

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2008

Ročník XII, číslo 1/2008

Brno 2008

Obsah

- 1 Využití extraktorů ASE a IKA pro přípravu a čištění vzorku pro GC/MS analýzy** 1
- Pavla Tieffová, Petra Kosubová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2,
656 06 Brno
- 2 Stanovení thalia ve vzorcích rostlinného materiálu** 12
- Eva Čižmárová, Eva Fojtlová, Eva Urbánková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2,
656 06 Brno
- 3 Stanovení polyaromatických uhlovodíků (PAHs) v půdách metodou HPLC** 29
- Šárka Plhalová
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>).

Využití extraktorů ASE a IKA pro přípravu a čištění vzorku pro GC/MS analýzy

Pavla Tieffová, Petra Kosubová

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

pavla.tieffova@ukzuz.cz

petra.kosubova@ukzuz.cz

1 Úvod

Přístrojové vybavení NRL-RO Brno bylo doplněno o dva nové extraktory, kterými je možné účinně extrahovat vzorky rozpouštědlem za zvýšeného tlaku a teploty (ASE, IKA). Cílem práce bylo najít a posoudit možnosti využití těchto extraktorů, optimalizovat metody a zavést nové typy extrakce do stávajících postupů přípravy vzorků ke GC/MS analýze.

Extraktor ASE 100 je plně automatizované a programovatelné zařízení, umožňující extrakci jednoho vzorku rozpouštědlem za zvýšeného tlaku a nastavitelné teploty. Nerezové extrakční cely s vnitřním objemem 11 ml, 34 ml a 64 ml pro umístění vzorku jsou rozebíratelné. Tvoří je silnostěnný nerezový válec a šroubovací víčka s otvory pro přívod rozpouštědla. Na výstupu z cely extrakt prochází přes kovovou fritu, chráněnou celulózovým filtrem proti ucpání jemnými částicemi ze vzorku. Vzorek se smíchá s hygroskopickou křemelinou nebo bezvodým síranem sodným a objem cely se doplní inertním materiálem nebo sorbentem. Správnou volbou sorbentu a extrakčních podmínek lze získat extrakt dostatečně čistý pro přímé koncové stanovení. K extrakci lze používat organická rozpouštědla s teplotou samovznícení vyšší než 200 °C. Nelze použít např. sirouhlík, diethylether a dioxan nebo rozpouštědla na bázi vody v rozsahu pH 2 až pH 11. Extrakční cyklus je rozdělen na statickou část a na promytí cely čistým rozpouštědlem. Opakováním těchto cyklů se zvyšuje účinnost extrakce. Další kritické parametry pro vymývání látek ze vzorku a sorbentu jsou extrakční síla rozpouštědla a teplota. Změna tlaku nemá výrazný vliv, a proto u tohoto typu zařízení je tlak udržován na konstantní hodnotě 11,7 MPa. Na závěr extrakčního cyklu je cela se vzorkem profouknuta a vysušena proudem dusíku.

Výhodou tohoto zařízení je možnost spojit extrakci vzorku se současným zachycením nežádoucích koextraktů na vhodném sorbentu, umístěném do extrakční cely spolu se vzorkem (selektivní PLE).

Extraktor IKA je celoskleněné zařízení, kterým lze účinně extrahovat čtyři vzorky současně. Extrakční nádoby s rozpouštědlem jsou zasazeny do vyhřívaného kovového termobloku, který může být rychle ochlazen připojenou vodou. Vzorek se umístí do nástavce s fritou, spojí se s extrakční nádobkou a zpětným chladičem. Páry rozpouštědla procházejí přes fritu do vzorku a ten je fluidně extrahován. Po ochlazení vznikne v aparatuře podtlak a rozpouštědlo se přes fritu nasaje zpět do spodní části. Po opětovném zvýšení teploty se cyklus opakuje s čistými parami rozpouštědla a extrakt se koncentruje ve spodní nádobce. Počet extrakčních cyklů, teplota vyhřívání a doba potřebná pro jednotlivé kroky se nastaví v ovládacím programu pro toto zařízení.

2 Materiál a metody

2.1 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, dichlormetan, chloroform, isooktan,

Florisil 0,15mm až 0,25 mm, Merck; aktivace 4 hod/650 °C, reaktivace 5 hod/150 °C,

Silikagel 100/resp. 60 (0,063 mm až 0,200 mm), Merck; aktivace 12 hod/150 °C,

Síran sodný, aktivace 6 hod při 550 °C,

Spe-ed Matrix, Applied Separations,

Mořský písek, vyžíhaný 12 hodin při 550 °C,

Vnitřní standardy PCB 30, PCB 155, ¹³C₁₂-4,4'-DDE, ¹³C₆-lindan, Absolute Standards,

Směsné standardy CEN PCB MIX1, Supelco; 10 µg/ml heptanu,

Pesticide MIX13 Dr. Ehrenstorfer; 10 µg/ml cyklohexanu,

Standardní referenční materiál krmná směs CRM 115, BCR,

Standardní referenční materiál čistírenský kal IMEP 21, IRMM,

Interní referenční materiál sediment SETOC 764, WEPAL.

2.2 Přístroje a pomůcky

Plynový chromatograf Varian 3800 GC, kapilární kolona DB5-MS (J&W Scientific); (60 m × 0,25 mm × 0,25 µm).

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 270 °C. Nosný plyn He 5.0, průtok 1 ml/min.

Hmotnostní spektrometr Varian 1200 MS, umožňující tandemovou hmotnostní spektrometrii. EI ionizace při 70 eV. Teplota (iontový zdroj/spojení GC-MS) 200/275 °C. Kolizní plyn Argon 4.6, tlak 2,2 mTorr, šířka m/z prekurzoru/produktů 0,7/1,0.

Sestava pro gelovou permeační chromatografii (GPC): HP 1050 pumpa, nástřikový ventil Rheodyne (model 7725i) s přeplňovací smyčkou (1 ml), separační kolona (8 mm × 500 mm), náplň Bio-Beads S-X3 200-400 mesh, mobilní fáze chloroform, průtok 0,6 ml/min.

Sběrač frakcí Gilson FC 203B, sběr PCB/OCP frakce mezi 20. min. až 34. min. Teflonové filtrační disky 30 mm × 0,45 μm.

Rotační vakuová odparka (RVO),

Muflová pec,

Ultrazvuková lázeň,

Laboratorní sklo.

2.3 Pracovní postup

Tyto pracovní postupy jsou doplněním standardního operačního postupu SOP 30 (1).

2.3.1 ASE extrakce PCB/OCP ze vzorků krmiv s vysokým obsahem tuku (SOP 30, kapitola 5.2.2-A)

Do 34ml extrakční cely se vloží filtr, 6 g florisilu a rozetřená směs 2 g vzorku, 20 ng vnitřních standardů (PCB 30, PCB 155, $^{13}\text{C}_{12}$ -4,4'-DDE a $^{13}\text{C}_6$ -lindanu), 4 g Na_2SO_4 a další 4 g florisilu. Zbývající prostor se vyplní vyžíhaným pískem, cela se uzavře šroubovacím víčkem a vloží do přístroje. Nastaví se příslušný extrakční program a spustí se proces. Získaný extrakt se převede do 100ml baňky, odpaří pomocí RVO na objem 1 ml až 2 ml, převede se do 2ml vialky, přidá se 0,2 ml isooktanu, odpaří se mírným proudem dusíku na objem asi 0,2 ml. Převede se automatickou pipetou do insertu o objemu 0,25 ml a vloží se do vialky.

Extrakční program (rybí moučky)

Cela 34 ml, extrakční rozpouštědlo 15% DCM v hexanu, T = 40 °C; 2 cykly,

Time (static/purge) = 600/20 s, Flush = 150 %.

Celková doba extrakce 28 minut, objem eluátu přibližně 80 ml.

2.3.2 ASE extrakce PCB ze vzorků čistírenských kalů (SOP 30, kapitola 5.2.2-B)

Do 34ml extrakční cely se vloží filtr, 6 g florisilu a rozetřená směs 2,5 g vzorku, 4 g florisilu, 2 g silikagelu, 1 g křemelinu a 0,5 ml roztoku vnitřního standardu (50 ng PCB 30 a PCB 155). Objem cely se doplní síranem a křemelinou, uzavře se šroubovací víčko a cela se vloží do přístroje.

Nastaví se program a spustí se start. Po skončení extrakce se vloží promývací cela a systém se 2 × propláchne čistým rozpouštědlem. Získaný extrakt se převede do 100ml baňky, odpaří pomocí RVO téměř k suchu, odparek se rozpustí v chloroformu, přefiltruje se přes teflonový disk do 4ml vialky a doplní se chloroformem do 4 ml. Vzorek je připraven na dočištění metodou GPC.

Extrakční program (čistírenské kaly) Cela 34 ml, extrakční rozpouštědlo 15% DCM v hexanu, T = 100 °C; 2 cykly, Time (static/purge) = 600/40 s, Flush = 120 %.

Celková doba extrakce 30 minut, objem eluátu přibližně 85 ml.

3 Výsledky a diskuse

Při optimalizaci extrakce požadovaných analytů ze vzorku byly odzkoušeny postupy uvedené v aplikačních listech a v návodu k ASE 100 (2) a v publikovaných studiích (3, 4, 5, 6) o PLE (pressurized liquid extraction).

3.1 ASE extrakce krmiv

Hlavním cílem bylo nalézt podmínky pro jednokrokovou přípravu vzorku krmiv pro GC/MS analýzu PCB a OCP. Základní nastavení vycházelo ze studie J. L. Gomez-Arizy (7), který optimalizoval selektivní PLE pro extrakci polychlorovaných bifenylů z biotických materiálů (ryby, vejce, škeble).

Kritickým faktorem je teplota extrakce. S jejím zvyšováním roste výtěžnost sledovaných analytů, ale zároveň i množství uvolněného tuku. Optimalizace byla provedena na vzorku krmné suroviny - rybí moučky s obsahem sledovaných látek pod mezí stanovitelnosti. Vzorek byl obohacen přídatkem směšného standardu na koncentrační hladině 10 ppb až 20 ppb. Byl ověřen vliv extrakčního času, eluční síly rozpouštědla a teploty na výtěžnost analytů a eluci tuku. Extrakty s vyšším podílem tuku bylo nutné před koncovou GC/MS analýzou ještě přečistit metodou GPC.

Tabulka 1: Vliv extrakční síly rozpouštědla na výtěžnost SPLE

Rybí moučka	Výtěžnost (%)			
SPLE (florisil)	T = 40 °C, extrakce 2 × 10 min			
GPC	ne	ne	ano	ano
% DCM v hexanu	15	30	50	100
PCB - indikátorové ^{a)}	99	120	115	107
OCP - základní ^{b)}	100	94	97	99
OCP - rozšiřující ^{c)}	75	74	83	73
OCP - kritické ^{d)}	27	37	36	29
^{a)} PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180 ^{b)} HCB, α -, β -, γ -, δ -HCH, o,p'-, p,p'-DDE, DDD, DDT ^{c)} HEPT, HEPX-A, B, oxychlordan, cis-/trans-chlordan, aldrin, dieldrin, endrin, isodrin, α -, β -endosulfan, mirex methoxychlor ^{d)} endrin, β -endosulfan				

Pro PCB a základní skupinu OCP byla dostatečná účinnost extrakce již při použití 15 % DCM. Pro polárnější látky skupiny OCP při dané teplotě nebylo dosaženo uspokojivé výtěžnosti ani pro 100 % DCM. Vliv rostoucí eluční síly rozpouštědla nebyl rozhodující, jako optimální byl vyhodnocen 15 % DCM v hexanu.

Tabulka 2: Vliv extrakčního času na výtěžnost SPLE pro OCP

Rybí moučka	Výtěžnost (%)		
SPLE (florisil)	T = 40 °C, 15 % DCM v hexanu		
Počet cyklů × čas	2 × 10 min	3 × 10 min	3 × 15 min
HEPT, HEPX-A, B	88	88	89
cis/trans/oxy-chlordan	84	85	85
Drinové sloučeniny	75	74	80
Endosulfany	66	61	70
Methoxychlor	113	125	117
Mirex	102	101	103
OCP - kritické ^{a)}	36	28	38
^{a)} endrin, β -endosulfan			

Počet extrakčních cyklů a trvání statické fáze také nebylo rozhodujícím faktorem pro zvýšení účinnosti eluce pro žádnou ze skupin sledovaných parametrů. Ve shodě s literaturou bylo zvoleno nastavení extrakce se dvěma statickými cykly po 10 minutách.

Tabulka 3: Vliv teploty extrakce na výtěžnost SPLE pro OCP

Rybí moučka	Výtěžnost (%)			
	15 % DCM v hexanu		100 % DCM	
SPLE (florisil), 2 × 10 min				
GPC	ne	ano	ano	ano
Teplota (°C)	40	60	100	100
HEPT, HEPX-A, B	71	99	95	101
cis/trans/oxy-chlordan	104	107	111	101
Drinové sloučeniny	49	56	92	90
Endosulfany	0	0	44	101
Methoxychlor	0	0	0	111
Mirex	95	95	95	102
OCP - kritické ^{a)}	0	0	19	75
^{a)} endrin, β-endosulfan				

Pro všechny sledované látky s výjimkou drinových sloučenin, endosulfanu a methoxychloru je dostačující extrakční teplota 40 °C, při které je množství uvolněného tuku minimální a extrakt po zakoncentrování lze přímo použít pro koncovou analýzu.

Z porovnání výsledků v tabulkách 2 a 3 vyplývá vysoká variabilita výtěžnosti pro skupinu drinových OCP (aldrin, dieldrin, endrin, isodrin), endosulfanů a methoxychloru. Důvodem může být i to, že experimenty pro stanovení vlivu extrakčního času a teploty byly provedeny s různými vzorky rybí moučky. Obsah tuku ve vzorku má výrazný vliv na výtěžnost SPLE za jinak stejných podmínek.

