

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2024

Ročník XXVIII, číslo 3/2024

Brno 2024

Obsah

1	Rozšíření a revalidace zkoušky stanovení polárních pesticidů Pavčina Landová Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno, Hroznová 2, 603 00 Brno	1
2	Analýza dikvátu a parakvátu v zemědělských komoditách Petra Kosubová, Pavčina Landová, Miroslav Prchal Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno, Hroznová 2, 603 00 Brno	18
3	Stanovení glyfosátu a glufosinátu v půdě metodou LC-MS/MS Kristýna Brabcová, Pavčina Landová, Petra Kosubová Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno, Hroznová 2, 603 00 Brno	32

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Rozšíření a revalidace zkoušky stanovení polárních pesticidů

Pavlna Landová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
ONRL Brno, Hroznová 2, 603 00 Brno
pavlina.landova@ukzuz.cz

1 Úvod

Stanovení polárních pesticidů patří, oproti analýze pesticidů multiresiduálními metodami, k analyticky komplikovanějšímu stanovení, které vyžaduje použití rozdílných extrakčních technik, speciálních chromatografických kolon a jiných strategií kvantifikace. Pole stanovení polárních pesticidů je poměrně dynamické a stále se vyvíjí. Dochází k rozšiřování rozsahů metod o nové polární pesticidy a jejich metabolity. Současně dochází k pokroku v oblasti extrakčních a čistících postupů i samotné analýzy. Používají se nové stacionární fáze chromatografických kolon, které umožňují stanovení těchto poměrně malých polárních molekul. I vzhledem k těmto skutečnostem byla nutnost rozšířit a revalidovat zkoušku stanovení.

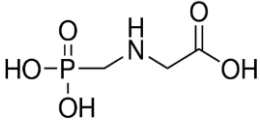
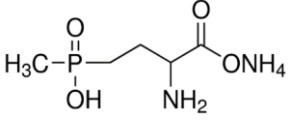
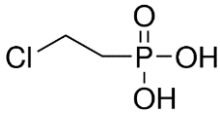
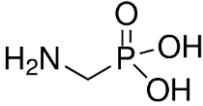
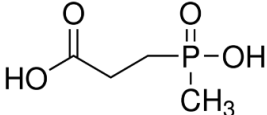
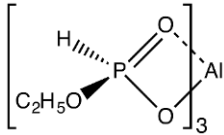
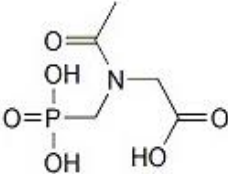
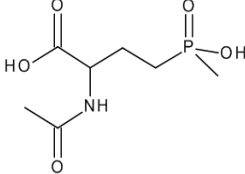
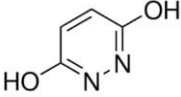
Zvolená metodika obsahuje modifikovanou verzi již dříve zavedeného extrakčního postupu pro stanovení glyfosátu v krmných surovinách. Extrakce nově zahrnuje přídavek většího množství kyseliny mravenčí a EDTA. Postup rovněž obsahuje přečištění získaných extraktů pomocí acetonitrilu. Všechny tyto modifikace napomáhají ke zvýšení extraktability analytů a snížení obsahu matričních koextraktů. Výše popsaným postupem je nyní možné stanovit devět polárních pesticidů v krmném materiálu za dosažení nízkých reportovacích limitů se splněním minimálních akceptovatelných výkonnostních parametrů metody. Totéž pak platí pro stanovení devíti polárních pesticidů v rostlinném materiálu, kdy pro validaci v tomto materiálu byla aplikována původní zjednodušená verze extrakčního postupu.

2 Teoretická část

Herbicidy se v zemědělství hojně využívají ke zvyšování výnosů a zlepšení kvality pěstovaných komodit. Fungují na principu redukce/inhibice růstu plevelů. Také hrají významnou roli jako desikanty u plodin jako jsou obiloviny (pšenice, ječmen, oves), olejnin (soja) a luštěniny (fazole, hrášek). Vysoce polární iontové sloučeniny jsou skupinou herbicidů, která se celosvětově aplikuje ve velké míře právě na tyto komodity. Zejména glyfosát, který je vzhledem k jeho rapidní degradaci ve vodě a půdě považován za neperzistentní a bezpečný k životnímu prostředí, je celosvětově jedním z nejpoužívanějších herbicidů. Navzdory omezeným důkazům o jeho karcinogenitě a mutagenitě ale může způsobit závažné poškození očí a může být potenciálně škodlivý k vodní biotě. Hlavním metabolitem glyfosátu je AMPA, její toxicita je srovnatelná s glyfosátem [1]. Spotřeba glyfosátu narostla i kvůli zvýšenému používání geneticky modifikovaných plodin (zejména v USA), rezistencí k působení glyfosátu (např. geneticky modifikovaná soja). Se zvýšenou spotřebou glyfosátu dochází ovšem k rozvoji rezistence i u plevelů [2], což znamená jeho sníženou účinnost a nutnost aplikace vyšších dávek nebo aplikace jiných herbicidů. Glyfosát našel využití i v nezemědělském sektoru, jakým je například kontrola travin na železničních tratích a jiné [3].

Stran glyfosátu, do této skupiny polárních pesticidů patří i další látky, pro které jejich zařazení do portfolia sledovaných látek nabývá v poslední době na důležitosti. Mezi tyto pesticidy patří glufosinát, maleinohydrazid, fosetyl nebo ethefon a jejich metabolity. Zatímco glufosinát plní podobnou herbicidní roli jako glyfosát, tak například ethefon je růstovým regulátorem používaným pro podporu předsklizňového dozrávání jablek a dalšího ovoce a zeleniny. Dále se aplikuje na obiloviny ke zvýšení jejich odolnosti proti poléhání. Fosetyl je látka fungicidní, která se aplikuje ke kontrole nemocí způsobených *Phytophthora*, *Pythium*, *Plasmopara*, *Bremia* ssp., a to zejména u vinné révy [4]. Maleinohydrazid je růstový regulátor používaný zejména u brambor a cibule, kde brání klíčení hlíz a rašení cibulí během skladování. Pro většinu těchto polárních pesticidů jsou již nastaveny maximální residuální limity, které u některých pesticidů ve své definici zahrnují i metabolity (např. glufosinát s metabolity MPP a N-acetyl glufosinát) [2].

Kompletní výčet polárních pesticidů a jejich metabolitů s chemickou strukturou, který je předmětem této práce, je uveden na Obrázku 1.

Glyfosát herbicid	Glufosinát-NH₄ herbicid	Ethefon růstový regulátor
		
AMPA degradační produkt glyfosátu	MPP degradační produkt glufosinátu	Fosetyl fungicid
		
N-acetyl glyfosát degradační produkt glyfosátu	N-acetyl glufosinát degradační produkt glufosinátu	Maleinohydrazid růstový regulátor
		

Obrázek 1. Chemická struktura glyfosátu, dalších polárních pesticidů a jejich metabolitů.

Přesto, že glyfosát patří k nejpoužívanějším herbicidům, jeho analytické stanovení je poměrně komplikované a do dnešní doby neexistuje metodika, která by byla jednoduchá a univerzální. To stejné pak více či méně platí i pro další výše zmíněné pesticidy. Tyto látky není většinou možno analyzovat multiresiduálními metodami právě kvůli jejich polaritě, která vede ke špatné extraktabilitě do běžně používaných organických rozpouštědel. Vysoká polarita také představuje problém při chromatografické separaci na běžně používaných C18 reverzních fázích v případě multiresiduálních metod, kdy u těchto sloučenin nedochází k dostatečným interakcím se stacionární fází [1].

K překonání těchto problémů jsou aplikovány alternativní extrakční procedury založené na použití polárních rozpouštědel, jako je voda a methanol. Ke zlepšení chromatografického chování, zvýšení retence a zlepšení tvaru pík se používají kolony se speciálními stacionárními fázemi, které obsahují aktivní uhlí. Separace lze docílit i použitím HILIC kolon nebo iontové chromatografie. Další alternativou je derivatizace glyfosátu pomocí FMOC-Cl. Po derivatizaci

je pak možné použít tradiční C18 reverzní fáze. Nutno ovšem dodat, že derivatizace FMOC-Cl nelze aplikovat na všechny polární pesticidy. Použití iontové chromatografie zase znamená nutnost mít k dispozici poměrně sofistikované chromatografické vybavení, kterým nedisponují všechny laboratoře.

V literatuře je popsána celá řada postupů pro stanovení glyfosátu a dalších polárních pesticidů. Jedním z nich je QuPpe [5] metodika doporučená EURL-SRM, která nabízí momentálně jeden z nejkompexnějších zdrojů informací pro analýzu polárních pesticidů a dalších látek obdobné povahy. QuPpe metodika prošla během posledních let řadou úprav a aktualizací. Do metodiky jsou přidávány nové polární pesticidy a jejich metabolity, nebo LC-/IC-MS/MS metody s použitím nově dostupných kolon na trhu. Zásadní změnou byla ale modifikace extrakčního postupu, která byla provedena z důvodů zvýšení extraktability pesticidů a také z důvodů zlepšení eliminace matričních koextraktů. Modifikovaná extrakce pro komodity typu obilovin a luštěnin nově zahrnuje přidavek většího množství kyseliny mravenčí ke sražení bílkovin a dále pak přidavek EDTA, který slouží ke komplexaci iontů kovů, jako jsou Ca a Mg. Získaný extrakt se pak dále přečistí pomocí přídatku ACN, kdy dochází k dalšímu srážení bílkovin. I přes tyto modifikace jsou takto připravené vzorky stále bohaté na koextrakty. Ke správné korekci matričních efektů a tím pádem i správné kvantifikaci látek se doporučuje použití příslušných izotopově značených interních standardů.

Cílem práce bylo rozšířit a revalidovat zkoušku stanovení polárních pesticidů. Důvodem je navýšení počtu stanovovaných látek vycházející z jejich zařazení do víceletého kontrolního plánu. Dále vycházela nutnost revalidace z modifikace zavedeného extrakčního postupu podle metodiky QuPpe a použití nové měřicí sestavy LC-MS/MS.

3 Praktická část

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Chemikálie

Voda (ultračistá, MQ), methanol (CH₃OH, pro HPLC a pro LC-MS), acetonitril (ACN, pro HPLC), kyselina mravenčí (HCOOH, FA), tetrasodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové dihydrát/tetrahydrát (EDTA), kyselina octová (CH₃COOH).

3.1.2 Standardy a referenční materiály

Standardy pesticidů v pevném nebo kapalném skupenství s deklarovanou čistotou:

Glyphosate (C₃H₈NO₅P) CAS [1071-83-6].

Aminomethyl phosphonic acid = AMPA (CH₆NO₃P) CAS [1066-51-9].

Glufosinate ammonium (C₅H₁₅N₂O₄P) CAS [77182-82-2].

N-acetyl-glyphosate (C₅H₁₀NO₆P) CAS [129660-96-4].

3-(Methylphosphinico) propionic acid = MPP (C₄H₉O₄P) CAS [15090-23-0].

Ethephon (C₂H₆ClO₃P) CAS [16672-87-0].

Fosetyl-aluminium (C₆H₁₈AlO₉P₃) CAS [39148-24-8].

Glufosinate-N-acetyl (C₇H₁₄NO₅P) CAS [73634-73-8].

Maleic hydrazide (C₄H₄N₂O₂) CAS [123-33-1].

Vnitřní izotopově značené standardy:

Glyphosate-¹³C₂, ¹⁵N (C₃H₈¹³C₂¹⁵N¹⁵O₅P), c = 1 mg/ml H₂O.

AMPA-¹³C, ¹⁵N (C₁H₆¹³C¹⁵N¹⁵O₃P), c = 1 mg/ml 1% MeOH vH₂O.

Glufosinate D₃ hydrochloride (C₅H₁₀D₃ClNO₄P), c = 1 mg/ml 10% ACN.

N-acetyl-glyphosate D₃ (C₅H₇D₃NO₆P), c = 1 mg/ml 10% ACN.

MPP D₃ sodium salt (C₄H₄D₃Na₂O₄P), c = 1 mg/ml 10% ACN.

Ethephon D₄ (C₂H₂ClO₃PD₄), c = 0,1 mg/ml 10% aceton.

D₁₅-Fosetyl-aluminium (C₆H₃AlD₁₅O₉P₃), c = 0,1 mg/ml 10% ACN.

