

ANNA M. STACHNIUK, EMILIA FORNAL

TECHNIKI EKSTRAKCYJNE STOSOWANE W OZNACZANIU POZOSTAŁOŚCI PESTYCYDÓW W ŻYWNOSCI METODĄ LC-MS

Streszczenie

Przedstawiono przegląd technik ekstrakcyjnych stosowanych do izolacji pozostałości pestycydów z żywności, oznaczanych następnie metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS). Skoncentrowano się wyłącznie na metodach umożliwiających jednoczesną analizę pozostałości wielu pestycydów w pojedynczym oznaczeniu. Omówiono techniki ekstrakcyjne z udziałem: rozpuszczalnika, sorbentu i membrany oraz techniki łączone, takie jak: QuEChERS, CHEMAC i STEMIT.

W analizie pestycydów jednym z głównych problemów jest optymalizacja zastosowanej techniki ekstrakcyjnej połączonej z oczyszczaniem ekstraktu. W przypadku jednoczesnego oznaczania pozostałości wielu pestycydów o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych stosuje się rozwiązania kompromisowe, umożliwiające izolację jak największej liczby związków. Najczęściej używa się rozpuszczalników o średniej polarności, głównie acetonitrylu, metanolu oraz octanu etylu. Wśród sorbentów powszechnie stosowane są kolumnienki Oasis HLB oraz mieszaniny PSA (*Primary-Secondary Amine*) i GCB (*Graphitized Carbon Black*). Jako membrany najczęściej stosuje się porowate membrany polipropylenowe w postaci włókna kapilarnego (*hollowfiber*). Szczególną uwagę poświęcono w pracy zastosowaniu metody QuEChERS do izolacji pestycydów z próbek żywności.

Słowa kluczowe: żywność, pestycydy, ekstrakcja, QuEChERS, LC-MS

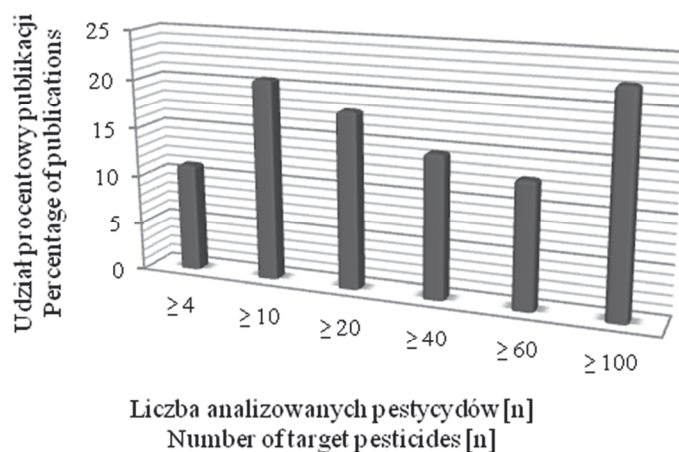
Wprowadzenie

Oznaczanie pestycydów w żywności jest wieloetapową procedurą analityczną obejmującą pobieranie i przygotowanie próbek, w tym ekstrakcję analitów z matrycy i oczyszczanie ekstraktów oraz oznaczenie pestycydów. Pobranie próbek oraz ich prawidłowe przygotowanie mają istotne znaczenie, gdyż determinują jakość i wiarygodność wyniku oznaczenia.

Dr A. M. Stachniuk, dr hab. E. Fornal, Interdyscyplinarne Centrum Badań Naukowych, Wydz. Biotechnologii i Nauk o Środowisku, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, ul. Konstantynów 1J, 20-708 Lublin. Kontakt: lianna@kul.pl

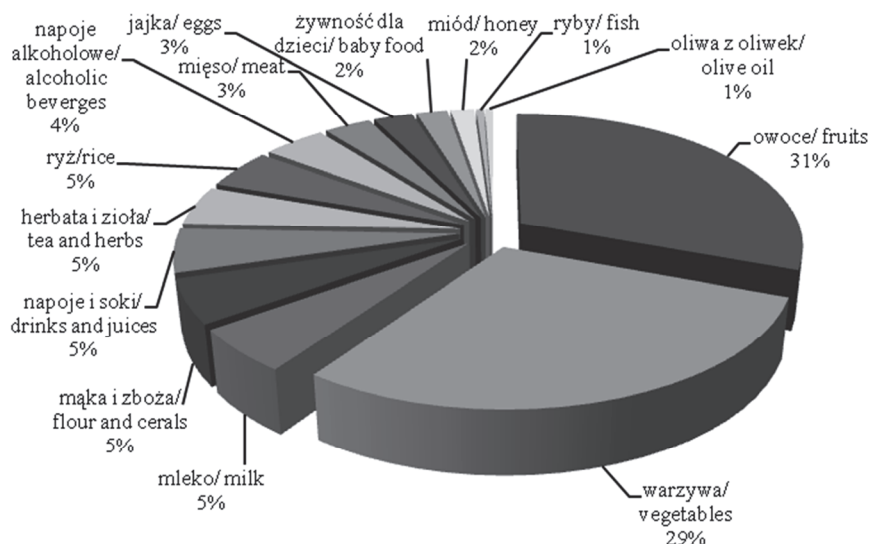
Wybór procedury przygotowania próbek uwarunkowany jest rodzajem produktu spożywczego oraz strukturą chemiczną oznaczanego zanieczyszczenia. W analizie pozostałości pestycydów, podobnie jak w analizie innych substancji zanieczyszczających żywność, występuje tendencja do opracowywania szybkich metod jednoczesnego oznaczania pozostałości wielu składników (ang. *multiresidue methods*), często pochodzących z różnych klas chemicznych. Konieczność ta wynika m.in. ze stosowania różnorodnych substancji aktywnych w środkach ochrony roślin, co może prowadzić do współwystępowania w produkcie spożywczym szerokiej gamy pestycydów różniących się właściwościami chemicznymi.

