

Validation of the Multiresidue Method Analysis for Pesticides in Bee Honey by UPLC-MS/MS using the Method of Samples Preparation QuEChERS

Y.A. Omelchun[†], A.I. Kobish[†], N.P. Klochkova[†], L.V. Shevchenko[‡]

[†] State Research Institute for Laboratory Diagnostics and Veterinary Sanitary Examination, 30, Donetska Str., Kyiv, 03151, Ukraine;

[‡] National University of Life and Environmental Sciences, 15, Heroyiv Oborony Str., Kyiv, 03041, Ukraine; *e-mail: my_answer@ukr.net

Received: October 13, 2021; Accepted: July 27, 2022

DOI: 10.17721/moca.2022.141-152

In this paper we present the results of evaluating the suitability of the developed method for the simultaneous determination of 200 pesticide residues in bee honey using ultraperformance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The main stages of extraction of pesticides from the matrix using QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe) sample preparation are described. Appropriate mobile phase composition was used to better identify analytes, internal standards were not applied. The studied list of pesticides is relevant for use in modern agriculture. The limit of quantification of the method (LOQ) for each of the analytes is 0.001 mg/kg, the relative standard deviation in the conditions of repeatability and reproducibility < 20.0 %, the expanded measurement uncertainty is less than the limit of regulatory requirements < 50.0 %. The calibration graph for each of the analytes had a coefficient $R^2 > 0.99$. The use of QuEChERS sample preparation methods allows to reduce labor intensity, time and reagents, increase the accuracy and precision of research in comparison with classical methods of sample preparation. The described method makes it possible to detect a wide range of pesticides and has a fairly high sensitivity.

Keywords: QuEChERS, residues pesticides, bee honey, Limit of Quantitation (LOQ), liquid chromatography, tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS

Валідація методики одночасного багатокомпонентного аналізу залишків пестицидів у меді бджолиному за допомогою методу УЕРХ-МС/МС та використання підготовки проб QuEChERS

Ю.А. Омельчун[†], А.І. Кобиш[†], Н.П. Клочкова[†], Л.В. Шевченко[‡]

[†] Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, вул. Донецька, 30, Київ, 03151, Україна;

[‡] Національний університет біоресурсів та природокористування, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна; *e-mail: my_answer@ukr.net

Надійшла: 13 жовтня 2021 р; Прийнята: 27 липня 2022 р

DOI: 10.17721/moca.2022.141-152

В статті наведені результати оцінювання придатності методики, розробленої для одночасного кількісного виявлення залишків до 200 пестицидів в меді бджолиному за допомогою рідинної тандемної хромато-мас-спектрометрії (УЕРХ-МС/МС). Описані основні етапи екстракції пестицидів з матриці з використанням пробопідготовки QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe), без застосування внутрішніх стандартів. Досліджуваний перелік пестицидів актуальний для застосування в сучасному сільському господарстві, відповідно є необхідність контролю безпечності продуктів харчування на вказані в статті показники. Межа кількісного визначення методу (МКВ) складає 0.001 мг/кг, що є достатньо низьким рівнем виявлення, відносне стандартне відхилення в умовах повторюваності та відтворюваності < 20.0 %, розширена невизначеність вимірювання менша межі нормативних вимог, тобто < 50.0 %. Градувальний графік для кожного з аналітів мав коефіцієнт кореляції $R^2 > 0.99$. Застосування методики підготовки проб QuEChERS дозволяє зменшити трудоемність, затрати часу та реактивів, збільшити точність та прецизійність результатів досліджень порівняно з результатами, отриманими за допомогою класичних методів визначення залишків пестицидів. Описаний метод дає можливість виявити широкий спектр діючих речовин засобів захисту рослин та має достатньо високу чутливість для контролю залишків токсикантів на низьких рівнях концентрацій.

Ключові слова: методика QuEChERS, залишки пестицидів, мед бджолиний, МКВ, рідинна хроматографія, тандемна мас-спектрометрія, УЕРХ-МС/МС

Сьогодні досить гостро постає проблема масштабного неконтрольованого застосування пестицидів у аграрному секторі. Нераціональне використання засобів захисту рослин в сільському господарстві ставить під загрозу екологічну безпеку навколишнього середовища, а також шкодить бджільництву, як одному з основних складових аграрної галузі.

Основні принципи державної політики України щодо пестицидів визначає Закон України "Про пестициди і агрохімікати" [1].

Найбільш суворе щодо застосування пестицидів європейське законодавство, про що вказують максимально допустимі рівні залишкового вмісту пестицидів в різних продуктах рослинного і тваринного походження викладені в Регламенті ЄС № 396/2005 з доповненнями, а також Директиві Комісії 2006/125/ЄС [2, 3].

ВООЗ сумісно з ФАО відповідає за оцінку ризиків для здоров'я людини як при безпосередньому контакті з пестицидами, так і внаслідок наявності залишкових кількостей у продуктах харчування, і також за розробку рекомендацій щодо засобів захисту від такого впливу [4]. Дослідження ФАО показують, що 70 % пестицидів, зареєстрованих в багатьох країнах, що розвиваються, можуть бути класифіковані як високонебезпечні, тобто здатні спричинити суттєву шкоду здоров'ю та екосистемі.

