

# STOPOVÁ ANALÝZA ORGANICKÝCH KONTAMINANTŮ – PŘÍKLADY APLIKACE MODERNÍCH INSTRUMENTÁLNÍCH TECHNIK V OBLASTI POTRAVIN A BIOTICKÉ SLOŽKY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

JANA HAJŠLOVÁ

*Ústav chemie a analýzy potravin, akreditovaná Metrologická laboratoř, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28, Praha 6  
e-mail: jana.hajslova@vscht.cz*

Došlo dne 20.III.2002

**Klíčová slova:** kontaminanty, stopová analýza, multireziduální metody, pracovní charakteristiky, chromatografie, hmotnostní spektrometrie, matriční efekty

## Obsah

1. Úvod
2. Multireziduální metody, základní požadavky na pracovní charakteristiky
3. Plynová chromatografie (GC)
  - 3.1. Matriční efekty v GC
    - 3.1.1. Matriční efekty v GC injektoru
    - 3.1.2. Optimalizace nástříkové techniky v GC
  - 3.2. Rychlá GC
  - 3.3. Spojení GC-MS
4. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)
  - 4.1. Spojení LC-MS
    - 4.1.1. Matriční efekty v LC-MS<sup>2</sup>

## 1. Úvod

Intenzivní rozvoj průmyslové výroby, dopravy i služeb spolu s rozsáhlou chemizací řady oblastí zemědělské výroby, ke kterým došlo zejména ve druhé polovině minulého století, byl bohužel doprovázen i některými negativními aspekty. Jedním z nejzávažnějších byl vzrůstající rozsah emisí širokého spektra chemických škodlivin prakticky do všech složek životního prostředí včetně potravního řetězce člověka. Potřeba získat podklady pro proces identifikace a charakterizace (eko)toxikologických rizik; nutnost průběžného sledování dopadů přijatých preventivních či nápravných opatření i vzrůstající rozsah legislativních požadavků na kontrolu dodržování norem v oblasti chemické bezpečnosti se zákonitě promítly v intenzifikaci výzkumu zaměřeného na vývoj progresivních spektrálních, chromatografických a dalších analytických metod určených pro sledování reziduí anorganických i organických kontaminantů v různých typech environmentálních matic a poživatin. Pozoruhodné pokroky dosažené v oblasti stopové analýzy úzce souvisely s expanzivním zaváděním počítači řízené instrumentace využívající v široké míře prvků automatizace a robotizace.

Ústav chemie a analýzy potravin VŠCHT se problemati-

kou sledování chemických škodlivin v prostředí člověka (vedle xenobiotik jde v řadě případů i o toxiny přírodního původu) zabývá již více než tři desítky let. V současné době se pracoviště podílí na několika tuzemských i mezinárodních projektech zaměřených na zavádění, optimalizaci a validaci (ultra)stopových chromatografických metod pro analýzy těkavých organických kontaminantů.

Cílem dále uvedeného pojednání je s využitím nejnovějších poznatků a praktických zkušeností získaných při vyšetřování vzorků poživatin a environmentálních biotických matic ilustrovat stávající trendy v oblasti reziduální analýzy se zvláštním důrazem na aplikaci perspektivních instrumentálních technik. Pozornost je zaměřena především na kritické aspekty terminálního analytického kroku (identifikace a kvantifikace analytů), které je nutné zohlednit při zajištění kvality generovaných dat. Metody izolace reziduí a purifikace primárních extraktů (oddělení cílových analytů od ko-izolovaných složek výchozí matrice) byly předmětem předchozí publikace v tomto časopise<sup>1</sup>. Je třeba zdůraznit, že tato práce si neklade za cíl přinést souhrnný přehled používaných progresivních technik a stávajících trendů v oblasti reziduální analýzy, referovány jsou zde původní práce autorského pracoviště, ve kterých lze nalézt související odkazy.

## 2. Multireziduální metody, základní požadavky na pracovní charakteristiky

Požadavky na zvýšení laboratorních kapacit při současné minimalizaci nákladů řeší mnohé kontrolní laboratoře postupným zaváděním tzv. multireziduálních metod, které umožňují v různých maticích v rámci jediné analýzy<sup>2</sup> stanovit velký počet analytů vyznačujících se někdy i poměrně širokým spektrem fyzikálně-chemických vlastností. V tabulce I je uveden výčet nejvýznamnějších kritérií<sup>3</sup> jak z oblasti provozních požadavků, tak i pokud jde o pracovní charakteristiky, z jejichž specifikace se při volbě vhodného analytického postupu vychází.

Je samozřejmé, že v reálných podmínkách je nutné hledat optimální kompromis vycházející ze zhodnocení konkrétního cíle uvažovaného analytického vyšetření a podmínek dostupných pro jeho realizaci. Příklady konkrétních požadavků<sup>4-6</sup> na základní pracovní charakteristiky metod aplikovaných v oblasti stopové analýzy pro legislativní účely jsou shrnuty v tabulce II.

## 3. Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie představuje bezesporu jednu z nejvýznamnějších technik využívaných v analýze reziduí organických kontaminantů<sup>7</sup>. Možnost zlepšení pracovních charakteristik multireziduálních metod v našich studiích hledáme jak na úrovni vhodného výběru nástříkové techniky, tak i prostřednictvím optimalizace vlastního chromatografického procesu a v neposlední řadě volbou vhodných podmínek detekce.

