CH 8.10. Stanovenie fumonizínov B1 a B2 v biologickom materiály

Pôvod metódy

STN EN 13585

1. Rozsah metódy

Metóda bola úspešne validovaná v medzilaboratórnom štúdiu podľa AOAC príručky (1) v kukurici obsahujúcej od 405 ug/kg do 6732 ug/kg fumonizínu B_1 , a od 152 ug/kg do 2619 ug/kg fumonizínu B_2. Táto metóda je vhodná na analyzovanie vzoriek kukurice alebo minimálne upravovanej kukurice (napr. čerstvá, sušená a mletá). Táto metóda neposkytuje spoľahlivé výsledky pri výrobkoch na báze kukurice.

3. Princíp

Fumonizíny sú zo vzorky kukurice extrahované zmesou metanolu a vody. Filtrovaný extarkt je prečistený na silnej anión-meničovej SPE kolónke a fuminizíny sú eluované zmesou kyseliny octovej a metanolu. Extrakt sa odparí a reziduá sa opätovne rozpustia v metanole a pridá sa o-ftaldialdehyd/2-merkaptoetanole) na vytvorenie derivátov, ktoré sú fluorescenčne aktívne. Deriváty sa analyzujú na kolóne s obrátenými fázami metódou HPLC s fluorecsenčnou detekciou.

4. Chemikálie a materiál

4.1 Všeobecne

Počas analýzy, pokiaľ nie je inak uvedené, používajte iba chemikálie známej čistoty a iba destilovanú vodu stupňa 1 ako je definované v EN ISO 3696. Rozpúšťadla musia byť HPLC kvality.

5. Aparatúra

Bežné laboratórne vybavenie

5.1 HPLC zariadenie:

-vysokotlakový kvapalinový chromatograf,
separačná kolóna s náplňou obrátených fáz, -z nehrdzavejúcej ocele,
-fluorescenčný detektor, Dátová stanica
Homogenizátor alebo mixér.
Filtračný papier
Silný anión menič SPE kolónka, napr. Bond –Elut SAX-cartridges, obsahujúca 500 mg sorbentu alebo podobná.
SPE extrakčný manifold
Rotačná vákuová odparka s ohrevom.
Membránová filter, pre vodné roztoky s veľkosťou pórov 0,45 um.

Príprava testovacej vzorky

Pomeľte vzorku aby prešla 1,0 mm sitom a následne ju zhomogenizujte..

8.3.1 Testovaný roztok z kukurice

Znova rozpusťe odparené rezíduum (pozri 8.2) v 200 ul metanolu (4.2). Tiež sa môže použiť acetonitrilový roztok (4.4). Preneste 25 ul tohto roztoku na dno malej testovacej skúmavky a pridajte 225 ul derivatizačného činidla (4.13). Energicky premiešajte (na wortexe) a injekujte do HPLC alikvótne množstvo (nap.10 ul) derivatizovaného roztoku na HPLC kolónu (5.1.2) v reprodukovateľnom čase do 3 minút po pridaní derivatizačného činidla. Ak fumonizínové chromatografické píky prevyšujú píky štandardov alebo najvyšší bod kalibračnej krivky, urobte riedenie extraktu vzorky a opakujte derivatizáciu.
Upozornenie 1 Je problematické odhadnúť presný čas medzi pridaním derivatizačného roztoku a injektážou na HPLC kolónu, pretože progresívne klesá fluorescencia fumonizínových derivátov, ktorá sa objavuje po 4 minútach.
Upozornenie 2 Limit detekcie a kvantifikácie sa menín podľa citlivosti použitého fluorescenčného detektora.
Upozornenie 3 Typický chromatogram je v prílohe A.

