

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2025

Ročník XXIX, číslo 2/2025

Brno 2025

Obsah

- 1 Stanovení obsahu dusíku v asimilačních orgánech lesních vzorků metodou NIR spektroskopie**
Lenka Latková, David Čížmár, Bibiána Kotzianová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Opava
Jaselská 16, 746 01 Opava

1
- 2 Zavedení kvalitativní detekce transgenu MON87429 u kukuřice**
Jana Stehlíková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OdMB
Hroznová 2, 603 00 Brno

7
- 3 Rozšíření a revalidace multireziduální metody stanovení reziduí pesticidů v rostlinném materiálu**
Pavčina Landová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno
Hroznová 2, 603 00 Brno

23

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Stanovení obsahu dusíku v asimilačních orgánech lesních vzorků metodou NIR spektroskopie

Lenka Latková, David Čížmár, Bibiána Kotzianová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

ONRL Opava, Jaselská 16, 746 01 Opava

lenka.latkova@ukzuz.gov.cz

1 Úvod

Údaje o chemismu pletiv asimilačních orgánů lesních vzorků jsou doplňkem k údajům o půdním prostředí v průzkumu výživy lesa. Průzkum výživy lesa hodnotí stav lesa podle stavu živin a dalších vybraných prvků a charakteristik v půdním prostředí. Jeho posláním je informovat vlastníky lesních pozemků, jejich uživatele a zaměstnance pověřené řízením lesního hospodářství a zaměstnance státní správy. Údaje o půdním prostředí a úrovni výživy dřevin jsou podkladem pro rozhodování o vhodnosti melioračních zásahů a s nimi spojených finančních nákladů.

Vhodným místem pro odběr vzorků asimilačních pletiv u stálezelených jehličnatých dřevin je osluněná strana vrcholku koruny. Analyzují se jednoleté (první ročník) a dvouleté (druhý ročník) jehlice, které jsou odebrány v prostoru, ve kterém byly odebrány půdní vzorky.

Stanovení obsahu dusíku slouží ke klasifikaci obsahu dusíku v asimilačních orgánech dřevin.

3 Materiál a metody

3.1 Princip stanovení dusíku

Vytvoření NIR kalibračního modelu pro daný parametr spočívá ve vztažení informace získané absorpcí v NIR oblasti s hodnotou stanovenou laboratorní referenční metodou (LRM) do vzájemného poměru a získání regresní závislosti.

V následující části je uvedena klasická laboratorní metoda, pomocí které byly získány referenční hodnoty použité pro kalibraci NIR spektrometru.

Stanovení obsahu dusíku

Stanovení obsahu dusíku v rostlinném materiálu vychází z JPP ÚKZÚZ 40058.1 Stanovení celkového dusíku podle Dumase. Po vysušení v sušárně s cirkulujícím vzduchem při teplotě 65 °C byly vzorky upraveny na nožovém mlýnku Retsch Grindomix GM 200, pak byl odebrán alikvotní díl do vysoušečky a vysušen při 105 °C, po vysušení byl vzorek umístěn do exikátoru. Před vlastní analýzou byl vzorek vyjmut a ihned byl navažován do speciálních keramických spalovacích kelímků a umístěn do zásobníku analyzátoru Primacs SN-100, firmy Scalar. Následně byl stanoven dusík Dumasovou metodou. Spalování probíhá při 1100 °C v kyslíkové atmosféře a detekce byla provedena pomocí tepelně vodivostního detektoru metodou externí kalibrace. Jako kalibrační standardní látka byl použit EDTA. Navážka vzorku byla 200 mg.

3.2 Stanovení metodou NIR spektroskopie

Pro vytvoření přesného NIR kalibračního modelu je obecně základním požadavkem dostatečný počet analyzovaných vzorků. Pro kalibraci dusíku v asimilačních orgánech smrku bylo použito 104 vzorků z odběru vzorků v roce 2022, v těchto vzorcích jsou zahrnuty jehlice jednoleté i dvouleté. Vzorky byly analyzovány v Oddělení NRL Plzeň, kde byl stanoven obsah dusíku na analyzátoru CN.

Pro kalibraci byla NIR spektra nasnímána v křemenných kyvetách o průměru 3 cm v režimu reflektance. NIR měření byla prováděna v blízké infračervené spektrální oblasti přístrojem Nicolet Antaris s Fourierovou transformací. Spektrální reflektance, udávaná jako průměr ze 120 spekter, byla zobrazena jako logaritmus inverzní reflektance ($\log 1/R$) v 0,5 nm intervalech v rozsahu vlnových délek (1000 – 2500) nm.

Pro správný vývoj NIR kalibračního modelu je důležité, aby koncentrační rozsah kalibrovaného parametru byl co možná nejvyšší. Koncentrační rozsahy pro stanovovaný parametr v asimilačních orgánů smrku jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Složení vzorků asimilačních orgánů smrku použitých pro kalibraci přístroje Nicolet Antaris měřených v reflektanci

	N (%/s)
N _K (počet vzorků)	104
Minimum	0,98
Maximum	1,56
Průměr	1,25

Důležitým předpokladem vytvoření úspěšného kalibračního modelu je dále skutečnost, že laboratorní referenční metoda používaná pro kalibraci NIR spektrometru musí být dostatečně přesná.

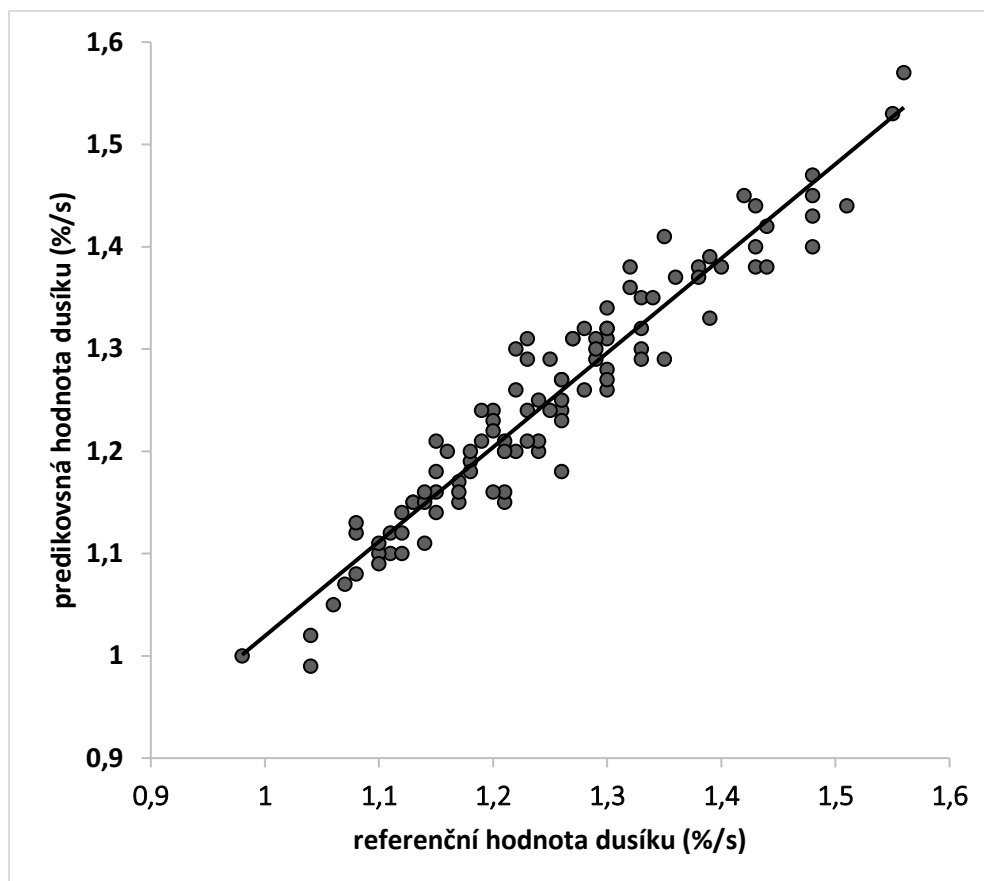
V prvním kroku před vlastní regresní tvorbou kalibračního modelu byla na jednotlivé soubory kalibračních spekter (vzorků) aplikována matematická korekce spekter SNV, která eliminuje vliv velikosti částic. Tento krok je velmi důležitý u vzorků, které před vlastní NIR analýzou prošly úpravou síťováním nebo pro vlastní měření NIR spektroskopii nebyly pomlety. Na takto upravených NIR spektrech byla provedena analýza hlavních komponent, která je vhodná pro detekci a určení odlehlých měření vzorků (spekter). Metodou hlavních komponent (PCA) byla identifikována odlehlá měření, ale současně bylo ověřeno, zda tímto vylučováním nebyly označeny důležité kalibrační vzorky (extrémní body, které mohou odpovídat např. koncentrační abnormalitě), čímž by byla snížena robustnost vytvářeného kalibračního modelu. Tímto způsobem upravené kalibrační soubory pro stanovení obsahu dusíku v asimilačních orgánech smrku po vyloučení odlehlých měření byly dále korigovány regresní metodou PLS. Následně byly jednotlivé kalibrační modely optimalizovány tak, aby poskytovaly co nejvyšší hodnotu korelačního koeficientu R a zároveň co nejnižší střední kvadratickou chybu predikce RMSECV při optimálním počtu latentních proměnných (hlavních komponent) v modelu.

V průběhu tvorby kalibračního modelu byly rovněž vybrány vhodné vlnové délky a to takové, u kterých se absorpcí záření v NIR spektru projevila zřejmá korelace s laboratorní referenční hodnotou. Výsledkem optimalizace kalibračního modelu je získaný graf referenčních versus

NIR predikovaných koncentrací (kalibrační závislost, kalibrační křivka) a hodnota střední kvadratické chyby predikce RMSECV a korelačního koeficientu R.

4 Výsledky a diskuse

Na základě výsledků LRM byl vytvořen a optimalizován kalibrační model pro stanovení parametru obsah dusíku metodou NIR spektroskopie ve vzorcích asimilačních orgánů smrku. Kalibrační závislosti jsou zobrazeny graficky na obrázku 1.



Obrázek 1. Kalibrační závislost pro parametr dusík (%/s).

Přehled získaných kvalitativních parametrů kalibračního modelu stanovených regresní metodou PLS pro vybraný parametr ve vzorcích asimilačních orgánů smrku je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2. Kvalitativní parametry kalibračního modelu vzorků asimilačních orgánů smrku.

Parametr	RMSECV	R
N (%/s)	0,0476	0,9223

Legenda: RMSECV – střední kvadratická chyba predikce (CV-příčné validace); R – korelační koeficient.

Z tabulky 2 je zřejmé, že pro stanovení parametru obsahu dusíku byla získána vysoká hodnota korelačního koeficientu.

Predikční schopnosti tohoto vytvořeného kalibračního modelu pro stanovení obsahu dusíku ve vzorcích asimilačních orgánů smrku byly ověřovány na souboru nezávislých vzorků, které nebyly zahrnuty do vývoje kalibračního modelu. Vyhodnocení následného porovnání výsledků získaných LRM a metodou NIR spektroskopie je uvedeno v tabulce 3.

Tabulka 3. Protokol validace analytických metod LS7.

Statistické vyhodnocení
Počet měření 30
Průměr měření 1,28
Průměr ref. měření 1,27
Linearita Nevyhovuje
Koeficient b0 -0,0700942
Koeficient b1 1,04514
Test významnosti absolutního koeficientu nevýznamný Tk = 0,8789 Tab.hodn. = 2,048
Test hypotézy koef. b1=1 potvrzena Tk = 0,7294 Tab.hodn. = 2,048
Výtěžnost 99,01
Test shody sad měření studentovým t-testem Vyhovuje Tk = 1,711 Tab.hodn. = 2,045
QC koeficient 3,04
Výběrový korelační koeficient 2,93 %

Z tabulky 3 vyplývá, že metoda NIR spektroskopie v porovnání s laboratorní referenční metodou poskytuje statisticky shodné výsledky pro stanovení obsahu dusíku ve vzorcích asimilačních orgánů smrku.

5 Závěr

Na dostatečně obsáhlém souboru vzorků asimilačních orgánů smrku byl optimalizován kalibrační model pro stanovení dusíku metodou FT-NIR spektroskopie.

Z prezentovaného grafu kalibračních závislostí a hodnot kvalitativních parametrů (RMSECV, R) vytvořeného kalibračního modelu je zřejmé, že hodnoty obsahu dusíku stanovené laboratorní referenční metodou a predikované metodou NIR spektroskopie spolu korelují ($R = 0,9223$).

Zároveň byly porovnány dvě analytické metody. Prezentované výsledky potvrdily vhodnost metody NIR spektroskopie a lze ji tak ji doporučit pro predikování obsahu dusíku ve vzorcích asimilačních orgánů smrku.

4 Literatura

1. JPP ÚKZÚZ, postup č. 40058.1 Stanovení celkového dusíku podle Dumase.
2. Průzkum výživy lesa na území České republiky 1996-2016, ÚKZÚZ, Brno.

Zavedení kvalitativní detekce transgenu MON87429 u kukuřice

Jana Stehlíková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
OdMB, Hroznová 2, 603 00 Brno
jana.stehlikova@ukzuz.gov.cz

1 Úvod

Geneticky modifikovaný organismus (GM organismus, GMO) je organismus, jehož genetický materiál byl úmyslně změněn, a to způsobem, kterého se nedosáhne přirozenou rekombinací. Dotčené techniky jsou uvedeny v Zákonu o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty č. 78/2004 Sb.

Geneticky modifikované (GM) plodiny jsou takové rostliny, u kterých byl změněn dědičný materiál (DNA) pomocí genových technologií.

GM kukuřice MON87429

Unique Identifier UI: MON87429-9

Pro vývoj kukuřice MON87429 byla využita transformace rostlin pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. Výsledná GM kukuřice vykazuje kombinovanou toleranci k herbicidům glufosinátu, glyfosátu, herbicidu dikamba a herbicidu 2,4-D.

Základní obsažené genetické modifikace jsou:

- pat, umožňuje rostlině syntézu enzymu fosfotricin N-acetyltransferáza (PAT) ze *Streptomyces viridochromogenes* a tím eliminuje herbicidní účinek glufosinátových herbicidů.
- dmo, umožňuje syntézu enzymu dikamba mono-oxygenázy ze *Stenotrophomonas maltophilia* a tím poskytuje toleranci k herbicidu dikamba.
- cp4 epsps (aroA:CP4), umožňuje syntézu herbicid-tolerantní formy enzymu 5-enolpyruvylshikimát-3-fosfát syntázy (EPSPS) z *Agrobacterium tumefaciens*, snižuje afinitu ke glyfosátu, čímž zvyšuje toleranci k herbicidu glyfosátu.

- ft_t: protein 2,4-D a FOPs dioxygenázy ze *Sphingobium herbicidovorans*, který poskytuje toleranci k herbicidům 2,4-D a FOPs.

Transgenní kazeta MON87429 je znázorněna na obrázku č. 1.



Obrázek č. 1. Konstrukt MON87429.

