

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů

**STANOVENÍ REZIDUÍ PYROXULAMU
A AMINOPYRALIDU POMOCÍ LC-MS/MS**
uplatněná certifikovaná metodika

Sebnem Kurhan, Pavel Klouček, Petr Maršík, Ivan
Jablonský, Martin Koudela

2020

Obsah

1.	Úvod.....	3
2.	Cíl metodiky.....	3
3.	Vlastní popis metodiky - PYROXULAM.....	4
3.1.	Příprava vzorku	4
3.2.	Kalibrační standardy	5
3.3.	Validace metody.....	6
3.4.	LC-MS stanovení	7
	Výsledky.....	9
4.	Vlastní popis metodiky - AMINOPYRALID	10
4.1.	Experimentální chemikálie a činidla	10
4.2.	Příprava vzorku	11
4.3.	Parametry validace metody	11
4.4.	Kalibrační roztoky.....	12
4.5.	Validace metody.....	12
4.6.	LC-MS stanovení	13
4.7.	Výsledky	15
5.	Srovnání novosti postupů.....	17
5.1.	Pyroxulam	17
5.2.	Aminopyralid	17
6.	Popis uplatnění certifikované metodiky.....	18
7.	Ekonomické aspekty	19
8.	Seznam použité související literatury	19
9.	Seznam publikací, které předcházely metodice	20
10.	Dedikace.....	20

1. Úvod

Pro výrobu substrátu hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*) se používá v Evropě sláma obilnin. Jde o druhotnou surovinu dodávanou tuzemskými zemědělci. S ohledem na skutečnost, že takováto sláma pochází prakticky výlučně z obilnin pěstovaných v režimu konvenčního zemědělství, tedy za podmínek, kdy jsou aplikovány různé typy pesticidů, lze zákonitě očekávat, že ve slámě se budou rezidua aplikovaných látek a jejich metabolitů nacházet. A právě tato skutečnost limituje využití slámy pro daný účel, neboť z dostupných dat (ÚKZÚZ 2017) vyplývá, že 17-20 % porostů obilnin je v České republice ošetřováno herbicidy Mustang Forte, Hurricane a Corello s účinnými látkami (ú.l.) aminopyralid a pyroxsulam. Podle etiket těchto pesticidů se sláma z porostů ošetřených uvedenými pesticidy nesmí používat pro výrobu substrátů pěstovaných hub a jako nastýlka v jahodárnách. V poslední době pěstitelé rajčat rovněž poukazují na poškození rajčat vlivem uvedených ú.l. obsažených ve slamnatém podílu chlévského hnoje, který byl použit při hnojení. Data o reziduích uvedených přípravků v substrátech pro houby nejsou dostupná. Navíc, jak bylo naznačeno, není jasné, jakým biotransformačním pochodům aktivní složky použitých přípravků v rostlinách a houbách podléhají. Přihlédne-li se i ke způsobu nákupu slámy, je zřejmé, že za daných okolností je pro pěstitele prakticky nemožné od dodavatele zjistit, zda se jedná o slámu takto ošetřenou. Navíc žádná z dostupných laboratoří se průkazem použití takových přípravků nezabývala. Uvedená fakta se promítají nejenom do obav pěstitelů jahod a hub, kteří mají zájem dodržovat legislativní nařízení. Není totiž zřejmé, zda rezidua aktivních složek přípravků potenciálně ve slámě inkorporovaná, nejsou translokována do plodin, hub či jahod a nepůsobí na tyto plodiny toxicky. Z uvedeného vyplývá potřeba zjistit, zda rezidua obsažená v substrátu (sláma-půda) negativně neovlivňují pěstovanou plodinu (vedle pěstitelů hub a jahodníků přicházejí z praxe v současné době informace především od pěstitelů rajčat). Tuto skutečnost by mohla naznačovat práce [http:// onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.2119/epdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.2119/epdf)

Metodika bude dostupná volně ke stažení na <https://metodiky.agrobiologie.cz/>.

2. Cíl metodiky

Cílem metodiky je

- Vyvinout a validovat nejvhodnější metody analýzy dvou účinných látek – pyroxulam a aminopyralid, včetně přípravy vzorku, ve vzorcích pšeničné slámy

