CH 10.2. STANOVENIE FARBÍV METÓDOU HPLC/MS/MS

1 PRINCÍP METÓDY

Na analýzu sa použije chromatografická kolóna s obrátenými fázami a po rozdelení rezíduí sa tieto detegujú hmotnostným detektorom pracujúcim v režime MS/MS. Ionizácia APCI a ESI. Identifikácia látky je prevedená dvoma tranzíciami (2 transitions) a kontrolou ich iónových pomerov (ion ratio). Kvantifikácia je prevedená metódou internej kalibrácie.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie sudánu I, sudánu II, sudánu III, sudánu IV, para redu, rhodaminu B, dimethyl yellow, toluidine red, auramine O, sudánu 410, oil red vo vzorkách korenín, ochucovadiel, omáčok a olejov. A tiež na stanovenie červenej 2G, allury a ponceau 4R v mäsových výrobkoch a koreniacich prípravkoch.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 Sudán I (S 1)
3.1.2 Sudán II (S 2)
3.1.3 Sudán III (S 3)
3.1.4 Sudán IV (S 4)
3.1.5 Sudán red 7B (S 5)
3.1.6 Sudán 410 (S 6)
3.1.7 Sudán I-D5 (S 7)
3.1.8 Para Red (P)
3.1.9 Rhodamine B (R)
3.1.10 Orange II sodium salt (O)
3.1.11 Dimethyl Yellow (DY)
3.1.12 Toluidine Red (TR)
3.1.13 Oil Red (OR)
3.1.14 Auramine (A)
3.1.15 red 2G (R2G)
3.1.16 allura red AC (AR)
3.1.17 ponceau 4R (P4R)
3.1.18 acetonitril gradient grade
3.1.19 metanol gradient grade
3.1.20 octan amónny
3.1.21 acetón p.a.

3.1.22 síran sodný bezvodý p.a., vypálený pri 500^0C v muflovej peci /4 hod./
3.1.23 florisil, vypálený v muflovej peci pri 650 °C 4 hod. prechovávať v tme a v exsikátore. Takto aktivovaný vydrží najviac 4 dni.
3.1.24 Hydromatrix
3.1.25 morský piesok, vypálený pri 450°C v muflovej peci /5 hodín/
3.1.26 chloroform p.a.
3.1.27 petroléter p.a.
3.1.28 amoniak 25% p.a.
3.1.29 deionizovaná voda
3.1.30 kyselina vínna p.a.
3.1.31 etanol 96% p.a.

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 1 M octan amónny
3.2.2 0,01 M octan amónny v acetonitrile
3.2.3 0,01 M octan amónny
3.2.4 extrakčná zmes: chloroform – acetón (2:1)
3.2.5 extrakčná zmes: petroléter – acetón (1:1)
3.2.6 extrakčná zmes: metanol – amoniak (8:2)
3.2.7 10 % kyselina vínna
3.2.8 10 % amoniak

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobné roztoky štandardov

3.3.1.1 Zásobný roztok štandardu sudán I (1000 mg/l v chloroforme) – (S 1)
Navážiť 25,8 mg štandardu sudán I (3.1.1) do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku chloroformom. (3.1.26).
3.3.1.2 Zásobný roztok štandardu sudán II (1000 mg/l v chloroforme) – (S 2)
Navážiť 27,8 mg štandardu sudánu II (3.1.2) do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku chloroformom (3.1.26).
3.3.1.3 Zásobný roztok štandardu sudán III (1000 mg/l v chloroforme) – (S 3)
Navážiť 26,0 mg štandardu sudánu III (3.1.3) do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku chloroformom (3.1.26).
3.3.1.4 Zásobný roztok štandardu sudán IV (1000 mg/l v chloroforme) – (S 4)
Navážiť 28,1 mg štandardu sudánu IV (3.1.4) do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku chloroformom (3.1.26).
3.3.1.5 Zásobný roztok vnútorného štandardu sudán red 7B (1000 mg/l v chloroforme) – (S 5)
Navážiť 26,3 mg štandardu sudánu red 7B (3.1.5) do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku chloroformom (3.1.26).
3.3.1.6 Zásobný roztok vnútorného štandardu sudán 410 (1000 mg/l v chloroforme) – (S 6)
Navážiť 25 mg štandardu sudánu 410 (3.1.6) do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku chloroformom (3.1.26).
3.3.1.7 Zásobný roztok vnútorného štandardu sudán I-D5 (100 mg/l v chloroforme) – (S 7)
Navážiť 5 mg štandardu sudánu I-D5 (3.1.7) do 50 ml odmernej banky a doplniť po značku chloroformom (3.1.26).

