

**Жидкостная хроматография /  
Масс-спектрометрия**

Авторы:

Wilhad M. Reuter

Avinash Dalmia

PerkinElmer, Inc.  
Shelton, CT

## Анализ микотоксинов в мультизерновых и кукурузных хлопьях методом ВЭЖХ-МС/МС

### Введение

Продукты питания, корма и посевные культуры, содержащие микотоксины, представляют серьёзную угрозу для здоровья животных и людей. Микотоксины, как продукт жизнедеятельности грибов, являются токсичными вторичными метаболитами. Воздействию грибов особенно подвержены сельскохозяйственные культуры. Учитывая, что по оценкам экспертов 25% всех культур заражены микотоксинами, многие страны установили нормативные требования на их максимальное содержание не только в кормах и зерне, но также и в переработанных пищевых продуктах, особенно в зерновых продуктах и детском питании.

Актуальные значения предельно допустимых концентраций (ПДК) микотоксинов в продуктах переработки зерновых культур для разных стран представлены в Таблице 1. Наиболее строгие требования относятся к микотоксину В1 (ПДК 2 мкг/кг в соответствии с требованиями ЕС) и охратоксину А (ПДК 3 мкг/кг в соответствии с требованиями ЕС и Сингапура).

**Таблица 1. Значения ПДК (мкг/кг; ppb) для микотоксинов в продуктах переработки зерновых культур, предназначенных для потребления человеком [1].**

Микотоксин	ЕС	США	Китай	Сингапур	Бразилия
<b>Суммарное содержание В1, В2, G1 и G2</b>	4	20	-	5	5
<b>В1</b>	2	-	5* 20**	5	-
<b>Суммарное содержание Т-2 и НТ-2</b>	75***	-	-	-	-
<b>Суммарное содержание F-В1 и F-В2</b>	800	-	-	-	400
<b>Охратоксин А</b>	3	-	5*	3	10
<b>Алкалоиды спорыньи</b>	NA				

\*Зерновые продукты; \*\* Кукуруза / арахис;  
 - в настоящее время нет нормативного ограничения  
 \*\*\* Ориентировочный уровень (ПДК обсуждается)

Цель данного исследования – разработка простого и эффективного метода для определения низких концентраций микотоксинов в мультисерновых и кукурузных хлопьях методом ВЭЖХ-МС/МС. Определяемые микотоксины: афлатоксины В1, В2, G1, G2, Охратоксин А, НТ-2 и Т-2 токсины, эргокристин и фумонизины F-В1 и F-В2.

## **Экспериментальная часть**

### **Оборудование и программное обеспечение**

Хроматографическое разделение проводили на УВЭЖХ PerkinElmer с масс-спектрометрическим детектором QSight 210 (масс-анализатор - тройной квадруполь) (PerkinElmer). Управление прибором, сбор и обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Simplicity 3Q (PerkinElmer).

### **Хроматографические условия и параметры масс-спектрометра.**

Хроматографические условия и параметры масс-спектрометра представлены в таблицах 2 и 3 соответственно.

