестицидов, содержащих 2,4-Д, на примере яиц, молока, субпродуктов (печень, почки).

Для идентификации 2,4-Д предложен комплекс хроматографических методов с использованием нескольких способов детектирования: tandem-ная жидкостная масс-спектрометрия с тройным квадрупопом, газожидкостная хроматография с масс-селективным или электронно-захватным детекторами. Тем самым нам удалось расширить аналитические возможности определения 2,4-Д в сложных матрицах.

В настоящее время методика (МУК 4.1.3440-17 «Определение остаточных количеств 2,4-Д кислоты в молоке, яйцах и субпродуктах млекопитающих хроматографическими методами») имеет Свидетельство об аттестации методики (метода) измерений – № РОСС RU.0001.310430/0274.22.09.16 и внесена в Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляев Е.Н. Стойкие органические загрязнители, содержащиеся в окружающей среде, их влияние на здоровье населения. Экологический вестник России. 2016; № 8: 10-15.
2. Куликова Н.А., Лебедева Г.Ф. Гербициды и экологические аспекты их применения: Учебное пособие. М.: ЛИБРОКОМ, 2010: 152 с.
3. Справочник пестицидов и агрохимикатов разрешенных к применению на территории Российской Федерации, 2016 Версия 1.2 (26.12.2016). М.: АГРО-РУС, 2016: 218 с.
4. Pesticide Chemistry. Crop protection,

- Public health, Environmental safety. Ed. by Ohkawa H., Miyagawa H., Lee P.W. Verlag, WILEY-VCH, 2007: 497 p.
5. Carabias-Martínez R, Rodríguez-Gonzalo E, Revilla-Ruiz P, Hernández-Méndez J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. J Chromatogr A. 2005 Sep 30;1089(1-2):1-17.
6. Michel Rubens dos Reis Souza, Cybelle Oliveira Moreira, Tamires Gleice de Lima, Adriano Aquino, Haroldo Silveira Dórea. Validation of a matrix solid phase dispersion (MSPD) technique for determination of pesticides in lyophilized

- eggs of the chicken Gallus gallus domesticus. Microchemical Journal, 2013; V.110, 395-401.
7. Спиридонов Ю.Я., Ларина Г.Е., Шестаков В.Г. Методическое руководство по изучению гербицидов, применяемых в растениеводстве. – Голицыно: Россельхозакадемия-ВНИИФ, 2004: 240 с.
8. Anastassiades M., Lehotay S.J., Stajnbaher 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. 2003; 86: 412-419.
9. ГН 1.2.3111-Г гигиенические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды (перечень): Гигиенические нормативы: – М: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014: 131 с.
10. Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде: Справочное издание/М-во сел. хоз-ва СССР. Гос. комис. по хим. средствам борьбы с вредителями, болезнями растений и сорняками; Под ред. М.А. Клиссенко. – М.: Колос; 1983: 176- 82.

REFERENCES:

1. Belyaev E.N. Persistent organic pollutants contained in the environment, their impact on public health. Ecological Herald of Russia. 2002; № 8: 10-15 (in Russian).
2. Kulikova N.A., Lebedeva G.F. Herbicides and environmental aspects of their use: Tutorial. M.: LIBROKOM, 2010: 152 (in Russian).
3. Version 1.2 (December 26, 2016). Directory of pesticides and agrochemicals allowed for use in the territory of the Russian Federation. M.: AGRORUS, 2016: 218 (in Russian).

4. Ed. by Ohkawa H., Miyagawa H., Lee P.W. Verlag. Pesticide Chemistry. Crop protection, Public health, Environmental safety., WILEY-VCH, 2007: 497.
5. Carabias-Martínez R, Rodríguez-Gonzalo E, Revilla-Ruiz P, Hernández-Méndez J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. J Chromatogr A. 2005 Sep 30; 1089(1-2):1-17.
6. Michel Rubens dos Reis Souza, Cybelle Oliveira Moreira, Tamires Gleice de Lima, Adriano Aquino, Haroldo Silveira Dórea. Validation of a matrix solid

- phase dispersion (MSPD) technique for determination of pesticides in lyophilized eggs of the chicken Gallus gallus domesticus. Microchemical Journal, 2013; V.110: 395-401.
7. Spiridonov Yu.Ya., Larina G.E., Shestakov V.G. Methodical guidelines for the study of herbicides used in crop production.– Golitsyno: Rosselkhozakademiya-VNIIF, 2004: 2(in Russian).
8. Anastassiades M., Lehotay S.J., Stajnbaher 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. 2003; 86: 412-419.
9. GN 1.2.3111-Hygienic standards for pesticide content in environmental facilities (list): Hygienic standards: – M: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rosпотребнадзор, 2014: 131 p. (in Russian).
10. Methods for the determination of micro-quantities of pesticides in food, feed and the environment: Reference edition / Ed. M.A. Klissenko. – Moscow: Kolos, 1983: 176-(in Russian).

V.N. Rakitskii, N.E. Fedorova, V.V. Bayusheva, O.E. Egorchenkova, L.G. Bondareva

DETERMINATION OF 2,4-D IN SOME FOOD PRODUCTS (MILK, EGGS, LIVER, KIDNEYS) BY CHROMATOGRAPHY METHODS

Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman, Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Well-being, 1410014, Mytishchi, Moscow region, Russian Federation

The modern technique for the determination of 2,4-D, that belongs to global environmental pollutants, including the use of the technology of sample preparation - dispersive solid-phase-liquid extraction (QuEChERS), new for products of animal origin, has been developed. The sample preparation procedure includes the steps of: preliminary freezing of the sample to be analyzed, extraction with acetonitrile containing 1% acetic acid in the presence of MgSO₄ and NaCl, purification by dispersive solid-phase extraction using a mixture of sorbents based on primary-secondary amine, octadecylsilane and graphitized carbon black, the freeze of the solution - at the last stage. Using the proposed technique allows to isolate the desired component from a matrix with a high content of animal fat into a selected organic solvent with high efficiency, that made it possible to expand significantly the arsenal of analytical equipment used to detect residual amounts of 2,4-D in food products of agricultural production, for example milk, eggs and offal (liver, kidney): tandem liquid mass-spectrometry (HPLC-MS/MS), gas-liquid chromatography with mass-selective and electron-capture detectors (GLC-MSD, GLC-ECD).

The lower limit of the quantitative determination is 2,4-D: 0,005 mg/kg for milk and eggs, 0.05 mg/kg for the liver and kidneys. Completeness of extraction is 85-94%, RMS of repeatability is 3,4-11,4%.

Keywords: sample preparation, liquid and gas-liquid chromatography, 2,4-D, products of agricultural production

Переработанный материал поступил в редакцию 17.01.2018 г.