

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2007

Ročník XI, číslo 1/2007

Brno 2007

Obsah

1. **Zavedení stanovení zearalenonu v obilovinách, krmných surovinách a podobných matricích metodou ELISA** 1

Jana Stehlíková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský,
NRL - Oddělení mikrobiologie a biochemie,
Hroznová 2, 656 06 Brno

2. **Stanovení ochratoxinu A, deoxynivalenolu, zearalenonu, aflatoxinů a fumonisinů metodou HPLC nebo LC/MS/MS v krmivech** 12

Marie Mrkvicová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL - RO Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno

3. **Stanovení vybraných OCP v krmivech metodou GC-NCI-MS** 47

Petra Kosubová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL - RO Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno

4. **Hodnocení účinnosti feromonových odparníků** 55

Přemysl Fiala
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OHP - Oddělení lesnické Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno

Pavla Tieffová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL - RO Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Plné znění Bulletinů NRL (včetně grafů a obrázků) najdete i na našich webových stránkách v části věnované Národní referenční laboratoři (<http://www.ukzuz.cz>).

Zavedení stanovení zearalenonu v obilovinách, krmných surovinách a podobných matricích metodou ELISA

Jana Stehlíková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL - Oddělení mikrobiologie a biochemie,
Hroznová 2, 656 06 Brno
jana.stehlikova@ukzuz.cz

1 Úvod

Mykotoxiny jsou sekundární toxické metabolity vláknitých mikromycetů patřící mezi významné toxiny přírodního původu. Mykotoxiny jsou strukturně odlišné komplexní organické sloučeniny nebiřkovinné povahy, toxické pro člověka a ostatní živé organizmy. V současné době je známo přes 300 mykotoxinů a nadále jsou objevovány a chemicky charakterizovány nové.

Mykotoxin zearalenon (F-2 toxin), podle Chemical abstracts – {6[10-Hydroxy-6-oxo-trans-1-undeceny]-2,4-dihydroxybenzoic acid lactone}, je z hlediska chemické struktury lakton kyseliny β -ressorcylové. Zearalenony produkují zejména toxinogenní kmeny rodu *Fusarium*. Hlavním druhem v produkci zearalenonů je *Fusarium graminearum* (= *F. roseum*, nepohlavní forma *Gibberella zeae*), která široce infikuje krmivářské a potravinářské obilí a je schopna produkovat až 1900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ toxinu v sušině. V současné době je izolováno 15 derivátů základní struktury zearalenonu.

Vzhledem ke své chronické toxicitě představuje zearalenon zdravotní riziko pro člověka i hospodářská zvířata. Zearalenon je ve skladovaných komoditách velmi stabilní a jeho koncentrace se výrazně nemění ani po tepelném zpracování či fermentaci.

Při kontaminaci zrna fuzárií dochází často k souběžnému výskytu zearalenonu a trychotecenových toxinů.

Zearalenon byl nalezen například v obilovinách a výrobcích z nich – ječmen, slad, pivo, kukuřice, oves, pšenice, dále v ořechách, banánech, ale i koření, olejích a podobně.

Pro detekci zearalenonu v potravinách a krmivech se nejvíce používají fyzikálně-chemické metody jako je HPLC, HPLC-MS, GC-MS, TLC, HPTLC. Vedle toho už patří k rozšířeným metodám imunoenzymatické metody postavené na komerčně vyráběných diagnostických kitech - ELISA. V současné době je na trhu řada výrobců, kteří nabízejí diagnostiku v různých variantách složitosti, přesnosti a citlivosti.

Laboratoř imunologické diagnostiky NRL-OMB začala s testováním vzorků na přítomnost zearalenonu v roce 2006. Jedná se jak o provádění screeningu, tak i o kvantitativní stanovení. Pro analýzu jsou využívány detekční kity řady RIDASCREEN FAST firmy R- Biopharm AG, Germany. Používaný diagnostický kit Ridascreen fast Zearalenon není ověřený AOAC & FGIS. Cílem validace bylo stanovit základní validační parametry.

V rámci této práce byla zavedena a částečně validována metoda Stanovení zearalenonu v obilovinách, krmných surovinách a podobných matricích metodou ELISA. Byly stanoveny parametry přesnost, opakovatelnost, výtěžnost a nejistoty metody.

2 Materiál a metody

Základem pro provedení analýz je diagnostický kit Ridascreen fast Zearalenon, R- Biopharm AG, Germany. Analýza je prováděna dle návodu dodávaného výrobcem diagnostiky.

Test je založen na reakci antigen – protilátka. Na stěny jamky mikrotitrační destičky je navázána protilátka specifická k antigenu – mykotoxinu. Po postupné aplikaci vzorku/standardu, protilátky mykotoxinu a enzymového konjugátu mykotoxinu dojde ke kompetitivní imunoenzymatické reakci. Vázaný antigen (konjugát) a volný antigen (mykotoxin ze vzorku/standardu) soutěží o omezený počet vazebných míst na molekulách protilátky.

Pro vizualizaci se používá substrát, který reaguje s navázaným konjugátem za vzniku zbarvení. Po zastavení reakce pomocí stop činidla se barva změní a zbarvení je po určité době stabilní. Detekce se provádí spektrofotometricky při vhodné vlnové délce (450 nm). Absorbance je nepřímo úměrná koncentraci mykotoxinu. Kvantitativní vyhodnocení se provádí metodou kalibrační křivky.

2.1 Přístroje a zařízení

1. Laboratorní šrotovník MM, laboratorní mlýn nožový VM-7;
2. Analytické váhy;
3. Elektromagnetické míchadlo;
4. pH-metr;
5. Automatické pipety s nastavitelným objemem (50 – 1000) μ l, špičky;
6. Multikanálová automatická pipeta s nastavitelnými objemy (50 –100) μ l, špičky;
7. Zařízení pro filtraci (filtrační nálevky, filtrační papír Whatman No.1);
8. Lednice;
9. Spektrofotometr pro 96 jamkové mikrotitrační destičky, měřící při vlnové délce 450 nm.

2.2 Chemikálie a roztoky

2.2.1 Diagnostický kit

Ridascreen fast Zearalenon, R- Biopharm AG, Germany, R 5502 (48 jamek).

Tento kit obsahuje

1. Mikrotitrační destičku stripového charakteru se 48 jamkami;
2. Řadu pěti kalibračních roztoků: (0; 50; 100; 200; 400) ppb - pro přímé použití;
3. Konjugát (peroxidázou značený deoxynivalenol) - pro přímé použití;
4. Deoxynivalenol protilátka - pro přímé použití;
5. Promývací pufr (směs k přípravě);
6. Substrát (chromogen) - pro přímé použití;
7. Stop činidlo (kyselina sírová) - pro přímé použití.

2.2.2 Certifikované referenční materiály – CRM

Pro interní kontrolu a potřeby validace byl při provádění analýz zařazován níže uvedený CRM.

Tabulka č. 1: Přehled použitých certifikovaných referenčních materiálů

Výrobce	Deklarovaný obsah DON	Matrice/druh kontaminace
R-Biopharm Rhone Limited, Germany	648 ppb ± 140 ppb (HPLC)	Proso / přirozená kontaminace

2.2.3 Potřebné chemikálie nedodávané v rámci kitů

1. Destilovaná, deionizovaná voda;
2. Metanol, p.a.;
3. Chlornan sodný, pro dekontaminaci skla a zařízení;
4. Etanol, technický, pro dekontaminaci skla a zařízení.

2.3 Vzorky

Výsledky byly získány analýzou vzorků odebíraných v rámci hodnocení provokačních pokusů Odboru odrůdového zkušebnictví. Dále byly využity dostupné referenční materiály a výsledky vzorků testovaných NRL- RO Brno metodou HPLC.

2.4 Pracovní postup

2.4.1 Příprava vzorku

Z dodaného vzorku se odebere reprezentativní část pro pomletí. Malé vzorky jsou mlety celé. Doporučený je průměr částic menší než 1 mm.

Zařízení, nástroje a pracovní plocha se po práci se vzorkem dekontaminuje 2% roztokem chlornanu sodného nebo jiným vhodným dekontaminačním roztokem.

Do extrakční nádoby se přesně naváží 5 g pomletého vzorku a přidá 25 ml 70% metanolu. Extrahuje se 3 minuty. Pro extrakci lze použít míchání, třepání a pod. Extrakční směs se přefiltruje přes filtrační papír Whatman 1 nebo jemu odpovídající.

Přefiltrovaný extrakt se zředí destilovanou vodou v poměru 1 : 1. Takto připravený vzorek je možno použít pro analýzu.

2.4.2 Postup analýzy

1. Všechny součásti kitu se vyndají z lednice a nechají vytemperovat na laboratorní teplotu. Pokud nebude použit celý kit, vyndá se ze sáčku pouze potřebný počet jamek a vloží do rámečku. Zbytek jamek se vrátí do lednice.
2. Připraví se mapa se zaznamenáním pozic standardů a vzorků.
3. Pomocí pipety se napipetuje do každé jamky 50 μ l extraktu vzorku nebo standardu. Pro každý vzorek/standard se použije nová špička.
4. Do všech jamek se pipetou přidá 50 μ l enzymového konjugátu.
5. Do všech jamek se pipetou přidá 50 μ l protilátky mykotoxinu.
6. Obsah jamek se opatrně, ale důkladně zamíchá krouživým pohybem rámečkem na hladkém povrchu v obou směrech, pomocí vortexu s nástavcem na destičky apod. a nechá inkubovat 10 min. při laboratorní teplotě.
7. Obsah jamek se vylije a destička se opakovaně vyklepne na absorpční papír do úplného odstranění tekutiny z jamek. Jamky se pomocí multikanálové pipety nebo stříčky naplní promývacím roztokem (destilovaná voda nebo výrobcem doporučený pufr) a opět vylíjí a vyklepnou. Tento postup se opakuje 2 \times .

8. Do všech jamek se pipetou přidá 100 µl substrátu, obsah jamek se důkladně promíchá a nechá se inkubovat ve tmě po dobu 5 min. při laboratorní teplotě.
9. Do všech jamek se pipetou přidá 100 µl stop činidla a obsah jamek se důkladně promíchá.
10. Pomocí mikrodestičkového fotometru se změří absorbance při vhodné vlnové délce 450 nm. Měření musí proběhnout během doby, která je udaná výrobcem jako doba od přidání stop činidla, po kterou je absorbance stabilní.

2.4.3 Hodnocení testu

Kvantitativní vyhodnocení se provádí metodou kalibrační křivky podle doporučení výrobce. Pro standardy i vzorky se vypočte hodnota IA podle vztahu

$$IA = \log[A/(A_0 - A)],$$

kde A je naměřená absorbance,

A₀ je absorbance nulového standardu.

Na osu x se vynesou koncentrace a na osu y hodnoty IA. Koncentrace odpovídající jednotlivým vzorkům se odečtou z kalibrační křivky.

2.4.4 Bezpečnostní opatření

Při mletí vzorku je nutné používat ochranné pomůcky - rukavice, rouška proti prachu, odtah vzduchu.

Při práci s metanolem a metanolovými extrakty je třeba dodržovat pravidla pro zacházení s vysoce toxickými a hořlavými látkami a specifika dle bezpečnostního listu.

Standardní roztoky obsahují mykotoxin, proto je nutné používat při práci rukavice a zabránit kontaktu s pokožkou.

Laboratorní sklo, které přišlo do styku s toxinem, je třeba dekontaminovat. Pro dekontaminaci (umístění do roztoku na dobu 1 hod. až 2 hod.) je vhodné například použití 2% roztoku chlornanu sodného.

3 Výsledky a diskuse

3.1 Stanovení validačních parametrů

3.1.1 Opakovatelnost

Opakovatelnost charakterizuje rozptýlení hodnot měřené vlastnosti kolem střední hodnoty, zapříčiněné působením náhodných chyb. Statistickou mírou přesnosti je směrodatná odchylka (s) resp. relativní směrodatná odchylka (s_r) v %. Data pro vyhodnocení opakovatelnosti byla naměřena za podmínek měření opakovatelnosti, tj. v jedné laboratoři, jedním pracovníkem na stejném zařízení v co nejkratším čase.

Ke stanovení hodnot opakovatelnosti byly v použity

A. Výsledky paralelních měření 24 reálných vzorků pšenice ozimé testované v rámci provokačních pokusů OÖZ.

B. Výsledky paralelních měření CRM- milo a vzorků se standardním přídatkem zearalenonu. Výpočet byl proveden pomocí programu EffiValidation 3.0 – Opakovatelnost – Z paralelních měření a opakovatelnost po úrovních z vícenásobného měření. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách č. 2 až č. 5.

Ze směrodatné odchylky, která charakterizuje přesnost výsledků získaných použitou analytickou metodou, lze vypočítat dovolenou diferenci paralelních stanovení, tj. maximální rozpětí, které lze ještě vysvětlit přítomností náhodných chyb.

Diference dvou paralelních stanovení byla vypočítána podle vzorce

$$R = a_s \cdot s ,$$

kde a_s je tabelovaný koeficient pro dvě paralelní měření a hladinu významnosti $\alpha = 0,05$ a jeho hodnota je 2,77.

Tabulka č. 2: Opakovatelnost - data A

Poř.číslo	Měření 1 ($\mu\text{g/kg}$)	Měření 2 ($\mu\text{g/kg}$)	Poř.číslo	Měření 1 ($\mu\text{g/kg}$)	Měření 2 ($\mu\text{g/kg}$)
1	225,4	208,8	13	80,1	82,5
2	226,7	218,8	14	55,5	62,3
3	210,4	241,7	15	79,8	98,1
4	50,1	55,5	16	68,4	61,9
5	65	62,3	17	54,3	61,6
6	55,5	56,1	18	73,7	81,3
7	92,3	91,8	19	79,4	69,2
8	63,1	67,9	20	65,9	73,2
9	148,5	149,2	21	82,2	72,0
10	97,4	93,9	22	160,5	180,0
11	57,8	70,9	23	76,4	95,6
12	108,2	118,9	24	169,3	173,2

Tabulka č. 3: Opakovatelnost - vyhodnocení A

Analyt	Opakovatelnost s ($\mu\text{g/kg}$)	Rel. opakovatelnost s _R (%)	Diference R s . 2,77 ($\mu\text{g/kg}$)
Zearalenon	8,82	8,49	24,43

Opakovatelnost metody je 8,8 $\mu\text{g/kg}$, tj. 8,5 %.

Tabulka č. 4: Opakovatelnost - data B

Popis vzorku ($\mu\text{g/kg}$)	Měření 1 ($\mu\text{g/kg}$)	Měření 2 ($\mu\text{g/kg}$)	Měření 3 ($\mu\text{g/kg}$)	Měření 4 ($\mu\text{g/kg}$)	Měření 5 ($\mu\text{g/kg}$)	Měření 6 ($\mu\text{g/kg}$)	Měření 7 ($\mu\text{g/kg}$)
+ 18	18,6	14,1	-	-	-	-	-
+ 40	39,7	35,2	-	-	-	-	-
+ 320	301,0	314,2	-	-	-	-	-
CRM-648	534	593	584	599	591	547	614

Tabulka č. 5: Opakovatelnost - vyhodnocení B

Úroveň (µg/kg)	Opakovatelnost s (µg/kg)	Rel. opakovatelnost s_R (%)	Diference R (s × 2,77) (µg/kg)	Výtěžnost (%)
+ 18	3,18	19,46	8,80	90,83
+ 40	3,18	8,49	8,80	93,63
+ 320	9,33	3,03	25,84	96,13
CRM- 648	28,95	4,99	80,19	89,48

Opakovatelnost metody získaná jako průměr z výše uvedených hodnot je 11,2 µg/kg, tj. 9 %.