Pro kritické analyty se podařilo dosáhnout uspokojivé výtěžnosti při teplotě extrakce 100 °C a 100 % DCM, ale z extraktu bylo nutné odstranit tuk dočištěním na GPC. Pro tyto látky je lepší použít způsob extrakce vytřepáním vzorku do vhodného rozpouštědla (LSE). Postup s vytřepáním do ethylacetátu byl testován v rámci validace připravované evropské normy pro stanovení PCB/OCP v krmivech.

V tabulce 4 jsou uvedeny výtěžnosti extrakce za optimalizovaných podmínek pro vzorky krmiv s obsahem tuku 1 % až 15 %. Pro extrakci vzorků s vysokým obsahem tuku (rybí moučky, řepkové expelery) byla optimální teplota 40 °C, pro krmné suroviny s nízkým obsahem tuku (sušené mléko,

pojiva, luštěníny) je třeba použít vyšší teplotu, 60 °C. Rozšířená nejistota stanovení pro PCB; HCB; HCHs; DDTs při obohacení na úrovni 10 ppb až 20 ppb byla (15; 23; 10; 13) %.

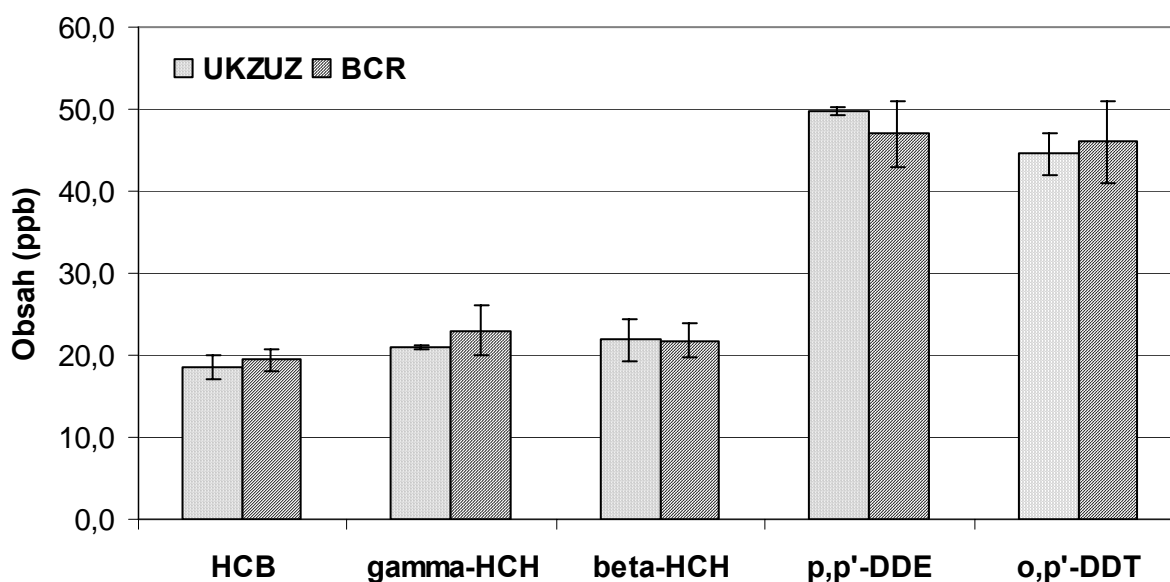
Tabulka 4: Ověření optimalizovaných podmínek SPLE pro krmiva s různým obsahem tuku

Krmná směs	Výtěžnost (%)		
	15% DCM v hexanu, 2 × 10 min		
Teplota (°C)	60	40	40
Tuk (%)	1,00	8,55	14,86
PCBs ^{a)}	105	99	100
HCB	91	101	96
HCHs ^{b)}	91	98	100
DDTs ^{c)}	103	100	94

^{a)} PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180
^{b)} α -, β -, γ -, δ -HCH
^{c)} o,p'-, p,p'-DDD, DDE, DDT

Optimalizované podmínky pro SPLE byly ověřeny analýzou certifikovaného krmiva CRM 115. Stanovené obsahy sledovaných látek byly vyhovující (obrázek 1).

Obrázek 1: Ověření optimalizovaných podmínek SPLE pomocí CRM 115 (krmná směs)



3.2 ASE extrakce kalů

Extrakční podmínky pro indikátorové kongenery PCB byly optimalizovány na vzorku sedimentu IRM 764, který je pravidelně zařazován do okružních testů SETOC, a proto je používán jako interní referenční materiál. Referenční hodnota obsahu sledovaných látek byla získána z mediánu hodnot uvedených ve sborníku výsledků těchto kruhových testů. Vzorky čistírenských kalů patří mezi obtížné matrice. Z extraktu je třeba odstranit velké množství rušivých koextraktů. Největší problémy činí vysoký obsah minerálních olejů a síry. Zakonzentrované extrakty z ASE byly čištěny pomocí GPC a vhodné bylo i další dočištění na sloupci sorbentu, smočeného koncentrovanou kyselinou sírovou.

Kritickým parametrem nastavení je opět teplota. Jako optimální byla vyhodnocena extrakce při 100 °C. Další zvyšování teploty už nemělo výrazný vliv na výtěžnost.

Tabulka 5: Vliv teploty na výtěžnost SPLE

IRM SETOC 764		Výtěžnost (%)		
SPLE (florisil + silikagel)		Extrakce 2 × 10 min, 15% DCM v hexanu		
Teplota (°C)	Obsah PCB (ng/g sušiny)	40	100	150
PCB 28	25,8	63	89	94
PCB 52	35,5	73	105	103
PCB 101	56,6	66	87	94
PCB 118	36,5	69	88	95
PCB 138	84,1	88	114	113
PCB 153	83,3	97	121	125
PCB 180	49,7	90	118	114

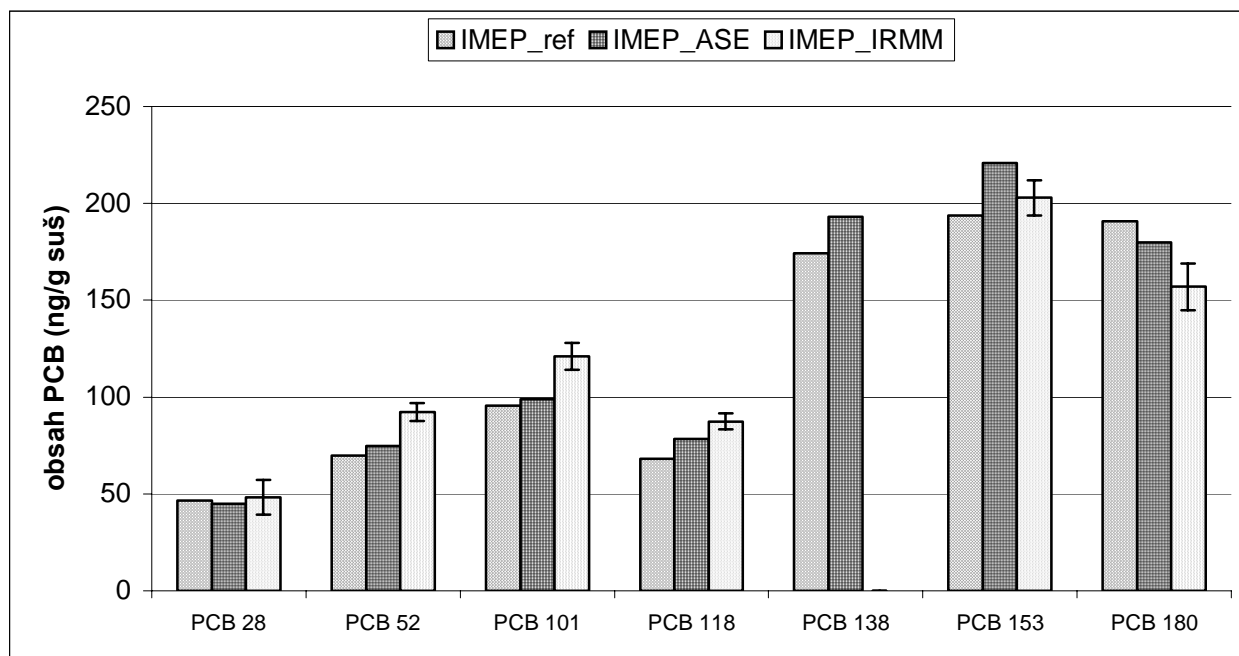
Optimalizován byl celkový objem promývacího rozpouštědla. V programu extraktoru se nastavuje procenty promytí cely (% flush) a výsledný objem extraktu závisí na velikosti a míře naplnění cely. Jako dostačující bylo zvoleno 120% promytí.

Tabulka 6: Vliv promytí extrakční cely na výtěžnost SPLE

IRM 764, IMEP 21	Výtěžnost (%)					
SPLE (florisil + silikagel)	Extrakce 2 × 10 min, T = 100 °C, 15 % DCM v hexanu					
Promytí cely rozpouštědlem Flush (%)	50	80	90	100	120	150
PCB 28	66	60	83	79	96	100
PCB 52	76	66	90	98	107	90
PCB 101	79	61	87	76	103	111
PCB 118	67	62	82	78	115	116
PCB 138	84	72	99	99	114	105
PCB 153	84	66	90	87	111	89
PCB 180	66	60	94	73	94	95

Nastavené podmínky byly ověřeny analýzou referenčního vzorku kalu CRM IMEP 21. Referenční materiál byl připraven i původním postupem (Soxtec-SPE-GPC) a výsledky byly porovnány (obrázek 2).

Obrázek 2: Ověření optimalizovaných podmínek pro ASE extrakci kalů pomocí IMEP-21



IMEP_ref: vzorek referenčního materiálu připraven postupem Soxtec-SPE-GPC

IMEP_ASE: vzorek referenčního materiálu připraven optimalizovaným postupem ASE

IMEP_IRMM: certifikovaná hodnota referenčního materiálu s rozšířenou nejistotou stanovení.

Hodnoty obsahu PCB stanovené oběma postupy extrakce a čištění byly ve vzájemné velmi dobré shodě. Horší shoda výsledků pro některé kongenery PCB s referenční hodnotou, stanovenou v kruhovém testu IMEP, lze vysvětlit použitím odlišné analytické kolony i jiného typu detektoru (MS/MS režim měření), než měly k dispozici ostatní zúčastněné laboratoře.

Optimalizovanou SPLE metodou bylo proměřeno 35 vzorků čistírenských kalů z programu monitoringu 2005 a výsledky byly porovnány s paralelním stanovením podle původního postupu (Soxtec-SPE-GPC). Obsahy sumy indikátorových kongenerů PCB u těchto vzorků byly v rozmezí 10 až 325 ng/g sušiny vzorku, s průměrem 80 ng/g.

Rozšířená nejistota stanovení pro jednotlivé kongenery PCB 28; 52; 101; 118; 138; 153; 180 byla (7,9; 10,0; 14,5; 17,4; 9,1; 5,4; 8,7) %.

3.3 Extraktor IKA

Tento extraktor lze použít pro PLE i SPLE metodu přípravy vzorku. Jedním z kritických parametrů pro nastavení podmínek extrakce je upevnění skleněné aparatury do termobloku. Podmínky pro extrakci v jednotlivých pozicích se lišily a bylo obtížné najít společné nastavení pro vyhřívání a následné chlazení extrakčních nádobek. Nespornou výhodou tohoto zařízení je jeho jednoduchá údržba a vysoká čistota skla, proto je tento extraktor převážně používán k přečištění materiálů pro stopová stanovení blížících se detekčním limitům.

4 Závěr

Byly optimalizovány podmínky pro selektivní extrakci (SPLE) indikátorových kongenerů PCB a persistentních organochlorových pesticidů (OCP) v přístroji ASE 100. Byla ověřena metoda jednokrokové přípravy vzorku krmiv s různým obsahem tuku a pracovní postup byl připojen k SOP 30 flexibilní akreditované zkoušky (1). Metoda byla ověřena analýzou certifikovaného referenčního materiálu CRM 115.

Byla zavedena SPLE metoda přípravy vzorků čistírenských kalů pro GC/MS stanovení PCB. Metoda byla ověřena analýzou certifikovaného referenčního materiálu IMEP 21 a proměřením 35 vzorků čistírenských kalů.

Byly ověřeny funkce a možnosti použití extrakčního zařízení pro fluidní extrakci FEX IKA pro potřeby extrakce vzorků a dočišťování materiálů pro reziduální analýzy.

5 Literatura

- 1 Příručka jakosti ÚKZÚZ, **2005**, SOP 30, Stanovení PCB a OCP metodou GC/MS.
- 2 ASE 100, Návod k použití, Amedis CZ, **2003**.
- 3 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.
- 4 Hussen, A., et al. Development of pressurized liquid extraction and clean-up procedure for the determination of endosulfan in aged contaminated Ethiopian soils. *J. Chromatogr. A* 1103, **2006**, 202 – 210.
- 5 Müller, A., et al. On line clean-up of pressurized liquid extracts for the determination of polychlorinated biphenyls in feedingstuffs and food matrices using GC-MS. *J. Chromatogr. A* 925, **2001**, 197 – 205.
- 6 Ramos, L., et al. Current use of pressurized liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *J. Chromatogr. A* 975, **2002**, 3 – 29.
- 7 Gomez-Ariza, J.L., et al. Determination of polychlorinated biphenyls in biota samples using simultaneous pressurized liquid extraction and purification. *J. Chromatogr. A* 946, **2002**, 209 – 219.

