

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Stanovení perzistentních organohalogenových polutantů
metodou GC/MS/MS

Disertační práce

Mgr. Roman Grabic

Praha, 2006

Poděkování:

Rád bych poděkoval Ing. Vladimíru Pekárkovi, CSc., který je duchovním otcem naší laboratoře a potažmo i této práce, za všechny ideje, nápady a přátelství.

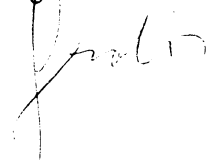
Děkuji prof. RNDr. Věře Pacákové, CSc. za cenné připomínky k mé práci, pomoc s publikační činností a neustálý mírný nátlak, bez něhož bych práci nikdy nedokončil.

Také děkuji vedení Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě, mým spolupracovníkům a mé rodině.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně za použití uvedené literatury a po odborných konzultacích s vedoucí disertační práce.

Mgr. Roman Grabic

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Gralic', written over the printed name.

Obsah

1	STANOVENÍ PERZISTENTNÍCH ORGANOHALOGENOVÝCH POLUTANTŮ METODOU GC/MS/MS.....	3
1.1	Úvod.....	3
1.2	Cíle práce.....	4
2	STRUKTURA A VLASTNOSTI STUDOVANÝCH LÁTEK.....	5
2.1	PCDD/F.....	5
2.2	PCB.....	6
2.3	PBDE.....	8
2.4	OCP.....	9
3	VÝVOJ A OPTIMALIZACE METOD STANOVENÍ POP.....	10
3.1	Úprava vzorků pro instrumentální analýzu.....	10
3.1.1	Extrakce.....	10
3.1.1.1	Extrakce kapalných vzorků.....	10
3.1.1.2	Extrakce pevných vzorků.....	13
3.1.1.3	Extrakce biologických materiálů.....	15
3.1.1.4	Extrakce odebraných vzorků ovzduší.....	16
3.1.2	Čištění extraktu.....	16
3.2	Chromatografická separace.....	21
3.2.1	PCDD/F.....	21
3.2.2	PCB.....	28
3.2.3	PBDE.....	34
3.2.4	OCP.....	35
3.3	MS/MS detekce.....	36
3.3.1	Popis principu funkce iontové pasti a režimu měření dat MS/MS.....	38
3.3.2	PCDD/F.....	41
3.3.3	PCB.....	73
3.3.4	PBDE.....	86
3.3.5	OCP.....	87
4	PUBLIKAČNÍ VÝSTUPY Z VÝVOJE METOD A PŘÍKLADY APLIKACÍ.....	93
5	ZÁVĚR.....	123
6	SEZNAM LITERATURY.....	125

Seznam zkratek

(C)RM	(certifikovaný) referenční materiál
(HR)GC	(vysokoučinná) plynová chromatografie
A/D	analogově/digitální
ACE (PCE)	urychlená (tlaková) extrakce rozpouštědlem
DCM	dichlormetan
DDD	dichlordifenyl dichloretan
DDE	dichlordifenyl dichloretylen
DDT	dichlordifenyl trichlormethylmetan
ECD	detektor elektronového záhytu
EPA	agentura pro ochranu životního prostředí
GPC	gelová permeační chromatografie
HCB	hexachlorbenzen
HCH	hexachlorcyklohexan
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HRMS	vysokorozlišující hmotnostní spektrometrie
IT	iontová past
MAE	extrakce v přítomnosti mikrovln
MPZ	mezinárodní porovnávací zkouška
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
OCP	organochlorové pesticidy
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PBDE	polybromované difenyletery
PCB	polychlorované bifenyly
PCDD	polychlorované dibenzo - p - dioxiny
PCDF	polychlorované dibenzofurany
PCN	polychlorované naftaleny
POP	perzistentní organické polutanty
RF	radio(vysoko)frekvenční napětí
RRF	relativní odezvový faktor
SFE	superkritická fluidní extrakce
SIM	mód MS - snímání izolovaných iontů
SPE	extrakce na pevnou fázi
SPM	polopropustná membrána
SPMD	polopropustná membrána pro vzorkování

1 Stanovení perzistentních organohalogenových polutantů metodou GC/MS/MS

1.1 Úvod

Průmyslová revoluce v polovině 19. století odstartovala rozvoj chemického průmyslu, který dodával nové materiály a sloučeniny nejen pro jiná průmyslová odvětví, ale i pro požadavky zemědělství. V široké paletě nově syntetizovaných látek skvělých užitkových parametrů se nacházely také sloučeniny, u nichž teprve po čase byly nalezeny nepříznivé účinky na zdraví lidí i zvířat či na ekosystém jako takový. Další látky vznikají při průmyslových procesech jako vedlejší a nežádoucí produkty.

Sloučeniny vyznačující se odolností vůči degradačním mechanismům jako je fotolýza, chemické či biologické odbourání bývají nazývány perzistentní organické polutanty (POP). Kontaminace životního prostředí POP se stala tak významným problémem, že je řešena na mezinárodní úrovni. Sekci POP má UNEP (United Nation Environment Programme), který také zavedl obecná kritéria pro POP látky:

1. persistence (poločas ve atmosféře je větší než 2 dny, poločas ve vodě, půdě a sedimentu je 2-6 měsíců)
2. bioakumulace (poměr biokoncentračního faktoru (BCF) a bioakumulačního faktoru (BAF) $BCF/BAF=1000-5000$ v rybách, nejsou-li tato data dostupná, používá se hodnota rozdělovacího koeficientu oktanol/voda $Kow >10\ 000$, popř. $\log Kow > 4$)
3. toxicita
4. těkavost (tenze par <1000 Pa)
5. transport na dlouhé vzdálenosti
6. biodostupnost.

Výsledkem aktivit na této úrovni je řada mezistátních úmluv o POP, nejnovější je Stockholmská úmluva o perzistentních polutantech, která byla ratifikována Českou republikou v roce 2004. V tomto dokumentu se smluvní strany zavazují k odstranění POP (tzn. ukončení jejich výroby a zákazu použití) uvedených v přílohách (organochlorové pesticidy (OCP) Aldrin, Dieldrin, Endrin, hexachlorbenzen (HCB), Mirex, Toxafen, Chlordan a polychlorované bifenyly (PCB)), k omezení používání 1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethanu DDT (povoleno v případě likvidace přenašečů chorob) a k omezení POP neúmyslně vznikajících či uvolňovaných lidskou činností (PCB, HCB a polychlorovaných dibenzodioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F)).

V České republice je v současné době v platnosti několik právních norem dotýkajících se POP a to jak obecných, tak i vyhlášek či zákonů stanovujících maximální přípustné limity některých POP v potravinách, krmivech, půdě, odpadní a pitné vodě či v emisích ze spaloven.

1.2 Cíle práce

Tato práce vznikla na základě požadavků vyvinout citlivou, selektivní a finančně dostupnou analytickou metodu pro stanovení halogenovaných POP. Ze začátku byla pozornost věnována hlavně PCDD/F a PCB, později byl rozsah studovaných látek rozšířen na polybromované difenylethery (PBDE) a halogenované pesticidy. Byly optimalizovány metody extrakce, následného přečištění vzorku a chromatografické separace složitých směsí izomerů. Bylo nutné vyvinout a optimalizovat MS/MS techniku detekce, která na nové generaci hmotnostních detektorů na principu iontové pastí s externím iontovým zdrojem a regulací tlaku kolizního plynu (GCQ a PolarisQ) nebyla v té době publikována. Dalším úkolem bylo aplikovat vyvinuté metody pro stanovení PCDD/F, PCB, PBDE a OCP v různých matricích (popílky, sedimenty, ovzduší, tkáně a tělní tekutiny).

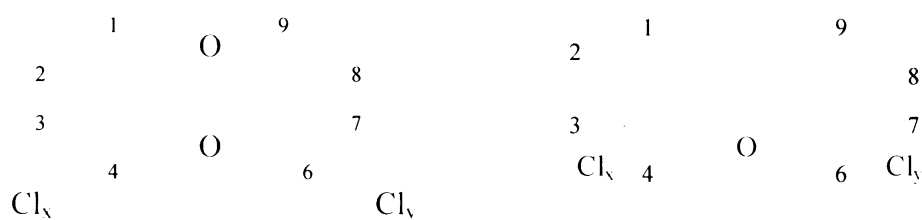
- Vyvinout a optimalizovat MS/MS metody pro stanovení PCDD/F, PCB, PBDE a OCP
- Optimalizovat GC metody pro MS/MS metody detekce
- Ověřit parametry vyvinutých metod
- Aplikovat metody na analýzy reálných vzorků jak biologických (tkáně, krev, mateřské mléko, potraviny apod) a také pro analýzy abiotických materiálů zejména popílků
- Ověřit stabilitu metod v praktickém použití

2 Struktura a vlastnosti studovaných látek

2.1 PCDD/F

Polychlorované dibenzo-p-dioxiny (PCDD) a polychlorované dibenzofurany (PCDF) jsou tricyklické, planární, aromatické sloučeniny obsahující 1-8 atomů chloru v molekule. Obecné strukturální vzorce jsou uvedeny na obrázku 1. Celkem existuje 75 různých polohových a substitučních izomerů (tzv. kongenerů) u PCDD a 135 u PCDF.

obrázek 1 Obecné vzorce PCDD a PCDF



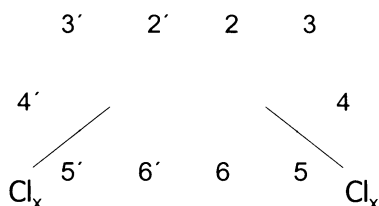
PCDD/F nikdy nebyly vyráběny pro průmyslové použití. Vznikají jako nežádoucí vedlejší produkty spalovacích procesů, chemických a metalurgických výrob, v menší míře též enzymatickými reakcemi v živých organismech [1]. Ve většině těchto procesů nejsou reakční mechanismy příliš selektivní a vedou ke vzniku velkého množství kongenerů.

Toxikologicky nejvýznamnější jsou kongenery se substituovanými pozicemi 2378, z celkového počtu 210 možných izomerů je jich 17 – tzv. „dirty“ PCDD/F. Pro zjednodušenou interpretaci výsledných hodnot koncentrací se používá hodnota TEQ – toxický ekvivalent 2378 TCDD, kdy koncentrace každého ze 17-ti 2378 substituovaných PCDD/F je vynásobena faktorem ekvivalentu toxicity TEF. Hodnoty TEF jsou výsledkem toxikologických studií chování PCDD/F. V současnosti jsou nejvíce používány hodnoty TEF podle Van den Berga [2]. TEQ je hodnota zakotvená jak ve stávající české, tak i v evropské legislativě [3-8]. Tento princip zjednodušuje analýzu PCDD/F na stanovení koncentrací 17-ti izomerů, případně ještě koncentrací homologových skupin (např. sumy tetraCD, tetraCDF apod). Analýzy všech izomerů se používají většinou pouze pro vědecké účely, jako je studium mechanismů vzniku nebo degradace PCDD/F.

2.2 PCB

Polychlorované bifenyly (PCB) jsou bicyklické sloučeniny obsahují 1-10 atomů chlorů v molekule. Obecný strukturní vzorec je uveden na obrázku 2.1. Celkem existuje 209 různých kongenerů PCB.

obrázek 2 Obecný vzorec PCB

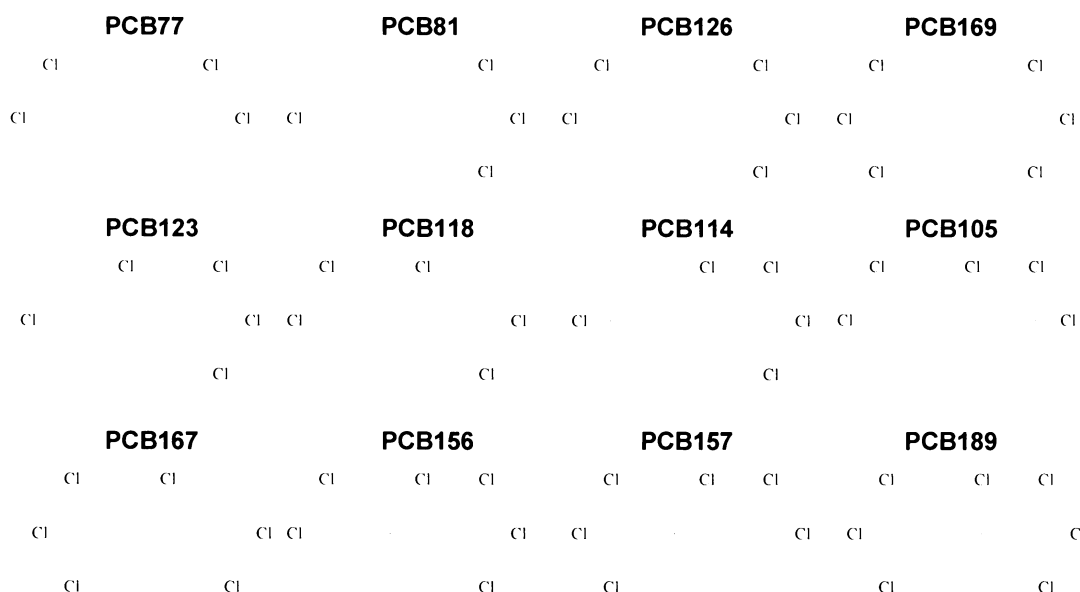


Místo systematického názvu se vžil a je široce používáno označení jednotlivých kongenerů pořadovými čísly od 1 do 209. Přehled všech kongenerů a jejich přiřazení k systematickým názvům bylo vypracováno Ballschmitemerem [9]. Tento systém byl několikrát revidován, došlo k malým změnám v pořadí, a poté ho akceptoval IUPAC jako názvosloví PCB izomerů.

PCB jsou průmyslovým produktem; byly vyráběny ve značných množstvích až do poloviny 70-tých let, u nás do r. 1984. Vyráběly se elektrofilní chlorací bifenyly, výsledné produkty se pak rozdestilovávaly do jednotlivých směsí (ve světě Aroclory, Kanechlory a u nás Delory). Ty byly používány jako dielektrika, izolanty, aditiva do nátěrových hmot a tmelů, teplosměnné kapaliny apod. Dalším zdrojem PCB jsou tepelné procesy jako je spalování fosilních paliv a odpadů, metalurgické procesy, eventuálně některé chemické procesy. Kvalitativní profil takto produkováných PCB je zásadně odlišný od běžného profilu nalézaného ve složkách životního prostředí, protože při vzniku těchto PCB se uplatňují jiné mechanismy.

Fyzikálně-chemické vlastnosti PCB jsou více různorodé než u ostatních polychlorovaných sloučenin, což je způsobeno jednoduchou bifenylovou vazbou. V závislosti na substituovaných polohách mohou oba aromatické kruhy zaujímat polohy, které jsou energeticky nejvýhodnější. V jedné řadě izomerů pak existují jak téměř koplární, tak perpendikulární PCB. Mono a non-ortho substituované kongenery vykazují v živých organismech aktivitu podobnou PCDD/F (dioxin-like PCB). Jejich přehled se strukturními vzorci je uveden na obrázku 3.

obrázek 3 Strukturní vzorce PCB s „dioxin-like“ aktivitou



Legislativa EU požaduje zahrnutí těchto PCB do monitorovacích programů s tím, že od r. 2004 budou pro „dioxin like“ PCB vytvořeny limity pro potraviny, krmiva a potravinové doplňky. Vzhledem k tomu, že podíl PCB na celkové sumě TEQ silně kolísá v závislosti na místě původu a také na druhu potraviny či krmiva (rozdíly mezi rostlinnými, rybími a živočišnými produkty), půjde o velmi výrazné zpřísnění, které se dotkne hlavně zemí, kde produkce a používání PCB byly zakázány později.

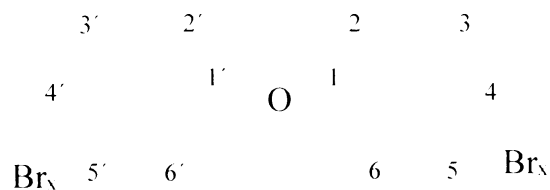
K analýze PCB může být přistupováno různými způsoby. Rutinní analýzy pro kontrolu potravin, krmiv a odpadů jsou prováděny na základě legislativy [7, 8, 9] jako analýzy „indikátorových kongenerů“ PCB. To jsou PCB 28, 52, 101, 138, 153 a 180. Tyto kongenery indikují přítomnost technických směsí PCB. PCB 28 a 52 jsou většinové kongenery v níže vrocích směsích jako je DELOR103 nebo AROCLOR 1242. PCB 153, 138 a 180 jsou výrazné složky DELORu 106 nebo AROCLORu 1260.

Pro potřeby stanovení podílu PCB na TEQ se provádějí analýzy 12-ti non- a mono-ortho substituovaných PCB, jak je uvedeno výše. Pro identifikace zdroje kontaminace, pro zjištění míry přeměny PCB v organismech a pro objasnění mechanismů vzniku či degradace PCB je nutno provádět kvantifikaci pokud možno co největšího množství PCB kongenerů ve vzorku. Tyto tzv. izomerově specifické analýzy jsou z analytického hlediska nejnáročnější na čas i instrumentaci.

2.3 PBDE

Polybromované difenylethery (PBDE) jsou skupina látek průmyslově produkováných jako retardéry hoření přidávaná do plastů a textilií, dielektrik apod. Obsah PBDE v plastech může činit až 30%. V roce 1992 činila roční produkce 40 000 tun a od té doby stále roste [10, 11]. PBDE nejsou v plastech kovalentně vázány a jsou postupně uvolňovány do okolního prostředí. Jak vyplývá z jejich struktury (obr. 4), jedná se o látky málo těkavé s velkou molekulovou hmotností, tudíž o resistantní polutanty, které jsou silně hydrofobní a dobře rozpustné v tucích. Vzhledem ke stále většímu využití plastů a nedořešené recyklaci a likvidaci plastových odpadů se PBDE mohou stát významným zdrojem kontaminace životního prostředí, neboť na rozdíl od chlorovaných persistentních látek (PCB, PCDD/F apod.), jejichž koncentrace v složkách životního i v mateřském mléce klesá, obsah PBDE exponenciálně roste [12, 13, 14].

obrázek 4 Obecný vzorec PBDE

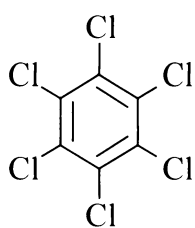


Komerčně jsou vyráběny tři směsi, které obsahují hlavně deka- (75 % produkce), okta- (15 %) nebo penta-BDE (10 %). Nižší deriváty (penta-BDE) jsou více toxické než deka-BDE [15]. V komerčních produktech, např. Bromkalu 70-5DE, se vyskytuje podstatně méně kongenerů než ve srovnatelných komerčních směsích PCB. Hlavními složkami Bromkalu 70-5DE jsou tri- až hexa- bromované kongenery (pro zjednodušení byla zavedena stejná nomenklatura jako u PCB). Stejně jako se používá pro zjednodušení analýz PCB pouze stanovení indikátorových kongenerů, tak v případě PBDE jsou většinou analyzovány pouze následující kongenery: PBDE 28, 47, 99, 100, 153, 154, 183.

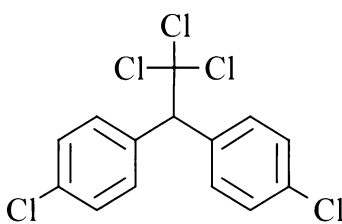
2.4 OCP

Do skupiny polutantů nazývané organochlorové pesticidy patří různorodá skupina látek od jednoduchých jako jsou např. chlorovaných benzenů až po komplikované směsi tricyklických sloučenin jako je Toxafen. V této práci jsou uvedeny výsledky experimentů pro nejčastěji analyzovanou skupinu látek, z nichž valná část je uvedena ve Stockholmské konvenci. Názvy a strukturální vzorce OCP jsou uvedeny v obrázku 5.

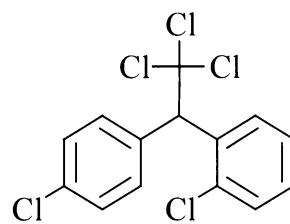
obrázek 5 Vzorce důležitých organochlorovaných pesticidů



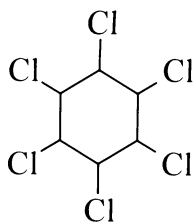
Hexachlorbenzen HCB



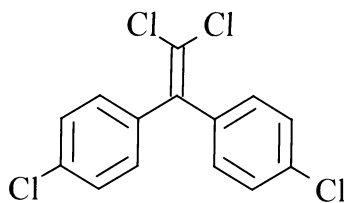
ppDDT



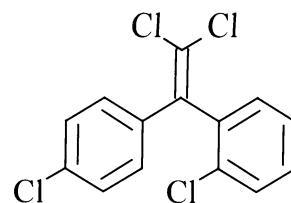
opDDT



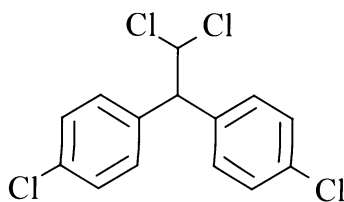
Hexachlorcyklohexan HCH



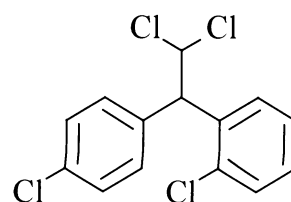
ppDDE



opDDE



ppDDD



opDDD

3 Vývoj a optimalizace metod stanovení POP

POP se vyskytují v životním prostředí i v živých organismech v širokém koncentračním rozmezí a v komplikovaných maticích. Jak je zřejmé z předchozí kapitoly, dalším faktorem, který komplikuje jejich analýzu, je výskyt velkého počtu izomerů. Z těchto skutečností plynou vysoké nároky jak na extrakci a čištění vzorků, tak i jejich separaci a detekci.

3.1 Úprava vzorků pro instrumentální analýzu

Úprava vzorku je nejdůležitější krok v celé metodě stanovení POP a je samozřejmě největším zdrojem nejistoty analytického výsledku. Z požadavku na velmi nízké meze stanovitelnosti vyplývá nutnost zpracovávat velká množství vzorků. Pokud musí být meze stanovitelnosti na řádové úrovni desítek fg/g jako je v případě krmiv a potravin, jdou hmotnosti navážek vzorků až do stovek gramů. Surové extrakty v závislosti na analyzované matici obsahují vysoká množství koextrahovaných látek, jako jsou např. lipidy, huminové látky, barviva apod.

3.1.1 Extrakce

Pro extrakci POP je používána řada metod jak principiálně i technicky velmi jednoduchých (extrakce z kapaliny do kapaliny, extrakce v Soxhletově extraktoru), tak i velmi sofistikovaných (superkritickou fluidní extrakce, extrakce v mikrovlnném poli), které zároveň umožňují hrubé přečištění vzorku.

3.1.1.1 Extrakce kapalných vzorků

POP jsou nepolární látky, jejichž rozpustnost ve vodě je velmi nízká – řádově v rozmezí pg až $\mu\text{g/l}$ vody. Nicméně se POP vyskytují v reálných vzorcích vody i ve formě vázané na koloidní, případně i větší částice. Pokud vzorek obsahuje větší množství těchto pevných částic, musí být separovány a extrahovány zvlášť [16]. Nejrozšířenějším postupem extrakce pro kapalně vzorky je extrakce z kapaliny do kapaliny, kdy je jako extrakční médium použito nepolární rozpouštědlo – většinou n-alkan (pentan nebo hexan), dichlormethan (DCM) nebo toluen [16, 17]. V případě, kdy extrahovaný vzorek není vodný (absorpční média pro odběr emisí, která tvoří látky mísitelné s vodou, jako jsou ethoxyethanol nebo diethylenglykol), je ke vzorku přidávána voda pro zvýšení polaritu extrahované směsi. Další

relativně rozšířenou technikou je extrakce pevnou fází (SPE) s využitím nikoliv kolonek, ale extrakčních disků [18, 19]. Může být použita i pro extrakci jiných než vodných vzorků, nicméně limitujícím prvkem je zde množství pevných částic ve vzorku a jeho viskozita. Tyto faktory v některých případech mohou znemožnit extrakci odpovídajícího množství vzorku.

Odlišnou metodou, která v sobě spojuje extrakci i odběr vzorku, je použití semipermeabilních membrán (SPMD, semipermeable membrane device). Jsou to membrány vyrobené z polyethylenu, plněné syntetickým lipidem, které umožňují extrakci POP rozpuštěných ve vodné fázi s výslednou citlivostí řádově vyšší než při klasických extrakčních technikách (při 30-ti denní expozici se pohybují „extrahované“ objemy v řádech desítek litrů). Základní principy SPMD včetně matematického popisu, kalibrace, korekcí na různé vlivy i příklady praktických aplikací jsou velmi dobře popsány [20-25].

Metody použité v této práci

Pro analýzy kapalných vzorků jsou v naší laboratoři používány dva postupy založené na extrakci z kapaliny do kapaliny a metoda SPMD. Nízké koncentrace, složitost čistících kroků a použití hmotnostní detekce vyžadují použití metody izotopového ředění (každý analyt má svůj ^{13}C značený analog přidaný před zahájením extrakce ke vzorku) nebo metody vnitřního standardu (^{13}C značená sloučenina slouží pro kvantifikaci více nativních sloučenin). Výhodami těchto metod je přímá kvantifikace z poměru odezev nativního analytu a vnitřního standardu, dále že není nutné pracovat s celým objemem extraktu a znát jeho přesný objem. Tato skutečnost byla použita pro vyvinutí zjednodušené metody extrakce dostačující pro analýzy PCB a OCP ve vzorcích vod: Známý objem vody, ke kterému je přidáno podle očekávané koncentrace 10-100 ng izotopově značených standardů (pro OCP $^{13}\text{C}_6$ značený gama HCH a $^{13}\text{C}_{12}$ ppDDE, pro PCB 10 $^{13}\text{C}_{12}$ značených mono- až dekaloro PCB), je extrahován 3 ml hexanu po dobu 30-ti minut na třepačce. Jsou odebrány 2 ml extraktu, ke kterým je přidán „recovery“ standard (standard pro korekci chyby zakoncentrování, nástřiku a změny citlivosti hmotnostního detektoru mezi jednotlivými nástřiky). Extrakt je poté zakoncentrován odpařením pod proudem dusíku nebo argonu na objem 100 - 250 μl . Opakovatelnost i správnost metody jsme ověřili analýzami vzorků vody obohacených nativními pesticidy. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

tabulka 1 Výtěžnosti OCP z obohacených vzorků vody

	Opakovatelnost výtěžnosti OCP z vody			
	Koncentrační hladina 100 ng/l		Koncentrační hladina 10 ng/l	
	průměrná výtěžnost	RSD	průměrná výtěžnost	RSD
alfaHCH	102%	7%	90%	8%
betaHCH	63%	13%	49%	9%
gamaHCH	95%	6%	88%	10%
deltaHCH	74%	16%	61%	14%
ppDDE	91%	7%	80%	9%
ppDDD	91%	4%	87%	6%
ppDDT	98%	4%	80%	11%

V tabulce jsou uvedeny průměrné výtěžnosti sedmi výsledků stanovení OCP ve vzorcích vody (1 l), ke kterým bylo přidáno 100 a 10 ng nativních OCP. Lepší výtěžnosti bylo dosaženo pro vyšší koncentrace OCP, také opakovatelnost byla pro většinu OCP lepší na vyšší koncentrační hladině, nicméně nejhorší opakovatelnost byla 16% RSD pro delta HCH na koncentrační hladině 100 ng/l.

Tato metoda je vhodná pro relativně čisté vzorky, kdy lze úplně vypustit čistící krok. Pro vzorky, kde je nutné dosáhnout velmi nízkých mezí stanovitelnosti a které obsahují i organickou polární fázi, je nutné použít zdoluhavější postup, při němž jsou vzorky opakovaně extrahovány v dělicích baňkách.

Celý objem vzorku nebo jeho přesně známý alikvotní podíl je převeden do dělicí nálevky. Ke vzorku jsou přidány izotopicky značené standardy a je zředěn demineralizovanou vodou v poměru 1:1 (pro vzorky emisí). Extrakce je provedena třikrát hexanem, první extrakce minimálně 1/10 celkového objemu, další již polovičním množstvím. Spojené hexanové extrakty jsou zahuštěny a vysušeny filtrací přes vrstvu Na₂SO₄. V rámci validace metody pro akreditaci jsme ověřili účinnost extrakce PCDD/F ze vzorků absorpčních roztoků uměle obohacených nativními PCDD/F. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

tabulka 2 Výtěžnost a opakovatelnost stanovení 10-ti izomerů v uměle připravených vzorcích absorpčních roztoků

	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	průměr stanovení	přidané množství	výtěžnost	SD	RSD
	pg/vzorek											
2378TCDD	518	530	548	506	535	465	532	519	500	104%	27.3	5.3%
12378PeCDD	516	503	497	512	527	496	502	508	500	102%	11.3	2.2%
123478HxCDD	541	567	508	507	492	521	491	518	500	104%	27.6	5.3%
1234678HpCDD	489	528	505	515	493	506	545	512	500	102%	19.7	3.9%
OCDD	612	650	610	615	578	626	607	614	500	123%	21.6	3.5%
2378TCDF	574	582	517	542	480	564	525	541	500	108%	36.2	6.7%
12378PeCDF	581	495	622	580	553	476	564	553	500	111%	51.1	9.2%
123478HxCDF	528	453	412	468	459	462	480	466	500	93%	34.6	7.4%
1234678HpCDF	526	478	492	524	527	594	491	519	500	104%	38.6	7.4%
OCDF	415	442	469	461	443	417	413	437	500	87%	22.8	5.2%

E1 až E7 jsou individuální výsledky stanovení PCDD/F ve vzorcích, které byly připraveny přidáním 500 pg standardu 10-ti PCDD/F do 200 ml etoxyetanolu. Tyto vzorky pak byly zpracovány výše uvedenou metodou. Z výsledků je patrné, že výtěžnost extrakce PCDD/F na koncentrační hladině 500 pg, se pohybuje okolo 100% s relativní směrodatnou odchylkou 4 až 9%.

3.1.1.2 Extrakce pevných vzorků

Charakter matrice pevných vzorků je mnohem proměnlivější a také metody extrakce nabízejí širší možnosti. V podstatě lze pevné vzorky rozdělit na matrice s aktivním povrchem (popílky, zeolity, bentonity apod.) a na matrice s neaktivním povrchem (půdy, sedimenty, odpady, apod.). Matrice aktivní je třeba před vlastní extrakcí deaktivovat, jinak je extrakční účinnost velmi nízká, speciálně pro látky typu PCDD/F. Pro asi nejvíce analyzované matrice typu popílku jsou popsány metody deaktivace pomocí koncentrované HCl nebo kys. octové [16, 26, 27]. Pro další matrice s aktivním povrchem je však tento přístup nepoužitelný. Např. zeolity a bentonity, látky běžně analyzované při kontrole doplňků do krmiv, vytvoří po digesci s HCl gel a výtěžnost vnitřních standardů pro výše chlorované PCDD/F nesplňuje normativní požadavky (vyšší než 25%). Řešením se ukázala deaktivace pomocí koncentrované kys. sírové.

Nejuniverzálnější a nejrozšířenější metodou extrakce je použití Soxhletova extraktoru. Do extrakční patry lze umístit dostatečně velké množství vzorku i filtry s deaktivovaným popílkem. Podle rozsahu extrahovaných POP je nutné měnit složení extrakční směsi. Pro stanovení OCP a PCB jsou postačující směsi n-alkanů s polárním rozpouštědlem, např. hexan a acetonem 3:1, popřípadě DCM. Pro stanovení PCDD/F mají nejvyšší extrakční účinnost aromatická rozpouštědla jako jsou benzen, toluen a xylen. Vzhledem k tomu, že benzen je prokázaný karcinogen, je prakticky výlučně používán toluen. Soxhletova extrakce je zakotvena ve většině technických norem pro stanovení POP [16, 17, 28, 29]. Nevýhodou metody je časová náročnost (min. 6 hodin pro OCP a PCB, 24 hod. pro PCDD/F).

Pro zvýšení průchodnosti laboratoře a také z důvodu nemožnosti automatizace Soxhletovy extrakce byly vyvinuty a dosáhly širokého rozšíření instrumentální extrakční techniky. Velmi rozšířená je superkritická fluidní extrakce (SFE) [30, 31, 32]. Tato metoda je velmi účinná, bohužel nepříliš selektivní a získané extrakty je obtížnější vyčistit. Z tohoto důvodu byla vyvinuty modifikace SFE, které zároveň slouží k frakcionaci a čištění extraktu v jednom kroku. Za různých tlakových a teplotních podmínek byly již v extrakčním kroku selektivně separovány PCB od PCDD/F [33]. Další velmi efektivní technikou je spojení SFE a kapalinové chromatografie, kdy extrahované analyty jsou zachyceny na různých typech adsorbentů (aktivní uhlí, modifikovaný silikagel atd) a poté separovány kapalinovou chromatografií [34]. Omezeními této metody jsou vysoká pořizovací cena a relativně malý objem extrakční komůrky.

Zrychlená extrakce rozpouštědlem (ACE), někdy nazývaná tlaková extrakce kapalinou (PSE), je další metodou, která byla zdokonalena až na komerčně dostupnou extrakční techniku [35, 36, 37]. Byly vyvinuty systémy, kde po extrakci následuje automatické přečištění vzorku na LC kolonách [35]. Nevýhodou je opět vysoká pořizovací cena.

Velmi účinná je také extrakce ve fokusovaném mikrovlnném poli (MAE). Metoda je popsána pro neaktivní matrice, zvláště půdy a sedimenty [38, 39, 40].

Metody použité v této práci

V běžné praxi používáme dvě metody extrakce – Soxhletovu extrakce a MAE. Použití MAE je limitováno relativně malou navázkou, max. 5g. a složením matrice (při optimalizaci se ukázala jako výhodná pro sedimenty a půdy). V principu lze použít stejné rozpouštědlové systémy s tím, že musí obsahovat ca 10-20% polární složky, která absorbuje mikrovlnné záření (k toluenu je přidáno 10% methanolu). V tabulce 3 je uvedeno porovnání metod. Je z ní patrné, že oproti Soxhletově extrakci je MAE mnohem méně časově náročná a spotřebovává méně rozpouštědla.

tabulka 3 Porovnání parametrů Soxhletovy extrakce s extrakcí ve fokusovaném mikrovlnném poli

	Soxhletova extrakce	Extrakce ve fokusovaném mikrovlnném poli
Navážka vzorku	až 50 g	do 5 g
Typ vzorku	popílky, půdy, potraviny, filtry absorpční materiály, polyuretanová pěna	práškové materiály - půdy, sedimenty nesmí to být matrice s aktivním povrchem
Doba analýzy	24 hodin	15 - 40 minut
Typ rozpouštědla	bez omezení	vždy směs obsahující polární složku
Objem rozpouštědla	100 - 600 ml podle velikosti extraktoru	50 - 100 ml
Cena aparatury	jednotky tis. Kč	několik set tisíc Kč
Provozní náklady	vyšší	nízké

Správnost obou metod průběžně kontrolujeme analýzou certifikovaných referenčních materiálů a také účastí v mezinárodních okružních rozborech.

3.1.1.3 Extrakce biologických materiálů

Zcela specifickými vzorky jsou biologické materiály, mezi které patří potraviny, vzorky tělních tkání, krve nebo mateřského mléka. Vyznačují se tím, že podléhají zkáze a samy také mohou být zdraví nebezpečné, speciálně vzorky podkožního tuku nebo krve. Tyto skutečnosti vyžadují zcela jiný režim laboratoře – použití jednorázového nádobí, důsledná desinfekce, očkování pracovníků, kteří přijdou s těmito vzorky do styku, zvláštní režim odpadového hospodářství a v neposlední řadě důsledné oddělení od analýz více kontaminovaných matric (půdy, popílky, ovzduší).

Obecně lze analýzu biologických materiálů rozdělit na analýzu matric s nízkým a vysokým obsahem tuků. Ke vzorkům s obsahem tuku do 5% jsou vnitřní standardy přidány před extrakcí, zatímco u tučnějších vzorků je vyextrahován tuk a teprve k němu jsou po zvážení přidány vnitřní standardy. Tento princip je zakotven i v legislativě, která se vztahuje k analýze potravin [41].

