	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10600.1 – Stanovení obsahu reziduí pesticidů metodou LC-MS	Vydání	1
		Revize	4

STANOVENÍ OBSAHU REZIDUÍ PESTICIDŮ METODOU LC-MS

1 Rozsah a účel

Postup je určen pro analýzu reziduí účinných látek přípravků na ochranu rostlin v rostlinném materiálu a krmných směsích s různým obsahem vody i tuku v sušině vzorku. Postup je vhodný i pro další ověřené matrice (kůra, půda, postřikové kapaliny). Obsah široké škály účinných látek pesticidních přípravků se stanoví hmotnostní spektrometrií ve spojení s kapalinovou chromatografií.


2 Princip

Vzorek smočený dostatečným přídatkem vody se extrahuje vytřepáním do acetonitrilu. pH směsi se upraví přídatkem pufovacích solí, intenzivně se protřepe a organická fáze se rozsadí odstředěním. Extrakt se zanalyzuje metodou LC-MS.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, nejlépe kvality pro reziduální analýzu. Rozpouštědla musejí být vhodná pro HPLC analýzu. Dostačující čistota chemikálií, sorbentů a rozpouštědel se testuje proměřením slepého vzorku.

- 1 Voda, H₂O, ultračistá.
- 2 Acetonitril, CH₃CN.
- 3 Metanol, CH₃OH.
- 4 Kyselina octová, CH₃COOH, koncentrovaná.
- 5 Kyselina mravenčí, CHOOH, koncentrovaná.
- 6 Kyselina mravenčí, CHOOH, 5% roztok.
Příprava: Rozpustí se 0,5 ml koncentrované CHOOH (5) v 10 ml acetonitrilu (2).
- 7 Mobilní fáze A, vodná.
Příprava: Smíchá se 1000 ml vody (1) a 1 ml kyseliny octové (4) nebo mravenčí (5).
- 8 Mobilní fáze B, organická.
Příprava: Smíchá se 1000 ml metanolu (3) a 1 ml kyseliny octové (4) nebo mravenčí (5).
- 9 Síran hořečnatý bezvodý, MgSO₄, vyžíhaný 6 h při 550 °C.
- 10 Chlorid sodný, NaCl, vyžíhaný 6 h při 550 °C.
- 11 Dvojsodná sůl kyseliny citronové, HOC(COOH)(CH₂COONa) . 1,5 H₂O.
- 12 Trojsodná sůl kyseliny citronové, HOC(COONa)(CH₂COONa) . 2 H₂O.
- 13 Pufovací směs pro úpravu pH vzorku (acetonitril + voda) na pH 5 až pH 5,5.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10600.1 – Stanovení obsahu reziduí pesticidů metodou LC-MS	Vydání	1
		Revize	4

Příprava: Do vialky se naváží 4 g ± 0,2 g MgSO₄ (9), 1 g ± 0,05 g NaCl (10), 1 g ± 0,05 g trojsodné soli kyseliny citronové (12) a 0,5 g ± 0,03 g dvojsodné soli (11).

14 Standardy pesticidů.

Certifikované analytické standardy se kupují v pevném stavu s deklarovanou čistotou. Seznam validovaných pesticidů je uveden v aktuální příloze k osvědčení o akreditaci NRL, ÚKZÚZ.

15 Zásobní roztoky pesticidů.

Pro každý analyt se připraví zásobní roztok o přesné koncentraci 1 mg/ml acetonitrilu, případně metanolu. Navažuje se alespoň 10 mg s přesností na 5 desetinných míst, navážka se přepočte na deklarovanou čistotu standardu a přidá se příslušné množství rozpouštědla. Roztoky se uchovávají v zatěsněné skleněné vialce a jejich stabilita se pravidelně ověřuje.

16 Pracovní roztoky pesticidních směsí.

Pracovní směsné roztoky se připraví ředěním zásobních roztoků dle požadovaného rozsahu analýzy obvykle o koncentraci 10 µg/ml acetonitrilu.

17 Matricové kalibrační směsi.

Analyty ve standardní směsi mohou být významně ovlivněny přítomností matričních koextraktů a jejich odezva na detektoru může být výrazně odlišná oproti standardu v čistém rozpouštědle. Pro spolehlivou kvantifikaci analytů v přítomnosti extraktu vzorku je vhodné použít matricové kalibrační standardy, které se připraví ředěním pracovních směsných roztoků extraktem požadované matrice, přičemž obsah této matrice by měl být minimálně 80 %.

18 Standardní směs pro kontrolu kvality (QC), roztok v acetonitrilu, c = 10 µg/ml.

Směs vybraných analytů (z různých skupin chemických sloučenin) a vnitřního standardu.

