Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2013

Ročník XVII, číslo 2/2013

Brno 2013

Obsah

1. **Zavedení metody LC/MS/MS pro stanovení melaminu, kyseliny kyanurové, ammelidu a ammelinu v krmivech a jiných matricích**
   Romana Pokorná, Zuzana Nehybová
   Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno,
   Hroznová 2, 656 06 Brno 1

2. **Skupinové stanovení vybraných mykotoxinů metodou LC-MS**
   Martina Bolechová, Petra Kosubová, Marie Mrkvicová, Zuzana Nehybová
   Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno,
   Hroznová 2, 656 06 Brno 8

3. **Stanovení PCB a OCP v rostlinách**
   Pavla Tieffová
   Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno,
   Hroznová 2, 656 06 Brno 21

4. **Stanovení reziduí pesticidů v rostlinách (vinná réva)**
   Petra Kosubová, Pavla Tieffová, Barbora Foltová
   Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno,
   Hroznová 2, 656 06 Brno 27

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Zavedení metody LC/MS/MS pro stanovení melaminu, kyseliny kyanurové, ammelidu a ammelinu v krmivech a jiných matricích

Romana Pokorná, Zuzana Nehybová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
zuzana.nehybova@ukzuz.cz, romana.pokorna@ukzuz.cz

1 Souhrn

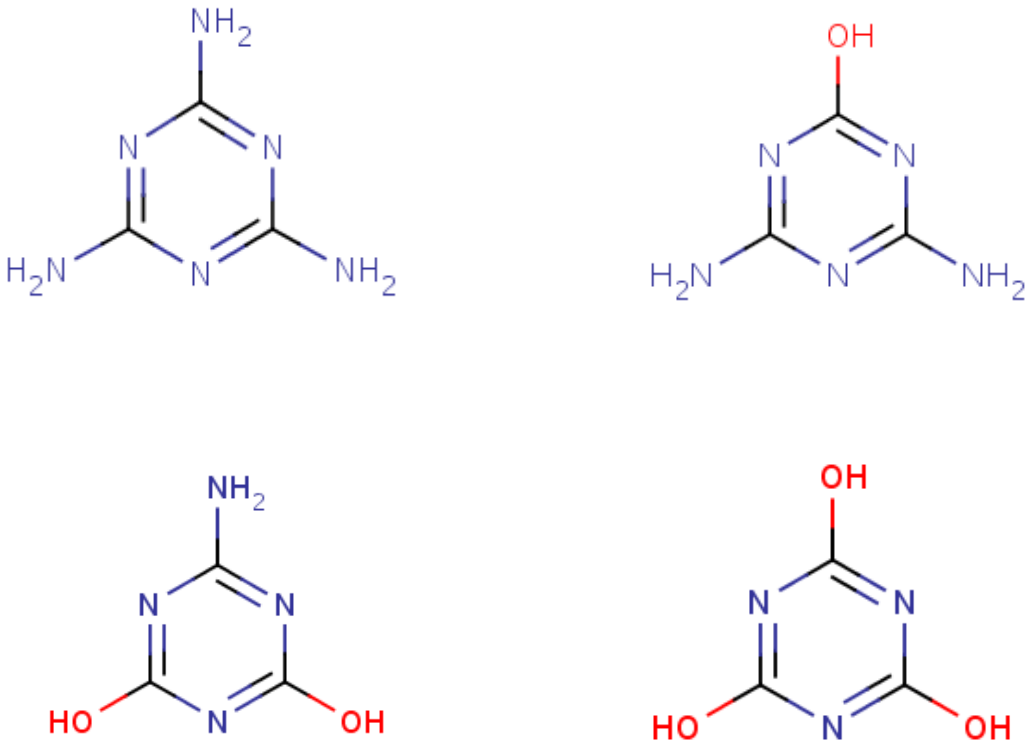
V NRL RO Brno byla v minulosti zavedena metoda na stanovení melaminu v krmivech metodou LC/MS/MS. Vzhledem k zájmu o stanovení chemicky podobných sloučenin práce pokračovala. Cílem bylo zavést a optimalizovat metodu pro simultánní stanovení melaminu, ammelinu, ammelidu a kyseliny kyanurové.

2 Úvod

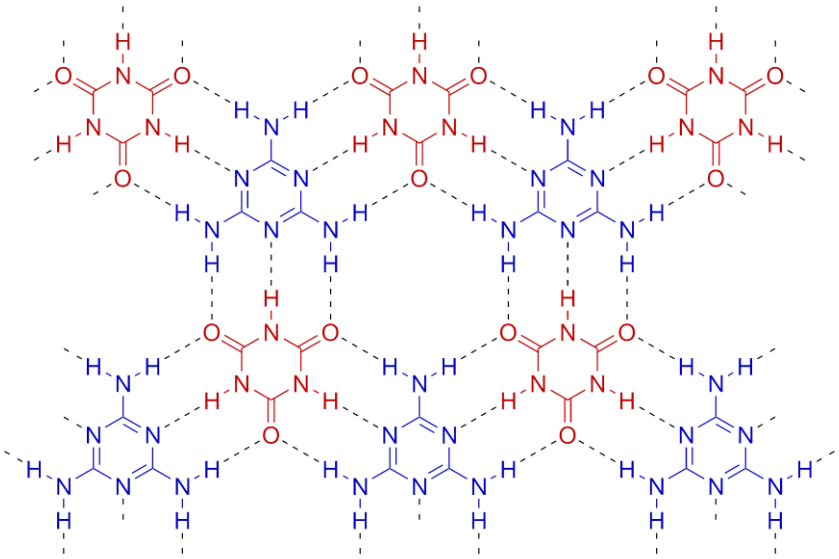
Melamin (2,4,6-triamino-1,3,5-triazin) je organická sloučenina, která se používá při výrobě hnojiv a plastů. Jde o velkoobjemovou chemikálii, která se vyrábí z močoviny. Jako vedlejší produkty při výrobě melaminu vznikají ammelin a ammelid, které jsou svou chemickou strukturou melaminu velmi podobné (obr. 1). Molekula melaminu obsahuje 66,6 hmotnostních procent dusíku. Proto byl melamin použit čínskými producenty pro falšování kvality krmných směsí pro psy a kočky v r. 2007 a v r. 2008 sušených mlék pro děti. Přidáním melaminu s vysokým obsahem dusíku je maskován nízký obsah bílkovin, který je určován na základě stanovení dusíku Kjeldahlovou metodou.

Melamin do doby, než byl použit v krmivech a potravinách, byl pokládán za látku neškodnou zdraví s akutní toxicitou podobnou kuchyňské soli. Podrobnější studie zjistily, že v trávicí

soustavě vzniká melamin-kyanurát (obr. 2) – polymerní komplex melaminu s kyselinou kyanurovou propojený vodíkovými vazbami, který tvoří téměř nerozpustné krystaly. Ty blokují a poškozují ledvinové buňky tak, že postupně může dojít až k selhání funkce ledvin. Proto se podezřelé mléčné výrobky a krmiva nejen z Číny kontrolují na obsah melaminu. Nařízení Komise (EU) č. 574/2011 ze dne 16. června 2011 stanovuje v produktech ke krmení maximální obsah melaminu 2,5 mg/kg. Zařazení strukturně příbuzných sloučenin kyseliny kyanurové, ammelinu a ammelidu do maximálního obsahu se zváží v pozdější fázi.



Obrázek 1. Melamin, ammelin (1 OH- skupina), ammelid (2 OH- skupiny), kyselina kyanurová (3 OH- skupiny)



Obrázek 2. Polymerní komplex melamin – kyanurát.

3 Materiál a metody

3.1 Princip metody

Vzorky krmiv se extrahují vhodným rozpouštědlem a bez přečištění se naředí a nastříknou do LC/MS systému. Analýza probíhá na kapalinovém chromatografu ve spojení s hmotnostním detektorem typu iontové pasti.

3.2 Chemikálie

Všechny použité chemikálie jsou minimálně kvality p.a. a vyšší.

1. Jednotlivé samostatné roztoky melaminu, kyseliny kyanurové, ammelinu a ammelidu o koncentracích 500 µg/ml.

   Roztok melaminu vznikl rozpuštěním 50 mg krystalického melaminu ve 100 ml směsi (acetonitril : voda) = (50 : 50, v/v).

   Roztok kyseliny kyanurové vznikl rozpuštěním 50 mg krystalické kyseliny kyanurové ve 100 ml směsi (acetonitril : voda) = (50 : 50, v/v).

Roztok ammelidu vznikl rozpuštěním 50 mg krystalického ammelidu ve 100 ml směsi (metanol : voda) = (50 : 50, v/v).

Roztok ammelinu vznikl rozpuštěním 50 mg krystalického ammelinu ve 100 ml směsi (methanol : voda) = (50 : 50, v/v).

Směsné roztoky všech čtyř analytů vznikly naředěním těchto roztoků do směsi (acetonitril : voda) = (50 : 50, v/v) o koncentracích (5; 10; 20; 50) μg/ml do vialek před LC/MS/MS analýzou.

3.3 Přístroje a zařízení

1. Kapalinový chromatograf Agilent 1100 ve spojení s hmotnostním spektrometrem Esquire 6000 (Bruker Daltonics).
2. Kolona XBridge HILIC 100 mm × 3 mm, s velikostí částic 3,5 μm.
3. Laboratorní třepačka.
4. Ultrazvuková lázeň.
5. Laboratorní odstředivka.
6. Zařízení pro výrobu ultračisté vody Milli-Q.

4 Pracovní postup

Optimalizace souhrnné metody pro stanovení melaminu, ammelinu, ammelidu a kyseliny kyanurové probíhaly s jednotlivými roztoky analytů a se směsnými roztoky všech analytů – melaminu, ammelinu, ammelidu a kyseliny kyanurové. Jelikož jsou to látky podobných vlastností, které se liší pouze o 1 m/z, je velmi těžké rozdělit je na koloně a poté i rozštěpit v hmotnostním spektrometru.

Tabulka 1. Molekulové hmotnosti (g/mol) jednotlivých analytů.

Analyt	Melamin	Ammelin	Ammelid	Kyselina kyanurová
Molekulová hmotnost	126,12	127,10	128,09	129,07

Příprava vzorku: Do nádobky se naváží 2 g vzorku, přidá se 15 ml 5% roztoku kyseliny trichloroctové a 5 ml acetonitrilu. Vzorky se třepou manuálně 30 min. Poté se na 30 min vloží do ultrazvuku a následně se odstředí. Naředí se a nastříknou do systému HPLC-MS.

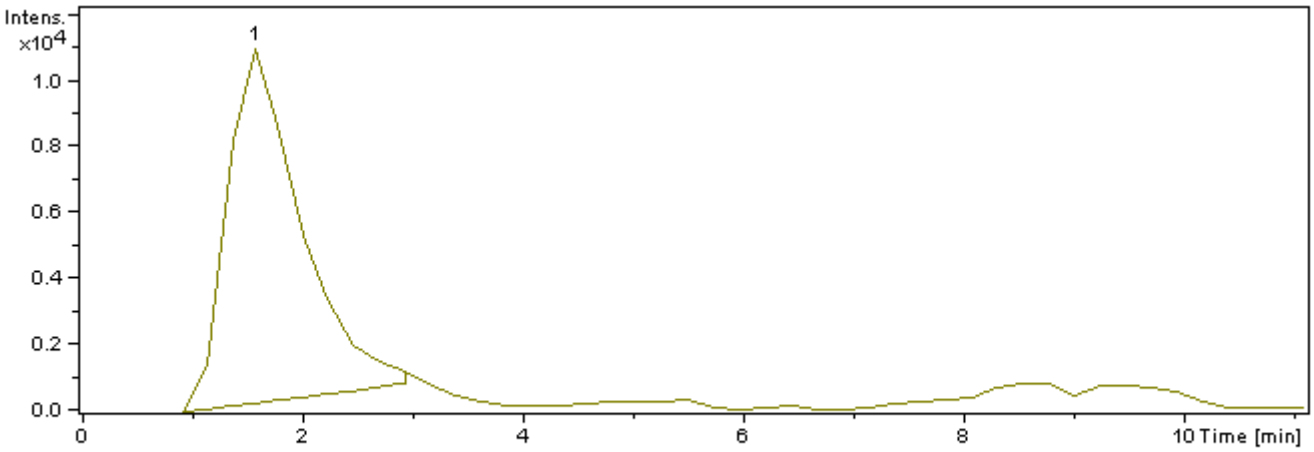
2 µl takto připraveného vzorku se nastříknou do kapalinového chromatografu s kolonou typu HILIC (XBridge - Waters) a separace probíhá gradientovou elucí mobilní fází. Mobilní fáze obsahuje 10mM vodný roztok octanu amonného jako složku A a 10mM roztok octanu amonného v (acetonitrilu : vodě) = (95 : 5, v/v) jako složku B. Analýza probíhá v hmotnostním spektrometru metodou MS/MS, ionizačním zdrojem je elektrosprej.

