	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10595.1 – Stanovení obsahu polybromovaných difenyleterů metodou GC-MS	Revize	1

STANOVENÍ OBSAHU POLYBROMOVANÝCH DIFENYLETERŮ METODOU GC-MS

1 Účel a rozsah

Postup je určen pro kvantitativní stanovení vybraných kongenerů polybromovaných difenyletherů (PBDE) v krmných surovinách (rybí moučka, rybí tuk). Za podmínek daných tímto postupem lze dosáhnout detekčních limitů (0,04 – 0,08) µg/kg sušiny vzorku.


2 Princip

PBDE se z předupraveného vzorku extrahují do dichlorometanu metodou tlakové extrakce rozpouštědlem (PLE) nebo Soxhletovy extrakce horkým rozpouštědlem. Extrakt se obohatí přidavkem vnitřního standardu s isotopově značenými PBDE (¹³C-PBDE), převede se do hexanu, přečistí se třepáním s koncentrovanou kyselinou sírovou. Po odstředění se hexanová fáze dočistí pomocí silikagelu modifikovaného kyselinou sírovou, převede se do isooktanu a zanalyzuje metodou plynové chromatografie s tandemovou hmotnostně selektivní detekcí (GC-MS/MS). Alternativním způsobem přípravy vzorku k analýze PBDE je aplikace preparativní adsorpční chromatografie na kombinované silikagelové koloně. Obsahy PBDE se vyhodnotí z kalibrační závislosti plochy diagnostického iontu jednotlivých analytů na koncentraci příslušného analytu v roztoku směšného standardu, obsahujícím všechny požadované látky a vnitřní standardy.


3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, nejlépe kvality pro reziduální analýzu.

- 1 Hexan pro reziduální analýzu.
- 2 Dichlormetan pro reziduální analýzu, DCM.
- 3 Eluční směs 50% DCM v hexanu.
- 4 Eluční směs 20% DCM v hexanu.
- 5 Eluční směs 2% DCM v hexanu.
- 6 Isooktan pro reziduální analýzu.
- 7 Koncentrovaná kyselina sírová p.a., H₂SO₄.
- 8 Hydroxid sodný, NaOH, roztok, c = 1 mol/l.
Příprava: 4 g NaOH se rozpustí v odměrné baňce ve 100 ml vody (25).
- 9 Dusičnan stříbrný, AgNO₃.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10595.1 – Stanovení obsahu polybromovaných difenyleterů metodou GC-MS	Vydání	1
		Revize	1

- 10 Silikagel 100 (0,063 mm – 0,200 mm), aktivovaný při 150 °C/12 h, uchovávaný v zábrusové lahvi v exsikátoru.
- 11 Kyselý silikagel 50%.
Příprava: Smíchá se 50 g silikagelu (10) s 50 g H₂SO₄ (7) a třepe se, až je směs sypká. Uchovává se v zábrusové lahvi v exsikátoru.
- 12 Silikagel 60 (0,063 mm – 0,200 mm), aktivovaný při 250 °C/12 h, uchovávaný v zábrusové lahvi v exsikátoru.
- 13 Kyselý silikagel 44%.
Příprava: Smíchá se 56 g silikagelu (12) s 44 g H₂SO₄ (7) a třepe se, až je směs sypká. Uchovává se v zábrusové lahvi v exsikátoru.
- 14 Zásaditý silikagel.
Příprava: Smíchá se 33 g silikagelu (12) se 17 g NaOH (8) a třepe se, až je směs sypká. Uchovává se v zábrusové lahvi v exsikátoru.
- 15 Stříbrný silikagel.
Příprava: Smíchá se 45 g silikagelu (12) s 5 g AgNO₃ (9), který byl před smícháním rozpuštěn ve 20 ml vody (25). Směs se důkladně promíchá a vysuší se při 120 °C/8 h, a uchovává se v tmavé zábrusové lahvi v exsikátoru.
- 16 Síran sodný bezvodý, Na₂SO₄, aktivovaný při 550 °C/12 h. Uchovává se v zábrusové lahvi v exsikátoru.
- 17 Křemenná vata silanizovaná.
- 18 Mořský písek, vyžíhaný při 550 °C/12 h.
- 19 Hydroskopická matrice, např. Speed-Matrix.
- 20 Standardy (viz.tabulka 1 a 2).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10595.1 – Stanovení obsahu polybromovaných difenyleterů metodou GC-MS	Revize	1

Tabulka 1. Seznam standardů PBDE.

