

## ПРИМЕНИМОСТЬ МЕТОДА ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОГО ДЕТЕКТИРОВАНИЯ И КЛАССИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ МИКОТОКСИНОВ В РАЗЛИЧНЫХ МАТРИЦАХ

© Артамонов И.В.



**Иван Владимирович Артамонов**

Вологодский научный центр Российской академии наук  
Российская Федерация, 160014, г. Вологда, ул. Горького, д. 56а  
E-mail: iv.artamonov@outlook.com  
ORCID: 0000-0002-6387-4886; ResearcherID: G-4714-2017

*Микотоксины представляют важную в хозяйственно-экономическом плане группу химических соединений, в то же время являющуюся крайне разнообразной по строению и свойствам, что делает невозможным применение какого-либо одного метода для их поиска и количественного определения в различных матрицах. С учетом того, какое влияние оказывают эти соединения на живые организмы, часто приводя к массовым интоксикациям и гибели сельскохозяйственных животных, отравлениям среди потребителей продуктов питания, важность поиска средств деконтаминации сырья и субстратов очевидна. На первом этапе в этом процессе происходят поиск и количественное определение содержания микотоксинов в различных матрицах. Необходимо отметить многообразие существующих методов, позволяющих с разными точностью и эффективностью определять концентрацию микотоксинов. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии занял важное место среди прочих благодаря своей универсальности и высокой точности. Цель исследования – рассмотрение возможностей одной из методик, позволяющей с высокой точностью определять содержание в образцах наиболее хозяйственно важных ввиду высокой токсичности, многообразия вызываемых эффектов и широкой распространенности микотоксинов: группы афлатоксинов, охратоксинов, зеараленона, фумонизина – метода ВЭЖХ (HPLC) с флуориметрическим детектированием (FLD). Задачи: анализ существующих методик определения микотоксинов и вариаций этих методик, факторов, влияющих на качество определения и воспроизводимость результатов. Методика HPLC-FLD в различных вариантах достаточно показательна, обладает высокой точностью и повторяемостью результата, что позволяет использовать ее при проведении научных исследований. В этом заключается ее научная новизна.*

*Микотоксины, хроматография, флуориметрическое детектирование, ВЭЖХ.*

## Введение

Объем продукции сельского хозяйства России в 2017–2019 гг. составил более 5,5 трлн руб., из которых на растениеводство приходится до 46% (2,6 трлн руб.). Формируя 4,7% ВВП страны и обеспечивая в последние годы лидерство Российской Федерации в мировом экспорте зерновых культур<sup>1</sup>, сельское хозяйство является весьма чувствительной отраслью экономики.

Качество производимой продукции напрямую определяет экономическую эффективность сельского хозяйства. Это касается не только продуктов питания (растительного и животного происхождения), но и кормов, от качества которых зависит здоровье сельскохозяйственных животных и, в конечном счете, их продуктивность и качество продукции животноводства.

Также нужно учитывать экономические потери, связанные с выбраковкой некачественной продукции, снижением конечной стоимости продукции ввиду ее низкого качества, падением продуктивности животных и их преждевременным выбыванием из стада.

Тщательный контроль как кормов, так и продукции сельского хозяйства на соответствие устанавливаемым нормам выступает необходимым условием повышения эффективности сельского хозяйства. Одним из критериев соответствия устанавливается содержание в продукции загрязнителей (контаминантов), обширной группой которых являются плесневые грибы и одни из их вторичных метаболитов – микотоксины.

Микотоксины – вторичные низкомолекулярные метаболиты плесневых грибов родов *Fusarium*, *Aspergillus*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Penicillium* и др., а также контаминанты

продукции сельского хозяйства, включая зерно злаковых, бобовые, масличные, овощные культуры и фрукты. Для жизнедеятельности грибов, однако, они не являются необходимыми и фактически никакой роли не играют. Исключением можно считать влияние микотоксинов на те грибы и растения, на которых они существуют. Поэтому в отношении их естественной функции можно сделать предположение о том, что микотоксины становятся средством повышения конкурентности.

Микотоксины выступают причиной множества заболеваний неинфекционной природы у человека и животных, объединяемых в группу «микотоксикозы», проявляющиеся как в острой форме (при попадании в организм больших доз микотоксинов однократно), так и хронической (следствие регулярного контакта с микотоксинами в малых дозах).

Микотоксины обладают миелотоксичным, нефротоксичным, канцерогенным, тератогенным, бактериостатическим, цитотоксическим, иммунодепрессивным, термогенным действием. Ввиду столь разнообразного влияния на животных и человека они стали объектом пристального изучения.

