	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10606.1 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů po derivatizaci metodou LC-MS	Revize	1

## STANOVENÍ OBSAHU REZIDUÍ POLÁRNÍCH PESTICIDŮ PO DERIVATIZACI 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 se extrahuje vytřepáním do 0,1% kyseliny mravenčí. Homogenizát se odstředí a poté se převede alikvot, který se derivatizuje. Po derivatizaci následuje čištění metodou SPE. Po zakoncentrování a filtraci se vzorek analyzuje pomocí LC-MS/MS po ionizaci elektrosprejem v pozitivním módu v režimu sledování vybraných přechodů (MRM). Obsah reziduí polárních pesticidů se stanoví metodou isotopového ředění a metodou externí kalibrace.

### 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, CH<sub>3</sub>OH, pro HPLC.
- 3 Methanol, CH<sub>3</sub>OH, pro LC-MS.
- 4 Kyselina mravenčí, HCOOH.
- 5 1% kyselina mravenčí ve vodě.

Příprava: 5 ml kyseliny mravenčí (4) se v 500ml odměrné baňce doplní ultračistou vodou (1).


- 6 0,1% kyselina mravenčí ve vodě.

Příprava: 0,25 ml kyseliny mravenčí (4) se v 250ml odměrné baňce doplní ultračistou vodou (1).

- 7 Hydroxid sodný, NaOH.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10606.1 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů po derivatizaci metodou LC-MS	Revize	1


- 8 Hydroxid sodný, NaOH, roztok,  $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$ .  
Příprava: 1 g hydroxidu sodného (7) se v 25ml odměrné baňce doplní ultračistou vodou (1).
- 9 Kyselina boritá,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ .
- 10 Chlorid draselný, KCl.
- 11 Borátový pufr., pH 9,0.  
Příprava: 3,1 g kyseliny borité (9), 3,75 g chloridu draselného (10) a 0,8 g hydroxidu sodného (7) se rozpustí v 80 ml vody (1). Hodnota pH se upraví na 9,0 roztokem hydroxidu sodného (8). Po převedení do 100ml odměrné baňky se vodou (1) doplní do 100 ml.
- 12 Dichloromethan,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , chromasolv.
- 13 Acetonitril,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , chromasolv.
- 14 Derivatizační činidlo, roztok FMOC-Cl,  $c(\text{FMOC-Cl}) = 20\text{mM/l}$ .  
Příprava: Do 50ml odměrné baňky se naváží 0,265 g FMOC-Cl a doplní se acetonitrem (13) po značku.
- 15 Octan amonný,  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , roztok,  $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 5 \text{ mol/l}$ .  
Příprava: 3,85 g octanu amonného se v 10ml odměrné baňce doplnit vodou (1) po značku.
- 16 Mobilní fáze A: Ultračistá voda (1) s methanolem (3) v poměru (90 : 10), V : V, 5 mM roztok octanu amonného.  
Příprava: 450 ml vody (1) se smíchá s 50 ml methanolu (3) a přidá se 500  $\mu\text{l}$  roztoku octanu amonného (15).
- 17 Mobilní fáze B: Ultračistá voda (1) s methanolem (3) v poměru (10 : 90), V : V.
- 18 Standardy pesticidů.  
Používají se pevné nebo kapalné standardy s deklarovanou čistotou od ověřeného výrobce.  
Glyfosát ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ ) CAS [1071-83-6].
- 19 Zásobní roztoky pesticidů.  
Příprava zásobního roztoku glyfosátu,  $c = 1 \text{ mg/ml}$ : Do 25ml plastové vialky se naváží přibližně 10 mg glyfosátu (18) a dováží se přesně napočítané množství 10% acetonitrilu (13) ve vodě (1). Zásobní roztok glyfosátu se uchovává v těsně uzavřené plastové vialce v lednici.

