8.7.a. Stanovenie deoxynivalenolu v surovinách rastlinného pôvodu metódou HPLC.

1. Pôvod metódy:
Aplikačné listy R-Biopharm Rhône LTD upravené na podmienky ŠVPÚ Košice RNDr. S. Tkáčikovou .

2. Princíp metódy

Deoxynivalenol, nazývaný aj vomitoxin, je členom trichotecénových toxínov produkovaných pliesňami rodu fusarium. Metóda je založená na extrakcii deoxynivalenolu z rastlinnej vzorky redestilovanou vodou a následnom prečistení na imunoafinitných kolónkach.

3. Použité prístroje
Váhy,
Trepačka,
Ultrazvuková lázeň,
Rotačná vákuová odparka,
Pipety,
SPE manifold,
imunoafinitné kolónky,
Kvapalinový chromatograf.

4. Zoznam chemikálií
deionizovaná voda HPLC čistoty,
Metanol p.a.,
metanol g.g.,
acetonitrl g.g.
polyetylénglykol,
PBS tablety.

5. Príprava štandardov
Deoxynivalenol sa zakúpi ako kryštalická látka, ktorá sa rekonštituuje 100 % acetonitrilom na koncentráciu 1 mg/ml. Nechá sa cez noc postáť pri laboratórnej teplote, aby sa kryštály úplne rozpustili. Zásobný roztok môže byť uskladnený v mrazničke pri –20 C jeden rok. Pracovný roztok sa nariedi tak, výsledná koncentrácia bude 2 ug/ml, 1 ug/ml, 0.5 ug/ml, 0.25 ug/ml, 0.125 ug/ml a 0.0625 ug/ml v mobilnej fáze.

6. Príprava vzoriek

dojčenská strava, obiloviny:

Vzorka sa zhomogenizuje. Do polguľovej banky sa naváži 25 g homogénnej vzorky a pridá sa 200 ml deionizovanej vody (pri dojčenskej strave sa pridá ešte 8g polyetylén glykolu (PEG)). Vzorka sa vytrepáva na trepačke 20 minút. Extrakt sa prefiltruje cez filtračný papier do odmerného valca. Na ďalšie čistenie sa odoberie 10 ml filtrátu ((pri dojčenskej strave 20 ml filtrátu), ktorý sa aplikuje na imunoafinitnú kolónku pomocou rezervoára pri prietoku

cca. 1 kvapka za sekundu. Kolónka sa premyje 10 ml fosfátového pufra pripraveného z PBS tabliet (pH=7.4) a následne vysuší za zapnutého vákua. Deoxynivalenol sa pomaly eluuje z kolónky 1,5 ml 100% metanolu a kolónka sa následne vysuší vákuom. Eluát sa odparí dosucha pri 60 C. Odparok sa rekonštituuje 1 ml mobilnej fázy a premieša sa na vortexe. 50 µl sa použije na nástrek do HPLC systému.

krmivá:

Vzorka sa zhomogenizuje. Do polguľovej banky sa naváži 25 g homogénnej vzorky krmiva a pridá sa 100 ml 84% acetonitrilu (ACN/voda 84/16 v/v). Vzorka sa vytrepáva na trepačke 20 minút. Extrakt sa prefiltruje cez filtračný papier do odmerného valca. Odoberie sa 2 ml filtrátu, ktoré sa rozpustia v 34 ml redestilovanej vody a aplikuje sa na imunoafinitnú kolónku pomocou rezervoára pri prietoku cca. 1 kvapka za sekundu. Kolónka sa premyje 10 ml fosfátového pufra pripraveného z PBS tabliet (pH=7.4) a následne vysuší za zapnutého vákua. Deoxynivalenol sa pomaly eluuje z kolónky 1,5 ml 100% acetonitrilu a kolónka sa následne vysuší vákuom. Eluát sa odparí dosucha pri 60 C. Odparok sa rekonštituuje 1 ml mobilnej fázy a premieša sa na vortexe. 50 µl sa použije na nástrek do HPLC systému.

