

Received: 13.11.2019 / Accepted: 28.11.2019

Impact of „clean-up” sorbents on the recovery and the matrix effect in the multi-residue method for the determination of pesticides in wine

Wpływ sorbentów „clean-up” na odzysk i efekt matrycy w wielopozostałościowej metodzie oznaczania pestycydów w winie

Bożena Łozowicka¹, Magdalena Jankowska^{1*}, Ewa Rutkowska¹, Marta Lulewicz¹, Piotr Kaczyński¹, Rafał Konecki¹, Piotr Iwaniuk^{1,2}

Summary

The analysis of pesticide residues in wine is a difficult process due to the complexity of the matrix that contains many classes of interfering compounds, which prevents a proper qualitative and quantitative analysis. The key step of the commonly applied QuEChERS method is the removal of such interfering substances. The selection of sorbents for the „clean-up” is essential to allowing the reduction of the matrix effect on the analysis and to obtain acceptable recovery parameters. Therefore, the purpose of the research was to examine the effect of the selected „clean-up” sorbents or their combination on the recovery and the matrix effect (ME) in the analysis of white and red wine in terms of 490 active substances of plant protection products using gas and liquid chromatography techniques based on the modified QuEChERS protocol. The most effective solution was the use of primary and secondary amine sorbents (average recoveries ranging from 70.5% to 117.1%, and matrix effect of $-20\% < ME < 20\%$) for most of the pesticides analysed.

Key words: pesticide residues, wine, „clean-up” sorbent, matrix effect, method application

Streszczenie

Analiza pozostałości pestycydów w winie jest trudnym procesem ze względu na złożoność matrycy, zawierającej wiele klas związków interferujących, uniemożliwiających prawidłową analizę jakościową i ilościową. Kluczowym etapem powszechnie stosowanej metody QuEChERS jest usunięcie substancji interferujących. W tym celu, ważnym jest dobór sorbentów „clean-up” umożliwiających redukcję efektu matrycy (ME) i uzyskanie akceptowalnych odzysków. Dlatego też, celem badań było zbadanie wpływu wybranych sorbentów „clean-up” bądź ich kombinacji na odzysk i efekt matrycy w analizie wina białego i czerwonego 490 substancji czynnych środków ochrony roślin przy wykorzystaniu technik chromatografii gazowej i cieczowej w oparciu o zmodyfikowany protokół QuEChERS. Najskuteczniejszym rozwiązaniem okazało się użycie pierwszo- i drugorzędowej aminy, jako sorbentu do oczyszczania (średnie odzyski w zakresie 70,5–117,1% i wartości efektu matrycy $-20\% < ME < 20\%$) dla większości analizowanych pestycydów.

Słowa kluczowe: pozostałości pestycydów, wino, sorbent do oczyszczania, efekt matrycy, aplikacja metody

¹Institut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Terenowa Stacja Doświadczalna w Białymstoku
Chełmońskiego 22, 15-195 Białystok

²Uniwersytet w Białymstoku, Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok

*corresponding author: m.jankowska@iorpib.poznan.pl

ORCID: 0000-0001-9049-2624

Wstęp / Introduction

Winogrona i produkty pochodzące z winogron są bardzo często spożywane na całym świecie, a ich światowa produkcja w 2017 roku wyniosła ponad 87 milionów ton oszacowana przez Organizację Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa. W celu poprawy plonów oraz ochrony winorośli przed stratami powodowanymi przez patogeny, szkodniki i chwasty, w winnicach na całym świecie szeroko stosowane są m.in. metody chemicznej ochrony roślin (Romanazzi i wsp. 2015). Do najgroźniejszych chorób winorośli należą: mączniak prawdziwy (*Uncinula necator*), mączniak rzekomy (*Plasmopara viticola*), biała i czarna zgnilizna (*Metasphaeria diplodiella*, *Guignardia bidwellii*), szara pleśń (*Botrytis cinerea*) czy antraknoza (*Elsinoe ampelina*), natomiast najważniejszymi szkodnikami są przędziorki, szpeciel piłśniowiec (*Eriophyes vitis*), obrzęk winoroślowy (*Phyllocoptes vitis*), wyroślec winoroślowy (*Epitrimerus vitis*), zwójka kwasigroneczka (*Eupoecilia ambiguella*), zwójka gronoweczka (*Polychrosis botrana*) oraz mszyce (Aphidodea) (Gessler i wsp. 2011; González-Domínguez i wsp. 2015).

Jednym z produktów wytwarzanych z winogron są wina. Jest to jeden z najczęściej spożywanych napojów alkoholowych na całym świecie, którego szacowana przez Międzynarodową Organizację Winorośli i Wina konsumpcja wyniosła ponad 246 milionów hektolitrow (w 2017 roku). Do najpowszechniej uprawianych odmian winorośli przeznaczonych do produkcji win zaliczane są: Bonarda, Cabernet Sauvignon, Carmenere, Cereza Rosé, Chardonnay, Criolla Grande, Malbec, Moscatel Rosado, Pinot Noir, Pedro Ximenez, Syrah i Torrontes Riojano.