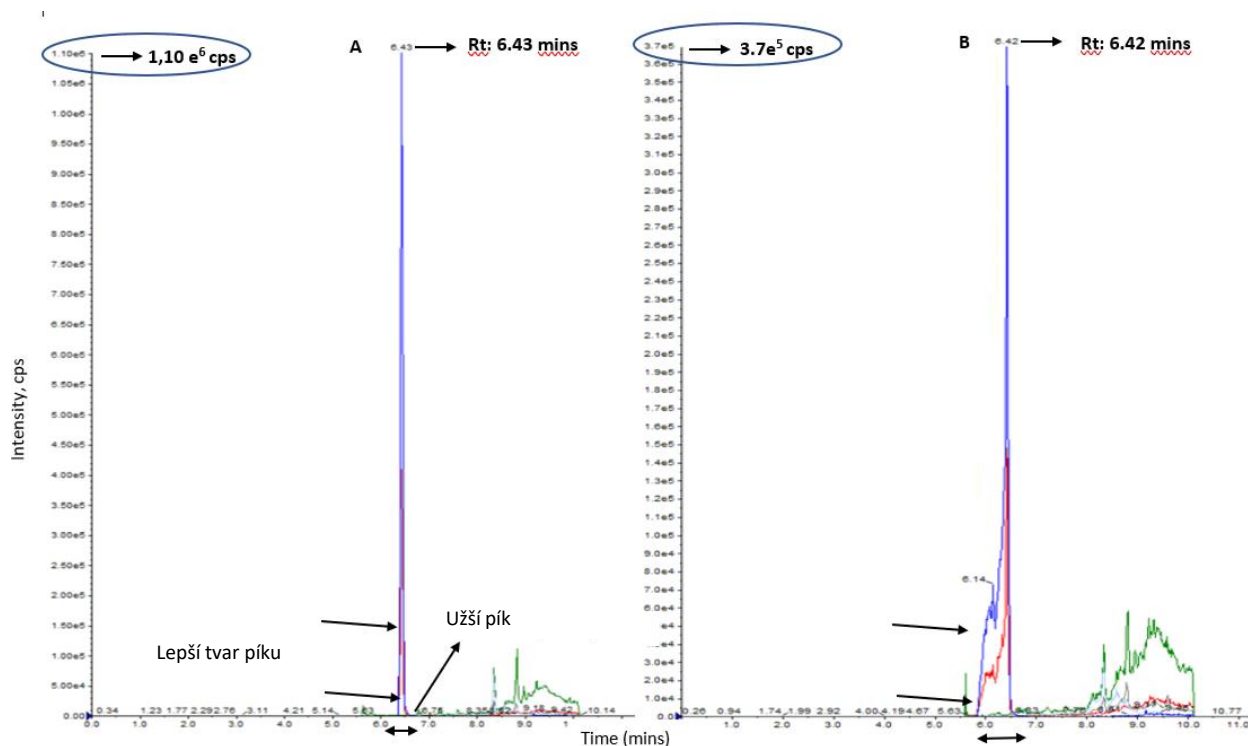
- Zjistit, zda velikost částic slámy (0,5-1,5 cm) může ovlivnit výtěžnost analytů a tedy případnou rychlost uvolňování residuů v praktických podmínkách

3. Vlastní popis metodiky - PYROXULAM

3.1. Příprava vzorku

- Použity byly vzorky slámy upravené nasekáním na tři různé velikostní šarže stébel (0,5 cm, 1,0 cm a 1,5 cm). Tyto vzorky byly připraveny podle validační zprávy metody EURL s úpravami. Pouze $1,00 \pm 0,003$ g každého jednotlivého vzorku bylo naváženo do 50ml centrifugační zkumavky na jedno použití, protože slámová matrice po přidání vody do vzorku před krokem extrakce nadměrně bobtná. Fluopyram-d4 byl použit jako vnitřní standard, ke každému vzorku bylo přidáno 50 μ l (1 μ g/ml). Ke vzorkům byl přidán alikvotní podíl 10 ml studené vody (+4° C) a obsah zkumavky byl ručně důkladně protřepán, aby bylo zajištěno, že veškerá sláma bude navlhčena. Vzorky byly ponechány v klidu po dobu 30 minut při laboratorní teplotě, poté bylo přidáno 10 ml ledového acetonitrilu. Po přidání acetonitrilu byla víčka zkumavek pevně zašroubována, vzorky byly znovu důkladně protřepány a ponechány 5 minut stát. Nakonec byly přidány směsi solí a pufrů obsahující 4 g MgSO_4 , 1 g NaCl, 1 g Na-citrátu a 0,5 g Na_2 -citrátu seskvihydrátu. Vždy po přidání dávky jednotlivých pufrů byly zkumavky důkladně protřepány, aby byl obsah dokonale promísen a zabránilo se tvorbě shluků.
- Zkumavky byly centrifugovány při 4600 RCF při +4 °C po dobu 15 minut. Čirý supernatant byl odebrán do čistých 15 ml centrifugačních zkumavek (přibližně 6 ml).
- Alikvot 1 ml supernatantu byl převeden do mikrocentrifugační zkumavky a acetonitril byl odpařen pod proudem N_2 při 37 °C v suché lázni. Odparek byl rekonstituován ve stejném objemu směsi mobilních fází pro kapalinovou chromatografii A, B (1:1, v/v) a mikrocentrifugační zkumavky byla umístěny do ultrazvukové vodní lázně na 5 minut. Poté byly centrifugovány při 15 000 RCF při + 4° C po dobu 5 minut a čirý supernatant byl přenesen do LC vialek.

- Metoda mohla být validována bez nutnosti dalšího čištění vzorku díky použití směsi mobilních fází v poměru 1:1 (v/v) jako rozpouštědla vzorků. Nahrazení původně používaného acetonitrilu touto směsí vedlo k odstranění interferujících sloučenin, které nejsou na rozdíl od acetonitrilu ve směsi methanolu a vody rozpustné. Rozdíly mezi SRM chromatogramy ilustruje obr. 1. Další předběžné pokusy také prokázaly, že zařazení dalších kroků předčištění (tj. extrakce na pevné fázi – SPE; kombinace QuEChERS-SPE) nevede k lepším výsledkům a pouze zvyšuje nároky na chemikálie, čas a další zařízení.



