

# МЕТОД ЖИДКОСТНОЙ ТАНДЕМНОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКОТОКСИНОВ В ДЕТСКОМ ПИТАНИИ И КОРМАХ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

**А.М.Захарова**, к.х.н., **И.С.Муратова**, к.х.н., **А.В.Кинд**,  
**Н.Ю.Исупова**, к.х.н., **Д.А.Бараненко**, к.т.н., **И.Л.Гринштейн**, к.х.н.,  
ООО "Аналит Продактс"  
za@analit-spb.ru

УДК 543.544.5.068.7; ВАК 02.00.02

Проблема безопасности пищевой продукции и кормов для животных – одна из жизненно важных. Среди наиболее токсичных веществ, накапливаемых в продуктах из некачественного сырья или из-за неправильного хранения, особое место занимают микотоксины. Современные аналитические методы и оборудование позволяют контролировать их содержание на очень низких уровнях по сравнению с предельно допустимыми концентрациями. В статье представлены результаты исследования содержания микотоксинов в 10 образцах каш для детского питания, а также в 12 образцах кормов для кошек и собак разных производителей. Для количественного определения использовали метод жидкостной тандемной хромато-масс-спектрометрии. Описаны процедуры пробоподготовки, подбора условий для хроматографического анализа и масс-спектрометрического детектирования целевых соединений.

Микотоксины – продукты метаболизма определенных видов плесневых грибов, которые встречаются повсеместно, но обычно в чрезвычайно малых количествах и поэтому не представляют опасности. Однако, при благоприятных условиях (оптимальная температура, влажность, питательная среда) они начинают интенсивно размножаться. Несоблюдение условий хранения пищевой продукции и сырья способствует развитию грибковой микрофлоры. Это происходит в продуктах как растительного, так и животного происхождения. Вместе с мясом, молоком, яйцами, крупами, орехами, фруктами токсины попадают в организм человека, где накапливаются в тканях или подвергаются метаболизму с образованием других токсичных соединений [1-3]. Эти соединения оказывают канцерогенное и мутагенное воздействие в чрезвычайно низких концентрациях. Постоянное воздействие микотоксинов может привести к тяжелому поражению почек, печени и сердечно-сосудистой системы, как человека, так и животных [4]. Они не разлагаются при термической обработке продукции. Выделяют пять групп наиболее распространенных микотоксинов: дезоксиниваленол, зеараленон, охратоксины, фумонизины и афлатоксины. Во многих странах, в том числе и в России, введены норма-

тивы на содержание самых опасных микотоксинов в пище, кормах для животных и сырье для них. Особое внимание уделяется контролю детского питания. Для этой категории продукции установлены очень низкие нормы содержания микотоксинов (табл.1) [5]. Определение такого уровня концентраций представляет собой непростую аналитическую задачу [6].

Те же соединения нормируются в кормах для сельскохозяйственных животных и птицы. Однако, для непродуктивных животных регламентируется только содержание афлатоксина В1 (< 0,01 мг/кг) [7, 8], контроль за другими опасными соединениями этой группы не проводится. Поэтому одна из задач нашего исследования состояла в оценке содержания наиболее вредных токсинов в сухих кормах для этих животных.

Нормативные документы предписывают определение микотоксинов методами высокоэффективной жидкостной, тонкослойной и газовой хроматографии. Анализу предшествует длительная пробоподготовка, включающая экстракцию, очистку полученных экстрактов на сорбционных колонках (в том числе иммуноаффинных), упаривание и т.д. [9-13]. Сложность выявления микотоксинов хроматографическими

Таблица 1. Предельно допустимые уровни микотоксинов в детском питании, согласно СанПиН 2.3.2.1078-01

Наименование микотоксина	ПДК, мг/кг
Афлатоксин В1	<0,00015
Афлатоксин М1	< 0,00002
Зеараленон	<0,005
Дезоксиниваленол	<0,05
Т-2 токсин	<0,05
Охратоксин А	<0,005

методами связана с широким разнообразием их химической природы и свойств, а также с присутствием большого количества непредсказуемых примесей в продуктах растительного и животного происхождения. Именно поэтому общепринятые методики их определения обычно касаются только одного соединения.

