CH 8.3. Stanovenie aflatoxínov B1, B2, G1 a G2 v orieškoch

1. Pôvod metódy

BAKERBOND Application Note ,FF-014/ Trucksess,et.al,J.Assoc.Off.Anal.Chem. 67/5/973975,1984.

2. Princíp metódy

Metóda je vhodná na rýchle analýzy aflatoxínov v potravinách. Zo vzoriek sa extrahujú aflatoxíny zmesou rozpúšťadiel a zakoncentrujú sa pomocou extrakcie na tuhej fáze. Po vymytí aflatoxínov zmesou chloroform : acetón sa roztok odparí dosucha a odparok sa rozpustí v metanole a nastrekuje sa do HPLC. Detekcia je na DAD pri UV 365 nm a konfirmácia na FLD
s programovateľnou vlnovou dĺžkou.

3. Použité prístroje a spotrebný materiál

kolónky SPE
Silikagél,Octadecyl C_{18}
SPE manifold,
250 ml kadička,
5 ml skúmavka,
vodná výveva,
kvapalinový chromatograf HP 1090.

4. Zoznam chemikálií

Chloroform,
dichlórmetán,
metanol,
benzén,
acetón,
hexán,
dietyléter,
redestilovaná voda,
NaCl,
aflatoxíny (Supelco).

5. Príprava vzoriek/oriešky, syry, arašidové maslo

Vzorka sa homogenizuje a vytrepáva so zmesou metanol : voda. Zmes sa prefiltruje a odoberie sa 40 ml filtrátu. K odobratému filtrátu sa pridá vodný roztok NaCl. Vyzrážané tuky sa extrahujú. Kolónka SPE – Silikagél sa premyje 3 ml hexánu a 3 ml dichlórmetánu. Rozpustený odparok sa nechá za mierneho vákua pretiecť SPE kolónkou . Zachytené aflatoxíny sa vymývajú zmesou chloroform : acetón.

Obilniny

50 g vzorky sa zhomogenizuje a následne extrahuje dvakrát 50 ml chloroformu. Chloroformový podiel sa oddelí a chloroform sa odparí dosucha

6. Podmienky stanovenia

Kolóna: LiChrospher C_{18},endcapped, Symmetry

Mobilná fáza: acetonitril : metanol : voda
Prietok mobilnej fázy: 0,5 ml / min pre kolónu LiChrom, 1,1 ml / min pre kolónu Symmetry
Detektor: UV, 365 nm
Injekčný objem: 40 ul
Teplota: 40° C

CH 8.3.
Stanovenie aflatoxínov HPLC/FLD

1 PRINCÍP METÓDY

Vzorka sa extrahuje zmesou metanol-voda, extrakt sa prečisťuje na imunoafinitnej kolónke a následne sa analyzuje na chromatografickej kolóne so zakotvenou reverznou fázou.. Meranie aflatoxínov B, G sa realizuje fluorescenčnou detekciou s použitím postkolónovej derivatizácie. Aflatoxín M_1 sa stanovuje fluorescenčnou detekciou bez post- kolónovej derivatizácie.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie aflatoxínov B, G v orechoch, káve, v múke a výrobkoch z múky, v rastlinných produktoch, pive, pečeni, v krmivách a aflatoxínu M_1 v sušenom a kvapalnom mlieku.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 chlorid sodný p.a.
3.1.2 metanol gradient grade
3.1.3 acetonitril gradiet grade
3.1.4 deionizovaná voda
3.1.5 jód p.a. sublimovaný
3.1.6 chlorid draselný p.a.
3.1.7 KH_2PO_4 p.a.
3.1.8 $Na_2HPO_4 . 12H_2O$
3.1.9 Phosphate buffered saline tablets
3.1.10 kys.chlorovodíková 37% p.a
3.1.11 hydroxid sodný p.a.
3.1.12 štandard: Aflatoxins B_1, B_2, G_1, G_2 (zmesný štandard – každý aflatoxín 250 ng/ml)
3.1.13 štandard: Aflatoxin M_1 (1000 ng/ml)
3.1.14 chloramín
3.1.15 acetón p.a.
3.1.16 destilovaná voda
3.1.17 Thimerosal USP

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 extrakčná zmes - metanol: voda (60:40) (do 1 l odmernej banky preniesť 600 ml metanolu (3.1.2) a doplniť po rysku deionizovanou vodou) (3.1.4), pripravuje sa čerstvá.