Wino jest napojem wytwarzanym w wyniku fermentacji winogron przez naturalne drożdże. Przy produkcji czerwonego wina, sok winogronowy fermentuje wraz ze skórką, bogatą w antocyjaniny, nadające ciemnoczerwony kolor. Natomiast białe wino, otrzymane z wyciśniętego soku z białych odmian, pozbawione jest tych związków. Proces technologiczny winifikacji obejmuje wiele etapów (m.in. fermentację, filtrowanie, klarowanie, mieszanie, dojrzewanie), które mogą mieć wpływ na poziom pozostałości środków ochrony roślin (ś.o.r.) obecnych w winogronach chronionych chemicznie przeznaczonych do produkcji win, a w konsekwencji na stężenie w przetworzonym produkcie (rozcieńczenie lub zatężenie) (Cunha i wsp. 2009).

Biorąc pod uwagę fakt, że pozostałości środków ochrony roślin mogą mieć wpływ na jakość wina, a w konsekwencji zdrowie konsumentów, koniecznym staje się opracowanie dokładnej i szybkiej wielopozostałościowej metody monitorowania szerokiego spektrum substancji czynnych (s.cz.) środków ochrony roślin, stosowanych na całym świecie do chemicznej ochrony winorośli.

Analiza pozostałości pestycydów w winie jest trudnym procesem ze względu na złożoność matrycy, zawierającej

wiele klas związków interferujących, uniemożliwiających prawidłową analizę jakościową i ilościową analitów. Przygotowanie i oczyszczanie próbki jest krytycznym etapem całego procesu analizy ze względu na obecność m.in.: alkoholu, węglowodanów, kwasów organicznych, barwników (chlorofilu, karotenoidów, flawonoidów, antocyjanów), polifenoli (antocyjany, flawonole i garbniki) oraz związków azotowych i substancji nieorganicznych (Markoski i wsp. 2016).

Metoda QuEChERS (ang. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) to procedura ekstrakcji i izolacji analitów z próbki, która jest obecnie najbardziej uniwersalną techniką analizy szerokiego zakresu związków, w tym pestycydów, o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych, na niskich poziomach stężeń w zróżnicowanych matrycach (Łozowicka i wsp. 2014, 2016; Rutkowska i wsp. 2019).

Oryginalna procedura QuEChERS (Anastassiades i wsp. 2003) jest poddawana różnorodnym modyfikacjom ze względu na rodzaj badanej próbki i oznaczane związki. Problem analityczny oznaczania szeregu klas pestycydów zróżnicowanych pod kątem właściwości fizykochemicznych w próbkach wina polega na usunięciu całego spektrum substancji interferujących. W tym celu ważny jest dobór sorbentów „clean-up” umożliwiających redukcję wpływu efektu matrycy (ME) i uzyskanie akceptowalnych parametrów odzysku dla badanych związków. Do oczyszczania stosuje się powszechnie dostępne sorbenty: pierwszo- i drugorzędowe aminy (PSA, ang. primary secondary amine), grafityzowany węgiel (GCB, ang. graphitized carbon black), żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi (C18), chitynę, Florisil, tlenek glinu czy żel krzemionkowy (Montes i wsp. 2009; Samsidara i wsp. 2018).

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu wybranych sorbentów „clean-up” bądź ich kombinacji na odzysk i efekt matrycy 490 substancji czynnych środków ochrony roślin w analizie wina białego i czerwonego, przy wykorzystaniu technik chromatografii gazowej i cieczowej sprzężonych z tandemową spektrometrią mas (GC-LC/MS/MS) w oparciu o zmodyfikowany protokół QuEChERS.

Materiały i metody / Materials and methods

Materiał do badań optymalizacji metody stanowiły próbki wina białego i czerwonego wolne od pozostałości ś.o.r. (potwierdzone chromatograficznie). Do momentu analizy, próbki przechowywane były w zamkniętych butelkach w temperaturze $6 \pm 2^\circ\text{C}$.

Naważkę 10 g umieszczono w próbkach polipropylenowych o pojemności 50 ml i wzbogacono mieszaninami wzorców z grupy akarycydów, fungicydów, herbicydów, insektycydów oraz regulatorów wzrostu (tab. 1) na trzech poziomach stężeń: (i) 0,005 mg/kg, (ii) 0,050 mg/kg i (iii) 0,500 mg/kg. Anality ekstrahowano 10 ml acetonii-

trylu, a następnie dodano sole buforujące (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, ang. dispersive solid phase extraction), stosując następujące trzy mieszaniny: (i) 150 mg MgSO₄ (bezwodny siarczan magnezu) + 10 mg PSA, (ii) 150 mg MgSO₄ + 25 mg PSA + 2,5 mg GCB, (iii) 150 mg MgSO₄ + 50 mg PSA + 50 mg Chlorofiltr. Całość wytrząsano, po czym odwirowano warstwę organiczną i przeniesiono bez-

pośrednio 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). Schemat przygotowania próbek wina do badań przedstawia rysunek 1.

Walidację opracowanej metody przeprowadzono w oparciu o przewodnik SANTE (SANTE/11813/2017). Parametry, takie jak poprawność i precyzja wyrażone za pomocą średniego odzysku i względnego odchylenia standardowego (RSD) pozwoliły na ocenę wydajności metody. Zgodnie z kryteriami SANTE metodę można zastosować do badań, gdy wartości odzysków mieszczą się w zakresie 70–120%,

Tabela 1. Oznaczone substancje czynne s.o.r.

