

AUTOMATICKÁ SPEKTRÁLNA DEKONVOLÚCIA NA ANALÝZU REZÍDUÍ PESTICÍDOV METÓDOU RÝCHLEJ GC-MS

MICHAL KIRCHNER, SILVIA ONDREKOVÁ*
a EVA MATISOVÁ

Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
eva.matisova@stuba.sk

Došlo 5.5.06, prijaté 7.11.06.

Kľúčové slová: GC-MS, analýza rezíduí pesticídov, automatická spektrálna dekonvolúcia, AMDIS

Úvod

Zvyšovanie rýchlosti analýz plynovou chromatografiou sa stalo zaujímavým už v období uvedenia kapilárnych kolón. Jednou z možností zvyšovania rýchlosti GC separácie je použitie krátkych kolón s malým vnútorným priemerom. Používajú sa kapilárne kolóny s malým vnútorným priemerom (I.D.) – 0,1 alebo 0,15 mm narrow-bore kolóny a s dĺžkou zvyčajne do 15 m. Výhodou takýchto kolón je predovšetkým vysoká separačná účinnosť porovnateľná, alebo dokonca vyššia ako v prípade konvenčných GC kolón^{1,2}. K nevýhodám kapilárnych kolón s malým I.D. patrí nízky prietok nosného plynu, čo môže významne komplikovať dávkovanie vzorky a ich otázná odolnosť voči málo prchavým súčastiam matrice prítomným vo vzorke³. Chromatografické píky po separácii na kolónach s malým I.D. majú malú šírku, čo kladie vysoké nároky na detekciu, predovšetkým v prípade použitia hmotnostno-spektrometrických detektorov.

K času potrebnému na získanie analytického výsledku významne vplýva okrem samotnej separácie aj úprava vzorky a vyhodnotenie nameraných údajov. Firma Agilent Technologies vyvinula softvér „Deconvolution Reporting Software“⁴, ktorý má slúžiť na automatickú identifikáciu pesticídov (prípadne inej skupiny analytov) podľa knižnice hmotnostných spektier (RTLPEst 2) a na kvantitatívnu analýzu metódou GC-MS. Detekcia analytov v GC-MS sa uskutočňuje pri snímaní v režime „Full Scan“ (snímanie celých spektier). Vyhodnocovanie s použitím

„Deconvolution Reporting Software“ začína v prvej časti softvérového balíka – MSD Chemstation – program na obsluhu GC-MS a vyhodnocovanie analýz. Tu sa uskutoční bežná identifikácia analytov podľa elučného času a pomerov intenzít preddefinovaných selektívnych iónov a kvantitatívna analýza s použitím zvolenej kalibračnej metódy. Následne sa uskutoční dekonvolúcia chromatografických píkov a identifikácia cieľových analytov v druhej časti softvérového balíka, v programe AMDIS. Tento program slúži na automatickú elimináciu šumu z meraní a spektrálnu dekonvolúciu chromatografických píkov⁵. Identifikáciu uskutočňuje porovnávaním dekonvoluovaných spektier s referenčnými spektrami vo zvolenej knižnici, v prípade pesticídov je to knižnica RTLPEst 2, ktorá obsahuje spektrá 567 aktívnych látok. Následne sa všetky dekonvoluované spektrá, ktoré boli v programe AMDIS identifikované ako cieľové analyty, ešte raz porovnávajú so spektrami v knižnici NIST⁰² (obsahuje 147000 rôznych zlúčenín) s použitím programu MS Search. Výstupom je správa obsahujúca tabuľku identifikovaných zlúčenín spolu s „match“ faktorom vyjadrujúcim zhodu dekonvoluovaného spektra s referenčným spektrom a množstvom látky. V dostupnej literatúre sa však neuvádzajú medze detekcie, pri ktorých je automatická procedúra spoľahlivá⁴. Na medze detekcie rôznych látok vplývajú dva faktory. Prvým je medza detekcie použitého GC-MS, teda množstvo látky, pri ktorom sa zaznamená dostatočne kvalitné hmotnostné spektrum a druhým je kvalita dekonvolúcie v programe AMDIS. Tu je dôležité, aby bolo možné účinne eliminovať šum merania a spektrálne odlišiť píky analytov od píkov pochádzajúcich z matrice vzorky.