Protože je nutná pravidelná úřední kontrola krmiv a materiálů pro výrobu krmiv, laboratoř neustále rozšiřuje spektrum stanovovaných genetických modifikací v kukuřici. Práce popisuje kvalitativní stanovení MON87429 a určení meze detekce stanovení (MD). Součástí je ověření detekce screeningového elementu promotor 35S, pat a cp4epsps v použitém referenčním materiálu.

2 Princip

Základem metody detekce genetických modifikací je polymerázová řetězová reakce (dále PCR). Jedná se o běžně používanou metodu, při které dochází k mnohonásobnému zmnožení konkrétního požadovaného úseku DNA. V tomto případě se jedná o klasickou PCR s elektroforetickou detekcí ampikonu na agarózovém gelu.

3 Materiál a metody

Pro zavedení byly použity izoláty DNA z certifikovaných referenčních materiálů od The American Oil Chemists' Society (AOCS) a IRMM Institute for reference Material and Measurements (IRMM).

- AOCS 0411-C, non modified maize powder, (pure, blank) - laboratorní značení: CRM 14/2016
- ERM – BF427a, 98140 Maize, seed powder, (< 0,4 g/kg) - laboratorní značení: CRM 5/2022
- AOCS 0321-A, MON 87429 Maize powder, (≥ 996 g/kg) - laboratorní značení: CRM 11/2023

- AOCS 0707-B4, A2704-12 soy leaf tissue genomic DNA (> 999.9 ng/μg) – laboratorní značení: CRM 24/2012
- AOCS 0804-B, MON1445 cotton powder (> 994 g/kg) – laboratorní značení: CRM 27/2012

Izolace byla provedena pomocí zavedeného komerčního kitu (NucleoSpin® Food – MACHEREY-NAGEL). U izolátů DNA byla změřena koncentrace, byly otestovány na kvalitu i amplifikovatelnost DNA.

V rámci verifikace byla stanovena správnost stanovení. K tomu bylo využito tří izolátů (A-C) CRM 11/2023. Zároveň byl otestován i směsný CRM 14/2016, který slouží pro stanovení meze detekce. Směsný izolát (Sm) vznikl smícháním izolátů A-E CRM 14/2016, změřením koncentrace výsledné směsi a naředěním na koncentraci požadovanou do reakce.

PCR s koncentrací DNA v izolátu 5ng/μl a s koncentrací DNA 10 ng/μl byla provedena u CRM MON87429 v izolátech A-E.

Dále byla ověřena detekce screeningového elementu p35S, pat a cp4epsps v CRM 11/2023 u izolátů A-C a u směsného izolátu CRM 14/2016.

Součástí verifikace bylo stanovení meze detekce (MD) na hladině $\leq 0,1$ % GM m/m. K dispozici byl CRM s 100 % GM m/m. Postupným ředěním izolované DNA byla připravena koncentrační řada (100 – 0,05) % m/m GM. Pro ředění izolátu DNA z CRM s GM byl použit izolát DNA z CRM stejné, nemodifikované plodiny (NK, CRM 14/2016, 0 % GM m/m) o stejné koncentraci DNA v izolátu.

Mez detekce byla ověřena provedením pěti nezávislých PCR (amplifikací) zaváděné modifikace.

Pro zavedení byly využity následující metody.

- Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR, ÚKZÚZ, JPP ZK, postupy č. 10252.1, 10255.1, 10257.1, 10259.1
- ID č. 7 Validace metod v NRL, Příloha č. 6 Verifikace metod založených na polymerázové řetězové reakci pro stanovení genetických modifikací v osivech, krmivech a krmných směsích.

- Compendium of Reference Methods for GMO Analysis, European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GMFF), European Network of GMO Laboratories (ENGL), 2011
- Event-specific Method for the Quantification of maize MON 87429 by Real-time PCR, Validation Report and Validated Method, JRC – Institute for Health and Consumer Protection, EURL-VL-07/19VP, JRC Publication JRC126240, 2021.

3.1 Přístroje a pomůcky

Extrakce DNA

- 1 Váhy s přesností 0,01 g.
- 2 Vodní lázeň nebo termoblok, přednostně s vibrací, třepáním.
- 3 Centrifuga.
- 4 Minishaker, vortex.
- 5 Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.
- 6 Přenosná UV lampa.
- 7 Digestoř.
- 8 pHmetr.
- 9 Lednice.
- 10 Mrazicí box.
- 11 Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) μ l, špičky s filtrem a bez filtru.
- 12 Plastové zkumavky s víčkem, (2 – 2,5) ml.
- 13 Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby.

Měření koncentrace a čistoty DNA, gelová elektroforéza

- 1 Nízkoobjemový spektrofotometr NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).
- 2 Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.
- 3 pHmetr.
- 4 Lednice.
- 5 Mrazicí box.
- 6 Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) μ l, špičky s filtrem a bez filtru.

- 7 Plastové zkumavky s víčkem o objemu (2 – 2,5) ml.
- 8 Elektroforetická vana, zdroj napětí, elektroforetické hřebínky.
- 9 Fotodokumentační zařízení se softwarem BIO PRINT TX4 (Vilber Lourmat).
- 10 Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby.

PCR reakce – amplifikace

- 1 PCR box.
- 2 Minishaker, vortex.
- 3 Termální cyklér C 1000 Touch Thermal Cycler (BIO RAD)
- 4 Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) µl a sterilní špičky s filtrem i bez filtru.
- 5 Plastové sterilní zkumavky, 0,2 ml, 0,5 ml, 2 ml.
- 6 Výrobník ledu.
- 7 Lednice.
- 8 Mrazicí box.
- 9 Latexové rukavice bezpudrové, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby, nádoba na uchování ledu.

3.2 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

Extrakce DNA: NucleoSpin® Food, výrobce Macherey – Nagel, kit pro izolaci genomické

DNA z potravin a krmiv

- 1 Lysis Buffer CF.
- 2 Buffer C4.
- 3 Wash buffer CQW.
- 4 Wash buffer C5 (koncentrát).
- 5 Elution buffer CE.
- 6 NucleoSpin® Food Columns (plus Collection Tubes).
- 7 Proteinase K (lyofilizát).
- 8 Proteinase buffer PB.

Měření koncentrace a čistoty DNA, gelová elektroforéza

- 1 Agaróza pro molekulární biologii (Agarose for molecular biology, Sigma Aldrich).
- 2 Pracovní roztok 1 × TAE pro elektroforézu.
- 3 1% Pracovní roztok interkalačního barviva (ethidium bromid).
- 4 Elektroforetický marker pro izolát DNA (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Life Technologies Czech Republic).
- 5 6 × Loading Dye Solution.
- 6 Elektroforetický marker pro amplifikáty (EZ Load™ Molecular Ruler 50 bp PCR Biorad).
- 7 Ribonuklease A 10 mg / ml (DNase and protease free).

PCR reakce – amplifikace

- 1 REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix with MgCl₂, výrobce Sigma–Aldrich, univerzální reakční směs pro PCR (dále REDTaq).
- 2 REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂.
- 3 PCR voda.

Další potřebné chemikálie nedodávané v rámci kitů

- 1 Voda vhodná pro PCR.
- 2 Dekontaminační roztok pro ošetření ploch.
- 3 Amplifikační primery:

Pro analýzy byly použity amplifikační primery od firmy Generi-Biotech.

Vnitřní (referenční) gen kukuřice – škrobová invertáza:

IVRI-F: CCG CTG TAT CAC AAG GGC TGG TAC

IVRI-R: GGA GCC CGT GTA GAG CAT GAC GAT C

MON87429

MON87429- F: CGA GAC AGA CTC AAT GTA TCC GAG ATA CTC

MON87429- R: CCA TCA TAC TCA TTG CTG ATC CAT GTA

p35S

35s-cf3: CCA CGT CTT CAA AGC AAG TGG

35s-cf4: TCC TCT CCA AAT GAA ATG CCA TTC C

pat

PAT_16-L (F): GAT ATG GCC GCG GTT TGT GAT

PAT_16-R (R): TTC CAG GGC CCA GCG TAA G

CP4epsps

GT73-TmF: GGG ATG ACG TTA ATT GGC TCT G

GT73-TmR: GGC TGC TTG CAC CGT GAA G

4 Pracovní postup

Pro zavádění byly použity postupy JPP 10252.1 Izolace DNA pro stanovení GMO metodou PCR-kit Nucleospin Food, JPP 10255.1 Provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) pomocí kitu RedTaq pro stanovení GMO, JPP 10257.1 Gelová elektroforéza pro stanovení GMO metodou PCR a JPP 10259.1 Vyhodnocení výsledků stanovení GMO metodou PCR.

Složení reakční směsi pro PCR pomocí kitu REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (jednoduchá PCR) pro vnitřní gen kukuřice, GM MON87429, p35S, cp4epsps a pat je uvedeno v tabulce č. 1. Jednotlivé amplifikační programy jsou uvedeny v tabulkách č. 2 až 6.

Tabulka č. 1. Složení reakční směsi.

Složka	Koncentrace roztoků	Finální koncentrace	Objem (μl/reakce)
PCR voda			6,5
RedTaq PCR MIX	2 ×	1 ×	12,5
Primer F	20 μM	0,4 μM	0,5
Primer R	20 μM	0,4 μM	0,5
Templátová DNA	10 ng/μl	2 ng/ul	5
Objem směsi vč. templátu			25

Vnitřní gen kukuřice (škrobová invertáza)

primery: IVRI-F / IVRI-R

délka amplikonu: 225 bp

Tabulka č. 2. Amplifikační program.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	60	1
Denaturace	94	50	35
Annealing	68	110	
Extenze	72	120	
Závěrečná extenze	72	300	1

P35S

primery: 35s-cf3/35s-cf4

délka amplikonu: 123bp

Tabulka č. 3. Amplifikační program.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	60	1
Denaturace	94	58	40
Annealing	57,5	120	
Extenze	72	105	
Závěrečná extenze	72	180	1

cp4epsps

primery: GT73-TmF/GT73-TmR

délka amplikonu: 88bp

Tabulka č. 4. Amplifikační program.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	45
Annealing a extenze	60	60	

pat

primery: PAT_16-L (F)/ PAT_16-R (R):

délka amplikonu: 186bp

Tabulka č. 5. Amplifikační program.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	40
Annealing a extenze	60	60	

MON87429

primery: MON 87429 primer 1 / MON 87429 primer 2

délka amplikonu: 116 bp

Tabulka č. 6. Amplifikační program.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	45
Annealing a extenze	60	60	

5 Výsledky a diskuse

5.1 Kvalita DNA

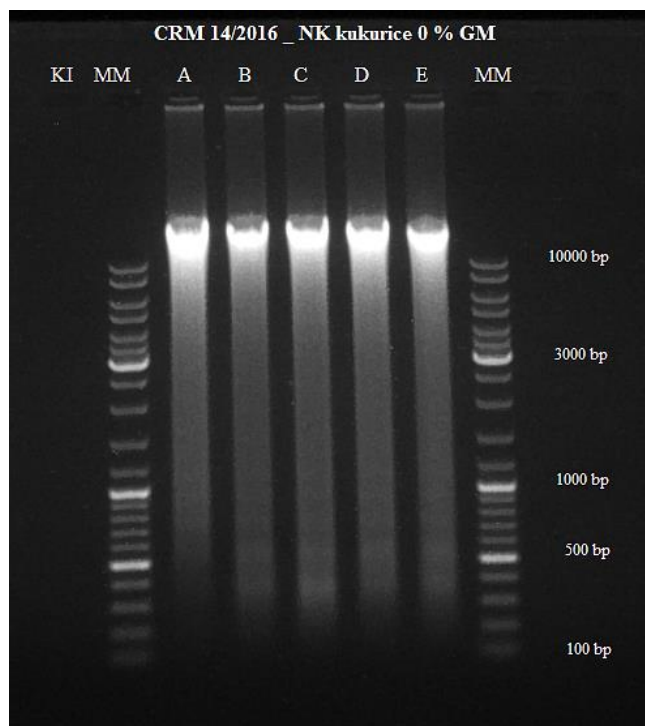
Pro potřeby zavádění byla extrahována DNA z CRM geneticky nemodifikované kukuřice (CRM 14/2016) a z CRM GM kukuřice MON87429 (CRM 11/2023). U izolátů byla změřena koncentrace (tabulka č. 7), otestována kvalita i amplifikovatelnost DNA při stanovení vnitřního genu - sójového lektinu (obrázky č. 2 - 4).

Všechny získané izoláty CRM vyhovovaly pro všechny následující analýzy.

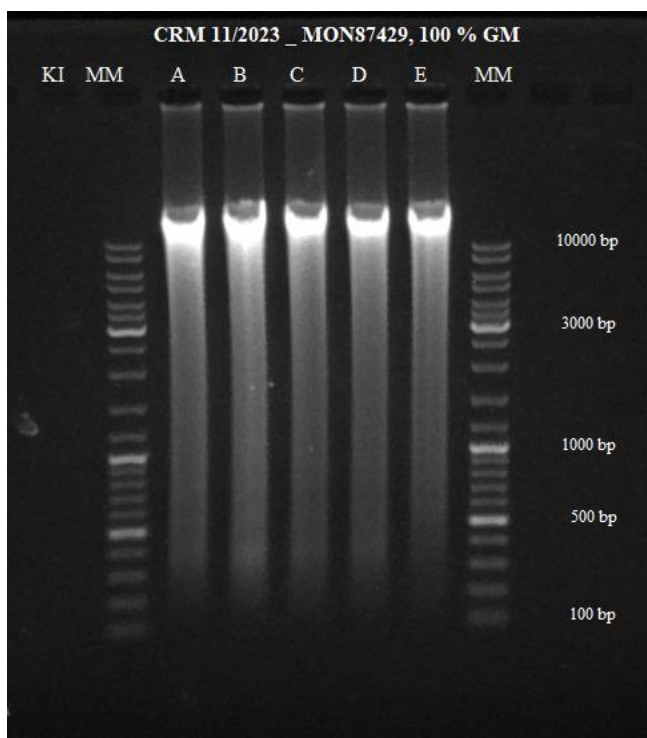
Tabulka č. 7. CRM 14/2016, CRM 11/2023 – hodnoty naměřených koncentrací a hodnoty určující čistotu vyextrahované DNA.