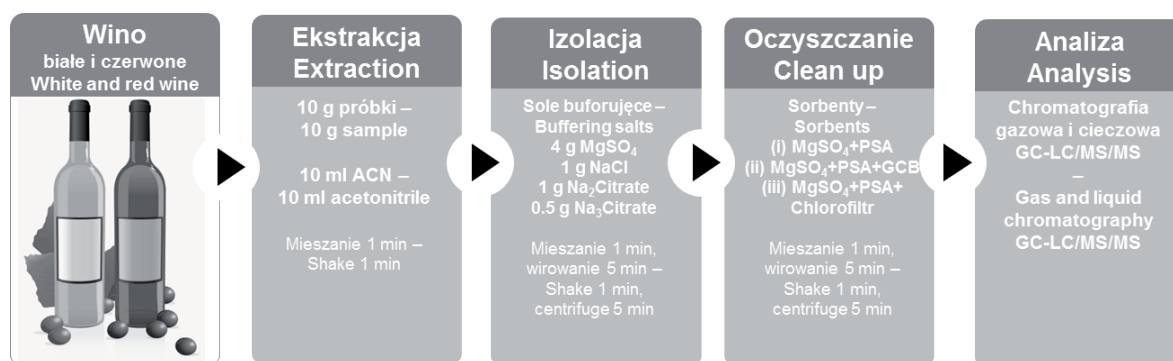
Table 1. Determined active substances of plant protection products

Akarycydy Acaricides (11)	benzoximate ² , bromopropylate ¹ , chlorfenson ¹ , clofentezine ² , dicofol ¹ , etoxazole ^{1,2} , fenbutatin oxide ² , hexythiazox ^{1,2} , propargite ^{1,2} , tebufenpyrad ^{1,2} , tetradifon ¹
Insektycydy Insecticides (211)	3-hydroxycarbofuran ¹ , abamectin ² , acephate ^{1,2} , acetamiprid ^{1,2} , acrinathrin ¹ , aldicarb ² , aldicarb sulfone ² , aldicarb sulfoxide ² , aldrin ¹ , allethrin ² , alpha-cypermethrin ¹ , aminocarb ² , amitraz ¹ , azadirachtin ² , azinphos-ethyl ¹ , azinphos-methyl ¹ , bendiocarb ² , benfuracarb ^{1,2} , bifentazate ^{1,2} , bifenthrin ¹ , beta-cyfluthrin ¹ , bromophos-ethyl ¹ , bromophos-methyl ¹ , buprofezin ^{1,2} , butocarboxim ² , butocarboxim sulfoxide ² , BYI08330-enol ² , BYI08330-enol-glucoside ² , BYI08330-ketohydroxy ² , BYI08330-monohydroxy ² , cadusafos ^{1,2} , carbaryl ^{1,2} , carbofuran ^{1,2} , carbosulfan ¹ , chlordane cis ¹ , chlordane trans ¹ , chlorantraniliprole ^{1,2} , chlorfenapyr ¹ , chlorfenvinphos ¹ , chlorfluaazuron ² , chlorobenzilate ¹ , chlorpyrifos ¹ , chlorpyrifos-methyl ¹ , chromafenozide ² , clothianidin ² , coumaphos ² , crimidine ² , cyantraniliprole ² , cyfluthrin ¹ , λ-cyhalothrin ¹ , γ-cyhalothrin ¹ , cypermethrin ¹ , dazomet ² , DDT (sum of op ² -DDT ¹ , pp ² -DDD ¹ , pp ² -DDE ¹ , pp ² -DDT ¹), dieldrin ¹ , 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} , epinomectin 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} , fenamiphos sulfone ² , fenamiphos sulfoxide ² , fenazaquin ^{1,2} , fenchlorphos ^{1,2} , fenitrothion ¹ , fenobucarb ² , fenoxycarb ^{1,2} , fenpropathrin ¹ , fenpyroximate ² , fensulfthion sulfone ² , fensulfthion sulfone ² , fenthion ¹ , fention sulfoxide ² , fipronil ^{1,2} , flonicamid ^{1,2} , fluazuron ² , flubendiamide ² , flufenoxuron ² , flumethrin ² , formetanate ² , formothion ¹ , fonofos ¹ , fosthiazate ^{1,2} , furathiocarb ² , halofenozide ² , α-HCH ¹ , β-HCH ¹ , γ-HCH (lindane) ¹ , heptachlor ¹ , heptachlor endo-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 , malaonox 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 , mirex ¹ , monocrotophos ² , moxidectin ² , naled ² , nitenpyram ² , novaluron ² , omethoate ² , oxamyl ^{1,2} , oxamyl oxime 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} , phosphamidon 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 , resmethrin ¹ , rotenone ² , spinosyn A ¹ , spinosyn D ¹ , spirodiclofen ^{1,2} , spiromesifen ^{1,2} , spirioctetamat 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 , thionazin ¹ , tralomethrin ¹ , transluthrin ² , triazophos ¹ , trichlorfon ² , triflumuron ² , vamidothion ² , zeta-cypermethrin ¹
Fungicydy Fungicides (120)	2-phenylophenol ¹ , acibenzolar-S-methyl ² , ametoctradin ² , azaconazole ^{1,2} , azoxystrobin ^{1,2} , benalaxyl ^{1,2} , benomyl ² , benthiaivalicarb-isopropyl ² , biphenyl ¹ , bitertanol ^{1,2} , bixafen ² , boscalid ^{1,2} , bromuconazole ^{1,2} , bupirimate ^{1,2} , captafol ¹ , captan ¹ , carbendazim ² , carboxin ^{1,2} , chinomethionate ¹ , chlorothalonil ¹ , chlozolate ¹ , cyazofamid ² , cyflufenamid ^{1,2} , cymoxanil ² , cyproconazole ^{1,2} , cyprodinil ^{1,2} , dichlofluanid ^{1,2} , diclobutrazol ² , dicloran ¹ , didecyldimethylammonium chloride (DDAC) ² , diethofencarb ^{1,2} , difenoconazole ^{1,2} , dimethomorph ^{1,2} , dimoxystrobin ^{1,2} , diniconazole ^{1,2} , diphenylamine ¹ , dodine ² , 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 , fluoxastrobil ² , fluquinconazole ^{1,2} , flusilazole ^{1,2} , flutolanil ^{1,2} , flutriafol ^{1,2} , fluxapyroxad 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} , isopyrazam ² , krezoxim-methyl ^{1,2} , mendipropamid ² , mepanipyrim ^{1,2} , mepronil ² , metalaxyl ^{1,2} , metconazole ^{1,2} , methabenthiazuron ² , methfuroxam ² , metrafenone ^{1,2} , myclobutanil ^{1,2} , N,N-dimethyl-N ² -p-tolylsulphamide (DMST) ² , oxadixyl ^{1,2} , oxycarboxin ² , penconazole ^{1,2} , pencycuron ^{1,2} , penflufen ² , penthiopyrad 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} , tetrahydrophthalimide (THPI) ¹ , thiabendazole ² , thiophanate-ethyl ² , thiophanate-methyl ² , tolclofos-methyl ^{1,2} , tolylfuanid ^{1,2} , triadimefon ^{1,2} , triadimenol ^{1,2} , triazoxide ² , tricyclazole ² , tridemorf ² , trifloxystrobin ^{1,2} , triflumizole ^{1,2} , triforine ² , triticonazole ^{1,2} , uniconazole ² , vinclozolin ¹ , zoxamide ^{1,2}

