CH 5.8.
MULTIREZIDUÁLNE STANOVENIE REZÍDUÍ PESTICÍDOV METÓDOU GC A UPLC

1 PRINCÍP METÓDY

GC

Extrahované rezíduá kontaminantov pomocou nepolárneho rozpúšťadla sú prečisťované na gélovej permeačnej kolóne. Následne sú prevedené do nepolárneho rozpúšťadla a analyzované na dvojdimenzionálnom plynovom chromatografe s nízkorozlišovacím detektorom LECO PEGASUS IV GCxGC/TOF. Kvantifikácia je prevedená metódou externej kalibrácie.

UPLC

Zhomogenizovaná vzorka sa extrahuje metanolom, extrahované rezíduá sú prečisťované solid phase extrakciou (SPE). Eluát je odfúkaný do sucha a rezíduá rozpustené v zmesi metanol – voda. Na analýzu sa použije chromatografická kolóna s obrátenými fázami a po rozdelení rezíduí sa tieto detegujú hmotnostným detektorom pracujúcim v režime MS/MS v pozitívnom móde. Ionizácia ESI. Identifikácia látky je prevedená dvoma tranzíciami (2 transitions) a kontrolou ich iónových pomerov (ion ratio). Kvantifikácia je prevedená metódou externej kalibrácie.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

GC

Metóda je vhodná na stanovenie rezíduí pesticídov v matriciach rastlinného a živočíšneho pôvodu.

UPLC

Metóda je vhodná na stanovenie rezíduí pesticídov v matriciach rastlinného a živočíšneho pôvodu.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 aldicarb 99,9 % – (A)
3.1.2 aldicarb sulfone 99,7 % – (AS)
3.1.3 aldicarb sulfoxide 96,3 % – (ASx)
3.1.4 methomyl 99,9 % – (Me)
3.1.5 imidacloprid 99,9 % – (Im)
3.1.6 carbofuran 99,9 % – (Ca)
3.1.7 pirimicarb 99 % – (Pi)
3.1.8 metanol LiChrosolv gradient grade
3.1.9 dichlormethane for liquid chromatography
3.1.10 octan amónny extra pure
3.1.11 chlorid sodný p.a.
3.1.12 redestilovaná voda

3.1.13 quintozen 95,9% – (QT)
3.1.14 chlorbenzilat 98,7% – (CHB)
3.1.15 methidathion 96,0% – (MD)
3.1.16 chlorfenvinphos 97,2% - (CHF)
3.1.17 pyrazophos 99,8% – (PY)
3.1.18 deltametrhrin 99,8% – (DM)
3.1.19 bifenthrin 99,5% – (BF)
3.1.20 tecnazene 99,7% – (TC)
3.1.21 profenofos 98,4% – (PF)
3.1.22 cyklohexán p.a.
3.1.23 etylacetát p.a.
3.1.24 nonán p.a.
3.1.25 izooktán
3.1.26 petroléter
3.1.27 acetón p.a.
3.1.28 hydromatrix

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 20 % chlorid sodný

Navážiť 20 g chloridu sodného (3.1.11) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť vo vode a doplniť do 100 ml redestilovanou vodou. (3.1.12)

3.2.2 1 M octan amónny

Navážiť 7,708 g octanu amónneho (3.1.10) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť vo vode a doplniť do 100 ml redestilovanou vodou. (3.1.12.)

3.2.3 0,005 M octan amónny

Zobrať 5 ml 1 M octanu amónneho (3.2.2.) a doplniť do 1 l redestilovanou vodou. (3.1.12.)

3.2.4 petroléter:acetón(3.1.27) (9:1 v/v) – extrakčná zmes pre ASE-200 DIONEX [do odmerného valca pridať 900ml petroléteru (3.1.26)a 100ml acetónu(3.1.27)].

3.2.5 cyklohexán:etylacetát (1:1) – mobilná fáza [do odmerného valca pridať 500 ml cyklohexánu (3.1.22)a 500 ml etylacetátu(3.1.23)]

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobné roztoky štandardov

3.3.1.1 Zásobný roztok štandardu aldicarbu (100 mg/l v metanole)

Navážiť 10 mg aldicarbu (3.1.1) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (1.1.8).

3.3.1.2 Zásobný roztok štandardu aldicarb sulfone (100 mg/l v metanole)

Navážiť 10 mg aldicarbu sulfone (3.1.2) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (1.1.8).