5 Výsledky a diskuse

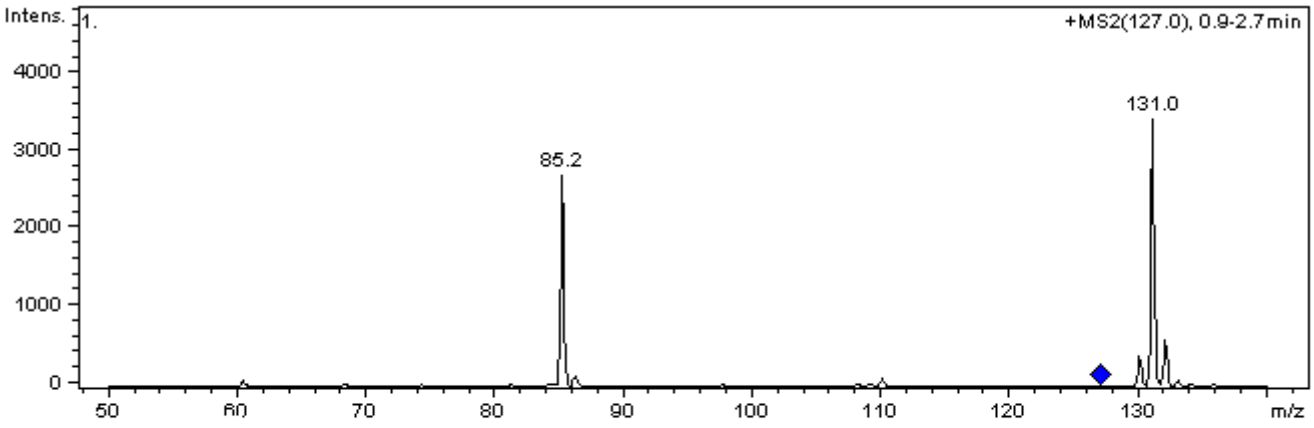
Optimalizace HPLC metody nebyla nutná. Byl využit již dříve akreditovaný postup pro stanovení melaminu. U separace melaminu se využívá tzv. HILIC chromatografie, která má vlastnosti chromatografie normálních fází a přitom pracuje s rozpouštědly chromatografie obrácených fází. Chromatografická metoda byla vypracována s kolonou XBridge HILIC (Waters) a mobilní fází 10mM octanu amonného v acetonitrilu s vodou a 10mM octanu amonného ve vodě v gradientovém programu.

Optimalizace MS/MS metody probíhala pomocí jednotlivých standardních roztoků využitím přímého vstupu do hmotnostního spektrometru. Melamin tvoří v elektrospreji v módu MS intenzivní fragment $[M+H]^+$ 127 m/z a jeho intenzita se podstatně sníží v režimu MS/MS, stejně jako u všech ostatních analytů. Hlavními produktovými ionty jsou (85; 57; 58; 71) m/z. Ammelid tvoří v elektrospreji v módu MS ion $[M+H]^+$ 129 m/z a jeho produktové ionty v režimu MS/MS jsou (109; 63) m/z. Ammelin fragmentuje v záporném módu a tvoří mateřský ion $[M-H]^-$ 126 m/z. Dceřiné ionty jsou (83; 111; 112) m/z. Kyselina kyanurová fragmentuje také v záporném módu elektrospreje a její mateřský ion je $[M-H]^-$ 128 m/z.

Na obrázcích 3 a 4 jsou uvedeny chromatogram melaminu (extracted ion chromatogram) a jeho hmotnostní spektrum.



Obrázek 3. Chromatogram standardního roztoku melaminu.



Obrázek 4. Hmotnostní spektrum melaminu.

Jelikož jde o velmi stabilní molekuly, fragmentace původních iontů je obtížná. Při přímém nástřiku jednotlivých standardů byly optimalizovány jednotlivé MS/MS metody, které pak byly rozděleny do metod pozitivního módu ESI+ (melamin a ammelid) a negativního módu ESI- (kyselina kyanurová a ammelin). Ve snaze zlepšit správnost stanovení byl do optimalizace zahrnut i izotopově značený standard – melamin se třemi molekulami dusíku ^{15}N. Jeho molekulová hmotnost je 129,10 g/mol a mateřský ion v ESI+ 130 m/z. Dceřiné ionty (85; 87; 88; 112; 113; 114) m/z.

Byly získány kalibrační křivky, které byly v omezeném rozsahu reprodukovatelné. Stanovení všech analytů ze společného směsného standardu však bylo problematické. Žádná kalibrační křivka ze směsného standardu neodpovídala tomu, co bylo naměřeno s analyty jednotlivě

namíchanými. Intenzita signálu znatelně poklesla a u některých analytů se nepodařilo zaznamenat jejich chromatogram a spektrum. Z toho důvodu analýzy spikovaných vzorků ani reálných krmných směsí nepokračovaly.

6 Závěr

Prokázalo se, že společná metoda stanovení melaminu, ammelinu, ammelidu a kyseliny kyanurové není na přístroji s hmotnostním detektorem – iontovou pastí – vhodná. Určitým příslibem pro vývoj společné metody stanovení by mohla být analýza na přístroji s větší citlivostí a vyšším rozlišením.

7 Literatura

1. Wendy C. Andersen, Sherri B. Turnipseed, Christine M. Karbiwnyk, and Mark R. Madson, Determination of Melamine Residues in Catfish Tissue by Triple Quadrupole LC-MS-MS with HILIC Chromatography, U.S. Food and Drug Administration, Animal Drugs Research Center, Denver, CO.
2. Muñiz-Valencia, R., et al. (2008): Method development and validation for melamine and its derivatives in rice concentrates by liquid chromatography. Application to animal feed samples. Analytical and Bioanalytical Chemistry 392, 523-531.
3. Jeremy Shia, Claude Mallet, Michael Young, Jianzhong Li, Ying Meng nad Cai Qi, Rapid, specific analysis of melamine contamination in infant formula and liquid milk by UPLC/MS/MS, Waters Corporation,Milford, MA, USA, Waters Technologies, Shangai, China, Application Note.
4. Jeremy Shia and Daniel Diehl, Protecting the food supply: rapid, specific analysis of melamine and cyanuric acid in infant formula by LC/MS/MS, Chemistry Applied Technology, Waters Corporation, Application Note.
5. Sherri Turnipseed[1], Christine Casey[1], Cristina Nochetto[2], David N. Heller[2], Determination of Melamine and Cyanuric Acid Residues in Infant Formula using LC-MS/MS, [1] Denver Laboratory, Office of Regulatory Affairs, Food and Drug Administration, [2] Office of Research, Center for Veterinary Medicine, Food and Drug Administration.
6. http://en.wikipedia.org/wiki/Melamine

Skupinové stanovení vybraných mykotoxinů metodou LC-MS

Martina Bolechová, Petra Kosubová, Marie Mrkvicová, Zuzana Nehybová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
martina.bolechova@ukzuz.cz

1 Souhrn

V laboratoři NRL-RO Brno byla zavedena metoda pro stanovení 17 vybraných mykotoxinů v kompletní krmné směsi a v surovinách určených pro výrobu kompletního krmiva. Tato metoda je efektivní a rychlou alternativou s nízkými náklady k metodám, v nichž se používají imunoafinitní kolonky. Metoda je vhodná nejen ke screeningu, ale i ke kvantitativnímu stanovení mykotoxinů.

2 Teoretická část

2.1 Úvod

Mykotoxiny se v NRL-RO Brno stanovují pomocí akreditovaných postupů založených na normativních metodách určených pro sledování mykotoxinů v krmivech [1 – 4]. Tyto metody jsou selektivní a lze jimi stanovit vždy jen jeden daný mykotoxin nebo malou skupinu analytů s podobnou strukturou a fyzikálně chemickými vlastnostmi (např. HT-2 toxin společně s T-2 toxinem, nebo skupinu aflatoxinů). Cílem multireziduálního stanovení mykotoxinů bylo sjednotit postup přípravy vzorku a koncové stanovení mykotoxinů, a tím snížit časové a finanční nároky spojené s použitím normativních postupů. Výhodou metody je také možnost jejího rozšíření o další sledované analyty v souladu s požadavky Evropské unie.
Multireziduální stanovení mykotoxinů je založeno na metodě QuEChERS, která byla primárně vyvinuta pro účely multireziduálního stanovení pesticidů [5]. Tato metoda zahrnuje extrakci do acetonitrilu, vysolení analytů do acetonitrilové fáze, separaci vodné fáze

a stanovení obsahu mykotoxinů ultra-účinnou kapalinovou chromatografií (UPLC) ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS).

Byly vybrány mykotoxiny, které jsou v právních předpisech uvedeny jako nežádoucí látky v krmivech. Jejich hladina je legislativně limitována, nebo jsou pro ně nastaveny směrné hodnoty [6, 7]. Další sledovanou skupinou jsou mykotoxiny, které jsou v současné době předmětem zájmu Evropského úřadu pro bezpečnost potravin EFSA, který dohlíží na hygienicko-toxikologickou nezávadnost potravin a krmiv. Údaje o výskytu těchto mykotoxinů budou základem pro nastavení vhodných regulujících limitů [8]. Celkem bylo vybráno 17 mykotoxinů (viz tabulka 1).

Cílem práce bylo vyvinout a zavést multireziduální metodu pro stanovení vybraných mykotoxinů v krmivech a v surovinách určených pro jejich výrobu.

Tabulka č. 1. Směrné hodnoty pro mykotoxiny v krmivech.

Mykotoxin	**Produkty určené ke krmení zvířat**	**Směrné hodnoty (mg/kg)**
Deoxynivalenol	obiloviny, produkty z obilovin, vedlejší produkty z kukuřice, doplňková a kompletní krmiva	0,9 – 12
Zearalenon	obiloviny, produkty z obilovin, vedlejší produkty z kukuřice, doplňková a kompletní krmiva	0,1 – 3
Ochratoxin A	obiloviny, produkty z obilovin, vedlejší produkty z kukuřice, doplňková a kompletní krmiva	0,05 – 0,25
Fumonisin B1, B2	kukuřice, produkty z kukuřice, doplňková a kompletní krmiva	5 – 60
Aflatoxin B1[a]	všechny krmné suroviny, kompletní krmiva, doplňková krmiva	0,005 – 0,02
Aflatoxin B2, G1, G2	–	
T-2 toxin a HT-2 toxin	–	
Aflatoxin B2, G1, G2	–	
Enniatin A, A1, B, B1	–	
Beauvericin	–	
Nivalenol	–	

[a]… maximální povolený obsah (mg/kg)

3 Praktická část

3.1 Materiál a metody

Seznam použitých chemikálií a činidel, příprava vzorků k analýze a koncové stanovení jsou uvedeny v JPP ZK – postup 575 [9], který je zveřejněn na www.ukzuz.cz. Jsou sledovány tyto mykotoxiny: deoxynivalenol, nivalenol, aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1, aflatoxin G2, T-2 toxin, HT-2 toxin, fumonisin B1, fumonisin B2, ochratoxin A, zearalenon, enniatin A, enniatin A1, enniatin B, enniatin B1, beauvericin. Podmínky měření jsou uvedeny v tabulkách č. 2 a 3.

Tabulka č. 2. Chromatografické podmínky UPLC stanovení.

UPLC – Acquity Waters	
Kolona	ACQUITY UPLC BEH C18 (50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm)
Předkolona	ACQUITY UPLC BEH C18 (5 mm × 2,1 mm × 1,7 μm)
Nástřik	2,5 μl
Slabý promývací roztok	Deionizovaná voda/methanol (90/10)
Silný promývací roztok	Methanol
Mobilní fáze A	0,1% kyselina mravenčí v deionizované vodě
Mobilní fáze B	0,1% kyselina mravenčí a 1mM mravenčan amonný v methanolu
Průtok mobilní fáze	0,4 ml/min
Gradient mobilní fáze	0 min (10 % B) – 0,3 min (20 % B) – 4,5 min (99,5 % B) – 7 min (99,5 % B) – 7,1 min (10 % B) – 10 min (10 % B)

Tabulka č. 3. Podmínky stanovení pro Xevo TQ MS Waters.

Mykotoxin	RT (min)	Prekursor ion	CV (V)	Produkt ion 1	CE (V)	Produkt ion 2	CE (V)
Nivalenol	0,84	313,0	26	125,0	12	177	13
Deoxynivalenol	1,10	297,1	20	203	20	231,1	20
Aflatoxin G2	2,07	331,1	45	245,1	40	313,1	33
Aflatoxin G1	2,21	329,1	45	243,1	37	311,1	30
Aflatoxin B2	2,33	315,1	45	259,1	40	287,1	35
Aflatoxin B1	2,46	313,1	45	213,0	40	241	40
HT-2 Toxin	3,02	442,0	16	215,0	13	263	13
Fumonisin B1	3,15	722,4	45	334,2	40	352,2	40
T-2 Toxin	3,29	484,1	20	185,2	12	215,3	12
Zearalenon	3,48	319,0	20	185,0	20	187	20
Ochratoxin A	3,54	404,2	25	221,1	25	239,1	25
Fumonisin B2	3,62	706,4	50	318,2	55	336,2	50
Enniatin B	4,35	640,4	50	196,1	25	214,1	25
Beauvericin	4,44	784,4	50	244	25	262,4	25
Enniatin B1	4,45	654,4	50	196,1	30	214,2	30
Enniatin A1	4,54	668,5	50	210,2	27	228,2	27
Enniatin A	4,62	682,5	50	210,3	27	228,3	27
Teplota iontového zdroje – 150 °C; teplota sušicího plynu – 450 °C; průtok sušicího plynu – 700 l/h; průtok „cone gas“ – 45 l/h; průtok kolizního plynu – 0,18 ml/min; napětí na kapiláře – 3 kV; ionizace elektrosprejem v pozitivním modu.							

3.2 Výsledky a diskuse

3.2.1 Validace stanovení mykotoxinů

Stanovení 17 mykotoxinů bylo validováno ve čtyřech matricích: v kukuřici, pšenici, siláži a v kompletní krmné směsi (KKS). Validace probíhala analýzou obohacených vzorků podle požadavků uvedených v rozhodnutí komise ze dne 14. srpna 2002 [10] a v nařízení komise (ES) č. 401/2006 [11]. V rámci validace byla ověřena správnost, přesnost, selektivita a rozšířená nejistota stanovení. Obohacení bylo provedeno v 6 opakováních na 3 hladinách pro každou matrici. Nejnižší validovaná hladina odpovídá tzv. reportovacímu limitu (RL) (viz. tabulka č. 4). Takto je definována mez stanovitelnosti, tj. úroveň, nad kterou lze věrohodně provést kvantitativní stanovení. Obsah mykotoxinů byl kvantifikován s využitím matricové kalibrace. V rámci validace bylo ověřeno použití vnitřního standardu (aflatoxin M1) pro indikaci nestandardního chování vzorku při přípravě či koncovém stanovení.