Tabela 1. Oznaczone substancje czynne ś.o.r. – cd.
Table 1. Determined active substances of plant protection products – continued

Herbicydy Herbicides (141)	acetochlor ¹ , aclonifen ² , alachlor ² , ametryn ² , amidosulfuron ² , atrazine ^{1,2} , benfluralin ¹ , bensulfuron-methyl ² , beflubutamid ² , bifenox ² , bromacil ^{1,2} , butafenacil ² , buralin ¹ , buturon ² , carbetamide ² , cerfentrazone-ethyl ² , chlorbromuron ² , chloridazon ^{1,2} , chlorotoluron ² , chloroxuron ² , chlorpropham ¹ , chlorsulfuron ² , chlorthal-dimethyl ¹ , 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 , ethamet-sulfuron-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 , imazamox 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 , pebulate ¹ , pendimethalin ^{1,2} , pethoxamid ² , phenmedipham ² , picolinafen ² , pinoxaden 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 , quinmerac ² , quinochloramine ^{1,2} , quizalofop-p-ethyl ¹ , rimsulfuron ² , secbutmeton ² , siduron ² , simazine ^{1,2} , simetryn ² , sulcotrione ² , sulfentrazone ² , sulfometuron-methyl ² , sulfosulfuron ² , tebuthiuron ² , tembotrione ² , tepraloxymid ² , terbacil ¹ , terbufos ¹ , terbumeton ² , terbuthylazine ^{1,2} , terbutryn ^{1,2} , thidiazuron ² , thifensulfuron-methyl ² , thiobencarb ² , topramezone ² , traloxymid E ² , traloxymid Z ² , triasulfuron ² , tribenuron-methyl ² , trifluralin ¹ , triflurosulfuron-methyl ² , tritosulfuron ²
Regulatory wzrostu Growth regulators (4)	flumetralin ¹ , forchlorfenuron ² , paclobutrazol ^{1,2} , trinexapac-ethyl ²
Inne – Others (3)	anthraquinone ² , mefenpyr-diethyl ² , piperonyl butoxide ²

¹GC/MS/MS, ²LC/MS/MS



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

a precyzja jest mniejsza od 20%. W przypadku wielopozostałościowych metod odzysk w przedziale 40–70% oraz 120–140% jest akceptowalny, pod warunkiem spełnienia pozostałych parametrów walidacyjnych. Efekt matrycy określono na podstawie stosunku liczbowego współczynników kierunkowych liniowych równań regresji krzywych kalibracyjnych przygotowanych w matrycy i rozpuszczalniku. Efekt matrycy sklasyfikowany jest w trzech kategoriach: miękki ($-20\% < ME < 20\%$), średni ($20\% < ME < 50\%$ i $-20\% > ME > -50\%$) oraz silny ($-50\% > ME > 50\%$) (Rutkowska i wsp. 2019).

