

LC-MS/MS stanovení pesticidů ve chmelu metodou QuEChERS v kombinaci s disperzní SPE



Autoři:

Ing. Martin Dušek, Ph.D.

RNDr. Jana Olšovská, Ph.D.

Zástupce autorského týmu: RNDr. Jana Olšovská, Ph.D.

Poskytovatel: TAČR TE02000177 “Centrum pro inovativní využití a posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků”

Recenzenti:

Mgr. Petra Kosubová, Ph.D., Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský,
Hroznová 63/2, 656 06 Brno

RNDr. Petr Kozlík, Ph.D., Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova
Albertov 6, 128 43 Praha 2

Osvědčení o uznání uplatněné certifikované metodiky vydal: MZe, Úsek potravinářských výrob
– Úřad pro potraviny, Odbor bezpečnosti potravin, Těšnov 17, 117 05 Praha 1, V Praze dne
21. 5. 2019, osvědčení č. 25495/2019-MZE-18140.

Uživatel metodiky: Chmelařský institut s.r.o., Žatec

Číslo interní metodiky VÚPS: VÚPS/2019/006-PES

Autoři:

Ing. Martin Dušek, Ph.D., Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Lípová 15, Praha 2,
120 44

RNDr. Jana Olšovská, Ph.D., Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Lípová 15, Praha 2,
120 44

© Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., 2019

ISBN 978-80-86576-84-8

OBSAH

PROBLEMATIKA	4
I CÍL METODIKY	4
II VLASTNÍ POPIS METODIKY	5
1. Použitelnost metody	5
2. Princip metody	5
3. Terminologie a definice	5
4. Rušivé vlivy	6
5. Přístroje a zařízení	7
6. Chemikálie, roztoky a materiály	7
7. Odběr a přechovávání vzorků	7
8. Postup stanovení	9
9. Výpočet a vyhodnocení	15
10. Parametry metody	17
III SROVNÁNÍ NOVISTI POSTUPU	20
IV POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	21
V EKONOMICKÉ ASPEKTY METODIKY	21
VI SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	21
VII SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	21

PROBLEMATIKA

Vzhledem k možným škodlivým účinkům nadměrného příjmu reziduí pesticidů na zdraví lidí jsou pro jejich obsahy ve chmelu stanoveny maximální reziduální limity (MRL) dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005 o maximálních limitech reziduí pesticidů v potravinách a krmivech rostlinného a živočišného původu ze dne 23. února 2005.

Producenti chmele by tak měli věnovat pozornost obsahu reziduí pesticidů v této komoditě, neboť aplikací agrochemikálií na chmelnicích mohlo dojít k překročení těchto limitů. Z tohoto důvodu je nutné mít k dispozici vhodnou metodiku pro stanovení reziduí pesticidů v této matrici.

I CÍL METODIKY

Cílem metodiky je předložit rutinní, reprodukovatelný postup pro stanovení obsahu reziduí pesticidů ve chmelu pomocí metody kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí, který bude reflektovat pro tuto komoditu stanovené legislativní limity.

II VLASTNÍ POPIS METODIKY

1. Použitelnost metody

Metodou lze stanovit obsah pesticidů v chmelu za použití techniky LC-MS. Metoda byla ověřena pro stanovení pesticidů Acephat, Acetamiprid, Avamectin B1A, Azoxystrobin, Bifenthrin, Boscalid, Carbendazim, Chlorpyrifos, Clothianidin, Cyazofamid, Cymoxanil, Dimethomorph, Etoxazole, Fenpyroximate, Flonicamid, Hexythiazox, Imazalil, Imidacloprid, Malaoxon, Malathion, Mandipropamid, Mepanipyrim, Metalaxyl, Myclobutanil, Dibrom/Naled, Oxadiazon, Penconazol, Pendimethalin, Pirimicarb, Propamocarb, Propargite, Propiconazole, Pymetrozin, Pyraclostrobin, Pyridaben, Quinoxifen, Spirodiclofen, Spirotetramat, Spiroxamine, Tebuconazole, Tebufenpyrad, Thiabendazole, Thiamethoxam, Triadimefon, Triadimenol, Trifloxystrobin a Triflumizole v chmelové matrici.

2. Princip metody

Rezidua pesticidů používaných k chemickému ošetřování chmele jsou ze vzorků, po jejich namletí a homogenizaci, vzorku extrahované metodou QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*). Tento postup spočívá v extrakci směsí voda:acetonitril a následným vysolením organické vrstvy přidavkem směsí síranu hořečnatého a chloridu sodného. Po odstředění je organická fáze vysušena pomocí síranu hořečnatého a dále přečištěna pomocí disperzní SPE, při které dojde k odstranění koextraktů matrice rušících stanovení. Vlastní stanovení se provádí metodou vysoko účinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.

