

**MULTIREZIDUALNI GC-MS METODI ZA DOLOČANJE
OSTANKOV FITOFARMACEVTSKIH SREDSTEV IZ
OKOLJA V CVETNEM PRAHU IN MEDU**

Helena Baša Česnik

Ljubljana 2021

Izdal in založil

Kmetijski inštitut Slovenije

Ljubljana, Hacquetova ulica 17

Avtorica dr. Helena Baša Česnik, univ. dipl. inž. kemije

Uredila Lili Marinček, univ. dipl. inž. zoot.

Publikacija bo izšla v elektronski obliki in bo dostopna na spletni strani
Kmetijskega inštituta Slovenije https://www.kis.si/Druge_publicacije/

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

COBISS.SI-ID 70632707

ISBN 978-961-6998-48-2 (PDF)

Vpeljava metod je bila financirana s strani Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS), v okviru raziskovalnega programa št. P4-0133 iz državnega proračuna.

Vsebina

1 Uvod	4
2 Multirezidualna GC-MS metoda za določanje ostankov fitofarmaceutskih sredstev iz okolja v cvetnem prahu.....	5
2.1 Uvod	5
2.2 Ekstrakcija in čiščenje	5
2.3 Določitev	6
2.4 Validacija	7
3 Multirezidualna GC-MS metoda za določanje ostankov fitofarmaceutskih sredstev iz okolja v medu	12
3.1 Uvod	12
3.2 Ekstrakcija	12
3.3 Določitev	13
3.4 Validacija	13
4 Zaključki	21
5 Literatura	22

1 UVOD

Cvetni prah je prehransko dopolnilo, ki je tako kot med spoštovan zaradi svoje hranilne vrednosti. Ker potrošniki na tržišču iščejo varna in kvalitetna živila, je v obeh živilih nujno spremljanje ostankov fitofarmaceutskih sredstev (FFS).

Čebele letijo v radiju 4,8 km od čebelnjaka (Eckert; 1933), da nabirajo cvetni prah. Če se čebelnjaki nahajajo blizu obdelovalnih kmetijskih površin na katerih pridelovalci uporabljajo FFS, lahko čebele pridejo v stik z ostanki FFS preko nektarja, cvetnega prahu in listov rastline, ali preko zraka, prsti in vode, na katere je pri tretiranju zaneslo FFS (Crenna in sod.; 2020). Ostanke FFS tako čebele zanesajo v panj, od koder pridejo v med.

Zato smo v Centralnem laboratoriju Kmetijskega inštituta Slovenije vpeljali dve multirezidualni metodi, s katerima lahko spremljamo ostanke FFS v cvetnem prahu in medu. Obe metodi smo objavili v znanstvenima člankoma (Baša Česnik; 2021, Baša Česnik in sod.; 2019).

2 MULTIREZIDUALNA GC-MS METODA ZA DOLOČANJE OSTANKOV FITOFARMACEVTSKIH SREDSTEV IZ OKOLJA V CVETNEM PRAHU

2.1 Uvod

V literaturi obstajajo številne metode za določanje ostankov FFS v cvetnem prahu. Najmodernejši pristop je uporaba QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) metode, kjer ostanke FFS ekstrahirajo z acetonitrilom. Prednost tega topila je, da pri ekstrakciji zmanjšuje ko-ekstrakcijo beljakovin z njihovim obarjanjem (Wang in sod.; 2012) in omejuje topnost maščob (Lozano in sod.; 2014). Zato smo ga uporabili tudi v našem laboratoriju. Za čiščenje ekstraktov so v literaturi navedli uporabo: (a) primarnega sekundarnega amina (primary secondary amine, PSA), ki zadržuje maščobne kisline (Cabrera de Oliveria; 2016, Kasiotis in sod.; 2014, Stenerson; 2018), (b) PSA in C₁₈ adsorbenta, kjer slednji odstranjuje maščobe (Lehotay; 2007, Mullin in sod.; 2010), (c) PSA, C₁₈ in grafitiziranega črnega ogljika (Graphitized carbon black), kjer slednji odstranjuje planarne molekule, kot so pigmenti (npr. klorofil) (David in sod.; 2016, Stenerson; 2018) in (d) PSA in C₁₈ in Z-Sep adsorbenta, kjer slednji odstranjuje oljne ostanke in nekatere pigmente (Hakme in sod.; 2017, Stenerson; 2018, Vázquez in sod.; 2015). V Centralnem laboratoriju, smo uporabili komercialno dostopne kolonce za ekstrakcijo na trdni fazi (Solid Phase Extraction, SPE) Supelclean Ultra 2400, ki vsebujejo Grapsphere (grafitiziran ogljik), PSA, C₁₈ in Z-Sep. Na ta način smo združili vsa v literaturi poročana čiščenja ekstraktov. Določitev aktivnih spojin smo izvajali s plinskim kromatografom, sklopljenim z masnim spektrometrom (GC-MS).

2.2 Ekstrakcija in čiščenje

K 10 g cvetnega prahu v čaši, smo dodali 50 ml acetonitrila. Z mikserjem smo vsebino čaše mešali 2 minuti. Mešanico smo pustili 30 minut, da se je trdna usedlina posedla na dno čaše. Tekoči del smo prenesli v 50 ml centrifugirko in ga centrifugirali 10 minut pri 7000 obratih na minuto. Tekočino nad oborino smo filtrirali preko 15 g brezvodnega Na₂SO₄ in filter papirja črni trak v 100 ml Soxhletovo bučko. Potem smo sedimentu v čaši dodali 30 ml acetonitrila in z mikserjem mešali 2 minuti. Vsebino čaše smo prenesli v že uporabljeno 50 ml centrifugirko. Sledilo je 10 minutno centrifugiranje pri 7000 obratih na minuto. Tekočino nad oborino smo filtrirali preko 15 g brezvodnega Na₂SO₄ in filter papirja črni trak v 100 ml Soxhletovo bučko iz prejšnjega koraka. Na₂SO₄ smo sprali s 15 ml acetonitrila. Nato smo odparili acetonitril v Soxhletovi bučki na rotavaporju do približno 2 ml in preostanek izpihali z dušikom do suhega. Suhi eluat smo raztopili v 1 ml acetonitrila s pomočjo ultrazvočne kopeli. Ekstrakt smo prenesli na SPE kolonco Ultra 2400 3 ml, ki smo jo predhodno kondicionirali s 3 ml acetonitrila. SPE kolonco smo sprali s 16 ml acetonitrila. 3-4 ml/min pretoka skozi SPE kolonco smo dosegli z vodno vakuumsko