Tabulka č. 4. Limity kvantifikace (LOQ)

Analyt / Matrice		Nivalenol	Deoxynivalenol	Aflatoxin G2	Aflatoxin G1	Aflatoxin B2	Aflatoxin B1	HT-2 Toxin	Fumonisin B1	T-2 Toxin	Zearalenon	Ochratoxin A	Fumonisin B2	Enniatin B	Beauvericin	Enniatin B1	Enniatin A1	Enniatin A
Kukuřice	LOQ [ppb] [a]	80	50	2,5	2,5	1	1	5	10	5	10	2,5	10	5	5	5	5	5
Pšenice		80	50	2,5	2,5	1	1	5	10	5	10	5	20	5	5	5	5	5
KKS		80	50	2,5	2,5	1	1	5	10	5	20	5	20	5	5	5	5	5
Siláž		160	50	5	10	2	2,5	10	20	5	20	5	20	5	5	5	5	5

a… LOQ odpovídá nejnižší validované hladině, jedná se tedy o tzv. reportovací limit (RL)

U všech 17 mykotoxinů byla splněna validační kritéria pro správnost (výtěžnost) a přesnost (opakovatelnost) dle nařízení komise (ES) č. 401/2006 a rozhodnutí komise ze dne 14. srpna 2002 [10, 11]. Všechna validační kritéria jsou uvedena v tabulce 5. V případě validace mykotoxinů nebyla v některých matricích pro zearalenon, fumonisin B1 a fumonisin B2 dodržena kritéria pro výtěžnost nebo opakovatelnost (viz tabulka č. 5 – šedý text), z tohoto důvodu se stává reportovacím limitem první následující validovaná hladina. U validace nivalenolu byla ve všech matricích stanovena výtěžnost nižší než 80 %, tzn. v případě nálezu tohoto mykotoxinu je nutná korekce jeho obsahu na výtěžnost.

Tabulka č. 5. Výtěžnost a správnost metody pro různě obohacené vzorky.

Matrice / Mykotoxin	Výtěžnost ± RSD (%)			
	Kukuřice	**Pšenice**	**Kompletní krmná směs**	**Siláž**
NIV	80 ppb: 59 ± 11	80 ppb: 50 ± 2	80 ppb: 76 ± 13	160 ppb: 60 ± 16
	160 ppb: 65 ± 6	160 ppb: 51 ± 8	160 ppb: 61 ± 12	320 ppb: 54 ± 14
	2000 ppb: 52 ± 3	800 ppb: 50 ± 8	800 ppb: 60 ± 8	1600 ppb: 51 ± 5
DON	50 ppb: 93 ± 10	50 ppb: 75 ± 5	50 ppb: 93 ± 25	50 ppb: 103 ± 5
	100 ppb: 91 ± 9	100 ppb: 78 ± 8	100 ppb: 89 ± 9	100 ppb: 89 ± 7
	2000 ppb: 88 ± 2	500 ppb: 85 ± 4	500 ppb: 90 ± 7	500 ppb: 84 ± 3
AF G2	2,5 ppb: 92 ± 14	2,5 ppb: 103 ± 7	2,5 ppb: 109 ± 14	5 ppb: 101 ± 11
	5 ppb: 94 ± 8	5 ppb: 103 ± 8	5 ppb: 105 ± 12	10 ppb: 100 ± 7
	50 ppb: 100 ± 3	25 ppb: 98 ± 5	25 ppb: 100 ± 5	50 ppb: 95 ± 3
AF G1	2,5 ppb: 97 ± 11	2,5 ppb: 95 ± 14	2,5 ppb: 96 ± 25	10 ppb: 88 ± 15
	5 ppb: 100 ± 4	5 ppb: 92 ± 12	5 ppb: 97 ± 12	20 ppb: 96 ± 6
	50 ppb: 106 ± 4	25 ppb: 98 ± 4	25 ppb: 104 ± 5	100 ppb: 89 ± 4
AF B2	1 ppb: 104 ± 10	1 ppb: 86 ± 13	1 ppb: 88 ± 20	2 ppb: 94 ± 14
	2 ppb: 104 ± 6	2 ppb: 97 ± 12	2 ppb: 90 ± 10	4 ppb: 94 ± 13
	50 ppb: 102 ± 2	10 ppb: 99 ± 4	10 ppb: 92 ± 10	20 ppb: 91 ± 7
AF B1	1 ppb: 81 ± 19	1 ppb: 79 ± 12	1 ppb: 92 ± 14	2,5 ppb: 92 ± 10
	2 ppb: 93 ± 6	2 ppb: 93 ± 4	2 ppb: 92 ± 6	5 ppb: 94 ± 5
	40 ppb: 100 ± 1	10 ppb: 101 ± 2	10 ppb: 92 ± 5	25 ppb: 88 ± 4
HT-2	5 ppb: 98 ± 10	5 ppb: 105 ± 28	5 ppb: 130 ± 31	10 ppb: 102 ± 12
	10 ppb: 87 ± 11	10 ppb: 99 ± 13	10 ppb: 106 ± 16	20 ppb: 98 ± 10
	200 ppb: 105 ± 3	50 ppb: 99 ± 12	50 ppb: 100 ± 10	100 ppb: 92 ± 4
FB1	*5 ppb: 58 ± 59*	10 ppb: 94 ± 17	10 ppb: 119 ± 6	20 ppb: 74 ± 15
	10 ppb: 65 ± 24	20 ppb: 106 ± 13	20 ppb: 79 ± 15	40 ppb: 82 ± 5
	20 ppb: 855 ± 11	50 ppb: 75 ± 14	100 ppb: 62 ± 4	200 ppb: 79 ± 1
T-2	5 ppb: 95 ± 13	5 ppb: 90 ± 14	5 ppb: 87 ± 19	5 ppb: 91 ± 20
	10 ppb: 105 ± 13	10 ppb: 94 ± 9	10 ppb: 103 ± 12	10 ppb: 101 ± 13
	200 ppb: 104 ± 2	50 ppb: 92 ± 5	50 ppb: 103 ± 4	50 ppb: 104 ± 7
ZEN	*5 ppb: 65 ± 111*	*5 ppb: 82 ± 44*	20 ppb: 106 ± 14	20 ppb: 86 ± 20
	10 ppb: 84 ± 21	10 ppb: 86 ± 15	40 ppb: 104 ± 10	40 ppb: 78 ± 20
	200 ppb: 99 ± 3	50 ppb: 102 ± 7	200 ppb: 98 ± 6	200 ppb: 100 ± 6
OTA	2,5 ppb: 98 ± 8	5 ppb: 110 ± 1	5 ppb: 107 ± 7	5 ppb: 74 ± 7
	5 ppb: 89 ± 11	10 ppb: 110 ± 3	10 ppb: 102 ± 5	10 ppb: 79 ± 11
	50 ppb: 110 ± 2	50 ppb: 95 ± 2	50 ppb: 92 ± 2	50 ppb: 89 ± 3
FB2	10 ppb: 65 ± 24	*5 ppb: 124 ± 38*	*10 ppb: 150 ± 9*	20 ppb: 79 ± 11
	20 ppb: 102 ± 2	20 ppb: 96 ± 10	20 ppb: 107 ± 11	40 ppb: 70 ± 10
	40 ppb: 111 ± 4	50 ppb: 119 ± 7	100 ppb: 81 ± 9	200 ppb: 70 ± 4
EnB	5 ppb: 103 ± 2	5 ppb: 96 ± 12	5 ppb: 86 ± 9	5 ppb: 70 ± 12
	10 ppb: 102 ± 2	10 ppb: 101 ± 14	10 ppb: 86 ± 7	10 ppb: 81 ± 6
	40 ppb: 105 ± 3	50 ppb: 114 ± 7	50 ppb: 88 ± 2	50 ppb: 108 ± 2
Bea	5 ppb: 108 ± 13	5 ppb: 100 ± 2	5 ppb: 106 ± 3	5 ppb: 88 ± 5
	10 ppb: 99 ± 3	10 ppb: 97 ± 3	10 ppb: 88 ± 5	10 ppb: 86 ± 5
	40 ppb: 101 ± 1	50 ppb: 98 ± 2	50 ppb: 93 ± 2	50 ppb: 87 ± 4

EnB1	5 ppb: 101 ± 4	5 ppb: 107 ± 10	5 ppb: 93 ± 18	5 ppb: 84 ± 5
	10 ppb: 100 ± 3	10 ppb: 99 ± 6	10 ppb: 79 ± 5	10 ppb: 85 ± 5
	40 ppb: 106 ± 3	50 ppb: 105 ± 5	50 ppb: 97 ± 2	50 ppb: 91 ± 2
EnA1	5 ppb: 106 ± 2	5 ppb: 96 ± 7	5 ppb: 84 ± 5	5 ppb: 96 ± 6
	10 ppb: 100 ± 2	10 ppb: 95 ± 4	10 ppb: 93 ± 3	10 ppb: 86 ± 4
	40 ppb: 103 ± 1	50 ppb: 99 ± 3	50 ppb: 98 ± 2	50 ppb: 90 ± 2
EnA	5 ppb: 100 ± 2	5 ppb: 94 ± 4	5 ppb: 106 ± 3	5 ppb: 93 ± 6
	10 ppb: 100 ± 3	10 ppb: 96 ± 4	10 ppb: 95 ± 4	10 ppb: 87 ± 4
	40 ppb: 105 ± 3	50 ppb: 99 ± 2	50 ppb: 97 ± 2	50 ppb: 88 ± 1
AF M1	10 ppb: 99 ± 9	10 ppb: 94 ± 9	10 ppb: 91 ± 6	20 ppb: 82 ± 13

Dalším důležitým validačním parametrem je selektivita stanovení. Selektivita je definována jako schopnost metody selektivně změřit validovanou vlastnost, tzn., že vliv potenciálních interferentů je nevýznamný. V hmotnostní spektrometrii je mírou selektivity hmotnostní spektrum, které je charakteristické pro každou látku. Selektivita detekce je splněna v případě, že poměr intenzity sledovaných iontů zůstává zachován u standardu i reálných vzorků. V případě LC-MS analýz dále pozorujeme matriční efekty (ME), což znamená ovlivnění signálu analytu přítomností matrice. V rámci validace byly ME sledovány v extraktech všech sledovaných matric. Pro deoxynivalenol, T-2 toxin, fumonisin B1, ochratoxin A a aflatoxin B1 byla navíc použita kvantifikace izotopovým ředěním. Porovnání matričních efektů s případnou korekcí pomocí izotopového ředění je uvedeno v tabulce č. 6.

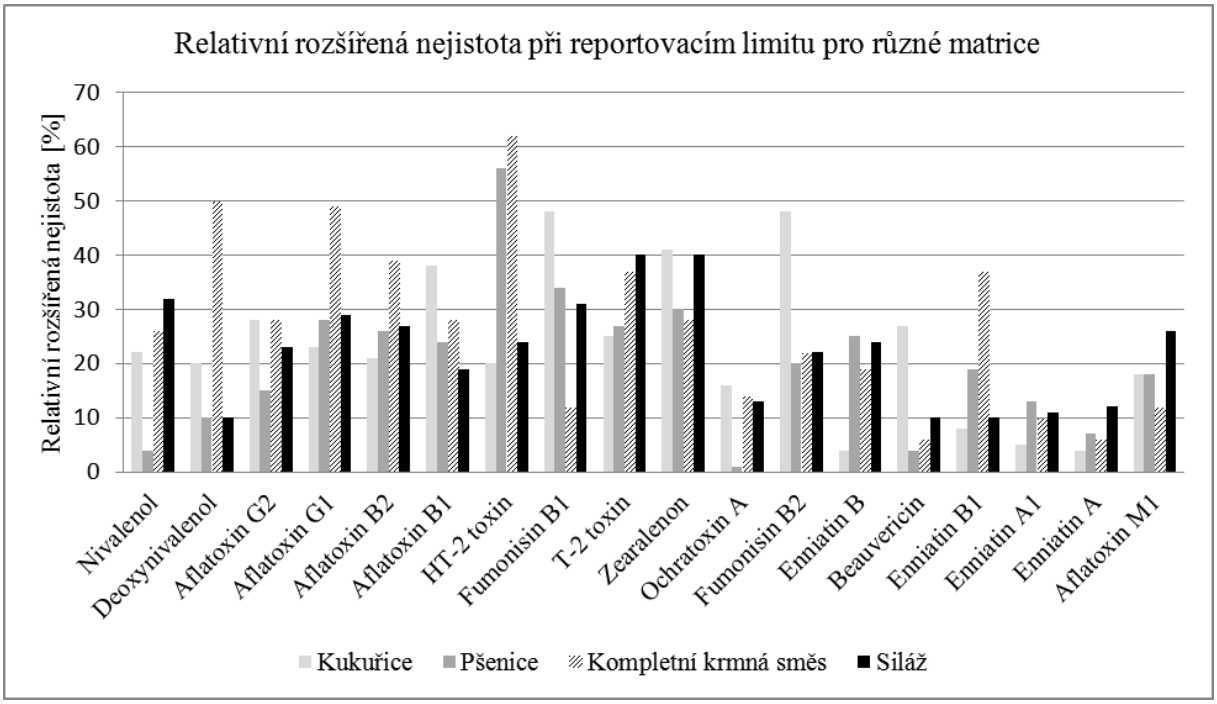
Tabulka č. 6. Porovnání matricových efektů v různých matricích při LC-MS/MS detekci.

