

# Metrologická a zkušební laboratoř VŠCHT



**Institute of Chemical Technology, Prague**  
Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic, tel./fax +420 220 443 185  
**Metrological and Testing Laboratory**  
*CMI associated laboratory, testing laboratory No. 1316.2*  
*accredited by the Czech Accreditation Institute, signatory of MRA ILAC*



Program rozvoje metrologie 2006

PRM VII/5/06

## Metodiky měřicích postupů pro legální účely

Prof. Ing. Miloslav Suchánek, CSc., odpovědný řešitel

Prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc.

Doc. Ing. Vladimír Kocourek, CSc.

Doc. Ing. Oto Mestek, CSc.

listopad 2006

## Obsah

Schválené zadání projektu .....	4
Úvodní text .....	9
Příloha I .....	11
Schéma měřicího postupu pro kovy	
Příloha II .....	43
Přehled legislativy	
Příloha III .....	58
Schéma měřicího postupu pro pesticidy	
Příloha IV .....	119
Schéma měřicího postupu pro polyaromatické uhlovodíky	
Příloha V .....	167
Návrhy postupů při interpretaci výsledků	
Přednáška presentovaná na 3. metrologickém kongresu, Tel Aviv, Israel	

PROGRAM ROZVOJE METROLOGIE 2006

Číslo úkolu *)	Název úkolu	Stručná charakteristika úkolu Výsledek řešení úkolu	Termíny řešení		Neinvestič. prostředky tis. Kč
			zahájení	ukončení	
VII/5/06	Metodiky měřicích postupů pro legální účely	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Vytvoření metrologicky správných schémat měření pro stanovení některých kovů v potravinách – začátek experimentálních prací, stanovení kovů v čistých kalibračních roztocích a CMC</li> <li>2. Vytvoření metrologicky správných schémat měření pro stanovení residuí pesticidů v potravinách s ohledem na současnou evropskou legislativu – začátek experimentálních prací v oblasti nepolárních a středně polárních pesticidů stanovitelných GC-MS</li> <li>3. Vytvoření metrologicky správných schémat měření pro stanovení některých karcinogenních látek v biotických matricích – začátek experimentálních prací, stanovení polyaromatických uhlovodíků v čistých roztocích a CMC</li> <li>4. Zpracování podkladů pro vytvoření závazné metodické příručky pro interpretaci výsledků při rozhodovacích procesech</li> </ol> <p>Výsledkem řešení projektu bude</p> <p>Správná schémata měření pro výše uvedené oblasti Vytvoření závazné metodické příručky pro interpretaci výsledků při rozhodovacích procesech</p>	01/06	11/06	400
Předkládá (adresa, razítko, podpis): Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Metrologická a zkušební laboratoř Technická 5, 166 28 Praha 6		Bank. spojení / č. účtu: 130197294/0300			
		IČO / DIČ: 60461373/CZ60461373		Č.j.:	
		Odpovědný řešitel: M. Suchánek		Došlo :	
		Podpis :		Za odbor metrologie:	
		Tel. / fax: 220443685		Poznámka:	
		Datum : 13.7.2006		Přílohy:	

\*) číslo úkolu přidělí ÚNMZ



## **1.1 Hlavní cíle úkolu:**

V současné evropské legislativě, která přechází do legislativy české, jsou dvě oblasti zvýšeného zájmu o správné měřicí postupy, které poskytují spolehlivé výsledky: analýza pitné vody (Water directive 2000/60/EC) a analýza kontaminantů v potravinách (96/23/EC, 2002/657/EC). Na základě výsledků měření (výsledek = hodnota měřené veličiny + nejistota) je možno činit závěry o shodě vlastností měření objektů s právními. Oblasti použití tohoto projektu lze zobecnit na jakoukoli oblast, ve které se výsledky měření interpretují podle legislativních požadavků. Je proto třeba vytvořit soubor schémat měření, které budou vykazovat nejlépe odhadnutou nejistotu měření a budou spoluvytvářet schéma návaznosti výsledků ve zmíněných oblastech měření.

Metrologická a zkušební laboratoř VŠCHT (dále MZL) je přidruženou laboratoří ČMI, je uvedena v databázi CIPM MRA a splňuje podmínky EUROMETu týkající se systému jakosti. Je rovněž jedinou laboratoří v ČR, která je schopna zastupovat ČMI v oblastech Metrologie v chemii i na mezinárodním fóru. MZL VŠCHT má vysokou vědeckou úroveň v oblasti Metrologie v chemii a disponuje vysoce kvalitními lidskými zdroji.

Hlavní cíle předkládaného úkolu, resp. Obsahová struktura projektu pro rok 2006, se dají shrnout do těchto bodů:

### Obsahová struktura projektu pro rok 2006

1. Vytvoření měřicích schémat a postupů pro stanovení pesticidů v biotických maticích, rozpočet nejistot
2. Vytvoření měřicích schémat a postupů pro stanovení některých karcinogenních látek v biotických maticích (polyaromatické uhlovodíky)
3. Vytvoření měřicích postupů pro stanovení některých kovů v biotických a biotických maticích (rtuť, měď, olovo, kadmium, arsen, selen)
4. Vytvoření závazné metodické příručky pro interpretaci výsledků při rozhodovacích procesech (garance ČMI)

Výsledkem projektu by byla větší věrohodnost přidružené laboratoře ČMI mezi českými laboratořemi a samozřejmě i větší váha ČMI v Metrologii v chemii.

Projekt předpokládá dlouhodobější řešení, v jehož rámci budou v roce 2006 řešeny tyto hlavní úkoly:

1. Vytvoření metrologicky správných měřicích schémat pro stanovení některých kovů v potravinách – začátek experimentálních prací, stanovení kovů v čistých kalibračních roztocích a CMC
2. Vytvoření metrologicky správných měřicích schémat pro stanovení residuí pesticidů v potravinách s ohledem na současnou evropskou legislativu (neustále se měnící) – začátek experimentálních prací v oblasti nepolárních a středně polárních pesticidů stanovitelných GC-MS
3. Vytvoření metrologicky správných měřicích schémat pro stanovení některých karcinogenních látek v biotických matricích – začátek experimentálních prací, stanovení polyaromatických uhlovodíků v čistých roztocích a CMC
4. Zpracování podkladů pro vytvoření závazné metodické příručky pro interpretaci výsledků při rozhodovacích procesech

## **1.2 Objektivně ověřitelné výsledky řešení úkolu:**

ad 1) Validační protokol, schéma měřicího postupu ICP-MS, schéma návaznosti pro čisté roztoky kovů (kalibrační roztoky), rozpočet nejistot - CMC

ad 2) Přehled právních předpisů, Rešerše stanovení residuí pesticidů a zhodnocení zkušeností s měřicími schémata v EU, Validační protokol, Správná měřicí schémata, schéma návaznosti, rozpočet nejistot

ad 3) Přehled právních předpisů, Rešerše stanovení PAH, Validační protokol pro čisté roztoky PAH, Správná měřicí schémata, schéma návaznosti, rozpočet nejistot – CMC

ad 4) Rešerše postupu pro interpretaci výsledků pro rozhodovací procesy

## **1.3 Způsob ověření: (uvést neopomenutelné účastníky):**

Oponentura dílčí a závěrečné zprávy za účasti pracovníků ÚNMZ a ČMI

## **1.4 Navrhovaní oponenti úkolu (minimálně 2, podléhají odsouhlasení zadavatelem úkolu):**

Ing. Petr Cuhra, CSc., Státní zemědělská a potravinářská inspekce  
Ing. Jan Tichý, ČMI

## **2.1 Dílčí cíle nezbytné k dosažení hlavních cílů úkolu (I. etapa řešení) :**

Přehled I právních předpisů pro oblast potravin

Rešerše postupu pro interpretaci výsledků pro rozhodovací procesy

## 2.2 Objektivně ověřitelné ukazatele dílčích cílů

zpráva, obsahující přehled legislativy, schémata návaznosti a rešerši pro interpretaci výsledků

## 2.3 Způsob ověření dílčích cílů

dílčí oponentura

## 3. Kalkulace úkolu (rozpis nákladů) pro rok 2006:

Materiál (rozpouštědla, CRM, argon, plyny)	80 000
Cestovné	40 000
Mzdové prostředky	96 360
Náklady na oponenturu	2 000
Režie VŠCHT	84 048
Soc. a zdr. pojištění	33 726
DPH (19%)	63 866
<b>Celkem</b>	<b>400 000 Kč</b>

## 4. Podíl státu na financování úkolu (v %): 100

## 5. Praktické využití výsledků řešení:

Ve všech měřeních a rozhodovacích procesech pro legální účely

## 6. Spoluřešitelé úkolu (uvést rozsah spolupráce-věcný, finanční):

Pracovníci Metrologické a zkušební laboratoře VŠCHT

## 7. Nároky na zahraniční cesty (stát, organizace, délka pobytu, finanční nároky):

Metrologický kongres. Israel. CITAC, 7 dní, 40.000 Kč

**8. Prohlašujeme, že naše organizace současně nenárokovala, resp. nemá přislíbeny finanční prostředky na řešení úkolu ze státního rozpočtu prostřednictvím jiného orgánu státní správy, popř. nevyužila jiné, duplicitní cesty k financování navrhovaného úkolu.**

**Název, adresa, razítko a podpis statutárního zástupce:**

VŠCHT Praha. Technická 5, 166 28 Praha 6; prorektorka Prof. Ing. Jitka Moravcová, CSc.



## Úvod k řešení projektu

Řešení úkolu v Programu rozvoje metrologie 2006 je tvořen přílohami, jejichž obsahem je řešení dílčích úkolů v zadání projektu.

Příloha I obsahuje návrh měřicích schémat pro některé kovy. Cílem dílčího úkolu bylo navrhnout a experimentálně ověřit možnosti stanovení CMC pro vybrané kovy tak, aby , přidružená laboratoř VŠCHT mohla ověřit kalibrační standardní roztoky českých producentů (např. fy Analytika) a navrhnout tyto CMC do databáze CIPM MRA.

Příloha II obsahuje přehled legislativy v oblasti stanovení pesticidů a polyaromatických uhlovodíků v některých biotických matricích, např. potravinách a krmivech.

Příloha III obsahuje jednak přehled nejdůležitějších možností stanovení pesticidů a dále pak aplikaci stanovení v potravinách, konkrétně v jablkách. Tato část překračuje rámec zadání a může být použita jako dobrá startovní pozice při případném pokračování tohoto úkolu v příštím roce.

Příloha IV obsahuje pojednání o možnostech stanovení PAU v čistých roztocích s aplikací na potraviny a biotické matrice.

V příloze V je uvedena prezentace přehledu možností rozhodování pro legální účely. Tato část může být chápána i jako publikační výstup projektu.

V dalších částech je uvedena cestovní zpráva z cesty na 3. metrologický kongres v Tel Avivu, kde byly prezentovány odpovědným řešitelem dvě přednášky, z nichž jedna je uvedena v příloze IV. V poslední části zprávy tohoto projektu je uvedeno vyúčtování pomocí oficiálního formuláře VŠCHT.

**Příloha I**  
**Schéma měřicího postupu pro kovy**

1 Úvod.....	12
2 Princip metody ICP-MS.....	12
3 Příprava kalibračních roztoků a zjištění návaznosti.....	12
3.1 Postup využívající navázání na výsledky metrologické autority.....	14
3.2 Postup využívající navázání na výsledky primární metody.....	15
4 Obecné zásady měření metodou ICP-MS.....	17
4.1 Přesnost měření signálu.....	17
4.2 Kalibrace.....	18
4.3 Metody korekce spektrálních interferencí.....	19
4.4 metody korekce nespektrálních interferencí.....	19
5 Metody analýzy s externí kalibrací.....	21
5.1 Příklad standardního operačního postupu.....	21
5.2 Příklad validačního protokolu.....	26
5.3 Odhad nejistot.....	30
5.4 Nejlepší kalibrační schopnost.....	34
6 Metoda izotopového zředování.....	34
6.1 Princip a výpočty.....	34
6.2 Příprava izotopově obohacených roztoků a zajištění návaznosti.....	35
6.3 Hlavní zásady měření izotopově zředovací metodou.....	37
6.4 Odhad nejistot.....	40
6.5 Nejlepší kalibrační schopnost.....	42

# STANOVENÍ PRVKŮ METODOU HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE S INDUKČNĚ VÁZANÝM PLAZMATEM

## 1 Úvod

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) patří v současné době k nejdynamičtěji se rozvíjejícím technikám v prvkové analýze jak biologických, tak i jiných materiálů. Velice široké pole působnosti tato metoda našla také při analýze vod nebo široké palety geologických, metalurgických a jiných vzorků. K přednostem ICP-MS patří zejména velice nízké meze detekce často na koncentrační úrovni jednotek ng/l a široký dynamický rozsah přesahující až osm řádů koncentrací. Metoda je také velice universální: kromě inertních plynů a několika dalších nekovů lze stanovovat prakticky všechny prvky periodické soustavy. Rozbor vody metodou ICP-MS je obsahem návrhů ISO norem ISO/CD 17294 (Water quality – Determination of 61 elements by inductively coupled plasma mass spectrometry) a ISO/CD 17294-1 (Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry – Part 1: general guideline).

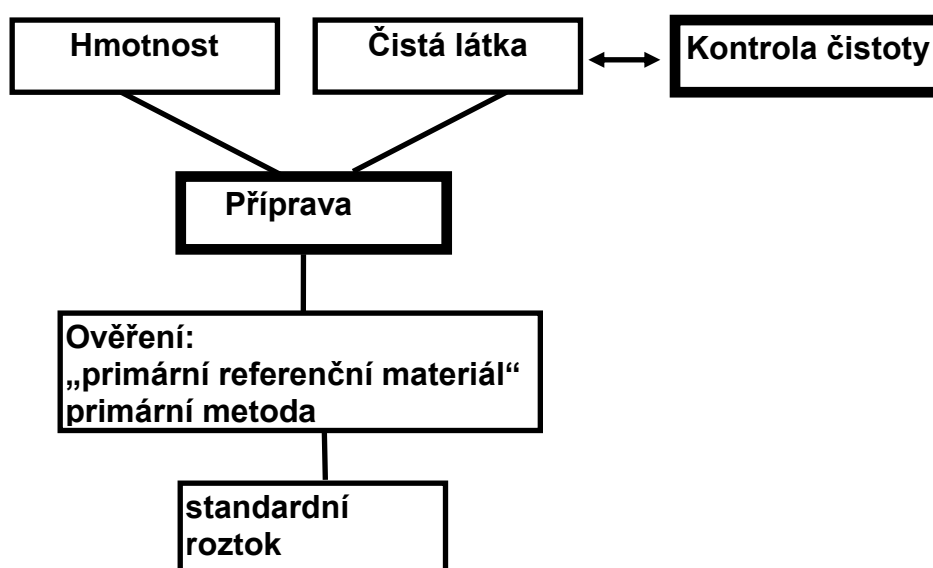
## 2 Princip metody ICP-MS

V nejběžnějším uspořádání slouží metoda k analýze kapalných vzorků. To znamená, že pevné vzorky je před vlastní analýzou nutné převést do roztoku. Kapalným vzorkem je ve zmlžovači převeden na aerosol, který je vnášen do plazmového výboje udržovaného vysokofrekvenčním elektromagnetickým polem v proudu argonu. V plazmatu dojde k atomizaci vzorku a ionizaci atomů a vzniklé převážně jednonásobně kladně nabitě ionty jsou z plazmatu vakuem extrahovány do vlastního hmotnostního spektrometru. V něm jsou nejprve separovány obvykle v kvadrupólovém analyzátoru dělicím ionty podle jejich poměru hmotnosti a náboje a poté je jejich množství detekováno vhodným detektorem. Výsledkem je signál měřený v jednotkách cps (count per second), který je úměrný koncentraci analytu v původním vzorku. Kvantitativní vyhodnocení analýz se provádí často metodou externí kalibrace, kdy je signál neznámého vzorku porovnán se sadou (běžně však pouze s jedním) standardů. Pro metodu ICP-MS je navíc charakteristické používání metody vnitřního standardu. Do vzorku i do kalibračních roztoků je přidáno stejné množství prvku, který není ve vzorku původně přítomen a který se svým chováním podobá co nejvíce analytu (běžně se používají např. Bi, Eu, In, Sc, Y) a místo signálu samotného analytu se měří poměr signálů analytu a vnitřního standardu. Touto metodou lze do značné míry eliminovat řadu nespektrálních interferencí. Důležitou kalibrační technikou je i izotopové zředování, které bývá považováno za primární metodu.

## 3 Příprava kalibračních roztoků a zajištění návaznosti

Kvantitativní analýza metodou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem provedená technikou externí kalibrace patří z metrologického hlediska mezi relativní měřicí techniky, tedy metody založené na porovnání neznámého vzorku se sadou kalibračních vzorků o známém obsahu. Předpokládá se, že rozdíly ve složení, formě apod. mezi kalibrační sadou a jednotlivými vzorky mají zanedbatelný vliv na výsledek měření (o tom, jak tyto podmínky zajistit viz níže). Rutinní kalibrační procedura využívá v tomto případě roztoky připravené ředěním

jednoprvkových základních roztoků (běžně nazývané standardní roztoky). Tyto roztoky si laboratoře mohou připravovat sami rozpouštěním čistých chemikálií, běžně jsou však komerčně dostupné roztoky řady výrobců a to v koncentracích obvykle 1 000 mg/l a 10 000 mg/l. Některé z nich mohou mít v závislosti na postupu přípravy i statut certifikovaného referenčního materiálu. Protože neexistují žádné národní etalony chemických sloučenin a prvků, standardní roztoky by měly být navázány na jednotku mol pomocí primárních metod měření nebo by měly být navázány na roztoky připravované obecně uznávanou metrologickou autoritou. Pro přípravu standardních roztoků tedy nestačí pouze navážít a rozpustit velice čistou chemikálii, ale koncentrace toho roztoku musí být bezpodmínečně ověřena a musí být stanovena také nejistota této koncentrace. Obecný postup přípravy je zobrazen v obr. 1



Obr. 1 Obecné schema přípravy standardních roztoků

Z rešerše v databázi COMAR (viz tabulka) však vyplývá, že řada výrobců těchto roztoků více méně provádí pouze přípravu roztoků z velmi čistých chemikálií a krok ověření vynechává. Sporné je vydání certifikátu na opakovanou přípravu roztoků, které odporuje duchu ISO Guidu 35.

Výrobce	Příprava
NIST, USA	gravimetrická příprava z čistých kovů, vzájemné porovnání více šarží pomocí ICP-OES
Merck, SRN	navázání na roztoky NIST
Analytika, ČR	příprava z „primárních látek“ (?)
CERI, Japonsko	neuveďeno
SMU, Slovensko	příprava z čistých kovů
GBW, Čína	neuveďeno
CENAM, Mexiko	neuveďeno
GUP, Rusko	neuveďeno
GUM, Polsko	neuveďeno

### 3.1 Postup využívající navázání na výsledky metrologické autority

Mezi široce uznávané metrologické autority, které by mohly sloužit k navázání dalších standardních roztoků, patří National Institute of Standards and Technology (NIST) ve Spojených státech. Na tyto roztoky jsou navázány např. standardní roztoky firmy Merck. Jedná se o roztoky s udávaným hmotnostním zlomkem na typické hladině  $10\,000 \pm 17$  mg/kg. Výhoda jejich aplikace spočívá zejména v tom, že obsah prvku je udáván ve formě hmotnostního zlomku, což umožňuje provádět další operace vážkově. Nabízeny jsou tyto roztoky:

<u>3101a</u>	Aluminum Standard Solution
<u>3102a</u>	Antimony Standard Solution
<u>3103a</u>	Arsenic Standard Solution
<u>3104a</u>	Barium Standard Solution
<u>3106</u>	Bismuth Standard Solution
<u>3107</u>	Boron Standard Solution
<u>3108</u>	Cadmium Standard Solution
<u>3109a</u>	Calcium Standard Solution
<u>3110</u>	Cerium Standard Solution
<u>3111a</u>	Cesium Standard Solution
<u>3112a</u>	Chromium Standard Solution
<u>3113</u>	Cobalt Standard Solution
<u>3114</u>	Copper Standard Solution
<u>3115a</u>	Dysprosium Standard Solution
<u>3116a</u>	Erbium Standard Solution
<u>3117a</u>	Europium Standard Solution
<u>3118a</u>	Gadolinium Standard Solution
<u>3119a</u>	Gallium Standard Solution
<u>3120a</u>	Germanium Standard Solution
<u>3121</u>	Gold Standard Solution
<u>3122</u>	Hafnium Standard Solution
<u>3123a</u>	Holmium Standard Solution
<u>3124a</u>	Indium Standard Solution
<u>3126a</u>	Iron Standard Solution
<u>3127a</u>	Lanthanum Standard Solution
<u>3128</u>	Lead Standard Solution
<u>3129a</u>	Lithium Standard Solution
<u>3130a</u>	Lutetium Standard Solution
<u>3131a</u>	Magnesium Standard Solution
<u>3132</u>	Manganese Standard Solution
<u>3133</u>	Mercury Standard Solution
<u>3134</u>	Molybdenum Standard Solution
<u>3135a</u>	Neodymium Standard Solution
<u>3136</u>	Nickel Standard Solution
<u>3137</u>	Niobium Standard Solution
<u>3138</u>	Palladium Standard Solution
<u>3140</u>	Platinum Standard Solution
<u>3141a</u>	Potassium Standard Solution
<u>3142a</u>	Praseodymium Standard Solution
<u>3143</u>	Rhenium Standard Solution
<u>3144</u>	Rhodium Standard Solution
<u>3145a</u>	Rubidium Standard Solution

<u>3147a</u>	Samarium Standard Solution
<u>3148a</u>	Scandium Standard Solution
<u>3149</u>	Selenium Standard Solution
<u>3150</u>	Silicon Standard Solution
<u>3151</u>	Silver Standard Solution
<u>3152a</u>	Sodium Standard Solution
<u>3153a</u>	Strontium Standard Solution
<u>3154</u>	Sulfur Standard Solution
<u>3155</u>	Tantalum Standard Solution
<u>3156</u>	Tellurium Standard Solution
<u>3157a</u>	Terbium Standard Solution
<u>3158</u>	Thallium Standard Solution
<u>3159</u>	Thorium Standard Solution
<u>3160a</u>	Thulium Standard Solution
<u>3161a</u>	Tin Standard Solution
<u>3162a</u>	Titanium Standard Solution
<u>3163</u>	Tungsten Standard Solution
<u>3164</u>	Uranium Standard Solution
<u>3165</u>	Vanadium Standard Solution
<u>3166a</u>	Ytterbium Standard Solution
<u>3167a</u>	Yttrium Standard Solution
<u>3168a</u>	Zinc Standard Solution

K porovnání testovaného roztoku a roztoku NIST je vhodné použít některou nepříliš citlivou instrumentální metodu, vhodná je např. optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES). I tak se ale nelze vyhnout ředění obou roztoků.

### 3.2 Postup využívající navázání na výsledky primární metody

Vhodnou primární metodou pro ověřování koncentrace standardních roztoků kovů je gravimetrická analýza. Přehled vhodných metod je podán např. v publikaci Jílek A., Kořan J.: Vážková analýza a elektroanalýza, díl II, TVV, Praha 1951 a v řadě dalších. Výslednou koncentraci daného prvku  $\rho(\text{Me})$  [mg/l] získanou gravimetrickým stanovením lze vypočítat podle vztahu:

$$\rho(\text{Me}) = f \cdot m \cdot \frac{1000}{V} + \Delta\rho(\text{Me}) \quad (1)$$

kde  $f$  je gravimetrický faktor,  $V$  je pipetovaný objem roztoku [ml] (pozor: pro dosažení vyšší správnosti výsledků je nutné každou pipetu před použitím zkalibrovat),  $m$  je hmotnost sraženiny a  $\Delta\rho(\text{Me})$  je korekce na zbytkové množství kovu rozpuštěné ve filtrátu a promývací vodě. Ta se určí vhodnou metodou, např. atomovou absorpční spektrometrií). Kombinovaná nejistota jednotlivých výsledků koncentrací se vypočte podle vztahu:

$$u(\rho(\text{Me})) = \sqrt{\rho^2(\text{Me}) \cdot \left( \frac{u(f)^2}{f^2} + \frac{u(m)^2}{m^2} + \frac{u(V)^2}{V_p^2} \right) + u(\Delta\rho(\text{Me}))^2} \quad (2)$$

Nejistota gravimetrického faktoru se určí z nejistot molárních hmotností, odhad nejistot vážení a odměřování objemů je zřejmý, relativní nejistotu korekce  $\Delta\rho(\text{Me})$  lze odhadnout ze zkušeností s měřením metodou AAS jako přibližně 2 %. I hrubý odhad nezatíží konečnou kombinovanou nejistotu velkou chybou, protože korekce

představuje méně než 1 % z celkové koncentrace kovu. V laboratořích VŠCHT byly rozpouštěním velmi čistých kovů připraveny standardní roztoky některých kovů, jejich přehled je uveden v následující tabulce:

<b>Kov</b>	<b>Hodnota vypočtená z navážky kovu</b>	<b>Srážedlo</b>	<b>Nalezená hodnota</b>
Cd	1 011 mg/l	chinaldinan sodný	1 012 ± 1 mg/l
Cu	1 029 mg/l	salicylaldoxim	1 030 ± 1 mg/l
Ni	1 002 mg/l	dimethyldioxim	1 002 ± 1 mg/l
Pb	1 010 mg/l	8-hydroxychinolin	1 008 ± 2 mg/l
Tl	1 017 mg/l	chroman draselný	1 015 ± 1 mg/l
Zn	1 010 mg/l	chinaldinan sodný	1 008 ± 1 mg/l



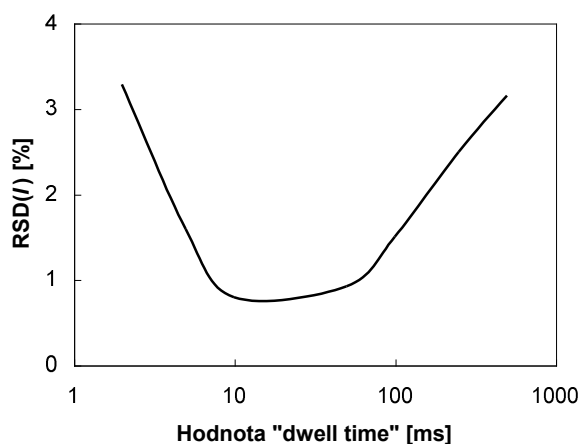
## 4 Obecné zásady měření metodou ICP-MS

### 4.1 Přesnost měření signálu

Metoda ICP-MS je charakteristická vysokým dynamickým rozsahem. Tzv. efektivní koncentrační rozsah, tj. poměr nejvyšší a nejnižší měřitelné koncentrace analytu, případně limitu detekce metody (LDM), bývá v rozmezí od 2 000 do 10 000. Pro odhad směrodatné odchylky přesnosti pro různé koncentrace analytu platí následující pravidla (viz ISO/CD 17294-1). Pro koncentrace vyšší než padesátinásobek LDM je relativní směrodatná odchylka přesnosti již konstantní, stačí proto určit její hodnotu na jedné koncentrační úrovni. Pro nižší koncentrace platí tento vztah:

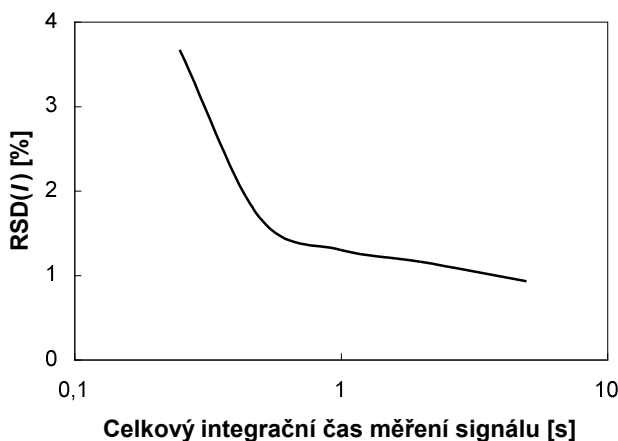
$$s_r(y \leq 50 \cdot LDM) = \sqrt{\left(\frac{LDM}{3 \cdot y}\right)^2 + s_r(y > 50 \cdot LDM)^2} \quad (3)$$

Jednou z důležitých složek přesnosti je opakovatelnost měření intenzity signálu. Tu lze do určité míry ovlivnit volbou časového průběhu integrace signálu. Hodnotu doby měření na jedné hmotnosti během jednoho integračního kroku („dwell time“) je doporučováno volit nižší než 100 ms a doplnit ji zvýšeným počtem jednotlivých integračních kroků („sweep“). Vysoká frekvence vzorkování signálu omezuje značně krátkodobé fluktuace způsobené především zmlžovačem, měření analytu a vnitřního standardu se stává více simultánním. Při velmi krátkých hodnotách délky integračního kroku se však opakovatelnost opět zhoršuje. Obrázek 2 ukazuje příklad závislosti relativní směrodatné odchylky (RSD) opakovatelnosti měření signálu (roztok Cu 200 ng/ml, vnitřní standard In o koncentraci 100 ng/ml) na délce integračního kroku. Celkový integrační čas byl ve všech bodech shodný a měl hodnotu 5 s.



Obr. 2: Příklad závislosti relativní směrodatné odchylky opakovatelnosti měření signálu metodou ICP-MS na délce jednoho integračního kroku.

Celková doba integrace signálu pro jeden izotop postačuje okolo 1 s, pouze pro prvky s nižší citlivostí nebo detekčním limitem (např. As, Se, Cd a Hg) může být tato doba poněkud vyšší. Integrační doba delší než 5 s již nevede k podstatnému zlepšení přesnosti, viz obrázek 3 (analyzován stejný roztok jako v předešlém případě). Odstup signálu od šumu je také ovlivněn způsobem měření signálu, k nejvyššímu odstupu signálu od šumu vede měření na vrcholu hmotnostního píku („peak hopping, peak jumping“).



Obr. 3: Příklad závislosti relativní směrodatné odchylky opakovatelnosti měření signálu metodou ICP-MS na celkové délce integrace signálu

#### 4.2 Kalibrace

Pro metodu ICP-MS jsou charakteristická vysoká linearita signálu, velice nízké signály pozadí a závislost přesnosti naměřeného signálu na jeho velikosti. Z těchto důvodů je výše uvedenými normami doporučováno a v praxi také běžně aplikováno použití jednobodové kalibrace. Měří se proto nejprve roztok s nulovou koncentrací analytu, jehož naměřený signál je odečítán ode všech následujících měření, a pak jeden kalibrační roztok sloužící pro výpočet hodnoty směrnice  $k$  kalibrační přímky procházející počátkem:

$$k = \frac{A_{An}}{\rho_{IS}} \quad (4)$$

Index An se vztahuje k analytu a index IS se vztahuje k vnitřnímu standardu. Veličina  $I$  představuje změřený poměr intenzit signálů analytu a vnitřního standardu. Protože koncentrace vnitřního standardu v kalibračních roztocích a vzorcích je shodná, v praxi se pro vyhodnocení koncentrace neznámých vzorků vztah (2) formálně zjednodušuje na:

$$k' = \rho_{An} / I \quad (4')$$

Nejistota koncentrace vnitřního standardu, která v rovnici (4') není explicitně zahrnuta, musí být do odhadu celkové nejistoty kalibrace také zahrnuta. Proto je při jejím odhadu lépe vycházet ze vztahu (4).

Přestože z teoretických principů metody ICP-MS lze linearitu vztahu signálu a koncentrace měřeného vzorku předpokládat, je přesto vždy nutné ji během procesu validace metody ověřit alespoň v rozsahu požadovaném standardním operačním postupem. Důvodem nelinearity, která se může vyskytnout hlavně při měření vzorků s vyšší koncentrací analytu, může být špatně nastavená hodnota korekce mrtvého času detektoru („dead time correction“) nebo chybné vzájemné navázání obou režimů detektoru iontů – pulsního a analogového („dual detector calibration“). Z těchto důvodů norma ISO/CD 17294-1 doporučuje před měření každé dávky vzorků zařadit kontrolní roztok o zhruba poloviční koncentraci než kalibrační roztok. Tento roztok slouží právě ke kontrole linearit kalibrace.

### 4.3 Metody korekce spektrálních interferencí

Spektrální interference v ICP-MS mají svůj původ v nedostatečné rozlišovací schopnosti kvadrupólového analyzátoru. Jedná se jednak o izobarický překryv (např. při měření signálu izotopu  $^{68}\text{Zn}$  vadí izotop  $^{68}\text{Ni}$ ), vznik různých oxidových a polyatomických iontů v plazmatu (např. částice  $^{33}\text{S}^{16}\text{O}_2$  ruší stanovení  $^{65}\text{Cu}$ ) či o vznik dvojnásobně nabitých iontů (např. dvojnásobně nabitý ion  $^{136}\text{Ba}$  se chová jako jednonásobně nabitý ion  $^{68}\text{Zn}$ ).

Ideálním řešením je interferenční vlivy odstranit buď pomocí separace interferentu a analytu nebo volbou metody, která interference nevykazuje. Moderní spektrometry mají zabudované zařízení (reakční cela apod.), ve kterém za řízených podmínek dochází reakcí s pomocným plynem k rozbití rušícího polyatomického iontu za vzniku jiného.

V řadě případů je možné interference matematicky odkorigovat pomocí on-line nebo off-line korekce. Při těchto postupech (podrobnosti buď ve výše citovaných normách nebo základních učebnicích ICP-MS) je měřen signál interferentu na jiné linii, vynásoben vhodným konverzním faktorem (poměrem zastoupení jednotlivých izotopů nebo výtěžností vniku oxidových, polyatomických, nebo dvojnásobně nabitých iontů) a odečten od hrubého signálu analytu:

$$I_{An} = I_{An+Int} - F \cdot I'_{Int} \quad (5)$$

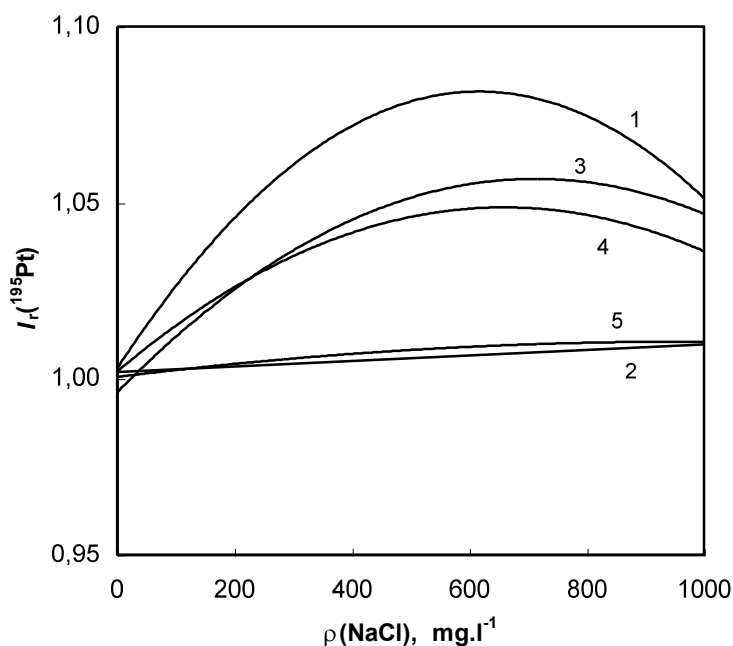
Příkladem může být interference izotopu rtuti  $^{196}\text{Hg}$  při stanovení platiny na linii izotopu  $^{196}\text{Pt}$ . Abychom získali hodnotu čistého signálu  $I_{An}$  analytu  $^{196}\text{Pt}$ , musí se od změřené hodnoty  $I_{An+Int}$ , která představuje součet intenzit signálů  $^{196}\text{Pt}$  a  $^{196}\text{Hg}$ , odečíst hodnota signálu interferentu změřená na jiné linii  $I'_{Int}$ , např. na linii izotopu  $^{202}\text{Hg}$ , vynásobenou korekčním faktorem  $F$ , který v tomto jednoduchém případě představuje poměr izotopového zastoupení  $^{196}\text{Hg}$  a  $^{202}\text{Hg}$ . Trochu složitější situace nastává v případě interferencí, které jsou způsobeny oxidovými a polyatomickými ionty. Tak např. stanovení kadmia na linii  $^{114}\text{Cd}$  je rušeno vznikem oxidů molybdenu, zejména částic  $^{98}\text{Mo}^{16}\text{O}$ . Protože není k dispozici jiná linie pro přímé měření signálu  $\text{MoO}$ , která by sama nebyla rušena, je nutné signál interferentu  $I'_{Int}$  měřit přímo na linii molybdenu, např. na linii izotopu  $^{95}\text{Mo}$ . Hodnotu korekčního faktoru  $F$ , která představuje poměr signálů  $^{98}\text{Mo}^{16}\text{O}$  a  $^{95}\text{Mo}$ , však v tomto případě nelze teoreticky odvodit a musí být určena experimentálně analýzou roztoku, který obsahuje pouze molybden. Použití tohoto přístupu, kdy je hodnota konverzního faktoru  $F$  určena experimentálně, lze však doporučit i pro předchozí případ izobarického překryvu. Nedokonalost kvadrupólového analyzátoru má za následek tu skutečnost, že experimentálně zjištěné hodnoty poměrů izotopových zastoupení neodpovídají teoretickým hodnotám (tzv. „mass discrimination“).

V případě, že koncentrace interferentu je ve vzorcích konstantní, je jednodušší a pohodlnější vliv interferencí zahrnout do kalibrace přípravou modelových roztoků.

### 4.4 Metody korekce nespektrálních interferencí

Mezi důležité nespektrální interference patří deprese nebo zvýšení signálu vlivem vysoké koncentrace matričních prvků, zejména snížení intenzity signálu analytu vlivem přítomnosti velkého množství snadno ionizovatelných prvků. Důležitý je i vliv obsahu minerálních kyselin a organických látek. Nespektrální interference se eliminují metodou vnitřního standardu, v případě vyššího obsahu alkalických kovů a organických látek ve vzorku je však zároveň potřeba i namodelovat kalibrační roztoky. Obdobně kalibrační roztoky musí obsahovat podobné množství kyseliny jako vzorky. V praxi bylo zjištěno, že pokud obsah  $\text{HNO}_3$  ve vzorcích leží v rozmezí 2 – 6 % (v/v), lze její vliv pomocí vhodného vnitřního standardu (jako nejuniverzálnější se

ukázalo Rh a In pro lehké a středně těžké prvky a Bi pro těžké prvky) téměř zcela eliminovat. Obdobně lze eliminovat i vliv organických látek a alkálií. V případě netypických nespektrálních interferencí je možné využít i další prvky. Volba se provádí podle doporučení v odborné literatuře nebo se vhodnost daného vnitřního standardu pro daný účel vyhodnotí experimentálně ve zvláštní studii. Příkladem takové studie může být výběr vhodného vnitřního standardu pro stanovení Pt v roztocích s vysokým obsahem NaCl. vyhodnocení této studie je uvedeno v obrázku 4, veličina v obrázku je relativní intenzita signálu  $^{195}\text{Pt}$ , tedy vlastní intenzita  $^{195}\text{Pt}$  vydělená intenzitou signálu příslušného vnitřního standardu. Aby byly křivky příslušející jednotlivým vnitřním standardům lépe srovnatelné, jsou jednotlivé naměřené relativní intenzity normovány vydělením hodnotou prvního bodu grafu.



Obr. 4 Schopnost různých porovnávacích prvků korigovat vliv koncentrace NaCl: 1 – Rh, 2 – Ir, 3 – In, 4 – Bi, 5 – Au.

## 5 Metoda analýzy s externí kalibrací

### 5.1 Příklad standardního operačního postupu

#### 1 Rozsah zkoušky

Tento standardní operační postup popisuje stanovení obsahu Al, As, Ag, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Mo, Mn, Ni, Pb, Tl, V a Zn v roztocích a vzorcích biologického původu.

#### 2 Příprava a mytí laboratorního nádobí pro laboratoř ICP - MS

##### Použitelnost

Zásady popsané v této kapitole se aplikují na nádobí (skleněné, plastové, porcelánové a achátové) používané v laboratoři ICP-MS.

##### Pomůcky

- 1000 ml skleněná Erlenmayerova baňka se zátkou
- 100 ml skleněná kádinka
- 65 % kyselina dusičná p.p., nebo Suprapur®
- 65 % kyselina dusičná p.a.
- Milli - Q voda
- Ethanol (denaturovaný)

**Roztok zředěné kyseliny dusičné (1:10)** - do 1000 ml skleněné Erlenmayerovy baňky se nalije 900 ml Milli-Q vody a přidá 100 ml 65 % kyseliny dusičné p.a.. Baňka se uzavře zátkou a obsah baňky se důkladně promíchá.

##### Loužení použitého nádobí

Z použitého nádobí se nejprve odstraní značení pomocí buničiny namočené v ethanolu. Zbylé roztoky se vylíjí do výlevky, nádobí se nejméně třikrát vypláchne Milli-Q vodou. Takto vypláchnuté jednotlivé kusy nádobí (odměrné baňky, zkumavky, vzorkovnice) se zcela naplní zředěnou kyselinou dusičnou (1:10), uzavřou zátkou nebo parafilmem, uloží se na určené místo v digestoři a čitelně označí datem. Nálevky se po opláchnutí uloží do větší kádinky, zalijí zředěnou kyselinou dusičnou (1:10), kádinka se přikryje hodinovým sklem a čitelně označí datem. Nádobí se nechá loužit po dobu minimálně tří týdnů.

##### Mytí louženého nádobí

Nádobí je možné ponechat naplněné zředěnou kyselinou dusičnou až do dalšího použití nebo se po třech týdnech jednotlivé kusy nádobí opláchnou nejméně třikrát Milli-Q vodou a vysuší v sušárně (skleněné nádobí při teplotě 90 °C a plastové nádobí při teplotě 60 °C). Suché nádobí se uloží do sáčků a označí nápisem "loužené" nebo "čisté".

#### 3 Rozklad tuhých vzorků

##### Použitelnost

Metoda využívající rozklad v mikrovlnném rozkladném zařízení je použitelná pro rozklad biologických vzorků a léčiv a vzorků půd, sedimentů a spadů pro stanovení obecných kovů a metaloidů. Metoda využívající rozklad na topné desce je použitelná pro rozklad půd, sedimentů a spadů pro stanovení platinových kovů.

##### Pomůcky

- 50 a 100 ml PP odměrné baňky se zátkami
- PP nálevky, průměr 4 cm
- skleněné kádinky 100 ml vysoké
- hodinová sklíčka a skleněné tyčinky
- láhve na kyseliny s dávkovači

##### Přístroje

- analytické váhy
- mineralizační zařízení BM-1S (Plazmatonika, Polsko) se 110 ml PTFE nádobkami a PTFE víčky
- topná deska

## Chemikálie

- kyselina dusičná 65 % Suprapur®
- kyselina dusičná 65 % p.a.
- kyselina chlorovodíková 35-37 % p.a.
- kyselina fluorovodíková 40 % p.a.
- diluent: Milli-Q voda

## Pracovní postup pro mikrovlnný rozklad

K navážce 0,1-5 g vzorku materiálu (podle obsahu vody a podle předpokládaného obsahu analytů) ve 110 ml teflonových nádobkách se přidají 3-5 ml 65 % HNO<sub>3</sub> čistoty Suprapur®. V případě vzorků, které obsahují křemičitany (vzorky anorganického původu a některé trávy) se přidá 0,1 -1 ml HF. Teflonové nádobky se přikryjí teflonovými víčky, na víčka se položí kovové (Ni nebo Ti) membrány a nádobky se vloží do ocelového pláště rozkladného zařízení a plášť se uzavře. Následuje rozklad podle programu uvedeného v tabulce. Po skončení rozkladu se mineralizáty kvantitativně převedou vodou do 50-100 ml odměrných baňek. Pokud se předpokládá další ředění vzorku, odměrné baňky se doplní vodou po značku. Analogicky se připraví slepé pokusy.

Krok	Trvání [min]	Příkon [% max. příkonu]	Horní tlaková mez [MPa]	Dolní tlaková mez [MPa]
1	1	60	2,5	2,4
2	1	70	3,0	2,9
3	1	80	3,5	3,4
4	7	90	4,0	3,9

V případě zvláště rezistentních vzorků je možné rozklad prodloužit.

## 4 Příprava kalibračních roztoků

### Použitelnost

Připravené kalibrační roztoky se používají při stanovení výše uvedených prvků nebo menší skupiny prvků.

### Pomůcky

- skleněné 100 ml odměrné baňky tř. A se zátkami
- plastové 100 ml odměrné baňky se zátkami
- 50 ml skleněná odměrná baňka tř. A se zátkou
- pipety s fixním objemem 5 ml, 1 ml, 500  $\mu$ l, 250  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 20  $\mu$ l a 10  $\mu$ l
- pipeta s nastavitelným objemem 0,5 – 10  $\mu$ l
- 100 ml PE lahvičky s uzávěrem

### Roztoky

- kyselina dusičná 65 % Suprapur®
- kyselina dusičná 65 % p.a.
- kyselina chlorovodíková 35 - 37 % HCl p.a.
- Triton X-100
- standardní roztoky analytů o koncentraci 1 000 mg/l (Merck, Fluka apod.); standardní roztok vanadu je potřeba používat připravený z NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub> v matrici zř. NH<sub>3</sub> (Fluka)
- diluent: Milli-Q voda

**Roztok vnitřních standardů IS (Ge, Y, Rh, In a Bi 2,5 mg/l)** - do 100 ml odměrné baňky se odpipetují 3 ml 65 % HNO<sub>3</sub> čistoty Suprapur®, po 0,25 ml roztoků jmenovaných kovů o koncentraci 1000 mg/l a baňka se doplní vodou po značku. Roztok se promíchá a přelije se do 100 ml PP láhve. Láhev se opatří štítkem s popisem, datem přípravy a datem ukončení použitelnosti. Roztok je použitelný 1 rok.

Poznámka: připravuje se pouze roztok vnitřních standardů pro dané měření skutečně používaných.

### Kalibrační roztoky

**Roztok na modelování interferencí při stanovení Cr a V:** roztok obsahuje chloridové ionty v koncentraci cca 100 mg/l a vnitřní standardy v koncentraci 50  $\mu$ g/l. Do 100 ml skleněné baňky se odpipetuje 20  $\mu$ l konc. HCl čistoty p.a., 2 ml roztoku IS, 3 ml konc. HNO<sub>3</sub> čistoty Suprapur® a doplní se vodou po značku. Roztok se připravuje pro každé měření čerstvý.

**Roztok na modelování interferencí při stanovení Cd:** roztok obsahuje Mo v koncentraci cca 100 µg/l a vnitřní standardy v koncentraci 50 µg/l. Do 100 ml skleněné baňky se odpipetuje 10 µl roztoku Mo o koncentraci 1 000 mg/l, 2 ml roztoku IS, 3 ml konc. HNO<sub>3</sub> čistoty Suprapur® a doplní se vodou po značku. Roztok se připravuje pro každé měření čerstvý.

**Roztok B:** obsahuje: Fe v koncentraci 200 mg/l, Mn a Zn v koncentraci 100 mg/l a současně Cu v koncentraci 20 mg/l. Do 100 ml skleněné odměrné baňky se odpipetují roztoky analytů o koncentraci 1 000 mg/l a konc. kyselina dusičná dle tabulky:

roztok	65 % HNO <sub>3</sub> Suprapur®	Fe	Cu	Mn	Zn
ml	3	20	2	2	10

roztok v baňce se doplní vodou po značku, promíchá se a přelije se do PP láhve. Láhev se opatří štítkem s popisem, datem přípravy a datem ukončení použitelnosti. Roztok je použitelný 1 rok.

**Roztok C:** obsahuje Al, Co, Cr, Mo, Ni a Pb v koncentraci 100 mg/l a současně V, As, Cd, Ag a Tl v koncentraci 10 mg/l. Do 100 ml odměrné baňky se odpipetují roztoky analytů o koncentraci 1 000 mg/l a konc. kyselina dusičná dle tabulky:

roztok	HNO <sub>3</sub> Suprapur®	Al	Co	Cr	Mo	Ni	Pb	V	As	Cd	Ag	Tl
ml	3	10	10	10	10	10	10	1	1	1	1	1

roztok v baňce se doplní vodou po značku, promíchá se a přelije se do PP láhve. Láhev se opatří štítkem s popisem, datem přípravy a datem ukončení použitelnosti. Roztok je použitelný 1 rok.

**Roztok C/10:** obsahuje Al, Co, Cr, Mo, Ni a Pb v koncentraci 10 mg/l a současně V, As, Cd, Ag a Tl v koncentraci 1 mg/l. Do 50 ml odměrné baňky se odměří 3 ml 65 % HNO<sub>3</sub> čistoty Suprapur® a 5 ml roztoku C. Roztok v baňce se doplní vodou po značku, promíchá se a přelije se do PP láhve. Láhev se opatří štítkem s popisem, datem přípravy a datem ukončení použitelnosti. Roztok je použitelný 1 měsíc.

**Vlastní kalibrační roztoky S0 (blank), S1, S2, S3:** podle tabulky se do 100 ml plastových odměrných baněk odpipetují dříve připravené roztoky:

Standardní roztok	ml HNO <sub>3</sub> Suprapur®	ml IS	ml B	ml C/10
S0	3	2	0	0
S1	3	2	0,2	0,2
S2	3	2	0,5	0,5
S3	3	2	1,0	1,0

Jednotlivé odměrné baňky se nakonec doplní vodou po značku, uzavřou zátkami a roztoky se promíchají. Připravené standardní roztoky mají tyto koncentrace [µg/l]:

Prvky	S0	S1	S2	S3
Fe	0	400	1000	2000
Zn	0	200	500	1000
Cu, Mn	0	40	100	200
Al, Co, Cr, Mo, Ni, Pb	0	20	50	100
V, As, Cd, Ag, Tl	0	2	5	10
vnitřní standardy	50	50	50	50

Kalibrační roztoky S0 až S3 je třeba připravovat pro každé měření čerstvé. Po skončení práce s ICP-MS se kalibrační roztoky z odměrných baněk vylíjí, odměrné baňky se vypláchnou vodou, přidají se 3 ml konc. HNO<sub>3</sub> a baňka se doplní vodou po okraj. Zazátkované baňky se uloží až do další přípravy kalibračních roztoků před měřením.

## 5 Příprava vzorků před měřením

### Pomůcky

- skleněné 50 a 100 ml odměrné baňky tř. A se zátkami
- plastové 50 a 100 ml odměrné baňky se zátkami
- pipety s fixním objemem 5 ml, 1 ml, 500 µl a 200 µl
- pipeta s nastavitelným objemem 1-5 ml

- nylonové filtry 45  $\mu\text{m}$
- plastové injekční stříkačky

### **Roztoky**

- kyselina dusičná 65 % Suprapur®
- kyselina chlorovodíková 37 % p.a.
- diluent: Milli-Q voda

### **Vzorky po rozkladu v mikrovlnném rozkladném zařízení**

Podle předpokládaného obsahu sledovaných prvků se provádí buďto přímá analýza, nebo se vzorek před analýzou ředí. V případě přímé analýzy se do odměrné baňky s digerátem odpipetuje 1 ml (v případě 50 ml odměrné baňky) nebo 2 ml (v případě 100 ml odměrné baňky) roztoku IS, baňka se doplní vodou po značku a důkladně promíchá. Vzorek je připraven k měření. V případě analýzy po ředění se odměrné baňky s digeráty doplní vodou po značku a promíchají. Z tohoto roztoku se pipetuje alikvótní podíl 0,5 – 10 ml do 50 nebo 100 ml odměrné baňky, okyselí 2 ml  $\text{HNO}_3$  čistoty Suprapur®, odpipetuje 1 ml (v případě 50 ml odměrné baňky) nebo 2 ml (v případě 100 ml odměrné baňky) roztoku IS, baňka se doplní vodou po značku a důkladně promíchá. Vzorek je připraven k měření.

### **Vzorky vod a jiné kapalné vzorky**

Vzorky pitných povrchových vod se odebírají do předem vyčištěných PE láhví o objemu 500 nebo 250 ml obsahujících 5,0 nebo 2,5 ml 65 %  $\text{HNO}_3$  Suprapur® respektive. Láhev se vodou plní po hrdlo a vzorky se uchovávají v chladničce. Podle přání zákazníka se vzorek vody před analýzou případně filtruje pomocí 45  $\mu\text{m}$  nylonového filtru nasazeného na plastovou injekční stříkačku. Stříkačka i filtr se před použitím musí propláchnout vzorkem vody. Před měřením se 25 ml odměrná PP baňka vypláchne vzorkem vody, odpipetuje se do ní 0,5 ml roztoku IS a pomocí 5 ml pipety se doplní po značku vzorkem vody.

V případě dalších kapalných vzorků se ze vzorku podle předpokládaného obsahu analytů odpipetuje alikvótní podíl 0,5 – 10 ml do 25, 50 nebo 100 ml odměrné baňky, okyselí patřičným množstvím konc.  $\text{HNO}_3$  čistoty Suprapur® tak, aby její konečné zředění bylo 1:50, odpipetuje 0,5 ml (v případě 25 ml odměrné baňky) nebo 1 ml (v případě 50 ml odměrné baňky) nebo 2 ml (v případě 100 ml odměrné baňky) roztoku IS, baňka se doplní vodou po značku a důkladně promíchá. Vzorek je připraven k měření.

## **6. Příprava hmotnostního spektrometru před měřením**

Podle technické dokumentace ke spektrometru je třeba provést v patřičných časových intervalech následující kroky:

1. kalibrace hmotnostní škály spektrometru a nastavení rozlišení,
2. seřízení polohy plazmové hlavice v osách x a y,
3. optimalizace pulzního detektoru,
4. optimalizace analogového detektoru,
5. kalibrace duálního detektoru,
6. kalibrace funkce „Autolens“,
7. kontrola funkce přístroje – citlivost, úroveň oxidových a dvojnásobně nabitých iontů

Před každým měřením je nutné překontrolovat stav hadiček přivádějících vzorek do zmlžovače a odvádějících odpad ze mlžné komory. V případě, že hadičky jsou nadměrně opotřebované, je nutné je vyměnit za nové. Dále se překontroluje stav vstupních kuželů a injektoru plazmové hlavice a případně se vyčistí podle postupu doporučeného výrobcem. V případě čištění injektoru je třeba provést ještě následnou optimalizaci polohy plazmové hlavice.

Po zažehnutí plazmatu se přístroj nechá minimálně 15 min stabilizovat. Potom se překontroluje tlak uvnitř evakuované části spektrometru, který by měla odpovídat hodnotě stanovené manuálem a provede se optimalizace průtoku argonu v nosném (analytickém) kanálu.

## **7. Měření metodou ICP-MS**

### **Metoda**

Pro měření se připraví vhodná metoda zahrnující všechny analyzované prvky včetně prvků potřebných pro korekce nespektrálních interferencí (viz níže) a vnitřních standardů. Vodítko pro sestavení metody a nastavení spektrometru je uvedeno v tabulce.



Operátor vypracovanou metodu uloží na disk počítače a do deníku si zapíše její jméno. Stejně si zapíše název souboru, do kterého ukládá výsledky měření a název adresáře, do kterého se ukládají surová data o měření.

příkon generátoru	1 000 – 1 300 W
průtok Ar v nosném kanálu	optimalizovaná hodnota (cca 0,7 – 1,0 l/min)
průtok vzorku	1,0 ml/min
promývání zmlžovače před měřením	15 s při maximálním průtoku, 20 s při normálním průtoku
iontová optika	funkce Autolens
mód měření	„peak hopping“
detektor	„dual“
měřené nuklidy (zvolí se pouze skutečně měřené nuklidy)	<sup>27</sup> Al, <sup>35</sup> Cl, <sup>51</sup> V, <sup>52</sup> Cr, <sup>53</sup> Cr, <sup>55</sup> Mn, <sup>56</sup> Fe, <sup>57</sup> Fe, <sup>58</sup> Ni, <sup>59</sup> Co, <sup>60</sup> Ni, <sup>62</sup> Ni, <sup>65</sup> Cu, <sup>66</sup> Zn, <sup>72</sup> Ge, <sup>75</sup> As, <sup>95</sup> Mo, <sup>103</sup> Rh, <sup>107</sup> Ag, <sup>111</sup> Cd, <sup>115</sup> In, <sup>205</sup> Tl, <sup>206</sup> Pb, <sup>207</sup> Pb, <sup>208</sup> Pb, <sup>209</sup> Bi
doba měření/amu	20 – 100 ms
počet měření na repliku	5 – 20
počet replik na vzorek	5 – 10
doba měření na jeden nuklid	2 – 10 s
vyhodnocení signálu	průměr
kalibrace	externí
vnitřní standardy	obvykle Bi (pro Pb, Tl a Pt) a In nebo Rh (pro ostatní prvky); v případě netypických nespektrálních interferencí je možné využít i další prvky. Volba se provádí podle doporučení v odborné literatuře nebo se vhodnost daného vnitřního standardu pro daný účel vyhodnotí experimentálně ve zvláštní studii.
odečítání blanku	po korekci na vnitřní standard

### Kalibrace

Při první kalibraci se proměří nulový kalibrační roztok (S0) a všechny tři kalibrační roztoky (S1-3). Vizuálně se posoudí linearita kalibrace. Pokud lineární závislost zjevně není lineární, je potřeba nejprve připravit znova všechny kalibrační roztoky. Pokud toto opatření nevede k nápravě, je třeba provést kalibraci detektoru spektrometru. Po každém pátém až desátém měřeném vzorku se provede kontrola stability kalibrace tak, že se nejkoncentrovanější kalibrační roztok změří jako neznámý vzorek. Pokud se nalezená koncentrace liší o více než 3 % od nominální hodnoty, je nutné provést rekalibraci. Při rekalibraci již není nutné proměřovat všechny kalibrační roztoky, postačující je kalibrace zahrnující nulový kalibrační roztok (S0) a kalibrační roztok s nejvyšší koncentrací (S3).

### Korekce spektrálních interferencí

Korekce izobarických překryvů je prováděna automaticky softwarem přístroje v on-line režimu. Off-line korekce interferencí způsobených polyatomickými, zejména oxidovými, ionty se provede tak, že se kromě linie nuklidu analytu <sup>n</sup>A sleduje i linie nuklidu prvku tvořícího rušící oxidové ionty <sup>m</sup>M a koncentrace analytu vyhodnocená softwarem spektrometru se koriguje podle vztahu:

$$\rho(^n A)_{kor} = \rho(^n A) - R(^n MO) \cdot I_{rel}(^m M)$$

kde  $\rho(^n A)$  je nalezená koncentrace zahrnující skutečnou koncentraci analytu zvýšenou o zdánlivou koncentraci vyvolanou interferencí.  $I_{rel}(^m M)$  je relativní signál rušícího prvku (tj. vztažený k signálu vnitřního standardu) a  $R(^n MO)$  ( $\mu\text{g/l}$ ) je výtěžek tvorby rušícího oxidového iontu, tj. zdánlivá koncentrace analytu nalezená v roztoku interferentu o jednotkové relativní intenzitě. Hodnota tohoto parametru se určuje analýzou roztoku obsahujícího pouze interferent před a během měření neznámých vzorků:

$$R(^n MO) = \rho_{ap}(^n A) / I_{rel}(^m M)$$

Hodnota  $\rho_{ap}(^n A)$  v této rovnici je nalezená zdánlivá koncentrace analytu v tomto roztoku interferentu.

Vhodné nuklidy pro analýzu V, Cr a Cd jsou uvedeny v tabulce.

Linie analytu <sup>n</sup> A	Rušící částice	Linie interferentu <sup>m</sup> M
<sup>51</sup> V, <sup>53</sup> Cr	ClO	<sup>35</sup> Cl
<sup>111</sup> Cd	MoO	<sup>95</sup> Mo

### Výpočet výsledku stanovení

Hmotnostní zlomek prvku ve vzorku [mg/kg] se vypočítá ze vztahu:

$$w = \frac{(\rho_v - \rho_0) \cdot V_1 \cdot V_3}{1000 \cdot m \cdot V_2}$$

$\rho_v$  je hmotnostní koncentrace analytu v roztoku vzorku [ $\mu\text{g/l}$ ] korigovaná na spektrální interference,

$\rho_0$  je průměrná hmotnostní koncentrace analytu ve skupině slepých vzorků, která přísluší k analyzované sérii vzorků [ $\mu\text{g/l}$ ],

$m$  je navážka vzorku [g],

$V_1$  je objem odměrné baňky, do které byl převeden rozložený vzorek [ml],

$V_2$  je objem odebraného alikvotního podílu vzorku [ml], pokud se neředí, dosazuje se 1,

$V_3$  je objem alikvotního podílu vzorku po naředění [ml], pokud se neředí, dosazuje se 1.

