

1 Nové postupy pro stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků v potravinách

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) a jejich deriváty představují významnou skupinu environmentálních polutantů, které jsou uvolňovány do prostředí zejména v důsledku antropogenní, ale i neantropogenní činnosti. PAU jsou nacházeny ve všech biotických i abiotických složkách životního prostředí a to nejen v průmyslových oblastech, ale i v lokalitách velmi odlehlých od místa emisních zdrojů, což mimo jiné svědčí i o možnosti jejich transportu v atmosféře na velké vzdálenosti. Vzhledem ke karcinogennímu potenciálu některých PAU je jejich výskytu v životním prostředí a zejména jejich výskytu v potravinách a krmivech, věnována mimořádná pozornost (Haines and Hendrickson 2009).

K primární expozici člověka PAU dochází zejména potravinami (např. cereálie, oleje, mořské plody atd.), případně vzduchem a pitnou vodou. Ke kontaminaci potravin pak dochází zejména sorpcí PAU na plodiny z atmosféry, půdy a závlahové vody. Dalším zdrojem kontaminace potravin jsou technologické a kulinární postupy používané při jejich úpravě, jako je např. uzení, grilování, pražení a sušení (Guillen et al 2011, EFSA 2008).

PAU jsou sledovány v celé řadě potravinářských a environmentálních matric. Vzhledem k biologické aktivitě těchto látek je stanovení PAU v potravinách obvykle prováděno na velmi nízkých (stopových) koncentračních hladinách a vyžaduje používání složitých analytických postupů i značné zkušenosti a kvalifikaci analytika. Kompletní analytický postup zahrnuje zpravidla tyto kroky: vzorkování, extrakci, přečištění, separaci, identifikaci, kvantifikaci a interpretaci/prezentaci výsledků. Efektivnost celého procesu lze ovlivnit zejména v technikách extrakce, přečištění a separace. Je nutno zdůraznit, že jakákoli chyba je analytickým procesem přenášena dále a je přičítána k chybám ostatním. Vzhledem k nízkým koncentracím kontaminantů přítomným v komplexní matici bývá dosahováno relativně vysokých nejistot stanovení (Guillen et al 2011).

1.1 Extrakční techniky využívané pro stanovení PAU

V potravinách tvoří PAU většinou jen nepatrný podíl a jejich kvantitativní převedení do extrakčního činidla proto není vždy jednoduché a je provázeno ko-extrakcí řady dalších, interferujících sloučenin. Při výběru vhodné extrakční techniky je nutné vzít v úvahu několik faktorů jako např. rychlost a účinnost extrakce, investiční a provozní náklady spojené s danou technikou a v neposlední řadě také potenciální vliv použité metody, resp. extrakčního činidla, na životní prostředí. Použití účinné a relativně rychlé extrakční techniky dosahující vysoké výtěžnosti je jedním z hlavních předpokladů pro dobrou kvantifikaci analytů.

V posledních několika desetiletích bylo publikováno mnoho metod pro stanovení PAU v potravinách. Mezi často používané izolační techniky při stanovení PAU v potravinách a plodinách patří extrakce podle Soxhleta, která se používá zejména pro izolaci PAU z potravin s vysokým podílem lipidů (maso, ryby, sýr aj.) (Araki et al 2001, Fiedler et al 2002, Al-Omair and Helaleh 2004, Bordajandi et al 2004, Jánková et al 2005, Wenzl et al 2006, Zohair et al 2006, Jie et al 2007, Al-Rashdan et al 2010, Plaza-Bolaños et al 2010, Ashraf and Salam 2012, Essumang et al 2012,

Farhadian et al 2012), extrakce podpořená ultrazvukem (sonikace, USE – ultra sound extraction) (Nieva-Cano et al 2001, Lin and Zhu 2004, Rey-Salgueiro et al 2009, Plaza-Bolañosa et al 2010, Tadeo JL et al. 2010, Yua et al 2012,), extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku (PLE – pressurized liquid extraction) (Wang et al 1999, Kim et al 2003, Jira 2004, Martínez et al 2004, Jánková et al 2005, Houessou et al 2006, Veyrand et al 2007, Djinic et al 2008, Plaza-Bolañosa et al 2010), extrakce pomocí mikrovln (MAE – microwave assisted extraction) (Navarro et al 2006, Pena et al 2006, Purcaro et al 2009, Ramalhosa et al 2012) a superkritická fluidní extrakce (SFE – supercritical fluid extraction) (Moret et al 2004, Lage et al 2005). Použitím semi-automatizovaných extrakčních technik (PLE, SFE a MAE) bylo dosaženo výrazného snížení doby extrakce a objemu použitých rozpouštědel oproti běžně používané extrakci v Soxhletově aparatuře. Navíc může být účinnost PLE zvýšena přidáním sorbentu (silikagel, florisil nebo oxid hlinitý) přímo do extrakční cely, na kterém se během extrakce zadržují některé matriční ko-extraktory (např. lipidy) a tím dochází k přečištění primárního extraktu přímo při extrakci. Tímto způsobem lze dosáhnout větší selektivity extrakce a v důsledku toho i výrazné časové úspory (Veyrand et al 2007, Lund et al 2009, Plaza-Bolañosa et al 2010,).

