



Nowe perspektywy w analizie żywności

Agnieszka Ulanowska, Grzegorz Strączyński*

Powszechnie wiadomym jest, że żywność oraz napoje, stanowią nie tylko źródło energii, ale również dostarczają witamin i minerałów, przez co mają ogromny wpływ na zdrowie człowieka. Dlatego należy dbać o to, aby produkty żywnościowe były świeże, nie zawierały konserwantów, zaś owoce i warzywa wolne były od środków ochrony roślin. Jednakże producenci żywności chcąc zwiększyć swoje plony, ochronić je przed chorobami, owadami, bardzo często stosują substancje, które zostały zakazane do kontaktu z żywnością ze względu na zagrożenie dla zdrowia człowieka. Szkodliwość pestycydów wynika głównie ze względu na ich znaczną trwałość w środowisku i zdolność kumulowania się w tkankach tłuszczowych, dlatego objawy zatrucia tymi substancjami mogą ujawnić się nawet po kilku latach. Wiele z tych związków jest podejrzewane o działanie rakotwórcze oraz o zmniejszenie płodności. Pomimo znacznego ograniczenia stosowania, a nawet zakazu stosowania niektórych pestycydów jak np. chloroorganicznych w rolnictwie i polichlorowanych bifenyli (PCB) w przemyśle, nadal stwierdza się ich obecność w żywności zwierzęcego pochodzenia.

Od 1 września 2008 roku w całej Unii Europejskiej obowiązują ujednoczone normy w zakresie dopuszczalnego poziomu pozostałości pestycydów w żywności i paszy. W rozporządzeniu tym znajduje się około 1100 pestycydów, których najwyższe dopuszczalne stężenia (NDS) wahają się najczęściej w granicach od 0,01 do 0,05 mg/kg. Analitycy dążą zatem do wdrożenia metod, które pozwolą na oznaczanie pestycydów na wymaganym poziomie stężeń. Jednakże, jest to bardzo trudne zadanie, ponieważ próbki żywności posiadają bardzo bogatą matrycę, co znacznie utrudnia wykrywanie pozostałości środków ochrony roślin, które najczęściej występują w niej na śladowym poziomie stężeń. Dodatkowo, w żywności może znajdować się od kilku do kilkudziesięciu pestycydów, a wyzwaniem dla analityka jest oznaczenie jak największej ich liczby. Ponadto, ważne jest również aby zastosowana metoda analityczna była jednocześnie wystarczająco czuła i szybka, a proces przygotowania próbki możliwie prosty i tani.

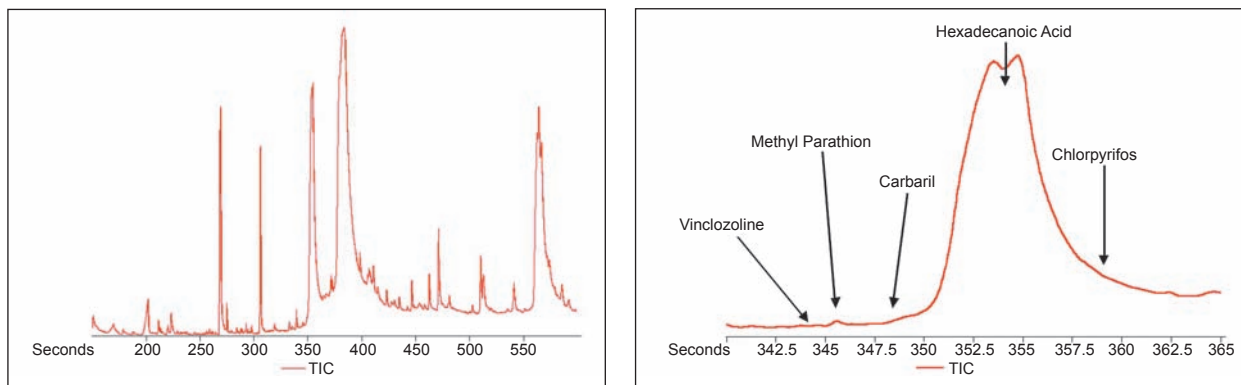
Dużym postępowaniem technologicznym było wprowadzenie w latach 70 do laboratoriów analitycznych chromatografii

