PROGRESS IN PLANT PROTECTION
61 (1): 82-92, 2021
ISSN 1427-4337

DOI: 10.14199/ppp-2021-010
Published online: 30.03.2021

Received: 02.03.2021 / Accepted: 23.03.2021

Optymalizacja metod oznaczania 7 neonikotynoidów w pszczołach, miodach, dziko rosnących roślinach miododajnych i cieczach gutacyjnych

Optimization of the methods for the determination of 7 neonicotinoids in honey bees, honeys, melliferous weeds and guttation fluids

Izabela Hrynko*

Streszczenie

W pracy przedstawiono pionierskie badania jednoczesnego oznaczania 7 neonikotynoidów (acetamipryd, chlotianidyna, dinotefuran, imidachlopryd, nitenpyram, tiachlopryd, tiametoksam) w próbkach pszczół, miodu, cieczy gutacyjnej i dziko rosnących roślin miododajnych. W przypadku każdej matrycy zastosowano indywidualne podejście poddając optymalizacji: masę naważki analitycznej, rodzaj rozpuszczalnika ekstrahującego oraz skład sorbentów do oczyszczania. Zastosowanie unikalnych sorbentów do oczyszczania ekstraktów pozwoliło na usunięcie z próbki niepożądanych substancji interferujących, takich jak woski pszczele, lipidy, białka, aminokwasy, cukry, czy hormony roślinne. Identyfikacja analitów oraz ich analiza ilościowa została przeprowadzona techniką chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas. Średnie odzyski analizowanych związków mieściły się w akceptowalnych granicach 70–120% z względnym odchyleniem standardowym (RSD) ≤ 20%, poza kilkoma wyjątkami. Opracowane i zwalidowane metody pozwolą wyjaśnić szereg kwestii dotyczących potencjalnie negatywnego wpływu neonikotynoidów na zdrowie pszczół.

Słowa kluczowe: neonikotynoidy, pszczoły, produkty pszczele, optymalizacja, sorbent do oczyszczania

Summary

The present study discusses the pioneering research of simultaneous determination of 7 neonicotinoids (acetamiprid, clothianidin, dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram, thiacloprid, thiamethoxam) in honey bees, honey, guttation fluid and melliferous weeds samples. An individual approach was applied for each matrix, optimizing: the mass of the analytical sample, the kind of extraction solvent, and the composition of purification sorbents. Application of unique sorbents for purification of extracts enabled removal of interfering substances (i.e. beeswax, lipids, proteins, amino acids, sugars, and plant hormones) from the sample. The identification of analytes and their quantitative analysis has been performed through liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Average recoveries of the compounds under analysis fell within the acceptable range of 70–120%, with relative standard deviation (RSD) ≤ 20%, except several substances. Developed and validated methods will enable explanation of a number of issues concerning the potential adverse impact of neonicotinoids on honey bee health.

Key words: neonicotinoids, honey bees, bee products, optimization, „clean-up" sorbent

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Terenowa Stacja Doświadczalna w Białymstoku
Chełmońskiego 22, 15-195 Białystok
*corresponding author: i.hrynko@iorpib.poznan.pl
ORCID: 0000-0001-5836-0912

Wstęp / Introduction

Jedną z ważniejszych grup środków owadobójczych podejrzewanych o przyczynianie się do masowego ginięcia rodzin pszczelich są neonikotynoidy. Związki te zostały wprowadzone na rynek w połowie lat 90. XX wieku i od tego czasu są najczęściej stosowaną grupą insektycydów (Goulson 2013; Bass i wsp. 2015). Powszechność stosowania neonikotynoidów wynika z ich wysoce selektywnego działania, a także wyjątkowych właściwości biologicznych i chemicznych. Stanowią one ważną grupę insektycydów, skutecznych przeciwko szerokiej gamie szkodników ssących i gryzących, a zakres ich stosowania obejmuje szkodniki: zbóż, rzepaku, roślin bobowatych, tytoniu, ziemniaków, a także owoców ziarnkowych i warzyw.

Mechanizm działania neonikotynoidów różni się od środków ochrony roślin (ś.o.r.) starszej generacji, co pozwoliło przełamać odporność wytworzoną na niektóre pyretroidy i insektycydy fosforoorganiczne. Neonikotynoidy są spokrewnione z nikotyną i podobnie jak ona są antagonistami nikotynowych receptorów acetylocholiny (nAChR) (Kanne i wsp. 2005). Można je podzielić na trzy grupy: N-nitroguanidyny (imidachlopryd, tiametoksam, chlotianidyna i dinotefuran), N-cyjanoamidyny (acetamipryd i tiachlopryd) i nitrometyleny (nitenpyram) (Jeschke i wsp. 2011) (tab. 1).

Niejednorodność związków w tej grupie chemicznej przejawia się również różnym stopniem ich toksyczności dla organizmów niecelowych, w tym owadów pożytecznych i zapylających (Tomizawa i Casida 2005). Neonikotynoidy nitroguanidynowe cechuje bardzo wysoka toksyczność, a mierzona w mikrogramach wartość doustnej dawki śmiertelnej (ang. lethal dose, LD_{50}) trzech z nich (imidachloprydu, tiametoksamu, chlotianidyny) waha się pomiędzy 0,0037 i 0,081 µg/pszczołę (PPDB 2019). Obecnie unijne rozporządzenie zakazuje stosowania imidachloprydu, tiametoksamu i chlotianidyny (EFSA 2012). Podobna sytuacja spotkała tiachlopryd, z grupy neonikotynoidów cyjanoamidynowych, preparaty zawierające tę substancję czynną mogły być w sprzedaży do 3 listopada 2020 roku (www.gov.pl). To właśnie ze względu na wysoką toksyczność dla pszczół miodnych, neonikotynoidy są intensywnie badane na całym świecie, a przypadki występowania tych związków w pszczołach i produktach pszczelich są jednymi z najczęściej udokumentowanych w literaturze (Kasiotis i wsp. 2014).

Według Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. European Food Safety Authority, EFSA) w analizie przyczyn zatruć pszczół istotne znaczenie dla skutecznego monitorowania mają metody analityczne do identyfikacji neonikotynoidów w organizmach padłych pszczół, produktach pszczelich i materiale roślinnym, na które to wykonywane są aplikacje ś.o.r. (Dulin i wsp. 2013; Lu i wsp. 2018). Jednakże złożony skład matryc (Jankowska i Łozowicka 2021) oraz wymagane niskie granice oznaczalności powodują, że brakuje w tej dziedzinie analityki odpowiednich procedur analitycznych. Pomimo prycypinalnego postępu obserwowanego w ostatnich latach w analityce, oznaczanie pozostałości tych związków w matrycach biologicznych i roślinnych jest niezwykle złożonym procesem. Związane jest to ze specyfiką procedur przygotowania próbek, które oparte są na wieloetapowych operacjach oraz wynika z charakteru związków i próbki. Głównymi składnikami pszczół i produktów pszczelich są: woski pszczele, lipidy i białka.

