

Received 22.04.2021 / Accepted: 20.05.2021

ARTYKUŁ ORYGINALNY

Optimalizacja i walidacja metody oznaczania pozostałości środków ochrony roślin w zielonych warzywach z wykorzystaniem LC-MS/MS

Optimization and validation of a method for the determination of pesticide residues in green vegetables by LC-MS/MS

Klaudia Pszczolińska^{A*}, Barbara Kociołek

Streszczenie

Oznaczanie pozostałości środków ochrony roślin w złożonych matrycach, do których należą produkty o wysokiej zawartości chlorofilu wymaga zmodyfikowanego postępowania na etapie oczyszczania, gdyż standardowa metoda QuEChERS nie umożliwia wystarczającej redukcji interferentów z ekstraktu. Współekstrakcja chlorofilu z zielonych matryc, takich jak warzywa lub zioła, to istotne utrudnienie, które może być przyczyną wyników fałszywie pozytywnych lub negatywnych. W związku z tym celem pracy była optymalizacja metody oznaczania pozostałości środków ochrony roślin w zielonych matrycach polegająca na doborze odpowiedniego zestawu sorbentów wykorzystywanych na etapie oczyszczania ekstraktu oraz ocenie wpływu masy próbki, dodatku wody i rozcieńczenia końcowego. Uzyskane wyniki optymalizacji pozwoliły na opracowanie metody, która następnie została poddana procesowi walidacji, wykonanej dla 134 substancji czynnych z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS.

Słowa kluczowe: pozostałości środków ochrony roślin, efekt matrycy, zielone warzywa, chromatografia cieczowa

Abstract

The determination of residues of plant protection products in complex matrices which contain products with high chlorophyll content requires a modified cleanup procedure as the standard QuEChERS method does not sufficiently reduce the interference substances from extracts. Co-extraction of chlorophyll from green matrices such as vegetables or herbs is a significant complication that can result in false positive or negative results. Therefore, the aim of this work was the optimization method of determination pesticide residue in green matrices in order to select an appropriate set of sorbents used at the extract clean-up stage and to assess the influence of sample weight, water addition and final dilution. The obtained optimization results allowed for development a method, which was then subjected to a validation process, that was carried out for 134 active substances using the LC-MS/MS technique.

Key words: pesticide residues, matrix effect, green vegetables, liquid chromatography

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Oddział Sośnicowice
Gliwicka 29, 44-153 Sośnicowice
*corresponding author: k.pszczolinska@iorpib.poznan.pl
ORCID: 0000-0002-9991-6689

Wstęp / Introduction

Właściwe odżywianie przyczynia się niewątpliwie do poprawy jakości życia, dlatego też świadomość dietetyczna i przestrzeganie zaleceń jest istotne w zachowaniu zdrowia i dobrego samopoczucia. Aktualne wytyczne w zakresie zdrowego odżywiania wskazują, że podstawowym elementem zrównoważonej diety powinny być warzywa i owoce (Guiding Principles 2019; Dietary Guidelines 2020–2025; Zalecenia 2020). Ich regularne spożywanie jest korzystne z uwagi na liczne prozdrowotne właściwości. Dostarczają one wielu składników mineralnych, witamin (przede wszystkim witaminy C, β -karotenu, folianów), polifenoli, błonnika oraz naturalnych przeciwutleniaczy, tzw. antyoksydantów, które usuwają szkodliwe dla organizmu wolne rodniki tlenowe. Ponadto, wykazano także wpływ owoców i warzyw na zmniejszenie ryzyka rozwoju wielu chorób, w tym cukrzycy typu 2, otyłości, nadciśnienia, niedokrwiennej choroby serca czy niektórych nowotworów (Olędzki 2012; Zielińska i wsp. 2017; Konopacka i wsp. 2018; Gardocka-Jałowiec i wsp. 2020).

W grupie warzyw za wyjątkowo zdrowe uznawane są zielone warzywa, które swój kolor oraz cenne właściwości zawdzięczają zawartemu w nich chlorofilowi. Umożliwia on przemianę energii świetlnej (głównie promieniowania słonecznego) w energię biochemiczną, potrzebną do przeprowadzenia procesu fotosyntezy poprzez generowanie elektronów, niezbędnych w poszczególnych etapach tego procesu. Do tej szczególnej grupy zielonych warzyw, zaliczamy warzywa liściaste, czyli różnego rodzaju sałaty, szpinak, szczaw, jarmuż, kapustę, a także szparagi, brokuły, szczypior, koper i brukselkę (Zielińska i wsp. 2017; Konopacka i wsp. 2018; Gardocka-Jałowiec i wsp. 2020).

Aby zapewnić konsumentom możliwość bezpiecznego spożywania warzyw ważne jest systematyczne kontrolowanie prawidłowości stosowania środków ochrony roślin (ś.o.r.) oraz ocena ich pozostałości. W Polsce zagadnienia te realizowane są w ramach monitoringu krajowego, którego część badawczą wykonuje Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy (IOR – PIB). Coroczne badania wykazują, że między innymi w zielonych warzywach wykrywane są pozostałości substancji czynnych niedozwolonych do stosowania w danej uprawie oraz przekroczenia najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości (NDP) (Rozporządzenie 2005; Nowacka i Hołodyńska-Kulas 2020; Nowacka i wsp. 2020).

W celu zapewnienia właściwego poziomu bezpieczeństwa żywności, konieczne jest opracowanie metod analitycznych, które pozwolą na oznaczanie szerokiego zakresu pozostałości ś.o.r. wykrywanych na niskim poziomie stężeń. Przygotowanie próbki to kluczowy etap analizy substancji czynnych, którego celem jest uzyskanie odpowiedniego odzysku dla dużej liczby analitów oraz ekstraktu bez zawartości interferentów (Alcântara i wsp. 2019; Santana-Mayor i wsp. 2019). Opracowywanie i wdrażanie do rutynowych

analiz szybkich, dokładnych i powtarzalnych metod jest istotnym zagadnieniem realizowanym przez chemików analityków.

