

Определение Т-2-токсина методом газо-жидкостной хроматографии с детектором ЭЗД после дериватизации трифторуксусным ангидридом

И. А. Филенко, к. т. н.¹

УДК 543.544.3

Содержание микотоксинов в пищевой продукции зерновой природы – один из показателей ее безопасности. В статье описано определение Т-2-токсина в современных лабораторных условиях на отечественном оборудовании. Предложена формула расчета, не требующая сравнения площадей пиков. Установлен более широкий диапазон определяемых концентраций Т-2-токсина. Проведена статистическая обработка результатов и рассчитаны метрологические характеристики.

Ключевые слова: Т-2-токсин, газовая хроматография, ЭЗД-детектор, дериватизация

Введение

Т-2-токсин (рис. 1) – один из наиболее токсичных представителей группы трихотеценовых микотоксинов, синтезируемых плесневыми грибами рода *Fusarium* [1]. Он оказывает разрушающее действие на кровеносную, иммунную, нервную системы, пищеварительный тракт, кожу [2]. Содержание Т-2-токсина в зерне, продуктах питания зерновой природы, кормах, комбикормовом сырье регламентировано в соответствующих нормативных документах.

Наиболее распространенными способами определения Т-2-токсина являются хроматографические методы. Помимо них, получили развитие иммуноферментные методы [3, 4], однако отмечается их меньшая точность в сравнении с хроматографией [5].

Для методов ВЭЖХ и УВЭЖХ (HPLC, UPLC) предложены различные способы дериватизации

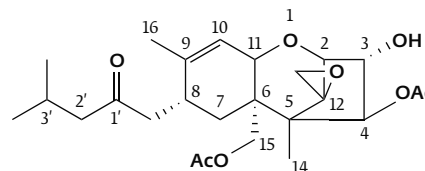


Рис. 1. Т-2-токсин

и детектирования аналита, позволяющие достичь низких пределов обнаружения и воспроизводимости результатов [6, 7]. Так, в [6] приводится предел обнаружения 0,005 мг/кг, степень извлечения аналита 80–99% и стандартное отклонение менее 6%.

Наиболее современным и усовершенствованным методом определения микотоксинов, включая Т-2, признается ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Вместе с этим, разнообразие анализируемых матриц, химическое родство Т-2-токсина и его метаболитов требуют дальнейшего освоения, валидации и верификации метода [8]. Однако несмотря на то, что в России

¹ ФГБУН Всероссийский институт научной и технической информации Российской академии наук (ВИНИТИ РАН), Москва, Россия. technologistf@mail.ru.

принят стандарт на определение Т-2-токсина методом хромато-масс-спектрометрии [9], его нельзя назвать распространенным в рядовых химико-аналитических лабораториях ввиду сложности и высокой стоимости соответствующего оборудования.

В испытательных лабораториях санитарно-гигиенического профиля для этих целей чаще применяют метод газовой хроматографии с детектором электронного захвата (ГХ-ЭЗД, GC-ECD). Между тем, количество исследований, посвященных ГХ-методам определения Т-2, сравнительно невелико, а имеющиеся – демонстрируют различные подходы к определению [10]. Так, для дериватизации Т-2-токсина применяются ангидриды трифторуксусной (ТФАА) и пентафторпропановой (PFPA) кислот, N-гептафторбутирил имидазол (НВФИ) [11–14]. В исследованиях используют различные капиллярные колонки и режимы хроматографирования: температурные градиенты, газы-носители и их скорости.

В России нормативными документами для определения Т-2-токсина методом ГХ-ЭЗД являются МУ 3184-84 [15] и ГОСТ 33682-2015 [16]. Оба документа устарели морально и технически. Сравнение текстов позволяет сделать вывод, что в технической части ГОСТ, несмотря на свою сравнительную новизну, является калькой МУ, применяемых с 1984 года. Так, для обработки хроматограмм «площадь пика определяют умножением высоты пика на ширину пика на половине его высоты» [15, 16], что давно вышло из практики с внедрением интеграторов. В качестве оборудования приводятся набивные колонки, которые в лабораторной практике применяются все реже. Расчет результата осуществляется по формуле, предусматривающей дополнительное последовательное введение стандарта и вычисление отношения площадей пиков. Весьма скудно представлены метрологические характеристики метода – в МУ приводится значение (точнее, диапазон значений) относительного стандартного отклонения, в ГОСТ отсутствуют и эти сведения. В качестве градуировочных стандартов рекомендованы две точки 0,2 и 0,5 мкл раствора ТФА-производного стандарта Т-2-токсина, что соответствует 5 и 12,5 нг Т-2-токсина. Для предела обнаружения приводится значение 0,05 мг/кг, в то время как современное оборудование позволяет достичь гораздо лучшей чувствительности. Помимо этого, современные требования к аккредитованным лабораториям (ГОСТ 17025-2019, п. 7.6) предписывают вычисление неопределенности результатов измерений, а в опубликованных на данный момент работах они не приводятся.

Настоящая статья посвящена попытке устранения этих недочетов и усовершенствованию методики определения массовой концентрации Т-2-токсина в пищевой продукции методом газо-жидкостной хроматографии с капиллярной колонкой и ЭЗД-детектированием с акцентом на использование, где это возможно, оборудования и реагентов российского производства.

Объекты и методы исследования

В качестве объекта исследования отбирали пробы пищевой продукции зерновой природы, не содержащей Т-2-токсин. В пробы вводилась рассчитанная стандартная добавка Т-2. Методику газохроматографического определения Т-2 разрабатывали на основе стандартизированных методик (МУ 3184-84, ГОСТ 33682-2015) [15, 16]. Для дериватизации Т-2-токсина использован трифторуксусный ангидрид (ТФА, ТФАА). По методу «введено-найденно» определена степень извлечения аналита.

Экстракцию из отобранной пробы и очистку экстракта проводили в соответствии с ГОСТ 33682-2015 [16], п. 5.1, 5.2.

Для получения ТФА-производного использовали приготовленный экстракт и, параллельно, стандарт Т-2-токсина. В мерную пробирку на 5 мл добавляли 50 мкл стандартного раствора Т-2-токсина в бензоле, 250 мкл бензола, 50 мг свежепрокаленного карбоната натрия и 50 мкл трифторуксусного ангидрида. Пробирку закрывали стеклянной притертой пробкой и перемешивали при температуре 20÷25 °С в течение 30 мин на лабораторном вортексе (Multi Speed Vortex MSV-3500) при RPM=500. Содержимое пробирок разбавляли бензолом до 1 мл и фильтровали через химическую воронку с кусочком ваты в другую пробирку на 5 мл, карбонат натрия на фильтре промывали 0,5 мл бензола. Объединенные бензольные фильтраты упаривали досуха в слабой струе азота (ОСЧ). Остаток растворяли в 200 мкл бензола и анализировали.

Анализ Т-2-токсина в бензольных экстрактах проводили с помощью газового хроматографа «Кристаллюкс-4000М» (ООО «НПФ «Мета-Хром», г. Йошкар-Ола). Параметры хроматографирования: капиллярная колонка (Restek, Rtx-5, Crossbond 5% diphenyl / 95% dimethyl polysiloxane, 60 м × 0,25 мм × 0,25 мкм), газ-носитель – азот ОСЧ, давление на входе в колонку 3 атм, температура испарителя 240 °С, температура детектора 260 °С, деление потока 1:10, температура термостата колонки: 1 мин 190 °С, подъем до 200 °С со скоростью 10 °С/мин. Время анализа 45 мин.

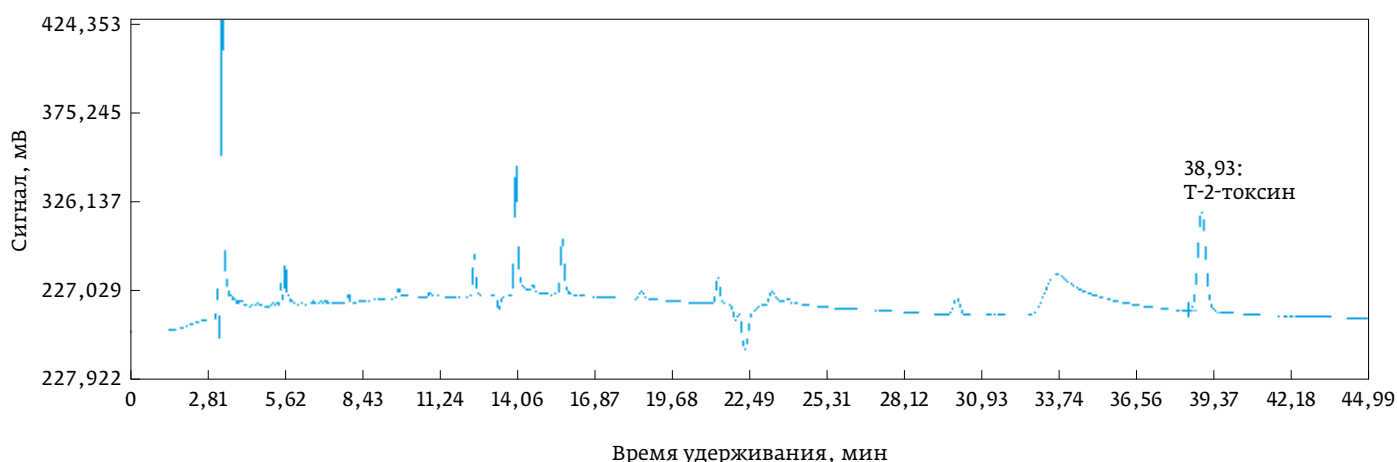


Рис. 2. Хроматографический пик Т-2-токсина (38,93 мин)

Реактивы: трифторуксусный ангидрид (ТФАА) $\geq 99\%$, для газовой хроматографии, Sigma-Aldrich 106232; бензол, квалификация «ХЧ для хроматографии», АО «ВЕКТОН»; стандартный образец состава раствора Т-2-токсина в бензоле (Т-2-100) ГСО 7942-2001, ФГБНУ «ВНИИВСГЭ».

Градуировочная зависимость построена по пяти точкам: 0,1; 0,5; 2,0; 10; 25 мг/л. Полученный массив точек аппроксимирован линейной зависимостью с RSD 2,94%. $R^2 = 0,9952$. Обработку пиков вели по площади.

Расчет содержания Т-2-токсина проводили по формуле

$$C = \frac{V_1 V_3 C_x}{V_2 m} \text{ [млн}^{-1}\text{]}, \quad (1)$$

где V_1 – объем экстрагирующего растворителя, мл (100 мл); V_2 – объем фильтрата, взятый для анализа, мл (70 мл); V_3 – объем бензольного раствора ТФА-производного, мл (0,2 мл); C_x – показания прибора, мг/л; m – навеска пробы, г (20 г).

Таблица 1. Степень извлечения Т-2-токсина из модельных объектов

| Объект исследования | Введено, мг/кг | Найдено, мг/кг | Степень извлечения, % |
|-------------------------|----------------|----------------|-----------------------|
| Мука пшеничная | 1,0 | 0,90 | 90 |
| Хлеб ржаной | 1,0 | 0,95 | 95 |
| Булка из пшеничной муки | 1,0 | 0,94 | 94 |

Результаты исследований и их обсуждение

Время удерживания (Retention time) в условиях эксперимента составило 38,9 мин. На рис. 2 приведен пример хроматограммы.

В результате построения градуировочной зависимости по большему количеству точек расширены границы определяемых содержаний.

Содержание Т-2-токсина в сырье, вычисленное по (1) и соответствующее предельным точкам калибровочной зависимости, определяется в диапазоне $[0,0014 \div 0,35]$ млн⁻¹ (мг/кг), что значительно шире, чем регламентировано МУ 3184-84 $(0,05 \div 0,1 \text{ мг/кг})$ [15].

Степень извлечения Т-2-токсина в условиях эксперимента составляла 90–95%. В табл. 1 приведены степени извлечения Т-2-токсина для различных модельных объектов.

Таблица 2. Показатели точности анализа, %

| | |
|---|----|
| Предел повторяемости, r_d | 10 |
| Предел внутрилабораторной прецизионности, R_d | 16 |
| Границы интервала, в котором погрешность анализа находится с вероятностью $P = 0,95$, Δ_d | 11 |

Таблица 3. Значения неопределенности измерений, %

| | |
|---|-----|
| Относительная суммарная неопределенность, u_c | 5,8 |
| Относительная расширенная неопределенность, U | 12 |
| Коэффициент охвата, k , для уровня доверия 0,95 | 2 |

Проведено сопоставление времени выхода и формы пика в зависимости от температурных режимов. Установлено, что высокая начальная температура режима хроматографирования (190 °С) сокращает время анализа, не оказывая влияния на форму и площадь пика определяемого вещества.

В табл. 2 приведены результаты статистической обработки двадцати параллельных определений с изменяемыми параметрами – время, оператор при $n=2$, $P=0,95$. Для оценки однородности дисперсий и наличия выбросов результаты анализировали по критериям Кохрена и Граббса. Обработку результатов проводили по РМГ 61-2010 [17] в условиях внутривлабораторной прецизионности.

В работе также рассчитаны значения неопределенности измерений [18, 19] (табл. 3).

Заключение

Проведенные исследования позволили актуализировать данные по определению Т-2-токсина с помощью газо-жидкостной хроматографии с ЭЗД-детектором – наиболее применяемым в рутинных анализах методом. Для выбранных параметров процесса установлено время удерживания Т-2-токсина и рассчитаны метрологические характеристики. Расширен по сравнению с действующими методиками диапазон измерения содержания Т-2-токсина в сырье и оценена степень его извлечения во время пробоподготовки.

