

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2008

Ročník XII, číslo 2/2008

Brno 2008

Obsah

- 1 **Zavedení metod detekce transgenních odrůd kukuřice DAS 59122** 1
- Hana Hájková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř –
Oddělení mikrobiologie a biochemie, Hroznová 2, 656 06 Brno
- 2 **Dioxinový screening metodou Biosense** 10
- Petra Kosubová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno, Hroznová 2,
656 06 Brno
- 3 **Zavedení multireziduální metody stanovení pesticidů v krmivech
metodou LC-MS/MS** 29
- Ivana Vaverková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Praha, Za opravnou 4,
150 06 Praha 5 – Motol

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

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

Zavedení metod detekce transgenních odrůd kukuřice

DAS 59122

Hana Hájková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř –
Oddělení mikrobiologie a biochemie, Hroznová 2, 656 06 Brno
hana.hajkova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Cílem této práce bylo pomocí zavedeného způsobu detekce rostlinných transgenů rozšířit nabízenou škálu stanovení o postup pro detekci transgenní kukuřice DAS 59122, kterou laboratoř dosud neprováděla.

2 Úvod

Stávající systém detekcí transgenů v rostlinném materiálu je univerzální. Specifitu stanovením dodává výběr vhodných amplifikačních primerů. Tak je možné zavádět další detekce v podstatě libovolných genetických materiálů, což specifické kity neumožňují. V rámci Jednotných pracovních postupů byla zavedena identifikace další genetické modifikace kukuřice 59122 DAS. Byla vyzkoušena technika amplifikace DNA pomocí univerzálního PCR-kitu (a v něm popsaného protokolu) v kombinaci s primery, jejichž používání je pro příslušnou detekci známo z literatury a materiálů EU. Optimalizace parametrů PCR (polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce) byla provedena za použití dostupného certifikovaného referenčního materiálu (CRM).

3 Materiál a metody

Základem této metody je

1. Izolace DNA z daného vzorku,
2. Amplifikace DNA pomocí PCR,
3. Vyhodnocení amplifikovaných fragmentů pomocí elektroforézy na agarózovém gelu.

Výsledky se vyhodnocují za použití systému kontrol a ve srovnání s CRM.

3.1 Přístroje a zařízení

1. Laboratorní šrotovník,
2. Váhy (s přesností na 0,01g),
3. Elektrická vodní lázeň,

4. Centrifuga,
5. Termostat,
6. Biohazard-box,
7. Elektromagnetické míchadlo,
8. Elektrická vana a zdroj – elektroforéza,
9. Gelově-dokumentační zařízení, jehož součástí je i snímač Olympus a PC se softwarem AlphaDigiDoc)
10. Sušárna, autokláv.

3.2 Chemikálie a roztoky

Používá se jeden kit pro izolaci DNA a jeden univerzální kit pro PCR. Přesné chemické složení reagensů není výrobcem kitů uvedeno.

3.2.1 Kit pro izolaci DNA

GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit, výrobce Sigma-Aldrich - kit pro izolaci DNA z rostlinného materiálu včetně semen.

Kit obsahuje

1. Lysis Solution Part A,
2. Lysis Solution Part B,
3. Precipitation Solution,
4. Binding Solution,
5. Column Preparation Solution,
6. Wash Solution Concentrate- před použitím se ředí ethanolem 95% až 99% dle návodu,
7. Elution Solution (10mM Tris, 1 mM EDTA, pH přibližně 8,0),
8. GenElute™ Filtration Columns- kolony ve zkumavkách,
9. GenElute™ Nucleic Acid Binding Columns- kolony ve zkumavkách,
10. Collection Tubes- sběrné zkumavky o objemu 2ml.

3.2.2 Kit pro amplifikaci DNA

REDTaq™ ReadyMix™ PCR Reaction Mix, výrobce Sigma-Aldrich - univerzální reakční směs pro PCR. (Dále je označován jako „REDTaq“.)

Kit obsahuje

1. 20 mM Tris-HCl (pH8,3) se 100 mM KCl,
2. 3mM MgCl₂,
3. Želatina 0,002%
4. Stabilizátory,

5. 0,4 mM dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP),
6. 0,06 unit/ μ l Taq DNA-polymeráza,
7. Voda PCR Reagent

Přípravu reakční směsi pro PCR uvádí tabulka č.1 zpracovaná dle pokynů výrobce k použití kitu.

Tabulka č. 1: Příprava PCR, kit REDTaq

Složka	1 reakce (μ l)	5 reakcí (μ l)	10 reakcí (μ l)	15 reakcí (μ l)	20 reakcí (μ l)	25 reakcí (μ l)
Voda	18	90	180	270	360	450
REDTaq mix	25	125	250	375	500	625
Specifický amplifikační primer F	1	5	10	15	20	25
Specifický amplifikační primer R	1	5	10	15	20	25
Reakční směs bez templátu	45	225	450	675	900	1125
Templát	1 \times 5	5 \times 5	10 \times 5	15 \times 5	20 \times 5	25 \times 5
Reakční směs včetně templátu	50	250	500	750	1000	1250

3.2.3 Charakteristika specifických amplifikačních primerů

Tabulka č. 2: Charakteristika specifických amplifikačních primerů

Amplikon	Délka (bp)	Název primerů	Charakteristika amplikonu	Limit detekce dané PCR (LOD)
Kukuřice 59122 DAS	86	DAS-59122-7-rb1f DAS-59122-7-rb1r	Specifický pro gen Cry34Ab1, Cry35Ab1 a PAT	Ověřeno \leq 0,1 %

3.2.4 Pozitivní a negativní standardy (referenční materiály - RM)

Laboratoř používá referenční materiály, které představují:

1. Negativní kontrolu – má obsah GMO nulový nebo pod limitem detekce (LOD),
2. Pozitivní kontroly – jsou CRM v podobě mouky obsahující asi 1 % a 10 % příslušného GMO. Jedná se o certifikovaný referenční materiál uznávaný v rámci EU a ve světě. Pochází z Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), Belgie.

Vedle uvedených kontrol zahrnuje každá rutinní analýza vzorku i tzv. beztemplátovou kontrolu každého běhu PCR pro vyloučení kontaminací, které by mohly způsobit falešně pozitivní výsledky.

Tabulka č. 3: Přehled CRM

Plodina	Negativní kontrola	Pozitivní kontrola	Původ, certifikát	Poznámka
Kukuřice	–	59122 maize (1 % a 10 %)	Set ERM-BF424, Fluka Biochemica IRMM	Dried maize powder
Řepka	IRM 2, 3, 4, 5	–	ÚKZÚZ Zkušební stanice Hradec nad Svitavou	Směs negativních kontrol

3.2.5 Chemikálie (nejsou součástí kitů)

Používají se chemikálie čistoty p.a. nebo označené „pro molekulární biologii“.

1. Voda vhodná pro PCR (vodivost do 2 μ S),
2. Agaróza pro molekulární biologii (A-5093 Sigma, pro rutinní použití) – pro elektroforézu,
3. Denaturovaný ethanol – pouze do stříček pro čištění povrchů,
4. (95 – 100)% ethanol pro ředění „Wash Solution“ při izolaci DNA,
5. Ethidiumbromid – zásobní a pracovní roztok (Merck, 1%) – pro elektroforézu,
6. Elektroforetický marker pro amplifikáty (GeneRuler 50bp DNA Ladder SMO373 Fermentas, uchovává se ve zkumavkách po cca 20 μ l),
7. Ribonukleáza A (ENO 531 Fermentas),
8. Chemikálie pro přípravu elektroforetického pufru TAE (Sigma):

- Na₂(disodná sůl kyseliny ethyléndiamintetraoctové),
- Trizma base [tris-(hydroxymethyl)aminomethan],
- Ledová kyselina octová.

3.3 Vzorky

Vzorky kukuřice byly dodány odborem krmiv ÚKZÚZ (krmná surovina – kukuřičné zrno). Genetická modifikace, jejíž detekce byla nově zavedena, však v nich nalezena nebyla.

3.4 Pracovní postupy

3.4.1 Izolace rostlinné DNA a DNA referenčního materiálu

Metodika je přesně popsána v manuálech uvedených kitů a v JPP „Detekce přítomnosti GMO v rostlinném materiálu metodou PCR“. Navážka mletého vzorku je dvakrát po 60 mg na každý vzorek.

Rozemletý zhomogenizovaný vzorek podstupuje lýzi buněk lyzačním pufrem za přítomnosti proteinázy, degradaci RNA, vysrážení a odstranění ostatních buněčných komponent, navázání DNA na silikagel upevněný v kolonce, promytí navázané DNA a její rozpuštění v elučním pufru. K amplifikaci se používá izolát DNA v objemu dle návodu výrobce PCR kitů.

3.4.2 Polymerázová řetězová reakce PCR

Příprava reakční směsi:

1. Připraví se PCR box: pracovní nástroje, pomůcky i prostor se dekontaminují od jakýchkoli molekul DNA otřením povrchů ethanolem a UV zářením po dobu 30 min.
2. Stanoví se počet reakcí (počet vzorků plus příslušné kontroly). Podle tabulky reakčních směsí (viz. tab. 1) se vypočítají celkové objemy všech součástí reakce. Výsledný objem celkové reakční směsi je 50 μ l.
3. Kompletní reakční směs se sterilně smíchá v pořadí: redestilovaná H₂O, REDTaq Mix (obsahující všechny komponenty potřebné pro PCR včetně DNA-polymerázy) a primery specifické pro hledaný úsek DNA. Tato směs bez templátu se rozpipetuje po množstvích uvedených v tabulce do přichystaných amplifikačních zkumavek.
4. Nakonec se do každé zkumavky přidá 5 μ l templátové DNA. Pro beztemplátovou kontrolu se místo templátové DNA přidá 5 μ l vody.
5. Amplifikační zkumavky s dobře utěsněným víčkem se vloží do jamek v bloku termocykleru a spustí se příslušný program.

3.4.3 Elektroforéza v agarózovém gelu

Jedná se o standardní metodu pro tzv. "end-point" vyhodnocení PCR (tj. vyhodnocení po ukončení celé amplifikace), vhodnou pro kvalitativní detekce GMO.

1. Příprava gelu: Uvaří se 2% agarózový gel v elektroforetickém TAE-puftru (Tris-acetát-EDTA). Připraví se nalévací vanička s vhodným hřebínkem. "Zuby" hřebínku vytvoří v tuhoucím gelu jamky konstantní velikosti. Po mírném zchlazení se přidá roztok ethidiumbromidu (interkalační barvivo sloužící ke zviditelnění DNA v gelu), opatrně zamíchá a nalije se do vaničky. Po ztuhnutí gelu se opatrně vyjme hřebínek, gel se přenesse do elektroforetické vany a převrství se TAE-pufrem.
2. Nanášení vzorků: Objem vzorku nanášeného do jamky závisí na typu hřebínku. Je nezbytné promyslet si rozvržení vzorků a markerů v jamkách gelu. Vzorky před nanesením do jamek není třeba barvit. Oba používané amplifikační kity používají červenou DNA-polymerázu a toto barvivo během chodu elektroforézy indikuje postup DNA v gelu. Do jamek se nanesou vzorky amplifikátů a marker molekulové hmotnosti (obsahuje fragmenty DNA deklarovaných délek) a spustí se chod elektroforézy. Pro amplifikáty se používá krokový marker (po 50 bp).
3. Vyhodnocení: Po 45 min. až 55 min. chodu, když rozdělení fragmentů podle jejich délek již dostatečně pokročilo, se gel prosvítí na transiluminátoru a udělá se fotodokumentace. Snímky se popisují, vyhodnocují a uchovávají v elektronické podobě.

3.4.4 Zavádění nové PCR-detekce: kukuřice DAS 59122

Cílem je ověření funkčnosti primerů podle vytvořeného amplifikačního programu.

1. Do termálního cykleru se naprogramuje nový program dle návodu k použití přístroje. Konkrétní naprogramování cykleru pro kukuřici 59122 uvádí tabulka č. 4.

Tabulka č. 4: Amplifikované fragmenty a amplifikační program

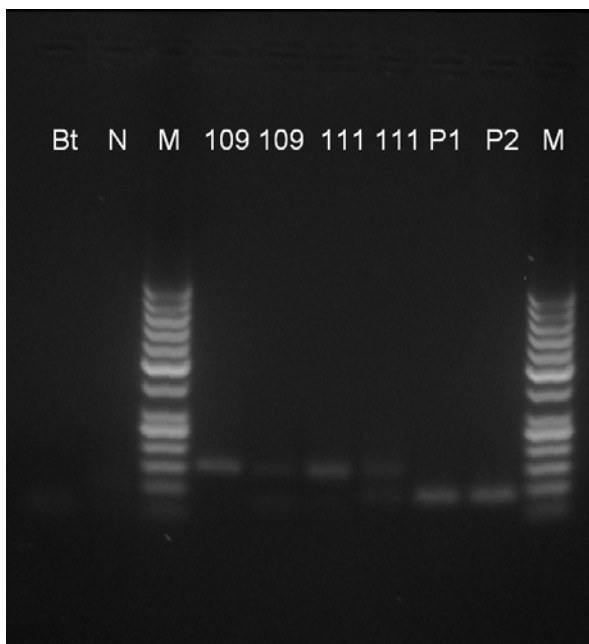
Hledaný/amplifikovaný úsek		Amplifikační program		
Název	Délka (bp)	Název	Průběh	Poznámka
Kukuřice DAS	86	C:17 DAS	94 °C/ 8 min 30 sec/1 cyklus 94 °C/ 30 sec 60 °C/ 1min 72 °C/ 40 sec/50 cyklů 72 °C/ 1min/1 cyklus	Jednoduchá PCR

2. Namíchá se PCR-směs podle tabulek pro daný kit. Jako templát se použije roztok DNA, který obsahuje amplifikovatelný úsek (pozitivní kontrola 1% a 10%). Dále se použije beztemplátová

(místo DNA je ve směsi voda) a negativní kontrola, pro zjištění kontaminací a nespecifických reakcí. Jako další se použije DNA ze vzorků kukuřice z laboratoře.

