STANOVENÍ OBSAHU MYKOTOXINŮ METODOU LC-MS - TOXIN T-2 a HT-2

1 Rozsah a účel

Metoda je vhodná pro stanovení toxinů T-2 a HT-2 v krmivech.

2 Princip

Toxiny T-2 a HT-2 se extrahují ze vzorku směsí acetonitril : voda a část extraktu se přečistí např. na kolonce Multisep 227+. Eluát se odpaří pod proudem dusíku při 50 °C, rozpustí se v mobilní fázi a dochází k přímému nástřiku do systému LC-MS.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1 Acetonitril, čistota pro HPLC nebo vyšší.

2 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

3 Extrakční směs, acetonitril : voda, 84 : 16 (v/v).

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se nalije 840 ml acetonitrilu (1) a doplní se vodou (2) po značku.

4 Směs acetonitril : voda, 50 : 50 (v/v).

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se nalije 50 ml acetonitrilu (1) a doplní se vodou (2) po značku.

5 T-2 toxin - zásobní roztok o koncentraci 1250 µg/ml v acetonitrilu.

Příprava: Roztok se připraví rozpuštěním 5 mg krystalického toxinu T-2 ve 4 ml acetonitrilu (1).

6 HT-2 toxin - zásobní roztok o koncentraci 103,1 µg/ml v acetonitrilu (Biopure), objem 5 ml.

7 Isotopově značený T-2 toxin, U-[$^{13}C_{24}$] T-2 toxin, roztok o koncentraci 25,1 µg/ml v acetonitrilu (Biopure), objem 1,2 ml, slouží jako vnitřní standard.

8 Roztok isotopově značeného T-2 toxinu o koncentraci 251 ng/ml.

Příprava: Do 50ml odměrné baňky se napipetuje 500 µl roztoku vnitřního standardu (7) a doplní se acetonitrilem (1) po značku.

9 Směsný roztok T-2 a HT-2 toxinů o koncentracích 1000 ng/ml T-2 toxinu a 2000 ng/ml HT-2 toxinu v acetonitrilu.

Příprava: Do 50ml odměrné baňky se napipetuje 40 µl roztoku T-2 toxinu (5), 970 µl roztoku HT-2 toxinu (6) a doplní se acetonitrilem (1) po značku.

10 Sada kalibračních roztoků o koncentracích (20; 100; 400; 700 a 1000) ng/ml T-2 toxinu, (40; 200; 800; 1400 a 2000) ng/ml HT-2 toxinu a 492 ng/ml vnitřního standardu.

Příprava: Do vialek se napipetuje (0; 20; 100; 400; 700 a 1000) µl roztoku standardů (9) a do každé vialky se přidá ještě 20 µl roztoku vnitřního standardu (7). Vialky se doplní do 1 ml směsí acetonitril : voda (5).

11 Octan amonný.

12 Mobilní fáze pro HPLC.

A: 10 mM octan amonný ve vodě.
Příprava: Rozpustí se 0,771 g octanu amonného (11) v 1000 ml vody (2).

B: Acetonitril (1).

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 Kolonky SPE, např. Multisep 227+ firmy ROMER Labs.

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

7 Kapalinový chromatograf s hmotnostním detektorem a příslušenstvím.

5 Postup

5.1 Extrakce

Do 300ml kónické baňky se naváží 25 g zkušebního vzorku krmiva a přidá se 100 ml extrakčního činidla (3). Baňka se uzavře zátkou, obsah se promíchá a třepe se na horizontální laboratorní třepačce 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 Přečištění a příprava vzorku pro LC-MS analýzu

3 ml zfiltrovaného extraktu se aplikují na kolonku SPE, např. MultiSep 227 Trich+, přidá se 150 µl vnitřního standardu - isotopově značeného T-2 toxinu (8) a pak další 3 ml extraktu. Celý extrakt se nechá kolonkou prokapat pouze gravitací do předložené nádoby. Zbytek kapaliny, která zůstala v kolonce, se injekční stříkačkou protlačí ven a přidá se k předchozímu eluátu.

5.3 Příprava vzorku pro LC-MS analýzu

4 ml eluátu se odpaří pod proudem dusíku při teplotě 50 ºC a vysušený zbytek se rozpustí ve 400 µl směsi acetonitril : voda (4). Vzorek se protřepe a nechá nejméně 30 s v ultrazvukové lázni.