3.3.1.8 Zásobný roztok štandardu para red (1000 mg/l v chloroforme) – (P)
Navážiť 26,3 mg štandardu para red (3.1.8) do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku chloroformom. (3.1.26).
3.3.1.9 Zásobný roztok štandardu rhodamine B (1000 mg/l v chloroforme) – (R)
Navážiť 26,3 mg štandardu rhodamine B (3.1.9) do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku chloroformom. (3.1.26).
3.3.1.10 Zásobný roztok štandardu orange II (1000 mg/l v chloroforme) – (O)
Navážiť 26,9 mg štandardu orange II sodium salt (3.1.10) do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku chloroformom. (3.1.26).
3.3.1.11 Zásobný roztok štandardu dimethyl yellow (1000 mg/l v chloroforme) – (DY)
Navážiť 25,5 mg štandardu dimethyl yellow (3.1.11) do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku chloroformom. (3.1.26).
3.3.1.12 Zásobný roztok štandardu toluidine red (1000 mg/l v chloroforme) – (TR)
Navážiť 27,8 mg štandardu toluidine red (3.1.12) do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku chloroformom. (3.1.26).
3.3.1.13 Zásobný roztok štandardu oil red (1000 mg/l v chloroforme) – (OR)
Navážiť 25 mg štandardu oil red(3.1.13) do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku chloroformom. (3.1.26).
3.3.1.14 Zásobný roztok štandardu auramine O (1000 mg/l v chloroforme) – (A)
Navážiť 30,5 mg štandardu auramine O (3.1.14) do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku chloroformom. (3.1.26).
3.3.1.15 Zásobný roztok štandardu red 2G (1000 mg/l v metanole) – (R2G)
Do 50 ml odmernej banky navážiť 61,9 mg R2G (3.1.15), rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po rysku metanolom (3.1.19)
3.3.1.16 Zásobný roztok štandardu allura red (1000 mg/l v metanole) – (AR)
Do 50 ml odmernej banky navážiť 57,9 mg AR (3.1.16), rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po rysku metanolom (3.1.19)
3.3.1.17 Zásobný roztok štandardu ponceau 4R (1000 mg/l v metanole) – (P4R)
Do 50 ml odmernej banky navážiť 59,5 mg P4R (3.1.17), rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po rysku metanolom (3.1.19)

Poznámka: Zásobné roztoky štandardov je potrebné uchovávať na tmavom mieste v chladničke do 10°C. Doba expirácie je 6 mesiacov.

3.3.2 Základné roztoky štandardov

3.3.2.1 Základný zmesný roztok štandardov (S 1, S 2, S 3, S 4, P, R, O) (100 mg/l v metanole) **FC**
Zobrať 1 ml zo zásobných roztokov štandardov (S 1, S 2, S 3, S 4, P, R, O) (3.3.1.1 – 3.3.1.4,3.1.8.-3.1.10.) do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.16).
3.3.2.2 Základný roztok vnútorného štandardu sudan red 7B (S 5) (100 mg/l v metanole)**ISR**
Zobrať 1 ml zo zásobného roztoku štandardu (S 5) (3.3.1.5) do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.16).

3.3.3 Zriedené roztoky základných štandardov

3.3.3.1 Zmesný roztok štandardov (S 1, S 2, S 3, S 4, P, O, R, OR, A,DY,TR,S6) (10 mg/l v metanole) **SM1**

Zobrať 1 ml zo základných roztokov štandardov (S 1, S 2, S 3, S 4, P, O, R, OR,A,DY,TR, S6) do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.16).

3.3.3.2 Zmesný roztok štandardov (S 1, S 2, S 3, S 4, P, O, R, OR, A,DY,TR,S6) (1 mg/l v metanole) **SM2**

Zobrať 1 ml zo zmesného roztoku štandardov SM3 (S 1, S 2, S 3, S 4, P, O, R, OR,A,DY,TR, S6) do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.16).

3.3.3.3 Zriedený roztok vnútorného štandardu (S 5) (10 mg/l v metanole) **ISR1**

Zobrať 1 ml zo základného roztoku štandardu (S 5) ISR (3.3.2.2), do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.12).

3.3.3.4 Zriedený roztok vnútorného štandardu (S 5) (1 mg/l v metanole) **ISR 2**

Zobrať 0,1 ml zo základného roztoku štandardu (S 5) ISR (3.3.2.2), do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.12).

3.3.3.5 Zriedený roztok vnútorného štandardu (S 7) (1 mg/l v metanole) **ISD**

Zobrať 0,1 ml zo zásobného roztoku štandardu (S 7) (3.3.1.7), do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.12).

