



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

Fakulta potravinářské a biochemické technologie

Ústav analýzy potravin a výživy

Cílová analýza pesticidních látek a jejich metabolitů v rostlinných materiálech z ekologické produkce

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Dana Schusterová, Marie Suchanová, Monika Tomaniová,
Vladimír Kocourek, Jana Hajšlová**

Praha, 2016

Dedikace:

Uplatněná certifikovaná metodika vznikla ve spolupráci s Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským v Brně za finanční podpory Ministerstva zemědělství v rámci projektu QJ1530272 (Komplexní strategie pro efektivní odhalování falšování potravin v řetězci (prvo)výroba-spotřebitel) a dále byla tato práce realizována v rámci “Operačního programu Praha - Konkurenceschopnost” (CZ.2.16/3.1.00/21537) za podpory “Národního programu udržitelnosti I” - NPU I (LO1601 - č.: MSMT-43760/2015).

© **Dana Schusterová, Marie Suchanová, Monika Tomaniová, Vladimír Kocourek,
Jana Hajšlová, 2016**
ISBN 978-80-7080-980-8

OBSAH

1	CÍL METODIKY	4
2	TEORETICKÝ ÚVOD	5
3	VLASTNÍ POPIS METODIKY	7
3.1	Použitelnost metody	7
3.2	Princip metody	7
3.3	Chemikálie a spotřební materiál	9
3.4	Přístroje a zařízení	9
3.5	Pracovní postup	10
3.5.1	<i>Odběr a uchování vzorků</i>	10
3.5.2	<i>Příprava zásobních roztoků standardů</i>	10
3.5.3	<i>Extrakce vzorků</i>	11
3.5.4	<i>Identifikace a kvantifikace</i>	12
3.5.5	<i>Pracovní charakteristiky</i>	19
4	SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	21
5	POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	22
6	EKONOMICKÉ ASPEKTY	22
7	SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	24
8	SEZNAM PUBLIKACÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH METODICE	25
9	SEZNAM ZKRATEK	25
10	AUTOŘI A OPONENTI	26

1 Cíl metodiky

Jedním z cílů projektu „Komplexní strategie pro efektivní odhalování falšování potravin v řetězci (prvo)výroba-spotřebitel“ (NAZV QJ1530272) podporovaného Ministerstvem zemědělství je zvýšení průkaznosti laboratorních analýz při kontrole dodržování zásad ekologického zemědělství. Zhodnocení přítomnosti reziduí/metabolitů pesticidů nalezených při kontrole a certifikaci bioprodukce by mělo vycházet z multireziduální metody stanovení nejen pesticidů, ale též jejich metabolitů a degradačních produktů, které spolehlivě prokazují aplikaci přípravku na ochranu rostlin (POR) i po uplynutí delší doby, kdy původní účinná látka již podlehla degradaci. Za tím účelem byla navržena a validována multireziduální metoda umožňující stanovení biologicky aktivních složek pesticidních přípravků na hladinách řádově $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ a méně. Cílová analýza pesticidů a screening metabolitů vybraných účinných látek se provádí metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s vysokorozlišovací tandemovou hmotnostní spektrometrií.

Validovaná metodika bude předána k využití pracovníkům laboratoří Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského v Brně (ÚKZÚZ) a Státní zemědělské a potravinářské inspekci (SZPI) pro možné využití při kontrole ekologické produkce. Metodika je plně využitelná také pro kontrolu ovoce a zeleniny produkované v integrovaném systému pěstování.

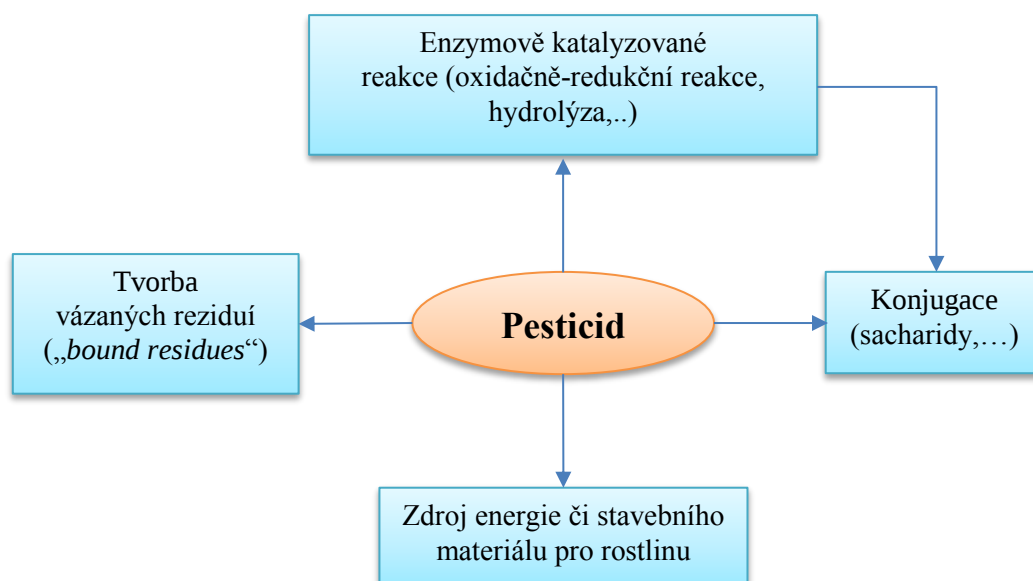
2 TEORETICKÝ ÚVOD

Pesticidy představují široké spektrum chemických látek, které jsou běžně používané při pěstování rostlin k jejich ochraně před škodami na produktech způsobenými činností hmyzu, plísní, plevelů a dalších škodlivých organismů. Řadí se mezi vysoce sledované cizorodé látky běžně přítomné v zemědělských plodinách, neboť mohou pro spotřebitele představovat zdravotní riziko. Jejich množství v potravinách jsou regulována nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005 ve znění pozdějších předpisů. Reziduum je v tomto nařízení definováno jako jedna nebo více látek (včetně metabolitů a produktů vznikajících při jejich rozkladu nebo reakci), které jsou v důsledku používání přípravků na ochranu rostlin, přítomny v rostlinách, rostlinných produktech, příp. na jejich povrchu. Součástí tohoto nařízení jsou maximální limity reziduí (MLR) v potravinách rostlinného a živočišného původu pro jednotlivé kombinace pesticid-komodita.

Zvláštní požadavky pro použití pesticidů jsou stanoveny pro ekologickou produkci. V ekologické zemědělské produkci by mělo být omezeno používání pesticidů, zejména pesticidů syntetických. V ochraně před škůdci, chorobami a plevely se upřednostňuje preventivní přístup, který zahrnuje volbu vhodných druhů a odrůd, vhodné střídání plodin, ochranu přirozených nepřátel škůdců nebo fyzikální a mechanické způsoby ochrany. Přípravky na ochranu rostlin je možné použít, ovšem v případě, že nemohou být plodiny náležitě chráněny, a za předpokladu, že byly pro použití v ekologické produkci povoleny nařízením Komise (ES) č. 889/2008, ve znění pozdějších předpisů.

Vstup pesticidů do prostředí je důsledkem jejich úmyslné aplikace, která by měla probíhat vždy v souladu se zásadami správné zemědělské praxe (GAP), resp. s pokyny na etiketě registrovaného přípravku. Na pesticidy, které pronikly do složek životního prostředí může působit řada vlivů a dochází k jejich transformaci a degradaci, což představuje hlavní cesty eliminace těchto sloučenin z prostředí. Většinou je v důsledku transformačního procesu původní (mateřská) sloučenina převedena na méně toxické produkty. Metabolické dráhy probíhající při transformaci pesticidů (biodegradaci) v exponovaných cílových i necílových rostlinách jsou velmi komplexní, viz **Obr. 1**. Vznikajícími sloučeninami jsou například metabolity vznikající oxidačně-redukčními a hydrolytickými reakcemi, dále konjugované pesticidy či jejich metabolity (např. konjugáty s β -D-glukosou) nebo tzv. vázaná rezidua

(„*bound residues*“), která vznikají zapouzdřením reziduí do biologických makromolekul nebo jsou na makromolekuly navázána kovalentní vazbou.



Obrázek 1: Biotransformace pesticidů v rostlinách

Pro analýzu reziduí pesticidů v potravinách se v současné době nejčastěji využívá extrakční metoda QuEChERS (z angl. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*). Analytická koncovka může být provedena technikami kapalinové nebo plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC–MS; GC–MS). Analýza degradačních produktů a metabolitů v rámci konvenčních metod může být často problematická, zvláště v případě, že stanovované analyty vykazují významně odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti než mateřské látky. Obvykle bývají tyto sloučeniny podstatně polárnější a méně těkavé než mateřské sloučeniny a významněji se proto uplatňuje technika LC–MS. Stanovení degradačních produktů reziduí pesticidů je v řadě případů též obtížné i proto, že tyto látky jsou obvykle přítomny ve vzorcích ve velmi nízkých koncentracích (řádově na hladinách jednotek $\mu\text{g kg}^{-1}$ a nižších). Metabolity pesticidů mohou být teoreticky detekovány v plodech, ale též v ostatních částech rostlin (listy) i poté, co mateřská látka již podlehla úplné degradaci. Přítomnost těchto látek tedy může i po delší době indikovat úmyslné použití pesticidního přípravku pro ošetření plodin a kontrolní analýza těchto látek může představovat jeden z klíčových důkazních nástrojů při kontrole dodržování pravidel v systému ekologické produkce.

3 VLASTNÍ POPIS METODIKY

3.1 Použitelnost metody

Metoda je obecně vhodná pro analýzu reziduí pesticidů a metabolitů pesticidů v listech, plodech, víně a v ovocných nápojích. Optimalizována a validována byla především pro kontrolu hroznů révy vinné a dále produktů zpracování hroznů (moštů, zkvašených moštů a vína), viz **Tab. I.** Metoda byla validována pro vybrané pesticidy s fungicidním a insekticidním účinkem, které jsou při ošetření vinic nejčastěji používány, nicméně metoda může být genericky rozšířena o další aktivní složky přípravků na ochranu rostlin.

