	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10576.1 – Stanovení obsahu přírodních toxinů metodou LC-MS	Revize	1

## STANOVENÍ OBSAHU PŘÍRODNÍCH TOXINŮ METODOU LC-MS

### 1 Rozsah a účel

Postup je určen pro stanovení obsahu přírodních toxinů v krmivech.

### 2 Princip


Přírodní toxiny se extrahují ze vzorku pomocí modifikované metody QuEChERS. Obsah přírodních toxinů se stanoví kapalinovou chromatografií s hmotnostně selektivní detekcí (LC-MS).

### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není dále uvedeno jinak. Čistota chemikálií se kontroluje proměřením slepého vzorku.

- 1 Voda, ultračistá, 18,2 MΩ/cm.
- 2 Acetonitril, CH<sub>3</sub>CN, HPLC grade.
- 3 Kyselina mravenčí, HCOOH, 98%, ρ = 1,22 g/ml.
- 4 Kyselina mravenčí, HCOOH, ρ = 1,22 g/ml, pro MS.
- 5 Síran hořečnatý bezvodý, MgSO<sub>4</sub>.
- 6 Chlorid sodný, NaCl.
- 7 Pevná směs solí chloridu sodného a síranu hořečnatého  
Příprava: Do skleněné vialky se naváží (4 ± 0,1) g bezvodého síranu hořečnatého (5) a (1 ± 0,1) g chloridu sodného (6). Vialka se uzavře víčkem a promíchá se.
- 8 Methanol, CH<sub>3</sub>OH, LC/MS grade.
- 9 Acetonitril, CH<sub>3</sub>CN, LC/MS grade.
- 10 Mravenčan amonný, HCOONH<sub>4</sub>, pro MS.
- 11 Extrakční činidlo, 0,1% roztok HCOOH ve vodě.

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se přidá asi 90 ml vody (1), poté se do baňky pipetuje 0,1 ml kyseliny mravenčí (3), roztok se promíchá, doplní vodou (1) po značku. Před použitím se roztok promíchá.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10576.1 – Stanovení obsahu přírodních toxinů metodou LC-MS	Revize	1

- 12 Zásobní roztok mravenčanu amonného,  $\text{HCOONH}_4$ ,  $c = 1 \text{ mol/l}$ .

Příprava:  $(1,576 \pm 0,01) \text{ g HCOONH}_4$  (10) se rozpustí v kádince asi v 10 ml vody (1), kvantitativně se převede do 25ml odměrné baňky, roztok se promíchá a doplní vodou (1) po značku. Před použitím se roztok opět promíchá.

- 13 Mobilní fáze A: 0,1%  $\text{HCOOH}$  ve vodě.

Příprava: Do 250ml odměrné baňky se přidá asi 200 ml vody (1), poté se do baňky pipetuje 0,25 ml kyseliny mravenčí (4) a roztok se promíchá. Poté se doplní vodou (1) po značku. Před použitím se roztok opět promíchá.

- 14 Mobilní fáze B: 0,1% roztok  $\text{HCOOH}$  v methanolu s 1mM  $\text{HCOONH}_4$ .

Příprava: Do 250ml odměrné baňky se přidá asi 200 ml methanolu (8), poté se do baňky pipetuje 0,25 ml kyseliny mravenčí (4) a 0,25 ml 1M  $\text{HCOONH}_4$  (12), roztok se promíchá a doplní methanolem (8) po značku. Před použitím se roztok opět promíchá.

- 15 Standardy analytů.

Používají se certifikované analytické standardy v pevném, kapalném nebo odpařeném stavu s deklarovanou čistotou od ověřeného výrobce.

Monocrotaline ( $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_6$ ) CAS [315-22-0].

Retrorsine ( $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}_6$ ) CAS [480-54-6].

Senecionine ( $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}_5$ ) CAS [130-01-8].

Senkirkine ( $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{NO}_6$ ) CAS [2318-18-5].

Seneciphylline ( $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ ) CAS [480-81-9].

Ergocornine ( $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_5$ ) CAS [564-36-3].

Ergocorninine ( $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_5$ ) CAS [564-37-4].

Ergocryptine ( $\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_5$ ) CAS [511-09-1].

Ergocryptinine ( $\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_5$ ) CAS [511-10-4].

Ergocristine ( $\text{C}_{35}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_5$ ) CAS [511-08-0].