3. Provede se PCR a elektroforéza. Podle obrázků gelu se zjistí přítomnost či nepřítomnost hledaného pruhu, jehož vzdálenost od startu se porovná s 50bp DNA markerem. Výsledek představuje obrázek č. 1.

Obr. č. 1: Amplifikace transgenu DAS

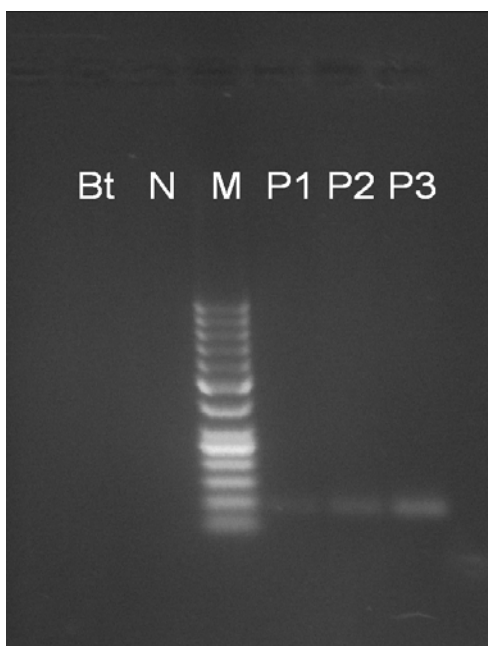


Bt	Beztemplátová kontrola,
N	Negativní kontrola IRM 2345,
M	Marker 50bp,
109,111	Vzorky kukuřice,
P1	Pozitivní kontrola CRM 1/2007 1%,
P2	Pozitivní kontrola CRM 2/2007 10%.

1. Provede se další PCR pro zjištění limitu detekce tak, že se 1% CRM naředí redestilovanou vodou na koncentraci 0,1 %. Namíchá se PCR-směs pro daný kit. Jako templát DNA se použije pouze CRM s koncentrací 0,1 %, 1 % a 10 %.

2. Po skončení PCR reakce se provede elektroforéza. Z obrázku gelu se hodnotí výsledek (opět srovnáním DNA 50bp markeru), který je znázorněn na obrázku č. 2.

Obr. č. 2: Amplifikace transgenu DAS



Bt	Beztemplátová kontrola,
N	Negativní kontrola IRM 2345,
M	Marker 50bp,
P1	Pozitivní kontrola 0,1 % získaná ředěním z CRM 1/2007 1%,
P2	Pozitivní kontrola CRM 1/2007 1%,
P3	Pozitivní kontrola CRM 2/2007 10%.

4 Výsledky a diskuse

Byly analyzovány vzorky krmiv, pozitivní kontroly a negativní kontrola. V žádném z nich nebyla detekována přítomnost uvedené modifikace.

Jako pozitivní kontroly pro PCR se použily 2 druhy certifikovaného referenčního materiálu ve formě mouky, které byly zakoupeny od IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements), Belgie. Jako 3. pozitivní kontrola byl zařazen interní referenční materiál s obsahem GMO 0,1 %. Ve všech pozitivních kontrolách byla genetická modifikace 59122 nalezena.

5 Závěr

Byla vyzkoušena technika detekce a identifikace DNA v rámci JPP. Byla ověřena vhodnost těchto technik v podmínkách pracoviště. Byla zavedena metoda pro detekci další modifikace odrůd kukuřice: 59122 DAS, která bude začleněna do JPP.

6 Literatura

- 1 Mazzara M., Codeil S., Eede G.: Event-specific method for the quantification of maize line DAS-59122 using real-time PCR, Validation Report, Community Reference Laboratory for GM Food And Feed Italy, Joint Research Centre, <http://gmo-crl.jrc.it>, **2005**
- 2 Mazzara M., Codeil S., Eede G.: Event-specific method for the quantification of maize DAS-59122 using real-time PCR, Protocol, Community Reference Laboratory for GM Food And Feed Italy, Joint Research Centre, <http://gmo-crl.jrc.it>, **2005**

Dioxinový screening metodou Biosense

Petra Kosubová

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

1 Souhrn

Byla zavedena screeningová metoda pro stanovení látek s dioxinovým účinkem s využitím ELISA detekce (enzyme-linked immunosorbent assay). Vybraná bioanalytická metoda (Ahimmunosstanovení) umožňuje screeningové stanovení látek, které mají schopnost interagovat s buněčným proteinem, Ah-receptorem. Tuto schopnost vykazují nejen látky dioxinového typu, ale také řada dalších organických látek, které mohou negativně ovlivňovat ELISA detekci. Pro zachování selektivity detekce je vhodné metodu aplikovat pro matrice poskytující minimální množství interferentů a koextraktů, jakými jsou minerální látky. U přípravy komplikovaných matric, např. čistírenských kalů, nebylo možné pomocí zavedených čisticích postupů odstranit interferující koextrakty a zároveň zařazením dalších čisticích kroků metoda ztratila screeningový charakter. Práce uvádí přehled bioanalytických přístupů stanovení látek dioxinového typu, jejich porovnání s konfirmačními metodami, včetně požadavků na jejich provedení, dále standardní operační postup (SOP) pro potřeby ÚKZÚZ a zpracování výsledků.

2 Úvod

2.1 Látky s dioxinovým účinkem – jejich vlastnosti a výskyt

Hlavními představiteli skupiny látek s dioxinovým účinkem jsou polychlorované dibenzo-*p*-dioxiny (PCDD) a polychlorované dibenzofurany (PCDF) označované souhrnně PCDD/F. Strukturně se jedná o dva benzenové kruhy spojené buď dvěma (PCDD) nebo jedním (PCDF) kyslíkovým můstkem substituované jedním až osmi atomy chlóru. Skupina PCDD zahrnuje 75 kongenerů a skupina PCDF 135 kongenerů. Tyto látky nebyly nikdy záměrně vyráběny. Primárními zdroji PCDD/F jsou termické a spalovací procesy. PCDD/F dále vznikají jako vedlejší produkty při metalurgických procesech a průmyslových výroбах v přítomnosti chlóru, například při výrobě papíru, výrobě pesticidů, pentachlorofenolu a dalších chlorových sloučenin. K sekundárním zdrojům kontaminace PCDD/F patří například úniky ze skládek odpadu nebo aplikace čistírenských kalů (1).

Jediný způsob užití PCDD/F je v oblasti výzkumu těchto látek, při studiu výskytu, environmentálního chování a toxikologických vlastností. Tyto látky vykazují vysokou stabilitu

za různých podmínek, schopnost akumulovat se v tukových složkách a potravních řetězcích a zároveň patří k vysoce toxickým látkám. Nejtoxičtější ze skupiny PCDD/F je 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD) řazený podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) mezi karcinogeny pro člověka. Pro hodnocení humánních rizik byl tomuto kongeneru Světovou zdravotnickou organizací (WHO) přiřazen jednotkový faktor ekvivalentní toxicity (TEF) a vyhodnocena relativní toxicita dalších 16 toxikologicky významných kongenerů PCDD/F vzhledem k 2,3,7,8-TCDD. Tyto látky, 7 PCDD a 10 PCDF, vykazují společný strukturní znak, jsou substituované v polohách 2,3,7,8 atomy chlóru, a zároveň vykazují stejný způsob interakce v organismu, vážou se na buněčný Ah-receptor. Podobné chování bylo pozorováno u čtyř non-ortho a osmi mono-ortho polychlorovaných bifenyly (PCB), které jsou označovány jako koplanární (c-PCB) nebo podobné dioxinům (DL-PCB). V roce 1998 Van den Berg zveřejnil TEF pro 17 PCDD/F a 12 DL-PCB, které se využívají pro výpočet toxických ekvivalentů jednotlivých kongenerů a celkový toxický ekvivalent (WHO-TEQ), popisující riziko daného materiálu (2). V roce 2005 byly WHO-TEF přezkoumány a změněny u 14 látek (3). Vedle WHO-TEQ může být také vypočten mezinárodní toxický ekvivalent (I-TEQ). Tento přístup se nejvíce liší v příspěvku 1,2,3,7,8-pentachlorodibenzo-*p*-dioxinu a nezahrnuje vliv DL-PCB (4, 5) (viz. tab. č.1).

2.2 Legislativa a kontrola

Dioxiny se uvolňují do životního prostředí při různých technologických procesech a jsou distribuovány v environmentálních složkách, kde podléhají transformačním procesům. Obecně živé organismy mohou být exponovány dioxiny z životního prostředí třemi způsoby: inhalační cestou, kůží a potravou. Hlavní expoziční cestou pro člověka je potrava, kterou může přijímat více než 90 % dioxinů. Asi 80 % potravy představují obvykle potraviny živočišného původu.

Hlavním zdrojem dioxinů v těchto potravinách jsou krmiva podávaná hospodářským zvířatům. Za nejvíce kontaminované krmné suroviny určil Vědecký výbor pro výživu zvířat (SCAN) rybí maso, rybí olej a živočišný tuk. Vysoké obsahy dioxinů byly také nalezeny v doplňkových látkách krmiv, konkrétně ve sloučeninách stopových prvků. Evropská Komise vydala směrnici 2006/13/ES, kterou se mění přílohy I a II směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES o nežádoucích látkách v krmivech, pokud jde o dioxiny a PCB s dioxinovým efektem, která vedle maximálních obsahů udává také akční hodnoty (6). Tyto hodnoty byly stanoveny za účelem podpory aktivního přístupu ke snižování dioxinů v potravinách a krmivech v rámci doporučení Komise 2006/88/ES a slouží příslušným orgánům a provozovatelům k určení, zda je vhodné identifikovat zdroj kontaminace a přijmout opatření k jeho omezení nebo odstranění (7). Za účelem získání spolehlivých údajů o přítomnosti PCDD/F a DL-PCB v produktech určených ke krmení zvířat navrhuje Komise v doporučení 2004/704/ES minimální četnost vzorků pro monitoring. Zároveň

doporučuje analyzovat také PCB jiného typu než typu dioxinů s cílem porozumění vztahů, výskytu a časovému vývoji přítomnosti jednotlivých sledovaných skupin analytů (8).

Tabulka č. 1 Souhrn TEF látek s dioxinovým účinkem

Substituované pozice	TEF		
	WHO-1998 (2)	WHO-2005 (3)	I-1988 (4,5)
PCDD			
2,3,7,8	1	1	1
1,2,3,7,8	1	1	0,5
1,2,3,4,7,8	0,1	0,1	0,1
1,2,3,6,7,8	0,1	0,1	0,1
1,2,3,7,8,9	0,1	0,1	0,1
1,2,3,4,6,7,8	0,01	0,01	0,01
1,2,3,4,6,7,8,9	0,0001	0,0003	0,001
PCDF			
2,3,7,8	0,1	0,1	0,1
1,2,3,7,8	0,05	0,03	0,05
2,3,4,7,8	0,5	0,3	0,5
1,2,3,4,7,8	0,1	0,1	0,1
1,2,3,6,7,8	0,1	0,1	0,1
1,2,3,7,8,9	0,1	0,1	0,1
2,3,4,6,7,8	0,1	0,1	0,1
1,2,3,4,6,7,8	0,01	0,01	0,01
1,2,3,4,7,8,9	0,01	0,01	0,001
1,2,3,4,6,7,8,9	0,0001	0,0003	0,001
Non-ortho PCB			
PCB 77	0,0001	0,0001	
PCB 81	0,0001	0,0003	
PCB 126	0,1	0,1	
PCB 169	0,01	0,03	
Mono-ortho PCB			
PCB 105	0,0001	0,00003	
PCB 114	0,0005	0,00003	
PCB 118	0,0001	0,00003	
PCB 123	0,0001	0,00003	
PCB 156	0,0005	0,00003	
PCB 157	0,0005	0,00003	
PCB 167	0,00001	0,00003	
PCB 189	0,0001	0,00003	

Primární environmentální složkou sledovanou v rámci kontroly potravinového řetězce je půda. Hlavním zdrojem kontaminace zemědělsky využívané půdy je aplikace čistírenských kalů. Vyhláška MŽP č. 382/2001 Sb., o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě, udává maximální hodnoty pouze pro obsahy dvou skupin organických rizikových látek, tj. adsorbovatelných organických halogenů (AOX) a PCB (9). V roce 2000 byl v rámci Evropské unie zpracován dokument s návrhy pro zlepšení situace při nakládání s kaly, který uváděl maximální

limit pro obsah PCDD/F v upravených kalech 100 ng I-TEQ/kg v suchém vzorku (10). Návrh však nebyl schválen a v současnosti není v ČR limitní obsah PCDD/F v kalech legislativně stanoven.

2.3 Metody stanovení a požadavky na jejich provedení

S cílem sjednotit uvádění a interpretaci analytických výsledků stanovení PCDD/F a DL-PCB byly Evropskou Komisí vydány požadavky na metody odběru vzorku a metody jejich stanovení. Obecné požadavky na provádění analytických metod a interpretaci výsledků jsou stanoveny v rozhodnutí Komise 2002/657/ES (11), kterým se provádí směrnice Rady 96/23/ES o kontrolních opatřeních u některých látek a jejich reziduí v živých zvířatech a živočišných produktech. Konkrétní požadavky pro stanovení obsahu PCDD/F a DL-PCB v krmivech udává směrnice Komise 2002/70/EC (12).

