

# ВАЛИДАЦИЯ МНОГООСТАТОЧНОГО МЕТОДА ОБНАРУЖЕНИЯ МИКРОКОЛИЧЕСТВ ПЕСТИЦИДОВ В ПЛОДООВОЩНОЙ ПРОДУКЦИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС- СПЕКТРОМЕТРИЕЙ (ГХ-МС)

*Шамсутдинова М. А.<sup>1</sup>, Воронина Н. В.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Комитет санитарно-эпидемиологического благополучия и общественного здоровья при  
Министерство здравоохранения Республики Узбекистан*

<sup>2</sup>*Ташкентский государственный медицинский университет*

## MASS-SPEKTROMETRIYA (GX-MS) BILAN GAZ XROMATOGRAFIYASIDAN FOYDALANGAN HOLDA MEVA VA SABZAVOT MAHSULOTLARIDA PESTITSIDLARNING IZ (MIKRO) MIQDORINI ANIQLASH UCHUN KO'P QOLDIQLI USULNI VALIYADATSIYA QILISH.

*Shamsutdinova M. A.<sup>1</sup>, Voronina N. V.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*O'zbekiston Respublikasi Sog'liqni saqlash vazirligi huzuridagi Sanitariya-epidemiologik  
osoyishtalik va jamoat salomatligi qo'mitasi*

<sup>2</sup>*Toshkent davlat tibbiyot universiteti*

## VALIDATION OF A MULTI-RESIDUE METHOD FOR DETECTION OF MI- CRO-QUANTITIES OF PESTICIDES IN HORTICULTURAL PRODUCTS USING GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY (GC-MS)

*M. A. Shamsutdinova<sup>1</sup>, N. V. Voronina<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Committee for Sanitary and Epidemiological Welfare and Public Health under Ministry of Health  
of the Republic of Uzbekistan*

<sup>2</sup>*Tashkent State Medical University*

[https://doi.org/10.62209/SPJ/vol6\\_Iss1/art4](https://doi.org/10.62209/SPJ/vol6_Iss1/art4)

**Аннотация.** В этом исследовании представлена процедура подготовки проб – «томат» и «сушёный виноград», согласно руководству SANTE/11312/2021. Образцы были извлечены методом QuEChERS CEN и очищены методом дисперсионной твердофазной экстракции (d.SPE) в соответствии с протоколом, описанным в методе с несколькими остатками EURL-FV. Методология была проверена в соответствии с руководящими принципами Европейской комиссии DG-SANTE (SANTE/11312/2021) и Европейского комитета по стандартизации (EN 15662, 2018), что позволило получить приемлемые аналитические параметры. Все исследуемые соединения показали отличный линейный отклик (25% из них выше  $R^2 > 0,990$ , 74% выше  $R^2 > 0,995$ ), и только одно соединение, «бифентрин» дало линейный ответ 1% из них ниже  $R^2 < 0,990$ . Все остаточные значения (обратно рассчитанные концентрации) находились в пределах 20% допуска, предусмотренного рекомендациями SANTE, с диапазоном калибровки от 0,002 мг/кг (45%), от 0,005 мг/кг (54%) или от 0,01 мг/кг (1%) до 0,100 мг/кг. Применимость метода была определена на трех уровнях контроля качества, оказалась приемлемой для показанных репрезентативных соединений, что дало %RSD < 10%. В целом данные о производительности показывают, что ГХ – МС (модель “Agilent 7898/59778”) при использовании в сочетании с установленным методом подготовки проб QuEChERS CEN подходит для определения остаточных количеств 22 пестицидов в «томате» и «сушёном винограде» в пределах нормативных остатков.