Микотоксины – чрезвычайно разнообразная группа веществ, воздействующая практически на все аспекты функционирования организма. В настоящее время неизвестными остаются многие эффекты микотоксинов. В частности, некоторые публикации показывают, что микотоксины оказывают существенное влияние на организмы животных даже в меньших концентрациях, чем допускается различными регуляторами [1]. Отчасти это объясняется и огромным количеством микотоксинов (в настоящее время известно не менее 400 видов) [2; 3].

Впервые о микотоксикозах в СССР упоминал в 1938 году Н.А. Грандильевский,

<sup>1</sup> Объем экспорта зерна в 2018 году составил 43,3 млн т (для сравнения: США – 25,5 млн т, Евросоюз – 24 млн т, Канада – 24,5 млн т).

описывая случай отравления лошадей соломой, зараженной грибами *Stachybotrys alternans*. Он употреблял термин «стахботриотоксикоз», отмечая у животных, получавших зараженный корм в достаточно больших количествах, расстройство координации, тахикардию, аритмию, потерю чувствительности, общее угнетение, кровоизлияния на слизистых оболочках (в том числе и слизистой оболочке кишечника). При этом гибель животного наступает в первые сутки после приема корма. У КРС (по А.Х. Саркисову) наблюдаются две стадии отравления. Для второй стадии характерны мышечная дрожь, атония преджелудков, диарея с кровью, кашель, отеки, беременность у некоторых животных прерывается абортom [4].

Эфирные вытяжки грибов *Fusarium sporotrichioides*, *Stachybotrys alternans* при нанесении на кожу вызывают сильные некрозы и смерть животных. *Claviceps purpurea* приводит к эрготизму (к которому восприимчив и человек) и смерти животных и птицы в короткий период. Информация о поражениях людей спорыньей известна еще из средневековых летописей, а с 591 по 1789 год в Европе произошло 132 эпидемии эрготизма. В 1128 году эпидемия эрготизма стала причиной гибели 14 тыс. человек в Париже [5]. Даже в современной истории имеются случаи массового отравления людей микотоксинами, последний из них зафиксирован в 1951 году в Пон-Сент-Эспри во Франции.

Заражение грибами-продуцентами микотоксинов – частое явление в практике сельского хозяйства всех стран мира. Промышленная переработка не оказывает существенного влияния на содержание микотоксинов в пищевых продуктах и кормах, и они легко передаются по производственным цепочкам, попадая в конечные продукты и организм животных и человека.

Стоит отметить, что до недавнего времени основное внимание уделялось поиску

микотоксинов в зерне, злаках, кукурузном силосе. Гораздо меньшее количество работ посвящено травяному силосу (разного состава), в котором обнаруживаются токсины грибов рода *Fusarium* [6].

Заражение может происходить как до сбора урожая, так и после него. Заражение грибами *Penicillium* spp. происходит, как правило, после сбора, в то время как грибы *Alternaria* spp. и *Fusarium* spp. поражают растения еще в посевах. Грибы *Aspergillus* spp. могут заражать материал в обоих случаях [8]. По этой причине избежать заражения в агрокультуре практически невозможно. Даже после уничтожения микрофлоры микотоксины остаются в сырье, попадая в организмы животных, продукты питания и организм человека.

Глобализация рынка сельскохозяйственной продукции, продуктов питания, кормов, снижение временных затрат на транспортировку продукции приводит к сложно предсказуемым последствиям в распространении плесневых грибов и продуцируемых ими контаминантов по всему миру [8]. Исследования показывают, что доля зараженных микотоксинами образцов различных культур (используемых как в качестве пищевого сырья, так и кормов) имеет стабильную положительную динамику [9].

Распространение микотоксинов носит глобальный характер и является значимой проблемой для сельского хозяйства в целом. По этой причине исследования различного масштаба (как крупные, интегрирующие данные из множества источников, так и локальные, оценивающие ситуацию в отдельно взятых регионах мира, государствах и их субъектах) – важный элемент решения задачи, связанной со снижением негативных эффектов, вызываемых этими контаминантами.

Цель исследования – выявление возможностей одной из методик, позволяющей с высокой точностью определять концен-

трацию в исследуемых образцах наиболее хозяйственно важных ввиду высокой токсичности, многообразия вызываемых эффектов и широкой распространенности микотоксинов: группы афлатоксинов, ократоксинов, зеараленона, фумонизина – метода ВЭЖХ (HPLC) с флуориметрическим детектированием (FLD).

Задачи исследования:

- 1) анализ существующих методик определения микотоксинов;
- 2) анализ существующих вариаций методик, факторов, влияющих на качество определения и воспроизводимость результатов.

### **Методы определения микотоксинов**

Выявление заражения материала микотоксинами связано с определенными трудностями. Кроме случаев явного заражения, когда колонии плесневых грибов или признаки поражения хорошо заметны, большинство случаев скрытые. Концентрация микотоксинов, как правило, недостаточно высока, чтобы определять ее классическими методами аналитической химии.

Активную разработку методов для определения содержания микотоксинов стимулировали крупные эпидемии болезней сельскохозяйственных животных и птицы. После эпидемии «болезни X», результатом которой стала гибель более 100 тыс. индек в Великобритании в 1960 году, внимание исследователей привлекло наличие в арахисе, используемом в качестве добавок к корму птицы, флуоресцирующего контаминанта – плесневого гриба *Aspergillus flavus*, продуцирующего группу афлатоксинов [10].

Результатом исследований стала целая группа методов, с различной степенью точности определяющих концентрацию микотоксинов в целом и афлатоксинов как одной из самых опасных групп в частно-

сти, в исследуемых образцах. Наиболее распространенные методы представлены в *табл. 1*.

Стандартным методом выявления заражения в настоящее время служит иммуноферментный анализ (ИФА или ELISA, англ.). Его сущность заключается в высокоселективной реакции антиген-антитело, в результате которой образуются продукты, обладающие окраской или другими свойствами, позволяющими оценить ферментативную активность.

В приложение к микотоксинам, как правило, используется фотометрический метод определения концентрации в видимом диапазоне волн (классическая длина волны при определении содержания микотоксинов – 450 нм).

В настоящее время в абсолютном большинстве случаев применения ИФА микотоксинов используются готовые наборы, содержащие стандартные ИФА-планшеты с закрепленными антителами, позволяющие проводить быстрый анализ, но имеющие высокую стоимость. Вторым ограничением ИФА является его высокая селективность, позволяющая определять только один микотоксин (или группу микотоксинов) в каждом испытании.

Тем не менее ИФА-методы недостаточно точны и показательны, чтобы использовать их в качестве методов точного количественного определения, когда такое определение выступает конечной целью анализа. В этих случаях, как правило, обращаются к высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ или HPLC) и ее вариантам (в частности сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии – УВЭЖХ или UHPLC), а также различным методикам детектирования.

В соответствии с сущностью метода ВЭЖХ (либо УВЭЖХ) определение микотоксинов заключается в их разделении (в случае анализа нескольких микотоксинов) и обнаружении различными методами

**Таблица 1. Наиболее распространенные методы анализа микотоксинов, используемые в настоящее время**

Метод	Предел обнаружения (нг/г)	Преимущества	Недостатки	Анализируемые субстраты (примеры)
Тонкослойная хроматография	> 10	Универсальный, компактный, быстрый	Трудоемкий, низкая чувствительность	Арахис, какао, кукуруза и др.
Газовая хроматография	–	Быстрый, автоматизирован	Низкая чувствительность, высокая стоимость	
Жидкостная хроматография	> 1	Высокие точность, чувствительность, извлекаемость, автоматизирован, анализ нескольких токсинов за один раз	Сравнительно высокая стоимость	Любые субстраты после экстракции токсинов
Разделение на мини колонках	> 5	Быстрый, простой	Крайне низкая точность	Кормовые смеси, арахис, семена хлопка, кукуруза
Метод яркой желто-зеленой флуоресценции	–	Быстрый метод	Низкая точность	Кукуруза, ячмень, сорго
Изотопный иммунологический анализ	> 5	Высокая чувствительность, высокая специфичность	Дорогостоящий, радиоактивно опасный	
ELISA (ИФА)	> 0,25	Высокоселективный, высокочувствительный, быстрый	Дорогостоящий	Любые субстраты после экстракции

Примечание: группа биологических методов определения, индикатором содержания микотоксинов в которых служат живые организмы (эмбрионы, культуры тканей и клеток, микроорганизмы, чувствительные к микотоксинам животные, например форель), не получила широкого распространения ввиду невозможности количественного определения и высокой трудоемкости. В то же время с развитием технической базы снижаются трудоемкость и себестоимость химических и физических методов определения.  
 Источник: Ellis W.O. [et al.]. Aflatoxins in food: Occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1991, vol. 30, no. 4, pp. 403–439.

детектирования после разделения на хроматографической колонке.

Будучи структурно сложными органическими соединениями<sup>2</sup> (относительно простое строение имеет, например, патулин), микотоксины существенно различаются по времени удержания на хроматографических колонках, что позволяет проводить эффективное разделение их смесей.

Ввиду отсутствия у хроматографической колонки свойства селективности по отношению к микотоксинам (все введенные в нее микотоксины взаимодействуют

с неподвижной и подвижной фазами), в процессе элюирования разделяются даже близкие по строению токсины, например, показано, что группа афлатоксинов хорошо поддается разделению на классических обращенно-фазовых хроматографических колонках с привитой неподвижной фазой C18<sup>3</sup>. Элюирование производится смесями метанола, ацетонитрила и воды в различных соотношениях.