gazowej (GC) i zastosowanie jej do oznaczania pozostałości pestycydów w żywności i paszach [1]. Najczęściej stosowanymi wówczas systemami były połączenia GC z selektywnymi detektorami, jak detektor wychwytu elektronów (ang. electron capture detector, ECD), azotowo-fosforowy (nitrogen-phosphorus detector, NPD) lub płomieniowo-fotometryczny (ang. flame photometric detector, FPD). Obecnie coraz częściej wykorzystuje się sprzężenie chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC/MS), które znacznie zwiększa możliwości identyfikacyjne metody, a dzięki zastosowaniu trybu monitorowania wybranych jonów (SIM) możliwe jest uzyskanie granic wykrywalności zbliżonych, a w niektórych przypadkach nawet niższych, od klasycznych detektorów stosowanych w GC.

Niekiedy metodą z wyboru do oznaczania pozostałości pestycydów w żywności jest chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC/MS). Aktualnie coraz bardziej popularne są tandemowe połączenia typu MS/MS, które doskonale sprawdzają się w przypadku analiz ukierunkowanych (ang. target analysis) [2]. W przypadku, gdy zależy nam na oznaczeniu jak

największej ilości zanieczyszczeń w próbce, układ LC/MS/MS przestaje być użyteczny. LECO Corporation proponuje alternatywne rozwiązanie, podobne do MS/MS. System o nazwie Citius LC-HRT stanowi połączenie wysokorozdzielczej spektrometrii mas z analizatorem czasu przelotu z chromatografią cieczową (LC-TOFMS), w którym zastosowano źródło jonów tzw. pełne CID (ang. comprehensive CID), którego unikalna budowa umożliwi wielokrotną jonizację wszystkich substancji wprowadzonych do układu. Aparat ten łączy jednocześnie wysoką rozdzielczość ($R=100\ 000$), dużą szybkość akwizycji danych (do 200 widm/s) z dokładnością pomiaru masy (poniżej 1 ppm). Ten bezkompromisowy system spełnia wszelkie wymagania współczesnej analityki. Citius LC-HRT umożliwi operatorowi wybór trybu rozdzielczości, w której ma zostać wykonana analiza. Aparat ten może pracować w trybie rozdzielczości ultra wysokiej ($R=100\ 000$), wysokiej ($R=50\ 000$) i jednostkowej ($R=2\ 500$).

Nowe możliwości analityczne w analizie żywności zapewniło wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas czasu przelotu (GC-TOFMS). Fakt



Rys. 1. Całkowity prąd jonowy ekstraktu z musu jabłkowego oraz fragment chromatogramu z pestycydami przykrytymi matrycą [3]

ten ustanowił nowy rozdział w analityce laboratoryjnej. Stosowanie systemu GC-TOFMS o nazwie Pegasus HT pozwala na oznaczenie kilkudziesięciu pestycydów w próbce na bardzo niskim poziomie stężeń bez stosowania SIM i skomplikowanych metod przygotowania próbki. Dzięki dużej przepustowości aparatu i dużej szybkości akwizycji danych z możliwością rejestrowania do 500 pełnych widm masowych w ciągu sekundy, otrzymane widma masowe są bardzo dobrej jakości, w związku z czym uzyskuje się pewną identyfikację analitów. Przykładowo, Pegasus HT został wykorzystany do analizy pestycydów w musie jabłkowym. Próbkę do badań przygotowano przez ekstrakcję w heksanie [3]. Po wykonaniu analizy GC-TOFMS okazało się, że część pestycydów obecnych w próbce znajduje się poniżej linii bazowej oraz są one niewidoczne na chromatogramie. Całkowity prąd jonowy (ang. total ion current, TIC) ekstraktu z musu jabłkowego oraz 20-sekundowy fragment chromatogramu zawierający pestycydy przykryte

