

	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10605.4 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů metodou LC-MS/MS	Revize	0

STANOVENÍ OBSAHU REZIDUÍ POLÁRNÍCH PESTICIDŮ METODOU LC-MS/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. U komplikovanějších matric, jako např. obilniny a luštěniny, je k extrakci použit větší přídavek kyseliny mravenčí a přídavek 10% vodného roztoku Na₄EDTA. Homogenát se odstředí a poté se alikvot supernatantu zfiltruje. Filtrát se analyzuje pomocí LC-MS/MS po ionizaci elektrosprejem v režimu sledování vybraných přechodů (MRM). Obsah reziduí polárních pesticidů se stanoví s využitím isotopově značených vnitřních standardů (ILIS) s pomocí solventové nebo matriční kalibrace, případně metodou 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, H₂O, ultračistá.

2 Metanol, CH₃OH.

3 Acetonitril, CH₃CN.

4 10% acetonitril ve vodě.

Příprava: 10 ml acetonitrilu (3) se v kádince smíchá s 90 ml ultračisté vody (1).

5 Kyselina mravenčí, HCOOH.

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

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

7 Roztok 0,5% kyseliny mravenčí v 50% methanolu.

Příprava: V kádince se smíchá 10 ml ultračisté vody (1) a 10 ml 1% roztoku kyseliny mravenčí v methanolu (6).

8 Tetrasodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (dihydrát nebo tetrahydrát), C₁₀H₁₂N₂Na₄O₈ × xH₂O, Na₄EDTA.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10605.4 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů metodou LC-MS/MS	Revize	0

- 9 Komplexační činidlo, 10% vodný roztok Na₄EDTA.
Příprava: Do 100ml odměrné baňky se naváží 15,85 g, resp. 14,59 g Na₄EDTA tetrahydrátu, resp. dihydrátu (8) a po rozpuštění ve vodě se doplní vodou po značku.
- 10 Mravenčan amonný, HCOONH₄, roztok, c(HCOONH₄) = 2,5 mol/l.
Příprava: 3,9410 g mravenčanu amonného se rozpustí v 10% acetonitrilu (4) ve 25ml odměrné baňce a doplní se po značku.
- 11 Kyselina octová, CH₃COOH.
- 12 Mobilní fáze A pro stanovení chlormekvátu a mepikvátu, 10mM vodný okyselený roztok mravenčanu amonného.
Příprava: Ve 250ml odměrné baňce se rozpustí 0,9 ml kyseliny mravenčí (5) a 1 ml 2,5 mol/l roztoku mravenčanu amonného (10) a doplní se vodou (1) po značku.
- 13 Mobilní fáze B pro stanovení chlormekvátu a mepikvátu, acetonitril, CH₃CN (3).
- 14 Mobilní fáze A pro stanovení glyfosátu a spol. (viz Poznámka 1) na koloně HYPERCARB, 1% kyselina octová v 5% methanolu ve vodě.
Příprava: V 500ml odměrné baňce se rozpustí 5 ml kyseliny octové (11), odměrným válcem se přidá 25 ml methanolu (2) a baňka se doplní vodou (1) po značku.
- 15 Mobilní fáze B pro stanovení glyfosátu a spol. na koloně HYPERCARB, 1% roztok kyseliny octové v methanolu.
Příprava: V 500ml odměrné baňce se rozpustí 5 ml kyseliny octové (11) a doplní se methanolem (2) po značku.
- 16 Mobilní fáze A pro stanovení glyfosátu a spol. na koloně APP, 1,2% kyselina mravenčí ve vodě.
Příprava: V 500ml odměrné baňce se rozpustí 6 ml kyseliny mravenčí (5) a doplní se vodou (1) po značku.
- 17 Mobilní fáze B pro stanovení glyfosátu a spol. na koloně APP, 0,5% kyselina mravenčí v acetonitrilu.
Příprava: V 500ml odměrné baňce se rozpustí 2,5 ml kyseliny mravenčí (5) a doplní se acetonitrem (3) po značku.
- 18 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].
Aminomethyl phosphonic acid = AMPA (CH₆NO₃P), CAS [1066-51-9].
Ethephon (C₂H₆ClO₃P), CAS [16672-87-0].
Ethephon-hydroxy = HEPA (C₂H₇O₄P), CAS [22987-21-9].
Fosetyl-aluminium (C₆H₁₈AlO₉P₃), CAS [39148-24-8].

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10605.4 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů metodou LC-MS/MS	Revize	0

Glufosinate ammonium ($C_5H_{15}N_2O_4P$), CAS [77182-82-2].

Glufosinate-N-acetyl ($C_7H_{14}NO_5P$), CAS [73634-73-8].

