	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10605.2 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů metodou LC-MS	Strana	1
		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 nebo negativním módu v režimu sledování vybraných přechodů (MRM). Obsah reziduí polárních pesticidů se stanoví metodou isotopového ředění nebo metodou externí kalibrace, případně standardního přídavku.

3 Chemikálie

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

1 Voda (ultračistá).

2 Methanol, CH₃OH.

3 25% methanol ve vodě.

Příprava: 100 ml methanolu (2) se v kádince smíchá s 300 ml ultračisté vody (1).

4 Kyselina mravenčí, HCOOH.

5 Extrakční činidlo, kyselina mravenčí v methanolu, 1% roztok.


Příprava: Do 500ml odměrné baňky se napipetuje 5 ml kyseliny mravenčí (4) a doplní se methanolem (2) po značku.

6 Roztok vody a 1% kyseliny mravenčí v methanolu (1 : 1).


Příprava: V asi 50ml kádince se smíchá 10 ml ultračisté vody (1) a 10 ml 1% roztoku kyseliny mravenčí v methanolu (5).

7 Mravenčan amonný, HCOONH₄, roztok, c(HCOONH₄) = 2 mol/l.

Příprava: 3,1525 g mravenčanu amonného se rozpustí v 25 ml ultračisté vody (1).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10605.2 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů metodou LC-MS	Revize	1


- 8 Kyselina octová, CH₃COOH.
- 9 Mobilní fáze A (kváty): 2 mM vodný roztok mravenčanu amonného, upravený na pH 3.
 Příprava: Ve 250ml odměrné baňce se rozpustí 0,9 ml kyseliny mravenčí (4) a 0,25 ml 2M roztoku mravenčanu amonného (7) a doplní vodou (1) po značku.
- 10 Mobilní fáze B (kváty): acetonitril, CH₃CN.
- 11 Mobilní fáze A (glyfosát): 5% methanol ve vodě, modifikátor 1% kyselina octová.
 Příprava: V 500ml odměrné baňce se rozpustí 25 ml methanolu (2) a 5 ml kyseliny octové (8) a doplní vodou (1) po značku.
- 12 Mobilní fáze B (glyfosát): 1% roztok kyseliny octové v methanolu.
 Příprava: Ve 500 ml odměrné baňce se rozpustí 5 ml kyseliny octové (8) a doplní methanolem (2) po značku.
- 13 Standardy pesticidů.
 Používají se pevné nebo kapalné standardy s deklarovanou čistotou od ověřeného výrobce.
 Chlormequat chloride (C₅H₁₃Cl₂N) CAS [999-81-5].
 Mepiquat chloride (C₇H₁₆ClN) CAS [24307-26-4].
 Glyphosate (C₃H₈NO₅P) CAS [1071-83-6].
 Aminomethyl phosphonic acid (CH₆NO₃P) CAS [1066-51-9].
- 14 Zásobní roztoky pesticidů.
 Příprava zásobního roztoku chlormekvátového kationtu, c = 1 mg/ml: Rozpustí se 12,98 mg chlormekvát chloridu (13) v 10 ml methanolu (2). Roztok se uchovává v těsně uzavřené skleněné vialce při minus 18 °C.
 Příprava zásobního roztoku mepikvátového kationtu, c = 1 mg/ml: Rozpustí se 13,2 mg mepikvát chloridu (13) v 10 ml methanolu (2). Roztok se uchovává v těsně uzavřené skleněné vialce při minus 18 °C.
 Příprava zásobního roztoku glyfosátu, c = 1 mg/ml: Do 10ml odměrné baňky se rozpustí 10 mg glyfosátu (13) v 25% methanolu (3). Zásobní roztok glyfosátu se uchovává v těsně uzavřené plastové vialce při 4 °C.
 Zásobní roztok AMPA, c = 1 mg/ml. Používá se roztok od ověřeného výrobce.
 Zásobní roztok AMPA se uchovává v těsně uzavřené plastové vialce při 4 °C.
- 15 Pracovní směsný roztok glyfosátu a AMPA, c = 100 µg/ml.
 Příprava: 500 µl zásobního roztoku glyfosátu, c = 1 mg/ml (14) se smíchá s 500 µl roztoku AMPA, c = 1 mg/ml (14) a doplní se v 5ml odměrné baňce roztokem vody a 1% kyseliny mravenčí v methanolu (6).
- 16 Pracovní směsný roztok glyfosátu a AMPA, c = 10 µg/ml.
 Příprava: Do plastové vialky se pipetuje 80 µl pracovního směsného roztoku (15) a 720 µl roztoku vody a 1% kyseliny mravenčí v methanolu (6).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10605.2 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů metodou LC-MS	Revize	1