Cieľom tejto práce je odhadnúť najnižšiu koncentráciu, pri ktorej je možná automatická dekonvolúcia a identifikácia rezíduí pesticídov v ovoci a zelenine programom AMDIS (Automated Mass – spectral Deconvolution and Identification System) a výpočet medze detekcie vybraných pesticídov pri rýchlej GC-MS analýze v režime „Full Scan“.

Experimentálna časť

Chromatografické analýzy boli vykonané na GC-MS 6890N (Agilent Technologies, USA) s hmotnostným detektorom 5973N (Agilent Technologies, USA) s PTV dávkovačom (Programmed Temperature Vaporizer – dávkovač s programovanou teplotou odparovania) a autosamplerom 7683. Plynový chromatogram bol v on-line zapojení s počítačom pracujúcim so softvérom na kontrolu priebehu analýzy a spracovanie dát v MSD Chemstation D.01.02.

Na analýzu bola použitá kapilárna kolóna s malým

* Silvia Ondreková sa s touto prácou úspešne zúčastnila súťaže O cenu firmy Merck 2006 za najlepšiu študentskú vedeckú prácu v odbore analytickej chémie.

Tabuľka I

Zoznam sledovaných pesticídov, zaradenie do chemických skupín, pôvod, elučný čas (t), koeficient determinácie (R^2), vypočítaná medza detekcie (LOD) a cieľový (kvantifikačný) ión

Pesticíd	Skupina	Zdroj	t [min]	R^2	LOD [ng μl^{-1}]	Cieľový ión [m/z]
Dimethoate	organofosfát	Cheminova Agro	3,79	0,9990	0,30	87
Diazinon	organofosfát	Agrovita	3,97	0,9990	0,32	276
Terbutylazine	triazín	Ciba-Geigy	3,99	0,9990	0,28	214
Pyrimethanil	anilino- pyrimidín	Schering	4,06	0,9993	0,22	198
Chlorpyrifos-methyl	organofosfát	Dr,Ehrenstorfer	4,37	0,9994	0,20	286
Fenitrothion	organofosfát	Sumimoto Chemical	4,63	0,9994	0,28	277
Chlorpyrifos	organofosfát	Dow Chemical co,	4,72	0,9990	0,28	314
Cyprodinil	anilino- pyrimidín	Ciba-Geigy	5,02	0,9991	0,26	225
Penconazole	triazol	Ciba-Geigy	5,06	0,9991	0,26	248
Captan	ftalamid	Agrovita	5,17	0,9888	1,10	79
Methidathion	organofosfát	Ciba-Geigy	5,25	0,9990	0,28	145
Myclobutanil	triazol	Dow Agro science	5,50	0,9990	0,28	179
Kresoxim-methyl	oximinoacetát	Dr,Ehrenstorfer	5,58	0,9990	0,30	131
Tebuconazole	triazol	Agrovita	6,23	0,9989	0,30	250
Phosalone	organofosfát	Dr,Ehrenstorfer	6,73	0,9991	0,30	367
Bitertanol	triazol	Bayer	7,15	0,9983	0,40	170
Cypermethrin	pyretroid	Agrovita	7,65	0,9966	1,04	181
Etofenprox	neesterový pyretroid	Mitsui Toatsu Chemicals	7,71	0,9992	0,24	163

vnútorným priemerom typu CP-Sil 8 CB Low Bleed/MS s rozmermi 15 m \times 0,15 mm s hrúbkou stacionárnej fázy 0,15 μm so zložením 95 % dimetyl 5 % fenylosiloxán od firmy Chrompak-Varian (Middelburg, Holandsko). Ako nosný plyn bolo použité hélium s čistotou 5,0 od firmy Linde Technoplyn (Bratislava, SR).