Пестициди природного походження несуть мінімальне техногенне навантаження на довкілля, а от синтетичні препарати – це надзвичайно небезпечні отруйні хімічні речовини. Недоліком більшості неорганічних пестицидів є високе дозування та відсутність вибіркової дії. Тому найчастіше для боротьби зі шкідниками сільськогосподарських культур використовуються високоактивні синтетичні органічні препарати [5]. Слід зазначити, що останні є досить стійкими в навколишньому середовищі. Персистентність пестицидів порівнюють із радіоактивними ізотопами і оцінюють також за періодом напіврозпаду - часу, за який концентрація пестицидів зменшується в 2 рази [6]. Найстійкішими вважаються хлорорганічні сполуки. Серед них вирізняють хлорпохідні ароматичних вуглеводнів, терпенів, хімічних речовин дієнового ряду, хлоровані вуглеводні, тощо [7].

Небезпека пестицидів полягає також у тому, що лише 5 % від загальної кількості використаного препарату досягає мети – вражає шкідників, а інші 95 % потрапляють в природне середовище. Поширення даних токсикантів у довкіллі відбувається як фізичним шляхом – через водотоки, розсіювання вітром в атмосфері, так і біологічним – перенесення живими організмами по харчовому ланцюгу. Варто зазначити, що із просуванням організмів до вищих ланок харчового ланцюга концентрації ксенобіотиків зростають [8, 9].

Пестициди негативно впливають на корисну флору і фауну, а також безпечність сільськогосподарської продукції, призводячи до порушення біологічної рівноваги в екосистемі. Накопичуються у поверхневих та підземних водах і на довгі роки залишаються у ґрунті. Їх залишки разом з продуктами харчування надходять до організму людини. Кумуються у великих кількостях у внутрішніх органах, переважно в печінці та нирках, а також у жирових тканинах, затримуючись надовго, деякі – назавжди. За твердженням дослідників, більшість пестицидів містить у собі метаболічні токсини, які призводять до гострих отруєнь та багатьох хронічних захворювань [9, 10]. Як от розвиток захворювань серцево-судинної, репродуктивної, нервової і травної систем. До того ж деякі пестициди виявляють мутагенну та канцерогенну дію на живі організми [11-13]. Ще однією негативною властивістю пестицидів є те, що вони можуть виводитися з організму матері разом з молоком і потрапляти в організм дитини [14, 15].

Слід зауважити, що хімічні засоби, що застосовуються для боротьби зі шкідниками, надають лише тимчасову допомогу, оскільки з часом до них виробляється стійкість. Це викликає необхідність використання нових, ще сильніших речовин. Тому, навіть використання зменшеної їх кількості не вирішує проблему [8].

Вчені США доводять, що показник загальної токсичності пестицидів зріс на 80 % для комах-запилювачів, наземних рослин та водних безхребетних. Найбільший внесок у зростання токсичності для цих організмів зробили інсектициди з групи неонікотиніодів та синтетичних піретроїдів. Хоча за останні роки їхнє застосування суттєво зменшило отруйний вплив на ссавців, зокрема людину та птахів, вони завдають великої шкоди корисним комахам, оскільки ті фізіологічно подібні до шкідників. Зокрема це стосується медоносних бджіл, які є запорукою хорошого врожаю, оскільки запилюють більшість рослин та є важливою складовою екосистеми. Обробка медоносних культур пестицидами спричиняє масову загибель бджіл, а також знижує їхню життєздатність і продуктивність. Це загрожує зникненню багатьох видів рослин, зокрема й сільськогосподарських.

Найбільш небезпечний пероральний вплив неонікотиніодів на бджіл, у зв'язку з низькими летальними дозами та високою ймовірністю контамінації їх через пилок, нектар і воду [16]. Неонікотиніоди найчастіше виявляються в зразках меду. Більш ліпофільні сполуки, такі як хлорорганічні та фосфорорганічні пестициди, поліциклічні ароматичні вуглеводні виявляються переважно в бджолиному воску [17-19].

Відомо, що залишки пестицидів, виявлені в меді бджолиному здатні викликати вплив на репродуктивну систему чоловіків та жінок [20].

Таким чином, забруднення пестицидами навколишнього середовища завдає шкоди здоров'ю людей, тварин, рослин, а також тих комах, які є бажаними для аграрних господарств [21].

Мед – широкоживаний продукт завдяки своїм цілющим і поживним властивостям. Однак залишки пестицидів, які можуть потрапити до меду, знижують його якість, зводячи нанівель цінні харчові та лікувальні властивості. Крім того, залишкові кількості пестицидів в меді та продуктах бджільництва можуть слугувати індикатором забруднення довкілля. Отже, значне зростання використання цих токсикантів у агровиробництві, в зв'язку з підвищеним попитом на продукти харчування, доводить актуальність досліджень меду за їх вмістом.

Аналіз пестицидів у харчових продуктах досить важливе та одночасно складне завдання лабораторної практики [4, 22, 23]. Оскільки концентрація цих сполук в меді зазвичай невисока та одночасно можуть бути виявлені декілька пестицидів, необхідно застосовувати високочутливі та селективні методи випробувань. Постійна необхідність у збільшенні чутливості та точності вимірювань для ідентифікації нових типів пестицидів вимагає нових розробок. В даному контексті необхідно змінювати підходи до прободготовки, застосовувати ефективну рідинну та/або газову хроматографію в поєднанні з мас-спектрометрією [24].

Звичайні методики прободготовки передбачають тривалий та трудомісткий процес очищення зразків харчової продукції від небажаних сполук, які потрапляють в екстракт та заважають виявленню досліджуваних аналітів за допомогою мас-спектрометрії. Крім того, невелика кількість ліпідів, що залишалася в кінцевих екстрактах, може зашкодити хроматографічній колонці, джерелу і детектору [25]. Тому є необхідність

у підготовці проб для визначення залишкових кількостей токсикантів, позбавлених недоліків, властивих традиційним методикам, та які є легкі, швидкі, дешеві у виконанні і забезпечують високу селективність без складних процедур очищення [26].