Glufosinate-N-acetyl D₃ (C₇D₃H₁₁NO₅P), c = 1 mg/ml 10% ACN.

Maleic hydrazide D₂ (C₄H₂D₂N₂O₂), c = 1 mg/ml MeOH.

Interní referenční materiál (IRM):

Vzorky získané v rámci účasti v evropských testech způsobilosti (EUPT) pořádané Referenčními laboratořemi Evropské Unie (EURL) pro rezidua pesticidů.

3.1.3 Laboratorní pomůcky a vybavení pro přípravu vzorku

Analytické váhy, vertikální třepačka (min. 300 kmitů/min), centrifuga (3900 až 5000 ot/min), centrifugační zkumavky plastové se šroubovacím víčkem (15 ml; 50 ml), centrifugační zkumavky Eppendorf (1,5 ml), vysokorychlostní míchadlo (např. Vortex), filtrační materiál (stříkačkové filtry nylonové o velikosti pórů 0,2 μm), šroubovací vialky plastové (2 ml).

3.1.4 Postup přípravy

Příprava vzorků byla provedena podle JPP 10605.4 [6].

Postup pro vzorky rostlinného materiálu, ovoce a zeleninu

Homogenní vzorek se naváží do 50ml centrifugační zkumavky a smočí se dostatečným přídavkem vody. Navážka vzorku a přídavek vody se volí podle doporučení v metodice QuPPE [5]. U ovoce a zeleniny se navažuje 10 g, u listů a obilovin 5 g atd. Vzorek se extrahuje 10 ml okyseleného methanolu (1% FA) 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. Podíl extraktu (1 – 1,5) ml se zfiltruje do zkumavky Eppendorf a nechá se vytemperovat na laboratorní teplotu.

Postup pro vzorky komplexnějších matric jako jsou např. krmiva

Homogenní vzorek se naváží do 50ml centrifugační zkumavky a smočí se dostatečným přídavkem vody. Např. u obilovin, luštěnin a olejnatých semínek se k 5 g vzorku přidá 9 ml vody. V případě dalších materiálů se navážka vzorku a přídavek vody volí podle doporučení v metodice QuPPE [5]. Ke vzorku se přidá 10 ml okyseleného methanolu (1% FA) a 100 μl kyseliny mravenčí, centrifugační zkumavka se uzavře a krátce protřepe. Poté se ke vzorku přidá 1 ml 10% EDTA 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. Podíl extraktu (1 – 1,5) ml se převede do zkumavky Eppendorf a nechá se vytemperovat na laboratorní teplotu. Poté se 0,75 ml extraktu smíchá s 0,75 ml ACN ve zkumavce Eppendorf. Roztok se promíchá, zfiltruje do zkumavky Eppendorf a nechá se vytemperovat na laboratorní teplotu.

Přesně 1 ml filtrátu se převede do plastové vialky a obohatí se 5 µl směsí interních standardů. Poté se několik sekund promíchá na Vortexu.

3.1.5 Přístrojové vybavení a podmínky pro koncové stanovení

Kapalinový chromatograf Agilent UHPLC 1290 Infinity vybavený kolonou Hypercarb (Thermo Fisher Scientific) o rozměrech 100 mm × 2,1 mm × 5 µm s předkolonou Hypercarb o rozměrech 10 mm × 2,1 mm × 5 µm (Thermo Fisher Scientific), a tandemový hmotnostní spektrometr Sciex QTrap 4500.

Chromatografická separace byla provedena podle pokynů v metodice QuPPE [5] s drobnými úpravami podle možností našeho přístrojového vybavení. Detaily nastavení měřicí LC-MS/MS metody jsou uvedeny v Tabulkách 1, 2 a 3.

Tabulka 1. Nastavení parametrů kapalinové chromatografie.

Parametr	Nastavení
Mobilní fáze	A: 1% kyselina octová v 5% methanolu ve vodě B: 1% kyselina octová v methanolu
Průtok mobilní fáze	0,2/0,4 ml/min
Objem nástřiku	5 µl
Teplota kolony	40 °C

Tabulka 2. Gradient mobilní fáze.

Čas [min]	% mobilní fáze A	Průtok mobilní fáze (ml/min)
0,0	100	0,2
10,0	70	0,2
10,5	70	0,2
11,0	5	0,4
14,0	5	0,4
14,1	5	0,2
16,0	100	0,2
21,0	100	0,2

Tabulka 3. MRM přechody sledovaných analytů a interních standardů.

Parametr	RT* [min]	MRM1	MRM2	MRM3
Glyfosát	3,12	168 > 63	168 > 124	168 > 150
AMPA	1,81	110 > 63	110 > 79	
Glufosinát	2,48	180 > 63	180 > 136	
N-acetyl-glyfosát	8,08	210 > 63	210 > 79	
MPP	5,11	151 > 107	151 > 63	
Ethefon	5,81	143 > 107	143 > 79	
Fosetyl	5,26	109 > 81	109 > 63	
N-acetyl-glufosinát	8,23	222 > 136	222 > 63	
Maleinohydrazid	8,99	111 > 82	111 > 83	
Glyfosát -¹³C₂, ¹⁵N	3,09	171 > 63	171 > 126	
AMPA-¹³C, ¹⁵N	1,79	112 > 63		
Glufosinát-d3	2,45	183 > 98	183 > 63	
N-acetyl-glyfosát-d3	8,02	213 > 63		
MPP-d3	5,03	154 > 63	154 > 136	
Ethefon-d4	5,74	147 > 111	147 > 79	
Fosetyl-d15	5,17	114 > 82	114 > 63	
N-acetyl-glufosinát -d3	8,16	225 > 63	225 > 137	
Maleinohydrazid-d2	8,91	113 > 85	113 > 84	

*Retenční časy analytů se mohou v závislosti na matici vzorku měnit. Ke správné identifikaci analytu je nutné použít srovnání s retenčním časem příslušného interního standardu.

Ionizace byla provedena elektrosprejem při teplotě iontového zdroje 550 °C a negativním módu ionizace s napětím na kapiláře – 4500 V. Nastavené parametry plynů: CUR (N₂) – 40 psi, CAD (N₂) – medium, GS1 (vzduch) – 60 psi, GS2 (vzduch) – 60 psi.

Analyty byly detekovány v módu sledování vybraných přechodů (MRM), které jsou uvedeny v Tabulce 3 výše. MRM přechody byly převzaty z literatury [5], ověřeny a optimalizovány pro získání co nejvyšších odezev pro používanou aplikaci a měřicí sestavu.

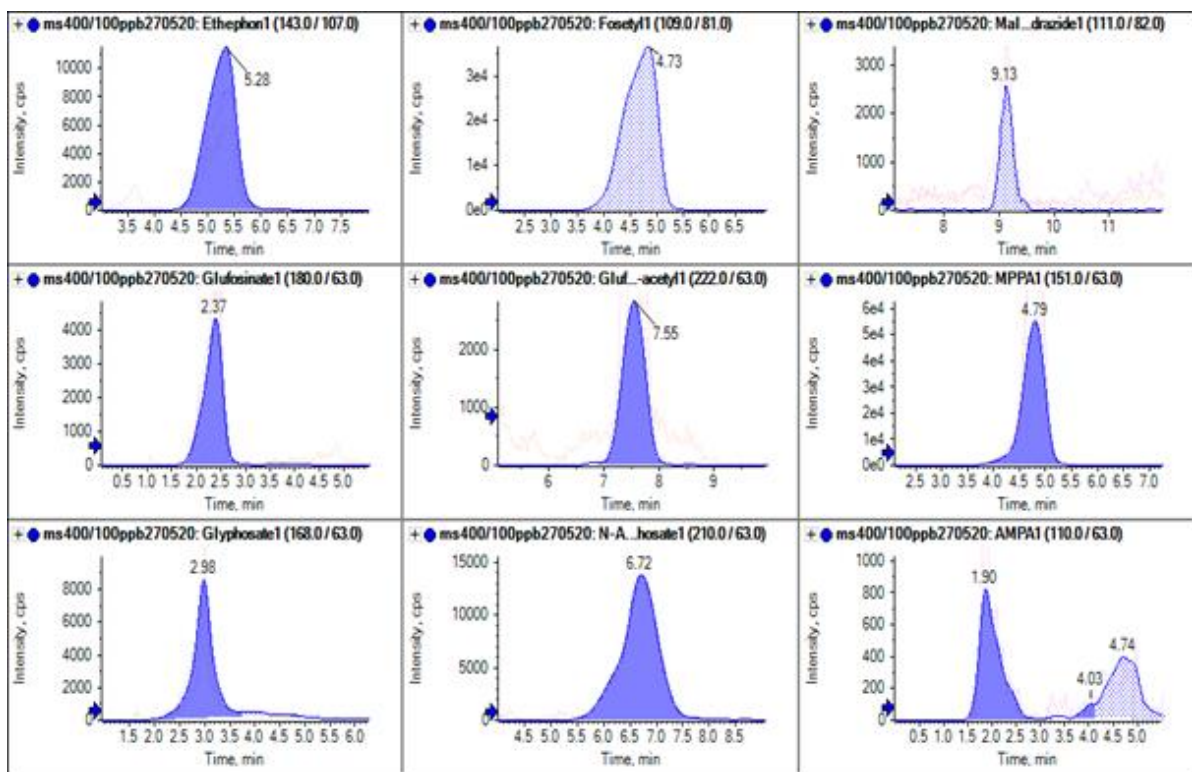
3.2 Výsledky

Před samotnou validací bylo nezbytné uskutečnit několik kroků, a to:

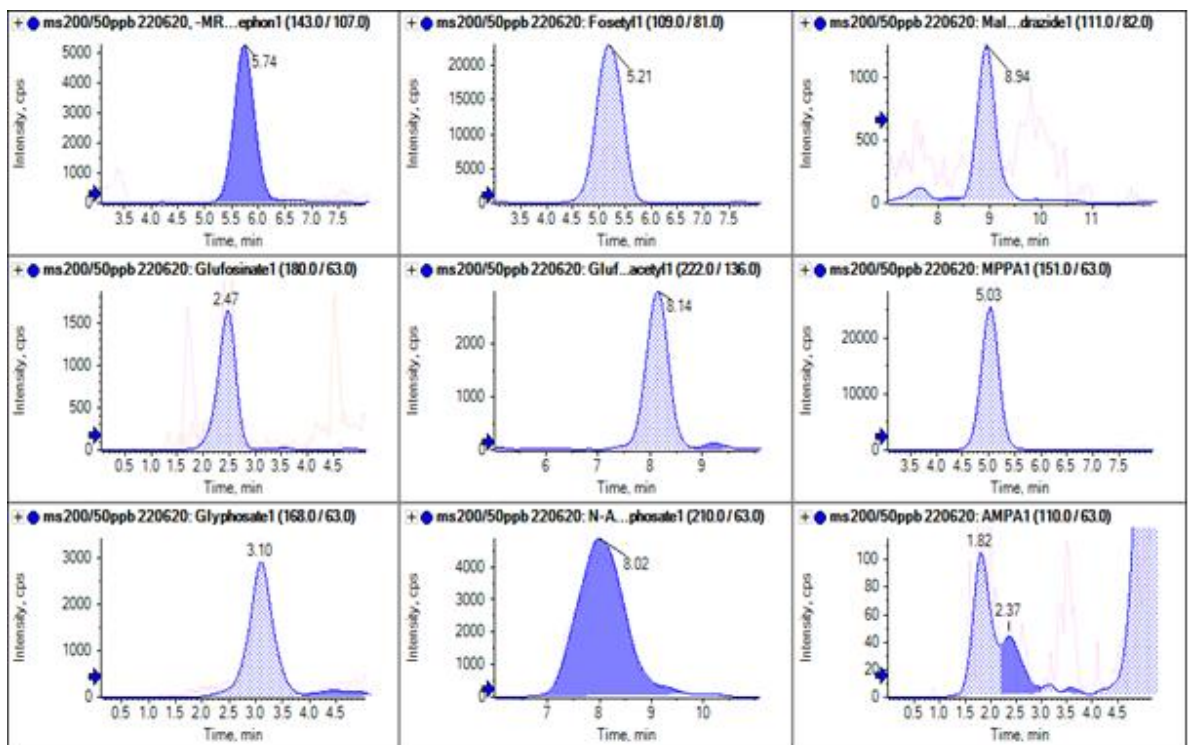
- Nastavení a optimalizace LC-MS/MS měřicí metody.
- Screening a prvotní testy výtěžností na různých materiálech – cílem bylo získat informace o chování všech analytů při aplikovaném postupu extrakce, přípravy a měření. Taktéž bylo zjišťováno případné pozadí a hmotnostní interference v různých materiálech, souběžně byly hledány vhodné blankové matrice rostlinného materiálu a krmiva, pomocí kterých by bylo možné danou revalidaci realizovat.
- Ověřit použitelnost navržených interních standardů a zkontrolovat jejich izotopovou čistotu pro vyloučení přítomnosti nativních forem pesticidů v zakoupených standardech. Na nutnost kontroly upozorňuje i metodika QuPPE [5].