Optimalizované chromatografické podmienky:

Podmienky PTV dávkovača: režim studený splitless, počiatková teplota: 150 $^{\circ}\text{C}$, počiatkový čas: 0,00 min, 1. teplotný gradient gradient: 400 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ do 300 $^{\circ}\text{C}$ (2,00 min), 2. teplotný gradient 400 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ do 350 $^{\circ}\text{C}$ (0,5 min), tlak 363,5 kPa, splitless čas 1,13 min, prietok deličom 160 ml min^{-1} , dávkovaný objem: 2 μl .

Teplotný program termostatu pece: počiatková teplota 130 $^{\circ}\text{C}$ izotermicky 1,13 min, teplotný gradient 27,25 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, konečná teplota 290 $^{\circ}\text{C}$ 6,00 min.

Podmienky MS detektora: teplota GC-MS prevodníka 290 $^{\circ}\text{C}$, režim „Full Scan“ so začiatkom merania po 2,50 min, rozsah skenovaných m/z 50–450, vzorkovací parameter 1, teplota iónového zdroja 250 $^{\circ}\text{C}$, energia elektrónov 70 eV, teplota kvadrupólu 150 $^{\circ}\text{C}$.

Štandardy pesticídov sme získali z rôznych zdrojov (tab. I). Zásobný roztok pesticídov s približnou koncentráciou 0,5 mg ml^{-1} bol pripravený v toluéne (SupraSolvMerck KgaA, Darmstadt, Nemecko).

Metóda úpravy vzoriek bola prevzatá z literatúry⁶. Zo zhomogenizovanej vzorky jablka (odroda jonatán), sa odobralo 25 gramov do kadičky a extrahovalo sa s použitím homogenizátora Ultra-Turrax T25 basic (Ika Werke, Staufen, Nemecko) (19 000 ot min^{-1} , 3 min) s 50 ml acetonitrilu (Suprasolv, Merck, Bratislava). Po filtrácii zmesi cez filtračný papier zo sklenených mikrovláskien a prídavku 2,5 g NaCl sa oddelená organická fáza presušila s 2 g bezvodého MgSO_4 . Extrakt (25 ml) sa na vákuovej odparke odparil do objemu približne 1 ml. Získaný koncentrát sa prečisťoval na 500 mg SPE NH_2 - kolónke (Bond-elut, IST, Midglamorgan, UK) elúciou 15 ml acetónu (Suprasolv, Merck, Bratislava). Efluent sa prúdom čistého dusíka odparil do sucha a doplnil toluénom na objem 5 ml. Zakoncentrovací faktor úpravy vzorky bol 2,5.

Výsledky a diskusia

Použitie softvéru AMDIS na automatickú dekonvolúciu a detekciu analytov

Na posúdenie možnosti využitia softvéru AMDIS v stopovej analýze reziduí pesticídov s použitím rýchlejšej

Tabuľka II
Početnosť pozitívnej identifikácie jednotlivých pesticídov na rôznych koncentračných hladinách, n=7