V současné době se pro extrakci PAU z potravin nejrychleji rozšiřuje použití metody QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe). Jedná se o velice rychlou metodu, kterou je možné poměrně jednoduše a bez nároku na drahé laboratorní vybavení provést extrakci a přečištění v jednom kroku. Tato metoda byla původně vyvinuta pro stanovení pesticidů v maticích s vysokým obsahem vody a nízkým obsahem tuku (Anastassiades et al 2003). Principem metody je přestup analytů do organického rozpouštědla z vodného prostředí vzorku (pro zvýšení iontové síly a snížení rozpustnosti nepolárních analytů ve vodném prostředí je možné přidat bezvodý síran hořečnatý ($MgSO_4$ jako desikátor) a chlorid sodný ($NaCl$)). Organická část je následně odebrána pro další analýzu. Tato metoda má oproti tradičním technikám mnoho výhod, jako je například vysoká efektivita, nízká spotřeba rozpouštědel a eliminace používání chlorovaných rozpouštědel (např. chloroformu, dichlormethanu), které byly tradičně pro PAU využívány. Do současné doby byla metoda QuEChERS testována pro extrakci PAU z různých potravin a environmentálních materiálů buď ve své původní podobě nebo po částečné modifikaci (změna extrakčního rozpouštědla, množství a druhů použitých solí atd.) (Ramalhosa et al 2009, Shelly and Perman 2010, Forsberg et al 2011, Kalachova et al 2011, Angioni et al 2012, Drabova et al 2012, Gratz et al 2012, Johnson 2012, Kao et al 2012).

1.2 Odstranění interferujících sloučenin

Při analýze složitých matic, jakými potraviny jsou, je spolu s cílovými analyty často ko-izolována řada dalších komponent obsažených ve vyšetřovaném vzorku. Jejich míra a zastoupení jsou podmíněny jak charakterem použitého extrakčního rozpouštědla, tak použitou izolační technikou. V biotických vzorcích rostlinného původu se jedná zejména o různé přírodní pigmenty (karotenoidy, chlorofyly apod.), oleje, vosky či silice, u živočišných materiálů jsou to zejména tuky, steroly aj.. Účinné odstranění zmíněných látek, které mohou negativním způsobem ovlivnit identifikaci a kvantifikaci PAU, je významným předpokladem pro dosažení spolehlivých výsledků.

Pro odstranění interferujících sloučenin z primárních extraktů se využívá zejména techniky gelové permeační chromatografie (GPC) s gely na bázi kopolymerů styrenu a divinylbenzenu, především tzv.

řada BioBeads[®] s označením S-X3, S-X8 a dále gel XAD-2 a Envirosep ABC, provozované v kombinaci s různými mobilními fázemi (dichlormethan, dichlormethan-*n*-hexane, chloroform, cyclohexan-ethylacetát) a geometrií kolon (Ballesteros et al 2006, Navarro et al 2006, Jie et al 2007, Suchanova et al 2008, Drábová et al 2011) a dále adsorpční chromatografie (SPE), kde mezi nejvíce používané sorbenty patří silikagel, florisil oxid hlinitý, C₈ a C₁₈ používané jako stacionární fáze za využití elučnicích činidel (např. cyklohexan, *n*-hexan, ethylacetat) a různých směsí rozpouštědel (např. dichlormethan-*n*-hexane, *n*-hexane-toluene) jako mobilní fáze (Grova et al 2002, Moret and Conte 2002, Barranco et al 2003, Al-Omair et al 2004, Anastasio et al 2004, Bogusz et al., 2004; Guillén et al 2004, Lin et al 2004, Anyakora et al 2005, Garcia-Falcon et al 2005, Lutz et al 2006, Navarro et al 2006, Pensado et al 2006, Zohair et al 2006, Luo et al 2007, Rey-Salgueiro et al 2009, Ehrenhauser et al 2010, Gratz et al 2011, Belo et al 2012).

Další možnost představuje využití techniky extrakce na tuhou fázi (SPE) za využití molekulárně vtištěných polymerů (MIPs - Molecularly Imprinted Polymers) jako stacionární fáze (Krumpadam et al 2010). MIP je přečišťovací metoda založená na zachycení analytů na ukotveném polymerním nosiči. Následně jsou analyty zpětně desorbovány. Díky tomu, že polymery jsou vyráběny za pomoci vzorové molekuly cíleně pro jednotlivé analyty, je sorpce velmi selektivní. Teoreticky lze tuto metodu využít pro široké spektrum analytů, problémem však je příprava specifického polymeru (polymer kyseliny metakrylové, zesítněný dimethylakrylátem ethylenglykolu). Aplikace těchto syntetických polymerů umožňuje nejen pre-koncentraci a čištění vzorku, ale také selektivní extrakci cílových analytů (Ho et al 2010, Drabova et al 2012, Application Note 192).

Další v současné době velmi rozšířenou metodou pro přečištění extraktu je disperzní extrakce na tuhou fázi (d-SPE) (Cai et al 2012). Tato jednoduchá a rychlá metoda se používá hlavně pro přečištění po extrakci metodou QuEChERS. Pro přečištění jsou nejčastěji používány sorbenty primární- sekundární amin (PSA) a C₁₈ a jejich směsi.

