CH 3.5.
STANOVENIE MALACHITOVEJ ZELENEJ A INÝCH NEAUTORIZOVANÝCH FARBÍV METÓDOU HPLC/MS/MS

1 PRINCÍP METÓDY

Zhomogenizovaná vzorka sa po prídavku vody extrahuje acetonitrilom. Na analýzu sa použije chromatografická kolónu s obrátenými fázami a po rozdelení rezíduí sa tieto detegujú hmotnostným detektorom pracujúcim v režime MS/MS a pozitívnom móde ionizácie. Ionizácia je ESI. Identifikácia látky je prevedená dvoma tranzíciami (2 transitions) a kontrolou ich iónových pomerov (ion ratio) . Kvantifikácia je prevedená metódou vnútorného štandardu. Vnútornými štandardami sú: leukomalachitová zelená D5, leukokryštálová violeť D6, malachitová zelená D5 a kryštálová violeť D6.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie malachitovej zelenej, leukomalachitovej zelenej, kryštálovej violete, leukokryštálovej violete, brilantnej zelenej vo svale rýb.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 Leucomalachite green - (**LMG)**
3.1.2 Crystal violet - (**CV)**
3.1.3 Crystal violet D6 trihydrate - (**CV D6)**
3.1.4 Malachite green oxalate– (**MG)**
3.1.5 Malachite green D5 Picrate– (**MG D5)**
3.1.6 Leucomalachite green D5– (**LMG D5**)
3.1.7 Leucocrystal violet – (**LCV**)
3.1.8 Leucocrystal violet D6 – (**LCV D6**)
3.1.9 Brilliant green – (**BG**)
3.1.10 acetonitril gradient grade
3.1.11 hydroxylamine hydrochloride 99 %
3.1.12 octan amónny extra čistý bezvodý
3.1.13 kyselina octová 100 % p.a.
3.1.14 amoniak 25 % extračistý
3.1.15 metanol gradient grade
3.1.16 deionizovaná voda

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 10 % hydroxid amónny
3.2.2 0.1 M octan amónny pH 4,5 – mobilná fáza
3.2.3 5 g/l hydroxylamín hydrochlorid
3.2.4 1 M octan amónny

3.2.5 0,01 M octan amónny
3.2.6 acetonitril : 0,01 M octan amónny , (7 :3)

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobné roztoky štandardov

3.3.1.1 Zásobný roztok štandardu LMG (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10 mg leucomalachite green (3.1.1.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v metanole a doplniť po značku metanolom (3.1.15.).
3.3.1.2 Zásobný roztok štandardu LMG D5 (100 mg/l v metanole)
Navážiť 5,05 mg leucomalachite green D5 (3.1.6.) do 50 ml odmernej banky. Rozpustiť v metanole a doplniť po značku metanolom (3.1.15.).
3.3.1.3 Zásobný roztok štandardu MG (100 mg/l v metanole)
Navážiť 15,3 mg malachite green oxalate (3.1.4.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v metanole a doplniť po značku metanolom (3.1.15.).
3.3.1.4 Zásobný roztok štandardu MG D5 (100 mg/l v metanole)
Navážiť 8,5 mg malachite green D5 picrate(3.1.5.) do 50 ml odmernej banky. Rozpustiť v metanole a doplniť po značku metanolom (3.1.15.).
3.3.1.5 Zásobný roztok štandardu CV (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10,9 mg crystal violet (3.1.2.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v metanole a doplniť po značku metanolom (3.1.15.).
3.3.1.6 Zásobný roztok štandardu CV D6 (100 mg/l v metanole)
Navážiť 5,7 mg crystal violet D6 trihydrate (3.1.3.) do 50 ml odmernej banky. Rozpustiť v metanole a doplniť po značku metanolom (3.1.15.).
3.3.1.7 Zásobný roztok štandardu LCV (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10 mg leucocrystal violet (3.1.7.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v metanole a doplniť po značku metanolom (3.1.15.).
3.3.1.8 Zásobný roztok štandardu LCV D6 (100 mg/l v metanole)
Navážiť 5,05 mg leucocrystal violet D6 (3.1.8.) do 50 ml odmernej banky. Rozpustiť v metanole a doplniť po značku metanolom (3.1.15.).
3.3.1.9 Zásobný roztok štandardu BG (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10,2 mg briliant green (3.1.9.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v metanole a doplniť po značku metanolom (3.1.15.).

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 roztok štandardov LMG, MG, CV, LCV, BG – **Z1**
(1 mg/l v ACN:0,01 M octan amónny (7:3))

Zobrať 100 µl zásobných roztoku štandardov LMG, MG, CV,LCV, BG (100 mg/l) (3.3.1.1., 3.3.1.3.,3.3.1.5.,3.3.1.7, 3.3.1.9..). Preniesť do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku roztokom ACN:0,01 M octan amónny (7:3) (3.2.6.)

3.3.2.2 Základný roztok štandardu LMG D5, MG D5, LCV D6, CV D6 – **IS1**
(1 mg/l v ACN:0,01 M octan amónny (7:3))

Zobrať 100 µl zásobných roztokov štandardov LMG D5, MG D5, CV D6, LCV D6, (100 mg/l) (3.3.1.2.), (3.3.1.4.), (3.3.1.6.), (3.3.1.8.) . Preniesť do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku roztokom ACN:0,01 M octan amónny (7:3) (3.2.6.)

3.3.3 Zriedené roztoky základných štandardov

3.3.3.1 Štandard LMG, MG, LCV, CV, BG- **FC**
(50 µg/l v ACN:0,01 M octan amónny (7:3))

Zobrať 500 µl základného štandardu Z1 (1 mg/l) (3.3.2.1.). Preniesť do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku roztokom ACN:0,01 M octan amónny (7:3) (3.2.6.)

