

Received: 15.09.2017 / Accepted: 04.01.2018

Optimization of the multiresidue method for the determination of pesticide residues in root vegetables

Optymalizacja wielopozostałościowej metody oznaczania pozostałości pestycydów w warzywach korzeniowych

Piotr Kaczyński*, Izabela Hryenko, Ewa Rutkowska, Patrycja Mojsak,
Julia Szabuńko, Bożena Łozowicka

Summary

The aim of this study was to develop the multiresidue method for the determination of 426 pesticide residues in root vegetables (beetroot, carrot, parsnip, parsley, radish and celery) based on QuEChERS method extraction. Optimization of the method included selection of the parameters such as a sample weight, extracting solvent and sorbent in a clean-up step. The optimum parameter was the application of 10 g sample weight/10 ml 1% formic acid in acetonitrile/clean-up 150 mg MgSO₄ + 25 mg primary secondary amine + 2.5 mg graphitized carbon black. Active substances were determined by gas chromatography and liquid chromatography coupled with tandem quadrupole mass spectrometry (GC-MS/MS and LC-MS/MS). The average recoveries for most compounds were in the range 72.3–119.4% and the relative standard deviations were 0.3–16.2%. The developed method allowing the determination of very low concentration levels (0.005 mg/kg) has been adapted for routine tests defining the pesticide residues in root vegetables. The obtained results were highly satisfactory and demonstrated their compliance with the criteria recommended by the European Union document SANTE/11945/2015.

Key words: optimization; pesticide residues; root vegetables; application of the method; official control

Streszczenie

Celem badań było opracowanie wielopozostałościowej metody oznaczania pozostałości 426 substancji czynnych środków ochrony roślin w warzywach korzeniowych (buraku ćwikłowym, marchwi, pasternaku, pietruszce, rzodkiewce i selerze), opartej na metodzie QuEChERS. Optymalizacja obejmowała dobór takich parametrów, jak: masa próbki, rodzaj eluentu do ekstrakcji i sorbentu na etapie oczyszczania. Najbardziej optymalne okazało się zastosowanie układu 10 g próbki/10 ml 1% kwasu mrówkowego w acetonitrylu/150 mg MgSO₄ + 25 mg pierwszo-drugorzędowej aminy + 2,5 mg czarnego węgla grafityzowanego. Substancje czynne oznaczono technikami chromatografii gazowej i cieczowej sprzężonymi z tandemową spektrometrią mas (GC-MS/MS i LC-MS/MS). Średnie odzyski dla większości związków mieściły się w granicach 72,3–119,4%, a względne odchylenie standardowe 0,3–16,2%. Opracowana metoda pozwalająca na oznaczenie niskich poziomów stężeń analitów (0,005 mg/kg), została zaadoptowana do badań rutynowych oznaczania pestycydów w warzywach korzeniowych. Wyniki walidacji były zadowalające i spełniały kryteria zalecane przez dokument Unii Europejskiej SANTE/11945/2015.

Słowa kluczowe: optymalizacja; pozostałości pestycydów; warzywa korzeniowe; aplikacja metody; kontrola urzędowa

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Terenowa Stacja Doświadczalna
Chełmońskiego 22, 15-195 Białystok
*corresponding author: p.kaczynski@iorpib.poznan.pl

Wstęp / Introduction

Warzywa korzeniowe stanowią istotną grupę roślin małoobszarowych uprawianych w Polsce. Są bogatym źródłem witamin, składników mineralnych oraz błonnika. Warzywa korzeniowe wrażliwe są na choroby pochodzenia bakteryjnego i grzybowego (m.in. zgniliznę korzeni, parch zwykły, septoriozę selera, czy fuzariozę), szkodniki (m.in. polyśnięcę marchwiankę, pędraki, drutowce, liściolubkę selerową, mszyce) oraz chwasty (m.in. rdest powojowy, gwiazdnicę pospolitą, przytulię czepną, czy fiołka polnego).

W celu zapewnienia bezpieczeństwa konsumentów niezbędna jest kontrola jakości warzyw należących do tej grupy, w tym również ocena pozostałości środków ochrony roślin (ś.o.r.). Dlatego też laboratoria powinny dysponować metodami analitycznymi umożliwiającymi oznaczanie szerokiego spektrum pestycydów z różnych klas chemicznych na niskich poziomach stężeń.

Etap przygotowania próbki jest krytycznym punktem całego procesu analizy ze względu na obecność w matrycy m.in.: cukrów (Łozowicka i wsp. 2016a), lipidów i wosków (Kaczyński i wsp. 2017), chlorofilu (Łozowicka i wsp. 2014) i innych barwników roślinnych – karotenoidów, flawonoidów, antocyjanów, betalain (Rodriguez-Saona i wsp. 1999; Kujala i wsp. 2002; Zhou i wsp. 2009; Klein i Rodriguez-Concepcion 2015).

W celu eliminacji substancji przeszkadzających oraz uniknięcia efektu matrycy niezwykle istotne jest właściwe postępowanie w kluczowych etapach analizy próbki tj.: ekstrakcji, oczyszczania ekstraktu oraz jakościowego i ilościowego oznaczania analitu. Trudności analityczne przy opracowywaniu takich metod wynikają z faktu, iż pozostałości występują na niskich poziomach stężeń (ppm, ppb) (Łozowicka i wsp. 2016b).

Obecnie najbardziej uniwersalną metodą przygotowania próbek do badań, pozwalającą na analizę szerokiego spektrum pestycydów w próbkach warzyw jest technika QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe – szybka, prosta, tania, efektywna, odporna i bezpieczna) (Rejczak i Tuzimski 2015). Polega ona na izolacji i podziale w układzie ciecz–ciecz składników próbki z użyciem acetonitrylu, a następnie oczyszczeniu ekstraktu z wykorzystaniem metody dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej (d-SPE – dispersive solid phase extraction) (Anastassiades i wsp. 2003).

Celem pracy była optymalizacja metody analitycznej umożliwiającej oznaczanie pozostałości 426 substancji czynnych (s.cz.) ś.o.r. w jednym toku analitycznym przy wykorzystaniu technik chromatografii gazowej i cieczowej sprzężonych z tandemową spektrometrią mas (GC-MS/MS – gas chromatography-tandem mass spectrometry i LC-MS/MS – liquid chromatography-tandem mass spectrometry).

