

SÚČASNÝ STAV A TRENDY EXTRAKCIE REZÍDUIÍ PESTICÍDOV Z NUTRACEUTÍK

AGNEŠA PÁLENÍKOVÁ a SVETLANA HROUZKOVÁ

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

Došlo 22.1.16, prepracované 4.3.16, prijaté 1.8.16.

Kľúčové slová: nutraceutiká, rezíduá pesticídov, extrakcia, stanovenie

Obsah

1. Úvod
2. Extrakcia vzoriek
 - 2.1. Liečivé rastliny
 - 2.2. Čínska prírodná medicína
 - 2.3. Čaje
 - 2.4. Tabletky a kapsule
 - 2.5. Nutraceutické nápoje
3. Čistiace techniky
4. Porovnanie extrakčných techník
5. Separácia a stanovenie pesticídov
 - 5.1. Plynová chromatografia
 - 5.2. Kvapalinová chromatografia
 - 5.3. MS s priamym vstupom
6. Záver

1. Úvod

V posledných rokoch je čoraz väčší záujem o zdravý životný štýl a s tým rastie záujem o využitie zdraviu prospešných produktov¹. Obsah bioaktívnych látok v rastlinách prispel k vývoju nutraceutík. Potravinársky priemysel vyrába nové účinné produkty, ktoré nie len zodpovedajú potrebám spotrebiteľov, ale pritom majú pozitívne účinky na zdravie².

Pojem „nutraceutiká“ vytvorila v roku 1989 Nadácia pre rozvoj inováčnej medicíny a vznikol spojením výživy a jej liečivých účinkov, aby poskytoval názov pre túto rýchlo sa rozvíjajúcu oblasť biomedicínskeho výskumu. Z anglického slova *nutrition* – výživa vznikla časť pojmu *nutra-*, druhá časť *-ceutiká* je odvodená z pojmu *farmaceutiká* – látky s liečivými účinkami. Zatiaľ neexistuje všeobecne platná definícia pre tento druh produktov. Prvá definícia bola navrhnutá Defelice v roku 1995:

„Nutraceutiká sú potraviny alebo zložky potravín podporujúce zdravie alebo znižujúce riziko niektorých ochorení“³. Do skupiny nutraceutických produktov patria izolované výživné látky, doplnky stravy, ktoré sú rastlinného pôvodu vo forme kapsúl, tabletiiek, sušené liečivé rastliny, čínska prírodná medicína, bylinkové čaje, nápoje pre športovcov a geneticky modifikované potraviny⁴. Veľa produktov sa považuje za nutraceutiká, preto je prijatie všeobecnej legislatívy, ktorá zahŕňa všetky produkty, takmer nemožné⁵.

Spotreba nutraceutík rastie. Mnoho spotrebiteľov sa domnieva, že nutraceutiká majú pozitívny vplyv na ich zdravie, a myslia si, že tieto prírodné produkty sú efektívne pri liečení niektorých ochorení a nemajú vedľajšie účinky⁶. Hlavným problémom súvisiacim s výrobou nutraceutík je prítomnosť nepravých produktov s falošným alebo nedefinovaným zložením⁷. Ďalším problémom týkajúcim sa výroby a konzumácie nutraceutík spočíva v závislosti zloženia a obsahu aktívnych zložiek od ročného obdobia, teploty, vlhkosti, pôdy a niekoľkých ďalších faktorov⁸.

Na rozdiel od potravín, nutraceutiká môžu byť uvedené na trh bez sledovania látok, ktoré potenciálne ohrozujú zdravie človeka⁶. Príručka kvality pre doplnky stravy rastlinného pôvodu vydaná Európskym botanickým fórom uvádza, že kontrola kontaminácie prírodných produktov sa môže vykonávať kedykoľvek počas prípravy nutraceutík⁹. Vzhľadom na to, že nutraceutiká sú rastlinného pôvodu, navyše v procese prípravy spravidla dochádza k zakoncentrovaniu účinných a aj neúčinných látok, je zrejmé, že pesticídy a iné toxické látky sa môžu vo finálnom produkte vyskytovať v detegovateľných množstvách¹⁰.

Nutraceutiká a sušené rastliny zvyčajne predstavujú veľmi zložitú maticu pre stanovenie rezíduí pesticídov. Väčšina produktov sú koncentráty s komplikovanou maticou, čo spôsobuje väčší problém pri vývoji analytických metód a vyžaduje citlivejšiu inštrumentáciu pre detekciu nízkych koncentračných hladín pesticídov¹¹. Zakoncentrovacia fáza môže spôsobiť zvýšenie obsahu koextrahovaných zlúčenín, ktoré rušia analýzu. Preto pri stanovení pesticídov v nutraceutických produktoch je nevyhnutné vziať do úvahy zaradenie spoľahlivého čistiaceho kroku pred chromatografickou analýzou⁶.

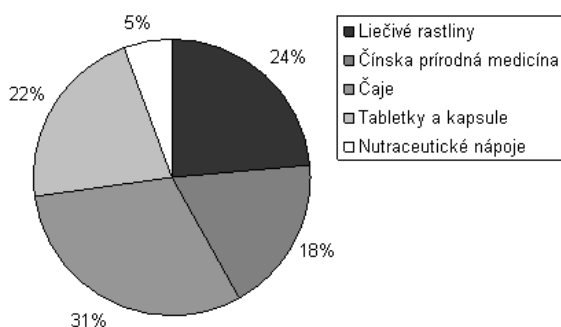
Cieľom článku je poskytnúť literárny prehľad o súčasných trendoch z oblasti úpravy vzoriek a extrakcie rezíduí pesticídov z rôznych typov nutraceutických produktov. Prehľad je rozdelený do kapitol podľa typu nutraceutík. Samostatná kapitola sa venuje potrebe aplikácie čistiacich techník. V ďalšej časti článku sú zhodnotené aj použité analytické metódy na detekciu a stanovenie pesticídov v komplexných nutraceutických maticiach.

2. Extrakcia vzoriek

Z prehľadu literatúry je zrejme, že pesticídy sa sledujú predovšetkým v piatich typoch nutraceutík: v liečivých rastlinách, čínskej prírodnej medicíne, čajoch, tabletkách a rôznych typoch nutraceutických nápojov. Na obr. 1 je zobrazené percentuálne rozdelenie publikovaných vedeckých prác v závislosti od typu vzoriek. Ako vyplýva z obrázku, najčastejšie predmetom analýzy podľa prác publikovaných za 15 rokov sú sušené rastliny a čaje. Viac ako 30 % z publikovaných štúdií sa zameralo na stanovenie pesticídov v čajoch. Ideálna extrakčná technika by mala izolovať a zakoncentrovať skúmané analyty a poskytovať „čistý“ extrakt, vo forme pesticídov v rozpúšťadle bez interferencií¹². Okrem toho, ideálna metóda úpravy vzorky má byť rýchla, jednoduchá na použitie, lacná a kompatibilná s analytickou inštrumentáciou, preto súčasné trendy vo vývoji smerujú k miniaturizácii a zjednodušeniu jednotlivých krokov¹³. V posledných rokoch boli vyvinuté rôzne mikroextrakčné techniky, ktoré majú výhodu oproti konvenčným extrakčným technikám v malej spotrebe organického rozpúšťadla, rýchlosti a jednoduchosti. Popri tom sa bežne používajú aj extrakčné techniky ako QuEChERS alebo extrakcia podporená ultrazvukom.

2.1. Liečivé rastliny

Liečivé rastliny hrajú veľmi dôležitú úlohu v prírodnom lekárstve, ale terapeutické účinky týchto rastlín sú často akceptované bez akýchkoľvek vedeckých alebo lekárskeho skúšok¹⁴. Tieto rastliny majú veľa pozitívnych účinkov: hypotenzívne alebo antihypertenzívne účinky, obsahujú jedinečné antioxidanty, esenciálne oleje, vitamíny, fytoosteroly a ďalšie výživné látky, ktoré podporujú imunitný systém¹⁵. Všeobecne platí, že bylinky majú veľmi komplikované matrice s obsahom vody, tukov a so širokou škálou biochemických zložiek, pričom jednotlivé zložky vykazujú rôznu polaritu, rozpustnosť a rôzne pKa



Obr. 1. Percentuálne zastúpenie publikovaných prác na analýzu pesticídov v nutraceutikách podľa typu matrice

hodnoty¹⁶. V literatúre uverejnenej za ostatných 10 rokov sa publikovali práce zaoberajúce sa sledovaním reziduí pesticídov vo vzorkách liečivých rastlín: pľúcnik lekárskeho (*Pulmonaria officinalis* L.), medovka lekárska (*Melissa officinalis* L.)¹⁵, drieň lekárskeho (*Cornus officinalis*)¹⁷, čierne hadí koreň (*Cimicifuga racemosa*)¹⁸, harmanček (*Matricaria chamomilla*)^{15,18}, pestrec mariánskeho (*Silybum marianum*), senovka grécka (*Trigonella foenum-graecum* L.), koreň sladkého drievka (*Glycyrrhiza glabra*)¹⁸, horcový koreň (*Gentiana radix*)¹⁶, cesnak kuchynský (*Allium sativum* L.), jazmín žltý (*Jasminum odoratissimum*)¹⁸, piepor opojný (*Piper methysticum*)^{18,19}, bobule palmy (*Serenoa serrulata*)^{18,20}, sójove zrná (*Glycine max* L.)²¹, lipa (*Tilia*), mäta pieporná (*Mentha piperita* L.), materina dúška (*Thymus vulgaris* L.)¹⁵, pomatka kokosová (*Poria cocos*)²², kôra škoric (*Cinnamomum verum*)^{14,18}, pomarančová kôra (*Citrus aurantium*)¹⁸.

QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) technika je v súčasnej dobe najčastejšie používaná pri stanovení reziduí pesticídov v rastlinných matriciach. Aj v prípade liečivých rastlín autori najčastejšie zvolili na prípravu vzorky túto techniku v spojení s disperznou extrakciou na tuhej fáze (dSPE). Originálna metóda bola vyvinutá Anastassiadesom a spol. v roku 2003. QuEChERS metóda je principiálne vysoťovacia extrakcia rozpúšťadlom, spravidla acetonitrilom. Po prídavku zmesi NaCl a MgSO₄ sa rozdelí vodná a organická fáza. Oddelená organická fáza je následne čistená pomocou dSPE primárnym sekundárnym aminorom (PSA)²³ a inými sorbentami podľa typu matrice. Prečistená organická fáza sa podrobí analýze, najčastejšie chromatografickej s vhodnou detekciou. Viaceré štúdie opisovali aplikáciu originálnej alebo modifikovanej QuEChERS metódy, ale v každom prípade bolo potrebné redukovať hmotnosť vzorky na 1 až 2 g a zmiešať s 8–10 ml vody^{17,18,20,24–27} a následne sa používal acetonitril ako extrakčné rozpúšťadlo. S prídavkom kyseliny octovej k acetonitrilu sa zvýšila účinnosť extrakcie kyslíkych pesticídov, čo sa prejavilo pri úprave vzoriek drienka lekárskeho¹⁷.

Okrem QuEChERS techniky sa používala široká škála extrakčných metód, ako extrakcia tekutinou v nadkritickom stave (SFE)²⁸, technika disperzie matrice na tuhej fáze (MSPD)¹⁵, extrakcia podporená mikrovlnným žiarením (MAE)²⁹ a aplikovali sa aj mikroextrakčné techniky, disperzná mikroextrakcia v systéme kvapalina-kvapalina (DLLME)²² a mikroextrakcia tuhú fázou (SPME)¹⁴. Pri DLLME sa zmes extrakčného (organické rozpúšťadlo, alebo iónová kvapalina) a disperzného rozpúšťadla rýchlo nastrekne do vodnej vzorky, čím vznikne zakalená sústava s malými kvapkami extrakčného rozpúšťadla, do ktorých sa izolujú a zakoncentrujú analyty. Táto technika sa používala na extrakciu 10 organofosforečných pesticídov (OPP) zo sušených vzoriek pomatky kokosovej. Na extrakciu postačovalo 0,1 g vzorky a 80 µl extrakčného rozpúšťadla CCl₄ (cit.²²). Pomocou SPME sa úspešne extrahovalo 19 organochlórovaných pesticídov (OCP) z rôznych liečivých rastlín. Pri tejto technike sa študoval vplyv prídavku soli na účinnosť extrakcie. Zistilo sa, že

v porovnaní s inými optimalizovanými postupmi SPME, ktoré sa používali na extrakciu pesticídov, kde prídavok soli zvýšil účinnosť, v tomto prípade mal opačný vplyv. Môže to byť spôsobené tým, že liečivé rastliny sú prírodné produkty s vysokým obsahom soli a prídavok NaCl blokuje adsorpciu pesticídov na vlákno¹⁴. V prípade niektorých mikroextrakčných technik nie je potrebné použiť extrakčné rozpúšťadlo ako napríklad pri SPME v kombinácii s termodesorpciou¹⁴, alebo sú potrebné len veľmi malé objemy (μl), napríklad pri DLLME (cit.²²).

2.2. Čínska prírodná medicína

Tradičná čínska prírodná medicína (TCM) má dlhú históriu v Číne, používa sa pri liečení rôznych chorôb³⁰. V Číne sú denne konzumované rôzne liečivé rastliny ako liečivo alebo ako zložky potravín. S rastúcim dopytom rásťo aj poľnohospodárske pestovanie rastlín pre čínsku prírodnú medicínu. Podobne ako iné poľnohospodárske rastliny aj tieto musia byť predmetom kontroly¹⁷. Napriek tomu, rezíduá pesticídov v TCM neboli kontrolované v Číne do roku 2000. V tomto roku sa stanovili maximálne reziduálne limity (MRL) pre 9 OCP v 2 typoch vzoriek, sladké drievko (*Glycyrrhizae glabra* L.) a kozinec blanitý (*Radix Astragali*)³¹. Oddelenie potravín a hygieny v Hong Kongu rozšírilo uvedené nariadenie o kontrolu MRL hodnôt pre 20 OCP a ich metabolitov (hexachlórbenzén, α -BHC, pentachlór-nitrobenzén, γ -BHC, heptachlór, pentachlór anilin, aldrin, β -BHC, δ -BHC, oxychlórán, heptachlór epoxid, *trans*-chlórán, *cis*-chlórán, *p,p'*-DDE, dieldrin, endrin, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDT, pentachlór-tioanizol). MRL hodnoty sú v rozmedzí³² 0,05 a 1 mg kg⁻¹. Rozšírenie sa týka aj počtu vzoriek, legislatívne sa nariadilo sledovať nasledovné TCM: čínska škorica (*Cinnamomi cortex*), ženšen (*Ginseng radix* a *Ginseng radix rubra*), sennový list (*Sennae folium*), kozinec blanitý (*Astragali radix*), *Polygalae radix*, sladké drievko (*Glycyrrhizae radix*), *Asiasari radix*, drieh lekársky (*Cornus officinalis*), perila krovitá (*Perilla frutescens*), jujuba čínska (*Fructus Zizyphi Jujubae*), citrónovník pomarančový (*Aurantii nobilis pericarpium*), mišpulník japonský (*Folium Eriobotryae Japonicae*) a *Moutan cortex*³³.

Pri úprave rôznych typov TCM vzoriek sa obvykle používa extrakcia podporená ultrazvukom (UAE)^{31,32,34–36}. UAE je jednoduchá technika úpravy vzorky, kde sa vzorka mieša s vhodným extrakčným rozpúšťadlom a transfer analytov sa urýchľuje pomocou ultrazvuku³⁵. V rámci vývoja metódy extrakcie je potrebné optimalizovať tri hlavné faktory: výber extrakčného rozpúšťadla, objem extrakčného rozpúšťadla a čas extrakcie, ale aj ďalšie podmienky môžu ovplyvniť extrakciu, napr. teplota extrakcie, intenzita ultrazvuku, iónová sila a pH. Ukázalo sa, že typ extrakčného rozpúšťadla má najväčší vplyv na výťažnosti pesticídov zo vzoriek TCM (cit.³⁵). Najčastejšie sa na extrakciu použilo 40 ml acetonitrilu pre 2 g vzorky³⁵ alebo 40 ml zmesi aceton-dichlómetán (2:1) pre 5 g vzorky³⁴. V oboch prípadoch sa vzorky TCM extraho-

vali 15 min. Z ďalších rozpúšťadiel, ktoré sú účinné na extrakciu pesticídov z TCM, treba spomenúť petrol éter³¹, acetón³⁶ a etylacetát³².

Ďalšou často používanou je technika QuEChERS v spojení s čistiacim krokom dSPE^{30,37,38}. TCM sú vzorky s obsahom vody < 10 %, preto nemodifikovaná QuEChERS metóda nie je na extrakciu vhodná. Používajú sa menšie hmotnosti vzoriek ako 10 g a miešajú sa s vodou. Chen a spol.¹⁷ porovnávali rôzne spôsoby miešania vzoriek s extrakčným rozpúšťadlom, (a) extrakcia pomocou ultrazvuku s 10 ml acetonitrilu, (b) extrakcia 10 ml acetonitrilu za podpory ultrazvuku a s pridaním soli na zvýšenie výťažnosti, (c) extrakcia pomocou vortexu s 10 ml acetonitrilu a pridaním soli na rozseparovanie fáz a odstránenie vody. Ako najvhodnejšia sa ukázala extrakcia pomocou vortexu¹⁷. Pri QuEChERS extrakcii je dôležitým faktorom aj pomer hmotnosti vzorky a objemu vody. Najčastejšie sa ku 2 g vzorky pridáva 10 ml vody^{17,37}.