Tabulka I

Kritéria zohledňovaná při výběru analytického postupu v reziduální analýze

Parametry podmiňující kvalitu výsledků	Aspekty vztahující se k ekonomickým parametrům
Limit detekce, limit kvantifikace Přesnost: správnost a shodnost <sup>a</sup> Citlivost Selektivita a specificita Dynamický a lineární rozsah Robustnost	Náklady na zařízení, chemikálie a pomůcky, cena lidské práce Délka analýzy, průsaznost vzorků Náklady na zajištění kontroly jakosti včetně externí (mezilaboratorní porovnání) Požadavky na prostor a energie, cena údržby Náklady na bezpečnostní opatření Pracnost, resp. snadnost provedení, možnosti automatizace, příp. robotizace

<sup>a</sup> Uvedená terminologie (překlad anglické definice accuracy = trueness + precision) vychází z normy ČSN ISO 3534-1)

Tabulka II

Požadavky na hodnoty výtěžnosti analytických metod využívaných při stanovení reziduí pesticidů (*c* – koncentrační hladiny analytů, *RSD* – opakovatelnost jako relativní směrodatná odchylka)

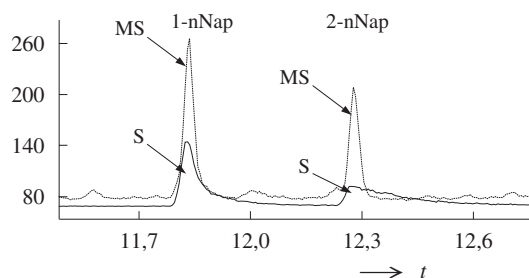
<i>c</i> [μg.kg <sup>-1</sup> ]	<i>RSD</i> [%]	Výtěžnost [%]	
		metody pro jeden či skupinu příbuzných analytů	multireziduální metody
≤1	35	50–120	40–120
1–10	30	70–110	50–120
>10	<20	80–110	60–110

### 3.1. Matriční efekty v GC

Extrakty komplexních matic, jako jsou potraviny a různé biotické vzorky rostlinného či živočišného původu, běžně obsahují vedle cílových analytů i řadu těkavých a netěkavých komponent (lipidy a doprovodné látky, přirozené pigmenty, pryskyřice apod.), z nichž některé není možné pomocí běžně používaných čisticích kroků zcela odstranit. Dlouhodobé vnášení, resp. opakovaný nástřik těchto koextraktů do chromatografického systému pak postupně vede ke zhoršování procesu separace, identifikace i kvantifikace analytů. Negativní vliv na kvalitu výsledků se projevuje mimo jiné poklesem jejich přesnosti, zvyšováním hodnot detekčních limitů. Vrstvá i riziko falešně negativních i falešně pozitivních nálezů.

#### 3.1.1. Matriční efekty v GC injektoru

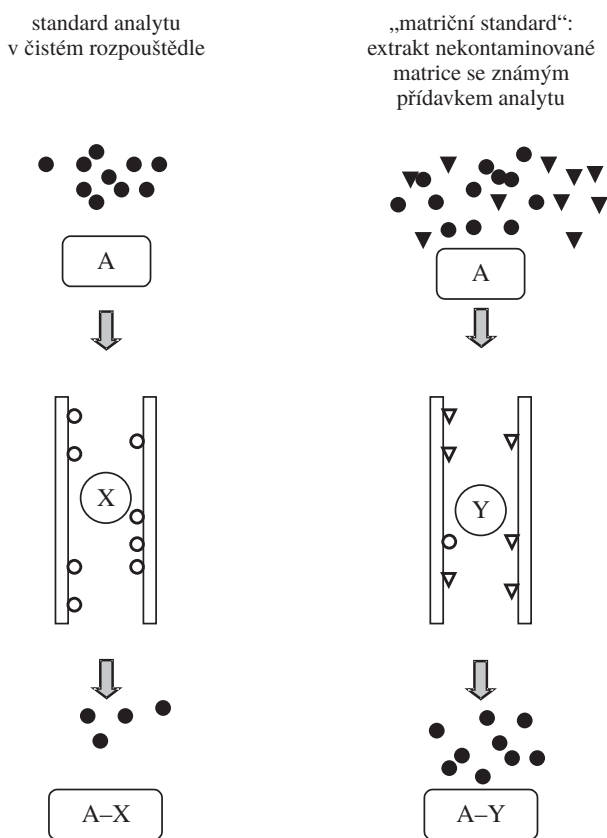
Závažným problémem při kvantifikaci některých kontaminantů (především těch, které obsahují ve své molekule polární skupiny), je jejich potenciální termodegradace, případně adsorpce, ke kterým může docházet v nástřikovém prostoru „horkých“ (izotermních) vypařovacích injektorů. Tato rizika jsou zvláště významná v případě nástřiku bez dělení toku nosného plynu (tzv. „splitless“), který může trvat i desítky sekund. K uvedeným jevům dochází zejména na aktivních centrech reprezentovaných silanolovými skupinami, příp. stopami těžkých kovů, jež jsou téměř vždy přítomny ve stěnách skleněné nástřikové vložky (lineru).



Obr. 1. Matriční efekt při stanovení nitro-PAU technikou GC-MS-ECNI, *m/z* 173; MS – matriční standard, S – standard v čistém rozpouštědle (nástřik 1 pg analytu – nitronaftalenu, nNap)

Při analýze reálných vzorků, tj. extraktů obsahujících vedle analytů též složky výchozí matrice, mohou tyto komponenty interagovat se zmíněnými aktivními centry a v závislosti na vzájemných koncentračních poměrech je částečně či zcela zamaskovat. Výsledkem je pak ochrana citlivých analytů před degradací či adsorpcí po dobu jejich setrvání v prostoru injektoru<sup>8</sup>. Oproti nástřiku analytu (standardu) v čistém rozpouštědle tak v přítomnosti matrice dochází ke vnesení většího množství daného analytu na chromatografickou kolonu, což se pochopitelně projeví vyšším signálem detektoru (v angličtině se tento typ matričních efektů označuje jako matrix-induced response enhancement).