Stanovení thalia ve vzorcích rostlinného materiálu

Eva Čížmárová, Eva Fojtlová, Eva Urbánková

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

eva.fojtlova@ukzuz.cz

eva.urbankova@ukzuz.cz

1 Úvod

Thalium je považováno za významný toxický prvek, kterému je třeba věnovat značnou pozornost zejména v souvislosti s jeho schopností přecházet do některých rostlin. Akutní a chronická toxicita thalia je srovnávána s toxicitou kadmia, rtuti a olova. Jeho škodlivé účinky při intoxikaci mohou vést např. k vypadávání vlasů, k poruchám nervového nebo trávicího systému člověka. Příjem thalia a jeho akumulace v rostlinách jsou značně závislé na druhu rostliny. Významně je thalium přijímáno řepkou a příbuznými olejnatými rostlinami a může tak potenciálně vstupovat do potravního řetězce. V současné době nejsou v ČR dostupné žádné doporučené maximální hodnoty pro obsah tohoto prvku v krmivech nebo potravinách. Jako prozatímní pracovní rozsahy byly stanoveny pouze koncentrace v rozmezí (0,4 – 2) mg/kg Tl v sušině pro pícniny a v rozmezí (0,25 – 0,5) mg/kg v sušině pro potraviny. Výskyt thalia ve vzorcích krmiv a surovin používaných pro jejich výrobu není tedy přesně znám, proto předmětem práce bylo i zjištění možných obsahů thalia u vybraných druhů rostlin, příp. krmiv na bázi rostlinného charakteru vytypovaných s ohledem na potencionální zvýšený obsah tohoto prvku. V rámci této práce byl z analytického hlediska ověřen vhodný způsob mineralizace vzorků a dále byl prověřen vztah mezi dvěma různými způsoby koncového analytického stanovení thalia s použitím vhodné optické instrumentace s dostatečnou citlivostí pro tento prvek.

2 Materiál a metody

Pro ověření a optimalizaci vhodného postupu byly použity vzorky rostlinného materiálu. Jednalo se převážně o řepkové semeno, řepkové expelery, řepkový šrot, slunečnicové semeno, sojový šrot a slunečnicový šrot. Používají se jako suroviny pro přípravu krmných směsí a jsou sledovány v rámci programu monitoringu krmiv. Vzorky byly odebrány a analyzovány v NRL-RO Brno a rovněž v rámci spolupráce s laboratoří ICP-MS spektrometrie MZLU Brno.

Vzorky byly mineralizovány metodou na mokré cestě za normálního tlaku a dále s použitím mikrovlnného rozkladu. V připravených mineralizátech vzorků byl obsah thalia stanoven metodou atomové absorpční spektrofotometrie s elektrotermickou atomizací ETA-AAS a také metodou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ICP-MS. Vzorky olejnatých semen (řepka, slunečnice, sojové boby) a extrahované šroty nebyly před navažováním upravovány mletím, ale byly navažovány v nepomletém stavu. Vzorky řepkových a slunečnicových expelerů, řepkového příp. sojového nebo slunečnicového toastovaného šrotu byly předupraveny homogenizací a mletím na laboratorním mlýnku VM-7 Minirazant. Ve všech vzorcích byl stanoven obsah vlhkosti gravimetricky jako úbytek po vysušení vzorku při teplotě (103 ± 2) °C dle metody Stanovení obsahu vlhkosti v krmivech dle kapitoly 1.1 uvedené v Postupech laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů.

2.1 Přístroje a zařízení

- 1 Mineralizační zařízení dvacetimístné s programovatelným nastavením teploty a s vodními chladiči (Kjeldatherm, Gerhardt, Bonn, SRN),
- 2 Mineralizační zařízení mikrovlnné MWS-3 Speedwave (Berghof, SRN), mineralizační nádoby vysokotlaké s pojistným ventilem,
- 3 Podvarové destilační zařízení pro přípravu ultračistých kyselin BSB-939-IR (Berghof, SRN),
- 4 Atomový absorpční spektrofotometr s elektrotermickým atomizátorem a možností korekce nescifické absorpce na principu Zeemanova jevu, AAnalyst 600 (PerkinElmer Instruments, USA) vybavený autosamplerem, grafitové kyvety THGA a THGA-END CUP s platformou pokryté pyrolytickým grafitem,
- 5 Bezelektrodová výbojka (EDL) jako zdroj záření pro thalium,
- 6 Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem ELAN 6000 (PerkinElmer SCIEX, Norwalk, USA),
- 7 Zařízení pro přípravu vysoce čisté demineralizované vody (Millipore, USA),
- 8 Laboratorní mlýnek VM-7 (Minirazant, ČR).

2.2 Chemikálie a roztoky

- 1 Kyselina dusičná, 65% (m/m), $c(\text{HNO}_3) = 14,4 \text{ mol.l}^{-1}$, $\rho(\text{HNO}_3) = 1,4 \text{ g.ml}^{-1}$,
- 2 Kyseliny dusičná zředěná, $c(\text{HNO}_3) = 0,5 \text{ mol.l}^{-1}$,
- 3 Peroxid vodíku, 30% (m/m),
- 4 Chemické modifikátory matrice pro ETA-AAS měření, roztok Pd o koncentraci $c = 1 \text{ g.l}^{-1}$ v 0,5% HNO_3 , roztok kyseliny askorbové o koncentraci $c = 10 \text{ g.l}^{-1}$ v H_2O , (Analytika s.r.o. Praha),
- 5 Vnitřní standard pro ICP-MS měření, roztok Lu o koncentraci $c = 10 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$,
- 6 Argon čistoty 4.8.

Všechny používané chemikálie pro mineralizaci, ředění i měření vzorků byly čistoty minimálně p.a. (Lachema, ČR) nebo vyšší. Kyselina dusičná byla používána po předestilování podvarovou destilací. Pro přípravu všech roztoků byla používána vysoce čistá demineralizovaná voda Milli Q s kontrolovaným obsahem stanovovaných složek o měrném odporu (resistivitě) $18,2 \text{ M}\Omega.\text{cm}^{-1}$ (Millipore, Bedford, USA). Kalibrační standardní roztoky pro měření byly připraveny postupným ředěním certifikovaného základního standardního roztoku thalia o koncentraci 1 g.l^{-1} (Analytika s.r.o. Praha, ČR).

2.3 Způsob mineralizace vzorků

Vzorky byly mineralizovány oběma dále uvedenými postupy vždy v paralelním stanovení. Každá série mineralizace se skládala z vhodného počtu vzorků dle typu použitého mineralizačního zařízení, z 1 vzorku interního referenčního materiálu a 1 až 2 slepých pokusů.

2.3.1 Mineralizace kyselinou dusičnou a peroxidem vodíku za normálního tlaku- mineralizační zařízení Gerhardt

Navážka upraveného vzorku se oxiduje peroxidem vodíku v prostředí koncentrované kyseliny dusičné za varu.

Vzorky byly mineralizovány dle Jednotných pracovních postupů ÚKZÚZ Analýza rostlinného materiálu (2005) dle kapitoly 2.2.1 v mírně modifikovaném postupu. Modifikace spočívala v přidavku celkového objemu peroxidu vodíku a zvýšení teploty při mineralizaci.

Pracovní postup mineralizace

Do mineralizační trubice se naváží 1,000 g upraveného a vysušeného materiálu s přesností na 0,001 g, přidá se 8 ml koncentrované kyseliny dusičné a směs se nechá stát přes noc při laboratorní teplotě v digestoři. Po této době se ke vzorkům přidá 10 ml peroxidu vodíku 30%, nasadí se zpětné chladiče s vodním chlazením a trubice se umístí do mineralizačního bloku za postupného zvyšování teploty. Mineralizace vzorků poté probíhá 1 hodinu při teplotě (150 ± 5) °C. Po skončení mineralizace a úplném vychladnutí se mineralizát kvantitativně převede přes analytický kvantitativní filtr střední hustoty (např. Filtrak 389) do odměrné baňky o objemu 50 ml. Vzorek na filtru se promývá zředěnou kyselinou dusičnou ($0,5 \text{ mol.l}^{-1}$) a po vytemperování na laboratorní teplotu se doplní zředěnou kyselinou dusičnou ($0,5 \text{ mol.l}^{-1}$) po značku. Mineralizát se převede do uzavíratelných plastových lahvíček.

2.3.2 Mineralizace kyselinou dusičnou a peroxidem vodíku v uzavřeném systému s mikrovlnným ohřevem-mineralizační zařízení MWS-3

Navážka upraveného vzorku se oxiduje peroxidem vodíku v prostředí koncentrované kyseliny dusičné v uzavřeném systému za kontrolovaného nárůstu teploty.

Vzorky byly mineralizovány dle Jednotných pracovních postupů ÚKZÚZ Analýza rostlinného materiálu (2005) dle kapitoly 2.2.2 postup B vysokotlaký rozklad.

Pracovní postup mineralizace

Do mineralizační nádoby se naváží 0,5 g upraveného a vysušeného materiálu s přesností na 0,001 g, přidá se 8 ml koncentrované kyseliny dusičné a 2 ml peroxidu vodíku 30%. Teflonová nádobka se uzavře víčkem a umístí se do mineralizačního zařízení. Rozklad probíhá podle teplotního programu uvedeného v tabulce č.1. Po ukončení mineralizace se obsah převede do 25 ml odměrné baňky, mineralizační nádoba se propláchně vodou a baňka se po vytemperování doplní demineralizovanou vodou po značku. Poté se obsah baňky filtruje s použitím analytického kvantitativního filtru (např. Filtrak 390) do plastové lahvičky.

Tabulka č. 1: Teplotní program mikrovlnné mineralizace, zařízení MWS-3

Teplota (°C)	150	190	100	100
Časový nárůst (min)	5	4	2	2
Časová prodleva (min)	4	5	10	10

2.4 Způsob stanovení obsahu thalia

Obsah thalia v připravených mineralizátech byl stanoven metodou externí kalibrační křivky dvěma podstatně odlišnými optickými metodami, které však vykazují srovnatelnou citlivost stanovení pro nízké koncentrační obsahy tohoto prvku.

2.4.1 Stanovení Tl metodou ETA-AAS

Pro kalibraci thalia byla použita externí kalibrační křivka v rozsahu koncentrací (0; 1; 2; 5; 10) $\mu\text{g.l}^{-1}$ v matrici kyseliny dusičné a peroxidu vodíku (160 ml HNO_3 p.a. podvarově destilované + 40 ml H_2O_2 p.a./1000 ml demineralizované vody). Kalibrační křivka byla lineární v celém rozsahu měřených koncentrací ($R \geq 0,9999$).

Jako chemický modifikátor matrice byla použita redukováná forma palladia, která váže analyt do vysokých teplot. Je-li palladium dávkováno ve své elementární formě (přídavkem redukujících činidel nebo teplotní redukcí), uplatňuje se jeho schopnost silné intermetalické vazby s atomy kovů. Do grafitové kyvety se dávkovalo 8 μl modifikátoru palladium (0,1% roztok), 5 μl modifikátoru kyseliny askorbové (1% roztok) a 20 μl vzorku, slepého pokusu nebo kalibračního standardu. Jako vnější i vnitřní inertní plyn byl použit argon čistoty 4.8. Pro vyhodnocení byla použita integrovaná plocha signálu po korekci na nespecifickou absorpci.

V tabulce č. 2 je uveden teplotní program pro elektrotermický atomizátor s příčně vyhřívanou grafitovou kyvetou s integrovanou platformou a Zeemanovou korekcí pozadí. V tabulce č. 3 je uvedeno nastavení přístroje ETA-AAS.

Mez detekce metody byla stanovena jako 3SD slepého pokusu, $\text{LOD} = 25 \mu\text{g.kg}^{-1}$, mez stanovitelnosti byla stanovena jako 10SD slepého pokusu, $\text{LOQ} = 50 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

Tabulka č. 2: Teplotní program měření Tl s modifikátorem matrice

Krok	Proces	Teplota (°C)	Rychlost ohřevu (s)	Doba procesu (s)	Průtok Ar (ml.min^{-1})	Integrace signálu
1	Sušení	100	5	35	250	off
2	Sušení	130	20	35	250	off
3	Pyrolýza	850	20	10	250	off
4	Atomizace	1700	0	3	0	on
5	Čištění	2450	1	3	250	off

Tabulka č. 3: Nastavení přístroje AAnalyst 600 se Zeemanovou korekcí pozadí a příčně vyhřívanou grafitovou kyvetou THGA, ETA-AAS

Vlnová délka	279,8 nm
Žhavení EDL lampy	340 mA
Šířka štěrbin	0,7 L
Signál	AA-BG, peak area
Integrace signálu	3 s
BOC time	2 s
Delay time	0 s
Teplota nástřiku do kyvety	20 °C

2.4.2 Stanovení Tl metodou ICP-MS

Pro kalibraci thalia byla použita externí kalibrační křivka v rozsahu koncentrací (0; 1; 5; 10; 50) $\mu\text{g.l}^{-1}$ v matrici kyseliny dusičné (1ml HNO_3 čistoty suprapur Merck/50 ml objemu baňky). Kalibrační křivka byla lineární v celém rozsahu měřených koncentrací ($R \geq 0,9999$). Pro stanovení byl použit izotop ^{205}Tl . Jako interní standard pro potlačení vlivu nespektrálních interferencí byl použit roztok lutecia o koncentraci $10 \mu\text{g.l}^{-1}$ (signál izotopu ^{175}Lu), roztok byl přísáván peristaltickou pumpou automaticky při měření. Vzorky připravené mineralizací na mokré cestě nebyly před měřením ředěny.

Mez detekce metody byla stanovena jako 3SD slepého pokusu, $\text{LOD} = 1,2 \mu\text{g.kg}^{-1}$, mez stanovitelnosti byla stanovena jako 10SD slepého pokusu, $\text{LOQ} = 4 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Nastavení přístroje ICP-MS uvádí tabulka č. 4.

