

О. М. Коршун, Н. М. Ващенко, Д. С. Мілохов, А. А. Борисенко, С. Т. Омельчук
ІНСТИТУТ ГІГІЄНИ ТА ЕКОЛОГІЇ НАЦІОНАЛЬНОГО МЕДИЧНОГО УНІВЕРСИТЕТУ
ІМЕНІ О. О. БОГОМОЛЬЦЯ, КИЇВ

ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ З МАС-СПЕКТРОМЕТРИЧНИМ ДЕТЕКТУВАННЯМ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ДИКВАТУ В ОЛІЙНИХ КУЛЬТУРАХ

Вступ. У статті викладено наукове обґрунтування вибору методу, розробку умов пробопідготовки зерна сої, насіння соняшнику і ріпаку, якісної ідентифікації та кількісного визначення в цих матрицях високополярного гербіциду диквату, що входить до систем захисту сільськогосподарських культур.

Мета дослідження – розробити методику визначення диквату в зерні сої, насінні соняшнику і ріпаку з межею кількісного визначення 0,01 мг/кг.

Методи дослідження. Хроматографічний аналіз проводили на рідинному хроматографі фірми “Шімадзу” (Японія) з потрійним квадрупольним мас-спектрометричним детектором. Мас-спектрометричне детектування за умов ресстрування множинних реакцій при іонізації за допомогою електроспрея в позитивному режимі відбувалося після хроматографічного розділення на колонці Kinetex HILIC. Правильність і точність визначення досліджуваної сполуки в пробах сільськогосподарських культур перевіряли методом “внесено – знайдено”. Для статистичної обробки результатів використовували пакет статистичних програм IBM SPSS StatisticsBase v.22 та MS Excel.

Результати й обговорення. Методика основана на екстракції диквату підкисленою сумішшю метанолу з водою із застосуванням стадії нагрівання. Розроблені оптимальні умови пробопідготовки зерна сої, насіння соняшнику і ріпаку, хроматографічного розділення на гідрофільній (нормально-фазовій) колонці та кількісного вимірювання диквату з використанням мас-спектрометричного детектування забезпечують визначення аналізованої сполуки з межею кількісного визначення 0,01 мг/кг з необхідною правильністю (на рівні від 70 до 120 %) і точністю (RSD \leq 20 %).

Висновок. Розроблена методика визначення диквату в зерні сої, насінні соняшнику і ріпаку методом рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням є високочутливою та дозволяє контролювати встановлені гігієнічні нормативи, отримувати достовірну і репрезентативну інформацію щодо вмісту залишкових кількостей пестицидів, що є необхідною передумовою оцінки ризику застосування хімічних засобів захисту рослин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: дикват; олійні культури; межа кількісного визначення; рідинна хроматографія з мас-спектрометричним детектуванням.

ВСТУП. Дипіридиловий гербіцид дикват широко використовують у всьому світі понад 50 років. Дикват – неселективний контактний гербіцид, який застосовують для десикації культурних рослин з метою прискорення досягання швидкого підсушування рослинної тканини та полегшення збору врожаю. В Україні дозволено використовувати більше 40 препаратів на основі цієї сполуки для захисту соняшнику, ріпаку, сої та інших культур [1]. Для визначення в сільськогосподарських культурах залишкових кількостей диквату затверджено відповідні методичні вказівки.

© О. М. Коршун, Н. М. Ващенко, Д. С. Мілохов, А. А. Борисенко, С. Т. Омельчук, 2023.