1.3 Techniky používané pro separaci a stanovení PAU

Dříve se jako běžná instrumentální technika využívala vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s fluorescenčním detektorem (FLD) (Nieva-Cano et al 2001, Moret and Conte 2002, Weißhaar 2002, Barranco et al 2003, Camargo and Toledo 2003, Kishikawa et al 2003, Anastasio et al 2004, Barranco et al 2004, Bogusz et al 2004, Bordajandi et al 2004, Janska et al 2004, Lai et al 2004, Pandey et al 2004, Garcia-Falcon et al 2005, Gomes-Zuin et al 2005, Houessou et al 2005, Lage et al 2005, Pensado et al 2005, Ramalhosa et al 2005, Houessou et al 2006, Pena et al 2006, Luo et al 2007, Perugini et al 2007, Tfouni et al 2007, Vit a et al 2007, Suchanova et al 2008, Windal et al 2008, Danyi et al 2009, Purcaro et al 2009, Rey-Salgueiro et al 2009, Wolska et al 2009, Serpe et al 2010, German-Hernandez et al 2011, Janoszka 2011), UV detektorem (Chen et al 1996, Chiu et al 1997, Lin et al 2004, Houessou et al 2006, Dost and Ideli 2012) nebo, v ojedinělých případech, hmotnostně-spektrometrickým (MS) (Hollosi et al 2011). K separaci jednotlivých analytů jsou používány kolony s reverzní fází či polymerní fází dedikovanou speciálně pro separaci PAU o délce 15 – 25 cm a vnitřním průměru 3 – 4,6 mm, plněné částicemi o průměru 3 – 5 μm.

Vzhledem k úpravě seznamu sledovaných PAU (seznam zveřejněný EK v roce 2005?), kde jsou zahrnuty i analyty, které nefluoreskují (např. cyclopenta[*c,d*]pyrene), byla HPLC postupně nahrazována plynovou chromatografií (GC). Dříve se kapilární GC obvykle používala především ve spojení s plamenově ionizační detekcí (FID) (Cai et al 2009, Tadeo et al 2010, Wretling et al 2010). Vzhledem k malé selektivitě a nízké citlivosti FID, je v současné době téměř nezbytné využití hmotnostně–spektrometrického detektoru (MSD)(Chen et al 1997, Chiu et al 1997, Wang et al 1999, Mottier et al 2000, Araki et al 2001, Fiedler et al 2002, Grova et al 2002, Guillen et al 2002, Al-Omair et al 2004, Guillen et al 2004, Jira 2004, Martínez et al 2004, Anyakora et al 2005, Diletti et al 2005, Vichi et al. 2005, Arrebola et al 2006, Gomes Zuin et al 2006, Lutz et al 2006, Navarro 2006, Poster et al 2006, Zohair et al 2006, Aguinaga et al 2007, Jie et al 2007, Martin et al 2007, Purcaro et al 2007, Rodil 2007, Veyrand et al 2007, Vichi 2007, Aguinaga et al 2008, Djinic 2008, Ziegenhals K et al. 2008, Orecchio et al 2009, Wang et al 2010) a velmi často i v tandemovém uspořádání (GC-MS/MS) (Nieva-Cano et al 2005, Arrebola et al 2006, Ballestros et al 2006, Houessou et al 2006, Veyrand et al 2007, Ehrenhauser et al 2010), což umožňuje za vhodně zvolených podmínek (kolona, teplotní program) stanovení i „těžkých“ vysokomolekulárních PAU vyskytujících se na stopových koncentracích. V současné době je GC-MS široce užívanou chromatografickou technikou na kapilárních kolonách s vnitřními průměry v rozmezí 0,2 – 0,32 mm, s délkou mezi 25 až 60 m a tloušťkou filmu stacionární fáze (obvykle na bázi fenylmethylpolysiloxanu s 5 a 35 % obsahem fenylu nebo se 100 % obsahem dimethylpolysiloxanu) 0,1 – 0,25 μm . Její výhodou je výborná separace analytů a poměrně nízké detekční limity (Poster et al 2006).

Jednou z velice moderních metod používaných pro stanovení PAU je dvoudimenzionální plynová chromatografie (GC \times GC) (Purcaro et al 2007) ve spojení s hmotnostní detekcí s analyzátozem doby letu (TOF - Time-of-Flight) (Manzano et al 2012, Pena-Abaurrea et al 2012). Tato technika je založena na separaci látek postupně na dvou kolonách, lišících se svou selektivitou. Eluent z první, „klasické“ nepolární kolony je pomocí modulátoru kryogenicky zadržen, zaostřen a postupně dávkován na druhou kolonu, která je polární a dlouhá řádově jen 1,5 metru. Separace na druhé koloně je výrazně kratší (řádově několik sekund oproti separaci na první koloně, která trvá řádově několik desítek minut). Metoda vyžaduje detektor s vysokou frekvencí akvizice signálu a využití se zde nachází pro hmotnostní detektor typu TOF. Výhodou využití dvourozměrné chromatografie je zvýšení kapacity píků, zvýšení citlivosti, lepší oddělení ko-extraktů a v neposlední řadě možnost tvorby strukturovaných chromatogramů. Nevýhodou může být nedostatečná separace isomerů, například B[*b*]F, B[*j*]F a B[*k*]F, které se při nevhodné optimalizaci modulace mohou dostat na druhou kolonu společně a nemusí být v druhé dimenzi dostatečně rozděleny (Poster et al 2006, Kalachova et al 2012).

