

Скрытая угроза

Быстрый и высокочувствительный анализ детского питания на наличие микотоксинов с помощью тандемного масс-спектрометра LCMS-8050

Микотоксины – вторичные метаболиты плесневых грибов – представляют серьёзную угрозу для человека и животных. Они являются естественными загрязнителями продуктов питания и сырья для их производства и, как правило, образуются при несоблюдении режимов хранения последних, например, при повышенной температуре и влажности, что способствует росту грибковой микрофлоры. Вследствие того, что случаи острого отравления микотоксинами встречаются относительно редко, опасности, которую представляют микотоксины, уделяется сравнительно мало внимания.

Хотя высокие концентрации микотоксинов могут действовать как сильный яд, и наибольшую опасность представляет их канцерогенное, мутагенное и тератогенное воздействие на организм даже в низких концентрациях. Кроме того, можно полагать, что накопление микотоксинов в организме ответственно за тяжёлые пораже-



Система ВЭЖХ Nexera X2 и тандемный масс-спектрометр LCMS-8050

ния таких органов, как почки и печень, а также за развитие сердечных заболеваний и заболеваний нервной системы.

Согласно оценке Продовольственной и Сельскохозяйственной Организации ООН (FAO) до 25 % мирового производства сырья для пищевой продукции может быть заражено плесневыми грибами и, соответственно, микотоксинами. В первую очередь это относится к злаковым, масличным и бобовым культурам, овощам, фруктам и кофе.

Предельно допустимые нормы содержания

Для защиты здоровья потребителей, начиная с 2006 года, в Европе

были законодательно установлены предельно допустимые уровни содержания микотоксинов в определённых продуктах. Эти уровни зависят от токсичности микотоксинов и от предполагаемого использования продуктов. Очевидно, что особое внимание было уделено продуктам детского питания, поскольку детский организм обладает повышенной чувствительностью к токсичным воздействиям вследствие малой массы тела, ускоренного метаболизма и недостаточной способности к детоксикации ксенобиотиков. Соответственно, Европейская Комиссия установила очень низкие нормы допустимого содержания микотоксинов в продуктах, предназначенных для питания малышей.

Наиболее низкие пределы содержания были установлены для чрезвычайно токсичного охратоксина (0,025 мкг/кг), а также для афлатоксинов В1 (0,1 мкг/кг) и М1 (0,025 мкг/кг) вследствие их канцерогенности.

Естественно, что анализ продуктов детского питания для выявления следового содержания микотоксинов представляет первостепенный интерес. Настоящее сообщение представляет новую методику сверхбыстрого анализа продуктов детского питания с использованием тандемного жидкостного хроматомасс-спектрометра LCMS-8050.

Для исследования были выбраны следующие продукты: порошок для приготовления молока, хлопья для завтрака, мука, рис, тапиока и овощное пюре, смешанное с хлопьями.

Материалы и методы

Подготовка образцов для анализа

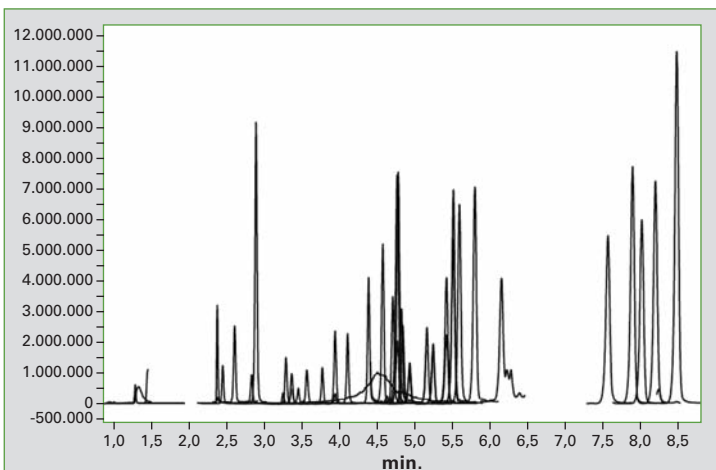


Рисунок 1: Хроматограмма, полученная при анализе стандартной смеси микотоксинов (45 соединений, концентрация афлатоксинов и охратоксина составляет 2 ppb, концентрация остальных микотоксинов – 50 ppb)