Останнім часом метод QuEChERS досить часто використовується під час дослідження різних харчових продуктів на наявність залишків пестицидів та інших токсикантів. Він забезпечує точні результати випробувань і достатньо високий відсоток повернення аналітів, не застосовуючи при цьому внутрішні стандарти для усунення проблем, пов'язаних з властивостями досліджуваних матриць та мінімізації генерування помилок на стадії прободготовки [27, 28]. Використання незначної кількості органічного розчинника та базового лабораторного обладнання забезпечують цій методиці меншу вартість та більшу безпечність для довкілля порівняно з традиційною підготовкою проб [27, 29].

Мета нашої роботи полягала у розробці методики та оцінці її придатності для одночасного визначення у меді бджололиному на низьких рівнях концентрацій залишків до 200 пестицидів, які широко застосовуються в сучасному аграрному секторі країни, використовуючи при цьому метод ультраефективної рідинної тандемної мас-спектрометрії та підхід до підготовки проб QuEChERS.

Матеріали і методи досліджень

Дослідження проводились на рідинному триоквадрупольному тандемному мас-спектрометрі "Waters Xevo TQ-XS" за параметрів хроматографування, вказаних в Таблиці 1. Швидкість потоку рухомої фази та градієнт елювання наведено в Таблиці 2.

Таблиця 1. Параметри хроматографування.

УЕРХ система:	ACQUITY UPLC I – Class;
Колонка:	Acquity UPLC BEN C18, 100 x 2.1mm x 1,7µm
Температура термостату колонки:	40 °C
Об'єм введення:	10 мкл
Режим введення проби:	Автоматичний
Тривалість хроматографування:	17 хв
Програмне забезпечення:	MassLynx
Рухома фаза:	A: 2 мМ амонію форміат з 0,1% мурашиною кислотою у розчині вода – ацетонітрил (95:5) B: 0,025% мурашина кислота в ацетонітрилі
МС система:	Xevo TQ-XS
Тип іонізації:	Electrospray (ESI+/ ESI-)
Напруга на капілярі:	0.5 кВ
Температура джерела іонізації:	150 °C
Температура десольватації:	600 °C
Швидкість потоку газу для десольватації:	1000 мл/хв (азот)
Швидкість потоку газу на конусі:	150 мл/хв

Таблиця 2. Швидкість потоку рухомої фази і градієнт елюювання.

Час, хв	Швидкість потоку, мл/хв	Мобільна фаза А, %	Мобільна фаза В, %
-	0.45	98	2
0.25	0.45	98	2
2.25	0.45	1	99
13.00	0.45	1	99
13.01	0.45	98	2
17.00	0.45	98	2

Всі стандартні зразки пестицидів були високої чистоти (>98.0%), виробництва «Sigma-Aldrich». Основний стандартний розчин аналітів з концентрацією 100 мкг/мл зберігався за температури -20°C , проміжні і робочі розчини суміші пестицидів готувались з основного стандартного розчину в день використання. Для градуювання хроматографічного обладнання аналізували градуювальні розчини досліджуваних аналітів на п'яти рівнях концентрацій від 0.001 мкг/мл до 0.05 мкг/мл, з подальшим кількісним визначенням за площею піків. Отримані результати обробляли за методом найменших квадратів, що дало можливість отримати коефіцієнти a і b градуювальної прямої виду $y = a + bx$.

Градуювальні графіки для визначення пестицидів (азоксистробін, ацетаміпрід, диметоат, імідаклопрід, карбендазім, клотіанідин, тебуконазол, тіаклопрід, тіаметоксам, флутріафол, хлорпірифос, ципроконазол (I, II)) наведено на Рисунках S1–S12 (Додаток).

Для проведення підготовки досліджуваних проб застосовувалось таке обладнання: струшувач для пробірок «Bio Vortex V1», центрифуга низькотемпературна «Jouan GR 4.22»; шейкер орбітальний «Biosan», ваги лабораторні «OHAUS» 2-го класу точності, з межею зважування до 210 г, дозатори піпеткові одноканальні «Eppendorf» об'ємом від 0.001 см³ до 10.0 см³.

В даних випробуваннях використовувались розчинники з класифікацією для РХ-МС (Chromasolv, 99,9%): ацетонітрил, метанол та вода деіонізована; реактиви з чистотою >99%, класифікації A.C.S. reagent, виробництва «Sigma-Aldrich»: амонію форміат, сульфату магнію, хлориду натрію, натрію цитрат дигідрат, натрію гідроцитрат 1,5-гідрат; та сорбенти: суміш первинних і вторинних амінів (PSA), кат. номер 52738-U, Supelco та октадецил модифікований силікагель (C18), кат. номер 97727-U, Supelco.

Визначення залишків пестицидів виконували методом УЕРХ-МС/МС після відповідної екстракції їх з проби розчинником, очищення екстрактів за допомогою дисперсійної твердофазної екстракції та ідентифікації аналітів за часом утримання і співвідношенням маси відповідного іону до його заряду, кількісне визначення – методом зовнішніх стандартів за площею піків.

Пробопідготовка. Під час проведення дослідження використовували умовно чисту матрицю меду бджололиного для внесення добавки стандартного розчину суміші аналітів на трьох рівнях концентрацій, а саме 0.001 мг/кг, 0.01 та 0.05 мг/кг.

Загальна маса кожного зі зразків, які були відібрані з різних зон України (Полісся, Волинь, Поділля, Київщина, Галичина, Закарпаття, Буковина, Південна і Лівобережна Україна) безпосередньо для проведення досліджень складала 500 г.

Паралельно проводили для досліджуваного виду матриці контроль реактивів (експеримент з холостою пробєю).