Oznaczenie jakościowe i ilościowe wykonano przy wykorzystaniu chromatografów gazowych i cieczowych sprzężonych z tandemową spektrometrią mas. Do analizy pozostałości ś.o.r. techniką chromatografii gazowej użyto chromatograf Agilent 7890 A (Agilent Technologies, PaloAlto, CA, USA) połączony ze spektrometrem mas z trzema kwadrupolami Agilent 7000B. Separacji analitów 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. Objętość wstrzyki-

wanej próbki wynosiła 2 µl. Zastosowano następujący program temperaturowy pieca: 70°C => 25°C/min => 150°C => 3°C/min => 200°C => 8°C/min => 280°C (izoterma 10,0 min). Analiza jednej próbki trwała 42,25 min. Jako gaz nośny zastosowano hel o przepływie 2,1 ml/min. Jonizację próbki przeprowadzono za pomocą strumienia elektronów (EI, ang. electron ionisation) (energia jonizacyjna 70 eV). Jako gaz kolizyjny wykorzystano azot. Temperatura linii transferowej, źródła jonów i dwóch kwadrupoli wynosiły odpowiednio, 280°C, 300°C, 180°C, 180°C.

Do analizy pozostałości s.o.r. techniką chromatografii ciekowej użyto chromatograf 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. Jako fazę ruchomą zastosowano: 0,5% roztwór kwasu mrówkowego z dodatkiem 2 mmol mrówczanu amonu w wodzie (faza A) i w metanolu (faza B). Elucję gradientową przeprowadzono przy natężeniu przepływu fazy ruchomej 0,50 ml/min, stosując następujący program: 0–1 min 1% fazy B => 1–12 min od 1% do 90% fazy B => 12–22 min 90% fazy B => 22–24 min od 90% do 1% fazy B => 24–30 min 1% fazy B. Zastosowano jonizację na drodze elektrorozpraszania (ESI, ang. electrospray ionization) 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

Wino jest złożoną, ciekłą matrycą zawierającą węglowodany, kwasy organiczne, alkohole, związki fenolowe, barwniki pochodzenia naturalnego, związki azotowe i substancje nieorganiczne, które w znacznym stopniu utrudniają analizę chromatograficzną. W związku z obecnością interferentów, selektywna ekstrakcja docelowych analitów jest trudna i wymaga odpowiedniego podejścia.

W oznaczaniu pozostałości pestycydów powszechnie wykorzystuje się metody przygotowania próbki bazujące na ekstrakcji ciecz-ciecz (LLE, ang. liquid-liquid extraction), rozproszeniu matrycy na fazie stałej (MSPD, ang. matrix solid phase extraction), czy ekstrakcji do fazy stałej (SPE, ang. solid phase extraction) (Samsidara i wsp. 2018). Jednakże, kierunki badań skłaniają się ku najbardziej uniwersalnej metodzie QuEChERS, łączącej ekstrakcję analitu za pomocą rozpuszczalnika z oczyszczaniem ekstraktu za pomocą dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej. Anastassiades i wsp. (2003) opracował ją po raz pierwszy

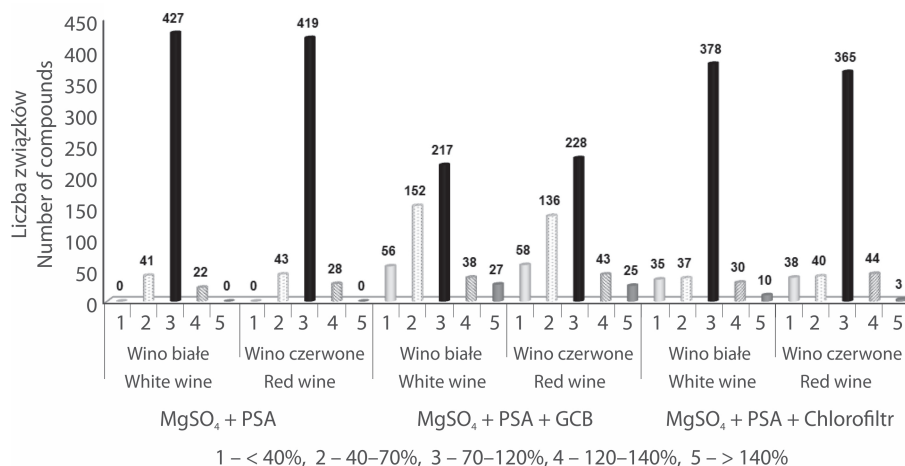
do oznaczania pozostałości pestycydów w próbkach stałych owoców i warzyw o dużej zawartości wody (ponad 75%).