Многолетняя практика свидетельствует, что наиболее успешно хроматографическим способом разделяются и анализи-

<sup>2</sup> Микотоксины относятся к различным группам органических веществ, включая поликетиды (афлатоксины, цитринин), производные кумарина (охратоксины), сесквитерпеноиды (трихотеценовые микотоксины), производные пирана (патулин), и практически всегда содержат один или несколько карбоциклов и гетероциклов.

<sup>3</sup> Индекс C18 показывает длину привитого на неподвижную фазу радикала (модификатора), что определяет свойства хроматографической колонки и качество разделения. В практике обращенно-фазовой хроматографии используются колонки с различной длиной модификатора, от C2 до C30.

руются зеараленон, охратоксины и группа афлатоксинов. Оценивая применимость FL-детектирования, в основном сосредоточимся на последних как наиболее важных по степени влияния на живые организмы, чаще встречающихся и, в общем, являющихся причиной наибольшего числа случаев отравления.

Стоит отметить, что хроматографическое разделение микотоксинов требует предварительной очистки пробы с помощью метода твердофазной экстракции на иммуноаффинных колонках, позволяющих существенно повысить концентрацию анализируемых веществ и избавиться от примесей, которые могут влиять на выраженность флуоресценции и, соответственно, сигнала, получаемого детектором<sup>4</sup>.

Первые успешные попытки разделения афлатоксинов методом ВЭЖХ с детектированием их флуоресценции в ультрафиолете были предприняты в середине 1970-х годов. Разделение на нормально-фазовых колонках с детектированием в диапазоне 360–365 нм показало предел точности 1–10 нг/г, что было бы недостаточно для определения их концентраций в установленных нормах для пищевых продуктов пределах.

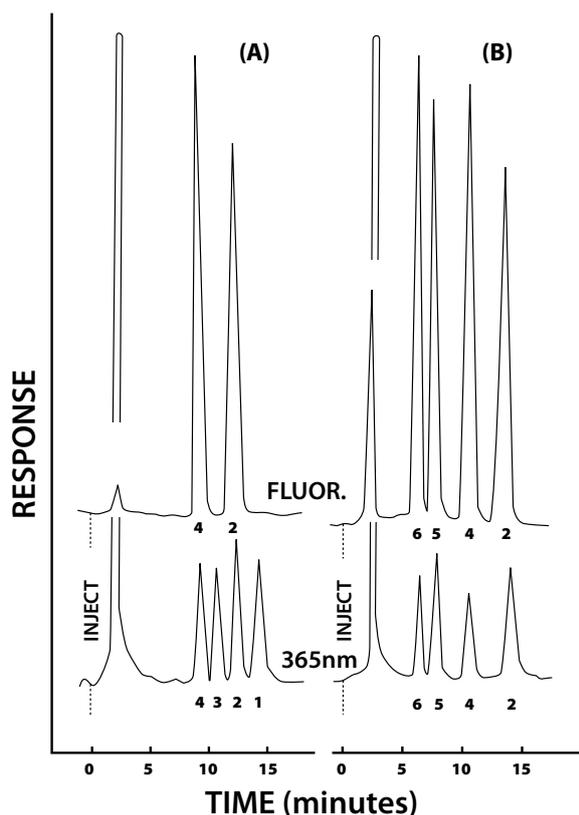
Использование в качестве растворителя и подвижной фазы хлороформа или дихлорметана в сочетании с нормально-фазовой колонкой приводило к тому, что флуоресценция афлатоксинов В1 (AFB1) и В2 (AFB2) практически полностью подавлялась, что приводило к необходимости комбинировать UV-детектор для В1 и В2 с FL-детектором для афлатоксинов G1 (AFG1) и G2 (AFG2). В то же время в смесях растворителей с водой в обращенно-фазовой хроматографии сильно подавляется флуоресценция токсинов AFB1 и AFG1 [11].

Общепринятым способом усиления флуоресценции афлатоксинов является их дериватизация. Впервые усиление флуоресценции дериватов афлатоксина В1 по сравнению с исходным веществом упомянуто в работе N. Davis, U. Diener в 1980 году (использовалась предколоночная дериватизация микотоксинов йодом). Было показано более чем двукратное усиление сигнала деривата в сравнении с исходным микотоксином AFB1. Кроме того, снизилось время удержания деривата: для AFB1 с 12 до 7,5 минут, для AFG1 – с 10 до 6 минут [12]. В настоящее время дериватирующим агентом в анализе афлатоксинов чаще всего выступает бром. Бромпроизводные афлатоксинов имеют существенно более сильную флуоресценцию. При использовании в качестве подвижной фазы смеси ацетонитрила и воды также можно избежать существенного ослабления флуоресценции деривата. Дериватизация бромом применяется, как правило, в постколоночном варианте, для которого время удержания микотоксинов остается прежним. Показателен и метод дериватизации о-фталевым альдегидом в варианте предколоночной дериватизации, в котором он применим для анализа фумонизина<sup>5</sup> [13]. Вариантом метода предколоночной дериватизации является дериватизация афлатоксинов трифторуксусной кислотой (TFA). Он также позволяет усилить сигнал деривата по отношению к исходному афлатоксину и повысить предел обнаружения до 0,5 нг/г для всех четырех афлатоксинов (рис. 1) [11; 14].