Metoda byla vyzkoušena na několika druzích matric od rostlinného materiálu až po krmné suroviny, jako například oves, hrách, vojtěška, sláma a jahody. Za navržených podmínek chromatografie a MS detekce bylo možné analyzovat všechny analyty z rozsahu výše zmíněných polárních pesticidů. Dalším důležitým zjištěním bylo, že při aplikaci navrženého postupu bude pravděpodobně možné dosáhnout uspokojivě nízkých limitů detekce a kvantifikace. Ukázkové chromatogramy pesticidů v ovesné a pšeničné matrici jsou na Obrázcích 2 a 3 níže. Nejhorší chromatografické chování a odezva byly pozorovány pro metabolit glyfosátu AMPA, ale i přes to bylo možné tuto látku navrženou metodou analyzovat. Ke správnosti stanovení velkou měrou přispívá použití izotopově značeného standardu, který umožňuje zvolit správný rozsah integrace a korekce matričních efektů.

Z naměřených dat bylo také patrné, že některé pesticidy mají několikanásobně lepší citlivost. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k přípravě pesticidní směsi obsahující pesticidy na dvou koncentračních hladinách. Ethefon, fosetyl a glufosinát-N-acetyl byly do pesticidní směsi přidány na 4 × nižší koncentraci (to stejné platilo v případě směsi interních standardů). Proto jsou testované koncentrační hladiny uváděny ve formátu např. 800/200 µg/kg značící obě koncentrace. Jako vhodnou maticí pro provedení validace byl z krmných surovin zvolen oves a z rostlinného materiálu pšenice ozimá.



Obrázek č. 2. LC-MS/MS chromatogramy analytů v matričním standardu ovsa (zrna) na koncentrační hladině 400/100 µg/kg.



Obrázek č. 3. LC-MS/MS chromatogramy analytů v matričním standardu pšenice (čerstvého rostlinného materiálu) na koncentrační hladině 800/200 µg/kg.

3.2.2 Validace metody

Metoda byla validována vícenásobnou analýzou vzorků obohacených o příslušné nativní standardy na níže popsaných hladinách. V rámci validace byly ověřeny parametry uvedené v Tabulce 4, přičemž kritéria přijatelnosti byla adaptována na základě dokumentu SANTE/12682/2019 [7].

Tabulka 4. Validované parametry a min. akceptovatelné výkonnostní parametry metody.

Parametr	Způsob	Kritérium
Linearita	Ověření hodnoty korelačního koeficientu	$\geq 0,995$
Mez stanovitelnosti	Nejnižší obohacená hladina splňující podmínky identifikace, správnosti a přesnosti	\leq MRL
Správnost	Průměrná výtěžnost každé obohacené hladiny, případně průměrná výtěžnost u dostupných interních referenčních materiálů	70–120 % (30–140 %)
Přesnost	Opakovatelnost pro každou obohacenou hladinu	$\leq 20\%$
Nejistota	Rozšířená nejistota, $k = 2$	50 %

Linearita a rozsah kalibrace

Linearita bylo hodnocena v kalibračním rozsahu od minimálně meze stanovitelnosti do 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, resp. 4000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. K hodnocení korelačního koeficientu byl využit příslušný vyhodnocovací software (Sciex OS) a jeho minimální přijatelná hodnota byla 0,995. Linearita byla prokázána pro všechny látky v obou materiálech v rozsahu od meze stanovitelnosti do 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, resp. 4000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (viz. Tabulka 5).

Tabulka 5. Korelační koeficienty a rozsahy kalibrací.

Analyt	Rostlinný materiál		Krmivo	
	r ²	Rozsah kalibrace (µg/kg)	r ²	Rozsah kalibrace (µg/kg)
AMPA	0,99865	80-4000	0,99705	160-4000
Ethefon	0,99879	2-1000	0,99888	10-1000
Fosetyl	0,99971	2-1000	0,99988	5-1000
N-acetyl-glufosinát	0,99613	10-1000	0,99969	10-1000
Glufosinát	0,99942	40-4000	0,99924	20-4000
Glyfosát	0,99817	40-4000	0,99792	40-4000
Maleinohydrazid	0,99665	80-4000	0,99892	80-4000
MPP	0,99996	4-4000	0,99986	20-4000
N-acetyl-glyfosát	0,99974	8-4000	0,99976	40-4000

Správnost a přesnost

Správnost a přesnost stanovení vybraných pesticidních látek byla stanovena opakovanou analýzou obohacených vzorků rostlinného materiálu na hladinách (2, 10, 20, 50, 200, resp. 8, 40, 80, 200, 800) µg/kg; a obohacených vzorků krmiva na hladinách (10, 20, 200, resp. 40, 80, 800) µg/kg. U pesticidních látek byla hodnocena validační kritéria pro správnost a přesnost podle SANTE/12682/2019 [7], tj. výtěžnost v rozmezí (70 – 120) % a opakovatelnost ≤ 20 % na vybraných hladinách. Ze souhrnu výtěžností a opakovatelností (viz. Tabulka 6) vyplývá, že všech 9 pesticidů splnilo obě kritéria.

Tabulka 6. Souhrn výtěžností (správnost) a opakovatelností (přesnost) pesticidních látek pro rostlinný materiál a krmivo.

	Rostlinný materiál			Krmivo		
	Výtěžnost (%)	Opakovatelnost (%)	Počet hladin	Výtěžnost (%)	Opakovatelnost (%)	Počet hladin
AMPA	81,1	12,0	2	70,1	6,0	1
Ethefon	83,9	6,1	4	84,8	4,6	3
Fosetyl	80,3	3,7	5	80,5	3,1	3
N-acetyl-glufosinát	87,8	4,9	4	78,8	8,0	3
Glufosinát	80,1	8,8	3	80,1	8,1	3
Glyfosát	85,7	4,8	4	86,2	7,3	3
Maleinohydrazid	85,0	7,9	3	83,1	6,2	1
MPP	84,9	7,0	5	82,2	2,6	3
N-acetyl-glyfosát	85,9	1,7	4	82,8	6,0	3

Správnost stanovení byla u několika pesticidů testována i za pomoci opakované analýzy (n = 6) dvou referenčních materiálů, a to IRM-SRM10 (kukuřičná mouka) a IRM-SRM13 (sójová mouka). V případě materiálu IRM-SRM10 se hodnoty výtěžností u všech stanovovaných analytů, které materiál obsahoval, pohybovaly v rozmezí (73 – 111) %. V případě materiálu IRM-SRM13 se hodnoty výtěžností u všech stanovovaných analytů, které materiál obsahoval, pohybovaly v rozmezí (86 – 106) % (viz. Tabulka 7). Správnost metody s kritériem (70 – 120) % je tudíž vyhovující u obou referenčních materiálů.

Tabulka 7. Vyhodnocení výtěžností u materiálu IRM-SRM10 a IRM-SRM13.

IRM-SRM10				
Analyt	Referenční hodnota (µg/kg)	Naměřeno (µg/kg)	Výtěžnost (%)	Kritéria přijatelnosti
Ethefon	162	155,2	95,8	Splněno
Glyfosát	568	629,2	110,8	Splněno
N-acetyl-glufosinát	319	231,8	72,7	Splněno
IRM-SRM13				
Glyfosát	903	953,4	105,6	Splněno
Glufosinát	192	203,8	106,2	Splněno
MPP	188	161,7	86,0	Splněno
N-acetyl-glyfosát	835	831,4	99,6	Splněno

V rámci validace byla také testována vhodnost a funkčnost vybraných interních standardů (IS), a to na základě hodnocení správnosti. Obě vybrané matrice byly extrahovány s přidavkem interních standardů před extrakcí, a to na hladinách 50/200 µg/kg pro rostlinný materiál (n = 8), resp. 20/80 µg/kg pro krmivo (n = 6). V případě rostlinného materiálu bylo u všech analytů docíleno výtěžnosti extrakce v rozmezí (95 – 105) % (viz. Tabulka 8).

Tabulka 8. Vyhodnocení správnosti stanovení pro rostlinný materiál, přidavek interních standardů před extrakcí.

Analyt	Předloženo (µg/kg)	Naměřeno (µg/kg)	Výtěžnost (%)	Kritéria přijatelnosti
AMPA	200	211,0	105,5	Splněno
Ethefon	50	47,79	95,6	Splněno
Fosetyl	50	48,78	97,6	Splněno
N-acetyl-glufosinát	50	50,10	100,2	Splněno
Glufosinát	200	192,4	96,2	Splněno
Glyfosát	200	194,9	97,5	Splněno
Maleinohydrazid	200	190,9	95,5	Splněno
MPP	200	207,5	103,8	Splněno
N-acetyl-glyfosát	200	207,7	103,8	Splněno

V případě krmiva se výtěžnost pohybovala v rozmezí (89 – 95) % u 8 sledovaných analytů (viz. Tabulka 9), pouze v případě maleinohydrazidu nebyla výtěžnost tímto způsobem určena z důvodu nevhodně zvolené testované hladiny.

Tabulka 9. Vyhodnocení správnosti stanovení u krmiva, přidavek interních standardů před extrakcí.

Analyt	Předloženo (µg/kg)	Naměřeno (µg/kg)	Výtěžnost (%)	Kritéria přijatelnosti
Ethefon	20	17,75	88,8	Splněno
Fosetyl	20	18,89	94,5	Splněno
N-acetyl-glufosinát	20	18,72	93,6	Splněno
Glufosinát	80	73,54	91,9	Splněno
Glyfosát	80	75,65	94,6	Splněno
MPP	80	75,25	94,1	Splněno
N-acetyl-glyfosát	80	75,85	94,8	Splněno

Mez stanovitelnosti

RL-LVL je nejnižší validovaná hladina označována jako reportovací limit (RL), u které byly splněny kritéria pro výtěžnost a opakovatelnost dle SANTE/12682/2019. Nejnižší validované hladiny byly pro jednotlivé pesticidní látky a testované matrice různorodé. Jejich přehled je uvede níže v Tabulce 10. RL-LIMS je skutečný reportovací limit uvedený v laboratorním systému pro uvedení výsledku na protokol stanovený s ohledem na splnění identifikačních kritérií, jejich přehled je uveden v Tabulce 10 níže.

Nejistota

Stanovené nejistoty vycházejí z vícenásobných měření matrice obohacené na různých hladinách. Požadavek na maximální rozšířenou nejistotu 50 % byl splněn u všech parametrů na validovaných hladinách v případě analýzy nečištěných extraktů (tj. rostlinný materiál).

Rozšířená nejistota pro celkovou metodu byla 12,90 % v případě rostlinného materiálu, resp. 12,12 % v případě krmiva.

Tabulka 10. Souhrn RL-LVL, RL-LIMS a rozšířených nejistot pesticidních látek pro rostlinný materiál a krmivo.

	Rostlinný materiál			Krmivo		
	RL-LVL (µg/kg)	RL-LIMS (µg/kg)	Nejistota (%)	RL-LVL (µg/kg)	RL-LIMS (µg/kg)	Nejistota (%)
AMPA	200	200	24,0	800	800	12,0
Ethefon	10	10	12,3	10	10	9,2
Fosetyl	2	2	7,5	10	10	6,2
N-acetyl-glufosinát	10	10	9,8	10	20	16,0
Glufosinát	40	40	17,7	40	40	16,2
Glyfosát	40	40	9,6	40	40	14,7
Maleinohydrazid	80	80	15,8	800	800	12,4
MPP	8	8	14,1	40	40	5,2
N-acetyl-glyfosát	40	40	3,5	40	40	11,9

Porovnání dosažených výsledků validace s validačním plánem

Opakovatelnost a nejistota vyhovovaly pro všechny validované parametry limitním akceptovatelným hodnotám a jejich porovnání je uvedeno v Tabulce 11.