První dvě hodnoty (+ 18 a + 40) sloužily zároveň k ověření informace výrobce, který uvádí, že detekční limit se v závislosti na matrici pohybuje v rozmezí (17 – 41) µg/kg a limit kvantifikace pro běžně matrice je nižší než 50 µg/kg.

U CRM je nutno brát v úvahu, že jeho deklarovaný obsah je mimo koncentrační rozsah kitu a chyba se zvyšuje ředěním vzorku a následným přepočtem výsledku.

Správnost

Správnost charakterizuje shodnost výsledků měření validované vlastnosti s akceptovanou nebo deklarovanou referenční nebo vztažnou hodnotou.

Správnost metody stanovení zearalenonu byla ověřena za použití CRM -milo. Výpočet byl proveden v programu EffiValidation 3.0, parametr Správnost - Omezený koncentrační rozsah – referenční materiál k dispozici. (viz. tabulka č. 6)

Tabulka č. 6: Ověření správnosti metody stanovení zearalenonu – data

Matrice	Referenční hodnota (µg/kg)	Naměřeno (µg/kg)
CRM milo	648	533
CRM milo	648	593
CRM milo	648	584
CRM milo	648	599
CRM milo	648	590
CRM milo	648	546
CRM milo	648	614

Tabulka č. 7: Ověření správnosti metody stanovení zearalenonu – vyhodnocení

Matrice	Referenční hodnota (µg/kg)	Naměřeno (µg/kg)	Výtěžnost (%)	Refer. přesnost (µg/kg)	Přesnost (µg/kg)	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti
CRM-milo.	648	579,86	89,48	140	29,35	Přijata	Přijata
Závěr: Analytická metoda poskytuje pro referenční materiál statisticky správné výsledky.							

K výsledku stanovení správnosti je třeba vzít v úvahu, že dostupný CRM nebyl z hlediska svého relativně vysokého obsahu zearalenonu a udávané hodnoty referenční přesnosti nejvhodnější, s ohledem na hladinu přirozeně se vyskytující kontaminace stanovovaných vzorků.

Dále je třeba vzít v úvahu, že ačkoli dosažená výtěžnost odpovídá požadavkům na stanovení, jsou všechny stanovené koncentrace pod referenční hodnotou CRM. Z výtěžností pro jednotlivé koncentrační hladiny (tabulka č. 5) vyplývá, že výtěžnost u vzorku s nejvyšším obsahem zearalenonu je nejnižší a obecně se vždy pohybuje pod 100 %.

3.1.3 Nejistoty stanovení zearalenonu

Stanovení relativní standardní nejistoty a relativní rozšířené nejistoty bylo provedeno v programu EffiValidation 3.0. K výpočtu byly použity hodnoty paralelních měření jednotlivých vzorků a CRM- milo, varianta „nejistoty ze stanovení přesnosti - paralelní měření k dispozici“. Hodnota nejistoty stanovení je uvedena v tabulce č. 8.

Tabulka č. 8: Hodnoty nejistoty stanovení zearalenonu

Stanovovaná látka	Relativní standardní nejistota (%)	Relativní rozšířená nejistota (k = 1,96) (%)
Zearalenon	8,65	16,96

Pro uvádění výsledků kvantitativní analýzy bude používána relativní rozšířená nejistota měření zaokrouhlená na 20 %.

4 Závěr

Cílem vývojového úkolu bylo zavést stanovení zearalenonu v obilovinách, krmných surovinách a podobných matricích metodou ELISA včetně stanovení základních validačních parametrů.

Pro metodu a použitý diagnostický kit byly stanoveny následující validační parametry.

Relativní rozšířená nejistota měření pro zearalenon byla stanovena 20 %.

Správnost metody stanovení zearalenonu byla ověřena pomocí dostupného CRM. Následné vyhodnocení v programu EffiValidation 3.0 potvrdilo, že analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

Opakovatelnost, vypočtená pomocí výsledků paralelních měření 24 reálných vzorků v celém koncentračním rozsahu, charakterizovaná jako směrodatná odchylka s byla stanovena: $s = 9 \mu\text{g/kg}$, relativní směrodatná odchylka $s_R = 9 \%$ a diference dvou paralelních vzorků pro hladinu významnosti $\alpha = 0,05$ je $R = 25 \mu\text{g/kg}$.

Výtěžnost stanovení se pohybovala v rozmezí (83 – 96) %.

Výtěžnost udávaná výrobcem je uváděna okolo 80 %.

Na základě výsledků MPZ bude k validačním parametrům doplněna reprodukovatelnost.

5 Literatura

1. R-Biopharm AG, DarmstadtGermany: Ridascreen FAST ZEARALENON, manuál ke kitu
2. Centner, V.: Uživatelská příručka EffiValidation 3.0
3. Malíř, F.; Ostrý, V. a kol: Vláknnité mikromycety (plísňě), mykotoxiny a zdraví člověka, NCO NZO Brno, **2003**.

Stanovení ochratoxinu A, deoxynivalenolu, zearalenonu, aflatoxinů a fumonisinů metodou HPLC nebo LC/MS/MS v krmivech

Marie Mrkvicová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2,
656 06 Brno
marie.mrkvicova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Cílem práce byl vývoj, odzkoušení a následná validace metod na stanovení ochratoxinu A, deoxynivalenolu, zearalenonu, aflatoxinů a fumonisinů metodou HPLC nebo LC/MS/MS v krmivech. V roce 2004 byla zavedena a validována metoda na stanovení ochratoxinu A a deoxynivalenolu metodou HPLC, v roce 2005 byla flexibilně akreditována metoda „Stanovení obsahu mykotoxinů metodou HPLC“. Při řešení tohoto úkolu probíhala spolupráce s pracovníky NRL-OMB Brno. Pro finanční náročnost HPLC metod stanovení mykotoxinů bylo rozhodnuto nejprve provést screening odebraných vzorků metodou ELISA a u pozitivních výsledků následnou kvantifikaci metodou HPLC. V roce 2005 byla také zavedena a akreditována metoda na stanovení zearalenonu metodou HPLC a stanovení aflatoxinů a fumonisinů metodou LC/MS/MS. V roce 2005 bylo analyzováno 120 vzorků na obsah ochratoxinu A a deoxynivalenolu a 56 vzorků na obsah zearalenonu, fumonisinů a aflatoxinů.

Všechny vzorky byly analyzovány metodou HPLC, bez předchozího screeningu. Stanovení obsahu mykotoxinů metodou LC/MS/MS bylo předmětem flexibilní akreditace v roce 2006. MS detekci jsme zvolili pro vyloučení nutnosti derivatizace před měřením.

2 Úvod

Mykotoxiny jsou sekundární toxické metabolity vláknitých mikromycetů, které patří mezi významné toxiny přírodního původu. Jsou to strukturně odlišné komplexní organické

sloučeniny o nízké molekulové hmotnosti (až na výjimky nižší než 700 g/mol). Jsou nebílkovinné povahy, toxické pro člověka a živé organismy. V současné době je známo přes 300 mykotoxinů a jsou objevovány další. Tvorba mykotoxinů je podmíněna biologickými, fyzikálními a chemickými faktory. Obsah mykotoxinů pak závisí na následujících faktorech: vlhkosti, teplotě, délce skladování, poškození obalu zrna, přítomnosti kyslíku, oxidu uhličitého, složení substrátu, mykologickém profilu toxinogenních vláknitých mikromycetů, sporulaci, mikrobiálních interakcích a přítomnosti hmyzu. Mykotoxiny patří celosvětově k významným toxinům přírodního původu s akutními, chronickými, ale i pozdními toxickými účinky. Dělí se podle míry akutní toxicity na silně toxické (aflatoxiny, ochratoxin A, T-2 toxin), středně toxické (citrinin, sterigmatocystin), slabě toxické (trichoteceny, zearalenon). Mykotoxiny můžeme dále dělit podle toxicity k cílovým orgánům na dermatotoxiny, genotoxiny, hematotoxiny, hepatotoxiny, imunotoxiny, nefrotoxiny, neurotoxiny, toxiny gastrointestinálního traktu aj. Další dělení je možné podle biologických účinků, podle účinku na buněčné úrovni atd.

Vzhledem k vysoké toxicitě mykotoxinů a potřebě jejich sledování je věnována v rámci EU této problematice velká pozornost. K nejdůležitějším závazným dokumentům patří Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 178/2002/ES, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví se postupy týkající se bezpečnosti potravin, dále Směrnice Evropského parlamentu a Rady č. 32/2002/ES, o nežádoucích látkách v krmivech a Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 882/2004/ES, o úředních kontrolách za účelem ověření dodržování právních předpisů týkajících se krmiv a potravin a pravidel o zdraví zvířat a dobrých životních podmínkách zvířat.

V návaznosti na legislativu ES, týkající se bezpečnosti potravin, se ÚKZÚZ podílí na monitorování zakázaných a nežádoucích látek v krmivech. Účelem monitorování je sběr dat u látek, které nemají jasně stanovený povolený limit, ale mají mez detekce a stanovitelnosti analytické metody. Směrnice č. 32/2002/ES sice stanovuje maximální povolené obsahy aflatoxinu B₁ v krmivech, nejsou už však k dispozici pravidla EU pro hodnocení ostatních mykotoxinů. Shromažďování informací o výskytu mykotoxinů zjištěném při namátkovém vzorkování by mohlo poskytnout užitečné údaje pro vyhodnocení situace a přípravu další potřebné legislativy.

Analytické metody používané ke stanovení mykotoxinů jsou velmi rozmanité. Důležitou součástí metody je správný odběr vzorku, homogenizace, mletí, extrakce a přečištění, zkoncentrování, případně derivatizace. Každý z těchto na sebe navazujících kroků rozhoduje

o výsledku analýzy. Extrakce vzorků vhodným rozpouštědlem se provádí na laboratorní třepačce v Erlenmayerově baňce se zábrusem. Extrakční rozpouštědlo se volí dle povahy, rozpustnosti příslušného mykotoxinu a s ohledem na extrahovaný materiál a další zpracování extraktu. Vzhledem k charakteru a stálosti mykotoxinů probíhá extrakce za laboratorní teploty a za neutrální nebo kyselé reakce. K extrakci mykotoxinů se nejčastěji používá metanol, voda, acetonitril, octan etylnatý, aceton, chloroform, případně vodné roztoky organických rozpouštědel. Po extrakci se suspenze přefiltruje, popřípadě odstředí. Přečištění extraktu lze provést několika způsoby. Metoda extrakce kapalina-kapalina se dnes již opouští, používá se separace na pevné fázi (SPE). Jednou z možností je gelová filtrace k odstranění lipidických sloučenin a pigmentů. V současné době se nejčastěji používá čištění extraktu mykotoxinů na imunoafinitních kolonkách (např. RIDA- R-Biopharm, VICAM- Vicam LP, USA, EASI-EXTRACT- Rhone Poulenc). Jsou založeny na principu imunologické reakce antigen + protilátka. Na imunoafinitní kolonce dojde k reverznímu spojení mezi protilátkami navázanými na gel v kolonce a jim odpovídajícím antigenem (mykotoxinem) z matrice. Promytím se odstraní zbytky extraktu a desorpcí se uvolní antigen z vazby s protilátkou. Metody detekce mykotoxinů lze rozdělit na imunochemické (ELISA) a chromatografické (TLC, HPTLC, GC, GC/MS, HPLC, LC/MS). Z hlediska finanční náročnosti a přístrojového vybavení je nejdostupnější tenkovrstevná chromatografie (TLC), která je vhodná pro rychlé kvalitativní stanovení mykotoxinů. Na jejím základě byla vyvinuta metoda instrumentalizované HPTLC. Nověji se začaly používat metody HPLC s UV a fluorescenční detekcí. Pro látky neabsorbující v UV oblasti lze využít před- a post- kolonovou derivatizaci. Pro dostatečně těkavé toxiny existují metody GC. V poslední době byl zaznamenán velký rozvoj LC/MS metod, které umožňují jednoznačnou identifikaci mykotoxinu.

V současné době nejsou v platnosti jednotné evropské normy pro stanovení mykotoxinů v krmivech ani v potravinách. Jednotlivé směrnice ES umožňují použít jakoukoliv metodu za předpokladu, že splňují předepsaná kritéria- opakovatelnost, reprodukovatelnost a výtěžnost, (Směrnice Komise č. 53/1998/ES, č. 26/2002/ES, č. 38/2005/ES, Směrnice Rady č. 29/1999/ES, č. 32/2002/ES, ČSN 56 0003). Při řešení vývojového úkolu jsme stáli před problémem vybrat z mnoha publikovaných metod metodu vhodnou pro dostupnou instrumentaci- HPLC, LC/MS/MS, optimalizovat ji a validovat.

3 Materiál a metody

V rámci monitoringu bylo požadováno stanovení deoxynivalenonu (DON), zearalenonu (ZON), ochratoxinu A, aflatoxinů a fumonisinů. Princip jejich stanovení je obdobný a rovněž použité chemikálie a zařízení lze uvést pro všechny stanovené mykotoxiny v jednom všeobecném přehledu. Možné odlišnosti jednotlivých metod jsou zmíněny v příslušných kapitolách pro daný mykotoxin. Podrobné postupy stanovení jsou popsány ve standardním operačním postupu (SOP č. 23; SOP č. 33).

3.1 Princip metody

Vzorek se upraví mletím a homogenizací na částice o velikosti (1,0 – 1,5) mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku během homogenizace. Vzorek se extrahuje v kónické baňce vhodným rozpouštědlem vytřepáváním na laboratorní třepačce. Extrakt se přefiltruje a přečistí na imunoafinitní kolonce. Po promytí a eluci se dle potřeby analyt naředí, odpaří a rozpustí ve vhodném rozpouštědle. Před nástřikem se přefiltruje, může se odstředit při 10 000 otáčkách. Obsah požadovaných analytů se stanoví metodou HPLC nebo LC/MS.

3.2 Chemikálie

Všechny použité chemikálie jsou čistoty minimálně p.a. Rozpouštědla pro přípravu mobilních fází pro HPLC jsou kvality vyšší (Gradient Grade pro HPLC, pro LC/MS). Dostatečná čistota použitých chemikálií je kontrolována analýzou slepého vzorku.

Rozpouštědla- acetonitril, methanol, toluen, ultračistá voda, připravená systémem Milli-Q;

Pufr PBS, pH 7,4;

Octan amonný;

Kyselina mravenčí (98 – 100)%;

Hydroxid sodný roztok 8g/l;

Ledová kyselina octová;

Standardy- např. z katalogu „Biochemikálie a reagentie Sigma Aldrich“, nebo od firem Supelco, R-Biopharm Rhone, Vicam.

Referenční materiál- v roce 2005 pro všechny mykotoxiny od firmy R- Biopharm Rhone, v roce 2004 pro deoxynivalenol a ochratoxin A od firmy Vicam.

3.3 Přístroje a pomůcky

Laboratorní mlýnek VM-7 minirazant;

Analytické váhy;

Laboratorní třepačka;

Ultrazvuková lázeň;

Zařízení pro výrobu ultračisté vody Milli-Q;

Koncentrátor vzorků- Termovap 10;

Odstředivka;

SPE- manifold s vakuovou pumpou;

Automatiské pipety;

Imunoafinitní kolonky pro jednotlivé mykotoxiny firmy VICAM;

Filtrační papíry (např. Whatman 113V);

Kapalinový chromatograf HP-1100 s DAD a FLD detektorem;

Kapalinový chromatograf HP-1100 s hmotnostním detektorem Bruker-Daltonics.