Przegląd literatury naukowej wskazuje na szerokie zastosowanie metody QuEChERS w analizie próbek win. Niemniej jednak w literaturze naukowej brak jest prac opisujących kompleksowe oznaczenie kilkuset związków jednocześnie w próbkach wina białego i czerwonego, dotyczą one raczej pojedynczych pestycydów lub kilku grup. Oliver (2013) wykorzystał PSA jako sorbent „clean-up” w oznaczaniu 24 pestycydów w czerwonym winie, Walorczyk i wsp. (2011) 161 pestycydów w białym, różowym i czerwonym winie, Pelit i wsp. (2012) chloropiryfos i jego metabolit w czerwonym winie, a Słowik-Borowiec i Szpyrka (2018) 131 s.cz. w trzech rodzajach win. Ponadto inni badacze testowali także różne kombinacje sorbentów. González-Rodríguez i wsp. (2009) oraz Tuzimski i wsp. (2016) użyli mieszaniny PSA + GCB do oznaczania 6 fungicydów, a Cunha i wsp. (2009) zastosowali mieszaninę PSA + C18 do oznaczania 27 pestycydów.

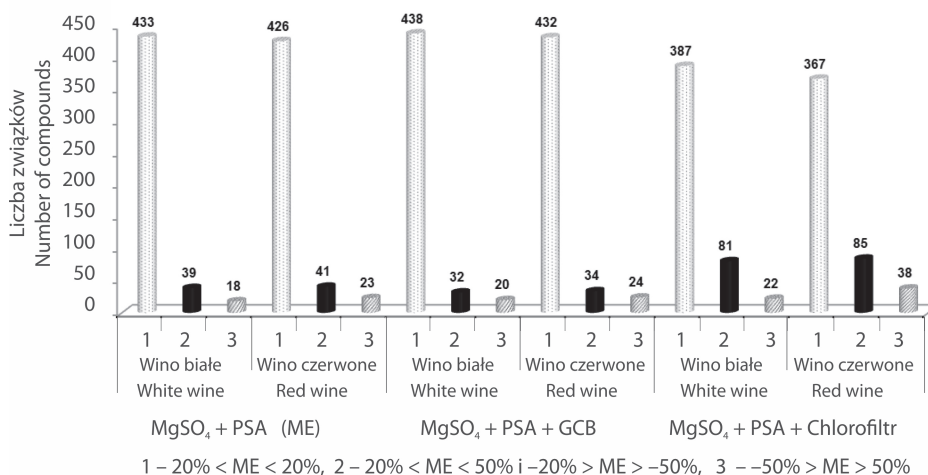
W niniejszym eksperymencie naukowym dokonano modyfikacji w stosunku do oryginalnej metody QuEChERS poprzez zastosowanie (i) ciekłej matrycy (oryginalna procedura – matryca stała), (ii) buforu cytrynianowego na etapie ekstrakcji (oryginalna procedura – chlorek sodu) oraz (iii) wykorzystanie różnych kombinacji sorbentów do oczyszczania i (iv) oznaczenie 490 pestycydów (oryginalna procedura – kilkanaście reprezentatywnych pestycydów) (Anastassiades i wsp. 2003).

Olbrzymim wyzwaniem niniejszej pracy było oznaczenie ilościowe i jakościowe 490 pestycydów, charakteryzujących się zróżnicowanymi właściwościami fizykochemicznymi, zarówno na etapie przygotowania próbki do badań, jak i oznaczeń instrumentalnych. Analizowane s.cz. wykazują bardzo zróżnicowaną: (i) polarność, od polarnego wamidotyonu ($\log P = -4,2$) do niepolarnego pirydalilu ($\log P = 8,1$), (ii) rozpuszczalność, mieszczącą się w zakresie od najmniej rozpuszczalnej deltametryny ($\log S = -3,7$) do najbardziej rozpuszczalnego acefatu ($\log S = 5,9$) oraz (iii) lotność, wahającą się od nielotnego fluchinkonazolu ($\log VP = -5,19$) do charakteryzującego się wysoką prężnością par dichlorofosu ($\log VP = 3,32$). Oznaczane związki należą do ponad 50 różnych grup chemicznych (związki chloroorganiczne, fosforoorganiczne, karbaminiany itd.), a ich masy cząsteczkowe wynoszą od 141,13 g/mol (metamidofos) do 745,99 g/mol (spinosyn D) (PPDB 2019).

Szczególną uwagę zwrócono na etap oczyszczania próbki „clean-up”. Wybór sorbentów był podyktowany obecnością substancji interferujących. PSA (i) zastosowano do skutecznego usunięcia kwasów organicznych, cukrów i pigmentów z ekstraktów z wina, a jej połączenie z niewielkimi ilościami grafityzowanego węgla (ii) dodatkowo pozwoliło usunąć polifenole i inne polarne związki. Natomiast zastosowana mieszanina PSA z Chlorofiltrem (iii) pozwoliła selektywnie usunąć pozostałe barwniki bez utraty aromatycznych pestycydów polarnych (rys. 2, 3).



Rys. 2. Wpływ różnych sorbentów na odzysk pestycydów
Fig. 2. Influence of different sorbents on the extraction recovery



Rys. 3. Wpływ różnych sorbentów na efekt matrycy pestycydów (ME)
Fig. 3. Influence of different sorbents on the matrix effect (ME)

W badaniach zastosowanie mieszaniny (ii) MgSO₄ + PSA + GCB spowodowało wzrost efektywności oczyszczania próbki poprzez wystarczające zredukowanie efektu matrycy (jedynie 10% badanych pestycydów wykazało wartości ME w zakresie -20% > ME > 20%) (rys. 3), niemniej jednak 83 analizowane związki charakteryzowały się nieakceptowalnymi wartościami odzysków (rys. 2).