3.2.2 metanol: voda (1:1) (do 100ml odmernej banky preniesť 50ml metanolu (3.1.2) a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.4)), roztok pripravovať vždy čerstvý

3.2.3 mobilná fáza - acetonitril : metanol : voda (22:22:56) (do 1 l odmernej banky preniesť, 220 ml acetonitrilu (3.1.3), 220 ml metanolu (3.1.2) a po rysku doplniť deionizovanou vodou (3.1.4)), doba expirácie: 1mesiac

3.2.4 elučná zmes M1 - metanol:acetonitril (20:30) (do 50 ml odmernej banky preniesť 20 ml metanolu (3.1.2) a doplniť po rysku acetonitrilom (3.1.3)), roztok pripravovať vždy čerstvý

3.2.5 saturovaný jód v destilovanej vode (100 mg I_2 (3.1.5) rozpustiť v kadičke v 2ml metanolu (3.1.2), doplniť do 200 ml deionizovanou vodou (3.1.4), nechať na ultrazvukovom kúpeli 20 min., prefiltrovať cez Whatman 4, roztok pripravovať vždy čerstvý

3.2.6 0,1M HCl (8,3ml 37% HCl (3.1.10) preniesť do 1 l odmernej banky a doplniť po rysku destilovanou vodou (3.1.16)), doba expirácie: 1mesiac

3.2.7 0,1M NaOH (navážiť 0,4g NaOH (3.1.11), rozpustiť v redestilovanej vode (3.1.16), preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po rysku destilovanou vodou), doba expirácie: 1mesiac

3.2.8 PBS pufer, pH 7,4 (1 tabletku Phosphate buffered saline tablets (3.1.9) rozpustiť v 100ml redestilovanej vody(3.1.4))

3.2.9 10% chloramín (navážiť 100g chloramínu(3.1.13) do 1l odmernej banky, rozpustiť v destilovanej vode (3.1.16) a doplniť do objemu 1 l)

3.2.10 5% acetón (25ml acetónu (3.1.14) preniesť do 500ml odmernej banky a doplniť po rysku destilovanou vodou (3.1.16))

3.2.11 0,01% thimerosal - navážiť 100mg thimerosalu (3.1.17), rozpustiť v destilovanej vode a doplniť v 1 l odmernej banke po rysku.

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobné roztoky štandardov

Zásobný zmesný roztok aflatoxínov B_1, B_2, G_1, G_2 (3.1.11) má koncentráciu každého analytu 250 ng/ml.
Zásobný roztok M_1 (3.1.12) má koncentráciu 1000 ng/ml.

3.3.2 Základné roztoky štandardov aflatoxínov

3.3.2.1 Základný roztok aflatoxínov B, G **ZR1** (5 µg/l)
Do 25 ml odmernej banky napipetovať 500 µl zo zásobného zmesného roztoku aflatoxínov B_1,B_2,G_1,G_2 (ABG) (3.1.11) a doplniť po rysku zmesou metanol : voda (1:1) (3.2.2). Pripravovať vždy čerstvý pred každým meraním.

3.3.2.2 Základný roztok aflatoxínu M_1 **ZR2** (2 µg/l)
Do 25 ml odmernej banky napipetovať 50 µl zo zásobného roztoku aflatoxínu M_1 (AM) (3.1.12) a doplniť po rysku zmesou metanol : voda (1:1) (3.2.2). Pripravovať vždy čerstvý pred každým meraním.

