

УПАТСТВО ЗА УПОТРЕБА НА МАСЕНА СПЕКТРОМЕТРИЈА ЗА ИДЕНТИФИКАЦИЈА, ПОТВРДУВАЊЕ И КВАНТИТАТИВНО ОДРЕДУВАЊЕ НА РЕЗИДУИ

CAC/GL 56-2005

ТЕСТОВИ ЗА ПОТВРДУВАЊЕ

Кога анализите се вршат заради мониторинг или спроведување, особено е важно да се генерираат потврдни податоци пред да се пријават мострите кои содржат резидуи од пестициди кои вообичаено не се поврзани со тој производ, или каде што се чини дека МРП се надминати. Мострите може да содржат интерферентни хемикалии кои може погрешно да се идентификуваат како пестициди. Примерите во гасната хроматографија ги вклучуваат одговорите на детекторите за прикажување на електроните на фталат естери и на селективните детектори на фосфор за соединенија кои содржат сулфур и азот.

Анализата на резидуите од пестициди со методи за повеќе резидуи генерално се состои од две фази: скрининг и потврдување. Процесот е шематски прикажан на слика 2. Првата фаза се состои од утврдување на оние резидуи од пестициди кои веројатно ќе бидат присутни со толкување на необработените податоци, избегнувајќи колку што е можно повеќе лажни негативни резултати. Втората фаза е потврдувањето, што се фокусира на резидуите од пестициди пронајдени во фазата 1.

Употребата на резултатите што треба да се пријават и последователната одлука за управување ги одредува напорите вложени во процесот на потврдување. Изборот на техниката што се користи за потврдување зависи од нејзината достапност, време и трошок. Таа се заснова или на понатамошно толкување на хроматографските и масените спектрометриски податоци, на алтернативни методи кои користат различни физичко-хемиски својства на соединението, или комбинација од различни методи за сепарација и детекција. Некои алтернативни процедури за потврда се дадени во табела 6.

Секогаш кога се користат хроматографски техники при скрининг или потврдување, клучни се правилните поставки на временскиот прозорец на ретенција. Треба да се внимава инструментот да биде правилно прилагоден пред да се започне со анализата; треба да се изврши тест за соодветност на системот пред секоја серија на анализи¹. Базата на податоци за времето на ретенција треба да се прилагоди за тековните услови². Во фаза 1, може да се применат интервали на толеранција од 1,5 до 3% од апсолутното време на ретенција за капиларна ГХ во зависност од обликот на пикот. За потврда на времето на ретенција, апсолутните интервали на толеранција ќе се зголемат при поголемо време на ретенција. Интервалот на толеранција треба да биде помал од 1 секунда за времето на ретенција помало од 500 секунди. За време на ретенција помеѓу 500 и 5000 секунди, се препорачува интервал од 0,2% RPT. За повисоко време на ретенција, 6 секунди е соодветен интервал.

Тестовите за потврдување може да бидат квантитативни и/или квалитативни, но, во повеќето случаи, ќе бидат потребни двата типа на информации. Посебни проблеми се јавуваат кога резидуите мора да се потврдат на или околу границата на одредување, иако е тешко да се измерат резидуите на ова ниво, обезбедувањето соодветна потврда и за нивото и за идентитетот е од суштинско значење.

Потребата од тестовите за потврда може да зависи од типот на мострата или неговата позната историја. Во некои култури или производи, често се наоѓаат одредени резидуи. За серија моистри од

¹ Соболева Е. Амбрус А., Примена на тест за соодветност на систем за осигурување квалитет и оптимизација на перформансите на гасен хроматографски систем за анализа на резидуи од пестициди Весник за хроматографија. А. 1027. 2004. 55-65 (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. 55-65.)

² Лантос Џ., Каденцки Ј., Закар Ф., Амбрус А. Валидација на гасни хроматографски бази на податоци за квалитативна идентификација на активните состојки во резидуи од пестициди во Фајгел А. Амбрус А. (уред.) Принципи на валидација на методи, Кралско здружение за хемија, Кембриџ, 2000 год., стр. 128-137 (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, pp 128-137.)