Chromatografický záznam získaný v rámci vývoje metody pro stanovení nitro-derivátů polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) uvedený na obrázku 1 názorně ilustruje popsany jev (při stanovení mateřských PAU se s tímto typem matričních efektů nesetkáme, neboť interakce těchto nepolárních molekul s aktivními centry není významná)<sup>9</sup>. Z praktického hlediska tak při kvantifikaci založené na externí kalibraci standardem v čistém rozpouštědle může dojít k často velmi významnému nadhodnocení výsledků (zdánlivé hodnoty výtěžnosti, zejména v případě velmi nízkých hladin analytů někdy dosahují i 1000 %). Názorně jsou jevy, ke kterým dochází v injektorové vložce, zobrazeny na obrázku 2. Obecně je velikost matričních efektů tohoto typu koncentračně závislá a v případě relativně vysokých koncentrací analytu se nadhodnocení nálezů analytů zřetelně neprojevuje. V reálných podmínkách však počet aktivních míst není konstantní. V průběhu analýzy může docházet k jejich nárůstu v důsledku tepelného namáhání nástřikové vložky, resp. depozitů zde přítomných,



Obr. 2. Ilustrace podstaty injektorových matričních efektů při GC analýze využívající nástřikové techniky „splitless“; A – počet molekul analytu v nástřiknutém vzorku, X, Y – počet „volných“ aktivních center v nástřikovém prostoru pro sorpci analytu, ● molekuly analytu nástřiknuté do injektoru a podíl vnesené na kolonu; ○ molekuly analytu sorbované na stěně nástřikové vložky, ▼ molekuly matrice nástřiknuté do injektoru a podíl vnesené na kolonu, ▽ molekuly matrice adsorbované na stěně nástřikové vložky, (A-X) < (A-Y)

současně však může probíhat i jejich deaktivace. Hodnota matričních efektů je tedy v čase proměnná, v rámci validace metody je nezbytné příslušné trendy dlouhodobě sledovat.

V uvedeném kontextu se jistě jako velmi aktuální jeví otázka možnosti kompenzace, případně eliminace matričních efektů. Teoreticky se zdá být nejjednodušší možností použití inertních materiálů, jejichž povrchy jsou prosté aktivních center, nicméně žádné z běžně dostupných komponent tento požadavek zcela nesplňují. Pro reálné podmínky se sice nabízí několik řešení, žádné z nich však není zcela ideální a vyhovující potřebám multireziduálních metod. Atraktivní, i když ekonomicky značně náročnou variantou, je bezesporu využití izotopy značených analogů; tyto však nejsou pro řadu kontaminantů (např. moderní pesticidy) k dispozici. Z hlediska dosažení správných výsledků je korektnějším řešením kalibrace pomocí matričních standardů. Jejich příprava, zejména při požadavku na vyšetřování širokého spektra kombinací matrice–analyt, představuje značnou časovou i kapacitní zátěž; navíc ne vždy je k dispozici matrice prostá stop cílových analytů.

### 3.1.2. Optimalizace nástřikové techniky v GC

Jak vyplynulo z předchozích úvah, děje probíhající v průběhu „splitless“ nástřikové periody mohou zásadním způsobem ovlivnit přesnost výsledků i hodnoty dosažitelných detekčních limitů. Z uvedených důvodů jsme sérii studií zaměřili na získání podkladů pro kritické zhodnocení aplikačního potenciálu různých typů nástřikových technik v oblasti reziduální analýzy pesticidů. Jedním z cílů bylo posoudit možnost realizace kalibrace pouze pomocí standardů v čistém rozpouštědle, a odstranit tak (náročnou) přípravu matričních standardů.

V prvé sadě experimentů jsme dosáhli částečné, někdy až úplné eliminace matričních efektů pomocí elektronicky řízeného tlakového pulzu aplikovaného v průběhu nástřikové periody<sup>10</sup>. S přihlédnutím k charakteru vzorku i typu instrumentu, resp. geometrii injektoru, je nutné nalézt jak horní hranici tlaku v nástřikovém prostoru, tak i délku jeho trvání tak, aby nedocházelo ke ztrátě těkavějších analytů. Zvýraznění kompenzačního efektu pulzního nástřiku lze docílit zvýšením objemu nástřikovaného vzorku (za běžných podmínek až na cca 5  $\mu$ l); v takovém případě je však nutné zabránit deformaci píků a posunu jejich retenčních časů předřazením kratší deaktivované kapiláry před vlastní analytickou kolonu (tzv. retention gap).

V navazujících experimentech jsme využili injektor s programovatelnou teplotou vypařování (programmable temperature vaporizer, PTV), který obecně umožňuje podstatně šetrnější nástřik labilních analytů či analytů náchylných k sorpci na aktivních místech nástřikové vložky. Vzorek je totiž zaveden do injektoru udržovaného v blízkosti nebo pod bodem varu příslušného rozpouštědla. Po odstranění par rozpouštědla je zajištěn transfer analytů na separační kolonu bleskovým vyhrátím injektorového prostoru. Na koloně udržované při vhodné nízké teplotě dojde k refokusaci zóny analytů. Pro analýzy extraktů s obsahem reziduí pesticidů byla optimalizována<sup>11</sup> nástřiková technika „solvent-vent“, umožňující postupný nástřik až 30  $\mu$ l vzorku. Díky této skutečnosti, tj. možnosti zavedení velkého objemu vzorku do injektorového prostoru, není nutné zahušťování vzorku před GC analýzou, přičemž vypuštění odpařovacího kroku má za následek zkrácení přípravné fáze při současném eliminaci rizika ztrát těkavých analytů. Při porovnání s ostatními technikami, nástřik pomocí PTV v největší míře kompenzoval matriční efekty a zároveň poskytoval nejlepší ochranu vstupní části separační kolony před depozicí netěkavých matričních komponent<sup>12</sup>. Pomocí PTV jsme při zachování požadované kvality dat realizovali více než 135 nástřiků matričních vzorků, zatímco při pulzním „splitless“ nástřiku polovičního ekvivalentu původní matrice nebylo možné již po cca 85 analýzách některé polární analyty kvantifikovat.

### 3.2. Rychlá GC

Rychlá plynová chromatografie, které jsme v rámci našich studií věnovali řadu experimentů, reprezentuje bezesporu jeden z progresivních trendů v oblasti reziduální analýzy. Pojem rychlá chromatografie je ovšem poněkud obtížné exaktně vymezit, nicméně obecně lze takto klasifikovat separace složitých směsí realizované během několika minut (šířky píku v polovičce výšky se pak pohybují v rozmezí několika

sekund), popsány byly i analýzy, jejichž délka se pohybovala na úrovni sekund (tzv. ultrarychlá chromatografie).

