	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10561.1 – Stanovení obsahu mykotoxinů metodou HPLC – zearalenon	Revize	2

STANOVENÍ OBSAHU MYKOTOXINŮ METODOU HPLC - ZEARALENON

1 Rozsah a účel

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení zearalenonu v krmivech.

Poznámky

1 *Zearalenon (ZON) je charakterizován jako lakton kyseliny β -resorcylové. Po chemické stránce se jedná o [6-(10-hydroxy-6-oxo-trans-a-undecenyl)- β -resorcylic-acid-lactone].*

2 Princip

ZON se z krmiv extrahuje vodným roztokem rozpouštědla. Extrakt se přečistí na imunoafinitní kolonce. Zearalenon se stanoví pomocí HPLC na reverzní fázi s fluorescenční detekcí při excitační vlnové délce 274 nm a emisní vlnové délce 446 nm.

3 Chemikálie


Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Acetonitril, CH₃CN, HPLC grade.
- 2 Methanol, CH₃OH, HPLC grade.
- 3 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 4 Chlorid sodný, NaCl, min 99%.
- 5 Hydrogenfosforečnan disodný, Na₂HPO₄, min. 99%.
- 6 Dihydrogenfosforečnan draselný, KH₂PO₄, min. 99%.
- 7 Chlorid draselný, KCl, min 99%.
- 8 Hydroxid sodný, NaOH, roztok, c = 8 g/l.

Příprava: 8 g hydroxidu sodného se rozpustí ve vodě (3) a po vytemperování se doplní vodou (3) do 1000 ml.

- 9 Solný fosfátový pufr (PBS).


Příprava: 8 g chloridu sodného (4), 1,2 g hydrogenfosforečnanu disodného (5), 0,2 g dihydrogenfosforečnanu draselného (6) a 0,2 g chloridu draselného (7) se rozpustí v 900 ml vody, pH se upraví roztokem hydroxidu sodného (8) na hodnotu 7,4 a pak se doplní do 1000 ml vodou. Lze použít komerčně dostupné tablety pro PBS (5 tablet /1000 ml).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10561.1 – Stanovení obsahu mykotoxinů metodou HPLC – zearalenon	Revize	2

- 10 Mobilní fáze pro HPLC – methanol + voda, (75 + 25), (v/v).
Příprava: Smíchá se 750 ml methanolu (2) a 250 ml vody (3).
- 11 Extrakční roztok – methanol + voda (75 + 25), (v/v), je stejný jako mobilní fáze.
Příprava: Smíchá se 750 ml methanolu (2) a 250 ml vody (3).
- 12 Promývací roztok – methanol + PBS (15 + 85), (v/v).
Příprava: Smíchá se 150 ml methanolu (2) a 850 ml PBS (9).
- 13 Ředící roztok – methanol + voda (50 + 50), (v/v).
Příprava: Smíchá se 500 ml methanolu (2) a 500 ml vody (3).
- 14 Zearalenon, zásobní roztok.
Příprava: Do 50ml odměrné baňky se převede 10 mg zearalenonu (18), doplní se po značku acetonitrilem (1) a promíchá. Koncentrace zearalenonu je 200 µg/ml.
- 15 Pracovní roztok standardu.
Příprava: Do 100ml odměrné baňky se pipetuje 1 ml zásobního roztoku (14) a doplní se po značku acetonitrilem (1). Výsledná koncentrace je 2000 ng/ml.
- 16 Hydroxid sodný, NaOH, roztok, c = 40g/l.
Příprava: Ve vodě (3) se rozpustí 40 g hydroxidu sodného a po vytemperování se doplní vodou do 1000 ml.
- 17 Extrakční roztok pro kolonky R-Biopharm: acetonitril + voda, (75 + 25), (v/v).
Příprava: Smíchá se 750 ml acetonitrilu (1) a 250 ml vody (3).
- 18 Zearalenon, standardní substance.

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s fluorescenční detekcí.
- 2 Laboratorní třepačka horizontální.
- 3 Vakuový manifold.
- 4 Vakuová pumpa.
- 5 Plastové stříkačky a kohouty pro připojení imunoafinitních kolonek.
- 6 Koncentrátor vzorku Termovap.
- 7 Ultrazvuková lázeň.
- 8 Analytické váhy.
- 9 Imunoafinitní kolonky určené pro přečištění zearalenonu (např. ZearalaTest, Vicam, EASI-EXTRACT Zearalenon, R-Biopharm).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10561.1 – Stanovení obsahu mykotoxinů metodou HPLC – zearalenon	Revize	2

- 10 Filtrační papír (např. Whatman 113V nebo filtrační papír Vicam k. č. 13242) a filtry z mikrovlákna (např. Vicam k.č. 31955)
- 11 Laboratorní sklo.

