CH 3.2.
Stanovenie akrylamidu metódou GC/MS/MS a UPLC/MS/MS

1 PRINCÍP METÓDY

GC

Zhomogenizovanú vzorku po bromácií extrahujeme octanom etylnatým. Detekcia sa vykonáva hmotnostným detektorom pracujúcim v režime MS/MS. Kvantifikácia je prevedená metódou vnútorných štandardov akrylamidu 1,3,3-13C3 alebo 2,3,3-D3.

UPLC

Zhomogenizovaná vzorka sa extrahuje acetonitrilom a hexánom. Extrakt je prečistený SPE a eluát odfúkaný do sucha. Rezíduá, rozpustené vo vode, sú napichované na chromatografickú kolónu. Detekcia sa vykonáva hmotnostným detektorom pracujúcim v režime MS/MS. Kvantifikácia je prevedená metódou vnútorného štandardu akrylamidu D3.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie akrylamidu vo vode a v potravinách.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 Akrylamid
3.1.2 Bromid draselný - KBr, p.a.
3.1.3 Bróm - Br_2
3.1.4 Deionizovaná voda
3.1.5 Kyselina bromovodíková - HBr 47%, p.a.
3.1.6 Tiosíran sodný – $Na_2S_2O_3$. H_2O kryšt.,p.a.
3.1.7 Síran sodný –Na_2SO_4 bezvodý, p.a.
3.1.8 Octan etylnatý– $CH_3COOC_2H_5$
3.1.9 Akrylamid (1,2,3-13C3)
3.1.10 Akrylamid (2,3,3-D3)
3.1.11 Metanol gradient grade p.a.
3.1.12 Acetonitril gradient grade p.a.
3.1.13 n-Hexane p.a.
3.1.14 Ethyl acetate p.a.
3.1.15 $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$
3.1.16 $ZnSO_4 .7H_2O$

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 Brómova voda – malé množstvo brómu pretrepávame s deionizovanou vodou tak dlho, kým sa rozpúšťa, a potom brómovu vodu od prebytočného brómu odlejeme.

3.2.2 1M $Na_2S_2O_3 .H_2O$ – do 100ml odmernej banky navážiť 24,82g $Na_2S_2O_3 .H_2O$ a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.2.3 Carez I (navážiť 150 g $K_4[Fe (CN)_6].3H_2O$, preniesť do 1l odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou).

3.2.4 Carez II (navážiť 300 g $ZnSO_4 .7H_2O$ preniesť do 1l odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou).

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobné roztoky štandardov

3.3.1.1 Zásobný roztok akrylamidu (100mg/l vo vode)- **(S1)**
Navážiť 5mg štandardu do 50ml odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou. Uchovávať ho v chladničke.

3.3.1.2 Zásobný roztok vnútorného štandardu akrylamid -13C3 (100mg/l v metanole)- **(S2)**
Odobrať 100µl vnútorného štandardu akrylamid - 13C3 (3.1.9) a pridať 900µl metanolu.

3.3.1.3 Zásobný roztok vnútorného štandardu akrylamid - D3 (100mg/l v metanole) – **(S3)**
Navážiť 5mg vnútorného štandardu akrylamid – D3 (3.1.10) do 50ml odmernej banky a doplniť metanolom.

3.3.2 Základné roztoky štandardov

3.3.2.1 Základný roztok akrylamidu (1 mg/l vo vode)-**FC1**
Zobrať 100µl zo zásobného roztoku štandardu (3.3.1.1) do 10ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.2.2 Základný roztok vnútorného štandardu akrylamid 13C3 (1mg/l vo vode)- **IS1**
Zobrať 100µl zo zásobného roztoku štandardu S2 (3.3.1.2) do 10ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.2.3 Základný roztok vnútorného štandardu akrylamid D3 (1mg/l vo vode) - **IS2**
Zobrať 100µl zo zásobného roztoku štandardu S3(3.3.1.3) do 10ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.2.4 Základný roztok akrylamidu (5 mg/l vo vode)-**FC2**
Zobrať 500µl zo zásobného roztoku štandardu (3.3.1.1) do 10ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.2.5 Základný roztok vnútorného štandardu akrylamid D3 (5mg/l vo vode) - **IS3**
Zobrať 500µl zo zásobného roztoku štandardu S2 (3.3.1.2) do 10ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.3 Kalibračné roztoky štandardov

Do 10ml odmerných baniek napipetovať jednotlivé objemy roztokov podľa tabuľky 1 a doplniť po značku deionizovanou vodou.