Koncentrace analytu v kapalném vzorku  $\rho$  [ $\mu\text{g/l}$ ] se vypočte podle vztahu:

$$\rho = (\rho_v - \rho_0) \cdot \frac{V_2}{V_1}$$

$\rho_v$  je hmotnostní koncentrace analytu v naředěném roztoku vzorku [ $\mu\text{g/l}$ ] korigovaná na spektrální interference,

$\rho_0$  je průměrná hmotnostní koncentrace analytu ve skupině slepých vzorků, která přísluší k analyzované sérii vzorků [ $\mu\text{g/l}$ ],

$V_1$  je objem odebraného alikvotního podílu vzorku [ml],

$V_2$  je objem alikvotního podílu vzorku po naředění [ml].

## 5.2 Příklad validačního protokolu

### Správnost

Ověření bylo provedeno opakovanou různými analýzou referenčních materiálů:

- CRM 145 R – Trace elements in a sewage sludge, naváženo asi 0,2 g přesně, převedeno do 100 ml odměrné baňky a 10 $\times$  ředěno.

Stanovovaný prvek	Cr	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	Cd	Pb
<b>Jednotky</b>	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
x-ref	307	156	5,61	247	696	2122	3,5	286
u(x-ref)	7	2	0,16	4	6	12	0,08	2,5
1.	299,9	166,7	5,0	241,6	685,3	2079,8	3,6	299,2
2.	312,4	166,0	6,2	245,2	695,1	2263,2	3,5	277,3
3.	316,8	166,6	5,7	246,7	698,7	2008,0	3,6	320,7
4.	295,5	138,9	5,5	235,2	672,6	1929,2	3,4	294,6
5.	314,2	160,7	5,2	250,7	689,8	2242,9	3,6	312,0
6.	315,9	158,8	6,0	249,0			3,4	288,6
$\bar{x}$	309,108	159,619	5,597	244,724	688,299	2104,621	3,522	298,733
s	9,079	10,681	0,467	5,634	10,152	145,777	0,097	15,743
n	6	6	6	6	5	5	6	6
$u(x)$	3,706	4,361	0,191	2,300	4,540	65,193	0,040	6,427
R	1,007	1,023	0,998	0,991	0,989	0,992	1,006	1,045
u(R)	0,026	0,031	0,044	0,019	0,010	0,029	0,026	0,024
t	0,27	0,75	0,05	0,50	1,06	0,29	0,25	1,84
$t_{krit}$	2,57	2,57	2,57	2,57	2,78	2,78	2,57	2,57
správnost	<b>ano</b>	<b>ano</b>	<b>ano</b>	<b>ano</b>	<b>ano</b>	<b>ano</b>	<b>ano</b>	<b>ano</b>

- CRM 281 – Trace elements in rye grass, naváženo asi 0,5 g přesně, převedeno do 50 ml odměrné baňky, pro Mn 10 × ředěno, jinak neředěno.

Stanovovaný prvek	Ni	Cu	Zn	Mo	Cd	Pb	Mn
Jednotky	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
x-ref	3,00	9,65	31,5	0,84	0,12	2,38	81,6
u(x-ref)	0,09	0,19	0,7	0,03	0,002	0,06	1,3
1.	3,0	9,6	31,2	1,1	0,1	2,4	84,0
2.	3,2	9,6	32,6	0,9	0,1	2,4	84,0
3.	3,0	9,3	33,2	0,9	0,1	2,4	81,6
4.	3,3	9,4	31,5	0,9	0,1	2,5	82,6
5.	3,1	9,7	32,2	0,9	0,1	2,4	85,1
6.	3,1	9,4	34,0	0,9	0,1	2,6	83,5
$\bar{x}$	3,112	9,507	32,442	0,926	0,115	2,430	83,466
s	0,126	0,135	1,028	0,085	0,002	0,078	1,227
n	6	6	6	6	6	6	6
$u(\bar{x})$	0,052	0,055	0,420	0,035	0,001	0,032	0,501
R	1,04	0,99	1,03	1,10	0,96	1,02	1,02
u(R)	0,036	0,020	0,026	0,057	0,017	0,029	0,017
t	1,05	0,73	1,13	1,80	2,44	0,73	1,313
$t_{\text{krit}}$	2,57	2,57	2,57	2,57	2,57	2,57	2,57
správnost	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano

DORM -2 – Dogfish Muscle, naváženo asi 0,5 g přesně, převedeno do 50 ml odměrné baňky, pro Cr a Ni naředěno 5 ×, jinak neředěno

Stanovovaný prvek	Al	Mn	Fe	Co	Cu	Zn	Ag	Cd	Pb	Cr	Ni
Jednotky	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
x-ref	1,09	3,66	142	0,182	2,34	25,6	0,041	0,043	0,065	34,7	19,4
u(x-ref)	0,09	0,17	5	0,016	0,08	1,2	0,007	0,004	0,004	2,3	1,6
1.	0,86	3,30	148,12	0,18	2,24	26,02	0,04	0,05	0,06	27,74	16,18
2.	0,89	3,49	158,26	0,19	2,29	25,81	0,03	0,05	0,07	30,22	17,46
3.	1,00	3,53	163,87	0,19	2,40	26,88	0,03	0,05	0,06	28,99	16,47
4.	1,00	3,42	157,38	0,19	2,21	28,23	0,03	0,05	0,07	31,38	18,24
5.	1,23	3,06	139,53	0,17	2,15	27,94	0,03	0,05	0,05	29,72	17,72
6.	0,93	3,74		0,19			0,03	0,05			
$\bar{x}$	0,986	3,423	153,433	0,184	2,259	26,973	0,034	0,048	0,063	29,609	17,213
s	0,134	0,228	9,608	0,011	0,092	1,094	0,003	0,001	0,009	1,359	0,865
n	6	6	5	6	5	5	6	6	5	5	5
$u(\bar{x})$	0,055	0,093	4,297	0,004	0,041	0,489	0,001	0,000	0,004	0,608	0,387
R	0,90	0,94	1,08	1,01	0,97	1,05	0,83	1,10	0,97	0,85	0,89
u(R)	0,09	0,05	0,05	0,09	0,04	0,05	0,14	0,10	0,08	0,06	0,08
t	1,06	1,29	1,66	0,11	0,93	1,01	1,19	1,02	0,39	2,48	1,49
$t_{\text{krit}}$	2,57	2,57	2,78	2,57	2,78	2,78	2,57	2,57	2,78	2,78	2,78
správnost	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano

### Mez detekce

Mez detekce byla stanovena opakovanou analýzou slepých pokusů ( $n = 6$ ) a vypočtena jako součet průměrné hodnoty slepých pokusů a trojnásobku směrodatné odchylky:

Mez detekce		
Prvek	Vodný roztok [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ] (*)	Pevný vzorek [ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ] (**)
Ag	0,01	0,003
Al	1,0	0,4
As	0,06	0,06
Cd	0,002	0,0005
Co	0,004	0,007
Cr	0,2	0,1
Cu	0,5	0,04
Fe	6,0	0,6
Mn	0,04	0,03
Mo	0,2	0,03
Ni	0,4	0,07
Pb	0,05	0,05
Tl	0,002	0,001
V	0,01	0,004
Zn	6,0	1,0

Vysvětlivky:

(\*) ... uvažovaná přímá analýza kapalného vzorku bez ředění. Slepé pokusy představují analýzu destilované vody.

(\*\*) ... odpovídá rozkladu 0,5 g pevného vzorku a převedení do 50 ml odměrné baňky bez dalšího ředění. Slepé pokusy zahrnují i rozklad v mikrovlnném zařízení.

### **Linearita**

Test linearity kalibrační závislosti byl proveden tak, že ředěním byly připraveny nulové roztoky a roztoky obsahující stanovované analyty na pěti ekvidistantních hladinách pokrývajících celý kalibrační rozsah. Každý z roztoků byl připraven celkem třikrát. Měření relativních intenzit signálů bylo provedeno s pomocí různých vnitřních standardů. Vlastní test linearity byl proveden pomocí Mandelova testu.

Prvek	Jednotky	Testovaný rozsah	n	Vnitřní standard In			Vnitřní standard Rh		
				F	F <sub>k</sub>	linearita	F	F <sub>k</sub>	linearita
Ag	μg.l <sup>-1</sup>	0-10	18	0,215	4,544	ano	1,58	4,544	ano
Al	μg.l	0-10	18	1,915	4,544	ano	4,524	4,544	ano
Cd	μg.l	0-10	18	0,745	4,544	ano	2,763	4,544	ano
Co	μg.l	0-10	17	2,917	4,601	ano	3,165	4,601	ano
Cr	μg.l	0-10	18	0,221	4,544	ano	0,924	4,544	ano
Cu	μg.l	0-20	18	4,458	4,544	ano	4,308	4,544	ano
Fe	μg.l	0-200	18	0,625	4,544	ano	1,122	4,544	ano
Mn	μg.l	0-100	18	2,902	4,544	ano	8,02	4,544	ne
Mo	μg.l	0-10	18	0,649	4,544	ano	2,246	4,544	ano
Ni	μg.l	0-10	18	1,915	4,544	ano	2,007	4,544	ano
Ni	μg.l	0-10	18	1,183	4,544	ano	2,023	4,544	ano
V	μg.l	0-10	18	0,316	4,544	ano	1,182	4,544	ano
Zn	μg.l	0-1000	18	4,403	4,544	ano	0,066	4,544	ano
Prvek	Jednotky	Testovaný rozsah	n	Vnitřní standard Bi			Vnitřní standard Ge		
				F	F <sub>k</sub>	linearita	F	F <sub>k</sub>	linearita
As	μg.l	0-10	18				1,464	4,544	ano
Pb	μg.l	0-10	18	1,816	4,544	ano			
Tl	μg.l	0-10	18	3,765	4,544	ano			

### **Pracovní rozsah**

Pro kapalně vzorky byla spodní hranice pracovního rozsahu určena jako mez stanovitelnosti (součet průměrné hodnoty slepých pokusů a desetinásobku směrodatné odchylky těchto slepých pokusů).

Horní mez pracovního rozsahu odpovídá horní hranici kalibrace a vzorku vody ředěné 200 ×.

Pro pevně vzorky odpovídá spodní hranice pracovního rozsahu mezi stanovitelnosti při uvažované navážce 0,5 g materiálu a převedení do 50 ml odměrné baňky. Horní mez pracovního rozsahu odpovídá horní hranici kalibrace, navážce vzorku 0,1 g, převedení digerátu do 100 ml odměrné baňky a 200 násobnému ředění před vlastním měření.

K získání hodnot slepých pokusů platí poznámka uvedená u stanovení meze detekce.

Stanovovaný prvek	Kapalně vzorky μg.l <sup>-1</sup>	Pevně vzorky μg.g <sup>-1</sup>
Ag	0,03-2000	0,01-2000
Al	2-2000	1,0-2000
As	0,06-2000	0,2-2000
Cd	0,007-2000	0,002-2000
Co	0,01-2000	0,02-2000
Cr	0,7-2000	0,3-2000
Cu	1,3-4000	0,1-4000
Fe	20-40000	2-40000
Mn	0,1-20000	0,1-20000
Mo	0,4-2000	0,1-2000

Ni	1,0-2000	0,2-2000
Pb	0,12-2000	0,1-2000
Tl	0,004-2000	0,0006-2000
V	0,04-2000	0,0085-2000
Zn	17-20000	3-20000

### Testy matematické korekce interferencí

Test účinnosti matematické korekce interferencí byl proveden nejprve pro stanovení kadmia, při kterém rušící částicí je oxidový ion  $\text{MoO}^+$ . Test spočíval v tom, že se v šesti roztocích obsahujících postupně 0, 20, 40, 60, 80 a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  Mo změřila zdánlivá koncentrace kadmia a zároveň se provedla korekce podle postupu popsaného v standardním operačním postupu. Pro výpočet korekčního faktoru posloužila další měření posledně jmenovaného roztoku provedená jak před, tak na závěr celé série.

Mo $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Cd (zdánlivá) $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Cd (po korekci) $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
0	0,005	-0,004
20	0,102	-0,002
40	0,208	-0,001
60	0,297	-0,007
80	0,422	0,016
100	0,519	0,011

V dalším pokusu byla testována účinnost korekce při stanovení chromu a vanadu, při kterých ruší částice  $\text{ClO}^+$ . Test byl proveden obdobně jako v předešlém případě, modelové roztoky obsahovaly 0, 20, 40, 60, 80 a 100  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  Cl.

Cl $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	Cr (zdánlivá) $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Cr (po korekci) $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	V (zdánlivá) $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	V (po korekci) $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
0	0,06	0,02	0,01	0,00
20	0,43	0,04	0,12	0,01
40	0,95	0,06	0,29	0,03
60	1,44	0,13	0,41	0,03
80	2,01	0,21	0,57	0,05
100	2,49	0,01	0,72	0,00

### 5.3 Odhad nejistot

Z hlediska výpočtu nejistot nevyžaduje metoda ICP-MS oproti jiným analytickým metodám s externí kalibrací žádný zvláštní přístup, jen je potřeba do kombinované nejistoty zahrnout některé charakteristické složky, zejména složky nejistot, které jsou způsobeny interferenčními vlivy.

Při odhadu kombinované nejistoty je výhodné vyjít z dat o provozu metody, jako je validační studie apod., nesmí se však zapomenout, že data o přesnosti metody získaná během validace nebo mezilaboratorní studie nemusí nutně zahrnovat všechny zdroje nejistot. Proto je vhodné postupovat podle následujícího schématu:

- sestaví se seznam všech složek nejistoty
- sestaví se seznam složek nejistoty pokrytých dostupnými daty a porovná se seznamem vyhotoveným v předchozím kroku,
- vyhodnotí se nepokryté složky nejistot: experimentálně, z literárních údajů . . . ,
- vypočte se kombinované nejistota. Vychází se např. z funkčního vztahu.:

$$y_{kor} = y \cdot f_1 \cdot f_2 \cdot \dots + \Delta_1 + \Delta_2 + \dots \quad (6)$$

$y_{kor}$  je korigovaná hodnota výsledku,  $y$  je výsledek analýzy s nejistotou rovnou hodnotě přesnosti a  $f_i$  a  $\Delta_i$  jsou opravné faktory na složky nejistoty nezahrnuté do dat o provozu metody a umožňují formálně sloučit údaj o přesnosti metody a ostatní složky nejistot. Pokud tyto faktory mají násobný charakter, mají pak jednotkovou hodnotu a jejich nejistota odpovídá relativní hodnotě nejistoty dané původní složky. Pokud mají tyto faktory aditivní charakter, je jejich vlastní hodnota nulová a jejich nejistota odpovídá přímo nejistotě odpovídající složky. Kombinovaná nejistota veličiny  $y_{kor}$  se vypočte podle známých pravidel pro výpočet kombinované nejistoty.

Hlavním zdrojem dat o provozu metody bývá vnitrolaboratorní validační studie. Důležitým bodem validační studie je odhad mezilehlé přesnosti (vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti). Ta je stanovena během delšího časového intervalu a zahrnuje i vlivy různých měřících zařízení a různých analytiků a může sloužit jako základ pro odhad nejistot. Složky nejistot, které v hodnotě mezilehlé přesnosti nebývají obvykle zahrnuty, jsou:

- nejistota stanovení výtěžnosti,
- nejistota kalibrace a přípravy kalibračních roztoků,
- nejistota pramenící z interferenčních vlivů,
- nejistota vzorkování (záleží na tom, jaký vzorek je použit pro stanovení mezilehlé přesnosti, zdali se jedná o vnitrolaboratorní standard, který je homogenní, nebo zdali se jedná o reálné vzorky).

Zdroje nejistot měření charakteristické pro metodu ICP-MS jsou:

### **Přesnost**

Mezilehlá přesnost může být vyhodnocena opakovanou analýzou jednoho vzorku ( $n$  analýz) prováděných v delším časovém období. Směrodatná odchylka mezilehlé přesnosti má pak hodnotu:

$$s(y) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}} \quad (7)$$

Takto lze získat údaj o přesnosti např. z regulačního diagramu. Podmínkou je ale to, aby regulační diagram byl konstruován na základě analýz vzorku s reálnou maticí. Jinou možností je výpočet směrodatné odchylky z paralelních stanovení  $n$  různých vzorků:

$$s(y) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{i1} - y_{i2})^2}{2 \cdot n}} \quad (8)$$

Pokud se analyzované vzorky podstatně liší v obsahu analytu, je lépe vypočítat přímo relativní směrodatnou odchylku:

$$s_r(y) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{i1} - y_{i2}) / \bar{y}_i}{2 \cdot n}} \quad (9)$$

### **Kalibrace**

při odhadu nejistoty kalibrace je nutné vycházet z rovnice kalibrační přímky (4). Nejistota signálu kalibračního roztoku  $l$  se určí z experimentálně získané hodnoty opakovatelnosti  $s(l)$ . Koncentrace analytu v kalibračním roztoku, který byl připraven

postupným ředěním základního (obvykle zakoupeného) roztoku o koncentraci  $\rho_{zákl,An}$  se v případě dvoustupňového ředění (pipetou 1 se pipetuje základní roztok do odměrné baňky 1 a tento zředěný roztok se pipetuje pipetou 2 do odměrné baňky 2) vypočte ze vztahu:

$$\rho_{An} = \rho_{zákl,An} \cdot \frac{V_{pip-1}}{V_{OB-1}} \cdot \frac{V_{pip-2}}{V_{OB-2}} \quad (10)$$

(zkratka pip znamená pipetu a OB odměrnou baňku).

Koncentrace vnitřního standardu, který se pipetou 3 přidává ze zásobního roztoku o koncentraci  $\rho_{zás,IS}$  do odměrné baňky 2, se vypočte ze vztahu:

$$\rho_{IS} = \rho_{zás,IS} \cdot \frac{V_{pip-3}}{V_{OB-2}} \quad (11)$$

a pro poměr koncentrací analytu a vnitřního standardu v kalibračním roztoku platí vztah:

$$\frac{\rho_{An}}{\rho_{IS}} = \frac{\rho_{zákl,An} \cdot V_{pip-1} \cdot V_{pip-2}}{\rho_{zás,IS} \cdot V_{pip-3} \cdot V_{OB-1}} \quad (12)$$

V konečném vztahu (12) se již neobjevuje objem odměrné baňky 2, který nemá na poměr koncentrací analytu a vnitřního standardu v kalibračním vzorku vliv a při výpočtu nejistoty se dokonce neuplatní ani nejistota koncentrace zásobního roztoku vnitřního standardu  $\rho_{zás,IS}$ , protože tentýž roztok je použit i při přípravě vzorku. Nezáleží totiž na přesné koncentraci vnitřního standardu, ale pouze na tom, aby jeho koncentrace v kalibračním roztoku a ve vzorcích byla totožná.

$$u\left(\frac{\rho_{An}}{\rho_{IS}}\right) = \frac{\rho_{An}}{\rho_{IS}} \cdot \sqrt{\left(\frac{u(\rho_{zákl,An})}{\rho_{zákl,An}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{pip-1})}{V_{pip-1}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{pip-2})}{V_{pip-2}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{pip-3})}{V_{pip-3}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{OB-1})}{V_{OB-1}}\right)^2} \quad (13)$$

Kombinovaná nejistota hodnoty směrnice má pak hodnotu:

$$u(k) = k \cdot \sqrt{\left(u\left(\frac{\rho_{An}}{\rho_{IS}}\right) / \left(\frac{\rho_{An}}{\rho_{IS}}\right)\right)^2 + \left(\frac{u(I)}{I}\right)^2} \quad (14)$$

Nejistota směrnice kalibrační závislosti není obsažena v hodnotě přesnosti metody, musí se s ní tedy sloučit podle vztahu (1). Její vliv má násobný charakter a nejistota příslušného korekčního faktoru je:

$$u(f(kal)) = u(k)/k \quad (15)$$

### Spektrální interference

Provádí-li se korekce interferencí podle rovnice (5), pak se nejistota dodatečného měření signálu interferentu se projeví v hodnotě přesnosti analýzy (zvýší se směrodatná odchylka). V hodnotě přesnosti však není zahrnuta nejistota použitého konverzního faktoru  $F$ , kterou je nutno vyhodnotit zvlášť. Je to možné provést tak, že se hodnota  $F$  určuje měřením před a po každé dávce vzorků a z takto časem postupně získaných dvojic se vypočte opakovatelnost  $s(F)$ . Standardní nejistota aditivního korekčního faktoru  $u(\Delta_{spekt.int.})$  (viz rovnice 6) se pak vypočte podle:

$$u(\Delta_{spekt.int.}) = s(\bar{F}) \cdot I'_{int} \cdot k \quad (16)$$

V případě, kdy je vliv interferencí zahrnout do kalibrace, postupuje se podle následujícího postupu:



- zjistí se rozpětí obsahu interferentu v běžných vzorcích (z literárních údajů, experimentálně),
- analýzou čistého roztoku interferentu se stanoví hodnota interferenčního faktoru:

$$IF = \frac{\text{zdánlivá koncentrace analytu vyvolaná interferentem}}{\text{koncentrace interferentu}} \quad (17)$$

kalibrační roztoky (roztok) se připraví s takovým přídavkem interferentu, který odpovídá jeho průměrnému obsahu ve vzorcích,

- rozpětí obsahu interferentu okolo průměrné hodnoty se převede na standardní nejistotu  $u(\rho_{int})$
- standardní nejistota obsahu interferentu  $u(\rho_{int})$  se vynásobením  $IF$  převede na standardní nejistotu aditivního korekčního faktoru  $u(\Delta_{spekt. int})$  (viz rovnice 1).

$$u(\Delta_{spekt. int}) = u(\rho_{int}) \cdot IF \quad (18)$$

Hodnota interferenčního faktoru v sobě zahrnuje jednak výtěžnost tvorby rušících částic, jednak izotopové zastoupení atomů vytvářejících rušící částici i zvoleného izotopu analytu. Jeho hodnotu lze tedy ovlivnit jak výběrem vhodného izotopu analytu ke měření, tak volbou měřících podmínek (příkon do plasmatu, průtok argonu zmlžovačem), které tvorbu polyatomických a oxidových částic ovlivňují.

### Nespektrální interference

Pokud se vliv nespektrálních interferencí bude zahrnovat do výpočtu nejistot podle rovnice (6), je nutné použít násobný korekční faktor  $f_{nespekt. int.}$ , jehož standardní nejistota byla z dlouhodobých pozorování experimentálně odhadnuta na  $u(f_{nespekt. int.}) = 0,01$ .

Pro výpočet **kombinované nejistoty** lze odvodit tento vztah, ve kterém je již zohledněno to, že numerická hodnota výsledku analýzy  $y$  a korigovaného výsledku  $y_{kor}$  je shodná a že hodnoty korekčních faktorů  $f$  jsou jednotkové:

$$u_c(y) = \sqrt{y^2 \cdot \left( u_r^2(y) + u(f_{kal})^2 + u(f_{nespekt.int})^2 \right) + u^2(\Delta_{spekt.int})} \quad (19)$$

a pro relativní kombinovanou nejistotu lze odvodit vztah:

$$u_{c,r}(y) = \sqrt{s_r^2(y) + u(f_{kal})^2 + u(f_{nespekt.int})^2 + u^2(\Delta_{spekt.int})} / y^2 \quad (20)$$

Dlouhodobé zkušenosti s analýzou řady vzorků ukazují, že tento poměrně složitý odhad nejistoty lze zjednodušit tak, že se nejistota rozloží pouze na dvě složky: opakovatelnost analýz a součet systematických vlivů nepokrytých přesností (bias). Pro vzorky, u kterých se neprovádí off-line korekce spektrálních interferencí, lze relativní hodnotu složky nejistoty neobsažené v opakovatelnosti odhadnout jako 2 % z výsledku analýzy. Odhad kombinované nejistoty výsledků lze tedy zjednodušit na:

$$u(y) = \sqrt{s(y)^2/n + 0,02 \cdot y^2} \quad (21)$$

kde  $y$  je buďto nalezený hmotnostní zlomek  $w$  nebo koncentrace  $\rho$ ,  $n$  je počet paralelních stanovení,  $s(y)$  je směrodatná odchylka opakovatelnosti a hodnota  $0,02 \cdot y$  představuje kvalifikovaný odhad složek nejistot nepokrytých opakovatelností.

Postup odhadu kombinované nejistoty výsledků zahrnujících matematickou off-line korekci spektrálních interferencí je obdobný. Nejistotu odhadnutou podle výše

uvedeného vzorce je třeba ještě zkombinovat se složkou odpovídající korekci spektrálních interferencí. Tato složka nejistot má hodnotu:

$$u(x)_{SI} = x \cdot \sqrt{\left( \frac{u(R(^n\text{MO}))}{R(^n\text{MO})} \right)^2 + u^2(I_{rel}(^m\text{M})) / I_{rel}(^m\text{M})^2} \quad (22)$$

kde  $u(R(^n\text{MO}))$  je nejistota výtěžku tvorby rušícího oxidového iontu, která se odhadne jako směrodatná odchylka tohoto parametru získaná z opakovaných měření roztoku obsahujícího pouze interferent (viz výše), a  $u(I_{rel}(^m\text{M}))$  je nejistota měření signálu rušícího prvku ve vzorku (viz výše), která se odhadne buďto jako směrodatná odchylka opakovaných měření tohoto signálu nebo jako kvalifikovaný odhad  $u(I_{rel}(^m\text{M})) = 0,02 \cdot I_{rel}(^m\text{M})$ . Při použití tohoto odhadu se odhad nejistoty spojené s korekcí interferencí zjednoduší na:

$$u(x)_{SI} = x \cdot \sqrt{\left( \frac{u(R(^n\text{MO}))}{R(^n\text{MO})} \right)^2 + 0,02^2} \quad (23)$$

Kombinovaná nejistota výsledku analýzy se konečně odhadne ze vztahu:

$$u(x) = \sqrt{s(x)^2 / n + 0,02 \cdot x^2} + u(x)_{SI}^2 \quad (24)$$

Rozšířená nejistota výsledku se vypočte za pomoci koeficientu rozšíření  $k=2$ :

$$U(x) = 2 \cdot u(x) \quad (25)$$

#### 5.4 Nejlepší kalibrační schopnost (CMC)

Za ideální případ se považuje analýza čistého roztoku analytu, u které odpadá nutnost rozkladu vzorku a nevyskytují se spektrální i nespektrální interference. Analýzou uměle připraveného vzorku obsahující Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Mo, Ag, Cd, Tl a Pb ( $n=6$ ) v koncentraci odpovídající 40 % kalibračního rozsahu byla získána hodnota relativní směrodatné odchylky opakovatelnosti 1,2 %. Odhad složky nejistoty nezahrnuté do opakovatelnosti (v tomto případě pouze kalibrace) je 1,0 %. Kombinací těchto dvou složek nejistot se získá hodnota relativní nejistoty výsledku přibližně 1,5 %, což odpovídá nejlepší kalibrační schopnosti, CMC (relativní rozšířené nejistotě) 3,0 %.

## 6 Metoda izotopového zředování

### 6.1 Princip a výpočty

Metoda izotopového zředování je velice důležitá technika elementární analýzy a v principu může být provedena s libovolným hmotnostním spektrometrem, nejenom se spektrometrem ICP-MS. Metoda je založena na měření změny poměru intenzit signálů dvou vybraných izotopů nebo dvou skupin izotopů analytu (měrného a referentního) po přidavku známého přídatku materiálu obohaceného referentním izotopem. Izotopově obohacený materiál se přidává nejčastěji ve formě roztoku, ale i tehdy je výhodnější přídatky odvažovat a ne odměřovat jejich objem. Z naměřeného izotopového poměru lze vypočítat koncentraci analytu ve vzorku. V některých případech, pokud je k dispozici radioizotop s velmi dlouhým poločase rozpadu, lze metodu aplikovat i na monoizotopický prvek jako je např. mangan. Izotopové zředování patří mezi primární metody měření. To znamená, že výsledek analýzy není odvozen od etalonu měřené veličiny, tedy v tomto případě chemického složení. Návaznost na jednotku SI soustavy mol je zajištěna navázáním na jednotku kg (odvážení izotopově obohaceného materiálu).

Prvním krokem analýzy by mělo být měření izotopového poměru v samotném vzorku. Toto měření slouží k prvnímu odhadu koncentrace analytu a k výpočtu

optimálního množství izotopového přídatku. Druhým důvodem je test případných spektrálních interferencí. Pro správné provedení izotopového zředování je totiž nutné, aby žádných z izotopů nebyl rušen a v případě, že tomu tak není, je nutné provést separaci analytu. Teprve v dalším kroku se připravuje roztok vzorku s přídatkem obohaceného materiálu. Doporučuje se přidat izotopový přídatek pokud možno v co nejranějším stadiu přípravy vzorku, aby došlo k ustálení chemické rovnováhy mezi přídatkem a analytem ze vzorku. Pokud k tomu dojde, pak výsledek analýzy nebude ovlivněn případnými následnými ztrátami analytu způsobenými např. chemickou separací apod. Chemická rovnováha mezi přídatkem a vzorkem je hlavním požadavkem na metodu izotopového zředování, proto také tato metoda není příliš vhodná pro přímou analýzu pevných vzorků.

Metoda izotopového zředování nabízí řadu výhod ve srovnání s ostatními kalibračními technikami používanými v ICP-MS. Jak již bylo zmíněno výše, je robustní vůči částečným ztrátám analytu během přípravy vzorku. Dále tato technika je necitlivá vůči řadě fyzikálních a chemických interferencí, o kterých se dá předpokládat, že budou mít na oba izotopy sledovaného prvku stejný vliv. A konečně, izotopové zředování může být považováno za ideální formu vnitřní standardizace: interním standardem pro každý analyt je jeho vlastní izotop. V důsledku toho jak správnost, tak přesnost výsledků izotopového zředování je obvykle lepší než u ostatních kalibračních technik. Ve srovnání s měřením izotopových poměrů metodou termální ionisace (TIMS) je přesnost ICP-MS sice nižší, přesto však pro stopovou elementární analýzu je obvykle více než postačující. Oproti technice TIMS je ICP-MS nepoměrně rychlejší, přesto ale pro rutinní použití tato technika zůstává méně vhodná zejména z časových nároků na průběh analýz. Určitou nevýhodou je i to, že tato metoda není universální, nelze ji aplikovat na existujících devatenáct monoizotopických prvků.

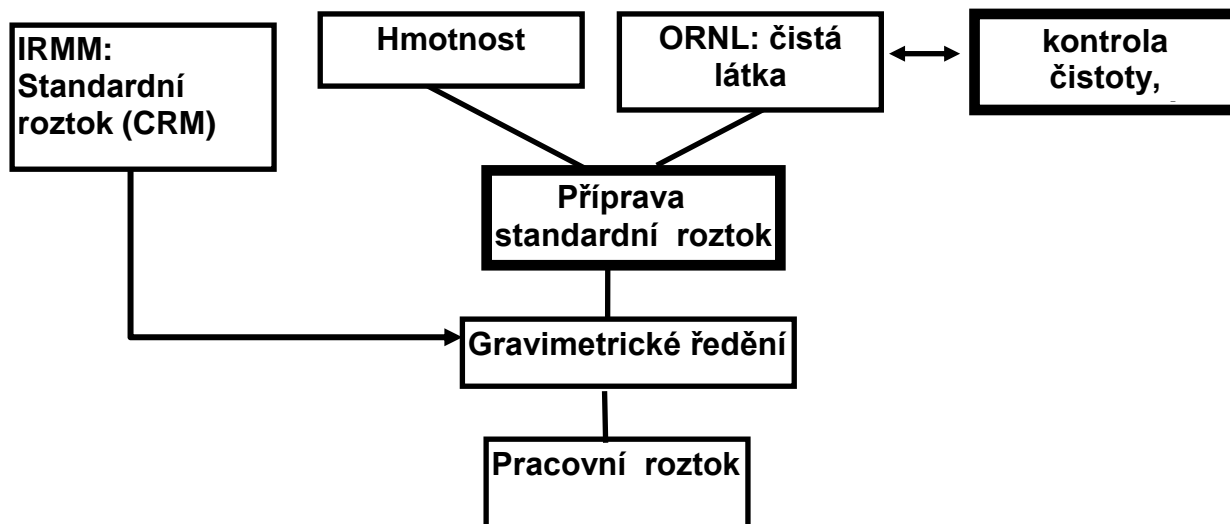
Výpočet hmotnostního zlomku analytu ( $w$ ) ve vzorku [ng/g] se provede podle vztahu:

$$w = \frac{w_{ISO} \cdot m_{ISO} \cdot (A_{2ISO} - f \cdot A_{1ISO})}{m_s \cdot (A_{1N} - f \cdot A_{2N})} \cdot \frac{M_N}{M_{ISO}} \quad (26)$$

kde  $w_{ISO}$  je hmotnostní zlomek roztoku izotopově obohaceného materiálu [ng/g],  $m_{ISO}$  je hmotnost přídatku tohoto roztoku,  $m_s$  je hmotnost vzorku [g],  $f$  je měřený izotopový poměr izotopů nebo skupin izotopů 1 (měrný) a 2 (referentní),  $M_N$  [g/mol] je molární hmotnost analytu s přírodním izotopovým složením,  $M_{ISO}$  je molární hmotnost [g/mol] je molární hmotnost analytu v izotopově obohaceném materiálu,  $A_1$  jsou zastoupení izotopu nebo skupiny izotopů 1 ve vzorku (index N) a v izotopově obohaceném materiálu (index ISO), a  $A_2$  jsou zastoupení izotopu nebo skupiny izotopů 2 ve vzorku (index N) a v izotopově obohaceném materiálu (index ISO).

## 6.2 Příprava izotopově obohacených roztoků a zajištění návaznosti

Izotopově obohacené roztoky je možné zakoupit již připravené. Roztoky mající charakter certifikovaného referenčního materiálu vyrábí pouze IRMM. K dispozici jsou obohacené roztoky stabilních izotopů těchto kovů:  $^{10}\text{B}$ ,  $^{11}\text{B}$ ,  $^6\text{Li}$ ,  $^{87}\text{Rb}$ ,  $^{85}\text{Rb}$ ,  $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{56}\text{Fe}$ ,  $^{111}\text{Cd}$ ,  $^{50}\text{Cr}$ ,  $^{52}\text{Cr}$ ,  $^{65}\text{Cu}$ ,  $^{84}\text{Sr}$ ,  $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{26}\text{Mg}$ ,  $^{202}\text{Hg}$ ,  $^{205}\text{Tl}$ ,  $^{64}\text{Zn}$  a  $^{67}\text{Zn}$ . Jrdná se o roztoky o typické koncentraci 2 – 10 mg/l dodávané v množství okolo 5 ml. Jinou možností je příprava vlastních roztoků (postup viz níže) z izotopově obohacených materiálů dodávaných Oak Ridge National Laboratory, která nabízí více než stovku nejružnějších preparátů. Návaznost izotopové zředovací analýzy je zobrazena v následujícím schématu:



Obr. 5 Obecné schéma přípravy izotopově obohacených roztoků

### Příklad postupu přípravy vlastního izotopově obohaceného roztoku

Při přípravě roztoků izotopově obohacených materiálů jsou všechny operace odměřování objemu nahrazeny vážením a místo koncentrace jsou tyto roztoky charakterizované hmotnostním zlomkem. Důvodem je snížení nejistot a nezávislost hmotnostního zlomku na teplotě roztoku. Všude kde se v následujícím textu hovoří o vážení odměrné baňky na analytických vahách, je uvedena hmotností myšlen průměr ze tří nezávislých vážení.

#### Příprava základního roztoku přibližně 100 µg/g

Navážka  $m_1$  izotopově obohaceného materiálu obsahující  $10,0 \pm 0,5$  mg kovu se odváží do 25 ml PP kádinky. Pro zajištění dostatečné přesnosti a správnosti se toto vážení provádí v laboratořích ČMI. Typická rozšířená nejistota  $U(m_1)$  je  $\pm 0,02$  mg. V případě, kdy izotopově obohacený materiál je tvořen čistým kovem, odpovídá hmotnost  $m_1$  přímo hmotnosti kovu. V případě, kdy preparát je tvořen sloučeninou kovu, provede se přepočítání hmotnosti kovu a sloučeniny podle vztahu:

$$m_{\text{kov}} = m_{\text{sloučenina}} \cdot f_{\text{kov/sloučenina}}$$

$$f_{\text{kov/sloučenina}} = M_{\text{kov}} / M_{\text{sloučenina}}$$

**Pozor:** k výpočtu nelze použít běžné molární hmotnosti  $M$  nalezené v běžných tabulkách, ale pro jejich výpočet je nutné vzít do úvahy izotopové složení konkrétního preparátu.

Navážka izotopového preparátu se rozpustí ve vhodném rozpouštědle a pomocí vhodného diluentu se kvantitativně převede do 100 ml skleněné odměrné baňky. Baňka musí být vyčištěná a předem zvážená. Před vážením baňka musí být suchá a buničínovým kapesníčkem zbavená zbytků i zbytků vlhkosti, potu a jiných nečistot na vnějším povrchu. Hmotnost prázdné baňky je  $m_2$ . Po převedení roztoku izotopového materiálu do baňky se baňka doplní po rysku vhodným diluentem a znova zváží tak, aby její hmotnost neovlivnily nečistoty ulpěné na vnějším povrchu. Hmotnost baňky po doplnění je  $m_3$ .

Kov	Forma	Rozpouštědlo	Diluent
Ag	Ag	HNO <sub>3</sub> (konc.)	HNO <sub>3</sub> (1 + 20)
Cr	Cr	HNO <sub>3</sub> (1 + 1)	HNO <sub>3</sub> (1 + 20)
Cu	Cu	HNO <sub>3</sub> (1 + 1)	HNO <sub>3</sub> (1 + 20)
Ni	Ni	HNO <sub>3</sub> (1 + 1)	HNO <sub>3</sub> (1 + 20)
Pb	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	HNO <sub>3</sub> (1 + 20)	HNO <sub>3</sub> (1 + 20)
Pt	Pt	lučavka král. (konc.)	HCl (1 + 5)
Sn	Sn	HCl (1 + 1)	HCl (1 + 10)
Tl	Tl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	HNO <sub>3</sub> (1 + 1)	HNO <sub>3</sub> (1 + 20)
Zn	ZnO	HNO <sub>3</sub> (1 + 1)	HNO <sub>3</sub> (1 + 20)

Výpočet hmotnostního zlomku izotopového preparátu v základním roztoku se provede podle vztahu:

$$w_{ISO,zá\ kl} = \frac{m_1}{(m_3 - m_2) \cdot f_{vztlak}} \cdot f_{kov/sloučenina}$$

Hodnota korekčního faktoru na vztlak vzduchu  $f_{vztlak}$  je 1,00106.

Stabilita tohoto roztoku je při uchovávání v ledničce alespoň pět let.

Nejistota hmotnostního zlomku je daná především nejistotou hmotnosti  $m_1$ :

$$u(w_{ISO,zá\ kl}) = w_{ISO,zá\ kl} \cdot u(m_1) / m_1$$

### **Příprava pracovního roztoku**

Suchá a čistá 100 ml odměrná baňka se zváží (hmotnost  $m_1$ ) i se zátkou. Do baňky se odpipetuje přibližně 20 ml diluentu a baňka se uzavře. Po několika minutách, kdy je atmosféra uvnitř baňky plná nasycených par diluentu se baňka opět zváží (hmotnost  $m_2$ ) a ponechá se stát na míse vah. Opatrně se vyjme zátka a do baňky se rychle pneumatickým dávkovačem přidá požadované množství (2,5 ml pro roztok zinku, 1 ml pro ostatní kovy) základního roztoku. Baňka se uzavře a odečte se její hmotnost ( $m_3$ ). Poté se baňka doplní diluentem po rysku a znovu zváží (hmotnost  $m_4$ ).

Výpočet hmotnostního zlomku  $w_{ISO}$  v tomto roztoku se provede podle vztahu:

$$w_{ISO} = \frac{m_3 - m_2}{m_4 - m_1} \cdot w_{ISO,zá\ kl}$$

Stabilita tohoto roztoku je při uchovávání v ledničce alespoň šest měsíců.

Nejistota hmotnostního zlomku je i při tomto stupni ředění a pečlivém provedení všeho vážení daná především nejistotou hmotnostního zlomku  $w_{ISO,zákl}$ :

$$u(w_{ISO}) = w_{ISO} \cdot u(w_{ISO,zá\ kl}) / w_{ISO,zá\ kl}$$

### **6.3 Hlavní zásady měření izotopově zředovací metodou**

Pracovní rozsah pro metodu izotopového zředování je velice flexibilní a dá se rozšiřovat volbou hmotnosti vzorku a hmotnosti a koncentrace přídavku roztoku izotopově obohaceného standardu, které mají primární vliv na velikost měřeného izotopového poměru a tím ale i na nejistotu výsledků. Při jejich volbě je nutno vzít do úvahy tato kritéria:

- maximální hmotnost vzorku, kterou lze bezpečně rozložit v mikrovlnném rozkladném zařízení je 0,5 - 1,0 g sušiny podle typu materiálu.
- příliš malá navážka vzorku není vhodná pro nehomogenní materiály.
- navážka pracovního roztoku izotopově obohaceného materiálu menší než 50 mg vede ke zvýšení nejistoty výsledků.
- konečná koncentrace analytu v měření roztoku by měla být dostatečně vysoká, aby se omezil vliv kontaminací během celé procedury.
- měřený izotopový poměr by měl být pokud možno blízký jedničce.
- intenzity všech izotopů by se měly při stejném režimu detektoru. Eliminují se tím chyby způsobené špatným sladěním kalibrací obou režimů (analogový a pulsní).
- navážky vzorku i přídavku pracovního roztoku izotopově obohaceného materiálu ovlivňují citlivost stanovení. Platí, že tím menší je navážka pracovního roztoku izotopově obohaceného materiálu, tím větší je citlivost. Navážka vzorku má opačný vliv.
- navážky vzorku i přídavku pracovního roztoku izotopově obohaceného materiálu ovlivňují vliv ostatních složek nejistot na kombinovanou nejistotu výsledku.

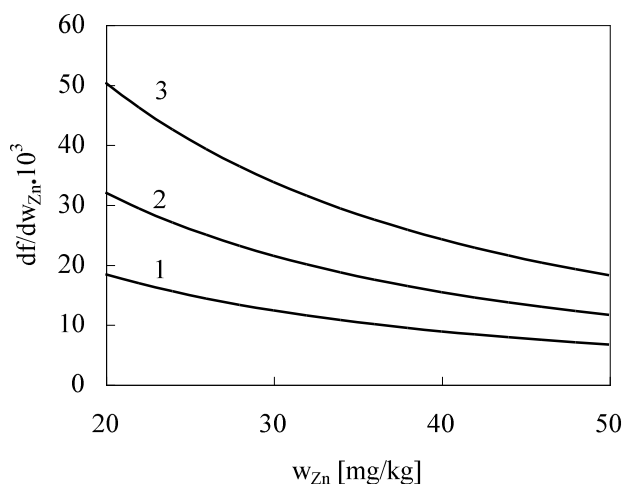
Citlivost stanovení (citlivost je v případě ID-MS definována jako změna poměru izotopů vyvolaná změnou obsahu analytu ve vzorku  $dI/dw$ ) je kromě výše diskutovaných parametrů ovlivněna volbou měrného a referentního izotopu. Čím větší je zastoupení měrného izotopu ve vzorku a zároveň čím větší je zastoupení referentního izotopu v izotopově obohaceném standardu, tím větší bude i citlivost stanovení. Volba referentního izotopu však kromě požadavku na citlivost bude v řadě případů ovlivněna i cenou izotopově obohaceného materiálu. Tak např. cena izotopu  $^{62}\text{Ni}$  (přírodní zastoupení 3,63 %, obohaceno na 98 %) je zhruba 20 USD za 1 mg, zatímco cena izotopu  $^{61}\text{Ni}$  (přírodní zastoupení 1,14 %, obohaceno na 99 %) je přibližně 70 USD za 1 mg. Citlivost stanovení lze však podstatně zvýšit tím, že místo prostého poměru dvou izotopů se měří poměr dvou skupin izotopů, příklady mohou být poměry  $(^{206}\text{Pb} + ^{207}\text{Pb} + ^{208}\text{Pb})/^{204}\text{Pb}$ ,  $(^{58}\text{Ni} + ^{60}\text{Ni} + ^{62}\text{Ni})/^{62}\text{Ni}$ ,  $(^{206}\text{Pb} + ^{207}\text{Pb} + ^{208}\text{Pb})/^{204}\text{Pb}$ ,  $(^{64}\text{Zn} + ^{66}\text{Zn})/^{68}\text{Zn}$  a  $(^{194}\text{Pt} + ^{195}\text{Pt} + ^{196}\text{Pt})/^{198}\text{Pt}$ . Kromě zvýšení citlivosti má měření signálu skupiny izotopů vliv i na kombinovanou nejistotu výsledku analýzy. Tento vliv je způsoben jednak již diskutovaným zvýšením citlivosti, dále zvýšením přesnosti měření (v důsledku negativní korelace mezi signály jednotlivých izotopů uvnitř skupiny bude měření signálu odpovídající sumě izotopů přesnější) a částečně i snížením relativní nejistoty zastoupení sumy izotopů vůči nejistotě zastoupení jednotlivých izotopů.

Při přípravě vlastního měřicího programu pro izotopové zředování, optimalizaci nastavení parametrů hmotnostního spektrometru a vlastním měření je nutno vycházet z pokynů obsažených v manuálu přístroje. Hmotnostní kalibraci spektrometru (Tuning) je vhodné provést tak, aby zahrnovala všechny měřené izotopy analytu a izotopy rušících prvků použité pro automatickou matematickou korekci. Stabilitu kalibrace postačuje kontrolovat jednou za rok. Optimalizaci těchto parametrů, které nemají přímý vliv na hodnotu měřeného izotopového poměru (příkon do plasmatu, napětí na iontové optice, průtok argonu zmlžovačem) se provádí pomocí roztoku obsahující sledovaný analyt. Optimalizačním kritériem je maximální hodnota signálu izotopu s nejvyšším výskytem. Optimalizace příkonu do plasmatu se provádí jednou za rok. Optimalizace zbývajících dvou parametrů se provádí denně s každou dávkou měřených vzorků. Optimalizace parametrů, které mají přímý vliv na hodnotu měřeného izotopového poměru se provádí pomocí roztoku analytu se známým teoretickým izotopovým složením (volba tohoto roztoku viz dále). Mezi tyto parametry patří odstup stejnosměrné a střídavé složky napětí na tyčích kvadrupólového hmotnostního filtru (AC rod offset), režim odečtu signálu (odečet na vrcholu hmotnostního píku nebo skanování profilu hmotnostního píku) a časový režim odečtu signálu (hodnoty doby odečtu signálu). Optimalizačním kritériem je shoda naměřeného izotopového poměru s teoretickou hodnotou (minimální hmotnostní diskriminace). Optimalizace se provádí během vývoje metody a ověřuje se vždy tehdy, jestliže korekční faktor na hmotnostní diskriminaci vybočí z rozsahu 0,95 - 1,05.

V případě, že přírodní izotopové složení analytu a složení izotopově obohaceného materiálu umožňuje několik variant měření izotopových poměrů, volí se ten který vede k vyšší citlivosti měření. Výhodné je měření poměrů skupin izotopů, které z důvodů vysoké negativní korelace mezi měřenými hodnotami signálů jednotlivých izotopů vede ke zvýšení přesnosti měřeného signálu skupiny izotopů. Z podobného důvodu je i nejistota zastoupení skupiny izotopů menší než nejistota zastoupení jednotlivých izotopů. Pouze v případě, že některé izotopy jsou rušeny obtížně odstranitelnou interferencí, je výhodnější volit k měření izotopy vedoucí k nižší citlivosti měření. Ilustrativním příkladem volby izotopů k měření je stanovení

zinku. Zastoupení jednotlivých izotopů v přírodním zinku a izotopově obohaceném materiálu je uveden v následující tabulce. Z ní vyplývá možnost měření poměrů  $^{64}\text{Zn}/^{68}\text{Zn}$ ,  $^{66}\text{Zn}/^{68}\text{Zn}$  nebo  $(^{64}\text{Zn}+^{66}\text{Zn})/^{68}\text{Zn}$ . Z obrázku 6 vyplývá, že poslední možnost vede k nejvyšší citlivosti měření.

Izotop	Přírodní zinek	Izotopově obohacený materiál
64	$48,63 \pm 0,60$ % mol/mol	$0,12 \pm 0,01$ % mol/mol
66	$27,90 \pm 0,27$ % mol/mol	$0,11 \pm 0,01$ % mol/mol
67	$4,10 \pm 0,13$ % mol/mol	$0,05 \pm 0,01$ % mol/mol
68	$18,75 \pm 0,51$ % mol/mol	$99,71 \pm 0,02$ % mol/mol
70	$0,62 \pm 0,03$ % mol/mol	$0,01 \pm 0,005$ % mol/mol



Obrázek 6: Citlivost stanovení při různých volbách měřených izotopových poměrů. 1 -  $^{64}\text{Zn}/^{68}\text{Zn}$ , 2 -  $^{66}\text{Zn}/^{68}\text{Zn}$ , 3 -  $(^{64}\text{Zn}+^{66}\text{Zn})/^{68}\text{Zn}$ .

Izotopový poměr naměřený hmotnostním spektrometrem s kvadrupólovým filtrem, který má nízkou rozlišovací schopnost, nemusí být vždy správný, hovoříme o tzv. hmotnostní diskriminaci. Opravný faktor se získá měřením kontrolního roztoku obsahující izotopy analytu ve známém poměru. Koncentrace analytu v tomto roztoku by měla odpovídat přibližně měřeným vzorkům. Hodnota opravného faktoru na hmotnostní diskriminaci, kterou se násobí všechny naměřené izotopové poměry neznámých vzorků, se vypočte vydělením naměřené a teoretické hodnoty izotopových poměrů pro tento roztok. Protože hmotnostní diskriminace kolísá v průběhu měření, je nutné měření kontrolního vzorku zařazovat za každý druhý neznámý vzorek. Hodnota teoretického izotopového složení kontrolního roztoku nemusí zcela přesně odpovídat měřeným izotopovým poměrům neznámých vzorků, hmotnostní diskriminace je totiž konstantní v poměrně širokém rozmezí izotopových poměrů (minimálně v rozmezí 0,2 - 5,0). Je však výhodné, je-li tento roztok tvořen pouze jednou složkou, tedy pouze analytem s přírodním zastoupením izotopů nebo izotopově obohaceným materiálem. Pouze v případě, kdy izotopový poměr jak

přírodního analytu, tak izotopově obohaceného materiálu vybočuje z rozmezí 0,2 - 5,0, je nutné připravit kontrolní vzorek vážením obou těchto složek.

#### 6.4 Odhad nejistot

Obvyklý výpočet nejistoty kombinované z několika složek vychází ze zákona o šíření chyb, pro výpočet kombinované nejistoty  $u$  veličiny  $y$ , která je funkcí více proměnných  $x_i$  platí:

$$u(y(x_1, x_2, \dots, x_n)) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left( \frac{\partial y}{\partial x_i} \cdot u(x_i) \right)^2 + \sum_{i,j=1}^n \left( \frac{\partial y}{\partial x_i} \cdot \frac{\partial y}{\partial x_j} \cdot s(x_i, x_j) \right)} \quad (27)$$

kde  $u(x_i)$  jsou standardní nejistoty jednotlivých proměnných a  $s(x_i, x_j)$  jsou kovariance. Přímé použití tohoto vztahu sice principiálně nezpůsobuje potíže, avšak i v případě zanedbání kovariačních členů může vést při aplikaci na izotopové zředování k poměrně složitým výrazům. Tyto problémy je možno velice snadno obejít počítačovou simulací metodou Monte Carlo. Protože tato simulace je velmi rychlá a dovoluje snadno měnit celé kombinace hodnot jednotlivých parametrů, je vhodná nejenom k výpočtu samotné nejistoty, ale i k optimalizaci měřicích metod. Odhad kombinované nejistoty veličiny  $y$  simulací Monte Carlo je založen na mnohonásobném opakování výpočtu hodnoty této veličiny  $y$  ze vstupních veličin  $x_i$  podle daného funkčního vztahu. Za jednotlivé veličiny  $x_i$  se dosazují hodnoty skládající se ze dvou členů: konstantního členu odpovídající střední hodnotě a náhodného členu odpovídajícímu chybě dané veličiny. Náhodný člen se získá vynásobením náhodného čísla  $e$  s normálním rozdělením  $N(0,1)$  a standardní nejistoty  $u(x_i)$ . Hodnoty standardních nejistot musí ovšem být získány experimentálně.

Složky nejistot, které se uplatňují při výpočtu kombinované nejistoty hmotnostního zlomku analytu jsou sumarizovány v níže uvedené tabulce společně i s postupy odhadu jejich velikosti.

Nejistota spojená s měřením izotopového poměru se určí opakovaným měřením několika roztoků připravených smícháním roztoků obsahující analyt s přírodním izotopovým složením a dále roztoku izotopově obohaceného standardu, které svým konečným izotopovým složením pokrývají celý pracovní rozsah. Opakovatelnost měření izotopového poměru je obvykle v celém pracovní rozsahu konstantní. Celková hodnota opakovatelnosti se proto vypočte jako residuální směrodatná odchylka  $s_e$ . Měření každého vzorku se však skládá z měření samotného vzorku a z měření kontrolního roztoku pro stanovení korekce na hmotnostní diskriminaci. Proto se standardní nejistota měřeného izotopového poměru přibližně odhadne jako  $\sqrt{2} \cdot s_e$ .

Nejistota vážení pracovního roztoku izotopově obohaceného materiálu je poněkud vyšší ( $u(w_{ISO}) = 0,1$  mg) než nejistota vážení pevného vzorku ( $u(w_s) = 0,05$  mg) vzhledem k možnému odpařování roztoku během vážení.

Izotopové složení a čistota izotopově obohaceného standardu jsou obvykle výrobcem preparátu stanoveny s malou nejistotou a tak tvoří zanedbatelný příspěvek ke kombinované nejistotě. Přírodní izotopové složení některých prvků však může významně kolísat od lokality k lokalitě a průměrné hodnoty udávané v různých tabulkách jsou zatíženy značnou nejistotou. Jedná se např. o olovo, jehož různé izotopy jsou konečným článkem radioaktivních rozpadových řad, a o zinek. Tuto složku nejistoty by bylo možné eliminovat stanovením přesného izotopového složení každého konkrétního vzorku, to je však na přístrojích ICP-MS nemožné.

Nejistotu složení roztoku izotopově obohaceného standardu lze podstatně snížit tím, že všechny operace odměřování objemu během jeho přípravy se nahradí



vážením. Výsledný hmotnostní zlomek je určen s nižší nejistotou než hmotnostní koncentrace a je i teplotně nezávislý. Takto připravený roztok se do vzorku neodměřuje, ale odvažuje, což vede k dalšímu snížení kombinované nejistoty konečného výsledku.

#### Přehled složek nejistot při analýze metodou ID-MS

Složka nejistoty	Způsob odhadu	Zahrnutí do opakovatelnosti
$A_{1N}$	výpočet z *	ne
$A_{2N}$	výpočet z *	ne
$A_{1ISO}$	výpočet z dat výrobce	ne
$A_{2ISO}$	výpočet z dat výrobce	ne
$m_s$	experimentálně opakovaným vážením	ano
$m_{ISO}$	experimentálně opakovaným vážením	ano
$w_{ISO}$	výpočetem z nejistot vážení při přípravě roztoku	ne
$f$	experimentálně měřením roztoků s různým isotopovým složením	ano
nehomogenita vzorku	?	ano
rozklad vzorku	nulový příspěvek za předpokladu, že rozklad je totální a přídavek isotopově obohaceného standardu je přidán před rozkladem	
kontaminace	experimentálně analýzou slepých pokusů	ano

\*např. IUPAC: *Pure Appl. Chem.*, 70, 217, 1998.

Při slučování složek nejistoty do skupin je nutné vzít do úvahy to, zda se tyto složky zapojují do opakovatelnosti analýzy. Možné dělení je např. toto: složky neobsažené v opakovatelnosti  $u_{non-rep}(w)$ , složky obsažené v opakovatelnosti s výjimkou kontaminace  $u_{rep}(w)$  a nejistota způsobená variabilitou kontaminace  $u_{cont}(w)$ . Velikosti nejistot prvních dvou skupin lze odhadnout pomocí Monte-Carlo simulací za použití experimentálních dat, velikost poslední složky se odhadne z analýz slepých pokusů.

Kombinovaná hodnota hmotnostního zlomku analytu ve vzorku získaného jako průměr z  $n$  stanovení se vypočte podle vztahu:

$$u_c(w) = \sqrt{u_{non-rep}^2(w) + u_{rep}^2(w)/n + u_{cont}^2(w)/n} \quad (28)$$

Jiný způsob výpočtu kombinované nejistoty vychází přímo z experimentální hodnoty směrodatné odchylky opakovatelnosti  $s_{rep}(w)$ :

$$u_c(w) = \sqrt{u_{non-rep}^2(w) + s_{rep}^2(w)/n} \quad (29)$$

Použití tohoto výpočtu je výhodné zejména tehdy, jestliže se do opakovatelnosti se promítnou i vlivy nezahrnuté do předchozího modelu. Jedná se zejména o vliv nehomogenity vzorku.

### **6.5 Nejlepší kalibrační schopnost (CMC)**

Za ideální případ se považuje analýza čistého roztoku analytu, kdy odpadá nutnost rozkladu vzorku a separace rušících složek. Je-li v ideálním případě známo isotopové složení vzorku i isotopově obohaceného materiálu se zanedbatelnou nejistotou, je nejlepší měřicí schopnost ovlivněna především opakovatelností měření isotopových poměrů (v ideálním případě  $s_r(f) = 0,2 \%$ ) a nejistotou hmotnostního zlomku pracovního roztoku isotopově obohaceného standardu ( $u_r(w_{ISO}) = 0,1 \%$ ). Kombinací těchto dvou složek nejistot se získá hodnota relativní nejistoty výsledku přibližně  $0,25 \%$ , což odpovídá nejlepší kalibrační schopnosti, CMC (relativní rozšířené nejistotě)  $0,5 \%$ .

## **Příloha II**

### **Přehled legislativy**

## **PŘEHLED PRÁVNÍCH PŘEDPISŮ VZTAHUJÍCÍCH SE K PROBLEMATICE MĚŘENÍ REZIDUÍ PESTICIDŮ A PAU**

### **A. Legislativní úprava požadavků na rezidua pesticidů a na metody jejich stanovení**

Mezi pesticidy se řadí několik zcela různých skupin látek s velmi odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Protože se jedná o látky záměrně vyráběné a cíleně používané, musí být před uvedením na trh podrobeny poměrně přísnému registračnímu řízení jehož podmínkou je rovněž dokumentování metod stanovení účinné látky v přípravku a jejích reziduí v plodinách na které je schvalován. Podmínky včetně základních zásad Správné laboratorní praxe při testování přípravků uvádí Vyhláška č. 329/2004 Sb. o přípravcích a dalších prostředcích na ochranu rostlin.

Pro sledování reziduí pesticidů v plodinách, potravinách a vodách se však v praxi používají tzv. multidetekční metody, které jsou schopny v jediném analytickém procesu identifikovat a stanovit větší počet pesticidních látek (potenciálně 80 až 200) pro které jsou legislativně předepsány limitní hodnoty nazvané jako Maximální Limity Reziduí (MLR). Upravit legislativně MLR pro velký počet pesticidů v různých maticích je poměrně náročné. Na mezinárodní úrovni jsou přijímány MLR, které slouží jako doporučené ale vzhledem k různým podmínkám jednotlivých zemí se mohou konkrétní hodnoty v jednotlivých zemích – dokonce i v rámci zemí EU - poněkud lišit (nesmí tím ovšem být nikterak narušen princip volného pohybu zboží v jednotném evropském prostoru).

Nelze opomenout skutečnost, že legislativa v oblasti pesticidů primárně vychází ze stanovisek, doporučení a standardů expertní Komise Codex Alimentarius (CAC) pracující v rámci Světové organizace pro zemědělství a výživu (FAO) ve spolupráci se Světovou zdravotnickou organizací (WHO). CAC pak vydává i četné metodické dokumenty vztahující se ke kvalitě výsledků reziduálních analýz, včetně validace metod, odhadu nejistot apod.

Evropská Komise zatím ponechá jednotlivým členským zemím určitou volnost v přístupech k regulaci reziduí pesticidů a určení národních MRL a do tohoto procesu zasahuje spíše pestrou řadou mnoha dílčích směrnic, z nichž každá řeší zpravidla jen malou část problematiky a často jen doplňuje či mění směrnice předchozí. Harmonizace MRL v rámci EU je proto dost obtížná a nepřiliš transparentní. Formou Nařízení nebo Rozhodnutí Komise jsou regulovány spíše obecné zásady a principy a ani samotné analytické metody nejsou přesněji vymezovány tak, aby nebyl zbytečně „inhibován“ prudký rozvoj moderních technik umožňujících rozšířit počet sledovaných látek, zvýšit spolehlivost identifikace a zvýšit přesnost výsledků při snížení mezí stanovitelnosti.

Klíčovým dokumentem, který vydalo DG SANCO v oblasti analýzy reziduí pesticidů v plodinách a potravinách je Document N° SANCO/10232/2006 podrobně popisující postupy a kritéria pro řízení kvality výsledků a Document N° SANCO/825/00 rev. 7 popisující nároky na analytické metody, včetně metod používaných pro monitoring pesticidů v půdě a vodě.