Prawidłowe przygotowanie próbki determinuje jakość i wiarygodność wyniku oznaczenia. Jednakże etap ten jest wyjątkowo podatny na błędy i tylko odpowiednio przygotowany gwarantuje powtarzalną metodę oraz dokładny i niepodważalny wynik. Opracowana przez Anastassiadesa i wsp. (2003) metoda QuEChERS (ang. quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) polegająca na ekstrakcji i podziale w układzie ciecz–ciecz składników próbki z użyciem acetonitrylu, a następnie oczyszczeniu ekstraktu z wykorzystaniem metody dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej (ang. dispersive solid phase extraction, d-SPE), jest obecnie najczęściej wykorzystywaną techniką ekstrakcji w przygotowaniu próbek roślinnych, biologicznych i środowiskowych (Kaczyński i wsp. 2018; Łozowicka i wsp. 2019). Jednakże, aby sprostać wyzwaniom analitycznym, jakie stawia się obecnie przed laboratoriami (metody o niskich granicach oznaczalności, akceptowalne odzyski, efektywne usunięcie substancji interferujących, niski koszt) bardzo często konieczna jest modyfikacja kluczowych etapów przygotowania próbki, na które składają się masa naważki analitycznej, rodzaj/ilość rozpuszczalnika ekstrahującego oraz skład/proporcja sorbentów do oczyszczania.

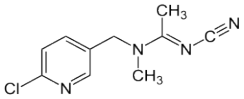
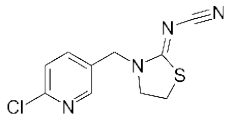
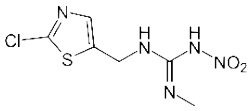
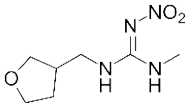
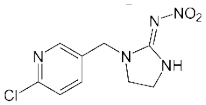
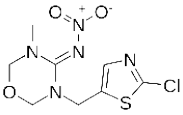
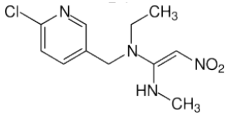
Celem niniejszej pracy była optymalizacja i modyfikacja kluczowych etapów procedury analitycznej umożliwiających oznaczenie na bardzo niskich poziomach stężeń 7 neonikotynoidów w matrycach pszczół, miodu, cieczy gutacyjnej i dziko rosnących roślin miododajnych będących pożytkiem pszczelim.

Materiały i metody / Materials and methods

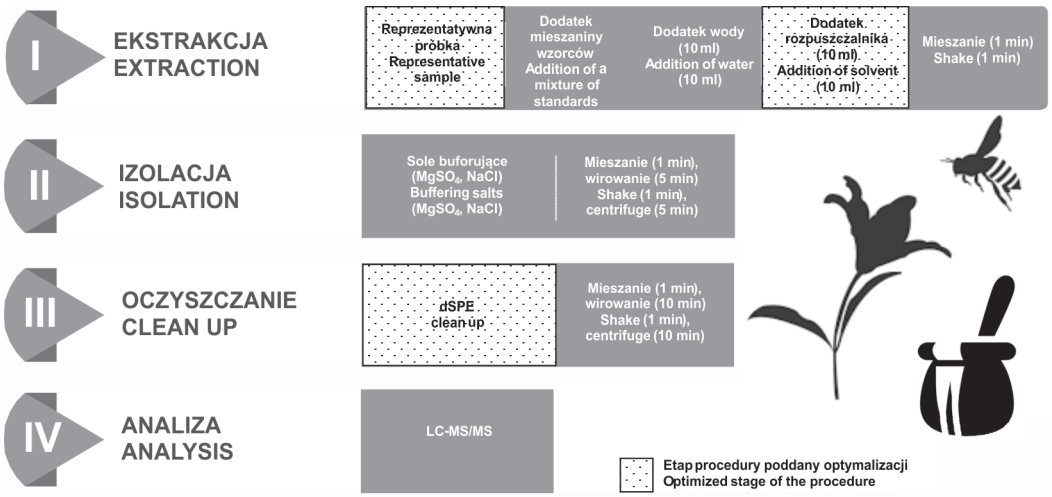
Materiał do badań stanowiły próbki: (i) pszczół (pozyskane od lokalnych pszczelarzy), (ii) miodu (pozyskane od lokalnych producentów miodu), (iii) dziko rosnących roślin miododajnych, takich jak chaber bławatek i mniszek lekarski (zebrane z terenów wokół pasiek) i (iv) cieczy gutacyjnej (pozyskanej z doświadczeń laboratoryjnych) wolne od pozostałości ś.o.r. (potwierdzone chromatograficznie).

Próbki pszczół, miodu, roślin miododajnych i cieczy gutacyjnej przygotowano przy użyciu metody QuEChERS i dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej przedstawionej na rysunku 1. i całościowo opisanej we wcześniejszej opubli-

Tabela 1. Właściwości chemiczne i toksykologiczne insektycydów z klasy neonikotynoidów
Table 1. Chemical and toxicological properties of neonicotinoid class of insecticides

Związek Compound	Masa molowa Molecular mass [g/mol]	Rozpuszczalność w wodzie Solubility in water [mg/l]	Log K_{ow}	Czas połowicznego rozkładu $t_{1/2}$ w glebie [dni] Half-life $t_{1/2}$ in soil [days]	Toksyczność dla pszczół miodnych Toxicity to honey bees
N-cyjanoamidyny – N-cyanoamidines					
Acetamipryd Acetamiprid 	222,7	2950	0,80	31–450[a]	umiarkowana moderate
Tiachlopryd Thiacloprid  $C_{10}H_9ClN_4S$	252,7	184	1,26	3,4–1000[a]	umiarkowana moderate
N-nitroguanidyny – N-nitroguanidines					
Chlotianidyna Clothianidin 	249,7	340	0,91	9–1250[a]	wysoka high
Dinotefuran Dinotefuran 	202,2	39830	–0,55	75–82[a]	wysoka high
Imidachlopryd Imidacloprid 	255,7	610	0,57	17–6931[a]	wysoka high
Tiametoksam Thiamethoxam 	291,7	4100	–0,13	6–3001[a]	wysoka high
Nitrometyleny – Nitromethylenes					
Nitenpyram Nitenpyram 	270,7	590000	–0,66	0–8[a]	wysoka high

Źródło: PPDB 2019, [a]Borsuah i wsp. (2020)



Rys. 1. Schemat przygotowania próbek
Fig. 1. Scheme of sample preparation

kowanej pracy (Hrynko i wsp. 2018). W toku badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy optymalizacji i modyfikacji poddano kluczowe etapy przygotowania próbki do badań. Analizowano wpływ: masy naważki analitycznej, rodzaju rozpuszczalnika ekstrahującego, a także oczyszczania próbki przy wykorzystaniu sorbentów o odmiennych właściwościach sorpcyjnych.

