	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10605.1 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů metodou LC-MS	Vydání	1
		Revize	1

STANOVENÍ OBSAHU REZIDUÍ POLÁRNÍCH PESTICIDŮ METODOU LC-MS

1 Rozsah a účel

Postup je určen pro analýzu reziduí účinných látek přípravků na ochranu rostlin v obilovinách, olejninách a dalších krmných surovinách a ostatním rostlinném materiálu. Obsah reziduí polárních pesticidů se stanoví kapalinovou chromatografií ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS).


2 Princip

Vzorek smočený dostatečným přídavkem vody se extrahuje vytřepáním do methanolu okyseleného 1% kyselinou mravenčí. Homogenát se odstředí a poté se alikvot supernatantu zfiltruje. Filtrát se analyzuje pomocí LC-MS/MS po ionizaci elektrosprejem v pozitivním módu v režimu sledování vybraných přechodů (MRM). Stanovení obsahu se provádí metodou isotopového ředění.


3 Chemikálie

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

- 1 Voda (ultračistá).
- 2 Methanol, CH₃OH.
- 3 Kyselina mravenčí, HCOOH.
- 4 Extrakční činidlo HCOOH v methanolu, 1% roztok.
Příprava: 1 ml HCOOH (3) se rozpustí ve 100 ml CH₃OH (2).
- 5 Mravenčan amonný, HCOONH₄, roztok, c(HCOONH₄) = 2 mol/l.
Příprava: 3,1525 g HCOONH₄ se rozpustí v 25 ml ultračisté vody (1).
- 6 Mobilní fáze A: 2 mM vodný roztok HCOONH₄ upravený na pH 3.
Příprava: Ve 250 ml odměrné baňce se rozpustí 0,9 ml HCOOH (3) a 0,25 ml 2M HCOONH₄ (5).
- 7 Mobilní fáze B: acetonitril, CH₃CN.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10605.1 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů metodou LC-MS	Vydání	1
		Revize	1

- 8 Standardy pesticidů.
 Certifikované analytické standardy se kupují v pevném stavu s deklarovanou čistotou.
 Chlormequat chlorid ($C_5H_{13}Cl_2N$) CAS [999-81-5]
 Mepiquat chloride ($C_7H_{16}ClN$) CAS [24307-26-4]
- 9 Zásobní roztoky pesticidů.
 Zásobní roztok chlormequatového kationtu o $c = 1$ mg/ml se připraví rozpuštěním 12,98 mg chlormequat chloridu (8) v 10 ml methanolu (2).
 Zásobní roztok mepiquatového kationtu o $c = 1$ mg/ml se připraví rozpuštěním 13,2 mg mepiquat chloridu (8) v 10 ml methanolu (2).
 Roztoky se uchovávají v zatěsněné skleněné vialce při minus 18 °C a jejich stabilita se pravidelně ověřuje.
- 10 Pracovní směsný roztok chlormequatu a mepiquatu o $c = 10$ µg/ml.
 Příprava: 100 µl zásobního roztoku chlormequatu o $c = 1$ mg/ml (9) se smíchá s 100 µl zásobního roztoku mepiquatu o $c = 1$ mg/ml (9) a doplní v 10 ml odměrné baňce methanolem (2) po rysku.
- 11 Pracovní směsný roztok chlormequatu a mepiquatu o $c = 1$ µg/ml.
 Příprava: 80 µl pracovního směsného roztoku (10) se smíchá s 720 µl methanolu (2).
- 12 Pracovní směsný roztok chlormequatu a mepiquatu o $c = 0,1$ µg/ml.
 Příprava: 80 µl pracovního směsného roztoku (11) se smíchá s 720 µl methanolu (2).
- 13 Vnitřní isotopově značené standardy (ISTD).
 Chlormequat chlorid D4, $c(C_5H_9Cl_2ND_4) = 100$ µg/ml D_2O .
 Mepiquat jodid D3 (methyl D3), $c(C_7H_{13}IND_3) = 100$ µg/ml D_2O .
- 14 Pracovní roztok ISTD pro obohacení vzorku před extrakcí o $c = 10$ µg/ml.
 Příprava: 130 µl standardu chlormequat chloridu D4 o $c = 100$ µg/ml D_2O (13) se smíchá s 205 µl mepiquat jodidu D3 o $c = 100$ µg/ml D_2O (13) a 665 µl methanolu (2).
- 15 Pracovní roztok ISTD pro obohacení extraktu a kalibračních standardů o $c = 1$ µg/ml.
 Příprava: 80 µl pracovního roztoku ISTD (14) smíchá s 720 µl methanolu (2).
- 16 Kalibrační pesticidní roztoky.
 Kalibrační pesticidní roztoky se připraví smísením pracovních roztoku pesticidů (10, 11, 12) a vnitřních isotopově značených standardů (15), viz. tabulka 1.
- 17 Interní referenční materiál: vzorky získané v rámci účasti v EUPT-C.


