

Politechnika Gdańska  
Wydział Chemiczny  
Katedra Chemii Analitycznej

Rozprawa doktorska

**NOWE METODYKI DO BADAŃ SKŁADNIKÓW OBCYCH  
W MIODACH PSZCZELICH**

Maciej Wojciech Kujawski

Promotor: prof. dr hab. inż. Jacek Namieśnik

Gdańsk 2011

## ***Dziękuję***

*PANU PROF. DR HAB. INŻ. JACKOWI NAMIEŚNIKOWI*  
*za umożliwienie realizacji niniejszego tematu pracy, poświęcony czas,*  
*cierpliwość, wyrozumiałość i zaufanie jakim mnie obdarzył, oraz za cenne*  
*uwagi i mobilizację w trakcie realizacji tej pracy*

*PANI DR HAB. INŻ. AGACIE KOT-WASIK*  
*oraz PANU DR HAB. INŻ. PIOTROWI KONIECZCE*  
*za cenne uwagi i sugestie podczas realizacji tej pracy*

*PRACOWNIKOM, KOLEŻANKOM I KOLEGOM*  
*Z KATEDRY CHEMII ANALITYCZNEJ,*  
*a w szczególności z pokoiów 224 i 011,*  
*za inspirujące naukowe dyskusje i stworzenie miłej atmosfery pracy*

*MINISTERSTWU NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO*  
*za wsparcie finansowe w realizacji badań*

*RODZINIE I PRZYJACIOŁOM*  
*za nieustające wsparcie i wiarę w moje możliwości*

---

## *Spis treści*

---

Streszczenie	6
Wykaz skrótów i akronimów stosowanych w pracy	7
<b>Wstęp</b>	<b>10</b>
<b>I. CZĘŚĆ LITERATUROWA</b>	<b>11</b>
2.1 Tytułem wprowadzenia	11
2.1.1 Charakterystyka miodu	11
2.1.2 Lecznicze właściwości miodu	13
2.2 Drogi zanieczyszczenia miodu	14
2.3 Podstawowe typy badań analitycznych miodu pszczelego	15
2.4 Etapy przygotowania próbek miodu do analizy	17
2.4.1 Reprezentatywność	18
2.4.2 Przechowywanie	18
2.4.3 Wstępne przygotowanie próbek	19
2.4.4 Ekstrakcja analitów	19
2.4.5 Oczyszczanie/ wzbogacanie ekstraktów	19
2.5 Techniki ekstrakcji wykorzystywane w przygotowaniu próbek miodu do oznaczania zanieczyszczeń	20
2.5.1 Destylacja próbek miodu	21
2.5.2 Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (SE)	21
2.5.3 Ekstrakcja do fazy stałej (SPE)	22
2.5.4 Ekstrakcja analitów z próbki zmieszanej z fazą stałą (MSPD)	23
2.5.5 Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPME)	23
2.5.6 Ekstrakcja z wykorzystaniem ruchomego elementu sorpcyjnego (SBSE)	25
2.5.7 Dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz-ciecz (DLLME)	26
2.5.8 Zalety i wady niektórych technik ekstrakcji	29
2.6 Kompleksowe podejście do etapu przygotowania próbek do analizy	30
2.6.1 Ekstrakcja ciecz-ciecz z wykorzystaniem złoża stałego sorbentu (SLE)	30
2.6.2 Podejście QuEChERS	31
2.7 Podsumowanie	32
2.8 Wykorzystanie technik chromatograficznych do oznaczania śladowych ilości zanieczyszczeń	35
2.8.1 Techniki instrumentalne wykorzystywane w metodykach analitycznych przeznaczonych do jednoczesnego oznaczania pozostałości wielu ksenobiotyków w badanych próbkach	35
<b>II. CEL I ZAKRES PRACY</b>	<b>38</b>
<b>III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA</b>	<b>39</b>

3. Charakterystyka materiałów i metod badawczych	39
3.1 Odczynniki i wzorce	39
3.2 Roztwory wzorcowe	41
3.3 Aparatura	41
3.4 Kryteria wyboru i charakterystyka analitów	42
3.5 Charakterystyka badanych próbek	42
3.6 Opracowanie nowych procedur analitycznych – uwagi ogólne	42
4. Metodyki oznaczania pozostałości pestycydów w próbkach miodu pszczelego	46
5. Analiza chromatograficzna	48
<b>IV. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE</b>	<b>53</b>
6. Wyznaczenie optymalnych parametrów proponowanych procedur analitycznych	53
6.1 Wyznaczenie optymalnych warunków chromatograficznych oznaczania pozostałości wybranych pestycydów techniką chromatografii cieczowej	53
6.1.1 Optymalizacja parametrów pracy spektrometrów mas	53
6.1.2 Ustalenie optymalnych warunków procesu rozdzielania chromatograficznego	55
6.2 Optymalizacja parametrów pracy urządzenia GC-MS wykorzystywanego podczas oznaczania pozostałości wybranych pestycydów chloroorganicznych w próbkach miodu pszczelego	59
6.3 Optymalizacja warunków ekstrakcji analitów	60
6.3.1 Technika SLE	60
6.3.2 Podejście QuEChERS	61
6.3.3 Optymalizacja warunków ekstrakcji wybranych pestycydów chloroorganicznych techniką DLLME z wykorzystaniem metod chemometrycznych	61
7. Wyznaczenie podstawowych parametrów walidacyjnych opracowanych metodyk oznaczania pozostałości pestycydów i ich metabolitów w próbkach miodu pszczelego	64
7.1. Zakres pomiarowy i liniowość metodyk	65
7.2. Wydajność ekstrakcji i powtarzalność	67
7.3. Sposoby wyznaczania granic wykrywalności i oznaczalności dla metodyk	71
7.3.1 Podejście dwuetapowe	73
7.3.2 Podsumowanie metod wyznaczania wartości liczbowych granic wykrywalności i oznaczalności	75
7.4. Granice wykrywalności i oznaczalności właściwe dla opracowanych metodyk analitycznych	76
8. Zastosowanie opracowanych metodyk do oznaczania pozostałości pestycydów i ich metabolitów w próbkach rzeczywistych	78

<b>V. PODSUMOWANIE I WNIOSKI</b>	84
<b>VI. LITERATURA</b>	86
<b>VII. DOROBEK NAUKOWY</b>	91
Abstract	93
Załączniki	94

## Streszczenie

Pszczoły, zbierając nektar, pyłek kwiatowy i spadź narażone są na częsty kontakt ze szkodliwymi substancjami (stosowanymi w rolnictwie) osadzonymi na roślinach i przenoszą te zanieczyszczenia - na powierzchni ciała lub wraz z pożytkami - do ula, i w konsekwencji zanieczyszczenia przedostają się do miodu. Tak więc miód pszczeli może być zanieczyszczony w wyniku różnych zabiegów związanych z praktyką pszczelarską, lub, w sposób pośredni, przez ksenobiotyki występujące w środowisku oraz w wyniku zabiegów związanych z działalnością rolniczą.

W związku z możliwością zanieczyszczenia miodu przez pestycydy należące do różnych klas związków chemicznych, pomocne okazuje się stosowanie metodyk analitycznych umożliwiających oznaczanie szerokiego spektrum analitów z jednej próbki i w jednym cyklu analitycznym. Pozwalają one zaoszczędzić czas i środki finansowe dzięki możliwości stosowania mniejszych objętości rozpuszczalników w porównaniu do tradycyjnych technik ekstrakcji (takich jak np. ekstrakcja ciec-ciecz), przez co są też mniej uciążliwe dla środowiska.

Obecnie na polskim rynku dopuszczonych do obrotu handlowego oraz stosowania i/lub znajdujących się w użytku jest łącznie ok. 860 preparatów będących środkami ochrony roślin, zawierających w sumie w swoim składzie ponad 270 organicznych substancji aktywnych. Około 70 z nich posiada ustalone przez Unię Europejską wartości najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości (NDP) w miodzie pszczelim. Podczas opracowywania nowych metodyk skupiono się na tych właśnie pestycydach.

Przedstawione i omówione zastały wyniki badań nad opracowaniem, optymalizacją i walidacją nowych metodyk analitycznych umożliwiających równoczesne oznaczanie pozostałości środków ochrony roślin w miodzie pszczelim z wykorzystaniem technik LC-MS/MS oraz GC-MS na etapie identyfikacji oraz oznaczeń ilościowych.

## Wykaz skrótów i akronimów stosowanych w pracy

Skrót	Termin Anglojęzyczny	Termin polskojęzyczny
11-OH	<i>1-Undecanol</i>	1-undekanol
5-HMF	<i>5-Hydroxymethylfurfural</i>	5-hydroksymetylofurfural
ACN	<i>Acetonitrile</i>	Acetonitryl
AED	<i>Atomic Emission Detector</i>	Detektor emisji atomowej
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionisation</i>	Jonizacja chemiczna w ciśnieniu atmosferycznym
C <sub>18</sub>	<i>Octadecylated Silica Bounded Stationary Phase</i>	Faza stacjonarna (C <sub>18</sub> ) związana na powierzchni krzemionki
C <sub>18</sub> -PFP	<i>Pentafluorophenyl-Octadecylated Silica Bounded Stationary Phase</i>	Faza stacjonarna (C <sub>18</sub> -PFP) związana na powierzchni krzemionki
C <sub>8</sub>	<i>Octasilyl Silica Bounded Stationary Phase</i>	Faza stacjonarna (C <sub>8</sub> ) związana na powierzchni krzemionki
CC	<i>Column Chromatography</i>	Chromatografia kolumnowa
CE	<i>Collision Energy</i>	Energia zderzeń
CEM	<i>Continuous Electron Multiplier</i>	Powielacz elektronowy
CLD	<i>Chemiluminescence Detector</i>	Detektor chemiluminescencyjny
CME-UABE	<i>Coacervative Microextraction Ultrasound-Assisted Back-Extraction</i>	(Technika) mikroekstrakcji micelarnej z wtórną ekstrakcją do rozpuszczalnika, wspomaganą ultradźwiękami
CV	<i>Coefficient of Variation</i>	Współczynnik zmienności
DAD	<i>Diode Array Detector</i>	Detektor z matrycą fotodiodową
DI-SPME	<i>Direct Immersion - Solid Phase Microextraction</i>	Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej zanurzonej bezpośrednio w roztworze
DLLME	<i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>	Dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz-ciecz
DP	<i>Declustering Potential</i>	Potencjał, pod wpływem którego następuje rozgrupowanie klastrów
dSPE	<i>Dispersive SPE</i>	SPE w wersji dyspersyjnej
DT	<i>Dwell Time</i>	Czas monitorowania poszczególnych jonów
ECD	<i>Electron Capture Detector</i>	Detektor wychwytu elektronów
EI	<i>Electron Impact</i>	Jonizacja w strumieniu elektronów
ELOQ	<i>Estimated Limit of Quantification</i>	Oszacowana granica oznaczalności
EMV	<i>Electron Multiplier Voltage</i>	Napięcie na powielaczu elektronowym
ER	<i>Efficiency of Recovery</i>	Wydajność ekstrakcji
F-AAS/AES	<i>Flame-Atomic Absorption Spectrometry/Atomic Emission Spectrometry</i>	Płomieniowa Absorpcyjna Spektrometria Atomowa/ Emisyjna Spektrometria Atomowa
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i>	Analiza przepływowo-nastrzykowa
FLD	<i>Fluorescence Detector</i>	Detektor fluorymetryczny
Frag	<i>Fragmentor (voltage)</i>	Napięcie fragmentujące
GC	<i>Gas Chromatography</i>	Chromatografia gazowa

GLC	<i>Gas-Liquid Chromatography</i>	Chromatografia gazowa z ciekłą fazą stacjonarną
HSSE	<i>Head-Space Sorptive Extraction</i>	Ekstrakcja z fazy nadpowierzchniowej z wykorzystaniem elementu sorpcyjnego
HS-SPME	<i>Head-Space Solid Phase Microextraction</i>	Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej
IC	<i>Ion Chromatography</i>	Chromatografia jonowa
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry</i>	Spektrometria mas z jonizacją w plazmie wzbudzonej indukcyjnie (technika)
IDL	<i>Instrumental Detection Limit</i>	Granica wykrywalności urządzenia kontrolno-pomiarowego
IQL	<i>Instrumental Quantification Limit</i>	Granica oznaczalności urządzenia kontrolno-pomiarowego
ITMS	<i>Ion-Trap Mass Spectrometry</i>	Detektor MS z pułapką jonową
KE	<i>European Commission</i>	Komisja Europejska
LC	<i>Liquid Chromatography</i>	Chromatografia cieczowa
LC-ESI-MS/MS	<i>Liquid Chromatography Coupled With Electrospray Ionisation Tandem Mass Spectrometer</i>	Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrem mas z jonizacją przez rozpylanie w polu elektrycznym
LC-UV-DAD	<i>Liquid Chromatography Coupled With Ultraviolet-Diode Array Detector</i>	Chromatografia cieczowa sprzężona z detektorem UV i szeregiem diod
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i>	Ekstrakcja ciecz-ciecz
LLMV	<i>Lower Limit of Method Validation</i>	Najniższy poziom stężenia dla którego przeprowadzono walidację metodyki
LOD	<i>Limit of Detection</i>	Granica wykrywalności
LOQ	<i>Limit of Quantification</i>	Granica oznaczalności
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i>	Jonizacja poprzez desorpcję analitów z próbki wiązką lasera
MDL	<i>Method Detection Limit</i>	Granica wykrywalności metodyki analitycznej
MQL	<i>Method Quantification Limit</i>	Granica oznaczalności metodyki analitycznej
MRL (ang.)	<i>Maximum Residue Level</i>	Najwyższy Dopuszczalny Poziom Pozostałości
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>	Monitorowanie wielu reakcji (charakterystycznych przejść fragmentacyjnych) równolegle (tryb pracy tandemowego spektrometru mas)
MS	<i>Mass Spectrometry</i>	Spektrometria mas
MSPD	<i>Matrix Solid-Phase Dispersion</i>	Ekstrakcja do fazy stałej zdyspergowanej w matrycy
NDP (pl.)	<i>Maximum Residue Level</i>	Najwyższy Dopuszczalny Poziom Pozostałości
NPD	<i>Nitrogen-Phosphorous Detector</i>	Detektor termojonowy



NP-HPLC	<i>Normal Phase High Proficiency Liquid Chromatography</i>	Wysokosprawna chromatografia cieczowa w normalnym układzie faz
OCp	<i>Organochlorine Pesticides</i>	Pestycydy chloroorganiczne
OPp	<i>Organophosphate Pesticides</i>	Pestycydy fosforoorganiczne
P&T	<i>Purge &amp; Trap</i>	Wypłukiwanie z jednoczesnym zatrzymywaniem analitów
PAH/WWA	<i>Polynuclear Aromatic Hydrocarbons/ Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>	Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne
PBDE	<i>Polibromodiphenyl Ether</i>	Polibromowy eter difenylowy
PCB	<i>Polichlorinated Biphenyls</i>	Polichlorowane bifenyle
PDMS/DVB	<i>Polidimethylsiloxane/Divinylbenzene</i>	Kopolimer polidimetylosiloksan/diwinylobenzen
PF	<i>Preconcentration Factor</i>	Współczynnik wzbogacenia
POISe	<i>Programmable Optimised Injection Sequence</i>	Programowalna zoptymalizowana sekwencja nastrzyku
PSA	<i>Primary-Secondary Amine</i>	Amina pierwszo-, drugorzędowa
PTFE	<i>Poly(tetrafluoroethylene)</i>	Poli(tetrafluoroetylen)
QMS	<i>Quadrupole Mass Spectrometry (Detector)</i>	Kwadrupolowy spektrometr mas (detektor)
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe (Methodology)</i>	Szybka, Łatwa, Tania, Wydajna, Odporna, Bezpieczna (metodologia)
RMSE	<i>Root Mean Square Error</i>	Pierwiastek błędu średniokwadratowego
RP-HPLC	<i>Reversed Phase High Proficiency Liquid Chromatography</i>	Wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz
RPM	<i>Revolutions Per Minute</i>	Obrotów na minutę
S/N	<i>Signal-To-Noise Ratio</i>	Stosunek sygnału do szumu
SBSE	<i>Stir-Bar Sorptive Extraction</i>	Ekstrakcja z wykorzystaniem ruchomego elementu sorpcyjnego
SE	<i>Solvent Extraction</i>	Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika
SIM	<i>Selected-Ion Monitoring</i>	Monitorowanie wybranych jonów
SLE	<i>Solid-Supported Liquid-Liquid Extraction</i>	Ekstrakcja ciecz-ciecz z wykorzystaniem złoża stałego sorbentu
SME	<i>Solvent Microextraction</i>	Mikroekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>	Ekstrakcja do fazy stałej
SPME	<i>Solid Phase Microextraction</i>	Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej
TOF	<i>Time Of Flight</i>	Analizator czasu przelotu
TST	<i>Total Scan Time</i>	Długość cyklu monitorowania
VWD	<i>Variable Wavelength Detector</i>	Detektor o zmiennej długości fali światła

## WSTĘP

Ze względu na skład chemiczny i właściwości lecznicze miód jest uznawany za cenny produkt spożywczy. Pszczoły zbierając nektar i pyłek roślin kwiatowych mają nieustanny kontakt ze środowiskiem: siadają na roślinach, glebie, pobierają wodę. Wraz z tymi pożytkami mogą przynosić do ula różne zanieczyszczenia, zatem kontrola jakości pozyskiwanego miodu jest niezmiernie ważna.

Miód jest produktem pochodzenia zwierzęcego i zgodnie z prawodawstwem europejskim należy w nim oznaczać pozostałości ksenobiotyków, dla których określono wartości najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości oraz związki, których obecność jest niedozwolona.

Coraz ostrzejsze wymagania prawne w zakresie jakości żywności sprawiają, że stosowane metodyki muszą cechować się coraz lepszą charakterystyką metrologiczną odnośnie możliwości wykrywania, identyfikacji i ilościowego oznaczania ksenobiotyków występujących w badanych próbkach nawet na bardzo niskich poziomach zawartości.

Jest to szczególnie istotne w przypadku oznaczania ksenobiotyków stwarzających poważne zagrożenie dla życia ludzkiego (takich jak substancje toksyczne, związki endokrynnie czynne, kancerogenne czy potencjalnie genotoksyczne), do których należą również pestycydy. W przypadku metodyk oznaczania tych ostatnich w żywności oraz paszy walidację przeprowadza się zgodnie z wytycznymi dokumentu SANCO/10684/2009.

Ochrona zdrowia oraz dążność do coraz lepszego i głębszego poznania poszczególnych elementów środowiska i procesów w nich zachodzących stanowią siłę napędową prac ukierunkowanych na opracowywanie nowych metodyk, bardziej przyjaznych środowisku, charakteryzujących się ograniczonym zużyciem rozpuszczalników organicznych, a nawet zastosowaniem bezrozpuszczalnikowych technik ekstrakcji. Takie podejście wynika z założeń zielonej chemii analitycznej.

W związku z możliwością zanieczyszczenia miodu przez pestycydy należące do różnych klas związków chemicznych, pomocne okazuje się stosowanie metodyk analitycznych umożliwiających oznaczanie szerokiego spektrum analitów z jednej próbki i w jednym cyklu analitycznym.

Istotnym elementem takich procedur jest etap przygotowania próbek do analizy, którego głównym zadaniem jest:

- zmiana matrycy na mniej złożoną;

- ekstrakcja (izolacja) analitów;
- usunięcie związków przeszkadzających (interferentów).

Z tego też powodu, techniki zapewniające możliwość skutecznej ekstrakcji pozostałości wielu ksenobiotyków o różnym charakterze chemicznym cieszą się dużym zainteresowaniem. Pozwalają one zaoszczędzić czas i środki finansowe dzięki możliwości stosowania mniejszych objętości rozpuszczalników w porównaniu do tradycyjnych technik ekstrakcji (takich jak np. ekstrakcja ciecz-ciecz), przez co są też mniej uciążliwe dla środowiska.

Obecnie na polskim rynku dopuszczonych do obrotu handlowego oraz stosowania jest łącznie ok. 860 preparatów będących środkami ochrony roślin, zawierających w sumie w swoim składzie ponad 270 organicznych substancji aktywnych [1]. Dla około 70 z nich ustalono (w Unii Europejskiej) wartości liczbowe NDP w miodzie pszczelim [2]. Podczas opracowywania nowych metodyk skupiono się na tych właśnie pestycydach.

Poniżej przedstawiona zostanie charakterystyka miodu, jego właściwości jak również możliwe drogi zanieczyszczenia miodu. Omówione zostaną techniki ekstrakcji najczęściej wykorzystywane w praktyce analitycznej do izolacji i wzbogacania ksenobiotyków obecnych w badanych próbkach miodu przed etapem oznaczeń końcowych oraz wyzwania związane z poszczególnymi etapami pracy analityka.

## I. CZĘŚĆ LITERATUROWA

### 2.1 Tytułem wprowadzenia

#### 2.1.1 Charakterystyka miodu

Miód jest wytwarzany przez pszczoły z nektaru kwiatowego, spadzi (substancji wydalananej przez mszyce i czerwce żerujące na drzewach) lub obu tych substancji. Proces przekształcania nektaru lub spadzi w miód (zwany dojrzewaniem miodu) przebiega w organizmach pszczół, a następnie w woskowych plastrach w ulu. Podczas tego procesu zachodzi odparowanie wody oraz szereg przemian biochemicznych (m.in. enzymatyczny rozkład sacharozy na glukozę i fruktozę) [3].

Zgodnie z zapisami zawartymi w Dyrektywie Rady 2001/110/WE miód jest naturalnie słodką substancją produkowaną przez pszczoły (*Apis mellifera*) z nektaru roślin lub wydzielin żywych części roślin, lub wydzielin owadów wysysających żywe części roślin, zbieranych przez pszczoły, przerabianych przez łączenie specyficznych substancji z pszczół, składanych, odwodnionych, gromadzonych i pozostawionych w plastrach miodu do dojrzewania [4].

Z chemicznego punktu widzenia miód jest wysoce higroskopijnym i przesyconym wodnym roztworem cukrów. Natomiast z analitycznego punktu widzenia miód trzeba traktować jako obiekt materialny charakteryzujący się złożonym i zmiennym składem matrycy. Jego skład w dużym stopniu zależy od gatunku rośliny, z której zbierany był nektar lub spadź, jak również od takich czynników jak warunki środowiskowe, klimat czy ingerencje pszczelarza [5,6]. W różnych odmianach miodu zidentyfikowano ponad 300 substancji należących do kilkunastu grup związków chemicznych. Przeciętny skład miodu przedstawiono w **Tabeli 1.** [3].

Tabela 1. Skład procentowy (% m/m) miodu

Składnik	Udział w masie (wartości przeciętne)
Woda	17 - 18 %
Cukry (suma)	78 %
- fruktoza	37 %
- glukoza	30 %
- sacharoza	1 %
- disacharydy	8 %
- polisacharydy	2 %
Kwasy organiczne	0,5 – 1,2 %
- kwas glukonowy	
- kwas cytrynowy	
- kwas maleinowy	
- kwas bursztynowy	
- kwas mrówkowy	
Enzymy	2 %
- inwertaza	
- oksydaza glukozy	
- katalaza	
- $\alpha$ - i $\beta$ -amylaza	
- inhibina (ma działanie antybiotyczne)	
Biopierwiastki, przede wszystkim sole potasu	0,2 %
Białka i aminokwasy	0,03 %
Pyłek kwiatowy i substancje mineralne	1 %

Charakterystycznym związkiem, powstającym na skutek rozpadu cukrów prostych, głównie fruktozy jest 5-hydroksymetylofurfural – jego wysoka zawartość jest wskaźnikiem przechowywania miodu w nieodpowiednich warunkach. Ważnymi składnikami miodu są enzymy, pochodzące głównie z wydzieliny gruczołów ślinowych pszczół. Miód zawiera także związki o charakterze hormonalnym, pochodzenia roślinnego i pszczelego [np. acetylocholina (w ilości do 5  $\mu\text{g/g}$  miodu) oraz jej prekursor - wolna cholina]. Wśród innych składników wyróżnia się flawonoidy, antocyjany, witaminy (w niewielkiej ilości; pochodzą one głównie z pyłku kwiatowego i mleczka pszczelego obecnych w miodzie), olejki eteryczne, pigmenty, sterole i fosfolipidy [3].

### 2.1.2 Lecznicze właściwości miodu

Od czasów starożytnych miód wykorzystywano w leczeniu niektórych chorób układu oddechowego i leczeniu ran, potem o jego dobroczynnych właściwościach zapomniano, by w połowie ubiegłego stulecia na nowo „odkryć” jego istotną rolę w leczeniu oparzeń, problemów żołądkowo-jelitowych, astmy, zakażonych ran i owrzodzeń [7,8]. Stosuje się go także w leczeniu niektórych chorób układu oddechowego, ponadto działa on stymulująco na układ odpornościowy. Przeciwutleniacze znajdujące się w miodzie to witamina C, chryzyna, katalaza, pinobanksyna, pinocembryna. Odkryciem o dużym znaczeniu jest potwierdzenie przeciwbakteryjnego działania miodu [np. 9-11]. Aktywność przeciwbakteryjna miodu jest związana z takimi jego właściwościami jak [12-16]:

- ❖ silne oddziaływanie pomiędzy cząsteczkami cukru i wody, wynikające z tego, że miód jest przesyconym roztworem cukru. Efekt osmotyczny pozostawia niewiele cząsteczek wody mogących podtrzymać wzrost mikroorganizmów. Szybkość zahamowania wzrostu zależy od stężenia miodu i od rodzaju bakterii;
- ❖ kwasowość – pH miodu na poziomie 3,2 - 4,5 jest wystarczająca by zahamować wzrost większości mikroorganizmów;
- ❖ obecność nadtlenku wodoru, powstającego w reakcji utleniania glukozy do kwasu glukonowego przez oksydazę glukozy;
- ❖ obecność substancji fitochemicznych (tzn. biologicznie czynnych składników pochodzenia roślinnego).

Nałożony na powierzchnię uszkodzonej tkanki miód ulega rozcieńczeniu dobrze zbuforowanymi płynami ustrojowymi biorcy. W wyniku tego procesu maleje efekt osmotyczny i kwasowość miodu. Rozcieńczanie nie ma wpływu na działanie większości czynników fitochemicznych, natomiast aktywność nadtlenku wodoru wzrasta 2,5 – 50 razy.

Miód działa hamująco na wzrost większości bakterii, również na niektóre szczepy gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) odporne na działanie metycyliny. To czyni z miodu atrakcyjny środek do stosowania nie tylko w celu zapobiegania i leczenia infekcji w ranach przewlekłych [15,17], ale również do leczenia ran ostrych. W przeciwieństwie do wielu konwencjonalnych chemoterapeutyków miód może być stosowany nieprzerwanie, ponieważ nie prowadzi to do powstania bakterii odpornych na działanie antybiotyku.

## 2.2 Drogi zanieczyszczenia miodu

Lecznicze właściwości miodu mogą być osłabione przez substancje obce, które dostały się do miodu z następujących źródeł:

- środowisko (ekotoksyny),
- praktyki rolnicze i pszczelarskie,
- przetwarzanie i przechowywanie miodu.

Wzrost intensywności chemizacji rolnictwa związany z dążnością do sprostania większemu zapotrzebowaniu na plony oraz stosowanie pestycydów do zwalczania chorób roślin czy antybiotyków w przypadku zwierząt, może prowadzić do skażenia plonów i produktów spożywczych, w tym również miodu wytwarzanego przez pszczoły.

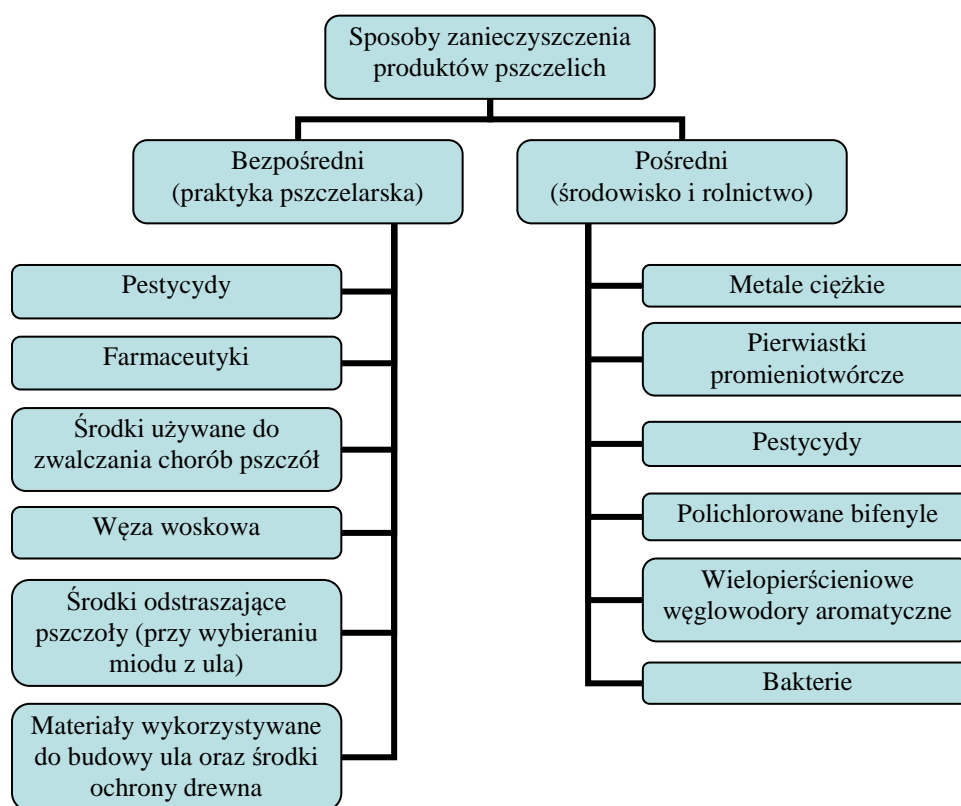
Rodzaj zanieczyszczeń oraz możliwe drogi ich transportu [18] przedstawiono na **Rysunkach 1. i 2.**



Rysunek 1. Schemat przedstawiający możliwe drogi transportu zanieczyszczeń do produktów pszczelich

Większość środków ochrony roślin jest rozpylana nad polami uprawnymi, plantacjami i lasami, a więc trafia bezpośrednio do środowiska. W ten sposób pestycydy mogą być przemieszczane przez wiatr na sąsiednie tereny, gdzie obecność tych środków jest zbędna lub szkodliwa. Pestycydy te, zarówno w postaci niezmienionej, jak i w postaci produktów rozpadu lub metabolitów mogą przenikać do gleb, wód, powietrza, czyli całego środowiska. Skażeniu może ulec też żywność i pasze, które będą stanowiły zagrożenie dla ludzi i zwierząt. Pestycydy przedostają się do wód m. in. poprzez spływ powierzchniowy z terenów rolniczych, z oprysków samolotami, ze ściekami miejskimi czy z zakładów, które stosują pestycydy. Przedostają się one również do zbiorników wodnych dzięki opadom atmosferycznym. Do punktowych źródeł zanieczyszczeń pestycydami należą nieszczelne i źle zlokalizowane mogilniki, osady denne, ścieki powstające podczas mycia urządzeń, które służyły do oprysku roślin. Pestycydy mogą powtórnie wracać do środowiska w wyniku

procesów życiowych organizmów, które przetwarzają te związki na bardziej toksyczne lub uwalniają je z osadów dennych, gdzie ulegają akumulacji [19].



Rysunek 2. Schemat obrazujący rodzaje zanieczyszczeń w zależności od sposobu ich transportu do produktów pszczelich

### 2.3 Podstawowe typy badań analitycznych próbek miodu pszczelego

Wzrastające zanieczyszczenie środowiska, wpływające praktycznie na cały ekosystem (ludzi, klimat, wodę, powietrze, glebę, rośliny, zwierzęta), jak również na jakość pożywienia, stało się poważnym problemem i spowodowało konieczność wykonywania rutynowych analiz jakości produktów spożywczych. Próbkę miodu poddaje się badaniom w celu wykrycia i oznaczenia zawartości różnych składników z trzech głównych powodów:

- kontroli jakości miodu pod względem spełnienia wymagań normatywnych;
- określania profili składu chemicznego miodu, celem zidentyfikowania markerów odmian miodu;
- wykrycia, identyfikacji oraz ilościowego oznaczania wszelkiego rodzaju zanieczyszczeń.

Ponadto prowadzi się badania miodu pod kątem jego właściwości leczniczych i możliwych zastosowań w dziedzinie medycyny. Dotychczas dowiedziono m.in. skutecznego działania

miodu w leczeniu ran przewlekłych i ostrych, a w ostatnim czasie przedstawiono obiecujące wyniki dotyczące jego aktywności przeciwnowotworowej [20-28].

Podczas badania jakości miodów oznaczane są takie parametry jak [29]:

- zawartość wody;
- zawartość cukrów redukujących oraz sacharozy z melecytozą;
- zawartość 5-HMF;
- zawartość proliny;
- liczba diastazowa;
- przewodność właściwa;
- pH i zawartość wolnych kwasów;
- zawartość arsenu, ołowiu, miedzi, cynku, cyny;
- zawartość zanieczyszczeń mechanicznych;
- obecność pozostałości farmaceutyków i stwierdzenie cech dyskwalifikujących;
- udział pyłku przewodniego;
- wymagania organoleptyczne (barwę, konsystencję, smak, zapach).

Dbając o jakość miodu i jego markę jako produktu naturalnego, zdrowego, mającego właściwości lecznicze, oprócz badania zawartości typowych składników miodu, ważne jest również prowadzenie badań analitycznych ukierunkowanych na wykrywanie pozostałości farmaceutyków i innych zanieczyszczeń. W przypadku wykrycia tych substancji w próbkach handlowych, w ilościach większych niż najwyższe dopuszczalne zawartości, wycofuje się daną partię miodu ze sprzedaży (tego typu badania są szczególnie ważne w przypadku importowania miodów i rozlewania ich w kraju).

Dzięki wynikom badań mających na celu zidentyfikowanie charakterystycznych składników poszczególnych miodów odmianowych możliwe staje się określenie odmianowości miodu z większym prawdopodobieństwem niż w przypadku metody oznaczania pyłku przewodniego, a tym samym z większą skutecznością można zapobiegać procederowi fałszowania odmian miodów.

Biorąc pod uwagę fakt, że pszczoły korzystają z pożytków znajdujących się w promieniu do 3 km od ula, z dużą dokładnością można określić źródło pochodzenia nektaru. Mając to na uwadze można wykorzystać produkty pszczele jako biowskaźniki zanieczyszczenia środowiska na danym obszarze. Ilość zanieczyszczeń występujących w nektarze jest znacznie większa od ilości tych samych zanieczyszczeń obecnych w miodzie, wytworzonym z tegoż nektaru, dzięki istotnej roli „filtrów zanieczyszczeń” jaką pełnią tu pszczoły (kropla nektaru zanim zostanie złożona w komórce plastra jest przeżuwana przez 32 pszczoły). Badając inne produkty pszczele oraz same pszczoły możliwe jest uzyskanie pełniejszego obrazu stanu zanieczyszczenia środowiska na danym terenie. I tak na przykład



miód można uznać za biowskaźnik zanieczyszczenia środowiska przez metale ciężkie [30] lub SO<sub>2</sub>, oznaczając jego zawartości w miodach pochodzących z uli rozmieszczonych w pewnej odległości od elektrowni węglowej [31].

#### 2.4 Etapy przygotowania próbek miodu do analizy

Na **Rysunku 3**, przedstawiono schematycznie wszystkie etapy procedur analitycznych stosowanych podczas oznaczania różnego rodzaju zanieczyszczeń w miodach. Ponieważ miód jest produktem pochodzenia biologicznego, procedury analityczne należy poddać procesowi walidacji zgodnie z *Decyzją Komisji 2002/657/WE wykonującą dyrektywę Rady 96/23/WE dotyczącą środków monitorowania niektórych substancji i ich pozostałości u żywych zwierząt i w produktach pochodzenia zwierzęcego*. Pozostałości, dla których określono wartości liczbowe NDP oraz związki, których obecność jest niedozwolona również należą do tej grupy zanieczyszczeń [32].



Rysunek 3. Ogólny schemat procedury analitycznej

Ze względu na fakt, że miód jest próbką o złożonej matrycy często konieczne jest przed etapem analizy przeprowadzenie odpowiednich operacji obróbki próbek miodu, które polegają głównie na ich oczyszczaniu w celu wyeliminowania związków przeszkadzających. Etap ten jest zwykle najbardziej czasochłonną i pracochłonną częścią całego toku postępowania analitycznego, jak również źródłem potencjalnych błędów. Konieczna jest walidacja metodyki, celem określenia wartości odzysku i powtarzalności oraz by uzyskać wyniki będące źródłem wiarygodnej informacji analitycznej.

Zwykle w skład etapu przygotowania próbki wchodzi takie działania jak homogenizacja, ekstrakcja i oczyszczanie przed końcowym oznaczeniem. W niektórych przypadkach, w zależności od charakteru oznaczanych związków i rodzaju detektora, może być konieczne przeprowadzenie derywatywacji.

Zasady „zielonej chemii analitycznej” i związane z tym względy środowiskowe i ekonomiczne sprawiają, że analitycy próbują opracować nowe metodyki analityczne umożliwiające stosowanie mniejszych próbek i zapewniające możliwość ograniczenia ilości rozpuszczalników potrzebnych do wykonania oznaczenia. Należy przy tym jednak pamiętać o tym że:

- należy zachować możliwość wykrycia śladowych ilości zanieczyszczeń, wymogu reprezentatywności próbki;
- bardziej wiarygodne wyniki otrzymuje się dla próbek o większej objętości/ masie [33].

Na każdym etapie przygotowania próbki miodu analityk musi radzić sobie z wieloma trudnościami, dbając przy tym o zapewnienie odpowiednich warunków prowadzenia wszystkich operacji i procesów wchodzących w skład metodyki analitycznej.

#### **2.4.1 Reprezentatywność**

Istotną rzeczą jest, by próbka była reprezentatywna, tzn. odzwierciedlała przeciętny skład całej partii miodu. Aby otrzymać reprezentatywną próbkę należy zhomogenizować próbkę laboratoryjną przez dokładne jej wymieszanie (co najmniej 3 minuty), należy przy tym uważać, by ilość powietrza wmieszanego do próbki była jak najmniejsza. Jeśli miód jest skryształizowany w twardą, zwartą masę można go zmiękczyć przez ogrzewanie odpowiednią grzałką lub w termostатовanej łaźni, w temperaturze nie większej niż 40°C [34].

#### **2.4.2 Przechowywanie**

Próbki miodu należy przechowywać w ciemnym i suchym pomieszczeniu, w temperaturze nie wyższej niż 18°C. Jednak nawet w takich warunkach może zachodzić degradacja pestycydów [35]. Próbki do oznaczeń na zawartość pestycydów należy przechowywać w pojemnikach z ciemnego szkła w temperaturze 2-4°C lub, w przypadku braku pojemników z ciemnego szkła, w temperaturze -20°C. Konieczne jest przechowywanie próbek w szczelnie zamkniętych pojemnikach szklanych, ponieważ zanieczyszczenia organiczne mogą wnikać w ścianki pojemników z tworzyw sztucznych i takie warunki przechowywania mogą być powodem fałszywie negatywnych wyników. Jako że miód jest silnie higroskopijny i łatwo wchłania zapachy, przechowywanie go z lotnymi związkami może powodować fałszywie pozytywne wyniki w oznaczaniu zanieczyszczeń. Dlatego dodatkowo należy go przechowywać w miejscach wolnych od obcych zapachów.