Do analizy pozostałości ś.o.r. techniką chromatografii cieczowej użyto chromatografu Eksigent Ultra LC-100 (Eksigent Technologies, Dublin, CA, USA). Separację analitów przeprowadzano na kolumnie KINETEX C18 (100 mm × 2,1 mm × 2,6 µm) utrzymywanej w temperaturze 40°C. Objętość wstrzykiwanej próbki wynosiła 10 µl. Zastosowanie elucji gradientowej z udziałem 0,5% roztworu kwasu mrówkowego z dodatkiem 2 mM mrówczanu amonu w wodzie (faza A) i w metanolu (faza B) pozwoliło osiągnąć zadowalające rozdzielenie badanych związków w czterech badanych matrycach. Elucję gradientową przeprowadzono przy natężeniu przepływu fazy ruchomej 0,4 ml/min, stosując program: 0–0,5 min (A: 95%, B: 5%), 5–7,5 min (A: 5%, B: 95%), 8–10 min (A: 95%, B: 5%). Zastosowano jonizację na drodze elektrorozpraszania (ang. electrospray ionization, ESI) w trybie tworzenia jonów dodatnich, charakteryzującą się następującymi parametrami: napięcie przyłożone do igły 5000 V, temperatura źródła 400°C, ciśnienie gazów: wspomagającego rozpylania 60 Pa, pomocniczego 50 Pa, osłonowego 30 Pa. Jako gaz rozpraszający i kolizyjny wykorzystano azot.

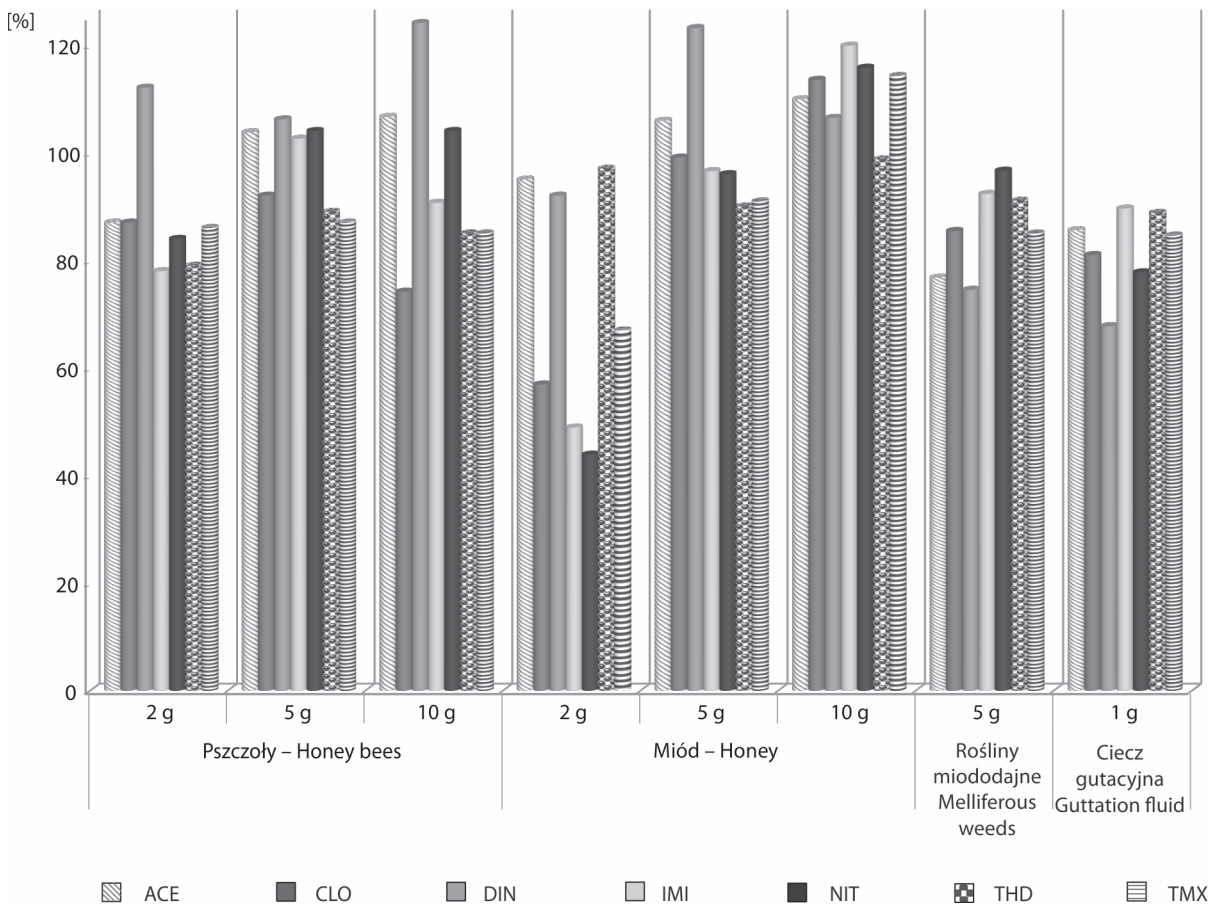
Wyniki i dyskusja / Results and discussion

W niniejszej pracy optymalizacji poddano te etapy procedury analitycznej, które według danych literaturowych mają największy wpływ na wynik analizy w złożonych matrycach pszczół i produktach pszczelich. W przypadku każdej badanej matrycy zastosowano indywidualne podejście, dobierając odpowiednią masę naważki analitycznej, rodzaj rozpuszczalnika ekstrahującego oraz skład sorbentów do oczyszczania. Wyniki oceniono na podstawie badań odzysków i efektów matrycowych związków.

Wpływ różnej masy próbki na odzysk analitów

Autorzy publikacji podejmujący problem oznaczania pozostałości neonikotynoidów w próbkach pszczół i produktów pszczelich w swoich metodach stosowali różne masy naważek próbek: 100 mg (Allgaier i wsp. 2019), 1 g (García-Valcárcel i wsp. 2019), 2 g (Gbylik-Sikorska i wsp. 2015), 5 g (Codling i wsp. 2016; Daniele i wsp. 2018) oraz 10 i 15 g (Jovanov i wsp. 2015).

W zaprezentowanych badaniach sprawdzono wpływ trzech naważek (2 g, 5 g i 10 g) na efektywność procesu ekstrakcji 7 neonikotynoidów w matrycy pszczół i miodu (rys. 2). Optymalną naważką dla matrycy pszczół okazała się naważka 5 g, zapewniając odzyski w zakresie 87–106% dla wszystkich badanych związków. Zastosowanie naważki mniejszej (2 g) i większej (10 g) dało nieznacznie gorsze wartości odzysków dla dinotefuranu (odzysk – 124%). Naważka 10 gramowa zapewniła odzyski w zakresie 99–120% dla wszystkich testowanych związków w matrycy miodu. W przypadku matrycy roślin miododajnych odgórnie zastosowano naważkę 5 gramową, uzyskując przy tym akceptowalne wartości odzysków w zakresie 75–97%. Ponadto taka proporcja próbki ułatwiła mieszanie jej z rozpuszczalnikiem, nie powodując przy tym nadmiernego rozcieńczenia analitu. Z uwagi na unikalność matrycy cieczy gutacyjnej do badań optymalizacyjnych zastosowano 1 gramową naważkę próbki. Odzyski analizowanych związków mieściły się w granicach 78−90% ze względnym odchyleniem standardowym (ang. relative standard deviation, RSD) poniżej 14%.