5 Pracovní postup

5.1 Extrakce

Do kónické baňky (250 ml nebo 500 ml) se naváží 25 g vzorku s přesností na 0,01 g a 2,5g NaCl, přidá se 100 ml extrakční směsi (11), baňka se uzavře zátkou a vzorek se třepe na laboratorní třepačce po dobu 1 h. Poté se vloží do ultrazvukové lázně na dobu 10 min. Pak se extrakt přefiltruje přes papírový filtr a následně přes filtr z mikrovlákna (10) do suché podložní nádoby, přičemž prvních 5 ml se nepoužije.


Poznámky

- 2 *Vzorek se upraví homogenizací a mletím na částice o velikosti 1,0 mm až 0,5 mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku během homogenizace.*
- 3 *Vlhké vzorky (siláže, senáže) je nutné nejprve usušit v sušárně při teplotě 50 °C na vlhkost menší než 14 % a pak postupovat stejně jako u suchých vzorků.*
- 4 *Některé matrice (sušené siláže a senáže, seno) poutají velké množství extrakční směsi. Její objem je pak nutné zvýšit na 200 ml.*
- 5 *Po extrakci siláží a senáží je nutné změřit pH a upravit na hodnotu 7,0 až 7,4 roztoky (8), (16).*

5.2 Přecházení na imunoafinitní kolonce - ZearaTest firmy Vicam

Do skleněné kádinky se napipetuje 10 ml filtrátu vzorku (viz. 5.1) a rozředí se 40 ml PBS (9). Naředěný vzorek se dobře zamíchá a přefiltruje přes filtr z mikrovlákna (10), přičemž prvních 5 ml se nepoužije. Imunoafinitní kolonky se připraví podle návodu výrobce. Vrchní kryt imunoafinitní kolonky (9) se propíchne ostrým hrotem nůžek, sejme se spodní kryt a napojí se přes kohout na vakuový manifold (3). Na kolonku se připojí plastová stříkačka (5). Do stříkačky-zásobníku se pipetuje 10 ml extraktu vzorku a nechá se přecházet přes kolonku samovolně (gravitací) nebo může být použita vakuová pumpa (4). Průtok by neměl překročit 5 ml/min (1 až 2 kapky/s) a aplikace vzorku probíhá až do průchodu vzduchu.

Imunoafinitní kolonka se propláchne 5 ml promývacího roztoku (12) a 10 ml vody (3). Nakonec se nechá projít kolonkou vzduch. Kolonka se vyjme z manifoldu a umístí se nad vialku. Při použití jiných kolonek je nutné řídit se návodem výrobce.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10561.1 – Stanovení obsahu mykotoxinů metodou HPLC – zearalenon	Revize	2

5.3 Příprava zkušebního roztoku vzorku

Zearalenon se eluuje do vialky 0,75 ml methanolu (2). Po průchodu poslední kapky kolonkou se počká ještě 1 min a pak se pokračuje v eluci druhou dávkou 0,75 ml methanolu (2). Přidá se 1,5 ml vody (3), směs se dobře promíchá a může se podle potřeby před analýzou HPLC ještě zfiltrovat nebo odstředit na laboratorní odstředivce po dobu 5 min při 10000 ot/min.

5.4 HPLC analýza

Kalibrační křivka

Do 10ml odměrných baněk se pipetuje postupně (50; 250; 450; 650; 850) µl pracovního roztoku standardu (15) a doplní se po značku ředicím roztokem (13). Výsledná koncentrace kalibračních roztoků je (10; 50; 90; 130; 170) ng/ml. Kalibrační křivka se připravuje na počátku každého dne analýzy a kdykoliv se změní chromatografické podmínky.

HPLC podmínky


Tabulka 1. Příklad podmínek chromatografického systému.

Kolona	Analytická kolona s reverzní fází, např. C18, 250 mm × 4,6 mm I.D, 4 µm nebo podobná
Mobilní fáze	(10)
Teplota kolony	30 °C
Objem nástřiku	100 µl
Fluorescenční detekce	Excitační vlnová délka 274 nm, emisní vlnová délka 446 nm
Průtok mobilní fáze	1,0 ml/min

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah zearalenonu (X) v krmivech vyjádřený v µg/kg se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{c \times V \times E}{m \times A}$$

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10561.1 – Stanovení obsahu mykotoxinů metodou HPLC – zearalenon	Revize	2

kde

- c je koncentrace ZONu vypočítaná z kalibrační křivky (ng/ml),
- V objem rozpouštědla použitý na extrakci (ml),
- E konečný objem roztoku (3,0ml),
- m navážka vzorku (g),
- A objem extraktu použitý na přečištění (ml).

Poznámky

- 6 *Jestliže je obsah zearalenonu vyšší než 3 mg/kg, je nutné extrakt před čištěním na imunoafinitních kolonkách ředit 10 ×.*
- 7 *Veškeré sklo, které přišlo do styku s mykotoxiny, je nutno dekontaminovat. K dekontaminaci se používá 2% roztok chlornanu sodného, který se nechá působit minimálně 2 h. Sklo se po opláchnutí vodou umyje běžným způsobem.*

7 Literatura

- 1 ČSN EN15792 – Determination of Zearalenone in animal feed – HPLC method with fluorescence detection and immunoaffinity column clean-up.