### **2.4.3 Wstępne przygotowanie próbek**

Przed etapem ekstrakcji próbki miodu są często rozpuszczane w wodzie lub odpowiednim buforze. Niekiedy w skład operacji przygotowania próbek wchodzi hydroliza mająca na celu przeprowadzenia oznaczanego związku z formy związanej z cukrem w formę wolną (np. przy oznaczaniu sulfonamidów stosuje się hydrolizę roztworem 1 M HCl) [36-38]. Taka operacja ułatwia również późniejsze oczyszczanie odpowiednich ekstraktów oraz wykrycie, identyfikację i ilościowe oznaczenie analitów. Na tym etapie należy dodać do próbki roztworów wzorca i/lub wzorca wewnętrznego.

### **2.4.4 Ekstrakcja analitów**

Bardzo często ekstrakcja analitów jest kluczowym etapem przygotowania próbki. Pozwala ona na wyizolowanie oznaczanych związków z pierwotnej matrycy i przeniesienie ich do innej, mniej złożonej i możliwie najbardziej odpowiedniej dla wybranej techniki oznaczeń końcowych. Może również pełnić rolę etapu oczyszczania, umożliwiając oczyszczenie próbki z przeszkadzających związków. W praktyce analitycznej stosuje się różne techniki ekstrakcji analitów i wykorzystuje się w nich różnice we właściwościach fizykochemicznych analitów i innych składników matrycy (np. polarność, powinowactwo do rozpuszczalników, hydrofobowość (rozpuszczalność), masa molowa i rozmiar cząsteczki, lotność). Bardzo ważny jest wybór właściwego rozpuszczalnika.

Większość technik ekstrakcji cieczy oparta jest na wykorzystaniu zjawiska podziału pomiędzy niemieszające się fazy. Techniki te można wykorzystać również do oczyszczania ekstraktów uzyskanych z ekstrakcji próbek stałych.

Podstawowe informacje o różnych technikach ekstrakcji wykorzystywanych w przygotowaniu próbek miodu do oznaczania zanieczyszczeń zostaną przedstawione w rozdziale 2.5.

### **2.4.5 Oczyszczanie/ wzbogacanie ekstraktów**

Głównym zadaniem procesu oczyszczania ekstraktu uzyskanego z próbki miodu jest usunięcie zanieczyszczeń wyekstrahowanych wraz z oznaczanymi związkami, ponieważ obecność tych zanieczyszczeń może powodować:

- błędy w oznaczeniu ilościowym – obecność składników matrycy może spowodować zmianę wydajności jonizacji analitów, ponadto wyniki mogą być zaniżone z powodu adsorpcji analitu w komórce dozownika lub w początkowej części kolumny (czoło

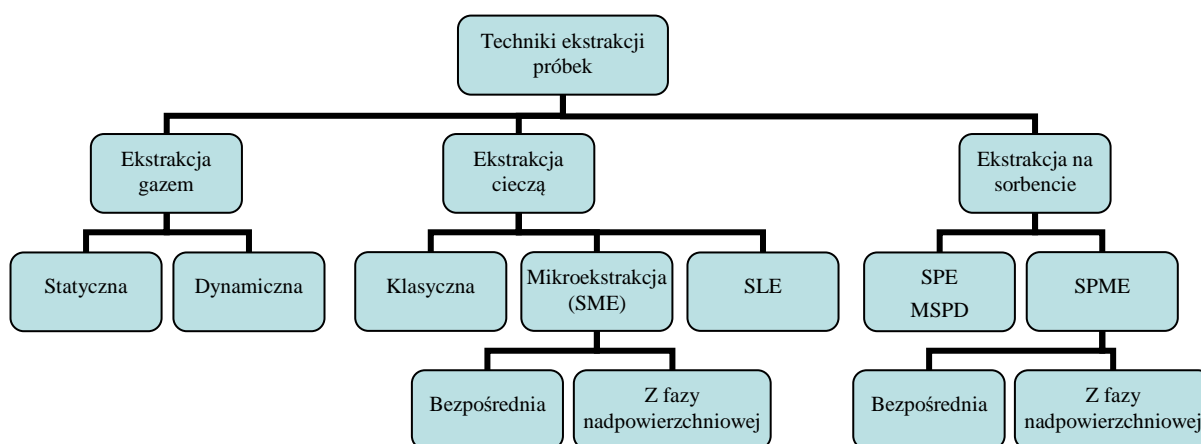
kolumny) do GC lub mogą być zawyżone z powodu nakładania się pików zanieczyszczeń na piki odpowiadające analitom;

- mylnie pozytywne wyniki z powodu pików zanieczyszczeń eluujących w „okienku” czasowym dla pików analitu, co może być jednak rozwiązane przez zastosowanie detektora mas w trybie monitorowania wybranych jonów (SIM);
- mylnie negatywne wyniki (spowodowane przesunięciem pików analitu poza „okienko” czasowe);
- szybkie niszczenie drogich kapilarnych kolumn chromatograficznych;
- okresy przestoju instrumentu spowodowane czyszczeniem i przebudowywaniem detektorów i źródła jonów.

Proces przygotowania próbki należy zoptymalizować, aby uzyskać możliwie duży odzysk analitów i jego dobrą powtarzalność. Ilość kroków procedury analitycznej powinna być możliwie najmniejsza, jako że każdy etap (czy też przeniesienie) może powodować straty oznaczanych związków. Mniejsza liczba kroków, w procesie przygotowania zapewnia mniejszą wartość niepewności i mniejszą możliwość wystąpienia źródeł błędów. Bardziej specyficzne ekstrakcje redukują potrzebę oczyszczania i możliwe straty analitów.

## 2.5 Techniki ekstrakcji wykorzystywane w przygotowaniu próbek miodu do oznaczania zanieczyszczeń

Ogólną klasyfikację technik ekstrakcji z próbek ciekłych i stałych przedstawiono schematycznie na **Rysunku 4**.



Rysunek 4. Klasyfikacja technik ekstrakcji analitów za stałych i ciekłych próbek charakteryzujących się złożonym składem matrycy.

### **2.5.1 Destylacja próbek miodu**

Jedną z najbardziej podstawowych technik ekstrakcyjnych (rozdzielania składników próbki) jest destylacja. Umożliwia ona rozdzielenie składników mieszaniny wykorzystując różnice we względnych prężnościach par i temperaturach wrzenia. Destylację próżniową można stosować do ekstrakcji próbek żywności [39], jednak jest ona czasochłonna i wymaga dużej ilości sprzętu laboratoryjnego, jak również dalszego etapu oczyszczania. Dlatego też destylację zwykle stosuje się w przypadku mieszanin związków wysokowrzących lub czystych roztworów. Oznaczanie lotnych składników jest częściej przeprowadzane z wykorzystaniem metod analizy par, takich jak analiza fazy nadpowierzchniowej lub destylacja z parą wodną [40]. Inne fizyczne techniki ekstrakcji analitów obejmują wymrażanie, strącanie białek, filtrację i odwirowanie (choć są one czasem uważane za techniki wstępnego przygotowania lub oczyszczania próbek).

### **2.5.2 Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (SE)**

Ekstrakcja roztworów wodnych próbek za pomocą rozpuszczalnika, czyli ekstrakcja ciecz-ciecz oparta jest na względnej rozpuszczalności analitu w dwóch niemieszających się ze sobą fazach i zależy od fizykochemicznej równowagi, wyrażanej poprzez współczynnik podziału [41]. Ekstrakcja analitu zachodzi dzięki różnicy w polarności (mocy rozpuszczającej) dwóch niemieszających się faz ciekłych.

Jest to jedna z najbardziej powszechnych technik ekstrakcji, w szczególności związków organicznych z próbek wody lub wodnych roztworów próbek. Zwykle przeprowadza się ją w rozdzielaczu, wytrząsając dwie niemieszające się fazy, powodując ich kontakt na zwiększonej powierzchni, a następnie pozwalając cieczom na rozdzielenie się. Każda z faz może być zebrana i poddana dalszej analizie. Często praktykuje się wielokrotną ekstrakcję celem zapewnienia możliwie ilościowego przeniesienia analitu do fazy odbierającej.

Problemy jakie mogą wyniknąć na tym etapie to:

- powstawanie emulsji podczas ekstrakcji ciecz-ciecz;
- straty oznaczanych związków spowodowane odparowaniem próbki do zbyt małej objętości (mniejszej niż objętość zalecana).

Z powstawaniem emulsji można poradzić sobie w różny sposób. W **Tabeli 2** zestawiono informacje o najczęściej stosowanych sposobach usuwania emulsji.

Tabela 2. Wybrane sposoby eliminacji emulsji stosowane podczas przygotowania próbek miodu do oznaczania w nich zanieczyszczeń.

Sposób	Uwagi
Dodatek małych ilości środków powierzchniowo czynnych celem obniżenia napięcia powierzchniowego (np. MeOH, EtOH, aceton).	Zabieg inwazyjny, wywołuje zmiany we właściwościach fizykochemicznych obu faz, co może być powodem zmiany wartości liczbowych odpowiednich współczynników podziału i w efekcie przesunąć równowagę podziału. W tej sytuacji może zachodzić potrzeba przedłużenia czasu ekstrakcji;
Rozbijanie emulsji ultradźwiękami	Sposób nieinwazyjny, czasochłonny, dający jednak akceptowalne rezultaty
Odwirowanie	Metoda nieinwazyjna, szybka i skuteczna
Po rozdzieleniu warstw, gdy emulsja znajduje się z fazą ekstrahentu, mieszaninę można wysuszyć bezwodnym Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (aktywowanym w 400°C przez 4 h).	Wymaga filtracji i przemycia Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> rozpuszczalnikiem użytym do ekstrakcji celem wymycia oznaczanych związków ze środka suszącego, poza tym może generować duże zużycie rozpuszczalnika
Wymrażanie po rozdzieleniu faz.	Woda zamarza, natomiast roztwór organiczny (ekstrakt z analitami) pozostaje ciekły i może zostać przeniesiony (przelany) do innego naczynia. Wymaga przemywania i może powodować duże zużycie rozpuszczalnika
Łagodne wytrząsanie, powodujące, że fazy stykają się ze sobą na zmniejszonej powierzchni, co można zrównoważyć wydłużonym czasem wytrząsania (np. 20 zamiast 10 minut).	Nie wprowadza się dodatkowych związków, a dłuższy czas pozwala na ustalenie się równowagi podziału pomiędzy fazami, zapewniając w ten sposób wydajną ekstrakcję. Jeżeli jednak użyty zostanie rozpuszczalnik umożliwiający ekstrakcję cukrów (np. octan etylu), mogą one być związane na Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> po rozdzieleniu faz.

### 2.5.3 Ekstrakcja do fazy stałej (SPE)

Proces ekstrakcji do fazy stałej polega na wykorzystaniu zjawiska sorpcji analitów z cieczy na ciele stałym, gdzie fazą ekstrahującą jest złożone stałego sorbentu. Podobnie jak w przypadku techniki SE zapewnia ona możliwość ilościowej ekstrakcji analitów, jest jednak techniką nierównowagową. Używana jest często do usuwania i wzbogacania śladowych ilości materiałów organicznych z próbek ciekłych lub roztworów. Wykorzystuje się do tego celu różnego typu materiały sorpcyjne. Jako najbardziej popularne można wymienić:

- fazy C<sub>8</sub> i C<sub>18</sub> związane na podłożu krzemionkowym;
- żywice polimerowe (kopolimer polistyren/diwinylobenzen);
- Florisil® (aktywowany krzemian magnezu);
- sorbenty polarne (tlenek glinu, węgiel aktywny, krzemionka ze związanymi grupami cyjanowymi i aminowymi);
- sorbenty jonowymienne, w których jonowe grupy funkcyjne, np. kwasy karboksylowe lub grupy aminowe są związane na sorbencie z krzemionki lub polimeru;
- sorbenty wielofunkcyjne, wykorzystujące zarówno główne jak i wtórne mechanizmy selektywnej retencji analitów.

Wymienione wyżej materiały sorpcyjne umożliwiają wykorzystanie oddziaływań opartych na adsorpcji, wiązaniu wodorowym, oddziaływaniach polarnych i niepolarnych,

wymianie kationów, anionów, wykluczeniu sterycznym. Na efektywność ekstrakcji analitów (w przypadku próbek żywności) można wpływać poprzez zmianę pH.

Ważnym parametrem do ustalenia na tym etapie, zaraz po wyborze rodzaju wypełnienia kolumny sorpcyjnej, jest wybór odpowiedniego rozpuszczalnika do kondycjonowania tej kolumny (który zwykle jest takim rozpuszczalnikiem jaki znajduje się w ekstrakcie) i właściwego eluentu. Typ wypełnienia kolumny ekstrakcyjnej do SPE zależy od rodzaju oznaczanych związków. Objętość próbki, którą wprowadza się do kolumny zależy od zawartości oznaczanych związków, jak również od pojemności ekstrakcyjnej sorbentu i wynosi zwykle 1-2 ml.

Określenie profilu elucji jest ważne ze względu na stwierdzenie, w której frakcji eluują oznaczane związki oraz jakiej objętości eluentu należy użyć.

#### **2.5.4 Ekstrakcja analitów z próbki zmieszanej z fazą stałą (MSPD)**

Opracowana w 1989 r. [42,43] technika równoczesnej ekstrakcji i oczyszczania, która eliminuje wady technik ekstrakcji rozpuszczalnikiem i klasycznej ekstrakcji do fazy stałej z próbek o niskiej zawartości wody (stałych lub półstałych). W przypadku tej techniki próbkę miesza się z adsorbentem (typowo faza C<sub>18</sub> lub Florisil), a następnie całość przenoszona jest do kolumny. Sorbent pełni tu kilka funkcji:

- działa jako czynnik zaburzający fizyczną strukturę próbki;
- adsorbuje składniki matrycy;
- pełni rolę stałego podłoża w kolumnie
- pozwala na frakcjonowanie próbki.

Po umieszczeniu mieszaniny w kolumnie prowadzi się elucję odpowiednim rozpuszczalnikiem, a ekstrakt można poddać analizie. Zanieczyszczenia i substancje przeszkadzające, takie jak pigmenty czy inne środki polarne (np. cukry) są zatrzymywane na sorbencie.

#### **2.5.5 Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPME)**

Jest to typowa bezrozpuszczalnikowa technika przygotowania próbki, w której wykorzystuje się włókno krzemionkowe, pokryte odpowiednią fazą stacjonarną, przymocowane do zmodyfikowanej strzykawki chromatograficznej. W przeciwieństwie do SPE jest techniką równowagową, która z założenia nie ma być techniką ekstrakcji całkowitej. Technika SPME służy do:

- pobierania próbek analitów z badanego medium z jednoczesnym wzbogacaniem analitów;
- wprowadzenia próbek do przyrządu kontrolno-pomiarowego, którym może być GC (z wykorzystaniem desorpcji termicznej) lub LC (z wykorzystaniem desorpcji za pomocą rozpuszczalnika).

Głównym czynnikiem wpływającym na wydajność ekstrakcji jest rodzaj fazy stacjonarnej, dobierany w zależności od analizowanych związków. Optymalnie dobrany typ pokrycia włókna ekstrakcyjnego zapewnia:

- poprawę odtwarzalności;
- obniżenie granic wykrywalności;
- zwiększenie zakresu liniowości metodyki;
- poprawę współczynnika korelacji liniowej;
- skrócenie czasu ekstrakcji;
- zmniejszenie ilości wyekstrahowanych zanieczyszczeń, co w efekcie daje lepszej jakości chromatogramy.

W praktyce nie jest konieczne osiągnięcie stanu równowagi ekstrakcyjnej, a zamiast tego ekstrakcje mogą być prowadzone przez określony czas [44]. Temperatura ekstrakcji, czas i szybkość mieszania próbki muszą być zoptymalizowane pod kątem danego zastosowania, a warunki pracy muszą być stabilne. Kolejnym problemem związanym z praktycznym wykorzystaniem techniki SPME jest ograniczona objętość fazy stacjonarnej osadzonej na włóknie urządzenia do SPME, co również może prowadzić do niecałkowitej ekstrakcji analitów.

Ze względu na efekty matrycowe przeprowadzenie analizy ilościowej z zastosowaniem procedur analitycznych w których technikę SPME wykorzystuje się na etapie poboru próbek analitów i ich wprowadzenia do urządzenia pomiarowego, konieczne jest dysponowanie odpowiednimi wzorcami. Warto tu rozważyć użycie wzorców wewnętrznych znakowanych izotopowo. Poprawia to w znacznym stopniu powtarzalność określonej metodyki analitycznej.

W analizie żywności wykorzystuje się wiele różnych typów włókien ekstrakcyjnych o różnej grubości i polarności pokrycia [44-47]. Jednak z powodu złożonego składu matrycy próbek żywnościowych bezpośrednie zanurzenie włókna może być trudne, dlatego do większości zastosowań w żywności stosuje się mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej. W przypadku SPME włókno może zostać uszkodzone lub mogą na nim



pozostać nieodwracalnie zaadsorbowane białka, powodując zmianę właściwości włókna, co uniemożliwia jego ponowne wykorzystanie.

W przypadku analizowania próbek miodu z wykorzystaniem techniki HS-SPME, z powodu obecności licznych związków lotnych naturalnie występujących w miodzie pszczelim, zachodzi silne zjawisko konkurencyjności sorbcji analitów oraz lotnych związków matrycy na włóknie. Z tego też powodu próbki najpierw rozcieńcza się, a następnie przeprowadza ekstrakcję techniką bezpośredniego zanurzenia włókna w roztworze próbki (DI-SPME).

W przypadku badań próbek, które charakteryzują się dużym obciążeniem przez związki traktowane jako zanieczyszczenia alternatywnym rozwiązaniem jest ochrona włókna przez umieszczenie go w membranie celulozowej, co może mieć dodatkowy efekt wykluczania sterycznego (np. pozwalając przenikać przez membranę tylko cząsteczkom o masie molowej  $< 1000$  Da). Wykorzystanie tej techniki wymaga znacznie dłuższego czasu ekstrakcji [48], a zjawisko blokowania porów membrany jest problemem wielu typów próbek żywności.

Główną zaletą mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej, w porównaniu z ekstrakcją za pomocą rozpuszczalnika jest redukcja ilości zużywanych rozpuszczalników, połączenie operacji pobierania próbek i ekstrakcji analitów w jeden etap i możliwość badania mniejszych próbek.

W ostatnim czasie opracowano włókna do SPME ze stopu metali o elastycznych właściwościach. Mogą one być pokryte PDMS/DVB, karboksenem/PDMS i DVB/karboksen-PDMS jak również PDMS [49]. Wpływa to w sposób istotny na poprawienie stabilność pracy i rozwiązuje problem łamliwości włókna podczas zanurzania go w próbkach o dużej lepkości lub wskutek złego dopasowania komory dozownika.

#### **2.5.6 Ekstrakcja z wykorzystaniem ruchomego elementu sorpcyjnego (SBSE)**

Technikę SBSE można traktować jako wariant techniki SPME, jednakże jej zasada jest bardziej zbliżona do LLE, w tym względzie, że będąc techniką wykorzystującą równowagę podziałową, SBSE stwarza możliwość przeprowadzenia ilościowej ekstrakcji analitów - w przeciwieństwie do SPME. W przypadku techniki SBSE próbka jest mieszana ruchomym elementem pokrytym warstwą sorbentu do momentu osiągnięcia przez anality równowagi podziałowej pomiędzy polimerem a fazą wodną. Następnie anality są desorbowane termicznie w dozowniku chromatografu gazowego lub ekstrahowane z fazy stacjonarnej za pomocą rozpuszczalnika i poddane analizie z wykorzystaniem techniki LC.

Zalety techniki SBSE są podobne do zalet techniki SPME, jako sorbentu można użyć tego samego rodzaju pokrycia [50]. Dodatkowo w tych samych warunkach prowadzenia ekstrakcji, pomimo porównywalnej liniowości i precyzji obu technik. Wydaje się że SBSE jest techniką lepszą niż DI-SPME do ekstrakcji insektycydów fosforoorganicznych z miodu pod kątem zdolności wzbogacania, dokładności i czułości [51].

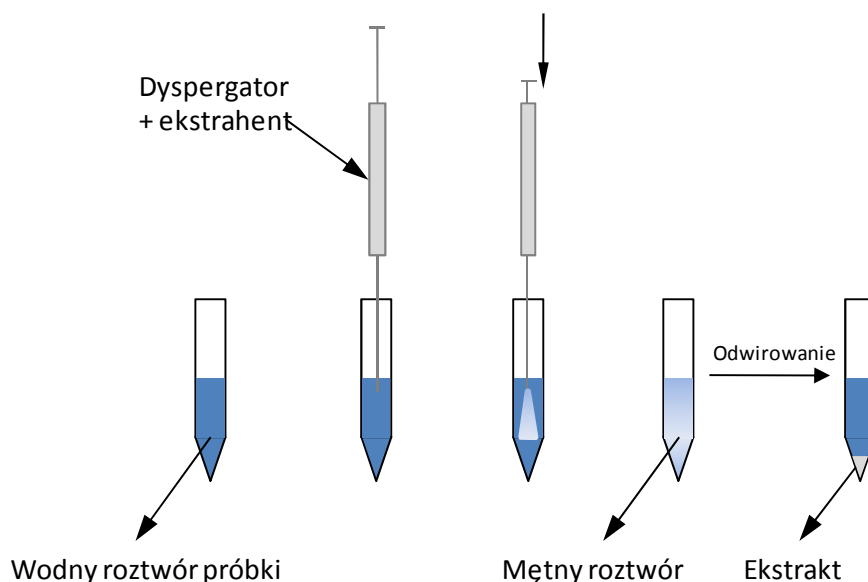
### 2.5.7 Dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz-ciecz (DLLME)

Analogicznie do technik mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej istnieją techniki mikroekstrakcji rozpuszczalnikiem (SME) [52]. Stosunkowo „młoda” technika ekstrakcyjna, opracowana w 2006 roku [53] - DLLME składa się z dwóch etapów:

1) Wstrzyknięcia odpowiedniej mieszaniny rozpuszczalników ekstrahującego i dyspergującego do próbki wody (względnie wodnego roztworu próbki) zawierającej anality. Na tym etapie rozpuszczalnik ekstrahujący ulega dyspersji w wodnej próbce do postaci drobnych kropelek, w których anality ulegają wzbogaceniu. Dzięki dużej powierzchni kontaktu pomiędzy rozpuszczalnikiem ekstrahującym a próbką wodną, bardzo szybko ustala się stan równowagi, a wydajność ekstrakcji jest praktycznie niezależna od czasu. Jest to główna zaleta tej techniki.

2) Odwirowania mętnego roztworu. Po odwirowaniu anality znajdujące się w dolnej fazie (sedymentacyjnej) można oznaczyć stosując odpowiednie techniki instrumentalne.

Na **Rysunku 5.** schematycznie przedstawiono zasadę techniki DLLME.



Rysunek 5. Schemat obrazujący kolejne etapy dyspersyjnej mikroekstrakcji w układzie ciecz-ciecz

Na wydajność procesu ekstrakcji w przypadku techniki DLLME mają wpływ następujące parametry:

- typ rozpuszczalnika ekstrahującego,
- typ rozpuszczalnika dyspergującego,
- objętość ekstrahenta,
- objętość dyspergatora.

Rodzaj rozpuszczalnika ekstrahującego jest głównym czynnikiem wpływającym na wydajność procesu DLLME. Rozpuszczalniki organiczne wybierane są na podstawie ich większej od wody gęstości, zdolności ekstrakcyjnej względem analitów i kompatybilności ze stosowanym układem chromatograficznym. Zwykle jako ekstrahent wybiera się halogenowane węglowodory, takie jak chlorobenzen, chloroform, czterochlorek węgla czy tetrachloroetylen, ze względu na ich dużą gęstość.

Przy wyborze rozpuszczalnika dyspergującego najbardziej istotnym czynnikiem jest zdolność jego mieszania się zarówno z rozpuszczalnikiem ekstrahującym jak i z fazą wodną. Zwykle jako rozpuszczalniki dyspersyjne wybierane są aceton, acetonitryl lub metanol. Objętość rozpuszczalnika ekstrahującego ma istotny wpływ na wartość liczbową współczynnika wzbogacania (PF). Zwiększając objętość ekstrahenta zwiększa się objętość fazy sedymentacyjnej powstałej po odwirowaniu, co przekłada się na obniżenie wartości liczbowej PF. Dlatego też optymalnie dobrana objętość ekstrahenta zapewnia zarówno wysoki współczynnik wzbogacania, jak i wystarczającą objętość fazy sedymentacyjnej do przeprowadzenia analizy po odwirowaniu roztworu. Objętość rozpuszczalnika dyspergującego bezpośrednio wpływa na:

- powstawanie mętnego roztworu (próbka wodna/ rozpuszczalnik dyspergujący/ rozpuszczalnik ekstrahujący),
- stopień zdyspergowania ekstrahenta w fazie wodnej, i w efekcie
- wydajność ekstrakcji.

Zmiana objętości rozpuszczalnika dyspergującego zmienia objętość fazy sedymentacyjnej. Dlatego konieczna jest zmiana zarówno objętości rozpuszczalnika dyspergującego i rozpuszczalnika ekstrahującego celem zachowania stałej objętości fazy sedymentacyjnej. Odpowiednia objętość rozpuszczalnika dyspergującego pozwalająca na uzyskanie mętnego roztworu zależy zarówno od objętości fazy wodnej jak i objętości rozpuszczalnika ekstrahującego. Ważnymi czynnikami, które mają wpływ na objętość fazy sedymentacyjnej są:

- rozpuszczalność ekstrahenta w wodzie,
- objętość roztworu próbki,

- objętość rozpuszczalnika dyspergującego,
- objętość rozpuszczalnika ekstrahującego.

Z praktycznego punktu widzenia, by uzyskać pożądaną objętość fazy sedymentacyjnej należy wykonać kilka wstępnych prób, zanim rozpocznie się właściwe doświadczenia. Najpierw należy obliczyć rozpuszczalność ekstrahenta w fazie wodnej. Następnie, z powodu wzrostu rozpuszczalności ekstrahenta wynikającej z obecności rozpuszczalnika dyspergującego, metodą prób i błędów oblicza się dokładną objętość fazy sedymentacyjnej, którą otrzyma się w wyniku użycia pożądaných objętości rozpuszczalników ekstrahującego i dyspergującego.

W przypadku techniki DLLME czas ekstrakcji jest definiowany jako czas, który upłynął od momentu wstrzyknięcia mieszaniny ekstrahenta i dyspergatora do momentu rozpoczęcia odwirowania. Powierzchnia kontaktu na granicy faz pomiędzy rozpuszczalnikiem ekstrahującym a fazą wodną jest nieskończenie wielka, dlatego też transfer analitów z fazy wodnej do organicznej jest szybki. W konsekwencji stan równowagi również ustala się szybko.

Wartość liczbowa PF definiowana jest jako stosunek stężeń analitu w fazie sedymentacyjnej ( $C_{sed}$ ) do początkowego stężenia analitu ( $C_0$ ) w próbce wodnej:

$$PF = \frac{C_{sed}}{C_0} \quad (1)$$

Wartość parametru  $C_{sed}$  odczytuje się z odpowiedniej krzywej kalibracyjnej, natomiast wydajność ekstrakcji definiuje się jako procent całkowitej ilości analitu ( $n_0$ ) wyekstrahowanej do fazy sedymentacyjnej ( $n_{sed}$ ):

$$ER = \frac{n_{sed}}{n_0} \cdot 100 = \frac{C_{sed} \cdot V_{sed}}{C_0 \cdot V_{aq}} \cdot 100 \quad (2)$$

$$ER = \frac{V_{sed}}{V_{aq}} \cdot PF \cdot 100 \quad (3)$$

gdzie:

$V_{sed}$  i  $V_{aq}$  to odpowiednio objętości fazy sedymentacyjnej oraz roztworu próbki.

Jedną z modyfikacji techniki DLLME [54] polega na zastosowaniu jako rozpuszczalnika ekstrahującego związku o gęstości mniejszej od wody i temperaturze krzepnięcia bliskiej temperaturze pokojowej (10-25°C), takiego jak np. 1-undekanol ( $T_k=17^\circ\text{C}$ ), 2-dodekanol ( $T_k=18^\circ\text{C}$ ) czy heksadekan ( $T_k=18^\circ\text{C}$ ). Po odwirowaniu unoszący się

na powierzchni ekstrahent zamraża się w niskiej temperaturze, następnie zbiera się go, pozostawia do roztopienia i ciekły poddaje się analizie. Dla tej modyfikacji można zaproponować w języku polskim termin techniki DLLME z wykorzystaniem kropli zestalonego rozpuszczalnika organicznego (nazwa oryginalna tej modyfikacji to „*Solidification of floating organic droplet*”). Stosowane w niej rozpuszczalniki ekstrahujące odznaczają się mniejszą toksycznością niż halogenowane węglowodory stosowane w klasycznej wersji techniki.

### 2.5.8 Zalety i wady wybranych technik ekstrakcji

Technikę ekstrakcji odpowiedniej grupy analitów z badanej próbki należy dobrać biorąc pod uwagę:

- skład matrycy próbki,
- właściwości oznaczanych związków,
- technikę wykrywania, identyfikacji i oznaczania analitów.

W większości przypadków więcej niż jedna technika spełnia warunki konieczne do jej zastosowania, dlatego dobrze jest rozważyć zalety i wady poszczególnych technik ekstrakcji.

W **Tabeli 3.** zebrano informacje o technikach ekstrakcji wykorzystywanych na etapie przygotowania próbek miodu do analizy.

Tabela 3. Zalety i wady technik ekstrakcji wykorzystywanych w procedurach oznaczania zanieczyszczeń w próbkach miodu.

Technika	Zalety	Wady
LLE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• możliwość miniaturyzacji – mikrofluidyka (mikrotechnika strumieniowa)</li> <li>• możliwość automatyzacji</li> <li>• możliwość ekstrakcji na stałym nośniku (SLE)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• w klasycznej wersji - duże objętości szkodliwych rozpuszczalników organicznych</li> <li>• powstawanie emulsji</li> <li>• z powodu ograniczonej selektywności, szczególnie w przypadku analizy składników śladowych, zachodzi potrzeba przeprowadzenia oczyszczania lub wzbogacania analitu przed wykonaniem analizy</li> </ul>
SPE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• znacznie mniejsze zużycie rozpuszczalników organicznych w porównaniu do SE</li> <li>• możliwość automatyzacji</li> <li>• dostępnych jest wiele typów sorbentów</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• złoże musi być jednorodne by uniknąć słabej wydajności, natomiast w zautomatyzowanych układach mogą wystąpić trudności z odtwarzalnością niektórych próbek, pomimo tego, że dostępne handlowo kolumny są uważane za godne zaufania;</li> <li>• składniki matrycy próbki mogą wpływać na zdolność sorbentu do „ekstrakcji” analitu z powodu współzawodnictwa w retencji; wiele tradycyjnych sorbentów ma ograniczoną selektywność;</li> <li>• niewystarczająca retencja bardzo polarnych związków; można stosować hydrofilowe materiały celem usprawnienia ekstrakcji większości polarnych związków.</li> </ul>
MSPD	<ul style="list-style-type: none"> <li>• W porównaniu z SE, daje zbliżone wyniki przy znacznie mniejszym zużyciu rozpuszczalników organicznych.</li> <li>• unika się rozcieńczania próbki przed ekstrakcją, tak jak to ma miejsce w przypadku SPE</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• składniki matrycy próbki mogą wpływać na zdolność sorbentu do „ekstrakcji” analitu z powodu współzawodnictwa w retencji; wiele tradycyjnych sorbentów ma ograniczoną selektywność;</li> <li>• niewystarczająca retencja bardzo polarnych związków; można stosować hydrofilowe materiały celem usprawnienia ekstrakcji większości polarnych związków.</li> </ul>

Tabela 3. c.d.

Technika	Zalety	Wady
SPME	<ul style="list-style-type: none"> <li>• brak rozpuszczalnika;</li> <li>• znaczna redukcja ślepych próbek;</li> <li>• w większości przypadków czas ekstrakcji jest skrócony do kilku minut;</li> <li>• daje dobre wyniki w szerokim zakresie stężeń analitów;</li> <li>• nie wymaga ilościowego/całkowitego przeniesienia analitu z ciekłej matrycy/próbki;</li> <li>• może być łatwo zautomatyzowana.</li> <li>• eliminuje problemy występujące w SPE</li> <li>• stosowana zarówno do polarnych jak i niepolarnych analitów</li> <li>• umożliwia analizę techniką GC i LC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• łamliwość włókna do ekstrakcji;</li> <li>• współzawodnictwo w sorpcji analitów;</li> <li>• różnice występujące pomiędzy partiami produktu;</li> <li>• niska trwałość pokrycia włókien;</li> <li>• słaba odtwarzalność wyników, szczególnie gdy brak wzorca wewnętrznego;</li> <li>• tryb DI tylko do relatywnie czystych roztworów</li> </ul>
SBSE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• takie jak dla SPME, a dodatkowo:</li> <li>• możliwość stosowana do skomplikowanych matryc (sosy, wina, napoje, soki, ocet balsamiczny)</li> <li>• wysoka powtarzalność i odtwarzalność wyników</li> <li>• potencjał do ilościowej ekstrakcji (odzyski ponad 80%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• różnice występujące pomiędzy partiami produktu</li> <li>• niska trwałość pokrycia elementu ruchomego</li> </ul>
DLLME	<ul style="list-style-type: none"> <li>• szybkość i łatwość stosowania;</li> <li>• minimalne objętości zużytych rozpuszczalników organicznych;</li> <li>• wydajność ekstrakcji niezależna od czasu;</li> <li>• zastosowanie wzorców wewnętrznych znacznie poprawia powtarzalność</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• limitowana możliwość wyboru rozpuszczalnika ekstrahującego;</li> <li>• stosowanie mikrolitrowych objętości lotnych rozpuszczalników organicznych przy wyższych temperaturach otoczenia;</li> <li>• w przypadku niektórych próbek, wydobywanie organicznej kropli spod warstwy osadu na granicy faz.</li> </ul>

Etap ekstrakcji może powodować straty lotnych i półlotnych analitów, tak więc tę operację należy wykonywać ostrożnie, dbając o to, by w próbce była odpowiednia ilość rozpuszczalnika. Redukcja objętości rozpuszczalnika do wartości mniejszej niż 1 ml, może spowodować straty lotnych związków, i w rezultacie dać mylnie negatywne wyniki. Jeśli ekstrahent całkowicie odparuje, należy powtórzyć ekstrakcję od początku. Możliwe jest zastąpienie jednej metody odparowania rozpuszczalnika inną, alternatywną, mając na uwadze najkorzystniejsze warunki dla każdej z nich i mając pewność, że parametry kontroli jakości są akceptowalne i nie obniżą się z powodu zmiany techniki (np. nadmiar rozpuszczalnika może być odparowany z próbki w aparacie Kuderny-Danisha z kolumnami rektyfikacyjnymi Snydera lub w łaźni wodnej o temperaturze 40°C w łagodnym strumieniu azotu).

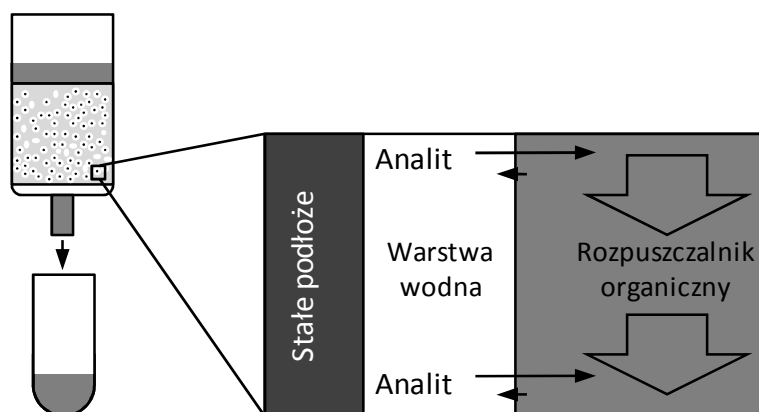
Ekstrakty z próbek przeznaczonych do badań na zawartość pozostałości antybiotyków, pestycydów oraz innych nielotnych związków zwykle odparowuje się do sucha (w warunkach, w których nie ulegną one rozkładowi termicznemu) i zmienia rozpuszczalnik na kompatybilny ze stosowaną techniką instrumentalną.

## 2.6 Kompleksowe podejście do etapu przygotowania próbek do analizy

### 2.6.1 Ekstrakcja ciecz-ciecz z wykorzystaniem złoża stałego sorbentu (SLE)

W tym podejściu, pierwszy raz opublikowanym w 2000 r. [55,56], wykorzystuje się kolumnienki do SPE wypełnione obojętnym złożem - ziemią okrzemkową. Zastosowanie

kolumnienek umożliwia przeprowadzenie ekstrakcji w krótkim czasie, unika się wytrząsania, a co za tym idzie powstawania emulsji. Dodatek soli do wodnego roztworu próbki (w ilości 0,5g NaCl/ml roztworu) powoduje zwiększenie wydajności ekstrakcji. Po naniesieniu roztworu próbki do kolumny, jest on adsorbowany na porowatym złożu. Równowaga adsorpcyjna ustala się w ciągu kilku minut i następnie można eluować anality octanem etylu (ok. 8% rozpuszcza się w wodzie), dichlorometanem lub innym rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą. Anality zostają wyekstrahowane z zaadsorbowanej na złożu fazy wodnej do przemieszczającej się fazy organicznej (**Rysunek 6.**).



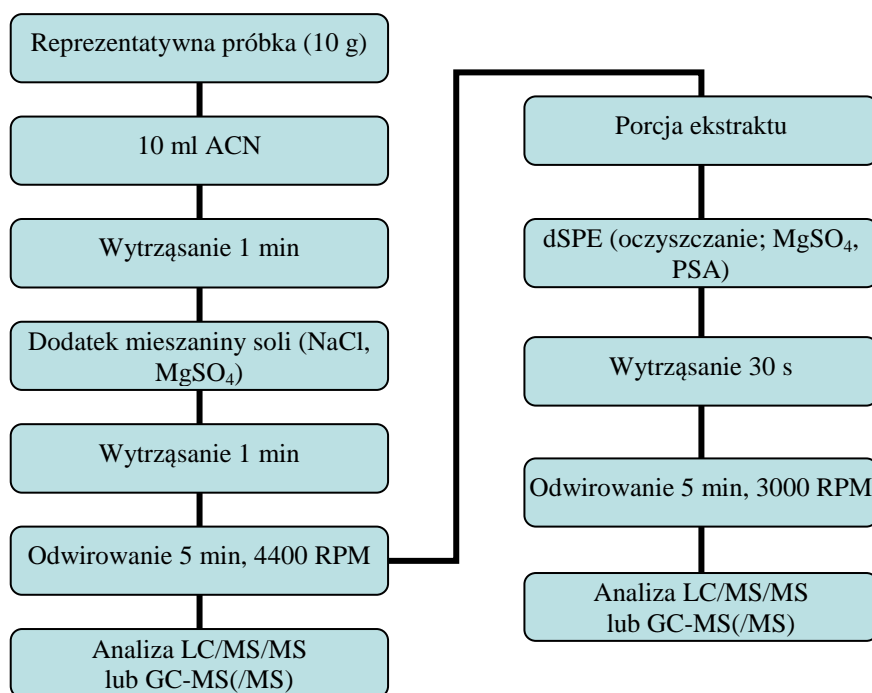
Rysunek 6. Zasada działania ekstrakcji ciecz-ciecz na stałym podłożu.

