CH 8.2.a.
Stanovenie ochratoxínu A metódou HPLC/FLD

1 PRINCÍP METÓDY

Ochratoxín A sa extrahuje zo vzorky zmesou acetonitril-voda, extrakt sa prečisťuje na imunoafinitnej kolónke a následne analyzuje metódou vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie na chromatografickej kolóne so zakotvenou reverznou fázou a deteguje fluorescenčnou detekciou . Vyhodnotenie sa prevedie formou externej kalibrácie.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie ochratoxínu v cereáliach, obilovinách, výrobkoch z obilia, káve, sušenom ovocí, ryži, kakau, koreninách, v pive, víne, kŕmnych zmesiach a pečeni.
Rozsah metódy je uvedený vo validačnom liste.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 Acetonitril, gradient grade p.a.
3.1.2 Metanol, gradient grade
3.1.3 kyselina octová, ľadová
3.1.4 hydrogénuhličitan sodný p.a.
3.1.5 $Na_2HPO_4.12H_2O$ p.a.
3.1.6 $NaH_2PO4.2H_2O$ p.a.
3.1.7 NaCl p.a.
3.1.8 hydroxid sodný p.a.
3.1.9 štandard ochratoxín A 1000ng/ml,
3.1.10 deionizovaná voda
3.1.11 chloramín
3.1.12 acetón p.a.
3.1.13 destilovaná voda
3.1.14 Tween 20

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 riediaci roztok - metanol : kyselina octová : voda /49:1:50/ (do 1000 ml odmernej banky preniesť 490 ml metanolu (3.1.2), 10 ml kyseliny octovej (3.1.3) a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.10)), pripravovať vždy čerstvý.

3.2.2 1 % roztok hydrogénuhličitanu sodného - navážiť 1 g hydrogénuhličitanu sodného (3.1.4) do 100 ml odmernej banky a doplniť po rysku destilovanou vodou (3.1.13), pripravovať vždy čerstvý.

3.2.3 extrakčná zmes - acetonitril : voda /60:40/
do 500 ml odmernej banky preniesť 300 ml acetonitrilu (3.1.1) a doplniť po rysku destilovanou vodou (3.1.13), roztok pripravovať vždy čerstvý.

3.2.4 PBS pufer, pH 7.4 - navážiť 7,15 g $Na_2HPO_4.12H_2O$ (3.1.5) + 0,65 g $NaH_2PO_4.2H_2O$ (3.1.6) a 8,7 g NaCl (3.1.7) do 1 l odmernej banky a doplniť po značku s deionizovanou vodou (3.1.10) (pH neupravovať!), doba expirácie : 1mesiac.

3.2.5 2M NaOH - navážiť 8g NaOH (3.1.8), rozpustiť v destilovanej vode (3.1.13), preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po rysku destilovanou vodou (3.1.13)), doba expirácie: 1mesiac.

3.2.6 elučný roztok - kyselina octová : metanol /2:98/ (do 100 ml odmernej banky napipetovať 2 ml kyseliny octovej (3.1.3) a doplniť po rysku metanolom (3.1.2)), pripravovať vždy čerstvý.

3.2.7 mobilná fáza - acetonitril : voda : kyselina octová (51:47:2)
do 1000 ml odmernej banky preniesť 510 ml acetonitrilu (3.1.1), 20 ml kyseliny octovej (3.1.3) a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.10)), doba expirácie: 1mesiac.

3.2.8 10% chloramín - navážiť 100g chloramínu (3.1.11), rozpustiť v destilovanej vode (3.1.13)a doplniť do objemu 1 l

3.2.9 5% acetón - 25ml acetónu (3.1.12) nariediť do objemu 500ml s destilovanou vodou (3.1.10)

3.2.10 extrakčná zmes káva - metanol : 1% hydrogénuhličitan sodný (70:30)
do 500ml odmerného valca preniesť 350ml metanolu(3.1.2) a doplniť po rysku 1% hydrogénuhličitanom sodným(3.2.2)

3.2.11 0,01% Tween 20 v PBS - Tween 20(3.1.14) nahriať aby skvapalnel, do 1000 ml odmernej banky preniesť približne 500ml PBS pufra(3.2.4), pridať 100µl Tweenu 20(3.1.14) a doplniť po rysku PBS pufrom(3.2.4).

