

**การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารฟูโมนิซินในข้าวโพด
ด้วยเทคนิค Immunoaffinity Column (IAC) clean up และ ESI-LC-MS**

นายไกรวุฒิ นวลขาว^{1/} นายวิทยา สังข์ทอง^{1/} นายภูเกียรติ ขำขาว^{1/}

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีทดสอบสารฟูโมนิซิน ปี₁ ปี₂ และ ปี₃ ในตัวอย่างข้าวโพด ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) โดยเลือกใช้ SIM Mode (Selected Ion Monitoring) สกัดตัวอย่างในข้าวโพดด้วย 80% เมทานอล และทำให้บริสุทธิ์ด้วย Immunoaffinity Column (IAC) และทดลองสร้างกราฟมาตรฐานในช่วง 5.00 – 1,044 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Coefficient of Determination, r^2) อยู่ระหว่าง 0.9996 – 0.9999 และทำการทดสอบด้วยตัวอย่าง Fortified Sample ให้ค่า %recovery อยู่ระหว่าง 92.6 – 101.8% และทำการทดสอบตัวอย่างควบคุมคุณภาพรหัสตัวอย่าง PT-08-3031 ให้ค่า %recovery อยู่ระหว่าง 71.9 – 79.5% จากผลการทดสอบพบว่าวิธีวิเคราะห์นี้สามารถนำไปทดสอบความใช้ได้ของวิธี เพื่อใช้วิเคราะห์สาร ฟูโมนิซิน ปี₁ ปี₂ และ ปี₃ ในตัวอย่างข้าวโพด ด้วยเทคนิค LC-MS ต่อไป

คำสำคัญ: ฟูโมนิซิน, LC-MS, Immunoaffinity Column, ข้าวโพด

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method Development for Simultaneous Determination of Fumonisin in Maize
By Immunoaffinity Column (IAC) clean up with ESI-LC-MS

Kraiwut Nualkaw^{1/} Witaya Sungthong^{1/} Kukiatt Khamkhaw^{1/}

Abstract

Method development for simultaneous determination of Fumonisin B₁ B₂ and B₃ in maize was conducted using liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) with selected ion monitoring (SIM) mode. Maize samples were extracted with 80% methanol and purified using immunoaffinity column (IAC). The standard calibration curves were evaluated over the concentration range of 5.00 – 1044 µg/L with the coefficient of determination (r^2) were between 0.9996 - 0.9999. The developed method was tested with a fortified sample that showed the %recovery were between 92.6 – 101.8%, and was tested with the quality control sample from Bipea code 08-3031 that showed the %recovery were between 71.9 – 79.5%. The results showed that suitable for method validation for simultaneous determination for Fumonisin B₁ B₂ and B₃ in maize with LC-MS.

Keywords: Fumonisins, LC-MS, Immunoaffinity Column, Maize

Feed Quality Control Laboratory Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products,
Department of Livestock Development

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารฟูโมนิซินในข้าวโพด ด้วยเทคนิค Immunoaffinity Column (IAC) clean up และ ESI-LC-MS

นายไกรวุฒิ นวลขาว^{1/} นายวิทยา สังข์ทอง^{1/} นายกู้เกียรติ ขำขาว^{1/}

บทนำ

Fumonisin (FUM) หรือที่รู้จักกันอีกชื่อ (2S,2'S)-2,2'-[[5S,6R,7R,9R,11S,16R,18S,19S)-19-amino-11,16,bis[oxy(2-oxoethane-2,1-diyl)]] disuccinic acid เป็นสารพิษที่เกิดจากกระบวนการ metabolism ของเชื้อราในตระกูล *Fusarium* (Miller, 1991) ซึ่งพบได้อย่างแพร่หลายในแถบสภาพอากาศร้อนชื้นที่มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 20 – 25 องศาเซลเซียส ภายใต้ค่า water activity (AW) ระหว่าง 0.87 ถึง 0.88 โดยสภาวะแวดล้อมนี้จะทำให้เชื้อราในตระกูล *Fusarium* สามารถผลิตสารพิษในกลุ่ม Trichothecenes ได้มากกว่า 180 ชนิด (Desjardin, 2006) ในปี 1988 ได้มีการจำแนกสารพิษชนิด Fumonisin ได้ถึง 28 กลุ่ม และในจำนวนเหล่านี้สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ 4 กลุ่ม ได้แก่ Fumonisin A, B, C และ P โดย Fumonisin B จะเป็นกลุ่มที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ Fumonisin B₁ (FB₁) พบในระดับที่สูงที่สุดราว ๆ 70 – 80% ของจำนวนสุทธิที่พบ รองลงมาเป็น Fumonisin B₂ (FB₂) และ B₃ (FB₃) มีสัดส่วนในการพบ 25% และ 8% ตามลำดับ (Braham, 1993), (Marin, 1995)