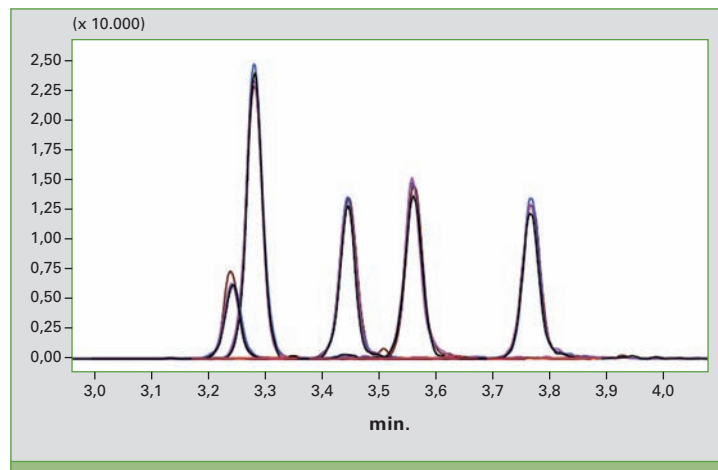


Рисунок 2: Увеличенный фрагмент хроматограмм, полученных при четырёх последовательных определениях 5-ти афлатоксинов (0,1 ppb) в образце сухих хлопьев

История изучения микотоксинов

Плесневые грибы и их вторичные метаболиты являются неотъемлемой частью биосферы, и человек сталкивался с ними уже на самых ранних этапах своего существования. Однако пристальный интерес исследователей они стали вызывать только во второй половине XX века. Уже в Библии есть упоминания о болезни, которая появляется после употребления в пищу растений, заражённых спорыньей. В период Средневековья болезнь, известная сейчас как эрготизм (огонь Св. Антония), унесла тысячи жизней. Возможно, первопричиной многих загадочных случаев внезапной деградации (вплоть до полного исчезновения) процветающих цивилизаций прошлого или мистической истории смертельных случаев среди первооткрывателей и исследователей гробницы Тутанхамона является отравление продуктами жизнедеятельности плесневых грибов.

Широкая распространённость в прошлом заболеваний, вызванных метаболитами грибов, получает всё большее подтверждение. Так, например, в конце XIX – в начале XX веков на территории бывшей Российской Империи были зафиксированы массовые случаи заболевания, вызванного грибами рода *Fusarium* (в заплесневелом сорго и пшенице). Первые случаи отмечались, начиная с 1891 года и до конца Второй Мировой войны: болезнь привела к тысячам смертей на территории бывшего Советского Союза (источник: Andreas Sascha Wendt, «Determination of aflatoxins and patulin using online SPE-LC»).

Впервые микотоксины были выделены и идентифицированы в 1961 году в Великобритании как результат расследования случаев массовой смерти домашней птицы. Тогда более 100000 индеек пали жертвой неизвестной болезни. После тщательных и длительных исследований из птичьего корма было выделено вещество, которое, как выяснилось, является продуктом жизнедеятельности грибов рода *Aspergillus*. По названию одного из продуцентов (*Aspergillus flavus*) вещество получило название афлатоксин. В последующие годы открытие новых форм микотоксинов носило поистине взрывной характер. В немалой степени это было связано с появлением и внедрением в практику новых

инструментальных методов исследования продуктов питания и сырья для их производства.

На сегодняшний день идентифицировано около 300-т различных микотоксинов, которые являются продуктами жизнедеятельности более чем 250-ти видов плесневых грибов (источник: Немецкий Федеральный Институт оценки степени риска, Bundesinstitut fuer Risikobewertung, BfR). Но только несколько из них представляют существенную опасность для здоровья:

- афлатоксин,
- охратоксин,
- алкалоиды спорыньи,
- токсины грибов рода *Fusarium* (зеараленон, фумонизин, трихотоцены и пр.),
- патулин.

Загрязнение продуктов и сырья микотоксинами может иметь место даже и после их очистки от видимого присутствия плесневых грибов. К тому же большинство микотоксинов являются весьма стабильными химическими соединениями и не разрушаются даже после тепловой обработки. Дополнительную опасность представляет так называемый эффект переноса, когда вследствие потребления сельскохозяйственными животными контаминированного микотоксинами растительного сырья в их организмах происходит накопление микотоксинов (либо в исходной форме, либо в виде метаболитов). Далее заражёнными оказываются уже продукты животноводства и птицеводства: мясо, молоко, яйца. И если в продуктах и сырье растительного происхождения присутствие микотоксинов можно в ряде случаев обнаружить визуально (по наличию видимых следов присутствия плесневых грибов), заражённые продукты животного происхождения ничем визуально не отличаются от безопасных. Соответственно, при обеспечении качества и безопасности пищевых продуктов возрастает роль современных инструментальных методов анализа, которые позволяют обнаруживать присутствие микотоксинов и их метаболитов в следовых количествах.