Метод тандемной хромато-масс-спектрометрии дает возможность селективного высокочувствительного определения одновременно большого количества соединений [14, 15]. Также интересно было подобрать единую процедуру пробоподготовки для объектов различной природы, чтобы за один анализ проводить определение широкого перечня микотоксинов. Именно поэтому целью нашего исследования стала разработка единого подхода к выявлению содержания основных нормируемых микотоксинов в образцах каш для детского питания и сухих кормов для кошек и собак с использованием тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии [16, 17].

Проанализировано десять образцов детских каш, шесть кормов для кошек и столько же – для собак. Одна из задач нашего исследования кормов состояла в определении количества токсикантов в продукции разных ценовых категорий – эконом-класса и профессиональных. Измеряли содержание девяти микотоксинов: афлатоксинов В1, В2, G1, G2, М1; Т-2 токсина; зеараленона; дезоксиниваленола; охратоксина А. Все товары были приобретены случайным образом в магазинах Санкт-Петербурга. В табл.2 приведены сведения об исследованных образцах, на рис.1, 2 – их фотографии.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Подготовка образцов

Пробоподготовка – важный этап, который включает стадии отбора, экстракции и очистки экстрактов. Необходимо учитывать, что метаболиты плесневых грибов концентрируются



Рис.1. Каши для детского питания

в местах образования плесени, неравномерно распределяясь в исследуемом объекте. Поэтому важно уделить особое внимание гомогенизации пробы.

Сухой, сыпучий объект исследования (каша, корм) измельчали с помощью блендера, тщательно перемешивали, добавляли 100 мл смеси АСН : Н<sub>2</sub>О (84:16 по объему) и проводили экстракцию из 25 г измельченного образца, непрерывно встряхивая в течение часа. Экстракты выдерживали несколько минут до осаждения нерастворимого остатка, затем отбирали 4–5 мл верхнего слоя раствора, фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм с помощью шприца и отбирали 2 мл. Раствор очищали на ТФЭ-картриджах Supel Tox AflaZea SPE производства компании Supelco. Сорбент картриджа не требует предварительной подготовки, что позволяет экономить время. Механизм очистки – адсорб-



Рис.2. Сухие корма для кошек и собак

Таблица 2. Сведения об образцах детских каш и кормов для кошек и собак

Маркировка образца	Название
Каша для детского питания	
№ 1 Nestle	Рисовая каша гипоаллергенная безмолочная
№ 2 Nestle	Мультизлаковая каша пять злаков безмолочная
№ 3 Bebi	Детская молочная каша рисовая с курагой
№ 4 Heinz	Низкоаллергенная кукурузная кашка
№ 5 Heinz	Низкоаллергенная многозерновая кашка из 5 злаков без молока
№ 6 "Умница"	Каша молочная пять злаков + 13 витаминов
№ 7 "Фруто няня"	Овсяная каша банан, яблоко
№ 8 "Сами с усами"	Детская молочная каша из пяти злаков
№ 9 "Малютка" Nutricia	Каша безмолочная кукурузная
№ 10 "Малютка" Nutricia	Каша безмолочная гречневая
Корма для кошек	
№ 11 Kitekat	Мясной пир
№ 12 Felix	Двойная вкуснятина с мясом
№ 13 Whiskas	Аппетитное ассорти с говядиной и кроликом
№ 14 Royal canin	Для стерилизованных взрослых кошек
№ 15 Monge	Rich in chicken. Sterilised
№ 16 Purina	Cat show. Sterilised
Корма для собак	
№ 17 Pedigree Vital	Для взрослых собак всех пород
№ 18 Perfect fit	Total 5
№ 19 Hills Science plan	Для взрослого питомца
№ 20 Purina pro plan	Duo Delice. Rich in beef with rice
№ 21 Royal canin	Для собак весом до 10 кг
№ 22 Chappi	Мясное изобилие с овощами и травами

ционное удаление примесей из экстракта: микотоксины проходят через сорбент, не удерживаясь. Раствор пропускали со скоростью примерно капля в секунду.