Tabulka č. 4: Nastavení přístroje ELAN 6000, ICP-MS

RF generátor	1000 W při frekvenci 40, 14 MHz s oscilátorem nastaveným na free-running
Detektor	Dual mode-simultánní scan
Pulzní detektor	1300 V
Analogový detektor	- 1750 V
Napětí na čočkách	8,9 V
Počet opakování měření (readings)	5
Zmlžovač	Cross-flow s průtokem nosného Ar 0,83 l.min ⁻¹
Rychlost nasávání vzorku peristaltickou pumpou	2,4 ml.min ⁻¹

3 Souhrn, výsledky a diskuse

Byly porovnány metody koncového stanovení obsahu thalia ve vzorcích rostlinného materiálu s použitím dvou rozdílných optických analytických metod, metody ICP MS a metody ETA-AAS. Metoda ICP-MS je pro stanovení nízkých koncentračních obsahů thalia v různých maticích vzorků velmi vhodná. Tato metoda již byla dříve s úspěchem použita pro stanovení obsahu thalia ve vzorcích půd po rozkladu lučavkou královskou, případně po rozkladu směsí kyseliny dusičné a peroxidu vodíku. Snahou úkolu bylo vyvinout a optimalizovat metodu stanovení obsahu thalia atomovou absorpční spektrofotometrií s elektrotermickou atomizací. Tato optická metoda vykazuje ve srovnání s metodou ICP-MS určitá omezení (především v rychlosti a efektivnosti měření a s ohledem na značný vliv zpracování matrice vzorku při optimalizaci metody ETA-AAS), ale přesto citlivost obou metod stanovení je přibližně srovnatelná. Pro metodu ETA-AAS je zejména velmi důležitá volba postupu mineralizace, především vyloučení přítomnosti chloridů např. z minerálních kyselin v mineralizátu vzorku, které jsou pro měření velkým interferentem. Při vývoji

stanovení thalia metodou ETA-AAS byl především optimalizován teplotní program úpravy, rozkladu a atomizace vzorku a použití vhodného modifikátoru matrice.

Dále byly porovnány metody mineralizace vzorků na mokré cestě ve směsi kyseliny dusičné a peroxidu vodíku, za normálního a zvýšeného tlaku. Mineralizace touto směsí činidel je vhodná pro obě metody koncového stanovení, mikrovlnný rozklad je však podstatně efektivnější z časového hlediska i z pohledu účinnosti rozkladu vzorku. V případě mineralizace mikrovlnné za zvýšeného tlaku byl optimalizován postup teplotního rozkladu, který je pro dokonalé rozložení olejnatých semen rozhodující.

Pro práci byly vybrány vzorky rostlinného materiálu s ohledem na předpokládaný možný zvýšený obsah thalia. Především se jednalo o vzorky semen řepky a příbuzných druhů olejnatých rostlin. Výsledky obou metod stanovení i obou metod mineralizace vzorků byly statisticky porovnány. Pro statistické zpracování výsledků byl použit program MS Office Excel 2000.

Popisná statistika: Výsledky popisné statistiky celého souboru dat uvádí tabulka č. 6. Z porovnání hodnot aritmetických průměrů a mediánů je zřejmé, že metoda ETA-AAS poskytuje ve srovnání s metodou ICP-MS pro stanovení thalia výsledky asi o 10 % až 15 % vyšší. Při porovnání mineralizačních postupů poskytuje metoda mikrovlnné mineralizace za zvýšeného tlaku výsledky asi o 5 % až 10 % vyšší než metoda mokrého rozkladu na normálního tlaku.

Metody měření i mineralizačních postupů byly porovnány lineární regresí. Hodnota R^2 udává spolehlivost regrese (koeficient, který po vynásobení 100 udává procento vzorků, které splňují uvedenou regresní rovnici).

Lineární regrese: Pro výpočet byla použita metoda nejmenších čtverců a výpočty byly provedeny pro rovnici $Y = a + bX$ a pro rovnici $Y = bX$ pro celý soubor dat. Z hodnot R^2 vyplývá, že mezi metodami je lineární vztah a vypočtené regresní rovnice jsou platné pro více než 95 % případů. Parametry regresní statistiky jsou uvedeny v tabulkách č. 7 až č. 10.

Z regresní statistiky bylo provedeno testování významnosti intervalu směrnice a koeficientů regresních přímk. Při porovnání obou koncových metod stanovení, metody ICP-MS a metody ETA-AAS, je pro rovnici $Y = a + bX$ zřejmý statistický rozdíl (interval neobsahuje 1 - směrnice je statisticky různá od 1). Při testování koeficientu t bylo zjištěno, že $t_{\text{stat}} = 3,013$ je v porovnání s $t_{\text{krit.}} = 1,990$ (tabelovaná hodnota Studentova rozdělení pro $v = 80$) opět statisticky významný, tedy metody nejsou ekvivalentní a metoda ETA-AAS vykazuje výsledky v průměru o 10 % až 15 % vyšší než metoda ICP-MS. Při porovnání obou postupů mineralizace vzorků, metody mokré mineralizace za normálního tlaku a mikrovlnné mineralizace za zvýšeného tlaku, je pro rovnici $Y = a + bX$ rozdíl statisticky nevýznamný (interval směrnice obsahuje 1). Testováním koeficientu t bylo zjištěno, že $t_{\text{stat}} = 1,051$ v porovnání s $t_{\text{krit.}} = 1,990$ je statisticky opět nevýznamný a rozdíl mezi oběma způsoby

mineralizace vzorků lze zanedbat. Všechny výpočty byly provedeny pro interval spolehlivosti 95 %. Na obrázcích č. 1 až č. 4 jsou uvedeny průběhy jednotlivých regresních přímek pro parametr Tl s regresními rovnicemi, které jsou znázorněny jednak jako přímky procházející bodem 0 a také jako přímky s nenulovým úsekem na ose Y. Regresní přímky pro celý soubor všech dat byly vyhodnoceny pro obě koncové optické metody stanovení Tl (ICP-MS a ETA-AAS) a pro 2 různé způsoby mineralizace vzorků (mikrovlnná mineralizace vysokotlaká a mineralizace za normálního tlaku) s koncovým stanovením metodou ETA-AAS.

V rámci vyhodnocení výsledků a validace obou instrumentálních metod stanovení obsahu Tl v rostlinném materiálu byly v programu EffiValidation verze 3.0 vyhodnoceny také relativní opakovatelnost a nejistoty z přesnosti stanovení. Výsledky validačních parametrů obou optických metod jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Všechny výsledky měření obsahu Tl pro metodu ETA-AAS i ICP-MS a pro oba způsoby mineralizace vzorků jsou souhrnně uvedeny v tabulce č.11.

4 Závěr

Byla optimalizována metoda stanovení obsahu thalia metodou ETA-AAS. Jako srovnávací metoda byla použita metoda ICP-MS, která je pro stanovení thalia spolehlivá a široce používaná z důvodu možnosti stanovení stopových koncentrací tohoto prvku v různých matricích vzorků.

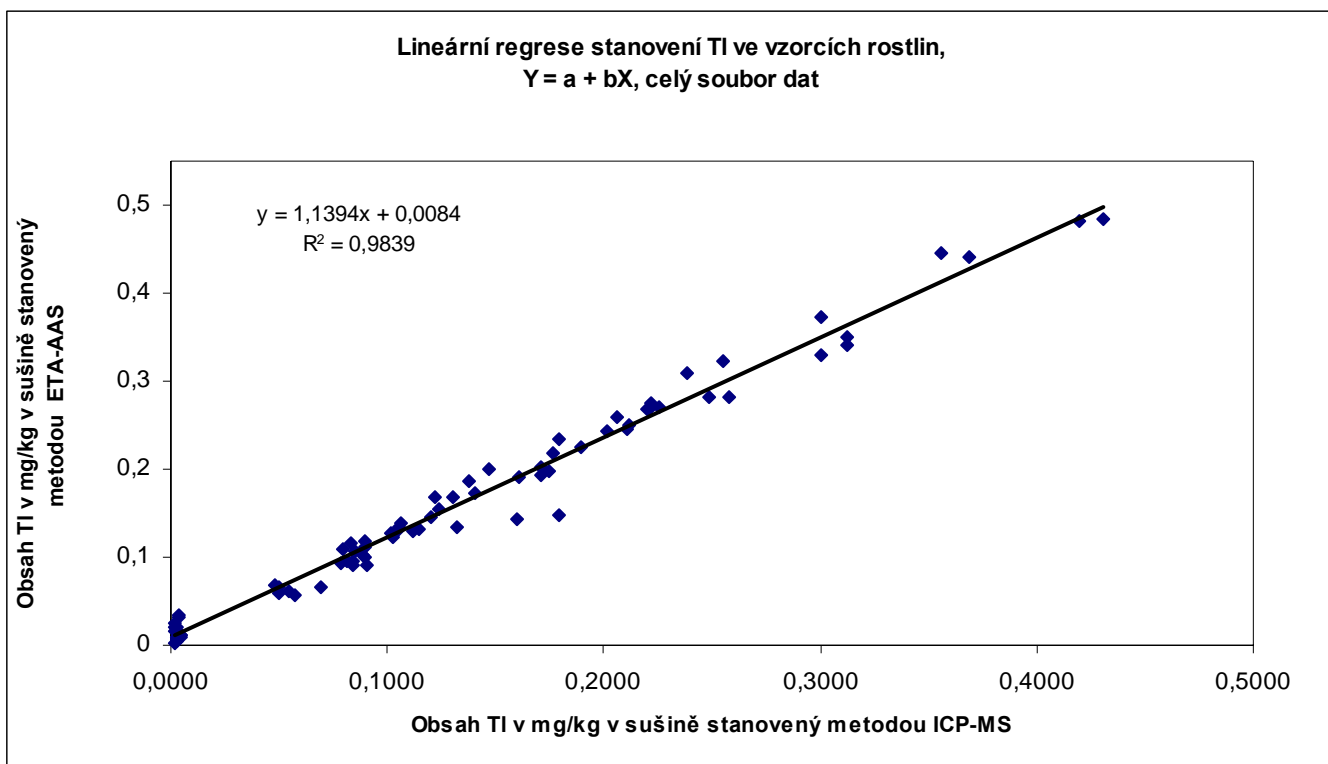
Optimalizovaný postup stanovení thalia metodou ETA-AAS lze použít jako vhodnou metodu koncového stanovení s velmi dobrými výsledky. Mezi oběma metodami (ICP-MS a ETA-AAS) byl shledán procentický rozdíl 10 % až 15 %, ale vzhledem k opakovatelnosti a nejistotám měření obou instrumentálních metod (viz tabulka č. 5) lze metodu ETA-AAS doporučit jako spolehlivý alternativní způsob měření obsahu thalia v rostlinném materiálu. Jako doporučený postup mineralizace vzorků je vhodné použít mikrovlnný rozklad za zvýšeného tlaku, který ve srovnání s mineralizací na mokré cestě umožní dokonalé rozložení matrice vzorku a je efektivnější i z časového hlediska. Oba mineralizační postupy využívají jako rozkladná činidla kyselinu dusičnou a peroxid vodíku, takže oba způsoby mineralizace jsou vhodné i poměrně šetrné pro obě koncové techniky ICP-MS i ETA-AAS.

Při sledování potenciálních obsahů thalia ve sledovaných matricích vzorků byly nalezeny pro řepkové semeno, řepkové expelery a řepkový extrahovaný šrot jako typické koncentrace (0,1 – 0,5) mg.kg⁻¹ v sušině, zatímco pro vzorky slunečnice, slunečnicových expelerů, slunečnicového extrahovaného šrotu, sójových bobů, příp. sójového šrotu byly obsahy thalia zanedbatelné a z hlediska měření se nacházely pod mezí stanovitelnosti obou instrumentálních metod měření.

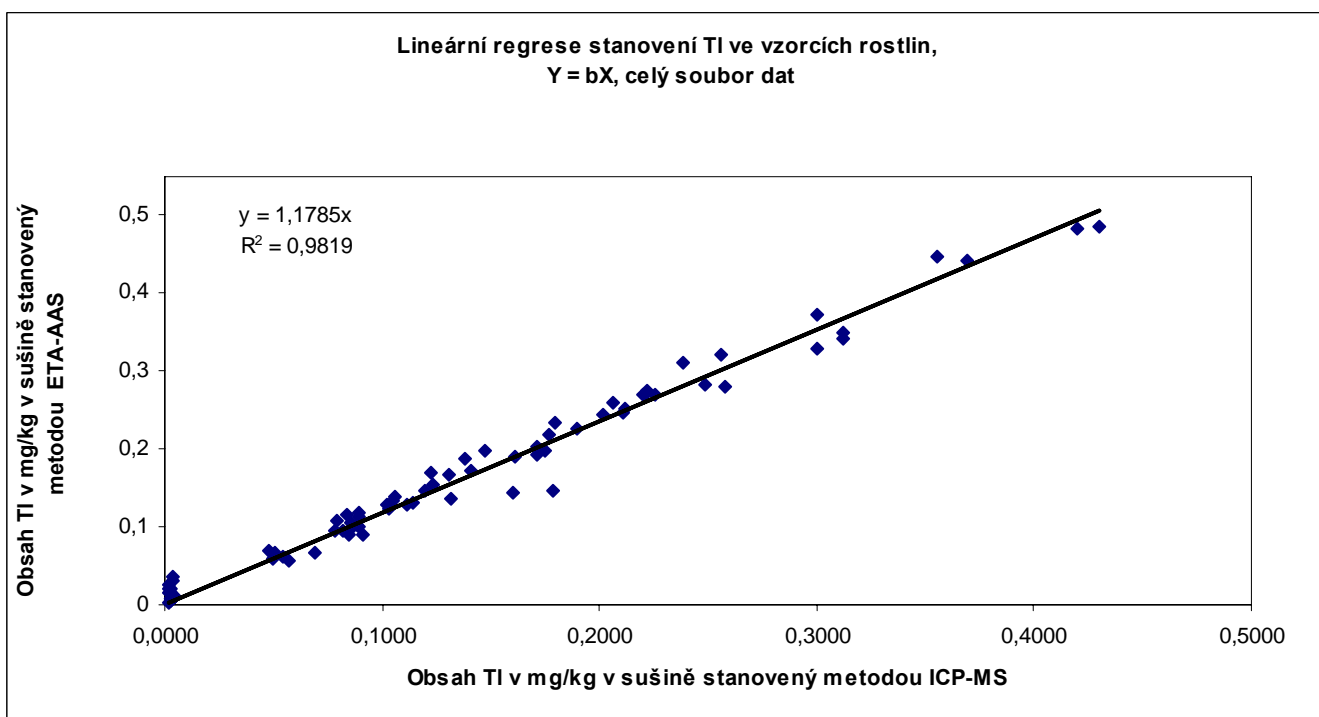
Z časového důvodu nebylo v rámci práce dokončeno měření obsahu thalia v mineralizátech připravených mikrovlnným rozkladem za zvýšeného tlaku metodou ICP-MS. Z uvedených výsledků lze však předpokládat, že srovnáním obou způsobů mineralizací by se potvrdily závěry, že mikrovlnný rozklad je pro stanovení thalia účinnější a lze jej doporučit jako nejvhodnější způsob mineralizace vzorků pro obě koncové metody ICP-MS i ETA-AAS.