**Ключевые слова:** плодоовощная продукция, остаточные количества пестицидов, метод ГХ – МС, QuEChERS, SANTE.

**Annotatsiya.** Ushbu tadqiqotda SANTE/11312/2021 qo'llanmasiga muvofiq "tomat" va "quritilgan uzum" namunalarini tayyorlash tartibi taqdim etilgan. Namunalar QuEChERS CEN usuli yordamida olingan hamda bir necha qoldiqli EURL-FV usulda tavsiflangan protokolga muvofiq, dispersiyali qattiq fazali ekstraksiya (d.SPE) usuli bilan tozalangan. Ushbu metodologiya Yevropa komissiyasining DG-SANTE (SANTE/11312/2021) va Yevropa standartlashtirish qo'mitasining (EN 15662, 2018) qo'llanma tamoyillariga muvofiq tekshirilgan bo'lib, bu maqbul tahliliy parametrlarga ega bo'lish imkonini berdi. O'rganilayotgan barcha birikmalar a'lo chiziqli javob ko'rsatdi (ulardan 25%-i  $R^2 > 0,990$  dan yuqori, 74%-i  $R^2 > 0,995$  dan yuqori) va faqat bitta birikma, "bifentrin", 1% da  $R^2 < 0,990$  dan past bo'lgan chiziqli javob bergan. Barcha qoldiq qiymatlar (qayta hisoblangan kontsentratsiyalar) SANTE tavsiyalarida ko'zda tutilgan qiymatning 20% chegarasida, kalibrlash diapazoni 0,002 mg/kg dan (45%), 0,005 mg/kg dan (54%) yoki 0,01 mg/kg dan (1%) 0,100 mg/kg gacha bo'lgan. Usulning qo'llanilishi sifat nazoratining uch darajasida aniqlandi va ko'rsatilgan reprezentativ birikmalar uchun maqbul bo'lib chiqdi, bu esa nisbiy standart og'ish %ni  $< 10\%$  ni berdi. Umuman olganda, unumdorlik to'g'risidagi ma'lumotlar shuni ko'rsatadiki, belgilangan QuEChERS CEN usuli yordamida namunalar tayyorlashda foydalanilgan GX-MS ("Agilent 7898/59778" modeli) normativ qoldiqlar doirasida "tomat" va "quritilgan uzum" dagi 22 ta pestitsidning qoldiq miqdorini aniqlash uchun mos keladi.

**Kalit so'zlar:** meva va sabzavot mahsulotlari, pestitsidlar qoldiq miqdorlari, GX-MS usuli, QuEChERS, SANTE.

**Abstract.** This research describes a sample preparation procedure for "tomato" and "dried grapes" in line with SANTE/11312/2021 Guidance. Samples were extracted following the QuEChERS CEN method and purified following Dispersive Solid Phase Extraction (d.SPE) method according to the protocol described in the method with several EURL-FV residues. The methodology was validated according to the European Commission DG-SANTE (SANTE/11312/2021) and European Committee for Standardization (EN 15662, 2018) guidelines, resulting in acceptable analytical parameters. All compounds tested showed excellent linear response (25% of them above  $R^2 > 0.990$ , 74% above  $R^2 > 0.995$ ), and only one compound, "bifenthrin", gave a linear answer with 1% of them below  $R^2 < 0.990$ . All residual values (back-calculated concentrations) were within the 20% tolerance of the SANTE guidelines with calibration ranges of 0.002 mg/kg (45%), 0.005 mg/kg (54%), or 0.01 mg/kg (1%) to 0.100 mg/kg. The applicability of the method was determined at three levels of quality control. It was found to be acceptable for the representative compounds shown yielding RSD% at  $< 10\%$ . Overall, the performance data indicate that GC-MS (Agilent 7898/59778 model) when used in conjunction with the established QuEChERS CEN sample preparation method is suitable for the determination of residues of 22 pesticides in "tomato" and "dried grapes" within the regulatory residue limits.

**Key words:** horticultural products, pesticide residues, GC-MS method, QuEChERS, SANTE.

Общепризнано, что овощи и фрукты входят в число основных продуктов полноценного рациона человека. Их ценность обусловлена содержанием ряда витаминов, макро и микроэлементов. Ранее широкий ассортимент свежих овощей и фруктов был доступен населению только в определенные сезоны года. На сегодняшний день, благодаря развитию тепличных технологий, в частности,

теплицзащищеннымгрунтом,обеспечивается круглогодичное разнообразие плодоовощной продукции. В теплицах при выращивании культур растениеводства нередко используют различные виды пестицидов (инсектициды, фунгициды, гербицидов, акарициды и др.), в целях защиты растений [7,15], а также при переработке, транспортировке и хранении свежей плодоовощной продукции. Каждый из более 1000 наименований пестицидов в

