

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2010

Ročník XIV, číslo 1/2010

Brno 2010

*Toto číslo Bulletinu Národní referenční laboratoře věnujeme naší předčasně zesnulé kolegyni
Martině Valíkové*

Obsah

1. **Vývoj kalibrační rovnice na N-látky a škrob ve sladovnickém ječmeni metodou FT-NIRS** 1

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

2. **Využití mikrovlnného rozkladu pro hydrolyzu krmiv – stanovení lysinu** 9

Vlastimil Kubíček, Eva Fojtlová, Eva Niedobová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno, Hroznová 2,
656 06 Brno

3. **Stanovení vybraných prvků v rostlinách metodou ICP-MS po mikrovlnném rozkladu** 23

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

4. **Zavedení multireziduální metody stanovení pesticidů metodou GC-MS/MS** 34

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

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

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

Vývoj kalibrační rovnice na N-látky a škrob ve sladovnickém ječmeni metodou FT-NIRS

David Čižmár

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

1 Souhrn

Metodou FT-NIR spektroskopie byly vytvořeny a optimalizovány kalibrační modely pro stanovení obsahu N-látek a škrobu ve sladovnickém ječmeni. Všechny vzorky, u nichž byl znám koncentrační obsah sledovaných parametrů získaných pomocí laboratorních referenční metod (LRM), pocházely z laboratoře testování odrůd. Příslušné kalibrační modely pak byly následně ověřeny pomocí Studentova t testu na porovnání dvou analytických metod. Vyhovující výsledky u všech naměřených parametrů prokázaly použitelnost metody FT-NIR spektroskopie pro stanovení N-látek a škrobu v ječmeni setém.

2 Úvod

Ječmen je společně s pšenicí cíleně pěstován od zemědělských počátků lidstva. Za oblast jeho původu je pokládána Asie, odkud se rozšířil přes Balkán do Evropy. Na naše území přinesly ječmen stěhovavé národy z jihozápadní Asie přibližně před pěti tisíci lety. Tato obilovina byla převážně používána pro lidskou výživu a pro své protizánětlivé a antiseptické účinky i jako léčivá rostlina.

Dle botanického zařazení patří ječmen do čeledi lipnicovitých trav. Ječmen zahrnuje 25 druhů planého ječmene a jeden druh kulturní: ječmen setý (*Hordeum vulgare*) (obr. 1), který patří k hospodářsky nejvýznamnějším rostlinám. Kulturní ječmen je jednoletá jarní nebo ozimá obilnina, některé plané druhy jsou i víceleté. V našich podmínkách se pěstují převážně jarní formy dvouřadého ječmene. Kromě pluchatých odrůd byly pro potravinářské účely vyšlechtěny i formy *nahé* a *waxy* (sklovité) odrůdy s vysokým obsahem rozpustné vlákniny a beta-glukanů (1).

Hlavní využití ječmene jako suroviny je v oblasti sladovnické, krmivářské a potravinářské. Využívá se rovněž v lihovarnictví k výrobě tradičních lihových nápojů, perspektivně se s ním počítá i jako s možným zdrojem obnovitelné energie pro výrobu bioethanolu v rámci tzv. lihobenzínového programu. Rovněž se nabízí jeho využití i k produkci škrobu. Pro obě tyto formy uplatnění jsou vhodné odrůdy převážně s vysokým obsahem škrobu (min. 60 % až 75 %) a minimálním obsahem bílkovin (do 10 %) (2).

Obr. 1: Ječmen setý (3)



Cílem práce bylo vytvořit a optimalizovat kalibrační modely pro stanovení dusíkatých látek (N-látek) a škrobu metodou NIR spektroskopie a zároveň vyhodnotit možnosti využití této moderní analytické metody na predikci vybraných parametrů v ječmeni setém.

3 Materiál a metody

3.1 Princip stanovení dusíkatých látek (N-látek) a škrobu

Vytvoření NIR kalibračního modelu pro daný parametr spočívá ve vztažení informace získané absorpcí v NIR oblasti s hodnotou stanovenou laboratorní referenční metodou (LRM) do vzájemného poměru a získání regresní závislosti.

V následující části jsou velmi stručně popsány klasické laboratorní metody mokré chemie, pomocí kterých byly získány referenční hodnoty použité pro kalibraci NIR spektrometru. Výsledek referenčních hodnot v kalibraci se uvádí jako průměr ze dvou paralelních stanovení.

Stanovení obsahu dusíkatých látek (N-látek)

Stanovení obsahu dusíkatých látek (hrubého proteinu) vychází z normy ČSN 46 7092-4 (4). Tato norma je platná pro stanovení obsahu dusíkatých látek v krmivech a používá se pro stanovení dusíkatých látek i ve vzorcích olejnin a obilovin.

Dusíkaté látky se stanoví metodou podle Kjeldahla - titračně alkalimetry (acidimetry) po mineralizaci vzorku horkou kyselinou sírovou za přítomnosti katalyzátoru převedením na síran amonný, vytěsněním amoniaku hydroxidem sodným a jeho predestilováním do kyseliny sírové (borité).

Stanovení obsahu škrobu

Stanovení obsahu škrobu vychází z normy ČSN 46 7092-21 (5), která platí pro stanovení obsahu škrobu v krmivech a používá se pro stanovení obsahu škrobu i ve vzorcích obilovin.

Obsah škrobu se stanoví polarimetry po hydrolýze vzorku kyselinou chlorovodíkovou a odstranění bílkovin Caressovými činidly, polarimetry změřením optické otáčivosti a provedením korekce na opticky aktivní látky rozpustné ve směsi ethylalkohol - voda.

3.2 Stanovení metodou NIR spektroskopie

Pro vytvoření přesného NIR kalibračního modelu je obecně základním požadavkem dostatečný počet analyzovaných vzorků. Rozsah analyzovaných vzorků odrůdového zkušebnictví klasickými laboratorními metodami (LRM) je mimořádný, ÚKZÚZ je v rámci ČR zcela ojedinělým pracovištěm zaměřeným na tento typ laboratorního testování, proto byl požadavek na množství vzorků pro vytvoření dostatečně robustních kalibračních modelů spolehlivě splněn. V případě ječmene setého bylo proměřeno celkem 290 vzorků pro kalibraci parametru N-látky a 290 vzorků na parametr škrob. Vzorky použité na kalibraci NIR spektrometru pocházely ze všech regionálních pracovišť ÚKZÚZ a byly nashromážděny za období 4 let.

Všechny vzorky ječmene byly před měřením pomlety na laboratorním mlýnku VM-7 (Minirazant) a následně prosety přes síto 1 mm. NIR spektra takto připravených vzorků byla nasnímana v křemenných kyvetách o průměru 3 cm v režimu reflektance. NIR měření byla prováděna v blízké infračervené spektrální oblasti přístrojem Nicolet Antaris s Fourierovou transformací. Spektrální reflektance udávaná jako průměr ze 120 spekter byla zobrazena jako logaritmus inverzní reflektance ($\log 1/R$) v 0,5nm intervalech v rozsahu vlnových délek

(1000 – 2500) nm. Každý vzorek byl změřen dvakrát, pro další vývoj kalibračního modelu pak bylo použito průměrné spektrum.

Pro správný vývoj NIR kalibračního modelu je důležité, aby koncentrační rozsah kalibrovaného parametru byl co možná nejvyšší. Koncentrační rozsahy pro stanovované parametry ve vzorcích ječmene setého jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Složení vzorků ječmene setého použitých pro kalibraci přístroje Nicolet Antaris měřených v reflektanci – celkový počet vzorků $N_K = 290$

	N-látky (%/s)	Škrob (%/s)
Minimum	8,65	54,94
Maximum	16,15	65,34
Průměr	11,20	60,71

Důležitým předpokladem vytvoření úspěšného kalibračního modelu je dále skutečnost, že laboratorní referenční metoda používaná pro kalibraci NIR spektrometru má být dostatečně přesná. Výsledky referenčních hodnot obou parametrů získaných klasickými metodami mokré chemie jsou prezentovány jako průměr paralelních stanovení.

V prvním kroku před vlastní regresní tvorbou kalibračního modelu byla na jednotlivé soubory kalibračních spekter (vzorků) aplikována matematická korekce spekter SNV, která eliminuje vliv velikosti částic. Tento krok je velmi důležitý u vzorků, které před vlastní NIR analýzou prošly úpravou síťováním nebo pro vlastní měření NIR spektroskopii nebyly pomlety. Na takto upravených NIR spektrech pro všechny parametry byla provedena analýza hlavních komponent, která je vhodná pro detekci a určení odlehlých měření vzorků (spekter). Metodou hlavních komponent (PCA) byla identifikována odlehlá měření, ale současně bylo ověřeno, zda tímto vylučováním nebyly označeny důležité kalibrační vzorky (extrémní body, které mohou odpovídat např. nové plodinné odrůdě nebo koncentrační abnormalitě), čímž by byla snížena robustnost vytvářeného kalibračního modelu.

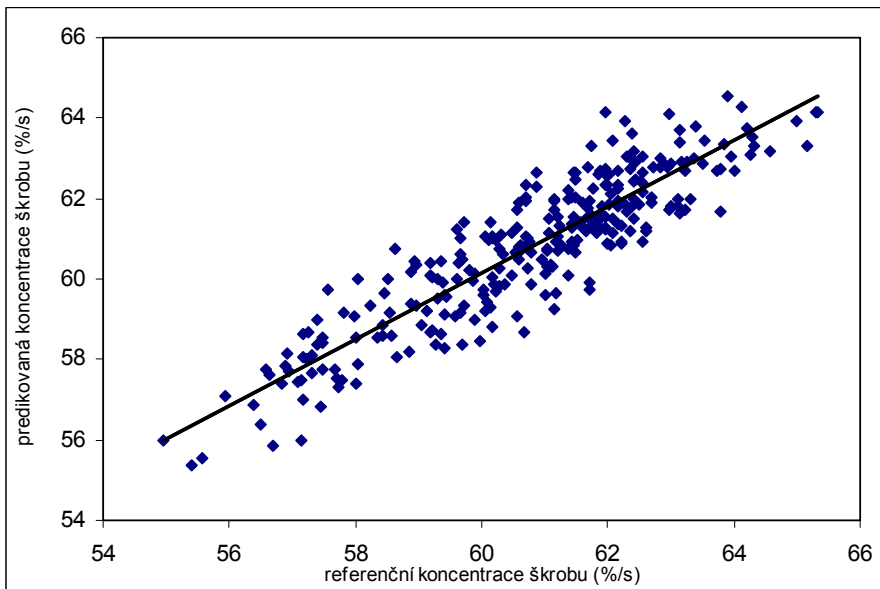
Tímto způsobem upravené kalibrační soubory pro stanovení vybraných parametrů v ječmeni setém po vyloučení odlehlých měření byly dále korigovány regresní metodou PLS. Následně byly jednotlivé kalibrační modely optimalizovány tak, aby poskytovaly co nejvyšší hodnotu korelačního koeficientu R a zároveň co nejnížší střední kvadratickou chybu predikce RMSECV při optimálním počtu latentních proměnných (hlavních komponent) v modelu.

V průběhu tvorby kalibračního modelu byly rovněž vybrány vhodné vlnové délky, a sice takové, u kterých se absorpcí záření v NIR spektru projevila zřejmá korelace s laboratorní referenční hodnotou. Výsledkem optimalizace kalibračního modelu je získaný graf referenčních *versus* NIR predikovaných koncentrací (kalibrační závislost, kalibrační křivka) a hodnota střední kvadratické chyby predikce RMSECV a korelačního koeficientu R.

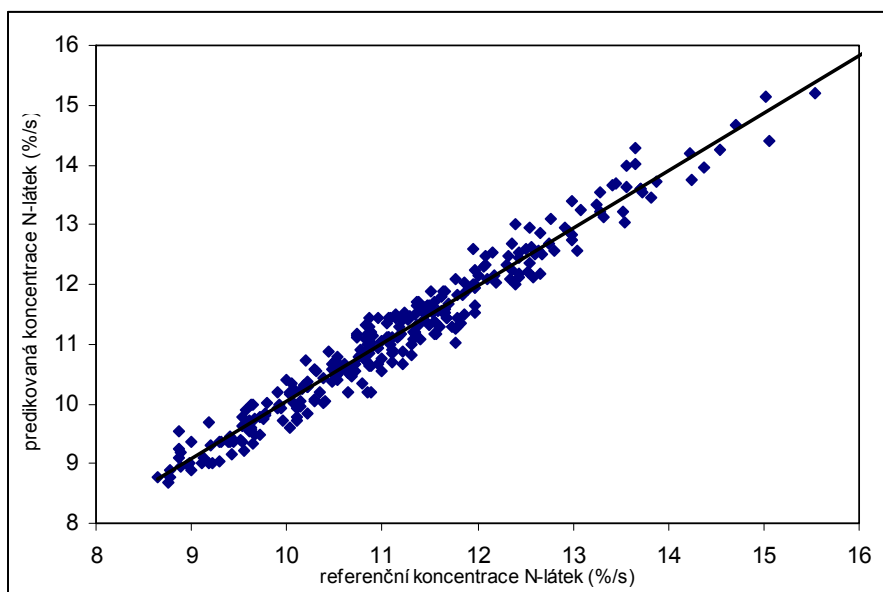
4 Výsledky a diskuse

Vytvořené kalibrační závislosti pro N-látky a škrob v ječmeni setém vyjádřené jako obsah v % v sušině vzorku jsou zobrazeny na obr. 2 a 3.

