

УДК 543.544.5:661.16

UDC: 543.544.5:661.16

02.00.00 Химические науки

Chemical sciences

**ПРОБОПОДГОТОВКА QuEChERS ПРИ  
ОПРЕДЕЛЕНИИ ПЕСТИЦИДОВ  
РАЗЛИЧНЫХ ХИМИЧЕСКИХ КЛАССОВ  
МЕТОДОМ ВЭЖХ****QuEChERS SAMPLE PREPARATION IN THE  
DETERMINATION OF PESTICIDES OF  
DIFFERENT CHEMICAL CLASSES BY HPLC**

Войкина Анна Владимировна<sup>1,2</sup>  
канд. биол. наук  
SPIN-код: 9098-7552

Voikina Anna Vladimirovna<sup>1,2</sup>  
Cand. in Biology  
SPIN-code: 9098-7552

Бугаев Леонид Анатольевич<sup>1</sup>  
канд. биол. наук, доцент  
SPIN-код: 3710-9407

Bugaev Leonid Anatolievich<sup>1</sup>  
Cand. in Biology, Associate Professor  
SPIN-code: 3710-9407

<sup>1</sup>ФГБНУ «Азовский научно-исследовательский  
институт рыбного хозяйства», Ростов-на-Дону,  
Россия

<sup>1</sup>FGBNU «Azov Scientific Research Institute of  
Fisheries», Rostov-on-Don, Russia

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Южный федеральный  
университет», Ростов-на-Дону, Россия  
344002, Ростов-на-Дону, ул. Береговая 21в  
e-mail: [vojkina-anna@yandex.ru](mailto:vojkina-anna@yandex.ru)

<sup>2</sup>FGAOU VO «Southern Federal University», Rostov-  
on-Don, Russia  
344002, Rostov-on-Don, Beregovaya 21B  
e-mail: [vojkina-anna@yandex.ru](mailto:vojkina-anna@yandex.ru)

Разработан способ одновременного определения действующих веществ пестицидов различных химических классов в биологическом материале (печень рыб) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием с использованием быстрой методики подготовки проб QuEChERS. Подбран оптимальный состав и объем реагентов для экстракции, время центрифугирования и обработки ультразвуком, природа и состав сорбентов, обеспечивающие максимальные значения степеней извлечения исследуемых веществ из матрицы и их очистку от мешающих веществ. В качестве экстрагента использовали ацетонитрил. Экстрагирование проводили в присутствии буферизирующей смеси - натрия лимоннокислого трехзамещенного (двойной гидрат) и натрия лимоннокислого двухзамещенного (полуторный гидрат). Для очистки полученного экстракта от соэкстрагируемых веществ (жиров, белков, сахаров, органических и жирных кислот, пигментов и других примесей) использовали насыпные сорбенты Bondesil PSA (алкилированный амин, содержащий две аминовые функциональные группы — вторичную и первичную) и C18E (обращено-фазовый сорбент на основе силикагеля с привитыми октадецилсилановыми группами). Степень извлечения анализируемых действующих веществ пестицидов из печени рыб составила > 79 %. Диапазоны определяемых содержаний пестицидов составил от 0,4 до 0,97 мг/кг. Величина относительного стандартного отклонения результатов анализа составляла 0,01-0,14

The method has been developed of simultaneous determination of active ingredients of different kinds of pesticides in biological tissues (fish liver) by applying HPLC with ultra-violet detection and the rapid method of QuEChERS sample preparation. We defined optimum volume and composition of the reagents for the extraction, time of centrifugation and ultrasound treatment, the origin and composition of sorbents that ensure maximum extraction of the substances studied and further cleanup of interfering substances. Acetonitrile was used as a solvent. The extraction was carried out in the presence of a buffering mixture - trisodium citrate dihydrate and disodium citrate hemihydrate. Bondesil PSA bulk sorbents (alkylated amine containing two amine functional groups - secondary and primary) and C18E (reversed-phase sorbent based on silica gel with grafted octadecylsilane groups) were used to purify the extract from coextractable substances (fats, proteins, sugars, organic and fatty acids, pigments and other impurities). The degree of extraction of the analyzed active ingredients of pesticides from the liver of fish was 79%. The detectable pesticide concentrations ranged from 0,4 to 0,97 mg/kg. The relative standard deviation of the analysis results amounted to 0,01-0,14