Obrázek 1. Změna pozadí a odezvy podle použitého rozpouštědla ve stejném vzorku (A: mobilní fáze, B: acetonitril)

3.2. Kalibrační standardy

Residua pyroxsulamu ve vzorcích slámy jsou kvantifikována metodou standardního přidavku, která dovoluje zjistit interakci pyroxsulamu s matricí a poskytuje reálné hodnoty

retenčního času. Dále je připravena externí kalibrační řada ve směsi rozpouštědel mobilních fází pro stanovení matričního efektu. Kalibrační křivka je připravena poměrem signálů pyroxsulam/fluopyram-d₄. Použité rozmezí kalibračních hladin (0,03, 1,0, 3,3, 10,0 a 33,3 ng/ml) je v lineárním rozsahu detektoru a jako jeho horní limit byla stanovena koncentrace 33,3 ng/ml. . Koeficient determinace (R^2) byl vyšší nebo roven 0,99 ($R^2 = 0,9963$).

3.3. Validace metody

Metoda extrakce a metoda kvantifikace jsou validovány podle technického pokynu požadavků SANTE/11813/2013, v termínech „Citlivost/linearita, matriční efekt, LOQ (mez kvantifikace), Specifita, Pravdivost (zkreslení), Přesnost, Poměr iontů a Retenční čas“. Ověření bylo provedeno ve třech nezávislých opakováních na každé ze dvou úrovní přídatku: 0,03 ug/kg, 1,0 ug/kg.

- ✓ Linearita je kontrolována z 5 kalibračních úrovní.
- ✓ Matriční efekt je vypočítán porovnáním odezvy externích standardů v čistém rozpouštědle a standardů v matrici.
- ✓ LOQ je stanovena jako nejnižší úroveň přídatku splňující kritéria metody pro správnost a přesnost ($\leq$ MRL - maximální reziduální limit).
- ✓ Pravdivost, průměrná výtěžnost pro každou testovanou úroveň přídatku (70–120 %).
- ✓ Přesnost, opakovatelnost RSD pro každou testovanou úroveň přídatku ($\leq$ 20%)
- ✓ Robustnost - použitá metoda QuEChERS se ukázala jako dostatečně robustní (Xu et al., 2015)
- ✓ Retenční čas ($\pm$ 0,1 min)

Vzorek 1B byl vybrán jako slepý vzorek, který neobsahuje stanovovaný herbicid. Jako limit kvantifikace (LOQ) je použita nejnižší hodnota přídatku, která splňuje kritéria přijatelnosti (% výtěžnost (pravdivost) mezi 70-120 % a RSD% (přesnost) $<$ 20%).

3.4. LC-MS stanovení

Vzorky jsou analyzovány pomocí systému AB Sciex LC QTRAP 6500+ MS/MS v režimu pozitivní ionizace. Pyroxsulam je detekován v režimu SRM. Standardy fluopyram-d₄ a pyroxsulam připravené v mobilní fázi v koncentraci 50 µg/kg byly před samotnou LC-MS/MS analýzou přímo nastříknuty do MS pro optimalizaci podmínek – zjištění charakteristických SRM přechodů (hodnot m/z Q1/Q3) a nastavení parametrů hmotnostního spektrometru (tabulka 1).

Tabulka 1. Optimalizace MS parametrů

Optimalizace MS parametrů	Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Dwell Time	ID	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
	401.998	209	150	Fluopyram d4-Quant	26	10	29	10
	401.998	-	150	Fluopyram d4-Qual	26	10	37	20
	434.935	195	150	Pyroxsulam_Quant	56	10	35	10
	434.935	124	150	Pyroxsulam_Qual-1	56	10	67	14

Tabulka 2. Podmínky LC separace

Podmínky separace		Mobilní fáze A: 2 mM mravenčan amonný, 0.1% kys, mravenčí Mobilní fáze B: Methanol			
		Gradient			
		Čas	Průtok (mL/min)	A konc. (%)	B. konc. (%)
		0	0.3	60	40
		2.00	0.3	10	90
		9.00	0.3	10	90
		9.10	0.3	40	60
		13.5	0.3	40	60
		14	0.3	60	40
		Termostat kolony 40°C Nástřik 2 µL Kolona ACE Excel 2 SuperC18 Termostat autosampleru +18°C			
		2,1 x 100 mm, 2µm particle size, 90 Å pore size Celkový čas analýzy: 14.00 min.			

Podmínky LC separace byly upraveny tak, aby byla minimalizována depozice pyroxulamu v systému. Pyroxulam má tendenci být zadržován v chromatografickém systému, což vede při nesprávně zvolených chromatografických podmínkách k falešně pozitivnímu zkršení signálu. Nově vyvinutá metoda LC je uvedena v tabulce 2.

Po eluci pyroxulamu a IS (pyroxulam Rt: 2,48 min, fluopyram Rt: 3,17 min) je zbytek eluentu odváděn do odpadu, aby bylo zabráněno zbytečnému zatížení iontového zdroje. Podmínky nastavení ventilu jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3. Nastavení přepínacího ventilu

Přepínací ventil	Čas (min)	Pozice	Směr
	0	B	Zdroj
	6.5	A	Odpad

Nastavení iontového zdroje je uvedeno v tabulce 4.

