

Received: 21.02.2022 / Accepted: 04.03.2022

ARTYKUŁ ORYGINALNY

Optimalizacja metody jednoczesnego oznaczania 248 pestycydów w suszonych owocach

Optimization of the method for the simultaneous determination of 248 pesticides in dry fruit

Ewa Rutkowska^{A*}, Bożena Łozowicka^B, Piotr Kaczyński^C

Streszczenie

Celem badań było przeprowadzenie optymalizacji metody jednoczesnego oznaczania 248 pestycydów w modelowych matrycach o niskiej zawartości wody (suszone owoce aronii, jabłek, porzeczek) przy wykorzystaniu techniki chromatografii gazowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas w oparciu o zmodyfikowany protokół QuEChERS. Badania koncentrowano na doborze: 1) dodatku wody (5 ml; 7,5 ml; 10 ml), 2) masy próbki (2 g; 5 g; 10 g), 3) polarności rozpuszczalnika (aceton; acetonitryl; octan etylu) oraz 4) sorbentów etapu oczyszczania (PSA/ENVI-Carb/MgSO₄; ChloroFiltr/PSA/MgSO₄; Chitosan; Chityna). Zastosowanie układu 2 g próbki/10 ml wody/10 ml acetonitrylu/PSA/ENVI-Carb/MgSO₄ umożliwiło uzyskanie akceptowalnych parametrów walidacyjnych. Odzyski analizowanych związków mieściły się w granicach 63–118%, a względne odchylenie standardowe poniżej 18% w zakresie stężeń (0,005–1,00 mg/kg). Nieistotnym efektem matrycy (–20% < ME < 20%) charakteryzowało się ponad 90% analizowanych związków. Metodę zaadaptowano do rutynowych badań i rozszerzono o inne matryce.

Słowa kluczowe: suszone owoce, pozostałości ś.o.r., chromatografia gazowa, metoda analityczna, optymalizacja

Abstract

The aim of this study was to optimize the method of simultaneous determination of 248 pesticides in model matrices of fruit with a low water content (chokeberry, apples, currants) using the gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry based on the modified QuEChERS protocol. The research focused on the selection of: 1) water addition (5 ml; 7.5 ml; 10 ml), 2) sample mass (2 g; 5 g; 10 g), 3) the polarity of the solvent (acetone, acetonitrile, ethyl acetate) and 4) clean-up sorbents (PSA/ENVI-Carb/MgSO₄; ChloroFiltr/PSA/MgSO₄; Chitosan; Chitin). The use of the 2 g sample/10 ml water/10 ml acetonitrile/PSA/ENVI-Carb/MgSO₄ system allowed to obtain acceptable validation parameters. The recoveries of the analyzed compounds were within the range of 63–118%, and the relative standard deviation below 18% in the concentration range (0.005–1.00 mg/kg). More than 90% of the analyzed compounds had a negligible matrix effect (–20% < ME < 20%). The method was applied to routine analysis and extended to other matrices.

Key words: dry fruit, pesticide residues, gas chromatography, analytical method, optimization

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Terenowa Stacja Doświadczalna w Białymstoku
Chełmońskiego 22, 15-195 Białystok

*corresponding author: e.rutkowska@iorpib.poznan.pl

ORCID: ^A0000-0002-4885-9127, ^B0000-0002-2760-3333, ^C0000-0002-3511-752X

Wstęp / Introduction

W celu uzyskania odpowiedniej jakości plonów, jak i ochrony drzew i krzewów owocowych, ze względu na ich wysoką podatność na agrofagi, tj. szkodniki i choroby, stosuje się środki ochrony roślin (ś.o.r.). Konsekwencją chemicznej ochrony roślin może być występowanie ich pozostałości w surowych owocach, jak też w produkcie końcowym – suszu owocowym (Zhao i wsp. 2014).

Suszone owoce charakteryzują się niską zawartością wody i wysoką zawartością węglowodanów. Powstają w wyniku termicznego procesu technologicznego jakim jest suszenie, podczas którego świeże owoce tracą 80–90% wody. Zaletą takiej obróbki jest zachowanie trwałości, wartości odżywczych i walorów smakowych z możliwością trwałego przechowywania oraz konsumpcji przez cały rok. W Polsce wielkość produkcji owoców suszonych wynosi 8 tys. ton rocznie, głównie jabłek i śliwek, a na całym świecie 2,5 mln ton, gdzie ponad 50% stanowią winogrona (rodzynki), daktyl, śliwki, morele oraz figi (Varela-Martínez i wsp. 2019).

Biorąc pod uwagę zapewnienie bezpieczeństwa konsumentów, koniecznym jest monitorowanie poziomu pozostałości ś.o.r. w suszonych produktach. Dlatego też, w celu skutecznej ich oceny niezbędna jest procedura analityczna, która pozwoli na oddzielenie występujących na poziomie śladowym pozostałości ś.o.r. od obecnych w wielokrotnie wyższych stężeniach substancji przeszkadzających. W chwili obecnej najbardziej uniwersalną metodą przygotowania próbek do badań jest wprowadzona przez Anastasiadesa i wsp. (2003) metoda QuEChERS (ang. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe). Największą jej zaletą jest elastyczność, dzięki czemu stwarza duże możliwości modyfikacji pod kątem badanych związków czy rodzaju matrycy (Perestrelo i wsp. 2019). Znalazła ona szerokie zastosowanie do oznaczeń pozostałości ś.o.r. w materiale roślinnym z wysoką zawartością: wody (owoce, warzywa) (Lee i wsp. 2018); węglowodanów (miód) (Hrynkó i wsp. 2018); tłuszczu (nasiona roślin oleistych, oleje roślinne) (Hakme i wsp. 2018); białka (zboża) (He i wsp. 2015); niską zawartością wody (herbata, zioła) (Rutkowska i wsp. 2019); produktach alkoholowych (piwo, wino) (Łozowicka i wsp. 2019, 2021) oraz pochodzenia zwierzęcego (mleko) (Tripathy i wsp. 2019), jak i w różnych elementach środowiska (Đurović-Pejčev i wsp. 2018), czy organizmach pożytecznych (pszczoły i produkty pszczele) (Roszko i wsp. 2016; Kaczyński i wsp. 2017).

W dostępnej literaturze naukowej brak jest opisanych metod oznaczania szerokiego spektrum ś.o.r. w materiale roślinnym charakteryzującym się niską zawartością wody i wysoką zawartością węglowodanów, a doniesienia dotyczą badań wybranych pojedynczych grup związków oraz matrycy (suszone jabłka, rodzynki) (Zhao i wsp. 2014; Rasche i wsp. 2015; Liu i wsp. 2016; Varela-Martínez i wsp. 2019).