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Základný roztok štandardu ochratoxínu A **ZR1** (5 µg/l v riediacom roztoku)
Do 25 ml odmernej banky napipetovať 125 µl roztoku OCHR (3.1.8) a doplniť po rysku riediacim roztokom metanol: kyselina octová: voda (49:1:50) (3.2.1). Pripravovať vždy čerstvý.

3.3.2 Kalibračné roztoky
Napipetovať do 10 ml odmerných baniek objemy podľa tabuľky 1 a doplniť riediacim roztokom metanol : kyselina octov : voda (49:1:50) (3.2.1) po rysku.

Tabuľka 1 Príprava kalibračných roztokov ochratoxínu A

Koncentrácia OCHR (µg/l)	Označenie roztoku	Prídavok zo základného roztoku ZR1 (ml)
0,5	**OCH1**	1
1	**OCH2**	2

1,5	**OCH3**	3
2	**OCH4**	4
5	**OCH5**	10

Kalibračné roztoky ochratoxínu A pripravovať vždy čertstvé pred každým meraním.

3.4 Dekontaminácia

Sklo dekontaminovať ponorením do roztoku 10% chloramínu (3.2.8) najmenej na 30 minút, potom do roztoku 5% acetónu(3.2.9) na 30minút. Potom starostlivo prepláchnuť destilovanou vodou. Sklo následne umyť štandardným postupom ako laboratórne sklo.
Reagencie dekontaminovať vyliatím do 10% roztoku chloramínu (3.2.8), po 30minútach pridať roztok 5% acetónu (3.2.9). Zberať do zberných nádob.

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

Ovládanie prístrojov a zariadení je uvedené v ŠPP č.1.2.01 CH

4.1 kvapalinový chromatograf s fluorescenčným detektorom
4.2 homogenizátor Ultraturax
4.3 ultrazvukový kúpeľ
4.4 50 µl striekačka Hamilton
4.5 automatické pipety
4.6 odmerné labotatórne sklo
4.7 filtračný papier
4.8 imunoafinitné kolónky
4.9 mixér

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Predpríprava vzoriek

Vzorky dôkladne zhomogenizovať v celom objeme dodanej vzorky.
Vzorku pečiva a chleba zvážiť, vysušiť do konštantnej hmotnosti v sušiarni pri teplote 105°C a znovu zvážiť. Vyrátať sušinu. Vzorku navážiť zo zhomogenizovanej vysušenej vzorky.
Vzorku krmiva zhomogenizovať, navažovať zo zhomogenizovanej vzorky. Stanoviť sušinu.
Ak má vzorka po zomletí veľkú hustotu, treba pridať k vzorke známy objem vody (3.1.13) najlepšie v pomere 1:1 a zhomogenizovať ju v celom objeme. O toto množstvo znížiť obsah vody pri extrakcii. Vzorky sušeného ovocia môžeme do tohto objemu vopred namočiť a až potom homogenizovať.

5.2 Príprava vzorky pre kontrolu kvality merania

5.2.1 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovanej vzorky kávy

Na prípravu vzoriek sa používaje negatívna matrica. Vzorka kávy je fortifikovaná na úrovni ustanoveného MRL (5µg/kg pražená káva, 10µg/kg instantná káva).

Navážiť 20 g zhomogenizovanej vzorky praženej kávy alebo 20 g zhomogenizovanej vzorky instantnej kávy do odmerného valca, pridať štandardný roztok ochratoxínu A 1000ng/ml

(OCHR) (3.1.9) podľa tabuľky 2. Zmixovať na Vortexe. Nechať postáť 15 minút. Extrakciu vzorky a prečistenie extraktu vykonať podľa 5.3.5 a prečistenie extraktu podľa 5.4.2.1.