Metody použité v této práci

Extrakce tuku z pevných vzorků je prováděna v Soxhletově extraktoru po odstranění obsažené vody lyofilizací nebo přidáním bezvodého síranu sodného. Vyjímkou jsou vzorky s velmi vysokým obsahem tuku (máslo, lidský podkožní tuk apod.), ze kterých je tuk vytaven při 105 °C.

Vzorky krve a mateřského mléka jsou po vysrážení bílkovin extrahovány podobně jako kapalně vzorky. Navážený vzorek je po přidání izotopicky značených standardů v dělicí nálevce zředěn demineralizovanou vodou (čištěnou 30 min. hexanem) v poměru min. 1:1. Je k němu přidán amoniak (cca 2 ml na 10g vzorku), ethanol (methanol pro vzorky krevního séra) v objemu ředící vody a vzorek je prudce protřepán. Extrakce je provedena opakovaně směsí hexanu s dietylerem (1:1), min. 1/10 celkového objemu vzorku. Pro odstranění případně vzniklých emulzí je použito odstředění při 3000 rpm.

3.1.1.4 Extrakce odebraných vzorků ovzduší

Vzorky ovzduší jsou odebírány různými druhy aparatur a nacházejí se buď sorbované na pevnou fázi (filtr, polyuretanová pěna nebo sorbent typu XAD-2) nebo v kapalném absorpčním médiu [17, 42, 43]. Vzhledem k rozměrům filtrů a ostatních odběrových medií jsou vzorky extrahovány v Soxhletově extraktoru. Pro vzorky v kapalně fázi jsou používány metody uvedené v kapitole extrakce kapalných vzorků.

3.1.2 Čištění extraktu

Surové extrakty musí být zbaveny všech koextrahovaných látek, které pouhou přítomností v koncentracích o několik řádů vyšších znemožňují vlastní GC/MS analýzu. Pro vzorky s relativně nízkým obsahem extrahovaných nečistot je vhodná hydrolýza, event. sulfonace těchto látek koncentrovanou kyselinou sírovou. Před tímto krokem musí být extrakt vysušen (nejrozšířenější je použití sloupce bezvodého síranu sodného), a v případě, že obsahuje aromatická rozpouštědla, musí být převeden do rozpouštědla, které nereaguje s kys. sírovou (n-alkany nebo dichlormethan) [16, 17]. Nevýhodou takového čištění je destrukce některých sloučenin, které mohou být předmětem analýzy (pesticidy typu Aldrinu, Dieldrinu, polycyklické aromatické uhlovodíky apod.). Široce používané jsou proto metody nedestruktivního čištění extraktu – sloupcová chromatografie na Florisilu, silikagelu [44, 45] či gelová permeační chromatografie (GPC) [46, 47, 48]. Kapacita kolon je však nedostačující pro vysoká množství lipidů, která jsou nezbytná pro dosažení požadovaných mezí stanovitelnosti. Jednoduchá a instrumentálně nenáročná metoda pro odstranění velkých množství tuků (až 20g) ze vzorků je dialýza na polopropustné membráně (SPM) [49, 50].

Následné čištění extraktů pro ultrastopovou analýzu je v drtivé většině klasickou sloupcovou kapalinovou chromatografií na různých sorbentech (různé druhy silikagelu, Florisil, oxid hlinitý o různém stupni aktivity, aktivní uhlí). Používá se i preparativní HPLC.

Schéma čištění POP použité v této práci

Blokové schéma čistících postupů je znázorněno na obrázku č.6.

obrázek 6 Obecné blokové schéma čištění vzorků pro analýzu POP metodou GC/MS/MS

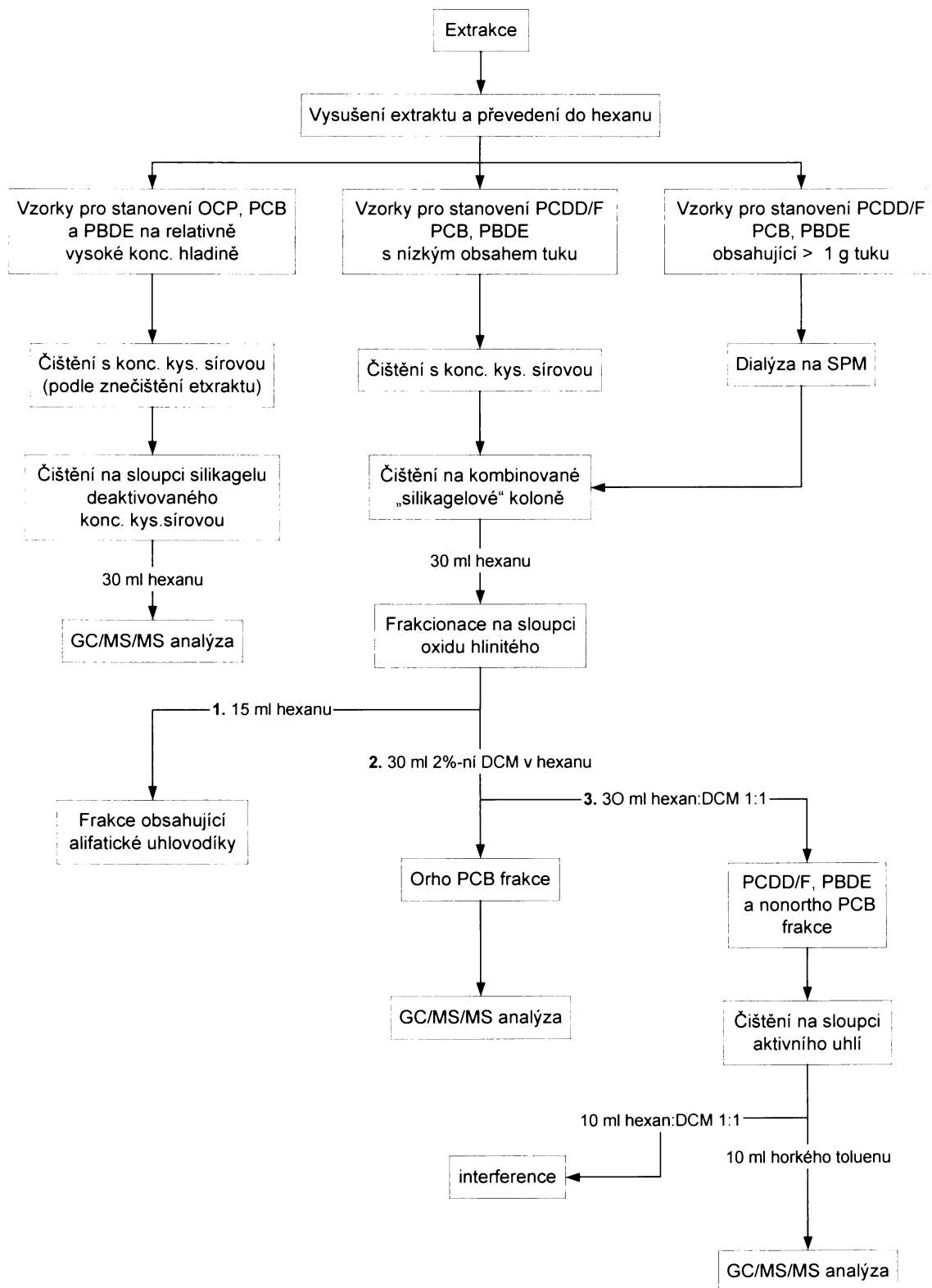


Schéma kolony plněné modifikovaným silikagelem je uvedeno v obrázku 7.

obrázek 7 Schéma kombinované „silikagelové“ kolony

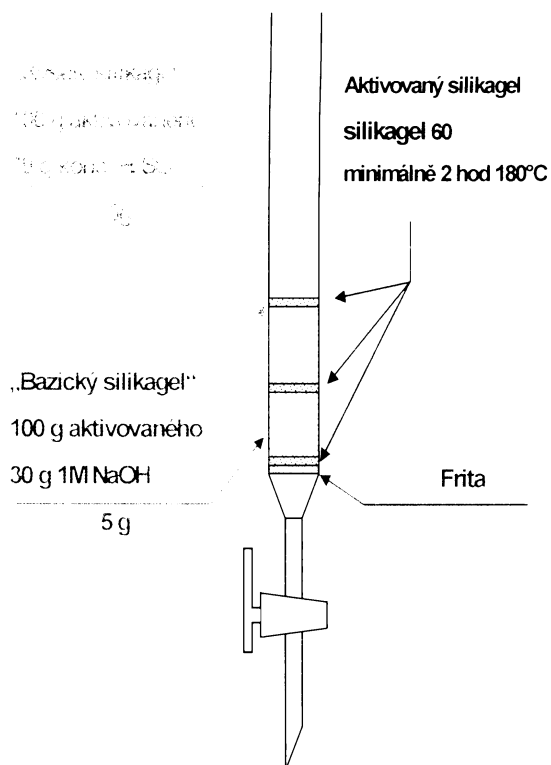
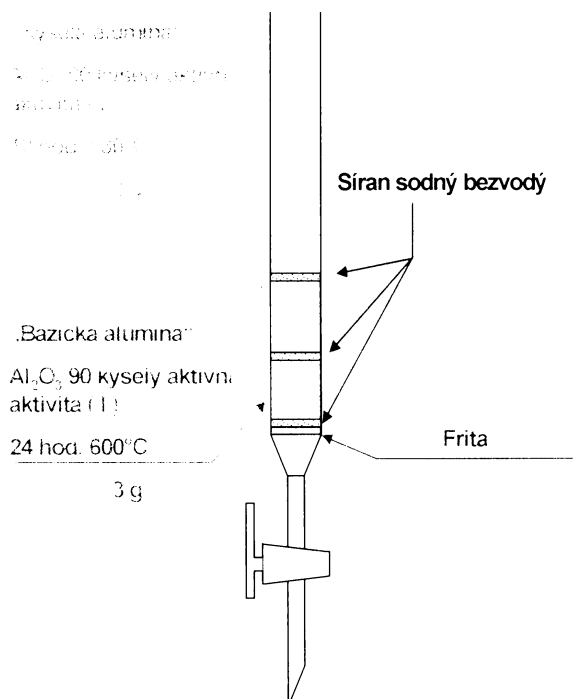


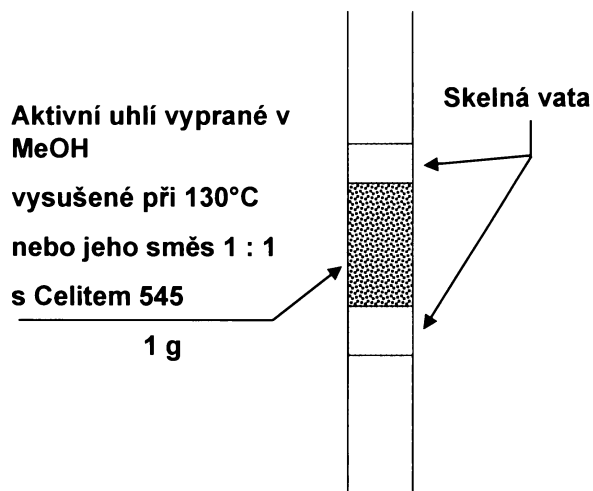
Schéma kolony plněná oxidem hlinitým o různé aktivitě je uvedeno v obrázku 8. V popisu je uveden typ oxidu hlinitého, teplota, při které je aktivován, čas potřebný k aktivaci a množství sorbentu. Všechny aktivované sorbenty uchováváme při teplotě 130°C, aby nedošlo k sorpci vody z ovzduší a tím ke změně aktivity.

obrázek 8 Schéma „aluminové“ kolony



Na obrázku 9 je znázorněna kolona plněná aktivním uhlím.

obrázek 9 Schéma kolony plněné aktivním uhlím



Odstranění velkého množství tuku je prováděno dialýzou vzorku přes polopropustnou membránu. Odvážené množství tuku je rozpuštěno v hexanu a převedeno do membrány, v případě živočišných tuků je někdy nutné použít přídavek DCM. Membrána je zavěšena do dialyzačního rozpouštědla (hexanu). Extrakt tuku je dialyzován 3x 24 hodin, podíly dialyzátu jsou spojeny, odpařeny na 1ml a čištěny jak je uvedeno výše. Účinnost odstranění tuku touto metodou je demonstrována v tabulce 4 pro rostlinný olej, vepřové sádlo a minerální olej.

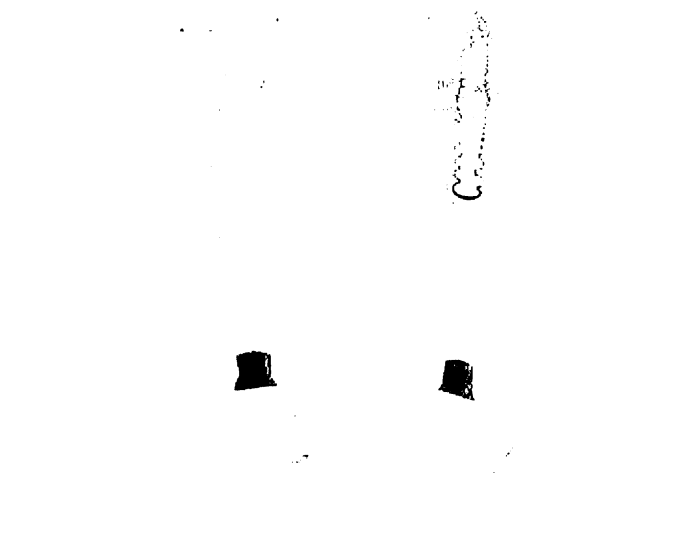
tabulka 4 Tabulka účinnosti odstranění matrice vzorku dialýzou přes SPM

Matrice	Množství matrice stanovené po aplikaci SPM [mg]				
	24 hod.	24 - 48 hod.	48 - 72 hod.	Suma	% z navážky
Olej A 3,5 g	4,5	3,9	4,3	12,7	0,36%
Olej B 3,5 g	4,2	4,3	3,1	11,6	0,33%
Sádlo A 3,6 g	5,3	9,1	4,6	19	0,54%
Sádlo B 3,6 g	4,7	5,8	3,4	13,9	0,39%
Motorový olej A (5 g)				434	8,68%
Motorový olej B (5 g)				486	9,72%

V tabulce jsou uvedeny hmotnosti matrice, která projde do dialyzátu, v jednotlivých frakcích i jako suma pro celý postup. V posledním sloupci je uveden relativní podíl matrice, která přešla do dialyzátu. Účinnost odstranění matrice je pak 100% - % matrice z navážky. Pro olej i sádlo je to více než 99,5 %. Pro minerální olej je pak účinnost 91,32 a 90,28 %.

Rostlinné a živočišné tuky odstraňuje dialýza přes SPM s účinností vyšší než 99,5 %. Při navážce 10 g je množství tuku prošlého přes membránu menší než 100 mg, což je množství jednoduše odstranitelné na 2g silikagelu. Minerální oleje tvořené většinou alifatickými uhlovodíky již procházejí přes membránu zhruba z 10-ti %. Pro látky tohoto typu není čištění dialýzou příliš účinné. Nevýhodou metody SPM je časová náročnost (48-72 hodin), která je však kompenzována jednoduchostí provedení (obrázek 10) a možností provést paralelně vyčištění až několika desítek vzorků.

obrázek 10 Fotografie jednoduché aparatury pro dialýzu



Pro ověření opakovatelnosti a správnosti tohoto čistícího postupu byly analyzovány uměle připravené vzorky (vepřové sádlo s přidavkem nativních POP). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 13 na straně 54.

3.2 Chromatografická separace

Rozvoj analýzy POP se kryje s rozmachem kapilární vysokoúčinné plynové chromatografie (HRGC) a rychlým vývojem detektorů k GC. Byly vyvinuty metody stanovení POP jinými metodami, v současnosti však mají, vyjma imunochemických metod používaných pro screening [51, 52], jen historický význam. POP byly stanovovány pomocí elektrochemických metod, kapalinovou chromatografií, chromatografií na náplňových kolonách [53] V průběhu posledních dvou desetiletí byly metody stanovení POP v rozsahu požadovaném stávající legislativou propracovány až do podob technických norem. Optimalizace separace izomerů popsána dále byla podmíněna jednak použitou metodou detekce, jednak požadovaným rozsahem sledovaných analytů, který byl často větší než popisují normy.

3.2.1 PCDD/F

Podmínky pro chromatografické dělení PCDD/F vycházejí z požadavku na stanovení 17-ti 2378 substituovaných PCDD/F na velmi nízkých koncentračních hladinách. Neexistuje žádná fáze, na které by bylo možné úspěšně separovat všechny tyto izomery od ostatních. PCDD mají méně polohových izomerů než PCDF, nicméně v případě tetra- a penta-CDD je nutno oddělit 1 izomer od 22 respektive 14, v případě tetra- a penta-CDF pak 1 a 2 izomery od 38 respektive 28 netoxických izomerů. Separace a eluční pořadí jednotlivých izomerů jsou dobře popsány [54, 55, 56]. Technika separace popsána v technických normách, ať již EPA nebo evropských, je založena na analýzách na nepolární fázi – obvykle typu DB-5 (5% difenylfenyl, 95% - dimethylpolysiloxan) v kombinaci se silně polární fází (50 – 100% dikyanopropylpolysiloxan eventuelně s příměsí polyethylenglykolu), jako jsou SP - 2331, DB-225, DB - dioxin. Jako zajímavost lze uvést použití kolon na bázi tekutých krystalů, které mají obdobnou separační účinnost, ale také stejnou nebo spíše horší stabilitu jako silně polární fáze [57]. V tabulce 5 jsou porovnány separační účinnosti nejvíce rozšířených chromatografických fází.

tabulka 5 Porovnání separace 2378 substituovaných PCDD/F

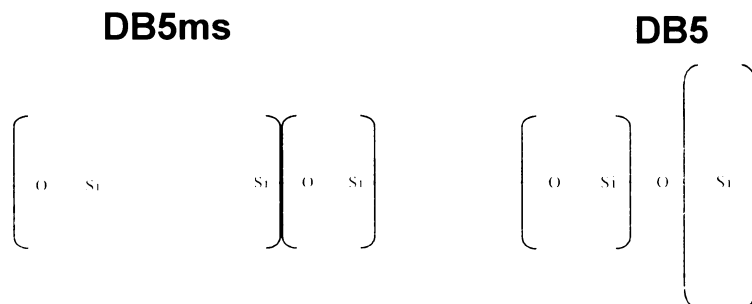
	WHO-TEF	DB-5ms	DB-5	DB-17	DB-DIOXIN	SP-2331
2378TCDD	1	+	+	X	++	++/ X (**)
12378PeCDD	1	+	++	++	X	++/ X (**)
123478HxCDD	0,1	+	++	++	X	++
123678HxCDD	0,1	+	++	++	++	++
123789HxCDD	0,1	+	+	++	++	++
1234678HpCDD	0,01	++	++	++	++ (*)	++ (*)
OCDD	0,0001	++	++	++	++ (*)	++ (*)
2378TCDF	0,1	+	X	++	++	+/ X (**)
12378PeCDF	0,05	++	+	X	+	+/ X (**)
23478PeCDF	0,5	X	X	++	X	++
123478HxCDF	0,1	++	X	+	++	X
123678HxCDF	0,1	++	++	X	+	++
234678HxCDF	0,1	+	+	+	++	++
123789HxCDF	0,1	X	+	++	++	++
1234678HpCDF	0,01	++	++	++	++ (*)	++ (*)
1234789HpCDF	0,01	++	++	++	++ (*)	++ (*)
OCDF	0,0001	++	++	++	++ (*)	++ (*)

- ++ pík separovaný na základní linii
- + pík dostatečně separovaný pro kvantifikaci
- X koeluce
- (*) pozorovány ztráty sorpcí po delším používání kolony
- (**) ztráta rozlišení až na 100%-ní koeluci s jiným kongenerem při delším používání

Z tabulky je patrné, že neexistuje chromatografická fáze, na které lze uspokojivě separovat všech 17 2378 substituovaných PCDD/F. Při použití kombinace fází DB5ms a DB17 jsou pouze dva kongenery separovány částečně, zatímco ostatní jsou separovány na základní linii. Další výhodou těchto chromatografických kolon v porovnání s obvyklými polárními fázemi je jejich stabilita.

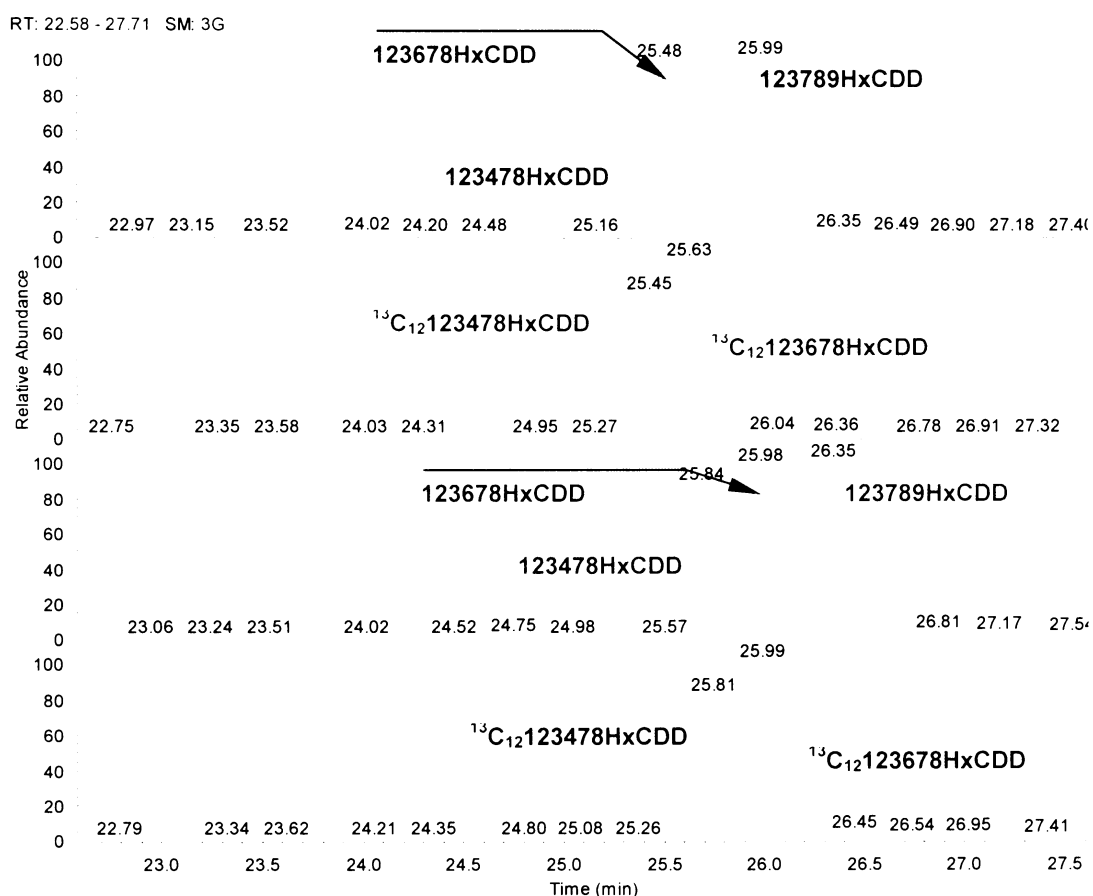
Na nepolárních fázích jsou dobře separovány homologové skupiny a nedochází zde k problémům se stanovením hepta- a okta-chlorovaných PCDD/F. Výhodou je velmi nízký únik fáze, tepelná stabilita obvykle do 330°C - 350°C a dlouhá životnost kolon. Problematická je separace tetra a penta CDD/F. Nejlepší v současné době komerčně dostupnou fází je DB-5ms a její analog Zebron 5ms, které se od ostatních 5%-fenyl fází liší jiným zesíťováním polymeru jak je ukázáno v obrázku 11.

obrázek 11 Porovnání zesíťování posiloxanu ve fázích DB5ms a běžné fáze DB5



Tyto dvě fáze vykazují lepší chromatografickou separaci 2378 TCDD i TCDF, nicméně kolony ztrácejí účinnost separace rychleji než běžné fáze typu DB5 a to velmi často „skokově“ během několika po sobě jdoucích nástřiků. Tato skutečnost opět souvisí s odlišným zesíťováním fáze. Na obrázku 12 je demonstrována ztráta separační účinnosti na příkladu HxCDD. Kolona nicméně zůstává použitelná pro separačně méně náročné analýzy, jako je stanovení PBDE nebo polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU).

obrázek 12 Chromatogramy standardů HxCDD na nově instalované koloně (DB5ms 30m x 0,25 mm průměr x 0,25 µm film) a na stejné koloně po cca 500 nástřících



Chromatogram standardu nativních a značených HxCDD na nové koloně je vykreslen modrou respektive červenou barvou. Chromatogram standardu nativních a izotopicky značených HxCDD na koloně po 500 nástřících je vykreslen barvou zelenou respektive hnědou.

Na silně polárních fázích typu kyanopropylsiloxanu jsou dobře separovány 2378 TCDD i TCDF, nicméně kolony nelze programově zahřívat na teploty vyšší než 260°C a také mají mnohem vyšší únik fáze, což zvyšuje chemický šum v hmotnostním detektoru a zhoršuje meze detekce a stanovitelnosti PCDD/F. Další nezanedbatelnou nevýhodou je nestabilita fáze, která se projevuje ztrátou separace požadovaných izomerů a to někdy i ve

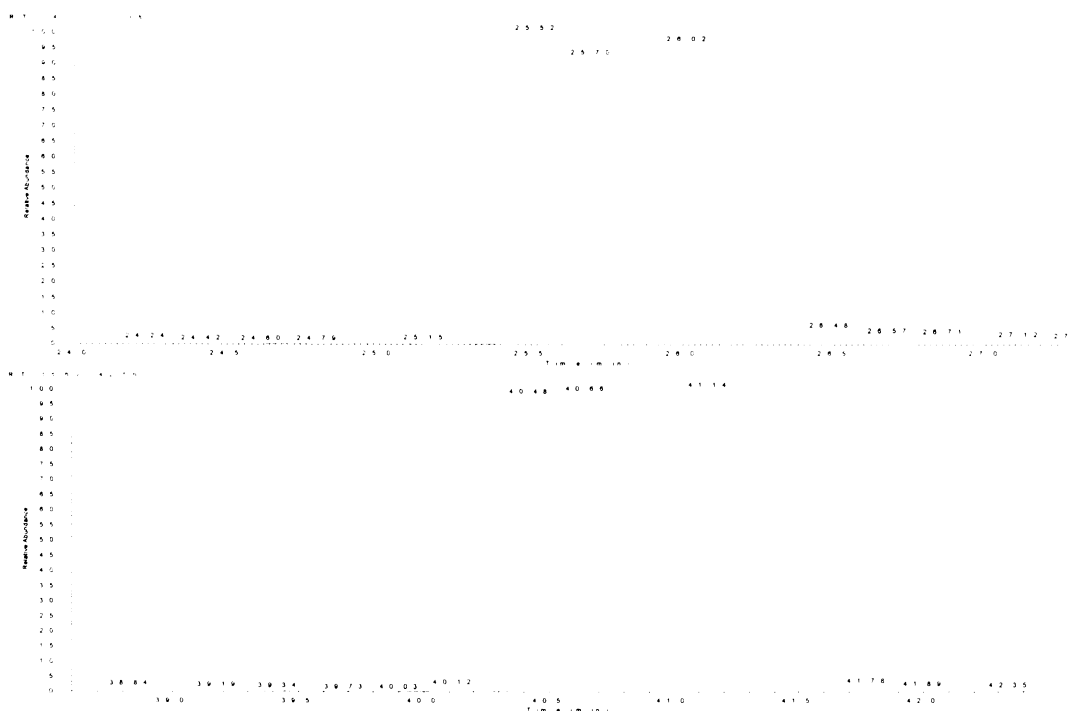
velmi krátkém časovém intervalu [54, 55]. Také byl pozorován rozklad hepta a okta CDD/F na těchto typech fáze.

Po úvodních experimentech s kolonou DB dioxin bylo zřejmé, že únik fáze je tak velký, že téměř znemožňuje správné fungování iontové pasti. Jako východisko z této situace jsme použili kolonu DB-17 (50% - difenyl, 50% dimetyl polysiloxan), která je středně polární. Separace 17-ti 2378 substituovaných izomerů je komplementární k DB5ms – viz tabulka 6. Na základní linii jsou separovány jak 2378 TCDF, tak i 23478 PeCDF a 123789HxCDF, které na koloně DB5ms koeluují s netoxickými kongenery. V porovnání se silně polárními fázemi je DB-17 mnohem stabilnější a průměrná životnost DB-17 je dokonce i delší než životnost kolon DB5ms.

Pro stanovení 17-ti „špinavých“ kongenerů používáme kombinaci výsledků dosažených na kolonách DB5ms a DB-17. Pokud ve vzorku nejsou přítomny 2378 substituované tetra až hexa PCDD/PCDF je možné postačující výsledek jen z analýzy na jedné fázi. Velmi zjednodušená je také analýza vzorků biologického původu, kde v drtivé většině vzorků nejsou přítomné jiné než 2378 substituované PCDD/F, které jsou odolné metabolické přeměně. Pro tyto typy vzorků standardně používáme pouze analýzu na koloně DB5ms, která má nižší únik fáze než DB-17.

Pro stanovení PCDD/F jsou používány kolony jak o délce 30m, tak i 60m, nicméně rozdělení píků není při použití delších kolon prokazatelně lepší. Vzhledem k tomu, že čas analýzy se téměř zdvojnásobuje, je jediným argumentem pro použití delší kolony poněkud lepší vykreslení píku (větší počet bodů na pík). Z ekonomického hlediska je mnohem výhodnější používat 30-ti metrové kolony, které jsou levnější, ale také zvyšují průchodnost laboratoře (doba trvání analýzy na koloně DB5ms 30m je 37 min oproti cca 60-ti minutám na koloně 60-ti metrové). Životnost kolon je stejná u 30-ti i 60-ti metrových, optimální je tedy použití 30m kolony DB5ms a v případě, že je vzorek pozitivní, tak je provedena konfirmační analýza na koloně DB17. Porovnání separace HxCDD je uvedeno v obrázku 13.

obrázek 13 Porovnání chromatogramů standardu HxCDD na koloně DB5ms o délce 30 a 60 m



Z obrázku je patrné, že 2378 HxCDD jsou separovány téměř stejně jak na koloně o délce 30m (modrý chromatogram), tak i na koloně o délce 60m (červený chromatogram). Rozdíl v retenci je přitom 15 minut.

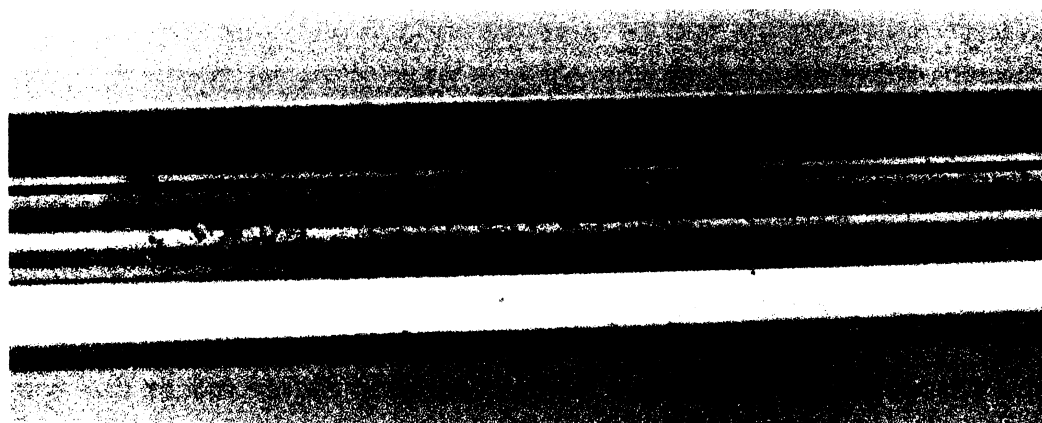
S tloušťkou filmu a průměrem kolony nelze při optimalizaci chromatografické separace příliš experimentovat. Z důvodu udržení pracovního vákuu v detektoru nelze používat větší průměr kolon než je 0,25 mm. Použití „megabore“ kolon je možné pouze s děličem nátoky nosného plynu před zavedením do prostoru MS, což ovšem snižuje citlivost detekce a to je v případě POP nežádoucí. Větší tloušťka filmu než 0,25 μm zase způsobuje vyšší únik fáze a navíc se běžně nevyrábí ke kolonám o průměru 0,25 mm a méně.