Analiza pozostałości ś.o.r. w suszu owocowym jest trudnym procesem ze względu na złożoność matrycy oraz występowanie badanych analitów na niskich poziomach stężeń (0,001–0,01 mg/kg). Obecność substancji koelujących (pigmenty, węglowodany, minerały, błonnik, kwasy organiczne oraz witaminy), które interferują z badanymi analitami, prowadzi do pogorszenia parametrów rozdzielania chromatograficznego (poszerzenia i ogonowania pików chromatograficznych), a także zakłóceń pracy sprzętu wykorzystywanego do analizy, co w konsekwencji prowadzi do zafałszowania wyniku badań (Rutkowska i wsp. 2019).

Celem pracy była wieloetapowa optymalizacja procesu przygotowania, ekstrakcji i oczyszczania oraz selektywna detekcja 248 substancji czynnych (s.cz.) w modelowych matrycach suszonych owoców przy wykorzystaniu techniki chromatografii gazowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (GC-MS/MS) w oparciu o protokół QuEChERS.

Materiały i metody / Materials and methods

Materiał do badań stanowiły reprezentatywne próbki suszu owocowego aronii, jabłek oraz porzeczek, wolnych od pozostałości ś.o.r. (potwierdzone chromatograficznie techniką GC-MS/MS). Badaniami objęto 248 substancji czynnych z grupy akarycydów (8 s.cz.), fungicydów (81 s.cz.), herbicydów (47 s.cz.), insektycydów (108 s.cz.), regulatorów wzrostu (3) oraz repelentów (1) (tab. 1).

Naważkę 2 g, 5 g, 10 g rozdrobnionej próbki umieszczono w probówkach polipropylenowych o pojemności 50 ml, następnie dodano wodę: 5 ml, 7,5 ml, 10 ml, po czym wytrząsano 20 sekund i pozostawiono na 10 minut. W kolejnym kroku dodano 50 µl 20 µg/ml fosforanu trifenylu oraz 10 ml rozpuszczalnika: acetonitrylu, acetonu, octanu etylu. Całość energicznie wytrząsano 1 minutę, po czym dodano mieszaninę soli buforujących: 4 g MgSO_4 (bezwodny siarczan magnezu), 1 g NaCl, 1 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (uwodniony cytrynian trisodu) oraz 0,5 g $\text{Na}_2\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}$ (uwodniony wodorocytrynian disodu), wytrząsano jedną minutę, a następnie wirowano przez 5 minut przy 4500 obr./min. Sześć mililitrów ekstraktu przeniesiono do 15 ml probówek polipropylenowych zawierających pojedyncze sorbenty lub mieszaniny sorbentów 150 mg PSA/45 mg ENVI-Carb/900 mg MgSO_4 , 50 mg ChloroFiltr/50 mg PSA/150 mg MgSO_4 , 200 g Chitosanu, 200 g Chityny. Całość wytrząsano, po czym wirowano przez 10 minut przy 4500 obr./min. Cztery mililitry warstwy organicznej przeniesiono do kolbki i dodano 50 µl 5 µg/ml kwasu mrówkowego i dwie krople dodekanu, po czym oddestylowano na wyparce próżniowej i suchą pozostałość rozpuszczono w 2 ml mieszaniny heksan/aceton (9 : 1, v/v). Roztwór przepuszczano przez filtr strzykawkowy PTFE 0,45 µm, do fiolki automatycznego podajnika próbek GC-MS/MS. Schemat przygotowania próbki suszonych owoców do badań przedstawiono na

