

Angelika BEYER^{1*} i Marek BIZIUK¹

OZNACZANIE POZOSTAŁOŚCI PESTYCYDÓW W PRÓBKACH ŻYWNOSCI Z WYKORZYSTANIEM METODYKI QuEChERS

QuEChERS APPROACH FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN FOOD MATRIXES

Abstrakt: Oznaczanie pozostałości pestycydów w próbkach żywności jest ogromnym wyzwaniem głównie z powodu dużych ilości substancji przeszkadzających, takich jak białka, cukry, tłuszcze, które podlegają ekstrakcji razem z analitami i najczęściej wywierają negatywny wpływ na tok analizy. Z drugiej strony zapewnienie „bezpieczeństwa żywności” wymaga monitorowania w niej pozostałości pestycydów. Z tego też powodu przed chemikami analitykami stoją nowe wyzwania w postaci konieczności opracowania metodyk oznaczania pozostałości, które pozwalają na oznaczanie pestycydów należących do różnych grup w trakcie jednej analizy. Ogromna różnorodność tych związków utrudnia jednak opracowanie procedury analitycznej pozwalającej na jednoczesne oznaczenie wszystkich analitów.

Słowa kluczowe: pestycydy, żywność, przygotowanie próbek, ekstrakcja, oczyszczanie, metodyka QuEChERS

Wstęp

Oznaczanie pozostałości pestycydów w próbkach żywności jest obecnie koniecznością ze względu na toksyczność i trwałość tych ksenobiotyków. Niestety, dostępne metodyki analityczne najczęściej stosowane w laboratoriach do oznaczeń pestycydów nie są idealne. Niektóre laboratoria, oznaczające pozostałości pestycydów, wciąż jeszcze stosują procedury opracowane 30 lat temu, gdy wymagania analityczne i legislacyjne były mniej ostre, a technologia nie była tak rozwinięta jak dziś. Tradycyjnie stosowane procedury są zarówno czaso-, jak i pracochłonne, skomplikowane, drogie, a w ich wyniku powstają znaczne ilości odpadów i często nie jest możliwe uzyskanie wystarczająco niskiej granicy oznaczalności. Nie jest również sytuacją niespotykaną potrzeba oznaczania wielu różnych (pod względem właściwości

¹ Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, ul. G. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, tel. 58 347 17 83, fax 58 347 26 94, email: biziuk@chem.pg.gda.pl

* Autor do korespondencji: angelika.beyer@gmail.com

fizycznych i chemicznych) związków, a nie jednego analitu czy pojedynczej klasy związków. Stąd potrzeba nowych rozwiązań dotyczących m.in. metodyk oznaczania pozostałości pestycydów w próbkach żywności.

Metodyki oznaczania pozostałości pestycydów w próbkach środowiskowych

Bez wątpienia wartym uwagi podejściem do problemu oznaczania pestycydów, ze względu na różnorodność tej grupy związków, jest zastosowanie metodyk oznaczania pozostałości (*multi-residue methods* - MRMs). Niestety, w literaturze naukowej można znaleźć stosunkowo niewiele informacji na temat takiego podejścia do oznaczania pozostałości pestycydów w próbkach żywności. Stąd próba przybliżenia czytelnikom kilku najważniejszych, zdaniem autorów, metodyk analizy pozostałości, mających zastosowanie do oznaczenia pestycydów w próbkach żywności.

Głównym założeniem metodyk oznaczania pozostałości jest gwarancja rzetelnych i precyzyjnych wyników na odpowiednio niskich poziomach stężeń dla szerokiego spektrum analitów. Ponadto, proponowane metodyki powinny się charakteryzować takimi parametrami, jak:

- szybkość analizy - małe opóźnienie czasowe pomiędzy etapem pobierania próbki a uzyskaniem informacji o ilości (stężeniu) analitów w próbce,
- łatwość wykonania analizy,
- możliwość zastosowania niedrogich odczynników i aparatury,
- selektywność oznaczania analitów,
- wysoki poziom automatyzacji, aby zredukować wpływ czynnika ludzkiego na wyniki analiz,
- możliwość stosowania niewielkich ilości rozpuszczalników i odczynników, w celu ograniczenia ilości odpadów powstających w wyniku analizy.

Jednak, jak pokazuje historia, spełnienie tych postulatów nie było i nadal nie jest łatwe.

W tabeli 1 przedstawiono chronologicznie krótki opis metodyk oznaczania pozostałości pestycydów w próbkach żywności, poczynawszy od pierwszej znanej metodyki zastosowanej do oznaczania pozostałości niepolarnych pestycydów, opracowanej przez chemika P.A. Millsa z Agencji ds. Żywności i Leków Stanów Zjednoczonych (FDA) w latach 60. XX wieku, przez metodyki przeznaczone do oznaczania szerokiego spektrum pozostałości pestycydów o różnej polarności zarówno chloroorganicznych, jak i fosforo- oraz azotoorganicznych, opracowywane w latach 70. i metodyki z lat 80., w których zaczęto zwracać większą uwagę na zanieczyszczenie środowiska i jego wpływ na zdrowie człowieka, aż do rozwoju metodyk zgodnych z zasadami rozwoju zrównoważonego i zielonej chemii.

Pomimo licznych zalet procedur i technik, których intensywny rozwój nastąpił w ciągu ostatnich 20-30 lat, żadnej z nich nie udało się przewyciężyć praktycznych ograniczeń tak, aby możliwe było jej powszechne wdrożenie. W tabeli 2 przedstawiono porównanie technik ekstrakcyjnych, które są najczęściej stosowane w analizie próbek żywności pod kątem zawartości pestycydów. Zaproponowane podejścia są użyteczne i znajdują szereg zastosowań, jednak nie są wystarczająco proste i wydajne, aby mogły



być rozpatrywane jako techniki ekstrakcyjne do procedur oznaczania pozostałości pestycydów w próbkach o złożonym składzie matrycy.