Eluat można analizować bezpośrednio, lub odparować rozpuszczalnik częściowo, celem podwyższenia stężenia, lub całkowicie, by zmienić go na bardziej kompatybilny z techniką instrumentalną wykorzystywaną do oznaczania ilościowego. Technika SLE jest stosunkowo łatwa do automatyzacji, co oprócz prostoty wykonania jest jej kolejnym atutem.

### 2.6.2 Podejście *QuEChERS*

Metodologia opracowana w 2003 r. [57] do oznaczania pozostałości pestycydów w próbkach owoców i warzyw o dużej zawartości wody (>75%, w przypadku próbek o mniejszej zawartości wody sporządza się wodny roztwór próbki). Schemat metodyki QuEChERS przedstawiono na **Rysunku 7.**

Obecność NaCl zwiększa wydajność ekstrakcji, ciepło wydzielone podczas egzotermicznego procesu hydratacji  $MgSO_4$  promuje ekstrakcję analitów do acetonitrylu. Jeśli próbki zawierają znaczne ilości barwników i/lub tłuszczów, to na etapie dSPE można zastosować złoże zawierające również węgiel aktywny lub złoże ze związanymi grupami C8 lub C18.



Rysunek 7. Schemat metodyki QuEChERS stosowanej do ekstrakcji pestycydów z próbek o złożonym składzie matrycy.

## 2.7 Podsumowanie

Informacje literaturowe o technikach ekstrakcji różnego typu analitów (ze szczególnym uwzględnieniem pozostałości środków ochrony roślin) z próbek o złożonym składzie matrycy (próbek miodu pszczelego) przedstawiono w **Tabeli 4**.

Natomiast w **Tabeli 5** zestawiono informacje literaturowe o rodzajach zanieczyszczeń wykrytych w miodach pochodzących z różnych regionów geograficznych.

Tabela 4. Informacje literaturowe o technikach ekstrakcji i oczyszczania ekstraktów wykorzystywanych w różnych procedurach analitycznych do oznaczania szerokiego spektrum zanieczyszczeń w próbkach miodu.

Anality(y)	Masa próbki	Przygotowanie wstępne	Technika ekstrakcji	Oczyszczanie ekstraktu	Oznaczenie końcowe	Lit.
12 sulfonamidów	1,5	Hydroliza	SE	Kolumna SCX do SPE	RP-HPLC-FLD z derywatyzacją pokolumnową	[36]
7 sulfonamidów	2	Hydroliza	-	-	LC-ESI-MS/MS	[37]
10 sulfonamidów	2	Hydroliza	SE	-	RP-LC-ESI-MS/MS	[38]
38 pozostałości antybiotyków	1,0	Rozpuszczenie w buforze	Sekwencyjna (4 etapy) SE	-	RP-LC-ESI-MS/MS	[58]
Bisfenol A, bisfenol F	10	Rozpuszczenie	PLS-2 SPE	-	RP-HPLC-FLD RP-LC-ESI-MS	[59]
Szczawian, siarczan, azotan	3	Rozpuszczenie	SPE w kolumnie ze złożem jonowymiennym	-	IC	[60]
Streptomycyna, dihydrostreptomycyna	1,5	-	SE	C <sub>18</sub> SPE	RP-LC-ESI-MS/MS	[61]
1,2-dibromoetan, 1,4-dichlorobenzen, naftalen	10	Rozpuszczenie	Purge.&Trap	-	GC-MS	[62]
15 PAH	1	Rozpuszczenie	LLE	Kolumna z tlenkiem glinu i zelem krzemionkowym	GC-MS	[63]
Kumafos, bromopropylan, amitraz, fluwalinat	20	-	SE	LLE	-	-
Tymol	10	-	SE	C <sub>18</sub> SPE	RP-HPLC-UV-DAD	[64]
Rotenon	10	-	SE	-	-	-



Tabela 4. c.d.

Anality(y)	Masa próbki	Przygotowanie wstępne	Technika ekstrakcji	Oczyszczanie ekstraktu	Oznaczenie końcowe	Lit.
9 chlorofenoli	1	Homogenizacja i derywatywizacja	SPME na włóknie PDMS/DVB	-	GC-AED	[65]
Fenol, tymol, karwakrol	2	Rozpuszczenie	-	-	NP-HPLC-FLD	[66]
Tylozyna	5	-	SE	SPE (Oasis HLB)	RP-LC-ESI-MS/MS	[67]
Metale ciężkie i przejściowe	0,5 – 1,0	Utleniająca fotoliza UV	-	-	IC z katarometrem, Woltamperometria pulsowa	[30]
Metale	1.0	Rozpuszczenie w stęż. HNO <sub>3</sub> i wytrawianie wspomagane mikrofalami	-	-	F-AAS/AES, ICP-MS	[68]
SO <sub>2</sub>	10	Całkowity rozkład	-	-	Grawimetria, potencjometryczne miareczkowanie strąceniami, fotometryczne miareczkowanie strąceniami	[31]
	15	Rozpuszczanie i filtracja	-	-		
Antranilan metylu, hydroksymetylfurfural i 4 pochodne związki	2,5	-	SE	Kolumnienka polimerowa do SPE	RP-HPLC-UV-DAD	[69]
Hydroksymetylfurfural	10	-	SE	Strącanie roztworem Carreza	RP-HPLC-UV	[34, 70,71]
1,4-dichlorobenzen	50	Rozpuszczenie	Destylacja parą wodną	-	GC-ITMS GC-QMS	[40]
Oksytetracyklina, tetracyklina, metacyklina	50	Rozpuszczenie	LLE w kolumnie wypełnionej żywicą XAD-2	-	RP-HPLC-UV-DAD-CL	[72]
7 PCB	5	-	SE w kolumnie	-	GC-ECD	[73]
25 OCP i 8 PBDE					GC-MS	
11 OCP	20	-	PLE	-	GC-ITMS	[74]
Tiamulina	4	-	SE	Kolumnienka polimerowa do SPE	RP-LC-DAD-ESI-MS	[75]
Fipronil	1	Rozpuszczenie	LLE	-	GC-ECD	[76]
	1	Rozpuszczenie	SPE (Florisil)	-	GC-MS	
22 OPP	5	Rozpuszczenie	SPE (C18)	-	LC-APCI-MS	[77]
11 OCP	10	Rozpuszczenie	LLE	SPE (Florisil)	GC-Scan-MS	[78]
15 OCP, 7 OPP, 6 PCB	12	Rozpuszczenie	SPE (Isolute ENV <sup>+</sup> )	-	GC-ECD/NPD	[79]
18 OCP	10	Rozpuszczenie	SPE (C18)	-	GC-ECD	[80]
48 pestycydów	10	-	SE	SPE (Florisil)	GC-SIM-MS	[81]
tiamfenikol i chloramfenikol	1	Rozpuszczenie	DLLME	-	LC-VWD	[82-84]
5 herbicydów (triazyny)	2	Rozpuszczenie	DLLME	-	RP-LC-DAD	[85]
9 OCP	5	Rozpuszczenie	LLE	-	GC-ECD	[86]
	4				GC-MS	
9 pestycydów	5	Rozpuszczenie	LLE	SPE (Florisil)	GLC-ECD	[87]
24 OCP	4	Rozpuszczenie	LLE	SPE (Florisil)	GC-ECD	[88]
9 OCP	5	Rozpuszczenie	SPE (C18)	-	GC-MS	[89]
33 OPP i karbaminiany					LC-APCI-MS	
51 pestycydów	10	Rozpuszczenie	SPE (C18)	-	GC-MS	[90]
10 insektycydów	10	Rozpuszczenie	LLE	-	GC-NPD	[91]
4 OPP	0,5	Rozpuszczenie	CME-UABE	-	GC-MS	[92]
Fipronil i jego metabolity, imidachlopryd, tiametoksam	1	Rozpuszczenie	SPE (Florisil)	-	LC-MS/MS	[93]
7 insektycydów i akarycydów	0,5	Rozpuszczenie	SPME	-	GC-MS	[94]
Chlorpiryfós, λ-cyhalotryna, cypermetryna, deltametryna	3	Rozpuszczenie	LLE-LTP	SPE (Florisil)	GC-ECD GC-MS	[95]

Tabela 5. Przykładowe informacje literaturowe o zanieczyszczeniach wykrytych w miodach pochodzących z różnych regionów geograficznych.

Zanieczyszczenie	Kraj pochodzenia miodu	Lit.
Pestycydy	Belgia, Brazylia, Francja, Grecja, Hiszpania, Jordania, Polska, Portugalia, Szwajcaria, Turcja, Włochy	[64,73,78,79, 81,86,88-91]
Sulfonamidy	Szwajcaria	[38]
Bisfenol A	Chiny, Hiszpania, Japonia	[59]
Antybiotyki aminoglikozydowe	Dania	[61]
Tetracykliny	Chiny	[72]
Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne	Grecja, Rumunia	[62,63]
Polichlorowane bifenyle	Turcja	[73]
Metale ciężkie i przejściowe	Indie, Polska, Włochy	[30,68]
Szczawiany, siarczany, azotany	Hiszpania	[60]
Fenole	Hiszpania	[66]
Chlorofenole	Hiszpania	[65]

Jak wynika z danych zestawionych w **Tabeli 4.**, techniką najczęściej stosowaną do ekstrakcji próbek lub do ich wstępnego oczyszczania są techniki SPE lub SE (z bardzo często następującym po niej oczyszczaniem z wykorzystaniem techniki SPE). W ten sposób zapewniona jest możliwość znacznej redukcji zakłóceń pochodzących z matrycy, co skutkuje polepszoną czułością, a to z kolei umożliwia osiągnięcie niższych granic oznaczania i ułatwia jednoznaczną identyfikację. Te aspekty mają istotne znaczenie, szczególnie w przypadku wykrywania ewentualnej obecności śladowych ilości zanieczyszczeń w próbkach o tak złożonym składzie matrycy jak miód.

W niektórych przypadkach techniki ekstrakcji takie jak SPE czy SE (w tym również LLE) nadal nie są wystarczająco selektywne by spełniać wymogi prawne dotyczące bezpieczeństwa żywności. Natomiast takie techniki jak SPME czy ekstrakcja z wykorzystaniem ruchomego elementu sorpcyjnego wymagają użycia mniejszej ilości rozpuszczalnika organicznego, są łatwe w zastosowaniu, umożliwiają wysoką przepustowość i generalnie są stosowane z dobrym rezultatem. Niemniej jednak, gdy rozpatruje się zastosowanie tych technik do oznaczania śladowych ilości zanieczyszczeń w miodach (czy ogólniej, w żywności), reprezentatywność próbki w znacznym stopniu zależy od prawidłowej homogenizacji w pierwszym etapie przygotowania próbki. W przypadku próbek o złożonym składzie matrycy, takich jak miód, często konieczne jest zastosowanie kilku różnych technik, mając na uwadze potrzebę osiągnięcia wymaganej jakości analizy przy możliwie jak najmniejszej ilości kroków.

## **2.8 Wykorzystanie technik chromatograficznych do oznaczania śladowych ilości zanieczyszczeń**

Wzrastające wymogi prawne odnośnie jakości żywności powodują konieczność zapewniania granic wykrywalności i oznaczalności na poziomach tak niskich jak to tylko możliwe, pozwalających na wykrywanie zabronionych związków i oznaczanie pozostałości zanieczyszczeń przynajmniej na poziomie ustalonych Najwyższych Dopuszczalnych Poziomów Pozostałości, szczególnie tych stwarzających poważne zagrożenie dla życia ludzkiego, takich jak substancje kancerogenne czy związki potencjalnie genotoksyczne.

W związku z bardzo silnymi efektami związanymi z wpływem matrycy, podczas ilościowego oznaczania zanieczyszczeń w miodzie należy stosować krzywe kalibracyjne w matrycy, z wzorcami wewnętrznymi i ślepe próbki z dodatkiem wzorca.

Rozważając chromatograficzną identyfikację i oznaczenie ilościowe zanieczyszczeń, pod uwagę należy wziąć takie czynniki jak lotność, rozpuszczalność i stabilność analitów. Technika analityczną najczęściej wykorzystywaną do oznaczania ksenobiotyków w miodzie jest chromatografia gazowa (typowymi detektorami wykorzystywanymi podczas takich analiz są *ECD* i *MS*). Jednakże podczas oznaczania substancji, które są termicznie niestabilne lub trudnolotne, wydłużony zostaje proces przygotowania próbki do analizy ponieważ konieczne jest przeprowadzenie procesu derywatywacji. Takie substancje częściej są oznaczane za pomocą techniki chromatografii cieczowej (z detektorami takimi jak *DAD* czy *MS*), co eliminuje potrzebę derywatywacji analitów.

### **2.8.1 Techniki instrumentalne wykorzystywane w metodykach analitycznych przeznaczonych do jednoczesnego oznaczania pozostałości wielu ksenobiotyków w badanych próbkach**

Techniką instrumentalną umożliwiającą równoczesne wykrycie i identyfikację koeluujących związków jest spektrometria mas. W przypadku stosowania tej techniki analizę przeprowadza się przez wybór charakterystycznych jonów lub ich transformacji. W przypadku technik *LC-MS* i *LC-MS/MS* ważną rzeczą jest zastosowanie odpowiedniej techniki ekstrakcji i przygotowania próbki, jako że efekty matrycowe mogą znacząco wpłynąć na układy detekcji, przyczyniając się do powstawania szumów o dużym natężeniu lub zmieniając wydajność jonizacji, a ponadto mogą mieć wpływ na wartości liczbowe najważniejszych parametrów metrologicznych odpowiednich procedur analitycznych, czyli:

- granica wykrywalności,
- granica oznaczalności.

Spektrometr mas ze względu na swą uniwersalność i niespecyficzność wydaje się być najlepszym detektorem do wykrywania i ilościowego oznaczania szerokiego spektrum zanieczyszczeń w ciągu jednego cyklu analitycznego. Spektrometr mas składa się ze źródła jonizacji (np.: ESI, APCI – w przypadku sprzężenia z LC; EI – w przypadku GC; MALDI), optyki jonowej (szeregu magnetycznych soczewek i filtrów masy, gdzie również może zachodzić fragmentacja cząsteczek) czyli analizatora masy oraz detektora masy (m.in. powielacz elektronowy, TOF, Orbitrap).

Poniżej pokrótce omówione zostały tryby pracy i rodzaje spektrometrów mas wykorzystanych w opracowanych metodykach.

### ***MS***

Spektrometr mas składa się z pojedynczego kwadrupolu mogącego pracować w trybie przemiatacia zakresu mas lub w trybie monitorowania jonów o wybranym stosunku masy do ładunku ( $m/z$ ).

### ***MS/MS***

Tandemowy spektrometr mas zbudowany jest z kilku kwadrupoli (heksapoli, oktapoli) ustawionych liniowo. W zależności od rodzaju ustawień detektora mas poszczególne kwadrupole mogą operować w różnych trybach (**Tabela 6.**). W przypadku MS i MS/MS analizatorem masy jest powielacz elektronowy (CEM).

### ***Orbitrap***

Nowy rodzaj detektora mas, opracowany w 2000 r. [96,97] i stale udoskonalany, w przeciwieństwie do pozostałych jest detektorem nieniszczącym. Zbudowany jest z wrzecionowatej elektrody wewnętrznej i dwóch elektrod zewnętrznych, kształtem przypominających zwiężającą się na jednym z końców beczkę, ułożonych koncentrycznie w stosunku do elektrody wewnętrznej. Pakiety jonów wpadające do detektora prostopadle do osi analizatora przez szczelinę w położeniu nierównowagowym krążą w stałym polu magnetycznym wokół elektrody wewnętrznej. Siła przyciągania równoważona jest przez działanie siły odśrodkowej powstałej na skutek ruchu obrotowego wprowadzonych jonów. W efekcie powstają pierścienie jonów o określonej wartości stosunku masy do ładunku. Częstotliwość oscylacji wzdłuż osi elektrody nie jest zależna od energii jonu ani od kąta pod jakim jony zostały wprowadzone w pole, a jedynie od stosunku  $m/z$  jonów. Pomiar częstotliwości oscylacji aksjalnych pozwala na określenie stosunku  $m/z$  jonu. Jony o


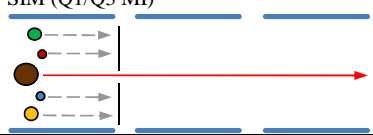
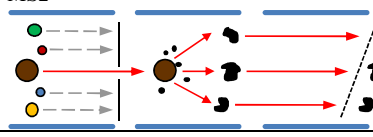
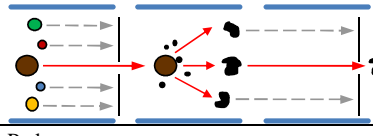
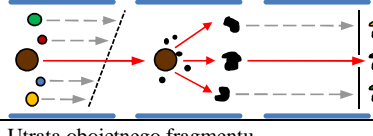
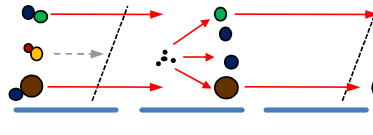
mniejszej wartości stosunku  $m/z$  znajdują się bliżej elektrody niż te o większym stosunku, w związku z tym są one wprowadzane do Orbitrapa w kolejności rosnącej [98].

W postaci surowej otrzymuje się obraz prądu przejściowego, a po zastosowaniu transformacji Fouriera można uzyskać widmo mas o wysokiej rozdzielczości (nawet do 150000).

Jest to detektor umożliwiający wysoce dokładny pomiar masy (poniżej 1 ppm) nawet dla związków o niskiej masie molowej; Orbitrap charakteryzuje się również szerokim zakresem dynamicznym – ok. 6000  $m/z$  [98].

W połączeniu z tandemowym spektrometrem mas stanowi potężne urządzenie do analiz opartych na dokładnym pomiarze masy, m.in. w takich dziedzinach jak proteomika, metabolomika czy lipidomika. Z powodzeniem można go również stosować do wykrywania i identyfikacji pozostałości pestycydów na poziomie ppb w miodzie pszczelim, co zostało zaprezentowane w niniejszej rozprawie.

Tabela 6. Podstawowe informacje o poszczególnych trybach pracy detektora MS/MS

Schematyczne przedstawienie zasady pracy różnych trybów skanowania	Q1	Q2	Q3	Cel stosowania trybu oraz rodzaj uzyskanych informacji
<b>Q1/Q3 MS</b> 	Skany	-	-	Widmo masowe w określonym przedziale mas ( $m/z$ )
<b>SIM (Q1/Q3 MI)</b> 	SIM	-	-	Identyfikacja jonu molekularnego
<b>MS2</b> 	SIM	Fragmentacja	Skany	Informacje strukturalne o nieznanymi analitach, potwierdzenie tożsamości znanych analitów przez przeszukiwanie bibliotek widm;
<b>MRM</b> 	SIM	Fragmentacja	SIM	Podniesienie selektywności przez „SIM <sup>2+</sup> ”, analiza ilościowa; znaczne obniżenie szumów przez podwójne filtrowanie masy; możliwość ilościowego oznaczania wielu analitów jednocześnie przez zdefiniowanie wielu przejść MRM w jednym eksperymencie
<b>Prekursor</b> 	Skany	Fragmentacja	SIM (filtruje masę naładowanego fragmentu)	Podniesienie selektywności przez uproszczenie widma masowego, przemiatanie w poszukiwaniu określonych analitów (np. badanie metabolitów); podaje cząsteczki, z których w komorze kolizyjnej powstał naładowany fragment o zadanym $m/z$
<b>Utrata obojętnego fragmentu</b> 	Skany	Fragmentacja	Skany równoległe do Q1 z zadaną różnicą masy, odpowiadającą masie obojętnego fragmentu	Podniesienie selektywności przez uproszczenie widma masowego, przemiatanie w poszukiwaniu określonych analitów (np. badanie metabolitów); podaje cząsteczki, które utraciły zadany obojętny fragment w komorze kolizyjnej

## II. CEL I ZAKRES PRACY

Produkty pszczele (takie jak miód i propolis) mają działanie antyseptyczne i stymulujące układ immunologiczny oraz są źródłem wielu biopierwiastków śladowych niezbędnych dla zdrowia. Ze względu na skład chemiczny i właściwości lecznicze (znane ludziom od starożytności) miód jest cennym produktem spożywczym i jego jakość należy zabezpieczać i kontrolować.

Dostępne metodyki opierają się głównie na ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika (SE, w tym LLE) i charakteryzują się dużym zużyciem rozpuszczalników organicznych. Dodatkowo w większości przypadków umożliwiają oznaczanie pestycydów należących do jednej tylko grupy/klasz chemicznej.

Głównym wyzwaniem, które stoi przed analitykiem jest konieczność opracowania metodyk analitycznych zapewniających możliwość oznaczenia możliwie szerokiego spektrum analitów w jednym cyklu analitycznym. W terminologii angielskiej takie metodyki są określane za pomocą terminu „*Multiresidue Methods*” [99].

Metodyka taka powinna spełniać następujące kryteria:

- umożliwić jednoczesne wykrywanie dużej liczby substancji należących do różnych grup związków chemicznych;
- charakteryzować się dużym odzyskiem związków, dobrą precyzją i wysoką czułością;
- zapewnić maksymalne oczyszczanie uzyskanych ekstraktów z substancji przeszkadzających przed etapem oznaczenia ilościowego;
- charakteryzować się małą kosztocłonnością, łatwością eksploatacji, szybkością uzyskiwania informacji oraz możliwie niewielkim oddziaływaniem na środowisko;
- wykorzystywać uniwersalną, a za razem selektywną i czułą technikę detekcji.

Z tego względu głównym celem pracy było opracowanie nowych metodyk analitycznych, które charakteryzują się niewielkim zużyciem rozpuszczalników organicznych i ponadto zapewniających możliwość efektywnego i ilościowego oznaczenia wielu pozostałości pestycydów i ich metabolitów jednocześnie. Taki tok postępowania jest zgodny z zasadami zielonej chemii analitycznej, które wynikają z koncepcji zrównoważonego rozwoju. Opracowane metodyki stanowią niezbędne narzędzie dające możliwość oznaczenia zawartości analitów z w/w grup w próbkach zebranych w kolejnych latach z pasiek z różnych rejonów Polski.

Prowadzone były badania ukierunkowane na:

- zbadanie przydatności do przygotowania próbek miodu takich technik ekstrakcji jak ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz połączona z oczyszczaniem za pomocą dyspersyjnej wersji SPE (QuEChERS - dSPE) oraz ekstrakcja ciecz-ciecz na złożu stałego sorbentu (solid-support liquid-liquid extraction), która łączy w sobie zalety LLE, SPE i SPME;
- opracowanie metodyki analitycznej oznaczania poziomów pozostałości wielu pestycydów jednocześnie w miodzie pszczelim oraz zoptymalizowanie parametrów prowadzenia analizy chromatograficznej z wykorzystaniem LC-MS/MS (dobór kolumny chromatograficznej, wybór eluentu i programu elucji, optymalizacja parametrów pracy tandemowego spektrometru mas);
- opracowanie metodyki analitycznej oznaczania poziomów pozostałości pestycydów chloroorganicznych z wykorzystaniem dyspersyjnej ekstrakcji ciecz-ciecz sprzężonej z GC-MS i zoptymalizowania warunków ekstrakcji;
- opracowanie metodyki analitycznej wykrywania i oznaczania poziomów pozostałości wielu pestycydów jednocześnie na podstawie wysoce dokładnego pomiaru masy z wykorzystaniem zastawu LC-MS sprzężonego z analizatorem mas Orbitrap;
- wyznaczenie parametrów walidacyjnych opracowanych metodyk analitycznych oznaczania poziomów pozostałości wielu pestycydów jednocześnie;
- wykorzystania opracowanych metodyk analitycznych do określenia poziomów pozostałości pestycydów w krajowych i zagranicznych miodach pszczelich.

### **III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA**

#### ***3. Charakterystykamateriałów i metod badawczych***

##### ***3.1 Odczynniki i wzorce***

- woda dejonizowana z urządzenia do produkcji ultraczystej wody Milli-Q (Millipore Corporation, USA);
- acetonitryl (LiChrosolv, Merck, Niemcy);
- octan etylu (Pestanal, Sigma-Aldrich, Niemcy);
- dichlorometan (Pestanal, Sigma-Aldrich, Niemcy);
- kolumnienki ChemElut do ekstrakcji w układzie ciecz – ciecz na złożu stałego sorbentu (SLE) 5 ml (Varian, USA);
- zestawy ekstrakcyjne QuEChERS buforowane (Agilent Technologies, CA, USA)

- azot do odparowania rozpuszczalnika (czystość 99,99%, Polska);
- metanol (czystość do *LC-MS*, Sigma-Aldrich, Niemcy);
- metanol (CHROMASOLV® Gradient grade, Sigma-Aldrich, Niemcy)
- *n*-heksan (czystość PA, Merck, Niemcy);
- aceton (Pestanal, Fluka, Niemcy);
- kwas mrówkowy (czystość PA, Merck, Niemcy);
- roztwór amoniaku (POCh, Polska)
- roztwory wzorców pestycydów (100 ng/μl w acetonie, Ultra Scientific, RI, USA):  
akrynatoryna, azoksystrobina, buprofezyna, chlopyralid, chloridazon, chlotianidyna, cymoksanil, cyprodynil, cyprokonazol, deltametryna, dichlofop, difenokonazol, diflubenzuron, dichlofop metylowy, dimetomorf, etofenproks, fenazachina, fenbukonazol, fenoksaprop-P, fenoksaprop-P etylu, fenpiroksymat, fenpropidyna, fluazyfop-P butylowy, fluchinkonazol, flusilazol, flutolanil, foksim, fosalon, fosmet, imidachlopyryd, indoksakarb, karbendazym, kletodym, kwizalofop-P-etylowy, metazachlor, metiokarb, metkonazol, oksadiksył, pirydaben, pirimikarb, piryproksyfen, profam, propakwizafop, propamokarb, prosulfokarb, setoksydim, symazyna, tebufenpyrad, tebukonazol, teflubenzuron, tetrakonazol, tiachlopyryd, tiametoksam, tiofanat metylowy, tolchlofos metylowy, triflumuron, tritosulfuron;
- fluorksypr meptylu (100 ng/μl w acetonie, LGC Standards, Polska):
- roztwory wzorców pestycydów (100 ng/μl w izooktanie, LGC Standards, Polska):  
aldryna, 4,4'-DDT, 4,4'-DDE, 4,4'-DDD, α-endosulfan, endryna, lindan (gamma-HCH)
- roztwory wzorców pestycydów (Dr Ehrenstorfer, Niemcy):  
o stężeniu 10 ng/μl: w metanolu: asulam; w cykloheksanie: beflubutamid, boskalid, lufenuron, spiromefezin, tepraloksydim; w acetonitrylu: dimoksyfobina, epoksykonazol, flonikamid, fluazyfop (kwas), fluoksastrobina, haloksyfop-R, haloksyfop-R metylu, desmetyl-pirimikarb, spinosad (spinozyna A i D); w izooktanie: fosmet-okson  
o stężeniu 2500 ng/μl w toluenie/heksanie: mieszanina 2,4'-DDT, 2,4'-DDE, 2,4'-DDD;  
o stężeniu 100 ng/μl w acetonie 2,4'-D8-DDT, 2,4'-D8-DDE
- wzorce w postaci stałej (czystości Pestanal):
  - Nowaluron (99,7%, Instytut Przemysłowej Chemii Organicznej, Polska)
  - Amidosulfuron (97,5%, Dr. Ehrenstorfer, Niemcy)
  - Spirodiklofen (99,3%, Sigma-Aldrich, Niemcy)
  - Setoksydim (90,0%, Sigma-Aldrich, Niemcy)
  - Benzoesan emamektyny (99,1%, Sigma-Aldrich, Niemcy)
  - Tritosulfuron (99,9%, Sigma-Aldrich, Niemcy)
- trifenylofosforan – TPP (500 μg/ml w MTBE, Supelco)

Nie prowadzono oczyszczania stosowanych rozpuszczalników i wzorców.



### **3.2 Roztwory wzorcowe**

Roztwory podstawowe wzorców w postaci stałej przygotowano przez rozpuszczenie w 1 ml metanolu (CHROMASOLV<sup>®</sup> Gradient grade) odpowiedniej ilości poszczególnych pestycydów, uzyskując w ten sposób roztwory o stężeniach analitów na poziomie 1000 µg/ml.

Roztwór roboczy przygotowano w kolbie miarowej w sposób objętościowy przez dodanie odpowiednich ilości roztworów podstawowych do acetonu o czystości Pestanal i dopełnieniu roztworu tym samym acetonem do określonej objętości. Stężenia analitów w roztworze roboczym wynosiły 1000 ng/ml (dla wzorców, których roztwory podstawowe miały stężenia 100 µg/ml) oraz 200 ng/ml (dla wzorców, których roztwory podstawowe miały stężenia 10 µg/ml). Roztwór ten wykorzystano do sporządzenia krzywych wzorcowych (metodą seryjnych rozcieńczeń) oraz podczas walidacji opracowanych metodyk analitycznych.

### **3.3 Aparatura**

Wirówka Eppendorf 5702 (Eppendorf SG, Niemcy).

Wirówka z wytrząsarką (Conbest, ELMI, Polska).

Urządzenie z łąznią wodną, do odparowania próbek w strumieniu azotu - TurboVap LV (Caliper LifeSciences, USA).

Na etapie oznaczeń końcowych wykorzystywano:

- chromatograf cieczowy Agilent serii 1200 sprzężony z tandemowym spektrometrem mas ABSciex 4000 QTRAP<sup>®</sup>;
- chromatograf cieczowy Agilent Infinity 1290 UHPLC sprzężony z tandemowym spektrometrem mas Agilent QqQ 6460;
- chromatograf cieczowy Dionex UltiMate 3000 UHPLC sprzężony z tandemowym spektrometrem mas Thermo-Fisher Scientific LTQ Velos z orbitalną pułapką jonową Orbitrap;
- chromatograf gazowy Agilent 7890A sprzężony ze spektrometrem mas Agilent 5975C.

Parametry pracy poszczególnych urządzeń, właściwe dla poszczególnych metodyk zostaną podane przy ich omawianiu.

### **3.4 Kryteria wyboru i właściwości analitów**

Przedmiotem zainteresowania są pestycydy, dla których znane są wartości liczbowe NDP w miodzie, podane w odpowiednim rozporządzeniu KE [2].

W **Tabeli 7.** zestawiono informacje o 92 pestycydach, które są przedmiotem zainteresowania i będą oznaczane w badanych próbkach miodu.

Pestycydy wybrane do analizy charakteryzują się ogromną różnorodnością pod względem kwasowości i lipofilowości, a to utrudnia proces ich oznaczania.

### **3.5 Charakterystyka badanych próbek**

Próbki miodu pszczelego z pięciu rejonów Polski: Pomorza, Wielkopolski, Ziemi Lubelskiej, Dolnego oraz Górnego Śląska oraz innych terenów (w sumie 58 próbek) otrzymano dzięki uprzejmości Instytutu Pszczelnictwa ISK w Puławach. Próbki, przysyłane tam przez pszczelarzy, były przechowywane w szklanych pojemnikach, zgodnie z wymaganiami normy PN-88/A-77626 „Miód pszczeli”.

### **3.6 Opracowanie nowych procedur analitycznych – uwagi ogólne**

Podczas ustalania optymalnych parametrów procedury analitycznej wykorzystującej technikę spektrometrii mas, pierwszym etapem jest zoptymalizowanie warunków pracy spektrometru mas, aby możliwe było oznaczanie analitów. Następnie optymalizuje się proces rozdzielania substancji (rodzaj kolumny chromatograficznej, skład i natężenie przepływu fazy ruchomej, temperaturę), a w końcowym etapie warunki ekstrakcji. Jest to w sposób oczywisty i logiczny kolejność odwrotna w stosunku do kolejności etapów analizy próbek.

Pestycydy, których oznaczanie za pomocą techniki *GC/MS* sprawia trudność, mogą być oznaczane techniką *LC-MS/MS*. W przypadku opracowania metodyk mających na celu oznaczanie wielu związków jednocześnie optymalizacja parametrów pracy urządzenia *MS/MS* jest najbardziej czaso- i pracochłonnym etapem, ponieważ należy zoptymalizować warunki pracy tandemowego spektrometru mas dla każdego analitu osobno.

Granice wykrywalności i oznaczalności są parametrami, które odgrywają istotną rolę w procesie walidacji metodyk analitycznych, a wyznaczenie ich wartości jest konieczne, by opracowana metoda mogła być wykorzystana podczas oznaczania próbek rzeczywistych.

Tabela 7. Informacje o pestycydach, które będą oznaczane w badanych próbkach miodu

Analit	Typ	Klasa chemiczna	Wzór sumaryczny	Masa molowa monoizotopowa [mol/g]	Nr CAS	Współczynnik podziału oktanol-woda logP (przy pH=7, 20°C)	pKa w 25°C	Toksyczność ostra LD50 doustnie szczur [mg/kg]	ADI [mg/(kg*dzień)]	NDP [ng/g]
Acefat	Insektycyd	Fosforoorganiczny	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub> PS	183,0119	30560-19-1	-0,85	8,35	945	0,03	-
Akrynatryna	Insektycyd, Akarycyd	Pyretroid	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> F <sub>6</sub> NO <sub>3</sub>	541,1324	101007-06-1	6,3	- <sup>a)</sup>	>5000	0,01	50
Aldryna	Insektycyd	Cyklodien	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>	361,8757	309-00-2	6,5	- <sup>a)</sup>	39	-	10
Amidosulfuron	Herbicyd	Sulfonilomocznik	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	369,0413	120923-37-7	-1,56	3,58	5000	0,2	10
Asulam	Herbicyd	Karbaminian	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	230,0361	3337-71-1	0,15	1,29 (pKa <sub>2</sub> =4,68)	>5000	0,36	50
Azoksystrobina	Fungicyd	Strobiluryna	C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	403,1168	131860-33-8	2,5	- <sup>a)</sup>	>5000	0,2	10
Beflubutamid	Herbicyd	Amid	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> F <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>	355,1195	113614-08-7	4,28	- <sup>a)</sup>	>5000	0,022	50
Benzoesan emamektyny	Insektycyd, Akarycyd, Stosowany w leczeniu weterynaryjnym	Otrzymany z mikroorganizmów	C <sub>24</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>15</sub> (Benzoesan emamektyny B <sub>1a</sub> ) + C <sub>35</sub> H <sub>73</sub> NO <sub>15</sub> (Benzoesan emamektyny B <sub>1b</sub> )	1007,5606	155569-91-8	5,0	- <sup>a)</sup>	70	-	10
			993,5450	137512-74-4						
Bitertanol	Fungicyd	Triazol	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	337,1790	55179-31-2	4,1	- <sup>a)</sup>	>5000	0,01	-
Boskalid	Fungicyd	Karboasoamid	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	342,0327	188425-85-6	2,96	- <sup>a)</sup>	>5000	0,04	500
Buprofezyna	Insektycyd, Akarycyd	Niesklasyfikowany	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> OS	305,1562	69327-76-0	4,93	- <sup>a)</sup>	>2198	0,01	50
Chlopyralid	Herbicyd	Związek pirydynowy	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	190,9541	1702-17-6	-2,63	2,01	>2675	0,15	50
Chlorydazon	Herbicyd	Pirydazinon	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> ClN <sub>3</sub> O	221,0356	1698-60-8	1,19	3,38	2140	0,1	50
Chlotianidyna	Insektycyd, Metabolit (gleba)	Neonikotynoid	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	249,0087	210880-92-5	0,905	11,1	>500	0,1	10
Chlorpiryfos	Insektycyd	Fosforoorganiczny	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> PS	348,9263	2921-88-2	4,7	- <sup>a)</sup>	64	0,01	-
Cymoksanil	Fungicyd	Oksym cyanoacetamidu	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	198,0753	57966-95-7	0,67	9,3	960	0,013	50
Cyprodynil	Fungicyd	Anilinopirymidyna	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub>	225,1266	121552-61-2	4	4,44	>2000	0,03	50
Cyprokonazol	Fungicyd	Triazol	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O	291,1138	94361-06-5	3,09	- <sup>a)</sup>	<350	0,02	50
DDT	Insektycyd	Chloroorganiczny	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>5</sub>	351,9147	50-29-3	6,91	- <sup>a)</sup>	113	0,01	50
Deltametryna	Herbicyd, Metabolit (gleba), Stosowany w leczeniu weterynaryjnym	Pyretroid	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> Br <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	504,9711	52918-63-5	4,6	- <sup>a)</sup>	87	0,01	30
Dichlofop	Herbicyd, Metabolit (gleba)	Kwas aryloksyfenoksypropionowy	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	326,0113	40843-25-2	1,61	3,43	>586	-	suma <sup>c)</sup>
Dichlofop metylowy	Herbicyd	Aryloksyfenoksypropionian	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	340,0269	51338-27-3	4,8	- <sup>a)</sup>	>512	0,001	10
Difenokonazol	Fungicyd	Triazol	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	405,0647	119446-68-3	4,36	1,07	1453	0,01	50
Diflubenzuron	Insektycyd	Benzoilomocznik	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> ClF <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	310,0321	35367-38-5	3,89	- <sup>a)</sup>	>4640	0,01	50
Dimetomorf	Fungicyd	Morfolina	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> ClNO <sub>4</sub>	387,1237	110488-70-5	2,68	-1,3	3900	0,05	50
Dimoksystrobina	Fungicyd	Strobiluryna	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	326,1630	149961-52-4	3,59	- <sup>a)</sup>	>5000	0,004	50
α-Endosulfan	Insektycyd, Akarycyd	Chloroorganiczny	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	403,8169	959-98-8	4,75	- <sup>a)</sup>	38	0,006	10
Endryna	Insektycyd, Awicyd, Rodentycyd	Chloroorganiczny	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub> O	377,8706	72-20-8	3,2	- <sup>a)</sup>	7,5	-	10
Epoksykonazol	Fungicyd	Triazol	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> ClFN <sub>3</sub> O	329,0731	133855-98-8/ 135319-73-2/ 106325-08-0	3,3	- <sup>a)</sup>	3160	0,008	50
Etofenproks	Insektycyd	Pyretroid	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	376,2038	80844-07-1	6,9	- <sup>a)</sup>	>2000	0,03	50
Fenazachina	Akarycyd, Insektycyd	Niesklasyfikowany	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O	306,1732	120928-09-8	5,51	2,44	134	0,005	10
Fenbukonazol	Fungicyd	Triazol	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>3</sub>	336,1142	114369-43-6	3,79	- <sup>a)</sup>	>2000	0,006	50
Fenoksaprop-P	Herbicyd	Aryloksyfenoksypropionian	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> ClNO <sub>3</sub>	333,0404	113158-40-0	-	-	-	-	suma <sup>d)</sup>
Fenoksaprop-P etylu	Herbicyd	Aryloksyfenoksypropionian	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> ClNO <sub>3</sub>	361,0717	71283-80-2	4,58	0,18	>3150	0,01	50
Fenpiroksymat	Akarycyd	Pirazol	C <sub>20</sub> H <sub>33</sub> NO	303,2562	134098-61-6	5,01	- <sup>a)</sup>	245	0,01	10
Fenpropidyna	Fungicyd	Niesklasyfikowany	C <sub>19</sub> H <sub>31</sub> N	273,2456	67306-00-7	2,6	10,13	1452	0,02	20
Flonikamid	Insektycyd, Aficyd	Związek pirydynowy	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O	229,0463	158062-67-0	-0,24	11,6	884	0,025	50
Fluazyfop (kwas)	Herbicyd	Kwas aryloksyfenoksypropionowy	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	327,0718	69335-91-7	-	-	-	-	suma <sup>c)</sup>
Fluazyfop-P butylowy	Herbicyd	Aryloksyfenoksypropionian	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	383,1344	79241-46-6	4,5	- <sup>a)</sup>	2451	0,01	50
Fluchinkonazol	Fungicyd	Triazol	C <sub>16</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>3</sub> O	375,0090	136426-54-5	3,24	0,9 (pKa <sub>2</sub> =-4,4)	112	0,002	20

Tabela 7. c.d.