Tabela 1. Oznaczane substancje czynne środków ochrony roślin

Table 1. Determined active substances of plant protection products

Grupa środków ochrony roślin (ilość badanych substancji czynnych) Group of pesticides (number of tested active substances)	Substancja czynna Active substance
1	2
Akarycydy (8) Acaricides (8)	bromopropylat, chlorfenson, dikofol, etoksazol, heksytiazoks, propargit, tebufenpyrad, tetradifon bromopropylate, chlorfenson, dicofol, etoxazole, hexythiazox, propargite, tebufenpyrad, tetradifon
Insektycydy (108) Insecticides (108)	acefat, acetamipryd, akrynatryna, aldryna, amitraz, azynofos etylowy, azynofos metylowy, bifenazat, bifentryna, bromofos etylowy, bromofos metylowy, buprofezyna, kadusafos, karbaryl, karbofuran, karbosulfan, chlordane cis, chlordane trans, chlorantraniprol, chlorfenwinfos, chlorobenzylat, chlorpiryfos, chlorpiryfos metylowy, cyflutryna, λ -cyhalotryna, γ -cyhalotryna, cypermetyryna, DDT (suma op'-DDT, pp'-DDD, pp'-DDE, pp'-DDT), dieldyna, deltametryna, diazinon, dichlorfos, dikrotofos, DEET, dimetoat, α -endosulfan, β -endosulfan, siarczan endosulfanu, endryna, EPN, esfenwalerat/fenwalerat, etion, etoprofos, etofenproks, fenamifos, fenazachina, fenchlorfos, fenitrotrion, fenoksykarb, fenpropatryna, fenpiroksymat, fention, fipronil, flonikamid, formotion, fostiazat, α -HCH, β -HCH, γ -HCH (lindan), heptachlor, heptachlor endo-epoksyd, heptenofos, indoksakarb, isokarbofos, isofenfos, isofenfos-metylowy, isoprokarb, malaokson, malation, mekarbam, metakrifos, metamidofos, metydatation, metoksychlor (DMDT), mewinfos, metiokarb, oksamyl, paraokson, paraokson metylowy, paration, paration-metylowy, permetyryna, fentoat, forat, fozalon, fosmet, pirimikarb, pirimifos etylowy, pirimifos metylowy, profenofos, propoksur, protiofos, pyridaben, pyriproksyfen, kwinalfos, resmetryna, spirodiklofen, spiromesifen, τ -fluwalinat, teflutryna, tetrachlorwinfos, tetrametryna, tiametoksam, transflutryna, triazofos
Insecticides (108)	acephate, acetamiprid, acrinathrin, aldrin, amitraz, azinphos-ethyl, azinphos-methyl, bifenazate, bifenthrin, bromophos-ethyl, bromophos-methyl, buprofezin, cadusafos, carbaryl, carbofuran, carbosulfan, chlordane cis, chlordane trans, chlorantraniliprole, chlorfenvinphos, chlorobenzilate, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, cyfluthrin, λ -cyhalothrin, γ -cyhalothrin, cypermethrin, DDT (sum of op'-DDT, pp'-DDD, pp'-DDE, pp'-DDT), dieldrin, deltamethrin, diazinon, dichlorvos, dicrotophos, diethyltoluamide (DEET), dimethoate, α -endosulfan, β -endosulfan, endosulfan-sulphate, endrin, EPN, esfenvalerate/fenvalerate, ethion, ethoprophos, etofenprox, fenamiphos, fenazaquin, fenchlorphos, fenitrothion, fenoxycarb, fenpropathrin, fenpyroximate, fenthion, fipronil, flonicamid, formothion, fosthiatate, α -HCH, β -HCH, γ -HCH (lindane), heptachlor, heptachlor endo-epoxide, heptenophos, indoxacarb, isocarbophos, isofenphos, isofenphos-methyl, isoprocarb, malaoxon, malathion, mecarbam, methacrifos, methamidophos, methidathion, methoxychlor (DMDT), mevinphos, metiokarb, oxamyl, paraoxon, paraoxon-methyl, parathion, parathion-methyl, permethrin, phenthoate, phorate, phosalone, phosmet, pirimicarb, pirimiphos-ethyl, pirimiphos-methyl, profenofos, propoxur, prothiofos, pyridaben, pyriproxyfen, quinalphos, resmethrin, spirodiclofen, spiromesifen, τ -fluvalinate, tefluthrin, tetrachlorvinphos, tetramethrin, thiamethoxam, transluthrin, triazophos
Fungicydy (81) Fungicides (81)	2-fenylfenol, azakonazol, azoksystrobina, benalaksyl, bifenyl, bitertanol, boskalid, bromukonazol, bupirymat, kaptafol, kaptan i jego metabolit tetrahydroftalimid (THPI), karboksyna, chinometionat, chlorotalonil, cyflufenamid, cyprokonazol, cyprodinil, dichlofluanid, dichloran, dietofenkarb, difenokonazol, dimetomorf, dimoksystrobina, dinikonazol, epoksykonazol, etakonazol, famoksadon, fenamidon, fenarimol, fenbukonazol, fenheksamid, fenpropidyna, fenpropimorf, fludioksonil, fluopikolid, fluchinkonazol, flusilazol, flutolanil, flutriafol, folpet, fuberidazol, heksachlorobenzen (HCB), heksakonazol, imazalil, imibenkonazol, ipkonazol, iprodion, iprovalikarb, isoprothiolan, krezoksym-metylowy, mepanipirim, metalaksyl, metkonazol, metrafenon, mychlobutanil, oksadiksyl, penkonazol, pencykuron, picoksystrobina, prochloraz, procymidon, propikonazol, protiokonazol-destio, pyraklostrobina, pyrazofos, pyrimetanil, chinoksyfen, spiroksamina, tebukonazol, technazen, tetrakonazol, tiabendazol, tolklofos-metylowy, tolylfluanid, triadimefon, triadimenol, trifloksystrobina, triflumizol, tritikonazol, winklozolina, zoksamid
Fungicides (81)	2-phenylophenol, azaconazole, azoxystrobin, benalaxyl, biphenyl, bitertanol, boscalid, bromuconazole, bupirimate, captafol, captan and their metabolite tetrahydrophthalimide (THPI), carboxin, chinomethionate, chlorothalonil, cyflufenamid, cyproconazole, cyprodinil, dichlofluanid, dicloran, diethofencarb, difenoconazole, dimethomorph, dimoxystrobin, diniconazole, epoxiconazole, etaconazole, famoxadone, fenamidone, fenarimol, fenbuconazole, fenhexamid, fenpropidin, fenpropimorph, fludioxonil, fluopicolide, fluquinconazole, flusilazole, flutolanil, flutriafol, folpet, fuberidazole, hexachlorobenzene (HCB), hexaconazole, imazalil, imibenconazole, ipconazole, iprodione, iprovalicarb, isoprothiolane, krezoxim-methyl, mepanipyrim, metalaxyl, metconazole, metrafenone, myclobutanil, oxadixyl, penconazole, pencycuron, picoxystrobin, prochloraz, procymidone, propiconazole, prothioconazole-desthio, pyraclostrobin, pyrazophos, pyrimethanil, quinoxifen, spiroxamine, tebuconazole, tecnazene, tetraconazole, thiabendazole, tolclfos-methyl, tolylfluanid, triadimefon, triadimenol, trifloxystrobin, triflumizole, triticonazole, vinclozolin, zoxamide

Tabela 1. Oznaczane substancje czynne środków ochrony roślin – cd.**Table 1.** Determined active substances of plant protection products – continuation

1	2
Herbicydy (47)	acetochlor, atrazyna, bromacyl, chlorydazon, chlorprofam, chlomazon, cyjanazyna, cyprazyna, desmedifam, dichlobenil, diflufenikan (DFF), dimetachlor, dimetenamid-P, etofumesat, fenoksaprop etylowy, flauazifop-P-butylu, flufenacet, flurochloridon, fluroksypyr-1-meptylheptyl, flurtamon, haloksyfop metylowy, lenacyl, linuron, metamitron, metazachlor, metobromuron, metolachlor, metrybuzyna, napropamid, nitrofen, oksyfluorfen, pebulat, pendimetalina, prometryna, propachlor, propachuizafop, propazyna, profam, propyzamid, prosulfocarb, chinoklamina, chizalofop-P-etylowy, symazyna, terbacyl, terbutyloazyna, terbutryna, trifluralina
Herbicides (47)	acetochlor, atrazine, bromacil, chloridazon, chlorpropham, clomazone, cyanazine, cyprazine, desmedipham, dichlobenil, diflufenican (DFF), dimethachlor, dimethenamid-P, ethofumesate, fenoxaprop-ethyl, flauazifop-P-butyl, flufenacet, flurochloridone, fluroxypyr-1-meptylheptyl, flurtamone, haloxyfop-methyl, lenacil, linuron, metamitron, metazachlor, metobromuron, metolachlor, metribuzin, napropamide, nitrofen, oxyfluorfen, pebulate, pendimethalin, prometryn, propachlor, propaquizafop, propazine, propham, propyzamide, prosulfocarb, quinclamine, quizalofop-P-ethyl, simazine, terbacyl, terbutylazine, terbutryn, trifluralin
Regulatory wzrostu (3)	difenyloamina, flumetralina, paklobutrazol
Growth regulators (3)	diphenylamine, flumetralin, paclobutrazol
Repellent (1)	antrachinon
Repellent (1)	anthraquinone