Aktuálnost potřeby zavedení rychlé plynové chromatografie do oblasti analýzy komplexních směsí organických těkavých kontaminantů vyplývá též ze skutečnosti, že klasické separace složek extraktů typicky realizované na kapilárních kolonách o délce 25 až 60 m, s vnitřním průměrem 0,15–0,32, příp. 0,53 mm trvají často desítky minut, nezděka přesahují i jednu hodinu. Při výběru strategie výrazného zkrácení doby analýzy jsme vycházeli z následujících možností: varianta A. – změněné či netradiční parametry separační kolony *i*) menší vnitřní průměr (tzv. „micro bore“ kolony), *ii*) kratší délka, *iii*) tenčí film stacionární fáze, *iv*) multikapilární kolony, *v*) šroubovitě stočené kolony; v úvahu byla vzata též varianta B. – úprava operačních podmínek při separaci, konkrétně *i*) použití rychlého teplotního programování, *ii*) práce při konstantní teplotě (izotermní analýza), *iii*) použití vodíku jako nosného plynu, *iv*) zvýšení průtoku nosného plynu na hodnoty vyšší než optimální, *v*) provozování kolony za sníženého tlaku (její výstup je zaveden do „vakua“).

Je ovšem nutné připomenout, že volba experimentálních podmínek zahrnuje nevyhnutelně řadu kompromisů. Vedle dosažení výrazného zrychlení stanovení je nutné zohlednit požadavky na dostatečnou kapacitu chromatografické kolony, která, mimo jiné, podmiňuje citlivost i hodnotu detekčního limitu; v neposlední řadě je nutné zachovat dostatečnou separační účinnost. Ta totiž zásadním způsobem podmiňuje nejenom správnost (přesnost i shodnost) výsledků analýz, ale promítá se též v hodnotách dosažitelných mezí detekce (uplatňuje se vliv „chemického“ šumu).

Z praktického pohledu ovšem nejsou všechny uvedené varianty plně kompatibilní s požadavky stopové analýzy a v některých případech je nelze realizovat pomocí konvenčních GC systémů. S přihlédnutím k omezenému rozsahu této práce je další diskuse zaměřena jen na nejvýznamnější aspekty.

Ve většině případů je rychlá GC realizována na krátkých kolonách, jejichž délka nepřesahuje 10 m; v případě ultrarychlé separace se dokonce pracuje s kolonami s délkou max. 1 m. Zkrácení délky kolony vede zákonitě k poklesu hodnoty rozlišení a vzniká riziko koelucí analytů. Použití hmotnostně-spektrometrického detektoru (MSD) představuje ve většině případů vhodné, ne však univerzální řešení. Oproti konvenčním, v oblasti analýzy kontaminantů hojně využívaným detektorům ( $\mu$ -ECD, NPD či FPD) s vysokou rychlostí akvizice dat, se při použití MSD s kvadrupolovým analyzátozem či iontovou pastí může stát limitujícím faktorem dosažitelná skanovací rychlost (tato se u uvedených běžných typů MSD pohybuje v rozmezí 10–20 spekter. $s^{-1}$ ). Potenciál techniky selektivní akvizice spektrálních dat, tzv. monitorizace vybraných iontových druhů (selected ion monitoring, SIM), umožňující u kvadrupolových MSD významné snížení detekčních limitů, nelze za podmínek rychlé chromatografie plně využít.

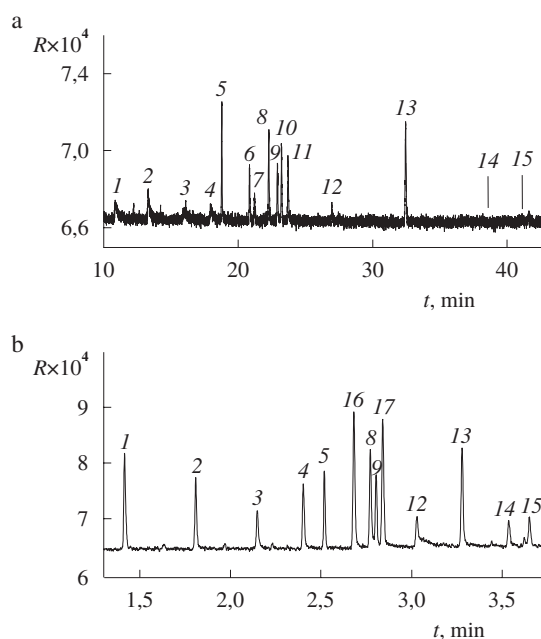
Dosud v praxi nejčastěji používaná varianta rychlé plynové chromatografie realizovaná pomocí kolon s malým vnitřním průměrem se v oblasti reziduální analýzy příliš neuplatnila z důvodů limitované dostupnosti vhodné nástřikové techniky. Obecným požadavkem za daných podmínek je pochopitelně rychlé vnesení vzorku na kolony v co nejužší zóně. Aplikace „splitless“ nástřiku – ve stopové analýze jedné z nejběžnějších technik, založené na refokusaci analytů ve vstupní části GC kolony, není prakticky proveditelná. Dlouhá kondenzační zó-

na je příčinou diskriminačních jevů a nepříjemné deformace píků.

Jako nejzajímavější varianty rychlé plynové chromatografie byly pro naše aplikace posléze vyhodnoceny: *i*) rychlé programování teploty a *ii*) separace za sníženého tlaku; v obou případech byly analýzy provozované na relativně krátkých kolonách.

Obrázek 3 ilustruje pracovní charakteristiky čtyřminutové GC analýzy extraktu pšenice kontaminovaného rezidui organofosforových insekticidů (detekce pomocí plameno-fotometrického detektoru, FPD)<sup>13</sup>. K rychlému ohřevu (v některých úsecích dosahovala rychlost teplotního gradientu až 360 °C. $\text{min}^{-1}$ ) separační kolony dlouhé 5 m byl využit odporový ohřev (elektronicky řízený odporový ohřev vodivého materiálu obklopujícího povrch kolony byl realizován pomocí externě připojeného systému „EZ flash“ – Thermedics Detection, USA, umístěného mimo vlastní plynový chromatograf HP 6890).