	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10605.1 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů metodou LC-MS	Vydání	1
		Revize	1

Tabulka 1. Příprava kalibračních standardních roztoků.

Kalibrační úroveň	Koncentrace pesticidu (ng/ml)	Koncentrace ISTD ng/ml	Obsah pesticidu (mg/kg)	Obsah ISTD (mg/kg)	Přídavek roztoku pesticidu (μl)	Přídavek roztoku ISTD (μl)	Přídavek matrice, solventu (μl)
1	0	10	0	0,040	0	10 (15)	990
2	1	10	0,004	0,040	10 (12)	10 (15)	980
3	5	10	0,020	0,040	50 (12)	10 (15)	940
4	25	10	0,100	0,040	25 (11)	10 (15)	965
5	100	10	0,400	0,040	10 (10)	10 (15)	980
6	500	10	2,000	0,040	50 (10)	10 (15)	940
7	1500	10	6,000	0,040	150 (10)	10 (15)	840

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Ultraúčinný kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem, např.: ACQUITY UPLC-TQ MS Xevo (Waters), vybavený UPLC kolonou, např.: ACQUITY UPLC BEH HILIC Column, 50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters), ACQUITY BEH HILIC VanGuard, 5 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters).
- 2 Analytické váhy.
- 3 Horizontální třepačka s rychlostí do 300 kmitů/min.
- 4 Centrifuga s rozsahem otáček nad 3000 otáček/min, pro objemy 1 až 100 ml.
- 5 Centrifugační zkumavky polypropylenová (PP) se šroubovacím víčkem, 15 ml; 50 ml.
- 6 Centrifugační zkumavka Eppendorf o objemu 1,5 ml.
- 7 Vysokorychlostní míchadlo, např. Vortex.
- 8 Filtrační materiál: stříkačkové filtry nylonové o velikosti pórů 0,2 μm nebo centrifugační filtrační zkumavky s velikostí pórů nylonových filtrů 0,2 μm.
- 9 Vialky skleněné, šroubovací o objemu 2 ml.
- 10 Běžné laboratorní vybavení (váhy, automatické pipety; pipetovací nástavec pro přesné dávkování rozpouštědla, skleněné Pasteurovy pipetky, hamiltonky) a laboratorní sklo.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10605.1 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů metodou LC-MS	Vydání	1
		Revize	1

5 Postup

5.1 Příprava vzorku

Homogenní vzorek se naváží do 50ml centrifugační zkumavky (5) a smočí se dostatečným přídavkem vody. Například u obilovin, luštěnin a olejnatých semínek se k 5 g vzorku přidá 10 g vody (1). Extrakce se provede 10 ml okyseleného methanolu (4) třepáním po dobu 15 minut při 300 kmitech/minutu. Vzorek se odstředí při 9000 otáčkách/min po dobu 5 minut, supernatant se převede do 15 ml PP zkumavky (5) a nechá se vymrazit. Vymražený extrakt se opět odstředí 5 minut při 3900 otáčkách/min. Přesně 1 ml supernatantu se převede do zkumavky Eppendorf (6) a obohatí se 10 µl ISTD (15). Po promíchání pomocí Vortexu se roztok zfiltruje (8) a převede do vialky (9).

Poznámky

1 Pokud je výtěžnost ISTD v dané matrici v rozsahu 80-120 %, což bylo například potvrzeno u obilovin a olejnin, je možné přidat ISTD až k finálnímu extraktu. V opačném případě je nutné obohacení vzorku 20 µl ISTD (14) před extrakcí.


5.2 UPLC-MS/MS stanovení

Extrakty převedené do 2ml vialky se analyzují metodou UPLC-MS/MS ve vhodné sekvenci vzorků a standardů, kdy se kalibrační standardy zařadí do sekvence před i za stanovovaný vzorek.