Tabela 2. Warunki chromatograficzne analizy instrumentalnej (GC-MS/MS)**Table 2.** Chromatographic parameters (GC-MS/MS)

Chromatograf gazowy (Agilent 7890B) z kwadropolowym detektorem mas (Agilent 7000B) Gas chromatograph (Agilent 7890B) coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (Agilent 7000B)			
Kolumna Column	HP-5MS, 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm film	metoda jonizacji ionization mode	jonizacja strumieniem elektronów (EI 70 eV) electron impact (70 eV)
Gaz nośny (przepływ) Carrier gas (flow)	He (2,1 ml/min)	temperatura – temperature linia transferowa – transfer line źródło jonów – ion source kwadropole – quadrupoles	280°C 300°C 180°C (Q1), 180°C (Q2)
Program temperaturowy Temperature program	temperatura początkowa 70°C (izoterma 2 min) → 25°C/min → 150°C → 3°C/min → 200°C → 8°C/min → 280°C (izoterma 10 min) initial temperature 70°C (hold 2 min) → 25°C/min → 150°C → 3°C/min → 200°C → 8°C/min → 280°C (hold 10 min)	gazy kolizyjne (przepływ) collision gases (flow)	He (2,25 ml/min) N (1,5 ml/min)
Tryb nastrzyku – Injection	2 µl bez podziału – 2 µl splitless		
Całkowity czas analizy – Total running time: 41.88 min			

He – hel – helium, N – azot – nitrogen

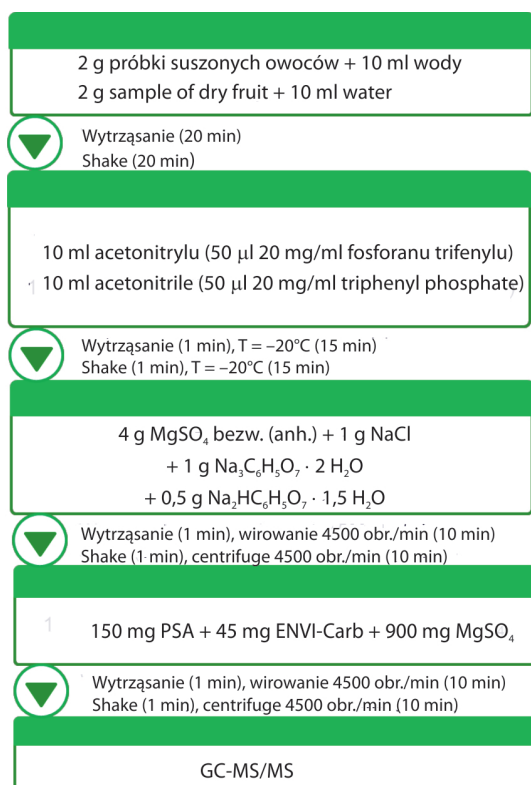
rysunku 1. Oznaczenie jakościowe i ilościowe wykonano techniką chromatografii gazowej z tandemową spektrometrią mas (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Warunki chromatograficzne zestawiono w tabeli 2.

Walidację opracowanej wielopozostałościowej metody przeprowadzono w oparciu o kryteria określone w przewodniku Komisji Europejskiej SANTE (SANTE/12682/2019). Wyznaczono parametry walidacyjne: liniość, odzysk, względne odchylenie standardowe, granicę oznaczalności i wykrywalności, efekt matrycy (ME) oraz niepewność metody.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Przygotowanie próbki do badań – optymalizacja metody

W celu zoptymalizowania metody oznaczania szerokiego spektrum s.c.z. ś.o.r. przeprowadzono szereg eksperymentów polegających na modyfikacji metody QuEChERS poprzez dobór odpowiedniej masy próbki, objętości wody, rodzaju rozpuszczalnika oraz sorbentów etapu oczyszczania. Parametrem do oceny przydatności procedury był odzysk, a w przypadku doboru rodzaju sorbentu do oczyszczania



Rys. 1. Schemat przygotowania próbek

Fig. 1. Scheme of sample preparation

dodatkowo efekt matrycy (Perestrelo i wsp. 2019). Odzyski sklasyfikowano w zakresie: <40%, 40–70%, 70–120%, 120–140% oraz >140%. Zgodnie z kryteriami przewodnika Komisji Europejskiej SANTE (SANTE/12682/2019) metodę wielopozostałościową można zastosować do badań, gdy wartości odzysków mieszczą się w zakresie 40–140%. Efekt matrycy sklasyfikowano jako: miękki, kiedy przyjmuje wartości $-20\% < ME < 20\%$, który jest nieistotny; średni ($20\% < ME < 50\%$ i $-20\% > ME > -50\%$) oraz silny ($-50\% > ME > 50\%$).

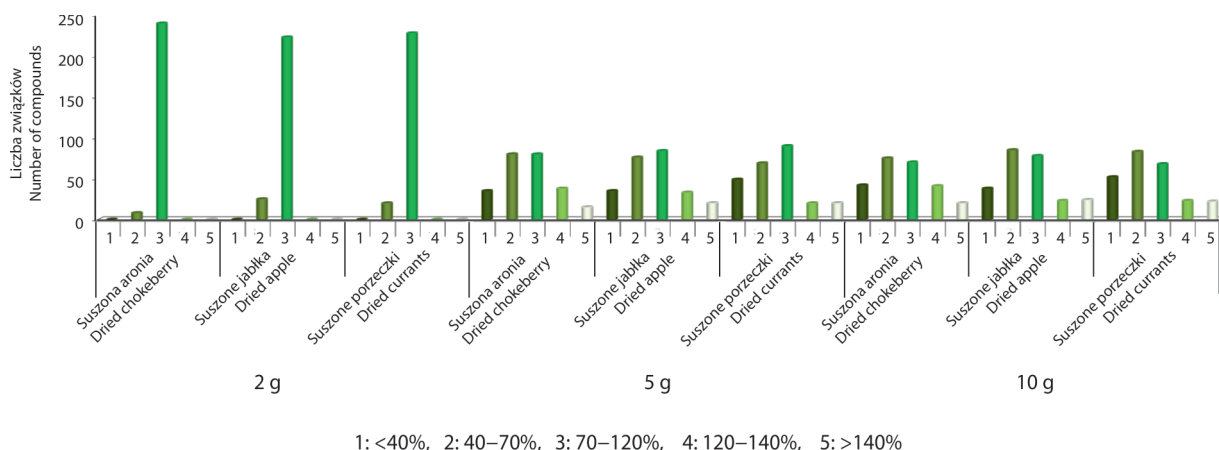
Ogromnym wyzwaniem było objęcie badaniami w jednym toku analitycznym ponad 50 różnych grup chemicznych reprezentowanych przez 248 s.cz. charakteryzujące się zróżnicowanymi właściwościami fizykochemicznymi (polarność, rozpuszczalność, lotność oraz masa cząsteczkowa). Problematiczna okazała się analiza związków nietrwałych termicznie, które ulegają degradacji w wysokiej temperaturze warunków dozowania, takich jak: dichlorofos, dikofol, kaptan, czy folpet oraz o budowie planarnej, które ulegają rozkładowi na powierzchni sorbentów stosowanych do oczyszczania (PSA, GCB), takich jak: chlorotalonil, dichlofluanid, tolilofluanid i niestabilnych przy określonym pH (w środowisku zasadowym kaptan, dichlofluanid, dikofol, folpet i tolilofluanid, jak i w środowisku kwasowym amitraz oraz karbosulfan) (Anastassiades i wsp. 2003).