Jako návod pro zajišťování kvality výsledků a jejich interpretaci lze použít také některé právní předpisy EU, které nebyly explicitně určeny pro stanovení reziduí pesticidů v potravinách rostlinného původu ale obsahují obecné principy a algoritmy, které zde mohou být oprávněně a velmi úspěšně aplikovány. Jde např. o Rozhodnutí

Komise 2002/657/ES, které se formálně vztahuje jen na živočišné produkty (především se jedná o rezidua veterinárních léčiv apod.).

Vzhledem ke skutečnosti, že pro tzv. „moderní pesticidy“ nejsou k dispozici žádné matricové CRM, je extrémně důležitá pravidelná účast laboratoří v mezilaboratorním testování způsobilosti a spolu s tím je také pro úřední laboratoře vytvářena síť evropských a národních referenčních laboratoří jako center excelence.

Celkový přehled legislativních předpisů týkajících se reziduí pesticidů a jejich stanovení je uveden v Příloze 1.

## **Legislativní úprava požadavků na polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) a na metody jejich stanovení**

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) jsou předmětem zájmu regulatorních orgánů jak v oblasti potravin, tak i složek životního prostředí.

V České republice bylo na základě dnes již neplatné prováděcí vyhlášky č. 53/2002 Sb. k Zákonu č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích zavedeno sledování obsahů celkem 9 individuálních látek (PAU) - benzo[*a*]anthracen, benzo[*b*]fluoranthen, benzo[*k*]fluoranthen, chrysen, dibenz[*a,h*]anthracen, benzo[*a*]pyren, indeno[1,2,3-*cd*]pyren, dibenz[*a,i*]pyren, dibenz[*a,h*]pyren. Podle tohoto právního předpisu neměly koncentrační hladiny zmíněných analytů např. v rybách překročit hodnotu tzv. přípustného množství (PM) 0,001 mg.kg<sup>-1</sup>, v kávě, obilí, ovoci, listové zelenině a tucích 2 µg/kg a v masných výrobcích a uzených rybách 0,003 mg.kg<sup>-1</sup>. Přípustné množství bylo stanoveno jednotlivě pro jednotlivé PAU, přičemž celkový obsah (suma) těchto 9 látek nesměla překročit desetinásobek takto uvedených limitů.

Pozdější vyhláškou č. 305/2004 Sb., kterou byly stanoveny druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách, byly už PAU limitovány pouze v jedlých olejích. Bylo stanoveno nejvyšší přípustné množství (NPM) 0,002 mg.kg<sup>-1</sup> pro jednotlivé PAU ((benzo[*a*]anthracen, benzo[*b*]fluoranthen, benzo[*k*]fluoranthen, chrysen, dibenzo[*a,h*]anthracen, benzo[*a*]pyren, indeno[1,2,3-*c,d*]pyren, dibenzo[*a,i*]pyren, dibenzo[*a,h*]pyren) a zároveň celkový obsah vyjmenovaných látek v potravině nesměl překročit desetinásobek NPM (tedy 0,02 mg.kg<sup>-1</sup> jako suma PAU).

V době vstupu České republiky do Evropské unie nebyla pro PAU stanovena evropskou legislativou prakticky žádná omezení a proto byla na území ČR nadále aplikována pouze vyhláška č. 305/2004 Sb.

Dne 4. února 2005 bylo vydáno Nařízení Komise Evropského společenství č. 208/2005/ES, kterým se mění nařízení Komise č. 466/2001/ES, pokud jde o polycyklické aromatické uhlovodíky a stanoví maximální limity benzo[*a*]pyrenu ve vybraných potravinách (viz Tabulka).

Ke stejnému datu (4. února 2005) vydala Komise Evropských společenství také Doporučení o dalším zjišťování obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků v některých potravinách. K vydání tohoto doporučení vedla přetrvávající pochybnosti týkající se metodik zjišťování obsahu karcinogenních PAU v potravinách, dále potřeba potvrdit, zda je nadále vhodné používat benzo[*a*]pyren jako indikátor výskytu a účinku karcinogenních PAU a také potřeba dále sledovat vliv výrobních a zpracovatelských metod potravin na vznik PAU.

Současně s tím byla vydána Směrnice Komise 2005/10/ES, která v Příloze II velice podrobně specifikuje klíčové požadavky na metody analýzy benzo[*a*]pyrenu. Pro úřední kontrolu potravin jsou zde dokonce stanoveny maximální hodnoty limitu

detekce ( $0,0003 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) a meze stanovitelnosti ( $0,0009 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), dále výtěžnosti (50 – 120 %) aj. Maximální ještě přijatelná standardní nejistota výsledku nesmí překročit hodnotu vypočtenou z detekčního limitu použité metody a aktuálně naměřené koncentrace benzo[a]pyrenu na základě vztahu uvedeného přímo ve Směrnici.

Tabulka: Maximální limity pro benzo[a]pyren v určitých potravinách (např. 208/2005/ES)

<b>Produkt</b>	<b>Maximální limit (<math>\mu\text{g/kg}</math> čerstvé hmotnosti)</b>
oleje a tuky určené pro přímou lidskou spotřebu nebo k použití jako potravinová složka	2,0
potraviny pro kojence a malé děti	1,0
obilné a ostatní příkrmy pro kojence a malé děti	
počáteční a pokračující kojenecká výživa, včetně počátečního a pokračujícího mléka pro kojence	
dietní potraviny pro zvláštní léčebné účely, určené speciálně pro kojence	
uzeniny a uzené masné výrobky	5,0
libové uzené ryby a uzené produkty rybolovu, s výjimkou mlžů	5,0
neuzené libové ryby	2,0
neuzení korýši a hlavonožci	5,0
mlži	10,0

Pro výběr a validaci metod stanovení PAU v potravinách jsou rovněž velmi cenné oficiální vědecké zprávy, které shrnují problematiku výskytu a hodnocení PAU v potravinách a nevyhnutelně se věnují rovněž analytickým metodám a jejich vhodnosti pro daný účel. Dva nejvýznamnější dokumenty zpracované v rámci expertních stanovisek pro Evropskou Komisi jsou proto citovány v přehledu legislativních dokumentů (Příloha 1).

Nelze opomenout také oblast životního prostředí, kde limitní hodnoty pro PAU byly stanoveny jak pro povrchové a pitné vody tak i pro odpady. PAU patří také k významným ukazatelům kvality venkovního ovzduší.

## **Seznam právních předpisů, které se vztahují k problematice měření reziduí pesticidů a PAU**

### **A. Pesticidy**

#### **I. Národní legislativa** (vyhlášky citovány bez odkazu na příslušný zákon)

1. Vyhláška č. 158/2004 Sb., kterou se stanoví maximálně přípustné množství reziduí jednotlivých druhů pesticidů v potravinách a potravinových surovinách.
2. Vyhláška č. 68/2005 Sb., kterou se mění vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 158/2004 Sb., kterou se stanoví maximálně přípustné množství reziduí jednotlivých druhů pesticidů v potravinách a potravinových surovinách.
3. Vyhláška č. 400/2006 Sb. kterou se mění vyhláška č. 158/2004 Sb., kterou se stanoví maximálně přípustné množství reziduí jednotlivých druhů pesticidů v potravinách a potravinových surovinách, ve znění vyhlášky č. 68/2005 Sb.
4. Vyhláška č. 54/2004 Sb. o potravinách pro zvláštní výživu a způsobu jejich použití.
5. *Vyhláška č. 329/2004 Sb. o přípravcích a dalších prostředcích na ochranu rostlin<sup>1</sup>.*
6. *Vyhláška č. 371/2006 Sb., kterou se mění vyhláška č. 329/2004 Sb., o přípravcích a dalších prostředcích na ochranu rostlin<sup>1</sup>.*
7. *Nářízení vlády č. 61/2003 Sb. o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových a odpadních vod.<sup>1</sup>*
8. *Vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody<sup>1</sup>.*

#### **II. Evropské a mezinárodní dokumenty**

##### **Směrnice Komise**

##### Nové – r. 2006, dosud nezahrnuté v platné národní vyhláškách (I.)

1. Směrnice Komise 2006/30/ES z dne 13. března 2006, kterou se mění přílohy směrnic Rady 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS, pokud jde o maximální limity reziduí skupiny látky benomyl
2. Směrnice Komise 2006/53/ES ze dne 7. června 2006, kterou se mění směrnice Rady 90/642/EHS, pokud jde o maximální limity reziduí fenbutatinoxidu, fenhexamidu, kyazofamidu, linuronu, triadimefonu/triadimenolu, pymetrozinu a pyraklostrobinu stanovené v uvedené směrnici
3. Směrnice Komise 2006/59/ES ze dne 28. června 2006, kterou se mění přílohy směrnic Rady 76/895/EHS, 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS, pokud

---

<sup>1</sup> netýká se přímo analýzy reziduí pesticidů v potravinách

jde o maximální limity reziduí u karbaryl, deltamethrin, endosulfan, fenitrothion, methidathion a oxamyl

4. Směrnice Komise 2006/60/ES ze dne 7. července 2006, kterou se mění přílohy směrnice Rady 90/642/EHS, pokud jde o maximální limity reziduí u trifloxystrobinu, thiabendazolu, abamektinu, benomylu, karbendazimu, thiofanát-methylu, myklobutanyle, glyfosfátu, trimethylsulfonia, fenpropimorfu a chlormekvatu
5. Směrnice Komise 2006/61/ES ze dne 7. července 2006, kterou se mění přílohy směrnic Rady 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS, pokud jde o maximální limity reziduí u atrazinu, anzifos-ethylu, cyfluthrinu, ethefonu, fenthionu, methamidofosu, methomylu, parakvatu a triazofosu
6. Směrnice Komise 2006/62/ES ze dne 12. července 2006, kterou se mění přílohy směrnic Rady 76/895/EHS, 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS, pokud jde o maximální limity reziduí látek desmedifam, fenmedifam a chlorfenvinfos
7. Směrnice Komise 2006/64/ES ze dne 18. července 2006, kterou se mění směrnice Rady 91/414/EHS za účelem zařazení účinných látek klopyralidu, cyprodinilu, fosetylu a trinexapaku

#### Již implementované v národních vyhláškách (I.)

1. Směrnice Rady 76/895/EHS ze dne 23. listopadu 1976 týkající se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v ovoci a zelenině a na nich.
2. Směrnice Komise 80/428/EHS ze dne 28. března 1980, kterou se mění příloha II ke směrnici Rady 76/895/EHS týkající se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v ovoci a zelenině a na nich.
3. Směrnice Rady 81/36/EHS ze dne 9. února 1981, kterou se mění příloha II ke směrnici 76/895/EHS týkající se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v ovoci a zelenině a na nich.
4. Směrnice Rady 82/528/EHS ze dne 19. července 1982, kterou se mění příloha II ke směrnici 76/895/EHS týkající se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v ovoci a zelenině a na nich.
5. Směrnice Rady 86/362/EHS ze dne 24. července týkající se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v obilninách a na nich.
6. Směrnice Rady 86/363/EHS týkající se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v potravinách živočišného původu a na nich.
7. Směrnice Rady 90/642/EHS týkající se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v určitých produktech rostlinného původu a na nich včetně ovoce a zeleniny.
8. Směrnice Rady 88/298/EHS ze dne 16. května 1988, kterou se mění příloha II ke směrnicím 76/895/EHS a 86/362/EHS týkajícím se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v ovoci a zelenině a na nich a v obilninách.
9. Směrnice Rady 89/186/EHS ze dne 6. března 1989, kterou se mění příloha II ke směrnicím 76/895/EHS týkajícím se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v ovoci a zelenině a na nich.



10. Směrnice Rady 91/414/EHS ze dne 15. července 1991 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh.
11. Směrnice Rady 93/57/EHS ze dne 29. června 1993, kterou se mění přílohy ke směrnicím 86/362/EHS a 86/363/EHS týkajícím se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v obilninách a na nich a v potravinách živočišného původu a na nich.
12. Směrnice Rady 93/58/EHS ze dne 29. června 1993, kterou se mění příloha II ke směrnici 76/895/EHS týkající se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v ovoci a zelenině a na nich a příloha ke směrnici 90/642/EHS týkající se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v určitých produktech rostlinného původu a na nich, včetně ovoce a zeleniny, a kterou se stanoví první seznam maximálních limitů.
13. Směrnice Rady 94/29/EHS ze dne 23. června 1994, kterou se mění přílohy ke směrnicím 83/362/EHS a 86/363/EHS týkajícím se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v obilninách a na nich a v potravinách živočišného původu a na nich.
14. Směrnice Rady 94/30/EHS ze dne 23. června 1994, kterou se mění příloha ke směrnici 90/642/EHS týkající se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v určitých produktech rostlinného původu a na nich, včetně ovoce a zeleniny, a kterou se stanoví seznam maximálních limitů.
15. Směrnice Rady 95/38/ES ze dne 17. července 1995, kterou se mění přílohy I a II ke směrnici 90/642/EHS týkající se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v určitých produktech rostlinného původu a na nich, včetně ovoce a zeleniny, a kterou se stanoví seznam maximálních limitů.
16. Směrnice Rady 95/39/ES ze dne 17. července 1995, kterou se mění přílohy ke směrnicím 86/362/EHS a 86/363/EHS týkajícím se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v obilninách a na nich a v potravinách živočišného původu a na nich.
17. Směrnice Rady 95/61/ES ze dne 29. listopadu 1995, kterou se mění příloha ke směrnici 90/642/EHS týkající se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v určitých produktech rostlinného původu a na nich, včetně ovoce a zeleniny.
18. Směrnice Rady 96/23/ES ze dne 29. dubna 1996 o kontrolních opatřeních u některých látek a jejich reziduí v živých zvířatech a živočišných produktech a o zrušení směrnic 85/358/EHS a 86/469/EHS a rozhodnutí 89/187/EHS a 91/664/EHS
19. Směrnice Rady 96/32/ES ze dne 21. května 1996, kterou se mění příloha II ke směrnici 76/895/EHS týkající se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v ovoci a zelenině a na nich a příloha II ke směrnici 90/642/EHS týkající se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v určitých produktech rostlinného původu a na nich, včetně ovoce a zeleniny, a kterou se stanoví seznam maximálních limitů.
20. Směrnice Rady 96/33/ES ze dne 21. května 1996, kterou se mění přílohy ke směrnicím 86/362/EHS a 86/363/EHS týkajícím se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v obilninách a na nich a v potravinách živočišného původu a na nich.

21. Směrnice Rady 97/41/ES ze dne 25. června 1997, kterou se mění směrnice 76/895/EHS, 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS týkající se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v ovoci a zelenině, v obilninách, potravinách živočišného původu a v určitých produktech rostlinného původu a na nich, včetně ovoce a zeleniny.
22. Směrnice Komise 97/71/ES ze dne 15. prosince 1997, kterou se mění přílohy ke směrnicím 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS týkajícím se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v obilninách, v potravinách živočišného původu a v určitých produktech rostlinného původu a na nich, včetně ovoce a zeleniny.
23. Směrnice Komise 98/82/ES ze dne 27. října 1998, kterou se mění přílohy ke směrnicím Rady 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS týkajícím se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v obilninách, v potravinách živočišného původu a v určitých produktech rostlinného původu a na nich, včetně ovoce a zeleniny.
24. Směrnice Komise 1999/65/ES ze dne 24. června 1999, kterou se mění směrnice Rady 86/362/EHS a 90/642/EHS týkající se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v obilninách a v určitých produktech rostlinného původu a na nich, včetně ovoce a zeleniny.
25. Směrnice Komise 1999/71/ES ze dne 14. července 1999, kterou se mění přílohy ke směrnicím Rady 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS týkajícím se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v obilninách, v potravinách živočišného původu a v určitých produktech rostlinného původu a na nich, včetně ovoce a zeleniny.
26. Směrnice Komise 2000/24/ES ze dne 28. dubna 2000, kterou se mění přílohy směrnic Rady 76/895/EHS, 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v obilninách, v potravinách živočišného původu a v určitých produktech rostlinného původu, včetně ovoce a zeleniny, a na nich.
27. Směrnice Komise 2000/42/ES ze dne 22. června 2000, kterou se mění přílohy směrnic Rady 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v obilninách, v potravinách živočišného původu a v určitých produktech rostlinného původu, včetně ovoce a zeleniny, a na nich.
28. Směrnice Komise 2000/48/ES ze dne 25. července 2000, kterou se mění přílohy směrnic Rady 86/362/EHS a 90/642/EHS o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v obilninách a v určitých produktech rostlinného původu, včetně ovoce a zeleniny, a na nich.
29. Směrnice Komise 2000/57/ES ze dne 22. září 2000, kterou se mění přílohy směrnic Rady 76/895/EHS a 90/642/EHS o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v ovoci a zelenině a v určitých produktech rostlinného původu, včetně ovoce a zeleniny, a na nich.
30. Směrnice Komise 2000/58/ES ze dne 22. září 2000, kterou se mění přílohy směrnic Rady 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v obilninách, v potravinách živočišného

- původu a v určitých produktech rostlinného původu, včetně ovoce a zeleniny, a na nich.
31. Směrnice Komise 2000/81/ES ze dne 18. prosince 2000, kterou se mění přílohy směrnic Rady 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v obilninách, v potravinách živočišného původu a v určitých produktech rostlinného původu, včetně ovoce a zeleniny, a na nich.
  32. Směrnice Komise 2000/82/ES ze dne 20. prosince 2000, kterou se mění přílohy směrnic Rady 76/895/EHS, 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v ovoci a zelenině, v obilninách, v potravinách živočišného původu a v určitých produktech rostlinného původu, včetně ovoce a zeleniny, a na nich.
  33. Směrnice Komise 2001/35/ES ze dne 11. května 2001, kterou se mění přílohy směrnice Rady 90/642/EHS o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v určitých produktech rostlinného původu a na nich, včetně ovoce a zeleniny.
  34. Směrnice Komise 2001/39/ES ze dne 23. května 2001, kterou se mění přílohy směrnic Rady 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v obilninách, v potravinách živočišného původu a v určitých produktech rostlinného původu a na nich, včetně ovoce a zeleniny, a na nich.
  35. Směrnice Komise 2001/48/ES ze dne 28. června 2001, kterou se mění přílohy směrnic Rady 86/362/EHS a 90/642/EHS o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v obilninách a na nich a v určitých produktech rostlinného původu a na nich, včetně ovoce a zeleniny, a na nich.
  36. Směrnice Komise 2001/57/ES ze dne 25. července 2001, kterou se mění přílohy směrnic Rady 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v obilninách a na nich, v potravinách živočišného původu a v určitých produktech rostlinného původu a na nich, včetně ovoce a zeleniny, a na nich. Směrnice Komise 2002/5/ES ze dne 30. ledna 2002, kterou se mění příloha II směrnice Rady 90/642/EHS o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v určitých produktech rostlinného původu a na nich, včetně ovoce a zeleniny, a na nich.
  37. Směrnice Komise 2002/23/ES ze dne 26. února 2002, kterou se mění přílohy směrnic Rady 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v obilninách a na nich, v potravinách živočišného původu a v určitých produktech rostlinného původu a na nich, včetně ovoce a zeleniny, a na nich.
  38. Směrnice Komise 2002/42/ES ze dne 17. května 2002, kterou se mění přílohy směrnic Rady 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v obilninách a na nich, v potravinách živočišného původu a v určitých produktech rostlinného původu a na nich, včetně ovoce a zeleniny, a na nich.
  39. Směrnice Komise 2002/66/ES ze dne 16. července 2002, kterou se mění přílohy směrnic Rady 76/895/EHS, 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v ovoci a zelenině, v obilninách,

- v potravinách živočišného původu a v určitých produktech rostlinného původu a na nich, včetně ovoce a zeleniny, a na jejich povrchu.
40. Směrnice Komise 2002/71/ES ze dne 19. srpna 2002, kterou se mění přílohy směrnic Rady 76/895/EHS, 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů (formothionu, dimethoatu, oxydeme-thon.methylu) v ovoci a zelenině, v obilninách, v potravinách živočišného původu a v určitých produktech rostlinného původu a na nich, včetně ovoce a zeleniny, a na jejich povrchu.
  41. Směrnice Komise 2002/76/ES ze dne 6. září 2002, kterou se mění přílohy směrnic Rady 86/362/EHS a 90/642/EHS o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů (metsulfuron-methylu) v obilninách a v určitých produktech rostlinného původu a na nich, včetně ovoce a zeleniny, a na jejich povrchu.
  42. Směrnice Komise 2002/79/ES ze dne 2. října 2002, kterou se mění přílohy směrnic Rady 76/895/EHS, 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v ovoci a zelenině, v obilninách, v potravinách živočišného původu a v určitých produktech rostlinného původu a na nich, včetně ovoce a zeleniny, a na jejich povrchu.
  43. Směrnice Komise 2002/97/ES ze dne 16. prosince 2002, kterou se mění přílohy směrnic Rady 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů (2,4-D, triasulfuronu a thifensulfuron-methylu) v obilninách, v potravinách živočišného původu a v určitých produktech rostlinného původu, včetně ovoce a zeleniny, a na jejich povrchu.
  44. Směrnice Komise 2002/100/ES ze dne 20. prosince 2002, kterou se mění příloha směrnice 90/642/EHS o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů pro azoxystrobin.
  45. Směrnice Komise 2003/13/EC ze dne 10. února 2003, kterou se mění směrnice 96/5/ES o zpracovaných potravinách na bázi obilovin a dětských potravinách pro kojence a malé děti.
  46. Směrnice Komise 2003/14/EC ze dne 10. února 2003, kterou se mění směrnice 91/321/EHS o kojeneckých výživách a pokračovacích výživách.
  47. Směrnice Komise 2003/60/ES ze dne 18. června 2003, kterou se mění přílohy směrnic Rady 76/895/EHS, 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v obilninách a na nich, v potravinách živočišného původu a v určitých produktech rostlinného původu a na nich, včetně ovoce a zeleniny, a na nich.
  48. Směrnice Komise 2003/62/ES ze dne 20. června 2003, kterou se mění přílohy směrnic Rady 86/362/EHS a 90/642/EHS o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů pro hexaconazole, clofentezine, myclobutanyl a prochloraz.
  49. Směrnice Komise 2003/69/ES ze dne 11. července 2003, kterou se mění příloha směrnice Rady 90/642/EHS, pokud jde o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů pro chlormequat, lambda-cyhalothrin, kresoxim-methyl, azoxystrobin a dithiokarbamáty.
  50. Směrnice Komise 2003/113/ES ze dne 3. prosince 2003, kterou se mění přílohy směrnice Rady 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS, pokud jde o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v obilninách, potravinách

živočišného původu a v určitých produktech rostlinného původu včetně ovoce a zeleniny, a na nich.

51. Směrnice Komise 2003/118/ES ze dne 5. prosince 2003, kterou se mění přílohy směrnic Rady 76/895/EHS, 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS, pokud jde o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů pro acephat, 2,4-D a parathion-methyl.
52. Směrnice Komise 2004/2/ES ze dne 9. ledna 2004, kterou se mění přílohy směrnic Rady 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS, pokud jde o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů pro fenamifosou.
53. Směrnice Komise 2004/59/ES ze dne 23. dubna 2004 doplňující směrnici 90/642/EHS týkající se maximálního limitu reziduí pesticidu brompropylatu.
54. Směrnice Komise 2004/61/ES ze dne 26. dubna 2004 doplňující přílohy směrnic Rady 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS týkající se stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů, jejichž použití je v Evropském společenství zakázáno.
55. Směrnice Komise 2004/95/ES ze dne 24. srpna 2004, kterou se mění směrnice Rady 90/642/EHS, pokud jde o maximální limity reziduí pesticidů bifenthrinu a famoxadonu stanovené v uvedené směrnici.
56. Směrnice Komise 2004/115/ES ze dne 15. prosince 2004, kterou se mění směrnice Rady 90/642/EHS, pokud jde o maximální limity reziduí určitých pesticidů stanovené v uvedené směrnici.
57. Směrnice Komise 2005/37/ES ze dne 3. června 2005, kterou se mění směrnice Rady 86/362/EHS a 90/642/EHS o stanovení maximálních limitů reziduí některých pesticidů v obilovinách a některých produktech rostlinného původu, včetně ovoce a zeleniny, a na jejich povrchu.
58. Směrnice Komise 2005/46/ES ze dne 8. července 2005, kterou se mění přílohy směrnic 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS, pokud jde o maximální limity reziduí amitrazu.
59. Směrnice Komise 2005/48/ES ze dne 23. srpna 2005, kterou se mění směrnice Rady 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS, pokud jde o stanovení maximálních limitů reziduí pro některé pesticidy v obilovinách a některých produktech živočišného a rostlinného původu a na jejich povrchu.
60. Směrnice Komise 2005/70/ES ze dne 20. října 2005, kterou se mění směrnice Rady 76/895/EHS, 86/362/EHS, 86/363/EHS a 90/642/EHS, pokud jde o stanovení maximálních limitů reziduí pro některé pesticidy v obilovinách a některých produktech živočišného a rostlinného původu a na jejich povrchu.
61. Směrnice Komise 2005/74/ES ze dne 25. října 2005, kterou se mění směrnice Rady 90/642/EHS, pokud jde o maximální limity reziduí ethofumesátu, lambda-cyhalothrinu, pymetrozinu a thiabendazolu stanovené v uvedené směrnici.
62. Směrnice Komise 2005/76/ES ze dne 8. listopadu 2005, kterou se mění směrnice Rady 90/642/EHS a 86/362/EHS, pokud jde o maximální limity reziduí kresoxim-methylu, cyromazinu, bifenthrinu, metalaxylu a azoxystrobinu stanovené v uvedené směrnici.

63. Směrnice Komise 2006/9/ES ze dne 23. ledna 2006, kterou se mění směrnice Rady 90/642/EHS, pokud jde o maximální limity reziduí diquatů stanovené v uvedené směrnici.
64. Směrnice Komise 2006/4/ES ze dne 26. ledna 2006, kterou se mění přílohy směrnic Rady 86/362/EHS a 90/642/EHS, pokud jde o maximální limity reziduí pro carbofuran."

## **Nařízení ES**

1. Nařízení Komise 645/2000/ES ze dne 28. března 2000, kterým se stanoví prováděcí pravidla nezbytná pro náležité uplatňování některých ustanovení článku 7 směrnice Rady 86/362/EHS a článku 4 směrnice Rady 90/642/EHS o sledování maximálních limitů reziduí pesticidů v obilovinách a v některých produktech rostlinného původu, včetně ovoce a zeleniny, a na jejich povrchu
2. Nařízení Evropského parlamentu a Rady 396/2005/ES ze dne 23. února 2005 o maximálních limitech reziduí pesticidů v potravinách a krmivech rostlinného a živočišného původu a na jejich povrchu a o změně směrnice Rady 91/414/EHS
3. Nařízení Komise 178/2006/ES ze dne 1. února 2006, kterým se mění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005 za účelem vypracování přílohy I, jež obsahuje seznam potravin a krmiv, na něž se vztahují maximální limity reziduí pesticidů.

## **Rozhodnutí Komise**

1. Rozhodnutí Komise 2002/657/ES ze dne 14. srpna 2002, kterým se implementuje směrnice Rady 96/23/ES, pokud jde o provádění analytických metod a interpretaci výsledků.

## **Metodické návody**

1. Quality control procedure for pesticide residues analysis. Document N° SANCO/10232/2006, 24/March/2006  
([http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf))
2. Guidance on residue analytical methods. Document N° SANCO/825/00 rev. 7, 17/March/2004, EC DG Health and Consumer Protection  
([http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/guide\\_doc\\_825-00\\_rev7\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/guide_doc_825-00_rev7_en.pdf))
3. Guidelines on good laboratory practice in residue analysis, CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003 FAO CCPR, Rome, 2003
4. Recommended Method of Sampling for the Determination of Pesticide Residues. CAC/GL 33-1999, Volume 2A, Part 1, Second Edition, Rome, 2000
5. Portion of Commodities to which Codex Maximum Residue Limits Apply and which is analysed. CAC/GL 33-1999, Volume 2A, Part 1, Second Edition, Rome, 2000.
6. Proposed draft guidelines on estimation of uncertainty of results. ALINORM 06/29/06, Appendix IV. FAO/WHO, Rome, 2006

## **B. Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU)**

### **I. Národní legislativa** (vyhlášky citovány bez odkazu na příslušný zákon)

1. Vyhláška č. 305/2004 Sb., kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách.
2. *Vyhláška č. 383/2001 Sb. o podrobnostech nakládání s odpady.*
3. *Nařízení vlády č. 350/2002 Sb., kterým se stanoví imisní limity a způsob sledování, posuzování, hodnocení a řízení kvality ovzduší.*
4. *Nařízení vlády č. 429/2005 Sb., kterou se mění nařízení vlády č. 350/2002 Sb., kterým se stanoví imisní limity a způsob sledování, posuzování, hodnocení a řízení kvality ovzduší ve znění nařízení vlády č. 60/2004 Sb.*
5. *Nařízení vlády č. 61/2003 Sb. o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových a odpadních vod (Příloha č. 3: Imisní standardy ukazatelů přípustného znečištění povrchových vod).*
6. *Vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody.*

### **Směrnice Komise**

1. Směrnice Komise 2005/10/ES ze dne 4. února 2005, kterou se stanoví metody odběru vzorků a metody analýzy pro úřední kontrolu obsahu benzo[a]pyrenu v potravinách.

### **Nařízení ES**

1. Nařízení Komise 208/2005/ES ze dne 4. února 2005, kterým se mění nařízení (ES) č. 466/2001, pokud jde o polycyklické aromatické uhlovodíky.

### **Doporučení ES**

1. Doporučení Komise 2005/108/ES ze dne 4. února 2005 o dalším zjišťování obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků v některých potravinách.

### **Oficiální vědecké zprávy a stanoviska**

1. Report on the collection of occurrence data on polycyclic aromatic hydrocarbons in food (SCOOP Task 3.2.12.), Annex 6: SAMPLING PROCEDURES, METHODS OF ANALYSIS. DG Health and Consumer Protection /Agence française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) Maisons-Alfort (F), 2004. *Dostupné na stránkách* [http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/scoop\\_3-2-12\\_final\\_report\\_pah\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/scoop_3-2-12_final_report_pah_en.pdf)
2. Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food. DG Health and Consumer Protection, SCF/CS/CNTM/PAH/29, Brusel, 2002. *Dostupné na stránkách* [http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/out153\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/out153_en.pdf) a [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out154\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out154_en.pdf) (Annex).



***Technické normy doporučené legislativou***

1. Analytické metody doporučené v příloze 10 Vyhlášky č. 383/2001 Sb. pro hodnocení celkového obsahu PAU v odpadech:

DIN 38 414 – S21, (ii) U.S. EPA Method 8310, (iii) U.S. EPA Method 8270c

**Příloha III**  
**Schéma měřicího postupu pro pesticidy**

1 Úvod.....	60
1.1 Průnik pesticidů do potravin a životního prostředí.....	60
1.2 Toxické účinky na člověka.....	61
1.3 Analýza reziduí pesticidů.....	62
1.4 Odstranění interferujících sloučenin.....	65
1.5 Plynová chromatografie.....	67
1.6 Dvoudimensionální plynová chromatografie.....	72
1.7 Hmotnostní detekce.....	73
2 Metoda stanovení reziduí pesticidů v potravinách.....	76
2.1 Principy metody.....	78
2.2 Použité přístroje a standardní roztoky.....	79
2.3 Příprava standardů.....	80
2.4 Eluční profily.....	80
2.5 Stanovení pracovních charakteristik.....	81
3 Studium nejistoty stanovení reziduí pesticidů v jablkách.....	92
3.1 Vyhodnocení nejistot postupem „zdola nahoru“.....	93
3.2 Měřicí postup „shora dolů“.....	102
3.3 Výpočet rozšířené nejistoty.....	107
3.4 Literatura.....	108

# REZIDUA PESTICIDŮ

## 1 Úvod

### 1.1 Průnik pesticidů do potravin a životního prostředí

Pesticidy se do životního prostředí dostávají řízeně během jejich aplikace, která by měla být v souladu s „Dobrou zemědělskou praxí“ (*Good Agriculture Practice*, GAP), tedy podle schválených pravidel, která zajišťují efektivní a bezpečné použití pesticidních přípravků. Pesticidní přípravky jsou často aplikovány na plochu listů. Cílovým organismem nemusí být rostlina, ale například na ní parazitující plísňe či hmyz. Pesticidy se systémovými účinky penetrují kutikulou listů, odkud jsou transportovány do celé rostliny. Kontaktní pesticidy vykazují účinek jen na místech, kde se nachází jejich povrchový depozit. Pesticidy se mohou aplikovat i přímo do půdy nebo se do ní dostávají během ošetření nadzemních částí rostlin. V tomto případě se předpokládá, že se do půdy dostane 35–50 % použitého přípravku, v závislosti na fenotypu rostliny a hustotě porostu. Systémové sloučeniny jsou přijímány kořenovým systémem rostlin a odtud transportovány do nadzemních částí. Dostupnost pesticidu z půdy závisí na jeho rozpustnosti a obsahu organického uhlíku v půdě.

Skupina pesticidů, které v životním prostředí nepodléhají transformaci vůbec nebo jen omezeně, jsou perzistentní organochlorové uhlovodíky. Jde vesměs o kontaktní insekticidy s neurotoxickými účinky a vyznačují se vysokou lipofilitou a z toho vyplývající schopností akumulace v tukové složce organismů. Tyto vlastnosti spolu s velkou chemickou stabilitou jsou důvodem, proč se rezidua perzistentních organochlorových pesticidů dosud běžně vyskytují v životním prostředí, přestože se v mnoha zemích světa přestaly používat [2]. Nejznámějším příkladem této skupiny látek je DDT (1,1,1,-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan). Vedle DDT se v životním prostředí vyskytují i jeho degradační produkty DDE (1,1,-dichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethylen) a DDD (1,1,-dichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan). Protože technický produkt obsahuje 30 % o,p'-DDT, vyskytují se kromě p,p'-DDE a p,p'-DDD i o,p'-DDE a o,p'-DDD. Za určitých okolností může docházet k oxidaci DDT a tvorbě polárnějšího dicofolu (2,2-bis(4-chlorfenyl)-1,1,1,-trichlor-2-hydroxyethan). Z toxikologického hlediska patří mezi nejvíce rizikové chlorované cyklodieny aldrin a dieldrin. Dieldrin, epoxid aldrinu a účinný insekticid vzniká fotooxidací nebo biotransformací aldrinu. Dalšími v minulosti používanými chlorovanými insekticidy jsou heptachlor, hexachlorbenzen (HCB) a  $\gamma$ -HCH nazývaný také lindan.

V dnešní době se však používají tzv. moderní pesticidy, vyznačující se lepší rozpustností ve vodě a nižšími hodnotami  $K_{OW}$  [3]. V prostředí, kam se moderní pesticidy po aplikaci dostávají existuje mnoho činitelů schopných je transformovat. V první řadě vstupují pesticidy do cílových i necílových organismů, kde mohou podléhat biotransformaci detoxikačními enzymy nebo se kumulovat v určitých částech těchto organismů. Část pesticidů zůstane v půdě, ve vodě nebo v atmosféře, kde mohou být transformovány nebo transportovány. Faktory podílející se na degradaci pesticidů jsou chemické, fyzikální nebo biologické, v životním prostředí však působí všechny najednou a míra jejich vlivu na konkrétní pesticid závisí na jeho chemické struktuře a fyzikálních vlastnostech.

Nejdůležitější fyzikální vlivy podílející se na degradaci pesticidů jsou světlo a teplo. Pesticidy na povrchu listů a půdy podléhají fotolýze nebo reakcím vyvolaným

zářením, případně termodegradaci, která může být rovněž vyvolána slunečním zářením.

Chemická transformace pesticidů probíhá hlavně ve vodě, kde mohou být degradovány vlivem pH, oxidovány kyslíkem a jeho reaktivními formami, jako je ozon, peroxidy a superoxidy nebo naopak redukovány, především díky přítomnosti kovů a jejich iontů.

Bakterie a houby jsou nejdůležitější skupiny organismů, které se podílejí na biotransformaci pesticidů v půdě a ve vodě. Dále se na biodegradaci pesticidů podílejí rostliny, bezobratlí a obratlovci. Obratlovci, především ptáci a savci, mají přímo enzymy schopné degradovat xenobiotika.

Transformace pesticidů v životním prostředí vede ve většině případů k detoxikaci, ale mohou probíhat i reakce vedoucí k produktům se stejnými toxickými účinky pro cílový organismus i člověka. Často zmiňované příklady jsou vznik dicofolu z DDT či aldoxycarbu z aldicarbu.

V některých případech mohou být vznikající sloučeniny ještě toxičtější než mateřská látka. Příkladem je aktivace parathionu (insekticid) spočívající v desulfuraci vedoucí ke vzniku paraoxonu, který je silným inhibitorem acetylcholinesterasy. Dalším případem proinsekticidu je karbosulfan, který je v organismu hmyzu hydrolyzován na karbofuran. Ke vzniku toxických produktů může dojít i během skladování či zpracování kontaminovaných surovin. Degradací fungicidních ethylenbisdithiokarbamátů vzniká mimo jiné ethylenthioamocovina, která je považována za potenciální karcinogen stejně jako *N,N*-dimethylhydrazin vznikající z regulátoru růstu daminozidu. V neposlední řadě je nutné zmínit perzistentní chlorované fenoly vznikající z lindanu, fenoxycyanové kyseliny, pentachlorofenolů a dalších prekurzorů, a které se mohou kumulovat v potravním řetězci člověka.

## 1.2 Toxické účinky na člověka

Pesticidy mohou být toxické i pro necílové organismy včetně člověka, především pokud princip účinku souvisí s pochody, které probíhají i v lidském organismu. Toxicita organofosfátů a karbamátů spočívá v inhibici acetylcholinesterasy, dinitrofenoly a polychlorované fenoly inhibují proces oxidativní fosforylace. Z thionofosfátů a thiofosfátů vznikají jejich oxoanalogy, které mají větší toxický účinek než mateřská látka. Některé pesticidy vykazují schopnost interferovat s hormonálními pochody obratlovců. DDT a jeho metabolity, především DDE, se mohou vázat na receptory  $17\beta$ -estradiolu [4]. Další pesticidy u kterých byla prokázána estrogenní aktivita jsou organochlorové pesticidy toxafen, dieldrin a heptachlor, z moderních pesticidů pak atrazin a alachlor (herbicidy), benomyl či ethylenbisdithiokarbamáty (fungicidy), dikofol, permethrin, parathion (insekticidy) a další.

I když žádný z dnes používaných pesticidů nebyl Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (*International agency for research on cancer*, IARC) klasifikován jako lidský karcinogen, některé z nich jsou zařazeny mezi potenciální lidské karcinogeny (např: toxafen, amitrol nebo fenoxycyanové kyseliny). Karcinogenní účinky mohou mít i produkty vzniklé z relativně netoxických prekurzorů, jako je ethylenthioamocovina nebo *N,N*-dimethylhydrazin.

U pesticidů, které se kumulují v tuku, jako je kupříkladu DDT a lindan, se může za určitých podmínek (např. při hladovění) projevit toxický účinek, protože dojde k jejich mobilizaci a velkému zvýšení koncentrace v krvi.

### 1.3 Analýza reziduí pesticidů

Rezidua pesticidů je možné detekovat v nejrůznějších matricích s rozdílným obsahem vody a lipidů. Z důvodu hodnocení kontaminace životního prostředí se celosvětově nejvíce pozornosti věnuje výskytu těchto analytů v potravinách, rostlinách, vodě a vodní biotě (ryby a slávky). Protože je dané spektrum matric velmi různorodé, neexistuje jediná univerzální analytická metoda, kterou by bylo možno aplikovat. Nicméně, obecně lze říci, že všechny metody se skládají z následujících kroků:

**extrakce** → **odstranění interferujících látek přečištěním** → **identifikace/kvantifikace** → **konfirmasiace** → **zhodnocení výsledků (porovnání s požadavky legislativy, apod.)** [5]

#### Multireziduální metody

Rezidua pesticidů v zemědělských produktech mohou být stanovena metodou pro analýzu jednotlivých pesticidů (single residue metod, SRM) nebo tzv. multireziduální analytickou metodou (multiresidue Metod, MRM), v níž je zahrnuto celé spektrum analytů. Použití multireziduálních metod je nutné především v případech, pokud neznáme tzv. historii vzorku, tj. jakými přípravky byla plodina ošetřena a zda nedošlo ke kontaminaci z jiného zdroje.

K výhodám MRM ve většině případů patří snížení doby i ceny analýz oproti stanovení stejného počtu analytů v sérii jednotlivých stanovení.

Základními kroky multireziduálních metod jsou:

- izolace (extrakce)
- přečištění (odstranění koextraktů)
- separace
- detekce / kvantifikace
- konfirmace

Vzhledem k faktu, že MRM metody se používají pro stanovení analytů reprezentujících obvykle poměrně široké spektrum fyzikálně-chemických vlastností, jsou kladeny poměrně vysoké nároky na uspokojivé hodnoty pracovních charakteristik. Proto je nutné pečlivě zoptimalizovat jednotlivé kroky MRM pro danou kombinaci pesticidů/matrice, často je nevyhnutelné zvolit určitý kompromis mezi pracovními charakteristikami, dostupností metody a cenou za analýzu.

### Isolace pesticidů z matrice

#### *Výběr rozpouštědla*

Nejběžnější je extrakce pevných vzorků kapalinou (rozpouštědlem). Výběr vhodného rozpouštědla se řídí podle jeho vlastností. Index polarity rozpouštědla je často nejdůležitější hledisko při výběru rozpouštědla a určuje jak snadno do něj budou přecházet analyty a rovněž složky matrice. Přehled rozpouštědel běžně používaných v multireziduální analýze a jejich vlastností poskytuje **Tab. I.**

Pro multireziduální analýzu pesticidů se jako nejvhodnější extrakční rozpouštědla ukázala aceton, acetonitril a ethylacetát, poskytující vysoké výtěžnosti širokého spektra pesticidů. Ethylacetát a acetonitril jsou výhodnější, protože se z nich snadněji odstraní vysolením voda, čímž se zajistí, že bílkoviny, sacharidy a další polární koextrakty nepřejdou do extraktu.

ANASTASSIADES [6] publikoval podrobnou studii o vývoji nové multiresiduální metody pro stanovení residuů pesticidů v potravinách s extrakcí do acetonitrilu (MeCN), pro kterou se vžilo označení QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) [6]. Metoda spočívá v extrakci analytů v centrifugační kyvetě s přísadkou  $MgSO_4$  jako desikátoru a NaCl k vysolení analytů do MeCN. Po odstředění se z horní vrstvy odebere alikvotní podíl, ke kterému je přidán další  $MgSO_4$  a k přečištění sorbent PSA (primární-sekundární amin). Během vývoje metody QuEChERS se ukázalo, že u odlišných matric mají pesticidy captan, chlorothalonil, dicofol, folpet, dichlofluanid, tolylfluanid a některé další, variabilní výtěžnosti. Tyto pesticidy v zásaditém prostředí, v některých rozpouštědlech a/nebo za zvýšené teploty podléhají degradaci a to způsobuje jejich obtížnou kontrolu. Proto LEHOTAY tuto metodu modifikoval: extrakce se provádí MeCN s 1 % obsahem kyseliny octové a NaCl je ve vysolovacím kroku nahrazen octanem sodným, čímž vzniká octanový pufr udržující pH < 4 bez závislosti na původním pH matrice [7].

Protože je ethylacetát (EtAc) velmi málo mísitelný s vodou, jeho největší výhodou oproti acetonu a MeCN je právě nízký obsah vody v extraktu, která může být snadno odstraněna přísadkou bezvodých solí.

Široké použití k extrakci pesticidů našel EtAc v 80. letech 20. století. EtAc byl použit k extrakci organochlorových a organofosfátových pesticidů z různých druhů ovoce a zeleniny. K přečištění extraktu se často používá gelová permeační chromatografie [8]. Kromě horších výtěžností polárních pesticidů jako acefát a methamidofos, poskytuje extrakce EtAc srovnatelné výsledky s extrakcí MeCN a acetonem.

**Tab. I.** Přehled fyzikálních vlastností rozpouštědel používaných v multiresiduální analýze pesticidů [9].

Rozpouštědlo	Index polarity	Rozpustnost ve vodě (% w/w)	Hustota ( $g \cdot ml^{-1}$ )	Viskozita ( $mN \cdot s \cdot m^{-2}$ )	Expanzní objem <sup>‡</sup>	Bod varu ( $^{\circ}C$ )
Voda	10,2	-	0,998	1,00	1416	100,0
Acetonitril	5,8	100	0,786	0,37	488	81,6
Aceton	5,1	100	0,791	0,32	348	56,2
Methanol	5,1	100	0,792	0,60	632	64,6
Ethanol	5,2	100	0,789	1,20	438	78,4
Ethylacetát	4,4	8,7	0,902	0,45	261	77,2
2-Propanol	3,9	100	0,785	1,76	334	82,4
Dichlormethan	3,1	1,6	1,33	0,44	399	40,7
Diethyleter	2,8	6,9	0,713	0,24	246	34,6
Toluen	2,4	0,052	0,866	0,52	240	110,8
Cyklohexan	0,2	0,006	0,789	0,98	268	80,7
Isooktan	0,1	0,002	0,692	0,50	155	99,0
n-Hexan	0,0	0,014	0,660	0,32	196	69,0

<sup>‡</sup> Expanzní objem je uveden pro teplotu 250  $^{\circ}C$  a tlak 10 psi (67 kPa)

Urychlení extrakce, zvýšení účinnosti a snížení objemů potřebných rozpouštědel může být dosaženo změnou fyzikálních podmínek, za kterých extrakce probíhá. Následující odstavce stručně charakterizují extrakční techniky.

### Soxhletova extrakce

Soxhletova extrakce je velmi účinná, jednoduše realizovatelná metoda, bez nároků na drahé vybavení laboratoře. Často je porovnávána účinnost a selektivita ostatních extrakčních metod právě se Soxhletovou extrakcí [11-13]. Její slabiny

spočívají v dlouhé době extrakce, která trvá několik hodin a větší spotřebě rozpouštědel.

### **Míchání a sonikace**

Míchání nebo mixování vzorku s rozpouštědlem je jednoduchý, rychlý a levný způsob extrakce. Další výhodou je, že vzorek se nezahřívá, takže se minimalizuje možnost snížení výtěžnosti analytů reakcí nebo termální degradací. V některých případech však tento postup nedosahuje potřebné účinnosti extrakce.

Extrakce může být realizována jednoduchým třepáním v ruce nebo různými mixery (vortex) a homogenizátory (např. vysokoobrátkový homogenizátor Ultra Turrax) [14, 15]. Alternativou jsou ultrazvukové lázně [16], kde však může nastat problém ohřevu vzorku, což v limitním případě vede k degradaci labilních analytů.

### **Extrakce mikrovlnným ohřevem**

Metoda je často označována jako MASE (*microwave-assisted solvent extraction*). Při MASE je vzorek umístěn do cely a zahříván mikrovlnným zářením. Extrakce probíhá v polootevřených systémech za atmosférického tlaku. Výhodou MASE je vysoká účinnost, rychlost a opakovatelnost extrakce, možnost paralelní extrakce několika vzorků a nízká spotřeba rozpouštědel. Na druhou stranu mohou analyty za zvýšené teploty degradovat [17]. Tento aspekt lze částečně ovlivnit výběrem rozpouštědla transparentního pro mikrovlny, takže je ohříván pouze vzorek a analyty přecházejí do studeného rozpouštědla..

### **Extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku**

Tato metoda se označuje jako PLE (*pressurized liquid extraction*) nebo ASE (*accelerated solvent extraction*, obchodní název firmy Dionex). Vzorek je smíchán s inertním materiálem (křemelina, síran sodný [12]) a vložen do kovových extrakčních cel. Nejprve je do extrakční cely pumpováno rozpouštědlo, které se ohřívá na nastavenou teplotu. Pak následuje 5–20 minut dlouhý statický extrakční krok, kdy rozpouštědlo neprotéká systémem. Po skončení statické fáze následuje tzv. dynamická fáze, kdy je extrakt vytlačen čerstvým rozpouštědlem do jímacích nádob. Pro dosažení vyšší účinnosti extrakce se může celý proces opakovat. Výhodou této metody je dobrá účinnost a rychlost extrakce s nízkou spotřebou rozpouštědel. Toho je dosaženo vysokou teplotou rozpouštědla, která díky vysokému tlaku není omezena bodem varu. Stejně jako v případě MASE je tento způsob extrakce nevhodný pro termolabilní analyty. Extrakt z PLE obsahuje velké množství koextraktů a vlhkost ze vzorku, takže je nutné zařadit přečišťovací krok.

PLE lze použít k extrakci analytů z rybí svaloviny [12], vnitřních orgánů savců [18], půd [19, 20] nebo rostlinných materiálů [21].

### **Superkritická fluidní extrakce**

Superkritická fluidní extrakce (*supercritical fluid extraction*, SFE) nevyužívá běžná rozpouštědla, ale tekutinu v nadkritickém stavu (nad tzv. kritickým bodem), která má rozpouštěcí kapacitu blízkou kapalinám a difuzivitu blízkou plynům [22]. SFE a PLE mají podobný postup při přípravě vzorku a extrakci zahrnující statickou a dynamickou fázi. SFE používá vyšší tlaky pro dosažení nadkritických podmínek. Nejčastěji se jako rozpouštědlo používá oxid uhličitý, protože má relativně nízký kritický bod (7,4 MPa, 31 °C), dobré extrakční vlastnosti blízké hexanu, nízkou



toxicitu, je bezpečný a po extrakci může být bezzbytku vypuštěn do atmosféry. Ke zlepšení extrakce polárnějších analytů, mohou být k CO<sub>2</sub> přidány modifikátory. Jako modifikátory se používají organická rozpouštědla (nejčastěji methanol a aceton) nebo voda.

Hlavní výhoda SFE oproti extrakčním metodám využívajících kapalná rozpouštědla spočívá v tom, že se po snížení tlaku plyn sám odstraní a analyty zůstávají zachyceny na pevném sorbentu nebo v malém množství rozpouštědla. Další klíčová výhoda SFE je, že fyzikální vlastnosti tekutiny v nadkritickém mohou být upravovány změnou teploty a tlaku a tak je možné dosáhnout selektivní extrakce, díky čemuž může být v některých případech eliminován přečišťovací krok [17, 21, 23, 24].

Vyšší selektivita extrakce je však omezena množstvím analytů, které mohou být extrahovány za stejných podmínek. Extrahovat lze pouze poměrně malá množství vzorku a extrakce pomocí SFE vyžaduje složitější vývoj metody a optimalizaci podmínek. Kromě toho SFE poskytuje pro polární analyty nižší výtěžnosti [25]

Technika SFE je vhodná pro extrakci mnoha typů matric jako je ovoce [26], zelenina [27], maso [21, 28], oleje [22, 29–31], cereálie [32, 33], půdy [17]

#### **1.4 Odstranění interferujících sloučenin**

Odstranění interferujících matričních komponent z extraktu bývá provedeno na základě rozdílných fyzikálně-chemických vlastností analytů a koextraktů.

##### **Extrakce kapalina-kapalina (LLE)**

Požadavkem pro tuto metodu je, aby použité kapaliny nebyly mezi sebou mísitelné a aby analyty přecházely nebo zůstávaly pouze v jedné z nich. Výběr rozpouštědel proto závisí na jejich polaritě a rozpustnosti pro cílové analyty [24, 33]. Hlavní nevýhoda této metody je ve spotřebě velkých objemů rozpouštědel, takže často následuje zakoncentrování a v požadavcích na jejich čistotu. Využívá se však i metoda používající mikrolitrové objemy nazvaná LPME (*Liquid-phase micro extraction*) [1]. Další nevýhody jsou možnost tvorby emulzí a sekundární kontaminace vzorku. LLE se používá především pro dobrou efektivitu a jednoduchost u stanovení vybraných skupin látek.

##### **Gelová permeační chromatografie (GPC)**

GPC primárně rozděluje látky na základě efektivního objemu molekuly. Menší molekuly pronikají hlouběji do póru gelu a mají proto větší retenční objem, než velké molekuly. Při použití GPC však neprobíhá separace pouze na základě velikosti molekul, ale projevují se i další vlivy, jako je tvorba vodíkových můstků, dipólové interakce,  $\pi$ - $\pi$  interakce a disperzní síly. Výběr vhodného gelu se řídí jeho pracovním rozsahem, zvaným vylučovací limit, který určuje, jak velké molekuly již nejsou v gelu vůbec zadržovány a procházejí v mrtvém objemu [35]. Pro analýzu pesticidů se používají styren-divinilové gely s malým vylučovacím limitem. Existují jako rigidní gely (PL gel), které jsou nestlačitelné, nebo měkké (Bio Beads) .

Velkou výhodou GPC je snadná automatizace. GPC technika je vhodná na oddělení lipidů [36] od pesticidů, protože mnoho pesticidů má relativně podobný efektivní objem a mohou proto být zachyceny v jedné frakci [37]. Na druhou stranu tato frakce může obsahovat významný podíl matričních koextraktů o stejném

efektivním objemu, takže v některých případech by bylo nutné zavést další čistící krok.

### Extrakce na tuhou fázi

Extrakce na tuhou fázi (*solid-phase extraction*, SPE) je často používaný přečišťovací krok v analýze reziduí pesticidů. SPE je založeno na vzájemných interakcích sorbentu, analytů a rozpouštědla. Nejběžnějším uspořádání SPE je v kolonkách, které obsahují 0,1–1 g sorbentu. Po nanesení vzorku může nastat několik situací:

- analyty i interferující látky jsou sorbentem zadrženy, k eluci analytů nebo interferentů je potřeba změnit eluční sílu rozpouštědla
- jsou zadrženy pouze analyty, interferující látky projdou kolonkou a analyty jsou eluovány rozpouštědlem s vyšší eluční silou
- jsou zadrženy pouze interferenty a analyty kolonkou projdou

V analýze reziduí pesticidů jsou používány různé typy sorbentů, jejichž přehled je uveden v **Tab. II**. Reverzní fáze tvořená silikagelem s chemicky navázanými nepolárními modifikátory (C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>, CN) může být použita k zadržení organických látek z vody a odstranění solí a polárních látek z roztoku. Zadržené látky se pak snadno eluují organickými rozpouštědly. V dnešní době se místo tradičních reverzních fází tvořených modifikovaným silikagelem začaly používat polymerní sorbenty jako je divinylbenzen-styren [38]. Polymerní sorbenty mají oproti C<sub>18</sub> silikagelu silnější retenci, větší kapacitu, nepotřebují kondicionaci a mají větší permeabilitu.

Sorbenty alumina, silikagel a florisil jsou využívány při analýze nepolárních pesticidů k odstranění lipidů z extraktu [16, 19, 39], ale použití těchto sorbentů k přečištění je méně vhodné pokud chceme stanovit i semi-polární a polární pesticidy, protože k eluci je potřeba použít velké objemy rozpouštědel.

Sorbenty aminopropyl (–NH<sub>2</sub>) a primární-sekundární amin (PSA) silně zadržují polární organické látky, jako jsou sacharidy, huminové kyseliny, mastné kyseliny a vosky [40, 41, 42]. Grafitizované saze (*graphitized carbon black*, GCB) silně interagují s mnoha typy planárních molekul jako jsou barviva a steroly. Sorbenty PSA a GCB použité samostatně nebo ve směsi mohou být vhodné pro přečištění hrubých extraktů obsahujících pesticidy, protože nejsou příliš polární nebo nemají planární strukturu.

Velmi jednoduchým, efektivním a levným uspořádáním SPE je disperzní SPE, kdy je malé množství sorbentu přidáno přímo do extraktu. Po filtraci nebo centrifugaci se k analýze odebere alikvotní objem přečištěného extraktu. Disperzní SPE má oproti kolonkovému uspořádání několik výhod :

- Sorbent přichází do styku s extraktem celým povrchem, takže čištění je efektivnější a účinnější.
- Nižší cena, protože se používá menší množství sorbentu a nejsou potřeba komerční kolonky.
- Není potřeba zdroj vakua a další zařízení jako u klasického SPE.
- Nepoužívají se žádná eluční rozpouštědla.
- Celý proces je rychlý a jednoduchý.

**Tab. II.** Typy sorbentů používaných v SPE v multireziduální analýze pesticidů [9].

Normální fáze	Reverzní fáze	Iontoměniče
Grafitizované saze (GCB)	Oktadecylovaný silikagel (C <sub>18</sub> )	Silné anexy (SAX)
Alumina	Polymery (divinylbenzen, DVB)	Primární-sekundární amin (PSA)
Silikagel	Cyanopropyl (-CN)	Aminopropyl (-NH <sub>2</sub> )
Florisil		Silné katexy

### 1.5 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie ve spojení s tradičními detektory ECD (*electron capture detector*), NPD (*nitrogen-phosphorus detektor*) a FPD (*flame photometric detector*) se ještě dnes používá k detekci v multireziduální analýze, avšak toto uspořádání neposkytuje možnost confirmace výsledků. Dnešní vývoj proto směřuje k detekci pomocí hmotnostní spektrometrie (*mass spectrometry*, MS), která je nejen citlivá, ale i vysoce selektivní a díky spektrální informaci umožňuje snadnou confirmaci.

#### Nástřikové techniky

Často používaným typem nástřiku ve stopové analýze je klasický splitless nástřik. Jeho omezení je v malých objemech nástřikovaných vzorků, ke kladům naopak patří menší rozsah kontaminace vstupní části analytické kolony oproti on-column nástřiku a relativně snadné nastavení pracovních podmínek.

Významného zlepšení pracovních parametrů této techniky lze docílit použitím tlakového pulzu během nástřiku prostřednictvím nosného plynu. Tato modifikace se nazývá pulzní splitless nástřik. Aplikace tlakového pulzu vede k vyšší průtokové rychlosti nosného plynu přes nástřikový prostor, čímž dojde k rychlejšímu transportu par vzorku na analytickou kolonu. Za těchto podmínek je pobyt analytů v nástřikovém prostoru mnohem kratší ve srovnání s klasickým splitless nástřikem, což vede k významnému potlačení diskriminace analytů, snížení adsorpce a/nebo tepelné degradace v nástřiku [43-48]. Navíc díky zvýšení tlaku je možno nástřikovat větší objemy bez rizika překročení kapacity lineru a dosáhnout tak nižších detekčních limitů [44, 46, 49-51].

Výhodou techniky on-column je nediskriminující přenos komponent vzorku [52-54], nedochází však k ochraně analytické kolony [55]. Touto technikou může být dosaženo přesnějších výsledků pro problematické analyty než při použití klasického splitless nástřiku, pokud je chromatografický systém relativně čistý, nicméně opakovaný nástřik vzorků s vyšším obsahem netěkavých matričních komponent vede k rychlému zhoršení charakteristiky systému, což je způsobeno kontaminací vstupní části kolony netěkavými látkami (tvorba depozitu).

Teplotně programovatelný nástřik (*programmed temperature vaporizer*, PTV) má několik výhod oproti jiným nástřikovým technikám, mj.: snížení diskriminace méně těkavých složek [56-59], „šetrnost“ k termolabilním analytům [60-62], a v neposlední řadě možnost nástřiku větších objemů, což je pravděpodobně nejdůležitějším rysem [63 - 75]. Na druhou stranu PTV nástřik vyžaduje velkou důkladnost a tím i úměrnou časovou náročnost optimalizace operačních charakteristik.

Speciálním typem nástřikové techniky publikované AMIRAVEM a DAGANEM je *direct sample introduction* (DSI) nebo také *difficult matrix introduction* (DMI) [76]. Při této technice je až 30 µl vzorku přidáno do mikrovialky, která je pak umístěna přímo do injektoru při relativně nízké teplotě. Po odpaření rozpouštědla a jeho odvodu přes split exit je injektor velmi rychle vyhřát a analyty jsou přeneseny na analytickou kolonu. Oba tyto kroky musí být důkladně optimalizovány aby nedocházelo ke ztrátám těkavějších analytů při odpařování rozpouštědla a byl zaručen kvantitativní přenos méně těkavých analytů na kolonu. Hlavní výhodou této techniky oproti jiným technikám nástřiku velkých objemů je, že netěkavé matriční komponenty zůstávají v mikrovialce a tak DSI technika nástřiku by měla eliminovat potřebu časté údržby chromatografického systému a prodloužit životnost analytické kolony. Technikou DSI je možno nástřikovat velké objemy vzorku bez přečištění [77], což snižuje cenu a zvyšuje výkonnost. Nicméně vyšší obsah semivolatilních koextrahovaných matričních složek v nepřečištěném extraktu může mít vliv na stanovení některých analytů v komplikovaných maticích. Na skleněné mikrovialce vznikají další aktivní místa způsobující matriční efekty. Matrice v mikrovialce navíc může za zvýšené teploty sorbovat cílové analyty [78] a tak snižovat jejich přenos na kolonu.