Гармонізація вітчизняних нормативів пестицидів у сільськогосподарській продукції з європейськими все частіше вимагає більш чутливих методик визначення діючих речовин препаратів, чого досягають шляхом удосконалення підходів до визначення їх залишкових кількостей у різних матрицях. Відсутність затверджених в Україні методик визначення диквату в зерні сої, насінні соняшнику і ріпаку з межею кількісного визначення 0,01 мг/кг зумовила потребу в їх розробці, що стало метою нашої роботи.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для приготування вихідного стандартного розчину диквату з концентрацією 100 мкг/мл (у деіонізованій воді)

використовували аналітичний стандарт дикват дибромід моногідрату ("Syngenta") 94,1 % чисто-ти (табл. 1) [2]. Шляхом послідовного розведення деіонізованою водою вихідного розчину готували робочі розчини, які застосовували для приготування градувальних розчинів та контрольних розчинів диквату в екстрактах зерна сої, насіння соняшнику і ріпаку, а також для внесення в модельні проби зазначених сільськогосподарських культур з метою перевірки правильності й точності методики визначення. При приготуванні розчинів диквату і в ході пробопідготовки використовували пластиковий посуд, щоб запобігти взаємодії сполуки зі скляними поверхнями [3].

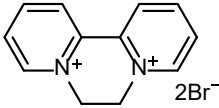
У дослідженні було використано рідинний хроматограф, сумісний з потрійним квадрупольним мас-спектрометричним детектором Shimadzu LCMS-8050. Мас-спектрометричне детектування за умов реєстрування множинних реакцій (MRM) при іонізації за допомогою електро-спрея (ESI) в позитивному режимі відбувалося

після хроматографічного розділення на колонці Kinetex® 2.6 µm HILIC 100 Å (100×2,1 mm). Обробку отриманих даних проводили за допомогою програми "LCMS solution".

Правильність і точність визначення досліджуваної сполуки в пробах сільськогосподарських культур перевіряли методом "внесено – знайдено". Ідентифікацію диквату в екстрактах проб проводили за часом утримування та значенням m/z характеристичних іонів диквату в градувальних розчинах, кількісне визначення здійснювали методом абсолютного градування.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням пакета статистичних програм IBM SPSS StatisticsBase v.22 та MS Excel. При статистичному аналізі отриманих даних використано дескриптивну статистику, кореляційний та регресійний аналізи. Значимість отриманих рівнянь регресії перевіряли за F-статистикою Фішера.

Таблиця 1 – Загальна інформація про дикват

Назва сполуки	Формула	Молекулярна маса	CAS RN
Дикват дибромід – 9,10-дигідро-8а,10а-діазоніафе- нантрен дибромід (IUPAC)	 $C_{12}H_{12}Br_2N_2$	344,1	85-00-7
Дикват дибромід моногідрат	$C_{12}H_{12}Br_2N_2 \cdot H_2O$	362,1	6385-62-2
Дикват-іон (дикват)	$C_{12}H_{12}N_2$	184,2	2764-72-9

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Для досягнення мети було необхідно обрати метод, розробити умови якісної ідентифікації та кількісного визначення диквату, а також умови підготовки зразків сільськогосподарських культур до аналізу.

Згідно із затвердженими в Україні методичними вказівками, межі кількісного визначення диквату спектрофотометричним методом становлять: у насінні ріпаку – 0,4 мг/кг, у зерні сої – 0,2 або 0,25 мг/кг [4, 5]. Тобто чутливість офіційних методик, які є багатостадійними і трудомісткими у виконанні, нижча за необхідну в 20–40 разів.

Фізико-хімічні властивості дикват диброміду, а саме висока розчинність у воді (718 г/л при 20 °C), низький коефіцієнт розподілу н-октанол/вода (Log P=-4,6 при 20 °C, pH 7), зумовлені його належністю до високополярних сполук [2]. Висока полярність і катіонний характер диквату призводять до значної взаємодії з різними поверхнями та матрицями, що ускладнює процеси екстракції, розділення і визначення [3]. Однак є аналітичні методики визначення високополярних пестицидів, у тому числі четвертинних амонієвих гербіцидів (параквату, диквату, хлормеквату та

мепіквату), з використанням рідинної хроматографії (з різними механізмами розділення) з мас-спектрометричним детектуванням [3, 6–8]. Тому для виконання завдання аналітичного визначення диквату із зазначеним рівнем чутливості ми зупинилися на методі рідинної хроматографії з використанням потрійного квадрупольного мас-спектрометричного детектора (PX-MS/MS).