**Таблица 2. Хроматографические условия.**

<b>Хроматографическая колонка</b>	PerkinElmer Analytical C18, 100 x 4.6 мм, 3 мкм, 4 (Part# N9303863)																																			
<b>Подвижная фаза</b>	<b>А:</b> 5 мМ формиат аммония и 0.1% муравьиная кислота <b>В:</b> 90/10 метанол/5 мМ формиат аммония и 0.1% муравьиная кислота																																			
	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="5">Программа градиентного элюирования</th> </tr> <tr> <th>Шаг</th> <th>Время (мин)</th> <th>Поток (мл/мин)</th> <th>%А</th> <th>%В</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0</td> <td>1.00</td> <td>45.00</td> <td>55.00</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>3.50</td> <td>1.00</td> <td>45.00</td> <td>55.00</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>3.75</td> <td>1.00</td> <td>10.00</td> <td>90.00</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>7.00</td> <td>1.00</td> <td>10.00</td> <td>90.00</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>7.10</td> <td>1.00</td> <td>45.00</td> <td>55.00</td> </tr> </tbody> </table>	Программа градиентного элюирования					Шаг	Время (мин)	Поток (мл/мин)	%А	%В	1	0	1.00	45.00	55.00	2	3.50	1.00	45.00	55.00	3	3.75	1.00	10.00	90.00	4	7.00	1.00	10.00	90.00	5	7.10	1.00	45.00	55.00
Программа градиентного элюирования																																				
Шаг	Время (мин)	Поток (мл/мин)	%А	%В																																
1	0	1.00	45.00	55.00																																
2	3.50	1.00	45.00	55.00																																
3	3.75	1.00	10.00	90.00																																
4	7.00	1.00	10.00	90.00																																
5	7.10	1.00	45.00	55.00																																
<b>Время анализа</b>	7.0 мин; время равновесия 4.0 мин																																			
<b>Температура термостата</b>	35 °С																																			
<b>Вводимый объем</b>	50 мкл																																			

**Таблица 3. Параметры масс-спектрометрического детектора.**

<b>Режим ионизации</b>	ESI +			
<b>Осушающий газ (азот): 120 (единиц); HSID Температура: 320 °С; Электроспрей V1: 4500 (В); EV(V)<sup>1</sup>: 30</b>				
<b>Группа 1 (1.00 - 2.10 мин)</b>	<b>MRM переходы</b>			
	<b>Количественный ион</b>	<b>Подтверждающий ион</b>	<b>CCL2 (В)<sup>2</sup></b>	<b>CE(В)<sup>3</sup></b>
Афлатоксин G2	331.1/245.2	331.1/285.1	-100	-35
<b>Группа 2 (1.90 - 3.50 мин)</b>	<b>MRM переходы</b>			
	<b>Количественный ион</b>	<b>Подтверждающий ион</b>	<b>CCL2(В)</b>	<b>CE(В)</b>
Афлатоксин G1	329.0/243.2	329.0/283.2	-120	-30
Афлатоксин В2	315.1/259.2	315.1/287.2	-120	-32
Афлатоксин В1	313.3/285.2	313.3/241.3	-110	-30
<b>Группа 3</b>	<b>MRM переходы</b>			

<b>(4.90 - 5.62 мин)</b>	<b>Количественный ион</b>	<b>Подтверждающий ион</b>	<b>CCL2(V)</b>	<b>CE(V)</b>
НТ-2 Токсин	447.3/285.3	447.3/345.4	-120	-23
Фумонизин F-B1	722.8/352.4	722.8/334.4	-120	-47
<b>Группа 4 (5.22 - 5.85 мин)</b>	<b>MRM переходы</b>			
	<b>Количественный ион</b>	<b>Подтверждающий ион</b>	<b>CCL2(V)</b>	<b>CE(V)</b>
Т-2 Токсин	489.2/245.1	489.2/387.1	-115	-30
Эргокристин	610.6/223.3	610.6/592.6	-120	-23
Охратоксин А	404.2/239.1	404.2/358.2	-85	-25
<b>Группа 5 (5.55 - 6.10 мин)</b>	<b>MRM переходы</b>			
	<b>Количественный ион</b>	<b>Подтверждающий ион</b>	<b>CCL2(V)</b>	<b>CE(V)</b>
Фумонизин F-B2	706.8/336.5	706.8/354.3	-120	-30

<sup>1</sup> - **EV** – (Entrance Voltage) – входное напряжение на интерфейсе переноса ионов в масс-анализатор.

<sup>2</sup> - **CCL2** (Collision Cell Lens 2 voltage) – напряжение на входной линзе ячейки столкновений.

<sup>3</sup> - **CE** (Collision energy) – энергия соударений.