Podrobný popis chromatografických podmínek, kalibrací a vlastního HPLC stanovení včetně výpočtů je uveden v jednotlivých standardních operačních postupech (SOP č. 23; SOP č. 33).

4 Výsledky a diskuse

4.1 HPLC metody

4.1.1 Deoxynivalenol (DON)

Vývoj a optimalizace metody

V současné době není v platnosti jednotná česká ani evropská norma na stanovení deoxynivalenolu. V roce 2004 byly zakoupeny imunoafinitní kolonky firmy Vicam a při analýzách se postupovalo podle návodu výrobce. Metoda byla validována. V rámci monitoringu nežádoucích a zakázaných látek bylo analyzováno 34 vzorků s pozitivním nálezem. V roce 2005 European Commission DG Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements v Geelu vytvořila návrh metody a uspořádala validační studii této metody, které se naše laboratoř zúčastnila. Principem metody je extrakce vzorku vodou, část extraktu se přečistí přes imunoafinitní kolonku. Eluce mykotoxinu z kolonky se provádí metanolem a po odpaření a rozpuštění v mobilní fázi se DON kvantitativně stanoví na HPLC s UV detekcí při vlnové délce 220 nm. Byly používány imunoafinitní kolonky firmy R-Biopharm. Metodu naše laboratoř převzala a odzkoušela

cenově výhodnější kolonky firmy Vicam. Podrobný popis metody a chromatografické podmínky měření DONu jsou uvedeny ve standardním operačním postupu (SOP č. 23).

Validace metody

V roce 2005 bylo v rámci monitoringu analyzováno na DON 120 vzorků, přičemž ve 44 vzorcích byla zjištěna hodnota vyšší než 50 µg/kg. Podle Směrnice komise č. 38/2005/ES při vyhodnocování parametrů přesnosti byly vzorky rozděleny podle nalezených obsahů do dvou úrovní: (100 – 500) µg/kg a ≥ 500 µg/kg. Zvlášť byla hodnocena úroveň do 100 µg/kg. Výsledky v jednotlivých úrovních jsou uvedeny v tabulkách č. 1; 2 a 3. Na základě proměřených vzorků a získaných výsledků byla metoda částečně validována. Validací parametry byly vyhodnoceny statistickým programem EffiValidation 3.0. Pro DON byla stanovena opakovatelnost, přesnost, správnost, mez detekce a mez stanovitelnosti, reprodukovatelnost, výtěžnost metody.

Tabulka č. 1: Naměřené hodnoty DON – úroveň ≤ 100 µg/kg

Vzorek č.	Materiál	Měření 1 (µg/kg)	Měření 2 (µg/kg)
904	pšenice	80,03	62,12
985	ječmen	59,26	66,09
1133	pšeničné otruby	110,3	86,58
1287	ječmen	54,2	60,41

Tabulka č. 2: Naměřené hodnoty DON – úroveň (100 – 500) µg/kg

Vzorek č.	Materiál	Měření 1 (µg/kg)	Měření 2 (µg/kg)	Vzorek č.	Materiál	Měření 1 (µg/kg)	Měření 2 (µg/kg)
898	pšenice	327,10	258,02	1292	pšenice	104,30	95,83
905	pšenice	344,88	292,22	1293	ječmen	115,72	132,62
968	pšenice	144,92	173,89	1377	ječmen	125,42	131,48
1118	pšenice	149,31	156,575	1455	kukuřice	396,13	386,97
1121	ječmen	179,84	165,94	1547	pšenice	181,54	168,35
1144	kukuřice	351,51	331,95	1605	kukuřice	419,59	380,60
1250	pšenice	282,28	215,13	1615	kukuřice	148,40	111,26
1291	pšenice	449,14	460,02	1617	pšenice	240,66	212,83
1632	kukuřice	112,70	130,81	1635	pšenice	339,57	453,76
1636	kukuřice	189,30	130,39	1637	kukuřice	443,51	387,74
1692	kukuřice	251,96	202,75	-	-	-	-

Tabulka č. 3: Naměřené hodnoty – úroveň $\geq 500 \mu\text{g/kg}$

Vzorek č.	Materiál	Měření 1 ($\mu\text{g/kg}$)	Měření 2 ($\mu\text{g/kg}$)	Vzorek č.	Materiál	Měření 1 ($\mu\text{g/kg}$)	Měření 2 ($\mu\text{g/kg}$)
906	kukuřice	550,20	466,47	1713	sojový šrot	1645,58	1598,07
990	pšenice	1426,71	1311,48	1738	kukuřice	1023,09	1318,83
1119	kukuřice	664,63	552,78	1739	kukuřice	1058,42	1113,83
1453	kukuřice	1492,77	1536,04	1778	kukuřice	1195,20	1200,98
1454	kukuřice	581,97	680,61	1779	kukuřice	300,40	883,41
1456	kukuřice	568,78	610,95	1780	kukuřice	605,67	603,63
1574	pšenice	1451,67	1310,97	1786	kukuřice	580,73	789,98
1655	kukuřice	1389,81	1252,86	1804	kukuřice	1337,47	1147,86
1695	kukuřice	3421,41	3369,31	1805	kukuřice	1117,60	938,37
1711	pšenice	870,96	958,52	-	-	-	-

Opakovatelnost

Data pro vyhodnocení opakovatelnosti byla naměřena za podmínek měření opakovatelnosti, tj. v jedné laboratoři, stejným pracovníkem, na stejném přístroji a v co nejkratším čase. Pro vyhodnocení opakovatelnosti byla vybrána metoda „Po úrovních z paralelního měření“. Ze směrodatné odchylky lze vypočítat dovolenou diferenci dvou stanovení, tj. maximální rozpětí, kterým lze ještě vysvětlit přítomnost náhodných chyb. Diference dvou paralelních stanovení (r) byla vypočítaná podle vztahu $r = 2,8 \times s$.

Tabulka č. 4: DON-opakovatelnost

Úroveň ($\mu\text{g/kg}$)	Opakovatelnost (s) ($\mu\text{g/kg}$)	Rel. opakovatelnost (%)	Diference $r (2,8 \times s)$
< 100	11,00352	15,20	30,81
100 – 500	31,45137	12,86	88,81
> 500	88,83316	7,76	248,73

Správnost

Pro ověření správnosti jsme použili CRM – Ground Wheat (přírodně obohacen) s deklarovanou hodnotou 0,7 ppm ($\pm 0,2$ ppm), od firmy R-Biopharm. Vzorek byl analyzován ve 3 opakováních. Naměřené výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: DON- správnost - CRM

Referenční hodnota ($\mu\text{g/kg}$)	Naměřeno ($\mu\text{g/kg}$)	Výtěžnost (%)	Referenční přesnost ($\mu\text{g/kg}$)	Přesnost ($\mu\text{g/kg}$)	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti
700	552,22	78,88	200	31,72993	Přijata	Přijata

Analytická metoda poskytuje pro referenční materiál statisticky správné výsledky. Výtěžnost byla stanovena na 79 %.

Správnost metody byla také prověřena metodou standardního přídávku. K certifikovanému materiálu BCR 396 (Sigma-Aldrich) s deklarovanou hodnotou $< 50 \mu\text{g/kg}$ (pšeničná mouka) bylo přidáno známé množství standardního roztoku DONu o koncentraci $8 \mu\text{g/ml}$. Byly připraveny 3 koncentrační hladiny odpovídající hladinám, do kterých byly zařazeny reálné vzorky. Takto připravené vzorky byly analyzovány a výsledky byly zpracovány v programu EffiValidation 3.0 - Správnost: „Velký koncentrační rozsah – slepý pokus k dispozici“. Byl zvolen t-test – testování správnosti po úrovních. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6: DON- správnost- standardní přídavek

Přídavek ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Naměřeno ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Výtěžnost (%)	Přesnost	Hypotéza
160	153,985	96,24	6,49831	Přijata
320	349,915	109,35	32,32185	Přijata
640	489,435	76,47	50,80562	Přijata

Ověření metody standardním přídávkem potvrdilo, že analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky. Výtěžnost byla stanovena (77 – 109) %.

Správnost metody byla zároveň ověřena účastí ve validačním testu analytické metody na stanovení obsahu deoxynivalenolu v dětské výživě a krmivu, pořádaném European Commission DG Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements v únoru roku 2005. Výsledky z naší laboratoře vyhovovaly všem parametrům.

Mez detekce a mez stanovitelnosti

Z chromatogramu slepého pokusu se určí maximální zakolísání základní linie (h_{max}) v oblasti dané 20ti násobkem pološířky stanovovaného píku a kalibrační přímky směrnici (b_1).

Maximální kolísání základní linie (mA): 0,02021

Směrnice kalibrační přímky: 4,96901

Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 7.

Tabulka č. 7: DON- mez detekce a mez stanovitelnosti

Měření na mezi detekce (mA)	Měření na mezi stanovitelnosti (mA)	Validovaná vlastnost na mezi detekce (ng/ml)	Validovaná vlastnost na mezi stanovitelnosti (ng/ml)
0,0606	0,202	12,20	40,65

Mez detekce/stanovitelnosti je 0,0606 resp. 0,202 jednotek. Validovaná vlastnost na mezi detekce/stanovitelnosti je 12,20 ng/ml resp. 40,65 ng/ml. Výsledky je nutné násobit dvěma (ředění během analýzy). Mez detekce je 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a mez stanovitelnosti 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Nejistota

V nízkých koncentracích na hladině trojnásobku meze detekce je nejistota obecně považována za 50 %. Proto byly vzorky rozděleny do dvou skupin podle obsahu DONu, do 150 µg/kg a nad 150 µg/kg. Výsledky byly vyhodnoceny programem EffiValidation 3.0 - z dat pro vyhodnocení přesnosti – „paralelní měření k dispozici“ a jsou shrnuty v tabulce č.8.

Tabulka č. 8: DON- nejistota

Charakteristika	Hladina < 150 µg/kg	Hladina > 150 µg/kg
Vypočtená hodnota (µg/kg)	115,12458	807,18875
St. nejistota (µg/kg)	16,79176	72,13509
Rel. st. nejistota (%)	14,58573	8,93658
Faktor pokrytí	2	2
Rozšířená st. nejistota (µg/kg)	33,58352	144,27018
Rel. rozšířená nejistota (µg/kg)	29,17146	17,87317

Relativní rozšířená nejistota na hladině do 150 µg/kg je 29 % a na hladině nad 150 µg/kg 18 %. Do programu LAB pro zápis hodnot obsahu látek ve vzorcích v naší laboratoři byla zadána hodnota 25 %.

Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost R je hodnota, pod níž bude podle očekávání s danou pravděpodobností ležet absolutní hodnota rozdílu výsledků dvou samostatných stanovení za podmínek reprodukovatelnosti, tj. u stejného materiálu získaného pracovníky různých laboratoří za použití standardizované zkušební metody: $R = 2,8 \times s_R$. Relativní směrodatná odchylka RSD_R se vypočítá z výsledků získaných za podmínek reprodukovatelnosti - $(s_R/x) \times 100$. V únoru 2005 se naše laboratoř zúčastnila Validace metody na stanovení DONu pořádané European Commission DG Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements, ve které byla stanovena reprodukovatelnost. Výsledky jsou v tabulce č. 9.

Tabulka č. 9: DON- reprodukovatelnost

Hladina ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD_R (%)	Hladina ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD_R (%)
188	25,2	808	23,3
229	15,7	1013	10,5
401	16,5	-	-

Zhodnocení metody pro DON

Dle Směrnice komise 2005/38/ES v Příloze II. - mohou laboratoře zvolit jakoukoliv metodu za předpokladu, že splňuje kritéria uvedená v tabulce č. 10.

Tabulka č. 10: Pracovní charakteristiky pro deoxynivalenol

Množství ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Deoxynivalenol		
	RSD_r (%)	RSD_R (%)	Výtěžnost (%)
$\geq 100 < 500$	≤ 20	≤ 40	60 až 110
≥ 500	≤ 20	≤ 40	70 až 120

Metoda je akceptovatelná v případě, že pro všechny koncentrační úrovně dosahuje relativní směrodatné odchylky $< 20\%$. Toto kritérium se nám podařilo ve všech úrovních splnit. Námi stanovené relativní opakovatelnosti se pohybují mezi 8% a 15% .

Kritérium výtěžnosti bylo ověřeno analýzou CRM s deklarovanou koncentrací DONu, odpovídající druhé koncentrační hladině. Výtěžnost 79% splňuje požadavek 70% až 120% .

Metoda standardního přídávku poskytla výsledky výtěžnosti 98% a 109% pro první koncentrační hladinu a 77% pro druhou hladinu, všechny výsledky danému kritériu vyhovují.

Při validační studii metody byly stanoveny RSD_R. Všechny hodnoty jsou menší než 40% .

4.1.2 Ochratoxin A (OTA)

Vývoj a optimalizace metody

V současné době je k dispozici jediná platná norma na stanovení ochratoxinu A- ČSN EN 14132 „Potraviny – Stanovení ochratoxinu A v ječmeni a pražené kávě – Metoda HLPC s přečištěním na imunoafinitní kolonce“, která je českou verzí evropské normy EN 14132 2003. Principem metody je homogenizace vzorku, extrakce vodným roztokem acetonitrilu, filtrace, ředění filtrátu fosfátovým pufrům a jeho přečištění na imunoafinitní kolonce. Pro práci s imunoafinitní kolonkou firmy Vicam byl používán instrukční návod OchraTest-HPLC pro kukuřici, obilí a krmivo. Z kolonky je mykotoxin eluován methanolem a naředěn vodou. Podrobný popis metody a chromatografické podmínky měření OTA jsou uvedeny ve standardním operačním postupu (SOP č. 23).

Validace metody

Metoda byla validována, byly stanoveny tyto validační parametry: opakovatelnost, správnost, mez detekce, mez stanovitelnosti, výtěžnost.

V roce 2004 laboratoř zjistila pouze 2 vzorky s pozitivním nálezem OTA. V roce 2005 bylo analyzováno 120 vzorků krmných surovin v rámci monitoringu nežádoucích a zakázaných látek, z toho 5 pozitivních.

Opakovatelnost

Pro stanovení opakovatelnosti bylo použito 5 vzorků, u kterých byl zjištěn pozitivní nález. Pro každý vzorek byla prováděna 4 stanovení. K vyhodnocení opakovatelnosti byla vybrána metoda: „Po úrovních z vícenásobného měření“. Diference dvou paralelních stanovení (r) byla vypočítána podle vzorce $r = 2,8 \times s$. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v tabulce č. 11 a vyhodnocení v tabulce č. 12.

Tabulka č. 11: OTA- naměřené hodnoty

Vzorek č.	Materiál	Měření 1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Měření 2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Měření 3 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Měření 4 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
898	pšenice	6,813	7,22	7,59	5,12
905	pšenice	42,48	46,11	27,53	36,10
1376	pšenice	2,11	1,30	1,00	1,33
1546	soja	39,35	35,65	46,41	35,77
1647	kukuřice	146,63	137,03	147,6	155,05

Tabulka č. 12: OTA -opakovatelnost

Vzorek č.	Průměr (µg/kg)	Opakovatelnost (µg/kg)	Relativní opakovatelnost (%)	Diference r (s × 2,8)
898	6,68475	1,09367	16,36	3,06
905	38,056	8,14589	21,41	22,81
1376	1,43375	0,47277	32,97	1,32
1546	39,29675	5,04369	12,83	14,12
1647	146,578	7,39252	5,04	20,70

Relativní opakovatelnost analytické metody byla stanovena na 20 %.