Jedną z najpopularniejszych metod przygotowania próbek w analizie pozostałości ś.o.r. jest metoda QuEChERS (ang. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) (Anastassiades i wsp. 2003). Metoda ta polega na izolacji i podziale składników próbki w układzie ciecz-ciecz z użyciem acetonitrylu, a następnie oczyszczeniu ekstraktu z wykorzystaniem metody dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej (d-SPE) (Anastassiades i wsp. 2003). Metoda QuEChERS znalazła uznanie wśród analityków na całym świecie dzięki swym zaletom, takim jak szybkość i łatwość przygotowania próbki, zmniejszenie zużycia rozpuszczalników, ograniczenie wykorzystania szkła laboratoryjnego, a przede wszystkim możliwość jednoczesnej analizy wielu substancji czynnych na niskim poziomie stężeń (Wilkowska i Biziuk 2011; Rejczak i Tuzimski 2015; Perestrelo i wsp. 2019).

Metoda QuEChERS jest techniką elastyczną, a jej kluczowe parametry można łatwo modyfikować i optymalizować, aby zwiększyć jej potencjalne zastosowanie w szerokim zakresie różnych związków i matryc (Perestrelo i wsp. 2019; Santana-Mayor i wsp. 2019). Jest to szczególnie istotne w analizie złożonych matryc, do których należą produkty o wysokiej zawartości chlorofilu. W przypadku takich matryc powszechnie stosowana na etapie oczyszczania d-SPE, mieszanina sorbentów siarczanu magnezu ($MgSO_4$) i pierwszo- i drugorzędowej aminy (PSA) daje niezadowalające wyniki. Współekstrakcja chlorofilu z zielonych matryc, takich jak warzywa lub zioła, to istotne utrudnienie, ponieważ ze względu na jego nietłotne właściwości jest jednym z najbardziej problematycznych interferentów w analizie pozostałości ś.o.r. (Walorczyk i wsp. 2015). Jeśli matrycowe interferenty nie zostaną zredukowane lub usunięte, mogą być przyczyną wyników fałszywie pozytywnych lub negatywnych (Lehotay 2011). Optymalizacja wykorzystania różnych sorbentów i ich różnych proporcji pozwala na wybór najlepszej wersji oczyszczania, które jest etapem koniecznym w analizie pozostałości ś.o.r. w zielonych matrycach.

Celem niniejszej pracy było opracowanie metody oznaczania pozostałości substancji czynnych w zielonych warzywach opartej na założeniach metody QuEChERS w połączeniu z techniką chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Istotnym etapem optymalizacji była ocena możliwości zastosowania różnych sorbentów na etapie oczyszczania d-SPE pod względem ich wpływu na wartości odzysku oraz efektu matrycy.

Materiały i metody / Materials and methods

Jako matryce reprezentatywne dla zielonych warzyw do badań wybrano próbki kopru i bazylii, w których analiza chromatograficzna nie wykazała pozostałości ś.o.r. Przed-

miotem przeprowadzonych badań była optymalizacja (i) masy próbki (5 g i 10 g), (ii) dodania odpowiedniej objętości wody (ekstrakcja bez dodania wody i z 5 ml wody), (iii) odpowiedniego zestawu sorbentów stosowanych na etapie oczyszczania d-SPE, (iv) wpływu rozcieńczenia próbki na efekt matrycy.

Badania optymalizacyjne wykonano w oparciu o analizę wybranych 41 reprezentatywnych substancji czynnych, należących do grupy fungicydów, herbicydów i insektycydów. Każda próbka została wzbogacona mieszaniną substancji czynnych na poziomie 0,1 mg/kg. Wszystkie etapy optymalizacji wykonano w 5 powtórzeniach i analizowano wobec 5-punktowej krzywej kalibracyjnej w matrycy. Oceny uzyskanych wyników dokonano w oparciu o wytyczne dokumentu SANTE/12682/2019, takie jak: wartość odzysku, wartość współczynnika zmienności oraz efektu matrycy (SANTE/12682/2019).

Etap ekstrakcji i oczyszczania przeprowadzono w oparciu o założenia metody QuEChERS (PN-EN 15662:2018-06). Do 50 ml próbki polipropylenowej odważono zhomogenizowaną próbkę, którą wzbogacono mieszaniną wzorców, a następnie ekstrahowano 10 ml acetonitrylu. Po 1 min wytrząsania, 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 ponownie wytrząsano, odwirowano przy obrotach 4500 obr./min, a otrzymany acetonitrylowy ekstrakt przeniesiono do próbki i poddano oczyszczaniu z wykorzystaniem sorbentów d-SPE. Etap ten prowadzony był w trzech wariantach (rys. 1). Po wytrząsaniu i odwirowaniu, odparowano 1 ml ekstraktu w strumieniu azotu, a suchą pozostałość rozpuszczono w 1 ml mieszaniny acetonitryl : woda (50 : 50). Próbkę po przefiltrowaniu przeniesiono do fiolki chromatograficznej.