Наважку меду $5\text{ г} \pm 0.01\text{ г}$ поміщали в центрифужну пробірку на 50 см³, вносили до матриці певну кількість робочого стандартного розчину одного з відповідних рівнів концентрацій, додавали 10 см³ деіонізованої води і струшували. Через 30 хв додавали екстрагуючий розчинник – ацетонітрил об'ємом 10 см³, 6 г сульфату магнію, 1 г хлориду натрію, 1 г натрію цитрату дигідрату та 0.5 г натрію гідроцитрату 1,5-гідрату. Пробірку інтенсивно струшували впродовж 1 хв на вортексі та 15 хв на апараті для струшування, центрифугували з охолодженням до $+4^{\circ}\text{C}$ протягом 5 хв зі швидкістю 5000 об/хв. Відібрані 2 см³ надосадової рідини перенесли в центрифужну пробірку об'ємом 15 см³, яка містила 50 мг PSA, 50 мг C18 і 300 мг магнію сульфату. Перемішували вміст пробірки впродовж 1 хв, і центрифугували протягом 5 хв при 5000 об/хв та -8°C . Для подальшого дослідження у скляну вагу, яка має класифікацію для РХ-МС відбирали 1 см³ очищеного екстракту та розміщували в автосамплері при $+4^{\circ}\text{C}$.

Результати досліджень та їх обговорення

Розроблена методика одночасного багатокомпонентного аналізу залишків пестицидів у меді бджололиному за допомогою рідинної тандемної хромато-мас-спектрометрії (УЕРХ-МС/МС) в поєднанні з підготовкою проб QuEChERS перевірена відповідно до вимог, які діють в Європейському Союзі, вказаних в SANTE/11312/2021 [33].

Валідація методики – важлива частина роботи аналітичної лабораторії. Лабораторні випробування необхідно проводити застосовуючи методики, точність яких, тобто правильність та прецизійність, перевірено для конкретного застосування [33]. Цей принцип стосується всіх лабораторій, що виконують дослідження на безпечність харчових продуктів.

Виконували оцінювання таких валідаційних характеристик методики, як лінійність, селективність, повторюваність,

внутрішньолaboratorна відтворюваність, між-laboratorна відтворюваність, процент повернення та розширена невизначеність вимірювань. Прийнято участь у міжlaboratorних порівняльних випробуваннях, організованих провайдерами інших країн. Результати досліджень, отримані при оцінюванні основних критеріїв валідації, наведено в Таблиці 3.

Випробування виконувались на трьох рівнях концентрацій, які є більш нижчими, порівняно з раніше проведеними дослідженнями [30-32].

Таблиця 3. Валідаційні характеристики методики.

Назва пестициду	Рівень збагачення, мг/кг	Повторюваність, (r), %	Відтворюваність, (R), %	Повернення, Rec, %	Розширена невизначеність (U), мг/кг
1	2	3	4	5	6
Абамектин	0.001	2.69	18.7	98.0	0.00035
Азоксистробін	0.001	1.87	13.6	92.4	0.00025
Альдикарб	0.001	1.97	9.97	95.6	0.00019
Альдикарб сульфон	0.001	1.71	12.9	89.8	0.00023
Аметрин	0.001	1.39	11.7	82.1	0.00019
Амінокарб	0.001	2.26	8.59	81.7	0.00014
Амітраз	0.001	1.62	19.5	93.4	0.00036
Ацетаміпрід	0.001	2.43	6.88	99.3	0.00014
Ацибензолар-S-метил	0.001	1.71	9.51	88.6	0.00017
Беналаксил	0.001	2.14	13.8	89.9	0.00025
Бендіокарб	0.001	2.48	11.7	83.2	0.00019
Бензоксимат	0.001	2.32	9.14	79.6	0.00015
Бітертанол	0.001	2.49	13.8	104.9	0.00029
Біфеназат	0.001	1.84	16.2	81.3	0.00026
Боскалід	0.001	1.68	8.77	106.1	0.00019
Бромуконазол I	0.001	1.90	8.94	102.3	0.00020
Бромуконазол II	0.001	1.97	9.06	102.4	0.00020
Бупіримат	0.001	2.51	9.64	94.6	0.00018
Бупрофезин	0.001	2.82	15.2	88.6	0.00027
Бутафенацил	0.001	1.32	6.70	117.0	0.00016
Бутокарбоксим	0.001	3.00	5.21	111.8	0.00012
Бутоксикарбоксим	0.001	3.46	13.6	80.8	0.00022
Вамідотіон	0.001	1.69	14.0	80.9	0.00023
Галофенозид	0.001	4.99	10.2	90.6	0.00018
Гексаконазол	0.001	3.07	12.1	109.3	0.00026
Гексафлумурон	0.001	3.77	17.1	80.7	0.00028
Гекситіазокс	0.001	2.27	8.84	105.1	0.00019
Десмедифам	0.001	3.37	10.6	77.1	0.00016
Диклбутразол	0.001	2.91	11.4	105.4	0.00024

Таблиця 3. (продовження)

