


| | | | |
|---|--|--------|---|
|  | Národní referenční laboratoř | Strana | 1 |
| | Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10615.1 – Stanovení obsahu reziduí dithiokarbamátů metodou GC-MS | Vydání | 1 |
| | | Revize | 2 |

STANOVENÍ OBSAHU REZIDUÍ DITHIOKARBAMÁTŮ METODOU GC-MS

1 Rozsah a účel

Postup je určen pro nepřímé stanovení reziduí dithiokarbamátových fungicidů (mancozeb maneb, metiram, propineb, thiram, zineb, ziram) po jejich katalytickém rozkladu na sirouhlík v krmivech a rostlinném materiálu. Postup je vhodný pro obiloviny, krmné směsi i pro vzorky ovoce a zeleniny. Obsah uvolněného sirouhlíku se stanoví metodou plynové chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí.

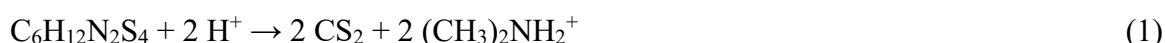
2 Princip

Dithiokarbamátové sloučeniny (DTC) se rozloží v kyselém prostředí za katalytického působení cínatých kationtů a množství uvolněného sirouhlíku (CS₂) se stanoví metodou GC-MS po nástřiku z plynné fáze (HS analýza) nebo po reextrakci CS₂ do nepolárního rozpouštědla.

Rezidua DTC fungicidů se obvykle nacházejí na povrchu vzorků a jsou náchylná k rozkladu ve vodném prostředí a za vyšší teploty. Proto se vzorky přednostně analyzují čerstvé nebo se homogenizují ve zmrazeném stavu. Drobné plody se analyzují celé, větší jednotky se umění na kusy, které už lze vložit do reakční nádoby, ve které proběhne katalytický rozklad DTC. Kvantifikace obsahu CS₂ se provede na externí kalibraci, připravenou přidavky definovaných hladin analytického standardu thiramu k matici slepého vzorku a připravenou k analýze stejným postupem jako hodnocené vzorky.

Rozklad thiramu na CS₂ probíhá podle rovnice (1).

Konverzní faktor mezi thiramem a CS₂ je 0,6323.



3 Chemikálie

Použitá rozpouštědla jsou čistoty minimálně p. a., jejich dostačující kvalita se ověřuje proměřením slepého vzorku.

1 Kyselina chlorovodíková, HCl, koncentrovaná, ρ = 1,18 g/ml.

2 Chlorid cínatý dihydrát, SnCl₂·2H₂O.


3 Činidlo, SnCl₂ ve 4,5 M HCl.

Příprava: Do 200ml odměrné baňky se naváží 3 g dihydrátu SnCl₂ (2), přidá se 80 ml HCl (1) a doplní se vodou (4) po značku. Obsah se důkladně promíchá. Při skladování v temnu a při teplotě do 8 °C je činidlo stálé 14 dnů.


4 Voda (neionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

5 Acetonitril, CH₃CN.

6 Isooktan, C₈H₁₈.

| | | | |
|---|--|--------|---|
|  | Národní referenční laboratoř | Strana | 2 |
| | Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10615.1 – Stanovení obsahu reziduí dithiokarbamátů metodou GC-MS | Vydání | 1 |
| | | Revize | 2 |