### **Matriční efekty a jejich kompenzace**

Významným problémem při GC analýze je skupina nepříznivých jevů obecně označovaných jako matriční efekty, které jsou způsobeny přítomností koextrahovaných matričních komponent [79]. Matriční efekty ovlivňují všechny kroky GC analýzy (nástřik, separace, detekce) a mohou se projevat negativně na kvalitě generovaných dat jako:

- maskování píků v důsledku koeluce;
- výskyt falešně pozitivních výsledků;
- nesprávná kvantifikace.

Velmi důležitou částí plynového chromatografu, do značné míry ovlivňované matričními komponentami, je nástřikový prostor. Během klasického splitless nástřiku, který je často používanou nástřikovou technikou ve stopové analýze, může docházet k termální degradaci a/nebo adsorpci některých analytů [80-82]. Po nástřiku reálného vzorku mají koextrahované matriční komponenty sklon obsazovat (blokovat) aktivní místa nástřikového prostoru (především silanolové skupiny ve skleněném lineru), což má za následek přenos většího množství cílových analytů na kolonu (a následkem toho vyšší signál a lépe zaostřené píky) v přítomnosti matrice než při nástřiku daných látek v čistém rozpouštědle. Uvedený fenomén, který popsal ERNEY [83] jako maticí indukované zvýšení chromatografické odezvy, dovoluje vysvětlení výtěžností významně převyšujících 100 % u polárnějších pesticidů, které jsou uváděny ve studiích používajících kalibrační standard rozpuštěný v čistém rozpouštědle. Obecně lze tedy konstatovat, že pokud jsou analyty rozpuštěny pouze v rozpouštědle a jsou používány jako kalibrační standardy, pak koncentrace analytů, které jsou ovlivněny matričními efekty v injektoru, jsou systematicky nadhodnocovány. Rozsah maticí indukovaných zvýšených odezev závisí na mnoha faktorech:

- typ a množství aktivních míst v nástřiku a na koloně;
- chemická struktura analytů (polární skupiny molekuly analytu, termolabilita);
- koncentrace analytu;

- teplota nástřiku;
- faktory ovlivňující dobu interakce analytu s aktivními místy (průtok nosného plynu, tlak v koloně, objem nástřiku a objem expandovaného rozpouštědla, retenční čas analytu);
- typ a koncentrace matrice;
- „historie“ GC systému (stupeň kontaminace).

Existuje několik možných přístupů k eliminaci nebo kompenzaci tohoto jevu. Odstranění matrice důkladným přečištěním extraktu [84] nebo deaktivací lineru [83, 85]. Další možností je použití izotopově značených vnitřních standardů, avšak k detekci může být použita pouze hmotnostní spektrometrie a tyto standardy jsou cenově nákladné. Praktický a doporučovaný způsob je použití kalibračního standardu v extraktu matrice bez cílových analytů (matriční standard) [40, 85, 86], ale tento postup má několik nevýhod. Především náklady na přípravu a skladování matričních standardů, obtížná dostupnost matrice bez analytů, nutnost připravit matriční standard pro každou komoditu, limitovaná stabilita některých analytů v matričních standardech [87] a zvýšená kontaminace nástřikového prostoru a vstupní části analytické kolony GC maticí [88]. Jednou z dalších cest kompenzace matričních efektů je přidání jednoduché sloučeniny nebo jich směsi na maskování aktivních míst. Tyto látky by se přidávaly do reálných vzorků i standardů v čistém rozpouštědle a kompenzovaly by matriční efekty, ale oproti matričním standardům nezůstávají v chromatografickém systému, jejich použití je levné a univerzální. Tyto látky byly nazvány „*analyte protectants*“ (AP) a pro 36 vybraných pesticidů byly testovány na již zmíněné metodě QuEChERS ANNASTASIADESEM [7, 8]. Aby látka mohla být použita jako protektant, musí tedy splňovat několik podmínek:

- Eluční profil protektantu se musí překrývat s elucí analytu, který má být chráněn.
- Nesmí reagovat s analyty a indukovat jejich rozklad.
- Nesmí se kumulovat v nástřikovém prostoru, v koloně nebo v detektoru.
- Nesmí interferovat s analyty při detekci.
- Musí být snadno dostupné.
- Musí být rozpustné v použitém rozpouštědle.

Mezi nejúčinnější analytické protektanty pro použití v kombinaci s metodou QuEChERS patří směs 3-ethoxy-1,2-propandiolu,  $\gamma$ -laktonu kyseliny L-gulonové a D-sorbitolu [78]. 3-Ethoxy-1,2-propandiol zajišťuje vhodnou ochranu nejdříve se eluujícím analytům, jeho eluční profil se překrývá s  $\gamma$ -laktonem kyseliny L-gulonové a k ochraně nakonec se eluujících analytů slouží D-sorbitol.

### Typy plynové chromatografie

Plynová chromatografie (*gas chromatography*, GC) může být použita pro separaci přibližně 80 % dnes používaných pesticidů, nebo pesticidů jejichž rezidua

se sledují. Pesticidy, které jsou termolabilní nebo polární bývají analyzovány použitím kapalinové chromatografie.

Teorie o separaci látek kapilární GC, typech kolon a teplotním programování je popsána v řadě pramenů [89-94]. Vedle použití „klasických“, v současné době asi nejrozšířenějších, konvenčních detektorů (ECD, NDP) v kombinaci s konfirmací pomocí specifických hmotnostních detektorů (MSD), patří mezi současné trendy v GC především rychlá separace látek (*fast GC*) a dvourozměrná chromatografie (GC×GC) poskytující větší kapacitu píků než konvenční (jednorozměrová) GC [8, 9]. Protože jsou oba směry vývoje GC podmíněny dostupností detekčních technik s vysokou akviziční rychlostí, nastal jejich velký rozvoj až s komerční dostupností vysokorychlostních průletových hmotnostních spektrometrů (*high speed time-of-flight mass spectrometer*, hs-TOF MS).

### Ovlivnění chromatografické separace

Zrychlení GC může být dosaženo změnou rozměrů kolony – kratší kolona, menší vnitřní průměr, tenčí vrstva stacionární fáze, nebo změnou operačních podmínek – rychlejší teplotní program, změna nosného plynu, vyšší rychlost průtoku nosného plynu nebo připojením vakua na konec kolony.

#### Změna rozměrů kolony

##### (i) Kolony s malým vnitřním průměrem

Zmenšení vnitřního průměru kolony vede ke snížení retence analytů. Použití kolon o vnitřním průměru 0,18 mm (rozdělení GC kolon je uvedeno v **Tab. III**) je v běžných analýzách limitováno jejich nižší kapacitou a vzhledem k malému vnitřnímu průměru je nástřik reálných vzorků často doprovázen ucpáváním kolony nevolatilními složkami matrice [95]. Pro tyto účely je vhodné použít split nástřik, což je ale z důvodu ztráty citlivosti pro reziduální analýzu nevhodné. Řešením může být instalace krátké předkolony o větším průměru před vlastní analytickou kolonu, která umožní spileless nástřik a omezí kontaminaci vlastního chromatografického systému matričními komponentami.

**Tab. III.** Rozdělení chromatografických kolon podle vnitřního průměru.

Název kolony	Vnitřní průměr (mm)	Průměry standardních kolon (mm)	Maximální rychlost nosného plynu (ml/min) <sup>‡</sup>
Megabor	0,5	0,53	≥ 660
Wide bore	≥ 0,3 do < 0,5	0,32; 0,45	≥ 86 do < 660
Narrow bore	≥ 0,2 do < 0,3	0,20; 0,25; 0,28	≥ 17 do < 86
Microbore	≥ 0,1 do < 0,2	0,10; 0,15; 0,18	≥ 1 do < 17
Sub-microbore	< 0,1	různé	< 1

<sup>‡</sup> Rychlost nosného plynu je kalkulována na He, tlak 100 psi (690 kPa) a podmínky na výstupu z 10 m kolony.

##### (ii) Použití krátkých kolon

Rychlost analýzy je přímo závislá na rychlosti nosného plynu a na délce kolony. Použití krátkých kolon je v konvenční plynové chromatografii omezeno analýzou relativně jednoduchých směsí látek, což je dáno sníženou účinností krátké kolony (nižší počet teoretických pater). Použitím hmotnostního detektoru může být ztráta

chromatografické separace kompenzována selektivitou hmotnostního separátoru [96]. Použitím kratší kolony ve spojení s MS je možné dosáhnout rychlejší separace a vyšší citlivosti.

### **(iii) Tloušťka filmu stacionární fáze**

Na tloušťce filmu stacionární fáze závisí jak kapacita, tak rychlost analýzy [97]. Tloušťka filmu ovlivňuje difúzi ve stacionární fázi, jestliže je tedy tloušťka filmu příliš velká, stává se separace neúčinnou a doba separace roste [98]. Čím tenčí je film stacionární fáze, tím je počet teoretických pater vyšší, na druhou stranu příliš tenký film stacionární fáze má za následek ztrátu kapacity kolony a může dojít ke snížení účinnosti separace [97]. Z uvedených důvodů se volí tloušťka stacionární fáze podle těkavosti analytů – pro velmi těkavé látky se používají kolony s větší vrstvou stacionární fáze, pro látky méně těkavé pak kolony s menší vrstvou stacionární fáze.

#### Změna operačních parametrů

Separční účinnost a citlivost stanovení je podmíněna správnou volbou chromatografických podmínek. Při optimalizaci plynově-chromatografického stanovení reziduí pesticidů je nutné zvážit volbu správného rozpouštědla, typ a velikost lineru, objem nástřiku vzorku, aj. Pro účinnou separaci cílových látek je dále nutno zvolit vhodný typ kolony a stacionární fáze. V praxi se pro analýzu reziduí pesticidů pomocí plynové chromatografie (*gas chromatography*, GC) osvědčilo použití kapilárních kolon se stacionární fází tvořenou 5% phenyl-methylpolysiloxanem.

### **(i) Rychlé teplotní programování**

Rychlé teplotní programování může urychlit mnoho analýz, je však vždy nutné zvažovat kompromisní řešení mezi rozlišením a rychlostí chromatografické separace. Rychlé teplotní programování je výhodné především pro rychlou separaci směsi obsahující látky s širokým rozmezím bodu varu [99]. Nachází velké uplatnění spolu s použitím krátkých kapilárních kolon s malým vnitřním průměrem [95, 99]. Realizuje se buď v konvenční GC peci nebo odporovým ohřevem. V prvním případě se dosahuje změn teplot kolony až  $120\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  v závislosti na doporučení výrobce a možnostech plynového chromatografu.

Novou technikou řazenou rovněž do kategorie „*fast chromatography*“, je technika odporového ohřevu kolony (tzv. „*flash GC*“). Protože je ohřívána pouze kolona a ne celá pec plynového chromatografu, nabízí tato technika mnohem efektivnější přenos tepla na kolonu (teplotu kolony lze měnit rychlostí až  $30\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ , což dovoluje dobu analýzy výrazně zkrátit. Zároveň je kratší také doba chlazení kolony na počáteční teplotu.

### **(ii) Typ nosného plynu**

Rychlost analýzy je závislá na typu použitého nosného plynu, který ovlivňuje hodnotu optimální lineární rychlosti [100]. Optimální rychlost průtoku plynu je rychlost, při které je dosažena minimální hodnoty výškového ekvivalentu teoretického patra - je to minimum křivky popsané Goalayovou rovnicí. Nejvyšší optimální rychlost průtoku má vodík, který se však z bezpečnostních důvodů nepoužívá. Z běžně používaných plynů následuje helium a dusík (v tomto pořadí se optimální lineární rychlost snižuje).

### **(iii) Zvýšením průtoku nosného plynu**

Ke zrychlení analýzy může přispět použití vyššího průtoku nosného plynu než optimálního [101], což přináší snížení účinnosti separace, nicméně z křivky

Goalayovy rovnice je patrné, že malé zvýšení lineární rychlosti přinese pouze nepatrné zhoršení účinnosti separace se znatelným snížením retenčních časů.

#### (iv) Izotermní analýza

Izotermní analýza umožňuje provádět pouze separaci látek s podobným bodem varu [102]. Při separaci jednoduchých směsí může být izotermní analýza v kombinaci s krátkými kolonami velmi rychlá [103]. Takovýchto směsí však v praxi není mnoho a extrakty potravinářských matric k nim vesměs nepatří. Pro stanovení reziduí pesticidů pomocí MRM je práce při konstantní teplotě prakticky nepoužitelná.

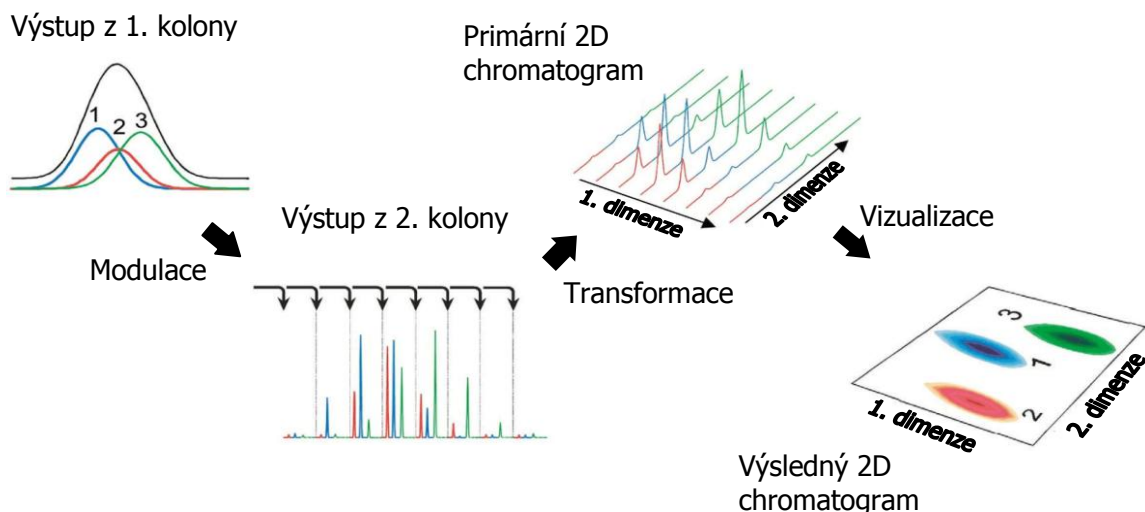
#### (v) Použití vakua na výstupu z kolony

Techniku nízkotlaké plynové chromatografie (*low-pressure gas chromatography*, LP-GC) již v 60. letech minulého století popsal GIDDINGS [104]. V LP-GC se používají kapilární kolony o velkém vnitřním průměru, tzv. megabore. Díky nižšímu tlaku dochází ke zvýšení difusivity a zvyšuje se tak optimální lineární rychlost nosného plynu. Kolona na LP-GC se připojuje k plynovému chromatografu přes krátkou a tenkou restriční kapiláru [96, 105]. Výhodou LP-GC je snížení doby analýzy bez větší ztráty účinnosti separace. Výhodné je u LP-GC použití hmotnostní detekce, protože hmotnostní detektory samy pracují za vakua.

### 1.6 Dvoudimenzionální plynová chromatografie (GC×GC)

Separace v běžné GC poskytuje značnou kapacitu píků, pokud však usilujeme o separaci většiny (popř. všech) komponent z komplexních vzorků, klasická GC často selhává. Právě analýza pesticidů konvenční GC může představovat problém, jelikož často není možné od sebe odseparovat nejen cílové analyty mezi sebou, ale rovněž analyty od matrice vzorku. Nejmarkantnější je problém u analytů s nízkými  $m/z$  iontů, které jsou málo selektivní. Možným řešením je použití techniky ortogonální dvourozměrné plynové chromatografie (*comprehensive two-dimensional gas chromatography*, GC×GC) [105]. Principem techniky GC×GC je separace vzorku na dvou kapilárních kolonách, které mají zcela odlišný separační mechanismus. Pokud je první kolona nepolární, je hlavním parametrem separace těkavost, budou se látky na druhé, polární koloně separovat především na základě interakcí se stacionární fází. Separace na druhé koloně v GC×GC je však velmi rychlá. Proto je možné pro detekci používat pouze detektory s dostatečnou akviziční rychlostí. Tomuto požadavku až donedávna vyhovovaly právě jen běžné detektory (FID,  $\mu$ ECD). Příchod  $hs$ -TOF s akvizicí až 500 spekter·s<sup>-1</sup> znamenal možnost použití hmotnostní spektrometrie i v GC×GC a získání dalšího (třetího) rozměru v GC×GC. Schéma dvourozměrné plynové chromatografie je uvedeno na (**Obr. 1**). Na výstupu z první kolony je modulační zařízení, kde jsou malé frakce vystupujících látek zachyceny, zaostřeny a v krátkých impulzech přenášeny k analýze na druhou kolonu. Proces modulace se opakuje v krátkých intervalech, takže primární 2D chromatogram je složen ze značného počtu chromatogramů druhé dimenze. Tyto chromatogramy jsou „skládány“ vedle sebe (transformace) a vytvoří tak 2D chromatogram, jehož osy tvoří retenční časy první a druhé kolony. Běžný způsob vizualizace je vrstevnicový chromatogram, kdy jednotlivé barvy a odstíny vyjadřují intenzitu píku.





Obr. 1. Schéma dvourozměrné chromatografie [106].

## 1.7 Hmotnostní detekce

Hmotnostní spektrometrie (*mass spectrometry*, MS) poskytuje oproti „tradičním“ detektorům pro plynovou chromatografii (FID, ECD, NPD apod.) nejen odezvu v čase, ale rovněž příslušnou spektrální informaci. To umožňuje kvantifikaci i konfirmaci analytů v jednom kroku.

V současné době jsou komerčně dostupné různé typy hmotnostních detektorů, ale všechny pracují na stejném principu: složky vzorku jsou ionizovány, vzniklé ionty separovány na základě poměru hmotnost/náboj ( $m/z$ ) a jsou urychleny směrem k detektoru, kde jsou registrovány.

### Ionizační techniky

Často používanou ionizační technikou v GC-MS je elektronová ionizace (*electron ionization*, EI). Molekuly vzorku jsou „bombardovány“ elektrony s vysokou energií (obvykle 70 eV), což vede ke vzniku vysoce energetického iontu, který podléhá fragmentaci v závislosti na struktuře sloučeniny. Vzniklé ionty jsou pak charakteristické pro danou sloučeninu [107, 108]. Technika EI může být používána pro identifikaci neznámých sloučenin, pro stanovení molekulové struktury a pro konfirmaci cílových sloučenin prostřednictvím porovnání hmotnostních spekter.

V řadě případů je fragmentace technikou EI rozsáhlá a zanechává malou nebo žádnou informaci o molekulárním iontu, což činí stanovení molekulové hmotnosti poněkud obtížné. Tento problém vedl k vývoji nízkoenergetických („měkkých“) technik jako pozitivní chemická ionizace (*positive chemical ionization*, PCI). Při technice PCI je zdrojový iont nabit prostřednictvím reakčního plynu (methan, amoniak, isobutan) při tlaku 0,1 – 100 Pa, čímž dojde k ionizaci produkující velké množství reakčních iontů. Molekuly vzorku jsou postupně ionizovány reakčním plynem prostřednictvím přenosu protonu, který produkuje pseudomolekulární ionty  $MH^+$  a v závislosti na volbě reakčního plynu dochází ke tvorbě různých aduktů (např.  $MNH_4^+$  je typickým aduktem amoniaku s reakčním plynem). Výsledné pseudomolekulární ionty  $MH^+$  mají obvykle nízkou vnitřní energii a tak podléhají méně fragmentaci než molekulární ionty generované prostřednictvím EI. Tento způsob ionizace poskytuje jednoznačnou informaci o molekulové hmotnosti. V důsledku malé nebo žádné fragmentace je technika PCI více vhodná pro konfirmaci,

protože ion  $MH^+$  je více intenzivní a specifický než jakýkoliv fragmentový ion o nižší hmotnosti. PCI tak může poskytnout zvýšení citlivosti a zlepšení detekce [109].

Produkce nízkoenergetických elektronů prostřednictvím chemické ionizace poskytuje příležitost pro další ionizační techniku, často nazývanou negativní chemická ionizace (*negative chemical ionization*, NCI). Mechanismus NCI je prakticky stejný jako u detektoru elektronového záchytu: elektron s nízkou energií je zachycen elektronegativní molekulou vzorku, dojde ke tvorbě iontu  $M^-$  (molekulárního aniontu), který může nebo nemusí podlehnout fragmentaci v závislosti na své struktuře. NCI má dvě význačné výhody oproti EI a PCI:

- je přibližně 100× rychlejší, dovolující v některých případech 100 násobné nebo vyšší zlepšení citlivosti
- je vysoce selektivní, protože pouze limitované množství analytů je schopno zachytit elektron (např. analyty obsahující halogenový atom, nitro skupinu nebo rozsáhlý systém aromatických kruhů)

Řada halogenovaných látek, které je možno detekovat pomocí ECD jsou ionizovatelné technikou NCI [110]. Pro umožnění ionizace technikou NCI, popř. pro zlepšení citlivosti je vhodná chemická derivatizace pomocí elektrofilních derivatizačních činidel.

## Hmotnostní separátory

Výběr hmotnostního analyzátoru je určen požadovaným hmotnostním rozsahem, rozlišením, citlivostí, akviziční rychlostí a v neposlední řadě cenou zařízení. V zásadě mohou být hmotnostní analyzátory rozděleny do dvou skupin: scanovací a nescanovací.

Nejběžnější scanovací analyzátory jsou kvadrupól a iontová past (*ion trap*). Obě zařízení mohou pracovat ve dvou módech: *Full Scan* (snímání zadaného rozsahu  $m/z$ ) a SIM (*selected ion monitoring* – snímání vybraných iontů). V módu SIM je u kvadrupólu dosaženo vyšší citlivosti snímáním jen několika vybraných iontů, avšak ztrácíme informaci o celém spektru [111]. Iontová past kromě módů *Full Scan* a SIM umožňuje pracovat v módech *Segment Scan* a MS/MS. *Segment Scan* je mód podobný „*Full Scanu*“, s tím rozdílem, že je možno zvolit k monitorování několik úseků s nejnižší a nejvyšší hodnotou  $m/z$ . Je tak dosaženo vyšších odezev i poměrů  $S/N$ , přičemž může poskytovat stejné spektrální informace. V módu MS/MS jsou molekuly vzorku ionizovány v iontovém zdroji a specifické (mateřské) ionty jsou izolovány a pak následně fragmentovány na ionty dceřinné [112-114]. Použitím módu MS/MS má za následek zvýšení selektivity a detektability (zvýšení poměru signálu k šumu,  $S/N$ ) ve srovnání s módy „*Full Scan*“ a SIM, ovšem práce v MS/MS módu vyžaduje důkladnou optimalizaci řady parametrů pro všechny analyty.

Zatímco výše uvedená technika MS/MS je prezentována jako *tandem-in-time*, existuje ještě *tandem-in-space* technika, kde každý krok MS/MS postupu vyžaduje specifické instrumentální součásti. Nejznámější je instrumentace zvaná trojitý kvadrupól (QQQ) [115], kde první kvadrupól slouží k izolaci mateřského iontu, ve druhém jsou izolované ionty fragmentovány a přeneseny do třetího kvadrupólu, který slouží pro izolaci a monitorování vybraných dceřinných iontů.

„Nescanovací“ hmotnostní analyzátory jsou reprezentovány průletovým hmotnostním analyzátozem (*time-of-flight*, TOF) a iontovým cyklotronem. Tyto instrumenty nabízejí velkou akviziční rychlost a jsou tak vhodné nejen pro klasické, ale také pro velmi rychlé chromatografické separace. Další jejich výhodou je akvizice

plných hmotnostních spekter bez ztráty citlivosti. Iontový cyklotron se však zatím běžně v analýze nepoužívá, ale TOF analyzátory jsou v praxi běžnější a získávají své nezastupitelné místo nejen na poli analýzy potravinových a environmentálních kontaminantů

## 2 Metoda stanovení reziduí pesticidů v potravinách

Tato kapitola je věnována praktickému příkladu řešení multireziduální metody s plynově-chromatografickou koncovkou pro stanovení 83 pesticidů s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Kapitola dále seznamuje se strategiemi a výsledky validačního postupu. Metoda je zamýšlená pro analýzu organochlorových, organofosforových a organodusiťatých pesticidů v širokém spektru rostlinných materiálů (např. ovoce, zelenina, obiloviny, luštěniny a olejniny). V rámci pilotní studie byly testovány pracovní charakteristiky na matrici s vysokým obsahem vody (jablka). V navazujících experimentech bude testována použitelnost metody pro matrice s nízkým obsahem vody (mouka, ovocné čaje), vyšším obsahem tuku (luštěniny, olejniny) a pro komplexní/složitá matrice (koření, čaje, chmel apod.).

### Přehled jednotlivých pesticidů:

#### ORGANOFOSFOROVÉ INSEKTICIDY

acephate	CAS: 30560-19-1
azinphos-ethyl	CAS: 2642-71-9
azinphos-methyl	CAS: 86-50-0
chlorfenvinphos	CAS: 41483-43-6
chlorpyrifos	CAS: 2921-88-2
chlorpyrifos-methyl	CAS: 5598-13-0
diazinon	CAS: 333-41-5
dichlorvos	CAS: 62-73-7
dimethoat	CAS: 60-51-5
ethion	CAS: 563-12-2
etrimfos	CAS: 38260-54-7
fenitrothion	CAS: 122-14-5
fenthion	CAS: 55-38-9
heptenophos	CAS: 23560-95-0
malathion	CAS: 121-75-5
methacrifos	CAS: 30864-28-9
methamidophos	CAS: 10265-92-6
methidathion	CAS: 950-37-8
monocrotophos	CAS: 6923-22-4
omethoat	CAS: 1113-02-6
parathion	CAS: 56-38-2
parathion-methyl	CAS: 298-00-0
phosalone	CAS: 2310-17-0
phosmet	CAS: 732-11-6
phosphamidon	CAS: 13171-21-6
pirimiphos-methyl	CAS: 29232-93-7
mevinphos ( <i>cis</i> , <i>trans</i> )	CAS: 26718-65-0
tolclofos-methyl	CAS: 57018-04-9
triazophos	CAS: 24017-47-8

## ORGANOCHLOROVANÉ PESTICIDY

endosulfan ( $\alpha$ , $\beta$ , SO <sub>4</sub> )	CAS: 115-29-7
chlorothalonil	CAS: 1897-45-6
aldrin	CAS: 309-00-2
dieldrin	CAS: 60-57-1
endrin	CAS: 72-20-8
<i>o,p</i> -DDD	CAS: 53-19-0
<i>p,p</i> -DDD	CAS: 72-54-8
<i>o,p</i> -DDE	CAS: 72-55-9
<i>p,p</i> -DDE	CAS: 72-55-9
<i>o,p</i> -DDT	CAS: 784-02-6
<i>p,p</i> -DDT	CAS: 50-29-3
heptachlor	CAS: 76-44-8
hexachlorbenzen (HCB)	CAS: 118-74-1
$\alpha$ -HCH	CAS: 319-85-7
$\beta$ -HCH	CAS: 58-89-9
$\gamma$ -HCH (lindan)	CAS: 58-89-9
$\delta$ -HCH	CAS: 6108-10-7

## N-TRIHALOGENMETHYLTHIO SLOUČENINY

captan	CAS: 133-06-2
folpet	CAS: 133-07-3
dichlofluanid	CAS: 1085-98-9
tolyfluanid	CAS: 731-27-1

## PYRETHROIDY

bifenthrin	CAS: 82657-04-3
$\beta$ -cyfluthrin	CAS: 68359-37-5
$\lambda$ -cyhalotrin	CAS: 68085-85-8
cypermethrin	CAS: 52315-07-8
deltamethrin	CAS: 52918-63-5
fenvalerate	CAS: 51630-58-1
permethrin	CAS: 52645-53-1

## DIKARBOXIMIDY

procymidone	CAS: 32809-16-8
vinclozolin	CAS: 50471-44-8
iprodione	CAS: 36734-19-7

## KARBAMÁTY

carbaryl	CAS: 63-25-2
fenoxy carb	CAS: 79127-80-3
chlorpropham	CAS: 101-21-3
pirimicarb	CAS: 23103-98-2
propham	CAS: 122-42-9

## TRIAZOLY

difenoconazole	CAS: 119446-68-3
penconazole	CAS: 66246-88-6

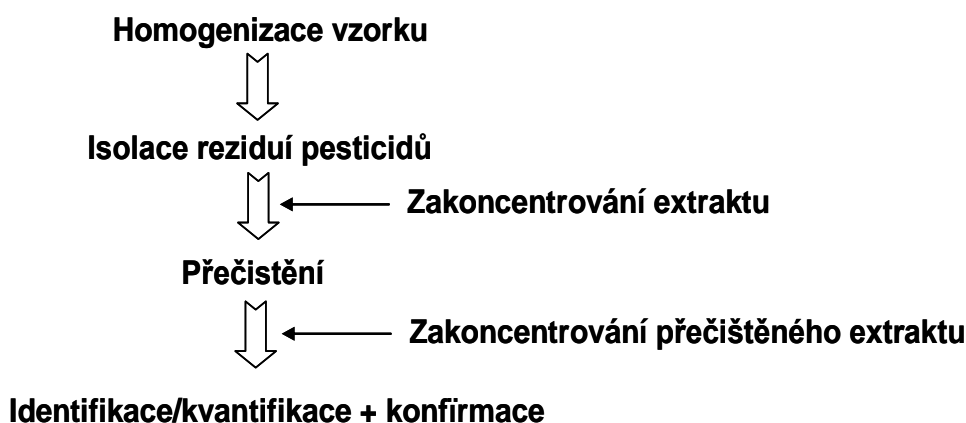
tebuconazole	CAS: 107534-96-3
tetraconazole	CAS: 112281-77-3
triadimefon	CAS: 43121-43-3
triazamate	CAS: 112143-82-5

## DALŠÍ

bupirimate (pyrimidin)	CAS: 41483-43-6
imazalil (azol)	CAS: 35554-44-0
bromopropylate (benzilát)	CAS: 18181-80-1
metalaxyl (acylalanin)	CAS: 57837-19-1
tetradifon (sulfon)	CAS: 116-29-0
thiabendazol (benzimidazol)	CAS: 148-79-8
cyprodinil (anilinopyrimidine)	CAS: 121552-61-2
fenarimol (pyrimidin)	CAS: 60168-88-9
kresoxim-methyl (oximinoacetát)	CAS: 143390-89-0
pyridaben (chloropyridazin)	CAS: 96489-71-3
trifloxystrobin (oximinoacetát)	CAS: 141517-21-7

### 2.1 Princip metody

Princip stanovení reziduí pesticidů z matric rostlinného původu je následující (viz. **Obr. 2**). Pesticidy jsou z navážky vzorku extrahovány organickým rozpouštědlem a primární extrakty jsou přečištěny pomocí vysokoučinné gelové permeační chromatografie (HPGPC). Identifikace a kvantifikace analytů v přečištěném extraktu se provádí metodou kapilární plynové chromatografie (GC) s využitím selektivních způsobů detekce (detektor elektronového záchytu – ECD a dusíko-fosforový detektor – NPD) na základě srovnání retenčních časů a ploch pík analytů a standardů. Obsahy analytů se stanovují metodou vnějšího standardu, tj. interpolací z kalibračních křivek sestavených pro jednotlivé analyty. K identifikaci a kvantifikaci některých analytů a ke confirmaci identity pozitivních nálezů je využita metoda plynové chromatografie s hmotnostně selektivní detekcí (GC/MSD).



**Obr. 2:** Schéma stanovení reziduí pesticidů v potravinách rostlinného původu.

## 2.2 Použité přístroje a standardní roztoky

### *Přečištění (HPGPC)*

- automatický systém pro kapalinovou chromatografii, sestávající z vysokotlaké pumpy 305, manometrického modulu 805 Manometric Module, nástříkové pumpy 402 Syringe Pump a automatického dávkovače 231 XL Sampling Injector, vše GILSON (USA)
- gelová kolona pro HPGPC (600 × 7,5 mm) plněná gelem PL-gel, velikost částic 10 μm, velikost pórů 50 Å, Polymer Laboratories Ltd. (UK)
- nerezová kolona pro GPC (500 × 8 mm) naplněná gelem Bio-Beads S-X3 v mobilní fázi cyklohexan-ethylacetát (1:1, v/v)

### *Plynový chromatograf s konvenčními detektory (GC – ECD/NPD)*

- HP 6890 Plus vybavený elektronickou kontrolou tlaku (EPC), split/splitless injektorem, detektorem elektronového záchytu (ECD) a dusíko-fosforovým detektorem (NPD), Hewlett-Packard (USA)
- automatický injektor pro plynový chromatograf HP 7683, Hewlett-Packard (USA)
- nástříková stříkačka 10 μl, Hamilton (USA)

### *Plynový chromatograf s hmotnostně-selektivní detekcí (GC - /MSD)*

- HP 6890 N vybavený elektronickou kontrolou tlaku (EPC), split/splitless injektorem a hmotnostně-selektivním detektorem MSD 5975 Inert XL, Agilent (USA)
- automatický injektor pro plynový chromatograf 7683B Series, Agilent (USA)
- nástříková stříkačka 10 μl, Hamilton (USA)

### *Kolona pro GC*

- kapilární křemenná kolona pro plynovou chromatografii s chemicky vázanou fází:  
DB-5 MS 60 m × 0,25 mm × 0,25 μm; (5% fenyl)-methylpolysiloxan, J&W Scientific (USA)

### *Chemikálie, roztoky a materiály*

- certifikované individuální standardy pesticidů, Dr. Ehrenstorfer (SRN) a Pestanal, Riedel de Haën (SRN)
- *zásobní roztoky pesticidů v toluenu,*  
síran sodný p.a., sušený žiháním při 600°C 7 hod, Lachema Brno (ČR)  
ethylacetát pro analýzu pesticidů, Scharlau (SRN)  
cyklohexan, toluen pro analýzu pesticidů, MERCK (SRN)  
papírové filtry se žlutou páskou - středně velké póry, Filtrak (SRN)
- Plyny:  
helium (Siad, ČR), čistota 5.0  
dusík (Siad, ČR), čistota 5.0  
vodík (Linde technoplyn, ČR), čistota 5.0  
syntetický vzduch (Siad), čistota 5.0

## 2.3 Příprava standardů

### *Zásobní standardy*

Zásobní roztoky standardů individuálních pesticidů byly připraveny navážením jednotlivých certifikovaných gramážových standardů do odměrných baněk na analytických vahách. Odvážené množství bylo rozpuštěno v organickém rozpouštědle a doplněno po rysku. Odpovídající množství zásobního roztoku bylo odměřeno mikrodávkačím a převedeno do odměrné banky. Po nadávkování všech individuálních standardů byl příslušný směsný standard doplněn v odměrné baňce organickým rozpouštědlem po rysku.

### *Kalibrační standardy*

V experimentech bylo používáno 6 kalibračních standardů. Kalibrační standard o nejvyšší koncentraci (STD1) byl připraven naředěním směsného standardu na příslušnou koncentrační hladinu. Ostatní kalibrační standardy byly připraveny rozředěním standardu STD1 toluenem do odměrných baněk.

### *Příprava standardů určených k cílené kontaminaci vzorků (kontrola výtěžnosti)*

Pro účely ověření správnosti metody (vyjádřené jako výtěžnost), byly rozředěním směsných standardů připraveny 2 výrazně odlišné koncentrační hladiny standardů (tzv. spikovací směsi) ve stejném organickém rozpouštědle, jako byly realizovány extrakce.

### *Příprava standardů pro ověření elučního profilu pesticidů při HPGPC*

Standard pro stanovení elučního profilu pesticidů na koloně PL- gel byl připraven ze spikovacích standardů opatrným odfoukáním jemným proudem dusíku a rozpuštěním v mobilní fázi.

### *Matriční standardy*

Kalibrace na matriční standardy byla realizována za účelem kompenzace matričních efektů při analýze vzorku plynovou chromatografií. Matriční standardy byly připraveny následujícím způsobem: přečištěný extrakt vzorku neobsahujícího rezidua pesticidů (tj. slepý vzorek) připravený postupem stejným jako vzorky, byl po odpaření do sucha rozpuštěn v 1 ml odpovídajícího kalibračního standardu a převeden do vialky.

Matriční standardy byly připravovány ze stejného typu matrice jako analyzované vzorky. V případě, že nebyl k dispozici slepý vzorek dané matrice, byla použita příbuzná matrice.

## 2.4 Eluční profily

Eluční profil pesticidů na koloně PL - gel byl testován za účelem ověření správného nastavení jímáné frakce eluentu z kolony. Alikvot směsného standardu byl automaticky nanesen (GPC systém Gilson) na kolonu PL – gel se stabilizovaným průtokem. Eluent z kolony byl jímán po frakcích o objemu 1 ml. Po najímání bylo z každé frakce odstraněno rozpouštědlo opatrným odfoukáním proudem dusíku a zbytek byl rozpuštěn v organickém rozpouštědle a analyzován plynovou chromatografií.



## 2.5 Stanovení pracovních charakteristik metody

V rámci validační studie pro stanovení reziduí pesticidů bylo provedeno stanovení následujících pracovních charakteristik:

- správnost (pravdivost a přesnost)
- pracovní rozsah a linearitu
- selektivita metody
- mez detekce a mez stanovitelnosti
- robustnost

### Pravdivost metody

Správnost metody je definována jako těsnost shody mezi pravou (skutečnou, resp. referenční hodnotou) a naměřenou střední hodnotou výsledku analýzy. Principiálně může být zjištěna několika způsoby – (i) porovnáním výsledků metody s potvrzenou referenční (primární) metodou, (ii) analýzou vzorku se známou koncentrací (např. certifikovaný referenční materiál, CRM) a (iii) fortifikací testovaného materiálu přídatkem standardu na známé koncentrační hladině (tzv. spike). Vzhledem k limitované stabilitě moderních pesticidů jsou komerční CRM prakticky nedostupné. Rutinně je tedy pravdivost metody ověřována analýzou materiálu s přídatkem standardu, je tedy vyjádřena jako výtěžnost.

V **Tab. IV** jsou uvedeny výtěžnosti jednotlivých látek na HPGPC za definovaných podmínek. Při přečištění extraktů rostlinných matric na HPGPC je z důvodu překryvu elučních pásů matričních koextraktů a analytů na HPGPC nižší výtěžnost lambda-cyhalotrinu (50 %). V **Tab. V** jsou uvedeny výtěžnosti jednotlivých látek získané při analýze vzorku jablek s přídatkem standardu. Při analýzách reálných vzorků byla pozorována nižší výtěžnost pesticidů imazalilu a thiabendazolu. Výtěžnost extrakce těchto látek je ovlivněna hodnotou pH analyzované matrice (zejména pro více kyselé potraviny – pomeranče atd.), a proto je nutné brát tento faktor v potaz. V těchto druzích matric může být rovněž nižší výtěžnost více polárních organofosforových insekticidů (methamidophos, acephate, fenthion atd.). Experimenty zabývající se zvýšením výtěžnosti těchto pesticidů při extrakčním kroku budou realizovány. V případě pozitivních nálezů všech výše uvedených analytů je jejich obsah ve vzorku korigován podle zjištěné aktuální výtěžnosti metody.

**Tab. IV. Výtěžnosti pesticidů na HPGPC (matrice – jablka)**

pesticid	detekce	koncentrace [mg/kg]	výtěžnost [%]
aldrin	GC/ECD	0,107	88
beta-cyfluthrin	GC/ECD	0,040	64
bifenthrin	GC/ECD	0,045	74
brompropylate	GC/ECD	0,043	97
captan	GC/MS	0,063	92
cyhalothrin-lambda	GC/ECD	0,034	51
cypermethrin	GC/ECD	0,051	81
deltamethrin	GC/ECD	0,119	92
dieldrin	GC/MS	0,107	96
dichlofluanid	GC/ECD	0,090	94
endosulfan-alfa	GC/ECD	0,020	94
endosulfan-beta	GC/ECD	0,017	88
endosulfan-SO4	GC/ECD	0,022	85
endrin	GC/ECD	0,113	92
fenvalerate	GC/ECD	0,047	79
folpet	GC/ECD	0,138	93
HCB	GC/ECD	0,117	71
heptachlor	GC/ECD	0,102	90
HCH-alfa	GC/ECD	0,198	80
HCH-beta	GC/ECD	0,114	90
HCH-delta	GC/ECD	0,117	89
chlorothalonil	GC/ECD	0,033	106
iprodion	GC/ECD	0,533	87
lindan	GC/ECD	0,094	91
o,p-DDD	GC/MS	0,124	96
o,p-DDE	GC/ECD	0,100	92
o,p-DDT	GC/ECD	0,104	89
p,p-DDD	GC/MS	0,098	92
p,p-DDE	GC/ECD	0,090	91
p,p-DDT	GC/ECD	0,109	85
permethrin	GC/ECD	0,103	91
procymidone	GC/MS	0,061	92
tetradifon	GC/MS	0,021	126
tolylfluanid	GC/MS	0,023	100
vinclozolin	GC/ECD	0,020	93
acephate	GC/NPD	0,202	130
azinphos-ethyl	GC/NPD	0,118	96
azinphos-methyl	GC/NPD	0,119	99
bupirimate	GC/NPD	0,156	85
carbaryl	GC/MS	0,239	94

Tab. IV. Výtěžnosti pesticidů na HPGPC (matrice – jablka) /pokračování/

pesticid	detekce	koncentrace [mg/kg]	výtěžnost [%]
diazinon	GC/NPD	0,115	95
dichlorvos	GC/NPD	0,178	59
dimethoate	GC/NPD	0,154	100
ethion	GC/NPD	0,142	95
etrimfos	GC/NPD	0,118	91
fenitrothion	GC/NPD	0,162	96
fenoxy carb	GC/NPD	0,609	97
fenthion	GC/NPD	0,205	54
heptenophos	GC/NPD	0,285	98
chlorfenvinphos	GC/NPD	0,149	102
chlorpropham	GC/NPD	0,640	97
chlorpyrifos	GC/NPD	0,221	94
chlorpyrifos-methyl	GC/NPD	0,238	93
imazalil	GC/NPD	0,306	29
malathion	GC/NPD	0,130	93
metalaxyl	GC/MS	0,600	94
methacriphos	GC/NPD	0,149	79
methamidophos	GC/NPD	0,391	94
methidathion	GC/NPD	0,115	93
mevinphos	GC/NPD	0,196	108
monocrotophos	GC/NPD	0,286	94
omethoate	GC/NPD	0,487	100
parathion-ethyl	GC/NPD	0,196	98
parathion-methyl	GC/MS	0,205	96
phosalone	GC/NPD	0,266	96
phosmet	GC/NPD	0,223	97
phosphamidon	GC/NPD	0,281	98
pirimicarb	GC/NPD	0,364	64
pirimiphos-methyl	GC/NPD	0,193	94
propham	GC/NPD	0,475	84
thiabendazole	GC/MS	0,369	92
tolclofos-methyl	GC/MS	0,208	96
triazophos	GC/NPD	0,180	91
cyprodinyl	GC/NPD	0,135	87
difenoconazole	GC/ECD	0,083	123
fenarimol	GC/ECD	0,165	83
kresoxim-methyl	GC/MS	0,071	94
penconazole	GC/MS	0,063	110
pyridaben	GC/MS	0,193	72
tebuconazole	GC/ECD	0,080	80
tetraconazole	GC/ECD	0,089	78
triadimefon	GC/MS	0,050	68
triazamate	GC/ECD	0,074	104
trifloxystrobin	GC/ECD	0,135	98

**Tab. V.** Průměrná výtěžnost pesticidů při analýze vzorku jablek s přidavkem standardu pesticidů

pesticid	detekce	koncentrace [mg/kg]	výtěžnost [%]
aldrin	GC/ECD	0,107	82
beta-cyfluthrin*	GC/ECD	0,040	80
bifenthrin	GC/ECD	0,045	87
brompropylate	GC/ECD	0,043	90
captan	GC/MS	0,063	85
cyhalothrin-lambda*	GC/ECD	0,034	53
cypermethrin	GC/ECD	0,051	85
deltamethrin	GC/ECD	0,119	92
dieldrin	GC/MS	0,107	94
dichlofluanid	GC/ECD	0,090	93
endosulfan-alfa	GC/ECD	0,020	101
endosulfan-beta	GC/ECD	0,017	91
endosulfan-SO4	GC/ECD	0,022	91
endrin	GC/ECD	0,113	88
fenvalerate	GC/ECD	0,047	90
folpet	GC/ECD	0,138	127
HCB	GC/ECD	0,117	83
heptachlor	GC/ECD	0,102	85
HCH-alfa	GC/ECD	0,198	89
HCH-beta	GC/ECD	0,114	86
HCH-delta	GC/ECD	0,117	82
chlorothalonil	GC/ECD	0,033	109
iprodion	GC/ECD	0,533	86
lindan	GC/ECD	0,094	81
o,p-DDD	GC/MS	0,124	94
o,p-DDE	GC/ECD	0,100	94
o,p-DDT	GC/ECD	0,104	88
p,p-DDD	GC/MS	0,098	96
p,p-DDE	GC/ECD	0,090	85
p,p-DDT	GC/ECD	0,109	87
permethrin	GC/ECD	0,103	85
procymidone	GC/MS	0,061	85
tetradifon	GC/MS	0,021	92
tolyfluanid	GC/MS	0,023	94
vinclozolin	GC/ECD	0,020	87
acephate	GC/NPD	0,202	112
azinphos-ethyl	GC/NPD	0,118	92
azinphos-methyl	GC/NPD	0,119	97
bupirimate	GC/NPD	0,156	84

\* obsah analytů je vždy korigován podle aktuální výtěžnosti metody

Tab. V. : pokračování

pesticid	detekce	koncentrace [mg/kg]	výtěžnost [%]
carbaryl	GC/MS	0,239	96
diazinon	GC/NPD	0,115	90
dichlorvos	GC/NPD	0,178	86
dimethoate	GC/NPD	0,154	92
ethion	GC/NPD	0,142	95
etrimfos	GC/NPD	0,118	90
fenitrothion	GC/NPD	0,162	91
fenoxycarb	GC/NPD	0,609	105
fenthion*	GC/NPD	0,205	64
heptenophos	GC/NPD	0,285	88
chlorfenvinphos	GC/NPD	0,149	99
chlorpropham	GC/NPD	0,640	89
chlorpyrifos	GC/NPD	0,221	93
chlorpyrifos-methyl	GC/NPD	0,238	92
imazail*	GC/NPD	0,306	39
malathion	GC/NPD	0,130	93
metalaxyl	GC/MS	0,600	85
methacriphos	GC/NPD	0,149	92
methamidophos	GC/NPD	0,391	94
methidathion	GC/NPD	0,115	99
mevinphos	GC/NPD	0,196	103
monocrotophos	GC/NPD	0,286	95
omethoate	GC/NPD	0,487	96
parathion-ethyl	GC/NPD	0,196	97
parathion-methyl	GC/MS	0,205	93
phosalone	GC/NPD	0,266	93
phosmet	GC/NPD	0,223	99
phosphamidon	GC/NPD	0,281	90
pirimicarb	GC/NPD	0,364	70
pirimiphos-methyl	GC/NPD	0,193	93
propham	GC/NPD	0,475	88
thiabendazole *	GC/MS	0,369	74
tolclofos-methyl	GC/MS	0,208	91
triazophos	GC/NPD	0,180	90
cyprodinyl	GC/NPD	0,135	65
difenoconazole	GC/ECD	0,083	95
fenarimol	GC/ECD	0,165	91
kresoxim-methyl	GC/MS	0,071	100
penconazole	GC/MS	0,063	87
pyridaben	GC/MS	0,193	104
tebuconazole	GC/ECD	0,080	94
tetraconazole	GC/ECD	0,089	88
triadimefon	GC/MS	0,050	90
triazamate	GC/ECD	0,074	102
trifloxystrobin	GC/ECD	0,135	106

\* obsah analytů je vždy korigován podle aktuální výtěžnosti metody

## Opakovatelnost metody

Opakovatelnost lze charakterizovat relativní směrodatnou odchylkou (RSD, %), která byla vypočtena ze šesti opakovaných stanovení na dvou různých koncentračních hladinách. **Tabulka VI** dokumentuje dosažené hodnoty RSD získané v systémech GC-ECD/NPD a GC-MS.

**Tab. VI.** Relativní směrodatné odchylky při stanovení pesticidů ve vzorcích se známým obsahem analytů (ECD,NPD detekce)

pesticid	koncentrace [mg/kg]	detekce	RSD [%]	pesticid	koncentrace [mg/kg]	detekce	RSD [%]
acephate	0,202	NPD	26,6	malathion	0,130	NPD	7,1
aldrin	0,107	ECD	7,3	metalaxyl	0,600	NPD	18,7
azinphos-ethyl	0,118	NPD	10,0	methacriphos	0,149	NPD	9,7
azinphos-methyl	0,119	NPD	9,7	methamidophos	0,391	NPD	22,9
beta-cyfluthrin-I+II	0,040	ECD	8,8	methidathion	0,115	NPD	8,7
bifenthrin	0,045	ECD	6,3	mevinphos	0,196	NPD	8,9
brompropylate	0,043	ECD	4,8	monocrotophos	0,286	NPD	20,8
bupirimate	0,156	NPD	20,2	o,p-DDD	0,124	ECD	7,4
captan	0,063	ECD	3,1	o,p-DDE	0,100	ECD	6,8
carbaryl	0,239	NPD	18,7	o,p-DDT	0,104	ECD	6,5
chlorfenvinphos I+II	0,149	NPD	9,6	omethoate	0,487	NPD	26,1
chlorothalonil	0,033	ECD	9,6	p,p-DDD	0,098	ECD	7,9
chlorpropham	0,640	NPD	8,7	p,p-DDE	0,090	ECD	6,6
chlorpyrifos	0,221	NPD	6,0	p,p-DDT	0,109	ECD	6,7
chlorpyrifos-methyl	0,238	NPD	7,1	parathion-ethyl	0,196	NPD	7,7
cyhalothrin-lambda	0,034	ECD	9,7	parathion-methyl	0,205	NPD	0,6
cypermethrin-I-IV	0,051	ECD	4,7	permethrin-II	0,103	ECD	10,2
deltamethrin	0,119	ECD	13,1	phosalone	0,266	NPD	6,9
diazinon	0,115	NPD	6,7	phosmet	0,223	NPD	10,3
dichlofluanid	0,090	ECD	10,9	phosphamidon I+II	0,281	NPD	10,6
dichlorvos	0,178	NPD	7,7	pirimicarb	0,364	NPD	33,5
dieldrin	0,107	ECD	7,4	pirimiphos-methyl	0,193	NPD	14,5
dimethoate	0,154	NPD	14,4	procymidone	0,061	ECD	3,1
endosulfan-alfa	0,020	ECD	10,7	propham	0,475	NPD	9,8
endosulfan-beta	0,017	ECD	5,3	tetradifon	0,021	ECD	5,9
endosulfan-SO <sub>4</sub>	0,022	ECD	4,3	thiabendazole	0,369	NPD	16,5
endrin	0,113	ECD	7,4	tolclofos-methyl	0,208	NPD	7,8
ethion	0,142	NPD	8,7	tolyfluanid	0,023	ECD	9,5
pesticid	koncentrace [mg/kg]	GC/MS m/z	RSD [%]	pesticid	koncentrace [mg/kg]	GC/MS m/z	RSD [%]
etrimfos	0,118	NPD	8,5	triazophos	0,180	NPD	14,2
fenitrothion	0,162	NPD	8,6	vinclozolin	0,020	ECD	9,7
fenoxycarb	0,609	NPD	20,5	cyprodinyl	0,135	NPD	17,6
fenthion	0,205	NPD	14,5	difenoconazole I+II	0,083	ECD	3,8
fenvalerate-I+II	0,047	ECD	9,0	fenarimol	0,165	ECD	10
folpet	0,138	ECD	7,8	kresoxim-methyl	0,071	ECD	8,9
HCB	0,117	ECD	8,0	penconazole	0,063	ECD	10,1
HCH-alfa	0,198	ECD	7,8	tebuconazole	0,193	ECD	6,0
HCH-beta	0,114	ECD	5,6	tetraconazole	0,080	ECD	5,2
HCH-delta	0,117	ECD	7,5	triadimefon	0,089	ECD	6,5

heptachlor	0,102	ECD	4,2	triazamate	0,050	ECD	7,6
heptenophos	0,285	NPD	10,0	trifloxystrobin	0,074	ECD	8,8
imazalil	0,306	ECD	10,5	lindan	0,094	ECD	7,6
acephate	0,202	136	21,2	malathion	0,130	127	4,1
aldrin	0,107	263	7,4	metalaxyl	0,600	206	3,8
azinhos-ethyl	0,118	132	9,1	methaciphos	0,149	208	3,4
azinhos-methyl	0,119	160	8,9	methamidophos	0,391	141	15,0
beta-cyfluthrin-I+II	0,040	163	8,2	methidathion	0,115	145	4,8
bifenthrin	0,045	181	5,6	mevinphos	0,196	127	5,1
brompropylate	0,043	341	7,4	monocrotophos	0,286	127	16,7
bupirimate	0,156	273	10,6	o,p-DDD	0,124	235	7,9
captan	0,063	79	9,8	o,p-DDE	0,100	318	7,8
carbaryl	0,239	144	5,7	o,p-DDT	0,104	235	8,3
chlorfenvinphosI+II	0,149	267	5,2	omethoate	0,487	156	17,3
chlorothalonil	0,033	266	2,9	p,p-DDD	0,098	199	8,1
chlorpropham	0,640	213	3,7	p,p-DDE	0,090	246	8,1
chlorpyrifos	0,221	314	7,7	p,p-DDT	0,109	235	9,3
chlorpyrifos-methyl	0,238	286	7,3	parathion-ethyl	0,196	291	8,0
cyhalothrin-lambda	0,034	181	8,7	parathion-methyl	0,205	263	8,1
cypermethrin-I-IV	0,051	181	11,7	permethrin-II	0,103	183	7,5
deltamethrin	0,119	253	12,6	phosalone	0,266	182	9,7
diazinon	0,115	179	7,8	phosmet	0,223	160	16,6
dichlofluanid	0,090	123	4,2	phosphamidon I+II	0,281	127	9,0
dichlorvos	0,178	185	10,3	pirimicarb	0,364	166	9,0
dieldrin	0,107	263	8,3	pirimiphos-methyl	0,193	290	9,8
dimethoate	0,154	125	4,0	procymidone	0,061	283	3,9
endosulfan-alfa	0,020	241	6,4	propham	0,475	179	3,5
endosulfan-beta	0,017	195	6,3	tetradifon	0,021	159	5,2
endosulfan-SO <sub>4</sub>	0,022	272	4,9	thiabendazole	0,369	201	16,4
endrin	0,113	263	8,0	tolclofos-methyl	0,208	265	7,6
ethion	0,142	231	9,9	tolyfluanid	0,023	137	4,5
etrimfos	0,118	292	7,1	triazophos	0,180	161	6,9
fenitrothion	0,162	277	7,7	vinclozolin	0,020	212	3,4
fenoxy carb	0,609	255	10,1	cyprodinyl	0,135	224	12,9
fenthion	0,205	278	14,2	difenoconazole	0,083	207	11,6
fenvalerate-I+II	0,047	167	9,0	fenarimol	0,165	219	12,5
folpet	0,138	130	11,9	kresoxim-methyl	0,071	116	16,4
HCB	0,117	284	7,5	penconazole	0,063	161	4,8
HCH-alfa	0,198	219	7,6	pyridaben	0,193	147	18,1
HCH-beta	0,114	219	7,0	tebuconazole	0,080	252	19,1
HCH-delta	0,117	219	7,9	tetraconazole	0,089	338	10,0
heptachlor	0,102	272	7,5	triadimefon	0,050	208	12,1
heptenophos	0,285	124	7,4	triazamate	0,074	262	17,4
imazalil	0,306	215	31,5	trifloxystrobin	0,135	222	27,2
lindan	0,094	183	7,5				

### Pracovní rozsah a linearita

Pracovní rozsah je rozsah koncentrace analytu, v němž lze dosáhnout přijatelné přesnosti stanovení. Pracovní rozsah je obecně širší než lineární rozsah, ve kterém je kalibrační vztah lineární.

Linearita analytické metody je její schopnost zajistit výsledky, které jsou přímo nebo pomocí definované matematické transformace úměrné koncentraci analytu ve vzorku v daném rozsahu.

### **Selektivita metody**

Selektivitou se rozumí schopnost analytické metody stanovit správně a jednoznačně cílový analyt v přítomnosti složek matrice vzorku. Vzhledem k tomu, že při analýze reálných vzorků (extrakce, přečištění extraktu atd.) nelze zcela odstranit složky matrice (rostlinné vosky a pigmenty – chlorofyly, karotenoidy atd.) izolované spolu s cílovými analyty, dochází při finálním plynově-chromatografickém stanovení k narušování signálu analytu signály těchto složek. Tento fakt následně ztěžuje identifikaci a kvantifikaci cílových analytů.

Plynová chromatografie s ECD detekcí umožňuje selektivní stanovení organohalogenových sloučenin, interference se vyskytují u matric s vyšším obsahem sloučenin (např. obsahující nenasycené vazby – terpenické silice v případě pomerančů; karoteny při stanovení mrkve, rajčat; atd.), které také poskytují odezvu při tomto způsobu detekce a nejsou odděleny během čistícího kroku.

Plynová chromatografie s NPD detekcí umožňuje selektivně stanovit látky obsahující v molekule atom dusíku popř. fosforu. Tato detekce je velmi selektivní, interference se vyskytují pouze v případě komodit s obsahem látek, zahrnujících ve své struktuře atomy dusíku (glukosinoláty a jejich degradační produkty v rostlinách čeledi *Brassicaceae*).

Aplikace GC-MS s hmotnostním analyzátozem typu kvadrupól slouží především ke confirmaci podezřelých nálezů ve vzorcích. V případě MRM, kdy analýzou velkého množství pesticidů nevyhnutelně dochází ke vzniku „kritických párů“ (koelucí dvou a více standardů), slouží k identifikaci těchto látek. Jak již bylo zmíněno v úvodu, kvadrupól pracuje ve dvou modech - Scan (snímání zadaného rozsahu  $m/z$ ) a SIM (*selected ion monitoring* – snímání vybraných iontů). V módu SIM je u kvadrupólu dosaženo výrazně vyšší citlivosti snímáním jen několika vybraných iontů pro každý analyt, ale ztrácí se komplexní spektrální informace. Nicméně, v současné době již existují kvadrupólové hmotnostní analyzátory umožňující pracovat v kombinovaném modu SIM/Scan, který umožňuje při zachování požadované citlivosti získat i plnou spektrální informaci.

### **Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ)**

Mez detekce (LOD) analytu je nejnížší množství analytu ve vzorku, které je možné detekovat, ale které není kvantifikovatelné jako exaktní hodnota.

Mez stanovitelnosti (LOQ) je vyjádřena jako nejnížší koncentrace analytu, jež může být stanovena s definovaným stupněm přesnosti (správnosti a shodnosti). Obvykle je to nejnížší bod kalibrační křivky (lowest calibration level, LCL) při vyloučení slepého pokusu.

Pro účely stanovení LOD byl připraven matriční standard jablek na koncentrační úrovni odpovídající nejnížšímu bodu kalibrační křivky. Mez detekce byla určena jako koncentrace analytu, pro kterou je dosaženo průměrné hodnoty podílu signál / šum  $S/N = 3$ , přičemž byl zohledněn šum v okolí píku daného analytu. Mez stanovitelnosti (LOQ) byla stanovena jako koncentrace odpovídající trojnásobku meze detekce (LOD).



**Tabulka VII** uvádí přehled detekčních limitů. S ohledem na změny LOD a LOQ, ke kterým dochází např. při analýze různých matic nebo v důsledku zvýšení a/nebo poklesu účinnosti separace při stanovení plynovou chromatografií, jsou tyto hodnoty pouze orientační. Aktuální hodnota LOD/LOQ se vyhodnocuje vždy individuálně pro danou kombinaci analyt/matrice.