Glyphosate ($C_3H_8NO_5P$), CAS [1071-83-6].

Glyphosate-N-acetyl ($C_5H_{10}NO_6P$), CAS [129660-96-4].

Maleic hydrazide ($C_4H_4N_2O_2$), CAS [123-33-1].

3-(Methylphosphinico) propionic acid = MPP ($C_4H_9O_4P$), CAS [15090-23-0].

N-acetyl-AMPA ($C_3H_8NO_4P$), CAS [57637-97-5].

Poznámky

1 Skupinou Glyfosát a spol. se rozumí následujících jedenáct látek: AMPA, ethefon, HEPA, fosetyl, glufosinát, glufosinát-N-acetyl, glyfosát, glyfosát-N-acetyl, maleinohydrazid, MPP a N-acetyl-AMPA.

19 Zásobní roztoky pesticidů.

Příprava zásobních roztoků jednotlivých pesticidů, $c = 1 \text{ mg/ml}$ ($0,1 \text{ mg/ml}$ pro fosetyl): Pro každý analyt se připraví zásobní roztok o přesné koncentraci 1 mg/ml ($0,1 \text{ mg/ml}$ pro fosetyl) ve vhodném rozpouštědle, např. v methanolu (2) nebo v 10% acetonitrilu ve vodě (4). Navažuje se přibližně 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 těsně uzavřených skleněných vialkách v lednici, popřípadě v mrazáku pro chlormekvát a mepikvát. Roztoky AMPA, glyfosátu, HEPA a N-acetyl-AMPA se uchovávají v těsně uzavřených plastových vialkách v lednici.

20 Pracovní směsné roztoky chlormekvátu a mepikvátu.

Pracovní směsné roztoky se připraví ředěním zásobních roztoků (19) podle požadovaného rozsahu analýzy, obvykle o koncentraci $c = 10$; 1 a $0,1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ v methanolu. Pracovní roztoky jsou uchovávány v těsně uzavřených skleněných vialkách v mrazáku.

21 Pracovní směsné roztoky glyfosátu a spol.

Pracovní směsné roztoky se připraví ředěním zásobních roztoků (19) podle požadovaného rozsahu analýzy, obvykle o koncentraci $c = 10/2,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$, resp. $c = 0,25/0,0625 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Pracovní roztoky jsou připravovány do vhodného rozpouštědla, např. do 10% acetonitrilu ve vodě (4) a jsou uchovávány v těsně uzavřených plastových vialkách v lednici.

22 Vnitřní isotopově značené standardy pesticidů (ILIS). Používají se pevné nebo kapalné standardy s deklarovanou čistotou od ověřeného výrobce.

Chlormequat chloride D4 ($C_5H_9Cl_2ND_4$), $c = 100 \text{ } \mu\text{g/ml}$ v D_2O .

Mepiquat iodide D3 (methyl D3) ($C_7H_{13}IND_3$), $c = 100 \text{ } \mu\text{g/ml}$ v D_2O .

AMPA- ^{13}C , ^{15}N ($^{13}CH_6^{15}NO_3P$), $c = 1 \text{ mg/ml}$ v 10% ACN.

Ethephon D4 ($C_2H_2ClO_3PD_4$), $c = 100 \text{ } \mu\text{g/ml}$ v acetonu.

D4 Ethephon-hydroxy ($C_2H_3D_4O_4P$), $c = 100 \text{ } \mu\text{g/ml}$ v acetonu.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10605.4 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů metodou LC-MS/MS	Revize	0

D15 Fosetyl-aluminium ($C_6H_3AlD_{15}O_9P_3$), $c = 0,1$ mg/ml v 10% ACN.

Glufosinate D3 hydrochloride ($C_5H_{10}D_3ClNO_4P$), $c = 1$ mg/ml v 10% ACN.

Glufosinate-N-acetyl D3 ($C_7D_3H_{11}NO_5P$), $c = 1$ mg/ml v 10% ACN.

Glyphosate- $^{13}C_2$, ^{15}N ($^{13}C_2CH_8^{15}NO_5P$), $c = 1$ mg/ml v H_2O .

Maleic hydrazide D2 ($C_4H_2D_2N_2O_2$), $c = 1$ mg/ml v MeOH.

MPP D3 sodium salt ($C_4H_4D_3Na_2O_4P$), $c = 1$ mg/ml v 10% ACN.

N-acetyl-glyphosate D3 ($C_5H_7D_3NO_6P$), $c = 1$ mg/ml v 10% ACN.

- 23 Pracovní roztok ILIS pro stanovení chlormekvátu a mepikvátu, obohacení vzorku před extrakcí, $c = 10$ µg/ml.

