6.16. STANOVENIE METABOLITOV NITROFURÁNOV METÓDOU HPLC/MS/MS

1 PRINCÍP METÓDY

Furazolidone, furaltadone, nitrofurantoin a nitrofurazone sú veterinárne liečivá, ktoré patria do skupiny nitrofuránov. Uvedené liečivá boli Európskou Komisiou zakázané v roku 1995. Nitrofuránové liečivá veľmi rýchlo metabolizujú, už niekoľko hodín po podaní, ich metabolity sú však relatívne stabilné. (niekoľko týždňov až mesiacov). Pre jednotlivé nitrofuránové liečivá sú sledované nasledujúce metabolity: 3-amino-2-oxalidinone (AOZ) pre furazolidone, 5-methylmorpholino-3-amino-2-oxalidinone (AMOZ) pre furaltadone, 1-amino-hydantoin (AHD) pre nitrofurantoin a semicarbazide (SEM) pre nitrofurazone. Uvedené metabolity sú analyzované po derivatizácii ako nitrophenylové deriváty. Na analýzu sa použije chromatografická kolóna s obrátenými fázami a po rozdelení rezíduí sa tieto detegujú hmotnostným detektorom pracujúcim v režime MS/MS v pozitívnom móde. Ionizácia ESI. Identifikácia látky je prevedená dvoma tranzíciami (2 transitions) a kontrolou ich iónových pomerov (ion ratio). Kvantifikácia je prevedená metódou vnútorného štandardu - izotopové zrieďovanie (isotopic dilution). Vnútornými štandardami sú AMOZ D_5 pre AMOZ a AOZ D_4 pre SEM, AHD a AOZ.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na konfirmačné stanovenie rezíduí nitrofuránov vo svale, mlieku, vajciach a mede.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 AMOZ
3.1.2 AOZ
3.1.3 AHD 1-Aminohydantoin
3.1.4 SEM Semicarbazidhydrochlorid
3.1.5 2-NP-AOZ
3.1.6 2-NP-AHD
3.1.7 2-NP-AMOZ
3.1.8 2-NP-SCA
3.1.9 AOZ-D4
3.1.10 AMOZ-D5
3.1.11 acetonitril gradient grade
3.1.12 metanol gradient grade
3.1.13 kyselina octová 100% p.a.
3.1.14 octan etylnatý
3.1.15 fosforečnan trisodný dodekahydrát
3.1.16 kyselina chlorovodíková p.a.
3.1.17 hydroxid sodný

3.1.18 2-nitrobenzaldehyd
3.1.19 deionizovaná voda

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 0,2 M kyselina chlorovodíková
3.2.2 2 M hydroxid sodný
3.2.3 100 mM 2-nitrobenzaldehyd
3.2.4 0,3 M fosforečnan trisodný
3.2.5 rekonštitučný roztok acetonitril:voda:kyselina octová (50:450:0,5) v/v
3.2.6 Mobilná fáza A HPLC acetonitril:voda:kyselina octová (900:100:1) v/v
3.2.7 Mobilná fáza B HPLC voda:kyselina octová (1000:1) v/v
3.2.8 Oplachovací roztok redestilovaná voda:metanol (50:50) v/v
3.2.9 Oplachovací roztok redestilovaná voda:metanol (25:75) v/v
3.2.10 Mobilná fáza B UPLC 0,5 mM octan amónny

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobné roztoky štandardov

3.3.1.1 Zásobné roztoky štandardov AOZ, AMOZ, AHD, SEM, AOZ –D_4, AMOZ-D_5, NPAMOZ, NPAOZ, NPAHD, NPSEM (50 mg/l v metanole)

Navážiť medzi $1 a 5 mg \pm 0{,}02 mg$ z každého štandardu, rozpustiť v malom množstve metanolu (3.1.12.) a doplniť ekvivalentným množstvom metanolu (3.1.12.) aby výsledná koncentrácia roztoku bola 50 mg/l.

Takto pripravené roztoky sa uchovávajú v chladničke pri teplote 4°C až 6°C a zostávajú stabilné po dobu troch mesiacov.

3.3.2 Základné roztoky štandardov

3.3.2.1 Základný zmesný roztok štandardov AOZ, AMOZ, AHD, SEM –**MM1** (1 mg/l v metanole)

Zobrať 200 µl zásobných roztokov AMOZ, AOZ, AHD, SEM (50 mg/l) (3.3.1.1.) do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.12.).