Ergocristinine ( $\text{C}_{35}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_5$ ) CAS [511-07-9].

Ergosine ( $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_5$ ) CAS [561-94-4].


Ergosininine ( $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_5$ ) CAS [596-88-3].

Ergotamine ( $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_5$ ) CAS [113-15-5].

Ergotaminine ( $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_5$ ) CAS [639-81-6].

Ergometrine ( $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$ ) CAS [60-79-7].

Ergometrinine ( $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$ ) CAS [479-00-5].

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10576.1 – Stanovení obsahu přírodních toxinů metodou LC-MS	Revize	1

16 Zásobní roztoky jednotlivých přírodních toxinů.


Pro analyty v pevné nebo odpařené formě se připraví zásobní roztoky o přesné koncentraci ve vhodném rozpouštědle. Navážka pevného standardu se přepočte na deklarovanou čistotu standardu a přidá se příslušné množství rozpouštědla. Některé analyty se dodávají již v rozpouštěné formě. Roztoky se uchovávají podle doporučení výrobce.

17 Pracovní roztok směsi přírodních toxinů,  $c = 500 \text{ ng/ml}$ .

Příprava: Do 2ml vialky se pipetují standardy přírodních toxinů (16) v takovém množství, aby pro každý analyt po přidavku acetonitrilu (9) vznikl roztok o koncentraci 500 ng/ml. Příklad přípravy směšného roztoku alkaloidů je uveden v Tabulce 1.

**Tabulka 1. Příklad přípravy směšného roztoku standardů alkaloidů o koncentraci 500 ng/ml a objemu 1 ml.**

Látka	Koncentrace zásobního roztoku standardu ( $\mu\text{g/ml}$ )	Objem ( $\mu\text{l}$ )
Retrorsine	50	10
Monocrotaline	50	10
Senecionine	50	10
Seneciphylline	50	10
Senkirkine	50	10
Ergocornine	100	5
Ergocorninine	100	5
Ergocryptine	100	5
Ergocryptinine	100	5
Ergocristine	100	5
Ergocristinine	100	5
Ergosine	100	5
Ergosinine	100	5
Ergotamine	100	5
Ergotaminine	100	5
Ergometrie	100	5
Ergometrinine	100	5
Acetonitril (9)	-	890

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10576.1 – Stanovení obsahu přírodních toxinů metodou LC-MS	Revize	1


#### 4 Přístroje a pomůcky

- 1 Ultraúčinný kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem, např.:  
ACQUITY UPLC-TQ MS Xevo (Waters), vybavený UPLC kolonou a předkolonou,  
např.:  
ACQUITY BEH C18 VanGuard, 5 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters),  
ACQUITY UPLC BEH C18, 50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters),  
nebo  
ACQUITY UPLC BEH C18, 100 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters).
- 2 Analytické váhy s přesností 0,1 g a analytické váhy s přesností 0,1 mg.
- 3 Horizontální třepačka, 250 kmitů/min.
- 5 Laboratorní odstředivka, 10000 ot/min.
- 6 Uzavíratelné plastové centrifugační zkumavky se šroubovacím víčkem; 15 ml; 50 ml.
- 7 Plastové centrifugační zkumavky pro objem 1,5 ml, např. Eppendorf.
- 8 Šroubovací vialky s uzávěrem pro objem 1,5 ml.
- 9 Vysokorychlostní míchadlo, např. Vortex, IKA Works GmbH, Německo.
- 10 Vysokorychlostní dispergátor, např. Ultraturrax, IKA Works GmbH, Německo.
- 11 Membránové filtry s velikostí pórů 0,2 μm. Mohou se použít např. nylonové nebo PTFE membránové filtry.