3.2 Princip metody

Pesticidy a jejich metabolity jsou ze vzorku extrahovány, acetonitrem za intenzivního třepání v centrifugační kyvetě. Acetonitril je ze směsi s vodou oddělen po přidavku chloridu sodného a síranu hořečnatého. Analýza extraktů vzorků se provádí metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií za ionizace elektrosprejem, UHPLC–HRMS/MS(ESI).

Tabulka I: Přehled účinných látek a jejich metabolitů a obchodní názvy registrovaných přípravků, které danou účinnou látku obsahují (systematický název a strukturní vzorec, viz Příloha).

#	Analyt (účinná látka / metabolit)	CAS#	Obchodní názvy registrovaných přípravků
1	Cyflufenamid	[180409-60-3]	DYNALI
1a	<i>Cyflufenamid (E-isomer)*</i>	-	
1b	<i>Cyflufenamid-decyclopropyl glycoside</i>	-	
1c	<i>Hydroxy-cyflufenamid</i>	-	
2	Difenoconazole	[119446-68-3]	DYNALI
2a	<i>1,2,4-triazole</i>	<i>[288-88-0]</i>	
2b	<i>Difenoconazole CGA 189138</i>	-	
2c	<i>Difenoconazole CGA 205374</i>	-	
2d	<i>Difenoconazole CGA 205375</i>	-	
3	Dimethomorph	[110488-70-5]	Acrobat MZ WG, Areva Combi, Forum Gold, Forum Star, Orvego
3a	Dimethomorph-demethyl	-	
3b	Dimethomorph-demethyl glycoside	-	
3c	<i>Dimethomorph-Z7</i>	-	
3d	<i>Dimethomorph-Z37</i>	-	
4	Fenhexamid	[126833-17-8]	TELDOR 500 SC
4a	Fenhexamid-glycoside	-	
4b	Hydroxy-fenhexamid	-	
4c	Hydroxy-fenhexamid glycoside	-	

#	Analyt (účinná látka / metabolit)	CAS#	Obchodní názvy registrovaných přípravků
5	Folpet	[133-07-3]	Areva Combi, Cassiopee 79 WG, Fanatic F, Follow 80 WG, Folpan 80 WG, Forum Star, Melody Combi 65,3 WG, Momentum, Pegaso F, Pergado F, Ridomil Gold Combi Pepite, Videryo F, Vincare, Vincya F
5a	<i>Phthalimide</i>	-	
5b	<i>Phthalic acid</i>	-	
6	Iprodione	[36734-19-7]	Rovral Aquaflo
6a	<i>Iprodione-desisopropyl</i>	-	
7	Iprovalicarb	[140923-17-7]	Cassiopee 79 WG, Melody Combi 65,3 WG
7a	Hydroxy-iprovalicarb	-	
7b	Hydroxy-iprovalicarb glycoside	-	
8	Metrafenone	[220899-03-6]	Vivando
8a	Metrafenone CL 1500836	-	
8b	Metrafenone CL 379395	-	
8c	Metrafenone CL 300402	-	
8d	<i>Metrafenone CL 197675</i>	-	
9	Meptyldinocap	[131-72-6]	Karathane New
9a	<i>2,4-DNOP</i>	-	
10	Pyraclostrobin	[175013-18-0]	Cabrio Top
10a	Hydroxy-pyraclostrobin	-	
10b	Pyraclostrobin-desmethoxy	-	
10c	<i>Hydroxy-pyraclostrobin glycoside</i>	-	
11	Quinoxifen	[124495-18-7]	IQ Crystal
11a	<i>3-hydroxy-quinoxifen</i>	-	
12	Spiroxamine	[118134-30-8]	Falcon 460 EC, Impulse Super, Prosper, Rombus Trio
12a	Spiroxamine-N-oxid	-	
12b	Spiroxamine-N-desethyl	-	
12c	Spiroxamine-N-despropyl	-	
12d	<i>Spiroxamine-cyclohexanol</i>	-	
12e	<i>Spiroxamine-cyclohexanol glycoside</i>	-	
12f	<i>Spiroxamine-diol</i>	-	
12g	<i>Spiroxamine-diol glycoside</i>	-	
13	Tebuconazole	[107534-96-3]	Falcon 460 EC, Impulse Super, Luna Experience, Rombus Trio
13a	Hydroxy-tebuconazole	-	
13b	Hydroxy-tebuconazole glycoside	-	
14	Tebuufenpyrad	[119168-77-3]	Masai
15	Triadimenol	[55219-65-3]	Falcon 460 EC, Impulse Super, Rombus Trio
15a	<i>Triadimenol glycoside</i>	-	
15b	<i>Hydroxy-triadimenol</i>	-	
15c	<i>Hydroxy-triadimenol glycoside</i>	-	
16	Trifloxystrobin	[141517-21-7]	Zato 50 WG
16a	<i>Trifloxystrobin CGA321113</i>	-	

* látky označené kurzívou jsou metabolity uvedené literatuře, ve vzorcích však nebyly detekovány

3.3 Chemikálie a spotřební materiál

- certifikované individuální standardy pesticidů, Dr. Ehrenstorfer (SRN), Sigma-Aldrich (USA) a Fluka Analytical (USA).
- methanol – LiChrosolv, gradient grade, Merck (SRN)
- acetonitril – Chromasolv, gradient grade, Sigma-Aldrich (USA)
- aceton – p.a., Penta (ČR)
- síran hořečnatý, > 98 %, Fluka (USA)
- chlorid sodný, Penta (ČR)
- mravenčan amonný, 99,999 % , Sigma-Aldrich (USA)
- octan amonný, p.a. pro HPLC, Sigma-Aldrich (USA)
- kyselina mravenčí pro MS, Sigma-Aldrich (USA)
- trifenyolfosfát: vnitřní standard Sigma-Aldrich (USA)
- nicarbazin: vnitřní standard Sigma-Aldrich (USA)
- referenční roztok, (G1969-85001); Agilent Technologies (USA)
- ladící roztok, (G1969-85000); Agilent Technologies (USA)
- pipetovací špičky Combitip Advanced EPPENDORF 0,1 ml, 0,5 ml, 1 ml, 5 ml
- centrifugační plastové zkumavky (kyvety), objem 15 ml, 50 ml, např. GOSSELIN; (FR)

Poznámka: chemikálie a materiály uvedených specifikací a dodavatelů byly použity při vývoji a validaci této metody, lze ale použít položky od alternativních dodavatelů, pokud vykazují stejné nebo lepší specifikace čistoty.

3.4 Přístroje a zařízení

- homogenizátor: na velké objemy vzorků Foss Tecator 2094 (Švédsko), pro menší množství Grindomix GM200 Retsch (SRN)
- zařízení pro přípravu deionizované vody Millipore Milli Q Integral 3, Millipore (FR)
- Centrifuga Hettich Rotina 35 R nebo 38 R, Hettich (SRN) s 15 ml a 50 ml kyvetami
- pipeta EPPENDORF MULTIPETTE Stream 1 µl – 50 ml
- Běžné laboratorní sklo a vybavení
- LC-MS systém:
 - Kapalinový chromatograf Infinity 1290 LC, Agilent Technologies (USA)
 - Analytická kolona Acquity HSS T3, 100 × 2,1 mm; 1,8 µm, Waters (USA)
 - Hmotnostní spektrometr Agilent Ion-Mobility Q-TOF 6560 (USA)

3.5 Pracovní postup

3.5.1 Odběr a uchování vzorků

Odběr vzorků pro stanovení pesticidů se provede podle platných metodik úřední kontroly při dodržení zásad ČSN 56 0253. Zkušební vzorky musí být v laboratoři uchovávány před analýzou při teplotě -18°C v mrazicím zařízení a připraveny pro analýzu v souladu s nařízením Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005, Příloha 1, část A, a normou ČSN EN 15 662.

3.5.2 Příprava zásobních roztoků standardů

Certifikované standardy pesticidů se skladují v originálním balení v mrazicím zařízení při teplotě -18°C nebo nižší. Z nich se připravují zásobní roztoky pesticidů nejčastěji do 10 ml odměrných baněk, optimální navážka standardu je 10 – 50 mg, viz **Tab. II**. Baňky se doplňují na příslušný objem zvoleným rozpouštědlem (vhodné je použití 1% roztoku kyseliny mravenčí).

Tabulka II: Seznam použitých standardů pesticidů

#	Analyt	Rozpouštědlo	Čistota [%]	Dodavatel standardu
1	Difenoconazole	MeOH	97,2	Fluka Analytical
2	Dimethomorph	MeOH	99,0	Fluka Analytical
3	Fenhexamid	MeCN/MeOH	99,7	Fluka Analytical
4	Iprovalicarb	MeOH	98,7	Fluka Analytical
5	Meptyldinocap	MeOH	93,0	Dr. Ehrenstorfer GmbH
6	Metrafenone	Aceton	99,9	Fluka Analytical
7	Pyraclostrobin	MeCN	99,9	Sigma-Aldrich
8	Quinoxifen	Aceton	99,9	Sigma-Aldrich
9	Spiroxamin	MeCN	98,5	Fluka Analytical
10	Tebuconazole	MeCN	99,5	Sigma-Aldrich
11	Tebufenpyrad	MeOH	99,9	Fluka Analytical
12	Triadimenol	MeOH	98,0	Dr. Ehrenstorfer GmbH
13	Trifloxystrobin	MeCN	99,5	Fluka Analytical

Zásobní roztoky jsou uchovávány při teplotě -18°C s uzávěry zajištěnými proti úniku roztoku parafilmem. Ze zásobních roztoků pesticidů se postupným ředěním připraví primární směsné roztoky v acetonitrilu o koncentraci $50\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ do 10 ml odměrných baněk. Pro výpočet koncentrace je nezbytné koncentraci korigovat na čistotu standardu uvedenou v certifikátu dodaného výrobcem. Jejich dalším smísením ve 10 ml baňce vznikne pracovní roztok o koncentraci $5\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$, který je použit pro přípravu kalibračních roztoků, viz **Tab. III**.