Tabuľka 2 Príprava negatívnej a fortifikovaných vzoriek kávy

Komodita	**Koncentrácia ochratoxínu A vo vzorke kávy (µg/kg)**	**Prídavok štand. roztoku OCHR (µl)**
pražená a instantná káva	0	0
pražená káva	5	100
instantná káva	10	200

5.2.2 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovanej vzorky výrobkov z obilia

Na prípravu vzoriek sa používa negatívna matrica. Vzorka výrobku z obilia je fortifikovaná na úrovni ustanoveného MRL (3µg/kg).

Navážiť 50 g zhomogenizovanej vzorky výrobku z obilia do vysokej kadičky, pridať štandardný roztok ochratoxínu A 1000ng/ml (OCHR) (3.1.9) podľa tabuľky 3. Zmixovať na Vortexe. Nechať postáť 15 minút. Pridať 200 ml extrakčnej zmesi acetonitril-voda (60:40) (3.2.3) a premiešať na Ultraturaxe (4.9) 3 min. Extrakt prefiltrovať cez Whatman No.4. 5 ml filtrátu doplniť do objemu 50ml PBS pufrom (3.2.4). Ďalej sa pokračuje podľa bodu 5.4. Prečistenie extraktov.

Tabuľka 3 Príprava negatívnej a fortifikovanej vzorky výrobkov z obilia

Koncentrácia ochratoxínu A vo vzorke výrobku z obilia (µg/kg)	**Prídavok štand. roztoku OCHR (µl)**
0	0
3	150

5.2.3 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovanej vzorky hrozienok

Na prípravu vzoriek sa používa negatívna matrica. Vzorka výrobku z obilia je fortifikovaná na úrovni ustanoveného MRL (3µg/kg).

Navážiť 100 g zhomogenizovanej vzorky hrozienok (homogenizácia s vodou 1:1, t.z. že vzorka obsahuje 50g vody) do vysokej kadičky, pridať štandardný roztok ochratoxínu A 1000ng/ml (OCHR) (3.1.9) podľa tabuľky 4. Zmixovať na Vortexe. Nechať postáť 15 minút. Pridať 120 ml acetonitrilu a 30ml vody (kvôli odpočítaniu vody z homogenizácie vzorky) a premiešať na Ultraturaxe (4.9) 3 min. Extrakt prefiltrovať cez Whatman No.4. minimálne 5 ml filtrátu doplniť do objemu 50ml PBS pufrom (3.2.4). Ďalej sa pokračuje podľa bodu 5.4. Prečistenie extraktov.

Tabuľka 4 Príprava negatívnej a fortifikovanej vzorky hrozienok

Koncentrácia ochratoxínu A vo vzorke hrozienok (µg/kg)	**Prídavok štand. roztoku OCHR (µl)**
0	0
3	150

5.2.4 Príprava negatívnej vzorky korenín , najmä papriky

Na prípravu vzoriek sa používa negatívna matrica. Vzorka korenín je fortifikovaná na úrovni 25µg/kg.

Navážiť 10 g zhomogenizovanej vzorky korenín do vysokej kadičky, pridať štandardný roztok ochratoxínu A 1000ng/ml (OCHR) (3.1.9) podľa tabuľky 5. Zmixovať na Vortexe. Nechať postáť 15 minút. Pridať 100 ml extrakčnej zmesi acetonitril-voda (60:40) (3.2.3) a premiešať na Ultraturaxe (4.9) 3 min. Extrakt prefiltrovať cez Whatman No.4. 5 ml filtrátu doplniť do objemu 50ml PBS pufrom (3.2.4). Ak sa po pridaní PBS obsah v banke zakalí tento treba celý od centrifugovať . Ďalej sa pokračuje podľa bodu 5.4.2.2. Prečistenie extraktov.

