CH 8.8.a
Stanovenie zearalenonu metódou HPLC/FLD

1 PRINCÍP METÓDY

Vzorka sa extrahuje zmesou acetonitril – voda, extrakt sa následne prečisťuje na imunoafinitnej kolónke a analyzuje sa na chromatografickej kolóne so zakotvenou reverznou fázou. Meranie sa realizuje metódou kvapalinovej chromatografie s fluorescenčnou detekciou. Vyhodnotenie sa robí metódou externej kalibrácie.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie zearalenonu v obilninách, múke, výrobkoch z múky, v cereáliách a v krmivách.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 acetonitril , gradient grade.
3.1.2 chlorid sodný p.a.
3.1.3 deionizovaná voda
3.1.4 $Na_2HPO_4.12H_2O$ p.a.
3.1.5 $NaH_2PO4.2H_2O$ p.a.
3.1.6 kyselina octová p.a.
3.1.7 štandard: Zearalenon (100 mg/l)
3.1.8 chloramín
3.1.9 acetón p.a.
3.1.10 destilovaná voda

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 <u>extrakčná zmes</u> - acetonitril : voda (75:25 v/v) (do 1 l odmernej banky preniesť 750 ml acetonitrilu(3.1.1) a doplniť po rysku deionizovanou vodou). Pripraviť vždy čerstvé.
3.2.2 <u>Zmes - acetonitril : voda (1:1 v/v)</u> (do 250 ml odmernej banky preniesť 125ml acetonitrilu(3.1.1) a doplniť po rysku deionizovanou vodou). Pripraviť vždy čerstvé.
3.2.3 <u>mobilná fáza</u> - acetonitril : voda : kyselina octová (51:47:2) (do 1 l odmernej banky preniesť 510 ml acetonitrilu(3.1.1), 20 ml kys. octovej(3.1.6) a po rysku doplniť deionizovanou vodou). Expirácia 1 mesiac.
3.2.4 <u>PBS pufer, pH 7.4 (</u>navážiť 7,15 g $Na_2HPO_4.12H_2O$ (3.1.4) + 0,65 g $NaH_2PO_4.2H_2O$ (3.1.5) a 8,7 g NaCl (3.1.2) do 1 l odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou), pH neupravovať! Expirácia 1 týždeň.
3.2.5 <u>10% chloramín</u> (navážiť 100g chloramínu(3.1.8), rozpustiť v destilovanej vode a doplniť do objemu 1 l). Expirácia 1 mesiac.
3.2.6 <u>5% acetón</u> (25ml acetónu(3.1.9) nariediť do objemu 500ml s destilovanou vodou). Expirácia 1 mesiac.

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobný roztok štandardu zearalenonu

Zásobný roztok zearalenonu ZEA (3.1.7) má koncentráciu analytu 100 mg/l.

3.3.2 Základný roztok štandardu zearalenonu **ZR1** (100 µg/l)

Do 25 ml odmernej banky napipetovať 25µl zo zásobného roztoku ZEA (3.1.7) a doplniť po rysku zmesou acetonitril : voda (1:1)(3.2.2)

3.3.3 Kalibračné roztoky

Napipetovať do 10ml odmerných baniek objemy základného roztoku zearalenonu ZR1 podľa tabuľky 1 a doplniť zmesou acetonitril : voda (1:1) (3.2.2) po rysku.

Tabuľka 1 Príprava kalibračných roztokov zearalenonu

Koncentrácia zearalenonu(µg/l)	Označenie roztoku	Prídavok zo základného roztoku ZR1 (ml)
10	Z1	1
25	Z2	2,5
50	Z3	5
75	Z4	7,5
100	Z5	10

Kalibračné roztoky sa pripravujú vždy čerstvé pred každým meraním.

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. 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 s FLD-detektorom
4.2 mlyn ROMER Mills, laboratórny mixér
4.3 ultrazvukový kúpeľ
4.4 homogenizátor Ultraturax
4.5 striekačka 25 µl Hamilton
4.6 laboratórne odmerné sklo
4.7 laboratórna odstredivka
4.8 filtračný papier
4.9 imunoafinitné kolónky

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Predpríprava vzoriek

5.1.1 Homogenizácia 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.

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:
nespracované obilniny, iné ako kukurica: 100µg/kg
nespracovaná kukurica: 350µg/kg
rafinovaný kukuričný olej: 400µg/kg
kukurica, kukuričná múka, raňajkové cereálie na báze kukurice: 100µg/kg
obilie, obilná múka, otruby, klíčky: 75µg/kg
chlieb, pečivo, sušienky, obilné snacky: 50µg/kg
potraviny na báze obilnín a kukurice pre dojčatá a malé deti: 20µg/kg

Navážiť 20 g zhomogenizovanej vzorky. Pridať štandard zearalenonu o koncentrácii 100 mg/l ZEA (3.1.7) podľa tabuľky 2. Zmixovať na Vortexe. Nechať postáť 15 minút a pokračovať podľa procedúry 5.3.1.2.

