Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2012

Ročník XVI, číslo 3/2012

Brno 2012

Obsah

1. **Využití komerčních kitů pro extrakci rostlinné DNA**
Kateřina Staňková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OMB, Hroznová 2, 656 06 Brno 1

2. **Ověření časové použitelnosti pomletého vzorku při stanovení obsahu oleje ve slunečnicovém semeni**
Zdeněk Kejla
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Opava, Jaselská 16, 746 23 Opava 10

3. **Stanovení vybraných perfluorovaných látek metodou UPLC-MS/MS**
Petra Kosubová, Barbora Foltová, *Noora Perkola
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
*SYKE Helsinky 37

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Využití komerčních kitů pro extrakci rostlinné DNA

Kateřina Staňková

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

1 Úvod

Cílem práce byla extrakce rostlinné DNA stávajícími a novými extrakčními kity, porovnání pracovních postupů a určení kvality a koncentrace získané DNA.

Poznámky

1 *Stávající extrakční kity: DNeasy Plant Mini Kit, GenElute™ Plant Genomic DNA miniprep Kit, NucleoSpin® Food.*

2 *Nové extrakční kity: foodproof® GMO Sample Preparation Kit, PowerPlant™ DNA Isolation Kit Sample.*

2 Materiál a metody

Základem těchto metod je extrakce DNA z rostlinného materiálu, změření její koncentrace a čistoty pomocí spektrofotometru a určení její kvality gelovou elektroforézou na 0,8% agarózovém gelu.

3 Přístroje a pomůcky

1 Váhy s přesností 0,01 g.

2 Vodní lázeň.

3 Centrifuga.

4 Minishaker.

5 Nízkoobjemový spektrofotometr, 230 nm, 260 nm, 280 nm.

6 Elektromagnetické míchadlo.

7 Elektroforetická vana a zdroj napětí.

8 Transiluminátor.

9 Fotodokumentační zařízení s příslušným software.

10 Přenosná UV lampa.

11 Mrazicí box.

12 Automatické pipety, (0,1 – 1000) µl, špičky.

13 Plastové zkumavky, 2 ml.

14 Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby.

4 Chemikálie

1 DNeasy Plant Mini Kit, výrobce Qiagen–kit. Kit pro extrakci a purifikaci DNA z rostlinných materiálů a hub obsahuje

1.1 Buffer AP1.

1.2 Buffer AP2.

1.3 Buffer AP3 (koncentrát), před prvním použitím se ředí (96 – 100)% etanolem.

1.4 Buffer AW (koncentrát), před prvním použitím se ředí (96 – 100)% etanolem.

1.5 RNase A (100 mg/ml).

1.6 DNeasy Mini Spin Columns (kolonky ve zkumavkách).

1.7 QIAshredder Mini Spin Columns (kolonky ve zkumavkách).

1.8 Collection Tubes 2 ml (sterilní zkumavky).

2 GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit, SIGMA-ALDRICH. Kit pro extrakci genomické DNA z rostlin obsahuje

2.1 Lysis solution Part A.

2.2 Lysis solution Part B.

2.3 Precipitation Solution.

2.4 Binding Solution.

2.5 Column Preparation Solution.

2.6 Wash Solution Concentrate – před prvním použitím se ředí (96 – 100)% etanolem.

2.7 Elution Solution.

2.8 GenElute Filtration Columns in Tubes (filtrační kolonky ve zkumavkách).

2.9 GenElute Nucleic Acid Binding Columns in Tubes (vázací kolonky ve zkumavkách).

2.10 Collection Tubes (sterilní zkumavky).

3 foodproof® GMO Sample Preparation Kit, BIOTECON Diagnostics GmbH. Kit pro extrakci DNA z čerstvého rostlinného materiálu a potravin rostlinného původu obsahuje

3.1 Extraction Buffer.

3.2 Binding Buffer.

3.3 Wash Buffer, před prvním použitím se ředí (96 – 100)% etanolem.

3.4 Elution Buffer.

3.5 Proteinase K.

3.6 High pure Filter Tubes.

3.7 Collection Tubes.

4 PowerPlant™ DNA Isolation Kit Sample, MO BIO Laboratories, Inc. Kit pro extrakci genomické DNA obsahuje

4.1 Beat Solution.

4.2 Solution PB1.

4.3 Solution PB2.

4.4 Solution PB3.

4.5 Solution PB4.

4.6 Solution PB5.

4.7 Solution PB6.

4.8 Solution PB7.

4.9 Spin Filters (kolonky).

4.10 Mikrozkumavky 2 ml.

4.11 Mikrozkumavky 2,2 ml.

5. NucleoSpin® Food, MACHEREY-NAGEL. Kit pro extrakci genomické DNA z potravin obsahuje

5.1 Lysis buffer CF.

5.2 Buffer C2.

5.3 Buffer C3.

5.4 Wash Buffer CQW.

5.5 Wash Buffer C5 (koncentrát), před prvním použitím se ředí (96 – 100)% etanolem.

5.6 Elution Buffer CE.

5.7 Columns plus Collection Tubes (zkumavky s kolonkami).

5.8 Proteinase K.

5.9 Proteinase Buffer PB.

5.10 Collection Tubes.

6. Ostatní chemikálie, které nejsou dodávané v kitech

6.1 Etanol, (96 – 100)%.

6.2 Etanol, denaturovaný.

6.3 Voda vysoké čistoty.

6.4 Isopropanol.

6.5 RNase A, DNase and protease free.

6.6 Agaróza pro molekulární biologii.

6.7 Pracovní roztok 1 × TAE pro elektroforézu.

6.8 Ethidium bromid, zásobní roztok.

6.9 EZ Load Precision Molecular Mass Standard, BIO-RAD.

6.10 6 × Loading Dye Solution. Barvicí činidlo.

5 Pracovní postup

Pro extrakci DNA byl použit vzorek GeMMA GeM SU 41B. Jednalo se o vzorek mouky obsahující Roundup Ready® sóju analyzovaný v rámci mezilaboratorního kruhového testu, kterého se laboratoř zúčastnila v roce 2010.

Extrakce byla provedena ve dvou paralelních stanoveních – A a B.

5.1 Extrakce DNA

Extrakce DNA probíhá ve 3 krocích.

1. Lýze buněk pomocí lyzačních pufrů. V této fázi dochází k rozbití buněk a uvolnění buněčného obsahu včetně DNA do pufrovaného roztoku.
2. Navázání uvolněné DNA na silika-kolonku, degradace proteinů proteinázou K a ribonukleové kyseliny RNázou A a promývání.
3. Uvolnění navázané DNA do elučního pufru.

Dodržovaly se postupy dle uživatelských příruček, které jsou součástí každého extrakčního kitu. Postupy se zásadně mezi sebou nelišily. U extrakčního kitu PowerPlant™ bylo nutno vortexovat zkumavky se vzorky po dobu 10 min v horizontální poloze.

5.2 Měření koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky

Měření při vlnových délkách 230 nm, 260 nm a 280 nm umožňuje vedle stanovení koncentrace získané DNA vyhodnotit také čistotu vzorku. Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem absorbance v oblasti vlnové délky okolo 260 nm, zatímco proteiny v oblasti okolo 280 nm. Stupeň čistoty nukleových kyselin se stanovuje z poměrů absorbancí A_{260nm}/A_{280nm} a $A_{260nm}/A_{230\,nm}$.

Koncentrace DNA se měřila proti slepému vzorku, kterým byl eluční pufr z jednotlivých kitů. Použily se 2 µl vzorku. Každý vzorek se měřil 2 ×. Do úvahy se vzaly průměry naměřených hodnot.

5.3 Elektroforéza v agarózovém gelu

Pomocí elektroforézy v 0,8% agarózovém gelu se zjistí kvalita vyizolované DNA a přítomnost RNA.

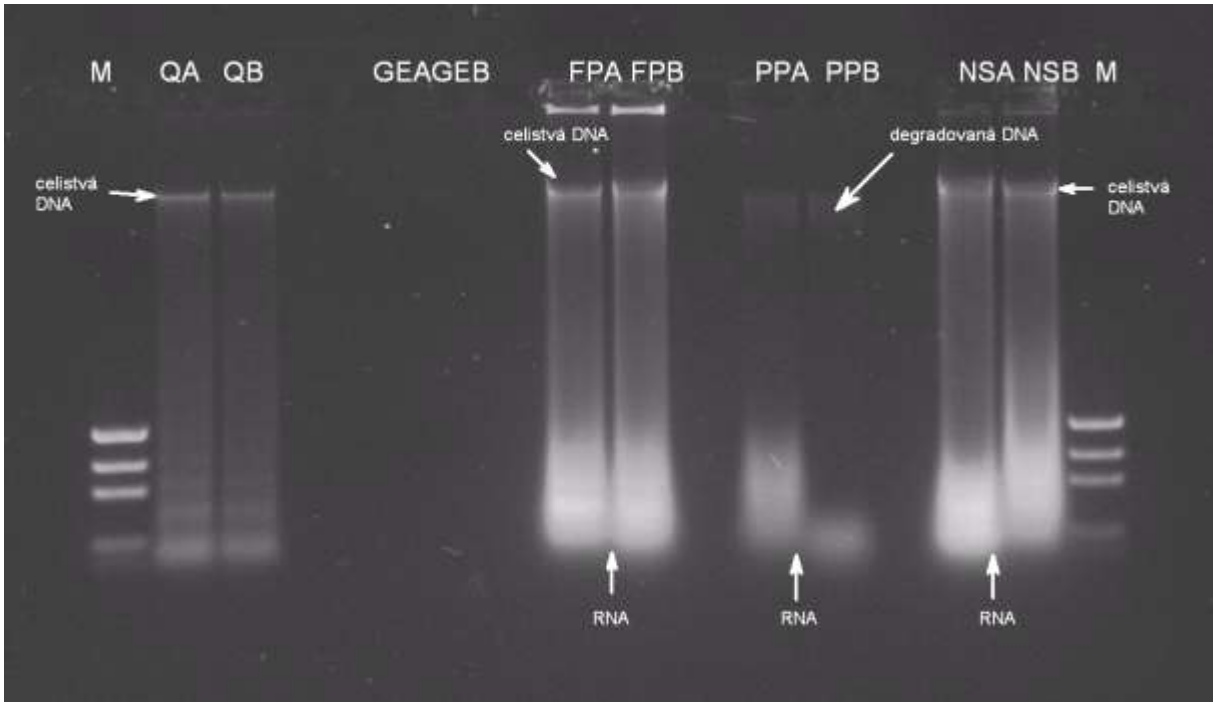
5.3.1 Příprava 0,8% agarózového gelu

Do Erlenmayerovy baňky se naváží (0,64 ± 0,1) g práškové agarózy a přidá se 80 ml pracovního 1 × TAE pufru. Vaří se při (150 – 200) °C s elektromagnetickým míchadlem asi (15 – 20) min, až se roztok úplně vyčeří a vzduchové bublinky vymizí i po zamíchání krouživým pohybem. Zatím se připraví nalévací vana a vhodný hřebínek.

Po mírném zchladnutí se do gelu přidá 10 µl pracovního roztoku ethidiumbromidu a míchá se 1 min. Poté se vyjme míchadélko a agaróza se nalije do vany s hřebínkem. Po (20 – 30) min, v závislosti na teplotě prostředí, se opatrně vyjme hřebínek a přenese gel z nalévací vany do elektroforetické vany s pracovním roztokem TAE pufru.

3 µl vyextrahované DNA se smíchají s 2 µl barviva 6 × Loading Dye Solution a spolu s Load Precision Molecular Mass standardem se nanesou do jamek a spustí se elektroforéza (70 V, 75 min).

6 Výsledky a diskuse



Obr. 1. Kvalita vyextrahované DNA.

M	Load Precision Molecular Mass Standard.
QA, QB	DNA extrahovaná pomocí kitu DNeasy Plant Mini Kit.
GEA, GEB	DNA extrahovaná pomocí kitu GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit.
FPA, FPB	DNA extrahovaná foodproof® GMO Sample Preparation Kit.
PPA, PPB	DNA extrahovaná PowerPlant™ DNA Isolation Kit Sample.
NSA, NSB	DNA extrahovaná NucleoSpin® Food.

Tabulka 1. Porovnání naměřených koncentrací a hodnot určujících čistotu vyextrahované DNA.

Extrakční kit	Vzorek	Koncentrace DNA (ng/µl)	$A_{260\ nm}/A_{280\ nm}$	$A_{260\ nm}/A_{230\ nm}$
DNeasy Plant	A	81,8	1,82	2,47
	B	77,1	1,79	2,37
GenElute™	A	1,75	1,31	0,03
	B	3,4	1,65	0,02
foodproof®	A	458	1,96	1,33
	B	460	2,01	1,58
PowerPlant™	A	206	2,13	1,62
	B	109	2,06	1,60
NucleoSpin®	A	548	2,07	2,10
	B	540	2,14	2,28

Pro následnou analýzu získané DNA jsou klíčové tyto paramatery: koncentrace DNA, její kvalita a čistota. Nízká koncentrace DNA, poškozená nebo znečištěná DNA mohou vést k amplifikaci nežádoucích fragmentů, k nízké amplifikaci nebo k úplné inhibici amplifikace.

Pro potřeby laboratoře je dostačující minimální koncentrace 5 ng/µl, čemuž vyhovují 4 z testovaných kitů.

Čistota DNA daná poměrem A_{260nm}/A_{280nm} se pohybuje v rozmezí (1,31 – 2,14). Optimální poměr se udává v rozmezí hodnot (1,7 – 2,0). Hodnoty pod 1,7 značí znečištění proteiny, což odpovídá kitu Gen Elute™, jelikož se v něm nepoužívá Proteináza K.

Hodnoty pohybující se okolo 2,0 a vyšší dokazují přítomnost RNA (viz obr. 1), a to z důvodu absence kroku zahrnující přidání RNase A do reakční směsi.

Hodnoty poměru A_{260nm}/A_{230nm} musejí být vyšší než 1,5. Ideální hodnoty jsou (2,0 – 2,2). Pokud je naměřená hodnota nižší než 1,5, je získaná DNA kontaminována látkami jako jsou fenol a guanidinové soli.

7 Závěr

Rostlinná DNA byla extrahována 5 extrakčními kity. Byla určena kvalita, koncentrace a čistota extrahované DNA.

Čtyřmi extrakčními kity byla získána DNA v množství a kvalitě potřebném pro další analýzu. Extrakční kit GenElute™ nevyhověl požadavkům laboratoře. Získaná DNA byla velmi nízké koncentrace, čistoty a špatné kvality.

Laboratoř navrhuje nahradit extrakční kit GenElute™ kitem foodproof® s tím, že do postupu extrakce DNA bude zařazen krok přidání RNaseA do reakční směsi.

8 Literatura

1 DNeasy® Plant Handbook, **2006** QIAGEN.
2 GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit USER GUIDE, **2008** Sigma-Aldrich.
3 foodproof® GMO Sample Preparation Kit, **2007** BIOTECON DIAGNOSTICS.
4 PowerPlant™ DNA Isolation Kit Sample Instruction Manual, **2009** MO BIO Laboratories, Inc.
5 Genomic DNA From Food User Manual, **2008** MACHEREY-NAGEL.
6 NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer User Manual.

Ověření časové použitelnosti pomletého vzorku při stanovení obsahu oleje ve slunečnicovém semeni

Zdeněk Kejla

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Opava, Jaselská 16, 746 23 Opava
zdenek.kejla@ukzuz.cz

1 Úvod

Slunečnice roční je jednoletá rostlina, jejíž pěstování je velmi rozšířené. Využívá se v olejářském průmyslu, kde se ze slunečnicových semen získává olej, používaný v potravinářství i při výrobě mýdel, barev apod.

