

## ŠTÚDIUM VYBRANÝCH PARAMETROV ANALYTICKÝCH METÓD NA KONTROLU KONTAMINÁCIE PROPOLISOVEJ TINKTÚRY

JÁN HROUZEK, NATÁLIA GRIGOVÁ, TAMARA PÓCISOVÁ, AGNEŠA SZARKA  
a SVETLANA HROUZKOVÁ

Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave,  
Radlinského 9, 812 37, Bratislava, Slovenská republika  
jhrouzek@stuba.sk, svetlana.hrouzkova@stuba.sk

Došlo 11.5.23, prijaté 23.5.23. *Nové pohľady na analytickou chemii\**

Analýza včiel a ich produktov môže poskytnúť zásadné informácie o stupni kontaminácie životného prostredia rezíduami pesticídov. Jedným zo sľubných produktov je propolisová tinktúra. Keďže propolisová tinktúra je komplexná vzorka, je nevyhnutné upraviť postup tak, aby sa minimalizovala potenciálna kontaminácia analytického prístroja používaného na stanovenie pesticídov. Navrhla sa metóda prípravy vzorky QuEChERS na extrakciu pesticídov z propolisovej tinktúry. Uspokojivé extrakčné výťažnosti v rozsahu 70–120 % pre 43 pesticídov zo 47 boli dosiahnuté použitím čistiacich sorbentov C18, PSA a Florisil v druhom kroku procedúry QuEChERS. Podrobne boli študované matricové efekty a vplyv interferencií na chromatografický signál.

Kľúčové slová: QuEChERS, propolisová tinktúra, plynová chromatografia, hmotnostná spektrometria, matricové efekty

### Úvod

V súčasnosti je veľmi dôležité zabráňovať kontaminácii a udržiavať čistotu životného prostredia. Kontaminácia životného prostredia má negatívne vplyvy na živočíchy, ktoré sa v ňom vyskytujú a v konečnom dôsledku aj na ľudí. Negatívne vplyvy môžu zahŕňať napríklad vymieranie druhov alebo poškodenie endokrinného a imunitného systému. Pesticídy sú skupina chemických látok, ktoré kontaminujú životné prostredie a spôsobujú spomínané negatívne vplyvy<sup>1</sup>. Na kontrolu kontaminácie životného prostredia sa s výhodou používa bioindikácia kontaminácie, čím sa rozumie vyšetrovanie živých organizmov operujúcich v životnom prostredí na veľkej ploche. Takýmto živočíchom je včela medonosná (*Apis mellifera L.*), ktorej výskyt a život je ohrozený prítomnosťou pesticídov v životnom prostredí. Sledovaním kondície včiel a včelích produktov možno usudzovať a predpokladať kontamináciu prostredia, v ktorom včela materiál zbiera a zanáša ho do úľov. Výskyt pesticídov v oblasti, kde včely operujú, môžeme monitorovať kontrolou kontaminácie včiel samotných a rôznych včelích produktov.