Masa próbki

Pierwszym optymalizowanym parametrem była masa próbki. W tym celu zastosowano trzy naważki (2, 5, 10 g) i sprawdzono ich wpływ na efektywność procesu ekstrakcji. Wykazano, że w przypadku 2 g próbki uzyskano akceptowalne wyniki odzysku (40–140%) we wszystkich testowanych matrycach. Zastosowanie większej naważki dało wartości odzysków poza zakresem ($40\% > \text{odzysk} > 140\%$) dla 20, 22, 28% (5 g naważka) oraz 25, 25, 30% (10 g naważka) testowanych związków, odpowiednio w matrycy suszonej aronii, jabłek i porzeczek. Wpływ masy próbki przedstawiono na rysunku 2.

Objętość wody

W celu osłabienia interakcji analitów z matrycą niezwykle istotnym elementem jest optymalizacja parametru dodanej wody (Čajka i wsp. 2012). Sprawdzonego wpływu dodatku trzech objętości wody (5; 7,5; 10 ml) na wydajność ekstrakcji. Ponadto zastosowano wodę o temperaturze 4°C, która kompensuje ciepło generowane podczas dodawania siarczanu magnezu na etapie ekstrakcji (reakcja egzotermiczna)



Rys. 2. Wpływ masy próbki na odzysk 248 analitów

Fig. 2. Influence of amount of samples on the recovery of 248 analytes

w celu ochrony wrażliwych na zmiany temperatury związków (dichlofluanid, folpet, kaptan, tolilofluanid). Użycie 5 ml wody nie dało zadowalających rezultatów z powodu całkowitego jej wchłonięcia. Zaobserwowano wzrost odzysku analitów wraz ze wzrostem objętości. Najlepsze rezultaty uzyskano dodając 10 ml wody (rys. 3).

Rozpuszczalnik do ekstrakcji

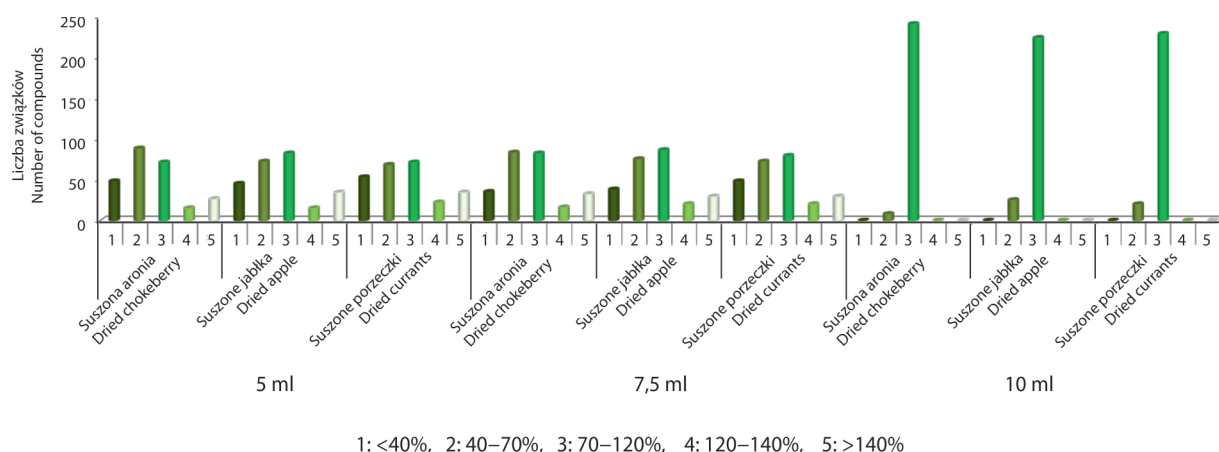
Jednym z kluczowych parametrów podlegających optymalizacji jest wybór odpowiedniego rozpuszczalnika ekstrakcyjnego, który powinien charakteryzować się wysoką zdolnością rozpuszczania badanych analitów, wpływając korzystnie na poprawę wydajności procesu ekstrakcji oraz minimalizację wymywania współekstrahowanych składników matrycy (Perestrelo i wsp. 2019). W eksperymentach oceniono wpływ rodzaju rozpuszczalnika na proces ekstrakcji wykorzystując octan etylu, aceton i acetonitryl. Zastosowanie acetonu i octanu etylu skutkowało uzyskaniem nieakceptowalnych wartości odzysków dla około 17% testowanych analitów. Wraz ze wzrostem polarności zaobserwowano wzrost wartości odzysku dla związków polarnych:

acefatu 54% (octanu etylu) => 96% (acetonitryl); dikrotofosu 51% (octanu etylu) => 80% (acetonitryl); metamidofosu 59% (aceton) => 91% (acetonitryl); czy oksamylu 49% (octan etylu) => 88% (acetonitryl). Acetonitryl okazał się najbardziej selektywny względem największej liczby badanych analitów, zapewniając akceptowalną wydajność ekstrakcji w szerokim zakresie (rys. 4).

Liu i wsp. (2016) ocenili efektywność wpływu acetonitrylu, 1% kwasu octowego w acetonitrylu i mieszaniny metanol/acetonitryl (3 : 7, v/v) na odzysk 29 analitów w suszonej papryce. Użycie kwasu octowego w acetonitrylu pozwoliło uzyskać akceptowalne odzyski (70–110%; RSD < 13%). Rasche i wsp. (2015) przy zastosowaniu 10 ml acetonitrylu uzyskali odzyski w przedziale 70–120% przy RSD < 20% dla większości analizowanych związków spośród 120 w próbkach rodzynek, suszonych jabłek oraz czarnych porzeczek.