การเฝ้าระวังสารพิษจากเชื้อรา Fumonisin นั้นเป็นส่วนสำคัญใน Food Safety Program เนื่องจากสารพิษชนิดนี้เป็นส่วนหนึ่งในสารพิษจากเชื้อรา (Mycotoxins) ที่สามารถก่อเกิดพิษและเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ได้ มีรายงานว่าพบสารพิษ FB₁, FB₂ และ FB₃ ในอาหารจากหลายประเทศ ได้แก่ อาร์เจนตินา, ออสเตรเลีย, บราซิล, บอตสวานา, บัลแกเรีย, แคนาดา, จีน, อียิปต์, ฝรั่งเศส, อิตาลี, ญี่ปุ่น, เกาหลี, อินเดีย, เนปาล, เปรู, แอฟริกาใต้, สวิตเซอร์แลนด์, สหรัฐอเมริกา และ ซิมบับเว ดังนั้น the U.S. Food and Drug Administration และ the European Commission ได้มีการเฝ้าระวังป้องกันสารพิษจากเชื้อราชนิดนี้ในอาหารและวัตถุดิบหลายชนิด ทั้งในอาหารคน และอาหารสัตว์ สหภาพยุโรปได้อนุญาตให้พบ FB₁ และ FB₂ ในอาหารได้ไม่เกิน 200 – 400 ug/kg ขึ้นอยู่กับชนิดและประเภทของวัตถุดิบ ส่วนทางด้านของสหรัฐอเมริกาได้มีการตั้งเกณฑ์มาตรฐานไว้สูงกว่า คือ อาหารมนุษย์ (FB₁ + FB₂ + FB₃) ไม่เกิน 2,000 – 4,000 ug/kg และ 5,000 – 100,000 ug/kg สำหรับอาหารสัตว์

1. วัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา Fumonisin ในข้าวโพดด้วยเทคนิค LC-MS

2. ขอบข่าย

ใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารพิษจากเชื้อรากลุ่ม Fumonisin (B_1 , B_2 , B_3) ในข้าวโพด และเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค Immunoaffinity Column (IAC) ตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS

3. ประโยชน์ที่ได้รับ

ได้วิธีที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษจากเชื้อรากลุ่ม Fumonisin ในข้าวโพด ด้วยเทคนิค LC-MS และนำไปใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ต่อไป

4. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

4.1 เครื่องมือ

- 4.1.1 เครื่อง LC-MS ยี่ห้อ Agilent Technologies รุ่น 1260 Infinity
- 4.1.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น PG603-S
- 4.1.3 ชุดปั่นตัวอย่างยี่ห้อ WARING รุ่น HGB2WT พร้อมโถ
- 4.1.4 Vortex Mixer ยี่ห้อ Genie รุ่น Genie 2
- 4.1.5 Micropipette ขนาด 10 – 100 μ L
- 4.1.6 Micropipette ขนาด 500 μ L
- 4.1.7 Micropipette ขนาด 100 – 1,000 μ L
- 4.1.8 Micropipette ขนาด 1,000 – 5,000 μ L
- 4.1.9 Dispenser ยี่ห้อ Genius รุ่น Simplex ขนาด 50 mL
- 4.1.10 เครื่อง Ultra sonic ยี่ห้อ Branson รุ่น 8200
- 4.1.11 ปีมกรองสารละลาย ยี่ห้อ EYELA รุ่น A-2S

4.2 สารเคมี/สารมาตรฐาน/วัสดุอ้างอิง

- 4.2.1 Formic acid HPLC Grade
- 4.2.2 Methanol HPLC Grade
- 4.2.3 Standard Fumonisin mix (Fumonisin B_1+B_2) ยี่ห้อ Fluka Lot.SZBF089XV
- 4.2.4 Standard Fumonisin B_3 ยี่ห้อ LGC Lot.16014F
- 4.2.5 Acetonitrile HPLC Grade
- 4.2.6 Sodium chloride AR Grade
- 4.2.7 Quality Control Sample (Animal Feed, Bipea PT-08-30311)