Tabuľka 2 Príprava negatívnej a fortifikovanej vzorky pre stanovenie zearalenonu

Komodita	MRL (µg/kg)	Koncentrácia zearalenonu vo vzorke(µg/kg)	Prídavok štandardu ZEA(µl)
kukurica	350	350	70
nespracované obilniny	100	100	20

obilná múka	75	75	15
chlieb, pečivo, sušienky, obilniny na prípravu raňajok	50	50	10
potraviny na báze obilnín pre deti	20	20	4

5.3 Príprava vzoriek

5.3.1 Príprava vzorky pre stanovenie zearalenonu
Počas prípravy a spracovania laboratórnych vzoriek je potrebné čo najviac vylúčiť denné svetlo, pretože mykotoxíny sa vplyvom ultrafialového svetla rozkladajú.

5.3.1.1
Navážiť 20 g zhomogenizovanej vzorky (5.1.1)

5.3.1.2
Pridať 100ml extrakčnej zmesi (3.2.1) a premiešať na Ultraturaxe (4.5) 3 min. Extrakt centrifugovať v laboratórnej odstredivke (4.8) pri 1600g 10min., prefiltrovať cez filtračný papier . Zobrať 20ml filtrátu a nariediť s 80ml PBS pufru (3.2.4).

5.4 Prečistenie extraktov

Vybrať kolónku EASY-EXTRAKT Zearalenon(4.10) z chladničky a vytemperovať na izbovú teplotu. Aktivovať kolónku presatím 20ml PBS pufra(3.2.4) rýchlosťou 5ml/min. Prekvapkať cez kolónku 25ml nariedeného extraktu rýchlosťou 5ml/min. Kolónku prepláchnuť 20ml deionizovanej vody rýchlosťou 5ml/min. Eluovať 1,5 ml acetonitrilu(3.1.1) do sklenenej skúmavky rýchlosťou 1 kvapka/sek. Eluát 3-krát spätne reverzne presať cez kolónku. Kolónku dôkladne vysušiť vzduchom a presať ešte 1,5ml deionizovanej vody (celkový objem eluátu je 3ml). Vzorka je nariedená 3-krát.

5.5 Chromatografická analýza

LC-podmienky

chromatografická kolóna LC-18
teplota kolóny: 40 °C
mobilná fáza : acetonitril:voda:kys. octová (51:47:2 v/v) (3.2.3)
prietok: 1 ml/min.
nástrek: 50 µl
fluorescenčná detekcia
excitačná vlnová dĺžka 274 nm
emisná vlnová dĺžka 455 nm

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

R-Biopharm Rhone - Easi Extract Zearalenone for sample clean-up prior to detection of zearalenone using HPLC analysis, Extraction procedure for determination of zearalenone in cereals and animal feet - aplikačný list R-Biopharm Rhone, 2005

Nariadenie Komisie (ES) č. 401/2006

8 ZOZNAM SKRATIEK

HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
FLD – fluorescenčný detektor
SPE - solid phase extraction
MRL – maximálny reziduálny limit
KT – kruhový test

CH 8.8.a. Stanovenie Zearalenonu v požívatinách a v krmivách metódou HPLC

1 Určenie metódy

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

2 Princíp metódy

Vzorky sa extrahujú zmesou acetonitril / voda, extrakt sa prefiltruje, alikvotná časť filtrátu sa zriedi slaným tlmivým roztokom PBS a prečistí sa na imunoafinitnej čistiacej kolónke. Prečistené extrakty sa analyzujú na reverznej fáze HPLC fluorescenčnou detekciou.

3 Pomôcky

3.1 Prístroje a zariadenia

- laboratórne sklo: odmerné valce, odmerné banky, pipety, sklenené lieviky, sklenené skúmavky, Erlenmayerove banky
- vákuové zariadenie na imunoafinitné kolónky
- filtračný papier
- filtračný papier so sklenenými vláknami
- polypropylénové centrifugačné skúmavky o objeme 50 ml
- imunoafinitné čistiace kolónky
- horizontálna trepačka
- zariadenie na odparovanie extraktov vzoriek v atmosfére dusíka

3.2. Chemikálie a roztoky

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

- acetonitril
- metanol
- redestilovaná voda
- chlorid sodný
- extrakčné činidlo, acetonitril / voda (90 / 10)
- 30 % zmes metanol / voda
- hydrogénfosforečnan disodný, Na_2HPO_4

- dihydrogénfosforečnan draselný, KH_2PO_4
- chlorid draselný
- hydroxid sodný
- slaný fosforečnanový tlmivý roztok (PBS)
- hydroxid sodný, roztok, c (NaOH) = 0,2 mol/l
- základný štandard Zearalenonu o koncentrácii 100 µg/ml
- zásobný roztok štandardu Zearalenonu o koncentrácii 5 000 ng/ml
- pracovné roztoky štandardu Zearalenonu na kalibračné krivky

4 Bezpečnosť pri práci

Dekontaminácia laboratórneho skla a roztokov obsahujúcich Deoxynivalenol 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 v Prílohe č. 2 k Výnosu 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; kompletný pracovný postup bez vzorky.