3. Terminologie a definice

QuEChERS – postup přípravy vzorku, kdy se vzorek extrahuje acetonitrilem a následně dojde po přidavku směsi solí ($\text{MgSO}_4 + \text{NaCl}$) a odstředění k vysolení acetonitrilu, který obsahuje vyextrahované analyty [1, 2].

Matriční kalibrace – slouží pro eliminaci vlivu matrice na odezvu detektoru u jednotlivých analytů. Matriční kalibrační řada se připravuje přidavkem roztoků standardů k extraktu připraveného z matrice chmelu prostého reziduí pesticidů.

Disperzní SPE (dSPE) – technika, která slouží k odstranění interferujících součástí matrice rušících stanovení. Na rozdíl od klasické SPE je přečištění založené na disperzi částic sorbentu

(PSA, C18, Z-Sep) ve vzorku a jejich následného odstředění.

NCE – Normalizovaná kolizní energie (*Normalized Collision Energy*)

4. Rušivé vlivy

Matrice chmele obsahuje velké množství interferujících látek, které snižují odezvu detektoru některých ze sledovaných analytů. Z toho důvodu je pro kvantifikaci nezbytně nutné používat matriční kalibraci anebo metodu standartního přídatku.

5. Přístroje a zařízení

- kapalinový chromatograf
- chromatografická kolona (reverzní fáze), např. Atlantis T3 3 μ m, 2.1x100 mm (Waters)
- hmotnostní spektrometr
- homogenizátor (mixer)
- laboratorní centrifuga
- vakuová centrifuga, např. Concentrator Plus 5305 Eppendorf
- uzavíratelné plastové kyvety o objemu 50 ml
- uzavíratelné plastové kyvety o objemu 15 ml
- plastové kyvety se šroubovacím uzávěrem o objemu 2 ml
- mikrozkmavka Eppendorf o objemu 1,5 ml
- skleněná kalibrovaná pipeta o objemu 10 ml
- váhy analytické s přesností 0,0001g
- předvážky s přesností 0,01g
- běžné laboratorní sklo a vybavení

6. Chemikálie

- acetonitril (super gradient nebo gradient grade)
- metanol (LCMS)
- voda (pro HPLC)
- kyselina mravenčí
- mravenčan amonný
- síran hořečnatý
- chlorid sodný
- PSA silica (Sigma-Aldrich, 52738-U)
- Discovery DSC-18 (Sigma-Aldrich, 52600-U)
- Supel QuE Z-Sep (Sigma-Aldrich, 55491-U)

Pokud není uvedeno jinak, používají se chemikálie čistoty p.a. a destilovaná nebo demineralizovaná voda nebo voda ekvivalentní čistoty (vodivost > 18 M Ω).

7. Roztoky

- zásobní roztoky individuálních pesticidů v acetonitrilu, metanolu nebo acetonu, zásobní

roztoky interních standardů tj. trifenylfosfátu (TPP), azoxystrobinu-*d4* a thiamethoxamu-*d3* v acetonitrilu všechny roztoky o koncentraci 1 g.l⁻¹

- **PES 10**: zásobní roztok směsi pesticidů v acetonitrilu o koncentraci 10 mg.l⁻¹

- **PES 1**: zásobní roztok směsi pesticidů v acetonitrilu o koncentraci 1 mg.l⁻¹

- **PES 0,1**: zásobní roztok směsi pesticidů v acetonitrilu o koncentraci 0,1 mg.l⁻¹

- **ISTD 10**: zásobní roztok směsi interních standardů (ISTD) v acetonitrilu o koncentraci 10 mg.l⁻¹

- **ISTD 1**: zásobní roztok směsi interních standardů (ISTD) v acetonitrilu o koncentraci 1 mg.l⁻¹

7.1 Příprava zásobního roztoku individuálních pesticidů

Zásobní roztok standardů o koncentraci 1 g.l⁻¹ se připraví tak, že do 25 ml vialky se šroubovacím uzávěrem se na analytických vahách přesně naváží 10 mg standardu příslušného pesticidu a skleněnou pipetou (třídy K) se přidá přesně 10 ml rozpouštědla - acetonitrilu, metanolu nebo acetonu v závislosti na jeho rozpustnost v těchto rozpouštědlech. Zásobní roztoky individuálních látek se uchovávají v mrazáku při -18°C.