črpalko. Celoten eluat (prvi del eluata je iz SPE kolonce priteknel po nanosu vzorca, drugi pa po spiranju kolonce) smo zbrali v čaši. Vsebino čaše smo prenesli v 100 ml Soxhletovo bučko. Čašo smo dvakrat sprali s 5 ml acetonitrila in vsebino prenesli v Soxhletovo bučko. Nato smo acetonitril odparili na rotavaporju do približno 2 ml in preostanek z dušikom izpihali do suhega. Pri vzorcih smo suhi eluat raztopili v 1 ml acetona s pomočjo ultrazvočne kopeli, pri standardih za kalibracijo v matriki (matrix match standards) pa smo suhemu eluatu dodali 1 ml delovnih raztopin z merjenimi aktivnimi snovmi in vsebino raztopili s pomočjo ultrazvočne kopeli.

2.3 Določitev

Določitev aktivnih snovi je potekala z GC-MS, katerega nastavitve so podane v preglednici 1.

Preglednica 1: Pogoji GC-MS instrumenta za določevanje ostankov FFS iz okolja v cvetnem prahu

Liner:	RESTEK 23302
Temperatura injektorja:	250 °C
Način injiciranja:	Pulsed Splitless
Kolona:	Agilent J & W, HP-5MS, 30 m x 0.25 mm ID, 0.25 µm
Temperaturni gradient kolone:	55 °C; 2 min 25 °C/min; od 55 °C do 130 °C 130 °C; 1 min 5 °C/min; od 130 °C do 180 °C 180 °C; 30 min 20 °C/min; od 180 °C do 230 °C 230 °C; 16 min 20 °C/min; od 230 °C do 250 °C 250 °C; 13 min 20 °C/min; od 250 °C do 280 °C 280 °C; 20 min
Temperatura ionskega izvora:	230 °C
Temperatura vmesnika:	280 °C
Temperatura detektorja:	150 °C
Nosilni plin:	Helij 6.0, 1,2 ml/min

Za vrednotenje aktivnih spojin smo uporabili način snemanja izbranih ionov (Selective ion monitoring mode, SIM). Izbrani ioni za vsako aktivno spojino so prikazani v preglednici 2.

2.4 Validacija

LOQ in linearnost

Linearnost odzivov smo preverili s kalibracijskimi standardi v matriki (matrix match standards). Imeli smo 4-6 koncentracijskih nivojev, z dvema ponovitvama na vsakem nivoju. Linearnost in območje linearnosti smo določili z linearno regresijo, s pomočjo F testa. Linearni model ustreza za vseh 47 aktivnih spojin podanih v preglednici 2. Linearnost smo dokazali v območju 0,01 mg/kg – 0,15 mg/kg za 6 aktivnih spojin, v območju 0,05 mg/kg - 0,12 mg/kg za 1 aktivno spojino in v območju 0,05 mg/kg – 0,15 mg/kg za 40 aktivnih spojin. R^2 je bil v območju 0,974 do 0,996.

Meje kvantitativne določitve metode (Limits of quantification, LOQs) smo ocenili iz kromatogramov kalibracijskih standardov v matriki (matrix match standards). LOQ smo izbrali pri razmerju S/N vsaj 10. Maksimalne dovoljene količine ostankov (Maximum Residue Levels, MRLs) za ostanke FFS iz okolja so podane v Regulativi (EC) 396/2005. Kjer so MRL-ji postavljeni na LOQ, je v Regulativi pri tej vrednosti dodan znak *. To pomeni, da se za analizne metode, ki omogočajo spremljati ostanke FFS zahteva LOQ, ki je enak MRL-jem označenim z *. Naši LOQ so bili v takih primerih postavljeni na MRL. LOQ-ji so podani v preglednici 2. Šest aktivnih spojin je imelo LOQ 0,01 mg/kg, za preostalih 41 aktivnih spojin pa je bil LOQ 0,05 mg/kg.

Merilna negotovost

Standardni odklon ponovljivosti in standardni odklon obnovljivosti smo določili v skladu z ISO 5725. Kupljeni ekološki cvetni prah smo analizirali, da smo dokazali, da v njem ni bilo ostankov FFS. Nato smo analizirali ekstrakte matrike z dodanim standardom (naspajkan ekološki cvetni prah) na koncentracijskem nivoju pri LOQ. V časovni periodi 10 dni, smo vsak dan pripravili dve paralelki matrik z dodanim standardom. Nato smo iz površin vrhov za vsako aktivno spojino izračunali standardni odklon ponovljivosti in standardni odklon obnovljivosti.

Negotovost ponovljivosti (U_r) in negotovost obnovljivosti (U_R) smo izračunali tako, da smo standardni odklon ponovljivosti in standardni odklon obnovljivosti pomnožili s Studentovim t faktorjem za 9 prostostnih stopenj in 95 % nivojem zaupanja ($t_{95;9} = 2.262$).

$$U_r = t_{95;9} \times S_r ; U_R = t_{95;9} \times S_R$$

Rezultati merilne negotovosti so prikazani v preglednici 2. Merilna negotovost ponovljivosti je bila v območju 0,001 mg/kg do 0,013 mg/kg, kar predstavlja 10-30 % LOQ-ja. Merilna negotovost obnovljivosti je bila v območju 0,002 mg/kg do 0,015 mg/kg, kar predstavlja 12-30 % LOQ-ja.

Merilna negotovost za ostanke FFS mora biti 50%, kot je to predlagano v smernici SANTE/11813/2017, oziroma v Sloveniji zakonsko predpisano v Uradnem listu (Ur. l. RS št. 108/2007). Med validacijo pa je potrebno dokazati, da je merilna negotovost manjša ali enaka predlagani merilni negotovosti. Pri naši metodi je bila merilna negotovost sprejemljiva za vseh 49 aktivnih spojin.