В табл. 2 представлены диапазоны частот детектирования микотоксинов (в варианте флуориметрического определения с дериватизацией) и пределы детектирования и количественного анализа. В за-

<sup>4</sup> Иммуноаффинные колонки являются стандартным способом очистки в анализе микотоксинов и базируются на тех же принципах, что и хроматография.

<sup>5</sup> Реализация методов пред- и постколоночной дериватизации требует существенных изменений в конструкции ВЭЖХ-системы, поэтому, как правило, на практике одновременно оба метода на одной ВЭЖХ-системе не используются.



**Рис. 1. Обращенно-фазовая хроматограмма афлатоксинов (содержание в пробе – 25 нг).**

(А) – неderivатизированные образцы,  
(В) – derivатизация с TFA.

Цифрами отмечены:

- 1 – AFB1, 2 – AFB2,
- 3 – AFG1, 4 – AFG2,
- 5 – AFB2a (гидратированный),
- 6 – AFG2a (гидратированный)

Источник: Kok W.T. Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B. Biomedical Sciences and Applications*, 1994, vol. 659, no. 1–2, pp. 127–137.

висимости от реализации методики, типа колонки, детектора и других факторов эти параметры могут изменяться как в большую, так и в меньшую сторону.

Сочетание классической ВЭЖХ и FL-детектора позволяет реализовать несколько методик определения микотоксинов, обладающих достаточно высоким пределом обнаружения. Возможность варьирования условий разделения (включая различные компоненты подвижной фазы и их соотношений, ее рН, скоростей потока элюэн-

**Таблица 2. Частоты детектирования и пределы обнаружения микотоксинов при детектировании FL-детектором**

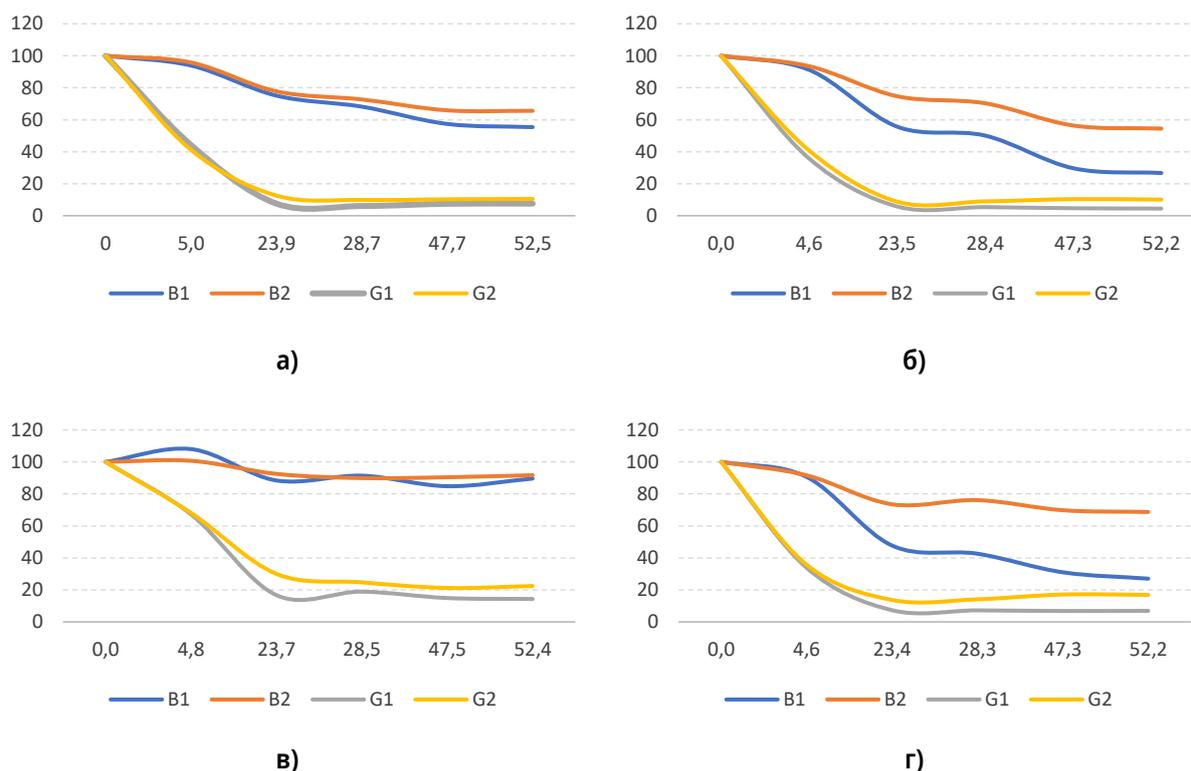
Токсин	Диапазон концентраций	Диапазон частот детектирования, нм	Пределы обнаружения (нг/г)	
			LOD	LOQ
AFB1	0.0125–10	360–440	0.0125	0.05
AFB2	0.00375–3		0.0037	0.015
AFG1	0.0125–10		0.0125	0.05
AFG2	0.00375–3		0.0037	0.015
OTA	0.05–40	330–460	0.05	0.2
ZEA	0.5–400	276–460	0.5	2
FBs		338–455	0.1	0.35