ME (%) / Mykotoxin	Kukuřice	Pšenice	KKS	Siláž
Nivalenol	104	105	82	75
Deoxynivalenol	83	78	44	54
Deoxynivalenol ^{13}C	101	100	98	99
Aflatoxin G2	159	134	154	115
Aflatoxin G1	116	120	104	78
Aflatoxin B2	74	101	69	39
Aflatoxin B1	57	105	67	33
HT-2 toxin	95	88	82	83
Fumonisin B1	363	259	369	385
Fumonisin B1 ^{13}C	150	148	163	141
T-2 toxin	102	94	99	107
T-2 toxin ^{13}C	180	191	175	118
Zearalenon	96	93	111	109
Ochratoxin A	114	131	219	83
Ochratoxin A ^{13}C	104	100	109	98
Fumonisin B2	189	192	209	276
Enniatin B	127	147	95	144
Beauvericin	87	78	111	71
Enniatin B1	130	149	127	149
Enniatin A1	88	79	108	77
Aflatoxin M1	216	230	216	244

^{13}C… korekce ME izotopovým ředěním

Vzhledem k variabilitě pozorovaných ME je nutné pro správnou kvantifikaci použít metodou standardního přídavku, nebo metodu s využitím matricové kalibrace, popřípadě metodou izotopového ředění. Matricovou kalibraci lze použít za předpokladu, že je k dispozici stejná, nebo alespoň podobná matrice bez sledovaných analytů. Tato metoda je vhodná pro jednosložkové matrice (pšenice, kukuřice…) a koriguje pouze matriční efekty. Metoda standardního přídavku je vhodná pro složité matrice (kompletní krmná směs), ale i jednoduché matrice, pro které nelze nalézt matriční blank. V případě, že je vzorek obohacen před extrakcí, je získaný výsledek korigován jak na matriční efekty, tak na výtěžnost metody. V případě obohacení extraktu vzorku před nástřikem je výsledek korigován pouze na matriční efekty. Metoda izotopového ředění je opět vhodná pro složité matrice (kompletní krmná směs), pro které nelze nalézt matriční blank. Jedná se o nákladnější přístup umožňující korekci jak matricových efektů, tak výtěžnosti postupu. Výhodou oproti metodě standardního přídavku je eliminace přípravy a měření opakovaných/obohacených vzorků.

Stanovení nejistoty vychází z vícenásobného měření matrice obohacené na různých hladinách. Rozšířená nejistota odpovídá směrodatné odchylce stanovených dat vynásobené faktorem pokrytí 2 (obrázek 1). Požadavek na maximální rozšířenou nejistotu byl splněn u všech validovaných mykotoxinů. Výjimku představoval fumonisin B1, fumonisin B2 a zearalenon, které nesplňovaly daný požadavek pro nejnižší validovanou hladinu. Pro tyto analyty byly požadavky na maximální rozšířenou nejistotu splněny na nejbližší následující validované hladině.



Obrázek č. 1. Relativní rozšířená nejistota stanovená v různých matricích na hladině odpovídající reportovacímu limitu.

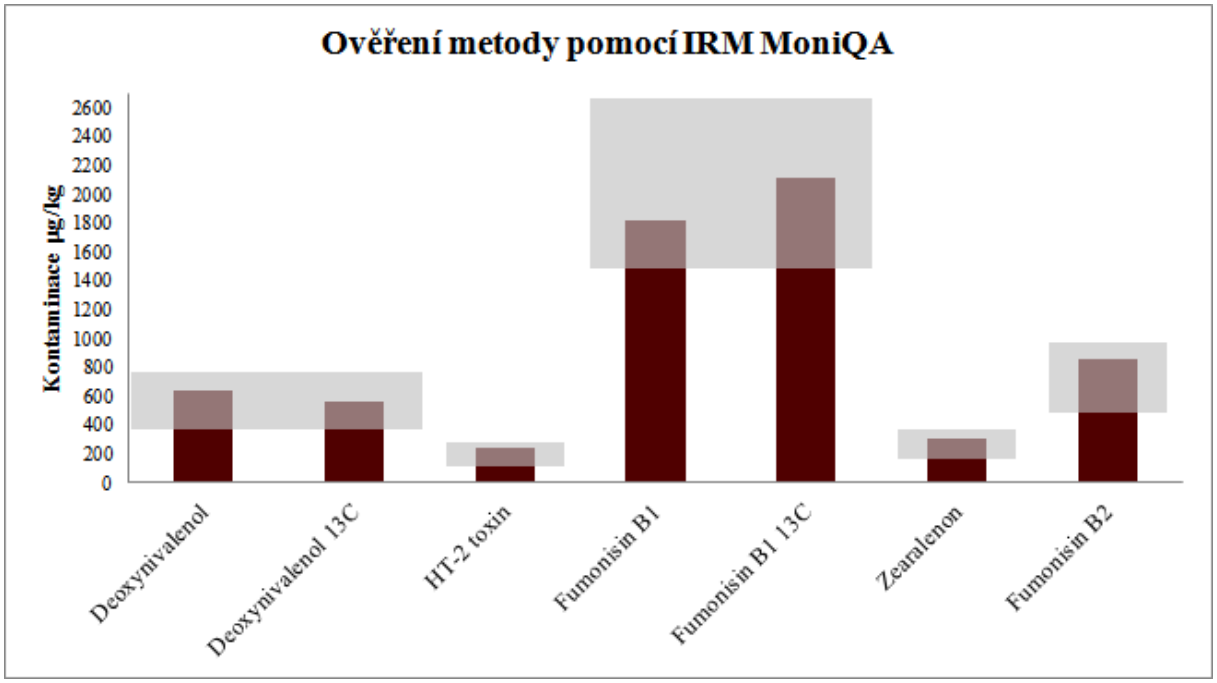
K identifikaci byla použita kritéria podle rozhodnutí komise ze dne 14. srpna 2002 [10], tj. retenční čas (RT) a poměr sledovaných kvantifikačních a konfirmačních iontů. Povolená odchylka RT pro LC je ± 2,5 %. Povolený rozsah poměrů sledovaných iontů je závislý na relativní intenzitě sledovaných iontů. Přítomnost sledované látky ve vzorku je potvrzena, pokud poměr intenzity sledovaných iontů stanovený ve vzorku odpovídá poměru stanoveného ve standardu. Identifikační kritéria validovaných mykotoxinů jsou uvedena v tabulce č. 7.

Tabulka č. 7. Identifikační kritéria.

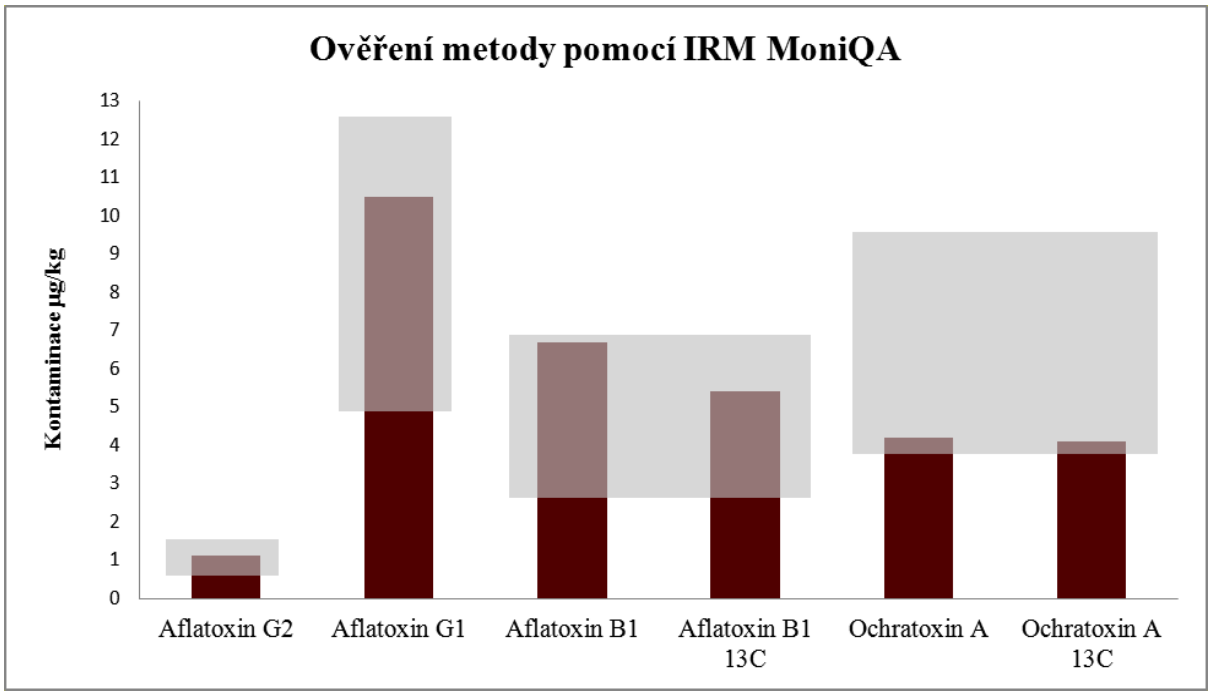
Mykotoxin	RT (min)	Poměr iontů
Nivalenol	0,85	1,04
Deoxynivalenol	1,11	0,47
Aflatoxin G2	2,07	0,74
Aflatoxin G1	2,21	1,56
Aflatoxin B2	2,33	0,94
Aflatoxin B1	2,46	1,62
HT-2 toxin	3,02	1,18
Fumonisin B1	3,17	0,81
T-2 toxin	3,30	1,44
Zearalenon	3,50	2,08
Ochratoxin A	3,55	8,30
Fumonisin B2	3,64	2,62
Enniatin B	4,35	1,87
Beauvericin	4,44	1,79
Enniatin B1	4,45	1,97
Enniatin A1	4,53	2,45

Správnost metody byla ověřena použitím IRM MoniQA (FOOD-CT-2006-036337). Jedná se o kukuřičnou matrici. Kvantifikace byla provedena metodou matricové kalibrace. Pro porovnání byla ke kvantifikaci zároveň použita metoda izotopového ředění. Tato metoda je vhodná pouze pro analyty, pro které je dostupný izotopově značený analog, a proto byly tímto způsobem kvantifikovány pouze některé analyty. Výsledky jsou graficky uvedeny na obrázcích 2 a 3. Interval spolehlivosti pro obsah daného mykotoxinu v příslušném IRM je v obrázcích vyznačen šedou barvou. Ve všech případech byly obsahy mykotoxinů stanovené

v tomto IRM vyhovující, a to nejen při běžné kvantifikaci, ale i s použitím izotopově značených standardů (v grafech značeno: 13C).



Obrázek č. 2. Ověření metody pomocí IRM MoniQA pro deoxynivalenol, HT-2 toxin, fumonisin B1, zearalenon a fumonisin B2.



Obrázek č. 3. Ověření metody pomocí IRM MoniQA pro aflatoxin G2, aflatoxin G1, aflatoxin B1, ochratoxin A.

4 Závěr

V rámci práce bylo validováno stanovení 17 mykotoxinů. Validované parametry splňovaly požadavky uvedené v rozhodnutí komise ze dne 14. srpna 2002 a v nařízení komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006. Metoda byla dále ověřena pomocí IRM. Vyvinutá metoda je vhodná pro účely multireziduálního stanovení vybraných mykotoxinů v krmivech a surovinách pro jejich výrobu. Metoda byla dále prezentována na mezinárodním workshopu zaměřeném na danou problematiku [12].

5 Literatura

1. EN 15791/2010 Animal feeding stuffs - Determination of Deoxynivalenol in animal feed - HPLC method with UV detection and immunoafinity columnclean-up.
2. EN 15792/2010 Animal feeding stuffs - Determination of Zearalenone in animal feed - HPLC method with fluorescence detection and immunoafinity column clean-up.
3. EN 16007 Animal feeding stuffs - Determination of Ochratoxin A in animal feed - HPLC method with fluorescence detection and immunoafinity column clean-up.
4. EN 16006 Animal feeding stuffs - Determination of Fumonisin B1 and B2 in compound animal feed with immunoaffinity column clean up and RP-HPLC with fluorescence detection after pre-or post column derivatisation.
5. 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. J AOAC Int, 2003, vol. 96, no. 2, p. 412 – 431.
6. Doporučení komise ze dne 17. srpna 2006 o přítomnosti deoxynivalenolu, zearalenonu, ochratoxinu A, T-2 a HT-2 a fumonisinů v produktech určených ke krmení zvířat. Text s významem pro EHP (2006/576/ES).
7. Směrnice evropského parlamentu a rady 2002/32/ES ze dne 7. května 2002 o nežádoucích látkách v krmivech. Úř. věst. L 140, 30.5.2002, s. 10.
8. Call for continuous collection of chemical contaminants occurrence data in food and feed [online]. Dostupné z: http://www.efsa.europa.eu/en/data/call/datex101217.htm. [15.11.2012].
9. JPP ÚKZÚZ: Zkoušení krmiv – postup 575
10. Rozhodnutí komise ze dne 14. srpna 2002, kterým se provádí směrnice Rady 96/23/ES, pokud jde o provádění analytických metod a interpretaci výsledků (oznámeno pod číslem K(2002) 3044). Text s významem pro EHP (2002/657/ES).
11. Nařízení komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006, kterým se stanoví metody odběru vzorků a metody analýzy pro úřední kontrolu množství mykotoxinů v potravinách.
12. Bolechová, M., Kosubová, P., Pospíchalová, M. Multi mycotoxin analysis of feed by UPLC-MS/MS. Mycotoxin workshop 2012, 14 – 16. Braunschweig, Německo. str. 43.

Stanovení PCB a OCP v rostlinách

Pavla Tieffová, Barbora Foltová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
pavla.tieffova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Flexibilní zkoušku č. 330 pro stanovení PCB a OCP metodou GC-MS bylo potřeba rozšířit o další matrici - rostlinný materiál. Postup přípravy vzorků rostlin pro stanovení indikátorových kongenerů PCB (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) a 11 základních analytů skupiny OCP (HCB, α, β, γ, δ – HCH, o,p´/p,p´izomery DDE/DDD/DDT) byl optimalizován tak, aby bylo dosaženo meze stanovitelnosti 0,5 µg/kg sušiny vzorku.

2 Úvod

V roce 2010 vznesl Odbor bezpečnosti krmiv a půdy ÚKZÚZ Brno požadavek sledovat přítomnost reziduí PCB a OCP ve vzorcích rostlin pěstovaných v půdě kontaminované těmito persistentními látkami. V laboratoři byl odzkoušen postup přípravy rostlinných vzorků k analýze včetně úpravy vzorku lyofilizací. Extrakt z takto připraveného vzorku byl vyčištěn a analyzován podle modifikovaného postupu akreditované zkoušky č. 330. Optimalizovaným postupem byl stanoven obsah PCB a OCP u 15 zkušebních vzorků brambor, kořenové zeleniny a obilovin. Tento postup byl validován a v roce 2011 akreditován jako nová zkouška č. 330 C. Postup přípravy lyofilizovaného vzorku rostlin byl přidán do souhrných pracovních instrukcí SPI 330 modulární metody stanovení PCB/OCP.