Točnost

Točnost smo preverili s preverjanjem izkoristkov. Izračunali smo povprečje izkoristkov iz testa za natančnost (2 paralelki matrike z dodanim standardom, 10 dni). Rezultati za izkoristke so podani v preglednici 2. Dobljeni izkoristki so bili v območju 73,0 % do 93,4 %, z RSD 5,6 % do 17,7 %. Natančneje, izkoristki pri LOQ 0,01 mg/kg so se gibali v območju 75,4 % do 93,4 %, z RSD 9,3 % do 17,7 % in izkoristki pri LOQ 0,05 mg/kg so se gibali v območju 73,0 % do 88,2 %, z RSD 5,6 % do 15,9 %. Glede na zahteve smernice SANTE/11813/2017 so sprejemljivi izkoristki med validacijo v območju 70% do 120%, z relativno standardno deviacijo $\leq 20\%$. Glede na smernice za validacijo, ki jih je podal Alder in sod. (2000), pa so sprejemljivi izkoristki: (a) pri koncentraciji >0.01 mg/kg in ≤ 0.1 mg/kg: 70% do 120%, RSD $\leq 20\%$ in (b) pri koncentraciji >0.001 mg/kg in ≤ 0.01 mg/kg: 60% do 120%, RSD $\leq 30\%$. Naši izkoristki so sprejemljivi glede na zahteve obeh smernic.

Preglednica 2: Validacijski parametri, izbrani ioni in MRL-ji za aktivne spojine v cvetnem prahu

Aktivna snov	MRL ^a (mg/kg)	Snemani ioni ^b T, Q ₁ , Q ₂ (m/z)	Območje linearnosti (mg/kg)	R ²	LOQ (mg/kg)	Izkoristek (%)	RSD ^c (%)	U _r ^d (mg/kg)	U _r ^e (%)	U _R ^f (mg/kg)	U _R ^g (%)
akrinatrin	0,05*	181, 208, 289	0,05-0,15	0,991	0,05	87,8	13,8	0,010	20,0	0,014	28,0
azinfos-metil	/	160, 132, 105	0,05-0,15	0,987	0,05	84,2	9,9	0,009	18,0	0,010	20,0
azoksistrobin	0,05*	344, 388, 345	0,05-0,15	0,987	0,05	85,3	11,8	0,011	22,0	0,011	22,0
bifentrin	0,05*	181, 165, 166	0,05-0,15	0,992	0,05	76,6	8,0	0,010	20,0	0,010	20,0
boskalid	0,05*	140, 342, 142	0,05-0,15	0,984	0,05	85,0	11,9	0,009	18,0	0,012	24,0
cihalotrin-lambda	0,05*	181, 197, 208	0,05-0,15	0,987	0,05	88,2	12,3	0,011	22,0	0,012	24,0
deltametrin	0,05*	181, 251, 255	0,05-0,15	0,990	0,05	80,1	14,9	0,010	20,0	0,014	28,0
diazinon	0,01*	179, 304, 199	0,01-0,15	0,994	0,01	81,3	12,9	0,002	20,0	0,002	20,0
difenilamin	0,05*	169, 167, 168	0,05-0,12	0,982	0,05	73,2	9,1	0,008	16,0	0,008	16,0
diklofluanid	/	226, 123, 167	0,05-0,15	0,990	0,05	79,1	7,9	0,010	20,0	0,010	20,0
dimetaklor	0,05*	134, 197, 210	0,05-0,15	0,995	0,05	81,2	6,5	0,006	12,0	0,006	12,0
dimetoat	/	87, 229, 143	0,05-0,15	0,994	0,05	81,7	5,6	0,010	20,0	0,010	20,0
endosulfan-sulfat	0,01*	272, 274, 387	0,01-0,15	0,995	0,01	82,4	9,3	0,001	10,0	0,002	20,0
fenbukonazol	0,05*	198, 129, 125	0,05-0,15	0,989	0,05	78,9	15,9	0,013	26,0	0,014	28,0
fenitrotion	0,01*	277, 260, 109	0,01-0,15	0,981	0,01	84,7	14,7	0,002	20,0	0,003	30,0
flonikamid	0,05*	174, 146, 229	0,05-0,15	0,992	0,05	79,8	7,7	0,007	14,0	0,007	14,0
fludioksonil	0,05*	248, 154, 127	0,05-0,15	0,990	0,05	85,5	9,8	0,009	18,0	0,010	20,0
flukvinkonazol	0,05*	340, 342, 108	0,05-0,15	0,989	0,05	82,6	10,7	0,010	20,0	0,010	20,0
forat	0,01*	231, 260, 97	0,01-0,15	0,996	0,01	82,4	17,7	0,002	20,0	0,003	30,0
fosalon	0,01*	182, 367, 121	0,01-0,15	0,995	0,01	93,4	13,9	0,003	30,0	0,003	30,0
HCH-alfa	0,01*	219, 181, 183	0,01-0,15	0,996	0,01	75,4	12,3	0,002	20,0	0,002	20,0
HCH-delta	/	219, 181, 183	0,05-0,15	0,979	0,05	82,8	12,7	0,007	14,0	0,012	24,0
iprodion	0,05*	314, 316, 187	0,05-0,15	0,986	0,05	81,6	9,8	0,010	20,0	0,010	20,0
karbaril	0,05*	144, 115, 116	0,05-0,15	0,988	0,05	81,9	7,0	0,010	20,0	0,010	20,0

