

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2015

Ročník XIX, číslo 2/2015

Brno 2015

Obsah

1. Stanovení reziduí dithiokarbamátových fungicidů Pavla Tieffová, Petra Kosubová Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno	1
2. Stanovení perfluoroalkylových sloučenin v komplexních matricích Klára Kantošová, Petra Kosubová Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno	9
3. Stanovení pyrrolizidinových alkaloidů v rostlinném materiálu Martina Čumová, Petra Kosubová, Marie Mrkvicová Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-OMB Brno Hroznová 2, 656 06 Brno	28

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Stanovení reziduí dithiokarbamátových fungicidů

Pavla Tieffová, Petra Kosubová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
pavla.tieffova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Rezidua dithiokarbamátových přípravků na ochranu rostlin se stanoví nepřímou metodou po katalyzovaném rozkladu účinné látky v kyselém prostředí. Rozkladný produkt sirouhlík CS_2 se kvantitativně stanoví metodou GC-MS.

Homogenizované vzorky rostlin a krmných směsí se analyzují metodou nástřiku plynné fáze (head space analýza, HS).

Postup byl vypracován na základě ČSN EN 12396-3 Stanovení reziduí dithiokarbamátu a thiuram disulfidu metodou plynové chromatografie (1) a byl optimalizován pro stanovení reziduí fungicidních přípravků (mancozeb, maneb, propineb, thiram, zineb) v rostlinném materiálu a v krmných surovinách.

Mez stanovitelnosti metody LOQ = 0,020 mg CS_2 /kg vzorku.

2 Úvod

Pracovníci Sekce úřední kontroly ÚKZÚZ se obrátili na laboratoře NRL ÚKZÚZ s požadavkem na stanovení reziduí účinných látek přípravků používaných k ochraně vinné révy před houbovými chorobami a škůdci, aby mohli prokázat případné nepovolené použití těchto přípravků u ekologicky hospodařících podniků.

Dithiokarbamátové přípravky jsou významnou skupinou fungicidů, které se používají k ošetření vinohradů. Běžnou praxí je jejich nepřímé stanovení po rozkladu na sirouhlík. Pro obsah reziduí CS_2 existují i stanovené limitní hodnoty (MLR) (2).

Metoda stanovení reziduí CS_2 v laboratořích ÚKZÚZ dosud nebyla zavedena, a proto byl vypracován a optimalizován postup kvantitativního stanovení CS_2 v rostlinném materiálu a krmných surovinách s využitím laboratorního a přístrojového vybavení laboratoří NRL RO Brno.

3 Materiál a metody

3.1 Princip metody - Head Space analýza

Tento postup je vhodný pro suché a homogenní vzorky krmných směsí a vzorky listů rostlin.

Dithiokarbamátové sloučeniny se rozloží v kyselém prostředí za katalytického působení cínatých kationtů a množství uvolněného sirouhlíku se stanoví metodou plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC-MS) nástřikem plynné fáze zreagovaného vzorku (HS).

Vzorek s přidavkem kyseliny chlorovodíkové a chloridu cínatého se v plynotěsné reakční vialce nechá za stálého protřepávání reagovat 60 min/80 °C. Uvolněný sirouhlík se hromadí v prostoru nad vzorkem a je analyzován nástřikem plynné fáze do plynového chromatografu s hmotnostním detektorem (GC-MS). Kvantifikace CS_2 se provede na externí kalibraci se započtením výtěžnosti postupu, odpovídající matici vzorku. Jednotlivé kalibrační hladiny se připraví přidavkem spočteného množství analytického standardu thiramu k matici slepého vzorku tak, aby koncentrace odpovídala požadované hladině uvolněného CS_2 . Podmínky hydrolýzy i objem volného prostoru nad vzorkem (V-HS) musí být pro vzorky i kalibrační hladiny totožné.

3.2 Chemikálie

Použitá rozpouštědla jsou čistoty minimálně p.a., jejichž dostačující kvalita se ověřuje proměřením slepého vzorku.

3.2.1 Kyselina chlorovodíková, HCl , koncentrovaná, $\rho = 1,18 \text{ g/ml}$.

3.2.2 Chlorid cínatý dihydrát, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

3.2.3 Činidlo, SnCl_2 ve 4,5 M HCl.

Příprava: Do 200ml odměrné baňky se naváží 3 g dihydrátu SnCl_2 (3.2.2), přidá se 80 ml HCl (3.2.1) a doplní se vodou (3.2.4) po značku. Obsah se důkladně promíchá. Činidlo se skladuje v temnu při $T \leq 8^\circ\text{C}$. Nelze používat činidlo starší 14 dnů.

3.2.4 Voda, H_2O .

3.2.5 Acetonitril, CH_3CN .

3.2.6 Thiram, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}_4$, certifikovaný analytický standard.

3.2.7 Zásobní roztok (ZR) thiramu v acetonitrilu, $c = 1 \text{ mg/ml}$.

Příprava: Do 20ml vialky se naváží se (10 – 20) mg thiramu (3.2.6) s přesností $\pm 0,01 \text{ mg}$ a rozpustí se v odpovídající navážce acetonitrilu (3.2.5). Důkladně se promíchá. Nelze používat roztok starší 5 týdnů.

3.2.8 Pracovní roztok (A) thiramu v acetonitrilu, $c = 100 \text{ }\mu\text{g/ml}$.

Příprava: ZR (3.2.7) se $10 \times$ zředí. Do 4ml vialky se odměří 200 μl ZR (3.2.7) a přidá se 1800 μl acetonitrilu (3.2.5). Důkladně se promíchá.

3.2.9 Pracovní roztok (B) thiramu v acetonitrilu, $c = 10 \text{ }\mu\text{g/ml}$.

Příprava: Pracovní roztok A (3.2.8) se $10 \times$ zředí. Do 4ml vialky se odměří 200 μl roztoku A (3.2.8) a přidá se 1800 μl acetonitrilu (3.2.5). Důkladně se promíchá.

3.2.10 Pracovní roztok (C) thiramu v acetonitrilu, $c = 1 \text{ }\mu\text{g/ml}$.

Příprava: Pracovní roztok B (3.2.9) se $10 \times$ zředí. Do 4ml vialky se odměří 200 μl roztoku B (3.2.9) a přidá se 1800 μl acetonitrilu (3.2.5). Důkladně se promíchá.

3.3 Přístroje a laboratorní vybavení

3.3.1 Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem, GC-MS/MS, Trace Ultra/ITQ 1100 (Thermo), software Xcalibur.

3.3.2 Kapilární kolona, DB XLB 30 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,25 μm (J & W Scientific).

3.3.3 Autosampler s HS jednotkou (agitátor), Combi PAL, software Cycle Composer, blok pro 1ml HS nástřikovou jehlu, (CTC Analytics).

3.3.4 Plynotěsná stříkačka pro HS nástřik, 1 ml.

3.3.5 Automatická pipeta s nastavitelným objemem (1 – 5) ml, špičky.

3.3.6 Plynotěsné stříkačky (10, 50, 100, 1000) μl .

3.3.7 Vialky pro HS, 20ml, sklo, magnetické víčko, septum silikon/PTFE.

3.3.8 Vialky pro GC, 2ml, sklo, šroubovací víčko, septum silikon/PTFE.

3.3.9 Laboratorní sušárna.

3.3.10 Nožový mlýn Grindomix GM300 (Retsch), nerezová mlecí nádoba.

3.3.11 Kapalný N₂, suchý led CO₂.

3.4 Pracovní postup

3.4.1 Příprava vzorku

Rezidua dithiokarbamátových fungicidů se nacházejí na povrchu ošetřených plodin a rychle se rozkládají v kyselém i alkalickém prostředí. Vzorky se analyzují čerstvé, co nejdříve po dodání do laboratoře. Je-li nutné je skladovat, uchovávají se při $T \leq -18\text{ °C}$.

Vzorky s nízkým obsahem vody (obiloviny, krmné směsi, listy) lze homogenizovat za kryogenních podmínek, nejlépe s přidavkem kapalného dusíku nebo peletek suchého ledu. Při manipulaci se vzorkem je třeba dbát na to, aby již zamrazený vzorek nerozmrznul.

3.4.2 Head Space analýza

Do 20ml HS vialky se naváží 1 g až 3 g vzorku, 0 ml až 2 ml vody (celková hmotnost smočeného vzorku je 3 g) a přidá se 6 ml činidla (3). Vialka se okamžitě vzduchotěsně uzavře a vloží se do vyhřívaného prostoru agitátoru v HS jednotce. Za průběžného třepání se vzorky nechají 60 min reagovat při 80 °C. Po uplynutí reakční doby se vialky přenesou do podavače pro automatizovaný nástřik. Nástřik 300 µl plynné fáze nad vzorkem se provede z vialky vytemperované na 40 °C.

3.4.3 GC-MS stanovení

Obsah sirouhlíku se stanoví metodou GC-MS po nástřiku plynné fáze. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v tabulce 1, hmotnostní spektra se získají za podmínek elektronové ionizace (EI) při 70 eV, měřením skenu (FS) v rozsahu hmot m/z 70-90. Kvantifikace obsahu se provede z iontu $m/z = 76$.

Tabulka 1. Chromatografické podmínky.

Nosný plyn	He 5.0; průtok 0,6 ml/min, po 3 min zvýšení na 1,5 ml/min
Teplota injektoru	250 °C
Teplota MS (TL/IZ)	280/220 °C
Teplotní program	60 °C (3 min) – 60 °C/min – 280 °C (3 min)
Nástřik	1 µl/resp. 500 µl (pro HS); split poměr 20
Retenční čas	CS ₂ = 2,02 min

4 Výsledky a diskuse

Při zavádění metody byly optimalizovány podmínky pro úpravu, homogenizaci a hydrolýzu vzorku. Vzorky s nízkým obsahem vody lze homogenizovat bez významných ztrát stanovovaných dithiokarbamátů a pro přípravu vzorku lze tedy použít menší navážku a 20ml HS vialky, které lze vložit do agitátoru pro automatizovanou hydrolýzu vzorku za konstantních reakčních podmínek. Pro kvantifikaci obsahu byl použit procesní standard sirouhlíku, připravený z analytického standardu thiramu za stejných podmínek jako analyzované vzorky.

Výpočet obsahu CS₂ se provede na externí kalibraci, která zahrnuje korekci na výtěžnosti postupu, odpovídající matici vzorku. Jednotlivé kalibrační hladiny se připraví přidávkem spočteného množství analytického standardu thiramu k matici slepého vzorku, viz tabulka 2 tak, aby koncentrace odpovídala požadované hladině uvolněného CS₂. Podmínky hydrolýzy i objem volného prostoru nad vzorkem (V-HS) musí být pro vzorky i kalibrační standardy totožné.

Teoreticky 1 mg thiramu poskytuje 0,6323 mg CS₂. Matricová kalibrace je lineární ($R^2 \geq 0,995$) v širokém rozmezí koncentrací. Rozsah byl ověřen od 19 ng až po 63 µg CS₂/HS-objem. Pro přesnou kvantifikaci nízkých obsahů je vhodné použít menší rozsah kvantifikačních hladin, úměrně nálezu. Pokud obsah reziduí ve vzorku překročí rozsah kalibrace, je nutné zopakovat analýzu s menší navážkou vzorku.

Tabulka 2. Příprava kalibrační řady pro HS analýzu.

Hladina	b (ng CS ₂ /HS)	Thiram (ng/HS)	Přidavky standardu (μl/na HS vialku)
1	19	30	30 roztoku C (3.2.10)
2	63	100	100 roztoku C (3.2.10)
3	316	500	50 roztoku B (3.2.9)
4	632	1 000	100 roztoku B (3.2.9)
5	1 581	2 500	25 roztoku A (3.2.8)
6	3 162	5 000	50 roztoku A (3.2.8)
7	6 323	10 000	100 roztoku A (3.2.8)
8	15 808	25 000	25 ZR (3.2.7)
9	31 615	50 000	50 ZR (3.2.7)
10	63 230	100 000	100 ZR (3.2.7)

Obsah CS₂ se vypočte ze směrnice kalibrační přímky, sestrojené z naměřených kalibračních bodů pro danou sérii vzorků. Výsledek se vyjádří v mg CS₂/kg vzorku a vypočte se podle rovnice (1).

$$c = \frac{b_{HS}}{m} \cdot 10^{-3} \quad (1)$$

kde c je obsah CS₂ ve vzorku (mg/kg),

b_{HS} obsah CS₂ odečtený z kalibrační přímky pro HS nástřik (ng/HS),

m navážka vzorku (g).

Detekční limity byly stanoveny z nejnižší úrovně kalibračních přímek, $LOD \leq 20$ ng CS₂/ HS-objem reakční vialky.

Za podmínek daných postupem lze dosáhnout meze stanovitelnosti $LOQ \leq 0,020$ mg CS₂/kg vzorku. Nastavený limit pro uvádění výsledků $RL = 0,020$ mg/kg vzorku.

Maximální povolený reziduální limit (3) pro potraviny a krmné směsi MLR je 0,050 mg/kg.