Ключевые слова: ПЕСТИЦИДЫ, QUECHERS,

Keywords: PESTICIDES, QUECHERS,

СОРБЕНТЫ, ВЭЖХ, СТЕПЕНЬ ИЗВЛЕЧЕНИЯ,  
ПРОБОПОДГОТОВКАBIOMATERIAL, HPLC, DEGREE OF  
EXTRACTION, SAMPLE PREPARATION

Doi: 10.21515/1990-4665-132-011

**Введение.** Применение пестицидов строго регламентировано через систему государственной регистрации, которая предусматривает разработку регламентов их применения. Эти мероприятия сопровождаются системой мониторинга остаточных количеств пестицидов в объектах окружающей среды и продуктах питания, которая позволяет собирать обширные данные по загрязнённости остатками пестицидов, проводить их анализ и оперативно реагировать на обстановку. Для осуществления таких программ необходимы высокочувствительные методы анализа остаточных количеств пестицидов, позволяющие детектировать и количественно оценивать уровни остаточных концентраций пестицидов ниже официально установленных по требованиям безопасности. В настоящий момент, в России в исследованиях по осуществлению мониторинга остаточных количеств пестицидов в основном используются индивидуальные методы их определения (конкретно для каждого вещества), что значительно повышает стоимость анализов и снижает производительность лабораторий [1].

При разработке новых методов определения веществ предпочтение в настоящее время отдается методикам, позволяющим идентифицировать максимально широкий круг аналитов в одной пробе для использования всех аналитических возможностей новых приборов. В итоге сформировалась схема анализа, основанная на экстракции матрицы органическим растворителем, очистке методом твердофазной экстракции, идентификации и количественном определении хроматографическими методами. Такая схема успешно применяется в настоящее время для анализа некоторых антибиотиков, сульфаниламидов и микроколичеств пестицидов в продуктах питания. Разработчики назвали этот метод

пробоподготовки “Кэтчерс” (QuEChERS - аббревиатура от основных достоинств метода: быстрый, простой, дешевый, эффективный, точный, надежный). До настоящего времени этот метод не применялся для токсикологических анализов биологического материала гидробионтов. Хотя принцип подготовки проб универсален, необходимо оптимизировать только условия экстракции и очистки, тип и количество сорбента для стадии очистки [2].

В данной работе нами предложен экономичный способ одновременного определения действующих веществ пестицидов с использованием предварительной подготовки образцов биологического материала (печень рыб) по методу QuEChERS. Это универсальный метод пробоподготовки проб позволяет извлечь остаточные количества пестицидов, принадлежащих к различным классам химических соединений, за один прием в несколько простых этапов.

**Материалы и методы исследования.** В работе использовали жидкостной хроматограф фирмы «Applied Biosystems» (США), снабженный детектором спектрофотометрическим Applied Biosystems Kratos 757 с дейтериевой лампой. Рабочий диапазон от 190 до 360 нм, максимальная чувствительность 0,005 AUFS. Колонка Reprosil-PUR ODS (размер 4×150 мм, зернение-5,0 мкм). Для удаления пузырьков воздуха в подвижной фазе использовали дегазатор DG-18. Обработку данных производили с помощью программного обеспечения Мультихром 1,5. Ультразвуковая ванны с механическим таймером и подогревом VBS-3H (Вилитек, Россия), Центрифуга DSC-302SD с ротором AR-1512 (Hsiang, Китай).