Obsah oleje ve slunečnicovém semeni se v laboratořích ÚKZÚZ stanovuje extrakcí nebo metodou NIR spektroskopie. Před vlastním měřením je nutno vzorek pomlet, neboť analýza nepomletých semen nedává spolehlivé výsledky. Obecně se obsah oleje ve slunečnicovém semeni stanovuje z čerstvě pomletého vzorku, nejpozději několik hodin po pomletí. Jedná se o empirické pravidlo, které dosud nebylo ověřeno. U analýz většího počtu vzorků způsobuje tento požadavek kapacitní i organizační problémy při vytěžování mlýnku nebo pracovníků laboratoře. Pokud by bylo možné měřit obsah oleje i v delším časovém intervalu po pomletí vzorku (řádově ve dnech), přípravné práce i samotné měření by se zjednodušily a zefektivnily.

Cílem práce bylo na souboru vzorků semen slunečnic proměřit obsah oleje v různých časových intervalech od pomletí a tím zjistit, zda lze měřit obsah oleje i po delší časové prodlevě od pomletí, případně jak dlouhá může tato prodleva být bez ovlivnění konečného výsledku obsahu oleje.

2 Přístroje a zařízení

1. Ultraodstředivý mlýn Retsch ZM 200 s distančním sítkem 1,5 mm.
2. Spektrofotometr FOSS NIRSystem 6500.
3. Kyvety typu small ring cup s křemenným okénkem o průměru 4,5 cm

3 Postup

Při zkoušení vzorků se postupovalo dle platných postupů stanovení oleje ve slunečnicovém semeni, řepce jarní a řepce ozimé metodou NIRS. Měřil se soubor 120 náhodně vybraných vzorků slunečnice z odrůdových zkušeben ÚKZÚZ (sklizeň 2008). Každý vzorek slunečnice byl pomlet a zhomogenizován. Poté byl nadávkován do kyvety a bylo nasnímáno reflektanční spektrum v rozsahu (400 – 2500) nm. S použitím softwaru WinISI II (fa ISI LLC, USA) a MatLab (fa MathWorks, USA) pak byla část spektra v oblasti (1100 – 2500) nm převedena do kalibrační rovnice a byl vyhodnocen parametr „olej v sušině“. Vzorky byly nejprve analyzovány čerstvě po pomletí (0 h) a dále v intervalech 24 h, 48 h, 72 h, 96 h a 168 h (krátkodobé intervalové měření). Takto bylo proměřeno 5 sérií po 20 vzorcích. Dále byla jedna série 20 vzorků proměřena dlouhodobě v intervalech 0 h, 72 h, 96 h, 120 h, 168 h, 264 h, 432 h, 600 h, 720 h, 936 h a 1104 h (dlouhodobé intervalové měření). Pomleté vzorky byly během intervalových měření uchovávány v polyetylenových sáčcích při laboratorní teplotě.

3.1 Vyhodnocení

Výsledky stanovení obsahu oleje po jednotlivých časových intervalech od pomletí vzorků byly porovnány s výsledky z čerstvě pomletých vzorků s využitím softwaru EffiValidation 3.0 (fa EffiChem, Lysice, CZ).

4 Výsledky

4.1 Krátkodobé intervalové měření

Výsledky měření jsou uvedeny v tabulkách č. 1 až č. 5. Vždy je uveden průměr ze dvou paralelních stanovení pro analýzu čerstvě pomletého vzorku (0 h) a po 1 dni, 2 dnech, 3 dnech, 4 dnech a 7 dnech (24 h, 48 h, 72 h, 96 h a 168 h).

Tabulka č. 1. Porovnání výsledků intervalového měření obsahu oleje ve slunečnicovém semeni – série 1.

Č. vzorku	**0 h** olej (%/s)	**24 h** olej (%/s)	**48 h** olej (%/s)	**72 h** olej (%/s)	**96 h** olej (%/s)	**168 h** olej (%/s)
4168	50,12	49,51	49,76	50,09	50,05	50,25
4169	50,28	48,98	49,59	49,97	49,02	49,69
4170	49,12	49,76	48,83	49,19	48,31	49,02
4171	48,12	47,66	48,61	49,15	48,49	47,70
4172	50,70	50,88	50,09	51,54	51,01	50,07
4173	51,21	51,51	51,10	51,06	50,98	51,39
4174	56,91	57,46	56,00	56,84	56,72	56,24
4175	52,45	52,59	52,64	52,53	52,45	52,49
4176	49,42	49,19	49,66	49,75	49,06	49,27
4177	51,74	51,68	51,76	52,12	52,44	50,83
4178	49,97	49,93	50,97	49,98	51,06	49,83
4179	52,65	51,97	52,55	52,42	51,61	51,20
4180	49,69	50,35	50,37	50,35	49,88	49,55
4181	50,63	51,27	50,35	51,64	51,65	50,43
4182	52,49	52,48	52,53	52,04	53,11	52,26
4183	54,84	53,86	53,77	53,07	54,40	53,35
4184	52,22	51,76	51,54	51,62	51,96	51,22
4185	53,00	52,17	52,46	52,54	52,20	52,06
4186	51,00	52,63	50,91	51,65	51,27	51,24
4187	51,79	52,01	51,86	52,40	51,49	50,70

Tabulka č. 2. Porovnání výsledků intervalového měření obsahu oleje ve slunečnicovém semeni – série 2.

Č. vzorku	**0 h** olej (%/s)	**24 h** olej (%/s)	**48 h** olej (%/s)	**72 h** olej (%/s)	**96 h** olej (%/s)	**168 h** olej (%/s)
4220	53,61	53,51	54,89	53,61	53,97	54,00
4221	57,34	56,60	57,02	56,42	56,49	56,23
4222	54,75	55,30	54,32	53,93	54,42	53,67
4223	55,49	54,89	54,95	56,19	55,77	55,59
4224	52,26	51,66	51,29	52,59	51,45	51,14
4225	52,91	52,80	52,57	52,32	52,36	52,50
4226	50,42	49,79	49,97	50,84	50,21	49,48
4227	51,95	53,29	53,45	52,73	53,08	51,55
4228	51,11	50,89	50,89	49,95	50,74	51,61
4229	45,17	45,69	46,23	44,53	43,65	43,12
4230	53,33	52,95	53,02	54,10	53,28	52,41
4231	52,51	52,35	52,50	52,37	52,34	52,62
4232	52,00	51,97	51,89	51,30	51,62	51,81
4233	53,05	52,95	53,30	53,25	52,71	52,76
4234	52,38	51,17	51,30	51,16	51,50	50,81
4235	50,36	50,83	50,42	51,40	50,73	50,67
4236	52,93	52,27	52,54	51,86	51,98	52,19
4237	52,91	52,97	52,18	53,29	53,04	52,88
4238	56,89	57,23	57,39	57,40	56,70	56,83
4239	54,14	54,38	54,51	54,06	54,46	54,82

Tabulka č. 3. Porovnání výsledků intervalového měření obsahu oleje ve slunečnicovém semeni – série 3.

Č. vzorku	**0 h** olej (%/s)	**24 h** olej (%/s)	**48 h** olej (%/s)	**72 h** olej (%/s)	**96 h** olej (%/s)	**168 h** olej (%/s)
4240	50,30	50,09	49,80	49,28	49,93	49,65
4241	52,15	52,15	51,86	51,45	51,34	51,63
4242	52,09	51,03	51,39	52,12	51,21	50,73
4243	53,50	52,66	52,42	52,90	51,95	52,37
4244	52,61	52,75	52,45	52,68	52,33	52,71
4245	54,23	53,50	54,14	53,34	52,73	53,82
4246	55,86	55,98	54,65	55,50	55,98	55,53
4247	55,11	54,94	54,70	53,88	54,61	54,55
4248	51,06	51,62	50,89	51,50	51,59	50,92
4249	53,95	54,17	53,76	55,20	53,89	53,63
4250	52,12	51,97	52,39	52,58	50,90	50,82
4251	53,94	54,23	54,10	53,93	53,40	53,51
4252	49,84	50,66	50,53	50,61	50,89	50,19
4253	52,50	52,81	53,49	53,43	52,69	53,13
4254	50,01	50,35	50,09	51,18	50,09	50,07
4255	51,14	50,44	51,61	50,99	51,71	51,30
4256	47,27	46,99	47,62	47,72	48,19	47,22
4257	46,40	46,03	46,74	46,51	46,23	46,22
4258	46,59	46,37	46,56	46,75	46,88	46,16
4259	48,76	49,11	48,89	48,28	48,66	48,21

Tabulka č. 4. Porovnání výsledků intervalového měření obsahu oleje ve slunečnicovém semeni – série 4.

Č. vzorku	**0 h** olej (%/s)	**24 h** olej (%/s)	**48 h** olej (%/s)	**72 h** olej (%/s)	**96 h** olej (%/s)	**168 h** olej (%/s)
4294	54,50	54,72	54,19	54,76	55,17	55,50
4295	47,64	48,00	48,30	48,63	48,65	48,14
4296	55,05	55,16	54,61	54,53	54,41	54,12
4297	54,80	54,97	55,59	55,03	54,75	56,19
4298	53,20	54,86	54,32	53,97	54,09	54,26
4299	54,52	55,17	54,95	55,20	55,36	54,26
4300	54,04	53,33	54,28	53,72	53,83	53,66
4301	56,43	55,88	55,84	55,53	55,27	55,06
4302	53,44	53,00	53,54	53,05	53,08	52,17
4303	52,70	53,13	51,79	52,80	53,72	52,94
4304	56,84	56,43	56,43	56,55	55,62	55,19
4305	56,92	56,64	57,06	56,99	56,18	57,40
4306	57,77	57,28	56,96	57,06	56,46	56,64
4307	56,58	57,04	56,97	56,67	56,00	56,35
4308	59,17	58,94	59,26	59,47	58,12	58,26
4309	58,06	57,64	57,90	58,07	57,78	56,89
4310	60,54	59,98	60,29	59,71	60,02	59,70
4311	52,93	52,89	52,91	52,13	52,04	51,90
4312	57,20	56,80	57,01	57,04	56,84	57,49
4313	55,97	55,76	54,63	55,29	54,86	55,20

Tabulka č. 5. Porovnání výsledků intervalového měření obsahu oleje ve slunečnicovém semeni – série 5.

Č. vzorku	0 h olej (%/s)	24 h olej (%/s)	48 h olej (%/s)	72 h olej (%/s)	96 h olej (%/s)	168 h olej (%/s)
4404	54,41	53,52	53,54	53,89	53,71	53,61
4405	55,31	54,63	54,77	54,73	54,75	54,74
4406	53,14	53,78	53,17	53,36	53,55	52,77
4407	51,91	52,00	51,61	50,57	51,53	50,74
4408	52,81	52,37	51,66	51,95	51,82	52,26
4409	51,07	51,33	50,91	50,43	50,09	49,74
4410	51,22	51,00	51,28	51,15	51,37	51,46
4411	52,74	51,51	51,76	51,61	52,41	52,29
4412	51,26	50,99	50,88	50,89	50,66	50,71
4413	46,08	45,54	46,18	46,18	45,65	45,79
4414	50,49	51,96	51,56	51,71	51,76	51,90
4415	46,61	46,62	46,44	47,25	45,86	46,83
4416	50,30	49,55	49,33	49,18	49,43	49,41
4417	52,02	51,91	51,67	52,31	51,82	51,92
4418	52,39	52,01	52,41	52,49	51,50	51,77
4419	49,10	49,77	49,12	49,71	50,28	50,06
4420	50,60	50,38	50,85	51,58	49,88	50,92
4421	52,12	52,16	52,17	52,35	51,71	51,68
4422	47,05	46,02	46,36	47,32	46,14	45,60
4423	49,98	50,56	49,39	49,99	49,83	50,16

Rozdíl výsledků mezi jednotlivými časovými intervaly nepřesáhl 1,77 % oleje v sušině, tj. 3,2 rel. %, přičemž nejistota měření je 6 % rel.

Správnost metody analýzy vzorků po delším časovém intervalu po pomletí byla ověřena porovnáním výsledků z jednotlivých časových intervalů a z čerstvě pomletého vzorku

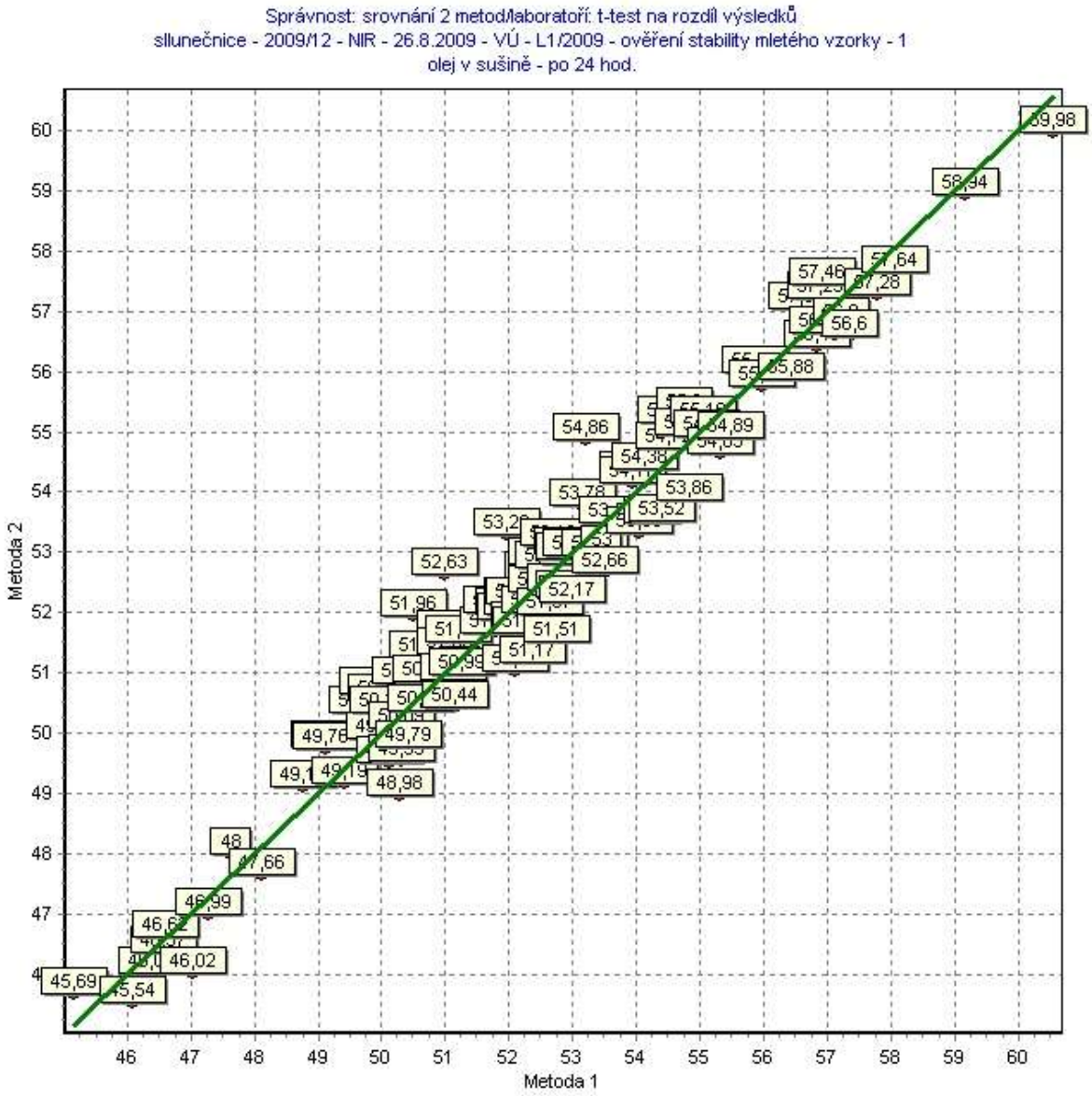
na rozdíl výsledků, které je součástí programu EffiValidation 3.0. Výsledky t-testu jsou znázorněny v tabulce č. 6 a na obrázcích č. 1 až č. 5.

Tabulka č. 6. Výsledky t-testu na rozdíl výsledků 2 metod.