5.4 Kalibrace a stanovení na LC-MS

Ze zásobního směsného roztoku T-2 a HT-2 toxinu (9) se naředí sada směsných kalibračních roztoků (10). 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	(12), gradientová eluce
Teplota kolony	30 °C
Objem nástřiku	(20 – 50) µl
Detektor	Hmotnostní detektor Esquire 6000, MS/MS analýza
MS podmínky	Iontový zdroj: Elektrosprej, záznam iontů v pozitivním módu, Rozsah m/z: 100 – 600, Sledované ionty MS: T-2 toxin – 489,2 m/z, HT-2 toxin – 447,2 m/z, Isotopově značený T-2 toxin – 513,3 m/z
MS/MS podmínky	Sledované produktové ionty: T-2 toxin (M = 466,5) – 327, 387, 245 m/z HT-2 toxin (M = 424,5) – 285, 345 m/z T-2 toxin, vnitřní st. (M = 490,5) – 406, 451, 344 m/z

6 Kontrola kvality

Jednou za 3 měsíce se analyzuje certifikovaný referenční materiál. Změřená hodnota musí souhlasit s hodnotou danou pro tento materiál.

7 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah toxinů T-2 a HT-2 v krmivech vyjádřený v ng/g se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{c \times V \times E}{m \times A} \times \frac{C}{D} = \frac{c \times 100 \times 0{,}4}{25 \times 4} \times \frac{62{,}7}{492} = c \times 0{,}051$$

kde c je koncentrace vypočtená z kalibrační křivky (ng/ml),

V objem rozpouštědla použitý na extrakci (100 ml),

E konečný objem roztoku (400 µl),

m navážka vzorku (25 g),

A objem extraktu použitý na přečištění (4 ml),

C koncentrace vnitřního standardu ve vzorku (62,7 µg/ml),

D koncentrace vnitřního standardu ve standardu (492 µg/ml).

STANOVENÍ OBSAHU MYKOTOXINŮ METODOU LCMS - T-2 A HT-2 S PŘEČIŠTĚNÍM NA IMUNOAFINITNÍCH KOLONKÁCH

1 Rozsah a účel

Metoda je vhodná pro stanovení toxinů T-2 a HT-2 v krmivech.

2 Princip

Toxiny T-2 a HT-2 se extrahují ze vzorku směsí methanol : voda a část extraktu se přečistí na imunoafinitní kolonce, např. T-2Test^{TM}. Eluát se odpaří pod proudem dusíku při 50 °C, rozpustí se v mobilní fázi a dochází k přímému nástřiku do systému 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 Extrakční směs, methanol : voda, 80 : 20 (v/v).

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se nalije 800 ml methanolu (1) a doplní se vodou (3) po značku.

5 Směs acetonitril : voda, 50 : 50 (v/v).

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se nalije 50 ml acetonitrilu (2) a doplní se vodou (3) po značku.

6 T-2 toxin - zásobní roztok o koncentraci 1250 µg/ml v acetonitrilu.

Příprava: Roztok se připraví rozpuštěním 5 mg krystalického toxinu T-2 ve 4 ml acetonitrilu (2).

7 HT-2 toxin - zásobní roztok o koncentraci 103,1 µg/ml v acetonitrilu (Biopure), objem 5 ml.

8 Isotopově značený T-2 toxin, U-[$^{13}C_{24}$] T-2 toxin, roztok o koncentraci 25,1 µg/ml v acetonitrilu (Biopure), objem 1,2 ml, slouží jako vnitřní standard.

9 Roztok isotopově značeného T-2 toxinu o koncentraci 251 ng/ml.

Příprava: Do 50ml odměrné baňky se napipetuje 500 µl roztoku vnitřního standardu (8) a doplní se acetonitrilem (2) po značku.

10 Směsný roztok T-2 a HT-2 toxinů o koncentracích 1000 ng/ml T-2 toxinu a 2000 ng/ml HT-2 toxinu v acetonitrilu.

Příprava: Do 50ml odměrné baňky se napipetuje 40 µl roztoku T-2 toxinu (6), 970 µl roztoku HT-2 toxinu (7) a doplní se acetonitrilem (2) po značku.