Tabulka III: Příprava zředěných směsných standardů v acetonitrilu pro přípravu matričních standardů

Kalibrační roztok (matriční standard) [ng ml ⁻¹]	Pracovní roztok pro přípravu matričního standardu [ng ml ⁻¹]	Výsledný objem pracovního roztoku [ml]	Zásobní směsný roztok pro připravu pracovního roztoku [ng ml ⁻¹]	Pipetovaný objem zásobního roztoku [ml]	Pipetovaný objem MeCN [ml]
100	2000	1	5000	0,40	0,60
50	1000	1	5000	0,20	0,80
20	400	2	5000	0,16	1,84
10	200	1	400	0,50	0,50
5	100	1	400	0,25	0,75
2	40	1	400	0,10	0,90
1	20	1	400	0,05	0,95

Kalibrační roztoky matričních standardů jsou připravovány přidavkem pracovního roztoku standardu v čistém rozpouštědle o vyšší koncentraci do extraktu matrice neobsahující rezidua sledovaných látek (příp. do extraktu matrice naředěného odpovídajícím způsobem). Kalibrační roztoky matričních standardů jsou připraveny následovně: přímo do vialky s 0,9 ml extraktu matrice se přidá 0,05 ml pracovního roztoku standardu směsi pesticidů a 0,05 ml vnitřního standardu, tj. směs TPP (trifenylfosfát) a nicarbazinu o koncentraci 1 µg ml⁻¹. Po uzavření se obsah třepáním promíchá. Takto připravené roztoky je možno skladovat při 5 °C až 1 měsíc.

Pro LC–MS je obvykle volen kalibrační rozsah v rozmezí 1 – 100 ng ml⁻¹ a pokud koncentrace analytu ve vzorku tento rozsah přesahuje, je zapotřebí vzorek odpovídajícím způsobem naředit a měření zopakovat.

3.5.3 Extrakce vzorků

Homogenizace vzorků se provádí ve výše uvedených zařízeních. V případě analýzy hroznů je dle nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005 (Příloha 1, část A) určena k analýze pouze část vzorku po odstranění stopek.

Extrakční postup pro stanovení reziduí pesticidů a metabolitů pesticidů je společný. 10 g homogenátu hroznů, resp. 10 g vína nebo moštu se naváží s přesností na 0,01 g do 50 ml centrifugační kyvety, přidá se 10 ml acetonitrilu, kyveta se pevně uzavře a 2 min se obsah intenzivně promíchává třepáním. Do kyvety se přidá předvážený síran hořečnatý (4 g) a chlorid sodný (1 g). Kyveta se rychle uzavře a 1 min intenzivně třepe, aby ze síranu nevznikly hrudky. Během třepání se kyveta zahřívá, protože reakce vody se síranem hořečnatým je exotermní. Následně se přidá 100 µl směsného roztoku vnitřního standardu o koncentraci 5 µg ml⁻¹ a po důkladném protřepání se kyveta odstředí při 10 000 min⁻¹ po dobu 5 min. Z horní vrstvy

se odebere supernatant pomocí pasteurovy pipety do vialky. Výsledný obsah matrice v extraktu je 1 g ml^{-1} a koncentrace vnitřního standardu 50 ng ml^{-1} .

V případě analýzy listů révy vinné se naváží 2,5 g vzorku a do centrifugační kyvety se přidá 10 ml vody s 1 % kyseliny mravenčí (v/v). Zbytek extrakce je totožný, jak bylo popsáno výše, ekvivalent obsahu matrice je v tomto případě $0,25 \text{ g ml}^{-1}$.

V případě analýzy vzorku obsahující ethanol (zkvašené mošty, víno) dochází při extrakci po přidavku anorganických solí ke smísení přítomného ethanolu s extrakčním rozpouštědlem – acetonitrilem. V důsledku je výsledný objem extraktu vyšší než 10 ml, variabilitu v objemu extraktu je možné kompenzovat použitím vnitřního standardu.

3.5.4 Identifikace a kvantifikace

Pro analýzu vzorků pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie se použije vhodný chromatografický systém ve spojení s hmotnostním spektrometrem s vysokorozlišovacím hmotnostním analyzátozem a ionizací elektrosprejem. Základní parametry LC–HRMS/MS metody použité při stanovení analytů jsou uvedeny v **Tab. IV** a **Tab. V**.

Identifikace a kvantifikace reziduí pesticidů byla realizována na základě porovnání retenčních časů produktového spektra analytů ve vzorku s příslušnými standardy.

Metabolity pesticidů byly sledovány screeningově a jejich identifikace byla realizována na základě sledování přesné hmoty pseudomolekulových iontů (m/z), shody isotopového profilu a dle produktového spektra sloučeniny. Konfirmace identity metabolitů přímým srovnáním se standardem látky nebyla použita, neboť pro většinu sledovaných metabolitů nejsou analytické standardy dostupné.

Tabulka IV: Podmínky analýzy LC–HRMS/MS (ESI+)

UHPLC					
Mobilní fáze	A: voda + 5mM mravenčan amonný + 0,1% kyselina mravenčí B: methanol + 5mM mravenčan amonný + 0,1% kyselina mravenčí				
Kolona	Acquity UPLC HSS T3 (100 mm × 2,1 mm × 1,8 μm)				
Objem nastříkovaného vzorku	4 μl				
Gradient	Čas [min]	Průtok [ml min ⁻¹]	A [%]	B [%]	Charakter změny gradientu
	0	0,2	95	5	
	10,0	0,3	1	99	Lineární
	12,0	0,4	1	99	Lineární
	12,1	0,4	95	5	Lineární
	14,0	0,4	95	5	Skokově
Teplota kolony	40 °C				
Teplota autosampleru	5 °C				
Oplach	50% methanol				
MS					
Ionizace	API – typ ESI (Dual-Spray AJS)				
Akviziční mód	Q-TOF Only				
Reference	<i>m/z</i> 121,0509 (C ₅ H ₄ N ₄) <i>m/z</i> 922,0098 (C ₁₈ H ₁₈ O ₆ N ₃ P ₃ F ₂₄)				
Hmotnostní rozsah	100–1100 <i>m/z</i>				
Napětí vložené na konec sprejovací kapiláry („Nozzle voltage“)	300 V				
Pomocný plyn („Sheath gas“)	380 °C; průtok: 12,0 l min ⁻¹				
Nebulizér	40 psi (276 kPa)				
Napětí na kapiláře („V _{cap} “)	3000 V				
Fragmentor	380 V				
Sušící plyn	N ₂ ; průtok: 10,0 l min ⁻¹				
Teplota sušícího plynu	180 °C				
Typ hmotnostního analyzátoru	hybridní analyzátor: kvadrupól-analyzátor doby letu (Q-TOF)				
MS/MS					
Kolizní energie	10 – 25 V (kolizní cela – oktapól)				
Kolizní plyn	N ₂				

Tabulka V: Podmínky analýzy LC-HRMS/MS (ESI-)

UHPLC					
Mobilní fáze	A: voda + 5mM octan amonný B: methanol				
Kolona	Acquity UPLC HSS T3 (100 mm × 2,1 mm × 1,8 μm)				
Objem nastříkovaného vzorku	4 μl				
Gradient	Čas [min]	Průtok [ml min ⁻¹]	A [%]	B [%]	Charakter změny gradientu
	0	0,2	95	5	
	10,0	0,3	1	99	Lineární
	12,0	0,4	1	99	Lineární
	12,1	0,4	95	5	Lineární
	14,0	0,4	95	5	Skokově
Teplota kolony	40 °C				
Teplota autosampleru	5 °C				
Oplach	50% methanol				
MS					
Ionizace	API – typ ESI (Dual-Spray AJS)				
Akviziční mód	Q-TOF Only				
Reference	<i>m/z</i> 119,0360 (C ₅ H ₄ N ₄) <i>m/z</i> 966,0007 (C ₁₈ H ₁₈ F ₂₄ N ₃ O ₆ P ₃)				
Hmotnostní rozsah	100–1100 <i>m/z</i>				
Napětí vložené na konec sprejovací kapiláry („Nozzle voltage“)	300 V				
Pomocný plyn („Sheath gas“)	380 °C; průtok: 12,0 l min ⁻¹				
Nebulizér	40 psi (276 kPa)				
Napětí na kapiláře („V _{cap} “)	3000 V				
Fragmentor	380 V				
Sušící plyn	N ₂ ; průtok: 10,0 l min ⁻¹				
Teplota sušícího plynu	180 °C				
Typ hmotnostního analyzátoru	hybridní analyzátor: kvadrupól-analyzátor doby letu (Q-TOF)				
MS/MS					
Kolizní energie	10 – 20 V (kolizní cela – oktapól)				
Kolizní plyn	N ₂				

3.5.4.1 Identifikace metabolitů pesticidů - Interpretace dat z HRMS

Pro identifikaci metabolitů pesticidů byl aplikován níže popsáný postup.

Extrakty vzorků jsou nejprve změřeny s využitím vysokorozlišovací MS s plnou akvizicí spekter, měřeno v hmotnostním rozsahu 100–1100 m/z . K vyhodnocení naměřených dat se využívá software *Agilent MassHunter Workstation*. Pro vyhledávání metabolitů v datech jsou využity literární zdroje, dále jsou uvažovány sloučeniny, které potenciálně mohou vznikat biotransformačními reakcemi (oxidace, glykosylace, dealkylace apod.) a případně je možné data zpracovat pomocí softwaru pro predikci metabolitů (např. *Agilent Metabolite ID*). Z vybraných látek, charakterizovaných retenčním časem, přesnou hmotou a biotransformační reakcí, je vytvořen seznam potenciálních metabolitů, pro které jsou naměřena produktová spektra v režimu HRMS/MS. Změřená MS/MS spektra jsou využita pro potvrzení identity (popř. struktury) navržených metabolitů. Produktová spektra mohou být zpracována softwarem *Agilent MSC*, který pomáhá při průkazu korelace mezi strukturním vzorcem a přesnou hmotou fragmentů v MS/MS spektru.

Potvrzení identity metabolitů je tedy provedeno na základě přesné monoisotopické hmoty, poměrů isotopů, vzdálenosti isotopů a přesné hmoty jednotlivých fragmentů z MS/MS spektra. Odchylka naměřené přesné hmoty od vypočtené hmoty ze sumárního vzorce je vyjadřována jako chyba hmoty v jednotkách ppm, jejíž hodnota by neměla překročit ± 5 ppm. Retenční časy a přesné hmoty (m/z) pseudomolekulových iontů sledovaných analytů a významných fragmentových iontů v daném systému jsou uvedeny v **Tab. VI**. V **Tab. VII** jsou uvedeny sumární vzorce a přesné hmoty metabolitů, které jsou uvedeny v literatuře jako produkty metabolismu pesticidů v révě vinné, ale ve vzorcích nebyly detekovány.