1	2	3	4	5	6
Диметоат	0.001	1.74	8.54	91.9	0.00016
Диметоморф I	0.001	3.57	5.99	76.9	0.00009
Диметоморф II	0.001	3.67	5.15	76.2	0.00008
Димоксистробін	0.001	3.77	10.2	87.7	0.00018
Диніконазол	0.001	4.81	5.56	113.4	0.00013
Динотефуран	0.001	2.01	8.44	82.6	0.00014
Диоксакарб	0.001	3.99	11.7	87.7	0.00021
Дифенокназол	0.001	3.44	10.4	111.9	0.00023
Дифлubenзурон	0.001	5.4	12.0	82.2	0.00020
Діетофенкарб	0.001	3.83	7.87	91.6	0.00014
Діурон	0.001	3.16	7.19	75.4	0.00011
Дорамектин	0.001	2.67	16.0	94.0	0.00030
Епоксиконазол	0.001	3.09	11.7	107.2	0.00025
Епріномектин	0.001	3.11	17.3	84.0	0.00029
Етаконазол	0.001	1.24	10.9	86.4	0.00019
Етирімол	0.001	3.13	11.8	79.4	0.00019
Етіофенкарб	0.001	1.82	7.07	97.2	0.00014
Етоксазол	0.001	2.56	8.21	100.1	0.00016
Зоксамід	0.001	1.75	9.11	98.9	0.00018
Івермектин	0.001	2.86	14.8	95.7	0.00028
Ізокарбофос	0.001	2.65	9.87	90.3	0.00018
Ізопрокарб	0.001	2.34	8.75	84.8	0.00015
Імазаліл	0.001	2.08	6.85	84.3	0.00012
Імідаклоприд	0.001	2.75	4.41	107.8	0.00010
Індоксакарб	0.001	4.42	15.9	91.7	0.00029
Іпконазол	0.001	4.95	10.2	95.9	0.00020
Іпровалікарб I	0.001	1.99	13.4	78.1	0.00021
Іпровалікарб II	0.001	2.05	13.6	79.5	0.00015
Карбарил	0.001	3.03	13.4	98.7	0.00026
Карбендазим	0.001	4.38	15.0	82.7	0.00025
Карбетамід	0.001	1.63	11.5	77.7	0.00018
Карбоксин	0.001	2.38	5.41	85.5	0.00009
Карбофуран	0.001	1.29	9.29	90.9	0.00017
Карбофуран-3-гідрокси	0.001	2.18	7.46	82.9	0.00012
Карфентразон-етил	0.001	0.88	16.5	85.0	0.00028
Квіноксифен	0.001	4.47	15.6	91.6	0.00029
Клотіанідин	0.001	2.66	7.62	106.7	0.00016
Клофентезин	0.001	1.29	7.48	117.3	0.00018
Крезоксим-метил	0.001	3.26	10.9	82.2	0.00018
Лінурон	0.001	4.77	12.9	88.0	0.00023
Луфенурон	0.001	2.65	14.0	96.3	0.00027

Таблиця 3. (продовження)

1	2	3	4	5	6
Мандипропамід	0.001	1.70	8.76	105.8	0.00019
Мевінфос І	0.001	3.96	11.6	86.1	0.00019
Мевінфос ІІ	0.001	4.07	11.9	86.5	0.00015
Мексакарбат	0.001	3.18	13.0	83.5	0.00022
Меланіпірим	0.001	3.74	17.9	95.4	0.00034
Мепроніл	0.001	2.67	14.0	96.0	0.00027
Метабензтіазурон	0.001	2.16	10.1	91.9	0.00018
Металаксил	0.001	2.53	4.38	77.4	0.00007
Метафлумізон	0.001	3.01	14.2	95.9	0.00027
Метіокарб	0.001	4.05	10.8	83.4	0.00018
Метконазол	0.001	2.86	14.4	109.1	0.00031
Метобромурон	0.001	3.31	11.0	96.3	0.00021
Метоксифенозид	0.001	1.46	16.7	96.2	0.00032
Метоміл	0.001	3.32	15.7	87.3	0.00027
Метопротрин	0.001	2.33	7.49	91.2	0.00014
Метрибузин	0.001	1.42	7.61	102.1	0.00016
Мефенацет	0.001	2.02	10.9	81.2	0.00018
Міклобутаніл	0.001	2.24	13.1	80.9	0.00021
Моксидектин	0.001	3.88	11.2	104.1	0.00023
Монолінурон	0.001	1.18	7.37	101.3	0.00015
Небурон	0.001	6.42	17.0	92.3	0.00031
Новалурон	0.001	4.17	11.6	104.7	0.00024
Нуарімол	0.001	4.49	11.2	102.3	0.00023
Оксадіксил	0.001	1.66	10.3	90.3	0.00019
Оксаміл	0.001	2.85	14.4	80.8	0.00023
Паклобутразол	0.001	2.85	9.05	81.4	0.00015
Пенконазол	0.001	1.72	9.10	115.7	0.00021
Пенцикурон	0.001	2.05	9.04	96.8	0.00018
Пікоксистробін	0.001	3.54	13.3	88.6	0.00024
Піпероніл бутоксид	0.001	3.22	9.30	96.3	0.00018
Піракарболід	0.001	3.05	11.1	85.2	0.00019
Піраклостробін	0.001	4.86	8.58	87.7	0.00015
Піридабен	0.001	1.70	6.64	105.7	0.00014
Піриметаніл	0.001	3.06	8.54	98.5	0.00017
Піримікарб	0.001	2.00	7.69	89.5	0.00014
Пірипроксифен	0.001	2.90	8.95	105.4	0.00019
Промекарб	0.001	2.41	13.9	82.8	0.00023
Прометон	0.001	2.87	8.91	104.8	0.00019
Прометрин	0.001	3.19	8.28	87.4	0.00014
Пропаргіт	0.001	3.14	9.09	86.7	0.00016
Пропіконазол	0.001	3.21	14.5	85.9	0.00025

Таблиця 3. (продовження).