Использовали стандартные образцы пестицидов фирмы «Bayer Crop-Science», Германия (чистота >98 %): имазапир, имидаклоприд, имазетапир, ципросульфамид, метрибузин, фенмедифам, флумиоксазин, хизалофоп-П-этил, этофумезат, ипродион, флуфенацет, флубендиамид,

фамоксадон, пенцикурон, дифлуфеникан. Стандартные растворы пестицидов с концентрацией 100 мкг/мл готовили из сухих образцов, используя в качестве растворителя ацетонитрил. Градуировочные растворы пестицидов хранили в рабочей камере холодильника при температуре +3-5°C в герметично закрытых стеклянных емкостях не более 3 месяцев. Перед использованием растворы выдерживали при комнатной температуре не менее 20 мин. Рабочие растворы смеси пестицидов готовили путем разбавления стандартных растворов индивидуальных пестицидов ацетонитрилом непосредственно перед использованием. Использовали ацетонитрил «осч.» 1 сорт («Криохром», Россия), воду бидистиллированную (ТУ 6-09-2502-77), кислоту ортофосфорную («х.ч.»), сорбент Bondesil PSA 40 мкм («Varian», США), сорбент C18E 40-63 мкм («Биохиммак», Россия), магний сернокислый, безводный («х.ч.»), натрий лимоннокислый двузамещенный 1,5-водный («х.ч.»), натрий лимоннокислый трехзамещенный 2-водный («х.ч.»).

Экстракцию пестицидов из печени рыб и очистку экстрактов осуществляли по методу QuEChERS. Навеску образца массой 5 г гомогенизировали при низкой температуре и помещали в центрифужные пробирки на 50 мл. Добавляли в пробирки 5 г сульфата магния ( $MgSO_4$ ) для поглощения влаги и тщательно растирали. Добавляли 0,6 г соли натрия лимоннокислого двухзамещенного (полуторный гидрат) и 0,5 г соли натрия лимоннокислого трехзамещенного (двойной гидрат), приливали 8 мл ацетонитрила, слегка встряхивали и подвергали обработке ультразвуком в ультразвуковой ванне в течение 1 минуты, затем оставляли при комнатной температуре на 30 минут. Далее пробирки помещали в центрифугу и центрифугировали в течение 5 минут (4000 об/мин). Жидкость над осадком декантировали в заранее приготовленные центрифужные пробирки объемом 15 мл с 1,2 г сульфата натрия ( $MgSO_4$ ), 0,05 г Bondesil PSA (сорбент) и 0,05 г C18E (сорбент), перемешивали

вручную в течение 1 минуты и оставляли при комнатной температуре на 40 минут. Пробирки помещали в центрифугу и центрифугировали в течение 5 минут (4000 об/мин). Полученный экстракт декантировали в роторные колбы для вакуумного испарителя и выпаривали до объёма 1 мл и проводили хроматографическое разделение.

**Результаты исследования и их обсуждение.** 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 общим методом анализа множественных остатков пестицидов и иных ксенобиотиков, что соответствует современным тенденциям аналитической химии пестицидов [3].

Исследуемые действующие вещества пестицидов плохо растворимы в воде, но имеют химическое сродство к органическим веществам, поэтому в качестве биологического материала при апробации методики была использована печень рыб. Печень является основным органом у живых организмов, который обезвреживает и выводит многие, в основном липофильные, вещества. В ходе эксперимента в матрицу вносили смеси стандартных растворов 15-ти действующих веществ. Выполняли пробоподготовку следующих образцов: холостое определение (выполняли все процедуры методики, но без матрицы); образец с добавлением раствора смеси стандартных пестицидов; контрольный образец без пестицидов.

В ходе эксперимента был подобран оптимальный состав и объем реагентов для экстракции, время центрифугирования и обработки ультразвуком, природа и состав сорбентов, которые обеспечивают

максимальные значения степеней извлечения исследуемых веществ из матрицы. В качестве экстрагента использовали ацетонитрил, в котором извлекаемые вещества имеют максимальную растворимость. Экстрагирование проводили в присутствии буферизирующей смеси - натрия лимоннокислого трехзамещенного (двойной гидрат) и натрия лимоннокислого двухзамещенного (полупорционный гидрат). Для удаления избыточной воды в пробу добавляли сульфат магния. Очистку полученного экстракта от соэкстрагируемых веществ (жиров, белков, сахаров, органических и жирных кислот, пигментов и других примесей) проводили с помощью насыпных сорбентов Bondesil PSA (алкилированный амин, содержащий две аминовые функциональные группы — вторичную и первичную) и C18E (обращено-фазовый сорбент на основе силикагеля с привитыми октадецилсилановыми группами).