слично потекло, кои содржат резидуи од истиот пестицид, може да биде доволно да се потврди идентитетот на резидуите во мал дел од мострите избрани по случаен избор. Слично на тоа, кога се знае дека одреден пестицид е применет врз материјалот од кој е земена мострата, може да има мала потреба од потврда на идентитетот, но треба да се потврдат одреден број резултати избрани по случаен избор. Онаму каде што се достапни „слепи“ примероци, тие се користат за проверка на појавата на можни интерферентни супстанции.

Потребните чекори за позитивна идентификација се прашање на проценка од страна на аналитичарот, а особено внимание треба да се посвети на изборот на метода која би го минимизирала ефектот на интерферентните соединенија.

Избраната техника(и) зависи(ат) од достапноста на соодветни инструменти и од експертизата во лабораторијата за тестирање.

ГАСНА ХРОМАТОГРАФИЈА/МАСЕНА СПЕКТРОМЕТРИЈА (ГХ/МС)

Податоците за резидуите добиени со помош на масена спектрометрија претставуваат најдефинитивен доказ и, каде што се достапни соодветни инструменти, таа е техниката за потврдување од избор. Техниката, исто така, најчесто се користи за скрининг на резидуи (фаза 1). Масеното спектрометриско одредување на резидуи обично се врши заедно со техниката на хроматографска сепарација за истовремено да се обезбедат времето на ретенција на соодносот на јонска маса/полнеж и застапеноста. Квантитативниот пренос на лабилни аналити низ хроматографскиот систем е подложен на појавување на проблеми слични на оние кои се појавуваат кај другите детектори. За квантификација, следените јони треба да бидат оние кои се најспецифични за аналитот, кои се предмет на најмалку интерференции и кои обезбедуваат добар сооднос на сигнал и шум.

При користење мониторинг на селектиран јон (MCJ), утврдени се интервалите на толеранција на јонскиот количник и времето на ретенција врз основа на стандардот за инјектирање на пестициди во чист растворувач во концентрација блиску до критичното ниво. Интервалите на толеранција за јонскиот количник треба да бидат во рамка на границите од $\pm 30\%$ од односот на апсолутната јонска застапеност. Резидуумот се потврдува³ кога 2 (или 3) избрани јонски количници се во рамките на утврдените интервали на толеранција. За мал број на пестициди, масениот спектар може да покаже само еден специфичен јон. Во овој случај, треба да се бара алтернативна потврда.

Кога детектираните јони сè уште укажуваат на можно присуство на резидуи, резултатот може да се пријави како прелиминарно идентификуван. Меѓутоа, кога резултатот ќе доведе до законодавно дејство или кога резултатите ќе се користат за други цели (на пр. проценка на внесот во исхраната), треба да се бара дополнителна потврда за идентитетот на аналитот. Ова може да се постигне со истата ГХ-МС опрема, со вбригување на стандардите на сомнителниот аналит усогласени со материјата, со цел да се компензира за влијанието на материјата врз јонскиот количник. Во овој случај, треба да се направат последователни вбригувања на стандардни и сомнителни мостри усогласени со материјата. Девиијацијата на PPT на аналитот во стандардниот и сомнителниот пик во примерокот обично треба да биде помала од 0,1%. Два јонски количника измерени во еден примерок треба да бидат во рамките на интервалот на толеранција пресметан врз основа на јонскиот количник во стандардот усогласен со материјата. Резидуумот се смета за потврдена доколку е во согласност со горенаведеното општо правило. Доколку јонските количници не се во рамките на интервалите на толеранција, може да се добие дополнителна потврда за идентитетот со употреба на алтернативни аналитички техники. Во табела 6 се наведени примери.