Při srovnání s konvenční analýzou realizovanou na kapiláře dlouhé 60 m (ostatní parametry použitých kolon, tj. vnitřní průměr a stacionární fáze, byly prakticky identické) trvající více než 40 min, je zřejmý dramatický rozdíl v hodnotách detekčních limitů. Za podmínek rychlé plynové chromatografie je totiž díky podstatně užším pikům analytů poměr signálu k šumu mnohonásobně vyšší. Porovnání výsledků získaných při rychlém programování teploty kolony pomocí odporového ohřevu s využitím modulu EZ flash a konvenčně, tj. v termostatu plynového chromatografu (přístroj HP 6890 Plus) dokumentovalo jednoznačně lepší opakovatelnosti retenčních časů



Obr. 3. Porovnání analýz identického extraktu organofosforových pesticidů pomocí konvenční (a) a rychlé (b) plynové chromatografie s odporovým ohřevem „EZ flash“ (detekce pomocí FPD); R – odezva detektoru, 1 – dichlorvos, 2 – mevinphos, 3 – omethoat, 4 – dimethoat, 5 – diazinon, 6 – chlorpyrifos, 7 – parathion-Me, 8 – pirimiphos-Me, 9 – malathion, 10 – chlorpyrifos-Et, 11 – parathion-Et, 12 – methidation, 13 – ethion, 14 – phosmet, 15 – phosalone, 16 – koeluce 1, 17 – koeluce 2

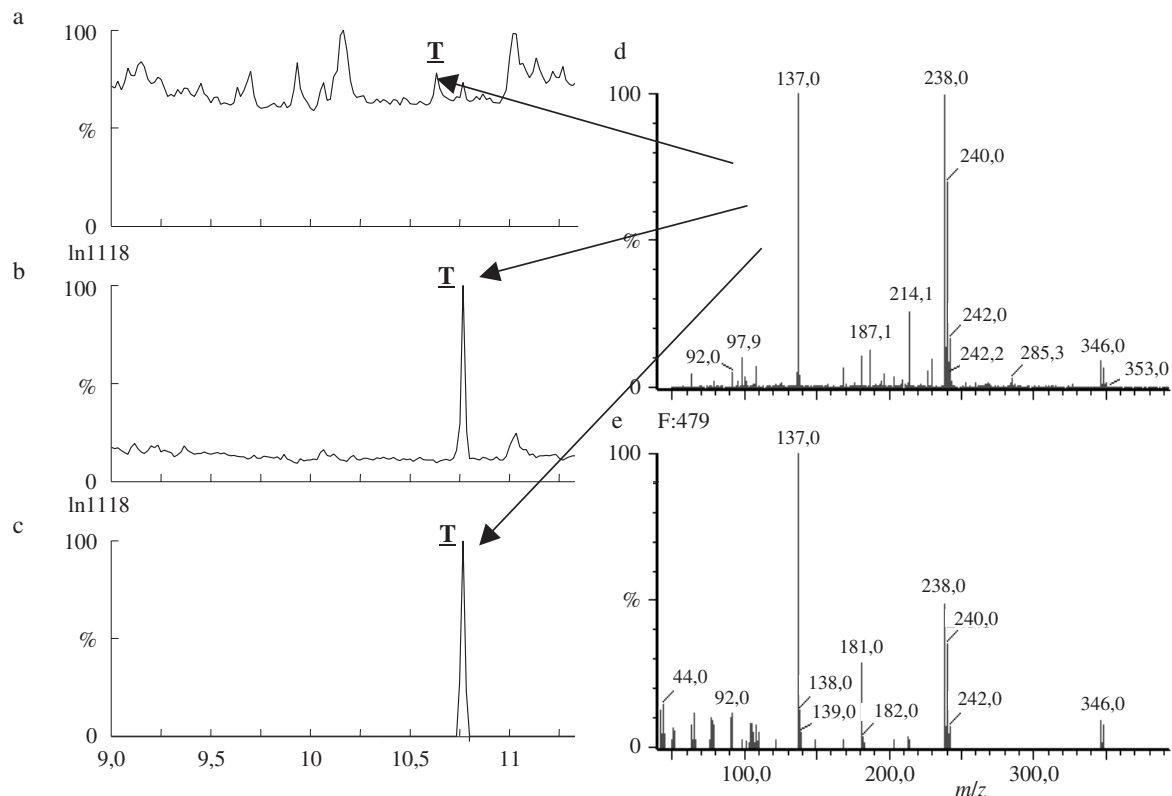
při aplikaci první z uvedených technik (tato skutečnost je zvláště významná v případě, kdy retenční čas analytů je využíván k jejich identifikaci). Rozdíl byl zřetelný zejména pro analyty s vyššími hodnotami retenčních časů; při rychlosti konvenčního ohřevu  $80\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  dosahovaly hodnoty relativní směrodatné odchylky již desítek %. Zmínit se je třeba ještě o další přednosti odporového ohřevu, kterou je vysoká rychlost re-ekvilibrace chromatografického systému (zchlazení na výchozí teplotu). Tato skutečnost dále zvyšuje laboratorní kapacitu.

Analýza směsi moderních pesticidů v reálných matricích v případě druhé, velmi zajímavé varianty rychlé plynové chromatografie, byla realizována<sup>14</sup> na 10 m dlouhé koloně s relativně velkým vnitřním průměrem (0,53 mm, tzv. megabore) připojené k „splitless“ injektoru krátkou restriční kapilárou (3 m, vnitřní průměr 0,25 mm) s dezaktivovaným povrchem, výstup kolony byl připojen k iontovému zdroji MS detektoru, čili separace analytů probíhala za nízkého tlaku, resp. za „vakua“. Zvýšení difuzivity analytů v plynné fázi umožňuje dosažení podstatně vyšší optimální lineární rychlosti nosného plynu (v souladu s van Deemterovým vztahem) a potažmo výrazné zrychlení separace těkavých komponent vzorku oproti chromatografické separaci, při které je na výstupu kolony atmosférický tlak. Popsaný systém (tzv. low-pressure, LP-GC-MS) má díky parametrům použité kolony vysokou kapacitu a je zároveň kompatibilní s nástřikovými technikami využívanými běžně v reziduální analýze. Zmíněný pokles dosažitelného chromatografického rozlišení ve většině

případů kompenzuje selektivita MSD. V našich experimentech jsme dosáhli snížení doby analýzy na třetinu (cca 15 min) při současném snížení detekčních limitů, které umožnil vyšší nástřik vzorku. Rozsah matričních efektů byl v souvislosti s touto skutečností významně omezen (viz odst. 3.1.1.).