Možné variace v oblasti nejistoty pro stanovení PAU v komplexních biotických maticích

Každé měření je zatíženo určitou chybou, proto žádným měřením nezískáme správnou hodnotu měřené veličiny. Měřením se pouze přiblížíme k pravé hodnotě. Nejistota měření je definována jako parametr přidružený k výsledku měření, který charakterizuje rozptýlení hodnot, které mohou být důvodně přisuzovány k měřené veličině. Tímto parametrem může být např. směrodatná odchylka (nebo její násobek) nebo šířka intervalu spolehlivosti. Výše uvedená definice znamená tedy nutnost provést kvalifikovaný odhad intervalu hodnot okolo průměrného výsledku měření, o kterém se domníváme, že zahrnuje pravou hodnotu měřené veličiny s předem zvolenou pravděpodobností (obvykle 95%). Nalezení kritických kroků metody je jedním z důvodů provádění odhadů nejistoty analytického postupu. Dalším důvodem je možnost posouzení validity získaných výsledků a tím jejich vhodné interpretace, případně posouzení shody se specifikací, např. legislativními limity. Zvláště poslední důvod je důležitý při stanovení PAU pro rozhodnutí zda výsledek analýzy splňuje či nesplňuje maximální limity pro sledované analyty ([Ellison et al. 2000](#), [ISO 21748:2004](#), [Magnusson et al 2003](#))

Jednotlivé kroky při odhadování nejistoty měření lze shrnout do následujících bodů:

1. Specifikace měřené veličiny (tzn. co se bude měřit, vztahy mezi měřenou veličinou a vstupními parametry apod.),
2. Identifikace potenciálních zdrojů nejistot,
3. Kvantifikace jednotlivých složek nejistoty,
4. Výpočet kombinované nejistoty.

V praxi může pocházet nejistota výsledků z mnoha zdrojů, mezi které lze zahrnout např.:

- Vzorkování (náhodné rozdíly mezi vzorky, systematické odchylky při vzorkování),
- Podmínky skladování a manipulace se vzorkem (včetně pre-analytické úpravy),
- Vlivy prostředí (sekundární kontaminace či naopak ztráty analytů)
- Vlivy přístrojů,
- Čistota používaných chemikálií (vliv čistoty referenčních materiálů apod.),
- Podmínky měření (vliv teploty na objem odměrného skla apod.),
- Vlivy vzorků (složení matrice, stabilita vzorku, vliv přídavku standardního roztoku na výtěžnost),
- Vlivy výpočtů (volba kalibračního modelu, zanedbání platných číslic a zaokrouhlování),
- Korekce na slepý pokus (nejistota hodnoty slepého pokusu, přiměřenost korekce na slepý pokus),
- Vlivy operátora (systematicky nižší nebo vyšší odečítání měřidla nebo stupnice, možnost mírně odlišného interpretování metody),
- Náhodné vlivy.

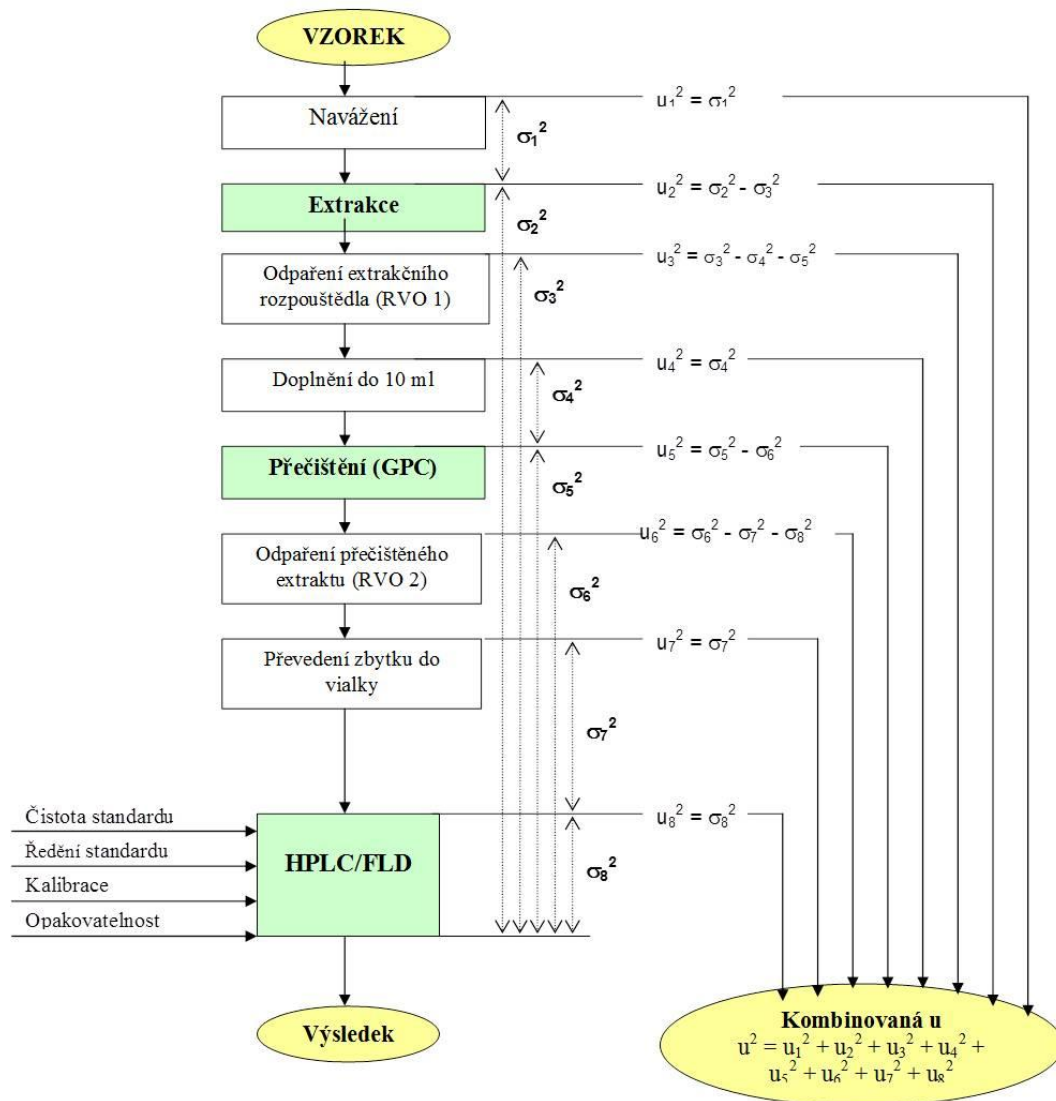
V případě, že jsou zdroje nejistoty jednotlivých částí analytického postupu identifikovány, je dalším krokem kvantitativní určení příspěvků nejistot pocházející z těchto zdrojů. Mezi základní principy, na základě kterých lze kvantifikovat tyto příspěvky, se řadí:

- Experimentální práce laboratoře provádějící analýzy
- Využití výsledků měření referenčních materiálů,
- Využití dat a výsledků z předchozí práce laboratoře nebo jiné instituce,
- Odhad vycházející z jiných výsledků nebo údajů (např. z informací od dodavatelů),
- Modelování na základě teoretických principů,
- Úsudek analytika založený na zkušenosti.

Kvantitativního vyjádření celkové nejistoty lze poté dosáhnout dvěma postupy:

- Přímým stanovením kombinovaných příspěvků nejistoty výsledků s využitím údajů o výkonnosti metody tzv. „top - down“ („shora - dolů“). Vzhledem k tomu, že pouze malý počet možných zdrojů nejistoty významně přispívá k celkové nejistotě, komponenty, zdroje nejistoty které jsou více než tři až čtyři krát menší než největší položka lze obvykle zanedbat. Na základě normy [ISO 21748:2004](#), pouze nejvýznamnější příspěvky nejistoty, tj. výtěžnost analytického postupu, opakovatelnost analýzy a čistota kalibračních standardů stačí použít k výpočtu celkové nejistoty postupem "top - down". Obecně platí, že "top - down" představuje jednodušší, i když ne tak rozsáhlý přístup k odhadu nejistoty ve srovnání s postupem „bottom - up“.
- Vyhodnocením nejistot pocházejících z každého jednotlivého zdroje a dále jejich sloučením tzv. „bottom - up“ („zdola - nahoru“) ([Ellison et al. 2000](#)) Tento přístup, který je poměrně komplikovaný a pracný, umožňuje rozlišovat, jaké zdroje nejistoty jsou nejdůležitější a které jsou nevýznamné a lze je zanedbat. Proces celkového výpočtu nejistoty je znázorněn na **Obrázku 1**, kde je analytický postup rozdělen do specifických bloků reprezentujících jednotlivé kroky.

V praxi je obvykle nutné a výhodné kombinování obou přístupů.



Obrázek 1 Obecné schéma výpočtu nejistoty postupem „bottom - up“ (symbol σ představuje rozptýlení hodnot jednotlivých kroků analytického postupu složeného ze systematické a náhodné chyby) (Janska et al 2006)

Při odhadu celkové nejistoty je vždy nezbytné uvážit každý zdroj nejistoty a vyhodnotit odděleně příspěvek z tohoto zdroje. Zdroje nejistoty lze v podstatě rozdělit na dva typy, náhodné efekty (zjistí se měřením rozptylu) a příspěvky jednotlivých systematických chyb (provede se intervalový odhad). Každý z dílčích příspěvků k nejistotě je nazýván složkou nejistoty. Je-li vyjádřena ve formě směrodatné odchylky, hovoříme o standardní nejistotě.

Odhad standardních nejistot se provede podle uvedených vztahů:

1. Veličina s rektangulárním rozdělením (šíře intervalu $2a$)

$$u(x_i) = a / \sqrt{3}$$
2. Veličina s normálním rozdělením (pro šíři intervalu spolehlivosti $L_{1,2} = 4\sigma$)

$$u(x_i) = s_{x_i}$$

kde s_{x_i} je směrodatná odchylka.

Celkovou nejistotu výsledku měření y lze pak vyjádřit jako kombinovanou standardní nejistotu, $u_c(y)$. Je rovna odhadu směrodatné odchylky, tedy hodnotě druhé odmocniny rozptylu (σ^2), získaného sloučením všech složek nejistoty (získaných jakýmkoliv způsobem) existujících ve všech fázích metody s použitím zákona o šíření nejistot.

Po odhadu jednotlivých složek nejistoty nebo jejich skupin a jejich vyjádření ve formě směrodatných odchylek lze tedy provést výpočet kombinované standardní nejistoty. Obecným vztahem mezi kombinovanou standardní nejistotou $u_c(y)$ hodnoty y a nejistotami navzájem nezávislých parametrů x_1, x_2, \dots, x_n na nichž závisí, je

$$u_c(y(x_1, x_2, \dots)) = \sqrt{\sum_{i=1, n} c_i^2 u(x_i)^2} = \sqrt{\sum_{i=1, n} u(y, x_i)^2}$$

Kde $y(x_1, x_2, \dots)$ je funkcí několika proměnných, x_1, x_2, \dots , c_i je citlivostní koeficient vypočtený jako $c_i = \partial y / \partial x_i$, parciální diferenciál y podle x_i a $u(y, x_i)$ je nejistota z pocházející z nejistoty x_i . Příspěvek každé proměnné $u(y, x_i)$ je pak čtvercem přidružené nejistoty vyjádřené ve formě směrodatné odchylky násobený čtvercem příslušného citlivostního koeficientu. Tyto citlivostní koeficienty vyjadřují, jak se mění hodnota y se změnou parametrů x_1, x_2 atd (EURACHEM-CITAC, Ellison et al. 2000, Janska et al 2006).