Nedílnou součástí plynové chromatografie je nástřik vzorku. Vzhledem k tomu, že PCDD/F jsou látky netěkavé, jsou nejčastěji používané techniky nástřiku on-column a splitless. Technika on-column je obtížně proveditelná komerčně dostupnými autosamplery, proto používáme výhradně techniku splitless. Konstrukce nástřiku se liší jak mezi dodavateli plynových chromatografů, tak i mezi typy od jednoho výrobce. Nicméně vzhledem ke stabilitě PCDD/F jsme nepozorovali výrazné rozdíly mezi injektory na Finnigan GC (GCQ) a Trace 2000 (PolarisQ). Podmínky nástřiku a teplotní programy pro používané kolony jsou uvedeny v tabulce 6.

tabulka 6 Parametry pro plynovou chromatografii PCDD/F

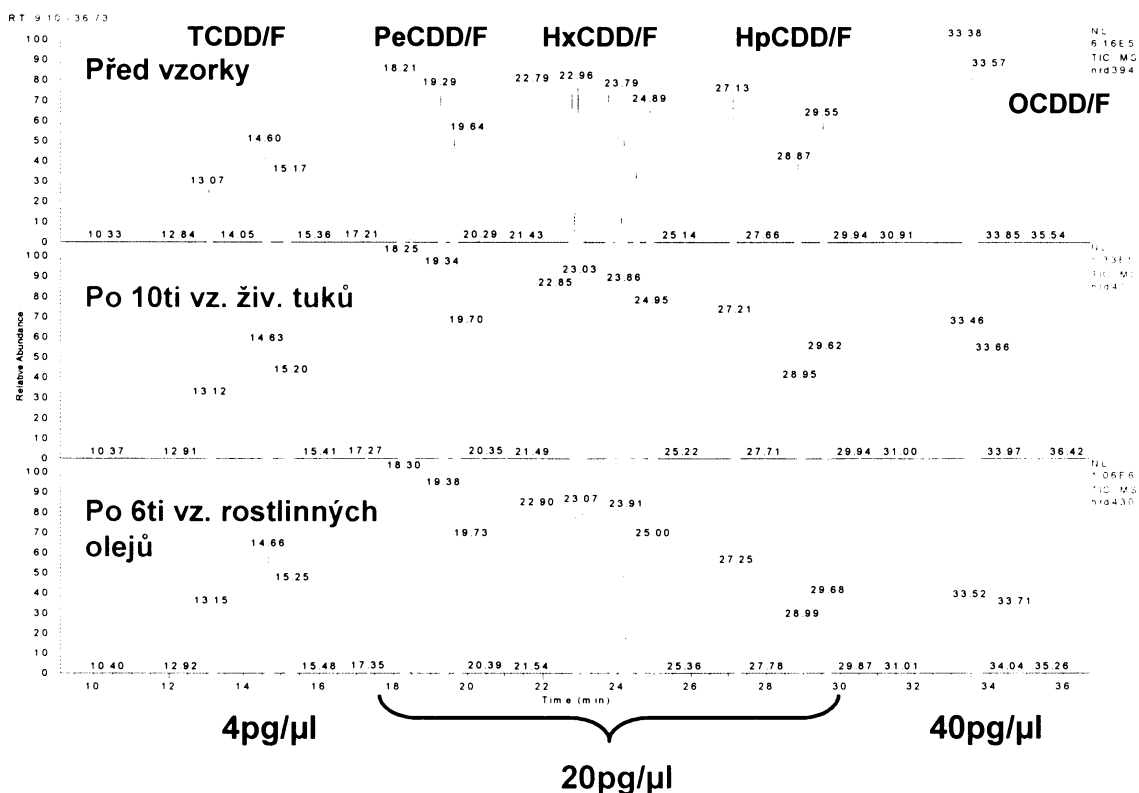
	DB5ms	DB5ms	DB17
délka kolony [m]	30	60	30
vnitřní průměr [mm]	0,25	0,25	0,25
tloušťka filmu [μm]	0,25	0,25	0,25
teplota injektoru	280°C	280°C	280°C
nosný plyn	He	He	He
průtok	1,2 ml.min ⁻¹	1,2 ml.min ⁻¹	1,2 ml.min ⁻¹
teplota kolony při nástřiku	150°C	150°C	150°C
doba uzavření splitru	2 min.	2 min.	2 min.
izoterma	1 min.	1 min.	1 min.
1. gradient	20°C.min ⁻¹	20°C.min ⁻¹	20°C.min ⁻¹
teplota	200°C	200°C	200°C
2. gradient	2,5°C.min ⁻¹	2 °C.min ⁻¹	2,5°C.min ⁻¹
teplota	300°C	280°C	280°C
3. gradient	5 min. izoterma	10°C.min ⁻¹	20°C.min ⁻¹
teplota		300°C 5 min. izoterma	
doba analýzy	38 min.	53 min.	49

Konstrukce nástřiku není pro analýzu PCDD/F rozhodujícím prvkem. Materiál a stav lineru však ano. Pro analýzu všech POP používáme linery z deaktivovaného (silylovaného) křemenného skla, na kterých nedochází k sorpci výšechlorovaných POP. Pokud jsou analyzovány vzorky, které jsou nedokonale vyčištěné, může docházet ke kondenzaci málo těkavých látek, jako jsou frakce uhlovodíků, steroly, mastné kyseliny apod. v prostoru lineru. Takto znečištěný liner je ukázán na obrázku 14.

obrázek 14 Kontaminace na vnitřním povrchu lineru

Film zkondenzovaných nepolárních látek způsobuje jednak diskriminaci méně těkavých POP ve fázi přechodu par z injektoru do kolony, ale také paměťový efekt. Část zvláště výsechlorovaných (hepta a oktaCDD/F) zůstává rozpuštěna ve filmu nečistot a je vymyta do kolony až dalším nástřikem. Efekt diskriminace je názorně popsán v obrázku 15.

obrázek 15 Chromatogramy standardu tetra až oktachlorovaných CDD/F s čistým a kontaminovaným nástřikem



První chromatogram shora je záznam odezvy kalibračního standardu nastříknutého do nového lineru. Koncentrace nativních PCDD/F ve standardu jsou uvedeny na obrázku dole (TCDD/F 4 pg/ml, PeCDD/F – HpCDD/F 20 pg/ml a OCDD/F 40 pg/ml). Je patrné, že nástřik vzorků, které se nepodařilo dokonale vyčistit, způsobuje kontaminaci lineru a z ní vyplývající diskriminaci HpCDD/F a OCDD/F, která se projevuje poklesem odezvy těchto kongenerů. Tato diskriminace je obzvláště patrná u standardu nastříknutého po vzorcích rostlinných olejů, kdy jsou píky OCDD/F nižší než TCDD/F, i když mají 10 x vyšší koncentraci. Empirické pozorování po analýzách několika stovek biologických vzorků ukazuje, že největší problémy způsobují rostlinné oleje a vzorky ryb (zvláště mořských), zatímco lipidy savců lze výše uvedenými čistícími postupy odstranit tak dokonale, že kontaminace lineru nastává až po desítkách nástřiků.

V případě kontaminace lineru je nezbytná co nejrychlejší výměna za čistý. Tato operace sice zabere několik hodin, ale zabrání poškození vlastní analytické kolony a také masivnímu znečištění hmotnostního detektoru. Jak již bylo uvedeno, je časté čištění lineru

obvyklé při velkých sériích biologických vzorků, u ostatních typů matric není výjimkou i několik set nástřiků bez zásahu do systému injektoru.

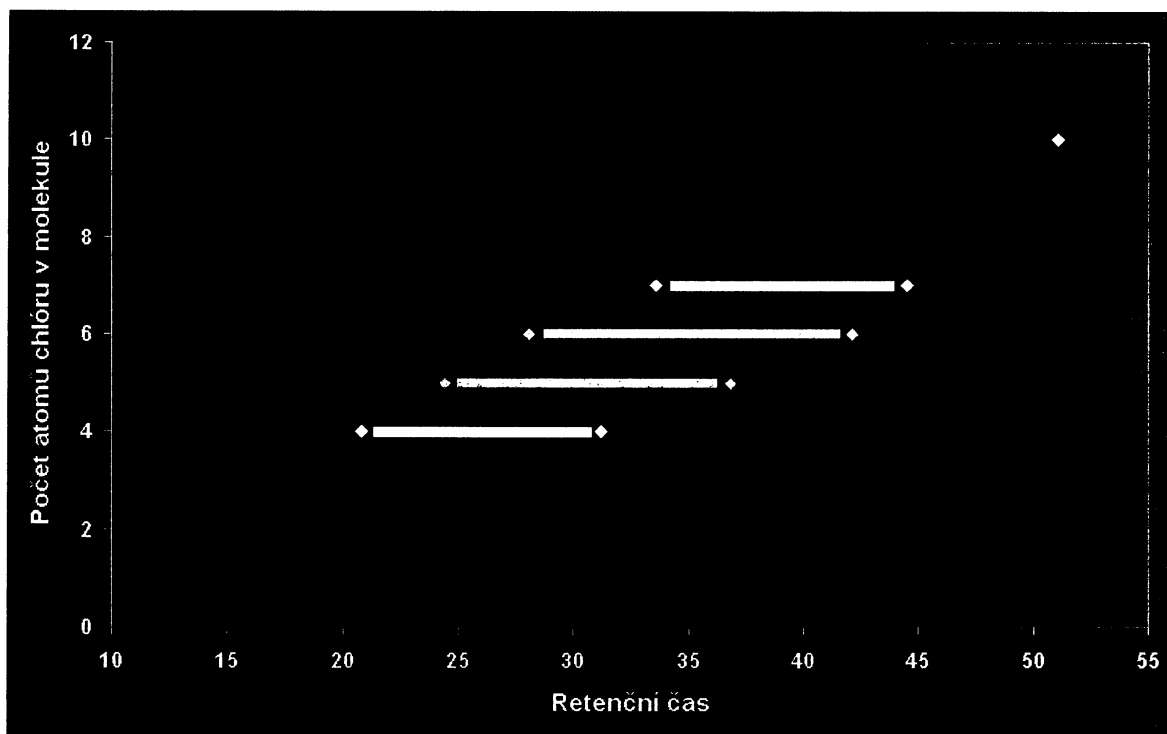
Pro stanovení 17-ti „špinavých“ PCDD/F je postačující kombinace dvou GC fází. Pro analýzy, kdy je požadována identifikace a kvantifikace všech izomerů, už je nutné zařadit i třetí fázi. Tyto analýzy však nejsou rutinní a používáme je pouze pro vědecké práce v oblasti mechanismu vzniku, eventuelně degradace PCDD/F.

3.2.2 PCB

Chromatografická separace PCB je vzhledem ke struktuře a počtu kongenerů a izomerů složitější než PCDD/F (na rozdíl od PCDD/F se nejedná o planární rigidní strukturu). Požadavky na dělení PCB se opět odvíjejí hlavně od legislativy, kde jsou nejčastější dva požadavky. První, jednodušší, je stanovení 6-ti tzv. indikátorových PCB (28, 52, 101, 138, 158 a 180). To jsou kongenery, které jsou dominantní v komerčně produkováných technických směsích jako jsou DELOR 103-106, AROCLOR 1242, 1254 nebo 1260. Druhou skupinou jsou tzv. „dioxin-like“ PCB. Těchto PCB je 12 a na rozdíl od indikátorových PCB nejsou majoritními složkami technických směsí, ani nejsou majoritní ve složkách životního prostředí. Nejkomplikovanější analýzy PCB jsou pak ty, které vyžadují stanovení co nejvíce z 209 možných kongenerů.

Jak již bylo uvedeno, PCB se strukturně výrazně liší od PCDD/F a to se promítá i do chromatografického chování. Nejpodstatnější je ta skutečnost, že intervaly retenčních časů homologových skupin se navzájem velmi výrazně překrývají, jak je uvedeno na obrázku 16.

obrázek 16 Intervaly retenčních časů homologů PCB na koloně DB5ms (60m x 0,25 mm x 0,25 μ m)



Na obrázku jsou znázorněny intervaly retence jednotlivých homologových skupin PCB. Na ose x je uveden čas v minutách, na ose y počet atomů chloru v molekule. Z grafu je patrné že se nepřekrývají pouze intervaly retence homologů, které se liší o jeden chlor, ale i retence homologů, které se liší o dva atomy chloru. Např. v čase 30 min. se překrývají retence tri-, tetra- a penta-CB.

PCB v závislosti na podmínkách ionizace vytvářejí výrazný fragment $[M - 2Cl]^+$. Ani pomocí hmotnostního spektrometru pak není možné rozeznat signál např. PeCB od HpCB. Naneštěstí právě „dioxin-like“ PCB jsou poslední eluující PCB a jejich retenční časy se překrývají s kongenery, které mají o dva chlory v molekule více a také jsou v reálných vzorcích zastoupeny na řádově vyšších koncentračních hladinách. Chromatografická separace je pak jediným možným řešením, které vede ke správnému výsledku. V minulosti byly v několika laboratořích na světě provedeny syntézy a pak následná stanovení retenčních časů všech 209 kongenerů PCB [58, 59]. Asi nejrozsáhlejší a pro laboratorní praxi nejpoužitelnější je studie pod vedením G.M. Framea, která popisuje chování všech 209 kongenerů na 20 různých komerčních stacionárních fázích [59].

Na základě výše uvedených publikací jsme vyvinuli metody pro separaci jak „dioxin-like“ PCB, tak metodu pro rutinní analýzu co největšího počtu kongenerů v jednom nástřiku (79 piků jednotlivých kongenerů nebo koeluujících skupin) a také metodu s použitím dvou fází pro stanovení až 100 kongenerů, které se běžně vyskytují v reálných vzorcích.

Frakce pro stanovení mono- a non-ortho substituovaných PCB (dioxin-like) jsou připraveny pro analýzu v nonanu a první PCB, které je detekováno, je PCB 81. Proto jsou teplotní program a podmínky nástřiku odlišné od izomerově specifických analýz, pro které jsou vzorky připraveny v heptanu. Podmínky GC analýzy 12-ti WHO PCB na kolonách používaných v laboratoři jsou uvedeny v tabulce 7. Podmínky pro izomerově specifické analýzy jsou pak popsány v tabulce 8. Materiál lineru je použit stejný jako pro PCDD/F analýzy, pouze efekty kontaminace jsou méně patrné na chromatogramech, protože PCB jsou těkavější a méně náchylné k sorpci.

tabulka 7 Parametry GC analýz pro stanovení 12-ti mono a nonortho substituovaných PCB

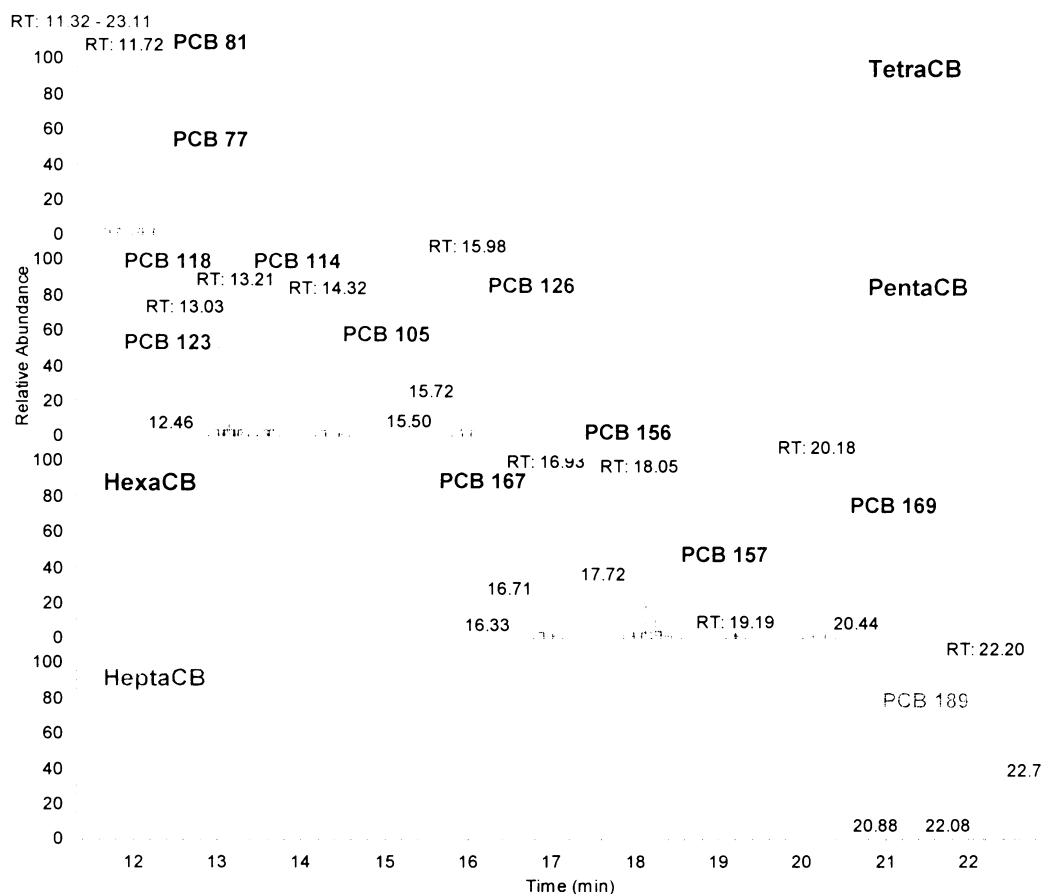
	DB5ms	DB5ms	DB17
délka kolony [m]	30	60	30
vnitřní průměr [mm]	0,25	0,25	0,25
tloušťka filmu [μm]	0,25	0,25	0,25
teplota injektoru	280°C	280°C	280°C
nosný plyn	He	He	He
průtok	1,2 ml.min ⁻¹	1,2 ml.min ⁻¹	1,2 ml.min ⁻¹
teplota kolony při nástřiku	150°C	150°C	150°C
doba uzavření splitru	2 min.	2 min.	2 min.
izoterma	1 min.	1 min.	1 min.
1. gradient	20°C.min ⁻¹	20°C.min ⁻¹	20°C.min ⁻¹
teplota	200°C	200°C	200°C
2. gradient	2,5°C.min ⁻¹	2 °C.min ⁻¹	2,5°C.min ⁻¹
teplota	300°C	280°C	280°C
3. gradient	5 min. isoterma	10°C.min ⁻¹	20°C.min ⁻¹
teplota		300°C	
		5 min. isoterma	
doba analýzy	38 min.	53 min.	49

tabulka 8 Parametry GC analýz pro kompletní kongenerovou analýzu PCB

	DB5ms	DB5ms	DB17
délka kolony [m]	30	60	30
vnitřní průměr [mm]	0,25	0,25	0,25
tloušťka filmu [μm]	0,25	0,25	0,25
teplota injektoru	280°C	280°C	280°C
nosný plyn	He	He	He
průtok	1,2 ml.min ⁻¹	1,2 ml.min ⁻¹	1,2 ml.min ⁻¹
teplota kolony při nástřiku	70°C	70°C	70°C
doba uzavření splitru	1 min.	1 min.	1 min.
izoterma	1 min.	1 min.	1 min.
1. gradient	20°C.min ⁻¹	20°C.min ⁻¹	20°C.min ⁻¹
teplota	180°C	180°C	180°C
2. gradient	2,5°C.min ⁻¹	2,5°C.min ⁻¹	2,5°C.min ⁻¹
teplota	300°C, 5 min isotherm.	290°C, 3 min. isoterma	280°C
3. gradient			
teplota			
doba analýzy			

Z hlediska separační účinnosti „dioxin-like“ PCB má jedinečné vlastnosti stacionární fáze typu DB5ms, která se stejně jako v případě PCDD/F liší od ostatních fází na bázi 5%-fenyl - 95% metylsiloxanu. Na obrázku 17 je znázorněn chromatogram standardu PCB, který obsahuje 61 kongenerů PCB (mono až dekachloro), zaznamenaný metodou pro analýzu “dioxin-like“ PCB.

obrázek 17 Chromatogram standardu PCB (BP-MS, Wellington Laboratories) na koloně DB5ms 30m x 0,25 mm x 0,25 µm



Z obrázku je patrné, že v chromatogramu pentaCB i hexaCB jsou přítomny píky, které jsou od cílových analytů chromatograficky separovány. Jde o PCB, které mají o dva chlory v molekule více. V případě PCB 114 je to PCB 188 (první eluující heptaCB), v případě PCB 156 a 157 jde o PCB 202 a 201 (oktaCB). Všechny kongenery PCB mají v tomto standardu stejnou koncentraci.

Už na příkladu kalibračního standardu, kde nejsou přítomny všechny PCB, které se vyskytují v reálných vzorcích, a kde je stejná koncentrace PCB, je vidět, že bez dokonalé chromatografické separace analytů by i detekce hmotnostním spektrometrem vedla k nesprávným výsledkům. „Dioxin-like“ PCB se obvykle vyskytují ve vzorcích na řádově nižších koncentračních hladinách než di a tri-ortho substituované izomery. Z tohoto důvodu je co nejlepší separace píky základním předpokladem úspěšné analýzy.

V tabulce devět jsou porovnány fáze DB5ms, dále DB5, HT5, RTX5 apod., které mají stejné složení a stacionární fáze DB-17 50% difenyl 50% dimethylpolysiloxan.

tabulka 9 Separační účinnost kolon pro vybrané kongenery PCB

	DB-5ms	DB-5	DB-17
Indikátorové PCB			
28	X 31	+ 31	+ 31
52	X 43	++	++
101	X 113	X 89 90	X 91
153	X 168	++	++
138	X 160	X 163 164	+ 158
180	X 193	++	X 171 193
"dioxin-like" PCB			
81	X 148	X 145	++
77	++	++	++
123	++	++	++
118	++	X 106	++
114	++	++	++
105	++	++	++
126	++	X 178	++
167	++	++	++
156	++	++	X 201 204
157	++	X 201	X 197
189	++	++	++

- ++ pík separovaný na základní linii
- + pík dostatečně separovaný pro kvantifikaci
- X koeluce

V tabulce uvedený přehled separace je založen na literárních údajích [59] v kombinaci s vlastními výsledky. Kongenery zvýrazněné tučně a podtrženy jsou zastoupeny v technických směsích i ve většině reálných vzorků více než 1%, kongenery uvedené nezvýrazněným písmem jsou zastoupeny mezi 0,05% - 1% a kongenery zvýrazněné sešikmeným písmem jsou zastoupeny < 0,05%. Jako koeluce jsou uvažovány pouze kongenery se stejným počtem atomů chloru v molekule nebo kongenery, které mají o dva atomy chloru v molekule více. Tyto kongenery interferují při MS detekci. Z tabulky je patrné, že fáze DB5 je vhodnější pro stanovení indikátorových PCB, zatímco DB5ms pro stanovení mono a non-orthoPCB. Kolonu DB-17 lze pak použít jako komplementární stacionární fázi k DB5ms.

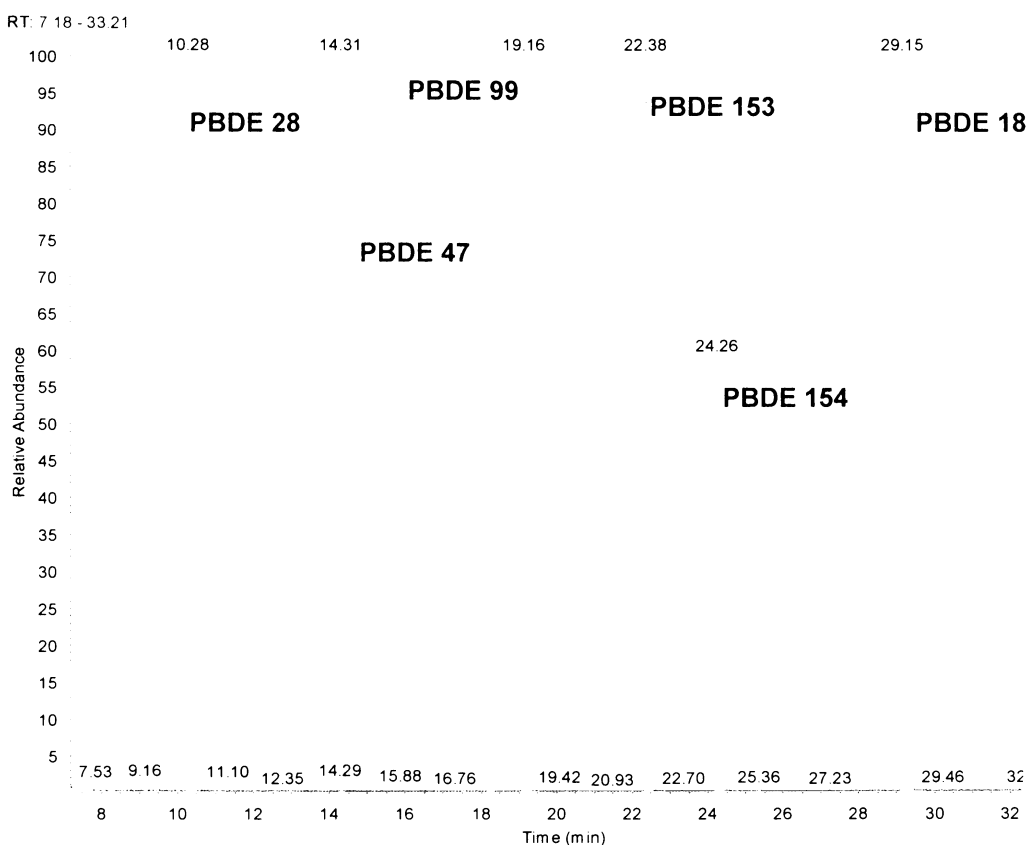
Kongenerově specifické analýzy co největšího počtu izomerů jsou chromatograficky nejkomplikovanější analýzy rutinně prováděné v naší laboratoři. Rozsah stanovovaných kongenerů PCB se odvíjí od komerčně dostupných směsí standardů a od toho, aby byly do analýzy zahrnuty kongenery, které se nejčastěji vyskytují ve vzorcích. Pro identifikaci a kvantifikaci používáme směs standardů BP-MS (Wellington Laboratories), která obsahuje vždy první a poslední eluující kongener v homologové skupině, indikátorové a „dioxin-like“ PCB a řadu dalších.

3.2.3 PBDE

V případě PBDE není problémem chromatografická separace kongenerů, protože jak v technických směsích, tak i v životním prostředí je majoritně přítomno pouze 7 kongenerů. Ostatní se nacházejí ve stopových množstvích. MS detekce je natolik selektivní, že není nutné separovat PBDE od koeluuujících sloučenin (PCDD/F apod).

Z analytického hlediska jsou větším problémem rozdíly v odezvách mezi izomery a z toho plynoucí nutnost použití co největšího počtu standardů, podobně jako v případě PCB. PBDE se po čistících krocích nacházejí ve stejné frakci jako PCDD/F. Pro chromatografii je pak používána kolona DB5ms se stejným teplotním programem jako pro tyto látky (viz tabulka č. 7).

obrázek 18 Chromatogram standardu PBDE



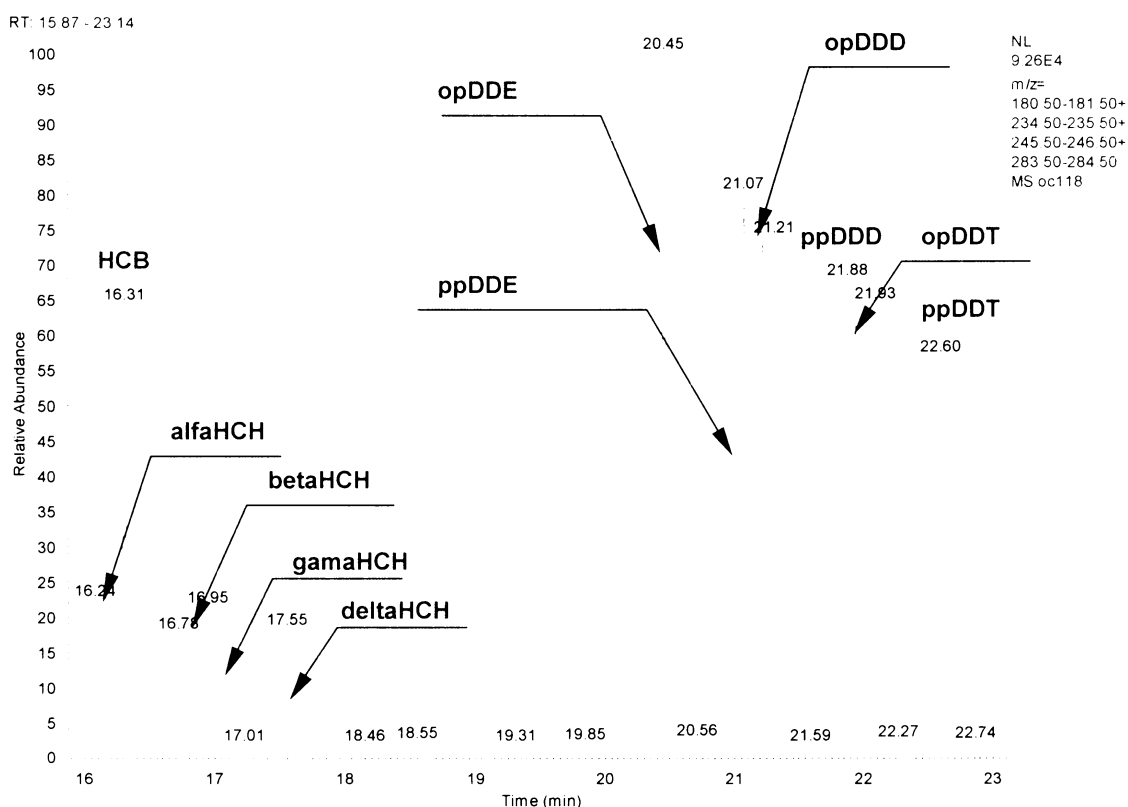
Z obrázku je patrné, že v případě PBDE je chromatografická separace více než postačující.

Poněkud větší problémy než v případě PCDD/F a PCB způsobuje sorpce PBDE v nástřiku. Projevuje se u hexa a více bromovaných difenyéterů a v matricově obtížných vzorcích způsobuje až o řád nižší odezvu. Speciálním případem je pak dekabromdifenyleter, pro který je nutné použít speciální injekční techniky (on-column nebo PTV) a jiné materiály lineru než pro „normální“ POP.

3.2.4 OCP

Organochlorové pesticidy jsou skupinou POP, která je nejméně náročná na chromatografickou separaci. MS detekce je spolehlivě selektivní pro možné interference, které se projevují např. na ECD detektoru (PCB, ftaláty apod.). Na běžné nepolární chromatografické fázi jako je DB5 nebo DB5ms jsou uspokojivě separovány jak izomery HCH, tak i izomery DDE, DDD a DDT. Injekční technika i teplotní program kolony jsou identické s těmi, které jsou uvedeny v tabulce 8. Chromatogram běžných OCP je uveden v obrázku č.19. Jedinou komplikací GC analýzy OCP jsou problémy se sorpcí ppDDT v kontaminovaném lineru, které jsou v případě nedokonalě vyčištěných vzorků mnohem markantnější i než u OCDD.

obrázek 19 Chromatogram HCH, HCB, DDT a jeho degradačních produktů (DB5ms 60m x 0,25 mm x 0,25 µm)



Separace jednotlivých OCP je na koloně DB5ms dostatečná i pro méně selektivní detektory jako je ECD. Jediným problematickým párem je ppDDD a opDDT, kde je separace dostatečná na nové koloně, ale s časem se podobně jako v případě PCDD/F rozdělení píků zhoršuje.

3.3 MS/MS detekce

Vzhledem k velmi nízkým koncentračním hladinám POP v životním prostředí musí být detektory spojené s plynovou chromatografií vysoce citlivé a selektivní. Z hlediska citlivosti je plně vyhovující hmotnostní spektrometrie. Nicméně z hlediska selektivity je výběr zúžen na spektrometry pracující ve vysokém rozlišení nebo na tandemovou hmotnostní spektrometrii (MS/MS).

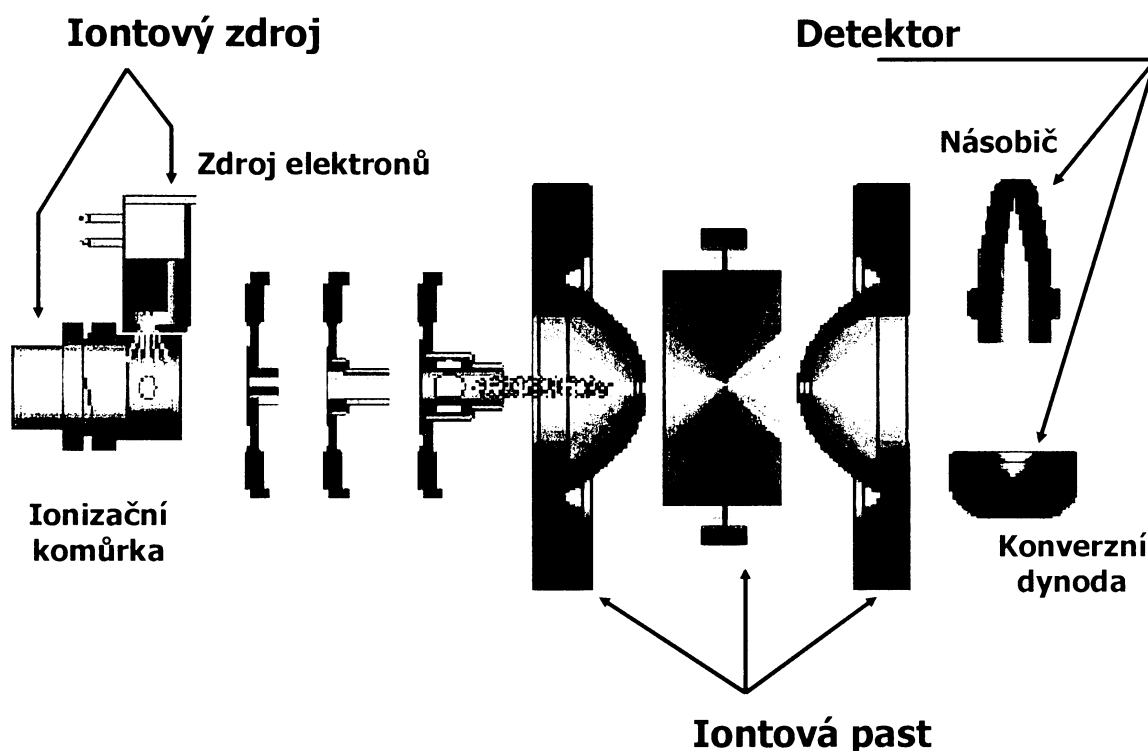
Principem MS/MS je izolace iontu(ů), jejich sekundární excitace a poté monitoring vzniklých dceřiných spekter či vybraných fragmentů. V podstatě lze MS/MS provádět na všech typech obvyklých hmotnostních detektorů ať již průletových (sektorové a kvadrupólové MS), tak i v iontové pasti. Rozdíl mezi nimi je ten, že v iontové pasti dochází k „uskladnění“ iontů v jednom hmotnostním spektrometru, zatímco v případě kvadrupólových MS jsou nutné vlastně tři MS. V prvním je prováděna izolace iontů, druhý slouží jako kolizní cela a třetí je analyzátor. Sektorové MS se v tandemovém uspořádání pro rutinní analýzu PCDD/F nepoužívají toho důvodu, že v modu vysokého rozlišení je selektivita i citlivost dostatečná.

Počátky GC/MS stanovení PCDD/F jsou spjaty s hmotnostními detektory na bázi sektorových a kvadrupólových MS, které jako jediné v té době měly dostatečnou citlivost a také rychlost, aby byl dostačujícím způsobem vykreslen chromatografický pík (minimálně 10 bodů na pík). Nástup MS/MS byl podmíněn vývojem dostatečně rychlých elektronických součástek (A/D převodníky, procesory apod.) a také dostupností výpočetní techniky. První zmínky o využití MS/MS pro analýzu POP pocházejí z poloviny 80-tých let [60-64]. Ve většině případů šlo pouze o 2378TCDD. Tyto první experimenty byly limitovány nedokonalostí řídicí elektroniky a software, který neumožňoval provádět více MS/MS experimentů v jednom časovém intervalu. Vzhledem k tomu, že nezbytnou podmínkou stanovení většiny POP a hlavně PCDD/F je přidání izotopicky značených vnitřních standardů, se tyto experimenty omezily pouze na demonstraci možností MS/MS. Již výše zmiňovaný rychlý rozvoj nových elektronických prvků a také uvolnění do té doby utajovaných „kosmických“ technologií, vedl k vývoji dokonalejších hmotnostních spektrometrů i jejich řídicích software.

Průlomovou prací, která prokázala, že iontová past pracující v modu MS/MS je vhodná pro stopovou analýzu PCDD/F, a že je porovnatelná s mnohem nákladnějšími systémy HRMS (vysokorozlišující hmotnostní spektrometr) a TQS (triple-stage quadrupole mass spectrometer – MS/MS v provedení tří kvadrupólových MS), publikovali v roce 1994 Plomley, Koestner a March [65]. Ve stejném roce použili GC/MS/MS pro stanovení PCB, PCN a pesticidů Feigel a kol. [66-7]. Od poloviny do konce devadesátých let pak byla metoda MS/MS v iontové pasti optimalizována a aplikována ve více laboratořích na analýzy POP látek, povětšinou PCDD/F a PCB [68-70]. Všechny výše citované experimenty byly

prováděny na iontových pastích první generace (různé verze IT firmy Varian – Saturn I - III). Hlavní konstrukční nevýhodou všech iontových pastí první generace je iontový zdroj, který je integrovaný v hmotnostním analyzátoru. Iontové pasti druhé generace, které začaly být komerčně dostupné v polovině devadesátých let (GCQ a PolarisQ firmy Finnigan), mají iontový zdroj mimo iontovou past, do které jsou pomocí iontové optiky vtahovány pouze ionizované částice. Blokové schéma IT pasti PolarisQ je uvedeno na obrázku 20.

Obrázek 20 Blokové schéma iontové pasti II generace – PolarisQ



Nosný plyn s analytem je přiváděn do ionizační komůrky ve směru kolmém k rovině zobrazení. Ionty jsou z ionizační komůrky vytahovány iontovou optikou (pro EI je na jednotlivé segmenty vložen záporný potenciál). Prostřední segment optiky slouží jako hradlo, které reguluje tok iontů do hmotnostního analyzátoru. Vlastní iontová past se skládá ze dvou koncových a jedné kruhové elektrody. Ionty vystupující z analyzátoru jsou odkloněny na konverzní dynodu, kde jsou přeměněny na elektrony. Elektronový svazek je pak zesílen v kaskádovém elektronásobiči a detekován jako elektrický proud.

Výhoda tohoto uspořádání spočívá v tom, že se do hmotnostního analyzátoru nedostávají neutrální molekuly, které způsobují efekt podobný chemické ionizaci a ve výsledku deformaci hmotnostních spekter. Ve většině případů jsou hmotnostní spektra získaná na IT druhé generace porovnatelná s hmotnostními spektry z kvadrupolových či

sektorových spektrometrů, což také umožňuje vyhodnocení spekter pomocí komerčních knihoven spekter např. NIST.