5 Literatura

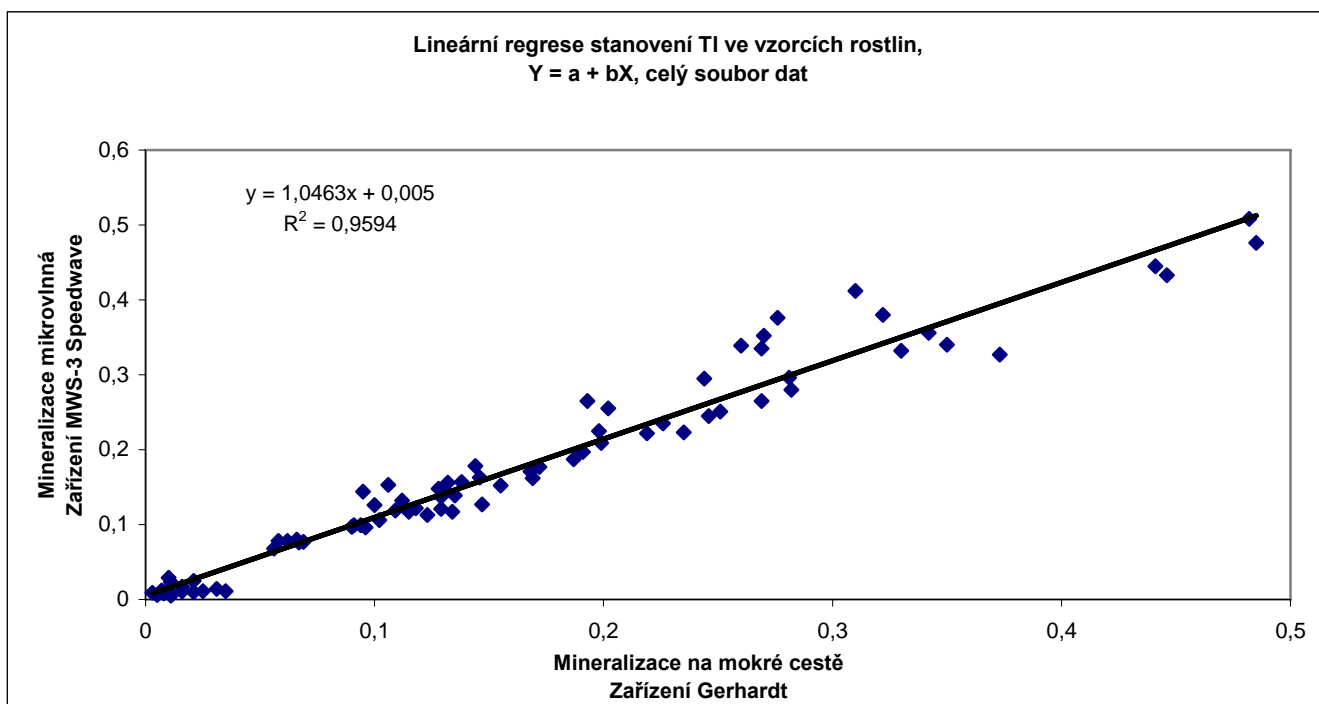
- 1 Zbírál J. a kol, **2005**, JPP Analýza rostlinného materiálu, ÚKZÚZ Brno
- 2 Postupy laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů, **2000**, Příloha č. 9 vyhlášky č.222/1996 Sb. ve znění pozdějších předpisů, ÚKZÚZ Brno
- 3 Pavlíčková, J, Zbírál, J, Smatanová, M, Habarta, P, Houserová, P, Kubáň, V: Uptake of thallium from naturally-contaminated soils into vegetables, *Food Additives and Contaminants*, May, **2006**, 23(5): 484 – 491
- 4 Uživatelská příručka EffiValidation, verze 3.0, **2003**
- 5 Eckschlager, K, Horsák, K, Kodejš, Z: Vyhodnocování analytických výsledků a metod, **1980**, SNTL Praha



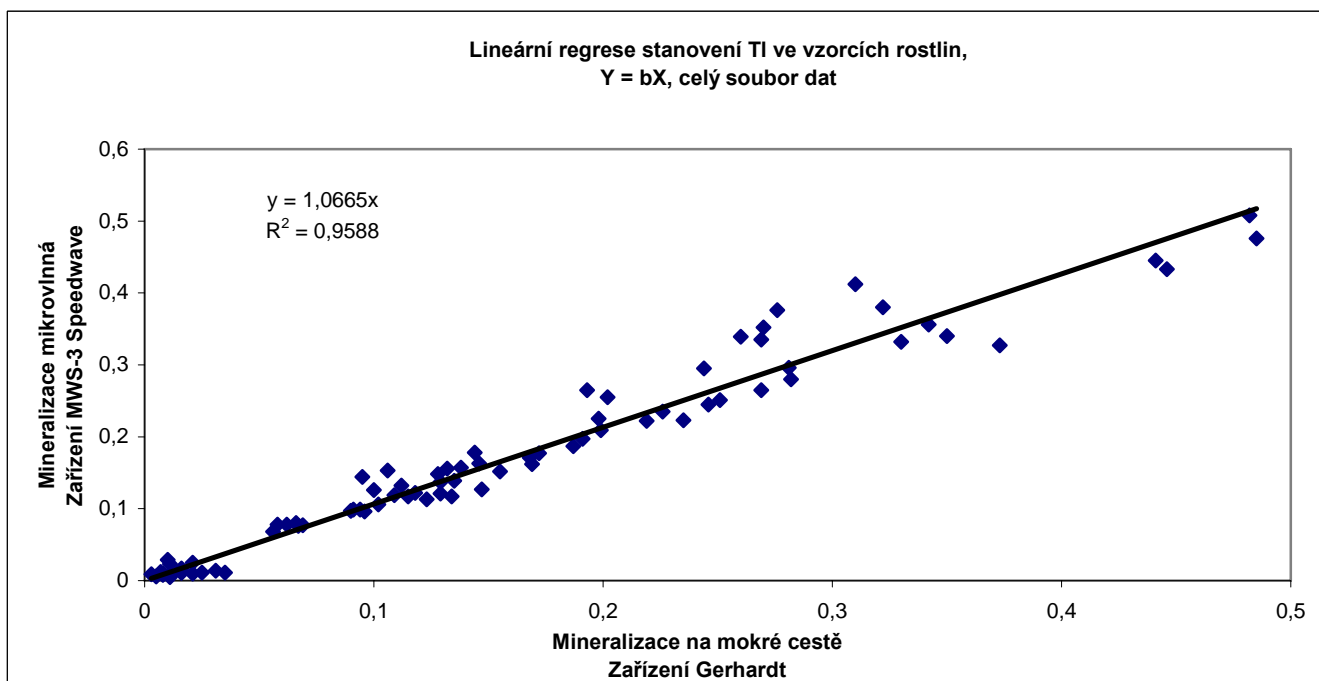
Obrázek č. 1: Lineární regrese $Y = a + bX$, porovnání metod měření obsahu thalia v rostlinném materiálu



Obrázek č. 2: Lineární regrese $Y = bX$, porovnání metod měření obsahu thalia v rostlinném materiálu



Obrázek č. 3: Lineární regrese $Y = a + bX$, porovnání způsobů mineralizace, měření metodou ETA-AAS, obsah thalia v mg/kg v sušině



Obrázek č. 4: Lineární regrese $Y = bX$, porovnání způsobů mineralizace, měření metodou ETA-AAS, obsah thalia v mg/kg v sušině

Tabulka č. 5: Validační parametry metod stanovení obsahu thalia - paralelní měření k dispozici

	Optická metoda	Relativní rozšířená nejistota (%)	Relativní opakovatelnost (%)	Mez detekce (mg/kg)	Mez stanovitelnosti (mg/kg)
TI	ICP-MS	2	10	0,001	0,004
TI	ETA-AAS	12	6	0,025	0,050

Tabulka č. 6: Popisná statistika souboru analyzovaných dat (mg/kg v sušině)

Metoda	Aritmetický průměr	Chyba aritmetického průměru	Medián	Rozdíl Min - Max	Min	Max	Šikmost	Špičatost
ETA-AAS, mokrý rozklad za normálního tlaku	0,155	0,019	0,132	0,480	0,004 ($< 0,05$)	0,484	0,8352	0,2697
ICP-MS, mokrý rozklad za normálního tlaku	0,129	0,017	0,107	0,423	0,002 ($< 0,004$)	0,425	0,8187	0,3836
ETA-AAS, MW rozklad za zvýšeného tlaku	0,167	0,021	0,142	0,486	0,007 ($< 0, 05$)	0,492	0,6856	- 0,2747

Počet vzorků n = 40 (průměr paralelních stanovení)

**Tabulka č. 7: Lineární regrese, Y = ETA-AAS, X = ICP-MS, jednoduchý lineární model
Y = a + bX**

	n	a	a_{min}	a_{max}	b	b_{min}	b_{max}	R²
Tl	80	0,0084	0,0028	0,0139	1,1395	1,1064	1,1726	0,9839

**Tabulka č. 8: Lineární regrese, Y = ETA-AAS, X = ICP-MS, jednoduchý lineární model
Y = bX**

	n	b	b_{min}	b_{max}	R²
Tl	80	1,1782	1,1560	1,2003	0,9819

**Tabulka č. 9: Lineární regrese, Y = MW rozklad, X = mokrá cesta za normálního tlaku,
jednoduchý lineární model Y = a + bX**

	n	a	a_{min}	a_{max}	b	b_{min}	b_{max}	R²
Tl	80	0,0051	-0,0046	0,0147	1,0463	0,9974	1,0951	0,9594

**Tabulka č. 10: Lineární regrese, Y = MW rozklad, X = mokrá cesta za normálního tlaku,
jednoduchý lineární model Y = bX**

	n	b	b_{min}	b_{max}	R²
Tl	80	1,0665	1,0363	1,0967	0,9588

Legenda:

n - počet vzorků

R² - koeficient determinace

Hladina spolehlivosti 95,0 %.

Tabulka č. 11: Souhrnná tabulka porovnání výsledků obsahu thalia ve vzorcích rostlinného materiálu (výsledky uvedeny v mg/kg v sušině)

Číslo vzorku	Mokrý min. Gerhardt	Mokrý min. Gerhardt	MW rozklad	Materiál	Sušina (%)
	1 g/50 ml ICP-MS Výsledek Tl	1 g/50 ml ETA-AAS (peak area) Výsledek Tl	0,5 g/25 ml ETA-AAS (peak area) Výsledek Tl		
425 a	0,1041	0,129	0,137	Řepkové semeno	94,1
425 b	0,1145	0,132	0,156		
427 a	< 0,004	< 0,05	< 0,05	Sójový loupáný extrahovaný šrot toastovaný	87,8
427 b	< 0,004	< 0,05	< 0,05		
558 a	0,2199	0,269	0,265	Řepkové expelery	92,1
558 b	0,2485	0,282	0,28		
561 a	0,3689	0,441	0,445	Řepkové expelery	91,0
561 b	0,3555	0,446	0,433		
562 a	0,1235	0,155	0,152	Řepkové expelery	92,6
562 b	0,1200	0,146	0,163		
565 a	0,0045	< 0,05	< 0,05	Slunečnicové expelery neloupané	92,5
565 b	< 0,004	< 0,05	< 0,05		
578 a	0,1746	0,198	0,225	Řepkové semeno	93,5
578 b	0,1768	0,219	0,222		
606 a	0,0049	< 0,05	< 0,05	Slunečnicové expelery neloupané	91,4
606 b	0,0048	< 0,05	< 0,05		
644 a	0,0503	0,066	0,08	Řepkové semeno	93,1
644 b	0,0690	0,067	0,076		
645 a	0,0787	0,094	0,099	Řepkové semeno	95,1
645 b	0,0817	0,096	0,096		
646 a	0,1118	0,129	0,121	Řepkové semeno	93,5
646 b	0,0854	0,106	0,153		
728 a	0,1610	0,191	0,197	Řepkové expelery	92,6
728 b	0,1471	0,199	0,209		
880 a	0,1220	0,169	0,162	Řepkové expelery	92,0
880 b	0,1307	0,168	0,171		
884 a	0,0894	0,112	0,132	Řepkové semeno	93,0
884 b	0,0892	0,118	0,122		
1051 a	0,1790	0,147	0,127	Řepkové semeno	93,6
1051 b	0,1028	0,123	0,113		
1134 a	< 0,004	< 0,05	< 0,05	Sójový loupáný extrahovaný šrot toastovaný	86,8
1134 b	< 0,004	< 0,05	< 0,05		
1137 a	< 0,004	< 0,05	< 0,05	Sójový loupáný extrahovaný šrot toastovaný	86,9
1137 b	< 0,004	< 0,05	< 0,05		
1193 a	0,1380	0,187	0,187	Řepkové semeno	93,0
1193 b	0,1407	0,172	0,177		
1194 a	0,1018	0,128	0,148	Řepkové semeno	93,7
1194 b	0,1058	0,138	0,157		
1223 a	0,3124	0,35	0,34	Řepkový extrahovaný šrot	89,1
1223 b	0,3124	0,342	0,356		

