

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2006

Ročník X, číslo 3/ 2006

Brno 2006

Obsah

- 1. Stanovení kontaminací halofuginonu, lasalocidu, maduramycinu, monensinu, narasinu, robenidinu, salinomycinu a semduramycinu metodou HPLC s hmotnostní detekcí** 1

Michal Halama, Linda Kuklová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Praha, Za opravnou 4,
150 06 Praha 5 – Motol
- 2. Zavedení metody pro analýzu toxafenu pomocí GC-MS** 22

Petra Kosubová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2,
656 06 Brno
- 3. Vývoj kalibračních modelů pro parametr olej u slunečnice metodou NIR spektroskopie** 36

David Čížmár
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2,
656 06 Brno
- 4. Zavedení extrakční techniky ASE na stanovení vybraných polyaromatických uhlovodíků v půdách** 42

Šárka Plhalová, Ivana Veverková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL – RO Opava, Jaselská 16,
746 23 Opava

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>).

Stanovení kontaminací halofuginonu, lasalocidu, maduramycinu, monensinu, narasinu, robenidinu, salinomycinu a semduramycinu metodou HPLC s hmotnostní detekcí

Michal Halama

Linda Kuklová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Praha, Za opravnou 4,
150 06 Praha 5 – Motol

michal.halama@ukzuz.cz

linda.kuklova@ukzuz.cz

1 Úvod

Tato práce se zabývá stanovením kontaminací halofuginonu, lasalocidu, maduramycinu, monensinu, narasinu, robenidinu, salinomycinu a semduramycinu v kmivech a premixech.

Halofuginon je vysoce účinné kokcidistatikum, které se používá v chovech brojlerů, kuřic a krůt. Účinná látka halofuginon je dodávána firmou Hoechst-Roussel Vet pod komerčním názvem Stenorol, který obsahuje 0,6 % halofuginonu. Doporučená dávka je 3 mg účinné látky halofuginonu na kilogram krmné směsi.

Lasalocid je ionophorní antibiotikum (antikokcidikum) produkované *Streptomyces lasaliensis* a používá se jako chemoterapeutikum ve výkrmu kuřat, kuřic a krůt.

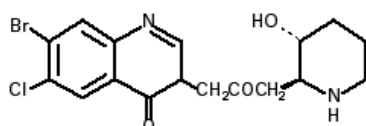
Semduramycin a maduramycin se řadí mezi ionophorní polyetherické monokarboxylové kyseliny. Používají se jako doplňkové látky k prevenci kokcidiózy drůbeže a do krmných směsí jsou přidávány ve formě svých sodných solí v množství (5 – 25) mg.kg⁻¹.

Monensin, salinomycin a narasin patří do skupiny polyetherických antibiotik produkovaných rodem *Streptomyces*. Aplikují se ve většině případů jako prevence ve formě krmiva. Do krmných směsí a premixů jsou přidávány ve formě sodných solí v obsazích

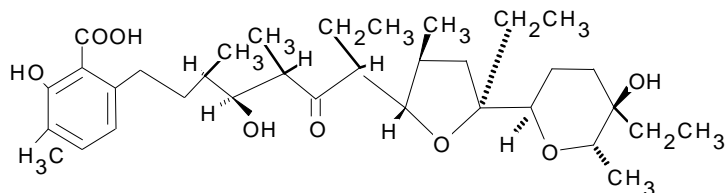
(15 – 100) mg.kg⁻¹. Určitým omezením jejich klinického používání jsou jejich toxické vlastnosti a dále vznik bakteriálně rezistentních kmenů, ale i environmentální znečištění v podobě jejich reziduí v živočišných produktech při jejich nesprávném používání. Všechny tři se používají jako doplňkové látky k prevenci kokcidiózy u drůbeže. Salinomycin a monensin jsou zároveň růstovými stimulatory prasat.

Robenidin se používá jako účinné kokcidiostatikum pro prevenci u kuřat a brojlerů.

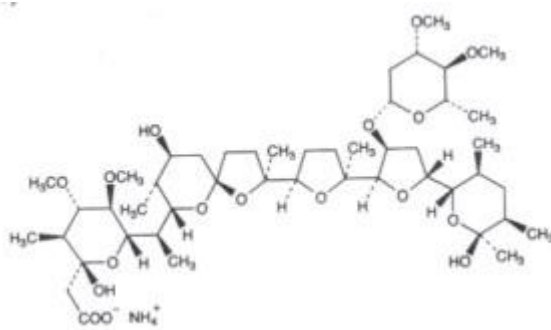
Halofuginon



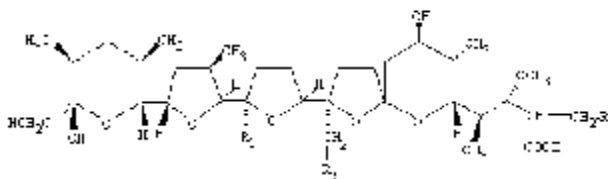
Lasalocid



Maduramycin

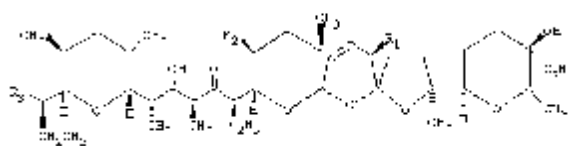


Monensin



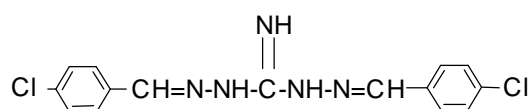
Factor	R ₁	R ₂	R ₃
1	CH ₂ CH ₃	I	II
2	CH ₃	I	I
3	CH ₂ CH ₃	I	CH ₃

Narasin

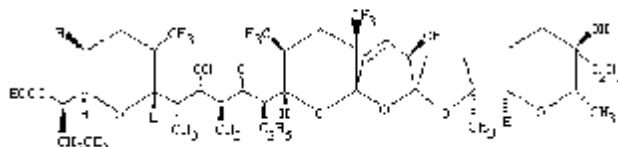


Factor	R ₁	R ₂	R ₃
A	OH	CH ₃	COOH
B	OH	CH ₃	COOH
C	OH	CH ₂ CH ₃	COOH
D	OH	CH ₃	COOH

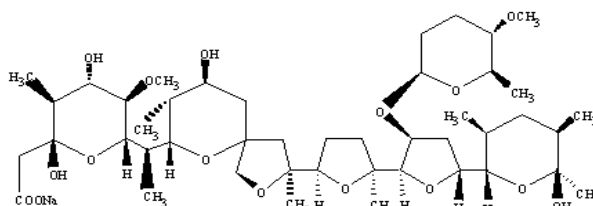
Robenidin



Salinomycin



Semduramycin



2 Princip

Vzorky krmných směsí jsou extrahovány směsným rozpouštědlem hexan-octan ethylnatý a extrakt je přečištěn na pevné fázi Silica. Vzorky premixů a kontaminací krmných směsí jsou extrahovány vodným roztokem methanolu. Po naředění jsou vzorky analyzovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi C₁₈ s hmotnostní detekcí.

3 Chemikálie

- 3.1 Methanol, CH₃OH, HPLC grade;
- 3.2 Dichlormethan, CH₂Cl₂, Mr = 84,93 g.mol⁻¹;
- 3.3 Redestilovaná voda (18,2 MΩ cm⁻¹);
- 3.4 Octan ethylnatý, čistota > 99,5 %, C₄H₈O₂, Mr = 88,11 g.mol⁻¹;
- 3.5 Hexan, čistota > 90 %, C₆H₁₄, Mr = 86,18 g.mol⁻¹;
- 3.6 Aceton, čistota > 99,5 %, CH₃COCH₃, Mr = 58,1 g.mol⁻¹;
- 3.7 Monensin, monohdrát, standardní substance, C₃₆H₆₁O₁₁Na.H₂O, Mr = 710,88 g.mol⁻¹;
- 3.8 Salinomycin, bezvodá forma, C₄₂H₆₉O₁₁Na, Mr = 772,99 g.mol⁻¹;
- 3.9 Narasin, C₄₃H₇₂O₁₁, Mr = 765,05 g.mol⁻¹;
- 3.10 Lasalocid A, sodná sůl, C₃₄H₅₃O₈Na, Mr = 612,78 g.mol⁻¹;
- 3.11 Maduramycin, C₄₇H₈₃O₁₇, Mr = 934,16 g.mol⁻¹;
- 3.12 Robenidin, C₁₅H₁₃Cl₂N₅, Mr = 334,21 g.mol⁻¹;
- 3.13 Halofuginon, C₁₆H₁₇BrClO₃, Mr = 414,7 g.mol⁻¹;
- 3.14 Semduramycin, C₄₅H₇₅O₁₆Na, Mr = 895 g.mol⁻¹;
- 3.15 Standardní roztok Monensinu (500 μg.ml⁻¹)

Naváží se přesně mezi 10 mg až 50 mg Monensinu (3.7) a převede do tmavé odměrné baňky a doplní vypočítaným množstvím methanolu (3.1) tak, aby výsledná koncentrace získaného roztoku byla přesně 500 μg.ml⁻¹. Tento roztok se uchovává ve tmě při teplotě (4 – 8) °C a za těchto podmínek je nejméně měsíc stabilní.

- 3.16 Standardní roztok Salinomycinu (500 μg.ml⁻¹)

Naváží se přesně mezi 10 mg až 50 mg Salinomycinu (3.8), převede do tmavé odměrné baňky a doplní vypočítaným množstvím methanolu (3.1) tak, aby výsledná koncentrace získaného roztoku byla přesně 500 μg.ml⁻¹. Tento roztok se uchovává ve tmě při teplotě (4 – 8) °C a za těchto podmínek je nejméně měsíc stabilní.

3.17 Standardní roztok Narasinu (500 µg.ml⁻¹)

Naváží se přesně mezi 10 mg až 50 mg Narasinu (3.9), převede do tmavé odměrné baňky a doplní vypočítaným množstvím methanolu (3.1) tak, aby výsledná koncentrace získaného roztoku byla 500 µg.ml⁻¹. Tento roztok se uchovává ve tmě při teplotě (4 – 8) °C a za těchto podmínek je nejméně měsíc stabilní.

3.18 Standardní roztok Lasalocidu (500 µg.ml⁻¹)

Naváží se přesně mezi 10 mg až 50 mg Lasalocidu (3.10), převede do tmavé odměrné baňky a doplní vypočítaným množstvím methanolu (3.1) tak, aby výsledná koncentrace získaného roztoku byla přesně 500 µg.ml⁻¹. Tento roztok se uchovává ve tmě při teplotě (4 – 8) °C a za těchto podmínek je nejméně měsíc stabilní.

3.19 Standardní roztok Maduramycinu (500 µg.ml⁻¹)

Naváží se přesně mezi 10 mg až 50 mg Maduramycinu (3.11), převede do tmavé odměrné baňky a doplní vypočítaným množstvím methanolu (3.1) tak, aby výsledná koncentrace získaného roztoku byla přesně 500 µg.ml⁻¹. Tento roztok se uchovává ve tmě při teplotě (4 – 8) °C a za těchto podmínek je nejméně měsíc stabilní.

3.20 Standardní roztok Robenidinu (500 µg.ml⁻¹)

Naváží se přesně mezi 10 mg až 50 mg Robenidinu (3.12), převede do tmavé odměrné baňky a doplní vypočítaným množstvím methanolu (3.1) tak, aby výsledná koncentrace získaného roztoku byla přesně 500 µg.ml⁻¹. Tento roztok se uchovává ve tmě při teplotě (4 – 8) °C a za těchto podmínek je nejméně měsíc stabilní.

3.21 Standardní roztok Halofuginonu (500 µg.ml⁻¹)

Naváží se přesně mezi 10 mg až 50 mg Halofuginonu (3.13), převede do tmavé odměrné baňky a doplní vypočítaným množstvím methanolu (3.1) tak, aby výsledná koncentrace získaného roztoku byla přesně 500 µg.ml⁻¹. Tento roztok se uchovává ve tmě při teplotě (4 – 8) °C a za těchto podmínek je nejméně měsíc stabilní.

3.22 Standardní roztok Semduramycinu (500 µg.ml⁻¹)

Naváží se přesně mezi 10 mg až 50 mg Semduramycinu (3.14), převede do tmavé odměrné baňky a doplní vypočítaným množstvím methanolu (3.1) tak, aby výsledná koncentrace získaného roztoku byla přesně 500 µg.ml⁻¹. Tento roztok se uchovává ve tmě při teplotě (4 – 8) °C a za těchto podmínek je nejméně měsíc stabilní.

3.23 Roztok směšného standardu (50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)

Do 50 ml odměrné baňky se odměří 5 ml od každého jednotlivého standardního roztoku, Monensinu (3.15), Salinomycinu (3.16), Narasinu (3.17), Lasalocidu (3.18), Maduramycinu (3.19), Robenidinu (3.20), Halofuginonu (3.21) a Semduramycinu (3.22) a doplní po rysku methanolem (3.1). Tento roztok se uchovává ve tmě při (4 – 8) °C a za těchto podmínek je stabilní nejméně týden.

3.24 Pracovní roztok směšného standardu (500 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$)

Připraví se stonásobným naředěním roztoku pracovního standardu (3.23). Do odměrné baňky (25 ml) se odměří 0,25 ml roztoku pracovního standardu (3.23) a doplní po rysku methanolem (3.1). Tento roztok je připravován čerstvý každý den.

3.25 Extrakční roztok 20% octanu ethylnatého v hexanu

Do odměrné baňky na 1000 ml se odměří 200 ml octanu ethylnatého (čistoty > 99,5 %, $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$, $M_r = 88,11 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), doplní n-hexanem (čistoty > 90 %, C_6H_{14} , $M_r = 86,18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) po značku a promíchá.

3.26 Promývací roztok pro SPE (5% aceton v dichlormethanu)

Do odměrné baňky na 250 ml se odměří 12,5 ml acetonu (3.6), doplní dichlormethanem (3.2) po značku a promíchá.

3.27 Eluční roztok pro SPE (8,0% roztok methanolu v dichlormethanu)

Do odměrné baňky na 500 ml se odměří 40,0 ml methanolu (3.1), doplní dichlormethanem (3.2) po značku a promíchá.

3.28 Methanol (90% roztok)

Připraví se smícháním 900 ml methanolu (3.1) a 100 ml redestilované vody (3.3). Vzniklý roztok se promíchá, odvzdušní v ultrazvukové lázni (4.3) a vytemperuje na laboratorní teplotu.

3.29 Methanol (50% roztok)

Připraví se smícháním 500 ml methanolu (3.1) a 500 ml redestilované vody (3.3). Vzniklý roztok se promíchá, odvzdušní v ultrazvukové lázni (4.3) a vytemperuje na laboratorní teplotu.

3.30 Mobilní fáze A: methanol /voda (25 : 75 v/v) + 0,1% kyselina mravenčí (3.32)

Připraví se smícháním 250 ml methanolu (3.1), 750 ml redestilované vody (3.3) a 1 ml kyseliny mravenčí (3.32). Vzniklý roztok se promíchá, odvzdušní v ultrazvukové lázni (4.3) a vytemperuje na laboratorní teplotu.

3.31 Mobilní fáze B: methanol (3.1) + 0,1% kyselina mravenčí (3.32)

Připraví se smícháním 1000 ml methanolu (3.1) a 1 ml kyseliny mravenčí (3.32). Vzniklý roztok se promíchá, odvzdušní v ultrazvukové lázni (4.3) a vytemperuje na laboratorní teplotu.

3.32 Kyselina mravenčí p.a. for mass spectrometry, 98%, $M_r = 46,03 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (94318, Fluca)

4 Pracovní pomůcky

- 4.1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s MS detekcí;
- 4.2 Laboratorní třepačka;
- 4.3 Ultrazvuková lázeň;
- 4.4 Laboratorní odstředivka;
- 4.5 Kolonky pro SPE Silica (např. Sep-Pak Plus –Waters, WAT020520);
- 4.6 Koncentrátor vzorků.

5 Pracovní postup

5.1 Příprava vzorku

Vzorek se upravuje homogenizací a mletím na částice o velikosti (1,0 – 0,5) mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku během homogenizace. Šrotování a úprava vzorku se provádí těsně před jeho extrakcí a dalším zpracováním, aby se zabránilo ztrátám analytu.

5.2 Extrakce a přečištění na pevné fázi

Do kónické zábrusové baňky (250 ml) se naváží s přesností na 0,001 g

5 g pro premixy doplňkových látek;

20 g pro krmné směsi.

Krmné směsi

Zkušební vzorek krmné směsi se přelije 100 ml extrakčního roztoku (3.10), baňka se uzavře zátkou a třepe na laboratorní třepačce 30 minut při cca (150 –180) kmitech za sekundu. Poté se filtruje suchým skládaným filtrem do suché podložené nádoby. Na extrakční jednotu se nasadí kolonka Silica (4.5), kondicionuje se 4 ml extrakčního roztoku 20% octanu ethylnatého (3.10), poté se na kolonku nanese 2 ml extraktu. Extrakt se nechá vsáknout tak, aby nedošlo k vyschnutí kolonky, promyje se 3 krát 2,5 ml dichlormethanu (3.2). Ionophory se poté eluují 3 krát 2 ml elučního roztoku (3.27). Eluát se odpaří na koncentrátoru vzorků pod proudem dusíku při 45 °C. K odparku se přidá (2 – 10) ml 50% methanolu (3.29) a rozpustí v ultrazvuku. Po vytemperování na laboratorní teplotu se naředí dle tabulky 1 a převede do vialky.

Premixy doplňkových látek

Zkušební vzorek premixu se přelije 100 ml 90% methanolu (3.28). Baňka se uzavře zátkou a třepe na laboratorní třepačce 30 minut při cca (150 –180) kmitech za sekundu. Získaný extrakt se poté odstředí 10 min při 1500 g, vytemperuje na laboratorní teplotu, naředí dle tabulky 1 roztokem 50% methanolu (3.29) a převede do vialky.

Krmné směsi – kontaminace

Zkušební vzorek krmné směsi se přelije 100 ml 90% methanolu (3.28). Baňka se uzavře zátkou a třepe na laboratorní třepačce 30 minut při cca (150 –180) kmitech za sekundu. Získaný extrakt se poté odstředí 10 min při 1500 g, vytemperuje na laboratorní teplotu, naředí dle tabulky 1 roztokem 50% methanolu (3.29) a převede do vialky.