CH 8.10.
STANOVENIE FUMONIZÍNOV METÓDOU HPLC / FLD

1 PRINCÍP METÓDY

Fumonizíny sa zo vzorky extrahujú zmesou acetonitril-metanol-voda. Prefiltrovaný extrakt sa prečistí na imunoafinitnej kolónke, z ktorej sú fumonizíny eluované metanolom. Eluát sa odparí dosucha a po rozpustení sa derivatizuje o-phthaldialdehydom s 2-mercaptoethanolom. Takto upravená vzorka sa napichuje na chromatografickú kolónu s reverznými fázami a deteguje s fluorescenčnou detekciou.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie fumonizínov B_1, B_2 v obilovinách, kukurici, múke, výrobkoch z múky, v cereáliách a v krmivách.
Rozsah metódy pre jednotlivé parametre je uvedený vo validačnom liste.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 acetonitril isocratic grade LiChrosolv
3.1.2 metanol gradient grade LiChrosolv
3.1.3 redestilovaná voda
3.1.4 o-fosforečná kyselina 85% H_3PO_4
3.1.5 o-phthaldialdehyd
3.1.6 2-mercaptoethanol
3.1.7 dihydrogénfosforečnan sodný dihydrát
3.1.8 tetrabóritan disodný dekahydrát
3.1.9 chlorid sodný p.a.
3.1.10 $Na_2HPO_4.12H_2O$ p.a.
3.1.11 $NaH_2PO4.2H_2O$ p.a.
3.1.12 štandard: Fumonisins Biopure (FB_1 50 mg/l, FB_2 50 mg/l v acetonitril-voda (1:1))(FUM)
3.1.13 chloramín
3.1.14 acetón
3.1.15 destilovaná voda

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 <u>extrakčná zmes</u> - acetonitril : metanol:voda (25:25:50 v/v) (do 1 l odmernej banky preniesť 250 ml acetonitrilu(3.1.1), 250 ml metanolu(3.1.2) a doplniť po rysku redestilovanou vodou(3.1.3)), pripravovať vždy čerstvú.
3.2.2 <u>PBS pufer, pH 7.4</u> (navážiť 7,15 g $Na_2HPO_4.12H_2O$ (3.1.10) + 0,65 g $NaH_2PO_4.2H_2O$ (3.1.11) a 8,7 g NaCl (3.1.9) do 1 l odmernej banky a doplniť po značku redestilovanou vodou), pH neupravovať! Expirácia 1 týždeň
PBS pufer sa môže pripraviť aj rozpustením tabletky.

3.2.3 0,1M tetrabóritan disodný (navážiť 3,8g tetrabóritanu disodného dekahydrátu(3.1.8), rozpustiť a doplniť redestilovanou vodou do objemu 100ml)

3.2.4 derivatizačné činidlo OPT (rozpustiť 40mg o-phthaldialdehydu(3.1.5) v 1ml metanolu(3.1.2) , pridať 5ml 0,1M tetrabóritanu disodného(3.2.3) a 50µl 2-mercaptoethanol(3.1.6.) Doba expirácie: 5dní, uchovávať v tme v chladničke.

3.2.5 0,1M dihydrogénfosforečnan sodný (navážiť 15,6g dihydrogénfosforečnanu sodného dihydrátu (3.1.7), rozpustiť a doplniť redestilovanou vodou do objemu 1000ml)

3.2.6 metanol-voda (1:1)(do 100ml odmernej banky preniesť 50ml metanolu(3.1.2) a doplniť po rysku redestilovanou vodou(3.1.3). Tento roztok slúži ako riediaci roztok na prípravu kalibračnej krivky. Doba expirácie: 1mesiac.

3.2.7 mobilná fáza - metanol : 0,1M dihydrogénfosforečnan sodný (77:23 v/v) (do 1 l odmernej banky preniesť 770 ml metanolu(3.1.2), doplniť do po rysku 0,1M dihydrogénfosforečnanom sodným(3.2.5), premiešať, pH roztoku upraviť na hodnotu 3,35 kyselinou fosforečnou. Mobilnú fázu pripravovať vždy čerstvú.

