

ANALYTICKÉ METÓDY NA DETEKCIU KONTAMINANTOV V KÔROVCOCH A MÄKKÝŠOCH

KATARÍNA RUSIŇÁKOVÁ^a, MICHAL KIRCHNER^b
a SVETLANA HROUZKOVÁ^a

^a Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava,

^b Výskumný ústav vodného hospodárstva, Nábr. arm. gen. L. Svobodu 5, 812 49 Bratislava, Slovenská republika
svetlana.hrouzkova@stuba.sk

Došlo 14.4.22, prijaté 17.5.22.

Kľúčové slová: čistenie extraktu, GC-MS, kontaminanty, kôrovce, mäkkýše, PAH, QuEChERS, rezíduá pesticídov

● <https://doi.org/10.54779/chl20220481>

Obsah

1. Úvod
2. Kôrovce a mäkkýše
3. Metódy prípravy vzorky
 - 3.1. Príprava na extrakciu
 - 3.2. Procedúra QuEChERS
 - 3.3. Soxhletova extrakcia
 - 3.4. Iné metódy extrakcie
4. Separácia a detekcia
5. Záver

1. Úvod

Voda je esenciálnou podmienkou života na Zemi a je tak nevyhnutné kontrolovať jej kvalitu a stanovovať kontaminujúce zložky. Pesticídy a polyaromatické uhľovodíky sú príklady zlučenin, ktorými je voda v rôznych oblastiach sveta často znečistená. Pri detekcii a stanovení týchto analytov vo vzorkách vody sa však stretávame s problémom. Nakoľko polyaromatické uhľovodíky a mnoho pesticídov vykazujú lipofilný charakter, ich koncentrácia priamo vo vzorkách vody je príliš nízka. Vodné druhy kôrovcov a mäkkýšov, ale aj ryby sa tak používajú ako indikátory kvality vody. Telá týchto organizmov majú schopnosť lipofilné látky akumulovať a koncentrovať vo svojich tukových tkanivách. Kôrovce, mäkkýše a ryby sú zdrojom nízkokalorických bielkovín a ich nutričná hodnota je vysoká. Práve kvôli týmto charakteristikám sú spomínané organizmy okrem indikácie čistoty ich biotopov aj častým prvkom ľudskej stravy. V prípade požívania kontaminovaných jedincov je konzument vystavený karcinogénnym,

mutagénnym, alebo iným negatívnym vplyvom. V prípade kontaminácie polyaromatickými uhľovodíkmi a intoxikácie rezíduami pesticídov môže dochádzať k narušeniu činnosti endokrinného systému konzumenta, z čoho vyplýva nutnosť kontroly prítomnosti kontaminantov v jedlých častiach diskutovaných organizmov.

Cieľom referátu je poskytnúť literárny prehľad poznatkov uverejnených v rozmedzí rokov 2015 až 2022, ktoré boli prínosom v oblasti vývoja alebo aplikácie analytických metód na analýzu látok znečisťujúcich životné prostredie zameraných na pesticídy a polyaromatické uhľovodíky zo vzoriek kôrovcov a vodných druhov mäkkýšov a tiež ich zhodnotenie pre vstupné zorientovanie sa čitateľa v problematike. Práca sa v úvodnej kapitole venuje kôrovcom a mäkkýšom, so zameraním sa na ich chemické zloženie, pretože je to kľúčom k potenciálnym komplikáciám počas analýzy. Následne sa veľmi detailne diskutujú rôzne spôsoby prípravy týchto vzoriek na analýzu a inštrumentálna analýza extraktov, pričom sa hodnotia aj medze detekcie analytických metód v súvislosti so spojením chromatografie s rôznymi detektormi. Prehľad je ukončený poukázaním na tie výskumy, v ktorých výsledky pozitívnych nálezov kontaminantov v reálnych vzorkách vyvolali obavy o zdravie konzumentov analyzovaných kôrovcov a mäkkýšov.

2. Kôrovce a mäkkýše

Kôrovce a mäkkýše sú indikátory čistoty prostredia, v ktorom žijú a sú tak častou vzorkou environmentálnych analýz. Kôrovce s mäkkýšmi predstavujú veľmi komplexnú maticu, ktorej chemické zloženie je pre vývoj analytickej metódy a predovšetkým časti extrakcie a čistenia extraktu kľúčovým poznatkom. Chemické zloženie tiel mäkkýšov a kôrovcov je v mnohom podobné zloženiu rýb¹. Živočíchy oboch spomínaných skupín pozostávajú najmä z vody, ktorá môže tvoriť až 80 % ich tiel². Bielkoviny sú hlavnou zložkou tiel rýb aj vodných bezstavovcov a príjem bielkovín práve z týchto organizmov môže pôsobiť preventívne pred kardiovaskulárnymi chorobami¹. Vo svalových tkanivách kôrovcov a mäkkýšov rozpoznávame tri druhy bielkovín. Myofibrilárne bielkoviny v telách vodných bezstavovcov v najväčšom množstve zastupuje paramyozín a z celkového obsahu bielkovín sú myofibrilárne proteíny v tkanivách kôrovcov a mäkkýšov zastúpené až na úrovni 75 % (cit.¹). Sarkoplazmatické bielkoviny predstavujú až do 30 % celkového množstva bielkovín vodných bezstavovcov¹. Z významne zastúpených proteínov v kôrovcoch nájdeme myoglobín. Taktiež sú obsiahnuté enzýmy, ako rôzne oxydoreduktázy, transferázy, fosforilázy a iné. Stromatické bielkoviny sú triedou bielkovín, ktorá tvorí len približne 3 % všetkých bielkovín svalov

vej hmoty rýb a vodných bezstavovcov a ako príklad týchto bielkovín môžeme uviesť elastín a kolagén, ktoré sa vyskytujú najmä v telách lastúrnikov, konkrétne v ich pružných väzoch, ktoré umožňujú otváranie a uzatváranie schránok¹.

Telá kôrovcov a mäkkýšov pozostávajú iba z 3 % tuku, čo je podstatne menej, ako je to pri telách rýb, nakoľko niektoré druhy rýb môžu obsahovať až 13 % tuku z ich celkovej hmotnosti¹. Množstvo tuku však závisí najmä od potravy, ktorú jedince prijímajú. Živočíchy chované na farmách sú častokrát kŕmené vysoko tukovou stravou s cieľom dosiahnuť maximálnu veľkosť jedincov, zatiaľ čo jedince tých istých druhov žijúcich voľne sú podstatne menšie s menším obsahom tuku. Tuky vodných bezstavovcov, ale aj rýb, pozostávajú najmä z nasýtených mastných kyselín, v najväčšom množstve zastúpené kyselinou palmítovou, no vo veľkom množstve je prítomná aj mononenásýtená kyselina olejová. Cholesterol je podobne ako aj u ľudí dôležitou zložkou tiel rýb a vodných bezstavovcov, v ktorých tvorí bunkové membrány či nervové obaly a tiež je zodpovedný za produkciu žlčových kyselín. V morských rybách môže tvoriť až 90 % všetkých sterolov, zatiaľ čo v telách kôrovcov a mäkkýšov je zastúpený len na úrovni 25 %, čo vyplýva z prítomnosti vysokej hladiny organickej kyseliny – taurínu, ktorá v ich telách spôsobuje lepšiu degradáciu cholesterolu a vylučovanie žlčových kyselín¹.

Morské plody sú vo všeobecnosti bohatým zdrojom vitamínov a minerálov, keďže aj samotné živočíchy potrebujú tieto zložky pre svoj vývin a správnu funkciu. Kôrovce a mäkkýše obsahujú najmä vo svojich vnútornostiach, no v menších koncentráciách aj v ich mäse, vitamíny A, D a E, avšak v neporovnateľne menšom množstve v porovnaní s ich koncentraciami v telách rýb. Vo vode rozpustné vitamíny sú distribuované v celom tele kôrovcov a mäkkýšov. Vitamíny B1, B2 a B3 predstavujú až do 7 % všetkých prítomných a o niečo menšie zastúpenie na úrovni 3 % zo všetkých prítomných vitamínov prislúcha vitamínom B5 a B9. Vitamín B12, ktorý je obsiahnutý vo veľkých koncentráciách najmä v mäse cicavcov, je v tkanivách niektorých mäkkýšov, hlavne z triedy Lastúrniky, obsiahnutý až na úrovni 18 % zo všetkých prítomných vitamínov².