PBDE	Zkratka	Vzorec	Molekulová hmotnost (g/mol)
2,4,4'-Tribromodifenylether	BDE28	C ₁₂ H ₇ Br ₃ O	406,91
2,2',4,4'-Tetrabromodifenylether	BDE47	C ₁₂ H ₆ Br ₄ O	485,81
2,3',4,4'-Tetrabromodifenylether	BDE66	C ₁₂ H ₆ Br ₄ O	485,81
2,2',4,4',6-Pentabromodifenylether	BDE100	C ₁₂ H ₅ Br ₅ O	564,71
2,2',4,4',5-Pentabromodifenylether	BDE99	C ₁₂ H ₅ Br ₅ O	564,71
2,2',3,4,4'-Pentabromodifenylether	BDE85	C ₁₂ H ₅ Br ₅ O	564,71
2,2',4,4',5,6'-Hexabromodifenylether	BDE154	C ₁₂ H ₄ Br ₆ O	643,61
2,2',4,4',5,5'-Hexabromodifenylether	BDE153	C ₁₂ H ₄ Br ₆ O	643,61
2,2',3,4,4',5',6-Heptabromodifenylether	BDE183	C ₁₂ H ₃ Br ₇ O	722,51


Tabulka 2. - Seznam izotopově značených vnitřních standardů ¹³C-PBDE.

¹³ C-PBDE	Zkratka	Vzorec	Molekulová hmotnost (g/mol)
2,4,4'-Tribromo[¹³ C ₁₂]difenylether	¹³ C-BDE28	¹³ C ₁₂ H ₇ Br ₃ O	418,80
2,2',4,4'-Tetrabromo[¹³ C ₁₂]difenylether	¹³ C -BDE47	¹³ C ₁₂ H ₆ Br ₄ O	497,70
3,3',4,4'-Tetrabromo[¹³ C ₁₂]difenylether	¹³ C -BDE77	¹³ C ₁₂ H ₆ Br ₄ O	497,70
2,2',4,4',6-Pentabromo[¹³ C ₁₂]difenylether	¹³ C -BDE100	¹³ C ₁₂ H ₅ Br ₅ O	576,60
2,2',4,4',5-Pentabromo[¹³ C ₁₂]difenylether	¹³ C -BDE99	¹³ C ₁₂ H ₅ Br ₅ O	576,60
2,2',4,4',5,6'-Hexabromo[¹³ C ₁₂]difenylether	¹³ C -BDE154	¹³ C ₁₂ H ₅ Br ₅ O	576,60
2,2',4,4',5,5'-Hexabromo[¹³ C ₁₂]difenylether	¹³ C -BDE153	¹³ C ₁₂ H ₄ Br ₆ O	655,50
2,2',3,4,4',5'-Hexabromo[¹³ C ₁₂]difenylether	¹³ C -BDE138	¹³ C ₁₂ H ₄ Br ₆ O	655,50
2,2',3,4,4',5',6-Heptabromo[¹³ C ₁₂]difenylether	¹³ C -BDE183	¹³ C ₁₂ H ₃ Br ₇ O	734,39

21 Směsné standardy:

BDE-MXF: Směsný standard nativních PBDE pro kvantifikaci; 2000 ng/ml nonanu, (Wellington, Kanada).

MBDE-MXFS: Směsný standard izotopově značených PBDE, surrogate; 2000 ng/ml nonanu, (Wellington, Kanada).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10595.1 – Stanovení obsahu polybromovaných difenyleterů metodou GC-MS	Revize	1

MBDE-MXFR: Směsný standard izotopově značených PBDE, recovery; 2000 ng/ml nonanu, (Wellington, Kanada).