3.3.3.6 Zmesný roztok štandardov (R2G, AR, P4R) (10 mg/l vo vode) **SS1**

Zobrať 1 ml zo zásobných roztokov štandardov (R2G)(3.3.1.15), (AR)(3.3.1.16), (P4R)(3.3.1.17) do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.3.7 Zmesný roztok štandardov (AR, P4R) (10 mg/l vo vode) **SS2**

Zobrať 1 ml zo zásobných roztokov štandardov (AR)(3.3.1.16), (P4R)(3.3.1.17) do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.3.8 Zriedený roztok štandardu (R2G) (10 mg/l vo vode) **SS3**

Zobrať 1 ml zo zásobného roztoku štandardu (R2G)(3.3.1.15) do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.3.9 Zmesný roztok štandardov (S1, S2, S3, S4, S5, S7, P) (1mg/l chloroforme) **SC**

Zobrať 0,1ml zo základných roztokov S1(3.3.1.1.), S2(3.3.1.2.), S3(3.3.1.3.), S4(3.3.1.4.), S5(3.3.1.5.), S7(3.3.1.7.), P (3.3.1.8.), preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po rysku chloroformom.

3.3.3.10 Roztok štandardu Sudán Red 7B(S5) (1mg/l v chloroforme) **ISR3**

Zobrať 0,1ml zo základného roztoku štandardu S5(3.3.1.5.), preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po rysku chloroformom.

3.3.3.11 Roztok štandardu Sudán I D5 (S7) (1mg/l v chloroforme) **ISD3**

Zobrať 0,1ml zo základného roztoku štandardu S7(3.3.1.7.), preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po rysku chloroformom.

3.3.3.12 Zriedený roztok štandardu (R2G) (1 mg/l vo vode) **SS4**

Zobrať 0,1 ml zo zásobného roztoku štandardu (R2G)(3.3.1.15) do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.3.13 Zriedený roztok štandardu (AR) (10 mg/l vo vode) **SS5**

Zobrať 1 ml zo zásobného roztoku štandardu (AR)(3.3.1.16) do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.4 Pracovné roztoky štandardov

3.3.4.1 Zmesný roztok štandardov (S 1, S 2, S 3, S 4, S 5, S 7, O, P, R, S 6, OR,A,DY,TR) (10 µg/l v metanole) **SW1**

Zobrať 0,1 ml zo zmesného roztoku štandardov (S 1, S 2, S 3, S 4, O, R, P, S 6, OR,A,DY,TR) SM4 (3.3.3.4), 0,1 ml zo zriedeného roztoku (S 5) ISR2 (3.3.3.6) a 0,1 ml zo zriedeného roztoku (S 7) ISD (3.3.3.8) do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.16).

3.3.4.2 Zmesný roztok štandardov (R2G 0,1 mg/l, AR, P4R 1 mg/l vo vode) **SW2**

Zobrať 1 ml zriedeného roztoku štandardu R2G (3.3.3.8.) do 100 ml odmernej banky, pridať 10 ml zmesného roztoku štandardov AR, P4R (3.3.3.7.) a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.4.3 Zmesný roztok štandardov (S 1, S 2, S 3, S 4, S 5, S 7, P) (10 µg/l v chloroforme) **SW3**

Zobrať 1ml zo zmesného roztoku štandardov SC (1mg/l v chloroforme)(3.3.3.9.), preniesť do 100 ml odmernej banky, doplniť po rysku chloroformom.

3.3.4.4 Roztok štandardu Sudán Red 7B 100ug/l v chloroforme **SW4**

Zobrať 1ml roztoku štandardu Sudán Red 7B 1mg/l v chloroforme (ISR3) (3.3.3.10), preniesť do 10ml odmernej banky, doplniť po rysku chloroformom.

3.3.4.5 Roztok štandardu Sudán I D5 100ug/l v chloroforme **SW5**

Zobrať 1ml roztoku štandardu Sudán I D5 1mg/l v chloroforme (ISD3) (3.3.3.10), preniesť do 10ml odmernej banky, doplniť po rysku chloroformom

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 kvapalinový chromatograf Agilent 1100 Series s hmotnostným detektrorom – ion trap Bruker-Gemini
4.2 kvapalinový chromatograf Waters Acquity UPLC s hmotnostným detektorom Micromass Quattro Premier XE
4.3 chromatografická kolóna: C 18
4.4 chromatografická kolóna: C18
4.5 chromatografická kolóna: UPLC C18
4.6 extrakčný prístroj ASE- 200
4.7 zariadenie na SPE ASPEC XL GILSON
4.8 gélová permeačná kolóna TESSEK stainless steel column 8 x 500 mm plnená BIO BEADS S-X3 200-400 mesh, mobile phase: chloroform
4.9 analytická váha HELAGO HM 200
4.10 ultrazvukový kúpeľ
4.11 rotačná vákuová odparka BUCHI R144
4.12 minishaker (Vortex)
4.13 Hamilton striekačka 100 µl, 250 µl, 50 µl
4.14 sklenená kolóna 400 x 15 mm
4.15 buničitá vata
4.16 sklená vata
4.17 Erlenmayerova banka 100 ml zo zábrusom
4.18 sklenená tyčinka
4.19 nerezová lyžica

4.20 filter sklenené vlákno
4.21 odmerné sklo-10 ml a 100 ml odmerná banka, 50 ml kadička, pipety 1 a 10 ml
4.22 HPLC pumpa pre GPC PU 4100 PHILIPS
4.23 zberač frakcií FOXY 200
4.24 SPE manifold
4.25 SPE kolónka
4.26 striekačkový mikrofilter

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Predpríprava vzoriek

Vzorky sa zhomogenizujú.