Z literárneho prehľadu je zjavné, že najčastejšie analyzovanými kôrovcami sú rôzne druhy kreviet. Krevety sú kozmopolitné živočíchy a je teda vhodné vyvíjať metódy na ich analýzu, nakoľko môžu byť aplikované celosvetovo. Podobne je to aj pri analýze mäkkýšov. Práve menšie druhy ako šklabky, ustrice, mušle, či slimáky sú relevantnými vzorkami. Ich populácia je veľká a pohybujú sa pomaly alebo vôbec sa nepohybujú, čo zjednodušuje vzorkovanie. Menšie druhy kôrovcov a mäkkýšov sa analyzujú s cieľom hodnotiť kvalitu komplexných vodných biotopov, nakoľko je relatívne jednoduché odobrať veľa vzorky. Väčšie druhy mäkkýšov a kôrovcov ako homáre, raky či chobotnice sa vzorkujú zložitejšie, nakoľko ich populácia je malá, môžu sa pohybovať veľmi rýchlo, v prípade chobotníc až reaktívne a v porovnaní s krevetami či mušľami a ustricami sa zvyčajne vyskytujú vo väčších hĺbkach. Spomenuté väčšie

druhy mäkkýšov a kôrovcov sú často konzumované najmä v prímorských oblastiach a cieľom analýz týchto vzoriek je najmä kontrolovať ich kvalitu ako potravy. Prehľad analyzovaných vzoriek s príslušnými referenciami je sumarizovaný v tab. I.

3. Metódy prípravy vzorky

Kôrovce a mäkkýše predstavujú komplexné vzorky a príprava na samotnú prístrojovú analýzu musí zohľadniť fakt, že extrakty je potrebné cielene čistiť od interferencií. Vzorky sa v prvom kroku vždy homogenizujú s cieľom zvýšiť povrch vzorky a následne tak dosiahnuť vyššiu účinnosť extrakcie. Sušenie mrazom alebo lyofilizácia je tiež častým krokom predúpravy vzoriek, ktorý je zaradený ešte pred homogenizáciu. Výsledkom lyofilizácie je vzorka, ktorá je lepšie homogenizovateľná, skladovateľná a trvanlivejšia. Z homogenátu sa extrahujú cieľové analyty a prvotný extrakt sa kvôli komplikovanosti vzoriek musí prečistiť, čo môže prebiehať rôznymi spôsobmi a technikami.

3.1. Príprava na extrakciu

Homogenizáciu sa získava vzorka, ktorej chemické zloženie je rovnaké v každej jej časti, čo sa realizuje v zariadeniach, ktoré homogenizáciu zabezpečujú mechanickým rozrušovaním. Na homogenizáciu vzoriek kôrovcov a mäkkýšov sa používajú zariadenia, ktoré homogenizáciu vzorky dosahujú jej mletím, drvením či rezaním na menšie časti, avšak pre dokonalú homogenizáciu je často nutné použiť kombináciu homogenizačných metód, ktoré sa kombinujú s občasným chladením homogenizačného prístroja ako aj homogenátu s cieľom chrániť vzorku pred tepelnou degradáciou.

Lyofilizácia alebo sušenie mrazom sa aplikuje pred homogenizáciou vzoriek. Lyofilizovaním vzoriek sa predchádza degradácii zložiek, ktoré sú tepelne nestabilné. Ochránajú sa tak svalové tkanivá a bielkoviny v nich, no lyofilizovaním vzorky sa zabezpečuje aj jej sterilita a stabilita, čo napomáha v ďalších krokoch analýzy. Proces sušenia mrazom môžeme rozdeliť do troch krokov, ktorými sú fáza mrazenia, sublimácie a fáza desorpcie. Vo fáze mrazenia je cieľom dosiahnuť zmrazenie vody prítomnej vo vzorke. Voda je vo vzorkách prítomná ako roztok a nie ako chemické individuum, preto je potrebné vzorku chladiť na teplotu nižšiu ako je bod topenia vody. Fáza sublimácie tiež označovaná ako primárne sušenie aplikuje nízky tlak pomocou vákua, čím sa vytvoria podmienky pre sublimáciu. Kryštály zmrazenej vody vytvorené v prvej fáze procesu sublimujú a výsledkom sú mikroskopické kanáliky a dutiny vo vzorke. Vzorka sa tak stáva krehkejšia, čo ďalej uľahčuje nasledovnú homogenizáciu. Studený povrch kondenzátora poskytuje povrch pre desublimáciu pár kvapaliny, čím odstraňuje pary vody z lyofilizačnej komory a umožňuje tak prestup ďalších pár z povrchu vzorky. V poslednom kroku s názvom desorpčná fáza alebo sekundárne sušenie, sa teplota vzorky oproti

Tabuľka I
 QuEChERS postup prípravy vzoriek kôrovcov a mäkkýšov

| Analyty | Vzorka | Príprava vzorky | Analytická metóda | LOD, LOQ | Lit. |
|---------------|---|---|---|--|------|
| 66 pesticídov | krevety (bližšie neurčené) | 1. HOMOG 2. E: QuEChERS: CH ₃ COONNH ₄ , Na ₂ EDTA, ACN, CH ₃ COONa d-SPE: PSA, C ₁₈ 3. filtrácia (PVDF) | LC-MS/MS kolóna: XSELECT HSS C ₁₈ MF: voda(HCOOH)/MeOH (HCOOH+octan amónny) ionizácia: ESI analyzátor: QqQ, SIM | LOD < 5 µg kg ⁻¹ LOQ < 10 µg kg ⁻¹ | 3 |
| 18 OPP | biele, obrovské riečne, obrovské tigrie krevety | 1. HOMOG 2. extrakcia, čistenie: QuEChERS, d-SPE | LC-MS/MS, GC-MS/MS ionizácia: ESI analyzátor: QqQ, SIM | LOQ = 5 ng g ⁻¹ | 4 |
| 84 PCB, OCP | mušle, škľabky | 1. HOMOG 2. extrakcia, čistenie QuEChERS: hexán:acetón+voda, MgSO ₄ , NaCl d-SPE: PSA, MgSO ₄ , MIPs 3. čistenie supernatantu: filtrácia | GC-MS/MS kolóna: DB-5 dávkovanie: splitless analyzátor: QqQ, DMRM | LOQ = 0,01–9,02 µg kg ⁻¹ | 5 |
| 59 POP | rôzne krevety (bližšie neurčené) | 1. HOMOG. 2. extrakcia, čistenie: QuEChERS: ACN, HCOONH ₄ d-SPE+in-vial fil: MgSO ₄ , PSA, C ₁₈ , Z-Sep | LPGC-MS/MS, HPLC-MS/MS kolóny: Supelco SLBTM-5 ms, RP ODS3 dávkovanie: PTV MF: HCOOH/MeCN ionizácia: EI, ESI analyzátor: QqQ, MRM | LOD < 5 ng g ⁻¹ | 6 |
| imidaklopid | krevety (Metapenaeus macleayi) | 1. HOMOG s ACN 2. extrakcia, čistenie: QuEChERS: ACN, Q-Sep d-SPE: MgSO ₄ , PSA | LC-MS kolóna: RP-C ₁₈ MF: (voda+TFA), (ACN+TFA) ionizácia: ESI | LOD = 0,9 ng g ⁻¹ LOQ = 2,7 ng g ⁻¹ | 7 |
| imidaklopid | krevety (Panaeus monodon) | 1. HOMOG s ACN 2. extrakcia, čistenie: QuEChERS: ACN, Q-Sep d-SPE: MgSO ₄ , PSA | HPLC-MS kolóna: fenyl/hexyl MF: (voda+TFA), (ACN+TFA) ionizácia: ESI analyzátor: SQ, SIM | LOD = 0,3 ng ml ⁻¹ LOQ = 1 ng ml ⁻¹ | 8 |
| Fenobukarb | krevety (aj vajcia, mlieko, mäso) | 1. HOMOG 2. extrakcia, čistenie: QuEChERS: (ACN+TFA), NaCl, SCTD, SCDS d-SPE: MgSO ₄ , C ₁₈ | LC-MS/MS kolóna: RP-C ₁₈ MF: voda(HCOOH/octan amónny) MeOH(HCOOG/octn amónny) ionizácia: ESI analyzátor: QqQ, MRM | LOD = 0,7 µg kg ⁻¹ LOQ = 2 µg kg ⁻¹ | 9 |
| 19 OCP | krevety (bližšie neurčené) | 1. HOMOG 2. extrakcia, čistenie: QuEChERS: ACN, MgSO ₄ , NaCl d-SPE: PSA, MgSO ₄ | GC-ECD kolóna: RTX-CL dávkovanie: splitless | LOD = 3–9 ng kg ⁻¹ | 10 |