мире, применяемых в сельском хозяйстве, отличается своими характеристиками и токсичностью [14]. Нежелательным эффектом широкого использования в сельском хозяйстве значительного ряда пестицидов без должного контроля является загрязнение свежей растительной продукции остаточными их количествами, биоккумуляция которых в организме человека нередко становится причиной возникновения ряда хронических заболеваний [8,10,14]. Кроме этого, хроническое воздействие пестицидов может привести к мутациям ДНК и канцерогенным эффектам, а также проблемам с репродуктивной системой у человека [3,5,9,13]. В связи с повышенным потенциальным риском воздействия пестицидов и их метаболитов на здоровье человека, вопрос безопасности пищевых реализуемых продуктов, населению является одним из ключевых направлений в обеспечении продовольственной безопасности каждой отдельно взятой страны. В разных странах разработаны и реализуются национальные требования к безопасности продукции, где регламентируются их санитарные и медико-биологические параметры [1,16,17]. Опираясь на основы доказательной науки усилиями Международных организаций (ФАО, ВОЗ) с совместным стремлением правительств заинтересованных стран созданы и обновляются стандарты, нормы, правила, научно обоснованные рекомендации (Кодекс Алиментариус), включающие безопасные уровни чужеродных веществ в пищевой продукции, в том числе максимально допустимые уровни остатков пестицидов (МДУ), не оказывающих негативного влияния на здоровье населения. Учитывая значительный рост ассортимента применяемых пестицидов в сельском хозяйстве, возрастает необходимость регулярного мониторинга микроколичеств пестицидов и их токсических метаболитов в продуктах питания с использованием высокоэффективного приборного оборудования, чувствительных методов и апробированных алгоритмов пробоподготовки образцов [12].

**Цель** исследования заключалась в оценке эффективности метода газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ – МС) для определения

остатков пестицидов в плодоовощной продукции, приготовленных по методологии подготовки проб QuEChERS.

#### **Объекты и методы исследований.**

Объектами исследования служили продукты растениеводства: томат свежий, сушеный виноград (изюм) и 22 пестицида из различных химических групп. Образцы проб были извлечены методом QuEChERS CEN (Быстрый, Простой, Дешевый, Эффективный, Точный и Надежный) и очищены методом дисперсионной твердофазной экстракции (d.SPE) в соответствии с протоколом по методике определения остатков пестицидов с использованием ГХ-МС. Пищевые продукты растительного происхождения - определение остатков пестицидов с использованием ГХ-МС и/или ЖХ-МС/МС после экстракции/разделения и очистки ацетонитрила дисперсионным методом SPE-QuEChERS [4]. Эффективность этапа ГХ – МС метода оценивалась с использованием рекомендаций SANTE [6] для 22 пестицидов. Собранные данные были проанализированы с помощью программного обеспечения Mass Hunter (версия 2017).

#### **Результаты и обсуждение**

Анализ нескольких остатков представляет собой сложную задачу из-за различной матричной сложности различных пищевых продуктов и требований к низким уровням обнаружения  $\mu\text{g/kg}$  (частей на миллиард или  $\text{mg/kg}$ ) [2,11].

Данный подход на сегодняшний день широко применяется в лабораториях, аккредитованных по ISO/IEC 17025 (стандарты «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий»), в Республике Узбекистан применялся впервые. В предлагаемых условиях способ специфичен при наличии пестицидов, используемых в интенсивной технологии выращивания фруктов и овощей.

Экспериментальная часть работы включала этапы приготовления стандартных растворов пестицидов, подготовку и экстракцию проб, оценки эффективности метода ГХ – МС. Приготовление стандартных растворов пестицидов заключалось в подготовке растворов соответствующих матрице стандартов в диапазоне концентраций от 0,001 до 0,050  $\text{mg/kg}$  (от 1,0