19 Vnitřní standardy (ISTD), roztok v acetonitrilu, koncentrace c = (2,5 - 10) µg/ml, např.: D10-diazinon, D10-chlorpyrifos, D6-tebuconazol, D5-pendimethalin, tris-(1,3-dichloro-isopropyl)fosfát.

20 Hydroxid sodný, NaOH.

21 Hydroxid sodný, NaOH, roztok c = 5 mol/l.

Příprava: 2 g NaOH (20) se rozpustí v malém množství vody (1) a doplní se do 10 ml.

22 Kyselina sírová, H₂SO₄, koncentrovaná.


23 Kyselina sírová, H₂SO₄, roztok c = 2,5 mol/l.

Příprava: 1,39 ml H₂SO₄ (22) se rozpustí v 10 ml vody (1).

24 Sorbent typu primární sekundární amin, např. Bondesil-PSA, (Varian), PSA (Supelco).

25 Sorbent typu C18-silikagel, např. ODS (Supelco).

26 GCB sorbent (Graphitized Carbon Black), např. Supelclean Envi-Carb (Supelco).

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10600.1 – Stanovení obsahu reziduí pesticidů metodou LC-MS	Vydání	1
		Revize	4


- 27 Směs GCB + MgSO₄:
Příprava: Smíchá se 1 díl GCB (27) s 19 díly MgSO₄ (9).
- 28 Sorpční směsi pro disperzní SPE.
- Směs P1 (základní):
Příprava: 50 mg PSA (25) + 300 mg MgSO₄ (9) na 2 ml extraktu (5.4).
- Směs P2 (směs s GCB):
Příprava: 50 mg PSA (25) + 300 mg GCB (28) na 2 ml extraktu (5.4).
- Směs P3 (směs s GCB a ODS):
Příprava: 10 mg ODS (26) + 50 mg PSA (25) + 300 mg GCB (28) na 2 ml ext. (5.4).
- Směs P1/2 (směs s ODS):
Příprava: 50 mg ODS (26) + 50 mg PSA (25) + 300 mg MgSO₄ (9) na 2 ml ext. (5.4).
- Směs P1/3 (směs s vyšším obsahem PSA):
Příprava: 300 mg PSA (25) + 300 mg MgSO₄ (9) na 2 ml extraktu (5.4).
- Směs P1/4 (směs s vyšším obsahem PSA):
Příprava: 100 mg PSA (25) + 300 mg MgSO₄ (9) na 2 ml extraktu (5.4).
- Směs P3/2 (směs s GCB a vyšším obsahem ODS):
Příprava: 50 mg ODS (26) + 50 mg PSA (25) + 300 mg GCB (28) na 2 ml ext. (5.4).

Poznámky

- Vnitřní standardy se volí dle požadavků analýzy a slouží ke kontrole retenčních časů, výtěžnosti a/nebo ke kvantifikaci obsahu stanovovaných analytů.*
- Tato metoda zahrnuje práci s toxickým a zdraví škodlivým materiálem, proto je třeba při pracovním postupu dodržovat odpovídající opatření dle bezpečnostních listů.*

4 Přístroje a pomůcky

- Kapalinový chromatograf s hmotnostní spektrometrem, LC-MS/MS, např.:
ACQUITY UPLC-TQXS MS Xevo (Waters),
LC-MS Agilent 6420 (Agilent Technologies).
- Separáční kolona, např.:
ACQUITY UPLC BEH C18, 50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters),
ACQUITY UPLC BEH C18, 100 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters),
ACQUITY BEH C18 VanGuard, 5 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters),
Zorbax Eclipse Plus RRHD C18, 1,8 μm, 100 mm × 2,1 mm.
- Analytické váhy.
- Nožový mlýn, vysokorychlostní dispergační zařízení.
- Centrifuga s rozsahem otáček nad 3000 ot/min, pro objemy do 100 ml.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10600.1 – Stanovení obsahu reziduí pesticidů metodou LC-MS	Vydání	1
		Revize	4

- 6 Centrifugační zkumavky s víčkem, PP, 1,5 ml, 15 ml; 50 ml.
- 7 Muflová pec s T min do 550 °C.
- 8 Ultrazvuková lázeň.
- 9 Vialky skleněné, šroubovací, objemy 2 ml, 4 ml, 20 ml.
- 10 Plastové injekční stříkačky 2 ml, 5 ml.
- 11 Filtrační disky s nylonovou nebo PTFE membránou s velikostí pórů 0,22 µm.
- 12 Běžné laboratorní vybavení (automatické pipety; pipetovací nástavec pro přesné dávkování rozpouštědla, skleněné Pasteurovy pipetky) a laboratorní sklo.
- 13 Vertikální třepačka s nastavitelnou frekvencí kmitů, min 500 kmitů/min, držáky pro 50ml a 15ml centrifugační zkumavky, např.: Geno/Grinder 2010 (SPEX Sample Prep).

