

QuEChERS – metoda wielopozostałościowa (cz. I)

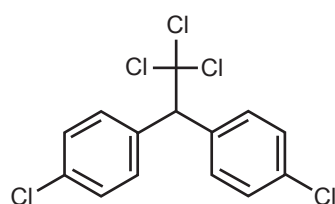
Leszek Ruchomski*

Środki ochrony roślin zaczęto stosować się na szeroką skalę od lat 40. ubiegłego wieku. Substancje aktywne wchodzące w skład preparatów handlowych pozwalają na zwiększenie zbiorów z pól uprawnych. Na przestrzeni lat wprowadzano nowe pestycydy, zastępujące te, których toksyczne działanie zostało udowodnione w stosunku do zwierząt i ludzi. Obecnie pestycydy podlegają rygorystycznym regulacjom prawnym określającym najwyższe dopuszczalne stężenie pozostałości w żywności, z tego powodu konieczne jest monitorowanie ich zawartości w żywności.

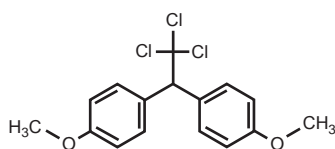
Metoda wielopozostałościowa

Właściwości chemiczne, będące konsekwencją budowy strukturalnej pestycydów, są zróżnicowane. Do grupy chloroorganicznych środków ochrony roślin zaliczane są [1]:

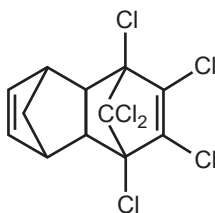
- chlorowane węglowodory aromatyczne – DDT (rys. 1),
- metoksychlor (rys. 2);
- chlorowane cyklodieny – aldryna (rys. 3), dieldryna, heptachlor, endosulfan (rys. 4);
- chlorowane węglowodory cykliczne – heksachlorocykloheksan (HCH), lindan (γ -HCH, rys. 5);
- chlorowane terpeny – toksafen.



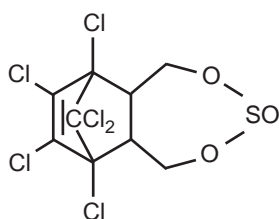
Rys. 1. DDT



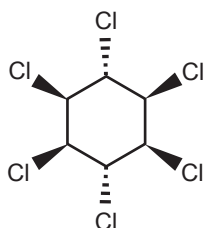
Rys. 2. Metoksychlor



Rys. 3. Aldryna



Rys. 4. Dieldryna, heptachlor, endosulfan



Rys. 5. γ -HCH

Z powodu wzrastającej liczby pestycydów oraz odmiennych właściwości fizykochemicznych w jednej grupie (związki azotoorganiczne, fosforoorganiczne, karbaminiany i inne) w latach 60. ubiegłego wieku prowadzono prace nad stworzeniem metody umożliwiającej przygotowanie próbek do oznaczenia różnych klas związków w jednym toku analitycznym [2]. Opracowane metody wielopozostałościowe MRM (ang. *multiresidue method*) dotyczyły stosowanych wcześniej pestycydów chloroorganicznych. Od tamtego czasu MRM nadal są modyfikowane i rozwijane.

Metoda QuEChERS

W 2003 roku ukazała się publikacja, w której Anastasiades, Lehotay i in. [3] opisali metodę wielopozostałościową oznaczania pestycydów w owocach i warzywach. Zaproponowana nazwa, przez samych twórców, jest bardzo wymowna i oddaje cechy charakterystyczne metody: szybka (ang. **Quick**), prosta (ang. **Easy**), tania (ang. **Cheap**), efektywna (ang. **Effective**), elastyczna (ang. **Rugged**) oraz bezpieczna (**Safe**), czyli **QuEChERS**. Charakteryzuje się niewielkim zużyciem odczynników, w tym szkodliwych rozpuszczalników organicznych oraz szkła laboratoryjnego,

jest więc przyjazna dla środowiska, spełnia wymagania Zielonej Chemii w analityce. Przygotowanie próbki do analizy składa się kilku podstawowych etapów:

- 1) pobranie próbki,
- 2) homogenizacja,
- 3) ekstrakcja rozpuszczalnikiem organicznym,
- 4) wysalanie,
- 5) oczyszczanie ekstraktu za pomocą dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej,
- 6) analiza końcowa za pomocą technik łączonych GC-MS lub LC-MS/MS.