GCQ byl první přístroj na principu IT, ve kterém bylo možné nezávisle na průtoku nosného plynu kolonou regulovat tlak v hmotnostním analyzátoru. To umožňuje přívod hélia (tzv. přídavný plyn - dumping gas) přímo do prostoru IT. Ve starší generaci byl tok regulován pouze průtokem nosného plynu přes GC kolonu, což při zachování optimálních separačních podmínek umožňuje pouze nepatrné změny. Vliv tlaku a druhu přídavného plynu na MS/MS experiment byl popsán již v roce 1983 Slaybackem a Taylorem [71]. Tyto experimenty byly provedeny na trojitém kvadrupólovém filtru, nicméně mají obecnou platnost pro MS/MS experimenty. Při vyšším tlaku (počtu atomů He v IT) je efektivita kolize větší, lepší výsledky také byly dosaženy za použití argonu jako přídavného plynu pro kolizi. V iontové pasti toto nelze provést vzhledem k nižšímu ionizačnímu potenciálu Ar a také k tomu, že pracovní vakuum v iontové pasti je řádově horší než v sektorovém nebo kvadrupólovém MS - mohlo by dojít k výboji, který by zničil elektroniku přístroje.

První MS/MS experimenty, jejichž výsledky jsou uvedeny v této práci, byly prováděny na přístroji GCQ a první verzi MS/MS software. Ta umožňovala pouze dva MS/MS experimenty v jednom časovém okně. Prudký vzestup úrovně výpočetní techniky i elektronických prvků pak vyústil v zavedení nových verzí software, kde je možné v jednom okně snimat zároveň až deset různých experimentů od plného skenu hmot až po MS^n , kde $n=10$. Nová verze software uvedená na trh s konstrukčně vylepšenou IT (Polaris a PolarisQ) v roce 2000 pak umožňovala optimalizaci dalších parametrů MS/MS. V roce 2001 pak vývoj vyústil k verzi iontové pasti, kde nátok přídavného plynu je řízen elektronickou regulací přímo ze software.

3.3.1 Popis principu funkce iontové pasti a režimu měření dat MS/MS

Na rozdíl od dvou nejčastěji používaných typů hmotnostních spektrometrů (kvadrupólového filtru a sektorového hmotnostního spektrometru), iontová past nepracuje v „průletovém“ režimu, nýbrž v režimu pulsním. Do prostoru pasti jsou přes hradlo (iontová čočka č. 2) napuštěny ionty, se kterými jsou pak dále prováděny požadované operace (full scan, MS/MS). Základní rovnice popisující chování iontu v iontové pasti je uvedena jako rovnice 1 [72].

rovnice 1

$$q_z = \left(\frac{m}{z} \right) \frac{4V}{r_o^2 \Omega^2}$$

m hmotnost iontu

z náboj iontu

V amplituda radiofrekvenčního napětí (RF)

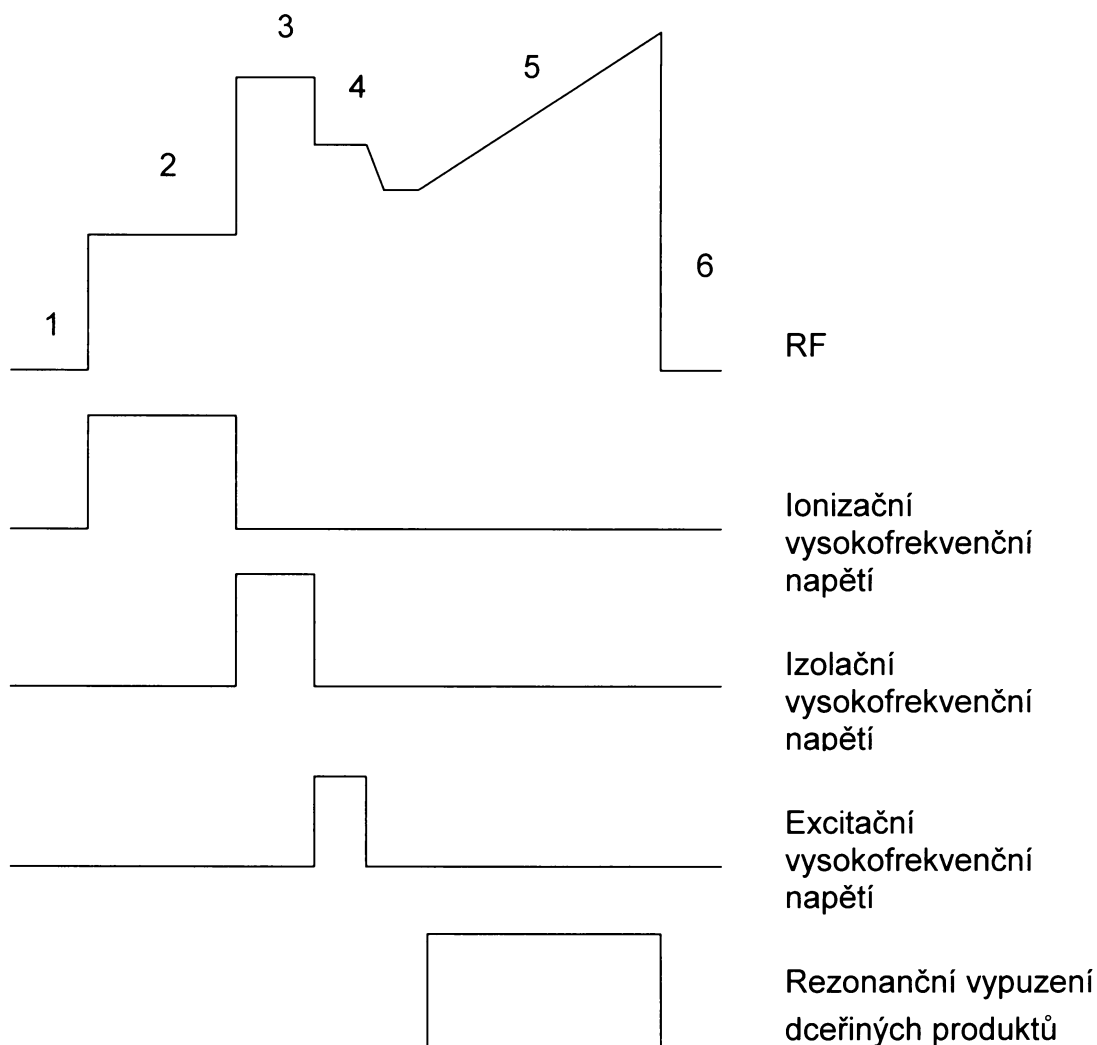
r_o vnitřní poloměr IT

Ω angulární frekvence nárůstu RF

q_z stabilitní faktor, který určuje na jaké dráze v IT se nachází při daném RF iont o daném m/z

V obrázku 21 je pak uvedeno schéma MS/MS experimentu s časovým průběhem aktivace jednotlivých funkcí. V původním software pro GCQ bylo možné měnit pouze parametr kolizní energie při jedné diskrétní hodnotě stabilitního faktoru q_z . V dalších verzích již je možné měnit doby aplikace jednotlivých segmentů MS/MS experimentu, jako jsou izolace iontů, excitace iontů a také manuálně zadávat frekvenci aplikovaného vysokofrekvenčního napětí. Pro sloučeniny studované v této práci změny provedené oproti standardně nastaveným hodnotám těchto parametrů byly nepozorovatelné nebo zanedbatelné. Tato skutečnost nám pak dovolila zjednodušit optimalizaci MS/MS experimentu na optimalizaci kolizní energie a nátoky přidavného plynu do IT.

obrázek 21 Schéma průběhu MS/MS experimentu v IT (převzato z firemních materiálů)



- 1 RF vypnuto – v IT nejsou přítomny žádné ionty
- 2 RF je zapnuto na udržováno na hladině vhodné pro skladování iontů . Hradlo (iontová čočka č. 2) je otevřená a ionty jsou napouštěny do pasti a „skladovány“.
- 3 Izolace rodičovských iontů - je aplikováno izolační vysokofrekvenční napětí (širokopásmový puls od 10 do 500 kHz s „dírou“ odpovídající hmotě rodičovského iontu). Toto vysokofrekvenční napětí destabilizuje všechny ionty kromě vybraného rodičovského iontu.
- 4 Excitační napětí (kolizní energie) společně se srážkami s atomy He v pasti sekundárně ionizují a excitují rodičovské ionty, což vede ke vzniku dceřiných iontů (použitá frekvence je 67 kHz)
- 5 Analytický scan dceřiných iontů je prováděn zvyšováním RF (0,09 μ sec/amu). Dceřinné ionty jsou vypuzeny z prostoru IT, fokusovány výstupní iontovou optikou na konverzní dynodu, kde dochází k jejich detekci.
- 6 RF je resetováno na nulovou hodnotu – vypnuto.

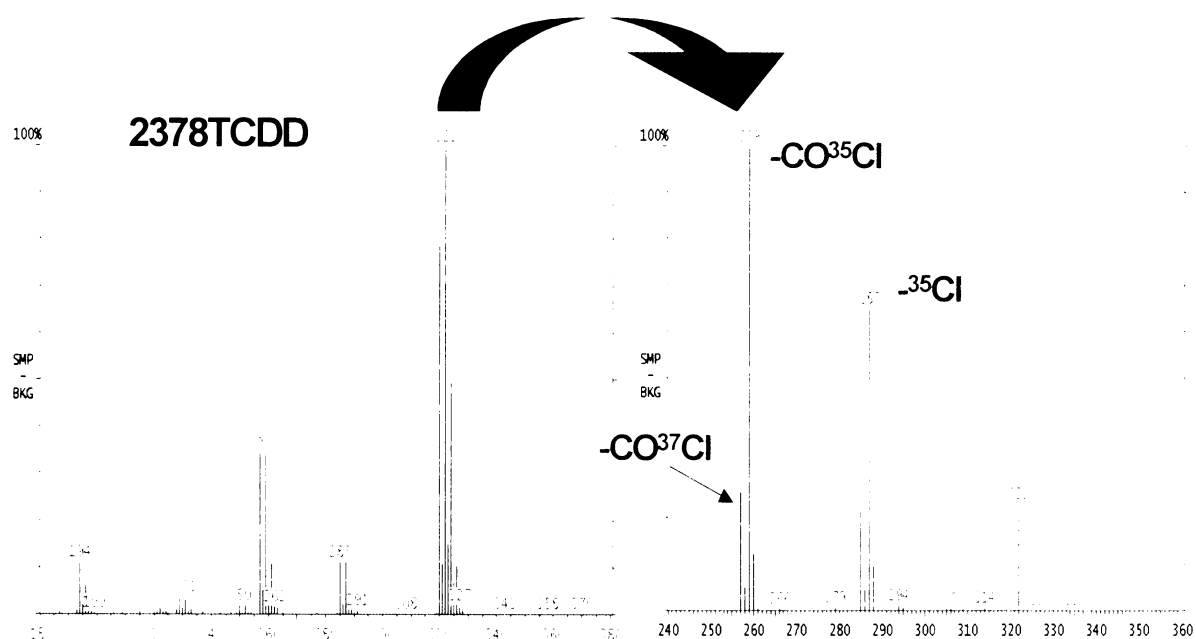
Výše popsaný MS/MS experiment lze v reálném čase provést pouze s jedním iontem. Nicméně doba trvání jednoho experimentu je velmi krátká a proto lze na jeden bod v chromatogramu provést „paralelně“ několik MS/MS experimentů. V řídicím programu lze nastavit v jednom okně až deset MS/MS experimentů. Každý z nich zabírá časový úsek, který je nazýván mikroscanem. Vzhledem k tomu, že je žádoucí dosáhnout co nejmenšího rozptylu dat na nízké koncentrační hladině, je nutné kumulovat signál a potlačit šum. Toho je dosaženo tím, že se v programu nastavuje počet mikroscanů, které se sečtou a způměrují (náhodný šum se vyruší a signál kumuluje). Obvyklý počet je 3 až 5 mikroscanů. Pokud jsou tedy prováděny tři MS/MS experimenty „paralelně“, znamená to, že je nejprve proveden požadovaný počet mikroscanů pro první MS/MS experiment pak pro druhý a poté pro třetí. Součet trvání těchto operací s ionty pak dává celkový interval jednoho měření na časové ose chromatogramu. Z tohoto popisu vyplývá, že je teoreticky možné provádět 10 MS/MS experimentů najednou, prakticky je však časový interval mezi dvěma body na časové ose chromatogramu tak velký, že již nelze dobře vykreslit chromatografický pík z GC kolony. Počet MS/MS experimentů snímaných v jednom okně „paralelně“ je tedy limitován tím, aby počet bodů na chromatografický pík neklesl pod 8 – 12 pro PCDD/F. Pro těkavější sloučeniny jako jsou PCB a OCP, používáme takové nastavení, aby byl počet bodů na pík minimálně 5.

3.3.2 PCDD/F

Vývoj MS/MS metody pro stanovení PCDD/F v lidském podkožním tuku byl prvním zadáním a nákup přístroje byl tímto zadáním podmíněn. První experimenty jsem zahájil v roce 1997, kdy byly iontové pasti nové generace dostupné zhruba 1 rok. Při firemním nastavení regulace nátoku byly námi dosažené meze stanovitelnosti příliš vysoké pro stanovení PCDD/F na koncentračních hladinách v řádu pg/g tuku. Nátok přídavného helia do iontové pasti je v přístrojích GCQ a GCQplus řešen jehlovým ventilem, který byl napojen přes redukci přímo do prostoru IT bez možnosti měřit průtok He. Tlak v hmotnostním analyzátoru nelze přímo měřit, proto jsme jako orientační hodnotu použili změnu vakua v celém prostoru MS analyzátoru.

Postup optimalizace MS/MS experimentu probíhal v několika krocích. Rozdílné bylo chování PCDD a PCDF, mezi jednotlivými homology PCDD nebo PCDF nebyly principiální rozdíly. Prvním krokem optimalizace je vybrání vhodného rodičovského iontu. Na obrázku 22 je uvedeno EI full scan a EI MS/MS spektrum 2378TCDD naměřená na přístroji GCQ.

obrázek 22 EI full scan spektrum (vlevo) a EI MS/MS spektrum (vpravo) 2378 TCDD

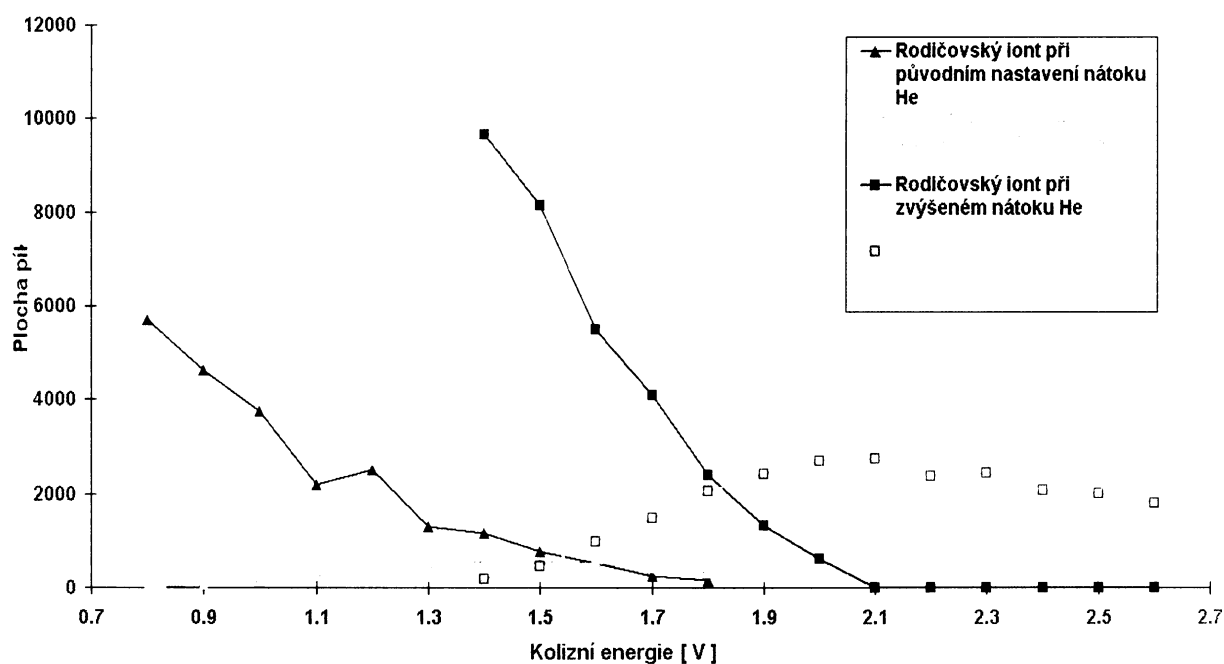


Molekulový iont 2378TCDD má hmotnost 320 m/z a na dibenzodioxinový skelet jsou navázány pouze atomy chloru 35. Jde tedy o izotopově čistý pík. Nejintenzivnější je pak iont o hmotnosti 322, kde jsou atomy Cl v molekule TCDD zastoupeny v přirozeném poměru izotopů (3 atomy ^{35}Cl ku 1 atomu ^{37}Cl). Z MS/MS spektra je pak patrné, že za daných podmínek byl nejintenzivnějším dceřinným iontem právě $M^{+2} - \text{CO}^{35}\text{Cl}$ (259 m/z) dále jsou ve spektru přítomny i ionty $M^{+2} - \text{C}^{35(37)}\text{Cl}$, které je však méně intenzivní a hlavně neselektivní (podobné fragmenty mohou odštěpit i ostatní chlorované látky např. PCB).

Pro MS/MS experiment jsme vybrali iont 322 jednak proto, že je nejintenzivnější, ale také proto, že podle poměru dceřinných iontů $M^{+2} - \text{CO}^{35}\text{Cl}$ a $M^{+2} - \text{CO}^{37}\text{Cl}$ je možné posoudit, zda jde opravdu o TCDD a ne o interferenci. Mechanismus odštěpení COCl z molekuly PCDD/F není příliš jasný, nicméně jde o velmi selektivní fragmentaci charakteristickou pouze pro PCDD/F a také pro PCDE (polychlorované difenylethery), kde však pravděpodobně za podmínek ionizace vzniknou nejprve z PCDE ($n \text{ Cl} = x$) PCDF ($n \text{ Cl} = x-2$) a ty pak poskytují stejná MS/MS spektra jako PCDF.

V prvním kroku optimalizace jsme vybrali vhodné rodičovské a dceřiné ionty. V druhém jsme pak optimalizovali kolizní energie pro co nejvyšší výtěžnost dceřinných iontů. Jak již bylo uvedeno výše, původní firemní nastavení nátoky He do iontové pasti neposkytovalo uspokojivou citlivost. Z tohoto důvodu jsme zvýšili nátok přídavného plynu do IT (rozdíl tlaku snímaného iontovou měrkou činil $2 \times 10^{-3} \text{ Pa}$). Při obou nastaveních byla provedena sada nástrůků standardu o stejné koncentraci do GC/MS, jediným parametrem, který jsme měnili, byla kolizní energie. Efekt zvýšení koncentrace He v prostoru hmotnostního spektrometru na výtěžnost dceřinných iontů je ukázán v obrázku 23.

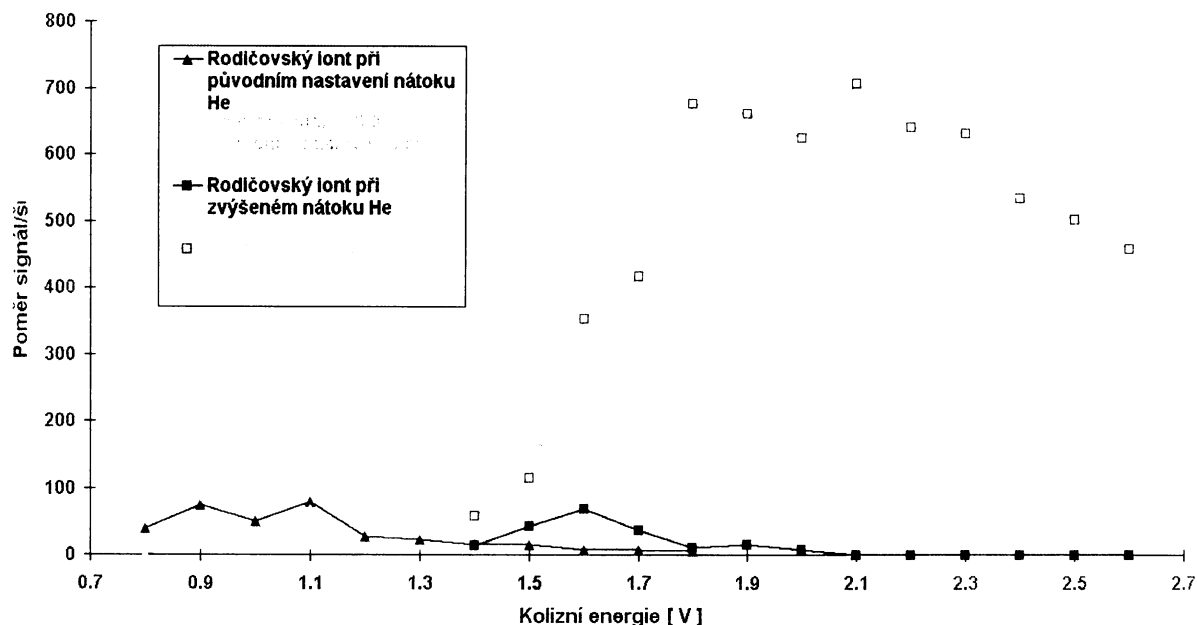
obrázek 23 Závislost ploch píku rodičovského a dceřinného iontu na kolizní energii při původním a zvýšeném nátoku He do IT. Nástřik 1 μl standardu o koncentraci 2,5 $\text{pg}/\mu\text{l}$, GC metoda popsaná výše v kapitole 4.2.1 .



Pro lepší názornost jsou jednotlivé body spojeny čarou, nejde o proložení polynomu či jiné funkce. Z obrázku je patrné, že se zvyšující se kolizní energii klesá odezva rodičovských iontů a naopak se zvyšuje odezva dceřinných produktů. Zvýšení nátoku He do iontové pasti způsobuje posun optimální kolizní energie (nejvyšší odezvu na dceřinných iontech) k vyšším hodnotám, ale také zvýšení odezvy dceřinných iontů na cca pětinašobek.

Tuto optimalizace jsme provedli na přístroji GCQ ještě se starou verzí ovládacího programu, kde byl MS/MS experiment prováděn při hodnotě q_z 0,225. Na dalším obrázku 24 je znázorněna pro stejné experimenty závislost poměru signál/šum na kolizní energii.

obrázek 24 Závislost poměru signál/šum na kolizní energii ze stejného experimentu jako obr. 22. Jednotlivé body jsou pro větší názornost spojeny čarou.



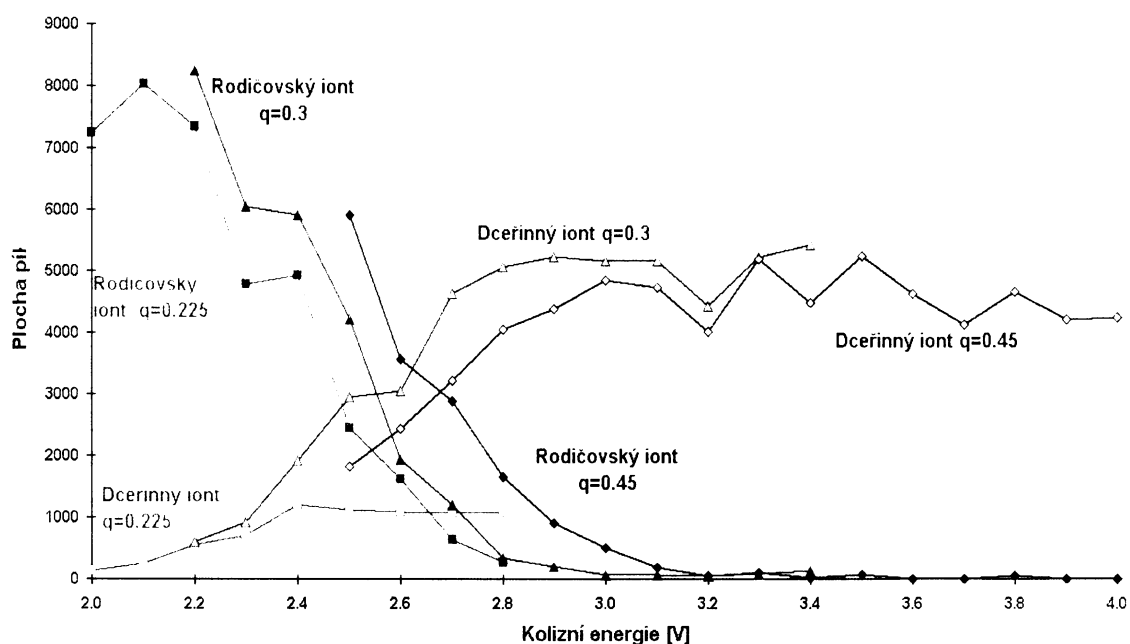
Z obrázku je patrný řádový rozdíl mezi poměrem signál/šum píků odpovídajících rodičovským a dceřiným iontům. Zatímco při stejném signálu (plocha píku) se pohybuje poměr signál/šum u rodičovských iontů maximálně v desítkách, je poměr signál/šum u dceřiných iontů řádově větší. Pro optimalizovaný nátok He se pak pohybuje v hodnotách 600 až 700. Z obrázku 23 je patrná obrovská výhoda MS/MS – potlačení chemického šumu a tedy zvýšení citlivosti detekce o řád.

Ve druhém optimalizačním kroku jsme dosáhli postačující citlivosti pro stanovení PCDD v dané matrici (podkožní lidský tuk). PCDF však bohužel vykazují za stejných podmínek odlišné chování. Optimální hodnoty kolizních energií pro PCDF byly vyšší než pro PCDD. Průběh závislosti ploch na kolizní energii byl jiný než u PCDD. Odezva na rodičovských iontech klesala, nicméně nárůst odezvy dceřiných iontů byl mnohem nižší než u PCDD. Energie dceřiných iontů je při použití stabilního faktoru $q_z = 0,225$ pravděpodobně příliš vysoká než aby se udržely na stabilní dráze v iontové pasti a tak jsou za těchto podmínek vypuzeny z IT dříve než je zahájen analytický scan.

Řešením tohoto problému bylo až dodání nové verze software, který umožňuje volbu MS/MS experimentu při třech různých hodnotách q_z 0,225, 0,3 a 0,45. Třetím krokem optimalizace tedy bylo proměření závislosti odezvy dceřiných iontů na kolizní energii při různých hodnotách q_z . Tyto experimenty již jsme již prováděli na přístroji PolarisQ, nicméně získané hodnoty jsou plně použitelné i na GCQ. Regulace přítoku He do hmotnostního spektrometru je v tomto typu PolarisQ řešena jehlovým ventilem s manometrem, který je již výrobcem kalibrován tak, že je možné pomocí tlaku přesně nastavit nátok He v ml/min.

Stejných hodnot odezvy i stejných MS/MS spekter jako u GCQ jsme na PolarisQ dosáhli při nátoku He 1,05 ml/min. oproti 0,3 ml/min firemního nastavení. Rozměry iontové pasti v PolarisQ jsou však poněkud odlišné od pasti použité v GCQ. Při tomto nátoku přídavného plynu jsme provedli optimalizaci kolizních energií a stabilitního faktoru. Výsledky jsou uvedeny v obrázku 25.

obrázek 25 Závislost odezvy rodičovských a dceřinných iontů 2378TCDF na kolizní energii při různých hodnotách stabilitního faktoru. Jednotlivé body jsou pro větší názornost spojeny čarou.



Z obrázku je patrné, že se zvyšováním hodnoty q_z se optimální kolizní energie pro 2378TCDF posunují k vyšším hodnotám. Dále je patrný velký rozdíl mezi odezvami dceřinných iontů při hodnotě q_z 0,225 a při vyšších hodnotách (0,3 a 0,45). Při vyšších hodnotách stabilitního faktoru již nedochází během MS/MS experimentu ke ztrátám dceřinných iontů a ploch píku (odezva) je při stejné koncentraci dokonce vyšší než u PCDD.

Jak již bylo uvedeno výše, optimalizační experimenty jsme prováděli jako sadu GC/MS analýz standardu o stejné koncentraci, který obsahoval vždy po jednom izomeru tetra až oktachlorovaných PCDD/F. Průběh optimalizací u ostatních izomerů byl velmi podobný modelovým sloučeninám 2378TCDD a 2378TCDF. Optimalizované parametry MS/MS pro jsou shrnuty v tabulce 10. Na průběhu závislosti odezvy na dceřinném iontu je patrné plato v okolí optimální kolizní energie. Změna kolizní energie v desetínách V od optimální hodnoty nemá podle našich zjištění vliv na odezvu.

tabulka 10 Tabulka optimalizovaných parametrů MS/MS experimentu pro Tetra až Okta CDD/F včetně izotopově značených vnitřních standardů pro nátok He do iontové pasti 1,05 ml/min. a hodnotu q_z 0.3.

	Kolizní energie	Rodičovský iont	Analytický scan
	[V]	nativní/izotopicky značený [m/z]	
TCDD	3.0	322/334	256-261/267-272
PeCDD	3.0	356/368	290-295/301-306
HxCDD	3.2	390/402	324-329/335-340
HpCDD	3.2	424/436	358-363/369-374
OCDD	3.3	460/472	394-399/405-410
TCDF	3.3	306/318	240-245/250-255
PeCDF	3.3	340/352	274-279/285-290
HxCDF	3.5	374/386	308-313/319-324
HpCDF	3.5	408/420	342-347/355-360
OCDF	3.6	444/456	378-383/394-399

Pro všechny MS/MS experimenty byly použity tyto další parametry: Izolační čas 8 ms, excitační čas 10 ms a počet mikroskanů 4. Nastavení času pro začátky jednotlivých experimentů je prováděno pro různé kolony na základě analýz standardních roztoků, ve kterých jsou přítomny vždy první a poslední eluující izomer z dané skupiny.

Postup optimalizace MS/MS, aplikaci a ověření metody pro analýzu biologických materiálů jsme publikovali v roce 2000 [74].

Pro rutinní užití jsme museli validovat parametry vyvinuté metody. Pro použití v praxi je nutné znát meze detekce (stanovitelnosti), lineární rozsah, selektivitu, robustnost metody a také její přesnost a správnost. První dva parametry lze stanovit na základě analýz certifikovaných roztoků standardu PCDD/F. Ve většině stávajících norem (včetně ČSN EN 1948, EPA 1613) je limit detekce odvozen od poměru signál/šum (S/N), kdy je za mez detekce považována koncentrace, při níž je poměr S/N větší nebo roven 3. Tento přístup je determinován tradicí plynové chromatografie, kdy byly odezvy (na nepříliš selektivních detektorech) vyhodnocovány na základě výšky píku. V případě GC/MS je tento přístup zavádějící. Pro stanovení meze detekce a stanovitelnosti jsme použili dva přístupy. Jeden používá hodnotu S/N a druhý je založen na statistickém přístupu, kdy je na základě opakovatelnosti nástřiku standardu na velmi nízké koncentrační hladině vypočítána mez detekce jako trojnásobek odhadu směrodatné odchylky plochy píku. Mez stanovitelnosti je poté z obou hodnot vypočítána jako 3,04 násobek meze detekce [75]. Optimalizovanou GC/MS/MS metodou jsme provedli 10 opakovaných analýz standardu PCDD/F o koncentraci

0,05 pg/μl (2 μl nástřík). Pomocí vyhodnocovacího software jsme integrovali plochy píků a stanovili poměr signál/šum. Vypočetli jsme průměrný poměr S/N na této koncentrační hladině a poté také mez detekce jako koncentraci odpovídající S/N = 3. Z ploch píku jsme vypočetli odhad směrodatné odchylky a z něho mez detekce jako koncentraci odpovídající trojnásobku tohoto odhadu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 11.

tabulka 11 Porovnání mezí detekce (DL) a stanovitelnosti (LOD) vypočtených na základě poměru signál šum (v tabulce označeno jako S/N) nebo z rozptylu ploch píku (v tabulce 3SD)

	DL (3SD)	DL(S/N=3)	LOD=3.04*DL(3SD)	LOD=3.04*DL (S/N=3)	LOD(SD)/LOD(S/N)
	pg/ul	pg/ul	pg/ul	pg/ul	
2378TCDD	0.041	0.011	0.12	0.035	3.5
12378PeCDD	0.040	0.007	0.12	0.021	5.8
123478HxCDD	0.038	0.007	0.12	0.021	5.5
1234678HpCDD	0.028	0.010	0.086	0.030	2.9
OCDD	0.040	0.024	0.12	0.073	1.6
2378TCDF	0.037	0.006	0.11	0.017	6.6
12378PeCDF	0.040	0.016	0.12	0.048	2.5
123478HxCDF	0.038	0.010	0.11	0.030	3.8
1234678HpCDF	0.032	0.004	0.10	0.012	8.1
OCDF	0.049	0.019	0.15	0.057	2.6

V posledním sloupci tabulky je uveden poměr mezi stanovitelností získaných z rozptylu ploch píků a z poměru S/N. Na první pohled je patrné, že meze stanovitelnosti odvozené od S/N jsou u všech PCDD/F 2-8 x lepší než ty, které jsou vypočtené z rozptylu ploch píků.

Pro kvantifikaci všech sloučenin metodou GC/MS je v naprosté většině používána plocha píku, nikoli jeho výška. Meze stanovitelnosti i detekce jsou proto na základě těchto dat pro všechny metody, uvedené v této práci, stanovovány z rozptylu ploch píků standardu, nikoli na základě poměru signál/šum.

Pro praktickou použitelnost detekční metody je důležitý lineární rozsah odezvy. Pro metodu izotopového zředění tento parametr znamená stabilitu odezvového faktoru při konstantní koncentraci vnitřního standardu a proměnné koncentraci nativního analytu. Vzorec pro výpočet relativního odezvového faktoru je uveden v rovnici 2.

rovnice 2 vzorec pro výpočet relativního odezvového faktoru

$$RRF = \frac{A_N * C_{IS}}{A_{IS} * C_N}$$

kde RRF je relativní odezvový faktor, A_N je plocha píku nativního analytu, A_{IS} je plocha píku izotopicky značeného vnitřního standardu, C_N a C_{IS} jsou pak příslušné koncentrace těchto látek v daném kalibračním standardu.