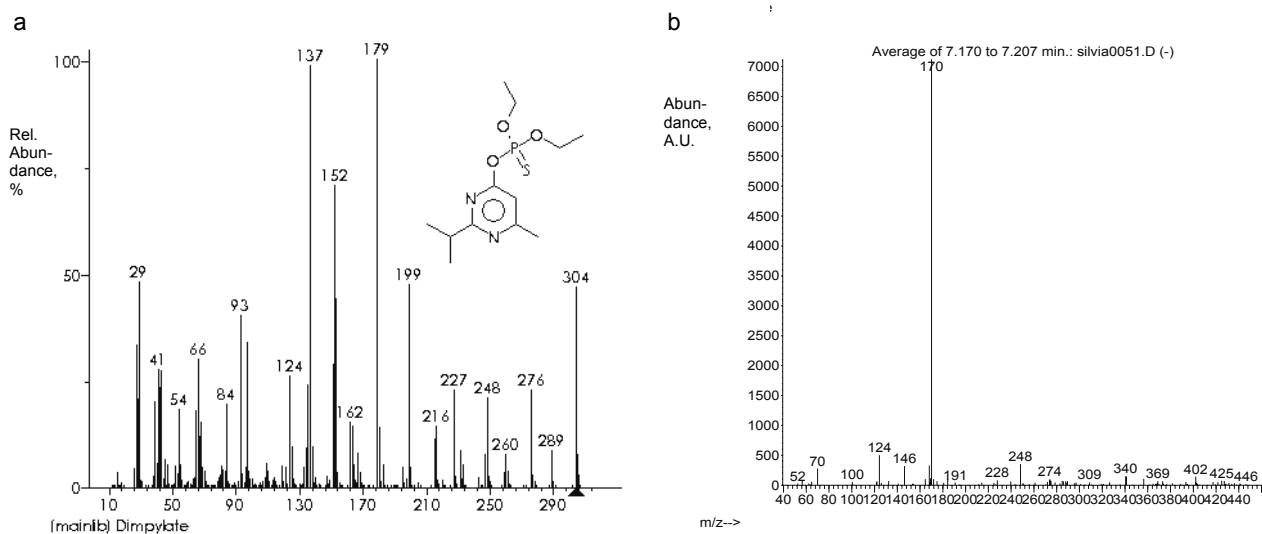
Pesticíd	Početnosť pozitívnej identifikácie jednotlivých pesticídov koncentrácia [ng μl^{-1}]						
	10	5	1	0,5	0,1	0,05	0,01
Dimethoate	7	7	7	7	3	0	0
Diazinon	7	7	7	7	7	7	0
Terbuthylazine	7	7	7	7	7	6	0
Pyrimethanil	7	7	7	7	7	7	1
Chlorpyrifos-methyl	7	7	7	7	7	7	0
Fenitrothion	7	7	7	7	7	4	0
Chlorpyrifos	7	7	7	7	7	7	0
Cyprodinil	7	7	7	7	7	7	1
Penconazole	7	7	7	7	7	7	0
Captan	7	7	7	0	0	0	0
Methidathion	7	7	7	7	7	0	0
Myclobutanil	7	7	7	7	7	0	0
Kresoxim-methyl	7	7	7	7	7	5	0
Tebuconazole	7	7	4	7	0	0	0
Phosalone	7	7	7	7	7	1	0
Bitertanol	7	7	7	2	0	0	0
Cypermethrin	7	7	7	7	0	0	0
Etofenprox	7	7	7	7	7	1	0

GC je potrebné zistiť najnižšiu koncentráciu rôznych pesticídov, pri ktorej je ešte možná spoľahlivá identifikácia s použitím automatickej dekonvolúcie. Na tento experiment sme zvolili zmes 18 pesticídov (tab. I), reprezentujúcu zastúpenie látok z viacerých chemických skupín pesticídov. Pripravili sme roztoky štandardov pesticídov v extrakte z jablák s rozdielnymi koncentraciami: 10; 5; 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 ng μl^{-1} , čo odpovedá 4; 2; 0,4; 0,2; 0,04; 0,02; 0,004 mg kg^{-1} v pôvodnej vzorke jablka. Čistota použitých jablák neošetrovaných pesticídovými prípravkami bola overená⁶. Roztok každej koncentračnej hladiny sme analyzovali na GC-MS prístroji 7 \times vo „full scan“ režime. Celkový čas analýzy bol 12,92 min a šírky sledovaných píkov pre všetky analýzy boli v rozmedzí od 0,72 do 1,02 sek. Pre rýchlu GC šírka píku by mala byť v rozmedzí 1–3 sek podľa definície^{1,2}. Počet zaznamenaných spektier na chromatografický pík (šírka píku pri základni) bol v rozmedzí 11–13.