### 3.3. Spojení GC-MS

Ještě v devadesátých letech minulého století se hmotnostně-spektrometrické detektory používaly jako primární prostředek pro kvantifikaci analytů ve stopové analýze jen ojediněle, ve většině aplikací spíše sloužily ke confirmaci nálezů kontaminantů. Cenová dostupnost hmotnostních detektorů s nízkým rozlišením postupně umožnila jejich rutinní využití v různých oblastech reziduální analýzy. Nejčastěji jsou hmotnostní analyzátoři reprezentováni přímým kvadrupolem, iontovou pastí, v posledních letech se zvyšuje počet aplikací využívajících analyzátoři typu „time of flight“ (TOF). Každý z nich samozřejmě disponuje určitými přednostmi; rozdíly jsou především v opakovatelnosti měření za přítomnosti složek matrice, v přesnosti určení hodnot  $m/z$  a rychlosti snímání spekter. Iontová past navíc umožňuje provádění vícenásobné spektrometrie (přímý kvadrupol a TOF pouze při zřetězení více stupňů). Zmínit se je třeba i o možnosti optimalizace pracovních charakteristik analytické metody pomocí volby vhodné ionizační techniky. Vedle běžné ionizace nárazem elektronů (electron impact, EI) je v ultrastopové analýze kontaminantů za určitých okolností výhodné použití měkké ioni-



Obr. 4. Záznamy při GC-TOF-MS analýze extraktu jablek kontaminovaných tolylfluanidem ( $0,07\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ); a – celkový iontový tok (TIC), b –  $m/z$  137, šířka okna 0,5 Da, c –  $m/z$  137,032, šířka okna 0,01 Da, d – spektrum píku T – vzorek, e – spektrum tolylfluanidu – knihovna NIST # 62557

začnící techniky využívající reakčního plynu (nejčastěji methanu), která nevede k rozsáhlejší fragmentaci mateřské molekuly. Detekce intenzivního pseudomolekulárního iontu  $MH^+$  je vesměs specifitější než nižších fragmentů a u některých látek může, díky nízkým hodnotám šumu v oblasti vyšších hodnot  $m/z$ , klesnout hodnota detekčního limitu. V případě stanovení analytů s elektronegativními substituenty či skupinami je možné pracovat v módu tzv. negativní chemické ionizace (negative chemical ionisation, NCI), správně negativní ionizace se záchytem elektronů (ECNI). Mechanismus detekce je podobný jako u ECD, primárně vzniká molekulový ion  $M^-$  záchytem nízkenergetických elektronů. Zvýšení poměru signálu k šumu až o dva řády oproti ionizaci EI s akvizicí dat v módu monitorizace vybraných iontových druhů (selected ion monitoring, SIM) používané v případě kvadrupolových analyzátorů umožňují spolu s dobrou selektivitou detekce spolehlivou kvantifikaci některých skupin kontaminantů na hladinách nižších než  $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Na autorském pracovišti je GC-ECNI využívána zejména pro stanovení polybromovaných difenyletherů (PBDE) a dalších bromovaných retardantů hoření, nitroderivátů PAU (cit.<sup>9</sup>) a pro stanovení toxických planárních (non-ortho) PCB. V posledním zmíněném případě se tato technika osvědčila, resp. poskytla přesné výsledky při certifikaci nového matričního referenčního materiálu CRM 719, na jehož přípravě se v rámci projektu EU pracoviště dílelo.

V rozsáhlé studii zaměřené na posouzení přesnosti výsledků analýz reziduí moderních pesticidů v extraktech z rostlinných matric získaných v různých GC systémech jsme při analýze série 14 identických vzorků pomocí GC-MS s kvadrupolovým analyzátozem HP 5973 (HP, USA) provozovaným v módu monitorizace vybraných iontových druhů prokázali vesměs nižší hodnoty relativních hodnot směrodatných odchylek (max. 5 %) nálezů než při detekci konvenčními detektory NPD, ECD. Na straně druhé, opakovatelnost retenčních časů byla u MSD nižší. Tento jev se stal zvláště zřetelným při rychlém programování teploty separační kolony. Za těchto podmínek se výrazně zhoršila i opakovatelnost výsledků<sup>16</sup>.

Pro analýzy některých kontaminantů začal být v minulém roce využíván též GC-MS systém vybavený iontovou pastí Polaris Q (Finnigan, USA). Předběžné poznatky s využitím alternativních měřicích módů lze shrnout následovně: *i*) pro rychlý „screening“, především neznámých vzorků, se jeví vhodné použít mód „Segment scan“, který ve snímaném rozsahu poskytuje plnou spektrální informaci, obdobně jako „Full scan“; *ii*) celkové odezvy analytů a poměr signálu k šumu jsou u „Segment scanu“ vyšší než u „Full scanu“; *iii*) velkou výhodou „Segment scanu“ je nenáročná příprava metody, tj. není nutné vybírat ionty a stanovovat časová okna jako v módu SIM, který má sice poměrně vysoké hodnoty poměru signálu k šumu (a tím nízký limit detekce), ale neposkytuje spektrální informaci; *iv*) při analýze vzorků obsahujících známé analyty v nízkých koncentracích je z hlediska dosažení nižšího limitu detekce vhodné použít mód  $MS^n$  (nejčastěji  $MS^2$ ).