W pracy przedstawiono przegląd technik ekstrakcyjnych stosowanych do izolacji z żywności pozostałości pestycydów oznaczanych metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas – LC-MS (ang. *Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometer*). Skoncentrowano się na metodach umożliwiających jednoczesną analizę pozostałości przynajmniej kilku pestycydów w pojedynczym oznaczeniu (rys. 1). Rodzaje żywności, których dotyczy przegląd literatury, przedstawiono na rys. 2. Najliczniejszą grupę stanowiły owoce i warzywa [19].



Rys. 1. Udział publikacji wchodzących w zakres przeglądu literaturowego, obejmujący metody umożliwiające jednoczesną analizę pozostałości wielu pestycydów w pojedynczym oznaczeniu. Na podstawie bazy Scopus, hasło wyszukiwania: pesticide, food, multiresidue methods, LC-MS

Fig. 1. Percentage of reviewed publications that cover methods to simultaneously analyze residues of many pesticides during a single determination run. Based on Scopus database, search term: pesticide, food, multi-residue methods, LC-MS



Rys. 2. Rodzaje matryc (żywności) objętych przeglądem literatury. Na podstawie bazy Scopus, hasło wyszukiwania: pesticide, food, multiresidue methods, LC-MS

Fig. 2. Types of matrices (of food) covered by reviewed publications. Based on Scopus database, search term: pesticide, food, multi-residue methods, LC-MS

Ze względu na różnorodność produktów spożywczych oraz duże zróżnicowanie środków ochrony roślin dopuszczonych do obrotu, w praktyce analitycznej stosuje się wiele różnych technik ekstrakcyjnych do izolacji pestycydów z żywności.

Techniki ekstrakcyjne z udziałem rozpuszczalnika

Techniki ekstrakcyjne z udziałem rozpuszczalnika wykorzystują zjawisko podziału substancji ekstrahowanej pomiędzy dwie niemieszające się fazy i polegają na przejściu analitów z ciekłej lub stałej próbki do rozpuszczalnika. Prawidłowo dobrany rozpuszczalnik zapewnia optymalne warunki procesu ekstrakcji i umożliwia otrzymanie maksymalnych odzysków analitów przy minimalnej współekstrakcji interferentów. Przy wyborze rozpuszczalnika należy uwzględnić: właściwości i stężenia analitów, rodzaj próbki oraz właściwości współobecnych substancji przeszkadzających. Pestycydy oznaczane metodami LC-MS najczęściej izoluje się z próbek żywności następującymi technikami z udziałem rozpuszczalnika: klasyczną ekstrakcją za pomocą rozpuszczalnika SE (ang. *solvent extraction*), ekstrakcją za pomocą rozpuszczalnika wspomaganą ultradźwiękami USE (ang. *ultrasonic solvent extraction*), przyspieszoną ekstrakcją za pomocą rozpuszczalnika PLE (ang. *pressurized liquid extraction*) oraz szczególnym rodzajem ekstrakcji cieczą, jakim jest ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym SFE (ang. *supercritical fluid extraction*).

Klasyczna ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (SE)

Metoda ta polega na wydzieleniu analitów z matrycy pierwotnej do rozpuszczalnika. Jest to jedna z pierwszych powszechnie stosowanych procedur wyodrębniania pestycydów, polegająca na intensywnym mieszaniu rozpuszczalnika z ekstrahowaną cieczą (ekstrakcja ciecz-ciecz, LLE – ang. *liquid-liquid extraction*) lub ciałem stałym, a następnie rozdzielaniu faz przez sedymentację, filtrowanie lub odwirowanie. Najważniejszym etapem procesu jest wybór rozpuszczalnika. W przypadku oznaczania jednocześnie wielu związków o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych najczęściej stosuje się rozpuszczalniki organiczne o średniej polarności, w tym: acetonitryl [23], octan etylu w obecności bezwodnego siarczanu(VI) sodu [4], metanol [25] i aceton [1]. Ponadto stosuje się mieszaniny: cykloheksanu z octanem etylu [22], acetonitrylu z toluenem [21] oraz acetonu i dichlorometanu z eterem naftowym (metoda Luke'a) [2]. Do izolacji pestycydów z próbek o dużej zawartości wody używa się dodatków soli. Obecność soli zwiększa wydajność ekstrakcji, a ciepło wydzielane podczas egzotermicznego procesu hydratacji danej soli sprzyja ekstrakcji analitów z fazy wodnej do fazy organicznej. W tym przypadku stosuje się NaCl, MgSO₄ i Na₂SO₄ [4, 23]. Właściwy odczyn (pH) matrycy wzmacnia efektywność ekstrakcji, a zapewnić go mogą dodatki obniżające lub zwiększające alkaliczność badanej próbki, takie jak: kwas mrówkowy, kwas octowy, wodorowęglan sodu oraz bufor czy mrówczan amonu [1, 4].

Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana ultradźwiękami (USE)

Wymieniona technika stosowana jest głównie do próbek stałych. Próbkę miesza się z rozpuszczalnikiem ekstrahującym i poddaje działaniu ultradźwięków. Rozchodzenie się fal dźwiękowych w cieczy związane jest z zmianami ciśnienia akustycznego wywołującego zjawisko kawitacji, które zwiększa penetrację rozpuszczalnika w głąb struktury ekstrahowanej próbki. Sprzyja to uwalnianiu zalegających tam substancji. W zależności od właściwości chemicznych analitu oraz rodzaju matrycy, w ekstrakcji wspomaganiej ultradźwiękami stosuje się różne rozpuszczalniki organiczne. Do izolacji pestycydów z próbek żywności najczęściej stosuje się acetonitryl [30] i octan etylu [29].

Metoda przyspieszonej ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika (PLE)

W metodzie tej ekstrakcję analitów z próbek stałych wykonuje się przy użyciu niewielkiej ilości rozpuszczalnika w podwyższonej temperaturze i pod zwiększonym ciśnieniem. Do przeprowadzenia przyspieszonej ekstrakcji niezbędna jest aparatura ekstrakcyjna umożliwiająca automatyzację całego procesu [12]. W procesie PLE pestycydy z próbek żywności wydzielają się najczęściej acetonitrylem, octanem etylu oraz mieszaniną octanu etylu z acetonem (do izolacji pestycydów z warzyw) [9].

Ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym (SFE)

Płyn w stanie nadkrytycznym wykazuje cechy zarówno cieczy, jak i gazu. Duża gęstość płynu w stanie nadkrytycznym powoduje, że substancje rozpuszczają się w nim jak w cieczy, a mała lepkość płynu i niskie napięcie powierzchniowe sprzyjają penetracji matrycy podobnej do tej, jaką wykazuje gaz. Do ekstrakcji płynem w stanie nadkrytycznym najczęściej stosowany jest ditlenek węgla (CO₂), charakteryzujący się niską temperaturę krytyczną (31,1 °C) oraz niskim ciśnieniem krytycznym (73,8 bar) [28]. W celu poprawienia wydajności procesu do ekstrakcji związków polarnych i silnie związanych z matrycą używa się niewielkich ilości substancji polarnych, zwanych modyfikatorami. Najczęściej stosowanymi modyfikatorami: są metanol, etanol, aceton, acetonitryl oraz dichlorometan. W analizie metodą LC-MS ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym modyfikowanym acetonem ma zastosowanie do izolacji pestycydów z owoców, warzyw i ryżu [13].

Techniki ekstrakcyjne z udziałem sorbentu

W technikach ekstrakcyjnych z udziałem sorbentu wykorzystuje się zjawisko sorpcji analitów z ekstrahowanej próbki na powierzchni ciała stałego, w których fazą ekstrahującą jest złożo sorbentu. Dobór rodzaju sorbentu i charakterystyki jego uziarnienia zależą od właściwości i stężenia analitów, charakteru matrycy próbki, współobecnych substancji utrudniających ekstrakcję i sposobu uwalniania analitów. Wśród technik ekstrakcji pestycydów z żywności, oznaczanych metodami LC-MS, z udziałem sorbentu do powszechnych należą: klasyczna ekstrakcja do fazy stałej (SPE, ang. *solid phase extraction*) wraz z jej modyfikacją, ekstrakcja do zdyspergowanej fazy stałej (dSPE, ang. *dispersive solid phase extraction*) oraz ekstrakcja analitu z próbki zmieszanej z fazą stałą (MSPD, ang. *matrix solid phase dispersion*).

Ekstrakcja do fazy stałej (SPE)

Jest to technika izolowania analitu w układzie ciecz - ciało stałe, polegająca na przepuszczeniu ciekłej analizowanej próbki przez uprzednio kondycjonowane złożo sorbentu i selektywnej adsorpcji analitów i/lub substancji przeszkadzających na powierzchni fazy stałej. Zatrzymywane związki są następnie wymywane niewielką ilością odpowiedniego rozpuszczalnika. Skuteczność procesu ekstrakcji zależy od właściwego doboru sorbentu, do którego obecne w próbce anality będą wykazywały większe powinowactwo niż do składników matrycy oraz od właściwego doboru rozpuszczalnika wymywającego.

Do izolacji pestycydów stosuje się głównie modyfikowane żele krzemionkowe oraz sorbenty polimerowe. Powszechnie stosowane są chemicznie modyfikowane materiały krzemionkowe z powierzchniową warstwą oktylową C₈ [27] i oktadecylową C₁₈ [23, 27], Florisil – produkt współstrącenia żelu krzemionkowego i wodorotlenku ma-

gnezu [14] oraz sorbenty niepolarne, takie jak węgiel aktywny [23] czy polarny żel krzemionkowy z chemicznie związanymi ugrupowaniami aminopropylowymi NH_2 [6]. Ich podstawowym ograniczeniem jest zatrzymywanie analitów o ściśle określonych właściwościach fizykochemicznych. Chcąc więc równocześnie oznaczyć wiele analitów, zastępuje się tradycyjne adsorbenty nowymi sorbentami o bardzo szerokim spektrum adsorpcyjnym, umożliwiającym izolowanie substancji o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych. Jednym z takich sorbentów jest kopolimer lipofilowego diwinylobenzenu i hydrofilowego N-winylopirolidonu, znany pod nazwą handlową Oasis HLB [1, 25, 27].

