

SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ

XXXVI. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin

23. – 25. 5.2005

Skalský Dvůr

Ed. Holasová M., Fiedlerová V., Špicner J.
VÚPP, Praha 2005

ISBN 80-86909-01-8

INOVATIVNÍ PŘÍSTUPY V ANALÝZE REZIDUÍ PESTICIDŮ

Čajka T., Hajšlová J., Lacina O.

Ústav chemie a analýzy potravin, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

Úvod

Analýza pesticidů v potravinách je často časově i laboratorně náročný proces. Použití organických rozpouštědel jako aceton, acetonitril (MeCN) nebo ethylacetát (EtAc) pro jejich extrakci poskytuje dobré výtěžnosti pro široké spektrum pesticidů lišících se polaritou, avšak před GC analýzou je téměř vždy nutné zařadit přečišťovací krok. Obvyklé přečišťovací techniky jako extrakce na tuhou fázi (SPE), extrakce kapalina/kapalina (LLE) a/nebo gelová permeační chromatografie (GPC) zvyšují nejen cenu a délku analýzy, ale snižují i laboratorní průsaznost, prodlužují celkovou dobu analýzy a vyžadují dodatečnou práci. Na druhou stranu je nutné poznamenat, že přečištění primárního extraktu je nedílnou součástí metody pro zlepšení robustnosti a spolehlivosti GC systému [1]. Netěkavé matriční depozity ze solí, sacharidů, proteinů a lipidů, které se mohou tvořit v nástřikovém prostoru a/nebo pomalu migrovat GC kolonou tak snižují pracovní charakteristiky do té doby, než je provedena údržba [2].

Metoda QuEChERS

ANASTASSIADES a kol. popsali podrobnou studii o vývoji nové multiresiduální metody pro stanovení residuů pesticidů v potravinách s extrakcí do MeCN, kterou označili jako QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) [3]. Metoda spočívá v extrakci analytů v centrifugační kyvetě s přidavkem bezvodého $MgSO_4$ jako desikátoru a NaCl (pro zvýšení výtěžnosti polárních analytů) do MeCN. Po odstředění se z horní vrstvy odebere alikvotní podíl, ke kterému je přidán další $MgSO_4$ a k přečištění sorbent PSA (primární-sekundární amin).

Během vývoje metody QuEChERS se ukázalo, že u odlišných matic mají některé pesticidy (captan, chlorothalonil, dicofol, folpet, dichlofluanid, tolylfluanid, aj.) variabilní a často nízké výtěžnosti. Tyto pesticidy v zásaditém prostředí, v některých rozpouštědlech a/nebo za zvýšené teploty, podléhají degradaci a to způsobuje jejich obtížnou kontrolu. Proto LEHOTAY a kol. tuto metodu modifikovali: extrakce se provádí MeCN s 1 % obsahem kyseliny octové a NaCl je nahrazen octanem sodným, čímž vzniká octanový pufr udržující pH < 4 bez závislosti na původním pH matrice [4].

Jelikož je u multiresiduálních metod nutné, aby poskytovaly nejenom přesná data, ale aby měly i příznivé ekonomické parametry a průsaznost, představuje metoda QuEChERS inovativní přístup v analýze reziduí pesticidů blízký se svými charakteristikami těmto požadavkům: je rychlá, s nízkými nároky na použitá rozpouštědla, laboratorní vybavení i na práci analytika.



Obrázek 1. Schéma postupu pufrované QuEChERS metody.