Obr. 2: Kalibrační závislost pro parametr N-látky (%/s)



Obr. 3: Kalibrační závislost pro parametr škrob (%/s)



Souhrnný přehled získaných kvalitativních parametrů kalibračních modelů stanovených regresní metodou PLS pro vybrané parametry v ječmeni setém je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2: Kvalitativní parametry kalibračních modelů vzorků ječmene setého

Parametr	RMSECV	R
N-látky (%/s)	0,27	0,98
Škrob (%/s)	1,00	0,90

Z tabulky 2, která zobrazuje kvalitativní parametry vytvořených NIR kalibračních modelů pro jednotlivé analyzované parametry, je zřejmé, že existuje vysoká korelace mezi posouzením chemické skladby měřených vzorků s použitím klasických laboratorních metod (LRM) a způsobem hodnocení metodou NIR spektroskopie.

Predikční schopnosti těchto vytvořených kalibračních modelů pro jednotlivá stanovení ve vzorcích ječmene setého byly ověřovány na nezávislých vzorcích, které nebyly zahrnuty do vývoje kalibračních modelů. Následným porovnáním výsledků získaných LRM a metodou NIR spektroskopie na testování shodnosti výsledků se ověřovala nulová hypotéza, že rozdíl $|\bar{x}_A - \bar{x}_B|$ není statisticky významný na zvolené hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Pro testování

shodnosti byl použit Studentův test t (6). Vypočtené hodnoty t testu byly porovnány s kritickou hodnotou t_{α} . Získané výsledky pro jednotlivé parametry jsou prezentovány v tabulce 3.

Tabulka 3: Kvalitativní parametry porovnání 2 analytických metod

Parametr	k	\bar{x}_A (LRM)	\bar{x}_B (NIR)	α	t	$t_{\alpha(0,05)}$
N-látky (%/s)	21	10,77	10,86	0,05	1,59	2,086
Škrob (%/s)	15	60,54	60,47	0,05	1,16	2,145

Z tabulky 3 je zřejmé, že vypočtené hodnoty t pro oba sledované parametry jsou nižší oproti tabulkové (kritické) hodnotě t_{α} . Z toho vyplývá, že metoda NIR spektroskopie v porovnání s laboratorní referenční metodou poskytuje statisticky shodné výsledky pro stanovení vybraných parametrů ve vzorcích ječmene setého.

5 Závěr

Na dostatečně obsáhlém souboru vzorků ječmene setého byly optimalizovány kalibrační modely metodou NIR spektroskopie pro stanovení vybraných nutričních parametrů.

Z prezentovaných grafů kalibračních závislostí a hodnot kvalitativních parametrů vytvořených kalibračních modelů (RMSECV, R) a výsledků porovnání dvou analytických metod (LRM vs. NIR) pro predikované parametry N-látky a škrob je zřejmé, že metoda NIR spektroskopie je vhodná a lze ji doporučit pro predikování těchto sledovaných parametrů v ječmeni setém.

6 Literatura

1. Příhoda, J., Skřivan, P., Hrušková, M.: Cereální chemie a technologie I, Vysoké škola chemicko-technologická v Praze, 2003
2. Prugar, J. a kol.: Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2008
3. Selgen a.s., Praha 7: www.selgen.cz, firemní literatura
4. ČSN 46 7092-4, Metody zkoušení krmiv: Stanovení dusíkatých látek (hrubého proteinu), 12/1998
5. ČSN 46 7092-21, Metody zkoušení krmiv: Stanovení obsahu škrobu, 11/1998
6. Eckschlager, K., Horsák, I., Kodejš, Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod. SNTL/ALFA Praha, 1980

Využití mikrovlnného rozkladu pro hydrolýzu krmiv – stanovení lysinu

Vlastimil Kubíček, Eva Fojtlová, Eva Niedobová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
vlastimil.kubicek@ukzuz.cz, eva.fojtlova@ukzuz.cz, eva.niedobova@ukzuz.cz

1 Úvod

Aminokyseliny jsou základní stavební jednotky bílkovin, tedy důležitá složka krmných směsí hospodářských zvířat. V potravě všech vyšších živočichů jsou aminokyseliny nejdůležitějším zdrojem dusíku a síry. Hlavní funkcí aminokyselin je jejich účast na proteosyntéze. Kondenzací aminoskupiny a karboxylové skupiny dvou aminokyselin vzniká peptidická vazba, která je základní formou spojování aminokyselin do peptidických řetězců. V živočišném organismu vzniká tímto způsobem velké množství nejrůznějších peptidů, kolísajících svou velikostí od nejmenších molekul, složených ze tří aminokyselin, až po polymery, obsahující více než tisíc základních jednotek. Stanovení lysinu v krmných směsích patří v laboratoři základní analytiky kromě k nejžádanějším. Již počátkem minulého století byla vyslovena domněnka, že nízký obsah lysinu, který patří mezi esenciální (nepostradatelné) aminokyseliny, může mít souvislost s nutriční hodnotou pšenice. Dnes je potvrzeno, že lysin je limitující aminokyselinou ve většině obilnin, bílkovinných krmiv rostlinného původu a krmných směsí pro prasata. Je nutné sledovat nejen nedostatek, ale i nadbytek aminokyselin v krmivu, protože nadměrné množství má toxický vliv na organismus, způsobuje depresi příjmu krmiva a snížení intenzity růstu. Aminokyseliny se totiž nemohou ukládat v těle do zásoby, ale jsou poměrně rychle vylučovány nebo metabolizovány na své degradační produkty. Stanovení aminokyselin v krmných směsích patří mezi dražší a pracnější analytické operace v oblasti analýz krmiv. Toto stanovení je spojeno se dvěma okruhy problémů, jejichž optimální řešení dosud nebylo zcela nalezeno. Za prvé je nutné zajistit převedení aminokyselin, které jsou převážně vázané v bílkovinách, do formy volných aminokyselin a to bez jejich ztráty nebo degradace. Za druhé se musí zvolit

taková metoda dělení a stanovení, která zaručuje dostatečnou přesnost a správnost, musí být dostatečně rychlá a experimentálně nenáročná. Analytika aminokyselin je navíc komplikována přítomností dalších složek v krmivu, které dané stanovení mohou rušit nebo mohou dávat pozitivní chyby. Kromě bílkovinných aminokyselin jsou typickými složkami také aminokyseliny, které bývají přítomny volné nebo v peptidech, nikoli vázané v bílkovinách. Ve vzorcích živočišného i rostlinného původu se vyskytují aminocukry, jejichž rozkladem se mohou vytvářet aminy, které vznikají také termickou degradací aminokyselin i při relativně nízkých teplotách nebo bakteriálním rozkladem. V peptidech a bílkovinách jsou aminokyseliny vzájemně vázány peptidovými vazbami, takže se z těchto vazeb musejí uvolnit hydrolýzou. Hydrolýza může probíhat v kyselém nebo alkalickém prostředí. Při kyselé hydrolýze se materiál hydrolyzuje za varu přebytkem konstantně vroucí kyseliny chlorovodíkové. Během hydrolýzy, která může trvat 4 h až 70 h při teplotě 100 °C až 145 °C, dochází k rozkladu siřných aminokyselin, proto se pro jejich stanovení musí použít jiný postup. Rychlost rozkladu peptidických vazeb se liší podle struktury a druhu jednotlivých aminokyselin. Aminokyseliny uvolněné z peptidických vazeb mohou dále podléhat různým rozkladným reakcím. Například pro stanovení přesných obsahů isoleucinu a valinu, které jsou obtížně uvolňovány ze svých peptidických vazeb, se musí použít hydrolýza po dobu 70 h, u threoninu a serinu dochází při této době podle různých autorů ke ztrátám ve výši (3 – 16) %, u tyrosinu kolem (1 – 14) %. Tyrosin může být v přítomnosti oxidačních činidel také oxidován nebo může přecházet na chlorderiváty. Vzhledem k dlouhé době hydrolýzy byla v roce 1970 publikována metoda, ve které se bílkoviny hydrolyzují při teplotě 145 °C pouhé 4 h. Tato metoda, která vykazuje relativně nejlepší poměr mezi časovou náročností a ztrátami aminokyselin rozkladem, se v laboratoři NRL-RO Brno používá pro kyselou hydrolýzu a je zařazena do JPP (1). Po hydrolýze následuje odpařování přebytečné HCl na vakuové odparce. Hydrolýza mikrovlnným rozkladem dále urychlí průchodnost vzorků laboratoří nejen díky zkrácení času samotné hydrolýzy, ale i tím, že odpadne vakuové odpařování. Dále není nutná následná neutralizace zbytkové HCl, protože složení tlumicího roztoku stačí na takovou úpravu pH, která je dostatečná k tomu, aby retenční časy lysinu a standardu byly podobné. V současné době se k separaci a kvantifikaci aminokyselin používá metod vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC) nebo střednětlaké kapalinové chromatografie na iontoměničích podle Steina a Moorea, jako je tomu v laboratoři NRL-RO Brno. K separaci aminokyselin se používají především ionexy, které byly využity k separaci již před mnoha lety a v různých modifikacích se v automatických analyzátoch aminokyselin používají dodnes. Vlastní kvantifikace aminokyselin není možná bez předchozí derivatizace, v případě

laboratoře NRL-RO Brno roztokem ninhydrinu, za kolonou chromatografického systému. Výhodou této metody je její velká robustnost, nevýhodou poněkud vyšší mez stanovitelnosti proti metodám HPLC a delší doba analýzy, která se pohybuje od 30 min do 120 min.

2 Materiál a metody

Pro ověření byly použity jak vzorky z mezilaboratorních porovnávacích zkoušek, tak běžné krmné směsi pro prasata a premixy s nižším obsahem přidaného lysinu. Mikrovlnný rozklad probíhal v peci MWS-3 Berghof ve vysokotlakých nádobách DAC 100 a DAC 100S (100 ml, 150 bar) s navážkami (0,06 – 0,3) g. Středotlaké nádoby DAP 60S (60 ml, 40 bar) nebyly použity kvůli nutnosti relativně vysoké navážky a problematického rozptýlení vzorku v úzké nádobě. Jako inserty do těchto nádob byly použity běžné skleněné zkumavky, později, kvůli možnému částečnému ovlivnění intenzity mikrovlnného záření, zkumavky z křemenného skla. Použití těchto insertů umožní lepší manipulaci se vzorkem při vážení i následném zpracování a ochrání vlastní teflonovou nádobu před poškozením. K tomu může někdy dojít místním přehříváním stěny nádoby při nedostatečně rozptýleném vzorku v suspenzi (2). Při hydrolyze dochází k mírně exotermní reakci i při velmi pozvolném začátku rozkladu. Z otevřeného insertu může vzkypěním suspenze přejít určité množství lysinu do prostoru rozkladné nádoby s kyselinou a docházet ke ztrátám. Pro ověření, zda k těmto ztrátám dochází a v jakém množství, byl vybrán rozklad vzorku tritikale ve 3 × 2 paralelních stanoveních s relativně vysokou navážkou cca 0,4 g a obsahem lysinu 5,1 g/kg. Kromě zpracování vzorku navrženým způsobem byla kyselina z rozkladné nádoby, která byla vně insertu, zahuštěna na odparce do sirupovité konzistence (1) a převedena do 5 ml tlumivého roztoku (2.2.7) a obsah lysinu byl analyzován. I přes to, že takto získaný vzorek byl 10 × koncentrovanější než běžně zpracovávané vzorky, obsah lysinu byl u všech analýz pod mezí detekce. Pro optimalizaci podmínek rozkladu byla vybrána kompletní krmná směs pro předvýkrm prasat do 35 kg živé hmotnosti, patřící mezi nejčastější zakázky. Byla prověřována závislost výtěžku na nastavené teplotě a délce mineralizace (tab. 2, 3, obr. 1, 2). Teplota v rozkladných nádobách se během mineralizace měří na principu snímání intenzity tepelného záření vydávaného vzorkem a snímaného infračerveným teplotním senzorem. Reálná teplota v nádobách je velmi závislá na typu a složení vzorku, homogenitě a jeho množství, protože při mikrovlnném rozkladu dochází k různě intenzivní exotermní reakci. Kvůli různorodým matricím vzorků krmiv byla proto mikrovlnná pec používána pro paralelní

stanovení vždy jen jednoho vzorku, tedy na dvě pozice. I přesto zůstává mikrovlnný rozklad významným pomocníkem v propustnosti vzorků laboratoří, zejména při potřebě rychlé přípravy malého množství vzorků a pokud je k dispozici dostatečný počet nádob, které mohou být připraveny předem. Při větších várkách vzorků se úspora času snižuje. Po ukončení rozkladného programu je možné nádoby okamžitě z pece odstranit a pokračovat rozkladem dalšího připraveného páru vzorků. Horké nádoby je možno chladit volně na vzduchu nebo ponořené ve vodě. Takto nádoby zchladnou rychleji, a protože v nádobách je stálý přetlak par HCl i po ochlazení, nehrozí naředění vzorku při současné kontrole těsnosti nádoby. Hydrolyzáty byly analyzovány na analyzátoru aminokyselin AAA 400 firmy Ingos s.r.o. s postkolonovou derivatizací.