Tabulka 11. Porovnání dosažených validovaných parametrů s limitními akceptovatelnými hodnotami.

Parametr	Matrice	Výtěžnost	Opakovatelnost	Nejistota
		Limitní akceptovatelné hodnoty		
Polární pesticidy	Krmivo	70-120 %	20 %	50 %
Polární pesticidy	Rostlina	70-120 %	20 %	50 %
		Dosažené hodnoty		
9 pesticidů	Krmivo	70-86 %	2,6-8,1 %	5,2-16,2 %
9 pesticidů	Rostlina	80-88 %	1,7-12,0 %	3,5-24,0 %

4 Závěr

Byla úspěšně rozšířena a revalidována zkouška stanovení polárních pesticidů v rostlinném materiálu a krmivech. Metoda byla verifikována pomocí vícenásobných stanovení obohacených vzorků krmiva (ovesná mouka) a rostlinného materiálu (pšenice ozimá). Metoda je vhodná pro UHPLC-MS/MS stanovení uvedených 9 polárních pesticidů a jejich metabolitů v krmivech a rostlinném materiálu. Získané validační parametry vyhovovaly požadavkům stanoveným dle SANTE/12682/2019.

5 Literatura

1. LOPEZ, Sonia Herrera, Jonatan DIAS, Hans MOL a André DE KOK. Selective multiresidue determination of highly polar anionic pesticides in plant-based milk, wine and beer using hydrophilic interaction liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2020, **1625**, 0–7. ISSN 18733778. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2020.461226
2. LÓPEZ, Sonia Herrera, Jonatan DIAS a André DE KOK. Analysis of highly polar pesticides and their main metabolites in animal origin matrices by hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry. *Food Control* [online]. 2020, **115**(February), 107289. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2020.107289
3. CEDERLUND, H. Environmental fate of glyphosate used on Swedish railways - Results from environmental monitoring conducted between 2007-2010 and 2015-2019. *Science of the Total Environment* [online]. 2021. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.152361
4. MACBEAN, C, ed. *The Pesticide Manual*. 16. vyd. Alton: BCPC, 2012. ISBN 9781901396867.

5. ANASTASSIADES, M, D I KOLBERG, E EICHHORN, A.-K WACHTLER, A BENKENSTEIN, S ZECHMANN, D MACK, C WILDGRUBE, A BARTH, I SIGALOV, S GÖRLICH, D DÖRK a G CERCHIA. Quick Method for the Analysis of Numerous Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC-MS/MS Measurement. I. Food of Plant Origin (QuPPE-PO-Method) Version. *Eurl-Srm* [online]. 2020, **11**, 1–86. Dostupné z: www.eurl-pesticides.eu;
6. JPP ÚKZÚZ. 10605.4 Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů metodou LC-MS/MS. 2020, (2), 1–7.
7. SANTE/12682/2019. Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. *Safety of the Food Chain Pesticides and Biocides. European Commission* [online]. 2019, 1–48. Dostupné z: https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf

Analýza dikvátu a parakvátu v zemědělských komoditách

Petra Kosubová, Pavlína Landová, Miroslav Prchal

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno

Hroznová 2, 603 00 Brno

petra.kosubova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Dikvát a parakvát se řadí mezi cenově nejdostupnější a neúčinnější desikanty využívané k ošetření brambor, plodin pěstovaných na semeno a mnoha dalších. V řadě zemí je použití těchto bipyridinových herbicidů zakázané, přesto je nutné vzhledem k toxikologickým vlastnostem monitorovat jejich výskyt ve vybraných, převážně dovozových komoditách. Zařazení stanovení dikvátu a parakvátu mezi běžně analyzované pesticidy brání jejich fyzikálně-chemické vlastnosti ztěžující jejich stanovení.

Cílem práce bylo optimalizovat a validovat metodu analýzy dikvátu a parakvátu s využitím dostupného vybavení laboratoře a ověřit její správnost účastí v testu způsobilosti.

2 Teoretická část

2.1 Úvod

Herbicidní účinky dikvátu a parakvátu byly objeveny již roku 1956. Tyto bipyridinové sloučeniny jsou neselektivní, vysoce účinné kontaktní herbicidy, které účinkují na široké spektrum plevelů. Díky rychlému nástupu účinku se často využívají jako desikanty k odstranění olistění z bavlníku, fazolí a brambor. Dikvát a parakvát účinkují zejména na zelené části rostlin s minimálním účinkem na kořeny a migrací v rostlině [1].

Mechanismus účinku dikvátu a parakvátu je založen na inhibici fotosyntézy, ovlivnění elektronových transportních systémů rostliny a destrukci buněčných struktur reaktivními formami kyslíku jako jsou superoxid, peroxid vodíku a hydroxylové radikály [2].

Z důvodu velkého počtu pesticidů, které se mohou objevit v potravinách a krmivech, je nejlepším nástrojem pro jejich monitoring použití multireziduálních metod. Navzdory pokrokům, jak v přístrojové technice, tak v přípravě vzorků, je stále zapotřebí pro látky se specifickými fyzikálně-chemickými vlastnostmi jako je dikvát a parakvát využívat individuální metody [3].

Metodu The Quick Polar Pesticides Method (QuPPE) vytvořila Evropská referenční laboratoř pro stanovení reziduí, které nelze stanovit multireziduálními metodami. Metoda je zaměřená na vysoce polární pesticidy a využívá extrakci pomocí okyseleného metanolu zahrnující minimální nebo žádné přečištění [4].

Dikvát a parakvát jsou iontové sloučeniny, obtížně separovatelné na C18 a dalších LC kolonách s reverzní fází. Alternativní metoda, chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC), je vhodná pro analýzu obou látek [5]. LC-MS/MS s ionizací elektrosprejem je v současnosti jednou z hlavních využívaných metod v oblasti analýzy pesticidů, včetně dikvátu a parakvátu. Vzhledem k robustnosti, citlivosti a selektivitě se v mnoha laboratořích nejčastěji využívá LC-MS/MS instrumentace s trojitým kvadrupólem [6].

Cílem práce bylo (i) optimalizovat jak metodu přípravy založenou na doporučené metodice QuPPE, tak měření s využitím LC-MS/MS techniky, konkrétně HILIC separace a detekce v MRM módu a (ii) zavést metodu vhodnou pro stanovení dikvátu a parakvátu pro účely kontroly dovozových krmných surovin, a dále rostlinného materiálu odebraného při podezření na porušení pravidel zemědělské praxe.

3 Praktická část

3.1 Materiál

3.1.1 Standardy a referenční materiály

Dikvát dibromid monohydrát $\geq 100,3$ % (Sigma Aldrich, Rakousko).

Parakvát dichlorid hydrát $\geq 98,0$ % (Sigma Aldrich Švýcarsko).

Dikvát dibromid (bipyridyl d_8) $\geq 98,0$ % (CND isotopes, Německo).

Parakvát dichlorid (ring d_8) $\geq 99,2$ % (Sigma Aldrich, Švýcarsko).

3.1.2 Chemikálie

Metanol pro HPLC $\geq 99,9$ %, gradient grade (Sigma Aldrich, Francie).

Acetonitril pro HPLC $\geq 99,9$ %, gradient grade (Sigma Aldrich, Francie).

Acetonitril pro LC/MS hypergrade Lichrosolv (Merck, Německo).

Kyselina mravenčí ≥ 96 % (Sigma Aldrich, Německo).

Kyselina mravenčí ≥ 98 % pro MS (Honeywell Fluka, Německo).

Mravenčan amonný ≥ 98 % pro MS (Sigma Aldrich, Indie).

Kyselina chlorovodíková 35 % p.a. (Lachner, Česká republika).

Sorbent C18, ODS bulk sorbent SPE (Agilent, Spojené státy americké).

3.1.3 Laboratorní vybavení

Nožový mlýnek Elektrolux K55.

Mlýnek VM 7.

Centrifuga Sigma 2-16 K.

Váha Kern EG (0,5 – 2200) g.

Třepačka Geno Grinder 2010.

Ultrazvuk s ohřevem Ecosound U-5STH.

Kapalinový chromatograf Agilent 1290.

Hmotnostní spektrometr Sciex 4500.

Mikropipety Eppendorf (10 – 100) μ l; (100 – 1000) μ l; (1 – 5) ml.

Vyhodnocovací program Sciex OS.

Plastové centrifugační zkumavky (5, 15 a 25) ml Eppendorf.

Polyethylenové vialky.

Stříkačkové filtry nylonové 13 mm; 0,22 μ m, pk/1000 (Labstore).

Systém Omnia Stakpure pro výrobu ultračisté vody.

3.2 Metody

3.2.1 Postup přípravy

Zhomogenizované vzorky byly naváženy do plastové 50ml centrifugační zkumavky s přesností na 0,05 g. Obsah vody v obohaceném vzorku byl před extrakcí upraven jejím přídatkem podle doporučení metodiky QuPPE automatickou pipetou.

U obohacených vzorků byly dikvátů a parakvát přidány vždy nejméně 3 dny před samotnou extrakcí s cílem zajistit čas pro navázání analytů na složky testovaného materiálu. Obohacené vzorky byly do extrakce uchovány v mrazáku.

3.2.2 Extrakce

CH₃OH/HCOOH: Vzorek s upraveným obsahem vody byl obohacen přídatkem směsi izotopicky značených standardů parakvátů a dikvátů tak, aby bylo dosaženo výsledného obsahu 0,1 mg · kg⁻¹. Následovala extrakce 10 ml 1% kyseliny mravenčí v metanolu s přídatkem 100 µl kyseliny mravenčí. Extrakce probíhala za laboratorní teploty v mechanické třepačce 15 min při 500 kmitech/min.

CH₃OH/HCl: Vzorek s upraveným obsahem vody byl obohacen přídatkem směsi izotopicky značených standardů parakvátů a dikvátů aby bylo dosaženo výsledného obsahu 0,1 mg · kg⁻¹. Následovala extrakce 10 ml 50 % metanolu v 0,1 M kyselině chlorovodíkové (V/V). Extrakce probíhala za laboratorní teploty v mechanické třepačce 15 min při 500 kmitech/min.

3.2.3 Vymražení a odstředění

Vzorky po extrakci byly odstředěny v při 5000 ot · min⁻¹ g a supernatant převeden do 15 ml centrifugační zkumavky. Extrakty byly vymraženy při -18 °C přes noc nebo při -80 °C po nejméně 120 min. Po vymražení následovalo odstředění chladných vzorků po dobu 5 min při 3900 ot · min⁻¹ a -5 °C. Při sledování vlivu vymražení byl srovnávací vzorek odstředěn pouze po extrakci a ihned zpracován.

3.2.4 Čištění extraktu

Precipitace acetonitrilem: Extrakty suchých krmných surovin byly čištěny pomocí precipitace acetonitrilem. Vzorek objemu 1 ml byl převeden do 5 ml centrifugační zkumavky s obsahem 1 ml acetonitrilu. Po 1 mině třepání byl vzorek centrifugován při 3900 ot · min⁻¹ a pokojové teplotě po dobu 5 min. Supernatant byl následně přefiltrován a analyzován.

Eliminace tuku pomocí sorbentu s C18: Vzorky s vysokým obsahem tuku byly současně čištěny pomocí sorbentu C18. Navážka 50 mg sorbentu byla přidána do směsi extraktu a acetonitrilu, směs byla následně podrobena stejné proceduře, jako při použití samotného acetonitrilu.

Všechny vzorky byly přefiltrovány pomocí laboratorních plastových stříkaček přes nylonový filtr.

3.2.5 Analýza vzorků pomocí LC-MS/MS

Obsah dikvátu a parakvátu byl stanoven LC-MS/MS technikou schopnou detekovat molekuly o hmotnostech v rozmezí 5–2000 Da. K separaci byla použita hybridní kolona se smíšeným mechanismem separace, Obelisc R. Použité chromatografické podmínky jsou uvedeny v Tabulce 1.

Při analýze byl použit hybridní trojitý kvadrupól s lineární iontovou pastí (4500 QTRAP; AB Sciex, Foster City, USA) a zdroj ESI (electro-spray ionisation) v pozitivním módu. Skenování probíhalo v SRM módu. Parametry metody jsou uvedeny v Tabulce 2. Data byla vyhodnocena programem Analyst 1.7.1. Kalibrační závislosti byly proloženy lineárně s vážením $1/x$.