За допомогою функції оптимізації параметрів MRM з використанням робочих розчинів диквату було автоматично оптимізовано масові переходи MRM і специфічні для диквату параметри мас-спектрометра (табл. 2). Для детектування обрано два переходи MRM: перший (183>157) є більш інтенсивним, за ним проведено кількісні розрахунки; другий (183>130) використано для підтвердження.

Попередні дослідження передбачали випробування двох аналітичних колонок з різними механізмами розділення: обернено-фазової Raptor™ Biphenyl 2,7 µm (100×2,1 mm) та гідрофільної (нормально-фазової) Kinetex® 2,6 µm HILIC 100 Å (100×2,1 mm). Ці колонки було протестовано з кількома різними рухомими фазами, що містили ацетонітрил, метанол і водні розчини

оцтової або мурашиної кислоти, форміат чи ацетат амонію. Колонки використовували з урахуванням їх придатності до певних умов експлуатації. Як і очікувалося, краще утримування/розділення диквату спостерігали при застосу-

ванні гідрофільної хроматографії. Оптимальні умови методу РХ-МС/МС наведено в таблиці 3. За наведених умов хроматографічного розділення час утримування диквату становить 1,60–1,72 хв.

Таблиця 2 – Умови ресстрування множинних реакцій диквату

Режим іонізації	Прекурсор-іон, m/z	Продукт-іон, m/z	Q1 Pre Bias, V	Collision energy (CE), V	Q3 Pre Bias, V
Позитивний	183,0	157,0	-12,0	-21,0	-27,0
		130,0	-12,0	-34,0	-22,0

Таблиця 3 – Параметри аналізу диквату

Умова хроматографування	
Рідинний хроматограф	Nexera X2
Хроматографічна колонка	Kinetex® 2,6 µm HILIC 100 Å (100×2,1 mm)
Рухома фаза (ізократика)	20 mM амонію форміату у воді з додаванням мурашиної кислоти+ацетонітрил (80+20, об+об)
Об'ємна витрата рухомої фази	0,3 мл/хв
Температура термостата колонки	35 °C
Об'єм, що хроматографується	5 мкл
Умова мас-спектрометричного детектування	
Детектор	Shimadzu LCMS-8050 (потрійний квадруполь)
Режим іонізації	Електроспрей іонізація у позитивному режимі (ESI+)
Напруга електроспрея	4 кВ
Час затримки (Dwell time)	50 мс
Температура інтерфейсу	350 °C
Температура лінії десольватації	200 °C
Температура блоку нагрівачів	300 °C
Об'ємна витрата розпилюючого газу (азот)	3,0 мл/хв
Об'ємна витрата підігрівального газу (повітря)	10,0 мл/хв
Об'ємна витрата висушувального газу (азот)	10,0 мл/хв
CID газ (аргон)	270 кПа

На основі контрольного екстракту кожної матриці готували п'ять градуювальних розчинів диквату; здійснювали хроматографічний аналіз кожного градуювального розчину 3 рази та будували для кожної матриці графік залежності площі хроматографічного піка сполуки від концентрації. Для всіх досліджуваних матриць лінійний діапазон детектування диквату перебував у діапазоні від 0,0025 до 0,05 нг; коефіцієнти кореляції становили 0,9999; градуювальні залежності описано рівняннями лінійної регресії.

Сучасним методом прободіготовки й інструментального визначення високополярних сполук у продуктах рослинного походження, а саме: фруктах, овочах, зернових та бобових культурах, горіхах, насінні олійних культур, меді, є метод QuPRe-PO-Method, який розробила Європейська референс-лабораторія для пестицидів, що потребують методів окремого визначення залишку (EURL-SRM) [9]. Даний метод містить варіант прободіготовки зернових та бобових культур, горіхів і насіння олійних культур (саме цей варіант ми взяли за основу) та має особливості для визначення найбільш полярних сполук – диквату і параквату (також враховано в наших дослі-

дженнях). Остаточний варіант прободіготовки наведено на схемі.

Хроматограми модельних проб (на прикладі зерна сої) наведено на рисунку.