Materiały i metody / Materials and methods

Materiał do badań stanowił 1 kg zhomogenizowanych części podziemnych warzyw korzeniowych (marchwi, buraka ćwikłowego i selera) pochodzących z gospodarstw ekologicznych, z czego przygotowano po cztery 250 g próbki analityczne do dalszych badań. Naważki (i) 2, (ii) 5 oraz (iii) 10 g umieszczono w 50 ml probówkach polipropylenowych, które wzbogacono mieszaninami wzorców z grupy akarycydów, insektycydów, fungicydów, herbicydów oraz regulatorów wzrostu (tab. 1) na trzech poziomach stężeń: I. 0,005–0,010 mg/kg, II. 0,050–0,100 mg/kg i III. 0,500–1,000 mg/kg.

Ekstrakcję prowadzono 10 ml: (i) heksanu, (ii) acetonu, (iii) 1% kwasu mrówkowego w acetonitrylu oraz (iv) metanolu.

Następnie dodano mieszaninę soli buforującej: 4 g bezwodnego siarczanu magnezu, 1 g chlorku sodu, 1 g uwodnionego cytrynianu trisodu oraz 0,5 g uwodnionego wodorocytrynianu disodu.

Próbkę wytrząsano, odwirowano, a warstwę organiczną przeniesiono do próbki polipropylenowej, po czym oczyszczano techniką dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej (d-SPE – dispersive solid phase extraction), stosując następujące mieszaniny: (i) 150 mg $MgSO_4$ (bezwodny siarczan magnezu) + 10 mg PSA (primary secondary amine – pierwszo-drugorzędowa amina); (ii) 150 mg $MgSO_4$ + 25 mg PSA + 25 mg C18; (iii) 150 mg $MgSO_4$ + 25 mg PSA + 2,5 mg GCB (graphitized carbon black – czarny węgiel grafityzowany); (iv) 150 mg $MgSO_4$ + 50 mg PSA + 50 mg C18 + 7,5 mg GCB.

Całość wytrząsano, po czym odwirowano warstwę organiczną i przeniesiono bezpośrednio do fiolek (w przypadku analizy LC-MS/MS) lub oddestylowano na wyparce próżniowej i suchą pozostałość rozpuszczono w 2 ml mieszaniny heksan/aceton (9 : 1, v/v) (w przypadku analizy GC-MS/MS).

Wyniki oceniono na podstawie badań odzysków poszczególnych związków z próbek wzbogaconych. Parametry, takie jak poprawność i precyzja wyrażone za pomocą średniego odzysku i względnego odchylenia standardowego (RSD – relative standard deviation) pozwoliły na ocenę wydajności metody. Zgodnie z kryteriami zawartymi w przewodniku SANTE/11945/2015, metodę można zastosować do badań, gdy wartości odzysków mieszczą się w zakresie 70–120%, a precyzja jest mniejsza od 20%. W przypadku wielopozostałościowych metod odzysk w przedziale 60–70% oraz 120–130% jest akceptowalny pod warunkiem spełnienia pozostałych parametrów walidacyjnych.

Oznaczenie jakościowe i ilościowe wykonano na chromatografie gazowym i cieczowym sprzężonym z tandemową spektrometrią mas (GC-MS/MS i LC-MS/MS).

Do analizy pozostałości ś.o.r. techniką chromatografii gazowej użyto chromatografu Agilent 7890 A (Agilent

Technologies, Palo Alto, CA, USA) wyposażonego w auto-sampler Agilent 7693 i połączonego ze spektrometrem mas z trzema kwadropolami Agilent 7000B. Separacji dokonano na kolumnie HP-5ms (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm film) i oznaczono w specyficznych warunkach fragmentacji MS/MS, które zoptymalizowano indywidualnie dla każdej z analizowanych substancji. Program temperaturowy: 70°C => 25°C/min => 150°C => 3°C/min => 200°C => 8°C/min => 280°C (izoterma 10,0 min), całkowity czas analizy 42,25 min. Jako gaz nośny zastosowano hel o przepływie 2,1 ml/min. Jonizację próbek przeprowadzono z zastosowaniem jonizacji elektronami (EI) (energia jonizacyjna 70 eV). Temperatura linii transferowej, źródła jonów i dwóch kwadropoli wynosiła 280°C, 300°C, 180°C, 180°C. Jako gaz kolizyjny wykorzystano azot.

Do analizy pozostałości ś.o.r. techniką chromatografii cieczowej użyto chromatografu Eksigent Ultra LC-100 (Eksigent Technologies, Dublin, CA, USA). Separację analitów przeprowadzono na kolumnie KINETEX C18 (100 mm × 2,1 mm, 2,6 μm) utrzymywanej w temperaturze 40°C. Objętość wstrzykiwanej próbki wynosiła 10 μl. Fazę

ruchomą stanowiły: 0,5% roztwór kwasu mrówkowego z dodatkiem 2 mmol mrówczanu amonu w wodzie (faza A) i w metanolu (faza B). Analizę przeprowadzono stosując elucję gradientową o następującym programie: 0–1 min 1% składnika B; 1–12 min od 1% do 90% B; 12–22 min 90% B; 22–24 min od 90% do 1% B; 24–30 min 1% B, przy natężeniu przepływu fazy ruchomej 0,50 ml/min. Detekcję przeprowadzono stosując źródło jonizacji przez rozpylenie w polu elektrycznym w trybie tworzenia jonów dodatnich, charakteryzującą się następującymi parametrami: napięcie przyłożone do igły 5000 V, temperatura źródła 400°C, ciśnienie gazów: wspomagającego rozpylania 60 psi, pomocniczego 50 psi, osłonowego 30 psi. Jako gaz rozpraszający i kolizyjny wykorzystano azot.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

I. Przygotowanie próbki do badań – optymalizacja metody

Opracowanie metody oznaczania 426 s.cz. w warzywach korzeniowych wymagało przeprowadzenia szeregu

Tabela 1. Oznaczone substancje czynne środków ochrony roślin
Table 1. Detected active substances of plant protection products