Tabela 1

Metodyki analizy pozostałości pestycydów w próbkach żywności

	Krótki opis metodyki	Lit.
lata 60. XX wieku	Metodyka opracowana przez Millsa pozwalająca na ekstrakcję insektycydów chloroorganicznych i innych niepolarnych pestycydów z żywności o małej zawartości tłuszczu za pomocą acetonitrylu, który był następnie rozcieńczany wodą. Po ekstrakcji tej mieszaniny za pomocą niepolarnego rozpuszczalnika (eter naftowy) możliwe było oznaczenie niepolarnych analitów. Jednak, względnie polarne pestycydy, jak insektycydy fosforoorganiczne, były częściowo tracone na tym etapie analizy.	[1]
	Metodyki będące w rzeczywistości niewielkimi modyfikacjami metody Millsa, w których również przeprowadzano ekstrakcję acetonitrylem, natomiast inne były etapy rozdzielania, oczyszczania czy oznaczania końcowego. Celem tych modyfikacji było rozszerzenie możliwości analitycznych procedury Millsa tak, aby możliwe było jej zastosowanie do związków o różnej polarności.	[2, 3]
lata 70. XX wieku	Nowa metodyka oznaczania szerokiego spektrum pozostałości pestycydów o różnej polarności (chloro-, fosforo- oraz azotoorganicznych), w której zamiast acetonitrylu do początkowej ekstrakcji stosowano aceton. Kolejnym etapem procedury była ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz z zastosowaniem niepolarnych rozpuszczalników (jak dichlorometan czy mieszanina dichlorometan-eter naftowy) w celu usunięcia wody z ekstraktu. Była to pierwsza metodyka, w której dodawano również roztworu chlorku sodu do pierwszego ekstraktu, co jednak powodowało tylko częściowe nasycenie fazy wodnej solą.	[4]
	Metodyki oznaczania pozostałości różnych pestycydów, w których dodawano chlorku sodu do nasycenia fazy wodnej, co zwiększało ilość acetonu w fazie organicznej, zwiększając polarność tej fazy, i w konsekwencji prowadziło do większych odzysków polarnych analitów.	[5, 6]
lata 80. XX wieku	Procedury, w których wprowadzano operacje i procesy niepociągające za sobą konieczności używania dużych ilości chlorowanych rozpuszczalników, chlorowane rozpuszczalniki, zastępowano innymi, np. mieszaniną cykloheksan-octan etylu (1:1) zamiast dichlorometanu czy mieszaniną dichlorometan-eter naftowy (1:1), aby zainicjować rozdzielanie. W dalszym ciągu do początkowej ekstrakcji najczęściej stosowano aceton.	[7, 8]
	Procedury, w których zaczęto stosować technikę ekstrakcji do fazy stałej (SPE) do izolacji pestycydów z rozcieńczonych acetonowych ekstraktów, w celu uniknięcia konieczności stosowania ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz.	[9, 10]
	Metodyki, w których stosowano fruktozę bądź sole, np. $MgSO_4$ i/lub $NaCl$ do rozdzielania wody i acetonu, zamiast używać niepolarnych rozpuszczalników.	[11, 12]
	Procedury, w których podjęto próby usunięcia fazy wodnej z ekstraktów poprzez jej wymrożenie. Jednak, aceton zbyt dobrze miesza się z wodą, aby możliwe było łatwe rozdzielanie wody od acetonu bez konieczności stosowania niepolarnych rozpuszczalników.	[13]
	Procedury będące modyfikacjami metodyki Millsa, w których przeprowadzano ekstrakcję za pomocą acetonitrylu, a następnie, zamiast niepolarnego współrozpuszczalnika, dodawano soli, np. $NaCl$. W przypadku zastosowania acetonitrylu dodatek soli zapewnia wystarczające oddzielenie wody.	[14]
	Kolejne metodyki oznaczania pozostałości pestycydów w próbkach żywności, korzystające z wysalania z acetonitrylu.	[15-17]
	Procedury MRM z użyciem octanu etylu, który tylko częściowo miesza się z wodą, co czyni dodawanie niepolarnych współrozpuszczalników, w celu oddzielenia wody od ekstraktu, zbędnym etapem. Jednak niektóre z najbardziej polarnych pestycydów nie rozdzielają się w octanie etylu. Dlatego też, aby zwiększyć odzyski związków polarnych, zazwyczaj dodawano większych ilości Na_2SO_4 (w celu związania wody).	[18, 19]
Kolejne metodyki oznaczania pozostałości pestycydów z użyciem octanu etylu. W celu zwiększenia polarności fazy organicznej stosowano polarne współrozpuszczalniki, takie jak metanol czy etanol.	[20]	

lata 90. XX wieku	Rozwój zielonej chemii analitycznej, zgodnej z koncepcją rozwoju zrównoważonego, doprowadził do rozwoju wielu nowych alternatywnych technik ekstrakcyjnych, takich jak: ekstrakcja za pomocą płynu w stanie nadkrytycznym (SFE), ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana promieniowaniem mikrofalowym (MAE), ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika z próbki zmieszanej z wypełniaczem (MSPD), mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME) oraz przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (PLE, znana również jako ASE).	
-------------------	---	--