CRM	Izolát	Koncentrace ng/μl	A 260/A 280	A 260/A 230
CRM 11/2023_ MON87429 100 % GM m/m Izoláty A, B, C, D, E	A	222,0	1,88	2,24
	B	219,8	1,88	2,23
	C	198,5	1,87	2,22
	D	174,5	1,87	2,24
	E	218,9	1,87	2,22
CRM 14/2016_ Kukuřice NK 0 % GM m/m Izoláty A, B, C, D, E	A	162,8	1,85	2,27
	B	132,6	1,84	2,28
	C	143,8	1,86	2,30
	D	156,5	1,84	2,28
	E	148,2	1,86	2,28

Kvalita izolátů DNA

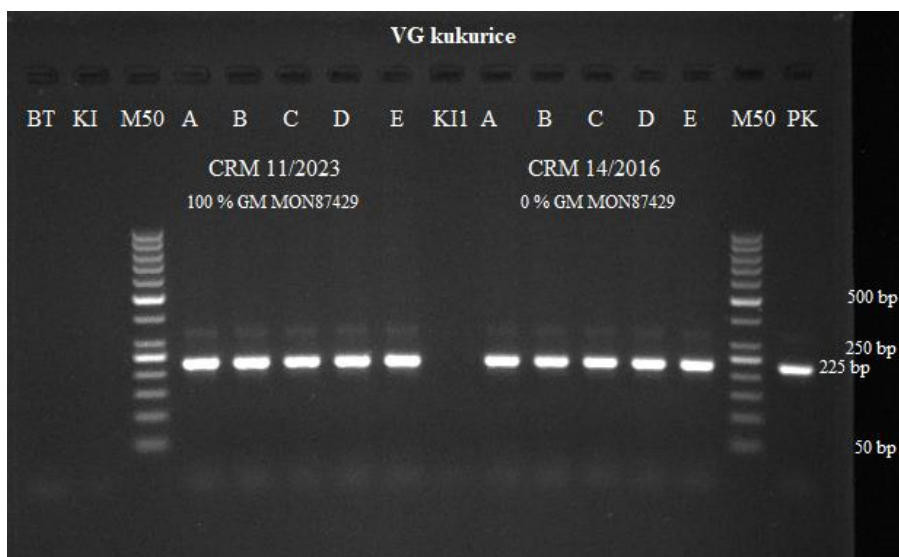


Obrázek č. 2. Kvalita izolátů DNA, CRM 14/2016_ izoláty NK A-E. MM – Elektroforetický marker, KI – kontrola izolace.



Obrázek č. 3. Kvalita izolátů DNA, CRM 11/2023 izoláty A-D. MM – Elektroforetický marker, KI – kontrola izolace.

5.2 Vnitřní gen kukuřice

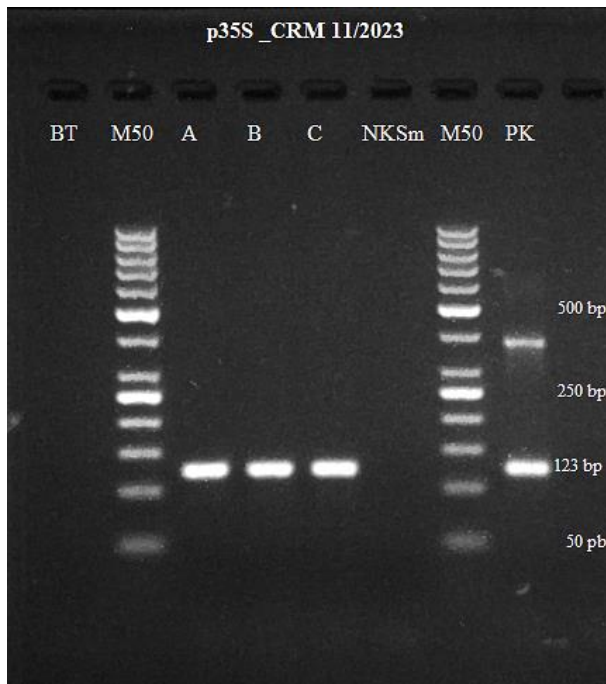


Obrázek č. 4. Vnitřní gen kukuřice (225 bp) pro CRM 14/2016, izoláty A-E; CRM 11/2023, izoláty A-E. BT- beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50 bp, KI a KI1 – kontroly izolace. PK- CRM 5/2022.

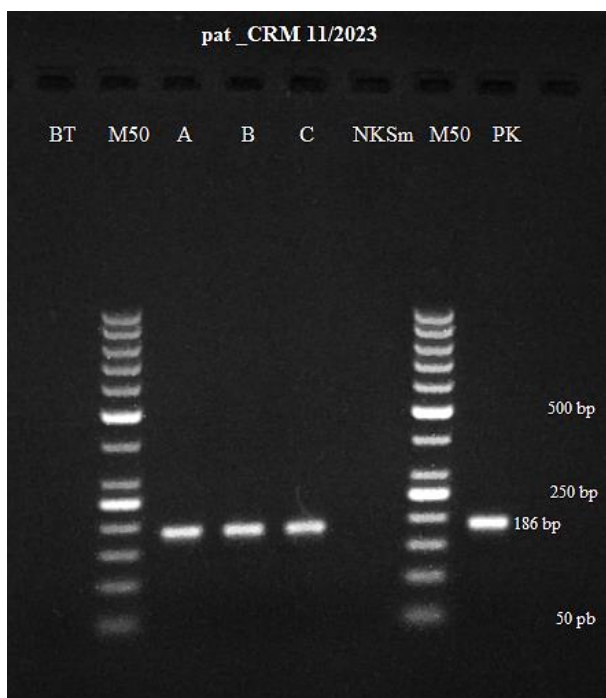
5.3 Screeningové elementy

U MON87429 byla ověřena detekce screeningového elementu p35S, pat a cp4epsps. Výsledky zkoušek byly pozitivní. Obrázky č. 5 - 7.

U CRM 14/2016 byla ověřena nepřítomnost screeningového elementu p35S, pat a cp4epsps ve směsném izolátu. Výsledky zkoušek byly negativní. Obrázky č.5-7.



Obrázek č. 5. Promotor 35S (123 bp) - CRM 11/2023 A, B, C. BT- beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50bp, NKSm – CRM14/2016 směsný izolát. PK-CRM 27/2012.



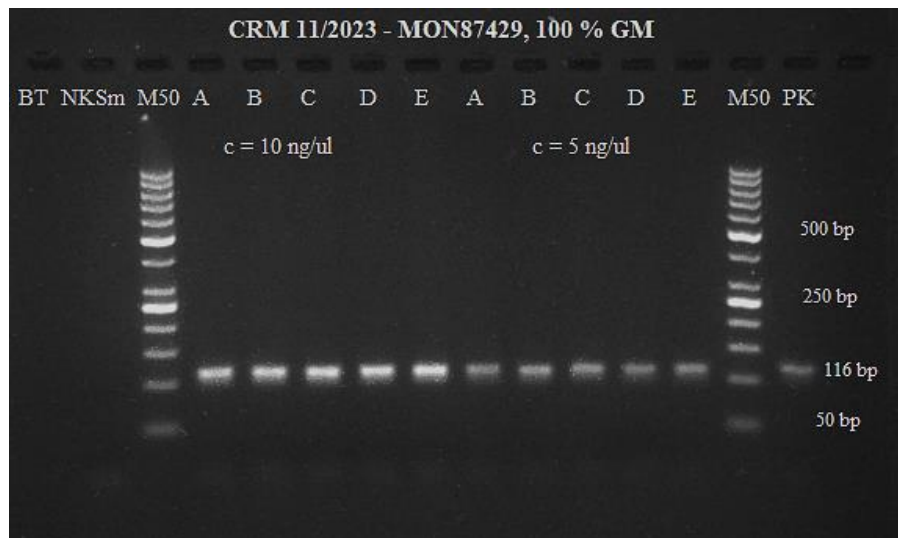
Obrázek č. 6. pat (186 bp) - CRM 11/2023, izoláty A, B, C. BT- beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50bp, NKSm – CRM14/2016 směsný izolát, PK-CRM 24/2012.



Obrázek č. 7. Cp4epsps (88 bp) - CRM 11/2023, izoláty A, B, C. BT- beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50bp, NKSm – CRM14/2016 směsný izolát, PK-CRM 27/2012.

5.4 Správnost stanovení

U MON87429 byla z izolátů (A-E) CRM 11/2023 provedena PCR s koncentrací DNA v izolátu 5 ng/μl a s koncentrací DNA 10 ng/μl. Výsledky zkoušek byly pozitivní. (obrázek č. 8).



Obrázek č. 8. Stanovení MON87429 (116 bp); BT – beztemplátová kontrola, NKSm – CRM14/2016 směsný izolát, M50-marker 50 bp, CRM 11/2023: PK, Izoláty A, B, C, D, E v koncentracích 10 ng DNA/μl a 5 ng DNA/μl.

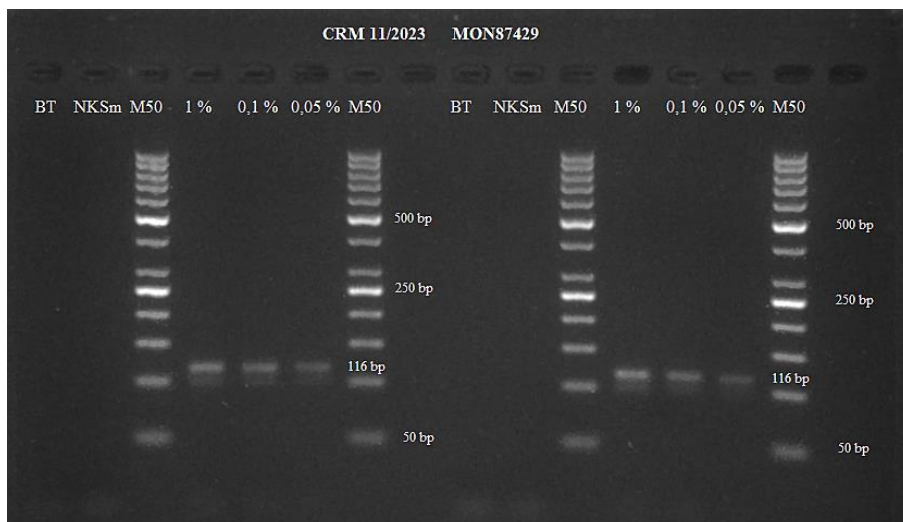
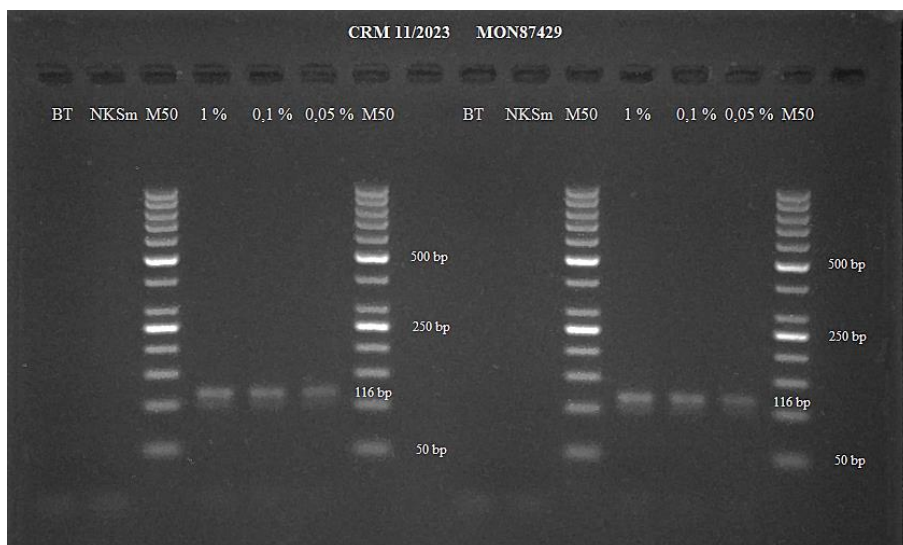
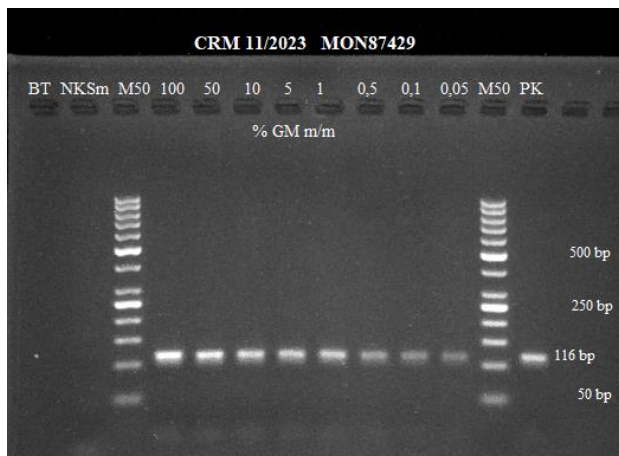
5.5 Mez detekce stanovení (MD)

Cílem verifikace bylo stanovení meze detekce na hladině $\leq 0,1$ % GM m/m.

Byla provedena amplifikace izolátu CRM 11/2023 o koncentraci DNA 10 ng/μl a obsahu modifikace (100 – 0,05) % m/m GM.

K amplifikaci a detekci produktu došlo ve všech opakováních. (Obrázky č. 9 - 11).

Z výsledků analýz vyplynulo, že obsah modifikace MON87429 lze detekovat na hladině 0,05 % GM m/m.



Obrázky č. 9 - 11. Stanovení MD transgenu MON87429 (116 bp), BT – beztemplátová kontrola, NKSm – CRM 14/2016, M50-marker 50 bp. CRM 11/2023: 100 %, 10 %, 1 %; 0,1 %; 0,05 % GM m/m. PCR proběhla do koncentrace 0,05 % GM m/m.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že testované certifikované referenční materiály vykazují pruhy v příslušných místech.

Detekovatelnost produktů PCR je závislá zejména na koncentraci templátové DNA, kvalitě templátové DNA (závisí na způsobu izolace, skladování apod.), kvalitě amplifikačních primerů, kvalitě gelu, použitém interkalačním barvivu a provedení elektroforézy.

6 Závěr

Cílem práce bylo zavést metodu pro detekci nové geneticky modifikované kukuřice MON87429 a rozšířit tak spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací v laboratoři OdMB.

Metoda stanovení MON87429 byla zavedena s mezí detekce 0,05 % GM m/m.

Tato metoda se zařadí jako další parametr při zkoušení přítomnosti genetických modifikací ve vzorcích krmiv a osiv.

7 Literatura

1. Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR, ÚKZÚZ, JPP ZK, postupy č. 10252.1, 10255.1, 10257.1, 10259.1
2. Compendium of Reference Methods for GMO Analysis, European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GMFF), European Network of GMO Laboratories (ENGL), 2011
3. Event-specific Method for the Quantification of maize MON 87429 by Real-time PCR, Validation Report and Validated Method, JRC – Institute for Health and Consumer Protection, EURL-VL-07/19VP, JRC Publication JRC126240, 2021

Rozšíření a revalidace multireziduální metody stanovení reziduí pesticidů v rostlinném materiálu

Pavλίna Landová

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

1 Úvod

Celkový počet registrovaných a aktuálně používaných přípravků pro ochranu rostlin (POR) pro profesionální použití v ČR čítá přes 2800 položek [1] s více než 300 různými účinnými látkami (platné ke dni 23. 1. 2024). Spotřeba POR má sice v posledních letech klesající tendenci [2], ale na trh jsou stále uváděny další přípravky s obsahem nových účinných pesticidních látek. K efektivnímu cílení kontroly je proto nezbytné reagovat na stále se měnící škálu POR na trhu a rozšiřovat tomu úměrně i portfolio stanovovaných pesticidních látek. K výběru a případné prioritizaci takovýchto látek dále slouží Víceletý kontrolní plán pro rezidua pesticidů [3], podněty ze stran inspektorů ÚKZÚZ, dále se také pracuje s informacemi z informačních portálů EURL [4]. Legislativně jsou rezidua pesticidů uvedena v Nařízení (ES) č. 396/2005 [5], které ustanovuje jejich maximální limity v potravinách a krmivech rostlinného a živočišného původu. Počet pesticidů s ustanovenými maximálními limity se i zde postupně navyšuje. Průběžně dochází i k dalším změnám, jako jsou změny těchto limitů, nebo jsou revidovány definice reziduí (přídavek metabolitů, specifikace izomerů atd.).