Vzorky kozinca blanitého sa upravili metódou MAE. Vzorka sa umiestňuje do špeciálnej nádoby spolu s rozpúšťadlom a zohrieva sa s mikrovlnným žiarením. Ako extrakčné rozpúšťadlo pre extrakciu OPP sa testoval acetonitril a etanol. Hoci neboli výrazné rozdiely v hodnotách výťažnosti, na extrakciu OPP sa použil etanol ako extrakčné rozpúšťadlo, vzhľadom na to, že je priaznivejší k životnému prostrediu a vhodnejší z dôvodu bezpečnosti³⁹.

Na extrakciu pesticídov z TCM sa použila aj extrakcia rozpúšťadlom pri zvýšenom tlaku (PLE). Táto technika je plne automatizovaná a využíva organické rozpúšťadlá pri zvýšených tlakoch a teplotách⁴⁰. Dosahujú sa podobné výťažnosti analytov ako pri klasickej Soxhletovej extrakcii, ale spotreba rozpúšťadla je menšia a kratší čas extrakcie. Spotreba organického rozpúšťadla môže byť minimalizovaná s využitím extrakcie horúcou vodou pri zvýšenom tlaku (PHWE). Pri zvýšenom tlaku a teplote polarita vody poklesne a možno ju použiť na extrakciu menej polárnych zlúčenín. PLE sa aplikovala na extrakciu 74 pesticídov zo vzoriek čínskej škorice, ženšenu a ginkgo biloba. Študované pesticídy boli OPP a karbamáty, pričom mnohé pesticídy sú polárne látky rozpustné v polárnych a semipolárnych rozpúšťadlách, ako acetón, etylacetát a acetonitril. Pri testovaní rozpúšťadiel pri vývoji PLE metódy sa dosiahli lepšie výťažnosti, keď sa použili acetón a acetonitril. Acetonitrilový extrakt obsahoval menej interferujúcich látok (lipidy, pigmenty), preto sa acetonitril zvolil ako extrakčné rozpúšťadlo⁴¹.

2.3. Čaje

Veľa druhov rastlín sa na celom svete spotrebuje vo forme odvarov čajov pre ich terapeutické účinky⁴². Popularitu získali hlavne pozitívnym zdravotným účinkom, ktoré sa dosahujú zložkami, ako sú flavonoidy, hlavne katechín⁴³. Pesticídy, najmä insekticídy ako etion, quinalfos, malation a dimetoát sa používajú na ochranu čajových listov a bylín cieľene pestovaných na prípravu bylinkových čajov. Dôsledkom toho je, že rezíduá pesticídov sa

môžu vyskytnúť aj v čajoch⁴⁴.

Čaje reprezentujú veľmi komplexné matrice s vysokým obsahom polyfenolov, metylxantínov, ako kofeín, ktoré sa môžu koextrahovať. Na extrakciu tohto typu matrice sa použili extrakčné techniky ako QuEChERS, extrakcia kvapalina-kvapalina (LLE), MAE a boli aplikované aj rôzne typy mikroextrakčných techník, SPME, mikroextrakcia kvapalinou využívajúca duté vlákno (HF-LPME) a mikroextrakcia jednou kvapkou (SDME).

Na extrakciu reziduí pesticídov zo vzoriek čajov sa najčastejšie použila SPME. Táto technika je založená na sorpcii analytov na vlákno potiahnuté sorbentom. Extrakcia sa uskutočňuje buď priamym ponorením vlákna do kvapalnej vzorky (DI) alebo v headspace (HS) móde. Analyty sa následne tepelne desorbujú v dávkovači GC⁴⁴. Pri extrakcii pesticídov sa najčastejšie používala HS-SPME. DI-SPME bola účinná na extrakciu 10 pesticídov, vrátane OPP a OCP z rôznych druhov čajov (biely, oolong, zelený a čierny, harmanček, mäta)⁴². Na izoláciu pesticídov z čajov sa používali rôzne typy vlákien. Schurek a spol.⁴⁴ porovnávali účinnosti extrakcie 36 pesticídov z fortifikovaných vodných suspenzií čajov a zo sušených čajových listov. Polydimetylsiloxánové (PDMS) vlákna boli vhodné na extrakciu pesticídov z fortifikovaných vodných suspenzií čajov, ale neboli vhodné na extrakciu pesticídov zo sušených čajových listov a opakovateľnosť nebola postačujúca. Zistilo sa, že prídavok vody uľahčuje uvoľnenie analytov zo vzorky a urýchli absorpciu analytov^{42,44}. Obmedzené množstvo komerčne dostupných vlákien viedlo k tomu, že sa začali laboratórne vyrábať nové typy. Tieto vlákna môžu byť vyrobené technológiou sol-gel^{45,46}. Nové PDMS/polyvinylalkohol (PVA) vlákno preukázalo vysokú účinnosť pre izoláciu OCP a OPP. PDMS/PVA vlákno poskytovalo v porovnaní s PDMS/DVB vláknom rýchlejšiu desorpciu a symetrické píky. Zistilo sa, že PDMS/DVB vlákno absorbuje viacej vody, čo môže rušiť GC-MS analýzu⁴⁶.

Z nových techník mikroextrakcie kvapalinou sa pri úprave čajov použili HF-LPME a SDME na izoláciu OCP (cit.^{47–49}). Proces extrakcie pri HF-LPME sa realizuje v póroch stien dutého vlákna, ktoré sú naplnené organickým rozpúšťadlom a v prípade SDME na špičke ihly striekačky sa tvorí mikrokvapka organického rozpúšťadla, ktorá sa umiestni do intenzívne miešaného roztoku vzorky. Ako extrakčné rozpúšťadlo sa použil *n*-hexán na SDME^{48,49} a 1-oktanol na DHFP-LPME. V prípade HF-LPME 1-oktanol sa používal na impregnáciu dutého vlákna aj na extrakciu. DHFP-LPME sa ukázala byť účinnou technikou pre extrakciu OCP z čajových listov aj z čajových nápojov⁴⁷. Qian a spol.⁴⁹ používali malý lievik na SDME, čo pomohlo k využitiu väčšej kvapky rozpúšťadla na extrakciu s objemom 4 μ l. Väčšia kvapka rozpúšťadla zvýši extrakčnú kapacitu SDME⁴⁹. Významnou výhodou uvedených extrakcií je eliminácia následného čistiaceho kroku.

Ďalšou metódou extrakcie pesticídov z čajových matric je QuEChERS technika. Táto technika sa použila na úpravu sušených čajových listov. Používala sa modifikovaná QuEChERS technika^{50–52}. Pôvodne navrhnutá metóda

sa používa na extrakciu pesticídov zo vzoriek s vysokým obsahom vody (> 80 %). Vzhľadom na to, že sušené čajové listy sú vzorky s nízkym obsahom vody, na analýzu sa používa menšie množstvo vzorky (2–5 g) a ku vzorkám sušených bylín sa pridáva voda (4–10 ml) pred samotnou extrakciou^{50,51,53}. Čajka a spol.⁵¹ porovnávali tri varianty QuEChERS techniky, originálnu a dve modifikované verzie (s acetátovým a citrátovým pufróm). Zistilo sa, že všetky spôsoby boli účinné na extrakciu 125 pesticídov zo zeleného a čierneho čaju⁵¹. V porovnaní s SPME technikou sa pri QuEChERS metóde používa organické rozpúšťadlo, spravidla acetonitril^{50–52} a je potrebné následné čistenie extraktov.

MAE sa používa na extrakciu organických látok z rôznych typov matric, vrátane extrakcie pesticídov z nutraceutík. Jedná sa o časovo nenáročnú techniku, ktorá je vhodná na rutinné analýzy. Na stanovenie OCP z bylinkových čajov sa použila extrakcia vodou ako extrakčným činidlom, ktorá je šetrná ku životnému prostrediu⁵⁴.

Na extrakciu pesticídov z čajových lístkov sa použila aj technika LLE, pri ktorej sa analyty extrahujú z kvapalnej vzorky do inej kvapaliny, spravidla rozpúšťadla, ktoré je nemiešateľné so vzorkou. Kvapalnou vzorkou je výluh z čajových lístkov. Okrem acetonitrilu^{55–58} sa použili na extrakciu aj iné rozpúšťadlá, napr. *n*-hexán⁵⁹ a dichlórmetán⁶⁰ s objemami v rozmedzí 15–150 ml.

2.4. Tabletky a kapsule

Tabletky a kapsule sú konzumentami zvyčajne najviac vyhľadanými formami nutraceutík. Táto forma je považovaná za najpohodnejšiu z hľadiska konzumácie. Nutraceutiká obsahujú skoncentrované účinné látky, to znamená, že aj prínosy sú viacnásobné⁶¹. Na druhej strane zakonzentrovanie spôsobuje, že aj interferenty môžu byť skoncentrované¹². Publikovali sa štúdie na stanovenie pesticídov v nutraceutických tabletkách a kapsulách, ako sójové kapsule¹¹, výrobky z ginkgo biloba^{1,62}, tabletky z hroznových semiačok¹² a zo zeleného čaju^{61,63}.