5.2 Príprava vzorky pre kontrolu kvality (aj matricová kalibrácia)

5.2.1 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovaných vzoriek

5.2.1.1 Stanovenie azo farbív

5.2.1.1.1 Príprava vzoriek – extrakcia stĺpcovou chromatografiou

Vzorky obsahujúce malé množstvo tuku (omáčky, kečupy, sypké vzorky – koreniny).
Navážiť 0,5 g homogenizovanej vzorky do 50 ml kadičky. Pridať jednotlivé roztoky štandardov podľa tabuľky 1. Pridať 2,5 lyžice bezvodého síranu sodného (3.1.20) a tyčinkou poriadne premiešať. Nechať postáť 10 minút a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2.2

5.2.1.1.2 Príprava vzoriek – extrakcia ASE 200 (accelerated solvent extraction)

Vzorky obsahujúce väčšie množstvo tuku.
Navážiť 0,5 g homogenizovanej vzorky. Pridať jednotlivé roztoky štandardov podľa tabuľky 1. Vzorku zmiešať so 4 g Hydromatrixu (3.1.23) v trecej miske tak, aby bola zmes sypká. Zmes kvantitatívne preniesť do 22 ml extrakčnej cely. Nechať postáť 15 min. Objem cely vyplniť dosypaním morského piesku (3.1.24) . Extrakčnú celu vložiť do extraktora ASE 200. Extrakciu vykonať podľa bodu 5.3.3.1 a pokračovať podľa bodu 5.3.3.2.

Tabuľka 1 Príprava fortifikovaných vzoriek

koncentrácia azo farieb vo vzorke (mg/kg)	koncentrácia vn. štandardu sudan red 7B vo vzorke (mg/kg)	koncentrácia vn. štandardu sudan I D5 vo vzorke (mg/kg)	Prídavok roztoku SM1 (µl)	Prídavok roztoku SM2 (µl)	Prídavok roztoku ISR2 (µl)	Prídavok roztoku ISD (µl)
0	0,2	0,4	0	0	100	200
0,1	0,2	0,4	0	50	100	200
0,2	0,2	0,4	0	100	100	200
0,4	0,2	0,4	0	200	100	200
1	0,2	0,4	50	0	100	200

5.2.1.1.3 Príprava vzoriek oleja – GPC (gélová permeačná chromatografia)

Vzorky oleja.
Navážiť 0,1 g homogenizovanej vzorky. Pridať jednotlivé roztoky štandardov podľa tabuľky 2. Premiešať, preniesť do tmavej vialky, doplniť do objemu 2 ml chloroformom.

Tabuľka 2 Príprava fortifikovaných vzoriek

koncentrácia azo farieb vo vzorke (mg/kg)	koncentrácia vn. štandardu sudan red 7B vo vzorke (mg/kg)	koncentrácia vn. štandardu sudan I D5 vo vzorke (mg/kg)	Prídavok roztoku SC (µl)	Prídavok roztoku SW4 (µl)	Prídavok roztoku SW5 (µl)
0	0,2	0,4	0	200	400
0,1	0,2	0,4	10	200	400
0,2	0,2	0,4	20	200	400
0,4	0,2	0,4	40	200	400
1	0,2	0,4	100	200	400

5.2.1.2 **Stanovenie ostatných farbív (červená 2G, allura, ponceau 4R)**

Koreniny
Navážiť 1g zhomogenizovanej vzorky. Pridať jednotlivé roztoky štandardov podľa tabuľky 3. Nechať postáť a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.5.

Tabuľka 3 Príprava fortifikovaných vzoriek

koncentrácia farieb R2G vo vzorke (mg/kg)	Prídavok roztoku SS4 (µl)	koncentrácia farby AR vo vzorke (mg/kg)	Prídavok roztoku SS5 (µl)
0	0	0	0
0,1	100	1	100
0,5	500	5	500
1	1000	10	1000
2	2000	20	2000

Ostatné komodity
Navážiť 5 g zhomogenizovanej vzorky. Pridať jednotlivé roztoky štandardov podľa tabuľky 4. Nechať postáť a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.5.