Tabulka 1. Ředění extraktů krmných směsí a premixů

	Deklarace (mg.kg ⁻¹)	Ředění
Krmná směs	< 10	100
	10 – 100	1000
	> 100	10 000
Premix	< 5 000	50 000
	5 000 – 20 000	500 000
	> 20 000	1 000 000

5.3 Kalibrace

5.3.1 Externí kalibrace

Používá se především při analýzách premixů, protože u krmných směsí nemusí dostatečně postihovat vlivy komplexní matrice krmných směsí na ionizaci ve hmotnostním detektoru. Do odměrných baněk (25 ml) se odměří (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0) ml pracovního roztoku směšného standardu (3.24) a doplní se po promíchání a vytemperování roztokem 50% methanolu (3.29) a převede do vialek. Takto naředěné kalibrační roztoky odpovídají koncentraci (4,0; 8,0; 12,0; 16,0; 20,0) ng.ml⁻¹. Na chromatografickou kolonu se dávkuje 50 µl kalibračních roztoků. Z průměrných ploch píků pro každou koncentraci se sestrojí kalibrační křivka.

5.3.2 Interní kalibrace

Používá se především při analýzách krmných směsí, protože na rozdíl od externí kalibrace lépe postihuje vlivy matrice vzorku na ionizaci a tím i na celkovou odezvu signálu. Při posledním ředění se odpipetuje odpovídající množství extraktu krmných směsí (0,25 ml) do 4 odměrných baněk (25 ml). První (P0) se ponechá bez přídatku standardů, do zbývajících (P1; P2; P3) se přidá odpovídající množství pracovního roztoku směšného standardu (P1 – 0,1 ml; P2 – 0,2 ml; P3 – 0,3 ml) a doplní se po rysku.

Sestrojí se závislost plochy píku na množství přídatku (ng.kg⁻¹) a zjistí parametry a, b rovnice

$y = ax + b$ popisující přímku pomocí lineární regrese.

Výsledná koncentrace x ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) = $(b/a) \cdot$ zředovací faktor

5.4 Chromatografické podmínky

Vlastní měření se provádí za následujících podmínek chromatografického systému:

Kolona: RP C-18 Symmetry Shield C18, 5 μm , 50 mm \times 2,1 mm (Waters);

Teplota kolony: 30 °C;

Teplota autosampleru: 20 °C;

Mobilní fáze: gradient mobilní fáze A (3.30), mobilní fáze B (3.31) dle tabulky 2;

Celková doba analýzy: 16,5 min;

Průtok mobilní fáze: 0,3 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$;

Objem nástřiku: 50 μl .

Retenční časy jednotlivých analytů za uvedených podmínek jsou v tabulce 3, ukázka separace je na obrázku 1.

Tabulka 2. Gradientový program pro analýzu stanovení halofuginonu, lasalocidu, maduramycinu, monensinu, narasinu, robenidinu, salinomycinu a semduramycinu v krmivech a premixech.

Čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
0	100	0
2	75	25
10	0	100
12	0	100
12,5	100	0

Tabulka 3. Retenční čas halofuginonu, lasalocidu, maduramycinu, monensinu, narasinu, robenidinu, salinomycinu a semduramycinu za uvedených podmínek.

	Retenční čas (min)
Halofuginon	3,05
Robenidin	6,68
Semduramycin	11,71
Monensin	12,10
Lasalocid	12,37
Maduramycin	12,40
Salinomycin	12,46
Narasin	12,73

5.5 MS podmínky

Pro identifikaci jednotlivých analytů byl použit MRM (multiple reaction monitoring) mód, sledováním dvou produktových iontů pocházejících z jednoho prekurzorového iontu, (European Union Commission Decision 2002/657/EC). Nalezené optimální parametry MS detektoru, při kterých je intenzita daného dceřiného iontu maximální, jsou uvedeny v tabulce č. 4. Nastavení MRM parametrů jednotlivých přechodů je uvedeno v tabulce č. 5, ukázka hmotnostních spekter pro jednotlivé analyty je uvedena na obrázku 2.

Tabulka 4. Parametry MS detektoru

Ionizační mód	ESI+
Capillary voltage	3,15 kV
Cone voltage	35 V
Source temperature	120 °C
Desolvation temperature	400 °C
Desolvation gas flow	600 l/h
Cone gas flow	100 l/h
CID gas	argon, p = 2,4 mbar

Tabulka 5. MRM parametry pro analýzu halofuginonu, lasalocidu, maduramycinu, monensinu, narasinu, robenidinu, salinomycinu a semduramycinu v krmivech a premixech.

	Prekurzorový iont (m/z)	Produktový iont (m/z)	Kolizní energie (eV)
Halofuginon	416	100,3	35
		120	35
Lasalocid	613,3	377,3	37
		577,3	33
Maduramycin	939,8	877,5	50
		719,5	70
Monensin	693,4	461,2	60
		479,2	65
Narasin	787,5	431,2	60
		531,2	65
Salinomycin	773,5	431,2	60
		265,2	65
Semduramycin	895,4	833,4	40
		705,5	65
Robenidin	334,1	138,1	18
		154,8	24

6.1 Interpretace validačních parametrů

6.1.1 Opakovatelnost

Měření opakovatelnosti bylo provedeno na následujících krmivech:

N1T – krmná směs pro nosnice;

KLK – kompletní krmná směs pro výkrm králíků bez antikokcidika;

BR3 – kompletní krmná směs pro výkrm kuřat;

MKP – Minerální doplňkové krmivo pro skot.

Opakovatelnost charakterizuje rozptýlení validované vlastnosti kolem střední hodnoty, které způsobují náhodné chyby. Stanovení opakovatelnosti bylo provedeno ze tří navážek čtyř

různých druhů krmiva spikovaných na koncentraci odpovídající 1 mg.kg^{-1} pro každou látku. Hodnoty opakovatelnosti jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6. Opakovatelnost metody

	Relativní opakovatelnost (%)
Halofuginon	7,39
Lasalocid	3,22
Maduramycin	12,61
Monensin	12,51
Narasin	17,33
Robenidin	24,67
Salinomycin	10,38
Semduramycin	5,05

6.1.2 Správnost

Správnost charakterizuje shodnost výsledků měření validované vlastnosti s deklarovanou referenční hodnotou. Správnost byla zjišťována testem výtěžnosti, kdy k přesně známé navážce vzorku, který neobsahuje stanovovanou látku byl přidán roztok čistého standardu v množství odpovídajícím (0,2; 0,5; 1,0) mg.kg^{-1} obsahu analytu v původním vzorku krmiva. Měření správnosti bylo provedeno na vzorku krmiva N1T – krmná směs pro nosnice. Z naměřených dat byla zpětně vypočtena výtěžnost celé metody. T – test prokázal normální rozdělení dat a dále nebyla prokázána při použití Cochranova, Dixonova a Grubsova testu přítomnost odlehlých bodů. Zjištěné statistické parametry jsou uvedeny pro jednotlivé látky v tabulkách 7 – 14.

Tabulka 7. Správnost: Halofuginon

Úroveň	Předloženo	Naměřeno	Výtěžnost	Přesnost	n	t	t-krit	Hypotéza
1	0,17	0,218	126,86	0,166	3	0,393	4,303	Přijata
2	0,43	0,614	142,95	0,086	3	3,700	4,303	Přijata
3	0,86	0,894	103,90	0,029	3	1,993	4,303	Přijata

Tabulka 8. Správnost: Lasalocid

Úroveň	Předloženo	Naměřeno	Výtěžnost	Přesnost	n	t	t-krit	Hypotéza
1	0,20	0,261	130,48	0,072	3	1,467	4,303	Přijata
2	0,50	0,504	100,88	0,031	3	0,244	4,303	Přijata
3	1,00	1,050	105,03	0,078	3	1,295	4,303	Přijata

Tabulka 9. Správnost: Maduramycin

Úroveň	Předloženo	Naměřeno	Výtěžnost	Přesnost	n	t	t-krit	Hypotéza
1	0,15	0,168	112,11	0,025	3	1,265	4,303	Přijata
2	0,38	0,367	97,76	0,050	3	0,338	4,303	Přijata
3	0,75	0,806	107,70	0,085	3	2,697	4,303	Přijata

Tabulka 10. Správnost: Monensin

Úroveň	Předloženo	Naměřeno	Výtěžnost	Přesnost	n	t	t-krit	Hypotéza
1	0,20	0,292	146,03	0,073	3	2,174	4,303	Přijata
2	0,50	0,577	115,38	0,190	3	0,810	4,303	Přijata
3	1,00	0,945	94,53	0,152	3	0,720	4,303	Přijata

Tabulka 11. Správnost: Narasin

Úroveň	Předloženo	Naměřeno	Výtěžnost	Přesnost	n	t	t-krit	Hypotéza
1	0,20	0,212	106,15	0,048	3	0,442	4,303	Přijata
2	0,50	0,544	108,82	0,062	3	1,418	4,303	Přijata
3	1,00	1,017	101,70	0,110	3	0,309	4,303	Přijata

Tabulka 12. Správnost: Robenidin

Úroveň	Předloženo	Naměřeno	Výtěžnost	Přesnost	n	t	t-krit	Hypotéza
1	0,20	0,124	61,76	0,032	3	4,129	4,303	Přijata
2	0,50	0,409	81,73	0,038	3	4,153	4,303	Přijata
3	1,00	0,870	86,99	0,053	3	4,266	4,303	Přijata

Tabulka 13. Správnost: Salinomycin

Úroveň	Předloženo	Naměřeno	Výtěžnost	Přesnost	n	t	t-krit	Hypotéza
1	0,20	0,227	113,29	0,022	3	2,116	4,303	Přijata
2	0,50	0,518	103,64	0,103	3	0,305	4,303	Přijata
3	1,00	1,115	111,55	0,058	3	3,464	4,303	Přijata

Tabulka 14. Správnost: Semduramycin

Úroveň	Předloženo	Naměřeno	Výtěžnost	Přesnost	n	t	t-krit	Hypotéza
1	0,20	0,231	115,29	0,032	3	1,016	4,303	Přijata
2	0,50	0,543	108,64	0,830	3	2,174	4,303	Přijata
3	1,00	1,025	102,55	0,062	3	1,265	4,303	Přijata

6.1.3 Mez detekce a stanovitelnosti

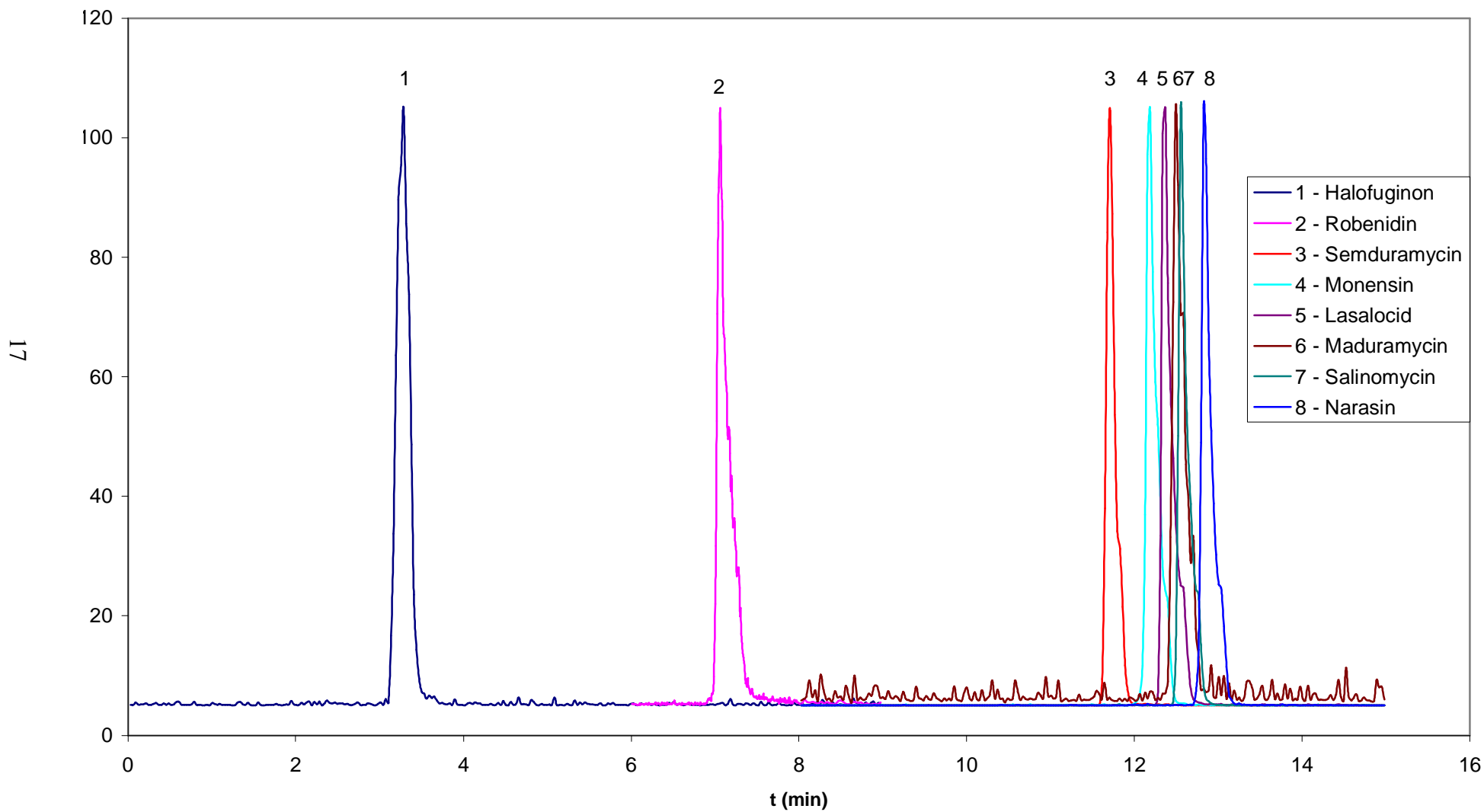
Z hodnot výtěžnosti uvedených v tabulkách 7 až 14 vyplývá, že tuto analytickou metodu je možno použít k detekci všech uvedených látek od $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ a od množství 1 mg.kg^{-1} je kvantifikovat. Zároveň bylo prokázáno, že vzorky krmiv bez obsahu jednotlivých analytů poskytují minimálně $10 \times$ nižší intenzitu, než nejnižší spikovaná koncentrace, čímž je zaručena dostatečná selektivita metody.

7 Závěr

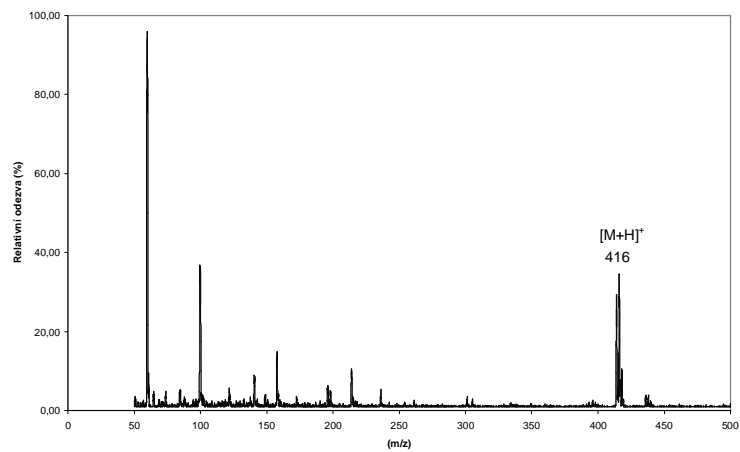
Zjištěné validační parametry prokázaly přesnost a správnost uvedené analytické metody a prokázaly její způsobilost k používání měření kontaminací všech uvedených analytů od $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ v rámci laboratorního odboru a její zahrnutí do Standardních operačních postupů ÚKZÚZ.

8 Literatura

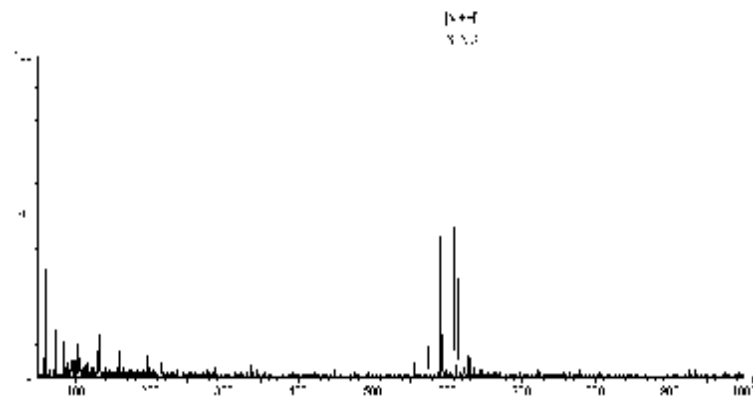
1. European Union Commission Decision 2002/657/EC, off. J. Eur. Commun. **2002** L221
2. Michal Halama, Ověření (konfirmační) metody pro stanovení doplňkových látek metodou LC/MS-MS, Bulletin Národní referenční laboratoře, X., **2006/1**, str. 39,
3. Agata Kot-Wasik Andrzej Wasik, Determination of robenidinenext term in animal feeds by liquid chromatography coupled with diode-array detection and mass spectrometry after accelerated solvent extraction, *Analytica Chimica Acta*, 543, **2005**, 46 – 51
4. M. Dubois, G. Pierret and Ph. Delahaut, Efficient and sensitive detection of residues of nine coccidiostats in egg and muscle by liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 813, **2004**, 181 – 189



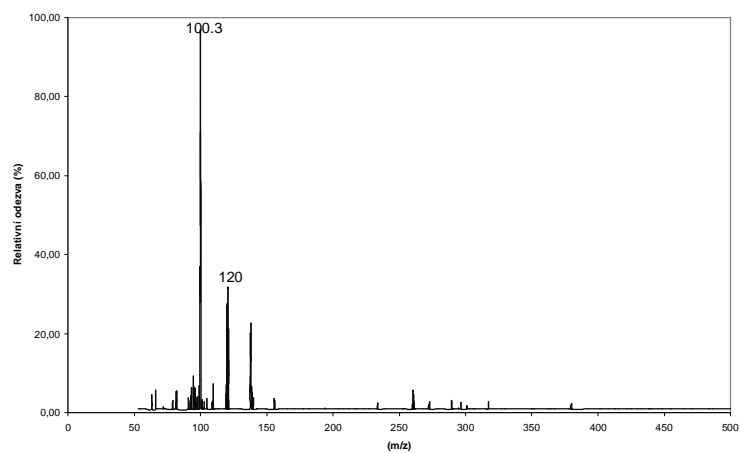
Obrázek 1. Ukázka normalizované chromatografické separace standardů jednotlivých analytů.



