

SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ

XXXVIII. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin

21. – 23. 5. 2007

Skalský Dvůr

Ed. Holasová M., Fiedlerová V., Špicner J.
VÚPP, Praha 2007

ISSN 1802-1433

RYCHLÉ METODY PRO VYŠETŘENÍ REZIDUÍ PESTICIDŮ V POTRAVINÁCH

Čajka T., Lacina O., Hajšlová J.

Ústav chemie a analýzy potravin, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

Úvod

Nejnovější toxikologické studie indikují potřebu minimalizovat dietární expozici populace reziduím pesticidů, což se v praxi projevuje snižováním nejvyšších povolených množství (MRL) „moderních“ pesticidů. Z tohoto důvodu je nutné mít k dispozici takové analytické metody, které umožňují flexibilně stanovit s dostatečnou přesností někdy až extrémně nízké koncentrace těchto látek ve velmi krátkém čase.

Pro vlastní stanovení analytů se nejčastěji využívá některá z chromatografických technik, přičemž nejširší uplatnění v reziduální analýze pesticidů nalezla plynová chromatografie (GC) ve spojení s různými detektory (nejčastěji dusíkofosforový, elektronového záchytu či hmotnostně-spektrometrický).

Rychlá plynová chromatografie

Rychlá GC separace představuje preferovaných přístup vedoucí ke zkrácení doby analýzy, což vede ke zvýšení průsaznosti laboratoře a v konečném důsledku k podstatnému snížení provozních nákladů.

Zkrácení doby analýzy lze dosáhnout změnou parametrů GC kolony a/nebo změnou operačních podmínek [1–3]:

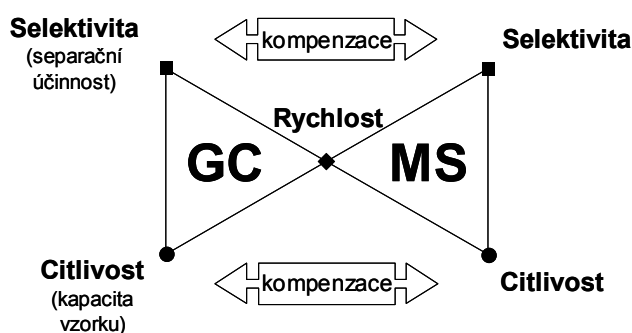
- *Vnitřní průměr kolony.* Zmenšení vnitřního průměru kolony vede ke snížení retence analytů. Použití kolon o vnitřním průměru $<0,18$ mm je však v běžných analýzách limitováno jejich nižší kapacitou (vzorky často obsahují komponenty matrice ve vyšších koncentracích než jsou koncentrace analytů). Vzhledem k malému vnitřnímu průměru je obtížnost nastříkání vzorku často doprovázena ucpáváním kolony. Pro tyto účely je vhodné použít „split“ nástřik, což je ale s ohledem na ztrátu citlivosti pro ultra-stopovou analýzu nevhodné.
- *Délka kolony.* Rychlost analýzy je závislá na rychlosti nosného plynu a na délce kolony. Použití krátkých kolon je v konvenční plynové chromatografii omezeno analýzou relativně jednoduchých směsí látek, což je dáno sníženou účinností krátké kolony (nižší počet teoretických pater). Použitím hmotnostního detektoru může být ztráta chromatografické separace nahrazena selektivitou hmotnostního separátoru. Použitím kratší kolony ve spojení s hmotnostním spektrometrem je možné dosáhnout rychlejší separace a zároveň vyšší citlivosti. Ztrátu účinnosti je vhodné minimalizovat pomocí rychlého teplotního programu.
- *Tloušťka filmu stacionární fáze.* Na tloušťce filmu stacionární fáze závisí kapacita a rychlost analýzy. Tloušťka filmu ovlivňuje difúzi ve stacionární fázi. Jestliže je tloušťka filmu příliš velká, stává se separace neúčinnou a zároveň roste doba nutná k separaci cílových analytů. Čím tenčí je film, tím je počet teoretických pater vyšší a účinnost lepší. Na druhou stranu příliš tenký film stacionární fáze má za následek ztrátu kapacity (je-li ve vzorku přítomno větší množství koextraktů z matrice, může dojít k posunutí elučních zón).
- *Teplotní programování.* Rychlejší teplotní programování může urychlit mnoho analýz při minimální ztrátě rozlišení; přesto je vždy nutné zvažovat kompromisní řešení mezi rozlišením a rychlostí chromatografické separace. Nesporně výhodné je např. pro rychlou separaci směsi obsahující látky s širokým rozmezím bodu varu. Rychlé teplotní programování nachází velké uplatnění zejména tam, kde se používají krátké kapilární kolony s malým vnitřním průměrem. Realizuje se buď v konvenční GC peci nebo odporovým ohřevem. V prvním případě se dosahuje změn teplot kolony až 2 °C/s v závislosti na doporučení výrobce a možnostech plynového chromatografu. V případě odporového ohřevu, kdy je pouze ohřívána pouze

kolona a ne celá pec plynového chromatografu, lze měnit rychlostí až 30 °C/s, což dovoluje dobu analýzy výrazně zkrátit. Zároveň je kratší také doba chlazení kolony na počáteční teplotu.