Na úpravu tabletiiek a kapsúl sa najčastejšie používala QuEChERS technika s acetonitrilom ako extrakčným rozpúšťadlom^{10,61,63–65} a etylacetátom^{11,12,62}. Pomocou tejto metódy sa extrahovalo viac ako 200 pesticídov z tabletiiek z ginkgo biloba a zeleného čaju^{1,61}. Dva typy QuEChERS techniky boli porovnané pre úpravu tabletiiek zeleného čaju, americká a európska QuEChERS metóda. V prípade európskej verzie sa pri extrakcii pridáva chlorid sodný a rôzne pufré, v americkej verzii sa používa octan sodný. Ukázalo sa, že americká QuEChERS poskytuje akceptovateľnejšie výťažnosti pre veľký počet pesticídov, vrátane polárných pesticídov⁶¹. Etylacetát a acetonitril sa porovnávali pri extrakcii 177 pesticídov z sójových kapsúl¹¹. Pesticídy patrili do rôznych skupín, napr. OCP, OPP, pyretroidy, organofluorované pesticídy, chloroacetamidy, metoxyakryláty atď. 92 % zo 177 pesticídov sa úspešne extrahovalo s výťažnosťami medzi 70 a 120 %, oproti tomu pre acetonitril tieto hodnoty boli oveľa nižšie, len 28 % pesticídov mali uspokojivé výťažnosti 70–120 %. Rovnaké

štúdiu sa realizovalo pri extrakcii 177 pesticídov z tabletiiek zeleného čaju, výsledky sa však s výsledkami získanými pre extrakciu pesticídov zo sójových kapsúl vzhľadom na odlišnosť matric významne odlišovali napr. vo výbere vhodného extrakčného činidla, čo z hľadiska výťažnosti znamená, že 64 % pesticídov sa vyextrahovalo zo vzorky pomocou acetonitrilu a len 8 % pesticídov pomocou etylacetátu vo vyššie uvedenom rozmedzí výťažnosti⁶³.

OPP boli účinne extrahované z detskej prírodnej medicíny pomocou HS-SPME metódy⁶⁶. PDMS/DVB vlákna sa ukázali byť účinným na extrakciu diazinónu a chlórpyrifosu. PDMS/DVB vlákno vykazovalo väčšiu afinitu k diazinónu ako PDMS a PDMS/CAR vlákna⁶⁶.

Ako u čajov, tak aj u nutraceutických kapsúl boli pesticídy extrahované metódou LLE s rôznymi rozpúšťadlami a extrakty boli následne čistené pomocou SPE^{67,68} alebo dSPE¹. Porovnávala sa extrakcia s acetonitrilom bez prečistenia a QuEChERS technikou s dSPE pre extrakciu 250 pesticídov z kapsúl ginkgo biloba¹. Ukázalo sa, že LLE s použitím acetonitrilu je účinnejšia. Pomocou acetonitrilovej extrakcie sa podarilo vyextrahovať 77 % z 250 pesticídov s výťažnosťami v rozsahu 70–120 %, QuEChERS technikou sa vyextrahovalo 64 % z 250 pesticídov s uspokojivými výťažnosťami v rozmedzí 70–120 %.

2.5. Nutraceutické nápoje

Nutraceutické produkty môžu byť konzumované v tekutej forme, ako čínske liečivé vína, nápoje pre športovcov, alebo iné nápoje. Čínske liečivé vína sú obľúbené v mnohých oblastiach Ázie aj Európy. Nemajú len vysokú nutričnú hodnotu a špecifickú chuť, ale hlavne pozitívne účinky na zdravie. Významnými komponentami týchto vín z hľadiska analýzy sú okrem vody a alkoholu najmä alkaloidy, soli, glykozidy, organické kyseliny a oleje. Kvôli popularite liečivých vín na celom svete rastie záujem o kontrolu kvality a bezpečnosti týchto produktov⁵³.

Na extrakciu pesticídov z čínskych liečivých vín a z športových nápojov bola použitá LLE a DLLME. LLE vyžaduje veľké objemy extrakčných rozpúšťadiel, čo môže mať negatívny vplyv na životné prostredie⁵³. Na extrakciu 19 pesticídov z nápojov pre športovcov bolo potrebných 100 ml rozpúšťadla (petrol éter) a extrakt sa pred GC analýzou prečistil gélovou permeačnou chromatografiou (GPC)⁶⁹. Liu a spol.⁵³ na extrakciu 18 OPP z liečivých vín využili DLLME a spotrebovali 2 ml zmesi aceton:dichlórmetán (1:1). Extrakciu uskutočnili v centrifugačnej skúmavke rýchlym pridaním rozpúšťadla a intenzívnym trepaním roztoku. OPP sa extrahovali do drobných kvapiek dichlórmetánu⁵³.

SDME sa použila na extrakciu 19 pesticídov z kokosového mlieka. Postačovala kvapka toluénu s objemom 1 μ l. Všeobecne platí, že s rastúcim objemom kvapky rastie aj množstvo extrahovaných pesticídov. Avšak s veľmi objemnými kvapkami sa ťažko pracuje a je potrebný vyšší čas extrakcie na dosiahnutie rovnováhy⁷⁰.

3. Čistiace techniky

Nutraceutiká predstavujú veľmi zložité matrice pre analýzu pesticídov, niektoré interferenty môžu byť aj napriek aplikovanej technike úpravy vzorky ešte koextrahované spolu s analytmi a môžu rušiť pri následnom stanovení. Tieto koextrahované zložky ovplyvňujú analýzu rôznymi spôsobmi. Neprchavé komponenty môžu byť usadené v dávkovacej časti plynového chromatografu a spôsobíť vznik nových aktívnych miest. Semi-prchavé látky spôsobujú deformáciu píkov a posúvanie retenčných časov skúmaných analytov. Okrem toho interferujúce ióny s blízkymi hodnotami m/z k hodnotám zaznamenaným pre skúmané analyty obmedzujú dosiahnutie nízkych medzí detekcie a spoľahlivú identifikáciu⁵¹.

V prípade QuEChERS metódy treba zvoliť na odstránenie matricových interferentov vhodný sorbent pre dSPE. Ukázalo sa, že samostatný PSA nie je dostatočný na izoláciu interferentov z nutraceutík, dosiahli sa nízke výťažnosti a pozorovali sa výrazné matricové efekty^{24,38}. Vzhľadom na zložitosť matrice sú potrebné ďalšie sorbenty, najčastejšie používaná bola kombinácia soli a sorbentov MgSO₄, PSA a grafitizovaný uhlík (graphitized carbon black – GCB) navrhnutá Anastassiadesom v pôvodnej QuEChERS metóde^{17,24,25}. PSA je vhodný na odstránenie organických kyselín a cukrov, zatiaľ čo GCB odstraňuje steroly a pigmenty. Pridaním GCB ku QuEChERS extraktu sa matricové vplyvy znížili, GCB adsorboval väčšinu koextrahujúcich látok, ale na druhej strane okrem interferentov adsorboval aj planárne pesticídy. Aby sa tomu predišlo, je potrebné pridať k extraktu toluén³⁸. V niektorých prípadoch bol pridaný k zmesi sorbentov aj silikagél modifikovaný C18 na odstránenie lipidov²⁰. Extrémne čistenie je potrebné v prípade kapsúl a tabliet pred chromatografickou analýzou. Používala sa zmes sorbentov, PSA, GCB, C18 a nového sorbenta na báze oxidu zirkoničitého (Zr-Sep⁺), ktorá je vhodná na odstránenie lipidických zložiek z matrice^{11,12,62,63}. Zr-Sep⁺ je silikagél, na ktorý sú naviazané molekuly oxidu zirkoničitého a C18 v pomere 1/1. V prípade kapsúl zo zeleného čaju nebolo potrebné následné čistenie po extrakcii, nakoľko prečistenie nemalo vplyv na zvýšenie výťažnosti pesticídov^{61,65}. Použitie viac ako jedného čistiaceho kroku môže zlepšiť výsledky validácie²⁶. Dvojkroková dSPE metóda sa použila na prečistenie extraktov koreňa ženšenu a čajov^{26,50}. V prípade ženšenu sa pridal modifikovaný silikagél C18 k extraktu v prvom čistiacom kroku a v druhom čistiacom kroku sa používal GCB a PSA, v tomto kroku sa pridal aj toluén k acetonitrilovému extraktu, aby boli desorbované planárne pesticídy z GCB, ako napr. kumafos a leptofos²⁶. Okrem dSPE boli použité aj iné čistiace metódy, napr. SPE (cit.^{18,33}). SPE kolónky obsahujú väčšie množstvo sorbentov ako sa používa pri dSPE, preto by mohli odstrániť viac koextrahujúcich zložiek z matrice a tým chrániť chromatografické prístroje a detektory. SPE sa používala na prečistenie vzoriek získaných z tabletiiek z púpavy pri stanovení 46 pesticídov. Používala sa zmesná kolónka, ktorá obsahovala 500 mg GCB a 500 mg PSA sorbenta¹⁰. Bola opísaná

aj kombinácia QuEChERS techniky s extrakčnou technikou využívajúcou minimálne objemy extrakčného rozpúšťadla, DLLME. DLLME bola použitá na čistenie extraktu ženšenu a na zakoncentrovanie pesticídov v extrakte²⁷. Cajka a spol.⁵¹ zistili, že acetonitrilový extrakt po QuEChERS metóde obsahuje veľké množstvo koextraktantov. Na odstránenie interferentov sa testovali rôzne metódy, ako dSPE, dSPE a následná LLE a samotná LLE. Extrakt po čistení dSPE ešte stále obsahoval veľa interferentov (7,5 mg ml⁻¹ získaných z 0,2 g vzorky). Pri použití LLE množstvo koextraktantov výrazne klesalo a výtlačnosti pesticídov boli vyhovujúce⁵¹.