3.3.2.2 Základný zmesný roztok štandardov AOZ-D_4, AMOZ-D_5 – **IS1** (1 mg/l v metanole)

Zobrať 200 µl zásobných roztokov AOZ-D_4, AMOZ-D_5 (50 mg/l) (3.3.1.1.) do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.12.).

3.3.2.3 Základný zmesný roztok štandardov NPAOZ, NPAMOZ, NPAHD, NPSEM –**NP1** (1 mg/l v metanole)

Zobrať 460 µl zásobného roztoku NPAOZ (50 mg/l), 332 µl zásobného roztoku NPAMOZ (50 mg/l), 432 µl zásobného roztoku NPAHD (50 mg/l), 554 µl zásobného roztoku NPSEM (50 mg/l) do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.12.).

3.3.3 Zriedené roztoky základných štandardov

3.3.3.1 Základný zmesný roztok štandardov AOZ, AMOZ, AHD, SEM –**MM2** (50 µg/l v metanole)

Zobrať 0,5 ml roztoku MM1 (3.3.2.1.) (1 mg/l) do 10 ml odmernej banky a doplniť do 10 ml metanolom (3.1.12.).

3.3.3.2 Základný zmesný roztok štandardov AOZ-D_4, AMOZ-D_5 – **IS2** (50 µg/l v metanole)

Zobrať 0,5 ml roztoku IS1 (3.3.2.2.) (1 mg/l) do 10 ml odmernej banky a doplniť do 10 ml metanolom (3.1.12.).

3.3.3.3 Základný zmesný roztok štandardov NPAOZ, NPAMOZ, NPAHD, NPSEM –**NP2** (100 µg/l v metanole)

Zobrať 1 ml roztoku NP1 (1 mg/l) (3.3.2.3.) do 10 ml odmernej banky a doplniť do 10 ml metanolom (3.1.12.).

3.3.4 Pracovné roztoky štandardov

3.3.4.1 Zmesný roztok štandardov NPAOZ, NPAMOZ, NPAHD, NPSEM - **WS** (1 µg /l vo vode)

Odobrať 0,1 ml roztoku NP2 (100 µg/l) (3.3.3.3.) do 10 ml odmernej banky a doplniť do 10 ml rekonštitučným roztokom (3.2.5.).

Poznámka: Všetky roztoky štandardov uchovávať v tme pri teplote 4 ^{0}C. Štandardné roztoky 3.3.1.1. sú stabilné 1 rok. Zmesné štandardné roztoky 3.3.2 a 3.3.3 sú stabilné 1 mesiac. Pracovný štandardný roztok 3.3.4.1. je stabilný 1 týždeň.

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 kvapalinový chromatograf Agilent 1100 Series s hmotnostným detektrorom – ion trap Bruker-Gemini
4.2 kvapalinový chromatograf Acquity UPLC s hmotnostným detektorom Micromass Quattro Premier XE
4.3 chromatografická kolóna : C18
4.4 chromatografická kolóna: UPLC C18
4.5 centrifúga BIOFUGE STRATOS
4.6 trepačka Heidolph
4.7 analytická váha HELAGO HM 200
4.8 teflónové centrifugačné nádobky – 50 ml
4.9 laboratórne odmerné sklo: 10 a 100 ml odmerná banka, 25 ml odmerný valec, 1 a 5 ml pipety
4.10 25 µl, 50 µl, 100 µl, 250 µl striekačky Hamilton
4.11 minishaker Vortex
4.12 pH papieriky
4.13 striekačkový mikrofilter

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Predpríprava vzoriek

Vzorky sa dobre zhomogenizujú a uchovávajú sa pri teplote <-18^{0}C. Pri vzorkách pozitívnych na obsah SEM, je potrebné aplikovať nasledovný postup.

Navážiť 1 g vzorky do sklenenej nádobky.