7.2 Příprava zásobního roztoku standardů – PES 10

Směsný zásobní roztok standardů se připraví odpipetováním 1 ml zásobního roztoku každého z pesticidů do 100 ml odměrné baňky a po odpipetování všech požadovaných látek se obsah v baňce doplní po rysku acetonitrem. Zásobní roztok se uchovává v mrazáku při uchování při -18°C.

7.3 Příprava zásobního roztoku standardů – PES 1

Zásobní roztok pesticidů PES 1 o koncentraci 1 mg.l⁻¹ se připravuje odpipetováním 1 ml roztoku **PES 10** do 10 ml odměrné baňky a doplněním acetonitrem po rysku. Tento zásobní roztok se uchovává v mrazáku při teplotě -18°C.

7.4 Příprava zásobního roztoku standardů – PES 0,1

Zásobní roztok pesticidů PES 0,1 o koncentraci 0,1 mg.l⁻¹ se připravuje odpipetováním 1 ml roztoku PES 1 do 10 ml odměrné baňky a doplněním acetonitrem po rysku. Tento zásobní roztok

se uchovává v mrazáku při teplotě -18°C.

7.5 Příprava zásobního roztoku interních standardů – ISTD 10

Směsný zásobní roztok interních standardů se připravuje pipetováním 1 ml zásobního roztoku izotopicky značených pesticidů (azoxystrobin-*d*4, thiamethoxam-*d*3) a roztoku trifenylfosfátu (TPP), připravených viz kapitola 7.1, do 100 ml odměrné baňky. Po pipetování zásobních roztoků všech látek se obsah v baňce doplní acetonitrilem po rysku. Tento zásobní roztok se uchovává v mrazáku při teplotě -18°C.

7.6 Příprava zásobního roztoku interních standardů – ISTD 1

Zásobní roztok pesticidů ISTD 1 o koncentraci 1 mg.l⁻¹ se připravuje pipetováním 1 ml roztoku PES 10 do 10 ml odměrné baňky a doplněním acetonitrilem po rysku. Tento zásobní roztok se uchovává v mrazáku při teplotě -18°C.

8. Postup stanovení

8.1 Příprava vzorku

Vzorky hlávkového chmele nebo granulovaného chmele se uchovávají při laboratorní teplotě a jsou v co nejkratším možném termínu zpracovány. Po namletí a homogenizaci se vzorky skladují v objemově úměrné, dobře uzavřené vzorkovnici na temném a chladném místě, nejlépe v lednici.

8.1.1 Přípravné práce pro přípravu jednoho vzorku

- A)** Do plastové kyvety (50 ml) se odváží: $4 \pm 0,2$ g bezvodého síranu hořečnatého a $1 \pm 0,05$ g chloridu sodného
- B)** Do plastové 15ml kyvety se odváží 0,9 g bezvodého síranu hořečnatého (0,15 g na 1 ml acetonitrilového extraktu).
- C)** Do plastové 2ml mikrozskumavky se šroubovacím uzávěrem se odváží 100 ± 5 mg sorbentu PSA, 25 ± 2 mg sorbentu C18 a 25 ± 2 mg sorbentu Z-Sep.

8.2 Extrakce pesticidů ze vzorku chmele

Do 50ml plastové kyvety se odváží $1 \pm 0,05$ g homogenizovaného vzorku chmele a následně

se do kyvety odpipetuje přesně 10 ml destilované vody. Obsah kyvety se důkladně promíchá na minitřepačce minimálně po dobu jedné minuty. Obsah kyvety se nechá stát 30 minut při laboratorní teplotě, aby voda přidaná ke vzorku jej co možná nejlépe prostoupila. Ke vzorku v kyvetě se poté přidá 50 µl roztoku směsi vnitřních standardů (ISTD 10) a 10 ml acetonitrilu. Směs v kyvetě se důkladně promíchá na minitřepačce, a to opět po dobu minimálně 1 minuty, následně se k obsahu kyvety naráz přidá předem připravená směs solí (viz kapitola 8.1.1, bod A). Kyvetu je třeba co nejrychleji uzavřít a následně s ní po dobu jedné minuty intenzivně třepat rukou, a to tak, aby v žádném případě nedošlo ke spečení přidaných a vytvoření hroudy. Obsah v kyvetě se následně odstředí při 4500 RPM po dobu 7 minut.

Po odstředění se obsah v kyvetě rozdělí do dvou vrstev. Z horní acetonitrilové vrstvy se odpipetuje přesně 6 ml do 15ml kyvety s předem naváženým bezvodým síranem hořečnatým (viz kapitola 8.1.1, bod B), čímž se roztok přesuší. Obsah kyvety se důkladně promíchá na minitřepačce po dobu 1 minuty a obsah kyvety se odstředí po dobu 5 minut při 4500 RPM.