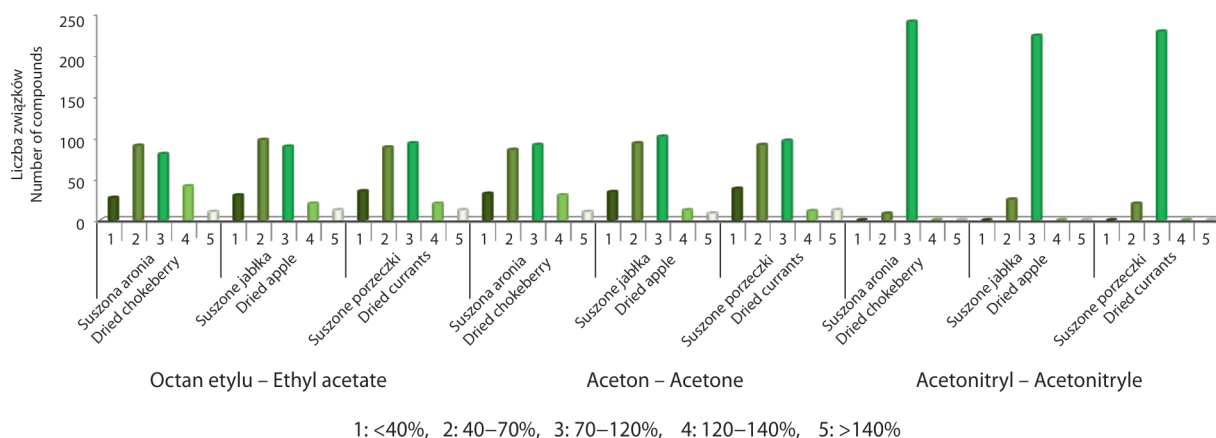
Sorbent do oczyszczania próbki „clean-up”

Kolejnym etapem protokołu postępowania z próbą jest wybór sorbentu bądź mieszanin sorbentów w celu eliminacji



Rys. 3. Wpływ dodatku wody na odzysk 248 analitów

Fig. 3. Influence of water addition on the extraction recovery



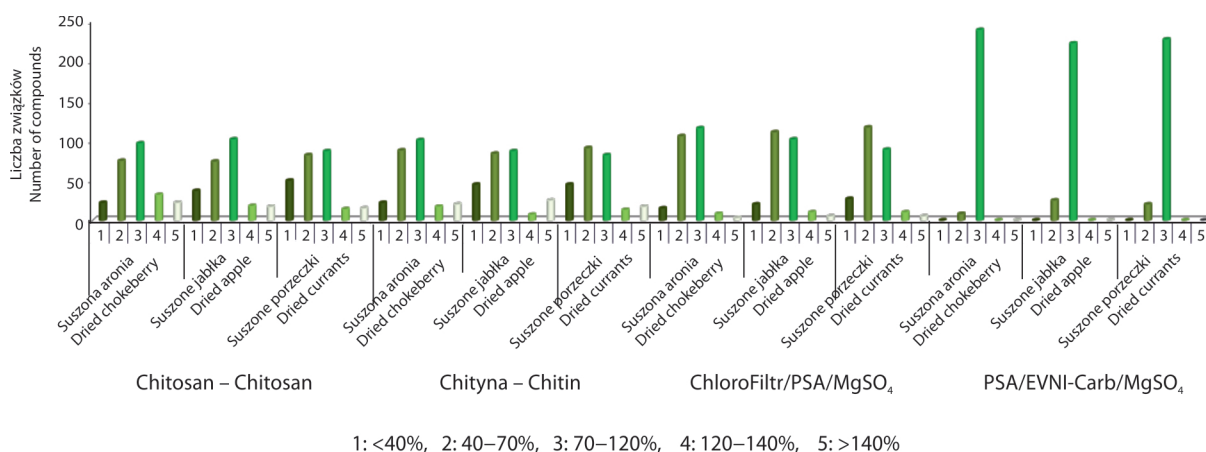
Rys. 4. Wpływ rozpuszczalników na odzysk 248 analitów

Fig. 4. Influence of solvents on the recovery of 248 analytes

substancji interferujących (Perestrelo i wsp. 2019). Kryterium wyboru spośród szeregu różniących się od siebie mechanizmem retencji sorbentów, stanowiła ich zdolność do usuwania składników matrycy: węglowodanów, pigmentów, minerałów, błonnika, polifenoli, kwasów organicznych i witamin (tab. 3) (Gyurova i Enikova 2014). Cykl badań obejmował zastosowanie pojedynczych sorbentów: chitosanu i chityny, kombinacji PSA/ENVI-Carb/MgSO₄, ChloroFiltr/PSA/MgSO₄ i badanie ich wpływu na odzysk i efekt matrycy. Użycie chitosanu dało wysoki i średni efekt matrycy odpowiednio dla 11–15%, 9–14% oraz nieakceptowalny

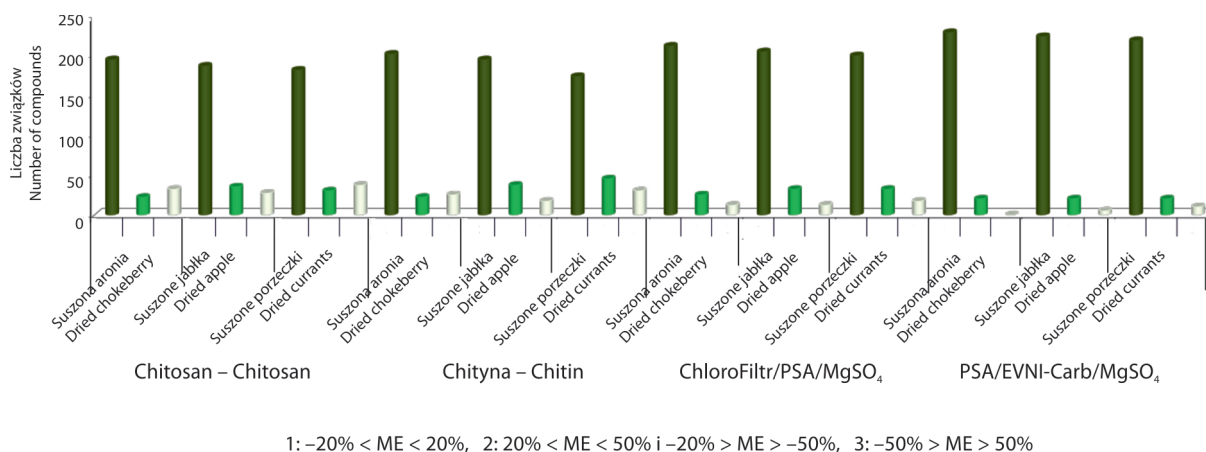
odzysk dla 18–26% analizowanych związków we wszystkich matrycach. Analogicznie w przypadku chityny, średni i wysoki ME odpowiednio dla 9–18%, 7–12% oraz odzysk poniżej 40% i powyżej 140% dla 17–28% badanych analitów (rys. 5, 6).