- *Typ nosného plynu.* Rychlost analýzy je závislá na typu použitého nosného plynu, který ovlivňuje hodnotu optimální lineární rychlosti (rychlost, při které je dosažena minimální hodnoty výškového ekvivalentu teoretického patra). Nejvyšší optimální rychlost průtoku má vodík, který se však z bezpečnostních důvodů nepoužívá. Z běžně používaných plynů následuje helium a dusík (v tomto pořadí se optimální lineární rychlost snižuje).
- *Průtok nosného plynu.* Ke zrychlení analýzy může přispět použití vyššího průtoku nosného plynu než optimálního, což přináší snížení účinnosti separace, ale malé zvýšení lineární rychlosti přinese pouze nepatrné zhoršení účinnosti separace se znatelným zkrácením retenčních časů.
- *Použití izotermní analýzy.* Izotermní analýza umožňuje provádět pouze separaci látek s podobným bodem varu. Při separaci jednoduchých směsí může být izotermní analýza v kombinaci s krátkými kolonami velmi rychlá.
- *Použití vakua na výstupu z kolony.* V případě použití vakua na výstupu z kolony (tzv. nízkotlaká plynová chromatografie, *low-pressure gas chromatography*, LP-GC) je použito kapilární kolony o velkém vnitřním průměru, tzv. *megabore* (5–10 m délka × 0,53 mm vnitřní průměr × 0,25–1 μm tloušťka stacionární fáze). Díky nižšímu tlaku dochází ke zvýšení difusivity a zvyšuje se tak optimální lineární rychlost nosného plynu. Kolona na LP-GC se připojuje k plynovému chromatografu přes krátkou a tenkou restriční kapiláru bez stacionární fáze (obvykle 2–5 m délka × 0,10–0,18 mm vnitřní průměr), což umožňuje použití konvenčních nástřikových technik. Použití techniky LP-GC vede ke značnému snížení doby analýzy bez větší ztráty účinnosti separace.

Hmotnostní spektrometrie ve spojení s rychlou GC

Hlavní výhodou hmotnostní spektrometrie (MS) ve spojení s rychlou GC představuje možnost spektrometricky rozlišit koelující se píky a kompenzovat tak nižší chromatografické rozlišení (Obrázek 1) [2].



Obrázek 1. Kombinace GC a MS pro optimalizaci rychlosti

Z hlediska používaných hmotnostních analyzátorů představuje kvadrupól pravděpodobně nejvíce používaný hmotnostní analyzátor, avšak pro dosažení uspokojivé citlivosti ve stopové analýze musí být používán v módu monitorování vybraných iontů (*selected ion monitoring*, SIM), což je spojeno se značnou ztrátou spektrálních informací. Obdobná nevýhoda je spojena s analyzátozem typu iontová past, kde pro dosažení vyšší selektivity je nutno pracovat v módu MS/MS. Použití hmotnostních analyzátorů využívajících pro separaci iontů rozdílnou dobu průletu jednotlivých

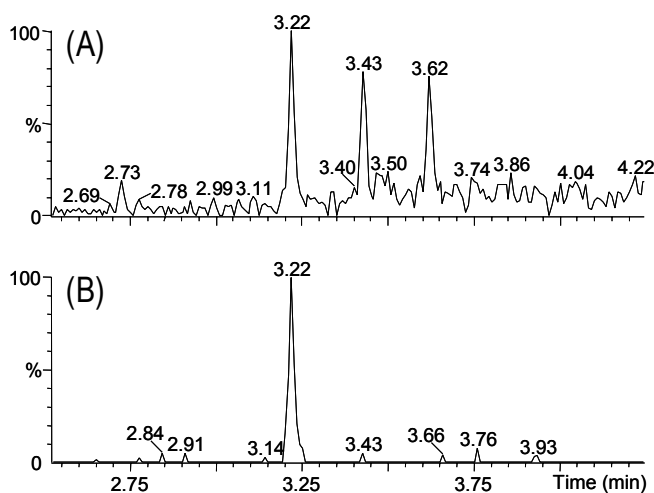
iontů letovou trubicí (*time-of-flight*, TOF) ve spojení s rychlou GC představuje inovativní přístup v reziduální analýze.