4.3 อุปกรณ์

- 4.3.1 Column LC Zorbax SB C_{18} 3.5 μ m ขนาด 4.6 X 100 มิลลิเมตร
- 4.3.2 น้ำบริสุทธิ์ที่มีความต้านทานไม่น้อยกว่า 18.2 $M\Omega$.cm
- 4.3.3 ซ้อนดักสาร
- 4.3.4 Syringe Filters ขนาด 0.45 μ m ชนิด Nylon
- 4.3.5 กรวยกรองสารละลาย ชนิด Polypropylene
- 4.3.6 หลอดเข็นตริฟิวซ์ชนิด Polypropylene ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 4.3.7 กระดาษกรอง Whatman no. 4 หรือเทียบเท่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18.5 เซนติเมตร
- 4.3.8 Rack สำหรับวางหลอดเข็นตริฟิวซ์

- 4.3.9 Glass Micro-fiber filter ขนาด 1.5 ไมโครเมตร หรือเทียบเท่า
- 4.3.10 Disposable Syringe พลาสติกชนิดไม่มีหัวเข็มขนาด 10 มิลลิลิตร
- 4.3.11 Clamp พร้อมขาตั้ง หรือชุด hand pump
- 4.3.12 Vial HPLC พร้อมฝาและ Septum
- 4.3.13 Aluminium foil
- 4.3.14 Immunoaffinity column FumoniTest, ยี่ห้อ VICAM
- 4.3.15 Cylinder ขนาด 10, 50, 1000 มิลลิลิตร
- 4.3.16 Beaker ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 4.3.17 Volumetric Flask ขนาด 5, 10, 50, 100 มิลลิลิตร
- 4.3.18 Disposable Cuvettes
- 4.3.19 ขวด Duran พร้อมฝาเกลียวสำหรับใส่ Mobile Phase

5. วิธีการดำเนินงาน

5.1 ทดสอบสถานะที่เหมาะสมสำหรับการแยกด้วยเทคนิค Liquid Chromatography ในการตรวจวัดสารพิษจากเชื้อรา Fumonisin ทั้ง 3 ชนิด ดัดแปลงจาก (Vega, 2016)

5.2 ทดสอบสถานะที่เหมาะสมสำหรับเครื่องตรวจวัด Mass Spectrometer ในการตรวจวัดสารพิษจากเชื้อรา Fumonisin ทั้ง 3 ชนิด ดัดแปลงจาก (Vega, 2016)

5.3 ทดสอบสร้าง Standard Calibration Curve ของสารพิษจากเชื้อรา Fumonisin ทั้ง 3 ชนิด 8 ระดับความเข้มข้นและนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS นำพื้นที่ใต้กราฟ และความเข้มข้นไปสร้าง calibration curve หาค่า r^2 (Coefficient of Determination) โดยค่า $r^2 \geq 0.995$ (AOAC, 2016) ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบสารพิษจากเชื้อรา Fumonisin ทั้ง 3 ชนิด

Compounds	Concentration ranges (ng/mL)
Fumonisin B ₁	5.05-1010 (5.05, 10.10, 20.20, 50.50, 101.0, 202.0, 505.0, 1044.0)
Fumonisin B ₂	5.22-1044 (5.22, 10.44, 20.88, 52.20, 104.4, 208.8, 522.0, 1044.0)
Fumonisin B ₃	5.00-1000 (5.00, 10.00, 20.00, 50.00, 100.0, 200.0, 500.0, 1000.0)

5.4 ทดลองเตรียมตัวอย่างข้าวโพด (Blank Maize) ในการตรวจวัดสารพิษจากเชื้อรา Fumonisin ทั้ง 3 ชนิด ดัดแปลงจาก AOAC Official Method 2001.04, 2016 (AOAC, 2016) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ชั่งตัวอย่าง 25.0 g + Sodium chloride 2.5 g ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 mL