3.3.3 Kalibračné roztoky

3.3.3.1 Kalibračné roztoky aflatoxínov B, G
Napipetovať do 10 ml odmerných baniek objemy základného roztoku aflatoxínov B_1,B_2,G_1,G_2 (ZR1) podľa tabuľky 1 a doplniť zmesou metanol : voda (1:1) (3.2.2) po rysku.

Tabuľka 1 Príprava kalibračných roztokov aflatoxínov B, G

Koncentrácia aflatoxínov B,G (µg/l)	**Označenie roztoku**	**Prídavok zo základného roztoku ZR1 (ml)**
0,5	**BG1**	1
1	**BG2**	2
1,5	**BG3**	3
2	**BG4**	4
5	**BG5**	10

Kalibračné roztoky aflatoxínov B, G pripravovať čerstvé pred každým meraním.

3.3.3.2 Kalibračné roztoky aflatoxínu M_1

Napipetovať do 10 ml odmerných baniek objemy základného roztoku aflatoxínu M_1 (ZR2) podľa tabuľky 2 a doplniť zmesou metanol : voda (1:1) (3.2.2) po rysku.

Tabuľka 2 Príprava kalibračných roztokov aflatoxínu M_1

Koncentrácia aflatoxínu M_1 (µg/l)	**Označenie roztoku**	**Prídavok zo základného roztoku ZR2 (ml)**
0,2	**M1**	1
0,5	**M2**	2,5
1	**M3**	5
1,5	**M4**	7,5
2	**M5**	10

Kalibračné roztoky aflatoxínu M_1 pripravovať čerstvé pred každým meraním.

3.4 Dekontaminácia

Sklo dekontaminovať ponorením do roztoku 10% chloramínu (3.2.9) najmenej na 30 minút, potom do roztoku 5% acetónu(3.2.10) na 30minút. Potom starostlivo prepláchnuť destilovanou vodou. Sklo následne umyť štandardným postupom ako laboratórne sklo.

Reagencie (štandardy, extrakty spike vzoriek) dekontaminovať vyliatím do 10% roztoku chloramínu (3.2.9), po 30 minútach pridať roztok 5% acetónu (3.2.10). Zberať do zberných nádob.

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

Ovládanie prístrojov a zariadení je uvedené v ŠPP 1.2.01

4.1 kvapalinový chromatograf s fluorescenčným detektorom
4.2 ultrazvukový kúpeľ
4.3 homogenizátor Ultraturax
4.4 peristaltické čerpadlo
4.5 laboratórne odmerné sklo
4.6 odstredivka
4.7 imunoafinitné kolónky
4.8 mlyn ROMER Mills
4.9 filtračný papier

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Predpríprava vzoriek

5.1.1 Výpočet jedlého podielu u vzoriek so škrupinou

Zobrať 100 kusov orieškov náhodne vybratých zo vzorky, vylúskať a vážením zistiť obsah jedlého podielu.

$$\text{jedlý podiel (\%)} = \frac{\text{hmotnosť 100ks orieškov bez škrupiny}}{\text{hmotnosť 100ks orieškov so škrupinou}} \times 100$$

5.2 Príprava vzorky pre kontrolu kvality merania

5.2.1 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovanej vzorky orieškov a ostatných tuhých matríc pre stanovenie aflatoxínov B, G

Na prípravu vzoriek sa použijú negatívne matrice. Vzorky sa fortifikujú na úrovni ustanoveného MRL, podľa tabuľky 3:

Komodita	**MRL – Aflatox. B1 (µg/kg)**	**MRL – Suma Aflatox. (µg/kg)**
Arašidy	2,0	4,0
Pistácie, Mandle	8,0	10,0
Lieskovce, Para orechy	5,0	10,0
Koreniny (paprika)	5,0	10,0
Sušené ovocie	2,0	4,0
Obilie	2,0	4,0

Pozn.: Platnosť od 9.3.2010, novela NK 1881/2006

Navážiť 50 g zhomogenizovanej vzorky. Pridať zmesný štandard aflatoxínov o koncentrácii 250 ng/ml ABG (3.1.11) podľa tabuľky 4. Zmixovať na Vortexe. Nechať postáť 15 minút a pokračovať podľa procedúry 5.3.1.2.

