	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10570.1 – Stanovení obsahu mykotoxinů metodou LC-MS – aflatoxin B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> a G <sub>2</sub>	Revize	1

## STANOVENÍ OBSAHU MYKOTOXINŮ METODOU LC-MS - aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub>

### 1 Rozsah a účel

Metoda je vhodná pro stanovení aflatoxinů B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub> v krmivech.

### 2 Princip

Aflatoxiny (AF) se extrahují ze vzorku směsí methanol : voda. Část extraktu se přečistí na imunoafinitní kolonce. Eluát se doplní vodou a analyzuje se metodou LC-MS.

### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Methanol, čistota pro HPLC nebo vyšší.
- 2 Acetonitril, čistota pro HPLC nebo vyšší.
- 3 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 4 Toluén, C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>.
- 5 Extrakční směs methanol : voda , 70 : 30 (v/v).


Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se nalije 700 ml methanolu (1) a doplní se vodou (3) po značku.

- 6 Směs toluén : acetonitril, 98 : 2 (v/v).

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se nalije 98 ml toluenu (4) a doplní se acetonitrilem (2) po značku.

- 7 Zásobní roztoky aflatoxinů B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> o koncentraci 20 µg/ml.

Příprava: Ve čtyřech 50ml odměrných baňkách se rozpustí po 1 mg od každého aflatoxinu (např. Sigma Aldrich) ve směsi toluén : acetonitril (6). Zásobní roztoky se uchovávají v odměrných baňkách obalených hliníkovou folií v chladničce při teplotě 4 °C.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10570.1 – Stanovení obsahu mykotoxinů metodou LC-MS – aflatoxin B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> a G <sub>2</sub>	Vydání	1
		Revize	1

8 Směsný zásobní roztok – roztok obsahující 500 ng/ml aflatoxinu B<sub>1</sub>, 125 ng/ml aflatoxinu B<sub>2</sub>, 250 ng/ml aflatoxinu G<sub>1</sub> a 125 ng/ml aflatoxinu G<sub>2</sub> ve směsi toluen : acetonitril (6).

Příprava: 1,25 ml zásobního roztoku aflatoxinu B<sub>1</sub> (7), 313 µl zásobního roztoku aflatoxinu B<sub>2</sub> (7), 626 µl zásobního roztoku aflatoxinu G<sub>1</sub> (7), 313 µl zásobního roztoku aflatoxinu G<sub>2</sub> (7) se napipetuje do 50ml odměrné baňky a doplní se směsí toluen : acetonitril (6). Uchovává se v odměrné baňce obalené hliníkovou folií v chladničce při teplotě 4 °C.

9 Směsné kalibrační roztoky aflatoxinů B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub>.

Příprava: Do vialky se pipetuje (10; 20; 40; 60; 80; 100) µl směsného zásobního roztoku (8) a 2 µl vnitřního standardu aflatoxinu M<sub>1</sub> (14). Kapalina se odpaří pod proudem dusíku při laboratorní teplotě, rozpustí v 1,6 ml směsi methanol : voda (13) a roztok se promíchá. Každý den měření se připravují čerstvé kalibrační roztoky (9).

10 Octan amonný, CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>.

11 Mobilní fáze pro HPLC.

A: methanol (1).

B: vodný roztok octanu amonného, c(CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>) = 10 mmol/l.

Příprava: V 1000 ml vody se rozpustí 0,771 g octanu amonného (10).

12 Chlorid sodný, NaCl.

13 Směs methanol : voda , 50 : 50 (v/v).

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se nalije 50 ml methanolu (1) a doplní se vodou (3) po značku.

14 Aflatoxin M<sub>1</sub>, roztok o koncentraci 10 µg/ml aflatoxinu M<sub>1</sub> v acetonitrilu, používá se jako vnitřní standard.

#### 4 Přístroje a pomůcky

1 Analytické váhy s přesností 0,01 mg.

2 Laboratorní třepačka horizontální.

3 Ultrazvuková lázeň.


4 Zařízení pro výrobu ultračisté vody, např. Milli-Q.

5 Imunoafinitní kolonky, např. AflaTest<sup>TM</sup> firmy VICAM.

6 Koncentrátor vzorků, např. Termovap ECOM s.r.o.

7 Filtrační papíry, např. firmy VICAM: „microfibre filters“.

8 Kapalinový chromatograf s hmotnostním detektorem a příslušenstvím.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10570.1 – Stanovení obsahu mykotoxinů metodou LC-MS – aflatoxin B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> a G <sub>2</sub>	Revize	1