Opakovatelnost postupu byla stanovena pro matrice obilná směs, list a hrozen vinné révy na hladině 0,050/0,500/5 mg/kg vzorku ($n = 6$). Stanovené hodnoty opakovatelnosti byly v povoleném rozmezí podle tabulky 3.

Akceptovatelná výtěžnost postupu (1) je 70 % až 110 %. V případě kvantifikace na procesní kalibraci, připravenou rozkladem thiramu, jsou výsledky již korigovány na výtěžnost.

Tabulka 3. Povolené hodnoty opakovatelnosti.

Koncentrační hladina (mg/kg)	Relativní nejistota (%)
< 0,100	50
0,100 – 1,000	25
> 1,000	12,5

Správnost metody byla ověřena účastí v mezinárodním porovnávacím testu EUPT SRM.

5 Závěr

V laboratoři NRL RO Brno byla zavedena metoda pro nepřímé stanovení reziduí dithiokarbamátových fungicidů po jejich katalytickém rozkladu na sirouhlík. Byl optimalizován postup kvantitativního stanovení CS_2 v rostlinném materiálu a krmných surovinách metodou GC-MS s nástřikem plynné fáze vzorku (Head Space analýza).

Mez stanovitelnosti postupu $\text{LOQ} = 0,020 \text{ mg CS}_2/\text{kg}$ vzorku je dostatečná i pro kontrolu dodržení limitů pro tyto látky, protože $\text{MLR} (\text{CS}_2) \geq 0,050 \text{ mg/kg}$.

Správnost metody byla ověřena úspěšnou účastí v mezilaboratorním testu EUPT-SRM7 v roce 2012. Testovacím vzorkem byla pomletá čočka, přirozeně kontaminovaná přípravky na ochranu rostlin po polním ošetření plodiny. Střední hodnota nálezů z výsledků 87 hodnocených laboratoří byla $0,615 \text{ mg CS}_2/\text{kg}$ vzorku.

Tímto optimalizovaným postupem byly v roce 2012, 2013 a 2014 proměřeny vzorky listů a hroznů vinné révy z kontroly vinohradů v režimu ekologického zemědělství. Pro porovnání nálezů byly v každé sérii analyzovány i vzorky pozitivních kontrol z konvenčně ošetřeného vinohradu se známou aplikací fungicidních přípravků.

6 Literatura

1. ČSN EN 12396-2 Potraviny s nízkým obsahem tuku – Stanovení reziduí dithio karbamátu a thiuram disulfidu – Část 2: Metoda plynové chromatografie, červen 1999.
2. Nařízení EP a Rady (ES) č.396/2005 o maximálních limitech reziduí pesticidů v potravinách a krmivech rostlinného a živočišného původu a na jejich povrchu a o změně směrnice Rady 91/414/EHS, 2005.
3. www.crl-pesticides.eu, Final Report EUPT-SRM7, 2012.

Stanovení perfluoroalkylových sloučenin v komplexních matricích

Klára Kantošová, Petra Kosubová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
pavla.tieffova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Perfluoroalkylové sloučeniny (PFAS) představují rozsáhlou skupinu látek antropogenního původu s širokým průmyslovým uplatněním. Nejvýznamnějšími členy této skupiny jsou perfluorokarboxylové (PFCA) a perfluoroalkansulfonové (PFSA) kyseliny. PFAS se v současnosti detekují v různých složkách životního prostředí a je nutné zjistit možnosti vstupu do potravního řetězce.

Na rozdíl od prvotní studie, která se zabývá analýzou PFAS v rybích moučkách, je tato práce zaměřena na sledování PFAS v komplexních matricích, konkrétně v kalech a krmivech. Pro stanovení vybraných zástupců PFAS v uvedených materiálech byly testovány různé postupy přípravy. Pomocí optimalizované metody bylo analyzováno 41 vzorků čistírenských kalů a 30 vzorků krmiv.

2 Teoretická část

2.1 Úvod

Perfluoroalkylové sloučeniny (PFAS) představují skupinu alifatických látek, u kterých jsou všechny vodíkové substituenty vázané na uhlík nahrazeny atomy fluoru. Vazba uhlík-fluor je extrémně silná a stabilní, což má za následek vysokou chemickou a tepelnou stabilitu. Navíc tyto látky vykazují jak hydrofilní tak lipofilní chování, a proto nalézají uplatnění

v průmyslu a spotřebním zboží především jako povrchově aktivní látky (surfaktanty) a složky polymerních materiálů. Pro jejich rozmanité průmyslové uplatnění se v současnosti PFAS nacházejí ve všech složkách životního prostředí, včetně živočichů a lidské populace. Tyto látky mají sklon k bioakumulaci, vážou se na proteinovou složku tkání. Vyšší bioakumulační potenciál mají PFAS s dlouhými řetězci, jejichž nejvýznamnějšími zástupci jsou perfluorooktansulfonát (PFOS) a perfluorooktanová kyselina (PFOA). Zároveň jsou PFOS a PFOA koncovými produkty degradace PFAS s delšími řetězci [1–3].

Přes všechna současná omezení výroby a používání PFAS [1–3] se tyto látky vyskytují v různých environmentálních složkách a mohou vstupovat do potravních řetězců. Je tedy nezbytné jejich výskyt sledovat a kontrolovat. Pro tyto účely se nejčastěji využívá technika LC-MS/MS, tj. spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií, která umožňuje spolehlivě kvantifikovat PFAS v komplexních matricích a zároveň detekovat, zejména ve spojení s ultraúčinnou kapalinovou chromatografií, co nejnižší hladiny PFAS v potravinách a krmivech [2, 4, 7].

Čistírenské kaly mohou být potenciálním zdrojem PFAS, které se na ně sorbují během procesu čištění odpadních vod. Jelikož v české legislativě není obsah PFAS v kalech limitován a kaly mohou být používány jako hnojivo na zemědělskou půdu, může touto cestou docházet k jejich vstupu do potravního řetězce člověka [8–10].

Informace o výskytu PFAS v krmivech jsou stále velmi omezené. V krmivech bývá častou používanou surovinou rybí moučka, vyráběna jako vedlejší produkt při zpracování ryb. Ryby patří mezi komodity nejvíce kontaminované těmito látkami. Případná kontaminace krmiv může ohrozit chov hospodářských zvířat a následně ovlivnit nezávadnost potravního řetězce [11, 12].

Cílem této práce bylo zavést vhodnou metodu pro stanovení perfluoroalkylových sloučenin (PFAS) v čistírenských kalech a krmivech a zmapovat jejich výskyt v uvedených matricích aplikovaných v zemědělské praxi.

3 Praktická část

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Standardy

Směsný standard pro kvantifikaci: PFAC-MXA s obsahem 7 perfluorokarboxylových kyselin (C_4 – C_{10}) a 3 perfluoroalkansulfonových kyselin (C_4 , C_6 a C_8) o koncentraci $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ v methanolu (Wellington Laboratories, Kanada) a PFAC-MXB s obsahem 13 perfluorokarboxylových kyselin (C_4 – C_{14} , C_{16} a C_{18}) a 4 perfluoroalkansulfonových kyselin (C_4 , C_6 , C_8 a C_{10}) o koncentraci $2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ v methanolu (Wellington Laboratories, Kanada).

Směsné vnitřní standardy (IS): surrogate standard s obsahem 4 isotopově značených MPFAA4 ($^{13}\text{C}_4$ -PFOS, $^{13}\text{C}_2$ -PFHxA, $^{13}\text{C}_4$ -PFOA, $^{13}\text{C}_2$ -PFDA) o koncentraci $0,2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ v methanolu, surrogate standard MPFAC-MXA s obsahem 9 isotopově značených PFAA ($^{13}\text{C}_4$ -PFBA, $^{13}\text{C}_2$ -PFHxA, $^{13}\text{C}_4$ -PFOA, $^{13}\text{C}_5$ -PFNA, $^{13}\text{C}_2$ -PFDA, $^{13}\text{C}_2$ -PFUdA, $^{13}\text{C}_2$ -PFDoA, $^{18}\text{O}_2$ -PFHxS a $^{13}\text{C}_4$ -PFOS) o koncentraci $0,2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ v methanolu a nástřikový standard s obsahem 2 isotopově značených MPFAA2 ($^{13}\text{C}_8$ -PFOS, $^{13}\text{C}_8$ -PFOA) o koncentraci $0,1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ v methanolu (Wellington Laboratories, Kanada).

3.1.2 Chemikálie

Methanol pro LC-MS (Merck), acetonitril pro LC-MS (Sigma-Aldrich), hexan Suprasolv (Merck), hydroxid sodný p.a. (Lach-ner), kyselina chlorovodíková p.a. (Lach-ner), aktivní uhlí GCB (ENVI-Carb, 120/400, Supelco), síran hořečnatý (sušený 16 h při 100°C , žíhaný 16 h při 550°C), chlorid sodný p.a. (Lach-ner), sorbent ODS C18 (Agilent Technologies), mořský písek, křemelina, octan amonný NH_4OAc pro LC-MS (Sigma-Aldrich), deionizovaná voda (Millipore).

3.1.3 Laboratorní pomůcky a vybavení pro přípravu vzorku

Plastové zkumavky (15 ml, 50 ml), analytické váhy (Sartorius), ultrazvuková lázeň Ecoson (Labicom), extraktor ASE 100 (Dionex), extraktor B-811 (Büchi), odstředivka Sigma 2-16K (Sigma), koncentrátor Termovap (Ecom), třepačka (Kavalier), Eppendorf zkumavky (1,5 ml), stříkačky (2 ml), stříkačkové nylonové filtry ($0,2 \mu\text{m}$), dávkovače Hamilton, automatické pipety, PP vialky (300 μl , 700 μl , 2000 μl).

3.1.4 Postup přípravy

3.1.4.1 Čistírenské kaly

1 g vzorku čistírenského kalu v plastových zkumavkách byl obohacen 30 μ l surrogate standardu MPFAA4. Ke vzorku bylo přidáno 0,5 ml roztoku NaOH v methanolu o koncentraci 0,2 mol.l⁻¹. Po promíchání se vzorek nechal stát 30 min. Následovala neutralizace přidáním 50 μ l roztoku HCl v methanolu o koncentraci 2 mol.l⁻¹. Vzorek byl 15 min extrahován 5 ml methanolu v ultrazvukové lázni. Extrakt byl 5 min odstředěn při 5000 rpm a supernatant byl převeden do čisté plastové zkumavky. Extrakce byla zopakována a spojený extrakt byl zkoncentrován pod proudem dusíku na 2 ml. Zkoncentrovaný extrakt byl přečištěn pomocí 100 mg aktivního uhlí (třepání 1 min). Po 5min odstředění při 5000 rpm byl do zkumavky Eppendorf odebrán 1 ml extraktu a zkoncentrován pod proudem dusíku na 0,5 ml. Tento zkoncentrovaný podíl extraktu byl obohacen 30 μ l nástřikového standardu MPFAA2 a doplněn deionizovanou vodou na výsledný objem 1 ml. Po promíchání byl finální extrakt filtrován přes stříkačkové nylonové filtry (0,2 μ m) do PP vialky.

3.1.4.2 Krmiva

1 g vzorku krmiva v plastových zkumavkách byl obohacen 30 μ l surrogate standardu MPFAC-MXA a extrahován 5 ml acetonitrilu v ultrazvukové lázni 15 min. Extrakt byl odstředěn 5 min při 5000 rpm a supernatant byl převeden do čisté plastové zkumavky. Extrakce byla zopakována a spojený extrakt byl zkoncentrován pod proudem dusíku na 2 ml a olejová frakce byla odstraněna vytřepáním do hexanu (2 $\times$ 2 ml). Extrakt byl dále zkoncentrován na 1 ml a přečištěn pomocí 100 mg aktivního uhlí (třepání 1 min). Po odstředění 5 min při 5000 rpm bylo 500 μ l extraktu obohaceno 30 μ l nástřikového standardu MPFAA2 a doplněno deionizovanou vodou na výsledný objem 1 ml. Po promíchání byl finální extrakt filtrován přes stříkačkové nylonové filtry (0,2 μ m) do plastové vialky.