Понатамошна потврда со користење на масена спектрометрија може да се постигне со добивање на целосниот масен спектар на електроните (во пракса, генерално од $m/z 50$ до надвор од регионот на молекуларните јони). Отсуството на интерферентни јони е битен проблем при потврдувањето на идентитетот. Може да се добие дополнителна потврда за идентитетот со (i) употреба на алтернативна хроматографска колона; (ii) со употреба на алтернативна техника за јонизација (на пр. хемиска јонизација); (iii) со мониторинг на понатамошни реакциски продукти на избрани јони со тандемска

³ Соболева Е. Ахад К. Амбрус А. Применливост на некои критериуми за МС за потврда на пестицидни резидуи, . Аналит, 129, 1123-1129, 2004 год. (Soboleva E. Ahad K. Ambrus A. Applicability of some MS criteria for the confirmation of pesticide residues, . Analyst, 129, 1123-1129, 2004)

масена спектрометрија (МС/МС или МСⁿ); или (iv) со мониторинг на избрани јони при зголемена масена резолуција.

Масените спектрометриски анализи треба да ги задоволат сличните аналитички критериуми за контрола на квалитетот како оние што се применуваат на други системи.

ХПЛЦ И ХПЛЦ-МС

Потврдувањето на резидуите откриени по сепарацијата со ХПЛЦ е генерално попроблематично отколку при користење гасна хроматографија. Ако откривањето е со апсорпција на УВ, продуцирањето на целосен спектар може да обезбеди добар доказ за идентитетот. Меѓутоа, УВ спектрите на некои пестициди се со слабо дијагностичко значење, бидејќи се слични со оние продуцирани од многу други соединенија кои поседуваат слични функционални групи или структури, а коелуцијата на интерферентните соединенија може да создаде дополнителни проблеми. Податоците за апсорпцијата на УВ продуцирани на повеќе бранови должини може да ја потврдат или отфрлат идентификацијата, но, генерално, не се доволно карактеристични сами по себе. Податоците добиени со флуоресценција може да се користат за потврдување на оние добиени со апсорпција на УВ.

ЛС-МС може да обезбеди добри потврдни докази, бидејќи генерираните спектри се генерално многу едноставни, покажуваат мала карактеристична фрагментираност, но резултатите произведени од ЛС-МС веројатно нема да бидат дефинитивни. ЛС-МС/МС е помоќна техника, која ја комбинира ја селективноста со специфичноста и често обезбедува добри докази за идентитетот. ЛС-МС техниките имаат тенденција да бидат предмет на ефектите на материјата, особено на супресија, па затоа за потврда на квантитетот може да биде потребно додавање стандарди или изотопски означени стандарди. Дериватизацијата може исто така да биде корисна за потврдување на резидуи откриени со ХПЛЦ (Табела 6).

ТЕНКОСЛОЈНА ХРОМАТОГРАФИЈА (ТЛЦ)

Во некои случаи, потврдувањето на наодите добиени со гасна хроматографија најсоодветно се постигнува со ТЛЦ. Идентификацијата се базира врз два критериуми, Rf-вредноста и реакцијата на визуелизација. Методите на детекција базирани брз биоесеи (на пр. ензими -, габиен раст или инхибиција на хлоропласти) се особено погодни за квалитативна потврда бидејќи се специфични за одреден тип соединенија, чувствителни и обично многу малку погодени од ко-екстрактите⁴⁵. Научната литература содржи бројни референци за техниката⁶. Сепак, квантитативните можности на тенкослојната хроматографија се ограничени. Понатамошното проширување на оваа техника вклучува отстранување на површината на плочата што одговара на Rf на соединението од интерес, проследено со елуирање од материјалот на слојот и дополнителна хемиска или физичка потврдна анализа. Раствор од стандардниот пестицид треба секогаш да биде забележан на плочата заедно со екстрактот од примерокот за да се елиминираат какви било проблеми со неповторливоста на Rf. Прекумерното забележување на екстрактот со стандарден пестицид исто така може да даде корисни информации. Предностите на тенкослојната хроматографија се брзината, ниската цена и применливоста кај термички сензитивни материји; недостатоците вклучуваат (обично) помала чувствителност и моќ на сепарација од инструменталните техники за хроматографска детекција и потреба од поефикасно чистење во случај на детекција врз основа на хемиски реакции на бои.