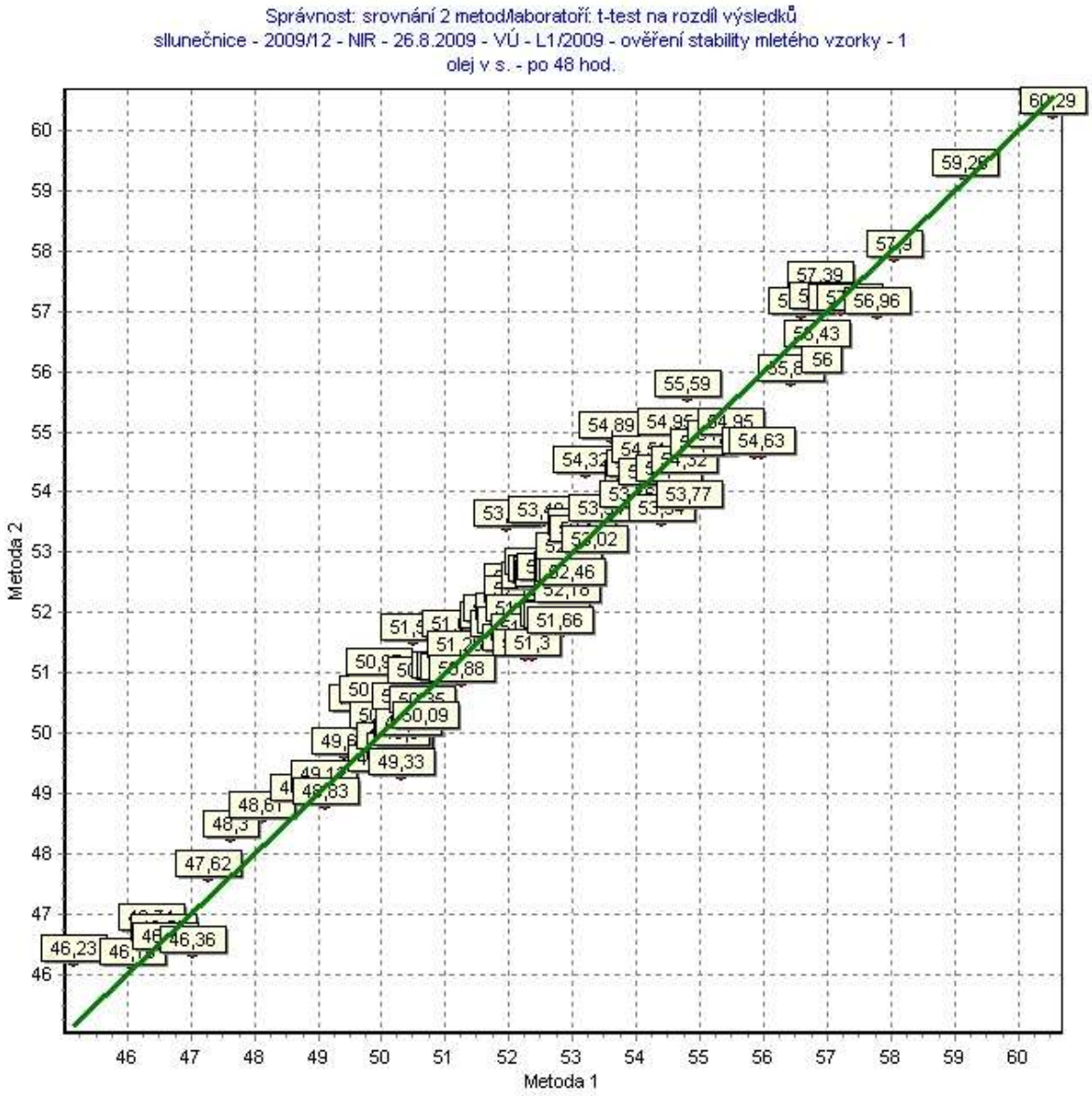
Srovnávané časové intervaly	Průměrný rozdíl	Přesnost rozdílu	Interval spolehlivosti	Hypotéza
(0 – 24) h	0,0798	0,58918876	–0,03692 až +0,19652	true
(0 – 48) h	0,1098	0,57387089	–0,0051 až +0,22469	true
(0 – 72) h	0,0427	0,66529078	–0,08909 až +0,17449	true
(0 – 96) h	0,2334	0,67934642	+0,09882 až +0,36798	false
(0 – 168) h	0,3867	0,68202618	+0,25159 až +0,52181	false

Ve srovnání s analýzou čerstvě pomletého vzorku poskytují analýzy vzorků po 24 h, 48 h a 72 h od pomletí statisticky stejné výsledky.

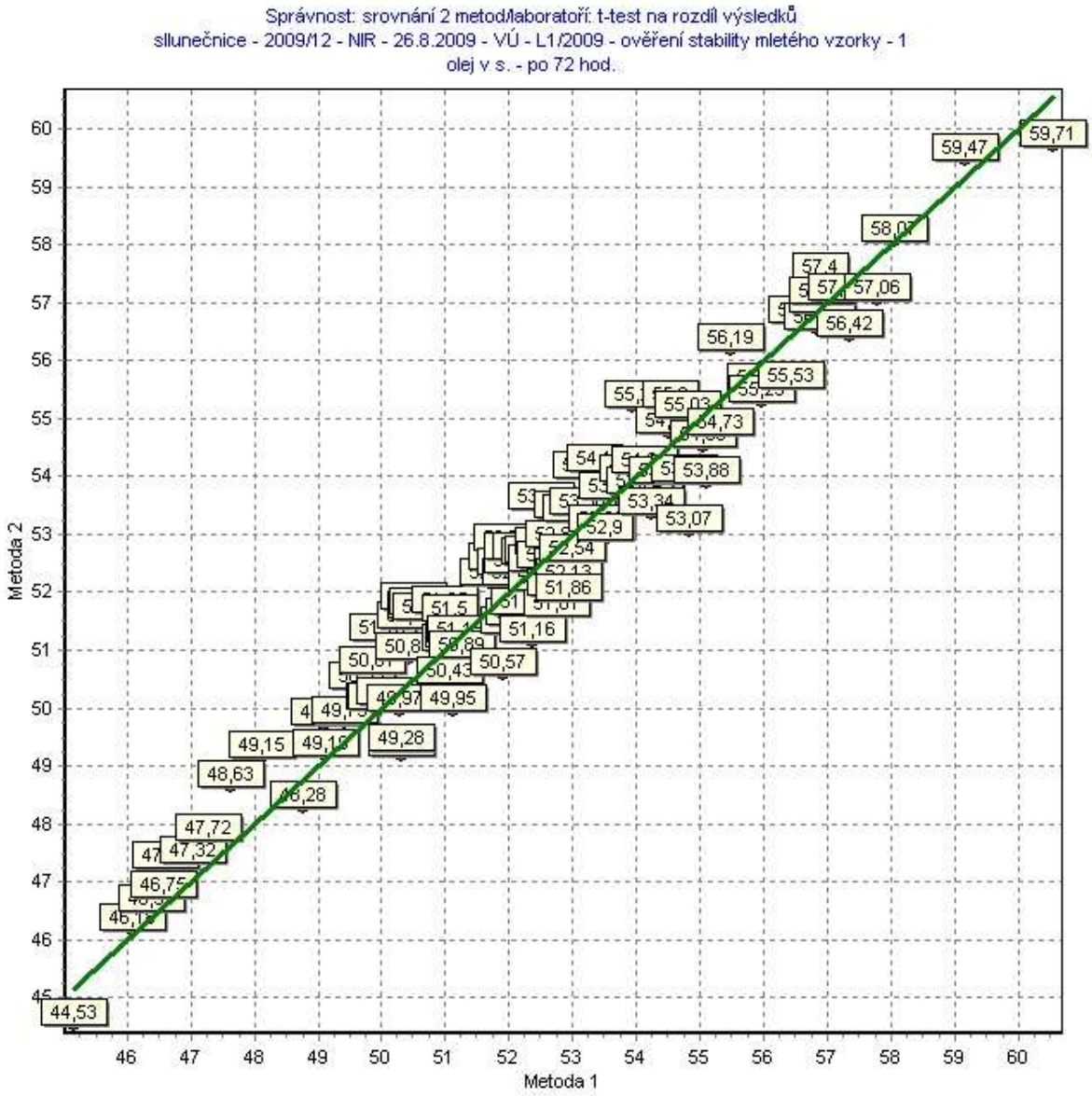
Analýzy vzorků po 96 h a 168 h po pomletí statisticky stejné výsledky neposkytují.



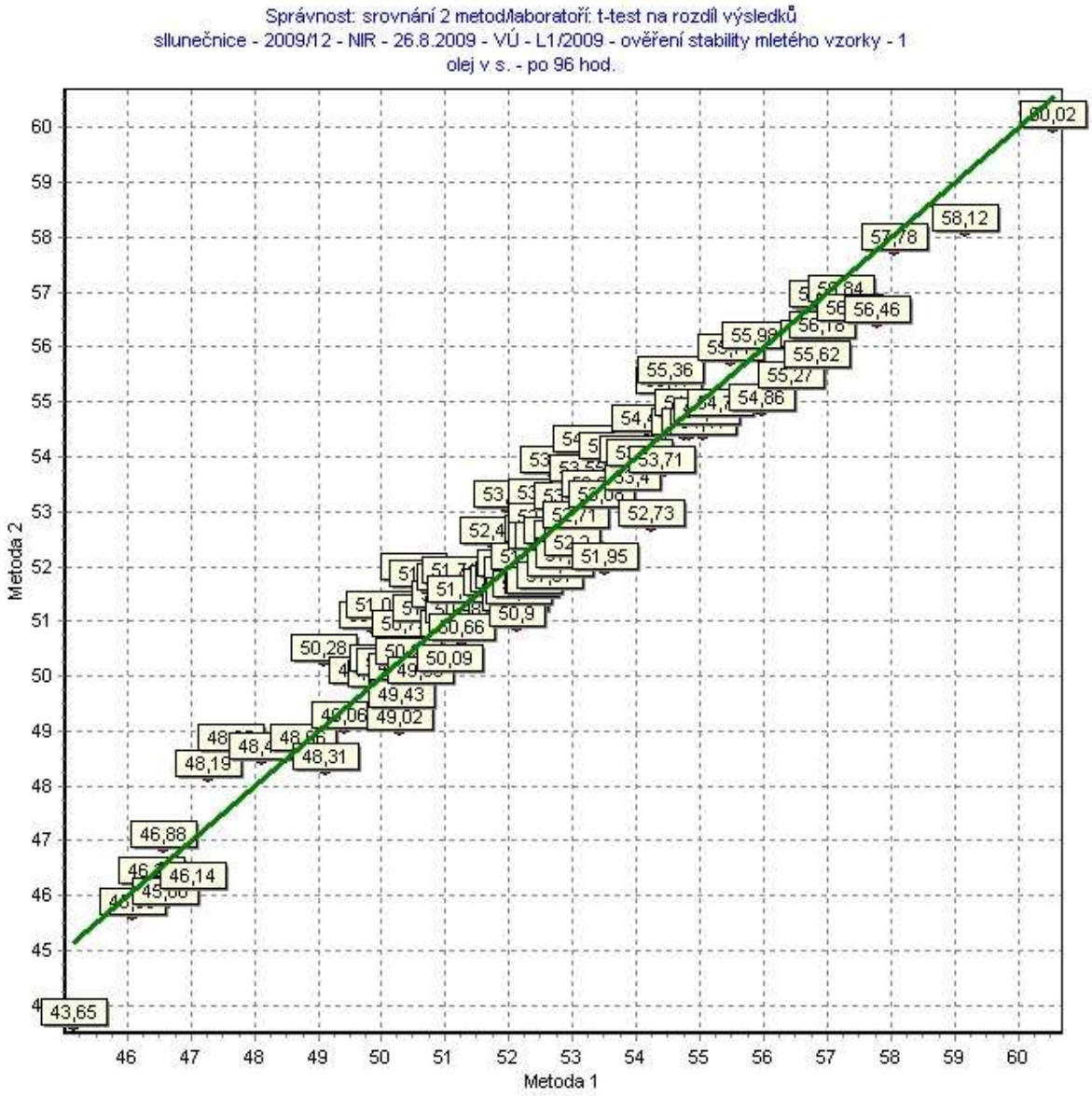
Obr. č. 1. Průběh t-testu na rozdíl výsledků metody 1 (čerstvě pomletý vzorek) a metody 2 (vzorek 24 h po pomletí).



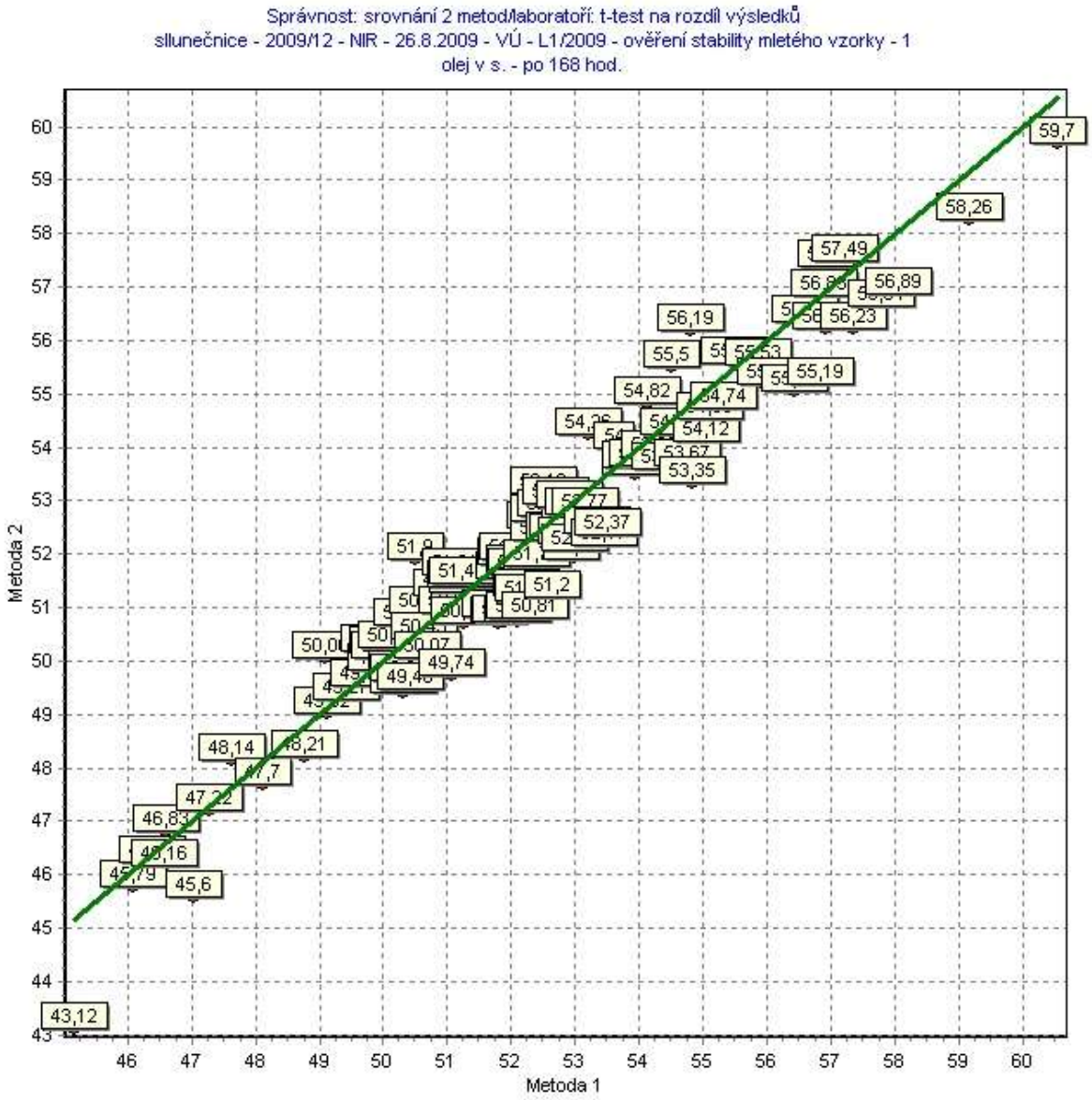
Obr. č. 2. Průběh t-testu na rozdíl výsledků metody 1 (čerstvě pomletý vzorek) a metody 2 (vzorek 48 h po pomletí).