*Tab. VII. Meze detekce jednotlivých pesticidů v matrici (jablka) (nd=nedetekováno)*

pesticid	detekční limit [mg/kg]		
	ECD	NPD	MSD
acephate	nd	0,020	0,025
azinphos-Et	0,005	0,010	0,010
azinphos-Me	0,005	0,010	0,010
beta-cyfluthrin	0,001	nd	0,010
bifentrin	0,001	nd	0,010
bromopropylate	0,001	nd	0,010
bupirimate	0,005	nd	0,010
captan	0,010	nd	0,015
carbaryl	nd	0,010	0,005
cyhalothrin-lambda	0,005	nd	0,015
cypermethrin	0,005	nd	0,015
deltamethrin	0,005	nd	0,010
diazinon	nd	0,005	0,005
dichlofluanid	0,005	nd	0,005
dichlorvos	nd	0,005	0,010
dimethoate	nd	0,005	0,010
endosulfan-alfa	0,001	nd	0,010
endosulfan-beta	0,001	nd	0,010
endosulfan-SO4	0,001	nd	0,010
Ethion	nd	0,005	0,005
etrimfos	nd	0,005	0,010
fenitrothion	0,005	0,005	0,005
fenoxycarb	nd	0,020	0,005
fenthion	nd	0,010	0,010
fenvalerate	0,005	nd	0,020
Folpet	0,005	nd	0,010
heptenophos	nd	0,005	0,005
chlorothalonil	0,001	nd	0,005
chlorfenvinfos	0,005	0,010	0,005
chlorpropham	nd	0,020	0,005
chlorpyrifos	0,001	0,005	0,005
chlorpyrifos-me	0,001	0,005	0,005
imazalil	0,010	nd	0,010
malathion	0,010	0,005	0,005
metalaxyl	nd	0,025	0,030
metaciphos	nd	0,005	0,005
methamidophos	nd	0,025	0,025
methidathion	0,005	0,005	0,010
mevinphos	nd	0,005	0,005
monocrotophos	nd	0,010	0,010

Tab. VII/pokračování/. Meze detekce jednotlivých pesticidů (jablka) (nd=nedetkováno)

pesticid	detekční limit [mg/kg]		
	ECD	NPD	MSD
omethoate	nd	0,015	0,010
parathion-ethyl	nd	0,005	0,005
parathion-methyl	nd	0,005	0,005
phosalone	0,005	0,010	0,005
phosmet	0,010	0,005	0,010
phosphamidone	0,010	0,005	0,005
permethrin	0,005	nd	0,010
pirimicarb	nd	0,020	0,005
pirimiphos-me	nd	0,005	0,005
procymidone	0,005	nd	0,005
propham	nd	0,020	0,005
tetradifon	0,005	nd	0,005
thiabendazole	nd	0,025	0,010
tolclophos-me	0,005	0,005	0,010
tolyfluanid	0,005	nd	0,005
triazophos	nd	0,005	0,010
vinclozolin	0,005	nd	0,005
Aldrin	0,005	nd	0,010
dieldrin	0,005	nd	0,010
Endrin	0,005	nd	0,010
heptachlor	0,001	nd	0,010
o,p-DDD	0,001	nd	0,005
o,p-DDE	0,001	nd	0,005
o,p-DDT	0,001	nd	0,005
p,p-DDD	0,001	nd	0,005
p,p-DDE	0,001	nd	0,005
p,p-DDT	0,001	nd	0,005
HCB	0,001	nd	0,001
α-HCH	0,001	nd	0,001
β-HCH	0,001	nd	0,001
γ-HCH (lindan)	0,001	nd	0,001
δ-HCH	0,001	nd	0,001
cyprodinyl	nd	0,010	0,005
difenoconazole	0,010	nd	0,050
fenarimol	0,005	nd	0,010
kresoxim-methyl	0,005	0,040	0,010
penconazole	0,005	0,030	0,005
pyridaben	0,010	nd	0,004
tebuconazole	0,005	nd	0,010
tetraconazole	nd	0,005	0,010
triadimefon	0,005	nd	0,010
triazamate	0,005	0,015	0,010
trifloxystrobin	0,005	0,030	0,005

## Robustnost metody

Během zavádění analytického postupu byly identifikovány takové fáze analytického schématu, které mohou významně ovlivňovat výsledek analýzy. Jedná se o následující operace:

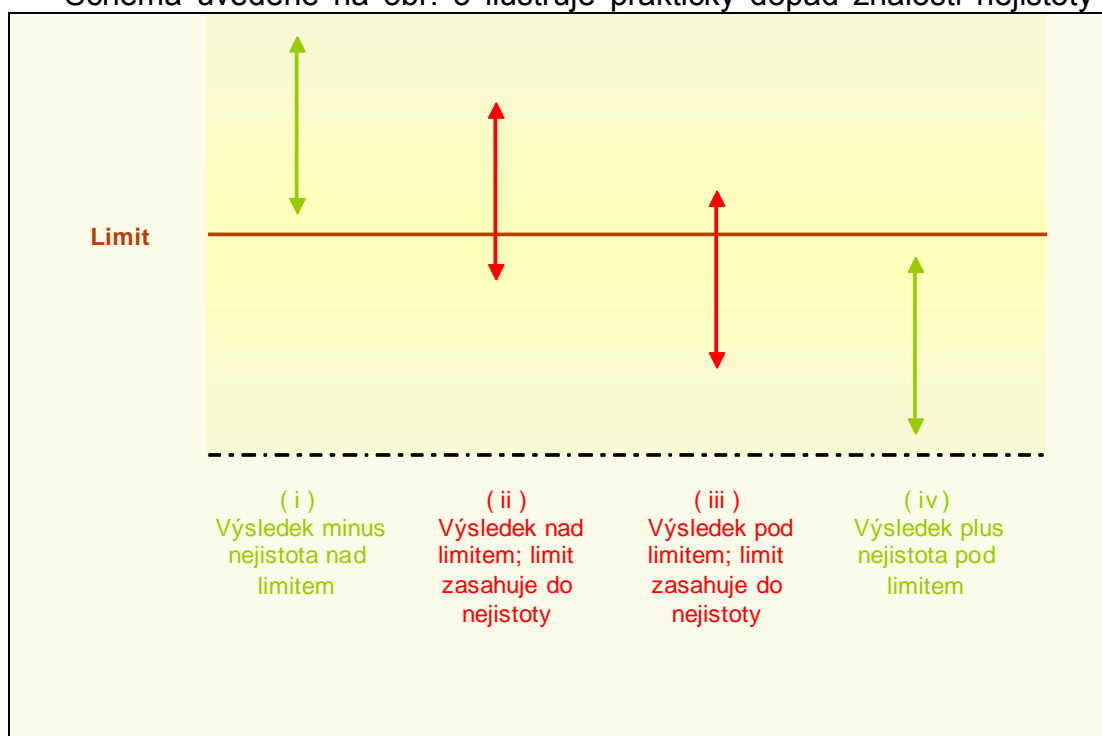
1. doba extrakce a objem extrakčního činidla
  - při extrakci pomocí vysokoobrátkového homogenizátoru dochází k zahřívání extrahované směsi, které by mohlo způsobit vytěkání analytů; proto je třeba provádět extrakci maximálně 2 minuty
  - v extraktu některých komodit, jako např. jahod dochází během převádění extraktu do mobilní fáze pro GPC k precipitaci sraženiny, ve které může zůstat zachycena (adsorbována) část analytů, což se vede ke snížení jejich výtěžnosti. V uvedeném případě je třeba zvýšit poměr objemu rozpouštědla vůči navažovanému vzorku, případně zvýšit pH matrice před extrakcí (na hodnotu pH = 7)
2. odpařování extrakční směsi popř. odfoukávání zbytků rozpouštědel
  - ovlivňuje výtěžnost těkavějších analytů: dichlorvos, heptenophos; odpařování rozpouštědel se provádí při definované teplotě lázně s výhodou použití vakuostatu, odfoukávání zbytků rozpouštědla proudem dusíku je nutno provádět co nejšetrněji
3. změna elučního objemu jímané frakce při HPGPC
  - může nastat v případě, kdy dochází k podtékání nebo k tlakování HPGPC systému; je proto nutné před analýzami ověřit rychlost průtoku mobilní fáze, se sekvencí neznámých vzorků pak analyzovat vždy alespoň jeden vzorek se známou koncentrací analytů popřípadě roztok standardu
4. kritické body plynově-chromatografického stanovení
  - odpařování rozpouštědla před analýzou na plynovém chromatografu, kdy při použití automatického injektoru se vzorky nastříkují až po delším setrvání na zásobníku injektoru (např. přes noc) a během této doby se část rozpouštědla odpaří a dojde k zakoncentrování vzorku
  - ovlivnění odezvy analytů přítomností matrice ve vzorku – „matriční efekty“:
    - odezvy některých analytů jsou přímo ovlivněny kvalitou GC systému (organofosforové insekticidy, z dalších např. captan, chlorothalonil), stav systému se testuje nástřikem standardní směsi pesticidů a jejím vizuálním porovnáním s ukázkovým chromatogramem standardu. Zejména nadměrné chvostování a snížené odezvy některých píků jsou ukazatelem zhoršení kvality systému. Aktuální stav systému je nutné posoudit, popřípadě provést nutnou údržbu (vyčištění popřípadě výměna lineru, odstranění části chromatografické kolony – asi 20 cm, výměna septa). Tuto údržbu je v praxi nutné provést po přibližně 200 nástřicích reálných vzorků (včetně matričních standardů)
  - při každé sekvenci vzorků je nutné analyzovat také slepý vzorek, aby byla identifikována interference analytů s nečistotami zavedenými při přípravě vzorku

### 3 Studium nejistoty stanovení reziduí pesticidů v jablkách

Nejistota [116] měření je charakteristika výsledku a její odhad je součástí validačního procesu. Nejistota je definována jako parametr přidružený výsledku měření, který charakterizuje rozptýlení hodnot, které mohou být důvodně přisuzovány k měřené veličině.

Je všeobecně známo, že výsledek každého měření je ovlivněn výskytem náhodných a systematických chyb a je tedy **odhadem** skutečné hodnoty. Vzhledem k tomu, že výsledky chemických analýz slouží jako podklady důležitých rozhodnutí (v oblasti reziduí pesticidů se jedná především o posuzování obsahu rezidua ve vzorku ve vztahu k MRL), je třeba, aby byly doprovázeny parametrem, který vyjadřuje míru spolehlivosti těchto výsledku. Tímto parametrem je nejistota měření.

Schéma uvedené na obr. 3 ilustruje praktický dopad znalosti nejistoty měření.



**Obr. 3.** Nejistota a limit [119]

Jak je patrné z obr. 3, v případech (i) a (iv) lze jednoznačně prohlásit, že výsledek zkoušky se nachází nad/pod limitem. Naopak v případech (ii) a (iii) toto rozhodnutí učinit nelze (bez znalosti nejistoty měření by mohl výsledek zkoušky vést k chybným závěrům).

Tato kapitola validační studie je zaměřena na porovnání postupu „zdola - nahoru“ s postupem „shora - dolu“ pro odhad nejistot stanovení koncentrace reziduí pesticidů v ovoci výše popsanou multireziduální metodou. Vzhledem k relativní obtížnosti postupu „zdola - nahoru“ byla tato metodika aplikována k odhadu nejistot skupiny pouze 14 pesticidů zahrnujících zástupce pyrethroidů, karbamátů a azolů, tj. sloučenin s různými fyzikálně - chemickými vlastnostmi. S pomocí tohoto postupu byly rovněž identifikovány významné zdroje celkové nejistoty. Pro všechny pesticidy zahrnuté v multireziduální metodě byla celková nejistota stanovení odhadnuta postupem „shora - dolu“. Jako reprezentativní matrice byla zvolena jablka.

### 3.1 Vyhodnocení nejistot postupem „zdola-nahoru“ („bottom-up“)

Metodika „zdola - nahoru“ je založena na principu identifikace a kvantifikace všech potenciálních zdrojů nejistoty, jejich následné kombinace a výpočtu celkové kombinované nejistoty. Tato metodika představuje původní navržený postup odhadu nejistot, nicméně praktické zkušenosti ukázaly, že jeho důsledná aplikace je v oblasti chemických analýz až příliš komplikovaná. V souladu s očekáváním lze předpokládat, že nejistoty řady faktorů (např. nejistoty plynoucí ze změn laboratorní teploty během analýzy) se podílejí na celkové nejistotě pouze malou měrou. Kalkulace těchto nejistot je tedy poněkud samoučelná a neopodstatněným způsobem zvyšuje časové i ekonomické náklady. Při úvahách o aplikaci postupu „zdola - nahoru“ bylo proto rozhodnuto, že budou vyhodnoceny nejistoty (jejich náhodná a systematická složka) spojené se třemi základními kroky metody tj. s extrakcí vzorku, přečištěním extraktu a analýzou přečištěného extraktu plynovou chromatografií (**Obr. 4**). Tato strategie znamená zjednodušení, které v jistém smyslu připomíná dále diskutovaný postup „shora - dolu“, protože takto vyhodnocené nejistoty uvedených tří analytických kroků v sobě již zahrnují jednotlivé dílčí zdroje. Nicméně takto modifikovaný postup „zdola - nahoru“ stále umožňuje vzájemné porovnání nejistot plynoucích z těchto analytických kroků.

Metodika „zdola - nahoru“ byla plně aplikována pouze při vyhodnocování nejistot spojených s GC kalibrací, tj. přípravou kalibračních standardů (**Obr. 4**).

K získání dat potřebných k odhadu nejistot postupem „zdola - nahoru“ byly realizovány 3

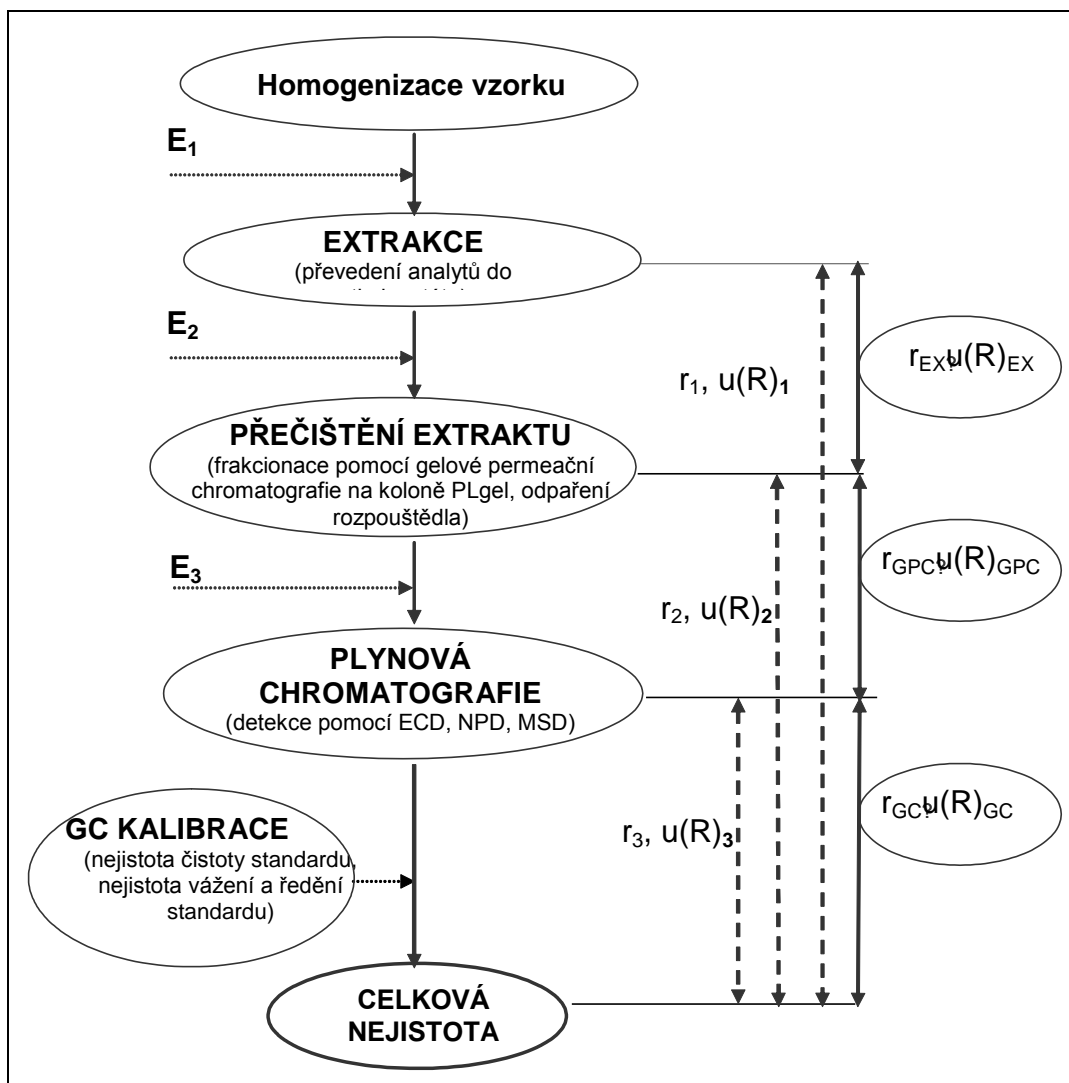
experimenty ( $E_1 - E_3$ ). V každém z těchto experimentů byla analyzována série 6 cíleně kontaminovaných matričních vzorků (matrice – jablka)

Popis experimentů:

Experiment  $E_1$ : analýza série 6 matričních vzorků cíleně kontaminovaných před extrakcí; po extrakci byly vzorky přečištěny a analyzovány metodou GC-MS.

Experiment  $E_2$ : analýza série 6 matričních vzorků cíleně kontaminovaných před přečištěním extraktu.

Experiment  $E_3$ : GC analýza série matričních standardů (příprava viz. kapitola 1.3.3.5)



**Obr. 4.** Příspěvky nejistot dílčích zdrojů k celkové nejistotě E1-3 znázorňuje počátek experimentu

E<sub>1-3</sub> (tj. fázi analytické metody, ve které byla provedena cílená kontaminace matričních vzorků), r<sub>1-3</sub> představují opakovatelnost získanou experimenty E1-3, u(R)<sub>1-3</sub> představují nejistotu výtěžnosti vyjádřenou z dat získaných experimenty E<sub>1-3</sub>, r<sub>EX</sub>, r<sub>GPC</sub>, r<sub>GC</sub> – představují opakovatelnost jednotlivých kroků metody (tj. extrakce, přečištění a GC stanovení), u(R)<sub>EX</sub>, u(R)<sub>GPC</sub>, u(R)<sub>GC</sub> – představují nejistotu spojenou s výtěžnostmi extrakce, přečištění a GC stanovení.

### *Nejistoty extrakce, přečištění a GC stanovení*

#### **Náhodné složky nejistoty**

Velikost náhodných složek nejistoty uvedených analytických kroků (extrakce, přečištění extraktu a GC stanovení) byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti (RSD). Základem k výpočtu RSD, které se vztahují k jednotlivým analytickým krokům se staly hodnoty RSD opakovatelnosti naměřené v experimentech E<sub>1-3</sub> (v každém experimentu byl počet opakovaných stanovení

analytů v cíleně kontaminovaných vzorcích  $n = 6$ ). Jak plyne z **Obr. 4**, tyto relativní směrodatné odchylky (označené jako  $r_1$ ,  $r_2$ ,  $r_3$ ) nejsou vzájemně nezávislé (tj.  $r_1$  obsahuje současně  $r_2$  a  $r_3$ ,  $r_2$  obsahuje  $r_3$ ). Náhodné složky nejistoty, které se vztahují k jednotlivým analytickým krokům, bylo třeba vyjádřit pomocí následujících rovnic,

$$r_{EX}(\%) = \sqrt{r_1^2 - r_{GPC}^2 - r_{GC}^2}$$

$$r_{GPC}(\%) = \sqrt{r_2^2 - r_{GC}^2}$$

$$r_{GC}(\%) = \sqrt{r_3^2} = r_3$$

kde  $r_{EX}$  představuje opakovatelnost extrakce,  $r_{GPC}$  opakovatelnost přečištění a  $r_{GC}$  opakovatelnost GC stanovení. Výchozí a vypočítané hodnoty jsou uvedeny v **Tab. VIII**.

**Tab. VIII:** Hodnoty opakovatelnosti získané experimentálně (experimenty E<sub>1-3</sub>) a vypočítané hodnoty opakovatelnosti extrakce, přečištění extraktu a GC stanovení vybraných pesticidů

Pesticid	GC metoda	$r_1$ (%)	$r_2$ (%)	$r_{EX}$ (%)	$r_{GPC}$ (%)	$r_{GC} = r_3$ (%)
<i>Pyrethroidy</i>						
Beta-cyfluthrin	GC-ECD	7,5	4,7	5,9	4,0	2,5
Bifenthrin	GC-ECD	7,3	4,1	6,0	1,4	3,8
Cypermethrin	GC-ECD	7,9	3,9	6,9	2,2	3,2
Deltamethrin	GC-ECD	13,1	5,3	11,9	2,8	4,5
Fenvalerate	GC-ECD	9,5	4,2	8,5	1,4	3,9
Permethrin	GC-ECD	10,2	4,4	9,2	3,2	3,1
<i>Karbamáty</i>						
Carbaryl	GC-NPD	8,7	7,5	4,4	4,0	6,4
Chlorpropham	CG-NPD	9,7	8,6	4,4	4,7	8,2
Fenoxycarb	GC-NPD	8,5	7,2	4,5	2,4	6,8
Propham	GC-NPD	9,8	8,1	5,4	3,1	7,9
<i>Azoly</i>						
Bitertanol	GC-ECD	11,2	9,5	6,0	4,9	8,1
Fenarimol	GC-ECD	12,8	5,7	11,5	2,8	4,9
Prochloraz	GC-ECD	21,5	9,6	19,3	3,3	9,0
Tebuconazole	GC-ECD	19,3	13,7	13,5	7,4	11,5

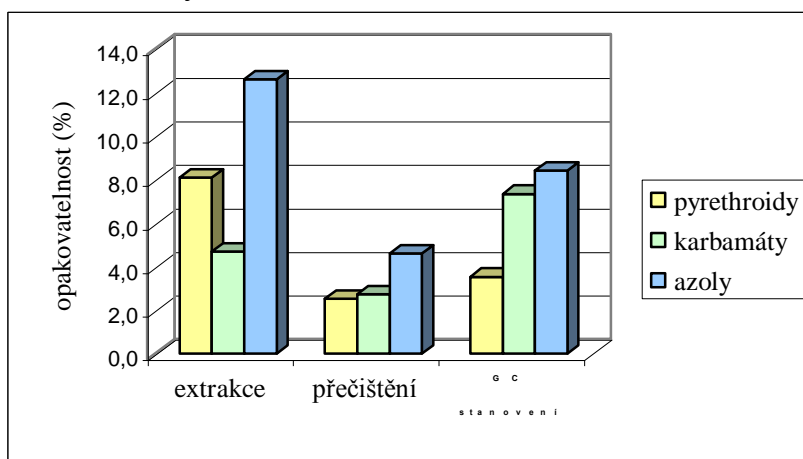
Jak vyplývá z **Tabulky VIII**, hodnoty opakovatelnosti  $r_1$  (tzn. RSD celého analytického postupu) se pro většinu analytu pohybovaly v rozmezí 7.3 - 13.1 %. Tyto hodnoty jsou na dané koncentrační hladině (0.040 - 0.163 mg/kg) srovnatelné s údaji, které uvádí autoři řady validačních studií zaměřených na stanovení reziduí pesticidu v rostlinných matricích [124-127]. Z testovaných analytů pouze prochloraz a tebuconazole vykazovaly vyšší hodnoty  $r_1$  (prochloraz 21.5 %, tebuconazole 19.3 %). V případě prochlorazu (koncentrační úroveň = 0.163 mg/kg) překročila dosažená hodnota opakovatelnosti  $r_1$  doporučené kritérium, které má v rozsahu koncentrací 0.1 - 1 mg/kg hodnotu 15 % (**Tab. IX**). Výpočtem opakovatelností  $r_{EX}$ ,  $r_{GPC}$  a  $r_{GC}$  bylo

zjištěno, že u této sloučeniny představuje extrakce největší příspěvek k hodnotě opakovatelnosti celé analytické procedury.

**Tab. IX:** Kritéria pro multireziduální analýzu pesticidů [117]

Koncentrace	Opakovatelnost CV (%)	Reprodukovatelnost CV (%)	Rozsah výtěžnosti (%)
≤ 1 µg/kg	35	53	50 - 120
> 1 µg/kg ≤ 0.01 mg/kg	30	45	60 - 120
> 0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg	20	32	70 - 120
> 0.1 mg/kg ≤ 1 mg/kg	15	23	70 - 110
> 1 mg/kg	10	16	70 - 110

V případě prochlorazu i tebuconazolu k celkovému rozptylu výsledků významně přispívá rovněž třetí analytický krok, tj. analýza plynovou chromatografií, což je pravděpodobně důsledek chvostování píku a s tím související nepřesnosti integrace, ke kterému dochází při separaci těchto látek v chromatografické koloně. Jak plyne z **Tabulky VIII** a především z **Obr. 5**, přispívá třetí analytický krok výrazně k celkové hodnotě opakovatelnosti  $r_1$  rovněž v případě karbamátů. Příčinou je v tomto případě termodegradace, které podléhá řada pesticidů patřících do této skupiny a ke které dochází během přenosu analytu z horkého nástříkového prostoru do chromatografické kolony.



**Obr. 5:** Opakovatelnost extrakce, přečištění a GC stanovení (průměrné hodnoty pro jednotlivé skupiny pesticidů)

#### Systematické složky nejistoty

Systematické složky nejistoty (tj. nejistoty výtěžnosti  $u(R)_{1-3}$ ) byly odvozeny z průměrné hodnoty výtěžnosti ( $n = 6$ ) vypočítané z dat získaných v rámci experimentů  $E_1$ - $E_3$  a vyjádřeny pomocí rovnice odvozené z rovnoměrného rozdělení:

$$u(R)_{1-3}(\%) = \frac{0.5 \times (100 - R_{E1-3})}{\sqrt{3}}$$

kde  $R_{E1-3}$  je výtěžnost analytu v daném experimentu ( $E_1$ - $E_3$ ).

Stejně jako v případě náhodných složek však takto vypočítané nejistoty nejsou vzájemně nezávislé. Nejistoty výtěžnosti, které vyjadřují velikost systematických chyb jednotlivých analytických kroků je třeba vyjádřit rovnicemi:



$$u(R)_{EX} (\%) = \sqrt{u(R)_1^2 - u(R)_{GPC}^2 - u(R)_{GC}^2}$$

$$u(R)_{GPC} (\%) = \sqrt{u(R)_2^2 - u(R)_{GC}^2}$$

$$u(R)_{GC} (\%) = \sqrt{u(R)_3^2} = u(R)_3$$

kde  $u(R)_{EX}$  představuje nejistotu výtěžnosti extrakce,  $u(R)_{GPC}$  nejistotu výtěžnosti přečištění a  $u(R)_{GC}$  nejistotu výtěžnosti GC analýzy. Hodnoty výtěžností jednotlivých analytů získané v experimentech  $E_1 - E_3$  a nejistoty výtěžnosti vypočítané výš uvedenými rovnicemi jsou uvedeny v **Tab. X**.

**Tab. X:** Výtěžnost a nejistoty výtěžnosti vybraných pesticidů

Pesticid	GC metoda	$R_{E1}$ (%)	$R_{E2}$ (%)	$R_{E3}$ (%)	$u(R)_1$ (%)	$u(R)_2$ (%)	$u(R)_{EX}$ (%)	$u(R)_{GPC}$ (%)	$u(R)_{GC} \square u(R)_3$ (%)
<i>Pyrethroidy</i>									
Beta-cyfluthrin	GC-ECD	71	80	98	8,4	5,9	6,0	5,8	0,7
Bifenthrin	GC-ECD	79	81	100	6,2	5,6	2,6	5,6	0,1
Cypermethrin	GC-ECD	83	84	97	4,9	4,6	1,6	4,6	0,8
Deltamethrin	GC-ECD	81	85	99	5,4	4,3	3,3	4,3	0,2
Fenvalerate	GC-ECD	85	89	99	4,3	3,1	2,9	3,1	0,4
Permethrin	GC-ECD	82	83	99	5,2	5,0	1,5	5,0	0,4
<i>Karbamáty</i>									
Carbaryl	GC-NPD	86	97	92	4,1	3,9	1,3	3,0	2,4
Chlorpropham	GC-NPD	90	95	93	2,9	2,4	1,7	1,2	2,0
Fenoxycarb	GC-NPD	87	99	97	3,6	1,4	3,4	1,1	0,9
Propham	GC-NPD	73	95	96	7,8	1,5	7,6	0,7	1,3
<i>Azoly</i>									
Bitertanol	GC-ECD	75	97	98	7,2	0,9	7,1	0,8	0,5
Fenarimol	GC-ECD	77	94	96	6,7	1,8	6,4	1,4	1,1
Prochloraz	GC-ECD	57	94	94	12,3	7,6	9,7	5,0	1,6
Tebuconazole	GC-ECD	72	94	99	8,1	1,7	7,9	1,7	0,3

S výjimkou prochlorazu bylo u všech analytů dosaženo hodnot  $u(R)_1$  (tzn. nejistot výtěžnosti odrážející systematické chyby celého analytického postupu) do 10 %. Pro prochloraz bylo dosaženo nejvyšší hodnoty  $u(R)_1$  a také  $u(R)_{EX}$  (tj. nejistoty výtěžnosti extrakce). Důvodem je pravděpodobně částečná ionizace této sloučeniny ( $pK_a = 3.8$  [123]) v kyselém prostředí jablečné matrice, která se odrazí v nižší hodnotě výtěžnosti (viz hodnota  $R_{E1}$  v Tab. 5.2). Vyšších hodnot výtěžnosti lze docílit úpravou resp. zvýšením pH matrice před extrakcí přidávkem roztoku uhličitanu sodného k navážce vzorku (**Tab. XI**).

**Tab. XI:** Výťažnost prochlorazu v závislosti na pH matrice (jablka)

pH matrice	Přídavek Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (ml) <sup>b/</sup>	Výtěžnost (%)
4 <sup>a/</sup>	0	57
5	0,35	64
6	0,75	77
7	1,00	84

<sup>a/</sup> pH neupravené matrice,

<sup>b/</sup> objem roztoku Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> potřebný k úpravě pH navážky vzorku

Jak je uvedeno v Tab. X, vykazují pyrethroidy v porovnání s ostatními skupinami sloučenin při GPC přečištění nižší hodnoty výtěžnosti, což se projevuje ve vyšších hodnotách systematické složky nejistoty tohoto kroku [ $u(R)_{GPC}$ ]. Důvodem je částečný překryv elučních zón této skupiny analytů s koextrakty matrice na koloně PL-gel (molekulární hmotnost pyrethroidu je ve srovnání s karbamáty a azoly vyšší [123]). Aby nedošlo k přechodu koextraktů do jímané frakce, byl první podíl eluční zóny pyrethroidů odváděn do odpadu, čímž vznikla tato ztráta. Jak plyne z Tabulky VIII, tato ztráta je velmi dobře opakovatelná (viz hodnoty  $r_{GPC}$ , Tab. VIII). Při hodnocení systematické složky nejistoty je třeba podotknout, že při analýze reálných vzorků (obsahujících rezidua aplikovaného pesticidního přípravku) může být dosaženo „horších“ (tj. nižších) hodnot výtěžnosti ve srovnání se zde prezentovanými výsledky pro cíleně kontaminované vzorky z důvodu obtížnější extrahovatelnosti. Vzhledem k nedostupnosti certifikovaného referenčního materiálu však nebylo možné takové porovnání provést.

### Nejistoty spojené s GC kalibrací

Ke zdrojům nejistot spojených s GC kalibrací patří především příprava kalibračních standardů (tj. procesy vážení a ředění standardů). Potenciálním zdrojem je rovněž nejistota čistoty standardu.

### Nejistota vážení

Nejistota vážení má svou náhodnou a systematickou složku. Náhodná složka „ $r_{BAL}$ “ byla vypočítána pomocí rovnice:

$$r_{BAL}(\%) = \frac{SD_w}{m_A} \times 100$$

kde  $SD_w$  je směrodatná odchylka opakovaných vážení ( $n = 6$ ) prázdné odměrné banky, která byla použita k přípravě zásobních roztoku standardu a  $m_A$  je navážka daného pesticidu. Systematická složka nejistoty „ $s_{BAL}$ “ byla odvozena z rovnoměrného rozdělení [118] pomocí rovnice:

$$\sigma_{BAL}(\%) = \frac{a}{m_A \times \sqrt{3}} \times 100$$

kde „ $a$ “ je údaj o odchylce vážení uvedený v kalibračním certifikátu analytických vah. Náhodné a systematické složky nejistoty jsou uvedeny v **Tab. XII**.

**Tab. XII:** Náhodná a systematická složka nejistoty vážení vybraných pesticidů

Pesticid	r <sub>BAL</sub> (%)	σ <sub>BAL</sub> (%)	Pesticid	r <sub>BAL</sub> (%)	σ <sub>BAL</sub> (%)
Beta-cyfluthrin	1,5	0,05	Fenoxycarb	1,9	0,07
Bifenthrin	2,1	0,07	Fenvalerate	1,0	0,04
Bitertanol	2,9	0,10	Chlorpropham	0,8	0,03
Carbaryl	1,2	0,04	Permethrin	1,5	0,05
Cypermethrin	1,2	0,04	Prochloraz	2,4	0,08
Deltamethrin	1,4	0,05	Propham	0,7	0,03
Fenarimol	3,1	0,11	Tebuconazole	2,2	0,08

### Nejistota ředění

Podobně jako v případě vážení je třeba vyhodnotit náhodnou a systematickou složku nejistoty ředění. Náhodná složka ( $r_{DIL}$ ) byla vyjádřena pomocí rovnice:

$$r_{DIL}(\%) = \frac{SD_B}{m_B - m_C} \times 100$$

kde  $SD_B$  je směrodatná odchylka vypočítaná z vážení odměrné banky, která byla opakovaně ( $n = 6$ ) doplňována rozpouštědlem použitým k přípravě standardu,  $m_B$  je průměrná hmotnost takto doplňované banky a  $m_C$  je průměrná hmotnost prázdné odměrné banky ( $n = 6$ ). Systematická složka nejistoty ( $s_{DIL}$ ) byla vypočítaná z údaje o odchylce objemu odměrné banky „b“, tj. stejně jako v případě systematické složky nejistoty vážení odvozena z rovnoměrného rozdělení – rovnice:

$$\sigma_{DIL}(\%) = \frac{b}{V \times \sqrt{3}} \times 100$$

kde  $V$  je nominální objem odměrné banky. Náhodná i systematická složka nejistoty ředění je odvozena výhradně z údajů o objemu a jeho odchylce, které jsou udány výrobcem odměrné banky a zůstává tudíž stejná pro všechny analyty. Hodnoty  $r_{DIL}$  a  $s_{DIL}$  vypočítané pomocí rovnic jsou 0.07 % a 0.14 %.

### Nejistota čistoty standardu

Nejistota čistoty standardu  $u_{STD}$  byla odvozena z rovnoměrného rozdělení – rovnice:

$$u_{STD}(\%) = \frac{0.5 \times (100 - p)}{\sqrt{3}}$$

kde  $p$  (%) představuje čistotu standardu uvedenou na certifikátu, který byl dodán výrobcem. Nejistoty čistoty standardu nepřesáhly s výjimkou cypermethrinu hodnotu 1 % (**Tab. XIII**). V případě tohoto analytu byl k dispozici standard o čistotě pouze 91 %.

**Tab. XIII:** Nejistota čistoty standardu vybraných pesticidů:

Pesticid	u <sub>STD</sub> (%)	Pesticid	u <sub>STD</sub> (%)
Beta-cyfluthrin	0,87	Fenoxycarb	0,44
Bifenthrin	0,58	Fenvalerate	0,29
Bitertanol	0,58	Chlorpropham	0,59
Carbaryl	0,15	Permethrin	0,72

Cypermethrin	2,60	Prochloraz	0,72
Deltamethrin	0,43	Propham	0,15
Fenarimol	0,14	Tebuconazole	0,58

### Výpočet kombinované nejistoty

Náhodná a systematická složka nejistot vyjádřené v předchozích kapitolách byly použity k výpočtu kombinované nejistoty jednotlivých analytických procedur (extrakce, přečištění, GC stanovení, vážení, ředění).

$$u_{cEX}(\%) = \sqrt{r_{EX}^2 + u(R)_{EX}^2}$$

$$u_{cGPC}(\%) = \sqrt{r_{GPC}^2 + u(R)_{GPC}^2}$$

$$u_{cGC}(\%) = \sqrt{r_{GC}^2 + u(R)_{GC}^2}$$

$$u_{cBAL}(\%) = \sqrt{r_{BAL}^2 + \sigma_{BAL}^2}$$

$$u_{cDIL}(\%) = \sqrt{r_{DIL}^2 + \sigma_{DIL}^2}$$

kde  $u_{cEX}$  představuje kombinovanou nejistotu extrakce,  $u_{cGPC}$  kombinovanou nejistotu přečištění,  $u_{cGC}$  kombinovanou nejistotu GC stanovení,  $u_{cBAL}$  kombinovanou nejistotu vážení a  $u_{cDIL}$  kombinovanou nejistotu ředění. Kombinované nejistoty jednotlivých analytických procedur byly použity (spolu s nejistotou čistoty standardu) k výpočtu kombinované nejistoty  $u_c$  celého analytického postupu – viz rovnice:

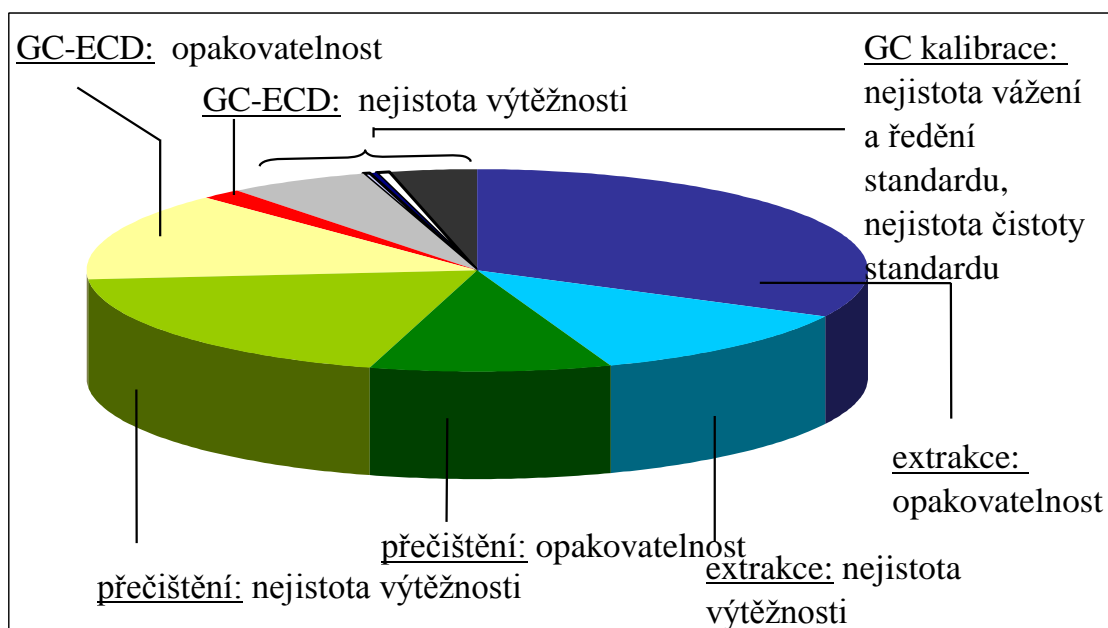
$$u_c(\%) = \sqrt{u_{cEX}^2 + u_{cGPC}^2 + u_{cGC}^2 + u_{cBAL}^2 + u_{cDIL}^2 + u_{STD}^2}$$

Jak plyne z **Tabulky XIV**, získané hodnoty kombinované nejistoty  $u_c$  se za podmínek experimentu pohybovaly v rozmezí 9.3 % (pro fenoxycarb) do 24.3 % (pro prochloraz). Nejistota extrakce (jak její náhodná tak systematická složka) představuje největší příspěvek (zvláště v případě pyrethroidů a azolů) kombinované nejistoty celého analytického postupu (Tab. XIV, Obr. 6 - 8). Jak již bylo diskutováno, pro pyrethroidy je významným zdrojem nejistoty rovněž přečištění extraktu, GC stanovení pak přispívá významně k celkové nejistotě v případě karbamátů a azolů. Nejistoty spojené s GC kalibrací odhadované podle popsané metodiky nejsou pro většinu analytů příliš významné.

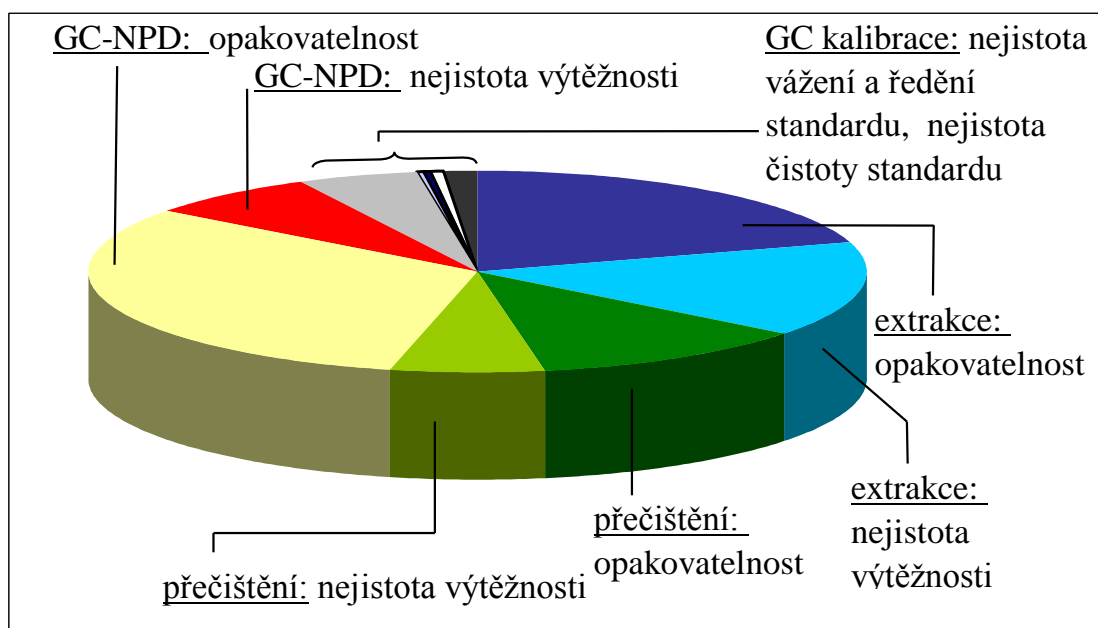
**Tab. XIV:** Stanovení reziduí vybraných pesticidů: Přehled kombinovaných nejistot získaných postupem „zdola - nahoru“

Pesticid	GC metoda	$u_{cEX}$ (%)	$u_{cGPC}$ (%)	$u_{cGC}$ (%)	$u_{cBAL}$ (%)	$u_{cDIL}$ (%)	$u_{STD}$ (%)	Kombinovaná nejistota $u_c$ (%)
<i>Pyrethroidy</i>								
Beta-cyfluthrin	GC-ECD	8,4	7,1	2,6	1,5	0,16	0,87	11,4
Bifenthrin	GC-ECD	6,6	5,8	3,8	2,1	0,16	0,58	9,8
Cypermethrin	GC-ECD	7,0	5,1	3,3	1,2	0,16	2,60	9,7
Deltamethrin	GC-ECD	12,4	5,1	4,5	1,4	0,16	0,43	14,2
Fenvalerate	GC-ECD	9,0	3,4	4,0	1,0	0,16	0,29	10,5
Permethrin	GC-ECD	9,3	5,9	3,1	1,5	0,16	0,72	11,6
<i>Karbamáty</i>								
Carbaryl	GC-NPD	4,6	5,0	6,8	1,2	0,16	0,15	9,7
Chlorpropham	GC-NPD	4,7	2,8	8,5	0,8	0,16	0,59	10,2

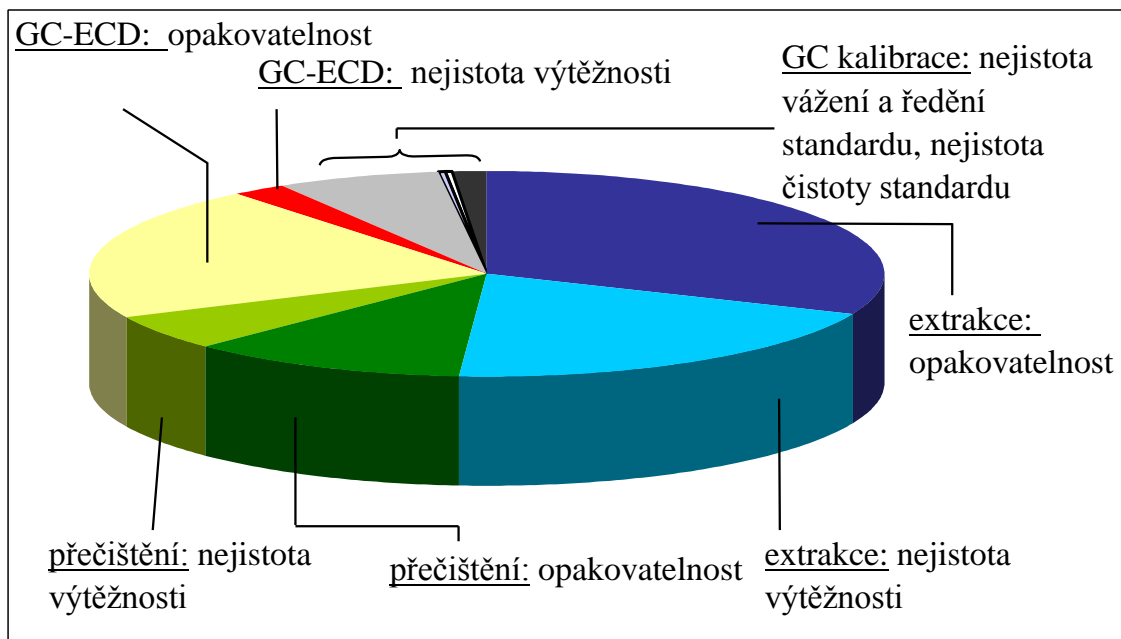
Fenoxycarb	GC-NPD	5,6	2,7	6,8	1,9	0,16	0,44	9,3
Propham	GC-NPD	9,4	2,0	8,0	0,7	0,16	0,15	12,6
<i>Azoly</i>								
Bitertanol	GC-ECD	9,3	5,0	8,2	2,9	0,16	0,58	13,7
Fenarimol	GC-ECD	13,1	3,1	5,1	3,1	0,16	0,14	14,8
Prochloraz	GC-ECD	21,6	6,0	9,1	2,4	0,16	0,72	24,3
Tebuconazole	GC-ECD	15,7	7,6	11,5	2,2	0,16	0,58	21,0



**Obr. 6:** Příspěvky nejistot jednotlivých kroků ke kombinované nejistotě celého analytického postupu (průměr hodnot získaných pro *pyrethroidy*)



**Obr. 7:** Příspěvky nejistot jednotlivých kroků ke kombinované nejistotě celého analytického postupu (průměr hodnot získaných pro *karbamáty*)



**Obr. 8:** Příspěvky nejistot jednotlivých kroků ke kombinované nejistotě celého analytického postupu (průměr hodnot získaných pro *azoly*)

### 3.2 Řešení postupu “shora - dolu” (“top - down”)

K vyhodnocení nejistoty postupem „shora - dolu“ byla využita data vyjadřující souhrnné příspěvky jednotlivých zdrojů. Mezi tato data se řadí opakovatelnost stanovení vyjadřující příspěvky všech náhodných chyb a výtěžnost sumarizující příspěvky systematických chyb. Opakovatelnost a výtěžnost byly získány v rámci studie přesnosti a pravdivosti, která byla realizována analýzou série 6 matričních vzorku cíleně kontaminovaných před extrakcí opakovanou 3 x v průběhu 12 měsíců. V každé sérii byla opakovatelnost vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka. Nejistota výtěžnosti byla odvozena z rovnoměrného rozdělení – rovnice:

$$u(R)_i(\%) = \frac{0.5 \times (100 - R_i)}{\sqrt{3}}$$

kde  $R_i$  je výtěžnost analytu.

Kombinovaná nejistota  $u_{ctn}$  celého analytického postupu byla získána z relativní směrodatné odchylky a nejistoty výtěžnosti pomocí rovnice:

$$u_{ctn}(\%) = \sqrt{r_m^2 + u(R)_m^2}$$

kde  $r_{tn}$  představuje opakovatelnost a  $u(R)_{tn}$  nejistotu výtěžnosti (označení série experimentu  $n = 1 - 3$ ).

Průměrná hodnota celkové kombinované nejistoty  $u_{cAV}$  byla vypočítána z hodnot  $u_{ctn}$  pomocí kvadratického průměru – rovnice

$$u_{cAV}(\%) = \sqrt{\frac{u_{ct1}^2 + u_{ct2}^2 + u_{ct3}^2}{3}}$$

Výsledné hodnoty nejistoty stanovení získané pro jednotlivé pesticidy multireziduální GC-MS metody postupem „shora - dolu“ jsou uvedeny v **Tab. XV**. Na

základě porovnání hodnot kombinovaných nejistot získaných v jednotlivých sériích lze konstatovat, že nebyly zaznamenány výraznější rozdíly ve výsledných hodnotách  $u_{ctn}$  (Tab. XV), tj. nedošlo k výrazným změnám ve výkonnosti analytické metody v průběhu roku. Pro většinu analytů rovněž vyhovují dosažené hodnoty opakovatelnosti a výtěžnosti kritériím pro multireziduální analýzu pesticidu (Tab. IX). Výjimkou jsou některé sloučeniny ze skupiny azolů (prochloraz, tebuconazole a thiabendazol) a organofosforových pesticidů (omethoate), u kterých bylo překročeno na dané koncentrační hladině kritérium pro opakovatelnost. Jak již bylo zmíněno, v případě azolů jsou příčinou především problémy spojené s extrakcí těchto sloučenin z matrice a dále problémy, které nastávají při GC stanovení a projevují se chvostováním píku. U omethoatu souvisí vyšší hodnoty opakovatelnosti pravděpodobně s problematikou nástřiku do plynového chromatografu, tj. s přenosem par vzorku z nástřikového prostoru do chromatografické kolony. Podobně jako v případě karbamátů může i u této sloučeniny docházet k částečné termodegradaci v nástřikovém prostoru [121-122]. Obtížnost extrakce látek ze skupiny azolů se projevuje také v hodnotách výtěžnosti (především u prochlorazu). Vhodným řešením může být v tomto případě úprava pH matrice před extrakcí (Tab. XI). Požadované kritérium pro výtěžnost analytu nebylo splněno také při analýze cyhalothrinu-lambda. V tomto případě se - podobně jako u ostatních pyrethroidů - jedná o známou a velmi dobře opakovatelnou ztrátu vzniklou při přečištění extraktu na koloně PL - gel. Při kvantifikaci tohoto analytu je tedy možné uvažovat o korekci výsledku na výtěžnost. V případě látek ze skupin pyrethroidů, karbamátů a azolů bylo možné provést porovnání kombinovaných nejistot získaných postupem „zdola - nahoru“ a „shora - dolů“ (tj. porovnání hodnot  $u_c$  v Tab. XIV a  $u_{cAV}$  v Tab. XV). Jak plyne z těchto dat, jsou oba postupy z hlediska dosažených výsledků srovnatelné.

**Tab. XV:** Stanovení reziduí pesticidů: Přehled kombinovaných nejistot získaných postupem „shora - dolů“

Pesticid	GC metoda	Série 1				Série 2				Série 3				u <sub>cAV</sub> (%)
		r <sub>t1</sub> (%)	R <sub>t1</sub> (%)	u(R <sub>t1</sub> ) (%)	u <sub>ct1</sub> (%)	r <sub>t2</sub> (%)	R <sub>t2</sub> (%)	u(R <sub>t2</sub> ) (%)	u <sub>ct2</sub> (%)	r <sub>t3</sub> (%)	R <sub>t3</sub> (%)	u(R <sub>t3</sub> ) (%)	u <sub>ct3</sub> (%)	
Acephate	GC-NPD	8,6	82,3	5,1	10,0	11,3	72,2	7,9	13,8	5,5	85,8	4,1	6,9	10,6
Aldrin	GC-ECD	3,0	81,8	5,3	6,0	6,6	88,2	3,4	7,4	7,9	87,9	3,5	8,6	7,4
Azinphos-ethyl	GC-NPD	10,6	88,4	3,3	11,1	9,8	84,1	4,6	10,8	13,4	88,6	3,3	13,8	12,0
Azinphos-methyl	GC-NPD	11,7	96,6	1,0	11,7	12,7	83,2	4,8	13,6	10,4	83,9	4,7	11,4	12,3
Beta-cyfluthrin <sup>al</sup>	GC-ECD	7,5	71,0	8,4	11,3	9,9	79,5	5,9	11,5	11,6	75,1	7,2	13,7	12,2
Bifenthrin <sup>al</sup>	GC-ECD	7,3	78,6	6,2	9,6	4,5	83,4	4,8	6,6	5,6	80,2	5,8	8,0	8,2
Bitertanol <sup>al</sup>	GC-ECD	11,2	75,1	7,2	13,3	11,6	82,0	5,2	12,7	13,8	86,1	4,0	14,4	13,5
Bromopropylate	GC-ECD	6,5	87,2	3,7	7,4	5,2	79,6	5,9	7,9	7,8	85,6	4,2	8,9	8,1
Bupirimate	GC-ECD	6,8	92,8	2,1	7,1	6,9	81,2	5,4	8,8	4,5	75,0	7,2	8,5	8,2
Captan	GC-MSD	9,7	75,3	7,1	12,1	15,5	79,6	5,9	16,6	11,5	81,4	5,4	12,7	13,9
Carbaryl <sup>al</sup>	GC-NPD	8,7	85,8	4,1	9,6	7,4	77,0	6,6	10,0	6,5	84,0	4,6	8,0	9,2
Chlorfenvinphos	GC-NPD	7,5	86,3	4,0	8,5	6,3	74,5	7,4	9,7	6,4	85,5	4,2	7,7	8,7
Chlorothalonil	GC-ECD	7,0	85,9	4,1	8,1	10,3	80,3	5,7	11,8	8,2	78,5	6,2	10,3	10,2
Chlorpropham <sup>al</sup>	GC-NPD	9,7	89,9	2,9	10,1	7,7	89,3	3,1	8,3	8,3	86,0	4,0	9,2	9,3
Chlorpyrifos	GC-NPD	8,1	92,9	2,1	8,4	9,8	78,4	6,2	11,6	6,4	84,0	4,6	7,9	9,4
Chlorpyrifos-methyl	GC-NPD	7,5	83,3	4,8	8,9	7,1	80,5	5,6	9,0	7,6	85,5	4,2	8,7	8,9
Cyhalothrin-lambda	GC-ECD	8,0	61,5	11,1	13,7	10,5	50,4	14,3	17,7	7,3	52,3	13,8	15,6	15,8
Cypermethrin <sup>al</sup>	GC-ECD	7,9	83,1	4,9	9,3	7,2	80,9	5,5	9,1	10,8	88,0	3,5	11,3	10,0
Cyprodinyl	GC-NPD	10,3	89,3	3,1	10,8	6,2	78,6	6,2	8,8	11,8	85,9	4,1	12,5	10,8
Deltamethrin <sup>al</sup>	GC-ECD	13,1	81,2	5,4	14,1	9,4	85,5	4,2	10,3	12,9	83,0	4,9	13,8	12,9
Diazinon	GC-NPD	11,4	83,8	4,7	12,3	10,9	78,3	6,3	12,6	7,3	71,7	8,2	10,9	12,0
Dichlofluanid	GC-ECD	8,4	87,9	3,5	9,1	11,7	79,8	5,8	13,1	10,6	85,1	4,3	11,5	11,3
Dichlorvos	GC-NPD	6,4	86,0	4,0	7,6	10,7	71,0	8,4	13,6	7,8	73,1	7,8	11,0	11,0
Dieldrin	GC-MSD	7,5	78,5	6,2	9,7	11,8	77,5	6,5	13,4	9,0	83,2	4,9	10,2	11,2
Difenoconazole	GC-ECD	4,6	108,7	2,5	5,2	7,8	91,3	2,5	8,2	10,7	94,5	1,6	10,8	8,4
Diphenylamine	GC-NPD	9,8	75,1	7,2	12,1	12,4	85,7	4,1	13,1	8,0	69,8	8,7	11,8	12,4

**Tab. XV:** pokračování

Dimethoate	GC-ECD	7,0	81,6	4,0	8,0	5,7	74,3	7,4	9,3	10,9	77,7	6,4	12,7	10,2
Endosulfan-alpha	GC-ECD	8,6	90,6	2,7	9,1	11,6	81,3	5,4	12,8	10,5	92,1	2,3	10,8	11,0



Endosulfan-beta	GC-ECD	7,8	91,3	2,7	8,3	5,7	81,2	5,4	7,9	6,4	85,4	4,2	7,7	7,9
Endosulfan-SO <sub>4</sub>	GC-ECD	2,3	90,5	2,7	3,6	4,6	81,6	5,3	7,0	6,2	78,8	6,1	8,7	6,8
Endrin	GC-ECD	3,8	88,4	3,4	5,1	5,2	94,0	1,7	5,5	8,0	83,4	4,8	9,3	6,9
Ethion	GC-NPD	4,4	94,9	1,5	4,6	4,6	81,6	5,3	7,1	9,4	86,9	3,8	10,1	7,6
Etrifos	GC-NPD	12,5	76,6	6,8	14,2	12,0	77,3	6,6	13,7	9,1	74,3	6,0	10,9	13,0
Fenarimol <sup>ai</sup>	GC-ECD	12,8	76,9	6,7	14,4	9,3	68,9	9,0	13,0	11,6	80,9	5,5	12,8	13,4
Fenitrothion	GC-NPD	9,6	86,9	3,8	10,3	9,8	83,6	4,7	10,8	7,6	93,9	1,8	7,8	9,7
Fenoxycarb <sup>ai</sup>	GC-NPD	8,5	87,4	3,6	9,2	7,2	89,3	3,1	7,9	9,1	81,0	5,5	10,6	9,3
Fenthion	GC-NPD	10,8	75,0	7,2	13,0	10,9	77,8	6,4	12,6	6,1	69,1	8,9	10,8	12,2
Fenvalerate <sup>ai</sup>	GC-ECD	9,5	85,1	4,3	10,4	6,5	90,2	2,8	7,1	5,7	81,9	5,2	7,7	8,5
Folpet	GC-ECD	7,2	104,1	1,2	7,3	8,5	82,2	5,1	9,9	10,6	82,6	5,0	11,7	9,8
HCB	GC-ECD	3,0	82,6	5,0	5,9	9,0	86,7	3,8	9,8	8,6	78,2	6,3	10,7	9,0
HCH-alpha	GC-ECD	9,3	87,8	3,5	10,0	5,2	84,3	4,5	6,8	8,4	74,8	7,3	11,1	9,5
HCH-beta	GC-ECD	7,2	86,5	3,9	8,2	12,1	82,3	5,1	13,1	6,0	83,6	4,7	7,6	10,0
HCH-delta	GC-ECD	3,2	81,9	5,2	6,1	5,0	89,2	3,1	5,9	8,1	81,2	5,4	9,7	7,5
HCH-gamma	GC-ECD	3,7	80,7	5,6	6,7	3,9	71,4	8,3	9,2	8,3	78,0	6,4	10,4	8,9
Heptachlor	GC-ECD	4,3	85,2	4,3	6,1	5,3	84,4	4,5	7,0	4,6	84,1	4,6	6,5	6,5
Heptenophos	GC-NPD	7,3	83,8	4,7	8,6	10,7	72,3	8,0	13,4	10,8	82,9	4,9	11,9	11,5
Iprodione	GC-ECD	11,2	81,4	5,4	12,4	14,6	93,0	2,0	14,7	8,7	83,7	4,7	9,9	12,5
Kresoxim-methyl	GC-ECD	11,7	91,3	2,5	12,0	11,6	85,9	4,1	12,3	14,2	91,7	2,4	14,4	12,9
Malathion	GC-NPD	4,5	93,2	2,0	4,9	6,5	82,9	4,9	8,2	6,2	82,6	5,0	8,0	7,2
Methacriphos	GC-NPD	6,3	86,6	3,9	7,4	10,5	70,7	8,5	13,5	9,2	75,7	7,0	11,6	11,1
Metalaxyl	GC-NPD	9,1	83,9	4,6	10,2	13,7	89,5	3,1	14,0	9,8	80,5	5,6	11,3	12,0
Methamidophos	GC-NPD	8,3	71,0	8,4	11,8	6,8	70,4	8,5	10,8	10,4	72,0	8,1	13,2	12,0
Methidathion	GC-NPD	4,4	90,7	2,7	5,2	9,4	75,2	7,2	11,8	8,1	85,5	4,2	9,1	9,1
Mevinphos	GC-NPD	6,5	76,3	6,8	9,5	9,6	70,3	8,6	12,9	9,1	72,3	8,0	12,1	11,6
Monocrotophos	GC-NPD	9,3	77,3	6,6	11,4	10,3	70,7	9,4	13,3	3,7	74,4	7,4	8,3	11,2
o,p-DDD	GC-MSD	9,0	70,9	8,4	12,3	15,0	84,7	4,4	15,7	8,5	82,7	5,0	9,8	12,8
o,p-DDE	GC-ECD	6,4	91,7	2,4	6,8	10,1	85,7	4,1	10,9	7,3	86,0	4,0	8,4	8,9

**Tab. XV: pokračování**

o,p-DDT	GC-ECD	3,8	87,6	3,6	5,2	3,0	81,3	5,5	6,2	7,0	83,8	4,7	8,4	6,8
Omethoate	GC-NPD	17,9	81,7	5,3	18,7	8,0	69,2	8,9	12,0	15,8	69,5	8,8	18,1	16,5
p,p-DDD	GC-ECD	3,9	85,1	4,3	5,8	3,4	90,1	2,9	4,5	8,5	84,3	4,5	9,6	7,0
p,p-DDE	GC-ECD	2,6	85,5	4,2	4,9	4,5	78,8	6,1	7,6	7,1	78,2	6,3	9,5	7,6

p,p-DDT	GC-ECD	3,0	86,8	3,8	4,9	4,0	93,7	4,7	6,2	7,3	81,5	5,3	9,0	6,9
Parathion-ethyl	GC-NPD	7,5	84,1	4,6	8,8	8,4	70,8	8,4	11,9	8,3	70,0	8,7	12,0	11,0
Parathion-methyl	GC-NPD	5,4	88,2	3,4	6,4	11,6	89,7	3,0	12,0	7,1	85,5	4,2	8,3	9,2
Penconazole	GC-ECD	12,2	106,9	2,0	12,4	15,1	95,2	1,4	15,2	16,4	92,8	2,1	16,5	14,8
<i>Permethrin</i> <sup>a/</sup>	GC-ECD	10,2	81,9	5,2	11,5	8,3	81,2	5,4	9,9	8,2	86,0	4,0	9,1	10,2
Phosalone	GC-NPD	7,7	93,0	2,0	8,0	10,6	86,1	4,0	11,3	7,5	83,8	4,7	8,8	9,5
Phosmet	GC-NPD	8,1	95,6	1,3	8,2	6,2	73,6	7,6	9,8	12,4	80,6	5,6	13,6	10,8
Phosphamidon	GC-NPD	6,1	81,4	5,4	8,2	6,5	78,5	6,2	9,0	10,9	74,0	7,5	13,3	10,4
Pirimicarb	GC-NPD	11,4	70,4	8,5	14,3	11,2	70,8	8,4	14,0	12,0	81,6	5,3	13,1	13,8
Pirimiphos-methyl	GC-NPD	10,4	92,5	2,2	10,6	10,3	93,8	1,8	10,5	12,6	85,0	4,3	13,3	11,5
Prochloraz <sup>a/</sup>	GC-ECD	21,5	57,3	12,3	24,8	19,4	29,5	20,4	28,1	21,4	46,7	15,4	26,4	26,5
Procymidone	GC-MSD	10,6	81,0	5,5	11,9	12,3	76,7	6,7	14,0	9,4	82,1	5,2	10,7	12,3
Propham <sup>a/</sup>	GC-NPD	9,8	73,1	7,8	12,5	8,9	88,1	3,4	9,6	14	83,0	4,9	14,8	12,5
Pyridaben	GC-ECD	5,8	77,4	6,5	8,7	9,1	81,9	5,2	10,5	8,9	85,1	4,3	9,9	9,7
Quinalphos	GC-NPD	4,4	94,7	1,5	4,7	10,8	93,9	1,8	11,0	7,9	91,4	2,5	8,3	8,4
Tebuconazole <sup>a/</sup>	GC-ECD	19,3	71,9	8,1	20,9	23,2	50,3	14,3	27,3	24,2	74,9	7,2	25,3	24,6
Tetraconazole	GC-ECD	10,7	76,6	6,8	12,7	12,2	86,5	3,9	12,8	9,5	81,5	5,3	10,9	12,1
Tetradifon	GC-ECD	7,5	99,6	0,1	7,5	8,2	94,1	1,7	8,4	7,0	81,8	5,2	8,7	8,2
Thiabendazole	GC-NPD	18,0	74,4	7,4	19,4	20,2	91,9	2,3	20,4	17,8	71,4	8,3	19,6	19,8
Tolclofos-methyl	GC-NPD	7,8	84,7	4,4	9,0	8,8	77,0	6,6	11,0	8,5	85,3	4,2	9,5	9,9
Tolyfluanid	GC-ECD	5,7	86,6	4,2	7,0	5,5	88,5	3,3	6,4	4,7	86,3	4,0	6,1	6,5
Triadimefon	GC-ECD	19,9	81,0	5,5	20,6	15,6	85,0	4,3	16,2	17,3	88,7	3,3	17,6	18,2
Triazamate	GC-ECD	16,0	97,5	0,7	16,0	12,5	91,7	2,4	12,7	10,0	96,3	1,1	10,1	13,2
Triazophos	GC-NPD	5,1	90,9	2,6	5,7	9,3	84,6	4,5	10,3	9,7	78,5	6,2	11,5	9,5
Trifloxystrobin	GC-ECD	4,2	83,9	4,7	6,3	8,3	88,4	3,3	9,0	10,3	86,7	3,8	11,0	8,9
Vinclozolin	GC-ECD	5,0	87,3	3,7	6,2	6,5	83,0	4,9	8,2	5,7	87,2	3,7	6,8	7,1

<sup>a/</sup> Pro tento pesticid byl proveden odhad nejistoty také postupem „zdola - nahoru“

### 3.3 Výpočet rozšířené nejistoty

Rozšířená nejistota představuje interval, o kterém lze předpokládat, že zahrne značný podíl distribuce hodnot, které mohou být přisuzovány měřené veličině [120]. Rozšířená nejistota „U“ se vypočítá vynásobením kombinované nejistoty (tj. hodnoty  $u_c$  v Tab. XIV nebo  $u_{cAV}$  v Tab. XV) koeficientem rozšíření. V případě, že vychází kombinovaná nejistota z pozorování s dostatečným počtem stupňů volnosti (ne méně než 6, je doporučován koeficient rozšíření  $k = 2$  [120]). Počet stupňů volnosti je odvozen z počtu opakování (opakovaných měření), na základě kterých byla odhadnuta kombinovaná nejistota (např. pro 6 opakovaných stanovení je počet stupňů volnosti roven 5). Pokud vychází kombinovaná nejistota nebo její dominantní příspěvek z pozorování s nižším počtem stupňů volnosti doporučuje se použít jako hodnotu „k“ hodnotu dvoustranného Studentova t-rozdělení pro odpovídající počet stupňů volnosti a 95 % pravděpodobnost (Tab. XVI). Příklad přiřazení rozšířené nejistoty výsledku měření je uveden v Tab. XVII.