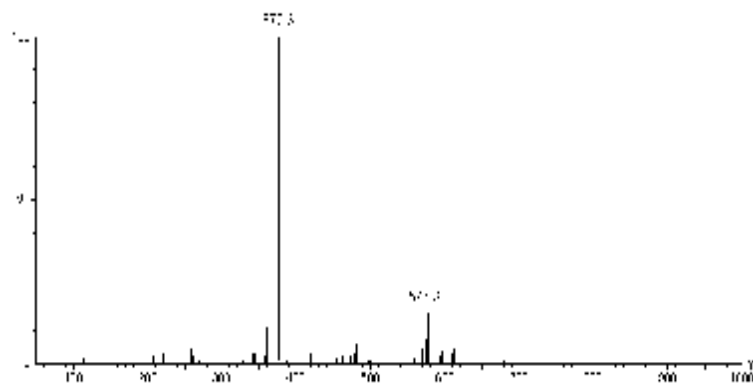
Obrázek 2.a: Halofuginon MS spektrum



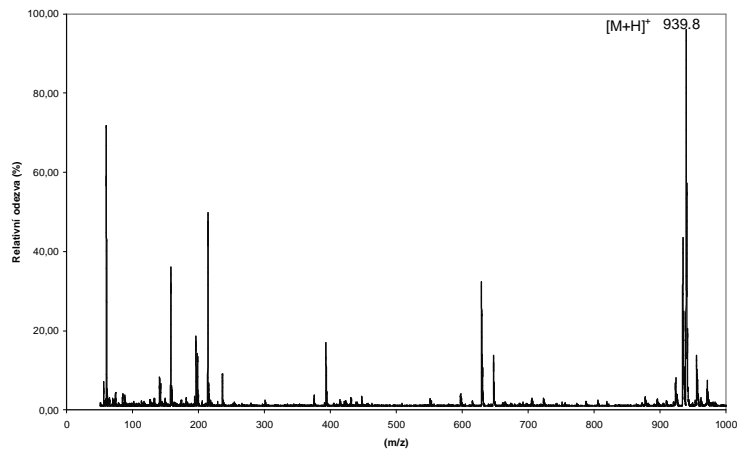
Obrázek 2.b: Lasalocid MS spektrum



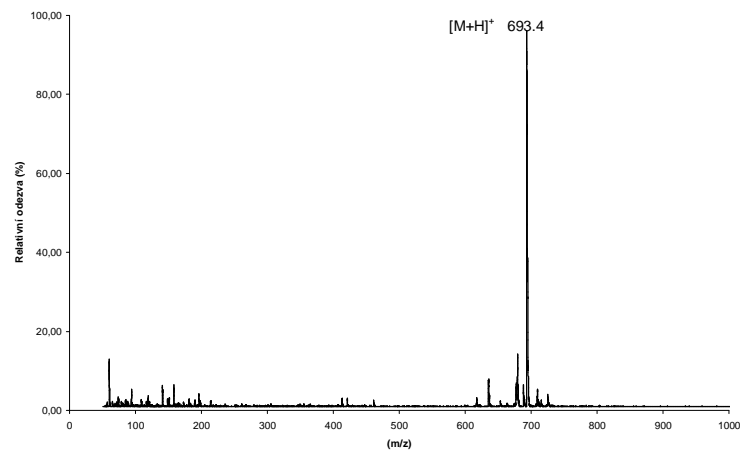
Obrázek 2.c: Halofuginon MS/MS spektrum



Obrázek 2.d: Lasalocid MS/MS spektrum

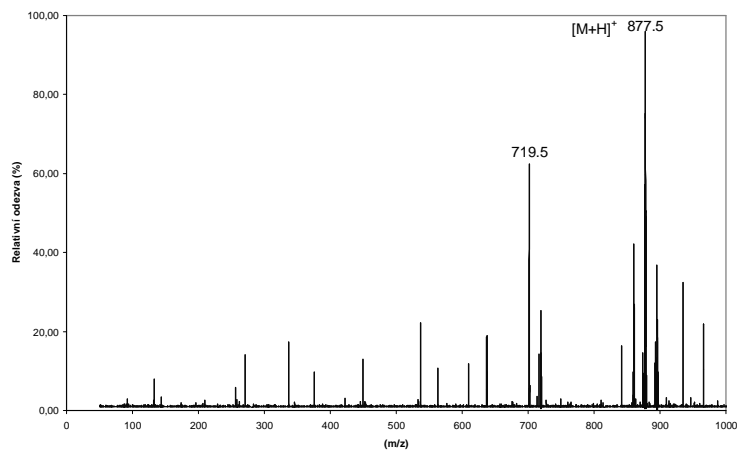


Obrázek 2.e: Maduramycin MS spektrum

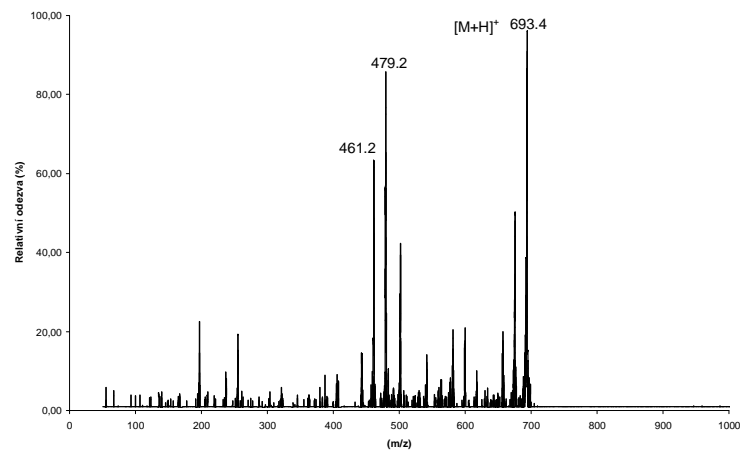


Obrázek 2.f: Monensin MS spektrum

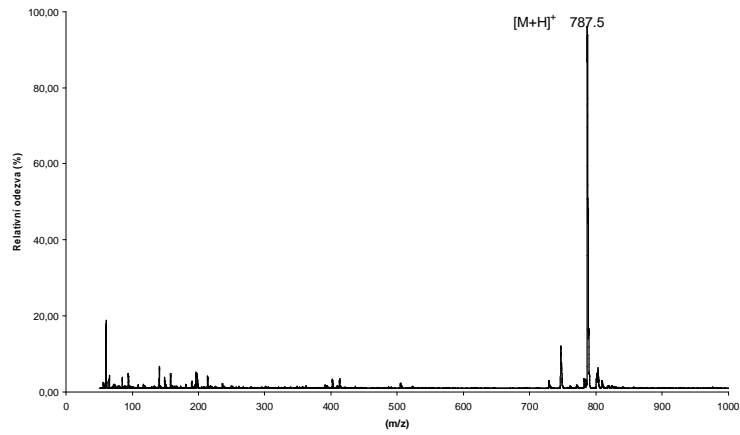
19



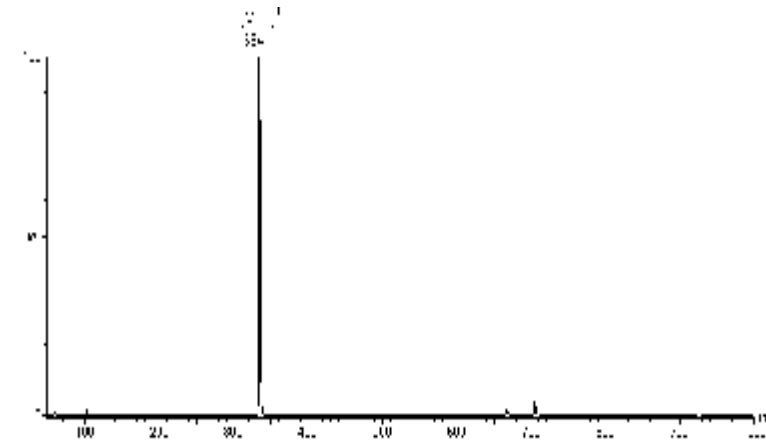
Obrázek 2.g: Maduramycin MS/MS spektrum



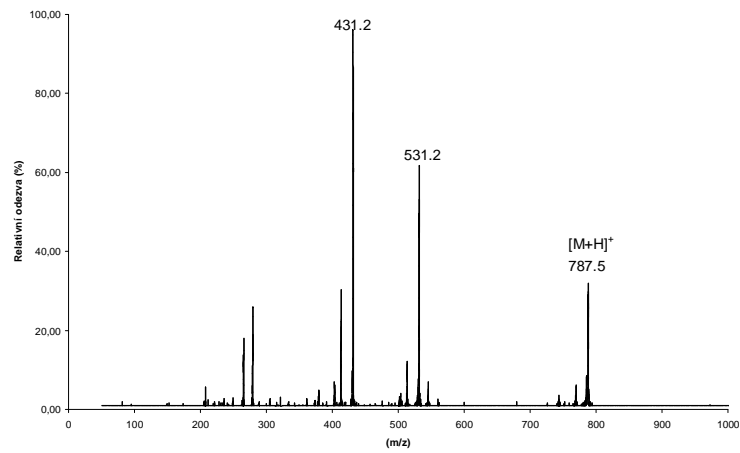
Obrázek 2.h: Monensin MS/MS spektrum



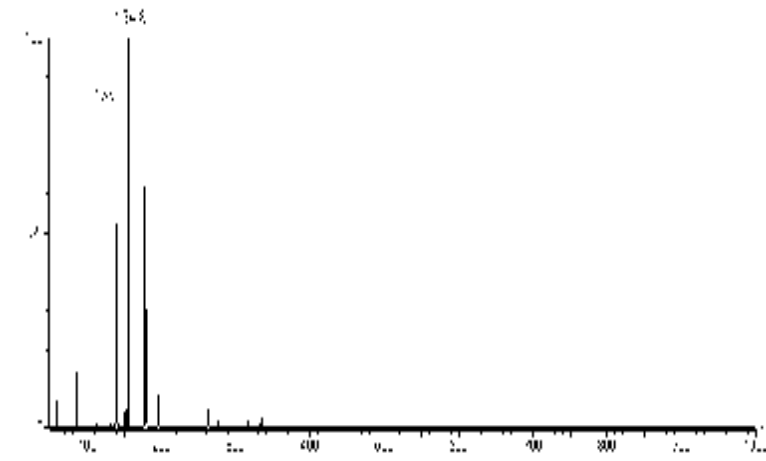
Obrázek 2.i: Narasin MS spektrum



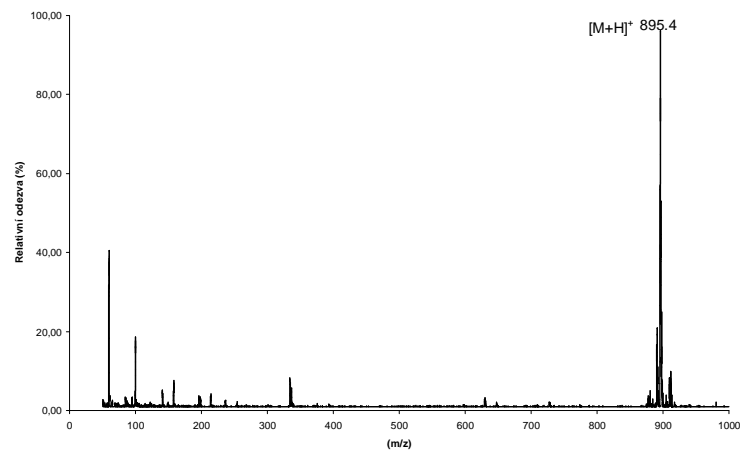
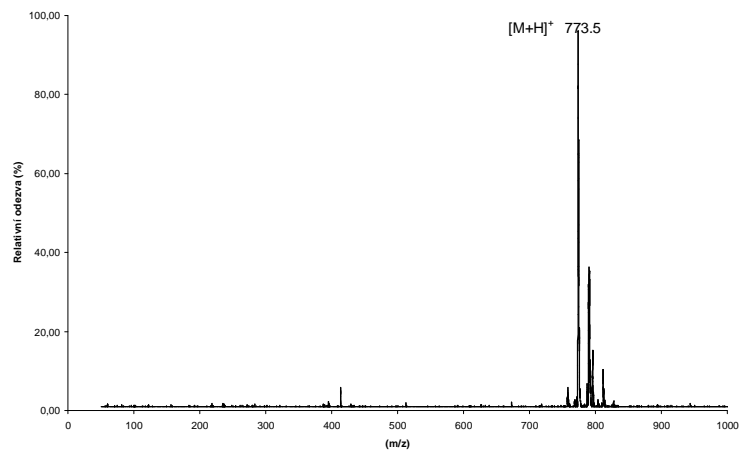
Obrázek 2.j: Robenidin MS spektrum



Obrázek 2.k: Narasin MS/MS spektrum



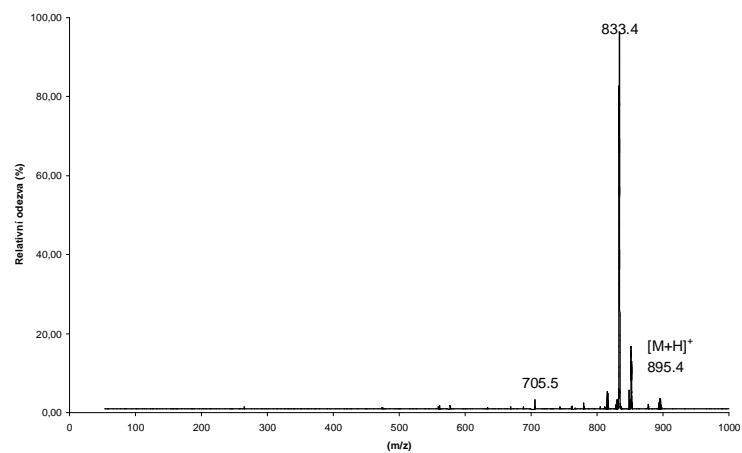
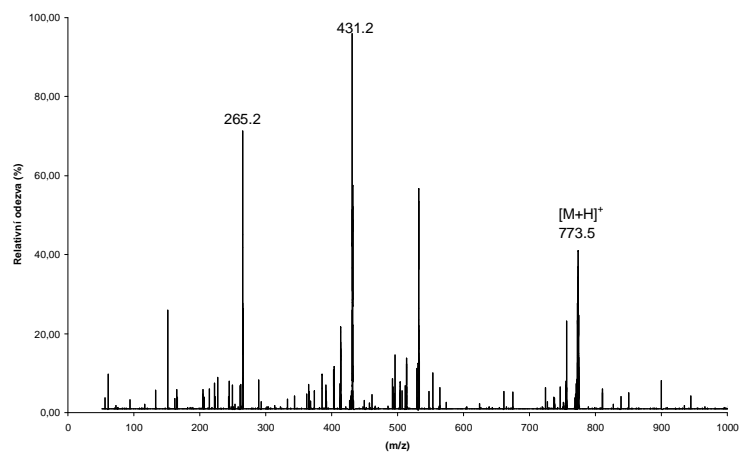
Obrázek 2.l: Robenidin MS/MS spektrum



Obrázek 2.i: Salinomycin MS spektrum

Obrázek 2.j: Sempduramycin MS spektrum

21



Obrázek 2.k: Salinomycin MS/MS spektrum

Obrázek 2.l: Sempduramycin MS/MS spektrum

Zavedení metody pro analýzu toxafenu pomocí GC-MS

Petra Kosubová

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

1 Souhrn

Pro účely kontroly toxafenu v krmivech a jiných abiotických materiálech byla zavedena metoda stanovení toxafenu s využitím GC-MS. Pro přípravu vzorků krmiv byla testována metoda selektivní extrakce s využitím přístroje ASE 100 a byl ověřen klasický postup čištění extraktů krmiv zahrnující gelovou permeační chromatografii a kolonovou chromatografii na florisilu. Pro analýzu toxafenu v půdních vzorcích byl ověřen postup přípravy používaný při stanovení PCB a OCP zahrnující Soxhletovu extrakci a adsorpční chromatografii na sloupci silikagelu. Detekce toxafenu byla porovnána ve dvou MS režimech. Ověřené metody byly použity při analýze 20 vzorků rybích mouček a 8 vzorků lesních půd.

2 Úvod

Toxafen je komplexní směs polychlorovaných bicyklických terpenů vykazující insekticidní vlastnosti. Poprvé byl uveden na trh v roce 1945 společností Hercules Co. v USA jako pesticid proti škůdcům na bavlně (1). V bývalém Československu se toxafen používal v 50. až 70. letech minulého století k ošetření řepky olejky proti blýskáčkovi, nosatčikům a při ošetření vojtěšky proti plodomorce. Z celostátních přehledů prodeje pesticidů v bývalém Československu bylo zjištěno, že se v zemědělství aplikovalo asi 10 000 tun východoněmeckého přípravku Melipax (VEB Fahlberg-List, Magdeburg), který obsahoval 10 % technického toxafenu (2).

Toxafen je díky environmentálnímu chování, hlavně však persistenci, bioakumulačnímu potenciálu a toxickým vlastnostem, zařazen do skupiny persistentních organických polutantů (POP). Opatření související s eliminací POP z životního prostředí vyplývají ze Stockholmské

úmluvy z roku 2001 (3) a z protokolu o POP z roku 1998 (4), rozšiřující UNECE úmluvu o dálkovém přeshraničním přenosu polutantů. Toxafen dále patří mezi nežádoucí látky sledované v potravinách a krmivech. Maximální residuální limity (MRL) pro toxafen v ovoci a zelenině (0,1 mg technického toxafenu/kg) udává směrnice Rady 93/58/EEC (5). Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES (6) stanovující MRL pro toxafen ve všech krmivech (0,1 mg technického toxafenu/kg krmiva s 12% obsahem vlhkosti) byla změněna směrnicí Komise 2005/86/ES (7) pokud jde o toxafen na základě aktualizovaného vědeckého posouzení rizik toxafenu. Jako ukazatele kontaminace toxafenem byly vybrány persistentní toxafenové kongenery Parlar 26, Parlar 50 a Parlar 62, u kterých dochází k bioakumulaci v rámci potravinového řetězce. Naopak Parlar 32, který představuje hlavní složku technických směsí a podléhá biologické přeměně relativně rychle, byl navržen k monitorování ke zjištění současné kontaminace a odhalení možných podvodných postupů. Hlavní zdroj toxafenu v krmivech představují rybí moučky a rybí tuk, které jsou majoritními složkami krmiv pro ryby. Směrnice Komise 2005/86/ES stanovuje pro tyto krmné materiály MRL toxafenu vyjádřené jako sumu tří persistentních kongenerů (viz. tab. 1) (7). Koncept MRL založený na indikátorových persistentních kongenerech toxafenu, byl poprvé zaveden v německé legislativě pro MRL toxafenu v rybách a rybích produktech. Vývojem a validací tohoto přístupu se zabývala skupina profesora Aldera z FRFCF, Hamburg (8, 9).