Příprava: 130 µl standardu chlormekvát chloridu D4 (22) se smíchá s 205 µl mepikvát jodidu D3 (22) a 665 µl methanolu (2).

- 24 Pracovní roztok ILIS pro stanovení chlormekvátu a mepikvátu, obohacení extraktu a kalibračních standardů, $c = 1$ µg/ml.

Příprava: 80 µl pracovního roztoku ILIS (23) smíchá s 720 µl methanolu (2).

- 25 Pracovní roztok ILIS pro stanovení glyfosátu a spol., $c = 10/2,5$ µg/ml.

Příprava: Vypočtené množství jednotlivých roztoků ILIS (22) se smíchá v 10ml plastové odměrné baňce a doplní se 10% acetonitrilem ve vodě (4) po značku.

- 26 Kalibrační roztoky pro stanovení chlormekvátu a mepikvátu.

Příprava: Smísí se pracovní roztoky pesticidů (20) a příslušné vnitřní isotopově značené standardy (24). Kalibrační rozsah pro stanovení chlormekvátu a mepikvátu činí 0,004–2,000 mg/kg za použití solventové kalibrace připravené do 0,5% roztoku kyseliny mravenčí v 50% methanolu (7).

- 27 Kalibrační roztoky pro stanovení glyfosátu a spol.

Příprava: Smísí se pracovní roztoky pesticidů (21) a příslušné vnitřní isotopově značené standardy (25). Kalibrační rozsah pro stanovení glyfosátu a spol. činí např. 0,002–2,000 mg/kg za použití vhodné matricové kalibrace.

- 28 Interní referenční materiál, např. vzorky získané v rámci účasti v EUPT.

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10605.4 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů metodou LC-MS/MS	Revize	0

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem, např.:
ACQUITY UPLC-TQ XS MS Xevo (Waters) nebo UHPLC 1290 Infinity II Biocompatible (Agilent)-MS/MS QT 4500 (Sciex), s tímto vybavením:
 - a) HPLC a UPLC kolony pro stanovení chlormekvátu a mepikvátu, např.:
OBELISC R, 100 mm × 2,1 mm, 5 µm (Sielec).
ACQUITY UPLC BEH HILIC Column, 50 mm × 2,1 mm, 1,7 µm (Waters).
 - b) HPLC a UPLC kolony pro stanovení glyfosátu a spol., např.:
HYPERCARB, 100 mm × 2,1 mm, 5 µm (Thermo).
Anionic Polar Pesticide (APP), 100 mm × 2,1 mm, 5 µm (Waters).
Torus DEA, 100 mm × 2,1 mm, 1,7 µm (Waters).
- 2 Analytické váhy.
- 3 Třepačka, min. 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 zkumavky typu Eppendorf, 1,5 ml.
- 7 Vysokorychlostní míchadlo, např. Vortex.
- 8 Filtrační materiál: stříkačkové filtry nylonové o velikosti pórů 0,2 µm.
- 9 Vialky skleněné a plastové, šroubovací, 2 ml.

5 Postup

5.1 Extrakce vzorku – postup vhodný pro rostlinný materiál, ovoce a zeleninu

Homogenní vzorek se naváží do 50ml centrifugační zkumavky a smočí se dostatečným přídavkem vody (1). Navážka vzorku a přídavek vody se volí podle doporučení v metodice QuPPe (2). U ovoce a zeleniny se navažuje 10 g, u listů a obilovin 5 g atd. Vzorek se extrahuje 10 ml okyseleného methanolu (6) třepáním 15 min při minimálně 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 nejméně 2 h, nejlépe přes noc. Vymražený extrakt se opět odstředí 5 min při 3900 ot./min.

5.2 Extrakce vzorku – postup vhodný pro komplexnější matrice

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 9 ml vody (1). V případě dalších materiálů se navážka vzorku a přídavek vody volí podle doporučení v metodice QuPPe (2). Ke vzorku se přidá 10 ml okyseleného methanolu (6) a 100 µl kyseliny mravenčí (9), centrifugační zkumavka se uzavře a krátce protřepá. Poté se ke vzorku přidá 1 ml

	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10605.4 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů metodou LC-MS/MS	Revize	0

10% EDTA (9) a vzorek se extrahuje třepáním 15 min při minimálně 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 nejméně 2 h, nejlépe přes noc. Vymražený extrakt se opět odstředí 5 min při 3900 ot./min.