- 17 Pracovní směsný roztok chlormekvátu a mepikvátu, $c = 10 \mu\text{g/ml}$.
 Příprava: 100 μl zásobního roztoku chlormekvátu, $c = 1 \text{ mg/ml}$ (14) se smíchá s 100 μl zásobního roztoku mepikvátu, $c = 1 \text{ mg/ml}$ (14) a doplní v 10 ml odměrné baňce methanolem (2) po značku.
- 18 Pracovní směsný roztok chlormekvátu a mepikvátu, $c = 1 \mu\text{g/ml}$.
 Příprava: Do plastové vialky se pipetuje 80 μl pracovního směsného roztoku (17) a 720 μl methanolu (2).
- 19 Pracovní směsný roztok chlormekvátu a mepikvátu, $c = 0,1 \mu\text{g/ml}$.
 Příprava: 80 μl pracovního směsného roztoku (18) se smíchá s 720 μl methanolu (2).
- 20 Vnitřní isotopově značené standardy (ISTD). Používají se standardy od ověřeného výrobce.
 Chlormequat chloride D4, $c(\text{C}_5\text{H}_9\text{Cl}_2\text{ND}_4) = 100 \mu\text{g/ml D}_2\text{O}$.
 Mepiquat iodide D3 (methyl D3), $c(\text{C}_7\text{H}_{13}\text{IND}_3) = 100 \mu\text{g/ml D}_2\text{O}$.
- 21 Pracovní roztok ISTD pro obohacení vzorku před extrakcí, $c = 10 \mu\text{g/ml}$.
 Příprava: 130 μl standardu chlormekvát chloridu D4, $c = 100 \mu\text{g/ml D}_2\text{O}$ (20) se smíchá s 205 μl mepikvát jodidu D3, $c = 100 \mu\text{g/ml D}_2\text{O}$ (20) a 665 μl methanolu (2).
- 22 Pracovní roztok ISTD pro obohacení extraktu a kalibračních standardů, $c = 1 \mu\text{g/ml}$.
 Příprava: 80 μl pracovního roztoku ISTD (21) smíchá s 720 μl methanolu (2).
- 23 Kalibrační roztoky pesticidů.
 Příprava: Smísí se pracovní roztoky pesticidů (15) až (19) a vnitřních isotopově značených standardů (22), podle tabulek 1 a 2.
- 24 Interní referenční materiál: vzorky získané v rámci účasti v EUPT-C.

Tabulka 1. Příprava kalibračních standardních roztoků (kváty).

Kalibrační úroveň	Konc. pesticidu (ng/ml)	Konc. 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 (22)	990
2	1	10	0,004	0,040	10 (19)	10 (22)	980
3	5	10	0,020	0,040	50 (19)	10 (22)	940
4	25	10	0,100	0,040	25 (18)	10 (22)	965
5	100	10	0,400	0,040	10 (17)	10 (22)	980
6	500	10	2,000	0,040	50 (17)	10 (22)	940
7	1500	10	6,000	0,040	150 (17)	10 (22)	840


	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10605.2 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů metodou LC-MS	Strana	4
		Vydání	1
		Revize	1

Tabulka 2. Příprava kalibračních standardních roztoků (glyfosát).

Kalibrační úroveň	Koncentrace pesticidu (ng/ml)	Přídavek roztoku pesticidu (μl)	Přídavek solventu (6) (μl)	Přídavek matrice/solventu (μl)
1	50	5 (16)	95	900
2	100	10 (16)	90	900
3	500	50 (16)	50	900
4	2 500	25 (15)	75	900
5	5 000	50 (15)	50	900
6	10 000	100 (15)	-	900

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem, např.:
 ACQUITY UPLC-TQ MS Xevo (Waters) nebo LC-MS/MS 6420 (Agilent), vybavený:
 - a) UPLC kolonou (kváty), 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),
 - b) HPLC kolonou (glyfosát), např.:
 HYPERCARB, 100 mm × 2,1 mm × 5 μm (Thermo).
- 2 Analytické váhy.
- 3 Horizontální třepačka, 300 kmitů/min.
- 4 Centrifuga, 3900 ot/min a 5000 ot/min, 1 ml až 100 ml.
- 5 Centrifugační zkumavky plastové se šroubovacím víčkem, 15 ml; 50 ml.
- 6 Centrifugační zkumavka Eppendorf, 1,5 ml.
- 7 Vysokorychlostní míchadlo, např. Vortex.
- 8 Filtrační materiál: stříkačkové filtry nylonové a PTFE o velikosti pórů 0,2 μm a 0,45 μm nebo centrifugační filtrační zkumavky s velikostí pórů nylonových filtrů 0,2 μm.
- 9 Vialky skleněné a plastové, šroubovací, 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 Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10605.2 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů metodou LC-MS	Strana	5
		Vydání	1
		Revize	1