Tato směrnice rozlišuje požadavky podle dvou základních přístupů stanovení, a to screeningové a konfirmační. Screeningové metody jsou používány k vytipování vzorků s obsahem dioxinů od 30 % do 40 % hladiny maximálního limitu s využitím bioanalytických přístupů nebo plynové chromatografie ve spojení s nízkorozlišovací hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Pro potvrzení přítomnosti dioxinů a stanovení jejich obsahů jsou požadovány konfirmační analýzy založené na vysokorozlišovací plynové chromatografii s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií (HRGC-HRMS). Parametry pro screeningové metody jsou uvedeny v kapitole 3.7.2 (12).

Vysoké požadavky jsou zároveň stanoveny pro přípravu vzorků k analýze, která je detailně zpracována v metodě EPA 1613-B aplikované hlavně v kombinaci s HRGC-HRMS analýzou (13). Tento předpis zahrnuje vedle extrakčních technik soubor čisticích a pre-separačních postupů, umožňujících maximální odstranění různých skupin interferentů. Jejich eliminace je nezbytná pro získání spolehlivých výsledků při konfirmačních stanoveních a zároveň je velice důležitá při použití biotestů, u kterých přítomnost interferentů a nadbytek matricových koextraktů může vést k vysokému podílu falešně pozitivních nálezů, a tím snižovat spolehlivost a použitelnost biotestů.

K extrakci PCDD/F je jako extrakční činidlo doporučován toluen (13). Soxhletova extrakce probíhá až 24 hodin. V případě tlakové extrakce rozpouštědlem (PLE) při 200 °C je extrakční doba výrazně nižší (14). Jednou z obtížně extrahovatelných matric jsou minerální doplňkové látky krmiv z funkční skupiny pojiv a protispékavých látek. Za účelem sjednocení extrakčního postupu pro tyto materiály byla v roce 2006 Referenční laboratoří společenství (CRL) pro dioxiny a PCB v krmivech a potravinách ve Freiburgu uspořádána mezinárodní studie. Jejím cílem bylo porovnat různé extrakční podmínky a navrhnout jednotný postup. Důležitým závěrem studie je doporučení provádět extrakci do směsi toluenu s polárním rozpouštědlem, například ethanolem (15). Na základě závěru této studie provedl J.-F. Focant optimalizaci PLE pro extrakci PCDD/F z minerálních krmiv. Série 12 pokusů byla provedena v Plackett-Burmanova designu a statisticky

vyhodnocena (16). Optimalizované podmínky byly využity při extrakci vybraných minerálních látek v rámci tohoto VÚ.

2.4 Bioanalytické přístupy

Problematika bioanalytických metod (biotestů) pro stanovení dioxinů je přehledně zpracována v práci M.S. Denisona (17). Metody se rozdělují do dvou základních skupin, imunochemické (immunoassay = IA) a biologické (bioassay = BA). Detekce dioxinů u IA je založena na vysoce specifické interakci protilátek produkovaných v organismech proti dioxinům. V BA se využívá schopnosti dioxinů aktivovat Ah-receptor (AhR) a vyvolat jeho následný transdukční mechanismus. BA se dále dělí na dvě podskupiny: na metody využívající buněčný, případně tkáňový extrakt, popisující schopnost látek přítomných v extraktu vzorku aktivovat vazbu AhR na DNA (in vitro AhR-BA) a na metody založené na aktivaci exprese genu pomocí AhR probíhající v živých buněčných liniích (in vivo AhR-BA). Principy a způsoby detekce dioxinů se u jednotlivých přístupů odlišují, avšak všechny metody založené na biotestech by měly vykazovat schopnost selektivně stanovit hodnoty toxického ekvivalentu pro sumu PCDD/F a DL-PCB (17).

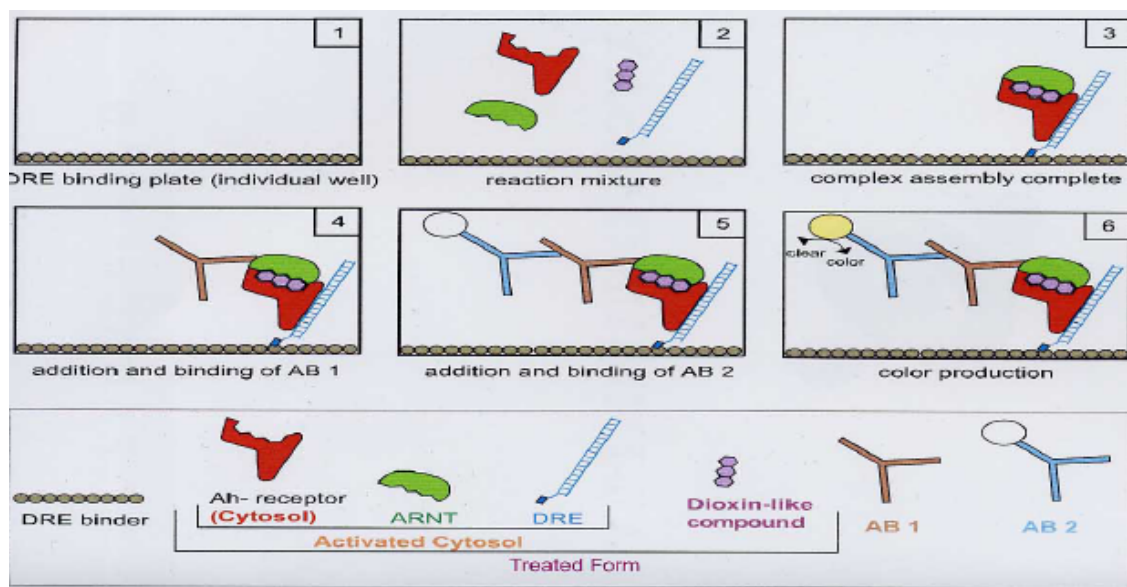
Screening PCDD/F pomocí IA je popsán v metodě EPA 4025 (18). Protilátky využívané v IA soupravách specificky interagují s PCDD/F, ale také se strukturně podobnými látkami přítomnými v extraktu vzorku. Důsledkem těchto křížových reakcí je nadhodnocování obsahu PCDD/F a zvýšený podíl falešně pozitivních nálezů. Další nevýhodou IA je výrazně nižší citlivost, tj. vyšší detekční limity, než vykazují BA. Na druhé straně IA stanovení jsou rychlejší v porovnání s BA díky jednoduchosti detekčního systému a nižších nárokům na čištění extraktů (17). M. Nichkova studovala vliv intenzity čištění extraktu na matricové efekty při imunochemické analýze sedimentů a krevního séra a popsala zvýšení spolehlivosti IA se vzrůstající intenzitou a počtem čisticích kroků (19).

První screeningová analýza PCDD/F založená na buněčném systému byla popsána v 70. letech minulého století. In vivo AhR-BA jsou založené na indukci aktivity buněčných enzymů, například ethoxyresorufin O-deethylázy (EROD) nebo luciferázy, využívané v metodách CALUX (chemically-activated luciferase expression). V současnosti je většina analýz prováděna pomocí těchto dvou systémů. Výhodou in vivo AhR-BA je přítomnost dalších metabolických enzymů, které mohou degradovat vazby interferujících látek z extraktu vzorku s AhR, a tím snižovat podíl falešně pozitivních nálezů. Certifikace těchto metod pro účely oficiálního screeningu a monitoringu probíhá velice pomalu z důvodu nedostatečného počtu průkazných validačních dat a studií (20 až 22).

Nejnovějšími screeningovými metodami jsou in vitro AhR-BA, které dosud nejsou široce používány. Při analýze se využívá tkáňový extrakt, nejčastěji jaterní cytosol, obsahující 3 základní složky pro specifickou vazbu PCDD/F na AhR, tj. dimerizační Arnt protein, oligomer DNA (DRE) a samotný AhR. Jedním ze tří způsobů detekce vzniklého komplexu je imunochemická reakce

a metoda se označuje jako Ah-imunostanovení. Metoda je prezentována jako rychlá, relativně levná, citlivá a snadno proveditelná. Avšak vykazuje jednu hlavní nevýhodu, tj. vysoký podíl falešně pozitivních nálezů u neznámých vzorků, pokud není součástí přípravy vzorku intenzivní čisticí procedura, která by umožňovala odstranit interferující látky schopné vazby na AhR (17, 23).

Obrázek č. 1: Schéma Ah-imunostanovení Biosense (23)



Obecně platí, že při použití vhodných extrakčních a čisticích postupů data získaná pomocí uvedených bioanalytických metod mohou korelovat s výsledky získanými pomocí HRGC-HRMS stanovení. Avšak porovnávání čísla poskytují zcela odlišnou informaci o vzorku. Výsledky HRGC-HRMS stanovení jsou udávány v podobě toxických ekvivalentů (TEQ), k jejichž výpočtu se používají faktory stanovené v rámci studií na zvířatech, které vyjadřují relativní toxicitu jednotlivých PCDD/F a DL-PCB kongenerů oproti 2,3,7,8-TCDD. Výsledky biotestů popisují pouze schopnost extraktu vyvolat určitou biochemickou reakci, avšak neposkytují žádnou informaci o toxicitě analyzované látky v organismu. A následkem nesprávného označení výstupů jednotlivých metod může dojít ke špatné interpretaci výsledků a k nevhodnému použití bioanalytických metod (17).

Cílem práce bylo zavést screeningovou metodu pro Ah-imunostanovení látek s dioxinovým účinkem v krmivech s využitím soupravy Biosense.

3 Materiál a metody – standardní operační postup

3.1 Rozsah použití

Ah-imunostanovení Biosense je screeningová metoda založená na ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) detekci látek dioxinového typu, vhodná pro analýzu materiálů s nízkým obsahem interferentů. Kvantifikační limit soupravy Biosense je 1 pg až 2 pg 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinu. Metoda je vhodná pro identifikaci vzorků doplňkových látek krmiv s nadlimitním výskytem dioxinů, jejichž obsahy jsou následně stanoveny konfirmační analýzou.

3.2 Princip metody

Ah-imunostanovení Biosense umožňuje screeningové stanovení látek, které mají schopnost interagovat s buněčným proteinem, Ah-receptorem. Tuto schopnost vykazují nejen látky dioxinového typu, ale také řada dalších organických látek, které mohou negativně ovlivňovat ELISA detekci a vést k falešně pozitivním nálezům. Pro zachování selektivity detekce je vhodné metodu využívat pro analýzu materiálů s nízkým obsahem interferentů a koextraktů, jakými jsou například minerální látky.

Minerální látky jsou extrahovány metodou tlakové extrakce rozpouštědlem do směsi toluenu s ethanolem (14,15). Po převedení do hexanu je extrakt přečištěn pomocí adsorpční kolonové chromatografie na silikagelu (13). Eluát je odpařen k suchu a rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (DMSO).

Podíl vzorku v DMSO je smíchán s aktivovaným cytoelem, který obsahuje Ah-receptor a další komponenty pro ELISA detekci. Po dvouhodinové inkubaci při 30 °C je nevázaný Ah-receptor odstraněn a přidány protilátky umožňující fotometrické stanovení vázaného komplexu Ah-receptoru s látkou dioxinového typu. Intenzita zabarvení je úměrná množství vázaného komplexu (23).

3.3 Chemikálie

Všechny chemikálie jsou čistoty pro reziduální analýzu. Čistota použitých chemikálií je testována stanovením slepého vzorku v každé analyzované sérii.

3.3.1 n-Hexan suprasolv (Merck),

3.3.2 Ethanol suprasolv (Merck),

3.3.3 Toluén suprasolv (Merck),

3.3.4 Dichlormethan (DCM) suprasolv (Merck),

3.3.5 Dimethylsulfoxid (DMSO) suprasolv (Merck),

3.3.6 Kyselina sírová (H₂SO₄), koncentrovaná, p.a. (Merck),

- 3.3.7 Hydroxid sodný (NaOH) p.a. (Lachner), 4 g pevného NaOH se rozpustí ve 100 ml deionizované vody (Millipore),
- 3.3.8 Síran sodný bezvodý (Na₂SO₄), práškový (Merck), určený pro extrakci, aktivovaný minimálně 4 h při 400 °C,
- 3.3.9 Síran sodný bezvodý (Na₂SO₄), granulovaný (Merck), určený pro chromatografii, aktivovaný minimálně 4 h při 400 °C,
- 3.3.10 Mořský písek, kysele praný (Merck), žíhaný minimálně 4 h při 450 °C,
- 3.3.11 Aktivovaný silikagel 60 (0,063-0,200 mm) (Merck), přečištěný pomocí DCM Soxhletovou extrakcí po dobu 8 h, aktivovaný 12 h při 180 °C,
- 3.3.12 Kyselý silikagel 60 (Merck), modifikovaný H₂SO₄. K 56 g aktivovaného silikagelu 60 se přidá po částech 44 g koncentrované H₂SO₄ a směs se intenzivně třepe až je sypká.
- 3.3.13 Bazický silikagel 60 (Merck) modifikovaný NaOH. K 50 g aktivovaného silikagelu 60 se přidá 25 ml 1M vodného roztoku NaOH a směs se intenzivně třepe až je sypká.
- 3.3.14 Křemenná vata silanizovaná (Supelco),
- 3.3.15 ELISA souprava (Biosense Laboratories, AS), uchovaná a zpracovaná dle pokynů výrobce a manuálu,
- 3.3.16 Standardní roztok 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinu (2,3,4,7-TCDD) o koncentraci 32,2 µg v 1 ml DMSO (Wellington),
 - 3.3.16.1 Zásobní roztok st-A o koncentraci 32,2 ng/ml DMSO, 10 µl st o koncentraci 32,2 µg/ml se doplní DMSO v 10 ml odměrné baňce,
 - 3.3.16.2. Zásobní roztok st-B o koncentraci 3,22 ng/ml DMSO, 1 ml st-A se doplní DMSO v 10 ml odměrné baňce,
 - 3.3.16.3. Zásobní roztok st-C o koncentraci 0,322 ng/ml DMSO, 1 ml st-B se doplní DMSO v 10 ml odměrné baňce,
- 3.3.17 Deionizovaná voda (Millipore) pro přípravu roztoku.