Tabuľka I
Pokračovanie

| Analyty | Vzorka | Príprava vzorky | Analytická metóda | LOD, LOQ | Lit. |
|--|--|---|---|--|------|
| 76 herbicídov | ustrice (<i>Crassostrea gigas</i>) škľabky (<i>Meretrix lusoria</i> , <i>Corbicula fluminea</i>) | 1. HOMOG 2. extrakcia, čistenie: QuEChERS: ACN d-SPE | LC-MS/MS, GC-MS/MS dávkovanie: splitless ionizácia: ESI, EI analyzátor: QqQ, MRM | LOQ < 5 ng g ⁻¹ | 11 |
| 60 pesticídov | raky, krevety | 1. HOMOG 2. extrakcia, čistenie: QuEChERS: ACN, NaCl d-SPE: PSA | HPLC-MS/MS kolóna: RP-C ₁₈ MF: ACN/HCOOH ionizácia: ESI analyzátor: QqQ, MRM | LOD = 0,4–10 ng g ⁻¹ LOQ = 1–16 ng g ⁻¹ | 12 |
| 6 diacyl- hydrazínových insekticídov | krab (<i>Eriocheir sinensis</i>) krevety (<i>Panaeus vannamei</i>) | 1. HOMOG mäsa a pohlavných žliaz (krab), homogenizácia krevety 2. extrakcia čistenie: QuEChERS: ACN, MgSO ₄ , NaCl, dispergátor, hexán d-SPE: PSA, C ₁₈ | LC-MS/MS kolóna: Hypersil Gold C ₁₈ MF: CH ₃ COOH/ACN ionizácia: ESI analyzátor: QqQ, MRM | LOD = 0,38–0,96 ng g ⁻¹ LOQ = 1,27–3,20 ng g ⁻¹ | 13 |
| 20 pesticídov | krevety (bližšie neurčené) | 1. HOMOG 2. extrakcia, čistenie: QuEChERS EDTA 0,1M, CH ₃ COONH ₄ (pufor), ACN, NaCl dSPE: PSA, MgSO ₄ , C ₁₈ | LC-MS/MS kolóna: Phenomenex Luna C ₁₈ MF: (HCOOH+voda)/ (HCOOH+ACN) ionizácia: ESI analyzátor: QqQ, MRM | LOQ ≤ 5 ng g ⁻¹ | 14 |
| Imidakloprid | krevety (<i>Saccostrea</i>), ustrice | 1. HOMOG 2. QuEChERS: ACN, Q-Sep | LC-DAD/MS kolóna: Zorbax C ₁₈ MF: (voda+TFA)/(ACN+TFA) ionizácia: ESI analyzátor: SQ, SIM | LOD = 1 ng ml ⁻¹ LOQ = 3,7 ng ml ⁻¹ | 15 |
| PAH | krevety (<i>Gammarus pulex</i>) | 1. HOMOG sušených kreviet 2. extrakcia, čistenie: QuEChERS: MiliQ, ACN, MgSO ₄ , NaCl d-SPE: MgSO ₄ , C ₁₈ DLLME: NaHCO ₃ , CHCl ₃ H ₂ SO ₄ clean up: H ₂ SO ₄ pridané k odobratej sedimentovej fáze, ručné pretrepanie, pridané hexánu | kvantitatívna analýza: GC-MS/MS kolóna: 2×15 m kapilárne kolóny pripravené rozdelením kolóny (30 m) selektívnej na PAH dávkovanie: pulzný splitless ionizácia: EI analyzátor: QqQ, pseudo MRM kvalitatívna analýza: GC-MS kolóna: 2×15 m identické HP-5MS dávkovanie: PTV, TDU, splitless ionizácia: EI analyzátor: Q, FS | LOD = 1,5–2,1 ng g ⁻¹ LOQ = 4,7–6,3 ng g ⁻¹ | 16 |

Pozn. ACN – acetonitril, C₁₈ – silikagél modifikovaný oktaedecylsilánom, DLLME – disperzná mikroextrakcia kvapalina-kvapalina, dSPE – disperzná extrakcia tuhou fázou, HOMOG – homogenizácia, OCP – organochlórované pesticídy, OPP – organofosforečné pesticídy, PCB – polychlórované bifenily, POP – perzistentné organické polutanty, PSA – silikagél modifikovaný funkčnými skupinami primárnych a sekundárnych amínov, Q-Sep – extrakčný set na QuEChERS

2. fáze procesu zvýši, čím sa dosiahne rozbitie väzieb medzi molekulami kvapaliny a vzorkou.

Najjednoduchšie sa lyofilizácia realizuje pomocou veľkých kryštálov, ktorých vznik sa dá dosiahnuť pomalým mrazením alebo chladením. V prípade biologických vzoriek sú veľké kryštály nevýhodné, pretože môžu narušovať bunkovú stenu, a preto proces mrazenia kôrovcov a mäkkýšov prebieha veľmi rýchlo.

3.2. Procedúra QuEChERS

Koncepcia prípravy vzorky na analýzu s názvom QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe, jedná sa o akronym slov: rýchla, jednoduchá, lacná, účinná, robustná a bezpečná) je najčastejšie používanou extrakčnou technikou prípravy vzoriek kôrovcov a mäkkýšov s cieľom detekcie a stanovenia pesticídov^{3–15}, ale aj polyaromatických uhľovodíkov¹⁶, polychlórovaných bifenylov (PCB)⁵ a celej skupiny perzistentných organických polutantov (POP)⁶. Postup prípravy vzoriek QuEChERS je v súlade s požiadavkami zelenej analytickej chémie, keďže QuEChERS využíva len malé objemy extrakčných rozpúšťadiel a chlórované rozpúšťadlá sa pri tejto metóde nepoužívajú vôbec. Najčastejšie používaným rozpúšťadlom pri extrakcii pesticídov z homogenátov kôrovcov a mäkkýšov je acetonitril^{3,6–8,10–16}, ktorý je všeobecne najdominantnejším extrakčným rozpúšťadlom QuEChERS postupu, pretože poskytuje najčistejšie extrakty v porovnaní s ďalšími bežne dostupnými rozpúšťadlami a je vhodný na dávkovanie v plynovej chromatografii. QuEChERS postup prípravy vzoriek vodných bezstavovcov bol tiež realizovaný extrakčnou zmesou hexánu a acetónu v pomere 1:9 s prídavkom destilovanej vody⁵ alebo aj 0,1 % roztokom kyseliny trifluóroctovej v acetonitrile⁹. Použitá bola aj modifikácia QuEChERS spočívajúca v pridaní tlmivého roztoku do známeho postupu. Homogenát vzorky sa najprv vortexuje spolu so suspenziou tlmivého roztoku octanu a soli kyseliny etyléndiamintetraoctovej a až následne je k tejto zmesi pridávané extrakčné činidlo (ACN) a to už priamo s extrakčnou soľou¹⁴.

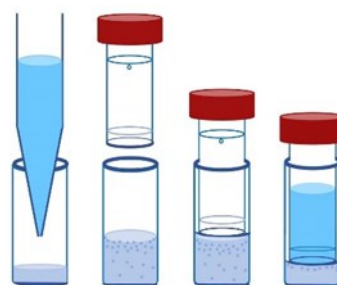
Ďalším krokom QuEChERS postupu prípravy vzoriek je pridanie extrakčných solí, ktoré zabezpečujú oddelenie vodnej a organickej fázy. Pri získavaní extraktov z kôrovcov a mäkkýšov sa na oddelenie fáz pridávajú soli NaCl a MgSO₄. Extrakčné soli ako dihydrát citrónanu trisodného (SCTD) a seskvihydrát disodnej soli kyseliny citrónovej (SCDS), prípadne ich zmes je možné použiť namiesto pufrov v prípade potreby stabilizácie pH (cit.⁹). V prípade originálneho QuEChERS postupu, ktorý nevyužíva tmenie, sa často uplatňuje Q-Sep komerčná soľ originálneho QuEChERS kitu. Balenie obsahuje presne naváženú zmes solí NaCl a MgSO₄, čím sa práca spresňuje a zjednodušuje^{7,8,15}.