5 Postup

5.1 Příprava vzorku

Homogenní vzorek se naváží do 50ml centrifugační zkumavky a smočí se dostatečným přídavkem vody (1). Např. u obilovin, luštěnin a olejnatých semínek se k 5 g vzorku přidá 10 g vody (1). V případě dalších materiálů se navážka vzorku a přídavek vody volí podle doporučení v metodice QuPpe. Vzorek se extrahuje 10 ml okyseleného methanolu (5) třepáním 15 min při 300 kmitech/min. Vzorek se odstředí 5 min při nejméně 5000 ot/min, supernatant se převede do 15ml plastové zkumavky a nechá se vymrazit v mrazáku při minus 18 °C nejméně 2 h. Vymražený extrakt se opět odstředí 5 min při 3900 otáčkách/min. Podíl extraktu se zfiltruje do šroubovací vialky. V případě glyfosátu je nutné použít plastové vialky. Při použití izotopově značeného standardu se podíl extraktu nejprve zfiltruje do zkumavky Eppendorf a nechá se vytemperovat na laboratorní teplotu. Poté se přesně 1 ml supernatantu převede do vialky a obohatí se 10 µl ISTD (22). Poté se několik sekund promíchá na Vortexu.

Poznámky

- 1 Pokud je výtěžnost ISTD v dané matrici v rozsahu (80 – 120) %, což bylo např. potvrzeno u obilovin a olejnin, je možné přidat ISTD až k finálnímu extraktu. Jinak je nutné obohatit vzorek ISTD (21) před extrakcí.


5.2 LC-MS/MS stanovení

Extrakt převedené do 2ml vialky se analyzují metodou LC-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 jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3. MRM sledované pro chlormekvát, mepikvát a ISTD.

Pesticid	Sledované MRM m/z
Chlormekvát	122 → 58, 122 → 63, 124 → 58
Mepikvát	114 → 98, 114 → 58, 114 → 99
Chlormekvát D4 (ISTD)	126 → 58
Mepikvát D3 (ISTD)	117 → 101
Glyfosát	168 → 63, 168 → 150, 168 → 81, 168 → 79
AMPA	110 → 63, 110 → 79

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10605.2 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů metodou LC-MS	Revize	1

6 Kontrola kvality

Požadavky na zajištění kvality reziduálních analýz pesticidů jsou uvedeny v dokumentu SANCO/12571/2013.

Zkouška je v případě kvátů založena na 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 se výtěžnost sledovaných látek v dané matrici blíží 100 %, např. 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 – 140) % a pro její výpočet je nutné porovnání s odezvou ISTD v matricovém standardu/vzorku.

V případě glyfosátu a AMPA je zkouška založena na metodě externí matricové kalibrace nebo na metodě standardního přídatku, tzn. že kvantifikace je provedena pomocí kalibrace připravené do blankové matrice podobné stanovovanému vzorku nebo je vzorek připraven ve více opakováních, z nichž jeden podíl zůstává neobohacen standardem a další opakování jsou před nebo po extrakci obohaceny známým množstvím analytu. Obě metody umožňují kompenzovat vliv matricového efektu.

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 $\pm 0,2$ min 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 kvantifikaci 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 se doporučuje použít metodu standardního přídatku 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 v případě kvátů. V případě glyfosátu a AMPA je RL 0,4 mg/kg (obiloviny), 0,5 mg/kg (rostlinný materiál) a 0,2 mg/kg (zelenina). Pro hodnoty nad mezí stanovitelnosti se výsledek zaokrouhlí podle tabulky 4.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10605.2 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů metodou LC-MS	Strana	7
		Vydání	1
		Revize	1

Tabulka 4. Zaokrouhlování a udávání výsledků.

Hladina reziduí (µg/kg)	Zápis výsledku
< 10	2 platné číslice
> 10	3 platné číslice

8 Validační data

Postupem daným pro tuto zkoušku byla stanovena výtěžnost a opakovatelnost chlormekvátu, mepikvátu, glyfosátu a AMPA, které vyhovovaly požadavkům uvedeným v dokumentu SANCO/12571/2013.

Nejnižší validovaná hladina byla 0,008 mg/kg v případě kvátů. V případě glyfosátu a AMPA byla nejnižší validovaná hladina 0,4 mg/kg (obiloviny), 0,5 mg/kg (rostlinný materiál) a 0,2 mg/kg (zelenina), což jsou hodnoty meze stanovitelnosti nastavené pro zápis výsledků.

9 Literatura

- 1 ČSN EN 15055 Potraviny s nízkým obsahem tuku – Stanovení chlormekvátu a mepikvátu – Metoda LC-MS/MS.
- 2 EURL-SRM QuPPE Method Version 7.1 – 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/12571/2013 – Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed.