



APPLICATION NOTE

**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
Суммарное содержание В1, В2, G1 и G2	4	20	-	5	5
В1	2	-	5* 20**	5	-
Суммарное содержание Т-2 и НТ-2	75***	-	-	-	-
Суммарное содержание F-B1 и F-B2	800	-	-	-	400
Охратоксин А	3	-	5*	3	10
Алкалоиды спорыньи	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 мультизерновых 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-B1 и F-B2.

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.

Хроматографическая колонка	PerkinElmer Analytical C18, 100 x 4.6 мм, 3 мкм, 4 (Part# N9303863)				
Подвижная фаза	А: 5 мМ формиат аммония и 0.1% муравьиная кислота В: 90/10 метанол/5 мМ формиат аммония и 0.1% муравьиная кислота				
	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	
Время анализа	7.0 мин; время равновесия 4.0 мин				
Температура термостата	35 °С				
Вводимый объем	50 мкл				

Таблица 3. Параметры масс-спектрометрического детектора.

Режим ионизации	ESI +			
Осушающий газ (азот): 120 (единиц); HSID Температура: 320 °С; Электроспрей V1: 4500 (В); EV ¹ : 30(В);				
Группа 1 (1.00 - 2.10 мин)	MRM переходы			
	Количественный ион	Подтверждающий ион	CCL2 (В)²	CE(В)³
Афлатоксин G2	331.1/245.2	331.1/285.1	-100	-35
Группа 2 (1.90 - 3.50 мин)	MRM переходы			
	Количественный ион	Подтверждающий ион	CCL2(В)	CE(В)
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
Группа 3 (4.90 - 5.62 мин)	MRM переходы			
	Количественный ион	Подтверждающий ион	CCL2(В)	CE(В)
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

Таблица 3. (продолжение)

Группа 4 (5.22 - 5.85 мин)	MRM переходы			
	Количественный ион	Подтверждающий ион	CCL2(B)	CE(B)
Т-2 Токсин	489.2/245.1	489.2/387.1	-115	-30
Эргокрестин	610.6/223.3	610.6/592.6	-120	-23
Охратоксин А	404.2/239.1	404.2/358.2	-85	-25
Группа 5 (5.55 - 6.10 мин)	MRM переходы			
	Количественный ион	Подтверждающий ион	CCL2(B)	CE(B)
Фумонизин F-B2	706.8/336.5	706.8/354.3	-120	-30

¹ - EV – (Entrance Voltage) – входное напряжение на интерфейсе переноса ионов в масс-анализатор.

² - CCL2 (Collision Cell Lens 2 voltage) – напряжение на входной линзе ячейки столкновений.

³ - CE (Collision energy) – энергия соударений.

Стандартные растворы и пробоподготовка

Образцы мультизерновых 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 мультизерновых 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 компонентов:

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.