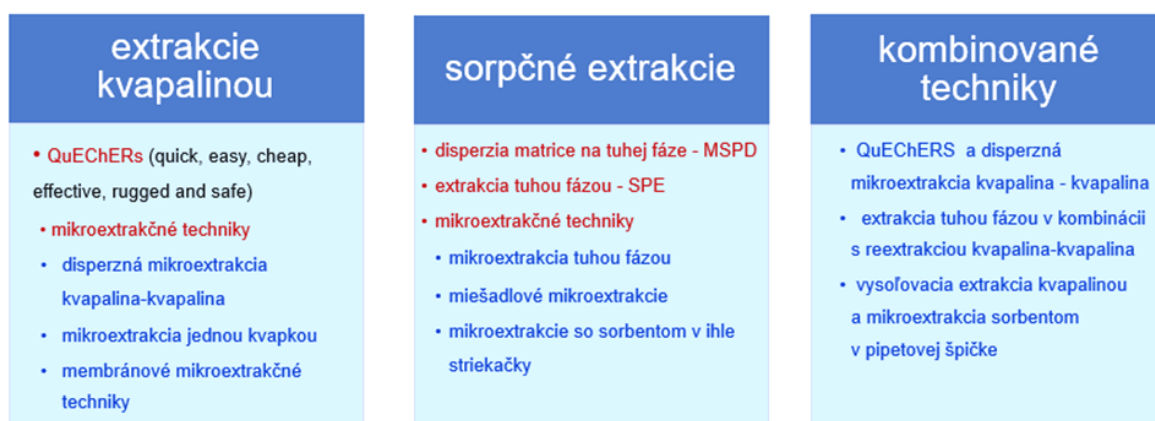
Ján Hrouzek ukončil v júni 2022 bakalárske štúdium na Fakulte chemickej a potravinárskej technológie Slovenskej technickej univerzity v Bratislave a v súčasnosti je študentom inžinierskeho štúdia na študijnom programe Technická chémia na tej istej univerzite. Patrí k vynikajúcim študentom a veľmi ho baví experimentálna práca v oblasti chromatografických metód. Trávi nadpriemerne veľa času výskumnou činnosťou na Ústave analytickej chémie. V roku 2022 obsadil 1. miesto na Študentskej vedeckej konferencii Chémia a technológia pre život v Bratislave, kde zároveň získal aj Cenu Nadácie pre rozvoj FCHPT STU. Získal zvláštni uznaní poroty na konferencii O cenu Karla Štúlíka 2023 v Ostrave. Je spoluautorom 2 publikácií evidovaných vo WOS, obe s témou analýzy včelích produktov, čo je aj jeho srdcovou záležitosťou vo výskume a plánuje ju rozvíjať v rámci diplomovej práce v najbližšom akademickom roku.

Včelí produkt využiteľný na kontrolu kontaminácie životného prostredia je včelí peľ, propolis a z neho vyrobená propolisová tinktúra. Takéto vzorky sú multikomponentnou zmesou látok rôzneho pôvodu a vlastností a pred jej inštrumentálnou analýzou je nutné vytvoriť vhodný postup pre úpravu vzorky<sup>2</sup>. Vzorky včelieho pôvodu sa prioritne upravujú postupom QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), čo znamená rýchla, jednoduchá, lacná, efektívna, robustná a bezpečná) a následne sa analyzujú pomocou plynovej alebo kvapalínovej chromatografie s hmotnostno-spektrickou detekciou<sup>3</sup>. Prehľad analytických metód vhodných na tento účel je uvedený na obr. 1.

Cieľom tejto práce je vyvinúť analytické metódy vhodné na bioindikáciu kontaminácie životného prostredia. Čiastkovým cieľom predloženej práce je vybrať vhodnú techniku extrakcie rezíduí pesticídov používaných na Slovensku z propolisovej tinktúry. Hlavný zámer výskumu je aplikovať zelené metódy analytickej chémie a optimalizovať podmienky tak, aby sa minimalizovali maticové vplyvy vzoriek s veľmi komplexnou maticou, ako sú včelie produkty.

## Experimentálna časť

Vzorky propolisových tinktúr (EMKO, FYTOTÉKA, Slovenská republika) s obsahom etylalkoholu 60 hm.% (67 obj.%) boli zakúpené v lekární. Tinktúry boli skladované v chladničke pri teplote 0–8 °C. Do centrifugačnej skúmavky sa pipetovala zriedená propolisová tinktúra v objeme 1 ml (zriedená 1:10), 5 ml acetonitrilu, 0,5 g chloridu sodného a 2 g síranu horečnatého. Zmes sa trepla pomocou vortexu po dobu 1 min (2500 rpm) a odstredila sa pomocou centrifúgy s otáčkami 4500 rpm po dobu trvania 5 min. Acetonitrilová fáza v objeme 4 ml sa odobrala do ďalšej centrifugačnej skúmavky a pridala sa vybraná kombinácia nasledovných sorbentov: PSA (primárny-sekundárny amín), GCB (grafitizovaný uhlík), EMR-Lipid (Enhanced Matrix Removal – Lipid), C18 (oktadecylsilánom modifikovaný silikagel) a Florisil. Realizovalo sa 5 rôznych čistení extraktu a pre každé čistenie je príslušná kombinácia a navážky sorbentov uvedené v tabuľke I. Zmes sa trepla na vortexe (2500 rpm, 1 min) a odstredila sa pomocou centrifúgy (4500 rpm, 5 min). Alikvótna časť extraktu sa odpipetovala. Takto vzniknutý extrakt (blank) sa následne analyzoval, alebo sa použil na prípravu maticového štandardu.