Гомогенизированный образец (5 г) смешивали с 20 мл смеси вода/ацетонитрил (1:1 по объёму), обрабатывали в ультразвуковой бане (5 минут) и далее перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Полученную смесь центрифугировали (10 минут), отбирали надосадочную жидкость и разбавляли её водой в соотношении 1:4. Затем раствор пропускали с минимально возможной скоростью через предварительно промытую ацетонитрилом (2 мл) и водой (2 мл) колонку для экстракции (Isolute® Мусо, Biotage, Швеция; 60 мг / 3 мл). После этого колонку последовательно промывали 3 мл воды и смесью вода/ацетонитрил (3 мл, соотношение объёмов 9:1).

После высушивания колонки осуществляли элюирование образца сначала 2-мя мл ацетонитрила, подкисленного 0,1 % муравьиной кислоты, а затем 2-мя мл метанола. Элюат упаривали при 35 °С в атмосфере азота (Turbovap, Biotage, Швеция) и сухой остаток растворяли в 150 мкл смеси вода/метанол/ацетонитрил (соотношение объёмов 80:10:10), содержащей 0,1 % муравьиной кислоты.

Условия ВЭЖХ-МС/МС

Полученный экстракт анализировали при помощи ВЭЖХ-системы Nexera X2 и тандемного масс-спектрометра LCMS-8050 (Shimadzu, Япония). Использовали режим измерения MRM (Multiple Reaction Monitoring, мониторинг множественных реакций) с регистрацией двух MRM-переходов на каждое определяемое соединение. Все параметры работы масс-спектрометра, такие как поток газа-распылителя, температура интерфейса и напряжение на детекторе, были тщательно оптимизированы с целью достижения наивысшей чувствительности анализа. Такая оптимизация режимов работы весьма существенна при определении следовых содержаний целевых компонентов, особенно представляющих реальную угрозу для здоровья.

Определение 45 микотоксинов менее чем за 9 минут

На рисунке 1 показана хроматограмма, полученная при анализе стандартной смеси микотоксинов (содержание афлатоксинов B1, B2, G1, G2, M1 и охратоксинов А и В –

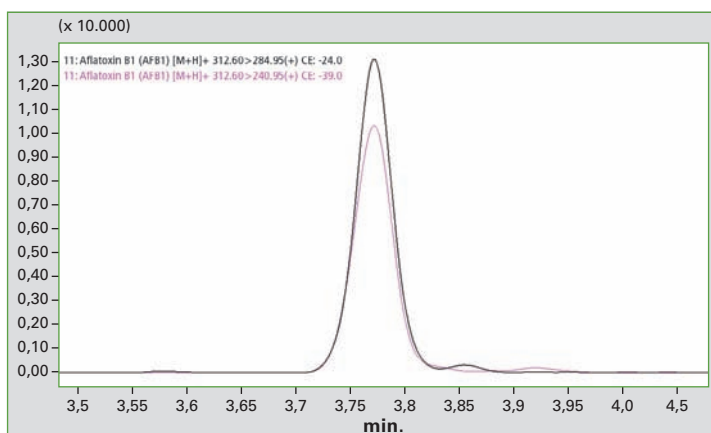


Рисунок 3: Фрагмент хроматограммы, полученной при определении афлатоксина B1 (0,2 ppb)

	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	AFM1
Степень извлечения (пробоподготовка)	101 %	109 %	104 %	114 %	118 %
Степень извлечения (измерение)	49 %	90 %	96 %	106 %	91 %
Степень извлечения (общая)	49 %	98 %	100 %	121 %	108 %

Таблица 1: Величины степени извлечения, полученные при пробоподготовке и при измерении

2 ppb, содержание остальных микотоксинов – 50 ppb). В качестве критерия оценки влияния эффекта матрицы на конечный резуль-

тат анализа использовали величины степени извлечения (recovery rate), полученные при пробоподготовке (extraction recovery) ▶

и непосредственно при измерении (ionization recovery). Для этого проводили анализы с использованием трёх образцов с различными матрицами. В таблице 1 приведены величины степени извлечения в случае анализа овощного пюре, смешанного с хлопьями. Сравнивали площади хроматографических пиков, полученных при анализе пюре, в которое были добавлены стандарты микотоксинов, и полученных при анализе стандартной смеси последних. Величины степени извлечения при анализе двух других образцов (молочного порошка и хлопьев для завтрака) практически не отличались от величин, приведённых в таблице 1.

Дополнительно оценивали воспроизводимость получаемых результатов. На рисунке 2 показаны результаты четырёх определений афлатоксинов (0,1 ppb) в образце сухих хлопьев.

Как видно из рисунков 3 и 4, при использовании системы Nexera X2/

LCMS-8050 для анализа детского питания легко достигается требуемый Европейскими нормативами предел делегирования афлатоксина B1 (0,1 мкг/мл, MRM-переход 312,6 > 284,9 для количественного определения, MRM-переход 312,6 > 240,9 для подтверждающего качественного определения) и афлатоксина M1 (0,025 мкг/мл, MRM-переход 329,1 > 237,0 для количественного определения, MRM-переход 329,1 > 229,0 для подтверждающего качественного определения).