Kompletní nastavení přístroje a podmínky měření jsou uvedeny v aktuální měřicí metodě použité přístrojové sestavy. Před analýzou reálných vzorků se ověří citlivost systému analýzou nejnižšího kalibračního bodu a zároveň stabilita retenčního chování v daném chromatografickém systému. Selektivita analýzy je zajištěna využitím MRM módu při MS detekci. Sledované MRM pro chlormequat, mepiquat a ISTD jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2. MRM sledované pro chlormequat, mepiquat a ISTD

Pesticid	Sledované MRM
Chlormequat	122 > 58, 122 > 63, 124 > 58
Mepiquat	114 > 98, 114 > 58, 114 > 99
Chlormequat D4 (ISTD)	126 > 58
Mepiquat D3 (ISTD)	117 > 101

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10605.1 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů metodou LC-MS	Vydání	1
		Revize	1

6 Kontrola kvality

Požadavky na zajištění kvality reziduálních analýz pesticidů jsou uvedeny v dokumentu SANCO/12495/2011.

Zkouška je založena metodě izotopového ředění, tzn. vzorek je obohacen izotopově značeným analogem sledovaného pesticidu (ISTD), který se využívá ke korekci ztrát při přípravě vzorku a eliminaci vlivu matricových interferentů přítomných v daném vzorku. V případě, že je ISTD přidán ke vzorku před extrakcí, je výsledek korigován jak na výtěžnost, tak na matricové efekty. Pokud je výtěžnost sledovaných ISTD v dané matici blíží se 100 %, například u obilovin a olejnin, je možné ISTD přidat k finálnímu extraktu před analýzou pouze pro korekci matricových efektů. Povolený rozsah pro výtěžnost ISTD v jednotlivých vzorcích je 60 až 140 % a pro její výpočet je nutné použití porovnání s odezvou ISTD v matricovém standardu.

Do každé série vzorků se průběžně zařazuje analýza kontrolního vzorku referenčního materiálu nebo obohacené matrice a procesní slepý pokus. Pro tyto kontrolní vzorky se vede a vyhodnocuje regulační diagram.

7 Výpočet a vyjádření výsledků

Přítomnost stanovovaného analytu je potvrzena, pokud je odchylka retenčního času daného pesticidu v chromatogramu vzorku a kalibračního standardu menší než 2,5 % a pokud se poměr produktových iontů ve spektru vzorku nachází v povoleném intervalu daném poměrem těchto produktových iontů ve spektru kalibračních standardů.


Metoda izotopového ředění umožňuje provést kvantifikace vzorku jak pomocí solventových, tak matricových kalibračních standardů. Kalibrační závislost musí vykazovat minimální charakteristiky $RSD < 20\%$ a $R^2 > 0.995$.

V případě podezření na překročení povoleného obsahu reziduí ve vzorku je doporučeno použít metodu standardního přídávku ke vzorku, za předpokladu lineární závislosti odezvy na koncentraci v daném koncentračním rozsahu.

Výsledek pod mezí stanovitelnosti se uvede jako $< RL$ (reporting limit = mez stanovitelnosti), tj. $< 0,008$ mg/kg. Pro hodnoty nad mezí stanovitelnosti se výsledek zaokrouhlí dle tabulky 3.

Tabulka 3. Zaokrouhlování a udávání výsledků.

Hladina reziduí ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Zápis výsledku
< 10	2 platné číslice
> 10	3 platné číslice

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10605.1 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů metodou LC-MS	Vydání	1
		Revize	1

8 Validační data

Postupem daným pro tuto zkoušku byla stanovena výtěžnost a opakovatelnost chlormequatu a mepiquatu, které vyhovovaly požadavkům uvedeným v dokumentu SANCO/12495/2011, tj, výtěžnost byla u všech validačních experimentu v rozmezí 70 až 120 % a relativní standardní odchylka opakovaného stanovení byla menší než 20 %.

Nejnižší validovaná hladina byla 0,008 mg/kg, což je hodnota meze stanovitelnosti nastavená pro zápis výsledků. Tato hladina je minimálně pětkrát nižší než nejnižší hodnota maximálního limitu reziduí pro tyto látky.

9 Literatura

- 1 ČSN EN 15055 Potraviny s nízkým obsahem tuku – Stanovení chlormequatu a mepiquatu – Metoda LC-MS/MS.
- 2 EURL-SRM QuPPE Method Version 6 – Quick Method for the Analysis of Residues of Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin Involving Simultaneous Extraction with Methanol and LC-MS/MS Determination.
- 3 Dokument SANCO/12495/2011 – Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.