8. Podmienky stanovenia

LC system

Kolóna: C-18 endcapped (Gemini,Phenomenex 150x4.6, 5 µm)
Mobilná fáza: voda/metanol/acetonitril 90 /5/5 v/v/v
Prietok mobilnej fázy: 1,0 ml / min
Teplota na kolóne : 40 °C
Teplota vzoriek: 10 °C
Injekovaný objem: 50 ul
UV detekcia: 218 nm
Čas analýzy: 20 min

CH 8.7. a
STANOVENIE DEOXYNIVALENOLU METÓDOU HPLC / DAD

1 PRINCÍP METÓDY

Deoxynivalenol sa zo vzorky extrahuje zmesou acetonitril – voda. Extrakt sa následne prečisťuje na imunoafinitnej kolónke a napichuje sa na chromatografickú kolónu so zakotvenou reverznou fázou. Meranie sa realizuje metódou kvapalinovej chromatografie s DAD detekciou. Vyhodnotenie výsledkov sa prevedie formou externej kalibrácie.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie deoxynivalenolu v obilovinách, kukurici, múke, výrobkoch z múky, v cereáliách a v krmivách.
Rozsah metódy je uvedený vo validačnom liste.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 Acetonitril, gradient grade
3.1.2 Metanol, gradient grade
3.1.3 deionizovaná voda
3.1.4 štandard: Deoxynivalenol (100 mg/l v acetonitrile)(DON)
3.1.5 chloramín
3.1.6 acetón
3.1.7 destilovaná voda

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 <u>extrakčná zmes</u> - acetonitril : voda (84:16 v/v) (do 1 l odmernej banky preniesť 840 ml acetonitrilu(3.1.1) a doplniť po rysku deionizovanou vodou), pripravovať vždy čerstvú.
3.2.2 <u>mobilná fáza</u> - voda : acetonitril : metanol (88:6:6 v/v) (do 1 l odmernej banky preniesť, 60 ml acetonitrilu (3.1.1), 60 ml metanolu (3.1.2) a po rysku doplniť deionizovanou vodou (3.1.3)), doba expirácie: 2 týždne
3.2.3 <u>10% chloramín</u> (navážiť 100g chloramínu (3.1.5), rozpustiť v destilovanej vode a doplniť do objemu 1 l), doba expirácie 1 mesiac
3.2.4 <u>5% acetón</u> (25ml acetónu (3.1.6) nariediť do objemu 500ml s destilovanou vodou), doba expirácie 1 mesiac

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobný roztok štandardu deoxynivalenolu

Zásobný roztok deoxynivalenolu DON (3.1.4) má koncentráciu analytu 100 mg/l.

3.3.2 Základný roztok štandardu deoxynivalenolu **ZR1** (1 mg/l = 1000 ug/l))

Do 10 ml odmernej banky napipetovať 100 µl zo zásobného roztoku DON (3.1.4) a doplniť po rysku mobilnou fázou (3.2.2)

3.3.3 Kalibračné roztoky

Napipetovať do 5ml odmerných baniek objemy základného roztoku deoxynivalenolu ZR1(3.3.2) podľa tabuľky 1 a doplniť po rysku mobilnou fázou (3.2.2).

Tabuľka 1 Príprava kalibračných roztokov deoxynivalenolu

Koncentrácia deoxynivalenolu(ug/l)	**Označenie roztoku**	**Prídavok zo základného roztoku ZR1 (µl)**
50	**Z1**	250
100	**Z2**	500
150	**Z3**	750
200	**Z4**	1000
500	**Z5**	2500

Do kalibračnej krivky sa zaraďuje aj základný štandardný roztok s koncentrácoiu 1000ug/l (ZR1).

3.4 Dekontaminácia

Sklo dekontaminovať ponorením do roztoku 10% chloramínu (3.2.3) najmenej na 30 minút, potom do roztoku 5% acetónu (3.2.4) na 30minút. Potom starostlivo prepláchnuť destilovanou vodou. Sklo následne umyť štandardným postupom ako laboratórne sklo.
Reagencie dekontaminovať vyliatím do 10% roztoku chloramínu (3.2.3), po 30 minútach pridať roztok 5% acetónu (3.2.4). 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 DAD detektorom
4.2 laboratórne odmerné sklo
4.3 laboratórna odstredivka
4.4 imunoafinitné kolónky
4.5 filtračný papier
4.6 Termovap
4.7 Vortex
4.8 chromatografická kolóna SUPELCOSIL LC-18
4.9 automatické kalibrované pipety
4.10 homogenizátor Ultraturax

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 vzorky pre kontrolu kvality

Na prípravu vzoriek sa použijú negatívne matrice. Vzorky krmív a vzorky potravín a obilia sa fortifikujú na úrovni MRL.

