

Applicability of a QuEChERS-based method for determination of pesticide residues in peppermint (*Mentha piperita* L.)

Zastosowanie techniki QuEChERS w analizie pozostałości środków ochrony roślin w mięcie pieprzowej (*Mentha piperita* L.)

Magdalena Słowik-Borowiec, Ewa Szpyrka, Magdalena Grzegorzak,
Anna Kurdziel, Julian Rupar, Aneta Matyaszek

Summary

The aim of this study was to evaluate the usefulness of the QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) sample preparation technique in conjunction with gas chromatography with electron capture and nitrogen phosphorus detection (GC-ECD/NPD – gas chromatography with electron capture and nitrogen phosphorus detection) for the analysis of pesticide residues in peppermint. Validation experiments were carried out for 14 compounds at two spiking levels of 0.01 and 0.1 mg/kg. The obtained results were highly satisfactory and compliant with the criteria recommended by the European Union document SANCO/10684/2009 (recently superseded by SANCO/12684/2011). The compounds showed recoveries in the range of 70–120% and repeatability (relative standard deviation) equal to or less than 20%. The QuEChERS allowed to obtain high quality pesticide residue results with a reduced number of analytical steps and a lower glassware and solvent consumption compared with used previously method.

Key words: peppermint, gas chromatography, determination of pesticide residues, QuEChERS

Streszczenie

Celem badań było sprawdzenie przydatności techniki ekstrakcji/oczyszczania zwanej QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) w połączeniu z chromatografią gazową z detekcją wychwytu elektronów i azotowo-fosforową (GC-ECD/NPD – gas chromatography with electron capture and nitrogen phosphorus detection) w badaniach pozostałości środków ochrony roślin w mięcie. Walidacji poddano 14 związków na 2 poziomach wzbogacenia: 0,01 i 0,1 mg/kg. Uzyskane wyniki były zadowalające i spełniały wymagania zaleceń europejskich SANCO/10684/2009 (obecnie zastąpionych przez SANCO/12684/2011), a więc odzysk dla badanych związków mieścił się w przedziale 70–120%, a powtarzalność wyrażona względnym odchyleniem standardowym była mniejsza lub równa 20%. W porównaniu z wcześniej stosowaną metodą, ta oparta na QuEChERS pozwoliła uzyskać prawidłowe wyniki przy minimalnej liczbie etapów procesu analitycznego oraz niewielkim zużyciu odczynników i szkła laboratoryjnego.

Słowa kluczowe: mięta pieprzowa, chromatografia gazowa, pozostałości środków ochrony roślin, QuEChERS

Institut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Terenowa Stacja Doświadczalna
Langiewicza 28, 35-101 Rzeszów
m.borowiec@iorgib.poznan.pl

Wstęp / Introduction

Podstawowym problemem oznaczania pozostałości pestycydów w materiałach biologicznych jest obecność skomplikowanej matrycy, zawierającej związki, które interferując z analitami, poszerzają piki chromatograficzne, a także mogą zakłócić pracę, czy uszkodzić sprzęt wykorzystywany do analizy. Do związków tych należą przede wszystkim: kwasy tłuszczowe, sterole oraz barwniki. Pogarszają one parametry rozdzielności chromatograficznego oraz powodują zanieczyszczenie wkładki dozownika i kolumny chromatograficznej (Ferrer i wsp. 2005; He i wsp. 2007).

Trudny materiał analityczny stanowią zioła, w tym również mięta, które w swoim składzie zawierają olejki eteryczne, kwasy organiczne oraz licznie zgromadzony chlorofil. Stosowane dotychczas metody analizy próbek mięty polegały na ekstrakcji mieszaniną aceton-eter naftowy 1:9 (v/v), następnie oczyszczaniu na kolumnie wypełnionej florisilem i zbieraniu oddzielnie 4 frakcji, które potem analizowano na chromatografie gazowej (Szpyrka i wsp. 2004; Sadło i wsp. 2006). Przeprowadzona walidacja tej metody udowodniła, że odzyski dla badanych związków mieściły się w wymaganym przedziale (70–120%) (SANCO 2009), jednak procedura ta jest bardzo czasochłonna i droga ze względu na duże zużycie odczynników chemicznych. Anastassiades i Lehotay (2003) opisali metodę QuEChERS (z ang. quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) pozwalającą na oznaczenie pozostałości wielu pestycydów w owocach i warzywach, w której, przy niewielkim zużyciu odczynników i krótkim czasie przygotowania ekstraktów w laboratorium, można osiągnąć zadowalające rezultaty. Metoda ta stała się na tyle powszechna w oznaczaniu pozostałości w materiale roślinnym, że została włączona od 2008 roku do zbioru Polskich Norm jako norma PN-EN 15662 2008.

Celem podjętych badań była próba zastosowania techniki opartej na metodzie QuEChERS w analizie mięty w połączeniu z chromatografią gazową z detekcją wychwytu elektronów i azotowo-fosforową (gas chromatography with electron capture and nitrogen phosphorus detection – GC-ECD/NPD).