3.1.5 Přístrojové vybavení a podmínky pro koncové stanovení

Extrakty byly analyzovány pomocí ultraúčinného kapalinového chromatografu ve spojení s trojnásobným kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem (Acquity UPLC – TQ MS Xevo, Waters, USA). Před nástřikový ventil byla zařazena PFC izolátorová kolona

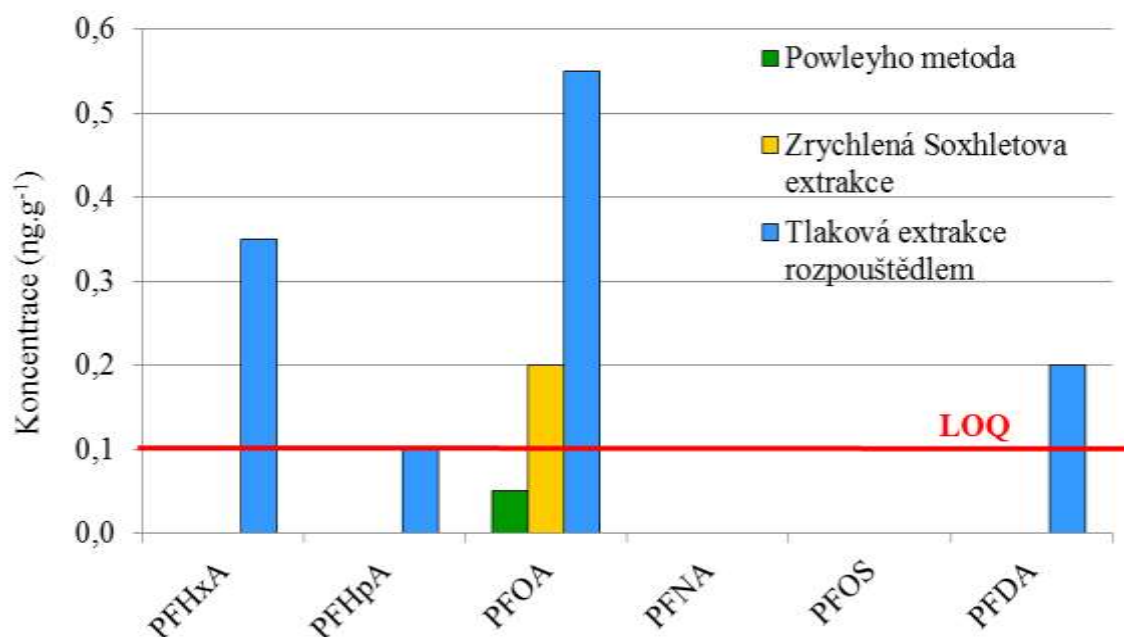
pro eliminaci případných interferujících PFAS uvolňujících se z UPLC systému 3. Chromatografická separace byla provedena na koloně Acquity UPLC® BEH C18 (50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm) gradientovou elucí mobilní fáze složené z methanolu (2 mM NH₄OAc) a deionizované vody (2 mM NH₄OAc). Průtok byl 0,6 ml.min⁻¹ pro čistírenské kaly a 0,3 ml.min⁻¹ pro krmiva. Teplota kolony byla 60 °C a objem nástřiku 5 μl. Ionizace byla provedena elektrosprejem v negativním módu a MS detekce probíhala v režimu sledování vybraných přechodů (MRM). Pro kvantifikaci byly použity specifické přechody: [M-H]⁻ → [M-H-COO]⁻ pro PFCA, [M-H]⁻ → [SO₃]⁻ pro PFSA v případě kalů a [M-H]⁻ → [FSO₃]⁻ pro PFSA v případě krmiv.

3.2 Výsledky a diskuse

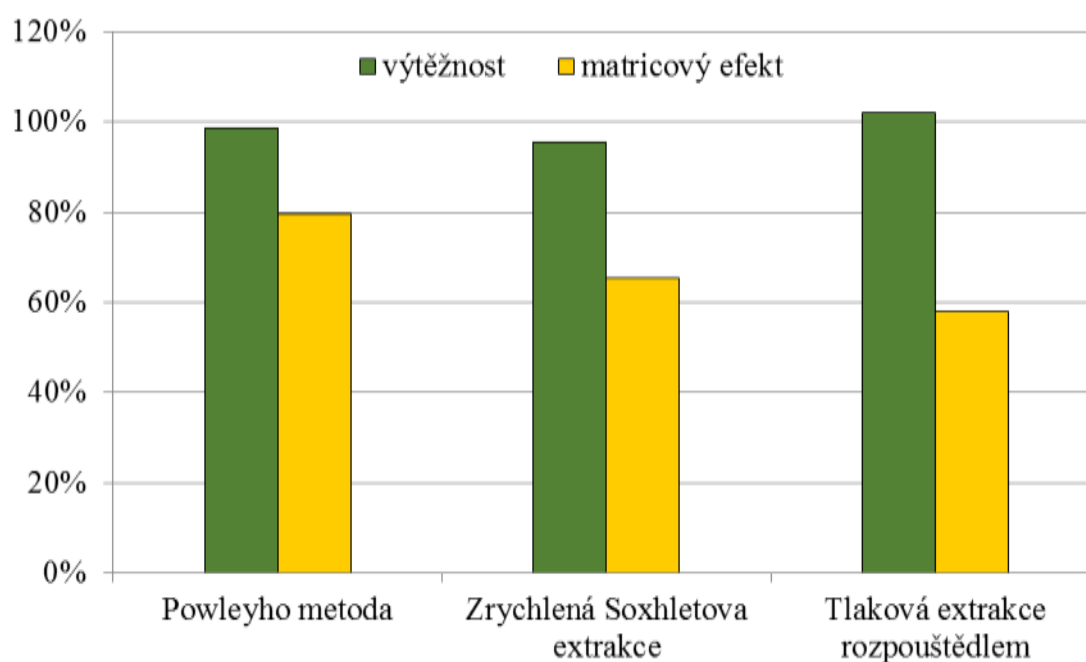
3.2.1 Optimalizace metody přípravy vzorku

3.2.1.1 Čistírenské kaly

Pro extrakci PFAS ze vzorků čistírenských kalů byly testovány tři techniky: zrychlená Soxhletova extrakce, tlaková extrakce rozpouštědlem (ASE) [6, 13] a sonifikace (Powleyho metoda) 13. Všechny tři metody vykazovaly porovnatelnou účinnost extrakce zájmových analytů. Při testování slepého pokusu bylo zjištěno, že ASE a zrychlená Soxhletova extrakce vykazují alespoň u jednoho analytu vysoké pozadí (především PFOA), což je pravděpodobně způsobeno přítomností teflonových součástí v používaných extrakčních zařízeních, které mohou uvolňovat sledované analyty do extraktu (viz Obrázek 1). Matricový efekt (v podobě suprese signálu) byl pozorován u všech testovaných metod, ale v případě Powleyho metody byl nejnižší, jelikož dochází k extrakci menšího množství koextraktů než v případě ASE a zrychlené Soxhletovy extrakce (viz Obrázek 2). Po zhodnocení všech těchto výsledků byla zvolena Powleyho metoda jako vhodná extrakční metoda pro provedení screeningu 41 vzorků čistírenských kalů.



Obrázek 1. Srovnání pozad'ových nálezů různých extrakčních technik.



Obrázek 2. Srovnání extrakčních technik pro vzorky kalů.

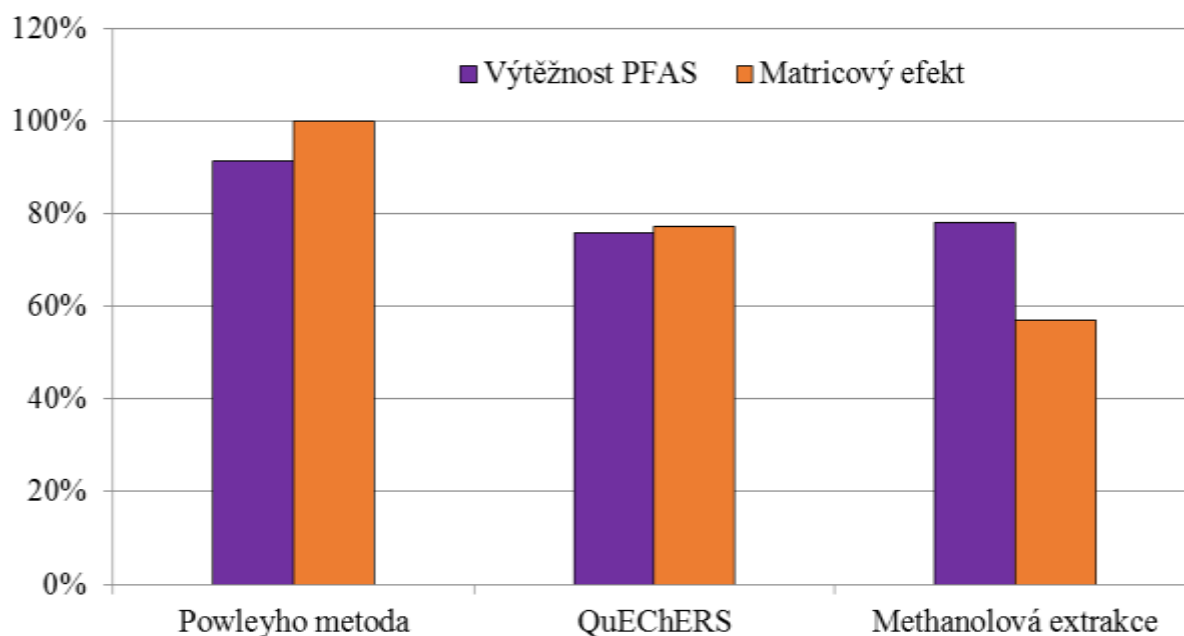
Pro čištění extraktu byly testovány dvě metody: disperzní extrakce tuhou fází (DSPE) aktivním uhlím 13 a extrakce kapalina-kapalina do hexanu. Přetřepáním do hexanu je možné odstranit olejovou frakci z extraktu. Výsledky se zařazeným hexanovým čištěním a bez hexanového čištění byly srovnatelné a tudíž není zařazení toho kroku nutné. Aktivním uhlím se z extraktu odstraní huminové látky. Byla testována 3 různá množství aktivního uhlí,

a to 25 mg, 100 mg a 300 mg. Experimentálně bylo zjištěno, že množství 100 mg je dostatečné pro účinné přečištění extraktu.

3.2.1.2 Krmiva

Na vzorcích krmiv byly testovány tři různé metody přípravy vzorku: methanолоvá extrakce třepáním 14, sonifikace (Powleyho metoda) a QuEChERS 15. Stručný popis testovaných metod je znázorněn v tabulce 1.

Pro porovnání účinnosti testovaných metod byly vzorky obohaceny nativními PFAS na hladině 1 ng.g^{-1} . Vybrané vzorky krmiv byly extrahovány ve třech opakováních a výsledky experimentu jsou znázorněny v tabulce 2. Z výsledků lze vidět, že Powleyho metoda poskytovala dobrou výtěžnost nativních PFAS a splňuje požadavky na kvalitu uvedené v 2002/657/ES [17]. Powleyho metoda také vykazovala nejnižší maticový efekt (viz Obrázek 3). Z těchto důvodů byla Powleyho metoda zvolena pro screening 30 vzorků krmiv.



Obrázek 3. Srovnání extrakčních technik pro vzorky krmiv.

Tabulka 1. Schematický popis jednotlivých extrakčních metod.

	Powleyho metoda	QuEChERS	Methanolová extrakce
Navážka	1 g	2 g	2 g
Surrogate st. MPFAC-MXA	30 µl	60 µl	60 µl
Extrakční čin.	Acetonitril (2 × 5 ml)	Acetonitril (4 ml) + H ₂ O (4 ml)	Methanol (6 ml)
Extrakce	2 × 15 min ultrazvuk	30 min třepání	15 min třepání
Odstředění	5 min, 5 000 rpm	-	-
Zkoncentrování	na 2 ml	-	-
Čištění 1	Odstranění olejové fáze vytřepáním do hexanu (2 × 2 ml)	Vysolení pomocí 1,6 g MgSO ₄ a 0,4 g NaCl	DSPE 340 mg GCB
Odstředění	5 min, 5 000 rpm	5 min, 9 000 rpm	5 min, 9 000 rpm
Zkoncentrování	na 1 ml	-	1,5ml podíl extraktu na 0,5 ml
Čištění 2	DSPE 100 mg GCB	DPSE 300 mg MgSO ₄ , 30 mg ODS, 15 mg GCB (2ml podíl extraktu)	-
Zkoncentrování	-	1ml podíl extraktu na 0,5 ml	-
Ředění	0,5ml podíl extraktu + 0,5 ml H ₂ O	0,5 ml extraktu + 0,5 ml H ₂ O	0,5 ml extraktu + 0,5 ml H ₂ O
Nástřikový st. MPFAA2	30 µl	30 µl	30 µl
Finální úprava	Filtrace přes 0,2µm nylonové filtry	Filtrace přes 0,2µm nylonové filtry	Odstředění 5 min, 12 000 rpm a filtrace přes 0,2µm nylonové filtry

Tabulka 2. Výtěžnosti a RSD (%) nativních PFAS pro jednotlivé metody přípravy vzorku.