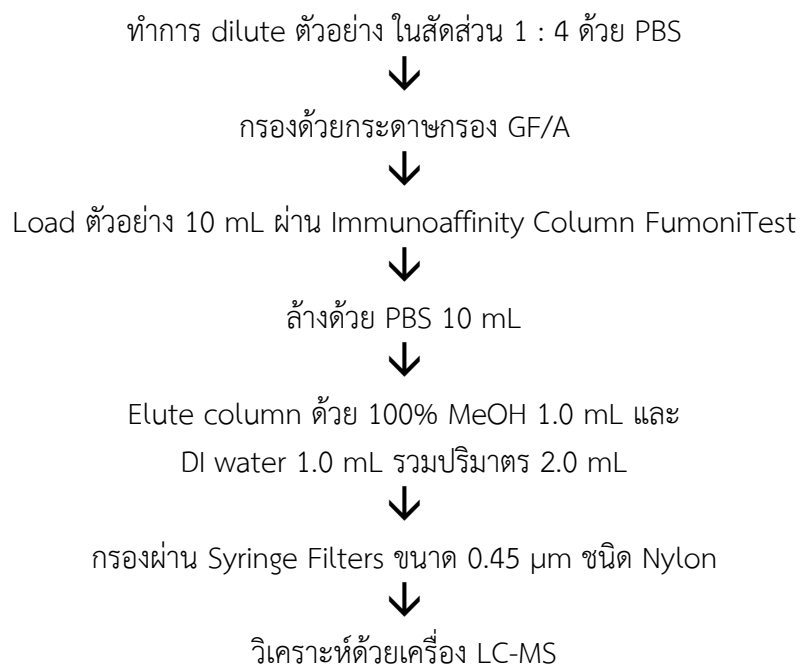


เติม 80% Methanol 50 mL เขย่าเป็นเวลา 30 นาที



กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4





5.5 ทดสอบ Fortified Sample โดยเติมสารมาตรฐาน Fumonisin ทั้ง 3 ชนิด ลงในตัวอย่าง ข้าวโพด ให้มีความเข้มข้นของ Fumonisin B₁ B₂ B₃ แต่ละชนิดเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และทำการเตรียมตัวอย่างตามข้อ 6.4 และประเมินประสิทธิภาพของวิธีทดสอบจากค่า %Recovery โดยค่าที่ได้ต้องอยู่ระหว่าง 60-120% (European Commission EC. 41/2006, 2006)

5.6 ทดสอบตัวอย่างอ้างอิง (QC Sample) รหัส 08-3031 และทำการเตรียมตัวอย่างตามข้อ 5.4 และประเมินประสิทธิภาพของวิธีทดสอบจากค่า %Recovery โดยค่าที่ได้ต้องอยู่ระหว่าง 60 - 120% (European Commission EC. 41/2006, 2006)

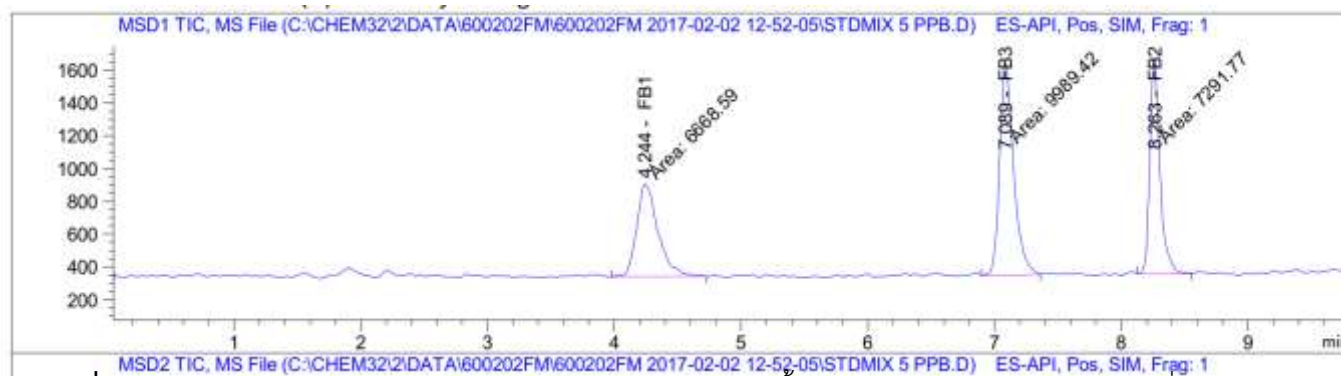
6. ผลการทดลอง

6.1 ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารพิษจากเชื้อรา Fumonisin ทั้ง 3 ชนิด ด้วย Liquid Chromatography ตามตารางที่ 2 และ รูปที่ 1

ตารางที่ 2 แสดง LC Condition สำหรับวิเคราะห์สาร Fumonisin ทั้ง 3 ชนิด โดยใช้คอลัมน์ Zorbax SB C18 4.6 x 100 mm, 3.5 µm.