Obr. 1. Prehľad techník na extrakciu včelích produktov

Tabuľka I

Kombinácie sorbentov a ich množstvá použité pri rôznych spôsoboch čistenia extraktov propolisovej tinktúry

Sorbenty/návažok	Čistenie 1	Čistenie 2	Čistenie 3	Čistenie 4	Čistenie 5
GCB (12 mg)	+				
PSA (100 mg)	+	+		+	+
C18 (100 mg)	+	+			+
EMR-Lipid *			+		
Florisil (100 mg)				+	+

Legenda: + sorbent bol v danom čistení použitý, \* množstvo je dané výrobcom priamo v zakúpenej skúmavke

Roztoky štandardov pesticídov boli pripravené navážením 10 mg pesticídu do 10 ml odmernej banky a následným doplnením etanolom. Z takto pripravených roztokov štandardov jednotlivých pesticídov sme následne pripravili zásobný zmesný roztok 47 pesticídov s koncentráciou  $20 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  v etanole. Všetky pripravené zásobné roztoky štandardov a zmesný roztok sa uchovávali v mrazničke pri teplote  $-19$  až  $-21$  °C. Zásobný roztok sa následne riedil na nižšie potrebné koncentrácie. Pre GC-MS analýzy v móde full scan sme pripravovali roztoky s koncentráciou  $2 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  riedením  $100 \mu\text{l}$  zmesi pesticídov do  $900 \mu\text{l}$  rozpušťača. V závislosti od typu extraktu sa buď priamo do propolisovej tinktúry pridali pesticídy (do  $937,5 \mu\text{l}$  propolisovej tinktúry sa pridalo  $62,5 \mu\text{l}$  štandardov pesticídov zo zásobného roztoku ( $20 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  v EtOH) a počkali sme 10 min, aby sa pesticídy rozpustili vo vzorke) a postupovalo sa extrakciou opísanou vyššie pre blank, alebo priamo pred analýzou sa pridala zmes pesticídov do extraktu nefortifikovanej propolisovej tinktúry (blanku), čím sa pripravil matricový štandard (do  $987,5 \mu\text{l}$  ACN extraktu sa pridalo  $12,5 \mu\text{l}$  štandardov pesticídov zo zásobného roztoku ( $20 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  v EtOH)).

