	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50340.1 – Stanovení namořenosti osiva metodou LC-MS	Vydání	1
		Revize	1

## STANOVENÍ NAMOŘENOSTI OSIVA METODOU LC-MS

### 1 Účel a rozsah

Postup je určen pro stanovení účinných látek přípravků na ochranu rostlin v namořeném osivu po extrakci do acetonu. Identifikací přítomných účinných látek a kvantifikací jejich obsahu lze potvrdit nebo vyvrátit ošetření osiva deklarovaným přípravkem a zjistit možnou kontaminaci jiným přípravkem v mořicím zařízení.

Postup byl optimalizován pro karboxin, cyprokonazol, difenokonazol, fludioxonyl, fluoxastrobin, iprodion, prochloraz, prothiokonazol, prothiokonazol-desthio, tebukonazol, thiram, tritikonazol, propamokarb, klothianidin, thiaklopid, imidaklopid, metalaxyl, thiamethoxam, imazalil, pencykuron, sedaxan, thiofanát-methyl, tetrakonazol, fluxapyroxad, fluopyram, fluopikolid, penflufen.

### 2 Princip

Účinné látky se z celých namořených zrn extrahují do acetonu sonifikací vzorku v ultrazvukové lázni. Zfiltrovaný extrakt se použije pro přípravu roztoků pro koncové LC-MS stanovení.


### 3 Chemikálie

Všechny použité chemikálie jsou čistoty minimálně p.a., nejlépe však kvality pro reziduální analýzu, rozpouštědla musejí být vhodná pro LC-MS. Dostačující čistota chemikálií a laboratorního skla se testuje proměřením slepého vzorku.

- 1 Aceton.
- 2 Acetonitril.
- 3 Methanol.
- 4 Voda.
- 5 Kyselina octová, CH<sub>3</sub>COOH.
- 6 Kyselina mravenčí, HCOOH.
- 7 5% roztok HCOOH v acetonitrilu.

Příprava: 0,5 ml HCOOH (6) se rozpustí v 10 ml acetonitrilu (2).

- 8 Mobilní fáze A: 0,1% CH<sub>3</sub>COOH ve vodě.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50340.1 – Stanovení namořenosti osiva metodou LC-MS	Vydání	1
		Revize	1

Příprava: 0,250 ml CH<sub>3</sub>COOH (5) se ve 250ml odměrné baňce doplní po značku vodou (4).

- 9 Mobilní fáze B: 0,1% roztok CH<sub>3</sub>COOH v methanolu.

Příprava: 0,250 ml CH<sub>3</sub>COOH (5) se ve 250ml odměrné baňce doplní po značku methanolem (3).

- 10 Analytický standard účinné látky přípravku.

## Poznámky

- Certifikované analytické standardy se nakupují v pevném stavu a vede se jejich evidence.*
- Z analytických standardů se připraví zásobní roztok o přesné koncentraci 1 mg/ml acetonitrilu. Navažuje se alespoň 10 mg s přesností na 5 desetinných míst, navážka se přepočte na deklarovanou čistotu standardu a přidá se příslušné množství rozpouštědla. Roztoky se uchovávají při teplotě do 8 °C a jejich stabilita se musí pravidelně ověřovat.*
- Pracovní roztoky standardů a jejich směsné kalibrační roztoky se připraví ředěním zásobních roztoků do acetonitrilu (případně jiného vhodného rozpouštědla podle koncového stanovení), v potřebném koncentračním rozsahu. Např. (1 – 1000) ng/ml podle očekávaného obsahu daného analytu v namořeném osivu.*
- Účinné látky přípravků na ochranu rostlin lze z namořených zrn extrahovat pomocí jiného rozpouštědla, např. methanolu nebo acetonitrilu.*


## 4 Přístroje a pomůcky

- Kapalinový chromatograf s MS detektorem umožňující měření v MRM módu.
- Analytická kolona s reverzní fází C18 o rozměrech (50 – 100) mm × 2,1 mm × (1,7 – 1,8) μm.
- Filtrační disky PTFE nebo Nylon, průměr 13 mm nebo 30 mm, velikost pórů 0,2 μm, injekční stříkačka PP, 5 ml nebo 20 ml.
- Vialky se šroubovacím uzávěrem a PTFE/silikon septem, (2; 4; 20; 40) ml.