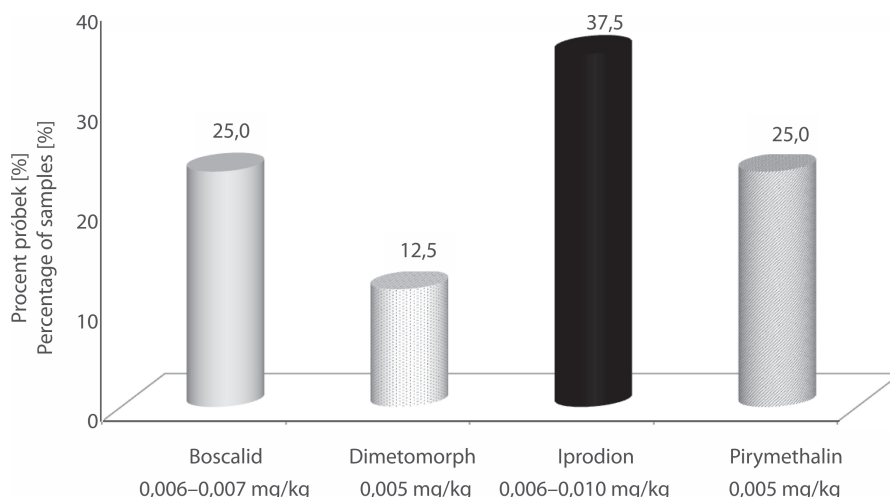
W przypadku kombinacji (iii) MgSO₄ + PSA + Chlorofiltr nieakceptowalne wartości odzysków uzyskano dla około 40 analizowanych związków (rys. 2). Wartości efektu matrycy znajdowały się poza dopuszczalnym zakresem (-20% > ME > 20%) dla 21% i 25% badanych pestycydów, odpowiednio w winie białym i czerwonym (rys. 3).

Najbardziej skutecznym rozwiązaniem okazał się pierwszy wariant zawierający (i) MgSO₄ + PSA. Zastosowanie tej kombinacji zapewniło odzyski w akceptowalnym zakresie 40–70% dla 41 i 43 związków, 70–120% dla

427 i 419 związków, 120–140% dla 22 i 28 związków, odpowiednio dla próbek wina białego i czerwonego (rys. 2). Większość analizowanych pestycydów (powyżej 85%) charakteryzowała się nieistotnym efektem matrycy (-20% < ME < 20%), około 8% wykazało średnią wartość ME (20% < ME < 50% i -20% > ME > -50%), a tylko 5% wykazało silny ME (-50% > ME > 50%) (rys. 3). „

II. Walidacja metody

Walidację zoptymalizowanej metody oznaczania pozostałości ś.o.r. przeprowadzono zgodnie z wytycznymi przewodnika SANTE (SANTE/11813/2017) i uzyskano zadawalające parametry walidacyjne. Średnie odzyski analizowanych związków mieściły się w granicach 70,5–117,1% w badanym zakresie stężeń 0,005–0,50 mg/kg ze względnym odchyleniem standardowym RSD mieszczącym się od 0,5 do 18,8%. Według SANTE akceptowalne są również



Rys. 4. Częstość wykrywania poszczególnych fungicydów w próbkach win
 Fig. 4. The frequency of occurrence of fungicides detected in wine samples

odzyski w zakresie 40–70% oraz 120–140% pod warunkiem spełnienia pozostałych parametrów walidacyjnych. Część związków wykazała akceptowalne odzyski w zakresie 58–69% oraz 123–131% z grupy fungicydów (kaptan 58% – cyprokonazol 131%), herbicydów (bromacyl 67% – chlomazon 127%) oraz insektycydów (dimetoat 67% – izo-karbofos 129%) charakteryzując się dobrymi pozostałymi parametrami walidacyjnymi.

Efekt matrycy badanych związków w próbkach wina białego i czerwonego był nieistotny dla około 85% związków i wahał się od –19% do 17% oraz –20% do 19%, odpowiednio. Pozostałe związki wykazały efekt matrycy w zakresie od –59% do –21% oraz od 22% do 58%. Acefat (–59%) oraz karbaryl (53%) wykazały największą wartość efektu matrycy w próbkach wina białego, a tiabendazol (–59%) oraz τ -fluwalinat (58%) w próbkach wina czerwonego.

III. Aplikacja metody

Zoptymalizowana metoda została zaadoptowana do analizy 11 próbek win pochodzących z amerykańskich upraw ekologicznych oraz 2 próbek z włoskich upraw konwencjonalnych: 7 próbek win czerwonych (Cabernet Sauvignon, Carmenere, Syrah, Pinot Noir) oraz 6 win białych (Chardonnay). Pozostałości ś.o.r. wykryto w 6 próbkach, co stanowiło 46% przebadanych próbek win. Potwierdzono obecność 4 związków z 490 poszukiwanych, w tym wszystkie wykryte pozostałości pestycydów należały

do fungicydów (boskalid, dimetomorf, pirymetanal – próbki konwencjonalne; iprodion – próbki ekologiczne) (rys. 4).