Správnost

K vyhodnocení správnosti jsme použili CRM – Ground Wheat (přírodně obohacen) s deklarovanou hodnotou 16,8 ppb (± 4,5 ppb), od firmy R-Biopharm. Byl analyzován ve 4 opakováních. Naměřené výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 13 a výsledky v tabulce č. 14.

Tabulka č. 13: OTA- správnost- CRM hodnoty

Popis	Referenční hodnota (µg/kg)	Referenční přesnost (µg/kg)	Měření 1 (µg/kg)	Měření 2 (µg/kg)	Měření 3 (µg/kg)	Měření 4 (µg/kg)
CRM	16,8	4,5	18,154	15,990	19,113	18,050

Tabulka č. 14: OTA- správnost- CRM výsledky

Referenční hodnota	Naměřeno (µg/kg)	Výtěžnost (%)	Referenční přesnost (µg/kg)	Přesnost (µg/kg)	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti
16,8	17,8265	106,11	4,5	1,31482	Přijata	Přijata

Analytická metoda poskytuje pro referenční materiál statisticky správné výsledky s výtěžností 106 %. Správnost metody byla také prověřena metodou standardního přídávku. K tomuto účelu byl použit vzorek krmné suroviny, která vykazovala nulové hodnoty ochratoxinu A. K výchozímu vzorku bylo přidáno známé množství standardního roztoku ochratoxinu A o koncentraci 1 µg/ml a byly připraveny 3 koncentrační hladiny, odpovídající koncentrační hladině meze detekce a certifikovaného referenčního materiálu. Takto připravené vzorky byly analyzovány a výsledky byly zpracovány v programu EffiValidation 3.0 - Správnost: „Velký

koncentrační rozsah – slepý pokus k dispozici“. Byl zvolen t-test – testování správnosti po úrovních. Naměřené hodnoty a výsledky jsou shrnuty v tabulkách č.15 a 16.

Tabulka č. 15: OTA- správnost – standardní přidavek hodnoty

Předloženo ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Měření 1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Měření 2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
0,8	0,754	0,788
4,0	3,514	3,698
20,0	19,146	17,964

Tabulka č. 16: OTA- správnost - standardní přidavek výsledky

Přidavek ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Naměřeno ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Výtěžnost (%)	Přesnost	Hypotéza
0,8	0,771	96,38	0,02404	Přijata
4,0	3,606	90,15	0,13011	Přijata
20,0	18,555	92,78	0,8358	Přijata

Na hladině do 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ jsme stanovili výtěžnost 96 %, na hladině do 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 90 %, nad 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ je výtěžnost metody 93 %.

Mez detekce a mez stanovitelnosti

K vyhodnocení byla použita metoda: “Ze signálu slepého pokusu v chromatografii“.

Maximální kolísání základní linie (mA): 0,0005

Směrnice kalibrační přímky: 0,0867

Tabulka č. 17: OTA- mez detekce a mez stanovitelnosti

Měření na mezi detekce (mA)	Měření na mezi stanovitelnosti (mA)	Validovaná vlastnost na mezi detekce (ng/ml)	Validovaná vlastnost na mezi stanovitelnosti (ng/ml)
0,0015	0,005	0,0173	0,05767

Mez detekce/stanovitelnosti je 0,0015 resp. 0,005 jednotek. Validovaná vlastnost na mezi detekce/stanovitelnosti je 0,0173, resp. 0,05767 ng/ml. Výsledky je nutné násobit třemi

(ředění během analýzy). Mez detekce je 0,052 µg/kg a mez stanovitelnosti 0,173 µg/kg. Do Programu LAB byla zadána hodnota - Limit detekce: 0,5 µg/kg.

Nejistota

Nejistoty byly vyhodnoceny programem EffiValidation 3.0 – „Z dat pro hodnocení přesnosti – vícenásobná měření k dispozici“. Předpokládá se, že všechny uvažované zdroje nejistot jsou reprezentativně zastoupeny v datech. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v tabulce č. 18 a výsledky v tabulce č. 19.

Tabulka č. 18: OTA- nejistota hodnoty

Popis	Měření 1 (µg/kg)	Měření 2 (µg/kg)	Měření 3 (µg/kg)	Měření 4 (µg/kg)
898	6,81	7,22	7,59	5,12
905	42,48	46,11	27,53	36,10
1376	2,11	1,30	1,00	1,33
1546	39,35	35,65	46,41	35,77
1647	146,63	137,032	147,60	155,05

Tabulka č. 19: OTA- nejistota výsledky

Charakteristika	Hodnota	Charakteristika	Hodnota
Vypočtená hodnota (µg/kg)	46,4102	Faktor pokrytí	2
St. nejistota (µg/kg)	5,43821	Rozšířená st. nejistota (µg/kg)	10,87642
Rel. st. nejistota (%)	11,7177	Rel. rozšířená nejistota (%)	23,4354

Relativní rozšířená nejistota je 23 %.

Reprodukovatelnost

Nebyla stanovena.

Zhodnocení metody pro ochratoxin

Dle Směrnice Komise 2002/26/ES v Příloze II- Pracovní charakteristiky pro metody analýzy při úřední kontrole množství ochratoxinu A laboratoře musí splňovat kritéria uvedená v tabulce č. 20.

Tabulka č. 20: Kritéria hodnocení metody

Množství ($\mu\text{g/kg}$)	RSD _r (%)	Výtěžnost (%)
≤ 1	≤ 40	50 – 120
1 – 10	≤ 20	70 – 110

Relativní opakovatelnost námi stanovených vzorků byla 20 %. Na hladině okolo $1\mu\text{g/kg}$ byl zjištěn 1 vzorek s relativní opakovatelností 33 % a ve druhé hladině se relativní opakovatelnost pohybuje mezi (5 – 20) %. Výsledky jsou vyhovující.

Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky. Na hladině do $1\mu\text{g/kg}$ byla stanovena výtěžnost 96 %, ve druhé hladině 90 %, nad tyto hladiny pak výtěžnost 93 %. Výsledky jsou vyhovující.

4.1.3 Zearalenon (ZON)

Vývoj a optimalizace metody

V současné době neexistuje předepsaná rozhodčí metoda pro stanovení ZONu. European Commission DG Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements však připravila návrh metody na stanovení ZONu a v červnu 2005 se konala validační studie této metody, které se naše laboratoř účastnila. Principem metody je extrakce vzorku vodným roztokem methanolu a přečištění extraktu na imunoafinitní kolonce. ZON se eluuje z kolonky methanolem, roztok se naředí vodou a analyzuje na HPLC na reverzní fázi s fluorescenční detekcí (excitační vlnová délka 274 nm a emisní vlnová délka 446 nm). Metoda byla převzata, odzkoušena. Zároveň byly otestovány i kolonky firmy Vicam.

Validace metody

Metoda byla validována. Byly určeny tyto validační parametry: opakovatelnost, správnost, mez detekce a mez stanovitelnosti, nejistota a reprodukovatelnost.

Opakovatelnost

Z 57 vzorků krmných surovin bylo pro stanovení opakovatelnosti vybráno 5 vzorků, u kterých byl zjištěn pozitivní nález. Pro každý vzorek byla prováděna 4 stanovení.

K vyhodnocení opakovatelnosti byla vybrána metoda: „Po úrovních z vícenásobného měření“. Diference dvou paralelních stanovení (r) byla vypočítána podle vzorce $r = 2,8 \times s$. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v tabulce č. 21 a vyhodnocení v tabulce č. 22.

Tabulka č. 21: ZON- opakovatelnost hodnoty

Vzorek č.	Materiál	Měření 1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Měření 2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Měření 3 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Měření 4 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
988	pšenice	14,732	8,484,	14,974	6,13
1286	kukuřice	68,612	62,505	62,894	64,408
1319	pšenice	59,339	50,968	65,004	59,575
1320	ječmen	52,247	56,87	53,152	64,518
1789	kukuřice	38,328	33,239	47,475	36,492

Tabulka č. 22: ZON- opakovatelnost výsledky

Vzorek č.	Průměr ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Opakovatelnost ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Relativní opakovatelnost (%)	Diference r ($s \times 2,8$)
988	11,08	4,46251	40,28	12,50
1286	64,60	2,79478	4,33	7,83
1319	58,72	5,79357	9,87	16,22
1320	56,70	5,58473	9,85	15,64
1789	38,88	6,10197	15,70	17,09

Relativní opakovatelnost dané metody byla stanovena 20 %.

Správnost

K hodnocení správnosti jsme použili CRM – Milo (přírodně obohacen) s deklarovanou hodnotou 648 ppb ($\pm 148\text{ppb}$), od firmy R-Biopharm. CRM byl analyzován ve 3 opakováních. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v tabulce č. 23 a výsledky v tabulce č. 24.

Tabulka č. 23: ZON- správnost hodnoty CRM

Popis	Referenční hodnota (µg/kg)	Referenční přesnost (µg/kg)	Měření 1 (µg/kg)	Měření 2 (µg/kg)	Měření 3 (µg/kg)
CRM	648	140	704,33	603,18	606,72

Tabulka č. 24: ZON- správnost výsledky CRM

Referenční hodnota (µg/kg)	Naměřeno (µg/kg)	Výtěžnost (%)	Referenční přesnost (µg/kg)	Přesnost (µg/kg)	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti
648	638,07	98,47	140	57,403	Přijata	Přijata

Analytická metoda poskytuje pro referenční materiál statisticky správné výsledky a stanovená výtěžnost je 99 %.

V rámci Validace metody stanovení obsahu zearalenonu v krmivu pořádané European Commission DG Joint Research Centre naše laboratoř obdržela IRM s deklarovanou hodnotou 75 µg/kg. Materiál byl analyzován v paralelním opakování. Naměřené hodnoty a výsledky jsou shrnuty v tabulkách č. 25 a 26.

Tabulka č. 25: ZON- správnost hodnoty IRM

Popis	Referenční hodnota (µg/kg)	Referenční přesnost (µg/kg)	Měření 1 (µg/kg)	Měření 2 (µg/kg)
IRM	75	10	77,61	75,06

Tabulka č. 26: ZON- správnost výsledky IRM

Referenční hodnota (µg/kg)	Naměřeno (µg/kg)	Výtěžnost (%)	Referenční přesnost (µg/kg)	Přesnost (µg/kg)	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti
75	76,335	101,78	10	1,80312	Přijata	Přijata

Stanovená výtěžnost je 102 %. Správnost metody byla také prověřena metodou standardního přídávku. K tomuto účelu byl použit vzorek krmné suroviny, která vykazovala nulové hodnoty zearalenonu. K výchozímu vzorku bylo přidáno známé množství standardního

roztoku ZONu o koncentraci 200 μ g/ml a byly připraveny 3 koncentrační hladiny, odpovídající koncentračnímu rozsahu stanovených vzorků. Takto připravené vzorky byly analyzovány a výsledky byly zpracovány v programu EffiValidation 3.0 - Správnost: „Velký koncentrační rozsah – slepý pokus k dispozici“. Byl zvolen t-test – testování správnosti po úrovních. Naměřené hodnoty a výsledky jsou shrnuty v tabulkách č. 27 a 28.

Tabulka č. 27: ZON- správnost- standardní přidavek hodnoty

Předloženo (μg/kg)	Měření 1 (μg/kg)	Měření 2 (μg/kg)
160	167,17	160,93
400	394,77	380,45
800	787,81	780,89

Tabulka č. 28: ZON- správnost- standardní přidavek výsledky

Přidavek (μg/kg)	Naměřeno (μg/kg)	Výtěžnost (%)	Přesnost (μg/kg)	Hypotéza
160	164,049	102,53	4,41447	Přijata
400	387,611	96,90	10,12577	Přijata
800	784,348	98,04	4,89671	Přijata

Metoda ověřená standardním přídatkem poskytuje výtěžky 97 % až 103 %.

Správnost metody byla také ověřena účastí ve Validaci analytické metody na stanovení obsahu zearalenonu v krmivu, pořádané European Commission DG Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements v červnu roku 2005. Výsledky z naší laboratoře vyhovovaly všem parametrům.

Mez detekce a stanovitelnosti

K vyhodnocení byla použita metoda: „Ze signálu slepého pokusu v chromatografii“.

Maximální kolísání základní linie (mA): 0,00066

Směrnice kalibrační přímky: 0,01011

Tabulka č. 29: ZON – mez detekce a mez stanovitelnosti

Měření na mezi detekce (mA)	Měření na mezi stanovitelnosti (mA)	Validovaná vlastnost na mezi detekce (ng/ml)	Validovaná vlastnost na mezi stanovitelnosti (ng/ml)
0,0018	0,006	0,17822	0,59406

Mez detekce/stanovitelnosti je 0,0018 resp. 0,006 jednotek. Validovaná vlastnost na mezi detekce/stanovitelnosti je 0,17822 resp. 0,04065 ng/ml. Výsledky je nutné násobit šesti (ředění během analýzy). Mez detekce je 1,1 µg/kg a mez stanovitelnosti 3,6 µg/kg. Do Programu LAB byla zadána hodnota - Limit detekce: 5 µg/kg.

Nejistota

Nejistota byly vyhodnocena programem EffiValidation 3.0 – „Z dat pro hodnocení přesnosti – vícenásobná měření k dispozici“. Předpokládá se, že všechny uvažované zdroje nejistot jsou reprezentativně zastoupeny v datech. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 30.

Tabulka č. 30: ZON- nejistota

Charakteristika	Hodnota	Charakteristika	Hodnota
Vypočtená hodnota (µg/kg)	45,9622	Faktor pokrytí	2
St. nejistota (µg/kg)	5,12847	Rozšířená st. nejistota (µg/kg)	10,25633
Rel. st. nejistota (%)	11,15736	Rel. rozšířená nejistota (%)	22,31471

Relativní rozšířená nejistota je 22 %.

Do programu LAB pro zápis hodnot obsahu látek ve vzorcích v naší laboratoři byla zadána hodnota 25 %.

Reprodukovatelnost

V lednu 2005 se laboratoř zúčastnila Validace metody na stanovení ZONu (viz. Příloha), ve které byla stanovena reprodukovatelnost. Výsledky jsou v tabulce č. 31.

Tabulka č. 31: ZON- reprodukovatelnost

Hladina ($\mu\text{g/kg}$)	RSD _R (%)
31,5	17,3
69,7	16,3
87,4	21,4
126,0	17,7
306,8	15,5

Relativní reprodukovatelnost se pohybovala od 16 do 21 %.

Zhodnocení metody pro zearalenon

Dle Směrnice komise 2005/38/ES v příloze II – Pracovní charakteristiky pro metody na stanovení zearalenonu laboratoře musejí splňovat následující kritéria:

Tabulka č. 32: Pracovní charakteristiky pro zearalenon

Množství ($\mu\text{g/kg}$)	Zearalenon		
	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Výtěžnost (%)
≤ 50	≤ 40	≤ 50	60 až 120
> 50	≤ 25	≤ 40	70 až 120

Relativní opakovatelnost námi stanovených vzorků byla 20 %. Na hladině do 50 $\mu\text{g/kg}$ byly zjištěny 2 vzorky a splňují požadavek rel. opakovatelnosti (40 % a 16 %) a ve druhé hladině se rel. opakovatelnost pohybuje mezi 4 % až 10 %. Je rovněž vyhovující.

Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky a splňuje kritéria výtěžnosti. Stanovené výsledky jsou na hladině okolo 50 $\mu\text{g/kg}$ 102 % (IRM), ve druhé hladině 99 % (CRM) a 97 % až 103 % (vzorky se standardním přídatkem).

Relativní směrodatná odchylka RSD_R se pohybovala mezi 16 % až 21 % a splňuje daná kritéria.

4.2 LC/MS metody

4.2.1 Fumonisin B₁ a B₂ (FUM B₁ a B₂)

Vývoj a optimalizace metody

Pro stanovení obsahu fumonisinu platí norma ČSN EN 13585 „Potraviny- Stanovení fumonisinů B₁ a B₂ v kukuřici- Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s přečištěním extrakcí na pevné fázi“. Metoda byla odzkoušena, ale zatím nebyla zavedena, požadované vzorky byly analyzovány LC/MS metodou. Extrakce a přečištění extraktu probíhalo podle návodu firmy Vicam, který byl dodán spolu s imunoafinitními kolonkami. Z publikovaných článků byla potom vybrána a optimalizována MS/MS metoda s předchozí separací na kapalinovém chromatografu určená ke kvantifikaci fumonisinů. Podrobný postup je popsán v SOP č. 33.

Validace metody

Metoda byla validována, byly určeny tato validační parametry: opakovatelnost, správnost, mez detekce a mez stanovitelnosti, výtěžnosti.

Opakovatelnost

V roce 2005 bylo analyzováno 56 vzorků krmných surovin v rámci monitoringu nežádoucích a zakázaných látek. Pro stanovení opakovatelnosti byly vybrány 3 vzorky s pozitivním výskytem fumonisinů. K vyhodnocení opakovatelnosti byla vybrána metoda: „Po úrovních z vícenásobného měření“. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v tabulkách č. 33 a 35; vyhodnocení v tabulkách č. 34 a 36.

Tabulka č. 33: Naměřené hodnoty pro Fumonisin B₁

Číslo vzorku	Materiál	Měření 1 (µg/kg)	Měření 2 (µg/kg)	Měření 3 (µg/kg)	Měření 4 (µg/kg)
1571	kukuřice	22,50	19,01	19,51	21,67
1664	kukuřice	2,04	2,57	-	-
1789	kukuřice	6,30	6,76	5,96	-

Tabulka č. 34: Vyhodnocení pro Fumonisin B₁

Číslo vzorku	Průměr (µg/kg)	Opakovatelnost (µg/kg)	Relativní opakovatelnost (%)
1571	20,6725	1,6783	8,11852
1664	2,3050	0,3748	16,25885
1789	6,3400	0,4015	6,33276

Tabulka č. 35: Naměřené hodnoty (µg/kg) pro Fumonisin B₂

Číslo vzorku	Materiál	Měření 1 (µg/kg)	Měření 2 (µg/kg)	Měření 3 (µg/kg)	Měření 4 (µg/kg)
1571	kukuřice	195,0	172,8	193,01	209,68
1664	kukuřice	14,54	13,67	17,57	14,51
1789	kukuřice	7,51	5,16	6,76	-

Tabulka č.36: Vyhodnocení pro Fumonisin B₂

Číslo vzorku	Průměr (µg/kg)	Opakovatelnost (µg/kg)	Relativní opakovatelnost (%)
1571	192,6225	15,16237	7,87155
1664	15,0725	1,71313	11,36595
1789	6,47667	1,20035	18,53341

Relativní opakovatelnost námi stanovených vzorků je 9,51 % pro Fumonisin B₁ a 12,55 % pro Fumonisin B₂.

Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly stanoveny z poměru S/N (signal to noise) – signálu k šumu. Jako mez detekce se udává hodnota S/N = 3 a jako mez stanovitelnosti je stanovena hodnota S/N = 10.

Tabulka č 37: Meze detekce a stanovitelnosti pro Fumonisin B₁,B₂

Mykotoxin	Mez detekce (µg/kg)	Mez stanovitelnosti (µg/kg)
Fumonisin B ₁	0,6	2
Fumonisin B ₂	3	10

Mez detekce pro Fumonisin B₁ je 0,6 µg/kg, pro Fumonisin B₂ 3 µg/kg; meze stanovitelnosti jsou pro FUM B₁ 2 µg/kg a pro FUM B₂ 10 µg/kg.

Správnost

Správnost byla ověřena metodou standardního přídávku na vzorcích negativního výskytu fumonisinů a na vzorku s pozitivním výskytem v různých množstevních hladinách. Přidáno bylo různé množství směšného standardního roztoku fumonisinů. Výtěžnosti byly vypočteny z průměrného výsledku měření. Shrnutí je v tabulkách č. 38 a 39.

Tabulka č. 38: Ověření správnosti metody standardním přídávkem pro Fumonisin B₁

Číslo vzorku/ obsah FUM B ₁ (µg/kg)	Přidané množství (µg/kg)	Měření 1 (µg/kg)	Měření 2 (µg/kg)	Výtěžnost (%)
1571/ 20,7	200	155,4	144,3	64,6
1571/ 20,7	320	248,7	269,1	74,4
1280/ 0	600	480,6	430	75,9
895/ 0	600	467,2	428,8	74,7

Tabulka č. 39: Ověření správnosti metody standardním přídávkem pro Fumonisin B₂

Číslo vzorku/ obsah FUM B ₂ (µg/kg)	Přidané množství (µg/kg)	Měření 1 (µg/kg)	Měření 2 (µg/kg)	Výtěžnost (%)
1571/ 193	200	342,8	340,2	74,3
1571/ 193	320	490,4	516,9	97,1
1280/ 0	600	407,3	432,5	70,0
895/ 0	600	489,7	505,5	82,9

Výtěžnosti fumonisinů B₁ a B₂ stanovené pomocí standardního přídávku jsou v rozmezí 64 % až 90 % pro koncentrační hladinu do 500 µg/kg a v rozmezí 70 % až 83 % pro koncentrační hladinu nad 500 µg/kg.

Nejistoty a reprodukovatelnost

Z důvodu absence kruhového testu nebyly stanoveny.

Zhodnocení metody pro fumonisin B₁ a B₂

Dle Směrnice komise 2005/38/ES v příloze II- Pracovní charakteristiky pro metody na stanovení fumonisinů B₁ a B₂ laboratoře musí splňovat následující kritéria uvedená v tabulkách č. 40 a 41.

Tabulka č. 40: Kritéria hodnocení metody- relativní směrodatná odchylka

Množství (µg/kg)	RSD _r (%)
≤ 500	≤ 30
> 500	≤ 20

RSD_r- relativní směrodatná odchylka vypočtená z výsledků získaných za podmínek opakovatelnosti.

Tabulka č. 41: Kritéria hodnocení metody- výtěžnosti fumonisinů B₁ a B₂

Množství (µg/kg)	Výtěžnost (%)
≤ 500	60 – 120
> 500	70 – 110

Relativní opakovatelnost námi stanovených vzorků byla 9,51 % pro Fumonisin B₁ a 12,55 % pro Fumonisin B₂. Všechny změřené vzorky byly na hladině nižší než 500 µg/kg a splňují podmínky relativní opakovatelnosti do 30 %.

Výtěžnosti fumonisinů byly stanoveny na obou koncentračních hladinách a také splňují požadavky Směrnice komise 2005/38/ES.

4.2.2 Aflatoxiny B₁, B₂, G₁ a G₂

Vývoj a optimalizace metody

Metoda na stanovení aflatoxinů v krmných surovinách a krmivech dosud nebyla zařazena do českých ani evropských norem. V platnosti je pouze ČSN EN 12955 „Potraviny- Stanovení aflatoxinu B₁ a sumy aflatoxinů B₁, B₂, G₁ a G₂ v cereáliích, skořápkových plodech

a podobných výrobcích- Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s postkolonovou derivatizací přečištěním na imunoafinitní koloně“. Metoda nebyla zavedena, vzorky na stanovení aflatoxinů byly analyzovány LC/MS metodou.

Aflatoxiny byly extrahovány podle postupu firmy Vicam, dodaného společně s imunoafinitními kolonkami pro stanovení aflatoxinů. Metoda pro kvalitativní i kvantitativní stanovení aflatoxinů byla navržena a optimalizována z publikovaných prací tak, aby splňovala hlavní validační parametry. Využito bylo iontového zdroje APPI a ke kvantifikaci jsme použili opět MS/MS metodu. Podrobný postup je popsán v SOP č. 33.

Validace metody

Metoda byla validována, byly určeny tato validační parametry: opakovatelnost, správnost, mez detekce a mez stanovitelnosti, výtěžnosti.

Opakovatelnost

V roce 2005 bylo analyzováno na přítomnost aflatoxinů 56 vzorků krmných surovin v rámci monitoringu nežádoucích a zakázaných látek. Jelikož všechny analyzované vzorky krmných surovin, se ukázaly jako negativní, relativní opakovatelnost byla stanovena na vzorku s různým přídatkem standardních roztoků jednotlivých aflatoxinů.

K vyhodnocení opakovatelnosti byla vybrána metoda: „Po úrovních z vícenásobného měření“. Naměřené hodnoty a vyhodnocení jsou shrnuty v tabulkách č. 42 až 49.

Tabulka č. 42: Naměřené hodnoty pro Aflatoxin B₁

Číslo vzorku	Materiál	Měření 1 (µg/kg)	Měření 2 (µg/kg)
1776 A	kukuřice	30,02	32,23
1776 B	kukuřice	8,61	8,55
1776 C	kukuřice	6,01	6,31
1776 D	kukuřice	32,55	34,45
1776 E	kukuřice	10,8	9,26
1776 F	kukuřice	2,19	2,11

Tabulka č. 43: Vyhodnocení pro Aflatoxin B₁

Číslo vzorku	Průměr (µg/kg)	Opakovatelnost (µg/kg)	Relativní opakovatelnost (%)
1776 A	31,13	1,5556	4,9972
1776 B	8,58	0,0424	0,4945
1776 C	6,16	0,2121	3,4437
1776 D	33,50	1,3435	4,0105
1776 E	10,03	1,0889	10,8569
1776 F	2,15	0,0566	2,6311

Tabulka č. 44: Naměřené hodnoty pro Aflatoxin B₂

Číslo vzorku	Materiál	Měření 1 (µg/kg)	Měření 2 (µg/kg)
1776 A	kukuřice	9,51	10,22
1776 B	kukuřice	3,55	3,01
1776 C	kukuřice	2,18	1,94

Tabulka č. 45: Vyhodnocení pro Aflatoxin B₂

Číslo vzorku	Průměr (µg/kg)	Opakovatelnost (µg/kg)	Relativní opakovatelnost (%)
1776 A	9,865	0,50205	5,089
1776 B	3,280	0,38184	11,641
1776 C	2,060	0,16971	8,238

Tabulka č. 46: Naměřené hodnoty pro Aflatoxin G₁

Číslo vzorku	Materiál	Měření 1 (µg/kg)	Měření 2 (µg/kg)
1776 A	kukuřice	16,36	18,14
1776 B	kukuřice	5,76	7,04
1776 C	kukuřice	3,78	3,49

Tabulka č. 47: Vyhodnocení pro Aflatoxin G₁

Číslo vzorku	Průměr (µg/kg)	Opakovatelnost (µg/kg)	Relativní opakovatelnost (%)
1776 A	17,250	1,2587	7,297
1776 B	6,400	0,9051	14,142
1776 C	3,635	0,2051	5,641

Tabulka č. 48: Naměřené hodnoty pro Aflatoxin G₂

Číslo vzorku	Materiál	Měření 1 (µg/kg)	Měření 2 (µg/kg)
1776 A	kukuřice	9,40	10,16
1776 B	kukuřice	3,30	2,62
1776 C	kukuřice	2,91	2,53

Tabulka č.49: Vyhodnocení pro Aflatoxin G₂

Číslo vzorku	Průměr (µg/kg)	Opakovatelnost (µg/kg)	Relativní opakovatelnost (%)
1776 A	9,78	0,5374	5,495
1776 B	2,96	0,4808	16,244
1776 C	2,72	0,2687	9,879

Relativní opakovatelnosti analytické metody jsou pro jednotlivé aflatoxiny B₁, B₂, G₁ a G₂ 5,45 %; 8,74 %; 9,75 % a 11,33 %.

Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly stanoveny z poměru S/N (signal to noise) – signálu k šumu. Jako mez detekce se udává hodnota S/N = 3 a jako mez stanovitelnosti je stanovena hodnota S/N = 10.

Tabulka č. 50: Meze detekce a stanovitelnosti pro aflatoxiny B₁, B₂, G₁ a G₂

Mykotoxin	Mez detekce S/N = 3 (µg/kg)	Mez stanovitelnosti S/N = 10 (µg/kg)
Aflatoxin B₁	0,3	1
Aflatoxin B₂	1,2	4
Aflatoxin G₁	2,1	7
Aflatoxin G₂	2,1	7

Správnost

Správnost byla ověřena metodou standardního přídávku na vzorcích negativního výskytu aflatoxinů na různých množstevních hladinách rozdělených podle normy ES.

Tabulka č. 51: Ověření správnosti metody standardním přídávkem pro Aflatoxin B₁

Číslo vzorku	Přidané množství (µg/kg)	Měření 1 (µg/kg)	Měření 2 (µg/kg)	Výtěžnost (%)
1776 A	38	30,02	32,23	81,9
1776 B	10	8,61	8,55	85,8
1776 C	8	6,01	6,31	77,0
1776 D	40	32,55	34,45	83,8
1776 E	12	10,80	9,26	83,6
1776 F	3	2,11	2,19	71,7

Tabulka č. 52: Ověření správnosti metody standardním přídávkem pro Aflatoxin B₂

Číslo vzorku	Přidané množství (µg/kg)	Měření 1 (µg/kg)	Měření 2 (µg/kg)	Výtěžnost (%)
1776 A	12	9,51	10,22	82,2
1776 B	3,75	3,55	3,01	87,5
1776 C	2,5	2,18	1,94	82,4

Tabulka č. 53: Ověření správnosti metody standardním přídatkem pro Aflatoxin G₁

Číslo vzorku	Přidané množství (µg/kg)	Měření 1 (µg/kg)	Měření 2 (µg/kg)	Výtěžnost (%)
1776 A	20	16,36	18,14	86,3
1776 B	7,5	5,76	7,04	85,3
1776 C	5	3,78	3,49	72,7

Tabulka č. 54: Ověření správnosti metody standardním přídatkem pro Aflatoxin G₂

Číslo vzorku	Přidané množství (µg/kg)	Měření 1 (µg/kg)	Měření 2 (µg/kg)	Výtěžnost (%)
1776 A	12	9,40	10,16	81,5
1776 B	3,75	3,30	2,62	78,9
1776 C	2,5	2,91	2,53	108,8

Zhodnocení metody pro aflatoxiny B₁, B₂, G₁ a G₂

Dle Směrnice komise 98/53/ES musí analytická metoda pro stanovení aflatoxinů splňovat následující kritéria uvedená v tabulkách č. 55 a 56.