Tabulka 1. Chromatografické podmínky.

Parametr	Hodnota
Kapalinový chromatograf	Agilent UHPLC 1290
Analytická kolona	OBELISC R, 100 mm × 2,1 mm × 5 μm (Sciex)
Předkolona	OBELISC R, 10 mm × 2,1 mm × 5 μm (Sciex)
Mobilní fáze	A: 10mM vodný roztok mravenčanu amonného okyseleného kyselinou mravenčí (0,0036 ml · ml ⁻¹), B: Acetonitril
Eluce	Gradientová
	0,0 min 20 % A, 80 % B
	0,0–3,0 min 80 % A, 20 % B lineární gradient
	3,0–7,0 min 80 % A, 20 % B izokratická eluce
	7,0–7,1 min 20 % A, 20 % B lineární gradient
	7,1–10,0 min 20 % A, 80 % B izokratická eluce
Průtok	0,4 ml · min ⁻¹
Teplota kolony	40 °C
Objem nástřiku	2 μl
Doba analýzy	10 min
Doba sběru dat	2,5–5 minuta

Tabulka 2. Sledované MRM přechody.

Název	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Čas (ms)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Dikvát1	183	157	90	90	10	31	12
Dikvát2	183	130	90	90	10	45	10
Dikvát3	183	78	90	90	10	51	9
Parakvát1	186	171	90	51	10	25	6
Parakvát2	186	155	90	51	10	51	12
Parakvát3	186	103	90	51	10	47	28
DikvátD8	191	165	90	90	10	33	14
ParakvátD8	194	179	90	51	10	27	12

DP – deklasterační potenciál, EP – vstupní potenciál do cely, CE – kolizní energie, CXP – výstupní potenciál z cely.

3.3 Výsledky

3.3.1 Optimalizace

K extrakci analytů z rostlinného materiálu byly použity extrakční postupy **CH₃OH/HCOOH** a **CH₃OH/HCl**. Výtěžek extrakce bez přepočtu pomocí izotopických standardů byl velmi nízký v případě obou extrakčních postupů. Po přepočtu zahrnující ztráty analytu během extrakce bylo dosaženo vyšší výtěžnosti obou analytů, v případě použití extrakční metody MetOH/FA.

Tabulka 3. Výtěžnost extrakce z rostlinného materiálu (%).

Postup	1	2
Výtěžnost	Základní postup s CH ₃ OH/HCOOH	Modifikovaný postup s CH ₃ OH/HCl
Interní standard dikvátu	38	26
Dikvát korigovaný na ILIS	105	111
Interní standard parakvátu	11	3
Parakvát korigovaný na ILIS	91	84
ILIS průměrná	25	14
Analytů průměrná	98	98

Jako zástupce obilovin, jakožto plodin s vysokým obsahem škrobu, byla vybrána kukuřice. Základním extrakčním postupem pro porovnání účinnosti byla metoda CH₃OH/HCOOH

zahrnující vymražení a precipitaci acetonitrilem. Následnou úpravou extrakčních podmínek nebylo dosaženo vyšší výtěžnosti.

Tabulka 4. Přehled testovaných postupů pro extrakci dikvátu a parakvátu z kukuřice.

Postup	1	2	3	4	5
1% HCOOH/CH ₃ OH + 100 µl HCOOH	ano	ano	-	ano	ano
50% CH ₃ OH + 0,1M HCl	-	-	ano	-	-
Extrakce při 70 °C	-	ano	-	-	-
Extrakce 60 min	-	-	-	ano	-
Vymražení	ano	ano	ano	ano	-
Precipitace acetonitrilem	ano	ano	ano	ano	ano

Tabulka 5. Výtěžnost dikvátu a parakvátu z kukuřice (%)	Postup	1	2	3	4	5
Interní standard dikvátu		79	82	58	82	61
Dikvát korigovaný na ILIS		78	76	80	77	87
Interní standard parakvátu		83	74	56	80	58
Parakvát korigovaný na ILIS		77	75	76	73	89
ILIS průměrná		81	78	57	81	59
Analytů průměrná		78	75	78	75	88

Extrakční postupy analytů z luštěnin byly testovány na lupině a sóji. Vzhledem k vyššímu obsahu bílkovin v matrici byl základní postup extrakce pomocí CH₃OH/HCOOH doplněn čisticím krokem, precipitací acetonitrilem.

Výsledná extrakční procedura číslo 4 poskytovala nejvyšší korigovanou výtěžnost pro dikvát i parakvát, ale nižší výtěžky ILIS, než metoda využívající kyselinu mravenčí (Tabulka 7). Přes tuto skutečnost byla tato metoda, s ohledem na dostatečnou intenzitu odezev měřených látek, vybrána pro validaci.

Tabulka 6. Přehled testovaných postupů pro extrakci dikvátku a parakvátku z luštěnin.

Postup	1	2	3	4	5	6
Druh matrice	lupina	lupina	lupina	lupina, sója	lupina, sója	lupina
1% HCOOH/CH ₃ OH + 100 µl HCOOH	ano	ano	-	-	-	-
50% CH ₃ OH /0,1M HCl	-	-	ano	ano	-	ano
50% CH ₃ OH /0,2M HCl	-	-	-	-	ano	-
Extrakce při 70 °C	-	ano	-	-	-	-
Extrakce 60 min						ano
Vymražení	ano	ano	ano	-	-	ano
Precipitace acetonitrilem	ano	ano	ano	ano	ano	ano

Tabulka 7: Výtěžnost dikvátku a parakvátku z luštěnin (%).

Postup	1	2	3	4	5	6
Interní standard dikvátku	81	116	50	57	83	86
Dikvát korigovaný na ILIS	51	50	75	80	74	60
Interní standard parakvátku	86	124	54	57	81	66
Parakvát korigovaný na ILIS	52	53	75	85	78	63
ILIS průměrná	83	120	52	57	82	76
Analytů průměrná	51	52	75	83	76	61

Ke zkouškám extrakčních metod pro olejninu byly vybrány dva materiály, řepka a sezam. Jako výchozí metoda pro extrakci olejin byla opět zvolena extrakce CH₃OH/HCOOH. Z důvodu vyššího obsahu tuku v testovaných materiálech byl zvolen čisticí krok DSPE s použitím sorbentu C18 a/nebo vymražení v kombinaci s precipitací acetonitrilem.

Použitím sorbentu společně s ředěním acetonitrilem bylo dosaženo korigovaných výtěžků analytů v rozsahu 83 % až 91 %. Nejlepší výsledky poskytoval postup 7 bez vymražení, který byl s ohledem na nejmenší časovou náročnost vybrán pro validaci stanovení v olejninách.

Tabulka 8. Přehled testovaných postupů pro extrakci dikvátu a parakvátu z olejin.

Postup	1	2	3	4	5	6	7	8
Druh matrice	řepka	řepka	řepka	řepka	řepka, sezam	řepka, sezam	řepka, sezam	sezam
1% HCOOH/CH ₃ OH + 100 μl HCOOH	ano	ano	-	-	ano	ano	ano	-
1% HCOOH/CH ₃ OH + 200 μl HCOOH	-	-	-	-	-	-	-	ano
50% CH ₃ OH /0,1M HCl	-	-	ano	ano	-	-	-	-
Extrakce při 70 °C	-	ano	-	-	-	-	-	-
Vymražení	ano	ano	ano	ano	ano	ano	-	-
Precipitace acetonitrilem	-	-	ano	ano	ano	ano	ano	ano
DSPE s C18	-	-	-	ano	-	ano	ano	ano

Tabulka 9. Výtěžnosti dikvátu a parakvátu z olejin (%).

Experiment	1	2	3	4	5	6	7	8
Interní standard dikvátu	41	36	17	19	82	65	80	74
Dikvát korigovaný na ILIS	73	63	84	85	84	83	89	84
Interní standard parakvátu	39	34	19	20	67	57	64	63
Parakvát korigovaný na ILIS	77	66	83	75	88	83	91	83
ILIS průměrná	40	35	18	19	74	61	72	68
Analytů průměrná	75	65	84	80	86	83	90	83

Na všech matricích bylo vyzkoušeno několik extrakčních postupů společně s dalšími úpravami extraktu. Následně byl na základě výtěžnosti nativních látek a ILIS vybrán vždy nejvhodnější postup pro danou surovinu. Souhrn postupů použitých pro validaci je uvedený v Tabulce 10.

Tabulka 10. Výsledné postupy pro jednotlivé suroviny.

Postup	Rostlinný materiál	Brambory	Obiloviny	Luštěniny	Olejnin
1% HCOOH/CH ₃ OH + 100 μl HCOOH	ano	ano	ano	-	ano
50% CH ₃ OH v 0,1M HCl	-	-	-	ano	-
Precipitace acetonitrilem	-	-	ano	ano	ano
DSPE s C18	-	-	-	-	ano

3.3.2 Validace metody

Metoda byla validována pomocí vícenásobného analýzy vzorků obohacených o příslušný nativní a interní standard. Vybrané matrice byly obohaceny v rozmezí (0,001 – 2) mg/kg, v závislosti na složitosti matrice a reportovacích limitů. V rámci validace byly ověřeny parametry uvedené v Tabulce 11.

Tabulka 11. Validační parametry [7].

Parametr	Způsob	Kritérium
Linearita	Ověření hodnoty korelačního koeficientu	$\geq 0,995$
Limit kvantifikace	Nejnižší obohacená hladina splňující podmínky identifikace, správnosti a přesnosti	$\leq \text{MRL}$
Selektivita	Odezva analytu v rozpouštědle a v blankové matrici	$\leq \pm 10 \%$
Správnost	Průměrná výtěžnost každé obohacené hladiny	(70 – 120) %
Přesnost	Opakovatelnost pro každou obohacenou hladinu	$\leq 20 \%$

Přesnost a správnost: Přesnost (opakovatelnost) a správnost (výtěžnost) metody byly ověřeny opakovanou analýzou vždy nejméně 7 obohacených vzorků na každé z hladin. Validační hladiny byly voleny podle maximální limity reziduí (MRL) pro každou skupinu surovin. Stanovená opakovatelnost a výtěžnost na všech hladinách vyhověla validačním kritériím z Tabulky 11. V Tabulce 12 jsou uvedeny souhrnné výsledky pro jednotlivé suroviny.

Tabulka 12. Výsledky validace jednotlivých, materiálů.

Surovina	Dikvát			Parakvát		
	Opakovatelnost (%)	Výtěžnost (%)	Počet hladin	Opakovatelnost (%)	Výtěžnost (%)	Počet hladin
Rostlinný materiál	3,1	91,1	4	1,3	99,2	4
Brambory	2,9	93,2	2	2,6	92,4	1
Obiloviny	4,1	93,2	3	6,7	98,0	4
Luštěniny	4,2	98,8	4	8,2	106,5	4
Olejniny	3,0	103,0	3	13,6	95,0	3

Linearita: Pracovní rozsah analytů byl zvolen podle validačních parametrů SANTE na pěti koncentračních úrovních, vhodných ke sledování MRL. Kalibrace pro rostlinný materiál byla vytvořena v rozsahu 0,004 až 2 mg. kg⁻¹ a kalibrace pro krmné suroviny v rozsahu 0,008 až 0,8 mg.kg⁻¹. Pro vytvoření kalibrační křivky byly použity roztoky 50% metanolu ve vodě (V/V) obohacené o příslušný obsah nativní látky a izotopicky značeného standardu (solventová kalibrace). Hodnoty koncentrace a relativní odezvy analytů byly proloženy přímkou. Linearita byla ověřena pomocí porovnání druhé mocniny indexu korelace, hodnoty korelace s validačními kritérii. Korelační koeficient byl ve všech případech stanoven jako 1,000.

Limit kvantifikace: Podle validačních parametrů se za limit kvantifikace považuje nejnižší validovaná hladina, splňující požadavky pro identifikaci a parametry metody pro správnost a přesnost. Na všech validačních hladinách bylo možné detekovat nejméně dva iontové přechody. Všechny validované suroviny vyhověly požadavkům správnosti a současně maximální přípustné hodnotě relativní přesnosti.

Za mez kvantifikace je tedy možné považovat každou nejnižší validovanou hladinu pro danou surovinu. V matricích obilovin a olejnin byla mez kvantifikace stanovena jako 0,01 mg.kg⁻¹ a v případě luštěnin jako 0,02 mg.kg⁻¹.