Aktivna snov	MRL ^a (mg/kg)	Snemani ioni ^b T, Q ₁ , Q ₂ (m/z)	Območje linearnosti (mg/kg)	R ²	LOQ (mg/kg)	Izkoristek (%)	RSD ^c (%)	U _r ^d (mg/kg)	U _r ^e (%)	U _R ^f (mg/kg)	U _R ^g (%)
karbofuran	0,05*	164, 149, 131	0,05-0,15	0,992	0,05	80,6	8,2	0,007	14,0	0,008	16,0
klomazon	0,05*	125, 204, 127	0,05-0,15	0,988	0,05	75,2	10,9	0,006	12,0	0,009	18,0
klorprofam	0,05*	213, 127, 154	0,05-0,15	0,983	0,05	74,9	8,0	0,007	14,0	0,007	14,0
krezoksim-metil	0,05*	116, 206, 131	0,05-0,15	0,992	0,05	84,5	9,3	0,008	16,0	0,009	18,0
kvinalfos	0,05*	146, 298, 157	0,05-0,15	0,992	0,05	81,2	7,8	0,010	20,0	0,010	20,0
kvinoklamin	0,05*	207, 172, 209	0,05-0,15	0,990	0,05	76,9	12,8	0,010	20,0	0,010	20,0
mekarbam	0,05*	131, 159, 329	0,05-0,15	0,974	0,05	79,7	10,8	0,010	20,0	0,010	20,0
metakrifos	0,05*	208, 180, 240	0,05-0,15	0,993	0,05	73,0	8,4	0,006	12,0	0,007	14,0
metrafenon	0,05*	393, 408, 379	0,05-0,15	0,992	0,05	80,5	9,2	0,010	20,0	0,010	20,0
paration	/	291, 292, 235	0,05-0,15	0,993	0,05	82,3	15,7	0,009	18,0	0,015	30,0
permetrin	/	183, 163, 165	0,05-0,15	0,989	0,05	78,3	10,2	0,008	16,0	0,008	16,0
piridafention	/	199, 340, 188	0,05-0,15	0,992	0,05	83,9	9,2	0,008	16,0	0,009	18,0
pirimifos-metil	0,05*	290, 305, 276	0,05-0,15	0,992	0,05	78,4	7,0	0,010	20,0	0,010	20,0
pirimikarb	0,05*	166, 238, 167	0,05-0,15	0,983	0,05	79,5	7,2	0,006	12,0	0,007	14,0
procimidon	0,05*	283, 285, 96	0,05-0,15	0,981	0,05	80,1	9,6	0,010	20,0	0,010	20,0
propizamid	0,05*	173, 175, 145	0,05-0,15	0,993	0,05	78,3	9,8	0,007	14,0	0,009	18,0
tetradifon	0,05*	159, 229, 356	0,05-0,15	0,990	0,05	82,1	10,7	0,009	18,0	0,010	20,0
tolilfluanid	0,05*	238, 137, 240	0,05-0,15	0,985	0,05	80,8	7,7	0,007	14,0	0,007	14,0
tolklofos-metil	0,05*	265, 267, 250	0,05-0,15	0,994	0,05	78,4	7,9	0,010	20,0	0,010	20,0
triadimefon	0,05*	208, 210, 181	0,05-0,15	0,993	0,05	80,4	9,0	0,007	14,0	0,008	16,0
triazofos	0,05*	161, 162, 285	0,05-0,15	0,982	0,05	84,1	10,4	0,010	20,0	0,010	20,0
trifloksistrobin	0,05*	116, 222, 186	0,05-0,15	0,992	0,05	83,7	8,7	0,008	16,0	0,008	16,0
vinklozolin	0,05*	285, 124, 187	0,05-0,15	0,995	0,05	83,9	8,1	0,008	16,0	0,008	16,0

LEGENDA PREGLEDNICE 2:

^a Regulative (EC) 396/2005, * pomeni, da je MRL postavljen na LOQ analizne metode

^b T = ciljni ion (target ion), Q = kvalitativni ion (qualifier ion)

^c RSD je bila izračunana za izkoristke

^{d,e} U_r = merilna negotovost ponovljivosti

^{f,g} U_R = merilna negotovost obnovljivosti

3 MULTIREZIDUALNA GC-MS METODA ZA DOLOČANJE OSTANKOV FITOFARMACEVTSKIH SREDSTEV IZ OKOLJA V MEDU

3.1 Uvod

V literaturi so podane številne metode za določanje ostankov FFS v medu. Le-te za ekstrakcijo uporabljajo organska topila acetonitril, etilacetat ali aceton. Najpogosteje se uporablja QuEChERS metoda, pri kateri se ekstrakcijo izvaja z acetonitrilom. Vendar ima to topilo slabost, da se pri ekstrakciji matrik, ki vsebujejo veliko količino sladkorja, tvori dvojna plast. Zato smo mi za ekstrakcijo tekoče-tekoče izbrali aceton, kjer pri ekstrakciji matrik, ki vsebujejo veliko količino sladkorja, ne nastaja dvojna plast (Luke in sod.; 1975). Acetonu smo dodali diklorometan in petroleter, da smo omogočili ekstrakcijo širokega nabora aktivnih snovi: od zelo polarnih, kot je flonikamid, do nepolarnih, kot je cihalotrin-lambda. Določitev aktivnih spojin smo izvajali z GC-MS.

3.2 Ekstrakcija

V čaši smo 20 g vzorca medu raztopili v 15 ml MilliQ vode. Dodali smo 40 ml acetona. Mešanico smo z mikserjem mešali 2 minuti. Dodali smo 80 ml mešanice petroletra in diklorometana v volumskem razmerju 1:1 in mešali še nadaljnji 2 minuti. Mešanico smo prenesli v lij ločnik, ki je vseboval 3 g NaCl. Čašo smo sprali z 80 ml mešanice petroletra in diklorometana v volumskem razmerju 1:1. Topilo smo dodali v lij ločnik, katerega smo stresali 1 minuto. Zgornjo organsko fazo smo filtrirali preko filtrirnega papirja črni trak, ki je vseboval 15 g brezvodnega Na₂SO₄, v 500 ml Soxhletovo bučko. Spodnjo vodno fazo smo z istim postopkom ekstrahirali še dvakrat. Topila iz zbranih organskih faz smo odparili do približno 2 ml na rotavaporju in jih nato z dušikom izpihali do suhega. Pri vzorcih smo suhi eluat raztopili v 2 ml mešanice etilacetat : cikloheksan v volumskem razmerju 1:1 s pomočjo ultrazvočne kopeli, pri standardih za kalibracijo v matriki (matrix match standards) pa smo suhemu eluatu dodali 2 ml delovnih raztopin z merjenimi aktivnimi snovmi in vsebino raztopili s pomočjo ultrazvočne kopeli.

3.3 Določitev

Določitev aktivnih snovi je potekala z GC-MS, katerega nastavitve so podane v preglednici 3.

Preglednica 3: Pogoji GC-MS instrumenta za določevanje ostankov FFS iz okolja v medu

Liner:	Agilent 5181-3316
Temperatura injektorja:	250 °C
Način injiciranja:	Pulsed Splitless
Kolona:	Agilent J & W, HP-5MS, 30 m x 0.25 mm ID, 0.25 µm
Temperaturni gradient kolone:	55 °C; 2 min 25 °C/min; od 55 °C do 130 °C 130 °C; 1 min 5 °C/min; od 130 °C do 180 °C 180 °C; 30 min 20 °C/min; od 180 °C do 230 °C 230 °C; 16 min 20 °C/min; od 230 °C do 250 °C 250 °C; 13 min 20 °C/min; od 250 °C do 280 °C 280 °C; 20 min
Temperatura ionskega izvora:	230 °C
Temperatura vmesnika:	280 °C
Temperatura detektorja:	150 °C
Nosilni plin:	Helij 6.0, 1,2 ml/min

Za vrednotenje aktivnih spojin smo uporabili način snemanja izbranih ionov (Selective ion monitoring mode, SIM). Izbrani ioni za vsako aktivno spojino so prikazani v preglednici 4.

3.4 Validacija

LOQ in linearnost

Linearnost odzivov smo preverili s kalibracijskimi standardi v matriki (matrix match standards). Imeli smo 3-8 koncentracijskih nivojev, s petimi ponovitvami na vsakem nivoju. Linearnost in območje linearnosti smo določili z linearno regresijo, s pomočjo F testa. Linearni model ustreza za vseh 72 aktivnih spojin podanih v preglednici 4. Linearnost smo dokazali v območju 0,01 mg/kg – 0,15 mg/kg za 16 aktivnih spojin, v območju 0,02 mg/kg - 0,1 mg/kg za 1 aktivno spojino, v območju 0,02 – 0,15 mg/kg za 4 aktivne spojine, v območju 0,03 mg/kg – 0,15 mg/kg za 2 aktivni spojini, v

območju 0,05 mg/kg – 0,1 mg/kg za 1 aktivno spojino, v območju 0,05 mg/kg – 0,15 mg/kg za 46 aktivnih spojin in v območju 0,05 mg/kg – 0,2 mg/kg za 2 aktivni spojini. R^2 je bil v območju 0,960 do 0,988.

Meje kvantitativne določitve metode (Limits of quantification, LOQs) smo ocenili iz kromatogramov kalibracijskih standardov v matriki (matrix match standards). LOQ smo izbrali pri razmerju S/N vsaj 10. Maksimalne dovoljene količine ostankov (Maximum Residue Levels, MRLs) za ostanke FFS iz okolja so podane v Regulativi (EC) 396/2005. Kjer so MRL-ji postavljeni na LOQ, je v Regulativi pri tej vrednosti dodan znak *. To pomeni, da se za analizne metode, ki omogočajo spremljati ostanke FFS zahteva LOQ, ki je enak MRL-jem označenim z *. Naši LOQ so bili v takih primerih postavljeni na MRL. LOQ-ji so podani v preglednici 4. 16 aktivnih spojin je imelo LOQ 0,01 mg/kg, 5 aktivnih spojin je imelo LOQ 0,02 mg/kg, 2 aktivni spojini sta imeli LOQ 0,03 mg/kg, za preostalih 49 aktivnih spojin pa je bil LOQ 0,05 mg/kg.

Merilna negotovost

Standardni odklon ponovljivosti in standardni odklon obnovljivosti smo določili v skladu z ISO 5725. Kupljeni ekološki med smo analizirali, da smo dokazali, da v njem ni bilo ostankov FFS. Nato smo analizirali ekstrakte matrike z dodanim standardom (naspajkan ekološki med) na koncentracijskem nivoju pri LOQ. V časovni periodi 10 dni, smo vsak dan pripravili dve paralelki matrik z dodanim standardom. Nato smo iz površin vrhov za vsako aktivno spojino izračunali standardni odklon ponovljivosti in standardni odklon obnovljivosti.

Negotovost ponovljivosti (U_r) in negotovost obnovljivosti (U_R) smo izračunali tako, da smo standardni odklon ponovljivosti in standardni odklon obnovljivosti pomnožili s Studentovim t faktorjem za 9 prostostnih stopenj in 95 % nivojem zaupanja ($t_{95;9} = 2.262$).

$$U_r = t_{95; 9} \times s_r ; U_R = t_{95; 9} \times s_R$$

Rezultati merilne negotovosti so prikazani v preglednici 4. Merilna negotovost ponovljivosti je bila v območju 0,0007 mg/kg do 0,01 mg/kg, kar predstavlja 7-25 % LOQ-ja. Merilna negotovost obnovljivosti je bila v območju 0,0007 mg/kg do 0,02 mg/kg, kar predstavlja 7-40 % LOQ-ja.

Merilna negotovost za ostanke FFS mora biti 50%, kot je to predlagano v smernici SANTE/11813/2017, oziroma v Sloveniji zakonsko predpisano v Uradnem listu (Ur. l. RS št. 108/2007). Med validacijo pa je potrebno dokazati, da je merilna negotovost manjša ali enaka predlagani merilni negotovosti. Pri naši metodi je bila merilna negotovost sprejemljiva za vseh 72 aktivnih spojin.

Točnost

Točnost smo preverili s preverjanjem izkoristkov. Analizirali smo 10 ekstraktov matrik z dodanim standardom (naspajkan ekološki med) na koncentracijskem nivoju pri LOQ. Vsako paralelko smo injicirali dvakrat. Izračunali smo povprečje izkoristkov. Rezultati so podani v preglednici 4. Dobljeni izkoristki so bili v območju 77,4 % do 99,2 %, z RSD 5,4 % do 16,7 %. Natančneje, izkoristki pri LOQ 0,01 mg/kg so se gibali v območju 77,5 % do 94,2 %, z RSD 5,7 % do 11,7 % in izkoristki pri LOQ > 0,01 do ≤ 0,05 mg/kg so se gibali v območju 77,4 % do 99,2 %, z RSD 5,4 % do 16,7 %. Glede na zahteve smernice SANTE/11813/2017 so sprejemljivi izkoristki med validacijo v območju 70% do 120%, z relativno standardno deviacijo ≤ 20%. Glede na smernice za validacijo, ki jih je podal Alder in sod. (2000), pa so sprejemljivi izkoristki: (a) pri koncentraciji >0.01 mg/kg in ≤ 0.1 mg/kg: 70% do 120%, RSD ≤ 20% in (b) pri koncentraciji >0.001 mg/kg in ≤ 0.01 mg/kg: 60% do 120%, RSD ≤ 30%. Naši izkoristki so sprejemljivi glede na zahteve obeh smernic.

Točnost smo preverili tudi s sodelovanjem v medlaboratorijski primerjavi BIPEA. Rezultati so pokazali, da je z vrednost v sprejemljivih mejah za vse analizirane aktivne spojine ($-2 \leq z \leq 2$). 12 od 13 aktivnih spojin (92,3% analiziranih aktivnih spojin) je imelo z vrednost v območju -1 to 1, kar je zelo zadovoljivo. Le 1 aktivna snov (akrinatrin) je imela z vrednost nižjo od -1, vendar je bila še vedno v zahtevanem območju za pravilen rezultat. Rezultati so predstavljeni v preglednici 5.

Preglednica 4: Validacijski parametri, izbrani ioni in MRL-ji za aktivne spojine v medu

Aktivna snov	MRL ^a (mg/kg)	Snemani ioni ^b T, Q ₁ , Q ₂ , Q ₃ (m/z)	Območje linearnosti (mg/kg)	R ²	LOQ (mg/kg)	Izkoristek (%)	RSD ^c (%)	U _r ^d (mg/kg)	U _r ^e (%)	U _R ^f (mg/kg)	U _R ^g (%)
akrinatrin	0,05*	181, 208, 289	0,02-0,15	0,978	0,02	94,7	6,6	0,003	15,0	0,003	15,0
aldrin	0,01	263, 265, 261	0,01-0,15	0,984	0,01	88,4	6,1	0,0008	8,0	0,0007	7,0
azinfos-metil	/	160, 132, 105	0,01-0,15	0,984	0,01	81,2	7,2	0,001	10,0	0,001	10,0
azoksistrobin	0,05*	344, 388, 345	0,05-0,15	0,976	0,05	83,5	13,9	0,010	20,0	0,010	20,0
bifentrin	0,05*	181, 165, 166	0,01-0,15	0,984	0,01	88,8	6,9	0,001	10,0	0,001	10,0
boskalid	0,05*	140, 342, 142	0,05-0,15	0,963	0,05	83,7	8,8	0,008	16,0	0,009	18,0
bromopropilat	0,01*	183, 341, 185	0,01-0,15	0,982	0,01	92,4	7,5	0,001	10,0	0,001	10,0
bupirimat	0,05*	273, 316, 208	0,05-0,15	0,972	0,05	77,6	11,3	0,008	16,0	0,009	18,0
cihalotrin-lambda	0,05*	181, 197, 208	0,05-0,15	0,977	0,05	89,9	6,7	0,006	12,0	0,006	12,0
cipermetrin	0,05*	181, 163, 165	0,05-0,15	0,967	0,05	93,5	7,1	0,007	14,0	0,008	16,0
ciprodinil	0,05*	224, 225, 210	0,05-0,15	0,974	0,05	84,2	7,2	0,006	12,0	0,006	12,0
ciprokonazol	0,05*	222, 139, 224	0,05-0,15	0,973	0,05	82,7	9,0	0,008	16,0	0,008	16,0
deltametrin	0,05*	181, 251, 255	0,03-0,15	0,983	0,03	92,9	7,8	0,004	13,3	0,004	13,3
diazinon	0,01*	179, 304, 199	0,01-0,15	0,985	0,01	84,7	8,5	0,001	10,0	0,001	10,0
diklofluanid	/	226, 123, 167	0,05-0,15	0,975	0,05	87,3	6,0	0,004	8,0	0,004	8,0
diklorvos	/	109, 185, 145	0,02-0,1	0,982	0,02	83,0	16,7	0,005	25,0	0,006	30,0
dimetaklor	0,05*	134, 197, 210	0,01-0,15	0,983	0,01	94,2	9,7	0,001	10,0	0,002	20,0
dinikonazol	0,05*	268, 270, 70	0,05-0,15	0,972	0,05	84,1	7,5	0,007	14,0	0,007	14,0
endrin	0,01	263, 261, 265	0,01-0,15	0,984	0,01	89,3	6,2	0,001	10,0	0,001	10,0
esfenvalerat + fenvalerat	0,05*	125, 167, 225	0,05-0,15	0,971	0,05	99,2	7,5	0,007	14,0	0,007	14,0
fenamidon	0,05*	238, 268, 237	0,05-0,15	0,974	0,05	84,1	7,8	0,007	14,0	0,007	14,0
fenbukonazol	0,05*	198, 129, 125	0,05-0,15	0,974	0,05	83,0	13,0	0,010	20,0	0,010	20,0

