	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10610.1 – Stanovení obsahu reziduí pesticidů metodou GC-MS	Vydání	1
		Revize	5

STANOVENÍ OBSAHU REZIDUÍ PESTICIDŮ METODOU GC-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 plynovou chromatografií.


2 Princip

Vzorek smočený dostatečným přídavkem vody se extrahuje vytřepáním do acetonitrilu. pH směsi se upraví přídavkem pufovacích solí, intenzivně se protřepe a organická fáze se rozsadí odstředěním. Extrakt pro GC-MS analýzu se čistí vymražením a následnou disperzní SPE.


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 Síran hořečnatý bezvodý, MgSO₄, vyžíhaný 6 h při 550 °C.
- 5 Chlorid sodný, NaCl, vyžíhaný 6 h při 550 °C.
- 6 Dvojsodná sůl kyseliny citronové, HOC(COOH)(CH₂COONa) . 1,5 H₂O.
- 7 Trojsodná sůl kyseliny citronové, HOC(COONa)(CH₂COONa) . 2 H₂O.
- 8 Pufovací směs pro úpravu pH vzorku (acetonitril + voda) na pH 5 až pH 5,5.
Příprava: Do vialky se naváží 4 g ± 0,2 g MgSO₄ (4), 1 g ± 0,05 g NaCl (5), 1 g ± 0,05 g trojsodné soli k. citronové (7) a 0,5 g ± 0,03 g dvojsodné soli (6).
- 9 Kyselina mravenčí, CHOOH, koncentrovaná.
- 10 Kyselina mravenčí, CHOOH, 5% roztok.
Příprava: Rozpustí se 0,5 ml koncentrované CHOOH (10) v 10 ml acetonitrilu (2).
- 11 Sorbent typu primární sekundární amin, např. Bondesil-PSA, (Varian), PSA (Supelco).
- 12 Sorbent typu C18-silikagel, např. ODS (Supelco).
- 13 GCB sorbent (Graphitized Carbon Black), např. Supelclean Envi-Carb (Supelco).

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10610.1 – Stanovení obsahu reziduí pesticidů metodou GC-MS	Vydání	1
		Revize	5

- 14 Směs GCB + MgSO₄:
Příprava: Smíchá se 1 díl GCB (13) s 19 díly MgSO₄ (4).
- 15 Sorpční směsi pro D-SPE.
Směs P1 (základní):
Příprava: 50 mg PSA (11) + 300 mg MgSO₄ (4) na 2 ml extraktu (5.4).
Směs P2 (směs s GCB):
Příprava: 50 mg PSA (11) + 300 mg GCB (14) na 2 ml extraktu (5.4).
Směs P3 (směs s GCB a ODS):
Příprava: 10 mg ODS (12) + 50 mg PSA (11) + 300 mg GCB (14) na 2 ml ext. (5.4).
Směs P1/2 (směs s ODS):
Příprava: 50 mg ODS (12) + 50 mg PSA (11) + 300 mg MgSO₄ (4) na 2 ml ext. (5.4).
Směs P1/3 (směs s vyšším obsahem PSA):
Příprava: 300 mg PSA (11) + 300 mg MgSO₄ (4) na 2 ml extraktu (5.4).
Směs P1/4 (směs s vyšším obsahem PSA):
Příprava: 100 mg PSA (11) + 300 mg MgSO₄ (4) na 2 ml extraktu (5.4).
Směs P3/2 (směs s GCB a vyšším obsahem ODS):
Příprava: 50 mg ODS (12) + 50 mg PSA (11) + 300 mg GCB (14) na 2 ml ext. (5.4).
- 16 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.
- 17 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.
- 18 Pracovní roztoky pesticidních směsí.
Pracovní směšné roztoky se připraví ředěním zásobních roztoků dle požadovaného rozsahu analýzy, obvykle o koncentraci 10 µg/ml acetonitrilu.
- 19 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 směšných roztoků extraktem požadované matrice, přičemž obsah této matrice by měl být minimálně 80 %.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10610.1 – Stanovení obsahu reziduí pesticidů metodou GC-MS	Vydání	1
		Revize	5


- 20 Standardní směs pro kontrolu kvality (QC), roztok v acetonitrilu, $c = 10 \mu\text{g/ml}$.
Směs vybraných analytů (z různých skupin chemických sloučenin) a vnitřního standardu.
- 21 Vnitřní standardy (ISTD), roztok v acetonitrilu, koncentrace $c = (2,5 - 10) \mu\text{g/ml}$, např.:
D10-diazinon, D6-cypermethrin, D4-folpet, D10-chlorpyrifos, D6-tebuconazol,
D5-pendimethalin, PCB 185, tris-(1,3-dichloroisopropyl)fosfát.
- 22 Kyselina sírová, koncentrovaná, H_2SO_4 .

Poznámky

- 1 *Vnitřní standardy se volí dle požadavků analýzy a slouží ke kontrole retenčních časů, výtěžnosti a/nebo ke kvantifikaci obsahu stanovovaných analytů.*
- 2 *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

- 1 Plynový chromatograf s hmotnostní spektrometrem, GC-MS/MS, např.:
GC 7890B - MS TQ 7010 (Agilent Technologies).
- 2 Analytická kolona, např.:
DB XLB 30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm (J&W Scientific),
VF5-MS 30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm (Varian),
DB 1701 30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm (J&W Scientific).
- 3 Analytické váhy.
- 4 Nožový mlýn, vysokorychlostní dispergační zařízení.
- 5 Centrifuga s rozsahem otáček nad 3000 ot/min, pro objemy do 100 ml.
- 6 Centrifugační zkumavky s víčkem, PP, 1,5 ml, 15 ml; 50 ml.
- 7 Vertikální třepačka s nastavitelnou frekvencí kmitů, min 500 kmitů/min, držáky pro 50ml a 15ml centrifugační zkumavky, např.: Geno/Grinder 2010 (SPEX Sample Prep).
- 8 Muflová pec s T min do 550 °C.
- 9 Ultrazvuková lázeň.
- 10 Běžné laboratorní vybavení (automatické pipety; pipetovací nástavec pro přesné dávkování rozpouštědla, skleněné Pasteurovy pipetky) a laboratorní sklo.
- 11 Vialky skleněné, šroubovací, objemy 2 ml, 4 ml, 20 ml.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10610.1 – Stanovení obsahu reziduí pesticidů metodou GC-MS	Vydání	1
		Revize	5

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 přídavkem 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.