3 Materiál a metody

Změna metody se týkala přípravy vzorku a čištění extraktu. Postup měření, vyhodnocení a zpracování dat je shodný s postupem zkoušek 330 A, B. Pro rostlinný materiál byly vybrány tři reprezentativní matrice: lupina (vysoký obsah chlorofylu, vody, nízký obsah tuku), mrkev (vysoký obsah vody, karotenoidů) a řepkové semínko (vysoký obsah tuku a koextraktů, nízký

obsah vody). Vhodný referenční materiál není dostupný, proto k optimalizaci a validaci postupu bylo použito stanovení přídavku známého množství standardu k testované matrici na různých koncentračních hladinách.

3.1 Chemikálie

Veškeré použité chemikálie jsou uvedeny v souhrnných pracovních instrukcích (SPI) 330 a odkazy na ně odpovídají kapitolám tohoto postupu.

3.2 Přístroje a laboratorní vybavení

1. Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem GC-MS/MS Trace Ultra/ITQ 1100; software Xcalibur, (Thermo Electron Corporation).
2. Kapilární kolona DB XLB 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, (J&W Scientific).
3. Lyofilizátor ALPHA1-2, (Christ).
4. Extraktor ASE 100, (Dionex).
5. Rotační vakuová odparka.

3.3 Úprava vzorku lyofilizací

Předupravený vzorek se navrství na lyofilizační misku, miska se vzorkem se zváží, zabalí se do mikrotenové folie a zamrazí se (T < –18 °C). Lyofilizační zařízení se připraví a spustí dle návodu. Vloží se misky se zamraženým vzorkem a spustí se proces lyofilizace. Vyhříváním poliček pro uložení vzorků a kontrolou aktuální teploty ve vzorku a tlaku ve vymražovaném prostoru se udržují optimální podmínky blízké průběhu sublimační křivky. Proces lyofilizace je ukončen, když teplota uvnitř vzorku, snímaná po celou dobu teplotní sondou, dosáhne teploty vyhřívané poličky (T ~ 20 °C).

Miska s vysušeným vzorkem se opět zváží a z rozdílu hmotnosti vzorku před a po sušení se zjistí ztráta vody lyofilizací. Lyofilizovaný vzorek se dále homogenizuje postupem vhodným pro suché vzorky. Pro potřebu přepočtu na původní hmotnost vzorku se gravimetricky stanoví obsah sušiny lyofilizovaného (analytického) vzorku.

3.4 Extrakce PCB/OCP z rostlinného materiálu

Postup je optimalizován pro stanovení 7 kongenerů PCB a 11 základních OCP v suchém rostlinném materiálu (obsah vody ≤ 10 %) a v tukových semenech.

Na dno extrakční cely (ASE, 34 ml) se vloží filtr, nasype se 9 g směsi aktivovaných sorbentů (5 g síranu sodného, 2 g silikagelu a 2 g florisilu) a homogenní směs ze 2 g vzorku, 2 g florisilu, 2 g síranu sodného a 20 ng vnitřního standardu. Objem cely se doplní pískem, přidá se 0,5 g křemeliny, cela se uzavře a vloží do přístroje. Nastaví se příslušný extrakční program a spustí se proces. Po skončené extrakci se vloží promývací cela a přístroj se 2 × propláchne 5 ml čistého rozpouštědla.

Program: T = 40 °C; Time (static/purge) = 600/20 s, Flush (proplach dusíkem) = 150 %, 2 cykly, eluce 15% DCM v hexanu (SPI 330, 5.2.2 C).

Extrakt se podle potřeby dočistí na krátké kolonce s kyselým silikagelem (SPI 330, 5.3.4). Vyčištěný extrakt v isooktanu se převede do 2ml kónické vialky, přidá se 20 ng nástřikového standardu a objem se upraví odfoukáním pod proudem dusíku na 200 µl. Vialka se uzavře šroubovacím víčkem s teflonovým septem a vzorek je připraven k nástřiku do GC-MS.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Optimalizace lyofilizace

Vzorky byly lyofilizovány ve stolním zařízení ALPHA. Ve spodní části přístroje je vymrazovací prostor. Na chlazených spirálách při teplotě asi –55 °C dochází za sníženého tlaku ke kondenzaci a vymrazování vodních par. V horní části kryté polykarbonátovým zvonem je nosič s pěti vyhřívatelnými poličkami, na které se umístí misky se vzorky. Vzorek ve zmrazeném stavu se předem nahrubo rozmixuje, nasype se a přitlačí do misek ve vrstvě 10 mm až 15 mm silné. Do vrstvy vzorku se vsune teplotní sonda, miska se vzorkem se překryje fólií a nechá se opět zamrazit. Do přístroje připraveného podle pokynů v návodu se umístí misky se zamrazenými vzorky, připojí se teplotní sonda, přístroj se uzavře a spustí se proces vymrazování.

Přednastavené programy pro proces lyofilizace se příliš neosvědčily. Lepší způsob je manuálně nastavit požadovanou teplotu na poličkách se vzorky a podle aktuálního stavu ji měnit. Cílem je vést proces sublimace vody ze zmrzlého vzorku při hodnotách teploty **T** a tlaku **p** blížících se průběhu sublimační křivky, tedy dostatečně zahřívat poličky a přivádět

tak tepelnou energii do vzorku. Vzorky s vysokým obsahem vody a cukrů při nedostatečném zamrazení mohou v první fázi pěnit, protože při počátečním poklesu tlaku se prudce odpařuje voda a teplota ve vzorku se dostane nad kritickou hodnotu určenou sublimační křivkou. Vhodné počáteční nastavení teploty poličky se vzorky je $\mathbf{T}_{shelf}$ = 0 °C a nastavení limitního tlaku v lyofilizátoru $\mathbf{p}_{off}$ = 611 Pa (trojný bod). Jakmile teplota uvnitř vzorku (snímaná sondou) začne výrazně klesat ($\mathbf{T}_{sample} \leq -10$ °C), lze postupně zvyšovat vakuum (snížením pojistného tlaku pro otvírání ventilu až na $\mathbf{p}_{off}$ = 1 Pa) a zvyšovat teplotu $\mathbf{T}_{shelf} \geq 30$ °C. Po několika hodinách teplota ve vzorku začne stoupat a proces sušení lze ukončit, když $\mathbf{T}_{sample} \div \mathbf{T}_{shelf.}$. Pokud je uvnitř sušené hmoty stále voda, $\mathbf{T}_{sample}$ je výrazně nižší než nastavená $\mathbf{T}_{shelf}$ a při předčasném ukončení procesu by vzorek zavlhnul.

Průběh lyofilizace byl testován na vzorcích trávy, zeleného osení, kořenové zeleniny, brambor, červené řepy, papriky a bobulového ovoce. Delší dobu sušení vyžadují vzorky s vysokým obsahem cukru (řepa, paprika) a celé bobule rybízu, ostatní vzorky byly při optimálním nastavení průběhu procesu vysušeny za (12 – 15) h.

4.2 Optimalizace extrakce a čištění extraktu vzorku

Pro extrakci vzorku lyofilizovaných rostlin bylo použito účinné extrakční zařízení ASE. Extrakční cela (34 ml) naplněná směsí sorbentů a vzorku byla extrahována 15% dichlormetanem v hexanu. Cílem optimalizace bylo najít takový poměr sorbentů, navážky vzorku a extrakčních podmínek, aby získaný extrakt byl co nejčistší a výtěžnost extrakce byla pro všechny stanovované analyty dostačující, (80 – 120)% výtěžnost. Postup byl ověřován pro různé typy matrice vzorku. Matrice s obsahem vody nad 10 % byly lyofilizovány (vojtěška, lupina, jílek, brambory, kořen mrkve), vzorky tukových semen (mák, řepkové semínko) a obiloviny (oves, pšenice) byly homogenizovány a analyzovány bez dosoušení. Sorbenty použité do extrakční cely byly vhodné pro reziduální analýzu a aktivovány při předepsané teplotě (viz SPI 330). Jako optimální byla zvolena kombinace sorbentů silikagel 100, florisil a vyžíhaný bezvodý síranu sodný. Byly ověřovány extrakční teploty (40; 60; 100) °C. Zvyšování extrakční teploty nemělo průkazný vliv na zvýšení výtěžnosti stanovovaných analytů, proto byla zvolena extrakční teplota 40 °C, při které se vymývá menší množství rušivých koextraktů. Zkoncentrovaný extrakt z ASE je vhodné dočistit ještě na sloupci s koncentrovanou kyselinou sírovou (SPI 330, 5.3.4).

4.3 Použité referenční materiály

Vhodný referenční materiál nebyl k dispozici, k optimalizaci postupu byly použity obohacené vzorky testovaných plodin. Navržený postup přípravy byl ověřen analýzou vzorků tří reprezentativních typů rostlinného materiálu, obohacených přídavkem standardu s obsahem stanovovaných analytů na hladině 0,5 ppb, 10 ppb a 100 ppb, vztaženo na sušinu stanovovaného vzorku. Na každé koncentrační hladině byly připraveny a vyextrahovány tři různé vzorky příslušné matrice a každý z nich byl stanoven ve dvou opakováních měření na GC-MS. Výsledky byly statisticky zpracovány programem Effi Validation 3.0.

Pro každou zkoušenou matrici byl analyzován slepý vzorek a bylo ověřeno, že daný materiál naobsahuje významné nálezy stanovovaných analytů. Hodnoty slepých vzorků nebyly úplně nulové pro všechny matrice a analyty, a proto byly výsledky u nejnižších hladin přídavků (0,5 ppb a 10 ppb) korigovány na příspěvek příslušného slepého vzorku.

Jako vhodný materiál pro validaci byla vybrána lupina (vysoký obsah chlorofylu, nízký obsah tuku; lyofilizován byl směsný vzorek z celých rostlin, včetně květenství a semen), mrkev (vysoký obsah vody, karotenoidů; lyofilizován vzorek konzumně zralé mrkve) a řepkové semínko (vysoký obsah tuku, nízký obsah vody; analyzován pomletý vzorek bez sušení).

4.4 Validační parametry

Validace byla provedena pro 18 analytů persistentních látek ze skupiny PCB/OCP (indikátorové kongenery PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153 a 180, HCB, α, β, γ,δ izomery HCH a *o,p´/p,p´*polohové izomery DDT a jeho metabolitů DDE a DDD). Z validovaných vlastností byla ověřována opakovatelnost, střední přesnost, správnost, mez detekce a mez stanovitelnosti, rozšířená nejistota, linearita a slepý pokus. Vše bylo doloženo výpočtem a potvrzeno výstupem z programu Effi Validation 3.0. Byla sepsána podrobná validační zpráva a doložen validační protokol.

5 Závěr

Postup přípravy vzorků rostlinného materiálu s obsahem vody nad 10 % pro stanovení PCB/OCP byl optimalizován, validován a přidán do modulárních postupů ke zkoušce č. 330. Rozšíření této flexibilní zkoušky o další matrici vzorků bylo úspěšně obhájeno při dozorové akreditační návštěvě ČIA v roce 2011.

Od roku 2010 bylo do programu bazálního monitoringu zemědělských půd ÚKZÚZ zařazeno sledování 15 vzorků rostlin, pěstovaných na kontaminovaných lokalitách, sledovaných v rámci tohoto monitoringu. V nadzemních částech rostlin rezidua PCB/OCP nalezena nebyla, ale ve vzorcích kořenové zeleniny a hlíz brambor byly nálezy nad mezí stanovitelnosti.

6 Literatura

1. Souhrnné pracovní instrukce ke zkoušce č. 330, SPI 330 - Stanovení obsahu PCB a OCP metodou GC-MS, ÚKZÚZ NRL-RO Brno, revize 2012.
2. Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ; Analýza rostlinného materiálu, postup 4.2 a 4.3, 2005.
3. Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ; Úprava vzorků krmiv a rostlinného materiálu, 2008.
4. Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ; Zkoušení krmiv, postup 580 a 590, 2009.
5. Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ; Analýza půd II, postup 4.3 a 4.4, 2011.

Stanovení reziduí pesticidů v rostlinách (vinná réva)

Petra Kosubová, Pavla Tieffová, Barbora Foltová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
petra.kosubova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Uplatněním flexibility zkoušky 336 byl v laboratoři NRL-RO Brno zaveden postup pro stanovení 31 vybraných pesticidních látek povolených pro aplikaci do vinné révy. Tento postup byl použit (i) pro analýzy vzorků, které byly odebrány z ekologicky hospodařících podniků za účelem úřední kontroly prováděné Odborem bezpečnosti krmiv a půdy a (ii) pro analýzy srovnávacích kontrolních vzorků odebraných z konvenčních zkušebních vinohradů za účelem sledování výskytu a dynamiky odbourávání reziduí pesticidů v konvenční zemědělské produkci.

2 Teoretická část

2.1 Úvod

Multireziduální stanovení pesticidů bylo v NRL ÚKZÚZ primárně zavedeno pro účely kontroly nezávadnosti krmiv a surovin pro jejich výrobu. Od roku 2007 je toto stanovení akreditováno s flexibilním rozsahem typu 3, tzn. s možností rozšíření záběru zkoušky o nové analyty a také matrice (1). V roce 2011 byla uplatněna flexibilita zkoušky, čímž došlo k rozšíření rozsahu o možnost analýzy fungicidních látek určených pro aplikaci na vinnou révu. Ošetření vinohradů fungicidy je nezbytné pro zachování konvenční produkce vína, avšak není povoleno u ekologického pěstování vína. Sledování těchto látek v listech vinné révy bylo zvoleno jako možný ukazatel při kontrolách dodržování zásad ekologického vinohradnictví. Pravidla ekologického zemědělství (EZ) obecně jsou v ČR upravena Nařízením Rady č. 834/2007 a Komise č. 889/2008 a českého národního zákona č. 242/2000.