Ekstrakcja do zdyspergowanej fazy stałej (dSPE)

W metodzie tej, będącej modyfikacją klasycznej SPE, tradycyjne złożone sorbentu zastąpiono sorbentem sypkim dodawanym bezpośrednio do roztworu próbki. Największe znaczenie mają sorbenty: na bazie modyfikowanego żelu krzemionkowego z grupami oktadecylowymi C_{18} [8], amina pierwszo- i drugorzędowa PSA (ang. *primary secondary amine*,) [4, 8, 12, 30] oraz sadza grafitowana GCB (ang. *graphitized carbon black*) [12, 30].

Ekstrakcja z próbki zmieszanej z fazą stałą (MSPD)

Jest to technika równoczesnego izolowania analitu oraz oczyszczania ekstraktu w układzie ciecz – ciało stałe. W przypadku tej techniki zhomogenizowaną próbkę miesza się ze stałym sorbentem i umieszcza w kolumnie najczęściej na warstwie bezwodnego siarczanu(VI) sodu, a następnie wymywa anality odpowiednio dobranym rozpuszczalnikiem. Charakter sorbentu dobierany jest stosownie do natury matrycy i właściwości substancji izolowanej oraz interferentów i może służyć do zatrzymywania jednych lub drugich. Do izolacji pestycydów z próbek najczęściej stosowane są: modyfikowane żele krzemionkowe z powierzchniową warstwą oktadecylową C_{18} [17], modyfikowane żele krzemionkowe z chemicznie związanymi grupami aminopropylowymi NH_2 [10], Florisil [17], a także ziemia okrzemkowa [26]. W zależności od właściwości oznaczanych substancji oraz sorbentu wybranego do ekstrakcji, do wymywania analitów stosuje się różne rozpuszczalniki organiczne. Na ogół używa się: acetonitrylu, octanu etylu, dichlorometanu oraz ich mieszanin [10, 17, 26].

Techniki ekstrakcyjne z udziałem membrany

W technikach ekstrakcyjnych z udziałem membrany, służących do przygotowania próbek do analizy LC-MS, wykorzystuje się właściwości membrany jako przegrody cienkoarstwowej, zdolnej do selektywnego transportu cząsteczek pomiędzy fazą zasilającą (donorową) a fazą odbierającą (akceptorową). Do izolowania pestycydów z żywności stosuje się m.in. membranę nieporowatą (półprzepuszczalną), głównie po-

limer impregnowany cieczą, którą umieszcza się pomiędzy dwiema innymi, najczęściej ciekłymi fazami. Zwykle stosuje się ekstrakcję membranową połączoną z absorpcją w rozpuszczalniku MASE (ang. *membran assisted solvent extraction*) oraz mikroekstrakcję z wykorzystaniem włókna z osadzoną fazą ciekłą HF-LPME (ang. *hollow fiber liquid phase microextraction*).

Ekstrakcja membranowa połączona z absorpcją w rozpuszczalniku (MASE)

Opisywana ekstrakcja stanowi zminiaturyzowany proces klasycznej ekstrakcji rozpuszczalnikiem typu ciecz – ciecz polegający na wykorzystaniu półprzepuszczalnej membrany polimerowej. Proces ekstrakcji realizowany jest w układzie faza wodna/polimer/faza organiczna, w którym anality ekstrahuje się z fazy wodnej przez polipropylenową membranę do małej objętości rozpuszczalnika organicznego. W zależności od właściwości chemicznych analitu w ekstrakcji MASE stosuje się różne rozpuszczalniki organiczne. W analizie wina metodą LC-MS do izolacji pestycydów zastosowano technikę ekstrakcji MASE z toluenem, który jest najwydajniejszym rozpuszczalnikiem organicznym używanym do izolowania pestycydów z próbek wodnych [20].

Mikroekstrakcja z wykorzystaniem włókna z osadzoną fazą ciekłą (HF-LPME)

Technika ekstrakcyjna w układzie ciecz – ciecz, w której ciecz ekstrahująca znajduje się w przestrzeniach polimerowej membrany mającej postać włókna kapilarnego. Proces izolacji polega na ekstrakcji analitu z roztworu fazy donorowej do rozpuszczalnika organicznego unieruchomionego na porowatej hydrofobowej membranie, a następnie na reekstrakcji związku do fazy akceptorowej. Przeważnie stosuje się porowate membrany polipropylenowe w postaci włókna kapilarnego (ang. *hollowfiber*) niemieckiej firmy Membrana GmbH, znane pod nazwą handlową Accurel PP hollowfiber [5]. Technika ekstrakcji membranowej z wykorzystaniem włókna kapilarnego jest stosowana do izolacji pestycydów z wina i piwa [5].

Techniki ekstrakcyjne łączone

Techniki ekstrakcyjne łączone są nową, rozwijającą się grupą metod umożliwiających przygotowanie próbek do analiz. Dzięki połączeniu w jeden proces różnych technik ekstrakcyjnych ułatwiają one równoczesną izolację szerokiej gamy związków wywodzących się z różnych grup chemicznych. Pozwalają zintegrować różne etapy procesu przygotowania próbek do badań, takie jak ekstrakcja analitów z próbki, wzbogacanie czy oczyszczanie ekstraktów, eliminując tym samym szereg etapów pośrednich. Charakteryzują się wysokim potencjałem do modyfikacji, przez co są nieustannie rozwijane. W analizie pozostałości pestycydów w żywności metodami LC-MS wśród technik łączonych powszechna jest metoda QuEChERS, opracowana przez Anastas-

siadesa w 2003 r. [3], chociaż znane są i inne metody, jak opracowane przez Guo w 2010 r. techniki ekstrakcji łącznej CHEMAC czy STEMIT [11].