Tabuľka 4 Príprava fortifikovaných vzoriek

koncentrácia farieb R2G, P4R, AR vo vzorke mg/kg	Prídavok roztoku SS1 (µl)
0	0
0,5	250
1	500
1,5	750
2	1000

5.3 **Príprava vzorky**

Stanovenie azofarbív

5.3.1 Fortifikácia vzorky vnútorným štandardom (úroveň 0,2 mg/kg sudán red 7B a 0,4 mg/kg sudán I-D5

5.3.1.1 Príprava vzoriek – extrakcia stĺpcovou chromatografiou:

Vzorky obsahujúce malé množstvo tuku (omáčky, kečupy, sypké vzorky – koreniny).
Navážiť 0,5 g homogenizovanej vzorky do 50 ml kadičky. Pridať 100 µl roztoku ISR2 (3.3.3.6) a 200 µl ISD (3.3.3.8). Pridať 2,5 lyžice bezvodého síranu sodného (3.1.22) a tyčinkou poriadne premiešať. Nechať postáť 10 minút a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2.2

5.3.1.2 Príprava vzoriek – extrakcia ASE 200 (accelerated solvent extraction)

Vzorky obsahujúce väčšie množstvo tuku.
Navážiť 0,5 g homogenizovanej vzorky. Pridať 100 µl roztoku ISR2 (3.3.3.6) a 200 µl ISD (3.3.3.8). Vzorku zmiešať so 4 g Hydromatrixu (3.1.24) v trecej miske tak, aby bola zmes sypká. Zmes kvantitatívne preniesť do 22 ml extrakčnej cely. Nechať postáť 15 min. Objem cely vyplniť dosypaním morského piesku (3.1.25) . Extrakčnú celu vložiť do extraktora ASE 200. Extrakciu vykonať podľa bodu 5.3.3.1 a pokračovať podľa bodu 5.3.3.2.

5.3.1.3 Príprava vzoriek – prečistenie gélovou permeačnou chromatografiou

Vzorky oleja.
Navážiť 0,1 g homogenizovanej vzorky. Pridať 200 µl roztoku SW4 (3.3.4.4) a 400 µl SW5 (3.3.4.5). Premiešať, preniesť do hnedej vialky, doplniť do objemu 2 ml chloroformom.

5.3.2 **Extrakcia pomocou stĺpcovej chromatografie**

Vzorky obsahujúce malé množstvo tuku (omáčky, kečupy, sypké vzorky – koreniny).

5.3.2.1 Príprava kolóny
Do spodnej časti kolóny umiestniť vatu. Kolónu naplniť do ¾ florisilom (3.1.23) a do vrchnej časti umiestniť sklenú vatu.

5.3.2.2 Extrakcia
Vzorku zmiešanú z bezvodým síranom sodným preniesť na kolónu. Preliať 50 ml acetónu (3.1.21). Eluát zachytávať do 100 ml Erlenmayerových baniek zo zábrusom. Eluát odpariť na rotačnej vákuovej odparke a dofúkať do sucha pod prúdom dusíka. Rezíduá rozpustiť v 4 ml mobilnej fázy (3.2.2.2). Umiestniť na ultrazvuk na 2 min. Preniesť do vialiek, napichnúť na chromatografickú kolónu.

5.3.3 **Extrakcia pomocou ASE 200 (accelerated solvent extraction)**

Vzorky obsahujúce väčšie množstvo tuku.

5.3.3.1 Extrakcia

Tabuľka 5 Pracovné podmienky extraktora ASE 200

Tlak systému	1500 PSI
teplota pece	120 ^{o}C
Oven Heat-up Time	5 min.
Static Time	5 min.
Solvent	chloroform /acetón /2:1/
Flush Volume	60 % of extraction cell volume
Nitrogen Purge	150 PSI 90 sekúnd
Počet cyklov	2

Extrakt v záchytnej 40 ml kónickej nádobke vložiť do TURBOVAPU II a odfúkať pri 40 °C na 1 ml. Zbytok dofúkať dusíkom. Do banky pridať pomocou pipety 2 ml chloroformu (3.1.26). Extrakt prečistiť na gélovej permeačnej kolóne.

Stanovenie ostatných farbív

5.3.4 **Extrakcia**

Koreniny
Ku vzorke pridať 40ml 10% kyseliny vínnej (3.2.7), priviesť do varu, ochladiť. Pridať 40ml etanolu (3.1.31), premiešať, odstrediť 5 minút pri 23 000 x g pri izbovej teplote, prefiltrovať cez filter sklené vlákna Whatman 4. Extrakt prečistiť na SPE kolónke (4.25). Eluát premiešať na Vortexe a prefiltrovať cez striekačkový mikrofilter a napichnúť na chromatografickú kolónu.

Ostatné matrice
Vzorku zaliať zhruba 5 ml vody. Nechať postáť. Zaliať zmesou petroléter : acetón (1:1) (3.2.4) v Erlenmayerovej banke a nechať rozdeliť vrstvy (cca 12 hod.). Hornú vrstvu opatrne zliať a spodnú vrstvu extrahovať 100 ml zmesou metanol : amoniak (80:20) (3.2.5) v ultrazvukovom kúpeli 20 min. Prefiltrovať cez filter a zahustiť na turbovape pri 60°C na objem cca 5 ml. Preliať do 10 ml odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou.

Poznámka: V prípade, že sa vzorka koncentračne vymyká z rozsahu meranej kalibračnej krivky je pri opakovanom meraní upravená tak, aby koncentračne spadala do kalibračného rozsahu.