Tabuľka 4 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovanej vzorky pre stanovenie aflatoxínov B,G

Koncentrácia aflatoxínov B_1, B_2, G_1, G_2 vo vzorke (µg/kg)	**Prídavok roztoku ABG (µl)**
0	0
2,0	400
5,0	1000
8,0	1600

5.2.2 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovanej vzorky mlieka pre stanovenie aflatoxínu M_1

Na prípravu vzoriek sa použijú negatívne matrice. Vzorky sa fortifikujú na úrovni ustanoveného MRL (0,05ug/kg).
Zobrať 50 ml vzorky mlieka. Pridať štandard aflatoxínu M_1 o koncentrácii 1000 ng/ml AM(3.1.12) podľa tabuľky 5. Zmixovať na Vortexe a pokračovať podľa bodu 5.4.2 Prečistenie extraktu pri stanovení aflatoxínu M_1.

Tabuľka 5 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovanej vzorky pre stanovenie aflatoxínu M_1

Koncentrácia aflatoxínu M_1 vo vzorke (µg/kg)	**Prídavok roztoku AM (µl)**
0	0
0,05	2,5

5.3 Príprava vzoriek

5.3.1 Príprava vzorky pre stanovenie aflatoxínov B_1, B_2, G_1, G_2

Počas prípravy a spracovania laboratórnych vzoriek je potrebné čo najviac vylúčiť denné svetlo (príprava v miestnosti s minimálnym prístupom denného svetla), pretože aflatoxíny sa postupne vplyvom ultrafialového svetla rozkladá.

Navážiť 50 g zhomogenizovanej vzorky (5.1.2). U vzorky, pri ktorej bola pri homogenizácii pridaná voda, navážiť prerátané množstvo vzorky (na 50g v pôvodnej hmote), úmerné množstvu pridanej vody.

Pridať 4 g NaCl (3.1.1) .Vzorku extrahovať 250ml zmesi metanol : voda (60:40) (3.2.1) za pomoci Ultraturaxu. U vzorky, pri ktorej bola pri homogenizácii pridaná voda, pri extrakcii znížiť množstvo vody v extrakčnej zmesi o objem použitý pri homogenizácii. Následne prefiltrovať cez Whatman 4 asi v objeme 50 ml. Zobrať 10 ml filtrátu, nariediť s 10ml PBS pufru (3.2.8).
Pivo odplyniť na ultrazvuku a nariediť 1:1 s deionizovanou vodou (3.1.4). Ďalej postupovať podľa bodu 5.4 Prečistenie extraktov.

5.3.2 Príprava vzorky pre stanovenie aflatoxínu M_1

Tekuté mlieko zohriať na teplotu 35 - 37°C, približne 60ml prefiltrovať, podľa potreby odstrediť 5 min. pri 20 000 otáč./min.
Sušené mlieko sa musí najskôr obnoviť: navážiť 10 g suš. mlieka do 100ml odmerného valca. Pridať deionizovanú vodu o teplote 35 - 40°C do objemu 100ml, dobre premiešať. Takto obnovené mlieko prefiltrovať, podľa potreby odstrediť 5 min. pri 20 000 otáč./min.
Smotana 33%, kondenzované mlieko: navážiť 20g vzorky do 100ml odmerného valca, zriediť deionizovanou vodou o teplote 35 - 40°C do objemu 100ml. Prefiltrovať, podľa potreby odstrediť 5 min. pri 20 000 otáč./min.
Smotana 10%,: navážiť 25g vzorky do 50ml odmerného valca, zriediť deionizovanou vodou o teplote 35 - 40°C do objemu 50ml. Prefiltrovať, podľa potreby odstrediť 5 min. pri 20 000 otáč./min.