Číslo vzorku	Mokrý min. Gerhardt	Mokrý min. Gerhardt	MW rozklad	Materiál	Sušina (%)
	1 g/50 ml ICP-MS Výsledek TI	1 g/50 ml ETA-AAS (peak area) Výsledek TI	0,5 g/25 ml ETA-AAS (peak area) Výsledek TI		
1237 a	0,0541	0,062	0,078	Řepkové semeno	92,5
1237 b	0,0477	0,069	0,077		
1238 a	0,2018	0,244	0,295	Řepkové semeno	92,7
1238 b	0,2577	0,281	0,296		
1239 a	0,3004	0,373	0,327	Řepkové semeno	90,9
1239 b	0,3004	0,33	0,332		
1240 a	0,0836	0,115	0,117	Řepkové semeno	93,3
1240 b	0,0796	0,109	0,119		
1241 a	0,0843	0,095	0,144	Řepkové semeno	91,8
1241 b	0,1050	0,134	0,117		
1277 a	< 0,004	< 0,05	< 0,05	Slunečnicový extrahovaný šrot	90,1
1277 b	< 0,004	< 0,05	< 0,05		
1278 a	0,1603	0,144	0,178	Řepkové semeno	93,6
1278 b	0,1321	0,135	0,139		
1309 a	0,1793	0,235	0,223	Řepkový extrahovaný šrot nízký obsah glukosinolátů	90,0
1309 b	0,1893	0,226	0,235		
1310 a	0,4199	0,482	0,508	Řepkové expelery	92,3
1310 b	0,4304	0,485	0,476		
1335 a	0,0896	0,1	0,126	Řepkové semeno	93,1
1335 b	0,0886	0,102	0,106		
1463 a	0,0908	0,091	0,099	Řepkové semeno	93,3
1463 b	0,0844	0,09	0,097		
1551 a	0,2118	0,251	0,251	Řepkové expelery	91,1
1551 b	0,2109	0,246	0,245		
1578 a	< 0,004	< 0,05	< 0,05	Sójové boby	86,5
1578 b	< 0,004	< 0,05	< 0,05		
1642 a	0,1713	0,202	0,255	Řepkové expelery	91,3
1642 b	0,1713	0,193	0,265		
1643 a	0,0499	0,058	0,078	Řepkové semeno	92,4
1643 b	0,0574	0,056	0,068		
1644 a	< 0,004	< 0,05	< 0,05	Slunečnicové semeno	94,7
1644 b	< 0,004	< 0,05	< 0,05		
1645 a	< 0,004	< 0,05	< 0,05	Slunečnice	95,4
1645 b	< 0,004	< 0,05	< 0,05		
1688 a	0,2219	0,276	0,376	Řepkový extrahovaný šrot	88,9
1688 b	0,2257	0,27	0,352		
1798 a	0,2555	0,322	0,38	Řepkový extrahovaný šrot	87,1
1798 b	0,2386	0,31	0,412		
1799 a	0,2063	0,26	0,339	Řepkový extrahovaný šrot	89,0
1799 b	0,2208	0,269	0,335		

Stanovení polyaromatických uhlovodíků (PAHs) v půdách metodou HPLC

Šárka Plhalová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Opava, Jaselská 16, 746 23 Opava
sarka.plhalova@ukzuz.cz

1 Úvod

Polyaromatické uhlovodíky (PAHs) představují již řadu let velmi sledovanou skupinu chemických sloučenin. Hlavním důvodem tohoto zájmu je jejich karcinogenita. Ta byla již pozorována v závěru 18. století s nástupem průmyslové revoluce a jednoznačně byla prokázána okolo roku 1930 u některých sloučenin izolovaných a identifikovaných v černouhelném dehtu. Postupně bylo izolováno z fosilních surovin a produktů jejich zpracování, z jiných přírodních zdrojů nebo bylo syntetizováno, několik set PAHs. Zpravidla se za PAHs považují uhlovodíky se třemi a více kondenzovanými kruhy v molekule. S počtem kruhů narůstá i počet možných izomerů (tabulka č.1).

Tabulka č. 1 : Přehled počtu možných izomerů PAHs

Počet kondenzovaných benzenových jader	Počet izomerů PAHs
3	3
4	7
5	22
6	82
7	333

US Enviromental Protection Agency (EPA) zařadila do seznamu 130 nejzávažnějších kontaminantů životního prostředí i 16 PAHs. Jejich fyzikální a chemické vlastnosti závisejí obecně na molekulové hmotnosti. S rostoucí velikostí molekuly roste bod varu a tání, klesá rozpustnost ve vodě a roste lipofilita PAHs. Tyto skutečnosti ovlivňují jejich distribuci a chování v prostředí. Literární prameny uvádějí, že do konce minulého století existovala určitá rovnováha mezi produkcí a degradací PAHs. Množství těchto látek vytvořených biosyntézou, vulkanickou činností, požáry a tehdejší antropogenní produkcí bylo udržováno na určité úrovni dekompozicí PAHs fotodegradací a mikrobiální degradací. S růstem podílu fosilních paliv jako energetických zdrojů byla tato rovnováha narušena tak, že vstup PAHs do prostředí převládl nad destrukčními ději.

Výsledky získané monitorováním PAHs ukazují, že tyto látky jsou rozptýleny ve všech složkách a oblastech životního prostředí. Člověk je exponován těmito polutanty z přírodního pozadí v půdách, rostlinách, ovzduší a vodě. Za přítomnost PAHs v prostředí je zodpovědná především činnost člověka spojená s průmyslovou výrobou. Jedná se o výrobu tepelné a elektrické energie, o výrobu plynu, zpracování ropy, spalování uhlovodíků v dopravních mechanismech. Tyto zdroje doplňuje i neprůmyslová činnost jako jsou požáry lesů a stepí, volné hoření fosilních surovin v oblasti jejich těžby, domácí topeniště a kouření obyvatelstva. Odhaduje se, že prostředí je každoročně zatěžováno 300 000 tunami PAHs, z toho asi 45 000 t do ovzduší, 230 000 t do vod a zbytek do půdy. Cílem práce bylo ověřit a zvalidovat metodu na nové sestavě HPLC Agilent 1100 a zároveň na nové chromatografické koloně.

2 Princip metody

Polyaromatické uhlovodíky v půdách se stanoví po extrakci acetonem, zakoncentrování a přečištění na pevné fázi, metodou HPLC na reverzní fázi s gradientovým průběhem eluce a fluorescenční detekcí.

3 Chemikálie, zkušební pomůcky a přístrojové vybavení

Acetonitril, HPLC grade,

50% acetonitril, ACN : H₂O, 1 : 1 (V/V),

20% acetonitril, ACN : H₂O, 20 : 80 (V/V),

Aceton, HPLC grade,

2-propanol, HPLC grade,

50% MeOH, MeOH : H₂O, 1 : 1 (V/V),

Methanol, HPLC grade,

Tetrahydrofuran (THF), HPLC grade,

Standard PAHs MIX v acetonitrilu, 100 µg/ml, Absolute Standards,

Pracovní standard PAHs v tetrahydrofuranu, 2 µg/ml,

Kapalinový chromatograf Agilent 1100 s fluorescenčním a DAD detektorem,

Vakuový manifold,

Ultrazvuková lázeň,

Horizontální třepačka,

Odstředivka,

SPE kolonky Strata C8, 500 mg/3 ml, Phenomenex,

Nástříkový filtr, 13 mm nylon syringe filter 0,45 µm, MetaChem.

4 Pracovní postup

4.1 Příprava vzorku

PAHs o nižších molekulových hmotnostech (naftalen, acenaftylen) jsou těkavé, a proto se půda nechá vysušit v temnu při pokojové teplotě. Pak se vzorek rozmělní, proseje přes 2mm síto a pomele se na achátovém mlýnku. Takto upravený vzorek se dále proseje přes 1mm síto. Pokud se zkoušený vzorek nepoužije ihned k analýze, naváží se 10 g půdy do 100ml lékovky z tmavého skla, uzavře se a uchovává v mrazničce.

4.2 Extrakce

Do 100ml kónické baňky se zábrusem se naváží 10 g půdy, napipetuje se 20 ml acetonu a baňka se uzavře. Obsah se extrahuje 30 minut na horizontální třepačce a pak se 5 minut sonifikuje. Obsah baňky se nechá ustát, převede se do 25ml zkumavky, která se uzavře a extrakt vzorku se odstředí. Do 50 ml odměrné baňky se napipetuje 10 ml extraktu, přidá se 2,5 ml 2-propanolu a baňka se doplní po rysku demineralizovanou vodou. Baňka se uzavře a obsah se 2 minuty sonifikuje. Takto připravený extrakt se přečistí přes kolonku SPE C8, která se předem kondicionuje postupně 1 × 2,5 ml 100% MeOH, 1 × 2,5 ml 50% MeOH a 2 × 2,5 ml demineralizovanou vodou. Na SPE kolonku vneseme 50 ml připraveného extraktu. Polární látky projdou SPE kolonkou a nepolární látky se zachytí na sorbentu C8. Extrahovaná část vzorku na sorbentu se promyje 2,5 ml 50% MeOH. Eluce PAHs se provede 3 ml THF a eluát se jímá do 10ml kalibrované zkumavky.

Získaný eluát se sonifikuje a pak se naředí (1 : 1) 20% acetonitrilem z důvodu mobility tetrahydrofuranu. Po naředění se vzorek opět sonifikuje asi 2 minuty. Eluát se nastříkne na kolonu přes nylonový nástříkový filtr.

4.3 Podmínky chromatografického stanovení

Vlastní měření kalibračních roztoků i extraktů vzorků probíhá za následujících podmínek chromatografického systému:

Kolona	Waters-PAH C18; 5 μ m; (4,6 \times 250) mm
Mobilní fáze	A - acetonitril : voda = 1 : 1
	B - acetonitril
Průtok	1,5 ml/min
Teplota kolony	35 °C
Objem nástřiku	20 μ l
Detekce	Fluorescenční
Doba analýzy	25 min.

Tabulka č. 2: Časový průběh gradientu

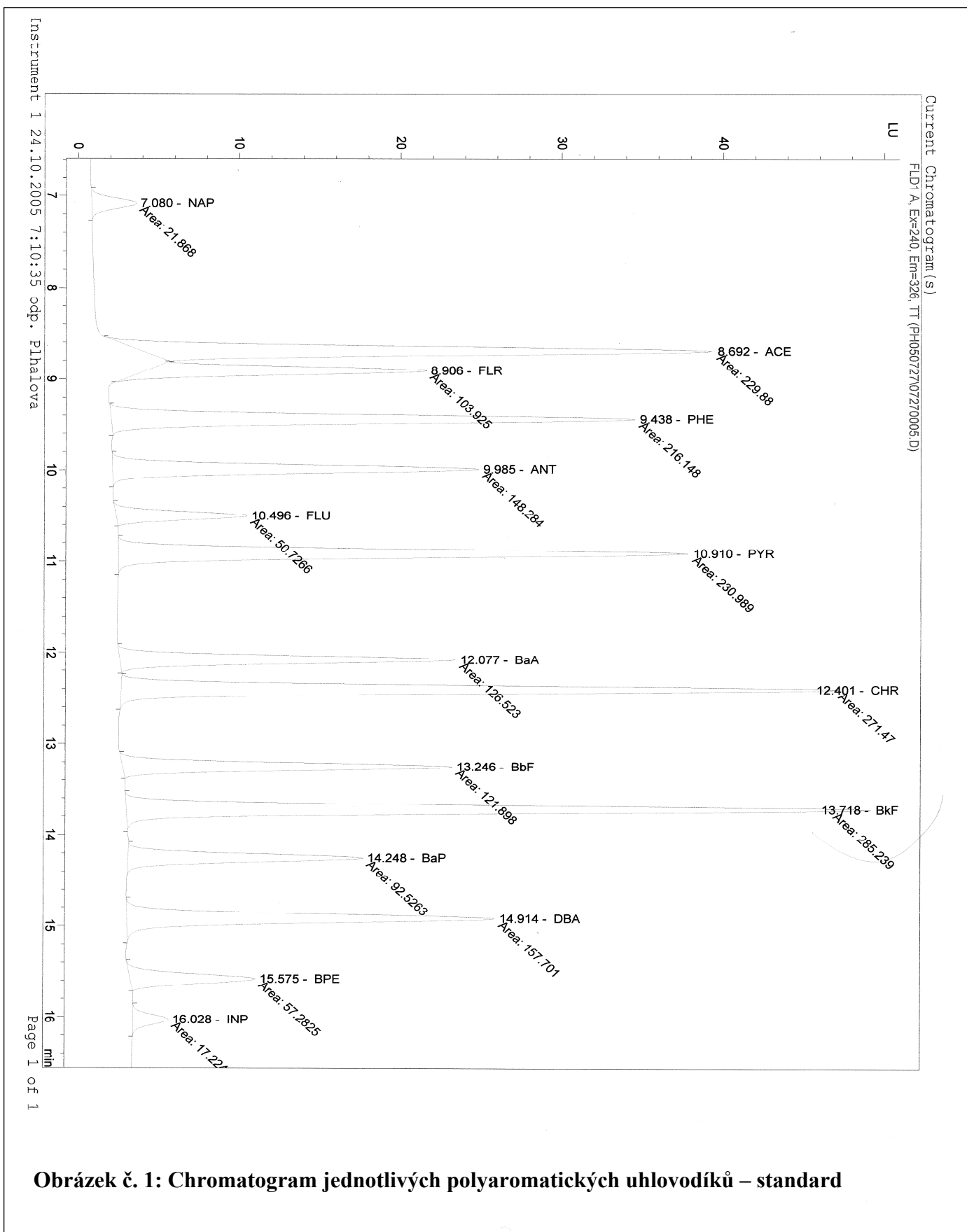
Čas (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
3	100	0
10	10	90
11	0	100
16	0	100
19	100	0
25	100	0