Z přesušeného acetonitrilového extraktu se odpipetuje 1 ml do mikrozkušavky s předem připravenou směsí sorbentů (viz kapitola 8.1.1, bod C) pro přečištění extraktu pomocí disperzní SPE techniky. Směs sorbentu a extraktu se v mikrozkušavce důkladně promíchá na mikrotřepačce a odstředí při 13 000 RPM po dobu 7 minut. Po odstředění se bez další úpravy odpipetuje 800 µl supernatantu do vialky pro vlastní LC-MS/MS stanovení.

8.3 Příprava slepého pokusu metody

Slepý pokus se připravuje tak, že se do kyvety pouze odpipetuje 10 ml destilované vody. Další postup, včetně přidavku směsi interních standardů, je identický s postupem uvedeným v kapitole 8.2.

8.4 Příprava vzorku pro ověření výtěžnosti

Do plastové kyvety (50 ml) se odváží $1 \pm 0,05$ g zhomogenizovaného vzorku chmele prostého reziduí pesticidů, ke kterému se přidá přesně 10 ml destilované vody. Obsah kyvety se důkladně promíchá na minitřepačce a kyveta se nechá stát 30 minut při laboratorní teplotě. Ke vzorku v kyvetě se následně přidá 0,5 ml směsi pesticidů (**PES 1**) o koncentraci 1 mg.l^{-1} , 50 µL roztoku vnitřních standardů (ISTD 10) a 10 ml acetonitrilu. Další postup je identický s postupem uvedeným v kapitole 8.2.

8.5 Příprava matriční kalibrační křivky

Pětibodová kalibrační řada matričních standardů o koncentracích 2; 10; 50; 100 a 200 $\mu\text{g.l}^{-1}$ se připraví tak, že se do pěti mikrozkušavek (Eppendorf, objem 1,5 ml) odpipetuje 800 μl acetonitrilového extraktu připraveného z matrice chmele prosté reziduí pesticidu a přečištěného pomocí disperzní SPE. Pomocí vakuové odstředivky se obsah v mikrozkušavce odpaří dosucha a dle Tabulky 1 se přidavkem zásobního roztoku pesticidů (**PES 0,1** nebo **PES 1**) připraví požadovaná matriční koncentrační řada.

Tabulka 1: Objemy potřebné pro přípravu kalibrační řady matričních standardů.

Koncentrace ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	Objem (μl) roztoku PES 0,1	Objem (μl) roztoku PES 1	Objem (μl) roztoku ISTD 1	Objem (μl) acetonitrilu
2	16	-	40	744
10	80	-	40	680
50	-	40	40	720
100	-	80	40	680
200	-	160	40	600

8.6 Kvantifikace metodou standardního přidavku

Pro kvantifikaci vzorků, kde je zjištěná koncentrace určitého analytu mimo rozsah kalibrační křivky, lze použít metodu standardních přidavků za konstantního objemu. Připraví se série roztoků tak, že se do čtyř vialek odpipetuje stejné množství vzorku (V_a) a k jednotlivým roztokům se přidá N objemových jednotek ($N = 0, 1, 2, 3$) směsi standardů **PES 0,1** nebo **PES 1**, přičemž objem se volí tak, aby absolutní přidané množství standardu odpovídal 50, 100 a 150 % přibližného obsahu analytu v objemu pipetovaného vzorku. Všechny roztoky se doplní acetonitrem na stejný objem.

8.7 LC-MS/MS analýza vzorku

8.7.1 Princip detekce a vyhodnocení MS

Hmotnostní spektrometr pracuje v módu PRM (*Parallel Reaction Monitoring*) tj. příslušný mateřský iont je selektován na kvadrupólu ($\pm 0,7$ Da), fragmentován v HCD fragmentační cele a následně je přesná hmota vzniklých specifických fragmentačních produktů spektru měřena v orbitální pasti. Pro každý z analytů je tedy sledována minimálně jeden specifický SRM přechod, kdy je pro určité m/z odpovídající mateřskému iontu sledován, s přesností 5 ppm, specifický ion z jeho příslušného fragmentačního spektra. Pokud je to možné, tak každý z analytů je charakterizován dvěma specifickými SRM přechody. Nejintenzivnější ion z fragmentačního spektra je použit jako kvantifikační (Q_1) a druhý jako konfirmační (Q_2).