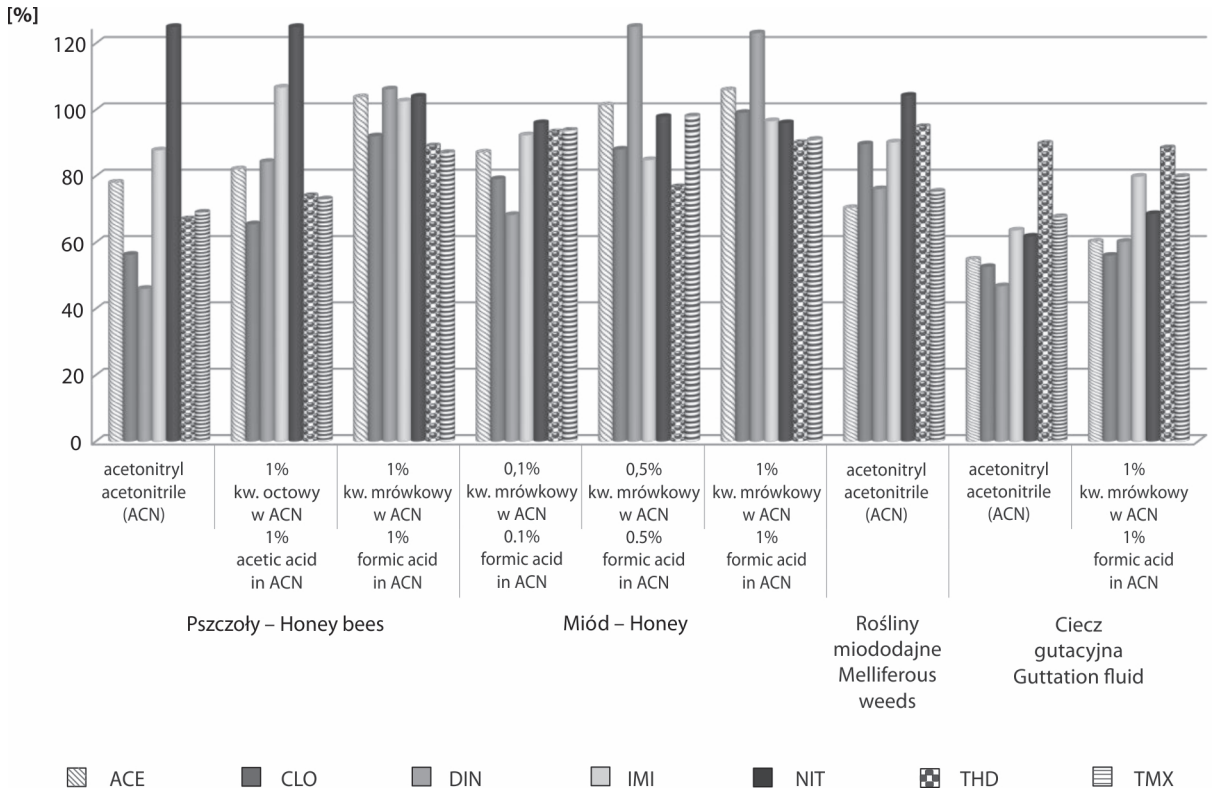


Rys. 2. Wpływ różnej masy próbki na odzysk
Fig. 2. Influence of different amount of samples on the extraction recovery

Wpływ rodzaju rozpuszczalnika na odzysk analitów

Ekstrakcja analitów z próbek z wykorzystaniem odpowiedniego rozpuszczalnika jest kluczowym krokiem w przenoszeniu zanieczyszczeń z matrycy pierwotnej do matrycy wtórnej. Odpowiednio dobrany rozpuszczalnik zapewnia optymalne warunki procesu ekstrakcji, pozwalające na maksymalny odzysk analitów (w zakresie 70–120%). W literaturze można znaleźć informacje o stosowaniu w procesie ekstrakcji ś.o.r. z próbek pszczół i produktów pszczelich różnych rozpuszczalników i ich mieszanin. Najbardziej popularnym ekstrahentem używanym do ekstrakcji jest acetonitryl (ACN). Zapewnia on wyższe odzyski i mniej zakłóceń matrycowych niż inne rozpuszczalniki, takie jak aceton czy metanol (Lehotay i wsp. 2010). Ponadto, łatwiej i skuteczniej ulega rozdzieleniu od wody po dodaniu soli ekstrakcyjnych. Stosowano go do ekstrakcji z próbek pszczół i pyłku pszczelego 7 neonikotynoidów (Codling i wsp. 2016), a także 2 i 4 neonikotynoidów z próbek miodu (Laaniste i wsp. 2016; Allgaier i wsp. 2019). Bardzo często w celu poprawy stabilności związków do acetonitrylu dodaje się różne kwasy (kwas cytrynowy, kwas mrówkowy lub kwas octowy) oraz bufor cytrynianowy, wodorowęglan sodu czy mrówczan amonu. W badaniach prowadzonych przez García-Valcárcel i wsp. (2019) dodatek kwasu octowego do acetonitrylu poprawił odzyski związków (76,9–104,9%). Użycie do ekstrakcji 1% roztworu kwasu octowego w acetonitrylu również poprawiło efektywność ekstrakcji (odzyski 70–120%) w badaniach Kiljanka i wsp. (2017).

W niniejszych badaniach w zależności od rodzaju zastosowanego rozpuszczalnika otrzymano różne odzyski analitów dla poszczególnych matryc (rys. 3). W przypadku matrycy pszczół zastosowanie acetonitrylu skutkowało uzyskaniem nieakceptowalnych wartości odzysków dla 71% związków. Zmodyfikowanie składu rozpuszczalnika poprzez dodatek kwasu mrówkowego nieznacznie poprawiło odzyski. W przypadku tej matrycy najkorzystniejsze okazało się zastosowanie jako rozpuszczalnika ekstrahującego 1% kwasu octowego w acetonitrylu (odzyski w przedziale 87–106%, przy RSD < 18%). Zastosowanie 1% kwasu mrówkowego w acetonitrylu poprawiło efektywność wymywania analitów w matrycy miodu (odzyski w przedziale 90–106%, za wyjątkiem dinotefuranu – 123%). Z kolei sam acetonitryl zapewnił akceptowalne odzyski dla wszystkich analitów w matrycy roślin miododajnych i cieczy gutacyjnej.