5.4 Chromatografická analýza

LC podmienky stanovenie azofarbív:

chromatografická kolóna: LiChrospher 100 RP-18e, 5 µm, 125 x 4 mm
teplota kolóny: 30 ºC
prietok mobilnej fázy 0.6 ml/min
dĺžka analýzy 11 min., izokratická elúcia
eluent : 0,01 M octan amónny v acetonitrile
Nástrek: 20 µl

MS podmienky stanovenie azo farbív:

Tabuľka 6 Parametre nastavenia MS/MS detekcie

č.seg.	1	2	3	4	5	6	7
min.	1-2,2	2,2-3,1	3,1-4,35	4,35-6	6-7,1	7,1-8,7	8,7-11
scan	180-460	120-300	140-270	140-300	140-370	140-390	210-410
target mass	400	292	249	277	353	380	381
Ionizácia	pozitívna	negatívna	pozitívna	pozitívna	pozitívna	pozitívna	pozitívna

Tabuľka 7 Parametre nastavenia MS/MS detekcie

name	**segment**	**RT** min	**Precursor** m/z	Product m/z	**Width** m/z	Amplitude V
Orange II	2	1,9	351	**195,**277**, 333**	2	1
Rhodamine		1,9	443		2	
Para red	3	2,7	292	**138,233** 264	2	1,05
Sudán I. D5 **IS**	4	3,36	254	156,**237**	2	0,9
Sudán I.		3,46	249	156,**232**	2	0,8
Sudán II.	5	4,9	277	156,**260**	2	0,7
Sudán III.	6	6,49	353	156,**197**	2	1,15
Sudán Red 7B **IS**	7	7,45	380	157,**183**	2	0,4
Sudán IV.	8	9,52	381	276,**224**	2	0,6

Tabuľka 8 Parametre nastavenia MS/MS detekcie

č.seg.	2	3
min.	1-2,5	2,2-4
scan	120-460	150-320
target mass	300	250
Ionizácia	pozitívna	pozitívna

Tabuľka 9 Parametre nastavenia MS/MS detekcie

name	**segment**	**RT** min	**Precursor** m/z	**Product** m/z	**Width** m/z	**Amplitude V**
Orange II	2	1,9	351	195,**277**, 333	2	1
Rhodamine		1,9	443	**399,4,** 355,4	2	
Auramine O		1,9	323	239, 268,**305**	4	0,9
Dimethyl yellow	3	2,9	226	105,**120**,134, 197,**211**	2	0,95
Toluidine red		2,9	308	156,**291**	2	0,65

LC podmienky stanovenie ostatných farbív:

HPLC
chromatografická kolóna: C18
teplota kolóny: 30 ºC
prietok mobilnej fázy 0.6 ml/min
eluenty: B – acetonitril , C 0,01 M octan amónny
gradientová elúcia
Nástrek: 50 µl

UPLC
chromatografická kolóna :UPLC C18
teplota kolóny: 30 ºC
prietok mobilnej fázy 0.3 ml/min
eluenty: B – acetonitril ,A- 0,01 M octan amónny
gradientová elúcia
Nástrek: 10 µl

MS podmienky stanovenie ostatných fabív
LC MSD Ion trap

Tabuľka 10 Podmienky nastavenia MS/MS detekcie

Name	**segment**	**RT** min	**Precursor** m/z	Product m/z	**Width** m/z	**Amplitude** V
ponceau 4R	2	4,5	539	**521,**401,457,203	4	0,33
allura		4,9	453	**217,** 272,435	4	0,55
red 2G		5,1	466	**424,** 448,406	2	0,3

Quattro Premiere
Tune Page:red 2G.jpr

Voltages:
Capillary (kV) : 3,6
Extractor (V): 7
RF Lens (V): 0

Temperatures:
Source Temp (^{0}C): 120
Desolvation Temp (^{0}C): 400

Gas Flow:
Desolvation (l/hr): 850
Cone (l/hr): 85

Analyser:
LM Resolution 1: 13,5
HM Resolution 1: 13,5
Ion Energy 1: 1
Entrance: 0
Exit: 1
LM Resolution 2: 13,5
HM Resolution 2: 13,5
Ion Energy 2: 0,5

Tabuľka 11 Podmienky MS/MS detekcie

Name	RT min.	Precursor m/z	Product m/z	Cone V	Collision eV
ponceau 4R	1,44	539	**158** 223,2	40	33 29
allura red	1,66	453,2	**217,2** 202,3	30	25 38
red 2G	1,83	466,1	**424,2** 342,2	28	15 20

5.4.1 Iniciačný test

Azo farbivá:
Nainjektovať na chromatografickú kolónu roztok SW1 (3.3.4.1). Skontrolovať pomer signálu k šumu produkovaných iónov. Pomer by mal byť vyšší ako 6.
Ostatné farbivá:
Nainjektovať na chromatografickú kolónu roztok SW2 (3.3.4.2). Skontrolovať pomer signálu k šumu produkovaných iónov. Pomer by mal byť vyšší ako 6.