LOD – предельная концентрация обнаружения  
LOQ – предельная концентрация количественного определения  
Источник: Sedova I., Kiseleva M., Tutelyan V. *Mycotoxins in tea: Occurrence, methods of determination and risk evaluation. Toxins (Basel)*. MDPI AG, 2018, vol. 10, no. 11, p. 444.

та, температуры хроматографической колонки, применение градиентного элюирования) позволяет подбирать такие условия разделения, которые наиболее полно соответствуют задачам анализа.

### **Стабильность микотоксинов применительно к методу ВЭЖХ**

Определенную проблему представляет стабильность обнаруживаемых методами ВЭЖХ микотоксинов. Экстракция и элюирование, как правило, проводятся одним и тем же растворителем. Известно, что классические растворители в обращенно-фазовой хроматографии негативно влияют на растворенные микотоксины, приводя к их деградации и снижению концентрации. На степень деградации влияют время нахождения микотоксинов в растворителе, температура и экспозиция светом. Эмпирические данные, отражающие динамику их определяемой концентрации [15], показывают, что влияние этих факторов даже внутри одной группы токсинов не единообразно (рис. 2).



**Рис. 2. Динамика концентрации микотоксинов группы афлатоксинов в растворах при различных условиях хранения в зависимости от времени хранения (часы):**

а) ацетонитрил/вода (50/50), 22°C, темнота;

б) ацетонитрил/вода (50/50), 22°C, свет;

в) метанол/вода (50/50), 22°C, темнота;

г) метанол/вода (50/50), 22°C, свет.

Колебания в сторону превышения предыдущих концентраций являются следствием усреднения значений концентрации нескольких проб и несовершенства детектора.

Источник: Beaver R.W. Degradation of aflatoxins in common HPLC solvents. Journal of High Resolution Chromatography, 1990, vol. 13, no. 12, pp. 833–835.

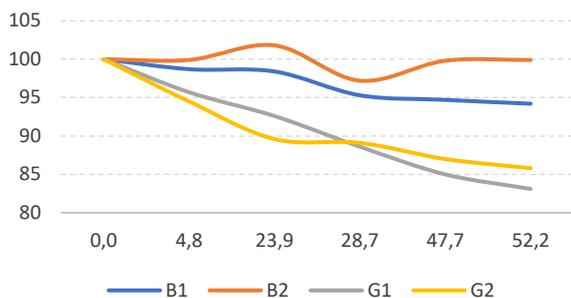
Без учета этого фактора определение становится неточным. Классическая хроматография работает с давлениями внутри колонки в диапазоне от 20 до 40 Мпа, что увеличивает время анализа. Для группы афлатоксинов, как мы указали выше, максимальное время удержания равняется приблизительно 23 минутам. Таким образом, последние пробы в серии содержат заведомо более низкие концентрации определяемых веществ по причине деградации их в растворителе. Этот эффект необходимо учитывать в процессе анализа.

Частично снизить степень деградации микотоксинов в ожидающих пробах мож-

но за счет охлаждения проб до температур заморзания экстракционной смеси. При температуре –18°C экстрагированные метанолом токсины остаются относительно стабильными для проведения анализа, но недостаточно – для хранения готовых проб (рис. 3).

Аналогичные результаты представлены в работе М. Kiseleva [et al.]. Они доказывают стабильность всей группы афлатоксинов в чистых органических растворителях (метанол) при соблюдении условий хранения [16].

С целью снижения степени деградации возможно применение других раствори-



**Рис. 3. Динамика изменения концентрации афлатоксинов в смеси метанола и воды (50:50) при температуре -18°C (часы)**

Источник: Beaver R.W. Degradation of aflatoxins in common HPLC solvents. Journal of High Resolution Chromatography, 1990, vol. 13, no. 12, pp. 833–835.