Tabulka 4. Nastavení iontového zdroje

Nastavení zdroje	Curtain Gas (Cur)	40 L/min
	Collision Gas (CS)	Medium
	IonSpray Voltage (IS)	5500
	Temperature (TEM)	550 °C
	Ion Source Gas (GS1)	40 L/min
	Ion Source Gas (GS2)	60 /min

Výsledky

Během předběžných pokusů byl testován široký rozsah koncentrací (0,03, 1,0, 3,3, 10,0 a 20 µg/kg). Díky vysoké selektivitě a výtěžnosti sloučeniny pomocí modifikované extrakční metody, a optimalizaci instrumentálních podmínek byly dosaženy nízké LOQ (tabulka 5).

Tabulka č. 5 Výsledky validace (kalibrace s maticí)

	Úroveň obohacení	Stanovené množství (µg/kg)	Sm. odch. ±	RSD%	Stanovení přírůvek	Výtěžnost %-pravdivost	Matriční efekt	LOQ µg/kg
Slepý vzorek	0	0.14	0.05	37.43%	0	0	55.05%	0.03
Přídavek 0.03	0.03	0.18	0.00	2.42%	0.0318	106.07%		
Přídavek 1	1	1.0098	0.12	11.59%	0.8666	86.66%		

Po dokončení validace metody byly vzorky různých velikostních frakcí (0,5 cm, 1,0 cm a 1,5 cm) extrahovány stejnou metodou. Získaná data jsou uvedena v tabulce 6. Podle naměřených výsledků velikost částic ve vzorcích slámy ovlivňuje zjištěné hladiny reziduí. Vyšší množství pyroxsulamu bylo detekováno ve vzorcích slámy s menší velikostí částic, které v podstatě představují stejnou skupinu vzorků.

Tabulka 6. Hodnoty residuí pyroxsulamu ve vzorcích slámy

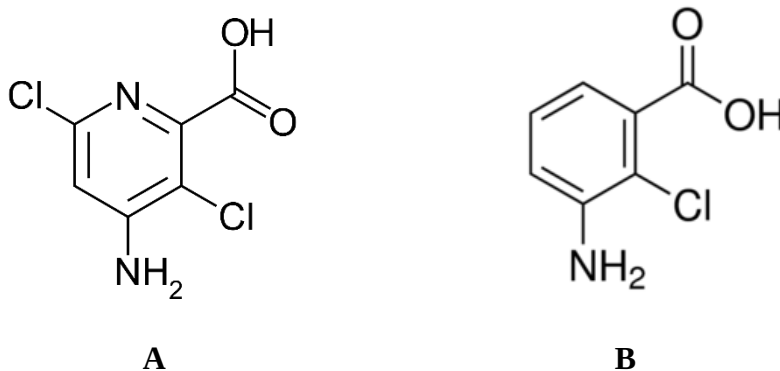
Vzorek	Residua (µg/kg)	Sm. odch.	% RSD
1A	0.2701	0.01	2.61
1B	0.1239	0.04	29.61
1C	0.0397	0.01	25.36
3A	1.8424	0.26	14.18
3B	0.9298	0.02	2.57
3C	1.0500	0.07	6.73
4A	1.9885	0.64	32.25
4B	1.3460	0.41	30.38
4C	1.3223	0.19	14.41
5A	0.9895	0.01	1.21
5B	0.8323	0.10	12.49
5C	0.4922	0.00	0.29

4. Vlastní popis metodiky - AMINOPYRALID

Aminopyralid je syntetický auxin, který funguje jako regulátor růstu a je schválen pro hubení plevelů. Jedná se o perzistentní herbicid, který je odolný vůči anaerobní konverzi, ale velmi citlivý na světlo. V chemické struktuře obsahuje aniontové i kationtové funkční skupiny (obrázek 2), což přispívá k vlastnostem, díky nimž je tento herbicid historicky obtížně extrahovatelný z různých matric.

4.1. Experimentální chemikálie a činidla

Standard aminopyralidu byl získán od společnosti Honeywell (Fluka, Německo). Hlavní zásobní roztok aminopyralidu byl připraven v acetonitrilu chromatografické kvality a udržován při -20°C . Pracovní zásobní roztok aminopyralidu byl připraven v koncentraci $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ a byl použit k přípravě kalibračních standardů v rozmezí koncentrací 1 až 100 ng/ml v 8 úrovních metodou standardního přídávku. Byly také připraveny externí kalibrační standardy za účelem výpočtu matričního efektu ve stejném koncentračním rozmezí, ale pouze s použitím methanolu. Jelikož neexistuje žádný komerčně dostupný deuterovaný nebo značený standard aminopyralidu, byla jako vnitřní standard použita kyselina 5-amino-2-chlorbenzoová, z důvodu podobnosti chemických struktur obou látek (obrázek 2). Zásobní roztok vnitřního standardu byl připraven v koncentraci $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ v acetonitrilu pro chromatografii a přidán ke každému vzorku v koncentraci $100\text{ }\mu\text{g/kg}$ na vzorek za účelem kontroly a normalizace potenciálních vlivů matrice v souladu s Baumhover et al. (2018).



Obrázek 2. Struktura aminopyralidu (A) a kys. 5-amino-2-chlorbenzoové (B)

4.2. Příprava vzorku

Vzorky byly připraveny podle referenční laboratoře Evropské unie, Single Residue Method (SRM), specifikované pro analýzu kyselých pesticidů pomocí metody QuEChERS (EURL-SRM, verze 1, 2015) s malými úpravami.