BDE 209: 50 µg/ml toluenu, (AccuStandard, USA).

MBDE-209: Izotopově značený BDE209; (25 ± 1,2) µg/ml nonanu, (Wellington, Kanada).

22 Standardní roztoky:

Pracovní roztok BDE-MXF: 500 ng (jednotlivých BDE) v 1 ml isooktanu.

Pracovní roztok BDE-MXF: 50 ng (jednotlivých BDE) v 1 ml isooktanu.

Pracovní roztok MBDE-MXFS surrogate standardu: 500 ng (jednotlivých 13C-BDE) v 1 ml isooktanu. Pipetuje se (20 – 100) µl k (1 – 5) g vzorku.

Pracovní roztok nástřikového standardu: 500 ng (jednotlivých 13C-BDE) v 1 ml isooktanu.

23 Kalibrační standardní roztoky:

Připraví se ze standardních roztoků (22) v koncentračním rozsahu (0 – 500) ng v 1 ml isooktanu (viz. tab. 3).


Tabulka 3. Příprava kalibračních standardních roztoků.

Kalibrační úroveň	c (ng/ml)			V (µl)				
	BDE-MXF	MBDE-MXFS	MBDE-MXFR	BDE-MXF	MBDE-MXFS	MBDE-MXFR	isooktan	celkový
1	0	100	100	0	40	40	120	200
2	1	100	100	4 (50 ng/ml)	40	40	116	200
3	5	100	100	2 (500 ng/ml)	40	40	118	200
4	20	100	100	8 (500 ng/ml)	40	40	112	200
5	100	100	100	40 (500 ng/ml)	40	40	80	200
6	500	100	100	50 (2000 ng/ml)	40	40	70	200

24 Referenční materiály:

WMF-01: Reference Fish Tissue for Organic Contam. Analysis (Wellington, Kanada).

25 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10595.1 – Stanovení obsahu polybromovaných difenyleterů metodou GC-MS	Vydání	1
		Revize	1

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem, např:
GC-MS/MS: CP 3800/Varian 1200, software Workstation MS (Varian).
GC-MS/MS: GC Trace Ultra/ITQ 1100, software Xcalibur (Thermo).
- 2 Kapilární kolona, např.:
Rapid-MS 10 m × 0,25 mm × 0,25 μm (Varian).
DB5-MS 15 m × 0,25 mm × 0,10 μm (Agilent J&W).
DB-XLB 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm (Agilent J&W).
- 3 Extraktor, např.:
ASE 100 s příslušenstvím (rozebíratelné nerezové cely a celulózové filtry), (Dionex).
B-811 pro Soxhletovu extrakci horkým rozpouštědlem, (Buchi).
- 4 Stolní chlazená odstředivka, např.: Sigma 2-16K (Sigma).
- 5 Muflová pec s T min do 600 °C.
- 6 Ultrazvuková lázeň.
- 7 Horizontální třepačka.
- 8 Rotační vakuová odparka (RVO).
- 9 Zařízení pro odpařování proudem inertního plynu.
- 10 Skleněné kolonky pro sloupcovou chromatografii (SPE):
Minikolona o velikosti 12 mm × 60 mm s rezervoárem 24 mm × 60 mm.
Kolona na silikagel o velikosti 20 mm × 170 mm s rezervoárem 34 mm × 75 mm.
- 11 Odměrné sklo (hamiltonky, odměrné baňky, odměrné válce).
- 12 Laboratorní sklo (kádinky, vialky, pasteurovy pipetky, inserty o objemu 250 μl).
- 13 Exsikátor.


5 Postup

5.1 Extrakce

Podle typu matrice se zvolí optimální způsob extrakce.