1	2	3	4	5	6
Пропоксур	0.001	3.5	9.17	84.8	0.00016
Протіконазол	0.001	2.44	12.8	97.3	0.00025
Прохлораз	0.001	1.81	19.1	91.1	0.00035
Ротенон	0.001	5.55	14.0	98.4	0.00028
Секбуметон	0.001	4.49	14.1	90.9	0.00026
Симетрин	0.001	2.21	5.56	96.4	0.00011
Сідурон	0.001	4.01	6.97	87.7	0.00012
Спіродиклофен	0.001	3.20	15.5	86.4	0.00027
Спіротетрамат	0.001	4.08	10.4	78.6	0.00016
Тебуконазол	0.001	2.98	13.2	108.5	0.00029
Тебутіурон	0.001	3.47	11.4	91.0	0.00021
Тебуфенозид	0.001	2.44	9.18	103.0	0.00019
Тебуфенпірад	0.001	1.77	7.79	111.4	0.00017
Темефос	0.001	1.64	7.95	109.2	0.00017
Тербуметон	0.001	3.69	13.0	85.3	0.00023
Тербутрин	0.001	2.07	8.54	112.8	0.00019
Тетраконазол	0.001	1.36	5.69	116.0	0.00013
Тефлubenзурон	0.001	3.14	11.9	100.1	0.00024
Тіабендазол	0.001	2.51	9.95	86.7	0.00017
Тіаклоприд	0.001	1.97	5.70	104.8	0.00012
Тіаметоксам	0.001	1.85	9.60	79.4	0.00015
Тідіазурон	0.001	2.91	10.7	76.9	0.00016
Тіобенкарб	0.001	1.26	5.95	108.9	0.00013
Тіофанат-метил	0.001	1.71	14.8	100.0	0.00030
Триадименол	0.001	4.85	12.1	97.6	0.00024
Триадимефон	0.001	2.44	13.3	85.2	0.00023
Тритіконазол	0.001	1.66	4.76	114.8	0.00011
Трифлосистробін	0.001	3.71	15.0	91.4	0.00027
Трифлумізол	0.001	2.89	11.3	85.2	0.00020
Трифлумурон	0.001	1.76	9.30	89.3	0.00017
Трихлорфон	0.001	2.83	11.1	100.3	0.00022
Трициклазол	0.001	2.34	8.65	84.9	0.00015
Феназаквін	0.001	2.74	13.4	92.4	0.00025
Фенамідон	0.001	4.79	15.2	93.9	0.00029
Фенаримол	0.001	6.14	12.2	99.2	0.00024
Фенбуконазол	0.001	1.89	17.6	99.6	0.00035
Фенмедифам	0.001	2.29	14.2	88.0	0.00025
Фенобукарб	0.001	3.61	8.88	81.2	0.00014
Феноксикарб	0.001	4.32	14.8	93.5	0.00028
Фенпіроксимат	0.001	0.99	5.90	108.1	0.00013
Фенпропіморф	0.001	3.32	14.5	87.0	0.00025

Таблиця 3. (продовження).

1	2	3	4	5	6
Фентоат	0.001	1.61	8.22	107.0	0.00018
Фенурон	0.001	2.02	7.96	95.4	0.00015
Фіпроніл	0.001	0.89	15.0	103.5	0.00031
Флонікамід	0.001	3.30	8.74	89.6	0.00016
Флуазинам	0.001	3.17	14.5	95.3	0.00028
Флубендіамід	0.001	4.47	14.3	100.8	0.00029
Флудиоксоніл	0.001	2.08	15.1	86.3	0.00026
Флуквіконазол	0.001	4.52	12.5	89.7	0.00022
Флуоксастробін	0.001	3.25	9.84	104.1	0.00020
Флуометурон	0.001	2.52	8.26	79.1	0.00013
Флусилазол	0.001	3.17	10.8	90.2	0.00019
Флутоланіл	0.001	2.04	7.41	109.1	0.00016
Флутріафол	0.001	3.03	7.31	99.8	0.00015
Флуфенацет	0.001	2.55	6.24	110.5	0.00014
Флуфеноксурон	0.001	2.06	7.53	111.9	0.00017
Форхлорфенурон	0.001	2.88	14.6	87.5	0.00026
Фуберідазол	0.001	2.71	15.0	87.0	0.00026
Фуралаксил	0.001	2.45	13.6	86.4	0.00024
Фуратіокарб	0.001	2.51	10.4	86.4	0.00018
Хлорантраніліпрол	0.001	3.40	14.3	95.3	0.00027
Хлороксурон	0.001	3.35	10.5	89.4	0.00019
Хлорпірифос	0.001	1.61	9.62	109.7	0.00021
Хлорпірифос-метил	0.001	2.99	13.6	108.6	0.00029
Хлортолурон	0.001	3.98	10.1	77.1	0.00016
Хлорфлуазурон	0.001	3.39	7.57	111.3	0.00017
Циазофамід	0.001	2.65	4.32	107.0	0.00009
Циклурон	0.001	1.67	10.5	88.7	0.00019
Цимоксаніл	0.001	1.84	9.64	103.6	0.00011
Ципродиніл	0.001	3.55	7.89	98.1	0.00015
Ципроконазол I	0.001	0.93	4.75	113.9	0.00011
Ципроконазол II	0.001	1.03	4.79	114.0	0.00009

Отримані результати щодо відсотку повернення аналітів з матриці на рівні збагачення 0.001 мг/кг знаходяться в межах 75.4 – 117.0 % та відповідають нормативним значенням – 70.0 – 120.0 %. Значення відносного стандартного відхилення в умовах повторюваності є в діапазоні 0.88 – 6.42 %, а відносне стандартне відхилення отримане в умовах відтворюваності складає 4.32 – 19.1 %, що відповідає вимогам < 20 %. Висока специфічність методу підтверджена, тобто здатність однозначно оцінювати аналізовану речовину в присутності інших компонентів. Лінійна залежність була

задовільною з відповідним коефіцієнтом кореляції $R^2 > 0.99$. Хроматограми градувальних розчинів деяких стандартних зразків досліджуваних пестицидів наведено в додатку (Рисунок S13-S18).