Metoda QuEChERS, (ang. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe)

Technika ekstrakcji rozpuszczalnikiem połączona z oczyszczaniem ekstraktu łączy metodę ekstrakcji analitu za pomocą rozpuszczalnika z metodą oczyszczania ekstraktu za pomocą dyspersyjnej wersji ekstrakcji do fazy stałej. Została ona opracowana w latach 2000 - 2002, a po raz pierwszy opublikowana w 2003 r. i wykorzystana do oznaczania pozostałości pestycydów w owocach i warzywach metodą GC-MS [3]. Jej pierwsze zastosowanie w połączeniu z metodami LC-MS zostało odnotowane w roku 2005 jako kontynuacja badań przeprowadzonych przez Anastassiadesa z roku 2003 [16]. Podstawowa koncepcja QuEChERS [3], opracowana do oznaczania pozostałości pestycydów w owocach i warzywach o dużej zawartości wody, polega na ekstrakcji analitów za pomocą acetonitrylu w obecności bezwodnego siarczanu(VI) magnezu i chlorku sodu, z fazy wodnej do fazy organicznej. Następnie interferenty są ekstrahowane do zdyspergowanej fazy stałej, mieszaniny bezwodnego siarczanu(VI) sodu i aminy pierwszo- i drugorzędowej (PSA). Drugi etap procedury ma na celu oczyszczenie otrzymanego ekstraktu. W zależności od celu analizy, rodzaju analitów, składu i rodzaju matrycy, procedura może być poddawana różnorodnym modyfikacjom [3]. Modyfikacje dotyczą: zmiany składu i/lub proporcji stosowanych w ekstrakcji soli [1, 16], zmiany składu i/lub proporcji stosowanych sorbentów [10, 16], stosowania buforów: cytrynianowego lub octowego [1, 11, 24] oraz stosowania odpowiednich kwasów lub zasad – w celu utrzymania optymalnego pH próbki w zakresie od 5 do 5,5. Inne modyfikacje tej metody polegają na całkowitym pominięciu etapu oczyszczania [24], zastosowaniu złoża sorbentu w postaci kolumny [7], zamianie rozpuszczalnika organicznego z acetonitrylu na hexan [15] czy wprowadzeniu dodatkowego etapu zateżnienia analitów w oczyszczonym ekstrakcie poprzez odparowanie i/lub wymianę rozpuszczalnika [4]. Porównania różnych procedur QuEChERS dokonano na przykładzie izolacji pestycydów z ryżu [24] oraz z owoców i warzyw [18].

Metoda ekstrakcji CHEMAC (ang. conservative homogenizing extraction and multi-function adsorption cleanup)

Metoda ta łączy ekstrakcję rozpuszczalnikiem z wielofunkcyjnym oczyszczaniem ekstraktu w procesie adsorpcji na powierzchni ciała stałego. Opracowana została na bazie procedury QuEChERS i stanowi połączenie metody ekstrakcji analitu za pomocą rozpuszczalnika z metodą oczyszczania ekstraktu za pomocą dSPE. W przypadku CHEMAC ekstrakcję analitów prowadzi się jednak w niskiej temperaturze, a do oczyszczania ekstraktów wykorzystuje się mieszaninę kilku sorbentów. Ekstrakcję przeprowadza się za pomocą 1-procentowego roztworu kwasu octowego w acetonitry-

lu w obecności bezwodnego siarczanu(VI) magnezu i octanu sodu. Otrzymany ekstrakt oczyszcza się metodą dSPE, stosując mieszaninę sorbentów: PSA, C₁₈, GCB oraz bezwodnego Na₂SO₄. Dodatkową zmianą w stosunku do procedury QuEChERS jest dodanie do oczyszczonego ekstraktu schłodzonego 2-procentowego kwasu octowego [11]. Aby zapobiec stratom pestycydów wykazujących silne powinowactwo do GCB, do ekstraktu dodawany jest toluen [11]. Dzięki zastosowaniu niskiej temperatury technika CHEMAC umożliwia izolowanie termolabilnych związków. W analizie żywności znalazła ona zastosowanie w izolowaniu fungicydów zawierających związki benzimidazolowe z owoców, warzyw, herbaty i zboża [11].

Technika ekstrakcji STEMIT (ang. single-tube extraction with multisorbent impurity trapping)

Technika łącząca ekstrakcję rozpuszczalnikiem z oczyszczaniem ekstraktu w procesie adsorpcji na powierzchni ciała stałego stanowi modyfikację metody CHEMAC, opisanej wyżej. Istotą wprowadzonej zmiany jest przeprowadzenie obu etapów: izolacji analitów i oczyszczania ekstraktu, czyli zarówno ekstrakcji rozpuszczalnikiem, jak i ekstrakcji do zdyspergowanej fazy stałej w jednej próbówce. Procedura STEMIT polega na równoczesnej ekstrakcji i oczyszczaniu analitów za pomocą 1-procentowego roztworu kwasu octowego w acetonitrylu z dodatkiem mieszaniny soli (6 g bezwodnego Na₂SO₄ i 1 g CH₃COONa) w obecności mieszaniny sorbentów (400 mg PSA, 300 mg C₁₈ oraz 60 mg GCB). Otrzymany ekstrakt, podobnie jak w metodzie CHEMAC, przed analizą LC-MS rozcieńcza się schłodzonym 2-procentowym kwasem octowym [11].