Tabuľka 1 Kalibračné roztoky štandardov

Koncentrácia akrylamidu v roztoku (µg/l)	Koncentrácia vnútorného štandardu akrylamidu D3 v roztoku (µg/l)	Koncentrácia vnútorného štandardu akrylamidu 13C3 v roztoku (µg/l)	Prídavok roztoku FC (µl)	Prídavok roztoku IS1 (µl)	Prídavok roztoku IS2 (µl)
0	50	50	0	500	500
5	50	50	50	500	500
10	50	50	100	500	500
20	50	50	200	500	500
50	50	50	500	500	500
100	50	50	1000	500	500

3.3.4 Pracovné roztoky štandardov

3.3.4.1 Zmesný roztok štandardu akrylamidu a akrylamidu D3 (50 µg/l vo vode) **WS**
Zobrať po 1 ml zo štandardov FC2 (3.3.2.4.) a IS3 (3.3.2.5.) do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 analytické váhy
4.2 homogenizátor
4.3 homogenizátor Ultraturax
4.4 chladená centifúga
4.5 rotačná vákuová odparka (RVO)
4.6 plynový chromatograf VARIAN 450 – GC, 300MS TQ
4.7 hélium 6.0
4.8 dusík 4.0
4.9 kvapalné CO_2 – potravinárske
4.10 laboratórne sklo
4.11 kapilárna chromatografická kolóna CP Sil 24 CB LOW BLEED/MS, 30 m x 0,25 mm ID, film 0,25 µm
4.12 kvapalinový chromatograf Waters Acquity UPLC s hmotnostným detektorom Micromass Quattro XE Premier
4.13 chromatografická kolóna : Waters Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm, 2,1 x 100 mm
4.14 vodný kúpeľ
4.15 hydromatrix
4.16 sklenená kolóna
4.17 sklená vata

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Predpríprava vzoriek

5.1.1 Potraviny

Vzorky zmraziť použitím suchého ľadu a potom dobre zhomogenizovať na mixéri (4.2).

5.1.2 Káva

Vzorky treba poriadne zhomogenizovať. Zrnkové kávy zomlieť.

5.2 Príprava kvality kontrol vzoriek

5.2.1 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovaných vzoriek

Potraviny:
Navážiť 2g homogenizovanej vzorky do kadičky. Pridať jednotlivé roztoky štandardov podľa tabuľky 2.1. Nechať postáť a pokračovať podľa procedúry 5.3.1.2

Voda:
Do odmerného valca pridať 50ml vzorky vody, pridať jednotlivé roztoky štandardov podľa tabuľky 2.2. Nechať postáť a pokračovať podľa procedúry 5.3.2.2

Káva:
Na prípravu vzoriek sa použijú negatívne matrice. Vzorky sa fortifikujú na úrovni 0, 100, 250, 500, 1000 µg/kg.

Do 100 ml odmernej banky návažiť 2,5 g zhomogenizovanej vzorky. Pridať jednotlivé roztoky štandardov podľa tabuľky 2.3. Nechať postáť a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.3.

Tabuľka 2.1 Príprava fortifikovaných vzoriek potravín

Koncentrácia akrylamidu vo vzorke (µg/kg)	Prídavok roztoku akrylamidu FC (µl)	Koncentrácia vnútorného štandardu akrylamidu D3 vo vzorke (µg/kg)	Koncentrácia vnútorného štandardu akrylamidu 13C3 vo vzorke (µg/kg)	Prídavok roztoku IS1 (µl)	Prídavok roztoku IS2 (µl)
0	0	250	250	500	500
100	200	250	250	500	500

Tabuľka 2.2 Príprava fortifikovaných vzoriek vody

Koncentrácia akrylamidu vo vzorke (µg/kg)	Prídavok roztoku akrylamidu FC (µl)	Koncentrácia vnútorného štandardu akrylamidu D3 vo vzorke (µg/l)	Koncentrácia vnútorného štandardu akrylamidu 13C3 vo vzorke (µg/l)	Prídavok roztoku IS1 (µl)	Prídavok roztoku IS2 (µl)
0	0	50	50	25	25
10	5	50	50	25	25

Tabuľka 2.3. Príprava fortifikovaných vzoriek kávy

konc. akrylamidu vzorke (µg/kg)	konc. int. štandardu akrylamidu D3 vo vzorke (µg/kg)	Prídavok roztoku FC1 (µl)	Prídavok roztoku FC2 (µl)	Prídavok roztoku IS3 (µl)	Prídavok vody (ml)
0	500	0	0	250	25,75
100	500	250	0	250	25,5
250	500	625	0	250	25,125
500	500	0	250	250	25,5
1000	500	0	500	250	25,125

5.3 Príprava vzorky k analýze

5.3.1 Potraviny

5.3.1.1 Do odmerného valca navážiť 2g zhomogenizovanej vzorky.

5.3.1.2 Pridať 100ml redestilovanej vody, 10 min mixovať na Ultraturaxe. Obsah preniesť do centrifugačnej skúmavky a centrifugovať. Supernatant prefiltrovať cez filter Whatman. K 50ml filtrátu pridať 7,5g KBr (3.1.2), miešaním rozpustiť. Upraviť pH na 1-3 konc. HBr (3.1.5), pridať 5ml nasýtenej brómovej vody (3.1.12) a zamiešať. Vzorku vložiť do ľadového kúpeľa v tme a nechať reagovať. Prebytok brómu odstrániť pridaním 1M $Na_2S_2O_3 .H_2O$ (3.2.2). Pridať 15g vyžíhaného Na_2SO_4 (3.1.7). Roztok previesť do 250ml deliaceho lievika a extrahovať 2 x 5ml octanom etylnatým (3.1.8). Organickú fázu presušiť cez vrstvu 2g bezvodého Na_2SO_4 (3.1.7) a filter premyť 2ml octanu etylnatého (3.1.8). Spojené organické fázy odpariť na RVO (4.5) a dofúkať dusíkom. Rozpustiť v 5 ml octanu etylnatého (3.1.8).