Vzorku slámy, podobně jako v případě analýzy pyroxulamu, je naváženo $1,0000 \pm 0,003$ g každého jednotlivého vzorku do 50ml centrifugační zkumavky na jedno použití, protože slámová matrice po přidání extrakčního rozpouštědla nadměrně bobtná. V tomto kroku je přidán vnitřní standard (IS) o koncentraci 100 µg/kg a vzorek je promíchán a ponechán stát po dobu 10 minut, aby bylo dosaženo rovnoměrné distribuce IS v rámci vzorku, a poté je promísen s 10 ml studené MilliQ vody. Aby byla snížena možná degradace aminopyralidu, jsou vzorky umístěny do chladničky a udržovány při 4 ° C po dobu 30 minut ve tmě. Na konci doby smáčení je přidáno extrakční rozpouštědlo, kterým je 10 ml acetonitrilu obohaceného 1% kyselinou mravenčí, a obsah zkumavky je důkladně protřepán a promíchán. Nakonec jsou do zkumavek přidány soli 4 g síranu hořečnatého a 1 g chloridu sodného - a vzorky jsou vortexovány, aby bylo zabráněno agregaci solí. Protože aminopyralid je mírně kyselý herbicid, není v tomto kroku přidávána žádná pufrovací sůl.

Zkumavky se vzorky jsou centrifugovány při 11 600 ot./min. při 4 °C dobu 15 minut a 6 ml acetonitrilové fáze je převedeno do 15 ml tmavých centrifugačních zkumavek. Obsah zkumavky je odpařen pod mírným proudem dusíku při 37 °C a suché vzorky jsou rozpuštěny v methanolu (3 ml) pomocí ultrazvuku a vortexu.

Vzorky v methanolu jsou znovu centrifugovány při 11 600 otáčkách za minutu při 4 °C po dobu 5 minut, aby byly odstraněny nerozpustné částice. Čirý supernatant je přenesen do 1,5 ml viálek, a následně analyzován bez dalšího přečištění.

Vzorky nesmí být nikdy vystaveny přímému světlu, proto je veškerá manipulace s nimi prováděna vždy za tlumeného světla a vzorky jsou skladovány ve tmě.

4.3. Parametry validace metody

Extrakční a kvantifikační metoda byla validována podle požadavků referenční laboratoře Evropské unie (EURL), a to pro parametry „Citlivost/linearita, matriční efekt, LOQ, Specifičnost, Pravdivost (zkreslení), Přesnost, Iontový poměr a Retenční čas“. Ověření bylo provedeno ve třech

nezávislých replikátech na každé ze čtyř úrovní přidavku: 5,0 µg/kg, 10,0 µg/kg, 25,0 µg/kg a 50,0 µg/kg. Jako blank slouží vzorek slámy bez přidavku aminopyralidu. V tomto případě byl vybrán jako slepý vzorek 1A, který neobsahuje sledovaný herbicid.

Limit detekce (LOQ) je stanoven jako nejnižší koncentrace, která splňuje kritéria přijatelnosti (% výtěžnosti – pravdivost – mezi 70-120 % a RSD% (přesnost) <20 %).

4.4. Kalibrační roztoky

Pro kvantifikaci aminopyralidu ve vzorcích slámy je použita metoda standardního přidavku, která umožňuje korekci vzhledem k chování aminopyralidu v matrici a přesnější detekci retenčního času. Externí kalibrace je provedena rozpuštěním standardu aminopyralidu v metanolu ve stejném koncentračním rozsahu. Vybraný rozsah (1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 a 100 ng/ml) je v oblasti lineární odezvy přístroje.

Kalibrační křivky byly vytvořeny pomocí hodnot ploch píků aminopyralidu/5-amino-2-chlorbenzoové kyseliny (IS). Koeficient determinace R^2 je vyšší nebo roven 0,99 (v tomto případě $R^2 = 0,9939$).

4.5. Validace metody

- ✓ Linearita je kontrolována z 8 kalibračních úrovní
- ✓ Matricový efekt je vypočítán porovnáním odezvy externích standardů a standardů v matrici.
- ✓ LOQ je stanovena jako nejnižší úroveň přidavku splňující kritéria metody pro správnost a přesnost ($\leq$ MRL).
- ✓ Pravdivost, průměrná výtěžnost pro každou testovanou úroveň přidavku (70–120%).
- ✓ Přesnost, opakovatelnost RSD pro každou testovanou úroveň přidavku ($\leq$ 20%)
- ✓ Robustnost, použitá metoda QuEChERS je podle Anastassiades et al. (2003) dostatečně robustní.
- ✓ Retenční čas ($\pm 0,1$ min)

4.6. LC-MS stanovení

Vzorky byly analyzovány pomocí systému AB Sciex LC QTRAP 6500+ MS/MS v pozitivním módu.

Před analýzou byl do MS systému ručně nastříknut čistý standard aminopyralidu o koncentraci 50 ppb rozpuštěného v methanolu, pro optimalizaci podmínek – zjištění charakteristických SRM přechodů (hodnot m/z Q1/Q3) a nastavení parametrů hmotnostního spektrometru (tabulka 7).