Tabulka VI: Sledované přesné hmoty pseudomolekulových iontů $[M+H]^+$, resp. $[M-H]^-$ sledovaných analytů (reziduí pesticidů i metabolitů) a fragmentů a retenční časy

Analyt (účinná látka/ metabolit)	Sumární vzorec	Ionizace	Přesná hmotnost pseudomolekulového iontu analytu (m/z)	Přesná hmotnost fragmentu 1	Přesná hmotnost fragmentu 2	Přesná hmotnost fragmentu 3	Kolizní energie (V)	RT (min)
Difenoconazole	$C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$	ESI+	406,0720	337,0398	251,0020	291,0323	10	9,8+10,06
Dimethomorph	$C_{21}H_{22}ClNO_4$	ESI+	388,1310	301,0650	165,0541	114,0546	10	8,89+9,07
Dimethomorph-demethyl	$C_{20}H_{20}ClNO_4$	ESI+	374,1154	287,0480	-	-	10	8,74
Dimethomorph-demethyl glycoside	$C_{26}H_{30}ClNO_9$	ESI+	536,1682	374,1154	287,0480	-	10	7,69
Fenhexamid	$C_{14}H_{17}Cl_2NO_2$	ESI+	302,0709	97,1008	55,0525	-	20	9,35
		ESI-	300,0564	264,0796	249,0558	-	20	9,27
Fenhexamid-glykosid	$C_{20}H_{27}Cl_2NO_7$	ESI+	464,1237	302,0702	97,1008	-	10	8,70
Hydroxy-fenhexamid	$C_{14}H_{17}Cl_2NO_3$	ESI+	318,0658	300,0549	113,0961	97,1008	10	8,56
		ESI-	316,0513	280,0730			20	8,5
Hydroxy-fenhexamid glycoside	$C_{20}H_{27}Cl_2NO_8$	ESI+	480,1187	318,0658	300,0547	97,1008	10	7,58
Iprovalicarb	$C_{18}H_{28}N_2O_3$	ESI+	321,2173	119,0852	116,0700	144,0644	10	9,37
		ESI-	319,2027	259,1470	216,0911		20	9,35
Hydroxy-iprovalicarb	$C_{18}H_{28}N_2O_4$	ESI+	337,2122	135,0800	116,0696	144,0644	10	7,9+8,05
Hydroxy-iprovalicarb glycoside	$C_{24}H_{38}N_2O_9$	ESI+	499,2650	337,2099	135,0800	116,0696	10	7,25+7,45
Metrafenone	$C_{19}H_{21}BrO_5$	ESI+	409,0645	209,0808	226,9706	-	10	10,06
Metrafenone CL 1500836	$C_{19}H_{20}O_6$	ESI+	345,1333	163,0387	165,0545	181,0849	15	8,5
Metrafenone CL 379395	$C_{19}H_{19}BrO_6$	ESI+	423,0438	240,9500	242,9640	-	15	9,7
Metrafenone CL 300402	$C_{19}H_{19}BrO_6$	ESI+	423,0438	225,0758	223,0596	212,9923	15	8,9
Pyraclostrobin	$C_{19}H_{18}ClN_3O_4$	ESI+	388,1059	163,0628	194,0811	296,0585	15	9,89
Hydroxy-pyraclostrobin	$C_{19}H_{18}ClN_3O_5$	ESI+	404,1008	194,0811	163,0628	132,0434	20	9,85
Pyraclostrobin-desmethoxy	$C_{18}H_{16}ClN_3O_3$	ESI+	358,0953	164,0704	132,0434	326,0677	20	9,88
Quinoxifen	$C_{15}H_8Cl_2FNO$	ESI+	308,0040	196,9789	272,0274	213,9820	25	10,64
Spiroxamine	$C_{18}H_{35}NO_2$	ESI+	298,2741	144,1345	100,1083	-	20	8,87
Spiroxamine- <i>N</i> -oxid	$C_{18}H_{35}NO_3$	ESI+	314,2690	160,1328	130,1218	100,1112	20	9,0+9,15+9,3
Spiroxamine- <i>N</i> -desethyl	$C_{16}H_{31}NO_2$	ESI+	270,2428	116,1066	72,0810	-	20	8,7
Spiroxamine- <i>N</i> -despropyl	$C_{15}H_{29}NO_2$	ESI+	256,2271	102,0909	57,9750	-	20	8,4
Tebuconazole	$C_{16}H_{22}ClN_3O$	ESI+	308,1524	70,0390	125,0147	-	20	9,76
Hydroxy-tebuconazole	$C_{16}H_{22}ClN_3O_2$	ESI+	324,1473	70,0390	125,0147	141,0078	20	9,36+9,66
Hydroxy-tebuconazole glycoside	$C_{22}H_{32}ClN_3O_7$	ESI+	486,2002	324,1481	70,0390	-	20	8,37
Tebufenpyrad	$C_{18}H_{24}ClN_3O$	ESI+	334,1681	145,0526	147,1169	171,0311	20	10,42
Triadimenol	$C_{14}H_{18}ClN_3O_2$	ESI+	296,1160	70,0405	99,0812	-	10	9,28
Trifloxystrobin	$C_{20}H_{19}F_3N_2O_4$	ESI+	409,1370	186,0524	206,0811	116,0492	10	10,13
TPP (ISTD)	$C_{18}H_{15}O_2P$	ESI+	327,0781	77,0376	215,0250	233,0356	10	9,8
Nicarbazin (ISTD)	$C_{19}H_{18}N_6O_6$	ESI-	301,0578	137,0354	107,0372	-	20	9,2

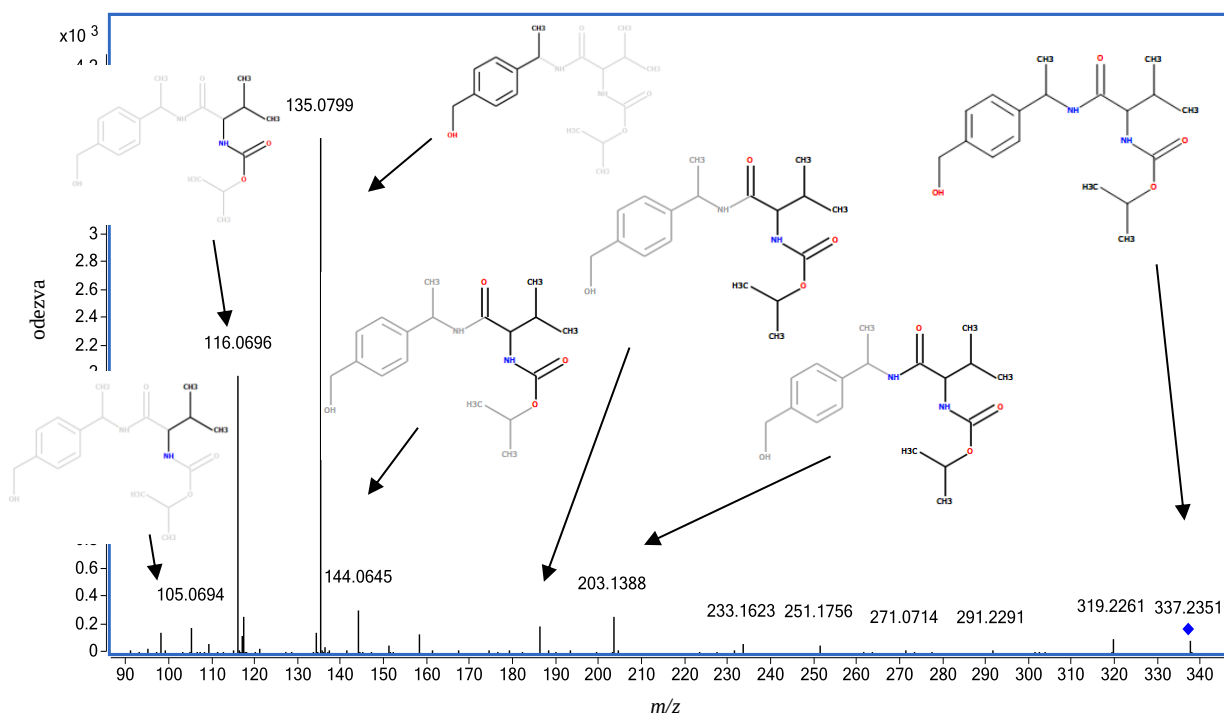
Tabulka VII: Sumární vzorce a přesné hmoty metabolitů, které jsou uvedené literatuře, ve vzorcích nedetekovány