		výtěž./ RSD (%)	PFHxS	PFOA	PFNA	PFOS	PFDA	PFUdA	PFDS	PFDoA	PFTrDA	PFTeDA	PFHxDA	PFODA
Powleyho metoda	KK_DZ_7	1	107,7	110,0	102,9	80,5	100,1	94,8	110,0	109,4	99,7	98,3	92,3	76,1
		2	107,5	104,7	97,7	96,3	107,6	89,4	84,2	101,6	103,2	105,3	90,2	81,2
		3	109,4	105,8	91,7	103,4	93,7	104,3	108,8	89,8	99,4	96,0	87,9	71,6
		prům.	108	107	97	93	100	96	101	100	101	100	90	76
		RSD	0,9	2,6	5,8	12,6	6,9	7,9	14,4	9,8	2,1	4,9	2,5	6,3
	DK_DZ_4	1	107,7	107,3	123,4	99,7	125,2	101,5	106,6	113,2	108,9	110,3	69,5	42,2
		2	123,1	110,3	131,3	95,5	109,6	117,4	131,9	138,1	116,2	110,1	83,7	38,7
		3	120,9	121,2	121,9	84,0	127,1	117,0	114,4	107,8	106,3	101,4	73,7	41,4
		prům.	117	113	126	93	121	112	118	120	110	107	76	41
		RSD	7,1	6,5	4,0	8,7	7,9	8,1	11,0	13,5	4,6	4,8	9,6	4,5
	KK_HZ_9	1	113,0	103,4	104,8	92,5	114,9	98,2	92,6	102,7	97,4	111,3	73,9	49,9
		2	101,1	100,3	102,5	110,3	110,0	94,4	113,0	105,2	112,6	110,4	84,8	56,5
		3	116,7	124,4	108,0	109,0	113,7	104,4	110,8	106,5	102,2	105,5	83,7	48,9
		prům.	110	109	105	104	113	99	105	105	104	109	81	52
		RSD	7,4	12,0	2,7	9,6	2,3	5,1	10,6	1,9	7,5	2,9	7,4	8,0
QuEChERS	KK_DZ_7	1	85,2	114,9	107,5	93,6	74,4	90,3	108,7	75,5	72,8	41,7	30,3	12,8
		2	86,3	107,5	94,5	99,7	83,7	85,1	92,1	73,1	64,4	42,0	25,9	9,6
		3	91,2	94,7	91,9	86,3	87,6	75,3	90,9	74,5	68,0	41,7	23,4	11,8
		prům.	88	106	98	93	82	84	97	74	68	42	27	11
		RSD	3,7	9,7	8,5	7,2	8,3	9,1	10,2	1,6	6,2	0,3	13,3	14,4
	DK_DZ_4		72,6	91,3	79,0	80,8	86,9	84,0	66,8	81,4	66,3	36,2	6,9	4,5
			78,4	91,2	71,3	71,8	83,1	77,2	53,5	79,1	63,9	39,8	7,1	4,5
			67,6	90,0	75,9	79,4	84,0	78,4	58,2	73,3	63,2	37,7	6,3	4,4
		prům.	73	91	75	77	85	80	59	78	64	38	7	4
		RSD	7,4	0,8	5,1	6,2	2,3	4,5	11,3	5,4	2,5	4,7	5,9	1,3
	KK_HZ_9	1	101,4	85,4	80,4	114,6	97,5	90,1	60,3	81,8	62,2	37,5	18,5	8,0
		2	99,9	93,1	89,6	100,2	91,1	83,6	61,8	89,2	55,7	36,8	21,4	7,0
		3	96,4	96,0	100,2	91,5	97,4	85,4	55,0	100,4	55,5	38,2	18,4	7,1
		prům.	99	91	90	102	95	86	59	90	58	37	19	7
		RSD	2,6	6,0	11,0	11,4	3,9	3,9	6,1	10,3	6,6	1,8	8,6	7,5
Methanolová extrakce	KK_DZ_7	1	95,3	116,3	85,4	77,5	126,1	107,7	39,3	87,9	34,0	3,9	0,1	5,0
		2	104,1	120,3	100,9	52,4	103,2	86,1	28,6	102,9	42,5	4,3	0,1	4,8
		3	117,1	128,2	108,9	65,4	90,4	115,6	29,8	117,8	36,1	3,9	0,3	4,7
		prům.	105	122	98	65	107	103	33	103	38	4	0,1	5
		RSD	10,4	5,0	12,1	19,3	17,0	14,8	18,0	14,5	11,8	5,4	108,3	3,3
	DK_DZ_4	1	131,9	120,9	116,2	90,5	103,9	100,0	45,1	97,4	83,7	65,7	67,4	86,0
		2	117,9	131,7	124,5	96,4	124,9	97,0	33,8	104,5	72,3	61,3	53,5	99,9
		3	112,5	133,7	106,8	126,4	125,1	95,8	32,1	84,4	63,0	69,2	58,3	94,0
		prům.	121	129	116	104	118	98	37	95	73	65	60	93
		RSD	8,3	5,5	7,7	18,4	10,3	2,2	19,0	10,7	14,2	6,0	11,8	7,5
	KK_HZ_9	1	128,0	117,7	108,3	124,1	124,6	99,4	69,7	118,3	37,6	12,1	0,0	4,5
		2	99,5	125,5	126,3	97,0	119,9	112,9	58,7	132,4	41,5	16,1	0,0	4,8
		3	119,4	123,8	104,0	94,6	103,9	103,4	69,2	117,4	35,6	13,0	0,0	4,7
		prům.	116	122	113	105	116	105	66	123	38	14	0	5
		RSD	12,6	3,3	10,5	15,6	9,4	6,6	9,5	6,8	7,9	15,4	0,0	2,8

* KK_DZ – kompletní krmivo pro domácí zvířata, DK_DZ – doplňkové krmivo pro domácí zvířata, KK_HZ – kompletní krmivo pro hospodářská zvířata

3.2.2 Stanovení pomocí UPLC-MS/MS

Koncové stanovení bylo provedeno na přístroji Xevo TQ MS. Ve vzorcích čistírenských kalů bylo sledováno 5 PFCA a PFOS a ve vzorcích krmiv bylo analyzováno 9 PFCA (C8–C18) a 3 PFSA. MS detekce PFAS byla provedena v MRM módu. Parametry UPLC-MS/MS pro stanovení PFAS jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3. Parametry UPLC-MS/MS pro jednotlivé PFAS.

		R_t pro průtok 0,6 ml.min⁻¹ (minuty)	R_t pro průtok 0,3 ml.min⁻¹ (minuty)	MRM	Ionizační napětí (V)	Kolizní energie (V)
Nativní PFAS	PFHxA	1,53	-	313 → 269	15	8
				313 → 119	15	24
	PFHpA	1,76	-	363 → 319	15	11
				363 → 169	15	18
	PFOA	1,92	2,43	413 → 369	15	10
				413 → 169	15	18
	PFNA	2,05	2,64	463 → 419	15	11
				463 → 219	15	14
	PFDA	2,15	2,80	513 → 469	20	10
				513 → 219	20	16
	PFUdA	-	2,94	563 → 519	16	10
				563 → 269	16	18
	PFDaA	-	3,05	613 → 569	16	12
				613 → 319	16	18
	PFTrDA	-	3,13	663 → 619	18	12
				663 → 369	18	18
	PFTeDA	-	3,21	713 → 669	18	12
				713 → 319	18	22
	PFHxDA	-	3,34	813 → 769	20	13
				813 → 219	20	25
Izotopově značené PFAS	PFODA	-	3,44	913 → 869	22	15
				913 → 269	22	25
	PFHxS	-	2,14	399 → 99	50	30
				399 → 80	50	36
	PFOS	2,05	2,64	499 → 99	62	38
				499 → 80	62	36
	PFDS	-	2,93	599 → 99	70	40
				599 → 80	70	50
	PFOA-13C4	1,92	2,43	417 → 372	15	10
	PFNA-13C5	-	2,64	468 → 423	15	11
	PFDA-13C2	-	2,80	515 → 470	20	10
	PFUdA-13C2	-	2,94	565 → 520	16	10
Izotopově značené PFAS	PFDaA-13C2	-	3,05	615 → 570	16	12
	PFHxS-18O2	-	2,14	403 → 103	50	30
	PFOS-13C4	2,05	2,64	503 → 99	62	38
				503 → 80	62	36
	PFOA-13C8	1,92	2,43	421 → 376	15	10
	PFOS-13C8	2,05	2,64	507 → 99	62	38
				507 → 80	62	36

PFSA byly detekovány pomocí dvou MRM přechodů, tj. $[M-H]^- \rightarrow [SO_3]^-$ pro kaly a $[M-H]^- \rightarrow [FSO_3]^-$ pro krmiva. Ve vzorcích krmiv nemohl být pro kvantifikaci PFOS použit přechod $[M-H]^- \rightarrow [SO_3]^-$ (499 $\rightarrow$ 80), jelikož v biotických vzorcích se PFOS na chromatografických fázích C18 koeluuje s interferentem taurodeoxycholátem, který také poskytuje odezvu na přechodu 499 $\rightarrow$ 80, což vede k deformaci chromatografického píku PFOS a nadhodnocení jeho obsahu. Toto zjištění popsali i další autoři [5, 7]. Proto byl v případě krmiv použit přechod $[M-H]^- \rightarrow [FSO_3]^-$ (499 $\rightarrow$ 99), který je pro PFOS specifický.

Pro detekci PFCA byly využity také dva MRM přechody, tj. $[M-H]^- \rightarrow [M-H-COO]^-$ a $[M-H]^- \rightarrow [M-H-COO-(CF_2)_x]^-$. Oba MRM byly shledány specifickými pro stanovení PFCA a pro kvantifikaci byl použit intenzivnější MRM odpovídající ztrátě CO_2 .

Odhady limitů detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) byly odvozeny z poměru signálu k šumu. LOD metody byly v rozsahu 0,01 $ng \cdot g^{-1}$ až 0,02 $ng \cdot g^{-1}$ a LOQ 0,03 $ng \cdot g^{-1}$ až 0,1 $ng \cdot g^{-1}$. Ke korekci ztrát při přípravě vzorku a eliminaci vlivu matricových efektů byla použita metoda izotopového ředění a vnitřního standardu.

3.2.3 Ověření metod

3.2.3.1 Čistírenské kaly

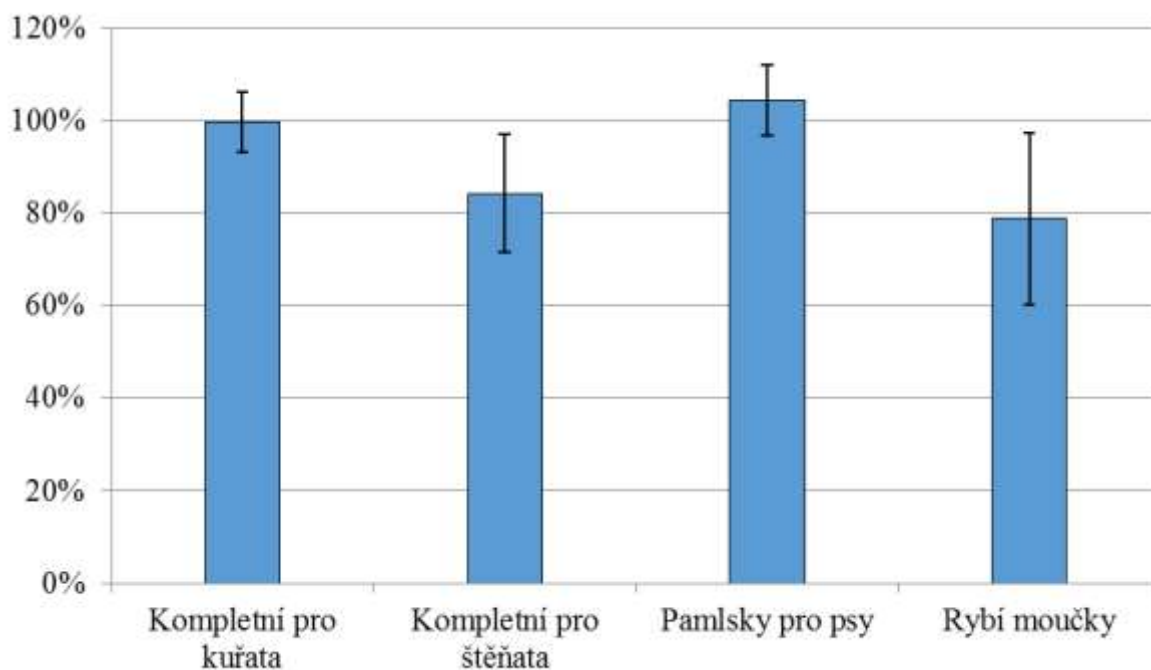
Správnost metody byla ověřena pomocí mezilaboratorního porovnání, protože v současnosti není dostupný žádný referenční materiál s certifikovanými obsahy PFAS. Laboratoře ÚKZÚZ a SYKE (Finský ústav pro životní prostředí, Helsinky) analyzovaly zvolený vzorek čistírenského kalu v triplicátu a výsledky byly hodnoceny t-testem, který ukázal, že obě laboratoře poskytují statisticky porovnatelné výsledky a potvrdil spolehlivost použitých metod (viz Tabulka 4).

Tabulka 4. Výsledky statistického porovnání laboratoří ÚKZÚZ a SYKE.