Процедуру проводили с помощью вакуумной установки для твердофазной экстракции – 12-позиционного манифолда производства компании LabTech. Для анализа детского питания собирали 1 мл элюата и упаривали при 50°C под вакуумом досуха в системе упаривания и концентрирования Smart Evaporator C1 компании BioChromato (Япония) (рис.3).

Благодаря технологии вихревого концентрирования при вакуумировании возрастает площадь поверхности контакта между жидкостью и воздухом (или азотом), ускоряется испарение растворителя и происходит концентрирование образцов без нагрева до высоких температур.

Кроме того, вихревой поток сдувает остатки раствора со стенок вials на дно, собирая весь аналит внизу. Сухой остаток перерастворяли в 500 мкл смеси ACN:H<sub>2</sub>O (10:90 по объему), фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм и подвергали хроматографическому анализу.

Поскольку норматив на содержание афлатоксина В1 в кормах для непродуктивных животных существенно выше, чем в детском питании, для этих продуктов исключили стадию концентрирования с упариванием экстракта и последующим перерастворением. К 200 мкл экстракта, полученного после очистки на картридже Supel Tox AflaZea SPE, добавляли 800 мкл воды, смесь отфильтровывали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм и подвергали хроматографическому анализу.

#### Условия ВЭЖХ-МС/МС-анализа

Анализ проводили на жидкостном хромато-масс-спектрометре с тройным квадруполом LCMS-8040 (Shimadzu, Япония) в режиме ESI (electrospray ionization, ионизация с распылением в электрическом поле). В качестве настроек интерфейса были выбраны: поток распыляющего газа (азота) – 2 л/мин, температура осушающего газа (азота) – 15 л/мин, температура десольватации – 400 °С. Для разделения микотоксинов использовали хроматографическую колонку Titan C18, 5 см × 3,0 мм; 1,9 мкм. В качестве подвижной фазы применяли 5 мМ формиат аммония в воде и смесь ацетонитрил:метанол 1:1 (об. %), используя градиентный режим элюирования. Скорость потока подвижной фазы – 0,4 мл/мин; температура колонки – 35°C; объем инъекции – 2 мкл. Также были подобраны условия МС-детектирования и оптимизированы ионы-прекурсоры и ионы-продукты (MRM-переходы) для каждого соединения в (+) и (-) режимах переключения полярности. Времена удерживания и MRM-переходы всех аналитов приведены в табл.3. Диапазон градуировочной зависимости составил 1–50 нг/мл для всех микотоксинов.



Рис.3. Принцип работы Smart Evaporator C1 компании Bio-Chromato (Япония)

Для построения градуировочной зависимости использовали готовые стандартные образцы – растворы микотоксинов в ацетонитриле, бензоле или смеси ацетонитрил-бензол производства РФ. Аликвоты стандартов упаривали в токе азота и перерастворяли в подвижной фазе, получая исходный раствор. Затем готовили серию градуировочных растворов в подвижной фазе. Построение зависимостей проводили по методу внешнего стандарта. На рис.4–6 представлены хроматограмма стандартного раствора, градуировочная зависимость и масс-спектр афлатоксина В1.

На рис.7, 8 приведены масс-спектры зеараленона и Т-2 токсина, а на рис.9, 10 – хроматограммы образцов экстрактов каш № 10 "Малютка" Nutricia и № 8 "Сами с усами" по выбранным ионам.

Хроматограммы образца корма для кошек № 15 Monge по выбранным ионам представлены на рис.11, 12.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

Полученные результаты определения микотоксинов в детском питании и кормах для непродуктивных животных обобщены и проанализированы. Поскольку ПДК единственного нормируемого в кормах афлатоксина В1 существенно выше, чем в детском питании (10 и 0,15 мкг/кг соответственно), мы не стали рассчитывать точные концентрации микотоксинов в кормах, если их содержание не превышало 0,02 мкг/кг. В образцах детского питания точные концентрации не определялись, если содержание компонента соответствовало концентрации менее 0,0002 мкг/кг, что на два порядка меньше ПДК афлатоксина М1, имеющего среди перечисленных микотоксинов самое низкое значение этого показателя – 0,02 мкг/кг.