2.1 Přístroje a zařízení

- 2.1.1 Mineralizační mikrovlnné zařízení MWS-3 Berghof
- 2.1.2 Automatický analyzátor aminokyselin AAA 400 Ingos
- 2.1.3 Rotační vakuová odparka Büchi
- 2.1.4 Ultrazvuková lázeň K12
- 2.1.5 Třepačka na zkumavky IKA

2.2 Chemikálie

- 2.2.1 Kyselina chlorovodíková p.a., koncentrovaná
- 2.2.2 Kyselina chlorovodíková, $c = 6 \text{ mol/l}$
- 2.2.3 Argon nebo jiný inertní plyn
- 2.2.4 Thiodiglykol, koncentrovaný
- 2.2.5 Kyselina citronová p.a.
- 2.2.6 NaCl p.a.
- 2.2.7 Citronanový rozpouštěcí tlumivý roztok, $\text{pH} = 2,2$
- 2.2.8 Azid sodný p.a.
- 2.2.9 Demineralizovaná voda $< 10 \mu\text{S}$

2.3 Pracovní postup

2.3.1 Hydrolýza

Navážka homogenizovaného vzorku (síto 0,5 mm) se kvantitativně převede do zkumavky z křemenného skla a postupně za občasného protřepání se přidají 3 ml kyseliny chlorovodíkové (2.2.2). Suspence se zbaví rozpuštěného vzduchu střídavým přepínáním vakua a inertního plynu. Do každé rozkladné nádoby se předloží 18 ml kyseliny chlorovodíkové (2.2.2) a vloží křemenná zkumavka se suspenzí vzorku. Směs v rozkladné nádobě se převrství argonem a nádoba uzavře. Hydrolýza probíhá podle programu znázorněném v tabulce 1. Po ukončení hydrolýzy se k obsahu křemenné zkumavky přidá cca 10 ml tlumivého roztoku (2.2.7) a rozkladný produkt se promíchá působením ultrazvukové lázně. Poté se suspenze doplní do definovaného objemu a po přefiltrování je okamžitě připravena k chromatografickému stanovení.

2.4 Diskuse a výsledky

Nejdříve byl vyzkoušen rozklad za podmínek co nejpodobnějších hydrolýze dle JPP čl. 2.17 včetně odpařování. Bez optimalizace metody byla výtěžnost lysinu 90 %. S nutností odpařování by metoda nepřinesla významnou úsporu času, a proto nebyla dále rozvíjena. Zajímavá metoda hydrolýzy v plynné fázi, která byla dále odzkoušena, nevykazovala uspokojivé výsledky, protože je omezena technologickými možnostmi stávajícího rozkladného zařízení a neumožňuje dostatečné rozptýlení vzorku v parách HCl, nutné pro dokonalou hydrolýzu. Byl zvolen způsob s přidavkem malého množství HCl přímo ke vzorku a s další HCl uvnitř rozkladné nádoby, ale vně křemenné zkumavky – insertu. Po optimalizaci teploty a délky mineralizace (tab. 2, 3, obr. 1, 2) byly jako nejvhodnější zvoleny hodnoty, které jsou uvedeny v tabulce 1. Pro ověření navrhované metodiky bylo vybráno 10 běžných vzorků krmných směsí a premixů. Každý vzorek byl hydrolyzován 3 × standardním způsobem a 3 × mikrovlnným rozkladem, analyzován a vyhodnocen programem používaným pro navázání pracovníků (tab. 4) s uspokojivým výsledkem. Pro statistické srovnání obou metod přípravy vzorků pro stanovení aminokyselin byl následně použit t-test, kde $t_{0,05, \text{krit}} = 2,776$. V tabulce č. 5 jsou uvedeny průměrné obsahy lysinu spolu se směrodatnými odchylkami. Z vypočítaných $t_{0,05}$ je zřejmé, že pouze u vzorku č. 1668 jsou výsledky statisticky rozdílné. U ostatních vzorků jsou výsledky získané oběma metodami statisticky shodné. Následně bylo shromážděno 50 paralelních měření vzorků,

hydrolyzovaných mikrovlnným ohřevem, z kterých byla programem EffiValidation vypočtena opakovatelnost a nejistota (tab. 6 a tab. 7).

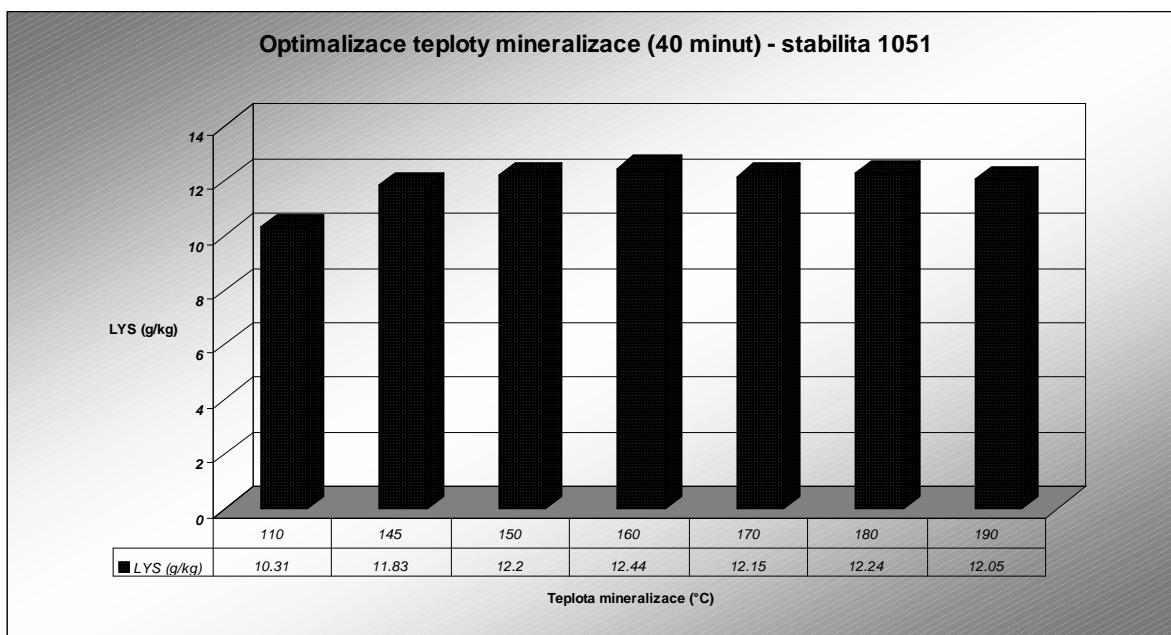
Tabulka 1. Teplotní program

Parametr aplikace	1. krok	2. krok	3. krok	4. krok
Teplota	110 °C	150 °C	160 °C	100 °C
Čas náběhu teploty	1 min	3 min	1 min	1 min
Čas	4 min	0 min	30 min	0 min

Tabulka 2. Optimalizace teploty a mineralizace

Max. teplota (°C)	Čas (min.)	LYS (g/kg)
110	40	10,31
145	40	11,83
150	40	12,2
160	40	12,44
170	40	12,15
180	40	12,24
190	40	12,05

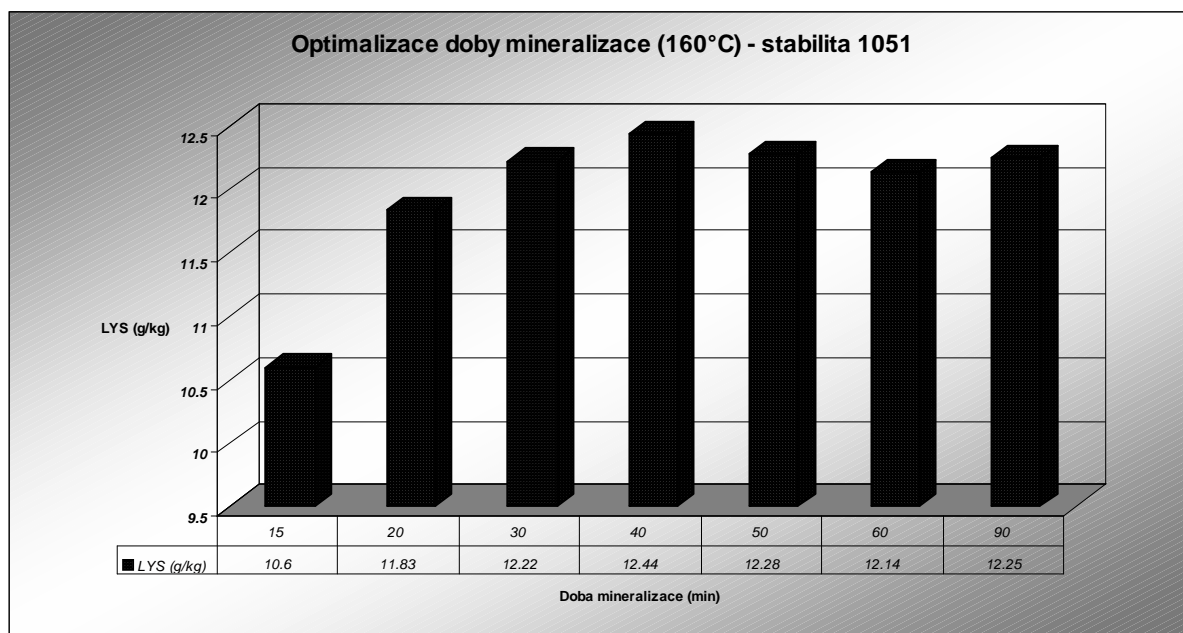
Obr. 1. Optimalizace teploty mineralizace



Tabulka 3. Optimalizace doby mineralizace

Max. teplota (°C)	Čas (min.)	LYS (g/kg)
160	15	10,6
160	20	11,83
160	30	12,22
160	40	12,44
160	50	12,28
160	60	12,14
160	90	12,25

Obr. 2. Optimalizace doby mineralizace



Tabulka 4. Vyhodnocení programem pro navázání pracovníků

Hydrolýza mikrovlnným rozkladem					Příprava dle př. č. 9 vyhlášky č. 222/96 čl. 2.17				
Č. vzorku	Hodnoty	Průměr		Interval	Č. vzorku	Hodnoty	Průměr		Interval
1768-4	45,86				1768-1	45,25			
1768-5	43,35	45,007	"±/-	3,263	1768-2	45,62	45,363	"±/-	0,520
1768-6	45,81				1768-3	45,22			
	41,744	45,007		48,270		44,843	45,363		45,883
						OK			OK

Č. vzorku	Hodnoty	Průměr		Interval	Č. vzorku	Hodnoty	Průměr		Interval
1008-1	9,75				1008-5	9,63			
1008-3	10,36	10,177	"±/-	0,871	1008-6	10,49	10,100	"±/-	1,118
1008-4	10,42				1008-7	10,18			
	9,306	10,177		11,048		8,982	10,100		11,218
						OK			OK

Č. vzorku	Hodnoty	Průměr		Interval	Č. vzorku	Hodnoty	Průměr		Interval
1055-1	9,72				1055-5	10,16			
1055-2	9,71	9,787	"±/-	0,286	1055-6	9,69	9,990	"±/-	0,611
1055-4	9,93				1055-7	10,12			
	9,501	9,787		10,073		9,379	9,990		10,601
						OK			OK