Přidá se 10 ml acetonitrilu (2) a definované malé množství roztoku vnitřního standardu, obsahující jeden nebo více standardů (21) o určité koncentraci.


Zkumavka se uzavře a intenzivně se třepa 2 min., ručně nebo ve třepačce (7). Suché matrice s přídavkem vody se třepou 15 min.

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 hydrolýzou

Pro celkové uvolnění chlorothalonilu je doporučena kyselá hydrolýza vzorku. K naváženému vzorku se před extrakcí přidá 100 µl H₂SO₄ (22).

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10610.1 – Stanovení obsahu reziduí pesticidů metodou GC-MS	Vydání	1
		Revize	5

5.3 Vysolení extraktu

K suspenzi vzorku se přidá vymražený míchací kamínek a připravená pufrovací směs (8), zkumavka se uzavře a 1 min se intenzivně protřepává, průběžně se chladí ponořením do ledové tříště. Před odstředěním (5 min při ≥ 3000 ot/min) se zchlazená směs intenzivně 1 min protřepe. Acetonitrilová vrstva supernatantu se převede do 15ml centrifugační 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. Vymražená zkumavka se krátce odstředí (5 min při ≥ 3000 ot/min) a z horní čiré vrstvy se odebírají podíly pro další zpracování.

Poznámky

- 5 *Síran hořečnatý ve vodném roztoku má tendenci tvořit hrudky, které rychle ztvrdnou. Proto je nutné bezprostředně po přidavku solí (8) obsah zkumavky dobře protřepat. Imin extrakce může být potom provedena pro celou dávku vzorků. Obsah zkumavek se po přidavku pufrovacích solí zahřívá a je vhodné vzorky po prvotním roztržení krátce ochladit v ledové tříšti.*

5.4 Čištění extraktu (D-SPE)

Aliquotní podíl vymraženého acetonitrilového extraktu (5.3) se vyčistí protřepáním se sorbentem (disperzní SPE) a dalším podílem bezvodého síranu hořečnatého pro odstranění vlhkosti. Jako základní sorbent pro D-SPE se použije PSA (11) a GCB (13). Zbytky lipidů v extraktu po vymražení (5.3) lze odstranit menším přídatkem ODS (12).

2ml podíl vymraženého extraktu (5.3) se převede do centrifugační zkumavky s předváženou směsí sorbentů (15). Intenzivně se třepe 2 min a odstředí se 5 min při ≥ 3000 ot/min, $T \leq 5$ °C.

Vzorky s vysokým obsahem karotenoidů nebo chlorofylu je nutné čistit D-SPE s přídatkem GCB (13).

Vhodné varianty postupu jsou podrobně uvedeny v ČSN EN 15662 (1), příklady v tabulce 1.

Stabilita pesticidů citlivých na bazické prostředí se zvýší okyselením čištěného extraktu přídatkem kyseliny mravenčí (9) v množství 10 μ l/1 ml extraktu. Stabilizace je vhodná pro většinu analytů (na kyselé prostředí jsou citlivé např. sulfonylmočoviny).


5.5 GC-MS stanovení

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

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

Měření může být provedeno na různých přístrojích s odlišnými technickými parametry a na různých analytických kolonách, za předpokladu dosažení uspokojivých výsledků.

Vhodná je konfirmace výsledků proměřením extraktů metodou LC-MS.

	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10610.1 – Stanovení obsahu reziduí pesticidů metodou GC-MS	Vydání	1
		Revize	5


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 šroty	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	-

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.

	Národní referenční laboratoř	Strana	7
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10610.1 – Stanovení obsahu reziduí pesticidů metodou GC-MS	Vydání	1
		Revize	5

Kontrola kvality pomocí ISTD: Pro GC aplikace se použijí jako ISTD pouze ty sloučeniny, které nejsou významně ovlivňovány maticí. Vlivem nežádoucích efektů na ISTD během analýzy může dojít k chybám při kvantifikaci. Ztráty ISTD během extrakce a čištění vedou k nadhodnocení obsahu stanovovaných analytů a tato chyba výrazně převyšuje ostatní zdroje chyb. Pro maticový efekt při GC 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 přidavkem pesticidů na relevantních hladinách, tj. hladina odpovídající reporting limitu nebo jeho násobku, případně na hladině maximálního reziduálního limitu. Povolený rozsah výtěžností 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 stanovovaného 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 maticového 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 (18), tyto výsledky lze použít i pro kvantifikaci, pokud bylo předchozími experimenty prokázáno, že nedochází k výraznému ovlivnění analytu maticí. V případě významného nálezu (např. podezření na překročení povolené hodnoty MRL) musí být použit maticový standard (19) a nebo metoda standardního přídatku.

Metoda ISTD s kalibrací pomocí maticových standardů

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

Metoda standardního přídatku ke vzorku

V případě podezření na překročení povoleného obsahu reziduí ve vzorku a nebo v matici

	Národní referenční laboratoř	Strana	8
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10610.1 – Stanovení obsahu reziduí pesticidů metodou GC-MS	Vydání	1
		Revize	5

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.