1. Pridať 6 ml roztoku redestilovaná voda/metanol (50/50) (3.2.8.). Homogenizovať 15 min. na trepačke head over head. (nastaviť 70 ot./min.) Centrifugovať 10 min. pri 3000 g a 4 ^{0}C. Odstrániť supernatant.
2. Ku vzorke po 1. kroku pridať 6 ml roztoku redestilovaná voda/metanol (25/75) (3.2.9.). Homogenizovať 15 min. na rotačke head over head. (nastaviť 70 ot./min.) Centrifugovať 10 min. pri 3000 g a 4 ^{0}C. Odstrániť supernatant.
3. Ku vzorke po 2. kroku pridať 6 ml metanolu (3.1.12.). Homogenizovať 15 min. na rotačke head over head. (nastaviť 70 ot./min.) Centrifugovať 10 min. pri 3000 g a 4 ^{0}C. Odstrániť supernatant.
4. Ku vzorke po 3. kroku pridať 2 ml deionizovanej vody. Vortexovať 20 s. Centrifugovať 10 min. pri 3000 g a 4 ^{0}C. Odstrániť supernatant.

5.2 Príprava kvality kontrol vzoriek - matricová kalibrácia

5.2.1 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovaných vzoriek

Na prípravu vzoriek sa použijú negatívne matrice. Vzorky sa fortifikujú v 0.5, 1, 2 a 5 násobku ustanoveného MRPL.

Navážiť 1 g homogenizovanej vzorky do sklenenej nádobky. Pridať jednotlivé roztoky štandardov podľa tabuľky 1 a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2

Tabuľka 1 Príprava fortifikovanách vzoriek

Koncentrácia AMOZ, AOZ, SEM, AHD vo vzorke (µg/kg)	Koncentrácia int. štandardov AMOZ D_5, AOZ D_4 vo vzorke (µg/kg)	Prídavok roztoku MM2 (µl)	Prídavok roztoku IS2 (µl)
0	2	0	40
0,5	2	10	40
1	2	20	40
2	2	40	40
5	2	100	40

5.3 Príprava vzorky

5.3.1 Fortifikácia vzorky vnútorným štandardom (úroveň 2 µg/kg AMOZ D_5, AOZ D_4)

Navážiť 1 g homogenizovanej vzorky do sklenenej nádobky. Pridať 40 µl roztoku IS2 (3.3.3.2.).

Poznámka: Nitroderiváty sú veľmi citlivé na svetlo. Proces prípravy vzorky je nutné realizovať pod žltým svetlom.

5.3.2 Hydrolýza a derivatizácia

K vzorke pridať 40 µl roztoku IS2 (3.3.3.2.), homogenizovať a nechať postáť 15 minút. Pridať 5 ml 0,2 M roztoku kyseliny chlorovodíkovej (3.2.1.) a 50 µl roztoku 2-NBA (3.2.3.). Nádobku uzavrieť a ručne pretrepať. Umiestniť na rotačku head over head (nastaviť 50 ot/min) do inkubátora a inkubovať 16 hodín.

5.3.3 Neutralizácia

Vzorku nechať schladiť. Pridať 500 µl 0,3 M roztoku Na_3PO_4 (3.2.4.). Ručne pretrepať a nechať stáť 5 minút.

5.3.4 Extrakcia

Do vzorky s upraveným pH pridať 4 ml octanu etylnatého (3.1.14.), do vzorky mlieka pridať 6ml. Umiestniť na trepačku (nastaviť 350 ot./min.) na 20 minút. Centrifugovať 10 minút pri otáčkach 2000 rpm. Preniesť organickú vrstvu do čistej nádobky na odparovanie. Ku zvyšku pridať 4 ml octanu etylnatého (3.1.14.), umiestniť na trepačku (nastaviť 350 ot./min.) na 20 minút a centrifugovať 10 minút pri otáčkach 3000 rpm. Odobrať organickú vrstvu a zmiešať ju s prvou frakciou v nádobke na odparovanie. Odpariť na termovape do sucha pod miernym prúdom dusíka pri teplote 45^0C.

5.3.5 Rozpustenie rezíduí

Rezíduá rozpustiť v 500 µl rekonštitučného roztoku (3.2.5.) u svalu, mlieka a vajec. U medu rezíduá rozpustiť v 250 µl rekonštitučného roztoku (3.2.5.). Premiešať na Vortexe 20 s. Prefiltrovať cez striekačkový mikrofilter do vialiek. Napichnúť na chromatografickú kolónu.