Analit	Typ	Klasa chemiczna	Wzór sumaryczny	Masa molowa monoizotopowa [mol/g]	Nr CAS	Współczynnik podziału oktanol-woda logP (przy pH=7, 20°C)	pKa w 25°C	Toksyczność ostra LD50 doustnie szczur [mg/kg]	ADI [mg/(kg*dzień)]	NDP [ng/g]
Fluoksastrobina	Fungicyd	Strobiluryna	C <sub>21</sub> H <sub>16</sub> ClFN <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	458,0793	361377-29-9	2,86	- <sup>a)</sup>	>2000	0,015	10
Fluoksypyr meptylu	Herbicyd	Związek pirydynowy	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	366,0913	81406-37-3	5,04	- <sup>a)</sup>	>2000	0,8	50
Flusilazol	Fungicyd	Triazol	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> Si	315,1003	85509-19-9	3,87	2,5	674	0,002	50
Flutolanil	Fungicyd	Oksetan	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	323,1133	66332-96-5	3,17	- <sup>a)</sup>	>10000	0,09	20
Foksim	Insektycyd, Środek dezynfekujący	Fosforoorganiczny	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	298,0541	14816-18-3	3,38	- <sup>a)</sup>	>2000	0,004	20
Fosalon	Insektycyd, Akarycyd	Fosforoorganiczny	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> ClNO <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>	366,9869	2310-17-0	4,01	- <sup>a)</sup>	120	0,01	50
Fosmet	Insektycyd, Akarycyd, Stosowany w leczeniu weterynaryjnym	Fosforoorganiczny	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>	316,9945	732-11-6	2,96	- <sup>a)</sup>	113	0,01	suma <sup>d)</sup> 50
Fosmet-okson	Insektycyd, Akarycyd,	Fosforoorganiczny	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>5</sub> PS	301,0174	3785-33-9	-	-	-	-	50
Haloksypop-P	Herbicyd, Metabolit (gleba)	Aryloksyfenoksypropionian	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClF <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	361,0329	95977-29-0	0,27	4,27	300	0,00065	suma <sup>d)</sup> 50
Haloksypop-R metylu	Herbicyd	Aryloksyfenoksypropionian	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> ClF <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	375,0485	72619-32-0	4,0	- <sup>a)</sup>	300	0,00065	50
Imazalil	Fungicyd, Stosowany w leczeniu weterynaryjnym	Imidazol	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	296,0483	35554-44-0	2,56	6,49	227	0,025	50
Imidachlopyryd	Insektycyd, Stosowany w leczeniu weterynaryjnym	Neonikotynoid	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	255,0523	138261-41-3	0,57	- <sup>a)</sup>	131	0,06	50
Indoksakarb	Insektycyd	Oksadiazyna	C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	527,0707	173584-44-6	4,65	- <sup>a)</sup>	268	0,006	20
Karbaryl	Insektycyd, Regulator wzrostu roślin	Karbaminian	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	201,0790	63-25-2	2,36	10,4	614	0,0075	-
Karbendazym	Fungicyd, Metabolit (gleba)	Benzimidazol	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	191,0695	10605-21-7	1,48	4,2	>10000	0,02	1000
Karfentrazon etylu	Herbicyd	Triazolion	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	387,0364	128639-02-1	3,36	- <sup>a)</sup>	>5000	0,03	-
Kletodym	Herbicyd	Cykloheksanodion	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> ClNO <sub>2</sub> S	359,1322	99129-21-2	4,14	4,47	1133	0,16	50 <sup>b)</sup>
Kwizalofop-P-etylowy	Herbicyd	Aryloksyfenoksypropionian	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	372,0877	100646-51-3	4,61	- <sup>a)</sup>	1182	0,009	50
Lindan (gamma-HCH)	Insektycyd, Akarycyd	Chloroorganiczny	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>	287,8601	58-89-9	3,69	- <sup>a)</sup>	88	0,003	10
Lufenuron	Insektycyd, Akarycyd, Stosowany w leczeniu weterynaryjnym	Benzoilomocznik	C <sub>17</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	509,9784	103055-07-8	5,12	10,2	>2000	0,0155	20
Malation	Insektycyd, Akarycyd, Stosowany w leczeniu weterynaryjnym	Fosforoorganiczny	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>	330,0361	121-75-5	2,75	- <sup>a)</sup>	1178	0,03	20
Metalaksyl	Fungicyd	Fenylamid	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	279,1471	57837-19-1	1,65	0	633	0,08	-
Metazachlor	Herbicyd	Chloroacetamid	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>3</sub> O	277,0982	67129-08-2	2,49	- <sup>a)</sup>	>2000	0,08	50
Metiokarb	Insektycyd, Moluskocyd	Karbaminian	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub> S	225,0824	2032-65-7	3,18	- <sup>a)</sup>	19	0,013	50
Metkonazol	Fungicyd	Triazol	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O	319,1451	125116-23-6	3,85	11,38 (pKa <sub>2</sub> =1,08)	595	0,01	10
Metydation	Insektycyd, Akarycyd	Fosforoorganiczny	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> PS <sub>3</sub>	301,9619	950-37-8	2,57	- <sup>a)</sup>	25	0,001	-
Nowaluron	Insektycyd	Benzoilomocznik	C <sub>17</sub> H <sub>9</sub> ClF <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	492,01231	116714-46-6	4,3	- <sup>a)</sup>	>5000	0,01	10
Oksadiksyl	Fungicyd	Fenylamid	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	278,1267	77732-09-3	0,65	- <sup>a)</sup>	1860	-	10
Pirydaben	Insektycyd, Akarycyd	Pirydazyon	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>2</sub> OS	468,0732	96489-71-3	6,37	- <sup>a)</sup>	161	0,01	20
Pirimikarb	Insektycyd	Karbaminian	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	238,1430	23103-98-2	1,7	4,4	142	0,035	suma <sup>d)</sup> 50
desmetyl-Pirimikarb	Insektycyd	Karbaminian	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	224,1273	30614-22-3	-	-	-	-	50
Piryproksyfen	Insektycyd, Stosowany w leczeniu weterynaryjnym	Niesklasyfikowany	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	321,1365	95737-68-1	5,37	6,87	>5000	0,1	50
Profam	Herbicyd, Regulator wzrostu roślin	Karbaminian	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	179,0946	122-42-9	2,6	- <sup>a)</sup>	>5000	-	50
Propakwizafop	Herbicyd	Aryloksyfenoksypropionian	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	443,1248	111479-05-1	4,78	- <sup>b)</sup>	>5000	0,015	50
Propamokarb	Fungicyd	Karbaminian	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	188,1525	24579-73-5	0,84	9,5	-	-	100
Prosulfokarb	Herbicyd	Tiokarbaminian	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> NOS	251,1344	52888-80-9	4,48	- <sup>a)</sup>	1820	0,005	50
Setoksydym	Herbicyd	Cykloheksadion	C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>2</sub> S	327,1868	74051-80-2	1,65	4,58	2676	0,14	50 <sup>b)</sup>
Spinosad	Insektycyd	Otrzymany z mikroorganizmów	C <sub>41</sub> H <sub>65</sub> NO <sub>10</sub> (spinozyna A) + C <sub>42</sub> H <sub>67</sub> NO <sub>10</sub> (spinozyna D)	731,4608 745,4765	168316-95-8	4	8,1 (Sp. A) 7,87 (Sp. D)	>2000	0,024	10
Spirodiklofen	Insektycyd, Akarycyd	Kwas tetronowy	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	410,10519	148477-71-8	5,83	- <sup>a)</sup>	>2500	0,015	20
Spiromefezin	Insektycyd	Kwas tetronowy	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	370,2144	283594-90-1	4,55	- <sup>a)</sup>	>2000	0,03	10
Symazyna	Herbicyd	Triazyna	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>5</sub>	201,0781	122-34-9	2,3	1,62	>5000	0,005	10
Tebufenpyrad	Akarycyd	Pirazol	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> ClN <sub>3</sub> O	333,1608	119168-77-3	4,93	- <sup>a)</sup>	>202	0,01	50

Tabela 7. c.d.

Analit	Typ	Klasa chemiczna	Wzór sumaryczny	Masa molowa monoizotopowa [mol/g]	Nr CAS	Współczynnik podziału oktanol-woda logP (przy pH=7, 20°C)	pKa w 25°C	Toksyczność ostra LD50 doustnie szczur [mg/kg]	ADI [mg/(kg*dzień)]	NDP [ng/g]
Tebukonazol	Fungicyd	Triazol	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O	307,1451	107534-96-3	3,7	b. słaba zasada	1700	0,03	50
Teflubenzuron	Insektycyd, Stosowany w leczeniu weterynaryjnym	Benzoilomocznik	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> C <sub>2</sub> F <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	379,9742	83121-18-0	4,3	9,2	>5038	0,01	50
Tepraloksydim	Herbicyd	Oksym cykloheksadionu	C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> ClNO <sub>4</sub>	341,1394	149979-41-9	0,2	4,58	>2000	0,025	20
Tetrazonazol	Fungicyd	Triazol	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O	371,0215	112281-77-3	3,56	0,65 (0,8-0,5)	1031	0,004	20
Tiachlopyrd	Insektycyd, Moluskocyd	Neonikotynoid	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>4</sub> S	355,9593	111988-49-9	1,26	- <sup>a)</sup>	444	0,01	200
Tiametoksam	Insektycyd	Neonikotynoid	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	291,0193	153719-23-4	-0,13	- <sup>a)</sup>	>1563	0,026	10
Tiofanat metylowy	Fungicyd	Benzimidazol	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	342,0456	23564-05-8	1,45	7,28	>5000	0,08	1000
Tolchlofos metylowy	Fungicyd	Chlorofenyl	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	299,9544	57018-04-9	4,56	- <sup>a)</sup>	>5000	0,064	50
Triflumuron	Insektycyd, Stosowany w leczeniu weterynaryjnym	Benzoilomocznik	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	358,0332	64628-44-0	4,9	- <sup>a)</sup>	>5000	0,014	10
Tritosulfuron	Herbicyd	Sulfonylomocznik	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> F <sub>6</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S	445,0279	142469-14-5	2,93	4,69	4700	0,5	10

a) nie dysocjuje

b) nie dysocjuje w przedziale pH 4-9

c) suma pozostałości dichlofopu i dichlofopu metylowego wyrażona jako dichlofop

d) suma pozostałości fenoksapropu-P i fenoksapropu-P etylu wyrażona jako fenoksaprop-P

e) suma pozostałości fluazyfopu-P i fluazyfopu-P butylu wyrażona jako fluazyfop-P

f) suma pozostałości fosmetu i fosmetu oksonu wyrażona jako fosmet

g) suma pozostałości haloksyfopu-P i haloksyfopu-R metylu wyrażona jako haloksyfop-P

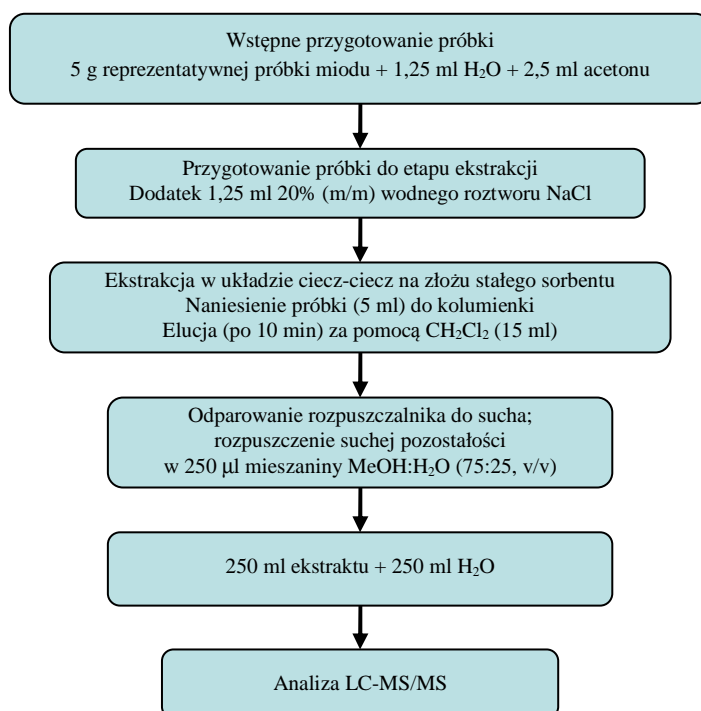
h) suma pozostałości kletodymu i setoksydimu wyrażona jako setoksydim

i) suma pozostałości pirimikarbu i desmetyl-pirimikarbu wyrażona jako pirimikarb

#### 4. Metodyki oznaczania pozostałości pestycydów w próbkach miodu pszczelego

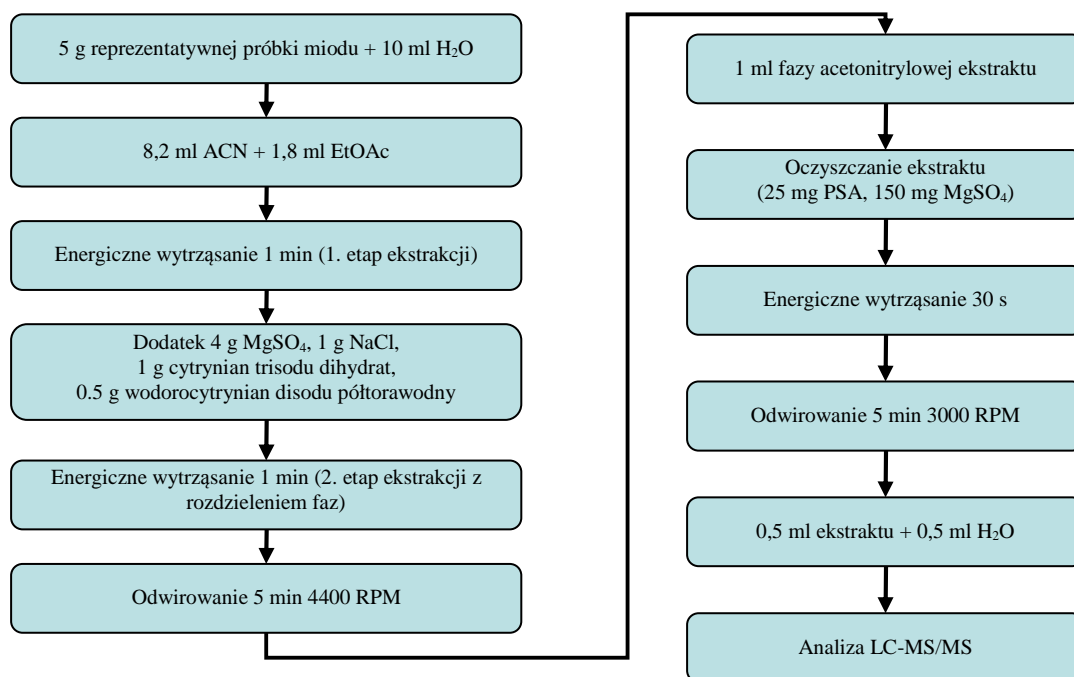
Opracowano cztery procedury oznaczania pozostałości wielu pestycydów w próbkach miodu pszczelego. W przypadku dwóch metodyk różniących się tylko etapem przygotowania próbki porównano wydajność ekstrakcji względem wybranych analitów. Szczegółowe schematy poszczególnych procedur przedstawiono poniżej. Wszystkie ekstrakty przed analizą były filtrowane z użyciem filtrów nastrykawkowych z PTFE 0,2  $\mu\text{m}$ .

Procedurę wykorzystującą technikę ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz na złożu stałego sorbentu zastosowaną do oznaczania pozostałości pestycydów w próbkach miodu pszczelego przedstawiono na **Rysunku 8**.

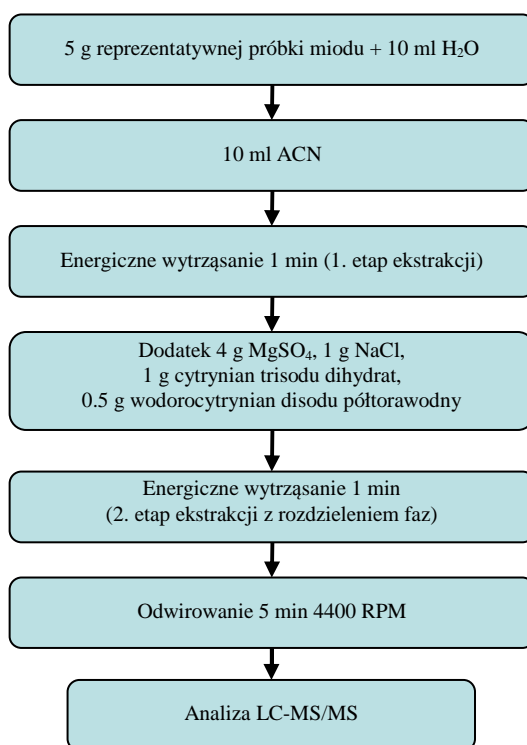


Rysunek 8. Schemat postępowania analitycznego do oznaczania pozostałości pestycydów w próbkach miodu pszczelego z wykorzystaniem ekstrakcji ciecz-ciecz na złożu stałego sorbentu

Schemat procedury oznaczania 72 pozostałości pestycydów i ich metabolitów z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas przedstawiono na **Rysunku 9**. Natomiast procedurę identyfikacji i oznaczania ilościowego 55 pozostałości pestycydów i ich metabolitów z wykorzystaniem detektora Orbitrap umożliwiającego wysoce dokładny pomiar masy zaprezentowano na **Rysunku 10**.

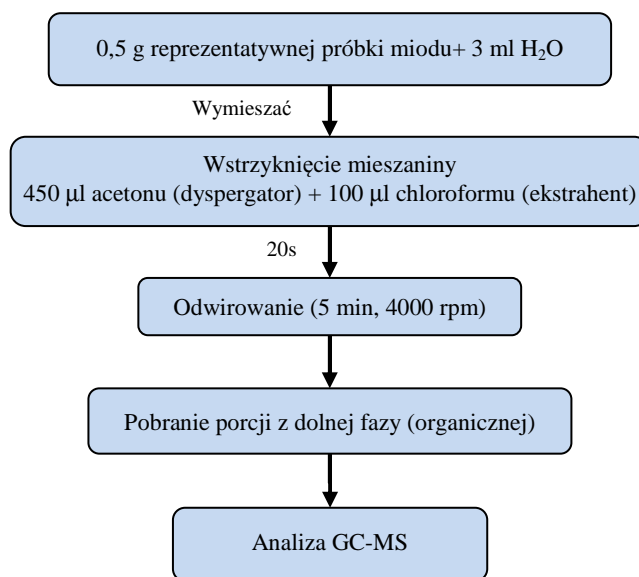


Rysunek 9. Schemat postępowania analitycznego wykorzystującego podejście QuEChERS na etapie przygotowania próbki do oznaczania pozostałości pestycydów w próbkach miodu pszczelego z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS.



Rysunek 10. Schemat postępowania analitycznego wykorzystującego podejście QuEChERS na etapie przygotowania próbki do oznaczania pestycydów w nieoczyszczonym ekstrakcie za pomocą wysoce dokładnego pomiaru masy molowej techniką LC-MS-Orbitrap

Procedurę oznaczania poziomów pozostałości wybranych pestycydów chloroorganicznych w próbkach miodu z wykorzystaniem techniki DLLME do przedstawiono na **Rysunku 11**.



Rysunek 11. Schemat procedury wykorzystanej do oznaczenia poziomów pozostałości wybranych pestycydów chloroorganicznych z zastosowaniem zoptymalizowanych warunków ekstrakcji techniką DLLME.

### 5. Analiza chromatograficzna

Na etapie oznaczeń końcowych wykorzystywano zarówno technikę chromatografii cieczowej, jak i gazowej. Pomimo tego, iż pozostałości większości pestycydów można oznaczać z wykorzystaniem techniki LC, pestycydy chloroorganiczne oznacza się z wykorzystaniem techniki GC, ponieważ umożliwia ona uzyskanie niższych wartości granic wykrywalności i oznaczalności [100,101]. Warunki prowadzenia analiz, wraz z podaniem rodzaju wypełnienia kolumn zestawiono w **Tabeli 8. i 9.**

Do detekcji wykorzystano tandemowy spektrometr mas oraz spektrometr mas z orbitalną pułapką jonową, z jonizacją przez elektrorozpylanie – w przypadku metodologii opartych na wykorzystaniu techniki LC; oraz spektrometr mas z pojedynczym kwadrupolem i jonizacją w strumieniu elektronów, pracujący w trybie SIM – w przypadku wykorzystania techniki GC. Monitorowane przejścia fragmentacyjne i specyficzne dla nich parametry detektora MS/MS oraz monitorowane jony (w przypadku wykorzystania GC-MS) zestawiono w **Tabeli 10.**



Tabela 8. Warunki prowadzenia analiz z wykorzystaniem techniki chromatografii ciekowej

Sposób przygotowania próbki do analizy chromatograficznej	SLE	QuEChERS	SLE lub QuEChERS	QuEChERS
Element układu pomiarowego	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS-Orbitrap
Chromatograf ciekowy	Agilent 1100	Agilent 1100	Agilent Infinity 1260	Dionex UltiMate 3000 HPLC
Detektor	4000 QTRAP (ABSciex)		6460 QqQ (Agilent)	LTQ Velos Orbitrap (Thermo-Fisher Scientific)
Tryb i czas monitorowania poszczególnych jonów lub przejść charakterystycznych	stały; DT = 50 ms	dynamiczny, TST = 2 s	dynamiczny, DT dobierane automatycznie w zależności od intensywności sygnału na podstawie wstępnego pomiaru	
Parametry pracy źródła jonizacji	ESI: +4700 V TEM: 350°C CUR: 25 psi GS1: 40 psi GS2: 40 psi	ESI: +5000 TEM: 600 CUR: 25 psi GS1: 50 psi GS2: 60 psi	ESI: +4500 Temp. gazu: 350°C Gaz rozpylający: 45 psi Przepływ gazu osłonowego: 10 l/min Temp. gazu osłonowego: 300°C delta EMV: 300 V	Zakres mas jonów: 150.0-1100.0 m/z) Rozdzielczość: 60000 FWHM HESI: +3500 V Temp. kapilary: 360°C Gaz rozpylający: 50 au Gaz pomocniczy: 17 au Gaz osłonowy: 5 au Temp. źródła : 350°C
Kolumna chromatograficzna	Atlantis™ dC18; 2,1 × 100 mm; 3 μm	ACE C <sub>18</sub> -PPF; 2,1 × 50 mm; 3 μm	Kinetex C <sub>18</sub> ; 2,1 × 50 mm; 1,7 μm core-shell	Ascentis Express; 2,1 × 50 mm; 2,7 μm fused-core
Faza stacjonarna	dC18	C18-PPF	C18	C18
Skład fazy ruchomej	A: H <sub>2</sub> O B: MeOH	A: H <sub>2</sub> O:MeOH 90:10 z 10 mM mrówczanem amonu B: H <sub>2</sub> O:MeOH 10:90 z 10 mM mrówczanem amonu		
Gradient elucji	Czas [min]    A:B (% v/v) 0            65/35 1            80/20 5            90/10 12,5        90/10 -            - -            -	Czas [min]    A:B (% v/v) 0            90/10 0,5         90/10 3            40/60 12          10/90 17          10/90 -            -	Czas [min]    A:B (% v/v) 0            80/20 0,5         80/20 2,5         40/60 4,5         40/60 9            10/90 14          10/90	Czas [min]    A:B (% v/v) 0            80/20 0,5         80/20 2,5         40/60 4,5         40/60 9            10/90 14          10/90
Natężenie przepływu eluentu	0,2 ml/min	0,4 ml/min		
Temperatura kolumny	40°C			
Objętość dozowanej próbki	5 μl			10 μl
Czas analizy + czas równoważenia przed analizą	12,5 min + 7,5 min	17 min + 4,5 min	14 min + 2 min	14 min + 3 min
Całkowity czas potrzebny na analizę jednej próbki	20 min	21,5 min	16	17
Ilość analizów	13	72	30	55

Tabela 9. Warunki prowadzenia analizy z wykorzystaniem techniki chromatografii gazowej

Sposób przygotowania próbki do analizy chromatograficznej	DLLME
Element układu pomiarowego	GC-EI-MS
Chromatograf gazowy	Agilent 5975A
Detektor	Agilent 5975C
Temperatura źródła jonizacji	230°C
Temperatura kwadrupola	150°C
Energia strumienia elektronów:	70 eV
Kolumna chromatograficzna	Zebtron ZB-5MS; 30 m × 0,25 mm; 0,25 μm fazy stacjonarnej
Faza stacjonarna	5% fenyl-arylen, 95% dimetylopolisiloksan
Ciśnienie gazu nośnego (He)	10,15 psi (70 kPa)
Natężenie przepływu gazu nośnego	1 ml/min

Tabela 9. c.d.

Temperatura dozownika	280°C
Temperatura złącza	280°C
Tryb pracy dozownika	bez podziału strumienia (splitless)
Program temperaturowy	80°C (1 min)
	80°C - 180°C (15°C/min)
	180°C - 240°C (10°C/min)
	240°C (3 min)
	240°C - 300°C (20°C/min)
300°C (2 min)	
Objętość dozowanej próbki	2 µl
Czas analizy	22 min
Ilość analizów	9

Tabela 10. Masy monitorowanych jonów wybranych do detekcji pozostałości poszczególnych pestycydów

Analit	Monitorowane przejścia charakterystyczne [m/z]		4000 QTRAP		QqQ 6460		5975C	
			DP [V]	CE [V]	Frag [V]	CE [V]	Monitorowane jony [m/z]	DT [ms]
Acefat	184,1	→ 143,1	38	13				
	184,1	→ 125,0		27				
Akrynatryna	559	→ 208			100	8		
	559	→ 181			100	28		
Aldryna							263; 91	100
Amidosulfuron	370,1	→ 261,3	62	22				
	370,1	→ 218,2		34				
Asulam	231	→ 156,1	64	17				
	231	→ 92		33				
Azoksystrobina	404,1	→ 372,1	51	19	100	8		
	404,1	→ 344,1		27	100	24		
Beflubutamid	356,3	→ 91,1	60	47				
	356,3	→ 65,1		109				
Benzoesan emamektyny	886,5	→ 158,6	110	53	200	40		
	886,5	→ 126,3		68	200	96		
Bitertanol	338,1	→ 70,1	36	25				
	338,1	→ 269,2		13				
Boskalid	343	→ 307	91	27				
	343	→ 140		27				
Buprofezyna	306,2	→ 201,1	46	17	100	4		
	306,2	→ 116,2		21	100	12		
Chloridazon	221,9	→ 104,1	120	33	150	20		
	221,9	→ 92,1		37	150	24		
Chlorpiryfos	349,9	→ 97,0	48	51				
	349,9	→ 198,0		25				
Chlotianidyna	250,0	→ 169,1	51	17				
	250,0	→ 132,0		21				
Cymoksanil	199	→ 128			50	4		
	199	→ 83			50	20		
Cyprodynil	226	→ 93	81	45	150	36		
	226	→ 77		63	150	48		
Cyprokonazol (izomer 1)	292,2	→ 70,2	56	33				
	292,2	→ 125,2		37				
Cyprokonazol (izomer 2)	292,1	→ 70,2	56	33				
	292,1	→ 125,2		37				
2,4'-DDD (TDE)							235; 165	60
2,4'-DDE							246; 176	60
2,4'-DDT							235; 165	100
2,4'-D8-DDE							254; 184	60
2,4'-D8-DDT							243; 173	80
4,4'-DDE							246; 318	60
4,4'-DDT							235; 237	80
Detametryna	523,0	→ 280,8	56	20				
	523,0	→ 181,0		48				
Dichlofop metylowy	358,1	→ 281,1	28	20				
	358,1	→ 120,1		38				
Difenokonazol	406,2	→ 251,1	76	37				
	408,2	→ 253,1		33				

Tabela 10. c.d.

Analit	Monitorowane przejścia charakterystyczne [m/z]			4000 QTRAP		QqQ 6460		5975C	
				DP [V]	CE [V]	Frag [V]	CE [V]	Monitorowane jony [m/z]	DT [ms]
Diflubenzuron	311	→	158,2	46	19	100	8		
	311	→	141,2		47		32		
Dimetomorf (izomer 1)	388,2	→	301,1	66	25	100	16		
	388,2	→	165,2		45		32		
Dimetomorf (izomer 2)	388,1	→	301,1	66	25				
	388,1	→	165,2		45				
Dimoksystrobina	327,1	→	205	40	15				
	327,1	→	116		35				
α-Endosulfan								237; 170	60
Endryna								263; 81	100
Epoksykonazol	330	→	121	56	27				
	330	→	101		63				
Etofenproks	394,1	→	177,3	48	21	100	8		
	394,1	→	107,1		57		40		
Fenazachina	307	→	161	61	31	100	12		
	307	→	147		25		16		
Fenbukonazol	337	→	125	61	37	100	16		
	337	→	70		33		28		
Fenoksaprop-P etylu	362,1	→	288,2	60	26				
	362,1	→	121,1		40				
Fenoksaprop-P	331,9	→	259,9			100	4		
	331,9	→	151,9				12		
Fenpiroksymat	422	→	366,1	56	23	100	12		
	422	→	135,1		43		28		
Fenpropidyna	274,3	→	147,3	166	41	150	28		
	274,3	→	117		75		60		
Flonikamid	230,1	→	203,1	55	35				
	230,1	→	174		35				
Fluazyfop-P butylowy	384	→	328,2	124	23	150	12		
	384	→	282,2		28		16		
Fluoksastrobina	459,2	→	427,2	55	28				
	459,2	→	188		35				
Fluroksypyr meptylu	255,1	→	209,1	46	19				
	255,1	→	181,0		31				
Flusilazol	316	→	247	56	25	100	12		
	316	→	165		35		28		
Flutolanil	341,1	→	242,1	61	35	100	24		
	341,1	→	262,1		35		12		
Foksim	299	→	129	70	19	50	4		
	299	→	77		47		32		
Fosalon	368	→	182,1	44	19	100	8		
	368	→	111		59		44		
Fosmet	318	→	160	51	19				
	318	→	133		49				
Fosmet-okson	302,1	→	160,2	44	20				
	302,1	→	77,1		71				
Haloksyfop-P	362,2	→	316,1	64	27				
	362,2	→	91,1		50				
Haloksyfop-R metylu	376,1	→	316,2	62	24				
	376,1	→	288,2		35				
Imazalil	297,1	→	159,1	61	30				
	297,1	→	161,1		33				
Imidachlopryd	256,2	→	209	51	23				
	256,2	→	175,2		23				
Indoksakarb	528	→	203	96	51				
	528	→	56		55				
Karbaryl	202,0	→	145,1	52	15				
	202,0	→	127,1		40				
Karbendazym	192,2	→	160,2	56	27				
	192,2	→	132,1		41				
Karfentrazon etylowy	412,1	→	346,2	82	33				
	412,1	→	346,2		25				
Kletodym (izomer 1)	360	→	164	61	25				
	360	→	268		17				
Kletodym (izomer 2)	360	→	164	61	25				
	360	→	268		17				
Kwizalofop-P etylowy	373,1	→	299,1	124	27	146	16		
	375,1	→	301,1		27		14		
Lindan (γ-HCH)								219; 183	100

Tabela 10. c.d.

Analit	Monitorowane przejścia charakterystyczne [m/z]		4000 QTRAP		QqQ 6460		5975C	
			DP [V]	CE [V]	Frag [V]	CE [V]	Monitorowane jony [m/z]	DT [ms]
Lufenuron	511,1	→ 158,1	61	27				
	511,1	→ 141,2		67				
Malation	331,0	→ 127,1	40	18				
	331,0	→ 99,0		32				
Metalaksyl	280,1	→ 220,1	53	19				
	280,1	→ 192,1		25				
Metazachlor	278,2	→ 134,2	51	27	50	16		
	278,2	→ 210,2		17	50	4		
Metidation	303,0	→ 145,1	30	14				
	303,0	→ 85,1		29				
Metiokarb	226,1	→ 169,2	41	13	50	8		
	226,1	→ 121,1		23	50	20		
Metkonazol	320	→ 70	56	45				
	320	→ 125		49				
Nowaluron	493	→ 158,1	71	27				
	493	→ 141,1		69				
Oksadiksył	279,2	→ 219,2	46	15				
	279,2	→ 132,1		41				
Pirimikarb	239,2	→ 72,1	53	34				
	239,2	→ 182,2		21				
desmetyl-Pirimikarb	225,1	→ 72,1	56	29				
	225,1	→ 168,2		21				
Pirydaben	365	→ 147	46	31	100	20		
	365	→ 309		19	100	8		
Piryproksyfen	322,1	→ 96	36	21	100	12		
	322,1	→ 185,1		29	100	20		
Profam	180	→ 138	36	13	50	4		
	180	→ 120		25	50	12		
Propakwizafop	444,1	→ 100,1	108	29	100	16		
	444,1	→ 299,2		31	100	20		
Propamokarb	189,2	→ 102,2	51	24				
	189,2	→ 73,9		35				
Prosulfokarb	252,3	→ 91,1	51	35	100	20		
	252,3	→ 128,1		17	100	4		
Spinozyna A	732,6	→ 142,1	131	43				
	732,6	→ 98		105				
Spinozyna D	746,6	→ 142,1	136	43				
	746,6	→ 98		113				
Spirodiklofen	411,3	→ 313,2	40	25				
	411,3	→ 213,1		35				
Symazyna	202,1	→ 132,1	66	25	100	16		
	202,1	→ 124,3		25	100	16		
Tebufenpyrad	334	→ 117	71	47	150	40		
	334	→ 145		37	150	24		
Tebukonazol	308	→ 70	41	39				
	308	→ 125		47				
Teflubenzuron	381,1	→ 141,2	66	53				
	381,1	→ 158,2		23				
Tetrakonazol	372	→ 159	56	39				
	372	→ 70		47				
Tiachlopyrd	253,1	→ 126,1	61	29				
	253,1	→ 99,1		57				
Tiametoksam	292	→ 211	71	17				
	292	→ 181		31				
Tiofanat metylowy	343	→ 151	46	25				
	343	→ 192		21				
Tolchlofos metylowy	301,1	→ 269,1	60	24				
	301,1	→ 175		36				
Tribenuron metylu	396,2	→ 155,2	45	21				
	396,2	→ 364,1		16				
Triflumuron	359,1	→ 156,2	51	23				
	359,1	→ 139		43				
Tritosulfuron	446,1	→ 195,2	84	29				
	446,1	→ 145,2		59				
TPP (IS)	327,2	→ 77,1	93	54				
	327,2	→ 152,1		69				

## IV. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

### *6. Wyznaczenie optymalnych parametrów proponowanych procedur analitycznych*

#### *6.1 Wyznaczenie optymalnych warunków chromatograficznych oznaczania pozostałości wybranych pestycydów techniką chromatografii cieczowej*

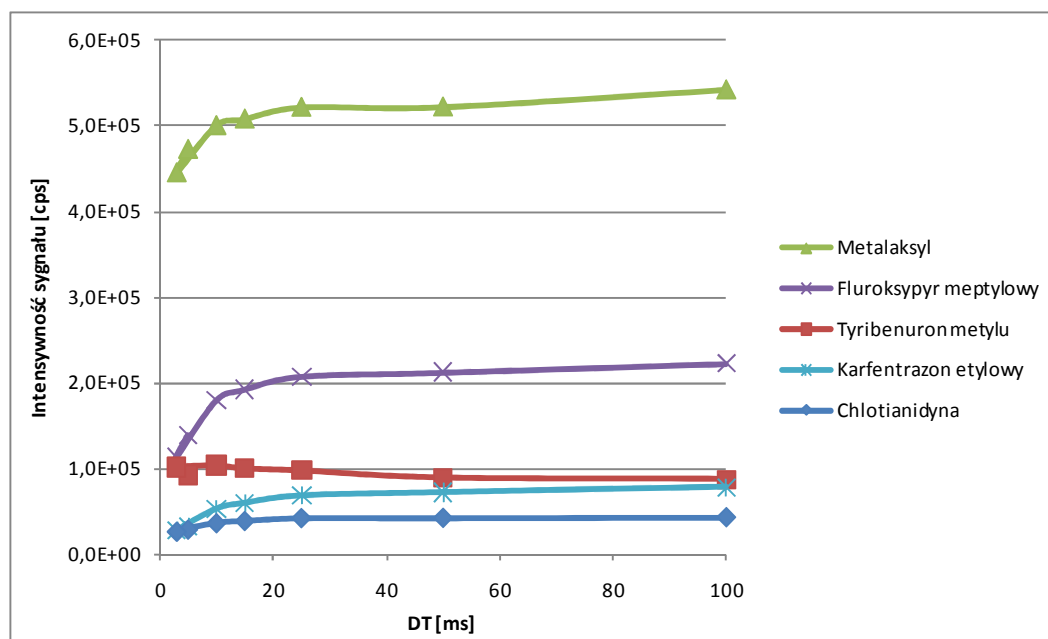
##### *6.1.1 Optymalizacja parametrów pracy spektrometrów mas*

W celu optymalizacji parametrów pracy urządzenia MS/MS (4000 QTRAP®), takich jak DP i CE, charakterystycznych dla poszczególnych oznaczanych pestycydów, sporządzono roztwory wzorcowe pojedynczych analitów w mieszaninie metanol – woda (50:50, v/v) by miały one skład zbliżony do stosowanej fazy ruchomej. Optymalny zakres stężenia analitu do optymalizacji detektora MS/MS mieści się w przedziale 1-100 µg/ml. Analizie poddano próbki roztworów wzorcowych, w których stężenie związku było na poziomie 2 µg/ml. Takie stężenie zapewniło wystarczającą intensywność sygnałów jonów mas i umożliwiło prawidłową identyfikację jonu pseudomolekularnego  $[M+H^+]$  lub adduktu  $[M+NH_4^+]$  albo  $[M+Na^+]$ , wybór charakterystycznych jonów fragmentacyjnych oraz optymalizację parametrów urządzenia MS/MS dla każdego analitu. Po optymalizacji parametrów charakterystycznych dla poszczególnych analitów (**Tabela 9.**) skupiono się na parametrach pracy urządzenia MS/MS, takich jak:

- potencjał jonizacyjny,
- temperatura źródła jonizacji,
- ciśnienia gazów: osłonowego, rozpylającego i ogrzewającego.

Parametry te zostały zoptymalizowane tak, aby uzyskać stabilne i jak najbardziej intensywne sygnały pochodzące od monitorowanych reakcji fragmentacji jonów. Optymalizację tych parametrów wykonano stosując technikę FIA, wykonując trójrotnie analizy dla każdej konfiguracji optymalizowanych parametrów i przyjmując jako optymalne wartości najlepsze dla związku dającego najsłabszy sygnał spośród wszystkich analitów.

