6.21. Stanovenie benzimidazolov v potravinách živočíšneho pôvodu metódou LC/MS/MS

1. Pôvod metódy
Bohm D., Hahn K., Gowik P.: List of the screening and confirmatory methods used in NRLs of the European Union for subsatces groups A5, B2a, B2b, B2e and in the German routine field laboratories for all substance groups of Annex I. Council Directive 96/23/EC. Berlin: BVL, 2005

Metóda bola upravená na podmienky ŠVPÚ Košice RNDr. S. Tkáčikovou .

2. Princíp metódy
Metóda je založená na extrakcii benzimidazolov a ich metabolitov z pečene acetonitrilom a z mlieka octanom etylnatým. V prípade mlieka sa použije kyslá hydrolýza tukov a lipidy sa zo vzorky následne odstránia n-hexánom., v prípade pečene prečistenie na kolónke, ktorá zo vzorke odstraňuje objemné molekuly (proteíny, lipidy).

3. Použité prístroje
Váhy,
Trepačka,
Centrifúga,
Rotačná vákuová odparka,
Centrifugačné skúmavky,
Pipety,
Manifold, čistiace kolónky Hybrid SPE-Precipitation (30mg, 1ml).

4. Zoznam chemikálií
Octan etylnatý p.a.,
n-hexán p.a.,
5 $mol.dm^{-3}$ HCl,
10 $mol.dm^{-3}$ NaOH,
nasýtený roztok $NaHCO_3$,
chlorid sodný p.a.
kyselina mravčia p.a.,
bóraxový pufer

5. Príprava štandardov
Zásobný roztok sa pripraví s koncentráciou 0,2 mg/L v metanole.

6. Príprava vzoriek

pečeň:
2 g zhomogenizovanej vzorky sa premieša s 0,5 g chloridu sodného. Pridá sa 10 ml acetonitrilu s obsahom 0,1% kyseliny mravčej a zmes sa vytrepáva 20 min na trepačke. Extrakcia sa opakuje ešte raz s 5 ml 0,1% kyseliny mravčej v acetonitrile. Extrakty sa spoja, v prípade potreby sa centrifugujú 10 min pri 3000 ot/min. Extrakt sa zakoncentruje pod prúdom dusíka pri 50 °C na objem 0,5 ml (Zymark).

mlieko:
5 g vzorky sa premieša s 15 ml boraxového pufra. Pridá sa 20 ml octanu etylnatého a zmes sa vytrepáva 20 min na trepačke, potom sa centrifuguje 10 min pri 3000 ot/min. Extrakcia sa zopakuje ešte raz. Octan etylnatý sa odparí dosucha pri 60 °C. Suchý extrakt sa rozpustí v 0,5ml acetonitrilu. Pridá sa 8 ml n-hexánu. Zmes sa dobre pretrepe (10 s). K zmesi sa pridá 3 ml HCl (5 $mol.dm^{-3}$) a zmes sa vytrepáva na trepačke 20 min a opäť sa odcentrifuguje 20 min pri 3000 ot/min. Horná fáza sa odstráni a vodná fáza sa zalkalizuje 2 ml 10 $mol.dm^{-3}$ NaOH za súčasného chladenia v ľadovom kúpeli.

7. Podmienky stanovenia
Kolóna: C - 18 endcapped (Luna.Phenomenex 125x2, μm)
Mobilná fáza: A: 0,1% kyselina mravčia v acetonitrile
B: 0,1% kyselina mravčia vo vode
Prietok mobilnej fázy: 0,2 ml / min
Teplota na kolóne : 40 °C
Teplota vzoriek: 10 °C
Injekovaný objem: 10 ul.
Čas analýzy: 20 min

MS/MS system
Detekcia: Triple quadrupole Quattro Micro Waters
Mód: ESI+, MRM mode

thiabendazol	cone 38 V	Coll 32 eV	202.02→131.16
	cone 38 V	Coll 25 eV	202.02→175.09
levamisol	cone 35 V	Coll 30 eV	205.08→117.10
	cone 35 V	Coll 30 eV	205.08→123.05
	cone 35 V	Coll 30 eV	205.08→178.16
fenbendazol	cone 32 V	Coll 22 eV	300.05→268.03
	cone 32 V	Coll 35 eV	300.05→159.19
oxfendazol	cone 34 V	Coll 35 eV	316.02→159.13
	cone 32 V	Coll 35 eV	316.02→191.10
albendazol	cone 30 V	Coll 32 eV	266.13→191.05
	cone 30 V	Coll 18 eV	266.13→234.12
triclabendazol	cone 43 V	Coll 38 eV	360.91→274.11
	cone 43 V	Coll 27 eV	360.91→346.02

Capillary (kV)	3.5
Extractor(V)	1
RF Lens (V)	0
Source temperature (°C)	100
Desolvation temperature (°C)	450
Desolvation gas flow (l/h)	700
Cone gas flow (l/h)	50

9. Kalibrácia a vyhodnotenie

Kvantifikácia analytov sa uskutoční metódou externého štandardu na menej intenzívny produkovaný ión.
Identifikácia analytov sa uskutočňuje kontrolou pomerov plôch 2 produkovaných iónov.