Оптимальні умови прободіготовки, хроматографічного розділення та мас-спектрометричного детектування покладено в основу методичних вказівок з визначення диквату в зерні сої, насінні соняшнику і ріпаку з межею кількісного визначення для кожної матриці 0,01 мг/кг. На основі досліджень проб із внесенням диквату на рівнях 0,01 та 0,02 мг/кг було встановлено, що розроблена методика забезпечує визначення аналізованої сполуки з необхідною правильністю (на рівні від 70 до 120 %) і точністю (RSD ≤20 %) [10].

ВИСНОВКИ. 1. Розроблена методика визначення диквату в зерні сої, насінні соняшнику і ріпаку методом рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням є високочутливою та дозволяє контролювати встановлені гігієнічні нормативи.

2. Упровадження розробленої методики у практику роботи установ Держпродспоживслужби



Схема. Пробопідготовка зерна сої, насіння соняшнику та ріпаку до аналізу на вміст диквату.

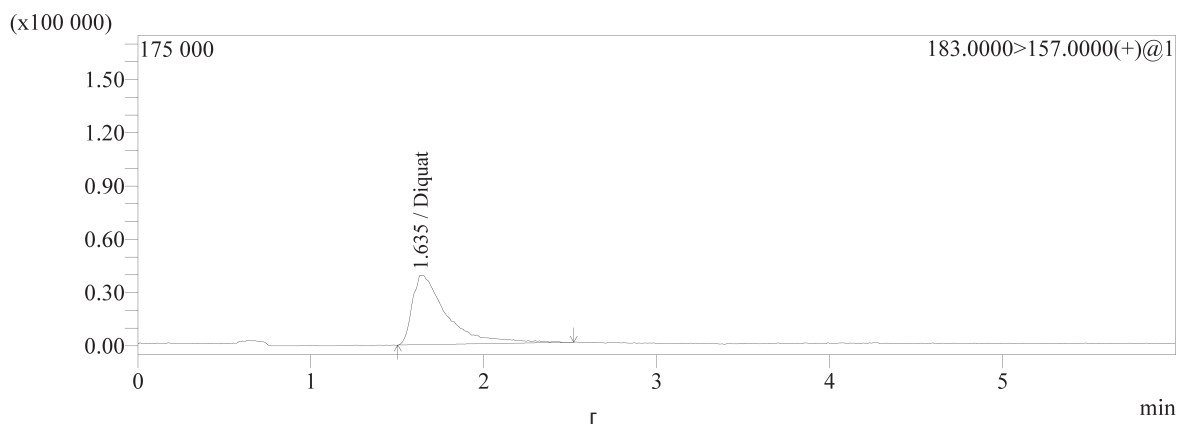
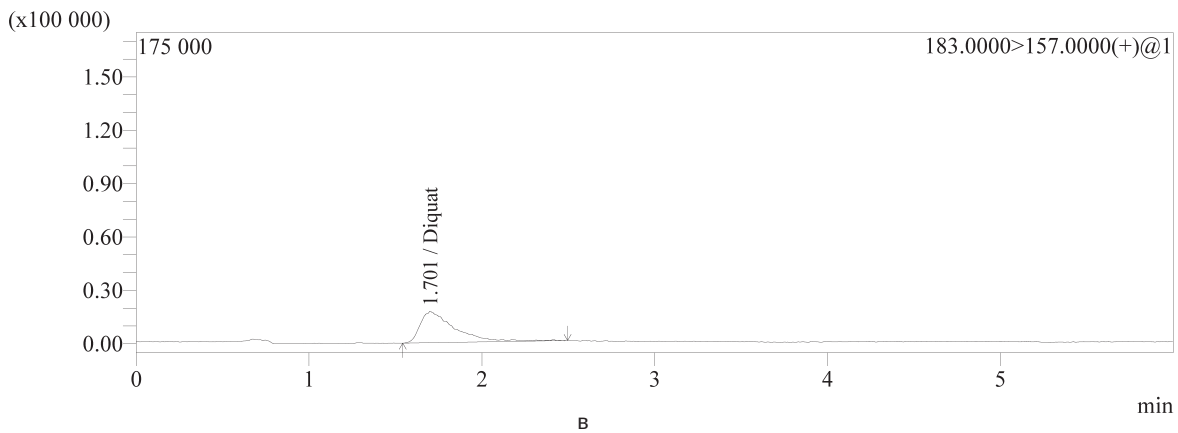
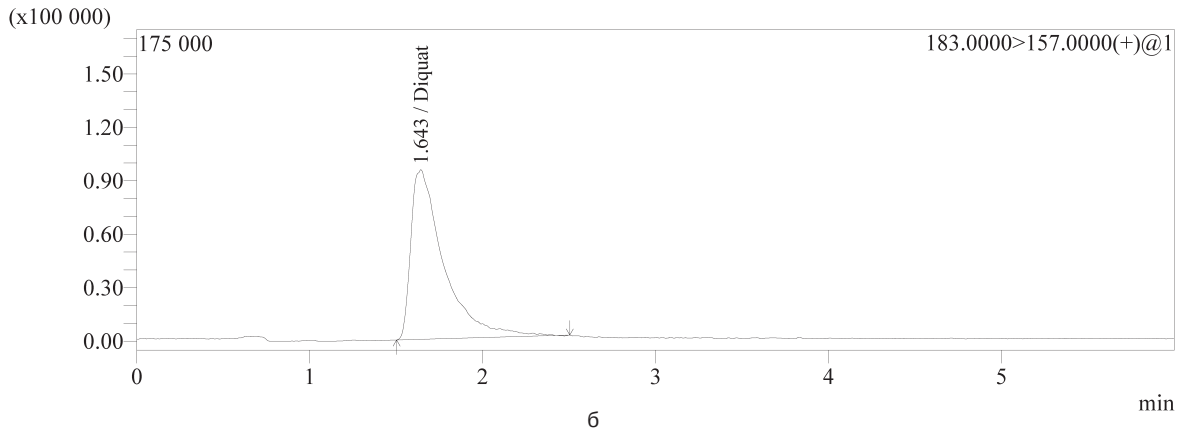
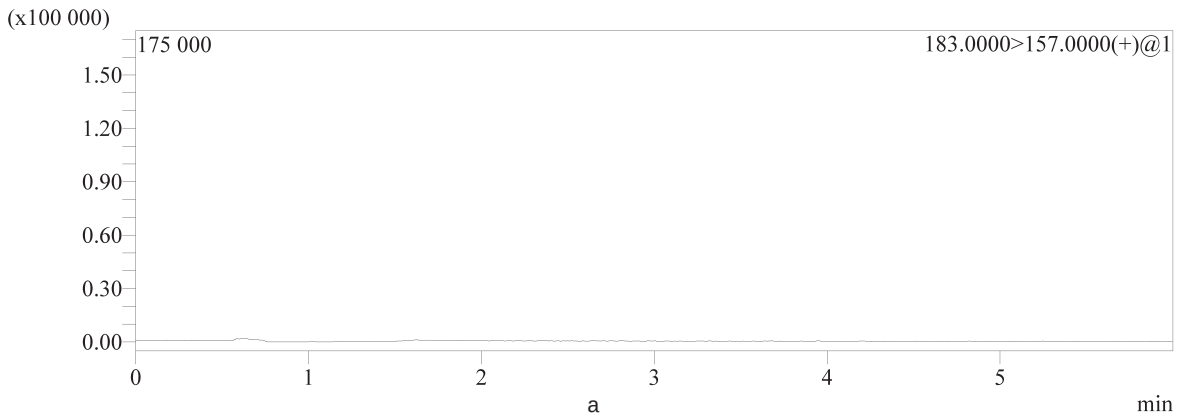


Рис. Хроматограми: а – екстракту контрольної проби зерна сої; б – градувального розчину диквату з масовою концентрацією 0,005 мкг/мл в екстракті контрольної проби зерна сої; в – екстракту проби зерна сої з внесенням диквату 0,01 мг/кг; г – екстракту проби зерна сої з внесенням диквату 0,02 мг/кг.