Mechanizm działania Mode of action	Substancja czynna Active substance
1	2
Akarycydy Acaricides (10)	benzoximate ² , bromopropylate ¹ , clofentezine ² , dicofol ¹ , etoxazole ^{1,2} , fenbutatin oxide ² , hexythiazox ^{1,2} , propargite ^{1,2} , tebufenpyrad ^{1,2} , tetradifon ¹
Insektycydy Insecticides (179)	3-hydroxycarbofuran ¹ , abamectin ² , acephate ^{1,2} , acetamiprid ^{1,2} , acrinathrin ¹ , aldrin ¹ , alpha-cypermethrin ¹ , aminocarb ² , amitraz ¹ , azinphos-ethyl ¹ , azinphos-methyl ¹ , bendiocarb ² , benfuracarb ^{1,2} , bifenazate ^{1,2} , bifenthrin ¹ , beta-cyfluthrin ¹ , bromophos-ethyl ¹ , bromophos-methyl ¹ , buprofezin ^{1,2} , cadusafos ^{1,2} , carbaryl ^{1,2} , carbofuran ^{1,2} , carbosulfan ¹ , chlorantraniliprole ^{1,2} , chlorfenvinphos ¹ , chlorfluazuron ² , chlorpyrifos ¹ , chlorpyrifos-methyl ¹ , chromafenozide ² , clothianidin ² , crimidine ² , cyfluthrin ¹ , λ-cyhalothrin ¹ , cypermethrin ¹ , dazomet ² , DDT (sum of op'-DDT ¹ , pp'-DDD ¹ , pp'-DDE ¹ , pp'-DDT ¹), dieldrin ¹ , dithiocarbamates ³ , deltamethrin ¹ , demeton-S ² , demeton-S-methyl ² , demeton-S-methyl sulfone ² , diafenthiuron ² , diazinon ¹ , dichlorvos ¹ , dicrotophos ^{1,2} , diethyltoluamide (DEET) ¹ , diflubenzuron ² , dimethoate ^{1,2} , dinotefuran ² , dioxacarb ² , disulfoton ² , disulfoton sulfone ² , doramectin ² , emamectin B1a ² , emamectin B1b ² , α-endosulfan ¹ , β-endosulfan ¹ , endosulfan-sulphate ¹ , endrin ¹ , EPN ^{1,2} , eprinomectin B1a ² , esfenvalerate/fenvalerate ¹ , ethiofencarb ² , ethiofencarb sulfone ² , ethiofencarb sulfoxide ² , ethion ¹ , ethiprole ² , ethoprophos ^{1,2} , etofenprox ^{1,2} , fenamiphos ^{1,2} , fenazaquin ^{1,2} , fenchlorphos ^{1,2} , fenitrothion ¹ , fenobucarb ² , fenoxycarb ^{1,2} , fenpropathrin ¹ , fenpyroximate ² , fensulfotthion sulfone ² , fenthion ¹ , fipronil ^{1,2} , flonicamid ^{1,2} , fluazuron ² , flubendiamide ² , flufenoxuron ² , formothion ¹ , fosthiazate ^{1,2} , furathiocarb ² , halofenozide ² , α-HCH ¹ , β-HCH ¹ , γ-HCH (lindane) ¹ , heptachlor ¹ , heptachlor epoxide ¹ , heptenophos ¹ , hexaflumuron ² , hydramethylnon ² , imidacloprid ² , indoxacarb ^{1,2} , isocarbophos ¹ , isofenphos ¹ , isofenphos-methyl ¹ , isoprocarb ^{1,2} , ivermectin ² , lufenuron ² , malaoxon ¹ , malathion ¹ , mecarbam ¹ , metaflumizone ² , methacrifos ^{1,2} , methamidophos ^{1,2} , methiocarb ² , methiocarb sulfone ² , methiocarb sulfoxide ² , methidathion ¹ , methomyl ² , methoxychlor (DMDT) ¹ , methoxyfenozide ² , metolcarb ² , mevinphos ^{1,2} , mexacarbate ² , monocrotophos ² , moxidectin ² , naled ² , nitenpyram ² , novaluron ² , omethoate ² , oxamyl ^{1,2} , oxydemeton-methyl ² , paraoxon ¹ , paraoxon-methyl ¹ , parathion ¹ , parathion-methyl ¹ , permethrin ¹ , phenthoate ^{1,2} , phorate ¹ , phorate sulfone ² , phorate sulfoxide ² , phosalone ¹ , phosmet ^{1,2} , phoxim ² , pirimicarb ^{1,2} , pirimicarb-desmethyl ² , pirimiphos-ethyl ¹ , pirimiphos-methyl ¹ , profenofos ¹ , promecarb ² , propoxur ^{1,2} , prothiofos ^{1,2} , pymetrozine ² , pyridaben ^{1,2} , pyridalyl ² , pyriproxyfen ^{1,2} , quinalphos ¹ , rotenone ² , spinosyn A ¹ , spinosyn D ¹ , spiroidiclofen ^{1,2} , spiromesifen ^{1,2} , spirotetramat ² , τ-fluvalinate ¹ , tebufenozide ² , teflubenzuron ² , tefluthrin ¹ , tetrachlorvinphos ¹ , tetramethrin ¹ , thiacloprid ² , thiamethoxam ^{1,2} , thiodicarb ² , thiofanox sulfone ² , thiofanox sulfoxide ² , triazophos ¹ , triflumuron ² , vamidothion ² , zeta-cypermethrin ¹