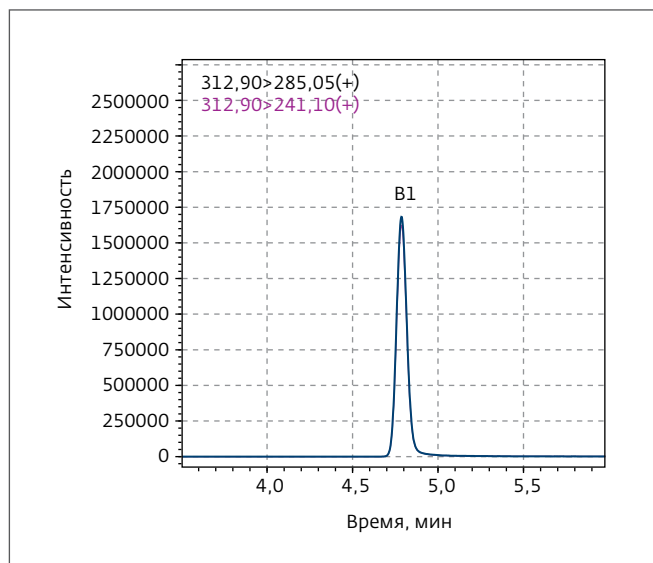


Рис.4. Хроматограмма стандартного раствора афлатоксина В1

Превышения содержания микотоксинов относительно существующих нормативов не выявлено ни в одном образце. Однако, благодаря высокой чувствительности метода tandemной ВЭЖХ-МС/МС, в 12 из 22 исследованных образцов микотоксины были обнаружены.

Так, в следующих образцах каш для детского питания были обнаружены: № 2 Nestle "Мультизлаковая каша пять злаков безмолочная" – зеараленон в концентрации 0,0006 мкг/кг, № 6 "Умница" "Каша молочная пять злаков + 13 витаминов" – Т-2 в концентрации 0,005 мкг/кг, зеараленон в концентрации 0,0002 мкг/кг, № 8 "Сами с усами" "Детская молочная каша из пяти злаков" – Т-2 в концентрации 0,5 мкг/кг,

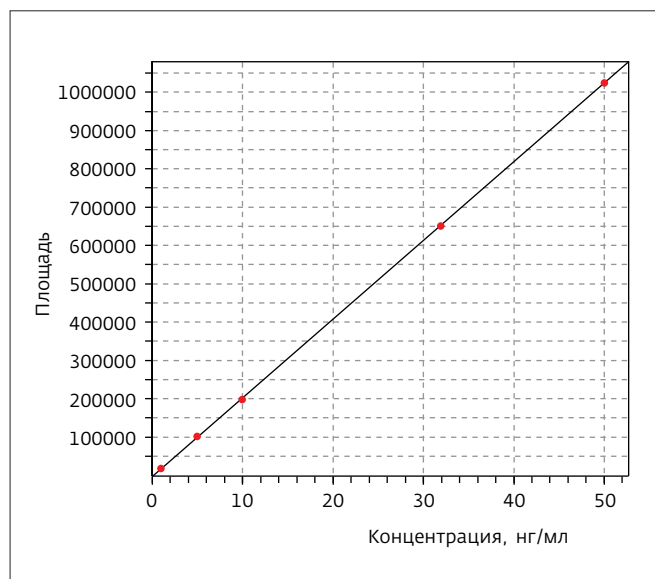


Рис.5. Градуировочная зависимость для афлатоксина В1

Таблица 3. Времена удерживания и условия детектирования микотоксинов

Название	Время удерживания, мин	Полярность +/-	MRM количественный	MRM качественный
Дезоксиниваленол (ДОН)	1,60	–	294,9 > 138,0	–
Охратоксин А (Охр.А)	3,17	–	401,8 > 358,1	401,8 > 167,0
Афлатоксин М1	3,50	+	328,9 > 273,0	–
Афлатоксин G2	3,74	+	330,5 > 313,5	330,5 > 245,0
Афлатоксин G1	4,03	+	328,9 > 243,0	328,9 > 200,1
Афлатоксин В2	4,29	+	314,9 > 259,0	314,9 > 287,1
Афлатоксин В1	4,74	+	312,9 > 285,0	312,9 > 241,1
Т-2 токсин	6,86	+	484,0 > 305,2	484,0 > 185,2
Зеараленон (ЗЕА)	7,01	–	316,0 > 131,2	316,0 > 175,1