Oznaczenia analityczne wykonano z wykorzystaniem chromatografu cieczowego Agilent 1200 sprzężonego z potrójnym kwadrupolowym detektorem mas G6410B (LC-MS/MS). Chromatograf cieczowy był wyposażony w kolumnę kapilarną Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm ×

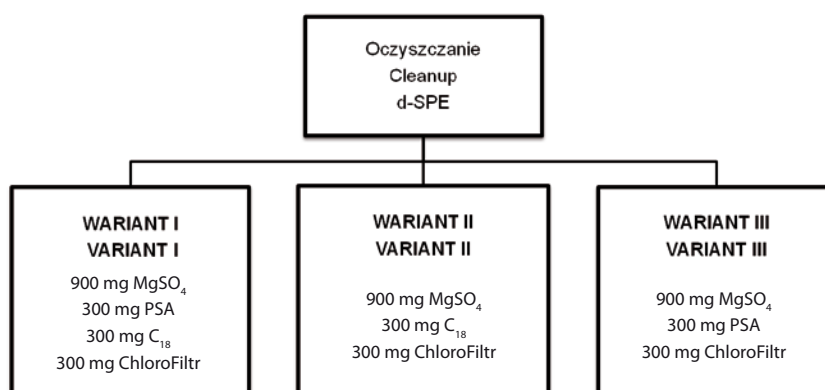
2,1 mm × 3,5 μm), a temperaturę pieca kolumny ustawiono na 40°C. Objętość nastrzyku próbki wynosiła 5 μl. Fazę ruchomą stanowił wodny roztwór mrówczanu amonu o stężeniu 5 mM (faza A) oraz metanolowy roztwór mrówczanu amonu o stężeniu 5 mM (faza B). Do rozdziału docelowych substancji czynnych przyjęto następującą procedurę elucji: 0–1 min 20% fazy B → 1–20 min od 20% do 100% fazy B → 20–25 min 100% fazy B → 25–26 min od 100% do 20% fazy B → 26–31 min 20% fazy B, przy natężeniu przepływu fazy ruchomej 0,3 ml/min. Zastosowano jonizację przez rozpylanie w polu elektrycznym (ESI). Identyfikację i oznaczenie ilościowe substancji czynnych wykonano w trybie monitorowania wielu reakcji (MRM), co umożliwiło monitorowanie jonów fragmentacyjnych związków, a tym samym zwiększyło pewność identyfikacji substancji czynnych.

Zgodnie z wytycznymi dokumentu SANTE/12682/2019 wykonano walidację 134 substancji czynnych zgodnie z opracowaną metodą (tab. 1). Wymagane parametry walidacyjne wraz z kryteriami akceptacji przedstawiono w tabeli 2. Na etapie walidacji, próbki zostały wzbogacone na 4 poziomach wzbogacenia, a każdy poziom został wykonany w 5 powtórzeniach. Krzywe kalibracyjne wykreślono na podstawie analizy rozcieńczeń wzorcowych na 5 poziomach stężeń, obejmujących badany zakres poziomów substancji czynnych.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

I. Optymalizacja metody

Pierwszy etap badań miał na celu dobór właściwej masy próbki i wyznaczenie odpowiedniej objętości dodawanej wody do próbki. Optymalizacji masy dokonano, aby sprawdzić, czy jej zmniejszenie umożliwi otrzymanie statystycznie wiarygodnych wyników w próbkach o wysokiej zawartości chlorofilu. Przetestowano również wpływ dodania wody do próbki, gdyż wykazano, że pomaga to rozpuszczalnikiowi w całkowitym wyekstrahowaniu analitów, dzie-



Rys. 1. Wykorzystane warianty oczyszczania d-SPE w przeprowadzonych badaniach
Fig. 1. The used variants of d-SPE in the conducted research