1	2
Fungicydy Fungicides (106)	2-phenylophenol ¹ , acibenzolar-S-methyl ² , azaconazole ^{1,2} , azoxystrobin ^{1,2} , benalaxyl ^{1,2} , bentiavalicarb-isopropyl ² , bitertanol ^{1,2} , boscalid ^{1,2} , bromuconazole ^{1,2} , bupirimate ^{1,2} , captafol ¹ , captan ¹ , carbendazim ² , carboxin ^{1,2} , chlorothalonil ¹ , chlozolinat ¹ , cyazofamid ² , cyflufenamid ^{1,2} , cymoxanil ² , cyproconazole ^{1,2} , cyprodinil ^{1,2} , dichlofluanid ^{1,2} , diclobutrazol ² , dicloran ¹ , diethofencarb ^{1,2} , difenoconazole ^{1,2} , dimethomorph ^{1,2} , dimoxystrobin ^{1,2} , diniconazole ^{1,2} , diphenylamine ¹ , epoxiconazole ^{1,2} , etaconazole ^{1,2} , ethirimol ² , famoxadone ^{1,2} , fenamidone ^{1,2} , fenarimol ¹ , fenbuconazole ^{1,2} , fenfuram ² , fenhexamid ^{1,2} , fenpropidin ^{1,2} , fenpropimorph ^{1,2} , fludioxonil ^{1,2} , fluopicolide ^{1,2} , fluopyram ² , fluoxastrobin ² , fluquinconazole ^{1,2} , flusilazole ^{1,2} , flutolanil ^{1,2} , flutriafol ^{1,2} , folpet ¹ , fuberidazole ^{1,2} , furalaxyl ² , hexachlorobenzene (HCB) ¹ , hexaconazole ^{1,2} , imazalil ^{1,2} , imibenconazole ¹ , ipconazole ^{1,2} , iprodione ¹ , iprovalicarb ^{1,2} , isoprothiolane ^{1,2} , kre-zoxim-methyl ^{1,2} , mendipropamid ² , mepanipyrim ^{1,2} , mepronil ² , metalaxyl ^{1,2} , metconazole ^{1,2} , methabenthiuron ² , methfuroxam ² , metrafenone ^{1,2} , myclobutanil ^{1,2} , oxadixyl ^{1,2} , oxycarboxin ² , penconazole ^{1,2} , pencycuron ^{1,2} , picoxystrobin ^{1,2} , prochloraz ^{1,2} , procymidone ^{1,2} , propamocarb ² , propiconazole ^{1,2} , proquinazid ² , prothioconazole-desthio ^{1,2} , pyracarbolid ² , pyraclostrobin ^{1,2} , pyrazophos ¹ , pyrimethanil ^{1,2} , quinoxifen ^{1,2} , spiroxamine ^{1,2} , tebuconazole ^{1,2} , tecnazene ¹ , tetraconazole ^{1,2} , thiabendazole ² , thiophanate-ethyl ² , thiophanate-methyl ² , tolclofos-methyl ^{1,2} , tolylfluanid ^{1,2} , triadimefon ^{1,2} , triadimenol ^{1,2} , triazoxide ² , tricyclazole ² , trifloxystrobin ^{1,2} , triflumizole ^{1,2} , triforine ² , triticonazole ^{1,2} , uni-conazole ² , vinclozolin ¹ , zoxamide ^{1,2}
Herbicydy Herbicides (126)	acetochlor ¹ , alachlor ² , ametryn ² , amidosulfuron ² , atrazine ^{1,2} , bensulfuron-methyl ² , beflubutamid ² , bromacil ^{1,2} , butafenacil ² , carbetamide ² , cerfentrazone-ethyl ² , chlorbromuron ² , chloridazon ^{1,2} , chlorotoluron ² , chloroxuron ² , chlortprropham ¹ , chlo-sulfuron ² , cinosulfuron ² , clethodim ² , clodinafop-propargyl ² , clomazone ^{1,2} , cyanazine ¹ , cycloxydim ² , cycluron ² , cyprazine ^{1,2} , desmedipham ^{1,2} , dichlobenil ¹ , difenoxuron ² , diflufenican (DFF) ^{1,2} , dimefuron ² , dimethachlor ^{1,2} , dimethenamid-P ¹ , diuron ² , ethametsulfuron-methyl ² , ethofumesate ^{1,2} , ethoxysulfuron ² , fenchlorazole-ethyl ² , fenoxaprop-ethyl ^{1,2} , fenuron ² , flazasulfuron ² , florasulam ² , fluazifop-P-butyl ¹ , flufenacet ^{1,2} , flumioxazin ² , fluometuron ² , fluoroglycofen-ethyl ² , fluridone ² , flurochloridone ^{1,2} , fluoxypyr-1-meptylheptyl ¹ , flurtamone ^{1,2} , fluthiacet methyl ² , foramsulfuron ² , halosulfuron-methyl ² , haloxyfop-ethoxyethyl ² , haloxyfop-methyl ^{1,2} , hexazinone ² , iodosulfuron-methyl ² , isoproturon ² , isoxaben ² , isoxadifen-ethyl ² , isoxaflutole ² , lenacil ^{1,2} , linuron ² , mefenacet ² , mesosulfuron-methyl ² , mesotrion ² , metamitron ^{1,2} , metazachlor ^{1,2} , methoprotryne ² , metobromuron ^{1,2} , metolachlor ¹ , metosulam ² , metoxuron ² , metribuzin ^{1,2} , metsulfuron-methyl ² , monolinuron ² , monuron ² , napropamide ¹ , neburon ² , nicosulfuron ² , nitrofen ¹ , norflurazon ² , oxyfluorfen ¹ , pendimethalin ^{1,2} , pethoxamid ² , phenmedipham ² , picolinafen ² , primisulfuron methyl ² , profoxydim ² , prometon ² , prometryn ^{1,2} , propachlor ¹ , propaquizafop ^{1,2} , propazine ¹ , propham ^{1,2} , propoxycarbazone-sodium ² , propyzamide ^{1,2} , prosulfocarb ^{1,2} , prosulfuron ² , pyridafol ² , pyridate ² , quinoclamine ^{1,2} , quizalofop-p-ethyl ¹ , rimsulfuron ² , secbumeton ² , siduron ² , simazine ^{1,2} , simetryn ² , sulfentrazone ² , sulfometuron-methyl ² , sulfosulfuron ² , tebuthiuron ² , tepraloxymid ² , terbumeton ² , terbuthylazine ^{1,2} , terbutryn ^{1,2} , thidiazuron ² , thifensulfuron-methyl ² , thiobencarb ² , traloxymid E ² , traloxymid Z ² , triasulfuron ² , tribenuron-methyl ² , trifluralin ¹ , triflusulfuron-methyl ² , tritosulfuron ²
Regulatory wzrostu Growth regulators (4)	flumetralin ¹ , forchlorfenuron ² , paclobutrazol ^{1,2} , trinexapac-ethyl ²
Inne – Others (1)	piperonyl butoxide ²

¹GC-MS/MS, ²LC-MS/MS

eksperymentów na etapie przygotowania próbki do badań, takich jak dobór: rodzaju rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji, masy próbki, a także mieszanin sorbentów stosowanych na etapie oczyszczania (tzw. „clean-up”).

1) masa próbki i rozpuszczalnik do ekstrakcji

Pierwszym badanym parametrem optymalizacji metody był dobór rodzaju rozpuszczalnika. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, iż wybór selektywnego ekstrahenta wobec tak dużej liczby analizowanych pestycydów był zadaniem najtrudniejszym ze względu na szerokie spektrum oznaczanych związków (426 s.cz.) pochodzących z różnych grup chemicznych oraz charakteryzujących się różnymi właściwościami fizyko-chemicznymi.

Masę próbki 5 g wybrano jako optymalną na tym etapie badań. Przeprowadzono szereg eksperymentów porównujących efektywność ekstrakcji analitów poprzez ocenę odzysków. Na podstawie danych przedstawionych na rysunku 1. stwierdzono, iż w przypadku zastosowania naważki 5 g oraz 10 ml heksanu lub acetonu, wartości odzysków dla ponad 150 związków nie spełniały kryteriów zawartych w SANTE/11945/2015. Zastosowanie metanolu poprawiło efektywność wmywania badanych analitów, a tym samym zwiększyło liczbę związków, których odzyski mieściły się w akceptowalnym zakresie (powyżej 300 s.cz.). Wyniki analiz, w których zastosowano ekstrakcję 1% kwasem mrówkowym w acetonitrylu zapewniły odzyski w zakresie 60–70% dla 70, 83,

79 związków, w zakresie 70–120% dla 215, 220, 220 związków, w zakresie 120–130% dla 74, 50, 64 związków, odpowiednio dla marchwi, buraka ćwikłowego i selera (rys. 1).