Speciálně při stanovení PCDD/F ve vzorcích emisí a popílku se můžeme setkat s tím, že koncentrační rozdíly mezi jednotlivými izomery činí až několik řádů. Vnitřní standard přitom přidáváme na relativně nízké koncentrační hladině. Velký lineární rozsah je tedy nezbytný. V době, kdy byla MS/MS metoda v naší laboratoři vyvinuta, nebyla v platnosti žádná norma, která by omezovala použití MS/MS detekce v praxi. V rámci zavádění evropské legislativy vstoupila v platnost norma ČSN EN 1948 1-3, ve které je primárně uvedena jako detekční metoda vysokorozlišující hmotnostní spektrometrie (HRMS). Nicméně po ověření daných parametrů (jedním z nich je i linearita odezvy) jsou akceptovány i další MS metody. V laboratoři jsme provedli řadu srovnávacích experimentů mezi MS/MS a HRMS (zakoupen v roce 2002), které jsme prezentovali na mezinárodní úrovni [76, 77]. V tabulce 12 jsou pak porovnány výsledky měření kalibrační sady standardů, která odpovídá ČSN EN 1948, metodami MS/MS a HRMS.

tabulka 12 Výsledky měření šestibodové kalibrační sady standardů

	Koncentrační rozmezí	Korelační faktor*		RSD vypočtených RRF	
	nativních PCDD/F			%	
Izomer	pg/μl	MS/MS	HRMS	MS/MS	HRMS
2378TCDD	0.2 – 320	0.99	0.99	5.1	1.6
12378PeCDD	0.4 – 640	0.99	0.99	8.9	2.3
123478HxCDD	0.4 – 640	0.99	0.99	7.6	2.5
1234678HpCDD	0.8 – 1280	0.99	0.99	5.7	1.0
OCDD	0.8 – 1280	0.99	0.99	7.1	1.4
2378TCDF	0.2 – 320	0.99	0.99	6.3	1.8
23478PeCDF	0.4 – 640	0.99	0.99	3.5	2.3
123478HxCDF	0.4 – 640	0.99	0.99	12	2.8
1234678HpCDF	0.8 – 1280	0.99	0.99	9.9	1.4
OCDF	0.8 – 1280	0.99	0.99	11	1.8

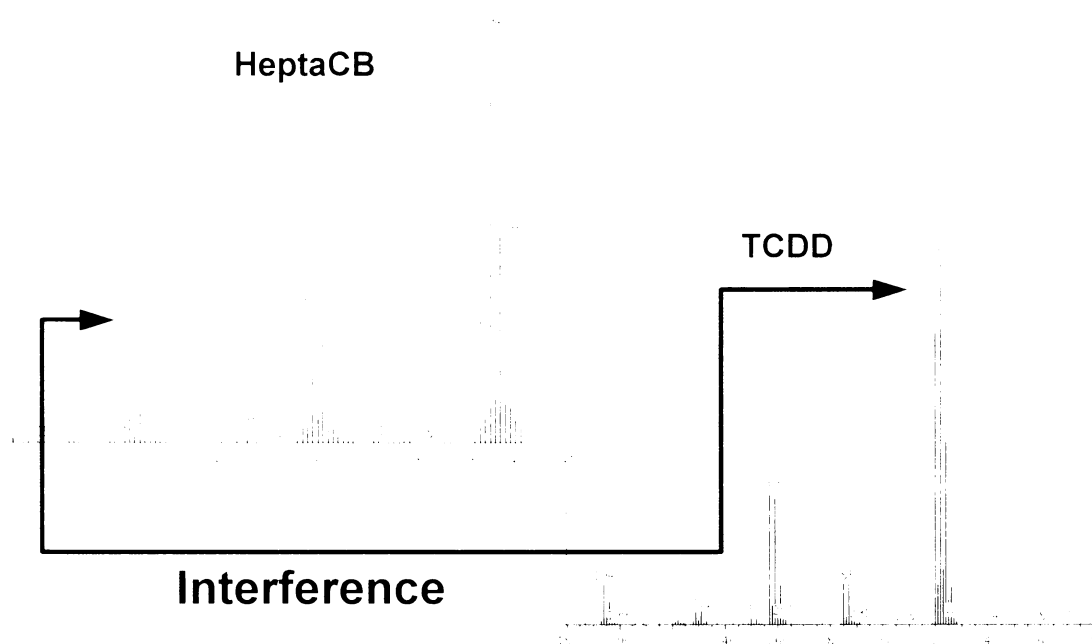
* závislost poměru ploch píků nativní/izotopicky značený IS ke koncentraci nativní sloučeniny

Podle požadavků výše uvedené normy by RSD odezvoových faktorů nemělo překročit 15%, při lineárním rozsahu přes dva řády. Tato kalibrační sada pokrývá rozsah větší jak čtyři řády. Jak je vidět z tab. 12, obě metody tento požadavek splňují. Nicméně HRMS má mnohem nižší rozptyl hodnot, což je dáno především lepším vykreslením píku (HRMS má větší vzorkovací frekvenci na časové ose chromatogramu).

Selektivitu detekční metody již nelze odvodit pouze z analýz kalibračních standardů, nýbrž musí být odvozena a ověřena analýzami reálných vzorků. Vzhledem k tomu, že

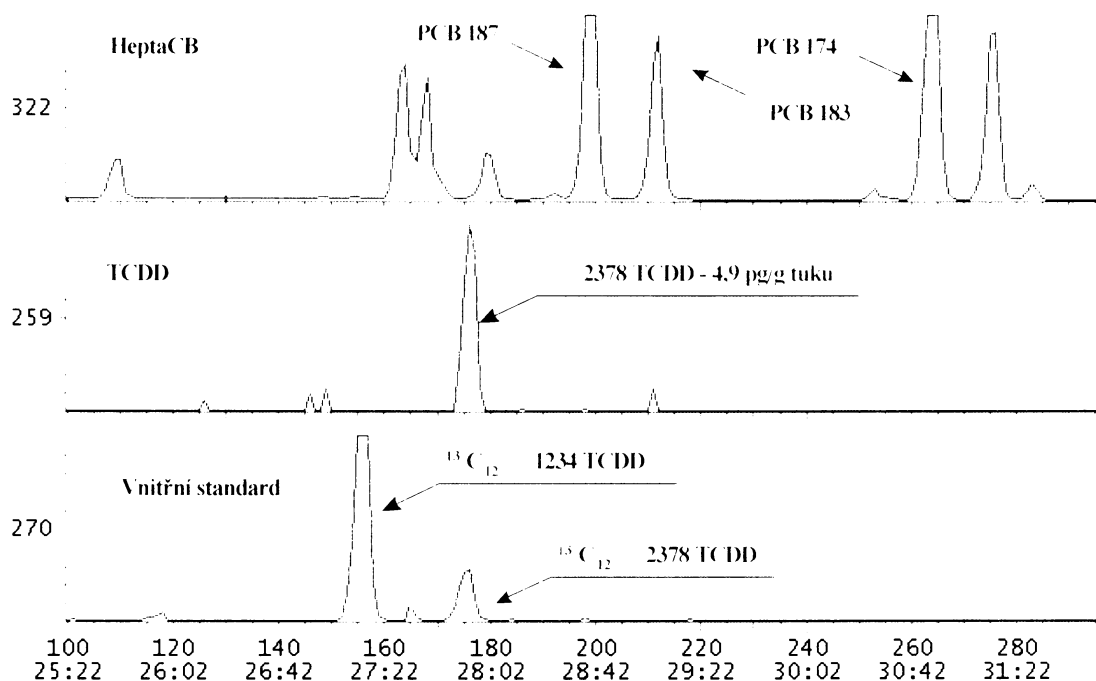
PCDD/F jsou ve vzorcích zastoupeny na řádově nižších koncentračních hladinách než další chlorované látky, jako jsou např. PCB a DDT, které mohou interferovat i při použití HRMS, je obrovskou výhodou MS/MS PCDD/F kvantifikace těchto sloučenin na dceřinném iontu, který vzniká odštěpením velmi specifického fragmentu COCl. Názorným příkladem je interference heptaCB s 2378TCDD (obr 26). Na obrázku 27 jsou pak porovnány chromatogramy reálného vzorku lidského podkožního tuku na m/z odpovídajících iontu 322 (rodičovský ion 2378 TCDD a zároveň fragment heptaCB).

obrázek 26 Porovnání hmotnostních spekter 2378TCDD a heptachlorbifenyly.



Z obrázku je patrné, že fragment $-2Cl$ HpCB interferuje s nejintenzivnějším iontem ve spektru 2378 TCDD.

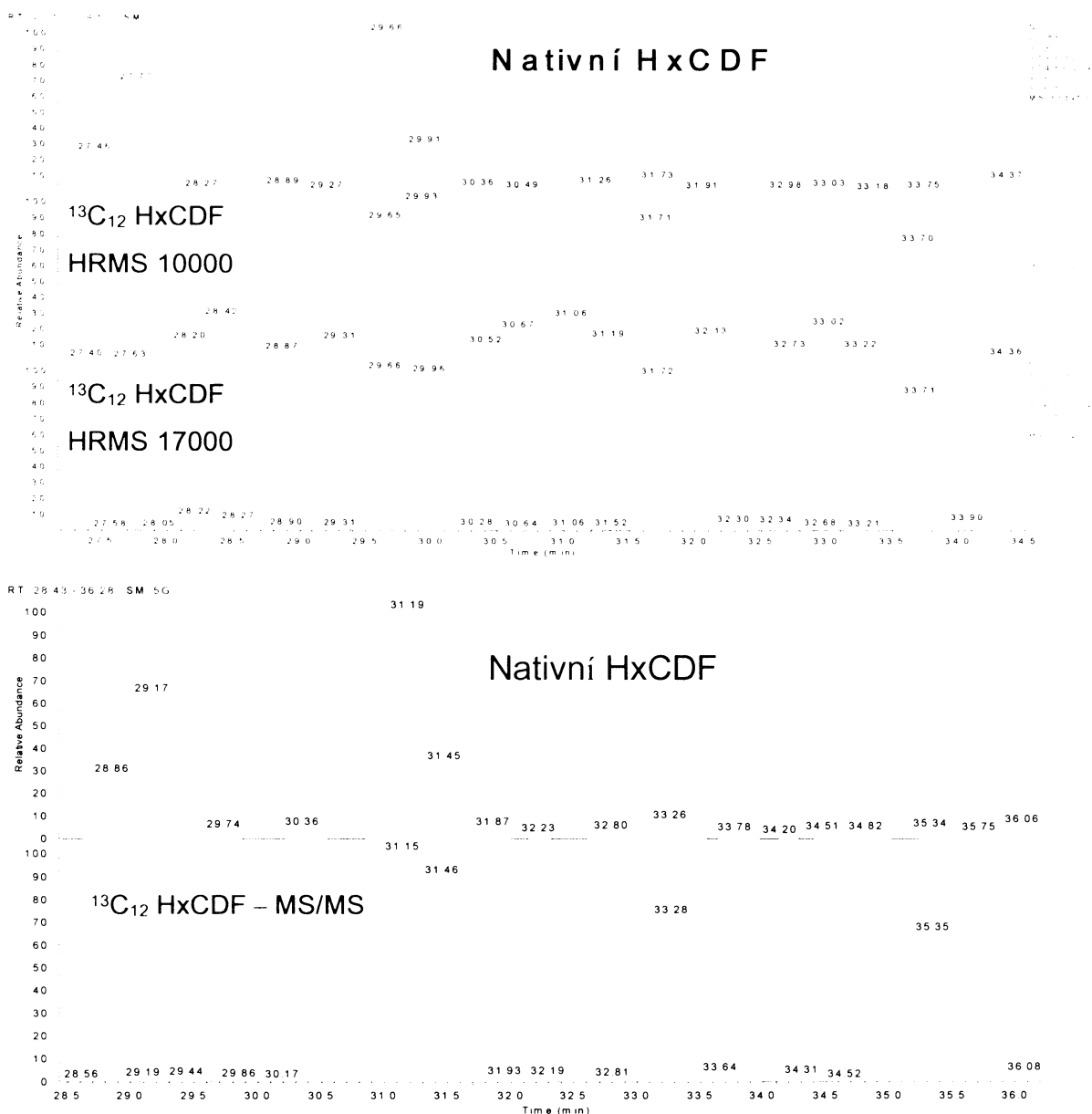
obrázek 27 Chromatogramy vzorku lidského podkožního tuku pro ionty m/z 322 (odpovídá nejintenzivnějšímu píku ve spektru TCDD, 259 (dceřinný iont TCDD) a na m/z 270 (vnitřní standard)



Z obrázku je patrné, že MS/MS detekce je velmi selektivní. Zatímco v chromatogramu na m/z 322 není patrný ani náznak píku, který by odpovídal TCDD, na m/z příslušející dceřinnému iontu je vykreslen pouze pík 2378TCDD. Pro ilustraci je uvedena koncentrace 2378TCDD (4.9 pg/g tuku), koncentrace interferujících izomerů HpCB se pohybuje řádově v desítkách až stovkách ng/g tuku. Z tohoto množství je většina odstraněna frakcionací na sloupci oxidu hlinitého, nicméně i cca 1-5 % těchto HpCB, které projdou čistící procedurou, neumožňuje stanovení 2378TCDD na m/z 322 při rozlišení menším než 10 000.

MS/MS je velmi selektivní i v porovnání s HRMS. Na obrázku 28 je uvedeno porovnání chromatogramů HxCDF v referenčním materiálu DX-1 (sediment z jezera Ontario). Jde o stejný vzorek, který jsme pouze třikrát analyzovali – jednou při rozlišení 10000, podruhé při rozlišení 17000 a potřetí metodou MS/MS.

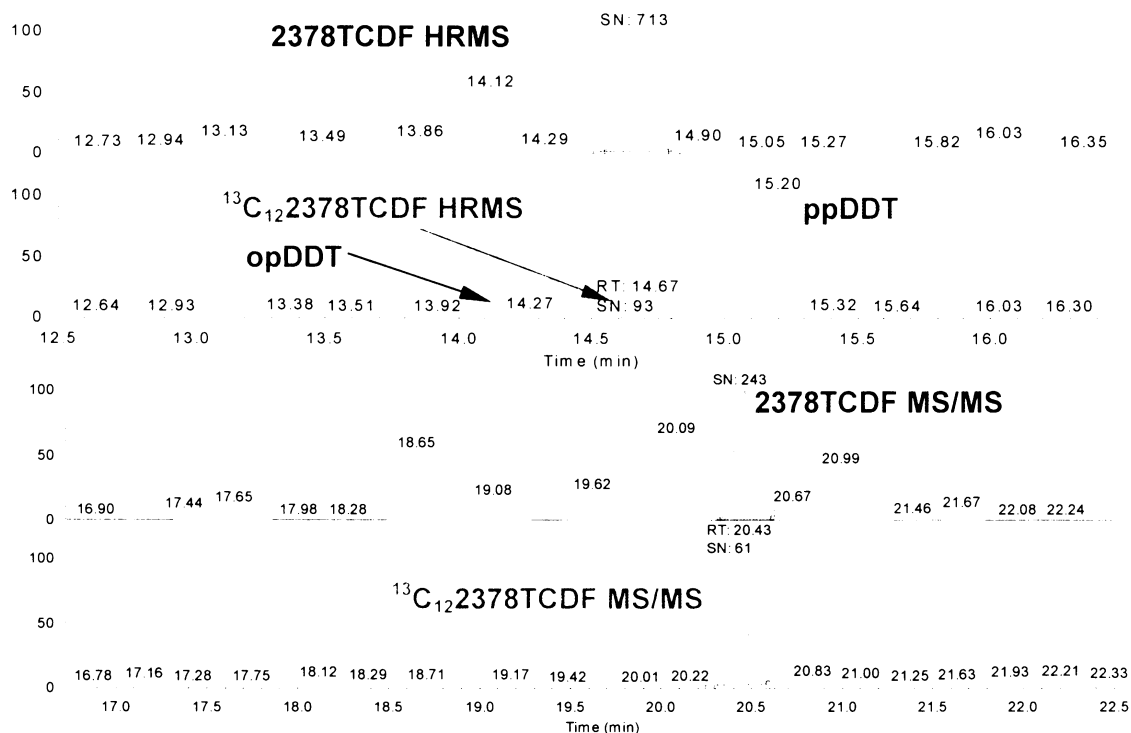
obrázek 28 Chromatogramy HxCDF v referenčním materiálu DX-1



Z obrázku je patrné, že chromatogramy nativních HxCDF jsou téměř identické jak metodou HRMS, tak i metodou MS/MS. Zato v chromatogramu izotopicky značených vnitřních standardů metodou HRMS, jsou při použití standardně používaného rozlišení 10 000 patrné píky interferencí, které se částečně podařilo eliminovat zvýšením rozlišení na 17 000. Přesto z porovnání nejlépe vychází detekce pomocí MS/MS, kde nejsou patrné žádné píky interferujících sloučenin. Navíc se zvýšením rozlišení u sektorových MS rapidně snižuje citlivost detekce.

Velmi názorným příkladem selektivity MS/MS je také porovnání HRMS a MS/MS chromatogramů mnohem méně exotických vzorků než jsou kanadské sedimenty a to na příkladu vzorků půd z okolí SPOLANY Neratovice. Zde kromě relativně vysokých koncentrací PCDD/F jsou běžné extrémně vysoké koncentrace organochlorových pesticidů, jako jsou např. DDT a jeho metabolity. DDT částečně přechází do dioxinové frakce vzorku a poté může způsobit problémy při HRMS detekci, jak je ukázáno v obrázku 29.

obrázek 29 Porovnání MS/MS a HRMS (rozlišení 10 000- 12 000) detekce TCDF ve vzorku půdy z okolí SPOLANY Neratovice (kolona DB5ms)



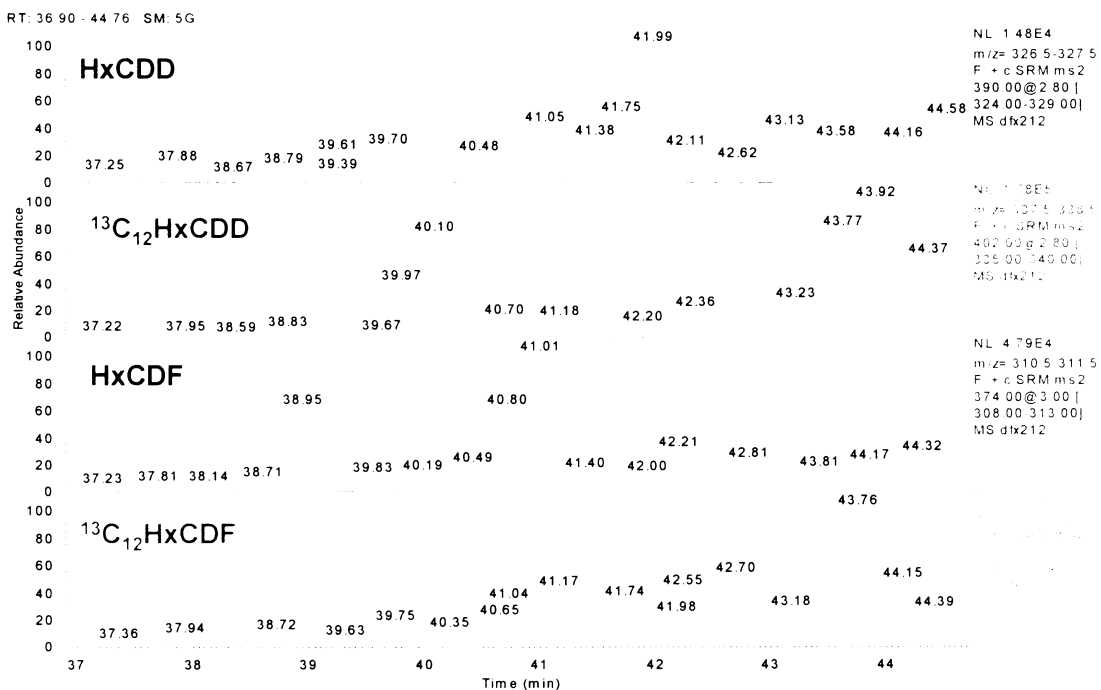
Z obrázku je patrné, že DDT a jeho metabolity mohou být problémem při použití HRMS detekce při stanovení TCDF ve vzorcích obsahujících vysoké hladiny těchto látek. Na použité nepolární fázi DB5ms jsou sice DDT a izotopicky značený 2378 TCDF separovány, nicméně pro separaci 2378 TCDF je nutná polární fáze, kde už separace DDT a 2378 TCDF není tak dobrá. Při aplikaci MS/MS ve stejném vzorku už v chromatogramu není vidět ani náznak píku interference.

Z výše uvedených příkladů je patrné, že MS/MS detekce PCDD/F je vysoce selektivní i v porovnání s referenční metodou pro analýzu PCDD/F – vysokorozlišující MS. I přesto jsme se však v praxi setkali s případy, kdy selektivita MS/MS ani HRMS nebyly dostačující pro úspěšné stanovení PCDD/F v daném vzorku. Většinou je příčinou interference složek v matrici vzorku, které nelze konvenčním postupem odstranit. Přítomnost této matrice v iontovém zdroji a následně i v analyzátoru pak způsobuje pokles výtěžnosti ionizace nebo až kompletní rekombinaci iontů. Ve výsledku se tento jev projevuje poklesem základní linie až na úroveň elektrického šumu a vymizením signálu. Tento jev je častější při MS/MS, neboť iontová past pracuje s větším množstvím iontů při mnohem horším vakuu.

Velmi vzácně jsme pozorovali i interference látek, které nelze označit jako matrici. Příkladem mohou posloužit analýzy destilačních zbytků z výroby PCB v CHEMKO Strážské. Tyto zbytky obsahují obrovské množství PCB, nicméně čistící procedura jich většinu odstraní. Bohužel se v nich vyskytují sloučeniny, které nelze jednoduše oddělit od PCDD/F, a které interferují při stanovení PCDD/F. Na obrázku 30 jsou uvedeny MS/MS

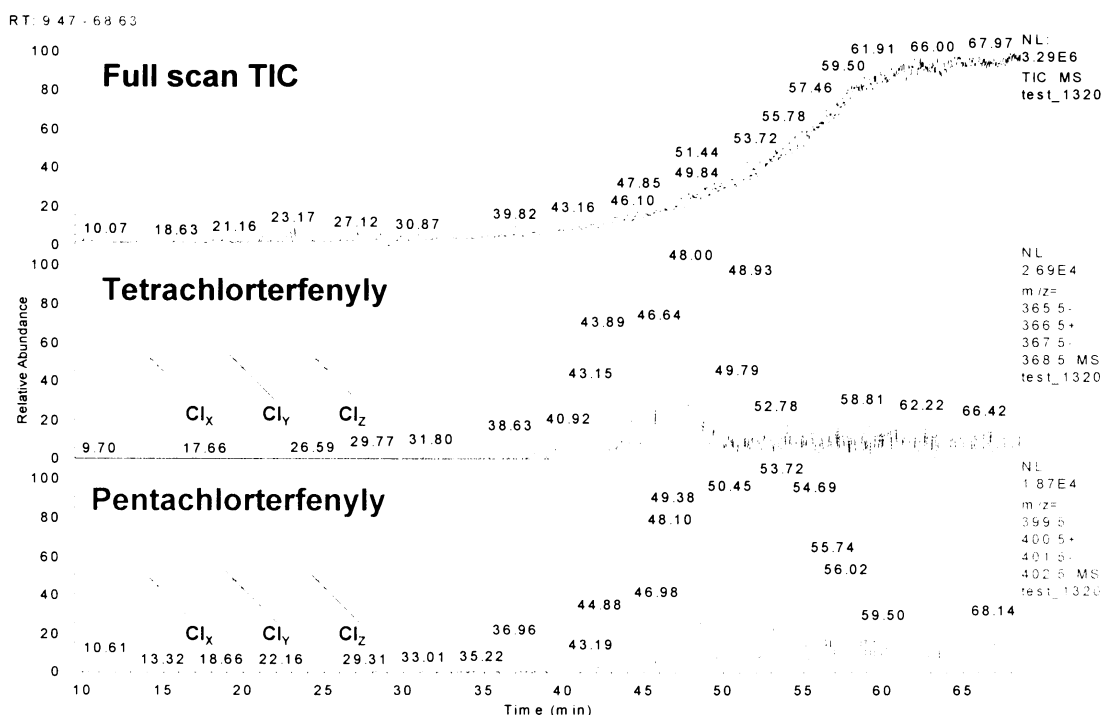
chromatogramy HxCDD/F. Nelze v nich identifikovat izotopicky značené vnitřní standardy ani nativní sloučeniny. Vzorek jsme poté analyzovali metodou GC/MS – v plném scanu pro případnou identifikaci interferencí. TIC chromatogram a extrahované chromatogramy příslušející mateřským iontům izotopicky značených HxCDD a nativních PeCDD jsou uvedeny v obrázku 31.

obrázek 30 Chromatogramy nativních a izotopicky značených standardů ve vzorku destilačních zbytků z výroby PCB (kolona DB5ms).



Ve všech chromatogramech je vidět velké množství částečně separovaných piků, které svým profilem ani počtem neodpovídají HxCDD/F.

obrázek 31 TIC a extrahované chromatogramy m/z 366 a 368 a m/z 400 a 402 (kolona DB-17).

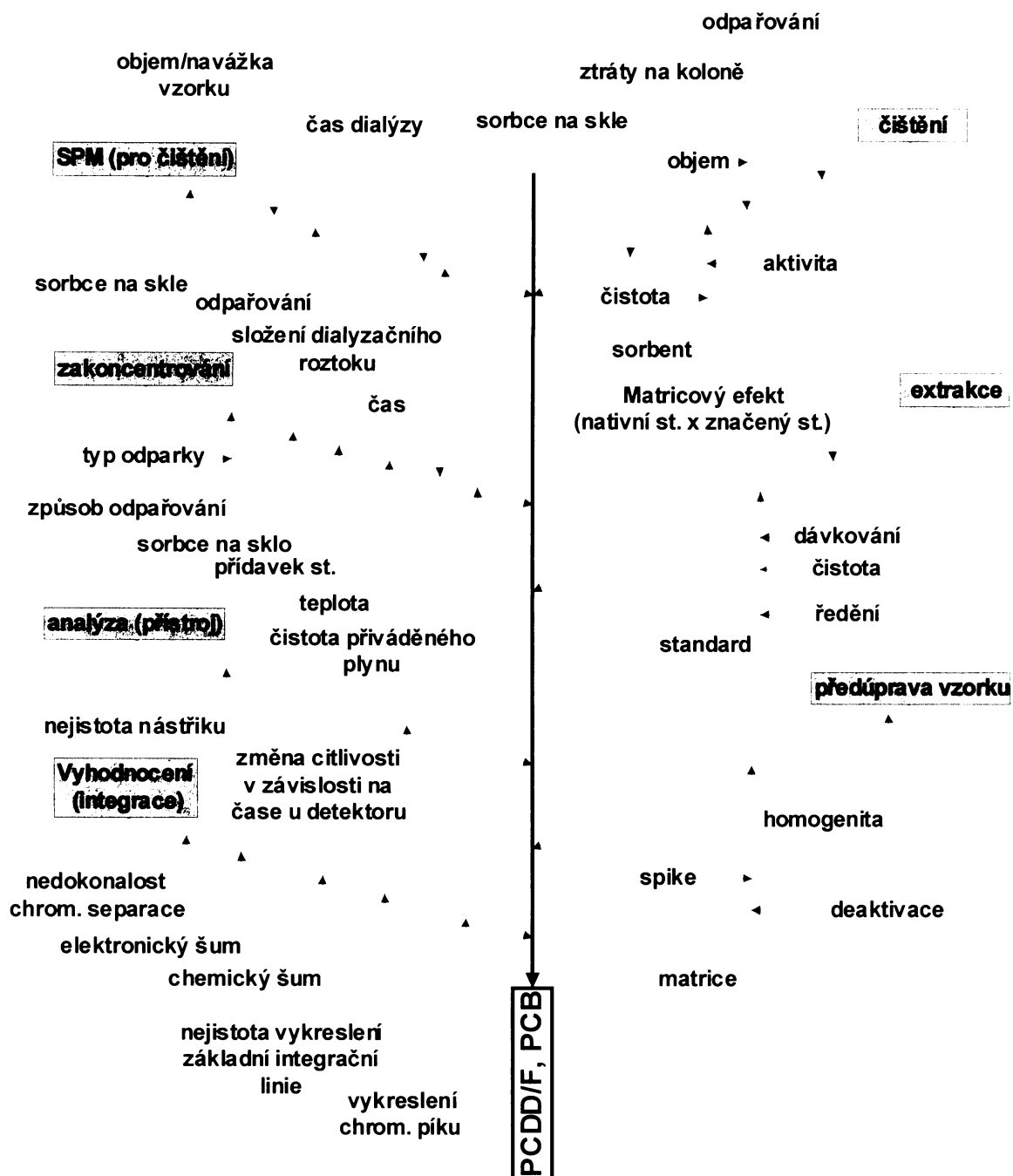


Interference byly identifikovány jako polychlorované terfenyly. Počet izomerů těchto sloučenin je mnohem vyšší než PCB, proto není možné oddělit PCDD/F chromatograficky. Chování terfenylů během čištění vzorku je identické jako PCDD/F. V tomto vzorku je jich o několik řádů více než PCDD/F, jejichž stanovení ruší mechanismech zmiňovaným výše v textu.

Selektivita MS/MS je plně postačující pro naprostou většinu vzorků, s nimiž jsme se za 9 let praxe s analýzami PCDD/F setkali. Snížení selektivity jsme pozorovali u obtížných matic, jako jsou rostlinné a minerální oleje, kde je to ovšem spíše problém čistícího postupu než vlastní MS/MS detekce. Naprosto ojedinělé jsou pak interference chlorovaných sloučenin v atypických vzorcích.

Dalšími velmi důležitými parametry metody jsou přesnost a správnost. Zde již nelze oddělit GC/MS/MS metodu od extrakce a čištění vzorku. Výsledná nejistota stanovení je součtem dílčích nejistot celého procesu analýzy. Existují postupy, které sčítají jednotlivé nejistoty dílčích kroků a z nich je pak spočtena celková nejistota stanovení, nicméně pro tak složitou metodu, jako je stanovení PCDD/F, to není možné. V obrázku 32 jsou schematicky popsány zdroje nejistot pro stanovení PCDD/F (tzv. Ishikavův diagram).

obrázek 32 Blokové schéma zdrojů nejistot při analýze PCDD/F



Z obrázku je patrné, že potenciálních zdrojů nejistoty při analýze PCDD/F je celá řada a je velmi obtížné definovat příspěvek každého z nich. Použití metody izotopového ředění naštěstí příspěvek většiny těchto zdrojů nejistot eliminuje na minimum. Celkovou nejistotu metody je nutné odvodit z experimentálních dat na základě opakovatelnosti analýz reálných vzorků.

Přesnost dané metody lze celkem jednoduše stanovit z opakovaných analýz vzorků. Problémem u tak komplikovaných metod jako je stanovení POP látek je to, že konvenční statistické metody vyžadují pro odhad směrodatné odchylky a další parametry soubory dat o počtech několika desítek výsledků. To je jak z časového tak i finančního hlediska těžko proveditelné. Proto jsme pro určení kvantitativních parametrů přesnosti použili postupy určené pro malé soubory dat.

Přesnost i správnost stanovení jsme v prvním kroku ověřili analýzami uměle připravených vzorků různých matic. Pro uměle připravené vzorky absorbátů jsou výsledky uvedeny již v tabulce 2. Výtěžnost metody pro analýzy pevných vzorků jsme ověřovali v prvním kroku na extrahovaném písku, do kterého jsme přidali nativní PCDD/F. Vzhledem k tomu, že je písek inertní materiál, byly výsledky velmi dobré, ale nijak nesimulovaly reálné vzorky, jako jsou půdy nebo popílky. Naopak uměle připravené vzorky tuku velmi dobře simulují vzorky jako jsou potraviny, ryby nebo podkožní tuk. Použili jsme vepřové sádlo, které má velmi nízké koncentrace cílových analytů (pod mezí stanovitelnosti). Do sedmi vzorků (10 g sádla) jsme přidali roztok nativních PCDD/F, naředili směsí hexan : dichlormetan. Takto připravené vzorky jsme převedli do tuby z polopropustné membrány (na jednom konci je zatavená), přidali k nim vnitřní standardy a dialyzovali je výše uvedeným postupem. Dialyzát byl pak dočištěn podle procedury uvedené v blokovém schématu, zkoncentrován na 40 μ l a analyzován GC/MS/MS. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 13.

tabulka 13 Výsledky sedmi paralelních stanovení PCDD/F v uměle připraveném vzorku tuku. Výtěžnost je zde uvedena jako poměr průměru stanovené koncentrace ke koncentraci vypočtené z přidavku standardu nativních PCDD/F do tuku.

	Koncentrace přidaných nativních PCDD/F	Průměr stanovených koncentrací	výtěžnost	RSD
	pg/g tuku	pg/g tuku		
2378TCDD	1	1.1	109%	19%
12378PeCDD	5	5.0	101%	12%
123478HxCDD	5	4.5	91%	14%
123678HxCDD	5	6.0	120%	16%
123789HxCDD	5	4.6	91%	18%
1234678HpCDD	5	5.1	102%	21%
OCDD	10	12.7	127%	7.5%
2378TCDF	1	1.0	96%	19%
12378PeCDF	5	4.7	93%	9.2%
23478PeCDF	5	4.6	93%	5.7%
123478HxCDF	5	5.2	105%	14%
123678HxCDF	5	5.3	107%	14%
234678HxCDF	5	5.0	99%	13%
123789HxCDF	5	5.7	115%	17%
1234678HpCDF	5	5.3	105%	12%
1234789HpCDF	5	5.5	110%	14%
OCDF	10	8.3	83%	16%

Z výsledků je patrné, že opakovatelnost metody je na této koncentrační hladině velmi dobrá. Nejistota stanovení se pohybuje se od 6 do 20-ti %. Také je zřejmé, že výsledky analýz nejsou v mezích této nejistoty odlišné od vztažené hodnoty.

Ve druhém kroku jsme provedli opakované analýzy reálných vzorků, kde jsou již i řádově odlišné koncentrace jednotlivých analytů a projevuje se matricový efekt. V tabulce 14 jsou uvedeny výsledky paralelních stanovení PCDD/F v popílku z rukávových filtrů. Ke vzorku popílku byly přidány vnitřní standardy a vzorek byl upraven, extrahován a přečištěn podle postupu uvedeného výše. Vzhledem k tomu, že v této matrici jsou přítomny i jiné než 2378 substituované PCDD/F, byly vzorky analyzovány jak na polární, tak i na nepolární stacionární fázi.

tabulka 14 Výsledky osmi paralelních stanovení PCDD/F v popílku z rukávových filtrů spalovny komunálních odpadů

	PF A	PF B	PF C	PF D	PF E	PF F	PF G	PF H	průměr	RSD
	ng/g									
2378TCDD	0.0233	0.0290	0.0264	0.0229	0.0302	0.0231	0.0315	0.0307	0.0271	12.6%
12378PeCDD	0.275	0.3	0.271	0.295	0.286	0.291	0.298	0.28	0.287	3.5%
123478HxCDD	0.999	1.01	0.924	0.977	0.933	0.933	0.942	0.927	0.956	3.4%
123678HxCDD	2.31	2.10	2.43	2.34	2.16	2.36	2.34	2.26	2.29	4.5%
123789HxCDD	1.74	1.52	1.74	1.78	1.59	1.77	1.57	1.66	1.67	5.6%
1234678HpCDD	30.5	28.3	30.5	32.4	29.0	30.2	27.7	29.0	29.7	4.7%
OCDD	50.4	48.8	55.9	58.5	56.6	56.2	52.1	54.6	54.1	5.8%
TCDD	0.617	0.687	0.605	0.590	0.639	0.564	0.732	0.62	0.632	8.0%
PeCDD	3.79	3.65	3.87	3.82	3.74	3.46	3.93	3.75	3.75	3.6%
HxCDD	25.7	24.3	25.3	25.4	23.5	24.5	24.6	24.6	24.7	2.7%
HpCDD	30.8	28.0	30.1	30.7	27.8	27.8	25.6	26.9	28.5	6.2%
2378TCDF	0.297	0.342	0.281	0.295	0.297	0.273	0.342	0.277	0.301	8.5%
12378PeCDF	0.658	0.664	0.672	0.672	0.699	0.686	0.713	0.726	0.686	3.3%
23478PeCDF	2.26	2.72	2.38	2.28	2.38	2.47	2.44	2.78	2.46	7.3%
123478HxCDF	4.20	4.22	4.66	3.82	4.13	4.27	4.05	3.49	4.11	7.8%
123678HxCDF	6.11	6.36	6.01	5.26	5.76	4.98	5.61	5.63	5.72	7.4%
234678HxCDF	15.4	13.5	14.0	15.1	14.4	12.2	12.1	15.1	14.0	8.6%
123789HxCDF	4.55	4.47	5.15	4.25	4.37	4.30	5.12	4.82	4.63	7.2%
1234678HpCDF	42.4	35.1	45.8	45.4	44.0	31.9	33.9	40.7	39.9	12.9%
1234789HpCDF	13.7	12.3	9.30	11.2	14.9	11.9	9.9	9.40	11.6	16.5%
OCDF	65.6	66.5	71.5	60.4	68.7	65.6	67.3	69.3	66.9	4.6%
TCDF	8.86	9.36	9.78	9.23	9.23	8.77	10.6	9.57	9.43	5.8%
PeCDF	23.0	23.8	22.4	23.1	23.6	22.7	23.8	24.7	23.4	2.9%
HxCDF	72.3	67.3	73.2	66.7	68.7	65.3	70.3	68.4	69.0	3.7%
HpCDF	105	88.0	90.1	96.3	106	80.4	77.9	83.5	90.9	11.0%

Z tabulky je patrné, že opakovatelnost stanovení PCDD/F i v reálné matrici je velmi dobrá. Relativní směrodatná odchylka byla maximálně 17%.