6 VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV MERANIA

Koncentrácia zložky je vyhodnotená pomocou matricovej kalibračnej krivky s korekciou na vnútorný štandard. Do kalibračnej závislosti sa vynáša na
os x: pomer koncentrácie zložky/ koncentrácie vnútorného štandardu
os y: pomer plochy zložky/plochy vnútorného štandardu

<u>Kvantifikácia – metóda vnútorného štandardu.</u>

C koncentrácia vzorky (µg/kg)

$$C = [c_1] \cdot \frac{sample\,area \cdot SI\,Sd\,[c_1]\,area}{SI\,sample\,area \cdot Sd\,[c_1]\,area}$$

Kvantifikácia robená na dominantné produkované ióny, ktoré sú v tabuľke 4 zvýraznené v stĺpci Product. V prípade pozitívnej vzorky je nutná kontrola iónových pomerov kvantifikačnej a kvalifikačnej tranzície. Iónový pomer musí spĺňať podmienky definované v Nariadení ES 657/2002

7 LITERATÚRA

1. F. Tateo, M. Bononi, Fast determination of Sudan I by HPLC/APCI-MS in hot chilli, spices, and oven-baked foods, Journal of Agricultural and Food Chemistry 2004, 52, 655-658
2. Method 145A Collaborative trial 145 of a method for the detection and determination of Sudan I in chilli products by HPLC
3. F. Calbiani, M. Careri, L. Elviri, A. Mangia, L. Pistara, I. Zagnoni, Development and in-house validation of a liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of Sudan I, Sudan II, Sudan III and Sudan IV on hot chilli products, Journal of Chromatography A 2004, 1042, 123-130

8 ZOZNAM SKRATIEK

HPLC -	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
UPLC -	ultraúčinná kvapalinová chromatografia
MS/MS -	hmotnostná detekcia s minimálne dvoma tranzíciami
MRPL –	minimum required performance limit
RT –	retenčný čas
ESI –	electrospray ionisation
APCI -	chemická ionizácia za atmosferického tlaku
MRM –	multiple reaction monitoring
e.g. –	napríklad
GPC –	gélová permeačná chromatografia

CH 10.2. STANOVENIE AZOFARBÍV METÓDOU LC/MS/MS

1. URČENIE METÓDY

Azozlúčeniny patria medzi najviac používané syntetické organické farbivá a viac ako 2000 týchto zlúčenín je uvedených v zozname Color Index (CI).

Azofarbivá, hlavne Sudan I sa pokladajú za genotoxické karcinogény, a preto ich prítomnosť v potravinách nie je povolená na žiadnej prípustnej hladine.

Metóda je určená na stanovenie:

7 Sudánových farbív: Sudan I, Sudan II, Sudan III, Sudan IV, Sudan Red G, Sudan red 7B, Sudan Orange G a Para red v čili produktoch, kari produktoch, koreninách a v červenej paprike a to metódou kvapalinovej chromatografie – elektrosprej – hmotnostnej spektrometrie.

2. PRINCÍP METÓDY

Po extrakcii zhomogenizovanej vzorky organickým rozpúšťadlom a následnej centrifugácii sa prefiltrovaný extrakt vzorky stanovuje metódou LC/MS/MS s ESI $^{+}$ ionizáciou.

3. POMÔCKY

3.1 PRÍSTROJE ZARIADENIA

- Ultra Turrax
- Centrifúga
- Vortex
- Milli-Q-Plus, systém na prečisťovanie destilovanej vody, Millipore

LC-MS/MS systém (Agilent) = kvapalinový chromatograf 1100 s quartérnou gradientovou pumpou a vákuovým degasserom + hmotnostný spektrometer MSD Trap SL.

3.2 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

Všetky použité materiály a chemikálie musia byť vhodné pre HPLC analýzu

Acetón pre HPLC, metanol pre HPLC, chloroform pre HPLC, kyselina mravčia p.a.

HPLC-grade H_2O, získaná prečistením destilovanej vody v zariadení Milli-Q-Plus

Sudan I (1-[(2,4-dimethylphenyl)azo]-2-naphthalenol)

Sudan II (1-(phenylazo)-2-naphthol),

Sudan III (1-(4-phenylazophenylazo)-2-naphthol)

Sudan IV (o-tolyazo-o-tolyazo-beta-naphthol)

Sudan Red G (1-(2-methoxyphenylazo)-2-naphtol)

Sudan Red 7B (1-(4-phenylazo)-phenylazo-2-ethylaminnaphtalene)

Sudan Orange G (4-phenylazo-1,3-dihydroxybenzene)

Para Red (1-(4-nitrophenylazo)-2-naphthol)

4. BEZPEČNOSŤ PRI PRÁCI

Dodržiavanie Zásad pre bezpečnú prácu v chemických laboratóriách STN 018003.