Parameters		Values	
Gradient Elution profile	Time	0.1% formic acid	MeOH
	0.00	38.0	62.0
	2.00	38.0	62.0
	10.00	2.0	98.0

	11.00	38.0	62.0
	17.00	38.0	62.0
Flow rate	0.5 mL/min		
Column temperature	40 °C		
Injection volume	20 uL		
Run time	17.00 min		
Retention time (min.)	Fumonisin B ₁ = 4.244		
	Fumonisin B ₃ = 7.089		
	Fumonisin B ₂ = 8.263		



รูปที่ 1 แสดง Total Ion Chromatogram (TIC) ของสารพิษจากเชื้อรา Fumonisin B₁, B₃ และ B₂ ที่ความเข้มข้น 5.0 ng/mL

6.2 ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของ Mass Spectrometer ในการวิเคราะห์สารพิษ Fumonisins ทั้ง 3 ชนิด ตามตารางที่ 3

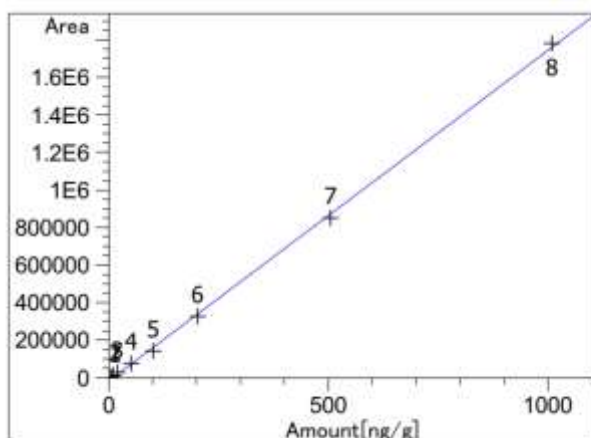
ตารางที่ 3 แสดงสภาวะที่เหมาะสมของ Mass Spectrometer

Parameters	Values
SIM mode (m/z)	FB ₁ [M+H] ⁺ = 722.4
	FB ₂ [M+H] ⁺ = 706.4
	FB ₃ [M+H] ⁺ = 706.4
ESI source	Positive mode
Dwell time	190 msec
Drying gas	10.0 mL/min
Nebulizer pressure	50 psig
Dry gas temperature	350 °C
Capillary voltage (+)	3500 V
Fragmentor	150 V

6.3 ผลการทดสอบ Standard Calibration Curve ของสารพิษจากเชื้อรากลุ่ม Fumonisin ทั้ง 3 ชนิด ตามตารางที่ 4 และ รูปที่ 2-4

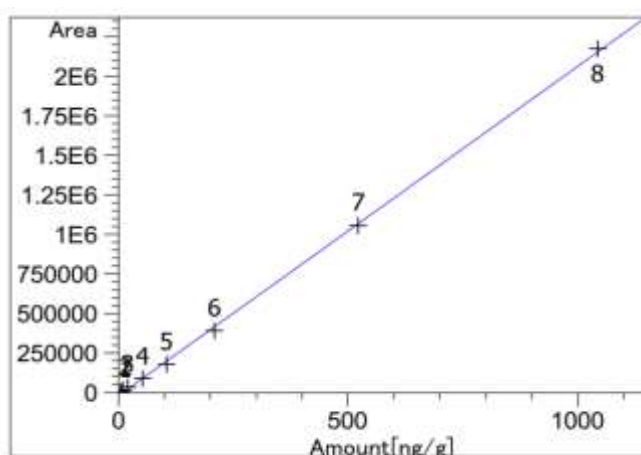
ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบแสดงค่าความเป็นเส้นตรงของสารพิษ Fumonisin ทั้ง 3 ชนิด

Compounds	Slope	Intercept	r^2
Fumonisin B ₁	1760.62725	-14357.76666	0.99963
Fumonisin B ₂	2083.40033	-17569.89215	0.99972
Fumonisin B ₃	2711.76115	-15821.20213	0.99986