Pro ověření stability metody v čase a také pro ověření správnosti rutinních analýz používáme referenční materiály (RM), které mají ověřenou homogenitu a certifikované hodnoty jsou výsledkem stanovení několika (maximálně 10-ti) laboratorů. Vzhledem k již dříve zmiňované náročnosti analýz je počet matricových referenčních materiálů, které jsou komerčně dostupné, velmi omezený. Dostupné jsou tyto matrice: popílek ze spalovny komunálního odpadu, různé typy sedimentů, kal z čistírny odpadních vod, ryby a sušené mléko. Téměř všechny tyto materiály používáme v laboratoři pro zajištění jakosti analýz. Seznam materiálů je uveden v tabulce 15.

tabulka 15 Seznam referenčních materiálů používaných v naší laboratoři

	Výrobce	Matrice	Analyty
BCR 490	Comunity Bureau of Reference, European Commision	popílek ze spalovny	PCDD/F
BCR 430		vepřové sádlo	OCP
NIST 1944	National Institute of Standards&Technology, USA	sediment	OCP, PCB
NIST 1588		tuk z tresčích jater	OCP, PCB
NIST 1589a		lyofilizovaná krevní plazma	OCP, PCB, PCDD/F
WMF-1	Wellington Laboratories, Canada	laofilizovaná rybí tkáň	PCDD/F, PBDE, PCB
WMS-1		sediment	PCDD/F, PBDE, PCB
RM1 (DX1)	Evironment Canada, National Water Research Institute	sediment	PCDD/F
CARP 1	National Research Council of Canada Institute for National Measurement Standards	rybí tkáň	PCDD/F

Pro ověření analýz PCDD/F ve vzorcích typu popílku či kontaminovaných vzorků ovzduší používáme certifikovaný referenční materiál (CRM) BCR 490. Jde o popílek ze spalovny komunálního odpadu, který obsahuje relativně vysoké koncentrace PCDD/F. Na vývoji tohoto materiálu se účastnilo 17 laboratoří. Metody extrakce, čištění a také statistické metody použité pro stanovení certifikovaných hodnot byly publikovány [78]. Pro analýzu používáme 1g CRM a postup extrakce a čištění popsáný pro popílky je uveden v kapitole 4.1.1. a 4.1.2..

Bohužel ze 17-ti 2378 TCDD/F jsou v tomto CRM uvedeny jako certifikované hodnoty pouze pro Tetra až HexaCDD/F. V tabulce 16 je uvedena statistika 21 výsledků certifikovaných parametrů, které jsme analyzovali od roku 1998 do roku 2003.

tabulka 16 Souhrnné výsledky 21 analýz PCDF/F v CRM BCR 490

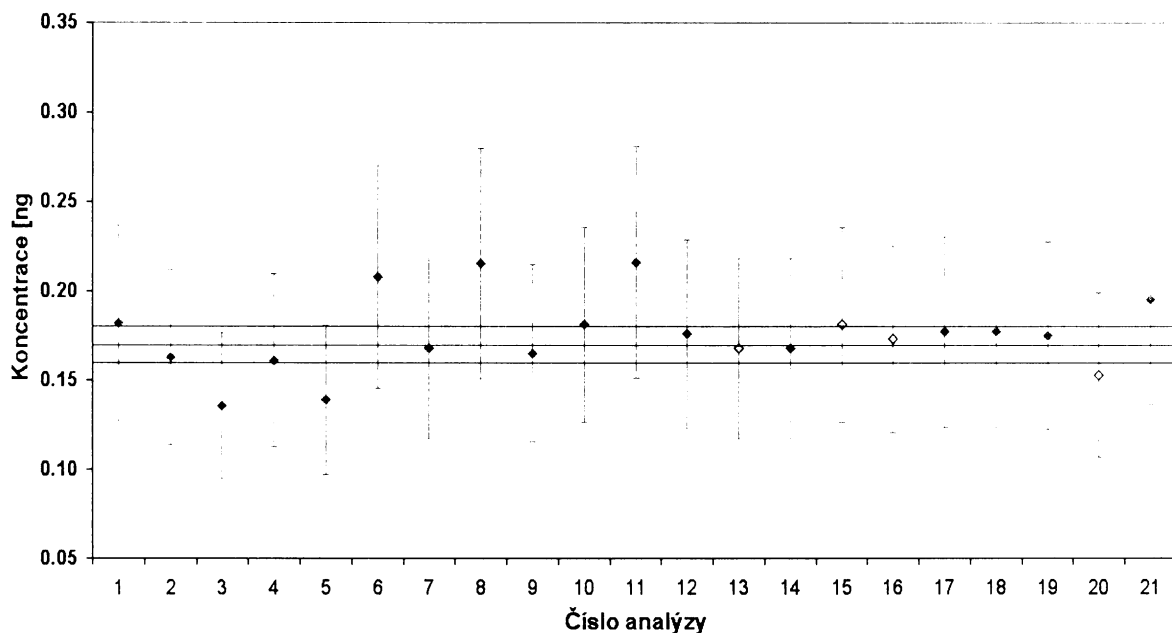
	Certifikovaná koncentrace	průměr stanovení	medián stanovení	RSD	odchylka mediánu od cert. konc.	relativní odchylka od cert. konc.
	ng/g	ng/g	ng/g		ng/g	
2378TCDD	0.169 ± 0.012	0.180	0.176	9.8%	0.011	6.5%
12378PeCDD	0.67 ± 0.040	0.654	0.674	11%	0.016	2.4%
123478HxCDD	0.95 ± 0.11	0.723	0.703	14%	0.227	24%
123678HxCDD	4.8 ± 0.40	3.67	3.68	8.3%	1.133	24%
123789HxCDD	2.84 ± 0.17	2.51	2.53	10%	0.331	12%
2378TCDF	0.90 ± 0.050	0.750	0.754	12%	0.150	17%
12378PeCDF	1.71 ± 0.12	1.49	1.52	11%	0.221	13%
23478PeCDF	1.85 ± 0.11	1.83	1.80	13%	0.018	1.0%
123478HxCDF	2.37 ± 0.12	2.37	2.42	10%	0.003	0.1%
123678HxCDF	2.64 ± 0.14	2.55	2.50	15%	0.087	3.3%
234678HxCDF	2.47 ± 0.17	2.53	2.54	11%	0.065	2.6%
123789HxCDF	0.34 ± 0.050	0.347	0.309	20%	0.052	15%

Z tabulky je patrné, že i opakovatelnost vyvinuté metody v čase je velmi dobrá. Relativní směrodatná odchylka výsledků je maximálně 20%. Jako měřítko správnosti metody lze použít odchylku mediánu stanovení nebo relativní odchylku mediánu od certifikované hodnoty. Tato odchylka nepřekračuje 25%.

V rámci akreditačních požadavků ISO 17 025 je definovaná správnost výsledků stanovení také jako návaznost metody na vyšší úroveň standardů než jsou certifikované kalibrační standardy. K tomuto účelu také používáme certifikované referenční materiály. Námi deklarovaná nejistota stanovení PCDD/F je 30%. Z výše uvedené tabulky pak vyplývá, že s touto nejistotou stanovení jsme navázáni na certifikovaný referenční materiál BCR 490. Více názorné je definování návaznosti jako průnik konfidenčního intervalu výsledku s konfidenčním intervalem daného kongeneru v CRM. Tato návaznost je ilustrována v obrázku 33 pro 2378TCDD a v obrázku 34 pro 23478 PeCDF. Grafy uvedené v těchto obrázcích lze také považovat za regulační diagramy stability stanovení PCDD/F v popílku.

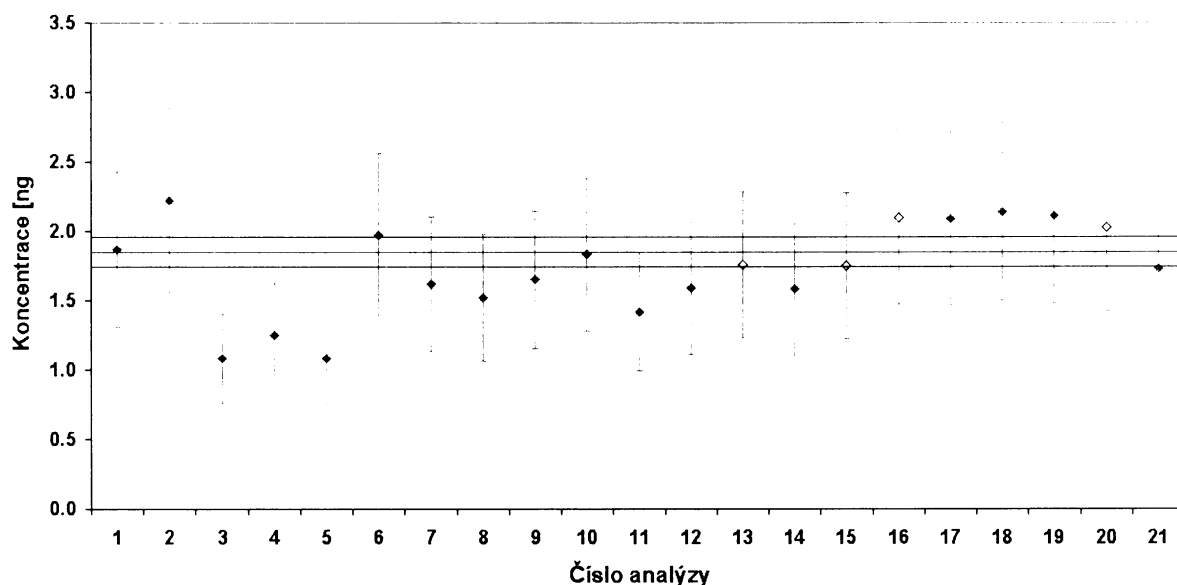
Pro stanovení pořadové číslo 3 až 5 je patrné, že hodnoty jsou zdatelně odchýlené. Tato odchylka nebyla způsobena problémem s extrakcí nebo s čištěním vzorku, nýbrž tím, že jsme skladovali tento referenční materiál v lednici. Popílek adsorboval vodu a tím se snížila koncentrace PCDD/F. Pro ověření správnosti jsme zakoupili novou šarži a starou vysušili. Výsledky od stanovení pořadové číslo 6 jsou střídavě výsledky analýz obou šarží.

obrázek 33 Regulační diagram stanovení 2378TCDD v BCR 490. Červená úsečka je promítnutím certifikované koncentrace 2378TCDD, modré pak znázorňují nejistotu (konfidenční interval) uvedenou v certifikátu. Individuální hodnoty jsou pak vyneseny jako body s úsečkami, které znázorňují nejistotu stanovení (30%). Pokud je vyneseny bod zelený, jde o MS/MS detekci, pokud je modrý byly výsledky získány HRMS.



Z regulačního diagramu je patrné, že ve všech 21 analýzách se intervaly spolehlivosti našich výsledků překrývají s konfidenčním intervalem certifikované koncentrace 2378TCDD. Z obrázku je také patrné, že výsledky dosažené MS/MS a HRMS se neliší.

obrázek 34 Regulační diagram stanovení 23478PeCDF v BCR 490. Červená úsečka je promítnutím certifikované koncentrace 23478PeCDF, modré pak znázorňují nejistotu (konfidenční interval) uvedenou v certifikátu. Individuální hodnoty jsou pak vyneseny jako body s úsečkami, které znázorňují nejistotu stanovení (30%). Pokud je vyneseny bod zelený, jde o MS/MS detekci, pokud je modrý byly výsledky získány HRMS.



Na koncentrační hladině desetin až desítek ng/g je vyvinutá metoda stanovení PCDD/F robustní a poskytuje správné výsledky. Jak matricově, tak i koncentračně se však referenční materiál BCR 490 neblíží ke vzorkům půd a sedimentů. Pro ověření správnosti a kontrolu stability metody na nízkých koncentračních hladinách používáme referenční materiály RM I (DX-1) a WMS I (dodávané Wellington Laboratories).

Matricově jde o sedimenty z jezera Ontario v Kanadě. Koncentrace PCDD/F se v těchto materiálech pohybují od jednotek po tisíce pg/g. Vzhledem k obtížnější matrici a řádově nižším koncentracím PCDD/F jsou deklarované nejistoty referenčních hodnot mnohem vyšší než u BCR 490. Výhodou je, že v obou sedimentech jsou uvedeny koncentrace jak 17-ti 2378PCDD/F, tak i suma všech kongenerů. Výsledky 27 stanovení PCDD/F v referenčním materiálu RM I jsou uvedeny v tabulce 17.

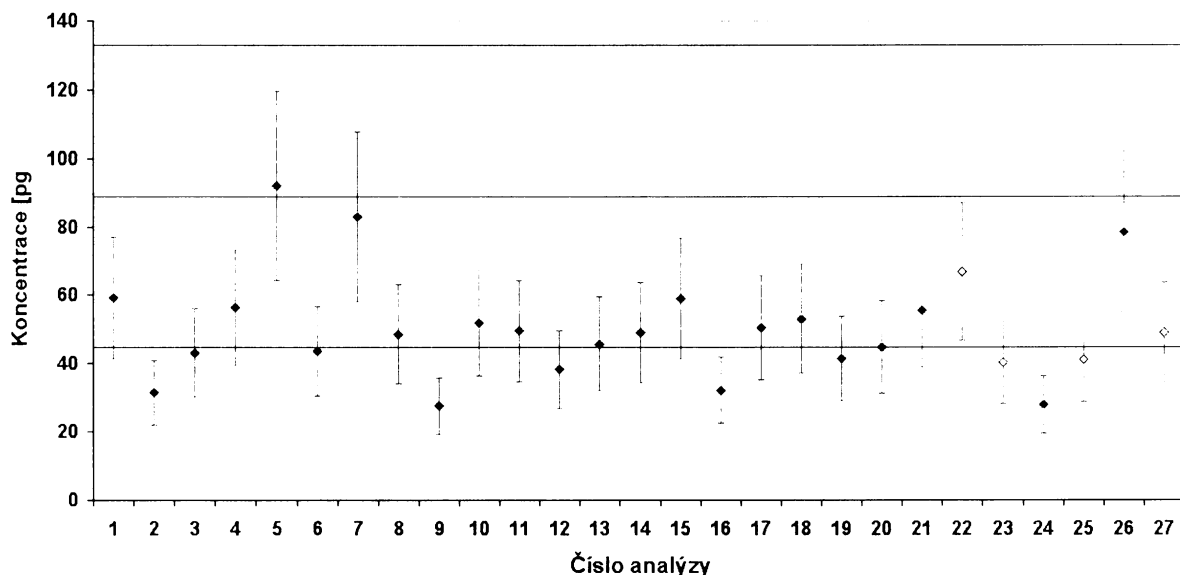
tabulka 17 Výsledky stanovení PCDD/F v referenčním materiálu RM I (jednotky pg/g)

	Certifikovaná koncentrace	průměr stanovení	medián stanovení	RSD	odchylka mediánu od cert. konc.	relativní odchylka od cert. konc.
2378TCDD	263 ± 53	271	268	12%	5.0	1.9%
12378PeCDD	22 ± 8	31	29	26%	6.9	31%
123478HxCDD	23 ± 7	28	25	25%	2.1	9.1%
123678HxCDD	77 ± 27	83	84	30%	6.6	8.6%
123789HxCDD	53 ± 24	47	44	46%	8.7	16%
1234678HpCDD	634 ± 182	559	572	10%	62.0	9.8%
OCDD	3932 ± 933	3629	3740	15%	192	4.9%
TCDD	416 ± 121	531	523	22%	107	26%
PeCDD	226 ± 143	405	414	21%	188	83%
HxCDD	669 ± 185	856	861	22%	192	29%
HpCDD	1251 ± 361	1104	1133	13%	118	9.4%
<hr/>						
2378TCDF	89 ± 44	51	49	34%	39.9	45%
12378PeCDF	39 ± 14	44	39	33%	0.4	0.9%
23478PeCDF	62 ± 32	78	71	28%	9.2	15%
123478HxCDF	714 ± 276	620	598	25%	116	16%
123678HxCDF	116 ± 37	133	123	29%	7.0	6.0%
234678HxCDF	57 ± 36	66	64	32%	6.8	12%
123789HxCDF	28 ± 42	30	34	76%	6.5	23%
1234678HpCDF	2397 ± 796	2601	2460	20%	62.8	2.6%
1234789HpCDF	137 ± 62	158	159	22%	22.0	16%
OCDF	7122 ± 2406	6422	6201	25%	921	13%
TCDF	659 ± 259	1012	910	43%	251	38%
PeCDF	790 ± 489	858	863	28%	73.0	9.2%
HxCDF	1800 ± 809	1802	1930	27%	130	7.2%
HpCDF	3567 ± 1165	3411	3345	20%	222	6.2%

Z tabulky je patrné, že na nižší koncentrační hladině je nejistota stanovení PCDD/F vyšší. Nicméně pro většinu kongenerů i suma kongenerů je mezi 10 až 30 %. Vybočují 123789 HxCDD a 123789HxCDF, kde je příčinou špatná chromatografická separace. Také správnost (shoda s certifikovanou hodnotou) je velmi dobrá, kromě sumy PeCDD, kde je příčinou pravděpodobně interference a 2378 TCDF, kde naše hodnoty jsou stabilně nižší než referenční hodnota. Nicméně nejistota referenční hodnoty 2378 TCDF je tak velká, že naše výsledky padají do konfidenčního intervalu.

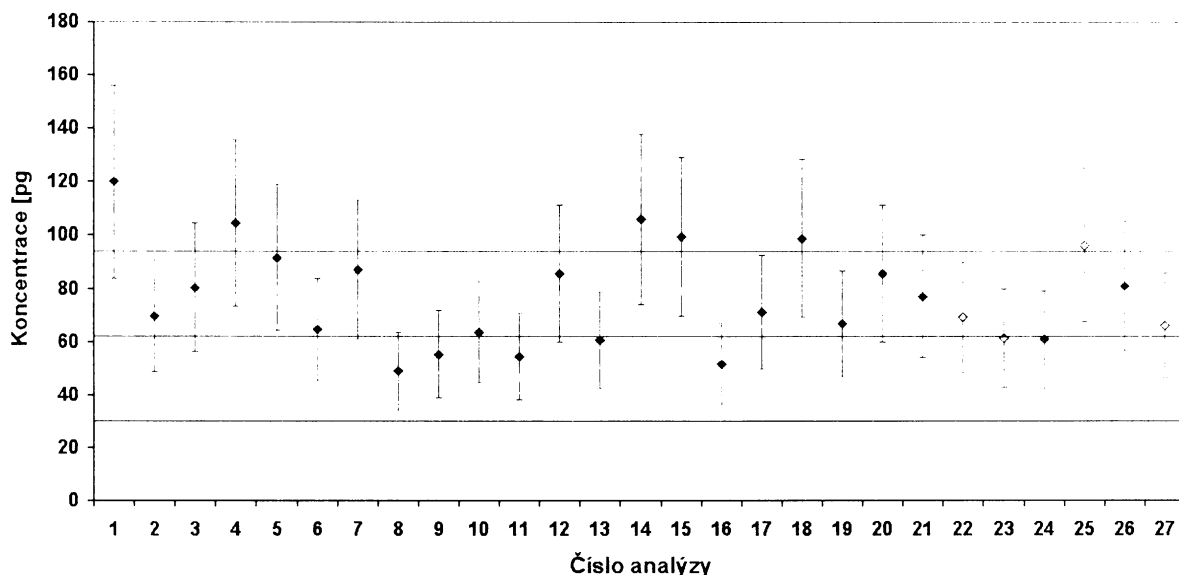
Regulační diagram 2378TCDF, jako kongeneru s největší odchylkou od referenční hodnoty v materiálu RM I, je ukázán v obrázku 35. Z tohoto diagramu je patrné, že naše výsledky jsou systematicky nižší než referenční hodnota, ale pořád se nacházejí uvnitř pásu nejistoty této referenční koncentrace nebo jsou na tento pás navázány s vlastní nejistotou 30 % (až na dva výsledky). Oproti metodám, které byly použity pro stanovení referenčních hodnot koncentrací, používáme jiné chromatografické fáze, což mohlo způsobit tuto odchylku. Pro ostatní kongenery už nejsou odchylky nijak výrazné a naše výsledky jsou rozptýleny okolo referenční hodnoty. Jako příklad může posloužit 23478PeCDF, který je v materiálu přítomen na podobné koncentrační hladině. Regulační diagram pro tento kongener je uveden v obrázku 36. Z těchto diagramů vyplývá, že výsledky pro jednotlivé kongenery jsou konzistentní, i když použijeme jinou detekční metodu. Nejvíce jsou výsledky ovlivněny extrakční metodou a použitými GC fázemi. Pokud jsou stejné pro MS/MS i HRMS, jsou rozdíly mezi těmito metodami detekce nižší než variabilita způsobená extrakcí a čištěním.

obrázek 35 Regulační diagram stanovení 2378TCDF v RM I. Červená úsečka je promítnutím referenční koncentrace 2378TCDF, modré pak znázorňují nejistotu (konfidenční interval) uvedenou v certifikátu. Individuální hodnoty jsou pak vyneseny jako body s úsečkami, které znázorňují nejistotu stanovení (30%). Pokud je vyneseny bod zelený, jde o MS/MS detekci, pokud je modrý, byly výsledky získány HRMS.



Z obrázku je patrné, že naše hodnoty jsou systematicky posunuté od referenční koncentrace 2378TCDF. Nicméně deklarovaný konfidenční interval této hodnoty je tak široký, že se naše výsledky nacházejí většinou uvnitř tohoto intervalu.

obrázek 36 Regulační diagram stanovení 23478PeCDF v RM I. Červená úsečka je promítnutím referenční koncentrace 23478PeCDF, modré pak znázorňují nejistotu (konfidenční interval) uvedenou v certifikátu. Individuální hodnoty jsou pak vyneseny jako body s úsečkami, které znázorňují nejistotu stanovení (30%). Pokud je vyneseny bod zelený, jde o MS/MS detekci, pokud je modrý, byly výsledky získány HRMS.



Pro ověření a kontrolu stability analýz biologického materiálu používáme CRM na nejnižších koncentračních hladinách (jednotky pg/g). V době, kdy byla metoda vyvíjena, byl komerčně dostupný certifikovaný referenční materiál CARP-1 (Wellington laboratories). Matricově jde o stabilizovanou suspenzi svaloviny kapra ve vodě [79]. Tento materiál se dodával zatavený v ampulích po 9 g. Pro jednotlivé analýzy jsme používali navážku 4.5 g. Postup extrakce jsme převzali z originální práce [79], extrakt byl pak dále čištěn naším obvyklým postupem. Výsledky 20-ti analýz CRM CARP-1 jsou uvedeny v tabulce 18. Pět posledních analýz bylo provedeno na HRMS.

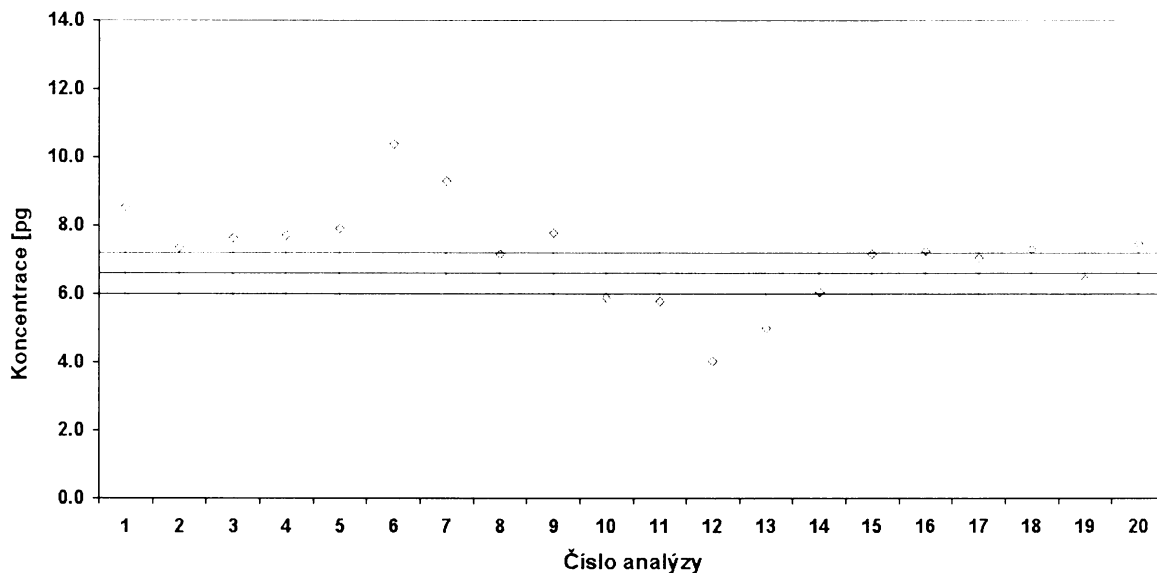
tabulka 18 Výsledky stanovení PCDD/F v CRM CARP-1 od roku 1998 až do poloviny roku 2003, kdy se přestal distribuovat.

	Certifikovaná koncentrace	průměr stanovení	medián stanovení	RSD	odchylka mediánu od cert. konc.	relativní odchylka od cert. konc.
2378TCDF	11.9 ± 2.7	11.6	11.6	22%	0.35	2.9%
12378PeCDF	5.0 ± 2.0	5.2	5.0	24%	0.035	0.7%
23478PeCDF		14.2	14.9	26%		
2378TCDD	6.6 ± 0.6	7.2	7.3	20%	0.68	10%
12378PeCDD	4.4 ± 1.1	4.2	4.0	25%	0.44	10%
123478HxCDD	1.9 ± 0.7	1.9	1.6	29%	0.31	16%
123678HxCDD	5.6 ± 1.3	6.3	6.4	21%	0.80	14%
123789HxCDD	0.7 ± 0.4	1.0	0.76	49%	0.058	8.3%
1234678HpCDD	6.5 ± 1.8	8.3	6.5	57%	0.04	0.5%
OCDD	6.3 ± 1.9	8.0	5.9	89%	0.36	5.7%

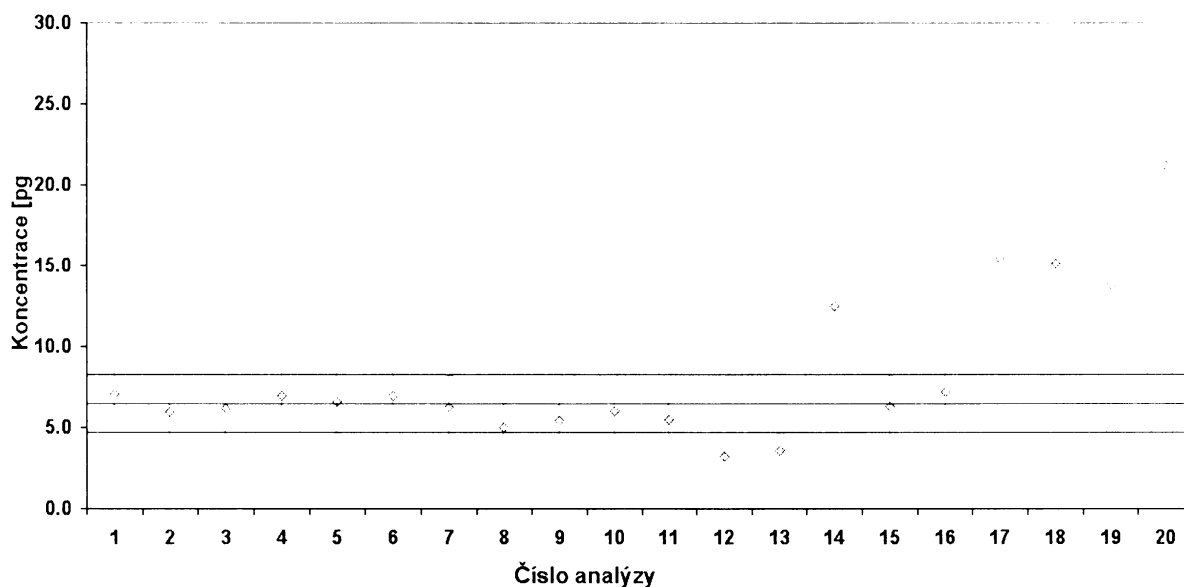
Z tabulky je patrné, že odchylka od certifikovaných hodnot není vyšší než 16%. Na druhou stranu u tří parametrů je viditelně větší rozptyl výsledků (hodnota RSD). V případě 123789HxCDD je to dáno koncentrací, která je blízko meze stanovitelnosti a často byly výsledky i pod mezí stanovitelnosti. V případě HpCDD je to problém posledních čtyř analýz na HRMS, kde byly evidentní interference, v případě OCDD jde o jeden odlehlý výsledek (viz regulační diagramy v obrázcích).

I na této úrovni byla metoda GC/MS/MS úspěšně ověřena a naopak se ukázal problém s HRMS detekcí, který jsme později identifikovali jako interference z poslední šarže CRM, které se projevovaly při HRMS detekci a nikoli při MS/MS. Tato skutečnost je nejnázornějším příkladem užitečnosti regulačních diagramů jako prostředku odhalení systematické chyby. Regulační diagramy 2378TCDD, 1234678HpCDD a OCDD jsou uvedeny v obrázcích 37-39.

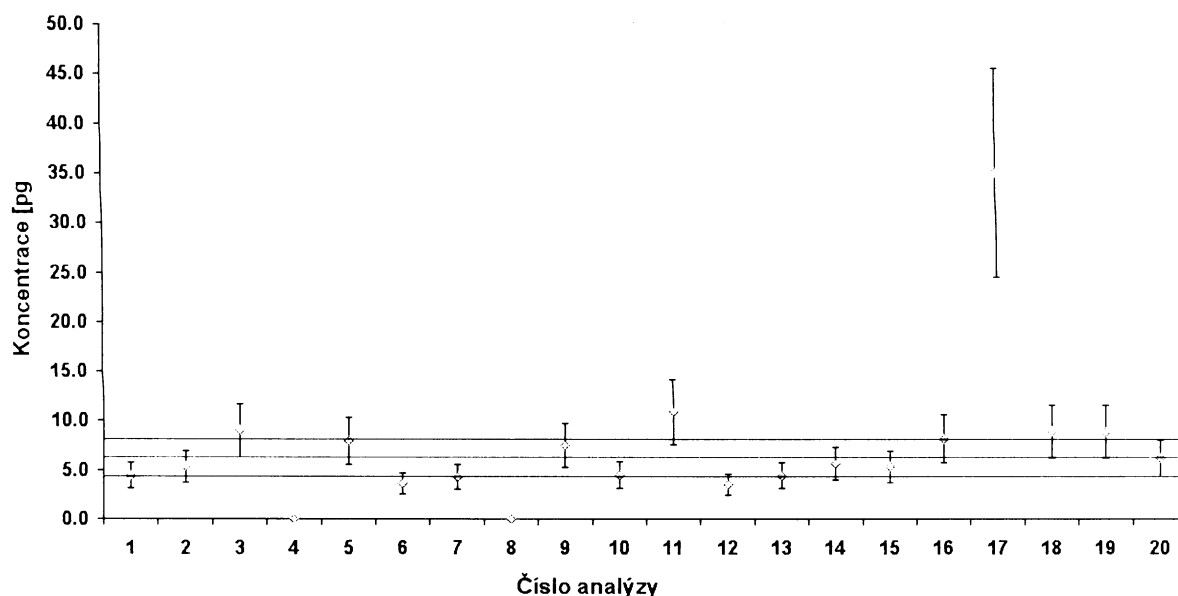
obrázek 37 Regulační diagram stanovení 2378TCDD v CRM CARP I. Červená úsečka je promítnutím certifikované koncentrace 2378TCDD, modré pak znázorňují nejistotu (konfidenční interval) uvedenou v certifikátu. Individuální hodnoty jsou pak vyneseny jako body s úsečkami, které znázorňují nejistotu stanovení (30%). Pokud je vyneseny bod zelený, jde o MS/MS detekci, pokud je modrý, byly výsledky získány HRMS.



obrázek 38 Regulační diagram stanovení 1234678HpCDD v CRM CARP I. Červená úsečka je promítnutím certifikované koncentrace 1234678HpCDD, modré pak znázorňují nejistotu (konfidenční interval) uvedenou v certifikátu. Individuální hodnoty jsou pak vyneseny jako body s úsečkami, které znázorňují nejistotu stanovení (30%). Pokud je vyneseny bod zelený, jde o MS/MS detekci, pokud je modrý, byly výsledky získány HRMS.



obrázek 39 Regulační diagram stanovení OCDD v CRM CARP I. Červená úsečka je promítnutím certifikované koncentrace OCDD, modré pak znázorňují nejistotu (konfidenční interval) uvedenou v certifikátu. Individuální hodnoty jsou pak vyneseny jako body s úsečkami, které znázorňují nejistotu stanovení (30%). Pokud je vyneseny bod zelený, jde o MS/MS detekci, pokud je modrý, byly výsledky získány HRMS.



Z výše uvedených výsledků a diagramů je patrné, že MS/MS je metoda, která je vhodná pro analýzu na velmi nízkých koncentračních hladinách. Nicméně podle direktiv evropské komise byla jako jediná metoda pro stanovení PCDD/F a „dioxin like“ PCB v potravinách a krmivech stanovena vysokorozlišující hmotnostní spektrometrie při rozlišení vyšším než 10 000. I tak velice citlivá a selektivní metoda jako je MS/MS je tedy v současné době postavena, pro analýzy potravin a krmiv, do role orientační metody. Z tohoto důvodu jsme nepokračovali ve vývoji GC/MS/MS v tomto rozsahu analyzovaných matric a byli jsme nuceni zakoupit sektorový HRMS. V roce 2002 pak také skončila distribuce CRM CARP-1. Byl nahrazen CRM WMF-I což je matricově lyofilizovaná ryba. Jak jsem již uvedl výše, museli jsme GC/MS/MS pro analýzy biologického materiálu nahradit GC/HRMS a z toho důvodu jsme již nepokračovali v analýzách CRM metodou MS/MS.

Nicméně v tomto roce by měla být na trh uvedena lineární iontová past ve spojení s GC, která umožňuje izolaci rodičovských iontů při rozlišení vyšším než 10 000 a následný MS/MS experiment. Tato iontová past by pak splňovala kritéria pro referenční metodu detekce PCDD/F a PCB při zachování výhody selektivity MS/MS.