№ 10 "Малютка" Nutricia "Каша безмолочная гречневая" – зеараленон в концентрации 0,07 мкг/кг.

Еще раз обращаем внимание на то, что выявленные концентрации токсинов Т-2 и зеараленона значительно ниже установленных в настоящее время ПДК.

Наше исследование показало, что в кормах для кошек микотоксины выявляются чаще, чем в кормах для собак. Так, в пяти из шести закупленных кормов для кошек были обнаружены афлатоксин В1, зеараленон и Т-2 токсин. Исключением стал образец Purina Cat show Sterilised, в котором содержание определяемых токсинов было на уровне шума. Количество нормируемого афлатоксина В1 составило 3 и 4 мкг/кг в образ-

цах Felix "Двойная вкуснятина с мясом" и Monge Rich in chicken Sterilised соответственно, что не противоречит регламентированной концентрации <0,01 мг/кг (<10 мкг/кг). Значительной разницы в содержании микотоксинов в кормах эконом-класса и профессиональных не выявлено. Напротив, в профессиональном корме для кошек Monge присутствовали три из девяти определяемых аналитов: В1 (4,00 мкг/кг), Т-2 (5,00 мкг/кг), зеараленон (8,00 мкг/кг).

Корма для собак показали более благоприятную картину: микотоксины обнаружены только в трех из шести. В образце Pedigree Vital были найдены дезоксиниваленол (2,00 мкг/кг) и Т-2 токсин (6,00 мкг/кг), а в кормах Purina

