	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10571.1 – Stanovení obsahu mykotoxinů metodou LC-MS – fumonisin B <sub>1</sub> a B <sub>2</sub>	Revize	1

## STANOVENÍ OBSAHU MYKOTOXINŮ METODOU LC-MS - FUMONISIN B<sub>1</sub> A B<sub>2</sub>

### 1 Rozsah a účel

Metoda je vhodná pro stanovení fumonisinů B<sub>1</sub> a B<sub>2</sub> v krmivech.

### 2 Princip

Fumonisy (FUM) se extrahují ze vzorku směsí methanol : voda a část extraktu se přečistí na imunoafinitní kolonce. Eluát se odpaří do sucha pod proudem dusíku při 50 °C, rozpustí se v mobilní fázi a analyzuje se metodou LC-MS.

### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1 Methanol, čistota pro HPLC nebo vyšší.

2 Acetonitril, čistota pro HPLC nebo vyšší.

3 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

4 Extrakční směs methanol : voda, 80 : 20 (v/v).

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se nalije 800 ml methanolu (1) a doplní se vodou (3) po značku.

5 Směs acetonitril : voda, 50 : 50 (v/v).

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se nalije 50 ml acetonitrilu (2) a doplní se vodou (3) po značku.


6 Pufr PBS.

Příprava: 8,0 g chloridu sodného (7), 1,2 g hydrogenfosforečnanu sodného (8), 0,2 g dihydrogenfosforečnanu draselného (9) a 0,2 g chloridu draselného (10) se rozpustí v 990 ml vody (3) a přidá se malé množství koncentrované kyseliny chlorovodíkové tak, aby pH roztoku bylo 7. Poté se objem doplní do 1000 ml.


7 Chlorid sodný, NaCl.

8 Hydrogenfosforečnan sodný, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

9 Dihydrogenfosforečnan draselný, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10571.1 – Stanovení obsahu mykotoxinů metodou LC-MS – fumonisin B <sub>1</sub> a B <sub>2</sub>	Revize	1

- 10 Chlorid draselný, KCl.
- 11 Tablety pro výrobu pufu PBS.  
Příprava: 1 tableta se rozpustí ve 200 ml vody (3).
- 12 Fumonisin B<sub>1</sub>.
- 13 Fumonisin B<sub>2</sub>.
- 14 Fumonisin B<sub>1</sub> – zásobní roztok o koncentraci 500 µg/ml ve směsi acetonitril : voda (5).  
Příprava: Zásobní roztok se připraví rozpuštěním 1 mg krystalického Fumonisinu B<sub>1</sub> (12) ve 2 ml směsi acetonitril : voda (5).
- 15 Fumonisin B<sub>2</sub> – zásobní roztok o koncentraci 500 µg/ml ve směsi acetonitril : voda (5).  
Příprava: Zásobní roztok se připraví rozpuštěním 1 mg krystalického Fumonisinu B<sub>2</sub> (13) v 2 ml směsi acetonitril : voda (5).
- 16 Kyselina mravenčí, (98 – 100)%.
- 17 Mobilní fáze pro HPLC.  
A: 0,1% roztok kyseliny mravenčí ve vodě, (v/v).  
Příprava: Pipetuje se 1 ml kyseliny mravenčí (16) do 1000 ml vody (3).  
B: Acetonitril (2).
- 18 Roztok isotopově značeného Fumonisinu B<sub>1</sub> - U-[<sup>13</sup>C<sub>34</sub>] Fumonisin B<sub>1</sub> – roztok o koncentraci 25,1 µg/ml ve směsi acetonitril : voda (5) – použití jako vnitřní standard.
- 19 Zásobní roztok isotopově značeného Fumonisinu B<sub>1</sub> o koncentraci 251 ng/ml ve směsi acetonitril : voda.  
Příprava: Do 50ml odměrné baňky se napipetuje 500 µl roztoku vnitřního standardu (18) a doplní se směsí acetonitril : voda (5) po značku.
- 20 Směsný zásobní roztok fumonisinů B<sub>1</sub> a B<sub>2</sub> o koncentraci 2 µg/ml ve směsi acetonitril : voda.  
Příprava: Do 25ml odměrné baňky se napipetuje 100 µl jednotlivých roztoků standardů (14, 15) a doplní se směsí acetonitril : voda (5) po značku.
- 21 Sada kalibračních roztoků o koncentracích (87; 174; 348; 497; 870) ng/ml fumonisinů B<sub>1</sub> a B<sub>2</sub> a 156,9 ng/ml vnitřního standardu.  
Příprava: Do vialky se napipetuje (0; 70; 140; 280; 400; 700) µl standardu (20) a do každé vialky se přidá ještě 10 µl roztoku vnitřního standardu (18). Vialky se doplní do 1,6 ml směsí acetonitril : voda (5).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10571.1 – Stanovení obsahu mykotoxinů metodou LC-MS – fumonisin B <sub>1</sub> a B <sub>2</sub>	Revize	1

#### 4 Přístroje a pomůcky

- 1 Analytické váhy s přesností 0,01 mg.
- 2 Laboratorní třepačka horizontální.
- 3 Ultrazvuková lázeň.
- 4 Zařízení pro výrobu ultračisté vody, např. Milli-Q.
- 5 Imunoafinitní kolonky, např. FumoniTest™ firmy VICAM.
- 6 Koncentrátor vzorků, např. Termovap ECOM s.r.o.
- 7 Filtrační papíry, např. firmy VICAM: „microfibre filters“.
- 8 Kapalinový chromatograf s hmotnostním detektorem a příslušenstvím.