5.4 Prečistenie extraktov

5.4.1 Prečistenie extraktov pri stanovení aflatoxínov B_1, B_2, G_1, G_2

Vybrať kolónku AFLAPREP B, G (4.11) z chladničky a vytemperovať na izbovú teplotu. Aplikovať 10 ml zriedeného extraktu (5.3.1) vzorky na kolónku rýchlosťou asi 2 ml/min pomocou zariadenia na SPE. Potom kolónku prepláchnuť 2x s 10 ml destilovanej (3.1.15) vody rýchlosťou 5ml/min.
Rezíduá eluovať s 1 ml metanolu (3.1.2) s rýchlosťou 1 kvapka/s. Vyeluovaný roztok spätne nasať na náplň kolónky a opäť prekvapkať. Spätné kvapkanie vykonať 2-krát. Potom prekvapkať cez náplň ešte 1 ml destilovanej vody (3.1.15).

Do série vzoriek sa zaraďuje aj tkz. slepý pokus, čo je vlastne zmes 10ml roztoku PBS(3.2.8) a 10ml extrakčnej zmesi (3.2.1).

5.4.2 Prečistenie extraktov pri stanovení aflatoxínu M_1

Vybrať kolónku AFLAPREP M (4.12) z chladničky a zohriať na izbovú teplotu. Nasať cez kolónku 50 ml tekutého prefiltrovaného mlieka, u sušeného mlieka 50ml obnoveného prefiltrovaného mlieka, u smotany 10% a 33% a u kondenzovaného mlieka 50ml zriedenej prefiltrovanej vzorky rýchlosťou 2-3ml/min.. Prepláchnuť 2x 10 ml vody rýchlosťou 5ml/min. Eluovať s 1,25 ml zmesi metanol-acetonitril (20:30)(3.2.4) rýchlosťou 1kvapka/2-3sekundy. Vykonať spätné kvapkanie 2-krát: vyeluovaný roztok spätne nasať cez náplň kolónky a opäť prekvapkať. Potom prekvapkať cez náplň ešte 1,25 ml destilovanej vody (3.1.15).

5.5 Chromatografická analýza

LC-podmienky

chromatografická kolóna – C18
teplota kolóny: 30°C
mobilná fáza - voda : acetonitril : metanol
prietok: 1 ml/min.
nástrek: 50 µl

5.4.1 Nastavenie FLD pre aflatoxíny B_1, B_2, G_1, G_2
excitačná vlnová dĺžka 360 nm
emisná vlnová dĺžka 444 nm

5.4.2 Postkolónová derivatizácia pre aflatoxíny B_1, B_2, G_1, G_2
prietok saturovaného jódu: 0.4 ml/min

5.4.3 Nastavenie FLD pre aflatoxín M1
excitačná vlnová dĺžka 360 nm
emisná vlnová dĺžka 430 nm

Poznámka: Príliš veľké kolísanie teploty spôsobuje posúvanie retenčných časov píkov. Povolená úroveň je: ±5% relatívnych (tzv. windows). Preto je vhodné dodržať stálu teplotu laboratória kde sa meracie zariadenie nachádza. Kontrola teploty tohto priestoru sa pravidelne vykonáva a zaznamenáva v zázname č.33/C/3-I.

6 VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV MERANIA

Koncentrácia zložky je úmerná hodnotám plochy píkov. Ich vyhodnotenie je vykonané porovnaním týchto plôch s plochami píkov nameraných v kalibračných roztokoch.

$$C_V = C_S \cdot R \qquad (\mu g/kg)$$

C_V - koncentrácia analytu v µg/kg
C_S - koncentrácia analytu určená z kalibračnej krivky (µg /l)

R - stupeň riedenia

Výsledky meraní sú prepočítané na výťažnosť metódy (korekcia na recovery).