Obr. č. 3. Průběh t-testu na rozdíl výsledků metody 1 (čerstvě pomletý vzorek) a metody 2 (vzorek 72 h po pomletí).



Obr. č. 4. Průběh t-testu na rozdíl výsledků metody 1 (čerstvě pomletý vzorek) a metody 2 (vzorek 96 h po pomletí).



Obr. č. 5. Průběh t-testu na rozdíl výsledků metody 1 (čerstvě pomletý vzorek) a metody 2 (vzorek 168 h po pomletí).

4.2 Dlouhodobé intervalové měření

Výsledky měření jsou uvedeny v tabulkách č. 7a a č. 7b. Vždy je uveden průměr ze dvou paralelních stanovení pro analýzu čerstvě pomletého vzorku (0 h) a pro analýzu po 3 dnech, 4 dnech, 5 dnech, 7 dnech, 11 dnech, 18 dnech, 25 dnech, 30 dnech, 39 dnech a 46 dnech (72 h, 96 h, 120 h, 168 h, 264 h, 432 h, 600 h, 720 h, 936 h a 1104 h).

Tabulka č. 7a. Porovnání výsledků dlouhodobého intervalového měření obsahu oleje ve slunečnicovém semeni – část 1.

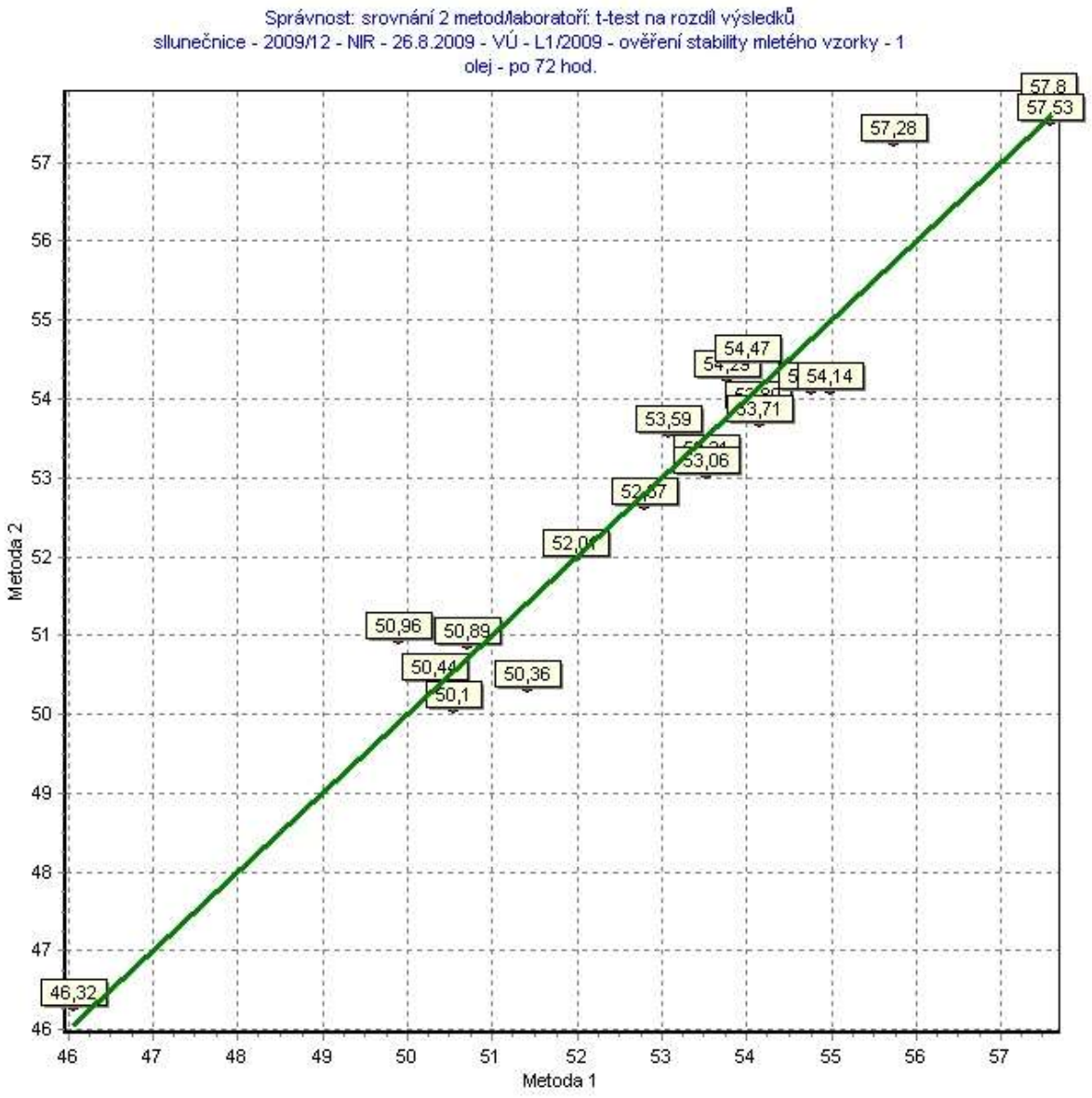
Č. vzorku	**0 h** olej (%/s)	**72 h** olej (%/s)	**96 h** olej (%/s)	**120 h** olej (%/s)	**168 h** olej (%/s)	**264 h** olej (%/s)
3385	54,77	54,14	54,70	54,18	54,93	54,94
3386	50,55	50,10	50,17	50,45	50,84	49,84
3387	53,53	53,06	52,85	53,18	52,91	52,17
3388	53,08	53,59	53,38	52,83	52,97	53,53
3389	50,33	50,44	51,18	50,95	50,16	50,43
3390	50,71	50,89	50,98	50,72	50,50	50,09
3391	54,14	53,89	53,16	53,98	54,04	53,32
3392	57,58	57,53	57,63	57,33	56,62	56,95
3393	53,78	54,29	53,59	53,86	53,57	53,09
3397	55,74	57,28	56,79	57,19	56,69	55,95
3398	51,98	52,01	51,63	50,53	51,45	51,45
3399	53,52	53,21	54,03	54,62	53,70	53,54
3400	54,02	54,47	54,47	54,77	53,80	54,14
3401	51,41	50,36	51,17	50,85	50,85	51,03
3402	49,91	50,96	50,22	50,26	51,28	50,59
3403	54,98	54,14	54,20	53,79	53,51	53,71
3404	57,56	57,80	57,58	57,60	57,22	57,58
3405	54,16	53,71	53,59	53,78	54,14	54,06
3409	52,80	52,67	52,55	52,40	52,05	51,87
3410	46,07	46,32	46,11	46,03	45,58	46,05

Tabulka č. 7b. Porovnání výsledků dlouhodobého intervalového měření obsahu oleje ve slunečnicovém semeni – část 2.

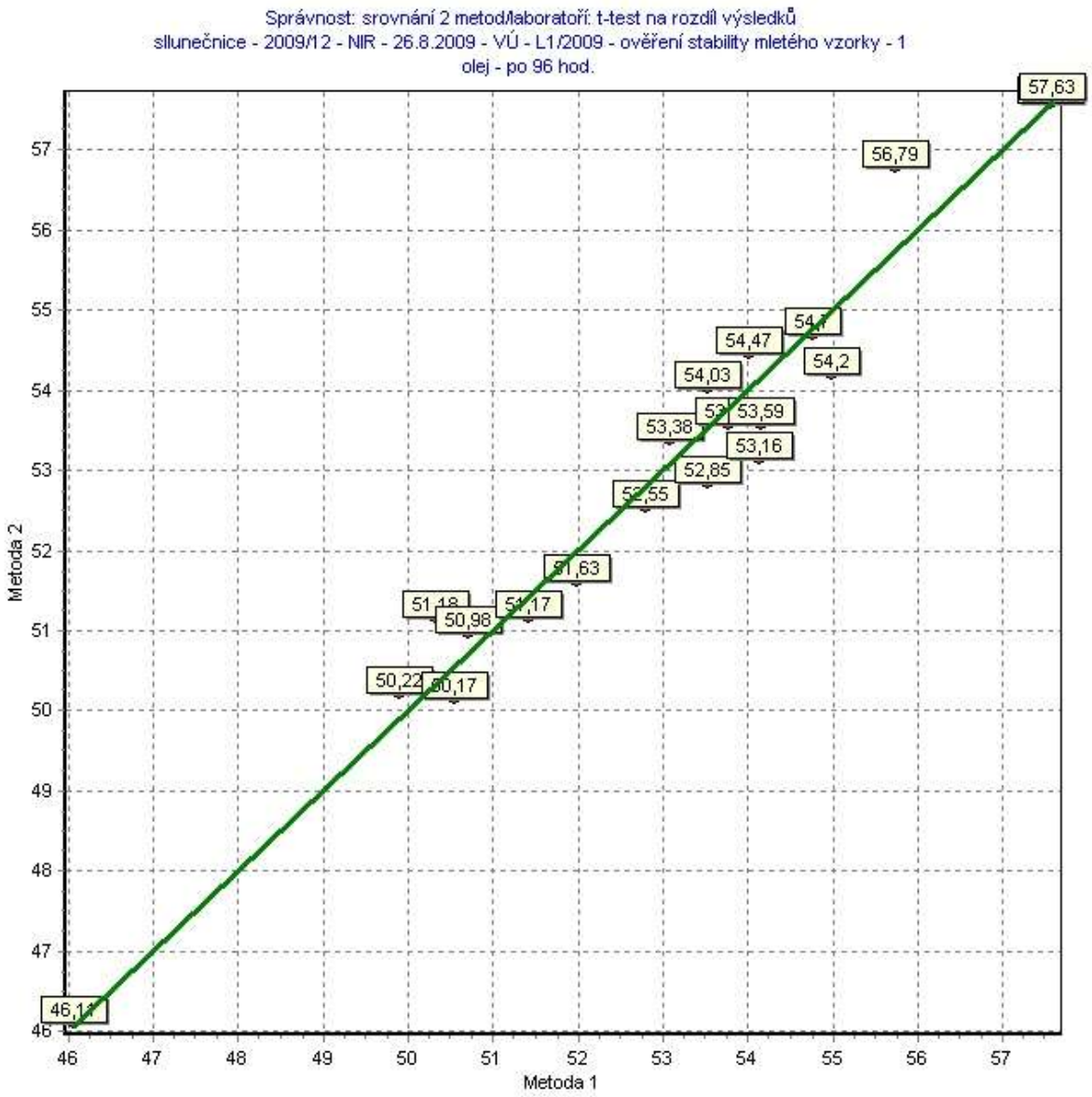
Č. vzorku	0 h olej (%/s)	432 h olej (%/s)	600 h olej (%/s)	720 h olej (%/s)	936 h olej (%/s)	1104 h olej (%/s)
3385	54,77	54,30	54,61	54,20	54,08	54,18
3386	50,55	50,31	49,54	49,60	49,40	49,37
3387	53,53	52,17	52,78	52,49	53,08	51,97
3388	53,08	52,88	53,07	52,48	53,22	52,76
3389	50,33	49,97	49,69	49,46	49,59	49,69
3390	50,71	49,62	50,08	50,01	49,73	49,71
3391	54,14	52,88	53,92	53,27	52,35	52,51
3392	57,58	56,77	55,70	56,17	56,26	56,20
3393	53,78	53,31	53,14	53,18	53,41	52,28
3397	55,74	55,69	56,23	56,14	55,36	55,40
3398	51,98	51,24	50,85	51,32	51,16	50,67
3399	53,52	53,65	53,56	53,82	53,25	52,43
3400	54,02	53,54	53,74	53,98	53,82	53,98
3401	51,41	51,11	50,32	50,51	50,75	50,95
3402	49,91	50,82	50,24	50,62	50,18	49,77
3403	54,98	54,09	53,69	53,20	52,96	53,00
3404	57,56	56,92	57,09	56,92	56,70	56,61
3405	54,16	52,83	52,89	52,87	52,48	52,60
3409	52,80	52,04	51,84	52,01	51,73	51,36
3410	46,07	45,85	45,77	45,66	45,39	45,67

Největší rozdíl výsledků mezi jednotlivými časovými intervaly při dlouhodobém intervalovém měření byl 1,98 % oleje v sušině, tj. 3,60 rel. % a ani při tomto měření nebyla ani jednou překročena nejistota měření 6 % rel.

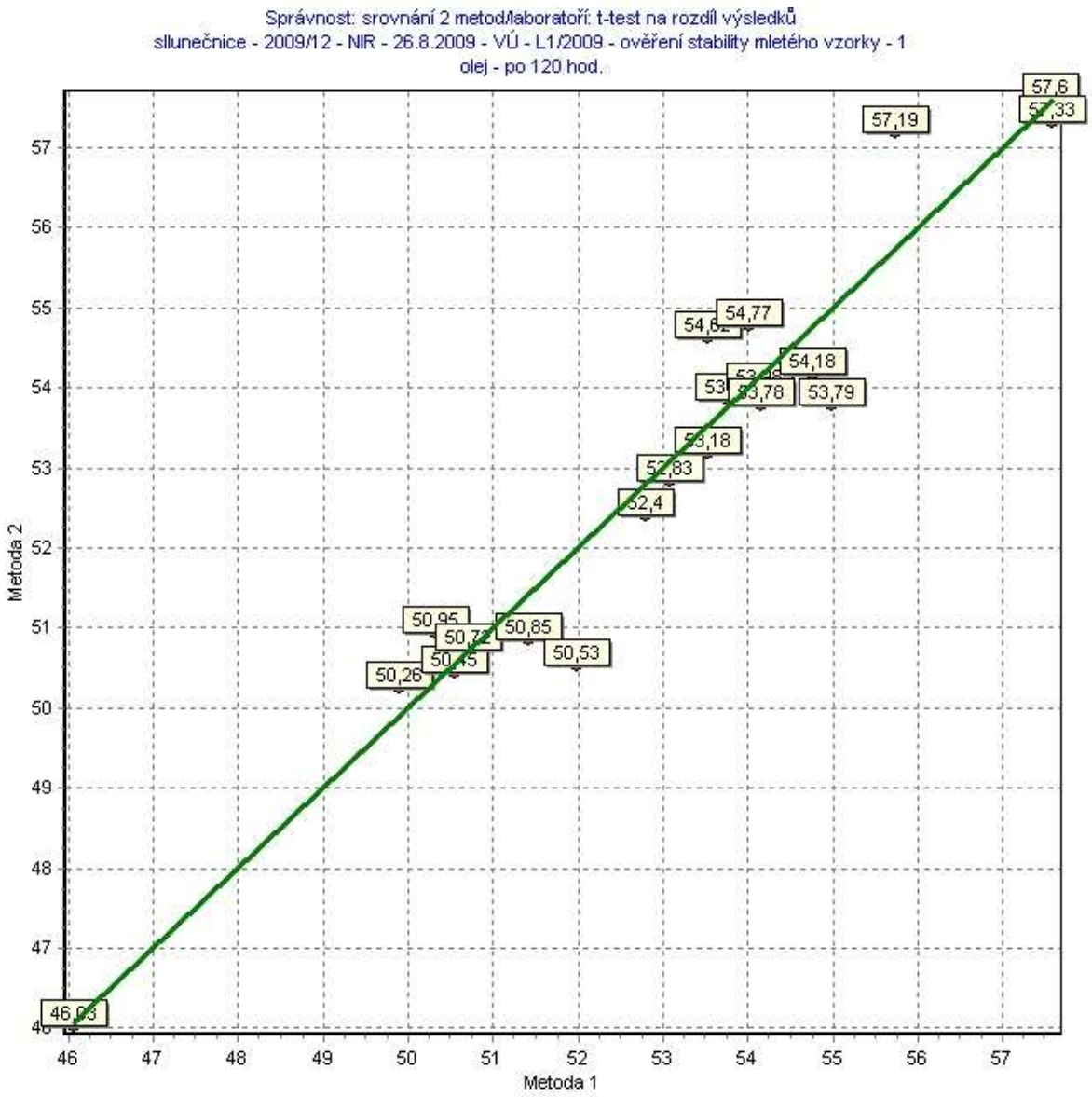
Správnost metody analýzy vzorků po delším časovém intervalu po pomletí byla ověřena porovnáním výsledků z jednotlivých časových intervalů a z čerstvě pomletého vzorku na rozdíl výsledků, které je součástí programu EffiValidation 3.0. Výsledky t-testu jsou znázorněny na obrázcích č. 6 až č. 15 a v tabulce č. 8.