QuEChERS extrakty kôrovcov a mäkkýšov sú následne čistené pomocou rôznych sorbentov a ich zmesami postupom čistenia extraktov známym ako disperzná extrakcia tuhú fázou (d-SPE). Metóda d-SPE je v porovnaní s klasickou SPE omnoho rýchlejšia a navyš používajú me-

nej extrakčného činidla. Princíp čistenia spočíva v disperzii tuhého sorbentu priamo vo vzorke/v extrakte. Po disperzii je sorbent zo vzorky izolovaný pomocou centrifúgy alebo filtrácie. Najčastejšie používanými sorbentmi je PSA (silikagél s fixovanou primárnou/sekundárnou aminovou funkčnou skupinou) a C18 (silikagél modifikovaný oktadecylsilánom), avšak kvôli komplexnosti vzorky sa takmer stále používa zmes viacerých sorbentov. Použitie samotného PSA alebo jeho kombinácia s MgSO₄ poskytuje dostatočne čisté extrakty vzoriek, ktorých matrica neobsahuje vysoké percento tuku^{7,8,10,12}. Touto maticou sú zvyčajne voľne žijúce krevety a v prípade veľmi chudého druhu kreviet je možné krok čistenia prvotného QuEChERS extraktu úplne vynechať¹⁵. Pri tukových vzorkách je vhodné použiť zmes PSA a C18, ale aj zmes MgSO₄, PSA, C18 a Z-Sep (silikagél modifikovaný oxidom zirkoničitým), keďže čistenie zmesami týchto sorbentov sa javí byť najefektívnejšie pri eliminácii tukových interferentov⁶. V prípade čistenia extraktu QuEChERS získaného extrakčnou zmesou hexánu a acetónu sa uplatnilo aj čistenie zmesou MgSO₄ so sorbentmi PSA a selektívnym sorbentom tvoreným polymérom s odtlačkom molekuly MIP (molecularly imprinted polymer) v pomere 3:1:1 (cit.⁵).

Osobitnú pozornosť si vyžaduje metóda čistenia d-SPE v spojení s filtráciou vo vialke (d-SPE + in-vial filtration), ktorá bola vyvinutá a aplikovaná na vzorky kreviet s cieľom detegovať 59 organických perzistentných polutantov⁶. Na obr. 1 je zobrazený postup tejto procedúry, ktorá výrazne zjednodušuje a urýchľuje prípravu vzorky. V prvom kroku sa k sorbentu, ktorý je pripravený vo vialke, pridá primárny QuEChERS extrakt. Filtračný piest sa zatlačí do polovice výšky vialky a obsah sa pretrepáva po dobu 30 sekúnd. Piest sa nakoniec zatlačí úplne, čím sa získava filtrovaný extrakt vhodný na inštrumentálnu analýzu.

Nagyová a spol.¹⁶ predstavili spojenie QuEChERS a disperznej mikroextrakcie v systéme kvapalina-kvapalina (DLLME) a tiež použili roztok kyseliny sírovej na úpravu extraktu DLLME. Ako prvá bola aplikovaná originálna acetonitrilová metóda QuEChERS spolu s klasickou d-SPE. Po odskúšaní sorbentov C18, PSA a ich zmesi spolu s MgSO₄ bola pre krok disperznej extrakcie tuhú fázou vybraná zmes sorbentov C18 a MgSO₄. DLLME



Obr. 1. Postup disperznej extrakcie tuhú fázou d-SPE v kombinácii s in vial filtráciou. (Farebná verzia obrázku je k dispozícii na webovej stránke Chemických listov)

Tabuľka II

Soxhletova extrakcia ako metóda prípravy vzoriek kôrovcov a mäkkýšov

| Analyty | Vzorka | Príprava vzorky | Analytická metóda | LOD, LOQ | Lit. |
|----------------------------|--|--|--|--------------------------------------|------|
| PAH | škľabky (Ruditapes philippinarum) | 1. LYO, HOMOG 2. extrakcia, čistenie: SoxE: DCM:acetón, Na ₂ SO ₄ SPE: PSA,DCM:hexán | HPLC – DAD kolóna: RP-C ₁₈ MF: voda, ACN | LOD = 0,07–0,16 ng g ⁻¹ | 17 |
| PAH | krevelty (Panaeus monodon) kraby (Uca tangeri) | 1. HOMOG mrazených vzoriek (prídavok acetónu a Na ₂ SO ₄) 2. extrakcia: SoxE (DCM:hexán) | GC-FID kolóna: HP-5890 | neuvedené | 18 |
| 8 OCP, 7 PAH, 18 PCB | krevelty (Parapanaeus, Panaeus), mušle (Mytilusgallo provincialis), chobotnica (Octopus vulgaris) kalamáre (Teuthida) | 1. LYO 2. extrakcia, čistenie: SoxE: DCM GCP: cyklohexán/etylacetát | GC-MS/MS kolóna: BPX5 ionizácia: EI analyzátor: QqQ | LOQ = 0,008–0,028 ng g ⁻¹ | 19 |
| OCP, PCB | krevelty (Exopalaemon carinicauda) mušle (Mactra veneriformis, Meretrix meretrix) | 1. LYO, HOMOG s Na ₂ SO ₄ 2. extrakcia: SoxE: hexán/acetón 3. čistenie: kolóna (silikagél, alumina) elučný roztok (DCM:hexán) | GC – bližšie neurčené | neuvedené | 20 |
| EDC (PCB, PBDE, DDT) | škľabky (Ruditapes philippinarum) | 1. LYO, HOMOG 2. extrakcia: SoxE: hexán/acetón 3. čistenie: kolóna (kyslý silikagél, Florisil) elučný roztok (DCM:hexán) | GC-MS/MS dávkoč: PTV kolóna: 5MS ionizácia: EI analyzátor: QqQ | neuvedené | 21 |
| PCB, OCP | škľabky, mušle | 1. LYO, HOMOG 2. extrakcia: SoxE: (hexán:acetón) 3. čistenie: kolóna (silikagél, alumina; Florisil) elučný roztok (hexán:acetón, hexán) | GC-ECD kolóna: DB5 | LOD = 0,01–0,03 ng g ⁻¹ | 22 |

Pozn. ACN – acetonitril, DCM – dichlórmetán, EDC – endokrinne disruptívne chemikálie, GCP – gélová permeačná chromatografia, HOMOG – homogenizácia, LYO – lyofilizácia, OCP – organochlórované pesticídy, OPP – organofosforečné pesticídy, PBDE – polybromované difenylétery, PCB – polychlórované bifenylly, POP – perzistentné organické polutanty, PSA – silikagél s funkčnými skupinami primárnych a sekundárnych amínov, SoxE – Soxhletova extrakcia, SPE – extrakcia tuhú fázou

a úprava extraktu roztokom kyseliny sírovej boli aplikované s cieľom prečistiť extrakt, vymeniť rozpúšťadlo a zakonzentrovat' extrakt bez toho, aby bolo potrebné rozpúšťadlo odparovať. Ako disperzné rozpúšťadlo sa použil chloroform. Aby sa predišlo rozkladu niektorých polyaromatických uhľovodíkov, bolo nutné zvolit' úpravu chloroformového DLLME extraktu pomocou roztoku H₂SO₄. Po

skúšaní roztokov kyseliny sírovej s rôznymi koncentraciami bol za optimálny zvolený 0,1 M H₂SO₄, nakoľko sa zistilo, že má pozitívny vplyv na potlačenie matricových efektov a pri tvorení fázy sedimentu sa účinne uvoľňujú cieľové analyty.

Postup QuEChERS extrakcií s prehľadom relevantných detailov analytickej metódy vrátane prehľadu vzoriek

a tiež medzi detekcie získaných danou metódou sumarizuje tab. I.

3.3. Soxhletova extrakcia

Soxhletova extrakcia je jednoduchá a efektívna metóda extrakcie, ktorou sa môžu extrahovať najrôznejšie tuhé vzorky, ako sú aj živočíšne tkanivá. Extrakcia sa odohráva v Soxhletovom extraktore, ktorý pozostáva z destilačnej banky uloženej na varíci, extrakčnej nádoby so vzorkou a chladiča. Pary extrakčného činidla uvoľneného varom v destilačnej banke kondenzujú v chladiči a pretekajú do extrakčnej nádoby so vzorkou, z ktorej extrahujú jej zložky. Po naplnení nádoby roztok extrahovaných látok pretečie cez spätný prepád – naspäť do varnej banky. Extrahované analyty sa už následne z roztoku neodparujú. Odparuje sa len čisté rozpúšťadlo, čo umožňuje opakovanie procesu extrakcie s ďalšou dávkou čistého extrakčného činidla. Soxhletova extrakcia je veľmi účinná, zároveň však zdĺhavá a používa relatívne veľké objemy rozpúšťadla, ktoré je spravidla v následnom kroku potrebné odstrániť.

Soxhletovou extrakciou sa pripravujú vzorky kôrovcov a mäkkýšov s cieľom detekcie hlavne polyaromatických uhľovodíkov^{17–19}, ale aj organochlórovaných pesticídov, polychlórovaných bifenylov^{19–22} a zlúčenín radených do skupiny disruptorov hormonálneho systému²¹. Používajú sa rôzne extrakčné rozpúšťadlá a ich zmesi, ktoré sa volia tak, aby mali vysokú afinitu k analytu a naopak nízku afinitu k matrici. Pri izolácii cieľových analytov sa používa zmes hexánu a acetónu v rôznych pomeroch^{20–22}, samotný dichlórmetán¹⁹, ale aj jeho zmesi s acetónom¹⁷ či hexánom¹⁸. Prehľad metód je sumarizovaný v tab. II.