3.3.1.3 Zásobný roztok štandardu aldicarb sulfoxidu (100 mg/l v metanole)

Navážiť 10,4 mg aldicarbu (3.1.3) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (1.1.8).

3.3.1.4 Zásobný roztok štandardu methomylu (100 mg/l v metanole)

Navážiť 10 mg methomylu (3.1.4) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (1.1.8).

3.3.1.5 Zásobný roztok štandardu imidaclopridu (100 mg/l v metanole)

Navážiť 10 mg imidaclopridu (3.1.5) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (1.1.8).

3.3.1.6 Zásobný roztok štandardu carbofuranu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10 mg carbofuranu (3.1.6) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (1.1.8).
3.3.1.7 Zásobný roztok štandardu pirimicarbu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10 mg pirimicarbu (3.1.7) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (1.1.8).
3.3.1.8 Zásobný roztok štandardu quintozenu (1000 mg/l v izooktáne)
Navážiť 10,4mg quintozenu (3.1.13) do 10 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve izooktánu a doplniť po značku izooktánom (3.3.25).
3.3.1.9 Zásobný roztok štandardu chlorbenzilatu (1000 mg/l v izooktáne)
Navážiť 10,1mg chlorbenzilatu (3.1.14) do 10 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve izooktánu a doplniť po značku izooktánom (3.3.25).
3.3.1.10 Zásobný roztok štandardu methidathion (1000 mg/l v izooktáne)
Navážiť 10,4mg methidathionu (3.1.15) do 10 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve izooktánu a doplniť po značku izooktánom (3.3.25).
3.3.1.11 Zásobný roztok štandardu chlorfenvinphosu (1000 mg/l v izooktáne)
Navážiť 10,3mg chlorfenvinphosu (3.1.16) do 10 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve izooktánu a doplniť po značku izooktánom (3.3.25).
3.3.1.12 Zásobný roztok štandardu pyrazophosu (1000 mg/l v izooktáne)
Navážiť 10mg pyrazophosu (3.1.17) do 10 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve izooktánu a doplniť po značku izooktánom (3.3.25).
3.3.1.13 Zásobný roztok štandardu deltametrhrinu (1000 mg/l v izooktáne)
Navážiť 10mg deltametrhrinu (3.1.18) do 10 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve izooktánu a doplniť po značku izooktánom (3.3.25).
3.3.1.14 Zásobný roztok štandardu bifenthrinu (1000 mg/l v izooktáne)
Navážiť 10mg bifenthrinu (3.1.19) do 10 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve izooktánu a doplniť po značku izooktánom (3.3.25).
3.3.1.15 Zásobný roztok štandardu tecnazene (1000 mg/l v izooktáne)
Navážiť 10mg tecnazene (3.1.20) do 10 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve izooktánu a doplniť po značku izooktánom (3.3.25).
3.3.1.16 Zásobný roztok štandardu profenofos (1000 mg/l v izooktáne)
Navážiť 10,2mg profenofosu (3.1.21) do 10 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve izooktánu a doplniť po značku izooktánom (3.3.25).

3.3.2 Základné roztoky štandardov

3.3.2.1 Základný zmesný roztok štandardov (A, AS, ASx, Me, Pi) 1 mg/l vo vode **MFC1**
Zobrať 1 ml zásobných roztokov štandardov (A, AS, ASx, Me, Pi) 100 mg/l. Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku redestilovanou vodou. (1.1.12)
3.3.2.2 Základný roztok štandardu (Im) 1 mg/l vo vode **MFC2**
Zobrať 1 ml zásobného roztoku štandardu (Im) 100 mg/l. Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku redestilovanou vodou. (1.1.12)
3.3.2.3 Základný roztok štandardu (Ca) 1 mg/l vo vode **MFC3**
Zobrať 1 ml zásobného roztoku štandardu (Im) 100 mg/l. Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku redestilovanou vodou. (1.1.12)
3.3.2.4 Základný zmesný roztok štandardov (QT,CHB, MD, CHF,PY,DM,BF,TC,PF) 10 mg/l v izooktáne **ZRP**
Zobrať 100µl zásobných roztokov štandardov (QT,CHB, MD, CHF,PY,DM,BF,TC,PF) 1000 mg/l. Preniesť do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku izooktánom. (3.3.25)