Tabulka č. 3: Excitační a emisní vlnové délky a retenční časy jednotlivých PAHs

PAH	Excitační λ (nm)	Emisní λ (nm)	Retenční čas (min.)
Naphtalene NAP	240	326	7,1
Acenaphtene ACN	240	326	8,7
Fluorene FLR	240	326	8,9
Phenanthrene PHE	246	368	9,4
Anthracene ANT	246	368	10
Fluoranthene FLU	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 BkF	248	432	13,2
Benzo(k)fluoranthene BkF	254	400	13,7
Benzo(a)pyrene BaP	254	400	14,3
Dibenzo(a,h)anthracene DBA	292	410	14,9
Benzo(g,h,i) perylene BPE	292	410	15,6
Indeno(1,2,3-c,d) pyrene INP	230	500	16,0

4.4 Kalibrace

Do sady odměrných baněk na 10 ml se pipetuje (0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0) ml pracovního roztoku, doplní se tetrahydrofuranem po značku, promíchá a vloží se na několik minut do ultrazvukové lázně. Tyto kalibrační roztoky se dále ředí 20% acetonitem v poměru (1 : 1) z důvodu mobility tetrahydrofuranu. Naředěné standardy se 2 minuty sonifikují. Tyto kalibrační roztoky odpovídají koncentraci (0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5) $\mu\text{g/ml}$. Na kolonu se nastříhuje 20 μl kalibračního roztoku ve dvou opakováních. Z průměrných hodnot odpovídajících ploch píků se sestrojí kalibrační křivka.



Obrázek č. 1: Chromatogram jednotlivých polyaromatických uhlovodíků – standard

5 Stanovení validačních parametrů

5.1 Opakovatelnost

Opakovatelnost charakterizuje rozptýlení validované vlastnosti kolem střední hodnoty, které je způsobeno náhodnými chybami. Rozptýlení hodnot okolo průměru vyjadřuje směrodatná odchylka. Data pro vyhodnocení byla naměřena za podmínek měření opakovatelnosti, tj. v jedné laboratoři, stejným analytikem na stejném přístroji a v co nejkratším čase.

Ke stanovení hodnot opakovatelnosti byly vybrány 2 vzorky běžných reálných půd (vzorky č. 922 a č. 1014), vnitrolaboratorní referenční materiál VRM a certifikovaný materiál půdy CRM (ERM-CC013, BAM). Měřilo se v sedmi a osmi opakováních, u certifikovaného materiálu v deseti opakováních. Pomocí programu EffiValidation 3.0 byla vypočtena opakovatelnost výběrem – Po úrovních z vícenásobného měření. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách č. 4 až č. 11.

Tabulka č. 4: Vzorek č. 922- výsledky měření (µg/kg)

PAH	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
NAP	7,23	8,17	8,66	8,39	9,20	9,00	8,06
ACE	4,52	5,12	4,97	2,79	5,77	4,19	4,69
FLR	13,7	13,1	13,3	11,8	14,1	12,6	12,4
PHE	90,4	89,4	89,2	94,1	102	92,6	90,6
ANT	31,9	31,1	33,4	34,1	30,2	30,3	32,6
FLU	203	195	203	248	223	218	214
PYR	179	177	184	218	198	193	189
BaA	79,9	75,6	82,3	91,2	77,6	78,6	76,8
CHR	98,7	93,9	95,0	114	100	103	96,4
BbF	66,3	67,2	68,0	68,2	66,0	70,5	67,5
BkF	47,9	45,1	47,7	52,0	46,1	49,3	46,4
BaP	93,4	89,8	92,0	106	89,6	93,6	90,1
DBA	12,0	11,1	11,3	11,8	11,1	11,7	10,5
BPE	58,5	54,9	54,9	66,6	61,6	63,3	60,2
INP	62,5	67,1	64	63,4	53,1	66,5	55,9

Tabulka č. 5: Vzorek č. 922- opakovatelnost stanovení PAHs

PAH	Aritmetický průměr (µg/kg)	Opakovatelnost (µg/kg)	Relativní opakovatelnost (%)
NAP	8,4	0,7	7,8
ACE	4,6	0,9	20,4
FLR	13	0,8	6,2
PHE	92,6	4,4	4,7
ANT	31,9	1,5	4,7
FLU	215	17,6	8,2
PYR	191	14	7,3
BaA	80,3	5,3	6,6
CHR	100	7,2	7,2
BbF	67,7	1,5	2,2
BkF	47,8	2,3	4,8
BaP	93,5	5,8	6,2
DBA	11,4	0,5	4,6
BPE	60	4,3	7,2
INP	61,8	5,3	8,6

Tabulka č. 6: Vzorek č. 1014- výsledky měření (µg/kg)

PAH	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
NAP	6,78	8,96	6,75	10,1	4,61	4,50	9,42	7,21
ACE	11,0	10,8	11,3	18,3	9,34	8,16	15,8	9,30
FLR	22,1	23,1	22,1	35,9	20,3	22,6	34,4	17,4
PHE	175	218	180	273	190	159	243	139
ANT	108	120	108	155	116	91,7	124	90,7
FLU	710	759	723	910	802	554	743	524
PYR	636	656	640	790	701	476	614	458
BaA	237	243	236	304	276	184	216	180
CHR	298	297	296	267	304	235	247	236
BbF	152	165	160	191	173	123	145	125
BkF	118	123	117	143	128	90,3	107	92,8
BaP	243	262	246	303	274	227	231	232
DBA	30,0	27,5	26,7	36,5	32,3	22,6	26,5	23,9
BPE	127	132	128	152	136	103	117	110
INP	170	172	167	199	190	138	149	139

Tabulka č. 7: Vzorek č. 1014- opakovatelnost stanovení PAHs

PAH	Aritmetický průměr (µg/kg)	Opakovatelnost (µg/kg)	Relativní opakovatelnost (%)
NAP	7,3	2,10	28,7
ACE	11,8	3,50	29,8
FLR	24,7	6,68	27,0
PHE	197	44,6	22,6
ANT	114	20,4	17,8
FLU	716	126	17,6
PYR	621	110	17,7
BaA	234	42,3	18,1
CHR	285	44,4	15,6
BbF	154	23,2	15,0
BkF	115	17,9	15,5
BaP	252	25,9	10,3
DBA	28,3	4,5	16,1
BPE	126	15,5	12,3
INP	166	22,4	13,5

Tabulka č. 8: Vzorek VRM- výsledky měření (µg/kg)

PAH	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
NAP	512	556	439	511	586	497	560	546
ACE	46,9	43,9	38,6	42,6	47,1	43,1	44	41,1
FLR	75,1	73,6	102	78,9	85,2	60,2	93,9	-
PHE	1110	1176	1000	1079	1071	1219	1133	1149
ANT	332	315	261	298	256	280	299	320
FLU	1852	1978	1863	2004	1948	1974	1883	1970
PYR	1603	1770	1590	1677	1545	1707	1686	1620
BaA	1007	1101	956	1037	963	859	1107	1062
CHR	1122	1272	1088	1161	1073	1194	1188	1148
BbF	1292	1334	1241	1403	1265	1169	1424	1217
BkF	636	677	616	661	600	648	646	604
BaP	1270	1364	1335	1565	1509	1153	1234	1191
DBA	181	162	178	191	190	161	174	159
BPE	807	1054	1107	1380	1413	968	832	850
INP	1279	1237	1201	1184	1026	1022	1010	1009

Tabulka č. 9: Vzorek VRM - Opakovatelnost stanovení PAHs

PAH	Aritmetický průměr ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Opakovatelnost ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Relativní opakovatelnost (%)
NAP	526	46,1	8,8
ACE	43,4	2,8	6,5
FLR	81,3	13,7	16,9
PHE	1117	68,1	6,1
ANT	295	27,6	9,3
FLU	1934	58,9	3,1
PYR	1650	73,1	4,4
BaA	1012	83,7	8,3
CHR	1156	64,0	5,5
BbF	1293	89,1	6,9
BkF	639	27,4	4,3
BaP	1328	147	11,1
DBA	175	12,8	7,3
BPE	1051	238	22,7
INP	1121	115	10,3

Tabulka č. 10: Certifikovaný materiál - výsledky měření (µg/kg)

PAH	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
NAP	2406	2429	2416	2412	2426	2878	2850	3197	3107	3159
ACE	1352	1349	1321	1339	1368	1542	1532	1510	1470	1525
FLR	2524	2504	2445	2528	2556	3128	3253	3306	3271	3321
PHE	13180	13261	12986	13203	13385	15098	14023	14569	14447	13870
ANT	3716	3556	3511	3708	3505	3633	3623	3713	3945	3733
FLU	15044	14903	14541	15031	14733	16500	17425	16968	16930	16491
PYR	13279	13370	13612	13747	13624	16065	14939	16073	15366	15026
BaA	7234	7604	7357	7691	7731	6711	7158	6997	6854	6704
CHR	7467	6778	6797	6759	6848	7864	7182	7962	7436	7330
BbF	6558	6751	6318	6631	6979	6604	6646	6712	6460	6523
BkF	3596	3599	3737	3786	3817	4298	3890	4355	3730	4157
BaP	8019	8280	8388	8258	8359	8891	8286	8855	8443	8303
DBA	1330	1221	1101	1271	1232	1183	1108	1144	1010	1123
BPE	5956	5827	5953	5964	5923	6728	6458	5818	6298	5689
INP	5395	5703	5503	5258	5211	5468	5266	6050	5288	5273

Tabulka č. 11: Certifikovaný materiál - opakovatelnost stanovení PAHs

PAH	Aritmetický průměr ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Opakovatelnost ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Relativní opakovatelnost (%)
NAP	2728	345	12,6
ACE	1431	92,6	6,4
FLR	2884	397	13,8
PHE	13802	716	5,2
ANT	3664	131	3,6
FLU	15857	101	6,9
PYR	14510	107	7,6
BaA	7204	389	5,4
CHR	7242	448	6,2
BbF	6618	178	2,7
BkF	3897	277	7,1
BaP	8408	269	3,2
DBA	1172	94	8,0
BPE	6061	327	5,4
INP	5442	261	4,8

5.2 Správnost

Správnost charakterizuje shodnost výsledků měření validované vlastnosti s akceptovanou nebo deklarovanou referenční nebo vztažnou hodnotou. Pokud je shodnost výsledků statistickým testováním potvrzena, metoda poskytuje správné výsledky. Pokud potvrzena není, metoda poskytuje vychýlené výsledky (tj. výsledky zatížené systematickou chybou).

Byl vybrán vzorek půdy, který je pravidelně ověřován mezinárodním testem z Wageningen a je zařazen jako vnitrolaboratorní materiál VRM. Tento vzorek byl změřen na staré HPLC sestavě a nové sestavě Agilent 1100 a získané výsledky byly porovnány pomocí EffiValidation 3.0 – srovnání dvou metod (t-test). Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 12.

Tabulka č. 12: Ověření správnosti metody stanovení – srovnání dvou metod

PAH	Naměřeno 1 (µg/kg)	Naměřeno 2 (µg/kg)	Výtěžnost (%)	Přesnost 1	Přesnost 2	t	t-krit	Hypotéza
NAP	542	530	97,8	17,5	33,5	0,5345	2,776	Přijata
ACE	51,1	48,1	94,1	8,7	4,6	0,5342	2,776	Přijata
FLR	53,4	58,5	109,4	4,6	9,7	0,8124	2,776	Přijata
PHE	1113	1101	98,9	15,9	24	0,7418	2,776	Přijata
ANT	266	261	98,4	18,5	7	0,3793	2,776	Přijata
FLU	1967	1977	100,5	44,5	6,1	0,3595	2,776	Přijata
PYR	1586	1587	100,1	24	27,3	0,0794	2,776	Přijata
BaA	1018	991	97,4	19,5	29,5	1,3067	2,776	Přijata
CHR	1147	1148	100,1	25,9	53,6	0,0485	2,776	Přijata
BbF	1242	1246	100,3	8,6	10,2	0,5169	2,776	Přijata
BkF	636	637	100,1	23,6	18,7	0,0383	2,776	Přijata
BaP	1217	1255	103,1	8,7	26,7	2,3462	2,776	Přijata
DBA	160	160	100	7,5	12,6	0,0000	2,776	Přijata
BPE	1017	1023	100,6	56,5	49,2	0,1386	2,776	Přijata
INP	1156	1168	101	89,1	60,7	0,1928	2,776	Přijata

Naměřeno 1	Průměr hodnot měření na staré sestavě HPLC
Naměřeno 2	Průměr hodnot měření na sestavě HPLC Agilent 1100
Výtěžnost	Výtěžnost metody (= 100 × naměřeno 2/naměřeno 1)
Přesnost 1	Směrodatná odchylka hodnot měřených na staré sestavě HPLC
Přesnost 2	Směrodatná odchylka hodnot měřených na sestavě HPLC Agilent 1100
t	Hodnota t pro Studentův t-test vypočtená pro testování shody výsledků
t-krit	Kritická hodnota t pro Studentův t-test (z tabulek)

Závěr: Srovnávané analytické metody poskytují statisticky stejné výsledky.