- 7 Thiram, C₆H₁₂N₂S₄, certifikovaný analytický standard.
- 8 Zásobní roztok thiramů v acetonitrilu (ZR), c = 1 mg/ml.
 Příprava: Do 20ml vialky se naváží 10 mg až 20 mg thiramů (7) s přesností ± 0,01 mg a rozpustí se v odpovídající navážce acetonitrilu (5). Důkladně se promíchá.
- 9 Pracovní roztok (A) thiramů v acetonitrilu, c = 100 µg/ml.
 Příprava: Zásobní roztok thiramů v acetonitrilu (8) se 10 × zředí. Do 4ml vialky se odměří 200 µl zásobního roztoku thiramů v acetonitrilu (8) a přidá se 1800 µl acetonitrilu (5). Důkladně se promíchá.
- 10 Pracovní roztok (B) thiramů v acetonitrilu, c = 10 µg/ml.
 Příprava: Pracovní roztok A (9) se 10 × zředí. Do 4ml vialky se odměří 200 µl pracovního roztoku A (9) a přidá se 1800 µl acetonitrilu (5). Důkladně se promíchá.
- 11 Pracovní roztok (C) thiramů v acetonitrilu, c = 1 µg/ml.
 Příprava: Pracovní roztok B (10) se 10 × zředí. Do 4ml vialky se odměří 200 µl pracovního roztoku B (10) a přidá se 1800 µl acetonitrilu (5). Důkladně se promíchá. Nepoužívat roztoky thiramů (10) až (11) starší 5 týdnů.
- 4 Přístroje a pomůcky
- 1 Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem, GC-MS/MS, např.: GC 7890B/MSD 5977 B (Agilent Technologies).
- 2 Kapilární kolona, např.:
 DB XLB 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm (Agilent Technologies),
 DB5-MS 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm (Agilent Technologies).
- 3 Autosampler s HS jednotkou (agitátor), např. Combi PAL, software Cycle Composer, blok pro HS nástřikovou jehlu o objemu 2,5 ml nebo 1 ml (CTC Analytics).
- 4 Plynotěsná stříkačka pro HS nástřik, 2,5 ml nebo 1 ml.
- 5 Automatické pipety s nastavitelným objemem (1 – 5) ml, špičky.
- 5 Plynotěsné stříkačky (10; 50; 100; 1000) µl.
- 6 Vialky pro HS, 20 ml, sklo, magnetické víčko, septum silikon/PTFE.
- 7 Reakční nádoby, 250 ml, sklo, šroubovací víčko, septum silikon/PTFE.
- 8 Vialky pro GC, 2 ml, sklo, šroubovací víčko, septum silikon/PTFE.
- 9 Insert 300 µl do 2ml vialky, sklo.
- 10 Analytické váhy.
- 11 Laboratorní sušárna.
- 12 Nožový mlýn, např. Grindomix GM300 (Retsch), nerezová mlecí nádoba.
- 13 Kapalný N₂, suchý led CO₂.

| | | | |
|---|--|--------|---|
|  | Národní referenční laboratoř | Strana | 3 |
| | Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10615.1 – Stanovení obsahu reziduí dithiokarbamátů metodou GC-MS | Vydání | 1 |
| | | Revize | 2 |

5 Postup

5.1 Příprava vzorku

Rezidua dithiokarbamátových fungicidů se nacházejí na povrchu ošetřených plodin a rychle se rozkládají v kyselé i alkalickém prostředí. Vzorky se analyzují nejlépe čerstvé, co nejdříve po dodání do laboratoře. Je-li nutné je skladovat, uchovávají se zmrazené.

Vzorky se přednostně analyzují celé (bobuloviny, semena) nebo pokrájené na menší kousky, které již lze vložit do reakční nádoby.

Vzorky s nízkým obsahem vody (obiloviny, krmné směsi, listy) lze homogenizovat za kryogenních podmínek, nejlépe s přidavkem kapalného dusíku nebo pelettek suchého ledu. Při manipulaci se vzorkem je třeba dbát na to, aby se již zamrazený vzorek nenechal zbytečně rozmraznout.

5.2 Head Space analýza


Do 20ml HS vialky se naváží 1 g až 3 g vzorku, 2 ml až 0 ml vody (celková hmotnost smočeného vzorku je 3 g) a přidá se 6 ml činidla (3). Vialka se okamžitě vzduchotěsně uzavře a vloží se do vyhřívaného prostoru agitátoru v HS jednotce, případně do vyhřáté sušárny. Za průběžného třepání se nechají vzorky reagovat 60 min při 80 °C, po uplynutí reakční doby se vialky přenesou do podavače pro automatizovaný nástřik. Nástřik 500 µl plynné fáze nad vzorkem se provede z vialky vytemperované na 40 °C.