	Národní referenční laboratoř		Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>		Vydání	1
	10606.1 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů po derivatizaci metodou LC-MS		Revize	1

- 20 Pracovní roztok glyfosátu,  $c = 10 \mu\text{g/ml}$ .  
Příprava: 100  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku glyfosátu,  $c = 1 \text{ mg/ml}$  (19) se doplní do 10ml plastové odměrné baňky vodou (1).
- 21 Pracovní roztok glyfosátu,  $c = 1 \mu\text{g/ml}$ .  
Příprava: Do plastové vialky se pipetuje 80  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku (20) a 720  $\mu\text{l}$  vody (1).
- 22 Vnitřní isotopově značené standardy (ILIS). Používají se standardy od ověřeného výrobce.  
Glyphosate- $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$  ( $^{13}\text{C}_2\text{CH}_8^{15}\text{N O}_5\text{P}$ ),  $c = 1 \text{ mg/ml H}_2\text{O}$ .
- 23 Pracovní roztok ILIS Glyphosate- $^{13}\text{C}_2$ - $^{15}\text{N}$ ,  $c = 20 \mu\text{g/ml}$ .  
Příprava: Do plastové vialky se pipetuje 20  $\mu\text{l}$  roztoku ILIS Glyphosate- $^{13}\text{C}_2$ - $^{15}\text{N}$ ,  $c = 1 \text{ mg/ml}$  (22) a 980  $\mu\text{l}$  vody (1).
- 24 Pracovní roztok vnitřního standardu Glyphosate- $^{13}\text{C}_2$ - $^{15}\text{N}$ ,  $c = 1 \mu\text{g/ml}$ .  
Příprava: Do plastové vialky se pipetuje 50  $\mu\text{l}$  roztoku Glyphosate- $^{13}\text{C}_2$ - $^{15}\text{N}$ ,  $c = 20 \mu\text{g/ml}$  (23) a 950  $\mu\text{l}$  vody (1).
- 25 Kalibrační roztoky pesticidů.  
Příprava: Smísí se pracovní roztoky pesticidů (20, 21) a vnitřních isotopově značených standardů (24), podle tabulky 1. Kalibrační standardy musí projít procesem derivatizace a SPE.
- 26 Interní referenční materiál: vzorky získané v rámci účasti v EUPT-C.

**Tabulka 1. Příprava kalibračních standardních roztoků.**

Kalibrační úroveň	Konc. pesticidu (ng/ml)	Konc. ISTD (ng/ml)	Obsah pesticidu (mg/kg)	Obsah ISTD (mg/kg)	Přídavek roztoku pesticidu ( $\mu\text{l}$ )	Přídavek roztoku ISTD ( $\mu\text{l}$ )	Přídavek matrice (ml)
1	3	50	0,006	0,100	3 (21)	50 (24)	4
2	30	50	0,060	0,100	3 (20)	50 (24)	4
3	300	50	0,600	0,100	30 (20)	50 (24)	4
4	400	50	0,800	0,100	40 (20)	50 (24)	4

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10606.1 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů po derivatizaci metodou LC-MS	Revize	1


#### 4 Přístroje a pomůcky

- 1 Kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem, např.:  
ACQUITY UPLC-TQ MS Xevo (Waters) nebo LC-MS/MS 6420 (Agilent), vybavený:  
UPLC kolonou, např.: ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 100 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters),  
nebo UHPLC kolonou, např.: ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD, 100 mm × 2,1 mm × 1,8 μm (Agilent).
- 2 Analytické váhy.
- 3 Třepačka, (300 – 500) kmitů/min.
- 4 Centrifuga, 5000 ot/min.
- 5 Centrifugační zkumavky plastové se šroubovacím víčkem, 15 ml; 50 ml.
- 6 SPE manifold.
- 7 Vývěva.
- 8 Vysokorychlostní míchadlo, např. Vortex.
- 9 Termovap.
- 9 Filtrační materiál: stříkačkové filtry nylonové o velikosti pórů 0,2 μm.
- 10 Vialky skleněné, šroubovací, 2 ml.
- 11 SPE kolonky: Oasis HLB 200 mg (Waters).