Inne techniki stosowane do oczyszczania ekstraktów

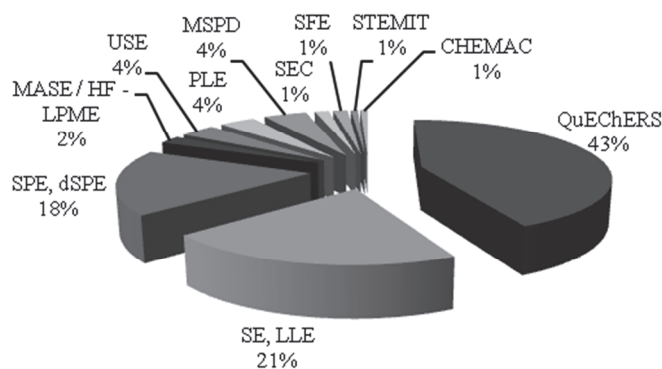
Spośród technik stosowanych do oczyszczania ekstraktów na szczególną uwagę zasługuje chromatografia wykluczania SEC (ang. *size exclusion chromatography*), znana również pod nazwą chromatografii żelowej GPC (ang. *gel permeation chromatography*). Jest to metoda polegająca na efektywnym rozdzieleniu składników mieszanin różniących się wielkością cząsteczek. Cząsteczki składników próbki, o wymiarach mniejszych niż wymiary porów fazy stacjonarnej (sita molekularnego) znajdującej się w kolumnie, mogą w nie wnikać, dzięki czemu zostają dłużej zatrzymane w kolumnie niż związki chemiczne o większych cząsteczkach. Chromatografia wykluczania jako technika oczyszczania ekstraktu jest stosowana do usuwania związków wielkocząsteczkowych, takich jak tłuszcze, białka i pigmenty. Technika SEC w analizie żywności metodami LC-MS stanowi niszową grupę procedur oczyszczania ekstraktów. Zastosowana została m.in. do oczyszczania ekstraktów z ziół [12] oraz mięsa [22]. Jako wypełnienia kolumn użyto kopolimerów styrenu i diwinylobenzenu o nazwie handlo-

wej Bio-Beads SX-2 i SX-3 [12, 22], a jako eluentu – mieszaniny octanu etylu z cykloheksanem [12, 22].

Podsumowanie

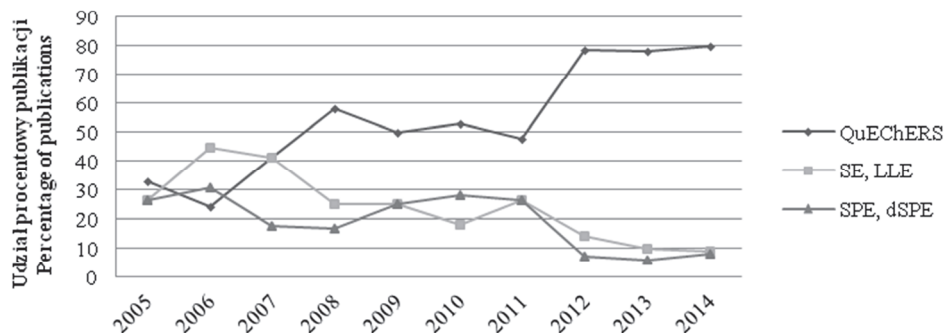
Obserwuje się znaczny rozwój metod ekstrakcyjnych stosowanych do izolacji pestycydów z żywności. Metody te umożliwiają równoczesną ekstrakcję pozostałości wielu substancji o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych. Spośród omówionych technik do ekstrakcji pestycydów z próbek żywności lub ich wstępnego oczyszczania najczęściej stosuje się: metodę QuEChERS, techniki SE, w tym również LLE oraz SPE wraz z dSPE. Pozostałe techniki ekstrakcyjne wykorzystywane są relatywnie rzadko (rys. 3). Wynika to przede wszystkim z ograniczonej kompatybilności tych metod z oznaczeniami LC-MS, braku dostępności odpowiedniej aparatury (do SFE i PLE), niedostatecznych umiejętności i niewystarczającego doświadczenia analitycznego oraz rutynowego używania jednej metody ekstrakcyjnej w laboratorium.

Od wprowadzenia (w 2005 r.) metody QuEChERS do analiz LC-MS nastąpiła zmiana preferencji w stosowaniu technik ekstrakcyjnych używanych do izolacji pozostałości pestycydów z próbek żywności. W literaturze opublikowano wiele przykładów zastosowań metody QuEChERS do oznaczeń pozostałości pestycydów w produktach spożywczych, jak również prac poświęconych porównaniu QuEChERS z innymi technikami ekstrakcyjnymi [5]. Wzrost znaczenia metody QuEChERS przedstawiono na rys. 4.