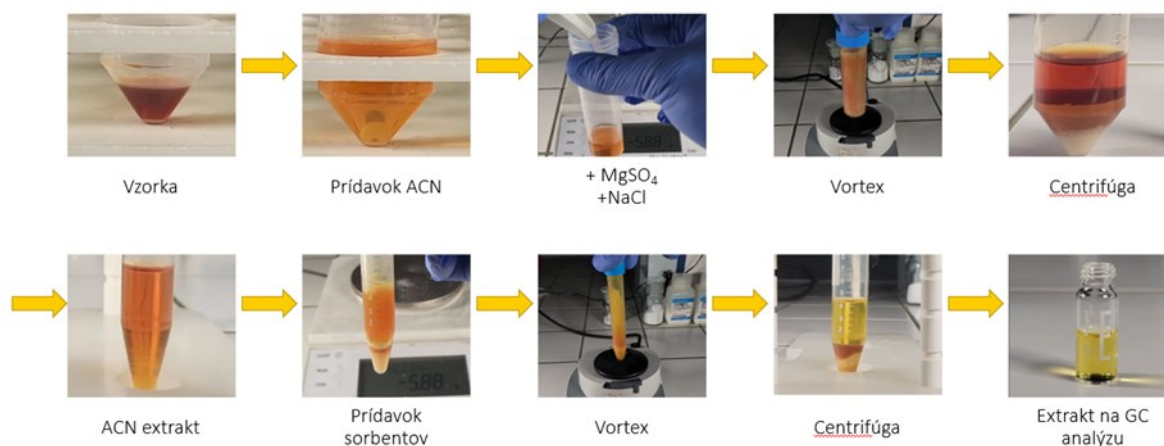
Na chromatografickú separáciu sa používal plynový chromatograf 6890N od Agilent Technologies. Dávkovo sa pomocou dávkovača s programovanou teplotou vyparovania (PTV) pracujúceho v móde solvent vent. Komponenty analyzovaného extraktu boli separované na kremennej kapilárnej kolóne CP-Sil 8 CB-MS ( $15 \text{ m} \times 0,15 \text{ mm}$  I. D.,  $0,15 \mu\text{m}$  filmu stacionárnej fázy). V kolóne bola nanosená stacionárna fáza so zložením 95 % dimetylsiloxán a 5 % difenylsiloxán. Ako nosný plyn sa použilo hélium (čistoty 4.0) s konštantným prietokom  $1,2 \text{ ml min}^{-1}$ . Na detekciu látok bol použitý hmotnostný spektrometer 5975 od Agilent Technologies. Na ionizáciu sa používala elektrónová ionizácia. Kvadrupólový analyzátor pracoval v móde SCAN v rozmedzí  $m/z$  od 40 do 550 alebo v móde selektívneho monitorovania iónov (SIM).

## Výsledky a diskusia

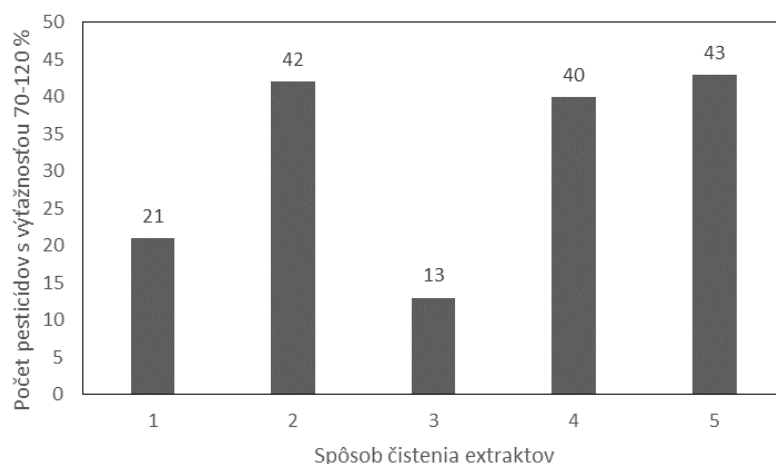
Pre vzorky v kvapalnej fáze, ako je propolisová tinktúra, je sľubnou technikou úpravy priama extrakcia kvapalinou. Na základe predbežných výsledkov<sup>1</sup> sa ukázalo, že samotná extrakcia kvapalinou neposkytovala dostatočne prečistený extrakt, a ten následne kontaminoval chromatografický systém v dávkovacej časti prístroja a tiež v iónovom zdroji. Pre účinnejšiu možnosť extrakcie a získania vhodného extraktu bol modifikovaný postup QuEChERS. V prvom kroku sa jedná o extrakciu kvapalina-kvapalina (LLE), kedy sa ku vzorke pridáva acetonitril (ACN), voda a soli ( $\text{MgSO}_4$  a  $\text{NaCl}$ ), a na premiešanie sa použije vortex a následne centrifúga na usadenie sedimentovateľných súčastí. Jedná sa vlastne o vysoľovacu extrakciu kvapalina-kvapalina, pri ktorej sa za pomoci pridaných solí oddelí vodná a acetonitrilová fáza. V skúmavke vznikajú oddelené fázy – naspodu sú usadené soli, nad nimi je vodná fáza a na vrchu sa nachádza organická fáza, teda acetonitrilový extrakt, do ktorého prechádzajú hľadané rezíduá pesticídov. V druhom kroku postupu QuEChERS sa realizuje disperzná extrakcia tuhú fázou (d-SPE). Schéma pracovného postupu je vyobrazená na obr. 2.