Tabela 1. Oznaczone substancje czynne
Table 1. Determined active substances

Grupa ś.o.r. Type of pesticide	Substancja czynna Active substance
Akarycydy Acaricides	benzoksymat, heksytliazoks benzoximate, hexythiazox
Fungicydy Fungicides	bentiawalikarb izopropyl, cyflufenamid, cyjazofamid, cymoksanil, diklobutrazol, famoksadon, fenpyrazamina, fluoksapyroksad, fluoksastrobina, fluopikolid, fluopyram, ipkonazol, iprowalikarb, izopyrazam, karbendazym, mandipropamid, mefentrifluonazol, metabentiazuron, pentiopyrad, prochinazyd, siltiofam, tiabendazol, triazoksyd, tricyklazol, walifenalat benthiavalikarb-isopropyl, cyflufenamid, cyazofamid, cymoxanil, diclobutrazole, famoxadone, fenpyrazamine, fluxapyroxad, fluoxastrobin, fluopicolide, fluopyram, ipconazole, iprovalikarb, isopyrazam, carbendazim, mandipropamid, mefentrifluconazole, methabenzthiazuron, penthiopyrad, proquinazid, silthiofam, thiabendazole, triazoxide, tricyclazole, valifenalate
Herbicydy Herbicides	chinoxlamina, chlomezon, chlorotoluron, chlorydazon, desmedifam, diflufenikan, dimefuron, fenchlorazol etylowy, fenmedifam, fenuron, flufenacet, flumioksazylna, fluometuron, fluorochloridon, fluoroglikofen etylowy, fluridon, flurtamon, haloxyfop metylowy, halosulfuron metylowy, izoksaben, izoksadifen etylowy, izoksafutol, izoproturon, karbetamid, karfentrazon etylowy, klodinafop propargilowy, linuron, metamitron, metobromuron, metoksuron, metoprotyna, metrybuzyna, monuron, napropamid, norfluazuron, petoksamid, pikolinafen, procyjazylna, profam, propachizafop, siduron, sulfosulfuron, tralkoksidym, tribenuron metylu, tritosulfuron quinclamine, clomazone, chlorotoluron, chloridazone, desmedipham, diflufenican, dimefuron, fenchlorazole-ethyl, phenmedipham, fenuron, flufenacet, flumioxazine, fluometuron, fluorochloridone, fluoroglycofen ethyl, fluridone, flurtamone, haloxyfop-methyl, halosulfuron-methyl, isoxaben, isoxadifen-ethyl, isoxafutole, isoproturon, carbetamide, carfentrazone-ethyl, clodinafop propargyl, linuron, metamitron, metobromuron, metoxuron, methoprotryne, metribuzin, monuron, napropamide, norfluazuron, petoxamide, picolinafen, procyzazine, profam, propaquizafop, siduron, sulfosulfuron, tralkoxidim, tribenuron methyl, tritosulfuron
Insektycydy Insecticides	acefat, acetamipryd, aldikarb, aldikarb sulfon, aldikarb sulfotlenek, alletryna, bendiokarb, butoksykarboksym, chlorantraniliprol, chlorfluazuron, chlorpiryfos, chromafenozyd, cyjanotraniliprol, DEET, diflubenzuron, dimetoat, dinotefuran, dioksakarb, etiofenkarb, etiofenkarb sulfon, etiofenkarb sulfotlenek, etiprol, fenpiroksymat, fenpropatryna, fensulfotion sulfon, fention, fention sulfon, fention sulfotlenek, flonikamid, fluazuron, flufenoksuron, foksym, halofenozyd, heksaflumuron, imidaklopyrd, karbaryl, karbofuran, karbofuran-3-hydroksy, klotianidyna, kumafos, lufenuron, metaflumizon, metoksyfenozyd, metomyl, nowaluron, oksydemeton metylowy, piperonylobutoksyd, piryfikarb desmetylu, rotenon, spirodiklofen, spirotetramat, tau-fluwalinat, tebufenozyd, teflubenzuron, tiaklopyrd, tiametoksam, tiodikarb, tiofanoks sulfon, tiofanoks sulfotlenek, tlenek oksamylu, trichlorfon, triflumuron acephate, acetamiprid, aldicarb, aldicarb sulfone, aldicarb sulfoxide, allethrin, bendiocarb, butoxycarboxim, chlorantraniliprole, chlorfluazuron, chlorpyrifos, chromafenozide, cyanotraniliprole, DEET, diflubenzuron, dimethoate, dinotefuran, dioxacarb, ethiofencarb, ethiofencarb sulfone, ethiofencarb sulfoxide, etiprole, fenpyroximate, fenprothrin, fensulfothion sulfone, fenthion, fenthion sulfone, fenthion sulfoxide, flonicamid, fluazuron, flufenoxuron, phoxim, halofenozide, hexaflumuron, imidacloprid, carbaryl, carbofuran, carbofuran-3-hydroxy, clothianidin, coumaphos, lufenuron, metaflumizone, methoxyfenozide, methomyl, novaluron, oxydemeton-methyl, piperonylbutoxide, pirimicarb desmethyl, rotenone, spirotetramat, tau-fluvalinate, tebufenozide, teflubenzuron, thiacloprid, thiamethoxam, thiodicarb, thiofanox sulfone, thiofanox sulfoxide, oxamyl oxide, trichlorfon, triflumuron

Tabela 2. Parametry walidacyjne i kryteria akceptacji (SANTE/12682/2019)
Table 2. Validation parameters and their acceptance criteria (SANTE/12682/2019)

Parametr walidacyjny Validation parameter	Kryterium akceptacji Acceptance criteria
Odzysk – Recovery	średni odzysk (R_{sr}) powinien mieścić się w zakresie 70–120% na każdym poziomie wzbogacenia average recovery for each spike level in the range 70–120%
Powtarzalność – Precision	współczynnik zmienności (CV) $\leq 20\%$ coefficient of variation $\leq 20\%$
Efekty matrycowe – Matrix effect	$-20\% \leq ME \leq 20\%$
Niepewność – Uncertainty	$\leq 50\%$

ki czemu wzrasta wydajność procesu ekstrakcji (Walorczyk i wsp. 2015; Rutkowska i wsp. 2018).

Badania wykonano w oparciu o dwie masy próbek: 5 g i 10 g. Ponadto etap ekstrakcji wykonano bez dodatku wody i z dodaniem 5 ml wody. Otrzymane wartości odzysków dla masy 5 g mieściły się w zakresie 57,3–111,5%, natomiast dla 10 g wynosiły 70,1–115,4%. Wartość odzysku poniżej 70% otrzymano dla spirotetramatu, lufenuronu, ipkonazolu i desmedifamu. Dodanie wody do próbki umożliwiło wyznaczenie odzysków związków na poziomie 60,3–117,4% dla masy 5 g oraz 70,8–116,6% dla 10 g. Powtarzalność na tym etapie badań mieściła się na poziomie 10%. Na podstawie uzyskanych wyników zdecydowano, że w dalszych badaniach będzie wykorzystywana masa próbki 10 g z dodatkiem 5 ml wody.

Oczyszczanie jest etapem koniecznym w złożonych matrycach, ponieważ bez niego otrzymany ekstrakt będzie zawierał interferenty, które mogą zakłócać analizę chromatograficzną. W oczyszczaniu d-SPE można zastosować różne sorbenty w zależności od matrycy. Popularnym sorbentem jest pierwszo- i drugorzędowa amina (PSA), której ogólną funkcją jest usuwanie kwasów tłuszczowych, cukrów, kwasów organicznych i niektórych barwników (Rejczak i Tuzimski 2015; Perestrelo i wsp. 2019). Stosowany jest również żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi (C_{18}) do usuwania lipidów czy grafityzowany węgiel (GCB) do barwników, szczególnie chlorofilu (Rejczak i Tuzimski 2015; Perestrelo i wsp. 2019).