Analyt (účinná látka/ metabolit)	Sumární vzorec	Přesná hmota analytu [Da]	Reference
Cyflufenamid (E-isomer)	C ₂₀ H ₁₇ F ₅ N ₂ O ₂	412,1210	[11]
Cyflufenamid-decyclopropyl glycoside	C ₂₂ H ₂₁ F ₅ N ₂ O ₈	536,1218	[11]
Hydroxy-cyflufenamid	C ₂₀ H ₁₇ F ₅ N ₂ O ₃	428,1159	[11]
1,2,4-triazole	C ₂ H ₃ N ₃	69,0327	[12]
Difenoconazole CGA 189138	C ₁₃ H ₈ Cl ₂ O ₃	281,9851	[12]
Difenoconazole CGA 205374	C ₁₆ H ₁₁ Cl ₂ N ₃ O ₂	347,0228	[12]
Difenoconazole CGA 205375	C ₁₆ H ₁₃ Cl ₂ N ₃ O ₂	349,0385	[12]
Dimethomorph-Z7	C ₁₅ H ₁₃ ClNO ₃	276,0553	[13]
Dimethomorph-Z37	C ₂₁ H ₂₀ ClNO ₅	401,1030	[13]
Phthalimide	C ₈ H ₅ NO ₂	147,0320	[14]
Phthalic acid	C ₈ H ₆ O ₄	166,0266	[14]
Iprodione-desisopropyl	C ₁₀ H ₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	286,9865	[15]
Metrafenone CL 197675	C ₁₉ H ₁₉ BrO ₇	438,0314	[16]
2,4-DNOP	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₅	296,1372	[17]
Hydroxy-pyraclostrobin glycoside	C ₂₅ H ₂₈ ClN ₃ O ₁₀	565,1463	[18]
3-hydroxy-quinoxyfen	C ₁₅ H ₈ Cl ₂ FNO ₂	322,9916	[19]
Spiroxamine-cyclohexanol	C ₁₀ H ₂₀ O	156,1514	[20]
Spiroxamine-cyclohexanol glycoside	C ₁₆ H ₃₀ O ₆	318,2042	[20]
Spiroxamine-diol	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172,1463	[20]
Spiroxamine-diol glycoside	C ₁₆ H ₃₀ O ₇	334,1992	[20]
Triadimenol glycoside	C ₂₀ H ₂₈ ClN ₃ O ₇	457,1616	[21]
Hydroxy-triadimenol	C ₁₄ H ₁₈ ClN ₃ O ₃	311,1037	[21]
Hydroxy-triadimenol glycoside	C ₂₀ H ₂₈ ClN ₃ O ₈	473,1565	[21]
Trifloxystrobin CGA321113	C ₁₉ H ₁₇ F ₃ N ₂ O ₄	394,1140	[22]

Příklad identifikace metabolitu iprovalicarb-hydroxy

V retenčním čase 7,9 min byl detekován pseudomolekulový ion m/z 337,2123, pro který byl navržen sumární vzorec C₁₈H₂₈N₂O₄ (teoretická hmota 336,2049 Da, chyba určení hmoty -2,2 ppm). V produktovém spektru této látky (viz **Obr.2**) bylo detekováno 6 fragmentových iontů – m/z 203,1380; m/z 186,1116; m/z 144,0640; m/z 135,0800; m/z 116,0705 a m/z 98,0605, které byly využity při identifikaci metabolitu. Uvedené fragmenty byly detekovány též v produktovém spektru fungicidu iprovalicarb, výjimkou je fragment m/z 135,0800, jehož přesná hmota odpovídá fragmentu m/z 119,0853 (detekován v MS/MS spektru iprovalicarb), která je navýšena o hmotu atomu kyslíku, který byl do struktury molekuly vnesen biotransformační reakcí. Při zohlednění měřených dat a údajů uvedených v literárních zdrojích [9] byla tato sloučenina identifikována jako iprovalicarb-hydroxy. V produktovém

spektru jsou znázorněny též návrhy pravděpodobných strukturních vzorců fragmentů, které byly vytvořeny s využitím softwaru *Agilent MSC* a znázorňují tu část molekuly prekurzoru, která se při fragmentaci odštěpí a nese náboj.



Obr. 2 Produktové spektrum metabolitu iprovalicarb-hydroxy, retenční čas 7,9 min

3.5.4.2 Kvantifikace reziduí pesticidů

Kalibrace, korekce na vnitřní standard a další vyhodnocení naměřených dat je zpracováváno pomocí softwarového vybavení LC-HRMS/MS přístroje (*Agilent MassHunter Quantitative Analysis*) případně je jako alternativu možno použít program Microsoft Excel, přičemž je kontrolována linearita kalibrační křivky pomocí koeficientu determinace (R^2).

Výpočet koncentrace analytu ve vzorku metodou externí kalibrace s korekcí na vnitřní standard se provádí podle následujícího vztahu:

$$A_N = \frac{A_a}{A_{IS}}$$

tyto hodnoty jsou následně vynášeny do závislosti na koncentraci analytu (v ng ml^{-1}). Z kalibrační závislosti lze tedy vypočítat koncentraci analytu ve vzorku (v ng ml^{-1}). Přepočet koncentrace analytu ve vzorku ($\mu\text{g kg}^{-1}$) metodou externí kalibrace se provádí následovně:

$$C_{vz} = C_{cal} \cdot f$$

$$f = \frac{V_{extrakt}}{m}$$

A_N	korigovaná plocha
A_a	plocha analytu
A_{IS}	plocha vnitřního standardu
C_{vz}	koncentrace analytu ve vzorku ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
C_{cal}	koncentrace analytu vypočítaná z kalibrační závislosti ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
V_{extrakt}	objem extraktu (ml)
m	navážka vzorku (kg)
f	přepočítávací faktor (obsah matrice v extraktu)

3.5.5 Pracovní charakteristiky

Pracovní charakteristiky metody byly zjišťovány pro pesticidy (mateřské sloučeniny) ve vzorcích vína, hroznů a listů révy vinné na základě přidavku standardů ke vzorkům neobsahující cílové látky. Po přidavku roztoku se vzorek promíchá a nechá minimálně 20 min stát zakrytý při laboratorní teplotě. Následně se extrahuje výše popsáním extrakčním postupem, viz kapitola 3.5.3. Výtěžnost a opakovatelnost postupu byla dokumentována na dvou koncentračních hladinách. Získané pracovní charakteristiky metody pro jednotlivé matrice jsou uvedeny v **Tab. VIII** a **Tab. IX**. Aktuální meze stanovitelnosti jsou vždy poněkud závislé na stavu analytického systému a je proto třeba, aby byly zahrnuty do pravidelné verifikace metody (spolu s kontrolou výtěžnosti).

Pro všechny pesticidy uvedené v **Tab. VIII** a **Tab. IX** umožňuje tato metoda s velmi dobrou přesností – tj. opakovatelností a výtěžností – měřit rezidua v hroznech a vínech na koncentračních hladinách rovno nebo menších než $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Tato hodnota představuje směrnou hodnotu pro posuzování potravin pocházejících z ekologického zemědělství. Zároveň tato metoda poskytuje velmi dobré a stabilní pracovní charakteristiky, které zcela splňují požadavky dokumentu SANTE 11945/2015 závazného pro úřední kontrolu reziduí pesticidů.

Tabulka VIII: Výtěžnosti a opakovatelnosti dosažené při validaci (n=6)

Analyt	Hrozny				Vino				Listy			
	2 µg kg ⁻¹		20 µg kg ⁻¹		2 µg kg ⁻¹		20 µg kg ⁻¹		8 µg kg ⁻¹		80 µg kg ⁻¹	
	výtěžnost	RSD	výtěžnost	RSD	výtěžnost	RSD	výtěžnost	RSD	výtěžnost	RSD	výtěžnost	RSD
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
Difenoconazole	87	5	97	4	94	2	96	1	88	4	89	1
Dimethomorph	93	2	92	1	96	2	91	4	95	3	93	4
Fenhexamid	88	3	89	4	98	3	94	2	89	3	88	2
Iprovalicarb	90	2	94	5	94	16	93	2	90	11	90	2
Metrafenone	84	6	97	3	94	2	95	1	88	2	93	2
Pyraclostrobin	90	2	89	1	89	2	88	1	89	1	88	1
Quinoxifen	83	4	85	2	88	3	90	1	81	4	82	3
Spiroxamine	94	1	90	2	91	1	84	9	92	2	93	3
Tebuconazole	87	3	92	2	92	2	95	1	91	2	88	2
Tebufenpyrad	92	3	87	1	89	2	92	2	89	3	85	1
Triadimenol	<LOQ		92	4	<LOQ		96	5	<LOQ		83	7
Trifloxystrobin	89	1	94	1	91	1	92	2	90	2	85	2
Meptyldinocap	<LOQ		85	3	<LOQ		94	4	<LOQ		79	6

Tabulka IX: Meze kvantifikace a lineární rozsah pro jednotlivé analyty (mg kg⁻¹)

Analyt	LOQ (mg kg ⁻¹) + lineární rozsah								
	Hrozny			Vino			Listy		
	navážka 10 g			navážka 10 g			navážka 2,5 g		
Difenoconazole	0,001	-	0,05	0,001	-	0,02	0,004	-	0,4
Dimethomorph	0,001	-	0,02	0,001	-	0,1	0,004	-	0,2
Fenhexamid	0,001	-	0,02	0,001	-	0,02	0,008	-	0,08
Iprovalicarb	0,001	-	0,05	0,001	-	0,05	0,004	-	0,2
Metrafenone	0,001	-	0,1	0,001	-	0,02	0,004	-	0,4
Pyraclostrobin	0,001	-	0,05	0,001	-	0,05	0,004	-	0,2
Quinoxifen	0,001	-	0,02	0,001	-	0,02	0,004	-	0,08
Spiroxamine	0,001	-	0,02	0,001	-	0,02	0,004	-	0,08
Tebuconazole	0,001	-	0,05	0,001	-	0,1	0,004	-	0,2
Tebufenpyrad	0,001	-	0,05	0,001	-	0,1	0,004	-	0,2
Triadimenol	0,01	-	0,1	0,01	-	0,05	0,04	-	0,4
Trifloxystrobin	0,001	-	0,02	0,001	-	0,02	0,004	-	0,2
Meptyldinocap	0,005	-	0,1	0,005	-	0,1	0,02	-	0,4

Stanovení validačních parametrů metabolitů, resp. degradačních produktů pomocí přídavku roztoku standardu látky nebylo realizováno, neboť pro sledované metabolity nebyly analytické standardy dostupné. Z opakovaných analýz vzorku (extrakčního postupu), který přirozeně obsahuje metabolity pesticidů, byla stanovena relativní směrodatná odchylka odezvy analytů, kterou byla charakterizována opakovatelnost metody (viz **Tab. X**).