3.2.8 10% chloramín (navážiť 100g chloramínu(3.1.5), rozpustiť v destilovanej vode a doplniť do objemu 1 l)

3.2.9 5% acetón (25ml acetónu(3.1.6) nariediť do objemu 500ml s destilovanou vodou)

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobný roztok štandardu fumonizínov

Zásobný roztok fumonizínov FUM (3.1.12) má koncentráciu analytov FB_1 50 mg/l a FB_2 50 mg/l

3.3.2 Základný roztok štandardu fumonizínov **ZR1** (FB_1 2 mg/l, FB_2 2 mg/l)

Do 5 ml odmernej banky napipetovať 200 µl zo zásobného roztoku FUM (3.1.12) a doplniť po rysku zmesou metanol-voda (1:1)(3.2.6)

3.3.3 Kalibračné roztoky štandardu fumonizínov pred derivatizáciou

Napipetovať do 5ml odmerných baniek objemy základného roztoku fumonizínov ZR1(3.3.2) podľa Tabuľky 1 a doplniť po rysku zmesou metanol-voda (1:1)(3.2.6)

Tabuľka 1 Príprava kalibračných roztokov fumonizínov FB_1, FB_2

Koncentrácia FB_1 (µg/l)	**Koncentrácia FB_2 (µg/l)**	**Označenie kalibrač.roztoku pred derivatizáciou**	**Prídavok zo základného roztoku ZR1 (ml)**
200	200	**K1**	0,5
500	500	**K2**	1,25
1000	1000	**K3**	2,5
2000	2000	**K4**	5

3.3.4 Derivatizácia kalibračných roztokov štandardu fumonizínov

Kalibračné roztoky štandardu fumonizínov (3.3.3)je potrebné pred meraním derivatizovať derivatizačným činidlom OPT(3.2.4)nasledovne:

Po pridaní derivatizačného činidla OPT (3.2.4) sa obsah vialky premieša na prístroji Vortex po dobu 30 sekúnd a obsah sa do 3 minút aplikuje na chromatografickú kolónu. Je potrebné dodržať vždy rovnaký čas od derivatizácie po nápich.

Rovnakým spôsobom budú derivatizované aj vzorky.

3.4 Dekontaminácia

Sklo dekontaminovať ponorením do roztoku 10% chloramínu (3.2.8) najmenej na 30 minút, potom do roztoku 5% acetónu (3.2.9) na 30minút. Potom starostlivo prepláchnuť destilovanou vodou. Sklo následne umyť štandardným postupom ako laboratórne sklo.
Reagencie dekontaminovať vyliatím do 10% roztoku chloramínu (3.2.8), po 30 minútach pridať roztok 5% acetónu (3.2.9). 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 AGILENT 1100 fluorescenčný detektor
4.2 homogenizátor Ultraturax
4.3 striekačka
4.4 laboratórne odmerné sklo
4.5 laboratórna odstredivka
4.6 imunoafinitné kolónky
4.7 filtračný papier
4.8 Termovap fy Ecom
4.9 Vortex

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Predpríprava vzoriek

5.1.1 Homogenizácia vzoriek

Vzorku dôkladne rozmixovať v laboratórnom mixéri.

5.2 Príprava vzorky pre kontrolu kvality merania

Na prípravu vzoriek sa použijú negatívne matrice. Vzorky sa fortifikujú na úrovni FB_1 0,2 mg/kg, FB_2 0,2 mg/kg.

Príprava negatívnej vzorky a fortifikovanej vzorky

Navážiť 20 g zhomogenizovanej vzorky. Pridať zásobný roztok štandardu fumonizínov o koncentrácii fumonizínov FB_1 50 mg/l, FB_2 50 mg/l FUM (3.1.10) podľa tabuľky 3. Zmixovať na Vortexe. Nechať postáť 15 minút a pokračovať podľa procedúry 5.3.2.

Tabuľka 3 Príprava negatívnej a fortifikovanej vzorky pre stanovenie fumonizínov

Koncentrácia fumonizínu FB_1vo vzorke (µg/kg)	Koncentrácia fumonizínu FB_2 vo vzorke (µg/kg)	Prídavok roztoku FUM (µl)
0	0	0
200	200	80

5.3 Príprava vzoriek

5.3.1 Naváženie vzorky
Navážiť 20 g zhomogenizovanej vzorky (5.1.1) do odmerného valca.

5.3.2 Extrakcia vzorky
Pridať 100ml extrakčnej zmesi acetonitril-metanol-voda (25:25:50 (3.2.1). Premiešať na Ultraturaxe (4.3) 2 minúty. Centrifugovať 10min. pri 2500otáč./min. Prefiltrovať cez filtračný papier Whatman 4 alebo Whatman 113. Zobrať 10ml filtrátu a zriediť s 40 ml PBS pufra(3.2.2)