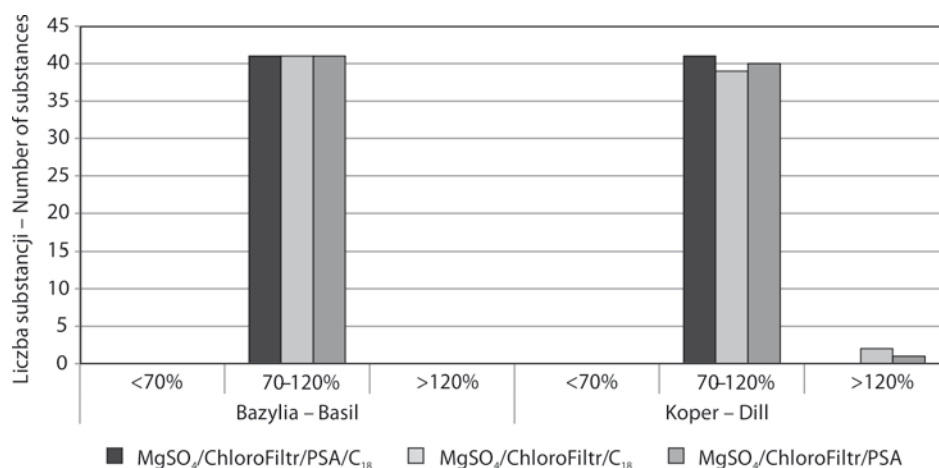
Chlorofil jest problematycznym, współekstrahowanym składnikiem matrycy, który dotychczas był usuwany z próbek z wykorzystaniem sorbentu GCB. Sorbent ten jednak posiada istotną wadę, a mianowicie powoduje silną adsorpcję polarnych analitów, co skutkuje niskimi wartościami odzysków (Rejczak i Tuzimski 2015; Perestrelo i wsp. 2019). Aby móc oznaczać pozostałości ś.o.r. w szerokim zakresie polarność związków na rynek wprowadzono sorbent ChloroFiltr (Wang 2013).

Istotnym etapem optymalizacji był dobór odpowiedniego składu sorbentów wykorzystywanych podczas oczyszczania d-SPE. Testowano komercyjnie dostępne sorbenty zawierające ChloroFiltr w trzech różnych wersjach różniących się zawartością PSA i C_{18} . Ponadto dokonano również oceny wpływu rozcieńczenia końcowego ekstraktu próbek na wynik we wszystkich konfiguracjach, porównując próbki nierozcieńczone oraz dwukrotnie rozcieńczone.

Wszystkie warianty sorbentów ($MgSO_4$ /ChloroFiltr/PSA/ C_{18} , $MgSO_4$ /ChloroFiltr/ C_{18} oraz $MgSO_4$ /ChloroFiltr/PSA) wykorzystane w analizie próbek bazylii pozwoliły na uzyskanie wartości odzysków mieszczących się w prawidłowym przedziale 70–104% (rys. 2). Natomiast w przypadku próbek kopru nieakceptowalne wartości odzysków powyżej 120% uzyskano dla zestawu sorbentów $MgSO_4$ /ChloroFiltr/ C_{18} w przypadku aldikarbu sulfotlenku i metomylu, a dla wariantu $MgSO_4$ /ChloroFiltr/PSA dla tiakloprydu.

Analiza efektów matrycy uzyskana dla trzech kombinacji sorbentów na etapie oczyszczania w próbce bazylii wykazała, że tylko w przypadku wariantu $MgSO_4$ /ChloroFiltr/ C_{18} uzyskano wartości efektu matrycy poza dopuszczalnym zakresem dla dwóch oznaczanych związków (karbendazyumu i cymoksanilu), natomiast w pozostałych wariantach wartości efektu matrycy mieściły się w przedziale –17,4–4,9 (rys. 3). Próbki kopru okazały się zdecydowanie bardziej problematyczną matrycą pod względem oczyszczania. Jedynie dla zestawu sorbentów $MgSO_4$ /ChloroFiltr/PSA/ C_{18} wartości efektów matrycy mieściły się w prawidłowym zakresie $-20\% \leq ME \leq 20\%$. W przypadku kombinacji sorbentów $MgSO_4$ /ChloroFiltr/ C_{18} tylko 75,6% substancji czynnych spełniło wymagania, a w przypadku sorbentów $MgSO_4$ /ChloroFiltr/PSA 80,5% substancji czynnych. Najsilniejszy efekt matrycy ($< -30\%$) zaobserwowano w obu przypadkach dla tiakloprydu i chinochlaminu oraz cyjazyfamidu dla wariantu $MgSO_4$ /ChloroFiltr/ C_{18} .

We wszystkich wariantach oczyszczania próbek dominował ujemny efekt matrycy, czyli tłumienie sygnałów



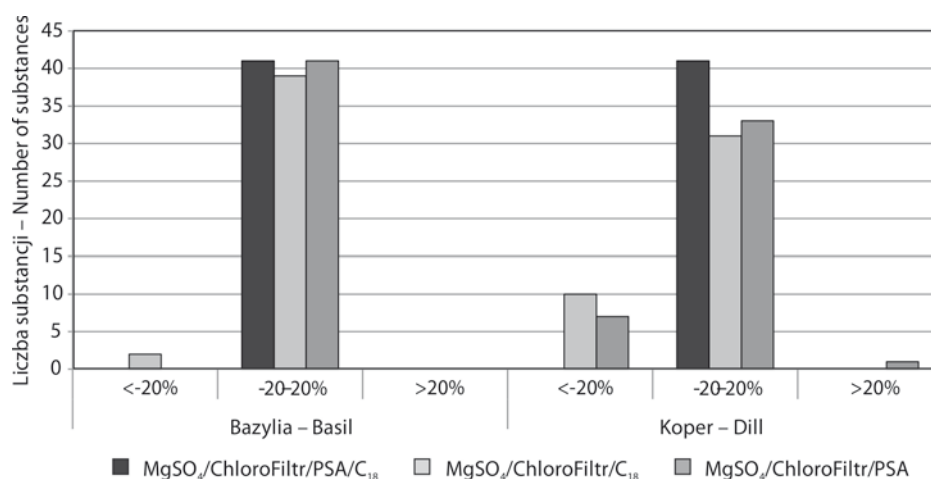
Rys. 2. Porównanie wartości odzysków uzyskanych dla próbek bazylii i kopru po zastosowaniu sprawdzanych wariantów oczyszczania d-SPE
Fig. 2. Comparison of the recovery values obtained for the basil and dill samples after the application of the tested d-SPE cleanup variants