Tabulka 1. Maximální residuální limity (MRL) toxafenu v krmivech

Toxafen – forma	Krmiva	MRL (ppm)	Legislativa
Technický	Všechna	0,1	2002/32/ES
Suma P26, P50, P62	Ryby a rybí produkty	0,02	2005/86/ES
Suma P26, P50, P62	Rybí tuk	0,2	2005/86/ES
Suma P26, P50, P62	Pro ryby	0,05	2005/86/ES

Příprava vzorků k finální analýze zahrnuje extrakci a čištění extraktu. K intenzivním extrakčním technikám krmiv a půd patří tlaková extrakce rozpouštědlem (PLE) a Soxhletova extrakce, která je časově náročná a vyžaduje velkou spotřebu rozpouštědel. Obě techniky poskytují při extrakci komplexních matric extrakty s vysokým obsahem interferujících látek a vyžadují jejich separaci pomocí například gelové permeační chromatografie nebo adsorpční chromatografie na sloupci florisilu nebo silikagelu (10). Velice zajímavou alternativou je

selektivní PLE, při níž je sorbent umístěn přímo v extrakční cele a dochází k extrakci a přečištění v jednom kroku. Při přípravě biotických vzorků je vhodnější použití florisilu, který zadrží větší podíl tukových koextraktů v porovnání s jinými sorbenty, například silikagelem nebo aluminou. Jednokrokovou přípravu komplexních matric pomocí zařízení ASE 200 popsali ve svých pracích J.L. Gómez-Ariza (11) a J.H. Kim (12).

Koncové stanovení toxafenu se provádí pomocí vysoko rozlišovací plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou (MS) detekcí. Pro rutinní účely se toxafen nejčastěji detekuje pomocí nízko rozlišovací tandemové MS (MS/MS) s využitím iontové pasti (IT) nebo MS s negativní chemickou ionizací (NCI-MS) s využitím kvadrupólových analyzátorů. NCI-MS umožňuje nízké detekční limity, avšak vykazuje vysokou variabilitu odezvových faktorů a nízkou reprodukovatelnost. V režimu vybraných iontů se sledují toxafenové fragmenty odpovídající $[M]^-$ a $[M-Cl]^-$ (13). Problematické jsou interference chlordanových sloučenin a kyslíkových aduktů PCB, které mohou vznikat v MS při netěsnosti systému a jejich hmotnostní separace je možná pouze s využitím vysoko rozlišovacích MS při minimálním rozlišení 10 000 (14). Vhodnou alternativou pro detekci toxafenových residuí je tandemová MS, při které se sleduje ztráta HCl při disociaci indukované kolizí vybraného prekursoru s inertním plynem. Při MS/MS se využívá dvou hmotnostně odlišných přístupů, tj. sledování disociace fragmentu o m/z 125 (monochlorotropyliu) na m/z 89, nebo disociace následujících fragmentů $[M-2HCl-Cl]^+$, $[M-HCl-C_2H_2Cl_2-Cl]^+$, $[M-3HCl-Cl]^+$. Porovnání obou přístupů je provedeno ve dvou nezávislých studiích (15,16).

Cílem práce bylo optimalizovat metodu pro stanovení toxafenu v různých matricích, provést její ověření analýzou referenčního materiálu a obohacených vzorků, porovnat různé módy MS detekce, a aplikovat ověřené metody při analýze vzorků krmiv a lesních půd.

3 Materiál a metody

3.1 Chemikálie

Všechny použité chemikálie byly čistoty minimálně p.a., nejlépe však kvality pro reziduální analýzu. Dostatečná čistota sorbentů a rozpouštědel byla kontrolována analýzou slepého vzorku. Rozpouštědla: hexan, aceton, dichlormetan (DCM), chloroform (CH_3Cl), isooktan. Florisil (0,15 mm – 0,25 mm, Merck, Německo), aktivace 4 h při 650 °C, reaktivace 16 h při 150 °C, případně deaktivace 3 % vody. Silikagel 100/60 (0,063-0,200/0,200-0,500 mm,

Merck, Německo), aktivace 12 h při 150 °C, deaktivace 3 % vody. Síran sodný Na₂SO₄, aktivace 6 h při 550 °C a mořský písek žíhaný 4 h při 650 °C (Lachema, ČR). Hydroskopický Spe-ed Matrix (Applied Separations, USA) byl použit k vysoušení původních vzorků a extraktů.

Tabulka 2. Přehled názvosloví toxafenových kongenerů

Parlarovo číslo	Systematický název	Ostatní značení	Použitá zkratka v textu
Parlar 26	2-endo,3-exo,5-endo,6-exo-8,8,10,10-oktachlorobornan	B8-1413, T2, TOX8, B[12012]-(202)	P26
Parlar 32	2,2,5-endo,6-exo,8,9,10-heptachlorobornan	B7-515, Toxicant B, B[30012]-(111)	P32
Parlar 50	2-endo,3-exo,5-endo,6-exo-8,8,9,10,10-nonachlorobornan	B9-1679, T12, TOX9, B[12012]-(212)	P50
Parlar 62	2,25,5,8,9,9,10,10-nonachlorobornan	B9-1025, B[30030]-(122)	P62

Vnitřní standard PCB 155 (Absolute Standards, USA), pracovní roztok 100 ng/ml isooktanu a izotopově značený standard ¹³C₁-chlordan (100 µg/ml nonanu, Chemservis, USA). Směsný analytický standard DE-USL 421 obsahující 4 toxafenové kongenery (5 µg/ml isooktanu, Promochem, Německo) (viz. tab. 2). Standard technického toxafenu (1000 µg/ml isooktanu, Supelco, USA). Certifikovaný referenční materiál SRM 1588a (rybí tuk, NIST, USA).

3.2 Přístroje a nastavení

Extraktor Soxtec Avanti (Foss, Dánsko) pro Soxhletovu extrakci horkým rozpouštědlem, směsí hexan/acetone. Teplota extrakce byla 135 °C a doba extrakce 2 h. Extraktor ASE 100 (Dionex, USA) pro tlakovou extrakci rozpouštědlem s příslušenstvím: 34 ml extrakční cely a 250 ml sběrné nádoby a celulózové filtry. Podmínky pro selektivní PLE extrakci byly následující: navážka vzorku/sorbentu 2 g/10 g; teplota 40 °C/60 °C; čas extrakce 10 min; čas profouknutí systému po skončení extrakce 20 s; objem proplachu 150 %; 2 statické cykly; extrakční rozpouštědlo 15 % DCM v hexanu.

GPC sestava: HP 1050 pumpa; nástřikový ventil Rheodyne (model 7725i) s přeplňovací smyčkou (1 ml); separační kolona (8 × 500) mm; náplň Bio-Beads SX3 (200 – 400) mesh, mobilní fáze CHCl₃; průtok 0,6 ml/min. Sběrač frakcí Gilson FC 203B. Toxafenová frakce byla sbírána mezi 20. min. až 40. min. Před GPC byly z extraktů odstraněny mechanické nečistoty pomocí teflonových filtračních disků 30 mm × 0,45 μm.

Plynový chromatograf CP-3800 (Varian, USA), kapilární kolona DB-XLB (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, J&W Scientific). Teplotní program pece: 90 °C (1 min), 200 °C (25 °C/min); 250 °C (4 °C/min); 280 °C (15 °C/min, 15 min). Splitless nástřik (1 μl); teplota injektoru 250 °C. Nosný plyn He 5.0; průtok 1 ml/min.

Hmotnostní spektrometr Varian 1200 MS s trojnásobným kvadrupólovým analyzátozem. Při MS/MS experimentech byly podmínky následující: EI ionizace při 70 eV, teplota iontového zdroje/výstupu z GC 200 °C/275 °C, tlak kolizního plynu (Argon 4.6) 2,2 mTorr, šířka *m/z* prekursoru 0,7 a produktů 1,0. Selektivní přechod monitorovaný při stanovení technického toxafenu a jednotlivých toxafenových kongenerů byl *m/z* 125 → *m/z* 89 při kolizní energii -10 V až -15 V. Při NCI-MS byly toxafenové kongenery detekovány v SIM režimu pomocí *m/z* odpovídajících fragmentům [M-Cl]⁻, tj. *m/z* 343, 373, 413. Negativní chemická ionizace probíhala při 150 eV, teplotě iontového zdroje/výstupu z GC 120 °C/275 °C a tlaku CH₄ v iontovém zdroji 6,5 Torr.

3.3 Pracovní postup

Podrobný popis jednotlivých postupů přípravy vzorků k analýze je uveden ve standardním operačním postupu SOP 30 (17).

Půdní vzorky: Půda (10 g) byla extrahována v automatickém extraktoru Soxtec, 80 ml směsi hexan/acetone (3 : 1). Extrakt s přidavkem vnitřního standardu se zkoncentroval na rotační vakuové odparce (RVO) na (1 – 2) ml a dočistil se na silikagelové kolonce (5 ml kyselého silikagelu, 2 ml silikagelu 100, 2 ml silikagelu 60 s větším zrněním a 1 ml bezvodého Na₂SO₄). Eluce byla provedena 20 ml hexanu a 10 ml 50% DCM v hexanu. Eluát se odpařil na RVO a odparek rekonstituovaný do isooktanu se převedl do vialky pro koncové GC-MS stanovení.

Krmiva klasickým postupem: Vzorky krmiv (10 g) se extrahovaly v automatickém extraktoru Soxtec, 80 ml směsi hexan/acetone (3 : 1). Extrakt s přísávkem vnitřního standardu se zkoncentroval na RVO téměř k suchu, odparek se rozpustil v chloroformu a přefiltroval přes teflonový disk. Z takto připraveného extraktu se nastříkl 1 ml podíl na GPC kolonu a jímala se toxafenová frakce při rychlosti průtoku mobilní fáze 0,6 ml CHCl₃/min. Zájmová frakce se odpařila na RVO téměř k suchu, odparek rekonstituovaný do 1 ml hexanu se dočistil na SPE kolonce s 4 ml florisilem s 3 % vody a 1 ml bezvodého Na₂SO₄. Eluce se provedla 12 ml 50% DCM v hexanu. Eluát se odpařil na RVO a odparek rekonstituovaný do isooktanu se převedl do vialky pro koncové GC-MS stanovení.

Krmiva pomocí ASE: Do nerezové cely (34 ml) se navázilo 6 g florisilu aktivovaného při 150 °C. Florisil se převrstvil rozetřenou směsí 2 g vzorku, 20 ng vnitřního standardu PCB 155, 4 g Na₂SO₄ a dalších 4 g florisilu. Zbývající prostor se vyplnil vyžíhaným pískem, cela se uzavřela šroubovacím víčkem a vložila do přístroje. Nastavil se příslušný extrakční program a spustil proces. Získaný extrakt se převedl do 100 ml baňky, odpařil pomocí RVO na objem (1 – 2) ml, převedl do minivialky, a odpařil se mírným proudem dusíku na objem ~ 0,2 ml.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Limity stanovení

Dosažené limity stanovení jsou dostatečné pro zajištění kontroly dodržování MRL v krmivech a krmných složkách stanovených směrnici Komise 2005/86/ES (viz. tab. 1) (7). Pro krmiva s 88% obsahem sušiny je MRL toxafenu 0,02 ppm, vyjádřený jako suma (P26 + P50 + P62). Po přepočtu na původní vzorek je stanovený limit 18 ppb. Mez detekce (LOD) při analýze GC-MS/MS byla 1,4 ppb, tj. 1/13 stanoveného MRL a mez stanovitelnosti 4,3 ppb (1/4 MRL).

Tabulka 3. Přehled detekčních limitů (LOD) při poměru S/N 3 : 1 při různých MS podmínkách a porovnání s literaturou

Toxafenový kongener	P26	P32	P50	P62
NCI-MS-SIM (Q) ^a	2	nd	2	10
NCI-MS-SIM (3Q)^b	0,4	0,7	0,6	1,6
MS/MS přechod, m/z 125 -> 89 (IT) ^c	2,8	2,2	1,0	2,3
MS/MS přechod, m/z 125 -> 89 (IT) ^d	2,2	1,4	7,2	5,2
MS/MS přechod, m/z 125 -> 89 (3Q)^b	1,1	1,1	4,8	7,0
MS/MS přechod, m/z 303 -> 267 (IT) ^d	3,6	nd	1,1	0,9
MS/MS přechod, m/z 303 -> 267 (IT) ^a	4	nd	6	4
MS/MS přechod, m/z 303 -> 267 (3Q)^b	nd	nd	nd	nd

^aSkopp (18), ^bUKZUZ – Varian 1200MS, ^cChan (19), ^dSkopp (15), nd - nedetekováno

Stanovené instrumentální meze detekce při GC-MS/MS analýze, tj. (1,1; 1,1; 4,8; 7,0) pg P26; P32; P50 resp. P62 při nástřiku 1 μ l, jsou v dobré shodě s literárními hodnotami. Výjimku představoval přechod m/z 303 \rightarrow m/z 267, který vykazuje při měření nonachlorových kongenerů pomocí MS s iontovou pastí lepší citlivost než výše uvedená ztráta chlorovodíku z monochlorotropyliu (15). Při použití trojnásobného kvadrupólu nebylo možné tento přechod detekovat díky transmisním a kolizním ztrátám při disociaci indukované argonem v kolizní cele (20).

Nejnižší kvantifikační limity byly naměřeny při monitorování přechodu m/z 231/233 na m/z 195/197. Přechod však není dostatečně selektivní pro stanovení toxafenu, může docházet k interferencím ostatních organochlorových sloučenin. Nejvyšší selektivity lze dosáhnout u přechodu m/z 125 \rightarrow m/z 89, který vykazuje nejvyšší LOQ. Při navážce 10 g jsou meze stanovitelnosti (0,4; 0,4; 1,6; 2,3) ng/g původního vzorku pro P26; P32; P50 resp. P62. Měření v režimu NCI-MS-SIM poskytuje lepší LOQ v porovnání s MS/MS přístupem, avšak z hlediska plynulosti chodu laboratoře a stability ostatních prováděných stanovení nejsou vhodné opakované změny uspořádání MS, související s použitím různých ionizačních technik.

Tabulka 4. Souhrn kvantifikačních limitů (LOQ) při poměru S/N 10 : 1 při různých MS podmínkách s využitím Varianu 1200MS

Toxafenový kongener	P26	P32	P50	P62
MS/MS přechod (<i>m/z</i>)	231 -> 195	233 -> 197	231 -> 195	231 -> 195
LOQ (ng/ml)	0,5	0,9	2,1	2,4
MS/MS přechod (<i>m/z</i>)	125 -> 89	125 -> 89	159 -> 123	159 -> 123
LOQ (ng/ml)	3,8	3,9	7,5	10,8
MS/MS přechod (<i>m/z</i>)	125 -> 89	125 -> 89	125 -> 89	125 -> 89
LOQ (ng/ml)	3,6	3,6	16,1	23,2
NCI-MS-SIM (<i>m/z</i>)	377	343	413	377
LOQ (ng/ml)	1,3	2,2	1,9	5,3

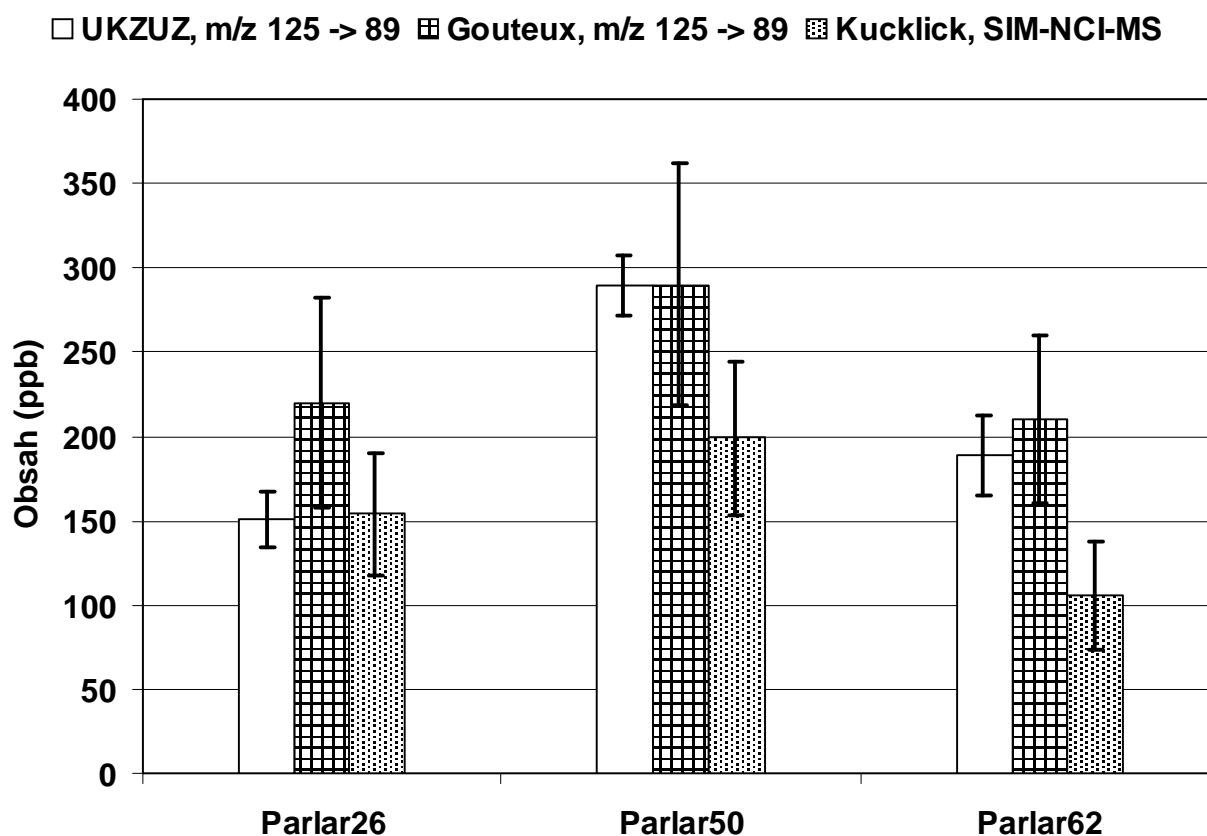
4.2 Analýza referenčního materiálu

Vyhodnocení správnosti navržené detekční metody stanovení toxafenu bylo provedeno analýzou referenčního materiálu, který toxafenové kongenery obsahuje, avšak nejsou uvedeny v jeho certifikátu. Při MS/MS detekci založené na sledování disociace chlorovodíku z monochlorotropyliu byly stanoveny nejnižší obsahy toxafenových kongenerů v SRM 1588a (viz. tab. 5), které byly v dobré shodě s publikovanými daty (16, 21) (viz. obr. 1). Celková opakovatelnost stanovení P26; P50 resp. P62 byla 5 %.