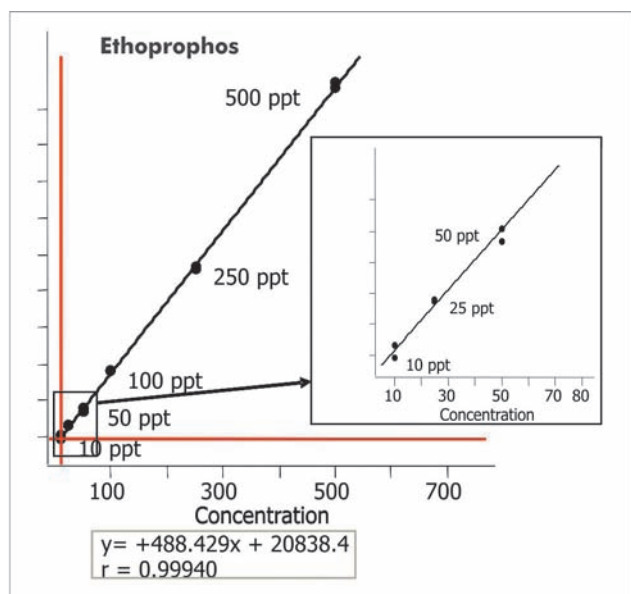
matrycą, zaprezentowano na rys. 1. Jednakże dzięki zastosowaniu funkcji automatycznego wyszukiwania pików (Automated Peak Find™) i dekonwolucji (True Signal Deconvolution™) zidentyfikowano 8 pestycydów w ekstrakcie z jabłek. Poszukiwanie możliwie najprostszymi i najszybszymi metodami przygotowania próbki, stanowi jedno z podstawowych wyzwań analitycznych. Okazuje się bowiem, że podczas tego etapu popełnianych jest najwięcej błędów, które wpływają na końcowy wynik analizy. W przypadku oznaczania chloroorganicznych i fosforoorganicznych pestycydów w liściach zielonej herbaty zastosowano ekstrakcję ruchomym elementem sorpcyjnym (ang. stirt bar sorptive extraction, SBSE), czyli ekstrakcję z wykorzystaniem ruchomego prętu pokrytego sorbentem, najczęściej polidimetylosiloksanem (PDMS) [4]. Proces ekstrakcji prowadzono w naparze z liści herbaty w ciągu 60 minut. Etap ten został wykonany automatycznie, dzięki wykorzystaniu automatycznego wymienni-

ka tub (ang. automatic tube exchanger, ATEX) i zestawu do termicznej desorpcji (ang. thermal desorption unit, TDU). Dokonano walidacji metody SBSE-GC-TOFMS dla 22 pestycydów, najczęściej identyfikowanych w tego typu próbkach w zakresie stężeń od 10 do 500 ppt (patrz tabela 1). Na rys. 2 zaprezen-

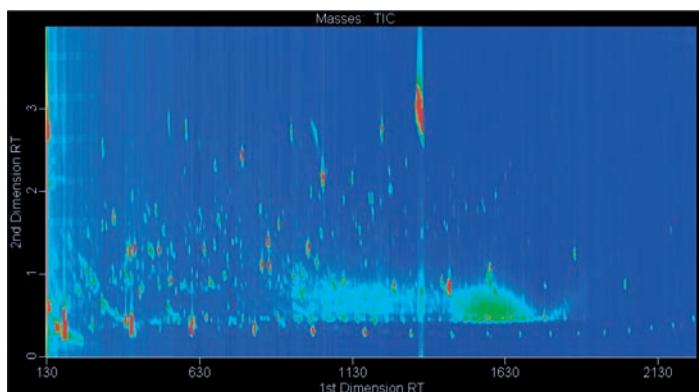
towano przykładową krzywą kalibracyjną wykonaną dla pestycydu. Udowodniono, że metoda ta wykazuje liniowość w badanym zakresie stężeń. Dzięki SBSE-GC-TOFMS udało się oznaczyć wszystkie pestycydy w próbce na poziomie powyżej 10 ppt. Analiza prowadzona w ciągu 8,2 minut pozwoliła na wykrycie w su-

