CH 8.12. a. Stanovenie T 2 toxínu a HT 2 toxínu v požívatinách a v krmivách metódou HPLC

1 Určenie metódy

Skúšobná metóda je použiteľná na stanovenie T2 toxínu a HT2 toxínu v obilninách, v požívatinách a v krmivách.

2 Princíp metódy

T2 toxín a HT2 toxín sa zo vzorky vyextrahuje extrakčným činidlom, extrakt sa prefiltruje, filtrát sa prečistí na imunoafinitnej čistiacej kolónke a analyzuje sa vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou po predkolónovej derivatizácii s použitím fluorescenčného detektora.

3 Pomôcky

3.1 Prístroje a zariadenia

- laboratórne sklo: odmerné valce, odmerné banky, pipety, sklenené lieviky, vialky
- analytické váhy
- mixér
- vákuové zariadenie na imunoafinitné kolónky
- termoblok nastavitelný na teplotu 50°C
- odparovacie zariadenie
- skúmavkový mixér (Vortex)
- filtračný papier
- filtračný papier so sklenenými vláknami
- 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
- metanol
- toluén
- 4-dimetylaminopyridín (DMAP) ((katalyzátor v predkolónovej derivatizácii), roztok o koncentrácii 0,325 µg/µl
- derivatizačné činidlo 1-Antroylnitril (1-AN)
- redestilovaná voda
- chlorid sodný
- chlorid sodný, roztok 2 %
- extrakčné činidlo: metanol/voda 90/10
- základný štandard T2 toxínu o koncentrácii 100 µg/ml, roztok
- základný štandard HT2 toxínu
- roztok štandardu T2 toxínu o koncentrácii 1 µg/ml
- roztok štandardu HT2 toxínu o koncentrácii 100 µg/ml
- roztok štandardu HT2 toxínu o koncentrácii 1 µg/ml
- pracovné roztoky štandardov T2 a HT2 toxínov na kalibračné krivky

4. Bezpečnosť pri práci

Dekontaminácia laboratórneho skla a roztokov obsahujúcich T2 toxín a HT2 toxín sa robí 10% roztokom chlórnanu sodného, pH = 7

5 Pracovný postup

5.1 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).

5.2 Kontrolná vzorka a slepá vzorka

S každou sadou vzoriek sa analyzuje slepá vzorka, čo je kompletný pracovný postup bez vzorky a raz za tri mesiace sa zaraďuje referenčný materiál ako kontrolná vzorka.

5.3 Príprava extraktu vzorky

5.3.1 Vzorky obilnín a potravín

Do sklenenej banky o objeme 250 ml sa naváži 50 g zhomogenizovanej a dobre premiešanej vzorky, pridá sa 5 g chloridu sodného, zaleje sa 250 ml extrakčného činidla a extrahuje sa v mixéri počas 2 minút. Vzorka s extrakčným činidlom sa prefiltruje cez filtračný papier. 10 ml filtrátu sa zriedi 40 ml vody. Zriedený filtrát sa dobre premieša a prefiltruje sa cez filtračný papier so sklenenými vláknami. Imunoafinitná kolónka sa vytemperuje na laboratórnu teplotu, otvorí sa vrchný uzáver a na kolónku sa nasadí striekačka o objeme 50 ml. Z kolónky sa odstráni spodný uzáver, kolónka sa nasadí na vákuové zariadenie na imunoafinitné kolónky a ihneď sa na kolónku nanesie 25 ml pripraveného filtrátu vzorky, ktorý sa nechá pretiecť kolónkou. Po pretečení vzorky sa imunoafinitná kolónka premyje 20 ml vody. T2 toxín a HT2 toxín, zachytené v kolónke, sa opatrne vyeluujú do skúmavky. Na elúciu sa použije 1,5 ml metanolu. Obsah skúmavky sa odparí do sucha pri teplote 50°C pod prúdom vzduchu alebo dusíka. Odparok sa podrobí predkolónovej derivatizácii.