⁴ Амбрус1* А., Фузеси2 И., Сузан2 М., Доби3 Д., Лантос4 Џ., Закар5 Ф., Корсос4 И., Олах3 Џ., Беке3 Б.Б. и Л. Катавикс5
Исплатливи скрининг методи за анализа на пестицидни резидуи во овошје, зеленчук и житни зрна, Весник за наука и здравје на животната средина B40, 297-339, 2005 год. (Ambrus1* A., Füzesi2 I., Susan2 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. B40, 297-339, 2005.)

⁵ Амбрус А.; Фузеси И.; Лантос Џ.; Корос И.; Хатфалуди Т. Повторливост и репродуктивност на вредностите на Rf и MDQ со различни системи за елуирање и детекција на ТЛЦ. Весник за наука и здравје на животната средина B39 **2004 год. прифатено за објавување.** (Ambrus A.; Füzesi I.; Lantos J.; Korsos I.; Hatfaludi T. Repeatability and Reproducibility of Rf and MDQ Values with Different TLC Elution and Detection Systems. J. Environ Sci. Health B39 2004)

⁶ Извештај на ИУПАК за пестициди (13) (Батора, В., Виторовиќ, С.Ј., Тиер, Х.П. и Клисенко, М.А.; Чиста и применета хемија, 53, 1981, 1039-1049 (IUPAC Report on Pesticides (13) (Bátora, V., Vitorovic, S.Y., Thier, H.-P. and Klisenko, M.A.; Pure & Appl. Chem., 53, 1981, 1039-1049)

ДЕРИВАТИЗАЦИЈА

Кога се селектираат јони за ГХ/МС потврда врз основа на дериват, избраните јони мора да бидат структурно значајни за резидуумот и да не претставуваат фрагменти од агенсот за дериватизација. Со оглед на тоа што дериватизацијата може да биде вреден начин за потврдување на идентитетот на еден резидуум, треба да се земе предвид дека исто така ќе додаде и дополнителен елемент на несигурност на квантитативната потврда.

Оваа област на потврда може да се разгледа под три широки категории.

(а) Хемиски реакции

Често се користат хемиски реакции од мал обем кои резултираат со деградациски, адициски или кондензациски продукти на пестицидите, проследени со повторно испитување на настанатите продукти со хроматографски техники. Реакциите резултираат со добивање продукти кои поседуваат различни времиња на ретенција и/или одговор на детекторот од оние на матичното соединение. Примерок од стандарден пестицид треба да се третира заедно со сомнителниот резидуум за да можат директно да се споредат резултатите од двете. Треба да се вклучи и фортификациран екстракт за да се докаже дека реакцијата била извршена во присуство на материјал од мострата. Може да дојде до интерференции кога дериватите се детектираат со помош на својствата на реагенсот за дериватизација. Ревизија на хемиски реакции кои биле користени за потврдни цели е објавена од Кокрен, В.П. (Cochrane, W.P.) (Хемиска дериватизација во анализата на пестициди, Пленум прес, Њујорк (1981 год.)) (Chemical derivatisation in pesticide analysis, Plenum Press, NY (1981)). Хемиските реакции ја имаат предноста што се брзи и лесни за спроведување, но може да биде потребна набавка и/или пурификација специјализирани реагенси.

(б) Физички реакции

Фотохемиската промена на резидуите од пестициди е корисна техника за добивање на еден или повеќе продукти со репродуктивна хроматографска шема. Примерокот од стандарден пестицид и фортификацираниот екстракт секогаш треба да се третираат на ист начин. Примероците што содржат повеќе од една резидуум од пестициди може да предизвикаат проблеми во толкувањето на резултатите. Во такви случаи може да се спроведе претходна сепарација на специфичните резидуи со користење на ТЛЦ, ХПЛЦ или фракционизирање на колоната пред реакцијата.

(в) Други методи

Многу пестициди се подложни на деградација/трансформација од ензими. За разлика од нормалните хемиски реакции, овие процеси се многу специфични и генерално се состојат од оксидација, хидролиза или деалкилација. Производите за конверзија поседуваат различни хроматографски карактеристики од матичниот пестицид и може да се користат стандардни пестициди за потврдни цели доколку се споредат со реакциските производи со користење на стандардни пестициди.