5.3 Reextrakce do isooktanu

Do 250ml reakční nádoby se naváží 50 g vzorku, odměří se 25 ml isooktanu (6) a přidá se 150 ml činidla (3). Lahvička se okamžitě vzduchotěsně uzavře, důkladně protřepe, vloží se do sušárny a nechá se reagovat 2 h při 80 °C. Vždy po 30 min se lahvička se vzorkem protřepe, celý vzorek musí být plně smočen činidlem. Po uplynutí reakční doby se vzorek vyjme ze sušárny. Po vychladnutí a temperaci na 25 °C se z horní isooktanové vrstvy odebere 1,8 ml podíl do 2ml vialky nebo 250 µl do insertové vložky (9). Pevně se uzavře šroubovací víčko a vzorek je připraven k nástřiku do GC-MS.

Poznámky

- Pro HS analýzu lze použít i jiné typy vialek kompatibilních s použitou agitační jednotkou a automatickým dávkovačem. Je ale nezbytně nutné zachovat stejný HS-objem V_0 plynné fáze ve vialce pro všechny vzorky i kalibrační body proměřované ve společné sérii. Při použití HS nástavce pro 1ml stříkačku se nastřikuje 300 µl plynné fáze.*
- Pro rozkladnou reakci a následné vytrpání CS_2 do nepolárního rozpouštědla lze použít i jiné vzduchotěsně uzavíratelné nádoby a jinou navážku vzorku. Je ale nutné zachovat stejný poměr navážky vzorku, činidla a isooktanu pro vzorky a kalibrační body.*

| | | | |
|---|--|--------|---|
|  | Národní referenční laboratoř | Strana | 4 |
| | Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10615.1 – Stanovení obsahu reziduí dithiokarbamátů metodou GC-MS | Vydání | 1 |
| | | Revize | 2 |

3 Pro snadnější odběr horní isooktanové vrstvy je vhodné vialku odstředit, např. 5 min při 4000 ot/min, nebo vytlačit před odběrem isooktan do hrdla reakční nádoby přidávkem vody.

5.4 GC-MS stanovení

5.4.1 Chromatografické podmínky

Příklad nastavení parametrů pro stanovení obsahu reziduí dithiokarbamátů metodou GC-MS je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1. Chromatografické podmínky.

| | |
|--------------------|---|
| Nosný plyn | He 5.0; průtok 0,6 ml/min, po 3 min zvýšení na 1,5 ml/min |
| Teplota injektoru | 250 °C |
| Teplota MS (TL/IZ) | 280/220 °C |
| Teplotní program | 60 °C (3 min) – 60 °C/min – 280 °C (3 min) |
| Nástřik | 1 µl/resp. 500 µl (pro HS); split poměr 20 |
| Retenční čas | CS ₂ ≈ 2,02 min |

5.4.2 Podmínky pro hmotnostní spektrometrii

Elektronová ionizace (EI) při 70 eV, měření v plném skenu (FS) v rozsahu hmot m/z 70-90. Kvantifikace obsahu z iontu m/z = 76.

5.4.3 Měření


Před analýzou se zkontroluje aktuální stav MS (typické odezvy pozadí, těsnost systému na hmotách pro vodu a vzduch, odezva na kalibrační plyn). Citlivost systému se ověří analýzou nejnižšího kalibračního bodu. Do měřicí sekvence se zařadí alespoň tři hladiny kalibračních roztoků, promývací rozpouštědlo, série reálných vzorků a na závěr opět kalibrační roztoky.

5.4.4 Kalibrace

Linearita ($R^2 \geq 0,995$) byla ověřena v širokém rozsahu koncentrací proměřením maticové kalibrace. Kalibrační body byly připravené přidávkou roztoku thiramu podle tabulek 2 až 4 do reakční vialky se slepou maticí vzorku.