Vzhledem k výše popsaným skutečnostem bylo nutné i v laboratoři ONRL Brno provést rozsáhlou revizi stanovovaných látek a stávající seznam rozšířit o nové relevantní pesticidy včetně některých metabolitů. Dalším důvodem pro revalidaci byl nákup nového LC MS/MS systému s hmotnostním spektrometrem Sciex TQ 6500+, který by měl sloužit právě pro tyto reziduální analýzy. Cílem této práce bylo rozšířit a revalidovat zkoušku multireziduální metody stanovení reziduí pesticidů v rostlinném materiálu.

2 Materiál a metody

2.1 Chemikálie

Seznam chemikálií je uveden v JPP 10600.2 [6].

2.2 Standardy a referenční materiály

Standardy pesticidů v pevném nebo kapalném skupenství s deklarovanou čistotou:

2,4-D, acetamiprid, acetochlor, aclonifen, alachlor, amidosulfuron, aminopyralid, asulam, atrazine, atrazine-2-hydroxy, atrazine-desethyl, atrazine-desethyl-desisopropyl, atrazine-desisopropyl, azadirachtin A, azoxystrobin, benalaxyl, bentazone, benzovindiflupyr, bixafen, boscalid, bromoxynil, bromuconazole, carbendazim, carboxin, carfentrazone-ethyl, cinerin, clomazone, clopyralid, clothianidin, cyantraniliprole, cyazofamid, cycloxydim, cyflufenamid, cymoxanil, cyproconazole, cyprodinil, cyprosulfamide, desmedipham, difenoconazole, diflubenzuron, diflufenican, dichlorprop, dimethachlor, dimethenamid, dimethoate, dimethomorph, dimoxystrobin, diuron, dodine, epoxiconazole, ethofumesate, etofenprox, famoxadone, fenamidone, fenhexamid, fenoxaprop-P, fenoxaprop-P-ethyl, fenoxycarb, fenpropidin, fenpropimorph, fenpyroximate, flazasulfuron, florasulam, fluazifop-P, fluazifop-P-butyl, fluazinam, fludioxonil, flufenacet, fluopicolide, fluopyram, fluoxastrobin, flupyradifuron, fluquinconazole, flurochloridone, fluroxypyr, flusilazole, flutolanil, fluvalinate-tau, fluxapyroxad, foramsulfuron, forchlorfenuron, halauxifen-methyl, haloxyfop, haloxyfop-etotyl, haloxyfop-methyl, hexazinone, hexythiazox, chlorantraniliprole, chloridazon, chloridazon-desphenyl, chloridazon-methyl-desphenyl, chlorotoluron, chlorpropham, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, chlorsulfuron, imazalil, imazamox, imidacloprid, indoxacarb, iodosulfuron-methyl, iprodione, iprovalicarb, isofetamid, isoproturon, isoxaflutole, jasmolin, lenacil, linuron, malathion, mandestrobin, mandipropamid, MCPA, MCPB, mecoprop, mefenpyr-diethyl, mefentrifluconazole, meptyldinocap, mesosulfuron-methyl, mesotrione, metalaxyl-M, metamitron, metazachlor, metconazole, methomyl, methoxyfenozide, metobromuron, metolachlor, metrafenone, metribuzin, metsulfuron-methyl, myclobutanil, napropamide, nicosulfuron, omethoate, oxamyl, paclobutrazol, penconazole, pendimethalin, penoxsulam, pethoxamid, phenmedipham, picloram, picolinafen, picoxystrobin, pinoxaden, pirimicarb, pirimicarb-desmethyl, pirimiphos-methyl, prochloraz, prochloraz BTS40348, prochloraz BTS44595, prochloraz BTS44596, prometryn, propachlor, propamocarb, propaquizafop, propargit, propiconazole, propoxycarbazone, propyzamide, proquinazid, prosulfocarb, prothioconazole-desthio, pymetrozine, pyraclostrobin, pyraflufen-ethyl, pyrethrin, pyridaben, pyridate, pyrimethanil, pyriproxyfen, pyroxsulam, quinclorac, quinmerac, quinmerac BH518-4, quinoxyfen, quizalofop-P, quizalofop-P-ethyl, quizalofop-P-tefuryl, rimsulfuron, sedaxane, silthiofam, simazine, simazine-2-hydroxy, spinosad, spinosyn A, spinosyn D, spiroxamine, sulfosulfuron, sulfoxaflor, tebuconazole, tebufenozide, tebufenpyrad, tembotrione, terbuthylazine, terbuthylazine-2-hydroxy, terbuthylazine-desethyl, terbuthylazine-desethyl-2-hydroxy, terbutryn, tetraconazole, thiabendazole, thiacloprid, thiamethoxam, thiencarbazone-methyl, thifensulfuron-methyl, thiodicarb, thiophanate-methyl, THPI, triadimenol, tri-allate,

triasulfuron, tribenuron-methyl, triclopyr, trifloxystrobin, triflusulfuron-methyl, trinexapac, trinexapac-ethyl, triticonazole, tritosulfuron, zoxamide.

2.3 Laboratorní pomůcky a vybavení pro přípravu vzorku

Seznam je uveden v JPP 10600.2.

2.4 Postup přípravy

Extrakce a příprava vzorků byla provedena v souladu s postupem uvedeným v JPP 10600.2. Konkrétní volba navážky a dalších proměnných parametrů v postupu souvisela s povahou validované matrice. Pro rostlinný materiál byla zvolena navážka 5 g s objemem přídavku vody 7 ml. Extrakce byla pak provedena standardně podle JPP. Vymražení extraktu a použití disperzního SPE nebylo pro LC-MS/MS techniku vzhledem k vlastnostem materiálu nutné. Příprava extraktu k analýze: 0,1 ml extraktu se převedlo do 1,5ml centrifugační zkumavky, dále se přidalo 0,4 ml acetonitrilu, 0,49 ml vody a 10 µl 5% kyseliny mravenčí v acetonitrilu. Extrakty se dále krátce promíchaly a zfiltrovaly za použití nylonového filtračního disku do chromatografické vialky. Kvantifikace proběhla pomocí matriční kalibrace připravené do validované blankové matrice.

2.5 Přístrojové vybavení a podmínky pro koncové stanovení

Kapalinový chromatograf Agilent UHPLC 1290 Infinity II vybavený kolonou Zorbax Eclipse Plus RRHD C18, 1,8 µm, 100 mm × 2,1 mm a tandemový hmotnostní spektrometr Sciex TQ 6500+. Detaily nastavení LC části metody jsou uvedeny v Tabulce 1 a Tabulce 2 níže.

Tabulka 1. Podmínky UHPLC separace.

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

Tabulka 2. Gradient mobilní fáze.

Čas (min)	% mobilní fáze B
0	5
0,75	5
1,5	30
2,25	50
8,25	98
10,5	98
10,6	5
13	5

Ionizace byla provedena elektrosprejem při teplotě iontového zdroje 325 °C za použití střídavého módu s napětím na kapiláře 5500/-4500 V. Nastavené parametry plynů: CUR (N2) – 40 psi, CAD (N2) – medium, GS1 (vzduch) – 40 psi, GS2 (vzduch) – 50 psi. Analyty byly detekovány v módu sledování vybraných přechodů (MRM), které jsou uvedeny v Tabulkách 3 a 4. Ukázkové chromatogramy jsou pak na Obrázku 1 níže.

Tabulka 3. MRM přechody sledovaných analytů měřené v negativním módu ionizace.

Parametr	Rt (min)	MRM 1	MRM 2	MRM 3
2,4-D	5,45	219,0 > 161,0	221,0 > 163,0	
Bentazone	4,32	239,0 > 131,9	239,0 > 175,1	
Bromoxynil	4,68	273,8 > 78,9	275,8 > 80,9	
Dichlorprop	5,99	233,0 > 161,0	235,0 > 163,0	
Famoxadone	6,73	373,1 > 282,0	373,1 > 329,1	
Fenoxaprop-P	6,97	332,0 > 151,9	332,0 > 260,0	
Fluazinam	7,65	462,7 > 415,7	462,7 > 397,8	
Fludioxonil	5,57	247,0 > 180,0	247,0 > 126,0	
Fluroxypyr	4,04	255,0 > 197,0	253,0 > 195,0	253,0 > 233,0
MCPA	5,38	199,0 > 140,9	201,0 > 143,0	
MCPB	6,08	227,0 > 140,8	229,0 > 142,9	
Mecoprop	5,90	213,0 > 141,0	215,0 > 143,0	
Meptyldinocap	8,36	295,1 > 193,9	295,1 > 133,9	
Mesotrione	3,65	338,0 > 291,0	338,0 > 212,0	
Propoxycarbazone	4,60	397,0 > 113,0	397,0 > 156,0	
Triclopyr	5,80	253,9 > 195,7	255,8 > 197,8	
IS-Dichlorprop-D6	5,94	239,0 > 164,0		

Tabulka 4. MRM přechody sledovaných analytů měřené v pozitivním módu ionizace.

Parametr	Rt (min)	MRM 1	MRM 2	MRM 3
Acetamiprid	3,19	223,0 > 126,0	223,0 > 90,0	225,0 > 128,0
Acetochlor	6,18	270,1 > 224,2	270,1 > 148,2	
Aclonifen	6,48	265,1 > 182,1	265,1 > 248,0	
Alachlor	6,21	270,1 > 238,0	270,1 > 162,3	
Amidosulfuron	4,48	370,0 > 261,0	370,0 > 218,0	
Aminopyralid	1,70	207,0 > 160,9	207,0 > 133,9	209,0 > 162,9
Asulam	2,28	231,2 > 156,0	231,2 > 92,0	
Atrazine	4,81	216,0 > 174,1	216,0 > 104,0	
Atrazine-2-hydroxy	2,60	198,1 > 156,0	198,1 > 69,0	
Atrazine-desethyl	3,44	188,1 > 146,0	190,0 > 148,0	188,1 > 104,1
Atrazine-desethyl-desisopopyl	1,66	146,0 > 79,0	146,0 > 110,0	

Parametr	Rt (min)	MRM 1	MRM 2	MRM 3
Atrazine-desisopropyl	2,97	174,1 > 104,1	174,1 > 79,0	
Azadirachtin A	4,56	703,2 > 567,1	703,2 > 585,1	
Azoxystrobin	5,40	404,0 > 372,0	404,0 > 344,0	
Benalaxyl	6,72	326,2 > 148,1	326,2 > 91,0	
Benzovindiflupyr	6,63	398,0 > 342,0	398,0 > 378,0	
Bixafen	6,47	414,0 > 394,1	414,0 > 265,9	
Boscalid	5,65	343,0 > 307,0	343,0 > 271,0	
Bromuconazole I	5,94	378,0 > 159,1	378,0 > 161,0	
Bromuconazole II	6,47	378,0 > 159,1	378,0 > 161,0	
Carbendazim	2,69	192,0 > 160,0	192,0 > 132,0	
Carfentrazone-ethyl	6,54	412,1 > 366,0	412,1 > 346,0	
Chlorantraniliprole	5,21	484,0 > 452,9	484,0 > 286,0	
Chloridazon	3,26	222,0 > 104,0	222,0 > 91,9	
Chloridazon-desphenyl	1,25	146,0 > 66,1	148,0 > 118,9	146,0 > 116,9
Chloridazon-methyl-desphenyl	2,15	160,0 > 88,1	160,0 > 117,0	
Chlorotoluron	4,66	213,0 > 72,0	215,0 > 72,0	
Chlorpropham	5,80	214,0 > 172,0	214,0 > 154,0	
Chlorpyrifos	7,81	351,9 > 199,8	351,9 > 96,9	
Chlorpyrifos-methyl	7,06	321,9 > 124,9	323,9 > 124,8	321,9 > 289,8
Chlorsulfuron	4,42	358,1 > 140,9	358,1 > 167,0	
Clomazone	5,25	240,0 > 124,9	240,0 > 89,1	
Clopyralid	2,70	192,0 > 110,0	192,0 > 145,9	194,0 > 110,0
Clothianidin	3,06	250,0 > 169,0	252,0 > 169,0	250,0 > 132,0
Cyantraniliprole	4,48	475,2 > 286,0	475,2 > 444,0	
Cyazofamid	6,22	325,0 > 108,0	327,0 > 108,0	
Cycloxydim I	5,35	326,2 > 280,0	326,2 > 180,0	
Cycloxydim II	7,36	326,2 > 280,0	326,2 > 180,0	
Cyflufenamid	6,89	413,2 > 241,0	413,2 > 295,0	
Cymoxanil	3,38	199,1 > 128,0	199,1 > 111,1	199,1 > 83,0
Cyproconazole I+II	5,93	292,1 > 70,0	292,1 > 125,0	
Cyprodinil	6,34	226,0 > 93,0	226,0 > 108,1	
Cyprosulfamide	3,95	375,1 > 135,1	375,1 > 254,1	

Parametr	Rt (min)	MRM 1	MRM 2	MRM 3
Desmedipham	5,10	301,2 > 182,1	301,2 > 136,1	
Difenoconazole	7,06	406,0 > 251,1	406,0 > 337,0	
Diflubenzuron	6,32	311,0 > 158,0	311,0 > 140,9	
Diflufenican	7,18	395,0 > 266,0	395,0 > 246,0	
Dimethachlor	5,05	256,1 > 224,0	256,1 > 148,1	
Dimethenamid	5,60	276,1 > 244,0	276,1 > 168,1	
Dimethoate	3,20	230,0 > 199,0	230,0 > 125,0	
Dimethomorph I+II	5,65	388,1 > 301,1	388,1 > 165,1	
Dimoxystrobin	6,49	327,1 > 116,0	327,1 > 205,0	
Diuron	4,98	233,1 > 71,9	235,1 > 72,0	
Dodine	5,36	228,3 > 186,2	228,3 > 57,0	
Epoxiconazole	6,22	330,1 > 121,0	330,1 > 101,2	
Ethofumesate	5,43	287,1 > 259,0	287,1 > 121,0	
Etofenprox	8,79	394,0 > 107,1	394,0 > 177,1	394,1 > 135,1
Fenamidone	5,55	312,1 > 236,1	312,1 > 92,1	
Fenhexamid	6,11	302,0 > 97,1	304,0 > 97,0	302,0 > 55,0
Fenoxaprop-P-ethyl	7,42	362,1 > 288,0	364,1 > 290,1	
Fenoxycarb	6,39	302,2 > 116,0	302,2 > 87,9	
Fenpropidin	3,97	274,2 > 147,1	274,2 > 117,0	
Fenpropimorph	4,39	304,3 > 147,1	304,3 > 117,1	
Fenpyroximate	8,14	422,2 > 366,1	422,2 > 138,1	
Flazasulfuron	5,18	408,0 > 182,1	408,0 > 83,1	
Florasulam	3,55	360,1 > 129,0	360,1 > 109,0	
Fluazifop-P	5,98	328,0 > 282,0	328,0 > 254,0	
Fluazifop-P-butyl	7,49	384,1 > 282,1	384,1 > 328,1	
Flufenacet	6,15	364,0 > 194,0	364,0 > 152,0	
Fluopicolide	5,77	383,0 > 173,0	383,0 > 144,9	
Fluopyram	6,03	397,0 > 208,0	397,0 > 173,0	
Fluoxastrobin	6,05	459,0 > 427,0	459,0 > 188,0	
Flupyradifuron	3,18	289,0 > 126,1	291,0 > 128,0	289,0 > 90,0
Fluquinconazole	6,05	376,1 > 306,9	376,1 > 349,0	
Flurochloridone	5,92	312,0 > 292,0	314,0 > 294,0	