Tabela 2

Porównanie nowoczesnych technik ekstrakcyjnych najczęściej stosowanych w analizie próbek żywności pod kątem zawartości pestycydów

Technika	Zalety	Wady	Lit.
ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana promieniowaniem mikrofalowym	<ul style="list-style-type: none"> - łatwość wykonania, - możliwość prowadzenia jednocześnie ekstrakcji kilku próbek, - zużycie niewielkich ilości rozpuszczalników, - krótki czas ekstrakcji, 	<ul style="list-style-type: none"> - niewystarczająca selektywność ekstrakcji, - konieczność oddzielenia ekstraktu od pozostałości poekstrakcyjnej, - brak możliwości ekstrakcji analitów nietrwałych termicznie, 	[21]
przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika	<ul style="list-style-type: none"> - możliwość automatyzacji procesu ekstrakcji pozwalająca realizować wszystkie etapy procesu w identyczny sposób, - krótki czas ekstrakcji, - możliwość ekstrakcji analitów nietrwałych termicznie, - umiarkowane zużycie rozpuszczalników, - łatwość przygotowania próbki do analizy, 	<ul style="list-style-type: none"> - duży koszt aparatury oraz jej utrzymania, - mała selektywność ekstrakcji, - konieczność czasochłonnego oczyszczania ekstraktów oraz aparatury po każdym użyciu, 	[22-24]
ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika próbki zmieszanej z wypełniaczem	<ul style="list-style-type: none"> - stosunkowo mały koszt analizy, - prostota wyposażenia - możliwość wykonywania kilku analiz równocześnie, - możliwość przeprowadzenia w warunkach <i>in situ</i>, - możliwość ograniczenia użycia dużych ilości toksycznych rozpuszczalników, 	<ul style="list-style-type: none"> - brak możliwości zapewnienia wystarczająco szerokiego zakresu analitycznego w pojedynczej procedurze, - czasem małe odzyski analitów, 	[25]
mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej	<ul style="list-style-type: none"> - możliwość całkowitego wyeliminowania użycia rozpuszczalników, - brak wrażliwości na zawiesiny, - ograniczona pojemność adsorbentu, dzięki czemu nie ma możliwości „przeładowania” kolumny w przypadku obecności w próbce dużej ilości analizowanych związków, - możliwość wielokrotnego powtórzenia analizy danej próbki, - możliwość wielokrotnego używania jednego włókna bez strat w adsorbowanej substancji, - możliwość używania do analiz chromatografów ze zwykłymi dozownikami - nie ma konieczności wprowadzania żadnych poważniejszych zmian w ich konstrukcji, 	<ul style="list-style-type: none"> - brak możliwości zapewnienia wystarczająco szerokiego zakresu analitycznego w pojedynczej procedurze, - trudności z odtwarzalnością wyników, często problemy z optymalizacją metody, 	[26, 27]

ekstrakcja za pomocą plynu w stanie nadkrytycznym	<ul style="list-style-type: none"> - możliwość znacznego zmniejszenia zużycia rozpuszczalników, - możliwość ekstrakcji analitów nietrwałych termicznie, - możliwość prowadzenia ekstrakcji frakcjonowanej, - krótki czas ekstrakcji, - stosunkowo niewielka pracochłonność ze względu na zastosowanie wyspecjalizowanego urządzenia pozwalającego na przeprowadzanie ekstrakcji w ciągły półautomatyczny sposób, 	<ul style="list-style-type: none"> - duży koszt aparatury i jej utrzymania, - mała selektywność ekstrakcji, - konieczność czasochłonnego oczyszczania ekstraktów oraz urządzenia po każdym użyciu. 	[28]
---	---	---	------

Pomimo wielu różnych metodyk oznaczania pozostałości, które zostały opisane w ciągu ostatnich 40-50 lat, żadna z nich, jak dotąd, nie może być uważana za szybką i łatwą procedurę analityczną zapewniającą selektywność i powtarzalność przy jednoczesnym zachowaniu dużych odzysków dla szerokiego spektrum analitów.

Celem tej pracy jest przedstawienie czytelnikom prostej, szybkiej i niedrożej procedury oznaczania pozostałości pestycydów w żywności, która dostarcza rzetelnych wyników, a jednocześnie umożliwia zmniejszenie ilości niezbędnych etapów analitycznych, odczynników i szkła laboratoryjnego. Metodyka ta upraszcza etapy ekstrakcji analitów i oczyszczania ekstraktów bez negatywnego wpływu na ilość odzyskanych analitów.

Metodyka analityczna QuEChERS

Anastassiades i współpr. [29, 30] opracowali oryginalną metodykę analityczną łączącą technikę ekstrakcji/izolacji różnorodnych pestycydów z próbek żywności oraz oczyszczania tych ekstraktów i nazwali ją „QuEChERS”, od angielskich słów:

- **Quick** - szybka,
- **Easy** - łatwa,
- **Cheap** - tania,
- **Effective** - skuteczna,
- **Rugged** - tolerancyjna, elastyczna,
- **Safe** - bezpieczna.

Technika ta polega na ekstrakcji za pomocą acetonitrylu w skali mikro i oczyszczaniu ekstraktu z wykorzystaniem dyspersyjnej wersji techniki ekstrakcji do fazy stałej (d-SPE).

Na rysunku 1 przedstawiono porównanie tradycyjnych metod oznaczania pestycydów w żywności oraz nowej metodyki QuEChERS. Wyraźnie wynika z niego, że zastosowanie metodyki QuEChERS pozwoli zmniejszyć ilość etapów procedury analitycznej. Jest to bardzo ważne, gdyż każdy dodatkowy etap komplikuje procedurę, jest również potencjalnym źródłem błędów.