телей. В смесях бензола и ацетонитрила (в соотношении 98:2) афлатоксины стабильны в течение многих лет при условии хранения в темноте и холоде. Аналогично в смесях ацетонитрила и воды (50:50) при pH < 7 не обнаруживается существенного снижения концентрации афлатоксинов. В работе G. Diaz [et al.] показано, что деградация афлатоксинов может быть связана с влиянием воды в составе смеси растворителей, а также с их адсорбцией на поверхности стеклянной виалы, и предложен способ снижения влияния этого фактора путем обработки стеклянных виал 50% азотной кислотой<sup>6</sup> [17]. Результаты испытаний стабильности афлатоксинов представлены в табл. 3, 4. Хороший результат дает также силанизация – обработка поверхности виал силанизирующими агентами (триметилхлорсилан, диметилдихлорсилан, дисилазаны).

Комбинируя различные способы предотвращения деградации, выбирая отвечающие требованиям растворители и их смеси, мы получаем возможность минимизировать ошибку оценки содержания микотоксинов (в частности – афлатоксинов) в исследуемых образцах. Также открывается возможность длительного

**Таблица 3. Стабильность афлатоксинов в смесях растворителя и воды с различным соотношением компонентов при комнатной температуре с 24-часовой экспозицией**

% растворителя	Растворитель	0 часов	24 часа	% <sup>а</sup>
AFB1,нг/г				
20	ACN	5.0 ± 0.35 <sup>с</sup>	4.31 ± 0.26 <sup>д</sup>	86
	MeOH	5.0 ± 0.38 <sup>с</sup>	3.70 ± 0.26 <sup>д</sup>	74
40	ACN	5.0 ± 0.39 <sup>с</sup>	4.58 ± 0.30 <sup>с</sup>	92
	MeOH	5.0 ± 0.20 <sup>с</sup>	4.43 ± 0.16 <sup>д</sup>	89
60	ACN	5.0 ± 0.22 <sup>с</sup>	4.78 ± 0.20 <sup>с</sup>	96
	MeOH	5.0 ± 0.09 <sup>с</sup>	4.75 ± 0.09 <sup>с</sup>	95
100	ACN	5.0 ± 0.47 <sup>с</sup>	5.08 ± 0.46 <sup>с</sup>	102
	MeOH	5.0 ± 0.07 <sup>с</sup>	4.78 ± 0.06 <sup>с</sup>	96
AFB2,нг/г				
20	ACN	1.5 ± 0.10 <sup>с</sup>	1.35 ± 0.05 <sup>с</sup>	90
	MeOH	1.5 ± 0.18 <sup>с</sup>	1.17 ± 0.09 <sup>д</sup>	78
40	ACN	1.5 ± 0.11 <sup>с</sup>	1.39 ± 0.08 <sup>с</sup>	93
	MeOH	1.5 ± 0.09 <sup>с</sup>	1.38 ± 0.04 <sup>с</sup>	92
60	ACN	1.5 ± 0.05 <sup>с</sup>	1.42 ± 0.06 <sup>с</sup>	95
	MeOH	1.5 ± 0.02 <sup>с</sup>	1.46 ± 0.03 <sup>с</sup>	97
100	ACN	1.5 ± 0.14 <sup>с</sup>	1.51 ± 0.12 <sup>с</sup>	101
	MeOH	1.5 ± 0.02 <sup>с</sup>	1.46 ± 0.02 <sup>с</sup>	97
AFG1,нг/г				
20	ACN	5.0 ± 0.37 <sup>с</sup>	1.43 ± 0.37 <sup>д</sup>	29
	MeOH	5.0 ± 0.41 <sup>с</sup>	1.02 ± 0.10 <sup>д</sup>	20
40	ACN	5.0 ± 0.34 <sup>с</sup>	1.50 ± 0.27 <sup>д</sup>	30
	MeOH	5.0 ± 0.22 <sup>с</sup>	1.89 ± 0.17 <sup>д</sup>	38
60	ACN	5.0 ± 0.20 <sup>с</sup>	2.28 ± 0.18 <sup>д</sup>	46
	MeOH	5.0 ± 0.11 <sup>с</sup>	2.53 ± 0.14 <sup>д</sup>	51
100	ACN	5.0 ± 0.47 <sup>с</sup>	4.94 ± 0.40 <sup>с</sup>	99
	MeOH	5.0 ± 0.06 <sup>с</sup>	4.73 ± 0.06 <sup>с</sup>	95
AFG2,нг/г				
20	ACN	1.5 ± 0.09 <sup>с</sup>	0.58 ± 0.07 <sup>д</sup>	39
	MeOH	1.5 ± 0.07 <sup>с</sup>	0.48 ± 0.04 <sup>д</sup>	32
40	ACN	1.5 ± 0.09 <sup>с</sup>	0.57 ± 0.07 <sup>д</sup>	38
	MeOH	1.5 ± 0.07 <sup>с</sup>	0.74 ± 0.05 <sup>д</sup>	49
60	ACN	1.5 ± 0.04 <sup>с</sup>	0.80 ± 0.06 <sup>д</sup>	53
	MeOH	1.5 ± 0.02 <sup>с</sup>	1.07 ± 0.25 <sup>д</sup>	71
100	ACN	1.5 ± 0.13 <sup>с</sup>	1.52 ± 0.11 <sup>с</sup>	101
	MeOH	1.5 ± 0.02 <sup>с</sup>	1.46 ± 0.02 <sup>с</sup>	97
а – соответствует доле афлатоксина в %, остающегося после 24-часовой экспозиции;				
с, d – средние значения и стандартное отклонение в трех повторах, индексы показывают степень различия в парах 0–24 часа (индексы с-с – несущественная, индексы с-d – значительная).				
Источник: Diaz G.J., Cepeda S.M., Martos P.A. Stability of aflatoxins in solution. Journal of AOAC International, 2012, vol. 95, no. 4, pp. 1084–1088.				