Pobrane próbki do analizy powinny oddawać charakter całej partii produktów, czyli być reprezentatywne. Badaniom można poddać zebrane owoce i warzywa oraz produkty przetworzone, przeznaczone do bezpośredniego spożycia, np. soki, dżemy i inne. Uzyskane wyniki pozwalają określić narażenie człowieka na pestycydy obecne w żywności. Przekroczenie prawnie ustalonych najwyższych poziomów pozostałości pestycydów, MRL (ang. *maximum residue limit*), umożliwia szybkie działanie polegające na wykluczeniu partii żywności z dalszej dystrybucji. Homogenizacja zapewnia ujednorodnienie próbki poprzez ucieranie lub mielenie. Etap ten można prowadzić po uprzednim zamrożeniu za

pomocą ciekłego azotu, co ułatwia homogenizację.

Ekstrakcję pestycydów można przeprowadzić między innymi: acetonitrylem, acetonem, heksanem, cykloheksanem, dichlorometanem, eterem naftowym lub octanem etylu. Przeprowadzone badania GC-MS w pełnym zakresie skanowania jonów (ang. *full scan*) [3] wykazały, że aceton ekstrahuje dużą liczbę związków z matrycy pierwotnej. Późniejsze wydzielenie pestycydów z fazy organicznej na drodze rozdzielania fazy wodnej i acetonowej, pomimo zastosowania soli ekstrakcyjnych, jest znacznie trudniejsze niż z innych rozpuszczalników na skutek nieograniczonej mieszalności z wodą, co może skutkować stratami analitu. Octan etylu nie miesza się z wodą, jest mniej polarny od acetonu i acetonitrylu, dlatego polarne pestycydy mogą nie zostać wyekstrahowane do fazy estrowej. Octan etylu ekstrahuje znaczenie większą liczbę barwników (pigmentów), wosków i tłuszczów z matrycy. Acetonitryl okazał się najbardziej selektywnym rozpuszczalnikiem względem dużej liczby pestycydów, nie ekstrahując przy tym dużej liczby interferentów. Ponadto, łatwiej i skuteczniej ulega rozdzielaniu od wody po dodaniu soli ekstrakcyjnych.

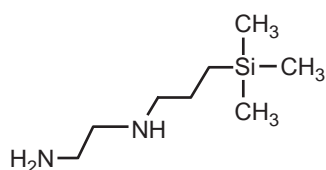
Kolejnym etapem jest dodatek soli ekstrakcyjnych, które mają za zadanie wysolenie warstwy wodnej, pochodzącej z próbki (matrycy pierwotnej), co prowadzi do migracji pestycydów do fazy acetonitrylowej. Stosowane są trzy kombinacje soli ekstrakcyj-

nych w zależności od modyfikacji metody QuEChERS:

- 1) bezwodny siarczan(VI) magnezu i chlorek sodu – pierwotna metoda QuEChERS,
- 2) bezwodny siarczan(VI) magnezu i octan sodu (CH_3COONa) – modyfikacja AOAC,
- 3) bezwodny siarczan(VI) magnezu, chlorek sodu, dwuwodny cytrynian sodu ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) oraz półtorawodny wodorocytrynian sodu ($\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$) – Norma PN-EN 15662:2008.

Po rozdzieleniu faz ekstrakt organiczny jest przenoszony do zamykanej probówki (fiolki) i oczyszczany z zastosowaniem dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej, d-SPE (ang. *dispersive solid phase extraction*). W d-SPE zastosowanie znajdują sypkie sorbenty, co stanowi modyfikację tradycyjnej SPE (kolumnienki, dyski). Dobór odpowiedniego sorbentu zależy od wyekstrahowanych związków przeszkadzających w oznaczeniu końcowym. Najczęściej stosowanymi sorbentami w oczyszczaniu ekstraktu są:

- PSA (ang. *primary secondary amine*), pierwszo-drugorzędowa amina, jest modyfikacją krzemionki, rys. 6. Używana do usunięcia cukrów, kwasów organicznych, kwasów tłuszczowych i pewnych pigmentów. Zastosowanie PSA nie powoduje strat ortofenylofenolu, który wykazuje



Rys. 6. PSA



DONSERV®

najwyższa jakość sprzętu, obsługi i serwisu



Zapraszamy na warsztaty szkoleniowe

WYPOSAŻAMY I OBSŁUGUJEMY LABORATORIA W BRANŻACH:

- Tworzywa sztuczne;
- Przemysł metalurgiczny;
- Przemysł petrochemiczny;
- Przemysł chemiczny;
- Farmacja i kosmetyka;
- Przemysł spożywczy;
- Przemysł paszowy;
- Badanie środowiska;
- Biologia/biotechnologia;
- Mikrobiologia;
- Jednostki naukowo-badawcze.