Tabulka 7. Optimalizace MS parametrů

Optimalizace MS parametrů	Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Dwell Time	ID	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
	206,943	160,9	110	Aminopyralid_Quant	21	10	29	18
	206,943	-	110	Aminopyralid_Qual-1	21	10	43	14
	171.973	93,00	145	kyselina 5-amino-2-chlorbenzoová	16	10	27	10

Po optimalizaci nastavení detekčních podmínek byla optimalizována metoda chromatografické separace s použitím čistého standardu až do získání optimálního tvaru a kvality píku. V tabulce 8 jsou uvedeny parametry LC metody.

Tabulka 8. Podmínky LC separace

Podmínky separace	Mobilní fáze A:	0.2% kyselina mravenčí		
	Mobilní fáze B:	Methanol		
	Gradient			
	Čas	Průtok (mL/min)	A konc. (%)	B. konc. (%)
	0	0.3	50	50
	0.5	0.3	50	50
	6	0.3	0	100
	6.5	0.3	50	50
	10	0.3	50	50
	Termostat kolony	30°C		
	Nástřik	2 µL		
	Kolona	ACE Excel 2 SuperC18 2,1 x 100 mm, 2µm particle size, 90 Å pore size		
	Termostat autosampleru	+4°C		

Celkový čas: 10.00 min.

Na základě retenčních časů sloučenin byl eluent směřován do hmotnostního detektoru nebo do odpadu. Retenční časy aminopyralidu a 5-amino-2-chlorbenzoové kyseliny byly stanoveny na 1,20 respektive 1,21 minuty. Podmínky nastavení ventilu jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9. Nastavení přepínacího ventilu

Přepínací ventil	Čas (min)	Pozice	Směr
	0	B	Zdroj
	3	A	Odpad

Nastavení parametrů iontového zdroje bylo optimalizováno na základě nejlepší odezvy signálu aminopyralidu a je uvedeno v tabulce 10.

Tabulka 10. Nastavení iontového zdroje

Nastavení zdroje	Curtain Gas (Cur)	20 L/min
	Collision Gas (CS)	Medium
	Ion Spray Voltage (IS)	4500
	Temperature (TEM)	550°C
	Ion Source Gas (GS1)	50 L/min
	Ion Source Gas (GS2)	50 L/min

4.7. Výsledky

Výsledky validace

Výsledky validace získané ze vzorků slámy pomocí LC-MS/MS jsou uvedeny v tabulce 11. Mez kvantifikace (LOQ) byla stanovena na 5 µg/kg v širokém rozmezí různých úrovní přídavek (5,0; 10,0; 25,0 a 50,0 µg/kg), z nichž jsou rovněž vypočtena akceptační kritéria pro validaci.

Tabulka 11. Hodnoty výtěžnosti a opakovatelnosti podle metod extrakce (n = 3)

Vzorek	Úroveň přídavku (µg/kg)	Stanovené množství (µg/kg)	Sm. odch. ±	Výtěžnost % - pravdivost	RSD%
Slepý vzorek (1A)	0	0.05	0.03	-	-
Přídavek 5	5	4.04	0.51	79.95%	12.69%
Přídavek 10	10	9.99	1.69	99.43%	16.93%
Přídavek 25	25	22.27	2.48	88.89%	11.12%
Přídavek 50	50	39.20	1.38	78.31%	3.53%

Stanovení obsahu aminopyralidu v reálných vzorcích

Obsah aminopyralidu ve vzorcích slámy je uveden v tabulce 12. Výsledky ukázaly, že velikost částic hraje důležitou roli v účinnosti extrakce. Různé vzorky slámy, které se lišily lokalitou a způsobem ošetření v průběhu kultivace (označení 1, 3, 4, 5), byly před extrakcí nařezány na tři velikostní šarže o velikosti částic (A=0,5 cm, B=1,0 cm, C=1,5 cm). U všech vzorků byl stanovený obsah aminopyralidu nepřímě úměrný velikosti částic. V rámci testovaných skupin byl nejvyšší

obsah reziduí aminopyralidu detekován ve všech velikostech vzorků 4. skupiny ($165,64 \pm 2,62$ $\mu\text{g/kg}$). Obsah aminopyralidu ve skupině 1, který byl také použit jako blank, byl pod LOQ.

Tabulka 12. Obsah aminopyralidu ve vzorcích (* A představuje vzorky o velikosti 0,5 cm, ** B představuje vzorky o velikosti 1,0 cm, *** C představuje vzorky o velikosti 1,5 cm, n = 3)

Vzorek	Aminopyralid ($\mu\text{g/kg}$)	Sm. odch.	% RSD
1A*	2,88	0,29	10.05
1B**	1,60	0,00	0.00
1C***	1,43	0,56	38.93
3A	45,92	1,20	2.62
3B	53,91	5,16	9.57
3C	0,81	0,81	100.00
4A	165,64	2,62	1.58
4B	102,27	4,94	4.83
4C	89,13	0,14	0.16
5A	6,17	0,30	4.78
5B	4,02	0,59	14.74
5C	1,58	0,56	35.24

Pokud jde o průměrnou výtěžnost extrakce, výsledky použité metody QuEChERS (EURL-SRM, 2015) přinesly uspokojivé výtěžky ($> 70\%$). Dále byla metoda upravena tak, aby se zvýšila kvalita signálu a zlepšilo se skóre validace. Extrakční rozpouštědlo (acetonitril) bylo tedy nahrazeno methanolem; stejně tak i při chromatografické separaci byly mobilní fáze nahrazeny Milli-Q vodou s přídavkem 0,2% kyseliny mravenčí (A) a čistým metanolem (B). Na rozdíl od referenční metody byl aminopyralid analyzován v režimu pozitivní ionizace v MRM módu. Parametry hmotnostní spektroskopie uvedené v tabulce 10 byly také nově stanoveny a vedly ke zvýšení rozlišení a citlivosti signálu aminopyralidu.