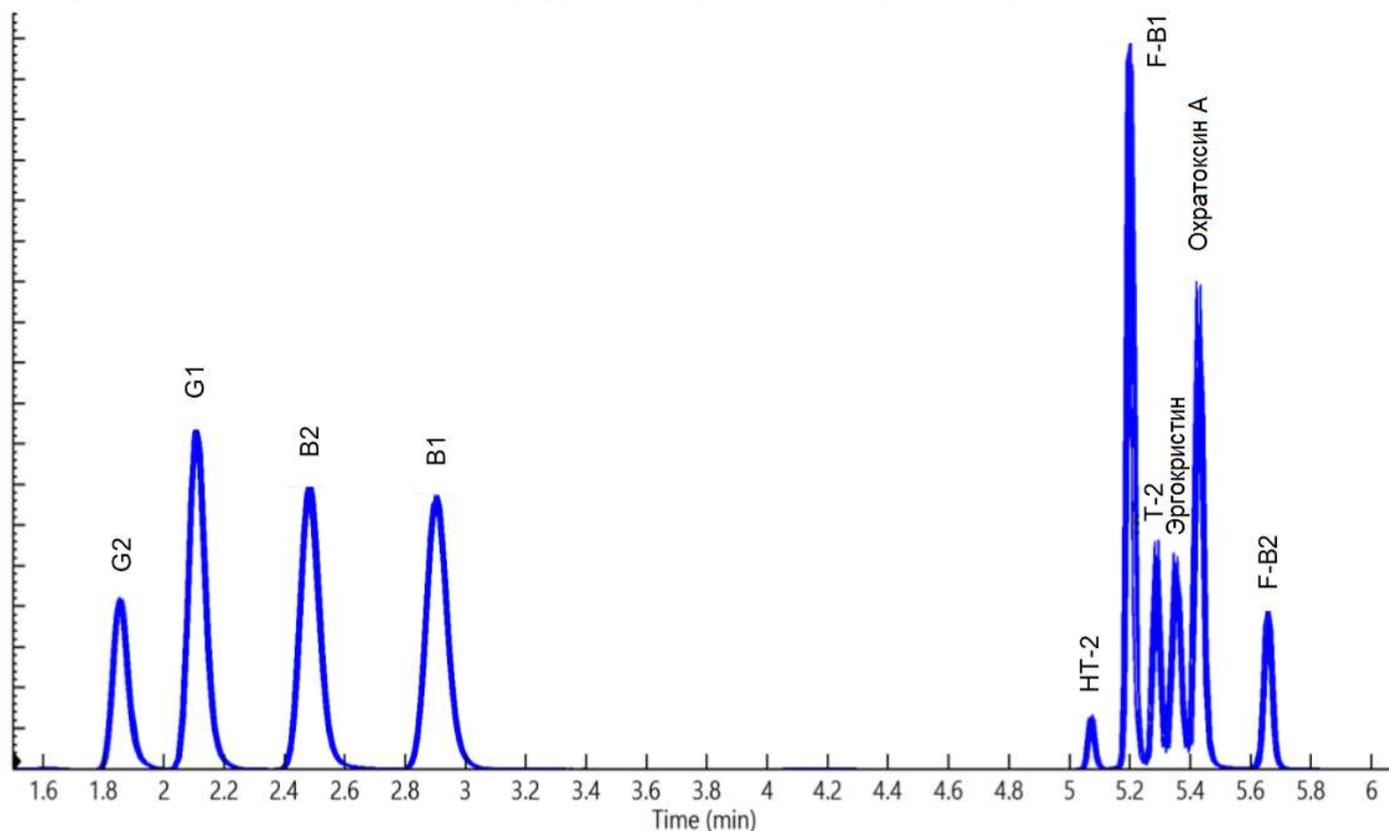


Рисунок 1. Наложение MRM хроматограмм (MRM-переходы для количественных ионов) 10 параллельных инъекций.

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.

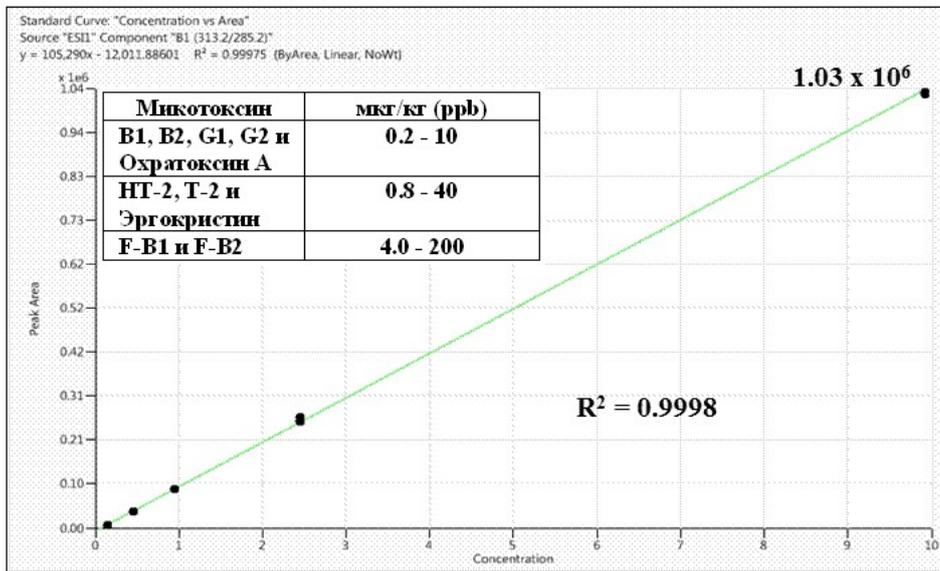


Рисунок 2. Калибровочный график микотоксина В1, полученный при калибровке без использования матрицы. Диапазоны концентраций определяемых компонентов.