3.3.3.2 Štandard LMG D5 MG D5, CV D6, LCV D6 – **ISR** (50 µg/l v ACN:0,01 M octan amónny (7:3))

Zobrať 500 µl základného štandardu IS1 (1 mg/l) (3.3.2.2.). Preniesť do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku roztokom ACN:0,01 M octan amónny (7:3) (3.2.6.)

3.3.4 Pracovné roztoky štandardov

3.3.4.1 Zmes štandardov LMG, LMG D5, MG D5, CV D6, LCV D6 MG, CV, LCV, BG – **MC1**
(2 µg/l v ACN:0,01 M octan amónny (7:3))

Zobrať po 20 µl základných roztokov štandardov Z1, IS1 (3.3.2.1.,3.3.2.2.). Preniesť do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku roztokom ACN:0,01 M octan amónny (7:3) (3.2.6.)

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 kvapalinový chromatograf Waters Acquity UPLC s hmotnostným detektorom Micromass Quattro Premier XE
4.2 chromatografická kolóna : C18 , s predkolónkou C18
4.3 analytická váha HELAGO HM 200
4.4 trepačka head over head HEIDOLPH Reax 2
4.5 minishaker (Vortex)
4.6 Odstredivka – Biofuge Stratos
4.7 Centrifugačné teflónové nádobky 50 ml
4.8 Hamilton striekačka 100 µl, 500 µl, 25 µl
4.9 Striekačkový mikrofilter 0.45 µm, nylon
4.10 Odmerné sklo 10 ml a 100 ml odmerná banka, 100 ml odmerný valec

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Predpríprava vzoriek

5.1.1 Vzorka sa dobre zhomogenizuje.

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 2 g homogenizovanej vzorky do centrifugačnej teflónovej nádobky. Pridať jednotlivé roztoky podľa tabuľky 1. Zmixovať na Vortexe. Nechať postáť 15 minút a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2

Tabuľka 1 Príprava fortifikovanách vzoriek

Koncentrácia LMG, MG, LCV, BG, CV vo vzorke (µg/kg)	Konc. int. štandardu LMG D5 MG D5, LCV D6, CV D6 vo vzorke (µg/kg)	Prídavok roztoku FC (µl)	Prídavok roztoku ISR (µl)	Prídavok redest. vody (µl)
0	4	0	160	840
1	4	40	160	800
2	4	80	160	760
4	4	160	160	680
10	4	400	160	440

5.3 Príprava vzorky

5.3.1 Fortifikácia vzorky vnútorným štandardom – úroveň 4 µg/kg LMG D5,MG D5, LCV D6, CV D6.

Navážiť 2 g homogenizovanej vzorky do centrifugačnej teflónovej nádobky. Pridať 160 µl roztoku ISR. Zmixovať na Vortexe.

5.3.2 Extrakcia
Ku vzorke pridať 840 µl redestilovanej vody. Premiešať a nechať postáť 10 minút. Pridať 8 ml acetonitrilu (3.1.10.). Umiestniť na trepačku head over head na 10 minút a nastaviť 100 ot/min. Centrifugovať 5 minút pri 14000 g a teplote 4 ^{0}C. Prefiltrovať cez nylonový striekačkový mikrofilter a 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:

chromatografická kolóna: **:** C18
teplota kolóny: 30 ºC
prietok mobilnej fázy: 0,6 ml/min
eluent : acetonitril/ 0,1 M octan amónny
gradientová elúcia
nástrek: 20 µl

MS podmienky:

MS detektor: Waters Quattro Premier XE

Voltages:
Capillary (kV) : 0,75
Extractor (V): 6
RF Lens (V): 0
Temperatures:
Source Temp (^{0}C): 120
Desolvation Temp (^{0}C): 400
Gas Flow:
Desolvation (l/hr): 800
Cone (l/hr): 80

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 2 Nastavenie podmienok MS/MS detekcie

Name	**RT** min.	**Precursor** m/z	**Product** m/z	**Cone** V	**Collision** eV
malachitová zelená	3,46	329,0	**313,1** 164,9	50	37 60
kryštálová violeť	4,23	372,0	**356,1** 340,1	60	40 55
briliantová zelená	5,07	385,0	**341,1** 297,0	66	40 55
leukomalachitová zelená D5 **IS**	6,40	336,1	239,1	49	30
leukomalachitová zelená	6,44	331,1	**239,1** 316,1	44	30 22
leukokryštálová violeť	6,50	374,1	**238,1** 359,1	47	29 22
malachitová zelená D5 **IS**	3,42	334,0	**318,1**	56	37
leukokryštálová violeť D6 **IS**	6,50	380,1	**364,2**	47	40
kryštálová violeť D6 **IS**	4,20	378,1	**362,1**	60	40
metylénová modrá	2,04	284,0	**268,0** 240,0	45	36 35

5.4.1 Iniciačný test

Nainjektovať na chromatografickú kolónu roztok MC1 (2 µg/l v mobilnej fáze). 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

Kvantifikácia – metóda vnútorného štandardu.

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 3 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. P. Sanders, B. Delépine, B. Roudaut, Malachite green and leucomalachite green residues in fish flesh by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) - validation a confirmatory method, AFSSA, 2005
2. Jonathan A.Tarabin, Karen A. Barnes, John Bygrave, W.H.H. Farrington, Screening and confirmation of triphenylmethane dyes and their leuco metabolites in trout muscle using HPLC-vis and ESP-LC-MS, Analyst, 1998, 123, 2567-2571,

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
e.g. - napríklad