5. Srovnání novosti postupů

5.1. Pyroxulam

Evropská komise stanovila maximální hladiny reziduí (MRL) pyroxsulamu na 10 µg/kg v obilovinách (část A přílohy I nařízení 396/2005). Podle přezkumu stávajících maximálních limitů reziduí pro pyroxsulam Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA, 2013), metoda poskytovaná referenční laboratoří Evropské unie (EURL) je považována za vhodnou pro stanovování pyroxsulamu v matricích s vysokým obsahem vody, kyselin, oleje i suchých komoditách s LOQ 10 µg/kg. EURL (2020) navíc ve všech komoditních skupinách aktualizovala LOQ metody na 5 µg/kg (EFSA, 2020).

Ve srovnání s jinými pesticidy existuje v literatuře jen omezené množství studií o pyroxsulamu v rostlinách, pravděpodobně kvůli jeho nižší toxicitě. Ve výzkumu sedmi herbicidů triazolo-pyrimidinsulfonamidové skupiny včetně pyroxsulamu má navrhovaná multireziduální metoda LOQ 5 µg/kg (Xu et al., 2015). Studie Bi et al. (2020) definovala LOQ stejným způsobem jako SANTE/1813/2017 a navrhovaná LOQ je také 5 µg/kg. Upravená a vylepšená metoda uvedená v této zprávě má tedy významně nižší LOQ (0,03 µg/kg) ve srovnání s dostupnými publikovanými metodami.

5.2. Aminopyralid

Pro výběr metodiky extrakce a kvantifikace bylo interně posouzeno pět různých metod, včetně EN 15662 QuEChERS (Tian et al., 2012), molekulárně tištěné extrakce na pevné fázi (MIP-SPE) (He et al., 2019; Tan et al., 2019), EN 15662 QuEChERS spolu s MIP-SPE (He et al., 2019) alkalická hydrolýza spojená s SPE (Watanabe et al., 2019) a okyselenými QuEChERS (EURL-SRM, 2015). Ačkoli existuje ještě jedna analytická metoda pro analýzu aminopyralidu doporučená Agenturou pro ochranu životního prostředí Spojených států (US-EPA), založená na butyl derivatizaci, nebyla v rámci této studie zkoumána, protože derivatizační proces je časově náročný a může být zdrojem nepřesností a chyb vzniklých během butylačního procesu. Konečné rozhodnutí pro výběr metody bylo učiněno na základě chromatografických výsledků získaných ze stejných vzorků provedených výše uvedenými metodami.

Podobně jako pro pyroxulam existuje v literatuře velmi omezený počet studií na stanovení reziduí aminopyralidu. V dohledatelné literatuře se hodnoty LOQ liší i podle různých přístupů k

parametrům validace. Tian a kol. (2012) stanovili LOQ na 21 µg/kg ve vzorcích okurek a 36 µg/kg pro vzorky hroznů s použitím velmi podobné extrakční metody jako námi použitá modifikovaná EURL-SRM (2015) pro potravinářské komodity s vysokým obsahem vody. Další výzkum využívající metodu extrakce a přečištění přes SPE kolonky obsahující molekulárně potišťené polymery He et al. (2019) a Tan et al. (2019) uváděli hladiny LOQ ve vzorcích mléka jako 0,77 µg/kg, respektive 0,41 µg/l. Tyto hodnoty však byly definovány podle poměru S/N a nebyly kompatibilní s kritérii validace EURL. S ohledem na nejnižší úrovně přídatků v těchto třech studiích jsou reálné LOQ 50 µg/kg (Tian et al., 2012) a 10 µg/l (He et al., 2019; Tan et al., 2019), což jsou hodnoty vyšší než LOQ dosažené pomocí této metodiky.

Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) uvedl, že analytické metody používané při stanovení reziduí aminopyralidu (ve volné a konjugované formě) by měly splňovat hladinu LOQ 10 µg/kg ve všech skupinách potravinářských matric, včetně těch s vysokým obsahem vody, kyselin, oleje a suchých komoditách (Anastassiadou et al., 2020). V této souvislosti poskytla referenční laboratoř Evropské unie (EURL) analytickou metodu s LOQ 50 µg/kg pro rutinní analýzu volného aminopyralidu pro všechny skupiny potravinových matric (EURL-SRM, 2015). Výsledky dosažené touto metodikou jsou tedy o jeden řád citlivější než původní výsledky podle EURL.

6. Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika je určena zejména pro orgány státní správy, vědeckovýzkumné organizace či soukromé subjekty zabývající se stanovováním reziduí pesticidů, v neposlední řadě je pak metodika určena také široké odborné veřejnosti. Může být využita například institucemi jako: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ) nebo Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI) a dalšími certifikovanými kontrolními subjekty či komerčními laboratořemi. Residua pesticidů je třeba zkoumat nejen z důvodu jejich případných nežádoucích vlivů, ale také z hlediska způsobů aplikace a stanovení účinnosti jednotlivých látek a jejich efektivních dávek. Vedle aspektů spojených s bezpečností tak metodika najde uplatnění i z hlediska zavádění jednotlivých pesticidů do pěstitelské praxe.