**Tab. XVI:** Kritické hodnoty dvoustranného Studentova t-rozdělení pro 95 % pravděpodobnost [120]

Stupeň volnosti	Kritická hodnota
1	12,7
2	4,3
3	3,2
4	2,8
5	2,6

**Tab. XVII:** Výsledek měření a nejistota [120]

Výsledek měření (koncentrace phosalonu v jablkách)	0,100 mg/kg
Kombinovaná nejistota $u_c$	9,5 %
Rozšířená nejistota U ( $k = 2$ )	19 % (tj. 19 % z výsledku měření)
Zápis výsledku měření	$0,100 \pm 0,019$ mg/kg

### 3.4 Literatura

- [1] J. Velíšek, v knize: *Chemie potravin*, sv. III, kap. 12.6, OSSIS, Tábor 2002
- [2] K. Jaga, C. Dharmani: *Global Surveillance of DDT and DDE levels in human tissues*, *Int J Occup Environ Health* 16, 7–20, 2003
- [3] J. Hajšlová, v knize: *Environmental contaminants in food* (C.F. Moffat, K.J. Whittle, ed), kap. 7, Sheffield Press, 1999
- [4] I. Shaw, R. Vannoor: *Pesticides*, v knize: *Food Chemical Safety*, sv. I - *Contaminants*, (ed. D.H. Watson), CRC Press, Boca Raton, USA
- [5] [5] M.F. Wilson, S.L. Reynolds, R.J. Fussell, v knize: *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals*; kap. *Advanced in methods for pesticide residues in food (727–752)*, John Wiley & Sons Ltd. 2003
- [6] M. Anastasiades, S.J. Lehotay: *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and „dispersive solid-phase extraction“ for the determination of pesticide residue in produce*, *J. AOAC* 86, 412–431, 2003
- [7] S.J. Lehotay, K. Maštovská, A.R. Lightfield: *Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables*, *J. AOAC* 88, 615–629, 2005
- [8] A.H. Roos, A.J. Van Munsteren, F.M. Nab, L.G.M.Th. Tuinstra: *Universal extraction/clean-up procedure for screening of pesticides by extraction with ethyl acetate and size exclusion chromatography*, *Anal. Chimica Acta* 196, 95–102, 1987
- [9] A.J. Krynitsky, S.J. Lehotay, v knize: *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals*, kap: *Overview of analytical technologies available to regulatory laboratories for the determination of pesticide residues (753–786)*, John Wiley & Sons Ltd., 2003
- [10] V. Nardell, C. Palermo, D. Centonze: *Rapid multiresidue extraction method of organochlorinated pesticides from fish feed*, *J. Chromatogr. A* 1034, 33–40, 2004
- [11] A. Covaci, A. Gheorghe, S. Voorspoels, J. Maervoet, E.S. Redeker, R. Blust, P. Schepens: *Polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in sediment cores from the Western Scheldt river (Belgium): analytical aspects and depth profiles*, *Environment International* 31, 367–375, 2005
- [12] P. Suchan, J. Pulkrabová, J. Hajšlová, V. Kocourek: *Pressurized liquid extraction in determination of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in fish samples*, *Anal. Chimica Acta* 520, 193–200, 2004
- [13] C. Nerín, R. Batlle, M. Sartaguda, C. Pedrocchi: *Supercritical fluid extraction of organochlorine pesticides and some metabolites in frogs from National Park of Ordesa and Monte Perdido*, *Anal. Chimica Acta* 464, 303–312, 2002
- [14] K. Patel, R.J. Fussell, D.M. Goodall, B.J. Keely: *Analysis of pesticide residues in lettuce by large volume–difficult matrix introduction–gas chromatography–time of flight–mass spectrometry (LV-DMI-GC-TOF-MS)*, *Analyst* 128, 1228–1231, 2003
- [15] T. Čajka, J. Hajšlová: *Gas chromatography–high-resolution time-of-flight mass spectrometry in pesticide residue analysis: advantages and limitations*, *J. Chromatogr. A* 1058, 251–261, 2004
- [16] J. Honga, K.H. Young, D.G. Kim, J. Seo, K.J. Kim: *Rapid determination of chlorinated pesticides in fish by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A* 1038, 27–35, 2004
- [17] S. Lei, K.L. Hian: *Optimization of microwave-assisted extraction and supercritical fluid extraction of carbamate pesticides in soil by experimental design methodology*, *J. Chromatogr. A* 1014, 165–177, 2003
- [18] M.L. Hopper: *Automated one-step supercritical fluid extraction and clean-up system for the analysis of pesticide residues in fatty matrices*, *J. Chromatogr. A* 840, 93–105, 1999

- [19]E. Concha-Grana, M.I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, E. Fernández-Fernández, D. Prada-Rodríguez: *Development of pressurized liquid extraction and cleanup procedures for determination of organochlorine pesticides in soils*, J. Chromatogr. A 1047, 147–155, 2004
- [20]E. Conte, R. Mllam, G. Morah, F. Abballe: *Comparison between accelerated solvent extraction and traditional extraction methods for the analysis of the herbicide diflufenican in soil*, J. Chromatogr. A 765, 121–125 1997
- [21]S. Tao, L.Q. Guo, X.J. Wang, W.X. Liu, T.Z. Ju, R. Dawson, J. Cao, F.L. Xu, B.G. Li: *Use of sequential ASE extraction to evaluate the bioavailability of DDT and its metabolites to wheat roots in soils with various organic carbon contents*, Sci. Total Envir. 320, 1–9, 2004
- [22]L. Hou, H.K. Lee: *Determination of pesticides in soil by liquid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry*, J. Chromatogr. A 1038, 37–42, 2004
- [23]M.L. Hopper: *Automated one-step supercritical fluid extraction and clean-up system for the analysis of pesticide residues in fatty matrices*, J. Chromatogr. A 840, 93–105, 1999
- [24]V.G. Zuina, J.H. Yariwakea, C. Bicchi: *Fast supercritical fluid extraction and high-resolution gas chromatography with electron-capture and flame photometric detection for multiresidue screening of organochlorine and organophosphorus pesticides in Brazil's medicinal plants*, J. Chromatogr. A 985, 159–166, 2003
- [25]S.J. Lehotay, C.H. Lee: *Evaluation of a fibrous cellulose drying agent in supercritical fluid extraction and pressurized liquid extraction of diverse pesticides*, J. Chromatogr. A 785, 313–327, 1997
- [26]S.J. Lehotay, K.I. Eller: *Development of a Sample Preparation Technique for Supercritical Fluid Extraction for Multiresidue Analysis of Pesticides in Produce*, J AOAC Int. 78, 821–830, 1995
- [27]S.J. Lehotay, N. Aharonson, E. Pfeil, M.A. Ibrahim: *Development of a Sample Preparation Technique for Supercritical Fluid Extraction for Multiresidue Analysis of Pesticides in Produce*, J AOAC Int. 78, 831–840, 1995
- [28]R.K. Juhler: *Supercritical fluid extraction of pesticides from meat: a systematic approach for optimisation*, Analyst 123, 1551–1556, 1998
- [29]M.L. Hopper: *Automated one-step supercritical fluid extraction and clean-up system for the analysis of pesticide residues in fatty matrices*, J. Chromatogr. A 840, 93–105, 1999
- [30]M.L. Hopper: *Extraction and Cleanup of Organochlorine and Organophosphorus Pesticide Residues in Fats by Supercritical Fluid Techniques*, J. AOAC Int. 80, 639–646, 1997
- [31]J.W. King, Z. Zhang: *Selective Extraction of Pesticides from Lipid-Containing Matrixes Using Supercritical Binary Gas Mixtures*, Anal. Chem. 70, 1431–1436, 1998
- [32]D.H. Kim, G.S. Heo, D.W. Lee: *Determination of organophosphorus pesticides in wheat flour by supercritical fluid extraction and gas chromatography with nitrogen–phosphorus detection*, J. Chromatogr. A 824, 63–70, 1998
- [33]K.N.T. Norman, S.H.W. Panton: *Supercritical fluid extraction and quantitative determination of organophosphorus pesticide residues in wheat and maize using gas chromatography with flame photometric and mass spectrometric detection*, J. Chromatogr. A 907, 247–255, 2001
- [34]A. Shanker, C. Sood, V. Kumar, S.D. Ravindranath: *A modified extraction and clean-up procedure for the detection and determination of parathionmethyl and chlorpyrifos residues in tea*, Pest. Manag. Sci. 57, 458–462, 2001
- [35]Z. Kabátek, B. Gaš, J. Vohlídal: *Gel permeation chromatography of polymers degrading randomly in the column - Theoretical treatment and practical aspects*, J. Chromatogr. A 786, 209–218, 1997
- [36]G.G. Rimkus, M. Rummeler, I. Nausch: *Gel permeation chromatography-high-performance liquid chromatography combination as an automated clean-up technique for the multiresidue analysis of fats*, J. Chromatogr. A 737, 9–14, 1996

- [37]P.D. Johnson, D.A. Rimmer, R.H. Brown: *Adaptation and application of a multi-residue method for the determination of a range of pesticides, including phenoxy acid herbicides in vegetation, ased on high-resolution gel permeation chromatographic clean-up and gas chromatographic analysis with mass-selective detection*, J. Chromatogr. A 765, 3–11, 1997
- [38]G. Niessner, W. Buchberger, R. Eckerstorfer: *Multiresidue screening methods for the determination of pesticides in plant materials*, J. Chromatogr. A 846, 341–348, 1999
- [39]M. Barriada-Pereira, M.J. González-Castro, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, E. Fernández-Fernández: *Determination of 21 organochlorine pesticides in tree leaves using solid-phase extraction clean-up cartridges*, J. Chromatogr. A 1061, 133–139, 2004
- [40]F.J. Schenck, S.J. Lehotay: *Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food?*, J. Chromatogr. A 868, 51–61, 2000
- [41]A. Hercegová, M. Dömötöróvá, E. Matisová, M. Kirchnera, R. Otrekala, V. Štefuca: *Fast gas chromatography with solid phase extraction clean-up for ultratrace analysis of pesticide residues in baby food*, J. Chromatogr. A, 2004 (v tisku)
- [42]E. Viana, J.C. Moltó, G. Font: *Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the analysis of pesticide residues in vegetables*, J. Chromatogr. A 754, 437–444, 1996
- [43]P.L. Wylie, K.J. Klein, M.Q. Thomson, B.W. Hermann: *Using electronic pressure programming to reduce the decomposition of labile compounds during splitless injection*, J. High Resolut. Chromatogr. 15, 763–768, 1992
- [44]F. David, P. Sandra, S.S. Stafford, B. Slavica: *Analysis of thermolabile pesticides using electronic pressure control for reduced decomposition: the analysis of iprodione as an example*, Hewlett-Packard Co., Application Note 228–272, 1994
- [45]P.L. Wylie, K. Uchiyama: *Improved gas chromatographic analysis of organophosphorus pesticides with pulsed splitless injection*, J. AOAC Int. 79, 571–577, 1996
- [46]M. Vincenti, C. Minero, M. Sega, C. Provida: *Optimized splitless injection of hydroxylated PCB by pressure pulse programming*, J. High Resolut. Chromatogr. 18, 490–494, 1995
- [47]R. Bartha, W. Vetter, B. Luckas: *Optimized pressure-pulse splitless injection and electron-capture, negative ionization detection for the congener specific determination of compounds of technical toxaphene*, Fresenius J. Anal. Chem. 358, 812–817, 1997
- [48]F. David, P. Sandra, S.S. Stafford, B. Slavica: *Improved sensitivity for the analysis of organochlorine pesticides by CGC - ECD using pressure-pulsed splitless injection*, Hewlett-Packard Co., Application Note 228–222, březen 1993.
- [49]P.L. Wylie, R.J. Phillips, K.J. Klein, M.Q. Thomson, B.W. Hermann: *Improving splitless injection with electronic pressure programming*, J. High Resolut. Chromatogr. 14, 649–655, 1991
- [50]F. David, P. Sandra, S.S. Stafford, B. Slavica: *Improved sensitivity for the analysis of polychlorinated biphenyls by CGC-ECD using pressure-pulsed splitless injection*, Application Note 228–223, Hewlett-Packard, duben 1993
- [51]F. David, P. Sandra, S.S. Stafford, B. Slavica: *Analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons using pressure-pulsed splitless injection*, Application Note 228–224, Hewlett-Packard, 1993
- [52]G. Schomburg, H. Husmann, R. Rittmann: *"Direct" (on-column) sampling into glass capillary columns. Comparative investigations on split, splitless and on-column sampling*, J. Chromatogr. A 204, 85–96, 1981
- [53]H.J. Stan, H. Goebel: *Evaluation of automated splitless and manual on-column injection techniques using capillary gas chromatography for pesticide residue analysis*, J. Chromatogr. 314, 413–420, 1984
- [54]S. Pedersen-Bjergaard, S.I. Semb, E.M. Brevik: *Comparison of on-column and splitless injection in capillary gas chromatography coupled with atomic emission detection*, J. High Resol. Chromatogr. 20, 47–49, 1997

- [55]K. Grob: *Effect of "dirty" injected on-column in capillary gas chromatography, analysis of the sterol fraction of oils as an example*, J. Chromatogr. 287, 1–14, 1984
- [56]F. Poy, S. Visani, F. Terrosi: *Automatic injection in high-resolution gas chromatography: programmed-temperature vaporizer as general-purpose injection system*, J. Chromatogr. A 217, 81–90, 1981
- [57]F. Poy, S. Visani, F. Terrosi: *Universal sample-injection system for capillary-column gas chromatography using a programmed-temperature vaporizer (PTV)*, J. High Resolut. Chromatogr. 5, 355–359, 1982
- [58]F. Poy, L. Cobelli: *Quantitative aspects of the programmed-temperature vaporization technique of sample introduction in parallel capillary-column and micro-bore capillary-column gas chromatography*, J. Chromatogr. A 279, 689–694, 1983
- [59]G. Schomburg, H. Husmann, F. Schulz: *Cold sample injection with either the split or splitless mode of temperature-programmed sample transfer. Comparison to cold on-column injection with a commercial device*, J. Chromatogr. A 279, 259–267, 1983
- [60]H.J. Stan, H.M. Müller: *Evaluation of automated and manual hot-splitless, cold-splitless (PVT), and on-column injection technique using capillary gas chromatography for the analysis of organophosphorus pesticides*, J. High Resolut. Chromatogr. Commun. 11, 140–143, 1988
- [61]H.M. Müller, H.J. Stan: *Pesticide residue analysis in food with CGC—study of long-term stability by the use of different injection techniques*, J. High Resolut. Chromatogr. 13, 697–701, 1990
- [62]Z.E. Penton: *Optimization of sample introduction parameters for determinations of pesticides by capillary gas chromatography using a two column, two detector system*, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 74, 872–875, 1991
- [63]J. Villen, T. Herraiz, G. Regiero, M. Herraiz: *Experiments with the PTV (programmed temperature vaporizer) in the solvent split mode for concentration of volatiles*, J. High Resolut. Chromatogr. 12, 633–635, 1989
- [64]J.J. Vreuls, U. Brinkman, G.J. Jong, K. Grob, A. Artho: *Online solid-phase extraction - thermal desorption for introduction of large volumes of aqueous samples into a gas chromatograph*, J. High Resolut. Chromatogr. 14, 455–459, 1991
- [65]S. Müller, J. Efer, W. Engewald: *Gas-chromatographic water analysis by direct injection of large sample volumes in an adsorbent-packed PTV injector*, Chromatographia 38, 694–700, 1994
- [66]K. Grob, Z. Li: *PTV [programmed temperature vaporizing] splitless injection of sample volumes up to 20 micro l*, J. High Resolut. Chromatogr. Commun. 11, 626–632, 1988
- [67]H.J. Stan, M. Linkerhägner: *Large-volume injection in residue analysis with capillary gas chromatography using a conventional autosampler and injection by programmed-temperature vaporization with solvent venting*, J. Chromatogr. A 727, 275–289, 1996
- [68]K. Grob, M. Biedermann: *Vaporising systems for large volume injection or on-line transfer into gas chromatography: classification, critical remarks and suggestion*, J. Chromatogr. A 750, 11–23, 1996
- [69]H.J. Stan, M. Linkerhägner: *Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with atomic emission detection. State-of-the-art use of modified multimethod S19 of the Deutsche Forschungsgemeinschaft and automated large-volume injection with programmed-temperature vaporization and solvent venting*, J. Chromatogr. A 750, 369–390, 1996
- [70]M. Klee, B. Wilson, P.L. Wylie: *Large-volume injection for gas chromatography using PTV*, Application Note 228–374, Hewlett-Packard, 1997
- [71]M. Termonia, B. Lacombez, F. Munari: *Optimization of the cold split - splitless injector in the solvent-split mode*, J. High Resolut. Chromatogr. Commun. 11, 890–895, 1988
- [72]J. Staniewski, J.A. Rijks: *Solvent elimination rate in temperature-programmed injections of large sample volumes in capillary gas chromatography*, J. Chromatogr. 623, 105–113, 1992

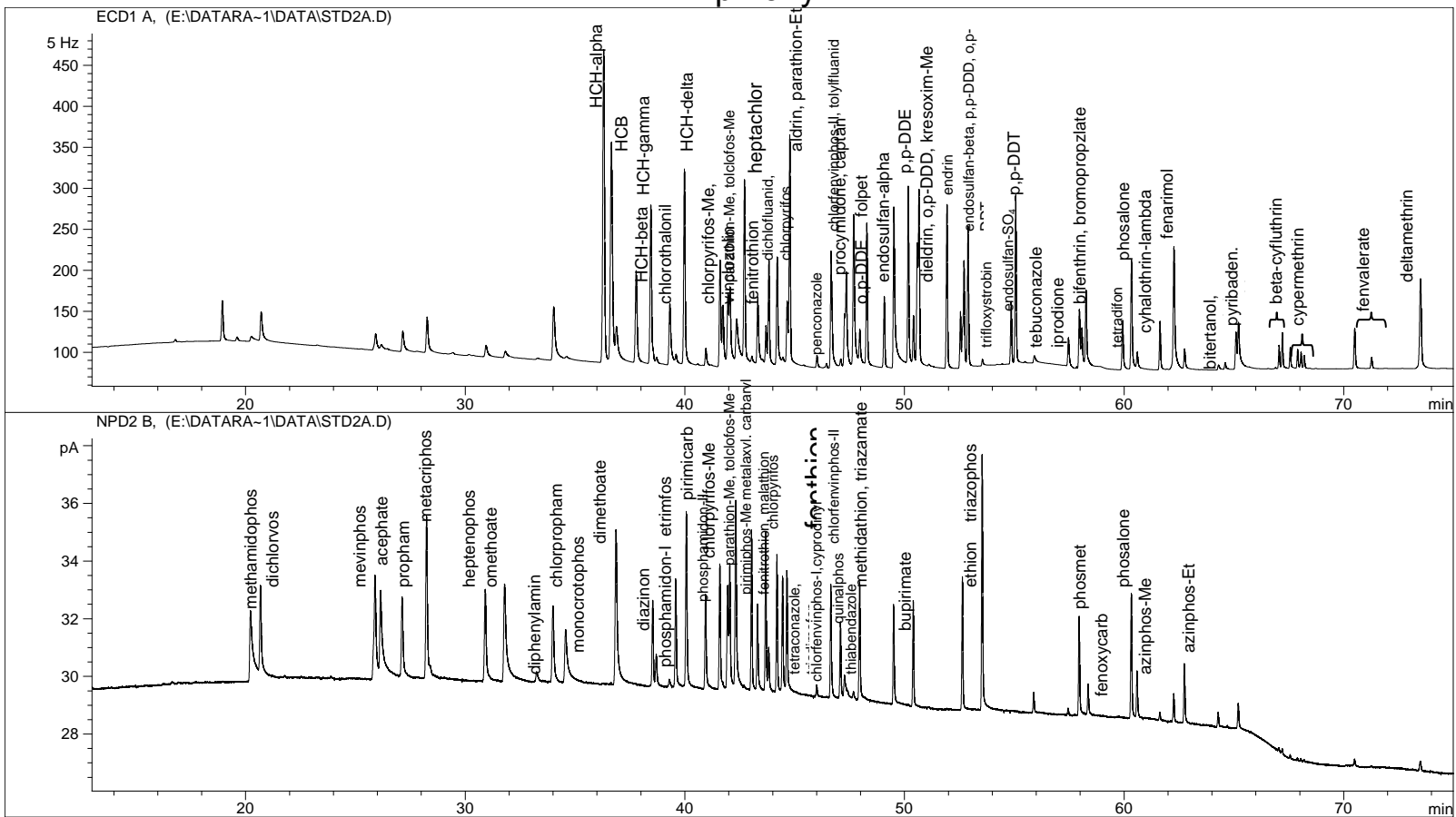
- [73]J. Staniewski, J.A. Rijks: *Potential and limitations of differently designed programmed-temperature injector liners for large-volume sample introduction in capillary GC*, J. High Resolut. Chromatogr. 16, 182–187, 1993
- [74]P.L. Wylie: *Trace level pesticide analysis by GC/MS using large volume injection*, Application Note 228–388, Hewlett-Packard, 1997
- [75]B. Grolimund, E. Boselli, K. Grob, G. Amado, G. Lercker: *Solvent trapping during large volume injection with an early vapor exit, Part 2: Chromatographic results and conclusions*, J. High Resolut. Chromatogr. 21, 378–382, 1998
- [76]A. Amirav, S. Dagan: *A direct sample introduction device for mass spectrometry studies and gas chromatography mass spectrometry analyses*, Eur. Mass Spectrom. 3, 105–111, 1997
- [77]K. Patel, R.J. Fussel, D.M. Goodall, B.J. Keely: *Evaluation of large volume-difficult matrix introduction-gas chromatography-time of flight-mass spectrometry (LV-DMI-GC-TOF-MS) for the determination of pesticides in fruit-based baby foods*, Food Additives and Contaminants 21, 658–669, 2004
- [78]T. Čajka, K. Maštovská, S.J. Lehotay, J. Hajšlová: *Use automated direct sample introduction with analyte protectants in the GC-MS analysis of pesticides residue*, J. Sep. Sci 28, 2005 (v tisku)
- [79]J. Hajšlová, J. Zrostlíková: *Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices*, J. Chromatogr. A 1000, 181–297, 2003
- [80]H.J. Stan, H.M. Müller: *Evaluation of automated and manual hot-splitless, cold-splitless (PVT), and on-column injection technique using capillary gas chromatography for the analysis of organophosphorus pesticides*, J. High Resolut. Chromatogr. Commun. 11, 140–143, 1988
- [81]H.M. Müller, H.J. Stan: *Pesticide residue analysis in food with CGC – study of long-term stability by the use of different injection techniques*, J. High Resolut. Chromatogr. 13, 697–701, 1990
- [82]H.M. Müller, H.J. Stan: *Thermal degradation observed with different injection techniques: quantitative estimation by the use of thermolabile carbamate pesticides*, J. High Resolut. Chromatogr. 13, 759–763, 1990
- [83]D.R. Erney, A.M. Gillespie, D.M. Gilvydis: *Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection*, J. Chromatogr. 638, 57–63, 1993
- [84]J. Hajšlová, K. Holadová, V. Kocourek, J. Poustka, M. Godula, P. Cuhra, M. Kempný: *Matrix-induced effects: a critical point in gas chromatographic analysis of pesticide residues*, J. Chromatogr. A 800, 283–295, 1998
- [85]M. Anastassiades, K. Maštovská, S.J. Lehotay: *Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides*, J. Chromatogr. A 1015, 163–184, 2003
- [86]D.R. Erney, T.M. Pawlowski, C.F. Poole: *Matrix-induced peak enhancement of pesticides in gas chromatography: is there a solution?*, J. High Resolut. Chromatogr. 20, 375–378, 1997
- [87]V. Kocourek, J. Hajšlová, K. Holadová, J. Poustka: *Stability of pesticides in plant extracts used as calibrants in the gas chromatographic analysis of residues*, J. Chromatogr. A 800, 297–304, 1998
- [88]E. Soboleva, N. Rathor, A. Mageto, Á. Ambrus, v knize: *Principles and Practices of Method Validation*. str. 138, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2000
- [89]A.K. Wong, B.J. McCoy, R.G. Carbonell: *Theory of capillary chromatography - Effect of coiling and interphase mass transfer*, J. Chromatogr. 129, 1–18, 1976
- [90]J.M. Takacs: *Contribution to the theory of open-tubular (capillary) columns in gas-liquid chromatography*, J. Chromatogr. 213, 371–388, 1981
- [91]K.J. Hyver, R.J. Phillips: *Considerations in enhancing resolution, speed and sensitivity in capillary gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry*, J. Chromatogr. 399, 33–46, 1987



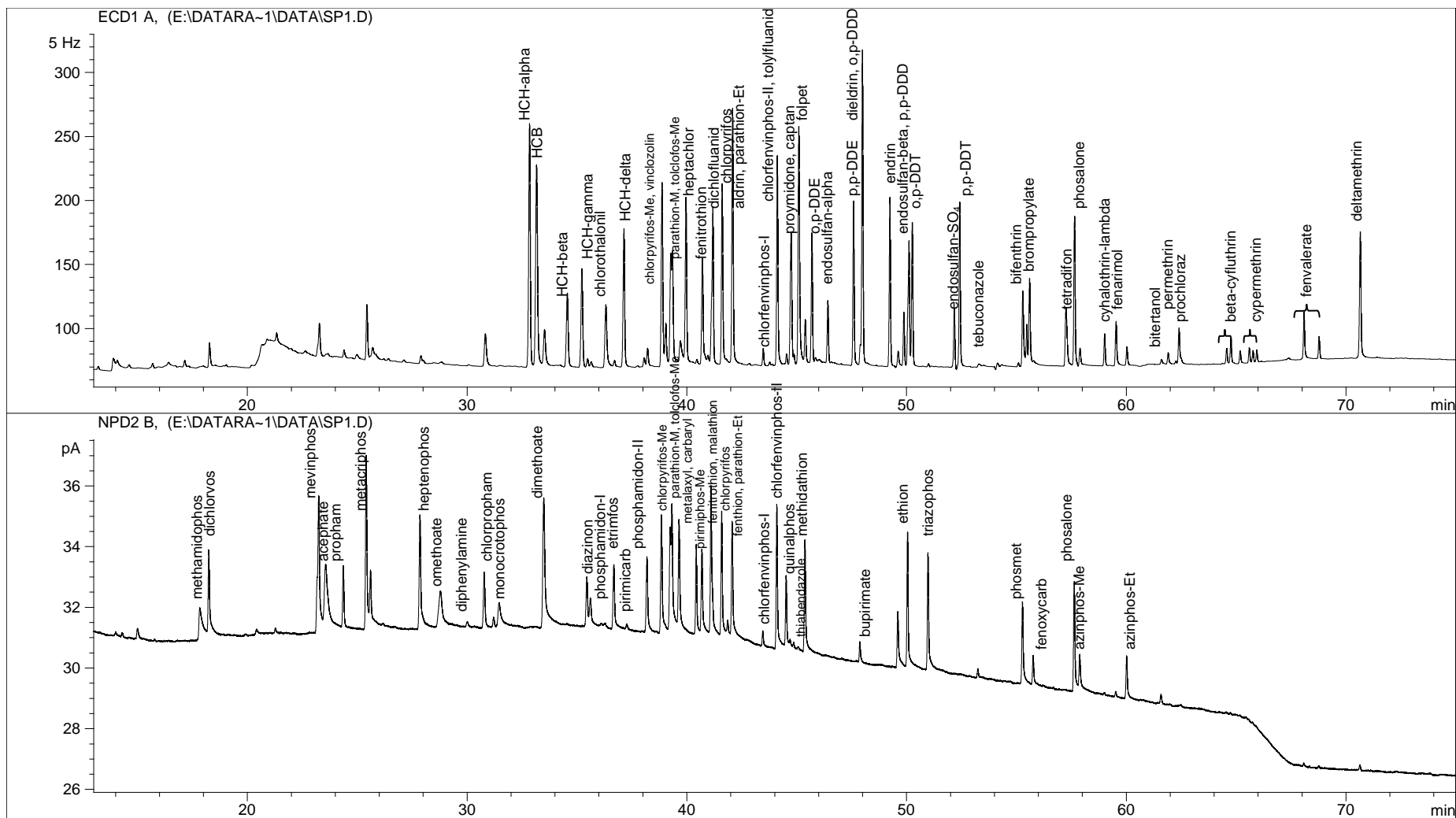
- [92] E.E. Akporhonor, S. Le Vent, D.R. Taylor: *Calculation of programmed temperature gas chromatography characteristics from isothermal data*, J. Chromatogr. 405, 67–76, 1987
- [93] A.J. Van Es, J.A. Rijks, C.A. Cramer: *Turbulent flow in capillary gas chromatography—evaluation of theoretical concept by Golay*, J. Chromatogr. 517, 143–159, 1990
- [94] J.Y. Zhang, G.M. Wang, R. Qian: *Theory of temperature-programmed gas chromatography—The method of moment analysis*, J. Chromatogr. 521, 71–87, 1990
- [95] J.W. Cochram: *Fast Gas Chromatography—Time-of-Flight Mass Spectrometry of Polychlorinated Biphenyls and Other Environmental Contaminants*, J. Chromatogr. Sci. 40, 254–268, 2002
- [96] K. Maštovská, S.J. Lehotay, J. Hajšlová: *Optimization and evaluation of low-pressure GC/MS for the fast analysis of multiple pesticide residues in a food commodity*, J. Chromatogr. A. 926, 291–308, 2001
- [97] M.E. Hail, R.A. Yost: *Theoretical and practical aspects of short open tubular columns at subambient pressures in gas chromatography/mass spectrometry*, Anal. Chem. 58, 2402–2410, 1989
- [98] M. Deursen, H.G. Janssen, J. Beens, P. Lipman, R. Reinierkens, P. Leclercq, C. Cramers: *Fast gas chromatography using vacuum outlet condition*, J. Microcol. Sep. 12, 613–622, 2000
- [99] C.A. Cramers, H.G. Janssen, M. Deursen, P.A. Leclercq: *High-speed gas chromatography: an overview of various concepts*, J. Chromatogr. A 856, 315–329, 1999
- [100] G. Gaspar: *High-speed gas chromatography. Theoretical and practical aspects*, J. Chromatogr. 556, 331–351, 1991
- [101] L.M. Blumberg: *Theory of fast capillary gas chromatography. Part 3.*, J. High Resol. Chromatogr. 22, 403–413, 1999
- [102] J. Zeeuw, J. Peene, H.G. Jansen, X. Lou: *A sample way to speed up separations by GC-MS using short 0,53 mm columns and vacuum outlet conditions*, J. High Chrom. 23, 677–680, 2000
- [103] C.P.M. Schutjes, E.A. Vermeer, J. Rijks, C.A. Cramers: *Increased speed of analysis in column inner diameter*, J. Chromatogr. 253, 1–16, 1982
- [104] J.C. Giddings: *Theory of Minimum Time Operation in Gas Chromatography*, Anal Chem 34, 314–319, 1962
- [105] K. Maštovská, J. Hajšlová, S.J. Lehotay: *Ruggedness and other performance characteristics of low-pressure gas chromatography-mass spectrometry for the fast analysis of multiple pesticide residues in a food commodity*, J. Chromatogr. A 1054, 335–349, 2004
- [106] J. Dallüge, M. Rijn, J. Beens, Vreuls R.J.J., U.A.Th. Brinkman, *Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry detection applied to the determination of pesticides in food extracts*, J. Chromatogr. A 965, 207–217, 2002
- [107] J.P. Toth: *Mass spectrometry, v knize: Pesticide Residues in Food: Methods, Techniques, and Regulations*, Fong W.G., Moye H.A., Seiber J.N., Toth J.P., John Wiley & Sons Ltd., 1999
- [108] A.G. Harrison: *Chemical Ionization Mass Spectrometry*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1983
- [109] G.C. Mattern, G.M. Singer, J. Louis, M. Robson, J.D. Rosen: *Determination of several pesticides with a chemical-ionization ion-trap detector*, J. Agric. Food Chem. 38, 402–407, 1990
- [110] E.A. Stemmler, R.A. Hites: *Electron Capture Negative Ion Spectra of Environmental Contaminants and Related Compounds*, VCH, New York, 1988
- [111] H. Jobst: *Investigation on the quantification of pesticides with mass selective detectors*, Fresenius J. Anal. Chem. 349, 298–300, 1994
- [112] J.B. Plomley, C.J. Koester, R.E. March: *Determination of N-nitrosodimethylamine in complex environmental matrices by quadrupole ion storage tandem mass spectrometry enhanced by unidirectional ion ejection*, Anal. Chem. 66, 4437–4443, 1994

- [113] G. Wells, C. Huston: *High-resolution selected-ion monitoring in a quadrupole ion-trap mass spectrometer*, Anal. Chem. 67, 3650–3655, 1995
- [114] J.B. Plomley, R.E. March, R.S. Mercer: *Tandem mass spectrometry of polychlorodibenzo-p-dioxin and polychlorodibenzofuran in a quadrupole ion trap. 1. Comparison of single-frequency, secular frequency modulation, and multifrequency resonant excitation modes*, Anal. Chem. 68, 2345–2352, 1996
- [115] J.V. Johnson, R.A. Yost, P.E. Kelley, D.C. Bradford: *Tandem-in-space and tandem-in-time mass spectrometry: triple quadrupoles and quadrupole ion traps*, Anal. Chem. 62, 2162–2172
- [116] M. Suchánek: *Kvalimetrie 14. – Návaznost chemických měření*, EURACHEM-ČR, Praha, 2005.
- [117] A. Hill: *Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis*, 3<sup>rd</sup> edition, Document No.:SANCO/10476/2003.
- [118] W.J. Youden, E.H. Steiner: *Statistics Manual of the AOAC*, AOAC International, Washington DC, 1975.
- [119] *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. EURACHEM/CITAC Guide 4, 2000, <http://www.eurachem.ul.pt/guides/QUAM2000-1.pdf>.
- [120] M. Suchánek: *Kvalimetrie 11. – Stanovení nejistoty analytického měření*, EURACHEM-ČR, Praha, 2001.
- [121] J. Hajšlová, K. Holadová, V. Kocourek, J. Poustka, M. Godula, P. Cuhra, M. Kempný: *Matrix-induced effects: a critical point in gas chromatographic analysis of pesticide residues*. *J. Chromatogr. A* **800** (1998) 283-295.
- [122] M. Godula, J. Hajšlová, K. Alterová: *Pulsed splitless injection and the extent to matrix effects in the analysis of pesticides*, *J. High Resolut. Chromatogr.* **22** (1999) 395-402.
- [123] C.D.S. Tomlin: *The Pesticide Manual, 12<sup>th</sup> edition*, British Crop Protection Council, CRC Press, 2002.
- [124] J. Fillion, F. Sauvé, J. Selwyn: *Multiresidue method for the determination of residues of 251 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection*. *J.AOAC Int.* **83** (2000) 698-712.
- [125] S. Navarro, A. Barba, G. Navarro, N. Vela, J. Oliva: *Multiresidue method for the rapid determination – in grape, must and wine – of fungicides frequently used on vineyards*. *J. Chromatogr. A* **882** (2000) 221-229.
- [126] J.L.M. Vidal, F.J. Arrebola, M. Mateu-Sánchez: *Application of gas chromatograph-tandem mass spectrometry to the analysis of pesticides in fruits and vegetables*. *J. Chromatogr. A* **959** (2002) 203-213.
- [127] A.R. Fernandez-Alba, A. Valverde, A. Agüera, M. Contreras: *Gas chromatographic determination of organochlorine and pyrethroid pesticides of horticultural concern*. *J. Chromatogr. A* **686** (1994) 263-274.

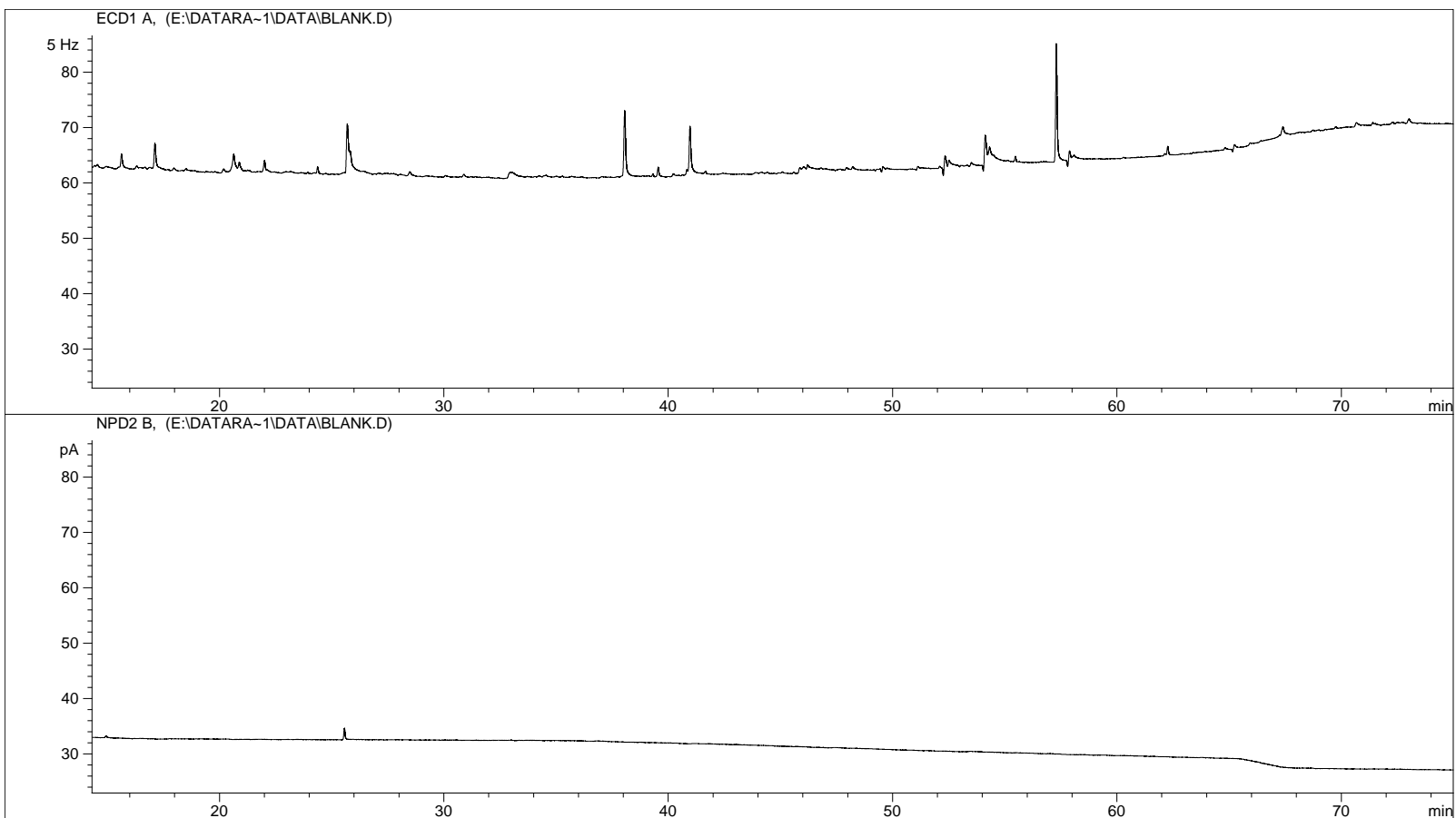
přílohy



Příloha I: Chromatogram standardu pesticidů v toluenu



**Příloha II: Chromatogram cíleně kontaminovaného matričního vzorku jablek**



**Příloha III:** Chromatogram matričního vzorku jablek neobsahujícího rezidua pesticidů



**Příloha IV**  
**Schéma měřicího postupu pro polycyklické aromatické uhlovodíky**

1 Úvod.....	121
2 Analytická chemie PAU.....	124
2.1 Izolace.....	125
2.2 Odstranění interferujících složek.....	131
2.3 Techniky využívané pro separaci s tanovení PAU.....	131
3 Stanovení PAU v potravinách a biotických matricích.....	139
3.1 Stanovení PAU v čistých roztocích.....	139
3.2 Optimalizace separace stanovení PAU metodou HPLC/FLD	142
4 Vyjadřování nejistot měření.....	154
4.1 Postup při odhadování nejistoty měření.....	154
4.2 Zdroje nejistot.....	154
4.3 Kvantifikace jednotlivých složek nejistoty a výpočet kombinované nejistoty.....	155
4.4 Odhad nejistoty analytického postupu; příklad stanovení PAU v olejích a tucích.....	156
5 Literatura.....	163



# POLYCYKLIČKÉ AROMATICKÉ UHLOVODÍKY

## 1 ÚVOD

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) představují významnou, prakticky všudypřítomnou skupinu organických kontaminantů. Vzhledem ke karcinogennímu/mutagennímu potenciálu některých PAU je jejich výskytu v potravinách, věnována mimořádná pozornost. Vědecký výbor pro potraviny (Scientific Committee on Food, SCF) se tomuto problému podrobně věnoval ve svém stanovisku z roku 2002 [1], kde dospěl k závěru, že řada PAU jsou genotoxické karcinogeny. Vzhledem k bezprahovým účinkům genotoxických látek by obsah PAU v potravinách měl být snížen na co nejnižší rozumně dosažitelnou úroveň. Vědecký výbor dále dospěl k názoru, že benzo[a]pyren by mohl být použit jako indikátor výskytu a účinku 15 karcinogenních PAU uvedených v Doporučení Komise ES v potravinách (*Doporučení komise ze dne 4. února 2005 o dalším zjišťování obsahu PAU v některých potravinách*).

K primární expozici člověka PAU dochází zejména potravinami, případně vzduchem a pitnou vodou. Ke kontaminaci potravin pak dochází dvěma hlavními cestami:

Technologickými a kulinárními postupy používanými při úpravě potravin, kdy potravina přichází do kontaktu se zplodinami hoření při uzení, grilování, pražení a přímém sušení. Množství a složení vznikajících PAU velmi závisí na podmínkách těchto procesů, jako je spalovací teplota dřeva, typ použitého paliva, přívod vzduchu a typ udícího procesu apod. V důsledku procesů sušení a ohřívání na přímém ohni, které se používají při výrobě jedlých olejů, může být obsah PAU vysoký. Při rafinaci olejů, může být B[a]P odstraněn prostřednictvím aktivního uhlíku, není však jasné, zda rafinace odstraní všechny nežádoucí PAU.

Minoritně může k tvorbě PAU v potravinách docházet i pyrolýzou nebo spalováním organické hmoty. Za hlavní prekurzory PAU jsou v tomto případě považovány peptidy, lipidy, sacharidy, steroidy, terpeny a přirozené pigmenty.

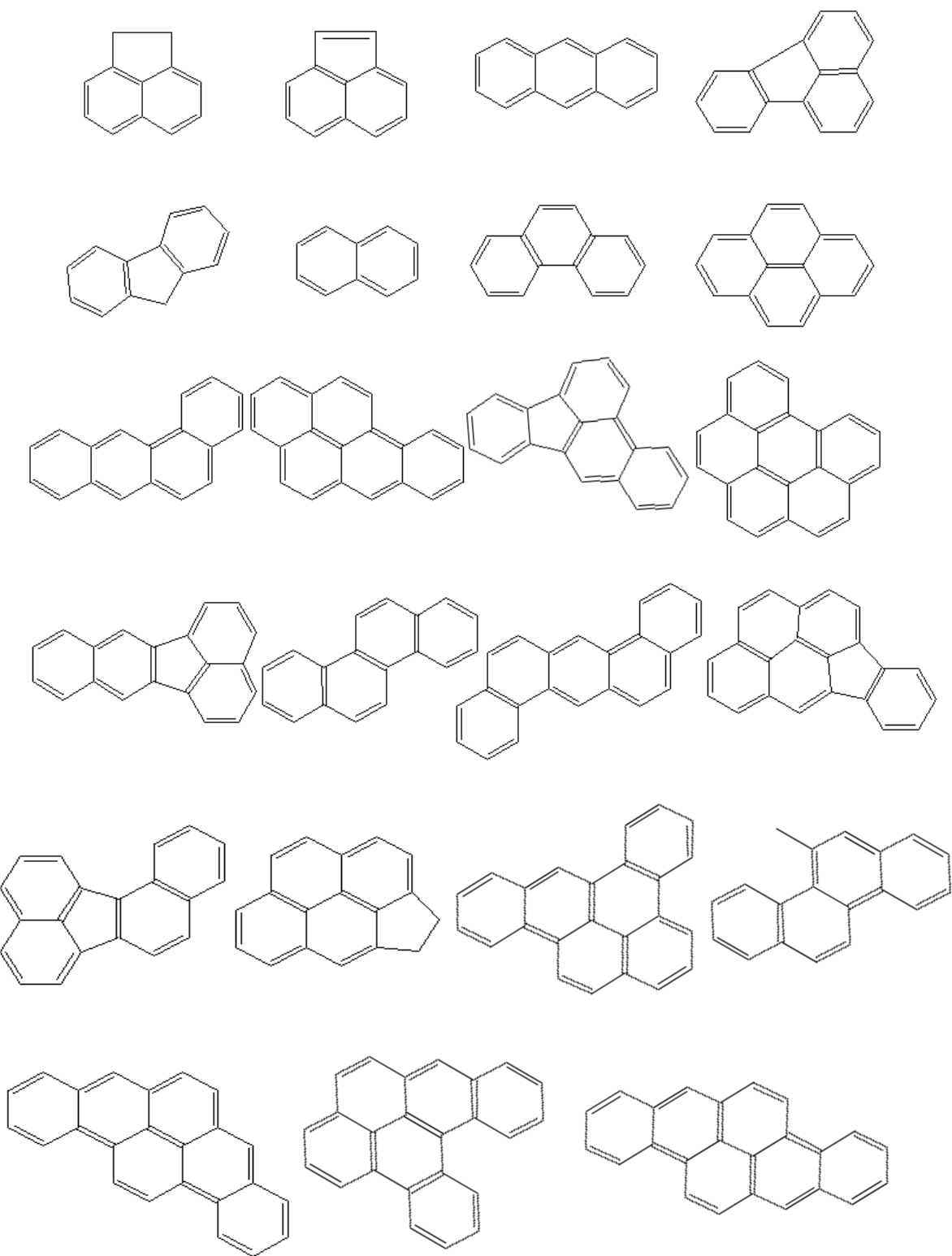
Kontaminací ze životního prostředí, tj. zejména depozicí / sorpcí PAU z atmosféry, půdy a vod na plodiny, přičemž riziko zvýšené kontaminace PAU je zejména v oblastech s intenzivní antropogenní činností (spalování fosilních paliv, doprava, výroba koksu, zpracování ropy...).

Z publikovaných studií vyplývá, že k celkovému dietárnímu příjmu PAU nejvíce přispívá konzumace cereálií a dále olejů a tuků.

Pro zjištění dietární expozice PAU je nutné monitorovat hladiny těchto látek v celé řadě potravinářských matric, dále sledovat spotřebu jednotlivých potravin a také technologické a kulinární úpravy vedoucí ke zvyšování, příp. snižování obsahu PAU v jednotlivých potravinách. K tomuto účelu je nutné disponovat vhodnými analytickými metodami umožňujícími jejich stanovení i na stopových hladinách. Většina studií, které se doposud zabývaly touto tematikou byla zaměřena na sledování 16 PAU, které jsou stanoveny jako prioritní polutanty US EPA (Tabulka 1, Obrázek 1). Pro stanovení „nových“ EU PAU (viz Tabulka 1, Obrázek 1) je nutné vyvinout a validovat vhodné analytické techniky, zejména s ohledem na obtížnou identifikaci a kvantifikaci některých cílových PAU.

**Tabulka 1:** Přehled PAU doporučených pro sledování v potravinách a životním prostředí podle US EPA a Evropskou komisí.

Název PAU	CAS	Doporučeno organizací
Acenaphthene	83-32-9	US EPA
Acenaphthylene	208-96-8	US EPA
Anthracene	120-12-7	US EPA
Benz[ <i>a</i> ]anthracene	56-55-3	US EPA / EK
Benzo[ <i>b</i> ]fluoranthene	205-99-2	US EPA / EK
Benzo[ <i>j</i> ]fluoranthene	205-82-3	EK
Benzo[ <i>k</i> ]fluoranthene	207-08-9	US EPA / EK
Benzo[ <i>ghi</i> ]perylene	191-24-2	US EPA / EK
Benzo[ <i>a</i> ]pyrene	50-32-8	US EPA / EK
Chrysene	218-01-9	US EPA / EK
Cyclopenta[ <i>cd</i> ]pyrene	27208-37-3	EK
Dibenz[ <i>a,h</i> ]anthracene	53-70-3	US EPA / EK
Dibenzo[ <i>a,e</i> ]pyrene	192-65-4	EK
Dibenzo[ <i>a,h</i> ]pyrene	189-64-0	EK
Dibenzo[ <i>a,i</i> ]pyrene	189-55-9	EK
Dibenzo[ <i>a,l</i> ]pyrene	191-30-0	EK
Fluoranthene	206-44-0	US EPA
Fluorene	86-73-7	US EPA
Indeno[1,2,3- <i>cd</i> ]pyrene	193-39-5	US EPA / EK
5-Methylchrysene	3697-24-3	EK
Naphthalene	91-20-3	US EPA
Phenanthrene	85-01-8	US EPA
Pyrene	129-00-0	US EPA



**Obrázek 1:** Struktura vybraných PAU (prioritně sledované)

## 2 Analytická chemie polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU)

Průnik environmentálních kontaminantů do potravních řetězců s sebou nese, vedle případných negativních dopadů na ekosystém, i riziko poškození zdraví člověka v důsledku příjmu škodlivin dietou. Je tedy zřejmé, že pro objektivní posouzení daných rizik, je nutné generovat validní data, která by byla získána s využitím relevantních metod.

PAU jsou sledovány v celé řadě potravinářských a environmentálních matric, mezi které se řadí ovzduší, sladkovodní a mořské vody a sedimenty, půda a biotické matrice jako např. vodní živočichové a vegetace. Pro tento účel je nutné využívat složité analytické postupy, protože environmentální PAU obvykle postrádají funkční skupiny a existují spíše jako četné strukturní izomery.

Posouzení expozice člověka PAU je závislé na spolehlivé a správné analytické metodě. Stanovení PAU v biotických a abiotických materiálech je obvykle prováděno na velmi nízkých (stopových) hladinách, a proto vyžaduje od analytika značné zkušenosti a kompetentnost. Obecné problémy spojené se stopovou analýzou PAU lze shrnout do několika bodů:

- heterogenita analyzovaných materiálů - uplatňuje se zejména při odběru a zpracování vzorků a může se projevit sníženou reprezentativností výsledků,
- omezená stabilita vzorků, ztráty analytů a případná kontaminace vzorků během jejich transportu a skladování,
- vysoké riziko sekundární kontaminace vzorků (spojené zejména přítomností pozadových hladin analytů v chemikáliích a prostředí laboratoře), případně ztráty analytů (včetně fotodekompozice) během provádění analytických operací,
- nedostatečné rozlišení při chromatografické separaci,
- relativně velký rozptyl výsledků slepých pokusů.

Tyto faktory podstatně ovlivňují správnost získaných výsledků. Z tohoto důvodu by měla být generovaná data, resp. identita nálezů, confirmována. Samozřejmou součástí prověření kvality dat by mělo být provádění slepých stanovení, dále ověření zda nemohlo dojít k náhodné kontaminaci během vzorkování a nakonec zda bylo provedeno stanovení uměle kontaminovaných vzorků nebo analýza vhodného certifikovaného referenčního materiálu pro posouzení správnosti.

Obecně by volba analytického postupu měla být podmíněna cíli, kterým má dané vyšetření sloužit. Kompletní analytická procedura pro identifikaci a kvantifikaci sloučenin obvykle začíná plánováním strategie vzorkování a končí získáním výsledku, prezentovaného obvykle společně se statistickým posouzením získaných dat. Tento řetěz analytických procedur, který není "silnější než jeho nejslabší článek", se obvykle skládá z kroků

***vzorkování → extrakce → přečištění → separace (případně předseparace) →  
→ identifikace → kvantifikace → statistické zhodnocení → prezentace výsledků.***

Zde je nutno zdůraznit, že jakákoliv chyba, která se objeví v některém z článků řetězce analytického postupu, je zákonitě přenášena a přičítána k ostatním chybám, které jsou generovány v jeho dalších článcích.

Po mnoho let byl v publikovaných pracích kladen největší důraz na vývoj kroků chromatografické separace, identifikace a kvantifikace, zatímco příspěvek ostatních kroků k nejistotě měření byl poněkud opomíjen. Studie realizované v posledním desetiletí však ukázaly, že právě krok extrakce je kritický pro správnost výsledků.

Zhodnocení účinnosti extrakce je důležitý proces, jehož parametry se odvíjí od použité extrakční techniky i typu vzorku. K vývoji a posouzení správnosti a účinnosti používaného analytického postupu většina analytiků používá, kromě matricových CRM, přídavek směsi jednotlivých PAU do matrice vzorku (*“spike”*). Vzhledem ke složitosti biotických, ale i abiotických matric, nelze předpokládat, že jsou přidané PAU integrovány v matici stejným způsobem jako ty přirozeně přítomné. Burford a kol. zjistili, že účinnost extrakce cíleně kontaminovaných vzorků může být až 10krát vyšší než u PAU přirozeně přítomných ve vzorku [2]. V případě, že byly pro *“spikovaný”* materiál zaznamenány výtěžnosti okolo 90 %, pro přirozený obsah PAU bylo za stejných extrakčních podmínek dosaženo výtěžností v rozmezí 25 – 80 %.

Ověření správnosti jednotlivých kroků analytických procedur lze tedy nejlépe dosáhnout použitím certifikovaného referenčního materiálu (CRM) s deklarovanými hladinami PAU, s matricemi totožnými nebo podobnými těm, které se vyskytují ve sledovaných vzorcích. CRM je možné využít i ke kontrole kvality rutinních analýz. Absence vhodného matricového referenčního materiálu pro naprostou většinu biotických vzorků však patří k nejvýraznějším problémům, které doprovází stanovení PAU zejména v biotických matricích. Dostupnost CRM je také omezena jejich vysokou cenou danou náročnou a složitou přípravou a procesem certifikace. Pro kontrolu správnosti analytického postupu stanovení PAU v abiotických materiálech je výběr omezen na CRM půdy, sedimentů, kalů, městského prachu, emisí tuhých částic z dieslových motorů, kamenouhelného dehtu, a v případě biotických matric pak na CRM tkáně mušlí a mořských řas. Pro analýzu vzorků potravinářských matric je možné použít, pokud je to vhodné, CRM kokosový olej (BCR 458, BCR 459).

Pro interní kontrolu jakosti je řešením příprava vlastního interního referenčního materiálu (IRM) s matricí shodnou s analyzovanými vzorky. V případě nedostupnosti vhodných CRM lze eventuálně využít alespoň srovnání s metodou se známými parametry (EPA, AOAC, IUPAC nebo FDA). Také účast v mezilaboratorních testech způsobilosti je nutností, pro externí posouzení kvality prováděných analýz.