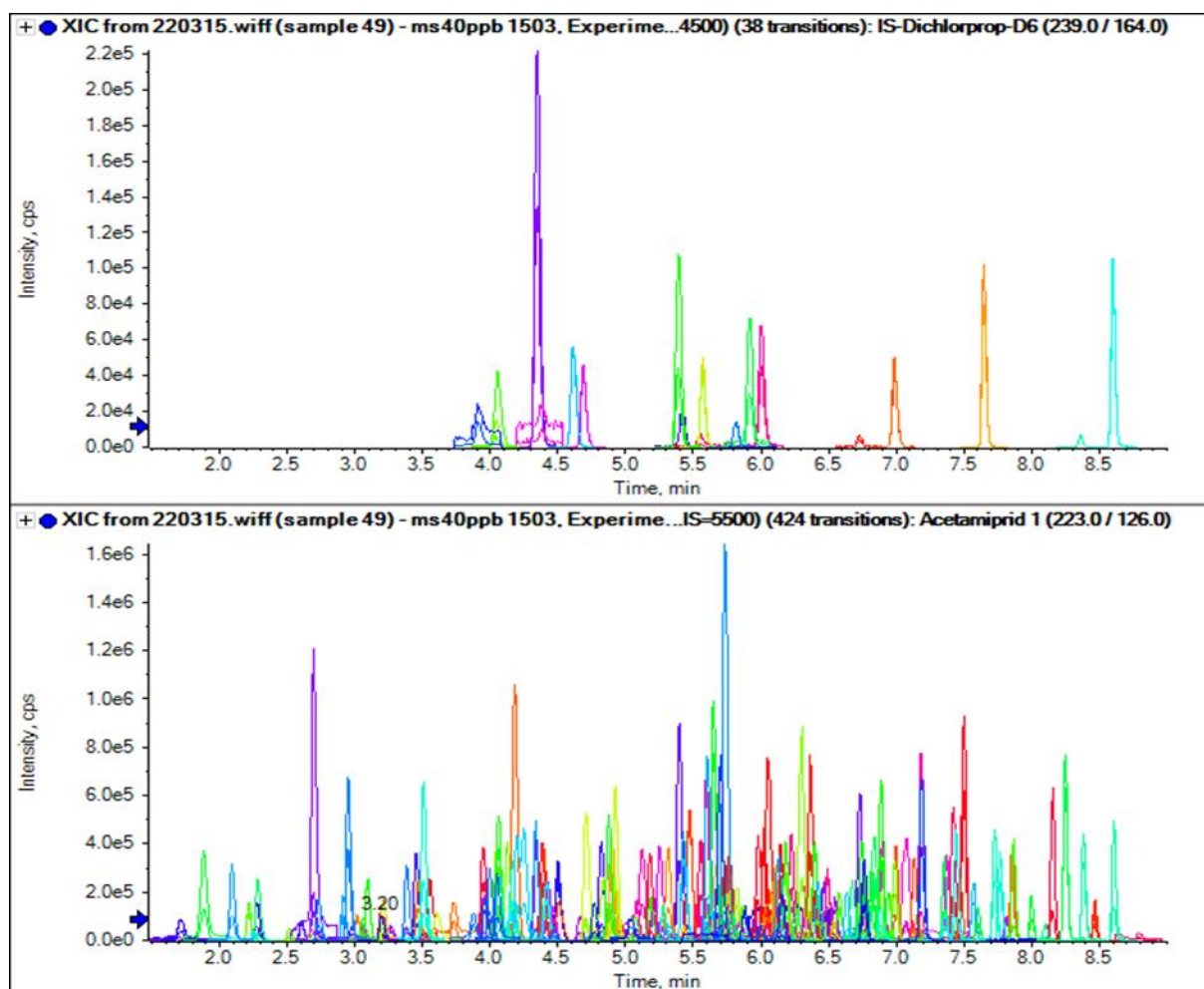
Parametr	Rt (min)	MRM 1	MRM 2	MRM 3
Flusilazole	6,37	316,0 > 247,0	316,0 > 165,0	
Flutolanil	5,74	324,1 > 242,0	324,1 > 262,0	
Fluvalinate-tau	8,47	503,0 > 208,1	503,0 > 181,1	505,0 > 208,1
Fluxapyroxad	5,77	382,1 > 362,1	382,1 > 342,1	
Foramsulfuron	4,40	453,0 > 182,2	453,0 > 272,0	
Forchlorfenuron	4,95	248,0 > 129,1	248,0 > 93,1	
Halauxifen-methyl	5,47	345,0 > 250,1	345,0 > 285,0	
Haloxyfop	6,99	362,0 > 315,9	362,0 > 287,9	
Haloxyfop-etotyl	7,47	434,0 > 315,9	434,0 > 91,0	
Haloxyfop-methyl	7,13	376,0 > 316,0	376,0 > 91,1	
Hexazinone	4,18	253,1 > 171,1	253,1 > 71,2	
Hexythiazox	7,85	353,1 > 228,2	353,1 > 168,2	
Imazalil	3,74	297,0 > 201,0	297,0 > 158,9	
Imazamox	3,46	306,0 > 261,0	306,0 > 193,0	
Imidacloprid	3,01	256,0 > 175,1	256,0 > 209,1	
Indoxacarb	7,15	528,0 > 249,0	528,0 > 203,0	
Iodosulfuron-methyl	5,31	508,0 > 167,0	508,0 > 141,1	
Iprodione	6,35	329,9 > 245,1	332,0 > 246,9	
Iprovalicarb	6,07	321,2 > 119,0	321,2 > 202,9	
Isofetamid	6,10	360,2 > 210,0	360,2 > 125,0	
Isoproturon	4,90	207,2 > 72,1	207,2 > 46,1	
Isoxaflutole	4,91	360,0 > 251,0	360,0 > 220,0	
Kresoxim-methyl	6,54	314,1 > 267,0	314,1 > 222,1	
Lenacil	4,89	235,1 > 153,1	235,1 > 135,9	
Linuron	5,44	249,0 > 160,0	249,0 > 182,0	
Malathion	5,75	330,9 > 127,1	330,9 > 284,9	
Mandestrobin	6,66	314,2 > 192,0	314,2 > 160,0	
Mandipropamid	5,67	412,2 > 328,1	412,2 > 356,1	
Mefentrifluconazole	6,74	398,1 > 70,3	398,1 > 182,0	
Mesosulfuron-methyl	4,70	504,1 > 182,0	504,1 > 139,0	
Metalaxyl-M	4,93	280,2 > 220,1	280,2 > 160,1	
Metamitron	3,21	203,1 > 104,0	203,1 > 175,0	203,1 > 77,1

Parametr	Rt (min)	MRM 1	MRM 2	MRM 3
Metazachlor	4,83	278,1 > 134,2	278,1 > 209,9	
Metconazole	6,87	320,0 > 70,1	320,0 > 125,1	
Methomyl	2,67	163,1 > 88,1	163,1 > 106,1	
Methoxyfenozide	5,82	369,2 > 149,1	369,2 > 313,0	
Metobromuron	4,70	259,0 > 170,0	259,0 > 148,1	
Metolachlor	6,30	284,0 > 252,0	284,0 > 176,2	
Metrafenone	6,99	409,1 > 226,9	409,1 > 209,1	
Metribuzin	4,16	215,2 > 84,1	215,2 > 187,1	
Metsulfuron-methyl	4,13	382,1 > 167,0	382,1 > 199,0	
Myclobutanil	5,87	289,2 > 69,9	289,2 > 125,1	
Napropamide	6,18	272,2 > 129,1	272,2 > 171,1	
Nicosulfuron	4,06	411,2 > 182,2	411,2 > 212,9	
Omethoate	2,21	214,0 > 183,0	214,0 > 125,0	
Oxamyl	2,52	237,1 > 72,1	237,1 > 90,1	
Paclobutrazol	5,73	294,1 > 70,1	294,1 > 125,1	
Penconazole	6,58	284,1 > 158,9	284,1 > 70,2	
Pendimethalin	7,86	282,1 > 212,0	282,1 > 194,0	
Penoxsulam	4,42	484,1 > 194,9	484,1 > 164,0	
Pethoxamid	6,19	296,2 > 131,0	296,2 > 250,0	
Phenmedipham	5,19	301,2 > 168,0	301,2 > 136,0	
Picloram	3,05	241,0 > 167,9	241,0 > 194,9	243,0 > 169,9
Picolinafen	7,56	377,0 > 238,0	377,0 > 145,0	377,0 > 359,0
Picoxystrobin	6,40	368,0 > 145,0	368,0 > 205,0	
Pinoxaden	6,93	401,3 > 317,1	401,3 > 57,1	
Pirimicarb	4,07	239,2 > 72,0	239,2 > 182,2	
Pirimicarb-desmethyl	3,10	225,0 > 72,0	225,0 > 168,0	
Pirimiphos-methyl	6,89	306,2 > 164,2	306,2 > 108,2	
Prochloraz	6,74	376,0 > 308,0	378,0 > 310,0	
Prochloraz BTS40348	3,40	282,0 > 86,1	282,0 > 44,1	
Prochloraz BTS44595	6,81	325,0 > 282,2	327,0 > 284,1	
Prochloraz BTS44596	6,75	353,0 > 308,0	355,0 > 310,0	
Prometryn	5,66	242,0 > 200,2	242,0 > 158,0	

Parametr	Rt (min)	MRM 1	MRM 2	MRM 3
Propachlor	4,88	212,1 > 170,0	212,1 > 94,0	
Propamocarb	1,89	189,2 > 144,1	189,2 > 102,1	
Propaquizafofop	7,59	444,0 > 100,2	444,0 > 371,0	
Propargit	8,00	368,2 > 231,1	368,2 > 175,0	368,1 > 57,1
Propiconazole	6,73	342,1 > 159,0	342,1 > 123,1	
Propyzamide	5,79	256,0 > 190,0	256,0 > 173,0	
Proquinazid	8,24	372,9 > 331,0	372,9 > 288,9	
Prosulfocarb	7,35	252,2 > 91,0	252,2 > 128,1	
Prothioconazole-desthio	6,27	312,0 > 70,1	312,0 > 125,0	
Pymetrozine	2,28	218,1 > 105,0	218,1 > 78,0	
Pyraclostrobin	6,83	388,1 > 194,0	388,1 > 163,0	
Pyraflufen-ethyl	6,67	413,0 > 338,9	413,0 > 289,0	
Cinerin I	8,07	317,2 > 149,1	317,2 > 107,0	
Cinerin II	7,14	361,2 > 149,1	361,2 > 107,1	
Jasmolin I	8,37	331,2 > 163,2	331,2 > 107,0	
Jasmolin II	7,54	375,2 > 163,1	375,2 > 107,1	375,2 > 77,1
Pyrethrin I	8,10	329,2 > 161,1	329,2 > 133,1	
Pyrethrin II	7,21	373,2 > 161,1	373,2 > 133,1	
Pyridaben	8,38	365,0 > 147,1	365,0 > 309,1	
Pyridate	8,60	379,0 > 207,0	379,0 > 351,1	
Pyrimethanil	5,28	200,0 > 107,0	200,0 > 82,0	
Pyriproxyfen	7,72	322,1 > 96,1	322,1 > 227,2	
Pyroxsulam	4,07	435,0 > 195,0	435,0 > 194,0	435,0 > 258,0
Quinclorac	4,18	242,0 > 161,1	244,0 > 163,1	244,0 > 161,1
Quinmerac	3,50	222,1 > 149,0	222,1 > 203,9	224,1 > 151,0
Quinmerac BH518-4	2,81	238,0 > 162,1	240,0 > 164,1	238,0 > 220,0
Quinoxifen	7,76	308,0 > 197,0	308,0 > 162,0	
Quizalofop-P	6,87	344,9 > 299,0	344,9 > 272,9	
Quizalofop-P-ethyl	7,44	373,0 > 299,0	373,0 > 271,0	
Quizalofop-P-tefuryl	7,37	429,1 > 298,9	429,1 > 85,0	
Rimsulfuron	4,41	432,1 > 181,9	432,1 > 324,9	
Sedaxane I+II	6,05	332,1 > 159,0	332,1 > 292,0	

Parametr	Rt (min)	MRM 1	MRM 2	MRM 3
Silthiofam	6,47	268,1 > 139,1	268,1 > 73,1	
Simazine	4,15	201,9 > 132,1	201,9 > 124,2	
Simazine-2-hydroxy	2,24	184,1 > 114,0	184,1 > 69,0	
Spinosyn A	5,63	732,3 > 142,2	732,3 > 98,2	
Spinosyn D	5,91	746,5 > 142,1	746,5 > 98,0	
Spiroxamine	4,25	298,0 > 144,0	298,0 > 100,0	
Sulfosulfuron	5,43	471,1 > 211,0	471,1 > 261,0	
Sulfoxaflor	3,30	278,0 > 174,2	278,0 > 154,0	
Tebuconazole	6,63	308,0 > 70,0	308,0 > 125,0	
Tebufenozide	6,42	353,2 > 133,1	353,2 > 297,1	
Tebufenpyrad	7,57	334,1 > 145,0	334,1 > 147,1	
Tembotrione	5,35	441,0 > 340,8	441,0 > 262,1	
Terbuthylazine	5,61	230,1 > 174,0	232,1 > 176,0	
Terbuthylazine-2-hydroxy	2,90	212,0 > 156,0	212,0 > 86,0	
Terbuthylazine-desethyl	4,33	202,2 > 146,0	204,1 > 148,0	202,2 > 104,0
Terbuthylazine-desethyl-2-hydroxy	2,08	184,1 > 128,0	184,1 > 86,0	
Terbutryn	5,73	242,1 > 186,1	242,1 > 91,1	
Tetraconazole	6,13	372,0 > 159,0	372,0 > 123,0	
TFNA	2,63	192,1 > 148,0	192,1 > 98,0	
TFNG	2,63	249,1 > 203,0	249,1 > 148,0	
Thiabendazole	2,95	202,0 > 175,0	202,0 > 131,0	
Thiacloprid	3,39	253,0 > 126,0	253,0 > 90,0	
Thiamethoxam	2,73	292,0 > 211,2	294,0 > 211,2	292,0 > 181,2
Thiencarbazone-methyl	3,87	391,2 > 230,0	391,2 > 219,0	
Thifensulfuron-methyl	4,00	387,9 > 167,1	387,9 > 141,1	
Thiodicarb	4,47	355,0 > 88,0	355,0 > 107,9	
Thiophanate-methyl	4,06	343,0 > 151,1	343,0 > 311,0	
THPI	2,77	152,0 > 81,0	152,0 > 79,0	
Triadimenol	6,02	296,0 > 70,1	298,0 > 70,1	
Tri-allate	7,88	304,1 > 142,9	306,1 > 145,0	
Triasulfuron	3,97	402,1 > 141,0	402,1 > 167,0	
Tribenuron-methyl	4,77	396,0 > 155,2	396,0 > 181,1	

Parametr	Rt (min)	MRM 1	MRM 2	MRM 3
Trifloxystrobin	7,19	409,2 > 186,0	409,2 > 145,1	
Triflusulfuron-methyl	5,70	493,2 > 263,9	493,2 > 95,9	
Trinexapac	3,91	225,0 > 69,0	225,0 > 111,0	
Trinexapac-ethyl	5,05	253,0 > 207,1	253,0 > 69,0	
Triticonazole	6,15	317,9 > 70,1	319,9 > 70,1	
Tritosulfuron	5,86	445,9 > 195,0	445,9 > 221,0	
Zoxamide	6,77	336,0 > 186,9	336,0 > 159,0	
IS-Carbendazim-D3	2,70	195,0 > 160,1		
IS-Diazinon-D10	6,71	315,2 > 170,0		
IS-Metalaxyl-phenyl-13C6	4,91	286,1 > 226,2		
IS-Pendimethalin-D5	7,85	287,1 > 213,0	287,1 > 194,0	
IS-Propamocarb-(propyl-D7)	1,90	196,2 > 103,2		
IS-Tebuconazole-D6	6,63	314,0 > 72,0		
IS-Terbuthylazine-D5	5,59	235,0 > 179,0		
IS-Thiacloprid-D4	3,37	257,0 > 126,1		



Obrázek 1. Extrahované iontové chromatogramy všech analyzovaných látek v negativním (ESI-) a pozitivním (ESI+) módu ionizace, matriční standard (oves), 0,040 mg/kg.