Tabulka č. 55: Kritéria hodnocení metody podle směrnice komise 98/53/ES

Množství (µg/kg)	RSD _r (%)
≤ 1	≤ 45
> 1 ≤ 10	≤ 32
> 10	≤ 23

RSD_r- relativní směrodatná odchylka vypočtená z výsledků získaných za podmínek opakovatelnosti.

Tabulka č. 56: Výtěžnosti aflatoxinů podle Směrnice komise 98/53/ES

Množství ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Výtěžnost (%)
≤ 1	50 – 120
$> 1 \leq 10$	70 – 110
> 10	80 – 110

Relativní opakovatelnost námi stanovených vzorků byla 5,45 % pro Aflatoxin B₁; 8,74 % pro Aflatoxin B₂; 9,75 % pro Aflatoxin G₁ a 11,33 % pro Aflatoxin G₂. Všechny tyto hodnoty splňují požadavky směrnice 98/53/ES.

Výtěžnosti aflatoxinů byly stanoveny na dvou koncentračních hladinách a také splňují požadavky Směrnice komise 98/53/ES.

5 Závěr

Cílem práce bylo vyvinout HPLC a LC/MS metody na stanovení ochratoxinu A, deoxynivalenonu, zearalenonu, aflatoxinů a fumonisinů v krmivech, provést jejich částečnou validaci a zjistit, zda jsou v souladu s příslušnými nařízeními ES.

Byly stanoveny jednotlivé validační parametry v koncentračních rozsazích, které předepisují nařízení ES a které odpovídají výskytu těchto látek v reálných vzorcích. Výsledky opakovatelnosti jsou akceptovatelné vzhledem k nařízením.

Správnost metod stanovení mykotoxinů byla ověřena analýzami certifikovaných referenčních materiálu firmy R-Bhiopharm a metodami standardního přídatku. Následné ověření v programu EffiValidation 3.0 potvrdilo, že analytické metody poskytují statisticky správné výsledky. Byly splněny podmínky výtěžností.

Pro jednotlivé metody byly stanoveny meze detekce a meze stanovitelnosti a relativní rozšířené nejistoty.

Z uspokojivých výsledků lze metody doporučit a používat k analýzám jednotlivých mykotoxinů v testovaných maticích- krmivech. V případě jiných matic (siláže a senáže) může docházet vzhledem k jejich povaze (vlhkost, pH) k nečekaným problémům a komplikacím, které bude nutné řešit.

6 Literatura

1. RNDr. František Malíř, Ph.D.; Vladimír Ostrý, CSc.; a kolektiv autorů, *Vláknité mikromycety (plísňě) mykotoxiny a zdraví člověka*, 1; Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských oborů: Brno, **2003**.
2. Leo M. L. Nollet.; Determination of Mycotoxins in Grains and Related Products. Food Analysis by HPLC,2; Marcel Dekker, Inc.: New York, **2000**; 493 – 523.
3. Příručka jakosti ÚKZÚZ, NRL-RO Brno, SOP č. 23, Stanovení obsahu mykotoxinů v krmivech
4. Vilamová, V.: Zabezpečení jakosti výsledků zkoušek, Bulletin LO 2004/2, ÚKZÚZ Brno, **2004**, str. 1 – 19.
5. Centner, V.: Uživatelská příručka Efivaldation 3.0, **2005**.
6. ZearalaTest, Instruction Manual; VICAM, L.P.: USA, **1998**.
7. DONtest HPLC Instruction Manual; VICAM, L.P.: USA, **1999**.
8. OchraTest Instruction Manual; VICAM, L.P.: USA, **1999**.
9. AlfaTest Instruction Manual; VICAM, L.P.: USA, **1999**.
10. FumoniTest Instruction Manual; VICAM, L.P.: USA, **1998**.
11. FUMONIPREP for detection of fumonisins B₁, B₂ and B₃ usin HPLC instructions for use; R-BIOPHARM RHONE LTD, **2003**.
12. ALFAPREP application of immunoaffinity columns for sample clean-up prior to HPLC analysis for aflatoxins, instructions for use; R-BIOPHARM RHONE LTD, **2003**.
13. EASI-EXTRACT Zearalenone for sample clean-up prior to detection of zearalenone using HPLC analysis, instructions for use; R-BIOPHARM RHONE LTD, **2003**.
14. DONPREP immunoaffinity column for detection of deoxynivalenol in cereals and cereal based products using HPLC, instructins for use,; R-BIOPHARM RHONE LTD, **2003**.
15. OCHRAPREP quantitative detection of ochratoxin A, instructions for use; R-BIOPHARM RHONE LTD, **2003**.
16. KOTAL F., RADOVÁ Z., A Simple Method for Determination of Deoxynivalenol in Cereals and Flours. Czech J. Food Sci., 20: 63 – 68.
17. ČSN EN 13585 Potraviny- Stanovení fumonisinů B₁ a B₂ v kukuřici- Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s předčištěním extrakcí na pevnou fázi, Český normalizační institut, Praha, **2002**.
18. ČSN EN 14132 Potraviny- Stanovení ochratoxinu A v ječmeni a pražené kávě- Metoda HPLC s předčištěním na imunoafinitní kolonce, Český normalizační institut, Praha, **2004**.
19. ČSN EN 12955 Potraviny- Stanovení aflatoxinu B₁ a sumy aflatoxinů B₁, B₂, G₁ a G₂ v cereáliích, skořápkových plodech a podobných výrobcích- Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s postkolonovou derivatizací a přečištěním na imunoafinitní koloně, CEN, Brussel **1999**.
20. Method for Determination of Deoxynivalenol in Baby Food and Animal Feed by Immunoaffinity Column Clean-up with HPLC using Ultraviolet Absorption, Validation of an analytical method – Collaborative Study, EC-JRC-IRMM, Geel, Belgium, **2005**.
21. Method for Determination of Zearalenone in Baby Food and Animal Feed by Immunoaffinity Column Clean-up with HPLC using Fluorimetry, Validation of an analytical method – Collaborative Study, EC-JRC-IRMM, Geel, Belgium.
22. A.F. Bittencourt, C.A.F. Oliviera, P. Dilkin, B. Correa, *Food Control* **2005**, 16, 117 – 120.

24. D. Royer, H.U. Humpf, P.A. Guy, *Food Addit. Contam.*, **2004**, 21, 678 – 692.
25. J. Nedělník, H. Moravcová, *Současný pohled na problematiku mykotoxinů*, 2005, in Conference proceedings: Effect of abiotic and biotic stress factors on plant qualities 2005, Research institute of crop production, Praha- Ruzyně.
26. K. Reif, W. Metzger, *J. Chromatogr. A*, **1995**, 692, 131 – 136.
27. J. Blesa, J.M. Soriano, J.C. Moltó, R. Marín, J. Manes, *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1011, 49 – 54.
28. M. Takino, T. Tanaka, K. Yamaguchi, T. Nakahara, *Food Addit. Contam.*, **2004**, 21, 76 – 84.
29. M. Ventura, A. Gómez, I. Anaya, J. Diaz, F. Broto, M. Agut, L. Comellas, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1048, 25 – 29.
30. Application note LC/MS-09, LC/MS Analysis of Aflatoxins in Food Samples Using an Ion Trap, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, **1999**.
31. M. Solfrizzo, G. Avantaggiato, A. Visconti, *J. Chromatogr. A*, 1998, 815, 67 – 73.
32. G. Buttinger, E. Fuchs, H. Knapp, F. Berthiller, R. Schuhmacher, E. M. Binder, R. Kirska, *Food Addit. Contam.*, **2004**, 21, 1107 – 1114.
33. J. M. Sáez, Á. Medina, J.V. Gimeno-Adelantado, R. Mateo, M. Jimenez, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1029, 125 – 133.
34. M. Becker, P. Degelmann, M. Herderich, P. Schreier, H.U: Humpf, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 818, 260 – 264.
35. Application note LC/MS-16, LC-ESI Ion Trap MS for Quantification of Ochratoxin A in Plant Extracts, Bruker Daltonics, Leipzig, Germany, **2001**.
36. R. Biffi, M. Munari, L. Dioguardi, C. Ballabio, A. Cattaneo, C.L. Galli, P. Restani, *Food Addit. Contam.*, **2004**, 21, 586 – 591.
37. D. Jornet, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 882, 29 – 35.
38. A. Tafuri, R. Ferracane, A. Ritieni, *Food Chem.*, **2004**, 88, 487 – 494.
39. E. Razzari-Fazali, J. Bohm, W. Luf, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 854, 45 – 55.
40. Application Note: 303, J.H. Oncur, Analysis of Vomitoxin (DON), Thermo Electron Corporation, USA, **2004**.
41. R.C. Schothorst, A.A. Jekel, H.P. Van Egmond, A. de Mul, P.E. Boon, J.D. Van Klaveren, *Food Addit. Contam.*, **2005**, 22-1, 48 – 55.
42. F. Kotal, K. Holadová, J. Hajšlová, J. Poustka, Z. Radová, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 830, 219 – 225.
43. L. Daško, D. Raouová, E. Belajová, M. Kováč, *Czech J. Food. Sci.*, **2005**, 23, 20- 26.
44. K. Meyer, K. Mohr, J. Bauer, P. Horn, M. Kovács, *Food Addit. Cotam.*, **2003**, 20- 7, 639 – 647.
45. M.F.P.M. de Castro, G.S. Stephard, V. Sewram, E. Vicente, T.A. Mendonca, A.C. Jordan, *Food Addit. Contam.*, **2004**, 21-7, 693 – 699.
46. G.s. Stephard, V. Sewram, *Food Addit. Contam.*, **2004**, 21-5, 498 – 505.
47. Application Brief: F. Mandel, Analysis of Fumonisin Mycotoxins by LC/MS, Agilent Technologies, **2000**.
48. Application Brief: 4-07-031222, Rapid Quantitation of Fumonisin B₁, B₂ and B₃ in cereals by LC-MS. **2003**, Romer Labs, Ins.
49. P.N. Nikiema, L. Worrillow, A.S. Traore, C.P. Wild, P.C. Turner, *Food Addit. Contam.*, **2004**, 21-9, 865 – 870.
50. J.L. Urraca, M.D. Marazuela, M.C. Moreno-Bondi, *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 524, 175-183.
51. E. Rosenberg, R. Krska, R. Wissiack, V. Kmetov, R. Josephs, E. Razzari, M. Grasserbauer, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 819, 277 – 288.
52. P. Zollner, J. Jodlbauer, W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 858, 167 – 174.

53. N. Nuryono, C.T. Noviandi, J. Bohm, E. Razzazi-Fazelli, *Food Control*, **2005**, 16, 65 – 71.
54. P. Zollner, D. Berner, J. Jodlbauer, W. Lindner, *J. Chromatogr. B*, **2000**, 738, 233 – 241.
55. J. Jodlbauer, P. Zollner, W. Lindner, *Chromatographia*, **2000**, 51, 681 – 687.
56. A. Laganá, G. Fago, A. Marino, D. Santarelli, *Rapid Commun. Mass Spectro.*, **2001**, 15, 304 – 310.
57. F.M. Launay, P.B. Young, S.S. Sterk, M.H. Blokland, D.G. Kennedy, *Food Addit. Contam.*, **2004**, 21-1, 52 – 62.
58. E.O. van Bennekom, L. Brouwer, E.H.M. Laurant, H. Hooijerink, M.W.F. Nielen, *Anal. Chim. Acta*, **2002**, 473, 151 – 160.
59. Application Note 350, Extraction of Zearalenone from Wheat and Corn by Accelerated Solvent Extraction (ASE), 2004, Dionex Corporation, USA.
60. SOP č. 23, Stanovení obsahu mykotoxinů metodou HPLC.
61. SOP č. 33, Stanovení obsahu mykotoxinů metodou LC/MS.

Stanovení vybraných OCP v krmivech metodou GC-NCI-MS

Petra Kosubová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2,
656 06 Brno,
petra.kosubova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Pro stanovení zakázaných organochlorových látek (OCP) v krmivech je v laboratoři zavedena metoda plynové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (GC-MS/MS). Pro stanovení látek obsahujících elektronegativní atomy, například pro OCP a PCB, je možné využít selektivní a citlivou MS detekci s negativní chemickou ionizací (NCI-MS). Hmotnostní spektrometr Varian MS 1200 umožňuje pracovat za různých podmínek ionizace, v různých skenovacích režimech. Jednotlivé testované MS techniky byly porovnány na základě detekčních a kvantifikačních limitů a posouzeny z hlediska jejich využití při rutinní kontrole OCP v krmivech.

2 Úvod

Kontrola OCP v krmivech se zpravidla provádí pomocí plynové chromatografie (GC) ve spojení s hmotnostní detekcí (MS), případně detekcí záchytem elektronu (ECD). Požadavky na kontrolní metody pro analýzu nežádoucích látek v krmivech vycházejí z Rozhodnutí komise 2002/657/EC (1). Kontrola nežádoucích látek souvisí v praxi s hodnotami maximálních přípustných obsahů stanovenými v normách. Hodnoty maximálních obsahů jednotlivých organochlorových látek v krmivech jsou uvedeny ve směrnici Komise 2006/77/ES (2). Obecně platí, že metody použité pro stanovení nežádoucích látek musejí splňovat požadavky kladené na kontrolní metody (1) a zároveň umožňovat stanovení obsahů menších než jsou maximální obsahy stanovené normou (2), tj. poskytovat nízké detekční a kvantifikační limity.

Nejčastěji používanou detekční technikou, doporučenou v normách a metodických standardech, je MS v režimu monitorování vybraných iontů (SIM) za podmínek elektronové

ionizace (EI) (3,4). Negativní chemická ionizace (NCI) je měkká ionizační technika podporující tvorbu molekulového iontu, který se zpravidla sleduje v SIM režimu. NCI-MS-SIM vykazuje vyšší citlivost, neboli nižší detekční limity při analýze látek obsahujících elektronegativní atomy, například chlór u OCP. Jejím nedostatkem je zvýšená variabilita odezev MS a větší nároky na údržbu přístroje. Další detekční metodou je selektivní tandemová MS (MS/MS), která vykazuje minimální ovlivnění interferujícími látkami. Citlivost stanovení sledovaných látek v různých MS režimech lze porovnat pomocí jejich detekčních (LOD) a kvantifikačních (LOQ) limitů.

Pro hodnocení těchto parametrů existují různé přístupy, které shrnuje Johannes Corley v práci zabývající se problematikou stanovení pesticidních látek (5). V roce 1975 IUPAC definoval LOD, jako nejnižší koncentrační hladinu či množství analytu, které může být statisticky odlišitelné od hodnoty analytického slepého stanovení. V současnosti IUPAC definuje LOD jako minimální detekovatelné množství daného analytu ve vzorku stanovené s chybou β , která popisuje riziko, že analyt přítomný ve vzorku nebude detekován. Dále rozlišujeme dva typy LOD, instrumentální detekční limit (IDL) a detekční limit metody (MDL). IDL, respektive IQL popisují pouze citlivost finálního stanovení, přístroje. Celkový analytický postup je charakterizován pomocí limitů metody, a to MDL a MQL, zahrnující vlivy jednotlivých fází stanovení a vlivy matrice. Základní přístup IUPAC poskytuje dobré odhady MDL a MQL spektroskopických metod, avšak v případě chromatografických technik selhává. EPA využívá pro stanovení limitů chromatografických metod poměru chromatografického signálu k šumu a doporučuje dvoustupňový postup jejich stanovení. V první fázi se provede odhad limitů a v druhém kroku jsou stanoveny hodnoty MDL a MQL v rámci validace metody na hladině blízké se limitu kvantifikace (5).