Selektivita: Posouzení selektivity metod proběhlo na základě porovnání směrnice solventové a matricové kalibrační křivky. Matricová kalibrace byla vytvořena na třech koncentračních úrovních pomocí přídatku nativní látky a ILIS do extraktů suchých krmných surovin.

Shodnosti kalibračních křivek vyhověly kritériu přijatelnosti (90 až 110) % pro selektivitu metody. Naměřená data potvrzují možnost použití solventové kalibrace, za předpokladu použití izotopicky značených interních standardů.

3.3.3 Verifikace metody

Validovaná metoda byla ověřena účastí v testu způsobilosti pořádaném EURL v roce 2021. Analyzovaným vzorkem bylo neloupané sezamové semeno obsahující 13 polárních pesticidních látek včetně dikvátu a parakvátu.

Tabulka 13. Výsledky účasti v kruhovém testu EUPT-SRM16.

Analyt	Naměřený obsah (mg · kg ⁻¹)	Vztažná hodnota (mg · kg ⁻¹)	Relativní směrodatná odchylka (%)	z-skóre (-)
Dikvát	0,241	0,244	24,7	-0,1
Parakvát	0,253	0,262	25,0	-0,2

3.3.4 Polní pokus

Při analýze bramborové nati ošetřené přípravkem Reglone obsahujícím dikvát byl stanoven obsah dikvátu 15 mg.kg⁻¹ s relativní odchylkou 8,3 %.

Při měření ošetřené nati byly analyzovány dva typy vzorků. V prvním případě se jednalo o zmražený vzorek, který byl následně pomletý. Vzhledem k nedostatečnému rozmělnění vzorku byl vzorek přemlet za přítomnosti tekutého dusíku. Přemletím bylo dosaženo účinnější dezintegrace vzorku na stejném mlýnku. Oba vzorky byly následně podrobeny stejné extrakční proceduře a analyzovány. Z porovnání průměrných hodnot a relativních odchylek stanoveného obsahu dikvátu v Tabulce 14, je možné vyvodit závěr, že homogenita vzorku mletého bez přidavku kapalného dusíku byla dostatečná.

Tabulka 14: Kvantifikace obsahu dikvátu v ošetřené bramborové nati.

Úprava vzorku	Měření	Obsah (mg · kg ⁻¹)	Průměr (mg · kg ⁻¹)	Přesnost (mg · kg ⁻¹)	Relativní přesnost (%)
Mletí zmrzlého vzorku	1	14	15	1	8,3
	2	15			
	3	17			
Mletí s kapalným dusíkem	1	16	15	1	8,3
	2	14			
	3	15			

Stanovený obsah dikvátu (Tabulka 15) v hlízách ošetřené rostliny se nacházel pod mezí kvantifikace, proto není možné brát tuto hodnotu jako kvantifikovaný obsah. Na základě hodnot poměru signálu k šumu mezi 100 až 150, byl prokázán obsah dikvátu v bramborách. Vzhledem k MRL 0,1 mg · kg⁻¹ v bramborových hlízách se jedná o velmi nízký obsah.

Tabulka 15. Orientační kvantifikace obsahu dikvátu v ošetřených bramborách.

Měření	Obsah (mg · kg ⁻¹)	Průměr (mg · kg ⁻¹)	Přesnost (mg · kg ⁻¹)	Relativní přesnost (%)
1	0,007	0,006	0,001	18,3
2	0,007			
3	0,005			

3.3.5 Analýza dikvátu a parakvátu v krmných surovinách

Při sledování obsahu dikvátu a parakvátu v suchých krmných surovinách bylo celkově analyzováno 10 vzorků obilovin, 12 vzorků olejnin a 8 vzorků luštěnin. Informace o původu vzorku nebyly dostupné. Při screeningu obsahu dikvátu a parakvátu v suchých krmných surovinách byl detekován pozitivní vzorek slunečnicového šrotu s obsahem dikvátu. Opakovanou analýzou vzorku byl ověřen stanovený obsah 0,0112 mg · kg⁻¹, který nepřesáhl MRL 0,09 mg · kg⁻¹ pro slunečnicové semeno.

4 Závěr

Na každé z matic bylo vyzkoušeno několik procedur založených na okyseleném metanolu jako extrakčním činidlem. U olejnin a luštěnin došlo úpravou postupu k výraznému zvýšení výtěžnosti. Výsledné extrakční postupy poskytovaly dostatečné výtěžky analytů a bylo je možné využít k validacím.

Metoda byla úspěšně validována na jednotlivých zástupcích třech základních skupin krmiv, obilovin, olejnin a luštěnin, dále pak na vzorcích čerstvého rostlinného materiálu a bramborových hlízách. Validované hladiny analytů splňovaly kritéria pro kontrolu maximálních limitů obsahu reziduí pesticidů.

Správnost metody pro vybrané skupiny vzorků byla ověřena pomocí referenčních materiálů, kdy ve všech případech bylo dosaženo dostatečné výtěžnosti. Způsobilost celé analytické metody byla ověřena úspěšným absolvováním kruhového testu.

V části věnované polnímu pokusu byly analyzovány dikvatem ošetřené části bramborového porostu. Analýzou byla zjištěna přítomnost dikvátu v bramborových hlízách pod limitem kvantifikace naší metody, obsah dikvátu v rostlinném materiálu byl úspěšně kvantifikován.

Vytvořená metoda byla aplikována při sledování obsahu reziduí dikvátu a parakvátu v suchých krmných surovinách. Z třiceti prověřených vzorků byl zaznamenán jediný vzorek s obsahem dikvátu nad mezí stanovitelnosti. Jednalo se o slunečnicový šrot s obsahem dikvátu $0,0112 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

4 Literatura

- 1 ROBERTS, TERRY R.; HUTSON, DAVID H.; LEE, PHILIP W.; NICHOLLS, PETER H.; PLIMMER, JACK R. Metabolic Pathways of Agrochemicals, Part 1 - Herbicides and Plant Growth Regulators: Bipyridylum Herbicides [online]. Royal Society of Chemistry, 1998 [cit. 2021-02-23].
- 2 Membrane disruptors. FLOYD M. ASHTON, Thomas J. Monaco, Stephen C. Weller. WEED SCIENCE: Principles and Practices [online]. 4. America: Wiley-Blackwell, 2002, s. 235-243 [cit. 2021-02-17]. ISBN 978-0-471-37051-2. Dostupné z: <http://base.dnsgb.com.ua/files/book/Agriculture/Weed/Weed-Science.pdf>
- 3 INDIVIDUAL METHODS FOR SPECIFIC COMPOUNDS. , Haddad, Paul R.; Poole, Colin F. Liquid Chromatography - Applications [online]. Elsevier, 2013, s. 330-331 [cit. 2021-01-05]. ISBN 978-0-12-415866-5. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00BKJ7K8/liquid-chromatography/lc-tof-ms-in-field-pesticide>
- 4 GORMEZ, Emrah, Ozgur GOLGE a Bulent KABAK. Quantification of fosetyl-aluminium/phosphonic acid and other highly polar residues in pomegranates using Quick Polar Pesticides method involving liquid chromatography-tandem mass spectrometry measurement. Journal of Chromatography A [online]. 2021, 1642. ISSN 00219673. Dostupné z: [doi:10.1016/j.chroma.2021.462038](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462038)
- 5 YOUNG, Michael S., Jeremy C. SHIA a Kim Van TRAN. UPLC-MS/MS Determination of Paraquat and Diquat in Potato and Wheat Using the CORTECS UPLC HILIC Column. Waters [online]. Milford, MA, USA: Waters Corporation, 2013 [cit. 2021-5-7]. Dostupné z: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004851en.pdf>
- 6 Multiresidue Analysis of Pesticides: LC-MS/MS versus LC-HRMS, Núñez, Oscar; Gallart-Ayala, Héctor; Martins, Claudia P B; Lucci, Paolo. Fast Liquid Chromatography - Mass Spectrometry Methods in Food and Environmental Analysis [online]. Londýn: World Scientific, s. 384-400 [cit. 2021-01-18]. ISBN 978-1-78326-494-0 Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpFLCMSMFF/fast-liquid-chromatography/fast-liquid-chromatography>
- 7 ANALYTICAL QUALITY CONTROL AND METHOD VALIDATION PROCEDURES FOR PESTICIDE RESIDUES ANALYSIS IN FOOD AND FEED: SANTE/12682/2019. EURL [online]. Evropská komise, 2020 [cit. 2021-9-9]. Dostupné z: https://www.eurlpesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf

Stanovení glyfosátu a glufosinátu v půdě metodou LC-MS/MS

Kristýna Brabcová, Pavlína Landová, Petra Kosubová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

ONRL Brno, Hroznová 2, 603 00 Brno

petra.kosubova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Glyfosát patří mezi celosvětově nejpoužívanější herbicidy. Kvůli jeho masivnímu používání je nutné sledovat výskyt glyfosátu jak ve složkách životního prostředí, tak i v potravním řetězci. Vedle metody, která umožňuje stanovit glyfosát v rostlinném materiálu a krmivech, bylo potřeba zavést také metodu pro analýzu této látky v půdních vzorcích. Zvolená metodika, která zahrnuje extrakci v zásaditém prostředí a derivatizační krok, byla validována pomocí obohacených vzorků dvou různých půd. Derivatizovaný glyfosát, AMPA a glufosinát je možné analyzovat s limitem kvantifikace 0,008 mg/kg. Práce je doplněna o prvotní screening výše uvedených látek ve vybraných půdách z lokalit bazálního monitoringu.

2 Úvod – teoretická část

Glyfosát, [N-(fosfonomethyl)glycin], je širokospektrální, systémový herbicid používaný celosvětově pro kontrolu plevelu. Vedle zemědělsky obhospodařovaných ploch se také často používá na zahradách a dalších místech s nezemědělským využitím (1). Glyfosát se aplikuje na povrchové části rostlin, ze kterých je rozveden cévními svazky a následně způsobuje odumření rostliny. Jeho hlavním metabolitem je kyselina aminomethylfosfonová (AMPA) (2). Od uvedení glyfosátu na trh v roce 1974 se jeho spotřeba celosvětově velmi navýšila, což z něj činí nejpoužívanější herbicid. Za alternativní náhradu lze považovat glufosinát [(RS)-2-Amino-4-(hydroxy(methyl)fosfonyl)butanová kyselina], který se používá ve formě glufosinátu amonného (3).

Výskyt glyfosátu je legislativně limitován v potravinách a krmivech. Vzhledem k časté a hojně aplikaci je výskyt glyfosátu a jeho metabolitů sledován také v dalších složkách životního prostředí, např. ve vodě či v půdě (4). Glyfosát může být adsorbován na půdní částice, především na půdní minerály. Herbicidy na bázi glyfosátu mohou také ovlivnit půdní mikroflóru, která se podílí na biogeochemických cyklech, což by mohlo vést ke změnám v koloběhu živin (5).

Stanovení reziduí glyfosátu, AMPA a glufosinátu je analyticky náročné z důvodu jejich amfoterního a vysoce polárního charakteru, jejich nízké hmotnosti a nedostatku funkčních skupin, které by mohly usnadnit jejich detekci (4). V půdních vzorcích je stanovení komplikováno složitostí matrice a množstvím matričních interferentů. Z důvodu nedostatečné extraktability extrakčního postupu využívaného pro jejich analýzu v rostlinném materiálu a krmivech je nutné půdní vzorky extrahovat v zásaditém prostředí (2,6). Pro zvýšení citlivosti detekce a zlepšení chromatografické separace je poté zařazen derivatizační krok. K derivatizaci se využívá fluorenylmethylchloroformát (FMOC), který poskytuje fluoreskující derivát snadno stanovitelný metodou kapalinové chromatografie (LC) s fluorescenční detekcí (7). Rozvoj techniky LC s tandemovou hmotnostně-spektrometrickou detekcí (MS/MS) umožnil zlepšení metodiky, protože FMOC deriváty snadno ionizují v elektrospreji a poskytují dobrou odezvu při MS/MS detekci. Důvodem k derivatizaci glyfosátu je rovněž dosažení dostatečné retence na běžně používaných reverzních fázích C18 (8).