Хроматографическое разделение и идентификация производились при следующих условиях: подвижная фаза - смесь ацетонитрила с 0,01 М ортофосфорной кислотой (в соотношении 3:2 по объему), режим элюирования изократический, скорость потока 0,5 мл/мин, температура термостата колонки – 40°C. Длина волны детектирования – 230 нм, объем вводимой пробы – 10 мкл. Продолжительность анализа – 35 мин. Идентификация веществ проводилась по времени удерживания, а количественное определение - методом абсолютной калибровки. При данных условиях разделение пестицидов, как в стандартных растворах, так и в анализируемых образцах, достигалось максимально. Хроматограмма смеси стандартов пестицидов представлена на рисунке 2. Хроматограмма образца печени рыб с добавлением растворов смесей стандартных пестицидов представлены на рисунке 3.

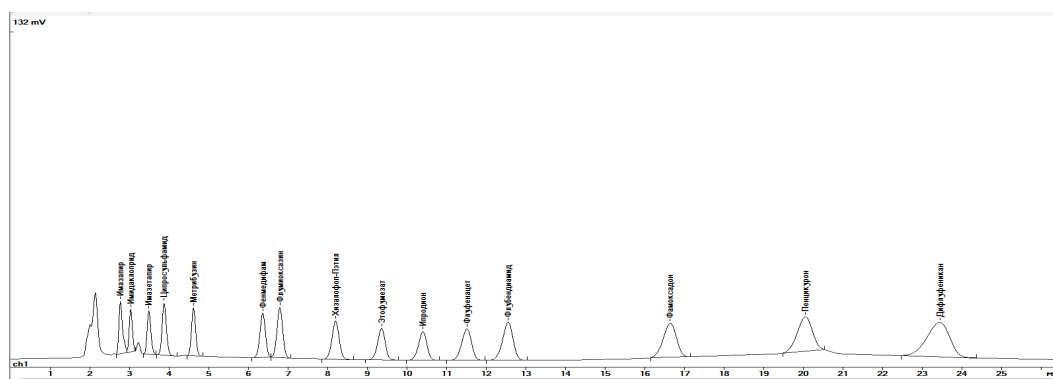


Рис. 1 — Хроматограмма стандартной смеси пестицидов:

1 – имзапир, 2 – имидаклоприд, 3 – имазетапир, 4 – ципросульфамид, 5 – метрибузин, 6 – фенмедифам, 7 – флумиоксазин, 8 – хизалофоп-П-этил, 9 – этофумезат, 10 – ипродион, 11 – флуфенацет, 12 – флубендиамид, 13 – фамоксадон, 14 – пенцикурон, 15 - дифлуфеникан