3.3.3 Pracovné roztoky štandardov

3.3.3.1 Zmesný roztok štandardov (A, AS, ASx, Im, Me, Ca, Pi) 10 µg/l vo vode **WS**
Zobrať 1 ml zo základných roztokov štandardov A, AS, ASx, Me, Pi (1 mg/l), Im (1 mg/l), Ca (1 mg/l). Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku redestilovanou vodou. (1.1.12)
3.3.3.2 Pracovný kalibračný štandardov (QT,CHB, MD, CHF,PY,DM,BF,TC,PF) - **PKP**
1.1.1.1.1 Do 10ml odmerných baniek pridať jednotlivé objemy roztoku ZRP podľa tabuľky 1.
Doplniť po značku izooktánom.

Tabuľka 1 – príprava kalibračných roztokov

Názov	Koncen trácia (µg/l)	Prídavok ZRP (µl)	Koncen-trácia (µg/l)	Prídavok ZRP (µl)	Koncen-trácia (µg/l)	Prídavok ZRP (µl)	Koncen-trácia (µg/l)	Prídavok ZRP (µl)
BIFENTHRIN	10	10	20	20	40	40	50	50
CHLORBENZILATE	10	10	20	20	40	40	50	50
DELTAMETHRIN	100	100	200	200	400	400	500	500
METHIDATHION	20	20	50	50	100	100	200	200
PROFENOFOS	50	50	100	100	150	150	200	200
PYRAZOPHOS	20	20	50	50	100	100	150	150
QUINTOZENE	10	10	20	20	50	50	100	100
TECNAZENE	50	50	100	100	150	150	200	200
CHLORFENVINPHOS	50	50	100	100	150	150	200	200

4. PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 kvapalinový chromatograf Waters Acquity UPLC s hmotnostným detektorom Micromass Quattro Premier XE
4.2 chromatografická kolóna : Waters UPLC BEH C18 2,1 x 100 mm, 1,7 µm
4.3 analytické váhy
4.4 trepačka
4.5 centrifúga
4.6 rotačná vákuová odparka (RVO)
4.7 dvojdimenzionálny plynový chromatograf s nízkorozlišovacím detektorom LECO PEGASUS IV GCxGC/TOF
4.8 kapilárna chromatografická kolóna: VF5, 35 m x 0,25mm, ID 0,25µm
4.9 kapilárna chromatografická kolóna: BPX50, 10 m x 0,1mm, 0,1µm
4.10 GPC-Gilson
4.11 ASE -200 DIONEX
4.12 laboratórne odmerné sklo
4.13 Erlenmayerova banka
4.14 teflónové centrifugačné nádobky
4.15 striekačkový mikrofilter
4.16 extrakčné kolónky Chem Elut

5 PRACOVNÝ POSTUP

UPLC

5.1 Predpríprava vzoriek
Vzorka sa dobre zhomogenizuje.

Príprava kvality kontrol vzoriek – matricová kalibrácia

5.1.1 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovaných vzoriek

Na prípravu vzoriek sa použijú negatívne matrice. Vzorky sa fortifikujú v 0.5, 1, 2 a 5 násobku ustanoveného MRL.
Navážiť 5 g homogenizovanej vzorky do centrifugačnej teflónovej nádobky. Pridať jednotlivé roztoky štandardov podľa tabuľky 2. Premiešať na vortexe. Nechať postáť 10 minút a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.1.2

Tabuľka 2 Príprava fortifikovaných vzoriek

koncentrácia pesticídov vo vzorke (µg/kg)			Prídavok roztoku MFC1 (µl)	Prídavok roztoku MFC2 (µl)	Prídavok roztoku MFC3 (µl)
C, CS, CSx, Me, Pi	Im	Ca	C, CS, CSx, Me, Pi	Im	Ca
0	0	0	0	0	0
25	5	10	125	25	50
50	10	20	250	50	100
100	20	40	500	100	200
250	50	100	1250	250	500

5.1.2 Navážiť 5g homogenizovanej vzorky do centrifugačnej teflónovej nádobky. Pridať 9 ml vody. Nechať postáť 10 minút. Pridať 20 ml metanolu (1.1.8). Vzorku 2 minúty miešať. Odobrať 6 ml extraktu, pridať 2 ml roztoku chloridu sodného (1.2.1.). Odobrať 5 ml extraktu. Naniesť na Chem Elut kolónku. (nie je nutné použiť vákuum, vzorka preteká samospádom) Počkať 5 min. Vyeluovať 16 ml dichlórmetánu. (1.1.9.). Eluát odfúkať do sucha na RVO. Rezíduá rekonštituovať v 250 µl metanolu (1.1.8.), pridať 1 ml redestilovanej vody. (1.1.8.). Prefiltrovať cez striekačkový mikrofilter do vialky. Napichnúť na chromatografickú kolónu.