Cílem práce bylo zavést metodu pro stanovení glyfosátu po derivatizaci činidlem FMOC v půdách. Stanovení v posledních letech opakovaně poptávají zákazníci laboratoře (inspektoři) při kontrole dodržování pravidel aplikace přípravků na ochranu rostlin (POR) a při řešení případných podnětů na nedodržení těchto pravidel. Po ověření výtěžnosti zvoleného extrakčního postupu nejen pro glyfosát, ale také pro degradační produkt AMPA a glufosinát, byla metoda validována pro stanovení těchto látek v půdních vzorcích a následoval jejich screening v půdách z vybraných lokalit bazálního monitoringu (BMZP).

3 Praktická část

3.1. Materiál a metody

3.1.1 Standardy a referenční materiály

Standardy pesticidů v pevném nebo kapalném skupenství s deklarovanou čistotou:

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

Aminomethyl phosphonic acid = AMPA (CH_6NO_3P) CAS [1066-51-9].

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

Vnitřní izotopově značené standardy (ILIS):

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

AMPA- ^{13}C , ^{15}N ($^{13}CH_6^{15}NO_3P$), $c = 1$ mg/ml 1% MeOH v H_2O .

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

3.1.2 Chemikálie

Voda (ultračistá), methanol (CH_3OH , pro HPLC a pro LC-MS), kyselina mravenčí ($HCOOH$), hydroxid draselný (KOH), kyselina chlorovodíková (HCl), hydroxid sodný ($NaOH$), kyselina boritá (H_3BO_3), chlorid draselný (KCl), dichloromethan (CH_2Cl_2 , chromasolv), acetonitril (CH_3CN , chromasolv), derivatizační činidlo FMOC-Cl, octan amonný (CH_3COONH_4).

3.1.3 Laboratorní pomůcky a vybavení pro přípravu vzorku

Analytické váhy, třepačka (300 kmitů/min), centrifuga (9000 ot/min), centrifugační zkumavky plastové se šroubovacím víčkem (15 ml; 50 ml), SPE kolonky Oasis HLB 200 mg (Waters), SPE manifold, vývěva, vysokorychlostní míchadlo (např. Vortex), termovap, odpařovací zkumavky (10 ml), filtrační materiál (stříkačkové filtry nylonové o velikosti pórů 0,2 μm), vialky (2 ml).

3.1.4 Postup přípravy

Homogenní vzorek se naváží do 50ml centrifugační zkumavky. Navážka vzorků půd činí 2 g. Ke vzorku se přidá 20 ml 0,6M KOH a vzorek se extrahuje třepáním 60 min při minimálně 300 kmitech/min. Poté se vzorek odstředí 15 min při 9000 ot/min. 4ml podíl vodného supernatantu se převede do čisté 50ml centrifugační zkumavky a přidá se k němu 400 μl 4,8M HCl, 40 μl ILIS, 4 ml borátového pufru a 4 ml 20mM roztoku FMOC-Cl. Směs se třepe 30 min při minimálně 300 kmitech/min a poté se doplní do 50 ml 1% kyselinou mravenčí a odstředí se 15 min při 9000 ot/min. Následuje čištění metodou SPE. Kolonky se nejprve promyjí 3 ml methanolu a 3 ml 1% kyselinou mravenčí. Pak se na kolonky nanese vzorek. Poté následuje promytí 10 ml ultračisté vody a 5 ml dichlormethanu. Eluce je provedena 5 ml methanolu. Eluát se následně odfouká pod dusíkem téměř do sucha a rekonstituuje se v 800 μl 50% methanolu

který se získá smícháním 400 µl vody a 400 µl methanolu. Po promíchání na Vortexu následuje ultrazvuk po dobu 1 min a filtrace vzorku do vialky.

3.1.5 Přístrojové vybavení a podmínky pro koncové stanovení

Kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem (např. UHPLC 1290 (Agilent)-MS/MS QTrap 4500 (Sciex)), vybavený UHPLC kolonou (např. ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD, 100 mm × 2,1 mm × 1,8 µm (Agilent)).

Chromatografická separace byla provedena gradientovou elucí mobilní fáze A složené z vody a methanolu v poměru 90 : 10 modifikované 5 mM roztokem octanu amonného, a mobilní fáze B složené z vody a methanolu v poměru 10 : 90 při průtoku 0,45 ml/min a teplotě kolony 45 °C. Objem nástřiku byl 1 µl. Ionizace byla provedena elektrosprejem při teplotě iontového zdroje 500 °C a pozitivním módu ionizace s napětím na kapiláře 3000 V. Nastavené parametry plynů: CUR (N2) – 35 psi, CAD (N2) – medium, GS1 (vzduch) – 40 psi, GS2 (vzduch) – 40 psi. Analyty byly detekovány v módu sledování vybraných přechodů (MRM), viz Tabulka 1.

Tabulka 1. Parametry MS měření pro glyfosát, AMPA, glufosinát a jejich příslušné ILIS.

Název	Q1 (m/z)	Q2 (m/z)	RT (min)	Retenční okno (s)	Váha MRM	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Glyfosát-FMOC 1	392	88	3,70	60	1	70	10	30	10
Glyfosát-FMOC 2	392	179	3,70	60	1	70	10	30	10
Glyfosát-FMOC 3	392	170	3,70	60	1	70	10	20	10
Glyfosát13C215N-FMOC 1	395	91	3,70	60	1	70	10	30	10
Glyfosát13C215N-FMOC 2	395	179	3,70	45	0,1	70	10	30	10
Glyfosát13C215N-FMOC 3	395	173	3,70	45	0,1	70	10	20	10
AMPA-FMOC 1	334	156	5,34	60	1	70	10	10	10
AMPA-FMOC 2	334	112	5,34	60	1	70	10	20	10
AMPA13C15N-FMOC 1	336	114	5,34	60	1	70	10	20	10
AMPA13C15N-FMOC 2	336	158	5,34	60	1	70	10	10	10
Glufosinát-FMOC 1	404	182	4,20	60	1	70	10	20	10
Glufosinát-FMOC 2	404	136	4,20	60	1	70	10	30	10
Glufosinát-FMOC 3	404	179	4,20	60	1	70	10	30	10
Glufosinát-d3-FMOC 1	407	185	4,20	60	1	70	10	20	10
Glufosinát-d3-FMOC 2	407	139	4,20	45	0,25	70	10	30	10

3.2 Výsledky

Z literárních údajů o extraktabilitě glyphosátu z půdní matrice vyplynula nutnost extrakce v alkalickém prostředí (2, 6). Následující derivatizační krok s přečištěním na SPE kolonkách využívaný u rostlinných a krmivářských vzorků byl zachován z důvodu potřeby dosažení nízkých kvantifikačních limitů (9).

3.2.1 Validační experiment

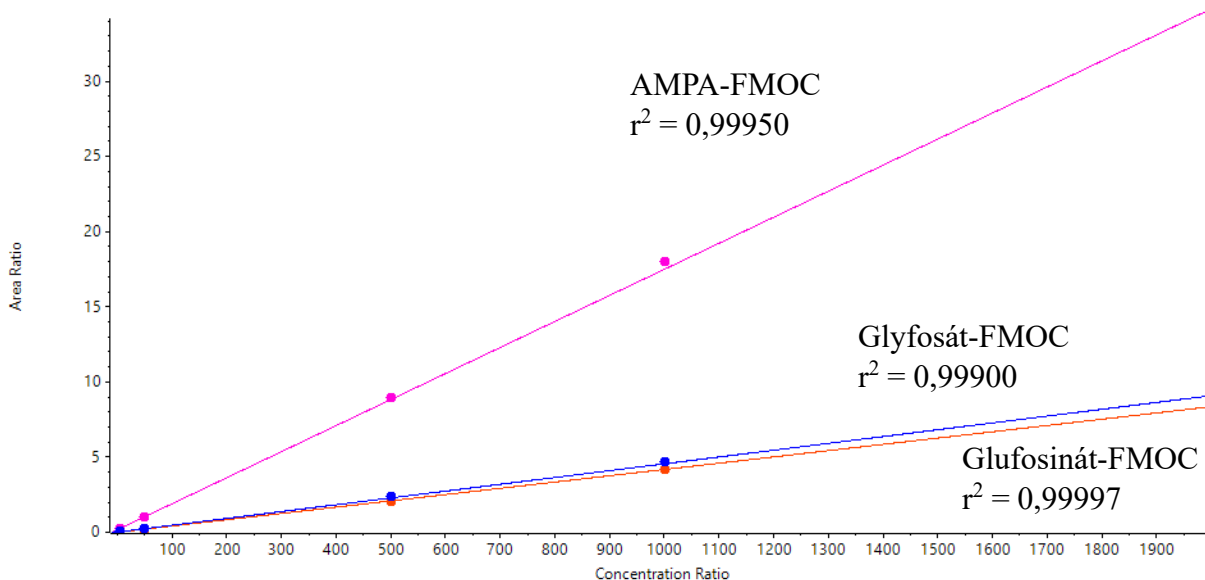
Metoda byla validována pomocí opakované analýzy obohacených vzorků dvou typů půd na několika hladinách. Vybrané půdy byly obohaceny na hladinách (8, 40 a 400) $\mu\text{g}/\text{kg}$ v minimálně šesti opakováních. V rámci validace byly ověřeny parametry uvedené v Tabulce 2.

Tabulka 2. Validační parametry.

Parametr	Způsob	Kritérium
Linearita	Ověření hodnoty korelačního koeficientu	$\geq 0,995$
Limit kvantifikace	Nejnižší obohacená hladina splňující podmínky identifikace, správnosti a přesnosti	nestanoveno
Správnost	Průměrná výtěžnost každé obohacené hladiny	(70 – 120) %
Přesnost	Opakovatelnost pro každou obohacenou hladinu	$\leq 20\%$

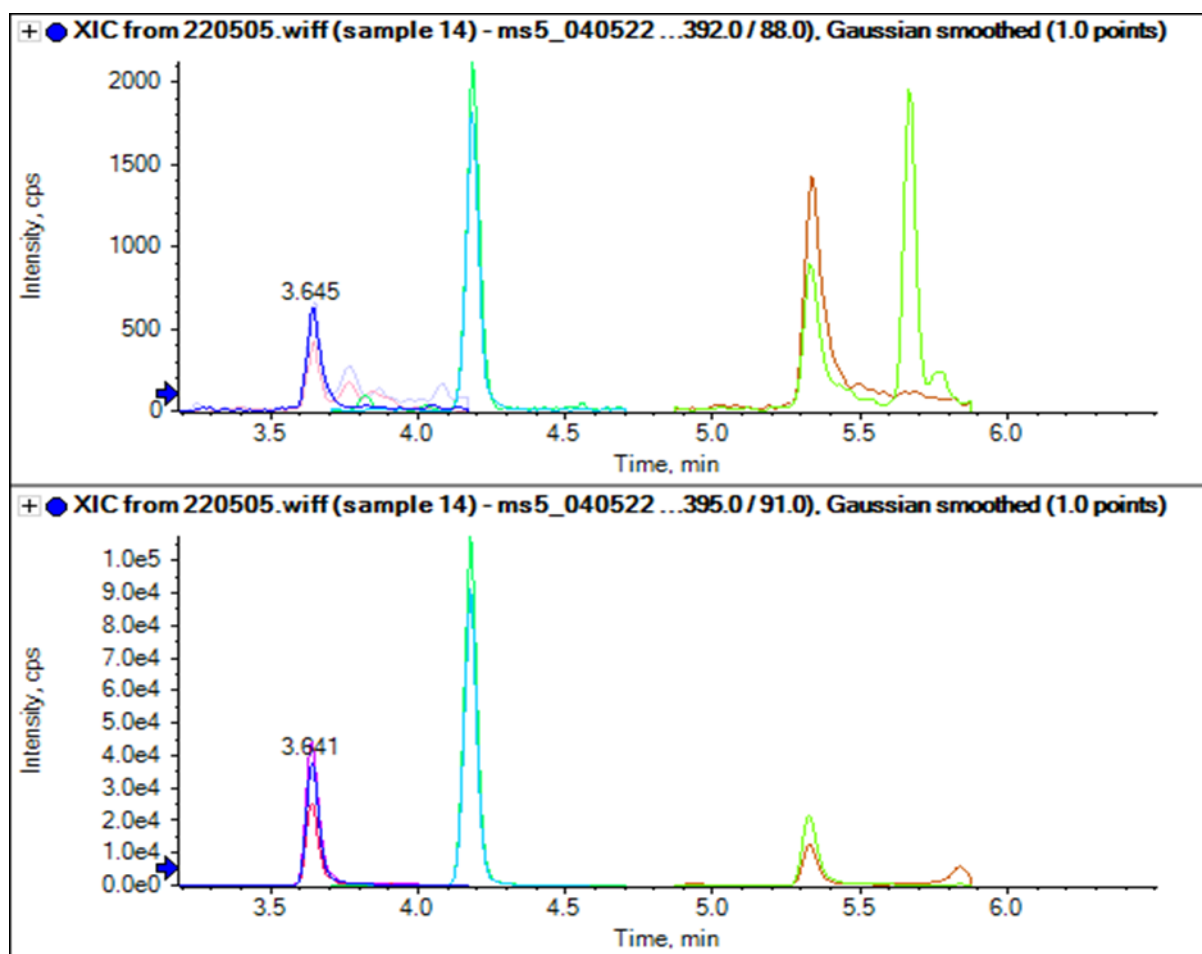
Linearita a rozsah kalibrace

Kalibrace byla připravena do blankové půdní matrice za použití izotopového ředění. Byly sestrojeny kalibrační přímky s body (5, 50, 500, 1000 a 2000) $\mu\text{g}/\text{kg}$. U všech analytů byla prokázána linearita v plném testovaném rozsahu, a to od 5 do 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, viz. Obrázek 1.