Tabuľka 5 Príprava negatívnej a fortifikovanej vzorky korenín , najmä papriky

Koncentrácia ochratoxínu A vo vzorke výrobku z obilia (µg/kg)	**Prídavok štand. roztoku OCHR (µl)**
0	0
25	1250

5.3 Príprava vzorky

5.3.1 Cereálie, kŕmne zmesi, obiloviny, výrobky z obilia, zelená káva, pečeň
Navážiť 50 g zhomogenizovanej vzorky , pridať 200 ml extrakčnej zmesi : acetonitril-voda (60:40)(3.2.3). Vzorku s extrakčnou zmesou premiešať po dobu 3 min. na Ultraturaxe(4.9). Prefiltrovať cez Whatman No.4.
Zobrať 5 ml filtrátu a doplniť do objemu 50 ml PBS pufrom (pH=7,4)(3.2.4). Ak je potrebné, tak opäť supernatant prefiltrovať (v tom prípade, ak sa vytvorí zrazenina). Pokračovať podľa bodu 5.4. Prečistenie extraktov .

5.3.2 Koreniny, najmä paprika
Navážiť 10 g zhomogenizovanej vzorky, pridať 100 ml extrakčnej zmesi acetonitril : voda (60:40)(3.2.3). Vzorku s extrakčnou zmesou premiešať po dobu 3 min. na Ultraturaxe (4.9). Prefiltrovať cez Whatman No.4.
Zobrať 5 ml filtrátu a doplniť do objemu 50 ml PBS pufrom (pH=7,4)(3.2.4). Ak je potrebné, tak opäť supernatant prefiltrovať (v tom prípade, ak sa vytvorí zrazenina). Pokračovať ďalej podľa bodu 5.4.2.2 Ručné prečistenie extraktov .

5.3.3 Pivo
Odplyniť na ultrazvukovom kúpeli 150 ml piva po dobu asi 20 minút. pH vzorky upraviť použitím 2 M NaOH (3.2.5) na hodnotu 7,2. Pokračovať podľa bodu 5.4.1 Prečistenie extraktov.

5.3.4 Víno
Napipetovať 15 ml vína a doplniť PBS pufrom (3.2.4) do objemu 50 ml. Pokračovať podľa bodu 5.4.1 Prečistenie extraktov.

5.3.5 Pražená káva, instantná káva, capuccino
Navážiť 20 kávy, pridať 100ml extrakčného roztoku metanol-1%hydrogénuhličitan sodný(3.2.10). Premiešať na Ultraturaxe (4.9) 3minúty. Prefiltrovať cez Whatman 4. Zobrať 5ml filtrátu, nariediť na objem 50 ml s 0,01%Tween-PBS(3.2.11). Pokračovať ďalej podľa bodu 5.4.2.1. Ručné prečistenie extraktov kávy

5.3.6 Hrozienka a sušené ovocie
Navážiť 50 g zhomogenizovanej vzorky (ak bola pri homogenizácií vzorky pridaná voda navážiť tak aby v homogénnej zmesi bolo 50g) , pridať 200 ml extrakčnej zmesi : acetonitril-voda (60:40)(3.2.3) (ak bola pri homogenizácií vzorky pridaná voda o túto znížiť jej objem v extrakčnej zmesi). Vzorku s extrakčnou zmesou premiešať po dobu 3 min. na Ultraturaxe (4.9). Prefiltrovať cez Whatman No.4.
Zobrať 5 ml filtrátu a doplniť do objemu 50 ml PBS pufrom (pH=7,4)(3.2.4) v odmernej banke. Ak je potrebné, tak opäť supernatant prefiltrovať (v tom prípade, ak sa vytvorí zrazenina), alebo od centrifugovať. Pokračovať podľa bodu 5.4.1 Prečistenie extraktov .

5.4 Prečistenie extraktov

5.4.1 Ručné prečistenie extraktov

Pri ručnom kvapkaní kalibračného roztoku ochratoxínu A cez imunoafinitnú kolónku napipetovať 3 ml kalibračného roztoku OCH4 (2µg/l) do odmerného valca, pridať PBS pufer (3.2.4) do objemu 40 ml. Aplikovať sa na kolónku 40 ml zriedeného kalibračného roztoku, ďalej postupovať presne tak, ako u vzorky v bode 5.4.1.

5.4.1.1 Ručné prečistenie extraktov kávy
Extrakty praženej a instantnej kávy sa kvapkajú cez immunoafinitnú kolónku OCHRAPREP vždy ručne nasledovným postupom:

50ml nariedeného extraktu kávy (celý objem)
20ml roztoku 0,01%Tween-PBS(3.2.11)
10ml PBS(3.2.4)
elúcia: 1,5ml metanol-kys.octová (98:2)
1,5ml deionizovanej vody
Vzorka je 3x riedená.

5.4.1.2 Ručné prečistenie extraktov korenín
Extrakty korenín sa kvapkajú cez immunoafinitnú kolónku OCHRAPREP vždy ručne nasledovným postupom:

40ml z nariedeného extraktu korenín (50ml)
20ml roztoku 0,01%Tween-PBS(3.2.11)
10ml PBS(3.2.4)
elúcia: 1,5ml metanol-kys.octová (98:2)
1,5ml deionizovanej vody
Vzorka je 7,5x riedená.

5.5 Chromatografická analýza

Chromatografická kolóna LC-18, 25 cm x 4.6 mm

teplota kolóny 30 ^{o} C
MF : ACN: H_2O : kyselina octová (51:47:2 v/v)(3.2.7)
prietok 1 ml/min.
Fluorescenčný detektor: excitačná vlnová dĺžka 333nm
emisná vlnová dĺžka 444 nm
nástrek: 50 μl

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.

$$C_V = \frac{C_S \cdot A_V}{As} \cdot R \qquad (mg/kg)$$

C_V - koncentrácia analytu v mg/kg
C_S - koncentrácia štandardu (mg/l)
A_V - plocha píku analytu u vzorky
A_S - plocha píku analytu u kal. roztoku
R - stupeň riedenia

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

7 LITERATÚRA

1. Rhone-Poulenc methods for OCHRAPREP P14/VI/15 May 1996
2. Nariadenie Komisie (ES) č. 401/2006
3. STN 56 0511 Požívatiny; Stanovenie ochratoxínu A v cereáliách a cereálnych výrobkoch, časť 1, časť 2, 2001

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 8.2.a. Stanovenie Ochratoxínu A v požívatinách a v krmivách metódou HPLC

1 Určenie metódy

Skúšobná metóda je použiteľná na stanovenie ochratoxínu A v požívatinách a v krmivách.

2 Princíp metódy

Ochratoxín A sa zo vzorky vyextrahuje extrakčným činidlom, extrakt sa prefiltruje, filtrát sa prečistí na imunoafinitnej čistiacej kolónke a analyzuje sa vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou s použitím fluorescenčného detektora.

3 Pomôcky

3.1 Prístroje a zariadenia

- laboratórne sklo: odmerné valce, odmerné banky, pipety, sklenené lieviky, Erlenmayerove banky, vialky
- analytické váhy
- laboratórna trepačka
- turbomixér
- vákuové zariadenie na imunoafinitné kolónky
- filtračný papier
- filtračný papier so sklenenými vláknami
- plastové striekačky o objeme 50 ml
- imunoafinitné kolónky
- pH meter

3.2. Chemikálie a roztoky

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

- acetonitril, čistota HPLC
- metanol, čistota HPLC
- kyselina octová, čistota HPLC
- hydrogénuhličitan sodný, čistota p.a.
- chlorid sodný, čistota p.a.
- polyetylénglykol, p.a.