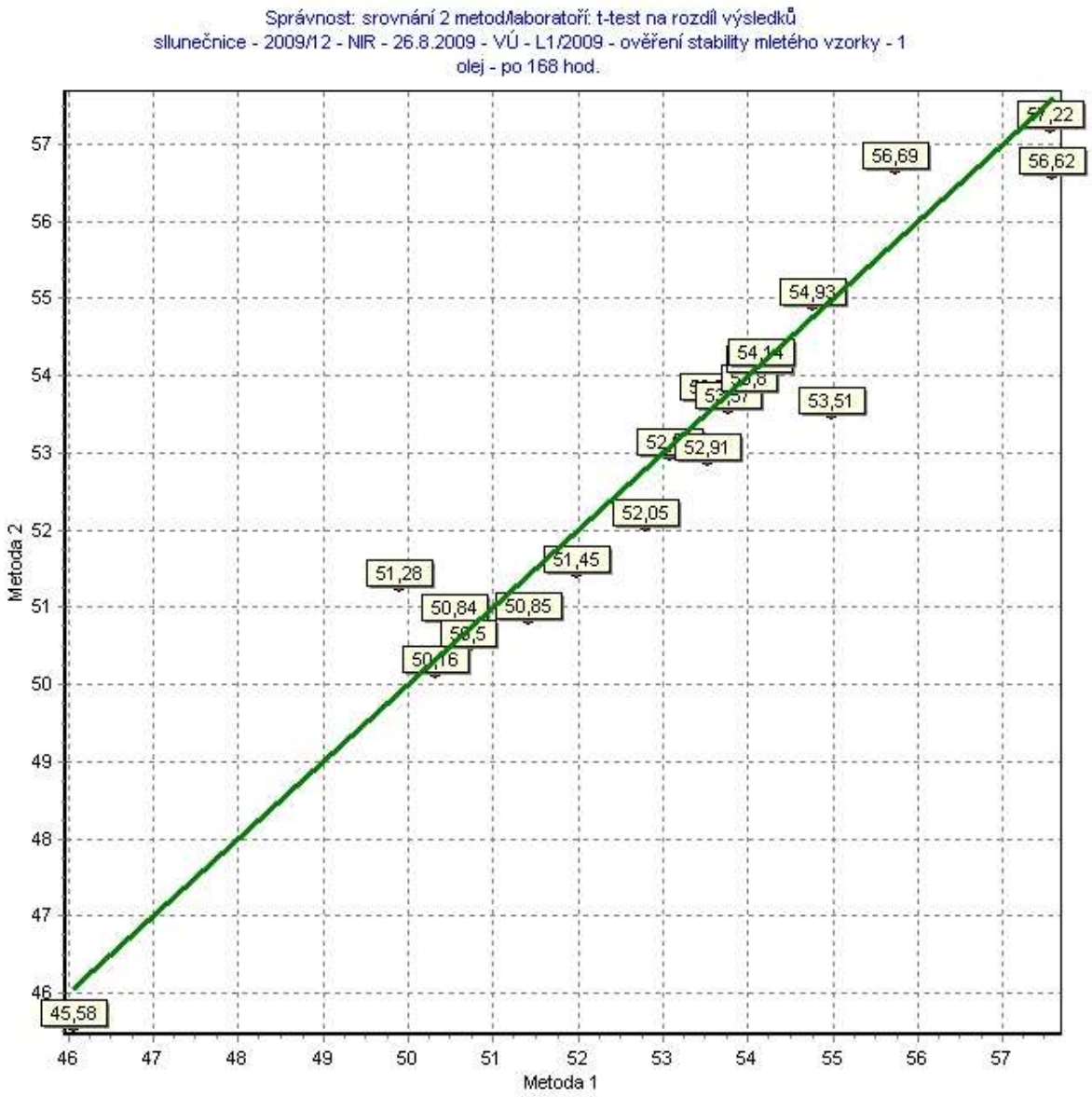
Obr. č. 6. Průběh t-testu na rozdíl výsledků metody 1 (čerstvě pomletý vzorek) a metody 2 (vzorek 72 h po pomletí – dlouhodobé měření).



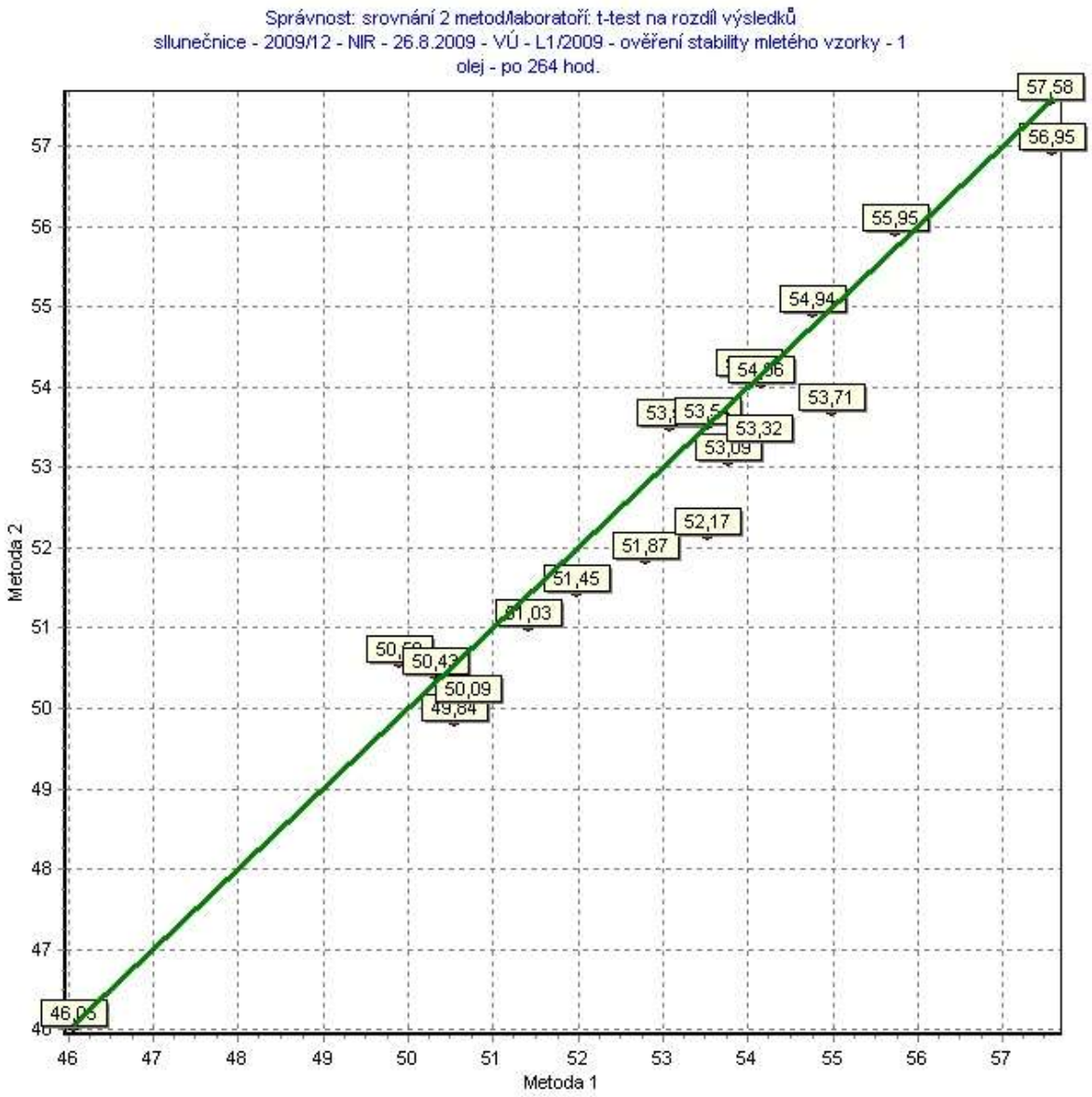
Obr. č. 7. Průběh t-testu na rozdíl výsledků metody 1 (čerstvě pomletý vzorek) a metody 2 (vzorek 96 h po pomletí – dlouhodobé měření).



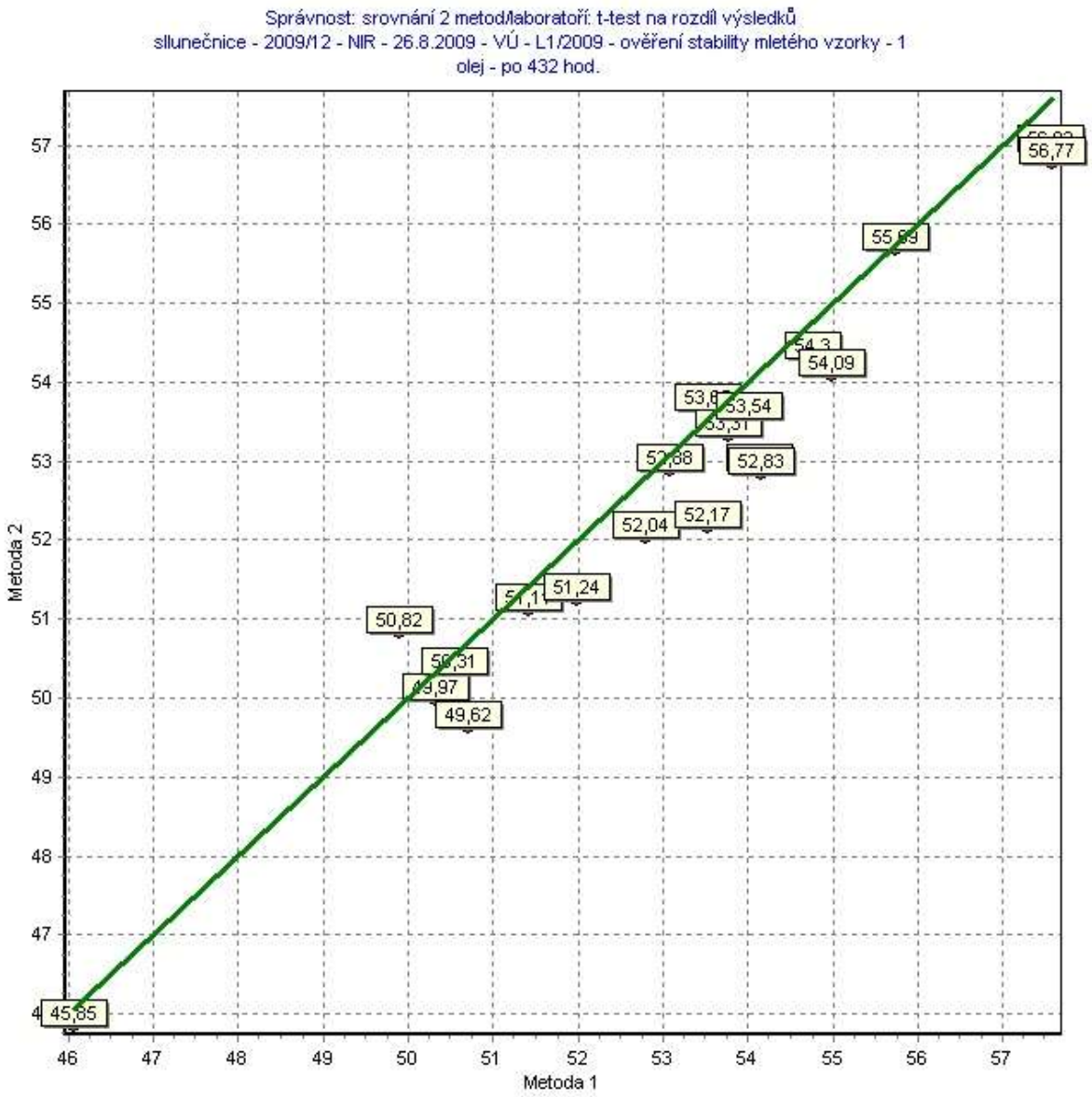
Obr. č. 8. Průběh t-testu na rozdíl výsledků metody 1 (čerstvě pomletý vzorek) a metody 2 (vzorek 120 h po pomletí – dlouhodobé měření).



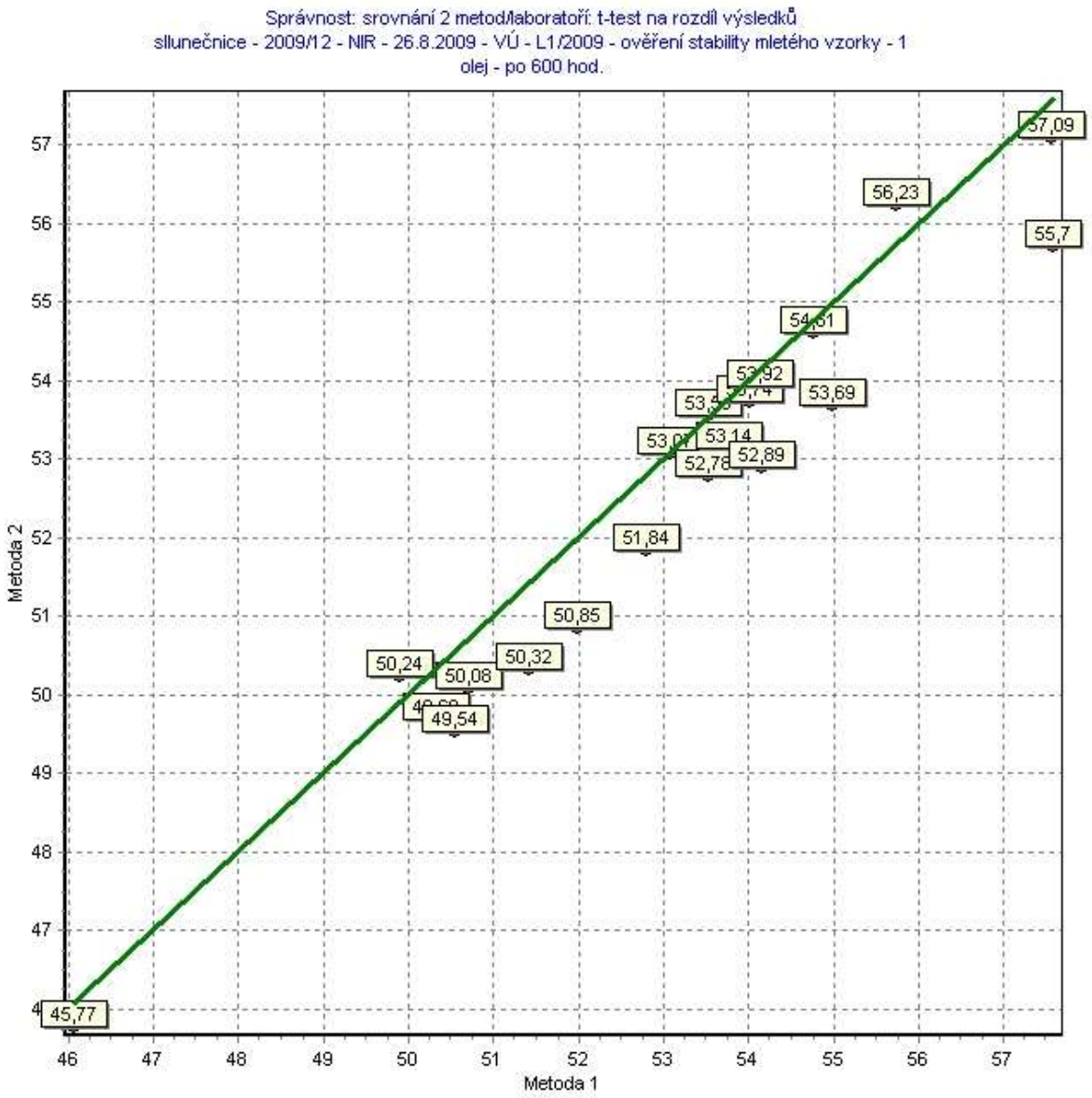
Obr. č. 9. Průběh t-testu na rozdíl výsledků metody 1 (čerstvě pomletý vzorek) a metody 2 (vzorek 168 h po pomletí – dlouhodobé měření).