Pri extrakcii OPP metódou MAE na prečistenie extraktu postačoval samotný sorbent PSA. Pri použití väčšieho množstva PSA (150 mg) začal sorbent adsorbovať aj pesticídy ako deneton-s-metyl a profenofos, preto je veľmi dôležitá optimalizácia hmotnosti PSA (cit.³⁹). Aj v prípade MAE techniky sa používajú mikroextrakčné techniky na prečistenie vzoriek. Extrakty bylkových čajov sa prečistili komplementárnou HS-SPME metódou. Porézne, sol-gel polyfenyl(metylsiloxán)-ové (PPMS) vlákna vykazovali veľkú citlivosť a selektivitu pre OCP (cit.⁵⁴).

V prípade plne automatizovaných techník ako SFE nebolo potrebné pre vzorky liečivých rastlín prečistenie vzoriek²⁸, v prípade techniky ASE sa aplikovalo dvojkrokové prečistenie GPC a následne pomocou SPE s využitím zmesi sorbentov GCB a PSA (cit.⁴¹).

UAE sa kombinuje s čistením SPE s rôznymi typmi sorbentov ako florisil, GCB, silikagél a silikagél modifikovaný amino-propylovými skupinami^{31,32,34,35}.

Extrakty čajov po LLE sa prečistili pomocou SPE, vo väčšine prípadov s použitím Cleanert TPT (Triple Phase of Tea) kolóny, ktorá je špeciálna kolóna pre extrakciu pesticídov z čajov^{56–58}, ale použil sa aj florisil samostatne^{59,60} alebo v kombinácii s GCB (cit.⁵⁵).

Všeobecne môžeme povedať, že použitím čistiaceho kroku sa zlepšila výtlačnosti a presnosť metódy.

4. Porovnanie extrakčných techník

Porovnanie techník podľa rôznych kritérií, ako objem rozpúšťadla, hmotnosť vzorky, výhody a limitácie je sumarizované v tab. I. Porovnaním použitých metód možno konštatovať, že QuEChERS metóda sa najčastejšie používa pre rôzne typy nutraceutických produktov s vyhovujúcimi výtlačnosťami. Počet pesticídov extrahovaných QuEChERS metódou je vyšší ako pri ostatných metódach a touto metódou sa extrahovali rôzne druhy pesticídov, vrátane OCP, OPP, pyreteroidov a karbamátov. Používajú sa rôzne typy mikroextrakčných techník, ktoré v porovnaní s inými technikami spĺňajú požiadavky „zelenej chémie“ použitím objemov extrakčného rozpúšťadla menších ako 1 ml na vzorku. Spotreba extrakčného rozpúšťadla pri iných metódach použitých na úpravu nutraceutík je v rozmedzí 5–100 ml. Z mikroextrakčných techník sa najčastejšie používa SPME, ktorá našla svoje uplatnenie hlavne pri úprave čajov. Keďže desorpcia analytov je uskutoč-

nená tepelnou desorpciou, táto metóda je bezrozpúšťadlovou metódou. Výhodou mikroextrakčných techník, ako SPME, SDME a DLLME je to, že nie je potrebné prečistenie extraktov, čo predstavuje veľkú výhodu z pohľadu časovej náročnosti a spotreby sorbentov a rozpúšťadiel. Nevýhodou mikroextrakčných techník je v tom, že sa používali na extrakciu menšieho počtu analytov, kým QuEChERS sa používa pri multireziduálnej analýze pesticídov, mikroextrakčné techniky sa používali na extrakciu určitých skupín, ako OCP alebo OPP. Používajú sa aj plne automatizované techniky, ako ASE a SFE, najmä pri analýze tuhých vzoriek, ale inštrumentálne vybavenie pre tieto techniky je finančne náročnejšie.

5. Separácia a stanovenie pesticídov

Pri analýze reziduí pesticídov sú dve základné požiadavky: nízke medze detekcie a multireziduálny charakter metódy. Záverečnou fázou analytických metód je identifikácia a stanovenie analytov pomocou vhodných inštrumentálnych techník. Najčastejšie využívanými analytickými metódami na stanovenie pesticídov v nutraceutických produktoch sú metódy založené na GC a HPLC v spojení s MS alebo tandemov MS/MS. V nasledujúcich kapitolách diskutujeme aplikácie, výhody a limitácie inštrumentálnych techník, ktoré boli použité na stanovenie pesticídov v nutraceutických produktoch.

5.1. Plynová chromatografia

Viac ako 70 % pesticídov používaných na ochranu liečivých rastlín možno stanoviť metódou GC (cit.³⁸). Na stanovenie pesticídov v nutraceutických produktoch boli vyvinuté metódy na základe spojení GC s rôznymi detektormi ako detektor elektrónového záchytu (ECD), plameňovo fotometrický detektor (FPD). Z klasických detektorov má ECD pri detekcii a stanovení pesticídov v nutraceutických produktoch najväčšie uplatnenie. ECD sa používa pri stanovení menšieho počtu pesticídov v rozmedzí 12–27. Vo väčšine prípadov ECD sa využíval pri stanovení OCP (cit.^{28,30,45,47,48,54,71}), ale boli publikované práce aj o stanovení zmesi OCP a PP (cit.³¹) a multireziduálnych zmesí OCP, OPP a PP (cit.³⁴). Výnimočne sa na detekciu použil aj FPD pri stanovení OPP (cit.^{39,53,66}). V každom prípade sa dosiahli LOD nižšie ako 15 µg kg⁻¹. Z ďalších detektorov použitých pri stanovení pesticídov v nutraceutikách možno spomenúť dusíkový-fosforový detektor (NPD), ktorý sa používal na stanovenie paration-metylu a chlórpyrifosu⁶⁰ a atómovo emisný detektor (AED) na stanovenie zmesi desiatich OCP, OPP a PP (cit.⁴²). Lozowicka a spol.¹⁵ opisali metódu na stanovenie 163 pesticídov v liečivých rastlinách pomocou GC-µECD/NPD s LOD hodnotami v rozsahu 3–30 µg kg⁻¹ (cit.¹⁵). Všeobecne sa dá zhodnotiť, že tieto detektory sú vhodné na stanovenie menšieho počtu pesticídov a LOD hodnoty sú najmä v prípade použitia selektívnych detektorov postačujúce pre stanovenie pesticídov v nutraceutických pro-

Tabulka I
Porovnanie metód na extrakciu pesticídov z nutraceutík

		Metóda ^a						
	QuEChERS	SPME	MAE	SFE	DLLME	MSPD	LLE	ASE
Čas extrakcie	10–20 min	5–60 min	5–10 min	20 min	< 1 min	Cca. 10 min	Cca. 1 min	< 15 min
Hmotnosť vzorky	1–15 g	1–7 ml	0,5–1 g	1–2 g	0,1 g	2 g	5 ml	4 g
Spotreba rozpúšťadla	10–40 ml	–	15–20 ml	< 5 ml *	< 1 ml	10–25 ml	2–100 ml	> 10 ml
Výhody	<p>Vysoké výťažnosti, adekvátna presnosť a správnosť, rôznorodosť vzoriek, jednoduchosť, nízka cena a minimálny počet krokov</p>	<p>citlivá, jednoduchá, finančne nenáročná, nepoužíva žiadne rozpúšťadlá v spojení s GC, úplne automatizovaná, spoji extrakciu, zakoncentrovanie a prečistenie bez použitia organických rozpúšťadiel</p>	<p>krátky extrakčný čas, extrakčné rozpúšťadlo môže byť aj voda</p>	<p>rýchlosť, vysoká selektivita extrakcie, relatívne čistý extrakt, nízka spotreba rozpúšťadiel, priame spojenie s čiastiacimi krokmi, *namiesto organických rozpúšťadiel sa použije pravidla CO₂</p>	<p>krátky extrakčný čas, nízke náklady, jednoduchosť, vysoké výťažnosti a obohacovacie faktory</p>	<p>spája izoláciu a čistenie, používa malé množstvá vzoriek, nenáročná inštrumentácia</p>	<p>široká škála overených aplikácií</p>	<p>krátky čas extrakcie, úplne automatizované</p>
Nevýhody	<p>nízke obohacovacie faktory, vyššie medze detekcie</p>	<p>malá kapacita vlákien, nízke prevádzkové teploty, nestabilita a napučanie vlákien pri použití organických rozpúšťadiel, poškodenie vlákien, odmedzená životnosť vlákien</p>	<p>nízka selektivita, potrebné čistenie extraktu</p>	<p>ovplyvňovaný obsahom vody, vysoká cena, potreba optimalizácie veľkých parametrov, extrakt treba zakoncentrovať, pre polárne látky je potrebný prídavok modifikátora</p>	<p>tvorba ťažko rozdeliteľných emulzií, použitie chlórovaných rozpúšťadiel</p>	<p>nízky počet analyzovaných pesticídov, komplikovaná optimalizácia</p>	<p>časovo náročné, spotreba veľkých objemov toxických rozpúšťadiel, potrebné čistenie extraktu</p>	<p>vysoká cena inštrumentácie, nečistý a zriedený extrakt</p>

^a ASE – urýchlená extrakcia rozpúšťadlom, DLLME – disperzná mikroextrakcia v systéme kvapalina-kvapalina, LLE – extrakcia kvapalina-kvapalina, MAE – extrakcia podporaná mikrovlnným žiarením, MSPD – technika disperzie matrice na tuhej fáze, QuEChERS – Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe, SFE – extrakcia tekutinou v nadkritickom stave, SPME – mikroextrakcia tuhou fázou

duktoch. Metódy sú výhodné pri použití na stanovenie látok, na confirmáciu látok je však zvyčajne vhodné použitie hmotnostných spektrometrov.