8.7.2 Podmínky LC-MS/MS stanovení

A) Pracovní podmínky kapalinového chromatografu:

- *kolona*: chromatografická kolona s reverzní fází, *např.* Atlantis T3 3 μm , 2,1x100 mm
- *mobilní fáze A*: 2 mM mravenčan amonný + 0,1 % kyselina mravenčí ve vodě
- *mobilní fáze B*: metanol
- *průtok mobilní fáze*: 0,34 ml.min⁻¹
- *objem nástřiku*: 2 μl
- *teplota kolony*: 40 °C

Tabulka 2: Složení gradientu LC části metody

čas (min)	% mobilní fáze A	% mobilní fáze B
0	85	15
0,5	85	15
9	5	95
15	5	95
16	85	15
20	85	15

B) Pracovní podmínky hmotnostní spektrometru s vysokým rozlišením (HR-MS):

1. Parametry ESI zdroje:

- teplota kapiláry (*Capillary temp.*): 295 °C
- průtok sušícího plynu (*Sheath gas flow rate*): 32
- průtok pomocného plynu (*Aux gas flow rate*): 7
- napětí na sprejovací kapiláře (*Spray voltage*): +3,8 kV
- teplota sušícího plynu (*Aux gas heater temperature*): 295 °C

2. Parametry hmotnostního spektrometru:

- detekce v kladném PRM (*Parallel Reaction Mode*) módu
- rozlišení (*Resolution*): 17 500
- *AGC Target*: 2e5
- *Maximum IT*: 40 ms
- šířka izolačního okna (*Isolation window*): 1,4 m/z

Tabulka 3: Parametry jednotlivých analytů. Retenční čas (RT, min), m/z pseudomolekulárního iontu mateřské látky, m/z fragmentu použitého pro kvantifikaci (Q_1), m/z fragmentu použitého pro konfirmaci (Q_2) a normalizovaná kolizní energie použitá pro fragmentaci mateřské látky (NCE).

	Analyt	RT (min)	m/z mateřského iontu $[M+H]^+$	Q_1 (m/z)	Q_2 (m/z)	NCE
1	Acephate	1,5	184,0	142,9919	-	30
2	Acetamiprid	4,7	223,1	126,0099	56,0500	38
3	Abamectin (B1a)*	10,5 ^a	890,5	305,2109	145,0858	20
4	Azoxystrobin	7,7	404,1	372,0954	344,1006	30
5	Azoxystrobin- <i>d4</i>	7,7	408,1	376,1226	348,1277	30
6	Bifenthrin	10,7	440,2 ^a	181,1011	166,0777	35
7	Boscalid	7,9	343,0	307,0614	139,9890	35
8	Carbendazim	3,1	192,1	160,0496	-	45
9	Chlorpyrifos	9,9	349,9	114,9614	197,9275	25
10	Clothianidin	4,3	250,0	169,0542	131,9670	15
11	Cyazofamid	8,4	325,1	108,0117	261,0900	10
12	Cymoxanil	5,1	199,1	128,0454	129,0296	40
13	Dibrom/Naled	7,2	378,8	141,0146	-	30
14	Dimethomorph (<i>E/Z</i>)	7,8/7,9	388,1	301,0608	165,0536	35
15	Etoazole	10,0	360,2	141,0146	158,0412	35
16	Fenpyroximate	10,1	422,2	366,1426	231,0988	32
17	Flonicamid	3,4	230,1	203,0415	174,0151	45
18	Hexythiazox	9,8	353,1	228,0229	114,9609	25
19	Imazalil	6,2	297,1	158,9762	69,0454	45
20	Imidacloprid	4,2	256,1	209,0576	175,0968	30
21	Malaoxon	6,4	315,1	127,0391	142,9926	10
22	Malathion	8,0	331,0	127,0391	285,0014	10
23	Mandipropamid	7,9	412,1	328,1096	356,1044	15
24	Mepanipyrim	8,3	224,1	106,0655	104,0499	65
25	Metalaxyl	7,3	280,2	220,1319	192,1371	25
26	Myclobutanil	8,1	289,1	70,0403	125,0147	30
27	Oxadiazon	9,7	345,1	219,9554	303,0297	27
28	Penconazol	8,7	284,1	70,0403	158,9753	28
29	Pendimethalin	9,9	282,1	212,0652	194,0549	30
30	Pirimicarb	5,5	239,2	72,0451	182,1289	35
31	Propamocarb	1,5	189,2	102,0554	144,1019	45
32	Propargite	9,9	368,2	175,1117	231,1742	10
33	Propiconazole	8,9	342,1	158,9762	186,9712	35
34	Pymetrozin	2,0	218,1	105,0454	-	40
35	Pyraclostrobin	8,9	388,1	194,0800	296,0566	15
36	Pyridaben 1	10,3	365,1	147,1160	-	35
37	Pyridaben 2	10,3	367,1	147,1160	-	35
38	Quinoxifen	8,9	308,0	228,9678	272,0256	60
39	Spirodiclofen	10,5	411,1	71,0856	313,0374	12
40	Spirotetramat	8,3	374,2	270,1407	302,1748	35
41	Spiroxamine	7,0	298,3	144,1375	100,1119	35
42	Tebuconazole	8,8	308,2	70,0403	112,0761	32
43	Tebuconpyrad	9,6	334,2	117,0217	145,0527	50
44	Thiabendazole	3,7	202,0	175,0314	131,0597	77