	ÚKZÚZ (c, $ng.g^{-1}$)	SYKE (c, $ng.g^{-1}$)	Hodnota t	t-kritické
PFHxA	0,337	0,283	1,249	2,776
PFHpA	0,080	0,140	1,837	2,776
PFOA	0,597	0,697	1,177	2,776
PFNA	0,440	0,417	0,944	2,776
PFDA	2,63	2,45	0,824	2,776
PFOS	31,05	28,97	0,823	2,776

Krmiva

Správnost a přesnost Powleyho metody zahrnující extrakci do acetonitrilu byla ověřena pro 4 krmné materiály obohacené PFAS na hladině 1 ng.g^{-1} . Průměrná výtěžnost a opakovatelnost použité metody byla 91 % a 11 %. Legislativní požadavky pro stanovení PFAS v potravinách a krmivech na hladině 1 ng.g^{-1} (správnost: 50 % až 120 %, přesnost: 22 % až 30 %) byly splněny u všech 12 PFAS ve všech validovaných materiálech [17].



Obrázek 4. Výtěžnosti a RSD (%) pro validované matrice krmiv.

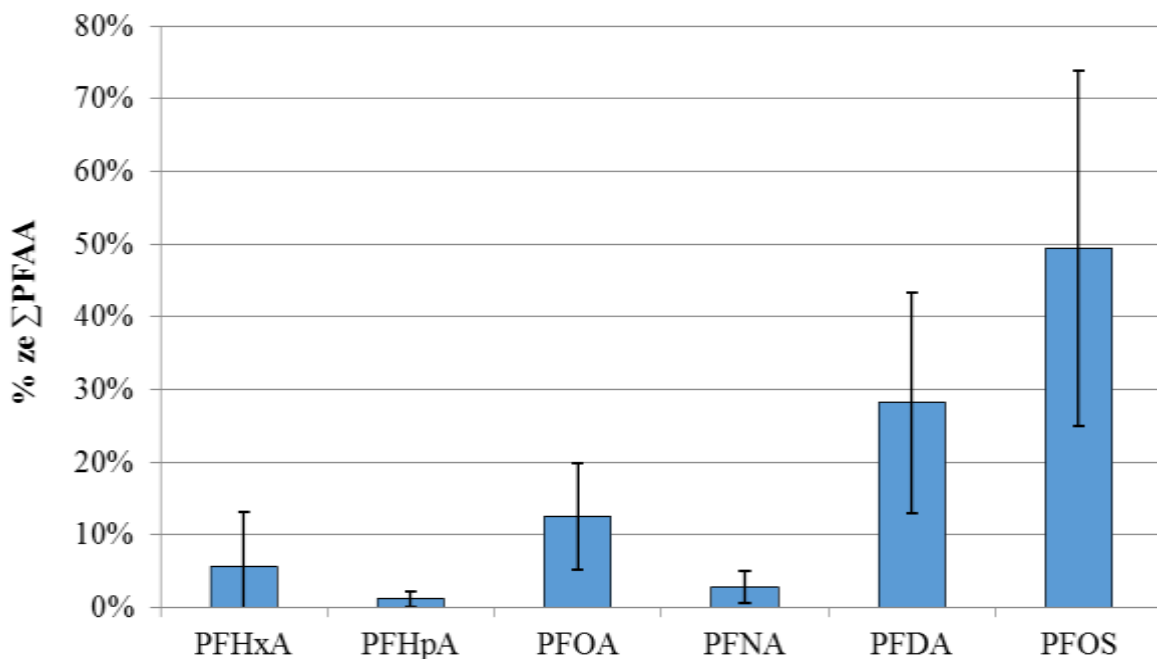
3.2.4 Screening PFAS

3.2.4.1 Čistírenské kaly

Vybrané PFAS byly analyzované ve 42 vzorcích čistírenských kalů z let 2013 až 2014. Výsledné koncentrace sledovaných analytů v jednotlivých vzorcích jsou znázorněny v tabulce 5. Nejčastěji se vyskytujícím analytem byl perfluorooktansulfonát (PFOS), který byl přítomen ve všech testovaných vzorcích v rozmezí $(0,74 - 390,26) \text{ ng.g}^{-1}$, což koresponduje s dříve publikovanými daty [9, 10, 17]. Další nejčastěji detekované analyty byly kyselina perfluorodekanová (PFDA) a kyselina perfluorooktanová (PFOA), které byly také stanoveny ve všech vzorcích. Profil PFAS charakteristický pro čistírenské kaly je uveden na obrázku 5.

Tabulka 5. Koncentrace sledovaných PFAS v čistírenských kalech (ng.g⁻¹ sušiny).

Číslo vzorku	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFOS
1	0,33	< 0,1	0,81	< 0,1	1,27	3,31
2	0,47	< 0,1	1,10	< 0,1	1,59	2,60
3	0,60	< 0,1	1,16	0,18	2,84	4,17
4	0,19	0,19	1,12	0,25	2,71	0,74
5	4,42	4,45	21,04	3,69	46,90	5,54
6	0,24	0,13	1,15	0,63	3,43	1,86
7	0,34	< 0,1	1,17	< 0,1	2,77	5,03
8	0,26	< 0,1	1,49	0,25	2,02	1,57
9	0,36	< 0,1	0,49	< 0,1	1,28	3,51
10	0,24	< 0,1	1,78	0,66	7,49	6,06
11	< 0,1	< 0,1	0,85	0,23	1,26	2,32
12	0,42	< 0,1	1,54	0,31	3,39	3,44
13	0,53	< 0,1	1,03	< 0,1	2,02	2,17
14	< 0,1	< 0,1	2,20	0,89	3,76	3,85
15	1,84	0,14	1,17	< 0,1	2,07	1,23
16	0,23	< 0,1	1,18	< 0,1	0,42	38,02
17	0,32	0,18	0,72	0,40	1,48	28,68
18	0,21	< 0,1	0,78	0,18	1,50	11,90
19	0,22	0,22	2,27	1,22	8,34	5,81
20	0,39	0,18	0,85	< 0,1	2,21	16,40
21	2,57	0,30	1,50	< 0,1	5,01	11,88
22	0,43	0,13	1,53	0,58	10,4	2,33
23	0,88	0,81	5,47	0,87	1,14	390
24	0,13	< 0,1	0,48	0,18	1,81	3,06
25	0,19	0,13	0,57	0,15	2,71	3,06
26	0,53	0,12	0,93	0,37	2,94	5,00
27	0,47	0,18	1,53	0,55	2,07	2,11
28	< 0,1	< 0,1	0,80	0,18	1,42	14,4
29	0,14	< 0,1	1,08	0,12	0,79	1,30
30	0,11	< 0,1	0,47	0,20	1,61	38,6
31	0,33	0,18	1,79	0,43	2,44	4,81
32	< 0,1	< 0,1	0,71	0,23	1,90	4,12
33	0,20	< 0,1	0,55	< 0,1	1,13	1,74
34	9,48	0,67	2,14	0,56	4,94	7,17
35	0,42	< 0,1	0,79	0,26	3,38	6,78
36	0,14	< 0,1	0,70	0,44	1,98	13,3
37	1,27	0,37	2,56	0,38	4,61	46,3
38	0,97	0,21	2,09	0,46	4,86	19,5
39	1,65	0,35	6,61	1,04	13,1	3,85
40	0,48	< 0,1	1,30	0,38	3,26	11,2
41	2,07	0,51	1,94	0,49	3,67	5,68
42	1,67	0,13	1,12	0,39	3,51	1,59
min	n.d.	n.d.	0,47	n.d.	0,42	0,74
max	9,48	4,45	21,04	3,69	46,90	390,26
medián	0,41	0,19	1,15	0,38	2,57	4,49



Obrázek 5. Profil PFAS v čistírenských kalech.

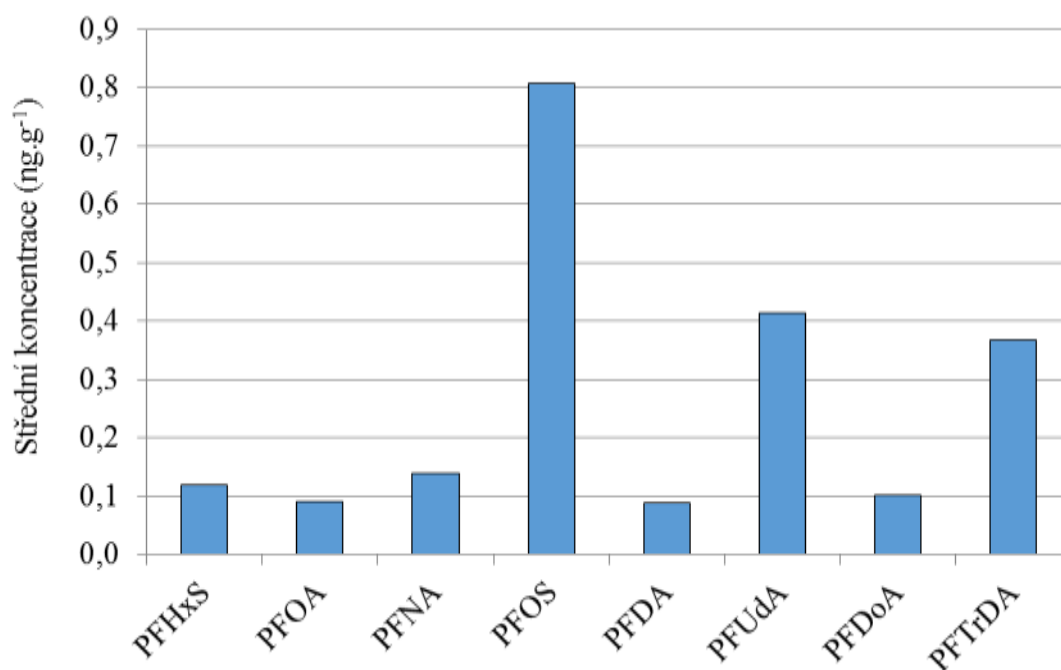
3.2.4.2 Krmiva

Bylo analyzováno 30 vzorků krmiv, z toho 12 kompletních krmiv pro hospodářská zvířata (KK_HZ), 10 kompletních krmiv pro domácí zvířata (KK_DZ), 4 doplňková krmiva pro domácí zvířata (DK_DZ) a 4 krmné suroviny rybí moučky (KS_RM). Vzorky byly odebrány v rámci úřední kontroly krmiv. Výsledné koncentrace PFAS jsou shrnuty v tabulce 6.

Ve vzorcích kompletních a doplňkových krmiv nebyly PFAS téměř vůbec přítomny. Pouze v několika vzorcích byl nalezen PFOS a PFOA v nízkých koncentracích, ale většina analytů nebyla vůbec detekována nebo byly pod LOQ. Ve vzorcích rybích mouček byly určité nálezy, což souhlasí s poznatky nalezenými v literatuře 10. Nejčastěji byl detekován PFOS (0,10 ng.g⁻¹ až 2,77 ng.g⁻¹ a dále PFUdA (0,20 ng.g⁻¹ až 0,59 ng.g⁻¹) a PFTrDA (0,28 ng.g⁻¹ až 0,62 ng.g⁻¹). Tyto tři analyty byly přítomny ve všech testovaných vzorcích rybích mouček. Profil PFAS stanovený v rybích moučkách je uveden na obrázku 6.

Tabulka 6. Koncentrace sledovaných PFAS ve vzorcích krmiv (ng.g⁻¹ původní hmoty).

	č. vz.	PFHxS	PFOA	PFNA	PFOS	PFDA	PFUdA	PFDS	PFDoA	PFTrDA	PFTeDA	PFHxDA	PFODA
KK_HZ	1	n.d.	< 0,07	< 0,05	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2	n.d.	0,077	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,04	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,04	< 0,08
	3	n.d.	< 0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,04	< 0,08
	4	n.d.	< 0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,04	< 0,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,04	n.d.
	6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,08
	7	n.d.	< 0,07	n.d.	0,135	n.d.	< 0,05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,04	< 0,08
	8	n.d.	< 0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,04	< 0,08
	9	n.d.	< 0,07	n.d.	0,041	n.d.	n.d.	< 0,04	< 0,04	n.d.	n.d.	< 0,04	< 0,08
	10	n.d.	< 0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,08
	11	n.d.	n.d.	< 0,05	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	12	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,03	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,04	n.d.	n.d.	< 0,04	n.d.
KK_DZ	1	n.d.	0,130	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,04	n.d.	n.d.	< 0,04	< 0,08
	2	n.d.	< 0,07	n.d.	< 0,03	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,04	n.d.	n.d.	< 0,04	< 0,08
	3	n.d.	< 0,07	< 0,05	< 0,03	< 0,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,08
	4	n.d.	< 0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,08
	5	n.d.	< 0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,04	n.d.	n.d.	< 0,04	< 0,08
	6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,04	< 0,08
	7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,04	n.d.	n.d.	< 0,04	< 0,08
	8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,08
	9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,08
	10	n.d.	< 0,07	n.d.	n.d.	< 0,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,04	n.d.
DK_DZ	1	< 0,04	0,093	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,04	n.d.	n.d.	< 0,04	< 0,08
	2	n.d.	< 0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,04	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,08
	3	n.d.	< 0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,08
	4	n.d.	< 0,07	n.d.	0,043	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,04	n.d.	n.d.	< 0,04	< 0,08
KS_RM	1	n.d.	0,093	0,072	0,722	n.d.	0,202	n.d.	< 0,04	0,281	n.d.	n.d.	n.d.
	2	< 0,04	0,082	0,169	2,768	0,090	0,586	n.d.	0,165	0,623	n.d.	< 0,04	n.d.
	3	0,120	0,092	0,139	0,891	n.d.	0,426	n.d.	0,065	0,331	n.d.	< 0,04	n.d.
	4	n.d.	n.d.	n.d.	0,100	n.d.	0,401	n.d.	0,103	0,407	n.d.	< 0,04	< 0,08



Obrázek 6. Střední koncentrace PFAS ve vzorcích rybí moučky.

