CH 8.9. STANOVENIE MYKOTOXÍNOV METÓDOU GC/TOF

1 PRINCÍP METÓDY

Mykotoxíny (deoxynivalenol, nivalenol, T-2, TH-2) sa zo vzorky extrahujú zmesou acetonitril – voda. Extrakt sa následne prečisťuje na čistiacej kolónke, derivatizuje TMSI a TMSC a napichuje sa na chromatografickú kolónu. Meranie sa realizuje metódou GC/TOF.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie deoxynivalenolu, nivalenolu, T-2, TH-2 v obilovinách, kukurici, múke, výrobkoch z múky, v cereáliách a v krmivách.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 acetonitril
3.1.2 deionizovaná voda
3.1.3 štandard: Deoxynivalenol (DON)
3.1.4 štandard: Nivalenol (NIV)
3.1.5 štandard: T-2 (T2)
3.1.6 štandard: HT-2 (HT2)
3.1.7 chloramín
3.1.8 acetón
3.1.9 destilovaná voda
3.1.10 dietyléter
3.1.11 hydrogénuhličitan sodný ($NaHCO_3$)
3.1.12 TMSI – trimethylsilylimidazole
3.1.13 TMCS - trimethylchlorosilane

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 extrakčná zmes: acetonitril : voda (84:16 v/v) (do 1 l odmernej banky preniesť 840 ml acetonitrilu(3.1.1) a doplniť po rysku deionizovanou vodou).
3.2.2 10% chloramín (navážiť 100g chloramínu (3.1.5), rozpustiť v deionizovanou vode a doplniť do objemu 1 l)
3.2.3 5% acetón (25ml acetónu(3.1.6) nariediť do objemu 500ml s deionizovanou vodou)
3.2.4 5% $NaHCO_3$ (navážiť 2,5g $NaHCO_3$ (3.1.11) do 50ml odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou)
3.2.5 silanizačné činidlo TMSI : TMCS (9:1) (zmiešať 9ml TMSI (3.1.12) a 1ml TMCS (3.1.13))

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Základný roztok štandardu deoxynivalenolu, nivalenolu, T-2, HT-2 **(DNT)** (1 mg/l)

Do 10 ml odmernej banky napipetovať 100 µl zo štandardu DON (3.1.3), NIV (3.1.4), T-2 (3.1.5), HT-2 (3.1.6) a doplniť po rysku acetonitrilom (3.1.1).

3.4 Dekontaminácia

Sklo dekontaminovať ponorením do roztoku 10% chloramínu (3.2.2) najmenej na 30 minút, potom do roztoku 5% acetónu (3.2.3) na 30minút. Potom starostlivo prepláchnuť destilovanou vodou. Sklo následne umyť štandardným postupom ako laboratórne sklo.
Reagencie dekontaminovať vyliatím do 10% roztoku chloramínu (3.2.2), po 30 minútach pridať roztok 5% acetónu (3.2.3). Zberať do zberných nádob.

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 dvojdimenzionálny plynový chromatograf s nízkorozlišovacím detektorom LECO PEGASUS IV GCxGC/TOF
4.2 kapilárna chromatografická kolóna: VF5, 35 m x 0,25mm, ID 0,25µm
4.3 kapilárna chromatografická kolóna: BPX50, 10 m x 0,1mm, 0,1µm
4.4 homogenizátor Ultraturax
4.5 laboratórne odmerné sklo
4.6 kolónky MycoSep
4.7 filtračný papier
4.8 termovap
4.9 analytická váha
4.10 trepačka head over head
4.11 minishaker
4.12 odstredivka
4.13 centrifugačné nádobky

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 0,1mg/kg.

5.2.1 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovanej vzorky
Navážiť 10g zhomogenizovanej vzorky. Pridať štandardy deoxynivalenol, nivalenol, T-2 a HT-2 podľa tabuľky 2 a 50ml extrakčnej zmesi acetonitril-voda 90:10 (3.2.1). Premiešať na Ultraturaxe (4.4). Prefiltrovať cez filtračný papier. Odobrať filtrát. Pokračovať podľa postupu 5.3.3.