Pro většinu případů v analytické chemii lze použít rozšířenou nejistotu U . Rozšířená nejistota je interval o kterém lze předpokládat, že se v něm nalézá hodnota měřené veličiny na vyšší úrovni spolehlivosti. Hodnota rozšířené nejistoty U se získá vynásobením standardní kombinované nejistoty $u_c(y)$ koeficientem rozšíření k . Volba koeficientu k závisí na požadované hladině spolehlivosti, pro standardně používanou hladinu spolehlivosti $\alpha=0,05$ (95% pravděpodobnost) je koeficient $k = 2$ (Janska et al 2006).

3 Použitá literatura:

- Aguinaga N, Campillo N, Vinas P, Hernandez-Cordoba M: *Anal. Bioanal. Chem.*, 391 (2008) 753.
- Aguinaga N, Campillo N, Vinas P, Hernandez-Cordoba M: *Anal. Chim. Acta*, 596 (2007) 285.
- Aguinaga N, Campillo N, Vinas P, Hernandez-Cordoba M: *Anal. Bioanal. Chem.*, 391 (2008) 1419.
- Al-Omair A, Helaleh MIH: *Chromatographia*, 59 (2004) 715.
- Al-Rashdan A, Helaleh MIH, Nisar A, Ibtisam A, Al-Ballam Z: *Int J Anal Chem.*, 2010 (2010), ID 821216.
- Anastassiades M, Lehoutay S, Stajnbaher D, Schenck F: *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412.
- Anastasio A, Mercogliano R, Vollano L, Pepe T, Cortesi ML: *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 4452.
- Angioni A, Porcu L, Secci M, Addis P: *Food Anal. Methods*, 5 (2012) 1131.
- Anyakora C, Ogbeche A, Palmer P, Coker H: *J. Chromatogr. A*, 1073 (2005) 323.
- Application Note 192, Sigma Aldrich, (2009).
- Araki RY, Dodo GH, Reimer SH, Knight MM: *J. Chromatogr. A*, 923 (2001) 177.
- Arrebola FJ, Garrido Frenich A, Gonzalez Rodriguez MJ, Plaza Bolanos P, Martinez Vidal JL: *J. Mass Spectrom.*, 41 (2006) 822.
- Ashraf MW, Salam A: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 88 (2012) 543.
- Ballesteros E, Garcia Sanchez A, Ramos Martos N: *J. Chromatogr. A*, 1111 (2006) 89.
- Barranco A, Alonso-Salces RM, Bakkali A, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F, Sarobe M: *J. Chromatogr. A*, 998 (2003) 33.
- Barranco A, Alonso-Salces RM, Corta E, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F, Sarobe M, *Food Chem.*, 86 (2004) 465.
- Bogusz MJ, El Hajj SA, Ehaideb Z, Hassan H, Al-Tufail M: *J. Chromatogr. A*, 1026 (2004) 1.
- Bordajandi LR, Mez GG, Abad E, Rivera J, Fernández-Bastón MM, Blasco JN, González MJ: *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 992.
- Cai SS, Stevens J, Syage JA: *Journal of Chromatography A*, 1227 (2012) 138.
- Cai SS, Syage JA, Hanold, KA, Balogh MP: *Anal. Chem.* 81 (2009) 2123.
- Chen BH, Wang CY, Chiu CP: *J. Agric. Food Chem.*, 44 (1996) 2244.
- Chen BH, Lin YS: *J. Agric. Food Chem.*, 45 (1997) 1394.
- Chiu CP, Lin YS, Chen BH: *Chromatographia*, 44 (1997) 497.
- Danyi S, Brose F, Brasseur C, Schneider Y-J, Larondelle Y, Pussemier L, Robbens J, De Saeger S, Maghuin – Rogister G, Scippo M-L *Anal. Chim. Acta*, 633 (2009) 293.
- Diletti G, Scortichini G, Scarpone R, Gatti G, Torreti L, Migliorati G: *J. Chromatogr. A*, 1062 (2005) 247.
- Djinovic J, Popovic A, Jira W: *Eur. Food Res. Technol.*, 227 (2008) 1191.
- Djinovic J, Popovic A, Jira W: *Meat Sci.*, 80 (2008) 449.
- Dost K, Ideli C: *Food Chem.*, 133 (2012) 193.
- Drábová L, Pulkrabová J, Kalachová K, Hradecký J, Suchanová M, Tomaniová M, Kocourek V, Hajšlová J: *Czech J. Food Sci.*, 29, 5 (2011) 498.
- Drabova L, Pulkrabova J, Kalachova K, Tomaniova M, Kocourek V, Hajslova J: *Talanta*, 100 (2012) 207.
- EFSA 2008: *The EFSA Journal*, 724 (2008) 1.