5.3 Príprava extraktu vzorky

Do Erlenmayerovej banky o objeme 500 ml sa naváži 50 g vzorky. Do vzorky sa pridá 5 g chloridu sodného a 150 ml extrakčného činidla. Obsah banky sa trepe na trepačke počas 1 hodiny.

Extrakt sa prefiltruje cez skladaný filtračný papier (filtrát č. 1). Do odmernej banky o objeme 50 ml sa napipetuje 10 ml filtrátu č. 1, banka sa doplní po značku tlmivým roztokom PBS a dobre sa premieša. Obsah odmernej banky sa prefiltruje cez filtračný papier so sklenenými mikrovláknami (filtrát č. 2). Filtrácia cez filtračný papier so sklenenými vláknami sa urobí ešte raz (filtrát č. 3)

5.4 Čistenie filtrátu na imunoafinitnej čistiacej kolónke

Imunoafinitná čistiaca kolónka sa pripojí na vákuový systém. Na vrch kolónky sa pripojí zásobník s fritou. Kolónka sa premyje 20 ml tlmivého roztoku PBS.

Do zásobníka sa napipetuje 25 ml filtrátu č. 3. Extrakt sa nechá pretiecť cez kolónku.

Ak sa neanalyzuje vzorka pigmentovaná kolónka sa premyje 20 ml redestilovanej vody.

Ak sa analyzuje pigmentovaná vzorka kolónka sa premyje 15 ml 30 % zmesi metanol.

Zásobník sa odstráni a Zearalenon sa z kolónky vymyje 2 ml acetonitrilu.

Eluát sa odparí do sucha pod dusíkom, pri teplote kúpeľa 45°C ± 5°C. Odparok sa rozpustí v 1,0 ml mobilnej fázy a premieša sa v skúmavkovom mixéri a použije sa na HPLC stanovenie.

6 Vyhodnotenie nameraných údajov

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

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

v ktorej:

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

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

Riedenie (ml): 150/10+40/25/1

150 - objem extrakčného činidla

10 - objem extraktu vzorky braného na riedenie

40 - objem PBS, ktorým sa extrakt nariedi

25 - objem extraktu vzorky nanášaného na kolónu

1 - objem mobilnej fázy, v ktorej bol rozpustený odparok

F = (150.0,04).5 / m alebo zjednodušene F = 30/m

150 – objem extrakčného činidla v ml

0,04 - podiel hodnôt 1/25

5 - zohladnenie riedenia

m - hmotnosť navážky v g

7 Literatúra

- Draft ISO/DIS 17372, dec.2005
- ISO 17372:2008
- 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

CH 8.8.a Stanovenie zearalenonu v biologickom materiály metódou HPLC

1. Pôvod metódy

Rhône-Diagnostics Technologies LTD

2. Princíp metódy

Metóda je vhodná na analýzu zearalenonu v rôznych vzorkách rastlinného a živočíšneho pôvodu a v detskej strave. Zo vzoriek sa extrahuje toxín zmesou rozpúšťadiel. Následne sa zachytáva na imunoafinitnej kolónke a zároveň sa koextrahované analyty vymyjú z kolónky spolu s extrakčnými roztokmi. Denaturáciou imunoafinitnej kolónky metanolom sa z nej uvoľní zearalenon.

3. Použité prístroje a spotrebný materiál

imunoafinitné kolónky
SPE manifold,
trepačka,
250 ml polguľová banka,
delice lieviky,
striekačkové mikrofiltre,
ultrazvukový kúpeľ,
kvapalinový chromatograf

4. Zoznam chemikálií

metanol p.a., g.g.,
hydroxid sodný 0,2M (8g NaOH rozpustiť v 1 L vody),
PBS tablety
redestilovaná voda,
extrakčný roztok: metanol/voda 75/25 v/v
premývací roztok
rozpúšťací roztok: metanol/voda 50/50 v/v
Štandard zearalenonu

5. Príprava štandardov

Zásobný roztok zearalenonu sa pripraví na koncentráciu 2000 ng/ml v acetonitrile.

6. Príprava vzoriek

Extrakcia

Vzorka sa naváži do uzatvárateľnej banky s objemom cca.250-500 ml. K vzorke sa pridá 150 ml zmesi extrakčného roztoku metanol/voda. Zmes sa pretrepe prudko v rukách, aby sa dosiahla homogénna suspenzia. Následne sa vytrepáva na trepačke. Extrakt sa prefiltruje a zbiera do odmerného valca. Z filtrátu sa odoberie 30 ml. Doplní sa roztokom pripraveným z PBS tabliet. Dobre sa pretrepe. Prefiltruje sa cez filtračný papier. Okamžite sa pokračuje v čistení na imunoafinitnej kolónke.

7. Podmienky stanovenia

Kolóna: LiChrospher C_{18},

Mobilná fáza: metanol : voda 75/25 v/v
Prietok mobilnej fázy: 0,7 ml / min
Detektor: FLD
Injekčný objem: 40 ul
Teplota: 40° C