analitów przez matrycę. Była to spodziewana reakcja, gdyż efekt tłumienia jonów jest częściej spotykany w dodatnim trybie jonizacji ESI, który był stosowany podczas tej analizy (Stahnke i wsp. 2012). Podobną przewagę ujemnych wartości efektu matrycy zaobserwowano w badaniach pozostałości 28 karbaminianów w próbkach pietruszki, bazylii, mięty, tymianku i szalwii (Nantia i wsp. 2017).

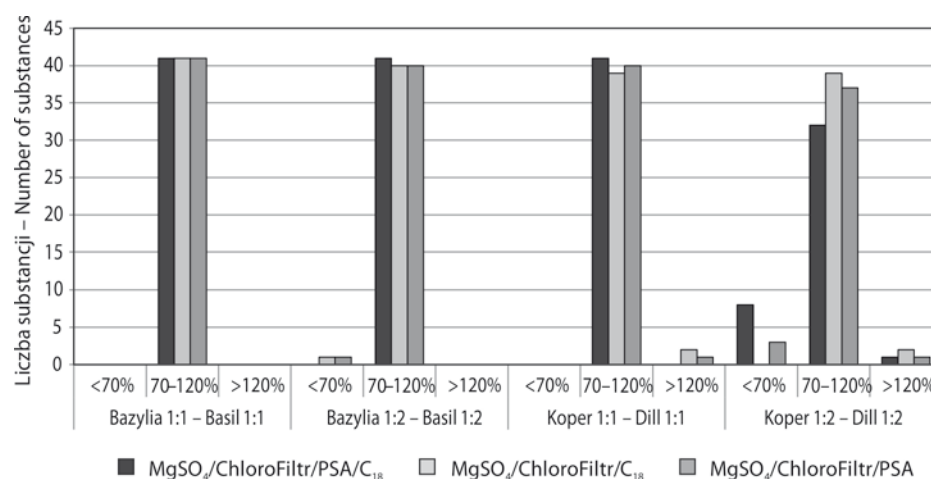
Rozcieńczenie końcowego ekstraktu próbki miało negatywny wpływ na wartości odzysków, co widoczne było szczególnie w próbkach kopru. W próbkach nierozcieńczonych w dopuszczalnym zakresie odzysków znajdowało się w zależności od wariantu od 95,1% do 100,0% badanych substancji, podczas gdy przy zastosowaniu rozcieńczenia 1 : 2 (v : v) było to 78,0–95,1% (rys. 4). Z kolei na efekt matrycy rozcieńczenie miało odwrotny wpływ. W nierozcieńczonych ekstraktach próbek, w których do oczyszczenia użyto mieszaniny sorbentów $MgSO_4$ /ChloroFiltr/ C_{18} i $MgSO_4$ /ChloroFiltr/PSA odnotowano większą liczbę wy-

ków efektów matrycowych poza dopuszczalnym zakresem w porównaniu do wariantów rozcieńczonych. Natomiast w przypadku próbek bazylii rozcieńczenie próbki jedynie nieznacznie wpłynęło na wartości odzysków i efektów matrycy (rys. 5).

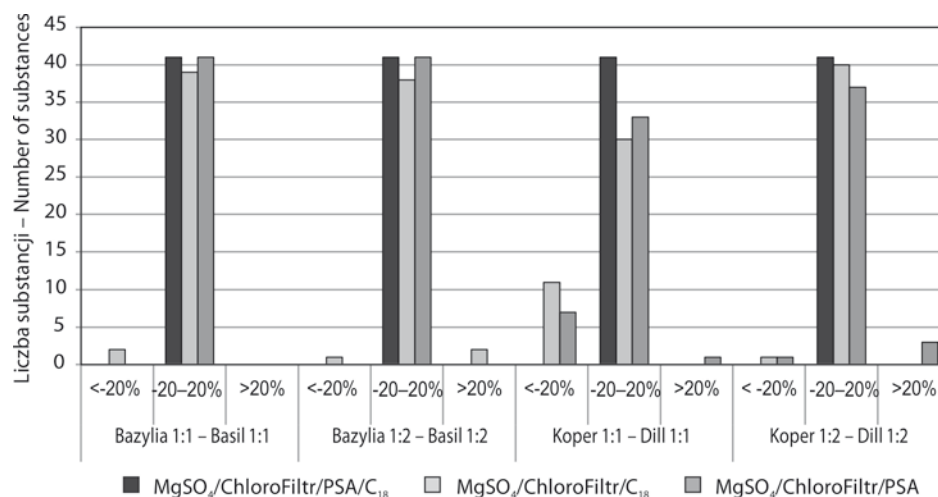
Uzyskane podczas optymalizacji metody wyniki wykazały, że wybór odpowiedniego zestawu sorbentów jest kluczowym etapem do osiągnięcia właściwego oczyszczenia ekstraktu z interferentów, a zarazem otrzymania wartości parametrów spełniających wymagania stawiane w analizie pozostałości ś.o.r. Najlepszą efektywność oczyszczania próbek bazylii i kopru, którą odzwierciedlała prawidłowa wartość efektów matrycy przy zachowaniu odzysków związków w wymaganym zakresie uzyskano dla następującego wariantu sorbentów $MgSO_4$ /ChloroFiltr/PSA/ C_{18} . Został więc on wykorzystany na etapie walidacji metody, a uzyskany oczyszczony ekstrakt nie był poddawany rozcieńczeniu.