Tabulka 5. Přehled stanovených obsahů toxafenových kongenerů v referenčním materiálu SRM1588a (rybí tuk) při různých MS podmínkách

Toxafenový kongener	P26	P32	P50	P62
MS/MS přechod (<i>m/z</i>)	231 -> 195	233 -> 197	231 -> 195	231 -> 195
Obsah (ng/g tuku)	193	nd	439	305
MS/MS přechod (<i>m/z</i>)	125 -> 89	125 -> 89	159 -> 123	159 -> 123
Obsah (ng/g tuku)	148	nd	394	224
MS/MS přechod (<i>m/z</i>)	125 -> 89	125 -> 89	125 -> 89	125 -> 89
Obsah (ng/g tuku)	150	nd	290	189
SIM-NCI-MS (<i>m/z</i>)	377	343	413	377
Obsah (ng/g tuku)	262	nd	432	218

Obrázek 1. Porovnání stanovených obsahů v SRM 1588a včetně nejistot stanovení (průměr ± směrodatná odchylka · koeficient rozšíření, k = 2, ng/g), klasický postup přípravy krmiv k finální analýze



4.3 Selektivní PLE

Pro efektivní přípravu vzorků krmiv byla zavedena metoda tlakové extrakce rozpouštědlem za zvýšené teploty s přidavkem sorbentu v extrakční cele, označovaná jako selektivní PLE s využitím ASE 100. Navržené podmínky v práci Gómeza-Arizey (11) byly ověřeny pro stanovení vybraných toxafenových kongenerů v krmivech s různým obsahem tuku. Při extrakci bylo na 2 g krmiva přidáno 10 g florisilu aktivovaného 16 h při 150 °C a připravený extrakt zkoncentrován na objem ~ 0,2 ml. Výtěžnosti pro jednotlivé kongenery a materiály shrnuje tabulka 6, přičemž celková výtěžnost stanovená pomocí GC-MS/MS byla (95 ± 10) % při obohacení 10 ppb. NCI-MS-SIM stanovení poskytlo srovnatelné výsledky.

Tabulka 6. Výtěžnost selektivní PLE pro toxafenové kongenery P26, P32, P50, P62 v krmivech, stanovená pomocí obohacených vzorků krmiv s různým obsahem tuku

Krmivo		ASE	Výtěžnost (%)					
			MS/MS					NCI-MS-SIM
Materiál	Tuk (%)	Teplota (°C)	P26	P32	P50	P62	Průměr	Průměr
Sušené mléko	1,00	40	110	103	106	88	102	93
Sušené mléko	0,96	60	94	86	102	80	91	105
Rybí moučka	8,55	40	106	96	101	83	96	92
Řepkové expelery	14,81	40	99	95	98	72	91	94
Souhrn			102	95	102	81	95	96

4.4 Volba vnitřního standardu

Za účelem zlepšení kvality výsledků byly zakoupeny do laboratoře izotopově značené standardy, konkrétně pro stanovení toxafenu $^{13}\text{C}_1$ -chlordan. Tyto látky jsou strukturně příbuzné, proto lze předpokládat podobné ionizační a fragmentační chování při MS, což je jeden z předpokladů pro výběr vnitřního standardu pro stanovení daného analytu. V obou případech se jedná o nasycené bicyklické sloučeniny substituované atomy chloru. Při optimalizaci PLE extrakce krmiv byla také vyhodnocena výtěžnost postupu pro $^{13}\text{C}_1$ -chlordan. Detekce $^{13}\text{C}_1$ -chlordanu byly provedena ve dvou MS režimech, v MS/MS a NCI-MS-SIM.

Tabulka 7. Výtěžnost selektivní PLE pro $^{13}\text{C}_1$ -chlordanu bez přídavku nativního chlordanu v krmivech s různým obsahem tuku

Krmivo		ASE	Výtěžnost (%)	
			MS/MS (m/z 376->m/z 304,302)	NCI-MS-SIM (m/z 411)
Materiál	Tuk (%)	Teplota (°C)		
Sušené mléko	1,00	40	99	90
Sušené mléko	0,96	60	96	94
Krmivo pro ryby	11,18	40	97	102
Řepkové expelery	14,81	40	103	96
Souhrn			99	96

Bez přídavku nativního chlordanu byla výtěžnost $^{13}\text{C}_1$ -chlordanu při zvolených extrakčních teplotách stanovena pomocí obou MS přístupů vyhovující (viz. tab. 7). V případě obohacení matrice nativním γ -chlordanem bylo u obou MS nastavení detekováno nadhodnocení výtěžnosti $^{13}\text{C}_1$ -chlordanu, způsobené vzájemnou hmotnostní interferencí. MS fragmenty nativního a izotopicky značeného chlordanu se liší o jednu hmotnostní jednotku. MS/MS přístup vykazoval (5 – 10)% zvýšení odezvy $^{13}\text{C}_1$ -chlordanu v přítomnosti nativního analogu. Avšak v případě NCI-MS byla interference téměř 100 %. Příčinou je vznik směsných chlorových klastrů chlordanů za podmínek chemické ionizace toxafenu, tj. teploty iontového zdroje a tlaku metanu, a překryv hmotnostních spekter těchto látek se stejnou retenční charakteristikou. Vhodnou alternativou $^{13}\text{C}_1$ -chlordanu je použití izotopově značeného DDE ($^{13}\text{C}_{12}$ -DDE) a PCB 118 ($^{13}\text{C}_{12}$ -PCB 118), které byly pořízeny pro kontrolu stanovení PCB a OCP v krmivech. Při detekci $^{13}\text{C}_{12}$ -DDE a $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB 118 v MS/MS režimu nebyly odhaleny žádné interferující látky.

4.5 Analýza vzorků rybích mouček

V rámci monitoringu nežádoucích látek v krmivech byl toxafen analyzován ve 20 vzorcích rybích mouček. V roce 2004 byly rybí moučky připraveny k finálnímu stanovení klasickým způsobem přípravy vzorků krmiv. V roce 2005 byly rybí moučky připraveny k finální analýze pomocí selektivní PLE s využitím ASE 100. Obsahy indikátorových toxafenových kongenerů v rybích moučkách stanovené v roce 2004 a 2005 nepřekročily MRL 18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ původního vzorku. Naměřené hodnoty korespondovaly s výsledky studie K. Oetjena, který dále upozornil na zvýšené obsahy toxafenu v surovém rybím oleji (7 – 206) $\mu\text{g}/\text{kg}$, zvláště pak v produktech evropského původu (22).

Tabulka 8. Obsahy indikátorových toxafenových kongenerů (ppb v původním vzorku) stanovené v rybích moučkách v roce 2004

Krmiva 2004	P26 (ppb)	P32 (ppb)	P50 (ppb)	P62 (ppb)
227	< 0,4	< 0,4	< 1,6	< 2,3
510	< 0,4	< 0,4	< 1,6	< 2,3
554	< 0,4	< 0,4	< 1,6	< 2,3
576	0,5	< 0,4	< 1,6	< 2,3
577	1,3	< 0,4	3,1	< 2,3
579	< 0,4	< 0,4	< 1,6	< 2,3
721	< 0,4	< 0,4	< 1,6	< 2,3
683	< 0,4	< 0,4	< 1,6	< 2,3
1018	0,9	< 0,4	2,3	< 2,3
1127	< 0,4	< 0,4	< 1,6	< 2,3

Tabulka 9. Obsahy indikátorových toxafenových kongenerů (ppb v původním vzorku) stanovené v rybích moučkách v roce 2005

Krmiva 2005	P26 (ppb)	P32 (ppb)	P50 (ppb)	P62 (ppb)
385	< 0,4	< 0,4	< 1,6	< 2,3
579	< 0,4	< 0,4	< 1,6	< 2,3
592	< 0,4	< 0,4	< 1,6	< 2,3
643	< 0,4	< 0,4	< 1,6	< 2,3
832	< 0,4	< 0,4	< 1,6	< 2,3
975	< 0,4	< 0,4	< 1,6	< 2,3
1196	< 0,4	< 0,4	< 1,6	< 2,3
1311	1,2	< 0,4	< 1,6	< 2,3
1342	< 0,4	< 0,4	< 1,6	< 2,3
1709	< 0,4	< 0,4	< 1,6	< 2,3

4.6 Analýza vzorků lesních půd

Výtěžnost toxafenu při přípravě půdních vzorků byla 91 %. V roce 2004 bylo zpracováno 8 vzorků humózních horizontů lesních půd. Celkový obsah 4 toxafenových kongenerů v těchto horizontech byl v rozmezí 0,50 ppb až 3,8 ppb, což odpovídá publikovaným hodnotám stanovených pomocí MS s iontovou pastí (23).

Tabulka 10. Obsahy toxafenových kongenerů v lesních půdách odebraných v Krušných horách, Jihomoravských úvalech a na Českomoravské vrchovině

Lesní půdy 2004	P26 (ppb)	P32 (ppb)	P50 (ppb)	P62 (ppb)
3324 (16615/02)	0,53	0,54	< 1,6	< 2,3
3325 (16616/02)	0,66	0,67	2,5	< 2,3
3326 (16617/02)	< 0,4	< 0,4	< 1,6	< 2,3
3327 (16618/02)	0,50	< 0,4	< 1,6	< 2,3
3328 (16620/02)	0,63	0,53	1,9	< 2,3
3329 (16621/02)	0,59	0,51	1,7	< 2,3
3330 (35028/02)	< 0,4	< 0,4	< 1,6	< 2,3
3331 (01454/02)	0,50	< 0,4	< 1,6	< 2,3

5 Závěr

Stanovené detekční a kvantifikační limity vyhovují požadavkům pro kontrolu toxafenu v krmivech. Pomocí MS/MS přístupu byly stanoveny indikované obsahy persistentních toxafenových kongenerů v referenčních materiálu SRM1588a s nejistotou 10 %. Selektivní PLE toxafenu z různých vzorků krmiv byla ověřena při obohacení 10 ppb s výtěžností (95 ± 10) %. V rámci monitoringu krmiv v roce 2004 a 2005 nebyly odhaleny vzorky s významnou toxafenovou kontaminací.

6 Literatura

1. de Geus, H.-J., et al., Environmental occurrence, analysis and toxicology of toxaphene compounds. *Environmental Health Perspectives*, **1999**, *107*, 1 – 51.
2. Kosubová, P. Chirální látky v životním prostředí – studium toxafenu. Disertační práce, Masarykova univerzita, Brno, **2004**.
3. Stockholmská úmluva o POP, Stockholm, Švédsko, **2001**. <http://www.pops.int>
4. Protokol o persistentních organických polutantech k Úmluvě o dálkovém přeshraničním přenosu škodlivin (1979), Aarhus, Dánsko, **1998**. http://www.unece.org/env/lrtap/pops_h1.htm
5. Směrnice Rady 93/58/EEC, kterou se mění příloha II ke směrnici 76/895/EHS týkající se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v ovoci a zelenině a na nich a příloha ke směrnici 90/642/EHS týkající se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v určitých produktech rostlinného původu a na nich, včetně ovoce a zeleniny, a kterou se stanoví první seznam maximálních limitů.
6. Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES o nežádoucích látkách v krmivech.

7. Směrnice Komise 2005/86/ES, kterou se mění příloha I směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES o nežádoucích látkách v krmivech, pokud jde o campechlor.
8. Alder, L., Vieth, B. A congener-specific method for the quantification of campechlor (toxaphene) residues in fish and other foodstuffs. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **1996**, 354, 81 – 92.
9. Alder, L., et al. Collaborative study on toxaphene indicator compounds (chlorobornanes) in fish oil. *Chemosphere*, **1997**, 35, 1391 – 1398.
10. Gfrerer, M., et al. Comparison of different extraction techniques for the determination of chlorinated pesticides in animal feed. *Anal Bioanal Chem*, **2004**, 378(7), 1861 – 7.
11. Gomez-Ariza, J.L., et al. Determination of polychlorinated biphenyls in biota samples using simultaneous pressurized liquid extraction and purification. *J Chromatogr A*, **2002**, 946(1 – 2), 209 – 19.
12. Kim, J.H., et al. One-step pressurized liquid extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytica Chimica Acta*, **2003**, 498, 55 – 60.
13. Glassmeyer, S.T., et al. Automated toxaphene quantitation by GC/MS. *Analytical Chemistry*, **1999**, 71, 1448 – 1453.
14. Fowler, B. The determination of toxaphene in environmental samples by negative ion electron capture high resolution mass spectrometry. *Chemosphere*, **2000**, 41, 487 – 492.
15. Skopp, S., et al. Analysis of "total toxaphene" and selected single congeners in biota by ion trap HRGC-EI-MS/MS using congener-optimized parent ion dissociations. *Environmental Science and Technology*, **2002**, 36, 2729 – 2735.
16. Gouteux, B., et al. Analysis of six relevant toxaphene congeners in biological samples using ion trap MS/MS. *Chemosphere*, **2002**, 49, 183 – 191.
17. Příkučka jakosti ÚKZÚZ, **2005**, SOP 30, Stanovení PCB a OCP metodou GC/MS.
18. Skopp, S., et al. Ion trap MS/MS detection, a sensitive and selective alternative for the analysis of toxaphenes and chlorinated paraffins. *Organohalogen Compounds*, **1999**, 40, 261 – 265.
19. Chan, H.M., et al. Determination of toxaphene in biological samples using high resolution GC coupled with ion trap MS/MS. *Chemosphere*, **1998**, 36, 2135 – 2148.
20. Galceran, M.T., Santos, F.J. Gas chromatography – Mass Spectrometry Analysis of Chlorinated Organic Compounds. Current Practice of Gas Chromatography – Mass Spectrometry, 1, Niessen, W.M.A.: New York, **2001**, 86, 117 – 155.
21. Kucklick, J.R., et al. Concentrations of polybrominated diphenyl ether congeners and toxaphene in selected marine standard reference materials. *Organohalogen Compounds*, **2003**, 60 – 65.
22. Oetjen K., Karl H. Levels of toxaphene indicator compounds in fish meal, fish oil and fish feed. *Chemosphere*, **1998**, 37(1), 1 – 11.
23. Kosubová, P., et al. Toxaphene and other chlorinated pesticides in the Czech mountain and lowland forest ecosystems. *Fresenius Environmental Bulletin*, **2005**, 14, 160 – 166.

Vývoj kalibračních modelů pro parametr olej u slunečnice metodou NIR spektroskopie

David Čížmár

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

david.cizmar@ukzuz.cz

1 Úvod

Slunečnice roční (*Helianthus annuus*) (obr.1) je jednoletá rostlina, která se často pěstuje jak na polích, tak i v zahrádkách. Pravděpodobně pochází z Mexika, odkud se dostala do Evropy v průběhu 16. století. V současné době se jedná o jednu z nejrozšířenějších plodin pěstovaných na území celé EU. Hlavní využití slunečnice je v olejářském průmyslu, kde se ze semen získává olej jak pro domácí, tak i pro průmyslové využití. Za studena lisované oleje se používají k jídlu, za horka lisovaný olej slouží k výrobě jemných mýdel, barev, margarínů aj.



Obr. 1: Slunečnice roční

Klasická laboratorní metoda stanovení obsahu oleje je časově náročná na přípravu vzorku a jeho následnou extrakci. Zároveň tato metoda není šetrná k životnímu prostředí, neboť extrakce vzorku probíhá rozpouštědlem petroléter.

Metoda NIR spektroskopie je naproti tomu rychlá, nedestruktivní a tedy vhodná analytická technika umožňující nahrazení klasické laboratorní metody stanovení obsahu oleje v slunečnici roční. V současné době pracoviště NIR spektroskopie NRL-RO Brno běžně provádí stanovení obsahu oleje v řepce olejce. Pro velký zájem ze strany odboru odrůdového zkušebnictví stanovit obsah oleje také ve slunečnici byla vypracována metodika pro stanovení obsahu oleje metodou NIR spektroskopie v této plodině.

Cílem práce bylo optimalizovat vlastní metodu NIR spektroskopie a vyhodnotit možnosti této metody na predikci obsahu oleje v plodině slunečnici roční.

2 Materiál a metody

2.1 Princip stanovení obsahu oleje metodou klasickou

Dosud běžně používaný způsob klasické metody mokré chemie vychází z norem ČSN EN ISO 659 Olejnatá semena - Stanovení obsahu oleje a ČSN 46 7092-7 Metody zkoušení krmiv – Část 7: Stanovení obsahu tuku.

Hexanový (petroléterový) výtazek zvaný obsah oleje je celkové množství extrahovaných látek získaných extrakcí analytického vzorku s rozpouštědlem hexanem nebo petroléterem.

2.2 Princip stanovení obsahu oleje metodou NIR spektroskopie

Metodou NIR spektroskopie bylo proměřeno více než 600 vzorků slunečnice roční. Všechny vzorky byly nejprve analyzovány klasickou laboratorní metodou dle ČSN norem výše uvedených a poté byly analyzovány metodou NIR spektroskopie.

Všechna NIR měření byla prováděna ve viditelné a blízké infračervené spektrální oblasti na přístroji FOSS NIRSystem 6500 vybaveným scanujícím monochromátorem s reflektanční detekcí. Každý vzorek slunečnice byl nadávkován do kyvety typu small ring cup s křemenným okénkem o průměru 4,5 cm. Spektrální reflektance udávaná jako průměr ze 25 spekter byla zobrazena jako logaritmus inverzní reflektance ($\log 1/R$) ve 2 nm intervalech v rozsahu (400 – 2500) nm. Na vývoj příslušného kalibračního modelu byla vybrána NIR spektrální oblast (1100 – 2500) nm.

Vývoj NIR metody pro stanovení obsahu oleje je založen na vytvoření kalibrační rovnice, která kvantifikuje vztah mezi informací NIR absorpce a hodnotou stanovenou klasickou

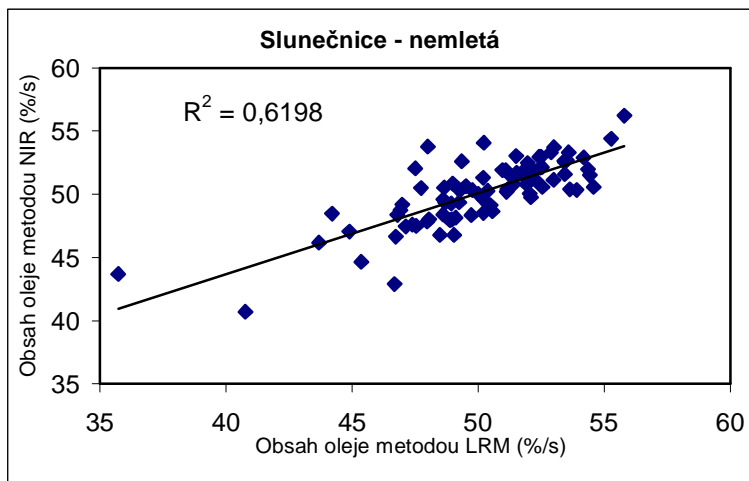
metodou. Metoda NIR spektroskopie je užitečná a použitelná pouze tehdy, jestliže je vztažena na přesnou a správnou klasickou metodu. Kalibrační modely byly vyvinuty pomocí softwaru NIR calibration verze 1.0 (fa EFFICHEM, Lysice, CZ).