до 50,0 частей на миллиард при концентрации во флаконе) для томата и от 0,002 до 0,100 мг/кг (от 1,0 до 50,0 частей на миллиард при концентрации во флаконе) для сушеного винограда. Повторные инъекции при трех уровнях концентрации проводили между калибровочными кривыми, заключенными в скобки, для оценки эффективности метода. Внутренний стандарт (трифенилфосфат) добавляли ко всем образцам перед анализом, чтобы внести поправку на любые возможные отклонения при вводе. Все химические реактивы и растворители, использованные в этом исследовании, имели аналитическую чистоту. В этом исследовании использовалась тройная дистиллированная вода. Для каждого пестицида точность, линейность, предел обнаружения (LOD) и предел количественного определения (LOQ) были рассчитаны в соответствии с рекомендациями Европейской комиссии для проверки аналитического метода, использованного в этом исследовании. Подготовка и экстракция проб включала следующие ступени. Гомогенизированный образец томата экстрагировали с использованием метода QuEChERS. Образец

сушеного винограда для усиления экстракции мишени сначала регидратировали водой, а затем для экстракции QuEChERS отбирали эквивалент 5 гр. образца. Далее супернатант экстрактов QuEChERS очищали с помощью пробирок d.SPE, которые содержали 25 мг. сорбента первичного вторичного амина (PSA) и 150 мг. MgSO<sub>4</sub> на 1 мл. экстракта образца. Затем образцы выпаривали и восстанавливали в этилацетате, добавляли смесь пестицидов и анализировали с помощью ГХ – МС. При обеспечении оптимальных условий газовой хроматографии оценивалась эффективность этапа ГХ – МС по рекомендациям SANTE для 22 наименований пестицидов. Результаты выявления множественных остатков пестицидов с низким уровнем обнаружения в соответствии с Международными требованиями в плодоовощной продукции представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

### Результаты обнаружения пестицидов и их метаболитов в образце томата свежего

	Название соединения	ВУ	Переход(Т)	Переход(Q)	Откл.-Т	Конц. ГХ/МС (ppb)	Отнош. Q	Проба (мг/кг)
1)	Acephate	6,770	42.0	136.0	6683	4,2884		0,0043
2)	Dimethoate	7,825	125.0	93.0	1940	2,8685	125,5	0,0029
3)	Diazinon	8,058	137.0	179.0	9697	4,5658	96,0	0,0046
4)	Fenitrothion	8,673	125.0	109.0	6245	4,3381	80,0	0,0043
5)	Malathion	8,754	173.0	125.0	11231	4,4547	83,6	0,0045
6)	Chlorpyrifos	9,185	97.0	229.0	234	5,1997	7,5	0,0052
7)	Hexythiazox	9,475	156.0	184.0	6871	4,8306	69,9	0,0048
8)	Profenofos	9,878	208.0	139.0	4520	4,3512	94,5	0,0044
9)	Chlorfenapyr	10,272	59.0	247.0	29697	4,7099	7,2	0,0047
10)	Triazophos	11,456	77.0	161.0	12391	4,5719	14,1	0,0046
11)	Propargite	12,063	81.0	135.0	699	4,2684		0,0043
12)	Fenoxycarb		88.0			5,0000		ND
13)	Brompylate	12,294	157.0	188.0	8	5,0000		0,0050
14)	Fenpropathrin	12,370	181.0		1018	5,0000		0,0057
15)	Phosalone	12,810	182.0	121.0	18103	4,5104	37,2	0,0045
16)	Lambda Cyhalothrin	14,110	197.0	181.0	13581	6,4839	5,3	0,0065
17)	Pyridaben	15,650	117.0	147.0	177	4,3262		0,0043
18)	Cypermethrin	15,951	163.0	181.0	20819	4,8731	72,1	0,0049
19)	Beta Cypermethrine	15,951	181.0	168.0	15009	4,6963	1,0	0,0047
20)	Fenvalerate	17,101	125.0	167.0	19990	4,6737	100,8	0,0047
21)	Difenoconazole	18,574	265.0	202.0	159	3,1039	51,8	0,0031
22)	Indoxocarb	19,624	150.0	203.0	2374	4,9206	21,3	0,0049



Таблица 2

Результаты обнаружения пестицидов и их метаболитов в образце сушеного винограда.