Na podstawie wyżej przedstawionych wyników można wnioskować, iż 1% kwas mrówkowy w acetonitrylu okazał się najbardziej selektywnym rozpuszczalnikiem względem tak dużej liczby analizowanych pestycydów, zapewniając maksymalne odzyski analitów przy minimalnej współekstrakcji interferentów. Dodanie kwasu mrówkowego jako środka zakwaszającego do zasadowych matryc (np. seler, pietruszka) pozwoliło utrzymać pH próbki pomiędzy 5,0–5,5, gwarantując przy tym stabilność wrażliwych na zmiany pH pestycydów (np. abamektyna, acefat, fenheksamid, czy chlorotalonil).

Ekstrakcja heksanem i acetonem spowodowała wzrost intensywności ko-ekstrakcji związków przeszkadzających w analizie chromatograficznej, dlatego też te rozpuszczalniki nie mogły być wybrane do dalszej optymalizacji metody.

W kolejnym etapie sprawdzono wpływ 2 g i 10 g masy próbki na efektywność procesu ekstrakcji przy użyciu 1% kwasu mrówkowego w acetonitrylu. Eksperyment wykazał, iż stosowanie najmniejszej naważki (2 g) nie spełniało kryteriów metody, tj. dla około 100 związków nie uzyskano odzysków w akceptowalnym zakresie. W przypadku naważki 10 g uzyskano najlepsze parametry walidacyjne (odpowiednio dla marchwi, buraka ćwikłowego i selera odzyski w zakresie 60–70% dla 45, 75, 65 związków, w zakresie 70–120% dla 298, 301, 305 związków, natomiast w zakresie 120–130% dla 65, 32, 34 związków, przy względnym odchyleniu standardowym $\leq 20\%$) (rys. 2).

2) sorbent do oczyszczania

Ze względu na niewystarczające usunięcie substancji ko-elujących z badanych matryc, kolejnym optymalizowanym parametrem był wybór rodzaju mieszaniny sorbentów w tzw. „*clean-up*”.

Warzywa korzeniowe zawierają duże ilości barwników roślinnych, takich jak: karotenoidy (marchew) (Klein i Rodriguez-Concepcion 2015), flawonoidy (seler) (Zhou i wsp. 2009), antocyjany (rzodkiew) (Rodriguez-Saona i wsp. 1999) i betalaina (burak ćwikłowy) (Kujala i wsp. 2002), które w znacznym stopniu utrudniają analizę chromatograficzną.

Z dostępnych danych literaturowych wynika, iż w przypadku próbek zawierających znaczne ilości barwników roślinnych, na etapie d-SPE stosuje się złoża zawierające węgiel aktywny (GCB), grupy oktadecylowe (C18), czy oktylowe (C8) (Łozowicka i wsp. 2016b). W związku z tym, że analizowane matryce (marchew, burak ćwikłowy i seler) mogą zawierać różne ilości i rodzaje barwników roślinnych, testowano cztery mieszaniny sorbentów (opisane w rozdziale Materiały i metody). Eksperymenty przeprowadzono z wykorzystaniem 10 g naważki i 1% kwasu mrówkowego w acetonitrylu, które zostały wybrane jako optymalne na etapie ekstrakcji analitów.

Zastosowanie na etapie oczyszczania mieszanin (i) $MgSO_4 + PSA$ i (ii) $MgSO_4 + PSA + C18$ dało porównywalne wyniki dla wszystkich testowanych matryc. Jednakże w przypadku tych sorbentów dla ponad 100 związków odzyski nie mieściły się w akceptowalnym zakresie (rys. 3).

Zastosowanie mieszaniny (iv) $MgSO_4 + PSA + C18 + GCB$ spowodowało wzrost efektywności oczyszczania próbki, a nieakceptowalne wartości odzysków uzyskano dla około 50 analizowanych związków. Jednak najbardziej skuteczne okazało się oczyszczanie ekstraktu przy wykorzystaniu mieszaniny (iii) $MgSO_4 + PSA + GCB$. Zastosowanie powyższej kombinacji zapewniło odzyski w akceptowalnym zakresie (60–70% dla 37, 46, 40 związków, 70–120% dla 359, 318, 312 związków, 120–130% dla 30, 62, 74 związków odpowiednio dla marchwi, buraka ćwikłowego i selera (rys. 3).

Reasumując, na podstawie przeprowadzonych badań optymalizacyjnych, opracowano procedurę oznaczania 426 s.cz. w próbkach warzyw korzeniowych w jednym toku analitycznym z zachowaniem dobrych parametrów walidacyjnych, spełniając kryteria metody wielopozostałościowej (SANTE/11945/2015). Schemat przygotowania próbki warzyw korzeniowych do badań przedstawia rysunek 4.

II. Walidacja metody

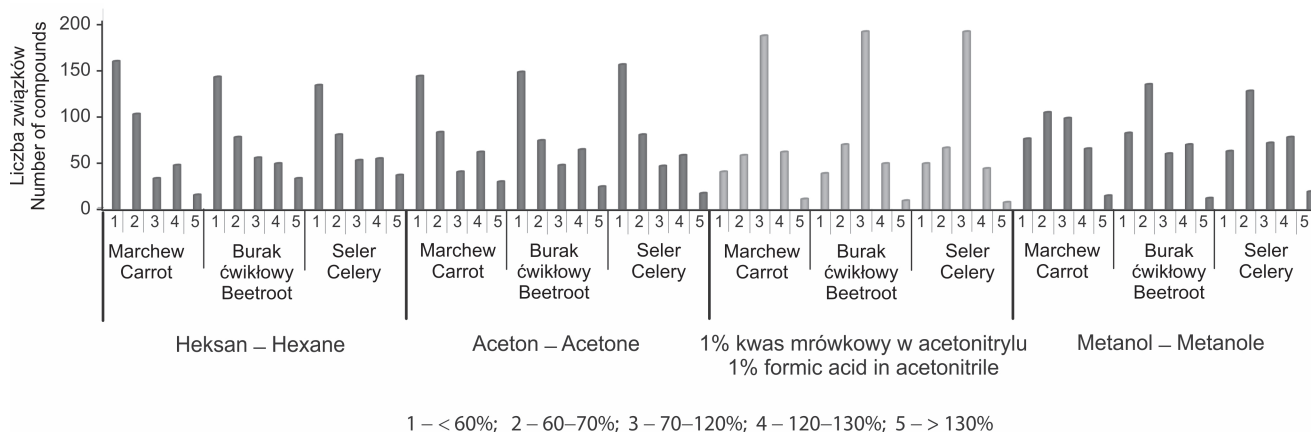
Walidację zoptymalizowanej metody oznaczania pozostałości ś.o.r. przeprowadzono zgodnie z wytycznymi przewodnika SANTE/11945/2015. Charakteryzuje się ona dobrymi parametrami walidacyjnymi (względne odchylenie standardowe RSD 0,3–16,2%). Średnie odzyski analizowanych związków mieściły się w granicach 72,3–119,4% w badanym zakresie stężeń 0,005–1,00 mg/kg. Część związków wykazała akceptowalne odzyski w zakresie 62,0–68,9% oraz 121,5–125,9% z grupy akarycydów (tetradifon), fungicydów (kaptafol, kaptan, folpet), herbicydów (atrazyna, kletodym, symazyna) oraz insektycydów (benfurakarb, kadusafos, izokarbofos) charakteryzując się dobrymi pozostałymi parametrami walidacyjnymi.