Úřední kontroly EZ provádí ÚKZÚZ společně s pověřenými kontrolními subjekty podle Nařízení Rady č. 822/2004 o úředních kontrolách (2).

Multireziduální stanovení pesticidů je založeno na normované metodě QuEChERS, která zahrnuje extrakci do acetonitrilu, pufrování, separaci vodné fáze, případné přečištění extraktu pomocí disperzní SPE a stanovení obsahu pesticidů plynovou (GC) nebo ultra účinnou kapalinovou chromatografií (UPLC) ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) (3). Ze seznamu pesticidních látek povolených pro aplikaci na vinnou révu (viz tab. 1) bylo pro první etapu kontrol vybráno 31 účinných látek, z toho 28 vhodných pro UPLC-MS/MS stanovení a tři látky (captan, folpet a iprodione) stanovitelné pomocí GC-MS/MS (viz tab. 2). Cílem práce bylo zavést postup pro stanovení vybraných pesticidů v listech a hroznech vinné révy a analyzovat vzorky odebrané z ekologicky hospodařících vinařských podniků a analyzovat srovnávací kontrolní vzorky.

Tabulka 1. Seznam přípravků a účinných látek povolených pro aplikaci do vinné révy.

Účinná látka	Přípravek
Azoxystrobin	Prokvadris Max, Quadris, Quadris Max, Universalis
Benalaxyl-M	Fantic F
Captan	Captan 50 WP, MAKE UP, Merpan (50 WP; 80 WG)
Cu: Hydroxid měďnatý	Funguran-OH 50 WP, Champion 50 WP, Kocide 2000
Cu: Oxichlorid mědi	Aliette Bordeaux, Cuprocaffaro, Cuprocaffaro Micro, Flowbrix, Kuprikol (50 až 57, 250 Sc), Ridomil Gold Plus 42.5 WP
Cu: Síran měďnatý zásaditý	Cuproxat SC, KeMiChem-Cu-Flo
Cyazofamid	Mildicut
Cymoxanil	Curzate Gold, Curzate M, Tanos 50 WG
Dimethomorph	Acrobat MZ,
Dinocap	Karathane LC
Diquat-dibromid	Agri Diquat - 200 SL, Euro-Chem Quat 200, KeMiChem-Diquat 200 SL, QLONE, RC-Diquat 200 SL, Reglone, REGO, Regular
Famoxadone	Tanos 50 WG
Fenamidone	Verita
Fenhexamid	Teldor 500 SC
Fluopicolide	Profiler
Flusilazole	Punch 10 EW
Folpet	Fantic F, Folpan, Melody Combi, Pergado F, Prokvadris Max, Quadris Max, Ridomil Gold (Combi Pepite, MZ 68 WP, MZ Pepite, MZ WP), Universalis
Fosetyl-Al	Aliette Bordeaux, Profiler, Verita
Glufosinate-ammonium	Basta 15
Glyphosate	Agroglyfosat, Boom Efekt, Dominator, Glyfo Klasik, Glyfogan, Glyfos, Glyfosol, Max-Glyphosat-I 480 SL, MON, Prototal, Torinka, Total, Touchdown Quattro
Glyphosate-IPA	Acomac, Agroklasik, B52, Clinic, Euro-Chem Glyfo 360-1, Glyfogan 480 SL, Kaput Harvest, Roundup
Glyphosate-potassium	Roundup Rapid
Iprodione	Rovral Aquaflo
Iprovalicarb	Melody Combi (43,5 WP; 65.3 WG)
Kresoxim-methyl	Discus, Kresox (50 WG)
Mancozeb	Acrobat MZ, Curzate Gold, Curzate M, Dithane DG Neotec, Dithane M45, Electis, NOVOZIR MN 80 NEW
Mandipropamid	Pergado F
MCPA	Agritox, Aminex, Dicopur, KeMiChem-MCPA, U46M fluid
Meptyldinocap	Karathane New
Metalaxyl-M	Ridomil Gold (Combi Pepite, MZ 68 WP, MZ Pepite, MZ WP, Plus 42.5 WP)
Metiram	Cabrio Top, Polyram WG
Metrafenone	Vivando
Oxid siřičitý	Solfobenton DC
Oxyfluorfen	Galigan 240 EC, Goal 2E, KeMiChem-oxyfluorfen 240 EC
Penconazole	KeMiChem-Penconazol 100 EC, Topas 100 EC
Pendimethalin	Stomp, KeMiChem-pendimetalin 400 SC
Proquinazid	Talendo
Pyraclostrobin	Cabrio Top
Pyrimethanil	Minos. Mythos 30 SC, Pyrus 400 SC
Quinoxyfen	IQ-Crystal
Quizalofop-P-ethyl	Gramin, Targa Super 5 EC
Síra	Kumulus WG, Sulikol (750 SC; K)
Spiroxamine	Falcon 460 EC
Tebuconazole	Falcon 460 EC
Tetraconazole	Domark 10 EC, Emerald 10 EC
Thiram	Thiram Granuflo
Triadimenol	Falcon 460 EC
Trifloxystrobin	Flint, Flint 50 WG, Zato 50 WG, KeMiChem-Trifloxystrobin 50 WG
Zoxamide	Electis

3 Praktická část

3.1 Materiál a metody

Seznam použitých chemikálií a činidel je uveden v JPP ÚKZÚZ: Zkoušení krmiv – postup 610 (4). Čistota a vhodnost použitých chemikálií a činidel byla zkontrolována analýzou laboratorních slepých pokusů. Příprava vzorků k analýze a koncové stanovení jsou popsány v JPP ÚKZÚZ: Zkoušení krmiv – postup 610 (4). Seznam sledovaných pesticidů je uveden v tabulce 2. Podmínky měření jsou uvedeny v tabulkách 3 až 6.

Tabulka 2. Seznam sledovaných pesticidů ve vinné révě.

Pesticidy	Způsob přípravy	Měřicí technika
Captan, Folpet, Iprodione	QuEChERS-acetonitrilový extrakt vymražen a přečištěn DSPE s PSA a GCB	GC-MS/MS
Azoxystrobin, Cyazofamid, Cymoxanil, Dimethomorph, Dinocap, Fenamidone, Fenhexamid, Fluopicolide, Flusilazole, Iprovalicarb, Kresoxim-methyl, Mandipropamid, MCPA, Metalaxyl-M, Metrafenone, Penconazole, Pendimethalin, Proquinazid, Pyraclostrobin, Pyrimethanil, Quinoxyfen, Spiroxamine, Tebuconazole, Tetraconazole, Thiram, Triadimenol, Trifloxystrobin, Zoxamide	QuEChERS-acetonitrilový extrakt vymražen, naředěn deionizovanou vodou a přefiltrován (filtr 0,2 μm)	UPLC-MS/MS

Tabulka 3. Chromatografické podmínky UPLC stanovení.

UPLC – Acquity Waters	
Kolona	ACQUITY UPLC BEH C18 (50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm)
Předkolona	ACQUITY UPLC BEH C18 (5 mm × 2,1 mm × 1,7 μm)
Nástřik	2 μl s přeplněním smyčky
Slabý promývací roztok	Deionizovaná voda/methanol (90/10)
Silný promývací roztok	Methanol
Mobilní fáze A	0,1% kyselina octová v deionizované vodě
Mobilní fáze B	0,1% kyselina octová v methanolu
Průtok mobilní fáze	0,6 ml/min
Gradient mobilní fáze	0 min (10%B) – 4 min (100%B) – 7 min (100%B) – 7,1 min (10%B) – 10 min (10%B)

Tabulka 4. Chromatografické podmínky GC stanovení.

GC – CP3800 Varian	
Kolona	DB-XLB (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm)
Nástřik	2 μl (0 min – split 50 – 0,2 min – splitless – 2,2 min – split 50 – 5 min – split 10)
Nosný plyn, průtok	Helium, 1,3 ml/min
Teplotní program pece	60 °C (2,2 min) – 30 °C/min – 220 °C – 4 °C/min – 260 °C – 20 °C/min – 280 °C (15 min)
Teplota program nástřiku	40 °C (0,2 min) – 200 °C/min – 280 °C (0,8 min) – 200 °C/min – 350 °C (2 min) – 200 °C/min – 280 °C (25 min)

Tabulka 5. Podmínky stanovení pro Xevo TQ MS Waters.

Pesticid	RT (min)	Prekursor ion 1	Produkt ion 1	CV,CE (V)	Prekursor ion 2	Produkt ion 2	CV,CE (V)
Azoxystrobin	2,65	404	372	20,15	404	329	20,35
Cyazofamid	2,98	325	108	17,20	327	108	17,20
Cymoxanil	1,41	199	128	14,8	199	111	14,18
Dimethomorph	2,75	388	165	30,40	388	301	30,20
Dinocap	3,84	295	209	45,32	295	193	45,35
Fenamidone	2,70	312	92	20,25	312	236	20,16
Fenhexamid	2,92	302	97	32,22	302	55	32,38
Fluopicolide	2,77	383	145	30,40	383	173	30,20
Flusilazole	3,04	316	165	27,28	316	247	27,18
Iprovalicarb	2,86	321	119	19,18	321	203	19,10
Kresoxim-methyl	3,08	314	116	15,12	314	267	15,7
Mandipropamid	2,76	412	328	16,16	412	356	16,10
MCPA	2,42	199	141	18,17	201	143	18,18
Metalaxyl-M	2,41	280	220	15,13	280	192	15,17
Metrafenone	3,26	409	227	19,16	409	209	19,14
Penconazole	3,12	284	159	25,34	284	70	24,16
Pendimethalin	3.60	282	212	12,10	282	194	12,17
Proquinazid	3,74	373	289	25,23	373	331	25,15
Pyraclostrobin	3,21	388	163	20,25	388	194	20,12
Pyrimethanil	2,45	200	107	42,24	200	82	42,24
Quinoxyfen	3,58	308	162	52,44	308	197	52,32
Spiroxamine	2,72	298	100	27,32	298	144	27,20
Tebuconazole	3,13	308	70	31,22	308	125	31,40
Tetraconazole	2,96	372	159	32,30	372	70	32,20
Thiram	1,85	241	120	20,15	241	88	20,10
Triadimenol	2,88	296	70	12,10	296	99	12,15
Trifloxystrobin	3,36	409	145	25,40	409	186	25,16
Zoxamide	3,16	336	159	27,38	336	187	27,25
Teplota iontového zdroje 150 °C; teplota desolvatačního plynu 450 °C; průtok desolvatačního plynu 700 l/h; průtok „cone gas“ 45 l/h; průtok kolizního plynu 0,18 ml/min; napětí na kapiláře 3 kV; ionizace elektrosprejem se střídáním polarit.							

Tabulka 6. Podmínky stanovení pro MS1200 Varian.

Pesticid	RT (min)	Prekursor ion 1	Produkt ion 1	CE (V)	Prekursor ion 2	Produkt ion 2	CE (V)
Captan	11,86	149	70	15	149	105	10
Folpet	11,99	260	130	15	260	102	30
Iprodione	16,71	314	245	10	314	271	10
Teplota transferline 280 °C; teplota iont. zdroje 200 °C; elektronová ionizace při 70 eV.							

Tabulka 7. Seznam vzorků.

Typy a počty vzorků	Listy	Hrozny
Vinohrady ekologicky hospodařících podniků	22	10
Pozitivní kontrola (konvenční vinohrad, ZS ÚKZÚZ, Oblekovice)	7	1
Negativní kontrola (neošetřované odlehlé vinohrady)	3	1

3.2 Výsledky a diskuse

3.2.1 Validace vybraných pesticidů

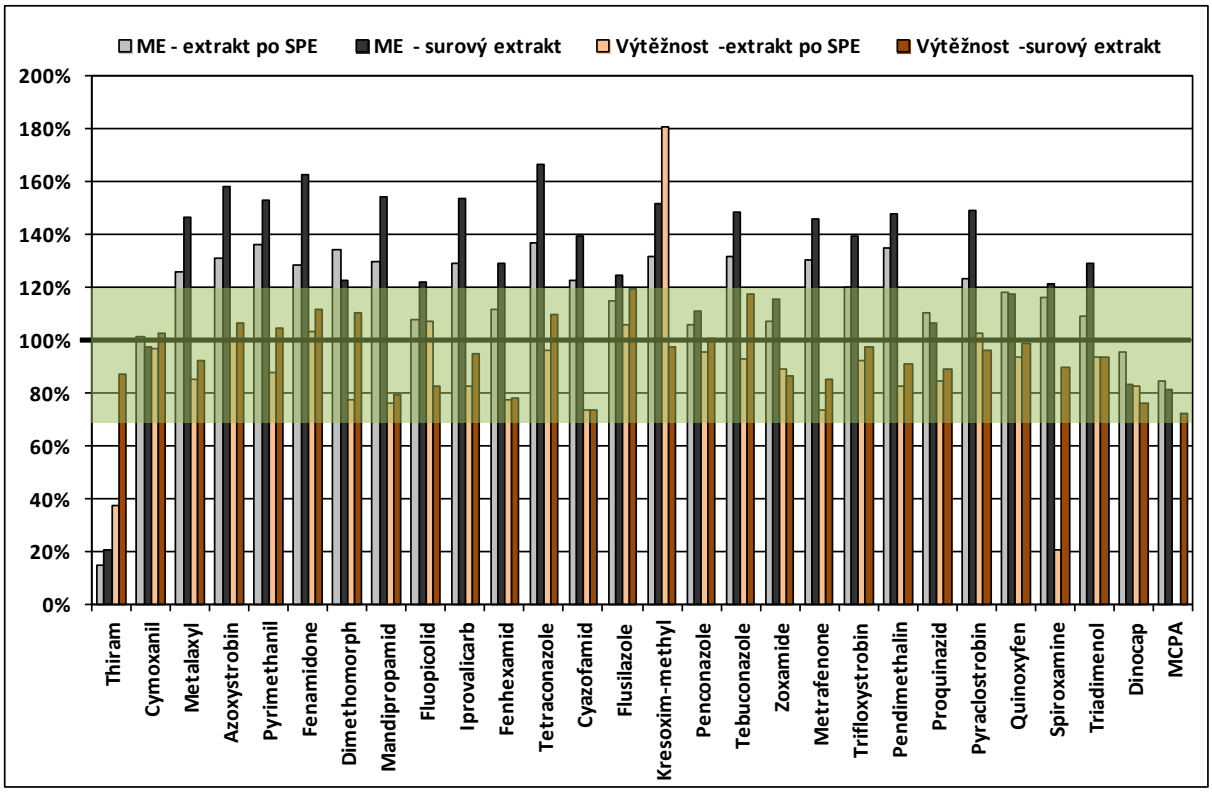
Stanovení vybraných 31 pesticidních látek v listech a hroznech vinné révy bylo validováno analýzou obohacených vzorků (negativní kontrola – viz tab. 7) podle požadavků uvedených v dokumentu SANCO/10684/2009 (5). V rámci validace byla ověřena správnost, přesnost, selektivita a rozšířená nejistota stanovení. Obohacení bylo provedeno v 5 až 6 opakováních na 2 hladinách u listů a 1 hladině u hroznů, konkrétně na 0,010 mg/kg (reportovací limit = RL) a na 0,100 mg/kg (10 × RL). Přičemž RL se dle SANCO/10684/2009 označuje úroveň odpovídající nejnižší validované hladině. Takto je dle výše uvedeného dokumentu definována mez stanovitelnosti, tj. úroveň, nad kterou lze věrohodně provést kvantitativní stanovení. Obsah pesticidů byl kvantifikován s využitím matricové kalibrace. V rámci validace bylo ověřeno použití vnitřního standardu (D10-diazinon) pro indikaci nestandardního chování vzorku při přípravě či koncovém stanovení.