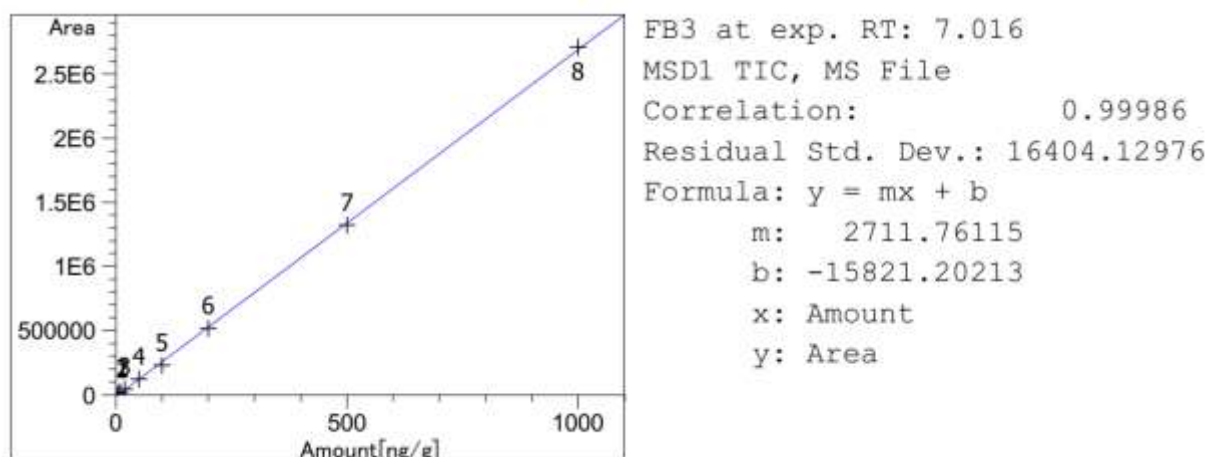
FB1 at exp. RT: 4.206
MSD1 TIC, MS File
Correlation: 0.99963
Residual Std. Dev.: 17458.31230
Formula: $y = mx + b$
m: 1760.62725
b: -14357.76666
x: Amount
y: Area

รูปที่ 2 แสดง Calibration curve ของ Fumonisin B₁ ที่ความเข้มข้น 5.05 – 1010.0 ng/mL



FB2 at exp. RT: 8.219
MSD1 TIC, MS File
Correlation: 0.99972
Residual Std. Dev.: 18403.89789
Formula: $y = mx + b$
m: 2083.40033
b: -17569.89215
x: Amount
y: Area

รูปที่ 3 แสดง Calibration curve ของ Fumonisin B₂ ที่ความเข้มข้น 5.22 – 1044.0 ng/mL

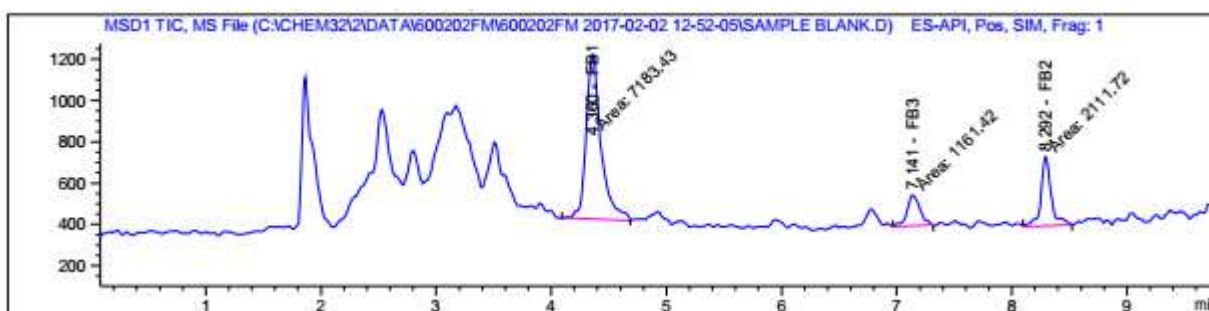


รูปที่ 4 แสดง Calibration curve ของ Fumonisin B₃ ที่ความเข้มข้น 5.0 – 1000.0 ng/mL