### **Стандартные растворы и пробоподготовка**

Образцы мультисерновых и кукурузных хлопьев были куплены в местном магазине.

Стандартные образцы индивидуальных веществ были приобретены в Sigma-Aldrich.

Для оценки влияния матричных эффектов были приготовлены две серии калибровочных растворов, в которых в качестве растворителя использовали:

1. смесь ацетонитрила и воды;
2. водно-ацетонитрильный экстракт мультисерновых или кукурузных хлопьев (матрица).

*Рабочий раствор* стандартных образцов готовили в смеси ацетонитрил/вода в соотношении 80/20.

*Приготовление калибровочных растворов без использования матрицы:*

Калибровочные растворы готовили путем последовательного разбавления рабочего раствора, предварительно разбавленного водой в соотношении 1:1, используя в качестве растворителя смесь ацетонитрила и воды 40/60, получая таким образом пять калибровочных растворов.

*Приготовление калибровочных растворов с использованием матрицы:*

К 5 граммам измельченных хлопьев прибавляли 20 мл рабочего раствора, затем энергично встряхивали в течение 25 мин и центрифугировали 10 мин при 3500 об/мин. Надосадочную жидкость разбавляли водой в соотношении 1:1, из полученного раствора готовили калибровочные растворы путем последовательного разбавления, используя в качестве растворителя смесь ацетонитрила и воды 40/60, получая таким образом пять калибровочных растворов.

*Приготовление испытуемых растворов образцов:*

К 5 граммам измельченных хлопьев прибавляли 20 мл смеси ацетонитрила и воды в соотношении 80/20, затем энергично встряхивали в течение 25 мин и центрифугировали 10 мин при 3500 об/мин. Надосадочную жидкость разбавляли водой в соотношении 1:1.

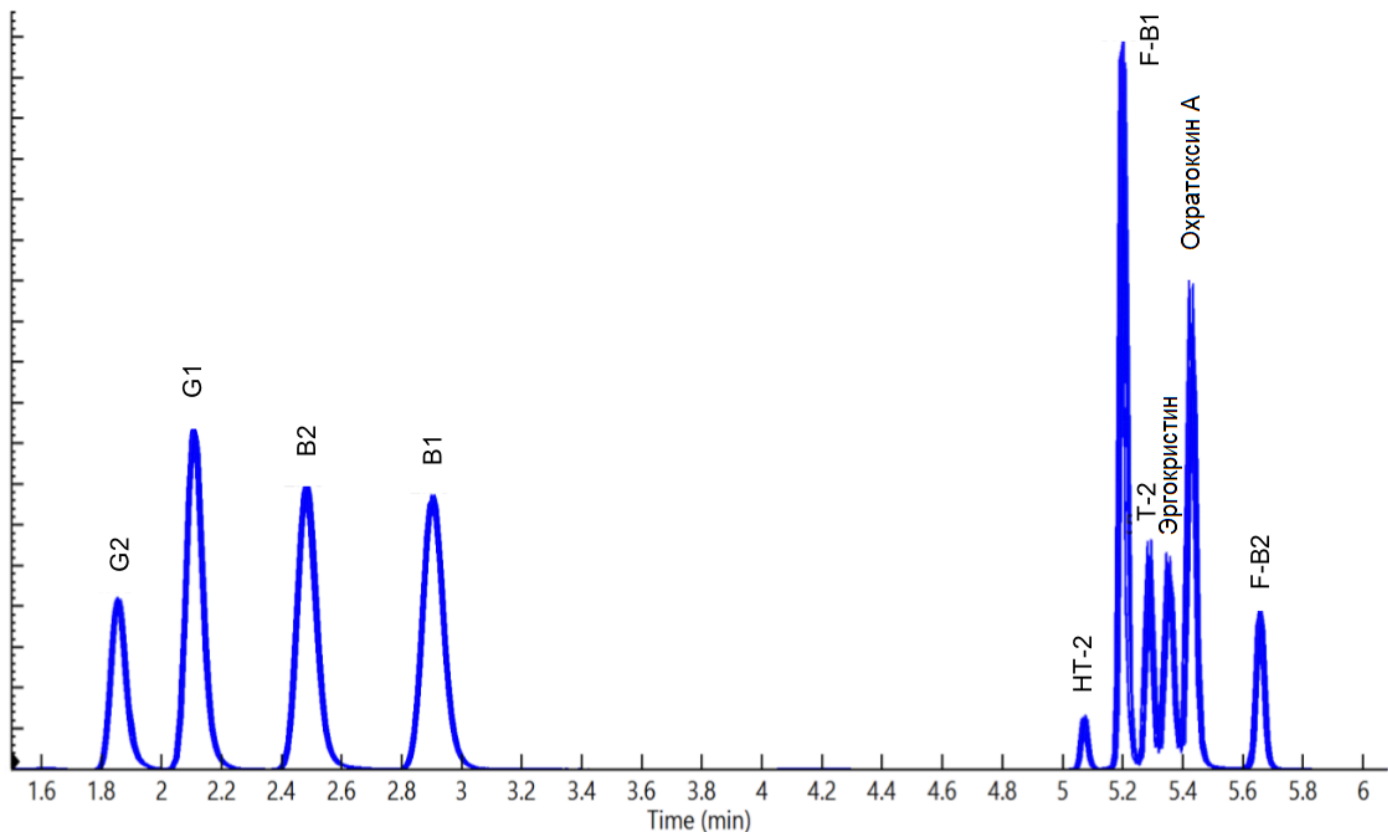
*Приготовление растворов для определения степени извлечения определяемых компонент:*