3.4 Přístroje a pomůcky

- 3.4.1 ASE 100 (Dionex),
- 3.4.2 Sušárna (Memmet),
- 3.4.3 Popouštěcí muflová pec (LAC),
- 3.4.4 Ultrazvuková lázeň (Kaintek),
- 3.4.5 Rotační vakuová odparka Laborota (RVO) (Heidolph),
- 3.4.6 Termovap pro odpařování proudem inertního plynu (Ecom),
- 3.4.7 Skleněné kolonky pro sloupcovou chromatografii,
- 3.4.8 Hlubokomrazicí box, minus 80 °C (NBSC),
- 3.4.9 Vortex/Multirotátor RS 60 – zařízení pro míchání, třepání zkumavek a vialek (Biosan),
- 3.4.10 Termostat, 30 °C (Trigon-plus),
- 3.4.11 Mikrodestičkový fotometr Optimax (EastPort),
- 3.4.12 Digestoř,
- 3.4.13 Laboratorní pomůcky (exsikátor, automatické pipety, apod.) a sklo.

3.5 Pracovní postup

3.5.1 Postup přípravy

3.5.1.1 ASE extrakce

Navážka 50 g vzorku se smíchá s 20 g bezvodého Na_2SO_4 , směs se vloží do rozebíratelné nerezové extrakční cely o objemu 66 ml s celulózovým filtrem na dně. Zbytek objemu se vyplní křemenným pískem a lože se uzavře celulózovým filtrem a hlavou cely. Uzavřená cela se umístí do přístroje a provede se extrakce 10% ethanolem v toluenu podle předvoleného programu (tlak 1500 psi, teplota 150 °C, čas 2 × 15 min, proplach 60 % a profouknutí dusíkem 100 s).

3.5.1.2 Převedení do hexanu

Extrakt se převede ze sběrné baňky do 100 ml srdcovky a pomocí rotační vakuové odparky při 40 °C se extrakt odpaří k suchu a následně rozpustí v hexanu. Srdcovka se 3 × opláchne hexanem a ultrazvukuje se. Konečný objem extraktu v hexanu je ~ 3 ml.

3.5.1.3 SPE čištění extraktu na silikagelu

Na dno skleněné kolonky se vloží smotek silanizované křemenné vaty a nasype se silikagelové lože (v pořadí: 0,5 g granulovaného Na_2SO_4 – 1 g bazického silikagelu – 0,5 g aktivovaného silikagelu – 4 g kyselého silikagelu – 0,5 g aktivovaného silikagelu – 1 g granulovaného Na_2SO_4). Během vrstvení i nakonec se pečlivě pořukáváním na kolonku sklepe celý obsah. Kolonka se promyje 10 ml hexanu a promývací hexan se odstraní. Smočený sorbent se nesmí nechat vyschnout. Na připravenou kolonku se nanese skleněnou Pasteurovou pipetkou zkoncentrovaný extrakt vzorku v hexanu, nejlépe opakovanými přídávky cca 1 ml extraktu. Baňka se opakovaně vypláchne 3 × 1 ml až 2 ml hexanu. S použitím ultrazvuku po dobu cca 30 s se promývací podíly postupně nanesou na kolonku. Nechá se právě vsáknout, zájmové látky se eluují 30 ml hexanu do zábrusové srdcovky umístěné pod kolonkou s rychlostí promývání ~ 20 až 30 kapek za minutu. V případě nedostatečné kapacity kolonky se čistí ještě jednou pomocí nové kolonky.

3.5.1.4 Převedení do DMSO

Eluát se odpaří pomocí RVO na objem ~ 100 μl , převede se do skleněného insertu vialky, srdcovka se vypláchne ~ 100 μl hexanu a ten se přidá do insertu k extraktu. Hexan se odpaří mírným proudem dusíku do sucha a odparek se rekonstituuje do 20 μl DMSO.

3.5.2 Postup stanovení

Celkové ELISA stanovení probíhá po dobu jednoho pracovního dne a detailní postup je uveden v manuálu přiloženém ke každé zakoupené soupravě (23). Následující postup je jeho zkrácenou verzí.

3.5.2.1 Příprava aktivovaného cytosolu (AC)

Chlazené komponenty soupravy se vyndají z chladicího boxu a vytemperují se na pokojovou teplotu. Zmrazené komponenty (*Cytosol*, *DRE Oligo*, *ARNT extract*, *Activator*) se vyndají z mrazicího boxu a nechají se roztát. Všechny meziprodukty se uchovávají v ledové lázni. Roztátý obsah tub *Cytosolu* se vlije do 50 ml zkumavky. Přidá se potřebný objem *DRE Oligo*, směs se lehce promíchá. Do směsi *Cytosol a DRE-Oligo* se přidá potřebný objem *ARNT*. Směs se opět lehce promíchá. Do směsi *Cytosol, DRE-Oligo a ARNT* se přidá potřebný objem *Activatoru*. Směs AC se okamžitě promíchá a uchovává se v ledové lázni. Nepoužité komponenty (*DRE Oligo*, *ARNT*, *Activator*) se vrátí zpět do mrazicího boxu.

3.5.2.2 Úprava vzorku před nanesením na ELISA destičku

K 1 ml podílu AC se přidá 10 μ l vzorku rozpuštěného v DMSO. Stejným způsobem se připraví referenční standard, negativní a pozitivní kontrola. Nárůstu citlivosti stanovení lze dosáhnout vyšším množstvím extraktu vůči AC. Například pro duplikátní stanovení v jednom naředění lze k 350 μ l AC přidat 8 μ l extraktu. Na jedné ELISA desce je možné zpracovat 10 až 40 vzorků.

3.5.2.3 ELISA

Pokud bude vzorek modifikován přímo k ELISA detekci v připraveném naředění, nanese se do jamky pouze 150 μ l. Pokud bude extrakt stanoven ve více ředěních, napipetuje se na ELISA destičku 300 μ l upraveného roztoku vzorku. Ředí se v poměru (1 : 1) aktivovaným cytosolem, tzn. ke 150 μ l aktivovaného cytosolu v následující jamce se přidá 150 μ l roztoku z předchozí úrovně. Každá ředěná jamka se promíchá ve špičce automatické pipety minimálně šestkrát opakovaným nasátím a vypuštěním obsahu jamky. Z poslední ředěné úrovně se před modifikací k detekci odebere 150 μ l, aby zůstal ve všech jamkách stejný objem (150 μ l). Destička se zakryje víčkem a inkubuje po dobu 2 hodin při 30 °C.

Během této doby se připraví promývací pufr zředěním koncentráту deionizovanou vodou Millipore. Pro 96 jamkovou destičku se připraví 500 ml promývacího pufru v odměrném válci a nespoteřovaný pufr se uchová při 4 °C v chladicím boxu. Po skončení inkubace se odstraní obsah jamek a napipetuje se do všech jamek 300 μ l zředěného promývacího pufru. Po 2 minutách se obsah jamek odstraní a promytí se zopakuje ještě 2 \times . Celkový počet promytí je 3.

Připraví se požadovaný objem zásobního roztoku primárních protilátek (AB-1-ZR) smícháním *AB1* a *AB diluent* a směs se opatrně promíchá. Nepoužitý *AB1* a *AB diluent* se vrátí do chladicího boxu a uchovávají se při 4 °C. Do všech jamek destičky se napipetuje 150 µl AB-1-ZR. Zakrytá destička se inkubuje 1 hodinu při 30 °C. Po skončení inkubace se obsah jamek odstraní a 3 × promyje zředěným promývacím roztokem, viz. výše.

Připraví se požadovaný objem zásobního roztoku sekundárních protilátek (AB-2-ZR) smícháním *AB2* a *AB diluent* a směs se opatrně promíchá. Nepoužitý *AB2* a *AB diluent* se vrátí do chladicího boxu a uchovávají se při 4 °C. Do všech jamek destičky se napipetuje 150 µl AB-2-ZR. Zakrytá destička se inkubuje 1 hodinu při 30 °C. Po skončení inkubace se obsah jamek odstraní a 3 × promyje zředěným promývacím roztokem, viz. výše. Promytá destička se zbaví zbytků roztoku opakovaným vyklepnutím do filtračního papíru.

3.5.2.4 Detekce

Detekční zásobní roztok se připraví rozpuštěním požadovaného počtu detekčních tablet v odpovídajícím objemu detekčního pufru. Roztok se opatrně promíchá, chrání se před denním světlem a vyčká se minimálně 15 minut pro dokonalé rozpuštění složek. Nepoužitý detekční pufr a detekční tablety se vrátí do chladicího boxu a uchovávají se při 4 °C. Do všech jamek destičky se napipetuje 150 µl připraveného detekčního zásobního roztoku. Zakrytá destička se inkubuje při 30 °C bez přístupu světla. Před měřením je nutno odstranit ze dna destičky případnou zkondenzovanou vodu. Měří se fotometricky při vlnové délce 405 nm. Výsledky se odečítají po (5; 10; 15; 30; 45; 60) min. Pro individuální podmínky je nutno stanovit nejvhodnější čas inkubace.

3.6 Vyhodnocení výsledků

3.6.1 Kalibrace

K 1 ml aktivovaného cytosolu se přidá 13,3 µl st-A, důkladně se promíchá a 2 × 300 µl tohoto roztoku se nanese na destičku. Poté se šestinásobně ředí podle manuálu a do posledního osmého řádku se napipetuje 150 µl aktivovaného cytosolu jako negativní kontrolní bod. Uvedeným postupem se získají kalibrační jamky s obsahem (1; 2; 4; 8; 16; 32; 64) pg 2,3,7,8-TCDD. Kalibrační závislost se sestaví vynesemím množství 2,3,7,8-TCDD v jamce a odpovídajících hodnot absorbance změřených při 405 nm.

3.6.2 Kvantifikace

Dioxinový ekvivalent (DEQ) je odezva vzorku stanoveného pomocí soupravy Biosense. DEQ se vypočítá pomocí kalibrační rovnice a naměřené absorbance příslušného vzorku. U doplňkových látek se předpokládá velice nízký obsah dioxinů. Proto se vzorek oproti doporučení čtyřnásobně neředí, ale každý vzorek se měří v duplikátu nebo triplikátu pouze v jednom ředění. Dále je

k výpočtu nutno použít navážku vzorku před extrakcí (50 g), objem DMSO, ve kterém se přečištěný extrakt rozpustil (20 µl), primární naředění podílu DMSO extraktu v aktivovaném cytosolu (1 : 50) a objem extraktu v DMSO v jamce (3 µl).

DEQ v jamce (pg) = (průměrná absorbance vzorku – intercept) / směrnice kalibrace

DEQ v původním vzorku (ng/kg) = DEQ v jamce × 20 / 3 / 50

3.7 Kontrola kvality

3.7.1 ELISA stanovení

Kalibrační závislost je v rozsahu 1 pg až 64 pg 2,3,7,8-TCDD/jamku lineární a charakterizována následujícími parametry: relativní směrodatná odchylka (RSD) < 6 %, $R^2 > 0,99$ a směrnice 0,040 (absorbance/pg) (23).

Kvantifikační limit ELISA soupravy je 1 pg až 2 pg 2,3,7,8-TCDD v jamce.

Do každé série se zařadí negativní a pozitivní kontrola. Negativní kontrolní bod musí vykazovat absorbanci nižší než nejnižší kalibrační bod. Pozitivní kontrolní bod představuje jednobodovou kontrolu kalibrace s využitím netoxického α -naphthoflavonu (NAP), který je dodáván v soupravě. Absorbance 2 µl roztoku NAP v jamce odpovídá odezvě druhého nejvyššího kalibračního bodu, tj. 32 pg 2,3,7,8-TCDD.

3.7.2 Požadavky pro screeningové metody

Metoda musí umožňovat identifikaci vzorků s obsahem látek dioxinového typu od 30 % do 40 % hladiny maximálního limitu, tj. 0,2 ng až 0,3 ng 2,3,7,8-TCDD/kg doplňkové látky.

V každé sérii musejí být zařazeny slepé laboratorní vzorky, referenční vzorky s obsahem dioxinů na hladině maximálního limitu, na její polovině a na jejím dvojnásobku. Výběžnost metody musí být v rozsahu 30 % až 140 % a RSD za podmínek opakovatelnosti < 30 %.

Mez detekce se stanoví jako podíl hodnoty odezvy trojnásobku směrodatné odchylky odezvy deseti opakovaných stanovení provedených se slepým vzorkem a hodnoty směrnice kalibrační přímky.

Odezva vzorku se porovná s odezvou referenčního vzorku s obsahem PCDD/F na hladině maximálního limitu. Vzorky s odezvou nižší než je referenční vzorek se označí za negativní a vzorky s vyšší odezvou se považují za pozitivní. Každý pozitivní výsledek a 2 % až 10 % negativních vzorků musí být potvrzeno konfirmační analýzou. Podíl falešně negativních výsledků musí být nižší než 1 %. Podíl falešně pozitivních výsledků by měl být nízký (12).