5 Postup

5.1 Předúprava vzorku

Vzorky se zpracovávají v den doručení do laboratoře. Není-li to možné, uchovávají se tak, aby se zabránilo jejich degradaci a úbytku analytů. Vhodné je zamražení vzorku. Je-li třeba, objem vzorku se zmenší kvartací.

Pro zajištění dostatečné homogenity se vzorek rozmělní v nožovém mlýnu, nejlépe s přídatkem suchého ledu nebo ve zmrzlém stavu.

Poznámky

3 *Netypické vzorky se skladují vhodným způsobem. Suché a homogenizované půdy lze uložit v suchu a temnu při laboratorní teplotě. Postřikové kapaliny (jícha) se extrahují v den dodání do laboratoře a extrakt je do dalšího zpracování zamražen. Zbytek vzorku se uchovává v ledničce.*


5.2 Extrakce

Homogenní vzorek se naváží do 50ml centrifugační zkumavky. V případě vzorku s vyšším obsahem vody se naváží 10 g ± 0,1 g, pro vzorky suché 5 g ± 0,05 g nebo 2,5 g ± 0,03 g, pro matrice poskytující bohatý extrakt se naváží (1 – 2) g ± 0,02 g. Ze vzorku postřikové kapaliny se pipetuje 1 ml.

Ke vzorkům s obsahem vody < 80 % se přidá voda (1) tak, aby její celkový obsah ve vzorku byl přibližně 10 g, ale vždy je nutné, aby vzorek byl vodou plně smočen. Podrobný přehled vhodného zpracování vzorku ovoce a zeleniny je uveden v ČSN EN 15662 (1), vzorové příklady pro běžné matrice vzorku jsou v tabulce 1.

K navážce vzorku se přidá 10 ml acetonitrilu (2) a definované malé množství roztoku vnitřního standardu, obsahující jeden nebo více ISTD (19) o určité koncentraci.

Zkumavka se uzavře a intenzivně se třepe 2 min., ručně nebo ve třepačce (13). Suché matrice s přídatkem vody se třepou 15 min.

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10600.1 – Stanovení obsahu reziduí pesticidů metodou LC-MS	Vydání	1
		Revize	4

Poznámky

- 4 *Není-li rozmělnění vzorku dostatečné, extrahuje se za pomoci dispergátoru přímo ve zkumavce 2 min při vysoké rychlosti. Obsahuje-li již vzorek přídavek ISTD, není nutné ulpělý vzorek z dispergačního nástavce oplachovat. Ale po každém použití musí být nástavec důkladně vyčištěn, aby se zabránilo znečištění následujícího vzorku. Vzorky obsahující vodu by měly být extrahovány ve zmrzlém stavu nebo v průběhu rozmrazování. Je-li vzorek extrahován při laboratorní teplotě, je nutné se ujistit, že nedochází k významnému rozkladu cílových analytů.*

5.2.1 Extrakce s hydrolyzou


Pro celkové uvolnění esterů a konjugátů kyselých pesticidů (např.: 2,4-D, Clopyralid, Dichlorprop, Fluazifop, Fluroxypyr, Haloxyfop, MCPA) je nutná alkalická hydrolyza vzorku. K naváženému vzorku se před extrakcí přidá voda (1) a (0,3 – 2) ml pracovní roztok NaOH (21), což vytvoří pH \approx 12. Zkumavka se intenzivně protřepává 1 minutu a potom se nechá stát 30 min s občasným protřepáním. Následně se provede neutralizace přidáním (0,3 – 1) ml roztoku kyseliny sírové (23). Po přidavku 10 ml acetonitrilu (2) se vzorek extrahuje již standardním postupem.

5.3 Vysolení extraktu

K suspenzi vzorku se přidá připravená pufovací směs (13) a vymražený míchací kamínek, zkumavka se uzavře a 1 min se intenzivně protřepává a průběžně se chladí ponořením do ledové tříště. Před odstředěním (5 min při \geq 3000 ot/min) se zchlazená směs intenzivně 1 min protřepe. Acetonitrilová vrstva supernatantu se převede do 15ml centrifugací zkumavky a uloží se alespoň na 2 h do mrazicího boxu. Spolu s hlavním podílem tukových a voskových koextraktů se vysrážejí i další látky omezeně rozpustné v acetonitrilu, např. cukry. Zkumavka se krátce odstředí (5 min při \geq 3000 ot/min) a 0,5 ml extraktu se převede do 1,5ml centrifugační zkumavky. Přidá se 0,49 ml vody (1) a 10 μ l 5% kyseliny mravenčí v acetonitrilu (6). Naředěný extrakt se promíchá a zfiltruje se přes filtrační disk (11) do 2ml vialky ke koncové analýze.

