	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10560.1 – Stanovení obsahu mykotoxinů metodou HPLC – deoxynivalenol	Revize	2

## STANOVENÍ OBSAHU MYKOTOXINŮ METODOU HPLC - DEOXYNIVALENOL

### 1 Rozsah a účel

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení deoxynivalenolu v krmivech.

#### Poznámky

1 *Deoxynivalenol (DON) patří mezi významné zástupce mykotoxinů trichocenové skupiny B, po chemické stránce trichothec-9-en-8-one, 12, 13-epoxy-3, 7, 15-trihydroxy - (3 a, 7 a).*


### 2 Princip

Stanoví se extrakcí ze vzorku vodou a část extraktu se přečistí přes imunoafinitní kolonku. Po odpaření a rozpuštění v mobilní fázi se DON kvantitativně stanoví metodou HPLC s UV detekcí při vlnové délce 220 nm.

### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Methanol – CH<sub>3</sub>OH, minimálně 99,7 % v/v, HPLC grade.
- 2 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 3 Ledová kyselina octová, CH<sub>3</sub>COOH.
- 4 Mobilní fáze pro HPLC – voda (2) + acetonitril (8) (90 + 10) (v/v).  
Příprava: Smíchá se 900 ml vody (2) a 100 ml acetonitrilu (8).
- 5 Deoxynivalenol – zásobní roztok v acetonitrilu (HPLC grade) o koncentraci 10 µg/ml.  
Příprava: Ve 100 ml acetonitrilu (8) se rozpustí 1 mg deoxynivalenolu (15).
- 6 Pracovní roztoky pro kalibraci.  
Příprava: Do odměrných baněk o objemu 10 ml se pipetuje (75; 150; 225; 300; 375; 450) µl zásobního roztoku (5), baňky se doplní mobilní fází (4) po značku a promíchají se. Získané roztoky o koncentracích (75; 150; 225; 300; 375; 450) ng/ml mohou být použity přímo pro nástřík do HPLC systému.
- 7 Polyethylen Glykol 8 000 (např. Fluka k. č. 81 272).
- 8 Acetonitril, HPLC grade.
- 9 Hydroxid sodný, NaOH, roztok, c(NaOH) = 1 mol/l.  
Příprava: 40 g NaOH se rozpustí ve vodě a doplní vodou do 1000 ml.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10560.1 – Stanovení obsahu mykotoxinů metodou HPLC – deoxynivalenol	Revize	2

10 Chlorid sodný, NaCl, min 99%.

11 Hydrogenfosforečnan disodný, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, min. 99%.

12 Dihydrogenfosforečnan draselný, KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, min. 99%.

13 Chlorid draselný, KCl, min. 99%.

14 Solný fosfátový pufr (PBS).

Příprava: 8 g chloridu sodného (10), 1,2 g hydrogenfosforečnanu disodného (11), 0,2 g dihydrogenfosforečnanu draselného (12) a 0,2 g chloridu draselného (13) se rozpustí v 900 ml vody. pH se upraví roztokem hydroxidu sodného (9) na hodnotu pH 7,4 a pak se doplní do 1000 ml vodou. Lze použít komerčně dostupné tablety pro PBS (5 tablet/1 litr).

15 Deoxynivalenol, standardní substance.

#### 4 Přístroje a pomůcky

1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV detekcí.

2 Laboratorní třepačka horizontální.

3 Vakuový manifold.

4 Koncentrátor vzorků.

5 Laboratorní odstředivka.

6 Vakuová pumpa.

7 Plastové stříkačky a kohouty pro připojení imunoafinitních kolonek.

8 Koncentrátor vzorků.

9 Ultrazvuková lázeň.

10 Analytické váhy s přesností na 0,01 mg.


11 Imunoafinitní kolonky určené pro přečištění extraktu deoxynivalenolu (např. DonPrep, R-Biopharm nebo DonTest, Vicam).

12 Filtrační papír (např. Whatman 113 V) a filtry z mikrovlákn (např. Vicam k. č. 31955).

#### 5 Pracovní postup

##### 5.1 Extrakce

Do 500ml kónické baňky se naváží 25 g vzorku s přesností 0,01 g, 5 g polyethylenglykolu (7) a přelije se 200 ml vody (2). Baňka se uzavře zátkou a vzorek se třepe na třepačce (2) po dobu 1 h. Nastavení počtu kmitů třepačky závisí na konzistenci vzorku. Poté se vloží do ultrazvukové lázně na dobu 10 min. Extrakt se přefiltruje přes papírový filtr do suché