- síran sodný, bezvodý, p.a.
- kyselina fosforečná, p.a.
- chloroform, p.a.
- amoniak, p.a.
- Tween 20
- Tween 20, 0,1% roztok v PBS
- redestilovaná voda
- chlóramín
- acetón
- **extrakčné činidlo pre vzorky kávy**: 1% vodný roztok hydrogénuhličitanu sodného
- **extrakčné činidlo pre vzorky vína**: zmesný roztok: 1% polyetylénglykolu a 5 % hydrogénuhličitanu sodného
- **premývací roztok pre vzorky vína**: zmesný roztok: 2,5 % chloridu sodného a 0,5 % hydrogénuhličitanu sodného
- **extrakčné činidlo pre ostatné vzorky (okrem kávy, vína, piva, zemiakov)**: metanol/3% roztok hydrogénuhličitanu sodného (1+1)
- **slaný fosforečnanový tlmivý roztok (PBS)**
- **základný štandard ochratoxínu A o koncentrácii 10 µg/ml**
- **roztok štandardu ochratoxínu A o koncentrácii 1 µg/ml**
- **pracovné roztoky štandardu ochratoxínu A na kalibračné krivky** o koncentráciách: 0,75 ng/ml, 0,5 ng/ml, 0,25 ng/ml, 0,1 ng/ml

Dekontaminácia laboratórneho skla a roztokov obsahujúcich ochratoxín A sa robí alkalickým roztokom pripraveným z 5 l vody, 300 ml chlóramínu a 200 ml acetónu (laboratórne sklo sa umiestni do roztoku najmenej na 6 hodín).

4 Pracovný postup

4.1 Príprava vzorky na analýzu

Vzorka určená na analýzu sa pripraví jedným z postupov uvedených vo Výnose 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 Vzorky kávy

Do sklenenej banky o objeme 250 ml sa naváži 5 g zhomogenizovanej a dobre premiešanej vzorky, zaleje sa 100 ml extrakčného činidla (1% vodný roztok hydrogénuhličitanu sodého) a extrahuje sa v turbomixéri počas 2 minút. Vzorka s extrakčným činidlom sa prefiltruje cez filtračný papier. 20 ml filtrátu sa zriedi 20 ml 0,1% Tweenu 20 v PBS. Celý objem zriedeného filtrátu sa nanesie na vytemperovanú imunoafinitnú kolónku a nechá sa pretiecť kolónkou prietokom 2 až 3 kvapky za sekundu. Po pretečení vzorky sa imunoafinitná kolónka premyje 20 ml 0,1% Tweenu 20 v PBS. Ochratoxín A, zachytený v kolónke, sa vyeluuje do vialky 1,5 ml zmesi metanol/kyselina octová (98/2) a 1,5 ml redestilovanej vody. Takto pripravená vzorka sa analyzuje vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou.

4.3.2 Vzorky vína

Do kadičky o objeme 250 ml sa napipetuje 50 ml vína a pridá sa 50 ml extrakčného činidla: 1% polyetylénglykol/5% hydrogénuhličitan sodný. Vzorka sa extrahuje 30 min na laboratórnej trepačke.

Vytemperovaná imunoafinitná kolónka sa vloží do držiaka kolóniek a aktivuje sa 10 ml slaného tlmivého roztoku PBS, ktorý sa nechá pretiecť cez kolónku. 25 ml vzorky z kadičky sa nanesie na imunoafinitnú kolónku a nechá sa pretiecť kolónkou prietokom 2 až 3 kvapky za sekundu. Po pretečení vzorky sa kolónka premyje 5 ml zmesi: 2,5 % chloridu sodného/0,5 % hydrogénuhličitanu sodného a po pretečení zmesi 5 ml destilovanej vody.

Ochratoxín A, zachytený v kolónke, sa vyeluuje do vialky 1 ml zmesi metanol / kyselina octová (98/2) a 1 ml redestilovanej vody.