Nároky na separaci PAU od koextraktů jsou spíše otázkou složitosti získaného extraktu a výběru vhodné separační a detekční techniky. Ve většině případů je však nutné krok přečištění vzorku po extrakci zařadit

## 2.1 Izolace

V analytických laboratořích je kladen stále větší důraz na rychlost prováděných analýz, současně se snižováním nákladů spojených s analýzou. Na základě vyhodnocení řady podkladů bylo zjištěno, že více než 60 % času vynaloženého na analýzu vzorku je obvykle spojeno s přípravou vzorku, 7 % času tvoří samotné stanovení, zbývající čas je strávený vzorkováním a vyhodnocením získaných dat.

Výběr extrakční a koncentrační metody je tedy založen na kompromisu mezi rychlostí, účinností, náklady a také na využití dostupných prostředků s ohledem na životní prostředí. Samotný vývoj extrakční procedury se pak odvíjí buď od typu vzorku (složení), nebo dostupné extrakční techniky. Dalším faktorem ovlivňujícím

volbu postupu je hladina kontaminace, která se může pohybovat v environmentálních matricích od prakticky nedetekovatelných množství, tj. méně než desetin  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , až po  $\text{mg}/\text{kg}$  pro jednotlivé PAU. Volbu postupu pro izolaci analytů z určitého typu vzorku je tedy nutné provádět také s ohledem na aplikační rozsah metody. Přesné výsledky je pak možné získat pouze použitím postupu, který je validován pro příslušnou kombinaci analyt/matrice, s typickou hladinou analytu pro danou matici, a proto pro izolaci PAU neexistuje univerzální postup.

Dosažení účinné extrakce, dobré opakovatelnosti výtěžnosti analytů a minimální kontaminace vzorku během jeho přípravy a analýzy je podmíněno dodržáním požadavků na pracovní postup a kvalitu používaných materiálů. Jejich opomenutí může vést ke snížení výtěžnosti extrakce, zhoršení opakovatelnosti stanovení a zvýšení mezí stanovitelnosti.

### ***Izolace PAU z pevných matric***

Klasické metody pro stanovení stopových hladin PAU v pevných matricích jsou obvykle pracné a časově náročné několikastupňové procedury, které vyžadují ve vysoké míře manuální manipulaci se vzorkem. Z těchto důvodů se moderní analytická chemie zaměřuje na vývoj analytických procesů, které by eliminovaly nevýhody klasických extrakčních technik. Vzhledem k širokému rozmezí hladin kontaminantů přítomných v širokém spektru vzorků, by měla být extrakční technika zvolená pro izolaci analytů komplexní a snadno standardizovatelná. Mezi běžně používané techniky pro izolaci PAU z pevných matric se dnes řadí extrakce podle Soxhleta, extrakce suspenze vzorku ve vhodném rozpouštědle pomocí ultrazvuku, superkritická fluidní extrakce (SFE), extrakce pomocí mikrovln (MAE), zrychlená extrakce rozpouštědlem (ASE) a v případě zejména potravinářských matric dosud používaná extrakce po alkalické hydrolýze. Další metody, jako např. třepání, jsou v současné době využívány již jen zřídka.

Většina zmíněných extrakčních metod pro izolaci PAU z pevných či polotuhých vzorků je založena na uvolnění analytů z matrice vlivem interakcí s vhodným rozpouštědlem. Volba rozpouštědla je obvykle podmíněna nejen rozpustností analytů a interferujících látek, ale také charakterem makrokomponent v daném vzorku. Rozhodující je především obsah vody, ale i přítomnost přírodních pigmentů, sacharidů, bílkovin a množství a složení lipidického podílu (triacylglyceroly, fosfolipidy, vosky) apod. Dalšími hledisky pro výběr rozpouštědla jsou bod varu, mísitelnost s jinými rozpouštědly, ekologická a toxikologická nezávadnost a ekonomická dostupnost. Některá rozpouštědla s velmi dobrými extrakčními schopnostmi jsou v současné době využívána pouze zřídka, díky svým karcinogenním vlastnostem nebo vlivu na životní prostředí (benzen, chlorovaná rozpouštědla).

### ***Izolace PAU z kapalných vzorků***

Vzhledem k relativně nízkým hladinám PAU nacházených v environmentálních a potravinářských matricích je obvykle nutné před vlastní chromatografickou separací provést zakoncentrování analytů. U kapalných vzorků jako je voda či biologické tekutiny jsou nejběžněji využívanými technikami pro izolaci PAU extrakce na tuhou

fázi (SPE) a mikroextrakce na tuhou fázi (SPME). Tyto techniky byly vyvinuty s ohledem na eliminaci, nebo alespoň minimalizaci použití organických rozpouštědel pro izolaci PAU z kapalných vzorků. Stále jsou však používány i klasické postupy extrakce do rozpouštědla nemísitelného se vzorkem.

V následující Tabulce II jsou stručně uvedeny charakteristiky jednotlivých extrakčních technik, přednosti a limitující faktory spojené s jejich použitím a reference na příslušné publikace s konkrétním využitím těchto metod.

**Tabulka II:** Přehled extrakčních technik používaných při stanovení PAU v potravinách

Technika	Charakteristika	Výhody	Nevýhody	Matrice
<b>Prostá extrakce rozpouštědlem</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• přechod analytů ze vzorku pomocí zvýšené teploty nebo třepání (opakovaného) s extrakčním rozpouštědlem (např. hexan, dichlormethan)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• jednoduché provedení</li> <li>• nízké náklady</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• statická extrakce</li> <li>• časově náročná</li> <li>• velká spotřeba rozpouštědel</li> <li>• nutnost zahuštění extraktu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ uzené párky [3]</li> <li>▪ uzené maso [3]</li> <li>▪ uzené ryby [4,5]</li> <li>▪ olivový olej [6]</li> </ul>
<b>Extrakce podle Soxhleta</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• opakovaná extrakce vzorku v patroně umístěné ve skleněné aparatuře rozpouštědlem (např. dichlormethan, hexan, aceton) zahříváním k bodu varu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• dynamická extrakce</li> <li>• velká výtěžnost</li> <li>• nízké náklady</li> <li>• není nutná filtrace extraktů</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• časově náročná</li> <li>• velká spotřeba rozpouštědel</li> <li>• nutnost zahuštění extraktu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ uzené maso [7]</li> <li>▪ ryby [8,9,10]</li> </ul>
<b>Extrakce podpořená ultrazvukem</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• prostá extrakce rozpouštědlem využívající navíc akustické vibrace s frekvencemi nad 20 kHz</li> <li>• extrakce probíhá za teploty laboratoře a většinou opakovaně v periodách vždy s čerstvým rozpouštědlem</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• rychlá metoda</li> <li>• nízké náklady</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• statická extrakce</li> <li>• velká spotřeba rozpouštědel</li> <li>• nutnost filtrace extraktu</li> <li>• nutnost zahuštění extraktu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ mlži [11]</li> <li>▪ hrách, fazole [12]</li> </ul>
<b>Zrychlená extrakce rozpouštědlem</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• extrakce pomocí rozpouštědla za vysokých tlaků a teplot nad bodem varu za normálního tlaku</li> <li>• zvýšená teplota se využívá ke snížení viskozity a povrchového napětí rozpouštědla a naopak zvýšení difúze a desorpce</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• rychlá metoda</li> <li>• nízká spotřeba rozpouštědel</li> <li>• možnost automatizace</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• vysoké investiční náklady</li> <li>• nutnost následného přečištění</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ uzené maso, uzené ryby [13]</li> <li>▪ rýže [14]</li> </ul>



Tabulka II: Pokračování

Technika	Charakteristika	Výhody	Nevýhody	Matrice
<b>Extrakce pomocí mikrovln</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>extrakce rozpouštědlem podporována elektromagnetickým vlněním s vlnovou délkou od 1 mm do 1 m při frekvenci 2450 MHz</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>rychlá metoda</li> <li>nízká spotřeba rozpouštědel</li> <li>možnost přesné kontroly průběhu extrakce</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>statická extrakce</li> <li>nutnost použití polárních rozpouštědel (dipólový moment)</li> <li>nutnost filtrace extraktu</li> <li>dražší vybavení</li> </ul>	-
<b>Extrakce po alkalické hydrolyze</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>hydrolyza vzorku varem s alkalizačním činidlem (např. KOH) a polárním extrakčním rozpouštědlem (např. methanol, ethanol) následována reextrakcí do nepolárního rozpouštědla (př. hexan, cyklohexan)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>velice účinná metoda</li> <li>nízké náklady</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>časově náročná</li> <li>nutnost filtrace prvního extraktu</li> <li>nutnost zahuštění extraktu</li> <li>nutnost následného přečištění</li> <li>velká spotřeba rozpouštědel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>grilované párky [15]</li> <li>uzený sýr [16,17]</li> <li>olivový olej [6]</li> <li>zelenina [18]</li> <li>masné výrobky [19]</li> <li>cereálie [19]</li> </ul>
<b>Extrakce na tuhou fázi</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>zádrž analytů sorbentem (př. modifikovaný silikagel C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub> a C<sub>2</sub> nebo fáze s funkčními skupinami CN, NH<sub>2</sub>) a jejich následná eluce rozpouštědlem</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>rychlá metoda</li> <li>nízká spotřeba rozpouštědel</li> <li>nízká cena</li> <li>může být použita k preseparaci</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>využití převážně pro PAU rozpustné ve vodě</li> <li>možné ztráty z adsorpce PAU</li> <li>převážně pro vodné vzorky</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>rostlinný olej [20,21]</li> <li>voda [22]</li> </ul>

- nebylo nalezeno žádné využití této techniky při izolaci PAU ze vzorků potravin

Tabulka II: Pokračování

Technika	Charakteristika	Výhody	Nevýhody	Matrice
<p><b>Mikroextrakce na tuhou fázi</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• analyty jsou ze vzorku sorbovány na křemenné vlákno potažené vhodnou stacionární fází (např. polydimethylsiloxan a PDMS/DVB)</li> <li>• vlákno je buď zanořené do kapalného vzorku (přímá SPME) nebo se vzorkuje plynná fáze nad vzorkem (head-space SPME)</li> <li>• po ukončení sorpce jsou analyty pomocí zvýšené teploty nebo rozpouštědla desorbovány a nanášeny na kolonu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• jednoduchá a šetrná metoda</li> <li>• rychlá metoda</li> <li>• spojuje odběr vzorku, extrakci a zakoncentrování do jednoho kroku</li> <li>• nevyžaduje použití rozpouštědla nebo jen minimální množství (při využití HPLC)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• možnost stanovení pouze PAU s méně než 4 aromatickými kruhy</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ uzený sýr [23,24]</li> </ul>
<p><b>Superkritická fluidní extrakce</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• extrakce kapalinou v nadkritickém stavu (např. CO<sub>2</sub>) s přidavkem modifikátoru (př. methanol, toluen)</li> <li>• extrakce prováděna staticky nebo dynamicky nebo kombinací obou dvou způsobů</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• rychlá metoda</li> <li>• nízká spotřeba rozpouštědel</li> <li>• možnost účinné kontroly průběhu extrakce</li> <li>• možnost automatizace pro extrakci více vzorků</li> <li>• možnost on-line spojení s detektorem</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• vysoké investiční náklady</li> <li>• problémy s ucpáváním restriktoru</li> <li>• problémy s odběrem extraktů</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ rostlinný olej [25,26]</li> <li>▪ uzené ryby [27]</li> </ul>

## 2.2 Odstranění interferujících sloučenin

Při analýze složitých matric, kterými bezesporu vzorky environmentálního původu či potravin jsou, je spolu s cílovými analyty často koizolována řada dalších komponent obsažených ve vyšetřovaném vzorku. Jejich míra a zastoupení jsou podmíněny jak charakterem rozpouštědla použitého pro extrakci, tak použitou izolační technikou. V biotických vzorcích rostlinného původu se jedná zejména o různé přírodní pigmenty (karotenoidy, chlorofyly a pod.), oleje, vosky či silice, u živočišných materiálů reprezentují hlavní koextrakty tuky. Účinné odstranění zmíněných látek, které mohou negativním způsobem ovlivnit (rušit nebo zcela znemožnit) identifikaci a kvantifikaci PAU, je klíčovým předpokladem pro dosažení spolehlivých výsledků. Nároky na požadovanou čistotu vzorku a tím i na čištění extraktu však určuje především používaná analytická koncovka.

Při výběru vhodné čistící techniky je kladen důraz zejména na uspokojivou separaci cílových analytů od koextraktů, samozřejmě s co nejvyšší výtěžností. Důležitým hlediskem je i doba analýzy, která by měla být co možná nejkratší a dále spotřeba rozpouštědel a jejich výběr z hlediska ekologického a toxikologického. Žádoucí je i možnost automatizace čistícího procesu.

K účinným preseparačním postupům patří kolonová chromatografie na Florisilu, silikagelu a Alumině. Jako eluční činidlo u silikagelu lze používat cyklohexan, u Florisilu spíše dichlormethan popřípadě dichlormethan ve směsi s jinými rozpouštědly a podobně pro Aluminu směs hexanu a dichlormethanu. Nevýhodou používání těchto sorbentů je obtížná automatizace tohoto čistícího procesu.

Další účinnou čistící technikou používanou pro přečištění extraktů je gelová permeační chromatografie (GPC), kdy je použit hydrofobizovaný polydextran Sephadex LH 20 či styrendivinylbenzenový kopolymer BioBeads S-X3. Tato metoda se dá snadno zautomatizovat, čímž se značně ulehčuje a zrychluje příprava vzorků. Velice často je využíváno k přečištění, především při analýze kapalných vzorků, SPE techniky na kolonkách plněných různými sorbenty (např. silikagel modifikovaný oktadecylovými nebo aminopropylými řetězci) za využití elučních činidel, jako např. cyklohexan, chloroform.

## 2.3 Techniky využívané pro separaci a stanovení PAU

Vzhledem ke složitosti analyzovaných směsí PAU je obvykle nutné provést, před samotnou identifikací a kvantifikací PAU v přečištěných extraktech vzorků, separaci jednotlivých sloučenin. Pro tento účel jsou většinou využívány chromatografické metody. V současné době se jedná zejména o aplikace technik plynové a kapalinové chromatografie.

Při výběru analytické koncovky hraje významnou roli návaznost na použité izolační a čistící techniky. S tím souvisí i vzhled chromatogramu (chromatografický profil), který je významně ovlivněn typem analyzovaného materiálu, stupněm a charakterem přečištění a selektivitou použité metody stanovení. Výhodou plynové chromatografie je separace na kolonách s vysokým počtem teoretických pater a dnes již téměř rutinní využití hmotnostně spektrometrického detektoru pro identifikaci a selektivní detekci. Využití kapalinové chromatografie je spojeno se selektivitou detekce (v případě využití fluorimetrické detekce), vyšší tolerancí k některým koextraktům a odstranění případných diskriminačních jevů při nástřiku, které souvisí s rozdílnou těkavostí PAU. Pro kvantifikaci stopových množství PAU

v environmentálních i potravinářských matricích však obě techniky disponují adekvátním rozlišením a ve spojení s vhodnou detekční technikou i citlivostí detekce.

### ***Plynová chromatografie***

V současné době je plynová chromatografie (GC) široce užívanou chromatografickou technikou pro stanovení PAU v potravinách. Její výhodou je výborná separace analytů a poměrně nízké detekční limity [28].

Dříve se kapilární GC obvykle požívala především ve spojení s plamenově ionizační detekcí (FID). Vzhledem k malé selektivitě a nižší citlivosti FID, je v současné době téměř nezbytné využití hmotnostně spektrometrického detektoru (MS), který umožňuje za vhodně zvolených podmínek (kolona, teplotní program) stanovení i „těžkých“ vysokomolekulárních PAU vyskytujících se v nízkých až stopových koncentracích. Používány jsou detektory kvadrupolové nebo iontové pasti, u kvadrupolu se nejčastěji provádí ionizace nárazem elektronů (EI) při 70 eV, v režimu monitorování jednotlivých iontů (SIM) [28].

Separční účinnost a citlivost významně souvisí s optimálními chromatografickými podmínkami. Při optimalizaci parametrů pro stanovení PAU pomocí GC se nesmí zapomenout na několik důležitých faktorů mezi, které patří vliv použitého rozpouštědla, nástřikové parametry (rychlost nástřiku, velikost lineru, objem nastříkovaného vzorku, teplota) a stacionární fáze kolony. Jedna z nejrozšířeněji používaných stacionárních fází se skládá z phenyl – methylpolysiloxanu (5 % phenylu). Kolony obsahující tuto stacionární fázi vykazují vysokou účinnost a umožňují přesnou kvantifikaci PAU [29].

Značnou selektivitou, zvláště pro separaci izomerů, se vyznačují kolony se stacionární fází s kapalnými krystaly, které umožňují separaci PAU i podle tvaru jejich molekuly, tj. podle poměru délky a šířky molekuly. Limitujícím faktorem pro použití těchto kolon je relativně nízká výrobní reprodukovatelnost stacionární fáze (značné rozdíly v selektivitě mezi kolonami) a použití za vyšších teplot (> 300 °C). Z těchto důvodů se zatím nedoporučuje využívat tyto kolony pro rutinní analýzu PAU [29,30].

Jednou z velice moderních metod pro stanovení PAU je dvoudimenzionální plynová chromatografie (GC × GC) ve spojení s hmotnostní detekcí s analyzátozem doby letu (TOF). Při této separační technice, při které jsou použity dvě kolony s různou selektivitou, propojené sériově za sebou. Vzorek je nejprve separován na první vysoce rozlišovací koloně. Mezi kolony je nainstalován modulátor k separaci eluátu z první kolony do velkého množství velmi malých frakcí. Každá jednotlivá frakce je zakoncentrována a následně nastříknuta na druhou kolonu. Druhá separace probíhá poměrně rychle (1 – 10 s), jednotlivé frakce jsou kontinuálně separovány bez vzájemných interferencí. Hlavní výhodou této techniky je větší kapacita píků, vyšší citlivost a lepší možnost stanovení neznámých látek [31]. Použití této poměrně nové techniky u vzorků potravin nebylo ovšem zatím příliš aplikováno a proto nebyla ani nalezena publikace v dostupné odborné literatuře.

### ***Kapalinová chromatografie***

V posledních letech nabyla vysokoúčinná kapalinová chromatografie na významu při stanovení PAU v potravinových vzorcích. Oproti GC má výhodu v tom, že není nutné dokonalé přečištění vzorků a také není tato technika omezena těkavostí

skladovaných látek. Dříve byly využívány kolony se silikagelem nebo aluminou, které byly později nahrazeny hlavně kolonami se speciální reverzní fází (polymerní) vhodnou pro separaci PAU. Kolony v současné době bývají dlouhé převážně 15 – 25 cm s vnitřním průměrem 3 – 4,6 mm. K eluci PAU se většinou používají vodné roztoky acetonitrilu, methanolu popřípadě tetrahydrofuranu, převážně v gradientovém módu, který je nutný, aby bylo možné v rámci celé analýzy sledovat celé spektrum obvykle stanovovaných PAU [32].

K detekci se využívá schopnosti řady PAU fluoreskovat, což umožňuje použití fluorimetrických detektorů. Vhodnou optimalizací excitačních a emisních vlnových délek lze dosáhnout vysokého stupně citlivosti a selektivity. K detekci PAU by bylo možno využít i jiných spektrometrických technik jakými jsou např. fotometrický detektor a detektor s diodovým polem (DAD), ale oproti fluorimetrickému detektoru se vyznačují nízkou citlivostí a selektivitou detekce [29,28].

Následující Tabulky III a IV shrnují základní podmínky extrakčních a čistících technik a metod identifikace a kvantifikace PAU nejčastěji používaných při analýze vzorků potravin.

**Tabulka III: Příklady extrakčních a čistících technik a podmínek pro GC při stanovení PAU v různých potravinových výrobcích**

Vzorek	Zpracování vzorku a přečištění	Kolona /stacionární fáze	Teplotní program	Detekce	Lit.
Grilované párky	Alkalická hydrolýza - směs ethanolu, vody a KOH; následná reextrakce cyklohexanem; přečištění pomocí SPE (aminopropylový a C <sub>18</sub> sorbent)	25 m × 0,2 mm i.d., 0,33 μm (Supelco SPB-5) předkolona: 1 m × 0,53 mm i.d	0,5 min při 80°C →230°C (8°C/min), →300°C (5°C/min)	MSD	[16]
Uzené ryby	Extrakce třepáním (pentan); přečištění na silikagelu a GPC (Sephadex LH-20)	25 m × 0,2 mm i.d. (SE-54)	100 →260°C (3°C/min)	MSD	[5]
Uzené ryby	Alkalická hydrolýza – směs methanolu, vody a KOH; následná reextrakce směsí (methanol-voda-cyklohexan a DMF-voda-cyklohexan); přečištění na GPC (Sephadex LH-20)	10 m × 2 mm plněné kolony (5% OV-101 a OV-17) (sorbent Gas Chrom)	1. 120 °C, →250°C (1°C/min) 2. 250°C, isothermní	FID MSD	[33]
Uzené párky	Alkalická hydrolýza – směs methanolu, vody a KOH; následná reextrakce směsí (methanol-voda-cyklohexan a DMF-voda-cyklohexan); přečištění na silikagelu a GPC (Sephadex LH-20)	10 m × 2 mm plněné kolony (5% OV-101) (sorbent Gas Chrom)	260°C, isothermní	FID	[34]
Uzené masné produkty	Alkalická hydrolýza - směs ethanolu, vody a KOH; následná reextrakce DMF; přečištění na Kiesel gelu 60	25 m × 0,28 mm i.d. (SE-54)	240°C, isothermní	MSD	[35]
Uzené ryby a rybí produkty	Alkalická hydrolýza – směs methanolu, vody a KOH; následná reextrakce směsí (methanol-voda-cyklohexan a DMF-voda-cyklohexan); přečištění na silikagelu a GPC (Sephadex LH-20)	55 m × 0,3 mm i.d. (SE-54)	6 min při 165°C →255°C (4°C/min)	FID	[36]

Vzorek	Zpracování vzorku a přečištění	Kolona /stacionární fáze	Teplotní program	Detekce	Lit.
Uzené ryby a uzené masné výrobky	Alkalická hydrolýza – směs methanolu, vody a KOH; následná reextrakce cyklohexanem; přečištění na Florisilu; následná reextrakce DMSO/hexanem	30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 μm (prokřížený 5% phenyl-methyl polysiloxan - DB-5)	25 °C, →180°C (prudce), →320°C (8°C/min)	FID MSD	[37]

**Tabulka III: Pokračování**

Vzorek	Zpracování vzorku a přečištění	Kolona /stacionární fáze	Teplotní program	Detekce	Lit.
Uzené ryby	Alkalická hydrolýza – směs methanolu, vody a KOH; následná reextrakce cyklohexanem; extrakce PAU kofein/mravenčí kyselinou, promytí roztokem NaCl; reextrakce cyklohexanem; přečištění na silikagelu	30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 μm (prokřížený 5% phenyl-methyl polysiloxan - DB-5)	1,5 min při 110°C → 210°C (30°C/min), →290°C (3°C/min), →300°C (10°C/min)	MSD	[38]
Uzený losos, párky a vepřové maso	Zrychlená extrakce rozpouštědlem (ASE), extrakční směs - CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -ACN; přečištění na Florisilu	30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 μm (prokřížený 5% phenyl-methyl polysiloxan - HP-5MS)	1 min při 40°C →250°C (12°C/min), →310°C (5°C/min)	MSD	[13]
Uzené maso	Alkalická hydrolýza – směs methanolu, vody a KOH; následná reextrakce cyklohexanem; další reextrakce směsí DMF-voda; přečištění na silikagelu a GPC (Bio Beads S-X3)	50 m × 0,25 mm i.d., 0,25 μm (prokřížený 5% phenyl-methyl polysiloxan - DB-5)	70°C, →280°C (5°C/min)	MSD	[39]
Uzené maso	Alkalická hydrolýza – směs methanolu, vody a KOH; následná reextrakce hexanem; přečištění pomocí SPE (Florisil)	30 m × 0,32 mm i.d., 0,25 μm (prokřížený 5% phenyl-methyl polysiloxan - DB-5)	1 min při 70°C →150°C (10°C/min), →280°C (4°C/min)	MSD (ITA)	[40]
Uzené kuřecí maso	Extrakce dle Soxhleta methanolem; Alkalická hydrolýza – směs methanolu, vody a KOH; následná reextrakce hexanem; přečištění na Florisilu	30 m × 0,32 mm i.d., 0,25 μm (prokřížený 5% phenyl-methyl polysiloxan - DB-5)	1 min při 70°C →150°C (10°C/min), →280°C (4°C/min), drží se 14 min	MSD (ITA)	[7]
Olivový olej	Extrakce třepáním (směs hexan-ACN 1:5); přečištění na GPC (BioBeads S-X3)	30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 μm (prokřížený 5% phenyl-methyl polysiloxan - HP-5MS) <i>předkolona:</i> 2 m × 0,25 mm i.d.	3,5 min 70°C →180°C (25 °C/min), drží se 10 min, →300°C (4°C/min), drží se 10 min	MSD (ITA)	[41]

**Tabulka III: Pokračování**

Vzorek	Zpracování vzorku a přečištění	Kolona /stacionární fáze	Teplotní program	Detekce	Lit.
Olivový olej	1. Extrakce třepáním (směs H <sub>2</sub> O-DMSO 2,4:1); následná reextrakce cyklohexanem; přečištění pomocí SPE (silikagel) 2. Stejný postup + Alkalická hydrolýza – směs methanolu, vody a KOH; následná reextrakce cyklohexanem	60 m × 0,25 mm i.d., 0,25 μm (prokřížený 5% phenyl-methyl polysiloxan HP-5MS)	0,5 min 50°C →130°C (8 °C/min), →290°C (5 °C/min), drží se 50 min	MSD	[6]
Uzený sýr	Extrakce tuku ze vzorku pomocí sonikace (cyklohexan); Alkalická hydrolýza – směs methanolu, vody a KOH; následná reextrakce cyklohexanem; přečištění pomocí SPE (Supelclean LC-Si SPE Tubes 3 ml)	60 m × 0,25 mm i.d., 0,25 μm (prokřížený 5% phenyl-methyl polysiloxan HP-5MS)	0,5 min 50°C →130°C (8 °C/min), →290°C (5 °C/min), drží se 50 min	MSD	[17]
Uzené ryby a oleje	Kyselá hydrolýza - HCl, následná reextrakce směsí dichlormethan-haxan (25:75); přečištění na GPC (Pharmacia Fine Chemicals 1m × 2,5 cm)	60 m × 0,25 mm i.d., 0,25 μm (prokřížený 5% phenyl-methyl polysiloxan HP-5MS)	1 min 80°C, →115°C (20 °C/min), 1 min 115 °C, →130°C (10 °C/min), →295°C (25 °C/min), 0,5 min 295°C, →300°C (1 °C/min)	MSD	[42]
Míži	Extrakce pomocí sonikace ve směsi aceton-hexan (50:50); přečištění na silikagelu	1. 30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 μm (prokřížený 5% phenyl-methyl polysiloxan HP-5MS) 2. 60 m × 0,25 mm i.d., 0,25 μm (prokřížený 5% phenyl-methyl polysiloxan HP-5MS)	1. 2 min 90 °C, →240°C (30 °C/min), drží se 4 min, →270°C (25 °C/min), drží se 14 min 2. 2 min 120 °C, →240°C (30 °C/min), drží se 4 min, →275°C (25 °C/min), drží se 19 min, →280°C (5 °C/min), drží se 11 min	MSD (ITA)	[43]



Tabulka IV: Příklady extrakčních a čistících technik a podmínek pro HPLC při stanovení PAU v různých potravinových výrobcích

Vzorek	Zpracování vzorku a přečištění	Kolona /stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Lit.
Uzené ryby	Alkalická hydrolýza – směs methanolu, vody a KOH; následná reextrakce cyklohexanem; extrakce PAU kofein/mravenčí kyselinou, promytí roztokem NaCl, reextrakce cyklohexanem; přečištění na silikagelu	15 cm × 4 mm i.d. Supelcosil LC PAH, 5 μm	A=ACN; B=H <sub>2</sub> O 0-1 min: 70%A, 30%B 1-19 min: 90%A, 10%B 20-40 min: 100%A, 0%B 40-55 min: 100%A <i>průtok</i> : - nejdříve gradientová a následně isokratická eluce	UVD 240, 254, 260 nm FLD Ex/Em 300/408 a 280/395 nm	[44]
Uzené párky, uzené maso	Extrakce třepáním směsí chloroform-methanol; přečištění na GPC (Bio Beads S-X3)	15 cm × 4,6 mm i.d. Supelcosil LC PAH, 5 μm	A=methanol-ACN-H <sub>2</sub> O 50:25:25; B=ACN 0-1 min: 100% A, 0%B 1- 25 min: 0%A, 100%B <i>průtok</i> : - gradientová eluce	FLD proměnné Ex (240-293) Em (340-498) nm	[3]
Uzené ryby	Extrakce třepáním chloroformem; přečištění na silikagelu	15 cm × 4,6 mm i.d. Supelcosil LC PAH, 5 μm	A=H <sub>2</sub> O; B=ACN 0-5 min: 60%A, 40%B 5-40 min: 100%A, 0%B <i>průtok</i> : 1,5 ml/min gradientová eluce	FLD proměnné nm	[4]
Uzené kuřecí maso	Extrakce dle Soxhleta methanolem; Alkalická hydrolýza – směs methanolu, vody a KOH; následná reextrakce hexanem; přečištění na Florisilu	12,5 cm × 4,6 mm i.d. Envirosep-pp C <sub>18</sub> , 5 μm	A=ACN; B=H <sub>2</sub> O 0-1 min: 55%A, 45%B 1-23 min: 100%A <i>průtok</i> : 1,2 ml/min gradientová eluce	FLD proměnné nm	[7]

„-“ není uvedeno

Tabulka IV: Pokračování

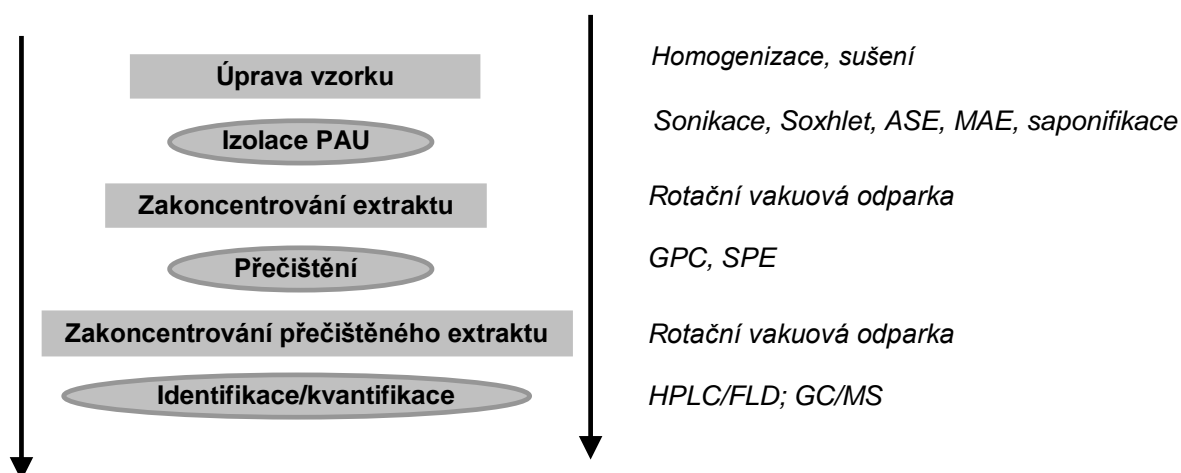
Vzorek	Zpracování vzorku a přečištění	Kolona /stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Lit.
Rostlinný olej	Superkritická fluidní extrakce (SFE), extrakční činidlo CO <sub>2</sub> s modifikátorem methanolem, přečištění na silikagelu	10 cm × 4,6 mm i.d. Hypersil Green PAH, 5 μm <i>předkolona:</i> Tecknokroma reversní fáze Tracer Tr-C-160 C <sub>18</sub>	A=ACN; B=H <sub>2</sub> O A78%, B22% <i>průtok:</i> 0,5 ml/min isokratická eluce	FLD Ex (270-300) Em (390-464) nm	[45]
Uzený sýr	Extrakce tuku, lipidová frakce rozpuštěná v cyklohexanu a extrahována směsí dimethylformamid (DMF)-voda (9:1), následná extrakce cyklohexanem a převedení do pentanu; přečištění pomocí SPE	25 cm × 4,6 mm i.d. Supelcosil LC PAH, 5 μm	A=H <sub>2</sub> O; B=ACN 0-5 min: 60%A, 40%B 5-25 min: 100% A, 0%B <i>průtok:</i> 1,5 ml/min gradientová eluce	FLD Ex (224-268) Em (320-400) nm	[46]
Uzené ryby a oleje	Kyselá hydrolyza - HCl, následná reextrakce směsí dichlormethan-hexan (25:75); přečištění na GPC (Pharmacia Fine Chemicals 1m × 2,5 cm)	25 cm × 4,6 mm i.d. Altech Prosphere 300 PAH 5u, 5 μm <i>předkolona:</i> 7,5 mm × 4,6 mm i.d. Alltech Prosphere 300 PAH 5u, 5 μm	methanol <i>průtok:</i> 1,5 ml/min isokratická eluce	FLD Ex (254 nm) Em (420 nm)	[47]
Míži	Sonikace ve směsi aceton-hexan 50:50; přečištění na silikagelu	25 cm × 4 mm i.d. Merc Superspher 100 RP-18, 4 μm <i>předkolona:</i> 4 mm × 4 mm Merc Lichrospher 100 RP-18 endkapovaná, 5 μm	A=ACN; B=H <sub>2</sub> O 95%A, 5%B <i>průtok:</i> 0,4 ml/min isokratická eluce	DAD 220-360 nm	[11]

„-“ není uvedeno

### 3 Stanovení PAU v potravinách a biotických matricích

Obecný princip stanovení PAU v potravinách a biotických matricích je následující:

PAU jsou extrahovány z vhodně upravených matric do organického rozpouštědla. Separace PAU od případných koextraktů se v extraktech izolovaných z rostlinných matric, olejů/tuků, sedimentů a masných výrobků provádí pomocí gelové permeační chromatografie (GPC), ve vzorcích ovzduší přečištěním na sloupci silikagelu a ve vzorcích vody pomocí extrakce na tuhou fázi (SPE). PAU se stanoví pomocí reverzní vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC/FLD) nebo pomocí plynové chromatografie s hmotnostně spektrickou detekcí (GC/MS). Obecné schéma stanovení PAU v potravinách a biotických matricích je uvedeno na obrázku 2.



**Obr. 2:** Obecné schéma stanovení PAU v potravinách a biotických matricích

#### 3.1 Stanovení PAU v čistých roztocích

Dále uvedená data a charakteristiky se týkají stanovení PAU v čistých roztocích pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC/FLD). V první fázi projektu byla metoda optimalizována především pro 12 níže uvedených PAU z 15ti definovaných organizací US EPA jako prioritní polutanty životního prostředí.

Stanovení PAU dle doporučeného seznamu Evropské komise pro potraviny pomocí techniky HPLC/FLD se po proměření fluorescenčních spekter ukázalo jako nevhodné, vzhledem k nízké / žádné fluorescenci některých PAU (benzo[*j*]fluoranthren a cyklopenta[*cd*]pyren) a také z důvodu obtížné eluce dibenzopyrenů. Za účelem stanovení těchto nově sledovaných PAU bude tedy v navazujících experimentech testována možnost využití metody GC/MS.

*Přehled stanovovaných analytů:*

phenanthren	Phe	CAS: 85-01-8
anthracen	Ant	CAS: 120-12-7
fluoranthren	Flt	CAS: 206-44-0
pyren	Pyr	CAS: 129-00-0

benz[ <i>a</i> ]anthracen	B[ <i>a</i> ]A	CAS: 56-55-3
chrysen	Chr	CAS: 218-01-9
benzo[ <i>b</i> ]fluoranthen	B[ <i>b</i> ]F	CAS: 205-99-2
benzo[ <i>k</i> ]fluoranthen	B[ <i>k</i> ]F	CAS: 207-08-9
benzo[ <i>a</i> ]pyren	B[ <i>a</i> ]P	CAS: 50-32-8
dibenz[ <i>a,h</i> ]anthracen	DB[ <i>ah</i> ]A	CAS: 53-70-3
benzo[ <i>ghi</i> ]perylene	B[ <i>ghi</i> ]P	CAS: 191-24-2
indeno[1,2,3- <i>cd</i> ]pyren	I[1,2,3- <i>cd</i> ]P	CAS: 193-39-5

### 3.1.1 Použité přístroje, kolony a standardní roztoky

#### **Kapalinový chromatograf:**

- kvartérní pumpa HP 1100 QuatPump G1311A (Hewlett-Packard, USA)
- vakuová odplyňovací jednotka HP 1100 Degasser G1322A (Hewlett-Packard, USA)
- automatický dávkovač HP 1100 ALS G1329A (Hewlett-Packard, USA)
- fluorimetrický detektor HP 1100 FLD G1321A (Hewlett-Packard, USA)
- termostátované oddělení kolon HP 1100 ColComp G1316A (Hewlett-Packard, USA)

#### **Kolona pro HPLC:**

LiChroCART 250-4 HPLC - Cartridge (analytická kolona s reverzní polymerovanou C<sub>18</sub> fází LiChrospher PAH<sup>®</sup> a velikostí částic 5 μm určená pro separaci PAU, o rozměrech 250 mm x 4 mm) s předkolonou LiChroCART 4-4 (4 mm x 4 mm) (Merck, Německo); alternativně je možné použít kolonu SUPELCOSIL<sup>™</sup> LC-PAH (analytická kolona s reverzní polymerovanou C<sub>18</sub> fází, velikostí částic 5 μm, určená pro separaci PAU, o rozměrech 250 mm x 4.6 mm) s předkolonou SUPELCOSIL<sup>™</sup> LC-18 (20 mm x 4.0 mm i.d., velikost částic 5 μm) (SUPELCO, USA)

#### **Použité standardy:**

- certifikovaný směsný standardní roztok PAU v acetonitrilu o různé koncentraci jednotlivých PAU - SRM 1647d (NIST, USA) Postup pro ředění koncentrační řady je uveden v Tabulce V.

**Ředění standardů: NIST SRM 1647d**

**Příklad ředění**

použité rozpouštědlo: acetonitril

ředění: do 25-ti ml odměrné baňky, pro hladinu A do 10 ml odměrné baňky

V = dávkovaný objem roztoku standardu příslušné hladiny

**POZNÁMKA: základní hladina uvedena jako střední hodnota intervalu vymezeného nejistotami**

PAU		základní (ug/ml)	Hladina V(ml)	A 2 ml	2 ampule
naphthalen	Naph	20,130	konc. (ng/ml)	4026,0	
acenaphthen	Ace	20,770		4154,0	
fluoren	Fin	4,750		950,0	
phenanthren	Phe	3,420		684,0	
anthracen	Ant	0,790		158,0	
fluoranthren	Fit	7,640		1528,0	
pyren	Pyr	8,470		1694,0	
benz[a]anthracen	BaA	4,090		818,0	
chrysen	Chr	3,670		734,0	
benzo[b]fluoranthren	BbF	4,170		834,0	
benzo[k]fluoranthren	BkF	4,720		944,0	
benzo[a]pyren	BaP	4,910		982,0	
dibenz[a,h]anthracen	DBahA	3,540		708,0	
benzo[ghi]perylen	BghiP	3,680		736,0	
indeno[1,2,3-cd]pyren	IcdP	4,280		856,0	

PAU		Hladina A (ng/ml)	Bod V(ml)	1 2,5 ml	2 2 ml	3 1,5 ml	4 1 ml	5 0,5 ml	6 0,25 ml
naphthalen	Naph	4026,0	konc. (ng/ml)	402,60	322,08	241,56	161,04	80,52	40,26
acenaphthen	Ace	4154,0		415,40	332,32	249,24	166,16	83,08	41,54
fluoren	Fin	950,0		95,00	76,00	57,00	38,00	19,00	9,50
phenanthren	Phe	684,0		68,40	54,72	41,04	27,36	13,68	6,84
anthracen	Ant	158,0		15,80	12,64	9,48	6,32	3,16	1,58
fluoranthren	Fit	1528,0		152,80	122,24	91,68	61,12	30,56	15,28
pyren	Pyr	1694,0		169,40	135,52	101,64	67,76	33,88	16,94
benz[a]anthracen	BaA	818,0		81,80	65,44	49,08	32,72	16,36	8,18
chrysen	Chr	734,0		73,40	58,72	44,04	29,36	14,68	7,34
benzo[b]fluoranthren	BbF	834,0		83,40	66,72	50,04	33,36	16,68	8,34
benzo[k]fluoranthren	BkF	944,0		94,40	75,52	56,64	37,76	18,88	9,44
benzo[a]pyren	BaP	982,0		98,20	78,56	58,92	39,28	19,64	9,82
dibenz[a,h]anthracen	DBahA	708,0		70,80	56,64	42,48	28,32	14,16	7,08
benzo[ghi]perylen	BghiP	736,0		73,60	58,88	44,16	29,44	14,72	7,36
indeno[1,2,3-cd]pyren	IcdP	856,0		85,60	68,48	51,36	34,24	17,12	8,56

PAU		Bod 3 (ng/ml)	Bod V(ml)	7 2 ml	8 0,75 ml	9 0,25 ml
naphthalen	Naph	241,6	konc. (ng/ml)	19,32	7,25	2,42
acenaphthen	Ace	249,2		19,94	7,48	2,49
fluoren	Fin	57,0		4,56	1,71	0,57
phenanthren	Phe	41,0		3,28	1,23	0,41
anthracen	Ant	9,5		0,76	0,28	0,09
fluoranthren	Fit	91,7		7,33	2,75	0,92
pyren	Pyr	101,6		8,13	3,05	1,02
benz[a]anthracen	BaA	49,1		3,93	1,47	0,49
chrysen	Chr	44,0		3,52	1,32	0,44
benzo[b]fluoranthren	BbF	50,0		4,00	1,50	0,50
benzo[k]fluoranthren	BkF	56,6		4,53	1,70	0,57
benzo[a]pyren	BaP	58,9		4,71	1,77	0,59
dibenz[a,h]anthracen	DBahA	42,5		3,40	1,27	0,42
benzo[ghi]perylen	BghiP	44,2		3,53	1,32	0,44
indeno[1,2,3-cd]pyren	IcdP	51,4		4,11	1,54	0,51

PAU		Bod 7 (ng/ml)	Bod V(ml)	10 1,5 ml	11 0,2 ml
naphthalen	Naph	19,32	konc. (ng/ml)	1,159	0,155
acenaphthen	Ace	19,94		1,196	0,160
fluoren	Fin	4,56		0,274	0,036
phenanthren	Phe	3,28		0,197	0,026
anthracen	Ant	0,76		0,046	0,006
fluoranthren	Fit	7,33		0,440	0,059
pyren	Pyr	8,13		0,488	0,065
benz[a]anthracen	BaA	3,93		0,236	0,031
chrysen	Chr	3,52		0,211	0,028
benzo[b]fluoranthren	BbF	4,00		0,240	0,032
benzo[k]fluoranthren	BkF	4,53		0,272	0,036
benzo[a]pyren	BaP	4,71		0,283	0,038
dibenz[a,h]anthracen	DBahA	3,40		0,204	0,027
benzo[ghi]perylen	BghiP	3,53		0,212	0,028
indeno[1,2,3-cd]pyren	IcdP	4,11		0,247	0,033

**Tabulka V: Postup pro ředění koncentrační řady standardu SRM 1647d**

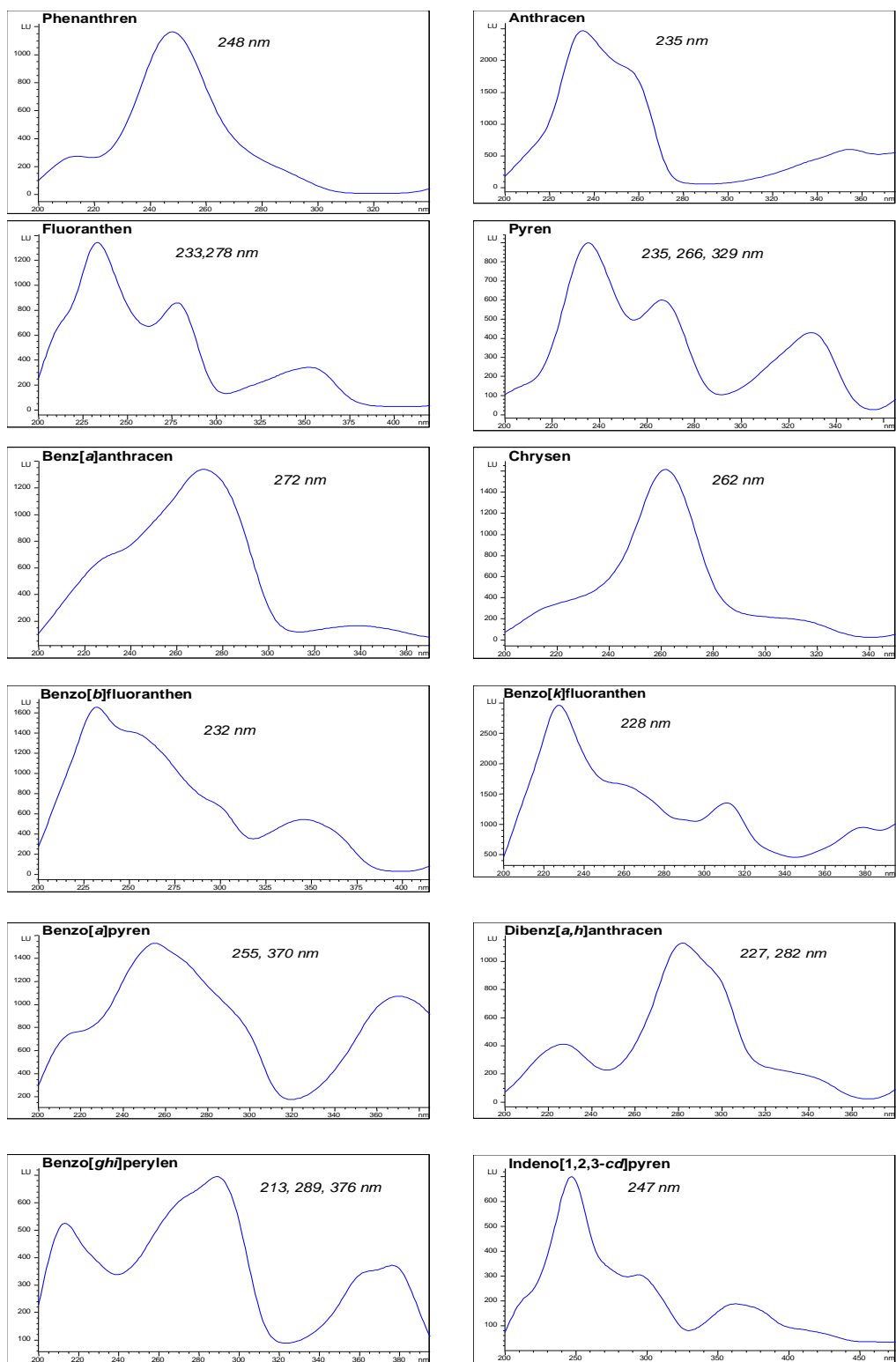
### **3.2 Optimalizace separace a stanovení PAU metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC/FLD)**

Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC/FLD) je v současné době nejvíce používaným systémem pro rutinní stanovení PAU, a to nejen v potravinách, ale i environmentálních matricích. Vzhledem k omezením, která vyplývají pro aplikaci techniky GC/MS, např. nízká těkavost výšejaderných PAU a nutnost dokonalého přečištění vzorků od netěkavých komponent matrice, je často volena, zejména pro stanovení PAU ve složitých, především potravinářských matricích, metoda HPLC/FLD. Technika GC/MS-EI je pak využívána zvláště pro ověření výsledků získaných HPLC/FLD (zejména falešně pozitivních).

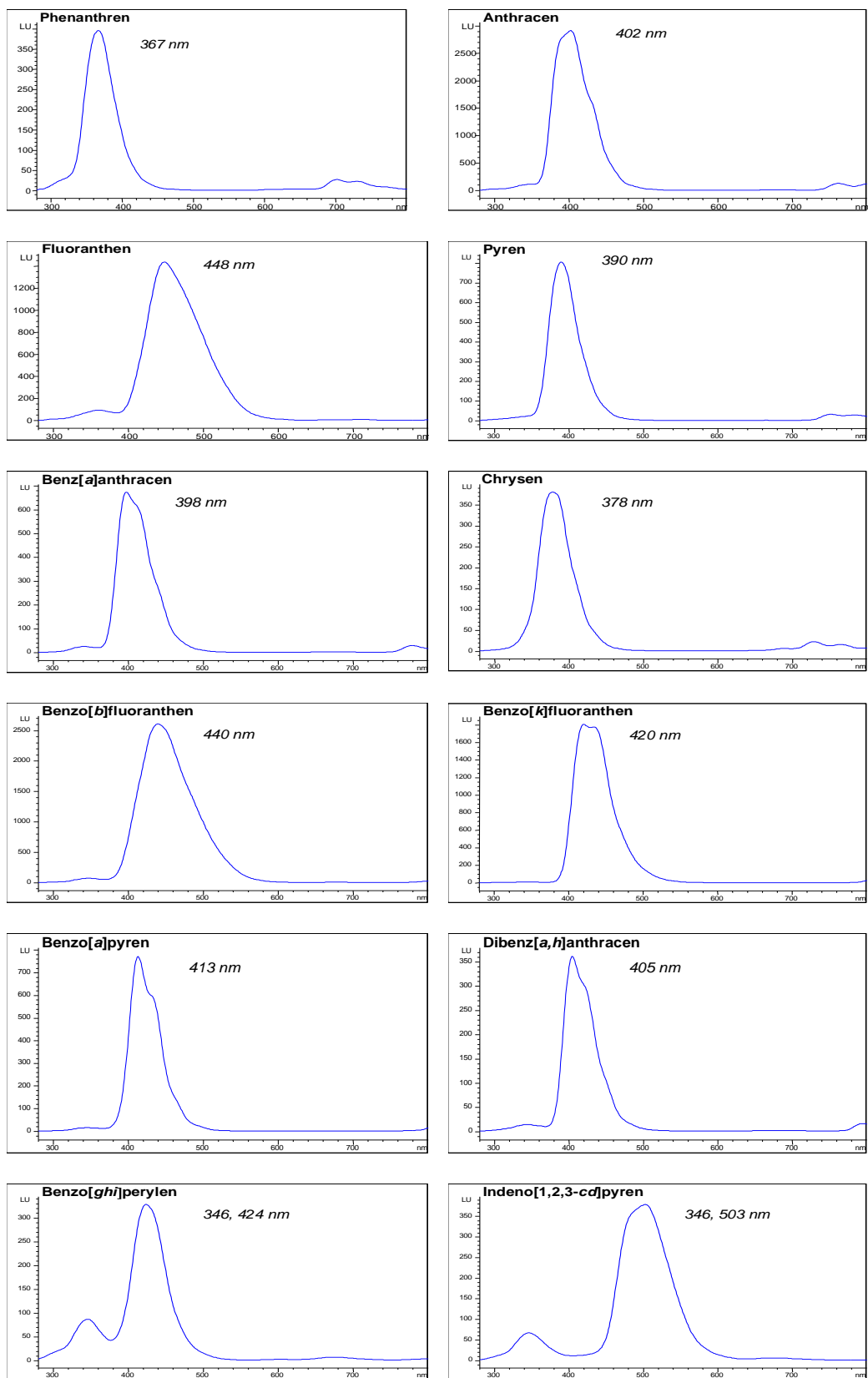
Cílem této části práce byla optimalizace metody HPLC/FLD s ohledem na kvalitu separace sledovaných PAU, optimalizaci detekce a dalších faktorů, které mohou mít vliv na kvalitu prováděných analýz.

#### ***Měření fluorescenčních spekter PAU***

Pro dosažení nezbytné citlivosti a selektivity detekce, zejména vzhledem k nízkým hladinám PAU v potravinových matricích, je nevyhnutelné použití fluorescenčního detektoru, který umožňuje v průběhu analýzy změnu nastavení vlnových délek excitačního a emisního záření. Tvar fluorescenčního spektra a intenzita fluorescence jsou do jisté míry ovlivněny složením mobilní fáze a částečně i parametry použité instrumentace (např. různou citlivostí pro různé oblasti vlnových délek) a hodnoty uváděné v literatuře se často pro konkrétní analyty liší. Proto byly za účelem optimalizace podmínek detekce, změřena excitační a emisní spektra jednotlivých PAU (Obr. 3 a 4).



**Obr. 3:** Excitační spektra sledovaných PAU (v acetonitrilu), včetně maxim vlnových délek

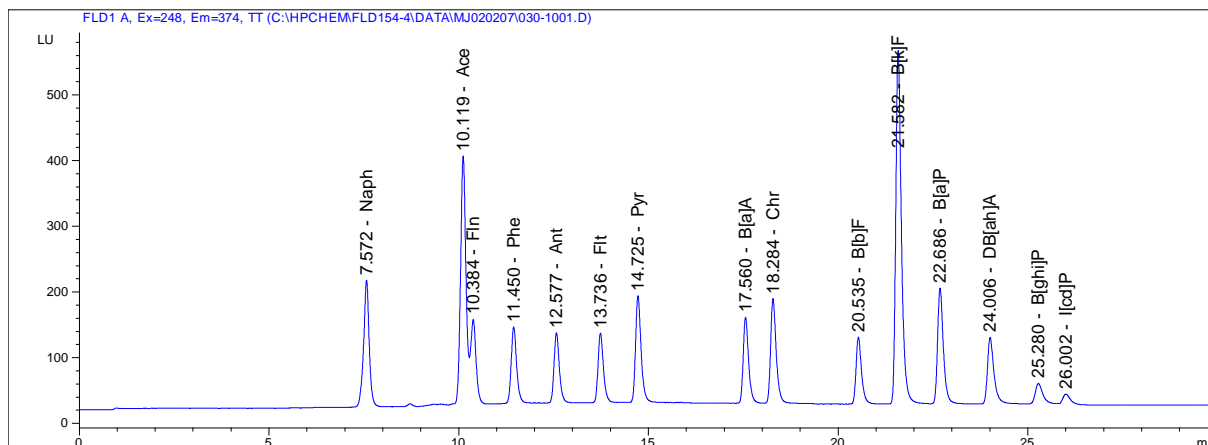


**Obr. 4:** Emisní spektra sledovaných PAU (v acetonitrilu), včetně maxim vlnových délek



## Optimalizace separace a detekce

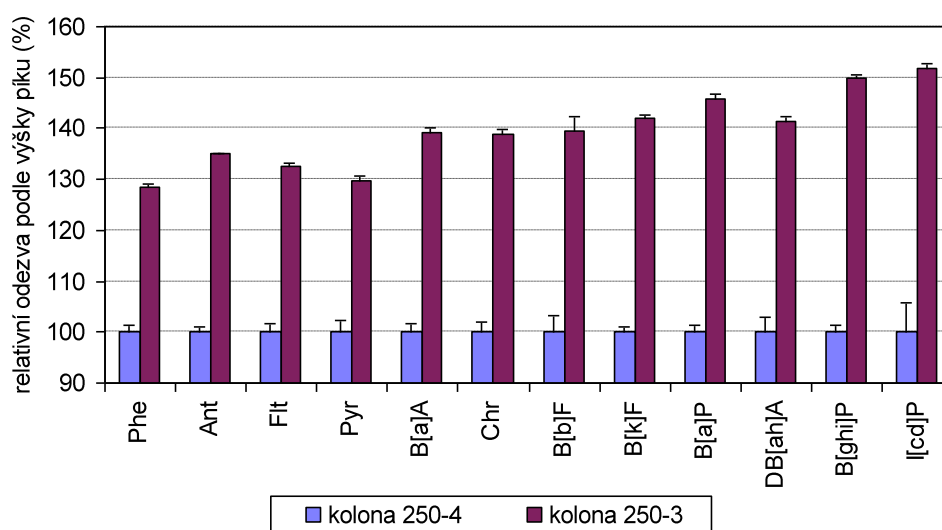
Eluce PAU byla prováděna *gradientem směsi acetonitril-voda (55:45, v/v) do 100 % acetonitrilu při teplotě 35 °C*. Pro separaci PAU byla používána kolona s vysoce polymerovanou vrstvou ligandů C<sub>18</sub>, doporučená pro separaci směsí PAU, neboť poskytuje zvýšenou selektivitu pro kritické (izomerní) páry PAU. Dostatečná účinnost separace postupu je dokumentována na obrázku 5.



**Obr. 5:** Chromatogram standardu NIST (koncentrace jednotlivých analytů 1,6 - 16,9 ng/ml, kolona LiChroCART 250-4 (MERCK))

V rámci prováděných experimentů byla pro separaci PAU ověřována také možnost využití kolony se stejnou stacionární fází, ale jiným vnitřním průměrem, 3 mm. Kolona s menším průměrem by měla se stejným nebo lepším rozlišením snížit, vzhledem k menšímu průtoku mobilní fáze, objem používaných rozpouštědel až na polovinu. S menším vnitřním průměrem kolony by také mělo docházet, pro stejný objem nástřiku jako na koloně s vnitřním průměrem 4 mm, k zúžení zóny eluce analytu a tím ke zvýšení jeho odezvy. Další možností zvýšení rozlišení by mohlo být použití kolony s menším zrněním částic.

Jak vyplývá z Obrázku 6 odezva jednotlivých PAU zjištěná na koloně s vnitřním průměrem 3 mm byla, při nástřiku 10  $\mu$ l, až o 50 % vyšší než pro kolonu s vnitřním průměrem 4 mm, což je podstatné zejména pro analyty s delší dobou eluce. Ovšem při zvýšení objemu nástřiku na 20  $\mu$ l (tedy objem nástřiku běžně používaný na koloně s vnitřním průměrem 4 mm) se začíná projevovat nedostatečná kapacita této kolony rozmýváním elučních zón jednotlivých PAU. Kolonu s vnitřním průměrem 3 mm je tedy možné použít pouze v případě analýzy vzorků, u kterých není, vzhledem k předpokládaným nálezům PAU, nutné nastříkat větší objem než 10  $\mu$ l. Nepopíratelnou výhodou této kolony, zjištěnou v souvislosti se zvýšenou odezvou, také bylo zvýšení poměru signálu k šumu a tedy i snížení meze detekce sledovaných PAU, a to až o polovinu. Také opakovatelnost nástřiku (vyjádřená jako RSD) na této "užší" koloně byla zejména pro PAU, které jsou eluovány s delším retenčním časem, až o polovinu nižší.



**Obr. 6:** Porovnání relativní odezvy PAU a opakovatelnosti retenčních časů na kolonách s vnitřním průměrem 3 a 4 mm (nástřík 10  $\mu$ l, obsah jednotlivých analytů ve standardu PAU 20 ng/ml; odezva zjištěná na koloně s vnitřním průměrem 4 mm = 100 %)

## Parametry metody HPLC/FLD, které mají vliv na kvalitu prováděných analýz

### **Opakovatelnost nástřiku**

Důležitým faktorem, který charakterizuje používaný systém, je opakovatelnost nástřiku, která neoddělitelně zahrnuje společnou nejistotu objemu nástřiku a stability odezvy detektoru. Pro všechny sledované analyty se pohybuje od desetin do 2 %, v rozsahu koncentrací PAU používaných pro kalibrační závislosti (viz kapitola 1.3.1.1).