Na čistenie extraktov po realizácii Soxhletovej extrakcie vzoriek kôrovcov a mäkkýšov boli najčastejšie použité metódy stĺpcovej chromatografie a SPE. Uvoľnenie kontaminantov z kolónok sa realizuje vhodnými rozpúšťadlami. Pri potrebe oddeliť polárne aj nepolárne látky z extraktov boli použité kolónky naplnené zmesou deaktivovaného silikagélu a alumíny, alebo Florisilu, ktoré látky zadržia a následne sú eluované zmesami elučných činidiel s vhodnou polaritou^{20–22}. Podobne ako pri čistení QuEChERS extraktov poskytol PSA dobré výsledky aj pri čistení Soxhletových extraktov, avšak v režime SPE (cit.¹⁷). Gélová permeačná chromatografia je konvenčná metóda čistenia vzoriek s veľkým obsahom tuku a účinne bola použitá nie len pri čistení extraktov Soxhletovej extrakcie¹⁹, ale aj pri extraktoch mikrovlnne podporenej extrakcie, ultrazvukom podporenej extrakcie a extrakcie kvapalina-kvapalina, ktorých využitie pri príprave vzoriek kôrovcov a mäkkýšov na analýzu je diskutované v nasledujúcej podkapitole.

3.4. Ďalšie metódy extrakcie

Prehľad ďalších metód na extrakciu kôrovcov a mäkkýšov sumarizuje prehľad v tab. III. Extrakcia kvapalina-kvapalina (LLE) je jedna z najviac používaných extrakcií všeobecne a svoje využitie má aj pri analýze

organických látok v kôrovcach a mäkkýšov. Ide o metódu, kedy sa rozpustená látka – analyt – rozdeľuje medzi dve kvapaliny, ktoré sa navzájom nemiešajú. Táto technika bola použitá pri izolovaní polyaromatických uhľovodíkov^{23,24}, na multireziduálnu analýzu disruptorov endokrinného systému a farmaceutík²⁵ ako aj rôznych tried pesticídov²⁶. Pre LLE sa používajú rôzne extrahovadlá, ktoré môžu byť obdobné ako pri Soxhletovej extrakcii^{24,26}, alebo stačí k vzorke obsahujúcej vodu pridať organické rozpúšťadlo ako napr. etylacetát²³. Použitá bola taktiež extrakčná zmes rozpúšťadiel acetonitrilu s metanolom²⁵. Pri extrakcii sa pre lepšie oddelenie fáz používajú extrakčné soli podobne ako v QuEChERS extrakciách. Pri príprave vzorky na LLE extrakciu je možné vzorku homogenizovať priamo s extrakčnou soľou²⁴. Čistenie extraktov po extrakcii kvapalina-kvapalina prebieha v kolónkach najčastejšie naplnenej silikagélom²³, ale účinným je aj prístup čistenia extraktu vo filtračnom lieviku cez vrstvu sklenej vaty²⁴ a v prípade príliš znečisteného extraktu použitie už spomenutej gélovej permeačnej chromatografie²⁶.

Ultrazvukom (UAE)^{27–30} a mikrovlnným žiarením (MAE)³¹ podporené extrakcie vo všeobecnosti poskytujú výťažnosti približne rovnaké ako LLE, avšak v kratšom čase. Je teda prirodzené, že našli uplatnenie v prípade analýz kôrovcov a mäkkýšov. Sorbent LiChrolut®EN je komerčný produkt, ktorý sa vyznačuje vysokou adsorpčnou kapacitou na polárne látky a jeho použitím na čistenie UAE extraktu pomocou prietokovej metódy SPE sa pri analýze inštrumentáciou GC-MS dosahuje výťažnosť až 96 % (cit.²⁸). V prípade čistenia extraktov vzoriek získaných týmito extrakčnými mechanizmami bolo reportované použitie gélovej permeačnej chromatografie s náplňou BioBead, čo je nepolárny styren-divinylbenzénový gél, ktorý sa používa predovšetkým na čistenie extraktov matric s vysokým obsahom tuku^{29,31}. Urýchlená extrakcia rozpúšťadlom (ASE – Accelerated Solvent Extraction) je v porovnaní s LLE bližšie ku kritériám zelenej analytickej chémie, nakoľko tlak a teplota, ktorá je pri extrakcii aplikovaná, nielen urýchľuje proces, ale vyžaduje sa použitie menšieho objemu rozpúšťadla ako pri klasickej LLE. ASE sa použila pri extrakcii celej skupiny POP látok³² a pri extrakcii PAH (cit.³³) pomocou klasických organických rozpúšťadiel, používaných pri LLE extrakciách.

Disperzia matrice vzorky na tuhej fáze (MSPD) je metóda extrakcie, ktorá využíva disperziu zložiek vzorky na tuhej fáze sorbentu pomocou mechanického roztierania vzorky so sorbentom v trecej miske. Pri príprave vzoriek kôrovcov a mäkkýšov bola aplikovaná na analýzu POP zlúčenín s použitím aktívneho silikagélu s elučným činidlom – dichlórmetánom³⁵.

Pri izolácii PAH látok z kôrovcov a mäkkýšov je tiež možné použiť extrakciu s predradeným zmydelňovaním, pri ktorej sa homogenát vzorky zahrieva v banke spolu s alkoholovým roztokom hydroxidu a až následne sa v deliacom lieviku takto zahriaty roztok pretrepáva spolu s organickým rozpúšťadlom. Takto získané extrakty sú pomerne dosť znečistené a je nevyhnutné prečistiť ich viacerými sorbentmi³⁴.

Tabuľka III

Iné spôsoby extrakcií používané pri príprave vzoriek kôrovcov a mäkkýšov

| Analyty | Vzorka | Príprava vzorky | Analytická metóda | LOD, LOQ | Lit. |
|--------------------------------------|---|--|--|--------------------------------------|------|
| PAH | Krevety (<i>Macrobrachium felicinum</i>) | 1. HOMOG, LYO 2. extrakcia: LLE: etylacetát, voda, MgSO ₄ , NaCl 3. čistenie extraktu: Mini-column Silica elučný roztok: (hexán:DCM) | GC-FID + Trace GC-MS dávkovanie: splitless kolóna: ZB-5MS ionizácia: EI analyzátor: SQ, SIM | neuvedené | 23 |
| PAH | Kraby (<i>Callinectes amnicola</i>) Krevety (<i>Penaeus notialis</i>) | 1. HOMOG s Na ₂ SO ₄ 2. extrakcia, čistenie: LLE (DCM:hexán), filtrácia v lieviku (síran sodný, sklená vata), 3. čistenie (vyrobená kolóna, sklená vata, silikagél, Na ₂ SO ₄) | GC-MS dávkovanie: splitless kolóna: Fused silica kapilár- na kolóna ionizácia: EI analyzátor: SQ, SIM | LOD = 0,02–30 mg kg ⁻¹ | 24 |
| 44 EDC, PhAC | Mušle (<i>Perna viridis</i>), škľabky (<i>Polymesoda expansa</i>) | 1. HOMOG 2. extrakcia, čistenie: LLE: ACN/MeOH | LC-MS/MS dávkovanie: kolóna: SB-C18 ionizácia: ESI analyzátor: QqQ, MRM | LOD < 1 ng g ⁻¹ | 25 |
| OCP, OPP, kar- bamáty, pyretroidy | Krevety (<i>Penaeus indicus</i> , <i>Metapenaeus monoceros</i> , <i>M. monoceros</i> , <i>P. semisulcatus</i> , <i>P. indicus</i>) | 1. strihanie nožnicami z nehrdzavejúcej ocele, HOMOG 2. extrakcia: LLE (DCM, cyklohexán) 3. čistenie: SEC (etylacetát:cyklohexán) | GC-MS, GC-FID dávkovanie: splitless kolóna: 5MS ionizácia: EI analyzátor: SQ, SIM | LOD = 10 ng g ⁻¹ | 26 |
| 16 PAH | krevety (<i>Metapenaeus affinis</i> , <i>Penaeus semisculatus</i>) | 1. HOMOG s Na ₂ SO ₄ , MgSO ₄ 2. extrakcia: UAE (hexán:acetón) 3. čistenie: stĺpcová chromatografia (Silikagél, Na ₂ SO ₄) elučný roztok (hexán:DCM) | HPLC – FLD, UV-Vis kolóna: kapilárna, bližšie neurčená | LOD = 2,3 ng g ⁻¹ | 27 |
| 24 EDC | sépie (<i>Sepia lyci- das</i>) chobotnice (<i>Octopus vulgaris</i>) krevety (<i>Crangon crangon</i>) varené krevety (<i>Panaeus kerathu- rus</i>) pečený krab (<i>Carcinus maenas</i>) mušle (<i>Mytillus galloprovincialis</i>) mušle (<i>Ruditapes decussatus</i>) ustrice (<i>Crassostrea gigas</i>) | 1. HOMOG 2. extrakcia, čistenie: UAE (ACN) kontinuálna SPE (PTFE vyrobená kolóna, LiChrolut sorbent) | GC-MS dávkovanie: splitless kolóna: DB-5MS ionizácia: EI analyzátor: SQ, SIM | LOD = 0,5–20 ng kg ⁻¹ | 28 |