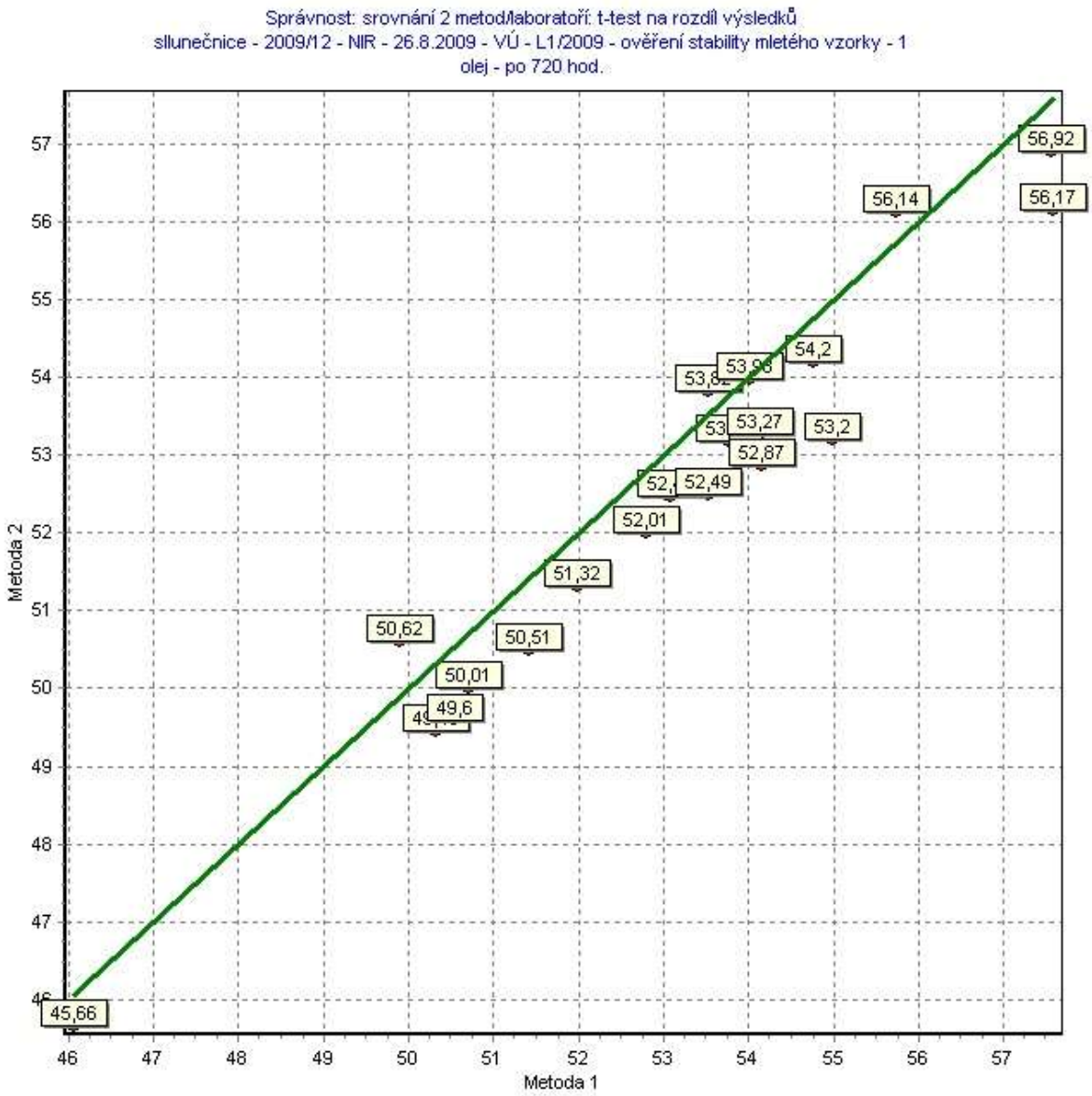
Obr. č. 10. Průběh t-testu na rozdíl výsledků metody 1 (čerstvě pomletý vzorek) a metody 2 (vzorek 264 h po pomletí – dlouhodobé měření).



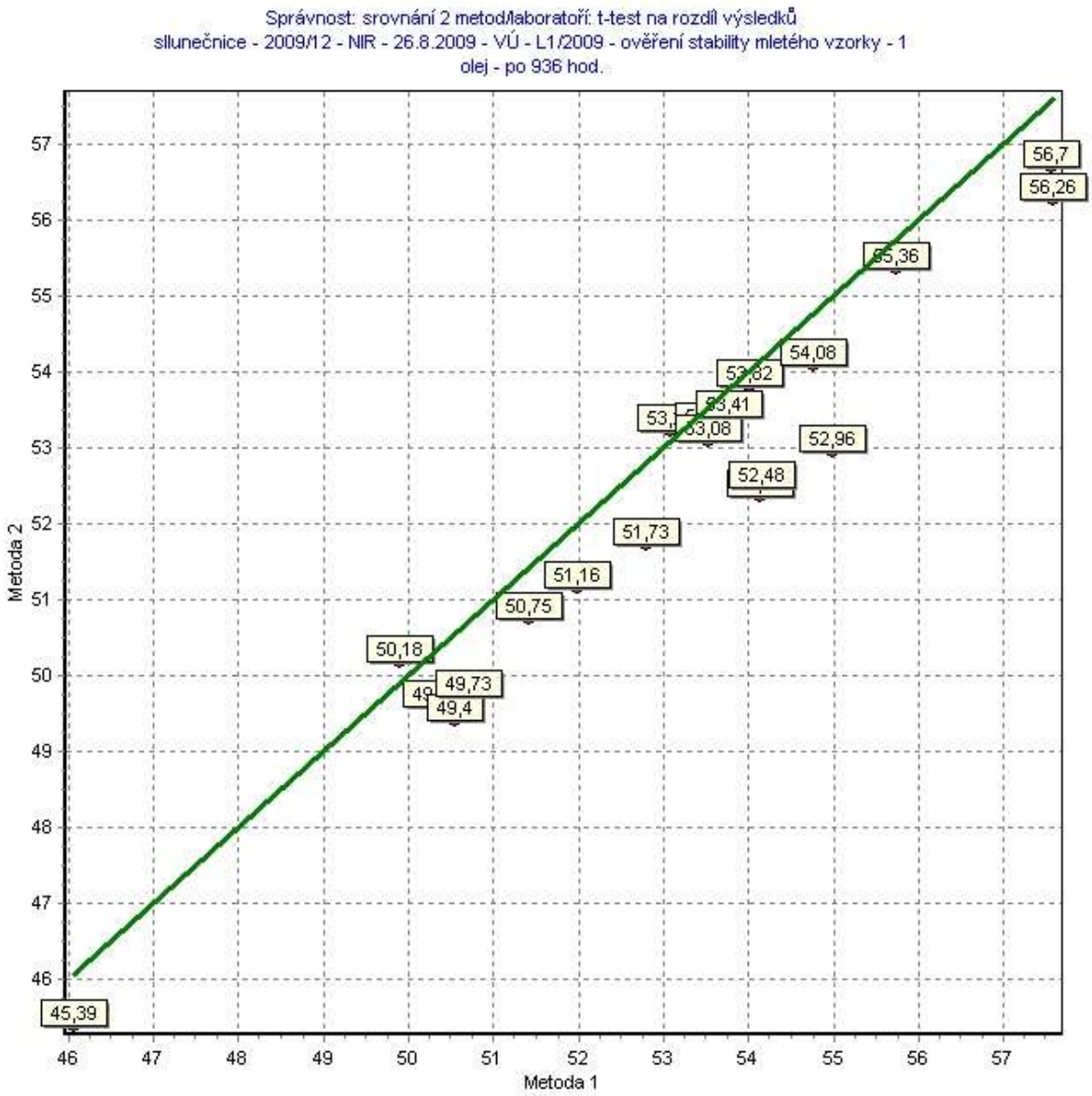
Obr. č. 11. Průběh t-testu na rozdíl výsledků metody 1 (čerstvě pomletý vzorek) a metody 2 (vzorek 432 h po pomletí – dlouhodobé měření).



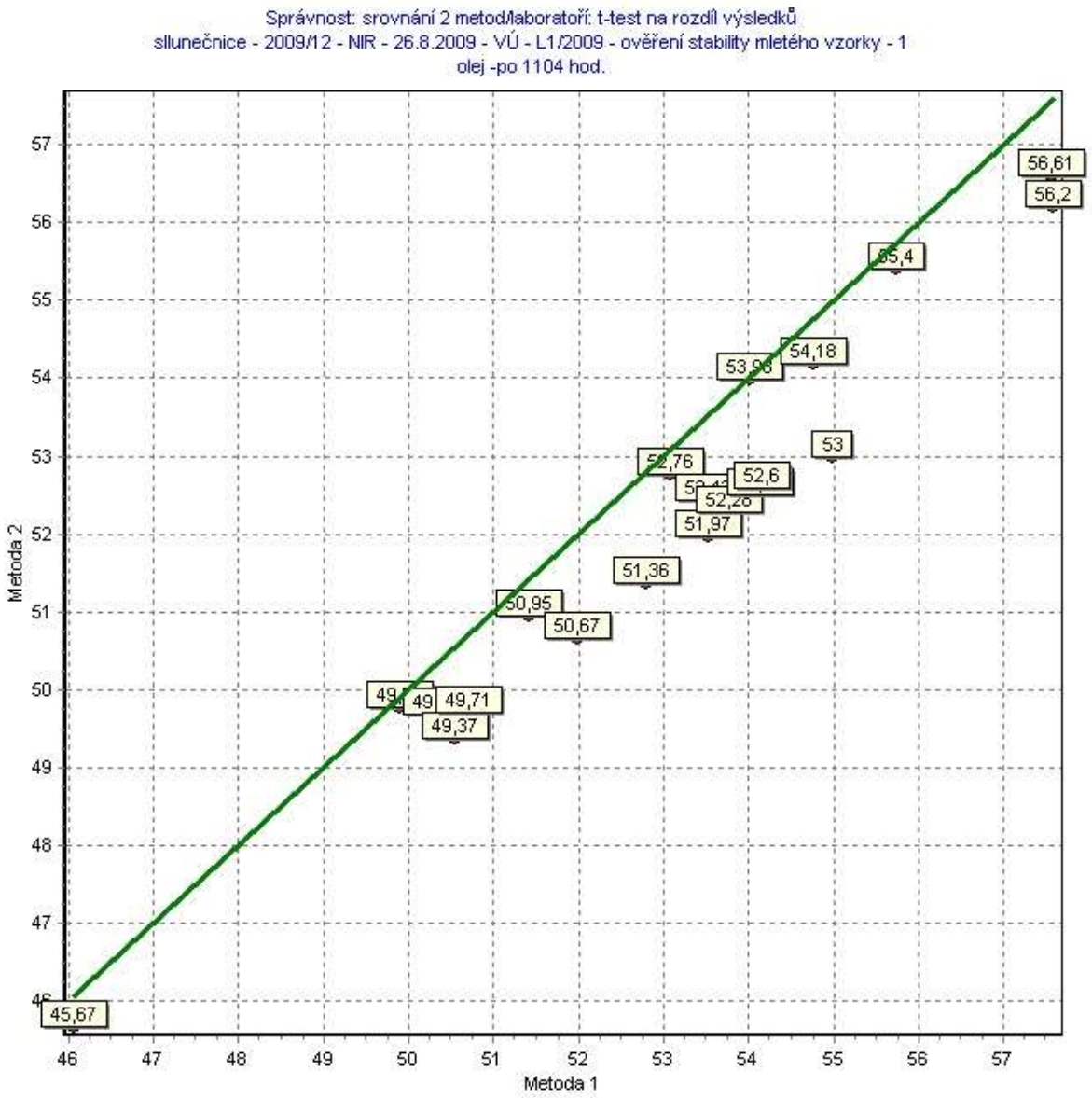
Obr. č. 12. Průběh t-testu na rozdíl výsledků metody 1 (čerstvě pomletý vzorek) a metody 2 (vzorek 600 h po pomletí – dlouhodobé měření).



Obr. č. 13. Průběh t-testu na rozdíl výsledků metody 1 (čerstvě pomletý vzorek) a metody 2 (vzorek 720 h po pomletí – dlouhodobé měření).



Obr. č. 14. Průběh t-testu na rozdíl výsledků metody 1 (čerstvě pomletý vzorek) a metody 2 (vzorek 936 h po pomletí – dlouhodobé měření).



Obr. č. 15. Průběh t-testu na rozdíl výsledků metody 1 (čerstvě pomletý vzorek) a metody 2 (vzorek 1104 h po pomletí – dlouhodobé měření).

Tabulka č. 8. Výsledky t-testu na rozdíl výsledků 2 metod.

Srovnávané časové intervaly	Průměrný rozdíl	Přesnost rozdílu	Interval spolehlivosti	Hypotéza
(0 – 72) h	0,012	0,62274097	–0,30345 až + 0,27945	true
(0 – 96) h	0,032	0,52888761	–0,21552 až + 0,27952	true
(0 – 120) h	0,066	0,69100537	–0,25740 až + 0,38940	true
(0 – 168) h	0,191	0,62252859	–0,10085 až + 0,48185	true
(0 – 264) h	0,314	0,56110301	+0,0519 až +0,5771	false
(0 – 432) h	0,531	0,54350979	+0,27713 až +0,78587	false
(0 – 600) h	0,593	0,59673917	+0,31422 až +0,87278	false
(0 – 720) h	0,636	0,60607864	+0,35185 až +0,91915	false
(0 – 936) h	0,786	0,60454768	+0,50307 až +1,06893	false
(0 – 1104) h	0,976	0,57161337	+0,70798 až +1,24302	false

Závěr: Ve srovnání s analýzou čerstvě pomletého vzorku poskytují analýzy vzorků po 72 h, 96 h, 120 h a 168 h od pomletí statisticky stejné výsledky.

Analýzy vzorků po 264 h, 432 h, 600 h, 720 h, 936 h a 1104 h po pomletí statisticky stejné výsledky neposkytují.

5 Diskuse

Z výsledků vyplývá, že mezi stanovením parametru „olej v sušině“ u čerstvě pomletého vzorku slunečnicového semene a analýzou vzorku 24 h, 48 h a 72 h po pomletí není statisticky významný rozdíl. Při dlouhodobém intervalovém měření vyhovovaly statisticky i výsledky po 96 h, 120 h a 168 h, ale tato skutečnost mohla být ovlivněna menším množstvím analyzovaných vzorků (20). Maximální rozdíl mezi stanoveními byl 1,98 % oleje v sušině, tj. 3,60 % rel., přičemž nejistota měření je 6 % rel. Z toho vyplývá, že měření

i po delším časovém intervalu od pomletí dává relevantní výsledky. U starších vzorků (řádově týdny po pomletí) je nicméně zřetelný trend k mírnému snižování obsahu oleje. V praxi ovšem přichází v úvahu analýza vzorků s prodlevou maximálně několika dnů od pomletí.

Provedené t-testy na rozdíl výsledků dvou metod potvrzují, že lze analyzovat vzorky slunečnicového semene i několik dnů po pomletí bez ovlivnění výsledného obsahu oleje v sušině.

6 Závěr

Při stanovení parametru „olej v sušině“ u slunečnicového semene lze analyzovat vzorky i po delší době od pomletí, maximálně po 3 dnech. Výsledky analýzy takových vzorků jsou statisticky stejné jako výsledky analýzy vzorků čerstvě pomletých. Pomleté vzorky je možno před analýzou skladovat při laboratorní teplotě v polyetylenových sáčcích.

7 Literatura

1 Kejla Z.: Ověření možnosti náhrady klasického 1 mm sítka mlýnku ZM 200 při mletí slunečnicových semen za distanční sítko 1,5 mm, Bulletin Národní referenční laboratoře, XIII., **2009**/2, str. 21-28.