Результати перевірки на вищих рівнях концентрацій були також прийнятними.

Аналізуючи отримані результати досліджень на всіх рівнях збагачення, зокрема й на найнижчому рівні, можемо зробити висновок, що результати валідаційних даних (Таблиця 3) відповідають вимогам нормативного документу SANTE/11312/2021 [33], який встановлює норми

для оцінювання критеріїв валідації методик визначення залишків пестицидів в продуктах харчування.

За період з 2020 по 2021 рік нами проведено дослідження 127 зразків меду бджолиного на залишки пестицидів з використанням даної методики, зразки були відібрані з різних регіонів України. Згідно з отриманими результатами випробувань в досліджених пробах виявлені такі пестициди, як азоксистробін, ацетаміприд, диметоат, імідаклоприд, карбендазим, клотіанідин, тебуконазол, тіаклоприд, тіаметоксам, флутріафол, хлорпірифос, ципроконазол. В Таблиці 4 для кожного з перерахованих вище пестицидів вказано параметри приладу, за яких проводилось дослідження.

Рівні вмісту встановлених залишків пестицидів були нижчими за максимальне-допустимі рівні

(МДР), визначені Регламентом (ЄС) 396/2005 [2] для продуктів бджільництва, і знаходяться в межах від 0,005 мг/кг до 1 мг/кг. Лише у двох відсотках випадків зафіксовано перевищення. Виявлені в зразках меду пестициди належать до груп неонікотиніодів, триазолів, бензімідазолів, стробілуринів та фосфорорганічних пестицидів. Зразки меду відбирались протягом всього періоду медозбору з різних регіонів країни і пасік, розміщених у сільській, приміській місцевості та землях лісового фонду. За походженням мед був квітковий, а саме з різнотрав'я, акацієвий, соняшниковий, гречаний, ріпаківий та падевий, що дало можливість оцінити забруднення відібраних зразків меду бджолиного залишками пестицидів більш ширше залежно від місця відбору та походження.

Таблиця 4. Параметри даних приладу для кожного з виявлених показників та коефіцієнт оцінки лінійної залежності.

Назва аналізу	Материнський іон	Дочірні іони	Напруга на конусі (Cone), V	Енергія зіткнення (Collision Energy), eV	Коефіцієнт кореляції, R ²
Азоксистробін	404.1	372.0 328.9	15 15	30 16	0.996
Ацетаміприд	223.0	126.0 56.1	30 30	15 20	0.999
Диметоат	230.0	198.8 124.8	20 20	22 10	0.999
Імідаклоприд	256.1	209.0 174.9	25 25	20 12	0.999
Карбендазим	192.1	160.1 132.1	10 10	30 15	0.997
Клотіанідин	250.0	132.1 169.0	25 25	15 10	0.998
Тебуконазол	308.2	124.9 70.1	30 30	24 40	0.999
Тіаклоприд	253.0	125.8 90.0	35 35	40 20	0.999
Тіаметоксам	292.0	132.0 211.2	25 25	20 10	0.999
Флутріафол	302.1	122.9 70.1	25 25	16 30	0.999
Хлорпірифос	349.9	198.0 97.0	27 27	32 20	0.997
Ципроконазол (сума)	292.2	70.2 125.1	5 5	20 30	0.999

Висновки

За результатами оцінювання придатності даної методики одночасного багатокомпонентного виявлення залишків пестицидів у меді бджолиному з використанням рідинної трьохквадрольної тандемної хромато-мас-спектрометрії (УФРХ-МС/МС) для кожного з перевірених аналітів межа кількісного визначення (МКВ) складає – 0.001 мг/кг, відносно стандартне відхилення в умовах повторюваності та відтворюваності на рівні < 20 %, розширена невизначеність вимірювання ≤ 35.0 %, що нижче, ніж межа нормативних вимог (≤ 50.0 %). Перевірені валідаційні характеристики розробленої методики відповідають вимогам нормативного документу ЄС щодо процедур та критеріїв перевірки методів аналізу залишків

пестицидів у продуктах харчування. Описаний метод має достатньо високу чутливість та дає можливість виявити широкий спектр пестицидів в умовах необхідності одночасного аналізу великого переліку пестицидів, зареєстрованих в Україні з перспективою їх використання. Перелік пестицидів (Таблиця 3) враховує діючі речовини препаратів сучасних торгових марок, які є на ринку.

Наведено основні етапи екстракції аналітів із досліджуваних зразків та подальшого одночасного кількісного визначення до 200 показників, без використання внутрішніх стандартів. Застосування методики підготовки проб QuEChERS дозволило зменшити трудоемність, затрати часу та реактивів, збільшити безпечність і надійність досліджень порівняно з класичними методами пробопідготовки.