Opracowanie nowej metodyki wymaga ustosunkowania się m.in. do następujących kwestii:

- sposobu rozdrobnienia próbki i jej ilości,
- wyboru rozpuszczalnika do ekstrakcji,
- wyboru odpowiedniego współczynnika „ilość próbki/ilość ekstrahenta”,
- sposobu prowadzenia ekstrakcji - wstrząsanie czy mieszanie,



- sposobu zainicjowania rozdzielenia faz,
- sposobu oczyszczania ekstraktu.

Tradycyjne metodyki analizy próbek żywności pod kątem zawartości pestycydów

- wymagają zazwyczaj dużych ilości próbek,
- są to zazwyczaj procedury wieloetapowe, które wymagają jednego bądź więcej etapów oczyszczania ekstraktu, a w związku z tym są skomplikowane, drogie, czaso- i pracochłonne,
- w ich wyniku powstają znaczne ilości odpadów,

Metodyka QuEChERS

- umożliwia zmniejszenie ilości próbek oraz potrzebnego szkła laboratoryjnego,
- nie wymaga mieszania i filtracji, etapu odparowywania/zatężania oraz wymiany rozpuszczalników.

Rys. 1. Porównanie tradycyjnego podejścia w analizie żywności pod kątem zawartości pestycydów oraz metodyki QuEChERS

Sposób rozdrobnienia próbki i jej ilość

Najprostszym sposobem poprawienia wydajności metody analitycznej jest zredukowanie rozmiaru próbki do najmniejszej jej ilości, która pozwoli otrzymać rzetelne wyniki. W większości metodyk oznaczania pozostałości potrzebna ilość próbki to ok. 50÷100 g. Taka ilość próbki musi zostać rozdrobniona za pomocą odpowiednich urządzeń i technik, a w przypadku żywności również w odpowiednich warunkach. Tak przygotowana próbka żywności o masie ok. 10 g została uznana jako odpowiednia w przypadku metodyki QuEChERS. Należy pamiętać, że im lepiej rozdrobniona próbka, tym lepsza penetracja matrycy przez rozpuszczalnik.

Wybór rozpuszczalnika do ekstrakcji

W przypadku oznaczania pozostałości pestycydów w próbkach żywności najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami były i są: aceton [4, 5, 11, 13, 29], octan etylu [18-20] i acetonitryl [1-3, 15-17], gdyż wszystkie one pozwalają osiągnąć duże odzyski analitów. W tabeli 3 przedstawiono wady i zalety tych rozpuszczalników. Ponieważ jednak po ekstrakcji z próbek żywności (owoców i warzyw) ekstrakty acetonirylem zawierają mniej substancji przeszkadzających niż ekstrakty octanem etylu i acetonem oraz stosunkowo łatwo można oddzielić acetonitryl od wody (za pomocą dodatku soli), to acetonitryl został wybrany jako rozpuszczalnik ekstrakcyjny w przypadku stosowania metodyki QuEChERS.

Tabela 3

Porównanie rozpuszczalników najczęściej stosowanych w analizie żywności pod kątem zawartości pestycydów

Rozpuszczalnik	Zalety	Wady
acetonitryl	- jest możliwe łatwe i skuteczne oddzielenie acetonitrylu od wody, używając dodatku soli zamiast niepolarnych rozpuszczalników	- ekstrakty zawierają substancje przeszkadzające
aceton	- dobrze miesza się z wodą	- nie jest możliwe rozdzielanie wody i acetonu bez użycia niepolarnych rozpuszczalników
octan etylu	- tylko częściowo miesza się z wodą, co czyni dodawanie niepolarnych rozpuszczalników, aby oddzielić go od wody, zbędnym etapem	- niektóre z najbardziej polarnych pestycydów nie rozdzielają się w nim, - jego używanie pociąga za sobą izolację z badanej próbki znacznych ilości niepolarnych substancji przeszkadzających, takich jak lipidy czy wosk epikutylarny, które należy usunąć przed etapem oznaczeń końcowych, oczyszczenie tak otrzymanego ekstraktu wymaga czasochłonnej techniki, np. chromatografii żelowej (GPC), co również skutkuje powstaniem dużych ilości odpadów.

Współczynnik „ilość próbki/ilość ekstrahenta”

Im mniejsza ilość ekstrahenta jest używana na jednostkę masy próbki, tym bardziej skoncentrowany ekstrakt można otrzymać. Pozwala to uniknąć etapu odparowywania rozpuszczalnika i, przynajmniej teoretycznie, obniża granicę wykrywalności. W trakcie opracowywania metodyki QuEChERS autorzy porównali dwa współczynniki „ilość próbki/ilość ekstrahenta”:

- 1/1 - 10 g próbki + 10 cm³ ekstrahenta,
- 2/1 - 10 g próbki + 5 cm³ ekstrahenta.

Okazało się, że odzyski dla najbardziej polarnych pestycydów w przypadku zastosowania współczynnika „ilość próbki/ilość ekstrahenta” równego 2/1 nie były tak duże jak w przypadku współczynnika 1/1. Mimo to odzyski wszystkich pestycydów wynosiły ponad 75% zarówno dla współczynnika 2/1, jak i 1/1.