Takto pripravená vzorka sa analyzuje vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou.

4.3.3 Vzorky piva

Do kadičky o objeme 250 ml sa napipetuje 50 ml piva a vzorka sa vloží na 30 min na laboratórnu trepačku.

Vytemperovaná imunoafinitná kolónka sa vloží do držiaka kolóniek a aktivuje sa 10 ml slaného tlmivého roztoku PBS, ktorý sa nechá pretiecť cez kolónku. Celý objem vzorky (50

ml) z kadičky sa nanesie na imunoafinitnú kolónku a nechá sa pretiecť cez kolónku. Po pretečení vzorky sa kolónka premyje 20 ml redestilovanej vody. Ochratoxín A, zachytený v kolónke, sa vyeluuje do vialky 1 ml zmesi metanol/kyselina octová (98/2) a 1 ml redestilovanej vody. Takto pripravená vzorka sa analyzuje vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou.

4.3.4 Vzorky zemiakov

Do sklenenej banky o objeme 250 ml sa naváži 25 g rozmixovaných zemiakov, pridá sa 30 g bezvodého síranu sodného, 5 ml zriedenej kyseliny fosforečnej (6,7 ml 85 %-nej kyseliny fosforečnej, sa zriedi redestilovanou vodou na objem 1000 ml) a 60 ml chloroformu. Zmes sa extrahuje na laboratórnej trepačke počas 30 minút a potom sa prefiltruje cez skladaný filtračný papier s 10 g bezvodého síranu sodného do destilačnej banky o objeme 250 ml. Filtrát sa odparí do sucha vo vákuovej rotačnej odparke. Odparok sa rozpustí v 2 x 2 ml acetonitrilu v ultrazvukovom kúpeli a preleje sa do 100 ml kadičky. Destilačná banka sa vymyje 2 x 40 ml tlmivého roztoku a vyleje sa do kadičky s acetonitrilovým podielom. Celý objem (84 ml) sa prefiltruje cez Büchnerov lievik. Filtrát sa nanesie na vytemperovanú a kondiciovanú imunoafinitnú kolónku. Nechá sa pretiecť kolónkou prietokom 2 až 3 kvapky za sekundu a následne sa kolónka premyje 250 ml redestilovanej vody.

Ochratoxín A, zachytený v kolónke, sa vyeluuje do vialky 1 ml zmesi metanol/kyselina octová (98/2) a 1 ml redestilovanej vody.

Takto pripravená vzorka sa analyzuje vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou.

4.3.5 Ostatné vzorky

Do Erlenmayerovej banky o objeme 250 ml sa naváži 10 g zhomogenizovanej a dobre premiešanej vzorky s presnosťou na 0,001 g a zaleje sa 100 ml extrakčného činidla metanol/3 % hydrogénuhličitan sodný (1+1).

Vzorka sa extrahuje 30 min na laboratórnej trepačke a potom sa prefiltruje cez filtračný papier.

Vytemperovaná imunoafinitná kolónka sa vloží do držiaka kolóniek a aktivuje sa 10 ml slaného tlmivého roztoku PBS, ktorý sa nechá pretiecť cez kolónku.

Do kadičky o objeme 150 ml sa napipetuje 20 ml filtrátu (v prípade vzoriek múky a obilnín 40 ml). K filtrátu sa pridá 30 ml (v prípade vzoriek múky a obilnín 60 ml) slaného tlmivého roztoku (PBS). Vzorky múky a obilnín sa prefiltrujú cez filtračný papier so sklenenými vláknami. Na imunoafinitnú kolónku sa nanesie 50 ml zriedenej vzorky s PBS, alebo 50 ml

druhého filtrátu v prípade múky a obilnín a nechá sa pretiecť kolónkou prietokom 2 až 3 kvapky za sekundu. Po pretečení vzorky sa kolónka premyje 15 ml redestilovanej vody.
Ochratoxín A, zachytený v kolónke, sa vyeluuje do vialky 1 ml zmesi metanol/kyselina octová (98/2) a 1 ml redestilovanej vody.
Takto pripravená vzorka sa analyzuje vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou.