Pre vhodný spôsob použitia postupu QuEChERS bolo potrebné zvoliť optimálnu kombináciu sorbentov na elimináciu rôznych interferentov z extraktu, čím sa dosiahlo zníženie matricových vplyvov. Skúmané kombinácie sorbentov sú sumarizované v tab. I.  $\text{MgSO}_4$  bol použitý pri všetkých spôsoboch čistenia na zachytenie zvyškovej vody.

Na extrakciu a prečistenie matrice sa testovali viaceré spôsoby. Pri každom spôsobe sa sorbenty vybrali tak, aby sa matrica komplexne prečistila od nežiaducich zložiek, ako sú tuky, cukry a farbivá. Pre každý postup čistenia sme uskutočnili 3 opakovania extrakcií a každý extrakt sme následne dvakrát analyzovali metódou GC-MS. Ďalej sme vypočítali hodnoty výťažností pesticídov pre rôzne spôsoby úpravy vzorky. Výťažnosť je daná pomerom



Obr. 2. Znázornenie postupu extrakcie rezíduí pesticídov z propolisovej tinktúry



Obr. 3. Počet pesticídov s výťažnosťou 70–120 % v závislosti od spôsobu čistenia opísanom v tab. I

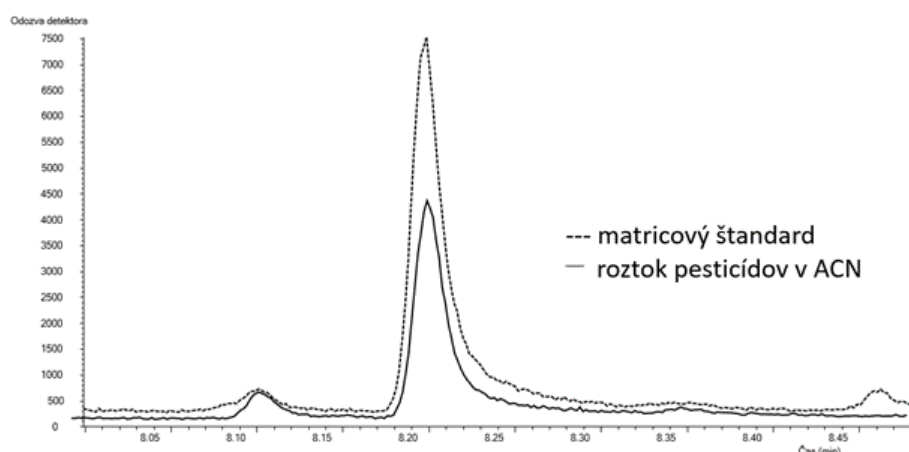
množstva látky, ktorá sa získa navrhnutým analytickým postupom ku množstvu látky skutočne obsiahnutej vo vzorke. Prakticky sa výpočet robí pomerom plochy píku jednotlivých analytov v extrakte fortifikovanej vzorky ku ploche píku analytov v porovnávacom roztoku pripravenom riedením na adekvátnu koncentračnú úroveň, aká je očakávaná v extrakte (v prípade 100% výťažnosti extrakčného procesu). Akceptovateľnými výťažnosťami sa rozumie hodnoty v rozmedzí 70–120 %. Výťažnosti extrakcie sa zistili porovnaním analýz extraktov fortifikovaných vzoriek a maticou značených štandardov.