## 5 Postup

### 5.1 Extrakce

Do 300ml kónické baňky se naváží 25 g zkušebního vzorku krmiva, přidá se 5 g NaCl a 100 ml extrakčního činidla (5). Baňka se uzavře zátkou, obsah se promíchá a extrahuje se na horizontální laboratorní třepačce (2) po dobu 60 min. Nastavení počtu kmitů třepačky závisí na konzistenci vzorku. Poté se baňka s obsahem vloží na 10 min do ultrazvukové lázně, po vyjmutí z lázně se nechá ustát. Extrakt se zfiltruje přes skládaný papírový filtr do předložené nádoby.

### 5.2 Přechištění a příprava vzorku pro LC-MS analýzu

10 ml zfiltrovaného extraktu se pipetuje do čisté suché baňky a zředí se 40 ml vody (3). Roztok se opět zfiltruje, tentokrát přes vláknitý filtrační papír (7). 5 ml tohoto zředěného zfiltrovaného extraktu se aplikuje na imunoafinitní kolonku (5) průtokem 1 až 2 kapky/s, potom se přidá 2,5 µl vnitřního standardu (14) a dalších 5 ml extraktu. Promyje se 10 ml vody (3), rychlost průtoku je 1 až 2 kapky/s. Aflatoxiny se elují 1 ml methanolu (1), vhodné je nechat methanol prokapat pouze gravitací. K methanolu se přidá 1 ml vody (3) a roztok se ponoří aspoň na 30 s do ultrazvukové lázně. Takto připravený vzorek se použije k analýze.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10570.1 – Stanovení obsahu mykotoxinů metodou LC-MS – aflatoxin B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> a G <sub>2</sub>	Revize	1

### 5.3 Kalibrace a stanovení na LC-MS


Ze zásobního směšného roztoku (7) se naředí sada směšných kalibračních roztoků (9). Připravené kalibrační roztoky i vzorky se měří za následujících podmínek, které slouží jako příklad.

**Tabulka 1. Chromatografické podmínky.**

Kolona	Zorbax XDB C18 150 mm × 4,6 mm I.D. 5 μm nebo podobná
Mobilní fáze	(11), isokratická eluce
Průtok	0,7 ml/min
Teplota kolony	40 °C
Objem nástřiku	(50 – 100) μl
Detektor	Hmotnostní detektor, MS/MS analýza
MS podmínky	Iontový zdroj: APPI, zápis iontů v pozitivním módu, Rozsah m/z: 100-360, Sledované ionty MS: AF B1 – 313 m/z, AF B2 – 315 m/z, AF G1 – 329 m/z, AF G2 – 331 m/z.
MS/MS podmínky	Sledované produktové ionty AF B1 (M = 312) – 285, 270, 298, 257, 243 m/z, AF B2 (M = 314) – 287, 297, 271, 255, 259, 241 m/z, AF G1 (M = 328) – 311, 301, 283, 255 m/z, AF G2 (M = 330) – 313, 285, 245, 303, 275 m/z.

## 6 Kontrola kvality

Jednou za 3 měsíce se analyzuje certifikovaný referenční materiál (např. firmy R-Biopharm). Změřená hodnota musí souhlasit s hodnotou certifikovanou pro tento materiál.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10570.1 – Stanovení obsahu mykotoxinů metodou LC-MS – aflatoxin B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> a G <sub>2</sub>	Vydání	1
		Revize	1

## 7 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah aflatoxinů B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub> v krmivech vyjádřený v ng/g se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{c \times V \times E}{m \times \left(\frac{A}{r}\right)} \times \frac{C}{D} = \frac{c \times 100 \times 2}{25 \times \frac{10}{5}} \times \frac{12,5}{20} = c \times 2,5$$

- kde
- $X$  je obsah jednotlivých aflatoxinů v ng/g,
  - $c$  koncentrace vypočtená z kalibrační křivky v ng/ml,
  - $V$  objem rozpouštědla použitý na extrakci (100 ml),
  - $E$  konečný objem roztoku (2 ml),
  - $m$  navážka vzorku (25 g),
  - $A$  objem extraktu použitý na přečištění (10 ml),
  - $r$  ředění před aplikací na immunoafinitní kolonku (5),
  - $C$  koncentrace vnitřního standardu ve vzorku (12,5 ng/ml),
  - $D$  koncentrace vnitřního standardu ve standardu (20 ng/ml).