Na detekciu veľkého počtu pesticídov sa používa MS detektor. Z publikovaných údajov vyplýva, že MS sa prednostne používa s kvadrupólovým analyzátorom (Q) (cit. ^{14,16,22,25,26,29,32,33,36,38,56,67,68,70,72,73}) a trojitým kvadrupólom (QqQ) ^{11,12,18,51,63,64}. Zriedkavo sa využívajú aj iné typy analyzátorov, ako napr. preletový analyzátor (TOF) ^{10,41,44} alebo ionová pasca (IT) ⁵⁰.

Kvadrupólový analyzátor (Q) našiel široké uplatnenie pri detekcii pesticídov v nutraceutických produktoch. Na zvýšenie citlivosti metódy sa používa mód selektívneho monitorovania vybraných iónov (SIM). Všeobecne platí, že najvýraznejší ión sa používa na kvantifikáciu a zvolia sa dva alebo tri špecifické ióny na confirmáciu analytu vo vzorke. Pri analýze komplexných matric ako sú nutraceutiká, je bežné, že iónové fragmenty sú prekryté iónmi z matrice. Preto je kľúčovým bodom vo vývoji metódy voľba špecifických iónov ¹⁴. Tento analyzátor sa používal aj pri sledovaní menšieho počtu pesticídov ³³, ale častejšie sa používa pri sledovaní veľkého počtu pesticídov, napr. 234 pesticídov zo skupín OCP, OPP, pyretroidov, organofluorovaných pesticídov, chloroacetamidov, metoxyakrylátov a iných ²⁵. LOD pri použití tohto typu analyzátoru je v rozmedzí 0,03–500 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Pri použití jednoduchého kvadrupólového analyzátoru sa môžu vyskytnúť aj problémy. Nepriaznivý vplyv na presnosť analýz majú koextrahované zložky matrice. Pri GC-MS ide predovšetkým o zvyšovanie odozvy pesticídov ³³. Tieto maticové efekty môžu ovplyvniť výťažnosť, a môžu sa pozorovať zvýšené odozvy pri dávkovaní zložitých extraktov. Aby sa eliminoval vplyv matrice, pri GC-MS analýzach sa používajú maticou značené štandardy alebo sa používajú ochranné látky ^{36,57}. Maticou spôsobené zvyšovanie chromatografickej odozvy sa dá eliminovať riedením pracovných roztokov štandardov extraktmi, pričom výťažnosť ostanú vyhovujúce ³³.

Vplyvy matrice sú hlavnou limitáciou pri vývoji GC-MS metódy. Zapojenie tandem analyzátorov MS poskytuje vyššiu selektivitu ako jednoduchá MS metóda. Pre stanovenie pesticídov v nutraceutických produktoch sa najčastejšie používa trojitý kvadrupól (QqQ). Federálna agentúra vlády Spojených štátov zodpovedná za hodnotenie a schvaľovanie zdravotníckych pomôcok (FDA) vyžaduje pri GC-MS analýzach pre identifikáciu vybraných pesticídov splnenie confirmačných kritérií na základe identifikačných bodov. Pre rôzne typy detekcie sa prideluje určitý počet bodov. V prípade pesticídov sa aplikujú rovnaké požiadavky ako pri veterinárne liečivá a teda na identifikáciu látok. V rámci EÚ sú odporúčania na identifikáciu látok sumarizované v dokumente SANTE/11945/2015, ktorý bol implementovaný 1. januára 2016 Generálnym riaditeľstvom pre zdravie a bezpečnosť potravín Európskej komisie ⁷⁴. Pre MS techniku sú potrebné tri/štyri komplementárne ióny s vhodnými pomermi iónov, zatiaľ čo identifikácia pomocou GC-MS/MS vyžaduje len dva páry prekurzorový ión-produktový ión ^{18,74}. Pre vysokorozlišovacie

prístroje sa odporúčajú na identifikáciu minimálne 2 ióny, podľa možnosti 1 molekulový ión a 1 fragmentový ión ⁷⁴. SRM mód detekciou MS/MS umožňuje simultánnu identifikáciu a stanovenie cieľových analytov s vysokou citlivosťou a selektivitou, ale počet produktových iónov je limitovaný skenovacou rýchlosťou prístroja ⁶³. Technika MS-MS(QqQ) sa použila pri stanovení 103 až 310 pesticídov v rôznych typoch nutraceutík. Ukázalo sa, že metóda je vhodná aj na stanovenie polárnejších pesticídov, pre ktoré sa prednostne používa LC-MS/MS metóda ^{1,12,62–64} a vybavenie je cenovo dostupnejšie ako LC-MS/MS. GC-MS/MS poskytuje nižšie LOD ako GC-MS v rozmedzí 0,01–10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Vo väčšine prípadov sa pri stanovení pesticídov v nutraceutikách volili 2 produktové ióny pre každý prekurzorový ión. V prípade bylinkových čajov sa používal MRM mód, pri ktorom sa volili 4 iónové premeny na pesticíd ⁵¹.

Z iných typov hmotnostných analyzátorov použitých pri stanovení pesticídov je významná iónová pasca (IT) ⁵⁰, ktorá sa aplikovala pri stanovení 22 pesticídov v extrakte zeleného čaju. LOD získané pomocou GC-IT boli v rozmedzí ⁵⁰ 1–109 $\mu\text{g kg}^{-1}$, čo je vyššia hodnota ako v prípade QqQ. TOF-MS sa používal v spojení dvojdimenzionálnou komprehenzívnou GC (GCxGC) ^{41,44}. TOF analyzátor má vyššiu rýchlosť skenovania ako Q alebo QqQ a poskytuje kompletne hmotnostné spektrum. Dôležitým bodom je, že TOF poskytuje vysokú citlivosť vo full scan (FS) móde, čím umožní okrem sledovania cieľových analytov aj identifikáciu neznámych zložiek ¹⁰. Jia a spol. ⁴¹ stanovili 423 pesticídov v extraktoch čajov s LOD v rozmedzí 0,07–6,92 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Najčastejšie pri stanovení pesticídov v nutraceutikách sa používa kvadrupólový analyzátor, ktorý poskytuje postačujúce LOD, je cenovo dostupný a rozšírený. Nižšie hodnoty LOD a vyšší stupeň selektivity sa dosiahne pri použití QqQ. TOF sa prednostne používajú pre necielený skrining. Vysokorozlišovacie rýchloskenujúce analyzátory TOF umožňujú snímanie vyššieho počtu pesticídov, tieto analyzátory sú však oveľa drahšie ako kvadrupólové. V prípade IT je počet stanovovaných pesticídov nižší.

5.2. Kvapalinová chromatografia

Využitie LC pri stanovení pesticídov sa v posledných rokoch zvýšilo. Veľa nových pesticídov, ktoré nahradzujú tradičné OCP a OPP, sa rozkladajú pri teplotách používaných v GC systémoch, a preto sú na ich separáciu vhodnejšie LC systémy. V dnešnej dobe sa LC používa prednostne pri stanovení tepelne labilných alebo neprchavých pesticídov ⁶³.