Tabela 1. Parametry walidacyjne dla 22 pestycydów [4]

Nazwa pestycydu	Czas retencji [s]	Współczynnik R2
Etoprofos	354,5	0,9994
Sulfotep	360,2	0,9969
α-Lindan	365,2	0,9972
Demeton-s	366,4	0,9987
b/g-Lindan	374,0	0,9966
Diazinon	374,1	0,9988
Disulfoton	377,0	0,9876
E-Lindan	379,5	0,9976
Metyloparation	387,8	0,9948
Ronnel	390,9	0,9977
Heptachlor	391,2	0,9954
Paration	398,2	0,9974
Trichloronat	401,4	0,9970
Epoksyd heptachloru	407,9	0,9947
Chlordan	413,1	0,9957
Chlordan:2	416,3	0,9976
Dieldryna	421,9	0,9981
Endryna	427,0	0,9906
Endosulfan II:2	428,7	0,9949
o,p'-DDT	436,1	0,9957
Metoksychlor	448,0	0,9983
Ketoendryna	449,4	0,9927



Rys. 2. Wykres krzywej kalibracyjnej wykonanej dla etoprosu [4]



Rys. 3. Chromatogram GCxGC/TOF-MS przedstawiający rozdzielanie ponad 1200 substancji wykrytych w wywarze z zielonej herbaty [5]

mie ponad 550 różnych substancji, w tym pestycydów. Z przeprowadzonych badań wynika, że nawet anality nie całkowicie rozdzielone, dzięki zastosowaniu funkcji oprogramowania ChromaTOF™, czyli automatycznego wyszukiwania pików oraz dekonwolucji, bez problemu mogą zostać zidentyfikowane. SBSE-GC/TOF-MS jest szybką, precyzyjną i czułą metodą, którą z po-

wodzeniem można stosować do oznaczania pozostałości chloroorganicznych i fosforoorganicznych pestycydów w zielonej herbacie występujących na śladowym poziomie stężeń.

Polepszenie rozdzielania dzięki układom dwuwymiarowym

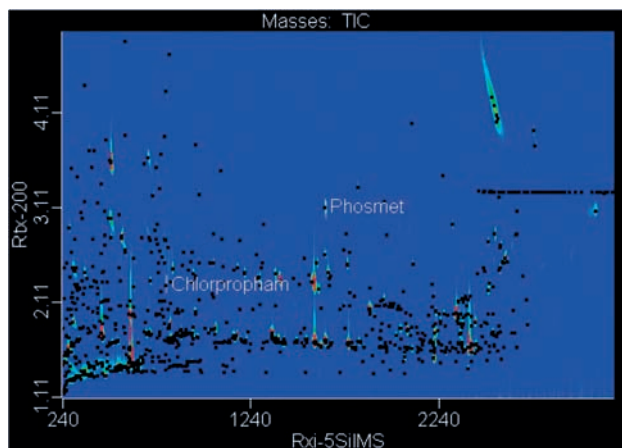
Analogiczne badanie zawartości pozostałości pestycydów