DONSERV

ul. Michała Spisaka 31, 02-495 Warszawa

☎ 22 863-19-30, fax: 22 863-19-33

@ info@donserv.pl

www.donserv.pl

tendencje do tworzenia wiązań wodorowych [3].

- NH_2 , krzemionka modyfikowana grupami aminopropylowymi. Ma mniejszą zdolność sorpcyjną od PSA, na skutek obecności jednego atomu azotu w przeciwieństwie do PSA (dwa atomy azotu).

- $\text{SiO}_2\text{-C18}$ (ODS), żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi. Usuwa związki tłuszczowe o długich łańcuchach, sterole i inne związki o charakterze niepolarnym.

- GCB (ang. *graphitized carbon black*), czarny węgiel grafityzowany, czasem nazywany grafityzowaną sadzą. Znajduje zastosowanie podczas usuwania polifenoli, pigmentów i barwników. GCB wykazuje silne powinowactwo do cząsteczek płaskich – układy wiązań wielokrotnych oraz struktury aromatyczne. Z tego powodu nie może być wykorzystany do oczyszczania ekstraktu podczas oznaczania między innymi: chlorotalonilu, cyprodinilu, heksachlorobenzenu, kumafosu, kwintoceenu, terbufosu, tiabendazolu [3,4], które ulegają adsorpcji na GCB.

- ChloroFiltr, stanowi stosunkowo nowy sorbent polimerowy do selektywnego usuwania chlorofilu, bez utraty polarnych pestycydów aromatycznych [5].

Na etapie d-SPE dodawany jest po raz drugi bezwodny siarczan(VI) magnezu wiążący wodę, która mogła znajdować się w przeniesionej fazie acetonitrylowej po ekstrakcji i wysoleniu. Masy dodanych sorbentów zależą od rodzaju matrycy, jej złożoności oraz

pobranej fazy acetonitrylowej do etapu oczyszczania.

W przeliczeniu na 1 ml przeniesionej fazy organicznej różni autorzy stosowali: 150 mg – 200 mg MgSO_4 , 25 mg – 70 mg PSA, 2,5 mg – 65 mg GCB.

Ostatnim etapem jest oznaczenie. Anastasiades, Lehotay i in. [3] wszystkie oznaczenia prowadzili z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas GC-MS. Obecnie stosowane są techniki chromatografii sprzężonej z tandemową spektrometrią mas: CG-MS/MS, HPLC-MS/MS, UPLC-MS/MS. Jak wynika z przedstawionej powyżej charakterystyki metody QuEChERS sposób przygotowania próbki do oznaczenia pozostałości pestycydów jest bardzo prosty i przebiega stosunkowo szybko. Matryca może zawierać składniki, które po wyekstrahowaniu nie zostaną usunięte na etapie d-SPE, z tego powodu spektrometry mas są zalecanymi detektorami w metodzie QuEChERS [3,6,7,8,9]. Mają tę zaletę, w porównaniu z innymi detektorami, że pozwalają również na identyfikację związku na podstawie widma mas.

Modyfikacje metod QuEChERS

Metoda QuEChERS od czasu ogłoszenia budzi zainteresowanie wśród badaczy – jest elastyczna, z tego powodu powstały różne modyfikacje.

- Pierwotna (oryginalna) metoda QuEChERS z 2003 roku.

- Metoda Amerykańskiego Stowarzyszenia Chemików Analityków (ang. *Association of Official Agricultural Chemists*) z 2007 roku – metoda AOAC 2007.01 [9]. W modyfikacji tej stosowany jest 1% kwas octowy w acetonitrylu do ekstrakcji, a octan sodu służy wysalaniu analitów i zastępuje chlorek sodu. Kwas octowy w mieszaninie z octanem sodu powoduje utworzenie buforu octanowego. Z tego powodu metoda jest przeznaczona do ekstrakcji pestycydów wrażliwych na zmianę odczynu roztworu. Kwas octowy może jednak ulegać sorpcji na PSA [4], ponadto dochodzi do poszerzenia pików w chromatografii gazowej.