Для оценки степени извлечения микотоксинов на примере микотоксина В1 и охратоксина А, которые имеют наименьшие ПДК (2 и 3 мкг/кг соответственно), к 5 граммам измельченных хлопьев добавляли 5 мл смеси ацетонитрил/вода в соотношении 40/60, содержащей по 5 ppb микотоксина В1 и охратоксина А. После экстракции и центрифугирования отбирали 5 миллилитров надосадочной жидкости и разбавляли ее водой в соотношении 1:1.

Перед вводом в хроматограф все растворы фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0.22 мкм, каждый раствор анализировали 3 раза.

## **Обсуждение результатов**

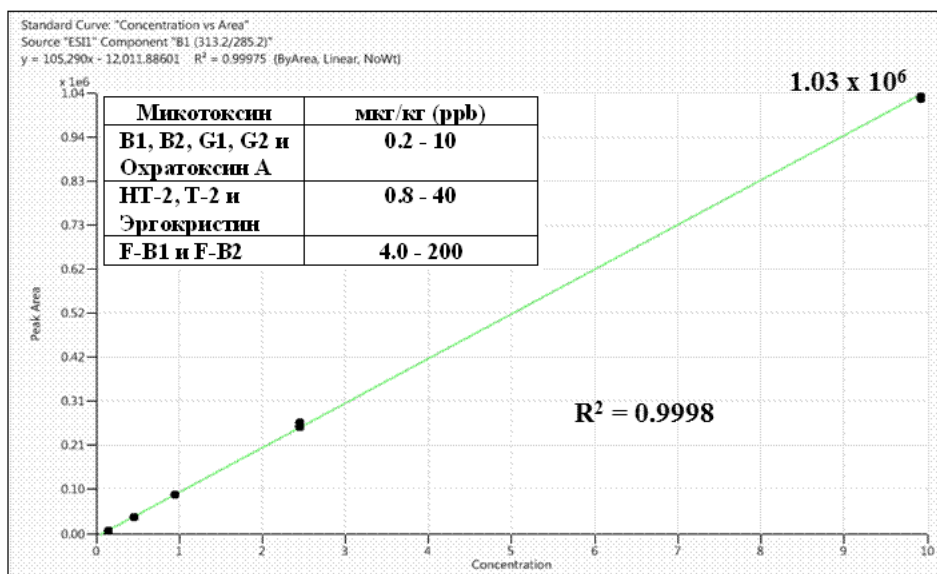
Рисунке 1 представлено наложение MRM хроматограмм (MRM-переходы для количественных ионов) 10 параллельных инъекций, демонстрирующее хорошую повторяемость результатов.