4 Závěr

Pro účely stanovení vybraných PFAS v komplexních matricích bylo testováno několik metod přípravy vzorku. Pro čistírenské kaly byla nejvhodnější extrakční technikou Powleyho metoda s extrakcí do methanolu, která poskytuje nejčistší extrakty, je dostatečně účinná, s nejnižším matricovým efektem a minimálním pozadím. Pro vzorky krmiv vykazovala nejčistší extrakty, nejvyšší výtěžnost nativních PFAS a nejnižší matricové efekty Powleyho metoda s extrakcí do acetonitrilu. Všechny vzorky byly analyzovány metodou UPLC-MS/MS s využitím systému Xevo TQ MS.

Nejčastěji se vyskytujícím analytem ve vzorcích kalů byl PFOS, který byl spolu s PFDA a PFOA přítomen ve všech testovaných vzorcích. Ve vzorcích krmiv byl opět nejčastěji detekován PFOS, který byl v nízkých koncentracích přítomen v 7 vzorcích. Dále byla v nízkých koncentracích detekována PFOA v 6 vzorcích. Ostatní analyty byly ve většině případu pod LOQ nebo nebyly detekovány vůbec. Ve všech vzorcích rybích mouček byly nalezeny také analyty PFUdA a PFTrDA. Výsledky screeningu krmiv poukázaly na velice nízkou kontaminaci těchto komodit perfluoroalkylovými sloučeninami.

5 Seznam použitých zkratk

PFAS – per(poly)fluoroalkylové sloučeniny (per(poly)fluoroalkyl substances)

PFSA – perfluoroalkansulfonáty (perfluoroalkane sulfonates)

PFCA – perfluorokarboxylové kyseliny (perfluorocarboxylic acids)

PFOS – perfluorooktansulfonová kyselina (perfluorooctan sulfonic acid)

PFHxS – perfluorohexansulfonová kyselina (perfluorohexane sulfonic acid)

PFDS – perfluorodekansulfonová kyselina (perfluorodecane sulfonic acid)

PFHxA – perfluorohexanová kyselina (perfluorohexanoic acid)

PFHpA – perfluoroheptanová kyselina (perfluoroheptanoic acid)

PFOA – perfluorooktanová kyselina (perfluorooctanoic acid)

PFNA – perfluorononanová kyselina (perfluorononanoic acid)

PFDA – perfluorodekanová kyselina (perfluorodecanoic acid)

PFUnA – perfluoroundekanová kyselina (perfluoroundecanoic acid)

PFDoA – perfluorododekanová kyselina (perfluorododecanoic acid)

PFTTrDA – perfluorotridekanová kyselina (perfluorotridecanoic acid)

PFTeDA – perfluorotetradekanová kyselina (perfluorotetradecanoic acid)

PFHxDA – perfluorohexadekanová kyselina (perfluorohexadecanoic acid)

PFODA – perfluorooktadekanová kyselina (perfluorooctadecanoic acid)

6 Literatura

1. VOOGT, P a M. SAEZ. Analytical chemistry of perfluoroalkylated substances. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2006, vol. 25, issue 4, s. 326-342.
2. LINDSTROM, Andrew B., et al. Polyfluorinated Compounds: Past, Present, and Future. *Environmental Science*. 2011, vol. 45, issue 19, s. 7954-7961.
3. BUCK, Robert C., et al. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: Terminology, classification, and origins. *Integrated Environmental Assessment and Management*. 2011, vol. 7, issue 4, s. 513-541.
4. Lee, P.J., et al. ACQUITY UPLC System for Quantifying Trace Levels of Perfluorinated Compounds with an ACQUITY PFC Analysis Kit, Waters Application note 720002813en, 2008.
5. Tittlemier, S.A. a Braekevelt, E. Analysis of polyfluorinated compounds in foods, *Anal Bioanal Chem*, 2011, 399, 221–227.
6. LLORCA, M., et al. Development and validation of a pressurized liquid extraction liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for perfluorinated compounds determination in fish. *Journal of Chromatography A*. 2009, vol. 1216, issue 43, s. 7195-7204.

7. STRYNAR, M., et al. LC/TOFMS and UPLC-MS/MS Methods for the Analysis of Perfluorooctanesulfonate (PFOS) and the Reduction of Matrix Interference in Complex Biological Matrices. 57th (American Society of Mass Spectrometry) Philadelphia, PA May 31st –June 4th, 2009.
8. ZHANG, Chaojie, Hong YAN, Fei LI, Xiang HU a Qi ZHOU. Sorption of short- and long-chain perfluoroalkyl surfactants on sewage sludges. *Journal of Hazardous Materials*. 2013, vol. 260, s. 689-699.
9. HIGGINS, Christopher P., et al. Quantitative Determination of Perfluorochemicals in Sediments and Domestic Sludge. *Environmental Science*. 2005, vol. 39, issue 11, s. 3946-3956.
10. MARTÍNEZ-MORAL, María Pilar a María Teresa TENA. Focused ultrasound solid–liquid extraction of perfluorinated compounds from sewage sludge. *Talanta*. 2013, vol. 109, s. 197-202.
11. SUOMINEN, K., et al. Occurrence of PCDD/F, PCB, PBDE, PFAS, and Organotin Compounds in Fish Meal, Fish Oil and Fish Feed. *Chemosphere*. 2011, vol. 85, issue 3, s. 300-306.
12. KOSUBOVÁ, P., et al. Analysis of perfluorosulfonic acids and perfluorocarboxylic acids in feed using UPLC-MS/MS. *Organohalogen Compounds*. 73/2011, s. 216-218.
13. CLERES, S., et al. Parallel pressurized solvent extraction of PCDD/PCDF, PBDE and PFC from soil, sludge, and sediment samples. *Organohalogen Compounds*. 2009, vol. 71, s. 1020-1025.
14. POWLEY, Charles R., et al. Matrix Effect-Free Analytical Methods for Determination of Perfluorinated Carboxylic Acids in Environmental Matrixes. *Analytical Chemistry*. 2005, vol. 77, issue 19, s. 6353-6358.
15. HRÁDKOVÁ, P., et al. A fast and simple procedure for determination of perfluoroalkyl substances in food and feed: a method verification by an interlaboratory study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013, vol. 405, issue 24, s. 7817-7827.
16. LACINA, O., et al. Simple, high throughput ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry trace analysis of perfluorinated alkylated substances in food of animal origin: Milk and fish. *Journal of Chromatography A*. 2011, vol. 1218, issue 28, s. 4312-4321.
17. 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
18. PERKOLA, Noora a Pirjo SAINIO. Survey of perfluorinated alkyl acids in Finnish effluents, storm water, landfill leachate and sludge. *Environmental Science and Pollution Research*. 2013, vol. 20, issue 11, p. 7979-7987.

Stanovení pyrrolizidinových alkaloidů v rostlinném materiálu

Martina Čumová, Petra Kosubová, Marie Mrkvicová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř,
Regionální oddělení Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
martina.cumova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Pyrrolizidinové alkaloidy jsou sekundární metabolity rostlin, které mohou být toxické pro lidi a zvířata, a proto by se měl výskyt těchto látek sledovat jak v potravinách, tak v krmivech. Laboratoř zavedla metodu pro stanovení pěti vybraných pyrrolizidinových alkaloidů v kompletní krmné směsi a v surovinách určených pro jejich výrobu. Metoda je vhodná nejen ke screeningu, ale i ke kvantitativnímu stanovení pyrrolizidinových alkaloidů.

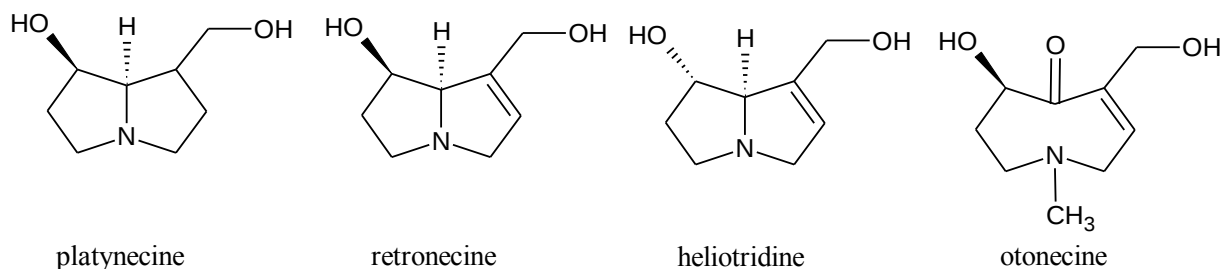
2 Teoretická část

2.1 Úvod

Alkaloidy jsou přírodní látky produkované některými organismy z řad živočichů, hub, bakterií a řas. Tyto látky sice nejsou nezbytné pro životaschopnost organismu, který si je vytváří, ale pomáhají mu k jeho přežití. Alkaloidy se člení podle svých typických strukturních charakteristik do několika skupin. Mezi nejznámější skupiny alkaloidů patří například tropanové (např. atropin), purinové (např. kofein) a ergotové alkaloidy (např. ergotamin). V poslední době vzrůstá také zájem o skupinu pyrrolizidinových alkaloidů (PAs), které jsou explicitně uvedeny ve směrnici 2002/32/ES o nežádoucích látkách krmivech. Na základě požadavků EU by se měl jejich výskyt v potravinách a krmivech sledovat.

PAs jsou sekundární metabolity rostlin, které jsou syntetizovány za účelem tvorby vlastního obranného mechanismu (např. proti hmyzu a býložravcům). V současné době se hovoří o více

než 350 chemických heterocyklických individuí, které ve své struktuře obvykle obsahují následující necinové báze, jejichž struktury jsou na obr. 1.



Obrázek 1. Typické necinové báze vyskytující se v chemické struktuře PAs [1].

Množství rostlin obsahujících PAs zaujímá přibližně 3 % z celosvětové rostlinné říše [2, 3]. Nejčastější výskyt PAs je pozorován u rostlin z čeledí Brtnákovitých (Boraginaceae), Hvězdnicovitých (Asteraceae) a Bobovitých (Fabaceae). V České republice PAs obsahuje např. heřmánek lékařský (*Matricaria recutita*), ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*), kostival lékařský (*Symphytum officinale*), starček přímětník (*Senecio jacobaea*) a další byliny, které se u nás běžně používají pro léčení onemocnění. PAs jsou například i v čajích a jiných rostlinách, které se používají v tradiční čínské medicíně. Velice často jsou PAs součástí doplňků stravy vyrobených z rostlin, které tyto alkaloidy obsahují.

Rostliny s vysokým obsahem pyrrolizidinových alkaloidů mohou představovat reálné riziko pro zdraví lidí i zvířat. PAs mají hepatotoxický, genotoxický a pneumotoxický účinek. Vedle toho se jedná o vážné karcinogeny a mutageny [4].

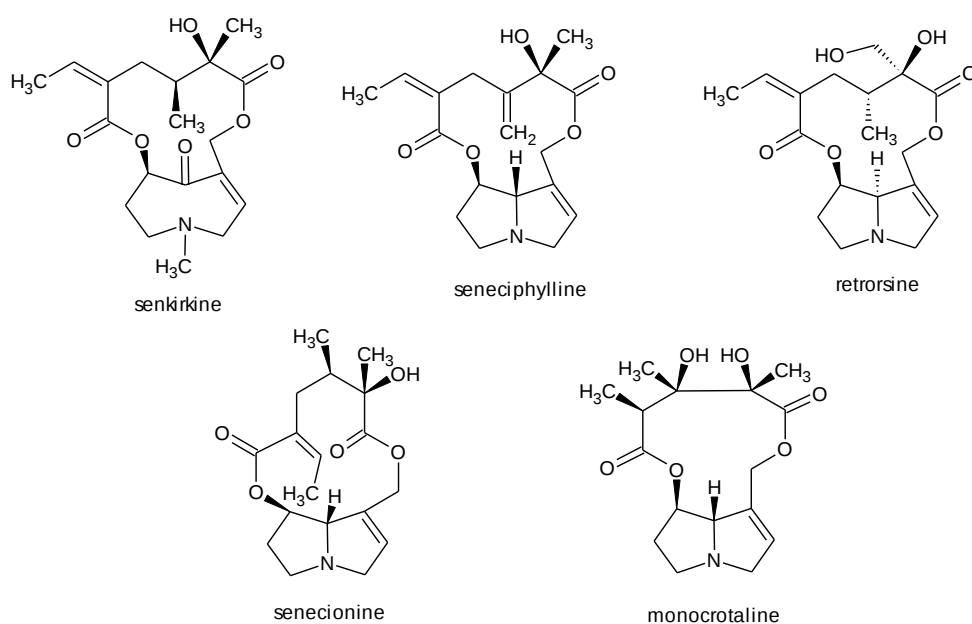
Požitím zmíněných rostlin, jejich semen nebo výluhů může dojít k přímé expozici organismu těmto nežádoucím látkám. Sekundární expozice může nastat v případě požití produktů živočišné výroby (např. mléko, maso, vejce, med), do kterých byly tyto látky nebo jejich metabolity distribuovány [2]. Avšak dosud není zaznamenán žádný případ otravy, který byl způsoben právě sekundární expozicí.