LC sa pri sledovaní pesticídov najčastejšie spája s tandemovým MS/MS ^{17,20,21,27,37,41,55,63} s využitím rôznych typov analyzátorov ako QqQ a zriedka Q-TOF. Pri LC-MS je dôležitým krokom ionizácia analytov, v prípade stanovení pesticídov v nutraceutikách sa používali dva typy techník, ionizácia elektrosprejom (ESI) ^{17,21,27,37,41,53} a chemická ionizácia pri atmosférickom tlaku (APCI) ³⁷. Chen a spol. ³⁷ porovnávali tieto dve ionizačné techniky pri

stanovení 53 pesticidov v čínskej prírodnej medicíne a zistili, že v prípade ESI sa dosiahnu nižšie hodnoty LOD. Pozorovanie vysvetlili tým, že v prípade UHPLC sa najlepšia separácia uskutoční pri prietoku $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, ale takýto prietok nie je vhodný pre APCI (cit.³⁷). Porovnávala sa aj negatívna ESI s pozitívnou ESI pri stanovení 169 pesticidov v sóji. Približne 90 % pesticidov ionizovaných v pozitívnom móde vykazovalo vysokú linearitu s koeficientom determinácie (r^2) $> 0,999$ v rozsahu koncentrácií $0,1\text{--}10 \text{ ng ml}^{-1}$; pričom v prípade negatívnej ionizácie len 50 % pesticidov malo takú vysokú hodnotu r^2 . Indikuje to, že matrica mala väčší vplyv na analýzu v prípade negatívnej ESI (cit.²¹).

QqQ sa používal vo väčšine prípadov pri stanovení zmesi pesticidov^{17,20,2737,41,63}. Vysoká selektivita SRM módu umožňuje stanoviť pesticidy aj v prípade, že nie sú chromatograficky rozlíšené¹⁷. Až 236 pesticidov bolo stanovených pomocou LC-MS/MS (cit.²⁰), s LOD hodnotami v rozsahu $0,01\text{--}16 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$. LC-MS/MS našla svoje uplatnenie aj pri stanovení chirálnych pesticidov. Na simultánne stanovenie *cis*-epoxikonazolu a indoxikarbu v čajoch sa s výhodou použila kombinácia QTOF/MS, ktorá poskytuje lepšie rozlíšenie signálu *m/z* v porovnaní s kvadrupolovým analyzátorom⁵⁵. Stanovenie viac ako 250 pesticidov a iných toxických látok v tabletkách z ginkgo biloba sa realizovalo pomocou LC-Orbitrap-MS, ktorý patrí do skupiny vysokorozlišovacích MS (HRMS)¹. HRMS umožní zvýšenie presnosti a robustnosti metódy, dovoľuje simultánne sledovanie vyššieho počtu analytov a umožní cieľnú analýzu pesticidov.

Značné komplikácie v LC-MS/MS analýze predstavujú maticové efekty. Majú negatívny vplyv na stanovenie pesticidov na nízkych koncentračných hladinách a na reprodukovateľnosť metódy³⁷. Pri LC-MS/MS technike sú maticové efekty spôsobené interferenciami z matrice, ktoré eluujú v podobných retenčných časoch ako analyty²¹. Prítomnosť interferentov má vplyv na ionizačný proces analytov, spôsobuje zvýšenie alebo zníženie signálu detektora a izobarickú interferenciu. Nutraceutiká obsahujú veľké množstvo polyfenolov a pigmentov, ktoré môžu rušiť analýzu. Izobarickú interferenciu možno eliminovať zmenou iónového páru prekursor/produkt, alebo zriadením extraktu rozpúšťadlom resp. mobilnou fázou. Zvýšenie a zníženie signálu detektora sa dá eliminovať použitím maticou značených kalibračných roztokov štandardov²⁰.

5.3. MS s priamym vstupom

FIMS (fiber introduction mass spectrometry) technika predstavuje priame spojenie SPME s MS bez chromatografickej separácie. Metódu publikovali Silva a spol.⁴⁶ na stanovenie 5 OCP a OPP z bylinkových nápojov. Pri analýze sa použilo PDMS/PVA vlákno. SPME vlákno s analytmi sa priamo vkladá do ionizačnej komory MS medzi filamentami EI zdroja a vysoká teplota a vákuum spôsobujú desorpciu analytov z vlákna. Používal sa kvadrupolový analyzátor a dosiahli sa LOD hodnoty v rozmedzí $0,3\text{--}3,9 \text{ ng ml}^{-1}$.

Metóda priamej analýzy reálnom čase (DART) patrí medzi nové ambientné MS techniky, pri ktorej sa používa vysokorozlišovací TOF analyzátor. DART sa používa namiesto ESI pri atmosferickom tlaku. V prípade nutraceutík sa DART použila na sledovanie fungicidov v pomarančovej kôre. Významnou výhodou DART je, že detekcia pesticidov trvá len niekoľko sekúnd⁷⁵.

Spektrometria založená na meraní pohyblivosti iónov (IMS) sa používala na stanovenie dichlorvosu v čajoch po úprave vzoriek pomocou SPME. Táto metóda je založená na separáciu iónov v elektrickom poli na základe ich rôznej pohyblivosti, pričom ionizácia prebieha pri atmosferickom tlaku⁷⁶.

6. Záver

V tejto práci sa diskutovali rôzne extrakčné techniky používané pre úpravu vzoriek nutraceutických produktov. Najčastejšie sa používa QuEChERS metóda, z iných techník sa ukázali byť účinnými najmä ASE, SFE a MAE. Na vzostupe je používanie mikroextrakčných techník, pričom predpokladáme, že ich aplikácie sa postupne dostanú do popredia vzhľadom na podmienky zelenej chémie. Z komplexnosti nutraceutických produktov vyplýva, že je potrebné prečistenie extraktov, čím sa zlepšia výťažnosti a presnosť metódy. Na chromatografickú separáciu sa používajú GC a LC techniky. Na identifikáciu pesticidov sa využívali rôzne detekčné systémy, pričom MS detektory už v súčasnosti nachádzajú najširšie uplatnenie, vďaka možnostiam identifikácie a konfirmácie výsledkov. Analýza reálnych vzoriek s množstvom pozitívnych nálezov poukázala na potrebu sledovania a zabezpečenia legislatívy pre kontrolu pesticidov v nutraceutikách.

Práca bola podporovaná Vedeckou grantovou agentúrou MŠ SR (VEGA projekt č. 1/0503/14). AP ďakuje Programu na podporu excelentných tímov mladých výskumníkov STU.

LITERATÚRA

- Martínez-Dominguez G., Romero-González R., Garrido-Frenich A.: *Microchem. J.* 118, 124 (2015).
- Lockwood G. B.: *J. Pharm. Pharmacol.* 63, 3 (2011).
- Defelice S. L.: *Trends Food Sci. Technol.* 17, 26 (1995).
- Andlauer W., Fürst P.: *Food Res. Int.* 35, 171 (2002).
- Gulati P., Ottaway P. B.: Botanical nutraceuticals (food supplements, fortified and functional foods) in the European Union with main focus on nutrition and health claims regulation. In D. Bagchi (ed.), *Nutraceutical and Functional Food Regulations*, s. 199–219. Elsevier, Burlington 2008.
- Martínez-Dominguez G., Plaza-Bolaños P., Romero-González R., Garrido-Frenich A.: *Talanta* 118, 277 (2014).
- López-Gutiérrez N., Romero-González R., Plaza-