Następnie zbadano wpływ wartości DT na intensywność sygnału analitu (na podstawie stosunku sygnału do szumu). Przykładowe wyniki dla kilku analitów zaprezentowano na **Rysunku 12.**



Rysunek 12. Zmiana zależności intensywności sygnału detektora od wielkości DT dla kilku przykładowych analitów.

Jak wynika z zależności zobrazowanej na wykresie, zwiększenie wartości DT powyżej 25 ms nie powoduje dalszego zwiększenia intensywności sygnału.

Podstawą identyfikacji analitów był czas retencji oraz 2 charakterystyczne przejścia MRM. Do analizy ilościowej wybierane było to przejście charakterystyczne dla poszczególnych analitów, które dawało bardziej intensywny sygnał.

Pierwotnie oznaczano anality w naprzemiennym trybie jonizacji dodatniej i ujemnej, co pozwoliło na oznaczanie większej ilości pestycydów (80) w jednym cyklu analitycznym. Aby możliwe było uzyskanie minimalnej ilości 5 punktów pomiarowych na pik, wymagane było ustalenie wartości DT jedynie na 5 ms.

Dla każdego z 80 analitów monitorowane są po dwa przejścia charakterystyczne – w sumie monitorowanych jest 160 przejść MRM w cyklu. Czas jednego cyklu zależy od tego jak długo zbierane są informacje dla poszczególnych przejść (DT). Czas stabilizacji urządzenia po przejściu z trybu jonizacji dodatniej na ujemną ustawiono na 700 ms – jest to optymalna wartość. Ten czas uwzględniony jest w czasie trwania jednego cyklu. Szerokość połówkowa najwyższego pików wynosiła ok. 7,7 s, więc chcąc uzyskać dla niego minimum 5 punktów pomiarowych jeden cykl musiałby trwać ok. 1,54 s. Jeśli odejmiemy od tego czas potrzebny na stabilizację (0,7 s), to na monitorowanie 160 przejść pozostaje 0,84 s, co daje w wyniku ok. 5 ms na jedno przejście.

Przy takiej wartości DT sygnały są mniej intensywne, przez co obniżeniu ulega również wartość S/N. Jest to czas odpowiedni w przypadku metod przesiewowych, jednak do

analizy ilościowej minimum to  $DT = 25$  ms i ok. 15 punktów/pik. Można by zwiększyć  $DT$  do wymaganego minimum, jednak by to uczynić i zachować wymaganą ilość pktów/pik należałoby czas monitorowania jonów podzielić na kilka okresów. Nie można było jednak tego uczynić, ponieważ brak było na chromatogramie miejsca, w którym przez dostatecznie długi czas (kilka sekund) nie eluowały anality. Rozwiązaniem jest zastosowanie trybu sMRM, czyli zaplanowanego monitorowania przejść charakterystycznych – różnica w stosunku do typowego MRM jest taka, że definiuje się okna czasowe, w których monitorowane mają być przejścia dla poszczególnych analitów i określa się długość cyklu monitorowania (TST).  $DT$  jest dobrany automatycznie na podstawie zadanej długości cyklu i ilości monitorowanych w danym okresie przejść charakterystycznych. Pozwala to na uzyskanie jakościowo lepszych chromatogramów MRM, a tym samym umożliwia analizę ilościową, jednakże dzieje się to kosztem możliwości monitorowania w naprzemiennym trybie jonizacji dodatniej i ujemnej.

Optymalizacja parametrów pracy detektora QqQ 6460 wykonana została automatycznie z wykorzystaniem techniki FIA dla zdefiniowanych przejść charakterystycznych. W ten sposób ustalone zostały odpowiednie wartości napięcia fragmentującego oraz CE. Optymalna wartość EMV została dobrana przez wykonanie serii analiz tego samego roztworu kalibracyjnego przy ustawionych różnych wartościach EMV. Podobnie jak poprzednio, kryterium wyboru optymalnej wartości była największa intensywność (wysokość piku chromatograficznego) najślabszego sygnału spośród tych monitorowanych. Pozostałe parametry, takie jak temperatura źródła jonizacji czy prędkości przepływu gazów ustawiono na typowe wartości używane podczas analiz pozostałości związków ochrony roślin.

Parametry pracy detektora LTQ Velos Orbitrap, takie jak napięcie i temperatury źródła jonizacji oraz prędkości przepływu gazów dobrane zostały na podstawie prędkości przepływu eluentu i jego składu. Pozostałe parametry dobierane były dynamicznie podczas prowadzenia analizy, przed urządzenie, w sposób automatyczny na podstawie wstępnych skanów, za każdym razem gdy zmierzony sygnał był większy od określonej wartości granicznej, poniżej której sygnały były uznawane za szumy.

### ***6.1.2 Ustalenie optymalnych warunków procesu rozdzielania chromatograficznego***

Po wyborze przejść charakterystycznych i optymalizacji parametrów urządzenia MS/MS dla każdego oznaczanego pestycydu, dobrano parametry analizy chromatograficznej (rozdzielenia chromatograficznego). Na różnych etapach badań sprawdzone zostały następujące kolumny chromatograficzne:

- Zorbax Eclipse DBX C18 (4,6×100 mm; 3,5 μm);
- Waters Atlantis™ dC18 (2,1×100 mm; 3 μm);
- Kinetex C18 (2,1 × 50 mm; 1,7 μm core-shell);
- Ascentis Express C18 (2,1 × 50 mm; 2,7 μm fused-core).
- ACE C18-PFP (2,1 × 50 mm; 3 μm);

W celu dostosowania gradientu elucji wykonano wstępną analizę stosując elucję o gradiencie liniowym 100% A do 100% B w ciągu 15 minut, następnie 10 min elucji 100% B, by mieć pewność, że związki silniej zatrzymywane w kolumnie w niej nie pozostały. Przed wykonaniem następnej analizy korygowano gradient elucji tak, by piki były względnie rozdzielone. W przypadku stosowania tandemowego spektrometru mas pracującego w trybie monitorowania wielu reakcji całkowite rozdzielanie pików chromatograficznych do podstawy nie jest konieczne dzięki tzw. wirtualnemu rozdzielaniu, które uzyskuje się właśnie przez zastosowanie trybu MRM. Pozwala to na oddzielne monitorowanie analitów. Początkowo wykonano analizę przy prędkości przepływu eluentu 0,2 ml/min, zwiększając ją do 0,4 ml/min, jeśli nie spowodowało to przekroczenia ciśnienia wstecznego dopuszczalnego dla danej kolumny chromatograficznej oraz jeśli nie pogorszało to jakości rozdzielania chromatograficznego.

Podczas optymalizacji części chromatograficznej należało również sprostać takim wyzwaniom jak efekty matrycowe czy zjawisko występowania rozdwojonych pików.

Miód charakteryzuje się złożonym składem matrycy i może w znacznym stopniu wpływać na wydajność procesu jonizacji. Niektóre z sygnałów monitorowanych przejść charakterystycznych dla wzorców w ekstrakcie ślepej próbki uległy znacznemu osłabieniu w stosunku do sygnałów analogicznych przejść dla wzorców w rozpuszczalniku. Zauważyć można było również niewielkie zmiany czasów retencji poszczególnych analitów.

Celem potwierdzenia istotności stosowania próbek kalibracyjnych i wzorcowych podczas procesu walidacji zbadano wielkość wpływu efektu matrycowego na intensywność sygnału dla przejść charakterystycznych poszczególnych analitów. Określono ją na podstawie stosunku liczbowego współczynników kierunkowych liniowych równań regresji krzywych kalibracyjnych wyznaczonych na podstawie wyników analiz próbek kalibracyjnych i roztworów mieszaniny wzorców tych samych analitów w czystym rozpuszczalniku. Wyniki dla kilku przykładowych analitów zestawiono w **Tabeli 11**.



Tabela 11. Parametry równań regresji liniowej, wpływ efektu matrycowego na intensywność sygnału detektora

Analit	IQL [ng/g]	Równanie liniowe wzorce w rozpuszczalniku	R <sup>2</sup>	Równanie liniowe wzorce w ekstrakcie ślepej próbki	R <sup>2</sup>	Stosunek współczynników kierunkowych pr. ślepa/rozpuszczalnik	Wzmocnienie (+)/ osłabienie (-) sygnału w %
Acefat	0,73	$9,90 \cdot 10^4 x - 4,32 \cdot 10^3$	0,9990	$2,37 \cdot 10^4 x - 1,40 \cdot 10^3$	0,9994	0,24	-76,1
Chlotianidyna	0,49	$2,61 \cdot 10^4 x + 382$	0,9978	$4,68 \cdot 10^3 x + 4,01 \cdot 10^3$	0,9900	0,18	-82,1
Imazalil	0,61	$3,49 \cdot 10^4 x + 5,41 \cdot 10^3$	0,9984	$1,37 \cdot 10^4 x + 2,81 \cdot 10^3$	0,9978	0,39	-60,0
Karbaryl	0,52	$9,61 \cdot 10^4 x - 3,12 \cdot 10^3$	0,9997	$2,55 \cdot 10^4 x + 673$	0,9992	0,26	-73,5
Tribenuron metylu	0,080	$1,69 \cdot 10^4 x + 4,54 \cdot 10^3$	0,9901	$4,43 \cdot 10^3 x + 1,33 \cdot 10^3$	0,9524	0,26	-73,8
Metalaksyl	0,28	$2,58 \cdot 10^5 x - 8,30 \cdot 10^3$	0,9995	$2,07 \cdot 10^5 x + 1,35 \cdot 10^3$	0,9995	0,81	-19,5
Metidation	0,61	$8,93 \cdot 10^4 x - 5,82 \cdot 10^3$	0,9975	$5,47 \cdot 10^4 x + 2,50 \cdot 10^3$	0,9982	0,61	-38,8
Malation	0,54	$7,98 \cdot 10^4 x - 6,57 \cdot 10^3$	0,9971	$7,08 \cdot 10^4 x - 1,01 \cdot 10^3$	0,9994	0,89	-11,2
Karfentrazon etylu	0,14	$3,02 \cdot 10^4 x - 944$	0,9992	$3,35 \cdot 10^4 x + 193$	0,9996	1,11	11,0
Bitertanol	0,30	$3,21 \cdot 10^4 x - 1,11 \cdot 10^3$	0,9992	$3,23 \cdot 10^4 x + 1,09 \cdot 10^3$	0,9989	1,01	0,65
Piryproksyfen	0,039	$4,09 \cdot 10^5 x - 1,19 \cdot 10^4$	0,9995	$3,69 \cdot 10^5 x - 210$	0,9990	0,90	-9,9
Chlorpiryfos	0,25	$3,81 \cdot 10^4 x - 1,79 \cdot 10^3$	0,9988	$2,98 \cdot 10^4 x + 8,25 \cdot 10^3$	0,9983	0,73	-21,8
Fluoksypyr meptylowy	0,10	$1,24 \cdot 10^5 x - 5,82 \cdot 10^3$	0,9990	$1,02 \cdot 10^5 x + 2,86 \cdot 10^3$	0,9994	0,82	-17,7

Odpowiedź detektora była liniowa w badanym zakresie stężeń (IQL – 5 ng/g). W przypadku 6 pestycydów zaobserwowano znaczny wpływ efektu matrycowego, który spowodował spadek intensywności sygnałów o ponad 60%. W przypadku metidationu intensywność sygnału uległa zmniejszeniu w stopniu umiarkowanym (ok. 40%). Sygnały dla reszty analitów były w niewielkim stopniu osłabione lub wzmocnione. Wskazuje to na znaczny wpływ efektu matrycowego w próbkach miodu. Rozcieńczanie ekstraktów wodą pomaga zmniejszyć wpływ efektu matrycowego, jednakże wpływa to na obniżenie czułości metodyki, skutkując podwyższeniem granic wykrywalności i oznaczalności. Pomimo tego powyższe rozwiązanie jest szeroko akceptowane i stosowane, szczególnie w laboratoriach prowadzących badania na szeroka skalę.

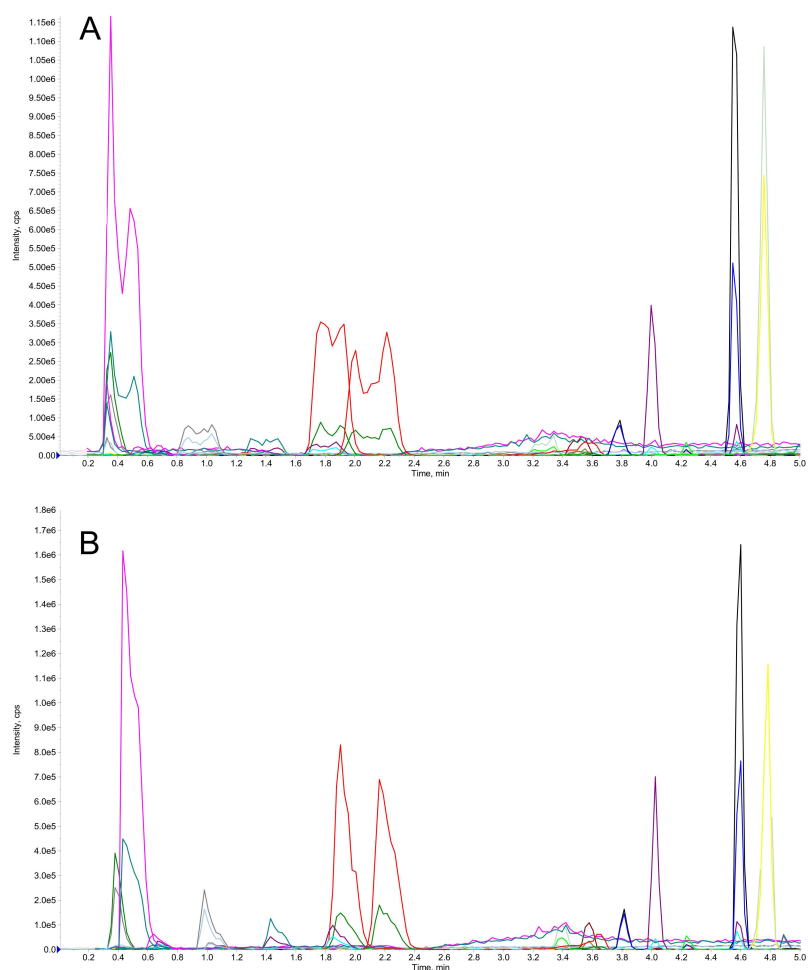
Zjawisko rozdwojonych pików występuje w sytuacji, gdy dozowana jest próbka zawierająca anality rozpuszczone w rozpuszczalniku o większej mocy elucyjnej niż początkowy gradient elucji. Tak też było w tym przypadku – anality rozpuszczone były w acetonitrylu, natomiast gradient elucji rozpoczynał się od mieszaniny o składzie 80% H<sub>2</sub>O i 20% MeOH (v/v). Po zadozowaniu próbki do układu chromatograficznego, acetonitryl (rozpuszczalnik próbki) z analitami nie zdąży się całkowicie przemieszczać z fazą ruchomą i po dotarciu na czoło kolumny część związków słabiej oddziałujących z fazą stacjonarną jest unoszona we frakcji acetonitrylowej, co skutkuje rozdwojeniem pików.

Jednym z możliwych stosowanych rozwiązań jest rozcieńczenie próbki przed jej dozowaniem do kolumny chromatograficznej w celu zbliżenia mocy elucyjnej

rozpuszczalnika do tej początkowego gradientu. Powoduje to jednak obniżenie czułości (podwyższenie granic wykrywalności i oznaczalności).

Drugą możliwością jest zastosowanie programowalnej zoptymalizowanej sekwencji nastrzyku (POISe) – polegające na oddzieleniu próbki od eluentu porcją wody [102].

Podczas przemieszczania w układzie chromatograficznym składniki próbki zaczynają mieszać się z wodą (dyfuzja). W momencie dojścia próbki do czoła kolumny chromatograficznej woda, słabiej oddziałująca z fazą stacjonarną, nie jest zatrzymywana i przemieszcza się przez frakcję acetonitrylową, mieszając się z nią i powodując znaczne obniżenie mocy elucyjnej rozpuszczalnika próbki. Powoduje to znaczną eliminację zjawiska rozdwojonych pików, co pokazano na **Rysunku 13**.



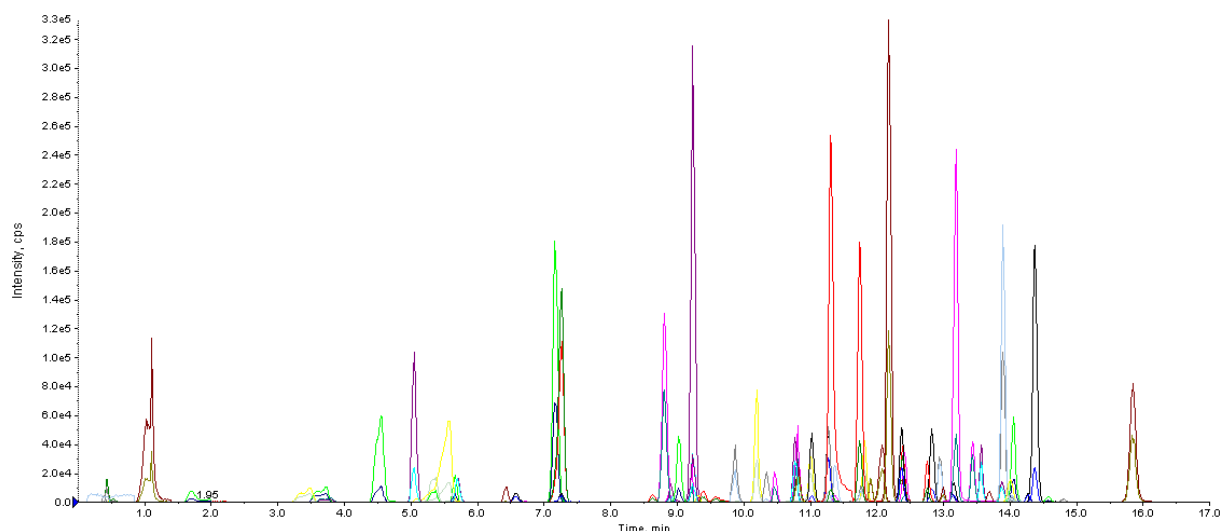
Rysunek 13. Fragment chromatogramu z pikami związków wczesnie opuszczających kolumnę chromatograficzną. Chromatogram otrzymany w trakcie analizy acetonitrylowego ekstraktu z próbki miodu z wykorzystaniem kolumny Kinetex C18 (2,1 × 50 mm; 1,7 μm core-shell):

A: dozowanie 5 μl próbki; B: dozowanie z zastosowaniem porcji 10 μl wody za 5 μl próbki.

Porównując kolumny Kinetex<sup>®</sup> oraz Ascentis Express<sup>®</sup>, różniące się jedynie rozmiarem wypełnienia (odpowiednio 1,7 i 2,7 μm) nie stwierdzono pomiędzy nimi istotnej różnicy pod

względem sprawności. Jedyną, oczywistą była różnica w wielkości ciśnień wstecznych – kolumna z wypełnieniem o mniejszym rozmiarze powodowała powstawanie większego ciśnienia wstecznego.

W roku 2010 firma Advanced Chromatography Technologies, UK wprowadziła na rynek kolumny z nowym rodzajem wypełnienia – grupami pentafluorofenyłowymi przyłączonymi do łańcuchów oktadecylowych związanych na podłożu krzemionkowym (C<sub>18</sub>-PFP). Zastosowanie kolumny z tym wypełnieniem pozwoliło na uzyskanie lepszego rozdzielania chromatograficznego dzięki zwiększeniu liczby rodzajów oddziaływań fazy stacjonarnej z analitami. Na **Rysunku 14.** przedstawiono przykładowy chromatogram uzyskany w trakcie analizy próbki mieszaniny wzorcowej zawierającej 72 anality na poziomie 40 ng/g w ekstrakcie ślepej próbki miodu. Dodatkowo, rozcieńczenie ekstraktu wodą w stosunku 1:1 pozwoliło prawie całkowicie wyeliminować zjawisko rozdwojonych pików związków wcześnie eluujących.



Rysunek 14. Chromatogram uzyskany podczas analizy próbki roztworu wzorcowego zawierającego anality na poziomie 40 ng/g w ekstrakcie ze ślepej próbki miodu z wykorzystaniem kolumny z wypełnieniem typu C<sub>18</sub>-PFP.

## **6.2 Optymalizacja parametrów pracy urządzenia GC-MS wykorzystywanego podczas oznaczania pozostałości wybranych pestycydów chloroorganicznych w próbkach miodu pszczelego**

W celu wybrania jonów charakterystycznych (m/z) dla każdego z analitów, nastrzyknięto mieszaninę wzorców pestycydów o stężeniu 50 µg/ml (50 ng/µl) w trybie Scan w zakresie 70-360 m/z. Takie stężenie pozwoliło na ustalenie tożsamości analitu z pomocą biblioteki widm oraz na wybranie 2-3 najbardziej intensywnych jonów. Jednakże wcześniej należało dobrać odpowiedni program temperaturowy pozwalający na całkowite (do podstawy)

rozdzielenie pików analitów. Do identyfikacji analitu używano dwóch jonów, pierwszy, bardziej intensywny używany był do oznaczeń ilościowych.

### **6.3 Optymalizacja warunków ekstrakcji analitów**

#### **6.3.1 Technika SLE**

Procedura ekstrakcji pozostałości pestycydów z próbek owoców i warzyw z wykorzystaniem kolumnienek z wypełnieniem z ziemi okrzemkowej została opisana w 2003 r. [103], jednak charakteryzowała się znacznym zużyciem rozpuszczalników organicznych. Tę procedurę poddano modyfikacji i optymalizacji tak, by umożliwić ekstrakcję analitów z próbek miodu pszczelego przy równoczesnej redukcji ilości zużywanych odczynników organicznych.

Optymalizację przeprowadzono dla różnego zestawu rozpuszczalników:

- octan etylu -  $2 \times 10$  ml
- octan etylu -  $3 \times 10$  ml
- metanol -  $2 \times 10$  ml
- mieszanina octanu etylu i n-heksanu (80:20, v/v) -  $2 \times 10$  ml
- mieszanina octanu etylu i n-heksanu (80:20, v/v) -  $3 \times 10$  ml
- dichlorometan -  $2 \times 10$  ml
- dichlorometan -  $1 \times 15$  ml

Po przeprowadzonej ekstrakcji obliczano odzysk pestycydów. W przypadku zastosowania octanu etylu był on na bardzo niskim poziomie (rzędu 20%), a odparowanie rozpuszczalnika trwało bardzo długo. Przy zastosowaniu metanolu uzyskiwano ekstrakt w postaci lepkiej cieczy, a rozpuszczalnika nie udało się odparować do sucha. Możliwe, że w tym wypadku wymyciu uległy również cukry (są rozpuszczalne w wodzie, a metanol miesza się z wodą w nieograniczonych ilościach) i próbki ekstraktów nie można było poddać analizie chromatograficznej. W przypadku zastosowania pozostałych eluentów odzysk zwiększył się o ok. 10%, jednakże ciągle był na niskim poziomie (poniżej 40%). Największe odzyski (ok. 80%) uzyskano stosując dichlorometan jako czynnik ekstrakcyjny. Ponadto nie pojawiły się problemy podczas elucji analitów oraz z odparowaniem rozpuszczalnika do sucha. Redukcja objętości dichlorometanu nie wpłynęła na wartość wydajności ekstrakcji, w związku z tym w dalszych badaniach stosowano 15 ml dichlorometanu jako czynnik ekstrakcyjny do izolacji pestycydów z badanych próbek miodu.

### **6.3.2 Podejście QuEChERS**

Zastosowanie podejścia QuEChERS wymagało modyfikacji oryginalnej procedury, opracowanej do oznaczania pozostałości pestycydów w próbkach owoców i warzyw o dużej zawartości wody (ponad 75%). Ze względu na fakt, iż miód zawiera w swoim składzie od 17% do 23% wody, należało jej dodać do próbki. Obniżyło to lepkość roztworu i znacznie ułatwiło mieszanie roztworu próbki z innymi cieczami.

Dodatek cytrynianów sodu podczas ekstrakcji spowodował wzrost wartości pH roztworu z ok. 3,5 do 5,0, natomiast ciepło hydratacji  $MgSO_4$  spowodowało podwyższenie temperatury mieszaniny do 41-42°C w trakcie mieszania, a po odwirowaniu fazy acetonitrylowa i wodna miały temperatury odpowiednio ok. 31°C i ok. 32°C. Podwyższona temperatura sprzyja kinetyce procesu sorpcji – desorpcji analitów z próbki oraz zmienia strukturę wosków występujących w miodzie (ze struktury o wysokiej porowatości na strukturę o niskiej porowatości), ułatwiając tym samym desorpcję analitów z matrycy.

Sprawdzono jak zmiana składu rozpuszczalnika ekstrahującego wpłynie na wydajność ekstrakcji, tzn. sprawdzono wpływ dodatku octanu etylu do acetonitrylu oraz uwzględniono etap oczyszczania ekstraktu (dSPE). Oczyszczanie ekstraktu oznaczało, że nie będzie możliwe oznaczenie w nim pestycydów zawierających grupy kwasowe, ponieważ wiążą się one z PSA. Te pestycydy należy oznaczać w nieoczyszczonym ekstrakcie.

Zastosowanie etapu oczyszczania wpłynęło na obniżenie szumów i pozwoliło uzyskać niższe granice wykrywalności i oznaczalności dla pestycydów niezawierających grup kwasowych. Procedura bez etapu oczyszczania została wykorzystana podczas porównania wydajności ekstrakcji wybranych analitów z 17 grup chemicznych z wykorzystaniem powyższych podejść ekstrakcyjnych.

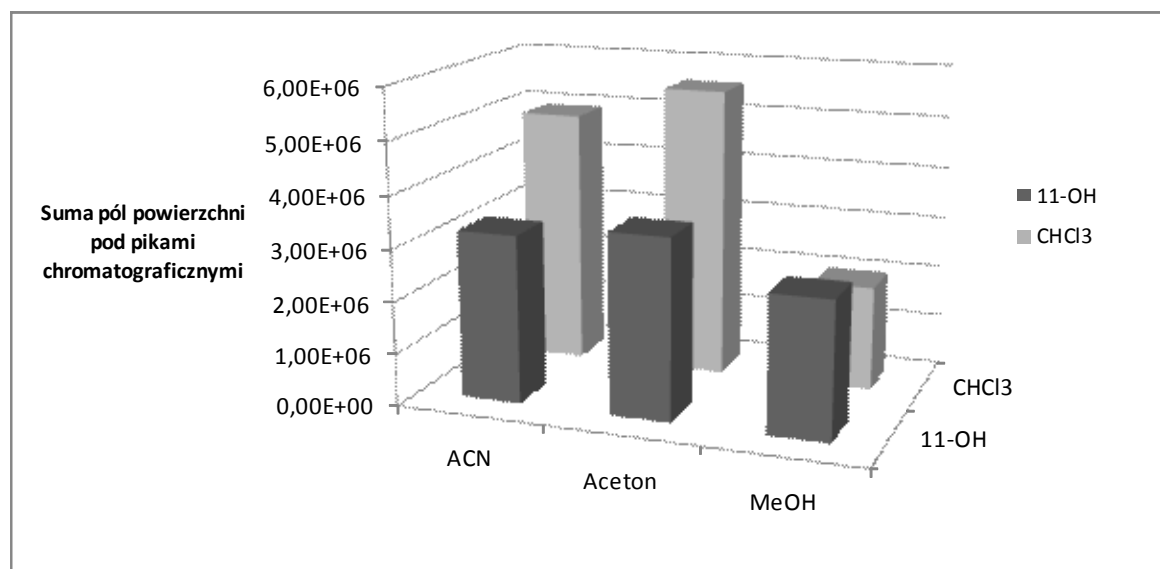
### **6.3.3 Optymalizacja warunków ekstrakcji wybranych pestycydów chloroorganicznych z wykorzystaniem techniki DLLME metodami chemometrycznymi**

Optymalizacji poddano 4 parametry, które według danych literaturowych [52,104] mają największy wpływ na wydajność ekstrakcji, czyli: rodzaj i objętości ekstrahenta oraz dyspergatora, ilość dodawanej soli (NaCl), pH roztworu próbki. Do obliczenia wydajności ekstrakcji korzystano z krzywej wzorcowej.

#### **Wybór ekstrahenta i dyspergatora**

Odpowiedni ekstrahent powinien mieć gęstość większą/mniejszą od wody i dobre powinowactwo do oznaczanych pestycydów. Na tej podstawie wybrano dwa rozpuszczalniki:

1-undekanol (11-OH) (gęstość 0,83 g/ml w 25 °C, T topnienia ok. 17°C) oraz chloroform (gęstość 1,49 g/ml w 25°C). Dyspergator musi być mieszalny zarówno z ekstrahentem jak i z wodą. W tym celu przetestowano acetonitryl, aceton i metanol. Przeprowadzono ekstrakcje dla każdej pary ekstrahent-dyspergator. Jak pokazano na wykresie (**Rysunek 15.**) najlepszą wydajność ekstrakcji osiągnięto stosując chloroform i aceton.



Rysunek 15. Wybór pary ekstrahent-dyspergator. Warunki ekstrakcji: 0,5 g miodu, 3 ml wody + 20 µl r-ru wzorców + dyspergator z ekstrahentem (400+100 µl)

### **Wykorzystanie planów czynnikowych**

W celu określenia które z czynników są najbardziej istotne, przygotowano plan czynnikowy. Dwupoziomowy plan czynnikowy wymaga wykonania eksperymentów we wszystkich możliwych kombinacjach na dwóch poziomach każdego z czynników [105]. Plan składał się z  $2^4=16$  eksperymentów. Były one wykonane w kolejności przypadkowej by zminimalizować efekt niekontrolowanych zmiennych. Czynniki wraz z zakresami zmian oraz plan doświadczalny z sumarycznymi wynikami przedstawiono w **Załącznikach 1.** oraz **2.**

Następnie obliczono równania wielokrotnej regresji liniowej z pomocą programu SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., USA) w celu stworzenia najlepiej dopasowanego modelu. Rozważono plan ortogonalny i nieortogonalny; plan ortogonalny nie bierze pod uwagę powtórzeń, poza tymi w centrum planu (tzn. dla wartości środkowych zakresu zmiany optymalizowanych czynników), w przeciwieństwie do planu nieortogonalny. Szczególnym aspektem tego planu jest fakt, że obliczone wartości współczynników i znaki są zawsze takie same, jakakolwiek jest zależność wynikająca z regresji. Z drugiej strony dodanie powtórzeń w planie nieortogonalnym mogło ułatwić oszacowanie czystego błędu.

Sposób postępowania w przypadku planu ortogonalnego został przedstawiony poniżej. Najpierw wykonano regresję uwzględniając X3 jako czynnik. Współczynnik determinacji liniowej  $R^2$  wynosił ok. 0,562. Ponadto wykazano, że X3 jest czynnikiem istotnym, a fakt, że wartość F była większa od wartości krytycznej, potwierdza, że model był statystycznie istotny. Następnie uwzględniono w modelu czynnik X2, jednak regresja wykazała, że jest to czynnik nieistotny, więc usunięto go z modelu. Taki sam wniosek wyciągnięto w przypadku czynnika X4. Do modelu dodano X1 i okazał się on czynnikiem istotnym, więc zachowano go w modelu. W następnym etapie po kolei dodawano oddziaływania drugiego stopnia, podobnie jak poprzednio. Istotne były X13 oraz X24.

Końcową zależność pomiędzy czynnikami najlepiej opisuje równanie 4.:

$$A = A1 + A2 \cdot X1 + A3 \cdot X3 + A4 \cdot X1X3 + A5 \cdot X2X4 \quad (4)$$

$$A1 = 1236662$$

$$A2 = -256904$$

$$A3 = -425277$$

$$A4 = 161513$$

$$A5 = 146147$$

W celu uzyskania lepszej wartości współczynnika determinacji rozważono stworzenie planu kompozycyjnego uwzględniającego czynniki X1 i X3.

### ***Zastosowanie planu kompozycyjnego***

Na tym etapie zastosowano kwadratowy ortogonalny plan kompozycyjny do określenia optymalnych warunków dla czynników krytycznych X1 i X3. Plan kompozycyjny składa się z planu czynnikowego  $2^p$  do którego dodano plan gwiazdowy i punkt centralny, w którym wykonano n powtórzeń [105].

W tym przypadku zmieniono stężenie soli (czynnik X3). Zgodnie z literaturą [9,10] rozważany wcześniej zakres stężeń mógł być zbyt szeroki by określić wpływ dodatku soli na wydajność ekstrakcji. Poziom 1 w tym planie odpowiadał stężeniu 0,85% NaCl (m/m). Plan oraz sumaryczna powierzchnia pod pikami monitorowanych jonów analitów dla poszczególnych warunków ekstrakcji zestawiono w **Załączniku 3**.

Wykorzystano poprzednią technikę regresji do zbudowania modelu. W wyniku tego jedynie X1 uznano za istotny czynnik. Współczynnik determinacji tego modelu wynosił ok. 0,612, co nie jest lepszym wynikiem od tych obliczonych dla pozostałych planów.

Wyniki dla różnych zastosowanych planów i regresji zestawiono w **Tabeli 12**.

Tabela 12. Podsumowanie wyników zastosowanych planów doświadczalnych

Rodzaj planu i czynniki	R <sup>2</sup>	F	F <sub>kryt</sub> (α=0,05)
<b>Plan ortogonalny</b>			
X3	0,562	17,956	4,45
X3;X1	0,767	21,390	3,63
X3;X1;X13	0,848	22,313	3,29
X3;X1;X13;X24	0,914	29,354	3,11
<b>Plan nieortogonalny</b>			
X3	0,547	22,975	4,38
X3;X1	0,777	31,325	3,55
X3;X1;X13	0,857	34,071	3,20
X3;X1;X13;X24	0,898	35,241	3,01
<b>Plan kompozytowy</b>			
X1	0,612	22,068	4,60

Podczas ekstrakcji pestycydów z próbki miodu ma się do czynienia z matrycą o złożonym składzie, z tego też powodu nie należy spodziewać się tak wysokich wartości R<sup>2</sup> jak w przypadku matrycy o nieskomplikowanym składzie (np. wody), jednak wartości ok. 0,90 w planach uwzględniających 4 czynniki są zadowalające.

### **7. Wyznaczenie podstawowych parametrów walidacyjnych opracowanych metodyk oznaczania pozostałości pestycydów i ich metabolitów w próbkach miodu pszczelego**

Walidacja jest procesem określenia charakterystyki metodyki pod kątem danego zastosowania, specyficzności, dokładności (wyrażonej przez CV), czułości, powtarzalności i odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej.

Proponowane procedury oznaczania pozostałości pestycydów i ich metabolitów w próbkach miodu pszczelego poddano procesowi walidacji określając takie parametry jak:

- granice wykrywalności i oznaczalności;
- liniowość i zakres pomiarowy;
- wydajność ekstrakcji;
- powtarzalność (precyzję);
- niepewność.

W procesie walidacji stosowano próbki ślepe, próbki kalibracyjne (ekstrakty ślepych próbek z dodatkiem ściśle określonych ilości analitów), próbki wzorcowe i próbki rzeczywiste. Pomiarów wykonywano wielokrotnie, a poszczególne parametry określano z wykorzystaniem ogólnie przyjętych zasad obróbki statystycznej wyników.



### 7.1. Zakres pomiarowy i liniowość metodyk

Zakres pomiarowy określa przedział pomiędzy najniższym a najwyższym poziomem stężenia w jakim anality mogą być oznaczane z założoną miarodajnością [106].

Liniowość metodyki to przedział zakresu pomiarowego metodyki analitycznej, w którym sygnał wyjściowy jest proporcjonalny do stężenia analitu [106].

Zakres pomiarowy i liniowość oznaczano na podstawie analizy próbek kalibracyjnych. Zakresy stężeń uwzględnione w procesie kalibracji w większości przypadków dobrano tak, by zawierały zarówno wartości na poziomie zbliżonym do tych występujących w próbkach rzeczywistych jak i te równe wartościom liczbowym NDP.

Równania regresji liniowej (funkcje kalibracyjne) dla poszczególnych analitów wyznaczono na podstawie wyników analizy próbek kalibracyjnych, stosując regresję ważoną typu „1/x”, która w przypadku nierównomiernie rozłożonych punktów danych lepiej odwzorowuje zależność wynikającą z ich rozkładu, niż regresja liniowa obliczona metodą najmniejszych kwadratów [107]. Równania regresji liniowej opisywały zależność pola powierzchni pod pikami chromatograficznymi analitów od nominalnych wartości stężeń. Każdy z roztworów poddano analizie trójrotnie.

Stopień zgodności punktów pomiarowych z wyznaczoną funkcją liniową wyrażono za pomocą współczynnika determinacji liniowej ( $R^2$ ). Jego wartość była większa od 0,9900 dla prawie wszystkich proponowanych metodyk i analitów (jedyny wyjątek stanowił tribenuron metylu, dla którego wartość  $R^2$  wynosiła 0,9524). W **Tabeli 13.** zestawiono wartości liczbowe współczynników determinacji oraz zakresy liniowe analitów charakteryzujące opracowane metodyki.

Tabela 13. Charakterystyka metrologiczna opracowanych procedur oznaczania pozostałości pestycydów i ich metabolitów w próbkach miodu pszczelego.

Analityk	QuEChERS-LC-MS/MS		SLE-LC-MS/MS		Porównanie wydajności SLE i QuEChERS techniką LC-MS/MS		QuEChERS-LC-MS-Orbitrap		DLLME-GC-MS	
	Zakres [ng/g]	$R^2$	Zakres [ng/g]	$R^2$	Zakres [ng/g]	$R^2$	Zakres [ng/g]	$R^2$	Zakres [ng/g]	$R^2$
Acefat			LOQ - 5,0	0,9994						
Akrynatryna					LOQ - 200	0,9921				
Aldryna									LOQ - 100	0,9978
Amidosulfuron	LOQ - 120	0,9944								
Asulam	LOQ - 120	0,9970					LOQ - 50,0	0,9996		
Azoksystrobina	LOQ - 120	0,9982			LOQ - 40,0	0,9928	LOQ - 50,0	0,9978		
Beflubutamid	LOQ - 24,0	0,9984					LOQ - 10,0	0,9903		
Benzoesan emamektyny	LOQ - 120	0,9956			LOQ - 40,0	0,9918	LOQ - 50,0	0,9916		
Bitertanol			LOQ - 5,0	0,9989						
Boskalid	LOQ - 24,0	0,9962					LOQ - 10,0	0,9994		
Buprofezyna	LOQ - 120	0,9984			LOQ - 200	0,9926	LOQ - 50,0	0,9956		
Chloridazon	LOQ - 120	0,9984			LOQ - 200	0,9918	LOQ - 50,0	0,9968		

Tabela 13. c.d.

