

Определение микотоксинов в образцах пшеницы методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии

Панихин Е., Московский офис Shimadzu Europa GmbH

Преимущества для пользователей

- ◆ Чувствительное одновременное определение микотоксинов, регулируемых согласно ТР ТС 015/2011, в соответствии с ГОСТ 34140-2017 с использованием жидкостного тандемного хроматомасс-спектрометра LCMS-8050 и жидкостного хроматографа LC-40 производства Shimadzu
- ◆ Быстрый автоматизированный количественный обсчет результатов анализа с помощью программного обеспечения LabSolutions Insight
- ◆ Оптимизированы аналитические условия анализа микотоксинов для LCMS-TQ Shimadzu

■ Аннотация

Содержание микотоксинов в образцах пшеницы определяли согласно ГОСТ 34140-2017 и ТР ТС 015/2011 с использованием жидкостного тандемного хроматомасс-спектрометра LCMS-8050 и жидкостного хроматографа LC-40 производства Shimadzu.

Был составлен и оптимизирован ВЭЖХ-МС/МС метод с построением матричной калибровки, с диапазоном линейности от 1 до 200 мкг/кг для афлатоксина В1, В2, G1, G2 и охратоксина А, от 100 до 10000 мкг/кг для дезоксиниваленола, от 20 до 4000 мкг/кг для зеараленона, от 10 до 2000 мкг/кг для Т-2 токсина, от 100 до 20000 мкг/кг для фумонизинов В1, В2. Коэффициент корреляции был лучше 0,99.

Пределы детектирования составили 0,01–0,60 мкг/кг. Степень извлечения 68%–147,7%. Этот метод может использоваться для чувствительного определения микотоксинов, регулируемых согласно ТР ТС 015/2011.

■ Введение

Микотоксины — токсины, низкомолекулярные вторичные метаболиты, продуцируемые микроскопическими плесневыми грибами. Плесневые грибы паразитируют на многих видах продовольственной продукции, таких как злаки, сухофрукты, орехи и специи. Плесень может появляться как до, так и после уборки урожая, на этапе хранения и/или на готовых продуктах питания в условиях благоприятной температуры и высокой влажности. Большинство микотоксинов отличается химической стабильностью и не разрушается в процессе термической обработки. Наиболее распространёнными микотоксинами, представляющими опасность для здоровья человека и животных, являются афлатоксины, Т-2 токсин, зеараленон, дезоксиниваленол, охратоксин А, фумонизины (Рис. 1). Предельно допустимые уровни микотоксинов, в зерне, поставляемом на пищевые цели определены в ТР ТС 015/2011.

■ Оборудование

Для анализа был использован жидкостный хроматомасс-спектрометр Shimadzu LCMS-8050 в паре с жидкостным хроматографом LC-40 ХЗ. Конфигурация жидкостного хроматографа включала насос подвижной фазы LC-40В ХЗ, автосемплер SIL-40С ХЗ, колоночный термостат СТО-40С, контроллер SCL-40. Для обсчета результатов использовалось программное обеспечение LabSolutions Insight.

Рисунок 1 Структурные формулы микотоксинов

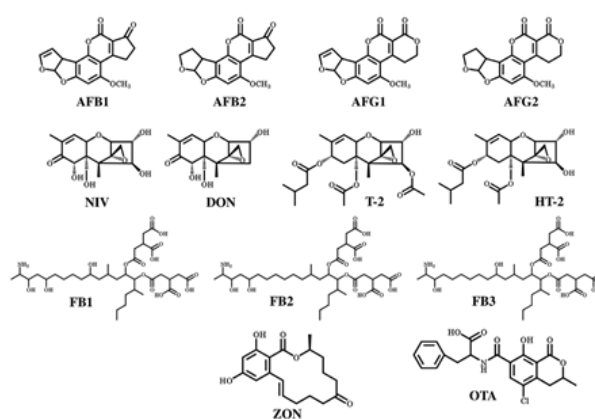


Рисунок 2 Жидкостный хроматограф серии LC-40 ХЗ с жидкостным хроматомасс-спектрометром LCMS-8050



■ Условия анализа

Условия ВЭЖХ

ВЭЖХ: LC-40 ХЗ

Аналитическая колонка:

Shim-pack GIST C18 150 мм × 2,1 мм × 2 мкм

Подвижная фаза А: 1% уксусная кислота —

10% метанол — 89% вода — 2,6 мМ ацетат аммония

Подвижная фаза В: 1% уксусная кислота — 2% вода

— 97% метанол — 2,6 мМ ацетат аммония

Поток подвижной фазы: 0,25 мл/мин

Объем инъекции: 20 мкл

Температура термостата: 40 °С

Градиент: 0% В (0–2 мин) — 100% В (12–16 мин) —

0% В (16,1–25 мин)