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 HPLC
chromatografická kolóna: C18
teplota: 40 ºC
prietok: 0,4 ml/min.
eluent : mobilná fáza A: acetonitril:voda:kyselina octová (900:100:1) v/v (3.2.6.)
mobilná fáza B: voda:kyselina octová (1000:1) v/v (3.2.7.)
gradientová elúcia

Nástrek: 50 µl

LC-podmienky UPLC

chromatografická kolóna: UPLC C18
teplota kolóny: 40 ºC
prietok mobilnej fázy: 0,25 ml/min.
eluent: metanol, 0,01 M octan amónny
gradientová elúcia
Nástrek: 10 µl

MS podmienky LC MSD Ion Trap:

Ionizačný mód: ESI pozitívna
Detekčný mód: MRM

Tabuľka 2 Podmienky MS/MS detekcie

Name	segment	RT min	Precursor m/z	Product m/z	Width m/z	Amplitude V
NPAMOZ-d5 **IS**	2	6,6	340	**296**	4	0,8
NPAMOZ		7,6	335	262,**291**	4	0,8
NPSEM	3	12,6	209	**166**,192	4	1,25
NPAHD		13	249	**134**,178	4	1,3
NPAOZ-d4 **IS**	4	14,1	240	**134**	4	1,2
NPAOZ		14,3	236	104,**134**	4	1,2

MS podmienky Quattro Premier XE:

ionizácia:ESI pozitívna
Voltages:
Capillary (kV) : 2,80
Extractor (V): 5
RF Lens (V): 0
Temperatures:
Source Temp (^{0}C): 120
Desolvation Temp (^{0}C): 400
Gas Flow:
Desolvation (l/hr): 600
Cone (l/hr): 60

Analyser:
LM Resolution 1: 13,5
HM Resolution 1: 13,5
Ion Energy 1: 0,4
Entrance: 0
Exit: 0
LM Resolution 2: 13,5
HM Resolution 2: 13,5
Ion Energy 2: 1,0

Tabuľka 3 Podmienky MS/MS detekcie

Name	**RT** min.	**Precursor** m/z	**Product** m/z	**Cone** V	**Collision** eV
NPAMOZ-d5 **IS**	3,95	340,0	296,0	25	12
NPAMOZ	3,98	335,0	**291,1** 262,1	25	12 16
NPSEM	3,58	209,0	**165,9** 191,9	25	10 12
NPAHD	3,37	249,0	**133,9** 178,0	28	14 16
NPAOZ-d4 **IS**	3,44	240,0	**134,0**	27	12
NPAOZ	3,47	236,0	**133,9** 104,0	27	12 25

5.4.1 Iniciačný test

Nainjektovať na chromatografickú kolónu roztok WS (3.3.4.1.). Skontrolovať pomer signálu ku 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. J.A. van Rhijn, P.P.J. Mulder, Muscle of poultry, rabbit and aquaculture products- Detection and identification of residues of metabolites of furazolidone, furaltadone, nitrofurantoin and nitrofurazone- LC-MS/MS confirmatory analysis, RIKILT 2002

8 ZOZNAM SKRATIEK

HPLC - vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
MS/MS- hmotnostná detekcia s minimálne dvoma tranzíciami
MRPL – minimum required performance limit
RT – retenčný čas
ESI – electrospray ionisation
MRM – multiple reaction monitoring
e.g. - napríklad

CH 6.16. STANOVENIE METABOLITOV NITROFURÁNOV METÓDOU LC/MS/MS

1. URČENIE METÓDY

Furazolidon, Furaltadon, nitrofurantoin a nitrofurazon sú veterinárne liečivá, ktoré patria do skupiny nitrofuránov. Pretože nie je možné stanoviť bezpečný limit na prítomnosť týchto liečiv v produktoch potravín pre ľudskú konzumáciu, boli nitrofurány v EU v roku 1995 zakázané pre zvieratá produkujúce potraviny. Nitrofurány veľmi rýchlo metabolizujú, nedajú sa detekovať už niekoľko hodín po aplikácii. Avšak ich metabolity sú stabilné týždne až mesiace, čiastočne ako proteinovo viazané metabolity.
Identifikované marker rezíduá (metabolity) sú: 3-amino-2-oxazolidinon (AOZ) pre furazolidon, 5-methylmorpholino-3-amino-2-oxazolidinon (AMOZ) pre furaltadon, 1-amino-hydantoin (AHD) pre nitrofurantoin a semicarbazid (SEM) pre nitrofurazon. Tieto marker rezíduá sú detekované metódou LC-MS/MS ako ich nitrofenyl deriváty.
Skúšobná metóda je vyvinutá na stanovenie a konfirmáciu prítomnosti rezíduí metabolitov nitrofuránových liečiv podľa EU kritérií vo svale hydiny, zajacov a vodných produktov (krevety, ryby) na koncentračnej úrovni minimálne 1 µg/kg (MRPL).
Opisovaná metóda je aplikovateľná na detekciu a identifikáciu podľa EU požiadaviek na konfirmačnú analýzu rezíduí voľných a tkanivovo viazaných metabolitov nitrofuránových liečiv v čerstvom alebo spracovanom (varené, obaľované, hotové produkty) svale hydiny, zajacov, morských produktov. Metóda je zameraná hlavne na detekciu a identifikáciu týchto látok podľa EU požiadaviek, ale dovoľuje aj semi-kvantitatívne stanovenie (s izotopovo značenými analógmi určených analytov).
Proteinovo-viazané rezíduá: Metabolity materskej zlúčeniny, ktoré sú kovalentne viazané na endogénne makromolekuly.