Obrázek 1. Kalibrační přímky a korelační koeficienty pro jednotlivé analyty.

Důležitým zjištěním také bylo, že odezva analytů na nejnižším kalibračním bodě 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ byla dostatečná, což vedlo k rozhodnutí provést validaci od hladiny 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (při započtení případných ztrát atd.). Ukázkový chromatogram matričního standardu na hladině 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ je na Obrázku 2.



Obrázek 2. Chromatogram vybraných analytů a jejich ILIS při hladině 5 µg/kg v půdě po derivatizaci FMOC-Cl.

Z důvodu úspory nákladů na přípravu procedurálních kalibračních řad pro jednotlivé matrice byla v dalším kroku porovnána shodnost kalibračních křivek pro rostlinný materiál a půdní matrici. U všech testovaných látek byla prokázána shodnost výše uvedených kalibračních křivek, tj. vyhověly kritériu přijatelnosti/shody (90 – 110) %, viz. Tabulka 3. Za předpokladu použití izotopicky značených interních standardů lze všechny typy vzorků kvantifikovat pomocí jakékoli procedurální matriční kalibrace.

Tabulka 3. Vyhodnocení shody kalibračních křivek v testovaném rozsahu (5 – 600) µg/kg.

Směrnice	Krmivo	Půda	Shoda
Glyphosate-FMOC	0,012140982	0,012052281	99,3 %
AMPA-FMOC	0,049648687	0,048660945	98,0 %
Glufosinate-FMOC	0,010454085	0,010489426	100,3 %

Stanovení správnosti a přesnosti

Z provedených opakovaných extrakcí na hladinách (8, 40 a 400) µg/kg byla vyhodnocena stanovená správnost (výťažnost) a přesnost (opakovatelnost) postupu. Oba parametry vyhovovaly u všech analytů na všech třech koncentračních hladinách. Bylo tedy dosaženo výťažností v rozmezí (70 – 120) % s opakovatelností ≤ 20 % (10). Výsledky validace jsou zobrazeny v Tabulce 4 a na Obrázcích 1 a 2.

Tabulka 4. Vyhodnocení správnosti a přesnosti stanovení pro jednotlivé analyty na všech testovaných hladinách.

Pesticid	Obohacení (µg/kg)	Výťažnost (%)	Opakovatelnost (%)	Počet měření
Glyfosát	8	88,0	8,5	6
	40	89,4	3,8	8
	400	94,5	5,5	8
AMPA	8	87,4	11,4	6
	40	98,4	3,4	8
	400	100,5	2,3	8
Glufosinát	8	91,7	2,6	6
	40	96,9	1,9	8
	400	96,5	1,1	8

Limit kvantifikace

Jako limit kvantifikace byla pro všechny analyty zvolena nejnižší validovaná hladina 8 µg/kg, jelikož na této hladině byla splněna všechna kritéria pro identifikaci, správnost a přesnost. RL-LVL bude tedy shodný s RL-LIMS.

Souhrnné výsledky validace glyfosátu, AMPA a glufosinátu jsou uvedeny v Tabulce 5 níže.

Tabulka 5. Shrnutí dosažených výsledků validovaných parametrů.

	RL-LIMS (µg/kg)	Výťažnost (povolená 70-120 %)	Korekce na výťažnost	Linearita (µg/kg)	Opakovatelnost (povolená < 20 %)	Rozšířená nejistota (%)
Glyfosát	8	90,4%	ne	5-2000	6,6	13,2
AMPA	8	94,3%	ne	5-2000	8,7	17,3
Glufosinát	8	94,6%	ne	5-2000	2,7	5,3

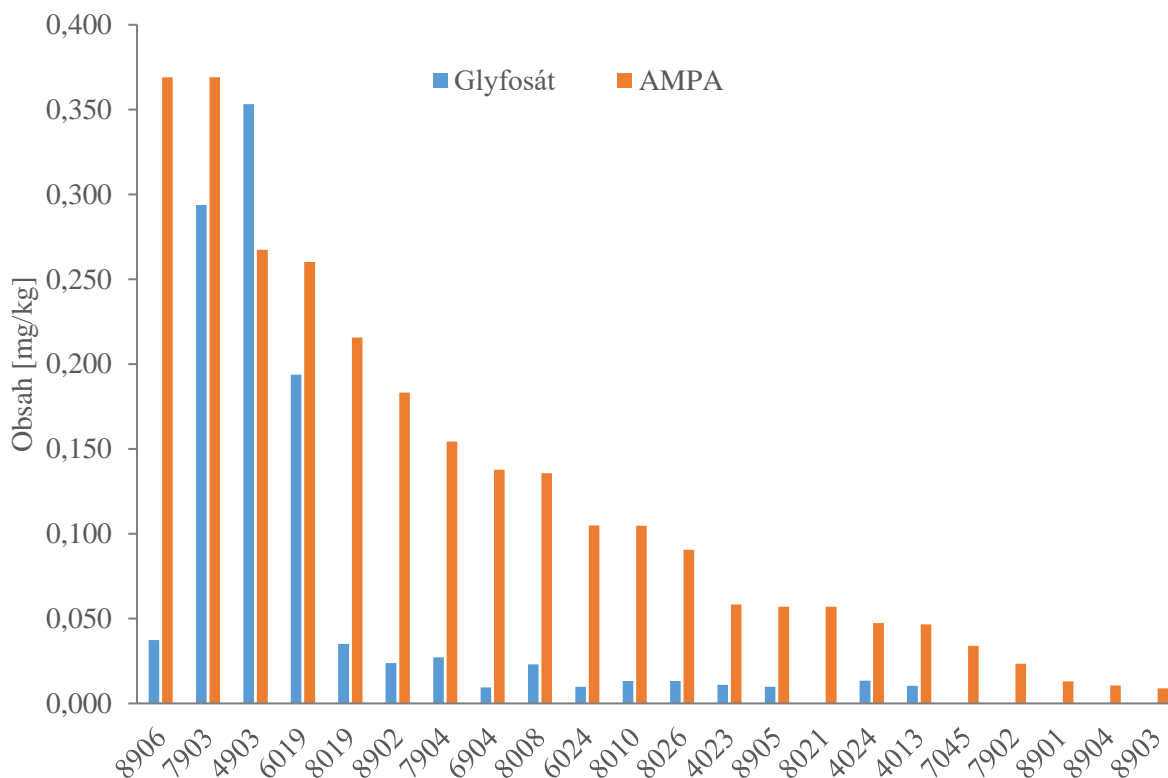
K identifikaci látek byla použita konfirmační kritéria, tj. retenční čas (RT) a poměr sledovaných, kvantifikačních a konfirmačních iontů. Pro správnou kvantifikaci je také nutné používat izotopově značený vnitřní standard (ILIS) nebo metodu standardního přídatku.

3.2.2 Screening v půdách BMZP (bazální monitoring zemědělských půd)

S použitím validované metody byla provedena analýza glyfosátu, AMPA a glufosinátu ve vybraných 22 lokalitách BMZP. Ve všech vzorcích půd byl stanoven degradační produkt AMPA, u 16 z nich byl stanoven glyfosát a glufosinát nebyl v žádné půdě detekován. Výsledky jsou zobrazeny v grafu na Obrázku 3 a jejich přehled v Tabulce 6. Ve většině vzorků je obsah metabolitu AMPA asi 5krát vyšší než obsah aplikovaného glyfosátu, s výjimkou lokalit 7903, 4903 a 6019, kde byly obsahy obou těchto látek řádově srovnatelné. Stanovené obsahy jsou v porovnání s publikovanými daty nižší o jeden až dva řády (2, 6). Jedním z vysvětlení je skutečnost, že soubor 22 vzorků obsahoval pouze odběry z lokalit s ornou půdou a nezahrnoval odběry z ploch s jiným typem hospodaření (sady, vinice) a/nebo jiným režimem ošetření (městské a další nezemědělské plochy).

Tabulka 6. Shrnutí výsledků screeningu glyfosátu, AMPA a glufosinátu v půdách BMZP.

Obsah (mg/kg)	Glyfosát	AMPA	Glufosinát
Minimální	0,0094	0,0089	-
Maximální	0,3533	0,3691	-
Průměrný	0,0673	0,1249	-
Medián	0,0182	0,0976	-
Četnost pozitivních vzorků	73%	100%	0%



Obrázek 3. Obsahy glyfosátu a AMPA ve vybraných lokalitách BMZP.

4 Závěr

Zavedená metoda, která zahrnuje extrakci v zásaditém prostředí a derivatizaci FMOC, představuje citlivou metodu pro stanovení glyfosátu, AMPA a glufosinátu v půdě. Mez stanovitelnosti pro všechny uvedené analyty je 0,008 mg/kg. Screening ukázal na 100% výskyt AMPA ve 22 půdách BMZP, 73 % vzorků obsahovalo glyfosát a žádný z nich glufosinát. U většiny půdních vzorků byl obsah metabolitu AMPA asi 5krát vyšší než obsah glyfosátu.

5 Literatura

1. COX, C. Herbicide Factsheet: Glyphosate. *Journal of Pesticide Reform*. **2004**, roč. 24, č. 4, s. 10–15.
2. BOTERO-COY, A.M., M. IBÁÑEZ, J.V. SANCHO a F. HERNÁNDEZ. Improvements in the analytical methodology for the residue determination of the herbicide glyphosate in soils by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2013**, vol. 1292, s. 132-141. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.12.007.
3. BERTRAND, C., V. BRETAGNOLLE, M. COEURDASSIER, et al. Glyphosate, AMPA and glufosinate in soils and earthworms in a French arable landscape. *Chemosphere*, **2022**, vol. 301. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2022.134672.
4. BOTERO-COY, A.M., M. IBÁÑEZ, J.V. SANCHO a F. HERNÁNDEZ. Direct liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean. *Journal of Chromatography A*. **2013**, vol. 1313, s. 157-165. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.07.037.
5. CHÁVEZ-ORTIZ, Pamela, Yunuen TAPIA-TORRES, John LARSEN a Felipe GARCÍA-OLIVA. Glyphosate-based herbicides alter soil carbon and phosphorus dynamics and microbial activity. *Applied Soil Ecology*. **2022**, vol. 169. DOI: 10.1016/j.apsoil.2021.104256.
6. KARASALI, Helen, George PAVLIDIS a Anna MAROUSOPOULOU. Investigation of the presence of glyphosate and its major metabolite AMPA in Greek soils. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. **2019**, 26(36), 36308–36321. ISSN 16147499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-019-06523-x
7. ČSN ISO 21458. *Jakost vod: Stanovení glyfosátu a AMPA - Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s fluorimetrickou detekcí*. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, **2010**.
8. PEREIRA, L. LC/MS of Glyphosate and AMPA. *Thermo Fisher Scientific*, Application note 20029. **2006**.
9. JPP ÚKZÚZ, postup č. 10606.1 Stanovení obsahu reziduí polárních pesticidů po derivatizaci metodou LC-MS.
10. SANTE/11312/2021 – Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residue analysis in food and feed.

Bulletin Národní referenční laboratoře XXVIII, 2024/3

Ročník: XXVIII, č.3

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2024

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 42

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196