Analit	QuEChERS-LC-MS/MS		SLE-LC-MS/MS		Porównanie wydajności SLE i QuEChERS techniką LC-MS/MS		QuEChERS-LC-MS-Orbitrap		DLLME-GC-MS	
	Zakres [ng/g]	R <sup>2</sup>	Zakres [ng/g]	R <sup>2</sup>	Zakres [ng/g]	R <sup>2</sup>	Zakres [ng/g]	R <sup>2</sup>	Zakres [ng/g]	R <sup>2</sup>
Chlorpiryfos			LOQ - 5,0	0,9983						
Chlotianidyna	LOQ - 120	0,9986	LOQ - 5,0	0,9900			LOQ - 50,0	0,9964		
Cymoksanil					LOQ - 200	0,9922				
Cyprodymil	LOQ - 120	0,9978			LOQ - 200	0,9924	LOQ - 50,0	0,9900		
Cyprokonazol (izomer 1)	LOQ - 120	0,9984					LOQ - 50,0	0,9937		
Cyprokonazol (izomer 2)	LOQ - 120	0,9980					LOQ - 50,0	0,9994		
2,4'-DDD (TDE)									LOQ - 100	0,9981
2,4'-DDE									LOQ - 100	0,9994
2,4'-DDT									LOQ - 100	0,9972
4,4'-DDE									LOQ - 100	0,9996
4,4'-DDT									LOQ - 100	0,9946
Detametryna	LOQ - 120	0,9962								
Dichlofop metylowy	LOQ - 120	0,9944								
Difenokonazol	LOQ - 120	0,9982					LOQ - 50,0	0,9900		
Diflubenzuron	LOQ - 120	0,9986			LOQ - 200	0,9919				
Dimetomorf (izomer 1)	LOQ - 120	0,9966			LOQ - 200	0,9919	LOQ - 50,0	0,9911		
Dimetomorf (izomer 2)	LOQ - 120	0,9984			LOQ - 200	0,9923				
Dimoksystrobina	LOQ - 24,0	0,9982					LOQ - 10,0	0,9888		
α-Endosulfan									LOQ - 100	0,9969
Endryna									LOQ - 100	0,9954
Epoksykonazol	LOQ - 120	0,9982					LOQ - 50,0	0,9915		
Etofenproks	LOQ - 120	0,9934			LOQ - 200	0,9999	LOQ - 50,0	0,9893		
Fenazachina	LOQ - 120	0,9966			LOQ - 40,0	0,9941	LOQ - 50,0	0,9904		
Fenbukonazol	LOQ - 120	0,9976			LOQ - 200	0,9976	LOQ - 50,0	0,9945		
Fenoksaprop-P etylu	LOQ - 120	0,9976					LOQ - 50,0	0,9843		
Fenoksaprop-P					LOQ - 200	0,9989	LOQ - 10,0	0,9988		
Fenpiroksymat	LOQ - 120	0,9962			LOQ - 40,0	0,9932	LOQ - 50,0	0,9882		
Fenpropidyna	LOQ - 120	0,9976			LOQ - 80,0	0,9971	LOQ - 50,0	0,9930		
Flonikamid	LOQ - 120	0,9984								
Fluazyfop-P butylowy	LOQ - 120	0,9982			LOQ - 200	0,9944	LOQ - 50,0	0,9922		
Fluoksastrobina	LOQ - 24,0	0,9980					LOQ - 10,0	0,9947		
Fluoksypyr meptylu	LOQ - 120	0,9966	LOQ - 5,0	0,9994						
Flusilazol	LOQ - 120	0,9980			LOQ - 200	0,9920	LOQ - 50,0	0,9887		
Flutolanil	LOQ - 120	0,9926			LOQ - 80,0	0,9957				
Foksim	LOQ - 120	0,9970			LOQ - 80,0	0,9915	LOQ - 50,0	0,9862		
Fosalon	LOQ - 120	0,9978			LOQ - 200	0,9942	LOQ - 50,0	0,9925		
Fosmet	LOQ - 120	0,9970								
Fosmet-okson	LOQ - 24,0	0,9940								
Haloksyfop-P	LOQ - 24,0	0,9900								
Haloksyfop-R metylu	LOQ - 24,0	0,9986					LOQ - 10,0	0,9896		
Imazalil	LOQ - 120	0,9986	LOQ - 5,0	0,9978						
Imidachlopryd	LOQ - 120	0,9974					LOQ - 50,0	0,9964		
Indoksakarb							LOQ - 50,0	0,9892		
Karbaryl			LOQ - 5,0	0,9992						
Karbendazym	LOQ - 120	0,9968					LOQ - 50,0	0,9976		
Karfentrazon etylowy			LOQ - 5,0	0,9996						
Kletodym (izomer 1)	LOQ - 120	0,9950					LOQ - 50,0	0,9970		
Kletodym (izomer 2)	LOQ - 120	0,9922								
Kwizalofop-P etylowy	LOQ - 120	0,9976			LOQ - 200	0,9963	LOQ - 50,0	0,9965		
Lindan (γ-HCH)									LOQ - 100	0,9973
Lufenuron	LOQ - 120	0,9974								
Malation			LOQ - 5,0	0,9994						
Metalaksyl			LOQ - 5,0	0,9995						
Metazachlor	LOQ - 120	0,9984			LOQ - 200	0,9941	LOQ - 50,0	0,9989		

Tabela 13. c.d.

Analit	QuEChERS-LC-MS/MS		SLE-LC-MS/MS		Porównanie wydajności SLE i QuEChERS techniką LC-MS/MS		QuEChERS-LC-MS-Orbitrap		DLLME-GC-MS	
	Zakres [ng/g]	R <sup>2</sup>	Zakres [ng/g]	R <sup>2</sup>	Zakres [ng/g]	R <sup>2</sup>	Zakres [ng/g]	R <sup>2</sup>	Zakres [ng/g]	R <sup>2</sup>
Metidation			LOQ - 5,0	0,9982						
Metiokarb	LOQ - 120	0,9982			LOQ - 200	0,9959	LOQ - 50,0	0,9974		
Metkonazol	LOQ - 120	0,9978					LOQ - 50,0	0,9975		
Nowaluron	LOQ - 120	0,9970								
Oksadiksył	LOQ - 120	0,9978					LOQ - 50,0	0,9906		
Pirimikarb	LOQ - 120	0,9984					LOQ - 50,0	0,9906		
desmetył-Pirimikarb	LOQ - 24,0	0,9980								
Pirydaben	LOQ - 120	0,9932			LOQ - 80,0	0,9979	LOQ - 50,0	0,9866		
Piryproksyfen	LOQ - 120	0,9960	LOQ - 5,0	0,9990	LOQ - 200	0,9997	LOQ - 50,0	0,9973		
Profam	LOQ - 120	0,9952			LOQ - 200	0,9942				
Propakwizafop	LOQ - 120	0,9982			LOQ - 200	0,9998	LOQ - 50,0	0,9940		
Propamokarb	LOQ - 120	0,9976					LOQ - 50,0	0,9849		
Prosulfokarb	LOQ - 120	0,9980			LOQ - 200	0,9917	LOQ - 50,0	0,9927		
Setoksydim							LOQ - 50,0	0,9920		
Spinozyna A	LOQ - 16,9	0,9966					LOQ - 8,45	0,9852		
Spinozyna D	LOQ - 3,08	0,9960					LOQ - 1,56	0,9927		
Spirodiklofen	LOQ - 120	0,9876								
Symazyna	LOQ - 120	0,9984			LOQ - 200	0,9996	LOQ - 50,0	0,9921		
Tebufenpyrad	LOQ - 120	0,9986			LOQ - 200	0,9946	LOQ - 50,0	0,9843		
Tebukonazol	LOQ - 120	0,9982					LOQ - 50,0	0,9846		
Teflubenzuron	LOQ - 120	0,9960								
Tetrazonazol	LOQ - 120	0,9984					LOQ - 50,0	0,9906		
Tiachlopryd	LOQ - 120	0,9984					LOQ - 50,0	0,9975		
Tiametoksam	LOQ - 120	0,9978					LOQ - 50,0	0,9973		
Tiofanat metylowy	LOQ - 120	0,9938					LOQ - 50,0	0,9864		
Tolchlofos metylowy	LOQ - 40,0	0,9984					LOQ - 40,0	0,9896		
Tribenuron metylu			LOQ - 5,0	0,9524						
Triflumuron	LOQ - 120	0,9982								
Tritosulfuron	LOQ - 120	0,9946								

## 7.2. Powtarzalność metodyki i wydajność ekstrakcji

W celu określenia wydajności ekstrakcji analitów z wykorzystaniem stosowanych technik przeprowadzono po 5 równoległych analiz próbek wzorcowych, każdą próbkę poddając oznaczeniu końcowemu trójrotnie. Odzyski wraz z obliczonymi dla nich współczynnikami zmienności zestawiono w **Tabeli 14**.

Tabela 14. Powtarzalność, dokładność pomiaru masy i wydajność ekstrakcji pozostałości pestycydów i ich metabolitów z próbek miodu pszczelego z zastosowaniem opracowanych metodyk.

Analit	QuEChERS-LC-MS/MS				SLE-LC-MS/MS			QuEChERS-LC-MS-Orbitrap			DLLME-GC-MS					
	C dla poz. 1 [ng/g]	(Odzysk ± CV) [%] dla poziomu 1		(Odzysk ± CV) [%] dla poziomu 5xC	(Odzysk ± CV) [%] dla poziomu 10xC	(Odzysk ± CV) [%] dla poz. 0,5 ng/g	(Odzysk ± CV) [%] dla poz. 1,0 ng/g	(Odzysk ± CV) [%] dla poz. 4,0 ng/g	Masa monoizotopowa [m/z] teoretyczna	Delta [ppm] zmierzona	PF	(Odzysk ± CV) [%] dla poziomu 2LOQ		(Odzysk ± CV) [%] dla poziomu 10LOQ	Odtwarzalność międzylaboratoryjna (CV)	
Acefat						56 ± 15	59 ± 7,2	60 ± 4,0								
Akrynatryna																
Aldryna												14,9	39,6 ± 5,8	44 ± 12	18,2%	11,8%
Amidosulfuron	2,0	81 ± 34	95 ± 16	98,6 ± 5,5												
Asulam	2,0	20,3 ± 2,6	25,3 ± 1,9	30 ± 3,2					248,07	248,06941	2,4					
Azoksystrobina	2,0	117 ± 11	120,2 ± 5,0	121,3 ± 6,8					404,1241	404,12439	0,7					
Beflubutamid	0,4	111 ± 17	117,5 ± 6,8	117,9 ± 6,9					356,1273	356,12668	1,7					
Benzoesan emamektyny	2,0	116,1 ± 9,3	122 ± 5,9	124,4 ± 7,4					886,53112	886,5329	2,0					
Bitertanol						74 ± 8,9	88 ± 7,2	92 ± 4,9								
Boskalid	0,4	110 ± 24	116,9 ± 5,5	119,4 ± 6,2					343,04	343,03993	0,2					
Buprofezyna	2,0	113 ± 11	119 ± 6,5	118,6 ± 6,3					306,1635	306,1633	0,7					
Chloridazon	2,0	123,7 ± 8,7	122,2 ± 7,0	122,2 ± 6,0					222,0434	222,0434	0					
Chlorpiryfos						109 ± 4,9	117 ± 4,2	113 ± 3,9								
Chlotianidyna	2,0	114 ± 12	117,9 ± 6,0	118,4 ± 6,2		76 ± 9,8	85 ± 7,2	82 ± 3,2	250,016	250,01587	0,5					
Cymoksanil																
Cyprodynil	2,0	108 ± 9,3	116,6 ± 6,6	117,1 ± 6,5					226,1339	226,13405	0,7					
Cyprokonazol (izomer 1)	2,0	122 ± 14	118,8 ± 9,1	116,2 ± 5,1					292,12112	292,12173	2,1					
Cyprokonazol (izomer 2)	2,0	121 ± 16	119,1 ± 7,8	118,3 ± 7,2					292,12112	292,12097	0,5					
2,4'-DDD (TDE)												18,3	48,9 ± 8,9	55 ± 11	10,7%	3,4%
2,4'-DDE												13,2	35 ± 13	42 ± 12	14,8%	4,8%
2,4'-DDT												16,6	44,3 ± 6,4	48 ± 12	19,0%	3,4%
4,4'-DDE												13,7	36,4 ± 7,1	52 ± 13	8,8%	3,4%
4,4'-DDT												30,5	81 ± 15	77 ± 13	2,5%	0,9%
Detametryna	2,0	114 ± 23	132,8 ± 8,5	133,6 ± 7,1												
Dichlofop metylowy	0,4	88 ± 16	80,3 ± 6,4	109,5 ± 7,4												
Difenokonazol	2,0	118 ± 15	116,4 ± 5,5	116,5 ± 5,9					406,072	406,07239	1,0					
Diflubenzuron	2,0	108 ± 15	114,7 ± 6,4	116,3 ± 5,8												
Dimetomorf (izomer 1)	2,0	117 ± 7,2	119,8 ± 8,1	121,3 ± 7,5					388,131	388,13116	0,4					
Dimetomorf (izomer 2)	2,0	121 ± 11	119,3 ± 6,5	119,4 ± 6,6												
Dimoksystrobina	2,0	120 ± 12	124,8 ± 6,6	125,2 ± 7,6					327,1703	327,17044	0,4					
α-Endosulfan												27,4	73 ± 11	77,4 ± 8,2	11,4%	3,1%
Endryna												30,5	81 ± 11	83,0 ± 9,2	15,1%	3,3%
Epoksykonazol	0,4	114 ± 10	118,3 ± 6,6	118,8 ± 6,5					330,0804	330,08026	0,4					
Etofenproks	2,0	123 ± 18	138,1 ± 7,7	139 ± 9,1					394,2377	394,23782	0,3					
Fenazachina	2,0	118 ± 13	114 ± 5,3	114,9 ± 6,9					307,1805	307,18039	0,4					
Fenbukonazol	2,0	113 ± 11	118,6 ± 8,2	119,6 ± 6,5					337,1215	337,12137	0,4					
Fenoksaprop-P etylu	2,0	93 ± 8,6	93,7 ± 4,8	102,9 ± 5,3					362,0795	362,07916	0,9					
Fenoksaprop-P									334,0482	334,04742	2,3					
Fenpiroksymat	2,0	113 ± 15	117,2 ± 7,4	117,5 ± 7,2					422,2074	422,20773	0,8					
Fenpropidyna	2,0	106 ± 11	112 ± 15	116 ± 19					274,2534	274,2529	1,8					
Flonikamid	2,0	113 ± 10	118,1 ± 7,2	121 ± 5,9												
Fluazyfop-P butylowy	2,0	111 ± 15	112,4 ± 5,8	113,9 ± 6,2					384,1422	384,14194	0,7					
Fluoksastrobina	2,0	117 ± 10	119,7 ± 6,7	118,7 ± 5,9					459,0865	459,08719	1,5					
Fluroksypyr meptylu	0,4	88 ± 18	107,1 ± 6,9	112,1 ± 8,5		74 ± 4,9	75 ± 4,4	81 ± 3,2								
Flusilazol	2,0	109 ± 12	114,1 ± 6,1	114,8 ± 5,9					316,1076	316,10757	0,1					
Flutolanil	2,0	156 ± 25	163,4 ± 12	167 ± 15												
Foksim	2,0	111 ± 15	114,4 ± 6,8	116,1 ± 7,1					299,0614	299,06143	0,1					

Tabela 14. c.d.

Analit	QuEChERS-LC-MS/MS						SLE-LC-MS/MS			QuEChERS-LC-MS-Orbitrap			DLLME-GC-MS				
	C dla poż.1 [ng/g]	(Odzysk ± CV) [%] dla poziomu 1		(Odzysk ± CV) [%] dla poziomu 5xC		(Odzysk ± CV) [%] dla poziomu 10xC		(Odzysk ± CV) [%] dla poz. 0,5 ng/g	(Odzysk ± CV) [%] dla poz. 1,0 ng/g	(Odzysk ± CV) [%] dla poz. 4,0 ng/g	Masa monoizotopowa [m/z]	Delta [ppm]	PF	(Odzysk ± CV) [%] dla poziomu		Odtwarzalność międzylaboratoryjna (CV)	
		teoretyczna	zmierzona	2LOQ	10LOQ												
Fosalon	2,0	117 ± 15	111,7 ± 6,7	112,1 ± 5,9							385,0207	385,02173	2,7				
Fosmet	2,0	119 ± 13	112,3 ± 5,9	113,5 ± 5,8													
Fosmet-okson	2,0	108 ± 13	108,2 ± 6,8	110,1 ± 6,1													
Haloksyfop-P	0,4	19 ± 14	17 ± 8,9	23 ± 3,8													
Haloksyfop-R metylu	0,4	76 ± 8,8	73,5 ± 5,5	89 ± 5,3							376,0558	376,05585	0,1				
Imazalil					67 ± 5,4	72 ± 3,5	71 ± 2,9										
Imidachlopryd	0,4	115 ± 11	119,7 ± 5,7	120,9 ± 6,1							256,0596	256,0592	1,6				
Indoksakarb	2,0	113 ± 14	115,4 ± 6,3	113,8 ± 5,6							528,078	528,07874	1,4				
Karbaryl					84 ± 6,7	88 ± 5,4	87 ± 5,8										
Karbendazym	2,0	108 ± 10	111,8 ± 5,7	115,3 ± 6,7							192,0768	192,07671	0,5				
Karfentrazon etylowy					75 ± 4,5	80 ± 3,8	83 ± 3,2										
Kletodym (izomer 1)	2,0	48 ± 9,4	48,2 ± 3,3	65 ± 6,8							360,1395	360,13928	0,6				
Kletodym (izomer 2)	2,0	112 ± 11	110 ± 11	115,4 ± 7,2													
Kwizalofop-P etylowy	2,0	96 ± 8,9	98,6 ± 5,1	106,7 ± 5,9							373,0955	373,09555	0,1				
Lindan (γ-HCH)														30	79,9 ± 8,4	81,6 ± 6,8	8,7% 1,5%
Lufenuron	2,0	83 ± 19	112,2 ± 8,6	114,1 ± 6,7													
Malation					72 ± 7,2	80 ± 5,8	87 ± 4,5										
Metakstyl					81 ± 8,5	75 ± 7,6	76 ± 6,7										
Metazachlor	2,0	118,7 ± 10	122,9 ± 6,3	123,5 ± 6,6							278,1055	278,10541	0,3				
Metidation					83 ± 8,9	76 ± 7,2	78 ± 4,9										
Metiokarb	2,0	110 ± 13	116,8 ± 6,6	119,9 ± 6,7							226,0896	226,08984	1,1				
Metkonazol	2,0	123,1 ± 10	116,8 ± 5,5	116,7 ± 6,1							320,1524	320,15231	0,3				
Nowaluron	2,0	119 ± 15	115,8 ± 7,1	116,7 ± 5,8													
Oksadikstyl	2,0	119 ± 13	116,4 ± 6,3	118,3 ± 6,8							279,1339	279,13373	0,6				
Pirimikarb	2,0	117,3 ± 8,8	121,1 ± 7,1	122,3 ± 6,4							239,1503	239,15027	0,1				
desmetyl-Pirimikarb	2,0	114 ± 11	118,9 ± 6,8	119,5 ± 5,9													
Pirydaben	2,0	121 ± 12	128,1 ± 7,3	127,2 ± 7,8							365,1449	365,14542	1,4				
Piryproksyfen	2,0	116 ± 13	116 ± 5,7	116,4 ± 6,7	63 ± 8,0	65 ± 4,9	74 ± 4,4				322,1438	322,14365	0,5				
Profam	2,0	142 ± 14	147,9 ± 10	150,4 ± 7,6													
Propakwizafop	2,0	89 ± 11	82 ± 7,4	96,1 ± 6,1							444,1326	444,13254	0,1				
Propamokarb	2,0	93,8 ± 7,8	94,9 ± 5,3	100,7 ± 7,7							189,1598	189,15958	1,2				
Prosulfokarb	2,0	110 ± 11	109,4 ± 6,3	110,1 ± 6,8							252,1422	252,14166	2,1				
Setoksydim											328,1941	328,19427	0,5				
Spinozyna A	2,0	115 ± 12	115,5 ± 6,6	116,7 ± 6,1							732,4681	732,46906	1,3				
Spinozyna D	0,31	112 ± 15	115,5 ± 6,8	116,9 ± 6,3							746,4838	746,48358	0,3				
Spirodiklofen	0,058	147 ± 18	151,5 ± 7,8	148,9 ± 12													
Symazyna	2,0	114 ± 12	119,1 ± 6,1	121,5 ± 6,6							202,0854	202,0854	0				
Tebufenpyrad	2,0	112 ± 10	114,1 ± 5,9	114,6 ± 6,6							334,1681	334,16815	0,1				
Tebukonazol	2,0	115 ± 14	116,7 ± 6,5	116,5 ± 5,4							308,1524	308,15213	0,9				
Teflubenzuron	2,0	116 ± 19	113,1 ± 9,0	112,9 ± 8,0													
Tetrakonazol	2,0	112 ± 10	117 ± 7,4	118,1 ± 5,9							372,0288	372,02933	1,4				
Tiachlopryd	2,0	115 ± 10	121,5 ± 5,7	122,9 ± 5,9							253,0309	253,03102	0,5				
Tiametoksam	2,0	128,8 ± 8,8	126,5 ± 8,2	125,2 ± 10							292,0266	292,02646	0,5				
Tiofanat metylowy	2,0	121 ± 13	119,5 ± 6,7	120,7 ± 7,7							343,0529	343,05276	0,4				
Tolchlofos metylowy	2,0	115 ± 21	112,1 ± 7,1	113,1 ± 8,1							300,9616	300,96219	2,0				
Tribenuron metylu					121 ± 16	115 ± 7,6	107 ± 5,4										
Triflumuron	3,6	117 ± 17	113,4 ± 4,9	114,5 ± 5,9													
Tritosulfuron	2,0	94 ± 25	109 ± 11	110,9 ± 3,5													

Dla większości oznaczanych pestycydów odzysk na trzech poziomach stężeń był w zalecanym zakresie 70-120%. W przypadku stosowania metodyk do prowadzenia analiz na szeroką skalę, najlepiej, by typowe wartości odzysków mieściły się w zakresie 60-140%. Odzyski analitów poza optymalnymi granicami są dopuszczalne w przypadku metodyk oznaczania wielu pozostałości jednocześnie, o ile wyniki są powtarzalne ( $CV < 20\%$ ). Poza tymi granicami były jedynie wydajności ekstrakcji acefatu ( $56\% \pm 15\%$ ), asulamu ( $20,3\% \pm 2,6\%$ ), haloksyfopu-P ( $19\% \pm 14\%$ ) i kletodymu ( $48,0\% \pm 9,4\%$ ). Odzyski o wartości ponad 140% otrzymano w przypadku flutolanilu ( $156\% \pm 25\%$  -  $167\% \pm 15\%$ ), profamu ( $142\% \pm 14\%$  -  $150,4\% \pm 7,6\%$ ) oraz spirodiklofenu ( $147\% \pm 18\%$  -  $151,5\% \pm 7,8\%$ ).

Odzyski i współczynniki zmienności różniły się w zależności od analitu i jego stężenia. W tym miejscu należy również zaznaczyć, że odzysk większy niż 100% może wynikać z budżetu niepewności, na który składają się wszystkie czynniki mogące być źródłem niepewności pomiarowej, jak również może to wynikać ze zmiennej wydajności jonizacji niektórych analitów w źródle ESI.

Odzyski uwzględniono podczas obliczania poziomów pozostałości pestycydów wykrytych w próbkach miodu pszczelego. Jeżeli oznaczony poziom pozostałości analitu znajdował się poza wyznaczonym zakresem liniowości, ekstrakt rozcieńczano tak, by szacowany poziom pozostałości w rozcieńczonej próbce znajdował się w wyznaczonym zakresie.

W celu porównania wydajności ekstrakcji wybranych analitów z zastosowaniem podejścia QuEChERS oraz techniki SLE wykonano najpierw test F-Snedecor'a ( $\alpha=0,05$ ) by stwierdzić czy względne odchylenia standardowe różnią się w sposób istotny; w przypadku braku statystycznie istotnej różnicy, stosowano test T ( $\alpha=0,05$ ), jeśli zaś różnica była statystycznie istotna – test Cohrana-Cox'a. Wyniki zestawiono w **Tabeli 15**.

Tabela 15. Wydajność ekstrakcji pozostałości 30 pestycydów z próbek miodu zawierających te anality na poziomach stężeń odpowiadających  $0,75 \cdot NDP$  i  $NDP$ .

Analit	Odzysk (CV) dla $0,75 \cdot NDP$				Odzysk (CV) dla $NDP$			
	QuEChERS		SLE		QuEChERS		SLE	
Akrynatryna	86%	(24%)	96%	(20%)	72%	(17%)	75%	(16%)
Azoksystrobina	73%	(19%)	71%	(12%)	59%	(16%)	67%	(16%)
Benzoesan emamektyny	77% <sup>a</sup>	(11%)	64% <sup>a</sup>	(11%)	65%	(14%)	70%	(11%)
Buprofezyna	66%	(13%)	73,7%	(9,8%)	56,1%	(7,4%)	58%	(12%)
Chloridazon	65,4%	(7,4%)	67%	(10%)	58,0%	(7,2%)	62,6%	(8,9%)
Cymoksanil	36%	(11%)	36%	(10%)	34% <sup>a</sup>	(12%)	41% <sup>a</sup>	(11%)
Cyprodynil	74,5%	(8,4%)	84%	(11%)	63,6%	(9,0%)	69%	(10%)
Diflubenzuron	70,5%	(7,6%)	74,2%	(8,6%)	61%	(13%)	67,1%	(8,1%)
Dimetomorf	70%	(16%)	70,6%	(8,4%)	59%	(14%)	66%	(12%)

Tabela 15. c.d.

Analit	Odzysk (CV) dla 0,75 NDP				Odzysk (CV) dla NDP			
	QuEChERS		SLE		QuEChERS		SLE	
Etofenproks	49%	(10%)	46,5%	(9,8%)	43,5%	(8,8%)	47%	(10%)
Fenazachina	53% <sup>a</sup>	(14%)	43% <sup>a</sup>	(18%)	40,4%	(8,0%)	48%	(23%)
Fenbukonazol	73%	(12%)	70,8%	(6,8%)	60%	(24%)	68,1%	(9,2%)
Fenoksaprop-P	73% <sup>a</sup>	(11%)	63,2% <sup>a</sup>	(8,2%)	65%	(10%)	70%	(10%)
Fenpiroksymat	66%	(13%)	73,1%	(8,0%)	62%	(20%)	65%	(10%)
Fenpropidyna	74%	(12%)	67,0%	(5,8%)	62,6%	(6,4%)	68,6%	(9,0%)
Fluazyfop-P butylowy	68% <sup>a</sup>	(10%)	53,2% <sup>a</sup>	(7,6%)	59,5%	(7,4%)	65,6%	(8,7%)
Flusilazol	69%	(14%)	61,8%	(4,8%)	56%	(22%)	63%	(10%)
Flutolanil	72% <sup>a</sup>	(15%)	60,4% <sup>a</sup>	(7,6%)	64%	(15%)	68%	(11%)
Foksim	64%	(20%)	55%	(10%)	60%	(15%)	62%	(15%)
Fosalon	76,8%	(8,6%)	70%	(12%)	70%	(13%)	75%	(10%)
Kwizalofop-P-etylowy	67%	(15%)	66,5%	(9,8%)	60%	(11%)	65%	(12%)
Metazachlor	73,1%	(7,6%)	74,0%	(7,2%)	62,4%	(9,0%)	68,4%	(7,4%)
Metiokarb	84,8% <sup>a</sup>	(8,0%)	67,0% <sup>a</sup>	(8,4%)	74,6%	(8,6%)	79,8%	(8,2%)
Pirydaben	60%	(15%)	60%	(11%)	52%	(24%)	56%	(13%)
Piryproksyfen	65%	(10%)	70%	(10%)	56,4%	(6,2%)	61%	(10%)
Profam	86%	(18%)	78%	(19%)	73%	(18%)	80%	(19%)
Propakwizafop	67%	(14%)	71,4%	(7,6%)	61%	(10%)	64%	(11%)
Prosulfokarb	58,1%	(6,2%)	55%	(10%)	49,6%	(9,4%)	54,9%	(8,1%)
Symazyna	69%	(21%)	70%	(21%)	57%	(23%)	54%	(20%)
Tebufenpyrad	66% <sup>a</sup>	(15%)	55% <sup>a</sup>	(14%)	57%	(12%)	62%	(15%)

<sup>a)</sup> statystycznie istotne różnice w odzyskach pomiędzy metodami (T-test,  $\alpha=0,05$ )

Odzysk na poziomie pozostałości równym wartości liczbowej 0,75 NDP uzyskany dla benzoesanu emamektyny, fenazachiny, fenoksapro-pu-P, fluazyfopu-P butylowego, flutolanilu, metiokarbu, tebufenpyradu różnił się w sposób statystycznie istotny (test T) w zależności od zastosowanej procedury. Na poziomie NDP jedynie wydajność ekstrakcji cymoksanilu różniła się w sposób statystycznie istotny. Różnice w wydajności ekstrakcji analitów w przypadku stosowania obu metodyk analitycznych stają się statystycznie istotne dla większej ilości analitów wraz ze spadkiem ich stężeń.

Odzysk cymoksanilu jest mały (34 – 41%) w obu przypadkach, jednak jest to sytuacja dopuszczalna w przypadku metod umożliwiających oznaczanie pozostałości wielu pestycydów jednocześnie, o ile zapewniona jest dobra powtarzalność wyników.

W przypadku 30 analizowanych pestycydów tylko dla 5 związków wyniki odbiegają nieznacznie od ustalonego kryterium ( $CV < 20\%$ ).

### 7.3 Sposoby wyznaczania granic wykrywalności i oznaczalności dla metodyk

Ze względu na różne definicje opisujące pojęcia granicy wykrywalności i oznaczalności proces ten jest często źródłem nieporozumień i wątpliwości.

Granica wykrywalności danego urządzenia kontrolno-pomiarowego (IDL) określa jakie ilości danego związku jest ona w stanie wykryć. Najczęściej do określenia wartości liczbowej parametru IDL korzysta się z definicji mówiącej, że jest to najmniejsza ilość danej substancji, którą można wykryć w sposób wiarygodny i odróżnić od tła wykorzystując dane urządzenie pomiarowe. Wartość liczbową parametru IDL zależy może od takich czynników jak czułość detektora względem analitu lub szum elektroniczny czy generowany przez detektor.

Wraz ze wzrostem czułości detektora obniżeniu ulega wartość liczbową IDL, podobnie obniża się ona ze spadkiem intensywności szumu aparaturowego.

Instrumentalna granica oznaczalności (IQL) określa najmniejszą ilość analitu, którą można oznaczyć ilościowo w sposób wiarygodny z wykorzystaniem danego urządzenia kontrolno-pomiarowego.

Wartości liczbowe parametrów IDL oraz IQL określają ograniczenia danej aparatury, względem czystych substancji (wzorców w rozpuszczalniku). Jednak w przypadku rzeczywistych próbek (środowiskowych, próbek żywności (np. miodu)) charakteryzujących się złożonym składem matrycy istotną rolę w intensywności sygnału odgrywają efekty matrycowe. Dlatego też, aby te efekty uwzględnić, w niniejszej pracy określano wartości IDL oraz IQL dla analitów w ekstrakcie matrycy, czyli wartości liczbowe odpowiednio LOD i LOQ.

Granica wykrywalności metodyki (MDL) jest parametrem charakterystycznym dla zastosowanej techniki ekstrakcji i techniki analizy wykorzystanych w metodyce opracowanej do oznaczania określonych analitów w danej matrycy. Wartość liczbową parametru MDL określa więc najmniejszą ilość analitu w próbce jaką można wiarygodnie wykryć lub odróżnić od tła matrycy próbki z wykorzystaniem danej metodyki. Taki parametr uwzględnia wpływ efektu matrycowego, wydajność ekstrakcji analitu oraz zmiany stężenia wynikające z odparowania rozpuszczalnika lub z rozcieńczenia.

Podobnie granica oznaczalności metodyki (MQL) określa najmniejszą ilość analitu w próbce jaką można oznaczyć ilościowo w sposób wiarygodny w danej matrycy (z wykorzystaniem danej metodyki).

Ważnym parametrem jest również najniższy poziom walidacji metodyki (LLMV). Określa najniższe stężenie analitu w próbce (matrycy) dla którego metodykę zwalidowano lub dowiedziono zdolności metodyki do wiarygodnego oznaczenia ilościowego.

W zależności od przyjętego sposobu wyznaczania granic wykrywalności, wartości dla danej metodyki mogą różnić się nawet o rząd wielkości, dlatego też chcąc porównać różne



metodyki należy wiedzieć z jakich definicji korzystano przy wyznaczaniu parametrów. Najlepiej, gdy korzystano z takich samych.

Znanych jest co najmniej 6 różnych metod wyznaczania granic wykrywalności i oznaczalności, jednak nie będą tu one wszystkie omówione. Przybliżone zostaną tylko dwie wykorzystane w niniejszej pracy na różnych etapach prowadzenia badań.

### **7.3.1 Podejście dwuetapowe**

Metoda zaproponowana przez specjalistów z US EPA jest opisana w wytycznych do „Wyznaczania wartości niewykrywalnych/nieoznaczalnych pozostałości pestycydów w żywności w oszacowaniu narażenia zdrowia ludzkiego” [108]; polega na wyznaczeniu wartości liczbowych parametrów MDL i MQL. Ta metoda zakłada:

1. etap: wyznaczenie wartości liczbowych IDL oraz IQL i wykorzystanie tych wartości do oszacowania wartości MDL i MQL;
2. etap: obliczenie wartości liczbowych MDL oraz MQL dla danej metodyki (określona technika ekstrakcji i oznaczania, konkretne analizy i matryca).

Najprostszym sposobem jest wyznaczanie wartości liczbowych parametrów MDL i MQL na podstawie pomiaru intensywności szumu w pobliżu czasu retencji analitu i oszacowanie stężenia analitu w matrycy, które daje sygnał równy trójrotności szumu (stosunek sygnału do szumu równy trzy odpowiada wartości liczbowej MDL). Jest to jednak sposób dający mało wiarygodne wyniki, ponieważ intensywność szumu zmienia się pomiędzy kolejnymi analizami, jak również zależy od zakresu czasu retencji wziętego do obliczenia intensywności szumu. Inną możliwością, dającą bardziej wiarygodną wartość liczbową MDL jest wykonanie następujących kroków:

1. Analiza kilku (co najmniej 5) ekstraktów próbek ślepych;
2. Pomiar  $N_{p-p}$  dla każdego ekstraktu;
3. Obliczenie średniej wartości  $N_{p-p}$  z pomiarów;
4. Obliczenie stężenia roztworu dla którego stosunek sygnału do szumu wynosi 3 (biorąc pod uwagę wydajność ekstrakcji);
5. Oszacowanie wartości liczbowej MDL przez obliczenie ilości analitu w matrycy, która by dała taki sygnał (uwzględniając wszystkie współczynniki zmiany objętości, a przez to stężenia).

### Metoda $t_{99}S_{LLMV}$

Drugi etap w podejściu dwuetapowym obejmuje obliczenie wartości liczbowych MDL i MQL. Metoda ta obejmuje następujące operacje [109]:

1. Przygotowanie ekstraktów 7 próbek ślepych. Masy tych próbek powinny być takie jak w opracowanej procedurze dla próbek rzeczywistych;
2. Oszacowanie wartości liczbowej LOQ z uwzględnieniem wszystkich współczynników wynikających z zastosowania danej procedury analitycznej;
3. Dodanie analitów do ślepych próbek w ilościach, które odpowiadają wartości oszacowanej granicy oznaczalności (ELOQ) w ślepych próbkach;
4. Ekstrakcja każdej z przygotowanych próbek kontrolnych zgodnie z procedurą opracowaną dla próbek rzeczywistych;
5. Analiza próbek ekstraktów;
6. Określenie poziomów zawartości pozostałości w każdej badanej próbce;
7. Obliczenie odchylenia standardowego tych pomiarów ( $S_{ELOQ}$ );
8. Obliczenie wartości liczbowych MDL dla analitów w danej matrycy dla opracowanej procedury analitycznej ze wzoru

$$MDL = t_{99(n-1)} \cdot S_{ELOQ} \quad (5)$$

gdzie  $t_{99(n-1)}$  jest współczynnikiem jednostronnego rozkładu testu t-Studenta dla  $n-1$  stopni swobody przy 99% ufności.

Dla siedmiu powtórzeń (6 stopni swobody) próbek kontrolnych

$$t_{99(n-1)} = 3,143$$

Za LOQ przyjmuje się stężenie dające sygnał będący 10-12-krotnością odchylenia standardowego ślepej próbki (w tym wypadku  $S_{ELOQ}$ ) [m.in. 109]. Dlatego jeśli przyjmie się, że  $LOQ=10 \cdot S_{ELOQ}$ , to dla 7 powtórzeń próbek kontrolnych

$$t_{99(n-1)} = 3,143$$

$$10/t_{99(n-1)} = 10/3,143 = 3,182, \text{ co można zaokrąglić do } 3;$$

wtedy parametr MQL dla danej metodyki definiuje się jako

$$MQL = 3 \cdot MDL$$

W ten sposób otrzymuje się wartość granicy, powyżej której wyniki pomiarów ilościowych są precyzyjne.

Do wyznaczenia MDL tą metodą można również wykorzystać odchylenie standardowe serii pomiarów próbek kontrolnych ( $S_{LLMV}$ ).

Wartości liczbowe MDL i MQL wyznaczone w powyższy sposób uwzględniają kilka czynników mających wpływ na intensywność sygnału analitu, takich jak:

- szum aparaturowy;
- zmienność czułości aparatury;
- zmienność wydajności metody;
- wpływ efektów matrycowych i związków przeszkadzających.

Najbardziej wiarygodne wyniki otrzymuje się gdy zachodzi zależność  $LLMV = 2-5$  MDL, dlatego ważnym jest, by właściwie oszacować wartości liczbowe LOD i LOQ.

### 7.3.2 Porównanie metod wyznaczania wartości liczbowych granic wykrywalności i oznaczalności

W Tabeli 16. zestawiono informacje charakterystyczne dla różnych sposobów wyznaczania parametrów metrologicznych procedur oznaczania pestycydów w próbkach żywności.

Tabela 16. Informacje o metodach obliczania wartości liczbowych granic wykrywalności i oznaczalności metodyk analitycznych

Metoda	Prosta i łatwa do zastosowania	Uwzględnia zmienność krzywej kalibracyjnej	Uwzględnia wydajność metody i efekty matrycowe	Zmienność pomiędzy laboratoriami i analitykami	Dobra do oszacowania LOD/LOQ	Uwagi
$3N_{p-p}$	+	-	+	wysoka	+	W dużym stopniu zależy od interpretacji analityka
$k \cdot s_B / m$	-	-	-	umiarkowana	-	Trudna do zastosowania
Propagacja błędów	-	+	-	niska	akceptowalna	Trudna do zastosowania
Hubaux-Vos	-	+	-	niska	bardzo żmudna i czasochłonna	Niepraktyczna w przypadku matryc o skomplikowanym składzie
RMSE	+	+	-	niska	+	Dobra do wyznaczenia IDL, jednak nie do MDL
$t_{99}S_{LLMV}$	+	+	+	niska	-	W dużym stopniu zależy od wybranej wartości LLMV
Podejście dwuetapowe wykorzystujące metodę $t_{99}S_{LLMV}$	+	+	+	niska	+	Najlepsza do obliczenia MDL i MQL

Podejście  $3N_{p-p}$ , pomimo tego że charakteryzuje się prostotą, pozostawia wiele w gestii analityka, przez co otrzymane wartości trudno porównać pomiędzy laboratoriami czy analitykami. Można je zastosować do oszacowania wartości liczbowych LOD i LOQ w podejściu dwuetapowym.