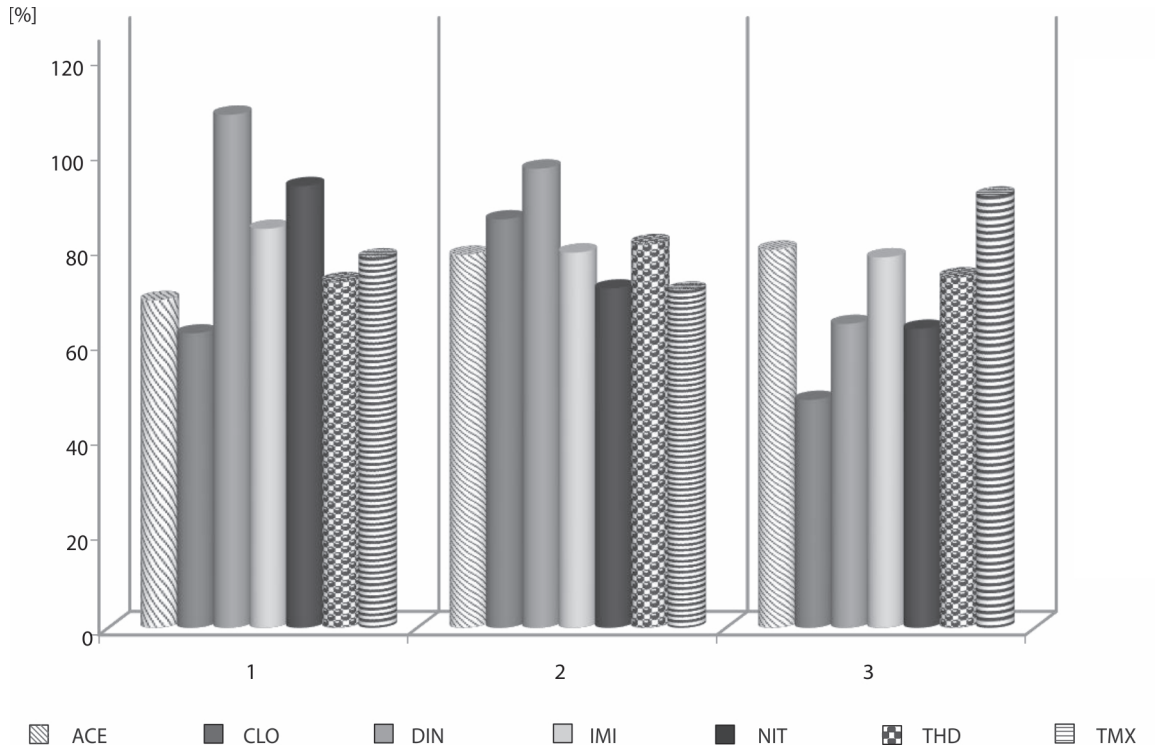
Rys. 3. Wpływ rodzaju rozpuszczalnika na odzysk
Fig. 3. Influence of different type of solvent on the extraction recovery

Wpływ oczyszczania próbki (d-SPE) – efekt „clean-up" na odzysk analitów i efekt matrycy

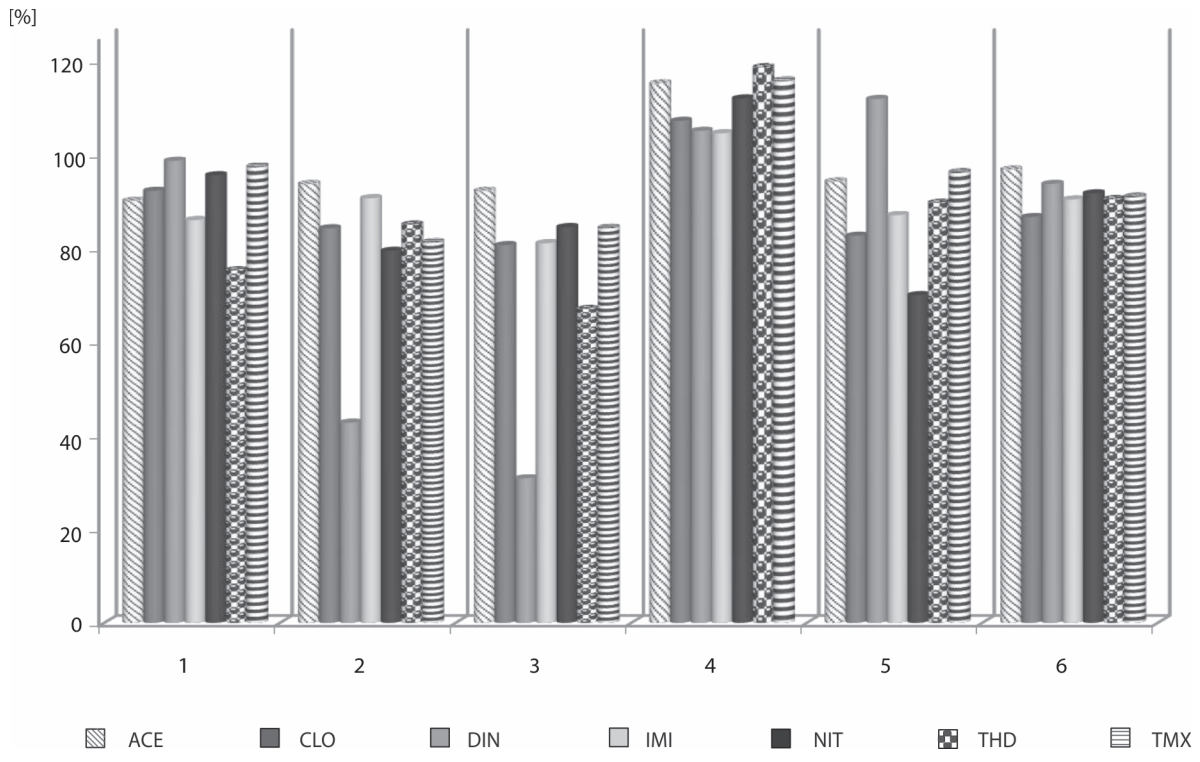
Próbki pszczół, produktów pszczelich, dziko rosnących roślin miododajnych, czy cieczy gutacyjnej, ze względu na bardzo skomplikowaną strukturę fizykochemiczną matrycy (zawartość wosków pszczelich, lipidów, białek, aminokwasów, cukrów, hormonów roślinnych), wymagają zastosowania etapu oczyszczania ekstraktu, w trakcie którego powinny zostać usunięte składniki niepożądane podczas analizy chromatograficznej. W literaturze można znaleźć informacje o wykorzystaniu różnego rodzaju sorbentów w procesie oczyszczania ekstraktów pszczół i produktów pszczelich. Pierwszo-drugorzędowa amina (ang. primary secondary amine, PSA) jest najczęściej stosowanym sorbentem w celu usunięcia z próbki kwasów organicznych, cukrów, kwasów tłuszczowych i niektórych pigmentów (Arias i wsp. 2014). Czarny węgiel grafityzowany (ang. graphitized carbon black, GCB) skutecznie usuwa pigmenty i sterole (Łozowicka i wsp. 2021). Florisil, oktadecylosilan (C18) i EMR-Lipid znalazły zastosowanie w matrycach tłuszczowych, takich jak awokado, czy tkanki zwierzęce (Han i wsp. 2016; Kaczyński i wsp. 2017; Łozowicka i wsp. 2021).