W przypadku użycia mieszaniny sorbentów ChloroFiltr/PSA/MgSO₄, efekt matrycy nie mieścił się w oczekiwany zakres ($-20\% > ME > 20\%$) dla 18% analizowanych substancji, a nieakceptowalne wartości odzysków ($40\% > \text{odzysk} > 140\%$) otrzymano dla około 10% związków we wszystkich badanych matrycach (rys. 5, 6).



Rys. 5. Wpływ sorbentów i kombinacji sorbentów na odzysk 248 analitów

Fig. 5. Influence of sorbents and sorbent combinations on the recovery of 248 analytes



Rys. 6. Wpływ sorbentów i kombinacji sorbentów na efekt matrycy 248 analitów

Fig. 6. Influence of different sorbents and sorbent combinations on the matrix effect

Zastosowanie kombinacji PSA/ENVI-Carb/MgSO₄ pozwoliło uzyskać dla ponad 90% związków nieistotny efekt matrycy, dla około 8% w zakresie $20\% < ME < 50\%$ i $-20\% > ME > -50\%$ oraz dla 2% w przedziale $-50\% > ME > 50\%$. Odzysk w zakresie 40–70% otrzymano średnio dla około 8% analitów oraz 70–120% dla 92% (rys. 5, 6). Niskie wartości odzysków średnio 65% (dichlorfos), 64% (kaptan),

czy 68% (tolilofluanid) uzyskano dla substancji nietrwałych termicznie i niestabilnych przy określonym pH. Ponadto dla związków polarnych: acefat, dikrotosof, oksamyl, czy tiametoksam oraz o dużej masie cząsteczkowej (>400 g/mol): fenpiroksymat, imibenkonazol, indoksakarb, propaquizafop, czy tau-fluwalinat nie udało się całkowicie wyeliminować efektu matrycy, który oscylował w przedziale 30–44%.

Tabela 3. Charakterystyka zastosowanych sorbentów
Table 3. Characteristics of the sorbents used

Sorbent – Sorbent	Charakterystyka – Characteristics	Zastosowanie – Application
Pierwso-drugorzędowa amina (PSA) – Primary secondary amine (PSA)	amina modyfikowana krzemionką, słaby sorbent anionowymienny silica modified amine, weak anion exchange sorbent	kwasy organiczne, węglowodany, pigmenty organic acids, sugars, pigments
ENVI-Carb	na bazie węgla aktywnego, powierzchnia składa się z heksagonalnych struktur pierścieniowych łączących się wzajemnie i układających się w grafitowe warstwy based on activated carbon, the surface consists of hexagonal ring structures interconnecting and forming graphite layers	pigmenty pigments
ChloroFiltr	sorbent polimerowy polymer sorbent	pigmenty pigments
Chitosan	naturalny sorbent, występujący w egzoszkieletach owadów, skorupach skorupiaków i ścianach komórkowych grzybów a natural sorbent found in insect exoskeletons, crustacean shells and fungal cell walls	lipidy, kwasy organiczne lipids, organic acids
Chityna – Chitin	naturalny sorbent ekstrahowany z krabów i krewetek natural sorbent extracted from crabs and shrimps	lipidy, kwasy organiczne lipids, organic acids

Liu i wsp. (2016) badali wpływ sorbentów: C18, PSA i GCB na oczyszczanie próbek z substancji przeszkadzających analizując 29 związków w suszonej papryce. Najlepsze wyniki uzyskali stosując mieszaninę PSA/C18. Varela-Martínez i wsp. (2019) przeprowadzili eksperymenty z różnymi naważkami sorbentów PSA/C18 (25/25 mg, 50/50 mg) do oznaczania 38 pestycydów w suszonych truskawkach, jeżynach, maraku, ananasach i winogronach. Ocenili, iż naważka dwukrotnie większa zapewniła wartości odzysków w zakresie 70–120%, przy RSD < 20% dla większości analitów.

Walidacja

Parametry walidacyjne zoptymalizowanej wielopozostałościowej metody sprawdzono pod kątem wymagań stawianych analizie pozostałości ś.o.r. zgodnie z przewodnikiem Komisji Europejskiej SANTE (SANTE/12682/2019). Metoda wykazała dobrą liniowość w zakresie 0,005–1,00 mg/kg przy zadowalających współczynnikach korelacji powyżej 0,99 dla wszystkich związków. Wartości odzysku dla 93, 90, 92% badanych analitów wahały się od 72 do 118% (RSD > 18%) odpowiednio dla próbek suszonej aronii, jabłek oraz porzeczki. Część s.c. wykazała akceptowalne odzyski w zakresie 63–68%, charakteryzując się przy tym dobrymi pozostałymi parametrami walidacyjnymi (rys. 5). Uzyskane wartości granicy wykrywalności i oznaczalności wyniosły 0,001 mg/kg i 0,005 mg/kg. Wartości rozszerzone niepewności metody wahały się od 6 do 29% (współczynnik rozszerzenia $k = 2$, poziom ufności 95%). Nieistotnym efektem matrycy ($-20\% < ME < 20\%$) charakteryzowało się 92, 90, 88% analizowanych s.c. odpowiednio dla próbek suszonej aronii, jabłek oraz porzeczki. Pozostałe związki wykazały średni oraz wysoki efekt matrycy w zakresie od –51% (acefat) do –24% (oksamil) oraz od 21% (imibenkonazol) do 58% (tau-fluwalinat) (rys. 6).

Aplikacja metody

Zoptymalizowaną procedurę badawczą wdrożono do rutynowych analiz jednoczesnego oznaczania szerokiego spektrum związków i zaadaptowano do zróżnicowanych matryc charakteryzujących się niską zawartością wody oraz wysoką węglowodanów. Przebadano 25 próbek suszonych owoców: aronii (2 próbki), bzu czarnego (1 próbka), jabłek (7 próbek), malin (4 próbki), porzeczki (7 próbek) oraz truskawek (4 próbki). Potwierdzono obecność 6 s.c. fungicydów (boskalid, cyprodinil, fludioksonil, kaptan, pyraklostrobina i trifloksystrobina). Pozostałości s.c. wykryto w 10 próbkach, co stanowi 40% wszystkich przebadanych. Najwięcej związków wykryto w suszu czarnej porzeczki (boskalid, cyprodinil, fludioksonil oraz pyraklostrobina), natomiast w suszonych owocach aronii oraz bzu czarnego nie stwierdzono pozostałości ś.o.r.