3.8 Mytí a dekontaminace skla a ASE cel

Vzhledem k velmi stabilnímu charakteru stanovovaných látek, které se ve vodě nerozpouštějí, sorbují se na sklo a jsou schopny odolávat i silným oxidačním činidlům, se volí vhodná dekontaminace. Sklo se umyje v teplé vodě se saponátem a důkladně se opláchně destilovanou vodou. V peci se nejprve předsuší 2 hodiny při 120 °C a poté vypálí 2 hodiny při 400 °C. Po zchladnutí se vypláchně hexanem suprasolv. Vialky se promyjí 2 × v rozpouštědle, předsuší 2 hodiny při 120 °C a poté vypálí 2 hodiny při 400 °C. Po zchladnutí se vypláchnou hexanem suprasolv.

Rozebrané ASE cely se vloží do směsi rozpouštědla z RVO a čistí se v ultrazvukové lázni 15 minut, poté se opláchnou hexanem a vysuší 2 hodiny při 120 °C. Těsnění a o-kroužky se mění dle potřeby a doporučení v manuálu k ASE.

Víčka se opláchnou hexanem suprasolv a nechají se oschnout v digestoři.

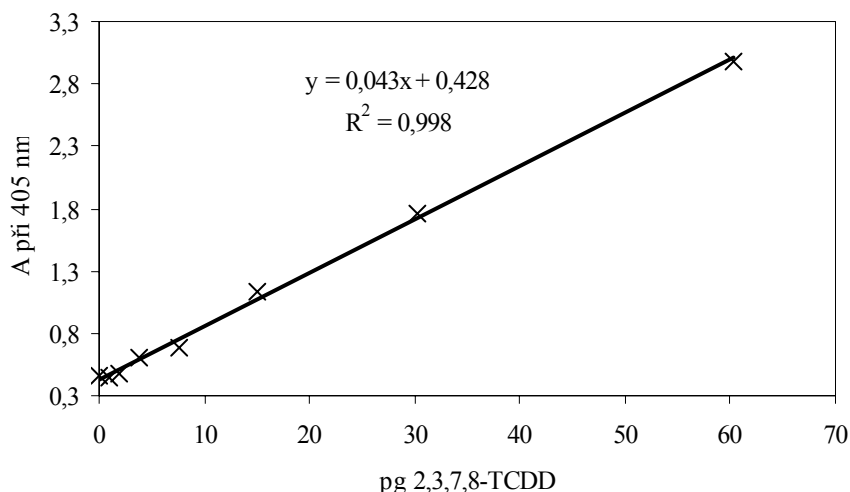
Veškerá septa, inserty a špičky jsou na jedno použití.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Kalibrace

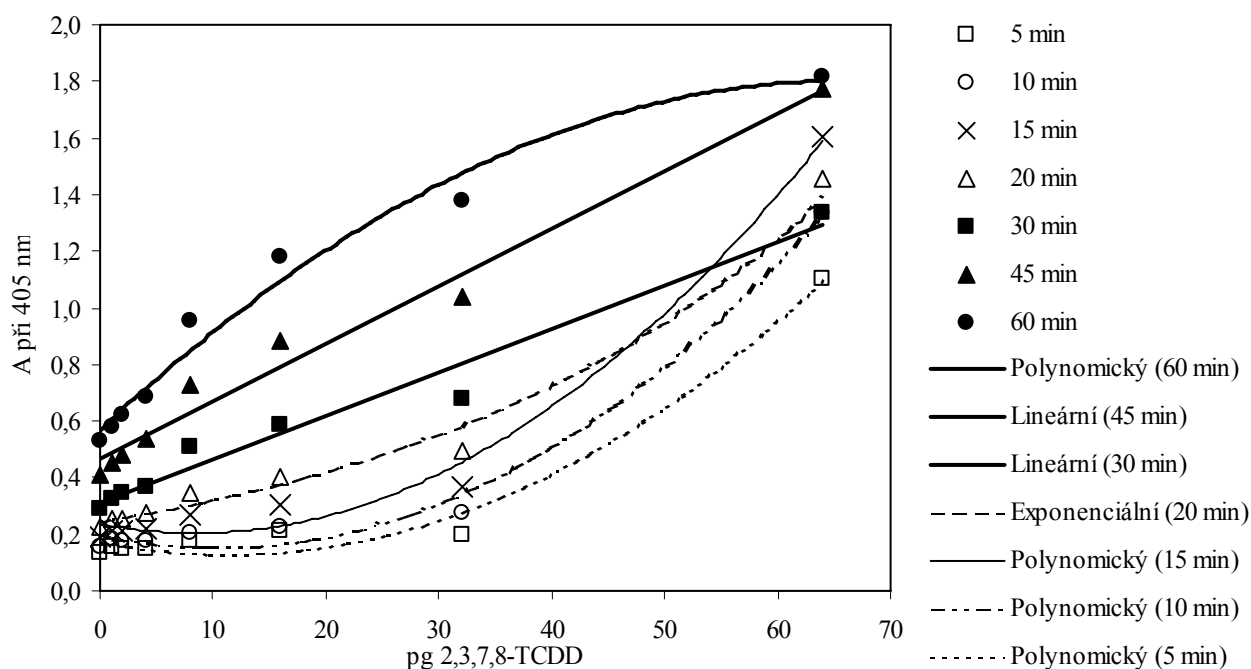
První kalibrační závislost odpovídala parametrům výrobce (viz. obr. č. 2) a pozitivní kontrola stanovená pomocí α -naphoflavonu vykazovala odezvu 102 %.

Obrázek č. 2 Kalibrace pro prvotní testování Ah-imunostanovení (Biosense)

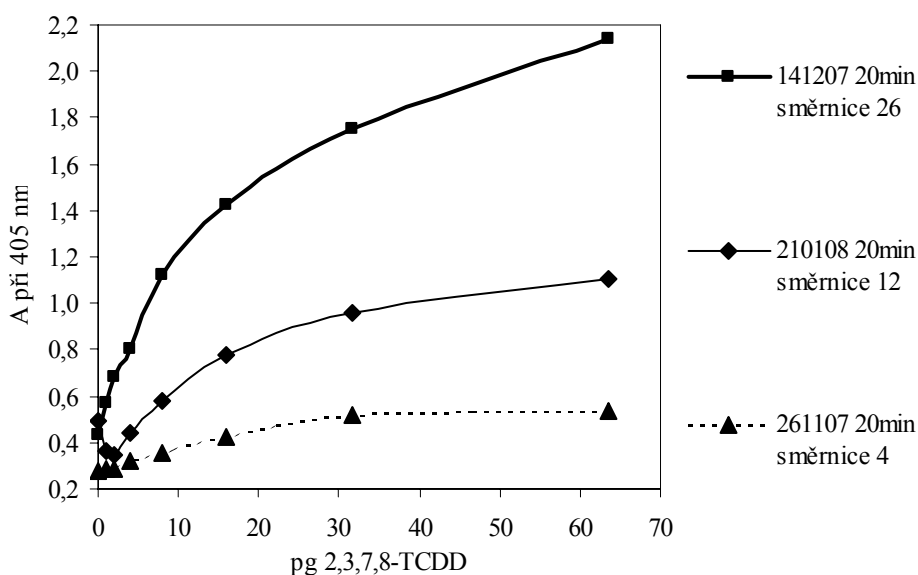


Během dalších experimentů souprava Biosense poskytovala kalibrační závislosti s nelineárním průběhem. Na obrázku č. 3 jsou znázorněna kalibrační data z následného měření odečtená z připravené desky v sedmi různých časech. Průměrná směrnice sestrojených kalibračních závislostí byla 0,018, tj. přibližně dvakrát nižší než deklaruje dodavatel soupravy (23).

Obrázek č. 3 Vývoj kalibrační závislosti v čase



Obrázek č. 4 Časová proměnlivost citlivosti souprav Biosense



V následujících třech experimentech vykazovaly kalibrační závislosti opět odlišné parametry oproti referenčním hodnotám. Při odečtu ve stejných detekčních časech (20 min) vykazovaly různou citlivostí, která byla vždy nižší než deklarovaná hodnota 0,040 (viz. obr. č. 4). Pozorované odchylky a nestabilita byly konzultovány s výrobcem soupravy (Dr. Chip Biotechnology Incorporation, Taiwan), který připouští nelineární průběh kalibračních závislostí v rozsahu 1 pg až 64 pg 2,3,7,8-TCDD a doporučuje kalibrovat v rozsahu 1 pg až 16 pg 2,3,7,8-TCDD. Výrobce zároveň trvá na stabilní citlivosti během celé expirační doby soupravy, ale upozorňuje na možné

vnější faktory ovlivňující stabilitu soupravy, jako jsou skladovací a přepravní podmínky a dodržení analytických podmínek.

4.2 Analýza doplňkových látek

V první fázi byla testovaná metoda založena na extrakci dle aplikačních specifikací Dionex. Extrakce toluenem probíhala při 200 °C po dobu 2 × 5 minut. Extrakt se čistil pomocí sloupcové chromatografie na 12 g silikagelu 60 modifikovaného 30% kyselinou sírovou. Metoda vykazovala na validovaných hladinách pro doplňkové látky (0,375; 0,75; 1,5) ng 2,3,7,8-TCDD/kg široký rozsah výtěžností (viz. tab. č. 2).

Tabulka č. 2 Stanovení reprezentativních matic a vzorků obohacených 2,3,7,8-TCDD

Vzorek	Absorbance	DEQ (ng/kg)	Výtěžnost (%)
Blank	0,475	0,44	–
ML	0,476	0,54	–
ML + 0,375	0,470	0,47	- 19
ML + 0,75	0,507	0,89	47
ML + 1,5	0,671	2,7	146
ML 442	0,434	0,06	–
ML 285	0,982	6,9	–

V další fázi testování bylo nutné ověřit metodu přípravy analýzou reálných vzorků. Protože není možné porovnávat hodnoty stanovené pomocí Ah-imunostanovení s legislativně stanovenými TEQ, metoda přípravy byla ověřena srovnáním referenčního vzorku minerálního krmiva (ZnO) ve spolupráci s NRL pro persistentní organické polutanty v Dobré ve Frýdku-Místku při Zdravotním ústavu Ostrava (ZÚO). Tato laboratoř připravila přečištěný extrakt validovaným postupem s průměrnou výtěžností PCDD/F 80 % a poskytla jej pro Ah-imunostanovení. V NRL-RO Brno byl stejný vzorek připraven postupem uvedeným v SOP a stanoven současně s extraktem ze ZÚO. Přepočtový faktor mezi stanovenou hodnotou DEQ a referenční hodnotou TEQ byl nastaven pomocí vzorku ze ZÚO a použit pro vzorek z laboratoře NRL-RO Brno. Tento experimentálně stanovený faktor 2 se výrazně lišil od faktoru 10 až 13, který navrhuje Biosense. Výtěžnosti obou vzorků byly vyhovující, tj. v rozsahu 30 % až 140 % pro screeningové metody (viz. tab. č. 3). Postup přípravy je vhodný pro stanovení doplňkových látek krmiv a bude ověřen vícenásobnou analýzou referenčního vzorku.

Maximální limit pro obsah PCDD/F v doplňkových látkách je (0,75 – 1,0) ng TEQ/kg a pro sumu PCDD/F a DL-PCB 1,5 ng TEQ/kg. Z požadavků na screeningovou metodu vyplývá, že metoda musí umožňovat stanovit obsahy na hladině 30 % až 40 % maximálního limitu, tj. 0,6 ng TEQ/kg pro sumu PCDD/F a DL-PCB. Kvantifikační limit metody je přímo úměrný směrodatné odchylce slepých stanovení a nepřímo úměrný směrnici kalibrace (12). Pokud tedy není detekční metoda dostatečně přesná a zároveň vykazuje nízkou citlivost, bude poskytovat vysoké kvantifikační limity. Již při třetinové citlivosti soupravy Biosense byl kvantifikační limit metody nevyhovující pro její využití při analýze doplňkových látek.

Tabulka č.3 Ověření přípravy vzorků doplňkových látek krmiv pro Ah-imunostanovení

	Absorbance 405 nm	RSD (%)	TCDD (pg)	DEQ (ng/kg)	Referenční hodnota	Výtěžnost (%)
Pozitivní kontrola kalibrace	0,833	21	32,6	–	31,7	103
BI – ÚKZÚZ	0,449	19	1,28	0,17	–	–
ZnO – ÚKZÚZ	0,595	9	11,9	1,76	0,92	86
ZnO – ZÚO	0,557	14	10,1	1,34	0,92	73

V roce 2007 bylo metodou Biosense analyzováno 20 vzorků doplňkových látek s negativními nálezy. Nejčastěji se jednalo o uhličitán vápenatý, hydrogenuhličitán sodný, oxid hořečnatý a dihydrogenfosforečnan sodný, amonný a vápenatý. Vzhledem k pozitivním nálezům PCDD/F v ZnO při konfirmační analýze HRGC-HRMS bylo navrženo, aby v následujícím období byly zařazeny vzorky ZnO také pro screeningové stanovení za účelem cílené kontroly kontaminace PCDD/F v tomto materiálu a ověřování funkčnosti tohoto stanovení analýzou pozitivního vzorku.

Screeningové stanovení PCDD/F se hodnotí porovnáním získaných hodnot reálných vzorků s referenčním vzorkem s obsahem PCDD/F na maximální hladině. Vzorek s obsahem menším než referenční vzorek se označí za negativní, vzorek s obsahem větším než referenční vzorek se označí za pozitivní. Takový vzorek je nutné podrobit konfirmační analýze založené na HRGC-HRMS. Pokud kalibrace nebo kontrolní vzorky neposkytnou očekávanou odezvu, je nutné přepracování celé série.