7 LITERATÚRA

1. AOAC methods, 16 th edition, 1995, N_O 49.2.18 – AOAC Official Method 991.31: Aflatoxins in Corn, Raw Peanuts, and Peanut Butter
2. Application of immunoaffinity columns for sample clean-up prior to HPLC analysis for aflatoxins B, G , R-Biopharm, Rhône P07, 2003
3. Application of immunoaffinity columns for sample clean-up prior to HPLC analysis for aflatoxin M1 , R-Biopharm, Rhône P04, 2005
4. STN 560516, European Standard EN 12955, 1999
5. STN 570109, European Standard EN ISO 14501, 1998
6. Nariadenie Komisie (ES) č. 401/2006

8 ZOZNAM SKRATIEK

HPLC - kvapalinový chromatograf / kvapalinová chromatografia/
FLD – fluorescenčný detektor
LOD - limit detekcie
LOQ - limit kvantifikácie
SD - výberová smerodajná odchýlka
SPE - solid phase extraction

CH 8.3. Stanovenie aflatoxínu B1 a sumy aflatoxínov B1, B2, G1 a G2 v požívatinách a v krmivách metódou HPLC

1 Určenie metódy

Metóda je použiteľná na analýzu aflatoxínov v požívatinách a v krmivách.

2 Princíp metódy

Vzorky sa extrahujú zmesou metanol/voda, extrakt sa prefiltruje, alikvotná časť filtrátu sa prečistí na imunoafinitnej čistiacej kolónke. Aflatoxíny sa vyeluujú z kolónky metanolom a vodou. Analyzujú sa na reverznej fáze metódou HPLC s použitím fluorescenčnej detekcie s postkolónovou derivatizáciou aflatoxínov B1 a G1.

3 Pomôcky

3.1 Prístroje a zariadenia

- laboratórne sklo: Petriho misky, kadičky, odmerné valce, pipety, Erlenmayerove banky, Büchnerov lievik
- vákuové zariadenie na imunoafinitné kolónky
- turbomixér alebo mixér so sklenenou nádobou
- filtračný papier so sklenenými vláknami
- imunoafinitné čistiace kolónky

3.2 Chemikálie a roztoky

Používajú sa len chemikálie označené p.a. alebo čistoty HPLC

- acetonitril
- methanol
- kyselina dusičná, roztok, c = 4 mol/l
- bromid draselný
- n-hexán
- redestilovaná voda

- chlorid sodný
- **extrakčné činidlo**, metanol/voda, roztok 70 %
- **slaný fosforečnanový tlmivý roztok (PBS)**
- **základné štandardy jednotlivých aflatoxínov** o koncentrácii 3 µg/ml
- **zásobné roztoky štandardov jednotlivých aflatoxínov** o koncentrácii 120 ng/ml
- **zásobný zmesný roztok štandardov aflatoxínov** o koncentrácii: 12 ng/ml aflatoxínu B1, 12 ng/ml aflatoxínu B2, 12 ng/ml aflatoxínu G1, 12 ng/ml aflatoxínu G2
- **pracovné roztoky štandardov aflatoxínov na kalibračné krivky**

Dekontaminácia laboratórneho skla a roztokov obsahujúcich aflatoxíny sa robí v roztoku pripravenom z 5 litrov vody, 100 g chloramínu a 200 ml acetónu. (laboratórne sklo sa umiestni do roztoku na noc).

4 Pracovný postup

4.1 Príprava vzorky na analýzu

Vzorka určená na analýzu sa pripraví jedným z postupov uvedených v Prílohe č. 2 k Výnosu MP SR č. 1497/4/1997-100 (krmivá) alebo podľa Nariadenia Komisie ES č. 401/2006 (potraviny)

4.2 Kontrolná vzorka a slepá vzorka

S každou sadou vzoriek sa analyzuje slepá vzorka, čo je kompletný pracovný postup bez vzorky.

4.3 Príprava extraktu vzorky

4.3.1. Orechy, pistácie, mandle, arašidy a olejnaté semená

Do sklenenej nádoby vhodného objemu sa naváži 25 g vzorky. Do vzorky sa pridá 5 g chloridu sodného, 200 ml extrakčného činidla a 100ml n-hexánu. Vzorka s extrakčným činidlom sa homogenizuje počas 3 minút v turbomixéri. Pri pistáciách pridávame len 100 ml extrakčného činidla s 50 ml n-hexánu a homogenizujú sa v mixéri so sklenenou nádobou 3 minúty.