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10560.1 – Stanovení obsahu mykotoxinů metodou HPLC – deoxynivalenol	Revize	2

podložní nádoby, přičemž prvních 5 ml se nepoužije. Následně se extrakt přefiltruje přes filtr z mikrovlákna (12), prvních 5 ml se nepoužije.

### Poznámky

- 2 *Před vlastní extrakcí se vzorek upravuje 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 *Po extrakci siláží a senáží je nutné změřit pH a upravit na hodnotu 7,0 až 7,4 roztokem NaOH (9).*

## 5.2 Přečištění extraktu

Připraví se imunoafinitní kolonky (11). Vrchní kryt se propíchne ostrým hrotem nůžek, sejme se dolní kryt a napojí se přes kohout (7) na vakuový manifold (3). Na kolonku se nasadí plastová stříkačka a do ní se pipetují 2 ml filtrátu. Roztok se nechá pomalu procházet přes kolonku až do průchodu vzduchu samovolně (gravitací) nebo je možné použít vakuovou pumpu (6). Průtok by neměl překročit 5ml/min (1 až 2 kapky/s). Poté se kolonka promyje 10 ml PBS pufru (14), opět až do průchodu vzduchu. Nakonec se vysuší proudem dusíku po dobu asi 5 s. DON se eluuje 0,75 ml methanolu (1) do vialky. Poté, co kolonkou proteče poslední kapka methanolu, se počká asi 1 min a potom se přidá ještě 0,75 ml methanolu pro celkovou eluci.


## 5.3 Příprava pro HPLC analýzu

Eluát se odpaří na koncentrátoru vzorku pod proudem dusíku při teplotě 45 °C, ihned se ochladí na laboratorní teplotu a rozpustí v 0,5 ml mobilní fáze (4). Vzorek se protřepe a nechá nejméně 30 s v ultrazvuku. Pokud je to nezbytné, může se před analýzou HPLC ještě zfiltrvat nebo odstředit na laboratorní odstředivce po dobu 5 min při 5000ot/min.

## 5.4 Stanovení a kalibrace HPLC

**Tabulka 1. Příklad podmínek chromatografického systému.**

Kolona	Analytická separační kolona s reverzní fází, např. Synergi Hydro - RP (C18) 250 mm × 4,6 mm I.D. 4 µm, nebo podobná
Mobilní fáze	(4)
Teplota kolony	30 °C
Objem nástřiku	100 µl
Detektor UV	220 nm
Retenční čas	19,5 min (mění se dle použité kolony)
Průtok	0,6 ml/min

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10560.1 – Stanovení obsahu mykotoxinů metodou HPLC – deoxynivalenol	Revize	2

## 5 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah DONu ( $X$ ) v krmivech vyjádřený v ng/g se vypočítá podle vztahu

$$X = c \times V \times E/m \times A = c \times 2$$

kde

$c$  je koncentrace DONu vypočítaná z kalibrační křivky (ng/ml),

$V$  objem rozpouštědla použitý na extrakci (ml),

$E$  konečný objem roztoku (0,5 ml mobilní fáze),

$m$  navážka vzorku (g),

$A$  objem extraktu použitý na přečištění (ml).

### Poznámky

5 *Veškeré sklo, které přišlo do styku s mykotoxiny, je nutné dekontaminovat. K dekontaminaci se používá 2% roztok chlornanu sodného, který se nechá působit nejméně 2 h. Sklo se po opláchnutí vodou umyje běžným způsobem.*

## 6 Literatura

1 ČSN EN 15791 – Determination of Deoxynivalenol in animal feed – HPLC method with immunoaffinity column clean-up.