5.3.2 Vzorky krmív

Do sklenenej banky o objeme 250 ml sa naváži 50 g zhomogenizovanej a dobre premiešanej vzorky, pridá sa 5 g chloridu sodného, zaleje sa 250 ml extrakčného činidla a extrahuje sa v mixéri počas 2 minút. Vzorka s extrakčným činidlom sa prefiltruje cez filtračný papier. 10 ml filtrátu sa zriedi 40 ml 2% roztoku chloridu sodného. Zriedený filtrát sa prefiltruje cez filtračný papier so sklenenými vláknami. Imunoafinitná kolónka sa vytemperuje na laboratórnu teplotu, otvorí sa vrchný uzáver a na kolónku sa nasadí striekačka o objeme 50 ml. Z kolónky sa odstráni spodný uzáver, kolónka sa nasadí na vákuové zariadenie na imunoafinitné kolónky a ihneď sa na kolónku nanesie 25 ml pripraveného filtrátu vzorky, ktorý sa nechá pretiecť kolónkou.

Po pretečení vzorky sa imunoafinitná kolónka premyje 20 ml vody. T2 toxín a HT2 toxín, zachytené v kolónke, sa opatrne vyeluujú do skúmavky. Na elúciu sa použije 1,5 ml metanolu. Obsah skúmavky sa odparí do sucha pri teplote 50°C. Odparok sa podrobí predkolónovej derivatizácii.

5.3.3 Predkolónová derivatizácia štandardov

Do vialky sa napipetuje 100 µl roztoku štandardu T2 toxínu alebo HT2 toxínu s koncentráciou 1000 ng/ml a odparí sa do sucha pri teplote 50°C. K odparku štandardu sa pridá 50 µl roztoku DMAP, 50 µl roztoku 1-AN, vialka sa zatvorí a obsah sa premieša v skúmavkovom mixéri (Vortex) počas 1 min. Zmes sa nechá reagovať v termobloku pri teplote 50°C počas 15 min., potom sa ochladí vo vode s ľadom počas 15 min. a odparí sa do sucha pri teplote 50°C v prúde vzduchu alebo dusíka.

Odparok sa rozpustí v 1 ml zmesi acetonitril/voda 70/30 a premieša sa v skúmavkovom mixéri počas 30 sekúnd. Takto pripravený štandard má koncentráciu 100 ng/ml T2 toxínu alebo HT2 toxínu a pripravia sa z neho ďalšie riedenia o koncentráciách 75 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5 ng/ml a 1,0 ng/ml, ktoré sa nastreknú na kolónu.

5.3.4 Predkolónová derivatizácia vzoriek

K odparku vzorky, pripravenému podľa 5.3.1 alebo 5.3.2, sa pridá 50 µl roztoku DMAP, 50 µl roztoku 1-AN, obsah sa premieša v skúmavkovom mixéri (Vortex) počas 1 min. Zmes sa nechá reagovať v termobloku pri teplote 50°C počas 15 min., potom sa ochladí vo vode s ľadom počas 15 min. a odparí sa do sucha pri teplote 50°C .Odparok sa rozpustí v 1 ml zmesi acetonitril/voda 70/30 a premieša sa v skúmavkovom mixéri počas 30 sekúnd. Takto pripravená vzorka sa nastrekne na kolónu.

6 Vyhodnotenie nameraných údajov

Množstvo T2 toxínu alebo HT2 toxínu (X) v µg/kg sa vypočíta podľa nasledujúcej rovnice:

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

v ktorej:

c je množstvo T2 toxínu alebo HT2 toxínu v analyzovanej vzorke, uvedené v chromatograme po zintegrovaní píku, v ng/ml

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

Riedenie (ml): 250/(10+40)/25/1

250 - objem extrakčného činidla

10 - objem filtrátu

40 - objem, ktorým sa riedil filtrát

25 - objem extraktu vzorky nanášaného na kolónu

1 - objem mobilnej fázy, v ktorej bol rozpustený odparok

F = (250.0,04).5 / m alebo zjednodušene F = 50/m

250 – objem extrakčného činidla v ml

0,04 - podiel hodnôt 1/25

5 - násobok riedenia filtrátu, t.j. (10+40)/10

m - hmotnosť navážky v g

7 Literatúra

- 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