Teoreticky 1 mg thiramu poskytuje 0,6323 mg CS₂.

Koncentrační rozsah byl ověřen od 16 ng až po 63 µg CS₂/ml isooktanu resp. HS-objemu. Pro přesnou kvantifikaci nízkých obsahů je vhodné použít menší rozsah kvantifikačních hladin, úměrně nálezu. Pokud nálezu reziduí ve vzorku překročí rozsah kalibrace, je nutné zopakovat analýzu s menší navázkou vzorku nebo zředit proměřený extrakt CS₂ odpipetováním alikvotního objemu extraktu do podílu čistého isooktanu ve 2ml vialce.


| | | | |
|---|--|--------|---|
|  | Národní referenční laboratoř | Strana | 5 |
| | Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10615.1 – Stanovení obsahu reziduí dithiokarbamátů metodou GC-MS | Vydání | 1 |
| | | Revize | 2 |

Tabulka 2. Příprava kalibrační řady pro HS analýzu.

| Hladina | <i>b</i> (ng CS ₂ /HS) | Thiram (ng/HS) | Přídavky standardu (μl/na HS vialku) |
|---------|--------------------------------------|-------------------|---|
| 1 | 19 | 30 | 30 roztoku C (11) |
| 2 | 63 | 100 | 100 roztoku C (11) |
| 3 | 316 | 500 | 50 roztoku B (10) |
| 4 | 632 | 1 000 | 100 roztoku B (10) |
| 5 | 1 581 | 2 500 | 25 roztoku A (9) |
| 6 | 3 162 | 5 000 | 50 roztoku A (9) |
| 7 | 6 323 | 10 000 | 100 roztoku A (9) |
| 8 | 15 808 | 25 000 | 25 ZR (8) |
| 9 | 31 615 | 50 000 | 50 ZR (8) |
| 10 | 63 230 | 100 000 | 100 ZR (8) |

Tabulka 3. Příprava kalibrační řady pro kapalný nástřík, vialka 20 ml, 2 ml isooktanu.

| Hladina | <i>b</i> (ng CS ₂ /ml isooktanu) | Thiram (ng/vialku) | Přídavky standardu (μl/vialku) |
|---------|--|-----------------------|-----------------------------------|
| 1 | 16 | 50 | 50 roztoku C (11) |
| 2 | 32 | 100 | 100 roztoku C (11) |
| 3 | 158 | 500 | 50 roztoku B (10) |
| 4 | 316 | 1 000 | 100 roztoku B (10) |
| 5 | 632 | 2 000 | 200 roztoku B (10) |
| 6 | 3 162 | 10 000 | 100 roztoku A (9) |
| 7 | 6 323 | 20 000 | 200 roztoku A (9) |
| 8 | 15 808 | 50 000 | 50 ZR (8) |
| 9 | 31 615 | 100 000 | 100 ZR (8) |
| 10 | 63 230 | 200 000 | 200 ZR (8) |

| | | | |
|---|--|--------|---|
|  | Národní referenční laboratoř | Strana | 6 |
| | Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10615.1 – Stanovení obsahu reziduí dithiokarbamátů metodou GC-MS | Vydání | 1 |
| | | Revize | 2 |

Tabulka 4. Příprava kalibrační řady pro kapalný nástřík, V=250 ml, 25 ml isooktanu.

| Hladina | <i>b</i> (ng CS ₂ /ml isooktanu) | Thiram (ng/vialku) | Přídavky standardu (μl/vialku) |
|---------|--|-----------------------|-----------------------------------|
| 1 | 25 | 1 000 | 100 roztoku B (10) |
| 2 | 38 | 1 500 | 150 roztoku B (10) |
| 3 | 51 | 2 000 | 200 roztoku B (10) |
| 4 | 253 | 10 000 | 100 roztoku A (9) |
| 5 | 506 | 20 000 | 200 roztoku A (9) |
| 6 | 1 265 | 50 000 | 500 roztoku A (9) |
| 7 | 2 529 | 100 000 | 100 ZR (8) |
| 8 | 5 058 | 200 000 | 200 ZR (8) |
| 9 | 12 646 | 500 000 | 500 ZR (8) |
| 10 | 25 292 | 1 000 000 | 1000 ZR (8) |

6 Výpočet a vyjadřování výsledků

Obsah CS₂ v proměřovaném extraktu se vypočte ze směrnice kalibrační přímky, sestrojené z naměřených kalibračních bodů pro danou sérii vzorků.