w zielonej herbacie przeprowadzono z wykorzystaniem dwuwymiarowej chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas czasu przelotu (GCxGC-TOFMS, LECO Pegasus 4D), stosując SBSE jako metodę przygotowania próbki [5]. Zastosowanie systemu GCxGC pozwoliło na znaczne zwiększenie pojemności pikowej układu i zdecydowane polepszenie rozdzielania analitów. Substancje, które w przypadku układu jednowymiarowej chromatografii gazowej koeluowały, teraz zostały dobrze rozdzielone. Chromatogram, który otrzymano w wyniku rozdzielania składników obecnych w ekstrakcie z zielonej herbaty zaprezentowano na rys. 3. Zastosowanie spektrometrii mas czasu przelotu pozwoliło na otrzymanie pełnych widm masowych bez konieczności zmniejszenia szybkości pracy detektora oraz jego czułości. Dzięki wykorzystaniu modulacji, piki chromatograficzne otrzymywane w drugim wymiarze są znacznie węższe, co bezpośrednio wpływa na obniżenie granicy wykrywalności oznaczanych substancji. Stosując metodę SBSE-GCxGC-TOFMS w ekstrakcie z zielonej herbaty udało się wykryć ponad 1200 różnych substancji chemicznych. System GCxGC/TOF-MS wykorzystano także do zbadania wpływu procesu mycia jabłek na zawartość pestycydów w owocach. QuEChERS (ang. quick, easy, cheap, effective, rugged, safe) zastosowano do przygotowania próbki [6]. Przedmiotem badań był fosmet i (insektycyd) chlor-

profam (regulator wzrostu) w ekstrakcie z jabłek. Okazuje się, że w układzie jednowymiarowej chromatografii gazowej, fosmet koeluuje z węglowodanami i kwasami tłuszczowymi pochodzącymi z matrycy. Układ GCxGC umożliwił pełne rozdzielanie pestycydów i ponad 1000 innych substancji obecnych w próbce. Wynik chromatograficznego rozdzielania analitów zaprezentowano na rys. 4. Przeprowadzona analiza ilościowa wykazała, że w jabłkach niemytych znajduje się 0,1 ng/g chlorprofamu i 18 ng/g fosmetu. W przypadku jabłek, które zostały umyte przed badaniem, nie wykryto chlorprofamu, zaś fosmet wykryto w ilości mniejszej niż poprzednio równej 13 ng/g. Z badań wynika, że Pegasus 4D pozwala na prowadzenie analiz ukierunkowanych, ale również umożliwia poszukiwanie nowych, nieznanych dotąd zanieczyszczeń żywności.

Wysoka rozdzielczość kluczem do sukcesu

Coraz częściej w badaniach żywności stosuje się wysokorozdzielcze spektrometry mas z analizą czasu przelotu, które umożliwiają jednoznaczną identyfikację analitów bez konieczności ich całkowitego rozdzielania metodami chromatograficznymi. Wykorzystanie tego typu systemów pozwala czasami również na pominięcie, bądź też znaczne uproszczenie procesu przygotowania próbki, ponieważ obecne składniki matrycy, nie wpływają na identyfikację analitów. Ponadto, pomiar mas z dokładnością do stężeń części atomowych



Rys. 4. Chromatogram GCxGC-TOFMS ekstraktu z jabłek. Czarne kropki oznaczają zidentyfikowane substancje [6]

jednostek masy z uwzględnieniem względnej intensywności izotopowej podczas pomiaru masy, pozwala na otrzymanie pewnego wyniku analizy jakościowej.

Układ LC-TOFMS o nazwie Citius LC-HRT zastosowano do oznaczenia flawonów, przeciwutleniaczy, biogennych amin oraz substancji odżywczych w winie oraz soku z winogron przeznaczonym do produkcji wina [7]. Próbkę do badań przygotowano poprzez trzykrotne rozcieńczenie soku i wina w 0,1% kwasie mrówkowym, przefiltrowano i poddano analizie. Badania wykonane w trybie wysokiej rozdzielczości w zakresie m/z od 50 do 2250 wykazały złożoność matrycy, jakim są wino i sok z winogron. W próbkach wykryto 24 substancje, w tym głównie antyoksydanty i aminy biogenne, ale także 6 pestycydów. Wśród wykrytych środków ochrony roślin były: metiokarb, karbendazym, izoprokarb, cymoksanil, pirymetanal i karbaryl, które w śladowych ilościach pozostały w owocach. Oznaczenie dodatkowych substancji

obecnych w winie oraz soku z winogron było możliwe dzięki zastosowaniu wielokrotnej jonizacji wszystkich substancji znajdujących się w próbce za pomocą źródła MS^{2} . Taki wynik byłby niemożliwy w przypadku tradycyjnego układu MS/MS.