Wstrząsanie czy mieszanie

Zdaniem autorów metodyki QuEChERS, wstrząsanie powinno być zawsze rozpatrywane przed mieszaniem z użyciem określonych urządzeń (mieszalników), o ile oczywiście ekstrakcja wspomagana wstrząsaniem dostarcza możliwe do przyjęcia wyniki, np. dla materiałów odniesienia. Na poparcie swojego twierdzenia przywołują następujące zalety wstrząsania nad mieszaniem:

- w trakcie wstrząsania próbka nie jest narażona na kontakt z metalowymi powierzchniami, które występują w mieszalnikach,
- w razie potrzeby wstrząsanie może być wykonane ręcznie zarówno w laboratorium, jak i w terenie,
- brak konieczności czyszczenia pojemnika na próbkę w mieszalniku między ekstrakcjami kolejnych próbek,

- wstrząsanie odbywa się w zamkniętym naczyniu, co jest bezpieczniejsze ze względu na brak emisji par rozpuszczalnika,
- nie jest potrzebna dodatkowa ilość rozpuszczalnika do płukania naczynia, w którym odbywało się mieszanie,
- koszt zakupu i utrzymania wytrząsarki jest mniejszy niż mieszalnika,
- w trakcie mieszania w mieszalniku generowane jest ciepło wywołane przez tarcie (szczególnie w przypadku dodatku soli), wstrząsanie eliminuje ten problem.

Sposób zainicjowania rozdzielania faz

Aby uniknąć stosowania często toksycznych i drogich współrozpuszczalników, opracowując metodykę QuEChERS, przeprowadzono szereg eksperymentów z dodatkiem różnych soli, które miały zainicjować rozdzielanie faz wodnej i organicznej. Zastosowanie różnych soli umożliwiło analizę pestycydów o różnej polarności. Spośród soli, które badano, siarczan magnezu zapewniał najbardziej kompletną ekstrakcję ciecz-ciecz, co miało bezpośrednie przełożenie na największe odzyski pestycydów, szczególnie tych najbardziej polarnych, jak metamidofos, acefat czy ometoat. Do dalszych eksperymentów wybrano mieszaninę 4 g $MgSO_4$ i 1 g NaCl.

Sposób oczyszczania ekstraktu

W konwencjonalnej odmianie techniki ekstrakcji do fazy stałej używa się najczęściej plastikowych bądź szklanych kolumniek wypełnionych złożem ekstrakcyjnego o masie 250÷1000 mg. Niezbędny jest też zestaw do oczyszczania i wzbogacania ekstraktów techniką ekstrakcji do fazy stałej (komora próżniowa ze szkła borokrzemianowego, pokrywa, króćce i zawory, manometr kontrolny, pompa próżniowa, odbieralnik rozpuszczalnika i odbieralnik próbki), a także etap kondycjonowania złoża i odparowywania rozpuszczalnika. Chociaż technika SPE z zastosowaniem kolumniek ekstrakcyjnych ma wiele zalet, nie jest jednak techniką idealną. Dlatego w metodyce QuEChERS zastosowano tzw. dyspersyjny wariant techniki SPE (d-SPE), który pozwala na oszczędność czasu, wysiłku, pieniędzy i rozpuszczalników w porównaniu z tradycyjną SPE, co świetnie ilustruje rysunek 2 [31], przedstawiający schemat postępowania w dyspersyjnej technice SPE.

Probówki zawierające złożo materiału ekstrakcyjnego do d-SPE można przygotować w laboratorium, ale również są one dostępne handlowo i mogą zawierać:

- siarczan magnezu - w celu rozdzielania wody od rozpuszczalnika organicznego,
- złożo zawierające pierwszorzędowe i drugorzędowe grupy aminowe (PSA) - w celu usunięcia cukrów i kwasów tłuszczowych,
- złożo sadzy grafityzowanej (GBC) - w celu usunięcia barwników i steroli,
- złożo C_{18} - w celu usunięcia niepolarnych substancji przeszkadzających, takich jak lipidy.

Na rysunku 3 [29, 33, 35] przedstawiono porównanie dwóch odmian techniki ekstrakcji do fazy stałej: tradycyjnej (kolumnowej) oraz dyspersyjnej SPE. Na tej podstawie wybrano dyspersyjną odmianę techniki SPE na złożu PSA.





1. Przeniesienie odwirowanego ekstraktu do probówki zawierającej złożę odpowiedniego sorbentu/sorbentów.
2. Energiczne wstrząsanie (ok. 30 s - 2 min).
3. Wirowanie (5 min, 3000 obr./min) w celu oddzielenia złoża sorbentu od oczyszczonego ekstraktu.
4. Natychmiastowe nastawienie miana pH (jeśli jest to konieczne). Ekstrakt tak przygotowany jest gotowy do oznaczeń końcowych techniką GC lub LC.

Rys. 2. Schemat postępowania w przypadku techniki d-SPE

Tradycyjne kolumnowe SPE	Dyspersyjne SPE oraz d-SPE
<ul style="list-style-type: none"> • zapewnia lepsze oczyszczenie próbek, • wymaga większej ilości próbki, • wymaga kondycjonowania złoża i etapu odparowania rozpuszczalnika. 	<ul style="list-style-type: none"> • umożliwia otrzymanie większych i bardziej powtarzalnych odzysków analitów o właściwościach kwasowych bądź zasadowych (np. acefat, karbendazym, imazalil, metamidofos, pymetrozyna i tiabendazol), • nie wymaga kondycjonowania złoża i etapu odparowania rozpuszczalnika, jest więc szybszą techniką, • wymaga mniejszej ilości próbki, sorbentu oraz sprzętu, jest więc techniką tańszą i łatwiejszą, • może być stosowana tylko, gdy na złożu sorbentu zatrzymywane są substancje przeszkadzające, a nie analit.