Tabuľka III
Pokračovanie

| Analyty | Vzorka | Príprava vzorky | Analytická metóda | LOD, LOQ | Lit. |
|--|---|---|--|--|------|
| 89 POP, EDC | škľabky | 1. HOMOG s Na ₂ SO ₄ 2. extrakcia: UAE (DCM:hexán) 3. čistenie: GPC (Bio-Beads, DCM-hexán) 75% pre GC, 25% pre LC GC: Florisil, DCM:hexán LC: filtrácia v striekačke | GC-MS/MS kolóna: DB5-MS, HT5-MS ionizácia: EI analyzátor: QqQ, MRM LC-MS/MS: kolóna: ZORBAX Eclipse Plus C18 MF: MiliQ/(ACN:MeOH) ionizácia: ESI | LOD = 0,9–33 ng g ⁻¹ | 29 |
| 15 PAH | krevety, kraby | 1. HOMOG 2. extrakcia: UAE (hexán:DCM), filtrácia organickej vrstvy cez lievik s vrstvou (Na ₂ SO ₄) 3. čistenie: sklená kolóna (aktívna a neutrálna Alumina), elučný roztok (hexán:DCM) | GC-FID bližšie neurčené | neuvedené | 30 |
| OCP | krevety (Leander modestus Heller), slimáky (Cipangopaludina chinensis) | 1. LYO, HOMOG 2. extrakcia, čistenie: MAE, filtrácia za zníženého tlaku, GPC (BioBead) elučný roztok (etylacetát:hexán), SPE (silikagél, DCM:hexán – elučný roztok) | GC-MS dávkovanie: splitless kolóna: HP5 ionizácia: EI analyzátor: SQ, SIM | LOD (DDD, DDT) = 5 ng g ⁻¹ LOD (iné OCPs) ≤ 1 ng g ⁻¹ | 31 |
| POP (10 PCB, 4 PBDE, 13 OCP) 29 PAH | ustrice | 1. LYO, HOMOG 2. extrakcia: ASE – DCM 3. čistenie PAH: Al ₂ O ₃ a silikagél mikrokolóna, elučný roztok (DCM:pentán) 4. čistenie POP: kyslý silikagél a sklenené perličky v extrakčných bunkách | PAH: GC-MS dávkovanie: splitless kolóna: HP-5 ionizácia: EI analyzátor: SQ, SIM PCB, PBDE, OCPs GC-ECD dávkovanie: splitless kolóna: HP-5 | LOD = 0,1–0,2 ng g ⁻¹ LOQ = 0,3–0,6 ng g ⁻¹ | 32 |
| 16 PAH | krevety slimáky mušle | 1. LYO, HOMOG 2. extrakcia: ASE (DCM:Hexán) 3. čistenie: silikagél- alumina kolóna, okyslený silikagél, rotačná odpadka | GC-MS dávkovanie: splitless kolóna: HP-5MS ionizácia: EI analyzátor: SQ, SIM | LOD = 0,57–2,96 ng g ⁻¹ | 33 |
| 16 PAH | krevety (Matapenaeus affinis) | 1. LYO 2. extrakcia: zmydelňovaním (KOH v EtOH roztoku + cyklohexán) 3. čistenie: stĺpcová chromatografia Na ₂ SO ₄ , silikagél, elučný roztok hexán:DCM | GC-MS dávkovanie: splitless kolóna: BPX-5MS ionizácia: EI analyzátor: SQ, SIM | LOD = 0,13–0,51 ng g ⁻¹ | 34 |

Tabuľka III
Pokračovanie

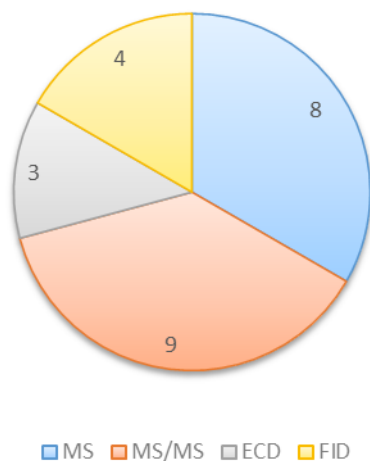
| Analyty | Vzorka | Príprava vzorky | Analytická metóda | LOD, LOQ | Lit. |
|---------------------------|----------------|---|--|----------------------------------|------|
| PAH OCP OPP PBDE | ustrice, mušle | 1. LYO, HOMO s Florisilom 2. extrakcia, čistenie: MSPD: SiO ₂ , DCM | GC-MS/MS dávkovanie: LVI-PTV kolóna: HP-5MS ionizácia: EI analyzátor: QqQ, SRM | LOD (úroveň ng g ⁻¹) | 35 |

Pozn. ACN – acetonitril, DCM – dichlórmetán, EDC – endokrinne disruptívne chemikálie, GC – plynová chromatografia, GPC – gélová permeačná chromatografia, HOMO – homogenizácia, LC – kvapalinová chromatografia, LYO – lyofilizácia, MSPD – matrix solid phase dispersion, OCP – organochlórované pesticídy, OPP – organofosforečné pesticídy, PBDE – polybromované difenylétery, PCB – polychlórované bifenyly, POP – perzistentné organické polutanty, SPE – extrakcia tuhou fázou, UAE – extrakcia podporená ultrazvukom

4. Separácia a detekcia

Pri detekcii rezíduí pesticídov a iných organických kontaminantov je potrebné dosahovať nízke medze detekcie (LOD) a analytická metóda musí mať multireziduálny charakter. Plynová a kvapalinová chromatografia sú v spojení s jednoduchou hmotnostnou spektrometriou alebo v kombinácii s tandemovou hmotnostnou spektrometriou najčastejšie používané analytické metódy na detekciu a stanovenie organických zlúčenín vo vzorkách kôrovcov a mäkkýšov.

Početné zastúpenie typov detektorov použitých pri plynovej chromatografii v rámci publikácií, ktoré sú predmetom prehľadu, zobrazuje obr. 2. Často je aplikované spojenie plynovej chromatografie s jednoduchým hmotnostným spektrometrom s kvadrupólovým analyzátorom.



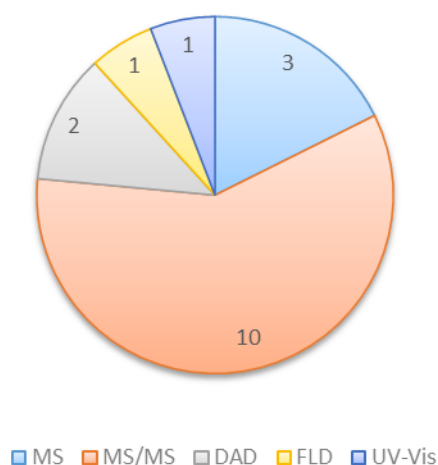
Obr. 2. Zastúpenie typov GC detektorov reportovaných v publikáciách venovaných detekcii organických látok vo vzorkách kôrovcov a mäkkýšov; ECD: detektor elektrónového záchytu (Electron Capture Detector); FID: plameňovo-ionizačný detektor (Flame Ionization Detector); MS: hmotnostná spektrometria (Mass Spectrometry), MS/MS: tandemová hmotnostná spektrometria (Tandem Mass Spectrometry). (Farebná verzia obrázku je k dispozícii na webovej stránke Chemických listov)

Najnižšie hodnoty LOD dosiahnuté použitím tejto inštrumentácie dosahujú 0,5 až 20 ng kg⁻¹, čo bolo dosiahnuté najmä použitím čistenia extraktu sorbentom LiChrolut®EN (cit.²⁸). Pre separáciu a detekciu PAH sa okrem GC-MS volí aj GC s plameňovo-ionizačným detektorom^{16,23,26}. Pri multireziduálnych analýzach, ktorých cieľom je stanoviť látky na nízkych koncentračných hladinách, je vhodné použiť plynovú chromatografiu v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou^{4-6,16,19,29,35}.