III. Aplikacja metody

Proponowana metoda pozwoliła na jednoczesne oznaczanie szerokiego spektrum pestycydów pochodzących z różnych grup chemicznych w podziemnych częściach warzyw korzeniowych.

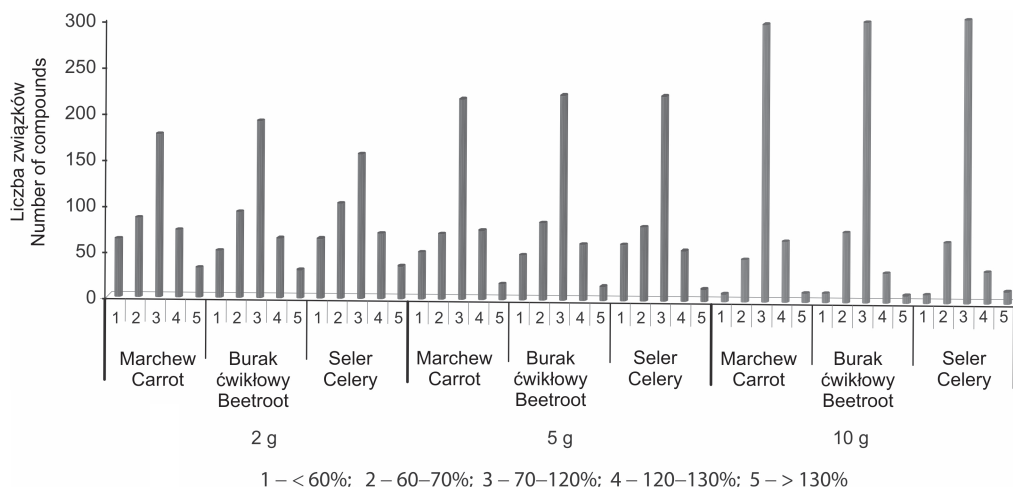
Analizie poddano 49 próbek warzyw korzeniowych: buraka ćwikłowego, marchwi, pasternaku, pietruszki, rzodkiewki i selera, pobranych z gospodarstw produkcyjnych na terenie województwa lubelskiego, mazowieckiego, podlaskiego i warmińsko-mazurskiego.

Pozostałości ś.o.r. wykryto w 24 próbkach, co stanowiło 49% przebadanych próbek warzyw korzeniowych. Próbkę z pozostałościami nieprzekraczającymi najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości (NDP) stanowiły



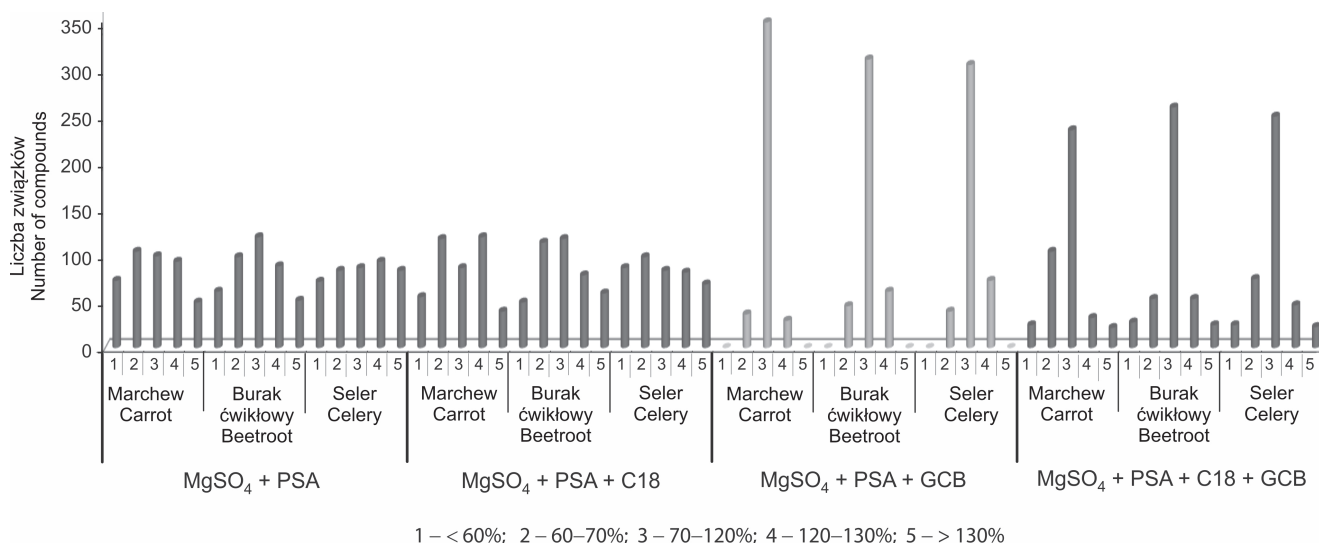
Rys. 1. Wpływ rodzaju rozpuszczalnika na odzysk pestycydów

