CH 5.10.

Stanovenie pentachlórfenolu v guarovej gume metódou LC-MS/MS

1 URČENIE METÓDY

Metóda je určená na stanovenie pentachlórfenolu v guarovej gume, je však použiteľná aj pre analýzy iných potravín.

2 PRINCÍP METÓDY

Vzorky sa v kyslom acetonitrile extrahujú v zmesi solí, odstredia a supernatant sa analyzuje metódou LC-MS/MS.

3 POMÔCKY

3.1. PRÍSTROJE A ZARIADENIA

- analytické váhy
- automatické pipety s nastaviteľným objemom, jednokanálové
- striekačky Hamilton
- centrifugačné skúmavky so zátkou (50 ml)
- vortex
- centrifúga s chladením
- ultrazvukový kúpeľ
- HPLC separačný modul Waters 2695
- MS detektor Quattro Premier XE
- Kolóna Zorbax XDB Eclipse

3.2. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

- síran horečnatý, bezvodý, p.a
- chlorid sodný, p.a
- citrát trisodný, dihydrát, p.a
- hydrogéncitrát disodný, sesquihydrát, p.a
- kyselina octová, ľadová, p.a.
- mravčan amónny, pre LC/MS
- metanol pre HPLC
- acetonitril pre LC/MS, Sigma -
- redestilovaná voda pre HPLC

štandardy: nicarbazín - vnútorný štandard (ISTD)
pentachlórfenol (PCP)

Zásobné roztoky štandardov

Pripraviť zásobné roztoky jednotlivých štandardov o koncentrácii 1,0 (S_0) mg/ml rozpustením odváženého množstva (s presnosťou na 0,1 mg) štandardu v acetonitrile .

Pracovné roztoky štandardov

Pripraviť pracovné roztoky jednotlivých štandardov o koncentrácii 1,0 µg/ml (riedenie S_3), riedením zásobných roztokov štandardov v acetonitrile.

Kalibračná krivka

Vykonáva sa matricová kalibrácia v rozsahu (0; 10; 15; 20; 25; 37,5)µg/kg. Pokiaľ nie je k dispozícii negatívny materiál k príslušnej matrici, kalibruje sa do vzorky. Fortifikácia matrice o návažku 1g je v tabuľke č.1.

Tab.č.1

Koncentrácia [µg/kg]	**0**	**10**	**15**	**20**	**25**	**37,5**
Prídavok pracovného roztoku S_3 štandardu PCP [µl]	0	10	15	20	25	37,5
Prídavok pracovného roztoku S_3 interného štandardu Nicarbazínu [µl]	100	100	100	100	100	100

Zmes solí

Navážiť (s presnosťou na 0,01g) do zásobných fľašiek, uchovávať v uzatvorených fľaškách (skúmavkách) v suchu pri laboratórnej teplote, prípadne navážiť zmes čerstvú.

4 g $MgSO_4$
1 g Na_3-citrátu dihydrátu
1 g NaCl
0,5 g Na_2H-citrátu-sesquihydrátu
- dobre premiešať

Kyslý acetonitril

0,4 ml ľadovej kyseliny octovej pridať k 80 ml acetonitrilu v 100 ml odmernej banke, doplniť acetonitrilom po značku, dobre premiešať.

5 mM roztok mravčanu amónneho vo vode (mobilná fáza A)

0,315 g mravčanu amónneho rozpustiť v 950 ml deionizovanej vody. Doplniť redestilovanou vodou po značku, dobre premiešať, 10 min sonifikovať.
Roztok pripravovať vždy čerstvý tesne pred použitím.

5 mM roztok mravčanu amónneho v metanole (mobilná fáza B)

0,315 g mravčanu amónneho rozpustiť v 950 ml metanolu. Doplniť metanolom po značku, dobre premiešať, 10 min sonifikovať.
Doba expirácie takto pripraveného roztoku je pri skladovaní pri laboratórnej teplote 3 mesiace.

4. BEZPEČNOSŤ PRI PRÁCI

Všetky extrakčné a čistiace kroky sa uskutočňujú pod ventilačným zariadením s odťahom pri použití ochranných okuliarov a rukavíc, je potrebné prísne dodržiavať Zásady pre bezpečnú prácu v chemických laboratóriách podľa STN 01 8003.

5. PRACOVNÝ POSTUP

5.1. PRÍPRAVA VZORKY

- 1 g homogénnej vzorky (s presnosťou na 1 mg) navážiť do 50 ml centrifugačnej skúmavky
- pridať 10 ml kyslého acetonitrilu
- vortexovať
- pridať 100 µl vnútorného štandardu nicarbazínu (koncentrácia S_3)
- vortexovať
- pridať 10 ml deionizovanej vody
- vortexovať 1 min
- pridať zmes solí
- vortexovať 1 min
- centrifugovať 5 min pri 3000 rpm
- odobrať supernatant do vialky na LC/MS analýzu

5.2. PRÍPRAVA MERANIA

HPLC podmienky:

Kolóna: Zorbax XDB Eclipse
Teplota kolóny: 40 ^{0}C
Objem nástreku : 10 µl
Prietok mobilnej fázy : 0,2 ml/min
Mobilná fáza A : 5 mM mravčan amónny vo vode
B : 5 mM mravčan amónny v metanole

MS/MS detekcia
Detektor : Quattro Premiere XE, Micromass Technologies
Iónový zdroj : ESI v negatívnom móde
Teplota zdroja : 100^{0}C
Desolvatačná teplota : 400^{0}C
Prietok dusíka : desolvatačný 800 ml/min
cone 50 ml/min
Prietok kolízneho plynu : 0,05 ml/min

5.3. MERANIE

Používa sa matricová kalibrácia s použitím vnútorného štandardu nicarbazínu. Z každej vzorky sa robia 2 paralelné stanovenia, s každým meraním sa vykoná aj analýza kontrolného matricového štandardu.
Pri nadlimitných hodnotách sa analýza vzorky opakuje.

6. VYHODNOTENIE NAMERANÝCH ÚDAJOV

Na kvantifikáciu sa používa matricová kalibrácia s použitím vnútorného štandardu.

Obsah analytu vo vzorke sa vypočíta podľa vzorca :

$$C = (y – b) / a$$

kde
C – koncentrácia analytu vo vzorke vyjadrená v µg/kg
y – pomer plochy analytu a vnútorného štandardu
b– intercept kalibračnej krivky
a – smernica kalibračnej krivky

Podľa Nariadenia CD 2002/657/EC sú vyžadované na konfirmáciu látok skupiny A Prílohy I Smernice 96/23/EC minimálne 4 identifikačné body. Tieto kritériá sú pre techniku LC-MS/MS splnené meraním aspoň dvoch prekurzorov, každý s 1 dcérskym iónom.

Ako doplňujúce kritérium je pomer plôch dvoch dcérskych iónov (primárneho a sekundárneho). Tento pomer musí byť v rozpätí ± 20% v porovnaní s priemernou hodnotou pomerov vypočítaných z matricovej kalibrácie.

Ako ďalšie kritérium sa využíva relatívny retenčný čas, teda pomer retenčného času sledovaného analytu a retenčného času príslušného vnútorného štandardu. Rozdiel medzi relatívnym retenčným časom analytu vo fortifikovanej matrici a v analyzovanej vzorke môže kolísať do ± 2,5%.

7. LITERATÚRA

- Modified Version of the QuEChERS- Method for the analysis of Pentachlorophenol in Guar Gum – Brief description, CRL for Single Residue Methods, CVUA Stuttgart