K vytvoření vztahu mezi spektry NIR a měřeními chemickými vlastnostmi sledovaného materiálu je možné použít různé kalibrační metody. Mezi nejčastěji používané techniky kalibrace v NIR spektroskopii patří PCR (regrese na hlavních komponentách), PLS (vícenásobné lineární regrese metody nejmenších čtverců), LWR (lokálně vážená regrese), SMLR (kroková vícenásobná lineární regrese) a ANN (regrese s použitím umělých neuronových sítí). Žádná z těchto uvedených kalibračních technik nemá univerzální uplatnění, protože kalibrační technika vhodná pro jednu aplikaci nemusí být akceptovatelná také pro ostatní. Pro vytvoření kalibračních modelů pro stanovení obsahu oleje ve slunečnici byla použita kalibrační technika typu PLS.

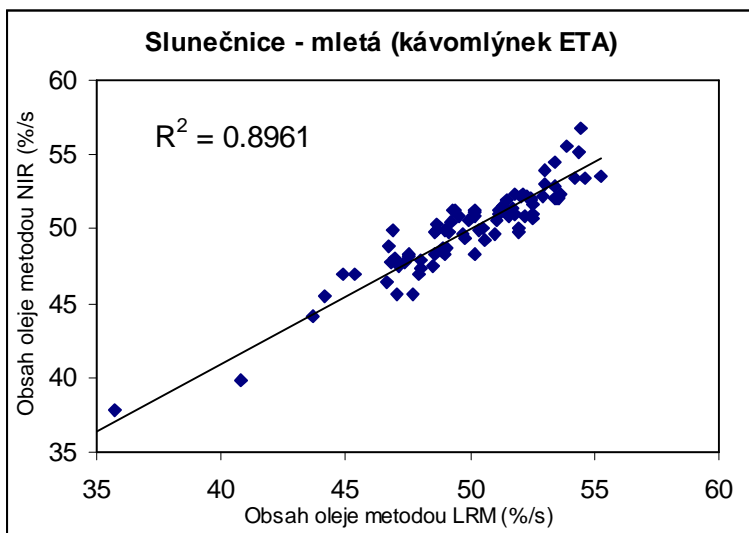
Ideální kalibrační model byl vybírán tak, aby poskytoval co nejmenší hodnotu střední kvadratické chyby predikce RMSECV a zároveň nejvyšší hodnotu korelačního koeficientu R, popř. koeficientu determinace R^2 . Parametr RMSECV je nejčastěji používaná charakteristika pro hodnocení kvality predikce v NIR spektroskopii. Korelační koeficient R je v NIR spektroskopii velmi často používán v kombinaci s RMSECV. Parametr R charakterizuje míru korelace mezi výsledky získanými klasickou metodou a NIR metodou.

3 Výsledky

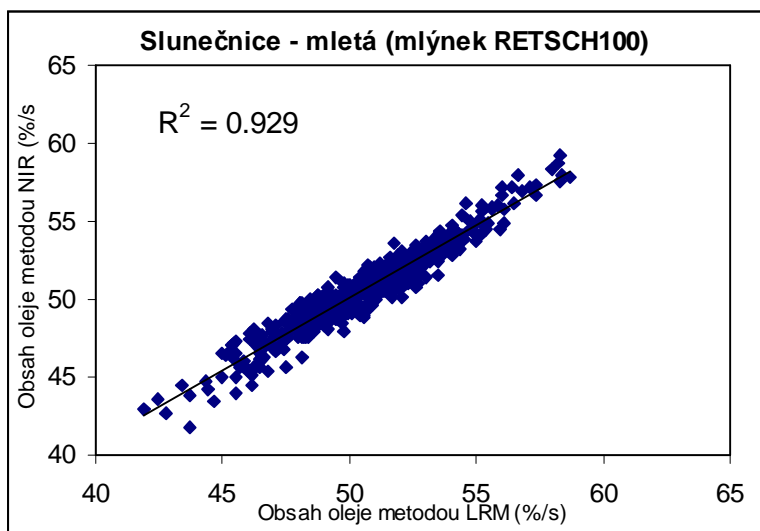
Při optimalizaci metody byla rozhodující pozornost věnována sledování způsobu úpravy vzorků před měřením a jeho vlivu na přesnost vytvořeného kalibračního modelu. Kalibrační modely na stanovení obsahu oleje metodou NIR spektroskopie ve slunečnici byly vytvořeny na vzorcích, které se lišily způsobem přípravy před vlastním měřením. Z důvodu rozdílné přípravy vzorků byly vytvořeny tři typy kalibračních modelů. Jeden kalibrační model byl vyvinut ze vzorků, které nebyly pomlety, měření probíhalo v celých semenech (obr. 2). Druhý kalibrační model byl vyvinut ze vzorků, které byly pomlety na kávomlýnku ETA (obr. 3). Třetí kalibrační model byl optimalizován pro vzorky, které byly pomlety na laboratorním mlýnku RETSCH 100 (síto 1 mm) (obr. 4). Kvalitativní parametry takto získaných kalibračních modelů jsou shrnuty v tab. 1. Z tabulky je zřejmé, že kvalitativní parametry takto získaných kalibračních modelů vykazují rozdíly a tedy je zřejmá závislost na použitém způsobu přípravy vzorků.



Obr. 2: Kalibrační závislost pro parametr olej (slunečnice roční – nemletý vzorek)



Obr. 3: Kalibrační závislost pro parametr olej (slunečnice roční – mletý vzorek kávomlýnek ETA)



Obr. 4: Kalibrační závislost pro parametr olej (slunečnice roční – mletý vzorek laboratorní mlýnek Retsch)

Tabulka 1

Způsob úpravy vzorků	Parametr	RMSECV	R ²
Nemletý	% olej/s	1,98	0,6198
Mletý (kávomlýnek ETA)	% olej/s	1,16	0,8961
Mletý (laboratorní mlýnek RETSCH 100)	% olej/s	0,70	0,9290

4 Závěr

Pro vývoj kalibračních modelů pro stanovení obsahu oleje ve slunečnici roční metodou NIR spektroskopie byly použity různé způsoby přípravy vzorků. Příprava vzorků slunečnice před vlastním měření metodou NIR spektroskopie spočívala v pomletí vzorků na různých typech mlýnků a v jednom případě byly testovány také vzorky nemleté, u nichž byla měřena celá semena. Z prezentovaných výsledků ve formě kalibračních závislostí (obr. 2 – obr. 4) a tabulky 1 popisující kvalitativní parametry vytvořených kalibračních modelů je zřejmé, že úprava vzorků má kritický vliv na kvalitu a přesnost kalibračních modelů a je tedy rozhodující pro následné měření neznámých vzorků, které nejsou součástí kalibrační modelů. Nejméně spolehlivé výsledky byly získány v případě nemletých vzorků, což je pravděpodobně způsobeno materiálem vzorku, který obsahuje dosti hrubou slupku semena a NIR záření prochází přes tuto vrstvu jen velmi obtížně. Z chemického hlediska to má za následek,

že naměřená spektra nevypovídají o skutečném obsahu oleje v semeni, ale o obsahu oleje ve slupce semena. Pokud pro měření byly použity vzorky slunečnice pomleté, kalibrace vykazovaly mnohem reprodukovatelnější výsledky než v případě nemletých vzorků. Pro vzorky zpracované formou mletí byly testovány 2 typy mlýnků, kávomlýnek ETA a laboratorní mlýnek RETSCH 100. Pro vzorky připravené mletím na laboratorním mlýnku RETSCH byl vytvořen kalibrační model s nižší hodnotou střední kvadratické chyby predikce a s vyšší hodnotou koeficientu determinace R^2 ve srovnání se vzorky upravovanými na kávomlýnku ETA (tab. 1). Tento rozdíl v získaných kvalitativních parametrech vytvořených kalibračních rovnic byl pravděpodobně způsoben volbou mletí, technicky laboratorní mlýnek RETSCH 100 je ve srovnání s kávomlýnkem ETA vysokootáčkový, a proto vzorky pomleté tímto způsobem poskytují dokonale homogenní směs.

Pro spolehlivé stanovení obsahu oleje ve vzorcích slunečnice roční metodou NIR spektroskopie je velmi důležité, aby jak pro následnou aktualizaci kalibrace tak i měření neznámých vzorků byl použitý stejný způsob přípravy vzorků a především byly dodrženy navržené podmínky mletí.

Na přípravu vzorků slunečnice před měřením není vhodné používat kávomlýnek ETA nebo měřit vzorky slunečnice v nemletém stavu, v celých semenech. Pro dokonalou přípravu vzorků před měřením metodou NIR spektroskopie je doporučeno používat výhradně laboratorní mlýnek RETSCH 100 nebo podobný laboratorní mlýnek vyšší řady tohoto typu, který zabezpečí dostatečnou homogenitu vzorku.

5 Literatura

1. Shenk, J. S., Westerhaus, M. O.: Analysis of agriculture and food products by near infrared reflectance spectroscopy, Infrasoft International, **1993**
2. Centner, V.: Methods and Diagnostics in Multivariate Calibration, **1998**
3. Novotný, F.: Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ – Metody chemických rozborů pro hodnocení kvality odrůd II, **2000**
4. Šulová, R.: SOP č.16 - Stanovení lehkého petroléterového výtažku zvaného obsah oleje, **2005**

Zavedení extrakční techniky ASE na stanovení vybraných polyaromatických uhlovodíků v půdách

Šárka Plhalová

Ivana Veverková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL – RO Opava, Jaselská 16,

746 23 Opava

sarka.plhalova@ukzuz.cz,

ivana.veverkova@ukzuz.cz

1 Úvod

Příprava vzorku k analýze představuje časově nejnáročnější a nejpracnější část analýzy. Všeobecně je hodnocena jako faktor, který přináší nejvíce chyb. Ideální metoda extrakce tuhých vzorků by měla být rychlá, jednoduchá, levná a výtěžnost analytů kvantitativní bez jejich ztráty a degradace. Klasické extrakce jsou většinou časově náročné, výsledné extrakty jsou zředěné a vyžadují následné zakoncentrování. V posledních letech byly hledány způsoby, jak nahradit klasické extrakční postupy technikami, které by snížily dobu extrakčního procesu a také množství extrahovadla. Jedna z nejnovějších extrakčních technik je zrychlená (vysokotlaká) extrakce rozpouštědlem ASE – Accelerated Solvent Extraction.

Tato práce se zabývá ověřením možnosti využití přístroje ASE 100 pro extrakci vybraných polyaromatických uhlovodíků z půdních vzorků a podobných materiálů. Cílem je nalezení optimálních parametrů přístroje tak, aby výtěžnost jednotlivých analytů byla na stejné úrovni jako při použití klasického postupu extrakce. Pro ověření správnosti nového postupu byl klasický postup extrakce použit jako srovnávací metoda.

2 Princip metody

Metoda ASE je v principu extrakční proces tuhá látka-kapalina, prováděný za zvýšené teploty (40 – 200) °C a tlaku (10 – 15) MPa po krátký časový úsek (5 – 20) min. Je používána pro tuhé a polotuhé vzorky.

Použitím vyšších teplot se zvyšuje kapacita rozpouštědla, tzn. i množství rozpuštěného analytu. Dochází k rychlejšímu přenosu hmoty. Díky vyšší teplotě se snižuje viskozita rozpouštědel, což dovoluje jejich lepší proniknutí do částecek matrice. Snižuje se povrchové napětí rozpouštědel, roztoků a matrice, a proto se může analyt rychleji rozpouštět. Použitím vyšších tlaků se usnadní extrakce ze vzorků, u kterých jsou analyty uzavřeny v pórech matrice. Pomohou natlačit rozpouštědlo do pórů, kde dojde ke kontaktu s analyty.

3 Materiál a metody

3.1 Přístroje a pomůcky

- 1 ASE 100;
- 2 Extrakční ocelová cela o objemu 34 ml;
- 3 Kapalinový chromatograf;
- 4 Vakuové zařízení pro extrakci na pevné fázi;
- 5 Centrifuga;
- 6 SPE kolonky C8, 500 mg/3 ml.

3.2 Chemikálie

- 1 Acetonitril (ACN), pro HPLC;
- 2 50% acetonitril, ACN : H₂O, 1 : 1 (V/V);
- 3 20% acetonitril, ACN : H₂O, 20 : 80 (V/V);
- 4 Aceton, pro HPLC;
- 5 2-propanol, pro HPLC;
- 6 Methanol (MeOH), pro HPLC;
- 7 50% methanol, MeOH : H₂O, 1 : 1 (V/V);
- 8 Tetrahydrofuran (THF), pro HPLC;
- 9 Na₂SO₄, p.a bezvodý, vyžíhaný při 500 °C;

- 10 Písek čistý, vyžíhaný při 500 °C;
- 11 Matrix;
- 12 Standard 16 PAHs, koncentrace jednotlivých PAHs $\beta = 100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (např. PAH MIX v acetonitrilu, standard firmy Absolute Standards, dodavatel v ČR Labicom Olomouc).

3.3 Vzorky půd

Pro ověření byly vybrány 4 vzorky půd s rozdílnými obsahy PAHs. Vzorek 907 s obsahy do 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, vzorek 922 s obsahy do 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, VRM 764 (vnitrolaboratorní referenční materiál) s obsahy do 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a CRM 24 (certifikovaný materiál) s obsahy od 1600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 16000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Obsahy PAHs u vzorků půd byly pro porovnání obou způsobů extrakce stanoveny i klasickým způsobem, tzn. že extrakce byla provedena vytřepáním do acetonu s následnou sonifikací.

3.4 Pracovní postup

3.4.1 Obecně

Vzorky se před přenesením do extrakční cely promíchají s inertním materiálem např. se síranem sodným, křemelinou, vyžíhaným čistým pískem (500 °C) nebo Matrixem. Extrakční cely se musí doplnit do celého objemu 34 ml inertním materiálem, aby v cele nezůstával prázdný objem. Pak se zadá do přístroje požadovaná metoda extrakčního procesu, jejíž parametry se musejí předem nadefinovat. Teplotu extrakce (T) je možno zvolit od 40 °C do 200 °C, čas statické extrakce (t) od 0 min do 99 min. Objem proplachu (flush volume FV) udávající objem čerstvého rozpouštědla – acetonu (4), kterým je cela propláchnuta po statické extrakci je možno nastavit v rozsahu (0 – 150) % objemu extrakční cely. Dále se nastavuje čas proplachu (purge time PT), po který je systém v závěrečné fázi proplachován dusíkem (20 – 900) s. Počet extrakčních cyklů (1 – 5) udává statický cyklus (SC).

3.4.2 Postup stanovení PAHs s využitím extrakce na přístroji ASE 100

Navážka vzorku se smíchá s inertním materiálem a převede do extrakční cely. Po skončené extrakci se objem získaného acetonového extraktu obvykle pohyboval mezi 30 ml až 40 ml. Dále se postupuje jako při klasické extrakci vytřepáváním. Napipetuje se 10 ml extraktu do 50 ml odměrné baňky, přidá se 2,5 ml 2-propanolu (5) a baňka se doplní po rysku demineralizovanou vodou, uzavře a obsah se asi 2 minuty sonifikuje. Takto připravený extrakt se přečistí přes SPE kolonku C8 (6), která se předem kondicionuje postupně 1 × 2,5 ml methanolu (6), 1 × 2,5 ml 50% methanolu (7) a 2 × 2,5 ml demineralizované vody.

Na SPE kolonku C8 se vnáší celý objem odměrné baňky (50 ml). Polární látky projdou SPE kolonkou a nepolární látky se zachytí na sorbentu. Extrahovaná část vzorku na sorbentu se promyje 2,5 ml 50% methanolu (7). Eluce PAHs se provede 3 ml tetrahydrofuranu (8) a eluát se jímá do 10 ml kalibrované zkumavky. Získaný eluát se sonifikuje cca 1 minutu a pak se naředí 20% acetonitrilem (3) 1 : 1. Po naředění se vzorek opět sonifikuje. Takto připravený eluát se nadávkuje na chromatografickou kolonu přes nylonový nástřikový filtr.

3.4.3 Podmínky HPLC stanovení

Vlastní měření kalibračních roztoků i extraktů vzorků se provádí za následujících podmínek chromatografického systému.

Kolona	Waters-PAH C18; 5 µm; 4,6 ×250 mm
Mobilní fáze	A - acetonitril : voda = 1 : 1 B - acetonitril
Průtok	1,5 ml/min
Teplota kolony	35 °C
Objem nástřiku	20 µl
Detekce	fluorescenční
Čas analýzy	25 min

Časový průběh gradientu

Čas (min)	A (%)	B (%)
	50% acetonitril	100% acetonitril
0	100	0
3	100	0
10	10	90
11	0	100
16	0	100
19	100	0
25	100	0

Excitační a emisní vlnové délky a retenční časy jednotlivých PAHů

PAH	Excitační λ (nm)	Emisní λ (nm)	Retenční čas (min)
Naphtalene NAP	240	326	7,1
Acenaphtene ANA	240	326	8,7
Fluorene FLU	240	326	8,9
Phenanthrene PHE	246	368	9,4
Anthracene ANT	246	368	10
Fluoranthene FLT	286	466	10,5
Pyrene PYR	232	396	10,9
Benzo(a)anthracene BaA	264	384	12,1
Chrysene CHR	264	384	12,4
Benzo(b)fluoranthene BbF	248	432	13,2
Benzo(k)fluoranthene BkF	254	400	13,7
Benzo(a)pyrene BaP	254	400	14,3
Dibenzo(a,h)anthracene	292	410	14,9
Benzo(g,h,i) perylene BPE	292	410	15,6
Indeno(1,2,3-c,d)pyrene IPY	230	500	16

3.4.4 Ověřování - optimalizace parametrů přístroje

Počáteční ověření vhodných parametrů přístroje bylo provedeno na vzorku VRM 764 (vnitrolaboratorní referenční vzorek, opakovaně zařazovaný v kruhových testech SETOC, Wageningen), u kterého je k dispozici dostatečné množství výsledků.

3.4.4.1 Vliv teploty a času extrakce

Byly testovány kombinace tří úrovní teploty (80 °C; 100 °C; 120 °C) a dvou časů extrakce (5 min.; 8 min.). Zároveň byly stanoveny hodnoty obsahů PAHs klasickou metodou, tzn. vytřepáním půdy do acetonu s následným přečištěním acetonového extraktu na pevné fázi přes SPE C8. Výsledky uvedené v kapitole Validace v tabulce 1 a 2 dokládají, že testované extrakční podmínky nemají významný vliv na výtěžnost extrakce.

Na základě doporučení v literatuře [2,3,4,5] i na základě naměřených výsledků byly zvoleny následující podmínky extrakce vzorků - čas extrakce 8 minut, teplota 100 °C, objem

proplachu acetonem 60%, čas proplachu dusíkem 50 s. Delší čas extrakce byl vybrán proto, aby v případě velkých obsahů PAHs bylo zaručeno dokonalejší vyextrahování analytů.