3 Výsledky

Před samotnou validací bylo nezbytné uskutečnit několik kroků. V první řadě byla optimalizována LC-MS/MS měřicí metoda. MRM přechody byly převzaty z původní metody, dále byly pro nové látky převzaty z literatury, případně byly zjištěny experimentálně přímou infuzí na MS. V dalším kroku byly připravené MRM ověřeny a optimalizovány pro získání co nejlepších odezev pro námi používanou aplikaci a instrumentaci. Následovalo testování metody na reálných vzorcích rostlinného materiálu, kdy byla ověřována citlivost metody a selektivita zvolených MRM přechodů. U některých látek bylo nutné dodatečně optimalizovat nastavení parametrů MS pro získání vyšší selektivity a co nejnižších limitů detekce. V dalším kroku byla vyhledána vhodná blanková rostlinná matrice pro samotnou validaci.

Jako nejvhodnější reprezentativní rostlinný materiál, který neobsahuje žádné stanovované analyty, byl zvolen oves.

3.1 Validace metody

Metoda byla validována pomocí vícenásobné analýzy vzorků obohacených o příslušné nativní standardy na níže popsaných hladinách. V rámci validace byly ověřeny parametry uvedené v Tabulce 5, přičemž kritéria přijatelnosti byla adaptována na základě dokumentu SANTE/11312/2021 [7].

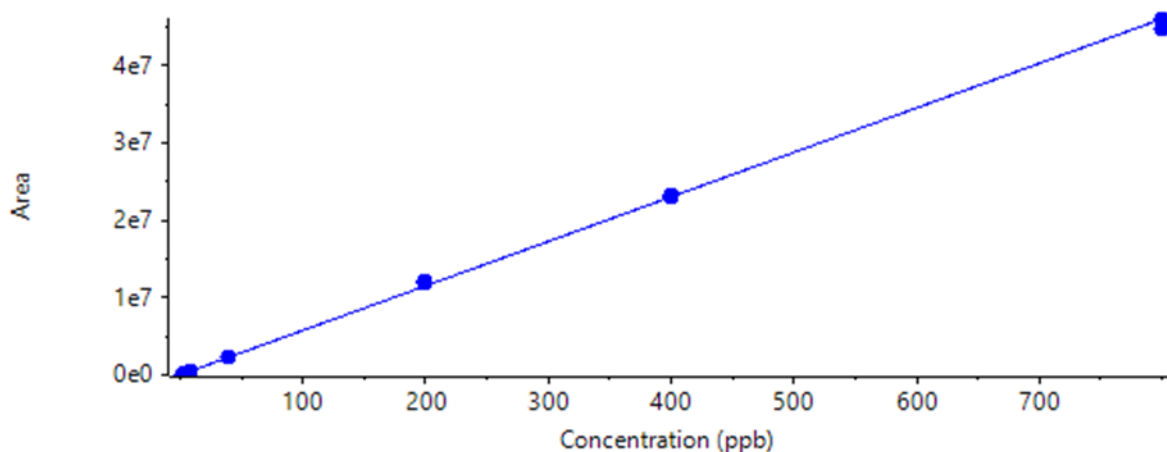
Tabulka 5. Validované parametry a min. akceptovatelné výkonnostní parametry metody.

Parametr	Způsob	Kritérium
Linearita	Ověření hodnoty korelačního koeficientu a odchylek kalibračních bodů	$r \geq 0,99$ odchylky $\leq \pm 20 \%$
Mez stanovitelnosti	Nejnižší obohacená hladina splňující podmínky identifikace, správnosti a přesnosti	$\leq \text{MRL}$
Správnost	Průměrná výtěžnost každé obohacené hladiny	(70 – 120) % (30 – 140) %
Přesnost	Opakovatelnost pro každou obohacenou hladinu	$\leq 20 \%$
Nejistota	Rozšířená nejistota, $k = 2$	50 %

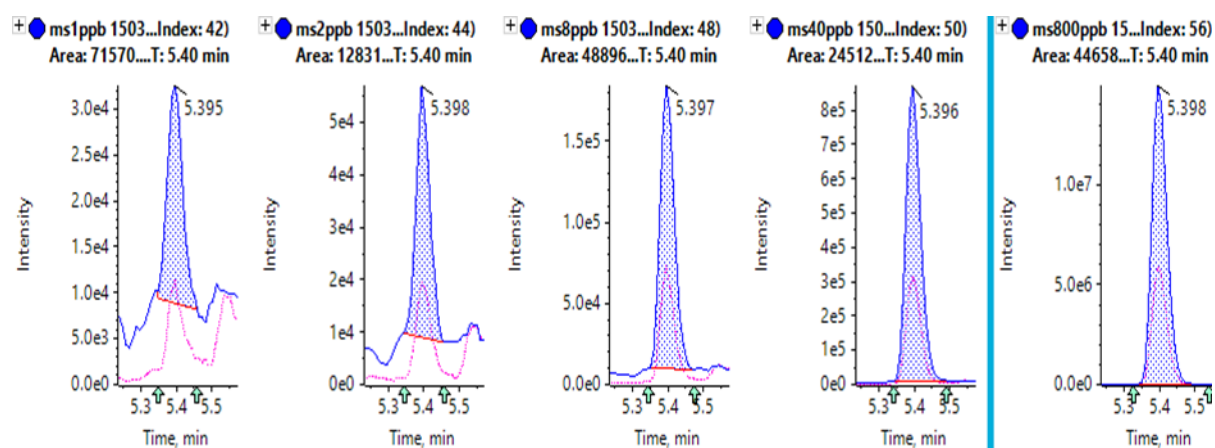
3.1.1 Linearita kalibrace

Linearita byla hodnocena v kalibračním rozsahu od 0,001 mg/kg do 0,800 mg/kg. K hodnocení korelačního koeficientu byl využit příslušný vyhodnocovací software (SciexOS) a jeho minimální přijatelná hodnota byla 0,99. Současně byla linearita hodnocena pomocí výpočtu odchylky zpětně vypočtené koncentrace od skutečné koncentrace na jednotlivých kalibračních bodech, a to v rozsahu od meze stanovitelnosti do 0,800 mg/kg. Maximální akceptovatelná odchylka musela být $\leq \pm 20 \%$. Pro všechny látky byla linearita prokázána minimálně v rozsahu od jejich meze stanovitelnosti (RL-LVL) do 0,800 mg/kg. Ukázková kalibrace pro azoxystrobin je na Obrázku 2, chromatogramy kalibračních bodů jsou pak na Obrázku 3.

Calibration for Azoxystrobin 1: $y = 5.75550e4 x + 19044.76384$ ($r = 0.99966$, $r^2 = 0.99932$) (weighting: $1 / x$)



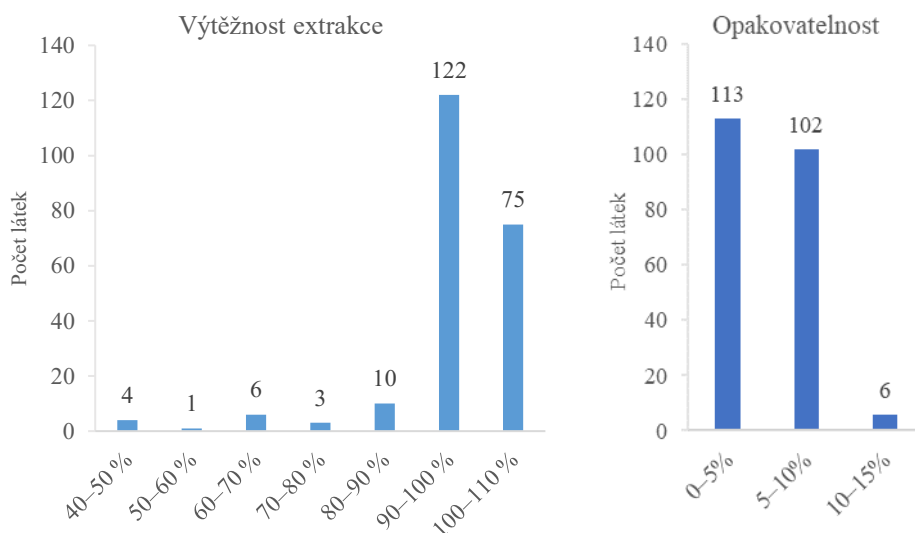
Obrázek 2. Kalibrační závislost pro azoxystrobin v rozsahu 0,001 mg/kg až 0,800 mg/kg.



Obrázek 3. Ukázkové chromatogramy vybraných kalibračních bodů azoxystrobinu v rozsahu od 0,001 mg/kg do 0,800 mg/kg.

3.1.2 Stanovení správnosti a přesnosti

Tyto parametry byly stanoveny opakovanou analýzou obohacených vzorků rostlinného materiálu na hladinách (0,002; 0,004; 0,008; 0,020; 0,040; 0,200) mg/kg. U pesticidních látek byla hodnocena validační kritéria pro správnost a přesnost podle SANTE/11312/2021, tj. výtěžnost v rozmezí (70 – 120) %, případně (30 – 140) %, a opakovatelnost ≤ 20 % na každé hladině.



Obrázek 4. Přehled zastoupení látek v dosažených mezích výtěžností a opakovatelností.

Ze souhrnu výtěžností a opakovatelností vyplývá (viz Obrázek 4), že všech 221 pesticidů splnilo na vybraných hladinách obě kritéria. Pouze u 14 pesticidů bylo dosaženo nižších, avšak stále akceptovatelných výtěžností, a to v rozmezí (40,1 – 75,9) %, tudíž u nich bude nutné provádět korekci na výtěžnost. Přehled dosažených výsledků pro jednotlivé analyty je uveden v Tabulce 6.

Tabulka 6. Souhrn validačních výsledků pro jednotlivé pesticidy.

Analyt	RL-LVL (mg/kg)	RL-LIMS (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Korekce na výtěžnost	Opakov. (%)	Rozšířená nejistota (%)	Počet hladin
2,4-D	0,004	0,008	99,3	ne	5,5	11,0	4
Acetamidrid	0,002	0,004	95,9	ne	3,4	6,8	5
Acetochlor	0,008	0,008	98,0	ne	6,7	13,4	3
Aclonifen	0,002	0,004	94,6	ne	8,2	16,4	5
Alachlor	0,008	0,008	105,5	ne	6,5	13,0	3
Amidosulfuron	0,002	0,002	90,8	ne	3,5	6,9	5
Aminopyralid	0,008	0,008	45,6	ano	8,3	16,5	3
Asulam	0,002	0,004	96,7	ne	3,1	6,3	5
Atrazine	0,002	0,002	96,7	ne	3,3	6,6	5
Atrazine-2-hydroxy	0,002	0,004	85,2	ne	4,0	8,1	5
Atrazine-desethyl	0,002	0,004	95,0	ne	5,7	11,4	5

Analyt	RL-LVL (mg/kg)	RL-LIMS (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Korekce na výtěžnost	Opakov. (%)	Rozšířená nejistota (%)	Počet hladin
Atrazine-desethyl-desisopopyl	0,008	0,008	91,5	ne	4,3	8,6	3
Atrazine-desisopopyl	0,002	0,004	92,8	ne	8,5	17,0	5
Azadirachtin A	0,008	0,008	103,7	ne	6,1	12,2	2
Azoxystrobin	0,002	0,002	103,3	ne	2,9	5,9	5
Benalaxyl	0,002	0,002	100,1	ne	5,2	10,4	5
Bentazone	0,002	0,002	94,4	ne	2,9	5,8	5
Benzovindiflupyr	0,008	0,008	98,6	ne	5,1	10,2	2
Bixafen	0,002	0,004	102,6	ne	5,7	11,3	5
Boscalid	0,004	0,004	95,2	ne	4,4	8,8	4
Bromoxynil	0,002	0,002	96,6	ne	5,6	11,2	5
Bromuconazole	0,002	0,004	98,5	ne	9,6	19,1	5
Carbendazim	0,004	0,004	95,5	ne	5,1	10,3	4
Carboxin	0,004	0,004	92,8	ne	4,2	8,4	4
Carfentrazone-ethyl	0,004	0,004	101,9	ne	6,4	12,9	4
Cinerin	0,011	0,011	107,5	ne	5,7	11,3	2
Clomazone	0,002	0,002	93,1	ne	3,8	7,6	5
Clopyralid	0,004	0,008	56,1	ano	10,6	21,2	4
Clothianidin	0,004	0,008	92,7	ne	7,2	14,5	4
Cyantraniliprole	0,002	0,002	99,5	ne	4,9	9,8	5
Cyazofamid	0,002	0,004	104,1	ne	6,3	12,5	5
Cycloxydim	0,004	0,008	95,0	ne	5,8	11,6	4
Cyflufenamid	0,002	0,002	103,6	ne	4,5	9,0	5
Cymoxanil	0,002	0,008	96,8	ne	6,5	13,0	5
Cyproconazole	0,004	0,008	99,0	ne	5,8	11,5	4
Cyprodinil	0,002	0,002	96,8	ne	5,4	10,7	5
Cyprosulfamide	0,002	0,004	96,0	ne	3,5	7,0	5
Desmedipham	0,002	0,002	96,7	ne	4,9	9,9	5
Difenoconazole	0,002	0,002	100,7	ne	3,0	5,9	5
Diflubenzuron	0,002	0,004	97,2	ne	8,0	16,0	5
Diflufenican	0,002	0,002	100,7	ne	3,1	6,1	5
Dichlorprop	0,002	0,004	96,6	ne	7,9	15,9	5

