CH 8.5.a. Stanovenie aflatoxínu M1 v mlieku metódou HPLC/FLD

1. Pôvod metódy
STN EN ISO 14501, modifikácia pre potreby ŠVPÚ Košice

2. Princíp metódy
Aflatoxín M1 je z mlieka extahovaný na imunoafinitnej kolóne (IA). Všetky ďalšie prímesy sú z kolóny vymyté roztokom PBS. Aflatoxín M1 je z IA kolónky eluovaný zmesou metanol/acetonitril (20:30, v/v). Získaný eluát sa aplikuje do HPLC s FLD detekciou.

3. Použité prístroje
kolónky AFLAPREP M (R-BIOPHARM RHÔNE LTD),
SPE manifold,
Kadičky,
Skúmavky,
vodná výveva,
filtračné papiere,
kvapalinový chromatograf FLD exc 365nm, em 420nm

4. Zoznam chemikálií
metanol,
acetonitril,
roztok príp. tablety PBS,
redestilovaná voda,
štandard aflatoxínu M1.

5. Príprava vzoriek
Mlieko
Mlieko sa zohreje na 35 - 37°C a prefiltruje cez filtračný papier, v prípade potreby sa použije ďalší filtračný papier, poprípade sa mlieko centrifuguje 15 min. pri 4000 ot/min. Na analýzu sa odoberie približne 50 ml mlieka, toto množstvo sa odváži. Na imunoafinitnú kolónku sa pripevní rezervoár, celých 50 ml mlieka sa aplikuje na imunoafinitnú kolónku. Nechá sa gravitáciou pretiecť, v prípade potreby sa použije vákuum, ktoré sa nastaví tak, aby rýchlosť pretekania mlieka cez IA kolónkou bola cca. 1 kvapka za sekundu. Kolónka sa prepláchne 10 ml roztoku PBS, následne sa preplach opakuje ešte raz s 10ml PBS a kolónka sa vysuší za použitia vákua. Aflatoxín M1 sa eluuje s 1,25 ml zmesi MeOH/ACN (20:30, v/v). Na zabezpečenie denaturácie väzby aflatoxínu je potrebný minimálne 30 s. kontakt s elučným činidlom, čo zabezpečíme opakovaným spätným premytím kolónky – tzv. “backflusching” aspoň raz. Potom sa na kolónku aplikuje 1,25 ml vody a zbiera sa do skúmavky spolu s prvým eluátom, čím sa získa 2,5 ml eluátu s obsahom aflatoxínu M1. Tento eluát sa priamo dávkuje do HPLC systému.

Sušené mlieko:
Odváži sa 10 g sušeného mlieka do 250 ml banky. Zohreje sa 100 ml vody na teplotu 30 – 40 °C. Do sušeného mlieka sa vleje cca 80 ml zohriatej vody v malých množstvách a postupne sa miešaním rozpúšťa. Homogénna zmes sa kvantitatívne prenesie do 100 ml odmernej banky a doplní do 100 ml zvyškom zohriatej vody. Rekonštituované mlieko sa prefiltruje cez filtračný papier a postupuje sa ďalej ako pri mlieku.

7. Podmienky stanovenia

Kolóna: Eclipse XDB – C18, 150 x 4,6mm, 5μm, Agilent
Mobilná fáza: acetonitril – metanol - voda v pomere 16/26/58, v/v/v
Prietok mobilnej fázy: 1,0 ml/min
Detekcia: FLD exc. 365nm, emis. 420nm
Teplota: 40 °C
Injekovaný objem: 50 ul.

CH 8.5.a. Stanovenie Aflatoxínu M1 v mlieku, v mliečnych výrobkoch a v mliečnych kŕmnych zmesiach metódou HPLC

1 Určenie metódy

Metóda je použiteľná na analýzu Aflatoxínu M1 v surovom kravskom mlieku, v sušenom mlieku, v mliečnych výrobkoch a v mliečnych kŕmnych zmesiach.

2 Princíp metódy

Aflatoxín M 1 sa vo vzorke stanoví po jej aplikácii na imunoafinitnú čistiacu kolónku, ktorá obsahuje špecifickú protilátku naviazanú na pevný materiál. Protilátka selektívne naviaže antigén Aflatoxínu M1 za vzniku komplexu protilátka – antigén. Všetky ostatné zložky z matrice vzorky sa vymyjú z kolónky vodou. Aflatoxín M1 sa z kolónky vyeluuje acetonitrilom a stanoví sa metódou HPLC na reverznej fáze fluorescenčnou detekciou.

3 Pomôcky

3.1 Prístroje a zariadenia

- laboratórne sklo: odmerné valce, pipety, sklenené lieviky, sklenené skúmavky,
- rotačná vákuová odparka
- vákuové zariadenie na imunoafinitné kolónky
- nadstavce o objeme 50 ml
- filtračný papier
- imunoafinitné čistiace kolónky
- analytické váhy

3.2 Chemikálie a roztoky

Používajú sa len chemikálie čistoty p.a. a HPLC

- acetonitril
- metanol
- hexán
- demineralizovaná voda
- chlorid sodný, nasýtený roztok

- chloroform
- Celit
- základný štandard Aflatoxínu M1 v acetonitrile o koncentrácii 10 µg/ml
- zásobný roztok štandardu Aflatoxínu M1 o koncentrácii 200 ng/ml
- roztoky štandardu Aflatoxínu M1 o koncentráciách 0,025 ng/ml až 10 ng/ml na kalibračné krivky

4 Bezpečnosť pri práci

- **dekontaminácia:** všetko použité sklo a roztoky sa musia dekontaminovať ponorením do 5 % roztoku hypochloritu sodného najmenej na dobu 30 minút a potom do 5 % roztoku acetonitrilu na 30 minút.