Po aplikácii vyvinutého čistiaceho kroku d-SPE + filtrácia vo vialke sa pomocou nízkotlakovej plynovej chromatografie (LPGC-MS/MS) stanovilo 30 z celkového počtu sledovaných 42 pesticídov a medze detekcie tejto analytickej metódy siahali pod 5 ng g⁻¹ (cit.⁶). Nízke medze detekcie (0,01–0,03 ng g⁻¹) dosiahla aj inštrumentácia GC-ECD aplikovaná pre detekciu organochlórovaných pesticídov a polychlórovaných bifenylov²².

Početné zastúpenie typov detektorov použitých na detekciu kontaminantov použitím kvapalinovej chromatografie zobrazuje obr. 3. Najrozšírenejšie je spojenie kvapalinovej chromatografie s tandemovou hmotnostnou spektrometriou s trojitým kvadrupólom. Najnižšie hodnoty LOD (0,38–0,96 ng g⁻¹) boli dosiahnuté pri analýze šiestich diacylhydrazínových pesticídov, ktoré boli zo vzorky extrahované postupom QuEChERS (cit.¹³). Jednoduchá hmotnostná spektrometria bola s kvapalinovým chromatografom kombinovaná pri analýzach imidaklopridu^{7,8,15} a v spojení s QuEChERS postupom sa dosiahla medza detekcie 0,3 ng ml⁻¹ (cit.⁸). Použitý bol aj detektor diódového poľa (DAD) a jeho použitie v HPLC inštrumentácii na detekciu PAH zlúčenín umožnilo dosiahnuť medze detekcie v rozmedzí 0,07 až 0,16 ng g⁻¹ (cit.¹⁷). Na analýzu 16 US EPA PAH zlúčenín bol taktiež použitý fluorescenčný detektor (FLD), na detekciu a stanovenie acetnaftylénu bol použitý UV-Vis detektor²⁷.

Pesticídy boli vyvinuté na hubenie škodcov, avšak mnohokrát sa ich aplikáciou poškodzujú aj necieľové organizmy, ľudí nevynímajúc. Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) každý rok zaznamenáva 3 milióny prípadov otravy pesticídmi, z ktorých až 220 tisíc končí smrťou ľudí. K otravám dochádza najmä v štátoch, v ktorých regu-



Obr. 3. Zastúpenie typov LC detektorov reportovaných v publikáciách venovaných detekcii organických látok vo vzorkách kôrovcov a mäkkýšov; FLD: fluorescenčný detektor; UV-Vis: spektrofotometrický detektor; DAD: detektor s diodovým poľom (Diode-Array Detector); MS: hmotnostná spektrometria (Single Mass Spectrometry), MS/MS: tandemová hmotnostná spektrometria (Tandem Mass Spectrometry). (Farebná verzia obrázku je k dispozícii na webovej stránke Chemických listov)

lácia používania pesticídov nie je tak prísna, resp. kontrolovaná a existujúca regulácia sa nedodržiava³⁶. Organochlórované pesticídy sú zvyčajne používané ako insekticídy, ktoré spôsobujú nervovú paralýzu hmyzu. Použitie tejto skupiny pesticídov je veľmi obmedzené a v mnohých krajinách úplne zakázané. Ich rezíduá sú však vo vzorkách pôdy, vody a živých organizmov stále detegovateľné, a tak sa OCP látky radia aj do skupiny perzistentných organických polutantov (POP). Použitie DDT pesticídu je dnes úplne zakázané, avšak v poľnohospodárskych oblastiach je stále detegovateľný na pomerne vysokých koncentračných hladinách, ako ukazuje aj analýza kreviet žijúcich na pobreží Bangladéšu, v ktorých bol pesticíd 4,4 DDT stanovený na 0,95 mg kg⁻¹ sušiny¹⁰.

Organofosforečné pesticídy (OPP) pôsobia ako inhibítory enzýmu cholinesterázy, ktorá je zodpovedná za hydrolyzu acetylcholínu na cholín a kyselinu octovú. Výsledkom je prekryv nervových synapsií acetylcholínom, čo ústi do zlyhania nervového prenosu a organizmus zomiera na svalový kŕč⁴. Pôsobia na stavovce aj bezstavovce a ich pozitívom je biodegradovateľnosť. Chlórpyrifos a trichlorfon boli stanovené na hladine 0,02 mg kg⁻¹ a 0,03 mg kg⁻¹ v dvoch zo 46 kusov kreviet lovených na Taiwanskom pobreží, čo indikovalo znečistenie vody a zdravotné riziko pre konzumentov⁴.

Pyretroidové pesticídy sú z dôvodu ich schopnosti rozkladať sa na svetle považované za najbezpečnejšie pesticídy. Analýza kreviet, sedimentov a vody s cieľom detekcie pesticídov rôznych tried poskytla výsledok, ktorý značne potvrdzuje schopnosť organizmov akumulovať a koncentrovať pesticídy silnejšie ako vzorky vody. Py-

retroid lambda-cyhalotrin bol stanovený vo vzorkách kreviet na úrovni 0,28–16,49 mg kg⁻¹, zatiaľ čo vo vzorkách vody sa nedetegoval vôbec²⁶. Koncentrácia tohto pesticídu výrazne prekračovala maximálny akceptovateľný limit 0,05 mg kg⁻¹ určený Svetovou zdravotníckou organizáciou (WHO).

Neonikotínoidové pesticídy sú systémové neurotoxíny so štruktúrou odvodenou od nikotínu. Vo vode rozpustný pesticíd imidakloprid bol analytom vo viacerých výskumoch, ktorých cieľom bolo preskúmať správanie kreviet pri dlhodobom vystavení imidaklopridu a zistiť, v ktorých častiach tiel vodných bezstavovcov sa imidakloprid koncentruje najviac. Počas 21 dní vystavovaní kreviet roztoku imidaklopridu sa ich rast úplne zastavil a výrazne sa znížil podiel tuku v ich telách⁷. Analýzou orgánov ustríc, ktoré boli vystavené imidaklopridu po dobu 3 dní, sa zistilo najvyššie zakonzentrovanie analytu v žiabroch, tráviacich žľazách a sťahovacích svaloch, avšak ponechaním jedincov v čistej vode počas jedného dňa sa dosiahla úplná eliminácia imidaklopridu s výnimkou sťahovacích svalov¹⁵.

Hlavným zdrojom polyaromatických uhlíkovdívok je ropa, zemný plyn a spaliny týchto pohonných hmôt. Agentúra Spojených štátov amerických pre ochranu životného prostredia (US EPA) a Európska únia stanovila 16 zlúčenín PAH, ktorých kontrola má byť prioritná. Sú nimi naftalén, acenaftylén, acenaftén, fluorén, fenantrén, antracén, fluorantén, pyrén, benzo(α)antracén, chryzén, benzo(b)fluorantén, benzo(k)pyrén, indeno(1,2,3-cd)pyrén, dibenzo(a,h)antracén, benzo(ghi)perylén a benzo(a)pyrén. Všetkých 16 prioritných PAH zlúčenín bolo vo vzorkách kreviet Perzského zálivu stanovených na 10–144 μg kg⁻¹ (cit.³⁴), ktoré indikovali len mierne prekročenie povolených limitov, zatiaľ čo analýzou kreviet v Nigérii boli PAH stanovené na 77 mg kg⁻¹ (cit.²⁴) a potvrdila sa tak závažnosť kontaminácie celej oblasti, ktorá bola zapríčinená únikom ropy pri jej ťažbe.

5. Záver

Drobné kôrovce a vodné druhy mäkkýšov obsahujú tukové tkanivá, ktoré umožňujú akumuláciu kontaminantov, predovšetkým nepolárnych organických látok, ako sú pesticídy, polyaromatické uhlíkovdívky ale aj iné organické kontaminanty, vo svojich tkanivách. Analýzou týchto drobných živočíchov je tak možné usudzovať o úrovni environmentálnej kontaminácie.