Fig. 1. Influence of different type of solvent on the extraction recovery



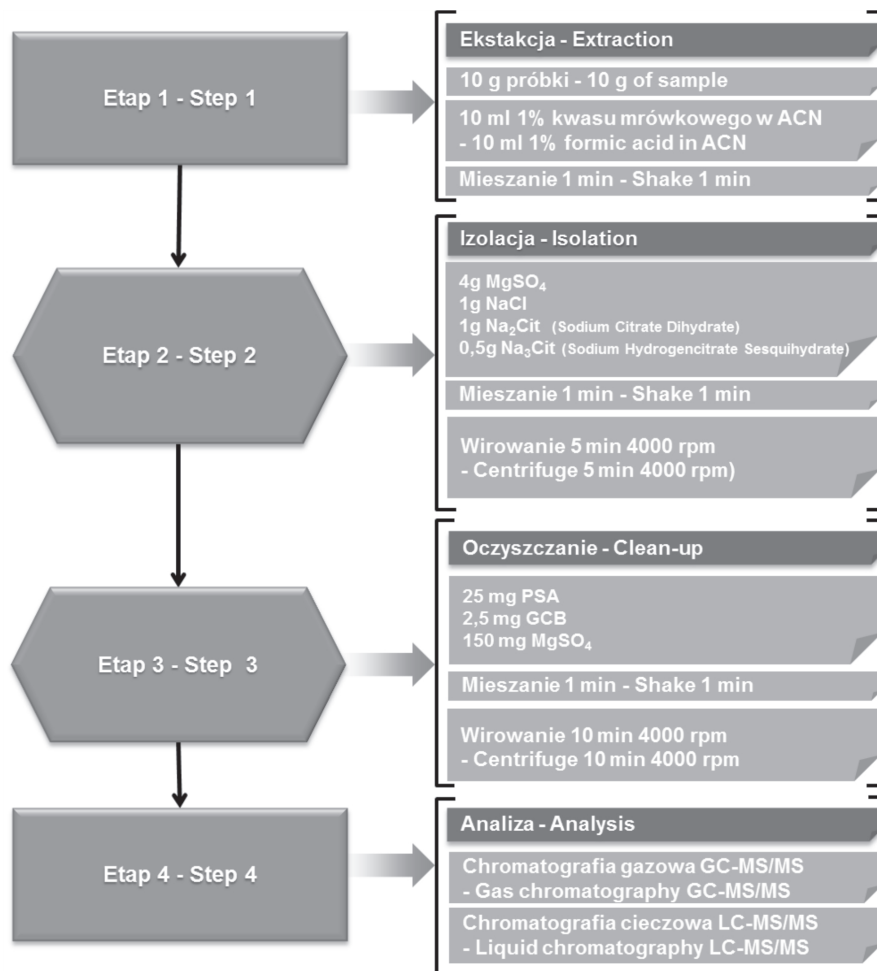
Rys. 2. Wpływ różnej masy próbki na odzysk pestycydów

Fig. 2. Influence of different amount of samples on the extraction recovery

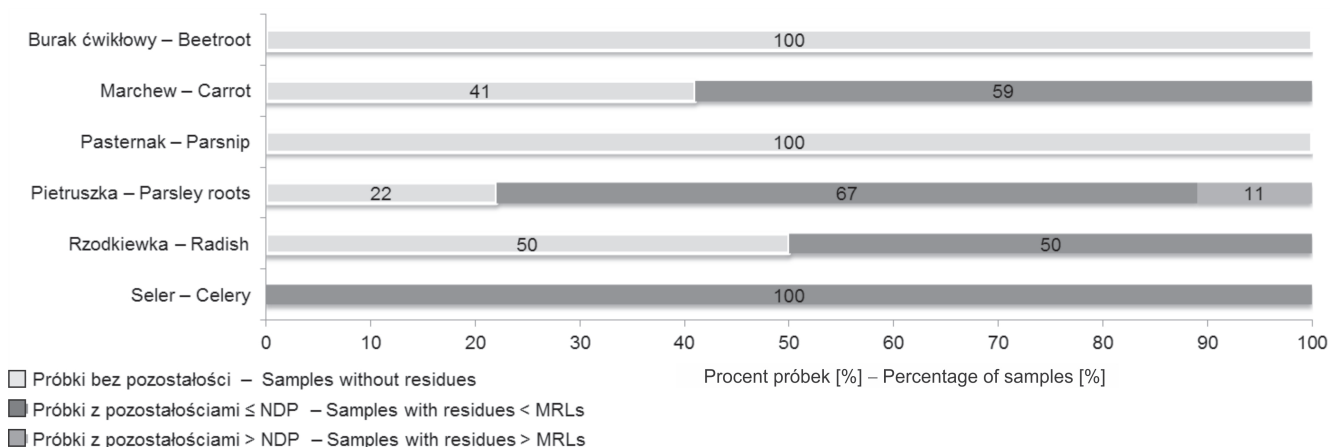


Rys. 3. Wpływ różnych sorbentów na odzysk pestycydów

Fig. 3. Influence of different sorbents on the extraction recovery



Rys. 4. Schemat przygotowania próbki warzyw korzeniowych
 Fig. 4. Outline of sample preparation of root vegetables

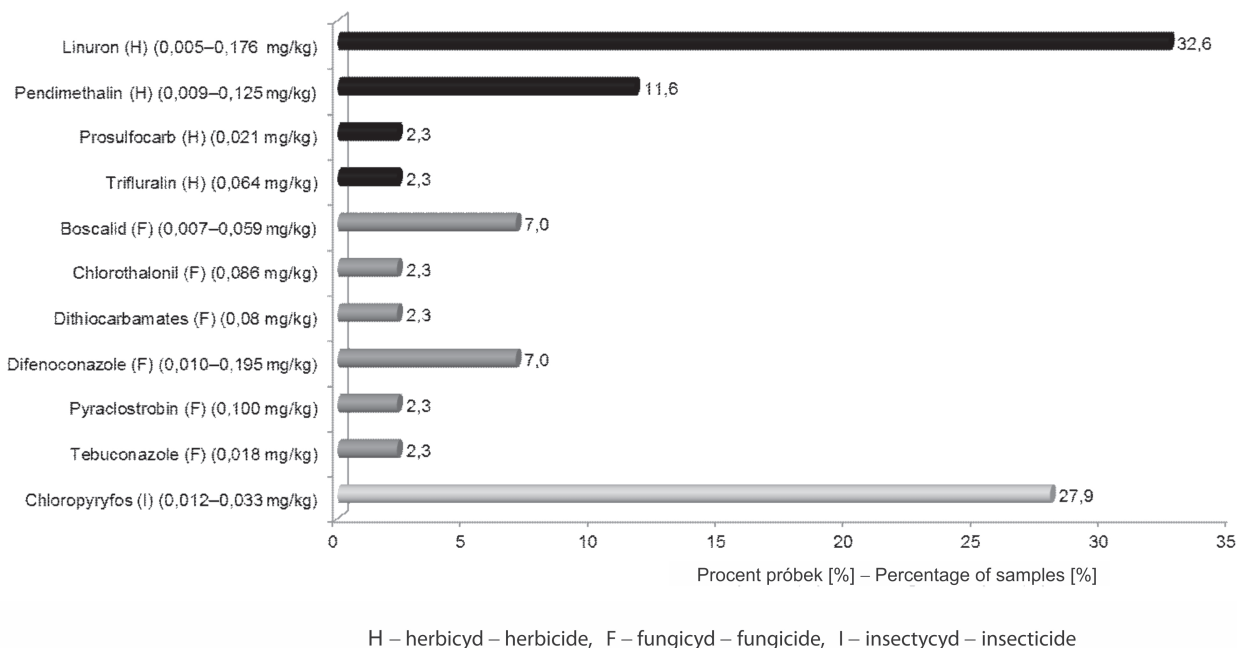


Rys. 5. Pozostałości środków ochrony roślin w warzywach korzeniowych
 Fig. 5. Pesticide residues in root vegetables