Cílem úkolu bylo vytvořit NCI-MS-SIM metodu pro stanovení vybraných OCP s využitím přístroje Varian MS 1200. NCI-MS-SIM metodu dále porovnat s EI-MS-SIM a EI-MS/MS metodami na základě limitů vypočítaných pomocí různých přístupů hodnocení. Testované MS metody posoudit z hlediska jejich využití při rutinní kontrole OCP v krmivech.

3 Materiál a metody

Materiál a metody použité při zpracování této práce jsou popsány v SOP č. 30 NRL-RO Brno (6). Optimalizace a zavedení EI-MS/MS metody, která je využívána v laboratoři při rutinních stanoveních PCB a OCP v různých materiálech, je popsáno ve VÚ K6/2005 (7). EI-MS-SIM

technika byla v laboratoři testována v rámci validace evropské normy pro stanovení PCB a OCP v krmivech metodou GC-MS pořádané technickou komisí CEN/TC 327 (4).

Všechna měření byla prováděna pomocí MS 1200 Varian ve spojení s plynovým chromatografem CP-3800 (Varian, USA). GC byl vybaven kapilární kolonou DB-XLB (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, J&W Scientific). Splitless nástřik byl 1 μl, průtok nosného plynu (He, 5.0) 1 ml/min, teplota injektoru pro základní OCP 270 °C a pro rozšiřující OCP 250 °C. Teplotní program byl následující: 90 °C (1 min), 200 °C (25 °C/min), 250 °C (4 °C/min), 280 °C (15 °C/min, 15 min). Nastavení MS v jednotlivých měřících módech je uvedeno v tabulce č. 1.

Tabulka 1. MS podmínky při stanovení OCP v různých režimech měření

Metoda	NCI-MS-SIM	EI-MS-SIM	EI-MS/MS
Energie ionizace (eV)	150	70	70
Teplota iont. zdroje (°C)	120	200	200
Tlak plynu (Torr)	6,5 (CH ₄)	-	2,2 × 10 ⁻³ (Argon)
Sledované ionty (<i>m/z</i>)	M ⁻	M ⁺	M ⁺
Heptachlor	235, 237, 266	237, 272 , 274	272->235, 237 (-15V)
Aldrin	235, 237 , 239	66, 263 , 293	263->191, 193 (-35V)
Isodrin	237 , 239, 330	-	193-> 123 , 157 (-20V)
Oxychlordan	235, 237 , 315	185, 387 , 389	185-> 149 (-7V)
HEPX-B	235, 237 , 239	81, 351 , 353	353->281, 282 (-12V)
HEPX-A	235, 237 , 354	81, 351 , 353	183-> 155 (-15V)
γ-Chlordan	408 , 410, 412	371, 373 , 375	375->301, 303 (-12V)
α-Chlordan	237, 408 , 410	371, 373 , 375	375->301, 303 (-12V)
α-Endosulfan	237, 406 , 408	195, 241, 339	195-> 159 (-10V)
Dieldrin	235, 237 , 239	79, 263 , 277	263->191, 193 (-35V)
Endrin	235, 237 , 239	81, 263 , 317	263->191, 193 (-35V)
β-Endosulfan	237, 406 , 408	195, 241, 339	195-> 159 (-10V)
Methoxychlor	-	-	227-> 169 (-25V)
Mirex	368, 404, 439	-	272->235, 237 (-15V)
HCB	-	249, 282, 284	284-> 214 , 249 (-30V)
α-HCH	-	183 , 217, 219	219->147, 183 (-17,-10V)
β-HCH	-	183 , 217, 219	219->147, 183 (-17,-10V)
γ-HCH	-	183, 217, 219	219->147, 183 (-17,-10V)
δ-HCH	-	-	219->147, 183 (-17,-10V)
o,p'-DDE	-	246 , 248, 318	246-> 176 , 211 (-30V)
p,p'-DDE	-	246 , 248, 318	246-> 176 , 211 (-30V)
o,p'-DDD	-	165 , 235, 237	235-> 165 , 199 (-20V)
p,p'-DDD	-	165 , 235, 237	235-> 165 , 199 (-20V)
o,p'-DDT	-	165 , 235, 237	235-> 165 , 199 (-20V)
p,p'-DDT	-	165 , 235, 237	235-> 165 , 199 (-20V)

Kvantifikační ionty jsou označeny tučně.

4 Výsledky a diskuse

V první fázi zpracování vývojového úkolu byly porovnány jednotlivé měřicí techniky na základě jejich citlivosti. Instrumentální detekční limity byly spočteny pomocí poměru signálu k šumu odečteného z výsledků měření standardů. Pro vybranou skupinu OCP nebylo možné jednoznačně zvolit techniku poskytující nejnižší limity.

Tabulka 2. Porovnání detekčních limitů látek z rozšiřující skupiny OCP získaných pomocí různých detekčních technik.

Metoda	NCI-SIM	EI-SIM	EI-MS/MS
c (ng/ml)	20	10	10
Detekční limit (ng/ml)	IDL-S/N	IDL-S/N	IDL-S/N
Heptachlor	0,43	0,12	0,11
Aldrin	0,24	0,07	0,43
Oxychlordan	0,69	0,30	0,26
HEPX-B	0,31	0,07	0,51
HEPX-A	0,56	0,24	1,08
γ-Chlordan	0,26	0,06	1,45
α-Chlordan	0,62	0,07	1,63
α-Endosulfan	0,31	0,86	0,59
Dieldrin	0,37	0,26	0,84
Endrin	0,55	0,50	0,77
β-Endosulfan	0,28	1,23	0,51

NCI-MS-SIM poskytovala srovnatelné hodnoty IDL pro jednotlivé OCP. Za daných podmínek NCI byly sledovány molekulové ionty pouze u chlordanových sloučenin a isomerů endosulfanu. U ostatních OCP byla naměřena bohatší NCI-MS spektra obsahující nižší fragmentové ionty, které byly využity při kvantifikaci. U některých analytů, například oxychlordan a endrin, byly detekční limity charakterizující jednotlivé MS metody velice podobné.

Největší rozdíly v citlivosti testovaných MS technik byly pozorovány u chlordanových sloučenin. Jedná se o látky s výbornou citlivostí při EI-MS-SIM stanovení, protože poskytují za podmínek elektronové ionizace (70 eV) velice intenzivní molekulové ionty s vysokou molekulovou hmotností (m/z 373, 375, 377), tj. s minimem interferencí. V případě EI-MS/MS byly tyto ionty vybrány jako prekursorů k sekundární fragmentaci. Z hodnot IDL při této technice vyplývá velice nízký výtěžek disociace chlordanových prekursorů iniciované argonem, který se používá jako kolizní plyn u trojnásobných kvadrupolových MS.

Žádné změny tlaku argonu v kolizní cele ani změny použité kolizní energie nevedly k výraznému zlepšení citlivosti.

EI-MS-SIM technika vykazovala nízkou citlivost pro isomery endosulfanu a endrin, které podléhají za podmínek elektronové ionizace výrazné fragmentaci. Při stanovení těchto látek pomocí jejich nízkomolekulárních fragmentů dochází k výrazným interferencím ostatními látkami přítomnými ve sledované matrici. Přestože je tato metoda standardně uznávanou a používanou detekční technikou ve spojení s GC, v naší laboratoři je používána okrajově, například při ověřování norem, a je ve většině případů nahrazována selektivní EI-MS/MS technikou.

Tabulka 3. Porovnání detekčních limitů NCI-MS-SIM metody pro rozšiřující skupinu OCP získaných pomocí různých přístupů hodnocení limitů.

Detekční limit (ng/ml)	IDL-S/N	IDL-SD	Změna citlivosti ¹
Heptachlor	0,43	2,4	5,5
Aldrin	0,24	4,0	16,9
Isodrin	0,62	2,5	4,0
Oxychlordan	0,69	3,1	4,5
HEPX-B	0,31	3,3	10,6
HEPX-A	0,56	3,4	6,1
γ-Chlordan	0,26	3,5	13,3
α-Chlordan	0,62	3,5	5,6
α-Endosulfan	0,31	3,4	11,1
Dieldrin	0,37	3,6	9,6
Endrin	0,55	2,9	5,3
β-Endosulfan	0,28	3,1	11,3
Mirex	0,70	2,4	3,5
¹ poměr IDL-SD/IDL-S/N			

Odhad IDL pro NCI-MS-SIM byl proveden dvěma způsoby z dat naměřených pomocí matricových standardů. Hodnoty IDL-S/N byly spočteny pomocí poměru signálu k šumu. Přístup IDL-SD, který vychází ze stanovení přesnosti dané techniky, poukázal na výrazné zhoršení citlivosti MS techniky v porovnání s hodnotami IDL-S/N. IDL-SD hodnoty byly vypočteny jako trojnásobek směrodatné odchylky opakovaných analýz matricových standardů s nízkou koncentrací OCP. Snížení citlivosti bylo průměrně osminásobné, tj. téměř o jeden řád koncentrace. Snížená přesnost stanovení, která souvisí se zvýšenou variabilitou odezev, mohla být způsobena tlakovými změnami ionizačního plynu CH₄ v iontovém zdroji MS, aj. Vzhledem ke zvýšeným nárokům na údržbu MS při použití NCI-MS-SIM nebyla tato technika zavedena v laboratoři k rutinním analýzám, avšak lze ji využít ke confirmaci

sporných výsledků u kontaminovaných krmiv získaných pomocí EI-MS/MS metoda, jejíž parametry jsou diskutovány níže.

Tabulka 4. Porovnání detekčních limitů EI-MS/MS metody pro rozšiřující skupinu OCP získaných pomocí různých přístupů hodnocení limitů.

Detekční limit (ng/ml)	IDL-S/N	IDL-SD	IQL-SD	MQL-SD	LCL=RL
Heptachlor	0,11	2,2	7,3	3,8	10
Aldrin	0,43	2,0	6,6	5,3	10
Isodrin	0,10	1,2	3,9	5,0	10
Oxychlordan	0,26	1,3	4,2	4,2	10
HEPX-A	1,08	2,7	8,9	ns	10
γ-Chlordan	1,45	2,8	9,4	8,5	10
α-Chlordan	1,63	3,4	11	8,5	10
α-Endosulfan	0,59	2,8	9,4	ns	10
Dieldrin	0,84	1,5	5,0	5,4	10
Endrin	0,77	2,2	7,2	ns	10
β-Endosulfan	0,51	2,6	8,7	ns	10
Methoxychlor	0,22	1,4	4,8	ns	10
Mirex	0,06	1,5	4,9	3,2	10
ns - nestanoven					

Rozdílnost detekčních limitů získaných pomocí dvou přístupů hodnocení byl pozorován také u EI-MS/MS techniky. Ze směrodatné odchylky opakovaných měření matricových standardů o koncentraci odpovídající nejnižší kalibrační úrovni, tj. 10 ng/ml, byl proveden odhad detekčního (IDL-SD) a kvantifikačního (IQL-SD) limitu. Na hladině odpovídající dvoj- až pětinasobku IDL-SD bylo u vybraných analytů provedeno ověření odhadnutých hodnot pomocí opakování celkového postupu stanovení. Hodnoty MQL dobře korespondovaly s odhady kvantifikačních limitů (IQL-SD). Z požadavků pro kontrolu těchto látek, tj. z hodnot maximálních obsahů, vyplývá vyhovující citlivost testované metody. Pro uvádění výsledků byl zaveden limit (RL= reporting limit), který odpovídá nejnižší kalibrační úrovni (LCL).

Podobné experimenty, výpočty a porovnání byly provedeny pro stanovení základních OCP pomocí EI-MS/MS (tab. 5). Selektivita metody byla demonstrována pomocí IDL-SD spočtených z dat pro solventové a matricové standardy o koncentraci 5 ng/ml. Průměrná hodnota IDL-SD pro oba experimenty byla 0,7 ng/ml. Shoda IDL-SD vyplývající z obou měření dokazuje minimální ovlivnění stanovení sledovaných OCP přidávkem matrice. Průměrný kvantifikační limit metody MQL pro základní OCP byl 3,3 ng/ml.

Tabulka 5. Porovnání detekčních limitů EI-MS/MS metody pro základní skupinu OCP získaných pomocí různých přístupů hodnocení limitů.

Detekční limit (ng/ml)	IDL-S/N	IDL-SD	IDL-SD	MDL-SD	MQL-SD	LCL=RL
c (ng/ml)	5	5	5	10	10	-
Matrice	isooktan	isooktan	extrakt RM	extrakt RM	extrakt RM	-
HCB	0,04	0,83	0,59	0,7	2,3	5,0
α-HCH	0,03	0,66	0,51	1,0	3,3	5,0
β-HCH	0,04	0,53	1,01	1,0	3,4	5,0
γ-HCH	0,03	0,83	1,04	1,0	3,2	5,0
δ-HCH	0,05	0,72	0,92	1,1	3,8	5,0
o,p'-DDE	0,02	0,56	0,56	0,7	2,3	5,0
p,p'-DDE	0,04	0,69	0,99	1,1	3,8	5,0
o,p'-DDD	0,03	0,56	0,53	0,8	2,8	5,0
p,p'-DDD	0,03	0,87	0,70	1,0	3,3	5,0
o,p'-DDT	0,04	0,56	0,61	1,2	4,1	5,0
p,p'-DDT	0,04	0,63	0,37	1,3	4,5	5,0

5 Závěr

Testované MS metody vykazovaly různou citlivost pro zájmové OCP. NCI-MS-SIM metoda poskytovala srovnatelné detekční a kvantifikační limity jako EI-MS/MS, která byla vybrána k rutinním stanovením OCP v krmivech, díky stabilitě odezev, selektivitě detekce a méně náročné údržbě MS, tj. vyšší plynulosti chodu laboratoře.

6 Literatura

1. Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
2. Směrnice Komise 2006/77/ES, kterou se mění příloha I směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES, pokud jde o maximální obsahy organochlorových sloučenin v krmivech.
3. ISO 22892:2006 Soil quality – Guidelines for the identification of target compounds by gas chromatography and mass spectrometry, **2006**.
4. TC 327 WI 00327022+00327023 Animal feeding stuffs – Determination of pesticides and PCBs by GC/MS, working document, **2005**.
5. Corley, J. Best practices in establishing detection and quantification limits for pesticide residues in foods, Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals, **2003**.
6. Příručka kvality ÚKZÚZ, 2006, SOP č. 30, Stanovení PCB a OCP metodou GC-MS.
7. Tieffová, P., Kosubová, P. Rozšíření stanovení OCP o další zakázané látky ze skupiny POP, Bulletin NRL, **2005**, 2, 12 – 21.

Hodnocení účinnosti feromonových odparníků

Přemysl Fiala

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OAPVR- oddělení lesnické, Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno
premysl.fiala@ukzuz.cz

Pavla Tieffová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
pavla.tieffova@ukzuz.cz

1 Úvod

Ochrana lesů proti kůrovci se provádí pomocí lapáků – pokácených stromů, které jsou po osídlení kůrovcem asanovány, nebo pomocí feromonových odparníků, umístěných ve speciálních lapačích. V roce 2006 bylo za tímto účelem použito 106 m³ lapáků a víc než 30 tisíc lapačů. Úkolem ÚKZÚZ Brno bylo ověření vlastností feromonových přípravků deklarovaných výrobcem nebo dovozci na přiložených etiketách. Tento úkol byl proveden v rámci rozpočtové kapitoly Služby vlastníkům lesa z pověření Odboru státní správy, hospodářské úpravy a ochrany lesů při Ministerstvu zemědělství České republiky. Hodnoceny byly feromonové přípravky dostupné v obchodní síti a náhodně vybrané vzorky byly použity pro terénní zkoušky biologické účinnosti a pro analytické rozborů. Biologická zkouška proběhla současně s laboratorními analýzami a následně byly koordinovány výsledky.