5.3.2 Voda

5.3.2.1 Do odmerného valca pridať 50ml vzorky vody.

5.3.2.2 Pridať 7,5g KBr (3.1.2), miešaním rozpustiť. Upraviť pH na 1-3 konc. HBr (3.1.5), pridať 5ml nasýtenej brómovej vody (3.1.12) a zamiešať. Vzorku vložiť do ľadového kúpeľa v tme a nechať reagovať. Prebytok brómu odstrániť pridaním 1M $Na_2S_2O_3 .H_2O$ (3.2.2). Pridať 15g vyžíhaného Na_2SO_4 (3.1.7). Roztok previesť do 250ml deliaceho lievika a extrahovať 2 x 5ml octanom etylnatým (3.1.8). Organickú fázu presušiť cez vrstvu 2g bezvodého Na_2SO_4 (3.1.7) a filter premyť 2ml octanu etylnatého (3.1.8). Spojené organické fázy odpariť na RVO (4.5) a dofúkať dusíkom. Rozpustiť v 1 ml octanu etylnatého (3.1.8).

5.3.3 Káva

5.3.3.1 Do odmernej banky navážiť 2,5 g zhomogenizovanej vzorky.

5.3.3.2 Pridať deionizovanú vodu podľa tabuľky 2.3. Pretrepať a umiestniť na ultrazvuk. Počas trepania pridať Carez I. a Carez II. Umiestniť na vodný kúpeľ. Ochladiť. Pridať 20 ml acetonitrilu a 20 ml hexánu. Zatvoriť, pretrepať a umiestniť na 10 min. na ultrazvuk. Prefiltrovať cez filtračný papier do odmerného valca.

Príprava sklenenej kolóny:

Do spodnej časti kolóny umiestniť vatu. Kolónu naplniť hydromatrixom. Na kolónu naniesť 20 ml výluhu. Eluovať etylacetátom. Odpariť na RVO. Dofúkať pod prúdom dusíka. Rezíduá rozpustiť v 2 ml deionizovanej vody.

5.3 Chromatografická analýza

5.3.1 GC podmienky:

Plynový chromatograf VARIAN 450 – GC, 300MS TQ uvedieme do chodu podľa návodu na obsluhu. Po splnení všetkých kritérií a podmienok pomeru vzduch voda môžeme začať nastavovať parametre :

kolóna Kapilárna chromatografická kolóna CP Sil 24 CB LOW BLEED/MS, 30 m x 0,25 mm ID , film 0,25 µm
init temperature 55°C 1 min, 20°C/min do 220°C, držať 2min, 50°C/min do 270°C, držať 3min

injektor PTV
init temperature 75°C 1 min, 150°C/min do 220°C

Ion Source: EI
Scan mode: centroid
SIM width: 0,700 amu
Detector set: voltage1250 V

Manifold temperature: 40,1 °C
Ion source temperature: 201,0 °C
Transfer line temperature: 279,5 °C

nástrek PTV 5µl
prietok He 1 ml/min

5.3.2 UPLC podmienky

chromatografická kolóna : Waters Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm, 2,1 x 100 mm
teplota: 30 ^{o}C
prietok: 0,3 ml/min.
eluent: A- 0,5 % kyselina mravčia, B- 0,5 % kyselina mravčia v acetonitrile
gradientová elúcia

Nástrek: 10 µl

MS podmienky:

ionizácia:ESI pozitívna
Voltages:
Capillary (kV) : 0,86
Extractor (V): 5
RF Lens (V): 0
Temperatures:
Source Temp (^{0}C): 120
Desolvation Temp (^{0}C): 400
Gas Flow:
Desolvation (l/hr): 700

Cone (l/hr): 70

6 VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV MERANIA

Kvantifikácia – metóda vnútorného štandardu.

C sample concentration (µg/kg)

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

7 ZOZNAM SKRATIEK

GC– plynová chromatografia
UPLC – ultra účinná kvapalinová chromatografia
MS/MS – hmotnostná detekcia s monimálne dvoma tranzíciami
RVO – vákuová rotačná odparka
LOD – limit detekcie
LOQ – limit kvantifikácie
TQ – triple quadrupole

8 POUŽITÁ LITERATÚRA

8.1 EPA, Method 8032A, Acrylamide by Gas Chromatography, December 1996

8.2 T.Wenzl, M.Beatriz de la Calle,E.Anklam: Analytical methods for the determination of acrylamide in food products, Food Additives and Contaminants,Vol 20, No 10(October 2003), pp. 885-902

8.3 Ono H., Chuda Y., Ohnishi-Kameyama M., Yada H., Ushizaka M., Kobayashi H., and Yoshida M., Analysis of acrylamide by LC-MS/MS and GC-MS in pracessed Japanese foods, Food Addit.Contam., 20, 215-220 (2003)