V současnosti existují dva typy průletových hmotnostních spektrometrů, které jsou vzájemně komplementární [4–6].

- První skupinu představují vysokorozlišovací průletové hmotnostní spektrometry (*high-resolution time-of-flight mass spectrometer*, HRTOFMS), které nabízejí vysoké hmotnostní rozlišení (navíc s možností přesného určení hmoty), avšak disponující malou akviziční rychlostí (obvykle do 10 spekter/s).
- Druhou skupinu tvoří vysokorychlostní průletové hmotnostní spektrometry (*high-speed time-of-flight mass spectrometer*, HSTOFMS) s vysokou akviziční rychlostí (až do 500 spekter/s), které ale poskytují jen jednotkové hmotnostní rozlišení, lze je však použít ve spojení s rychlou chromatografií, popř. s technikou kompletní dvourozměrné plynové chromatografie (GC×GC).

Oba typy instrumentací narozdíl od kvadrupólu a iontové pasti dovolují snímání celých hmotnostních spekter dokonce i na velmi nízkých koncentračních hladinách, což dovoluje provádět identifikaci/konfirmaci pomocí více iontů. K dalším výhodám lze uvést absenci spektrální asymetrie (nedochází ke změně poměrů iontů během akvizice jednotlivých hmotnostních spekter podél eluční zóny analytu), která je běžně pozorována u „scanovacích“ instrumentů (kvadrupól, iontová past). Použití speciálního softwaru pak dovoluje separovat částečně překryté chromatografické píky na základě vzrůstu/poklesu intenzity iontů v získaných hmotnostních spektrech (dekonvoluce). Rovněž možnost pracovat s rozšířeným hmotnostním rozsahem (až m/z 1500) lze shledat jako další výhodu.

Použití HRTOFMS instrumentace ve spojení s nízkotlakou plynovou chromatografií (LP-GC) při analýze reziduí pesticidů na hladině 0,01 mg/kg v dětské výživě ilustruje **Obrázek 2** na příkladu pesticidu *penconazole*. V případě extrahování cílového iontu m/z 248,095 za použití hmotnostního okna 1 Da bylo dosaženo hodnoty poměru signálu k šumu S/N pouze 5:1. Při použití užšího hmotnostního okna 0,02 Da došlo k redukci pozadových interferentů a ke zvýšení hodnoty $S/N = 49:1$ a tím ke snížení detekčního limitu daného pesticidu.



Obrázek 2. Vliv nastavení hmotnostního okna na detekci pesticidu *penconazole* ($t_R = 3,22$ min) na hladině 0,01 mg/kg v dětské výživě připravený metodou QuEChERS [7]. Pro analýzu použita konfigurace LP-GC ve spojení s HRTOFMS (GCT, Micromass, Velká Británie). Cílový iont m/z 248,095 extrahován za použití hmotnostního okna (A) 1 Da a (B) 0,02 Da.

Literatura

- [1] Hajšlová, J., Čajka, T., Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). V knize: *Food Toxicants Analysis*. Y. Picó (editor), ISBN: 978-0-444-52843-8, Elsevier, Oxford, Velká Británie, str. 419–473, 2006.
- [2] Maštovská, K., Lehotay, S.J., Practical approaches to fast gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1000, 153–180, 2003.
- [3] Maštovská, K., Lehotay, S.J., Hajšlová, J., Optimization and evaluation of low-pressure gas chromatography–mass spectrometry for the fast analysis of multiple pesticide residues in a food commodity, *Journal of Chromatography A*, 926, 291–208, 2001.
- [4] Čajka, T., Hajšlová, J., Gas chromatography–high-resolution time-of-flight mass spectrometry in pesticide residue analysis: advantages and limitations, *Journal of Chromatography A*, 1058, 251–261, 2004.
- [5] Čajka, T., Hajšlová, J., Gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry in food analysis, *LC GC Europe*, 20(1) 25–26, 28–31, 2007.
- [6] Čajka, T., Hajšlová, J., Kazda, R., Poustka, J., Challenges of gas chromatography–high-resolution time-of-flight mass spectrometry for simultaneous analysis of polybrominated diphenyl ethers and other halogenated persistent organic pollutants in environmental samples, *Journal of Separation Science*, 28(7), 601–611, 2005.
- [7] Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenck, FJ, Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce, *Journal of AOAC International*, 86(2), 412–431, 2003.

Poděkování

Tato studie byla realizována v rámci projektu MSM 6046137305 financovaného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.