Pro kalibraci je nutné použít vhodnou matici odpovídající měřeným vzorkům, aby matrice zohlednila případné přirozené pozadí CS₂ ve vzorku. To je nutné brát v úvahu zejména u plodin s vysokým obsahem sirných sloučenin (např. česnek a brukvovité plodiny).

Výsledek se vyjádří v mg CS₂/kg vzorku.


Pro postup s HS nástříkem (5.2) se obsah CS₂ vypočte podle rovnice (2) a pro postup s kapalným nástříkem extraktu v isooktanu (5.3) podle rovnice (3).

$$c = \frac{b_{HS}}{m} \cdot 10^{-3} \quad (2)$$

$$c = \frac{b \cdot V}{m} \cdot 10^{-3} \quad (3)$$

Kde

| | |
|-----------------------|--|
| <i>c</i> | je obsah CS ₂ ve vzorku v mg/kg, |
| <i>b</i> | obsah CS ₂ odečtený z kalibrační přímky pro isooktan v ng/ml, |
| <i>b_{HS}</i> | obsah CS ₂ odečtený z kalibrační přímky pro HS nástřík v ng/HS, |
| <i>m</i> | navážka vzorku v g, |
| <i>V</i> | objem isooktanu v reakční vialce/nádobce v ml. |

| | | | |
|---|--|--------|---|
|  | Národní referenční laboratoř | Strana | 7 |
| | Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv | Vydání | 1 |
| | 10615.1 – Stanovení obsahu reziduí dithiokarbamátů metodou GC-MS | Revize | 2 |

7 Validační data

Detekční limity byly stanoveny proměřením nejnižší úrovně kalibračních přímků na hladině $LOD \leq 20 \text{ ng CS}_2/\text{ml}$ nebo HS-objem reakční vialky.

Za podmínek daných postupem lze dosáhnout meze stanovitelnosti $LOQ \leq 0,020 \text{ mg CS}_2/\text{kg}$ vzorku. Nastavený limit pro uvádění výsledků $RL = 0,020 \text{ mg/kg}$ vzorku.

Maximální povolený reziduální limit (3) pro potraviny a krmné směsi $MRL \geq 0,050 \text{ mg/kg}$.

Opakovatelnost postupu byla stanovena pro matrice obilná směs, list a hrozen vinné révy na hladině 0,050/0,500/5 mg/kg vzorku (n=6).

Akceptovatelná výtěžnost postupu (1) je 70 % až 110 %. V případě kvantifikace na procesní kalibraci připravenou rozkladem thiramů jsou výsledky již korigovány na výtěžnost.

Správnost metody je průběžně kontrolována účastí v testech EUPT-SRM.

8 Literatura

- 1 ČSN EN 12396-2 Potraviny s nízkým obsahem tuku – Stanovení reziduí dithiokarbamátů a thiuram disulfidu – Část 2: Metoda plynové chromatografie, červen 1999.
- 2 <https://www.eurl-pesticides.eu>, EURL-SRM Methods, Dithiocarbamates as CS₂; Analysis of Dithiocarbamates in Foods of Plant Origin involving Cleavage into Carbon Disulfide, v.2, revize 12/2009.
- 3 Nařízení EP a Rady (ES) č. 396/2005 o maximálních limitech reziduí pesticidů v potravinách a krmivech rostlinného a živočišného původu a na jejich povrchu a o změně směrnice Rady 91/414/EHS, v platném znění.
- 4 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.