- Ehrenhauser FS, Wornat MJ, Valsaraj KT, Rodriguez P: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 24 (2010) 1351.
- Ellison SLR, Rösslein M, Williams A, editors. 2000. *Quantifying uncertainty in analytical measurement. EURACHEM/CITAC Guide No. 4*, EURACHEM CR: Prague.
- Essumang DK, Doodoo DK, Adjei JK: *J. Food Comp. Anal.* 27 (2012) 128.
- EURACHEM-CITAC, *Guide Measurement Uncertainty Arising from Sampling: A Guide to Methods and Approaches*, EURACHEM, 1st edn, 2007
- Farhadian A, Jinap S, Faridah A, Zaidul ISM: *Food Control*, 28 (2012) 420.
- Fiedler H, Cheung CK, Wong MH: *Chemosphere*, 46 (2002) 1429.
- Forsberg ND, Wilson GR, Anderson KA: *J. Agric. Food Chem.*, 59 (2011) 8108.
- Franca R, Belo C, Mariana Nunes C, Vieira dos Santos E, Vasconcellos Augusti D, Pissinatti R: *Anal. Methods* (2012) doi:10.1039/C2AY25818H.
- Garcia-Falcon MS, Cancho-Grande B, Simal-Gandara J: *Food Chem.*, 90 (2005) 643.
- German-Hernandez M, Pinoa V, Anderson JL, Afonso AM: *Talanta*, 85 (2011) 1199–1206.
- Gomes-Zuin V, Montero L, Bauer C, Popp P: *J. Chromatogr. A*, 1091 (2005) 2.
- Gomes Zuin V, Schellin M, Montero L, Yariwake JH, Augusto F, Popp P: *J. Chromatogr. A*, 1114 (2006) 180.
- Gratz SR, Ciolino LA, Mohrhaus AS, Gamble BM, Gracie JM, Jackson DS, Roetting JP, McCauley HA, Heitkemper DT, Fricke FL, Krol WJ, Arsenault TL, White JC, Flottmeyer MM, Johnson YS: *J. AOAC Int.*, 94 (2011) 1601.
- Grova N, Feidt C, Pineau CCC, Laurent C, Lafargue PE, Hachimi A, Rychen G: *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 4640.
- Guillen MD, Errecalde MC: *J. Sci. Food Agric.*, 82 (2002) 945.
- Guillen MD, Sopelana P, Palencia G: *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 2123.
- Guillen MD, Sopelana P, Partearroyo M A: *Reviews on Environmental Health*, 12 (2011) 133.
- Haines PA, Hendrickson MD: *Polymer Science and Technology* (2009), ISBN: 978-1-60741-462-9.
- Ho WL, Lin TC, Liu YY, Chen JA: *J. Environ. Sci. Health A*, 45 (2010) 211.
- Hollosi L, Wenzl T: *J. Chromatogr., A*, 1218 (2011) 23.
- Houessou JK, Benac C, Delteil C, Camel VR: *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 871.
- Houessou JK, Delteil C, Camel V: *J. Agric. Food Chem.*, 54 (2006) 7413.
- ISO/TS 21748:2004a. *Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation*, ISI: Geneva.
- Janoszka B: *Food Chem.*, 126 (2011) 134.
- Janska M, Tomaniova M, Hajslova J, Kocourek V: *Anal. Chim. Acta*, 520 (2005) 93.
- Janska M, Tomaniova M, Hajslova J, Kocourek V: *Food Addit. Contam. A* (2006) 309.
- Jie F, Kai-Xiong Chin W: *J. Anal. Chem.*, 35 (2007) 1607.
- Jira W: *Eur. Food Res. Technol.*, 218 (2004) 208.
- Johnson YS: *J. Food Sci.*, 77 (2012) 131.
- Kalachova K, Pulkrabova J, Cajka T, Drabova L, Hajslova J: *Anal. Bioanal. Chem.*, 403 (2012) 2813.