Rys. 3. Porównanie tradycyjnego kolumnowego SPE oraz dyspersyjnego SPE

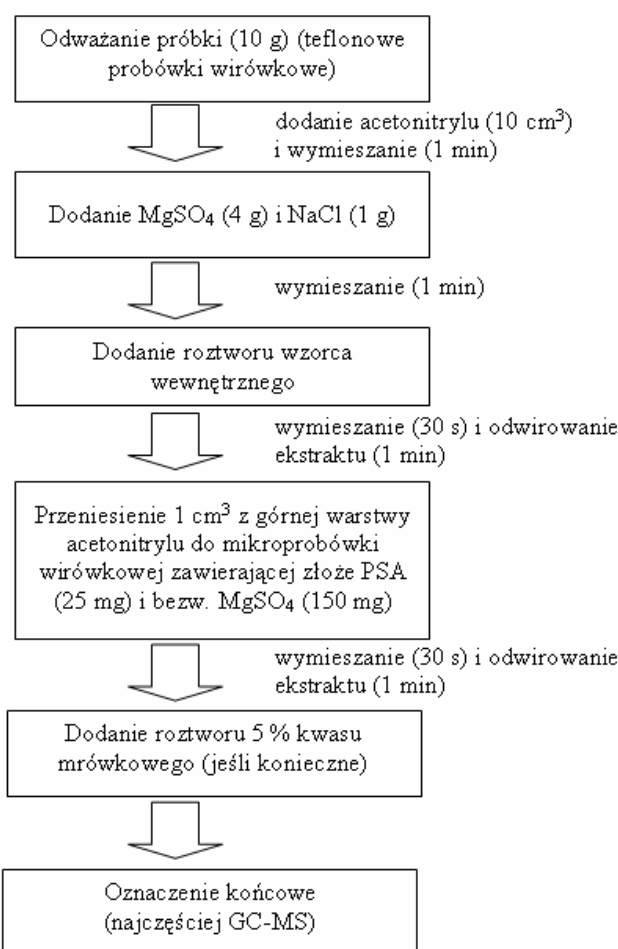
Oznaczanie pozostałości pestycydów w owocach i warzywach

Opracowana przez Anastasiadesa i współpracowników w 2003 roku [29] procedura (rys. 4) polegała na ekstrakcji przez wirowanie próbki żywności z acetonitrylem. Wodę i acetonitryl rozdzielano, dodając do ekstraktu bezwodnego siarczanu magnezu oraz chlorku sodu. Następnie ekstrakt oczyszczano przy użyciu techniki d-SPE z zastosowaniem złoża PSA, które efektywnie usuwa wiele polarnych substancji przeszkadzających, znajdujących się w próbkach żywności. Tak przygotowane ekstrakty były gotowe do oznaczeń końcowych.

Kontynuacją badań Anastasiadesa i współpracowników była przeprowadzona przez Lehotaya i współpracowników w 2005 roku [32] walidacja procedury dla ponad 200 różnych pestycydów w kilkunastu próbkach o zróżnicowanym składzie matrycy. Na etapie oznaczeń końco-



wych wykorzystano chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (GC-MS) oraz chromatografię cieczową z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Otrzymane wyniki były bardzo dobre dla większości pozostałości analizowanych pestycydów w warzywach i owocach, wyjątek stanowiły pewne pestycydy stabilne wyłącznie w środowisku o określonym pH. W próbkach, których matryce nie zawierają kwasów, jak sałata, zaobserwowano degradację pestycydów wrażliwych w środowisku zasadowym, takich jak kaptan, folpet, dichlorofluanid i chlorotalonil. Problem ten jednak przezwyciężono, dodając podczas ekstrakcji 0,1% roztworu kwasu octowego lub mrówkowego [33, 34]. Dla różnych warzyw i owoców z dodatkiem pestycydów zarówno polarnych, jak i zasadowych otrzymano odzyski przekraczające zazwyczaj 90% oraz powtarzalność najczęściej mniejszą niż 5% (miarą powtarzalności jest odchylenie standardowe powtarzalności oznaczeń).



Rys. 4. Główne etapy procedury analitycznej wykorzystywanej do oznaczania pestycydów w próbkach żywności (owoce i warzywa)

Oznaczanie pozostałości pestycydów w żywności o dużej zawartości tłuszczu

Bardzo dobre wyniki, które udało się otrzymać, stosując metodykę QuEChERS do analizy warzyw i owoców, spowodowały zainteresowanie tą procedurą i próby jej zastosowania do oznaczania pozostałości pestycydów w żywności zawierającej większe ilości tłuszczu [35].

Lehotay i współpracownicy [35] postawili sobie za cel oznaczyć zawartość pozostałości pestycydów w żywności zawierającej do 20% tłuszczu (mleko i jaja) metodyką QuEChERS. Uznali oni, że w żywności zawierającej od 2 do 20% tłuszczu mogą występować pozostałości zarówno lipofilowych, jak i hydrofilowych pestycydów, stąd słuszność poszukiwania i rozwoju metod analitycznych pozwalających na jednoczesne oznaczanie analitów o szerokim spektrum polarności. Do żywności takiej zaliczyć można m.in. mleko, jaja, orzechy, kukurydzę, soję, pszenicę oraz inne ziarna, ryby i owoce morza, a także nerki, wątrobę i mięso drobiowe, wieprzowe czy też wołowe, również awokado. Natomiast w żywności zawierającej powyżej 20% tłuszczu (m.in. oleje roślinne, tłuszcz zwierzęcy oraz masło) występują głównie anality niepolarne, stąd brak konieczności opracowywania metodyk analitycznych pozwalających na oznaczanie polarnych pestycydów w próbkach o takim składzie matrycy.