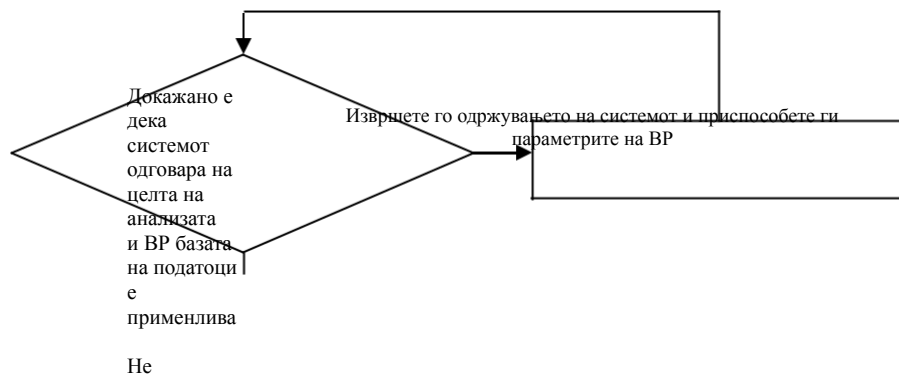
Табела 6. Методи на детекција погодни за скрининг (Фаза 1) и потврда (Фаза 2) на резидуи.

		Фаза 1 - Скрининг							
		ГХ со ка пи ла рн а ко ло на – ЕЦД, НПД, ФПД, ПФПД	ГС-МС	ЛС-МС	ЛЦ-ДАД или скенирање на УВ	ЛЦ-УВ/ ВИС (единствена бранова должина)	ЛЦ-флуоресценција	ГХ со преполна колона – ЕЦД, НПД, ФПД	ТЛЦ-ензим-, појава на габи или инхибиција на хлоропласт
Фаза 2 потврда	ГХ - капиларна колона – ЕЦД, НПД, ФПД, ПФПД	x ¹	x ¹	x	x	x	x	x	x
	ГС-МС	x	x ¹ ₂	x	x	x	x	x	x
	ЛС-МС	x	x		x	x	x	x	x
	Техники за целосно скенирање	x	x	x	x	x	x	x	x
	(МС) ⁿ , ХРМС, алтернативни техники на јонизација	x	x	x	x	x	x	x	x
	ЛЦ-ДАД или скенирање на УВ	x	x	x		x	x	x	x
	ЛЦ-УВ/ВИС (единствена бранова должина)	x	x				x	x	x
	ЛЦ - флуоресценција	x	x		x	x		x	x
	ТЛЦ - ензим, појава на габи или инхибиција на хлоропласт	x	x	x	x	x	x	x	x ² ₃
	Дериватизација	x	x	x	x	x	x	x	x
	Специфичен профил на изомери	x	x	x	x	x	x	x	