Wprowadzenie na rynek spektrometrów mas wyposażonych w analizatory czasu przelotu zmieniło wymiar analizy instrumentalnej. Dzięki układom typu GC-TOFMS, GCxGC-TOFMS oraz LC-TOFMS nieukierunkowane badanie żywności stało się możliwe bez stosowania kompromisu pomiędzy szybkością wykonywania analiz a czułością aparatu. Nowoczesne systemy, zapewniają jednocześnie dużą szybkość akwizycji danych przy zachowaniu niskich poziomów wykrywalności analitów. Ponadto systemy te wykazują liniowość w zakresie minimum czterech rzędów wielkości, toteż z powodzeniem mogą być stosowane do analizy ilościowej. Zaprezentowane powyżej przykłady zastosowania aparatów LECO

Corporation do analizy pozostałości pestycydów w żywności potwierdzają, że mogą one być wykorzystywane do tego typu badań.

Duża pojemność pikowa systemu GCxGC-TOFMS, zapewnia bardzo dobre rozdzielanie analitów, co pozwala na wyeliminowanie czasochłonnych i kosztownych metod przygotowania próbki. Podobnie w przypadku aparatu LC-TOFMS, bardzo dokładny pomiar rzeczywistej masy analitów i uwzględnienie intensywności izotopowej pierwiastków, umożliwia jednoznacznie identyfikację substancji, nawet jeśli nie zostały one całkowicie rozdzielone chromatograficznie. Wszystkie te elementy sprawiają, że także w tym przypadku proces przygotowania próbki można ograniczyć do rozpuszczenia lub rozcieńczenia próbki w odpowiednim rozpuszczalniku i filtracji.

Istotnym elementem wspomnianych systemów jest oprogramowanie o nazwie ChromaTOF™, które pozwala na pełną kontrolę pracy chromatografu i detektora TOFMS, jak również na rejestrowanie i przetwarzanie zgromadzonych danych. W oprogramowaniu dostępne są funkcje m.in. automatycznego wyszukiwania pików (Automated Peak Find®) i dekonwolucji (True Signal Deconvolution®), które pozwalają na znaczne ułatwienie oraz skrócenie analizowania danych do minimum.

Literatura

[1] L. Alder, K. Greulich, G. Kempe, B. Vieth, Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC/MS or LC/

MS/MS?, *Mass Spectrometry Reviews* 25 (2006) 838–865.

[2] R. Raina, *Chemical Analysis of Pesticides Using GC/MS, GC/MS/MS, and LC/MS/MS*, in: M. Stoytcheva (Ed.), *Pesticides - Strategies for Pesticides Analysis*, InTech, 2011, pp. 105-130.

[3] LECO Corporation, *Determination of Pesticides in Food Matrix by GC-TOFMS*, Application note No. 203-821-195 6/10-REV2 (2010).

[4] M. Libardoni, J. Heim, N. Ochiai, K. Sasamoto, *Trace Level Organochlorine and Organophosphorous Pesticides Analysis in Green Tea by SBSE-GC-TOFMS*, LECO Corporation Application note No. 203-821-337 3/08-REV0 (2008).

[5] M. Libardoni, J. Heim, N. Ochiai, K. Sasamoto, *Trace Level Organochlorine and Organophosphorous Pesticides Analysis in Brewed Green Tea*, LECO Application Notes No. 203-821-343 4/08-REV0 (2008).

[6] J. Binkley, *Screening and Quantitation of Pesticides in Jonagold Apples by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry (GCxGC-TOFMS)*, LECO Application Notes No. 203-821-393 9/10-REV0 (2010).

[7] LECO Corporation, *Qualitative Comparison of Wine Process Samples with UHPLC and Ultra High Resolution TOFMS*, Application note No. 203-821-418 3/12-REV0 (2012).

* Agnieszka Ulanowska, Grzegorz Strączyński; *LECO Polska Sp. z o.o., ul. Czarna 4, 43-100 Tychy, e-mail: leco@leco.com.pl*