Na obr. 3 je graficky znázornené porovnanie počtu pesticídov s výťažnosťou v rozmedzí 70–120 % v závislosti od jednotlivých zvolených spôsobov čistenia extraktu vzorky. Z tohto grafického porovnania môžeme zhodnotiť spôsob čistenia č. 5, teda čistenie extraktu s použitím sorbentov  $\text{MgSO}_4$ , NaCl, PSA, C18 a florisilu ako najúčinn-

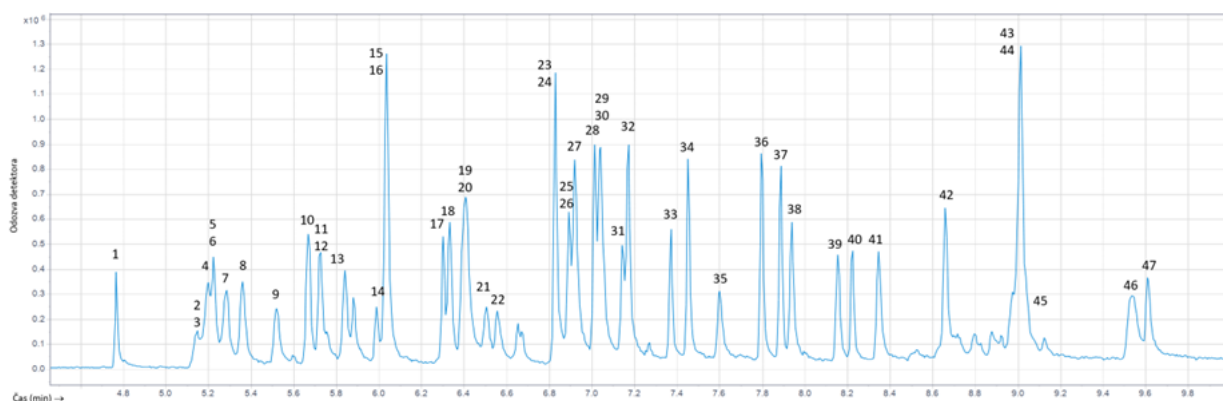
nejší spôsob z uvedených študovaných spôsobov prečistenia extraktu, pretože pri tomto spôsobe výťažnosti v rozmedzí 70–120 % dosahovalo 43 zo 47 pesticídov.

Spoľahlivú účinnosť prečistenia poskytovalo kombinované použitie  $\text{MgSO}_4$ , NaCl, PSA, C18 a florisilu.

Napriek veľkému úsiliu vo výskume analýzy reziduí pesticídov môže byť analýza podstatne skomplikovaná zložkami matrice, ktoré sa extrakčnou technikou nepodarí z extraktu odstrániť a budú zodpovednými za následné zvýšenie alebo naopak zoslabenie chromatografickej odozvy. Maticou indukované zvýšenie chromatografickej odozvy pozorované pre určité pesticídy sa prejavuje zvýšenou chromatografickou odozvou pre určité pesticídy v prítomnosti matrice v dôsledku menších strát analytu počas dávkovania. Neakceptovateľne vysoké výťažnosti sa pozorujú pre pesticídy, keď sa na porovnanie a kalibráciu použijú roztoky bez matrice<sup>4</sup>. Na obr. 4 uvá-



Obr. 4. Prekrytie GC-MS záznamov v móde SIM píkov cyhalotrínu  $\lambda$  v matricovom štandarde (prerušovaná čiara) a v čistom rozpúšťadle (ACN) (plná čiara)