Rys. 3. Zestawienie częstotliwości stosowania technik ekstrakcyjnych stosowanych do oznaczania pozostałości pestycydów w żywności metodą LC-MS. Na podstawie bazy Scopus, hasło wyszukiwania: pesticide, food, multiresidue methods, LC-MS

Fig. 3. Overview of how often (frequency rates) extraction techniques were applied when determining, by LC-MS method, pesticide residues in food. Based on Scopus database, search term: pesticide, food, multi-residue methods, LC-MS



Rys. 4. Zmiana preferencji w stosowaniu technik ekstrakcyjnych używanych do izolacji pestycydów z próbek żywności, oznaczanych metodą LC-MS w latach 2005-2014. Na podstawie bazy Scopus, hasło wyszukiwania: pesticide, food, multiresidue methods, LC-MS

Fig. 4. Preference change in using extraction techniques applied to isolate pesticide residues that are, nex, determined using LC-MS, in a period from 2005 to 2014. Based on Scopus database, search term: pesticide, food, multi-residue methods, LC-MS

Pomimo opracowania szeregu procedur analitycznych umożliwiających jednoczesną izolację pestycydów o zróżnicowanej budowie chemicznej i termolabilności z produktów spożywczych, nadal występują problemy dotyczące zarówno przygotowania próbek, jak i ich analizy. Niejednokrotnie są one związane z obecnością w próbkach zróżnicowanej matrycy, zawierającej związki, które mogą interferować z analitami, wpływając na jakość wyniku końcowego. Ponadto mała zawartość pestycydów w żywności wymaga wzbogacenia wyizolowanych związków z matrycy, co wydłuża procedurę przygotowania próbek. Niezbędne jest więc udoskonalanie stosowanych technik i opracowywanie nowych, które w sposób szybki, prosty, skuteczny i bezpieczny dla środowiska umożliwiłyby oznaczanie pestycydów z różnych grup chemicznych przy zróżnicowanej matrycy.

Literatura

- [1] Aguilera-Luiz M., Plaza Bolanos P., Romero-Gonzalez R., Martinez Vidal J., Frenich A.: Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk samples by Ultra High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **399**, 2863-2875.
- [2] Anagnostopoulos C.J., Miliadis G.E., Liapis K.S., Aplada-Sarlis P.: A multiresidue method for analysis of 56 pesticides in peaches using liquid chromatography with Tandem Mass Spectrometry detection. *Hellenic Plant Prot. J.*, 2009, **2**, 75-90.
- [3] Anastassiades M., Lehotay S.J., Stajnbaher D., Schenck F.J.: Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.*, 2003, **86**, 412-431.

- [4] Banerjee K., Oulkar D.P., Dasgupta S., Patil S.B., Patil S.H., Savant R., Adsule P.G.: Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chrom. A.*, 2007, **1173**, 98-109.
- [5] Bolanos P.P., Romero-Gonzalez R., Frenich A.G., Vidal J.L.M.: Application of hollow fibre liquid phase microextraction for the multi-residue determination of pesticides in alcoholic beverages by Ultra-High Pressure Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry. *J. Chrom. A.*, 2008, **1208**, 16-24.
- [6] Chen G.Q., Cao P.Y., Liu R.J.: A multi-residue method for fast determination of pesticides in tea by Ultra Performance Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry combined with modified QuEChERS sample preparation procedure. *Food Chem.*, 2011, **125**, 1406-1411.
- [7] Chen L.N., Song F.R., Liu Z.Q., Zheng Z., Xing J.P., Liu S.Y.: Multi-residue method for fast determination of pesticide residues in plants used in traditional chinese medicine by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry. *J. Chrom. A.*, 2012, **1225**, 132-140.
- [8] Dagnac T., Garcia-Chao M., Pulleiro P., Garcia-Jares C., Llompart M.: Dispersive solid-phase extraction followed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for the multi-residue analysis of pesticides in raw bovine milk. *J. Chrom. A.*, 2009, **1216**, 3702-3709.
- [9] Frenich A.G., Salvador I.M., Martinez Vidal J., Lopez-Lopez T.: Determination of multiclass pesticides in food commodities by pressurized liquid extraction using GC-MS/MS and LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, **383**, 1106-1118.
- [10] Gilbert-Lopez B., Garcia-Reyes J.F., Lozano A., Fernandez-Alba A.R., Molina-Diaz A.: Large-scale pesticide testing in olives by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry using two sample preparation methods based on matrix solid-phase dispersion and QuEChERS. *J. Chrom. A.*, 2010, **1217**, 6022-6035.
- [11] Guo B., Huang Z.Q., Wang M.L., Wang X.Y., Zhang Y., Chen B., Li Y.J., Yan H.F., Yao S.Z.: Simultaneous direct analysis of benzimidazole fungicides and relevant metabolites in agricultural products based on multifunction dispersive solid-phase extraction and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chrom. A.*, 2010, **1217**, 4796-4807.
- [12] Jia Z.W., Mao X.H., Chen K., Wang K., Ji S.: Comprehensive multi-residue method for the simultaneous determination of 74 pesticides and metabolites in traditional Chinese herbal medicines by accelerated solvent extraction with High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *J. AOAC Int.*, 2010, **93**, 1570-1588.
- [13] Kaihara A., Yoshii K., Tsumura Y., Ishimitsu S., Tonogai Y.: Multi-residue analysis of 18 pesticides in fresh fruits, vegetables and rice by supercritical fluid extraction and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Health Sci.*, 2002, **48**, 173-178.
- [14] Kamel A., Qian Y.R., Kolbe E., Stafford C.: Development and validation of a multiresidue method for the determination of neonicotinoid and macrocyclic lactone pesticide residues in milk, fruits, and vegetables by Ultra-Performance Liquid Chromatography/MS/MS. *J. AOAC Int.*, 2010, **93**, 389-399.
- [15] Lazartigues A., Wiest L., Baudot R., Thomas M., Feidt C., Cren-Olive C.: Multiresidue method to quantify pesticides in fish muscle by QuEChERS-based extraction and LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **400**, 2185-2193.
- [16] Lehotay S.J., de Kok A., Hiemstra M., Van Bodegraven P.: Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *J. AOAC Int.*, 2005, **88**, 595-614.
- [17] Lehotay S.J., Mastovska K., Yun S.J.: Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *J. AOAC Int.*, 2005, **88**, 630-638.
- [18] Lehotay S.J., Son K.A., Kwon H., Koesukwiwat U., Fu W.S., Mastovska K., Hoh E., Leepipatiboon N.: Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J. Chrom. A.*, 2010, **1217**, 2548-2560.
- [19] Materska M.: Wpływ warunków ekstrakcji na zawartość *O*-glikozydów kwercetyny w preparatach z owoców papryki. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2013, **91** (6), 139-150.