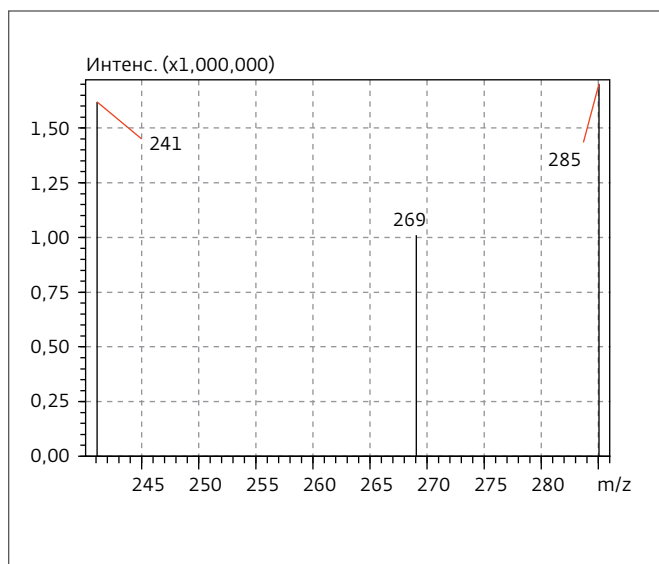


Рис.6. Масс-спектр афлатоксина В1

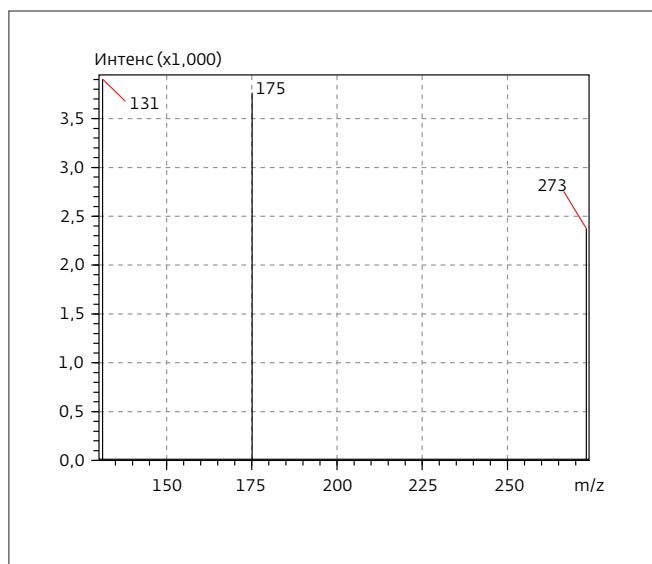


Рис.7. Масс-спектр зеараленона

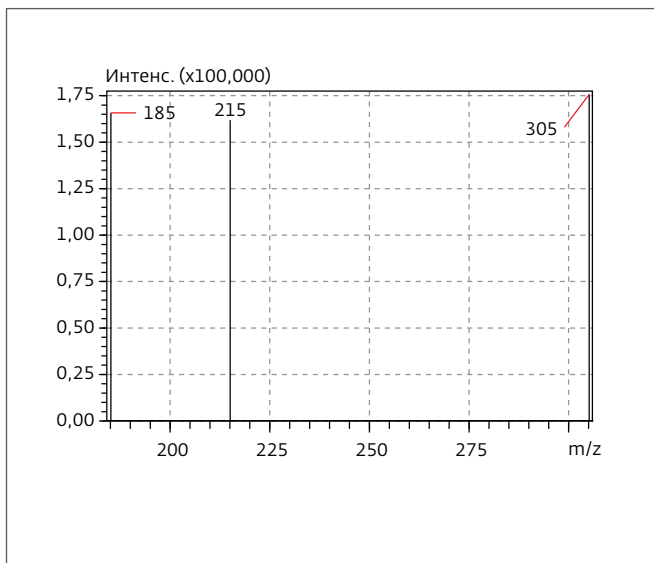


Рис.8. Масс-спектр T-2 токсина

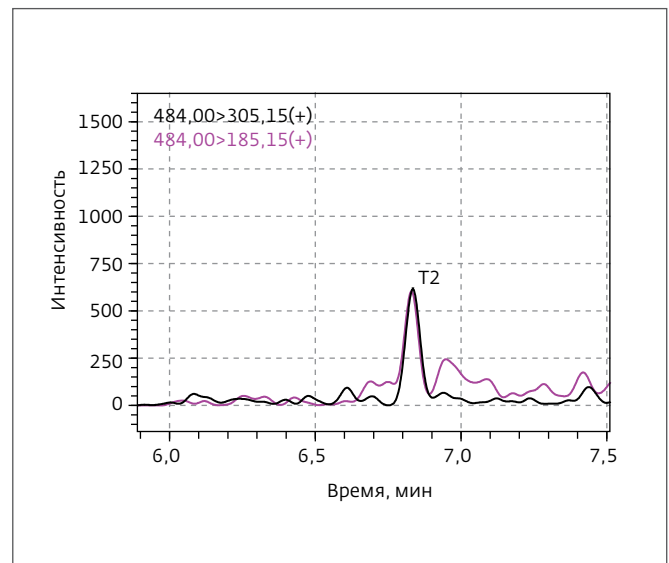


Рис.10. Хроматограмма экстракта образца каши №8, T-2 токсин

Pro plan и Шарри – только зеараленон в концентрациях 7,00 и 6,00 мкг/кг соответственно.

Все нормируемые микотоксины найдены в концентрациях, не превышающих предельно допустимые нормы, как в детском питании, так и в кормах. В кашах для малышей ненормируемых токсикантов (B2, G1, G2) не выявлено.

Таким образом, использование tandemной жидкостной хромато-масс-спектрометрии для определения микотоксинов имеет ряд неоспоримых преимуществ по сравнению с методами ВЭЖХ со спектрофотометрическим или флуориметрическим детектированием, иммуноферментным ана-

лизом и ТСХ. Достаточно одного анализа для получения информации о количественном содержании широкого набора микотоксинов, благодаря исключительной селективности детекторов типа "тройной квадруполь" в режиме MRM. Значительно упрощается пробоподготовка, повышается надежность результатов, существенно снижаются пределы детектирования. Последнее обстоятельство позволяет обнаруживать целевые компоненты в объектах, для которых предшествующие аналитические методы давали нулевой результат. Тем самым, внедрение высокочувствительных инструментальных методов анализа меняет наше представление об окружающем мире [17].