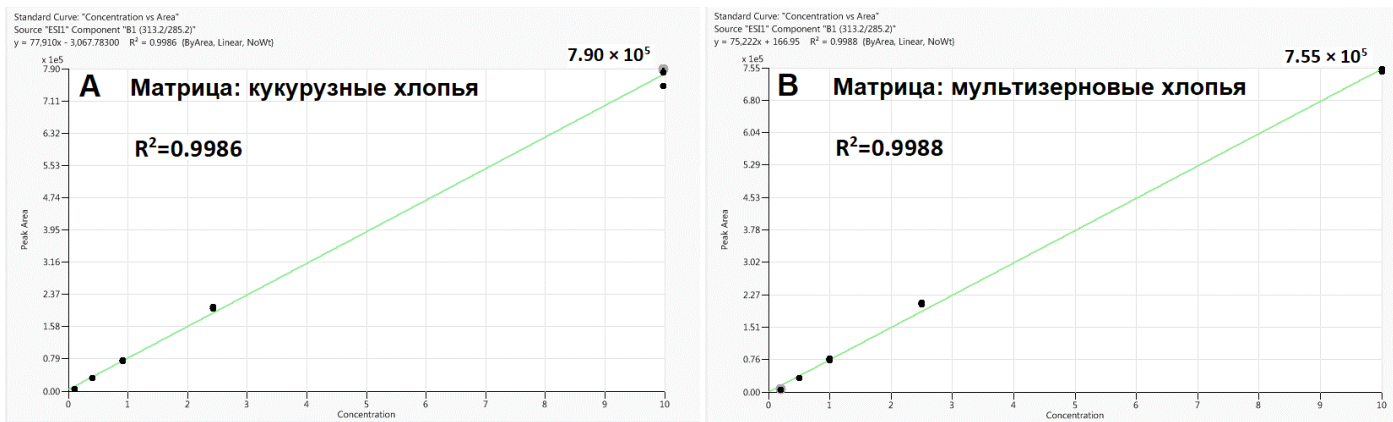
**Рисунок 1. Наложение MRM хроматограмм (MRM-переходы для количественных ионов) 10 параллельных инъекций.**

Квадрат коэффициента линейной корреляции калибровочных кривых для всех компонентов был больше 0.995 ( $R^2 > 0.995$ ).

Калибровочные графики микотоксина В1, полученные при приготовлении калибровочных растворов без использования матрицы и с матрицей представлены на рисунках 2 и 3 соответственно.



**Рисунок 2. Калибровочный график микотоксина В1, полученный при калибровке без использования матрицы. Диапазоны концентраций определяемых компонентов.**



**Рисунок 3. Калибровочные графики микотоксина В1, полученные при калибровке с использованием в качестве матрицы кукурузных (А) и мультизерновых (В) хлопьев.**

Для проверки возможного эффекта подавления ионизации сравнивали калибровочные графики, полученные для растворов без матрицы и с ее использованием. На рисунках 2 и 3 приведены значения отклика детектора на концентрацию микотоксина В1 равную 10 мкг/кг. Усредненные данные при сравнении величин отклика детектора на анализируемые компоненты свидетельствуют о снижении чувствительности на 20-25% в присутствии матрицы, что обусловлено эффектом подавления ионизации.

В таблице 4 приведены рассчитанные пределы количественного определения (ПКО) для определяемых компонентов.