Tabulka X: Opakovatelnost metody pro stanovení metabolitů pesticidů v listech révy vinné (n=6)

Metabolit/degradační produkt	RSD [%]
Dimethomorph-demethyl	13
Fenhexamid glycoside	8
Fenhexamid-hydroxy	12
Fenhexamid-hydroxy glycoside	5
Iprovalicarb-hydroxy	14
Iprovalicarb-hydroxy glycoside	13
Metrafenone-CL 1500836	6
Metrafenone-CL 379395	6
Metrafenone-CL 3000402	4
Pyraclostrobin-desmethoxy	6
Pyraclostrobin-hydroxy	3
Spiroxamine-N-desethyl	14
Spiroxamine-N-despropyl	10
Spiroxamine-N-oxide	2
Tebuconazole-hydroxy	9
Tebuconazole-hydroxy glycoside	8

4 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

V ekologické produkci je velmi omezeno použití pesticidů, povolené jsou jen určité látky a k jejich aplikaci by mělo být přistoupeno až v okamžiku, kdy nelze rostliny náležitým způsobem ochránit pomocí nechemických postupů (přirození nepřátelé škůdců apod.). Průkaz přítomnosti reziduí nepovolených účinných látek přípravků na ochranu rostlin v současné době představuje jeden z důležitých nástrojů pro kontrolu potravin vyprodukovaných v ekologickém zemědělství. V důsledku (bio)degradace pesticidů může dojít k transformaci a vzniklé metabolity mohou poté sloužit jako marker použití přípravku i poté, co rezidua mateřské účinné látky již nelze detekovat.

Popisovaná metoda je založena na extrakci pomocí multireziduální metody QuEChERS (viz též ČSN EN 15 662). V odborné literatuře bylo popsáno, že tato extrakční metoda je vhodná pro stanovení několika stovek reziduí pesticidů. Experimentálně bylo zjištěno, že metoda QuEChERS též poskytuje dostatečnou extrakční účinnost metabolitů pesticidů zařazených v dosavadním rozsahu sledovaných analytů v porovnání s jinými metodami přípravy vzorku. Tato skutečnost umožňuje simultánní stanovení obou skupin látek – reziduí pesticidů i jejich metabolitů – v acetonitrilovém extraktu v rámci jedné analýzy s využitím techniky UHPLC–HRMS/MS.

Pracovní charakteristiky popisované metody pro stanovení vybraných reziduí pesticidů ve vzorcích vína a v listů a hroznů révy vinné byly validovány. Při stanovení reziduí pesticidů

ve vzorcích hroznů a vína jsou dosahovány limity kvantifikace pod $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, tudíž touto metodou je možné monitorovat hladiny reziduí při kontrole dodržení pravidel pro ekologickou produkci. Rozšíření multireziduální metody na dosud nesledované metabolity účinných látek při snížení mezí stanovitelnosti všech analytů je podstatnou inovací v laboratorní kontrole s tím, že na tomto základě lze implementovat zcela novou kontrolní strategii při prokazování nedodržování zásad ekologického zemědělství.

5 POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Popisovaná metoda poskytuje rychlou a přesnou informaci o množství reziduí pesticidů ve vzorku a lze ji použít pro kontrolu reziduí pesticidů nejen v produktech ekologického zemědělství, ale také v rostlinném materiálu odebraném přímo v terénu u kontrolovaného subjektu. Parametry a pracovní charakteristiky analytické metody založené na principu UHPLC–HRMS/MS jsou pro sledovaná rezidua pesticidů v souladu s požadavky uvedených v závazném dokumentu SANTE 11945/2015. Současně tato metoda poskytne informaci o přítomnosti transformačních produktů pesticidů.

Metoda byla primárně vyvinuta pro analýzy v laboratořích Ústředního zkušebního a kontrolního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ), Státní zemědělské a potravinářské inspekce (SZPI), případně dalších, za účelem průkazu falšování produktů z ekologické produkce. Metodu lze genericky aplikovat také na další pesticidy a jejich metabolity.

6 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Využití metodiky kontrolními laboratořemi umožní zvýšit efektivitu kontroly produktů ekologického zemědělství, zvýší garanci původu produktu a jeho chemické bezpečnosti a projeví se na kvalitě produktů nabízených spotřebitelům.

Zhodnocení z hlediska ekonomických aspektů bylo provedeno za předpokladu, že laboratoř, která chce uvedenou metodu zavést, již má zkušenosti s LC-MS analýzou a vlastní tak kapalinový chromatograf s vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometrem. K realizaci analýz je tedy pak potřebné jen běžné vybavení laboratoře, viz kapitola 3.4, další investice nejsou potřebné.

Implementace metody zahrnuje zjištění aktuálních pracovních charakteristik, zejména ověření dostatečnosti limitů kvantifikace, linearity, ale také verifikaci metody pomocí přidavku pesticidů na předem známou hladinu a zjištění výtěžnosti, případně i opakovatelnosti metody v podmínkách konkrétní laboratoře. Za předpokladu, že by bylo provedeno 20 verifikačních

a kontrolních analýz, přičemž provozní náklady na jednu analýzu by byly 3200 Kč, celkové náklady na implementaci by se rovnaly 64 tis. Kč.

Ekonomicky významným přínosem je podstatné zvýšení účinnosti kontroly dodržování pravidel ekologického zemědělství a snížení ztrát způsobených mimo jiné decertifikací biopotravin v důsledku nesprávného použití nepovolených pesticidů. Dalším přínosem je zvýšení důvěry veřejnosti k produktům ekologického zemědělství, což v konečném důsledku přinese i zvýšení jejich spotřeby. Ekonomické přínosy očekávané v této oblasti nelze však přesně kvantifikovat.

7 SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- [1] Anastasiades M., Lehotay S.J., Štajnbaher D., Schenck F.J.: Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and „dispersive solid-phase extraction“ for the determination of pesticide residue in produce, J. AOAC (2003) 86:412–431.
- [2] Nařízení 396/2005/ES o maximálních limitech reziduí pesticidů v potravinách a krmivech rostlinného a živočišného původu a na jejich povrchu.
- [3] Nařízení 2007/834/ES o ekologické produkci a označování ekologických produktů a o zrušení nařízení (EHS) č. 2092/91.
- [4] Nařízení 2008/889/ES kterým se stanoví prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 834/2007 o ekologické produkci a označování ekologických produktů, pokud jde o ekologickou produkci, označování a kontrolu.
- [5] Skidmore M.W., Benner J.P., Chun Lam C.C., Booth J.D., Clark T., Gledhill A.J., Roberts K.J.: Bioavailability of Common Conjugates and Bound Residues, in Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety, H. Ohkawa, H. Miyagawa, P.W. Lee, Editor. 2007, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. p. 383-393.
- [6] Document N° SANTE 11945/2015 Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. EK, Brussels, 2015
- [7] Wang J., Cheung W.: UHPLC/ESI-MS/MS Determination of 187 Pesticides in Wine, J. AOAC (2016) 99:539-557.
- [8] ČSN EN 15662:2009 Potraviny rostlinného původu – Stanovení reziduí pesticidů s použitím GC-MS a/nebo LC-MS/MS po extrakci acetonitrem/separaci a přečištění pomocí disperzní SPE – Metoda QuEChERS
- [9] Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance iprovalicarb. EFSA Journal 2015; 13 (4): 4060. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2015.4060/epdf>. (staženo 27.12.2016)
- [10] Stupák M., Jandová R., Suchanová M., Kocourek V., Hajšlová J.: Uplatněná certifikovaná metodika: Metody odběru a analýzy potravin pro sledování kontaminace surovin a cereálních výrobků ošetřených insekticidními aerosoly. VŠCHT Praha, 2014.
- [11] Modification of the existing MRLs for cyflufenamid in various crops. EFSA Journal 2011;9(5):216. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2011.2161/epdf>
- [12] PESTICIDE RESIDUES IN FOOD 2007 Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. REPORT 2007 - Difenconazole (224). <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1556e/a1556e00.pdf>
- [13] PESTICIDE RESIDUES IN FOOD 2007 Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. REPORT 2007 - Dimethomorph (225). <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1556e/a1556e00.pdf>
- [14] Reasoned opinion on the modification of the existing MRL for folpet in wine grapes. EFSA Journal 2012;10(6):2769. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2012.2769/epdf>
- [15] Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for iprodione according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. EFSA Journal 2013;11(10):3438 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2013.3438/epdf>
- [16] PESTICIDE RESIDUES IN FOOD 2014 Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. REPORT 2014 - Metrafenone (278). <http://www.fao.org/3/a-i4245e.pdf>
- [17] PESTICIDE RESIDUES IN FOOD 2010 Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. REPORT 2010 - Meptyldinocap (244). <http://www.fao.org/docrep/013/i1949e/i1949e.pdf>

- [18] Review of the existing maximum residue levels (MRLs) for pyraclostrobin according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. EFSA Journal 2011;9(8):2344. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2011.2344/epdf>
- [19] PESTICIDE RESIDUES IN FOOD 2006 Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. REPORT 2006 - Quinoxifen (222). http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/JMPRepor2006.pdf
- [20] Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for spiroxamine according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. EFSA Journal 2015;13(1):3992. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2015.3992/epdf>
- [21] Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance triadimenol. EFSA Scientific Report (2008) 177, 1-134 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2008.177r/epdf>
- [22] Reasoned Opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for trifloxystrobin according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. EFSA Journal 2014;12(2):3592. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2014.3592/epdf>

8 SEZNAM PUBLIKACÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH METODICE

- Schusterova D., Suchanova M., Pulkrabova J., Rucki V., Urban J., Kocourek V., Hajslova J.: Pesticide transformation products as markers of their unauthorized application in organic farming. 11th European Pesticide Residue Workshop, 24.-27.5.2016, Limassol (Cyprus), Programme and Book of Abstracts p. 178.