Rys. 3. Porównanie wpływu efektu matrycy dla próbek bazylii i kopru po zastosowaniu sprawdzanych wariantów oczyszczenia d-SPE
Fig. 3. Comparison of the matrix effects obtained for the basil and dill samples after the application of the tested d-SPE cleanup variants



Rys. 4. Porównanie wpływu rozcieńczenia na wartość odzysku
Fig. 4. Comparison of the impact of dilution on the recovery values



Rys. 5. Porównanie wpływu rozcieńczenia na efekt matrycy
Fig. 5. Comparison of the impact of dilution on the matrix effects value

II. Walidacja metody

Walidację opracowanej metody wykonano zgodnie z wytycznymi dokumentu SANTE/12682/2019. Spełnienie wymagań walidacyjnych jest istotne, aby móc wdrożyć metodę do rutynowych analiz w laboratorium. Pierwszym wyznaczonym parametrem walidacyjnym była poprawność wyrażona przez odzysk. Średnie wartości odzysków wynosiły: (i) poziom 0,005 mg/kg: 70,2%–108,2%; (ii) poziom 0,01 mg/kg: 70,2–111,1%; (iii) poziom 0,05 mg/kg: 70,4–118,6%; (iv) poziom 0,2 mg/kg: 70,7–118,4%. Powtarzalność charakteryzowana przez współczynnik zmienności mieściła się w przedziale 0,0–19,3%.

Ocenę efektów matrycowych określono na podstawie współczynników kierunkowych równań krzywych kalibracyjnych wyznaczonych dla związków rozpuszczonych w matrycy próbki oraz w rozpuszczalniku. Uzyskane wartości efektu matrycy mieściły się w zakresie od –20,0% do 14,6%, czyli spełniły wymagane kryterium.

Wartości niepewności przypisanej do otrzymanego wyniku są niezbędnym elementem porównywania wyników między laboratoriami, klientami czy instytucjami, które wykorzystują wyniki pomiarów. Dokument SANTE/12682/2019 zakłada, że w obszarze oznaczania pozostałości ś.o.r. niepewność rozszerzona powinna wynosić $\leq 50\%$, a współczynnik rozszerzenia $k = 2$ dla przyjętego poziomu prawdopodobieństwa 95%. Obliczona niepewność dla każdej analizowanej substancji czynnej spełniła to wymaganie.

Granice oznaczalności (LOQ) dla każdego oznaczanego związku wyznaczono na podstawie najniższego poziomu wzbogacenia, który spełnia wymagania dla poszczególnych parametrów walidacyjnych. Dla 75% substancji czynnych

wyznaczono LOQ na poziomie 0,005 mg/kg, natomiast dla 25% wartość ta wynosiła 0,01 mg/kg.

Wnioski / Conclusions

1. Wykonane badania optymalizacyjne pozwoliły na podstawie uzyskanych wartości odzysku i efektu matrycy wyznaczyć masę 10 g próbki z dodatkiem 5 ml wody jako najkorzystniejsze parametry do ekstrakcji próbek o wysokiej zawartości chlorofilu. Wyniki spełniające kryteria walidacyjne, na podstawie analizy 41 substancji czynnych otrzymano przy wykorzystaniu wariantu sorbentu MgSO₄/ChloroFiltr/PSA/C₁₈ i nierozcieńczaniu końcowego ekstraktu (odzysk: 70,8–116,6% i efekt matrycy: –17,36–9,3%). Wyniki optymalizacji uzyskane dla reprezentatywnych matryc umożliwiły opracowanie metody oznaczania pozostałości ś.o.r. w grupie zielonych warzyw.
2. Opracowaną metodę oznaczania pozostałości ś.o.r. w próbkach warzyw o wysokiej zawartości chlorofilu z wykorzystaniem techniki instrumentalnej LC-MS/MS poddano procesowi walidacji dla 134 substancjach czynnych. Uzyskano akceptowalne wartości parametrów walidacyjnych, takich jak: odzysk: 70,2–118,6%, współczynnik zmienności: 0,0–19,3% i efekt matrycy: –20,0–14,6%. Wykonana walidacja potwierdziła, że opracowana metoda umożliwia otrzymanie wiarygodnych wyników w analizie pozostałości ś.o.r. w zielonych warzywach.
3. Opracowaną metodę wdrożono do rutynowych analiz wykrywających pozostałości ś.o.r. w laboratorium.