Hydrolýza mikrovlnným rozkladem
Příprava dle př. č. 9 vyhlášky č. 222/96 čl. 2.17

Č. vzorku	Hodnoty	Průměr		Interval	Č. vzorku	Hodnoty	Průměr		Interval
1439-1	13,82				1439-5	15,49			
1439-2	13,61	13,907	"±/-	0,884	1439-6	14,01	14,677	"±/-	1,924
1439-3	14,29				1439-7	14,53			
	13,023	13,907		14,791		12,753	14,677		16,601
						OK			OK

Č. vzorku	Hodnoty	Průměr		Interval	Č. vzorku	Hodnoty	Průměr		Interval
1440-1	9,37				1440-5	10,31			
1440-2	9,55	9,543	"±/-	0,442	1440-6	9,73	10,250	"±/-	1,274
1440-3	9,71				1440-7	10,71			
	9,101	9,543		9,985		8,976	10,250		11,524
						OK			OK

Č. vzorku	Hodnoty	Průměr		Interval	Č. vzorku	Hodnoty	Průměr		Interval
1570-2	9,23				1570-5	9,66			
1570-3	9,18	9,200	"±/-	0,065	1570-6	10,59	9,913	"±/-	1,430
1570-4	9,19				1570-7	9,49			
	9,135	9,200		9,265		8,483	9,913		11,343
						OK			OK

Hydrolyza mikrovlnným rozkladem

Příprava dle př. č. 9 vyhlášky č. 222/96 čl. 2.17

Č. vzorku	Hodnoty	Průměr		Interval	Č. vzorku	Hodnoty	Průměr		Interval
1597-7	30,61				1597-1	32,22			
1597-18	32,79	31,750	"±/-	2,834	1597-2	31,88	32,137	"±/-	0,559
1597-29	31,85				1597-3	32,31			
	28,916	31,750		34,584		31,578	32,137		32,696
						OK			OK

Č. vzorku	Hodnoty	Průměr		Interval	Č. vzorku	Hodnoty	Průměr		Interval
1589-7	58,67				1589-1	63,18			
1589-18	62,28	60,040	"±/-	4,693	1589-2	60,96	62,673	"±/-	3,796
1589-9	59,17				1589-3	63,88			
	55,347	60,040		64,733		58,877	62,673		66,469
						OK			OK

Č. vzorku	Hodnoty	Průměr		Interval	Č. vzorku	Hodnoty	Průměr		Interval
1668-1	8,41				1668-4	8,79			
1668-2	8,6	8,523	"±/-	0,247	1668-5	9,23	9,023	"±/-	0,572
1668-3	8,56				1668-6	9,05			
	8,276	8,523		8,770		8,451	9,023		9,595
						OK			OK

Č. vzorku	Hodnoty	Průměr		Interval	Č. vzorku	Hodnoty	Průměr		Interval
1667-8	6,33				1667-4	6,78			
1667-13	6,27	6,557	"±/-	1,040	1667-5	6,53	6,643	"±/-	0,325
1667-14	7,07				1667-6	6,62			
	5,517	6,557		7,597		6,318	6,643		6,968
						OK			OK


Tabulka 5. Vyhodnocení programem t-test

Číslo vzorku	Hydrolýza mikrovlnným rozkladem			Hydrolýza dle př. č. 9 vyhlášky č. 222/96 čl. 2.17			t _{0,05}
	LYS (g/kg)			LYS (g/kg)			
	Hodnoty	Průměr	sd	Hodnoty	Průměr	sd	
1768	45,86	45,01	1,43	45,25	45,36	0,22	0,347
	43,35			45,62			
	45,81			45,22			
1008	9,75	10,18	0,37	9,63	10,10	0,44	0,190
	10,36			10,49			
	10,42			10,18			
1055	9,72	9,79	0,12	10,16	9,99	0,26	0,996
	9,71			9,69			
	9,93			10,12			
1439	13,82	13,91	0,34	15,49	14,68	0,75	1,313
	13,61			14,01			
	14,29			14,53			
1440	9,37	9,54	0,17	10,31	10,25	0,49	1,917
	9,55			9,73			
	9,71			10,71			
1570	9,23	9,20	0,03	9,66	9,90	0,58	1,728
	9,18			10,59			
	9,19			9,49			
1597	30,61	31,75	1,09	32,22	32,14	0,23	0,490
	32,79			31,88			
	31,85			32,31			
1589	58,67	60,04	1,96	63,18	62,67	1,52	1,502
	62,28			60,96			
	59,17			63,88			
1668	8,41	8,52	0,10	8,79	9,02	0,22	2,912
	8,60			9,23			
	8,56			9,05			
1667	6,33	6,56	0,45	6,78	6,64	0,13	0,265
	6,27			6,53			
	7,07			6,62			

Tabulka 6. Opakovatelnost

	ANALYTICKÁ METODA: - krmiva - Stanovení lysinu MW hydrolyza - LC - 1		
	VALIDACE: Plná validace		
	PARAMETR: Opakovatelnost: z paralelních měření		
	VALIDOVANÁ VLASTNOST: List 1		
VYHODNOCENÍ:			
Průměr měření	Opakovatelnost	Rel. Opakovatelnost	n
11,82441	0,22389	1,89341	51
Závěr: Opakovatelnost analytické metody je 0,22389 jednotek, tj. 1,89 %.			

Tabulka 7. Nejistoty

	ANALYTICKÁ METODA: - krmiva - Stanovení lysinu MW hydrolyza - LC - 1	
	VALIDACE: Nejistoty	
	PARAMETR: Nejistoty: z přesnosti - paralelní měření k dispozici	
	VALIDOVANÁ VLASTNOST: List 1	
VYHODNOCENÍ:		
Charakteristika	Hodnota	
Vypočtená hodnota	11,82441	
St. nejistota	0,22389	
Rel. st. nejistota (%)	1,89341	
Faktor pokrytí	2	
Rozšířená st. nejistota	0,44777	
Rel. rozšířená nejistota	3,78683	
Závěr: Rozšířená st. nejistota je 0,44777. Relativní rozšířená nejistota je 3,79 %.		

3 Závěr

Uvedené výsledky dokládají vhodnost této metody pro stanovení lysinu v krmných směsích.

4 Literatura

1. RNDr. Pavel Šíma a kol.: Postupy laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látel a premixů 2001, 73 – 78
2. Ing. Jana Rezková, Ing. Karel Rezek: Využití mikrovlnného rozkladu při stanovení aminokyselin 2006
3. Vladislav Zalabák a kol.: Specificky účinné látky ve výživě zvířat 1980
4. www.milestonesrl.com
5. www.ingos.cz
6. www.sweb.cz
7. www.hplc.cz

Stanovení vybraných prvků v rostlinách metodou ICP-MS po mikrovlnném rozkladu

Eva Urbánková, Eva Niedbová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
eva.urbankova@ukzuz.cz, eva.niedbova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Certifikované referenční materiály (CRM) byly mineralizovány v uzavřeném systému s mikrovlnným ohřevem. Takto připravené vzorky byly měřeny na ICP-MS spektrometru. Ve vzorcích byly stanoveny obsahy berylia, boru, hliníku, vanadu, chromu, manganu, železa, kobaltu, niklu, mědi, zinku, arsenu, selenu, molybdenu, kadmia a olova.

2 Úvod

Pro rozklad rostlin se používá mnoho mineralizačních metod. Používají se metody rozkladu na suché i mokré cestě (1 – 4). Mineralizace na suché cestě s sebou nese riziko ztráty některých prvků z rostlinného materiálu. Klasické mineralizace na suché a mokré cestě jsou poměrně zdlouhavé a v průběhu rozkladu nelze získat informace o změnách jednotlivých vzorků. Z tohoto hlediska má velkou výhodu mikrovlnný rozklad, a to jak pro úsporu chemikálií, tak pro úsporu času (5, 6). Rozklad vzorku v mikrovlnném zařízení trvá asi půl hodiny podle druhu vzorku a podle zvoleného teplotního programu. Vzorek před vlastním rozkladem nevyžaduje dlouhou přípravu. Čas přípravy vzorku pro mikrovlnný rozklad je mnohem kratší než čas, který je třeba k přípravě mineralizace vzorku klasickou cestou. Nevýhodou tohoto rozkladu je limitované množství vzorku, které lze mineralizovat. Pro mikrovlnný rozklad je nezbytné, aby byl vzorek dostatečně homogenní. Většina zařízení pro mikrovlnný rozklad dovoluje použít množství vzorku do (0,5 – 1) g, což je postačující pro stanovení prvků, které se v daném materiálu vyskytují ve větších koncentracích. Pro stanovení prvků v takto zmineralizovaném materiálu je pak nutno použít taková zařízení,

kteřá umožňují stanovit velmi malé koncentrace prvků. Tato stanovení lze tedy provádět např. na atomovém absorpčním spektrometru s grafitovou kyvetou (ETA-AAS), nebo na hmotnostním spektrometru s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Pro mikrovlnný rozklad bylo použito mikrovlnné zařízení MWS-3 speedwave s osmimístným rotorem. Uvnitř přístroje je vestavěn infračervený teplotní senzor, který umožňuje přesné a rychlé sledování teplot uvnitř rozkladných nádob. Měření teploty je založeno na principu snímání intenzity tepelného záření vydávaného vzorkem v úzkém spektrálním rozmezí, kde je dostatečná propustnost stěnou nádoby. Při širokospektrálním sledování je toto záření odfiltrováno stěnami nádoby, a proto jej není možné dále měřit. Tento způsob je významný tím, že dochází k zamezení kontaminace, protože při měření teploty nedochází ke styku s okolím a teplota je snímána přes stěny rozkladných nádob. Zaznamenávané hodnoty jsou přiváděny do řídicí jednotky, která zpětně reguluje výkon mikrovlnné pece. Obsah jednotlivých prvků byl měřen na ICP-MS spektrometru Agilent 7500ce s kolizní/reakční celou (7). ICP-MS spektrometr má dostatečnou citlivost pro měření nízkých koncentrací prvků v mineralizátech rostlin připravených mikrovlnným rozkladem. Ionty vzniklé v plazmatu se analyzují na základě poměru hmotnosti a náboje iontu (M/z). Zároveň je spektrometr vybaven kolizní/reakční celou, která umožňuje efektivní odstranění polyatomických interferencí (např. $ArCl^+$, $ArAr^+$, ArO^+ , ArC^+ atd.), které znemožňují stanovení prvků (As, Se, Fe, Cr atd.). Odstraňování uvedených interferentů probíhá buď v reakčním módu s použitím vodíku jako reakčního plynu (vhodné zejména pro $ArAr^+$ při stanovení Se na izotopu 80 nebo ArO^+ při stanovení Fe na izotopu 56) a nebo v kolizním módu s použitím helia (odstranění $ArCl^+$ při stanovení As na izotopu 75 nebo ArC^+ při stanovení Cr na izotopu 52). Velký dynamický rozsah přístroje (více než 9 řádů) umožňuje stanovení analytů ve velkém koncentračním rozsahu bez nutnosti ředění mineralizátu.

Pro ověření mineralizace pro stanovení Be, B, Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd, Pb byly použity certifikované referenční materiály GBW07602, GBW07603 a GBW07604.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

- 3.1.1 Kyselina dusičná, HNO_3 , koncentrovaná, p.a. (Lachema Neratovice) predestilovaná na podvarovém destilačním zařízení
- 3.1.2 Peroxid vodíku H_2O_2 , 30%, Suprapur (Merck)
- 3.1.3 Demineralizovaná voda
- 3.1.4 Certifikované standardní roztoky Be, B, Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd, Pb, Sc, Ge, In, Bi, Te o koncentraci 1 g/l (Analytika, Česká republika)

3.2 Zařízení

- 3.2.1 Mikrovlnné zařízení MWS – 3 speedwave (Berghof, Eningen, Germany)
- 3.2.2 Podvarové destilační zařízení BSB-939-IR (Berghof, Eningen, Germany)
- 3.2.3 ICP-MS spektrometr Agilent 7500ce (Agilent, Japan)
- 3.2.4 Zařízení na přípravu ultračisté vody MilliQ (Milipore, Francie)

3.3 Mineralizace

Do teflonových nádobek se naváží 0,25 g vzorku a zalije se 6 ml kyseliny dusičné (3.1.1) a 2 ml peroxidu vodíku (3.1.2). Po 20 min se nádobky uzavřou a vloží se do mikrovlnného zařízení. Mineralizace probíhá následovně: za postupného nárůstu teplot jsou vzorky mineralizovány 4 min při 150 °C, 5 min při 190 °C a poté je teplota postupně snižována. Po vychladnutí se mineralizáty přelijí do 25 ml odměrné baňky a po vytemperování se doplní po značku demineralizovanou vodou. Poté se přelijí do PE lahvíček.