První zkušenosti v současné době získáváme s instrumentací GC-TOF-MS Micromass GCT (Micromass, UK). Tento konkrétní typ instrumentu umožňuje měření hmotnosti iontů s přesností na 4 desetinná místa. Na rozdíl od kvadrupolových analyzátorů poskytuje TOF plnou spektrální informaci i na velmi nízkých koncentračních hladinách. Předběžné experi-

menty byly realizovány za podmínek mírně zrychlené analýzy (asi 3× kratší doba analýzy, než je nutná pro dokonalou separaci všech analytů). Obrázek 4 dokumentuje vyšetření extraktu vzorku jablek na obsah reziduí pesticidů. Při použití charakteristické hmotnosti iontu zvolené s přesností 0,01 Da byl nalezen pík tolylfluoridu na relativně nízké koncentrační hladině. Podle naměřeného MS spektra byl tento pík po srovnání s knihovnou NIST automaticky identifikován. Plánovány jsou experimenty využívající TOF-MS ve spojení rychlou LP-GC (viz 3.2.).

#### 4. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) představuje po GC druhou nejvýznamnější separační techniku využívanou v oblasti identifikace a kvantifikace organických kontaminantů. Při analýze širšího spektra analytů v komplexních maticích se však limitujícím faktorem může stát nedostatečná selektivita běžně používaného UV detektoru (řešení nepřináší ani detektor s diodovým polem, DAD). Z uvedeného důvodu jsou kladeny značné nároky na účinnost přečištění vzorků (v případě multireziduálních metod však bohužel nelze využít potenciálu, resp. specifity imunochemických a přibuzných prekoncentračních technik). Vícestupňová purifikace primárního extraktu však může vést vedle prodloužení doby přípravy vzorku ke snížení hodnot výtěžnosti některých analytů. Nízké hodnoty detekčních limitů i podstatně lepší selektivity fluorescenčního detektoru (FLD) lze využít jen u omezeného spektra kontaminantů; příkladem všeobecně rozšířené, rutinní aplikace HPLC-FLD v této oblasti je snad jen stanovení PAU.

##### 4.1. Spojení LC-MS

Systémy HPLC s hmotnostně-selektivním detektorem, které se dnes stávají nepostradatelnou součástí vybavení specializovaných laboratoří, zásadně rozšířily možnosti sledování polárních a termolabilních kontaminantů a jejich metabolitů i v komplexních maticích. Tato technika v zásadě umožňuje zjednodušení přípravy vzorku (viz dále), nicméně i zde je nutné zohlednit možné matriční efekty.

V praxi se nejčastěji ionizace analytů provádí za atmosférického tlaku (atmospheric pressure ionisation, API); výhodou tohoto rozhraní je účinné odstraňování mobilní fáze, celková robustnost a snadnost údržby. Oba používané módy API *i*) elektrosprej (ESI) a *ii*) chemická ionizace (APCI) splňují požadavky na účinnou a opakovatelnou ionizaci širokého spektra látek.

Praktická aplikace systému LC-API-MS s analyzátozem typu iontová past (Finnigan LCQ Deca) nám poskytla možnost rychlého zavádění nových metod pro nové cílové analyty, tedy značnou operativnost a flexibilitu při řešení konkrétních nálehačných problémů. Dalšími výhodami tohoto systému jsou: *i*) dosažitelnost velmi nízkých detekčních limitů (pro některé analyty v módu  $MS^2$   $i < 0,1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  – v závislosti na zakoncentrování vzorku); *ii*) spolehlivost při konfirmaci nálezů; *iii*) významná redukce doby třeba pro přípravu vzorků, která je dána schopností této techniky měřit za přítomnosti poměrně velkého množství matrice (díky vysoké selektivitě detekce

není separace analytů ve většině případů kritická). Zmínit se je ovšem třeba i o některých skutečnostech limitujících aplikace v oblasti kvantitativní stopové analýzy: *i*) větší rozptyl výsledků pro některé kombinace analyt-matrice; *ii*) často nespokojivá linearita kalibrační závislosti i v relativně malém koncentračním rozsahu a *iii*) složitá detekce analytů, pro které není k dispozici standard (predikce iontů v módu MS<sup>2</sup> je obtížná).

#### 4.1.1. Matriční efekty v LC-MS<sup>2</sup>

Jak již bylo naznačeno, ve stopové analýze se nejčastěji využívá detekce v tzv. MS<sup>2</sup> módu, při níž je snímán charakteristický dceřiný ion vzniklý z primárního (většinou molekulového) iontu daného analytu. Výsledkem je značné zlepšení poměru signálu k šumu (10–100 násobné) oproti měření realizovanému v režimu plných spekter („Full ms“). Při aplikaci této vysoce specifické detekce jsou přítomné matriční koextrakty v chromatogramu prakticky „neviditelné“, a proto není jejich přítomnost kritická z hlediska možných pozadových interferencí, jako je tomu u méně selektivních detektorů (např. UV). Na druhé straně však složky matrice mohou ovlivňovat odezvu analytů díky participaci v jednom nebo více z následujících procesů probíhajících v LC-MS rozhraní: *i*) vznik kapiček aerosolu; *ii*) desolvatace molekul analytu; *iii*) odpařování rozpouštědla; *iv*) ionizace analytů. Výsledkem těchto jevů je, že při stejné koncentraci analytu je jeho odezva v reálném vzorku odlišná od odezvy standardu v čistém rozpouštědle. Přestože zde existuje zdánlivá analogie s výše popsanými matričními efekty v GC (viz 3.1.1.), tyto jevy mají v LC-MS poněkud odlišný, mimořádně komplexní charakter. Zatímco u GC se matriční efekty ovlivňující přesnost výsledků odehrávají v nástřikovém prostoru, a tedy před vlastní separací komponent vzorku, v případě LC-MS k matričním efektům dochází na LC-MS rozhraní, tj. až po separaci. Tato skutečnost komplikuje možnost zobecnění poznatků týkajících se matričních efektů, neboť rozdílné, resp. změněné podmínky HPLC separace mohou vést ke změně množství nebo typu matričních složek koeluujičících se s daným analytem. Dalším významným rozdílem proti plynové chromatografii je, že zatímco při GC matrice přítomná ve vzorku většinou způsobuje zvýšení odezvy, v LC-MS dochází často k výraznému snížení signálu analytu, což může mít kritický dopad na detektabilitu analytů.