Условия МС

ВЭЖХ-МС: LCMS-8050

Источник ионизации: HESI (+/-)

Напряжение на интерфейсе: 4 kV (+), -3 kV (-)

Поток газа распылителя: азот, 2 л/мин

Поток нагревающего газа: 10 л/мин

Поток осушающего газа: 10 л/мин

Соударительный газ: аргон 230 кПа

Температура линии десольватации: 250 °С

Температура нагреваемого блока: 500 °С

Температура интерфейса: 300 °С

Для достижения наибольшего отклика аналитов параметры регистрации событий MRM были оптимизированы с использованием растворов индивидуальных стандартов, полученные настройки приведены в Таблице 1.

■ Подготовка проб

Взвешивали 5,00 г подготовленной пробы пшеницы (средней пробы, измельченной на лабораторной мельнице и просеянной через сито 0,5 мм) и помещали в полипропиленовую пробирку вместимостью 50 мл. Добавляли 25 мл раствора для экстракции (состав: 79% ацетонитрила, 20% воды, 1% уксусной кислоты), перемешивали на вибрационном шейкере в течение 30 секунд, и затем в течение 60 минут на качающемся шейкере. После перемешивания пробы центрифугировали при относительном ускорении 3500 g в течение 20 минут. 500 мкл верхнего слоя экстракта переносили в микроцентрифужную пробирку и добавляли 500 мкл подвижной фазы А. Пробы центрифугировали при относительном ускорении 15 000 g при температуре 4 °С в течение 20 мин. После центрифугирования отбирали 700 мкл верхнего слоя, фильтровали через нейлоновый фильтр и переносили в виалу для ВЭЖХ-МС анализа.

Таблица 1 Настройки регистрации MRM

Микотоксин	Ион-прекурсор	Ион-продукт	Q1 Pre Bias(V)	CE (V)	Q3 Pre Bias(V)
Афлатоксин В1	313,10	241,10	-15,0	-39,0	-25,0
	313,10	285,10	-15,0	-24,0	-30,0
	313,10	269,10	-22,0	-34,0	-28,0
Афлатоксин В2	315,10	259,10	-23,0	-30,0	-28,0
	315,10	287,10	-23,0	-27,0	-30,0
	315,10	243,10	-15,0	-42,0	-25,0
Афлатоксин G1	329,10	243,10	-16,0	-30,0	-26,0
	329,10	311,10	-16,0	-23,0	-22,0
	329,10	200,10	-16,0	-45,0	-20,0
Афлатоксин G2	331,10	245,10	-16,0	-31,0	-25,0
	331,10	313,10	-16,0	-25,0	-23,0
	331,10	189,10	-16,0	-45,0	-20,0
Т-2 токсин	484,30	185,10	-19,0	-20,0	-20,0
	484,30	305,10	-19,0	-15,0	-15,0
	484,30	215,10	-18,0	-19,0	-15,0
Дезоксиниваленол	355,10	295,10	17,0	10,0	19,0
	355,10	265,10	13,0	15,0	30,0
	355,10	138,10	18,0	27,0	27,0
Охратоксин А	404,10	239,10	-20,0	-24,0	-25,0
	404,10	358,10	-20,0	-16,0	-26,0
	404,10	221,10	-20,0	-37,0	-23,0
Фумонизин В1	722,40	334,10	-28,0	-43,0	-23,0
	722,40	352,10	-28,0	-37,0	-25,0
	722,40	704,40	-28,0	-29,0	-26,0
Фумонизин В2	706,40	336,10	-28,0	-39,0	-23,0
	706,40	318,10	-26,0	-40,0	-22,0
	706,40	354,10	-28,0	-35,0	-17,0
Зеараленон	317,10	131,10	12,0	30,0	21,0
	317,10	175,10	15,0	23,0	11,0
	317,10	130,10	12,0	35,0	20,0

■ Результаты и обсуждение**MRM хроматограммы стандартного раствора**

Для построения матричной калибровочной кривой были приготовлены стандартные растворы G1-G6, согласно ГОСТ 34140-2017. MRM Хроматограммы матричного стандартного раствора уровня G1 представлены на Рис 3.