45	Thiamethoxam	3,5	292,0	211,0636	131,9663	26
46	Thiamethoxam- <i>d</i> 3	3,5	295,0	214,0835	131,9670	26
47	Triphenyl phosphate	8,8	327,1	233,0348	251,0453	40
48	Triadimefon	8,1	294,1	197,0716	69,0706	30
49	Triadimenol	8,2	296,1	70,0407	99,0809	27
50	Trifloxystrobin	9,2	409,1	186,0525	206,0811	20
51	Triflumizole	9,2	346,1	278,0554	73,0655	20

* [M+NH₄]⁺

9. Výpočet a vyhodnocení

9.1 Metoda vnějšího standardu

Pro výpočet koncentrace jednotlivých analytů se používá tzv. metoda vnějšího standardu, kdy se kvantifikace provádí na základě změřené kalibrační křivky. Při metodě kalibrační křivky se analyzuje série standardů o známé, ale různé koncentraci (c) a hledá se závislost kalibrační funkce $x = f(c)$. Neznámý obsah stanovované složky se pak určí pomocí analytické vyhodnocovací funkce $c = fA(x)$, a to odečtením koncentrace analytu z kalibrační křivky (tj. závislosti poměru ploch kalibračních standardů a vnitřního standardu na koncentraci v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a přepočtem na původní vzorek dle vztahu (1). Pro pesticidy azoxystrobin a thiamethoxam se jako vnitřní standardy používají izotopicky značené pesticidy azoxystrobin- d_4 a thiamethoxam- d_3 , pro ostatní analyty je vnitřní standard triphenyl phosphate (TPP).

$$c = \frac{\left(\frac{A_{\text{vz}}}{A_{\text{ISTD}}}\right) - q}{k} \cdot \left(\frac{V}{m}\right) \quad (1)$$

c obsah stanovovaného analytu ve vzorku [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$]

A_{vz} plocha eluční zóny analytu při analýze vzorku

A_{ISTD} plocha eluční zóny vnitřního standardu při analýze vzorku

q úsek na ose y kalibrační křivky

k směrnice kalibrační křivky

V objem acetonitrilu použitého pro extrakci (10 ml)

m navážka vzorku [g]

9.2 Metoda standardního přídatku

Pro kvantifikaci vzorků, kde je zjištěná koncentrace určitého analytu mimo rozsah kalibrační křivky, se použije metoda standardního přídatku. Připraví se série roztoků tak, jak je uvedeno v bodu 8.6 a koncentrace analytu v mg/kg se vypočítá dle vztahu (2).

$$c = \frac{q}{k} \cdot \frac{\left(\frac{1}{m \cdot V_a}\right)}{10} \quad (2)$$

q	úsek na ose y kalibrační křivka
k	směrnice kalibrační křivky
ca	obsah stanovovaného analytu ve vzorku [mg.kg^{-1}]
Va	objem pipetovaného vzorku [ml]
m	navážka vzorku [g]

10. Parametry metody

10.1 Správnost a shodnost

Pro stanovení správnosti a shodnosti byla pětikrát provedena analýza vzorku chmelu prostého reziduí pesticidů s přidavkem směsi pesticidů na hladině $0,05 \text{ mg.kg}^{-1}$ a pěti opakování s přidavkem na hladině $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$. Hodnoty výtěžnosti představují parametr správnosti metody a měly by se nacházet v rozmezí mezi 70 a 120 %. Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti (RSD) reprezentuje shodnost metody a měla by být menší než 20 % [3]. Hodnoty výtěžností (%) a RDS (%) na obou koncentračních hladinách jsou uvedené v tabulce 1.

10.2 Linearita odezvy detektoru

Linearita odezvy detektoru byla ověřena měřením závislosti plochy eluční zóny analytu (osa y) na jeho koncentraci v mg.l^{-1} (osa x). Koncentrační rozsah $0,002 - 0,200 \text{ mg.l}^{-1}$ reprezentuje lineární část kalibrační křivky. Rozsah použitelnosti tohoto rozsahu kalibrační křivky je maximálně 20 % pod a nad oběma krajními body tj. od $0,0016$ do $0,240 \text{ mg/l}$ [3].