Trzecia modyfikacja metody QuEChERS znajduje się w wykazie Polskich Norm od 2008 roku PN-EN 15662:2008, jako wersja anglojęzyczna [10]. Norma stosowana jest w oznaczaniu pozostałości pestycydów w produktach o niskiej zawartości tłuszczu, takich jak owoce, łącznie z owocami suszonymi, warzywa, zboża oraz ich przetwory. Metodę sprawdzono w badaniach międzylaboratoryjnych: ogórków, cytryn, mąki pszennej, rodzynek, jabłek, pomarańczy i sałaty. Do wysalania stosowany jest chlorek sodu oraz bufor cytrynianowy.

Na rys. 7 przedstawiono warianty omówionych metod QuEChERS. W Zakładzie Toksykologii Środowiska Państwowego Zakładu Higieny z sukcesem przeprowadzono próby zastosowania chromatografii gazowej z detektorem wychwytu elektronów GC-ECD do oznaczania pozostałości pestycydów [6]. Należy mieć na uwadze, że analit może współeluować ze związkami wyekstrahowanymi z matry-

cy pierwotnej i nieusuniętymi podczas d-SPE, a jedynym parametrem identyfikacyjnym jest czas retencji.

Kalibracja i wzorzec wewnętrzny

Najczęściej stosowaną metodą kalibracyjną jest krzywa kalibracyjna sporządzona na podstawie pomiarów roztworów wzorcowych o różnych stężeniach analitu. Metoda ta może nieść ze sobą błędy wynikające z nieuwzględnienia efektów matrycowych, z uwagi na fakt, że roztwór wzorcowy sporządzony jest w czystym rozpuszczalniku (wzorzec zewnętrzny). Innym rozwiązaniem jest wykonanie roztworów wzorcowych na bazie oczyszczonych ekstraktów [8]. W tym celu matrycę (owoce, warzywa lub przetwory) poddaje się ekstrakcji i oczyszczaniu d-SPE, a otrzymane oczyszczone ekstrakty stanowią rozpuszczalnik, do których dodawane są wzorce i sporządzana zostaje krzywa kalibracyjna. Metoda ta (ang. *matrix-matched calibration*) pozwala na minimalizowanie wpływu matrycy, ponieważ związki, które nie zostały usunięte na etapie d-SEP znajdują się w roztworze kalibracyjnym. Kalibracja dla wielu matryc może być przeprowadzona na drodze pojedynczo przygotowanych ekstraktów, bądź z homogenicznej mieszaniny owoców i warzyw matryc jednocześnie [8]. Matryce przeznaczone do przygotowania roztworów wzorcowych nie mogą zawierać oznaczanych pestycydów, co niejednokrotnie stanowi utrudnienie.

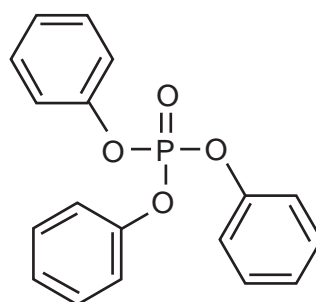


Rys. 7. Warianty metod QuEChERS

Kolejnym rozwiązaniem jest ochrona analitu (ang. *analyte protectants*) przed degradacją w kolumnie chromatograficznej. Autorzy metody QuEChERS [3] zaproponowali dodatek 3-etoksypropano-1,2-diolu oraz sorbitolu w acetonitrylowo-wodnym rozpuszczalniku do roztworów kalibracyjnych oraz próbek wzbogaconych poddanych oznaczeniu końcowemu. Wzorce wewnętrzne, umożliwiające określenie odzysku metody analitycznej, powinny

być zbliżone właściwościami fizykochemicznymi do analitu. Zastosowanie wysoko rozdzielczej spektrometrii mas oraz tandemowej spektrometrii mas umożliwia użycie wzorców znaczących izotopami. Innymi rozwiązaniami jest wykorzystanie fosforanu(V) tryfenylu – TPP, rys. 8 [3]. Odzysk TPP po etapie ekstrakcji i wysoleńni wynosi 98%, natomiast po etapie d-SPE z zastosowaniem PSA wynosi 99% (oba etapy badano osobno). TPP znajduje zastosowanie jako wzorzec

wewnętrzny w GC-MS w jonizacji strumieniem elektronów (ang. *electron impact*) [10] oraz w technice LC-MS w elektro-rozpylaniu (ang. *electrospray*)



Rys. 8. TPP

oraz jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym w trybie jonizacji dodatniej (ang. *atmospheric pressure chemical ionization positive modes*) [11]. Ze względu na powinowactwo GCB do struktur aromatycznych nie można wykorzystać tego sorbentu w d-SPE podczas stosowania TPP. W Normie PN-EN 15662:2008 [10] zostały wymienione jako wzorce wewnętrzne między innymi: TPP, fosforan(V) tris(1,3-dichloroizopropylu), trifenylometan oraz kongenery polichlorowanych bifenyli: PCB-18, PCB-28, PCB-52. Odzysk dla poszczególnego analitu powinien znajdować się w przedziale od 70% do 120%, a względne odchylenie standardowe (RSD) być mniejsze, bądź równe 20% [8].