2 Biologické zkoušky

V lesnické praxi se k signalizaci výskytu a hubení nežádoucích a přemnožených druhů škůdců používají feromonové odparníky, u nichž výrobce deklaruje specifickou citlivost k určitým biologickým druhům. Seznam výrobků povolených k používání a biologicky zkoušených v lesnické praxi je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1. Přehled feromonových odparníků používaných pro signalizaci výskytu lýkožrouta

Specifická účinnost odparníku		
Ips typographus (Lýkožrout smrkový)	Pityogenes chalcographus (Lýkožrout lesklý)	Kombinované (L. lesklý/smrkový/vrcholkový)
IT-Ecolure	Chalkoprax	PCHIT-Etokap
IT-Etokap	PC-Ecolure	Pheagr-IAC (L. vrcholkový)
FeSex-Typo		PCIT-Ecolure
Phearg-IT		ID-Ecolure (L. severský)
Pheroprax		
Ipsgone		

Pro ověření účinnosti feromonových odparníků byly vybrány následující výrobky:

FeSex-Typo

Ipsgone

IT-Ecolure Extra

Pheroprax-A

Uvedené přípravky byly zakoupeny ve specializované prodejně a do jejich použití v biologických i chemických zkouškách byly uloženy v chladu. Biologické zkoušky byly provedeny podle zásad uvedených na příslušných etiketách.

2.1 Metodika biologické terénní zkoušky

Biologická zkouška byla založena ve Ždánickém lese v katastrálním území obce Mouřínov. Na obdélníkové pasece s delší stranou ve směru východ - západ byly rozmístěny tři feromonové lapače typu Theysohn. Stanoviště odpovídá bukové doubravě s ostřicí chlupatou. Paseka je zalesněna bukem. Okolní porosty, kmenoviny, jsou buko-dubové s příměsí modřínu do 5 %. Při západní kratší straně je pěti arová skupina smrku ztepilého. Zkouška byla založena 14. května 2006 a ukončena 20. září 2006. Z počátku byly použity feromonové odparníky s obchodními názvy Ipsgone, IT-Ecolure a Pheroprax-A. Později byl doplněn FeSex-Typo. Jeho účinnost však pro pozdní období nebyla hodnocena.

2.2 Výsledky biologické terénní zkoušky

Při první odběru byly určeny hmyzí druhy nalezené v lapačích, výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2. Seznam druhů hmyzu nalezených v lapačích dne 4.6. 2006

Odchyt dle druhů	IT-Ecolure	Pheroprax-A	Ipsgone
Ips typographus	101	80	53
Ips duplicatus	15	6	4
Pityogenes chalcographus	1	1	2
Necílové druhy			
Ploštice	1	–	10
Krasec/Anthaxia quadripunctata	–	–	1
Kožojed/Attagenus sp.	1	–	–
Valgus sp.	1	–	–
Aphodius sp.	1	–	–
Nitidula sp.	–	–	2

Druhy určil Ing. Miloš Dušek, Hradec Králové, 5.6. 2006.

Z výsledků je patrné, že převládajícím zachyceným druhem je lýkožrout smrkový - *Ips typographus*. Všechny čtyři ověřované odparníky jsou deklarovány jako specifické pro druh *Ips typographus* (tabulka 1). Účinnost na ostatní druhy nebyla předmětem zkoušky. Při dalších kontrolách byly zaznamenávány jenom počty kůrovců (tabulka 3).

Různorodost lesních porostů v okolí stanovišť pro feromonové lapače může mít vliv na směr letu kůrovce. Pro potlačení „pozičního efektu“ byla stanoviště s odparníky průběžně střídána. Při kontrole 29.7. 2006 byly již neúčinné odparníky Ipsgone a IT-Ecolure nahrazeny novými a 27.8. 2006 byl odparník s Pheropraxem vyměněn za FeSex-Typo.

Tabulka 3. Počty chycených kůrovců během pozorování

Datum kontroly	Ipsgone	IT-Ecolure	Pheroprax-A	FeSex-Typo
14.05. 2006	63	120	100	–
21.05. 2006	45	35	52	–
04.06. 2006	22	33	45	–
11.06. 2006	3	6	15	–
18.06. 2006	3	87	323	–
27.06. 2006	3	13	155	–
05.07. 2006	0	2	100	–
11.07. 2006	0	2	135	–
29.07. 2006	0	0	52	–
13.08. 2006	49	65	2	–
27.08. 2006	0	20	–	–
20.09. 2006	0	0	–	1

Z údajů uvedených v tabulce 3 vyplývá nejvyšší účinnost u feromonového odparníku Pheroprax. Jeho účinnost se zvyšuje i v druhé polovině trvání zkoušky (v červenci) a zřejmě věrně kopíruje gradační křivku rojení kůrovce.

Účinnost Ipsgone a IT-Ecolure klesá v čase od května do července, i když u IT-Ecolure je potvrzena červencová gradace. Z hlediska technické účinnosti odparníků je zajímavé zvýšení počtu lapených kůrovců po jejich výměně za nové dne 13. srpna 2006. Je zde jasně vidět obnovená agregační schopnost i v porovnání s vyčerpaným Pheropraxem.

3 Laboratorní zkoušky

U hodnocených feromonových odparníků bylo ověřováno složení a hmotnost náplně, deklarované na etiketě výrobku (tabulka 4), případně zjištěné z dostupné dokumentace.

Hmotnost náplně byla stanovena diferenčním vážením odparníku v uzavřeném obalu a všech částí po extrakci v organickém rozpouštědle a následném vysušení do konstantní hmotnosti.

Ověření přítomnosti uvedených látek a jejich kvantifikace byla provedena pomocí kapilární plynové chromatografie s hmotnostně selektivní detekcí (GC/MS).

Tabulka 4. Parametry feromonového odparníku deklarované výrobcem

Odparník	FeSex-Typo	Ipsgone	IT-Ecolure	Pheroprax-A
Výrobce/dovozce	Biocont Lab.	Agri Sense	Fytofarma CZ	BASF
Hmotnost náplně	(3,2 – 4,2) g	min. 2,1 g	min. 5,5 g	(2 – 3) g
cis-Verbenol	(3,2 – 4,5) %	(4,73 ± 10) %	1,6 %	3,56 %
Ipsdienol	(0,3 – 0,4) %	(0,71 ± 10) %	–	0,36 %
2-CH ₃ -3-en-2-ol	(95,5 – 96,8) %	(94,56 ± 10) %	65,4 % ⁽¹⁾	96,08 %
Synergické složky	–	–	33,0 % ⁽²⁾	–

⁽¹⁾ V dokumentaci uvedeno: Alkoholy: 2-CH₃-3-en-2-ol, 2-methoxy-1-propanol, etanol.

⁽²⁾ V dokumentaci uvedeno: Synergické komponenty: R(+)-limonen, smrková silice.

3.1 Chemikálie

Aceton p.a.

Analytické standardy:

(S)-cis-Verbenol, čistota 95 % (nečistota trans-Verbenol); (Aldrich)

2-methyl-3-buten-2-ol; (Aldrich)

Vnitřní standard:

Methyl ester kyseliny tridekanové C13-ME; (Sigma)

3.2 Chromatografické podmínky

Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem HRGC 8000/MD 800; (Fisons Instrument);

Kapilární kolona DB XLB (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm);

Nosný plyn He 5.0, průtok 1ml/min.;

Nástřik 1 μl technikou SSL; uzavření splitu 10 s; T(injektoru) = 250 °C;

Teplotní program od 60 °C (1 min.), ohřev rychlostí 4 °C/min. do 120 °C, potom rychlostí 30 °C/min. na 240 °C, setrvání na teplotě 5 min.;

Nastavení hmotnostního detektoru:

Měření v EI módu, ionizační energie 70 eV, teplota iontové zdroje (IZ) = 200 °C,

teplota spojení GC-MS (interface) = 250 °C

Režim měření: FS (m/z od 30 do 300) pro identifikaci látek

SIM (diagnostické ionty Q1-Q3 v tabulce 5) pro kvantifikaci složek

Tabulka 5. Identifikační parametry pro stanovované látky

DB XLB (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm)	Retenční čas (min.)	m/z	SIM – m/z Q1-Q3
2-CH₃-3-buten-2-ol	4,50	43 , 58, 59, 134, 137	43
cis-Verbenol	13,52	94 , 91, 109, 119, 137	94, 91, 109
Ipsdienol	13,63	85 , 41, 55, 67	85
trans-Verbenol	13,79	92 , 91, 94, 109, 119, 134	94, 91, 109
C13-ME (vnitřní st.)	20,18	74 , 87, 143, 129, 185, 197	74, 87

m/z - fragmenty z hmotnostního spektra látky, tučně - nejintenzivnější ionty spektra

3.3 Pracovní postup a výsledky

3.3.1 Stanovení hmotnosti náplně odparníku

Výrobek v původním obalu byl zvážen na analytických vahách. Vnější obal i všechny vnitřní fólie byly rozstříhány na menší kousky, ze zásobníku byla odebrána kapalná náplň a uložena do skleněné vialky k dalšímu použití. Všechny součásti byly v kádince opakovaně extrahovány čerstvými podíly rozpouštědla. Promývací podíly byly odstraněny, zbytky odparníku vysušeny do konstantní hmotnosti a zváženy. Z rozdílu hmotnosti před a po extrakci byla spočtena hmotnost náplně odparníku.

3.3.2 Identifikace složek

Z odebrané náplně bylo přesně odváženo (10 – 100) mg do 10 ml odměrky a doplněno po rysku acetonem. Dalším ředěním byl připraven vzorek o koncentraci (1 – 100) μg stanovované složky na 1 ml acetonu. Tato koncentrace byla vhodná pro získání hmotnostního spektra ve FS režimu měření hmotnostního spektrometru. Jednotlivé píky chromatogramu byly identifikovány na vnější standard nebo pomocí knihovny spekter NIST.

3.3.3 Kvantifikace složek

Pro kvantitativní analýzu byly roztoky vzorku ještě zředěny acetonem na pracovní koncentraci (10 – 100) ng složky/ml acetonu. Vzorky byly proměřeny v SIM režimu měření, sbírány byly pouze vybrané charakteristické fragmenty hmotnostního spektra látek (viz

tabulka 5). Přesná kvantifikace všech složek ale nemohla být provedena, neboť nebyl k dispozici standard ipsdienolu a vzorek Ipsgonu byl natolik vyschlý, že nebylo možno navážit jej k analýze.

Tabulka 6. Výsledky hodnocení feromonových odparníků

Odparník	FeSex-Typo	Ipsgone	IT-Ecolure	Pheroprax-A
Hmotnost náplně				
deklarovaná	(3,2 – 4,2) g	min. 2,1 g	min. 5,5 g	(2 – 3) g
stanovená	4,2 g	0,7 g	2,9 g	2,4 g
Hodnocení	vyhovuje	nevyhovuje	nevyhovuje	vyhovuje
Deklarované složky	obsahuje	obsahuje	obsahuje	obsahuje

4 Diskuse

Pro hodnocení výrobků zákazníkem je důležitý i vzhled a způsob manipulace s výrobkem.

Z tohoto pohledu byl nejhorší odparník **FeSex - Typo**. Zakoupeno bylo balení po 10 kusech. Vnější obal byl z potahované hliníkové folie, ale jednotlivé odparníky byly pouze v zatavené polyetylenové folii, obsahující proužek pevného sorbentu pro udržení tvaru a sorpční tampon s buničinou. Použité rozpouštědlo bylo hnědé nečistotami, jeho přebytek byl i na vnější straně obalu odparníku.

Odparník **Ipsgone** byl balen po 1 kuse ve vrstvené hliníkové folii, vnitřní obal z průhledné folie obsahoval čtvereček sorpční materiálu, napuštěného modře zbarvenou tekutinou. Náplně v odparníku bylo tak málo, že ani odstředěním nešlo získat potřebné množství pro navážku vzorku ke kvantitativní analýze.

Ve vnějším obalu z hliníkové folie odparníku **IT - Ecolure** byly dva sorpční pruhy sorbentu, napuštěné čistým a bezbarvým roztokem, ze sorbentu bylo možno odebrat náplň k navážce vzorku.

Odparník **Pheroprax - A** byl ve tvaru plastového pouzdra s háčkem na zavěšení, zatavený opět ve vrstvené hliníkové folii. Obsahoval tři oddělené zásobníky ve tvaru ampule. Obsahy ampulí 1 a 2 byly analyzovány odděleně, oba vzorky však obsahovaly směs všech tří

deklarovaných složek. Ze 3. zásobníku, tvořícího ouško odparníku, nebylo možné odebrat vzorek, byl již prázdný. Použité chemikálie byly čisté, bezbarvé.

Sledování kvantitativního zastoupení hlavních složek, synergických komponent, případných rušivých účinků nečistot a minoritních složek, a hledat jejich spojitost s reálnou účinností feromonového přípravku, je nad rámec této kontrolní činnosti. Chemická analýza může pouze potvrdit nebo vyvrátit podezření na přítomnost konkrétně specifikovaných látek a nemůže nahradit biologické zkoušky ověření účinnosti feromonového přípravku.

Jednoduchou, ale účinnou možností kontroly je ověřovat hmotnost náplně odparníku a z dalšího zkoušení tak vyloučit výrobky s nedostatečným obsahem náplně.

Pro další ověřování účinnosti feromonových přípravků bude vhodné pro každý testovaný vzorek zaznamenat a sledovat změnu jeho hmotnosti v průběhu testu. Při výběru testovaných odparníků vybrat zástupce s deklarovanou specifickou účinností k různým druhům lýkožrouta a pro statistické vyhodnocení pokusu zvýšit počet lapačů, od každého typu odparníku založit několik opakování a přidat stanoviště odpovídající slepému pokusu. V časovém horizontu založit pro každé rojení lýkožrouta samostatný pokus, tak aby podmínky odchyty v různých lokalitách byly srovnatelné a nezkreslovaly hodnocení jednotlivých přípravků.

5 Závěr

Na základě chemické analýzy a ověření obsahu deklarovaných složek v odparníku nelze jednoduše posoudit jeho biologickou účinnost. Z odparníku se uvolňuje celý komplex látek od deklarovaných účinných složek až po nečistoty a příměsi, obsažené v použitých rozpouštědlech. Jednoznačným a jednoduchým hodnotícím kritériem pro hodnocení přípravku je hmotnost náplně, takto lze vyloučit nevyhovující vzorky z dalšího posuzování. Biologické zkoušky pro hodnocení a porovnání účinnosti různých typů odparníků jsou zatím nezastupitelné. Dodržení deklarované koncentrace složek není zárukou účinnosti odparníku.

Bulletin Národní referenční laboratoře XI 2007/1

Ročník: XI, č. 1
Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2007
Odpovědný redaktor: RNDr. Jiří Zbíral, Ph.D.
Technická spolupráce: Ing. Iva Strížová
Náklad: 150 výtisků
Počet stran: 62
Tisk: ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, tel.: 543 548 111
e-mail: ukzuz@ukzuz.cz

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196