5.1.1 Automatický extraktor ASE

Vzorek (1 g až 5 g) se smíchá s odpovídajícím množstvím (1 až 3 násobek navážky vzorku) bezvodého síranu sodného (16). Směs se nasype do nerezové cely o objemu 11 ml, obohatí se směsným izotopově značeným vnitřním standardem (22) (10 ng jednotlivých ¹³C-BDE/1 g vzorku), zbývající prostor se vyplní inertním materiálem (18) a lože se ukončí 2mm vrstvou

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10595.1 – Stanovení obsahu polybromovaných difenyleterů metodou GC-MS	Revize	1

hydroskopické matrice (19). Uzavřená cela se umístí do přístroje ASE 100 (3) a extrahuje se DCM (2) podle předvoleného programu:

T = 100 °C; čas (statická fáze/profouknutí) = 300/60 s, proplach = 50 %, 3 extrakční cykly. Extrakt se převede pomocí isooktanu (6) do 100ml baňky a zkoncentruje se pomocí RVO (8) při 40 °C na ~ 1 ml extraktu.

5.1.2 Automatický extraktor Büchi B-811

Do skleněné patrony s fritou se vloží 1 g až 5 g vzorku zabalené v buničině. Vzorek se obohatí přídatkem směsného izotopově značeného vnitřního standardu (22) (10 ng jednotlivých ¹³C-BDE/1 g vzorku). Extrakční kelímek se naplní 80 ml až 100 ml DCM (2) a vloží se do něj varný kamínek. Délka extrakce je 1 h (20 min horký Soxhlet a 40 min promytí patrony). Poté se extrakt zkoncentruje na ~ 5 ml, převede se pasteurkou pomocí isooktanu (6) do 100ml baňky a zkoncentruje na RVO (8) při 40 °C na ~ 1 ml extraktu.

5.2 Čištění extraktu

Podle typu matrice a vzhledu extraktu se zvolí optimální kombinace čištění.

5.2.1 Třepání s koncentrovanou H₂SO₄


Podíl extraktu odpovídající navážce 1 g vzorku se převede pasteurkou do 15ml zábrusové odměrné zkumavky a objem extraktu se upraví hexanem (1) na 5 ml. K podílu se přidá 10 ml koncentrované H₂SO₄ (7) a zkumavka se uzavře zábrusovou zátkou. Obsah se promíchá pomalým převrácením obsahu zkumavky do odbarvení hexanové vrstvy a zkumavka se odplyňuje. Zkumavku bez zábrusové zátky se odstředí 3 min při 2000 ot/min. Přechištěný extrakt se odebere do 20ml vialky. Do zkumavky se přidá 1 ml hexanu, protřepe se, odstředí a hexanová vrstva se přidá k hlavnímu podílu. Spojené hexanové podíly se zkoncentrují odfoukáním pod dusíkem na 1 ml až 2 ml pro následné dočištění.

5.2.2 Dočištění na minikolonce s modifikovaných kyselým silikagem

Do krátké skleněné kolonky (10) se vloží smotek křemenné vaty a naplní se 1 g bezvodého Na₂SO₄ (16) a 3 g kyselého silikagelu (11). Na čerstvě připravenou kolonku se nanese přechištěný extrakt (5.1.1 nebo 5.1.2) a k eluci se použije 10 ml hexanu (1), který se jímá do 50ml srdcovky. Eluát se odpaří na RVO na objem ~ 1 ml, převede se do vialky, pod proudem dusíku se zkoncentruje na objem 80 µl, převede se do insertu s nástříkovým izotopově značeným směsným standardem (10 ng jednotlivých ¹³C-BDE/1 g vzorku) (22).

5.2.3 Adsorpční chromatografie na kombinované silikagelové koloně

Na dno skleněné kolony (10) se umístí smotek silanizované vaty a dále 2,5 g stříbrného silikagelu (15), 1 g aktivovaného silikagelu (12), 2,5 g zásaditého silikagelu (14), 1 g aktivovaného silikagelu (12), 5 g kyselého silikagelu (13), 1 g aktivovaného silikagelu (12), 5 g Na₂SO₄ (16). Kolona se promyje 15 ml hexanu (1). Po promytí se na lože nanese ~ 2 ml surového extraktu a zásobní vialka po extraktu se 2 × vypláchne hexanem, podíly se nanesou

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	7
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10595.1 – Stanovení obsahu polybromovaných difenyleterů metodou GC-MS	Revize	1

postupně na kolonu. Eluce se provede 25 ml hexanu (1) a 30 ml 20% DCM v hexanu (4). Do eluátu se přidá 1 ml isooktanu a zkoncentruje se na RVO (8) při 40 °C na ~ 1 ml extraktu a následným odfoukáním pod dusíkem na 80 µl a převede do insertu s nástřikovým izotopově značeným směsným standardem (10 ng jednotlivých ¹³C-BDE/1 g vzorku) (22).