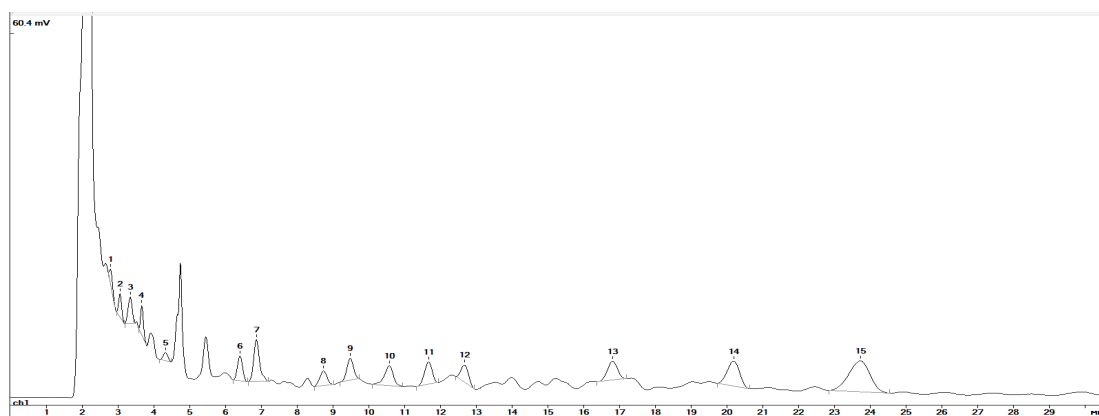


Рис. 2 — Хроматограмма пробы печени с добавкой смеси стандартных образцов пестицидов:

1 – имзапир, 2 – имидаклоприд, 3 – имазетапир, 4 – ципросульфамид, 5 – метрибузин, 6 – фенмедифам, 7 – флумиоксазин, 8 – хизалофоп-П-этил, 9 – этофумезат, 10 – ипродион, 11 – флуфенацет, 12 – флубендиамид, 13 – фамоксадон, 14 – пенцикурон, 15 - дифлуфеникан

Для оценки эффективности процесса пробоподготовки рассчитывали степень извлечения ( $R$ ) действующих веществ пестицидов из биологических образцов (печень рыб) и относительное стандартное отклонение ( $S_r$ ). Величину степени извлечения метода получали как отношение результата измеренного содержания пестицидов в пробе с добавкой к расчетному количеству пестицидов в пробе с добавкой. Выполнено по 10 определений в двух параллелях.

Исследования показали, что степень извлечения анализируемых действующих веществ пестицидов из печени рыб составила >79 %, что свидетельствует об эффективности применяемой методики для определения остаточных количеств пестицидов в биологическом материале (печень рыб). Величина относительного стандартного отклонения результатов анализа составляла 0,01-0,14. (табл.1).

Таблица 1. Аналитические характеристики методики определения пестицидов в печени рыб (n=10, P=0,95)

Пестицид	Время удерживания (мин)	Уравнение градуировочной характеристики	Предел обнаружения, мкг/кг	Предел определения, мкг/мл	(R), %	S <sub>r</sub>
Имазапир	2,733	y = 0,022100x	0,15	0,49	87	0,03
Имидаклоприд	2,986	y = 0,081246x	0,25	0,82	79	0,03
Имазетапир	3,451	y = 0,039133x	0,22	0,72	85	0,14
Ципросульфамид	3,820	y = 0,036583x	0,12	0,40	82	0,09
Метрибузин	4,548	y = 0,020694x	0,14	0,46	94	0,05
Фенмедифам	6,335	y = 0,017073x	0,20	0,68	80	0,04
Флумиоксазин	6,791	y = 0,009263x	0,29	0,91	79	0,09
Хизалофоп-П-этил	8,261	y = 0,031069x	0,17	0,97	80	0,07
Этофумезат	9,420	y = 0,058973x	0,21	0,51	94	0,03
Ипродион	10,419	y = 0,041369x	0,16	0,61	86	0,05
Флуфенацет	11,598	y = 0,049935x	0,18	0,78	83	0,14
Флубендиамид	12,687	y = 0,036661x	0,23	0,59	81	0,08
Фамоксадон	16,837	y = 0,018735x	0,22	0,75	87	0,02
Пенцикурон	20,201	y = 0,017986x	0,20	0,80	91	0,01
Дифлуфеникан	23,716	y = 0,018329x	0,14	0,74	92	0,09

Пределы обнаружения пестицидов (соотношение сигнал/шум = 3) варьировали от 0,12 до 0,29 мг/кг, пределы определения (масса пробы – 5 г.) варьировали от 0,4 до 0,97 мг/кг. Градуировочные характеристики для всех исследуемых действующих пестицидов имеют линейную зависимость с коэффициентами корреляции  $R^2 \geq 0,9978$ .