Různé organismy jsou k PAs různě citlivé. Zatímco malí přežvýkavci (kozy, ovce) nebo hlodavci jsou k působení PAs relativně odolní, naopak koně, prasata, skot, drůbež a lidé jsou velmi citliví [5, 6, 7]. Nebezpečím pro hospodářská zvířata jsou rostliny s obsahem PAs, které se za určitých okolností mohou rozmnožit v lučních porostech a dostat se do zelené píče, sena a jiných krmiv. Proto je nezbytné zavést analytickou metodu, která umožní kontrolovat výskyt PAs v krmivech.

Cílem práce bylo vyvinout metodu pro stanovení PAs v krmivech a krmných surovinách. Vyvinutá metoda má být rychlá, s minimálními náklady a s možností aplikace na rozdílné matrice (kompletní krmivo, zelená píce, med). Výhodou dané metody má být také možnost jejího rozšíření o další sledované analyty podle případných požadavků Evropské unie.

Pro extrakci analytů z matrice byla vybrána modifikovaná metoda QuEChERS [8], která se v různých obměnách často používá pro analýzu pesticidů, mykotoxinů, alkaloidů a jiných látek. Metoda zahrnuje extrakci do acetonitrilu, přečištění ve formě vysolení analytů do acetonitrilové fáze a separaci vodné fáze. Kvantitativní stanovení obsahu PAs probíhá pomocí ultra-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UPLC-MS/MS). Metoda byla cíleně nastavena tak, aby bylo v případě potřeby možno přidat tyto látky do již zavedené multimetody pro sledování mykotoxinů.

Obsah PAs v krmivech není doposud legislativně limitován, a proto se výběr PAs řídil požadavky připravovaného mezilaboratorního porovnávacího testu organizovaného JRC IRMM a dostupností standardů. Bylo vybráno těchto 5 Pas: monocrotaline, retrorsine, senecionine, seneciophylline a senkirkine, které byly validovány pro 4 různé matrice.



Obrázek 2. Chemické struktury vybraných pyrrolizidinových alkaloidů.

3 Praktická část

3.1 Chemikálie

Methanol, čistota LC-MS, mravenčan amonný pro MS a kyselina mravenčí, čistota LC-MS (Fluka). Ultra čistá voda připravena Milli-Q systémem (Millipore Corporation). Acetonitril, čistota HPLC (Sigma Aldrich). Odpařené standardy PAs (Biopure Referenzsubstanz GmbH). Alkaloidy byly rozpuštěny v methanolu a uchovávány při – 20 °C.

3.2 Přístroje a pomůcky

Ultraúčinný kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem, ACQUITY UPLC-TQ MS Xevo (Waters, USA), vybavený UPLC kolonou, ACQUITY UPLC BEH C18, 50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters, USA) a předkolonou, ACQUITY BEH C18 VanGuard, 5 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters, USA). Analytické váhy, ultrazvuková lázeň, horizontální třepačka s rychlostí do 300 kmitů/min, centrifuga s rozsahem otáček nad 3000 ot/min, plastové centrifugační zkušavky se šroubovacím víčkem o objemech 15 ml a 50 ml, centrifugační zkušavka Eppendorf o objemu 1,5 ml, stříkačkové filtry nylonové o velikosti pórů 0,2 μm (Labicom, Česká republika), skleněné vialky o objemu 2 ml.

3.3 Postup přípravy vzorku

Homogenní vzorek se naváží do 50ml plastové centrifugační zkušavky. K matici se přidá 10 ml 0,1% HCOOH. Extrakce se provede 10 ml acetonitrilu třepáním 20 min na horizontální třepačce při alespoň 150 kmit/min. Poté se přidá pevná směs solí (MgSO₄ a NaCl). Směs se opět intenzivně třepe. Vzorek se odstředí 5 min při 5000 ot/min, vrchní acetonitrilová vrstva se převede do 15ml plastové zkušavky a nechá se vymrazit. Vymražený extrakt se opět odstředí 5 min při 3900 ot/min. Přesně 0,5 ml acetonitrilové vrstvy se převede do zkušavky Eppendorf, poté se doplní vodou na celkový objem 1 ml. Po promíchání se roztok zfiltruje přes membránový filtr nebo se odstředí při 12000 ot/min a převede do vialky.

3.4 UPLC-MS/MS stanovení

Extrakty převedené do 2ml vialky se analyzují metodou UPLC-MS/MS ve vhodné sekvenci vzorků a standardů. Kompletní nastavení přístroje a podmínky měření jsou uvedeny v tabulkách 2 a 3. Před analýzou reálných vzorků se ověří citlivost systému analýzou nejnižšího kalibračního bodu a zároveň stabilita retenčního chování v daném chromatografickém systému. Selektivita analýzy je zajištěna využitím MRM módu při MS detekci. Podmínky měření jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

Tabulka 1. Chromatografické podmínky UPLC stanovení.

UPLC – Acquity Waters	
Kolona	ACQUITY UPLC BEH C18 (50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm)
Předkolona	ACQUITY UPLC BEH C18 (5 mm × 2,1 mm × 1,7 μm)
Nástřik	2,5 μl
Slabý promývací roztok	Deionizovaná voda/methanol (90/10)
Silný promývací roztok	Methanol
Mobilní fáze A	0,1% kyselina mravenčí v deionizované vodě
Mobilní fáze B	0,1% kyselina mravenčí a 1mM mravenčan amonný v methanolu
Průtok mobilní fáze	0,4 ml/min
Gradient mobilní fáze	0 min (10% B) – 0,3 min (20 % B) – 4,5 min (99,5 % B) – 7 min (99,5 %B) – 7,1 min (10% B) – 10 min (10% B)

Tabulka 2. Podmínky stanovení pro Xevo TQ MS Waters.

Pyrrolizidinový alkaloid	RT (min)	Prekursor ion	CV (eV)	Produktový ion 1	CE (eV)	Produktový ion 2	CE (V)
Senecionine	1,51	336.2	40	94	30	120	30
Retrorsine	1,18	352.2	40	94	33	120	32
Seneciphylline	1,27	334.2	40	94	28	120	23
Monocrotaline	0,43	326.2	40	94	30	120	30
Senkirkine	1,82	366.2	40	122	33	168	30
Teplota iontového zdroje 150 °C, teplota sušícího plynu 450 °C, průtok sušícího plynu 700 l/h, průtok „cone gas“ 45 l/h, průtok kolizního plynu 0,18 ml/min, napětí na kapiláře 3 kV, ionizace elektrosprejem v pozitivním modu							

4 Výsledky a diskuse

4.1 Validace stanovení pyrrolizidinových alkaloidů

Pro validaci stanovení 5 PAs byly použity čtyři matrice: vojtěška, mléčná krmná směs, kompletní krmná směs pro prasata a med; které byly obohaceny na dvou koncentračních hladinách. Obohacení bylo provedeno v 6 opakováních pro každou matici zvlášť. V rámci validace byla hodnocena citlivost, správnost, přesnost, selektivita a rozšířená nejistota. Pro všechny testované analyty byla splněna validační kritéria podle rozhodnutí komise (2002/657/ES). Mez stanovitelnosti LOQ, byla stanovena podle požadavků SANCO/12495/2011. Mezi stanovitelnosti byla tedy nejnížší validovaná hladina, tzv. reportovací limit (RL), který byl pro všechny parametry $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$, a to ve všech validovaných maticích. Ostatní validační data jsou uvedena v tabulkách 3 a 4. Kvantifikace obsahu PAs byla provedena s využitím matricové kalibrace.

Tabulka 3. Limity detekce a linearita pro PAs v různých maticích.

PA	Kalibrační rozsah	Solvent		Mléčná krmná směs		Kompletní krmná směs		Vojtěška		Med	
	$[\mu\text{g.kg}^{-1}]$	LOD $[\mu\text{g.kg}^{-1}]$	R^2	LOD $[\mu\text{g.kg}^{-1}]$	R^2	LOD $[\mu\text{g.kg}^{-1}]$	R^2	LOD $[\mu\text{g.kg}^{-1}]$	R^2	LOD $[\mu\text{g.kg}^{-1}]$	R^2
Senecionine	1 - 1000	0,2	0,9993	0,2	0,9982	0,4	0,9982	0,5	0,9993	0,9	0,9995
Retrorsine	1 - 1000	0,3	0,9992	0,2	0,9973	0,7	0,9955	0,5	0,9995	1,0	0,9993
Seneciphylline	1 - 1000	0,2	0,9986	0,3	0,9989	0,4	0,9985	0,8	0,9992	1,0	0,9994
Monocrotaline	1 - 1000	0,6	0,9983	0,4	0,9997	0,4	0,9962	0,7	0,9972	0,8	0,9997
Senkirkine	1 - 1000	0,2	0,9986	0,2	0,9994	0,3	0,9991	0,2	0,9995	0,5	0,9992

Tabulka 4. Výtěžnost a přesnost metody pro vzorky čtyř různých matic obohacených na dvou validačních hladinách.

	Výtěžnost (RSD) (%); n = 3							
	Mléčná krmná směs		Kompletní krmná směs		Vojtěška		Med	
	$5 \mu\text{g.kg}^{-1}$	$100 \mu\text{g.kg}^{-1}$	$5 \mu\text{g.kg}^{-1}$	$100 \mu\text{g.kg}^{-1}$	$5 \mu\text{g.kg}^{-1}$	$100 \mu\text{g.kg}^{-1}$	$5 \mu\text{g.kg}^{-1}$	$100 \mu\text{g.kg}^{-1}$
Senecionine	85 (5,9)	95 (1,5)	90 (3,2)	98 (0,5)	89 (7,0)	92 (3,0)	89 (5,0)	90 (2,2)
Retrorsine	77 (11,5)	82 (1,8)	85 (5,0)	83 (3,2)	87 (8,9)	81 (1,2)	79 (5,1)	78 (3,1)
Seneciphylline	81 (6,2)	94 (1,2)	82 (6,7)	95 (1,7)	92 (4,7)	92 (1,0)	82 (7,9)	87 (3,9)
Monocrotaline	94 (7,4)	94 (2,1)	72 (7,1)	83 (2,9)	91 (10,6)	80 (1,1)	83 (6,2)	86 (1,5)
Senkirkine	91 (1,5)	97 (0,5)	90 (1,7)	97 (1,5)	88 (2,9)	93 (0,9)	92 (1,5)	97 (3,3)

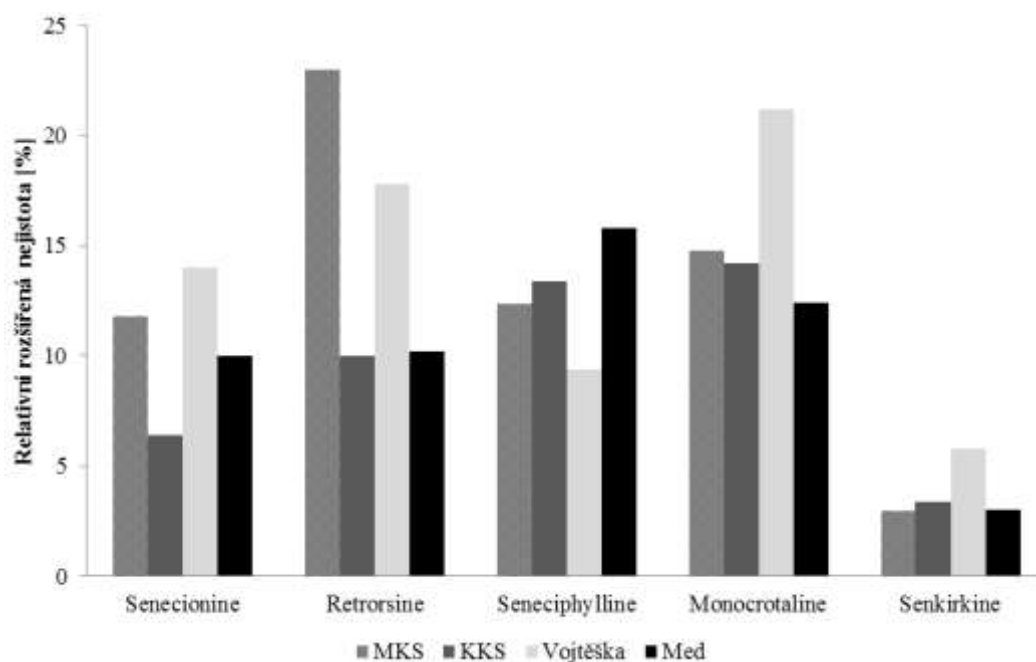
Dalším důležitým validačním parametrem je selektivita stanovení. Selektivita se definuje jako schopnost metody selektivně změřit validovanou vlastnost, tzn., že vliv potenciálních interferentů je nevýznamný. V případě LC-MS analýz jsou pozorovány matricové efekty (ME), což znamená ovlivnění signálu analytu přítomností matrice. V rámci validace byly sledovány ME v extraktech všech matic. Matriční efekt byl počítán dle následující rovnice: $ME = \text{směrnice kalibrační křivky v matrici} / \text{směrnice kalibrační křivky v rozpouštědle} \cdot 100$. Výsledné porovnání matričních efektů je uvedeno v tabulce 5. Ze získaných údajů vyplývá, že matrice má rozdílný vliv na jednotlivé analyty.