3.4 Měření

Vzorky získané mineralizací byly měřeny na ICP-MS spektrometru v heliovém módu. Kalibrační roztoky a roztok vnitřních porovnávacích prvků byly připraveny postupným ředěním ze základních certifikovaných roztoků (3.1.4) v rozsahu (0 – 1000) $\mu\text{g/l}$ a pro Al a Fe v rozsahu (0 – 50000) $\mu\text{g/l}$, pro vnitřní porovnávací prvky o koncentraci 1000 $\mu\text{g/l}$. V tabulce 1 jsou uvedeny izotopy použité při měření na ICP-MS spektrometru.

Tabulka 1: Měřené izotopy

Analyt	Izotop	Vnitřní porovnávací prvek
Berylium	9 Be	72 Ge
Bor	11 B	45 Sc
Hliník	27 Al	45 Sc
Vanad	51 V	115 In
Chrom	52 Cr	115 In
Mangan	55 Mn	72 Ge
Železo	57 Fe	72 Ge
Kobalt	59 Co	115 In
Nikl	60 Ni	115 In
Měď	65 Cu	115 In
Zinek	66 Zn	72 Ge
Arsen	75 As	125 Te
Selen	78 Se	125 Te
Molybden	95 Mo	72 Ge
Kadmium	111 Cd	115 In
Olovo	208 Pb	209 Bi

Tabulka 2: Pracovní podmínky ICP-MS spektrometru

Parametr	Ladění	Heliový mód
RF power	ne	1500 W
Sampl. Depth	ano	7 mm
Carrier Gas	ano	0,8 l/min
Makeup Gas	ano	0,2 l/min
Nebulizer pump	ne	0,1 rps
S/C Temp	ne	2 °C
Extract 1	ano	1 V až 5 V
Extract 2	ano	– 150 V až – 120 V
Omega Bias-ce	Ano	– 18 V
Omega Lens-ce	ano	2 V
Cell Entrance	ne	– 22 V
Plyn (H ₂ , He)	ano	5,5 ml/min
QP Focus	ne	– 10 V
Cell Exit	ne	– 46 V
OctP RF	ne	160 V
OctP Bias	Ne	– 19 V
QP Bias	Ne	– 15 V

4 Výsledky a diskuse

Vzorky CRM GBW07602, GBW07603 a GBW07604 byly mineralizovány v uzavřeném systému s mikrovlnným ohřevem ve třech paralelních stanoveních. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 3, 4, 5.

Tabulka 3: Tlaková mineralizace CRM GBW 07602 v uzavřeném systému (mg/kg)

Prvek	Certifikováno	Přesnost	Naměřeno	Nejistota
Pb	7,1	0,7	7,1	0,5
Fe	1020	40	1028	51
As	0,95	0,08	0,97	0,11
Se	0,184	0,011	0,185	0,017
Mo	0,26	0,03	0,26	0,03
Ni	1,7	0,3	1,5	0,2
Cu	5,2	0,3	5,3	0,3
Mn	58	3	58	3
Co	0,39	0,03	0,37	0,02
V	2,4	0,2	2,3	0,2
Cr	2,3	0,2	2,1	0,2
B	34	5	35	3
Be	0,056	0,011	0,048	0,013

Tabulka 4: Tlaková mineralizace CRM GBW 07603 v uzavřeném systému (mg/kg)

Prvek	Certifikováno	Přesnost	Naměřeno	Nejistota
Pb	47	2	50	4
Fe	1070	40	1072	54
As	1,25	0,10	1,35	0,16
Zn	55	2	53	4
Se	0,12	0,02	0,13	0,01
Mo	0,28	0,03	0,28	0,03
Ni	1,7	0,2	1,8	0,3
Cu	6,6	0,4	6,9	0,3
Mn	61	3	64	3
Co	0,41	0,03	0,39	0,02
V	2,4	0,2	2,1	0,2
B	38	4	39	3
Be	0,051	0,003	0,048	0,013

Tabulka 5: Tlaková mineralizace CRM GBW 07604 v uzavřeném systému (mg/kg)

Prvek	Certifikováno	Přesnost	Naměřeno	Nejistota
Cd	0,32	0,05	0,37	0,03
Pb	1,5	0,2	1,7	0,1
Fe	274	10	279	14
As	0,37	0,06	0,37	0,04
Zn	37	1	36	3
Se	0,14	0,01	0,14	0,01
Mo	0,18	0,01	0,17	0,02
Ni	1,9	0,2	1,6	0,2
Cu	9,3	0,5	8,7	0,4
Mn	45	2	48	2
Co	0,42	0,02	0,43	0,02
Cr	0,55	0,05	0,50	0,05
B	53	4	56	4
Be	0,021	0,004	0,023	0,006

Výsledky byly zpracovány v programu EffiValidation verze 3.0 (8) a všechny byly vyhodnoceny jako shodné. Pouze u hliníku byla výtěžnost vůči certifikované hodnotě kolem 50 % u všech tří rostlinných certifikovaných materiálů. Proto byly analyzovány vzorky rostlinného materiálu, které byly použity v MPZ ÚKZÚZ, a to vzorek 9031 (rok 1999, 2. perioda) a vzorek 9055 (rok 2004, 2. perioda). Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 6 a 7.

Tabulka 6: Tlaková mineralizace vzorku 9031 v uzavřeném systému (mg/kg)

Prvek	MPZ ÚKZÚZ Aritmetický průměr	Směrodatná odchylka	Naměřeno	Nejistota
Al	138	30	149	7

Tabulka 7: Tlaková mineralizace vzorku 9055 v uzavřeném systému (mg/kg)

Prvek	MPZ ÚKZÚZ Aritmetický průměr	Směrodatná odchylka	Naměřeno	Nejistota
Al	133	34	129	7

Podle výsledků analýzy vzorků MPZ ÚKZÚZ je patrné, že výsledky jsou s výsledky naměřenými ICP-MS shodné. Z toho důvodu se dá usuzovat, že CRM materiály obsahují vyšší podíl křemíku a část hliníku se váže s křemíkem na nerozpustné hlinitokřemičitany, které se ICP-MS nestanoví, což by dokazovala přítomnost jemného zákalu mineralizátů.

Z analýz slepých pokusů byly vypočítány meze detekce (MD) a meze stanovení (MS) pro jednotlivé prvky a dále z paralelních stanovení byly vypočítány hodnoty vnitrolaboratorní opakovatelnosti (VO) a rozšířené kombinované nejistoty (N), vše v programu EffiValidation 3.0 (viz. tabulka 8).

Tabulka 8: Meze detekce, stanovení, vnitrolaboratorní opakovatelnost a nejistoty stanovení

Prvek	MD (mg/kg)	MS (mg/kg)	VO (%)	N (%)
Cd	0,002	0,008	4	7
Pb	0,08	0,3	4	7
Fe	2	6	3	5
As	0,02	0,05	6	12
Zn	0,6	2	4	7
Se	0,03	0,05	4	9
Mo	0,03	0,1	5	10
Ni	0,1	0,4	8	15
Cu	0,07	0,2	3	5
Mn	0,07	0,2	3	5
Co	0,005	0,02	3	5
Cr	0,07	0,2	5	10
B	1	5	4	7
Be	0,006	0,02	14	28
Al	2	7	3	6
V	0,02	0,07	5	9

5 Závěr

Mikrovlňný rozklad ve spojení s ICP-MS technikou je vhodnou metodou pro stanovení vybraných prvků v rostlinách a to zejména z důvodu použití menší navážky vzorku rostlin, rozkladu v uzavřeném systému, kde je menší riziko kontaminací vzorku, zvláště těžkými kovy. ICP-MS metoda má dostatečnou citlivost pro stanovení výše zmíněných prvků v rostlinách s velice dobrými parametry stanovení jako jsou meze detekce a nejistota stanovení. Celý postup byl validován a akreditován v roce 2008 s flexibilitou typu 2

a podrobné postupy přípravy vzorku a měření jsou uvedeny v SOP 38. Prezentovaná metodika nahradila stávající metodiku pro stanovení mikroprvků a to spalování v muflové peci s následným měřením na ICP-OES, kde měřené obsahy prvků byly často na úrovni meze detekce a dále při rozkladu bylo zapotřebí většího množství vzorku, což znemožňovalo vícenásobné opakování rozkladu. Stejně tak byla zcela nahrazena metoda generování hydridů při stanovení arsenu, které je také prováděno metodou ICP-MS spolu s ostatními prvky.

6 Literatura

1. Peter Christie, E. Leslie Dickson, David J. Kilpatrick, Comparison between Wet and Dry Oxidation Methods of Sample Preparation for Copper and Zinc Analysis of Grassland Herbage. *J. Sci. Food Agric.* 1989, 48, 155 – 164.
2. G. Knapp, Mechanized Techniques for Sample Decomposition and Element Preconcentration. *Microchim. Acta (Wien)* 1991, II, 445 – 455.
3. Pavel Mader, Eva Čurdová, Metody rozkladu biologických materiálů pro stanovení stopových prvků, *Chem. Listy* 91, 1997, 227 – 236.
4. I. Lavilla, A.V.Filgueiras, C. Bendicho, Comparison of Digestion Methods for Determination of Trace and Minor Metals in Plant Samples, *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 5072 – 5077.
5. R.A.Bowman, A rapid Plant Digestion Method for Analysis of P and Certain Cations by Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry. *Commun.in Soil Sci. Plant Anal.*, 1989, 20 (5,6), 539 – 553.
6. Calvin R. Finch, H. Dale Pennington, Calvin G. Lyons, Sara E. Littau, Microwave Digestion of Plant Samples for Sulfur Analysis. *Commun. In Soil Sci. Plant Anal.*, 1990, 21(7,8), 583 – 594.
7. Aplikační literatura Agilent
8. Uživatelská příručka EffiValidation verze 3.0

Zavedení multireziduální metody stanovení pesticidů metodou GC-MS/MS

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 Souhrn

Na základě připravované EN 15662:2007 byla vypracována metoda multireziduálního stanovení pesticidů po extrakci vzorku do acetonitrilu (tzv. QuEChERS metoda) s koncovým stanovením GC-MS a LC-MS. Postup byl validován a akreditován jako flexibilní zkouška (1) s možností postupného rozšiřování počtu analytů. Následně byla flexibilita zkoušky rozšířena, a tak lze do metody zahrnovat nutné změny, související s aplikací postupu na nové matrice vzorku.

2 Úvod

Pro zajištění kvality a kontroly nezávadnosti krmiv a surovin pro jejich výrobu je nutné sledovat i rezidua pesticidů v různých matricích. Pro zachycení nízkých koncentrací široké škály látek rozdílných chemických vlastností ve vzorku lze použít různé multireziduální metody (MRM). Vývoj a přehled MRM pro rezidua pesticidů byl již zpracován ve VÚ K12/2006 (2).

QuEChERS metoda je určena pro stanovení reziduí účinných látek pesticidních přípravků v ovoci, zelenině, obilovinách a krmných směsích s různým obsahem vody i tuku ve vzorku. Obsah pesticidů se stanoví hmotnostní spektrometrií (MS) ve spojení s plynovou (GC) nebo kapalinovou chromatografií (LC).

Metoda vychází z návrhu evropské normy prEN 15662 pro multireziduální metodu stanovení pesticidů QuEChERS metodou (3) a splňuje požadavky na zajištění kvality práce při analýze reziduí podle dokumentu SANCO/2007/3131 (4).

Metoda byla ověřena pro 46 pesticidních látek v obilné krmné směsi a byla testována na dalších komplexních matricích.

3 Materiál a metody

3.1 Princip metody

Homogenní vzorek obohacený vnitřním standardem se v suchém nebo zmrzlém stavu extrahuje acetonitrilem. K matrici s nízkým obsahem vody (< 80 %) se přidává voda tak, aby výsledný poměr vody a acetonitrilu ve vzorku byl přibližně (1 : 1). Směs se intenzivně protřepe, přidá se pevná pufovací směs (síran hořečnatý, chlorid sodný, sodné soli kyseliny citronové) a upraví se pH vzorku na hodnotu 5 až 5,5. Směs se opět intenzivně třepe a organická fáze se rozsadí odstředěním při minimální rychlosti 3000 ot/min. Velký přebytek tuku se odstraní vymražením extraktu. Aliquotní podíl acetonitrilové fáze s přídavkem vnitřního standardu se vyčistí protřepáním se sorbenty (dispersní D-SPE) a dalším podílem bezvodého síranu hořečnatého pro odstranění vlhkosti. Jako základní sorbent pro D-SPE se použije PSA (primární/sekundární amin), pro dočištění extraktu z problematických matric se použije sorbent s aktivním uhlím (GCB) a sorbent na bázi silikagelu modifikovaného řetězcí C18 (ODS). Stabilita pesticidů citlivých na bazické prostředí se zvýší okyselením extraktu malým přídavkem kyseliny mravenčí. Extrakt je po převedení do vialky auto-sampleru připraven k nástřiku do plynového nebo kapalinového chromatografu k hmotnostně selektivnímu stanovení pesticidů.