5.3 GC-MS/MS stanovení

5.3.1 Chromatografické podmínky

Plynový chromatograf (1) s nepolární kapilární kolonou (2). Nastavení přístroje a podmínky měření jsou uvedeny v měřicí metodě příslušného ovládacího programu použité přístrojové sestavy.

5.3.2 Podmínky pro hmotnostní spektrometrii

Elektronová ionizace (EI) při 70 eV, měření v MS/MS módu, pro každý analyt se snímají dva produktové ionty. Kompletní nastavení je uvedeno v aktuální měřicí metodě použité přístrojové sestavy.

5.3.3 Měření

Před analýzou se zkontroluje aktuální stav MS. Systém musí vykazovat typické odezvy na ionty vody a vzduchu (m/z 18, 28, 32) a kalibračního plynu. Prověří se citlivost GC-MS systému analýzou nejnižšího kalibračního bodu. Pokud je poměr signál k šumu u všech sledovaných kongenerů větší než 10, provede se kalibrace pro všechny sledované kongenery PBDE. Následně se do sekvence řadí reálné vzorky tak, aby před analýzou každého vzorku bylo do systému nastříknuto rozpouštědlo.

6 Kontrola kvality


U všech stanovení se používá metoda izotopového ředění, přídavek izotopově značených vnitřních standardů se přidává do extraktu vzorku a výtěžnost postupu se průběžně kontroluje přidávkem nástřikového standardu do finálního extraktu.

Do série vzorků se průběžně zařazuje analýza kontrolních vzorků referenčních materiálů a procesní slepý vzorek. Pro tyto kontrolní vzorky se vede a vyhodnocuje regulační diagram.

7 Výpočet a vyjádření výsledků

Analyt se považuje za identifikovaný, pokud odchylka retenčního času daného kongeneru v chromatogramu vzorku a kalibračního standardu je menší než 1 % a pokud poměr produktových iontů daného kongeneru ve spektru vzorku je v rozmezí ± 50 % poměru ve spektru kalibračního standardu.

Kvantifikace se provede pomocí kalibrační přímky metodou izotopového ředění, případně metodou vnitřního standardu. Kalibrační závislosti musí vykazovat minimální charakteristiky (RSD < 20 %, R² > 0,995).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	8
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10595.1 – Stanovení obsahu polybromovaných difenyleterů metodou GC-MS	Vydání	1
		Revize	1

Výtěžnost vnitřních standardů v každém vzorku se stanoví porovnáním hodnot vnitřního a nástřikového standardu získaných při kalibraci s těmito hodnotami získanými z extraktu vzorků. Vnitřní standardy by měly vykazovat výtěžnost minimálně 50 %.

Výsledky se získají průměrem ze dvou paralelních stanovení. V případě výsledku pod mezí detekce LOD se uvede n.d.(nedetekováno), v intervalu nad mezí detekce do meze stanovitelnosti se uvede <LOQ (mez stanovitelnosti). Pro hodnoty nad mezí stanovitelnosti se výsledek zaokrouhlí podle tabulky 4.

Tabulka 4. Zaokrouhlování a udávání výsledků.

Hladina reziduí (µg/kg)	Zápis výsledků
< 10	2 platné číslice
> 10	3 platné číslice

8 Validační data

Za podmínek daných tímto postupem lze pro jednotlivé kongenery PBDE dosáhnout meze detekce (0,04 – 0,08) µg/kg sušiny vzorku.

Nastavená mez stanovitelnosti pro zápis výsledků RL = 0,1 µg/kg pro všechny stanovované kongenery.