Literatura / References

- Alcântara D.B., Fernandes T.S.M., Nascimento H.O., Lopes A.F., Menezes M.G., Lima A.C., Carvalho T.V., Grinberg P., Milhome M.A., Oliveira A.H.B., Becker H., Zocolo G.J., Nascimento R.F. 2019. Diagnostic detection systems and QuEChERS methods for multiclass pesticide analyses in different types of fruits: An overview from the last decade. *Food Chemistry* 298: 124958. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.124958
- Anastassiades M., Lehotay S.J., Štajnbaher D., Schenck F.J. 2003. Fast and easy multiresidue 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. DOI: 10.1093/jaoac/86.2.412
- Dietary Guidelines 2020–2025. Dietary Guidelines for Americans 2020–2025 [online]. Washington, D.C.: U.S. Department of Agriculture and U.S. Department of Health and Human Services, 2020. https://dietaryguidelines.gov/sites/default/files/2021-03/Dietary_Guidelines_for_Americans-2020-2025.pdf [dostęp: 06.04.2021].
- Gardocka-Jałowicz A., Stańczyk P., Szalonka K. 2020. Wpływ żywienia i żywności na stan zdrowia w świetle badań. [The impact of nutrition and food on health in the light of research]. s. 95–113. W: *Zdrowie i style życia. Determinanty długości życia* (W. Nowak, K. Szalonka, red.). E-Wydawnictwo. Prawnicza i Ekonomiczna Biblioteka Cyfrowa. Wydział Prawa, Administracji i Ekonomii Uniwersytetu Wrocławskiego. ISBN 978-83-66601-24-6 (druk). ISBN 978-83-66601-25-3 (online). DOI: 10.34616/23.20.112
- Guiding Principles 2019. Sustainable healthy diets – Guiding principles [online]. Rome: FAO and WHO, 2019. <http://www.fao.org/3/ca6640en/CA6640EN.pdf> [dostęp: 06.04.2021].
- Konopacka D., Rutkowski K.P., Płocharski W.J. 2018. Owoce i warzywa jako składnik zdrowej diety człowieka. s. 46–57. W: *Materiały Konferencyjne „Składniki bioaktywne surowców i produktów roślinnych”*. Oddział Małopolski Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności, Kraków, 24–25 września 2018, 308 ss.
- Lehotay S.J. 2011. QuEChERS sample preparation approach for mass spectrometric analysis of pesticide residues in foods. s. 65–91. W: *Mass Spectrometry in Food Safety. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol. 747 (J. Zweigenbaum, red.). Humana Press. DOI: 10.1007/978-1-61779-136-9_4
- Nantia E.A., Moreno-González D., Manfo F.P., Gámiz-Gracia L., García-Campaña A.M. 2017. QuEChERS-based method for the determination of carbamate residues in aromatic herbs by UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry* 216: 334–341. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.08.038
- Nowacka A., Hołodyńska-Kulas A. 2020. Pozostałości środków ochrony roślin w płodach rolnych (2016–2017). [Pesticide residues in agricultural crops (2016–2017)]. *Progress in Plant Protection* 60 (3): 201–231. DOI: 10.14199/ppp-2020-023
- Nowacka A., Hołodyńska-Kulas A., Drożdżyński D., Przewoźniak M., Pszczolińska K., Łozowicka B., Kaczyński P. 2020. Pozostałości środków ochrony roślin w płodach rolnych (2014–2015). [Pesticide residues in agricultural crops (2014–2015)]. *Progress in Plant Protection* 60 (2): 81–104. DOI: 10.14199/ppp-2020-010
- Ołędzki R. 2012. Potencjał antyoksydacyjny owoców i warzyw oraz jego wpływ na zdrowie człowieka. [Antioxidant potential of fruit and vegetables and its impact on human health]. *Nauki Inżynierskie i Technologie* 1 (4): 44–54.
- Perestrelo R., Silva P., Porto-Figueira P., Pereira J.A.M., Silva C., Medina S., Câmara J.S. 2019. QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. *Analytica Chimica Acta* 1070: 1–28. DOI: 10.1016/j.aca.2019.02.036
- PN-EN 15662:2018-06. Żywność pochodzenia roślinnego multimetoda do oznaczania pozostałości pestycydów z zastosowaniem analizy opartej na GC i LC po ekstrakcji/podziale acetonitrylem i oczyszczaniu metodą dyspersyjnej SPE. Metoda modułowa QuEChERS.
- Rejczak T., Tuzimski T. 2015. Recent trends in sample preparation and liquid chromatography/mass spectrometry for pesticide residue analysis in food and related matrixes. *Journal of AOAC International* 98 (5): 1143–1162. DOI: 10.5740/jaoacint.SGE1_Rejczak
- Rozporządzenie 2005. Rozporządzenie (WE) nr 396/2005 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 23 lutego 2005 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości pestycydów w żywności i paszy pochodzenia roślinnego i zwierzęcego oraz na ich powierzchni, zmieniające Dyrektywę Rady 91/414/EWG (Dz. Urz. L 70 z 16.03.2006 r. z późn. zm.).
- Rutkowska E., Łozowicka B., Kaczyński P. 2018. Modification of multiresidue QuEChERS protocol to minimize matrix effect and improve recoveries for determination of pesticide residues in dried herbs followed by GC-MS/MS. *Food Analytical Methods* 11: 709–724. DOI: 10.1007/s12161-017-1047-3
- Santana-Mayor Á., Socas-Rodríguez B., Herrera-Herrera A.V., Rodríguez-Delgado M.Á. 2019. Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis. *Trends in Analytical Chemistry* 116: 214–235. DOI: 10.1016/j.trac.2019.04.018
- SANTE/12682/2019. Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Supersedes Document No. SANTE/2017/11813.
- Stahnke H., Kittlaus S., Kempe G., Alder L. 2012. Reduction of matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry by dilution of the sample extracts: How much dilution is needed? *Analytical Chemistry* 84 (3): 1474–1482. DOI: 10.1021/ac202661j
- Walorczyk S., Drożdżyński D., Kierzek R. 2015. Determination of pesticide residues in samples of green minor crops by gas chromatography and ultra performance liquid chromatography coupled to tandem quadrupole mass spectrometry. *Talanta* 132: 197–204. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.08.073
- Wang X. 2013. ChloroFiltr®: A novel sorbent for chlorophyll removal. *LGC Asia Pacific* 16 (1): 33.
- Wilkowska A., Biziuk M. 2011. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry* 125 (3): 803–812. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.09.094
- Zalecenia 2020. Zalecenia zdrowego żywienia [online]. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny. <https://ncez.pzh.gov.pl/index.php/2021/03/04/talerz-zdrowego-zywienia/> [dostęp: 06.04.2021].
- Zielińska M., Białecka A., Pietruszka B., Hamułka J. 2017. Warzywa i owoce jako źródła wybranych substancji bioaktywnych i ich wpływ na funkcje poznawcze u osób starszych. [Vegetables and fruit, as a source of bioactive substances, and impact on memory and cognitive function of elderly]. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 71 (1): 267–280. DOI: 10.5604/01.3001.0010.3812