10.3 Mez stanovení (limit kvantifikace)

Mez stanovitelnosti byla odhadnuta jako koncentrace analytu odpovídající signálu detektoru, který je desetinásobkem směrodatné odchylky ($n=6$) signálu detektoru pro analyty v matriční standardu o koncentraci $0,002 \text{ mg.l}^{-1}$, což odpovídá $0,02 \text{ mg.kg}^{-1}$ ve vzorku. V případě, že nalezená hodnota pro mez stanovitelnosti byla větší než $0,002$, byla jako mez stanovitelnosti použita koncentrace $0,05 \text{ mg.kg}^{-1}$ tj. koncentrační hladina na které všechny analyty splnily požadavky na správnost a shodnost anebo shodnost v souladu s dokumentem SANTE/11945/2015 [3]. Meze stanovitelnosti pro jednotlivé analyty jsou uvedené v tabulce 3.

10.4 Nejistota stanovení

V souladu s dokumentem SANTE/11945/2015 [3] byla pro multireziduální metodu stanovení jako rozšířená nejistota stanovení, použita hodnota 50 %.

Tabulka 4: Hodnoty výtěžnosti (%), RSD (%) stanovené na dvou hladinách 50 a 500 ppb a mez stanovení (LOQ) pro jednotlivé analyty.

	Analyt	0,05 mg/kg		0,50 mg/kg		LOQ mg/kg
		Výtěžnost (%)	RSD (%)	Výtěžnost (%)	RSD (%)	
1	Acephat	72.7	1.6	58.2	9.8	0,05
2	Acetamiprid	84.7	2.3	83.6	3.5	0,02
3	Avamectin B1A	64.8	10.5	76.4	5.0	0,05
4	Azoxystrobin	97.2	1.7	90.7	1.8	0,02
5	Bifenthrin	94.2	6.9	117.6	2.8	0,05
6	Boscalid	98.0	5.3	82.9	3.5	0,05
7	Carbendazim	76.1	4.2	67.0	3.1	0,02
8	Chlorpyrifos	96.9	3.4	91.5	3.2	0,02
9	Clothianidin	79.8	2.5	81.4	3.5	0,02
10	Cyazofamid	87.3	1.9	83.0	2.7	0,05
11	Cymoxanil	93.6	5.7	79.0	5.0	0,02
12	Dimethomorph (E)	56.8	4.6	60.3	3.3	0,05
13	Dimethomorph (Z)	97.8	2.7	78.1	3.5	0,02
14	Etoxazole	88.5	2.4	92.7	2.6	0,02
15	Fenpyroximate	83.3	2.9	89.2	5.0	0,02
16	Flonicamid	79.3	6.4	82.6	3.4	0,05
17	Hexythiazox	102.9	3.6	89.1	2.4	0,05
18	Imazalil	127.6	5.9	56.3	10.6	0,02
19	Imidacloprid	80.8	5.4	82.8	1.9	0,02
20	Malaoxon	73.2	3.1	82.0	3.7	0,02
21	Malathion	61.2	1.1	70.0	5.2	0,02
22	Mandipropamid	93.4	2.2	85.6	3.8	0,02
23	Mepanipyrim	88.6	2.0	81.7	2.7	0,02
24	Metalaxyl	89.7	2.3	83.7	2.9	0,02
25	Myclobutanil	86.7	2.1	80.6	2.7	0,05
26	Naled	67.8	9.1	82.4	4.0	0,05
27	Oxadiazon	85.8	3.8	100.6	3.8	0,05
28	Penconazol	92.2	1.5	82.3	2.0	0,02
29	Pendimethalin	93.0	2.3	63.8	9.3	0,05
30	Pirimicarb	83.0	2.9	79.9	3.1	0,02
31	Propamocarb	9.8	20.4	13.7	4.9	0,02
32	Propargite	94.1	6.4	94.8	2.3	0,02
33	Propiconazole	87.5	1.4	82.2	1.5	0,05
34	Pymetrozine	19.3	8.9	-	-	0,02
35	Pyraclostrobin	90.9	1.9	86.3	2.6	0,02
36	Pyridaben	68.6	6.4	94.2	4.2	0,02
37	Quinoxifen	82.7	1.5	81.5	2.9	0,05
38	Spirodiclofen	86.0	4.5	83.7	3.5	0,05
39	Spirotetramat	74.7	4.1	64.8	4.8	0,02
40	Spiroxamine	40.8	3.8	53.7	3.5	0,02
41	Tebuconazole	89.7	1.0	81.2	1.5	0,02
42	Tebufenpyrad	81.2	2.3	86.8	3.1	0,02
43	Thiabendazole	63.5	4.6	53.6	6.3	0,02
44	Thiamethoxam	89.4	1.1	85.8	1.4	0,02
45	Triadimefon	87.6	2.0	82.5	2.6	0,02