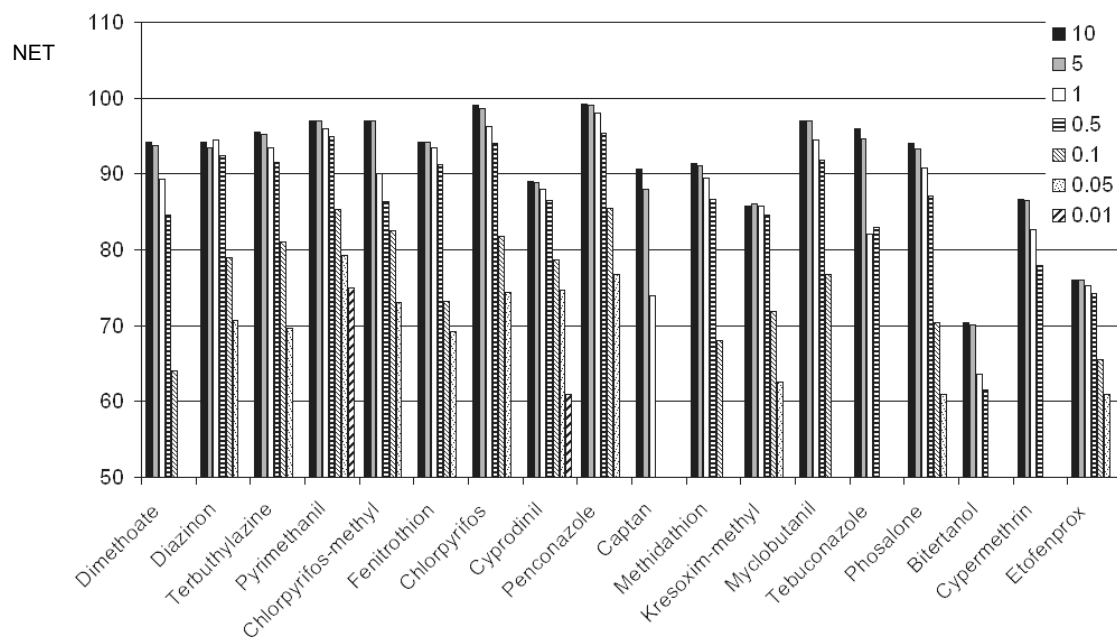
Na vyhodnotenie získaných GC-MS súborov sme použili prednastavené parametre softvéru AMDIS, všetky nastavenia vyhovovali vlastnostiam GC-MS záznamov z rýchlej GC-MS. Výsledkom z analýzy údajov v programe AMDIS je „report“ obsahujúci tabuľku identifikovaných látok spolu s niekoľkými faktormi vyjadrujúcimi podobnosť dekonvoluovaných spektier so spektrami v knižnici. V tab. II sú zhrnuté počty, vyjadrujúce koľkokrát pri každej koncentračnej hladine bola identifikácia da-

ného analytu úspešná. Pri vysokých koncentráciách 10 a 5 ng μl^{-1} bola automatická identifikácia úspešná vo všetkých prípadoch. Pri koncentrácii 1 ng μl^{-1} boli všetky pesticídy úspešne identifikované, výnimkou bol tebuconazole, ktorý bol identifikovaný len 4 \times , captan nebol identifikovaný pri koncentrácii 0,5 ng μl^{-1} a bitertanol bol identifikovaný pri tejto koncentrácii len 2 \times . Pri koncentrácii 0,1 ng μl^{-1} boli identifikované všetky zlúčeniny okrem captanu, tebuconazolu, bitertanolu a cypermethrinu; dimethoate bol identifikovaný len 3 \times . Všeobecne môžeme konštatovať, že s klesajúcou koncentraciou klesá úspešnosť identifikácie rezíduí pesticídov tak, ako to vyplýva z tab. II. Pri koncentrácii 0,01 ng μl^{-1} boli identifikované len pyrimethanil a cyprodinil 1 \times .