Analyt	RL-LVL (mg/kg)	RL-LIMS (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Korekce na výtěžnost	Opakov. (%)	Rozšířená nejistota (%)	Počet hladin
Dimethachlor	0,004	0,004	101,9	ne	5,0	9,9	4
Dimethenamid	0,002	0,002	99,2	ne	7,4	14,8	5
Dimethoate	0,002	0,002	98,8	ne	4,8	9,6	5
Dimethomorph	0,002	0,002	100,6	ne	7,8	15,7	5
Dimoxystrobin	0,002	0,002	100,6	ne	4,5	8,9	5
Diuron	0,002	0,004	94,9	ne	4,2	8,3	5
Dodine	0,040	0,040	75,8	ano	6,4	12,7	2
Epoxiconazole	0,002	0,002	96,9	ne	3,8	7,6	5
Ethofumesate	0,020	0,020	97,8	ne	7,3	14,6	3
Etofenprox	0,040	0,040	48,7	ano	6,2	12,3	2
Famoxadone	0,020	0,020	101,8	ne	8,4	16,8	3
Fenamidone	0,002	0,004	103,9	ne	4,2	8,4	5
Fenhexamid	0,002	0,004	95,5	ne	8,5	16,9	5
Fenoxaprop-P	0,002	0,002	97,4	ne	4,5	9,0	5
Fenoxaprop-P-ethyl	0,002	0,002	101,7	ne	4,2	8,5	5
Fenoxycarb	0,002	0,002	98,8	ne	8,1	16,2	5
Fenpropidin	0,002	0,002	93,3	ne	3,5	6,9	5
Fenpropimorph	0,002	0,002	90,8	ne	2,9	5,9	5
Fenpyroximate	0,002	0,002	99,8	ne	2,9	5,9	5
Flazasulfuron	0,002	0,002	98,2	ne	3,9	7,9	5
Florasulam	0,002	0,004	98,6	ne	2,5	5,0	5
Fluazifop-P	0,002	0,002	102,6	ne	4,9	9,8	5
Fluazifop-P-butyl	0,002	0,002	98,7	ne	3,2	6,3	5
Fluazinam	0,002	0,002	103,3	ne	3,1	6,2	5
Fludioxonil	0,002	0,004	97,7	ne	5,4	10,8	4
Flufenacet	0,002	0,002	98,9	ne	5,1	10,3	5
Fluopicolide	0,002	0,004	102,0	ne	5,1	10,1	4
Fluopyram	0,002	0,002	101,0	ne	4,8	9,5	5
Fluoxastrobin	0,002	0,004	100,6	ne	6,6	13,2	5
Flupyradifuron	0,002	0,002	99,2	ne	4,6	9,2	5
Fluquinconazole	0,002	0,004	102,5	ne	6,6	13,1	4

Analyt	RL-LVL (mg/kg)	RL-LIMS (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Korekce na výtěžnost	Opakov. (%)	Rozšířená nejistota (%)	Počet hladin
Flurochloridone	0,008	0,008	100,0	ne	11,4	22,8	3
Fluroxypyr	0,008	0,008	92,0	ne	7,7	15,3	3
Flusilazole	0,002	0,002	100,0	ne	4,0	7,9	5
Flutolanil	0,002	0,004	102,3	ne	6,2	12,4	5
Fluvalinate-tau	0,002	0,002	74,8	ano	5,0	10,0	5
Fluxapyroxad	0,002	0,004	102,5	ne	5,6	11,1	5
Foramsulfuron	0,002	0,002	98,0	ne	6,7	13,3	5
Forchlorfenuron	0,008	0,008	91,9	ne	4,0	8,1	2
Halauxifen-methyl	0,002	0,002	102,0	ne	5,5	11,1	5
Haloxyfop	0,002	0,002	102,3	ne	4,0	8,0	5
Haloxyfop-etotyl	0,002	0,004	101,9	ne	4,0	7,9	5
Haloxyfop-methyl	0,002	0,004	98,4	ne	5,9	11,7	5
Hexazinone	0,002	0,002	98,8	ne	3,1	6,2	5
Hexythiazox	0,002	0,002	94,6	ne	3,7	7,3	5
Chlorantraniliprole	0,002	0,004	94,2	ne	6,4	12,8	4
Chloridazon	0,002	0,004	91,0	ne	8,2	16,4	5
Chloridazon-desphenyl	0,020	0,020	60,1	ano	3,6	7,2	3
Chloridazon-methyl-desphenyl	0,008	0,008	75,9	ano	11,1	22,1	2
Chlorotoluron	0,002	0,004	96,9	ne	3,2	6,5	5
Chlorpropham	0,008	0,020	101,5	ne	10,0	20,0	3
Chlorpyrifos	0,002	0,004	92,2	ne	5,2	10,4	4
Chlorpyrifos-methyl	0,002	0,004	98,0	ne	3,9	7,8	4
Chlorsulfuron	0,002	0,002	97,9	ne	4,0	7,9	5
Imazalil	0,002	0,004	97,7	ne	4,5	9,0	5
Imazamox	0,002	0,002	94,0	ne	3,6	7,1	5
Imidacloprid	0,002	0,002	95,5	ne	7,2	14,4	5
Indoxacarb	0,002	0,002	98,7	ne	5,8	11,6	5
Iodosulfuron-methyl	0,002	0,002	96,9	ne	2,8	5,7	5
Iprodione	0,004	0,004	101,0	ne	7,1	14,1	4
Iprovalicarb	0,002	0,002	100,1	ne	5,1	10,2	5
Isofetamid	0,002	0,002	99,9	ne	6,4	12,8	5

Analyt	RL-LVL (mg/kg)	RL-LIMS (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Korekce na výtěžnost	Opakov. (%)	Rozšířená nejistota (%)	Počet hladin
Isoproturon	0,002	0,002	94,9	ne	5,1	10,2	5
Isoxaflutole	0,002	0,004	97,9	ne	3,3	6,6	5
Jasmolin	0,004	0,004	100,8	ne	5,5	10,9	2
Kresoxim-methyl	0,002	0,008	104,1	ne	9,4	18,8	4
Lenacil	0,002	0,004	93,3	ne	3,9	7,7	5
Linuron	0,004	0,004	100,2	ne	4,7	9,3	4
Malathion	0,002	0,002	100,4	ne	8,1	16,2	5
Mandestrobin	0,008	0,008	100,9	ne	3,6	7,2	2
Mandipropamid	0,002	0,004	100,7	ne	5,1	10,2	5
MCPA	0,002	0,002	98,9	ne	2,7	5,4	5
MCPB	0,016	0,016	101,9	ne	8,7	17,5	2
Mecoprop	0,004	0,008	97,0	ne	3,7	7,4	4
Mefentrifluconazole	0,002	0,008	101,8	ne	7,9	15,8	5
Meptyldinocap	0,004	0,008	98,7	ne	8,4	16,8	4
Mesosulfuron-methyl	0,002	0,002	100,4	ne	3,0	5,9	5
Mesotrione	0,002	0,004	99,7	ne	4,2	8,5	5
Metalaxyl-M	0,002	0,002	99,3	ne	3,4	6,8	5
Metamitron	0,002	0,004	91,6	ne	9,4	18,7	5
Metazachlor	0,002	0,002	95,5	ne	4,0	8,0	5
Metconazole	0,002	0,004	98,4	ne	3,7	7,5	5
Methomyl	0,002	0,004	103,9	ne	10,7	21,3	5
Methoxyfenozide	0,002	0,004	99,3	ne	4,6	9,2	5
Metobromuron	0,002	0,002	99,7	ne	5,1	10,2	5
Metolachlor	0,002	0,002	98,5	ne	4,1	8,2	5
Metrafenone	0,002	0,004	101,6	ne	5,9	11,8	5
Metribuzin	0,002	0,008	100,3	ne	9,7	19,4	5
Metsulfuron-methyl	0,002	0,002	101,6	ne	3,7	7,5	5
Myclobutanil	0,002	0,008	100,7	ne	6,3	12,5	5
Napropamide	0,002	0,002	101,4	ne	5,6	11,2	5
Nicosulfuron	0,002	0,002	81,1	ne	4,9	9,7	5
Omethoate	0,002	0,002	90,2	ne	4,6	9,2	5

Analyt	RL-LVL (mg/kg)	RL-LIMS (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Korekce na výtěžnost	Opakov. (%)	Rozšířená nejistota (%)	Počet hladin
Oxamyl	0,002	0,004	101,1	ne	5,8	11,5	5
Paclobutrazol	0,002	0,008	95,8	ne	8,7	17,5	5
Penconazole	0,002	0,002	98,6	ne	5,6	11,2	5
Pendimethalin	0,002	0,004	95,5	ne	3,5	6,9	5
Penoxsulam	0,008	0,008	100,4	ne	2,8	5,7	2
Pethoxamid	0,002	0,002	97,7	ne	4,4	8,7	5
Phenmedipham	0,002	0,002	96,6	ne	4,5	9,0	5
Picloram	0,004	0,008	60,2	ano	8,8	17,6	4
Picolinafen	0,008	0,008	93,0	ne	3,3	6,6	2
Picoxystrobin	0,002	0,002	102,2	ne	3,8	7,6	5
Pinoxaden	0,002	0,004	100,9	ne	6,2	12,3	5
Pirimicarb	0,002	0,002	94,3	ne	3,5	6,9	5
Pirimicarb-desmethyl	0,002	0,002	91,0	ne	4,1	8,1	5
Pirimiphos-methyl	0,002	0,002	101,8	ne	2,8	5,7	5
Prochloraz	0,002	0,002	101,2	ne	5,2	10,3	5
Prochloraz BTS40348	0,008	0,008	101,7	ne	5,6	11,2	2
Prochloraz BTS44595	0,002	0,002	97,0	ne	7,7	15,5	5
Prochloraz BTS44596	0,002	0,004	101,8	ne	5,8	11,7	4
Prometryn	0,002	0,002	99,1	ne	2,9	5,9	5
Propachlor	0,002	0,002	96,1	ne	3,6	7,1	5
Propamocarb	0,002	0,004	89,4	ne	3,3	6,6	5
Propaquizafop	0,002	0,002	98,3	ne	4,0	8,1	5
Propargite	0,002	0,004	98,5	ne	4,9	9,8	5
Propiconazole	0,002	0,004	95,6	ne	7,3	14,6	5
Propoxycarbazone	0,002	0,002	96,8	ne	3,7	7,4	5
Propyzamide	0,002	0,004	97,0	ne	10,5	21,1	5
Proquinazid	0,002	0,002	83,9	ne	3,9	7,8	5
Prosulfocarb	0,002	0,002	96,8	ne	2,3	4,6	5
Prothioconazole-desthio	0,002	0,004	101,1	ne	9,0	18,0	5
Pymetrozine	0,002	0,002	40,1	ano	6,9	13,8	5
Pyraclostrobin	0,002	0,002	100,6	ne	4,5	9,1	5

Analyt	RL-LVL (mg/kg)	RL-LIMS (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Korekce na výtěžnost	Opakov. (%)	Rozšířená nejistota (%)	Počet hladin
Pyraflufen-ethyl	0,002	0,004	101,2	ne	6,2	12,3	5
Pyrethrin	0,001	0,009	98,0	ne	2,6	5,2	3
Pyridaben	0,002	0,002	93,0	ne	3,3	6,6	5
Pyridate	0,002	0,002	88,9	ne	2,7	5,4	5
Pyrimethanil	0,002	0,002	94,9	ne	5,1	10,1	5
Pyriproxifen	0,002	0,002	96,9	ne	2,4	4,8	5
Pyroxsulam	0,002	0,002	92,7	ne	6,2	12,4	5
Quinclorac	0,002	0,002	84,2	ne	6,4	12,8	5
Quinmerac	0,002	0,002	85,7	ne	3,0	6,1	5
Quinmerac BH518-4	0,008	0,008	49,5	ano	6,5	13,1	2
Quinoxifen	0,002	0,002	92,3	ne	3,1	6,3	5
Quizalofop-P	0,002	0,004	96,6	ne	8,4	16,8	5
Quizalofop-P-ethyl	0,002	0,004	99,5	ne	3,6	7,1	5
Quizalofop-P-tefuryl	0,002	0,004	102,5	ne	6,3	12,6	5
Rimsulfuron	0,002	0,002	106,4	ne	5,0	10,0	5
Sedaxane	0,008	0,008	98,3	ne	2,5	5,0	2
Silthiofam	0,008	0,008	99,0	ne	6,9	13,8	2
Simazine	0,002	0,004	97,0	ne	7,4	14,8	5
Simazine-2-hydroxy	0,004	0,008	66,5	ano	4,1	8,2	3
Spinosad	0,010	0,010	102,2	ne	4,3	8,6	4
Spinosyn A	0,002	0,004	101,4	ne	5,2	10,4	4
Spinosyn D	0,001	0,006	101,0	ne	5,1	10,2	2
Spiroxamine	0,002	0,002	96,1	ne	3,2	6,5	5
Sulfosulfuron	0,002	0,002	102,6	ne	3,3	6,6	5
Sulfoxaflor	0,008	0,008	96,3	ne	6,9	13,9	2
Tebuconazole	0,002	0,004	98,2	ne	3,6	7,3	5
Tebufenozide	0,002	0,002	101,1	ne	2,8	5,6	5
Tebufenpyrad	0,002	0,002	98,8	ne	3,4	6,8	5
Tembotrione	0,002	0,004	95,9	ne	10,3	20,5	5
Terbuthylazine	0,002	0,002	100,7	ne	4,7	9,4	5
Terbuthylazine-2-hydroxy	0,002	0,004	92,2	ne	3,4	6,7	5

Analyt	RL-LVL (mg/kg)	RL-LIMS (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Korekce na výtěžnost	Opakov. (%)	Rozšířená nejistota (%)	Počet hladin
Terbutylazine-desethyl	0,002	0,002	98,4	ne	4,8	9,7	5
Terbutylazine-desethyl-2-hydroxy	0,002	0,004	66,3	ano	4,1	8,2	4
Terbutryn	0,002	0,004	100,1	ne	3,4	6,7	5
Tetraconazole	0,002	0,002	102,8	ne	5,3	10,7	5
Thiabendazole	0,002	0,002	88,5	ne	2,5	4,9	5
Thiacloprid	0,002	0,002	94,4	ne	3,2	6,3	5
Thiamethoxam	0,002	0,002	96,0	ne	4,6	9,2	5
Thiencarbazone-methyl	0,002	0,004	94,3	ne	7,3	14,5	5
Thifensulfuron-methyl	0,002	0,004	63,6	ano	7,4	14,8	5
Thiodicarb	0,004	0,004	95,1	ne	6,4	12,8	4
Thiophanate-methyl	0,004	0,008	68,1	ano	4,8	9,7	3
THPI	0,008	0,040	100,6	ne	9,9	19,9	3
Triadimenol	0,004	0,004	103,4	ne	7,7	15,3	4
Tri-allate	0,008	0,008	84,2	ne	3,5	7,0	2
Triasulfuron	0,002	0,002	89,9	ne	5,3	10,7	5
Tribenuron-methyl	0,002	0,008	105,1	ne	6,1	12,1	3
Triclopyr	0,004	0,008	98,6	ne	6,2	12,4	4
Trifloxystrobin	0,002	0,002	102,5	ne	1,9	3,8	5
Triflusulfuron-methyl	0,002	0,002	101,1	ne	4,1	8,2	5
Trinexapac	0,008	0,020	92,7	ne	3,3	6,6	3
Trinexapac-ethyl	0,004	0,008	97,8	ne	9,1	18,1	4
Triticonazole	0,002	0,004	97,2	ne	5,6	11,2	5
Tritosulfuron	0,004	0,004	97,8	ne	8,1	16,1	4
Zoxamide	0,002	0,002	101,4	ne	4,7	9,4	5

Správnost stanovení byla u několika pesticidů testována i za pomoci analýzy certifikovaného referenčního materiálu CRM AN-BM03 (zelený čaj). U všech 15 pesticidů byla kritéria přijatelnosti splněna. Hodnoty výtěžností se pohybovaly v rozmezí od 81,1 % do 115,9 %. Souhrn výsledků je uveden v Tabulce 7.