Tabuľka 2 Príprava negatívnej a fortifikovanej vzorky pre stanovenie DON, NIV, T-2, HT-2

Koncentrácia	Prídavok	Prídavok	Prídavok	Prídavok

DON, NIV, T-2, HT-2 vo vzorke (ug/kg)	štandardu deoxynivalenol (3.1.3) (µl)	štandardu nivalenol (3.1.4) (µl)	štandardu T-2 (3.1.5) (µl)	štandardu HT-2 (3.1.6) (µl)
0	0	0	0	0
100	25	25	25	25

5.3 Príprava vzoriek

5.3.1 Naváženie vzorky
Navážiť 10 g zhomogenizovanej vzorky (5.1.1) do odmerného valca.

5.3.2 Extrakcia vzorky
Pridať 100ml extrakčnej zmesi acetonitril-voda 90:10 (3.2.1). Premiešať na Ultraturaxe(4.4). Prefiltrovať cez filtračný papier. Odobrať filtrát.

5.3.3 Silanizácia vzorky
Filtrát preniesť na kolónku MycoSep (4.7). Z vrchnej časti odobrať 2ml do veľkej odparovačky. Odpariť pod prúdom dusíka. K odparenej vzorke pridať 100µl silanizačného činidla TMSI : TMCS (9:1) (3.2.5). Premiešať na Vortexe. Inkubovať vo vodnom kúpeli. Ochladiť na laboratórnu teplotu. Pridať 1ml izooktánu a premiešať na Vortexe. Pridať 4ml $NaHCO_3$ (3.2.4). Miešať na trepačke Head Over. Odobrať vrchnú vrstvu a injektovať do GC systému.

5.4 Chromatografická analýza

GC TOF -podmienky

Kolóny: 1. dimenzia: VF-5ms (35m x 0,25mm x 0,25um)
2. dimenzia BPX50 (1,79m x 0,1mm x 0,1um)
Teplotný program: 1. dimenzia: 70ºC (0,2min), 25ºC/min do 170ºC (0,2min), 5ºC/min do 300ºC (6min)
2. dimenzia: 100ºC (0,2min), 25ºC/min do 200ºC (0,2min), 5ºC/min do 330ºC (6min)
Front inlet: 0,00°C (0,6min), 400°C/min do 350°C (32min)
Kolóna 1.- front inlet gas saver flow 15 ml/min
Kolóna 2.- front inlet gas saver flow 5 ml/min
Modulátor: 30°C

TOF-MS parametre:
Ion source temperature: 220ºC
Transferline temperature: 280ºC

Nástrek: 5µl

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.

$$C_V = C_S \cdot R \qquad (ug/kg)$$

C_V - koncentrácia analytu v ug/kg

C_S - koncentrácia analytu určená z kalibračnej krivky (ug/l)

R - stupeň riedenia

Výsledky meraní sú prepočítané na výťažnosť metódy (korekcia na recovery).
Výsledky meraní pre vzorky pečiva a chleba sú prerátané na sušinu na pôvodnú hmotnosť.
Výsledky meraní pre vzorky krmiva sú prerátané na 12% vlhkosť (88% sušina).

Neistota meraní je vypočítaná z Horwitzovej rovnice podľa Nariadenia Komisie (ES) č. 401/2006 (predtým Commission Directive 2002/26/EC).

7 LITERATÚRA

1. Trilogy Analytical Laboratory, SOP-Tril-trichGC, Trichothecenes by GC/ECD – TMS Derivative
2. Langseth W, Rundberget T.: *Instrumental methods for determination of nonmcrocyclic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures,* in Journal of chromatography A, 815 (1998) 103-121
3. Nariadenie Komisie (ES) č. 401/2006

8 ZOZNAM SKRATIEK

GC/TOF - plynový hmotnostný spektrometer s analyzátorom doby letu (time-of-flight)