Úspešnosť automatickej identifikácie pesticídov na určitej koncentračnej hladine závisí od bohatosti hmotnostného spektra danej látky a účinnosti ionizácie. Hmotnostné spektrum diazinonu, uvedené na obr. 1, má dostatočný počet intenzívnych iónov: 137, 152, 179, 199, 304 a preto diazinon bol úspešne identifikovaný vo všetkých koncentračných hladinách okrem 0,01 ng μl^{-1} . Obr. 1 zobrazuje namerané hmotnostné spektrum bitertanolu, ktoré má jediný intenzívny ión s m/z 170, čo spôsobilo, že bol úspešne identifikovaný len v rozmedzí koncentračných hladín 10 až 1 ng μl^{-1} . Pri koncentrácii 0,5 ng μl^{-1} bol identifikovaný len 2 \times a v rozmedzí koncentrácií 0,1–0,01 ng μl^{-1} už nebol



Obr. 1. a) Hmotnostné spektrum diazinonu z knižnice NIST⁰², b) hmotnostné spektrum bitertanolu; namerané za podmienok uvedených v experimentálnej časti, dávkovaná koncentrácia $0,05 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$, dávkovaný objem $2 \mu\text{l}$



Obr. 2. Závislosť NET faktora charakterizujúceho podobnosť dekonvoluovaných spektier pesticídov programom AMDIS s referenčnými spektrami v knižnici RTL^{Pest2} od koncentrácie pesticídov v analyzovanom roztoku; koncentrácia pesticídov v jednotkách $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$

identifikovaný. Z toho vyplýva, že čím má daná látka menší počet intenzívnych iónov v hmotnostnom spektre, tým je horšie a ťažšie identifikovateľná.

Na obr. 2 je znázornená závislosť NET faktora vyjadrujúceho podobnosť dekonvoluovaného spektra s referenčným spektrom v knižnici RTL^{Pest2} od koncentrácie pesticídov

v analyzovanom roztoku. Ako z grafu vyplýva, takmer všetky látky boli úspešne identifikované s NET faktorom nad 90 na koncentračných hladinách 10 a $5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$. S klesajúcou koncentraciou analytov a znižujúcou sa komplexnosťou MS spektier sledovaných látok klesá aj NET faktor podobnosti dekonvoluovaných hmotnostných spektier.

Kalibrácia a výpočet medze detekcie

Na uskutočnenie kalibrácie sme vykonali integráciu plôch jednotlivých iónových extrahovaných chromatogramov zo záznamu celkového iónového toku (TIC) pre špecifické ióny zodpovedajúce jednotlivým pesticídum, tak ako sú uvedené v tab. I. Vypočítali sme priemernú plochu píkov pre každú koncentračnú hladinu. Opakovateľnosť meraní plôch píkov ($n=7$), vyjadrená ako relatívna smerodajná odchýlka sa zhoršovala s klesajúcou koncentráciou analyzovaných roztokov a pohybovala sa približne v rozmedzí do 4 % pre koncentrácie pesticídov do $1 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$. Pre nižšie koncentrácie sa RSD pohybovala až do 40 %. V tab. I sú uvedené vypočítané hodnoty koeficientu determinácie R^2 , ktorý sa používa na zhodnotenie linearitu odzvy metódy. Koeficient determinácie je najvyšší pre chlorpyrifos-methyl a fenitrothion (0,9994) a najnižší pre captan (0,9888). Zo štúdia vyplýva, že odzvy je lineárna v rozsahu koncentrácií $10\text{--}0,01 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$.

Pomocou postupu výpočtu medze detekcie (LOD) podľa literatúry⁷ sme vypočítali medze detekcie, ktoré sú uvedené v tab. I. LOD je najnižšia pre chlorpyrifos-methyl $0,20 \text{ ng}$ a najvyššia pre captan $1,10 \text{ ng}$. Zaujímavé je porovnanie vypočítaných medzí detekcie získaných z plôch píkov extrahovaných iónových chromatogramov a schopnosti programu AMDIS pozitívne identifikovať prítomné pesticídy na základe dekonvoluovaných spektier. AMDIS dokázal identifikovať mnohé analyty aj na koncentračnej hladine podstatne nižšej ako LOD vypočítaná metódou „Upper Limit Approach“⁷.