Poznámky

- 5 *Síran hořečnatý ve vodném roztoku má tendenci tvořit hrudky, které rychle ztvrdnou. Proto je nutné bezprostředně po přidavku solí (13) obsah zkumavky dobře protřepat. 1min extrakce může být potom provedena pro celou dávku vzorků. Obsah zkumavek se po přidavku pufovacích solí zahřívá a je vhodné vzorky po prvotním roztrpání krátce ochladit v ledové tříšti.*
- 6 *Acetonitrilový extrakt je možno v některých případech analyzovat bez vymražení a ředění.*
- 7 *Acetonitrilový extrakt po vymražení není nutné dále čistit. V případě potřeby je možné extrakt dočistit pomocí disperzní SPE, vhodné varianty postupu jsou podrobně uvedeny v ČSN EN 15662 (1).*

	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10600.1 – Stanovení obsahu reziduí pesticidů metodou LC-MS	Vydání	1
		Revize	4

Tabulka 1. Příklady podmínek extrakce a čištění pro jednotlivé matrice


Matrice	Navážka (g)	Voda (ml)	Třepání (min)	D-SPE
Obiloviny, rýže a jejich produkty	5	10	15	P1
Med	5	10	15	P1
Otruby	5	10	15	P1/4
Oves	5	10	15	P1/3
Luštěniny, sójové boby, kukuřice, ostropestřec	5	10	15	P2
Krmná směs, olejninu a jejich šrotu	5	10	15	P1/2
Zelenina listová, kořenová (petržel, mrkev)	10	0	2	P2
Cuketa, cibule, celer, brambory, rajčata	10	0	2	P1
Ovoce, hrozny, džus, sirup	10	0	2	P1
Rostliny (listy, dřevnaté stonky)	5	10	2	P2
Listy (réva, stromy)	5	7	2	P2
Keře (túje, jehličnany)	5	7	15	P3/2
Kůra	1	10	15	P3/2
Seno	1	10	15	P2
Sláma	2,5	10	15	P1
Rybí moučka	5	10	15	P1/2
Sušené mléko, sladový květ	2	10	15	P1
Vojtěšková moučka	2	10	15	P2
Mák, kmín, semena	2	10	15	P1/2
Cukrovarské řízky	2	15	15	P2
Půda	5	10	15	P1
Postřiková kapalina (jícha)	1	9	2	-

5.4 LC-MS stanovení

Extrakty převedené do 2ml vialky se analyzují metodou LC-MS ve vhodné sekvenci vzorků a standardů.

V případě významného nálezu reziduí pesticidů se použije metoda standardního přídavku ke vzorku pro přesnější kvantifikaci obsahu.

Měření může být provedeno na odlišných přístrojích a na různých analytických kolonách, za předpokladu dosažení uspokojivých výsledků.

	Národní referenční laboratoř	Strana	7
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10600.1 – Stanovení obsahu reziduí pesticidů metodou LC-MS	Vydání	1
		Revize	4

Vhodná je confirmace výsledků proměřením extraktů metodou GC-MS.

6 Kontrola kvality

Požadavky na zajištění kvality reziduálních analýz pesticidů jsou podrobně popsány v dokumentu DG SANTE (2).

Zkouška na přítomnost interferencí (slepý pokus): Připraví se procesní slepý pokus a slepý pokus s matricí bez přítomnosti sledovaných analytů. Chromatogram slepých vzorků nesmí obsahovat významné interferující píky v retenčním čase pro jednotlivé stanovované látky.

Kontrola kvality pomocí ISTD: Ztráty ISTD během extrakce a čištění vedou k nadhodnocení obsahu stanovovaných analytů a tato chyba výrazně převyšuje ostatní zdroje chyb. Pro matricový efekt při LC aplikacích je typické zesílení signálu a má za následek podhodnocení výsledku.

Kontrola kvality pomocí obohacených vzorků: Pro tento účel lze využít vzorek se zanedbatelným obsahem zájmových analytů, který se obohatí přídatkem pesticidů na relevantních hladinách, tj. hladina odpovídající reporting limitu nebo jeho násobku, případně na hladině maximálního reziduálního limitu. Povolený rozsah výtěžnosti při rutinní kontrole kvality je 60 % až 140 %.

