CH 8.11. Stanovenie patulinu v potravinách rastlinného pôvodu metódou HPLC.

1. Pôvod metódy

Mac. Donald et al.:J.of AOAC Inter., Vol 83, No6, 2000 upravená na potreby ŠVPÚ Košice Dr. Tkáčikovou.

Konfirmačná metóda podľa návodu ku kolónkam MYCOSEP PATULIN:Determination of Patulin in apple juice and apple juice concentrate with HPLC, CODE 1004015, January 1999.

2. Princíp metódy

Metóda je založená na princípe extrakcie patulínu z matrice octanom etylnatým s následným odstránením interferujúcich kyslých zlúčenín uhličitanom sodným.

3. Použité prístroje

Váhy,
Trepačka,
pH meter,
Rotačná vákuová odparka,
Deliace lieviky,
Filtračné lieviky,
Filtračné papiere,

4. Zoznam chemikálií

Octan etylnatý p.a.,
Redestilovaná voda upravená na pH=4 ľadovou kys. octovou,
Ľadová kys.octová,
Uhličitan sodný (Na_2CO_3) 1,5% vodný roztok,
Bezvodý síran sodný (Na_2SO_4),
Acetonitril g.g.

5. Príprava štandardov

Zásobný roztok sa pripraví s koncentráciou 0,5 mg/L v octane etylnatom, prípadne v dichlórmetáne. Udržiava sa v mrazničke v tme. Pracovné roztoky sa pripravia odparením vypočítaného objemu zásobného roztoku patulínu v octane etylnatom a rozpustením v deionizovanej vode pH=4 tak, aby po rozpustení bola jeho výsledná koncentrácia 10, 100, 200, 500, 800 a1000 μg/L.

6. Príprava vzoriek

jablká,detské výživy, drene, džúsy:

10 g zhomogenizovanej vzorky sa extrahuje 20 ml octanu etylnatého po dobu 15 min. Vrstva octanu etylnatého sa zleje do deliaceho lievika a extrakcia sa zopakuje ešte raz. K spojeným extraktom v deliacom lieviku sa pridá 4 ml 1,5 % roztoku uhličitanu sodného a dobre krátko pretrepe (cca. 0,5 min-patulín je nestabilný v alkalickom prostredí, preto sa pracuje v tomto kroku čo najrýchlejšie). Po oddelení vrstiev sa zleje spodná vodná vrstva do deliaceho lievika a horná octanová sa zleje cez filtračný papier s bezvodým síranom sodným do polguľovej banky. Vodná vrstva sa opakovane vytrepe s 10 ml octanu etylnatého a po oddelení vrstiev sa spodná vrstva vyleje do odpadu. Horná vrstva sa prilejeme cez bezvodý síran sodný do polguľovej banky k prvému extraktu. Síran sodný na filtračnom papieri sa ešte

opláchne malým množstvom octanu etylnatého. Spojené extrakty sa odparia na rotačnej vákuovej odparke dosucha a rozpustia v 1 ml mobilnej fázy.

Príprava džúsov a ovocných koncentrátov pre potvrdenie patulínu na kolónke MYCOSEP PATULIN:

Ovocné koncentráty:

K 2,5 ml koncentrátu sa do tmavej banky pridá 10 ml zmesi acetonitril/voda (84/16 v/v) a dobre sa pretrepe(na trepačke cca 15 min, na Vortex mixéri 5 min). Vrstvy sa nechajú oddeliť.

Džúsy:

K 2,5 ml koncentrátu sa do tmavej banky pridá 10 ml acetonitrilu a dobre sa pretrepe (na trepačke cca 15 min, na Vortex mixeri 5 min). Vrstvy sa nechajú oddeliť.

Odmeria sa množstvo hornej vrstvy (cca 11,5 ml) a zaznačí sa. Z tejto vrstvy sa odoberie 8 ml a prenesie do skúmavky v kyte. Patulínová kolónka sa gumeným červeným koncom nasadí na vrchný otvor skúmavky a pomaly ručne sa vzorka pretlačí cez sorbent kolónky do hornej časti (nezakrývať vrch kolónky prstami). Čas prechodu vzorky kolónkou nesmie byť menší ako 60 sec! Z prečistenej vzorky sa odoberie 4 ml, ktoré sa odparia na rotačnej vákuovej odparke pri 60 °C dosucha. Odparok sa rozpustí v 1 ml mobilnej fázy.

7. Podmienky stanovenia

Kolóna: Chromolith Performance RP-18e (100x4,6 mm, Merck)
Mobilná fáza: **:**A:redestilovaná voda pH=4 (acetic acid)
B: acetonitril

Prietok mobilnej fázy: 1,2 ml / min
Detekcia: DAD (276,20) (450,50) nm
Teplota: laboratórna
Injekovaný objem: 25 ul.