5. PRACOVNÝ POSTUP

5.1 PRÍPRAVA VZORKY

Príprava fortifikovaných vzoriek (matričná kalibračná krivka):

Naváži sa 2/5 g ± 0,1 g negatívnej vzorky (papriky/omáčky) do piatich sklenených skúmaviek, ktoré sa fortifikujú zmesným štandardným roztokom azofarbív podľa tabuľky 1 (v prípade pozitívnej vzorky podľa zistenej hodnoty a vzhľadom na MRPL v danej matrici). Fortifikované vzorky sa ďalej upravujú podľa nižšie uvedeného postupu.

Tabuľka č.1: Príprava fortifikovaných vzoriek

Množstvo vo vzorke [mg/kg]	Prídavok štandardu v µl	
	paprika	omáčka
0,05	10	25
0,10	20	50
0,25	50	125
0,50	100	250
1,00	200	500

Extrakcia vzorky:

Korenie, zmesné koreniny, mletá paprika:

Analyzovaná vzorka sa dokonale zhomogenizuje. Do sklenej centrifugačnej skúmavky sa odváži 1g priemernej vzorky, zaleje sa acetonitrilom a vzorka sa premieša na vortexe. Skúmavky sa vložia do ultrazvuku. Potom nasleduje centrifugácia 10 minút pri 1000 ot/min a 10 °C. Extrakt sa prefiltruje cez filtračný papier so skleným vláknom do odmernej banky a doplní sa po značku. Extrakt po prefiltrovaní cez 0,45 µm filtre je pripravený na analýzu LC/MS/MS.

Omáčky, zložené potravinové produkty:

Analyzovaná vzorka sa dokonale zhomogenizuje. Do sklenej centrifugačnej skúmavky sa odváži 5g priemernej vzorky, rozmieša sa s malým množstvom síranu sodného a zaleje sa acetonitrilom a vzorka sa premieša na vortexe a nasleduje centrifugácia 10 minút pri 1000

ot/min a 10 °C. Extrakt sa prefiltruje cez filtračný papier so skleným vláknom do odmernej banky a doplní sa po značku.. Extrakt po prefiltrovaní cez 0,45 µm filtre je pripravený na analýzu LC/MS/MS.

5.2 PRÍPRAVA MERANIA

LC podmienky:

Mobilná fáza:	A = Voda + 0,1 % kyselina mravčia (1 ml kyseliny na 1 L)
	B = Metanol + 0,1 % kyselina mravčia
	Izokraticky: 3 % A + 97 % B
Prietok:	0,2 ml/min
Nástrek:	20 µl
Teplota kolóny:	35 °C
Celkový čas:	23 min
Analytická kolóna	Luna C18, 250 x 2.1 mm, 5µm s predkolónou - Phenomenex

MS podmienky:

Ionizačný mód	ESI, positive
Nebuliser	40 psi
Dry gas	9 l/min N_2
Dry temp	350°C

* Poznámka:

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

Poradie píku	Zlúčenina	Prekurzor ión (m/z)	Produkt ión (m/z)	Fragmentačná energia	Segment / RT ± 0,5 min
1.	**Sudan Orange G**	215	198;122	1.40	2 / 4.1*
2.	**Para Red**	294	156;128	1.35	2 / 5.3*
3.	**Sudan Red G**	279	248;262;122	1.30	2 / 6.0*
4.	**Sudan I**	249	232;156;93	1.30	2 / 6.3*
5.	**Sudan II**	277	260;120	1.30	3 / 8.7*
6.	**Sudan III**	353	197;156	1.80	3 / 9.8*

7.	**Sudan Red 7B**	380	183;169	1.40	4 / 12.3
8.	**Sudan IV**	381	224;276	1.50	5 / 15.4

* MRM = multi reaction monitoring

6. VYHODNOTENIE NAMERANÝCH ÚDAJOV

Vyhodnocovanie nameraných údajov prebieha v dvoch rovinách:

1. Data analysis – na identifikáciu látok (možnosť sledovať chromatogram alebo MS spektra, prípadne práca s vlastnou knižnicou spektier)

2. QuantAnalysis – na kvantifikáciu látok

Prepočet látkovej koncentrácie na hmotnostnú:

hodnotu výsledku vyjadrujeme v mg/kg vzorky podľa nasledujúceho vzorca:

$$m = \frac{c.V.r}{n}$$

m = hmotnosť v mg/kg

c = nameraná koncentrácia analytu v mg/l

V = objem v ml

n = návažka vzorky v g

r = zrieďovací faktor

7. LITERATÚRA

[1] F.Calbiani, M.Careri, L.Elviri, A.Mangia, L.Pistara, I.Zagnoni: Journal of Chromatography A, 1042 (2004) 123 – 130.

[2] K. Hoenicke, Eurofins Analytik GmbH, Germany: Detection of 8 Sudan Dyes, Para Red in spices and food using LC-MS/MS, 2nd International symposium on recent advances in food analysis, 2-4 November 2005, Praha.