**Таблица 4. Значения ПКО для определяемых компонентов.**

Микотоксин	S/N (сигнал/шум)*	ПКО (мкг/кг)**
G2	73	0.03
G1	122	0.02
B2	91	0.02
B1	83	0.02
HT-2	27	0.30
F-B1	44	0.91
Эргокристин	40	0.20
Охратоксин А	75	0.03
T-2	85	0.09
F-B2	19	2.11

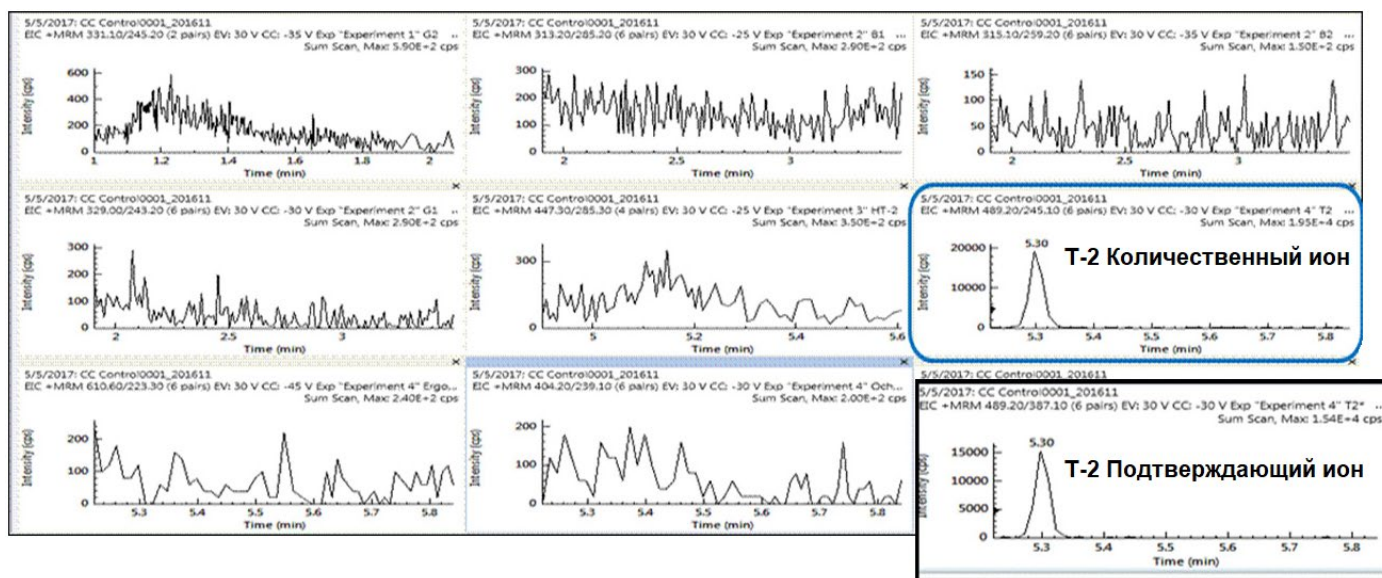
\* - Усредненное значение S/N (сигнал/шум) нижней концентрации калибровочных графиков, построенных с использованием в качестве матриц кукурузных и мультизерновых хлопьев.

\*\* - Рассчитано из значений приведенных для S/N (сигнал/шум).