2. PRINCÍP METÓDY

Tkanivovo viazané rezíduá sa hydrolyzujú s HCl. Časť reťazca nitrofuránových liečiv sa za týchto podmienok uvoľní. Uvoľnené rezíduá a voľné metabolity sa derivatizujú v slabokyslom prostredí s 2-nitrobenzaldehydom na im zodpovedajúce nitrofenyl deriváty. Po neutralizácii sa deriváty extrahujú etylacetátom. Organické rozpúšťadlo sa odparí a rezíduá sa rozpustia v zmesi acetonitril/voda a filtrujú do HPLC vialky. Stanovenie sa robí LC/MS-MS analýzou.

3. POMÔCKY

3.1 PRÍSTROJE A ZARIADENIA

- Kuchynský mlynček na mäso, prípadne Ultra Turrax
- Ultrazvukový vodný kúpeľ
- Rotačná vákuová odparka
- Centrifúga
- Inkubátor
- Laboratórna trepačka
- Vákuové zariadenie SPE (LiChrolut Extraction Unit)

- 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
- Analytická kolóna: Symmetry C_{18} 150 x 3.0 mm, 5 μm (Waters) s predkolónou Symmetry Sentry guard C_{18} 20 x 3.9 mm (Waters).
- Striekačkové membránové filtre 0.45 μm
- Kalibrované odmerné sklo

3.2 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

Všetky použité materiály a chemikálie musia byť vhodné pre HPLC analýzu

- Metanol pre HPLC, CH_3OH
- Kyselina chlorovodíková p.a., HCl, 32%
- 2-nitrobenzaldehyd (NBA), $C_7H_5NO_3$
- Dodekahydrát fosforečnanu sodného, Na_3PO_4. $12H_2O$
- Hydroxid sodný p.a., NaOH,
- Etyl acetát pre reziduálnu analýzu, $CH_3COOC_2H_5$
- Kyselina octová glacial Superpure, CH_3COOH
- Acetonitril gradient grade, CH_3CN
- HPLC-grade H_2O, získaná prečistením destilovanej vody v zariadení Milli-Q-Plus

Referenčný materiál:

- 3-Amino-2-oxazolidinone (AOZ)
- 5-Methylmorfolino-3-amino-2-oxazolidinone (AMOZ)
- 1-Amino-hydantoin (AHD) hydrochloride
- Semicarbazide (SEM) hydrochloride
- 5-Methylmorfolino-3-amino-2-oxazolidinone-d_5

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 1,0 ± 0,1 g zhomogenizovanej vzorky.

Príprava kontrolných vzoriek

Negatívna kontrola:

Naváži sa 1,0 ± 0,05 g negatívnej vzorky mäsa (neobsahuje AOZ, AMOZ, AHD a SEM) do 14 ml centrifugačnej skúmavky, ku ktorej sa pridá 40 μl IS2 a nechá sa stáť 15 minút. Potom nasleduje proces hydrolýzy a extrakcie.

Pozitívna kontrola (matričná kalibračná krivka):

Naváži sa 1,0 ± 0,05 g negatívnej vzorky mäsa do štyroch 14 ml centrifugačných skúmaviek, ktoré sa následne fortifikujú AOZ, AMOZ, AHD a SEM podľa tabuľky 1. Nafortifikované vzorky mäsa sa nechajú stáť 15 minút. Potom nasleduje proces hydrolýzy a extrakcie.