Линейность

Линейность оценивали в следующем диапазоне концентраций: от 1 до 200 мкг/кг для афлатоксина В1, В2, G1, G2 и охратоксина А, от 100 до 10000 мкг/кг для дезоксиниваленола, от 20 до 4000 мкг/кг для зеараленона, от 10 до 2000 мкг/кг для Т-2 токсина, от 100 до 20000 мкг/кг для фумонизинов В1, В2. Для этого в пробу пшеницы, не содержащую микотоксинов, добавляли соответствующие объемы стандартного раствора, после чего образцы проходили пробоподготовку согласно процедуре, описанной в разделе «Подготовка проб». Количественные характеристики построенной матричной калибровочной кривой, приведены в Табл. 2. Калибровочные кривые для каждого анализируемого микотоксина, представлены на Рис. 4.

Рисунок 3 Хроматограммы матричного стандартного раствора G1

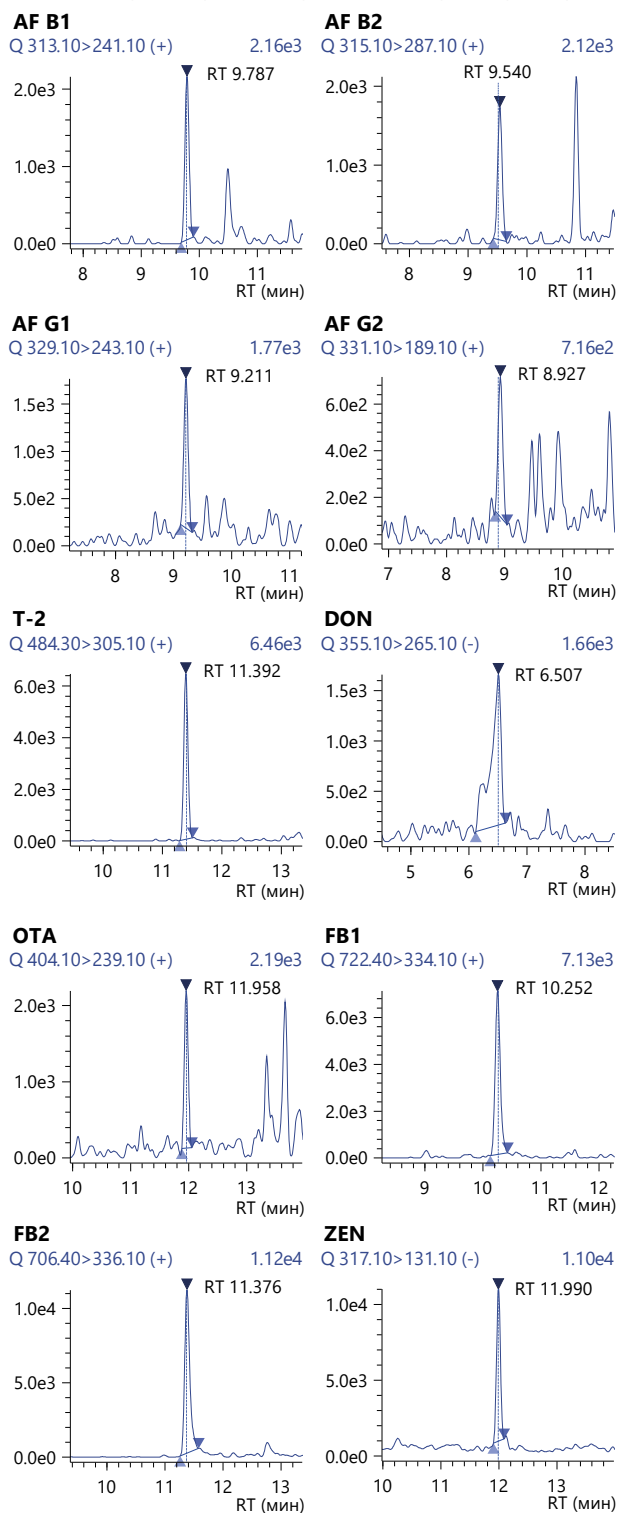


Рисунок 4 Матричные калибровочные кривые микотоксинов

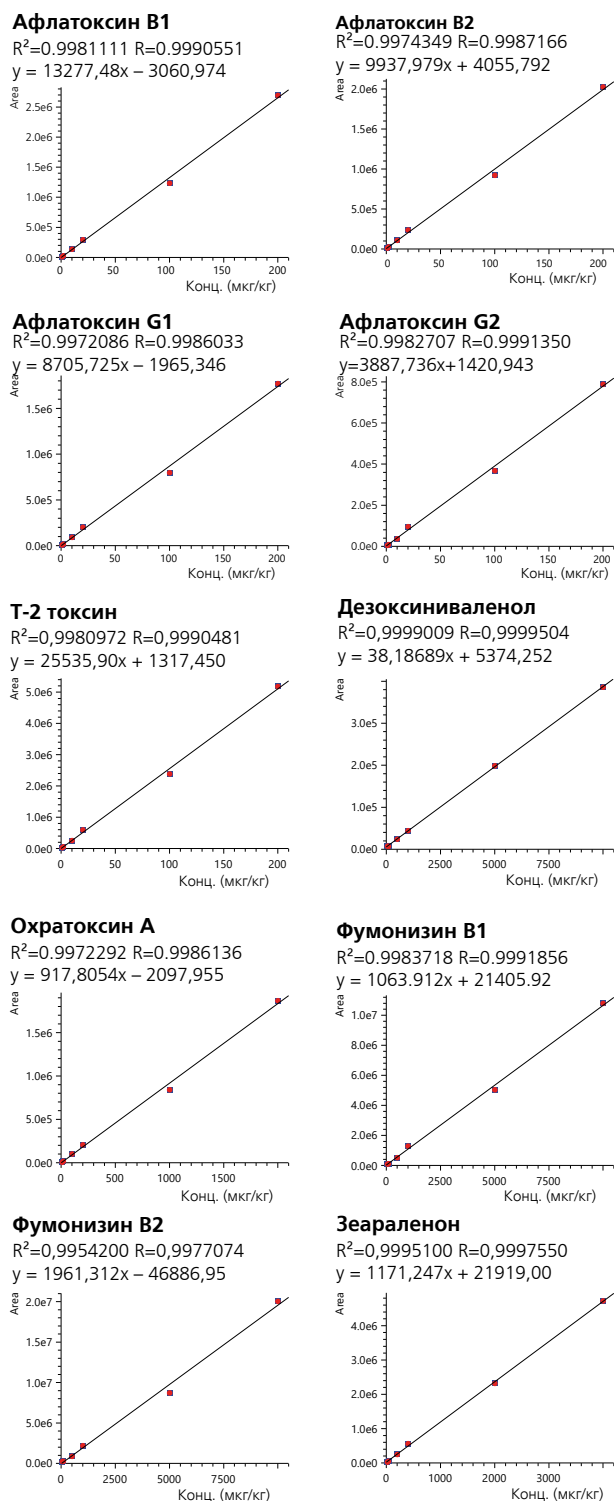