Aktivna snov	MRL ^a (mg/kg)	Snemani ioni ^b T, Q ₁ , Q ₂ , Q ₃ (m/z)	Območje linearnosti (mg/kg)	R ²	LOQ (mg/kg)	Izkoristek (%)	RSD ^c (%)	U _r ^d (mg/kg)	U _r ^e (%)	U _R ^f (mg/kg)	U _R ^g (%)
fention	0,01*	278, 279, 280	0,01-0,15	0,985	0,01	89,6	6,0	0,001	10,0	0,001	10,0
flonikamid	0,05*	174, 146, 229	0,05-0,2	0,982	0,05	78,2	11,4	0,009	18,0	0,010	20,0
fludioksonil	0,05*	248, 154, 127	0,05-0,15	0,969	0,05	83,6	7,3	0,008	16,0	0,008	16,0
flukvinkonazol	0,02*	340, 342, 108	0,02-0,15	0,982	0,02	85,0	9,9	0,003	15,0	0,003	15,0
folpet	0,05*	260, 262, 130	0,05-0,15	0,971	0,05	88,5	6,0	0,010	20,0	0,020	40,0
fosalon	0,01*	182, 367, 121	0,01-0,15	0,982	0,01	90,6	10,1	0,001	10,0	0,001	10,0
HCH-delta	/	219, 181, 183	0,02-0,15	0,985	0,02	86,7	6,0	0,002	10,0	0,002	10,0
heksaklorobenzen	0,01*	284, 286, 282	0,01-0,15	0,985	0,01	84,7	7,2	0,0008	8,0	0,0009	9,0
heptaklor	0,01	272, 274, 270	0,01-0,15	0,985	0,01	89,0	6,0	0,0007	7,0	0,0008	8,0
indoksakarb	0,05*	218, 264, 527	0,05-0,15	0,976	0,05	89,9	8,9	0,008	16,0	0,008	16,0
iprodion	0,05*	314, 316, 187	0,05-0,15	0,974	0,05	86,4	7,2	0,006	12,0	0,007	14,0
kaptan	0,05*	79, 107, 119, 149	0,05-0,15	0,972	0,05	88,9	5,9	0,009	18,0	0,015	30,0
karbaril	0,05*	144, 115, 116	0,05-0,15	0,973	0,05	85,8	8,2	0,006	12,0	0,007	14,0
karbofuran	0,05*	164, 149, 131	0,03-0,15	0,987	0,03	82,1	7,2	0,004	13,3	0,004	13,3
klortalonil	0,05*	266, 264, 268	0,05-0,15	0,974	0,05	84,7	6,2	0,005	10,0	0,005	10,0
klorpirifos-metil	0,05*	286, 288, 125	0,01-0,15	0,983	0,01	88,2	5,7	0,0008	8,0	0,0008	8,0
klorprofam	0,05*	213, 127, 154	0,05-0,15	0,978	0,05	86,2	6,4	0,004	8,0	0,004	8,0
krezoksim-metil	0,05*	116, 206, 131	0,05-0,15	0,974	0,05	87,3	5,7	0,005	10,0	0,005	10,0
kvinalfos	0,05*	146, 298, 157	0,05-0,15	0,974	0,05	86,5	5,6	0,005	10,0	0,005	10,0
kvinoklamin	0,05*	207, 172, 209	0,05-0,15	0,964	0,05	77,4	5,9	0,005	10,0	0,008	16,0
kvinoksifen	0,05*	237, 272, 307	0,05-0,15	0,977	0,05	85,1	6,1	0,006	12,0	0,006	12,0
malation	0,05*	173, 174, 211	0,05-0,15	0,974	0,05	86,6	5,6	0,005	10,0	0,005	10,0
matakrifos	0,05*	208, 180, 240	0,05-0,15	0,977	0,05	97,0	14,5	0,006	12,0	0,008	16,0
mekarbam	0,05*	131, 159, 329	0,05-0,15	0,974	0,05	87,1	5,9	0,005	10,0	0,005	10,0
metalaksil + metalaksil-M	0,05*	249, 206, 234	0,05-0,15	0,974	0,05	83,5	8,7	0,007	14,0	0,008	16,0

Aktivna snov	MRL ^a (mg/kg)	Snemani ioni ^b T, Q ₁ , Q ₂ , Q ₃ (m/z)	Območje linearnosti (mg/kg)	R ²	LOQ (mg/kg)	Izkoristek (%)	RSD ^c (%)	U _r ^d (mg/kg)	U _r ^e (%)	U _R ^f (mg/kg)	U _R ^g (%)
metidation	0,02*	145, 85, 125	0,02-0,15	0,977	0,02	84,0	10,5	0,002	10,0	0,002	10,0
metrafenon	0,05*	393, 408, 379	0,05-0,15	0,977	0,05	88,3	6,7	0,006	12,0	0,006	12,0
miklobutanil	0,05*	179, 288, 150	0,05-0,15	0,970	0,05	81,1	9,6	0,008	16,0	0,009	18,0
oksadiksil	0,01*	163, 105, 132	0,01-0,15	0,982	0,01	77,5	11,7	0,002	20,0	0,002	20,0
paration	/	291, 292, 235	0,01-0,15	0,984	0,01	87,6	8,1	0,001	10,0	0,001	10,0
penkonazol	0,05*	248, 159, 161	0,05-0,15	0,972	0,05	84,7	7,1	0,006	12,0	0,007	14,0
permetrin	/	183, 163, 165	0,02-0,15	0,987	0,02	89,8	5,9	0,002	10,0	0,002	10,0
piridafention	/	199, 340, 188	0,01-0,15	0,986	0,01	84,4	8,2	0,001	10,0	0,001	10,0
pirimetanil	0,05*	198, 199, 200	0,05-0,1	0,960	0,05	84,9	6,3	0,008	16,0	0,008	16,0
pirimifos-metil	0,05*	290, 305, 276	0,05-0,15	0,977	0,05	87,5	6,0	0,004	8,0	0,004	8,0
pirimikarb	0,05*	166, 238, 167	0,05-0,15	0,979	0,05	79,5	11,6	0,009	18,0	0,010	20,0
procimidon	0,05*	283, 285, 96	0,05-0,15	0,973	0,05	86,7	5,5	0,005	10,0	0,005	10,0
profenofos	0,05*	208, 139, 339	0,05-0,15	0,973	0,05	86,9	5,4	0,005	10,0	0,006	12,0
propargit	0,05*	135, 173, 350, 201	0,05-0,2	0,971	0,05	86,6	5,9	0,006	12,0	0,006	12,0
propizamid	0,05*	173, 175, 145	0,05-0,15	0,976	0,05	84,0	6,4	0,005	10,0	0,005	10,0
tebukonazol	0,05*	125, 250, 127	0,05-0,15	0,973	0,05	83,7	8,3	0,009	18,0	0,009	18,0
tetradifon	0,05*	159, 229, 356	0,05-0,15	0,977	0,05	88,1	5,9	0,005	10,0	0,006	12,0
tetrakonazol	0,02*	336, 338, 337	0,02-0,15	0,979	0,02	83,8	9,1	0,003	15,0	0,003	15,0
tolilfluanid	0,05*	238, 137, 240	0,05-0,15	0,975	0,05	87,8	5,5	0,005	10,0	0,005	10,0
tolklofos-metil	0,05*	265, 267, 250	0,05-0,15	0,976	0,05	87,5	5,9	0,004	8,0	0,004	8,0
triadimefon	0,05*	208, 210, 181	0,05-0,15	0,973	0,05	85,1	6,6	0,006	12,0	0,006	12,0
triadimenol	0,05*	112, 168, 128	0,05-0,15	0,962	0,05	83,7	9,1	0,007	14,0	0,009	18,0
triazofos	0,05*	161, 162, 285	0,01-0,15	0,988	0,01	86,5	6,0	0,002	20,0	0,002	20,0
trifloksistrobin	0,05*	116, 222, 186	0,05-0,15	0,978	0,05	87,8	6,3	0,005	10,0	0,005	10,0
vinklozolin	0,05*	285, 124, 187	0,05-0,15	0,976	0,05	87,9	5,5	0,004	8,0	0,004	8,0