V rámci modelové studie vlivu různých faktorů na rozsah matričních efektů v LC-MS<sup>2</sup> jsme věnovali pozornost analýze reziduí vybraných relativně polárních pesticidů. Mimo jiné byly porovnány obě dostupné techniky ionizace, APCI a ESI. Přestože je často zmiňována lepší tolerance techniky APCI vůči matričním komponentám, v případě extraktu jablek cíleně kontaminovaného pesticidy nebyl v našich experimentech mezi oběma ionizačními technikami zjištěn významný rozdíl v matričních efektech. Tyto se nepodařilo eliminovat ani přečištěním primárních extraktů pomocí gelové permeační chromatografie, jinak běžně používané v multireziduálních metodách využívajících pro stanovení reziduí pesticidů GC. Přestože je vzorek při tomto čisticím kroku zbaven vysokomolekulárních koextraktů, tyto zřejmě nejsou identické s matričními komponentami zodpovědnými za matriční efekty.

V případě, že matriční efekt nelze zcela eliminovat změnou podmínek separace HPLC či přečištěním vzorku, je po-

užití kalibrace pomocí vnějších rozpouštědlových standardů nevhodné, neboť existuje riziko nesprávné kvantifikace cílových analytů (na rozdíl od GC může hrozit jak nadhodnocení, tak podhodnocení výsledku).

V rámci jedné z našich studií<sup>15</sup> jsme se zaměřili na porovnání správnosti výsledků dosažených pomocí tří různých kalibračních technik: *i*) použitím vnějších rozpouštědlových standardů (spolehlivý přístup, avšak časově náročný, je nutné mít k dispozici vhodný materiál neobsahující rezidua standardů), *ii*) použitím vnějších matričních standardů a *iii*) technikou „echo-píku“ (standard obsahující analyt(y) je nastříknut s krátkým časovým posunem). Vzorky jablek byly cíleně kontaminovány pesticidy na dvou různých známých koncentračních hladinách 0,01 µg.ml<sup>-1</sup> a 0,1 µg.ml<sup>-1</sup>. Takto připravené vzorky byly posléze analyzovány stejně, jako kdyby se jednalo o neznámé vzorky, a z kalibrační závislosti byla vypočtena jejich koncentrace a poté porovnána se správnou hodnotou. Použití standardů v čistém rozpouštědle pro kalibraci se ukázalo být zcela nevhodné u analytů, které vykazují matriční efekt. Zatímco v literatuře se často diskutuje pouze potlačení odezvy analytů vlivem matrice, z našich experimentů vyplývá, že matriční efekt může být i vyšší než 100 %; docházelo tudíž k nadhodnocení výsledku (carbendazim, thiabendazol). Matriční kalibrace je na druhé straně poměrně spolehlivý způsob dosažení kvalitních výsledků. Technikou vnitřního standardu („echo píka“) bylo pro 6 z 8 pesticidů dosaženo správných výsledků, přičemž tato metoda navíc umožňuje odbourání pracné přípravy matričních standardů. Studie v této oblasti pokračují.

*V této práci jsem shrnula zkušenosti a uvedla některé zajímavé výsledky kolektivu laboratoře Ústavu chemie a analýzy potravin VŠCHT zabývající se problematikou environmentálních kontaminantů a chemickou bezpečností potravin. Jmenovitě chci poděkovat svým kolegům a doktorandům (v některých případech již bývalým) – S. Duškovi, M. Godulovi, K. Holadové, V. Kocourkovi, K. Alterové-Maštovské, J. Poustkovi a J. Křivánkové-Zrostlíkové za optimismus, se kterým se vrhali do nástrah stopové analýzy.*

#### LITERATURA

- Hajšlová J., Kocourek V., Poustka J., Cuhra P.: Chem. Listy 92, 777 (1998).
- Hajšlová J., v knize: *Environmental Contaminants in Food* (Moffat C. F., Whittle K. J., ed.), kap. 7. Sheffield Acad. Press, Sheffield – Boca Raton 1999.
- Kvalimetrie 7: Validace analytických metod*. EURACHEM-ČR, Praha 1998.
- Council Directive 97/57/EC, Off. J. European Com. L265, 87 (1997).
- Horwitz W., Kamps L. R., Boyer K. W.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63, 1344 (1980).
- FAO/IAEA in collaboration with AOAC/IUPAC/EURACHEM: *Practical Approach to Validation Methods for Analyses of Residues of Pesticides in Food*. FAO/IAEA, Vienna 1999.
- Lehotay S., Hajšlová J.: Trends Anal. Chem., v tisku.
- Hajšlová J., Holadová K., Kocourek V., Poustka J., Go-

- dula M., Cuhra P., Kempný M.: *J. Chromatogr.*, A 800, 283 (1998).
9. Dušek B., Hajšlová J., Kocourek V.: zasláno do tisku.
  10. Godula M., Hajšlová J., Alterová K.: *J. High Resol. Chromatogr.* 22, 395 (1999).
  11. Godula M., Hajšlová J., Maštovská K., Křivánková J.: *J. Sep. Sci.* 24, 355 (2001).
  12. Zrostlíková J., Hajšlová J., Godula M., Maštovská K.: *J. Chromatogr.*, A 937, 73 (2001).
  13. Maštovská K., Hajšlová J., Godula M., Křivánková J., Kocourek V.: *J. Chromatogr.*, A 907, 235 (2001).
  14. Maštovská K., Lehotay S. J., Hajšlová J.: *J. Chromatogr.*, A 926, 291 (2001)
  15. Zrostlíková J., Hajšlová J., Poustka J.: zasláno do tisku.
  16. Maštovská K.: *Dizertační práce*. VŠCHT, Praha 2001.

**J. Hajšlová** (*Department of Food Chemistry and Analysis, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Trace Analysis of Organic Contaminants – Examples of Application of Advanced Instrumental Techniques for Examination of Foodstuffs and Biotics**

Multiresidue methods employing various chromatographic techniques are currently used for determination of a wide range of semivolatile organic contaminants that may occur in food or environmental biotic matrices. Conceivable strategies aimed at improvement of performance characteristics of such methods are presented in this paper. Examples demonstrating applicability of advanced instrumental approaches such as fast GC and GC or LC coupled with mass spectrometry are provided. The quality of generated data is discussed.