CH 8.11. Stanovenie Patulínu metódou HPLC

1. Určenie metódy

Metóda je určená na stanovenie patulínu v ovocných a zeleninových výrobkoch a v surovinách.

2. Princíp metódy

Pripravená vzorka sa delí na chromatografickej kolóne s reverznou fázou. Patulín sa stanovuje kvapalinovou chromatografiou s UV/VIS detektorom alebo s detektorom diódového poľa.

3. Pomôcky

3.1. Prístroje a zariadenia

- HPLC zariadenie s UV/VIS detektorom alebo s detektorom diódového poľa
- separačná kolóna
- analytické váhy
- laboratórne sklo: deliaci lievik, Erlemayerove banky, pipety
- rotačná vákuová odparka
- filtračné disky

3.2. Chemikálie a roztoky

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

- voda pre HPLC
- acetonitril pre HPLC (ACN)
- octan etylnatý p. a.
- uhličitan sodný p. a.
- síran sodný bezvodý p.a.
- 20 % roztok kyseliny sírovej p. a.
- kyselina octová p.a.
- okyslená voda na pH 4,0; upravená kyselinou octovou
- štandard patulínu
- kyselina chloristá p.a. 60%
- chloramín 1% roztok
- acetón
- dekontaminačný roztok: 5 l vody + 300 ml 1% roztoku chloramínu + 200 ml acetónu

4. Pracovný postup

4.1. Príprava vzorky

Vzorka určená na analýzu sa pripraví podľa nariadenia ES č. 401/2006 (poraviny).

V prípade jablkovej šťavy odvážime 10 g zhomogenizovanej vzorky a kvantitatívne prenesieme do deliaceho lievika. Patulín extrahujeme 20 ml octanu etylnatého a intenzívne pretrepávame 2 minúty. Vrstvu octanu etylnatého prelejeme do sklenej kadičky. Tento postup opakujeme ešte dvakrát. Spojené vrstvy octanu etylnatého prelejeme do deliaceho lievika. Pridáme 4 ml 1,5% roztoku uhličitanu sodného. Po intenzívnom pretrepaní sa oddelí vodná vrstva od organickej. Extrakcia musí byť urobená rýchlo, vzhľadom na nestálosť patulínu v alkalickom prostredí. Vodnú vrstvu premyjeme 10 ml octanu etylnatého. K spojeným octanovým extraktom pridáme 5 kvapiek koncentrovanej kyseliny octovej, pretrepeme. Spojené vrstvy octanu etylnatého prelejeme cez 30g stĺpec síranu sodného bezvodého. Stĺpec síranu sodného bezvodého premyjeme 20ml octanu etylnatého. Filtrát sa zachytáva do destilačnej banky a pomocou vákuovej rotačnej odparky pri teplote 45 ^{o}C sa odparí do sucha. Suchý odparok rozpustíme v 5 ml octanu etylnatého, kvantitatívne prenesieme do 10 ml destilačnej banky a odparíme do sucha. Suchý odparok rozpustíme v 1-2 ml zmesi mobilnej fázy a 20 % roztoku kyseliny sírovej v pomere 50 : 50.Vzorku prefiltrujeme cez filtračný krúžok . Takto je vzorka pripravená na nástrek na separačnú kolónu.

V prípade tuhej vzorky (ako jablká, detská výživa) navážime 10 g zhomogenizovanej vzorky do 100 ml Erlenmayerovej banky. Pridáme 20 ml octanu etylnatého a intenzívne pretrepávame 2 minúty. Vrstvu octanu etylnatého prelejeme do sklenej kadičky. Tento postup opakujeme ešte dvakrát. Spojené vrstvy octanu etylnatého prelejeme do deliaceho lievika. Pokračujeme ako v predošlom prípade.

4.2. Príprava merania

So štandardom patulínu pracujeme podľa odporúčania výrobcu.

Odporúčaná koncentrácia pracovných roztokov patulínu je 0,025 mg/l, 0,05 mg/l, 0,1 mg/l, 0,3 mg/l , 0,5 mg/l , 1 mg/l.
Pred meraním premyjeme kolónu 20 minút zmesou vody a acetonitrilom (50% : 50%) a potom 20 minút mobilnou fázou. Po každom nástreku vzorky premyjeme kolónu acetonitrilom. Po ukončení prác premyjeme kolónu 20 minút zmesou vody a acetonitrilu (50% : 50%) a 20 minút acetonitrilom.

4.3. Meranie

Vzorky sa analyzujú po ustálení HPLC systému .
V každej sade sa meria kalibračná krivka, vzorky a kontrolná vzorka na výťažnosť.