47%, natomiast 2% próbek wykazało nieakceptowalne stężenie (powyżej NDP). Pozostałości ś.o.r. stwierdzono w 4 spośród 6 badanych gatunków warzyw. Częstość ich występowania była zróżnicowana i wynosiła 100% w selerze, 78% pietruszce, 59% w marchwi oraz 50% w rzodkiewce.

W buraku ćwikłowym oraz pasternaku nie stwierdzono pozostałości ś.o.r. (rys. 5).

Potwierdzono obecność 11 związków z 426 poszukiwanych, w tym jednego z grupy insektycydów, sześciu fungicydów i czterech herbicydów (rys. 5). Najczęściej



Rys. 6. Częstość wykrywania poszczególnych związków w warzywach korzeniowych
 Fig. 6. The frequency of occurrence of compounds detected in root vegetables

stwierdzono pozostałości herbicydu linuronu (32,6%) oraz insektycydu chloropiryfosu (27,9%).

Przeprowadzone badania wykazały dwojaki rodzaj nieprawidłowości w stosowaniu ś.o.r. – przekroczenia NDP i stosowanie preparatów niedopuszczonych do ochrony upraw. W przypadku wykrycia stężeń powyżej najwyższego dopuszczalnego poziomu uruchomiono procedurę alarmową RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed). W jednej próbce (pietruszki) stwierdzono taką niezgodność dla trifluraliny (0,064 mg/kg, NDP = 0,01 mg/kg). Powodem tego mógł być nieprawidłowy dobór ś.o.r. i jego dawki, jak również termin, czy technika zabiegu chemicznej ochrony.

W 8 próbkach (16,3% przebadanych próbek) wykryto substancje niedozwolone do ochrony poszczególnych upraw. Nieprawidłowości te dotyczyły dwóch s.c.z. w czterech rodzajach upraw. Odnotowano niedozwolone stosowanie jednej substancji owadobójczej (chloropiryfosu w marchwi, pietruszce i rzodkiewce) oraz substancji chwastobójczej (trifluraliny w pietruszce). Uzyskane wyniki wskazują na problem z ochroną upraw małoobszarowych.

Literatura / References

- Anastassiades M., Lehotay S.J., Stajnbaher D., Schenck F.J. 2003. Fast and easy multi-residue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive soil-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* 86 (2): 412–431.
- 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: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.033>.
- Klein C.S., Rodriguez-Concepcion M. 2015. Carotenoids in Carrot. *Pigments in Fruits and Vegetables*: 217–228. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2356-4_11.

Wnioski / Conclusions

- Wykorzystanie chromatografii gazowej i cieczowej (GC-MS/MS i LC-MS/MS) w połączeniu z ekstrakcją i jednoczesnym oczyszczaniem próbki pozwoliło w sposób wiarygodny przeprowadzić analizy dla 426 pestycydów w próbkach warzyw korzeniowych.
- W procesie optymalizacji metody analitycznej najbardziej optymalnym rozwiązaniem okazało się zastosowanie 10 g próbki/10 ml 1% kwasu mrówkowego w ACN/150 mg MgSO₄ + 25 mg PSA + 2,5 mg GCB.
- Metodę wdrożono do rutynowych badań pozostałości ś.o.r. w warzywach korzeniowych. Zdecydowana większość badanych warzyw korzeniowych (98%) spełniała wymagania prawa żywnościowego w zakresie najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości pestycydów, natomiast stosowanie niedopuszczonych s.c.z. zdarzało się częściej, przy czym aż 51% produktów nie zawierało pozostałości ś.o.r.

- Kujala T.S., Vienola M.S., Klika K.D., Loponen J.M., Pihlaja K. 2002. Betalain and phenolic compositions of four beetroot (*Beta vulgaris*) cultivars. *European Food Research and Technology* 214 (6): 505–510. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-001-0478-6>.
- Łozowicka B., Ilyasova G., Kaczynski P., Jankowska M., Rutkowska E., Hrynko I., Mojsak P., Szabunko J. 2016a. Multi-residue methods for the determination of over four hundred pesticides in solid and liquid high sucrose content matrices by tandem mass spectrometry coupled with gas and liquid chromatograph. *Talanta* 151: 51–61. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.01.020>.
- Łozowicka B., Rutkowska E., Hrynko I., Jankowska M., Kaczyński P. 2014. Opracowanie i optymalizacja metody oznaczania pozostałości środków ochrony roślin w liściach. [Development and evaluation of the method for the determination of pesticide residue in the leaves]. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin* 54 (4): 412–418. DOI: <http://dx.doi.org/10.14199/ppp-2014-070>.
- Łozowicka B., Rutkowska E., Jankowska M., Hrynko I., Kaczyński P. 2016b. Toxicological evaluation of multi-class pesticide residues in vegetables and associated human health risk study for adults and children. *Human and Ecological Risk Assessment* 22 (7): 1480–1505. DOI: <https://doi.org/10.1080/10807039.2016.1185690>.
- Rejczak T., Tuzimski T. 2015. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chemistry* 13: 980–1010. DOI: [10.1515/chem-2015-0109](https://doi.org/10.1515/chem-2015-0109).
- Rodriguez-Saona L.E., Giusti M.M., Wrolstad R.E. 1999. Color and pigment stability of red radish and red-fleshed potato anthocyanins in juice model systems. *Journal of Food Science* 64 (3): 451–456. DOI: [10.1111/j.1365-2621.1999.tb15061.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb15061.x).
- SANTE/11945/2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Supersedes SANCO/12571/2013. Implemented by 01/01/2016.
- Zhou K., Zhao F., Liu Z., Zhuang Y., Chen L., Qiu F. 2009. Triterpenoids and flavonoids from celery (*Apium graveolens*). *Journal of Natural Products* 72 (9): 1563–1567. DOI: [10.1021/np900117v](https://doi.org/10.1021/np900117v).