Materiały i metody / Materials and methods

Materiał do badań stanowiła świeża mięta pochodząca z uprawy ekologicznej. Próbkę analityczną przygotowaną przez zmielenie liści oraz łodyg roślin poddano wstępnej analizie pod kątem pozostałości środków ochrony roślin. W badanym materiale nie stwierdzono substancji aktywnych powyżej granicy oznaczalności metody analitycznej.

Do walidacji wytypowano 14 substancji aktywnych środków ochrony roślin, z których 6 było zarejestrowanych do ochrony mięty w latach 2010–2011 (Zalecenia 2010/2011), natomiast pozostałe były zarejestrowane w tej uprawie w latach poprzednich (Zalecenia 2006/2007, 2008/2009). Były to: cypermetryna, beta-cyflutryna, lambda-cyhalotryna, chloropiryfos, diazynon, esfenwalerat, fenitroton, flauazifop-P-butylu, fosalon, propyzamid, prometryna, trifluralina, triadimefon i tolifluanid.

W badaniach wykorzystano gotowe zestawy soli i sorbentów SampliQ oferowane przez firmę Agilent Technologies (USA) oraz certyfikowane materiały odniesienia (Dr. Ehrenstorfer, Niemcy).

Walidację przeprowadzono, wzbogacając próbki mieszaniną wzorców na 2 poziomach: 0,01 i 0,1 mg/kg, dla każdego z poziomów wykonano 6 powtórzeń.

5 g próbki mięty umieszczono w polipropylenowej probówce (50 ml), dodano 10 ml wody destylowanej, odpowiedni roztwór mieszaniny wzorców oraz acetonitryl. Całość wytrząsano 1 minutę, dodawano mieszaninę soli (1 g chlorku sodu, 0,5 g sekwiwodnego wodorocytrynianu disodu, 1 g cytrynianu trisodu, 4 g bezwodnego siarczanu magnezu), ponownie wytrząsano. Po odwirowaniu ekstrakt oczyszczano: warstwę acetonitrylową przeniesiono do polipropylenowej próbówki z solami [150 mg PSA (Primary Secondary Amine), 45 mg GCB (Graphitized Carbon Black C18), 900 mg bezwodnego siarczanu magnezu], ponownie wytrząsano i odwirowano. Z tak przygotowanego ekstraktu pobierano 2 ml, odparowano pod azotem i uzupełniono do tej samej objętości eterem naftowym (zmiana rozpuszczalnika z acetonitrylu na eter naftowy jest modyfikacją metody PN-EN 15662:2008), a następnie nanoszono na chromatograf. Ekstrakty próbek mięty analizowano w stosunku do wzorców w matrycy.

Do analizy ekstraktów zastosowano chromatograf gazowy Agilent 6890 sterowany za pomocą oprogramowania ChemStation (wersja Rev. A. 10.02), wyposażony w kolumnę chromatograficzną DB-1701 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) podłączoną jednocześnie do detektora wychwytu elektronów (ECD) oraz detektora azotowo-fosforowego (NPD) za pomocą uniwersalnego Y-splittera.

Zastosowano następujący program temperatury pieca kolumny: temperatura początkowa 100°C → 20°C/min → 180°C – 4 min → 20°C/min → 220°C – 5 min → 20°C/min → 260°C – 48 min. Łączny czas analizy wynosił 65 minut. Ekstrakt dozowano na kolumnę w objętości 2 μl za pomocą automatycznego podajnika próbek. Temperatura detektora EC wynosiła 270°C, detektora NP 300°C. Aparat pracował w trybie stałego ciśnienia. Jako gazu nośnego użyto azotu o czystości 6.0.

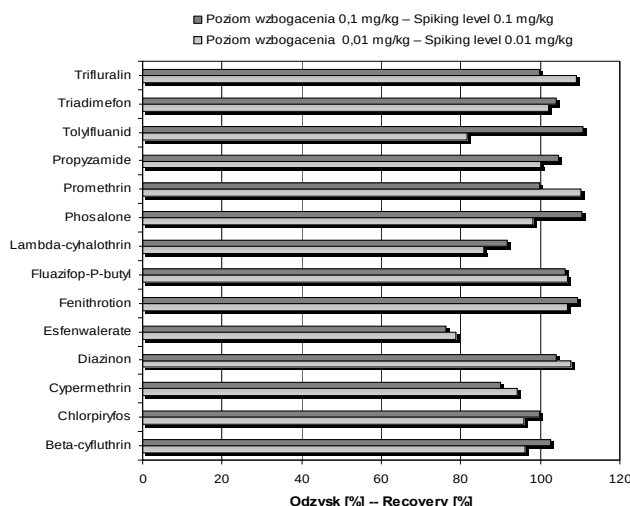
Dla wszystkich 14 oznaczanych związków granice oznaczalności wyniosły 0,01 mg/kg.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Dobierając odpowiednie zestawy do oczyszczania zwracano szczególną uwagę na sorbenty, które mogłyby usunąć z matrycy takie składniki, jak pigmenty czy olejki eteryczne, które stanowiłyby największy problem w późniejszej analizie chromatograficznej. Po oczyszczaniu z użyciem sorbentów GCB i PSA, przeznaczonych do oczyszczania owoców i warzyw z dużą zawartością pigmentów, w znacznym stopniu udało się pozbyć uciążliwych substancji z matrycy.