Správnost metody byla dále ověřena pomocí certifikovaného materiálu, půdy ERM – CC013. Naměřené hodnoty byly statisticky zpracovány za použití programu EffiValidation 3.0 výběrem Správnost – Omezený koncentrační rozsah – referenční materiál k dispozici. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 13.

Tabulka č. 13: Ověření správnosti metody stanovení – srovnání s referenčním materiálem

PAH	Referenční hodnota (µg/kg)	Naměřeno (µg/kg)	Výtěžnost (%)	Referenční přesnost (µg/kg)	Přesnost (µg/kg)	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti
NAP	2800	2518	89,9	400	23,3	Přijata	Přijata
ACE	1590	1535	96,6	160	24	Přijata	Přijata
FLR	2570	2235	87	290	30,9	Přijata	Přijata
PHE	13500	13307	98,6	1200	135	Přijata	Přijata
ANT	3700	3758	101,6	210	59,5	Přijata	Přijata
FLU	15900	14669	92,3	800	473	Přijata	Přijata
PYR	12800	13497	105	1000	300	Přijata	Přijata
BaA	7300	6766	92,7	800	234	Přijata	Přijata
CHR	6800	6710	98,7	900	262	Přijata	Přijata
BbF	7200	6020	83,6	700	408	Přijata	Přijata
BkF	3800	3648	96	400	93,2	Přijata	Přijata
BaP	7900	7664	97	600	201	Přijata	Přijata
DBA	1700	1570	92,3	300	68,7	Přijata	Přijata
BPE	5700	4658	81,7	600	184	Přijata	Přijata
INP	5300	4976	93,9	700	109	Přijata	Přijata

Závěr: Výtěžnost stanovení se pohybuje v rozmezí (82 – 105) %. Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

5.3 Linearita

Linearita popisuje míru lineární závislosti mezi validovanou vlastností (koncentrace látky) a měřením (odezva - plocha píku). K vyhodnocení lze použít několika metod. Byly vybrány korelační koeficient R a QC koeficient. Je testována hypotéza – pokud je vypočtený korelační koeficient větší než korelační koeficient k testování (0,99) a současně QC vypočtený koeficient menší než QC koeficient k testování (5 %), je metoda považována za lineární. Byla použita kalibrační řada 8 standardů v rozmezí (0,01 – 0,7) µg/ml PAHs. Výpočet byl proveden pomocí programu EffiValidation 3.0. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 14.

Tabulka č. 14: Výsledky testování linearity

PAH	Vypočtený korelační koeficient	Testovaný korelační koeficient	Vypočtený QC	Testovaný QC	Hypotéza
NAP	0,99994	0,99	1,36	5	Přijata
ACN	0,99996	0,99	1,12	5	Přijata
FLR	0,99998	0,99	0,74	5	Přijata
PHE	0,99998	0,99	0,74	5	Přijata
ANT	0,99998	0,99	0,86	5	Přijata
FLU	0,99969	0,99	3,3	5	Přijata
PYR	0,99997	0,99	0,92	5	Přijata
BaA	0,99998	0,99	0,78	5	Přijata
CHR	0,99995	0,99	1,22	5	Přijata
BbF	0,99982	0,99	2,47	5	Přijata
BkF	0,99996	0,99	1,09	5	Přijata
BaP	0,99998	0,99	0,77	5	Přijata
DBA	0,99999	0,99	0,53	5	Přijata
BPE	0,99938	0,99	4,61	5	Přijata
INP	0,99999	0,99	2,24	5	Přijata

Závěr: Linearita byla prokázána u všech sledovaných polyaromatických uhlovodíků.

5.4 Meze detekce a stanovitelnosti

Mez detekce je úroveň, nad kterou lze odezvu vzorku věrohodně odlišit od odezvy slepého pokusu, tzn. že nad ní lze provést kvalitativní stanovení. Mez stanovitelnosti je úroveň, nad kterou lze věrohodně provést kvantitativní stanovení. Meze se stanovují buď jako násobek směrodatné odchylky odezvy slepého pokusu nebo z kalibrační přímky.

Ke stanovení mezí detekce a stanovitelnosti byla použita kalibrační přímka sestavená ze standardů s nízkou koncentrací PAHs (1– 20) µg/l. Bylo naměřeno 6 koncentračních úrovní ve dvou opakováních. K výpočtu byl použit program EffiValidation 3.0. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 15.

Tabulka č. 15: Meze detekce a stanovitelnosti PAHs (µg/l)

PAH	LOD	LOQ	LOD	LOQ
NAP	2,1	3,8	2,6	4,6
ACE	0,4	0,7	0,5	0,8
FLR	1,4	2,6	1,7	3,1
PHE	1,6	2,9	1,9	3,5
ANT	0,6	1,0	0,7	1,2
FLU	0,6	1,0	0,7	1,2
PYR	0,6	1,1	0,7	1,2
BaA	0,4	0,8	0,5	1,0
CHR	0,5	0,9	0,6	1,1
BbF	0,5	0,9	0,6	1,1
BkF	0,4	0,8	0,5	1,0
BaP	0,9	1,5	1,1	1,8
DBA	0,6	1,0	0,7	1,2
BPE	0,7	1,2	0,8	1,4
INP	2,3	3,7	2,8	4,4

LOD – mez detekce

LOQ – mez stanovitelnosti

Při práci na sestavě Agilent 1100 se podařilo snížit detekční limity PAHs. Srovnání mezí detekce a stanovitelnosti je uvedeno v tabulce č. 16.

Tabulka č. 16: Srovnání limitů detekce a stanovitelnosti ($\mu\text{g/l}$) na sestavě HPLC Agilent 1100 a na staré HPLC sestavě

PAH	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
	Agilent 1100	Agilent 1100	Agilent 1100	Agilent 1100	stará sestava	stará sestava	stará sestava	stará sestava
NAP	2,1	3,8	2,6	4,6	3,2	4,3	3,8	5,2
ACE	0,4	0,7	0,5	0,8	1,8	4,0	2,2	4,8
FLR	1,4	2,6	1,7	3,1	1,8	2,5	2,2	3,0
PHE	1,6	2,9	1,9	3,5	1	1,2	1,2	1,4
ANT	0,6	1,0	0,7	1,2	0,7	1,2	0,8	1,4
FLU	0,6	1,0	0,7	1,2	1,1	1,9	1,3	2,3
PYR	0,6	1,1	0,5	1,2	4,1	6,5	4,9	7,8
BaA	0,4	0,8	0,6	1,0	1,8	3,3	2,2	4,0
CHR	0,5	0,9	0,6	1,1	4,8	8,7	5,8	10,4
BbF	0,5	0,9	0,6	1,1	1,9	3,3	2,3	4,0
BkF	0,4	0,8	0,5	1,0	1	1,7	1,2	2,0
BaP	0,9	1,5	1,1	1,8	1,2	2,1	1,4	2,5
DBA	0,6	1,0	0,7	1,2	1,9	3,4	2,3	4,1
BPE	0,7	1,2	0,8	1,4	2,9	4,6	5,5	5,5
INP	2,3	3,7	2,8	4,4	7,3	8,5	8,8	10,2

5.5 Citlivost

Citlivost je dána změnou signálu, vyvolanou jednotkovou změnou validované vlastnosti (tj. směrnici kalibrační přímky). Výpočet byl proveden pomocí programu Effvalidation 3.0 ze směrnice přímky. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 17.

Tabulka č. 17: Výsledky citlivosti PAHs

PAH	Citlivost (mV.s/μg)
NAP	0,1
ACE	1,1
FLR	0,7
PHE	1,3
ANT	0,9
FLU	0,3
PYR	1,3
BaA	0,7
CHR	1,6
BbF	0,7
BkF	1,5
BaP	0,9
DBA	0,9
BPE	0,3
INP	0,1

5.6 Nejistoty stanovení

Stanovení relativní standardní nejistoty a relativní rozšířené nejistoty bylo provedeno z hodnot vícenásobného měření v programu Effvalidation 3.0. Hodnoty nejistoty stanovení PAHs pro vzorky 922, 1014, vnitrolaboratorní referenční materiál (VRM) a certifikovaný materiál (CRM) jsou uvedeny v tabulce č.18.

Tabulka č. 18: Nejistoty stanovení PAHs

PAH	Vzorek	Mez stanovitelnosti (µg/kg)	Úroveň - obsah (µg/kg)	Relativní standardní nejistota (%)	Relativní rozšířená nejistota (%)
NAP	922	4,6	8,4	7,8	15,3
	1014		7,3	28,8	56,5
	VRM		549	8,8	17,2
	CRM		2728	12,6	24,8
ACE	922	0,8	4,6	7,8	15,3
	1014		11,7	29,7	58,3
	VRM		43,4	6,5	12,7
	CRM		1431	6,4	12,6
FLR	922	3,1	13	6,1	11,9
	1014		24,7	27	53
	VRM		81,3	17	33,4
	CRM		2874	14,2	27,8
PHE	922	3,5	92,6	4,7	9,2
	1014		197	22,7	44,4
	VRM		1117	6,1	11,9
	CRM		13802	5,2	10,2
ANT	922	1,2	31,9	4,7	9,3
	1014		114	17,9	35,1
	VRM		295	9,3	18,3
	CRM		3664	3,6	7
FLU	922	1,2	215	8,2	16
	1014		716	17,6	34,4
	VRM		1934	3,0	6,0
	CRM		15857	6,9	13,6
PYR	922	1,2	191	7,3	14,3
	1014		621	17,7	34,6
	VRM		1650	4,4	8,7
	CRM		14510	7,6	14,9

PAH	Vzorek	Mez stanovitelnosti (µg/kg)	Úroveň - obsah (µg/kg)	Relativní standardní nejistota (%)	Relativní rozšířená nejistota (%)
BaA	922	1,0	80,3	6,6	12,9
	1014		235	18	35,3
	VRM		1012	8,3	16,2
	CRM		7204	5,4	10,6
CHR	922	1,1	100	6,8	13,4
	1014		285	15,6	30,6
	VRM		1156	5,5	10,9
	CRM		7242	6,2	12,1
BbF	922	1,1	67,6	2,2	4,3
	1014		154	15,1	29,5
	VRM		1293	6,9	13,5
	CRM		6618	2,7	5,3
BkF	922	1,0	47,8	4,8	9,5
	1014		115	15,4	30,2
	VRM		636	4,3	8,5
	CRM		3897	7,1	13,9
BaP	922	1,8	93,5	6,2	12,1
	1014		252	10,3	20,3
	VRM		1328	11,1	21,7
	CRM		8408	3,2	6,3
DBA	922	1,2	11,4	4,5	8,9
	1014		28,3	16,1	31,5
	VRM		175	7,3	14,4
	CRM		1172	8	15,7
BPE	922	1,4	60	7,2	14,1
	1014		126	12,3	24,2
	VRM		1051	22,7	44,4
	CRM		6061	5,4	10,6
INP	922	4,4	61,8	8,6	16,8
	1014		165	13,4	26,3
	VRM		1121	10,3	20,1
	CRM		5442	4,8	9,4

6 Závěr

Cílem práce bylo převést metodu stanovení polyaromatických uhlovodíků metodou HPLC na nový kapalinový chromatograf Agilent 1100. Byly stanoveny validační parametry.

Opakovatelnost byla ověřena na dvou reálných půdách, na vnitrolaboratorním referenčním materiálu (VRM) a na certifikovaném referenčním materiálu (CRM) vícenásobným měřením.

Správnost byla ověřena pomocí certifikovaného referenčního materiálu. Výsledky měření byly zpracovány programem EffiValidation. Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky. Byl analyzován vnitrolaboratorní referenční materiál na staré sestavě HPLC a na sestavě Agilent 1100. Získané výsledky byly porovnány pomocí programu EffiValidation 3.0. Metoda stanovení PAHs poskytuje statisticky stejné výsledky.

Dále byl ověřen validační parametr linearita. Ta byla prokázána u všech sledovaných polyaromatických uhlovodíků.

Meze detekce a stanovitelnosti byly určeny z kalibrační přímky. Na HPLC Agilent 1100 se podařilo snížit detekční limity PAHs. Pomocí programu EffiValidation byla určena citlivost jednotlivých PAHs ze směrnice kalibrační přímky.

Byla vypočtena relativní standardní nejistota a relativní rozšířená nejistota z hodnot vícenásobného měření pro dvě reálné půdy, vnitrolaboratorní referenční materiál a pro certifikovaný referenční materiál. Relativní rozšířená nejistota pro většinu PAHs se pohybuje kolem 20 %, což koresponduje s hodnotami získanými na staré HPLC sestavě. Vzorek 1014 vykazuje vyšší hodnoty relativní rozšířené nejistoty, což znamená, že se jedná o nehomogenní půdu.

Provedenými validačními kroky byla ověřena správnost a platnost metody stanovení polyaromatických uhlovodíků v půdách na HPLC sestavě Agilent 1100.

7 Literatura

- 1 Koostra P.R., Straub M.H.C., Stil G.H., van der Velde E.G., Hesselink W., Land C.C.J.: Solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil samples. *Journal of Chromatography A*, 697 (1995) 123 – 129
- 2 J.L.Beltrán, R.Ferrer, J.Guiteras: *J.LIQ.Chrom.&Rel.Technol*,19(3), 477 – 488 (1996). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by HPLC with spectrofluorimetric detection and wavelength programming
- 3 Mäkelä M., Pyy L.: Effect of temperature on retention time reproducibility of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Chromatography A*, 699 (1995) 49 – 57
- 4 K. Eckschlager, I. Horsák, Z. Kodejš: Vyhodnocování analytických výsledků a metod.

Bulletin Národní referenční laboratoře XII 2008/1

Ročník: XII, č. 1
Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2008
Odpovědný redaktor: RNDr. Jiří Zbíral, Ph.D.
Technická spolupráce: Ing. Iva Strížová
Náklad: 150 výtisků
Počet stran: 51
Tisk: ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, tel.: 543 548 111
e-mail: ukzuz@ukzuz.cz

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196