- [20] Moeder M., Bauer C., Popp P., Van Pinxteren M., Reemtsma T.: Determination of pesticide residues in wine by membrane-assisted solvent extraction and High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **403**, 1731-1741.
- [21] Omate M., Harayama K., Sasaki T., Mochizuki N., Yamashita H.: Analysis of simultaneous screening for 277 pesticides in malt and beer by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Brewing Chem.*, 2006, **64**, 139-150.
- [22] Pang G.F., Cao Y.Z., Zhang J.J., Fan C.L., Liu Y.M., Li X.M., Jia G.Q., Li Z.Y., Shi Y.Q., Wu Y.P., Guo T.T.: Validation study on 660 pesticide residues in animal tissues by gel permeation chromatography cleanup/gas Chromatography-Mass Spectrometry and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chrom. A.*, 2006, **1125**, 1-30.
- [23] Pang G.F., Fan C.L., Liu Y.M., Cao Y.Z., Zhang J.J., Li X.M., Li Z.Y., Wu Y.P., Guo T.T.: Determination of residues of 446 pesticides in fruits and vegetables by three-cartridge solid-phase extraction-gas Chromatography-Mass Spectrometry and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. AOAC Int.*, 2006, **89**, 740-771.
- [24] Pareja L., Cesio V., Heinzen H., Fernandez-Alba A.R.: Evaluation of various QuEChERS based methods for the analysis of herbicides and other commonly used pesticides in polished rice by LC-MS/MS. *Talanta*, 2011, **83**, 1613-1622.
- [25] Pozo O.J., Barreda M., Sancho J.V., Hernandez F., Lliberia J.L., Cortes M.A., Bago B.: Multiresidue pesticide analysis of fruits by Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **389**, 1765-1771.
- [26] Radisic M., Grujic S., Vasiljevic T., Lausevic M.: Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food Chem.*, 2009, **113**, 712-719.
- [27] Rodrigues A.M., Ferreira V., Cardoso V.V., Ferreira E., Benoliel M.J.: Determination of several pesticides in water by solid-phase extraction, Liquid Chromatography and electrospray Tandem Mass Spectrometry. *J. Chrom. A.*, 2007, **1150**, 267-278.
- [28] Stepnowski P., Synak E., Szafranek B., Kaczyński Z.: *Techniki separacyjne*. Wyd. UG, Gdańsk 2010.
- [29] Tokman N., Soler C., La Farre M., Pico Y., Barcelo D.: Determination of amitraz and its transformation products in pears by ethyl acetate extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chrom. A.*, 2009, **1216**, 3138-3146.
- [30] Zhang X.A., Mobley N., Zang J.G., Zheng X.M., Lu L., Ragin O., Smith C.J.: Analysis of agricultural residues on tea using d-SPE sample preparation with GC-NCI-MS and UHPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 11553-11560.

EXTRACTION TECHNIQUES APPLIED TO LC-MS DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN FOOD

S u m m a r y

A review is given of the most significant extraction techniques used to isolate pesticide residues in food that are, next, determined by a liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method. The focus is exclusively on the methods, which make it possible to simultaneously analyse residue of multiple pesticides during one single determination run. The extraction techniques are discussed, which involve solvent extraction, solid-phase extraction, and membrane extraction as are the combined techniques such as QuEChERS, CHEMAC, and STEMIT.

In the analysis of pesticides, one of the major issues is the optimization of the applied extraction technique combined with the process of cleaning up the extract. In the case the residues of many pesticides are simultaneously determined that have different physical-chemical characteristics, compromise solutions are applied, which enable to isolate as many compounds as possible. Medium polarity solvents are most fre-

quently used; in the first place acetonitrile, methanol, and ethyl acetate. Of all the sorbent materials, the Oasis HLB and mixtures of PSA (*Primary-Secondary Amine*) and GCB (*graphitized Carbon Black*) are commonly applied. The porous (hollow) polypropylene membranes in the form of hollow fibres are most frequently used as membranes. In the paper, specifically highlighted was the application of a QuEChERS method to isolate pesticides from food samples.

Key words: food, pesticides, extraction, QuEChERS, LC-MS ☒