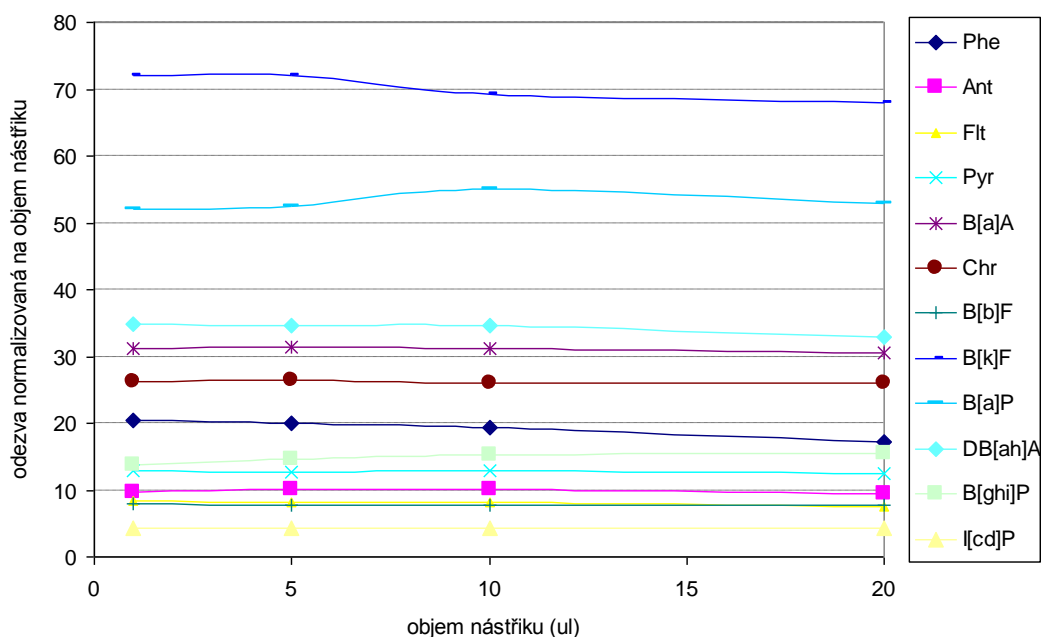
### **Stabilizace systému**

Vzhledem k nutnosti použití selektivních vlnových délek  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  pro detekci jednotlivých PAU a jejich přesné změně v čase v průběhu analýzy, je také důležité znát vliv parametrů používané pumpy, tj. schopnost přesně realizovat zadaný gradient a průtok mobilní fáze, na stabilitu retenčních časů. Nedostatečná opakovatelnost retenčních časů analytů při gradientové eluci může být způsobena i pomalou adaptací kolony z konečných podmínek analýzy zpět na startovací poměr mobilní fáze (před každou analýzou je tedy nutné kolonu dostatečně dlouhou dobu kondicionovat počátečním poměrem mobilní fáze). Na základě získaných zkušeností je nutné, pro stabilizaci podmínek separace, promytí kolony alespoň čtyřnásobkem doby mrtvého objemu před každou sekvenční analýzou. Na stabilitu retenčních časů má také velký vliv udržení dostatečně stabilní teploty na koloně. Výrobce používaného systému HP 1100, deklaruje stabilitu teploty termostatovaného bloku na  $\pm 0,15$  °C a přesnost nastavení na  $\pm 0,8$  °C, a to v rozsahu od -10 °C až do 80 °C. Na základě dlouhodobé zkušenosti je však nejlépe pracovat v místnosti, kde nedochází k velkým teplotním výkyvům a při teplotě, která je o 5 až 10 °C vyšší než teplota v místnosti. Z tohoto důvodu je, zejména v letním období, vhodné pracovat v klimatizovaných prostorách.

### **Objem nástřiku / lineární rozsah autosampleru**

Obsahy PAU a jejich relativní zastoupení v analyzovaných vzorcích a také ve slepých pokusech se často pohybují na rozdílných hladinách (v rámci jedné série vzorků se může jednat až o dva řády). Z tohoto důvodu může nastat situace, kdy pro některý ze sledovaných analytů dojde za nastavených parametrů zesílení fotonásobiče k přesáhnutí dynamického rozsahu detektoru, které se projeví nasycením na určité úrovni odezvy (tzv. "useknutím" píku); tato hladina však není pro jednotlivé PAU, vzhledem k různé citlivosti detekce, stejná. Takové vzorky je pak nutné analyzovat znovu. Pokud se zaměříme pouze na chromatografickou koncovku a pomíneme možnost úpravy kroků izolace, přečištění extraktů a dále zředění extraktu před analýzou HPLC/FLD, lze problém vyřešit jiným způsobem. Buď je možné, v případě větší série vzorků, použít časově náročnější variantu a opakovaně analyzovat celou sérii vzorků spolu se standardy na nižší úrovni zesílení fotonásobiče (snížení odezvy faktorem  $2^n$ ), a nebo vzorek ve vialce zředit. V případě ředění se však vnáší do analýzy další faktor, který může mít vliv jak na nejistotu stanovení, tak případnou kontaminaci. Nejjednodušším řešením tohoto problému je použití menšího objemu nástřikovaného vzorku. Z tohoto důvodu byl prověřen lineární rozsah autosampleru, na základě odezvy PAU, pro nástřik objemů od 1  $\mu\text{l}$  do běžně používaných 20  $\mu\text{l}$  a také opakovatelnost nástřiku pro jednotlivé objemy. Jak vyplývá z Obrázku 7, v případě vysoce kontaminovaných vzorků je možné využít i menšího objemu nástřiku (až 1  $\mu\text{l}$ ), bez nutnosti dalších zásahů do analytického postupu. Opakovatelnost nástřiku sledovaných PAU nepřesáhla ani u objemu nástřiku 1  $\mu\text{l}$  významně 2 %, pro objemy nástřiku menší než 1  $\mu\text{l}$  (0,5 a 0,2  $\mu\text{l}$ ) však vzrostla, a to až na 6 %.

Vzhledem k nízkým nálezům PAU v některých typech matric, zejména potravin, byla ověřována i možnost využití větších objemů nástřiku než běžně používaných 20  $\mu\text{l}$ . V případě modelové směsi PAU dochází již u nástřiku 25  $\mu\text{l}$  k rozmývání elučních zón PAU, které jsou eluovány s krátkým retenčním časem. Pozorovat lze tvar typický pro přehlčení kolony, tzv. "*leading*" (vedení) píků. Jedná se o efekt způsobený rozpouštědlem použitým pro nástřik na HPLC, tj. acetonitrilem, jehož eluční síla je vyšší než počátečního poměru mobilní fáze (acetonitril-voda, 55:45, v/v). Z tohoto důvodu by bylo vhodné pro vyšší objemy nástřiku než 25  $\mu\text{l}$  používat, pro zakoncentrování vzorku před nástřikem do systému HPLC/FLD, ředění do počátečního poměru mobilní fáze. Další možností pro zvýšení odezvy analytů je zakoncentrování odparku přečištěného extraktu do menšího objemu rozpouštědla. Na základě získaných zkušeností není praktické provádět převedení do objemu menšího než 200  $\mu\text{l}$ . Oproti běžně používaným 500  $\mu\text{l}$  je však tímto způsobem možné zvýšit, stejně jako u zvýšení objemu nástřiku na 40  $\mu\text{l}$ , odezvu PAU.



**Obr. 7:** Ověření lineárního rozsahu autosampleru pro nástřik objemů od 1 do 20 µl na základě odezvy PAU (odezva je normalizována na nastřikovaný objem standardu PAU, obsah jednotlivých analytů se pohyboval na hladině 32 - 159 ng/ml)

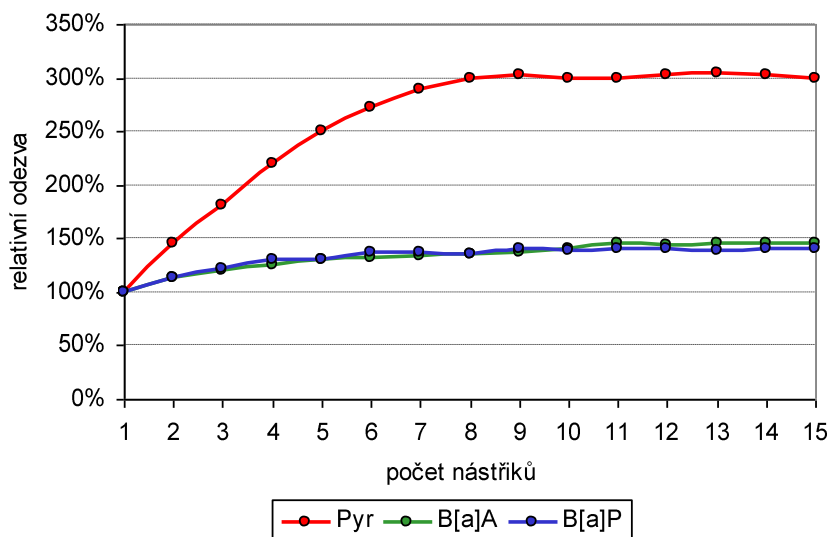
### Response time

Na kvalitu vykreslení píku má v případě způsobu detekce FLD, vliv tzv. "response time" (doba odezvy), tj. interval, po který je snímán signál. S rostoucí hodnotou doby odezvy, tj. zvýšením počtu bodů sejmutých pro vykreslení píku, dochází k "vyhlazení" šumu a hladšímu vykreslení píku, na druhou stranu klesá odezva analytu (podle výšky), tj. poměr signálu k šumu. Při kratší době odezvy je signál snímán v kratším časovém intervalu s vyšší odezvou (podle výšky). Hodnota nastavení doby odezvy má také vliv na délku časového intervalu potřebného ke změně vlnových délek mezi dvěma po sobě se eluujícími látkami (tj. rychlost reakce detektoru při změně selektivních  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ) - čím kratší je doba odezvy, tím je tato reakce rychlejší. Z popsaných důvodů je tedy třeba nalézt vhodný kompromis mezi odezvou, kvalitou vykreslení píku a intenzitou šumu. Na základě provedených experimentů byla jako optimální vybrána doba odezvy 2 s.

### Odplynění mobilní fáze

Vlivem nedostatečného odplynění mobilní fáze, může docházet ke změně fluorescenční odezvy PAU, tzv. "zhášení" fluorescence. Zejména kyslík může hrát významnou roli v potlačení odezvy některých analytů. Přítomnost kyslíku v mobilní fázi zkracuje v důsledku nezářivé dissipace energie dobu, po kterou jsou elektrony v molekule PAU v excitovaném stavu, což má za následek snížení intenzity fluorescence. Pro spolehlivou kvantifikaci je tedy nutné zajistit odstranění kyslíku z mobilní fáze a případně sledovat poměr PAU citlivých ke zhášení fluorescence vzhledem k analytu, který citlivý není. V případě odplynění mobilní fáze intenzivním

proudem helia (průtok asi 25 ml/min) je nutné, pro zaručení stability odezvy, provádět před započítáním analýz odplynění minimálně po dobu 4 hodin (Obr. 8). Také v průběhu měření je nezbytné "probublávat" mobilní fázi nepřetržitě, aby nedošlo k opětovnému rozpuštění kyslíku. Tento problém lze odstranit zavedením vakuové odplyňovací jednotky, která umožňuje, z hlediska kvantifikace, reprodukovatelné odplynění mobilní fáze.



**Obrázek 8:** Vliv odplynění mobilní fáze heliem na stabilitu odezvy vybraných PAU (začátek odplyňování mobilní fáze při nástřiku č. 1, odezva analytů při prvním nástřiku = 100 %)

### Fotodegradace

Fotodegradaci PAU ve vialce v autosampleru pak může být zabráněno použitím vialky z hnědého skla. Za těchto podmínek nebyly po třech dnech stání standardu PAU v acetonitrilu umístěném v hnědé vialce na autosampleru (s nepropíchnutým septem, v teplotě  $24 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ ) zaznamenány žádné změny v koncentraci sledovaných analytů.

### Robustnost metody HPLC/FLD

- před realizací HPLC koncovky je nutné kondicionovat kolonu promytím startovním poměrem mobilní fáze, s průtokem 1 ml/min po dobu minimálně 30 min
- pro posouzení stability HPLC systému (zejména retenčních časů) slouží jako orientační vždy první nástřik v analyzované sekvenci; tento se nepoužívá při vyhodnocení
- pracovní roztoky standardů a vzorky je nutné uchovávat v chladu ( $5 \text{ }^\circ\text{C}$ ), před nástřikem do HPLC systému je nezbytná jejich teplota na laboratorní teplotu

### ***Odhad meze detekce a stanovitelnosti***

Mez detekce (LOD – Limit of Detection) je určena jako nejnižší množství analytu ve vzorku, které lze ještě s určitou pravděpodobností detekovat. Určení meze detekce je závislé na typu prováděné analýzy. Obvykle se však stanovuje na základě průměrného signálu a směrodatné odchylky z opakovaných měření slepých vzorků. V detekčních systémech, které umožňují kontinuální záznam základní linie se často využívá stanovení meze detekce jako koncentrace analytu ve vzorku, která vyvolá odezvu odpovídající trojnásobku šumu (amplituda výchylek základní linie). Vzhledem k tomu, že jsou PAU přítomny ve slepých vzorcích všech sledovaných matric nad prakticky ověřenou mezí stanovitelnosti, nebylo možné provést odhad meze detekce na základě analýz slepých vzorků. Z tohoto důvodu byl zvolen jiný přístup, pomocí kterého byla pro jednotlivé matrice odhadnuta mez detekce jako trojnásobek směrodatné odchylky odezvy získané z opakovaných analýz standardu, který odpovídá koncentraci jednotlivých PAU 0,1 - 0,38 ng/ml. Je však třeba zdůraznit, že hodnoty LOD jsou závislé také na aktuální stavu chromatografického systému (tj. směr a opotřebením lampy, opotřebením kolony) a jejich velikost, uvedená v Tabulce VI, je tedy pouze orientační.

Mez stanovitelnosti (LOQ – Limit of Quantification) je nejmenší množství stanovované látky (analytu) ve vzorku, které může být kvantitativně stanoveno s přijatelným stupněm přesnosti. Takto určená mez stanovitelnosti by neměla být nižší než trojnásobek LOD. V tabulce VI jsou uvedeny LOD pro čisté PAU.

**Tabulka VI:** Meze detekce (LOD) PAU pro čisté látky (za použití metody HPLC/FLD)

PAU	LOD
	Standardní roztok PAU (ng/ml)
Phe	0,15
Ant	0,06
Flt	0,14
Pyr	0,07
B[a]A	0,03
Chr	0,02
B[b]F	0,05
B[k]F	0,01
B[a]P	0,01
DB[ah]A	0,01
B[ghi]P	0,03
I[1,2,3-cd]P	0,04

### ***Rozsah metody a linearita***

Vzhledem k tomu, že jsou analyzované kontaminanty zastoupeny v reálných vzorcích v širokém rozmezí koncentrací, je nutné volit kalibrační rozsah pracovních standardních roztoků v dostatečném rozsahu, který odpovídá reálným nálezům. V Tabulce V je uveden koncentrační rozsah kalibračních závislostí pro jednotlivé analyty. V praxi je kalibrace v celém rozsahu koncentrací uvedených v Tabulce V prováděna pomocí kvadratické závislosti. Pro ověření správnosti je kvantifikace prováděna také interpolací na dva body standardu obklopující nález a oba výsledky jsou porovnány. Kalibrace je dále kontrolována vnesením do grafu a v případě použití lineární regrese (pro omezený rozsah koncentrací PAU) pomocí korelačního koeficientu ( $R^2$ ) (softwarové vybavení HP Chemstation Rev. A.06.03).

### ***Selektivita metody***

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí je technikou, která umožňuje relativně značně selektivní detekci polycyklických aromatických uhlovodíků. Přesto se mohou v extraktech objevit interferující látky, které představují riziko nadhodnocení při vyjadřování obsahu analytů. Zdrojem interferentů mohou být vedle nedostatečně odstraněných složek matrice (v případě překročení kapacity GPC systému či sloupcové chromatografie na silikagelu) používaná rozpouštědla a chemikálie, ale i jiné látky, např. deriváty PAU (koextrahované za podmínek analytického postupu spolu se sledovanými analyty), které při zvoleném způsobu detekce ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ) poskytují odezvu.

### ***Nejlepší kalibrační schopnost metody (CMC)***

Za ideální postup pro stanovení nejlepší kalibrační schopnosti metody (CMC) je považován případ analýzy čistého roztoku standardu na koncentrační úrovni odpovídající bodu kalibrační křivky ležícímu mezi dvěma nejvyššími body kalibrace. V takovém případě je nejistota dána nejistotou nástřiku (odezvy) daného roztoku  $u_x$  a nejistotou nástřiku (odezvy) kalibračního roztoku  $u_k$ , která se vyjádří jako RSD z opakovaných nástřiků standardu. Zde je za ideální považováno, jestliže je kalibrační standard již v roztoku a od dodavatele je známa nejistota koncentrace  $u_s$ , uvedená v certifikátu dodavatele standardu. Výpočet kombinované nejistoty  $u_c$  se pak provede následujícím postupem

$$u_k^2 = u_x^2 + u_c^2 + u_s^2.$$

Protože nejistoty nástřiků standardů jsou stejné jako kalibračního roztoku, je  $u_x = u_c$ , a pak

$$u_c^2 = 2 u_c^2 + u_s^2.$$

Výpočet rozšířené nejistoty  $U$  je poté proveden jako

$$U = CMC = 2 u_k.$$

Na základě této strategie byly stanoveny pro jednotlivé PAU příslušné hodnoty CMC (Tab. IX). Příslušná data použita pro výpočet jsou uvedena v Tabulkách VII a VIII.

**Tabulka VII: Nejistota koncentrace standardu NIST 1647d (podle certifikátu)**

PAU	c (ug/ml)	U <sub>s</sub> rozšířená nejistota +/- (ug/ml)	u <sub>s</sub> (ug/ml)	u <sub>s</sub> (%)
Phe	3,42	0,06	0,03	<b>0,88</b>
Ant	0,79	0,02	0,01	<b>1,27</b>
Flt	7,64	0,1	0,05	<b>0,65</b>
Pyr	8,47	0,11	0,055	<b>0,65</b>
B[a]A	4,09	0,04	0,02	<b>0,49</b>
Chr	3,67	0,04	0,02	<b>0,54</b>
B[b]F	4,17	0,05	0,025	<b>0,60</b>
B[k]F	4,72	0,07	0,035	<b>0,74</b>
B[a]P	4,91	0,08	0,04	<b>0,81</b>
DB[ah]A	3,54	0,22	0,11	<b>3,11</b>
B[ghi]P	3,68	0,13	0,065	<b>1,77</b>
I[1,2,3-cd]P	4,28	0,09	0,045	<b>1,05</b>

**Vysvětlivky:**

c – koncentrace zásobního roztoku standardu

U<sub>s</sub> – rozšířená nejistota koncentrace standardu udaná výrobcemu<sub>s</sub> – nejistota koncentrace standardu**Tabulka VIII: Nejistota nástřiku (odezvy)**

PAU	c (ng/ml)	u <sub>c</sub> = RSD (%)
Phe	13,68	<b>2,58</b>
Ant	3,16	<b>2,24</b>
Flt	30,56	<b>2,04</b>
Pyr	33,88	<b>1,89</b>
B[a]A	16,36	<b>1,69</b>
Chr	14,68	<b>1,68</b>
B[b]F	16,68	<b>1,46</b>
B[k]F	18,88	<b>1,46</b>
B[a]P	19,64	<b>1,53</b>
DB[ah]A	14,16	<b>1,56</b>
B[ghi]P	14,72	<b>1,53</b>
I[1,2,3-cd]P	17,12	<b>1,55</b>

**Vysvětlivky:**

c – koncentrace pracovního roztoku standardu

u<sub>c</sub> – nejistota nástřiku (odezvy) standardu



**Tabulka IX:** Hodnoty CMC zjištěné pro jednotlivé PAU

<b>PAU</b>	<b>CMC (%)</b>
<b>Phe</b>	<b>5,5</b>
<b>Ant</b>	<b>5,1</b>
<b>Flt</b>	<b>5,8</b>
<b>Pyr</b>	<b>3,5</b>
<b>B[a]A</b>	<b>4,1</b>
<b>Chr</b>	<b>4,2</b>
<b>B[b]F</b>	<b>3,8</b>
<b>B[k]F</b>	<b>3,7</b>
<b>B[a]P</b>	<b>3,2</b>
<b>DB[ah]A</b>	<b>2,9</b>
<b>B[ghi]P</b>	<b>3,0</b>
<b>I[1,2,3-cd]P</b>	<b>3,4</b>

## 4 Vyjadřování nejistot měření

Nejistotu měření definujeme jako parametr přidružený k výsledku měření, který charakterizuje rozptýlení hodnot, které mohou být důvodně prisuzovány 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 skutečnou hodnotu měřené veličiny se zvolenou pravděpodobností (obvykle 95 %).

Nalezení kritických kroků metody je jedním z důvodů provádění odhadů nejistoty analytického postupu. Další příčinou je možnost posouzení míry spolehlivosti získaných výsledků a tím jejich vhodné interpretace.

### 4.1 Postup při odhadování nejistoty měření

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

- *specifikace měřené veličiny* (tzn. co se bude měřit, vztahy mezi měřenou veličinou a vstupními parametry apod.),
- identifikace potenciálních zdrojů nejistot,
- kvantifikace jednotlivých složek nejistoty,
- výpočet kombinované nejistoty.

### 4.2 Zdroje nejistot

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,
- 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.

### 4.3 Kvantifikace jednotlivých složek nejistoty a výpočet kombinované nejistoty

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:

- vyhodnocením nejistot pocházejících z každého jednotlivého zdroje a dále jejich sloučením (tzv. „*bottom-up*“),
- přímým stanovením kombinovaných příspěvků nejistoty výsledků s využitím údajů o parametrech metody (tzv. „*top-down*“).

V praxi je obvykle nutné a výhodné kombinování obou postupů.

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:

- veličina s rektangulárním rozdělením

$$u(x_i) = a / \sqrt{3}$$

kde  $a$  je pološířka intervalu spolehlivosti.

- veličina s normálním rozdělením

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

kde  $s_{x_i}$  je směrodatná odchylka.

Celkovou nejistotu výsledku měření  $y$  lze pak vyjádřit jako *kombinovanou standardní nejistotou*,  $u_c(y)$ . Je rovna odhadu směrodatné odchylky rovnající se kladné hodnotě druhé odmocniny celkového rozptylu, 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  $c_i = \delta y / \delta x_i$ , 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 vyjádřený 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.

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 hladinu spolehlivosti přibližně 95 % má  $k$  hodnotu 2.

#### 4.4. Odhad nejistoty analytického postupu; příklad stanovení PAU v olejích a tucích

Jak již bylo zmíněno, zjištění nejistoty analytického postupu stanovení PAU v olejích lze provést dvěma základními způsoby. Postupem, který do celkové nejistoty zahrnuje pouze předpokládané hlavní vlivy, tj. vliv výtěžnosti analytického postupu, opakovatelnost stanovení, čistotu standardu a nejistotu kalibrace (tzv. „top – down“), byly zjištěny nejistoty uvedené v Tabulce X.

Pro porovnání bylo provedeno zhodnocení vlivů jednotlivých pracovních operací na celkovou nejistotu stanovení PAH v olejích (tzv. „bottom-up“). Postup pro výpočet celkové nejistoty touto metodou („bottom-up“) je zobrazen na Obrázku 9, příspěvky jednotlivých vlivů, které byly v tomto případě uvažovány v rámci jednotlivých kroků analytického postupu, jsou shrnuty v Tabulce XI. Celková nejistota analytického postupu stanovení PAH v olejích zjištěná tímto způsobem, je uvedena v Tabulce XII. Příklad příspěvku dílčích nejistot jednotlivých kroků analytického postupu k celkové nejistotě je znázorněn pro zástupce nížejaderných PAH (Phe) a výšejaderných PAH (B[b]F) na Obrázku 10. Jak vyplývá z tohoto obrázku, s rostoucí molekulovou hmotností analytů klesá podíl kroku odpařování v rámci celkové nejistoty tohoto postupu stanovení PAH v olejích pomocí HPLC/FLD. Naopak vzrůstá podíl kroku přečištění extraktů pomocí GPC. Pro HPLC/FLD byl dále proveden detailnější rozbor jednotlivých vlivů, přičemž bylo zjištěno, že se na této nejistotě největší měrou podílí opakovatelnost nástřiku následovaná ředěním standardů (Obr. 11).

Jak vyplývá z Tabulek X a XII, celkové nejistoty zjištěné pomocí obou přístupů, tedy jak "top-down", tak "bottom-up", jsou v případě většiny sledovaných PAH v podstatě srovnatelné. Případné rozdíly zjištěné mezi vyjádřením celkové nejistoty těmito dvěma postupy mohou být způsobené např. v případě DB[ah]A relativně vysokým příspěvkem čistoty standardu k celkové nejistotě. Složitý postup zjišťování celkové

nejistoty na základě vlivu potenciálních příspěvků v rámci jednotlivých kroků analytického postupu, je tedy možné nahradit jednodušším výpočtem, pomocí předpokládaných hlavních vlivů na celkovou nejistotu stanovení PAH v olejích metodou HPLC/FLD.

Vzhledem k tomu, že součástí postupu stanovení PAH v olejích není "klasický" krok extrakce, bylo by vhodné na základě této studie provést další experimenty, jejichž cílem by bylo zhodnocení nejistoty analytického postupu, který v sobě zmíněný krok extrakce analytů ze vzorku zahrnuje. V případě zařazení extrakce do analytického postupu pravděpodobně dojde k nárůstu celkové nejistoty, přičemž extrakce by se na této hodnotě zřejmě podílela největší měrou.

**Tabulka X** Nejistoty analytického postupu zjištěné postupem „top down“

PAH	průměr ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	STD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	RSD	REC	$R^2$	R	č.std.
Phe	19,53	2,51	0,13	1,17	0,999	0,999	0,009
Ant	1,69	0,25	0,15	1,14	0,999	0,999	0,013
Flt	34,59	2,01	0,06	1,00	0,999	0,999	0,007
Pyr	46,98	2,75	0,06	0,99	0,999	0,999	0,006
B[a]A	38,48	2,85	0,07	0,95	0,999	0,999	0,005
Chr	100,00	8,10	0,08	0,95	0,999	0,999	0,005
B[b]F	35,18	5,03	0,14	0,95	0,999	0,999	0,006
B[k]F	11,45	1,75	0,15	0,95	0,999	0,999	0,007
B[a]P	30,49	2,13	0,07	0,94	0,999	0,999	0,008
DB[ah]A	3,29	0,61	0,19	0,95	0,999	0,999	0,031
B[ghi]P	34,52	4,25	0,12	0,95	0,999	0,999	0,018
I[cd]P	23,31	2,39	0,10	0,94	0,999	0,999	0,011

PAH	$u_{RSD}$ (%)	$u_y$ (%)	$u_c$ (%)	$u_c$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$U$ ( $\pm$ ) (%)	$U$ ( $\pm$ ) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$L_1$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$L_2$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Phe	7,5	11,7	11,7	2,28	23,4	4,56	14,96	24,09
Ant	8,7	9,6	9,6	0,16	19,2	0,32	1,37	2,01
Flt	3,4	3,4	3,4	1,18	6,8	2,37	32,22	36,96
Pyr	3,4	3,5	3,5	1,62	7,0	3,24	43,74	50,22
B[a]A	4,3	4,5	4,5	1,74	9,0	3,48	35,00	41,96
Chr	4,7	4,9	4,9	4,90	9,8	9,81	90,19	109,81
B[b]F	8,3	8,4	8,4	2,95	16,8	5,90	29,28	41,07
B[k]F	8,9	9,0	9,0	1,03	18,0	2,06	9,38	13,51
B[a]P	4,1	4,4	4,4	1,35	8,8	2,70	27,80	33,19
DB[ah]A	11,2	11,3	11,3	0,37	22,6	0,74	2,54	4,03
B[ghi]P	7,3	7,4	7,4	2,57	14,8	5,14	29,39	39,66
I[cd]P	6,0	6,2	6,2	1,45	12,4	2,90	20,40	26,21

**Vysvětlivky:**

průměr	průměrná hodnota zjištěná analýzou oleje (n = 8)
STD	standardní směrodatná odchylka
RSD	relativní směrodatná odchylka (dlouhodobá opakovatelnost)
REC	výtěžnost čistícího kroku (GPC)
$R^2$	korelační koeficient zjištěný z kalibrace
č.std.	čistota standardu ( $a$ ), standardizováno přepočtem z vyjádření v % podělením 100

<b>u<sub>std</sub></b>	nejistota čistoty standardu zjištěná na základě vztahu $u(x_i) = a/\sqrt{3}$
<b>u<sub>RSD</sub></b>	$u_{std}$ + nejistota průměru z 8 opakování
<b>u<sub>y</sub></b>	$u_{RSD}$ + nejistota systematické chyby odhadnutá z výtěžnosti GPC na základě vztahu $u = 0,5 \times (1-REC)/\sqrt{3}$
<b>u<sub>c</sub></b>	$u_y$ + nejistota chyby odhadnutá z kalibračního grafu
<b>U</b>	rozšířená nejistota, koeficient rozšíření $k = 2$
<b>L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub></b>	meze intervalu spolehlivosti

**Tabulka XI** Jednotlivé příspěvky pro výpočet celkové nejistoty postupem „bottom-up“

KROK ANALYTICKÉHO POSTUPU	VLIV	analyt	hodnota	jednotky	nejistota (%)
<b>1. Vážení</b>	opakovatelnost (n = 10)	12 PAH	250	mg	0,05
	přesnost vážení (převzato z kalibračního listu)	12 PAH	250	mg	0,007 *
<b>Doplnění objemu do 10 ml</b>	opakovatelnost (n = 10)	12 PAH	10	ml	1,1
	kalibrace odměrného skla (převzato od výrobce)	12 PAH	10	ml	0,001*
	vliv teplotní roztažnosti rozpuštědla (22 ± 2 °C), odhad pro chloroform	12 PAH	10	ml	0,2*
<b>3. Přečištění extraktů pomocí GPC</b>	opakovatelnost (n = 5)	Phe	1,71	ng/ml	8,1
		Ant	0,40	ng/ml	7,6
		Flt	3,82	ng/ml	7,7
		Pyr	4,24	ng/ml	8,3
		B[a]A	2,05	ng/ml	6,2
		Chr	1,84	ng/ml	5,8
		B[b]F	2,09	ng/ml	6,0
		B[k]F	2,36	ng/ml	7,1
		B[a]P	2,46	ng/ml	9,2
		DB[ah]A	1,77	ng/ml	5,8
		B[ghi]P	1,84	ng/ml	5,9
		I[cd]P	2,14	ng/ml	8,0
	výtěžnost (n = 5)	Phe	117,0	%	4,0 **
		Ant	114,0	%	2,9 **
		Flt	100,2	%	0,1 **
		Pyr	99,2	%	0,2 **
		B[a]A	95,2	%	1,4 **
		Chr	95,2	%	1,4 **
		B[b]F	95,3	%	1,4 **
		B[k]F	94,8	%	1,5 **
<b>4. Zahuštění přečištěných extraktů na odparce</b>	opakovatelnost (n = 5)	Phe	4,75	ng/ml	8,3
		Ant	3,97	ng/ml	7,1
		Flt	6,29	ng/ml	7,3
		Pyr	6,35	ng/ml	6,9
		B[a]A	1,60	ng/ml	6,2
		Chr	3,20	ng/ml	5,8
		B[b]F	3,99	ng/ml	5,4
		B[k]F	1,60	ng/ml	7,2
		B[a]P	3,20	ng/ml	9,1
		DB[ah]A	6,41	ng/ml	5,9
		B[ghi]P	3,97	ng/ml	4,8
		I[cd]P	3,98	ng/ml	8,2
	výtěžnost (n = 5)	Phe	95,2	%	1,4 **
		Ant	86,1	%	4,0 **
		Flt	104,0	%	1,2 **
		Pyr	103,1	%	0,9 **
		B[a]A	102,2	%	0,6 **
		Chr	101,8	%	0,6 **
		B[b]F	99,8	%	0,8 **
		B[k]F	96,1	%	1,2 **
B[a]P	98,4	%	0,6 **		
DB[ah]A	96,9	%	0,9 **		
B[ghi]P	99,2	%	0,3 **		
I[cd]P	96,3	%	1,2 **		

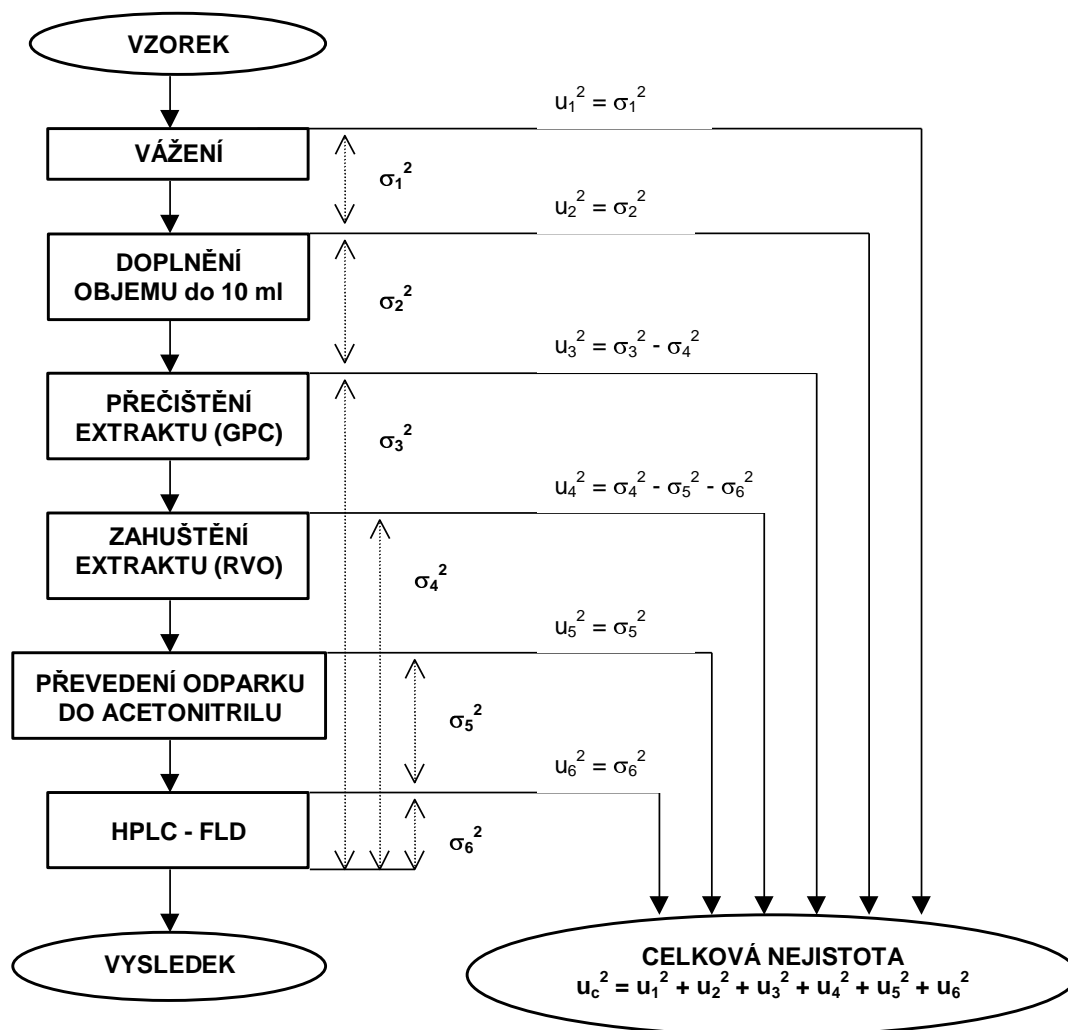
**Tabulka XI** Jednotlivé příspěvky pro výpočet celkové nejistoty postupem „bottom-up“ - pokračování

KROK ANALYTICKÉHO POSTUPU	VLIV	analyt	hodnota	jednotky	nejistota (%)
5. Převedení odparku do acetonitrilu (pomocí mikrodávkače Hamilton)	opakovatelnost (n = 10)	12 PAH	500	µl	0,5
	kalibrace mikrodávkače (převzato z kalibračního listu)	12 PAH	500	µl	0,00007 *
6. Stanovení PAH pomocí HPLC/FLD • koncentrace standardu	standardní nejistota koncentrace standardu	Phe	0,03	µg/ml	0,5 *
		Ant	0,01	µg/ml	0,7 *
		Flt	0,05	µg/ml	0,4 *
		Pyr	0,055	µg/ml	0,4 *
		B[a]A	0,02	µg/ml	0,3 *
		Chr	0,02	µg/ml	0,3 *
		B[b]F	0,025	µg/ml	0,3 *
		B[k]F	0,035	µg/ml	0,4 *
		B[a]P	0,04	µg/ml	0,5 *
		DB[a]A	0,11	µg/ml	1,8 *
		B[ghi]P	0,065	µg/ml	1,0 *
I[cd]P	0,045	µg/ml	0,6 *		
• ředění standardů pomocí mikrodávkače Hamilton	opakovatelnost (n = 10)	12 PAH	500	µl	0,5
	kalibrace mikrodávkače (převzato z kalibračního listu)	12 PAH	500	µl	0,00007 *
• ředění standardů pomocí pipety	opakovatelnost (n = 10)	12 PAH	1	ml	0,3
	kalibrace odměrného skla (převzato od výrobce)	12 PAH	1	ml	0,00004 *
• ředění standardů, doplnění objemu do 10 ml	opakovatelnost (n = 10)	12 PAH	10	ml	1,1
	kalibrace odměrného skla (převzato od výrobce)	12 PAH	10	ml	0,001 *
	vliv teplotní roztažnosti rozpouštědla (22 ± 2 °C), odhad pro acetonitril	12 PAH	10	ml	0,1*
• ředění standardů, doplnění objemu do 25 ml	opakovatelnost (n = 10)	12 PAH	25	ml	0,4
	kalibrace odměrného skla (převzato od výrobce)	12 PAH	25	ml	0,006 *
	vliv teplotní roztažnosti rozpouštědla (22 ± 2 °C), odhad pro acetonitril	12 PAH	25	ml	0,1 *
• kalibrace	koeficient lineární regrese R <sup>2</sup>	Phe	0,999	-	0,1
		Ant	0,999	-	0,1
		Flt	0,999	-	0,1
		Pyr	0,999	-	0,1
		B[a]A	0,999	-	0,1
		Chr	0,999	-	0,1
		B[b]F	0,999	-	0,1
		B[k]F	0,999	-	0,1
		B[a]P	0,999	-	0,1
		DB[a]A	0,999	-	0,1
		B[ghi]P	0,999	-	0,1
		I[cd]P	0,999	-	0,1
• analýza HPLC /FLD	opakovatelnost analýzy (objem nástřiku a odezva) (n = 10)	Phe	13,68	ng/ml	2,6
		Ant	3,16	ng/ml	2,2
		Flt	30,56	ng/ml	2,0
		Pyr	33,88	ng/ml	1,9
		B[a]A	16,36	ng/ml	1,7
		Chr	14,68	ng/ml	1,7
		B[b]F	16,68	ng/ml	1,5
		B[k]F	18,88	ng/ml	1,5
		B[a]P	19,64	ng/ml	1,5
		DB[a]A	14,16	ng/ml	1,6
		B[ghi]P	14,72	ng/ml	1,5
		I[cd]P	17,12	ng/ml	1,5

\* hodnoty vypočtené z intervalového odhadu (rektangulární rozdělení) podle vztahu  $u(x_i) = a/\sqrt{3}$

\*\* hodnoty vypočtené podle vztahu  $u = 0,5 \times (1-REC)/\sqrt{3}$





**Obr. 9:** Obecné schéma výpočtu nejistoty postupem „bottom-up“ (symbol  $\sigma$  představuje rozptýlení hodnot - složené ze systematické a náhodné chyby - jednotlivých kroků postupu)

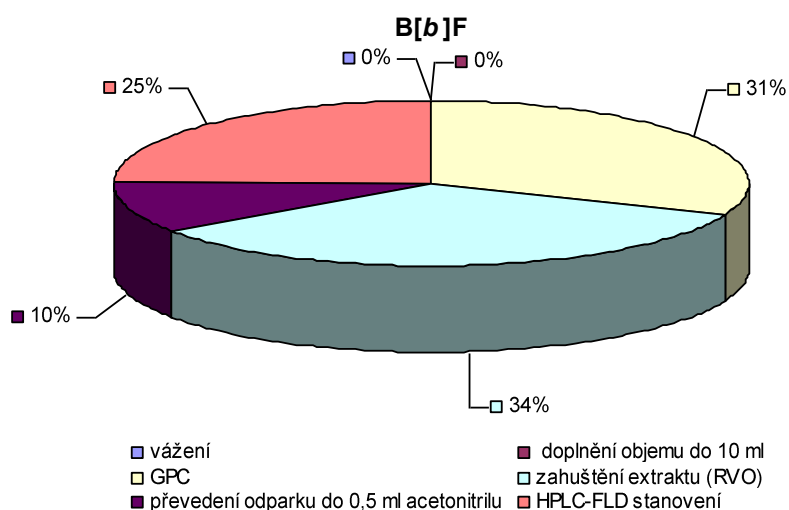
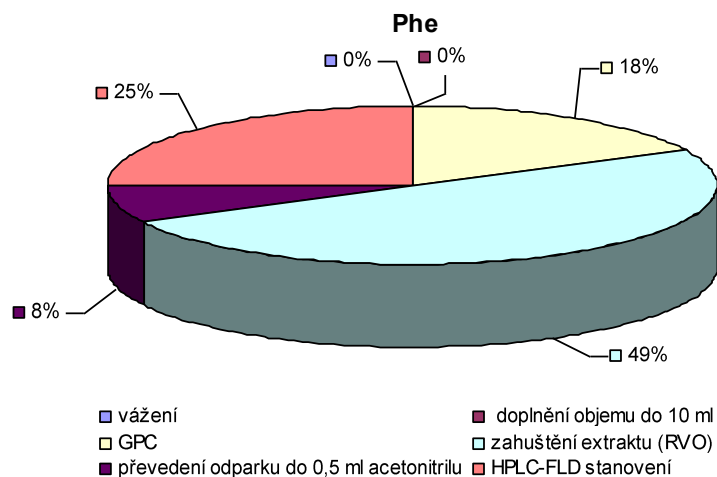
**Tabulka XII** Nejistoty analytického postupu zjištěné postupem „bottom up“

PAH	$u_c$ (%)	$U$ ( $\pm$ ) (%)
Phe	8,6	17,2
Ant	8,6	17,2
Flt	7,6	15,2
Pyr	8,1	16,2
B[a]A	6,3	12,6
Chr	6,3	12,6
B[b]F	6,3	12,6
B[k]f	7,3	14,6
B[a]P	9,3	18,6
DB[ah]A	6,4	12,8
B[gh]P	5,4	10,8
I[cd]P	8,3	16,6

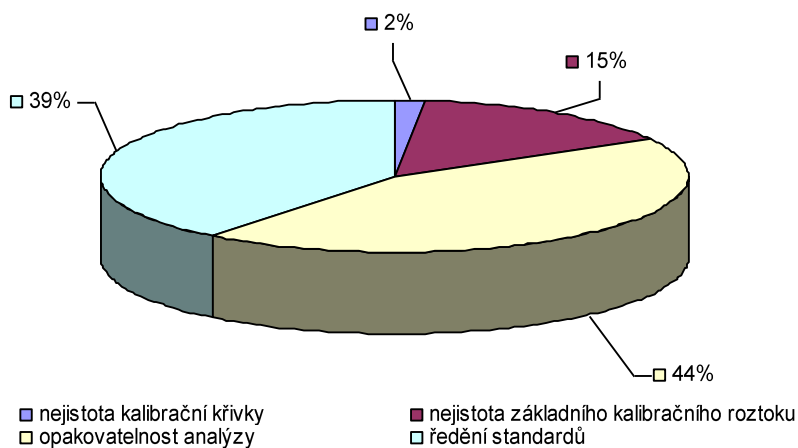
**Vysvětlivky:**

$u_c$  celková nejistota

$U$  rozšířená nejistota, koeficient rozšíření  $k = 2$



**Obr. 10:** Příspěvek dílčích nejistot jednotlivých kroků postupu na celkové nejistotě



**Obr. 11:** Příspěvek dílčích nejistot na celkové nejistotě kroku HPLC/FLD (příklad pro Phe)

## 5 Literatura

1. Scientific Committee on Food: Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of polycyclic aromatic hydrocarbons in food, **2002**, 25.
2. Harvey R. G.: Environmental Chemistry of PAHs, In: PAHs and Related Compounds, Hutzinger O. (ed.), Springer - Verlag, Berlin, **1998**. ISBN 3-540-62394-9.
3. Cejpek K., Hajšlová J., Jehličková Z., Merhaut J.: Simplified extraction and clean-up of PAUs in fatty and protein-rich matrices. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **1995**, 61, 65–80.
4. Moret S., Conte L., Dean D. J.: Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon content of smoked fish by means of a fast HPLC/HPLC method. *J. Agric. Food Chemistry*, **1999**, 47, 1367-71.
5. Afolabi A. O., Adesulu E. A., Oke O. I.: Polynuclear aromatic hydrocarbons in some Nigerian preserved freshwater fish species. *J. Agric Food Chem.*, **1983**, 31, 1083-90.
6. Guillén M. D., Sopelana P., Palencia G.: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Olive Pomace Oil. *J. Agric. Food Cem.*, **2004**, 52, 2123-32.
7. Chiu C.P., Lin Y.S., Chen B.H.: Comparison of GC-MS and HPLC for overcoming matrix interferences in the analysis of PAUs in smoked food. *Chromatographia*, **1997**, 44, 497.
8. Chiu C.P., Lin Y.S., Chen B.H.: Comparison of GC-MS and HPLC for overcoming matrix interferences in the analysis of PAUs in smoked food. *Chromatographia*, **1997**, 44, 497.
9. Vives I., Grimalt J. O., Fernández P., Rosseland B.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in fish from remote and high mountain lakes in Ekrope and Greenland. *Science of Total Environment*, **2004**, 324, 67-77.
10. Jánská M., Tomaniová M., Hajšlová J., Kocourek V.: Appraisal of "classic" and "novel" extraction procedure efficiencies for the isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives from biotic matrices. *Analytica Chemica Acta*, **2004**, 520, 93-103.
11. Filipkowska A., Lubecki L., Kowalewska G.: Polycyclic aromatic hydrocarbon analysis in different matrices of the marine environment. *Analytica Chemica Acta*, **2005**, 547, 243-254.
12. Baldyga B., Zbigniew B., Wieczorek J., Dymkowska-Malesa M., Smoczyński S.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in the beans, peas and broad beans from domestic market, 1999-2002. *Rocz Panstw Zakl Hig.*, **2005**, 56, 83-90.
13. Wang G., Lee A. S., Lewis M., Kamath B., Archer R. K.: Accelerated solvent extraction and gas chromatography/mass spectrometry for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food samples. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 1062-1066.
14. Tao S., Jiao X. C., Chen S. H., Liu W. X., Coveney R. M. Jr., Zhu L. Z., Luo Y. M.: Accumulation and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in rice (*Oryza Sativa*). *Environmental Pollution*, **2006**, 140, 406-415.
15. Mottier P., Parisod V., Turesky R. J.: Quantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in barbecued meat sausages by gas chromatography coupled to mass. *J. Agric Food Chem.*, **2000**, 48, 1160-1166.
16. A. Anastasio, R. Mercogliano, L. Vollano, T. Pepe, M. L. Cortesi: Levels of Benzo[a]pyrene (BaP) in "Mozzarella di Bufala Campana" Cheese Smoked According to Different Procedures. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 4452-4455.

17. Guillén M. D., Sopelana P.: Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked cheese. *J. of Dairy Science*, **2004**, 87, 3, 556-564.
18. Mekdec A., Dussauze J., Jourdin M., Deslandes E., Poupart N.: Gas chromatographic – mass spectrometric method for polycyclic aromatic hydrocarbon analysis in plant biota. *Jour. of Chromatography A*, **2006**, v tisku.
19. Kazerouni N., Sinha R., Hsu Che-Han, Greenberg A., Rothman N.: Analysis of 200 food items for benzo[a]pyren and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food Chem. Toxicol.*, **2001**, 39, 423-436.
20. Pillai I., Ritchie L., Heywood R., Wilson G., PAUlanpour B., Setford S., Saini S.: Development of an improved analytical method for the determination of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in transformer oil, *Jour. of Chromatography A*, **2005**, 1064, 205-212.
21. Barranco A., Alonso-Salces R. M., Bakkali A., Berrueta L. A., Gallo B., Vicente F., Sarobe M.: Solid-phase clean-up in the liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils. *Jour. of Chromatography A*, **2003**, 21, 33-40.
22. Oliferova L., Statkus M., Tsysin G., Shpigun O., Zolotov Y.: On-line solid-phase extraction and HPLC determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water using fluorocarbon polymer sorbents. *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 538, 35-40.
23. Guillen M. D., Sopelana P.: Headspace solid-phase microextraction as a tool to estimate the contamination of smoked cheeses by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. of Dairy Science*, **2005**, 88, 13-20.
24. Guillén M. D., Ibargoitia M. L., Sopelana P., Palencia G., Fresno M.: Components detected by means of solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry in the headspace of artisan fresh goat cheese smoked by traditional methods. *American Dairy Science Association*, **2004**, 87, 284-299.
25. Yusty Lage M. A., Daviña Cortizo J. L.: Supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection method for polycyclic aromatic hydrocarbons investigation in vegetable oil. *Food Control*, **2005**, 16, 59-64.
26. Zougagh M., Redigolo H., Ríos A., Valcárcel M.: Screening and confirmation of PAUs in vegetable oil samples by use of supercritical fluid extraction in conjunction with liquid chromatography and fluorimetric detection. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 525, 265-271.
27. Jävenpää E., Huopalahti R., Tapanainen P.: Use of supercritical fluid extraction-high performance liquid chromatography in the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons from smoked and broiled fish. *J. Liq. Chromatogr. Relat Technol.*, **1996**, 19, 1473-1482.
28. Šimko P.: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives. *Jour. of Chromatography B*, **2002**, 77, 3-18.
29. Moffat C. E., Whittle K. J.: Environmental Contaminants in Food. **1999**, ISBN 1-85075-921-9.
30. Betts T. J.: Possible value of a liquid crystal stationary phase for the gas chromatographic study of aromatic constituents of essential oils. *Jour. of Chromatography A*, **1990**, 513, 311-314.
31. Lu X., Zhao M., Kong H., Cai J., Wu J., Wu M., Hua R., Liu J., Ju G.: Characterization of complex hydrocarbons in cigarette smoke condensate by

- gas chromatography–mass spectrometry and comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. *Jour. of Chromatography A*, **2004**, 1043, 265-273.
32. Neilson A. H.: PAUs and related compounds chemistry. ISBN 3-540-62394-9, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **1998**. Grimmer G., Böhnke H.: Profile analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and metal content in sediment layers of a lake. *J. Assoc. Off. Anal. Chem*, **1975**, 1, 75-83.
  33. Grimmer G., Böhnke H.: Profile analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and metal content in sediment layers of a lake. *J. Assoc. Off. Anal. Chem*, **1975**, 1, 75-83.
  34. Fretheim K.: Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in Norwegian smoked meat sausages. *J. Agric. Food Chem*, **1976**, 24, 976-983.
  35. Binnemann P.H.: Benzo[a]pyrene contents of meat products. *Z. Lebensm Unters. Forsch.*, **1979**, 169, 447-452.
  36. Larsson B.K.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish. *Z. Lebensm Unters. Forsch.*, **1982**, 174, 101-107.
  37. Lawrence J.F., Weber D.F.: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in some canadian commercial fish, shellfish, and meat products by liquid chromatography with confirmation by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **1984**, 32, 789-794.
  38. Karl H., Leinemann M.: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fishery products from different smoking kilns. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1996**, 202, 458-464.
  39. Speer K., Steeg E., Horstmann P., Kühn Th., Montag A.: Determination and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in native vegetable oils, smoked fish products, mussels and oysters, and bream from the river Elbe. *Jour. High Res. Chrom.*, **1990**, 13, 104-111.
  40. Chen B.H., Lin Y.S.: Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons during processing of duck meat. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 1394-1403.
  41. Ballesteros E., Sánchez A. G., Martos N. R.: Simultaneous multidetermination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Jour. of Chromatography A*, **2006**, v tisku.
  42. Yurchenko S., Mölder U.: The determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish by gas chromatography mass spectrometry with positive-ion chemical ionization. *J. of Food Composition and Analysis*, **2005**, 18, 857-869.
  43. Guillén M. D., Ibargoitia M. L., Sopelana P., Palencia G., Fresno M.: Components detected by means of solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry in the headspace of artisan fresh goat cheese smoked by traditional methods. *American Dairy Science Association*, **2004**, 87, 284-299.
  44. Jävenpää E., Huopalahti R., Tapanainen P.: Use of supercritical fluid extraction-high performance liquid chromatography in the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons from smoked and broiled fish. *J. Liq. Chromatogr. Relat Technol.*, **1996**, 19, 1473-1482.
  45. Yusty Lage M. A., Daviña Cortizo J. L.: Supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection method for polycyclic aromatic hydrocarbons investigation in vegetable oil. *Food Control*, **2005**, 16, 59-64.

46. Pagliuca G., Gazzotti T., Zironi E., Serrazanetti G. P., Mollica D., Rosmini R.: Determination of high molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in a typical Italian smoked cheese by HPLC-FL. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 5111-5115.
47. Yurchenko S., Mölder U.: The determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish by gas chromatography mass spectrometry with positive-ion chemical ionization. *J. of Food Composition and Analysis*, **2005**, 18, 857-869.

**Příloha V**  
**Návrhy postupů při interpretaci výsledků**  
**Presentace na 3. metrologickém kongresu, Tel Aviv, Israel**

## Interpretation of test results

Miloslav Suchánek (ICT Prague, CZ)  
Piotr Robouch (EC-JRC-IRMM, Belgium)

## Interpretation of measurement results

- ILAC approach
- The Commission Decision
- Limit of Detection

Tel Aviv, November 2006

2

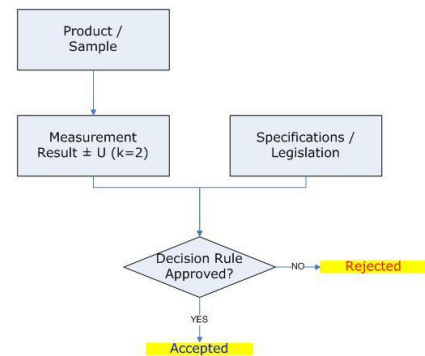
### Fundamental assumptions of any data interpretations:

1. Measurement procedure (method) is validated
2. Proven traceability of results to stated reference
3. Proper uncertainty budget

Tel Aviv, November 2006

3

According to ILAC G8 (1996)



Tel Aviv, November 2006

4

### Decision rules

„ILAC“ rule (ILAC-G8: 1996), agreement with ISO 10576-1:2003

**L** – maximal limit;

u – combined uncertainty (of result)

$\alpha$  - significant level; „error“ of 1<sup>st</sup> kind

DL<sub>s</sub> – (auxiliary) lower decision limit  $DL_s = L - k_\alpha \cdot u$

DL<sub>h</sub> – (auxiliary) upper decision limit  $DL_h = L + k_\alpha \cdot u$

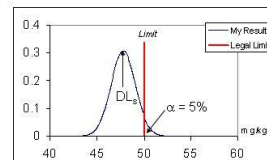
for  $\alpha = 0.05$  (5 %),  $k_\alpha = 1.64$

$$DL_s = L - 1.64 \cdot u$$

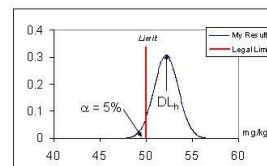
$$DL_h = L + 1.64 \cdot u$$

Tel Aviv, November 2006

5



→ certainly below

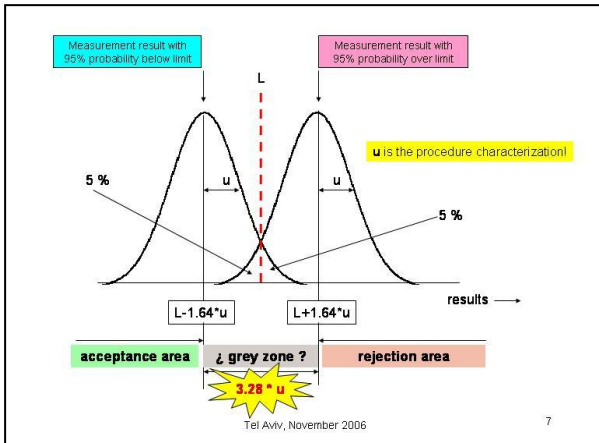


→ certainly above

Tel Aviv, November 2006

6





goto XLS

Tel Aviv, November 2006

8

## 2. „EU“ rule (Commission decision 2002/657/EC)

**Definitions:**

**Alpha ( $\alpha$ ) error** means the probability that tested sample is truly compliant, even though a non-compliant measurement has been obtained (false non-compliant decision)

**Beta ( $\beta$ ) error** means the probability that the tested sample is truly non-compliant, even though a compliant measurement has been obtained (false compliant decision)

Tel Aviv, November 2006

9

$CC_\alpha$  response with a given  $\alpha$ -error (1%) a 50% of  $\beta$ -error

$CC_\beta$  response with a very small  $\alpha$ -error and given  $\beta$ -error (5%)

measurement on the level L!

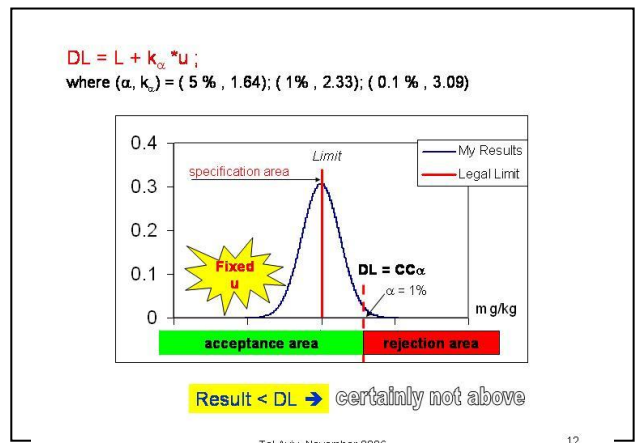
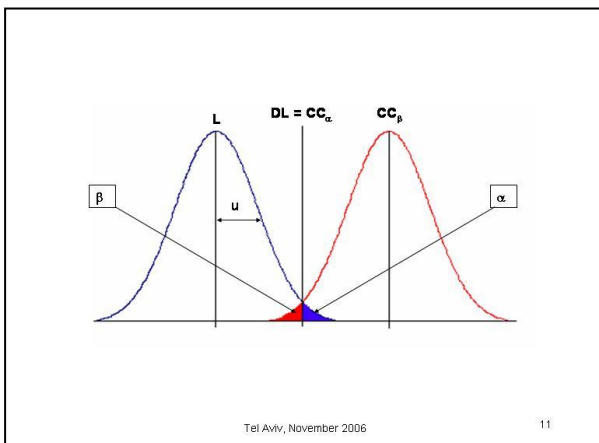
Measurement uncertainty = SD of within laboratory reproducibility

Different methodology for substances:

- with no established permitted limit
- with established permitted limit

Tel Aviv, November 2006

10



**Example: Alcohol content in Blood (in Sweden)**

- Legislative limit,  $L = 0,2 \text{ mg/kg}$
- False positive error of  $0.1\%$  ( $= \alpha$ )
- Measurement uncertainty in the vicinity of limit estimated as  $u = 0.0065 \text{ mg/kg}$ .

→  $DL = 0.2 + 3.09 \cdot 0.0065 = 0.22 \text{ mg/kg}$

**Interpretation:**

Blood sample with alcohol content  $< 0,22 \text{ mg/kg}$  is classified as compliant.

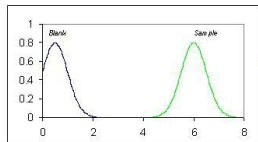
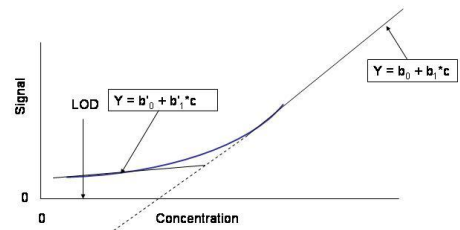
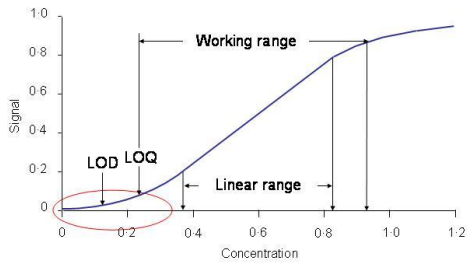
**Measurement capability of the method (limit of detection, LOD)**

is defined as the lowest quantity (content, concentration) of substance, which can be detected, identified or determined in the sample (matrix!) with a given  $\beta$ -error

alternative wording: with  $(1 - \beta)$  probability the measurement procedure is able to confirm the presence of substance in the sample

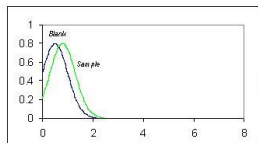
Limit of detection characterises the method with measurement capability

**Conversion of measured signals to concentration in the very low range of concentrations**



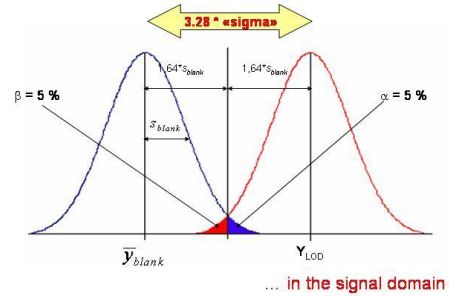
I can quantify

Where is my LOD?



I see nothing

**Measurement capability, LOD**



... in the signal domain

goto XLS

The evaluation of detection capability consists of five steps:

- Choice of a priori probabilities  $\alpha$  and  $\beta$  (usually  $\alpha = \beta = 5\%$ )
- Estimation of measurement uncertainty of procedural blank; usually substituted by standard deviation of repeatability or reproducibility,  $s_{blank}$
- Calculation of DL (signal domain):  
$$DL = Y_{blank} + 1.64 * s_{blank}$$
- Calculation of LOD in signal domain:  
$$LOD = Y_{blank} + 2 * 1.64 * s_{blank}$$
- Conversion of LOD in signal units into concentration (content) units with the use of calibration equation constructed in the vicinity of LOD