Obr. 5. Chromatografický záznam separácie zmesi pesticídov metódou GC-MS; 1 – Trifluralín, 2 – Dimetoát, 3 – Karbofurán, 4 – Atrazín, 5 – Propazín, 6 – Lindán, 7 – Terbutylazín, 8 – Pyrimetánil, 9 – Primikarb, 10 – Chlórpyrifos-metyl, 11 – Spiroxamín, 12 – Alachlór, 13 – Prometrín, 14 – Malatión, 15 – Chlórpyrifos, 16 – Aldrín, 17 – Pendimetalín, 18 – Cyprodinil, 19 – Penkonazol, 20 – Fipronil, 21 – Triadimenol, 22 – Chlórdán, 23 – Imazalil, 24 – p,p'-DDE, 25 – Oxyfluorfen, 26 – Myclobutanil, 27 – Flusilazol, 28 – Fluazifop-P-butyl, 29 – Cyprokonazol, 30 – Endrín, 31 – Endosulfán  $\beta$ , 32 – o,p'-DDT, 33 – Trifloxystrobin, 34 – p,p'-DDT, 35 – Tebukonazol, 36 – Bifentrin, 37 – Metoxychlór, 38 – Fenamidón, 39 – Pyriproxifén, 40 – Cyhalotrin  $\lambda$ , 41 – Fenarimol, 42 – Fluchinkonazol, 43 – Boskalid, 44 – Cypermetrin, 45 – Chizalifop-P-etyl, 46 – Difenkonazol, 47 – Deltametrín

dzame príklad zvýšenia odozvy pesticídu, v tomto prípade cyhalotrinu  $\lambda$ , ktorého odozva je vyššia v matricovom štandarde v porovnaní s rovnakou koncentráciou pesticídu v porovnávacom roztoku, ktorý je zarobený v acetonitrile.

Podrobná štúdia zloženia extraktu preto prináša cenné informácie na navrhnutie účinných spôsobov odstránenia rušivých látok z extraktu. Na obr. 5 uvádzame záznam separácie zmesi pesticídov metódou GC-MS s uvedením identifikácie jednotlivých analytov.

## Záver

V tejto práci sme sa venovali vývoju metódy na extrakciu pesticídov zo veľkých produktov za účelom kontroly kvality životného prostredia, v ktorom včela operuje. Zameriavali sme sa hlavne na tvorbu rýchleho, ekologického a cenovo nenáročného postupu. Vyberali sa vhodné spôsoby prečistenia extraktu propolisovej tinktúry rôznymi kombináciami sorbentov a solí. Akceptovateľné výťažnosti sa zaznamenali za použitia čistiaceho postupu s viacerými sorbentami kombinovanými v čistiacom kroku propolisovej tinktúry.

*Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-19-0149, Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaŠ SR a SAV na základe projektu VEGA č. 1/0412/20.*

## LITERATÚRA

- Hrouzek J.: *Extrakcia pesticídov z veľkých produktov s obsahom alkoholu. Bakalárska práca.* Slovenská technická univerzita v Bratislave, Bratislava 2021.
- Blažková I., Hrouzek J., Szarka A., Pócsová T., Hrouzková S.: *Acta Chim. Slovaca* 15, 103 (2022).
- Rusnáková M., Hrouzek J., Hrouzková S.: *J. Apic. Res.* 62 (1), 76 (2022).

- Erney D. R., Pawlowski T. M., Poole, C. F.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 20, 375 (1997).

**J. Hrouzek, N. Grigová, T. Pócsová, A. Szarka, and S. Hrouzková** (*Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Bratislava, Slovakia*): **Study of Selected Parameters of Analytical Methods to Control the Contamination of Propolis Tincture**

Analysis of honeybees and their products can provide crucial information about the degree of environmental contamination by pesticide residues. One of the promising products is propolis tincture which is a complex mixture. It is essential to modify the procedure in order to reduce the potential contamination of the analytical instrument used to determine pesticides. QuEChERS sample preparation method (acronym of Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) for the extraction of pesticides from the propolis tincture was proposed. Satisfactory extraction recoveries in the range of 70–120 % for 43 out of 47 pesticides have been obtained using C18, PSA and Florisil cleaning sorbents in the second step of QuEChERS procedure. Matrix effects and influence of interferences on the chromatographic signal were studied in detail.

**Keywords:** QuEChERS, propolis tincture, gas chromatography, mass spectrometry, matrix effects

## Acknowledgements

*This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the Contract No. APVV-19-0149 and by the Scientific Grant Agency of the Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic (VEGA project no. 1/0412/20).*