2 Jednotné metody zkoušení č. 7 – Stanovení tuku (oleje) ve slunečnicovém semenu, řepce ozimé a řepce jarní, Národní referenční laboratoř – Regionální oddělení Opava, **2007.**

3 Centner V.: Uživatelská příručka EffiValidation 3.0, **2002**

Stanovení vybraných perfluorovaných látek metodou UPLC-MS/MS

Petra Kosubová, Barbora Foltová, *Noora Perkola

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř,
Regionální oddělení Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
* SYKE Helsinky
petra.kosubova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Perfluorooktan sulfonová kyselina (PFOS) je nejvýznamnějším zástupcem skupiny perfluoroalkylových sloučenin (PFAS), který byl zařazen do seznamu POP Stockholmské úmluvy a je nutné sledovat jeho výskyt v různých složkách životního prostředí. PFAS primárně setrvávají ve vodním prostředí, ale je nutné zjistit přestup a výskyt v dalších složkách životního prostředí a také vstupy do potravních řetězců. Práce byla zaměřena na sledování výskytu těchto látek v krmivech, konkrétně v rybích moučkách. Pro stanovení deseti zástupců PFAS byl optimalizován postup přípravy založený na modifikované Powleyho metodě s využitím systému UPLC-MS/MS Xevo TQ MS pro koncovou analýzu. Pomocí zavedené metody bylo analyzováno dvacet vzorků rybích mouček.

2 Úvod

Skupina PFAS představuje alifatické látky, u kterých jsou všechny vodíkové substituenty vázané na uhlík nahrazeny atomy fluoru. Tato vazba uhlík-fluór je extrémně silná a stabilní, což má za následek vysokou chemickou a tepelnou stabilitu. Navíc tyto látky vykazují jak hydrofilní, tak lipofilní chování, což vede k rozmanité použitelnosti těchto látek, hlavně jako

povrchově aktivní látky (surfaktanty) a složky polymerních materiálů. Díky jejich širokému průmyslovému uplatnění a následným emisím se v současnosti PFAS nacházejí ve všech složkách životního prostředí, včetně živočichů a lidské populace. Tyto látky vykazují sklon k bioakumulaci a jsou často detekovány v krevním oběhovém systému. PFAS s dlouhými řetězci, jejichž nejvýznamnějšími zástupci jsou PFOS a perfluorooktanová kyselina (PFOA), mají vyšší bioakumulační potenciál než PFAS s krátkými řetězci. Zároveň jsou PFOA a PFOS koncovými produkty degradace PFAS s delšími řetězci v abiotických i biotických složkách prostředí. Tyto informace a obavy o možném environmentálním a toxikologickém dopadu PFAS s dlouhými řetězci vedly k řadě aktivit a změn v této oblasti průmyslu a legislativy. Např. (a) hlavní světový výrobce PFAS, společnost 3M, zastavila v letech 2000 – 2002 výrobu PFOS a podobných látek; (b) došlo ke schválení dohody mezi US EPA a osmi předními světovými společnostmi o snížení emisí a produkci PFOA a podobným látek o 95 % do roku 2010; (c) v roce 2006 Evropský parlament vydal nařízení o omezení používání PFOS a podobných látek a také (d) v roce 2009 byl PFOS zařazen do seznamu POP Stockholmské úmluvy do přílohy B, tj. mezi látky, jejichž výroba a použití je omezeno (1,2).

Přes všechna současná omezení výroby a aktivity vedoucí ke snížení úniků PFAS do prostředí se tyto látky v různých environmentálních složkách vyskytují a vstupují do potravních řetězců, což znamená nutnost sledování a kontroly PFAS. Pro tyto účely se nejčastěji využívá technika LC-MS/MS, tj. spojení kapalinové chromatografie a tandemovou hmotnostní spektrometrií. Vzhledem k širokému rozsahu koncentrací PFAS v jednotlivých materiálech je nutné použití techniky, která umožňuje spolehlivě kvantifikovat PFAS v silně kontaminovaných matricích a zároveň detekovat co nejnižší hladiny PFAS v potravinách a krmivech. Jedním z přístupů vedoucí ke snížení detekčních limitů je použití ultraúčinné kapalinové chromatografie (UPLC). Vzhledem k fyzikálně-chemické povaze v současnosti stále existuje řada nedořešených otázek, které se týkají analýzy PFAS, jakými jsou nedostatečná selektivita při jejich detekci, matricové efekty ovlivňující kvantifikaci PFAS a v neposlední řadě účinnost metod přípravy a nedostatek referenčních materiálů pro ověření správnosti metod stanovení (3-6).

Přes tyto analytické nejasnosti je nutné PFAS sledovat v prostředí a kontrolovat jejich výskyt a vstupy do potravního řetězce s cílem ochrany koncového spotřebitele. V roce 2011

Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) vydal podrobnou zprávu o výskytu PFAS v potravinách. Výsledky potvrdily, že také v potravinách je PFOS nejčastěji se vyskytující PFAS. Nejkontaminovanější komoditou podle EFSA byly rybí vnitřnosti a jedlé vnitřnosti divokých zvířat (7). Toto zjištění potvrzuje chování PFAS v organismech, jejich výskyt v krevním oběhu, vazbu na krevní proteiny a kumulaci v játrech, což PFAS zásadně odlišuje od lipofilních chlorovaných a bromovaných POP. Na rozdíl od potravin jsou informace o výskytu těchto látek v krmivech stále velice omezené. Krmiva představují rozmanitou skupinu látek a výrobků rostlinného a živočišného původu, jejichž případná kontaminace může ohrozit chov hospodářských zvířat a následně ovlivnit nezávadnost potravního řetězce. Rybí moučky jsou nutričně bohaté složky krmných směsí pro vybraná hospodářská zvířata (prasata a drůbež) a ryby. Tato krmná surovina se vyrábí z ryb a rybího odpadu vzniklého při zpracování rybího masa, což je materiál, který patří k nejvíce kontaminovaným komoditám.

Cílem této práce bylo zavést UPLC-MS/MS metodu pro stanovení perfluoroalkylových kyselin (PFAA) v rybí moučce a s využitím této metody provést screening vybraných PFAA ve dvaceti vzorcích rybích mouček a doplnit tak informace o výskytu těchto látek v krmných surovinách.

3 Materiál a metody

3.1 Standardy

Směsný standard pro kvantifikaci: PFAC-MXA obsahující 7 perfluorokarboxylových kyselin (PFCA) a 3 perfluoroalkan sulfonové kyseliny (PFSA) o koncentraci 5 μg/ml v methanolu (Wellington Laboratories, Kanada).

Směsné vnitřní standardy (IS): surrogate standard obsahující 4 isotopově značené PFAA ($^{13}C_4$-PFOS, $^{13}C_2$-PFHxA, $^{13}C_4$-PFOA, $^{13}C_2$-PFDA) o koncentraci 1 μg/ml v methanolu a nástřikový standard obsahující 2 isotopově značené PFAA ($^{13}C_8$-PFOS, $^{13}C_8$-PFOA) o koncentraci 1 μg ml^{-1} v methanolu (Wellington Laboratories, Kanada)

3.2 Chemikálie

Methanol pro LC-MS (Merck), Acetonitril pro LC-MS (Sigma-Aldrich), Hexan Suprasolv (Merck), aktivní uhlí (ENVI-Carb, 120/400, Supelco), octan amonný NH_4OAc pro LC-MS (Sigma-aldrich), deionizovaná voda (Millipore).

4 Přístroje a zařízení

Pro přípravu vzorků

1 Polypropylenové zkumavky, 15 ml.

2 Odstředivka Sigma 2-16K (Sigma).

3 Koncentrátor Termovap (Ecom).

4 Eppendorf zkumavky, 1,5 ml.

5 Dávkovače Hamilton,

6 Polypropylenové vialky, 300 µl.

Pro koncové stanovení

7 UPLC-MS/MS systém Acquity UPLC spojený s TQ MS Xevo (Waters, USA).

8 PFC isolátorová kolona pro eliminaci případných interferujících PFAS uvolňujících se z UPLC systému.

9 Kolona Acquity UPLC® BEH C18 (1,7 µm × 2,1 mm × 50 mm).

5 Pracovní postup

1 g vzorku rybí moučky byl obohacen 40 µl surrogate standardu o koncentraci 50 ng/ml a extrahován 5 ml acetonitrilu v polypropylenových zkumavkách na ultrazvukové lázni 15 min. Extrakt byl odstředěn 5 min při 2000 ot/min a supernatant byl převeden do čisté polypropylenové zkumavky. Extrakce byla provedena dvakrát a spojený extrakt byl zkoncentrován pod proudem dusíku na ~ 2 ml a olejová frakce byla odstraněna vytřepáním

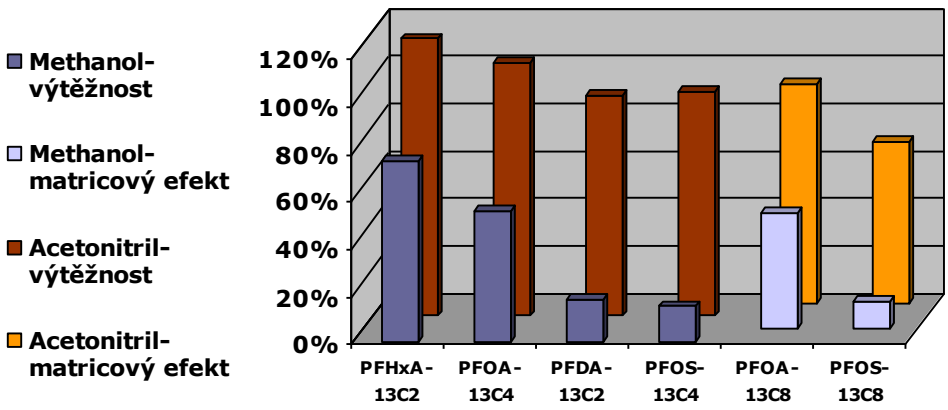
do hexanu (2 × 2 ml). Extrakt byl dále zkoncentrován na 1 ml a přečištěn pomocí 100 mg aktivního uhlí. Po 5min odstředění při 3500 ot/min bylo 300 µl extraktu zředěno 680 µl deionizované vody ve zkumavce Eppendorf a obohaceno 20 µl nástřikového standardu o koncentraci 25 ng/ml. Finální extrakt byl odstředěn 5 min při 10 000 ot/min a 300 µl podíl byl převeden do polypropylenové vialky.

Chromatografická separace byla provedena na koloně Acquity UPLC® BEH C18 (1,7 µm × 2,1 mm × 50 mm) gradientovou elucí mobilní fáze složené z methanolu (2 mM NH4OAc) a deionizované vody (2 mM NH4OAc). Průtok 0,6 ml/min, teplota kolony 60 ºC, objem nástřiku 5 µl. Ionizace byla provedena elektrosprejem v negativním módu a MS detekce v módu sledování vybraných přechodů (MRM). Pro kvantifikaci byly použity specifické přechody, tj. [M-H]- → [M-H-COO]- pro PFCA a [M-H]- → FSO3- pro PFSA.

6 Výsledky a diskuse

6.1 Testování metody – příprava vzorku

Vzorek k analýze byl připraven pomocí modifikované Powleyho metody. Původní Powleyho metoda, určená zejména pro analýzu abiotických materiálů, zahrnuje extrakci do methanolu v ultrazvukové lázni a přečištění na aktivním uhlí pomocí disperzní extrakce na pevnou fázi (DSPE) (8). Pro účely analýzy rybích mouček byla původní metoda modifikována ve dvou bodech. Pro odstranění olejové fáze bylo zařazeno vytřepání extraktu do hexanu. Methanol jako extrakční činidlo byl nahrazen acetonitrilem, s jehož použitím byly pozorovány menší matricové efekty a vyšší výtěžnost isotopově značených vnitřních standardů (Obr. 1).



Obrázek 1. Porovnání matricových efektů a výtěžností isotopově značených vnitřních standardů.

Vzorek rybí moučky vybraný pro optimalizaci metody poskytoval vyhovující výtěžnosti IS větší než 80 %. Avšak po provedení screeningu 20 rybích mouček bylo zjištěno, že výtěžnosti jsou velice proměnlivé. Stanovené výtěžnosti nebyly závislé na obsahu tuku v rybích moučkách, ale bylo možné pozorovat slabou korelaci s obsahem vody, přičemž se vzrůstajícím vlhkostí vzorku klesala výtěžnost IS. Avšak přídavek sušidla při extrakci její účinnost nezvýšil. Průměrné výtěžnosti surrogate standardů $^{13}C_2$-PFHxA, $^{13}C_4$-PFOA, $^{13}C_4$-PFOS a $^{13}C_2$-PFDA byly 67, 57, 70 a 54 %. Přes nízké výtěžnosti IS byly výsledky pro účel screeningu akceptovány, neboť v analyzovaných vzorcích byly nejvíce zastoupeny PFAA, jejichž obsahy byly kvantifikovány metodou isotopového ředění.

Pro analýzu PFAS je možné vedle Powleyho metody použít také další metody. K alternativním přístupům patří QuEChERS metoda (9) nebo selektivní iontově párová reakce s tetrabutylamonniem (TBA) a extrakcí do methyl-terc.butyletheru (MTBE) (10) nebo alkalická hydrolýza s následným přečištěním na WAX kolonkách (11). Některé z uvedených postupů budou ověřeny, porovnány s použitou modifikovanou Powleyho metodou a bude posouzena jejich vhodnost pro účely následných analýz krmiv.

6.2 Testování metody – stanovení pomocí UPLC-MS/MS

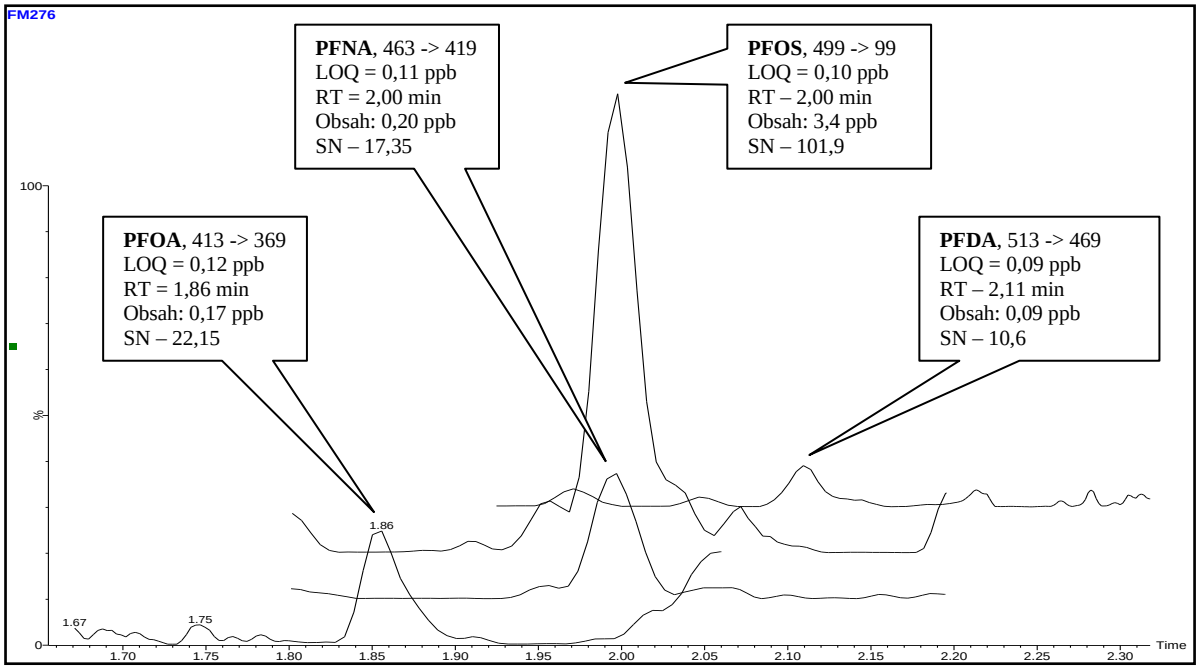
Koncové stanovení provedené na přístroji Xevo TQ MS zahrnovalo analýzu 7 PFCA a 3 PFSA, přičemž 2 PFCA, kyselina perfluorobutanová a perfluoropentanová, nebyly ve vzorcích krmiv kvantifikovány v důsledku nedostatku kvalifikačních bodů. Avšak při analýze biotických vzorků je důležitější sledování PFAS s delšími řetězci, které se v těchto matricích kumulují. Proto bude rozsah stanovení v dalším kroku rozšířen o PFCA s délkou uhlíkatého řetězce C11-C18 a také o perfluorodekan sulfonovou kyselinu.