Do niniejszych badań wytypowano następujące, charakteryzujące się zróżnicowanymi właściwościami sorpcyjnymi, rodzaje sorbentów i ich kombinacje: (i) pszczoły: EMR-Lipid, Z-Sep+, chityna; (ii) miód: chitosan, tlenek glinu, żel krzemionkowy, C8, C18, chitosan/tlenek glinu/C8; (iii) dziko rosnące rośliny miododajne (chaber bławatek, mniszek lekarski): Z-Sep, PSA/GCB/$MgSO_4$, PSA/C18/ENVI-Carb/$MgSO_4$; (iv) ciecz gutacyjna: tlenek grafenu, PSA/C18/GCB/$MgSO_4$, Fe_3O_4MNPs, Z-Sep (rys. 4a–4d). Spośród przetestowanych różnych sorbentów w matrycy pszczół najlepsze wyniki uzyskano dla sorbentu EMR-Lipid (odzyski w przedziale 71–97%, przy RSD < 10%). Połączenie trzech sorbentów (chitosanu, tlenku glinu i C8) pozwoliło na uzyskanie dobrej skuteczności metody w przypadku matrycy miodu (odzyski w przedziale 87–94%, przy RSD < 20%). W przypadku roślin miododajnych w zależności od zastosowanej strategii oczyszczania najefektywniejsze okazało się zastosowanie sorbentu PSA/C18/ENVI-Carb/$MgSO_4$, który dla wszystkich związków zapewnił odzyski w akceptowalnym zakresie (chaber bławatek: 83–110%; mniszek lekarski: 82–111%). Analizując wyniki uzyskane z przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, iż zastosowanie tlenku grafenu zapewniło dobre odzyski w matrycy cieczy gutacyjnej (70–109%).

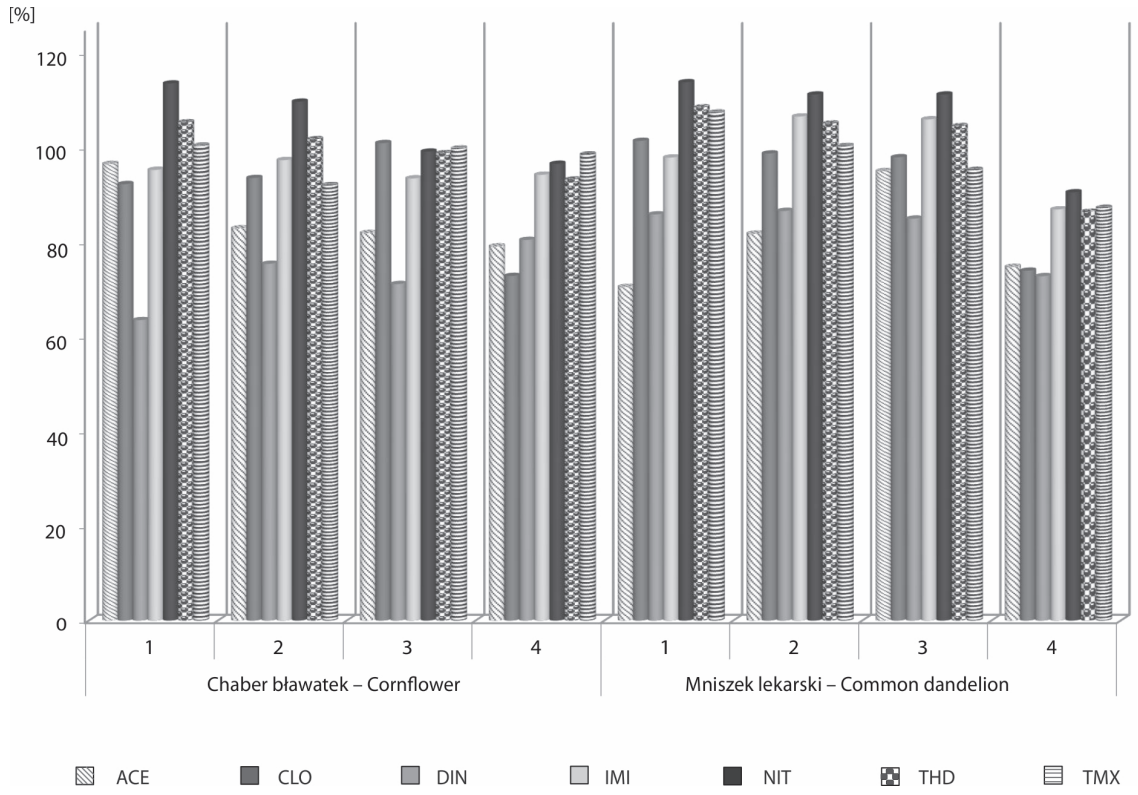
Istotnym zagadnieniem podczas etapu oczyszczania ekstraktów okazały się badania efektu matrycy (ang. matrix effect, ME) (Rutkowska i wsp. 2019). Spośród przetestowanych różnych sorbentów i ich kombinacji, najefektywniejsze pod względem minimalizacji efektu matrycy, okazało się zastosowanie sorbentów: (i) pszczoły: EMR-Lipid;



Rys. 4a. Wpływ różnych sorbentów na odzysk pestycydów
Pszczoły (1: chityna, 2: EMR-Lipid, 3: Z-Sep+)
Fig. 4a. Influence of different sorbents on the extraction recovery
Bees (1: chitin, 2: EMR-Lipid, 3: Z-Sep+)

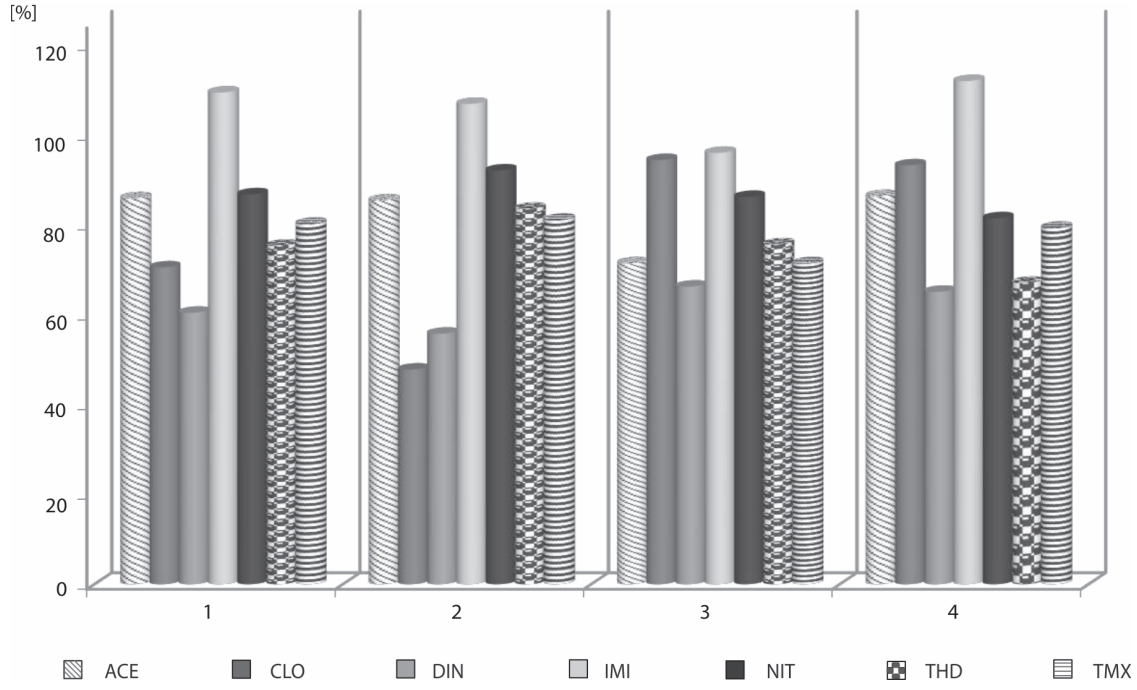


Rys. 4b. Wpływ różnych sorbentów na odzysk pestycydów
Miód (1: chitosan, 2: tlenek glinu, 3: żel krzemionkowy, 4: C18, 5: C8, 6: chitosan/tlenek glinu/C8)
Fig. 4b. Influence of different sorbents on the extraction recovery
Honey (1: chitosan, 2: aluminium oxide, 3: silica gel, 4: C18, 5: C8, 6: chitosan/aluminum oxide/C8)