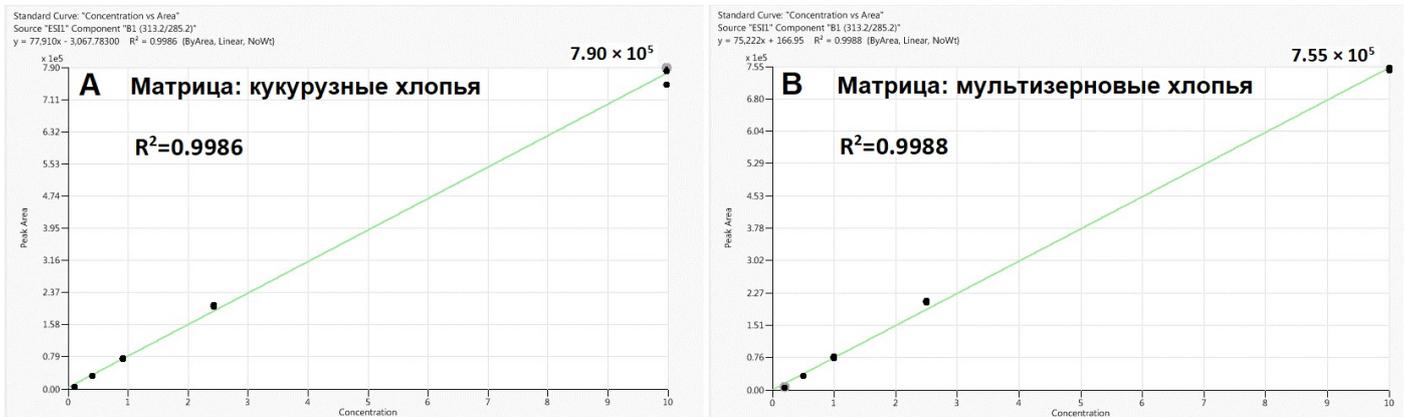


Рисунок 3. Калибровочные графики микотоксина В1, полученные при калибровке с использованием в качестве матрицы кукурузных (А) и мультизерновых (В) хлопьев.

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
Эргокрестин	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.