Pro ověření stability metody v čase používáme referenční materiály, které mají ověřenou homogenitu a certifikované hodnoty jsou výsledkem stanovení několika laboratoří. Nicméně všechny tyto postupy trpí zásadním nedostatkem a to tím, že nesimulují reálný

vzorek vstupující do laboratoře. Jak u uměle připravených vzorků, tak i u referenčních materiálů známe dopředu koncentrační hladiny analytů a těm můžeme přizpůsobit navážku vzorku. Nejlepším možným způsobem pro ověření správnosti analýz pak zůstává účast v mezinárodních porovnávacích studiích, kterých se účastní dostatečný počet laboratoří. Účelem účasti v MPZ je ověřit vlastní metodu stanovení na neznámém vzorku a na základě výsledků pak korigovat metodu tak, aby byla více robustní. Laboratoř obdrží reálný vzorek o neznámé koncentraci. Úspěch či neúspěch v těchto studiích pak je nejvěrohodnější odpovědí, zda vyvinutá metoda poskytuje správné výsledky. Od roku 1998 se účastníme většiny mezinárodních okružních testů pro analýzu PCDD/F, PCB a také PBDE. Stručný přehled je uveden v tabulce 19.

tabulka 19 Přehled okružních rozborů od roku 2000

Rok	Pořadatel	Typ vzorku	Parametry
2001	<i>Quasimeme</i>	makrela, tesčí játra	PCDD/F, PCB (WHO)
	<i>Folkehelsa, Norway</i>	hovězí maso, mateřské mléko, ryba-olej	PCDD/F, PCB (WHO)
	<i>VŠCHT Praha</i>	ryby	PCB, OCP
	<i>Consorzio Interuniversitario Nazionale la Chimica per l'Ambiente, Itálie</i>	popílky, sedimenty	PCDD/F, PCB
	<i>Institute of Environmental Chemistry, Umea Universitet, Sweden</i>	popílky, sedimenty	PCDD/F, PCB (WHO)
	<i>Quasimeme</i>	ryby, sedimenty, standard	PBDE
2002	<i>Quasimeme</i>	tresčí játra, sled, mušle	PCDD/F, PCB, PBDE
	<i>Institute of Environmental Chemistry, Umea Universitet, Sweden</i>	popílky, standardy, ryba	PCDD/F, PCB (WHO), PBDE
	<i>Folkehelsa, Norway</i>	filé z tuňáka, standard, vepřové maso, vaječný žloutek	PCDD/F, PCB (WHO)
	<i>Consorzio Interuniversitario Nazionale la Chimica per l'Ambiente, Itálie</i>	popílky, sediment	PAU, PCDD/F, PCB

2003	<i>Quasimeme</i>	mušle, losos, tresčí játra, uzenáč, olej, sediment	PCDD/F, PCB (WHO), PBDE
	<i>Institute of Environmental Chemistry, Umea Universitet, Sweden</i>	popílky, sedimenty, standard	PCDD/F, PCB (WHO)
	<i>Folkehelsa, Norway</i>	krocan, sýr, losos	PCDD/F, PCB (WHO)
2004	<i>Quasimeme</i>	olej, mušle, makrela	PCDD/F, PCB (WHO), PBDE
	<i>Institute of Environmental Chemistry, Umea Universitet, Sweden</i>	popílek, roztok, půda, jíl, sediment	PCDD/F, PCB (WHO)
	<i>Folkehelsa, Norway</i>	olej, standard, kuře, pstruh	PCDD/F, PCB (WHO), PBDE
	<i>Consorzio Interuniversitario Nazionale la Chimica per l'Ambiente, Itálie</i>	sediment, kal	PCDD/F, PCB, PAU
2005	<i>Institute of Environmental Chemistry, Umea Universitet, Sweden</i>	popílek, roztok, půda, jíl, sediment	PCDD/F, PCB (WHO)
	<i>Consorzio Interuniversitario Nazionale la Chimica per l'Ambiente, Itálie</i>	sediment, kal	PCDD/F, PCB, PAU

Z tabulky je zřejmé, že okružní rozbory pro PCDD/F i další POP pokrývají většinu důležitých matic. Každý rok se koncentrační rozsahy a částečně i matrice vzorků liší, jde tedy opravdu o simulaci reálných vzorků. Vzhledem k tomu, že vyhodnocení každé z těchto porovnávacích studií má téměř stejný rozsah jako tato práce, tak jsem v následujícím textu pouze na několika příkladech provedl zhodnocení obecných trendů a také porovnání úspěšnosti MS/MS detekce v porovnání s ostatními použitými metodami. Výsledky těchto studií také dávají dobrý přehled o tom, jaká je mezilaboratorní reprodukovatelnost analýz PCDD/F.

V roce 1998 jsme se zúčastnili poprvé mezinárodních porovnávacích zkoušek (MPZ) pořádaných Universitou v Umea. Mezi jinými jsme obdrželi dva vzorky identického popílku, které byly označeny jako nezávislé vzorky a také extrakt z tohoto popílku. V obrázku 40 je převzatý graf s vynesnými hodnotami průměru výsledků analýz těchto identických vzorků (zdrojová data převzata z originálu vyhodnocení).

obrázek 40 Výsledky mezinárodních porovnávacích testů (suma 17-ti 2378 PCDD/F jako TEQ) na identických vzorcích popílku. Koncentrační hladina vzorků byla 0.8 ng TEQ/g – tedy relativně vysoká.

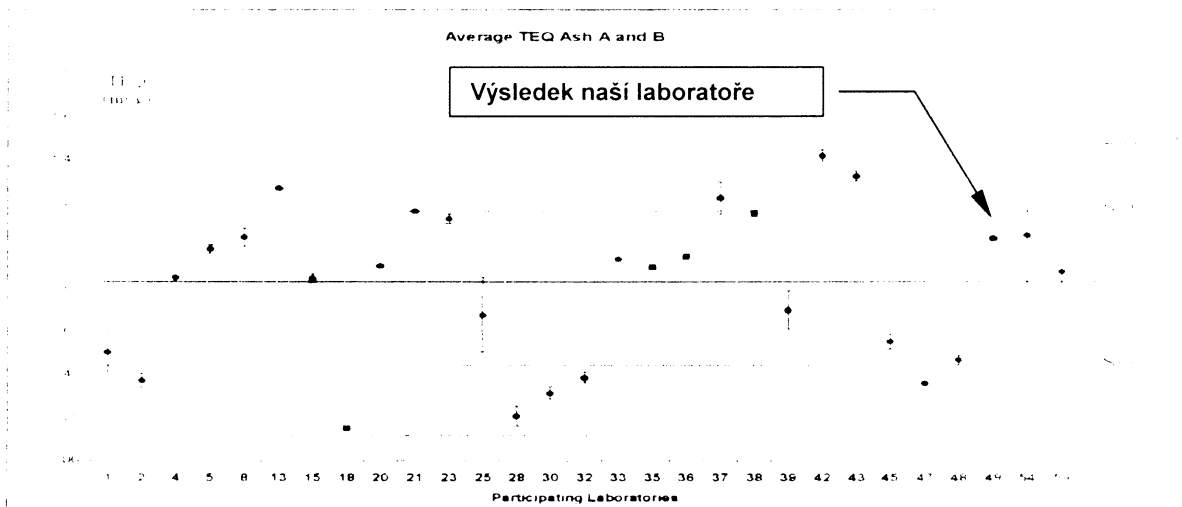
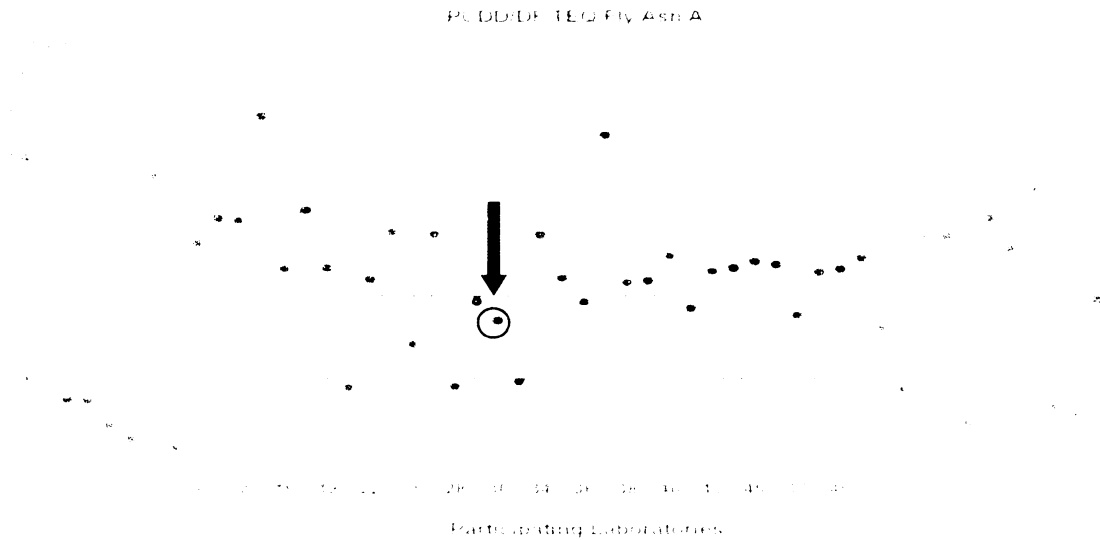


Figure 1. Results summarised in TEQ for all laboratories for Ash A and B, most results are within one SD of the mean value. Error bars represent the SD of the individual participants

Z obrázku je vidět, že rozptyl výsledků individuálních účastníků je až na výjimky velmi malý. Mezilaboratorní rozptyl je naopak relativně velký (RSD všech výsledků bylo 46%). Výsledek naší laboratoře se nachází v pásmu \pm SD 6d mediánu.

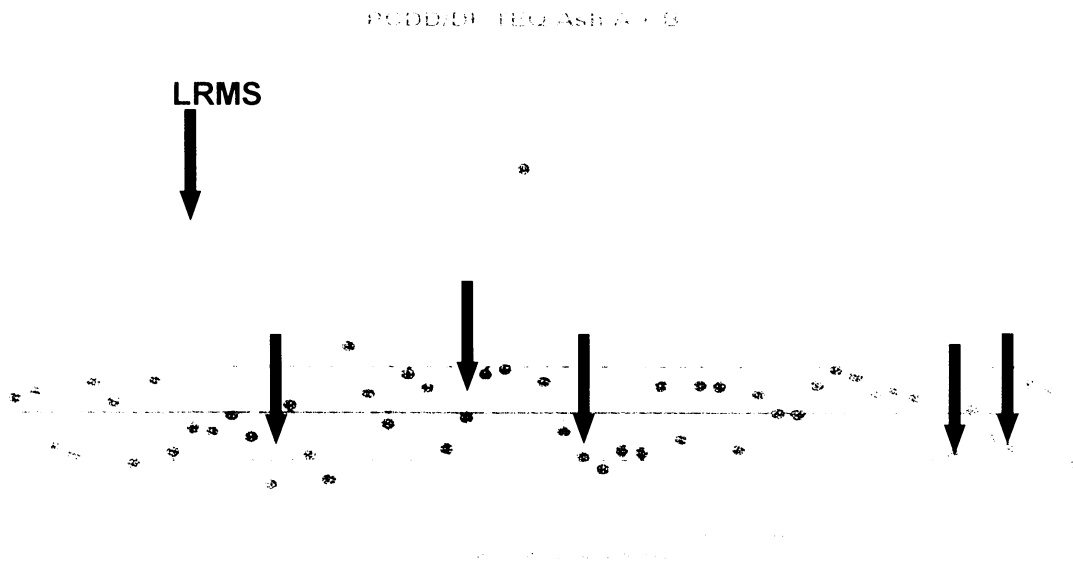
RSD výsledků analýz popílku bylo 46 %, zatímco RSD výsledků analýz extraktů ze stejného popílku (tedy se stejnými možnými interferencemi) bylo pouze 24%. Tato hodnota je na úrovni opakovatelnosti v laboratoři. Je tedy jasné, že nejistotu analýzy PCDD/F nejvíce ovlivňuje způsob extrakce. Potvrzením této skutečnosti jsou pak výsledky dalších kol MPZ, jak je ukázáno v obrázcích 41 – 42.

obrázek 41 Výsledky mezinárodního porovnávání testu (suma 17-ti 2378 PCDD/F jako TEQ) r. 1999 popílek ze spalovny komunálního odpadu. Koncentrační hladina vzorků byla 0.8 ng TEQ/g.



Počet zúčastněných laboratoří byl v roce 1999 49 s výslednou relativní směrodatnou odchylkou 49 %. Výsledek naší laboratoře je označen červenou šipkou. RSD analýz extraktu bylo 16 %.

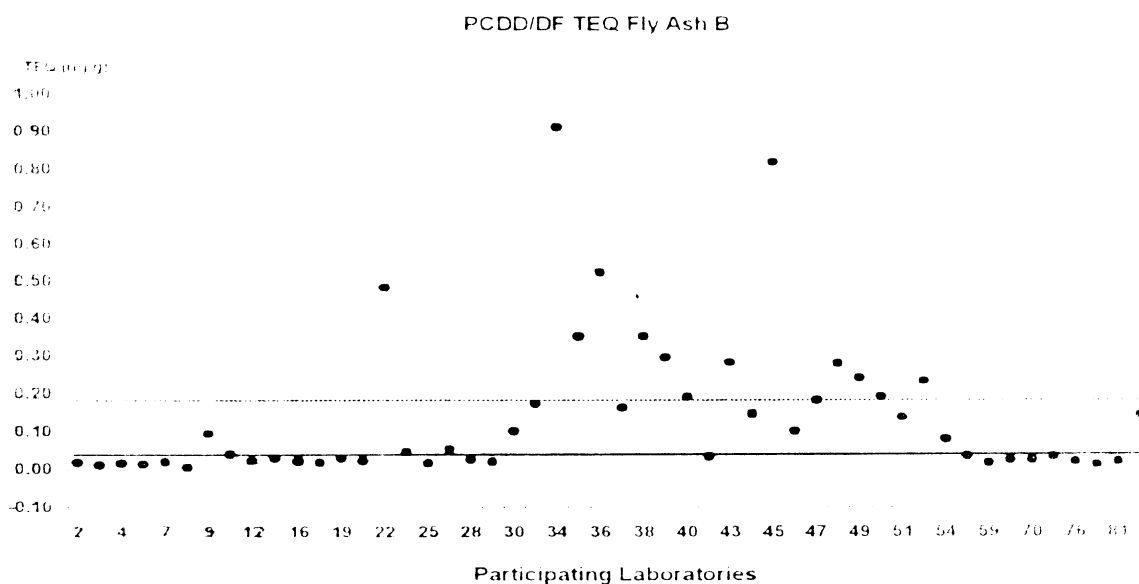
obrázek 42 Výsledky mezinárodního porovnávání testu (suma 17-ti 2378 PCDD/F jako TEQ) r. 2000 – identický popílek zasláný jako dva vzorky. Koncentrační hladina vzorků byla 1.4 ng TEQ/g.



Počet zúčastněných laboratoří byl v roce 2000 65 s výslednou relativní směrodatnou odchylkou 46 %. Výsledek naší laboratoře je označen oranžovou šipkou. Ve vyhodnocení byla u individuálních výsledků indikována detekční metoda, jak je uvedeno v obrázku, oranžovou šipkou je označen náš výsledek, modrou pak výsledky dosažené hmotnostní spektrometrií při nízkém rozlišení. Je evidentní, že kromě jediné laboratoře jsou všechny odlehle výsledky dosaženy metodou HRMS. RSD analýz extraktu popílku bylo 12 %.

Jak jsem již uvedl výše, z výsledků MPZ vyplývá, že nejdůležitějším krokem v analýze PCDD/F v popílku je dokonalé zvládnutí extrakčního postupu. Použitá metoda vlastní analýzy i čistící procedura již nemají tak velký vliv na nejistotu výsledku – jak ukazují konzistentní RSD výsledků analýz surových extraktů, které se pohybovalo od 12-ti do 24 %. Toto jsou nicméně výsledky analýz materiálů na relativně vysoké koncentrační hladině PCDD/F. V obrázku 43 jsou ukázány výsledky analýz popílku s vysokým obsahem uhlíku a velmi nízkou koncentrací PCDD/F v MPZ v roce 1999.

obrázek 43 Výsledky mezinárodního porovnávacích testu (suma 17-ti 2378 PCDD/F jako TEQ) r. 1999 popílek vysokým obsahem uhlíku (saze). Koncentrační hladina vzorku byla 0.035 ng TEQ/g.



Je evidentní, že rozptyl výsledků laboratoří v případě obtížné matrice a nízkých koncentrací je mnohem vyšší – u tohoto popílku činil 141 %. Náš výsledek je označen oranžovou šipkou.

Z obrázku vyplývá, že při nízkých koncentrací PCDD/F již nabývá na důležitosti citlivost a selektivita metody, a to jak koncovky, tak i čistícího postupu. Odlehlé výsledky jsou již vychýleny pouze směrem k vyšším hodnotám.

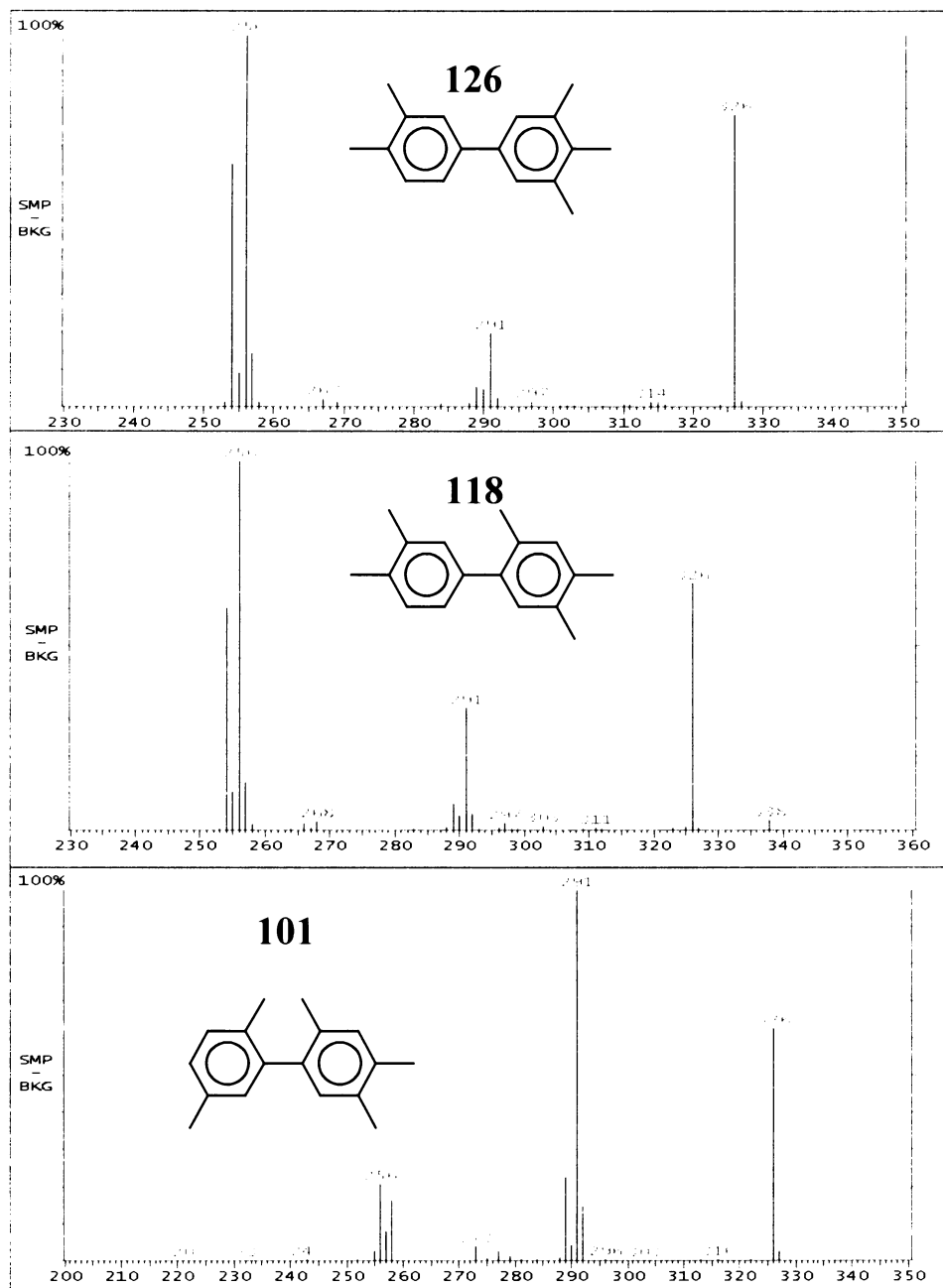
Po několika aférách s kontaminací potravin a krmiv PCDD/F (např. v roce 1999 tzv. belgická kuřata) se zvýšily na nároky na věrohodnost analytických výsledků, což vedlo až k legislativním krokům, které stanoví požadavky na analytické metody pro analýzy potravin, krmiv a ovzduší na úrovni direktiv EU [17, 73]. Jak jsem již zmiňoval výše, MS/MS detekce PCDD/F není podle této legislativy přípustná pro analýzy potravin a krmiv, nicméně kritéria pro analýzu PCDD/F v emisích splňuje. Pro analýzy půd, odpadů, vod zatím žádná legislativní omezení neplatí. Námi vyvinutá a ověřená metoda stanovení PCDD/F je tedy

použitelná jako plnohodnotná metoda ve všech matricích kromě potravin a krmiv, kde ji lze použít jako screeningovou metodu.

3.3.3 PCB

Při optimalizaci MS/MS metody pro stanovení PCB je nutno brát do úvahy zásadní strukturní rozdíl mezi PCDD/F a PCB. Zatímco PCDD/F jsou rigidní planární molekuly, molekula PCB obsahuje jednoduchou vazbu, která umožňuje natáčení jednotlivých aromatických jader do nejvýhodnější polohy (s nejnižší potenciální energií) v závislosti na tom, které pozice jsou substituované chlorem. Tento rozdíl se projevuje již tím, že i odezvy na detektoru elektronového záchytu (ECD) či v plném skenu se liší až o několik desítek procent mezi jednotlivými izomery [53]. Ještě výraznější je tento vliv struktury na výsledky MS/MS experimentů. V obrázku 44 jsou uvedena MS/MS spektra tří izomerů pentachlor bifenyly, která jsme naměřili za podmínek optimalizovaných pro PCDD/F.

obrázek 44 MS/MS spektra PCB 126, 118 a PCB 101, rodičovský iont 326



Spektra jsou obdržena za stejných podmínek (kolizní energie, q_z apod.). Struktura má vliv nejen na optimální kolizní energii, ale i na to, které dceřinné ionty jsou MS/MS produkovány. U non- a mono-ortho PCB (např. 126 a 118) jsou naprosto jasně preferovány ionty M-2Cl u multi-ortho PCB pak M-Cl.

Metody pro MS/MS analýzu PCB jsme vyvíjeli nejprve pro stanovení non- a mono-ortho PCB, poté pro indikátorové kongenery PCB a nakonec pro úplnou kongenerovou analýzu PCB. Nátok He do iontové pasti jsme použili stejný jako pro PCDD/F i z toho důvodu, že změna je příliš komplikovaná a nepříliš dobře opakovatelná a jedním z hlavních úkolů bylo vyvinout stabilní metodu pro rutinní analýzy. Optimalizovány byly tedy pouze kolizní energie.

Pro analýzu non-, mono-ortho a indikátorových PCB používáme takové parametry, aby byla odezva na píku dceřinných iontů co nejvyšší. V metodě pro úplnou kongenerovou analýzu není možné měnit kolizní energii podle zrovna eluujících izomerů, proto byl zvolen kompromis, který zaručuje relativně dobrou, i když ne maximální odezvu pro všechny izomery. Optimalizované parametry MS/MS metody pro stanovení mono a nonortho PCB jsou uvedeny v tabulce 20 pro úplnou kongenerovou analýzu pak v tabulce 21.

tabulka 20 Optimalizované parametry MS/MS experimentu pro mono a nonortho PCB.

	Kolizní energie	Rodičovský iont	Analytický scan
	[V]	nativní/izotopicky značený [m/z]	
TetraCB	3.0	292/304	256-261/267-272
PentaCB	3.0	326/338	290-295/301-306
HexaCB	3.0	360/372	324-329/335-340
HeptaCB	3.0	394/406	378-383/394-399

Pro všechny MS/MS experimenty byly použity tyto další parametry: Izolační čas 8 ms, excitační čas 10 ms a počet mikroscanů 3.

tabulka 21 Optimalizované parametry MS/MS experimentu pro úplnou kongenerovou analýzu PCB.

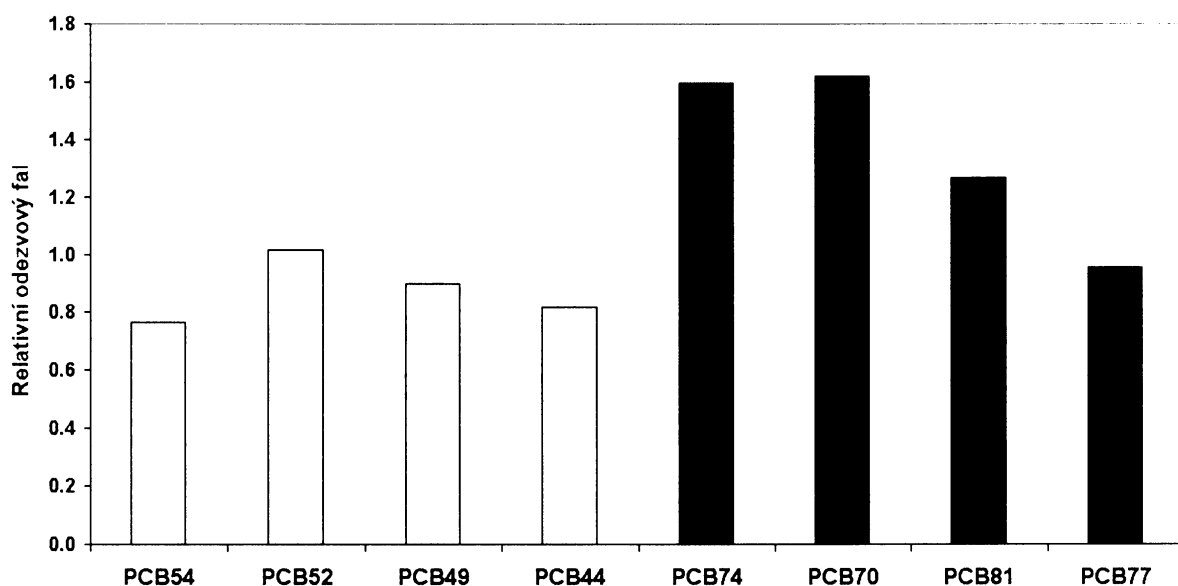
	Kolizní energie	Rodičovský iont	Analytický scan
	[V]	nativní/izotopicky značený [m/z]	
MonoCB	1.8	188/200	150-188/160-200
DiCB	2.3	222/234	150-222/162-234
TriCB	2.3	256/268	183-223/195-200
TetraCB	2.3	292/304	219-259/231-272
PentaCB	2.3	326/338	253-293/259-302
HexaCB	2.3	360/372	287-326/299-338
HeptaCB	2.3	394/406	321-360/333-372
OktaCB	2.3	430/442	357-396/371-408
NonaCB	2.5	464/476	393-428/405-440
DekaCB	2.6	498/510	427-453/439-474

Pro všechny MS/MS experimenty byly použity tyto další parametry: Izolační čas 8 ms, excitační čas 10 ms a počet mikroscanů 3. Nastavení času pro začátky jednotlivých experimentů je prováděno pro různé kolony na základě analýz standardních roztoků, ve kterých jsou přítomny vždy první a poslední eluující izomer z dané skupiny.

Pro stanovení mono a nonortho PCB používáme metodu izotopového ředění. Pro analýzu všech kongenerů PCB toto již není možné, proto používáme metodu vnitřního

standardu, kdy pro všechny izomery na stejném stupni chlorace používáme jeden izotopicky značený vnitřní standard. V kalibračním standardu je pak řada nativních kongenerů. Odezvové faktory (RRF - výpočet viz. rovnice 2) jsou relativně proměnlivé v závislosti na poloze chlórů v daném izomeru, která způsobuje již výše zmiňovanou rozdílnou fragmentaci. V obrázku 45 je jako příklad uveden graf RRF izomerů TetraCB vzhledem k vnitřnímu standardu $^{13}\text{C}_{12}$ značenému PCB 52.

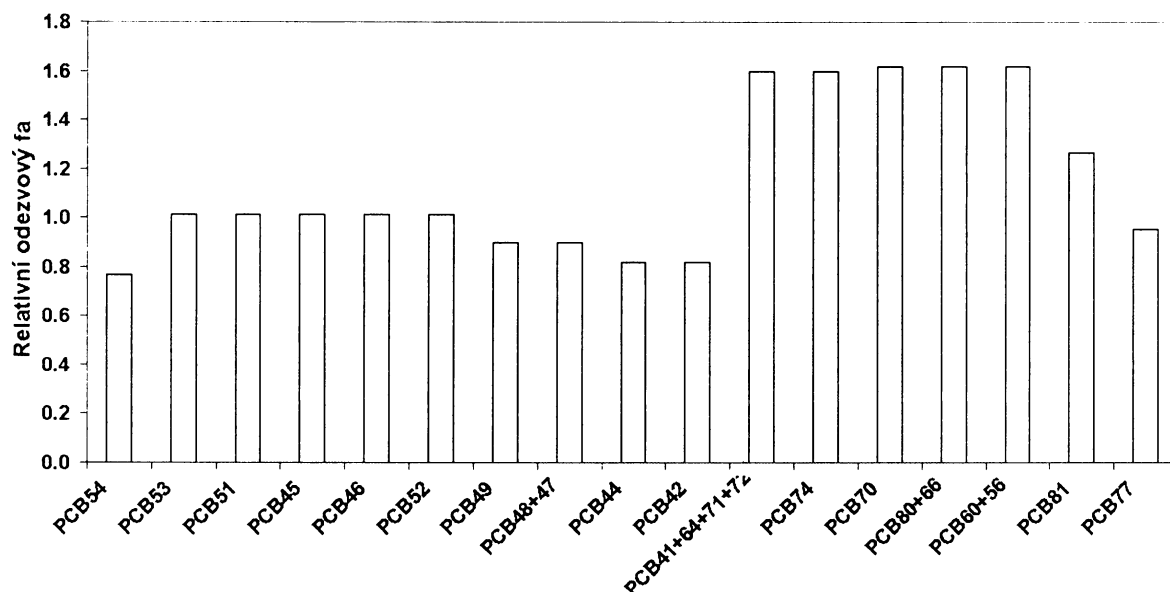
obrázek 45 Znárodnění RRF různých izomerů TetraCB vzhledem k $^{13}\text{C}_{12}$ PCB 52. Světější výplň označuje ty izomery, které jsou kvantifikovány na dceřinném iontu odpovídajícímu ztrátě jednoho atomu chlórů, tmavší potom ty, které jsou kvantifikovány na iontech M-2Cl.



Z obrázku je patrné, že PCB 52 má odezvoový faktor blízky 1, ale ty izomery, které jinak fragmentují mají hodnoty RRF až téměř 1.7. To je způsobeno tím, že mateřský iont 292 m/z není izotopicky čistý. My pak pro kvantifikaci těch izomerů, které fragmentují na M-Cl používáme pouze dceřinný iont 257m/z, ale pro ty izomery které intenzivně fragmentují na M-2Cl součet 220 m/z a 222m/z (-2Cl).

Vyvinutá MS/MS metoda zaznamenává chromatogram pro mono až dekaCB, nicméně pro rutinní analýzy používáme vyhodnocovací metody, které pokrývají pouze ty kongenery, které jsou přítomny na významné koncentrační úrovni v technických směsích. Z celkového počtu 209 kongenerů takto kvantifikujeme 94, z nichž některé integrujeme jako sumu v chromatograficky neseparovaných pících. Pro ty izomery, které nejsou přítomny v kvantifikačním standardu používáme RRF toho izomeru, který má nejbližší retenční čas a nejpodobnější MS/MS spektrum (proměřeno na technických směsích DELOR 103 až 106). Na obrázku 46 jsou pak zobrazeny RRF pro všechny izomery TetraCB, které rutinně kvantifikujeme.

obrázek 46 Relativní odezvové faktory používané pro izomery TetraCB v metodě pro rutinní stanovení 94 kongenerů PCB. Tmavější sloupce jsou RRF spočítané z kalibračního standardu, světlejší pak ty, které jsou přiřazené na základě podobnosti MS/MS spekter.



To jak kongenery PCB vybrané v této metodě reprezentují kontaminaci pocházející z technických směsí jsme ověřili analýzami standardních roztoků těchto směsí. Certifikovaný standard technických směsí DELOR 103, 104, 105, 106 a AROCLOR 1242 a 1260 jsme analyzovali jako vzorek a výsledné koncentrace PCB jsme sečetli a porovnali s certifikovanou koncentrací. Výsledky analýz jsou uvedeny v tabulce 22.

tabulka 22 Výsledky analýz šesti různých technických směsí. Analyzovali jsme 0.1 ml standardu o koncentraci 1000 ng/ml.