- Kalachova K, Pulkrabova J, Drabova L, Cajka T, Kocourek V, Hajslova J: *Anal. Chim. Acta*, 707 (2011) 84.
- Kao TH, Chen S, Chen CJ, Huang CW, Chen BH: *J. Agric. Food Chem.*, 60 (2012) 1380.
- Kim JH, Moon J K, Li Q X, Cho J Y: *Analytica Chimica Acta*, 498 (2003) 55.
- Kishikawa N, Wada M, Kuroda N, Akiyama S, Nakashima K: *J. Chromatogr. B*, 789 (2003) 257.
- Krumpadam RJ, Khan MS, Wate SR: *Water Res.*, 44, 681 – 688, 2010.
- Lage Yusty M, Cortizo Davina J: *Food control*, 16 (2005) 59.
- Lai JP, Niessner R, Knopp D: *Anal. Chim. Acta*, 522 (2004) 137.
- Lerda D: Factsheet, 3rd edition. EC, JRC/IRMM, Geel, 2010. Staženo 25.10.2012 z http://irmm.jrc.ec.europa.eu/EURLs/EURL_PAHs/
- Lin D, Zhu L: *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 8268.
- Lund M, Duedahl – Olesen L, Christensen JH: *Talanta*, 79 (2009) 10.
- Luo D, Yu Q, Yin H, Feng Y: *Anal. Chim. Acta*, 588 (2007) 261.
- Lutz S, Feidt C, Monteau F, Rychen G, Le Bizec B, Jurjanz S: *J. Agric. Food Chem.*, 54 (2006) 263.
- Magnusson B, Näykki T, Hovind H, Krysell M. Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories. 2003.NT Technical Report 537, NT Project No. 1589-02. Espoo: Nordtest.
- Manzano C, Hoh E, Massey Simonich SL: *Environ. Sci. Technol.*, 46 (2012) 7677.
- Martin D, Ruiz J: *Talanta*, 71 (2007) 751.
- Martínez E, Gros M, Lacorte S, Barceló D: *J. Chromatogr. A*, 1047 (2004) 181.
- Moret S, Conte LS: *J. Sep. Sci.*, 25 (2002) 96.
- Moret S, Conte LS: *Anal. Chim. Acta*, 525 (2004) 265.
- Mottier P, Parisod V, Turesky RJ: *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 1160.
- Navarro P, Cortazar E, Bartolome L, Deusto M, Raposo JC, Zuloaga O, Arana G, Etxebarria N: *J. Chromatogr. A*, 1128 (2006) 10.
- Nieva-Cano MJ, Rubio-Barroso S, Santos-Delgado MJ: *Analyst*, 126 (2001) 1326.
- Orecchio S, Ciotti VP, Culotta L: *Food Chem. Toxicol.*, 47 (2009) 819.
- Pandey MK, Mishra KK, Khanna SK, Das M: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 81 (2004) 1131.
- Pena-Abaurrea M, Ye F, Blasco J, Ramos L: *Journal of Chromatography A*, 1256 (2012) 222.
- Pena T, Pensado I, Casais C, Mejuto C, Phan-Tan-Luu R, Cela R: *J. Chromatogr. A*, 1121 (2006) 163.
- Pensado L, Casais MC, Mejuto MC, Cela R: *J. Chromatogr. A*, 1077 (2005) 103.
- Perugini M, Visciano P, Manera M, Turno G, Lucisano A, Amorena M: *J. Agric. Food Chem.*, 55 (2007) 2049.
- Plaza-Bolañosa P, Garrido Frenicha A, Martinez Vidala JL: *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 6303.
- Poster DL, Schantz MM, Sander LC, Wise SA: *Anal. Bioanal Chem.* 386 (2006) 859.
- Purcaro G, Morrison P, Moret S, Conte LS, Marriott PJ: *J. Chromatogr. A*, 1161 (2007) 284.
- Purcaro G, Moret S, Conte LS: *J. Chromatogr. A*, 1176 (2007) 231.

- Purcaro G, Moret S, Conte LS: *Meat Sci.*, 81 (2009) 275.
- Ramalhosa MJ, Paíga P, Moraisa S, Delerue-Matos C, Prior Pinto Oliveira MB: *J. Sep. Sci.*, 32 (2009) 3529.
- Ramalhosa MJ, Paíga P, Moraisa S, Sousac AMM, Gonçalvesc MP, Delerue-Matosa C, Pinto P, Oliveira MB: *Food Chem.*, 135 (2012) 234.
- Rey-Salgueiro L, Martínez-Carballo E, García-Falcón MS, González-Barreiro C, Simal-Gándara J: *Food Chem.*, 115 (2009) 814.
- Rodil R, Schellin M, Popp P: *J. Chromatogr. A*, 1163 (2007) 288.
- Rojo Camargo MC, Toledo MCF: *Food Control*, 14 (2003) 49.
- Serpe FP, Esposito M, Gallo P, Serpe L: *Food Chem.*, 122 (2010) 920.
- Shelly D, Perman CA: *LC GC North America*, (2010) 49.
- Suchanová M, Hajšlová J, Tomaniová M, Kocourek V, Babička L: *J. Sci. Food Agric.*, 88 (2008) 1307.
- Tadeo JL, Sánchez-Brunete C, Albero B, García-Valcárcel AI: *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 2415.
- Tfouni SAV, Machado RMD, Camargo MCR, Vitorino SHP, Vicente E, Toledo MCF: *Food Chem.*, 101 (2007) 334.
- Tfouni SAV, Toledo MCF: *Food Control*, 18 (2007) 948.
- Veyrand B, Brosseaud A, Sarcher L, Varlet V, Monteau F, Marchand P, Andre F, Le Bizec B: *J. Chromatogr. A*, 1149 (2007) 333.
- Vichi S, Pizzale L, Conte LS, Buxaderas S, Lopez-Tamames E: *J. Chromatogr. A*, 1090 (2005) 146.
- Vichi S, Pizzale L, Lanfranco SC, Buxaderas S, López-Tamames E: *Food Control*, 18 (2007) 1204.
- Viñas P, Campillo N, Aguinaga N, Pezez-Canovas E, Hernandez-Cordoba M: *J. Chromatogr. A*, 1164 (2007) 10.
- Wang G, Lee AS, Lewis M, Kamath B, Archer RK: *J. Agric. Food Chem.*, 47 (1999) 1062.
- Wang J, Cui G: *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4732–4737.
- Weißhaar R: *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 104 (2002) 282.
- Wenzl T, Simon R, Anklam E, Kleiner J: *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 716–725.
- Windal I, Boxus L, Hanot V: *J. Chromatogr. A*, 1212 (2008) 16.
- Wolska L, Gdaniec-Pietryka M, Konieczka P, Namiesnik J: *Talanta*, 78 (2009) 730.
- Wretling S, Eriksson A, Eskhult GA, Larsson B: *J. Food Comp. Anal.*, 23 (2010) 264.
- Yu L, Cao Y, Zhang J, Cui Z, Sun H: *Food Addit. Contam.A*, 29 (2012) 1800.
- Ziegenhals K, Hübschmann HJ, Speer K, Jira W: *J. Sep. Sci.*, 31 (2008) 1779.
- Zohair A, Salim AB, Soyibo AA, Beck AJ: *Chemosphere*, 63 (2006) 541.