4.3 Analýza čistírenských kalů

V první fázi byla testována extrakce čistírenských kalů při 170 °C po dobu 2 × 5 minut do směsi hexanu a acetonu. Před sloupcovou chromatografií na 12 g modifikovaného silikagelu 60 bylo zařazeno třepání extraktu s koncentrovanou kyselinou sírovou. Výtěžnost postupu na testovaných hladinách (50; 100; 200) ng 2,3,7,8-TCDD/kg byla 10 %, 49 % resp. 59 % (viz. tab. č. 4). Extrakty

kalů nebylo možné pomocí stávajícího postupu dostatečně přečistit a neodstranitelné zbytky extraktů mohly negativně ovlivnit funkci soupravy.

Tabulka č. 4 Stanovení čistírenských kalů obohacených 2,3,7,8-TCCD

Vzorek	Absorbance	DEQ (ng/kg)	Výtěžnost (%)
Blank	0,590	6,7	–
ČK	0,677	31,0	–
ČK + 50	0,717	36,1	10
ČK + 100	1,072	80,4	49
ČK + 200	1,614	148	59

Cílem druhé fáze testování bylo odstranění nepolární alifatické uhlovodíkové frakce z extraktů kalů s využitím gelové permeační chromatografie (GPC), která je rutinně využívána v NRL-RO Brno při přípravě vzorků krmiv a kalů. Pro ověření navrženého postupu byly zvoleny referenční vzorky sedimentů se stanovenou hodnotou TEQ (vzorek z testu SETOC, Wageningen, Nizozemí).

Navržený postup přípravy vzorků sedimentů k Ah-imunostanovení zahrnoval extrakci pomocí ASE 100 a třístupňové čištění extraktu pomocí koncentrované kyseliny sírové, s následnou GPC a dále kombinovanou silikagelovou kolonkou podle EPA 1613B. Navážka vzorku byla 4 g a 4 g Na₂SO₄. Extrakční rozpouštědlo byla směs hexan/acetone (3 : 1) a extrakční podmínky byly následující: teplota 180 °C, 2 × 5 min, proplach cely 60 % a profouknutí dusíkem 100 s. Nastavení odpovídá modifikovanému postupu z aplikačního listu Dionex pro extrakci PCDD/F. Výtěžnosti jednotlivých čistících kroků stanovené pomocí standardů byly vyhovující, tj. 101 % u GPC a 83 % pro čištění na silikagelu.

Použitím navrženého postupu se opět nepodařilo zcela odstranit nepolární uhlovodíkovou frakci a zbytkový podíl mohl ovlivnit spolehlivost Ah-imunostanovení PCDD/F. Vlivy různých čistících postupů na matricové efekty vzorků sedimentů při ELISA stanovení byly popsány v práci M. Nichkovy (19). Zjistila, že pro potlačení matricových efektů při ELISA stanovení vzorků sedimentů je nutné použít minimálně dvoustupňové čištění, zahrnující kombinovanou silikagelovou kolonku a separaci na aktivním uhlí. Příprava vzorků kalů, které obsahují průměrně 10 × až 20 × více organického materiálu než sedimenty, což znamená výrazně vyšší množství koextraktů, bude vyžadovat vícestupňové čištění odlišné od toho, které bylo doposud testováno v NRL-RO Brno.

4.4 Interpretace dat

Důležitou otázkou zůstává interpretace získaných dat. Vzorky s určitou hodnotou TEQ, avšak s různými profily PCDD/F a různým obsahem koextraktů, budou poskytovat při Ah-imunostanovení neporovnatelné odezvy. Důkazem jsou výsledky porovnání třech referenčních vzorků sedimentů, u kterých obsah 2,3,7,8-TCDD představoval průměrně 24 % stanovené hodnoty DEQ, avšak nebylo možné jednoznačně stanovit poměr mezi stanovenou hodnotou DEQ a celkovým referenčním TEQ jednotlivých vzorků (viz. tab. č. 5). Z výsledků tedy vyplývá, že u nízkých hodnot DEQ je možné předpokládat nízký obsah 2,3,7,8-TCDD a naopak, ale nelze jednoznačně odhadnout celkový TEQ pro vzorky s neznámými profily PCDD/F. Podobné závěry také předkládá zpráva projektu Horizontal SSPI-CT-2003-50241, ve které autoři upozorňují na výrazné rozdíly mezi hodnotami TEQ a odezvou použité bioanalytické metody u některých vzorků testovací sady (20).

Tabulka č. 5 Porovnání hodnot TEQ a DEQ stanovených pomocí soupravy Biosense

Vzorek	DEQ (ng/kg)	REF-TEQ (ng/kg)		TEQ/DEQ (%)	
	suma	TCDD	suma	TCDD	suma
S 778	3,2	0,85	50,8	27	1597
S 758	38,5	7,7	24,3	20	63
S 764	227	56,3	135	25	60

5 Závěr

Byla vypracována screeningová metoda pro Ah-imunostanovení látek s dioxinovým efektem, založená na ELISA detekci s využitím soupravy Biosense. Postup přípravy vzorku, detekce látek s dioxinovým účinkem a vyhodnocení vzorku byly zpracovány v podobě SOP. Pokud souprava Biosense vykazuje při detekci charakteristiky, které deklaruje výrobce, je tato metoda vhodná pro screeningové stanovení doplňkových látek krmiv. Metoda však není vhodná pro analýzu komplexních matic, jako jsou například sedimenty, případně čistírenské kaly, protože poskytuje odezvy, které jsou závislé na zastoupení PCDD/F kongenerů, a neposkytuje odezvy úměrné celkovému TEQ analyzovaného vzorku. Současným problémem zůstává časová nestabilita a nedostatečná citlivost vyhodnocovací soupravy Biosense, která se řeší s jejím výrobcem.

6 Literatura

1. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp104.html>
2. Van den Berg, M., et al.: Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and for wildlife, *Environmental Health Perspectives*, 1998, 106(12), 775 – 797.
3. Van den Berg, M., et al.: The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds, *Toxicological sciences*, 2006, 93(2), 223 – 241.
4. NATO/CCMS (North Atlantic Treaty Organization, Committee on the Challenges of Modern Society). (1988a) International toxicity equivalency factor (I-TEF) method of risk assessment for complex mixtures of dioxins and related compounds. Report No. 176.
5. NATO/CCMS (North Atlantic Treaty Organization, Committee on the Challenges of Modern Society). (1988b) Scientific basis for the development of international toxicity equivalency (I-TEF) factor method of risk assessment for complex mixtures of dioxins and related compounds. Report No. 178.
6. Směrnice Komise 2006/13/ES, kterou se mění přílohy I a II směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES o nežádoucích látkách v krmivech, pokud jde o dioxiny a PCB s dioxinovým efektem.
7. Doporučení Komise 2006/88/ES o snižování přítomnosti dioxinů, furanů a PCB v krmivech a potravinách.
8. Doporučení Komise 2004/704/ES o monitorování základních hodnot dioxinů a polychlorovaných bifenyly typu dioxinů v krmivech.
9. Vyhláška MŽP ČR č. 382/2001 Sb. o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě.
10. Vácha, R., et al.: Recommended maximum contents of persistent organic pollutants in sewage sludge for application on agricultural soils, *Plant, Soil and Environment*, 2006, 52, 362 – 367.
11. Rozhodnutí Komise 2002/657/ES o stanovení minimálních požadovaných pracovních limitů (MPPL) pro určitá rezidua v potravinách živočišného původu.
12. Směrnice Komise 2002/70/ES, kterou se stanoví požadavky pro určení obsahu dioxinů a PCB s dioxinovým efektem v krmivech.
13. US EPA Method 1613B, Tetra- through octa-chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS, 1994.
14. Dionex, Extraction of PCDDs and PCDFs from environmental samples using Accelerated solvent extraction (ASE), application note 323, 1999.
15. Kotz, A., et al.: Harmonization of extraction methods for the determination of PCDD/F in mineral feed, *Organohalogen Compounds*, 2007, 69, 130 – 132.
16. Focant, J.-F., et al.: Optimization of a parallel PLE procedure for the extraction of PCDDs and PCDFs in sepiolite, *Organohalogen Compounds*, 2007, 69, 1130 – 1133.
17. Denison, M.S., et al.: Bioanalytical approaches for the detection and relative quantification of halogenated dibenzo-p-dioxins and related chemicals, *Organohalogen Compounds*, 2007, 69, 14 – 19.
18. US EPA Method 4025, Screening for PCDD/Fs by immunoassay, 2002.
19. Nichkova, M., et al.: Immunochemical determination of dioxins in sediment and serum samples, *Talanta*, 2004, 63, 1213 – 1223.
20. Horizontal – ORG, SSPI-CT-2003-502411: Deliverable D2.5 Report on the use of CALUX bioassay techniques on a limited number of samples of sludge, compost and amended soils, 2007.
21. Gizzi, G., et al.: Determination of dioxins (PCDDs/PCDFs) and PCBs in food and feed using the DR CALUX bioassay: Results of an international validation study, *Food Additives and Contaminants*, 2005, 22(5), 472 – 481.
22. Van Wouwe, N., et al.: Interlaboratory comparison of dioxins and dioxin-like compounds in food using CALUX bioassays, *Organohalogen Compounds*, 2007, 69, 817 – 820.
23. Ah-immunoassay, Biosense Laboratories, AS, user's guide.

Zavedení multireziduální metody stanovení pesticidů v krmivech metodou LC-MS/MS

Ivana Vaverková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Praha, Za opravnou 4,
150 06 Praha 5 – Motol
ivana.vaverkova@ukzuz.cz

1 Úvod

Po zapojení laboratoří ÚKZÚZ do sítě CRL/NRL bylo nezbytné zavést do rutinního používání metody podle stávajících požadavků na analytické laboratoře. Podle návrhu normované multireziduální metody (dokument CEN/TC 275/WG 4 N 0236, tzv. QuEChERS metoda) bylo nutné zavést tento postup, ověřit základní validační parametry pro dostupné standardy, vybrat počáteční skupinu nejméně 10 pesticidních látek, vhodných pro přípravu k akreditaci metody s koncovým stanovením metodou LC-MS/MS pro detektor typu trojitého kvadrupolu a připravit SOP a další podklady nutné pro přihlášení zkoušky k akreditaci.

Multireziduální metoda QuEChERS specifikuje podmínky pro stanovení širokého spektra pesticidních přípravků. Před uvedením do rutinního použití v laboratoři se musí ověřit postup publikované metody, optimalizovat podmínky a vybrat skupinu analytů, které vyhovují kritériím použitelnosti metody pro stanovení pomocí LC s hmotnostní detekcí. Dále pak vymezit validační parametry a připravit SOP pro akreditaci metody.

Analyty byly vybrány na základě seznamu přípravků povolených v ČR k moření obilovin a luštěnin, seznamu pro monitoring EU a seznamu látek, které jsou předmětem mezilaboratorních porovnávacích zkoušek. Dalším kritériem pro výběr analytů byla použita metoda LC-MS/MS.

V r. 2007 se laboratoř zúčastnila mezinárodní porovnávací zkoušky C1/SRM2 pro stanovení reziduí pesticidních látek. Ze 40 stanovovaných látek zahrnutých v testu jich bylo laboratoří testováno 22 a bylo dosaženo velmi dobrého výsledku.

2 Princip

Při použití QuEChERS metody jsou zmražené homogenizované vzorky krmiv extrahovány pomocí acetonitrilu. Matrice s malým obsahem vody navíc před počáteční extrakcí vyžadují přidavek vody do celkového obsahu 10 g. Po přidavku bezvodého $MgSO_4$, $NaCl$ a pufru jsou fáze po další extrakci odděleny odstředěním. Podíl organické vrstvy je nejprve zmražen pro odstranění tuků, vosků a cukrů a poté přečištěn dispersní SPE s přidavkem sorbetu PSA (a GCB) a dalšího bezvodého

MgSO₄. Extrakt je okyselen 5% kyselinou. Fáze přečištění vzorku byla nakonec odstraněna, jak bude popsáno dále. Vzorky jsou analyzovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi C₁₈ s MS/MS hmotnostní detekcí. Ke stanovení se používá interní standard (ISTD). Ten slouží ke korekci chyb, korekci kolísání objemu acetonitrilové fáze při extrakci, zapříčiněného různým obsahem vody nebo cukrů ve vzorcích a různou teplotou, stejně jako ke korekci rozdílů v nastříkovaném objemu.

3 Chemikálie

3.1 Acetonitril, HPLC grade,

3.2 Methanol, HPLC grade,

3.3 Redestilovaná voda (18,2 MΩ.cm⁻¹),

3.4 Redestilovaná voda (18,2 MΩ.cm⁻¹), chlazená ≤ 4 °C,

3.5 Kyselina mravenčí p.a. for mass spectrometry, 98%, Mr = 46,03 g.mol⁻¹ ,

3.6 Síran hořečnatý bezvodý,

3.7 Chlorid sodný p.a.,

3.8 Hydrogencitrát disodný seskvihydrát p.a.,

3.9 Citrát trisodný dihydrát p.a.,

3.10 Extrakční směs solí

Do plastové váženky se naváží 4,0 g ± 0,2 g bezvodého síranu hořečnatého (3.6), 1,00 g ± 0,05 g chloridu sodného (3.7), 1,00 g ± 0,05 g citrátu trisodného (3.9) a 0,50 g ± 0,03 g hydrogencitrátu disodného (3.8).