9 SEZNAM ZKRATEK

EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
ESI	v MS: ionizace elektrosprejem
GAP	Správná zemědělská praxe
GC	Plynová chromatografie
ISTD	Vnitřní standard
LC	Kapalinová chromatografie; UHPLC: ultraúčinná kapalinová chromatografie
LOQ	Mez stanovitelnosti, kvantifikace (<i>Limit of quantification</i>)
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MLR	Maximální limit reziduí
MRM	Multireziduální metoda
MS	Hmotnostní spektrometrie (MS/MS: tandemová hmotnostní spektrometrie; HRMS: vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie)
POR	Přípravek na ochranu rostlin
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
RSD	Relativní směrodatná odchylka (zde za podmínek opakovatelnosti)
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
ÚKZÚZ	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

10 AUTOŘI A OPONENTI

Metodu zpracovali:

Ing. Dana Schusterová (20 %), Ing. Marie Suchanová, Ph.D. (20 %), Ing. Monika Tomaniová, Ph.D. (20 %), prof. Ing. Vladimír Kocourek, CSc. (20 %), prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc. (20 %)

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Ústav analýzy potravin a výživy, FPBT
Technická 3, 166 28 Praha 6 - Dejvice

Září 2016, Praha

Oponenti:

- 1) **Ing. Radim Štěpán, Ph.D.**, Inspektorát SZPI v Praze, NRL
Za Opravnou 300/6, 150 00 Praha 5

- 2) **Ing. Markéta Pospíchalová**, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský,
Hroznová 63/2, 656 06 Brno

Dana Schusterová, Marie Suchanová, Monika Tomaniová, Vladimír Kocourek, Jana Hajšlová

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Cílová analýza pesticidních látek a jejich metabolitů v rostlinných materiálech z ekologické produkce

Vydala: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Technická 5, 166 28 Praha 6

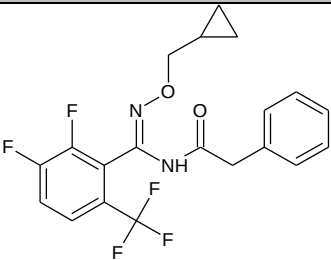
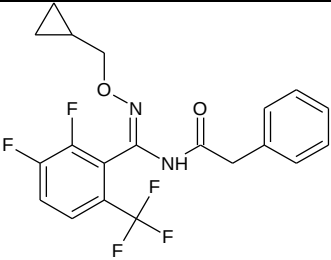
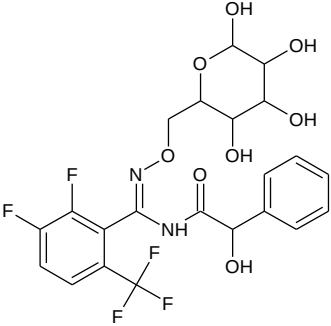
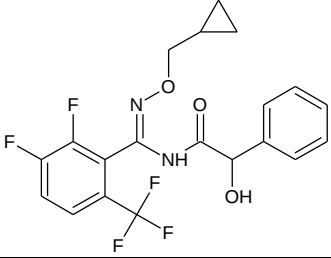
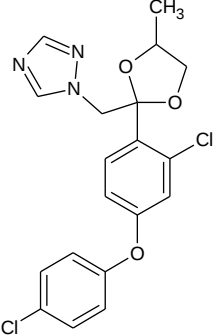
Oponenti: Ing. Radim Štěpán, Ph.D., Ing. Markéta Pospíchalová

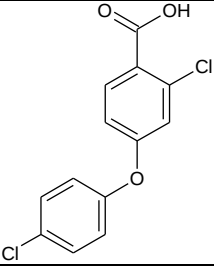
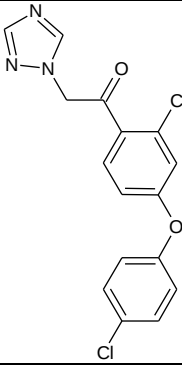
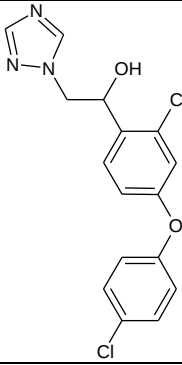
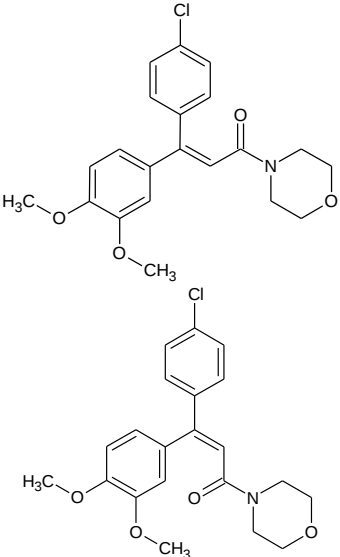
Rok vydání: 2016

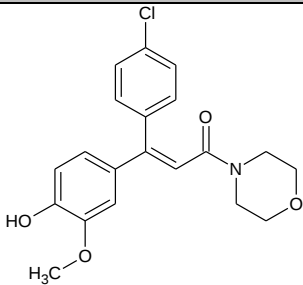
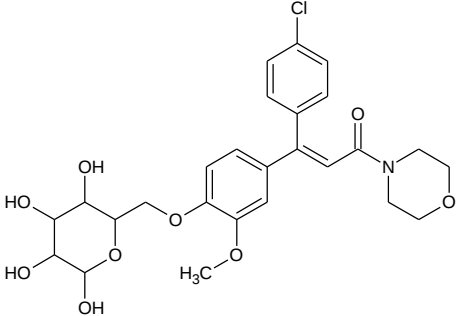
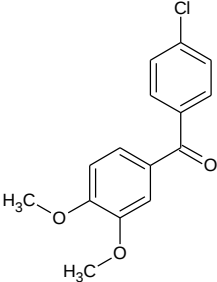
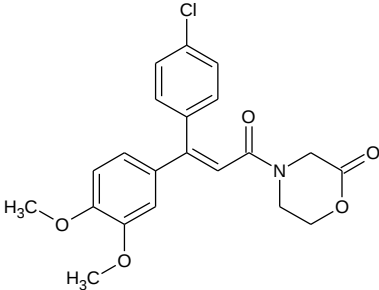
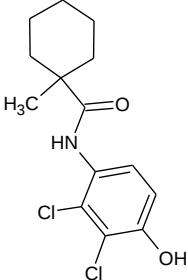
Počet stran: 27

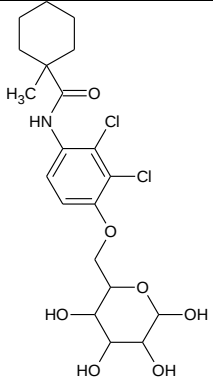
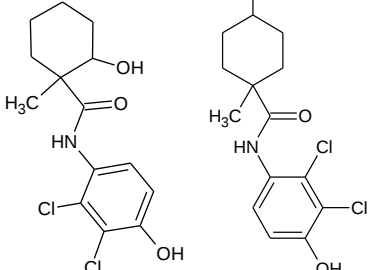
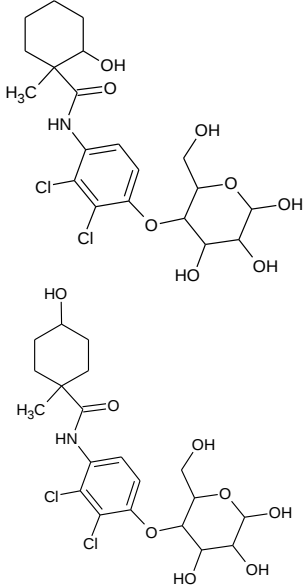
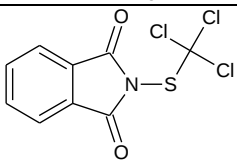
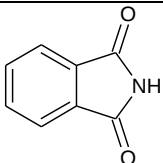
Elektronická verze publikace ve formátu PDF na CD-ROM.

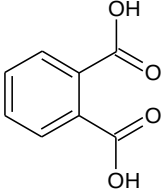
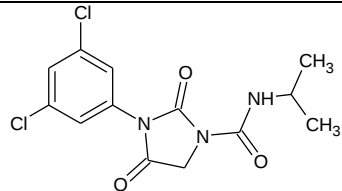
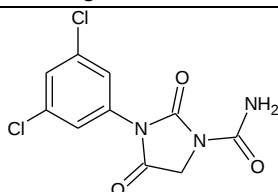
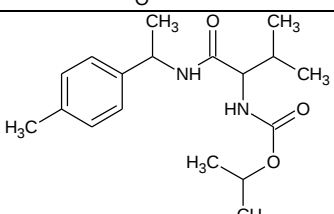
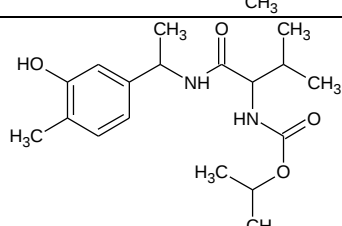
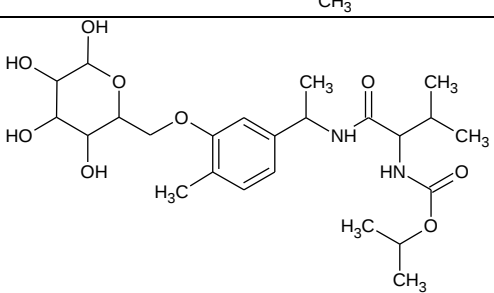
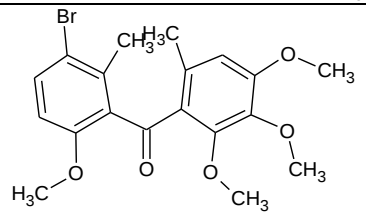
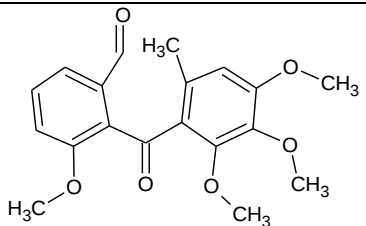
Příloha:

Triviální název, příp. kódové označení pesticidu/metabolitu	Systematický název	Strukturní vzorec
Cyflufenamid (účinná látka)	<i>N</i> -{(Z)-[(cyclopropylmethoxy)amino][2,3-difluor-6-(trifluormethyl)phenyl]metylen} - 2-phenylacetamide	
Cyflufenamid (E-isomer)	<i>N</i> -{(E)-[(cyclopropylmethoxy)amino][2,3-difluor-6-(trifluormethyl)phenyl]metylen} - 2-phenylacetamide	
Cyflufenamid-decyclopropyl glycoside	<i>N</i> -{(Z)-[2,3-difluoro-6-trifluoromethyl-(glucopyranosylimino)benzyl]}-2-phenylacetamide	
Hydroxy-cyflufenamid	<i>N</i> -{(Z)-[(cyclopropylmethoxy)imino][2,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)phenylmethyl]-2-hydroxy-2-phenylacetamide	
Difenoconazole (účinná látka)	3-chloro-4-[-4-methyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-2-yl]phenyl 4-chlorophenyl ether	
1,2,4-triazole	1,2,4-triazole	