7. Ekonomické aspekty

Uživatelé metodiky budou nabízet popsané stanovení jako jeden ze svých produktů/služeb. Náklady na zavedení metodiky lze rozdělit na investiční a materiálové. Investiční náklady na pořízení potřebného vybavení lze odhadnout na 10 000 000,- Kč. Zásadní je pořízení kapalinového chromatografu s hmotnostním detektorem typu trojitý kvadrupól nebo Q-TRAP, a další vybavení, zejména analytické váhy, pipety, vortex, odstředivky. Většina analytických laboratoří však tímto vybavením již disponuje. Materiálové náklady lze odhadnout ve výši 300,- Kč na vzorek. Jedná se zejména o spotřební materiál k přípravě vzorku, např. SPE kolonky, QuEChERS spotřební materiál, vialky, a materiál k provedení LC/MS analýz, např. extrakční rozpouštědla, kolony, mobilní fáze, technické plyny, standardy atd. Dále je třeba započítat osobní náklady, podle provedených příkladů je možno počítat s celkovým časem 30 minut na jeden vzorek, kdy větší počet vzorků významně zkrátí celkový čas přepočtený na jeden vzorek. Osobní náklady tak dosáhnou cca. 200 Kč na jeden vzorek. Cena jedné analýzy, za kterou bude nabízena, se bude pohybovat v cenové relaci cca. 5000,- Kč za vzorek. Při analýze 100 vzorků ročně bude hrubý zisk ve výši 440 000,- Kč, analogicky při analýze 1000 vzorků bude zisk 4 400 000 Kč,- ročně. Dále lze počítat s pozitivními efekty pro pěstitele různých plodin, kteří využívají obilnou slámu jako druhotnou surovinu např. jako mulč, pěstební substrát, organické hnojivo atd. Tento efekt se projeví ve snížení ztrát na výnosech dotčených plodin použitím bezreziduální slámy a nelze ho jednoduše kvantifikovat.

8. Seznam použité související literatury

- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86(2), 412–431. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>
- Baumhover, N. J., Larabee-Zierath, D., Vargo, J. D., Spak, D. R., Netzband, D., & Dai, S. Y. (2018). Regulatory Science A Simple Procedure for Determination of Aminocyclopyrachlor and Aminopyralid in Soil, Corn Meal, and Soy Meal using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. In *Journal of Regulatory Science* (Vol. 6, Issue 2).

- EURL-SRM. (2015). *Analysis of Acidic Pesticides using QuEChERS (EN15662) and acidified QuEChERS method*. Acidified QuEChERS (A-QuEChERS). https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/EurlSrm_Observations_AcidicPesticides.pdf
- He, Y., Tan, S., Abd El-Aty, A. M., Hacimüftüoğlu, A., & She, Y. (2019). Magnetic molecularly imprinted polymers for the detection of aminopyralid in milk using dispersive solid-phase extraction. *RSC Advances*, 9(51), 29998–30006. <https://doi.org/10.1039/c9ra05782j>
- Tan, S., Yu, H., He, Y., Wang, M., Liu, G., Hong, S., Yan, F., Wang, Y., Wang, M. Q., Li, T., Wang, J., Abd El-Aty, A. M., Hacimüftüoğlu, A., & She, Y. (2019). A dummy molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for selective determination of four pyridine carboxylic acid herbicides in milk. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1108, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.01.008>
- Tian, Y., Liu, X., Dong, F., Xu, J., Lu, C., Kong, Z., Wang, Y., & Zheng, Y. (2012). Simultaneous determination of aminopyralid, clopyralid, and picloram residues in vegetables and fruits using ultra-Performance liquid chromatography/Tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 95(2), 554–559. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.11-120>
- Watanabe, E., Seike, N., & Namiki, S. (2019). Highly sensitive analytical method for herbicide clopyralid residue in cattle manure compost with ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Pesticide Science*, 44(3), 186–191. <https://doi.org/10.1584/jpestics.d19-023>

9. Seznam publikací, které předcházely metodice

Pavel Nový, Matěj Božik, Lenka Kouřimská, Pavel Klouček, Lenka Zárubová, Miloslav Zouhar, Ondřej Douda. Stanovení reziduí botanických pesticidů pomocí SPME-GC. Uplatněná certifikovaná metodika. Česká zemědělská univerzita v Praze, 2015, ISBN: 978-80-213-2635-4.

10. Dedikace

Tato metodika vznikla v rámci řešení výzkumného projektu QK1910235 „Minimalizace rizik reziduí účinných látek vybraných herbicidů obsažených ve slámě a v půdě na kultury pěstovaných hub, jahodníku a rajčat“. Metodika bude dostupná volně ke stažení na <https://metodiky.agrobiologie.cz/>.

© Sebnem Kurhan, Pavel Klouček, Petr Maršík, Ivan Jablonský, Martin Koudela

Lektoroval: Peter Dobrev, Michaela Budňáková

ISBN: 978-80-213-3064-1