3.11 Mobilní fáze A (voda + 0,01% kys. mravenčí)

Připraví se smícháním 1000 ml vody (3.3) a 0,1 ml kys. mravenčí (3.5).

3.12 Mobilní fáze B (acetonitril + 0,01 % kys. mravenčí)

Připraví se smícháním 1000 ml acetonitrilu (3.1) a 0,1 ml kyseliny mravenčí (3.5).

3.13 Interní standard (ISTD) Tris-(1,3-dichlorisopropyl)-fosfát (3P),

3.14 Zásobní roztok ISTD (10 mg/ml)

Do vialky se naváží asi 10 mg ISTD a doplní vypočítaným množstvím acetonitrilu (3.1) tak, aby výsledná koncentrace získaného roztoku byla přesně 10 µg/ml. Tento roztok se uchovává ve tmě při teplotě minus 18 °C.

3.15 Pracovní roztok ISTD (50 µg/ml)

Připraví se naředěním 50 µl zásobního roztoku ISTD (3.14) do odměrné baňky (10 ml) a doplní se acetonitrem po rysku.

3.16 Standardy analytů,

3.17 Zásobní roztoky analytů (10 mg/ml)

Do vialky se naváží asi 10 mg standardu a doplní vypočítaným množstvím acetonitrilu (3.1) tak, aby výsledná koncentrace získaného roztoku byla přesně 10 mg/ml. Tento roztok se uchovává ve tmě při teplotě minus 18 °C. Zásobní roztok carbendazimu se pro menší rozpustnost připraví v koncentraci 1 mg/ml a doplní se methanolem (3.2).

3.18 Pracovní směsný roztok standardů (50 µg/ml)

Připraví se naředěním 50 µl zásobních roztoků jednotlivých standardů (3.17) do 10 ml odměrné baňky a doplní se acetonitrem (3.1) po rysku.

3.19 Pracovní roztok standardů (5 µg/ml)

Připraví se naředěním 1 ml pracovního směsného roztoku standardů (3.18) do 10 ml odměrné baňky, roztok se doplní acetonitrem (3.1) po rysku.

3.20 Pracovní roztok standardů (0,5 µg/ml)

Připraví se naředěním 1ml pracovního roztoku standardů o koncentraci 5µg/ml (3.19) do 10 ml odměrné baňky, roztok se doplní acetonitrem (3.1) po rysku.

4 Přístroje a pomůcky

4.1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s MS/MS detekcí,

4.2 Separační kolona Zorbax XDB C18, 150 mm × 2,1 mm, 3,5 µm,

4.3 Analytické váhy s přesností 0,1 mg,

4.4 Ultrazvuková lázeň,

4.5 Laboratorní odstředivka,

4.6 Plastové váženky,

4.7 Plastové zkumavky, 12 ml,

4.8 Plastové centrifugační zkumavky se šroubovým uzávěrem, 50 ml.

5 Pracovní postup

5.1 Příprava vzorku

Vzorek se upravuje homogenizací, zmražením přes noc, další homogenizací těsně před vážením a dalším zpracováním tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku během úpravy a ztrátám chemicky labilních analytů.

5.2 Extrakce

Do plastové centrifugační zkumavky (4.8) se naváží 5 g zkušební vzorku s přesností na 0,001 g, ke kterému se přidá 10 ml vody (3.4), 10 ml acetonitrilu (3.1) a 100 µl pracovního roztoku ISTD (3.15). Zkumavka se bezpečně uzavře a prudce protřepává po dobu 1 minuty. Je nutno zamezit úniku extraktu přes uzávěr během extrakce i otevírání zkumavky. Přidá se směs solí (3.10) a směs se ihned stejným postupem protřepe (1 min). Síran hořečnatý má tendenci vytvářet rychle tvrdnoucí shluky, proto je potřeba ihned po přidání směsi solí obsah zkumavky prudce protřepat alespoň po dobu 10 sekund. Následnou jednodinutovou extrakci je možno provést až společně s dalšími vzorky. Získaný extrakt se poté odstředí 5 minut při 3000 min⁻¹ a analyzuje pomocí LC-MS/MS.

5.3 Přečištění

V rámci optimalizace podmínek stanovení byly odzkoušeny postupy pro přečištění organické fáze, avšak ukázalo se, že spíše než ke zlepšení přispívají k prudké ztrátě výtěžnosti jednotlivých analytů. Stejného výsledku bylo dosaženo při analýze zmražených extraktů, a to s- i bez- následného okyselení. Přehled úbytků výtěžnosti vybraných pesticidů je uveden v následujících tabulkách 1 a 2. V literatuře se uvádějí i případy zapojení hydrolýzy a následné neutralizace pro iniciaci štěpení vazby mezi kyselým pesticidem a složkami matrice. I v tomto případě však dochází ke ztrátám analytu během přípravy vzorku. Z těchto důvodů byl krok přečištění a následného okyselení extraktu z postupu vyloučen. Při přípravě tak nedochází k prudkému nárůstu pH vlivem použitých sorbetů a ztrátám labilních pesticidů. Není tedy ani potřebné zařazovat následné okyselení.

Tabulka 1: Porovnání přípravy vzorku

Název	c (mg/kg)			
	Deklarovaná hodnota	Bez zmražení	Se zmražením	S okyselením
Azoxystrobin	0,24	0,19	0,15	0,16
Carbendazim	0,13	0,13	0,11	0,12
MCPA	0,05	0,05	0,04	0,04
Mecoprop	0,31	0,27	0,22	0,22
Propiconazol	0,36	0,28	0,27	0,28

Tabulka 2: Odchytky při různých přípravách vzorku

Název	Odchylka (%)		
	Bez zmražení	Se zmražením	S okyselením
Azoxystrobin	- 21,25	- 35,83	- 33,33
Carbendazim	3,08	- 13,08	- 9,23
MCPA	0,00	- 22,00	- 24,00
Mecoprop	-12,50	- 31,09	- 29,49
Propiconazol	- 21,39	- 24,44	- 22,78

5.4 Kvantitativní stanovení

5.4.1 Externí kalibrace

Pro prvotní nebo přibližné stanovení a pro potvrzení nepřítomnosti je možné použít kalibraci pouze v rozpouštědle (acetonitrilu). Pro kvantifikaci a výsledné stanovení se však používá interní kalibrace v matrici, protože na rozdíl od externí kalibrace lépe postihuje vlivy matrice vzorku na ionizaci a tím i na celkovou odezvu signálu. Může být nutné připravit více než jednu kalibrační závislost s ohledem na stanovované koncentrace jednotlivých analytů.

5.4.2 Ověření kalibrační závislosti

5 g vzorku blanku (matrice bez analytů) se připraví stejným postupem jako zkušební vzorek, ale bez přídavku interního standardu. Místo něj je přidáno stejné množství acetonitrilu (100 µl). Do pěti vialek se odpipetuje po 1 ml takto připraveného extraktu. Do každé z nich se pak přidá 10 µl

pracovního roztoku vnitřního standardu (3.15), požadované množství pracovního roztoku standardů (3.19, 3.20) a množství acetonitrilu pro dosažení konstantního objemu. Pro kalibrační rozsah (0,0025 – 0,5) mg/kg se použije následující ředění:

Tabulka 3: Rozpis pro sestavení kalibrační závislosti

Vialka Přídavek	1	2	3	4	5
Extrakt (ml)	1	1	1	1	1
ISTD (3.15) (μl)	10	10	10	10	10
Prac. r. stand. (3.20) (μl)	5	10	0	0	0
Prac. r. stand. (3.19) (μl)	0	0	10	50	100
Acetonitril (3.1) (μl)	95	90	90	50	0
Koncentrace (mg/kg)	0,0025	0,005	0,05	0,25	0,5

Kalibrační závislost se určí zvlášť pro každou látku pomocí následujících vztahů:

$$PR^{calmix} = \frac{A_{pes}^{calmix}}{A_{ISTD}^{calmix}}, \text{ pro každý stupeň kalibrace}$$

$$m_{pes}^{calmix} = C_{pes} \cdot V_{pes}^{calmix}, \text{ pro každý stupeň kalibrace.}$$

Kalibrační křivka má rovnici:

$$PR^{calmix} = a_{cal} \cdot m_{pes}^{calmix} + b_{cal}$$

Hmotnostní frakce w_R pesticidu ve vzorku je vypočítána pomocí poměru plochy píků pesticidu a interního standardu:

$$PR^{vz} = \frac{A_{pes}^{vz}}{A_{ISTD}^{vz}}, \text{ získaných z konečného extraktu jako:}$$

$$w_R = \frac{(PR^{vz} - b_{cal})}{a_{cal}} \cdot \frac{1}{m_a} \cdot \frac{m_{ISTD}^{vz}}{m_{ISTD}^{calmix}} \left[\frac{mg}{kg} \right], \text{ kde}$$

A_{pes}^{calmix} plocha píku pesticidu z kalibrační křivky

A_{ISTD}^{calmix} plocha píku interního standardu z kalibrační křivky

A_{pes}^{vz}	plocha píku pesticidu ze zkušební vzorku	
A_{ISTD}^{vz}	plocha píku interního standardu ze zkušební vzorku	
a_{cal}	konstanta kalibrační křivky (směrnice)	(1/μg)
b_{cal}	konstanta kalibrační křivky (úsek)	
C_{pes}	koncentrace pracovního roztoku pesticidů [μg/ml]	
m_a	hmotnost zkušební vzorku	(g)
m_{pes}^{calmix}	hmotnost pesticidu v kalibrační směsi	(μg)
m_{ISTD}^{calmix}	hmotnost interního standardu v kalibrační směsi	(μg)
m_{ISTD}^{vz}	hmotnost interního standardu přidaného ke zkušebnímu vzorku	(μg)
PR^{calmix}	poměr plochy píků pesticidu a interního standardu z kalibrační směsi	
PR^{vz}	poměr plochy píků pesticidu a interního standardu ze zkušební vzorku	(ml)
V_{pes}^{calmix}	objem pracovního roztoku pesticidů v kalibrační směsi	
w_R	hmotnost pesticidu ve zkuš. vzorku	(mg/kg)

V případě podezřelého nálezu nebo u složek, které se ukážou jako silně matričně ovlivňované, je nutno přistoupit ke kvantifikaci analytů metodou standardního přídávku.

Konečný extrakt zkušební vzorku se odpipetuje postupně do 4 vialek. První se ponechá bez přídávku standardů, do zbývajících se přidá podle potřeby daného stanovení odpovídající množství pracovního roztoku standardů o obsahu 0,5 μg/ml (3.20) nebo 5 μg/ml (3.19) a doplní se do konstantního objemu acetonitrilem (3.1).

Sestrojí se závislost plochy píku na množství přídávku a zjistí se parametry a , b rovnice $y = ax + b$, popisující přímkou pomocí lineární regrese.

Výsledná koncentrace (w_R) v mg/kg se vypočte podle vzorce:

$$|w_R| = \frac{b}{a} \cdot \frac{V}{V_{př} \cdot m_a} \left[\frac{mg}{kg} \right], \text{ kde}$$

a	konstanta kalibrační křivky	(1/μg)
b	konstanta kalibrační křivky	

m_a	hmotnost zkušební vzorku	(g)
V	objem přidaného acetonitrilu (10 ml)	(ml)
$V_{př}$	objem použitý jako standardní přídavek	(ml)
w_R	hmotnost pesticidu ve zkušebním vzorku	(mg/kg)

Do měřené sekvence se musejí zařadit kontrolní vzorky, v tomto případě krmivo se známým přidaným množstvím směsného roztoku standardů, které se připraví stejným postupem jako vzorky zkušební. Pro potvrzení malé významnosti chyb vzniklých při použití interního standardu je pak mimo jiné potřeba provést kontrolní měření ISTD. Toho je dosaženo přidáním interního standardu v jiné fázi analytického postupu, např. ke konečnému extraktu, a tím ke zjištění odchylek v signálu ISTD, vzniklých jinou než objemovou chybou.

Je také nutné změřit slepý vzorek s matricí, ve které nebudou žádné stopy po sledovaných analytech v daných retenčních časech.

5.5 Chromatografické podmínky

Vlastní měření se provádí za následujících podmínek chromatografického systému

- Kolona: Zorbax XDB C18, 3,5 μ m, 150 mm \times 2,1 mm
- Teplota kolony: 40 °C
- Teplota autosampleru: 10 °C
- Mobilní fáze: gradient mobilní fáze A (3.10) a mobilní fáze B (3.11) dle tabulky 4
- Celková doba analýzy: 24 min
- Průtok mobilní fáze: 0,3 ml/min
- Objem nástřiku: 5 μ l

Tabulka 4: Gradientový program LC pro analýzu

Čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
0	80	20
20	0	100
22	0	100
22,1	80	20
24	80	20

5.6 MS podmínky

Pro identifikaci jednotlivých analytů byl použit MRM (multiple reaction monitoring) mód, založený na sledování dvou produktových iontů pocházejících z jednoho prekurzorového iontu (European Union Commission Decision 2002/657/ECC). Nalezené optimální parametry MS detektoru, při kterých je intenzita daného dceřiného iontu maximální, jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Parametry MS detektoru

Parametr	Hodnota
Capillary voltage	3,5 kV
Cone voltage	15 V
Source temperature:	120 °C
Desolvation temperature	350 °C
Desolvation gas flow	700 l/h
Cone gas flow	100 l/h
CID gas	argon, 0,25 ml/min

5.7 Výběr analytů

Každý analyt byl nejprve proměřen a podle hmotnostního spektra, produktových iontů a retenčního času byla provedena prvotní identifikace a vytvořen seznam analytů (tabulka 6).