Ustanovené limity MRL v krmivách podľa Nariadenia vlády č. 430/2007:
-obilniny: 5mg/kg
-obilniny pre prežúvavce: 8 mg/kg
-vedľajšie výrobky z kukurice: 12 mg/kg
-KZ pre teľatá, jahňatá: 2 mg/kg
-doplnkové a kompletné krmivá: 5 mg/kg
-KZ pre hydinu: 1 mg/kg
-KZ pre ošípané: 0,9 mg/kg

Ustanovené limity v potravinách podľa Nariadenia Komisie (ES) 1126/2007:
-nespracované obilniny iné ako tvrdá pšenica, ovos a kukurica: 1250 µg/kg
-nespracovaná tvrdá pšenica, ovos a kukurica: 1750 µg/kg
-obilie, obilná a kukuričná múka, cestoviny: 750 µg/kg
-cestoviny: 750 µg/kg
-chlieb, pečivo,sušienky a cereálie: 500 µg/kg
-obilninová strava pre deti a dojčatá: 200 µg/kg

5.2.1 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovanej vzorky

Navážiť 25 g zhomogenizovanej vzorky. Pridať štandard deoxynivalenolu o koncentrácii 100 mg/l DON (3.1.4) podľa tabuľky 2. Zmixovať na Vortexe. Nechať postáť 15 minút a pokračovať podľa procedúry 5.3.2

Tabuľka 2 Príprava negatívnej a fortifikovanej vzorky pre stanovenie deoxynivalenolu

Koncentrácia deoxynivalenolu vo vzorke (ug/kg)	**Prídavok roztoku DON (µl)**
0	0
500	125

5.3 Príprava vzoriek

5.3.1 Naváženie vzorky
Navážiť 25 g zhomogenizovanej vzorky (5.1.1) do odmerného valca.

5.3.2 Extrakcia vzorky
Pridať 100ml extrakčnej zmesi acetonitril-voda 84:16 (3.2.1). Premiešať na Ultraturaxe (4.4) 2 minúty. Prefiltrovať cez filtračný papier Whatman 4 alebo Whatman 113. Zobrať 2ml filtrátu a zriediť s 34 ml redestilovanej vody (= 0,5g).

5.3.3 Prečistenie extraktu vzorky
Vybrať kolónku DONPREP (4.8) z chladničky a otepliť na izbovú teplotu. Prekvapkať cez kolónku zriedený extrakt rýchlosťou 1 kvapka/sek. Prepláchnuť kolónku 10ml redestilovanej vody rýchlosťou 1 kvapka/sek. Vysušiť kolónku. Eluovať deoxynivalenol pomalým prietokom 1,5ml acetonitrilu.(3.1.1) do sklenej skúmavky. 3-krát vykonať spätné nasatie eluátu cez kolónku (backflush). Presať cez kolónku vzduch na vyeluovanie posledných kvapiek acetonitrilu. Umiestniť sklenú skúmavku s eluátom do Termovapu (4.10) a prúdom dusíka pri teplote 60°C odpariť dosucha. Rozpustiť v 1ml mobilnej fázy (3.2.2). Premiešať na Vortexe(4.11). Takto pripravená vzorka je zriedená 2-krát.

5.4 Chromatografická analýza

LC-podmienky

chromatografická kolón LC-18
teplota kolóny: 40 ^{o} C
mobilná fáza : voda : acetonitril : metanol
prietok: 1 ml/min
nástrek: 50ul
DAD detekcia: 218nm

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 ug/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

1. R-Biopharm Rhone – Application note for analysis of deoxynivalenol in animal feed using acetonitrile extraction in conjuction with DONPREP, 2003
2. R-Biopharm Rhone – DONPREP immunoaffinity column for detection of deoxynivalenol in cereals and cereal based products using HPLC, 2003
3. Nariadenie Komisie (ES) č. 401/2006

8 ZOZNAM SKRATIEK

HPLC - kvapalinový chromatograf / kvapalinová chromatografia
DAD – detektor diódového poľa
KZ – kŕmna zmes
MRL – maximálny reziduálny limit

CH 8.7.a. Stanovenie Deoxynivalenolu v poživatinách a v krmivách metódou HPLC

1 Určenie metódy

Skúšobná metóda je použiteľná na stanovenie deoxynivalenolu v požívatinách a v krmivách.

2 Princíp metódy

Deoxynivalenol sa zo vzorky vyextrahuje vodou, extrakt sa prefiltruje, filtrát sa prečistí na imunoafinitnej čistiacej kolónke a analyzuje sa vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou s použitím UV detektora.

3 Pomôcky

3.1 Prístroje a zariadenia

- laboratórne sklo: odmerné valce, odmerné banky, pipety, sklenené lieviky, sklenené skúmavky, Erlenmayerove banky
- analytické váhy
- laboratórna trepačka
- vákuové zariadenie na imunoafinitné kolónky
- filtračný papier
- filtračný papier so sklenenými vláknami
- polypropylénové centrifugačné skúmavky
- imunoafinitné kolónky
- 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
- **extrakčné činidlo**: voda
- **základný štandard Deoxynivalenolu** o koncentrácii 100 μg/ml
- **zásobný roztok štandardu Deoxynivalenolu o koncentrácii 20 μg/ml**

- **zásobný roztok Deoxynivalenolu o koncentrácii 2 µg/ml**
- **pracovné roztoky štandardu Deoxynivalenolu na kalibračnú krivku**

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 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; kompletný pracovný postup bez vzorky.

5.3 Príprava extraktu vzorky

Do Erlenmayerovej banky o objeme 500 ml sa naváži 25 g zhomogenizovanej a dobre premiešanej vzorky a zaleje sa 200 ml redestilovanej vody Vzorka sa extrahuje 30 min na laboratórnej trepačke. Suspenzia sa prefiltruje cez filtračný papier (= filtrát 1). Filtrát 1 sa prefiltruje cez filtračný papier so sklenenými vláknami (= filtrát 2).

5 ml filtrátu 2 sa pipetou prenesie na imunoafinitnú kolónku, vopred vytemperovanú na laboratórnu teplotu a filtrát sa nechá pretiecť cez kolónku. Imunoafinitná kolónka sa premyje 10 ml redestilovanej vody, ktorá sa nechá pretiecť cez kolónku.

Deoxynivalenol sa z kolónky vyeluuje 2 ml metanolu, ktorý sa nechá voľne prekvapkať do pripravenej sklenenej skúmavky. Eluát sa odparí do sucha pod dusíkom pri teplote 50°C. Odparok sa rozpustí v 1 ml mobilnej fázy. Takto pripravená vzorka sa analyzuje vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou UV detektorom.

6 Vyhodnotenie nameraných údajov

Množstvo Deoxynivalenolu X v mg/kg sa vypočíta podľa nasledujúcej rovnice:

$$X = c \cdot F$$

v ktorej:

c - je množstvo Deoxynivalenolu v analyzovanej vzorke, uvedené v chromatograme po zintegrovaní píku, v µg/ml

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

Riedenie (ml): 200/5/1

200 - objem extrakčného činidla

5 - objem extraktu vzorky nanášaného na kolónu

1 - objem mobilnej fázy, v ktorej bol rozpustený odparok

F = (200.0,2) / m alebo zjednodušene F = 40/m

200 – objem extrakčného činidla v ml

0,2 - podiel hodnôt 1/5 v ml

m - hmotnosť navážky v g

- analýza referenčných materiálov najmenej raz za tri mesiace
- účasť v medzilaboratórnych porovnávacích skúškach
- paralelné stanovenie každej dvadsiatej vzorky
- validácia metódy

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