11 Sada kalibračních roztoků o koncentracích (20; 100; 400; 700 a 1000) ng/ml T-2 toxinu, (40; 200; 800; 1400 a 2000) ng/ml HT-2 toxinu a 492 ng/ml vnitřního standardu.

Příprava: Do vialek se napipetuje (0; 20; 100; 400; 700 a 1000) µl roztoku standardů (10) a do každé vialky se přidá ještě 20 µl roztoku vnitřního standardu (8). Vialky se doplní do 1 ml směsí acetonitril : voda (5).

12 Octan amonný.

13 Mobilní fáze pro HPLC.
A: 10 mM octan amonný ve vodě.

Příprava: Rozpustí se 0,771 g octanu amonného (11) v 1000 ml vody (2).

B: Acetonitril (1).

14 Chlorid sodný, NaCl

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. T-2Test™ firmy VICAM.

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

7 Kapalinový chromatograf s hmotnostním detektorem a příslušenstvím.

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

5 Postup

5.1 Extrakce

Do 300ml kónické baňky se naváží 25 g zkušebního vzorku krmiva, přidá se 2,5 g chloridu sodného (14) a 100 ml extrakčního činidla (4). Baňka se uzavře zátkou, obsah se promíchá a extrahuje se na horizontální laboratorní třepačce 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 Přečištění 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, např. T-2test^{TM} (5) průtokem 1 až 2 kapky/s, dokud neprojde kolonkou vzduch. Pak se přidá 150 µl vnitřního standardu – isotopicky značeného T-2 toxinu (9) a dalších 5 ml zředěného extraktu. Kolonka se promyje 10 ml vody (3). T-2 a HT-2 toxin se eluují 1,5 ml methanolu (1), vhodné je nechat methanol prokapat pouze gravitací.

5.3 Příprava vzorku pro LC-MS analýzu

Eluát se odpaří pod proudem dusíku při teplotě 50 ºC a vysušený zbytek se rozpustí ve 200 µl směsi acetonitril : voda (5). Vzorek se protřepe a nechá nejméně 30 s v ultrazvukové lázni.

5.4 Kalibrace a stanovení na LC-MS

Ze zásobního směsného roztoku toxinů T-2 a HT-2 (10) se naředí sada směsných kalibračních roztoků (11). Připravené kalibrační roztoky i vzorky se měří za následujících podmínek, které slouží jako příklad.

Tabulka 2. Chromatografické podmínky.

Kolona	Zorbax XDB C18 150 mm × 4,6 mm I.D. 5 μm nebo podobná
Mobilní fáze	13, gradientová eluce
Teplota kolony	30 °C
Objem nástřiku	(20 – 50) μl
Detektor	Hmotnostní detektor Esquire 6000, MS/MS analýza
MS podmínky	Iontový zdroj: Elektrosprej, záznam iontů v pozitivním módu, Rozsah m/z: 100 – 600, Sledované ionty MS: T-2 toxin – 489,2 m/z, HT-2 toxin – 447,2 m/z, Isotopově značený T-2 toxin – 513,3 m/z
MS/MS podmínky	Sledované produktové ionty: T-2 toxin (M = 466,5) – 327, 387, 245 m/z HT-2 toxin (M = 424,5) – 285, 345 m/z T-2 toxin, vnitřní st. (M = 490,5) – 406, 451, 344 m/z

6 Kontrola kvality

Jednou za 3 měsíce se analyzuje certifikovaný referenční materiál. Změřená hodnota musí souhlasit s hodnotou danou pro tento materiál.

7 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah toxinů T-2 a HT-2 v krmivech vyjádřený v ng/g se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{c \times V \times E}{m \times \left(\frac{A}{r}\right)} \times \frac{C}{D} = \frac{c \times 100 \times 0{,}2}{25 \times \frac{10}{5}} \times \frac{188{,}3}{492} = c \times 0{,}153$$

kde *c* je koncentrace vypočtená z kalibrační křivky (ng/ml),

V objem rozpouštědla použitý na extrakci (100 ml),

E konečný objem roztoku (200 µl),

m navážka vzorku (25 g),

A objem extraktu použitý na přečištění (10 ml),

r ředění před aplikací na imunoafinitní kolonku (5),

C koncentrace vnitřního standardu ve vzorku (188,3 µg/ml),

D koncentrace vnitřního standardu ve standardu (492 µg/ml).