Chociaż tłuszcze nie rozpuszczają się najlepiej w acetonitrylu, jednak pewne ich ilości będą się współekstrahowały z analitami, stąd konieczność usunięcia ich przed etapem oznaczeń końcowych. Dlatego też modyfikacje metodyki QuEChERS zmierzające do zastosowania jej do analizy żywności zawierającej tłuszcz rozpoczęto od ponownego ocenienia etapu oczyszczania ekstraktu. W przypadku próbek praktycznie niezawierających tłuszczu (owoce i warzywa) oczyszczanie za pomocą techniki d-SPE (na złożu PSA z dodatkiem bezwodnego $MgSO_4$) zapewniało możliwość usunięcia substancji przeszkadzających bez negatywnego wpływu na odzysk analitów [29]. W przypadku „tłustych” próbek oczyszczanie ekstraktów na złożu sadzy grafityzowanej (GCB) najlepiej spośród analizowanych złożów usuwało substancje przeszkadzające, usuwało jednak równocześnie niektóre pestycydy, jak terbufos, tiabendazol, heksachlorobenzen i inne - zawierające w molekule płaskie pierścienie. Dlatego porównano efektywność oczyszczania takich „tłustych próbek”, jak jaja, mleko, awokado i tkanki zwierzęce, metodyką QuEChERS z wykorzystaniem takich sorbentów, jak PSA, GCB i C_{18} za pomocą różnych odmian techniki SPE (tradycyjnej i d-SPE). Porównano również „oryginalną” metodykę QuEChERS, w której zastosowano $NaCl$ i $MgSO_4$, aby zapoczątkować rozdzielanie acetonitrylu i wody, oraz procedurę zmodyfikowaną, w której do acetonitrylu dodano 1% roztworu lodowatego kwasu octowego i soli sodowej kwasu octowego zamiast $NaCl$, aby osiągnąć stałe pH procedury niezależnie od początkowego pH próbki.

Okazało się, że zastosowanie zmodyfikowanej metodyki QuEChERS pozwoliło na otrzymanie większych odzysków analitów i większej stabilności tych pestycydów, które są wrażliwe na zmiany pH, dlatego w dalszych eksperymentach stosowano tę metodę [33]. Dowiedziono również, iż zastosowanie złoża sadzy grafityzowanej do oczyszczania próbek może mieć miejsce tylko w przypadku analizowania ich pod kątem zawartości pestycydów innych niż anality zawierające płaskie pierścienie w molekule. Zastosowanie kombinacji sorbentów PSA i C_{18} na etapie oczyszczania ekstraktów za pomocą techniki d-SPE pozwoliło na efektywne oczyszczanie próbek w przypadku konieczności oznacze-



nia analitów zawierających płaskie pierścienie w molekułach. Udowodniono też, że tradycyjna kolumnowa technika ekstrakcji do fazy stałej zastosowana w zmodyfikowanej metodyce QuEChERS pozwala na usunięcie większej ilości substancji przeszkadzających z ekstraktów z jaj niż technika d-SPE [35].

Podjęto również próby zastosowania metodyki QuEChERS do badań analitycznych innych próbek żywności o dużej zawartości tłuszczu, jak oliwki i olej z oliwek, pod kątem zawartości pestycydów należących do różnych klas [36] (chloroorganiczne, fosforoorganiczne oraz triazyny). Na etapie oczyszczania ekstraktów zastosowano mieszaninę 3 sorbentów: C₁₈, PSA i GCB, otrzymując obiecujące wyniki. Dla większości analitów otrzymano duże odzyski, jedynie dla mało polarnych analitów (chloroorganiczne) odzyski były mniejsze niż 70%.

Podsumowanie

Zmodyfikowana metodyka QuEChERS z wykorzystaniem dyspersyjnego wariantu techniki SPE jest łatwym i szybkim podejściem w przypadku konieczności przygotowania próbki pod kątem analizy zawartości pozostałości pestycydów. Jednak wydaje się, iż nie nadaje się do zastosowania w przypadku ekstrakcji lipofilowych pestycydów z próbek żywności o dużej zawartości tłuszczu. Może być natomiast przydatna do ekstrakcji pestycydów polarnych i średniopólnych z żywności o różnej zawartości tłuszczu. Z całą pewnością jest to użyteczna technika ekstrakcyjna w przypadku analizy żywności niezawierającej tłuszczu pod kątem zawartości pestycydów o szerokim zakresie polarności.

Spis akronimów

Akronim	Termin obcojęzyczny	Termin polski
ASE	Accelerated Solvent Extraction	Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika
FDA	Food and Drug Administration	Agencja ds. Żywności i Leków
GC-MS	Gas Chromatography - Mass Spectrometry	Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
GCB	Graphitized Carbon Black	Sadza (czerni węglowa) grafityzowana
GPC	Gel Permeation Chromatography	Chromatografia żelowa
LC-MS/MS	Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry	Chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas
MAE	Microwave - Assisted Extraction	Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana promieniowaniem mikrofalowym
MRMs	Multi-Residue Methods	Metodyki oznaczania pozostałości
MSPD	Matrix Solid Phase Dispersion	Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika z próbki zmieszanej z wypełniaczem
PLE	Pressurized Liquid Extraction	Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika
PSA	Primary Secondary Amine	Złoże zawierające pierwszorzędowe i drugorzędowe grupy aminowe
SFE	Supercritical Fluid Extraction	Ekstrakcja za pomocą płynu w stanie nadkrytycznym
SPE	Solid Phase Extraction	Ekstrakcja do fazy stałej
SPME	Solid Phase Microextraction	Mikroekstrakcja do fazy stałej