Nieliczne doniesienia naukowe potwierdzają obecność pozostałości ś.o.r. w suszach. Liu i wsp. (2016) opracowaną metodę zastosowali w analizie trzech próbek suszonej papryki. W jednej z nich wykryli fungicyd – paklobutrazol oraz dwa insektycydy – chloropirifos i karbaryl. Varela-Martínez i wsp. (2019) raportowali w pięciu z 15 analizowanych próbek suszu owocowego obecność dwóch fungicydów – iprodionu i metalaksylu oraz jednego insektycydu – chloropirifosu.

Wnioski / Conclusions

1. Zoptymalizowana metoda umożliwia oznaczanie zróżnicowanych pod względem właściwości fizykochemicznych 248 związków na niskich poziomach stężeń w jednym toku analitycznym, w próbkach charakteryzujących się niską zawartością wody i wysoką zawartością węglowodanów.

2. W procesie optymalizacji dokonano doboru masy próbki, objętości wody, rodzaju rozpuszczalnika oraz sorbentu etapu oczyszczania. Zastosowanie układu 2 g próbki/10 ml wody/10 ml acetonitrylu/PSA/ENVI-Carb/MgSO₄ umożliwiło uzyskanie akceptowalnych parametrów walidacyjnych, spełniających kryteria metody wielopozostałościowej.
3. Zoptymalizowaną metodę wdrożono do rutynowych badań w różnych gatunkach suszonych owoców. Występowanie pozostałości ś.o.r. odnotowano w 40% suszonych owoców, co w pełni uzasadnia konieczność ich monitorowania, jak i dalszego doskonalenia narzędzi analitycznych.

Literatura / References

- Anastassiades M., Lehotay S.J., Stajnbaher D., Schenck F.J. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solidphase extraction for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* 86 (2): 412–431. DOI: 10.1093/jaoac/86.2.412
- Čajka T., Sandy C., Bachanova V., Drabova L., Kalachova K., Pulkrabova J., Hajšlová J. 2012. Streamlining sample preparation and gas chromatography-tandem mass spectrometry analysis of multiple pesticide residues in tea. *Analytica Chimica Acta* 743: 51–60. DOI: 10.1016/j.aca.2012.06.051
- Đurović-Pejčev R.D., Bursić V.P., Zereński T.M. 2018. Comparison of QuEChERS with traditional sample preparation methods in the determination of multiclass pesticides in soil. *Journal of AOAC International* 102 (1): 46–51. DOI: 10.5740/jaoacint.18-0296
- Gyurova K.D., Enikova K.R. 2014. Dried fruits—brief characteristics of their nutritional values. Author's own data for dietary fibers content. *Journal of Food and Nutrition Sciences* 2 (4): 105–109. DOI: 10.11648/j.jfns.20140204.12
- Hakme E., Lozano A., Ferrer C., Díaz-Galiano F.J., Fernandez-Alba A.R. 2018. Analysis of pesticide residues in olive oil and other vegetable oils. *Trends in Analytical Chemistry* 100: 167–179. DOI: 10.1016/j.trac.2017.12.016
- He Z., Wang L., Peng Y., Luo M., Wang W., Liu X. 2015. Multiresidue analysis of over 200 pesticides in cereals using a QuEChERS and gas chromatography-tandem mass spectrometry-based method. *Food Chemistry* 169: 372–380. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.07.102
- 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
- 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
- Lee J., Shin Y., Lee J., Lee J., Kim B.J., Kim J.-H. 2018. Simultaneous analysis of 310 pesticide multiresidues using UHPLC-MS/MS in brown rice, orange, and spinach. *Chemosphere* 207: 519–526. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.05.116
- Liu M., Xie Y., Li H., Meng X., Zhang Y., Hu D., Zhang K., Xue W. 2016. Multiresidue determination of 29 pesticide residues in pepper through a modified QuEChERS method and gas chromatography–mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* 30 (10): 1686–1695. DOI: 10.1002/bmc.3742
- 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., Rutkowska E., Hrynko I., Rusiłowska J., Pietraszko A., Jankowska M., Czerwińska M., Nowakowska O., Kaczyński P. 2021. Optymalizacja metody jednoczesnego oznaczania 490 pestycydów w piwie. [Optimization of the method for the simultaneous determination of 490 pesticides in beer]. *Progress in Plant Protection* 61 (1): 53–61. DOI: 10.14199/ppp-2021-006
- Perestrelo R., Silva P., Porto-Figueira P., Pereira J.A.M., Silva C., Medina S., Câmara J.S. 2019. QuEChERS – Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. *Analytica Chimica Acta* 1070: 1–28. DOI: 10.1016/j.aca.2019.02.036
- Rasche C., Britta Fournes B., Dirk U., Speer K. 2015. Multi-residue pesticide analysis (gas chromatography–tandem mass spectrometry detection)—Improvement of the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method for dried fruits and fat-rich cereals – Benefit and limit of a standardized apple purée calibration (screening). *Journal of Chromatography A* 1403: 21–31. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.05.030
- Roszkó M.Ł., Kamińska M., Szymczyk K., Jędrzejczak R. 2016. Levels of selected persistent organic pollutants (PCB, PBDE) and pesticides in honey bee pollen sampled in Poland. *PLOS ONE* 11 (12): e0167487. DOI: 10.1371/journal.pone.0167487
- 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.
- Tripathy V., Sharma K.K., Yadav R., Devi S., Tayade A., Sharma K., Pandey P., Singh G., Patel A.N., Gautam R., Gupta R., Kalra S., Shukla P., Walia S., Shakil N.A. 2019. Development, validation of QuEChERS-based method for simultaneous determination of multiclass pesticide residue in milk, and evaluation of the matrix effect. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 54 (5): 394–406. DOI: 10.1080/03601234.2019.1574169
- Varela-Martínez D.A., González-Curbelo M.Á., González-Sálamo J., Hernández-Borges J. 2019. Analysis of multiclass pesticides in dried fruits using QuEChERS-gas chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 297: 124961. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.124961
- Zhao X., Kong W., Wei J., Yang M. 2014. Gas chromatography with flame photometric detection of 31 organophosphorus pesticide residues in *Alpinia oxyphylla* dried fruits. *Food Chemistry* 162: 270–276. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.04.060