Některé analyty mohou při čištění interagovat se sorbenty. Proto se z odstředěného surového extraktu odebere 1 ml podíl do AS vialky pro přímé stanovení pesticidů metodou LC-MS/MS bez dalšího čištění.

Kvantifikace obsahu stanovovaných látek se provede metodou vnitřního standardu (TCP) pomocí kalibračních přímk matricových standardů nebo metodou standardního přídavku ke vzorku.

3.2 Chemikálie a laboratorní pomůcky

Všechny použité chemikálie jsou čistoty minimálně p.a., nejlépe však kvality pro reziduální analýzu. Rozpouštědla musejí být vhodná pro HPLC analýzu. Dostačující čistota chemikálií, sorbentů a rozpouštědel se ověřuje proměřením slepého vzorku.

Rozpouštědla: Voda, acetonitril, metanol.

Chemikálie: Kyselina mravenčí, hydroxid sodný, chlorid sodný, sodné soli kyseliny citronové.

Sorbenty: Síran hořečnatý bezvodý, Bondesil-PSA (sorbent typu primární sekundární amin), Supelclean Envi-Carb (GCB, Graphitized Carbon Black sorbent).

Laboratorní vybavení: Laboratorní sklo, vialky, automatické pipety, dávkovač, homogenizátor, laboratorní váhy, centrifuga, ultrazvuková lázeň, sušárna skla, muflová pec.

3.3 Standardy

3.3.1 Vnitřní standardy (ISTD)

Tris-(1,3-dichloroisopropyl)fosfát (TCP), antracen, PCB 185

3.3.2 Standardy pesticidů

Azoxystrobin, bifenthrin, carbaryl, cyproconazol, chlorotalonil, chlorpropham, cypermethrin, chlorpyrifos, chlorpyrifos-metyl, deltamethrin, diazinon, dichlofluanid, difenoconazol, dichlorvos, endosulfan, endosulfan-sulfát, epoxyconazol, fenhexamid, fenpropimorph, fenvalerát, fluquinconazol, iprodion, kresoxim-metyl, λ -cyhalothrin, lindan, malaoxon, malathion, metconazol, methacrifos, myclobutanil, parathion, permethrin, penconazol, phosalon, pirimicarb, pirimifos-metyl, procymidon, propiconazol, spiroxamin, tebuconazol, tolylfluanid, triadimefon, triadimenol, triazofos, trifloxystrobin, vinclozolin.

3.4 Měřicí přístroje

Plynový chromatograf s hmotnostně spektrometrickým detektorem, GC/MS/MS:
CP 3800 GC/MS 1200 [Varian]

Kapilární kolona DB XLB 30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m [J&W Scientific]

4 Výsledky a diskuse

4.1 Optimalizace GC-MS podmínek

Z velkého množství pesticidních látek byly pro validaci postupu vybírány přednostně analyty doporučené ke sledování v rámci monitoringových programů (5), (6) a požadované v kruhových testech, pořádaných referenčními laboratořemi EU pro stanovení pesticidů (CRLs) (7).

GC-MS podmínky byly optimalizovány tak, aby jednotlivé analyty byly spolehlivě identifikovány a kvantifikovány a byla splněna nutná konfirmační kritéria (4). Pro potvrzení přítomnosti stanovovaného analytu ve vzorku byly sledovány následující parametry:

- retenční čas (RT) analytu a jeho relativní čas (RRT) vztažený na vnitřní standard TCP,
- poměr sledovaných hmotnostních fragmentů v MS spektru,
- charakteristický poměr a zastoupení stereoizomerů analytů.

Všeobecným požadavkem je sledovat 3 m/z fragmenty v režimu měření vybraných iontů (SIM) nebo 2 přechody v režimu tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS).

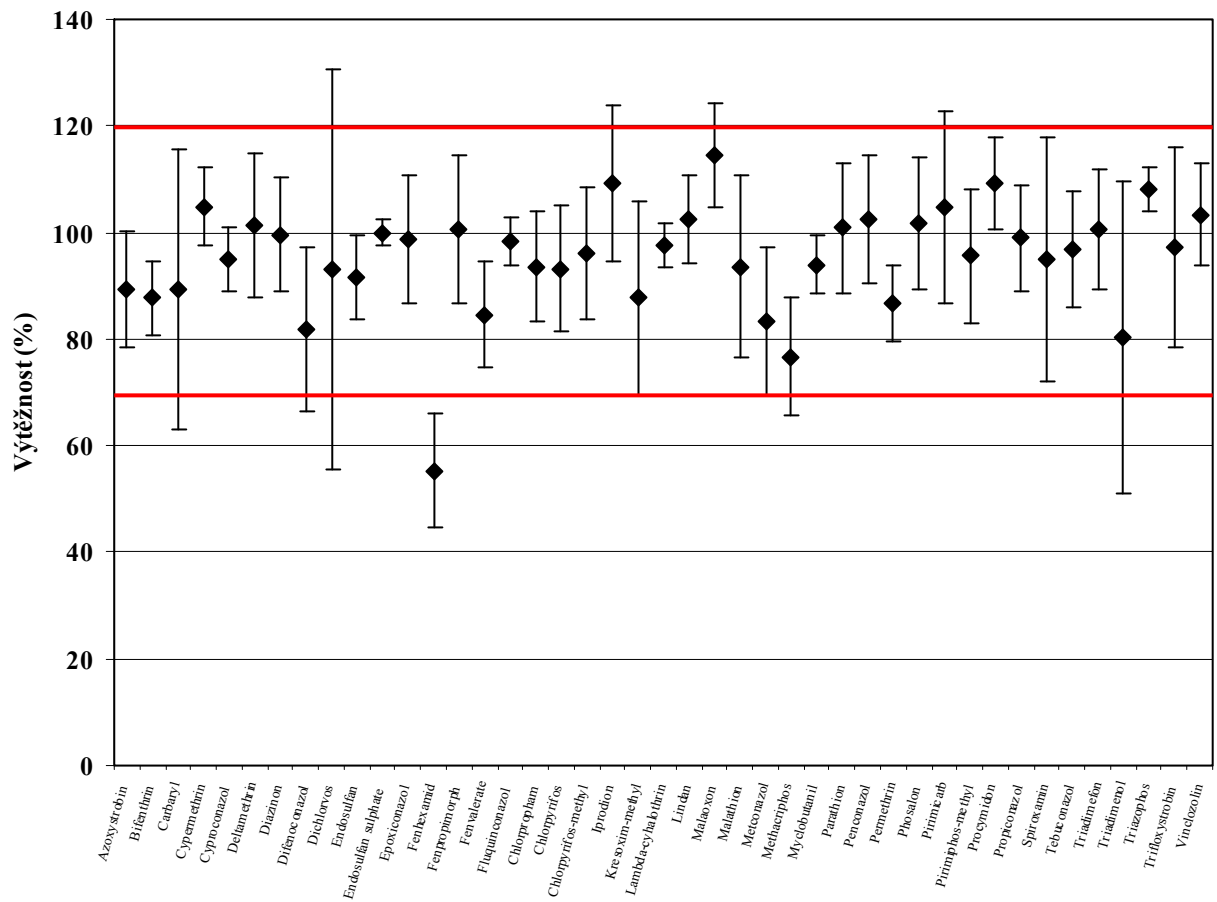
Parametry pro identifikaci jednotlivých analytů se získají proměřením roztoků analytických standardů, ideálně v přítomnosti extraktu matrice (matricový standard). Pro potvrzení identity je vhodné provést konfirmační stanovení za jiných chromatografických separačních podmínek, vyhodnocení více přechodů nebo sledovat přítomnost dalšího m/z fragmentu. Identifikační parametry sledovaných látek a jejich izomerů jsou uvedeny v tabulce 1.

4.2 Validace metody pro obilné matrice

Pro přípravu obilných vzorků ke GC-MS analýze byl dostačující základní čisticí postup, tj. vymrazení a D-SPE s PSA sorbentem. Pro 42 analytů byla výtěžnost postupu na koncentrační hladině 0,20 mg/kg v povoleném rozsahu (70 – 120) % s opakovatelností menší než 20 % (obrázek 1.). Postup je vhodný i pro fenhexamid, který vykazoval nižší výtěžnost 55 %, ale s velice dobrou opakovatelností 5 %. Nejvyšší nejistotu stanovení vykazoval carbaryl, dichlorvos a triadimenol. Při ověření metody na nižší hladině (0,01 – 0,02) mg/kg došlo k výraznému zhoršení nejistoty stanovení u fenvalerátu, malaoxonu a tebuconazolu.

Další testované látky chlorotalonil, dichlofluanid a tolylfluanid vykazovaly nízkou výtěžnost a malou citlivost stanovení, a proto byly převedeny na stanovení pomocí LC-MS/MS.

Obrázek 1. Výtěžnost a rozšířená nejistota stanovení pesticidních látek v obilném materiálu na hladině 0,2 mg/kg



Tabulka 1. Identifikační parametry sledovaných pesticidních látek

Analyt	RT-DB XLB (min)	RRT-DB XLB	SIM	MS/MS
TCP (ISTD)	14,55	1,000	381,191,321	381→ 159
Dichlorvos	6,03	0,414	109,185,220	-
Methacrifos	7,21	0,496	240,125,208	240→ 208
Chlorpropham	8,07	0,554	213,215,171	-
Diazinon	8,68	0,597	304,276,227	304→ 179
Lindan	9,00	0,619	181,219,254	219→ 183
Pirimicarb	9,16	0,630	238,166,72	238→ 166
Malaoxon	9,45	0,650	268,127,195	195→ 125
Spiroxamin-I	9,45	0,650	100,198,126	100→ 72
Vinclozolin	9,59	0,659	285,212,198	285→ 212
Chlorpyrifos-M	9,66	0,664	286,288,197	286→ 271
Pirimifos-M	9,84	0,676	305,290,276	290→ 233
Spiroxamin-II	9,90	0,681	100,198,126	100→ 72
Chlorotalonil	9,94	0,683	266,264,229	-
Carbaryl	9,95	0,684	144,115,116	144→ 115
Malathion	10,06	0,691	173,158,256	173→ 127
Fenpropimorph	10,21	0,702	303,128,173	-
Dichlofluanid	10,24	0,704	332,167,226	-
Chlorpyrifos	10,36	0,712	314,258,286	314→ 258
Aldrin	10,50	0,722	263,265,293	291→ 256
Triadimefon	10,56	0,726	208,210,181	208→ 181
Parathion	10,60	0,729	291,235,263	291→ 263
Tolyfluanid	11,22	0,771	346,348,238	-
Penconazol	11,37	0,782	248,250,159	248→ 157
Procymidon	11,51	0,791	285,283,96	283→ 255
Triadimenol-I	11,55	0,794	168,112,128	168→ 70
Triadimenol-II	11,70	0,804	168,128,112	168→ 70
Endosulfan-I	12,33	0,847	241,265,339	195→ 159
Kresoxim-M	12,56	0,863	206,131,116	206→ 116
Myclobutanil	13,21	0,908	179,288,206	-
Cyproconazol-I	13,60	0,935	222,139,224	222→ 125
Cyproconazol-II	13,70	0,942	224,222,139	222→ 125
Trifloxystrobin	14,19	0,976	377,222,206	-
Triazofos	14,38	0,988	257,172,313	257→ 162
Endosulfan-II	14,41	0,991	241,265,339	195→ 159
Propiconazol-I	14,92	1,026	259,261,173	173→ 145
Fenhexamid	15,05	1,034	301,177,266	301→ 266
Propiconazol-II	15,12	1,040	259,261,173	173→ 145
Endosulfan sulfát	15,66	1,077	387,272,389	272→ 237
Tebuconazol	15,78	1,085	252,250,125	250→ 125
Bifenthrin	16,11	1,107	181,165,166	181→ 166
Epoxiconazol	16,27	1,118	192,165,206	-
Iprodion	16,72	1,150	314,187,245	314→ 245
Metconazol	17,69	1,216	319,250,194	250→ 125
L-cyhalothrin	18,05	1,241	181,197,208	197→ 141
Phosalon	18,16	1,248	367,369,182	-
Permethrin-I	19,20	1,320	183,165,163	183→ 168
Permethrin-II	19,44	1,337	183,165,163	183→ 168
Fluquinconazol	20,12	1,383	340,342,313	340→ 298
Cypermethrin-I	20,93	1,439	181,163,209	163→ 127
Cypermethrin-II	21,18	1,456	181,163,209	163→ 127
Cypermethrin-III	21,29	1,464	181,163,209	163→ 127
Cypermethrin-IV	21,41	1,472	181,163,209	163→ 27
Fenvalerát-I	23,34	1,604	419,421,225	-
Fenvalerát-II	23,88	1,641	419,421,225	-
Difenoconazol-I	24,99	1,718	323,265,325	323→ 265
Difenoconazol-II	25,19	1,732	323,265,325	323→ 265
Deltamethrin	25,50	1,753	253,181,174	253→ 174
Azoxystrobin	26,46	1,819	344,345,388	-