4.3.6 Vzorky korenia a koreniacich prípravkov

Do Erlenmayerovej banky o objeme 250 ml sa naváži 5 g zhomogenizovanej a dobre premiešanej vzorky a zaleje sa 100 ml extrakčného činidla metanol/3 % hydrogénuhličitan sodný (1+1).Vzorka sa extrahuje 30 min na laboratórnej trepačke a potom sa prefiltruje cez filtračný papier. Ak je vzorka veľmi jemná, na filtráciu sa použije Büchnerov lievik alebo sa vzorka odstredí.
Vytemperovaná imunoafinitná kolónka sa vloží do držiaka kolóniek a aktivuje sa 10 ml slaného tlmivého roztoku PBS, ktorý sa nechá pretiecť cez kolónku.
Do kadičky o objeme 150 ml sa napipetuje 40 ml filtrátu. K filtrátu sa pridá 60 ml slaného tlmivého roztoku (PBS) a prefiltruje sa cez filtračný papier so sklenenými vláknami. Na imunoafinitnú kolónku sa nanesie 50 ml filtrátu a nechá sa pretiecť kolónkou prietokom 2 až 3 kvapky za sekundu (pomocou vákua). Po pretečení vzorky sa kolónka premyje 15 ml redestilovanej vody.
Ochratoxín A, zachytený v kolónke, sa vyeluuje do vialky 1 ml zmesi metanol/kyselina octová (98/2) a 1 ml redestilovanej vody.
Takto pripravená vzorka sa analyzuje vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou.

5 Vyhodnotenie nameraných údajov

Množstvo Ochratoxínu A (X) v µg/kg sa vypočíta podľa nasledujúcej rovnice:

$$\mathbf{X = c \cdot F}$$

v ktorej:

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

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

5.1 Káva

Riedenie (ml): 100/20/3

100 - objem extrakčného činidla

20 - objem extraktu vzorky nanášaného na kolónu

3 - objem, s ktorým bol analyt vyeluovaný z imunoafinitnej kolónky

m - hmotnosť navážky v g

F = (100.3/20) / m alebo zjednodušene F = 15/m

5.2 Pivo

Riedenie (ml) : 50/2

F= 2/50 = 0,04

2 - objem, s ktorým bol analyt vyeluovaný z imunoafinitnej kolónky

50 - objem vzorky nanesenej na imunoafinitnú kolónku

5.3 Víno a nápoje

Riedenie (ml) : (50 + 50)/25/2

F = 2.2/25 = 0,16

50 - objem vzorky

50 - objem extrakčného činidla

25 - objem vzorky nanesenej na imunoafinitnú kolónku

2 - objem, s ktorým bol analyt vyeluovaný z imunoafinitnej kolónky

5. 4 Ostatné vzorky

Riedenie (ml): 100/20/2

100 - objem extrakčného činidla

20 - objem extraktu vzorky nanášaného na kolónu

2 - objem, s ktorým bol analyt vyeluovaný z imunoafinitnej kolónky

m - hmotnosť navážky v g

F = (100.2/20) / m alebo zjednodušene F = 10/m

6 Literatúra

- STN EN 14132 Požívatiny. Stanovenie Ochratoxínu A v jačmeni a praženej káve. Metóda HPLC s predčistením na imunoafinitnej kolóne
- STN EN 14133 Požívatiny. Stanovenie Ochratoxínu A vo víne a pive. Metóda HPLC s predčistením na imunoafinitnej kolóne
- STN EN ISO 15141-1 Požívatiny. Stanovenie Ochratoxínu A v cereáliách a cereálnych výrobkoch. Časť 1: Metóda vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie s prečistením na silikagéli
- návod na použitie imunoafinitných čistiacich kolóniek
- 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