Matriční efekty a použití analytických protektantů

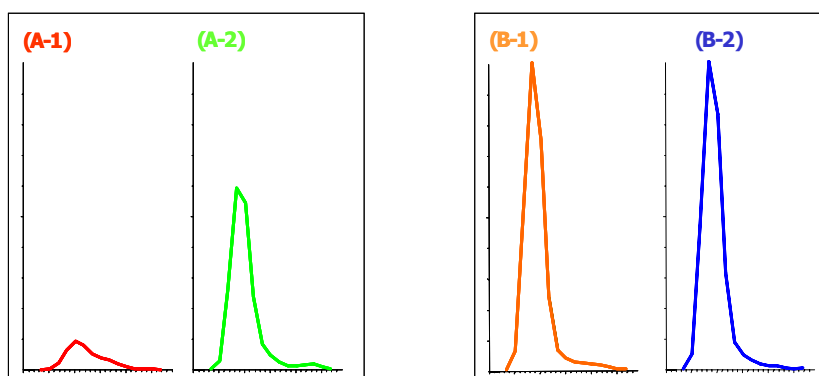
Významným problémem při GC analýze je skupina nepříznivých jevů obecně označovaných jako matriční efekty, které jsou způsobeny přítomností koextrahovaných matričních komponent [5]. Matriční efekty ovlivňují všechny kroky GC analýzy (nástřík, separace, detekce) a mohou se projevat negativně na kvalitě generovaných dat.

Velmi důležitou částí plynového chromatografu, do značné míry ovlivňované matričními komponentami, je nástřikový prostor. Během klasického splitless nástřiku, který je často používanou nástřikovou technikou ve stopové analýze, může docházet k termální degradaci a/nebo adsorpci některých analytů [6–8]. Po nástřiku reálného vzorku mají koextrahované matriční komponenty sklon obsazovat (blokovat) aktivní místa nástřikového prostoru (především silanolové skupiny ve skleněném lineru), což má za následek přenos většího množství cílových analytů na kolonu (a následkem toho vyšší signál a lépe zaostřené píky) v přítomnosti matrice než při nástřiku daných látek v čistém rozpouštědle (viz **Obr. 2A**). Uvedený fenomén, který popsal ERNEY [9] jako maticí indukované zvýšení chromatografické odezvy, dovoluje vysvětlení výtěžností významně převyšujících 100 % u polárnějších pesticidů, které jsou uváděny ve studiích používajících kalibrační standard rozpuštěný v čistém rozpouštědle. Obecně lze tedy konstatovat, že pokud jsou analyty rozpuštěny pouze v rozpouštědle a jsou používány jako kalibrační standardy, pak koncentrace analytů, které jsou ovlivněny matričními efekty v injektoru, jsou systematicky nadhodnocovány. Rozsah maticí indukovaných zvýšených odezev závisí na mnoha faktorech:

- typ a množství aktivních míst v nástřiku a na koloně;
- chemická struktura analytů (polární skupiny molekuly analytu, termolabilita);
- koncentrace analytu;
- teplota nástřiku;
- faktory ovlivňující dobu interakce analytu s aktivními místy (průtok nosného plynu, tlak v koloně, objem nástřiku a objem expandovaného rozpouštědla, retenční čas analytu);
- typ a koncentrace matrice;
- „historie“ GC systému (stupeň kontaminace).

Existuje několik možných přístupů k eliminaci nebo kompenzaci tohoto jevu. Odstranění matrice důkladným přečištěním extraktu nebo deaktivace lineru [9, 10]. Další možností je použití izotopově značených vnitřních standardů, avšak k detekci může být použita pouze hmotnostní spektrometrie a tyto standardy jsou cenově nákladné (v řadě případů nejsou ani dostupné). Praktický a doporučovaný způsob je použití kalibračního standardu v extraktu matrice bez cílových analytů (matriční standard) [10–12], ale tento postup má několik nevýhod. Především náklady na přípravu a skladování matričních standardů, obtížná dostupnost matrice bez analytů, nutnost připravit matriční standard pro každou komoditu, limitovaná stabilita některých analytů v matričních standardech [13] a zvýšená kontaminace nástřikového prostoru a vstupní části analytické kolony GC maticí [14].

Jednou z dalších cest kompenzace matričních efektů je přidání jednoduché sloučeniny nebo jejich směsi na maskování aktivních míst. Tyto látky, označované jako analytické protektanty, silně interagují s aktivními místy GC systému, snižují degradaci a/nebo adsorpci cílových analytů. Jejich použití tak minimalizuje ztráty náchylných analytů a tím významně zlepšují tvary chromatografických píků, čímž dochází ke snížení detekčních limitů (viz **Obr. 2B**) [3, 10].