46	Triadimenol	85.2	1.9	82.7	3.1	0,05
47	Trifloxystrobin	112.9	1.7	95.2	2.6	0,02
48	Triflumizole	93.7	3.5	82.1	3.2	0,02

III SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPU

Pro stanovení obsahu reziduí pesticidů v matricích ovoce a zeleniny se obvykle používá postup přípravy vzorků založený na metodě QuEChERS [1,2], jež spočívá v extrakci vzorku acetonitrilem a následným vysolením organické fáze přidavkem směsi solí.

Výše popsaná metodika je také založena na použití postupu QuEChERS, ale tento postup musel být doplněn dalším čistícím krokem vzhledem k povaze vzorku, který obsahuje velké množství látek extrahujících se do acetonitrilu a tím negativně ovlivňují vlastní odezvy sledovaných analytů. Přechistění vzorku se provádí disperzní SPE pomocí nově navržené směsi sorbentů, PSA, C18 a Z-Sep, jejíž složení bylo optimalizováno právě pro matici chmele. Postup se vyznačuje svou jednoduchostí a kromě třepání a odstředování vzorku není nutné provádět složité a časově náročné laboratorní operace.

Shrnutí: Postup přípravy vzorku, který byl optimalizován pro matici chmele, umožňuje rychle a přesně stanovit množství reziduí pesticidů ve chmelu, a to v koncentracích pod limitem vyjádřeným legislativním předpisem. Metodu je tedy možné velmi dobře používat pro rutinní kontrolu.

IV POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika bude uplatněna pro stanovení obsahu pesticidů ve chmelu, bude tedy sloužit pro kontrolu jeho zdravotní nezávadnosti. Metodiku budou využívat pěstitelé chmele a pivovary.

V EKONOMICKÉ ASPEKTY METODIKY

Ekonomické aspekty nelze jednoznačně vyčíslit. Metodika bude komerčně využita pro rutinní kontrolu zdravotní nezávadnosti chmele v ČR, přinese tedy finanční prostředky jejímu uživateli za analýzy chmele. Proces kontroly chmele přinese především snížení rizika výskytu pesticidů v pivu, tedy potenciálním finančním ztrátám pivovaru v případě odhalení zvýšené koncentrace pesticidů v jejich výrobku.

VI SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

1. Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenck, F.J.: Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. *JAOAC Int* **86**, 2003, 412-431
2. Lehotay, S.J., de Kok, A.: *Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. J AOAC Int* **88**, 2005, 595-614.
3. SANTE/11813/2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. 21–22November 2017 rev.0.
https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf

VII SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Dušek, M., Jandovská, V., Olšovská, J.: Analysis of multiresidue pesticides in dried hops by LC–MS/MS using QuEChERS extraction in combination with optimized dSPE clean-up. *Journal of the Institute of Brewing* **124**, 2018, 222-229.

DEDIKACE:

Metodika vznikla v rámci řešení projektu TAČR TE02000177, “Centrum pro inovativní využití a posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků“.

OPONENTI METODIKY:

Oponentní posudek odborníka v daném oboru zpracoval:

Oponentní posudek ze státní správy zpracoval:

Mgr. Petra Kosubová, Ph.D., Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
Hroznová 63/2, Brno, 656 06

PODÍL PRÁCE AUTORŮ METODIKY:

Ing. Martin Dušek, Ph.D. 80 %

RNDr. Jana Olšovská, Ph.D. 20 %

UŽIVATEL METODIKY:

Uživatel metodiky: Chmelařský institut s.r.o., Žatec

Metodika: LC-MS/MS stanovení pesticidů ve chmelu metodou QuEChERS v kombinaci s disperzní SPE

Autoři: Martin Dušek, Jana Olšovská

Vydal Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., jako svou 99. publikaci

Redakce: Kvasný průmysl, Lípová 15, 120 44 Praha 2

Tel. 224 915 530, fax 224 920 618

e-mail kvas@beerresearch.cz

www.beerresearch.cz, www.kvasnyprumysl.cz

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Adlerová

Tisk: Studio SV, s.r.o., Praha

Náklad: 50 výtisků

ISBN 978-80-86576-84-8

© Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., 2019