	Название соединения	ВУ	Переход(Т)	Переход(Q)	Откл.-Т	Конц. ГХ/МС (ppb)	Отнош. Q	Проба (мг/кг)
1)	Acephate	6,765	42.0	136.0	9420	10,2372		0,0102
2)	Dimethoate	7,825	125.0	93.0	8858	13,0946	87,3	0,0131
3)	Diazinon	8,058	137.0	179.0	25152	10,1447	97,3	0,0101
4)	Fenitrothion	8,673	125.0	109.0	22867	10,2206	78,4	0,0102
5)	Malathion	8,755	173.0	125.0	33661	10,1818	85,6	0,0102
6)	Chlorpyrifos	9,179	97.0	229.0	566	9,9334	6,4	0,0099
7)	Hexythiazox	9,470	156.0	184.0	17143	10,0565	58,5	0,0101
8)	Profenofos	9,873	208.0	139.0	15393	10,2163	83,4	0,0102
9)	Chlorfenapyr	10,272	59.0	247.0	70156	10,0967	7,1	0,0101
10)	Triazophos	11,456	77.0	161.0	37177	10,1427	13,6	0,0101
11)	Propargite	12,063	81.0	135.0	2910	10,2439	10,2	0,0102
12)	Fenoxycarb	12,155	88.0		361	10,0000		ND
13)	Brompylate	12,278	157.0	188.0	129	10,0000	20,7	0,0100
14)	Fenpropathrin	12,348	181.0		1994	10,0000		0,0098
15)	Phosalone	12,811	182.0	121.0	53685	10,1632	37,6	0,0102
16)	Lambda Cyhalothrin	14,110	197.0	181.0	18866	9,5054	6,3	0,0095
17)	Pyridaben	15,634	117.0	147.0	462	10,2246	38,4	0,0102
18)	Cypermethrin	15,951	163.0	181.0	49497	10,0423	72,1	0,0100
19)	Beta Cypermethrine	15,951	181.0	168.0	35667	10,1012	1,2	0,0101
20)	Fenvalerate	17,096	125.0	167.0	48433	10,1088	96,8	0,0101
21)	Difenoconazole	18,568	265.0	202.0	437	10,6320	55,6	0,0106
22)	Indoxocarb	19,618	150.0	203.0	5404	10,0265	23,8	0,0100

Результаты табличного материала показали, что достигнутые пределы количественного определения пестицидов находились между 0,003 и 0,01 мг/кг. Это свидетельствует о высокой точности, прецизионностью и чувствительностью.

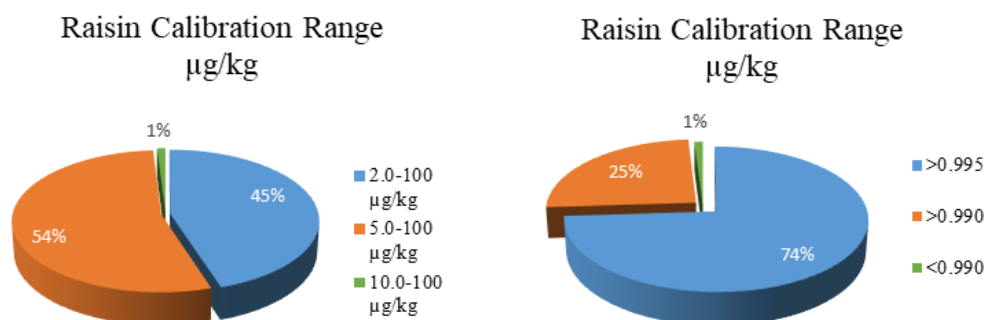


Рис 1. Калибровка с использованием матрицы, данные по 22 пестицидам, добавленным в органический изюм, экстрагированный методом QuEChERS.

Только одно соединение, «бифентрин», дало линейный ответ 1% из них ниже  $R^2 < 0,990$ . Все остаточные значения (обратно рассчитанные концентрации) находились в пределах 20% допуска, предусмотренного рекомендациями SANTE, с диапазоном ка-

либровки от 0,002 мг/кг (45%), от 0,005 мг/кг (54%) или от 0,01 мг/кг (1%) до 0,100 мг/кг.

#### Выводы

1. Метод ГХ – МС для определения остатков пестицидов в образцах томата и сушеном винограде, приготовлен-

ных по методологии подготовки проб QuEChERS обладает высокой точностью, прецизионностью и чувствительностью. ГХ – МС продемонстрировал превосходные, соответствующие назначению характеристики с точки зрения линейности и диапазона калибровки как для томата, так и для сушённого винограда.