і Міністерства захисту довкілля та природних ресурсів України сприятиме отриманню достовірної і репрезентативної інформації щодо вмі-

сту залишків пестицидів, що є необхідною передумовою оцінки ризику застосування хімічних засобів захисту рослин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні (довідкове видання). – К. : Юнівест Медіа, 2022. – 1008 с.

2. The PPDB A to Z List of Pesticide Active Ingredients [Електронний ресурс]: PPDB: Pesticide Properties DataBase University of Hertfordshire. – Access mode: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz.htm>

3. Baker D. R. Highly Polar Pesticide Multi-Residue Analysis in Food Safety by LC-MS/MS / D. R. Baker, E. Capodanno, M. Levi. – 2015. – Access mode: https://www.shimadzu.com/an/sites/shimadzu.com/an/files/pim/pim_document_file/applications/application_note/12240/ego115089.pdf

4. Методичні вказівки з визначення диквату в зерні рису, сої, насінні ріпаку, льону спектрофотометричним методом, № 614-2006 // Метод. вказівки з визначення мікрокількостей пестицидів в харчових продуктах, кормах та навколишньому середовищі : зб. № 56. – 2008. – С. 54–72.

5. Методичні вказівки з визначення диквату в сої та соєвій олії спектрофотометричним методом, № 645-2006 // Метод. вказівки з визначення мікрокількостей пестицидів в харчових продуктах, кормах та навколишньому середовищі : зб. № 63. – К. : Юнівест Медіа, 2009. – С. 38–54.

6. Development of an LC-MS/MS method for simultaneous determination of the quaternary ammonium herbicides paraquat, diquat, chlormequat, and mepiquat

in plant-derived commodities / A. Bauer, J. Luetjohann, S. Rohnx [et al.]. – 2018. – Access mode: <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1201-6>

7. Determination of paraquat and diquat: LC-MS method optimization and validation / I. R. Pizzutti, G. M. E. Vela, A. Kok [et al.]. – 2016. – Access mode: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.069>

8. Determination of diquat and paraquat in water by liquid chromatography-(electrospray ionization) mass spectrometry / V. Y. Taguchi, S. W. D. Jenkins, P. W. Crozier, D. T. Wang. – 1998. – Access mode: [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(98\)00043-9](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(98)00043-9)

9. Quick method for the analysis of highly polar pesticides in food involving extraction with acidified methanol and LC- or IC-MS/MS measurement – I. Food of Plant Origin (QuPPE-PO-Method) – Version 12 (published on EURL-SRM website on July 23, 2021) / M. Anastassiades, A.-K. Wachtler, D. I. Kolberg [et al.]. – 2021. – Режим доступу: https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=887&LabID=200&Lang=EN

10. Про використання норм точності і правильності вимірювань при здійсненні контролю за вмістом хімічних речовин в продовольчій сировині, продуктах харчування і об'єктах довкілля і відповідності між величинами МДР і ГДК і границями аналітичного визначення хімічних речовин : Постанова МОЗ України від 20 квітня 1999 р. № 20.

REFERENCES

1. (2022). *List of pesticides and agrochemicals approved for use in Ukraine (reference edition)*. Kyiv: Univest Media [in Ukrainian].

2. *The PPDB A to Z List of Pesticide Active Ingredients: PPDB: Pesticide Properties DataBase University of Hertfordshire*. Retrieved from <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz.htm>

3. Baker D.R., Capodanno E., Levi M. (2015). *Highly polar pesticide multi-residue analysis in food safety by LC-MS/MS*. Retrieved from https://www.shimadzu.com/an/sites/shimadzu.com/an/files/pim/pim_document_file/applications/application_note/12240/ego115089.pdf

4. (2008). Methodical guidelines for determining diquat in rice, soybean, rapeseed, and flax seeds by spectrophotometric method, № 614-2006. *Methodological Guidelines for the Determination of Microquantities of Pesticides in Food Products, Fodder and the Environment*, 56, 54-72 [in Ukrainian].

5. (2009). Methodological guidelines for the determination of diquat in soybeans and soybean oil by the spectrophotometric method, № 645-2006. *Methodological*

guidelines for the determination of microquantities of pesticides in food products, fodder and the environment, 63, 38–54 [in Ukrainian].