#### 5 Postup

##### 5.1 Příprava vzorku

Homogenní vzorek se naváží do 50ml centrifugační zkumavky. Navážka se liší v závislosti na povaze materiálu, např. u suchých vzorků, jako jsou obiloviny, luštěniny a olejnatá semínka se navažuje 2,5 g, u vzorků rostlin se také navažuje 2,5 g, ale u vzorků zeleniny, např. brambor, je navážka 5 g. Ke vzorku se přidá 20 ml 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě (6) a 20 ml dichlormethanu (12). Vzorek se extrahuje třepáním 10 min při (300 – 500) kmitech/min. Poté se vzorek odstředí 5 min při 4000 ot/min, při teplotě 5 °C. 4ml podíl vodného supernatantu se převede do čisté 50ml centrifugační zkumavky a přidá se k němu 50 μl ILIS (24), 4 ml pufru (11) a 4 ml 20mM roztoku FMOC-Cl (14). Směs se třepe 30 min při (300 – 500) kmitech/min a poté se doplní do 50 ml 1% kyselinou mravenčí (5) a odstředí se při 4000 ot/min. Následuje čištění metodou SPE. Kolonky se nejprve promyjí 3 ml methanolu (2) a 3 ml 1% kyselinou mravenčí (5). Pak se na kolonky nanese vzorek. Poté následuje promytí 10 ml vody (1) a 5 ml dichlormethanu (12). Eluce se provede 5 ml methanolu (2). Eluát se následně odfouká pod dusíkem téměř do sucha a rekonstituuje 1 ml

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10606.1 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů po derivatizaci metodou LC-MS	Revize	1

50 % methanolu, který se získá smícháním 500 µl vody (1) a 500 µl methanolu (2). Po promíchání na Vortexu následuje ultrazvuk po dobu 1 min a filtrace vzorku do vialky.

## 5.2 LC-MS/MS stanovení

Extrakty 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 2.

**Tabulka 2. MRM sledované pro glyfosát a ILIS.**

Pesticid	Sledované MRM m/z
Glyfosát-FMOC	392 → 88, 392 → 179, 392 → 170
ILIS-Glyfosát-FMOC	395 → 91, 395 → 179, 395 → 173

## 6 Kontrola kvality

Požadavky na zajištění kvality reziduálních analýz pesticidů jsou uvedeny v dokumentu SANTE/11945/2015.


Zkouška je založena na metodě izotopového ředění, tzn. vzorek je obohacen izotopově značeným analogem sledovaného pesticidu (ILIS), který se využívá ke korekci ztrát při přípravě vzorku a eliminaci vlivu matricových interferentů přítomných v daném vzorku. V případě, že je ILIS přidán ke vzorku před extrakcí, je výsledek korigován jak na výtěžnost, tak na matricové efekty. ILIS musí být přidán nejpozději před krokem derivatizace. Povolený rozsah pro výtěžnost ILIS v jednotlivých vzorcích je (60 – 140) % a pro její výpočet je nutné porovnání s odezvou ILIS v matricovém standardu/vzorku.

Do každé série vzorků se průběžně zařazuje analýza kontrolního vzorku referenčního materiálu nebo obohacené matrice. 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  $\pm 0,1$  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 pomocí různých matricových kalibračních standardů. Solventovou kalibraci nelze použít kvůli SPE. Kalibrační závislost musí vykazovat minimální charakteristiky  $RSD < 20\%$  a  $R^2 > 0.995$ .

	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10606.1 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů po derivatizaci metodou LC-MS	Revize	1

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. < 0,010 mg/kg. Pro hodnoty nad mezí stanovitelnosti se výsledek zaokrouhlí na 3 platné číslice.

## 8 Validační data

Postupem daným pro tuto zkoušku byla stanovena výtěžnost a opakovatelnost glyfosátu, které vyhovovaly požadavkům uvedeným v dokumentu SANTE/11945/2015.

Nejnižší validovaná hladina byla 0,006 mg/kg.

## 9 Literatura

- 1 GOSCINNY, Séverine, Hermann UNTERLUGGAUER, Jasmin ALDRIAN, Vincent HANOT a Sonja MASSELTHER. Determination of Glyphosate and Its Metabolite AMPA (Aminomethylphosphonic Acid) in Cereals After Derivatization by Isotope Dilution and UPLC-MS/MS". DOI: 10.1007/s12161-011-9361-7. ISBN 10.1007/s12161-011-9361-7. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12161-011-9361-7>
- 2 BANERJEE, Kaushik, D.P. OULKAR, P.G.ADSULE. Development and Validation of a Novel Residue Analysis Method for Glyphosate and AMPA in Plant Matrices by LC-MS/MS. Prezentace na konferenci EPRW 2012, Vídeň.
- 3 Dokument SANTE/11813/2017 – Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed.