CH 5.11.

STANOVENIE KARBAMÁTOV METÓDOU LC/MS/MS

1. URČENIE METÓDY

Karbamátové pesticídy sa za posledné roky stávajú čoraz viac dôležité pre ich široké spektrum účinnosti. Ide o triedu vysokoúčinných insekticídov, ktoré sú vo svete používané na ochranu plodín. Inhibujú acetylcholínesterázu, preto sa považujú za toxické pre životné prostredie a človeka.

Skúšobná metóda je vyvinutá na stanovenie a konfirmáciu prítomnosti rezíduí N-metyl karbamátov:

- Carbofuran
- Pirimicarb

v živočíšnej matrici (mäso, vajce) a v mede.

2. PRINCÍP METÓDY

Zhomogenizovaná vzorka sa opakovane extrahuje organickým rozpúšťadlom. Extrakt sa prefiltruje cez vrstvu bezvodého síranu sodného, po odparení sa zriedi s vodou a upraví pH. Ďalej sa extrakt prečistí technikou SPE, eluát sa odparí do sucha a zvyšok sa zakoncentruje do rozpúšťadla, ktoré zodpovedá zloženiu mobilnej fázy. Pre kvantifikáciu sa používa technika LC s MS detekciou.

3. POMÔCKY

3.1 PRÍSTROJE A ZARIADENIA

- Kuchynský mlynček na mäso, prípadne Ultra Turrax
- Ultrazvukový vodný kúpeľ
- Rotačná vákuová odparka
- Centrifúga
- Laboratórna trepačka
- Vákuové zariadenie SPE (LiChrolut Extraction Unit)
- Milli-Q-Plus, systém na prečisťovanie destilovanej vody, Millipore
- LC-MS/MS systém(Agilent) = kvapalinová chromatograf 1100 s quartérnou gradientovou pumpou a vákuovým degasserom + hmotnostný spektrometer MSD Trap
- Analytická kolóna: Thermo Hypersil C18, 125 x 2.1 mm, 5µm s integrovanou predkolónou
- Striekačkové membránové filtre 0.45 µm

3.2 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

Všetky použité materiály a chemikálie musia byť vhodné pre HPLC analýzu (napr. LiChrosolv, Uvasol, Suprasolv)

- Acetonitril, gradient grade
- Dichlórmetán Suprasolv, pre stopovú analýzu
- Octan amónny, p.a.
- Síran sodný bezvodý, p.a.
- HPLC-grade H_2O, získaná prečistením destilovanej vody v zariadení Milli-Q-Plus
- Kyselina fosforečná
- SPE kolónky- Strata X, OASIS HLB (200 mg/ 6 ml, resp. 500 mg/6 ml)
- Referenčný materiál: Carbofuran, Pirimicarb (Dr. Ehrenstorfer)
- Roztoky:
  mobilná fáza A: 10 mM octan amónny
  mobilná fáza B: metanol

4. BEZPEČNOSŤ PRI PRÁCI

Dodržiavanie Zásad pre bezpečnú prácu v chemických laboratóriách STN 018003.

5. PRACOVNÝ POSTUP

5.1 PRÍPRAVA VZORKY

Laboratórna vzorka

Laboratórna vzorka sa zmixuje tak, aby sa získal homogénny materiál. Odoberie sa najmenej 100 g a uchováva sa v mrazničke pri ≤ - 18°C po analýzu.
Z uloženej laboratórnej vzorky sa odoberie 5,0 ± 0,1 g zhomogenizovanej vzorky.

Príprava fortifikovaných vzoriek (matričná kalibračka)

V prípade pozitiévneho nálezu vyhodnocujeme vzorky vzhľadm na matričnú kalibračnú krivku. Naváži sa 5,0 ± 0,1 g negatívnej vzorky do piatich Erlenmayerových baniek, ktoré sa fortifikujú zmesným štandardným roztokom karbamátov podľa tabuľky 1. Fortifikované vzorky sa ďalej upravujú podľa nižšie uvedeného postupu.