Таблица 2 Параметры калибровочной кривой

Аналит	Калибровочная кривая	Коэффициент корреляции (r2)	LOD (мкг/кг)
Афлатоксин В1	$Y = 13277,48x - 3060,974$	0,998	0,05
Афлатоксин В2	$Y = 9937,979x + 4055,792$	0,997	0,02
Афлатоксин G1	$Y = 8705,725x - 1965,346$	0,997	0,04
Афлатоксин G2	$Y = 3887,736x + 1420,943$	0,998	0,09
T-2 токсин	$Y = 25535,90x + 1317,450$	0,998	0,01
Дезоксиниваленол	$Y = 38,18689x + 5374,252$	0,999	0,01
Охратоксин А	$Y = 917,8054x - 2097,955$	0,997	0,5
Фумонизин В1	$Y = 1063,912x + 21405,92$	0,998	0,6
Фумонизин В2	$Y = 1961,312x - 46886,95$	0,995	0,6
Зеараленон	$Y = 1171,247x + 21919,00$	0,999	0,1

Тест точности определения

Для оценки точности количественного определения микотоксинов к пробам пшеницы добавили необходимый объем стандартного раствора, чтобы получить концентрации равные 2, 4 и 5 уровням калибровочной кривой. Расчетные величины точности определения концентрации микотоксинов приведены в Табл. 3.