#### 5 Pracovní postup

##### 5.1 Příprava vzorku

Do 50ml uzavíratelné plastové centrifugační zkumavky se naváží ( $2 \pm 0,001$ ) g homogenního vzorku. Přidá se 10 ml 0,1% roztoku HCOOH (11) a 10 ml acetonitrilu (2). Zkumavka se uzavře šroubovacím víčkem. Vzorek se dobře promíchá pomocí vysokorychlostního míchadla (např. Vortex) a nechá se 20 min třepat v horizontální poloze v laboratorní třepačce s rychlostí asi 250 kmitů/min. Intenzita třepání se upraví tak, aby po celou dobu nedocházelo k sedimentaci vzorku. Poté se přidá 5 g pevné směsi solí (7). Směs se nejméně 30 s intenzivně manuálně třepe. Vzorek se odstředí 5 min při 5000 ot/min, supernatant se převede do 15ml uzavíratelné plastové centrifugační zkumavky a nechá se vymrazit při  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  nejméně po dobu 2 h. Vymražený extrakt se opět odstředí 5 min při 3900 ot/min. Přesně 500 μl horní acetonitrilové fáze se převede do plastové centrifugační zkumavky typu Eppendorf, kde se smísí s 500 μl vody (1). Po důkladném promíchání pomocí vysokorychlostního míchadla (např. Vortex) se roztok přefiltruje přes membránový filtr s velikostí pórů 0,2 μm nebo

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10576.1 – Stanovení obsahu přírodních toxinů metodou LC-MS	Revize	1

se centrifuguje 5 min při 10000 ot/min. Filtrát nebo supernatant se převádí do 1,5ml šroubovací vialky.

Slepý pokus se provede stejným postupem bez navážky vzorku. Slepý pokus slouží ke kontrole čistoty rozpouštědel.

### Poznámka

1 Ke vzorku s tuhou konzistencí je vhodné během extrakce do centrifugační zkumavky přidat míchací kamínek, nebo se může použít vysokorychlostní dispergátor.

## 5.2 Kalibrace

Do čtyř 1,5 ml šroubovacích vialek s uzávěrem se odměří 500  $\mu$ l acetonitrilu (9) a přidá se (1; 5; 50; 100)  $\mu$ l pracovního směšného roztoku standardů přírodních toxinů o koncentraci 500 ng/ml (17). Přidá se voda (1) do celkového objemu 1 ml. Takto naředěné kalibrační roztoky odpovídají koncentracím (5; 25; 50; 500)  $\mu$ g/kg. Příklad rozpisu ředění pro sestrojení kalibrační závislosti je uveden v Tabulce 2.

Z ploch píků pro každou koncentraci se sestrojí kalibrační křivka.


### Tabulka 2. Příklad pro sestrojení kalibrační závislosti.

Pracovní roztok standardů (17) ( $\mu$ l)	1	5	50	100
Acetonitril (9) ( $\mu$ l)	500	500	500	500
Voda (1) ( $\mu$ l)	499	495	450	400
Koncentrační hladina analytů ve standardech (ng/ml)	0,5	2,5	25	50
Odpovídající koncentrace analytů ve vzorku při navážce 2 g ( $\mu$ g/kg)	5	25	50	500

Podle Tabulky 2 lze v případě potřeby analogicky doplnit kalibrační bod s hladinou 100 ng/ml.

## 5.4 LC-MS/MS stanovení

Extrakty, slepý pokus a jednotlivé body kalibrační křivky se analyzují metodou LC-MS/MS. Příklad nastavení přístroje je uveden v Tabulce 3. Před analýzou reálných vzorků se ověří citlivost systému analýzou nejnižšího kalibračního bodu a zároveň stabilita retenčního chování v daném chromatografickém systému. Selektivita analýzy je zajištěna využitím MRM módu při MS detekci.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	6
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10576.1 – Stanovení obsahu přírodních toxinů metodou LC-MS	Revize	1

**Tabulka 3. Příklad nastavení LC-MS/MS systému.**

Kolona	ACQUITY BEH C18 VanGuard, 5 mm × 2,1 mm × 1,7 μm
Mobilní fáze	(13) a (14), gradientová eluce
Průtok	0,4 ml/min
Teplota kolony	40 °C
Objem nástřiku	2,5 μl
Detektor	Hmotnostní spektrometr XEVO TQ MS, MS/MS analýza
MS podmínky	Iontový zdroj: ESI, záznam iontů v pozitivním módu

## 6 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah alkaloidů vyjádřený v μg/kg se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{c \times V \times R}{m_a}$$

kde

c je koncentrace analytu odečtená z kalibrační křivky v ng/ml,

m<sub>a</sub> hmotnost zkušebního vzorku v g,

V objem extraktu v ml,

R ředění.

V případě analýzy komplikovaných matic se doporučuje použít metodu standardního přídatku ke vzorku, za předpokladu lineární závislosti odezvy na koncentraci v daném koncentračním rozsahu.

## 7 Literatura

- 1 Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stajnbaher, D., Schenck, F. J.: Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *JAOAC Int*, 2003, vol. 96, no. 2, p. 412 – 431.