5.3.3 Prečistenie extraktu vzorky
Vybrať kolónku FUMONIPREP (4.7) z chladničky a otepliť na izbovú teplotu. Prekvapkať cez kolónku 10ml zriedeného extraktu (=0,4g) rýchlosťou 1 kvapka/sek. Prepláchnuť kolónku 10ml PBS pufra(3.2.2) rýchlosťou 1 kvapka/sek. Vysušiť kolónku. Fumonizíny eluovať pomalým prietokom 2ml metanolu(3.1.2) do sklenej skúmavky. 3-krát vykonať spätné nasatie eluátu cez kolónku (backflush). Potom ešte eluovať 1 ml metanolu(3.1.2). Presať cez kolónku vzduch na vyeluovanie posledných kvapiek metanolu. Umiestniť sklenú skúmavku s eluátom do Termovapu (4.9) a prúdom dusíka pri teplote 60°C odpariť dosucha. Odparok rozpustiť v 400µl zmesi metanol-voda (1:1)(3.2.6).

Chromatografická analýza

LC-podmienky

chromatografická kolóna – RP-18
mobilná fáza : metanol : 0,1M dihydrogénfosforečnan sodný (77:23 v/v) pH 3,35 (3.2.7)
prietok: 1 ml/min
nástrek: 50 µl
FLD detekcia: excitačná vlnová dĺžka 335nm
emisná vlnová dĺžka 440nm

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.

$$C_V = C_S \cdot R \quad (\mu g/kg)$$

C_V - koncentrácia analytu v mg/kg

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

R - stupeň riedenia

7 LITERATÚRA

1. European Standard EN 14352 Foodstuffs-Determination of fumonisins B1 and B2 in maize based foods – HPLC method with immunoaffinity column clean-up, 2001
2. R-Biopharm Rhone – FUMONIPREP immunoaffinity column for detection of fumonisin B1, B2 and B3 using HPLC, Instructions for use, 2005

3. R-Biopharm Rhone – Application note for analysis of fumonisins in infant food, in cornflakes, in popcorn using FUMONIPREP, 2001
4. Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th Edition, 2005, Ch.49.5.02, Fumonisins B1 and B2 in Corn and Corn Flakes
5. Nariadenie Komisie (ES) č. 401/2006

8 ZOZNAM SKRATIEK

HPLC - kvapalinový chromatograf / kvapalinová chromatografia
FLD – fluorescenčný detektor
SPE - solid phase extraction
KZ – kŕmna zmes
MRL – maximálny reziduálny limit
FB_1, FB_2 – fumonizíny B_1, B_2

CH 8.10. Stanovenie Fumonizínu B1 a Fumonizínu B2 v požívatinách a v krmivách metódou HPLC

1 Určenie metódy

Metóda je použiteľná na analýzu Fumonizínu B1 a Fumonizínu B2 v požívatinách a v krmivách.

2 Princíp metódy

Fumonizíny sa zo vzorky vyextrahujú zmesou acetonitril/metanol/voda, extrakt sa prefiltruje a alikvotná časť filtrátu sa prečistí na imunoafinitnej čistiacej kolónke. Fumonizíny B1 a B2 sa z kolónky vyeluujú metanolom. Eluát sa odparí do sucha, odparok sa rozpustí v zmesi acetonitril/voda a po predkolónovej derivatizácii o-phthaldialdehydom sa analyzuje na HPLC fluorescenčnou detekciou.