2. Достоверность и точность метода ГХ-МС, определенная на трех уровнях контроля качества, оказалась приемлемой для показанных репрезентативных соединений, что дало %RSD <10%.

3. Проведенная валидация и адаптация многоостаточного метода обнаружения

микроколичеств пестицидов в плодоовощной продукции с применением ГХ-МС соответствуют требованиям международной надлежащей практики и являются оптимальными для рутинного анализа.

4. Внедрение в национальную надзорную практику данного метода повысит уровень контроля за безопасностью плодоовощной продукции, и будет способствовать обеспечению продовольственной безопасности страны и экспортному продвижению продукции растениеводства на мировом рынке.

### Список литературы:

1. Воронина Н.В. Нормативные, санитарные и медико-биологические основы обеспечения продовольственной безопасности Узбекистана //Вестник ассоциации врачей Узбекистана, 2016. - №4. – С.89-92.
2. Besufekad Mekonnen, Jafer Siraj, Samuel Negash Determination of pesticide residues in food premises using the QuEChERS method in Bench Sheko zone, south western Ethiopia Biomed Res Int. 2021; 6612096. doi: 10.1155/2021/6612096.
3. Cabry R., Merviel P., Madkour A. The impact of endocrine disruptor chemicals on oocyte/embryo and clinical outcomes in IVF. Endocr. Connect. 2020;9:R134–R142. doi: 10.1530/EC-20-0135.
4. Food products of plant origin - determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS after extraction/separation and purification of acetonitrile using the SPE-QuEChERS dispersive method; Polski Komitet Normalizacyjny: Warsaw, Poland, 2008.
5. Gerken J, Vincent G.T, Zapata D, Barron I.G, Comprehensive assessment of pesticide use patterns and increased cancer risk. Front. Cancer Control Soc. 2024. 2:1368086. DOI: 10.3389/fcacs.2024.1368086.
6. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed - SANTE/11312/2021 version 21. EU Health and Food Safety. 2023.
7. Hassan M.A., El-Nemr A. Pesticide pollution: classifications, effects on human health, extraction and treatment methods Egypt. J. Aquat. Res. 2020, 46 (3), pp. 207-220.
8. Helena Sandoval-Insausti et al. Intake of fruits and vegetables according to pesticide residue status in relation to all-cause and disease-specific mortality: Results from three prospective cohort studies //Environ Int. 2022 Jan 15; 159: 107024. doi: 10.1016/j.envint.2021.107024.
9. Jones A Kapeleka, Elingarami Sauli, Patrick A Ndakidemi. Pesticide exposure and genotoxic effects as measured by DNA damage and human monitoring biomarkers. Int J. Environ Health Res 2021. 31(7):805-822. doi: 10.1080/09603123.2019.1690132.
10. Kim E., Kabir, Jahan S.A. Exposure to pesticides and associated human health consequences. Sci. Total Environ. 2017, P. 525 – 535.
11. Narendran S.T, Meyyanathan S. N., Babu B. Review of pesticide residue analysis in fruits and vegetables. Pre-treatment, extraction and detection methods /International Journal of Food

Research 133(1):109141 DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109141

12. Shamsutdinova M.A., Voronina N.V. Monitoring of safety indicators of food raw materials and food products Journal German International Journal of Modern Science 2022 Issue №44. S. 30-31.

13. Sharma R.K., Singh P., Setia A. Insecticides and ovarian functions. Environ. Mol. Mutagen. 2020; 61:369–392. doi: 10.1002/em.22355.

14. WHO Pesticide residues in food. Fact sheets 15 September 2022 <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food>

15. Yadav and Devi Classification of pesticides and its effects on humans and the environment. Environ. Sci. Eng. 2017, 6 P.140 – 158.

16. СанҚваН 0079-24 «Озиқ-овқат маҳсулотларида хавфсизлигининг умумий санитария қоидалари, нормалари ва гигиена нормативлари».

17. СанҚваН №0009-21 «Атроф-муҳитда ва озиқ-овқат маҳсулотларида пестицидларнинг гигиеник нормалари».