6.4 ผลทดสอบข้าวโพด (Blank Maize) ตามตารางที่ 5 และรูปที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบตัวอย่างข้าวโพด (Blank maize)

Compounds	Result (ug/kg)	S/N
FB ₁	4.37	12.0
FB ₃	0.42	7.3
FB ₂	0.92	3.3

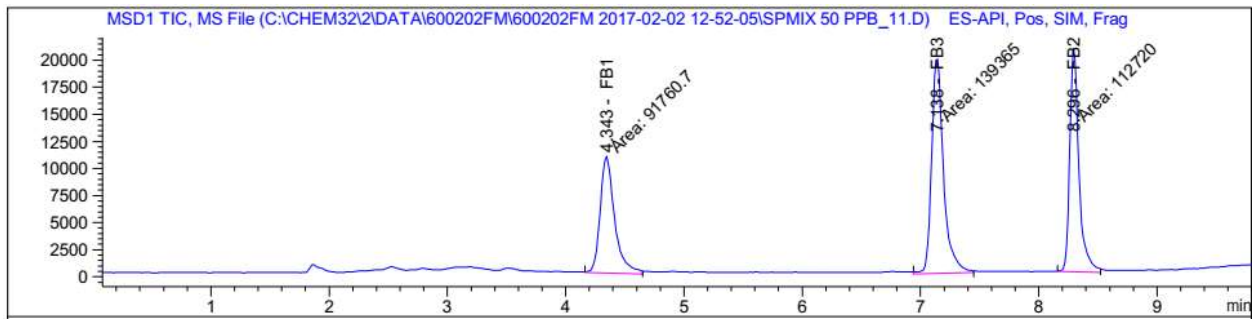


รูปที่ 5 แสดง Total Ion Chromatogram (TIC) ในตัวอย่าง Sample blank ของสารพิษจากเชื้อรา Fumonisin B₁, B₃ และ B₂

6.5 ผลทดสอบ Fortified Sample ตามตารางที่ 6 และ รูปที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงผลการทดสอบ Fortified sample

Compounds	Fortified conc. (ug/kg)	Results (ug/kg)	%recovery
FB ₁	50.5	51.43	101.84
FB ₃	52.2	48.34	92.60
FB ₂	50.0	49.88	99.76

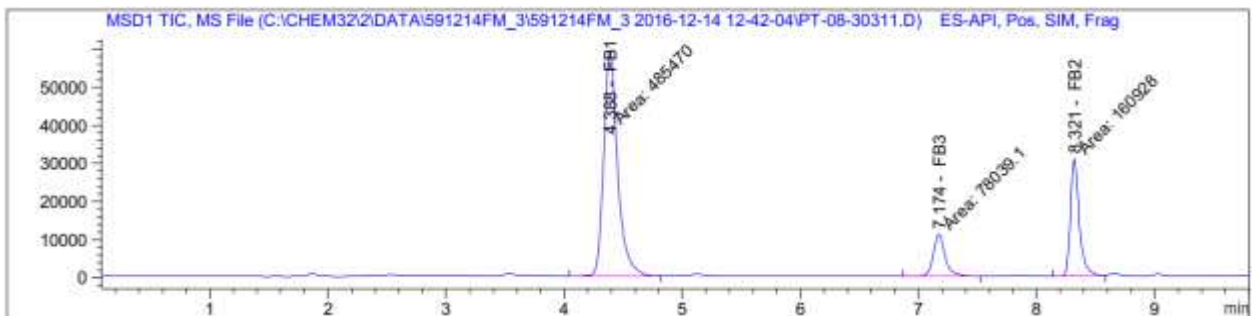


รูปที่ 6 แสดง Total Ion Chromatogram (TIC) ในตัวอย่าง Sample blank ของสารพิษจากเชื้อรา Fumonisin B₁, B₃ และ B₂

6.6 ผลการทดสอบตัวอย่างอ้างอิง (QC Sample) รหัส PT-08-30311 ตามตารางที่ 7 และ รูปที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงผลการทดสอบ QC Sample

Compounds	Fortified conc. (ug/kg)	Results (ug/kg)	%recovery
FB ₁	412.0	327.5	79.49
FB ₂	126.0	90.6	71.90
FB ₃	-	34.19	-