Do skleneného lievika sa vloží filtračný papier so sklenenými vláknami. Zhomogenizovaná vzorka sa prefiltruje a filtrát sa zachytí. Z filtrátu sa odpipetuje 10 ml, pridá sa 60 ml roztoku PBS , takto nariedený filtrát sa použije na ďalšie stanovenie.

Kvôli zákalu filtrát sa ešte jeden krát prefiltruje cez filtračný papier so sklenenými vláknami a použije sa 50ml zachyteného filtrátu.

4.3.2. Figy, hrozienka a sušené ovocie

Do sklenenej nádoby vhodného objemu sa naváži 25 g vzorky (ak sa navažuje zmes vzorky s vodou, navážka sa zvolí tak, aby obsahovala približne 25 g vzorky), s presnosťou na 0,001 g. Do vzorky sa pridá 5 g chloridu sodného a 300 ml extrakčného činidla. Vzorka s extrakčným činidlom sa homogenizuje počas 3 minút v turbomixéri.

Do skleneného lievika sa vloží filtračný papier so sklenenými vláknami. Zhomogenizovaná vzorka sa prefiltruje a filtrát sa zachytí. Z filtrátu sa odpipetuje 10 ml, pridá sa 60 ml roztoku PBS. Kvôli zákalu sa filtrát ešte jeden krát prefiltruje cez filtračný papier so sklenenými vláknami a použije sa 50ml zachyteného filtrátu.

4.3.3. Korenie a koreniace zmesi

Do sklenenej nádoby vhodného objemu sa naváži 5 g vzorky s presnosťou na 0,001g. Do vzorky sa pridá 5 g chloridu sodného a 300 ml extrakčného činidla. Vzorka s extrakčným činidlom sa homogenizuje počas 30 minút na trepačke.

Do skleneného lievika sa vloží filtračný papier so sklenenými vláknami. Zhomogenizovaná vzorka sa prefiltruje a filtrát sa zachytí. Z filtrátu sa odpipetuje 10 ml, pridá sa 60 ml roztoku PBS, takto nariedený filtrát sa ešte jeden krát prefiltruje cez filtračný papier so sklenenými vláknami a 50ml zachyteného filtrátu sa použije na ďalšie stanovenie

4.3.4. Ostatné vzorky – pekárenské výrobky, obilniny, ryža, mletá paprika a krmivá

Do sklenenej nádoby vhodného objemu sa naváži 25 g vzorky (ak sa navažuje zmes vzorky s vodou, navážka sa zvolí tak, aby obsahovala približne 25 g vzorky), s presnosťou na 0,001 g. Pri paprike sa navažuje 5 g.

Do vzorky sa pridá 5 g chloridu sodného a 125 ml extrakčného činidla. Vzorka s extrakčným činidlom sa homogenizuje počas 2 minút v turbomixéri alebo v mixéri so sklenenou nádobou.

Do skleneného lievika sa vloží filtračný papier so sklenenými vláknami. Zhomogenizovaná vzorka sa prefiltruje a filtrát sa zachytí. Z filtrátu sa odpipetuje 15 ml, pridá sa 30 ml redestilovanej vody, znova sa prefiltruje a filtrát sa použije na ďalšie stanovenie

4.4 Čistenie filtrátu na imunoafinitnej čistiacej kolónke

4.4.1 Čistenie filtrátu na imunoafinitnej čistiacej kolónke pre komodity pripravené podľa 4.3.1, 4.3.2 a 4.3.3

Imunoafinitná čistiaca kolónka sa nechá vytemperovať na laboratórnu teplotu, potom sa pripojí na vákuový systém a na kolónku sa pripojí zásobník.. Kolóna sa aktivuje 2x10ml PBS.
Na kolónku sa pipetou prenesie 70 ml zriedeného filtrátu a nechá sa pretiecť cez kolónku pri ustálenom prietoku; prietoková rýchlosť musí byť 1 až 2 kvapky za sekundu. Po pretečení filtrátu sa kolónka premyje 2x10 ml redestilovanej vody.
Zásobník sa odstráni a aflatoxíny sa z kolónky vymyjú s 0,5 ml metanolu a s 0,75 ml metanolu a postupne s redestilovanou vodou 1 ml, 1ml a 0,75ml. Takto pripravený extrakt sa použije na stanovenie.