## 5 Postup

### 5.1 Příprava extraktu

**Základní:** Do skleněné 4ml vialky se vloží 10 namořených zrn, diferenčně se zváží s přesností na 0,0001 g a přidají se 3 ml acetonu (1). Vialka se uzavře a vloží se na 10 min do ultrazvukové lázně. Do držáku se upevní tělo 5ml plastové stříkačky, na luerskou koncovku se pevně nasadí filtrační disk a pod výstup se umístí 20ml sběrná vialka. Extrakt

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50340.1 – Stanovení namořenosti osiva metodou LC-MS	Vydání	1
		Revize	1

namořených zrn se dekantuje do připravené injekční stříkačky. Ke zbytku ve 4ml vialce se přidají další 2 ml acetonu a vzorek se extrahuje dalších 10 min v ultrazvuku. I tento druhý podíl se přelije do stříkačky a extrakt se zfiltruje pomalým pohybem pístu přes disk do připravené 20ml vialky. Tento zásobní extrakt (ZE) se použije pro přípravu zředěných roztoků pro koncové LC-MS stanovení.

**Pro nehomogenně namořené osivo:** Do skleněné 40ml vialky se naváží 4 g namořených zrn, diferenčně s přesností na 0,0001 g a přidá se 20 ml acetonu (1). Vialka se uzavře a vloží se na 10 min do ultrazvukové lázně. Do držáku se upevní tělo 20ml plastové stříkačky, na luerskou koncovku se pevně nasadí filtrační disk a pod výstup se umístí 40ml sběrná vialka. Extrakt namořených zrn se dekantuje do připravené injekční stříkačky. Ke zbytku ve 40ml vialce se přidá dalších 20 ml acetonu a vzorek se extrahuje dalších 10 min v ultrazvuku. I tento druhý podíl se přelije do stříkačky a extrakt se zfiltruje pomalým pohybem pístu přes disk do připravené 40ml vialky. Tento zásobní extrakt (ZE) se použije pro přípravu zředěných roztoků pro koncové LC-MS stanovení.


Podle očekávaného obsahu stanovovaných látek (tabulka č. 3) se ZE zředí 10 × až 100 × do konečného objemu 1 ml. Pro stonásobné naředění se do 2ml vialky odměří 10 µl ZE, 490 µl acetonitrilu (2) a 500 µl vody (4). Pro desetinásobné naředění se do 2ml vialky odměří 100 µl ZE, 400 µl acetonitrilu (2) a 500 µl vody (4). Vialka se uzavře, roztok se dobře promíchá a extrakt je připraven ke koncovému stanovení. Je-li požadováno stanovení analytů na mezi stanovitelnosti, proměří se neředěný zásobní extrakt.

### Poznámky

- 5 Za podmínek daných tímto postupem lze dosáhnout meze stanovitelnosti 0,1 mg/kg osiva.*
- 6 Pro zvýšení stability některých pesticidů v extraktu je možné jeho okyselení v poměru 10 µl 5% HCOOH (7)/1 ml extraktu.*
- 7 U vysoce koncentrovaných ZE, je možné dvoustupňové ředění; v prvním kroku se ZE zředí 100 × acetonitrem (ZZE) (např. 100 µl ZE se doplní acetonitrem v 10ml odměrné baňce po značku) a tento zředěný extrakt se dále 10 × zředí do minivialky (např. 100 µl ZZE, 400 µl acetonitrilu (2) a 500 µl vody (4)).*

## 5.2 Stanovení metodou LC-MS

Pro vlastní stanovení se použije metoda ultraúčinné kapalinové chromatografie (UPLC) s hmotnostně spektrometrickou detekcí v módu sledování vícenásobných přechodů (MRM). Jednotlivé pesticidy se separují gradientovou elucí na chromatografické koloně s reverzní fází typu C18. Příklady možného nastavení chromatografických a MRM podmínek jsou uvedeny v tabulkách č. 1 a č. 2.


	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50340.1 – Stanovení namořenosti osiva metodou LC-MS	Vydání	1
		Revize	1

**Tabulka č. 1. Příklad nastavení chromatografických podmínek.**

Teplota termostatu kolony	40 °C
Průtok mobilní fáze	0,6 ml/min
Gradient mobilní fáze	0 min (10% B) – 4 min (100% B) – 7 min (100% B) 7,1 min (10% B) – 10 min (10% B)
Nástřík	(1 – 2) µl s přeplněním smyčky
Slabý promývací roztok	Deionizovaná voda/methanol (90/10), (V/V)
Silný promývací roztok	Methanol