Poznámky

- 2 V případě analýzy Glyfosátu a spol. (pro postup extrakce 5.2) na koloně HYPERCARB se 0,75 ml extraktu smíchá s 0,75 ml acetonitrilu (3) ve zkumavce typu Eppendorf. Pak se manuálně protřepe 1 min a odstředí 5 min při nejméně 3000 ot./min. Dále se pokračuje dle postupu v bodě 5.4.
- 3 U méně běžných matric je nutné vzorek obohatit 20násobkem (40násobkem v případě extrakce Glyfosátu a spol. postupem 5.2 a analýzou na koloně HYPERCARB) příslušného ILIS před extrakcí.

5.3 Finalizace extraktu pro stanovení chlormekvátu a mepikvátu

Ve zkumavce typu Eppendorf se k 10 µl roztoku ILIS (24) napipetuje 1 ml supernatantu (5.1 nebo 5.2). Zkumavka se uzavře, několik sekund se promíchá na vysokorychlostním míchadle (např. Vortexu) a její obsah se zfiltruje do skleněné chromatografické vialky.

5.4 Finalizace extraktu pro stanovení glyfosátu a spol.

Ve zkumavce typu Eppendorf se k 5 µl roztoku ILIS (25) napipetuje 1 ml supernatantu (5.1 nebo 5.2). Zkumavka se uzavře, několik sekund se promíchá na vysokorychlostním míchadle (např. Vortexu) a její obsah se zfiltruje do plastové chromatografické vialky.

5.5 LC-MS/MS stanovení

Připravené extrakty se analyzují metodou LC-MS/MS ve vhodné sekvenci vzorků a standardů.

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.

6 Kontrola kvality

Požadavky na zajištění kvality reziduálních analýz pesticidů jsou uvedeny v dokumentu SANTE/11312/2021 (V2) (3).

Zkouška využívá ke kvantifikaci isotopově značené interní standardy (ILIS) příslušných stanovovaných látek. ILIS přidávané k podílu vzorku při finalizaci slouží k eliminaci matričních vlivů. V případě, že jsou ILIS přidány ke vzorku před extrakcí, je výsledek korigován jak na matriční efekty, tak na výtěžnost. Pokud se výtěžnost sledovaných látek pohybuje v rozsahu 80–120 %, např. u obilovin a olejnin, je možné ILIS přidat k finálnímu extraktu před analýzou pouze pro korekci matričních vlivů.

	Národní referenční laboratoř	Strana	7
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10605.4 – Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů metodou LC-MS/MS	Revize	0

Do každé série vzorků se průběžně zařazuje analýza referenčního materiálu (28) nebo obohacené matrice. Pro tyto kontrolní vzorky se vede a vyhodnocuje regulační diagram.

7 Výpočet a vyjádření výsledků

Přítomnost analytu je potvrzena, pokud je odchylka retenčního času v chromatogramu vzorku a kalibračního standardu $\pm 0,1$ min (vhodněji lze využít relativní retenční čas vztažený na příslušný ILIS) a pokud se poměr produktových iontů ve spektru vzorku nachází v povoleném intervalu daném poměrem těchto produktových iontů ve spektru kalibračního standardu. Použití ILIS umožňuje kvantifikaci vzorku jak pomocí solventových, tak matricových kalibračních standardů. Při podezření na překročení povoleného obsahu reziduí ve vzorku se doporučuje použít metodu standardního přídatku ke vzorku, a to za předpokladu lineární závislosti odezvy na koncentraci v daném koncentračním rozsahu.

Výsledek pod mezí stanovitelnosti se uvede jako $< RL$ (reportovací limit = mez stanovitelnosti). Pro hodnoty nad mezí stanovitelnosti se výsledek zaokrouhlí podle Tabulky 1.

Tabulka 1. Zaokrouhlování a udávání výsledků.

Hladina sledovaných analytů (mg/kg)	Zápis výsledku
$< 0,01$	2 platné číslice
$> 0,01$	3 platné číslice

8 Validační data

Postupem daným pro tuto zkoušku byla stanovena výtěžnost a opakovatelnost chlormekvátu, mepikvátu, AMPA, ethefonu, HEPA, fosetylu, glufosinátu, glufosinátu-N-acetylu, glyfosátu, glyfosátu-N-acetylu, maleinohydrazidu, MPP a N-acetyl-AMPA, které vyhovovaly požadavkům uvedeným v dokumentu SANTE/11312/2021 (V2). Nejnížší validovaná hladina odpovídá RL, tj. mezi 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-PO-Method, Version 12.3 – Quick Method for the Analysis of Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC- or IC-MS/MS Measurement (I. Food of Plant Origin) https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/EurlSrm_meth_QuPPE_PO_V12_3.pdf
- 3 Dokument SANTE/11312/2021 (V2) – Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed v2 [https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-11/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2021-11312.pdf].