4.4.2 Čistenie filtrátu na imunoafinitnej čistiacej kolónke pre komodity pripravené podľa 4.3.4

Imunoafinitná čistiaca kolónka sa nechá vytemperovať na laboratórnu teplotu, potom sa pripojí na vákuový systém a na kolónku sa pripojí zásobník. Na kolónku sa pipetou prenesie 20 ml filtrátu a nechá sa pretiecť cez kolónku pri ustálenom prietoku. Po pretečení filtrátu sa kolónka premyje 10 ml redestilovanej vody.
Zásobník sa odstráni a aflatoxíny sa z kolónky vymyjú 1 ml metanolu a 1 ml redestilovanej vody. Takto pripravený extrakt sa použije na stanovenie.

4.5 Meranie

4.5.1 Príprava merania

Pred meraním sa separačná kolóna premyje (prekondiciovanie):

- metanolom (100%), 20 min.
- zmesou metanol/voda (50/50), 20 min.
- mobilnou fázou
- pripojí sa Kobra cela a mobilná fáza sa nechá pretekať cez Kobra celu počas 30 minút, potom je prístroj pripravený na meranie

4.5.2 Meranie

Správna funkcia prístroja sa overí zmeraním a vyhodnotením niektorého štandardu kalibračnej krivky.

Po overení správnej funkcie prístroja a systému sa nastreknú vzorky.

4.6 Skončenie merania

Po skončení merania sa Kobra cela odpojí a premyje sa vodou.

Analytická kolóna sa premyje (postkondiciovanie):

- zmesou metanol/voda (20/80), 20 min.
- metanolom (100%), 20 min.

5 Vyhodnotenie nameraných údajov

Množstvo každého aflatoxínu X v µg/kg sa vypočíta podľa nasledujúcej rovnice:

$$\mathbf{X = c \,.\, F}$$

v ktorej:

c je množstvo aflatoxínu v analyzovanej vzorke, uvedené v chromatograme po zintegrovaní píku, v ng/ml

F je faktor riedenia vzorky v procese analýzy

$$F = \frac{Vex \,.\, R \,.\, Vv}{M \,.\, Vk}$$

Vex – Objem extrakčného činidla

Vv – Objem, ktorým sa analyt vytesnil z kolónky
R – Násobok riedenia filtrátu (napr., pri riedení 10+ 60 je R=7)
Vk –Objem filtrátu aký sa dával na kolónu
M – navážka v g

6 Literatúra

- STN EN 12955 Požívatiny. Stanovenie aflatoxínu B1 a sumy aflatoxínov B1, B2, G1, G2 v obilninách, škrupinovom ovocí a výrobkoch z nich. Metóda vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie s postkolónovou derivatizáciou a predčistením na imunoafinitnej kolóne.
- STN EN 14123 Požívatiny. Stanovenie aflatoxínu B1 a sumy aflatoxínov B1, B2, G1, G2 v lieskových orieškach, figách a mletej paprike. Metóda vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie s postkolónovou derivatizáciou a predúpravou s použitím imunoafinitných kolóniek.
- ISO/FDIS 17375 Krmivá pre zvieratá – Stanovenie aflatoxínu B1
- návod na použitie imunoafinitných čistiacich kolóniek
- návod na použitie Kobra cely
- Výnos MP SR zo 7.10.1997 č. 1497/4/1997-100 o úradnom odbere vzoriek a o laboratórnom skúšaní a hodnotení krmív
- Nariadenie Komisie ES č. 401/2006 z 23.2.2006, ktorým sa stanovujú metódy odberu vzoriek a analytické metódy na úradnú kontrolu hodnôt mykotoxínov v potravinách