3.4.4.2 Vliv inertního materiálu a počtu statických cyklů

Za výše uvedených podmínek byly provedeny další experimenty pro zjištění vlivu inertního materiálu. Byly použity 3 typy inertního materiálu - síran sodný, Matrix a vyžíhaný písek. Testy byly prováděny na vzorcích VRM 764 a CRM 24 (s vysokými obsahy PAHs). Bylo zjištěno, že testované typy inertního materiálu nemají významný vliv na výtěžnost extrakce (viz. kapitola Validace, tabulky 3 – 14.) Opakovatelnost sledovaných PAHs na všech testovaných inertech nepřesáhla 12 % (viz. tabulky 15 – 18). Jako nejvhodnější byl vybrán vyžíhaný mořský písek, a to z důvodu nejnižších hodnot odezev slepých pokusů.

Současně s tím byl testován vliv počtu statických cyklů. Ukázalo se, že u vzorků s nižšími obsahy PAHs je dostačující jeden statický cyklus, pouze u nejvyšších obsahů v desítkách mg/kg je vhodné použít dva statické cykly extrakce.

3.4.4.3 Stanovení PAHs u reálných vzorků při vybraných parametrech extrakce

K tomu účelu byly vybrány dvě reálné půdy z monitoringu půd – vzorky 907 a 922, které byly již dříve analyzovány klasickým způsobem. Testování bylo provedeno za níže uvedených extrakčních podmínek.

Statický cyklus	1
Teplota extrakce	100 °C
Čas extrakce	8 minut
Inertní materiál	vyžíhaný písek
Objem proplachu acetonem	60 % objemu extrakční cely
Čas proplachu dusíkem	50 s

3.4.4.4 Výtěžnost u standardů PAHs za pomoci extrakce na ASE

Za stejných extrakčních podmínek byla výtěžnost metody ověřena také pomocí standardu ve dvou koncentračních úrovních, a sice 0,167 ug/ml a 0,333 ug/ml. Návratnost PAHs se pohybovala v rozmezí 90 % až 114 % (s výjimkou naftalenu s 80 % u hladiny 0,333 ug/ml).

***Poznámka :** Veškerá naměřená data jsou k dispozici v kompletní verzi VÚ A6/2006.*

4 Validace

Při ověřování extrakce PAHs metodou ASE byla provedena zkrácená validace, byly sledovány validační parametry opakovatelnost a správnost metody.

Opakovatelnost je druh přesnosti, stanovený za podmínek měření opakovatelnosti, tj. při opakování měření stejným analytikem na stejném přístroji v co nejkratším čase. Hodnoty opakovatelnosti jednotlivých PAHs byly stanoveny měřením navážek vzorku ve 4 až 5 opakováních. Z výsledků shrnutých v tabulkách 15 a 16 vyplývá, že hodnoty opakovatelnosti u extrakce metodou ASE jsou obdobné jako u klasické extrakce.

Správnost metody charakterizuje shodnost naměřených výsledků s akceptovanou nebo deklarovanou referenční hodnotou. Pokud je rozdíl mezi výsledky měření a referenční hodnotou statisticky významný, pak validovaná metoda není správná.

Porovnání obou způsobů extrakce bylo provedeno za pomoci programu Effvalidation 3.0 s využitím dvou metod testování:

- Porovnání 2 metod – t-test po úrovních
- Omezený koncentrační rozsah - referenční materiál k dispozici.

V tabulce 1 a 2 jsou testovány hodnoty výtěžností jednotlivých PAHs u vzorku VRM 764 (současně se zjišťováním optimální teploty a doby extrakce - viz kapitola 3.4.4.1).

Tabulka 1. Porovnání obsahů PAHs metodou ASE u VRM s referenční hodnotou (t extrakce= 5 min)

PAH	T = 80 °C			T = 100 °C			T = 120 °C		
	Výtěžnost (%)	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti	Výtěžnost (%)	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti	Výtěžnost (%)	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti
NAP	99,6	přijata	přijata	120	přijata	přijata	103,5	přijata	přijata
ACE	101,3	přijata	přijata	93,3	přijata	přijata	98,6	přijata	přijata
FLR	100,6	přijata	přijata	100	přijata	přijata	107,4	přijata	přijata
PHE	117,7	přijata	přijata	108,9	přijata	přijata	110,2	přijata	přijata
ANT	103,3	přijata	přijata	107	přijata	přijata	103,9	přijata	přijata
FLU	103,5	přijata	přijata	106,6	přijata	přijata	103,5	přijata	přijata
PYR	114,2	přijata	přijata	108,5	přijata	přijata	111,2	přijata	přijata
BaA	90,0	přijata	přijata	90,7	přijata	přijata	91,5	přijata	přijata
CHR	102,5	přijata	přijata	105	přijata	přijata	104,2	přijata	přijata
BbF	106,8	přijata	přijata	94,6	přijata	přijata	97,7	přijata	přijata
BkF	99,1	přijata	přijata	101,9	přijata	přijata	103	přijata	přijata
BaP	108,8	přijata	přijata	105,6	přijata	přijata	107,2	přijata	přijata
DBA	90,1	přijata	přijata	89,1	přijata	přijata	90,5	přijata	přijata
BPE	103,7	přijata	přijata	99,7	přijata	přijata	107,3	přijata	přijata
INP	96,4	přijata	přijata	84	přijata	přijata	96,7	přijata	přijata

Závěr: Metody poskytují statisticky správné výsledky.

Tabulka 2. Porovnání obsahů PAHs metodou ASE u VRM s referenční hodnotou (t extrakce= 8 min)

PAH	T = 80 °C			T = 100 °C			T = 120 °C		
	Výtěžnost (%)	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti	Výtěžnost (%)	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti	Výtěžnost (%)	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti
NAP	103,9	přijata	přijata	106,4	přijata	přijata	114,5	přijata	přijata
ACE	96	přijata	přijata	92,5	přijata	přijata	102,7	přijata	přijata
FLR	97,2	přijata	přijata	100,5	přijata	přijata	112,8	přijata	přijata
PHE	99,1	přijata	přijata	105,8	přijata	přijata	115,4	přijata	přijata
ANT	100,4	přijata	přijata	101,9	přijata	přijata	98,3	přijata	přijata
FLU	103,7	přijata	přijata	103,3	přijata	přijata	108,8	přijata	přijata
PYR	109,5	přijata	přijata	105,7	přijata	přijata	117,4	přijata	přijata
BaA	93,8	přijata	přijata	91,4	přijata	přijata	92,9	přijata	přijata
CHR	105,3	přijata	přijata	102,7	přijata	přijata	111,1	přijata	přijata
BbF	95,6	přijata	přijata	93,6	přijata	přijata	99,7	přijata	přijata
BkF	104,6	přijata	přijata	99,2	přijata	přijata	108,2	přijata	přijata
BaP	109,4	přijata	přijata	104,1	přijata	přijata	110,2	přijata	přijata
DBA	90,7	přijata	přijata	92,8	přijata	přijata	87,1	přijata	přijata
BPE	100,7	přijata	přijata	100,7	přijata	přijata	107,7	přijata	přijata
INP	93,6	přijata	přijata	102,7	přijata	přijata	85,1	přijata	přijata

Závěr: Metody poskytují statisticky správné výsledky.

Za vybraných extrakčních podmínek (viz kapitoly 3.4.4.1 a 3.4.4.2 – T= 100 °C, t= 8 minut, FV= 60 %, PT= 50 s, SC= 1) byla extrahována vnitrolaboratorní referenční půda VRM 764 na inertních materiálech – vyžíhaném písku, matrixu a síranu sodném. Výsledky byly testovány pomocí programu Effivaldation 3.0. Metoda ASE s různými inerty byla porovnána s klasickou extrakcí, dále byly výsledky porovnány s referenčními hodnotami. Výsledky testování jsou uvedeny v tabulkách 3 až 8. Stejný postup ověření a testování byl zvolen u certifikovaného materiálu CRM 24. Výsledky testování jsou uvedeny v tabulkách 9 až 14.

Vzorky půdy 907 a 922 byly extrahovány za stejných extrakčních podmínek na vyžíhaném písku. Také zde byla testována shodnost metod ASE a klasického vytřepání pomocí Effivaldation 3.0. Výsledky testování jsou uvedeny v tabulkách 19 a 20.

Tabulka 3. Porovnání metody ASE na vyžíhaném písku s klasickou extrakcí vytřepáním u VRM

PAH	Extrakce (mg/kg)		Výtěžnost (%)	t	t-kritické	Hypotéza
	ASE	Vytřepání				
NAP	828	573	69,2	15,64	2,776	zamítnuta
ANA	66,0	70,6	106,9	1,427	2,776	přijata
FLU	94,5	89,6	94,8	2,773	2,776	přijata
PHE	1244	1193	95,9	0,798	2,776	přijata
ANT	288	287	99,9	0,044	2,776	přijata
FLT	1904	2029	106,6	1,206	2,776	přijata
PYR	1678	1594	95,0	2,663	2,776	přijata
BaA	1124	1113	99,1	0,193	2,776	přijata
CHR	1211	1199	99,1	0,421	2,776	přijata
BbF	1463	1336	91,4	2,034	2,776	přijata
BkF	680	654	96,3	2,086	2,776	přijata
BaP	961	963	100,2	0,056	2,776	přijata
DBA	165	172	104,2	1,102	2,776	přijata
BPE	1086	1020	96,9	1,353	2,776	přijata
IPY	1068	1122	105,0	0,940	2,776	přijata

Závěr: Srovnávané metody poskytují statisticky stejné výsledky u všech polyaromatických uhlovodíků kromě naftalenu, kde byla hypotéza o shodě metod zamítnuta.

Tabulka 4. Porovnání výsledků metody ASE na vyžíhaném písku s referenčními hodnotami u VRM

PAH	Ref. hodnota (mg/kg)	Naměřeno (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Refer. přesnost (mg/kg)	Přesnost (mg/kg)	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti
NAP	630	927	147,1	244	14,3	přijata	přijata
ANA	67	66,9	99,9	17,1	1,35	přijata	přijata
FLU	85	108	127,1	20,4	2,65	přijata	přijata
PHE	1130	1376	121,0	245	15,6	přijata	přijata
ANT	286	294	102,8	69,8	14,4	přijata	přijata
FLT	2010	1841	91,6	259	129	přijata	přijata
PYR	1520	1678	110,4	199	12,5	přijata	přijata
BaA	1060	1072	101,1	159	80,9	přijata	přijata
CHR	1200	1237	103,1	165	41,2	přijata	přijata
BbF	1476	1481	100,3	171	33,8	přijata	přijata
BkF	711	689	97,0	108	18,6	přijata	přijata
BaP	1069	971	90,8	166	27,7	přijata	přijata
DBA	221	165	75,0	55,7	2,51	přijata	přijata
BPE	992	985	99,2	269	89,4	přijata	přijata
IPY	1120	1098	98,0	224	84,1	přijata	přijata

Závěr: Metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

Referenční hodnoty i referenční přesnosti byly použity z MPZ SETOC (Wageningen). Intervaly referenčních přesností jsou velmi široké. Průměry obsahů polyaromatických uhlovodíků jsou vypočítávány z výsledků více než 50 laboratoří. Soubor pro statistické zpracování vykazuje velký rozptyl výsledků, proto je povolená odchylka rozptylu velká. Tím lze vysvětlit, že byly přijaty hypotézy o správnosti u NAP, FLU, PHE a DBA.

Tabulka 5. Porovnání metody ASE na matrixu s klasickou extrakcí vytřepáním u VRM

PAH	Extrakce (mg/kg)		Výtěžnost (%)	t	t-kritické	Hypotéza
	ASE	Vytřepání				
NAP	632	573	90,6	3,500	2,776	zamítnuta
ANA	68,5	69,5	101,4	0,081	2,776	přijata
FLU	89,3	89,7	100,4	0,129	2,776	přijata
PHE	1148	1193	103,9	0,629	2,776	přijata
ANT	289	287	99,4	0,280	2,776	přijata
FLT	2103	2197	104,5	0,835	2,776	přijata
PYR	1555	1594	102,5	0,773	2,776	přijata
BaA	991	1021	103,1	0,464	2,776	přijata
CHR	1171	1199	102,4	0,563	2,776	přijata
BbF	1293	1323	102,3	0,332	2,776	přijata
BkF	688	676	98,3	0,221	2,776	přijata
BaP	1068	1040	97,4	0,566	2,776	přijata
DBA	131	173	131,8	5,986	2,776	zamítnuta
BPE	1004	1006	100,2	0,047	2,776	přijata
IPY	1027	1064	103,6	0,430	2,776	přijata

Závěr: Srovnávané metody poskytují statisticky stejné výsledky, kromě NAP a DBA, kde byla hypotéza o shodě metod čili hypotéza o správnosti metody zamítnuta.

Tabulka 6. Porovnání výsledků metody ASE na matrixu s referenčními hodnotami u VRM

PAH	Ref. hodnota (mg/kg)	Naměřeno (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Refer. přesnost (mg/kg)	Přesnost (mg/kg)	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti
NAP	630	658	104,4	244	56,4	přijata	přijata
ANA	67	70,2	104,7	17,1	5,90	přijata	přijata
FLU	85	87,5	103,0	20,4	5,31	přijata	přijata
PHE	1130	1114	98,6	245	81,7	přijata	přijata
ANT	286	279	97,4	69,8	15,5	přijata	přijata
FLT	2010	2101	104,5	259	83,1	přijata	přijata
PYR	1520	1514	99,6	199	100	přijata	přijata
BaA	1060	991	93,5	159	56,6	přijata	přijata
CHR	1200	1156	96,3	165	67,7	přijata	přijata
BbF	1476	1399	94,8	171	58,2	přijata	přijata
BkF	711	688	96,8	108	75,3	přijata	přijata
BaP	1069	1064	99,6	166	66,8	přijata	přijata
DBA	221	131	59,3	55,7	4,0	přijata	přijata
BPE	992	949	95,7	269	114	přijata	přijata
IPY	1120	1027	91,7	224	85	přijata	přijata

Závěr: Metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

Referenční hodnoty i referenční přesnosti byly použity z MPZ SETOC (Wageningen). Intervaly referenčních přesností jsou velmi široké. Průměry obsahů polyaromatických uhlovodíků jsou vypočítávány z výsledků více než 50 laboratoří. Soubor pro statistické zpracování vykazuje velký rozptyl výsledků, proto je povolena odchylka rozptylu velká. Tím lze vysvětlit, že byla přijata hypotéza o správnosti u DBA (výtěžnost 59,3 %).

Tabulka 7. Porovnání metody ASE na síranu s klasickou extrakcí vytřepáním u VRM

PAH	Extrakce (mg/kg)		Výtěžnost (%)	t	t-kritické	Hypotéza
	ASE	Vytřepání				
NAP	777	573	73,7	16,44	2,776	zamítnuta
ANA	57	55,1	96,7	0,470	2,776	přijata
FLU	85,8	89,6	104,4	1,556	2,776	přijata
PHE	1229	1193	97,1	0,510	2,776	přijata
ANT	294	287	97,6	0,885	2,776	přijata
FLT	2076	2197	105,8	1,013	2,776	přijata
PYR	1577	1590	100,8	0,243	2,776	přijata
BaA	1106	1141	103,3	0,641	2,776	přijata
CHR	1153	1177	102,1	0,464	2,776	přijata
BbF	1433	1323	92,4	1,537	2,776	přijata
BkF	699	668	95,6	0,684	2,776	přijata
BaP	1084	1040	95,9	0,606	2,776	přijata
DBA	148	162	109,5	1,615	2,776	přijata
BPE	1001	1012	101,1	0,212	2,776	přijata
IPY	1133	1172	103,4	1,389	2,776	přijata

Závěr: Srovnávané metody poskytují statisticky stejné výsledky u všech polyaromatických uhlovodíků kromě naftalenu, kde byla hypotéza o shodě metod zamítnuta.

Tabulka 8. Porovnání výsledků metody ASE na síranu s referenčními hodnotami u VRM

PAH	Ref. hodnota (mg/kg)	Naměřeno (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Refer. přesnost (mg/kg)	Přesnost (mg/kg)	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti
NAP	630	777	123,3	244	19,7	přijata	přijata
ANA	67	62,1	92,7	17,1	17,1	přijata	přijata
FLU	85	86,5	101,8	20,4	5,68	přijata	přijata
PHE	1130	1227	108,6	245	48,8	přijata	přijata
ANT	286	290	101,3	69,8	69,8	přijata	přijata
FLT	2010	2036	101,3	259	63,9	přijata	přijata
PYR	1520	1532	100,8	199	76,7	přijata	přijata
BaA	1060	1059	99,9	159	73,8	přijata	přijata
CHR	1200	1187	98,9	165	61,2	přijata	přijata
BbF	1476	1456	98,7	171	61,7	přijata	přijata
BkF	711	695	97,7	108	38,0	přijata	přijata
BaP	1069	1066	99,8	166	81,9	přijata	přijata
DBA	221	151	68,3	55,7	9,90	přijata	přijata
BPE	992	1012	102	269	54,6	přijata	přijata
IPY	1120	1103	98,5	224	51,2	přijata	přijata

Závěr: Metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

Referenční hodnoty i referenční přesnosti byly použity z MPZ SETOC (Wageningen). Intervaly referenčních přesností jsou velmi široké. Průměry obsahů polyaromatických uhlovodíků jsou vypočítávány z výsledků více než 50 laboratoří. Soubor pro statistické zpracování vykazuje velký rozptyl výsledků, proto je povolena odchylka rozptylu velká. Tím lze vysvětlit, že byly přijaty NAP (výtěžnost 123 %) a DBA (výtěžnost 68,3 %).

Tabulka 9. Porovnání metody ASE na vyžíhaném písku s klasickou extrakcí vytřepáním u CRM

PAH	Extrakce (mg/kg)		Výtěžnost (%)	t	t-kritické	Hypotéza
	ASE	Vytřepání				
NAP	2854	2718	95,2	0,693	2,776	přijata
ANA	1569	1507	96,0	2,237	2,776	přijata
FLU	2593	2510	96,8	1,821	2,776	přijata
PHE	13361	13469	100,8	0,335	2,776	přijata
ANT	3725	3645	97,8	0,771	2,776	přijata
FLT	15855	15525	97,9	0,563	2,776	přijata
PYR	12857	13420	104,4	2,061	2,776	přijata
BaA	7254	7196	99,2	0,485	2,776	přijata
CHR	7085	6795	95,9	1,246	2,776	přijata
BbF	6596	6750	102,3	1,229	2,776	přijata
BkF	3550	3644	102,7	1,900	2,776	přijata
BaP	8101	8186	101,0	0,626	2,776	přijata
DBA	1374	1254	91,3	0,933	2,776	přijata
BPE	5867	5828	99,3	0,213	2,776	přijata
IPY	5721	5522	96,5	1,318	2,776	přijata

Závěr: Srovnávané analytické metody poskytují statisticky stejné výsledky.

