CH 8.6. Stanovenie nivalenolu v krmivách a krmných zmesiach

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

2. Princíp metódy
Metóda je založená na extrakcii nivalenolu 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
Nivalenol 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, aby výsledná koncentrácia bola 50 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml, 700 µg/ml a 1000 µg/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. Nivalenol 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. Nivalenol 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 150 x 4.6, 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