Tabulka 5. Porovnání matricových efektů v různých maticích při LC-MS/MS detekci [%].

Alkaloid	MKS	KKS	Vojtěška	Med
Senecionine	104	97	88	106
Retrorsine	100	79	91	101
Seneciphylline	95	102	93	109
Monocrotaline	111	111	104	92
Senkirkine	97	93	86	79

Vzhledem k variabilitě pozorovaných ME je nutné pro správnou kvantifikaci použít metodu standardního přídávku, nebo metodu s využitím matricové kalibrace.

Stanovení nejistoty vychází z vícenásobného měření matrice obohacené standardy PAs na různých hladinách. Rozšířená nejistota odpovídá směrodatné odchylce stanovených dat vynásobené faktorem pokrytí 2 (Obrázek 3). Požadavek na maximální rozšířenou nejistotu byl splněn u všech validovaných PAs.



Obrázek 3. Relativní rozšířená nejistota stanovená v různých matricích pro hladinu RL.

K identifikaci byla použita kritéria podle rozhodnutí komise (2002/657/ES) [10], tj. retenční čas (RT) a poměr sledovaných kvantifikačních a konfirmačních iontů. Povolená odchylka RT pro LC je $\pm 2,5$ %. Povolený rozsah poměrů sledovaných iontů je závislý na relativní intenzitě sledovaných iontů. Přítomnost sledované látky ve vzorku je potvrzena, pokud poměr intenzity sledovaných iontů stanovený ve vzorku odpovídá poměru stanoveného ve standardu. Identifikační kritéria validovaných PAs jsou uvedena v tabulce 6.

Tabulka 6. Identifikační kritéria.

Mykotoxin	RT (min)	Poměr iontů
Senecionine	1,51	1,83
Retrorsine	1,17	1,75
Seneciphylline	1,26	1,85
Monocrotaline	0,43	4,65
Senkirkine	1,82	0,95

Správnost metody byla ověřena při PT organizovaném JRC v roce 2012. Jednalo se o kontaminované vzorky medu a rostlin. Kvantifikace byla provedena metodou matricové

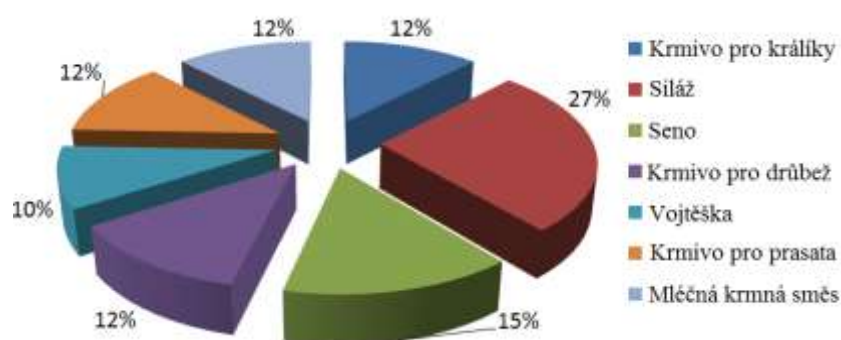
kalibrace. Ve všech vyhodnocených případech byly obsahy PAs, stanovené v tomto IRM, vyhovující.

Tabulka 7. Zajištění kvality QuEChERS metody pro stanovení PAs.

Cílové analyty	Materiál	Vztažná hodnota ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Výsledky QuEChERS ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	z-Score/výtěžnost (%)
Celkový obsah PA	Honey SNH	$85,23 \pm 3,89$	85,31	0/100
	Honey SAH	$85,18 \pm 3,88$	86,54	0,07/102
Retrorsine	Honey SNH	$20,86 \pm 0,73$	23,57	0,6/113
	Honey SAH	$20,84 \pm 0,73$	21,53	0,2/103
Seneciphylline	Honey SNH	$40,68 \pm 0,47$	36,97	-0,4/91
	Honey SAH	$40,65 \pm 0,47$	39,26	-0,2/97
Senecionine	Honey SNH	$20,52 \pm 0,55$	21,73	0,3/106
	Honey SAH	$20,51 \pm 0,55$	22,55	0,5/110

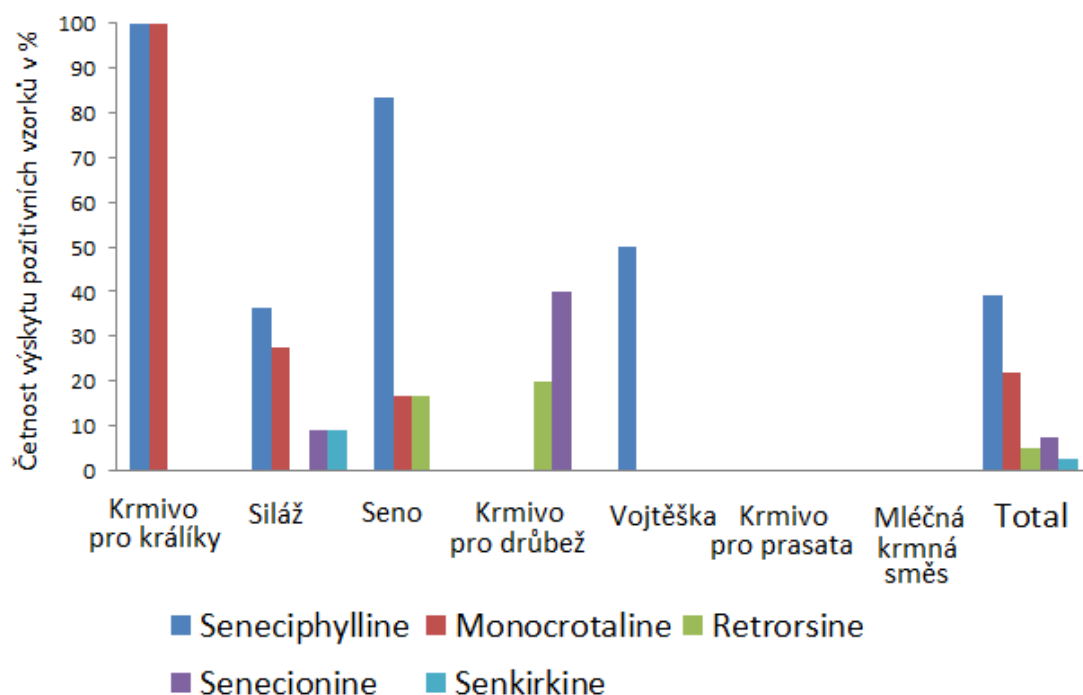
4.2 Analýza reálných vzorků

Vyvinutá metoda byla aplikována pro sledování PAs v reálných vzorcích krmiv. Ze vzorků odebraných v rámci kontroly krmiv na ÚKZÚZ bylo vybráno a testováno 41 vzorků, u nichž byla přítomnost PAs předpokládána. Zastoupení jednotlivých typů vzorků je pro přehlednost znázorněna na obrázku 4.



Obrázek 4. Skladba vzorků pro sledování PAs v krmivech a surovinách pro jejich výrobu.

Analýzou 41 vybraných krmiv byla prokázána přítomnost všech sledovaných PAs, které se v různém množství nacházely v některých testovaných materiálech. Četnost výskytu PAs je zobrazena na obrázku 5.



Obrázek 5. Četnost výskytu pozitivních nálezů PAs v krmivech.

Všechny analyzované vzorky byly kontaminovány (3 ± 1) PAs s výjimkou krmiv pro prasata a mléčných krmných směsí, které byly prosté sledovaných alkaloidů. V ostatních krmivech byly nejčastěji identifikovány alkaloidy seneciphylline a monocrotaline. Tyto dva alkaloidy byly dokonce obsaženy ve všech vzorcích krmiv pro králíky, zatímco senkirkine nebyl přítomen v žádném testovaném materiálu kromě siláže. Jediný seneciphylline byl obsažen v koncentracích překračujících $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$, zatímco ostatní sledované PAs byly v krmivech obsaženy na hladinách kolem $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ a menších.

Celkově lze shrnout, že testovaná krmiva nepředstavují pro zvířata riziko, vyplývající z přítomnosti sledovaných PAs. Nicméně vzhledem k reálným nálezům je vhodné monitorovat obsah PAs alespoň v pícech a v krmivech, která jsou z větší části pícími tvořeny (např. kompletní krmná směs pro králíky).

5 Závěr

V rámci práce byla provedena validace stanovení pěti vybraných pyrrolizidinových alkaloidů. Validované parametry splňovaly požadavky uvedené v rozhodnutí komise (2002/657/ES) a SANCO/12495/2011. Správnost metody byla ověřena při účasti mezilaboratorního porovnávacího testu na stanovení PAs v medu a rostlinném materiálu. Vyvinutá metoda je vhodná pro účely multireziduálního stanovení monocrotalinu, retrorsinu, seneciophyllinu, senkirkinu a senecioninu v krmivech a surovinách pro jejich výrobu. Metoda je navíc snadná, rychlá, finančně úsporná a lze ji rozšířit o nové analyty, jako například o ergotové alkaloidy. Výsledky analýzy krmiv, které byly testovány na přítomnost PAs, byly prezentovány na mezinárodní konferenci se zaměřením na kontrolu potravin a krmiv [11] a na studentské odborné konferenci pořádané Fakultou chemickou VUT v Brně [12].

6 Literatura

1. Fu PP, Xia Q, Lin Ge, Chou MW. 2004. Pyrrolizidine alkaloids-genotoxicity, metabolism, enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug metabolism review* 36: 1–55.
2. EFSA. (25-1-2007). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission related to pyrrolizidine alkaloids as undesirable substances in animal feed. *The EFSA Journal* 447, 1-51
3. Mulder PPJ, Beumer B, Oosterink E, Jong J. 2009. Dutch survey pyrrolizidine alkaloids in animal forage. Report 2009.018. RIKILT - Institute of Food Safety. Počet stran 45.
4. Zhou Y, Li N, Choi FF, Qiao CF, Song JZ, Li SL, Liu X, Cai ZW, Fu PP, Lin G, Xu HX. 2010. A new approach for simultaneous screening and quantification of toxic pyrrolizidine alkaloids in some potential pyrrolizidine alkaloid-containing plants by using ultra performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry. *Analytica chimica acta* 681: 33-40.
5. Cheeke PR. 1988. Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids. *Journal of animal science* 66: 2343 – 2350.
6. Mc Lean EK. 1970. The toxic actions of pyrrolizidine (Senecio) alkaloids. *Pharmacological Review*, 22: 429–483.
7. 5 WHO. (1988). Pyrrolizidine Alkaloids. *Environmental Health Criteria* 80, 1-345
8. Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stajnbaher, D., Schenck, F. J.: Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int*, 2003, vol. 96, no. 2, p. 412 – 431.
9. Rozhodnutí komise ze dne 14. srpna 2002, kterým se provádí směrnice Rady 96/23/ES, pokud jde o provádění analytických metod a interpretaci výsledků (2002/657/ES).

10. Dokument SANCO/12495/2011 – Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.
11. Bolechová, M.; Kosubová, P.; Mrkvicová, M. Determination of pyrrolizidine alkaloids in feed by UPLC-MS/ MS. Bilthoven the Netherlands: Bastiaanse Communication, 2013. s. 106 (s.)
12. Bolechová, M.; Kosubová, P., Čáslavský, J. Determination of Selected Naturally Occurring Alkaloids in Feed by UPLC-MS/ MS. *Studentská odborná konference Chemie je život 2013*. Sborník příspěvků. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. s. 236-241. ISBN: 978-80-214-4823- 0.

Bulletin Národní referenční laboratoře XIX 2015/2

Ročník: XIX, č. 2

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2015

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 39

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196