Wnioski / Conclusions

1. W procesie optymalizacji metody QuEChERS polegającej na doborze sorbentu „clean-up” bądź ich mieszanin najefektywniejsze oczyszczenie matrycy wina białego i czerwonego uzyskano przy zastosowaniu mieszaniny 150 mg $MgSO_4$ + 10 mg PSA.
2. Zoptymalizowana procedura QuEChERS pozwoliła na oznaczenie na niskich poziomach stężeń zróżnicowanych pod względem budowy chemicznej i właściwości fizykochemicznych 490 s.c.z. w próbkach win białych i czerwonych z wykorzystaniem chromatografii gazowej i ciekowej.
3. Metodę wdrożono do rutynowych badań pozostałości 490 s.c.z. ś.o.r. w próbkach win. Przeprowadzone badania wskazują, iż niezwykle istotne jest monitorowanie win pochodzących ze światowych upraw ze względu na wykryte w nich pozostałości ś.o.r. (46% przebadanych próbek).

Praca wykonana w ramach tematu statutowego SIB-02 „Opracowanie i wdrażanie nowatorskich metod oznaczania pozostałości środków ochrony roślin w materiale roślinnym, biologicznym i środowiskowym”.

Literatura / References

- Anastassiades M., Lehota S.J., Stajnbaher D., Schenck F.J. 2003. Fast and easy multi-residue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* 86 (2): 412–431.

- Cunha S.C., Fernandes J.O., Alves A., Oliveira M.B.P.P. 2009. Fast low-pressure gas chromatography–mass spectrometry method for the determination of multiple pesticides in grapes, musts and wines. *Journal of Chromatography A* 1216 (1): 119–126. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.11.015
- Gessler C., Pertot I., Perazolli M. 2011. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea* 50 (1): 3–44. DOI: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-9360
- González-Domínguez E., Caffi T., Ciliberti N., Rossi V. 2015. A mechanistic model of *Botrytis cinerea* on grapevines that includes weather, vine growth stage, and the main infection pathways. *PLoS One* 10 (10): e0140444. DOI: 10.1371/journal.pone.0140444
- González-Rodríguez R.M., Cancho-Grande B., Simal-Gándara J. 2009. Multiresidue determination of 11 new fungicides in grapes and wines by liquid-liquid extraction/clean-up and programmable temperature vaporization injection with analyte protectants/gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216 (32): 6033–6042. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.06.046
- Łozowicka B., Ilyasova G., Kaczyński P., Jankowska M., Rutkowska E., Hrynko I., Mojsak P., Szabuńko J. 2016. 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: 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* 54 (4): 412–418. DOI: 10.14199/ppp-2014-070
- Markoski M.M., Garavaglia J., Oliveira A., Olivares J., Marcadenti A. 2016. Molecular properties of red wine compounds and cardiometabolic benefits. *Nutrition and Metabolic Insights* 9: 51–57. DOI: 10.4137/NMI.S32909
- Montes R., Rodríguez I., Ramil M., Rubí E., Cela R. 2009. Solid-phase extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction for the sensitive determination of selected fungicides in wine. *Journal of Chromatography A* 1216 (29): 5459–5466. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.05.048
- Oliver M. 2013. Determination of 24 pesticide residues in red wine using a QuEChERS sample preparation approach and LC-MS/MS detection. *Thermo Fisher Scientific Application Note* 20830, 9 ss.
- Pelit F.O., Pelit L., Ertas H., Ertas F.N. 2012. Development of a gas chromatographic method for the determination of chlorpyrifos and its metabolite chlorpyrifos-oxon in wine matrix. *Journal of Chromatography B* 904: 35–41. DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.07.006
- PPDB – Pesticide Properties Database. 2019. University of Hertfordshire. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm> [dostęp: 07.10.2019].
- Romanazzi G., Mancini V., Feliziani E., Servili A., Endeshaw S., Neri D. 2015. Impact of alternative fungicides on grape downy mildew control and vine growth and development. *Plant Disease* 100 (4): 739–748. DOI: 10.1094/PDIS-05-15-0564-RE
- 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
- Samsidara A., Siddiquee S., MdShaaranib S. 2018. A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs. *Trends in Food Science and Technology* 71: 188–201. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.11.011
- SANTE/11813/2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf
- Słowik-Borowiec M., Szpyrka E. 2018. Multiresidue analysis of pesticides in wine and grape using gas chromatography with microelectron capture and nitrogen–phosphorus detection. *Food Analytical Methods* 11 (12): 3516–3530. DOI: 10.1007/s12161-018-1329-4
- Tuzimski T., Rejczak T., Pieniążek D., Buszewicz G., Teresiński G. 2016. Comparison of SPE/d-SPE and QuEChERS-based extraction procedures in terms of fungicide residue analysis in wine samples by HPLC–DAD and LC–QqQ–MS. *Journal of AOAC International* 99 (6): 1436–1443. DOI: 10.5740/jaoacint.16-0277
- Walorczyk S., Drożdżyński D., Gnusowski B. 2011. Multiresidue determination of 160 pesticides in wines employing mixed-mode dispersive-solid phase extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta* 85 (4): 1856–1870. DOI: 10.1016/j.talanta.2011.07.029