	DELOR103	DELOR104	DELOR105	DELOR106	AROCLOR1242	AROCLOR1260
	ng/vzorek					
TriCB						
PCB19	0.85	0.38	< 0.03	< 0.03	0.87	< 0.03
PCB18	8.10	4.82	0.05	0.04	8.90	0.05
PCB17	3.60	1.79	< 0.03	< 0.03	3.20	0.03
PCB27+24	0.43	0.20	< 0.03	< 0.03	0.44	< 0.03
PCB16+32	4.30	2.23	0.04	< 0.03	4.00	< 0.03
PCB26+25	1.40	0.87	< 0.02	< 0.03	2.00	< 0.02
PCB28+31	22.1	10.8	0.33	0.10	13.8	0.06
PCB33	6.30	3.39	0.08	0.04	5.30	0.02
PCB22	3.28	1.81	0.05	< 0.03	2.70	0.02
PCB37	3.40	1.82	0.04	0.03	2.10	< 0.03

	DELOR103	DELOR104	DELOR105	DELOR106	AROCLOR1242	AROCLOR1260
	ng/vzorek					
TetraCB						
PCB54	< 0.03	< 0.03	< 0.04	< 0.04	< 0.04	< 0.04
PCB53	0.53	0.61	0.05	< 0.03	0.72	< 0.03
PCB51	0.26	0.22	< 0.03	< 0.03	0.27	< 0.03
PCB45	0.62	0.60	< 0.03	< 0.03	0.86	< 0.03
PCB46	0.25	0.24	< 0.03	< 0.03	0.33	< 0.03
PCB52	2.67	3.30	3.01	0.72	3.91	0.50
PCB49	2.56	2.54	0.63	0.04	2.86	0.04
PCB48+47	2.45	2.03	0.26	< 0.03	2.41	< 0.03
PCB44	2.88	3.11	1.04	< 0.04	3.91	0.05
PCB42	1.14	1.21	0.07	< 0.04	1.25	< 0.04
PCB41+64+71+72	3.36	3.08	0.56	< 0.03	3.50	0.03
PCB74	2.68	1.86	0.83	< 0.03	2.01	< 0.03
PCB70	3.50	3.43	2.59	0.11	3.98	0.06
PCB80+66	5.17	3.87	1.29	0.08	3.70	0.04
PCB60+56	3.79	3.37	0.51	< 0.03	3.54	< 0.03
PCB81	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03
PCB77	0.45	0.45	0.05	< 0.04	0.39	< 0.04
PentaCB						
PCB104	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.04	< 0.04
PCB95	0.30	2.00	4.20	3.80	0.79	3.40
PCB84+89+92	0.28	0.70	2.50	0.91	0.64	0.70
PCB101	0.35	2.30	6.70	5.40	0.81	3.90
PCB99+113	0.29	0.45	4.00	0.21	0.47	0.10
PCB119	< 0.04	< 0.04	0.12	< 0.04	< 0.05	< 0.05
PCB97	0.17	0.36	1.70	0.38	0.43	0.16
PCB87	0.19	0.61	3.00	1.20	0.47	0.71
PCB110	0.42	1.50	8.20	3.50	1.00	1.90
PCB123	< 0.05	< 0.05	0.08	< 0.05	< 0.06	< 0.06
PCB118	0.42	0.96	9.50	2.20	0.68	0.80
PCB114	< 0.04	< 0.05	0.13	< 0.05	< 0.05	< 0.05
PCB105	0.18	0.62	3.80	0.23	0.56	0.10
PCB126	< 0.06	0.08	< 0.07	< 0.07	< 0.07	< 0.07

	DELOR103	DELOR104	DELOR105	DELOR106	AROCLOR1242	AROCLOR1260
	ng/vzorek					
HexaCB						
PCB155	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
PCB148	< 0.05	0.83	0.74	1.88	< 0.05	2.36
PCB151	0.03	1.08	0.60	2.08	< 0.03	3.70
PCB135+144	< 0.03	0.65	0.82	1.67	< 0.03	2.22
PCB149	0.08	3.38	4.58	9.61	0.08	10.65
PCB153+168	0.11	3.35	8.30	13.14	0.06	9.44
PCB130	< 0.03	0.76	1.11	2.62	< 0.03	3.00
PCB163+164	< 0.06	1.15	2.26	4.44	< 0.07	3.78
PCB138	0.09	2.38	10.30	12.20	0.11	6.67
PCB158	< 0.06	0.25	1.39	1.46	< 0.07	1.04
PCB128	< 0.03	0.28	2.36	1.84	0.04	0.77
PCB167	< 0.08	0.12	0.55	0.52	< 0.1	0.34
PCB156	< 0.07	0.18	1.24	1.35	< 0.08	0.73
PCB157	< 0.06	< 0.06	0.25	0.13	< 0.07	< 0.07
PCB169	< 0.10	< 0.10	< 0.10	< 0.11	< 0.11	< 0.11
HeptaCB						
PCB188	< 0.04	< 0.04	< 0.04	< 0.04	< 0.05	< 0.04
PCB179	< 0.02	0.33	0.09	0.37	< 0.03	1.20
PCB176	< 0.02	0.09	0.03	0.18	< 0.03	0.40
PCB178	< 0.02	0.13	0.04	0.28	< 0.03	0.79
PCB187	0.02	1.00	0.39	1.80	< 0.02	4.40
PCB183	0.02	0.59	0.43	1.60	< 0.03	2.20
PCB174	< 0.02	0.92	0.48	2.20	< 0.03	4.20
PCB177	< 0.02	0.47	0.30	1.50	< 0.03	2.20
PCB171	< 0.02	0.26	0.29	0.89	< 0.03	1.00
PCB180	0.03	1.80	1.69	6.50	< 0.03	8.00
PCB191	< 0.05	< 0.06	0.06	0.15	< 0.06	0.15
PCB170	< 0.02	0.71	1.07	3.80	< 0.03	3.40
PCB189	< 0.07	< 0.08	< 0.09	0.13	< 0.09	0.16
OktaCB						
PCB202	< 0.03	0.05	< 0.03	0.04	< 0.03	0.27
PCB201	< 0.03	0.07	< 0.03	0.06	< 0.04	0.28
PCB199	< 0.02	0.23	0.07	0.38	< 0.02	1.73
PCB203+196	< 0.02	0.35	0.10	0.68	< 0.02	2.24
PCB194	< 0.02	0.18	0.07	0.69	0.02	1.69
PCB205	< 0.03	0.03	< 0.03	0.04	< 0.04	0.12

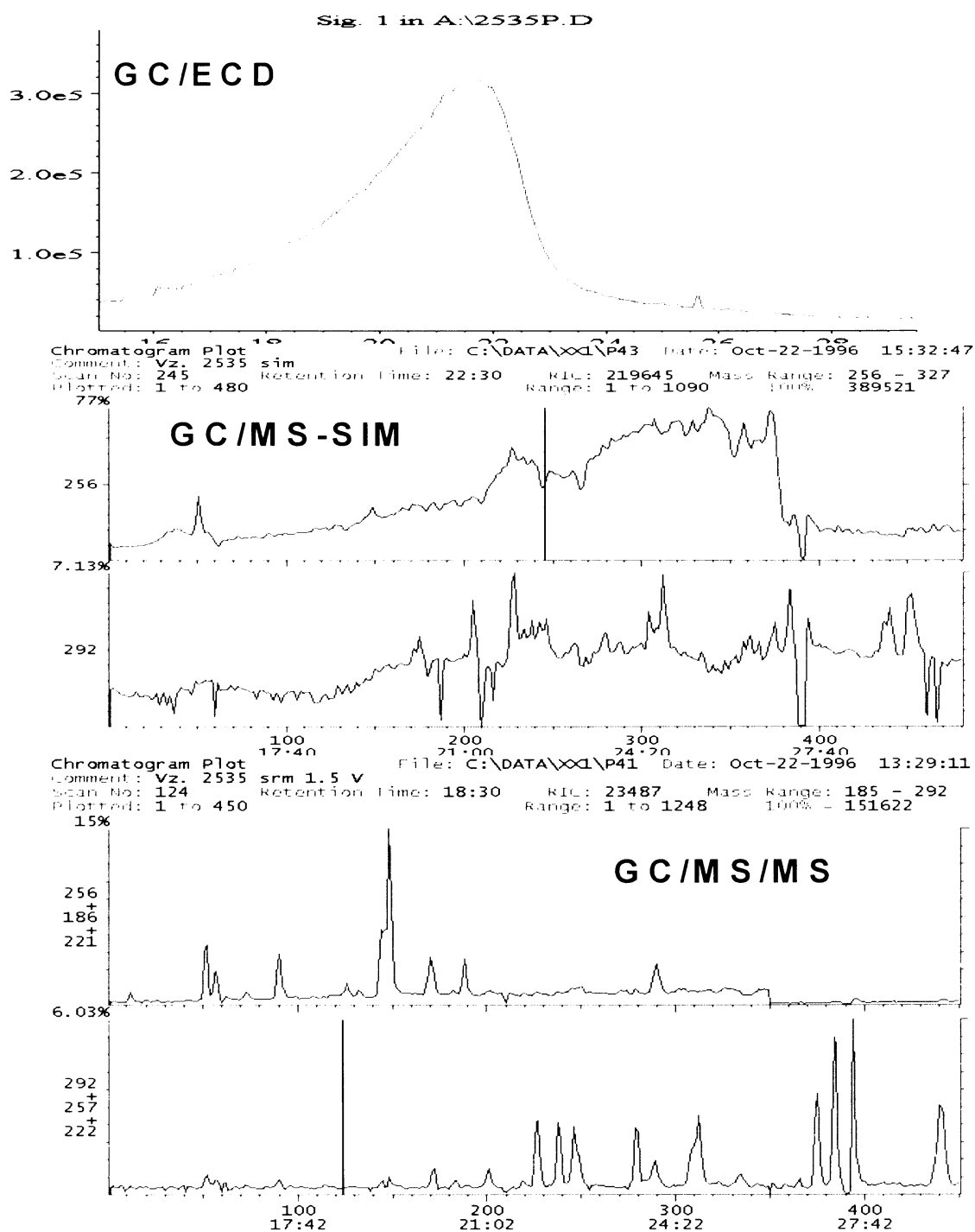
	DELOR103	DELOR104	DELOR105	DELOR106	AROCLOR1242	AROCLOR1260
	ng/vzorek					
Nona CB						
PCB208	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	0.08
PCB206	< 0.01	0.05	0.02	0.05	< 0.01	0.40
PCB207	< 0.02	0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02	0.04
DekaCB						
PCB209	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02	0.02
	DELOR103	DELOR104	DELOR105	DELOR106	AROCLOR1242	AROCLOR1260
Suma TriCB	53.8	28.1	0.60	0.20	43.3	0.20
Suma TetraCB	32.3	29.9	10.9	1.0	33.6	0.70
Suma PentaCB	2.6	9.6	43.9	17.8	5.9	11.8
Suma HexaCB	0.30	14.4	34.5	52.9	0.30	44.7
Suma HeptaCB	0.10	6.3	4.9	19.4	PMS	28.1
Suma OktaCB	PMS	0.91	0.24	1.9	0.02	6.3
Suma NonaCB	PMS	0.07	0.02	0.05	PMS	0.52
DekaCB	PMS	PMS	PMS	PMS	PMS	0.02
Suma PCB	89.1	89.3	95.1	93.2	83.1	92.4

Z tabulky je patrné, že součet sum stanovených kongenerů PCB v šesti různých technických směsích se pohyboval od 83.1 do 95.1 ng/vzorek, což je 83.1 až 95.1 % z množství technické směsi, která byla brána do analýzy.

Z výsledku těchto ověřovacích experimentů je jasné, že zvolený rozsah kongenerů PCB dobře pokrývá většinu PCB, které pocházejí z hlavního zdroje PCB – technických směsí. Vyvinuté metody byly dále validovány podle validačního protokolu laboratoře. Proměřili jsme lineární rozsahy MS/MS detekce a také stanovili meze stanovitelnosti. Tyto parametry GC/MS/MS metody pro stanovení PCB jsou téměř identické jako u PCDD/F. Při použití metody pro stanovení 94 kongenerů jsou meze stanovitelnosti poněkud horší v důsledku již zmiňovaného použití stejné kolizní energie, která pak není pro některé izomery optimální.

Nicméně zásadním faktorem, který ovlivňuje použitelnost MS/MS detekce v praxi je selektivita metody. Ta již není tak vysoká jako u PCDD/F, protože dceřinné ionty PCB vznikající odštěpením jednoho nebo dvou atomů chlóru mohou pocházet i z jiných chlorovaných sloučenin např. pesticidů, chlorovaných alifatických uhlovodíků apod. Nicméně je pořád mnohem větší než selektivita běžných detektorů používaných pro stanovení PCB. V obrázku 47 jsou jako příklad uvedeny chromatogramy stejného vzorku (extrakt z kalu z čistírny odpadních vod) při použití detektoru elektronového záchyty, MS detektoru v modu SIM a MS/MS.

obrázek 47 Chromatogramy extraktu vzorku kalu z čistírny odpadních vod - GC/ECD, GC/MS-SIM a GC/MS/MS.



V GC/ECD chromatogramu je pouze jeden velký široký pík, což je pík elementární síry, která vzniká oxidací organických sulfidů při čištění (s koncentrovanou kys. sírovou). Při použití MS v modu SIM je problém ten, že polymery síry (cyklická oktasíra) má stejný molekulový pík jako TriCB, které eluují ve stejném retenčním čase chemický šum je i na m/z 292 (TetraCB) tak vysoký, že znemožňuje jejich identifikaci i kvantifikaci. Pouze při použití MS/MS jsou na chromatogramu patrné píky kongenerů PCB. Masivní koeluce síry způsobuje změnu odezvy MS/MS, ta je však eliminována aplikací izotopicky značených vnitřních standardů.

Nižší selektivita stanovení PCB než PCDD/F však není u reálných vzorků příliš velkou nevýhodou, protože PCB se životním prostředím i organismech vyskytují na koncentrační hladině o několik řádů vyšší než právě PCDD/F. Citlivost metody nám pak umožňuje snižovat množství vzorku pro analýzu, což zjednodušuje a zrychluje čistící proceduru, která pro stanovení indikátorových kongenerů PCB představuje pouze krátkou kolonu plněnou silikagelem deaktivovaným konc. kyselinou sírovou.

Nicméně pro stanovení mono a nonortho PCB, které se nacházejí na koncentrační úrovni podobné PCDD/F je nutné použít celou čistící proceduru. Pro ověření správnosti stanovení jsme použili stejné postupy jako pro PCDD/F. Nicméně vypovídací schopnost analýz takto připravených vzorků je vzhledem velkému koncentračnímu rozpětí PCB a také k přítomnosti interferujících kongenerů PCB v reálném vzorku omezená. Referenční materiály pro mono a nonortho PCB začaly být dostupné až v době, kdy jsme již museli tyto analýzy z legislativních důvodů přesunout na HRMS. Nejschůdnější cestou pro ověření správnosti metody tak zůstaly mezinárodní porovnávací zkoušky. V tabulce 23 je jako příklad uvedeno porovnání výsledků stanovení „dioxin-like“ PCB v hovězím masu, kterých jsme dosáhli v naší laboratoři s mediánem výsledků 36 dalších laboratoří – statistika a hodnoty převzaty ze zprávy mezinárodních porovnávacích zkoušek v r. 2001 [80]

tabulka 23 Porovnání výsledku naší laboratoře s mediánem konsensuálních výsledků (povyloučení odlehlých výsledků) dosaženým v MPZ Dioxin in Food v roce 2001

PCB	Náš výsledek	medián konsens. výsledků pg/g tuku	RSD konsens. výs.	RD našeho výsledku
77	3.9	3.0	92%	30%
81	< 0.25	0.55	144%	
126	3.1	3.5	41%	-11%
169	0.66	0.83	45%	-20%
123	8.5	7.5	58%	13%
118	733	574	30%	28%
114	17	12	66%	42%
105	115	83	73%	39%
167	47	35	54%	34%
156	89	65	36%	37%
157	17	13	58%	31%
189	9	6.0	59%	50%

Z výsledků je patrné, že rozptyl výsledků je závislý na koncentrační hladině PCB a také na GC separaci. (PCB 114, 123 nejsou ideálně odděleny od interferujících PCB). Relativní odchylka našich výsledků od mediánu je vždy menší než deklarovaná relativní směrodatná odchylka konsensuálních výsledků.

Pro ověření správnosti metody pro stanovení indikátorových a ostatních kongenerů PCB jsme nepoužili uměle připravené vzorky, ale certifikované referenční materiály. Pro ověření správnosti a pro kontrolu analýz PCB v biologických materiálech používáme certifikovaný referenční materiál NIST SRM 1588, což je olej z tresčích jater. Pro abiotické matrice (půdy, sedimenty) používáme certifikovaný referenční materiál NIST SRM 1944, což je mořský sediment. Výsledky analýz těchto referenčních materiálů jsou uvedeny v tabulkách 24 a 25.

tabulka 24 Výsledky stanovení PCB v referenčním materiálu SRM 1944

	Certifikovaná koncentrace	Certifikovaná nejistota	Průměr stanovení	RSD	Rel. odchylka od cert. konc.
	ng/g	ng/g	ng/g		
PCB28+31	159.5	4.3	173.5	7.3%	8.8%
PCB44	60.2	2.0	60.1	8.7%	-0.2%
PCB49	53.0	1.7	55.0	4.4%	3.8%
PCB52	79.4	2.0	80.8	8.1%	1.7%
PCB66	71.9	4.3	62.8	10%	-13%
PCB87	29.9	4.3	26.1	9.0%	-13%
PCB95	65.0	8.9	45.7	9.2%	-30%
PCB99	37.5	2.4	27.6	12%	-26%
PCB101	73.4	2.5	66.7	8.3%	-9.1%
PCB105	24.5	1.1	23.7	12%	-3.3%
PCB110	63.5	4.7	67.6	8.2%	6.5%
PCB118	58.0	4.3	52.3	4.8%	-9.8%
PCB128	8.47	0.28	10.1	13%	20%
PCB138+163+164	62.1	3.0	73.9	15%	19%
PCB149	49.7	1.2	62.4	6.2%	26%
PCB151	16.93	0.36	17.8	9.3%	5.1%
PCB153	74.0	2.9	59.3	24%	-20%
PCB156	6.52	0.66	6.8	20%	3.6%
PCB170	22.6	1.4	17.0	11%	-25%
PCB180	44.3	1.2	42.1	14%	-5.0%
PCB183	12.19	0.57	11.2	12%	-8.5%
PCB187+159+182	25.1	1.0	26.6	13%	6.0%
PCB194	11.2	1.4	11.6	24%	3.7%
PCB195	3.75	0.39	neanalyzováno		
PCB206	9.21	0.51	8.1	16%	-12%
PCB209	6.81	0.33	6.8	13%	-0.6%

Z tabulky je patrné, že RSD stanovení PCB kongenerů v tomto CRM jsou maximálně 24%, což jen potvrzuje dobrou opakovatelnost metody. Největší odchylka od certifikovaných hodnot pak byla nalezena pro PCB 95 – a to 30%. Můžeme tedy konstatovat, že s deklarovanou nejistotou stanovení 30% jsme metrologicky navázáni na tento certifikovaný referenční materiál pro všechny certifikované parametry.

tabulka 25 Výsledky stanovení PCB v referenčním materiálu SRM 1588

	Certifikovaná koncentrace	nejistota	Průměr stanovení	RSD	Odchylka od cert. konc.
	ng/g				
PCB28+31	36.65	0.83	30.5	7.4%	-20%
PCB44	35.1	1.4	31.5	13%	-11%
PCB49	29.9	0.84	30.8	15%	2.8%
PCB52	83.3	2.3	76.4	8%	-9.0%
PCB66	54.7	1.5	55.3	13%	1.0%
PCB87	56.3	1.1	57.2	9%	1.6%
PCB95	35.2	1.1	53.7	22%	34%
PCB101	126.5	4.3	149.5	12%	15%
PCB105	60.2	2.3	61.7	12%	2.4%
PCB110	76.0	2.0	73.6	13%	-3.3%
PCB118	176.3	3.8	162.5	6%	-8.5%
PCB128	47.0	2.4	36.1	12%	-30%
PCB138+163+164	263.5	9.1	263.8	8%	0.1%
PCB149	105.7	3.6	86.0	11%	-23%
PCB151	54.8	2.1	48.3	12%	-13%
PCB153	273.8	7.7	279.7	4%	2%
PCB156	27.3	1.8	19.7	16%	-38%
PCB170	46.5	1.1	36.0	17%	-29%
PCB180	105.0	5.2	101.0	8%	-4%
PCB183	31.21	0.62	26.6	11%	-17%
PCB187+159+182	35.23	0.83	51.6	14%	32%
PCB194	15.37	0.61	11.2	7%	-37%
PCB201	12.2	0.46	2.8	24%	-343%
	Referenční koncentrace	nejistota	Průměr stanovení	RSD	Odchylka od ref. konc.
PCB16+32	2.6	0.8	2.9	14%	10%
PCB17	6.5	1.1	2.05	14%	-217%
PCB18	8.1	2.2	6.2	13%	-30%
PCB22	3.0	0.6	3.3	17%	9%
PCB33	3.3	1.4	2.1	15%	-58%
PCB41+71+64	19.3	3.2	14.9	16%	-29%
PCB42	14	3	9.2	16%	-53%
PCB55+60	18	11	20.1	18%	11%
PCB70+76	27	4	22.8	9%	-18%
PCB74	40	4.0	42.1	14%	5%
PCB158	21	2	18.9	22%	-11%
PCB174	41	10	16.5	17%	-148%
PCB177	4.9	0.8	4.5	17%	-9%
PCB178+129	28	1	9.9	13%	-184%
PCB189	2.9	0.6	2.2	64%	-32%
PCB191	4.5	0.7	1.6	30%	-190%
PCB196+203	24	3	15.7	12%	-53%
PCB199	17	2	12.5	13%	-36%
PCB206	3.4	1.6	3.5	7.1%	2.4%
PCB209	3.5	1.0	3.4	18%	-4%

V tomto CRM jsou jednak kongenery s certifikovanou koncentrací a také další jejichž koncentrace jsou uvedeny pouze jako referenční, protože při certifikaci vykazovaly příliš velký rozptyl výsledků nebo neshodu mezi dvěma metodami detekce (NIST pro PCB používá GC/ECD a GC/MS-SIM).

Z tabulek vyplývá, že GC/MS/MS metoda stanovení PCB poskytuje jak pro sediment tak i pro biologický materiál správné výsledky, které nejsou odlehle od certifikovaných koncentrací. Jedinou výjimkou je kongener PCB201, kde jsou naše výsledky stabilně řádově nižší. Poněkud menší shoda je patrná pro některé tzv. referenční hodnoty PCB kongenerů v materiálu 1588, ale tyto hodnoty jsou jako referenční uvedeny právě pro větší nejistotu výsledků dosaženou při certifikaci tohoto CRMa možné interference. V případě největší odchylky PCB 178+129 pak navíc v naší metodě stanovujeme pouze kongener PCB 179, což je pravděpodobnou příčinou této odchylky.

Další referenční materiály používáme také pro analýzy mono a nonortho PCB. Tyto referenční materiály začaly být komerčně dostupné až po roce 2002, kdy jsme ovšem tyto analýzy (také jako PCDD/F) museli z legislativních důvodů museli přesměrovat na HRMS detekci a tak není důvod je analyzovat MS/MS.

3.3.4 PBDE

Vývoj, optimalizaci a validaci MS/MS metody pro stanovení PBDE v biologickém materiálu jsme publikovali v Chemických listech v roce 2002 [81]. Celý článek je přiložen v kapitole 4 publikační výstupy.

3.3.5 OCP

Organochlorové pesticidy jsou strukturně úplně odlišné od PCDD/F i PCB. To se projevuje i na jejich hmotnostních spektrech, kde často nejsou nejintenzivnější molekulové píky nýbrž fragmenty. Při MS/MS experimentech dochází nejčastěji k odštěpení atomu chlóru nebo HCl. V tabulce 26 jsou uvedeny molekulový pík, nejintenzivnější pík (rodičovský iont) a dceřinný iont (ionty).

tabulka 26 Tabulka molekulových iontů a rodičovských a dceřinných iontů pro základní OCP

	molekulový iont	nejintenzivnější iont	dceřinný iont
	v MS spektru		
	m/z		
HCH	288	181	151/152
HCB	282	284	249
DDD	318	235	199/200
DDE	316	246	176
DDT	352	235	199/200

Z tabulky je patrné, že kromě HCB se nejintenzivnější ionty nekryjí s molekulovými ionty. Pro DDT a DDE jsou stejné rodičovské i dceřinné ionty.

Princip optimalizace MS/MS experimentu byl stejný jako pro PCDD/F. V tabulce 27 jsou pak uvedeny optimalizované parametry MS/MS. Pro stanovení OCP používáme dva izotopicky značené standardy – $^{13}\text{C}_6$ gamaHCH a $^{13}\text{C}_{12}$ ppDDE. $^{13}\text{C}_{12}$ ppDDT, který jsme také chtěli použít jako vnitřní standard byl po prvních validačních experimentech vyloučen pro interference v MS detekci mezi nativním ppDDT a jeho značeným analogem.

tabulka 27 Tabulka optimalizovaných parametrů MS/MS experimentu pro OCP včetně izotopově značených vnitřních standardů pro nátok He do iontové pasti 1,05 ml/min. a hodnotu q_z 0.3.

	izolační okno	Kolizní energie	Rodičovský iont	Analytický scan
	m/z	[V]	nativní/izotopicky značený [m/z]	
HCH	3	1.8	181/187	130-181/150-187
HCB	1	2.5	284	210-250
DDD	1	2.4	235	160-202
DDE	1	2.6	246/258	170-180/185-195
DDT	1	2.4	235	160-202

Vyvinutá MS/MS metoda byla validována podle již výše uvedeného postupu. V případě OCP musíme konstatovat, že MS/MS detekce OCP již není lineární v tak širokém rozmezí koncentrací jako pro PCDD/F, PBDE a PCB. Průměrné odezvové faktory OCP pro kalibrační standardy, kde byla koncentrace vnitřních standardů 100 ng/ml a koncentrace nativních OCP byla 5, 10, 25, 50, 100, 250 a 500 ng/ml jsou společně s jejich rozptylem uvedeným jako relativní směrodatná odchylka uvedeny v tabulce 28.

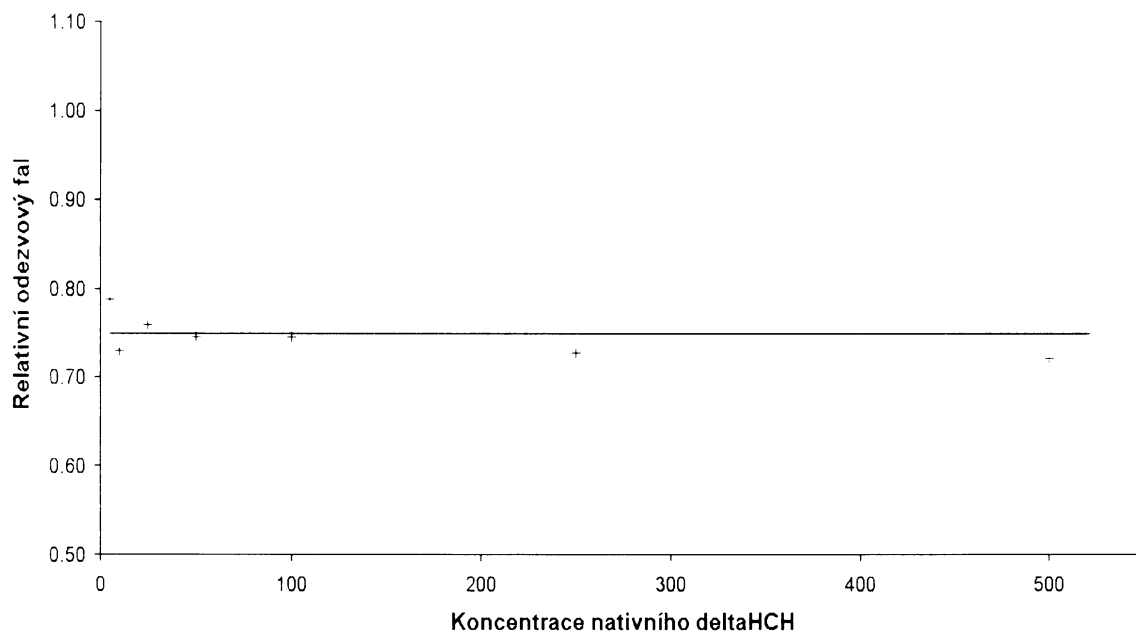
tabulka 28 Průměrné odezvové faktory OCP na vnitřní standardy $^{13}\text{C}_6$ gamaHCH a $^{13}\text{C}_{12}$ ppDDE (RRF ppDDT je pro ilustraci uveden i na $^{13}\text{C}_{12}$ ppDDT).

	5 - 500 ng/ml		5 - 250 ng/ml	
	Průměr RRF	RSD	Průměr RRF	RSD
alfaHCH	0.9958	7.5%	0.9958	7.4%
betaHCH	0.8324	4.7%	0.8324	3.0%
gamaHCH	0.8962	4.8%	0.8962	3.3%
deltaHCH	0.7452	3.0%	0.7452	3.0%
HCB	2.5173	13%	2.5173	12%
ppDDE	0.9260	4.8%	0.9260	5.3%
opDDD	0.3482	12%	0.3482	11%
ppDDD	0.2050	8.6%	0.2050	7.6%
opDDT	0.2109	22%	0.2215	18%
ppDDT na $^{13}\text{C}_{12}$ DDT	0.7108	19%	0.7395	17%
pp DDT na $^{13}\text{C}_{12}$DDE	0.1252	14%	0.1204	11%

Z tabulky je patrné, že největší variabilitu vykazují RRF op a ppDDT. Vynechání nejvyšší koncentrace pak vede ke snížení variability nikoliv však výrazně. V případě opDDT lze přičíst zvýšený rozptyl RRF nedokonalé chromatografické separaci ppDDD a opDDT.

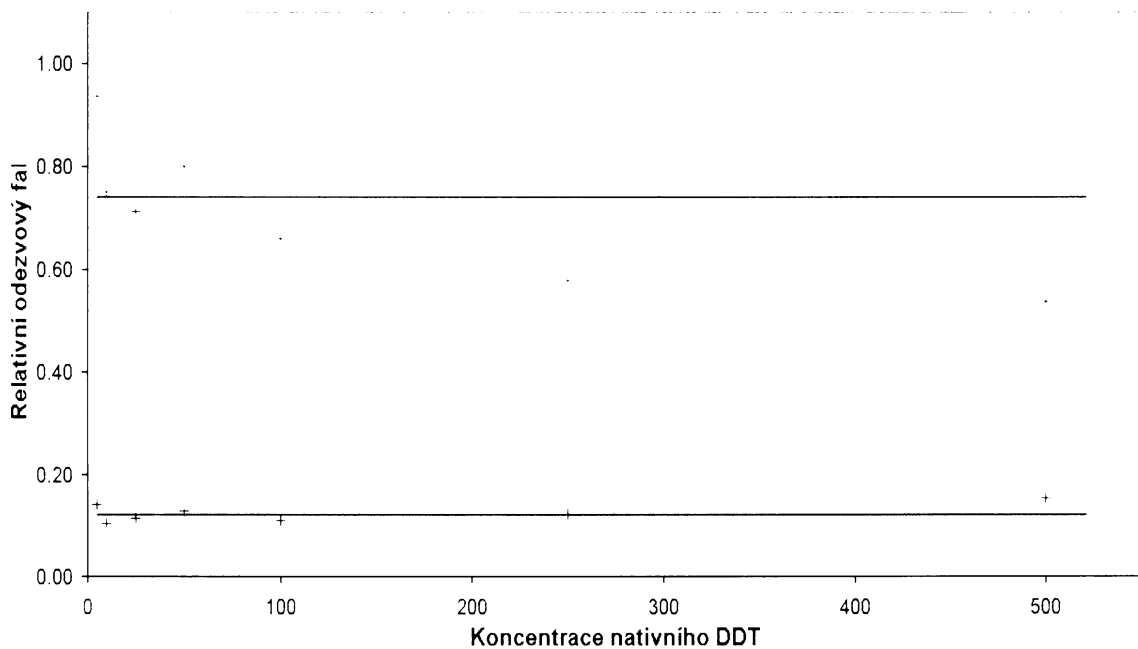
Názornější než RSD odezvoových faktorů jejich vnesení do grafu vůči koncentraci nativních sloučenin. V ideálním případě by měly být RRF statisticky rozděleny okolo průměrné hodnoty. Téměř ideální průběh závislosti RRF na koncentraci mají např. HCH – viz. obrázek 48. Stejná závislost RRF pro DDT je již více odlišná od ideálního průběhu. V obrázku 49 jsou uvedeny stejné závislosti pro DDT se dvěma odlišnými vnitřními standardy.

obrázek 48 Závislost RRF delta HCH na koncentraci nativního HCH. Červená čára je grafické znázornění průměrné hodnoty RRF.



Z obrázku je patrné, že RRF nejsou příliš odlehlé od průměrné hodnoty a závislost na koncentraci nativního HCH se neliší od ideálního průběhu (přímka paralelní s osou X).

obrázek 49 Závislost RRF ppDDT na koncentraci nativního DDT. Červené body jsou RRF s vnitřním standardem $^{13}\text{C}_{12}$ ppDDT, modrá pak s vnitřním standardem $^{13}\text{C}_{12}$ ppDDE. Čáry jsou grafickým znázorněním průměrných hodnot RRF.



Z obrázku je patrné, že zatímco odezvoový faktor ppDDT vůči značenému ppDDT vykazuje trend jasně odlišný od přímky paralelní s osou x, odezvoový faktor ppDDT vůči izotopicky značenému ppDDE má průběh mnohem bližší ideálnímu průběhu. Poněkud odlehlý je pouze nejvyšší bod kalibrace.

Z validace lineárního rozsahu stanovení OCP je patrné, že zvláště pro op a ppDDT je lineární odezva omezena směrem k vyšším koncentracím. Maximální přípustný poměr nativní DDT/vnitřní standard jsme stanovili na 3-4/1. Pokud je ve vzorku více nativních izomerů DDT než je tento poměr, je nutné postup opakovat s menším množstvím vzorku.

Toto omezení není příliš problematické ve vzorcích např. krve nebo mateřského mléka, kde se hladiny DDT pohybují v rozmezí maximálně jednoho řádu. Mnohem obtížnější je zvolení optimálního postupu při analýze např. půd z areálu SPOLANY Neratovice, kde koncentrace kolísají od jednotek ng/g až po jednotky procent. Vzhledem k tomu, že navážku vzorku pro analýzu nelze snižovat pod 0.2 – 0.5 g (vzorek již není reprezentativní), je nutné extrahovat např. 2g vzorku, extrakt zahustit na definovaný objem a k analýze odměřovat alikvoty již homogenního a reprezentativního extraktu.

Selektivita MS/MS stanovení OCP je stejně jako v případě PCB nižší než PCDD/F a PBDE, protože odštěpení Cl eventuelně HCl je vlastní téměř všem chlorovaným látkám. Nicméně platí to samé jako pro PCB – OCP jsou stále jedněmi z nejvíce koncentračně zastoupených POP ve složkách životního prostředí a tak nižší selektivita není nijak

omezující. V porovnání s obvyklými detektory používanými pro OCP jako jsou detektor elektronového záchytu nebo MS v modu SIM, je MS/MS samozřejmě selektivnější. Při použití ECD interferují PCB, které se ve většině vzorků vyskytují na podobných koncentračních hladinách jako OCP. Použití MS/MS detekce tyto interference eliminuje. Největším problémem při stanovení OCP pak zůstává sorpce v kontaminovaném GC injektoru, jak jsem již zmínil v kapitole 4.2.4. Tomuto jevu se dá úspěšně čelit preventivními výměnami lineru v GC injektoru po 40 – 50 nástřicích vzorku.

Dalším krokem validace bylo ověření účinnosti metody na uměle připravených vzorcích. Výsledky výtěžnosti OCP z vody jsou uvedeny v kapitole 4.1.1.1. Stejně experimenty jsme provedli i pro simulované vzorky tuku. Vzhledem k tomu, že navážky tuku pro stanovení OCP jsou maximálně 0.2 g a čištění provádíme pouze na sloupci silikagelu deaktivovaného kys. sírovou, jsou výsledky nereálně dobré. Nicméně pro OCP existují pro komplexní matrice jako je tuk či půda dostupné referenční materiály jako jsou již v kapitole PCB zmiňované NIST 1944 a 1588 a také BCR 430. Výsledky analýz těchto certifikovaných referenčních materiálů jsou uvedeny v tabulkách 29 –31.

tabulka 29 Výsledky analýz OCP v CRM NIST 1944

	Certifikovaná koncentrace	nejistota	průměr stanovení	RSD	Odchylka od cert. konc.
	ng/g				
HCB	6.03	0.35	5.6	12%	-7.3%
ppDDT	119	11.0	116	31%	-2.8%
	Referenční koncentrace	nejistota	průměr stanovení	RSD	Odchylka od ref. konc.
opDDE	19	3.0	20.9	14%	9.1%
opDDD	38.0	8.0	54.5	19%	30%
ppDDE	86	12.0	53.8	48%	-60%
ppDDD	108.0	16	93.7	40%	-15%

V tomto CRM jsou certifikované pouze dva OCP, zbývající izomery mají pouze orientační hodnotu. Pro stanovení OCP jsou sedimenty jedny z nejtěžších matric a je to patrné i pro výsledky našich analýz. I když odchylka ppDDT od certifikované koncentrace není velká, nejistota těchto stanovení zdaleka nedosahuje PCB na této koncentrační hladině. Také u ppDDE a ppDDD je rozptyl hodnot kolem průměru dosti značný. Mnohem vážnější je ovšem rozdíl mezi průměrem našich stanovení a referenční hodnotou. Vzhledem k tomu, že náš výsledek je nižší a navíc v případě ppDDE jde o metodu izotopového ředění, je možné že selektivnější metoda MS/MS dává nižší výsledky než GC/ECD a GC/MS-SIM použité NIST pro certifikaci tohoto referenčního materiálu.

tabulka 30 Výsledky analýz OCP v CRM NIST 1588

	Certifikovaná koncentrace	nejistota	Průměr našich stanovení	RSD	Odchylka od cert. konc.
	ng/g	ng/g	ng/g		
alfaHCH	85.3	3.4	87.3	10%	2.3%
gamaHCH	24.9	1.7	31.3	20%	20%
HCB	157.8	5.0	148	20%	-6.7%
opDDE	22	1.0	8.6	8.2%	-155%
ppDDE	651	11	584	11%	-11%
opDDD	36.3	1.4	30.4	16%	-19%
ppDDD	254	11	206	29%	-23%
opDDT	156.0	4.4	143	33%	-8.9%
ppDDT	524	12	528	32%	0.7%

Z tabulky je patrné, že op DDE stanovujeme systematicky odlehle od certifikované koncentrace. Vzhledem k tomu, že v jiných referenčních materiálech je tento izomer stanoven dobře je možné, že GC/MS/MS je selektivnější než metody použité při certifikaci tohoto CRM – proto je námi nacházená koncentrace opDDE mnohem nižší. V ostatních případech je dobrá shoda našich výsledků s certifikovanými koncentraci, ikdyž speciálně op a pp DDT nemají zrovna excelentní opakovatelnost. Tato skutečnost je nicméně důsledkem již výše zmiňovaných vlastností DDT (sorpce a degradace v nástřiku apod.).

tabulka 31 Výsledky analýz OCP v CRM BCR 430

	Certifikovaná koncentrace	nejistota	Průměr našich stanovení	RSD	Odchylka od cert. konc.
	ng/g	ng/g	ng/g		
alfaHCH	140	12	130	11%	-8.1%
betaHCH	259	21	253	11%	-2.2%
gamaHCH	500	30.0	484	7.0%	-3.3%
HCB	392	26	338	7%	-16%
ppDDE	820	60	769	10%	-6.6%
ppDDT	3400	180	2777	28%	-22%

Výsledky OCP v BCR 430 se ze všech používaných RM shodují nejlépe s certifikovanými hodnotami, což je však také důsledkem relativně vysoké hladiny OCP v tomto materiálu a také tím, že to není tak komplexní matrice jako je sediment nebo rybí tuk. PpDDT opět vykazuje největší relativní směrodatnou odchylku.

I když je analýza OCP v porovnání s PCB nebo PCDD/F mnohem jednodušší a koncentrační hladiny těchto látek jsou v analyzovaných matricích mnohem vyšší, tak je možné na základě těchto výsledků konstatovat, že stanovení OCP rozhodně není žádnou triviální záležitostí. Dokonalé přečištění vzorku a důraz na udržení čistoty GC injektoru jsou zásadními předpoklady pro udržení vysoké kvality těchto analýz, zvláště u velkých sérií vzorků.