3 Pomôcky

3.1 Prístroje a zariadenia

- laboratórne sklo: odmerné valce, odmerné banky, pipety, sklenené lieviky, sklenené skúmavky
- vákuové zariadenie, prispôsobené na imunoafinitné kolónky
- filtračný papier
- imunoafinitné čistiace kolónky
- horizontálna trepačka
- 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
- redestilovaná voda

- kyselina octová, ľadová
- o-phthaldialdehyd (OPA)
- 2-mercaptoetanol (MCE)
- hydrogénfosforečnan disodný, Na_2HPO_4
- dihydrogénfosforečnan draselný, KH_2PO_4
- chlorid draselný, KCl
- chlorid sodný, NaCl
- tetraboritan disodný, dekahydrát
- derivatizačné činidlo (OPA činidlo)
- slaný fosforečnanový tlmivý roztok (PBS)
- základný štandard Fumonizínu B1 o koncentrácii 50 µg/ml
- základný štandard Fumonizínu B2 o koncentrácii 50 µg/ml
- zásobný zmesný roztok štandardov o koncentrácii 5 000 ng/ml Fumonizínu B1 a 5 000 ng/ml Fumonizínu B2
- pracovné roztoky štandardov Fumonizínov B1 a B2 na kalibračné krivky

4 Bezpečnosť pri práci

Dekontaminácia laboratórneho skla a roztokov obsahujúcich Fumonizín B1, B2 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 v Prílohe č. 2 k Výnosu 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 a najmenej raz za tri mesiace referenčný materiál ako kontrolná vzorka

5.3 Príprava extraktu vzorky

Do sklenenej banky o objeme 250 ml sa naváži 25 g vzorky, pridá sa 2,5 g NaCl a 125 ml extrakčného činidla. Obsah banky sa trepe na trepačke počas 1 hodiny.

Extrakt sa prefiltruje cez skladaný filtračný papier. Do odmernej banky o objeme 50 ml sa napipetuje 10 ml filtrátu, banka sa doplní po značku tlmivým roztokom PBS a dobre sa premieša.

5.4 Čistenie filtrátu na imunoafinitnej čistiacej kolónke

Imunoafinitná čistiaca kolónka sa pripojí na vákuový systém. Na vrch kolónky sa pripojí zásobník. Kolónka sa premyje 10 ml PBS. Do zásobníka sa napipetuje 10 ml filtrátu vzorky a nechá sa pretiecť cez kolónku. Kolónka sa premyje 10 ml PBS.

Zásobník sa odstráni a fumonizíny sa z kolónky vyeluujú 3 ml metanolu.

Eluát sa odparí do sucha pod dusíkom, pri teplote kúpeľa 50°C ± 5°C. Odparok sa rozpustí v 0,25 ml zmesi acetonitril/voda (1+1) a premieša sa v skúmavkovom mixéri.

5.5 Predkolónová derivatizácia

- Predkolónová derivatizácia vzorky sa robí OPA činidlom. Vzorka musí byť nastreknutá v 3. minúte po zmiešaní s OPA činidlom.

6 Vyhodnotenie nameraných údajov

Množstvo Fumonizínu B1 alebo Fumonizínu B2 X v µg/kg vzorky sa vypočíta podľa nasledujúcej rovnice:

$$X = c \cdot F$$

v ktorej:

c je množstvo Fumonizínu B1 alebo Fumonizínu B2 v analyzovanej vzorke, uvedené v chromatograme po zintegrovaní píku, v ng/ml

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

Riedenie (ml): 125/10+40/10´/0,25

125 - objem extrakčného činidla

10 - objem filtrátu

40 - objem, ktorým bol filtrát riedený

10´ - objem extraktu vzorky nanášaného na kolónu

0,25 - objem mobilnej fázy, v ktorej bol rozpustený odparok

F = (125.0,025).5 / m alebo zjednodušene F = 15,625/m

125 – objem extrakčného činidla v ml

0,025 - podiel hodnôt 0,25/10 v ml

5 -násobok riedenia filtrátu, t.j. (10+40)/10

m - hmotnosť navážky v g

7 Literatúra

- Metóda z Výskumného ústavu potravinárskeho: Stanovenie fumonizínov FB1 a FB2 v pevnej matrici metódou HPLC
- Ľ. Daško, D. Rauová, E. Belajová, M. Kováč: Determination of Fumonisins B1 and B2 in Beer
- EN 14352 Foodstuffs – Determination of fumonisin B1 and B2 in maize based foods – HPLC method with immunoaffinity column clean up
- návod na použitie imunoafinitných čistiacich kolóniek
- Príloha č. 2 k Výnosu MP SR č. 1497/4/1997-100 zo 7.10.1997 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