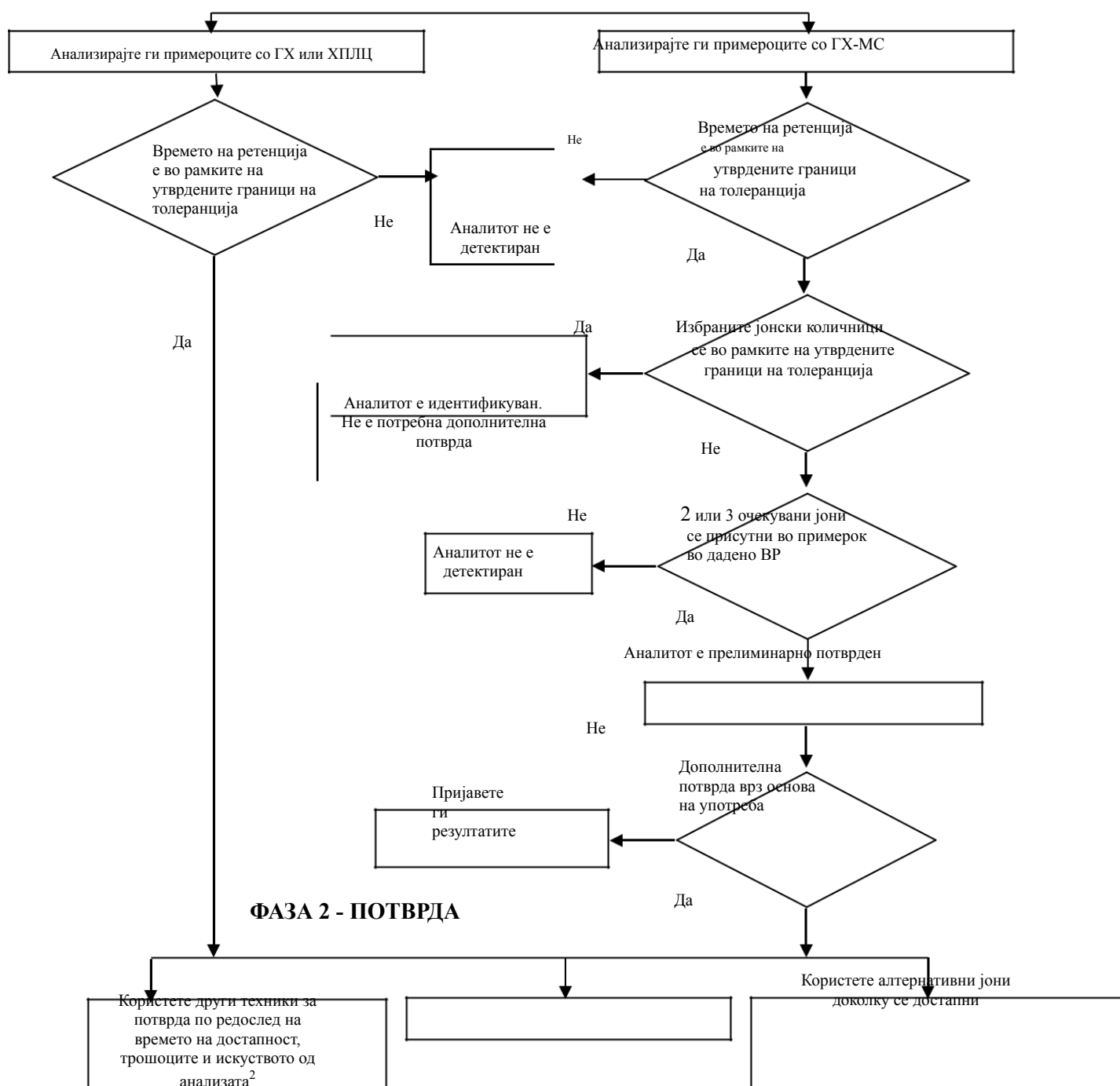
1 - Се користи или колона со различен поларитет, што резултира со различен редослед на елуирање на резидуите и контаминантите кои се елуираат во близина на пикот од интерес, или друг специфичен детектор.

2 – Истата ГХ-МС техника може да се користи за фаза 2 (потврда) доколку се одберат различни јони или се воспостават интервали на толеранција врз основа на решенија усогласени со материјата.

3 – Ќе се користи мобилна или стационарна фаза со различен поларитет.



ФАЗА 1 - СКРИНИНГ



Користете стандард усогласен со
материјата за сомнително соединение
за да ги потврдите интервалите на

толеранција на јонските количници и
ВР и измерете го аналитот

Слика 2. Шематски приказ на скрининг и потврда (Фаза 1 и Фаза 2) за пестицидни резидуи

- 1 – Невообичаени вредности вклучувајќи забранети супстанции, прекршување на МРЛ или барања за проучување како на пр. проценка на изложеноста
- 2 – Погледнете ја Табела 6 за други средства за потврда
- 3 – За мал број пестициди, масениот спектар може да покаже само еден специфичен јон. Во овој случај, треба да се бара алтернативна потврда.