Najbardziej praktyczną metodą określenia wartości liczbowych MDL i MQL jest podejście dwuetapowe wykorzystujące metodę RMSE (lub  $3N_{p-p}$ ) do oszacowania wartości liczbowej LOQ oraz metodę  $t_{99(n-1)} \cdot S_{E_{LOQ}}$ , ponieważ uwzględnia w końcowym wyniku wpływ efektów matrycowych i związków przeszkadzających jak również zmienność wydajności ekstrakcji. Metodę  $t_{99(n-1)} \cdot S_{E_{LOQ}}$  można zastosować do zbioru danych otrzymanych podczas walidacji metodyki, wykorzystując odchylenie standardowe odzysków na poziomie LLMV ( $S_{LLMV}$ ), zakładając, że poziom ten został prawidłowo określony.

#### 7.4. Granice wykrywalności i oznaczalności opracowanych metodyk analitycznych

Obecnie, przy dobrze zoptymalizowanych parametrach pracy detektora MS można uzyskać chromatogramy praktycznie pozbawione szumów. Tak więc mało zasadnym wydaje się stosowanie wartości S/N jako kryterium określającego granice wykrywalności i oznaczalności. Do walidacji metodyki oznaczania śladowych ilości pozostałości bardziej celowym jest oszacowanie granic wykrywalności i oznaczalności spełniających kryterium powtarzalności [110].

Wartości liczbowe granic wykrywalności i oznaczalności analitów charakterystyczne dla opracowanych metodyk zostały wyznaczone metodą  $t_{99} S_{LLMV}$  na podstawie serii ośmiu powtórzeń i wartości odchyłeń standardowych uzyskanych dla każdego analitu (w przypadku metodyki wykorzystującej DLLME-GC-MS granice te wyznaczono metodą  $3N_{p-p}$ ); wyniki te posłużyły w dalszej części do wyznaczenia wartości liczbowych MDL i MQL, które zestawiono w **Tabeli 17**.

Tabela 17. Wyznaczone wartości granic wykrywalności i oznaczalności pozostałości pestycydów i ich metabolitów w próbkach miodu, charakteryzujące opracowane metodyki analityczne

Analit	NDP [ng/g]	QuEChERS-LC-MS/MS		SLE-LC-MS/MS		Porównanie wydajności ekstrakcji				QuEChERS-LC-MS-Orbitrap	DLLME-GC-MS		
		MDL [ng/g]	MQL [ng/g]	MDL [ng/g]	MQL [ng/g]	podejście QuEChERS		technika SLE			LOQ [ng/g]	MDL [ng/g]	MQL [ng/g]
						MDL [ng/g]	MQL [ng/g]	MDL [ng/g]	MQL [ng/g]				
Acefat				0,37	1,3								
Akrynatryna						7,37	23,65	7,09	22,75				
Aldryna	10										0,31	1,0	
Amidosulfuron	10	3,24	9,73										
Asulam	50	1,9	5,69							5,0			
Azoksystrobina	10	0,14	0,42			0,45	1,5	0,41	1,34	0,5			
Beflubutamid	50	0,068	0,2							0,5			
Benzoesan emamektyny	10	0,67	2,01			0,45	1,48	0,45	1,5	1,0			
Bitertanol				0,14	0,41								
Boskalid	500	0,16	0,48							2,0			
Buprofezyna	50	0,12	0,36			1,11	3,74	1,08	3,64	0,5			
Chloridazon	50	0,24	0,72			1,16	3,8	1,07	3,51	2,0			
Chlorpiryfos				0,03	0,26								
Chlotianidyna	10	0,27	0,81	0,09	0,64					10			
Cymoksanil						1,97	6,48	1,87	6,15				
Cyprodynil	50	0,42	1,26			0,88	2,99	0,81	2,76	0,1			
Cyprokonazol (izomer 1)	50	1,48	4,44							5,0			
Cyprokonazol (izomer 2)	50	0,71	2,13							1,0			
2,4'-DDD (TDE)	20										0,30	1,0	
2,4'-DDE	50										0,11	0,30	
2,4'-DDT	50										0,29	1,0	
4,4'-DDE	50										0,10	0,29	

Tabela 17. c.d.

Analit	NDP [ng/g]	QuEChERS-LC-MS/MS		SLE-LC-MS/MS		Porównanie wydajności ekstrakcji				QuEChERS- LC-MS- Orbitrap	DLLME-GC-MS		
		MDL [ng/g]	MQL [ng/g]	MDL [ng/g]	MQL [ng/g]	podejście QuEChERS		technika SLE			LOQ [ng/g]	MDL [ng/g]	MQL [ng/g]
						MDL [ng/g]	MQL [ng/g]	MDL [ng/g]	MQL [ng/g]				
4,4'-DDT	50											0,71	2,3
Detametryna	30	0,91	2,73										
Dichlofop metylowy	10	1,25	3,74										
Difenokonazol	50	0,35	1,05							2,0			
Diflubenzuron	50	0,34	1,02			0,77	2,63	0,7	2,38				
Dimetomorf (izomer 1)	50	0,25	0,75			1,18	3,87	1,05	3,46	5,0			
Dimetomorf (izomer 2)	50	0,18	0,54										
Dimoksybina	50	0,045	0,14							0,5			
α-Endosulfan	10											4,0	13
Endryna	10											1,1	3,6
Epoksykonazol	50	0,19	0,57							1,0			
Etofenproks	50	0,12	0,36			0,92	2,99	0,86	2,8	5,0			
Fenazachina	10	0,31	0,93			1,04	3,46	0,97	3,24	1,0			
Fenbukonazol	50	0,29	0,87			0,66	2,18	0,57	1,91	3,0			
Fenoksaprop-P etylu	50	0,26	0,78							1,0			
Fenoksaprop-P						0,7	2,3	0,73	2,37	5,0			
Fenpirosymat	10	0,34	1,03			0,65	2,1	0,62	2	0,5			
Fenpropidyna	20	0,47	1,41			0,61	2,08	0,57	1,94	0,2			
Flonikamid	50	1,07	3,21										
Fluazyfop-P butylowy	50	0,25	0,75			0,67	2,19	0,75	2,45	0,5			
Fluoksastrobina	10	0,054	0,16							0,5			
Fluoksypyr meptylu	50	2,03	6,09	0,03	0,13								
Flusilazol	50	0,27	0,81			0,61	1,98	0,55	1,78	0,5			
Flutolanil	20	1,6	4,8			0,33	1,1	0,35	1,17				
Foksim	20	0,32	0,96			0,69	2,34	0,75	2,55	5,0			
Fosalon	50	0,45	1,35			0,69	2,28	0,69	2,29	1,0			
Fosmet	50	0,18	0,53										
Fosmet-okson	50	0,31	0,93										
Haloksyfop-P	50	5,67	17										
Haloksyfop-R metylu	50	0,069	0,21							0,5			
Imazalil				0,35	0,91								
Imidachlopyrd	50	0,2	0,6							5,0			
Indoksakarb	20	0,68	2,04							1,0			
Karbaryl				0,05	0,62								
Karbenfazym	1000	0,12	0,36							1,0			
Karfentrazon etylowy				0,05	0,18								
Kletodym (izomer 1)	50	0,79	2,37							5,0			
Kletodym (izomer 2)	50	0,48	1,44										
Kwizalofop-P etylowy	50	0,29	0,87			0,74	2,35	0,68	2,17	1,0			
Lindan (γ-HCH)	10											0,80	2,6
Lufenuron	20	0,67	2,01										
Malation				0,2	0,75								
Metalaksyl				0,05	0,34								
Metazachlor	50	0,11	0,33			1,35	4,49	1,23	4,09	3,0			
Metidation				0,3	0,74								
Metiokarb	50	0,18	0,54			0,64	2,14	0,72	2,39	5,0			
Metkonazol	10	0,21	0,63							0,5			
Nowaluron	10	0,52	1,56										
Oksadiksyl	10	0,38	1,14							1,0			
Pirimikarb	50	0,08	0,24							1,0			
desmetyl-Pirimikarb	50	0,057	0,17										
Pirydaben	20	0,25	0,74			1,57	5,17	1,46	4,81	1,0			
Piryproksyfen	50	0,17	0,51	0,02	0,06	0,74	2,48	0,68	2,28	0,5			
Profam	50	0,8	2,39			5,35	17,84	5,02	16,75				
Propakwizafop	50	0,77	2,3			0,68	2,31	0,64	2,18	0,5			
Propamokarb	100	0,22	0,67							1,0			
Prosulfokarb	50	0,18	0,54			0,6	1,97	0,55	1,79	0,5			
Setoksydim										1,0			
Spinozyna A	10	0,036	0,11							0,03			
Spinozyna D	10	0,017	0,05							0,14			
Spirodiklofen	20	0,78	2,34										
Symazyna	10	0,26	0,78			0,69	2,29	0,72	2,41	0,5			
Tebufenpyrad	50	0,2	0,6			0,89	2,98	0,93	3,1	0,5			
Tebukonazol	50	0,35	1,05							1,0			
Teflubenzuron	50	1,06	3,18										
Tetrakonazol	20	0,24	0,72							0,5			
Tiachlopyrd	200	0,2	0,6							0,5			
Tiametoksam	10	0,56	1,68							10,0			
Tiofanat metylowy	1000	0,53	1,59							10,0			
Tolchlofos metylowy	50	0,72	2,16							10,0			
Tribenuron metylu				0,03	0,09								
Triflumuron	10	0,32	0,96										
Tritosulfuron	10	1,54	4,62										

## **8. Zastosowanie opracowanych metodyk do oznaczania pozostałości pestycydów i ich metabolitów w próbkach rzeczywistych**

Analizie na zawartość pozostałości pestycydów poddano łącznie 58 próbek miodu pszczelego z różnych rejonów Polski:

- Pomorza (6),
- Wielkopolski (16),
- Lubelszczyzny (9),
- Dolnego Śląska (5),
- Górnego Śląska (9), oraz
- pojedyncze próbki z innych rejonów (w sumie 13).

Informacje o miejscach pobrania próbek i odmianach miodu zestawiono w **Załączniku 4**.

W celu zapewnienia wiarygodności uzyskanych wyników, przed każdą serią 20 próbek rzeczywistych wykonano analizę próbki ślepej i dwóch próbek ślepych z dodatkiem ściśle określonej ilości wzorców. Próbki kontrolne były przygotowywane do analizy wraz z próbkami rzeczywistymi i w taki sam sposób. Sumaryczne zestawienie wyników analiz próbek miodu pszczelego z różnych terenów Polski zaprezentowano w **Tabeli 18**.

Wyniki obliczono w oparciu o równania krzywych kalibracyjnych i z uwzględnieniem odzysków.

Szczegółowe zestawienie wszystkich zbadanych próbek przedstawiono w **Załączniku 5**. Wyniki oznaczeń podano wraz z rozszerzoną niepewnością ( $k=2$ ).

Rozszerzona niepewność ( $U$ ) jest wielkością określającą przedział wokół uzyskanego wyniku analizy, w którym można, na określonym poziomie prawdopodobieństwa, oczekiwać wystąpienia wartości oczekiwanej [106]. Dominującym parametrem mającym wpływ na wartość niepewności jest powtarzalność pomiarów.

Wielkość rozszerzonej niepewności obliczano z zależności:

$$U = k \cdot \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (6)$$

gdzie:

$S$  – odchylenie standardowe;

$n$  – liczba pomiarów;

$k$  – współczynnik rozszerzenia (dla poziomu istotności 0,05 (prawdopodobieństwa 95%)  $k=2$ ).

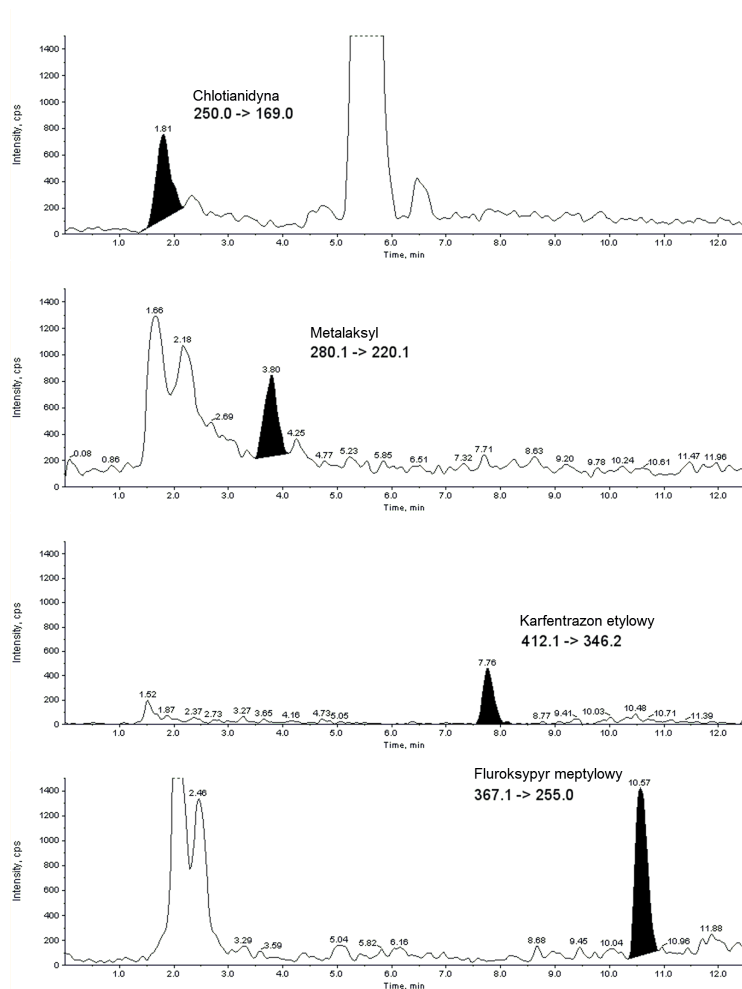
Tabela 18. Liczba próbek miodu pszczelego, w których wykryto pozostałości pestycydów z zastosowaniem opracowanych metodyk, podane wraz z zakresem wykrytych stężeń i medianą.

Pestycyd	Liczba próbek	Zakres stężeń min – max [ng/g]	Mediana [ng/g]	MQL [ng/g]
Chlotianidyna	31	<MQL – 2,56	<MQL	0,64
Karbendazym	27	<MQL - 7,61	0,972	0,36
Karfentrazon etylowy	16	<MQL – 0,26	0,226	0,18
Fluoksypyr meptylowy	16	<MQL – 0,33	0,242	0,13
Metalaksyl	12	<MQL	<MQL	0,34
Metkonazol	12	<MQL	<MQL	0,63
Metidation	12	<MQL – 0,85	<MQL	0,74
Dimoksystrobina	11	<MQL - 49,30	<MQL	0,14
Tiametoksam	11	<MQL - 2,02	<MQL	1,68
Tebukonazol	10	<MQL - 8,08	0,81	1,05
Imazalil	6	<MQL – 4,98	0,95	0,91
Boskalid	5	<MQL - 28,05	3,700	0,48
Imidachlopyrd	4	<MQL	<MQL	0,60
Tiachlopyrd	4	<MQL - 0,731	<MQL	0,60
Chlorpiryfos	3	<MQL – 0,50	<MQL	0,26
Azoksystrobina	2	<MQL	<MQL	0,42
Pirimikarb	2	<MQL	<MQL	0,24
Bitertanol	1	<MQL	<MQL	0,41
Haloksypop P	1	<MQL	<MQL	17,0
Propamokarb	1	<MQL	<MQL	0,67
Tetrazonazol	1	0,934	0,934	0,72
Tiofanat metylowy	1	3,445	3,445	1,59
4,4'-DDT <sup>a</sup>	15	3,02 – 13,91	5,82	2,31
Lindan	4	3,90 – 4,74	4,18	2,64
Endryna	4	<MQL – 4,71	2,71	3,63
Aldryna	2	2,47 – 2,61	2,54	0,99

<sup>a</sup> 4,4'-DDT i metabolity wyrażone jako 4,4'-DDT

W badanych próbkach najczęściej wykrywane były pozostałości 4,4'-DDT (79% próbek), karbendazymu i chlotianidyny (odpowiednio 66% i 61% próbek), następnie karfentrazonu etylowego i fluoksypiru meptylowego, obie wykryte w 31% próbek. Pozostałości metkonazolu występowały w 29% próbek, natomiast metalaksylu i metidationu w 27%. Pozostałe z 27 wykrytych pozostałości występowały w mniej niż 25 % próbek. Dimoksystrobina, boskalid i 4,4'-DDT występowały w oznaczanych próbkach na najwyższych poziomach – odpowiednio  $(49,30 \pm 0,60)$  ng/g,  $(28,05 \pm 0,70)$  ng/g oraz  $(13,91 \pm 0,42)$  ng/g. Dwa pierwsze wykryto w tej samej próbce miodu wielokwiatowego z okolic Orchowa (Wielkopolska), natomiast najwięcej 4,4'-DDT zawierała próbka miodu akacjowego z okolic Oleśnicy (Dolny Śląsk). Poziomy pozostałości tych pestycydów nie przekraczają dopuszczalnych wartości dla miodu pszczelego.

W 4 z 58 próbek nie wykryto żadnych pozostałości analitów, natomiast pozostałe próbki zawierały pozostałości od 1 do 9 z oznaczanych w sumie 95 pestycydów i ich metabolitów. Przykładowe chromatogramy uzyskane w trakcie analizy ekstraktów uzyskanych z badanych próbek miodu z Pomorza przedstawiono na **Rysunkach 16. i 17.**



Rysunek 16. Chromatogramy MRM uzyskane w wyniku analizy ekstraktu próbki z Pomorza, w której wykryto pozostałości 4 z oznaczanych pestycydów z wykorzystaniem opracowanej metodyki SLE-LC-MS/MS (kolumna Atlantis dC18; 2,1 x 100 mm; 3 μm).



Rysunek 17. Chromatogram SIM ( $m/z = 219$ ) uzyskany w trakcie analizy próbki miodu wielokwiatowego z wykorzystaniem opracowanej metodyki DLLME-GC-MS, w którym wykryto pozostałość lindanu ( $t_R=10,602$  min)

Opracowane procedury ekstrakcji i oczyszczania są efektywne, natomiast zastosowanie selektywnej detekcji zapewniło identyfikację i oznaczenie ilościowe analitów.

W **Tabeli 19**. zestawiono wyniki wraz z wartościami rozszerzonej niepewności pomiarowej uzyskane w trakcie analizy próbek miodu z pięciu rejonów Polski.



Tabela 19. Poziomy pozostałości pestycydów w próbkach miodu z pięciu regionów Polski (wyniki podane jako wartość średnia ± rozszerzona niepewność).

Analityk		Pomorzanie	Wielkopolska	Lubelszczyzna	Dolny Śląsk	Górny Śląsk
Chlotinidyna	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	5 (83%)	6 (40%)	5 (83%)	6 (75%)	3 (60%)
	Stężenie Min [ng/g]	1,67±0,40	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie Max [ng/g]	2,36±0,13	<MQL	1,26±0,28	1,16±0,33	0,92±0,21
Imazalil	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	2 (33%)	1 (7%)	0	1 (12%)	1 (20%)
	Stężenie Min [ng/g]	<MQL	<MQL	-	4,98±0,37	3,15±0,11
	Stężenie Max [ng/g]	<MQL	-	-	-	-
Metalaksyl	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	6 (100%)	1 (7%)	1 (17%)	2 (25%)	1 (20%)
	Stężenie Min [ng/g]	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie Max [ng/g]	<MQL	-	-	<MQL	<MQL
Metidation	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	0	3 (20%)	1 (17%)	2 (25%)	4 (80%)
	Stężenie Min [ng/g]	-	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie Max [ng/g]	-	0,794±0,040	-	<MQL	0,847±0,042
Karfentrazon etylowy	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	6 (100%)	3 (20%)	1 (17%)	3 (38%)	0
	Stężenie Min [ng/g]	0,185±0,019	<MQL	0,234±0,020	<MQL	-
	Stężenie Max [ng/g]	0,242±0,013	0,253±0,031	-	0,261±0,023	-
Bitertanol	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	0	0	1 (17%)	0	0
	Stężenie Min [ng/g]	-	-	<MQL	-	-
	Stężenie Max [ng/g]	-	-	-	-	-
Chlorpiryfos	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	0	3 (20%)	0	0	0
	Stężenie Min [ng/g]	-	<MQL	-	-	-
	Stężenie Max [ng/g]	-	0,504±0,041	-	-	-
Fluoksypyr meptylowy	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	6 (100%)	3 (20%)	1 (17%)	3 (38%)	0
	Stężenie Min [ng/g]	0,203±0,021	0,1395±0,0098	0,329±0,020	0,156±0,010	-
	Stężenie Max [ng/g]	0,2886±0,0077	0,301±0,029	-	0,329±0,019	-
Azoksystrobina	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	-	0	0	1 (20%)	0
	Stężenie Min [ng/g]	-	-	-	<MQL	-
	Stężenie Max [ng/g]	-	-	-	-	-
Boskalid	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	-	2 (17%)	0	1 (20%)	0
	Stężenie Min [ng/g]	-	3,700±0,040	-	<MQL	-
	Stężenie Max [ng/g]	-	28,05±0,70	-	-	-
Karbendazym	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	-	7 (58%)	5 (100%)	4 (80%)	4 (50%)
	Stężenie Min [ng/g]	-	<MQL	0,972±0,041	<MQL	<MQL
	Stężenie Max [ng/g]	-	0,933±0,017	5,620±0,080	2,605±0,030	7,610±0,040
Pirimikarb	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	-	0	1 (20%)	0	1 (12,5%)
	Stężenie Min [ng/g]	-	-	<MQL	-	<MQL
	Stężenie Max [ng/g]	-	-	-	-	-
Dimoksystrobina	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	-	2 (17%)	1 (20%)	3 (60%)	1 (12,5%)
	Stężenie Min [ng/g]	-	5,515±0,050	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie Max [ng/g]	-	49,3±0,60	-	0,229±0,039	-
Imidachlopyrd	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	-	1 (8%)	2 (40%)	1 (20%)	0
	Stężenie Min [ng/g]	-	<MQL	<MQL	<MQL	-
	Stężenie Max [ng/g]	-	-	<MQL	<MQL	-
Metkonazol	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	-	4 (33%)	1 (20%)	3 (60%)	1 (12,5%)
	Stężenie Min [ng/g]	-	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie Max [ng/g]	-	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
Propamokarb	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	-	0	0	0	1 (12,5%)
	Stężenie Min [ng/g]	-	-	-	-	<MQL
	Stężenie Max [ng/g]	-	-	-	-	-
Tebukonazol	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	-	2 (17%)	3 (60%)	0	3 (37,5%)
	Stężenie Min [ng/g]	-	2,075±0,090	<MQL	-	<MQL
	Stężenie Max [ng/g]	-	8,075±0,15	3,17±0,20	-	1,470±0,020
Tetrazonazol	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	-	0	0	1 (20%)	0
	Stężenie Min [ng/g]	-	-	-	0,93±0,11	-
	Stężenie Max [ng/g]	-	-	-	-	-
Tiachlopyrd	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	-	0	1 (20%)	0	1 (12,5%)
	Stężenie Min [ng/g]	-	-	<MQL	-	<MQL
	Stężenie Max [ng/g]	-	-	-	-	-
Tiametoksam	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	-	4 (33%)	1 (20%)	1 (20%)	2 (25%)
	Stężenie Min [ng/g]	-	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL
	Stężenie Max [ng/g]	-	2,02±0,24	-	-	<MQL
Tiofanat metylowy	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	-	0	1 (20%)	0	0
	Stężenie Min [ng/g]	-	-	3,445±0,090	-	-
	Stężenie Max [ng/g]	-	-	-	-	-
Endryna	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	-	1 (14%)	0	0	3 (60%)
	Stężenie Min [ng/g]	-	4,71±0,23	-	-	<LOQ
	Stężenie Max [ng/g]	-	-	-	-	4,32±0,22
Aldryna	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	-	0	1 (50%)	0	1 (25%)
	Stężenie Min [ng/g]	-	-	2,614±0,025	-	2,470±0,029
	Stężenie Max [ng/g]	-	-	-	-	-
4,4'-DDT	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	-	5 (71%)	2 (100%)	1 (100%)	4 (80%)
	Stężenie Min [ng/g]	-	5,61±0,32	3,02±0,13	13,91±0,32	4,33±0,17
	Stężenie Max [ng/g]	-	10,712±0,067	5,56±0,23	-	7,35±0,19
Lindan	Liczba próbek (%) <sup>a</sup>	-	0	1 (50%)	0	2 (40%)
	Stężenie Min [ng/g]	-	-	4,744±0,084	-	3,908±0,026
	Stężenie Max [ng/g]	-	-	-	-	3,95±0,17

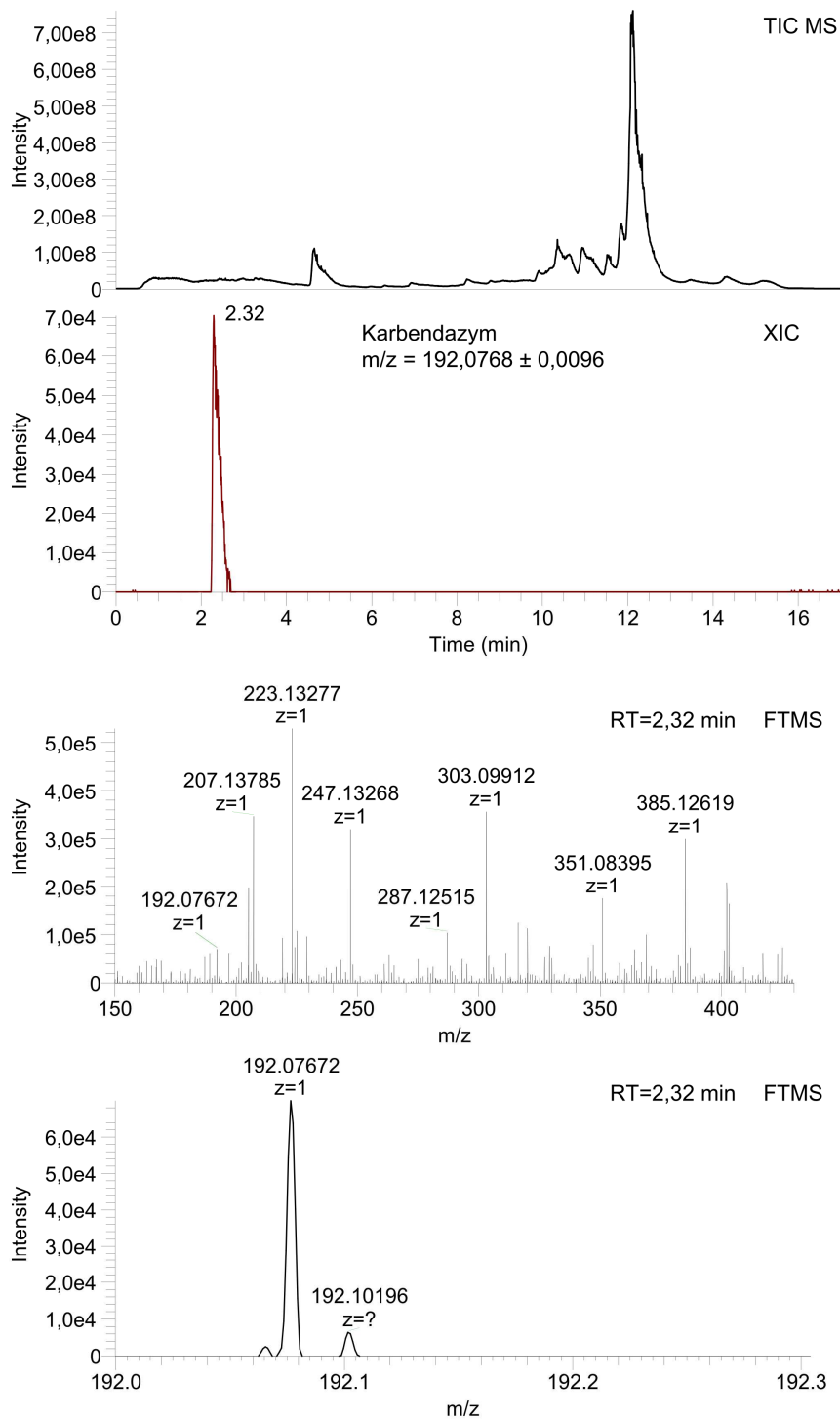
<sup>a)</sup> w których wykryto pozostałości danego pestycydu

W przypadku metodyki opartej na wysoce dokładnym pomiarze masy, zastosowanie układu U-HPLC pozwoliło na skrócenie czasu analizy dzięki zwiększeniu prędkości przepływu eluentu, a zastosowanie kolumny z wypełnieniem porowato-rdzeniowym nie spowodowało znacznego zwiększenia ciśnienia, w porównaniu z kolumną z wypełnieniem porowatym. Dzięki temu rozwiązaniu możliwe było skrócenie czasu analizy przy zachowaniu sprawności układu chromatograficznego i czułości. Wykorzystanie do detekcji układu MS-Orbitrap umożliwiło wysoce dokładny pomiar masy, zapewniając jednoznaczną identyfikację koeluuujących analitów i rozróżnienie analitów od substancji przeszkadzających na poziomie LOD. Jak pokazano w **Tabeli 17.**, LOQ jest w granicach 0,1-10 ng/g miodu – są to wartości poniżej ustanowionych NDP dla pestycydów w miodzie, lub im równe.

Różnica masy pomiędzy teoretyczną a określoną doświadczalnie nie przekracza 2,7 ppm.

Celem udowodnienia przydatności opracowanej metodyki QuEChERS-LC-MS-Orbitrap analizie poddano trzy próbki miodu: z Katalonii, Francji oraz Polski.

Miód rozmarynowy z Katalonii był wolny od zanieczyszczeń, miód francuski kasztanowy zawierał pozostałości benzoesanu emamektyny, fenpropidyny i symazyny w śladowych ilościach (na poziomach poniżej MQL), natomiast miód gryczany z Polski zawierał pozostałości: fenbukonazolu i tebukonazolu na poziomie poniżej MQL, oraz pozostałości fluazyfopu, flusilazolu i karbendazymu na poziomach odpowiednio ( $8,04 \pm 0,23$ ), ( $1,27 \pm 0,12$ ) i ( $15,1 \pm 0,41$ ) ng/g miodu. Przykładowe chromatogramy uzyskane w wyniku analizy próbki miodu gryczanego z Polski przedstawiono na **Rysunku 18.**



Rysunek 18. Przykładowe chromatogramy TIC i XIC oraz widmo masowe po transformacji Fouriera, zarejestrowane w  $t_R=2,32$  min i wycinek z pikem masowym karbendazymu, uzyskane w trakcie analizy próbki miodu wrzosowego z Polski, z wykorzystaniem opracowanej metodyki QuEChERS-LC-MS-Orbitrap (kolumna Ascentis Express, C18; 2,1 x 50 mm; 2,7  $\mu\text{m}$  fused-core).

## ***V. PODSUMOWANIE I WNIOSKI***

W trakcie prac związanych z opracowywaniem metodyk należało sprostać takim wyzwaniom jak powstawanie adduktów analitów ze składnikami matrycy i/lub fazy ruchomej, wpływ efektów matrycowych na wydajność jonizacji, oraz zjawisko rozdwojonych pików związków wcześniej eluujących. Udowodniono, że podejście QuEChERS można zastosować do próbek o tak złożonym składzie matrycy jak miód pszczele. Zastosowanie metody  $t_{99}S_{LLMV}$  pozwoliło na wyznaczenie wiarygodnych wartości MDL i MQL, uwzględniających wpływ efektów matrycowych na wydajność jonizacji analitów i intensywność sygnału.

Obie metodyki oznaczania pozostałości 30 pestycydów w modelowych próbkach miodu pszczelego (z dodatkiem ściśle określonych ilości analitów) z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS na etapie oznaczania końcowego wykorzystują warianty ekstrakcji ciecz-ciecz wymagające zmniejszonych ilości rozpuszczalników organicznych. Wydajności ekstrakcji analitów z zastosowaniem obu podejść zaczynają się różnić w sposób statystycznie istotny dla niższych poziomów stężeń. Obie metody pozwalają na ilościowe oznaczanie pozostałości pestycydów w próbkach miodu pszczelego na poziomach znacznie poniżej NDP rekomendowanych w dokumentach UE.

Opracowano również nową i szybką metodę pozwalającą na oznaczanie bardzo niskich poziomów stężeń pestycydów chloroorganicznych w miodzie. Zastosowanie planów doświadczalnych umożliwiło optymalizację warunków dyspersyjnej mikroekstrakcji ciecz-ciecz. Technika DLLME charakteryzuje się bardzo niskim zużyciem rozpuszczalników organicznych, a wykorzystanie GC-MS umożliwia jakościowe i ilościowe oznaczanie pozostałości pestycydów i ich metabolitów na poziomach poniżej NDP ustanowionych przez UE.

Opracowaną metodykę porównano z innymi dostępnymi metodykami umożliwiającymi oznaczanie OCP, które były opublikowane w ciągu ostatniej dekady (**Tabela 20.**).

W porównaniu z innymi metodami, nowo opracowana metodyka jest szybka, łatwa w zastosowaniu i charakteryzuje się zużyciem jedynie niewielkie ilości rozpuszczalników organicznych oraz wartościami MDL i MQL porównywalnymi z lub niższymi od innych dostępnych metod oznaczania OCP w próbkach miodu pszczelego.

Tabela 20. Porównanie wartości granic wykrywalności i oznaczalności dostępnych metodyk z opracowaną

Przygotowanie próbki	Analiza	LOD [ng/g]	LOQ [ng/g]	Lit.
SE (heksan/aceton)	GC-MS	0,05	b.d.	[73]
LLE (octan etylu)	GC-MS GC-ECD	3-10 1-20	10-40 50-100	[86]
LLE (octan etylu) + oczyszczanie SPE (krzemionka)	GLC-EC	10	50	[87]
SPE (Isolute ENV+)	GC-ECD	b.d.	0,1-0,6	[79]
LLE (benzyna lekka) + oczyszczanie SPE (Florisil)	GC-MS	1-2	2-7	[88]
SPE (C18)	GC-MS	b.d.	4-20	[89]
SPE (C18)	GC-MS	1,1-6,1	3,6-20,1	[90]
LLE (octan etylu) + oczyszczanie SPE (Florisil)	GC-MS	0,2-1	0,75-4	[81]
LLE (eter naftowy/ octan etylu (80/20 v/v)) + oczyszczanie SPE (Florisil)	GC-MS	0,65-2,5	2-7,8	[78]
DLLME	GC-MS	0,10-4,0	0,30-13	Opracowana metodyka

Opracowane metodyki charakteryzują się etapem przygotowania próbki nie wymagającym skomplikowanej aparatury, a stosowanie przygotowanych, handlowo dostępnych, odważonych odczynników redukuje możliwość wystąpienia błędu ludzkiego. Ponadto metodyki oparte na podejściu QuEChERS umożliwiają stosowanie różnych konfiguracji, w zależności od charakteru analitów i rodzaju badanych próbek.

Analiza parametrów metrologicznych, takich jak MQL i CV oraz dobra liniowość metodyk w badanych zakresach stężeń prowadzi do wniosku, że można je z powodzeniem wykorzystywać do oznaczania śladowych ilości pozostałości pestycydów i ich metabolitów na poziomach znacznie poniżej ustalonych wartości NDP.

Opracowane metodyki analityczne z powodzeniem zastosowano do oznaczenia poziomów pozostałości w sumie 92 pestycydów i ich metabolitów w próbkach miodu pszczelego z Polski. Na 58 przeanalizowanych próbek pozostałości pestycydów obecne były w 54 z nich. Najczęściej wykrywanymi związkami były 4,4'DDT, karbendazym i chlotianidyna. W sumie wykryto pozostałości 27 z 92 analitów, a pojedyncza próbka zawierała pozostałości od 1 do 9 pestycydów. Pestycydy, których pozostałości wykryto na najwyższych poziomach to dimoksydrobina ( $49,30 \text{ ng/g} \pm 0,60 \text{ ng/g}$ ), boskalid ( $28,05 \text{ ng/g} \pm 0,70 \text{ ng/g}$ ) oraz 4,4'DDT ( $13,91 \text{ ng/g} \pm 0,42 \text{ ng/g}$ ). Poziomy pozostałości pozostałych wykrytych analitów nie przekraczały wartości  $8,1 \text{ ng/g}$  miodu.

Próbki, w których wykryto pozostałości pestycydów, zawierały je na poziomach nieprzekraczających wartości NDP dla miodu. Biorąc pod uwagę średnie roczne spożycie miodu w Unii Europejskiej –  $0,8 \text{ kg/capita}$  (dla Polski jest to ok.  $0,5 \text{ kg/capita}$ ) [111,112]

można stwierdzić, że zawartości pozostałości pestycydów w przeanalizowanych próbkach miodu nie stwarzają zagrożenia dla zdrowia ludzkiego.