Rys. 4c. Wpływ różnych sorbentów na odzysk pestycydów
Dziko rosnące rośliny miododajne: chaber bławatek, mniszek lekarski (1: Z-Sep, 2: PSA/C18/ENVI-Carb/$MgSO_4$, 3: PSA/GCB/$MgSO_4$, 4: chitosan)

Fig. 4c. Influence of different sorbents on the extraction recovery
Melliferous weeds: cornflower, common dandelion (1: Z-Sep, 2: PSA/C18/ENVI-Carb/$MgSO_4$, 3: PSA/GCB/$MgSO_4$, 4: chitosan)



Rys. 4d. Wpływ różnych sorbentów na odzysk pestycydów
Ciecz gutacyjna (1: tlenek grafenu, 2: Fe_3O_4MNPs, 3: PSA/C18/GCB/$MgSO_4$, 4: Z-Sep)

Fig. 4d. Influence of different sorbents on the extraction recovery
Guttation fluid (1: graphene oxide, 2: Fe_3O_4MNPs, 3: PSA/C18/GCB/$MgSO_4$, 4: Z-Sep)

Tabela 2. Optymalne warunki procesu ekstrakcji dla 7 neonikotynoidów w matrycy pszczół, miodu, dziko rosnących roślin miododajnych i cieczy gutacyjnej
Table 2. Optimal conditions for the extraction process for 7 neonicotinoids in honey bees, honey, guttation fluid and melliferous weeds matrix

Warunki procesu ekstrakcji Conditions for the extraction process	Matryca – Matrix			
	pszczoły miodne honey bess	miód honey	dziko rosnące rośliny miododajne melliferous weeds	ciecz gutacyjna guttation fluid
Masa naważki analitycznej The mass of the analytical sample	5 g	10 g	5 g	1 g
Rodzaj rozpuszczalnika ekstrahującego The kind of extraction solvent	1% kwas octowy w acetonitrylu 1% acetic acid in acetonitrile	1% kwas mrówkowy w acetonitrylu 1% formic acid in acetonitrile	acetonitryl acetonitrile	acetonitryl acetonitrile
Sorbent do oczyszczania „Clean-up" sorbent	EMR-Lipid	chitosan/tlenek glinu/C8 chitosan/aluminum oxide/C8	PSA/C18/ENVI-Carb/$MgSO_4$ PSA/C18/ENVI-Carb/$MgSO_4$	tlenek grafenu graphene oxide
Odzysk – Recovery [%]	71–97	87–94	82–111	70–109
Względne odchylenie standardowe Relative standard deviation RSD [%]	4–9	4–19	6–20	5–10

(ii) miód: chitosan/tlenek glinu/C8; (iii) dziko rosnące rośliny miododajne: PSA/C18/ENVI-Carb/$MgSO_4$; (iv) ciecz gutacyjna: tlenek grafenu. Efekt matrycowy powodował jedynie niewielkie osłabienie lub wzmocnienie sygnałów badanych związków, a jego wartość w zdecydowanej większości mieściła się w akceptowalnym zakresie (–20% < ME < 20%). W tabeli 2. przedstawiono optymalne warunki procesu ekstrakcji dla 7 neonikotynoidów w matrycy pszczół, miodu, dziko rosnących roślin miododajnych i cieczy gutacyjnej.

Ze względu na ogromną wagę uzyskiwanych wyników, opracowane procedury badawcze poddano walidacji w oparciu o przewodnik SANTE (SANTE/12682/2019) i uzyskano zadawalające parametry walidacyjne. Wyznaczono: odzysk, precyzję, liniowość, granicę wykrywalności i oznaczalności, efekt matrycy oraz niepewność. Średnie odzyski analizowanych związków mieściły się w granicach 70−120% w badanym zakresie stężeń 0,001–0,500 mg/kg ze względnym odchyleniem standardowym RSD niższym niż 20%. Opracowane metody są konkurencyjne wobec innych metod, np. w metodzie opisanej przez Codling i wsp. (2016) wartości odzysków 7 neonikotynoidów wahały się w granicach od 51 do 68%, z kolei opracowana przez Valverde i wsp. (2018) metodyka charakteryzowała się granicą oznaczalności 7 neonikotynoidów w zakresie 0,05–0,3 mg/kg.

Wnioski / Conclusions

1. Oryginalność niniejszej pracy polegała na opracowaniu metod umożliwiających oznaczenie na bardzo niskich poziomach stężeń 7 neonikotynoidów w czterech matrycach: pszczołach, miodzie, cieczy gutacyjnej i wybranych gatunkach dziko rosnących roślin miododajnych.
2. Optymalizacji poddano trzy kluczowe etapy przygotowania próbki do badań: masę naważki analitycznej, rodzaj rozpuszczalnika ekstrahującego oraz skład sorbentów do oczyszczania.
3. W przypadku każdej matrycy zastosowano indywidualne podejście, oceniając wyniki na podstawie badań odzysków i efektów matrycowych poszczególnych związków.
4. Właściwe dobranie warunków przygotowania próbki analitycznej pozwoliło opracować metody charakteryzujące się niskimi granicami oznaczalności, akceptowalnymi odzyskami i efektywnym usunięciem substancji interferujących.
5. Przeprowadzony proces walidacyjny potwierdził spełnienie kryteriów Komisji Europejskiej, w związku z czym opracowane metody wdrożono do rutynowych badań.

Literatura / References

Allgaier M., Halder J.M., Kittelberger J., Hauer B., Nebel B.A. 2019. A simple and robust LC-ESI single quadrupole MS-based method to analyze neonicotinoids in honey bee extracts. MethodsX 6: 2484–2491. DOI: 10.1016/j.mex.2019.09.038

Anastassiades M., Lehotay S.J., Stajnbaher D., Schenck F.J. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive soildphase extraction for the determination of pesticide residues in produce. Journal of AOAC International 86 (2): 412–431. DOI: 10.1093/jaoac/86.2.412

Arias J.L.O., Rombaldi C., Caldas S.S., Primel E.G. 2014. Alternative sorbents for the dispersive solid-phase extraction step in quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction of pesticides from rice paddy soils with determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1360: 66–75. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.07.082

Bass C., Denholm I., Williamson M.S., Nauen R. 2015. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. Pesticide Biochemistry and Physiology 121: 78–87. DOI: 10.1016/j.pestbp.2015.04.004

Borsuah J.F., Messer T.L., Snow D.D., Comfort S.D., Mittelstet A.R. 2020. Literature review: global neonicotinoid insecticide occurrence in Aquatic Environments. Water 12 (12): 3388. DOI: 10.3390/w12123388