Закключение

Вследствие высокой токсичности и канцерогенности микотоксинов выявление их присутствия в продуктах питания и сырья для их производства представляет первостепенный интерес. Особенно это относится к продуктам, предназначенным для питания новорождённых и грудных детей.

Настоящее сообщение демонстрирует возможности высокопроиз-

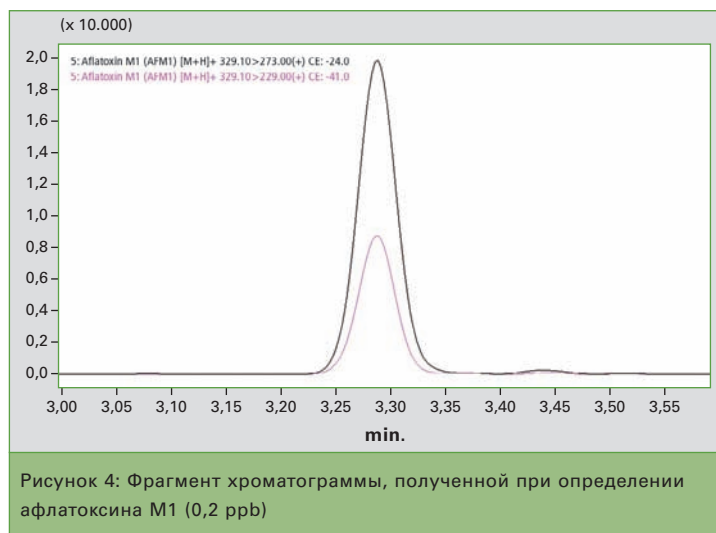


Рисунок 4: Фрагмент хроматограммы, полученной при определении афлатоксина M1 (0,2 ppb)

водительного, надёжного и чувствительного определения следовых количеств 45 микотоксинов в детском питании с использованием системы Nexera X2/LCMS-8050. Благодаря таким характеристикам LCMS-8050 как высочайшая скорость сканирования диапазона масс (до 30.000 а.е.м./с), сверхбыстрое переключение полярности ионизации (5 мсек)

и сверхбыстрая регистрация MRM-переходов, время анализа составляет менее чем 9 минут. При этом качественные и количественные результаты, получаемые в ходе анализа, как это видно из данных, представленных в таблице 1 и на рисунке 2, отличаются высокой точностью, надёжностью и воспроизводимостью.

Биотопливо: могут ли водоросли заставить колеса крутиться?

Мониторинг роста водорослей путём измерения параметра ТОС

Глобальное потепление, вызванное чрезмерным использованием полезных ископаемых, стало мощным толчком к ускоренному поиску альтернативных видов топлива, среди которых наиболее привлекательным является топливо, получаемое из биомассы.

Микроводоросли могут быть использованы для производства масла без конкуренции с пищевой промышленностью. По сравнению с другими видами биотоплива, микроводоросли характеризуются высоким индексом продуктивности на единицу времени и площади, в то время как возможности выбора земельного участка

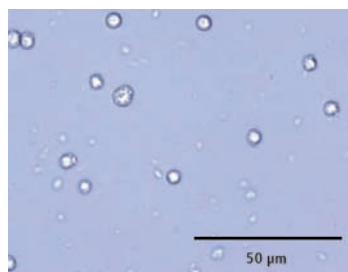


Рисунок 1: Изображение под микроскопом клеток микроводорослей в образце 1

для их выращивания огромны. Что касается практического использования биомассы микроводорослей, то на каждом этапе производства были проведены различные исследования, в том

числе в период селекции и разведения, выращивания, сбора, экстракции и очистки масла.

Анализатор общего органического углерода Shimadzu серии TOC-L с его мощными функциями окисления позволяет провести полное окисление и измерение таких образцов, как суспензии микроводорослей. В этом уникальном применении анализатор TOC-L используется для отслеживания процесса роста микроводорослей путём измерения показателя ТОС в культурах микроводорослей, при этом не требуется предварительная пробоподготовка. Результаты измерений предоставлены лабораторией профессора Yoshihiro

Shiraiwa в университете Tsukuba, Япония.

Аналитическая методика

Микроводоросли культивировали в течение восьми дней. В первый день показатель ТОС измерялся один раз как для образца 1 (культура, содержащая взвешенные частицы микроводорослей), так и для образца 2 (культура, полученная путём удаления микроводорослей с помощью седиментации в центрифуге). Разница между полученными показателями общего органического углерода образцов 1 и 2 представляла собой реальное значение ТОС для органических веществ, содержащихся