Obrázek 2. Porovnání velikosti a tvaru píků: (A-1) nástřík analytu v čistém rozpouštědle; (A-2) nástřík analytů s matricí; (B-1) nástřík analytu v čistém rozpouštědle s přidavkem analytických protektantů; (B-2) nástřík analytů s matricí s přidavkem analytických protektantů.

Aby látka mohla být použita jako protektant musí splňovat několik podmínek:

- Eluční profil protektantu se musí překrývat s elucí analytu, který má být chráněn.
- Nesmí reagovat s analyty a indukovat jejich rozklad.
- Nesmí se kumulovat v nástříkovém prostoru, v koloně nebo v detektoru.
- Nesmí interferovat s analyty při detekci.
- Musí být snadno dostupné.
- Musí být rozpustné v použitém rozpouštědle.

Jako celkově nejúčinnější protektant se ukázal γ -lakton kyseliny L-gulonové, který měl výrazný efekt pro všechny vybrané pesticidy s výjimkou methamidofosu a acephatu. Kromě samotného laktonu vznikají v GC systému i jeho degradační produkty, které se rovněž vážou na aktivní místa a tak pomáhají ke zlepšení tvaru píků mnoha pesticidů, z důvodů odlišné retence ve srovnání s laktonem a tak se eluční profil laktonu a jeho degradačních produktů překrývá s retenčními časy většiny pesticidů.

Jako nejúčinnější pro použití s metodou QuEChERS se ukázala směs 3-ethoxy-1,2-propandiolu ($10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), γ -laktonu kyseliny L-gulonové ($1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a D-sorbitolu ($1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) [15]. 3-Ethoxy-1,2-propandiol zajišťuje vhodnou ochranu nejdříve se eluujícími analyty, jeho eluční profil se překrývá s γ -laktonem kyseliny L-gulonové a k ochraně nakonec se eluujícími analyty slouží D-sorbitol.

Literatura

- [1] F.E. Ahmed, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2001**, 20, 649–661.
- [2] J. Zrostlíková, J. Hajšlová, M. Godula, K. Maštovská, *J. Chromatogr. A* **2001**, 937, 73–86.
- [3] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Štajnbaher, F.J. Schenck, *J. AOAC Int.* **2003**, 86, 412–431.
- [4] S.J. Lehotay, K. Maštovská, A.R. Lightfield, *J. AOAC Int.* **2005**, 88, 615–629.
- [5] J. Hajšlová, J. Zrostlíková, *J. Chromatogr. A* **2003**, 1000, 181–297.
- [6] H.J. Stan, H.M. Müller, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* **1988**, 11, 140–143.
- [7] H.M. Müller, H.J. Stan, *J. High Resolut. Chromatogr.* **1990**, 13, 697–701.
- [8] H.M. Müller, H.J. Stan, *J. High Resolut. Chromatogr.* **1990**, 13, 759–763.
- [9] D.R. Erney, A.M. Gillespie, D.M. Gilvydis, *J. Chromatogr.* **1993**, 638, 57–63.
- [10] M. Anastassiades, K. Maštovská, S.J. Lehotay, *J. Chromatogr. A* **2003**, 1015, 163–184.
- [11] F.J. Schenck, S.J. Lehotay, *J. Chromatogr. A* **2000**, 868, 51–61.

- [12] D.R. Erney, T.M. Pawlowski, C.F. Poole, *J. High Resolut. Chromatogr.* **1997**, *20*, 375–378.
- [13] V. Kocourek, J. Hajšlová, K. Holadová, J. Poustka, *J. Chromatogr. A* **1998**, *800*, 297–304.
- [14] E. Soboleva, N. Rathor, A. Mageto, Á. Ambrus, v knize: Principles and Practices of Method Validation. str. 138, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2000
- [15] T. Čajka, K. Maštovská, S.J. Lehotay, J. Hajšlová, *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 1048–1060.

Poděkování

Tato studie byla realizována v rámci projektu FRVŠ G4-1238 (2005) a výzkumného záměru MSM 604 613 73 05.