- Bolaños P., Martínez Vidal J. L., Garrido-Frenich A.: *Food Chem.* 173, 607 (2015).
8. Bernal J., Mendiola J. A., Ibáñez E., Cifuentes A.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55, 758 (2011).
 9. European Botanical Forum, Quality Guide for Botanical Food Supplements- Guidance for the manufacture of sale and high quality botanical food supplements across the EU. (2011) Available from: <http://www.botanicalforum.eu/uploads/11076EBF%20Artwork%201%20Web.pdf>, staženo 15.1.2016.
 10. Kowalski J., Misselwitz M., Thomas J., Cochran J.: *LCGC North Am.* 28, 972 (2010).
 11. Páleníková A., Martínez-Dominguez G., Arrebola F. J., Romero-González R., Hrouzková S., Garrido-Frenich A.: *Food Chem.* 171, 796 (2015).
 12. Nieto-García A. J., Romero-González R., Garrido-Frenich A.: *Food Control* 47, 369 (2015).
 13. Sarafraz-Yazdi A., Amiri A.: *Trends Anal. Chem.* 29, 1 (2010).
 14. Hwang B. H., Lee M. R.: *J. Chromatogr. A* 898, 245 (2000).
 15. Łozowicka B., Jankowska M., Rutkowska E., Hryńko I., Kaczyński P., Maciński J.: *J. Nat. Med.* 68, 95 (2014).
 16. Dai R., Ren X., He X., Huo Y.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 86, 559 (2011).
 17. Chen L., Song F., Liu Z., Zheng Z., Xing J., Liu S.: *J. Chromatogr. A* 1225, 132 (2012).
 18. Hayward D. G., Wong J. W., Shi F., Zhang K., Lee N. S., DiBenedetto A. L., Hengel M. J.: *Anal. Chem.* 85, 4686 (2013).
 19. Rai V., Kakkar P., Misra C., Ojha S. K., Sirvastava N., Mehrotra S.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 79, 269 (2007).
 20. Chen Y., Al-Taher F., Juskelis R., Wong J. W., Zhang K., Hayward D. G., Zweigenbaum J., Stevens J., Cappozzo J.: *J. Agric. Food Chem.* 60, 9991 (2012).
 21. Pizzutti R. I., de Kok A., Hiemstra M., Wickert C., Prestes O. D.: *J. Chromatogr. A* 1216, 4539 (2009).
 22. Ho Y. M., Tsoi Y. K., Leung K. S. Y.: *Anal. Chim. Acta* 775, 58 (2013).
 23. Anastassiades M., Lehotay S. J., Štajnbaher D., Schenck F. J.: *J. AOAC Int.* 86, 412 (2003).
 24. Dai R., Ren X., He X., Huo Y.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 86, 559 (2011).
 25. Nguyen T. D., Lee K. J., Lee M. H., Lee G. H.: *Microchem. J.* 95, 43 (2010).
 26. Wong J. W., Hennessy M. K., Hayward D. G., Krynitisky A. J., Cassias I., Schenck F. J.: *J. Agric. Food Chem.* 55, 1117 (2007).
 27. Chen L., Yin L., Song F., Liu Z., Zheng Z., Xing J., Liu S.: *J. Chromatogr. B* 917-918, 71 (2013).
 28. Zhao C., Hao G., Li H., Luo X., Chen Y.: *Biomed. Chromatogr.* 20, 857 (2006).
 29. Mao X., Wan Y., Yan A., Shen M., Wei Y.: *Talanta* 97, 131 (2012).
 30. Xu R., Wu J., Liu Y., Zhao R., Chen B., Yang M., Chen J.: *Chemosphere* 84, 908 (2011).
 31. Qing G., Xia L., Bo-Yang Y.: *Chin. J. Nat. Med.* 7, 210 (2009).
 32. Guo Q., Deng M., Yu B., Tan L.: *J. AOAC Int.* 93, 295 (2010).
 33. Tagami T., Kajimura K., Nomura C., Taguchi S., Iwagami S.: *Yakugaku Zasshi* 129, 173 (2009).
 34. Qian G., Rimao H., Feng T., Xiangwei W., Xuede L., Haiqun C., Yanhong S., Jun T.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 84, 779 (2010).
 35. Tong H., Tong Y., Xue J., Liu D., Wu X.: *Food Anal. Methods* 7, 135 (2014).
 36. Wang Y., Jin H. Y., Ma S.C., Lu J., Lin R.C.: *J. Chromatogr. A* 1218, 334 (2011).
 37. Chen L., Yin L., Song F., Liu Z., Zheng Z., Xing J., Liu S.: *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 1481 (2014).
 38. Du G., Song Y., Wang Y.: *J. Sep. Sci.* 34, 3372 (2011).
 39. Wan Y. Q., Mao X. J., Yan A. P., Shen M. Y., Wu Y. M.: *Biomed. Chromatogr.* 24, 961 (2010).
 40. Ahmed F. E.: *Trends Anal. Chem.* 20, 649 (2001).
 41. Jia Z., Mao X., Chen K., Wang K., Ji S.: *J. AOAC Int.* 93, 1570 (2010).
 42. Campillo N., Peñalver R., Hernández-Córdoba M.: *Talanta* 71, 1417 (2007).
 43. Oellig C., Schwack W.: *J. Chromatogr. A* 1260, 42 (2012).
 44. Schurek J., Protolés T., Hajšlová J., Riddellová K., Hernández F.: *Anal. Chim. Acta* 611, 163 (2008).
 45. Budziak D., Martendal E., Carasek E.: *J. Sep. Sci.* 31, 2875 (2008).
 46. Silva R. C., Zuin V. G., Yariwake J. H., Nogueira E., Augusto F.: *J. Mass Spectrom.* 42, 1358 (2007).
 47. Huang S. P., Huang S. D.: *J. Chromatogr. A* 1135, 6 (2006).
 48. Pakade Y. B., Sharma R., Nadda G., Tewary D. K.: *Int. J. Food Prop.* 16, 745 (2013).
 49. Qian L., He Y.: *J. Chromatogr. A* 1134, 32 (2006).
 50. Steiniger D., Lu G., Butler J., Phillips E., Fintschenko Y.: *J. AOAC Int.* 93, 1169 (2010).
 51. Čajka T., Sandy C., Bachanová V., Drabová L., Kalachová K., Pulkrabová J., Hajšlová J.: *Anal. Chim. Acta* 743, 51 (2012).
 52. Lozano A., Rajski Ł., Belmonte-Valles N., Uclés A., Uclés S., Mezcua M., Fernández-Alba A. R.: *J. Chromatogr. A* 1268, 109 (2012).
 53. Liu Q., Kong W., Qiu F., Wei J., Yang S., Zheng Y., Yang M.: *J. Chromatogr. B* 885-886, 90 (2012).
 54. Cai L., Xing J., Dong L., Wu C.: *J. Chromatogr. A* 1015, 11 (2003).
 55. Zhang X., Luo F., Lou Z., Lu M., Chen Z.: *J. Chromatogr. A* 1359, 212 (2014).
 56. Fan C. L., Chang Q. Y., Pang G. F., Li Z. Y., Kang J., Pan G. Q., Zheng S. Z., Wang W. W., Yao C. C., Ji X. X.: *J. AOAC Int.* 96, 432 (2013).
 57. Li Y., Chen X., Chunlin F., Guofang P.: *J. Chromatogr. A* 1266, 131 (2012).
 58. Pang G. F., Fan C. L., Chang Q. Y., Li Y., Kang J., Wang W. W., Cao J., Zhao Y. B., Li N., Li Z. Y.,

- Chen Z. M., Luo F. J., Lou Z. Y.: *J. AOAC Int.* 96, 887 (2013).
59. Naithani V., Kakkar P.: *Arch. Environ. Health* 59, 426 (2004).
 60. Shanker A., Sood C., Kumar V., Ravindranath S. D.: *Pest Manage. Sci.* 57, 458 (2001).
 61. Martínez-Dominguez G., Nieto-García A. J., Romero-González R., Garrido-Frenich A.: *Food Chem.* 177, 182 (2015).
 62. Páleníková A., Martínez-Dominguez G., Arrebola F. J., Romero-González R., Hrouzková S., Garrido-Frenich A.: *Food Anal. Methods* 8, 2194 (2015).
 63. Martínez-Dominguez G., Plaza-Bolaños P., Romero-González R., Garrido-Frenich A.: *J. Sep. Sci.* 37, 666 (2014).
 64. Maštovská K., Wylie P.: *J. Chromatogr. A* 1265, 155 (2012).
 65. Jia W., Chu X., Zhang F.: *J. Chromatogr. A* 1395, 160 (2015).
 66. Mosaddegh M. H., Emami F., Asghari G.: *Iran. J. Pharm. Res.* 12, 541 (2014).
 67. Tagami T., Kajimura K., Takagi S., Satsuki Y., Nakamura A., Okihashi M., Akutsu K., Obana H., Kitagawa M.: *J. Pharm. Soc. Jpn.* 127, 1167(2007).
 68. Yoon H. R., Cho S. Y., Kim J. M., Yoon I. B., Park M. K., Park J. H.: *Chromatographia* 49, 525 (1999).
 69. Miller K. D., Milne P.: *J. AOAC Int.* 91, 202 (2008).
 70. Pereira dos Anjos J., de Andrade J. B.: *Microchem. J.* 112, 119 (2014).
 71. Ling Y. C., Teng H. C., Cartwright C.: *J. Chromatogr. A* 835, 145 (1999).
 72. Nevado J. J. B., Rodríguez R. C., Guzmán F. J. B., Farinas N. R., Cogolludo J. M. G., Osma J. A. C.: *Talanta* 81, 887 (2010).
 73. Wu F., Lu W., Chen J., Liu W., Zhang L.: *Talanta* 82, 1038 (2010).
 74. SANTE /11945/2015 Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. European Commission Directorate –General for Health and Food Safety, Brussels, Belgium, 2015, Available from: http://ec.europa.eu/food/plant/docs/plant_pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945_en.pdf, staženo 15.1.2016.
 75. JEOL AccuTOF mass spectrometer with DART application data, Rapid detection of fungicide in orange peel. (2010) Available from: <http://www.jeol.com>, staženo 15.1.2016.
 76. Wang J. X., Gao X. G., Jia J., Li J. P., He X. L.: *Chinese J. Anal. Chem.* 43, 1193 (2015).

A. Páleníková and S. Hrouzková (*Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Analytical Chemistry, Bratislava*): **Present State and Trends in Extraction of Pesticide Residues in Nutraceuticals**

The main objective of the review is a discussion of various extraction techniques used for analysis of different types of nutraceuticals. It is shown that the most frequently used technique is the QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) method; other effective techniques are accelerated solvent extraction, supercritical fluid extraction, and microwave assisted extraction. On the other hand, the application of microextraction techniques is on the rise. It can be expected that these techniques will prevail because they reduce or eliminate the volume of toxic solvents required for extraction. The use of clean up steps following the extraction is recommended to obtain satisfactory recoveries and to minimize the matrix effect. The most frequently used techniques for determination of pesticides in nutraceuticals are GC or HPLC in combination with MS or MS-MS. Analysis of real samples with a number of positive findings endorse the idea that a deeper and continuous investigation of pesticide residues in nutraceutical products is necessary in order to guarantee consumer's safety.