Таблица 3 Точность определения (%)

Уровень калибровочной кривой	G2	G4	G5
	2 мкг/кг	20 мкг/кг	100 мкг/кг
AF G2	90,12	92,22	94,44
AF G1	111,02	106,52	91,97
AF B2	109,7	105,83	92,42
AF B1	117,44	107,72	93,31
T-2	106,3	100,26	93,55
	20 мкг/кг	200 мкг/кг	1000 мкг/кг
OTA	110	113,67	91,92
	100 мкг/кг	1000 мкг/кг	5000 мкг/кг
FB1	90,47	93,02	94,39
FB2	155,04	94,9	89,56
DON	85,43	91,39	99,45
	40 мкг/кг	400 мкг/кг	2000 мкг/кг
ZEN	101,55	112,44	95,15

Тест воспроизводимости определения

Для оценки воспроизводимости определения микотоксинов к шести пробам пшеницы добавили стандартный раствор, чтобы получить концентрацию равную 2 уровню калибровочной кривой. После добавки все пробы проходили пробоподготовку согласно процедуре, описанной в разделе «Подготовка проб». Расчетные величины ОСКО для площади и времени удерживания аналитов, рассчитанные программным обеспечением, для всех микотоксинов приведены в Табл. 4.

Таблица 4 Относительное стандартное отклонение площади пиков и времени выхода микотоксинов

	Время удерживания, ОСКО %	Площадь, ОСКО %
AF G2	0,089	3
AF G1	0,044	4
AF B2	0,049	3
AF B1	0,043	2
T-2	0,039	2
OTA	0,057	4
FB1	0,071	3
FB2	0,052	3
DON	0,118	3
ZEN	0,045	3

Тест определения степени извлечения

К образцу пшеницы, не содержащему микотоксинов, добавили различные объемы рабочего стандартного раствора, чтобы концентрация микотоксинов в пробе соответствовала указанной в таблице 5. Далее образцы проходили пробоподготовку согласно процедуре, описанной в разделе «Подготовка проб». Степень извлечения рассчитывали как отношение отклика образца с добавкой до пробоподготовки к отклику образца с добавкой после пробоподготовки. Рассчитанные степени извлечения представлены в Табл. 5.

Таблица 5 Степень извлечения микотоксинов

	10 мкг/кг	20 мкг/кг	100 мкг/кг
AF G2	115,95	111,69	107,51
AF G1	95,11	107,68	107,99
AF B2	103,08	95,60	90,33
AF B1	95,12	108,42	102,89
T-2	106,47	102,53	107,60
	100,00 мкг/кг	200,00 мкг/кг	1000,00 мкг/кг
OTA	92,12	115,23	103,71
	500,00 мкг/кг	1000,00 мкг/кг	5000,00 мкг/кг
FB1	82,08	68,27	77,05
FB2	86,83	72,30	81,79
DON	121,11	105,46	147,70
	200,00 мкг/кг	400,00 мкг/кг	2000,00 мкг/кг
ZEN	110,42	113,26	93,85

■ Заключение

Жидкостный хромато-масс-спектрометр LCMS-8050 Shimadzu в комбинации с ВЭЖХ LC-40 Shimadzu был опробован для анализа микотоксинов в образцах пшеницы согласно ГОСТ 34140-2017. В ходе работы построена калибровочная кривая на основе матричных стандартов с хорошей линейностью. Точность определения концентрации лежит в диапазоне от 86 до 117%. Степень извлечения микотоксинов равна 68–147,7%. Пределы детектирования 0,01–0,6 мкг/кг. Метод может использоваться для быстрого и высокочувствительного одновременного определения афлатоксинов, фумонизинов, охратоксинов, дезоксиниваленола, зераленола и Т-2 токсина в зерновых матрицах согласно ГОСТ 34140-2017.

LCMS, LabSolutions Insight являются товарными знаками Shimadzu Corporation или ее дочерних компаний в Японии и/или других странах.

Первое издание: февраль 2022



Shimadzu Corporation
www.shimadzu.com/an/

SHIMADZU Europa GmbH,
www.shimadzu.ru

Для применения в исследовательских целях. Не использовать в диагностических целях.

Настоящий документ может содержать ссылки на продукты, которые недоступны в вашей стране. Пожалуйста, свяжитесь с нами, чтобы проверить наличие указанных продуктов в вашей стране.

Содержание данной публикации не может быть воспроизведено, изменено или продано в каких-либо коммерческих целях без письменного разрешения Shimadzu.

Подробнее <http://www.shimadzu.com/about/trademarks/index.html>

Сторонние торговые марки и фирменные наименования могут использоваться в настоящем документе для обозначения организаций или их продуктов/услуг, независимо от того, используются они с символом торговой марки «ТМ» / «®» или нет.

Содержимое настоящего документа предоставляется по принципу «как есть» без гарантий любого рода и может быть изменено без предварительного уведомления. Shimadzu не несет никакой ответственности за любой ущерб, будь то прямой или косвенный, связанный с использованием данного документа. Эта публикация основана на информации, доступной Shimadzu на дату публикации или ранее, и может быть изменена без предварительного уведомления.