รูปที่ 7 แสดง Total Ion Chromatogram (TIC) ในตัวอย่าง QC Sample (08-3031) ของสารพิษจากเชื้อรา Fumonisin B₁, B₃ และ B₂

7. สรุปผลการทดลอง

7.1 ผลการทดสอบเตรียมสารมาตรฐาน Fumonisin ทั้ง 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 5.0 - 1,000 ng/mL นำไปสร้าง calibration curve ภายใต้สภาวะระบบเครื่อง LC-MS ที่ได้พัฒนาขึ้นนั้น ได้ค่า $r^2 = 0.9963$ สำหรับ FB_1 , $r^2 = 0.99986$ สำหรับ FB_3 และ $r^2 = 0.99972$ สำหรับ FB_2 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.995 (AOAC, 2016)

7.2 ผลการทดสอบ Sample blank โดยใช้ตัวอย่างข้าวโพด (maize) พบว่า ตัวอย่างมีปริมาณสารพิษ Fumonisin $B_1 = 4.37$ ug/kg, $B_3 = 0.42$ ug/kg และ $B_2 = 0.92$ ug/kg และมีค่า Signal to noise (S/N) 12.0, 7.3 และ 3.3 ตามลำดับ

7.3 ผลการทดสอบ fortified sample โดยการเติมสารพิษ Fumonisin $B_1 = 50.5$ ug/kg, $B_3 = 52.2$ ug/kg และ $B_2 = 50.0$ ug/kg นั้น ได้ผลการทดลองดังนี้ $FB_1 = 51.43$ ug/kg (%recovery = 101.84), $FB_3 = 48.34$ ug/kg (%recovery = 92.60) และ $FB_2 = 49.88$ ug/kg (%recovery = 99.76) %recovery ที่ได้ทั้งหมด อยู่ในเกณฑ์ 60 – 120% (AOAC, 2016)

7.4 ผลการทดสอบ QC Sample รหัส PT-08-30311 Animal Feed ที่มีค่า Assign value ของสาร Fumonisin ดังนี้ $FB_1 = 412.0$ ug/kg, $FB_2 = 126.0$ ug/kg ตรวจพบปริมาณ $FB_1 = 327.5$ ug/kg (%recovery 79.49) และ $FB_2 = 90.6$ ug/kg (%recovery 71.90) ซึ่ง %recovery อยู่ในเกณฑ์ 60 – 120% (AOAC, 2016)

7.5 จากผลการทดสอบพบว่าวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นสามารถนำไปตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ต่อไป

8. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ขอขอบคุณ นายไพโรจน์ อ่างโสภาส ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ นางสุทธิพร พริยายน หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์คุณภาพอาหารสัตว์ ส่วนบริหารจัดการห้องปฏิบัติการที่ดำเนินงานจัดทำวัสดุ อุปกรณ์ ในการปฏิบัติงาน และเจ้าหน้าที่งานพิษวิทยาและชีวเคมี (สารพิษจากเชื้อรา) กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ที่ช่วยดำเนินงานจนการศึกษานี้สำเร็จ

9. เอกสารอ้างอิง

- AOAC (2016). Appendix K: Part I: AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals.
- Branham, B. E., & Plattner, R.D. (1993) *Mycopathologia*. **124**, 99 – 104.
doi: 10.1007/BF01103109
- Desjardins, A. E. (2006) *Fusarium Mycotoxins. Chemistry, Genetics, and Biology*, American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN
- European Commission (EC), 2006. COMMISSION REGULATION (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs.
- Marin, S. V., Sanchis, I., Vinas, R., Canela, N., & Magan, N. (1995) *Lett. Appl. Microbiol.* **21**, 298 – 305. doi: 10.1111/j.1472-765X. 1995. Tb01064.x
- Marin, S. V., Sanchis, N., & Magan, N. (1995) *Can. J. Microbiol.* **41**, 1063 – 1070.
doi: 1139/m95 – 149
- Miller, J. D., Greehalgh, R., Wang, Y.Z., & Lu, M. (1991) *Mycologia*. **83**, 121 – 130.
doi: 10.2307/3759927
- VICAM FumoniTest and FumoniTest WB instruction manual. (2009) FUMONITEST HPLC procedure For Corn.
- Victor A. Vega (2016). A Quick Assay for the Quantitation of Fumonisin B₁ and B₂ in maize Sample by Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. Journal Of AOAC International. Vol. 99, No. 3.