U všech 31 pesticidních látek byla splněna validační kritéria pro správnost (výtěžnost) a přesnost (opakovatelnost) dle SANCO/10684/2009, tj. výtěžnost byla v rozmezí

(70 – 120) % a opakovatelnost ≤ 20 % na vybraných hladinách v listech vinné révy. V této matrici představoval výjimku pouze thiram, který vykazoval na hladině 0,010 mg/kg opakovatelnost větší než 20 %. Požadavek na opakovatelnost u thiramu byl splněn na 10 krát vyšší hladině, tj. RL pro thiram byl stanoven 0,100 mg/kg. Tato látka je velice náchylná k rozkladu, podobně jako ostatní látky ze skupiny dithiokarbamátů, které se stanovují společně po převedení na sirouhlík. Toto stanovení je předmětem samostatné zkoušky. V případě validace vybraných pesticidů v hroznech byla u 4 látek stanovena výtěžnost nižší než 70 %, tzn. v případě nálezu captanu, dinocapu, iprodionu nebo thiramu ve vzorku hroznů je nutná korekce jejich obsahu na výtěžnost.

Tabulka 8. Výtěžnost a správnost stanovená pomocí obohacených vzorků vinné révy a hroznů.

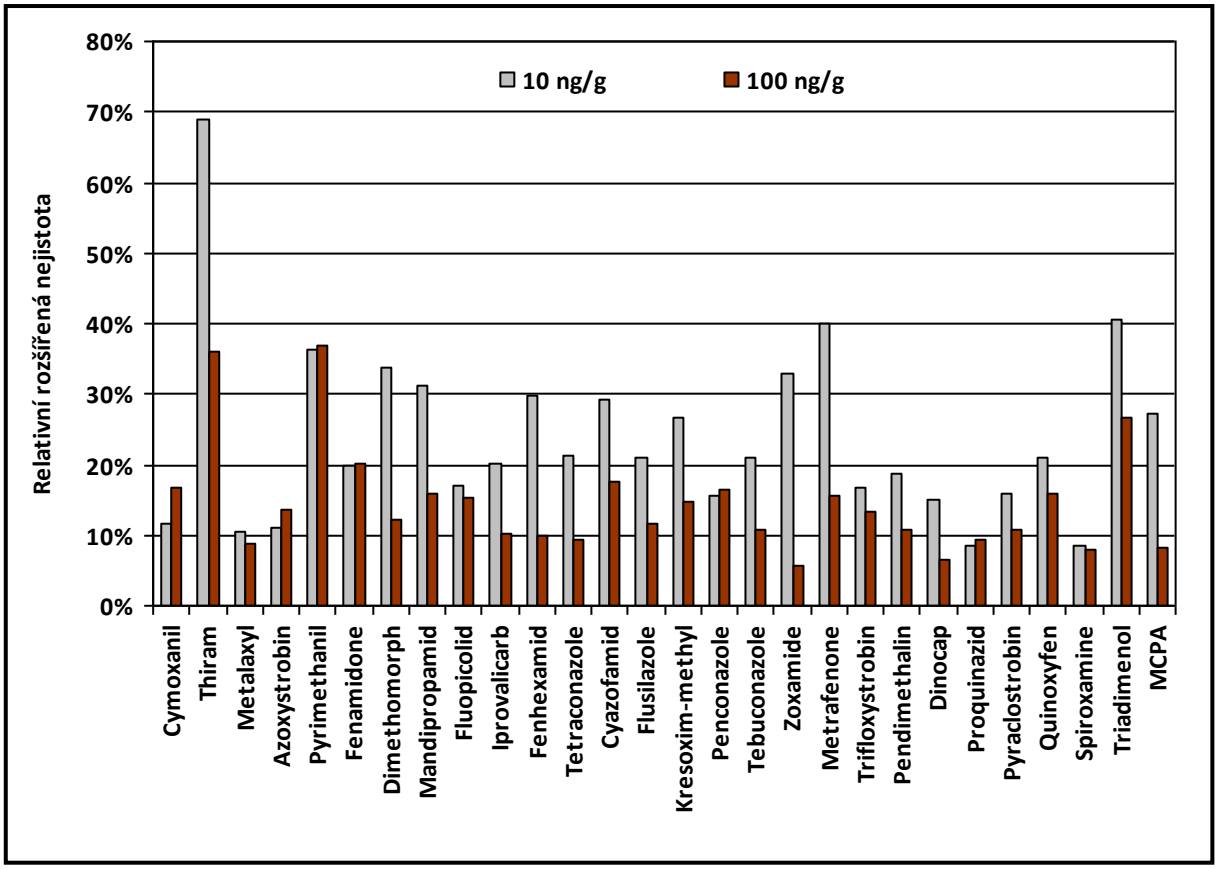
Vzorek / Pesticid	Výtěžnost ± RSD (%)		
	Listy (0,010 ppm)	Listy (0,100 ppm)	Hrozny (0,010 ppm)
Azoxystrobin	112,2 ± 5,6	111,6 ± 6,8	80,0 ± 13,0
Captan	108,0 ± 6,1	111,4 ± 8,9	60,3 ± 1,1
Cyazofamid	89,6 ± 14,6	119,9 ± 8,8	97,8 ± 12,3
Cymoxanil	94,5 ± 5,8	89,2 ± 8,4	82,2 ± 3,6
Dimethomorph	105,8 ± 16,9	113,1 ± 6,1	87,8 ± 13,4
Dinocap	80,3 ± 7,5	91,8 ± 3,3	63,6 ± 14,5
Fenamidone	99,2 ± 10,0	96,0 ± 10,1	99,8 ± 9,6
Fenhexamid	114,6 ± 14,9	110,3 ± 5,0	91,0 ± 12,2
Fluopicolide	120,0 ± 8,5	108,8 ± 7,7	96,8 ± 15,6
Flusilazole	97,7 ± 10,5	100,0 ± 5,8	90,2 ± 15,3
Folpet	113,6 ± 5,3	99,5 ± 4,4	97,7 ± 9,4
Iprodione	99,9 ± 7,3	102,2 ± 5,0	57,0 ± 12,5
Iprovalicarb	110,0 ± 10,0	109,9 ± 5,1	96,0 ± 17,5
Kresoxim-methyl	110,3 ± 13,4	120,0 ± 7,3	102,1 ± 16,1
Mandipropamid	119,8 ± 15,6	118,3 ± 8,0	90,2 ± 11,7
MCPA	103,3 ± 13,7	119,4 ± 4,2	117,0 ± 7,4
Metalaxyl	111,6 ± 5,3	107,2 ± 4,5	95,0 ± 8,0
Metrafenone	106,5 ± 20,0	116,4 ± 7,9	104,0 ± 14,1
Penconazole	96,2 ± 7,9	100,7 ± 8,2	86,7 ± 7,9
Pendimethalin	100,7 ± 9,3	103,2 ± 5,4	91,2 ± 9,7
Proquinazid	88,8 ± 4,3	90,5 ± 4,6	98,5 ± 5,1
Pyraclostrobin	117,1 ± 8,0	111,7 ± 5,4	90,8 ± 7,8
Pyrimethanil	79,6 ± 18,2	82,9 ± 18,4	84,8 ± 8,3
Quinoxyfen	92,8 ± 10,5	89,5 ± 8,0	102,5 ± 4,0
Spiroxamine	92,9 ± 4,3	104,8 ± 4,0	101,2 ± 7,1
Tebuconazole	95,7 ± 10,5	92,4 ± 5,3	98,0 ± 8,1
Tetraconazole	86,4 ± 10,6	99,2 ± 4,6	92,5 ± 7,4
Thiram	82,9 ± 34,5	90,9 ± 18,1	15,2 ± 6,5
Triadimenol	88,1 ± 20,0	107,9 ± 13,4	101,7 ± 18,6
Trifloxystrobin	112,4 ± 8,3	112,1 ± 6,6	109,2 ± 12,9
Zoxamide	115,2 ± 16,4	117,5 ± 2,9	108,2 ± 14,9



Obrázek 1. Porovnání matricových efektů a výtěžností v různě připravených extraktech listů révy vinné při LC-MS/MS detekci.

Dalším z důležitých validačních parametrů je selektivita stanovení. Selektivita je definována jako schopnost metody selektivně změřit validovanou vlastnost, tzn., že vliv potenciálních interferentů je nevýznamný. V (tandemové) hmotnostní spektrometrii je mírou selektivity (produktové) hmotnostní spektrum, které je charakteristické pro každou látku. Selektivita detekce je splněna v případě, že poměr intenzity sledovaných iontů zůstává zachován u standardu i reálných vzorků. V případě GC-MS a LC-MS analýz dále pozorujeme matricové efekty (ME), což znamená ovlivnění signálu analytu přítomností matrice. V rámci validace byly ME sledovány v obou typech extraktů, tj. v čištěných extraktech pro GC-MS/MS stanovení a v surových vymražených extraktech. Obecně byly při LC-MS/MS detekci pozorovány nižší ME v čištěných extraktech v porovnání s ME stanovených v surových extraktech. Avšak vzhledem k nízkým výtěžnostem, případně úplné ztrátě některých pesticidních látek (MCPA a spiroxamine) způsobených DSPE čištěním, byla pro LC-MS/MS stanovení zvolena analýza surových extraktů. V případě GC-MS/MS analýzy bylo nutné při přípravě vzorků použít DSPE čištění pomocí aktivního uhlí ke snížení obsahu chlorofylu v extraktu.

Rozšířená nejistota odpovídá směrodatné odchylce dat stanovených pro hodnocení přesnosti vynásobené faktorem pokrytí 2. Stanovené nejistoty vycházejí z vícenásobných měření obohacených vzorků listů a hroznů na různých hladinách. Požadavek na maximální rozšířenou nejistotu 50 % stanovený v dokumentu SANCO/10684/2009 byl v případě analýzy nečištěných vymražených extraktů splněn u všech validovaných pesticidních látek s výjimkou thiramu na hladině 0,010 mg/kg (69 %).



Obrázek 2. Relativní rozšířená nejistota stanovená v listech révy vinné.

K identifikaci byla použita konfirmační kritéria podle SANCO/10684/2009, tj. relativní retenční čas (RRT) a poměr sledovaných kvantifikačních a konfirmačních iontů. Povolená odchylka RRT pro GC stanovení je ± 0,5 % a pro LC ± 2,5 %. Povolený rozsah poměrů sledovaných iontů je závislý na relativní intenzitě sledovaných iontů. Přítomnost sledované látky ve vzorku je potvrzena, pokud poměr intenzity sledovaných iontů stanovený ve vzorku odpovídá poměru, který byl stanoven ve standardu. Identifikační ukazatele validovaných pesticidních látek jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9. Identifikační parametry.

Pesticid	RT (min)	Poměr iontů	Pesticid	RT (min)	Poměr iontů
Azoxystrobin	2,65	5,11	Pendimethalin	3,60	0,13
Cyazofamid	2,98	0,30	Proquinazid	3,74	1,26
Cymoxanil	1,41	0,53	Pyraclostrobin	3,21	0,63
Dimethomorph	2,75	0,42	Pyrimethanil	2,45	0,64
Dinocap	3,84	1,92	Quinoxyfen	3,58	1,53
Fenamidone	2,70	0,97	Spiroxamine	2,72	2,19
Fenhexamid	2,92	0,20	Tebuconazole	3,13	0,12
Fluopicolide	2,77	0,29	Tetraconazole	2,96	0,36
Flusilazole	3,04	0,99	Thiram	1,85	1,68
Iprovalicarb	2,86	0,45	Triadimenol	2,88	0,13
Kresoxim-methyl	3,08	0,34	Trifloxystrobin	3,36	0,73
Mandipropamid	2,76	0,40	Zoxamide	3,17	0,49
MCPA	2,42	0,27	Captan	11,86	0,64
Metalaxyl	2,41	0,39	Folpet	11,99	0,39
Metrafenone	3,26	0,64	Iprodione	16,71	0,58
Penconazole	3,12	1,31	–	–	–

3.2.2 Kontrolní vzorky

Negativní kontrolní vzorky, které byly odebrány z neošetřovaných odlehlých vinohradů, byly určeny validaci stanovení vybraných pesticidů v zájmových materiálech a pro kontrolu celého procesu přípravy a zpracování vzorku v laboratoři. Pozitivní kontrolní vzorky byly připraveny ve spolupráci s kolegy ze zkušební stanice ÚKZÚZ v Oblekovicích. Sloužily ke zmapování výskytu pesticidů ve vinné révě z konvenční produkce. Tyto kontroly byly odebrány

z testovací vinice Finsko ve stejném časovém intervalu, ve kterém probíhaly odběry z ekologicky hospodařících podniků. Laboratoř dále dostala informace o průběhu ošetření vinice Finsko přípravky pro ochranu rostlin (viz tab. 10).