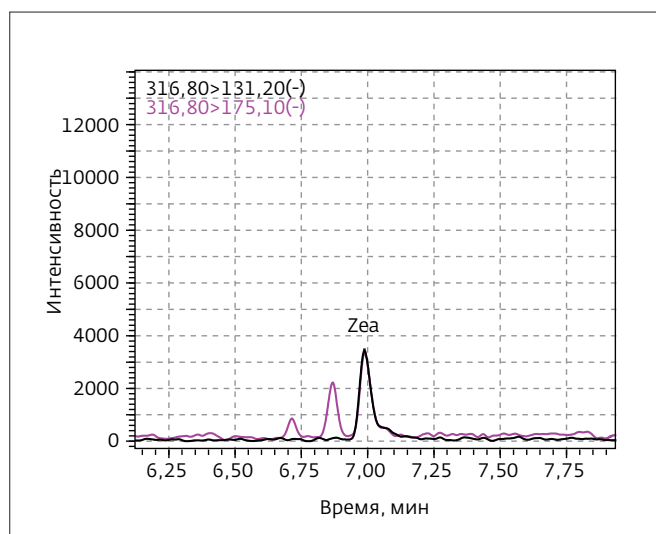


Рис.9. Хроматограмма экстракта образца каши № 10, зеараленон

#### ЛИТЕРАТУРА

1. **Zain M.E.** Impact of mycotoxins on humans and animals // Journal of Saudi Chemical Society. 2011. V. 15, Issue 2, P. 129–144.
2. **Cavallarini L., Antoniazzi S., Giaccone D., Tabacco E., Borreani G.** Transfer of aflatoxin M1 from milk to ripened cheese in three Italian traditional production methods // Food Control. 2014. 38. P. 174–177.
3. Общая токсикология / Под ред. Б.Курляндского, В.Филова. Медицина, 2002. 608 с.
4. **Tola M., Kebede B.** Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review // Cogent Food & Agriculture. 2016. 2: 1191103.
5. СанПин 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов.
6. ГОСТ Р 55453-2013. Национальный стандарт Российской Федерации. Корма для непродуктивных животных. Общие технические условия. М.: Стандартинформ, 2014.