6. Bauer, A., Luetjohann, J., Rohn, S., Kuballa, J., Jantzen, E. (2018) *Development of an LC-MS/MS Method for Simultaneous Determination of the Quaternary Ammonium Herbicides Paraquat, Diquat, Chlormequat, and Mepiquat in Plant-Derived Commodities*. Retrieved from: <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1201-6>

7. Pizzutti, I.R., Vela, G.M.E., Kok, A. (2016). Determination of paraquat and diquat: LC-MS method optimization and validation. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.069>

8. Taguchi, V.Y., Jenkins, S.W.D., Crozier, P.W., Wang, D.T. (1998). Determination of diquat and paraquat in water by liquid chromatography-(electrospray ionization) mass spectrometry. Retrieved from: [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(98\)00043-9](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(98)00043-9)

9. Anastassiades, M., Wachtler, A.-K., Kolberg, D.I. (2021). Quick method for the analysis of highly polar pesticides in food involving extraction with acidified

methanol and LC- or IC-MS/MS measurement – I. Food of Plant Origin (QuPPE-PO-Method) – Version 12 (published on EURL-SRM website on July 23, 2021). Retrieved from: <https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl/article.asp?CntID=887&LabID=200&Lang=EN> 10. (1999). On the use of standards of accuracy and correctness of measurements in the control of the content

of chemical substances in food raw materials, food products and environmental objects and correspondence between the values of MDR and GDC and the limits of analytical determination of chemical substances]. April 20, 1999 Resolution № 20 Ministry of Health of Ukraine [in Ukrainian].

O. M. Korshun, N. M. Vashchenko, D. S. Milokhov, A. A. Borysenko, S. T. Omelchuk
INSTITUTE OF HYGIENE AND ECOLOGY OF O. BOHOMOLETS NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY, KYIV

APPLICATION OF THE METHOD OF LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH MASS SPECTROMETRY DETECTION FOR THE DETERMINATION OF DIQUATE IN OIL CULTURES

Summary

Introduction. The article describes the scientific rationale for the choice of method, development of conditions for sample preparation of soybean, sunflower and rapeseed seeds, qualitative identification and quantification determination in these matrices of the highly polar herbicide diquat, which is part of crop protection systems.

The aim of the study – to develop methods for the determination of diquat in soybeans, sunflower seeds and rapeseed with the limit of quantitative determination 0.01 mg/kg.

Research Methods. Chromatographic analysis was performed by Shimadzu (Japan) liquid chromatograph using the triple quadrupole mass spectrometer. Mass spectrometric detection upon multiple reaction recording (MRM) conditions with electrospray ionization (ESI) in positive mode occurred after chromatographic separation on a Kinetex HILIC column. The correctness and accuracy of the determination of the investigated compound in samples of agricultural crops were checked by the "introduced-found" method. The package of IBM SPSS StatisticsBase v.22 and MS Excel statistical programs was used for statistical processing of results.

Results and Discussion. The method is based on extraction with an acidified methanol-water mixture with the application of an heating step. Optimal conditions for sample preparation of soybean, sunflower and rapeseed seeds, chromatographic separation on a hydrophilic (normal-phase) column, and quantitative measurement of diquat using tri-quadrupole mass spectrometric detection were developed to provide the determination of the analyzed compound with a limit of quantification determination of 0.01 mg/kg with the required precision (on levels from 70 to 120 %) and accuracy (RSD≤20 %).

Conclusions. Developed method for determination diquat in soybeans, sunflower seeds and rapeseed by liquid chromatograph using the triple quadrupole mass spectrometer allow to control the established hygienic standards, to obtain representative information on the content of pesticide residues, which is a prerequisite for risk assessment of plant protection products.

KEY WORDS: diquat; oil cultures; limit of quantification; liquid chromatograph using the triple quadrupole mass spectrometer.

Отримано 03.02.23

Адреса для листування: О. М. Коршун, Інститут гігієни та екології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, просп. Перемоги, 34, Київ, 03680, Україна, e-mail: lab_chrom@ukr.net.