Література

1. Zakon Ukraïny Pro pestycydy i agrohimikaty № 87/95-VR vid 02.03.95, red. vid 13.02.2020.
2. Regulation (EC) № 396/2005 of the European Parliament and of the Council on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. OJ L 70, 16.3.2005, p 1–16.
3. Commission Directive 2006/125/EC on processed cereal-based foods and baby foods for infants and young children. OJ L 339, 6.12.2006, p 16–35. <http://data.europa.eu/eli/dir/2006/125/oj>.
4. Pesticide residues in food. WHO. 2018. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food>
5. Rekha, Naik, S. N.; Prasad, R. Pesticide residue in organic and conventional food-risk analysis. *Chem. Health Saf.* 2006, 13, p 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.chs.2005.01.012>.
6. Shimshoni, J.A. et al. Pesticide distribution and depletion kinetic determination in honey and beeswax. *Model for pesticide occurrence and distribution in beehive products.* 2019, *PLoS ONE* 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.021263>
7. Tkachyshyn, V. S. Intoksykacija hlororganichnymi spolukamy. Gostri ta nevidkladni stany u praktyci likarja. 2008, 2(10). <https://urgent.com.ua/ua-issue-article-122>
8. Zadoks, J. C.; Waibel, H. From pesticides to genetically modified plants: history, economics and politics. *NJAS – Wageningen J. Life Sci.* 2000, 48, p 125–149.
9. Fedorov, L. L.; Jablov, A. V. Pestycydy – udar po byosfere y cheloveku. Nauka: Moskva, 1999; 462 s.
10. Hazarika, R.; Das, S. Health hazard due to exposure of pesticide. *J. Epidemiol. and Community Health.* 2011, 65(1), p 436–437.
11. Garcia, F. P.; Cortés Ascencio, S. Y.; Gaytan Oyarzun, J. C.; Ceruelo Hernandez, A.; Vazquez Alavarado, P. Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks. *Res. J. Environ. Sci. Toxicol.* 2012, 1, p 279–293. <https://www.semanticscholar.org/paper/Pesticides%3A-classification%2C-uses-and-toxicity.-of-Garc%C3%ADa-Ascencio/225e6c4ebada0757fc67ef46d06a2347dec00335?p2df>
12. Ravindran, J.; Pankajsham, M.; Puthur, S. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdiscip. Toxicol.* 2016, 9, p 90–100. <https://www.sciencedirect.com/article/10.1515/intox-2016-0012>
13. Sarbani, G.; Anirudha, G.; Gouri, D. S.; Surya, B. P. Mutagenic effects of carbosulfan, a carbamate pesticide. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2002, 519, p 75–82. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1383571802001146?via%3Dihub>
14. Pirsahab, M.; Limoe, M.; Namdari, F.; Khamutian, R. Organochlorine pesticides residue in breast milk. *Med. J. of the Islamic Repub. Iran.* 2015, 29(1). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4606957/pdf/MJIRI-29-228.pdf>
15. Yildizdas, H. Y.; Ozlu, F.; Efeoglu, P.; Daglioglu, N.; Satar, M. Non-persistent pesticides in breast milk in an agricultural area in Turkey. *J. Matern.-Fetal Neonat. Med.* 2019, 32(14), p 2387–2392. <https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1438395>
16. DiBartolomeis, M.; Kegley, S.; Mineau, P.; Radford, R.; Klein, K. An assessment of acute insecticide toxicity loading (AITL) of chemical pesticides used on agricultural land in the United States. 2019, *PLoS ONE* 14(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220029>
17. Bommuraj, V. et al. Pesticide and trace element residues in honey and beeswax combs from Israel in association with human risk assessment and honey adulteration. *Food Chem.* 2019, 299. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125123>
18. Chen, F.; Chen L.; Wang, Q.; Zhou, J.; Xue, X.; Zhao, J. Determination of organochlorine pesticides in propolis by gas chromatography-electron

capture detection using double column series solid-phase extraction. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 393(3), p 1073–1079.

19. Acosta-Tejada, G. M.; Medina-Peralta, S.; Moguel-Ordonez, Y. B.; Munoz-Rodriguez, D. Matrix solid-phase dispersion extraction of organophosphorus pesticides from propolis extracts and recovery evaluation by GC/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 400(3), p 885–891.

20. El-Nahhal, Y. Pesticide residues in honey and their potential reproductive toxicity. *Sci. Total Environ.* **2020**, 741. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139953>

21. Johnson, R. M.; Ellis, M. D.; Mullin, C. A., Frazier, M. Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie*. **2010**, p 312–331. <https://doi.org/10.1051/apido/201001841>

22. The International Code of Conduct on Pesticide Management. WHO/FAO. Rome, **2014**. 40 p.

23. Guidelines on good laboratory practice in pesticide residue analysis. CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003. Codex Alimentarius Commission, Rome, **2003**.

24. Souza, Tette, P. A.; Guidi, L. R.; De Abreu Glória, M. B.; Fernandes, C. Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. *Talanta*. **2016**, 149, p 124–141. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.045>

25. Castillo, M. An evaluation method for determination of non-polar pesticide residues in animal fat samples by using dispersive solid-phase extraction clean-up and GC-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 400, p 1315–1328.

26. Rejczak, T. A. Review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation

approach. *Open Chem.* **2015**, 13, p 980–1010.

27. Perestrelo, R. QuEChERS – Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. *Anal. Chim. Acta.* **2019**, 1070, p 1–28.

28. Majors, R. E. *Sample preparation fundamentals for chromatography*. Agilent Technologies; 2014; Vol. 42; p 2555–2568.

29. Schenck, F. J.; Hobbs, J. E. Evaluation of the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) approach to pesticide residue analysis. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2004**, 73, p 24–30.

30. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* **2003**, 86, 412–431.

31. Kasiotis, K. M.; Anagnostopoulos, C.; Anastasiadou, P.; Machera, K. Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC-MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. *Sci. Total Environ.* **2014**, 485–486, 633–642.

32. Cesnik, H. B.; Kmecl, V.; Bolta, Š. V. Pesticide and veterinary drug residues in honey—Validation of methods and a survey of organic and conventional honeys from Slovenia. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **2019**, 36, 1358–1375.

33. EC—European Commission. Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed; SANTE/11312/2021; DG SANTE: Bruxelles, Belgium, 2021; 46p.