GC

5.2 Predpríprava vzoriek
Vzorka sa dobre zhomogenizuje.

5.2.1. Príprava vzorky (platí pre mäso, pečeň, krmivá)
Navážiť 1 g zhomogenizovanej vzorky a zmiešať s asi 4 g hydromatrixu (3.1.3) v trecej miske. Zmes kvantitatívne preniesť do 22 ml extrakčnej cely a objem cely vyplniť dosypaním morského piesku. Extrakčnú celu vložiť do extraktora ASE 200 a extrakciu spustiť za týchto podmienok :

- ✓ tlak systému - 10342 kPa (1500 PSI)
- ✓ teplota pece - 100°C
- ✓ Oven Heat-up Time- 5 min.
- ✓ Static Time - 5 min.
- ✓ Solvent : chloroform:acetón (2:1 v/v)

- ✓ Flush Volume - 60 % of extraction cell volume
- ✓ Nitrogen Purge - 1034kPa (150 PSI) 90 sekúnd
- ✓ Počet cyklov - 2

Extrakt v záchytnej skúmavke preliať do 100 ml Erlenmayerovej banky a zahustiť na RVO takmer do sucha. Zbytok dofúkať dusíkom . Do banky pridať pomocou pipety 3 ml zmesi cyklohexán:etylacetát (1:1) Pokračovať podľa bodu 5.4.4.

5.2.2. Príprava vzorky (platí pre mlieko)
Navážiť 20 g mlieka, zaliať extrakčnou zmesou petroléter:acetón (1:1 v/v) (5.4), nechať vyextrahovať 24 hodín. Potom vrchnú vrstvu zliať, zahustiť na RVO takmer do sucha a zbytok dofúkať dusíkom. Do Erlenmayerovej banky pridať pomocou pipety 4 ml MF (5.5). Pokračovať podľa bodu 5.2.3.

5.2.3. Príprava vzorky (platí pre med)
Navážiť 10g medu do kadičky, pridať 20ml redestilovanej vody a rozpustiť. Nasledovne vzniknutý roztok vyextrahovať v deliacom lieviku roztokom hexán:dietyléter (1:1) s objemom 50 ml. Pretrepávať 2min. Nechať stáť 2 hod. Spodnú vrstvu zliať do deliaceho lievika a opäť extrahovať. Vrchnú vrstvu preniesť do Erlenmayerovej banky cez 2lyžice Na_2SO_4 a opláchnuť 2,5ml acetónu. Zahustiť na RVO takmer dosucha a zvyšok dofúkať dusíkom. Rozpustiť v 1ml izooktánu.

5.2.4. Prečistenie extraktu na gélovej permeačnej kolóne
0,5 ml zahusteného extraktu nastreknúť na gélovú permeačnú kolónu s prietokom mobilnej fázy 1,1 ml/min. Zbierať frakciu 20 ml - 35 ml do zbernej nádobky s 50 µl nonánu (3.24). Pre test účinnosti kolóny taktiež s každou sériou vzoriek nastrekovať na kolónu v množstve 0,5 ml aj pracovný kal. roztok v mobilnej fáze cyklohexán : etylacetát 1:1 (3.2.3) . Frakciu 20 – 35 ml opatrne na RVO odpariť takmer dosucha a potom dofúkať dusíkom. Nakoniec rezíduá rozpustiť v 0,5 ml izooktánu (3.25) a nastrekovať na chromatografickú kolónu v objeme 1 µl.

Poznámka: V prípade, že sa vzorka koncentračne vymyká z rozsahu meranej kalibračnej krivky je pri opakovanom meraní upravená tak, aby koncentračne spadala do kalibračného rozsahu.