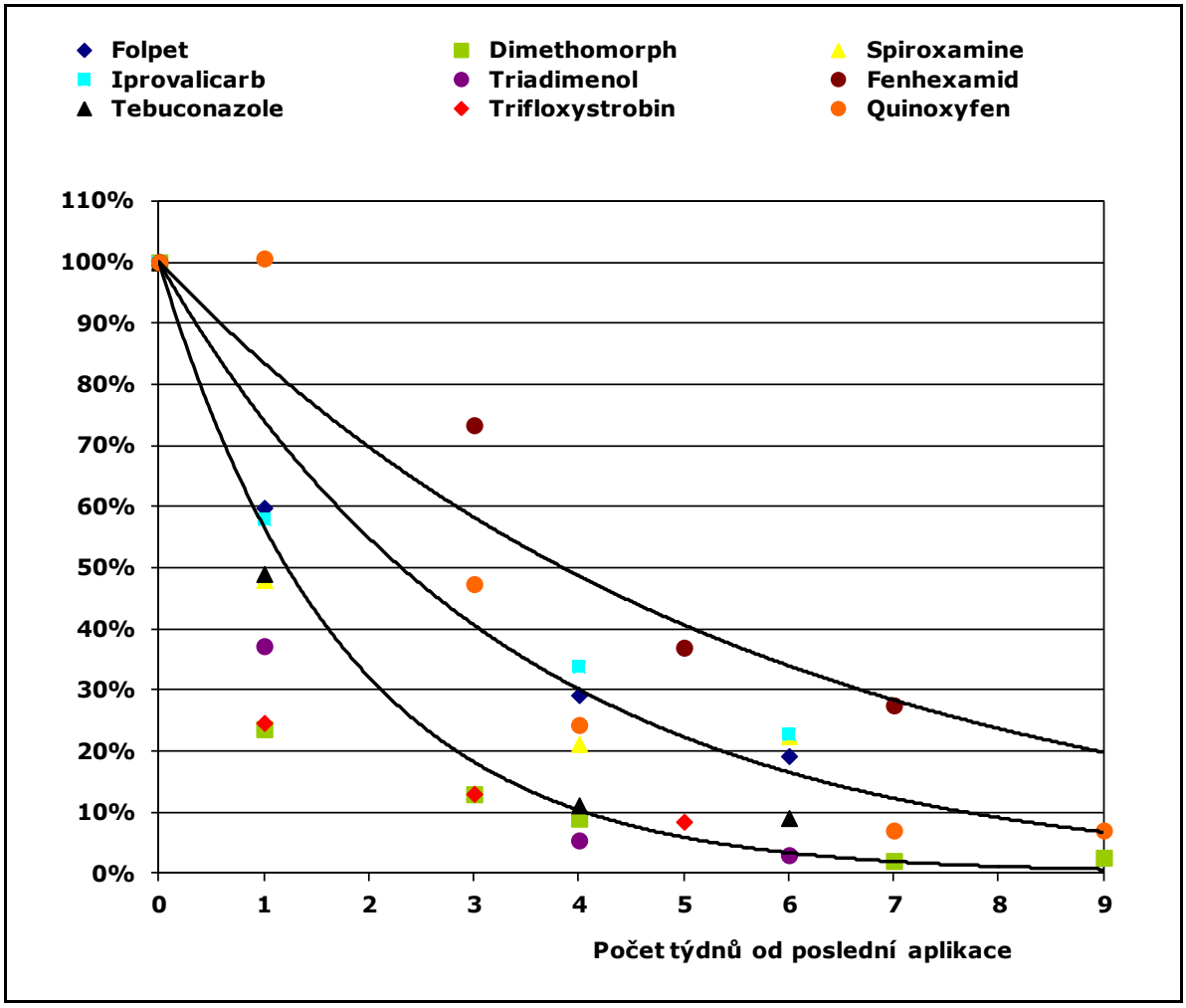
Obsahy pesticidních látek stanovené ve vzorcích pozitivních kontrol se pohybovaly od 0,011 mg/kg do 122 mg/kg. Nejvyšší obsahy byly stanoveny u folpetu (viz tab. 11). Obsahy pesticidů odpovídaly typům postřiků a době aplikace, které byly uvedeny v dodaném plánu ošetření. Dále byla sledována dynamika aplikovaných pesticidů na listech po ukončení aplikace. Nejpomaleji se odbourával fenhexamid, konkrétně asi 50 % za 4 týdny. Během stejného časového intervalu byl naopak nejrychlejší pokles obsahu, až na přibližně 10 % původní hodnoty, pozorován u trifloxystrobinu, dimethomorphu, triadimenolu a tebuconazolu (viz obr. 3).

Tabulka 10. Ošetření vinice Finsko v roce 2011 ve Zkušební stanici ÚKZÚZ v Oblekovicích.

Datum aplikace	Přípravek	Účinné látky
24.5.	Vivando	metrafenone
24.5.	Folpan 80 WG	folpet
3.6.	Falcon 460 EC	spiroxamine, tebuconazole, triadimenol
3.6.	Ridomil Gold MZ Pepite	mancozeb, metalaxyl-M
17.6.	Acrobat MZ	mancozeb, dimethomorph
17.6.	Zato 50 WG	trifloxystrobin
28.6.	Falcon 460 EC	spiroxamine, tebuconazole, triadimenol
1.7.	IQ-Crystal	quinoxyfen
1.7.	Melody Combi 65,3 WG	iprovalicarb, folpet
13.7.	Acrobat MZ	mancozeb, dimethomorph
13.7.	Zato 50 WG	trifloxystrobin
13.7.	Aliette Bordeaux	fosetyl - Al, oxichlorid mědi
21.7.	Teldor 500 SC	fenhexamid
21.7.	Melody Combi 65,3 WG	iprovalicarb, folpet
21.7.	Falcon 460 EC	spiroxamine, tebuconazole, triadimenol
5.8.	Teldor 500 SC	fenhexamid
5.8.	Aliette Bordeaux	fosetyl - Al, oxichlorid mědi
5.8.	Zato 50 WG	trifloxystrobin

Tabulka 11. Výsledky analýzy listů révy vinné odebraných z vinice Finsko v Oblekovicích.

Pozitivní kontrola (ppm, odběr 2011)	14.7.	21.7.	4.8.	12.8.	1.9.	15.9.	11.10.
Folpet	32,1	50,2	122,3	73,2	35,7	23,5	20,6
Dimethomorph	8,3	1,7	0,96	0,63	0,15	0,19	0,24
Spiroxamine	0,48	0,20	0,87	0,42	0,19	0,20	0,21
Iprovalicarb	3,4	5,5	13,0	7,4	4,3	2,9	3,3
Triadimenol	0,14	0,048	0,49	0,16	0,025	0,014	0,033
Fenhexamid	< 0,01	< 0,01	24,6	52,8	40,0	20,2	14,7
Tebuconazole	0,98	0,47	2,6	1,2	0,30	0,24	0,22
Metrafenone	0,069	< 0,01	0,011	0,053	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Trifloxystrobin	4,0	0,86	0,42	2,1	0,29	0,18	0,21
Quinoxyfen	0,10	0,097	0,044	0,022	< 0,01	< 0,01	< 0,01



Obrázek 3. Pokles obsahu pesticidů v listech pozitivních kontrol po ukončení aplikace.

3.2.3 Vzorky z ekologických vinohradů

Přítomnost pesticidů byla prokázána u 19 vzorků listů z celkového počtu 20 vzorků odebraných u ekologicky hospodařících podniků v období, kdy u konvenčních vinohradů dochází k nejintenzivnějšímu ošetřování. Obsahy reziduí pesticidů byly stanoveny v rozmezí (0,011 – 9,76) mg/kg. V 11 vzorcích byly nalezeny obsahy vyšší než 0,01 mg/kg (RL) u 2 nebo více reziduí. Vedle nejčastěji se vyskytujícího folpetu se ve vzorcích listů vinné révy nacházelo dalších 13 pesticidů (azoxystrobin, dimethomorph, dinocap, fluopicolide, iprovalicarb, mandipropamid, metrafenone, proquinazid, pyrimethanil, quinoxyfen, spiroxamine, tebuconazole, triadimenol). Obsahy reziduí v hroznech vzorkovaných v období sklizně překročily hodnotu RL pouze ve 2 vzorcích pro folpet a pyrimethanil z celkového počtu 10 odebraných vzorků. Nálezy reziduí pesticidů v hroznech byly v porovnání s nálezy v listech jak z hlediska obsahu, tak četnosti nálezu výrazně nižší. Avšak pro účely úřední

kontroly EZ by mělo být rozhodujícím ukazatelem pro kontrolu dodržení zásad EZ, tj. v tomto případě dodržení daného produkčního postupu bez použití nepovolených přípravků pro ochranu rostlin, stanovení pesticidů v listech vinné révy vzorkovaných v období ošetřování konvenční produkce.

Tabulka 12. Výsledky analýz pesticidů v listech vinné révy a hroznech z ekoprodukce

Pesticid	Listy		Hrozny	
	Počet vzorků s nálezem pesticidu	Ekologické, max. obsah (ppm)	Počet vzorků s nálezem pesticidu	Ekologické, max. obsah (ppm)
Azoxystrobin	1/20	0,077	0/10	< 0,010
Captan	0/20	< 0,010	0/10	< 0,010
Cyazofamid	0/20	< 0,010	0/10	< 0,010
Cymoxanil	0/20	< 0,010	0/10	< 0,010
Dimethomorph	2/20	0,041	0/10	< 0,010
Dinocap	1/20	0,025	0/10	< 0,010
Fenamidone	0/20	< 0,010	0/10	< 0,010
Fenhexamid	0/20	< 0,010	0/10	< 0,010
Fluopicolide	4/20	0,255	0/10	< 0,010
Flusilazole	0/20	< 0,010	0/10	< 0,010
Folpet	19/20	9,76	1/10	0,020
Iprodione	0/20	< 0,010	0/10	< 0,010
Iprovalicarb	8/20	1,89	0/10	< 0,010
Kresoxim-methyl	0/20	< 0,010	0/10	< 0,010
Mandipropamid	2/20	1,45	0/10	< 0,010
MCPA	0/20	< 0,010	0/10	< 0,010
Metalaxyl	0/20	< 0,010	0/10	< 0,010
Metrafenone	3/20	0,101	0/10	< 0,010
Penconazole	0/20	< 0,010	0/10	< 0,010
Pendimethalin	0/20	< 0,010	0/10	< 0,010
Proquinazid	1/20	0,023	0/10	< 0,010
Pyraclostrobin	0/20	< 0,010	0/10	< 0,010
Pyrimethanil	3/20	0,063	2/10	0,041
Quinoxyfen	3/20	0,354	0/10	< 0,010
Spiroxamine	8/20	0,185	0/10	< 0,010
Tebuconazole	2/20	0,207	0/10	< 0,010
Tetraconazole	0/20	< 0,010	0/10	< 0,010
Thiram	0/20	< 0,100	0/10	< 0,100
Triadimenol	1/20	0,047	0/10	< 0,010
Trifloxystrobin	0/20	< 0,010	0/10	< 0,010
Zoxamide	0/20	< 0,010	0/10	< 0,010

4 Závěr

V rámci práce bylo validováno stanovení 31 pesticidních látek povolených pro aplikaci do vinné révy dle požadavků specifikovaných v dokumentu SANCO/10684/2009. S využitím této metody bylo analyzováno 44 vzorků listů a hroznů pro účely úřední kontroly ekologicky hospodařících podniků. Na základě získaných dat ÚKZÚZ předložil Ministerstvu zemědělství podněty a doporučení pro metodiku úředních kontrol EZ. Získaná data byla dále prezentována na dvou mezinárodních workshopech zaměřených na problematiku pesticidů (6,7).

5 Literatura

1. Příručka kvality NRL, ÚKZÚZ, 2012.
2. Dvorký J. a Urban J. Základy ekologického zemědělství, podle Nařízení Rady (ES) č.834/2007 a Nařízení Komise (ES) č.889/2008 s příklady, ÚKZÚZ, 2011.
3. ČSN EN 15662 – Potraviny rostlinného původu – Stanovení reziduí pesticidů s použitím GC-MS a/nebo LC-MS/MS po extrakci acetonitrilem/separaci a předčištění pomocí disperzní SPE – Metoda QuEChERS.
4. JPP ÚKZÚZ: Zkoušení krmiv – postup 610.
5. SANCO/10684/2009 – Method validation and quality control procedures for pesticide residue analysis in food and feed.
6. Petra Kosubová, Pavla Tieffová, Martin Prudil, Jiří Urban, Markéta Pospíchalová: Pesticide Residue Analysis in Vine Leaves – Official Control of Organic Viticulture in the Czech Republic, RAFA 2011, 1.11.-.4.11.2011, Praha.
7. Petra Kosubová, Pavla Tieffová, Martin Prudil, Jiří Urban, Markéta Pospíchalová: Official Control of Organic Viticulture in the Czech Republic: Pesticide Residues Analysis in Vine Leaves and Grapes, EPRW 2012, 25.6.-28.6.2012, Vídeň, Rakousko.

Bulletin Národní referenční laboratoře XVII 2013/2

Ročník:	XVII, č. 2
Vydal:	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2013
Odpovědný redaktor:	Ing. Iva Strížová
Počet stran:	44

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196