LEGENDA PREGLEDNICE 4:

^a Regulatorna (EC) 396/2005, * pomeni, da je MRL postavljen na LOQ analize metode

^b T = ciljni ion (target ion), Q = kvalitativni ion (qualifier ion)

^c RSD je bila izračunana za izkoristke

^{d,e} U_r = merilna negotovost ponovljivosti

^{f,g} U_R = merilna negotovost obnovljivosti

Preglednica 5: Rezultati medlaboratorijske primerjave za aktivne spojine v medu (BIPEA; 2017)

Aktivna snov	Referenca	Toleranca	Minimum	Maksimum	Naš rezultat	Enote	Pravilnost	z
akrinatrin	0,026	0,013	0,013	0,039	0,016	mg/kg	+	-1,54
bifentrin	0,128	0,061	0,067	0,189	0,142	mg/kg	+	0,46
boskalid	0,131	0,062	0,069	0,193	0,115	mg/kg	+	-0,52
bromopropilat	0,146	0,068	0,078	0,214	0,160	mg/kg	+	0,41
cihalotrin-lambda	0,076	0,038	0,038	0,114	0,072	mg/kg	+	-0,21
cipermetrin	0,134	0,064	0,070	0,198	0,143	mg/kg	+	0,28
deltametrin	0,027	0,014	0,013	0,041	0,029	mg/kg	+	0,29
karbaril	0,153	0,071	0,082	0,224	0,151	mg/kg	+	-0,06
klorpirifos	0,095	0,048	0,047	0,143	0,098	mg/kg	+	0,13
malation	0,114	0,056	0,058	0,170	0,111	mg/kg	+	-0,11
metalaksil+metalaksil-M	0,073	0,037	0,036	0,110	0,070	mg/kg	+	-0,36
permetrin	0,134	0,064	0,070	0,198	0,133	mg/kg	+	-0,03
tetradifon	0,028	0,014	0,014	0,042	0,029	mg/kg	+	0,14

4 ZAKLJUČKI

Multirezidualna GC-MS metoda za določanje ostankov FFS v cvetnem prahu omogoča analizo 47 aktivnih spojin in primerjavo njihove koncentracije z veljavnimi evropskimi MRL-ji.

Multirezidualna GC-MS analiza za določanje ostankov FFS v medu omogoča analizo 72 aktivnih spojin in primerjavo njihove koncentracije z veljavnimi evropskimi MRL-ji.

5 LITERATURA

Alder L., Hill A., Holland P.T., Lantos J., Lee S.M., MacNeil J.D., O'Rangers J., van Zoonen P., Ambrus A. 2000. Guidelines for single-laboratory validation of analytical methods for trace-level concentrations of organic chemicals, Principles and practices of method validation (ed.: A. Fajgelj, A. Ambrus). The Royal Society of Chemistry, str. 179 – 252.

Baša Česnik H. 2021. Pesticide residues in bee pollen - validation of the gas chromatography-mass spectrometry multiresidual method and a survey of bee pollens from Slovenia. *Acta Agriculturae Slovenica*, 117: 1-11, DOI: 10.14720/aas.2021.117.2.1822.

Baša Česnik H., Kmecl V., Velikonja Bolta Š. 2019. Pesticide and veterinary drug residues in honey - validation of methods and a survey of organic and conventional honeys from Slovenia. *Food additives & contaminants. Part A., Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 36: 1358-1375, DOI: 10.1080/19440049.2019.1631492.

BIPEA. 2017. Bureau interprofessionnel d'études analytiques. Laboratory comparisons report, Honey, 29-3619. October 2017. Gienevilliers, BIPEA.

Cabrera de Oliveira R. C., Queiroz S. C. do N., da Luz C. F. P., Porto R. S., Rath S. 2016. Bee pollen as a bioindicator of environmental pesticide contamination. *Chemosphere*, 163:525-534. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.08.022.

Crenna E., Jolliet O., Collina E., Sala S., Fantke P. 2020. Characterizing honey bee exposure and effects from pesticides for chemical prioritization and life cycle assessment. *Environment International*, 138: 105642. DOI: 10.1016/j.envint.2020.105642.

Eckert J.E. 1933. The flight range of the honeybee. *Journal of Agricultural Research*, 47: 257-285.

Hakme E., Lozano A., Gómez-Ramos M. M., Hernando M. D., Fernández-Alba A. R. 2017. Non-target evaluation of contaminants in honey bees and pollen samples by gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Chemosphere*, 184: 1310-1319. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.06.089.

ISO 5725. 1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method, pp. 1-42.

Kasiotis K. M., Anagnostopoulos C., Anastasiadou P., Machera K. 2014. Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC-MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. *Science of the Total Environment*, 485-486: 633-642. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.03.042.

Lehotay S. J. 2007. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 90: 485-520. DOI: 10.1093/jaoac/90.2.485.

Lozano A., Rajski Ł., Uclés S., Belmonte-Valles N., Mezcua M., Fernández-Alba A. R. 2014. Evaluation of zirconium dioxide-based sorbents to decrease the matrix effect in avocado and almond multiresidue pesticide analysis followed by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta*, 118: 68-83. DOI: 10.1016/j.talanta.2013.09.053.

Luke M.A., Froberg J.E, Masumoto H.T. 1975. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *Journal of AOAC*, 58: 1020-1026.

SANTE/11813/2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. DG SANTE, European Commission, 2017.

Stenerson K. K, 2018. Analysis of pesticides in turmeric powder by LC-MS/MS and GC-MS/MS after cleanup with a novel dual-layer SPE cartridge. Supelco Analytical Products, *Analytix reporter*, št. 1, 2018.

Uradni list Republike Slovenije št. 108/2007, str. 14834.

Vázquez P. P., Lozano A., Uclés S., Ramos M. M. G., Fernández-Alba A. R. 2015. A sensitive and efficient method for routine pesticide multiresidue analysis in bee pollen samples using gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1426: 161-173. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.11.081.

Wang P.-C., Lee R.-J., Chen C.-Y., Chou C.-C., Lee M.-R. 2012. Determination of cyromazine and melamine in chicken eggs using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 752: 78-86. DOI: 10.1016/j.aca.2012.09.029.