С использованием данного метода пробоподготовки проанализированы пробы печени бычка-кругляка, тарани, судака и пиленгаса, выловленных в Азовском море в весенний период, на содержание исследуемых действующих веществ пестицидов. Было проанализировано по 20-30 образцов печени каждого вида рыб, результаты исследования представлены в таблице 2.



Таблица 2. Содержание действующих веществ пестицидов в печени производителей бычка-кругляка, тарани, судака и пиленгаса (n=3, P=0,95)

Пестицид	Бычок-кругляк, мкг/г	Тарань, мкг/г	Судак, мкг/г	Пиленгас, мкг/г
Имазапир	0,9±0,2	0,6±0,3	<ПО	1,6±0,2
Имидаклоприд	0,8±0,1	1,2±0,4	<ПО	<ПО
Имазетапир	<ПО	<ПО	1,2±0,3	2,1±0,6
Ципросульфамид	<ПО	<ПО	1,1±0,2	1,6±0,5
Метрибузин	0,7±0,3	0,6±0,2	1,8±0,1	<ПО
Фенмедифам	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО
Флумиоксазин	<ПО	<ПО	1,4±0,2	<ПО
Хизалофоп-П-этил	<ПО	<ПО	<ПО	1,4±0,1
Этофумезат	0,7±0,1	0,4±0,2	1,1±0,2	1,3±0,4
Ипродион	<ПО	0,8±0,2	<ПО	<ПО
Флуфенацет	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО
Флубендиамид	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО
Фамоксадон	0,8±0,2	1,6±0,3	<ПО	1,2±0,2
Пенцикурон	<ПО	1,4±0,4	0,9±0,2	<ПО
Дифлуфеникан	0,9±0,1	1,3±0,2	<ПО	<ПО

В печени рыб были обнаружены от 6 до 8 наименований действующих веществ пестицидов. Остальные действующие вещества находились в концентрациях ниже аналитического предела обнаружения методики.

На рисунке 3-4, в качестве примера, представлены хроматограммы пробы печени тарани и бычка-кругляка после извлечения действующих веществ пестицидов по методу QuEChERS.

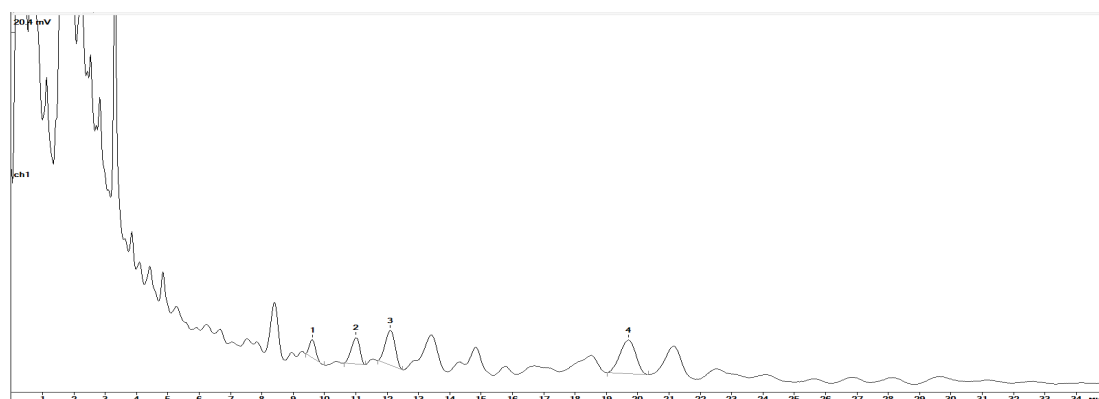


Рис. 3 — Пример хроматограммы экстракта печени тарани:

1 – этофумезат, 2 – ипродион, 3 – флубендиамид, 4 – пенцикурон

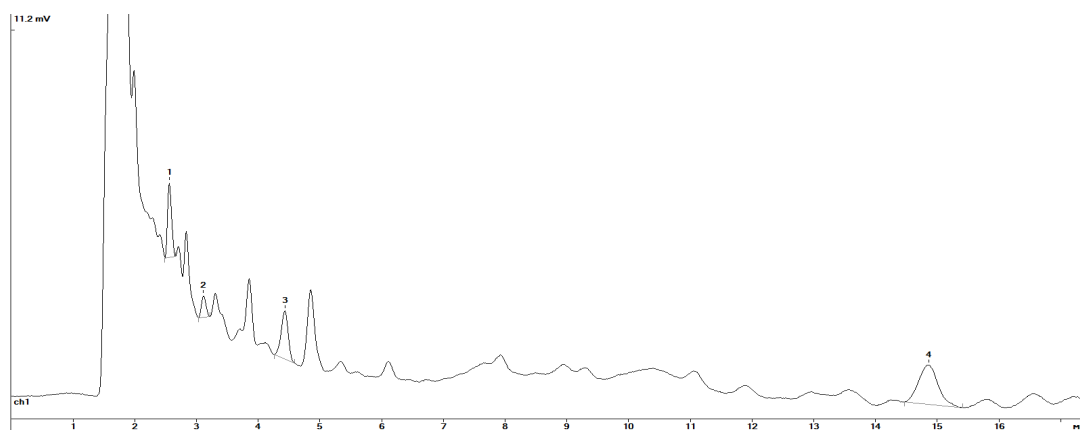


Рис. 4 — Пример хроматограммы экстракта печени бычка-кругляка:

1 – имзапир, 2 – имизетапир, 3 – фенмедифам, 4 – фамоксадон

**Заключение.** Таким образом, апробация пробоподготовки по методу QuEChERS на образцах биологического материала (печень рыб) показала преимущество перед традиционными трудоемкими способами извлечения остаточных количеств действующих веществ пестицидов. Достаточно высокие степени извлечения веществ и маленькие величины стандартного отклонения позволяют рекомендовать данный метод пробоподготовки для совместного определения действующих веществ пестицидов различных химических классов.

### Список литературы

1. Колунтаев Д.А. Оценка экологической безопасности продукции растениеводства методом группового анализа остаточных количеств пестицидов. Автореферат на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Москва. 2012
2. Мелентьев, А. Б. Химико-токсикологических анализ органов и тканей с использованием метода пробоподготовки «Кэтчерс» / А. Б. Мелентьев, Г. А. Латышева // Сборник тезисов конференции АСТЕ`2013. –М.: Издат. группа «Граница», 2013. – С. 20-22.
3. Мельничук С. Д., Баранов Ю. С., Земцова О. В., Павлинчук В. И., Максимчук И. С., Шимко Н. Н., Гончаренко В. С. Мини-MRM метод (quenchers) и его применение для определения остатков пестицидов в овощах и фруктах // Журнал Хроматографического товариства – Т. VIII. 2008. – № 1, 2

### References

1. Koluntaev D.A. Ocenka jekologicheskoy bezopasnosti produkcii rastenievodstva metodom gruppovogo analiza ostatochnyh kolichestv pesticidov. Avtoreferat na soiskanie uchenoj stepeni kandidata biologicheskikh nauk. Moskva. 2012

2. Melent'ev, A. B. Himiko-toksikologicheskikh analiz organov i tkanej s ispol'zovaniem metoda probopodgotovki «Kjetchers» / A. B. Melent'ev, G. A. Latysheva // Sbornik tezisov konferencii ACTE`2013. –M.: Izdat. gruppa «Granica», 2013. – S. 20-22.

3. Mel'nichuk S. D., Baranov Ju. S., Zemcova O. V., Pavlinchuk V. I., Maksimchuk I. S., Shimko N. N., Goncharenko V. S. Mini-MRM metod (quechers) i ego primenenie dlja opredelenija ostatkov pesticidov v ovoshhah i fruktah // Zhurnal Hromatografichnogo tovaristva – T. VIII. 2008. – № 1, 2