**Tabulka č. 2. Příklad nastavení MRM podmínek.**

Pesticid	Prekursor ion 1	Produkt ion 1	CV,CE (V)	Prekursor ion 2	Produkt ion 2	CV,CE (V)
Propamokarb	189	102	22,17	189	144	22,12
Karboxin	236	143	25,16	236	87	25,22
Thiram	241	120	20,15	241	88	20,10
Klothianidin	250	132	15,17	250	169	15,12
Thiaklopid	253	126	30,20	253	90	30,37
Imidaklopid	256	175	20,19	256	209	20,16
Metalaxyl	280	192	15,17	280	220	15,13
Cyprokonazol	292	125	27,24	292	70	27,18
Thiamethoxam	292	211	14,13	292	181	14,22
Imazalil	297	159	30,23	297	69	30,22
Tebukonazol	308	125	31,40	308	70	31,22
Prothiokonazol-desthio	312	70	13,25	312	125	13,20
Tritikonazol	318	70	20,18	318	125	20,40
Penflufen	318	141	45,20	318	234	45,15
Pencykuron	329	125	40,20	329	218	40,15
Iprodion	330	245	12,16	332	247	12,15

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50340.1 – Stanovení namořenosti osiva metodou LC-MS	Vydání	1
		Revize	1

Sedaxan	332	159	15,20	332	292	15,10
Thiofanát-methyl	343	151	19,22	343	93	19,46
Prothiokonazol	344	189	13,20	344	125	13,20
Tetrakonazol	372	159	32,30	372	70	32,20
Prochloraz	376	70	13,34	376	308	13,16
Fluxapyroxad	382	342	20,20	382	362	20,10
Fluopikolid	383	145	30,40	383	173	30,20
Fluopyram	397	145	45,45	397	173	45,25
Difenokonazol	406	111	37,60	406	251	37,25
Fluoxastrobin	459	427	27,18	459	188	27,18
Fludioxonyl	247	180	7,35	247	126	7,35

Teplota iontového zdroje: 150 °C; teplota desolvatačního plynu: 450 °C; průtok desolvatačního plynu: 900 l/h; průtok „cone gas“: 45 l/h; průtok kolizního plynu: 0,18 ml/min; napětí na kapiláře: – 3 kV; ionizace elektrosprejem se střídáním polarit.

## 6 Výpočet a vyjádření výsledků

Podmínky pro zpracování a vyhodnocení naměřených dat se zadají do vyhodnocovací metody přístroje. Pro potvrzení identity stanovované látky je důležitá shoda retenčního času a zastoupení charakteristických hmotnostních fragmentů  $m/z$  ( $Q$ ) v proměřovaném extraktu a v roztoku externího standardu. Koncentrace analytů (účinných látek mořících přípravků) v extraktu se vypočte z rovnice kalibrační křivky, sestrojené z odezev analytů, získaných proměřením kalibračních roztoků.

Výsledek se vyjádří v mg analytu/kg osiva a vypočte se podle vztahu

$$x = \frac{b \times V_1 \times F}{m} \times 10^{-3} \quad F = \frac{V_3}{V_2}$$

kde  $x$  je obsah účinné pesticidní látky ve vzorku v mg/kg,

$b$  koncentrace účinné látky v proměřovaném roztoku v ng/ml, odečtená z kalibrace,


$F$  zředovací faktor,

$V_1$  objem zásobního extraktu (ml);  $V_1 = 5$  ml,

$V_2$  objem alikvotního podílu ze zásobního extraktu ( $\mu$ l); např.  $V_2 = 10$   $\mu$ l,

$V_3$  objem proměřovaného extraktu ve 2ml vialce ( $\mu$ l);  $V_3 = 1000$   $\mu$ l,

$m$  navážka vzorku v mg.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b>  50340.1 – Stanovení namořenosti osiva metodou LC-MS	Vydání	1
		Revize	1

Je-li to požadováno, vypočte se i hodnota namořenosti  $N$ , která udává množství účinné látky (g) na výsevní jednotku (VJ). Nemá-li uvedeno jinak, tak 1 VJ = 100 000 zrn.

$$N = x \times HVJ \times 10^{-3}$$

kde  $N$  je namořenost vzorku (g/VJ),

$HVJ$  hmotnost výsevní jednotky (kg).

**Tabulka č. 3. Příklady odhadu očekávaného obsahu účinných látek v mořeném osivu.**

Mořicí přípravek	Účinná látka	Deklarovaný obsah (g/l)	Dávka (l/t osiva)	Očekávaný obsah (mg/kg osiva)
Vitavax 2000	Karboxin	200	2,5	500
	Thiram	200		500
Maxim Star 025	Cyprokonazol	200	2,0	400
	Fludioxonil	200		400
Celest Extra	Fludioxonil	25	1,5	37,5
	Difenokonazol	25		37,5
Orius 6	Tebukonazol	60	0,5	30