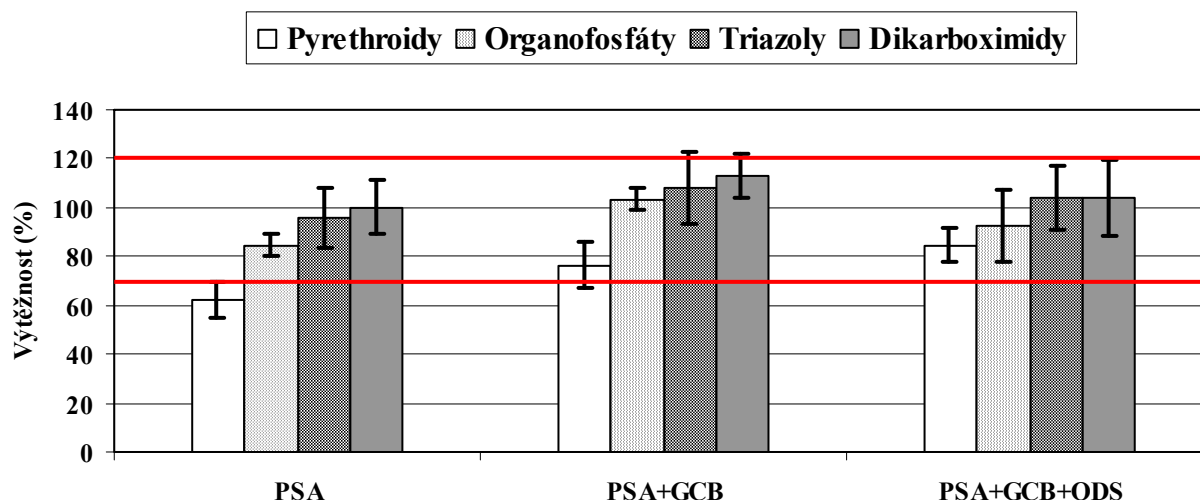
4.3 Validace metody pro matrice s vysokým obsahem tuku

Pro vzorky s vysokým obsahem tuku byla za reprezentativní matrici zvolena lupina. Vyluštěná semena mají vysoký obsah tuku (11 % – 12 %) i vlákniny (16 % – 17 %). Byly porovnány tři stupně čištění vymraženého extraktu (tabulka 2). Pro většinu analytů bylo optimální čištění se sorbenty PSA a GCB, tato metoda vykazovala nejspolehlivější parametry. Vícetupňové čištění výrazně zlepšilo validační parametry skupiny pyrethroidů (obrázek 2). Postupy byly ověřovány na koncentrační hladině 0,20 mg/kg a 0,04 mg/kg, největší nejistota stanovení byla zjištěna u fenhexamidu, fenvalerátu, malaoxonu a metconazolu (obrázek 3).

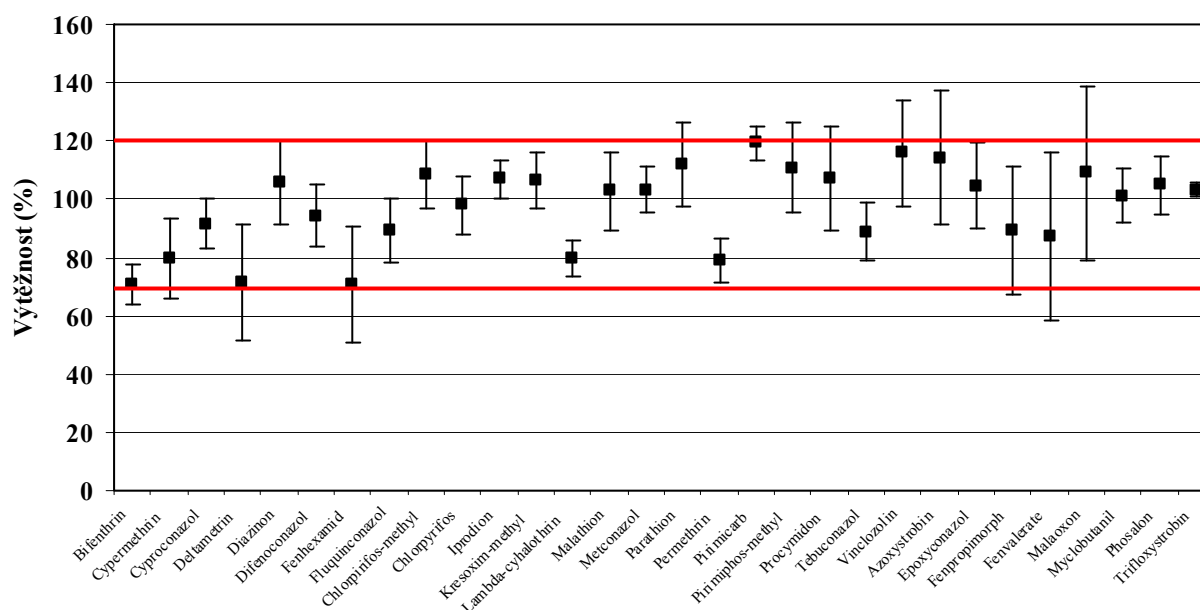
Tabulka 2. Testování vlivu různých způsobů čištění vzorku lupiny na výtěžnost a nejistotu stanovení vybraných pesticidních látek

D-SPE sorbent	PSA			PSA + GCB			PSA + GCB + ODS		
	Obsah (µg/kg)	RSD (%)	Výtěžnost (%)	Obsah (µg/kg)	RSD (%)	Výtěžnost (%)	Obsah (µg/kg)	RSD (%)	Výtěžnost (%)
Bifenthrin	15,5	4,0	50	22,3	1,0	71	21,7	2,2	69
Cypermethrin	21,5	6,2	70	25,3	1,9	82	28,8	3,2	93
Cyproconazol	39,4	1,6	95	44,9	3,6	108	43,6	2,8	105
Deltamethrin	30,9	1,1	71	32,7	6,8	75	41,6	8,4	95
Diazinon	36,5	3,2	92	45,6	3,5	115	38,6	8,3	97
Difenoconazol	37,7	0,2	99	41,1	4,1	108	41,1	5,1	108
Fenhexamid	24,5	6,0	78	27,2	19,5	87	28,5	24,2	91
Fluquinconazol	32,4	5,0	99	36,2	5,9	111	36,6	6,4	112
Chlorpyrifos	27,0	3,2	74	34,2	2,0	94	28,3	9,9	78
Chlorpyrifos-M	31,1	4,2	78	39,2	2,3	99	34,6	6,3	87
Iprodion	42,9	8,0	93	48,1	4,5	104	43,8	1,2	95
Kresoxim-M	32,8	3,7	97	40,4	4,2	119	36,3	6,3	107
L-cyhalothrin	29,4	4,6	70	34,3	3,4	82	38,2	1,5	92
Malathion	40,1	1,6	102	48,2	1,0	114	44,1	6,3	113
Metconazol	44,1	13,8	95	52,0	19,8	112	41,7	12,6	90
Parathion	27,4	0,3	76	34,4	2,7	96	31,7	4,5	88
Permethrin	18,6	2,8	51	26,1	10,0	71	27,0	1,4	74
Pirimicarb	48,2	7,2	106	58,4	2,3	110	45,8	14,8	101
Pirimifos-M	30,3	2,1	85	36,7	1,3	103	32,7	9,9	92
Procymidon	42,3	2,2	108	47,6	5,3	117	45,3	6,8	116
Tebuconazol	40,1	10,1	90	45,8	3,2	103	47,2	5,3	106
Vinclozolin	33,6	6,1	99	40,0	3,7	118	34,0	15,3	101
Metoda		4	85		5	100		7	96

Obrázek 2. Vliv způsobů čištění vzorku lupiny na výtěžnost a nejistotu stanovení vybraných pesticidních skupin



Obrázek 3. Výtěžnost a rozšířená nejistota stanovení pesticidních látek v lupině na hladině 0,2 mg/kg

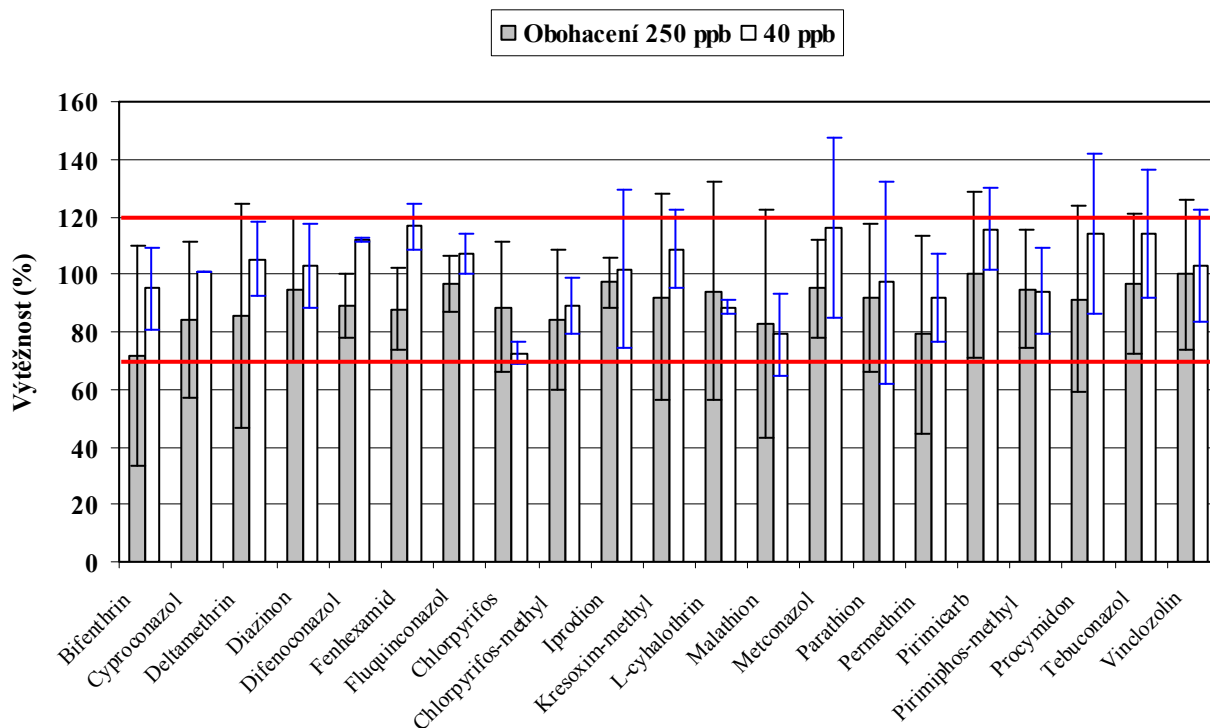


4.4 Validace metody pro komplexní matrice

Řepkový expeler je komplikovaný krmný materiál s vysokým obsahem tuku, chlorofylu a dalších koextraktů. Pro validaci byly vzorky expeleru obohaceny na hladině 0,04 mg/kg a 0,25 mg/kg a připraveny ke GC-MS analýze pomocí disperzní SPE s použitím směsi sorbentů PSA, GCB a ODS. Testovaná metoda umožnila stanovení 32 pesticidních látek, ale

rozšířená nejistota stanovení byla u 25 analytů větší než 20 %, z toho pro 11 látek byla větší než 30 % (obrázek 4).