5. Vyhodnotenie nameraných údajov

Výpočet sa robí na základe metódy vonkajšieho štandardu integráciou plôch píkov alebo meraním výšok píkov po zohľadnení elučných časov, spektrálnej zhody a linearity kalibračnej krivky. Pri výpočte sa zohľadní prípadný zrieďovací faktor. Koncentrácia vzorky sa prepočíta na stanovenú výťažnosť.

5.1. Spracovanie nameraných hodnôt

Obsah patulínu vo vzorke sa vypočíta podľa nasledujúcej rovnice:

$$X = \frac{c \cdot F}{n}$$

X - obsah analytu vo vzorke v ug/kg
c - koncentrácia meraného roztoku v ng/ml
V - konečný objem meraného roztoku v ml
n - návažka vzorky v g
F - prepočítavací faktor

Za podmienok metódy V = 1 ml, F = 1 ak V=2 ml, F = 2.

5.2. Interpretácia nameraných vysledkov.

Výsledok koncentrácie patulínu vo vzorke sa porovná s platnou legislatívou. Do protokolu sa uvedie nameraná hodnota prepočítaná na výťažnosť s príslušnou neistotou merania, aká bola zistená pri validácii metódy.

6. Literatúra

STN EN 14177 – Stanovenie patulínu v čírej a zakalenej jablkovej šťave a v jablkovom pyré. Metóda HPLC s prečistením extrakciou kvapalina-kvapalina.

Nariadenie komisie (ES) č. 1881/2006 z 19. decembra 2006, ktorým sa ustanovujú maximálne hodnoty obsahu niektorých kontaminantov v potravinách.

Nariadenie komisie (ES) č. 401/2006 z 23. februára 2006, ktorým sa stanovujú metódy odberu vzoriek a analytické metódy na úradnú kontrolu hodnôt mykotoxínov v potravinách.

CH 8.11.
STANOVENIE PATULÍNU METÓDOU HPLC / DAD

1 PRINCÍP METÓDY

Vzorka sa extrahuje etylacetátom, extrakt sa následne odparí a rozpustí vo vode. Analyzuje sa na chromatografickej kolóne so zakotvenou reverznou fázou. Meranie sa realizuje DAD detektorom pri vlnovej dĺžke 275nm.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie patulínu v ovocných nápojoch, nektároch, koncentrátoch a výrobkoch z ovocia.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 patulín 100 µl/ml štandard
3.1.2 HMF – (hydroxymetyl)furan-2-carbaldehyd
3.1.3 acetonitril
3.1.4 etylacetát for gas chromatography
3.1.5 uhličitan sodný dekahydrát
3.1.6 deionizovaná voda
3.1.7 chloramín
3.1.8 acetón
3.1.9 deionizovaná voda

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 1,5% uhličitan sodný (navážiť 1,5g uhličitanu sodného (3.1.5) do 100ml odmernej banky a doplniť deionizovanou vodou (3.1.8) po rysku).
3.2.2 10% chloramín (navážiť 100g chloramínu (3.1.8), rozpustiť v destilovanej vode (3.1.10) a doplniť do objemu 1 l).
3.2.3 5% acetón (25ml acetónu (3.1.9) nariediť do objemu 500ml s destilovanou vodou (3.1.10)).

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobný roztok štandardu patulínu
Zásobný roztok patulínu (3.1.1) má koncentráciu analytu 100 mg/l.

3.3.2 Zásobný roztok štandardu HMF (1000mg/l v acetonitrile)
Navážiť 10 mg HMF (3.1.2) do 10 ml odmernej banky. Banku doplniť po značku acetonitrilom (3.1.3).

3.3.3 Základný roztok štandardu patulínu **ZR1** (1 mg/l)
Do 10 ml odmernej banky napipetovať 100µl zo zásobného roztoku patulínu (3.1.1) a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.8).

3.3.4 Základný roztok štandardu HMF **ZR2** (1 mg/l)
Do 25 ml odmernej banky napipetovať 25µl zo zásobného roztoku HMF (3.1.1) a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.8).

3.3.5 Kalibračné roztoky

Napipetovať do 10 ml odmerných baniek objemy základného roztoku patulínu ZR1 a HMF ZR2 podľa tabuľky 1 a doplniť deionizovanou vodou (3.1.7) po rysku.

Tabuľka 1 Príprava kalibračných roztokov patulínu

Koncentrácia patulínu a HMF (µg/l)	**Označenie roztoku**	**Prídavok zo základného roztoku ZR1 (ml)**	**Prídavok zo základného roztoku ZR2 (ml)**
10	**P1**	0,1	0,1
25	**P2**	0,25	0,25
50	**P3**	0,5	0,5
75	**P4**	0,75	0,75
100	**P5**	1	1

3.4 Dekontaminácia

Sklo dekontaminovať ponorením do roztoku 10% chloramínu (3.2.5) najmenej na 30 minút, potom do roztoku 5% acetónu (3.2.6) na 30minút. Potom starostlivo prepláchnuť destilovanou vodou (3.1.10). Sklo následne umyť štandardným postupom ako laboratórne sklo.
Reagencie dekontaminovať vyliatím do 10% roztoku chloramínu (3.2.5), po 30 minútach pridať roztok 5% acetónu (3.2.6). Zberať do zberných nádob.