Tabuľka č.1: Príprava fortifikovaných vzoriek

Množstvo vo vzorke (mg/kg)	Prídavok štandardu 10mg/l do vzorky (µl)
0,02	10
0,05	25
0,10	50
0,15	75
0,20	100

Extrakcia vzorky

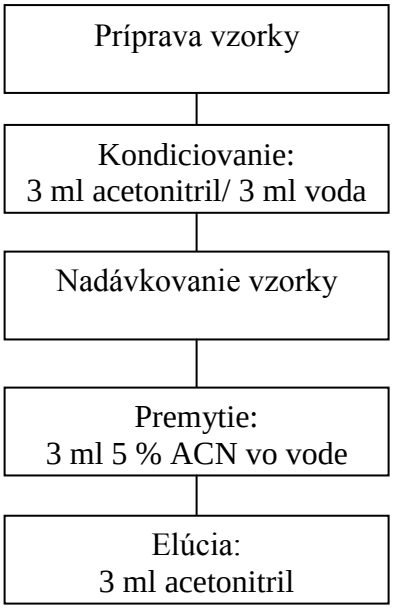
Naváži sa 5 g mäsa, resp. vajca do Erlenmayerovej banky a extrahuje sa s acetonitrilom na trepačke a v ultrazvuku. Extrakt sa prefiltruje cez bezvodý Na_2SO_4 a extrakcia sa zopakuje. Spojené extrakty sa odparia na vákuovej rotačnej odparke do sucha a odparok sa rozpustí v acetonitrile a vode. Upraví sa pH s H_3PO_4 (pH 3). Vzorka sa ďalej prečistí technikou SPE.
V prípade medu sa naváži 5g do Erlenmayerovej banky a pridá destilovaná voda a celý obsah sa trepe na trepačke a v ultrazvuku. Nakoniec sa upraví pH s H_3PO_4 (pH 3). Vzorka sa ďalej prečistí technikou SPE.

SPE prečistenie a elúcia analytov

Kolónka sa kondiciuje acetonitrilom a vodou. Cez kolónku sa nasaje pomocou mierneho vákua extrakt vzorky (1 ml/min) a vysuší sa vákuom. Analyty sa prečistia z kolónky 5% acetonitrilom vo vode. Kolónka sa nechá vysušiť a vzorka sa eluuje acetonitrilom. Eluát sa odparí na odparke do sucha a pridá sa 1 ml mobilnej fázy so zložením na počiatku gradientu. Po prefiltrovaní cez membránový filter 0.45 μm do HPLC vialky je vzorka pripravená na analýzu LC-MS/MS.

Schéma SPE prečistenia na polymérnych kolónkach:

SPE 200mg/6 ml



5.2 PRÍPRAVA MERANIA

LC podmienky:

Prietok	0,3 ml/min
Nástrek	5 μl

Teplota kolóny 30°C
Celkový čas 30 min

Tabuľka č. 2: Gradient LC

Čas (min)	Mobilná fáza A (%)	Mobilná fáza B (%)
0	90	10
8	80	20
15	0	100
20	0	100
24	90	10
post time 6 min		

MS podmienky:
Ionizačný mód ESI, positive (v prípade teflubenzuronu ESI, negative)
Nebuliser 40 psi
Dry gas 9 l/min
Dry temp 350°C

Dusík do MSD je vyrábaný in situ generátorom dusíka (Parker Balston-UK) z kompresoru vzduchu (Jun Air-Dánsko) pri 6 baroch.

5.3 MERANIE

Prekurzorový ión: ión, ktorý je vyselektovaný v prvom MS kroku.
Produktový ión: ión, ktorý je vyselektovaný v druhom MS kroku, vytvorený z prekurzorového iónu kolíziou indukovaného napätia (CID = Collision induced dissociation).

Tabuľka č. 3: MS/MS fragmentácia

Zlúčenina	Prekurzor ión (m/z)	Produkt ión (m/z)*	Fragmentačná energia (eV)	Segment / RT (min)**
Carbofurán	222	<u>165.0</u> 123.0	1,0	2 / 16,8 min
Pirimicarb	239	<u>182.0</u> 195.0	1,2	2 / 17,4 min

* produkt ión je podčiarknutý
** MRM = multi reaction monitoring

6. VYHODNOTENIE NAMERANÝCH ÚDAJOV

Výpočet sa robí na základe metódy vonkajšieho štandardu integráciou plôch píkov alebo meraním výšok píkov po zohľadnení elučných časov a linearity kalibračnej krivky. Pri výpočte sa zohľadní prípadný zrieďovací faktor.
Identifikácia sa robí pomocou porovnania retenčných časov a spektier meraných analytov.
Vzorky sa vyhodnocujú pomocou nameranej kalibračnej čiary, ktorá pozostáva aspoň z troch bodov.
Obsah analytov vo vzorke sa vypočíta:

$$X = \frac{c \cdot V}{n} \cdot F$$

X– obsah analytu vo vzorke v mg/kg
c – koncentrácia meraného roztoku v mg/l
V - konečný objem meraného roztoku v ml
n - navážka vzorky v g
F – zrieďovací faktor

7. LITERATÚRA

[1] M. Fernández, Y. Picó, J. Mañes, Journal of Chromatography A, 871 (2000) 43 – 56

[2] Waters OASIS sample Extraction Products, Environmental & Agrochemical Applications Notebook