Literatura

- [1] Mills P.A., Onley J.H. i Guither R.A.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1963, **46**, 186-191.
- [2] Thier H.P. i Bergner K.G.: *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, 1966, **62**, 399-402.
- [3] Storherr R.W., Ott P. i Watts R.R.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1971, **54**, 513-516.
- [4] Becker G.: *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, 1971, **67**, 125-126.
- [5] Luke M., Froberg J.E. i Masumoto H.T.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1975, **58**, 1020-1026.
- [6] Specht W. i Tilkes M.: *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1980, **301**, 300-307.
- [7] Specht W., Pelz S. i Gilsbach W.: *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1995, **353**, 183-190.
- [8] Anastassiades M. i Scherbaum E.: *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, 1997, **93**, 316-327.
- [9] Casanova J.: *J. AOAC Int.*, 1996, **79**, 936-940.
- [10] Nordenmeyer K. i Thier H.P.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.*, 1999, **208**, 259-263.
- [11] Luke M., Cassias I. i Yee S.: *Lab. Inform. Bull. No. 4178 Office of Regulatory Affairs, U.S. Food and Drug Administration, Rockville* 1999.
- [12] Schenck F.J., Callery P., Gannett P.M., Daft J.R. i Lehotay S.J.: *J. AOAC Int.*, 2002, **85**, 1177-1180.
- [13] Parfitt C.H.: *Lab. Inform. Bull. No. 3616 Office of Regulatory Affairs, U.S. Food and Drug Administration, Rockville* 1991.
- [14] Lee S.M., Papathakis M.L., Hsiao-Ming C.F. i Carr J.E.: *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1991, **339**, 376-383.
- [15] Fillion J., Sauve F. i Selwyn J.: *J. AOAC Int.*, 2000, **83**, 698-713.
- [16] Lehotay S.J.: *J. AOAC Int.*, 2002, **83**, 680-697.
- [17] Lehotay S.J., Lightfield A.R., Harman-Fetcho J.A. i Donoghue D.A.: *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **51**, 4589-4596.
- [18] Andersson A. i Palsheden H.: *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1991, **339**, 365-367.
- [19] Fernandez-Alba A.R., Valverde A., Aguera A. i Contreras M.: *J. Chromatogr. A*, 1993, **686**, 263-271.
- [20] Holstege D.M., Scharberg D.L., Tor E.R., Hart L.C. i Galey F.D.: *J. AOAC Int.*, 1994, **77**, 1263-1274.
- [21] Camel V.: *Trends Anal. Chem.*, 2000, **19**, 229-248.
- [22] Giergielewicz-Możajska H., Dąbrowski Ł. i Namieśnik J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2001, **31**, 149-165.
- [23] Ramos L., Kristenson E.M. i Brinkman U.A.Th.: *J. Chromatogr. A*, 2002, **975**, 3-29.
- [24] Carabias-Martinez R., Rodriguez-Gonzalo E., Revilla-Ruiz P. i Hernandez-Mendez J.: *J. Chromatogr. A*, 2005, **1089**, 1-17.
- [25] Valsamaki V.I., Boti V.I., Sakkas V.A. i Albanis T.A.: *Anal. Chim. Acta*, 2006, **573-574**, 195-201.
- [26] Pawliszyn J.: *Solid Phase Microextraction, Theory and Applications*. Wiley-VCH, New York 1997.
- [27] Wardencki W., Michulec M. i Curyło J.: *J. Food Sci. Technol.*, 2004, **39**, 703-717.
- [28] Camel V.: *J. Chromatogr. A*, 1998, **26**, 99-111.
- [29] Anastassiades M., Lehotay S.J., Stajnbaher D. i Schenck F.J.: *J. AOAC Int.*, 2003, **86**, 412-431.
- [30] Sadowska-Rociek A. i Cieślak E.: *Chem. Dydak. Ekol. Metrol.*, 2008, **13**(1/2), 33-38.
- [31] <http://www.restek.com/restek/images/external/805-01-003.pdf>
- [32] Lehotay S.J., de Kok A., Hiemstra M. i van Bodegraven P.: *J. AOAC Int.*, 2005, **88**, 595-614.
- [33] Lehotay S.J., Mastovska K. i Lightfield A.R.: *J. AOAC Int.*, 2005, **88**, 615-629.
- [34] Mastovska K. i Lehotay S.J.: *J. Chromatogr. A*, 2004, **1040**, 259-272.
- [35] Lehotay S.J., Mastovska K. i Yun S.J.: *J. AOAC Int.*, 2005, **88**, 630-638.
- [36] Garcia-Reyes J.F., Ferrer C., Gomez-Ramos M.J., Molina-Diaz A. i Fernandez-Alba A.R.: *Trends Anal. Chem.*, 2007, **26**, 239-251.



QUECHERS APPROACH FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN FOOD MATRIXES

Department of Analytical Chemistry, Chemical Faculty, Gdansk University of Technology

Abstract: Pesticide-residue determination in food samples is becoming a very challenging issue because of large amounts of interferences, such as proteins, saccharides and fats, which in most cases cause negative impact on the method. On the other hand, ensuring „food safety” requires monitoring pesticide residues. For this task, the development of multi-residue methods, which allow proper control of a large number of pesticides in a unique analysis, is the most common strategy. However, the different classes and physicochemical properties makes it difficult to develop methodologies that cover all the analytes under one study.

Keywords: pesticides, food, sample preparation, extraction, clean-up, QuEChERS method