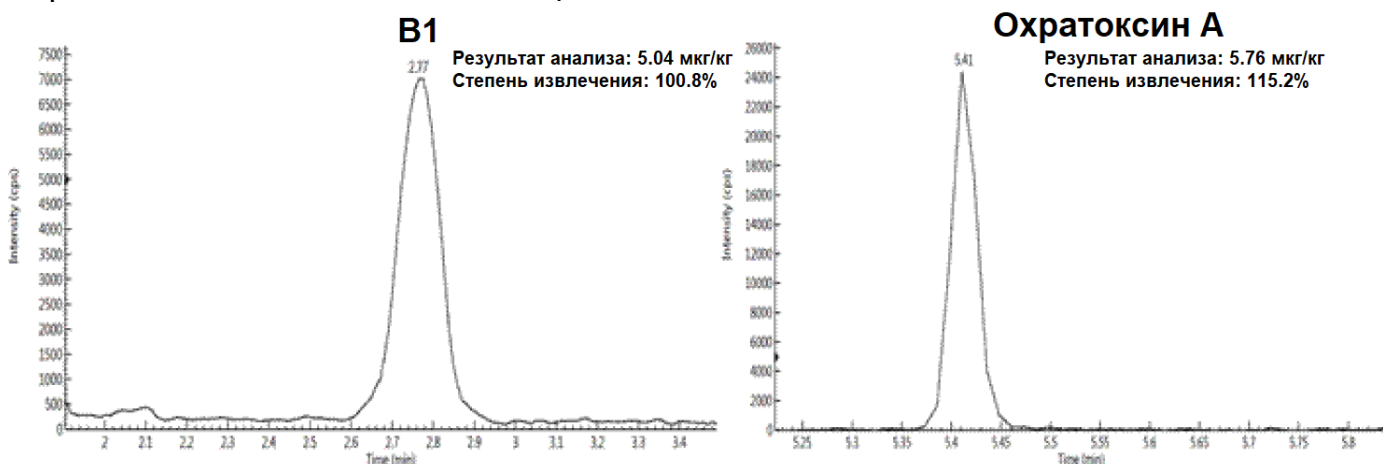
Контрольный анализ кукурузных и мультизерновых хлопьев, которые использовались в качестве матриц для калибровки, показал содержание в них микотоксина Т-2 с концентрацией 13.8 и 7.92 мкг/кг соответственно. Содержание микотоксина Т-2 в данных образцах учитывалось в дальнейшем при построении калибровочных графиков для данного микотоксина.

Хроматограммы MRM-переходов для количественного и подтверждающего ионов микотоксина Т-2 в образце кукурузных хлопьев показаны на рисунке 4.



**Рисунок 4. Хроматограммы MRM-переходов для количественного и подтверждающего ионов микотоксина Т-2 в образце кукурузных хлопьев.**

На рисунке 5 показана степень извлечения микотоксинов В1 и охратоксина А на примере анализа образца мультизерновых хлопьев с концентрацией определяемых соединений 5 мкг/кг.



**Рисунок 5. Хроматограммы MRM-переходов микотоксинов В1 и охратоксина А и их степень извлечения из образца мультизерновых хлопьев с концентрацией определяемых соединений 5 мкг/кг.**



## Заключение

Разработан простой и эффективный метод для определения низких концентраций микотоксинов в мультизерновых и кукурузных хлопьях методом ВЭЖХ-МС/МС.

Установленные пределы количественного определения микотоксинов значительно ниже значений ПДК, указанных в нормативных документах для продуктов переработки зерновых культур, предназначенных для потребления человеком.

В настоящий момент данная методика успешно применяется пользователями компании Scheltec для анализа микотоксинов в пищевой продукции из зерновых культур.

### Список литературы.

[1]. [www.mycotoxins.info/myco\\_info/consum\\_regu.html](http://www.mycotoxins.info/myco_info/consum_regu.html).

PerkinElmer, Inc.  
940 Winter Street  
Waltham, MA 02451 USA  
P: (800) 762-4000 or  
(+1) 203-925-4602  
[www.perkinelmer.com](http://www.perkinelmer.com)



---

For a complete listing of our global offices, visit [www.perkinelmer.com/ContactUs](http://www.perkinelmer.com/ContactUs)  
Copyright ©2017, PerkinElmer, Inc. All rights reserved. PerkinElmer® is a registered trademark of PerkinElmer, Inc. All other trademarks are the property of their respective owners.

013618B\_01 PKI