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 kvapalinový chromatograf AGILENT s DAD detektorom
4.2 trepačka
4.3 striekačka 25 µl Hamilton
4.4 Vortex
4.5 laboratórne odmerné sklo
4.6 laboratórna odstredivka
4.7 laboratórny mixér
4.8 sklenená vata

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Predpríprava vzoriek

5.1.1 Homogenizácia vzoriek

Ak ide o tekuté vzorky, dôkladne premiešať, ak ide o vzorky polotekutej alebo tuhej konzistencie dôkladne rozmixovať v laboratórnom mixéri a premiešať.

5.2 Príprava vzoriek pre kontrolu kvality merania

5.2.1 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovanej vzorky

Na prípravu vzoriek sa použijú negatívne matrice. Fortifikované vzorky sa fortifikujú na úrovni ustanoveného MRL:
Ovocné nápoje, nektáre a koncentráty : 50µg/kg
Polotekuté a tuhé výrobky z ovocia : 25µg/kg
Potraviny z ovocia pre dojčatá a malé deti : 10µg/kg
Navážiť 5 g zhomogenizovanej vzorky. Pridať štandard patulínu o koncentrácii 1 mg/l (3.1.7) podľa tabuľky 2. Premiesať na Vortexe. Nechať postáť 15 minút a pokračovať podľa procedúry 5.3.2.

Tabuľka 2 Príprava negatívnej a fortifikovanej vzorky pre stanovenie patulínu

Komodita	**MRL (µg/kg)**	**Koncentrácia patulínu vo vzorke (µg/kg)**	**Prídavok zo základného štandardu patulínu (ml)**	**Konečný objem pridanej deionizovanej vody (ml)**
Negatívna vzorka		0	0	podľa zvolenej matrice
Ovocné nápoje, nektáre a koncentráty	50	50	0,25	5
Polotekuté a tuhé výrobky z ovocia	25	25	0,125	2,5
Potraviny z ovocia pre dojčatá a malé deti	10	10	0,05	0,5

5.3 Príprava vzoriek

5.3.1 Predpríprava vzorky pre stanovenie patulínu

Navážiť 5 g zhomogenizovanej vzorky (5.1.1).

5.3.2 Príprava vzorky pre stanovenie patulínu

Pridať 10ml etylacetátu (3.1.4), dať na trepačku na 20 min a nechať postáť 5 min. Organickú vrstvu odobrať. Organickú vrstvu a extrahovať 1,5% uhličitanom sodným (3.2.1), premiešať na Vortexe a nechať postáť 10 min. Odobrať vrchnú vrstvu. Extrakt prefiltrovať cez sklenenú vatu a opláchnuť 2ml etylacetátom (3.1.3). Odpariť a rozpustiť v 0,5ml deionizovanej vody. U negatívnej a fortifikovanej vzorky rozpustiť v objeme podľa tabuľky 2.

Poznámka 1: V prípade, že sa vzorka koncentračne vymyká z rozsahu meranej kalibračnej krivky je pri opakovanom meraní upravená tak, aby koncentračne spadala do kalibračného rozsahu.

5.4 Chromatografická analýza

LC-podmienky

chromatografická kolóna C-18, 125mm

mobilná fáza :
A – acetonitril isocratic (3.1.2)
B - deionizovaná voda (3.1.7)
prietok: 0,5 ml/min.
nástrek: 20 µl
DAD detekcia
vlnová dĺžka 275 nm
Gradientová elúcia

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.

$$C_V = C_S \cdot R \quad \text{(mg/kg)}$$

C_V - koncentrácia analytu v mg/kg

C_S - koncentrácia analytu určená z kalibračnej krivky (mg/l)

R - stupeň riedenia

7 LITERATÚRA

1. Official Methods of analysis of AOAC International 18th edition, (2005), Chapter 49., p. 69-73, Method 995.10: patulin in apple juice, Method 2000.02: Patulin in clear and cloudy apple juice and apple puree
2. Journal of chromatography A 847 (1999), Vural Gokmen, Jale Acar, Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and patulin in Apple juice by reversed-phase liquid chromatography, p. 69-74

8 ZOZNAM SKRATIEK

HMF –hydroxymetylfurfural
HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
DAD – diode array detektor
MRL – maximálny reziduálny limit