Podsumowanie

Z przedstawionej charakterystyki metody QuEChERS wynika, że przygotowanie próbki do analizy nie wymaga skomplikowanych czynności, jest szybkie i proste. Jeden tok postępowania analitycznego umożliwia oznaczenie pestycydów różniących się właściwościami fizykochemicznymi, czyli spełnia wymagania metody wielopozostałościowej. W 2003 roku twórcy metody oszacowali koszt przygotowania pojedynczej próbki do analizy wynoszący poniżej jednego dolara amerykańskiego, a czas przygotowania 6 próbek przez jednego analityka – niespełna 30 minut [3]. Opracowana metoda QuEChERS od samego początku cieszy się zainteresowaniem wśród badaczy, o czym świadczą stworzone i stosowane modyfikacje pierwotnej

metodyki. Jedna z modyfikacji w 2008 roku została włączona w zbiór Polskich Norm. W celu ułatwienia pracy laboratoriom zajmującym się rutynowymi oznaczeniami pestycydów metodą QuEChERS firmy chemiczne oferują w sprzedaży gotowe odważki soli ekstrakcyjnych oraz sorbentów [12]. Na rynku dostępne są również automaty (platformy) do przygotowania próbek [13]. Elastyczność metody przejawia się w modyfikacjach umożliwiających oznaczenie innych analitów niż pestycydy.

Literatura

- [1] Pomorska K., *Pestycydy w środowisku i ich oznaczenie metodą chromatografii gazowej*, Komitet Inżynierii Środowiska PAN, Lublin, 2001.
- [2] Mills P.A., Onley J.H., Guither R.A., *Rapid method for chlorinated pesticide residues in nonfatty foods*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1963, 46: 186–191.
- [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] QuEChERS, Informational Booklet, www.pmsep.com.au/common/downloads/quenchers-booklet-2011-4-19-11.pdf, dostęp 20.06.2015.
- [5] QuEChERS ChloroFiltr, www.unitedchem.com/catalog/sample-prep/quenchers/quenchers-chlorofiltr, dostęp 25.06.2015.
- [6] Snopczyński T., Struciński P., Góralczyk K., Czaja K., Hernik A., Korcz W., Kucharska A., Ludwic-

ki J.K., *Zastosowanie metody QuEChERS w połączeniu z chromatografią gazową z detektorem wychwytu elektronów (GC-ECD) w analizie pozostałości pestycydów w żywności*, Roczn. PZH 2011, 62: 145–151.

[7] Sadowska-Rociek A., Cieślak E., *Stosowane techniki i najnowsze trendy w oznaczaniu pozostałości pestycydów w żywności metodą chromatografii gazowej*, CDEM, 2008, 13: 33–38.

[8] European commission, *Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed: SANCO/12571/2013*, 2013.

[9] AOAC Official Method 2007.01, *Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate*, 2007.

[10] Polska Norma PN-EN 15662: *Żywność pochodzenia roślinnego – Oznaczenie pozostałości pestycydów metodą GC-MS i/lub LC-MS(/MS) po uprzedniej ekstrakcji i rozdzielaniu acetonitrylem oraz oczyszczeniu metodą dyspersyjnej SPE – Metoda QuEChERS*, PKN, 2008.

[11] Anastassiades M., *Entwicklung von schnellen Verfahren zur Bestimmung von Pestizidrueckstaenden in Obst und Gemuesse mit Hilfe der SFE – ein Beitrag zur Beseitigung analytischer Defizite*, Shaker Verlag, Aachen, 2001.

[12] QuEChERS, United Chemical, www.unitedchem.com/catalog/sample-prep/quenchers, dostęp 01.07.2015.

[13] AutoMate-Q40, Automated Workflow Platform, www.teledynetekmar.com/AutoMateQ40/, dostęp 02.07.2015.

* mgr inż. Leszek Ruchomski; leszekruchomski@gmail.com