Na rysunku 1. przedstawiono wartości odzysku dla 14 badanych związków w procesie walidacji metody analizy mięty. Wartość odzysku stanowi średnia uzyskana z 6 równoległych próbek analizowanych dla każdego poziomu wzbogacenia: 0,01 i 0,1 mg/kg.

Dla wszystkich analizowanych próbek odzysk mieścił się w granicach 70–120%, a powtarzalność (odchylenie standardowe) była mniejsza lub równa 20%, a zatem wyniki te spełniają wymagania zaleceń europejskich SANCO/10684/2009 (obecnie zastąpionych przez SANCO/2495/2011).



Rys. 1. Odzysk dla badanych substancji aktywnych

Fig. 1. Recovery of the analysed active substances

W dotychczas stosowanej w laboratorium metodzie analizy mięty (Szpyrka i wsp. 2004; Sadło i wsp. 2006) oznaczano pozostałości środków ochrony roślin jedynie na detektorze NP, a granice oznaczalności związków były o wiele wyższe niż w przedstawionej metodzie QuEChERS.

W nowej metodzie w znacznym stopniu udało się skrócić czas przygotowania ekstraktu do analizy (z około 2 godzin do 20 minut), a przez to skrócić całkowity czas trwania analizy próbek. Technika QuEChERS jest również tańsza – wymaga zużycia mniejszej ilości potrzebnych odczynników chemicznych (z około 300 ml do 20 ml) i co się z tym wiąże, są mniejsze koszty utylizacji odpadów chemicznych.

Metoda QuEChERS jest również bardzo elastyczna i stwarza duże możliwości modyfikacji pod kątem badanych związków, rodzajów badanych matryc, wyposażenia i technik analitycznych stosowanych w laboratorium (Lehotay i wsp. 2010).

Wnioski / Conclusions

1. Zastosowana technika QuEChERS analizy mięty na pozostałości środków ochrony roślin jest znacznie szybsza, prostsza i tańsza w porównaniu z dotychczas stosowaną metodą w laboratorium.
2. W metodzie tej, w znacznym stopniu udało się pozbyć uciążliwych substancji z matrycy uzyskując zadowalające wyniki.
4. Uzyskane wyniki, dla przeprowadzonego procesu walidacji, spełniają wymagania zaleceń europejskich SANCO/01684/2009 (obecnie zastąpionych przez SANCO/12495/2011).
5. Adaptacja techniki QuEChERS w analizie mięty będzie mogła zostać wykorzystana do badań rutynowych, innych trudnych matryc roślinnych, np. zielarskich.

Literatura / References

- Anastassiades M., Lehotay S. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and „dispersive SPE” for the determination of pesticide residues in produce. J. AOAC Int. 86: 412–431.
- Ferrer C., Gómez M.J., García-Reyes J.F., Ferrer I., Thurman E.M., Fernández-Alba A.R. 2005. Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1069: 183–194.
- He Y., Liu Y.-H. 2007. Assessment of primary and secondary amine adsorbents and elution solvents with or without graphitized carbon for the SPE clean-up of food extracts in pesticide residue analysis. Chromatogr. 65: 581–590.
- Lehotay S.J., Ae Son K., 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. J. Chromatogr. A 1217: 2548–2560.
- PN-EN 15662. 2008. Żywność pochodzenia roślinnego – Oznaczanie pozostałości pestycydów metodą GC-MS i/lub LC-MS/(MS) po uprzedniej ekstrakcji i rozdzieleniu acetonitrylem oraz oczyszczaniu metodą dyspersyjnej SPE – Metoda QuEChERS, 80 ss.
- Sadło S., Szpyrka E., Rogozińska K., Rupar J. 2006. Występowanie pozostałości niektórych pestycydów w mięcie pieprzowej *Mentha piperita* L. w latach 2003–2005. Roczn. PZH 57: 211–216.
- SANCO/10684/2009. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, 53 pp.
- SANCO/12495/2011 Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, 40 pp.
- Szpyrka E., Rogozińska K., Rupar J., Sadło S. 2004. Metody oznaczania i występowanie pozostałości składników aktywnych niektórych środków ochrony roślin w mięcie pieprzowej (*Mentha piperita* L.). Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin 44 (2): 1142–1145.
- Zalecenia Ochrony Roślin na lata 2006/2007. Cz. IV, Rośliny Ozdobne Rośliny Zielarskie. 2006. Inst. Ochr. Roślin, Poznań 2006, 226 ss.
- Zalecenia Ochrony Roślin na lata 2008/2009 Cz. IV, Rośliny Ozdobne Rośliny Zielarskie. 2008. Inst. Ochr. Roślin, Poznań 2008, 180 ss.
- Zalecenia Ochrony Roślin na lata 2010/2011 Cz. IV, Rośliny Ozdobne Rośliny Zielarskie. 2010. Inst. Ochr. Roślin, Poznań 2010, 158 ss.