Triviální název, příp. kódové označení pesticidu/metabolitu	Systematický název	Strukturní vzorec
Difenoconazole CGA 189138	<i>2-chloro-4-(4-chloro-phenoxy)-benzoic acid</i>	
Difenoconazole CGA 205374 (Difenoconazole-ketone)	<i>1-[2-chloro-4-(4-chloro-phenoxy)-phenyl]-2-[1,2,4]triazol-1-yl-ethanone</i>	
Difenoconazole CGA 205375 (Difenoconazole-alcohol)	<i>1-[2-[2-chloro-4-(4-chloro-phenoxy)-phenyl]-2-1H-[1,2,4]triazol-yl]-ethanol</i>	
Dimethomorph (E-isomer a Z-isomer) (účinná látka)	<i>(E,Z)-4-[3-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)acryloyl]morpholine</i>	

Triviální název, příp. kódové označení pesticidu/metabolitu	Systematický název	Strukturní vzorec
Dimethomorph-demethyl	4-[(p-chlorophenyl)-3-hydroxy-4-methoxy-cinnamoyl]morpholine	
Dimethomorph-demethyl glycoside	4-[(p-chlorophenyl)-3-(β-D-glucopyranosyloxy)-4-methoxy-cinnamoyl]morpholine	
Dimethomorph-Z7	4-chloro-3',4'-dimethoxy-benzophenone	
Dimethomorph-Z37	4-[3-(4-chlorophenyl)-3,3,4-dimethoxy-phenyl]-1-oxo-2-propenyl]-2-oxo-morpholine	
Fenhexamid (účinná látka)	N-(2,3-Dichloro-4-hydroxyphenyl)-1-methylcyclohexanecarboxamide	

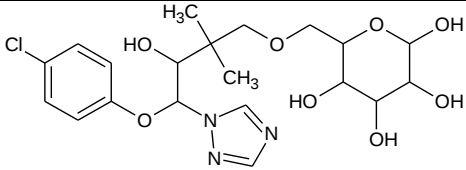
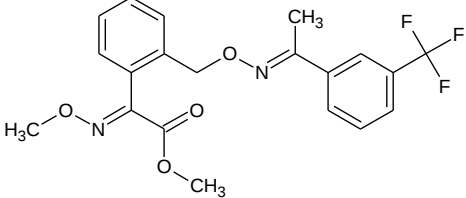
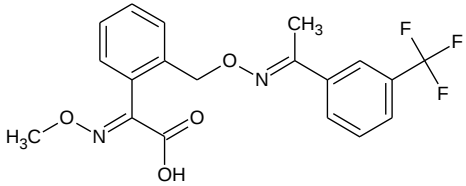
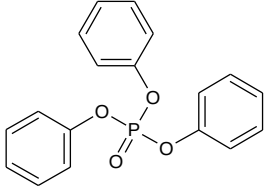
Triviální název, příp. kódové označení pesticidu/metabolitu	Systematický název	Strukturní vzorec
Fenhexamid-glycoside	<i>2,3-dichloro-4-[[(1-methylcyclohexyl) carbonyl] amino}phenyl β-D-glucopyranoside</i>	
2-hydroxy-fenhexamid 4-hydroxy-fenhexamid	<i>N-(2,3-dichloro-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-1-methylcyclohexane-1-carboxamide</i> <i>N-(2,3-dichloro-4-hydroxyphenyl)-4-hydroxy-1-methylcyclohexane-1-carboxamide</i>	
2-hydroxy-fenhexamid glycoside 4-hydroxy-fenhexamid glycoside	<i>2,3-dichloro-4-[[(2-hydroxy-1-methylcyclohexyl) carbonyl] amino}phenyl β-D-glucopyranoside</i> <i>2,3-dichloro-4-[[(4-hydroxy-1-methylcyclohexyl) carbonyl] amino}phenyl β-D-glucopyranoside</i>	
Folpet (účinná látka)	<i>N-(trichloromethylthio)phthalimide</i>	
Phthalimide	<i>1H-isoindole-1,3(2H)-dione</i>	

Triviální název, příp. kódové označení pesticidu/metabolitu	Systematický název	Strukturní vzorec
Phthalic acid	<i>Phthalic acid</i>	
Iprodione (účinná látka)	<i>3-(3,5-Dichlorophenyl)-N-isopropyl-2,4-dioxo-1-imidazolidinecarboxamide</i>	
Iprodione-desisopropyl	<i>3-(3,5-dichlorophenyl)-2,4-dioxoimidazolidine-1-carboxamide</i>	
Iprovalicarb Diastereoisomer A (S,R) + B (S,S) (účinná látka)	<i>isopropyl [(1S)-2-methyl-1-{[(1R)-1-p-tolyethyl]carbamoyl}propyl]carbamate</i> <i>isopropyl [(1S)-2-methyl-1-{[(1S)-1-p-tolyethyl]carbamoyl}propyl]carbamate</i>	
Hydroxy-iprovalicarb	<i>isopropyl [(2S)-1-{[1-(3-hydroxy-4-methylphenyl)ethyl]amino}-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]carbamate</i>	
Hydroxy-iprovalicarb glycoside	<i>isopropyl[(2R)-1-({1-[3-(β-D-glucopyranosyloxy)-4-methylphenyl]ethyl}amino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]carbamate</i>	
Metrafenone (účinná látka)	<i>(3-bromo-6-methoxy-2-methylphenyl) (2,3,4-trimethoxy-6-methylphenyl)- methanone</i>	
Metrafenone CL 1500836	<i>3-methoxy-2-(2,3,4-trimethoxy-6-methylbenzoyl)benzaldehyde</i>	

Triviální název, příp. kódové označení pesticidu/metabolitu	Systematický název	Strukturní vzorec
Metrafenone CL 379395	2-(3-bromo-6-methoxy-2-methylbenzoyl)-3,4,5-trimethoxybenzaldehyde	
Metrafenone CL 300402	7-bromo-4-methoxy-3-(2,3,4-trimethoxy-6-methylphenyl)-2-benzofuran-1(3H)-one	
Metrafenone CL 197675	(3-bromo-6-methoxy-2-carboxyl)(2,3,4-trimethoxy-6-methylphenyl)-methanone	
Meptyldinocap (účinná látka)	[2,4-dinitro -6-(2-octyl)phenyl crotonate]	
2,4-DNOP	(2,4-dinitro-6-(2-octyl)phenol)	
Pyraclostrobin (účinná látka)	Methyl-N-{2-[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]oxymethyl}phenyl}(N-methoxy)carbamate	
Hydroxy-pyraclostrobin	Methyl-N-{2-[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]oxymethyl}phenyl}(N-methoxy)carbamate	

Triviální název, příp. kódové označení pesticidu/metabolitu	Systematický název	Strukturní vzorec
Pyraclostrobin-desmethoxy	<i>Methyl N-(2{[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]oxymethyl}phenyl) carbamate</i>	
Hydroxy-pyraclostrobin glycoside	<i>Methyl 2({[1-(4-chlorophenyl)-4-(glucopyranosyloxy)-1H-pyrazol-3-yl]oxy}methyl)-methoxy-phenyl carbamate</i>	
Quinoxyfen (účinná látka)	<i>5,7-dichloro-4-quinolyl-4-fluorophenyl ether</i>	
3-hydroxy-quinoxyfen	<i>5,7-dichloro-4-(4-fluorophenoxy)-3-hydroxy-quinoline</i>	
Spiroxamine (účinná látka)	<i>8-tert-butyl-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-2-ylmethyl(ethyl) (propyl)amine</i>	
Spiroxamine-N-oxid	<i>[(8-tert-butyl-1,4- dioxaspiro[4.5]dec-2-yl)methyl]ethyl(propyl)amine oxide</i>	
Spiroxamine-N-desethyl	<i>N-[(8-tert-butyl-1,4- dioxaspiro[4.5]dec-2-yl) methyl]propan-1-amine</i>	
Spiroxamine-N-despropyl	<i>N-[(8-tert-butyl-1,4- dioxaspiro[4.5]dec-2-yl)methyl]ethanamine</i>	
Spiroxamine-cyclohexanol	<i>4-tert-butylcyclohexanol</i>	
Spiroxamine-cyclohexanol glycoside	<i>4-tert-butylcyclohexyl-glucopyranoside</i>	
Spiroxamine-diol	<i>4-(1-hydroxy-2-methylpropan-2-yl) cyclohexanol</i>	

Triviální název, příp. kódové označení pesticidu/metabolitu	Systematický název	Strukturní vzorec
Spiroxamine-diol glycoside	4-(1-hydroxy-2-methylpropan-2-yl) cyclohexyl-glucopyranoside	
Tebuconazole (účinná látka)	1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol	
Hydroxy-tebuconazole	2-chloro-5-[4-hydroxy-5,5-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)hexyl]phenol	
Hydroxy-tebuconazole glycoside	2-chloro-5-[4-hydroxy-5,5-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)hexyl]phenyl-glucopyranoside	
Tebufenpyrad (účinná látka)	N-(4-tert-butylbenzyl)-4-chloro-3-ethyl-1-methylpyrazole-5-carboxamide	
Triadimenol (účinná látka)	1-(4-chlorophenoxy)-3,3-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol	
Triadimenol glycoside	1-(4-chlorophenoxy)-3,3-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-yl-glucoside	
Hydroxy-triadimenol	4-(4-chlorophenoxy)-2,2-dimethyl-4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butane-1,3-diol	

Triviální název, příp. kódové označení pesticidu/metabolitu	Systematický název	Strukturní vzorec
Hydroxy-triadimenol glycoside	<i>4-(4-chlorophenoxy)-3-hydroxy-2,2-dimethyl-4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butyl glucoside</i>	
Trifloxystrobin (účinná látka)	<i>methyl (E)-methoxyimino-[(E)-α-[1-(a,a,a-trifluoro-m-tolyl) ethylideneaminoxy]-o-tolyl]acetate</i>	
Trifloxystrobin CGA321113	<i>(E,E)-Methoxyimino-[2-[1-(3-trifluoro-methylphenyl)ethylideneaminoxymethyl]-phenyl]-acetic acid</i>	
TPP	<i>Triphenyl phosphate</i>	
Nicarbazin	<i>1,3-Bis(4-nitrophenyl)urea-4,6-dimethyl-2(1H)-pyrimidinone (1:1)</i>	