Kontrola kvality pomocí interních referenčních materiálů: Pro tento účel lze využít vzorky získané při účasti v testech způsobilosti pořádaných EURL pro rezidua pesticidů, uchovávané v zamrazeném stavu.

7 Výpočet a vyjádření výsledků

7.1 Identifikace


Pro potvrzení přítomnosti analytu ve vzorku lze použít více parametrů:

- Retenční čas (RT) analytu, lépe jeho relativní čas (RRT), vztažený na ISTD.
- Charakteristický tvar píku analytu.
- Charakteristický poměr sledovaných hmot fragmentů v MS spektru. Dostačující jsou 2 SRM přechody pro MS/MS a sledování 3 hmot v MS (SIM).

Parametry pro identifikaci jednotlivých analytů se získají proměřením analytických standardů (přednostně z matricového standardu). Pro vyšší stupeň jistoty může být provedeno konfirmační stanovení za jiných chromatografických separačních podmínek nebo se provede kvantifikace s využitím jiného charakteristického iontu.

7.2 Výpočet koncentrace reziduí

Odezvy jednotlivých analytů jsou významně ovlivňovány přítomností koextraktů z matrice vzorku. Pro první orientační stanovení úrovně reziduí pesticidů ve vzorku lze použít kalibrační standard v čistém rozpouštědle, tyto výsledky lze použít i pro kvantifikaci, pokud bylo předchozími experimenty prokázáno, že nedochází k výraznému ovlivnění analytu matricí. V případě významného nálezu (např. podezření na překročení povolené hodnoty MRL) musí být použit matricový standard a nebo metoda standardního přídatku.

	Národní referenční laboratoř	Strana	8
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10600.1 – Stanovení obsahu reziduí pesticidů metodou LC-MS	Vydání	1
		Revize	4

Metoda matricové kalibrace

Kalibrační funkce se sestrojí pro každou účinnou látku vynesemím koncentrací různých kalibračních bodů proti relativní odezvě látky, vztažené na ISTD. Pro výpočet se použije výpočtový software příslušného přístroje.

Kvantifikace bez použití ISTD je možná, pokud bylo prokázáno, že dosažená přesnost a správnost stanovení je stále v povoleném rozmezí. V takovém případě se předpokládá, že objem acetonitrilové fáze po extrakci je stejný jako objem acetonitrilu přidaného ke vzorku.

Metoda standardního přídatku ke vzorku

V případě podezření na překročení povoleného obsahu reziduí ve vzorku a nebo v matici o které je známo, že způsobuje výrazný matricový efekt, se použije metoda standardního přídatku ke vzorku, za předpokladu lineární závislosti odezvy na koncentraci v daném koncentračním rozsahu.

Připravený extrakt vzorku se rozdělí na několik dílčích podílů, které se obohatí vzrůstajícím známým množstvím cílového analytu. Tento postup předpokládá znalost očekávané úrovně reziduí analytu z předchozí orientační analýzy.

7.3 Konfirmační zkoušky

Konfirmace kvantity zahrnuje analýzu druhé navážky vzorku v případě, že první analýza ukazuje na možné překročení povoleného obsahu reziduí (MRL).

8 Validační data

Metoda byla ověřena analýzou obohacených reprezentativních matic na různých koncentračních hladinách. Základní validační parametry, výtěžnost a opakovatelnost stanovení pro většinu pesticidních látek vyhovovaly požadavkům stanoveným v dokumentu DG SANTE (2). Výtěžnost se obvykle pohybovala v povoleném rozmezí 70 % až 120 % a relativní standardní odchylka opakovaného stanovení byla menší než 20 %.

Dosažitelné meze detekce a meze stanovitelnosti pro tuto metodu úzce souvisejí s množstvím stanovovaných parametrů ve vzorku, s citlivostí a selektivitou použitého přístrojového uspořádání, ale jsou dostatečné pro zjištění přítomnosti reziduí pesticidů i na hodnotě 0,01 mg/kg (obvyklá nejnižší hodnota MRL).

Metoda byla ověřena v mezinárodních porovnávacích testech EUPT pořádané EURL pro pesticidy.

9 Literatura

- 1 ČSN EN 15662:2018 Potraviny rostlinného původu – Multimetoda pro stanovení reziduí pesticidů s použitím analýzy založené na GC a LC po extrakci acetonitrilem /separaci a předčištění pomocí disperzní SPE – Modulární metoda QuEChERS.
- 2 DG-SANTE, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed, Document SANTE/11813/2017.