Codling G., Al Naggar Y., Giesy J.P., Robertson A.J. 2016. Concentrations of neonicotinoid insecticides in honey, pollen and honey bees (*Apis mellifera* L.) in central Saskatchewan, Canada. Chemosphere 144: 2321–2328. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.10.135

Daniele G., Giroud B., Jabot C., Vulliet E. 2018. Exposure assessment of honeybees through study of hive matrices: analysis of selected pesticide residues in honeybees, beebread, and beeswax from French beehives by LC-MS/MS. Environmental Science and Pollution Research 25: 6145–6153. DOI: 10.1007/s11356-017-9227-7

Dulin F., Halm-Lemeille M.P., Lozano S., Lepailleur A., Sopkova-de Oliveira Santos J., Rault S., Bureau R. 2013. Guidance on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). EFSA Journal 11 (7): 3295. DOI: 10.2903/j.efsa.2013.3295

EFSA (European Food Safety Authority) 2012. Statement on the findings in recent studies investigating sub-lethal effects in bees of some neonicotinoids in consideration of the uses currently authorised in Europe. EFSA Journal 10 (6): 2752. DOI: 10.2903/j.efsa.2012.2752

García-Valcárcel A.I., Martínez-Ferrer M.T., Campos-Rivela J.M., Hernando Guil M.D. 2019. Analysis of pesticide residues in honeybee (*Apis mellifera* L.) and in corbicular pollen. Exposure in citrus orchard with an integrated pest management system. Talanta 204: 153–162. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.05.106

Gbylik-Sikorska M., Sniegocki T., Posyniak A. 2015. Determination of neonicotinoid insecticides and their metabolites inhoney bee and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B 990: 132–140. DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.03.016

Goulson D. 2013. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. Journal of Applied Ecology 50 (4): 977–987. DOI: 10.1111/1365-2664.12111

Han L., Matarrita J., Sapozhnikova Y., Lehotay S.J. 2016. Evaluation of a recent product to remove lipids and other matrix coextractives in the analysis of pesticide residues and environmental contaminants in foods. Journal of Chromatography A 1449: 17–29. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.04.052

Hrynko I., Łozowicka B., Kaczyński P. 2018. Liquid chromatographic MS/MS analysis of a large group of insecticides in honey by modified QuEChERS. Food Analytical Methods 11: 2307–2319. DOI: 10.1007/s12161-018-1208-z

Jankowska M., Łozowicka B. 2021. Naturalne i syntetyczne substancje toksyczne występujące w roślinach rolniczych i ich produktach. [Natural and synthetic toxic substances occurring in agricultural plants and their products]. Progress in Plant Protection 61 (1). DOI: 10.14199/ppp-2021-003

Jeschke P., Nauen R., Schindler M., Elbert A. 2011. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59 (7): 2897–2908. DOI: 10.1021/jf101303g

Jovanov P., Guzsvány V., Lazić S., Franko M., Sakač M., Šarić L., Kos J. 2015. Development of HPLC-DAD method for determination of neonicotinoids in honey. Journal of Food Composition and Analysis 40: 106–113. DOI: 10.1016/j.jfca.2014.12.021

Kaczyński P., Hrynko I., Łozowicka B. 2017. Evolution of novel sorbents for effective clean-up of honeybee matrix in highly toxic insecticide LC/MS/MS analysis. Ecotoxicology and Environmental Safety 139: 124–131. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.01.033

Kaczyński P., Hrynko I., Rutkowska E., Mojsak P., Szabuńko J., Łozowicka B. 2018. Optymalizacja wielopozostałościowej metody oznaczania pozostałości pestycydów w warzywach korzeniowych. [Optimization of the multiresidue method for the determination of pesticide residues in root vegetables]. Progress in Plant Protection 58 (1): 13–21. DOI: 10.14199/ppp-2018-001

Kanne D.B., Dick R.A., Tomizawa M., Casida J.E. 2005. Neonicotinoid nitroguanidine insecticide metabolites: synthesis and nicotinic receptor potency of guanidines, aminoguanidines, and their derivatives. Chemical Research in Toxicology 18 (9): 1479–1484. DOI: 10.1021/tx050160u

Kasiotis K.M., Anagnostopoulos C., Anastasiadou P., Machera K. 2014. Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC-MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. Science of The Total Environment 485–486: 633–642. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.03.042

Kiljanek T., Niewiadowska A., Gaweł M., Semeniuk S., Borzęcka M., Posyniak A., Pohorecka K. 2017. Multiple pesticide residues in live and poisoned honeybees – Preliminary exposure assessment. Chemosphere 175: 36–44. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.02.028

Laaniste A., Leito I., Rebane R., Lõhmus R., Lõhmus A., Punga F., Kruve A. 2016. Determination of neonicotinoids in Estonian honey by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. Journal of Environmental Science and Health, Part B 51 (7): 455–464. DOI: 10.1080/03601234.2016.1159457

Lehotay S.J., Son K.A., Kwon H., Koesukwiwat U., Fu W., Mastovska K., Hoh E., Leepipatpiboon N. 2010. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. Journal of Chromatography A 1217 (16): 2548–2560. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.01.044

Lu C., Chang C.H., Palmer C., Zhao M., Zhang Q. 2018. Neonicotinoid residues in fruits and vegetables: an integrated dietary exposure assessment approach. Environmental Science & Technology 52 (5): 3175–3184. DOI: 10.1021/acs.est.7b05596

Łozowicka B., Jankowska M., Rutkowska E., Lulewicz M., Kaczyński P., Konecki R., Iwaniuk P. 2019. Wpływ sorbentów „clean-up" na odzysk i efekt matrycy w wielopozostałościowej metodzie oznaczania pestycydów w winie. [Impact of „clean-up" sorbents on the recovery and the matrix effect in the multi-residue method for the determination of pesticides in wine]. Progress in Plant Protection 59 (4): 206–213. DOI: 10.14199/ppp-2019-027

Łozowicka B., Kaczyński P., Iwaniuk P. 2021. Analysis of 22 free amino acids in honey from Eastern Europe and Central Asia using LC-MS/MS technique without derivatization step. Journal of Food Composition and Analysis 98: 103837. DOI: 10.1016/j.jfca.2021.103837

PPDB 2019. Pesticide Properties Database. University of Hertfordshire, Anglia. https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/ [dostęp: 24.02.2021].

Rutkowska E., Łozowicka B., Kaczyński P. 2019. Three approaches to minimize matrix effects in residue analysis of multiclass pesticides in dried complex matrices using gas chromatography tandem mass spectrometry. Food Chemistry 279: 20–29. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.11.130

SANTE/12682/2019. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.

Tomizawa M., Casida J.E. 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 45: 247–268. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930

Valverde S., Ibáñez M., Bernal J.L., Nozal M.J., Hernández F., Bernal J. 2018. Development and validation of ultra high performance-liquid chromatography-tandem mass spectrometry based methods for the determination of neonicotinoid insecticides in honey. Food Chemistry 266: 215–222. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.06.004

www.gov.pl/web/rolnictwo/komunikat---nowe-terminy-na-sprzedaz-i-stosowanie-srodkow [dostęp: 24.02.2021].