MS detekce PFAS byla provedena v MRM módu. PFSA byly detekovány pomocí dvou MRM přechodů, tj. $[M\text{-}H]^- \rightarrow FSO_3^-$ a $[M\text{-}H]^- \rightarrow SO_3^-$. Druhý uvedený přechod nebyl pro analýzu PFSA v rybích moučkách dostatečně selektivní a poskytoval falešně pozitivní nálezy. Toto zjištění bylo popsáno i dalšími autory (6,12). Pro detekci PFCA byly využity také dva MRM přechody, tj. $[M\text{-}H]^- \rightarrow [M\text{-}H\text{-}COO]^-$ a $[M\text{-}H]^- \rightarrow [M\text{-}H\text{-}COO\text{-}(CF_2)_x]^-$. Oba MRM byly shledány specifickými pro stanovení PFCA a pro kvantifikaci byl použit intenzivnější MRM odpovídající ztrátě CO_2. Obrázek 2 demonstruje detekci PFAA na limitních hladinách

v extraktu rybí moučky, přičemž odhady limitů detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) byly odvozeny z poměru signálu k šumu odečteného z chromatogramu nejnižší kalibrační úrovně, tj. 0,09 ng/ml. LOD metody byly v rozsahu (0,01 – 0,04) ng/g a LOQ (0,05 – 0,15) ng/g.

Tabulka 1. Souhrn UPLC-MS/MS parametrů pro sledované PFAA.

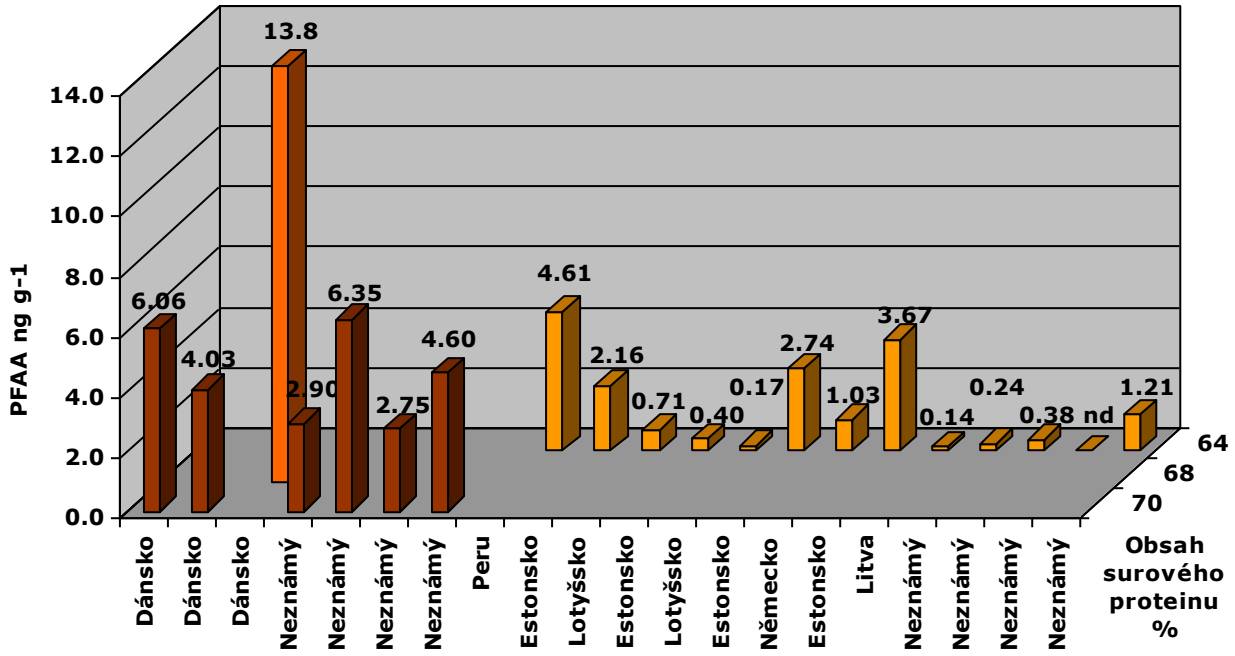
	RT (min)	MRM 1	MRM 2	Ionizační napětí (V)	Kolizní energie (V)	LOD (ng/g)
PFCA						
PFBA	0,50	213 > 169	–	18	8	0,01
PFPeA	1,05	263 > 219	–	15	9	0,02
PFHxA	1,43	313 > 269	313 > 119	15	8,24	0,01
PFHpA	1,66	363 > 319	363 > 169	15	11,18	0,02
PFOA	1,83	413 > 369	413 > 169	15	10,18	0,04
PFNA	1,97	463 > 419	463 > 219	15	11,14	0,03
PFDA	2,09	513 > 469	513 > 219	20	10,16	0,03
PFSA						
PFBS	1,16	299 > 99	299 > 80	40	24,28	0,02
PFHxS	1,68	399 > 99	399 > 80	50	30,36	0,04
PFOS	1,98	499 > 99	499 > 80	62	38,36	0,03
Surrogate IS						
13C2-PFHxA	1,43	315 > 270	–	15	8	–
13C4-PFOA	1,84	417 > 372	–	15	10	–
13C2-PFDA	2,09	515 > 470	–	20	10	–
13C4-PFOS	1,98	503 > 99	503 > 80	62	38,36	–
Nástřikový IS						
13C8-PFOA	1,84	421 > 376	–	15	10	–
13C8-PFOS	2,09	507 > 99	507 > 80	62	38,36	–



Obrázek 2. Chromatogram vybraných PFAA stanovených v rybí moučce 17 zobrazený pomocí kvantifikačních MRM.

6.3 Screening PFAA v rybích moučkách

PFAA byly analyzovány ve dvaceti vzorcích rybích mouček odebraných v rámci úřední kontroly krmiv v roce 2010. Nejčastěji se vyskytující PFAA byl PFOS, který byl detekován v 19 vzorcích. Toto zjištění potvrzuje zastoupení PFAA v biotických matricích popsané v odborné literatuře (1,2). Celkový obsah sledovaný PFAA se pohyboval do 13,8 ng/g v rybí moučce (Tab. 2). Tyto stanovené hodnoty jsou řádově nižší než obsahy těchto látek v rybách, rybím mase a ostatních rybích produktech (13-16). Pravděpodobným vysvětlením nižších obsahů PFAA v rybí moučce může být výrobní proces této krmné suroviny. Vstupní rybí surovina se rozmělní, hydrolyzuje, zfiltruje a vysuší. Filtrace je pravděpodobně dekontaminační krok, při kterém se velký podíl vodorozpustných PFAA odstraní z rybí moučky. Nálezy nízkých obsahů PFAA v této surovině podporují závěry EFSA, že kontaminace masa a jedlých vnitřností těmito látkami u hospodářských zvířat, které jsou krmeny méně kontaminovanou stravou, je nižší než tyto komodity získané z volně žijících zvířat (7).



Obrázek 3. Porovnání PFAA obsahu podle země původu a obsahu surového proteinu.

Tabulka 2. Obsahy PFAA v rybích moučkách (ng/g původní hmoty)

Rybí moučka	Země původu	Surový protein %	Tuk %	Vlhkost %	PFHxA	PFBS	PFHpA	PFHxS	PFOA	PFNA	PFOS	PFDA
1	Neznámý	64	11.0	7.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.24	n.d.
2	Estonsko	64	11.0	5.2	n.d.	n.d.	n.d.	< 0.15	n.d.	n.d.	0.33	n.d.
3	Neznámý	70	11.2	8.1	n.d.	n.d.	< 0.07	< 0.15	< 0.12	< 0.11	2.7	< 0.09
4	Lotyšsko	64	7.3	6.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.17	n.d.
5	Neznámý	70	11.6	7.9	n.d.	n.d.	n.d.	0.16	< 0.12	< 0.11	6.0	< 0.09
6	Estonsko	64	10.1	7.3	n.d.	n.d.	n.d.	< 0.15	< 0.12	0.11	2.3	0.14
7	Neznámý	64	9.7	7.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< 0.12	n.d.	< 0.10	n.d.
8	Neznámý	70	11.3	7.3	n.d.	n.d.	< 0.07	0.15	< 0.12	< 0.11	2.4	0.10
9	Litva	64	7.7	6.9	n.d.	n.d.	< 0.07	n.d.	n.d.	n.d.	0.10	n.d.
10	Estonsko	64	9.3	7.2	n.d.	n.d.	n.d.	0.21	n.d.	n.d.	1.9	< 0.09
11	Lotyšsko	64	5.9	6.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< 0.11	0.61	< 0.09
12	Dánsko	70	12.6	6.5	n.d.	n.d.	n.d.	< 0.15	n.d.	< 0.11	5.8	0.21
13	Dánsko	68	8.7	8.3	n.d.	n.d.	< 0.07	< 0.15	0.19	0.11	13.0	0.27
14	Německo	64	10.4	7.4	n.d.	n.d.	n.d.	< 0.15	n.d.	n.d.	0.91	< 0.09
15	Neznámý	70	10.7	8.5	n.d.	n.d.	n.d.	< 0.15	n.d.	< 0.11	4.2	0.25
16	Peru	64	10.5	7.9	n.d.	0.10	n.d.	0.21	< 0.12	< 0.11	4.1	0.12
17	Dánsko	70	10.2	7.8	n.d.	0.17	n.d.	n.d.	0.17	0.20	3.4	0.09
18	Estonsko	64	10.1	9.3	n.d.	n.d.	n.d.	0.21	0.19	0.28	2.9	0.13
19	Neznámý	64	9.7	8.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20	Neznámý	64	12.8	8.1	n.d.	n.d.	n.d.	< 0.15	0.12	< 0.11	0.87	0.09

Porovnáním stanovených obsahu PFAA s dalšími charakteristikami rybích mouček (obsah vody, tuku a surového proteinu) byla nalezena určitá korelace pouze mezi obsahem PFAA a surovým proteinem. Tato závislost potvrdila vazebnou afinitu PFAA k proteinům (1,2). Rybí moučky s obsahem surového proteinu ~ 70 % vykazovaly průměrně čtyřikrát vyšší obsah PFAA než rybí moučky charakterizované ~ 64 % obsahem surového proteinu (Obr. 3). Navíc vzorky pocházející z Pobaltských zemí a Peru obsahovaly nižší obsahy PFAA a surového proteinu než ty vyrobené v Dánsku. Tyto rozdílné nálezy PFAA mohou souviset s odlišnostmi ve výrobních procesech v jednotlivých státech, avšak hlavním faktorem ovlivňujícím obsahy PFAA v rybích moučkách bude pravděpodobně kontaminace vstupního rybího materiálu použitého pro jejich výrobu.

7 Závěr

Pro účely screeningu PFAA v rybích moučkách byla optimalizována metoda přípravy vzorku k analýze založená na Powleyho metodě. UPLC-MS/MS metoda byla zavedena s využitím systému Xevo TQ MS. Získané výsledky poukazují na nižší kontaminaci rybích mouček v porovnání s obsahy PFAA nacházenými v ostatních rybích materiálech (rybí homogenáty, maso a vnitřnosti). Nižší kontaminace složek krmných směsí než původní suroviny pro jejich výrobu podporuje publikovaná data o rozdílech v kontaminaci hospodářsky chovaných a volně žijících zvířat. Chované ryby obsahují nižší obsahy PFAA než volně žijící ryby (17-19). Podobný závěr vydala EFSA o kontaminaci potravin vyrobených zpracováním hospodářských a volně žijících zvířat (7).

8 Literatura

1. Houde, M., et al. Biological monitoring of polyfluoroalkyl substances: A review. Environ. Sci. Technol, **2006**, *40* (11), 3463-73.
2. Buck, R.C., et al. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: Terminology, classification, and origins. Integr Environ Assess Manag, **2011**, *7*, 513–541.
3. Llorca, M., et al. Development and validation of a pressurized liquid extraction liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for perfluorinated compounds determination in fish, J Chromatogr A, **2009**, *1216*, 7195–7204.
4. van Leeuwen, S.P.J., et al. Significant improvements in the analysis of perfluorinated compounds in water and fish: Results from an interlaboratory method evaluation study, J Chromatogr A, **2009**, *216*, 401–409.

5. Lee, P.J., et al. ACQUITY UPLC System for Quantifying Trace Levels of Perfluorinated Compounds with an ACQUITY PFC Analysis Kit, Waters Application note 720002813en, **2008**.
6. Tittlemier, S.A. a Braekevelt, E. Analysis of polyfluorinated compounds in foods, Anal Bioanal Chem, **2011**, *399*, 221–227.
7. European Food Safety Authority. Results of the monitoring of perfluoroalkylated substances in food in the period 2000 – 2009, EFSA Journal, **2011**, *9* (2), 2016, 1-34.
8. Powley, Ch.R., et al. Matrix Effect-Free Analytical Methods for Determination of Perfluorinated Carboxylic Acids in Environmental Matrixes, Anal Chem, **2005**, *77*, 6353-6358.
9. EN 15662:2008. Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS method, European Committee for Standardization, Technical Committee CEN/TC 275 "Food analysis - Horizontal Methods“
10. Hansen, K.J., et al. Compound-Specific, Quantitative Characterization of Organic Fluorochemicals in Biological Matrices, Environ Sci Technol, **2001**, *35* (4), 766-770.
11. So, M.K., et al. Alkaline Digestion and Solid Phase Extraction Method for Perfluorinated Compounds in Mussels and Oysters from South China and Japan, Arch Environ Contam Toxicol, **2006**, *50*, 240–248.
12. Strynar, M., et al. LC/TOFMS and UPLC-MS/MS Methods for the Analysis of Perfluorooctanesulfonate (PFOS) and the Reduction of Matrix Interference in Complex Biological Matrices. 57th (American Society of Mass Spectrometry) Philadelphia, PA May 31st –June 4tht, **2009**.
13. Kwadijk, C.J.A.F., et al. Distribution of Perfluorinated Compounds in Aquatic Systems in The Netherlands, Environ Sci Technol, **2010**, *44* (10), 3746–3751.
14. van Leeuwen, S.P.J., et al. Halogenated Contaminants in Farmed Salmon, Trout, Tilapia, Pangasius, and Shrimp, Environ Sci Technol, **2009**, *43* (11), 4009-4015.
15. Hrádková, P., et al. Perfluorinated compounds: Occurrence of emerging food contaminants in canned fish and seafood products, Czech J Food Sci, **2010**, *28* (4), 333-342.
16. Papež, M., et al. „Nové“ organohalogenované kontaminanty ve vodním ekosystému, Chem Listy, **2011**, *105*, 51-54.
17. Kelly, B.C., et al. Persistent organic pollutants in aquafeed and Pacific salmon smolts from fish hatcheries in British Columbia, Canada, Aquaculture, **2008**, *285*, 224–233.
18. Berntssen, M.H.G., et al. Chemical contaminants in aquafeeds and Atlantic salmon (Salmo salar) following the use of traditional- versus alternative feed ingredients, Chemosphere, **2010**, *78*, 637–646.
19. Bustnes, J.O., et al. Salmon Farms as a Source of Organohalogenated Contaminants in Wild Fish, Environ Sci Technol, **2010**, *44* (22), 8736-8743.

Bulletin Národní referenční laboratoře XVI 2012/3

Ročník:	XVI, č. 3
Vydal:	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2012
Odpovědný redaktor:	Ing. Iva Strížová
Počet stran:	49

Texty neprošly jazykovou úpravou.
ISSN 1801-9196