Tab. č.1: Príprava fortifikovaných vzoriek mäsa

Koncentrácia vo vzorkách (μg/kg)	Štandardná zmes MM2 (μl)	Interný štandard IS2 (μl)
0,5	10	40
1	20	40
2	40	40
5	100	40

Postup prípravy vzorky

Poznámka: Nitrofenyl deriváty sú veľmi citlivé na svetlo, preto je veľmi dôležité postup úpravy vzoriek uskutočňovať pod žltým svetlom.

Hydrolýza a derivatizácia

Naváži sa 1,0 ± 0,1 g zhomogenizovanej vzorky mäsa do 14 ml centrifugačnej skúmavky. Pridá sa 40 μl interného štandardu IS2 a nechá sa stáť 15 minút. Potom sa pridá 5 ml 0,2 M kyseliny chlorovodíkovej a 50 μl 2-NBA-roztoku pripraveného v metanole. Skúmavka sa uzavrie a homogenizuje sa pretrepaním v ruke. Následne sa umiestni do inkubátora pri teplote 37 ± 2 ºC na 16 hodín.

Neutralizácia

Po ochladení skúmavky na izbovú teplotu sa do vzorky pridá 500 μl 0,3 M roztoku Na_3PO_4 a premieša sa v ruke. pH tohto roztoku sa upraví na hodnotu 7,0 ± 0,5 pomocou 2M roztoku NaOH. Skúmavka sa pretrepe v ruke a pH sa skontroluje s pH papierikom. Ak je potrebné proces úpravy pH sa opakuje.

Extrakcia

Do vzorky s upraveným pH sa pridá 4 ml etylacetátu. Vzorka sa potom extrahuje na trepačke 20 minút a centrifuguje 10 minút pri 2000 otáčkach. Organická vrstva sa premiestni do 14 ml čistej centrifigačnej skúmavky. Postup extrakcie sa zopakuje s ďalšími 4 ml etylacetátu, pričom sa centrifuguje 10 minút pri 3500 otáčkach. Spojené organické vrstvy etylacetátu sa odparia do sucha pod dusíkom pri teplote 45 ºC.

Príprava vzorky na meranie

Odparok sa rozpustí v 500 μl rekonštitučného roztoku (RS) a prefiltruje sa cez 0,45 μm membránový filter priamo do vialky. Takto pripravená vzorka sa analyzuje metódou HPLC-MS/MS.

5.2 PRÍPRAVA MERANIA

LC podmienky:

Prietok 0,4 ml/min

Nástrek	50 µl
Teplota kolóny	40°C
Celkový čas	23 min

Tab. 2: Gradient LC

Čas (min)	Mobilná fáza A (%)	Mobilná fáza B (%)
0	90	10
1	90	10
14	55	45
16	10	90
18	10	90
19	90	10
post time 4 min		

MS podmienky:

Ionizačný mód	ESI, positive
Nebuliser	40 psi
Dry gas	10 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)

Tab. 3: MS/MS fragmentácia

Zlúčenina	Prekurzor ión (m/z)	Produkt ión (m/z)*	Fragmentačná energia (eV)	Segment / RT (min)
NPAMOZ	335	262, <u>291</u>		1 / 7,7
NPAHD	249	<u>134</u>, 178		2 / 14,2
NPSEM	209	<u>166</u>, 192		2 / 13,8
NPAOZ	236	<u>104</u>, 134		4 / 15,6

*Produkt ióny s vysokou intenzitou sú podčiarknuté

6. VYHODNOTENIE NAMERANÝCH ÚDAJOV

6.1 Spracovanie nameraných údajov

Identifikácia sa uskutočňuje pomocou porovnania retenčných časov a spektier meraných analytov.

Vyhodnocovanie nameraných údajov sa spracováva metódou vnútorného štandardu pomocou softvéru QuantAnalysis program. Koncentrácia štandardov matričnej kalibračnej krivky je uvedená priamo ako koncentrácia analytu vo vzorke, a teda nameraná hodnota v neznámej vzorke je priamo odčítaná z kalibračnej krivky v µg/kg.

7. LITERATÚRA

1. J.A. van Rhijn, P.P.J. Mulder, State Institute for Quality Control of Agricultural products (RIKILT), The Netherlands.