Komplexnosť analyzovaných vzoriek vyžaduje precíznú a mnohokrát komplikovanú metódu ich prípravy. Izolácia pesticídov zo vzoriek kôrovcov a mäkkýšov sa najčastejšie realizuje metódou QuEChERS, ktorej používanie sa kvôli jej súladu s požiadavkami zelenej analytickej chémie často preferuje. Polyaromatické uhlíkovdívky boli zo vzoriek extrahované najmä pomocou Soxhletovej extrakcie. Pre izolovanie analytov zo spomínaných vzoriek sa môže zvoliť aj klasická extrakcia kvapalina-kvapalina, ultrazvukom či mikrovlnným žiarením podporená extrakcia, rozpúšťadlom urýchlená extrakcia, ale aj technika

disperzie matrice vzorky na tuhej fáze. Kvôli komplikovanosti matrice vzoriek je nutné extrakty čistiť, pričom spôsoby čistenia extraktov môžu byť rôzne. Najčastejšie ide o čistenie rôznymi sorbentmi, kombináciami sorbentov, ale aj gélovou permeačnou chromatografiou a mnohokrát je nutné druhotné extrakty ešte filtrovať. Separácia a detekcia analytov prebieha plynovou alebo kvapalinovou chromatografiou s hmotnostnou spektrometriou alebo tandemovou hmotnostnou spektrometriou, ktoré ako techniky multireziduálnej analýzy sú pre vysokú účinnosť separácie a selektivitu detekcie metódami preferovanými. Prehľadový článok prezentuje aj výsledky analýz reálnych vzoriek. Trendom je vývoj analytických metód, aplikovateľných na detekciu a stanovenie viacerých skupín analytov naraz so zvyšovanou mierou selektivity a zároveň aj príklon k manuálne menej náročným metódam a voľba postupov znižujúcich environmentálnu záťaž produkovanú samotnou analýzou životného prostredia.

Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-19-0149 a Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaŠ SR a SAV na základe projektu VEGA 01/0412/20.

LITERATÚRA

- Petricorena Z. C., v knihe: *Handbook of Food Chemistry* (Cheung P., Mehta B., eds.), kap. 14, str. 403. Springer, Heidelberg/Berlin 2014. https://doi.org/10.1007/978-3-642-36605-5_12
- Belitz H. D., Grosch W., Schieberle P.: *Food Chemistry*. Springer, Heidelberg/Berlin 2009.
- Shin D., Kim J., Kang H. S.: *Food Control* 120, 107552 (2021).
- Chang H. Y., Yang W. CH., Xue Y. J., Tsai M. Y., Wang J. H., Chang G. R.: *Mar. Pollut. Bull.* 144, 140 (2019).
- Li W., Zhang Z. M., Zhang R. R., Jiao H. F., Sun A. L., Shi X. Z., Chen J.: *J. Mater.* 384, 121241 (2020).
- Han L., Sapozhnikova Y., Lehotay S. J.: *Anal. Chim. Acta* 827, 40 (2014).
- McLuckie C., Moltschanivskyj N., Gaston T., Dunstan R. H., Crompton M., Butcherine P., Bekendorff K., Taylor M. D.: *Sci. Total Environ.* 742, 140449 (2020).
- Butcherine P., Kelaher B. P., Taylor M. D., Barkla B. J.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 198, 110682 (2020).
- Zheng W., Park J. A., Zhang D., Abd El-Aty A. M., Kim S. K., Cho S. H., Choi J. M., Shim J. H., Chang B. J., Kim J. S., Shin H. C.: *J. Chromatogr. B* 1058, 1 (2017).
- Prodhon M., Alam S. N.: *SAARC J. Agric.* 16, 81 (2018).
- Chang G. R., Chen H. S., Lin F. Y.: *Mar. Pollut. Bull.* 113, 579 (2016).
- Song S., Zhu K., Han L., Sapozhnikova Y., Zhang Z., Yao W.: *J. Agric. Food Chem.* 66, 5031 (2018).
- Gan J., Liu H., Chen Y., Peng J., Liu T., Chen J., He L.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 210, 111853 (2021).
- Cho H. R., Park J. S., Kim J., Han S. B., Choi Y. S.: *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 9043 (2015).
- Ewere E. E., Powell D., Rudd D., Reichelt-Brushett A., Mouatt P., Voelcker N. H., Bekendorff K.: *Chemosphere* 230, 1 (2019).
- Nagyová S., Tölgyessy P., Laurenčík M., Kirchner M.: *Microchem. J.* 173, 107011 (2022).
- Sun J., Pan L., Cao Y., Li Z.: *Mar. Pollut. Bull.* 160, 111556 (2020).
- Tongo I., Etor E. E., Ezemonye L.: *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* 22, 731 (2018).
- Rodríguez-Hernández Á., Camacho M., Henríquez-Hernández L. A., Boada L. D., Ruiz-Suárez N., Valerón P. F., González M. A., Zaccaroni A., Zumbado M., Luzardo O. P.: *Sci. Total Environ.* 557, 808 (2016).
- Li H., Ye S., Ye J., Fan J., Gao M., Guo H.: *Mar. Pollut. Bull.* 114, 555 (2017).
- Casatta N., Mascolo G., Roscioli C., Vigano L.: *Sci. Total Environ.* 511, 214 (2015).
- Choi J. Y., Yang D. B., Hong G. H., Kim K., Shin K. H.: *Environ. Eng. Res.* 21, 373 (2016).
- Dosunmu M. I., Oyo-Ita I. O., Oyo-Ita O. E.: *Environ. Geochem. Health* 38, 1333 (2016).
- Olayinka O. O., Adewusi A. A., Olujimi O. O., Aladesida A. A.: *J. Health Pollut.* 9, 191204 (2019).
- Bayen S., Estrada E. S., Juhel G., Kelly B. C.: *Bioanal. Chem.* 407, 5553 (2015).
- Patiri G. F.: *Heavy metals and pesticide residues as quality determinants for sustainable management of prawns along the Indian coastline of Tanzania. Dizertačná práca*. Nelson Mandela African Institution of Science and Technology, Pretória 2020.
- Soltani N., Moore F., Keshavarzi B., Sorooshian A., Javid R.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 173, 251 (2019).
- Azzouz A., Colón L. P., Souhail B., Ballesteros E.: *Environ. Res.* 178, 108727 (2019).
- Zhang H., Bayen S., Kelly B. C.: *Talanta* 143, 7 (2015).
- Akinsanya B., Adebusoye S. A., Alinson T., Ukwu U. D.: *J. Basic Appl. Zool.* 79, 40 (2018).
- Liu W. X., Wang Y., He W., Qin N., Kong X. Z., He Q. S., Yang B., Yang C., Jiang Y. J., Jorgensen S. E., Xu F. L.: *Ecol. Indic.* 60, 335 (2016).
- Luna-Acosta A., Budzinski H., Le Menach K., Thomas-Guyon H., Bustamante P.: *Sci. Total Environ.* 514, 500 (2015).
- Qadeer A., Liu M., Yang J., Liu X., Khalil S. K., Huang Y., Habibullah-al-Mamun M., Gao D., Yang Y.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 178, 17 (2019).
- Keshavarzifard M., Vazirzadeh A., Sharifinia M.: *Mar. Pollut. Bull.* 159, 111463 (2020).
- Ziarrusta H., Olivares M., Delgado A., Posada-Ureta O., Zuloaga O., Etxebarria N.: *J. Chromatogr. A* 1391, 18 (2015).
- Kaur R., Mavi G. G., Raghav S.: *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 8, 1889 (2019).

K. Rusiňáková^a, M. Kirchner^b, and S. Hrouzková^a
(*Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Bratislava, Slovakia, ^aWater Research Institute, Bratislava, Slovakia*): **Analytical Methods for the Detection of Contaminants in Crustaceans and Mollusks**

The paper overviews analytical methods for the detection of a variety of contaminants, such as pesticide residues, polyaromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, etc. in environmental samples – crustaceans and mollusks. Complexity of analyzed samples requires a sophisticated sample preparation: mostly two-step procedures include an extraction followed by a clean-up of the extract. QuEChERES technique complies with the requirements of the green analytical chemistry and is preferred for the isolation of pesticide residues. Polyaromatic hydrocarbons are extracted from samples utilizing Soxhlet extraction. For the isolation of a variety of contaminants, liquid-liquid extraction, ultrasound assisted and microwave assisted extraction, accelerated solvent extraction as well as matrix solid phase dispersion are employed. Because of the com-

plexity of samples, a clean-up by sorbents or gel permeation chromatography are used. For the separation, gas or liquid chromatography connected with a variety of detectors may be used. However, mass spectrometry or tandem mass spectrometry are indispensable at present. Numerous real-life findings show the necessity of application of analytical methods to inspect the products.

Keywords: cleaning the extract, GC-MS, contaminants, crustaceans, mollusks, PAH, QuEChERES, pesticide residues

- Rusiňáková K., Kirchner M., Hrouzková S.: Chem. Listy 116, 481–493 (2022).
- <https://doi.org/10.54779/chl20220481>

Acknowledgements

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the Contract No. APVV-19-0149. The work was supported by the Scientific Grant Agency of the Ministry of Education of the Slovak Republic (VEGA project no. 1/0412/20).