Tabulka 10. Porovnání výsledků metody ASE na vyžíhaném písku s referenčními hodnotami u CRM

PAH	Ref. hodnota (mg/kg)	Naměřeno (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Refer. přesnost (mg/kg)	Přesnost (mg/kg)	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti
NAP	2800	2881	102,9	400	169	přijata	přijata
ANA	1590	1499	94,3	160	147	přijata	přijata
FLU	2570	2507	97,5	290	212	přijata	přijata
PHE	13500	13337	98,8	1200	872	přijata	přijata
ANT	3700	3711	100,3	210	146	přijata	přijata
FLT	15900	16121	101,4	800	540	přijata	přijata
PYR	12800	13078	102,2	1000	448	přijata	přijata
BaA	7300	7071	96,9	800	336	přijata	přijata
CHR	6800	7263	106,8	900	374	přijata	přijata
BbF	7200	6472	89,9	700	252	přijata	přijata
BkF	3800	3455	90,9	400	162	přijata	přijata
BaP	7900	7957	100,7	600	340	přijata	přijata
DBA	1700	1207	71,0	300	115	přijata	přijata
BPE	5700	5637	98,9	600	345	přijata	přijata
IPY	5300	5677	107,1	700	142	přijata	přijata

Závěr: Hypotéza o přesnosti a správnosti byla u všech polyaromatických uhlovodíků přijata. Testovaná metoda ASE poskytuje pro referenční materiál statisticky správné výsledky.

Tabulka 11. Porovnání metody ASE na matrixu s klasickou extrakcí vytřepáním u CRM

PAH	Extrakce (mg/kg)		Výtěžnost (%)	t	t-kritické	Hypotéza
	ASE	Vytřepání				
NAP	2862	2718	95,0	0,914	2,776	přijata
ANA	1522	1457	95,7	1,255	2,776	přijata
FLU	2648	2736	103,3	0,367	2,776	přijata
PHE	13686	13671	99,9	0,034	2,776	přijata
ANT	3732	3617	96,9	0,861	2,776	přijata
FLT	15622	15626	100,0	0,003	2,776	přijata
PYR	13024	13546	104,0	1,793	2,776	přijata
BaA	7328	7278	99,3	0,222	2,776	přijata
CHR	6653	6936	104,3	1,170	2,776	přijata
BbF	6639	6445	97,1	0,995	2,776	přijata
BkF	3440	3644	105,9	2,073	2,776	přijata
BaP	7841	8229	104,9	1,825	2,776	přijata
DBA	1062	1111	104,6	0,747	2,776	přijata
BPE	5792	5916	102,1	0,544	2,776	přijata
IPY	5524	5374	97,3	0,809	2,776	přijata

Závěr: Srovnávané analytické metody poskytují statisticky stejné výsledky.

Tabulka 12. Porovnání výsledků metody ASE na matrixu s referenčními hodnotami u CRM

PAH	Ref. hodnota (mg/kg)	Naměřeno (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Refer. přesnost (mg/kg)	Přesnost (mg/kg)	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti
NAP	2800	2929	104,6	400	104	přijata	přijata
ANA	1590	1583	99,6	160	76,6	přijata	přijata
FLU	2570	2670	103,9	290	181	přijata	přijata
PHE	13500	13648	101,1	1200	752	přijata	přijata
ANT	3700	3788	102,4	210	166	přijata	přijata
FLT	15900	16163	101,7	800	548	přijata	přijata
PYR	12800	12711	99,3	1000	555	přijata	přijata
BaA	7300	7006	96,0	800	471	přijata	přijata
CHR	6800	6625	97,4	900	363	přijata	přijata
BbF	7200	6342	88,1	700	424	přijata	přijata
BkF	3800	3382	89,0	400	272	přijata	přijata
BaP	7900	7800	98,7	600	329	přijata	přijata
DBA	1700	1074	63,2	300	47,4	přijata	zamítnuta
BPE	5700	5566	97,7	600	353	přijata	přijata
IPY	5300	5435	102,5	700	342	přijata	přijata

Závěr: Hypotéza o přesnosti a správnosti byla u všech polyaromatických uhlovodíků přijata, kromě DBA, kde byla hypotéza o správnosti zamítnuta (výtěžnost DBA 63,2 %). Testovaná metoda ASE poskytuje pro referenční materiál statisticky správné výsledky (s výjimkou DBA).

Tabulka 13. Porovnání metody ASE na síranu s klasickou extrakcí vytřepáním u CRM

PAH	Extrakce (mg/kg)		Výtěžnost (%)	t	t-kritické	Hypotéza
	ASE	Vytřepání				
NAP	2927	2945	100,6	0,185	2,776	přijata
ANA	1554	1528	98,3	0,860	2,776	přijata
FLU	2537	2510	98,9	0,778	2,776	přijata
PHE	13549	13671	100,9	0,293	2,776	přijata
ANT	3733	3724	99,8	0,066	2,776	přijata
FLT	15211	15525	95,8	1,402	2,776	přijata
PYR	13421	13420	100,0	0,003	2,776	přijata
BaA	7359	7250	98,5	0,588	2,776	přijata
CHR	7128	7001	98,2	0,502	2,776	přijata
BbF	6579	6550	99,6	0,533	2,776	přijata
BkF	3583	3644	101,7	0,724	2,776	přijata
BaP	7868	8186	104	2,243	2,776	přijata
DBA	1159	1199	103,4	1,270	2,776	přijata
BPE	5408	5778	106,8	4,571	2,776	zamítnuta
IPY	5548	5374	96,9	2,398	2,776	přijata

Závěr: Srovnávané analytické metody poskytují statisticky stejné výsledky, s výjimkou BPE, kde hypotéza o správnosti byla zamítnuta.

Tabulka 14. Porovnání výsledků metody ASE na síranu s referenčními hodnotami u CRM

PAH	Ref. hodnota (mg/kg)	Naměřeno (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Refer. přesnost (mg/kg)	Přesnost (mg/kg)	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti
NAP	2800	2953	105,5	400	87,1	přijata	přijata
ANA	1590	1554	97,7	160	54,0	přijata	přijata
FLU	2570	2600	101,2	290	90,7	přijata	přijata
PHE	13500	13674	101,3	1200	812	přijata	přijata
ANT	3700	3690	99,7	210	108	přijata	přijata
FLT	15900	16515	103,9	800	439	přijata	přijata
PYR	12800	13187	103,0	1000	423	přijata	přijata
BaA	7300	7340	100,5	800	316	přijata	přijata
CHR	6800	7188	105,7	900	184	přijata	přijata
BbF	7200	6503	90,3	700	108	přijata	přijata
BkF	3800	3490	91,8	400	154	přijata	přijata
BaP	7900	7774	98,4	600	190	přijata	přijata
DBA	1700	1172	70,0	300	19,1	přijata	přijata
BPE	5700	5314	93,2	600	159	přijata	přijata
IPY	5300	5548	104,7	700	66,5	přijata	přijata

Závěr: Hypotéza o přesnosti a správnosti byla u všech polyaromatických uhlovodíků přijata. Testovaná metoda ASE poskytuje pro referenční materiál statisticky správné výsledky.

Tabulka 15. Opakovatelnosti VRM u ASE (na písku, matrixu, síranu) a klasické extrakce

PAH	Písek (%)	Matrix (%)	Síran (%)	Klasické vytřepání (%)
NAP	1,6	8,9	5,1	3,9
ANA	1,8	8,4	11,2	6,7
FLU	3,4	7,5	7,6	9,9
PHE	2,4	9,2	4,4	3,3
ANT	7,5	5,6	4,1	6,6
FLT	7,0	8,1	8,1	2,7
PYR	3,5	9,0	5,0	1,8
BaA	8,4	9,9	7,0	4,0
CHR	3,3	5,9	5,2	2,2
BbF	2,3	12,4	4,2	1,9
BkF	2,7	11,0	5,5	2,6
BaP	3,6	7,8	7,7	2,9
DBA	2,5	3,1	6,3	6,8
BPE	9,1	11,2	5,4	1,8
IPY	7,7	9,5	4,6	4,2

Tabulka 16. Opakovatelnosti CRM na ASE (písek, matrix, síran) a klasické extrakce

PAH	Písek (%)	Matrix (%)	Síran (%)	Klasické vytřepání (%)
NAP	5,9	3,6	3,1	8,9
ANA	9,8	4,8	3,5	6,5
FLU	8,5	6,8	3,5	1,9
PHE	6,5	5,5	3,4	5,2
ANT	3,9	7,2	2,9	3,6
FLT	3,4	6,3	2,7	6,9
PYR	3,4	4,4	3,2	6,0
BaA	4,8	6,7	4,1	5,4
CHR	5,2	5,5	3,5	6,2
BbF	3,9	6,7	1,7	2,7
BkF	4,7	8,1	4,4	7,1
BaP	4,3	4,2	2,5	3,2
DBA	10,2	9,2	3,2	7,9
BPE	6,1	6,3	3,0	5,4
IPY	3,2	6,3	3,6	4,8

Tabulka 17. Porovnání obsahů PAHs na inertních maticích u VRM

PAH	ASE na vyžíhaném písku	ASE na matrixu	ASE na síranu sodném	Relativní směrodatná odchylka
	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)
NAP	828	632	777	11,1
ANA	66,0	68,5	57,0	7,7
FLU	94,5	89,3	85,8	4,0
PHE	1244	1148	1229	3,5
ANT	288	289	294	0,9
FLT	1904	2103	2076	4,3
PYR	1678	1555	1577	3,3
BaA	1124	991	1106	5,5
CHR	1211	1171	1153	2,1
BbF	1463	1293	1433	5,3
BkF	680	688	699	1,1
BaP	961	1068	1084	5,3
DBA	165	131	148	9,4
BPE	1086	1004	1001	3,8
IPY	1068	1027	1133	4,1

Tabulka 18. Porovnání obsahů PAHs na inertních maticích u CRM

PAH	ASE na vyžíhaném písku	ASE na matrixu	ASE na síranu sodném	Relativní směrodatná odchylka
	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)
NAP	2854	2862	2927	1,1
ANA	1569	1522	1554	1,3
FLU	2593	2648	2537	1,7
PHE	13361	13686	13549	1,0
ANT	3725	3732	3733	0,1
FLT	15855	15622	15211	1,7
PYR	12857	13024	13421	1,8
BaA	7254	7328	7359	0,6
CHR	7085	6653	7128	3,1
BbF	6596	6639	6579	0,4
BkF	3550	3440	3583	1,7
BaP	8101	7841	7868	1,5
DBA	1374	1062	1159	10,9
BPE	5867	5792	5408	3,5
IPY	5721	5524	5548	1,6

Tabulka 19. Porovnání metody ASE a klasické extrakce u vzorku 907

PAH	Extrakce (mg/kg)		Výtěžnost (%)	t	t-kritické	Hypotéza
	ASE	Vytřepání				
NAP	7,7	7,6	98,3	0,174	2,776	přijata
ANA	2,6	2,4	92,3	0,522	2,776	přijata
FLU	5,7	5,7	100,6	0,057	2,776	přijata
PHE	46,5	40,3	86,6	0,989	2,776	přijata
ANT	9,8	6,9	70,7	2,098	2,776	přijata
FLT	80,9	76,9	95,1	0,444	2,776	přijata
PYR	74,6	69,4	93,1	1,713	2,776	přijata
BaA	33,8	31,4	93,0	1,765	2,776	přijata
CHR	40,8	39	95,5	2,634	2,776	přijata
BbF	31,6	33,3	105,5	0,695	2,776	přijata
BkF	28,0	27,7	99,0	0,364	2,776	přijata
BaP	47,9	45,8	95,5	0,590	2,776	přijata
DBA	4,2	3,6	87,2	1,789	2,776	přijata
BPE	37,1	33,3	89,7	2,178	2,776	přijata
IPY	36,6	37,5	102,5	0,287	2,776	přijata

Závěr: Srovnávané analytické metody poskytují statisticky stejné výsledky.

Tabulka 20. Porovnání metody ASE a klasické extrakce u vzorku 922

PAH	Extrakce (mg/kg)		Výtěžnost (%)	t	t-kritické	Hypotéza
	ASE	Vytřepání				
NAP	10,7	10,5	97,8	0,325	2,776	přijata
ANA	3,7	3,5	95,5	0,822	2,776	přijata
FLU	9,6	10,2	107,0	0,389	2,776	přijata
PHE	101	99,4	98,0	0,360	2,776	přijata
ANT	19,3	18,3	94,4	0,582	2,776	přijata
FLT	228	232	101,9	0,361	2,776	přijata
PYR	195	190	97,8	0,512	2,776	přijata
BaA	89,4	87,4	97,8	1,083	2,776	přijata
CHR	110,7	102,8	92,9	1,640	2,776	přijata
BbF	100,3	99,6	99,2	0,150	2,776	přijata
BkF	51,3	50,9	99,3	0,175	2,776	přijata
BaP	103,2	99,6	96,5	0,540	2,776	přijata
DBA	11,3	10,8	95,0	1,202	2,776	přijata
BPE	82,3	71,5	87,0	2,760	2,776	přijata
IPY	65,0	67,7	104,2	0,390	2,776	přijata

Závěr: Srovnávané analytické metody poskytují statisticky stejné výsledky.

5 Závěr a diskuse

Cílem vývojového úkolu bylo ověřit možnost využití extrakční techniky ASE pro stanovení polyaromatických uhlovodíků a porovnat ji s extrakční technikou vytřepávání.

Ověřování a zkrácená validace (opakovatelnost, správnost) metody byly provedeny na reálných vzorcích z monitoringu půd, dále na vnitrolaboratorním referenčním materiálu a na certifikovaném materiálu. Extrakce všech uvedených půd byly provedeny na třech různých inertních materiálech – na vyžíhaném písku, na matrixu a na bezvodém vyžíhaném síranu sodném. Z měření a porovnání vyplynulo, že druh použitého inertního materiálu nemá

významný vliv na výsledky obsahů PAHs (tabulka 17 a 18). Byly prováděny extrakce s jedním a dvěma statickými cykly. Bylo zjištěno, že pro vzorky s vyššími obsahy PAHs je vhodnější používat dva statické cykly, u běžných vzorků je dostačující jeden statický cyklus.

Byly nalezeny optimální extrakční podmínky, u kterých byla ověřena správnost metody. U vzorku VRM 764 při srovnávání metody ASE a klasické metody vytřepání byla hypotéza o shodě metod přijata s výjimkou naftalenu, kde metoda ASE poskytuje vyšší výsledky. To je pravděpodobně způsobeno tím, že při klasické extrakci dochází u nízkovroucích PAHs k vyšším ztrátám. Rovněž při srovnávání naměřených hodnot s referenčními hodnotami byly hypotézy o přesnosti a správnosti u všech PAHs přijaty.

U certifikovaného referenčního vzorku CRM při srovnávání metody ASE a klasické metody byla hypotéza o shodě metod u všech polyaromatických uhlovodíků přijata. Při testování výsledků CRM s referenčními hodnotami byly hypotézy o přesnosti a správnosti přijaty.

Při srovnávání metod ASE a klasické extrakce u reálných půd 907 a 922 byla hypotéza o správnosti u všech polyaromatických uhlovodíků přijata (tabulka 19 a 20).

Metoda ASE byla ověřena také na standardu PAHs, výtěžnost se pohybovala v rozmezí 80 % až 114 %.

Opakovatelnost měření vzorků na všech testovaných inertních materiálech se pohybovala u VRM do 12 %, u CRM do 10 %, u klasické extrakce také do 10 %. Hypotéza o normalitě všech dat byla potvrzena.

Z výsledků ověřování metody ASE vyplývá, že metoda je vhodná pro extrakci půd při stanovení polyaromatických uhlovodíků. Hypotézy o správnosti a přesnosti byly přijaty. Metoda extrakce ASE a metoda vytřepáváním jsou srovnatelné a klasickou extrakci lze využitím přístroje ASE 100 úspěšně nahradit.

Nevýhodou využití přístroje je však jeho jednopozicový provoz a tím nemožnost analyzovat vzorky půd po větších sériích, jak to umožňuje současně využívaná klasická extrakce. V případě jednoho statického cyklu trvá extrakce jedné navážky zhruba 20 minut, tzn. extrakce jednoho vzorku (2 paralelní stanovení) trvá téměř tři čtvrtě hodiny (při použití dvou statických cyklů u vzorků kalů je to jedna hodina). Tímto se příprava vzorků prodlužuje, protože za stejnou dobu je možno provést klasickou extrakci u 12 navážek.

Využití přístroje je vhodné při analýzách jednotlivých vzorků a hlavně pro studium a ověřování extrakcí u nových matric nebo může pomoci při extrakcích některých problematických vzorků.

6 Literatura

1. Richter, B.E.; Jones, B.A.; Ezzell, J.L.; Porter N.L. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Analytical Chemistry*, **1996**, *68*, 1033 – 1039
2. Saim, N.; Dean, J.R.; Abdullah M.P.; Zakaria, Z. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil using Soxhlet extraction, pressurised and atmospheric microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction. *Journal of Chromatography A*, **1997**, 361 – 366
3. Giergielewicz-Mozajska, H.; Dabrowski, L.; Namiesnik, J. Accelerated Solvent Extraction (ASE) in the Analysis of Environmental Solid Samples – Some Aspects of Theory and Practice. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **2001**, *31*, 149 – 165
4. Björklund, E.; Nilsson, T. Pressurised liquid extraction of persistent organic pollutants in environmental analysis. *Trends in analytical chemistry*, **2000**, *vol. 19, no.7*, 434 – 444
5. Popp, P.; Keil, P.; Möder, M.; Paschke, A.; Thuss, U. Application of accelerated solvent extraction followed by gas chromatography, high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry for determination of PAHs, chlorinated pesticides and polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in solid wastes. *Journal of Chromatography A*, **1997**, *774*, 203 – 211
6. Kurečková, K.; Ventura, K.; Eisner, A.; Adam, M. Aplikace fluidních extrakcí při izolaci kontaminantů z půdních vzorků. *Chemické Listy*, **2001**, *95*, 415 – 419
7. Amedis, spol.s r.o.; Návod k použití

Bulletin Národní referenční laboratoře X 2006/ 3

Ročník: X, č. 3
Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2006
Odpovědný redaktor: RNDr. Jiří Zbíral, Ph.D.
Technická spolupráce: Ing. Iva Strížová
Náklad: 140 výtisků
Počet stran: 70
Tisk: ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, tel.: 543 548 111
e-mail: ukzuz@ukzuz.cz

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1212- 5466