Chromatografická analýza

LC – podmienky:
chromatografická kolóna: Acquity UPLC BEH C18 2,1 x 100 mm, 1,7 µm
teplota: 30 ^{0}C
prietok: 0,25 ml/min.
eluent: mobilná fáza A: 0,005 M octan amónny (1.2.3.)
mobilná fáza B: metanol
gradientová elúcia

nástrek : 10 µl

MS podmienky:
ionizácia:ESI pozitívna,
Voltages:

Capillary (kV) : 0,5
Extractor (V): 4
RF Lens (V): 0
Temperatures:
Source Temp (^{0}C): 120
Desolvation Temp (^{0}C): 400
Gas Flow:
Desolvation (l/hr): 700
Cone (l/hr): 70

5.2 GCxGC podmienky

Kolóny: 1. dimenzia: VF-5ms (35m x 0,25mm x 0,25um)
2. dimenzia BPX50 (1,79m x 0,1mm x 0,1um)
1. dimenzia: teplotný program kolóny 70ºC (2min), 40ºC/min do 180ºC (0,2min), 20ºC/min do 300ºC (13min)
2. dimenzia: teplotný program kolóny 100ºC (2min), 40ºC/min do 210ºC (0,2min), 20ºC/min do 330ºC (13min)
Front inlet: 0,00°C (0,6min), 400°C/min do 350°C (22min)
Kolóna 1.- front inlet gas saver flow 15 ml/min
Kolóna 2.- front inlet gas saver flow 5 ml/min
Modulátor: 30°C
Modulačná perióda: 5sec
Cold jet flow: 6 l/min, dry nitrogen
Hot jet flow: 20 l/min, dry air
TOF-MS parametre:
Ion source temperature: 220ºC
Transferline temperature: 280ºC
Nástrek: 5µl

Iniciačný test
Nainjektovať na chromatografickú kolónu roztok WS. Skontrolovať pomer signálu ku šumu produkovaných iónov. Pomer by mal byť vyšší ako 6.

6 VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV MERANIA

<u>Kvantifikácia – metóda externej kalibrácie</u>

Koncentrácia zložky je úmerná hodnotám plochy píkov. Koncentráciu zložky možno vypočítať dosadením plochy píku zložky do rovnice kalibračnej krivky pre dané stanovenie .

$$c_s = \frac{A-b}{a}$$

A – plocha píku

b – úsek z rovnice kalibračnej krivky
a – smernica z rovnice kalibračnej krivky

$c_V = c_S \cdot R$ (mg/kg)

c_V - koncentrácia analytu v mg/kg

c_S - koncentrácia analytu určená z kal.krivky (mg/l)

R - stupeň riedenia

7 LITERATÚRA

1. T. Kovalczuk, M. Jech, J. Poustka, A. Krajčová, J. Hajšlová, Novel approach for determination of 67 pesticides using UPLC hyphenated with tandem quadrupole mass spectrometry, 2 nd International symposium on recent advances in food analysis, Praque, 2005
2. C. Ryan, G. Kearney, New Technologies for the simultaneous analysis of multiple pesticide residues in agricultural produce, Waters application note, 2005
3. Nariadenie Európskej Únie EC 657/2002
4. R. Štěpán, P. Cuhra, S. Baršová, P. Špronglová: Application of GCxGC-TOF in analysis of pesticide residues in foodstuffs
5. Kocourek, Hajšlová, Metody stanovení cizorodých látek v potravinách, Praha1992
6. AOAC METHODS,16 th edition, No 10.1.01, 10.2.02, 10.2.01 – AOAC Official Method 970.52: Organochlorine and Organophosphorus Pesticide Residues; AOAC Official Method 983.21: Organochlorine and Polychlorinated Biphenyl Residues in Fish; AOAC Official Method 984.21: Organochlorine Pesticide Residues in Animal Fats
7. STN EN 12393-1 až 3 : Beztukové potraviny. Multireziduálne metódy na stanovenie rezíduí pesticídov plynovou chromatografiou , časť 1-3 a STN EN 1528-1 až 4 : Tukové potraviny. Stanovenie pesticídov a polychlórovaných bifenylov, časť 1-4

8 ZOZNAM SKRATIEK

GC/MS - plynový chromatograf s hmotnostným detektorom
UPLC/MS/MS – ultra účinná kvapalinová chromatografia s hmotnostnou detekciou
LOD - limit detekcie
LOQ - limit kvantifikácie
SD - výberová smerodajná odchýlka
ASE - accelerated solvent extractor
RVO - Vákuová rotačná odparka
GPC – gélová permeačná chromatografia
MRL – maximálny reziduálny limit