## VI. LITERATURA

- [1] Rejestr środków ochrony roślin dopuszczonych do obrotu zezwoleniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 20.08.2010 r.
- [2] 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.U. L 70 z 16.3.2005, 1-16, z aneksami
- [3] B. Kędzia, E. Hołderna-Kędzia „Leczenie miodem”, Polski Związek Pszczelarski, Warszawa, 1998
- [4] Dyrektywa Rady 2001/110/WE, Offic. J. Eur. Commun. L10/47, z dnia 20 grudnia 2001
- [5] E. Anklam, *A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey*, Food Chem. 63 (1998) 549
- [6] L. da C. Azeredo, M.A.A. Azeredo, S.R. de Souza, V.M.L. Dutra, *Protein contents and physicochemical properties in honey samples of Apis mellifera of different floral origins*, Food Chem. 80 (2003) 249
- [7] M. Al-Mamary, A. Al-Meerri, M. Al-Habori, *Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey*, Nutr. Res. 22 (2002) 1041
- [8] F. Orhan, B.E. Sekerel, C.N. Kocabas, C. Sackesen, G. Adalioğlu, A. Tuncer, *Complementary and alternative medicine in children with asthma*, Ann. Allergy Asthma Immunol. 90 (2003) 611
- [9] A. Zumla, A. Lulat, *Honey – a remedy rediscovered*, J. R. Soc. Med. 82 (1989) 384
- [10] S.E.E. Efem, K.T. Udoh, C.I. Iwara, *The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance*, Infection 20 (1992) 227
- [11] P.C. Molan, *The antibacterial activity of honey*, Bee World 73 (1992) 5-28, 59-76
- [12] P.C. Molan, *The role of honey in the management of wounds*, J. Wound Care 8 (1999) 415
- [13] E.E. Obaseiki-Ebor, T.C.A. Afonya, *Preliminary report on the antimicrobial activity of honey distillate*, J. Pharm. Pharmacol. 35 (1983) 748
- [14] S.E.E. Efem, *Clinical observations on the wound healing properties of honey*, Br. J. Surg. 75 (1988) 679
- [15] H.A.L. Wahdan, *Causes of the antimicrobial activity of honey*, Infection 26 (1998) 26
- [16] T. Postmes, A.E. Boogaard, M. van den Hazen, *Honey for wounds, ulcers, and skin graft preservation*, Lancet 341 (1993) 756
- [17] R. Cooper, P.C. Molan, *The use of honey as a antiseptic in managing Pseudomonas infection*, J. Wound Care 8 (1999) 161
- [18] M. Fernández, Y. Picó, J. Mañes, *Analytical Methods for Pesticide Residue Determination in Bee Products*, J. Food Protect. 65 (2002) 1502
- [19] M. Biziuk (redakcja), „Pestycydy. Występowanie, oznaczanie i unieszkodliwianie”. WNT, Warszawa, 2001
- [20] B. Kędzia, E. Hołderna-Kędzia, *Przeciwnowotworowe działanie miodu* (komunikat), XLV Naukowa Konferencja Pszczelarska (11-12.03.2008, Puławy)
- [21] A.V. Tsiapara, M. Jaakkola, I. Chinou, K. Graikou, T. Tolonen, V. Virtanen, P. Moutsatsou, *Bioactivity of Greek honey extracts on breast cancer (MCF-7), prostate cancer (PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells: Profile analysis of extracts*, Food Chem. 116 (2009) 702
- [22] E. Melliou, I. Chinou, *Chemical constituents of selected unifloral Greek bee-honeys with antimicrobial activity*, Food Chem. 129 (2011) 284
- [23] E. Aysan, E. Ayar, A. Aren, C. Cifter, *The role of intra-peritoneal honey administration in preventing post-operative peritoneal adhesions*, Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 104 (2002) 152
- [24] M. Kassim, M. Achoui, M.R. Mustafa, M.A. Mohd, K.M. Yusoff, *Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate in vitro anti-inflammatory activity*, Nutr. Res. 30 (2010) 650

- [25] R. Tomasin, M.C.C. Gomes-Marcondes, *Aloe vera and honey solution decreases cell proliferation and increases apoptosis susceptibility in tumour tissue while avoids liver damage*, EJC Supplements 8, No. 5 (2010) 83
- [26] A.N. Fauzi, M.N. Norazmi, N.S. Yaacob, *Tualang honey induces apoptosis and disrupts the mitochondrial membrane potential of human breast and cervical cancer cell lines*, Food Chem. Toxicol. 49 (2011) 871
- [27] A. A. Shati, F. G. Elsaid, E. E. Hafez, *Biochemical and molecular aspects of aluminium chloride-induced neurotoxicity in mice and the protective role of crocus sativus l. extraction and honey syrup*, Neuroscience 175 (2011) 66
- [28] M. Küçük, S. Kolaylı, Ş. Karaoğlu, E. Ulusoy, C. Baltacı, F. Candan, *Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia*, Food Chem. 100 (2007) 526
- [29] Polska Norma "Miód pszczeli" PN-88/A-77626
- [30] P.L. Buldini, S. Cavalli, A. Mevoli, J.L. Sharma, *Ion chromatographic and voltammetric determination of heavy and transition metals in honey*, Food Chem. 73 (2001) 487
- [31] M. Ponikvar, J. Šnajder, B. Sedej, *Honey as a bioindicator for environmental pollution with SO<sub>2</sub>*, Apidologie 36 (2005) 403
- [32] Dyrektywa Rady 96/23/WE, Offic. J. Eur. Commun. L 125, z dnia 23 maja 1996
- [33] W. Horwitz, L.R. Kamps, K.W. Boyer, *Quality assurance in the analysis of food for trace contaminants*, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63 (1980) 1344
- [34] S. Bogdanov (Edytor), *Harmonised Methods of the International Honey Commission*, IHC (2002) [http://www.apis.admin.ch/host/doc/pdfhoney/IHCmethods\\_e.pdf](http://www.apis.admin.ch/host/doc/pdfhoney/IHCmethods_e.pdf)
- [35] R. Rial-Otero, E.M. Gaspar, I. Moura, J.L. Capelo, *Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview*, Talanta 71 (2007) 503
- [36] K.E. Maudens, G.-F. Zhang, W.E. Lambert, *Quantitative analysis of 12 sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by HPLC with post-column derivatization and fluorescence detection*, J. Chromatogr. A, 1047 (2004) 85
- [37] T.S. Thompson, D.K. Noot, *Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, Anal. Chim. Acta 551 (2005) 168
- [38] L. Verzegnassi, M.-C. Savoy-Perroud, R. H. Stadler, *Application of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey*, J. Chromatogr. A, 977 (2002) 77
- [39] G.M. Telling, *A gas-liquid chromatographic procedure for the detection of volatile N-nitrosamines at the ten parts per billion level in foodstuffs after conversion to their corresponding nitramines*, J. Chromatogr. 73 (1972) 79
- [40] E.V. Botitsi, P.N. Kormali, S.N. Kontou, A. Economou, D.F. Tsipi, *Development and validation of a new analytical method for the determination of 1,4-dichlorobenzene in honey by gas chromatography-isotope dilution mass spectrometry after steam-distillation*, Anal. Chim. Acta 579 (2006) 53
- [41] P.W. Atkins, „*Chemia Fizyczna*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2001
- [42] A.R. Long, C.R. Short, S.A. Barker, *Method for the isolation and liquid chromatographic determination of eight sulfonamides in milk*, J. Chromatogr. A, 502 (1990) 87
- [43] A.R. Long, L.C. Hsieh, M.S. Malbrough, C.R. Short, S.A. Barker, *Matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and liquid chromatographic determination of five benzimidazole anthelmintics in pork muscle tissue*, J. Food Comp. Analysis 3 (1990) 20
- [44] H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn, *Applications of solid-phase microextraction in food analysis*, J. Chromatogr. A 880 (2000) 35
- [45] L. Pillonel, J.O. Bosset, R. Tabacchi, *Rapid Preconcentration and Enrichment Techniques for the Analysis of Food Volatile. A Review*, Lebensm.-Wiss u.-Technol. 35 (2002) 1
- [46] J.C.R. Demyttenaere, J.I. Sánchez Martínez, R. Verhé, P. Sandra, N. De Kimpe, *Analysis of volatiles of malt whisky by solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction*, J. Chromatogr. A 985 (2003) 221
- [47] W. Wardencki, M. Michulec, J. Curylo, *A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis*, Int. J. Food Sci. Technol. 39 (2004) 703
- [48] Z.Y. Zhang, J. Poerschmann, J. Pawliszyn, *Direct solid phase microextraction of complex aqueous samples with hollow fiber membrane protection*, Anal. Commun. 33 (1996) 219
- [49] I. Falch (Edytor), *The Reporter (Europe)*, 22, Sigma-Aldrich, 2006, p. 12

- [50] R.E. Wrolstad, T.E. Acree, E.A. Decker, M.H. Penner, D.S. Reid, S.J. Schwartz, C.F. Shoemaker, D. Smith, P. Sporns (edytory), *Handbook of Analytical Chemistry*, Wiley-Interscience, New Jersey, USA, 2005
- [51] C. Blasco, M. Fernández, Y. Picó, G. Font, *Comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction for determining six organophosphorus insecticides in honey by liquid chromatography–mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, 1030 (2004) 77
- [52] J.M. Kokosa, A. Przyjazny, M. Jeannot, *Solvent Microextraction: Theory and Practice*. Wiley, New Jersey, USA, 2009
- [53] M. Rezaee, Y. Assadi, M.-R.M. Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction*, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1
- [54] M.-R.K. Zanjani, Y. Yamini, S. Shariati, J.Å. Jönsson, *A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop*, *Anal. Chim. Acta* 585 (2007) 286
- [55] S. X. Peng, C. Henson, M. J. Strojnowski, A. Golebiowski, and S. R. Klopfenstein, *Automated High-Throughput Liquid–Liquid Extraction for Initial Purification of Combinatorial Libraries*, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 261
- [56] S. X. Peng, T. M. Branch, and S. L. King, *Fully Automated 96-Well Liquid–Liquid Extraction for Analysis of Biological Samples by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry*, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 708
- [57] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Štajnbaher, F.J. Schenck, *Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce*, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 86 (2003) 412
- [58] Y.-A. Hammel, R. Mohamed, E. Gremaud, M.-H. LeBreton, A. Guy, *Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, 1177 (2008) 58
- [59] K. Inoue, S. Murayama, K. Takeba, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, *Contamination of xenoestrogens bisphenol A and F in honey: safety assessment and analytical method of these compounds in honey*, *J. Food Comp. Anal.* 16 (2003) 497
- [60] Ma.J. del Nozal, J.L. Bernal, J.C. Diego, L.A. Gómez, J.M. Ruiz, M. Higes, *Determination of oxalate, sulphate and nitrate in honey and honeydew by ion-chromatography*, *J. Chromatogr. A*, 881 (2000) 629
- [61] M. von Bruijnsvoort, S.J.M. Ottink, K.M. Jonker, E. de Boer, *Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, 1058 (2004) 137
- [62] C. Tananaki, A. Zotou, A. Thrasyvoulou, *Determination of 1,2-dibromoethane, 1,4-dichlorobenzene and naphthalene residues in honey by gas chromatography-mass spectrometry using purge and trap thermal desorption extraction*, *J. Chromatogr. A*, 1083 (2005) 146
- [63] S. Dobrinas, S. Birghila, V. Coatu, *Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey and propolis produced from various flowering trees and plants in Romania*, *J. Food Comp. Anal.* 21 (2008) 71
- [64] A.-C. Martel, S. Zeggane, *Determination of acaricides in honey by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection*, *J. Chromatogr. A*, 954 (2002) 173
- [65] N. Campillo, R. Peñalver, M. Hernández-Córdoba, *Evaluation of solid-phase microextraction conditions for the determination of chlorophenols in honey samples using gas chromatography*, *J. Chromatogr. A*, 1125 (2006) 31
- [66] P. Viñas, M.J. Soler-Romera, M. Hernández-Córdoba, *Liquid chromatographic determination of phenol, thymol and carvacrol in honey using fluorimetric detection*, *Talanta* 69 (2006) 1063
- [67] C. Benetti, N. Dainese, G. Biancotto, R. Piro, F. Mutinelli, *Unauthorised antibiotic treatments in beekeeping. Development and validation of a method to quantify and confirm tylosin residues in honey using liquid chromatography–tandem mass spectrometric detection*, *Anal. Chim. Acta* 520 (2004) 87
- [68] M. Madejczyk, D. Baralkiewicz, *Characterization of Polish rape and honeydew honey according to their mineral contents using ICP-MS and F-AAS/AES*, *Anal. Chim. Acta* 617 (2008) 11
- [69] M.J. Nozal, J.L. Bernal, L. Toribio, J.J. Jiménez, M.T. Martín, *High-performance liquid chromatographic determination of methyl anthranilate, hydroxymethylfurfural and related compounds in honey*, *J. Chromatogr. A*, 917 (2001) 95
- [70] J. Jeuring, F. Kupperts, *High Performance Liquid Chromatography of Furfural and Hydroxymethylfurfural in Spirits and Honey*, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63 (1980) 1215



- [71] N. Spano, L. Casula, A. Panzanelli, M.I. Pilo, P.C. Piu, R. Scanu, A. Tapparo, G. Sanna, *An RP-HPLC determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey. The case of strawberry tree honey*, *Talanta* 68 (2006) 1390
- [72] G.-H. Wan, H. Cui, H.-S. Zheng, J. Zhou, L.-J. Liu, X.-F. Yu, *Determination of tetracyclines residues in honey using high-performance liquid chromatography with potassium permanganate-sodium sulfide- $\beta$ -cyclodextrin chemiluminescence detection*, *J. Chromatogr. B*, 824 (2005) 57
- [73] Ö. Erdoğan, *Levels of selected pesticides in honey samples from Kahramanmaraş, Turkey*, *Food Control* 18 (2007) 866
- [74] Wang, J., Kliks, M.M., Jun, S., Li, Q.X., *Residues of organochlorine pesticides in honeys from different geographic regions*, *Food Res Int* 43 (2010) 2329
- [75] M.J. Nozal, J.L. Bernal, M.T. Martín, J.J. Jiménez, J. Bernal, M. Higes, *Trace analysis of tiamulin in honey by liquid chromatography-diode array-electrospray ionization mass spectrometry detection*, *J. Chromatogr. A*, 1116 (2006) 102
- [76] J.J. Jiménez, J.L. Bernal, Ma.J. del Nozal, Ma.T. Martín, R. Mayo, *Sample preparation methods to analyze fipronil in honey by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection*, *J. Chromatogr. A*, 1187 (2008) 40
- [77] M. Fernández, Y. Picó, J. Mañes, *Rapid screening of organophosphorus pesticides in honey and bees by liquid chromatography – Mass spectrometry*, *Chromatographia*, 56 (2002) 577
- [78] Y.R. Tahboub, M. F. Zaater, T. A. Barri, *Simultaneous identification and quantitation of selected organochlorine pesticide residues in honey by full-scan gas chromatography–mass spectrometry*, *Anal. Chim. Acta*, 558 (2006) 62
- [79] A. Herrera, C. Pérez-Arquileú, P. Conchello, S. Bayarri, R. Lázaro, C. Yagüe, A. Ariño, *Determination of pesticides and PCBs in honey by solid-phase extraction cleanup followed by gas chromatography with electron-capture and nitrogen–phosphorus detection*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 381 (2005) 695
- [80] D. Tsipi, M. Triantafyllou, A. Hiskia, *Determination of organochlorine pesticide residues in honey, applying solid phase extraction with RP-C18 material*, *Analyst*, 124 (1999) 473
- [81] S.R. Rissato, M. S. Galhiane, M. V. de Almeida, M. Gerenutti, B. M. Apon, *Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography–mass spectrometry and application in environmental contamination*, *Food Chem.* 101 (2007) 1719
- [82] H. Chen, J. Ying, H. Chen, J. Huang, L. Liao, *LC Determination of Chloramphenicol in Honey Using Dispersive Liquid–Liquid Microextraction*, *Chromatographia* 68 (2008) 629
- [83] H. Chen, H. Chen, J. Ying, J. Huang, L. Liao, *Dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey*, *Anal. Chim. Acta* 632 (2009) 80
- [84] H. Chen, H. Chen, L. Liao, J. Ying, J. Huang, *Determination of Thiamphenicol in Honey by Dispersive Liquid–Liquid Microextraction with High-Performance Liquid Chromatography*, *J. Chromatogr. Sci.* 48 (2010) 450
- [85] Y. Wang, J. You, R. Ren, Y. Xiao, S. Gao, H. Zhang, A. Yu, *Determination of triazines in honey by dispersive liquid–liquid microextraction high-performance liquid chromatography*, *J. Chromatogr. A*. 1217 (2010) 4241
- [86] C. Blasco, C.M. Lino, Y. Picó, A. Pena, G. Font, M.I.N. Silveira, *Determination of organochlorine pesticide residues in honey from the central zone of Portugal and the Valencian community of Spain*, *J. Chromatogr. A*, 1049 (2004) 155
- [87] I. Mukherjee, *Determination of Pesticide Residues in Honey Samples*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 83 (2009) 818
- [88] H. Yavuz, G.O. Guler, A. Aktumsek, Y.S. Cakmak, H. Ozparlak, *Determination of some organochlorine pesticide residues in honeys from Konya, Turkey*, *Environ. Monit. Assess.* 168 (2010) 277
- [89] C. Blasco, M. Fernández, A. Pena, C. Lino, M.I. Silveira, G. Font, Y. Picó, *Assessment of Pesticide Residues in Honey Samples from Portugal and Spain*, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 8132
- [90] B. Albero, C. Sánchez-Brunete, J.L. Tadeo, *Analysis of Pesticides in Honey by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 5828
- [91] G. Balayianni, P. Balayiannis, *Bee Honey as an Environmental Bioindicator of Pesticides Occurrence in Six Agricultural Areas of Greece*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55 (2008) 462
- [92] A.R. Fontana, A.B. Camargo, J.C. Altamirano, *Coacervative microextraction ultrasound-assisted back-extraction technique for determination of organophosphates pesticides in honey samples by gas chromatography–mass spectrometry*, *J Chromatogr A*, 1217 (2010) 6334

- [93] M. García-Chao, M.J. Agruña, G.F. Calvete, V. Sakkas, M. Llompарт, T. Dagnac, *Validation of an off line solid phase extraction liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of systemic insecticide residues in honey and pollen samples collected in apiaries from NW Spain*, *Anal Chim Acta*, 672 (2010) 107
- [94] M. Volante, R. Galarini, V. Miano, M. Cattaneo, I. Pecorelli, M. Bianchi, M.T. Marinoni, L. Cossignani, R. Darniani, *A SPME-GC-MS Approach for Antivarroa and Pesticide Residues Analysis in Honey*, *Chromatographia*, 54 (2001) 241
- [95] G.P. de Pinho, A.A. Neves, M.E.L.R. de Queiroz, F.O. Silvério, *Optimization of the liquid–liquid extraction method and low temperature purification (LLE–LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography*, *Food Cont.*, 21 (2010) 1307
- [96] A. Makarov, *Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis*, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1156
- [97] Q. Hu, R.J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R.G. Cooks, *The Orbitrap: a new mass spectrometer*, *J. Mass Spectrom.* 40 (2005) 430
- [98] R.H. Perry, R. G. Cooks, R.J. Noll, *Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications*, *Mass Spectrom. Rev.* 27 (2008) 661
- [99] A. Sadowska-Rociek, E. Cieřlik, *Stosowane techniki i najnowsze trendy w oznaczaniu pozostałości pestycydów w żywności metodą chromatografii gazowej*, *CDEM* 13(1-2) (2008) 33
- [100] Y. Picó, D. Barceló, *The expanding role of LC-MS in analyzing metabolites and degradation products of food contaminants*, *TrAC* 27 (2008) 821
- [101] L. Alder, K. Greulich, G. Kempe, B. Vieth, *Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS?*, *Mass Spectrom. Rev.* 25 (2006) 838
- [102] F. Gritti, C.A. Sanchez, T. Farkas, G. Guiochon, *Achieving the full performance of highly efficient columns by optimizing conventional benchmark high-performance liquid chromatography instruments*, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3000
- [103] J. Klein, L. Alder, *Applicability of Gradient Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry to the Simultaneous Screening for About 100 Pesticides in Crops*, *J Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, 86 (5) (2003) 1015
- [104] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, *Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method*, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2342
- [105] J. Mazerski, *Podstawy Chemometrii*, skrypt, Wydawnictwo PG, Gdańsk, 2004
- [106] P. Konieczka, J. Namieřnik, *Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych*, WNT, Warszawa, 2007
- [107] J. Dolan, *Calibration Curves, Part V: Curve Weighting*, LCGC North America, Jul 1, 2009
- [108] US EPA, “Assigning Values to Non-detected/Non-quantified Pesticide Residues in Human Health Food Exposure Assessments”, Office of Pesticide Programs, US Environmental Protection Agency, Washington, DC, 2000 (<http://www.epa.gov/pesticides/trac/science/trac3b012.pdf>)
- [109] R.-K. Smith, “*Handbook of Environmental Analysis*”, Genium, New York, 1999
- [110] N.A. Épshtein, *Limit of Quantitation Estimated with Allowance for Reproducibility Requirements*, *Pharm. Chem. J.* 36 (2002) 631
- [111] R. Matysik-Pejas, *Uwarunkowana konsumpcja miodu w gospodarstwach domowych (na przykładzie wybranych rejonów województwa małopolskiego)*, *Stowarzyszenie ekonomistów Rolnictwa i agrobiznesu*, 9(4) (2007) 125
- [112] Eurostat (<http://epp.eurostat.ec.europa.eu>), dostęp w dniu 22.09.2011

## VII. DOROBEK NAUKOWY

### Publikacje:

Karel Friess, Vladimír Hynek, Milan Šípek, Wojciech M. Kujawski, Ondřej Vopička, Miroslav Zgažar, Maciej W. Kujawski, *Permeation and sorption properties of poly(ether-block-amide) membranes filled by two types of zeolites*, Separation and Purification Technology, 80 (2011) 418-427;

M.W. Kujawski, J. Namieśnik, *Levels of 13 multi-class pesticide residues in Polish honeys determined by LC-ESI-MS/MS*, Food Control 22 (2011) 914-919;

M.W. Kujawski, J. Namieśnik, *Miód pszczeli – obiekt zainteresowania analityków*, Analityka, 2/2009, str. 44.

M.W. Kujawski, J. Namieśnik, *Challenges in sample preparation for chromatographic determination of contaminations and trace residues in honey*, Trends in Analytical Chemistry 27 (9) (2008) 785;

Maciej W. Kujawski, Emilie Pinteaux, Jacek Namieśnik, *Application of dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) for the determination of selected organochlorine pesticides in honey by GC-MS* – w recenzji European Food Research and Technology

Maciej W. Kujawski, Żaneta Bargańska, Katarzyna Marciniak, Ewa Miedzianowska, Jan K. Kujawski, Marek Ślebioda, Jacek Namieśnik, *Determining pesticide contamination in honey by LC-ESI-MS/MS - comparison of pesticide recoveries of two liquid-liquid extraction based approaches* – w recenzji LWT – Food Science and Technology

M. Kujawski, P. Konieczka, „Szacowanie niepewności pomiaru analitycznego” – rozdział w skrypcie dla studentów PG do ćwiczeń z Chemii Analitycznej

### Wystąpienia konferencyjne:

K. Bierała, J. Bianga, E. Barszcz, M. Kujawski, J. Szpunar, *Analytical selenoproteomics – identification and quantification aspects* (poster), TraceSpec 2011: 13th Workshop on Progress in Trace Metal Speciation for Environmental Analytical Chemistry (Pau, Francja, 18-20.05.2011); Book of Abstracts, str. 67;

Maciej W. Kujawski, Żaneta Bargańska, Marek Ślebioda, Jacek Namieśnik, *Oznaczanie pozostałości pestycydów w miodzie pszczelim z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS* (komunikat), VIII Polska Konferencja Chemii Analitycznej “Analityka dla Społeczeństwa XXI wieku” (Kraków, Polska 4-9.07.2010); Materiały, s. 491;

Maciej W. Kujawski, Żaneta Bargańska, Katarzyna Marciniak, Ewa Miedzianowska, Marek Ślebioda, Jacek Namieśnik, *Porównanie wydajności ekstrakcji pestycydów z próbek miodu z wykorzystaniem technik OCLLE oraz QuEChERS* (poster), VIII Polska Konferencja Chemii Analitycznej “Analityka dla Społeczeństwa XXI wieku” (Kraków, Polska 4-9.07.2010); Materiały, s. 192;

Żaneta Bargańska, Marek Ślebioda, Maciej W. Kujawski Jacek Namieśnik, *Oznaczanie akrylamidu w kawie z wykorzystaniem techniki LC-ESI-MS/MS* (poster), VIII Polska Konferencja Chemii Analitycznej "Analityka dla Społeczeństwa XXI wieku" (Kraków, Polska 4-9.07.2010); Materiały, s. 502;

Maciej W. Kujawski, Żaneta Bargańska, Marek Ślebioda, Jacek Namieśnik, *Simultaneous determination of approximately 90 multi-class pesticide residues in honey by LC-MS/MS* (poster), 35<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (Boston, MA, USA 19-24.06.2010); Book of Abstracts, p. 87;

M. Kujawski, *Słodka chemia: rzecz o owocach pracy pszczół* (komunikat), Chemia dla zdrowia i urody (Gdańsk, Polska 8.06.2010); Materiały, s. 24-26;

J. Kujawski, P. Cysewski, M. Kujawski, W. Kujawski, *Recovery of acetone, butanol and ethanol from binary aqueous mixtures by hydrophobic pervaporation* (poster), International Scientific Conference on Pervaporation, Vapor Permeation and Membrane Distillation (Toruń, Polska 18-21.04.2010), Programme Booklet, p. 96;

M. Kujawski, J. Namieśnik, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons' Levels in Honeys from Various Regions of Poland* (poster), 14th International Symposium on Separation Sciences: New Achievements in Chromatography (Primošten, Chorwacja, 30.09-3.10.2008), Book of Abstracts, str. 77.

#### Przyznane granty, stypendia i staże

Grant promotorski na realizację projektu badawczego pod tytułem „Nowe rozwiązania metodyczne przeznaczone do badań poziomu zanieczyszczenia miodów pszczelich przez trwałe związki organiczne” (nr N N312 427037) przyznany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Dodatkowe stypendium doktoranckie za osiągnięcia naukowe przyznane w roku 2009/2010 ze środków projektu „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii” w ramach projektu z Funduszy Strukturalnych POKL (POKL.04.01.01-00-368/09).

Stypendium w ramach programu MISTRZ z Fundacji Nauki Polskiej, którego laureatem jest prof. dr hab. inż. Jacek Namieśnik.

## **Abstract**

Honey, regarded as a valuable natural food product and exhibiting healing properties, is also used as a natural sweetener and is added to bakery products. However, during its production and harvest, honey can be contaminated by pesticides - directly, by the use of pesticides in beehive treatment during honey harvest, or indirectly, resulting from bees gathering nectar, pollen and water for the colony come into contact with the environment. Pesticides used in agriculture and distributed in the environment are transferred by bees to the colonies and consequently, are later present in produced honey.

Because of variety of pesticide chemical classes, it is important to develop methods allowing simultaneous determination of a broad spectrum of analytes in one analytical cycle. Compared to traditional, available methods, Multiresidue Methods are faster, cheaper and use smaller amounts of organic solvents, and thus are more environmentally friendly.

Currently, there are ca. 860 formulations regarded as plant protection agents allowed for use in Poland. These formulations contain a total of 270 active substances, and ca. 70 of them has established MRLs in honey. During method development emphasis was put on these pesticides.

Results on development, optimization and validation of new methodologies applying LC-MS/SM and GC-MS for quantification are discussed, along with challenges in preparing honey samples for determining contaminations.

## ZAŁĄCZNIKI

### Załącznik 1.

Czynniki i ich poziomy dla planu czynnikowego

Czynnik	V ekstrahenta [μl]	V dyspergatora [μl]	Zawartość NaCl [% m/m]	pH
Symbol	X1	X2	X3	X4
Poziom max. (1)	150	450	14,3	7,3
Poziom min. (-1)	100	300	0	3,4

### Załącznik 2.

Plan doświadczalny i sumę pól powierzchni pod pikami monitorowanych jonów.

Doświadczenie	X1	X2	X3	X4	Suma pól powierzchni
1	1	1	1	-1	609797
2	1	1	-1	1	1301416
3	-1	-1	-1	1	1914238
4	-1	1	-1	-1	1568896
5	-1	-1	1	-1	845577
6	1	-1	1	1	582254
7	-1	1	1	1	964944
8	1	-1	-1	-1	1440318
9	-1	-1	-1	-1	2504640
10	-1	1	1	-1	795588
11	1	1	1	1	678914
12	-1	-1	1	1	1020990
13	1	-1	1	-1	993013
14	1	1	-1	-1	1248847
15	1	-1	-1	1	983508
16	-1	1	-1	1	2333650
0	0	0	0	0	1004729
0	0	0	0	0	1137753
0	0	0	0	0	1087515
4	-1	1	-1	-1	2260130
14	1	1	-1	-1	1282129

### Załącznik 3.

Plan czynnikowy i odpowiedzi.

Experiment	X1	X3	Suma pól powierzchni
1	1	-1	1103383
2	0	0	1243441
3	1	1	1144951
4	-1	-1	2308018
5	-1	1	2496270
6	0	0	976502
7	0	0	2273092
8	0	0	1902327
9	0	0	1429037
10	1,414	0	1159637
11	0	0	1800655
12	0	-1,414	1392515
13	0	0	1695560
14	0	1,414	1178524
15	-1,414	0	3342999
16	0	0	2259136

#### Załącznik 4.

Informacje o miejscu pobrania i odmianie próbek miodu poddanych analizie.

Lp.	Miejsce pobrania	Rodzaj miodu	Lp.	Miejsce pobrania	Rodzaj miodu
1	Rukowo	Rzepakowy	30	Grodziec	Akacjowy
2	Piaśnica Mała	Wielokwiatowy	31	Tuliszków	Akacjowy
3	Rukowo	Nektarowo- spadziowy	32	Rychwał	Akacjowy
4	Rukowo	Nektarowo- spadziowy	33	Więckowice (Rożwienica)	Nektarowo-spadziowy z lipą
5	Kębłowo (Wejherowo)	Nektarowo- spadziowy	34	Sędziejowice	Rzepakowy
6	Kębłowo (Wejherowo)	Nektarowo - lipowy	35	Sporniak (Wojciechów)	Wielokwiatowy
7	Słupca	Akacjowy	36	Świdnik	Rzepakowy
8	Wilków	Wielokwiatowy	37	Ślesin	Akacjowy
9	Powidz	Rzepakowy	38	Pawłowice	Gryczano - lipowy
10	Kopydłowo (Wilczyn)	Rzepakowo-akacjowy	39	Leśnica	Akacjowy
11	Kutno	Wielokwiatowy	40	Skubarczewo (Orchowo)	Wielokwiatowy
12	Oleśnica	Rzepakowy	41	Rychwał	Akacjowy
13	Witonia k. Łodzi	Nektarowo-akacjowy	42	Jantar (Stegna)	Malinowy
14	Walentynów (Lipsko)	Lipowy	43	Oleśnica	Akacjowy
15	Nysa	Akacjowy	44	Ożarów (Jastków)	Akacjowy
16	Oleśnica	Faceliowy	45	Białobrzegi (Chotcza)	Rzepakowy
17	Franciszków (Świdnik)	Wiosenny	46	Wielkopole	Rzepakowy
18	Turkowice (Warszawa)	Akacjowy	47	Winów	Akacjowy
19	Joniak	Malina leśna	48	Zwierzchociny (Babiak)	Akacjowy
20	Golina (Konin)	Akacjowy	49	Ruda Kościelna	Lipowy
21	Błaszki	Rzepakowy	50	Wierzowa-Podskale (Zręcin)	Rzepakowy
22	Grodziec	Rzepakowy	51	Bietrzykowice (Namysłów)	Rzepakowy z akacją
23	Żołyńia	Nektarowo - akacjowy	52	Nowy Adamów (Aleksandrów Łódzki)	Akacjowo - lipowy
24	Orchowo	Wielokwiatowy	53	Jantar (Stegna)	Rzepakowy
25	Neguszyce (Sadlno)	Wielokwiatowy	54	Rzeczniów	Wielokwiatowy
26	Szczyty	Akacjowy	55	Brzeziny	Wielokwiatowy
27	Sampolno	Akacjowy	56	Miłaczew	Akacjowy
28	Piaski	Akacjowy	57	Nysa	Malinowy
29	Pionki	Lipowy	58	Zagroda	Wielokwiatowy

Próbki z terenu Pomorza: 1-6

Próbki z terenu Wielkopolski: 7, 9, 10, 20, 21, 24, 25, 27, 31, 32, 37, 40, 41, 46, 48, 56

Próbki z terenu Dolnego Śląska: 12, 16, 26, 43, 51

Próbki z terenu Górnego Śląska: 15, 19, 22, 28, 29, 30, 38, 47, 57

Próbki z terenu Lubelszczyzny: 14, 17, 35, 36, 44, 45, 49, 54, 58



Załącznik 5.

Zestawienie wyników (wynik  $\pm$  U [ng/g]) analiz próbek miodu pszczelego. W tabeli uwzględniono jedynie analyty, których pozostałości wykryto w co najmniej jednej próbce.

Nr próbki	Chlortiamidyna	Imazalil	Metaklasyf	Metidation	Karfentrazon Etylowy	Biertanol	Chlorpiryfos	Fluoksypyr meptylowy	Haloksyfop-P	Azoksystrobin	Boskalid	Karbendazym	Pirimikarb	Dimoksystrobin	Imidachlopyrd	Mekkonazol	Propamokarb	Tebukonazol	Tetrakonazol	Tiachlopyrd	Tiametoksam	Tiofanate metylowy	Endryna	4,4'-DDT	2,4'-DDD	Lindan	Aldryna	
1	1,67 $\pm$ 0,40	n.w.	<MQL	n.w.	0,242 $\pm$ 0,013	n.w.	n.w.	0,238 $\pm$ 0,050																				
2	2,36 $\pm$ 0,13	n.w.	<MQL	n.w.	0,217 $\pm$ 0,019	n.w.	n.w.	0,242 $\pm$ 0,012																				
3	2,24 $\pm$ 0,49	<MQL	<MQL	n.w.	0,235 $\pm$ 0,011	n.w.	n.w.	0,239 $\pm$ 0,020																				
4	1,98 $\pm$ 0,69	n.w.	<MQL	n.w.	0,224 $\pm$ 0,027	n.w.	n.w.	0,2502 $\pm$ 0,0088																				
5	2,11 $\pm$ 0,65	<MQL	<MQL	n.w.	0,185 $\pm$ 0,019	n.w.	n.w.	0,203 $\pm$ 0,021																				
6	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	0,234 $\pm$ 0,028	n.w.	n.w.	0,2886 $\pm$ 0,0077																				
7	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	0,139 $\pm$ 0,010	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	4,71 $\pm$ 0,23	10,712 $\pm$ 0,067	n.w.	n.w.	n.w.	
8	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	0,256 $\pm$ 0,046	n.w.	n.w.	0,301 $\pm$ 0,017	n.w.	n.w.	3,81 $\pm$ 0,33	2,325 $\pm$ 0,050	n.w.	5,81 $\pm$ 0,30	n.w.	<MQL	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.						
9	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	0,253 $\pm$ 0,031	n.w.	n.w.	0,301 $\pm$ 0,029																				
10	<MQL	n.w.	<MQL	n.w.	0,225 $\pm$ 0,026	n.w.	n.w.	0,243 $\pm$ 0,042	n.w.	n.w.	3,700 $\pm$ 0,040	0,712 $\pm$ 0,037	n.w.	5,515 $\pm$ 0,050	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	7,54 $\pm$ 0,30	n.w.	n.w.	n.w.	
11	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	<MQL	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	0,942 $\pm$ 0,013	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	0,731 $\pm$ 0,010	n.w.	n.w.	n.w.	7,23 $\pm$ 0,18	n.w.	4,451 $\pm$ 0,066	n.w.	
12	<MQL	n.w.	<MQL	n.w.	0,227 $\pm$ 0,049	n.w.	n.w.	0,299 $\pm$ 0,031	n.w.	n.w.	n.w.	1,400 $\pm$ 0,040	n.w.	<MQL	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.					
13	<MQL	n.w.	<MQL	n.w.	0,189 $\pm$ 0,016	n.w.	n.w.	0,226 $\pm$ 0,020	<MQL	n.w.	n.w.	0,982 $\pm$ 0,057	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	<MQL	n.w.						
14	n.w.	n.w.	<MQL	<MQL	0,234 $\pm$ 0,020	n.w.	n.w.	0,329 $\pm$ 0,020																				
15	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	0,261 $\pm$ 0,023	n.w.	n.w.	0,329 $\pm$ 0,019	n.w.	n.w.	n.w.	3,025 $\pm$ 0,010	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.						
16	<MQL	n.w.	n.w.	<MQL	<MQL	n.w.	n.w.	0,156 $\pm$ 0,010	n.w.	n.w.	<MQL	1,02000 $\pm$ 0,00010	n.w.	0,229 $\pm$ 0,039	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.						
17	0,95 $\pm$ 0,39	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.																				
18	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.						
19	<MQL	4,98 $\pm$ 0,37	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
20	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.						
21	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	0,418 $\pm$ 0,015	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	2,075 $\pm$ 0,090	n.w.	n.w.	n.w.	2,02 $\pm$ 0,24	n.w.					
22	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.						

Nr próbki	Chloroameryna	Imazalil	Metakasył	Metidaiton	Karfenrazon Etylowy	Bitertanol	Chlorpiryfos	Fluoksypyr mepylowy	Haloksypop-P	Azoksystrobinia	Boskalid	Karbendazym	Pirimikarb	Dimoksystrobinia	Imidachlopyryd	Metkonazol	Propamokarb	Tebukonazol	Tetrazonazol	Tiachlopyryd	Tiametoksam	Tiofanate metylowy	Endryna	4,4'-DDT	2,4'-DDD	Lindan	Aldryna	
23	<MQL	1,56 ± 0,35	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
24	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.																				
25	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.						
26	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.						
27	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.																				
28	<MQL	n.w.	n.w.	0,847 ± 0,042	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.						
29	n.w.	3,15 ± 0,11	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	1,470 ± 0,020	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	5,50 ± 0,29	n.w.	3,908 ± 0,026	n.w.	
30	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.						
31	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	0,5090 ± 0,0040	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	6,26 ± 0,14	2,683 ± 0,082	n.w.	n.w.	
32	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
33	1,97 ± 0,23	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.						
34	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.						
35	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	1,475 ± 0,030	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	3,17 ± 0,20	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.						
36	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.																				
37	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	5,64 ± 0,17	n.w.	n.w.	n.w.	
38	0,92 ± 0,21	n.w.	<MQL	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	1,945 ± 0,070	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	4,32 ± 0,22	4,33 ± 0,17	n.w.	n.w.	2,470 ± 0,029
39	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	6,60 ± 0,34	n.w.	n.w.	n.w.	
40	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	0,504 ± 0,041	n.w.	n.w.	n.w.	28,05 ± 0,70	0,933 ± 0,017	n.w.	49,30 ± 0,60	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.						
41	n.w.	n.w.	n.w.	0,794 ± 0,040	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.																				
42	2,56 ± 0,35	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.																				
43	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	<MQL	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	0,93 ± 0,11	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	13,91 ± 0,32	n.w.	n.w.	n.w.	
44	1,26 ± 0,28	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	5,620 ± 0,080	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	3,445 ± 0,090						
45	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.																				
46	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	0,6100 ± 0,0080	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	8,07 ± 0,15	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	5,61 ± 0,32	n.w.	n.w.	n.w.	
47	1,16 ± 0,33	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	1,270 ± 0,040	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<LOQ	6,328 ± 0,045	n.w.	n.w.	n.w.	

Nr próbki	Chlortiamidyna	Imazalil	Metlaksył	Metidation	Karfenrazon Etylowy	Bitertanol	Chlorpiryfos	Fluoksypyr mepylowy	Haloksypop-P	Azoksystrobinia	Boskalid	Karbenazym	Pirimikarb	Dimoksystrobinia	Imidachlopyryd	Metkonazol	Propanotokarb	Tebukonazol	Tetrakonazol	Tiachlopyryd	Tiametoksam	Tiofanate metylowy	Endryna	4,4'-DDT	2,4'-DDD	Lindan	Aldryna	
48	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
49									n.w.	n.w.	n.w.	1,34000 ± 0,00010	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	5,56 ±0,23	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
50	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.						
51	1,01 ± 0,12	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	2,605 ± 0,030	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.						
52	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.																				
53									n.w.	<MQL	<MQL	0,41 ± 0,13	n.w.	0,231 ± 0,029	n.w.	<MQL	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.						
54									n.w.	n.w.	n.w.	4,120 ± 0,020	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	2,73 ± 0,12	4,744 ± 0,084	2,614 ± 0,025	
55									n.w.	n.w.	n.w.	1,730 ± 0,020	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	5,82 ±0,33	n.w.	n.w.	n.w.	
56									n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.						
57									n.w.	n.w.	n.w.	7,610 ± 0,040	<MQL	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	<MQL	<MQL	n.w.	<LOQ	4,34 ±0,24	2,72 ± 0,13	3,95 ± 0,17	n.w.	
58									n.w.	n.w.	n.w.	0,972 ± 0,041	n.w.	<MQL	<MQL	<MQL	n.w.	<MQL	n.w.	n.w.	<MQL	n.w.						

n.w. – nie wykryto;

puste miejsce oznacza, że dany analit nie był oznaczany w badanej próbce.