Tabulka 6: Seznam stanovovaných pesticidů

	Název		Název
1	2,4-D	15	Methomyl
2	Azoxystrobin	16	Myclobutanil
3	Carbaryl	17	Penconazol
4	Carbendazim	18	Pirimicarb
5	Diazinon	19	Pirimifos methyl
6	Dichlorvos	20	Prochloraz
7	Endosulfan sulfát	21	Propiconazol
8	Fenpropimorph	22	Spiroxamin
9	Chlorpyrifos	23	Tebuconazol
10	Imazalil	24	Thiabendazol
11	Imidacloprid	25	Thiophanate-methyl
12	Kresoxim methyl	26	Triadimefon
13	Malathion	27	Triadimenol
14	MCPA	28	Triazophos

Nastavení MRM parametrů jednotlivých přechodů je uvedeno v tabulce 7 společně s typem ionizačního módu a retenčními časy jednotlivých analytů.

Tabulka 7: MRM parametry, ionizační módy a retenční časy analytů

	Název	Mód	RT (min)	Prekurzorový iont (m/z)	Cone voltage (V)	Produktový iont 1 (m/z)	Kolizní energie 1 (eV)	Produktový iont 2 (m/z)	Kolizní energie 2 (eV)
1	2,4-D	ESI-	9,14	219,0	30	160,9	22	124,9	35
2	Azoxystrobin	ESI+	12,57	404,1	30	371,9	20	343,9	35
3	Carbaryl	ESI+	9,09	202,1	18	144,9	16	127,0	34
4	Carbendazim	ESI+	7,94	192,1	35	160,0	22	132,0	37
5	Diazinon	ESI+	15,97	305,1	45	169,1	40	96,6	42
6	Dichlorvos	ESI+	7,52	220,9	25	108,9	27	127,1	25
7	Endosulfan sulfát	ESI-	16,19	420,8	32	96,8	30	79,9	90
8	Fenpropimorph	ESI+	10,11	304,3	50	147,1	40	116,9	40
9	Chlorpyrifos	ESI+	18,58	349,9	25	198,0	35	96,9	45
10	Imazalil	ESI+	7,86	297,0	45	158,9	28	200,9	25
11	Imidacloprid	ESI+	3,89	256,1	28	175,0	25	208,9	18
12	Kresoxim methyl	ESI+	15,04	314,1	18	115,9	18	206,1	8
13	Malation	ESI+	13,77	331,0	18	127,0	18	99,0	28
14	MCPA	ESI-	9,35	199,0	35	140,8	37	124,9	21
15	Methomyl	ESI+	2,20	163,0	15	88,0	10	106,0	14
16	Myclobutanil	ESI+	12,42	289,1	40	125,1	35	70,1	25
17	Penconazol	ESI+	13,58	284,1	35	70,1	20	158,9	25
18	Pirimicarb	ESI+	5,49	239,1	35	72,1	26	181,9	22
19	Pirimifos methyl	ESI+	16,46	306,1	35	164,1	28	108,1	40
20	Prochloraz	ESI+	13,28	376,0	22	308,0	17	265,9	22
21	Propiconazol	ESI+	14,18	342,1	45	159,0	35	69,1	33
22	Spiroxamin	ESI+	9,93	298,3	35	144,2	25	211,2	30
23	Tebuconazol	ESI+	13,21	308,1	40	70,0	28	124,9	40
24	Thiabendazol	ESI+	2,06	202,0	40	131,1	40	174,9	32
25	Thiophanate-methyl	ESI+	7,96	343,0	30	151,0	25	192,0	20
26	Triadimefon	ESI+	12,77	294,0	30	197,2	23	225,1	16
27	Triadimenol	ESI+	11,33	296,1	20	70,1	14	227,2	12
28	Triazophos	ESI+	13,85	314,0	30	119,0	45	161,9	25
29	Tris fosfát	ISTD	14,52	430,9	22	320,8	15	98,9	30

6 Statistické údaje

Výtěžnost postupu a validační parametry byly ověřeny pomocí vzorku krmné směsi a premixu obohacených přídatkem směsného standardu pesticidů. Podle dokumentu SANCO/10232/2006 odpovídají vybrané analyty požadavkům, a to výtěžnosti v rozmezí 70 % až 110 % a opakovatelnosti < 15 % relat.

V tabulkách 8 a 9 jsou zaznamenány zkrácené statistické údaje jednotlivých pesticidních látek. Další parametry jsou součástí validačního protokolu.

Tabulka 8: Statistické údaje analytů – Opakovatelnost. KS- krmná směs, PX- premix, 6 stanovení, požadovaná opakovatelnost < 15 (% relat.)

Název	Matrice	Opakovatelnost (% relat.)
2,4-D	KS	6,41
	PX	10,00
Azoxystrobin	KS	2,36
	PX	7,14
Carbaryl	KS	3,20
	PX	9,47
Carbendazim	KS	4,83
	PX	10,49
Diazinon	KS	3,77
	PX	6,12
Dichlorvos	KS	6,77
	PX	9,46
Endosulfan sulfát	KS	6,63
	PX	8,46
Fenpropimorph	KS	3,89
	PX	8,06
Chlorpyrifos	KS	7,95
	PX	12,10
Imazalil	KS	0,98
	PX	5,49
Imidacloprid	KS	2,74
	PX	6,04
Kresoxim methyl	KS	10,68
	PX	11,01
Malathion	KS	11,53
	PX	9,60

Název	Matrice	Opakovatelnost (% relat.)
MCPA	KS	3,62
	PX	12,25
Methomyl	KS	3,46
	PX	6,20
Myclobutanil	KS	4,27
	PX	5,39
Penconazol	KS	2,97
	PX	5,22
Pirimicarb	KS	2,62
	PX	6,98
Pirimifos methyl	KS	2,26
	PX	6,60
Prochloraz	KS	2,73
	PX	5,46
Propiconazol	KS	4,28
	PX	4,95
Spiroxamin	KS	3,19
	PX	6,09
Tebuconazol	KS	3,60
	PX	7,06
Thiabendazol	KS	3,24
	PX	8,81
Thiophanate-methyl	KS	3,40
	PX	5,46
Triadimefon	KS	5,30
	PX	7,97
Triadimenol	KS	2,38
	PX	6,64
Triazophos	KS	9,12
	PX	6,99

Tabulka 9: Statistické údaje analytů – Správnost. KS- krmná směs, PX- premix, předloženo 0,5 mg/kg, požadovaná výtěžnost (70 – 110) %.

Název	Matrice	Průměrná výtěžnost (%)	Přesnost	Správnost
2,4-D	KS	89,38	0,02865	Potvrzena
	PX	90,87	0,04543	Potvrzena
Azoxystrobin	KS	86,69	0,01021	Potvrzena
	PX	90,24	0,03222	Potvrzena
Carbaryl	KS	102,18	0,01635	Potvrzena
	PX	93,74	0,0444	Potvrzena
Carbendazim	KS	91,38	0,02206	Potvrzena
	PX	99,53	0,05222	Potvrzena
Diazinon	KS	96,39	0,01819	Potvrzena
	PX	97,87	0,02997	Potvrzena
Dichlorvos	KS	86,42	0,02926	Potvrzena
	PX	87,05	0,04118	Potvrzena
Endosulfan sulfát	KS	94,09	0,03118	Potvrzena
	PX	93,95	0,03976	Potvrzena
Fenpropimorph	KS	90,33	0,01758	Potvrzena
	PX	96,70	0,03882	Potvrzena
Chlorpyrifos	KS	82,07	0,03261	Potvrzena
	PX	84,69	0,07819	Potvrzena
Imazalil	KS	91,34	0,0045	Potvrzena
	PX	95,56	0,02621	Potvrzena
Imidacloprid	KS	94,86	0,01301	Potvrzena
	PX	96,63	0,02918	Potvrzena
Kresoxim methyl	KS	93,17	0,04977	Potvrzena
	PX	86,66	0,04772	Potvrzena
Malathion	KS	131,05	0,07327	Nepotvrzena
	PX	88,13	0,04232	Potvrzena
MCPA	KS	106,05	0,0192	Potvrzena
	PX	76,05	0,0466	Potvrzena

Název	Matrice	Průměrná výtěžnost (%)	Přesnost	Správnost
Methomyl	KS	88,97	0,01538	Potvrzena
	PX	99,69	0,0309	Potvrzena
Myclobutanil	KS	102,16	0,0218	Potvrzena
	PX	100,47	0,02707	Potvrzena
Penconazol	KS	101,08	0,01501	Potvrzena
	PX	96,06	0,02505	Potvrzena
Pirimicarb	KS	98,55	0,01289	Potvrzena
	PX	100,93	0,03523	Potvrzena
Pirimifos methyl	KS	94,72	0,01068	Potvrzena
	PX	96,80	0,03196	Potvrzena
Prochloraz	KS	92,30	0,01259	Potvrzena
	PX	97,97	0,02673	Potvrzena
Propiconazol	KS	91,39	0,01956	Potvrzena
	PX	90,51	0,0224	Potvrzena
Spiroxamin	KS	91,51	0,01461	Potvrzena
	PX	97,76	0,02976	Potvrzena
Tebuconazol	KS	93,22	0,01679	Potvrzena
	PX	98,64	0,03484	Potvrzena
Thiabendazol	KS	86,35	0,01398	Potvrzena
	PX	28,90	0,01266	Nepotvrzena
Thiophanate-methyl	KS	99,05	0,01684	Potvrzena
	PX	72,60	0,01982	Potvrzena
Triadimefon	KS	101,30	0,02686	Potvrzena
	PX	100,33	0,03996	Potvrzena
Triadimenol	KS	97,45	0,01161	Potvrzena
	PX	101,04	0,03353	Potvrzena
Triazophos	KS	87,61	0,03995	Potvrzena
	PX	93,56	0,03268	Potvrzena

U thiabendazolu odpovídají hodnoty požadavkům při analýze krmných směsí, avšak u premixů je výtěžnost analytu pouze 28,9 %. Vzhledem k nízké hodnotě relativní opakovatelnosti (8,8 %) je možné metodu pro tento analyt použít, výsledky je však nutno korigovat na výtěžnost. Stejný postup lze aplikovat u stanovení malathionu u krmných směsích s výtěžností 131,1 %.

7 Porovnávací zkoušky

V roce 2007 se laboratoř zúčastnila mezinárodní porovnávací zkoušky C1/SRM2 pro stanovení reziduí pesticidních látek. Ze 40 stanovovaných látek zahrnutých v testu jich bylo v laboratoři testováno 22. Ty jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10: Seznam stanovovaných látek v C1/SRM2

	Název		Název
1	2,4-D	12	Methomyl
2	Azoxystrobin	13	Penconazol
3	Carbaryl	14	Pirimicarb
4	Carbendazim	15	Pirimifos methyl
5	Fenhexamid	16	Prochloraz
6	Fenpropimorph	17	Propiconazol
7	Imazalil	18	Spiroxamin
8	Kresoxim methyl	19	Thiabendazol
9	Malation	20	Thiophanate-methyl
10	MCPA	21	Triadimefon
11	Mecoprop	22	Triadimenol

Laboratoř identifikovala všechny analyty přítomné ve zkušebním vzorku bez falešně pozitivních nebo negativních hodnot. Takovýchto látek s deklarovanou hodnotou, stanovitelných pomocí kapalinové chromatografie, bylo ve vzorku celkem pět. Jejich podrobnější výsledky jsou shrnuty v tabulce 11.

Tabulka XI: Výsledky C1/SRM2

Název	Hodnota (mg/kg)	z-scóre
Azoxystrobin	0,189	- 0,9
Carbendazim	0,134	0,3
MCPA	0,05	0
Mecoprop	0,273	- 0,6
Propiconazol	0,38	0,3

Porovnávací zkoušky se zúčastnilo celkem 63 laboratoří z 25 zemí. Laboratoř dosáhla šestého nejlepšího váženého průměru z-scóre.

8 Závěr

Z původního seznamu bylo vybráno 28 látek, které splňují podmínky metody, a to jak z pohledu samotné analýzy, tak z pohledu statistických výsledků výtěžnosti a opakovatelnosti. Byly vytvořeny SOP a podklady potřebné k přihlášení zkoušky k akreditaci. V rámci ověření metody se laboratoř zúčastnila mezinárodní porovnávací zkoušky C1/SRM2 pro stanovení reziduí pesticidních látek a dosáhla výborného výsledku. Výsledky zavádění a ověřování metody jsou hodnotným krokem k dalším úspěšným stanovením reziduí pesticidních látek v této laboratoři.

9 Literatura

1. Anastassiades M.: Analysis of Acidic Pesticides in Wheat Flour Samples by LC-MS(/MS) using the QuEChERS Method (incl. optional alkaline hydrolysis to release covalently bound compounds). 2007
2. Anastassiades M.: QuEChERS - A Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Low-Fat Products. 2005.
3. CEN/TC 275/WG 4 N 0236: Foods of plants origin – Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS(/MS) following acetonitrile extraction / partitioning and cleanup by dispersive SPE – QuEChERS-method. 2006.
4. Document N° SANCO/10232/2006: Quality kontrol procedures for pesticide residues analysis. 2006.
5. Tieffová P., Kosubová P.: Využití přístroje GPC pro multireziduální analýzy, Bulletin Národní referenční laboratoře, č. 2/2007.

Bulletin Národní referenční laboratoře XII 2008/2

Ročník: XII, č. 2
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: 46
Tisk: ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, tel.: 543 548 111
e-mail: ukzuz@ukzuz.cz

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196