Литература / References

- Awuchi C. G., Ondari E. N., Ogbonna C. U., Upadhyay A. K., Baran K., Okpala C. O. R., Korzeniowska M., Guiné R. P. F. Mycotoxins affecting animals, foods, humans, and plants: types, occurrence, toxicities, action mechanisms, prevention, and detoxification strategies – a revisit. *Foods*. 2021. 10(6): 1279.
- Kalantari H., Mousavi M. Review on T-2 toxin. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2010. 5(1): 26–38.
- ГОСТ 34108-2017. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение содержания микотоксинов прямым твердофазным конкурентным иммуноферментным методом. М.: Стандартинформ, 2020. 20 с.
GOST 34108-2017. Feed, compound feed, feed raw materials. Determination of mycotoxin content by direct solid-phase competitive enzyme immunoassay. М.: Standartinform Publ., 2020. 20 p.
- Мишина Н. Н., Семенов Э. И., Папуниди К. Х. Применение конъюгата Т-2 токсина с полилизинном для обнаружения Т-2 токсина в конкурентном ИФА. *Ветеринарный врач*. 2017. 4: 33–40.
Mishina N. N., Semyonov E. I., Papunidi K. H. Application of a T-2 toxin conjugate with polylysine for the detection of T-2 toxin in a competitive EIA. *Veterinarnyj vrach = Veterinarian*. 2017. 4: 33–40.
- Adunphatcharaphon S. et al. The evolution of multiplex detection of mycotoxins using immunoassay platform technologies. *Journal of Hazardous Materials*. 2022. P. 128706.
- Pascale M., Panzarini G., Visconti A. Determination of HT-2 and T-2 toxins in oats and wheat by ultra-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Talanta*. 2012. 89: 231–236.
- Pascale M., Haidukowski M., Visconti A. Determination of T-2 toxin in cereal grains by liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and derivatization with 1-anthrolylnitrile. *Journal of Chromatography A*. 2003. 989(2): 257–264.
- Гогина Н. Н. Содержание Т-2 и HT-2 микотоксинов в кормах и их влияние на переваримость питательных веществ у мясных кур: дис. канд. с.-х. наук: 06.02.08 ФНЦ «ВНИТИП» РАН, Сергиев Посад, 2020. 166 с.
Gogina N. N. The content of T-2 and HT-2 mycotoxins in feed and their effect on the digestibility of nutrients in meat chickens: dissertation of the Candidate of Agricultural Sciences 06.02.08 FNC VNITIP RAN, Sergiev Posad. 2020. 166 p.
- ГОСТ 34140-2017. Продукты пищевые, корма, продовольственное сырье. Метод определения микотоксинов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. М.: Стандартинформ, 2020. 20 с.
GOST 34140-2017 Food products, feed, food raw materials. Method for the determination of mycotoxins using high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. М.: Standartinform Publ., 2020. 20 p.
- Krska R. et al. Determination of T-2 and HT-2 toxins in food and feed: An update. *World Mycotoxin Journal*. 2014. 7(2): 131–142.
- Kotal F. et al. Determination of trichothecenes in cereals. *Journal of Chromatography A*. 1999. 830(1): 219–225.
- Majerus P., Hain J., Scheer M. T-2 and HT-2 toxin analysis in cereals and cereal products following IAC cleanup and determination via GC-ECD after derivatization. *Mycotoxin Research*. 2008. 24(1): 24–30.
- Cohen H., Lapointe M. Capillary gas chromatographic determination of T-2 toxin, HT-2 toxin, and diacetoxyscirpenol in cereal grains. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 1984. 67(6): 1105–1107.
- Kong W. et al. Validation of a gas chromatography-electron capture detection of T-2 and HT-2 toxins in Chinese herbal medicines and related products after immunoaffinity column clean-up and pre-column derivatization. *Food chemistry*. 2012. 132(1): 574–581.
- МУ 3184-84. Методические указания по обнаружению, идентификации и определению содержания Т-2 токсина в пищевых продуктах и продовольственном сырье. М., 1984. 12 с.
MU 3184-84. Guidelines for the detection, identification and determination of the T-2 toxin content in food products and food raw materials. Moscow, 1984. 12 p.
- ГОСТ 33682-2015. Продукты пищевые. Определение Т-2 токсина хроматографическим методом. Минск, 2015. 8 с.
GOST 33682-2015. Food products. Determination of T-2 toxin by chromatographic method. Minsk, 2015. 8 p.
- РМГ 61-2010. Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. М.: Стандартинформ, 2012. 62 с.
RMG 61-2010. State system for ensuring the uniformity of measurements. Accuracy, trueness and precision measures of the procedures for quantitative chemical analysis. Methods of evaluation. М.: Standartinform Publ., 2012. 62 p.
- ГОСТ 34100.3-2017/ISO/IEC Guide 98-3:2008 Неопределенность измерения. Часть 3. Руководство по выражению неопределенности измерения. М.: Стандартинформ, 2018. 104 с.
GOST 34100.3-2017/ISO/IEC Guide 98-3:2008 Uncertainty of measurement. Part 3. Guide to the expression of uncertainty in measurement. М.: Standartinform Publ., 2018. 104 p.
- Руководство ЕВРАХИМ/СИТАК СГ 4. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях. Третье издание. 2012. 165 с.
EURACHEM/CITAC Manual CG 4. Quantitative description of uncertainty in analytical measurements. Third edition. 2012. 165 p.

Статья поступила в редакцию 15.05.2023

Принята к публикации 01.06.2023