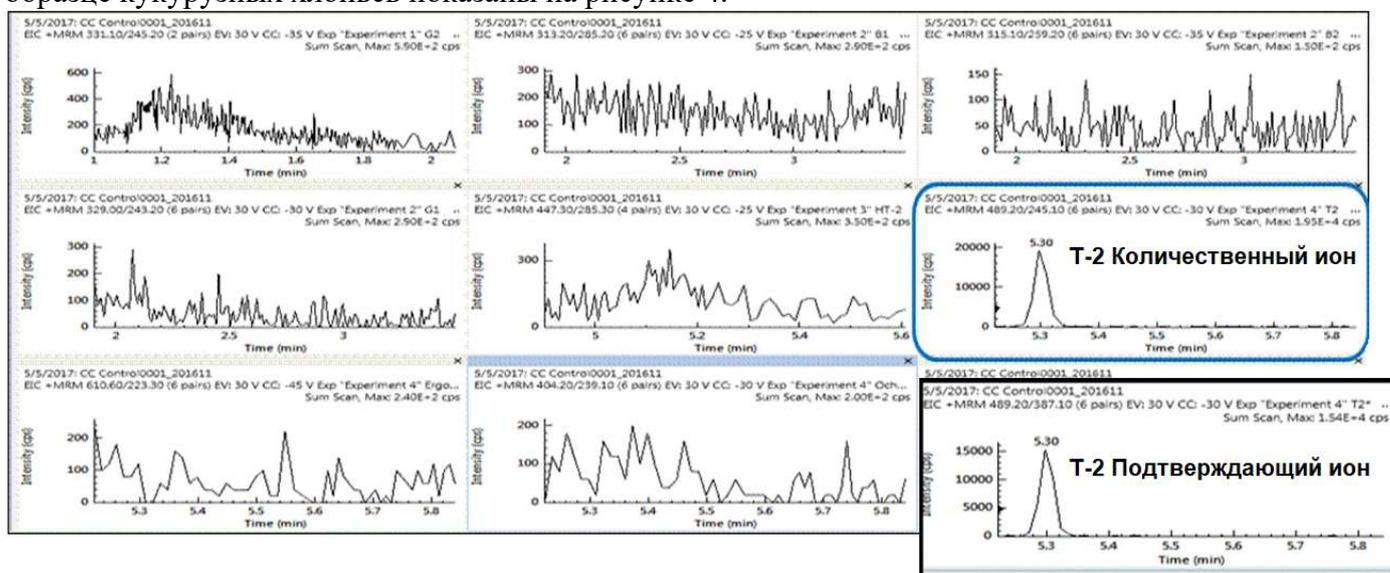


Рисунок 4. Хроматограммы MRM-переходов для количественного и подтверждающего ионов микотоксина Т-2 в образце кукурузных хлопьев.

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

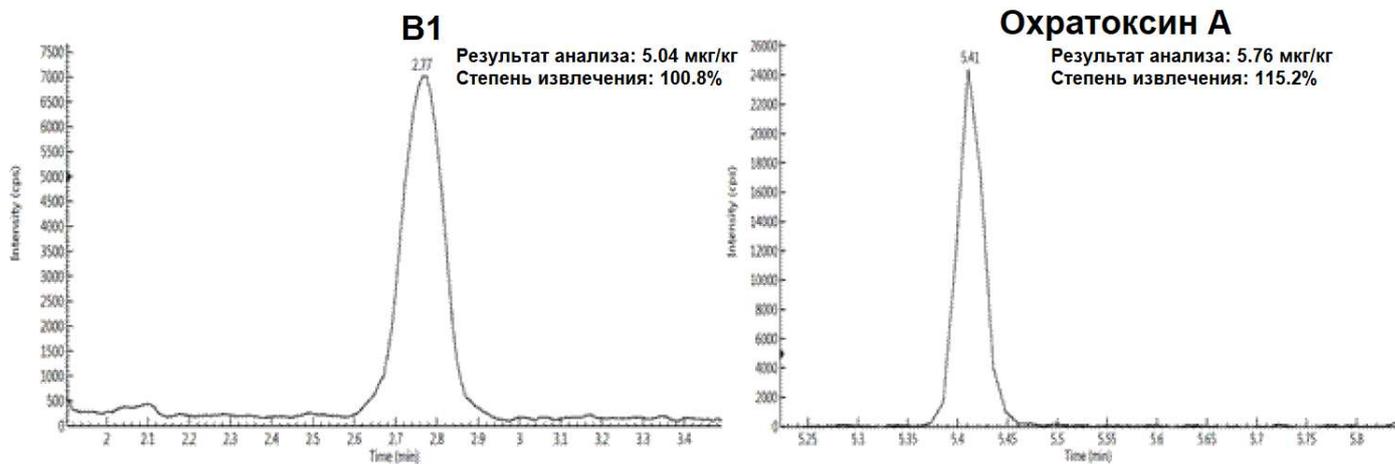


Рисунок 5. Хроматограммы MRM-переходов микотоксинов В1 и охратоксина А и их степень извлечения из образца мультизерновых хлопьев с концентрацией определяемых соединений 5 мкг/кг.

Заключение

Разработан простой и эффективный метод для определения низких концентраций микотоксинов в мультизерновых и кукурузных хлопьях с помощью ВЭЖХ-МС/МС PerkinElmer QSight 210.

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.

Scheltec авторизованный дистрибьютор PerkinElmer в странах СНГ, Грузии и Монголии
<http://www.scheltec.ru>

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



For a complete listing of our global offices, visit 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.