5 Pracovný postup

5.1 Príprava vzorky na analýzu

5.1.1 Surové mlieko

Vzorka mlieka sa premieša a zahreje na teplotu 35°C až 37°C a prefiltruje sa cez viac vrstiev filtračného papiera. Na analýzu je potrebné pripraviť najmenej 50 ml mlieka.

5.1.2 Sušené mlieko a mliečne kŕmne zmesi

Do kadičky o objeme 250 ml sa naváži 5 g dobre premiešanej vzorky a po malých množstvách sa pridá celkom 50 ml vody vopred zohriatej na teplotu 50°C. Zmes sa mieša v ultrazvukovom kúpeli až do získania homogénnej konzistencie. Vzorka obnoveného mlieka sa nechá vychladnúť na teplotu 20°C a potom sa kvantitatívne prenesie pomocou malého množstva vody do odmernej banky o objeme 100 ml a banka sa vodou doplní na objem 100 ml. Na analýzu je potrebné pripraviť najmenej 50 ml mlieka alebo 50 ml mliečnej kŕmnej zmesi.

5.1.3 Mliečne výrobky

Do banky sa naváži 20 g vzorky s presnosťou na 0,001 g, pridá sa 75 ml chloroformu, 1 ml nasýteného roztoku chloridu sodného a 5 g Celitu. Obsah banky sa trepe na trepačke počas 20 minút a potom sa prefiltruje cez skladaný filtračný papier. Banka sa opláchne 50 ml chloroformu a chloroform so zvyškami vzorky sa prefiltruje. Celý filtrát sa odparí do sucha

v rotačnej vákuovej odparke pri teplote 50°C. Odparok sa rozpustí v 1 ml metanolu, pridá sa 50 ml hexánu a zmes sa prenesie do oddeľovacieho lievika o objeme 500 ml. Zmes v oddeľovacom lieviku sa postupne vytrepáva 30 ml vody, 20 ml vody a 20 ml vody. Spodná vodná vrstva sa zachytáva.

5.2 Čistenie vzoriek na imunoafinitných kolónkach

5.2.1 Surové mlieko a obnovené sušené mlieko

Do kadičky sa napipetuje 50 ml pripravenej vzorky. Do nadstavca o objeme 50 ml, pripojeného na imunoafinitnú kolónku sa vzorka kvantitatívne prenesie a nechá sa pomaly pretiecť cez kolónku.

Kolónka sa po pretečení vzorky premyje 2 x 10 ml vody. Kolónka sa odpojí od vákuového systému. Aflatoxín M1 sa z kolónky vyeluuje 4 ml acetonitrilu. Eluát sa zachytí do sklenenej banky a odparí sa do sucha pri teplote 50°C v rotačnej vákuovej odparke. Odparok sa rozpustí v 0,5 ml vody a použije na HPLC stanovenie.

5.2.2 Mliečne výrobky

Celý objem vzorky pripravený postupom 5.1.3 sa prenesie do nadstavca o objeme 50 ml, pripojeného na imunoafinitnú kolónku a nechá sa pomaly pretiecť cez kolónku.

Kolónka sa po pretečení vzorky premyje 2 x 10 ml vody.. Kolónka sa odpojí od vákuového systému. Aflatoxín M1 sa z kolónky vyeluuje 4 ml acetonitrilu. Eluát sa odparí do sucha v rotačnej vákuovej odparke pri teplote 50°C. Odparok sa rozpustí v 0,5 ml vody a použije na HPLC stanovenie.

6 Vyhodnotenie nameraných údajov a vyjadrenie výsledkov

V chromatograme príslušnej vzorky sa zintegruje pík, ktorý má rovnaký retenčný čas ako štandard podľa aktuálnej kalibračnej krivky. Hodnoty koncentrácie Aflatoxínu M1 sú vyjadrené v ng/ml. Z nameraného množstva sa vypočíta obsah Aflatoxínu M1 podľa rovnice:

$$x = c \cdot F$$

v ktorej:

x je množstvo Aflatoxínu M 1 v analyzovanej vzorke v µg/kg

c - je množstvo Aflatoxínu M 1 v analyzovanej vzorke, vypočítané z kalibračnej krivky, v ng /ml

F -je faktor riedenia vzorky v procese analýzy, získaný výpočtom podľa komodít:

6.1 Mlieko a mliečne výrobky

Riedenie (ml): 0,5

F = 0,5 / m

0,5 - objem , v ktorom bol rozpustený odparok

m - hmotnosť navážky v g

6.2 Sušené mlieko a mliečne kŕmne zmesi

Riedenie (ml): 100/50/0,5

F = 100.0,01/m , zjednodušene 1/m

100 - objem extračného činidla

50 - objem vzorky nanesenej na imunoafinitnú kolónku

0,5 - objem , v ktorom bol rozpustený odparok

m - hmotnosť navážky v g

0,01 - podiel hodnôt 0,5/50

7 Literatúra

- ISO 14501: 1998 (E) – Milk and milk powder – Determination of aflatoxin M1 content – Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by high-performance liquid chromatography
- návod na použitie imunoafinitných čistiacich kolóniek