#### 5 Postup

##### 5.1 Extrakce

Do 300ml kónické baňky se naváží 25 g zkušební vzorku krmiva, přidá se 2,5 g chloridu sodného (7) a 100 ml extrakčního činidla (4). Baňka se uzavře zátkou, obsah se promíchá a extrahuje se na horizontální laboratorní třepačce po dobu 60 min. Nastavení počtu kmitů třepačky závisí na konzistenci vzorku. Poté se baňka s obsahem vloží na 10 min do ultrazvukové lázně, po vyjmutí z lázně se nechá ustát. Extrakt se zfiltruje přes skládaný papírový filtr do předložené nádoby.

##### 5.2 Přechištění a příprava vzorku pro LC-MS analýzu


10 ml zfiltrovaného extraktu se napipetuje do čisté suché baňky a zředí se 40 ml PBS (6, 11). Po promíchání se roztok opět zfiltruje, tentokrát přes vláknitý filtrační papír (7). 5 ml tohoto zředěného zfiltrovaného extraktu se aplikuje na imunoafinitní kolonku (5) průtokem 1 až 2 kapky/s, potom se přidá 200 µl vnitřního standardu (19) a dalších 5 ml extraktu. Kolonka se promyje 10 ml PBS (6, 11), rychlost průtoku je stejná. Fumonisin se eluuje 1,5 ml methanolu (1), vhodné je nechat methanol prokapat pouze gravitací.

##### 5.3 Příprava vzorku pro LC-MS analýzu

Eluát se odpaří pod proudem dusíku při teplotě 60 °C a vysušený vzorek se rozpustí v 500 µl směsi acetonitril : voda (5). Vzorek se protřepe a nechá nejméně 30 s v ultrazvukové lázni.

##### 5.4 Kalibrace a stanovení na LC-MS

Ze směsného zásobního roztoku fumonisinů (20) se naředí sada směsných kalibračních roztoků (21). Připravené kalibrační roztoky i vzorky se měří za následujících podmínek, které slouží jako příklad.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10571.1 – Stanovení obsahu mykotoxinů metodou LC-MS – fumonisin B <sub>1</sub> a B <sub>2</sub>	Revize	1

**Tabulka 1. Chromatografické podmínky.**

Kolona	Zorbax SB C18 150 mm × 4,6 mm I.D. 5 μm nebo podobná
Mobilní fáze	(17), gradientová eluce
Teplota kolony	30 °C
Objem nástřiku	(50 – 100) μl
Detektor	Hmotnostní detektor Esquire 6000, MS/MS analýza
MS podmínky	Iontový zdroj: Elektrosprej, záznam iontů v pozitivním módu, Rozsah m/z: 300-800, Sledované ionty MS: FUM B <sub>1</sub> – 722,5 m/z; FUM B <sub>2</sub> – 706,6 m/z.
MS/MS podmínky	Sledované produktové ionty FUM B <sub>1</sub> (M <sub>r</sub> = 721,8) – 704, 528, 352, 686, 546, 510, 370 m/z FUM B <sub>2</sub> (M <sub>r</sub> = 705,8) – 512, 336, 688, 354, 670, 530 m/z

## 6 Kontrola kvality

Jednou za 3 měsíce se analyzuje certifikovaný referenční materiál (např. firmy R-Biopharm). Změřená hodnota musí souhlasit s hodnotou danou pro tento materiál.

## 7 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah fumonisinů B<sub>1</sub> a B<sub>2</sub> v krmivech X vyjádřený v ng/g se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{c \times V \times E}{m \times \left(\frac{A}{r}\right)} \times \frac{C}{D} = \frac{c \times 100 \times 0,5}{25 \times \frac{10}{5}} \times \frac{100,4}{156,9} = c \times 0,64$$

- kde
- c* je koncentrace vypočtená z kalibrační křivky (ng/ml),
  - V* objem rozpouštědla použitý na extrakci (100 ml),
  - E* konečný objem roztoku (500 μl),
  - m* navážka vzorku (25 g),
  - A* objem extraktu použitý na přečištění (10 ml),
  - r* ředění před aplikací na imunoafinitní kolonku (5),
  - C* koncentrace vnitřního standardu ve vzorku (100,4 μg/ml),
  - D* koncentrace vnitřního standardu ve standardu (156,9 μg/ml).