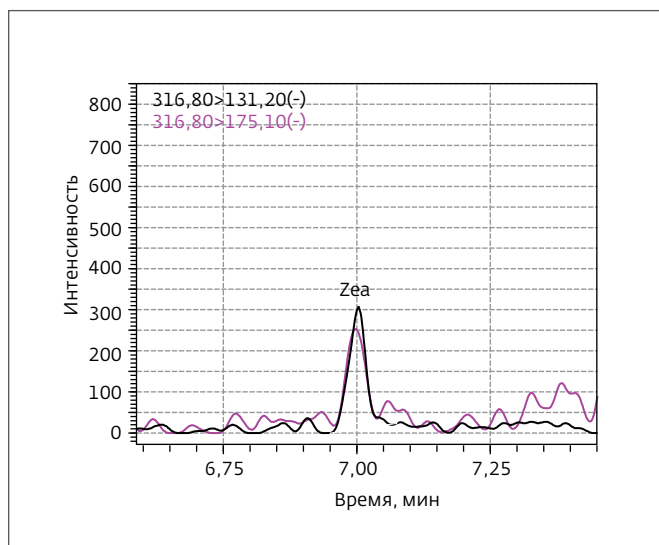


Рис.11. Хроматограмма образца экстракта корма для кошек № 15 Monge, зеараленон

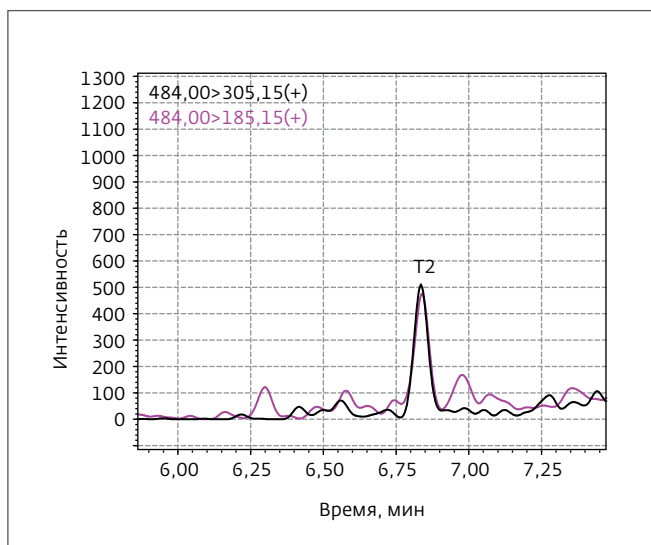


Рис.12. Хроматограмма образца экстракта корма для кошек № 15 Monge, T-2 токсин

7. Ветеринарно-санитарные нормы и требования к качеству кормов для непродуктивных животных. Утв. Минсельхозпродом РФ 15.07.97 п 13-7-2/1010.
8. ГОСТ EN 15850-2013. Продукты пищевые. Определение зеараленона в продуктах для детского питания на кукурузной основе, ячменной, кукурузной и пшеничной муке, поленте и продуктах на зерновой основе для питания грудных детей и детей раннего возраста. Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта и флуориметрическим детектированием. М.: Стандартиформ, 2016.
9. ГОСТ EN 15851-2013. Продукты пищевые. Определение афлатоксина В1 в продуктах на зерновой основе для питания грудных детей и детей раннего возраста. Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта и флуориметрическим детектированием. М.: Стандартиформ, 2014.
10. ГОСТ EN 15835-2013. Продукты пищевые. Определение охратоксина А в продуктах на зерновой основе для питания грудных детей и детей раннего возраста. Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта и флуориметрического детектирования. М., Стандартиформ, 2016.
11. ГОСТ 28001-88. Межгосударственный стандарт. Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения микотоксинов: Т-2 токсина, зеараленона (Ф-2) и охратоксина А. Комбикорма. Часть 5. Корма. Комбикорма. Комбикормовое сырье. Премиксы. Методы анализа: Сб. ГОСТов. М.: ИПК Издательство стандартов, 2002.
12. МУ 3184-84. Методические указания по обнаружению, идентификации и определению содержания Т-2 токсина в пищевых продуктах и продовольственном сырье // Сб. метод. документов, необходимых для обеспечения применения Федерального закона от 12.06.08 № 88-ФЗ "Технический регламент на молоко и молочную продукцию". Ч. 13. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.
13. Flores-Flores M.E., González-Penas E. An LC-MS/MS method for multi-mycotoxin quantification in cow milk // Food Chemistry. 2017. V. 218. P. 378–385.
14. Geary P.A., Chen G., Kimanya M.E., Shirima C.P., Oplawtowska-Stachowiak M., Elliott C.T., Routledge M.N., Gong Y.Y. Determination of multi-mycotoxin occurrence in maize based porridges from selected regions of Tanzania by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), a longitudinal study // J. Food Control. 2016. 68. P. 337–343.
15. Zhang K., Wong J.W., Krynitsky A.J., Trucksess M.W. Determining Mycotoxins in baby foods and animal feeds using stable isotope dilution and liquid chromatography tandem mass spectrometry // J. Agric. Food Chem. 2014. 62. P. 8935–8943.
16. Fabregat-Cabello N., Zomer P., Sancho J.V., Roig-Navarro A.F. and Mol H.G.J. Comparison of approaches to deal with matrix effects in LC-MS/MS based determinations of mycotoxins in food and feed // World Mycotoxin Journal. 2016. 9 (2). P. 149–161.
17. Амелин В.Г., Карасева Н.М., Третьяков А.В. Хроматографические методы определения микотоксинов в пищевых продуктах // Журнал аналитической химии. 2013. Т. 68. № 3. С. 212–223.