Obrázek 4. Výtěžnost a rozšířená nejistota pro stanovení vybraných pesticidů ve vzorku řepkového expeleru obohaceného na hladině 0,04 mg/kg a 0,25 mg/kg



4.5 Kvantifikace obsahu pesticidů

Odezvy jednotlivých analytů jsou významně ovlivňovány přítomností koextraktů z matrice vzorku. Pro orientační stanovení úrovně reziduí pesticidů ve vzorku lze použít kalibrační standard v čistém rozpouštědle. Tyto výsledky mohou být použity i pro kvantifikaci, pokud bylo předchozími experimenty prokázáno, že nedochází k výraznému ovlivnění analytu maticí. V případě významného nálezu, např. podezření na překročení povolené hodnoty reziduí (MRL), musí být použit maticový standard nebo metoda standardního přídatku.

4.5.1 Metoda vnitřního standardu

K navázce vzorku se přidá známé množství vhodné látky, která se při zpracování vzorku i koncovém stanovení chová podobně jako analyzovaná látka. Poměr látkového množství vnitřního standardu (ISTD) a kvantifikovaných látek zůstává stejný během celého procesu a korigují se tak ztráty analytů a změny v objemu rozpouštědla během přípravy i při vlastní

chromatografické analýze. Pro kontrolu výtěžnosti celého postupu se do extraktu připraveného k analýze přidá další standard a z poměru tohoto nástřikového standardu a ISTD se vypočte výtěžnost celého postupu.

Při výběru vhodných vnitřních standardů je nutné se přesvědčit, že nedochází k nežádoucím efektům (rozdílná sorpce ISTD a analytů, ztráty při odpařování a významné matricové efekty) a k následným chybám při kvantifikaci sledovaných látek.

4.5.2 Matricové efekty

Matrice vzorku může mít nezanedbatelný vliv na odezvu stanovovaných látek při MS stanovení. Matricový efekt (ME) se posoudí porovnáním odezvy standardů rozpuštěných v čistém rozpouštědle a v rozpouštědle s přidavkem extraktu matrice.

ME rostly s komplexností matrice (obilí < lupina < řepkový expeler). Při stanovení pesticidů v lupině významnou interferenci vykazoval fenhexamid, iprodion, metconazol a parathion, u expeleru byly ME patrné u všech pesticidů kromě fluquinconazolu. Vliv matrice se výrazně projeví při měření v SIM módu, pro nedostatečně vyčištěné extrakty je tento režim nevhodný. Měření v MS/MS režimu poskytovalo výsledky s menší nejistotou stanovení a výtěžnosti byly uspokojivé i pro stanovení pesticidů v expeleru.

Z výsledků vyplývá nutnost měření komplexních matic v MS/MS módu a kvantifikace pomocí matricových standardů (tabulka 3).

4.5.3 Meze stanovitelnosti

Meze stanovitelnosti metody byly vyhodnoceny pomocí dvou přístupů, stanovením poměru signálu k šumu v matricových standardech a pomocí validace na nízké hladině. Kromě detekčního limitu (LOD) a meze stanovitelnosti metody (LOQ) je v rutinní laboratorní praxi zavedena praktická mez stanovitelnosti (RL, reporting limit). Hodnota RL vychází z validačních parametrů metody, ale zohledňuje časovou variabilitu stavu přístroje a další proměnné faktory, a je proto nastavena na obvykle vyšší hodnotu než je LOQ.

Praktická mez stanovitelnosti byla $1 \times$ až $10 \times$ nižší než je minimální požadovaná stanovitelnost metody (MRRL) pro pesticidy v obilovinách. Přehled výsledků je uveden v tabulce 4.

Tabulka 3. Matricové efekty a výtěžnost pro různé matrice a měřící režimy

Analyt	Matricové efekty (%)				Výtěžnost (%)	
	Matrice režim měření	Obilí MS/MS	Lupina MS/MS	Expeler MS/MS	Expeler SIM	Expeler MS/MS
Bifenthrin	89	83	135	162	95	131
Cypermethrin	82	100	147	143	95	242
Cyproconazol	114	88	160	0	101	0
Deltamethrin	109	104	76	174	105	0
Diazinon	93	84	144	147	103	123
Difenoconazol	110	114	132	177	112	175
Fenhexamid	78	143	160	204	117	21
Fluquinconazol	96	88	94	101	107	112
Chlorpyrifos	86	88	121	131	89	113
Chlorpyrifos-M	101	119	115	157	73	98
Iprodion	97	147	106	113	102	119
Kresoxim-M	83	87	125	150	109	122
L-cyhalothrin	108	105	102	92	89	0
Malathion	95	102	107	114	79	136
Metconazol	118	149	136	149	116	82
Parathion	91	156	153	183	97	125
Permethrin	103	103	130	108	92	113
Pirimicarb	91	102	141	189	116	148
Pirimifos-M	78	97	120	130	94	101
Procymidon	107	96	224	493	114	54
Tebuconazol	106	93	147	357	114	0
Vinclozolin	77	98	137	175	103	140
Průměr	96	107	132	166	-	-

Tabulka 4. Přehled mezi stanovitelnosti

Parametr	LOD (ng/ml)	LOQ (mg/kg)	RL (mg/kg)	Validační hladina (mg/kg)	MRRL (mg/kg)	RL - LIMS (mg/kg)
Azoxystrobin		-	-	0,010	0,020	0,010
Bifenthrin	0,4	0,001	0,005	-	0,020	0,005
Carbaryl	2,7	0,005	0,010	-	0,020	0,010
Cypermethrin	1,5	0,003	0,005	-	0,020	0,005
Cyproconazol	2,0	0,004	0,005	0,020	0,050	0,020
Deltametrin	3,6	0,007	0,010	-	0,020	0,010
Diazinon	0,6	0,001	0,005	-	0,020	0,005
Difenoconazol	1,4	0,003	0,005	0,020	0,050	0,020
Dichlorvos		-	-	0,020	-	0,020
Endosulfan	2,6	0,005	0,010	-	0,020	0,010
Endosulfan sulfát	1,8	0,004	0,005	-	0,020	0,005
Epoxiconazol		-	-	0,010	0,050	0,010
Fenhexamid	8,5	0,017	0,020	-	0,050	0,020
Fenpropimorph		-	-	0,020	0,020	0,020
Fenvalerát		-	-	0,020	-	0,020
Fluquinconazol	0,5	0,001	0,005	0,010	0,050	0,010
Chlorpyrifos-M	1,5	0,003	0,005	-	0,020	0,005
Chlorpropham		-	-	0,010	-	0,010
Chlorpyrifos	0,5	0,001	0,005	-	0,020	0,005
Iprodion	7,4	0,015	0,020	-	0,020	0,020
Kresoxim-M	0,4	0,001	0,005	-	0,020	0,005
L-cyhalothrin	0,9	0,002	0,005	-	0,020	0,005
Lindan	1,1	0,002	0,005	-	0,010	0,005
Malaoxon		-	-	0,020	0,050	0,020
Malathion	0,8	0,002	0,005	-	0,050	0,005
Metconazol	6,4	0,013	0,020	0,020	0,050	0,020
Methacrifos	0,9	0,002	0,005	-	0,020	0,005
Myclobutanil		-	-	0,020	-	0,020
Parathion	5,4	0,011	0,020	-	0,050	0,020
Penconazol	0,3	0,001	0,005	-	0,050	0,005
Permethrin	3,9	0,008	0,010	0,020	0,050	0,020
Phosalon		-	-	0,010	-	0,010
Pirimicarb	0,2	0,000	0,005	-	0,020	0,005
Pirimifos-M	0,4	0,001	0,005	-	0,020	0,005
Procymidon	2,4	0,005	0,010	-	0,020	0,010
Propiconazol	5,5	0,011	0,020	-	0,050	0,020
Spiroxamin	3,5	0,007	0,010	-	0,050	0,010
Tebuconazol	1,2	0,002	0,005	0,010	0,050	0,010
Triadimefon	4,8	0,010	0,010	-	0,050	0,010
Triadimenol	14	0,028	0,040	-	0,050	0,040
Triazofos	5,1	0,010	0,010	-	0,020	0,010
Trifloxystrobin		-	-	0,020	0,050	0,020
Vinclozolin	1,3	0,003	0,005	-	0,050	0,005

4.6 Kontrola kvality

Požadavky na zajištění kvality při analýze reziduí pesticidů jsou podrobně popsány v dokumentu SANCO/2007/3131 (4). Vedle použití jednoho či více vnitřních standardů pro kontrolu výtěžnosti se doporučuje průběžně kontrolovat správnost multireziduální metody pomocí interních nebo certifikovaných referenčních materiálů. Dalším stupněm kontroly kvality je účast laboratoře v odpovídajících testech způsobilosti.

4.6.1 Kruhové testy sítě CRL/NRLs

V roce 2006 byla vytvořena síť referenčních laboratoří (CRLs) členských států EU a pověřených národních laboratoří členských států (NRLs) s cílem zajistit vysokou kvalitu, přesnost a srovnatelnost analytických výsledků. Pro rezidua pesticidů v potravinách a surovinách pro jejich výrobu byly zřízeny 4 CRL (pro obiloviny a krmiva; potraviny živočišného původu; ovoce a zeleninu; individuální reziduální metody). Laboratoře ÚKZÚZ byly jmenovány NRL pro stanovení reziduí v obilovinách a krmivech. Již od roku 2006 se laboratoře ÚKZÚZ pravidelně a úspěšně účastní všech porovnávacích testů této skupiny (PT C, Proficiency Testing for Cereals). Výsledky testů jsou každý rok zpracovány a uveřejněny ve sborníku vydaném pořádatelkou laboratoří (8).

5 Závěr

Multireziduální metoda stanovení reziduí účinných látek pesticidních přípravků po extrakci vzorku do acetonitrilu (QUECHERS metoda) s GC-MS i LC-MS detekcí byla úspěšně zavedena a akreditována jako flexibilní akreditovaná zkouška v laboratořích NRL-RO Brno a RO Praha (pouze LC-MS detekce). Zavedení této metody a úspěšná spolupráce obou pracovišť umožnila rozšířit dlouholetý program monitoringu zakázaných a nežádoucích látek v krmivech o skupinu reziduí pesticidních přípravků; v současné době se požaduje stanovení 40 analytů v surovinách pro výrobu krmných směsí.

Laboratoře ÚKZÚZ byly v roce 2006 jmenovány MZe ČR národní referenční laboratoří (NRL) pro stanovení reziduí pesticidů v obilovinách a krmivech a jsou zapojeny do činnosti mezinárodní sítě referenčních laboratoří EU pro rezidua pesticidů a úspěšně se účastní kruhových testů (Proficiency Testing), pořádaných příslušnou pověřenou CRL.

Metoda s koncovým GC-MS/MS stanovením byla validována pro 46 analytů v krmných směsích na bázi obilovin a postup byl ověřen a upraven pro matrice s vysokým obsahem tuku (lupina) i chlorofylu (řepkový expeler).

Postup bude dále rozšiřován a validován pro nové analyty i matrice, což je předpoklad úspěšného absolvování PT porovnávacích testů, a podle požadavků na analýzy běžných vzorků pro potřeby ostatních technických odborů ÚKZÚZ.

6 Literatura

1. SOP zkoušky č. 36 Multireziduální metoda stanovení pesticidů, Zkušební laboratoř č. 1071.3, ČIA, 2007.
2. Tieffová, P., Kosubová, P. Využití přístroje GPC pro multireziduální analýzy. Bulletin Národní referenční laboratoře ÚKZÚZ, 2007, XI (2), 41-51.
3. prEN 15662:2007 Foods of plant origin – Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and cleanup by dispersive SPE - QuChERS method, 2007.
4. SANCO/2007/3131 Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, DG-SANCO, 31/October/2007.
5. Doporučení Komise 2007/225/ES ze dne 3.4. 2007 týkající se koordinovaného monitorovacího programu Společenství pro rok 2007 s cílem zajistit dodržování MLR pesticidů v obilovinách a v některých dalších produktech rostlinného původu a na jejich povrchu a vnitrostátních monitorovacích programů pro rok 2008.
6. Doporučení Komise 2008/103/ES ze dne 4.2. 2008 týkající se koordinovaného monitorovacího programu Společenství pro rok 2008 s cílem zajistit dodržování MLR pesticidů v obilovinách a v některých dalších produktech rostlinného původu a na jejich povrchu a vnitrostátních monitorovacích programů pro rok 2009.
7. <http://www.crl-pesticides.eu>
8. Final Report of EU-PT-C1/SRM2 2007, *Pesticide Residues in Cereals using Multi and Single Residue Methods*, Technical University of Denmark, December 2007.

Bulletin Národní referenční laboratoře XIV 2010/1

Ročník: XIV, č. 1
Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2010
Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová
Náklad: 140 výtisků
Počet stran: 47
Tisk: ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, tel.: 543 548 111
e-mail: ukzuz@ukzuz.cz

Texty neprošly jazykovou úpravou.