Záver

Na posúdenie možnosti použitia rýchlej GC-MS a automatického vyhodnocovania analýz programom AMDIS sme ako modelovú vzorku zvolili roztoky štandardov vybraných pesticídov v extrakte matrice jablka s koncentraciami, ktoré zodpovedajú množstvám 4; 2; 0,4; 0,2; 0,04; 0,02; 0,004 mg kg^{-1} v pôvodnej vzorke jablka. Pri vysokých koncentraciách 4 a 2 mg kg^{-1} bola automatická identifikácia úspešná vo všetkých prípadoch, pri koncentrácii 0,4 mg kg^{-1} bola automatická identifikácia neúspešná pre captan a bitertanol. S ďalším poklesom koncentrácií sledovaných pesticídov v analyzovaných roztokoch sa znižoval počet úspešne identifikovaných látok, ako aj podobnosť dekonvoluovaných spektier s referenčnými spektrami v knižnici vyjadrená ako NET faktor. Vypočítali sme medzu detekcie LOD, ktorá sa pohybuje v rozmedzí $0,20 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ pre chlorpyrifos po $1,10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ pre captan. Zo získaných výsledkov vyplýva, že navrhovaná kombinácia rýchlej GC-MS a automatickej identifikácie

s programom AMDIS nie je dostatočne citlivá na identifikáciu všetkých reziduí pesticídov v rastlinných komoditách. Závisí to od požadovaných hodnôt maximálnych reziduálnych limitov (MRL), ktoré sa pre rôzne kombinácie pesticídov a komodít pohybujú v rozmedzí $0,01\text{--}10 \text{ mg kg}^{-1}$. Veľmi nízke MRL ($0,01 \text{ mg kg}^{-1}$) sú vyžadované pre detskú výživu.

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-20-000705.

LITERATÚRA

1. Kirchner M., Matisová E.: Chem. Listy 98, 396 (2004).
2. Matisová E., Dömötörövá M.: J. Chromatogr., A 1000, 199 (2003).
3. Kirchner M., Matisová E., Otrekal R., Hercegová A., de Zeeuw J.: J. Chromatogr., A 1084, 63 (2005).
4. <http://www.chem.agilent.com/Scripts/Generic.ASP?lPage=14509&indcol=N&prodcol=Y>, stiahnuté 26.4.2006.
5. <http://www.amdis.net>, stiahnuté 26.4.2006.
6. Hercegová A., Dömötörövá M., Matisová E., Kirchner M., Štefuca V.: J. Chromatogr., A 1084, 46 (2005).
7. Mocák J., Bobrowski A.: Water Sci. Technol. 1, 19 (2001).

M. Kirchner, S. Ondreková, and E. Matisová
(*Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovakia*): **Automated Mass Spectral Deconvolution for Pesticide Residues Analysis by Fast GC-MS**

The aim of this study was to estimate the lowest concentration of pesticide residues in non-fatty food matrix at which the residues can be successfully identified by automatic spectral deconvolution software AMDIS. For GC-MS measurements fast GC with narrow capillary column was utilized. For a mixture of 18 pesticides, the identification was successful at concentration levels $4\text{--}0.4 \text{ mg kg}^{-1}$ in real matrix samples (apples). With decreasing concentration, the number of identified pesticides and the quality of deconvoluted spectra decreased. The calculated limits of full-scan detection ranged from 0.20 ng for chlorpyrifos to 1.10 ng for captan. Software AMDIS with the used experimental set-up is not sufficiently sensitive for reliable identification of pesticide residues in non-fatty food matrices with low maximal residual limits (e.g. baby food 0.01 mg kg^{-1}).