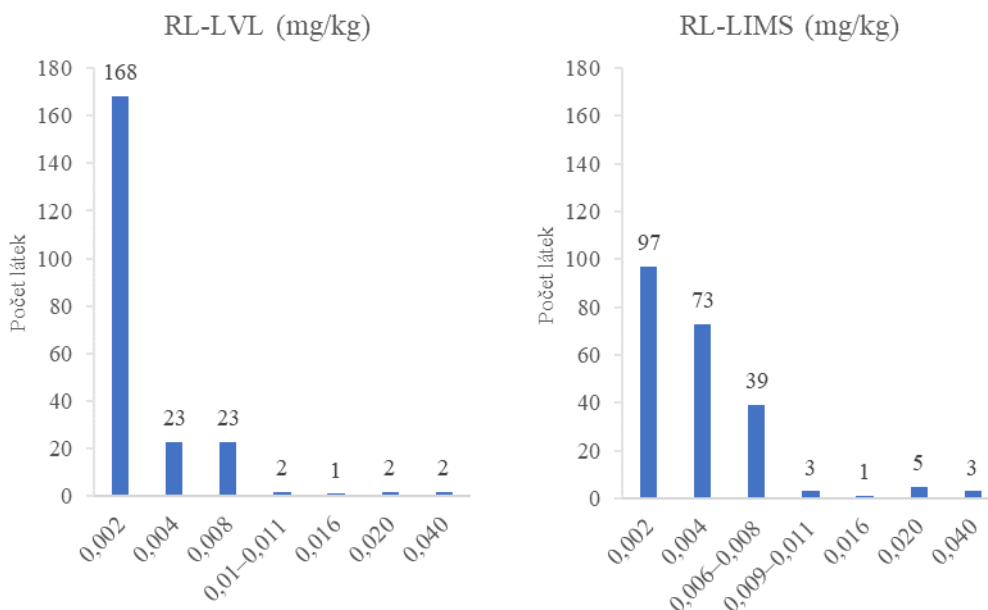
Tabulka 7. Vyhodnocení správnosti metody pomocí analýzy CRM AN-BM03.

Analyt	Referenční hodnota (µg/kg)	Nejistota ref. materiálu (µg/kg)	Naměřeno (µg/kg)	Nejistota stanovení (µg/kg)	Výtěžnost (%)	Kritéria přijatelnosti
Acetamidiprid	90,0	9,1	99,0	0,02	110,0	Splněno
Carbendazim	50,5	6,8	54,8	0,07	108,5	Splněno
Chlorpyrifos	243,0	49	244,6	0,06	100,7	Splněno
Clothianidin	192,0	23	198,0	0,05	103,1	Splněno
Difenoconazole	178,0	23	163,1	0,08	91,7	Splněno
Imidacloprid	35,0	5,5	35,9	0,08	102,6	Splněno
Indoxacarb	268,0	18	255,9	0,06	95,5	Splněno
Metalaxyl	90,5	14,9	90,5	0,05	100,0	Splněno
Methomyl	79,0	7,0	76,9	0,07	97,4	Splněno
Metamitron	61,0	8,2	58,3	0,04	95,5	Splněno
Pendimethalin	170,0	33	137,8	0,04	81,1	Splněno
Propargite	31,0	4,3	34,2	0,12	110,4	Splněno
Pyridaben	214,0	18	213,6	0,07	99,8	Splněno
Tebuconazole	68,5	6,5	71,2	0,11	103,9	Splněno
Thiacloprid	70,5	4,1	72,4	0,06	102,7	Splněno
Thiamethoxam	57,5	8,3	52,7	0,07	91,7	Splněno

3.1.3 Mez stanovitelnosti

RL-LVL je nejnižší validovaná hladina označována jako reportovací limit (RL), u které byly splněny kritéria pro výtěžnost a opakovatelnost. RL-LIMS je skutečný reportovací limit uvedený v laboratorním systému pro uvedení výsledků na protokol stanovený s ohledem na splnění identifikačních kritérií. Nejnižší validované hladiny a RL-LIMS byly pro jednotlivé pesticidní látky různorodé, jejich přehled je uveden výše v Tabulce 6.

Většina látek (168 z 221) splnila kritéria správnosti a přesnosti na nejnižší testované hladině 0,002 mg/kg. Nicméně po uvážení všech kritérií včetně požadavků na identifikaci látek bylo nutné nastavit limity vyšší, viz. přehled na Obrázku 5. U některých látek to bylo z důvodu hraniční citlivosti, u některých nebyl přítomen konfirmační iont o dostatečné intenzitě, u některých pak byly vzaty v úvahu i matriční efekty, které jsou diskutovány v následující kapitole.



Obrázek 5. Přehled dosažených RL-LVL a následně zvolených RL-LIMS s uvedením počtu látek.

3.1.4 Matriční efekty

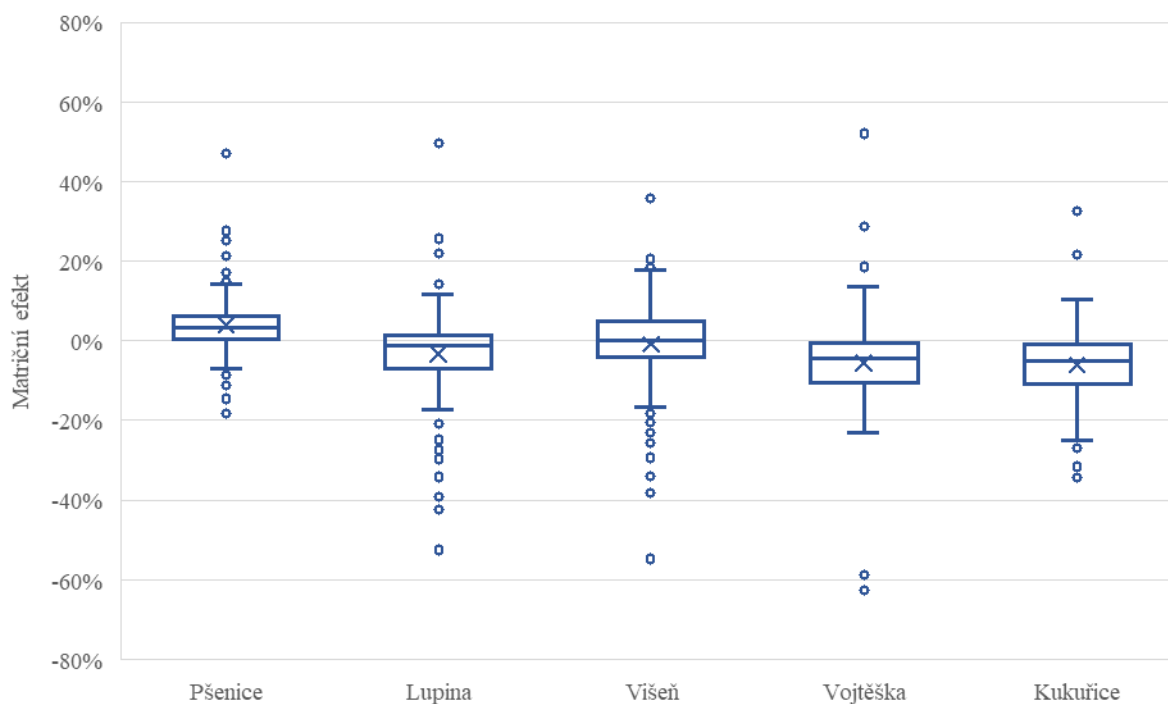
U LC-MS technik s ionizací elektrosprejem mohou být intenzity odezev stanovovaných látek značně ovlivněny přítomností koeluuujících složek matrice extraktu vzorku. Faktorů, které se podílejí na intenzitě a různorodosti matričních efektů, je celá řada, např.:

- typ a nastavení použité instrumentace
- vlastnosti vzorků (různorodost složení, obsah specifických látek)
- příprava vzorku (typ extrakce, čištění, ředění)
- typ použité kalibrace (matriční, solventová atd.)
- vlastnosti stanovovaných látek.

Pro ověření matričního chování stanovovaných látek v rozdílných rostlinných materiálech bylo vybráno pět zástupců: pšenice, lupina, višň, vojtěška a kukuřice. Materiály byly extrahovány a zpracovány stejným postupem, jako matrice ovsa, která byla použita k validaci. Extrakty vzorků a matriční standardy (hladina 0,040 mg/kg) připravené do těchto extraktů byly měřeny v sekvenci souběžně s matriční kalibrací připravenou do validovaného ovsa. Matriční efekty byly kalkulovány porovnáním odezev látek v jednotlivých materiálech s odezvami z kalibrace. Kladné hodnoty matričních efektů znamenají navýšení odezev oproti kalibrační matici, záporné pak jejich pokles.

Vzhledem k použití velmi citlivé instrumentace bylo možné extrakty vzorků před analýzou více

ředit ($10 \times$) a použít nízký objem nástřiku ($1 \mu\text{l}$) za dosažení stále uspokojivých limitů detekce. Tato strategie byla zvolena právě z důvodů redukce variability matričních efektů ve vzorcích, jelikož typy rostlinných materiálů analyzovaných na Oddělení reziduálních analýz jsou značně různorodé. Následující krabicový graf na Obrázku 6 znázorňuje celkové chování všech látek v testovaných materiálech.



Obrázek 6. Grafické znázornění matričního chování analyzovaných látek v jednotlivých materiálech vztažených k matriční kalibraci.

Jak je z grafu patrné, chování látek v testovaných materiálech bylo ve velké míře podobné jako v kalibrační matici. Pouze u několika analytů byly pozorovány poklesy nebo nárůsty odezev nad hranici $\pm 20\%$ (vztaženo ke kalibrační matici), což je hranice při jejímž překročení je nutné podle SANTE výsledky na matriční efekt korigovat, tj. podle možností zvolit např. jinou kalibrační matici, provést standardní přidavek, použít interní standard atd. V průměru přes všechny testované látky byly největší poklesy, avšak stále v povolených mezích, pozorovány u kukuřice a vojtěšky. V ostatních materiálech se výsledky v průměru více blížily kalibrační matici, avšak u těchto materiálů figurovalo více analytů s odlehlými hodnotami. Nutno dodat, že ve většině případů se nejednalo o tytéž látky. Pouze u acetamipridu a flupyradifuronu bylo dosahováno konzistentně vyšších odezev nad 20% . V případě florasulamu, mesotrionu a thiophanate-methylu bylo ve třech testovaných materiálech dosaženo významějších poklesů

pod -20 %. Tato měření potvrdila, že s použitím většího ředění jsou odezvy většiny analyzovaných látek velmi podobné.

3.1.5 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, rozšířené nejistoty se nejčastěji pohybovaly v rozpětí od 5 do 15 %, maximální hodnota 22,8 % byla dosažena u flurochloridonu.

3.1.6 Porovnání dosažených výsledků validace s validačním plánem

Opakovatelnost a nejistota vyhovovaly pro všechny validované parametry limitním hodnotám (viz souhrn v Tabulce 8 níže). V některých případech byla výtěžnost mimo povolený rozsah. SANTE/11312/2021 stanovení takových parametrů (pymetrozine, aminopyralid, etofenprox, quinmerac BH518-4, clopyralid, chloridazon-desphenyl, picloram, thifensulfuron-methyl, terbuthylazine-desethyl-2-hydroxy, simazine-2-hydroxy a thiophanate-methyl) umožňuje, pokud je jejich výtěžnost v rozsahu (30 – 140) % a stanovení daného parametru vykazují akceptovatelnou přesnost (opakovatelnost). U všech těchto 11 pesticidů bylo akceptovatelných opakovatelností dosaženo.

Tabulka 8. Porovnání dosažených validovaných parametrů s limitními akceptovatelnými hodnotami.

Parametr	Matrice	Výtěžnost	Opakovatelnost	Nejistota
		Limitní akceptovatelné hodnoty		
Pesticidy	Rostlina	(70 – 120) % (30 – 140) %	20 %	50 %
		Dosažené hodnoty		
210 pesticidů	Rostlina	(74,8 – 107,5) %	(1,9 – 11,4) %	(3,8 – 22,8) %
11 pesticidů	Rostlina	(40,1 – 68,1) %	(3,6 – 10,6) %	(7,2 – 21,2) %

4 Závěr

V práci byla úspěšně rozšířena a revalidována zkouška multireziduálního stanovení pesticidů metodou LC-MS/MS. Metoda byla verifikována pomocí vícenásobných stanovení obohacených vzorků rostlin, k hodnocení správnosti bylo dále použito CRM AN-BM03 (zelený čaj). Metoda je vhodná pro UHPLC-MS/MS stanovení uvedených 221 pesticidů v rostlinných vzorcích. Získané validační parametry vyhovovaly požadavkům stanoveným podle SANTE/11312/2021.

5 Literatura

- [1] ÚKZÚZ. *Vyhledávání v registru přípravků* [online]. Dostupné z: <https://intranet.ukzuz.cz/public/app/eagriapp/POR/Vyhledavani.aspx?type=7&stamp=1706020797890>
- [2] ÚKZÚZ. *Spotřeba účinných látek a přípravků na ochranu rostlin POR a pomocných prostředků PP v letech 2009-2022 česká verze* [online]. 2023. Dostupné z: https://eagri.cz/public/portal/ukzuz/pripravky-na-or/ucinne-latky-v-por-statistika-spotreba/spotreba-pripravku-na-or/spotreba-v-jednotlivych-letech/spotreba-roky-neviditelny/2009-2022/Spotreba_ucinnych_latek_a_pripravku_na_ochranu_rostlin_POR_a_pomocnych
- [3] MZE. *Víceletý kontrolní plán pro rezidua pesticidů 2024 - 2026, Česká republika* [online]. Dostupné z: <https://eagri.cz/public/portal/mze/potraviny/bezpecnost-potravin/monitoring-cizorodnych-latek/vicelety-kontrolni-plan-pro-rezidua-pesticidu-2024-2026-ceska-republika>
- [4] EURL. *EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides* [online]. Dostupné z: <https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/home.asp?LabID=100&Lang=EN>
- [5] *Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC Text with EEA relevance.* [online]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32005R0396>
- [6] ÚKZÚZ. *Jednotné pracovní postupy - zkoušení krmiv, 10600.2 - Stanovení obsahu reziduí pesticidů metodou LC-MS.* 2024.
- [7] EURL. *Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, SANTE 11312/2021* [online]. 2022. Dostupné z: https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/SANTE_11312_2021.pdf

Bulletin Národní referenční laboratoře XXIX, 2025/2

Ročník: XXIX, č. 2

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2025

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 50

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196