<sup>6</sup> Предложенная методика заключается в обработке виалы 50% азотной кислотой в течение 16 часов, что практически полностью исключает деградацию афлатоксинов.

**Таблица 4. Стабильность афлатоксинов в смесях растворителя и воды с различным соотношением компонентов при температуре 5°C с 24-часовой экспозицией**

% раство- рителя	Раство- ритель	0 часов	24 часа	%
AFB1, нг/г				
20	ACN	5.0 ± 0.13 <sup>c</sup>	4.94 ± 0.15 <sup>c</sup>	99
	MeOH	5.0 ± 0.47 <sup>c</sup>	4.93 ± 0.51 <sup>c</sup>	99
40	ACN	5.0 ± 0.32 <sup>c</sup>	5.07 ± 0.31 <sup>c</sup>	101
	MeOH	5.0 ± 0.31 <sup>c</sup>	5.05 ± 0.30 <sup>c</sup>	101
60	ACN	5.0 ± 0.29 <sup>c</sup>	5.03 ± 0.23 <sup>c</sup>	101
	MeOH	5.0 ± 0.04 <sup>c</sup>	5.01 ± 0.07 <sup>c</sup>	100
100	ACN	5.0 ± 0.12 <sup>c</sup>	4.97 ± 0.16 <sup>c</sup>	99
	MeOH	5.0 ± 0.23 <sup>c</sup>	5.01 ± 0.26 <sup>c</sup>	100
AFB2, нг/г				
20	ACN	1.5 ± 0.04 <sup>c</sup>	1.49 ± 0.03 <sup>c</sup>	99
	MeOH	1.5 ± 0.15 <sup>c</sup>	1.48 ± 0.16 <sup>c</sup>	98
40	ACN	1.5 ± 0.06 <sup>c</sup>	1.51 ± 0.10 <sup>c</sup>	101
	MeOH	1.5 ± 0.08 <sup>c</sup>	1.50 ± 0.09 <sup>c</sup>	100
60	ACN	1.5 ± 0.07 <sup>c</sup>	1.51 ± 0.07 <sup>c</sup>	100
	MeOH	1.5 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.49 ± 0.03 <sup>c</sup>	99
100	ACN	1.5 ± 0.03 <sup>c</sup>	1.48 ± 0.05 <sup>c</sup>	99
	MeOH	1.5 ± 0.08 <sup>c</sup>	1.51 ± 0.07 <sup>c</sup>	101
AFG1, нг/г				
20	ACN	5.0 ± 0.14 <sup>c</sup>	4.87 ± 0.11 <sup>c</sup>	97
	MeOH	5.0 ± 0.52 <sup>c</sup>	4.77 ± 0.49 <sup>c</sup>	95
40	ACN	5.0 ± 0.30 <sup>c</sup>	5.02 ± 0.28 <sup>c</sup>	100
	MeOH	5.0 ± 0.23 <sup>c</sup>	4.85 ± 0.22 <sup>c</sup>	97
60	ACN	5.0 ± 0.23 <sup>c</sup>	4.97 ± 0.25 <sup>c</sup>	99
	MeOH	5.0 ± 0.07 <sup>c</sup>	4.94 ± 0.07 <sup>c</sup>	99
100	ACN	5.0 ± 0.15 <sup>c</sup>	4.91 ± 0.12 <sup>c</sup>	98
	MeOH	5.0 ± 0.26 <sup>c</sup>	4.96 ± 0.23 <sup>c</sup>	99
AFG2, нг/г				
20	ACN	1.5 ± 0.05 <sup>c</sup>	1.44 ± 0.01 <sup>c</sup>	96
	MeOH	1.5 ± 0.15 <sup>c</sup>	1.43 ± 0.14 <sup>c</sup>	95
40	ACN	1.5 ± 0.11 <sup>c</sup>	1.49 ± 0.09 <sup>c</sup>	99
	MeOH	1.5 ± 0.09 <sup>c</sup>	1.48 ± 0.08 <sup>c</sup>	99
60	ACN	1.5 ± 0.07 <sup>c</sup>	1.47 ± 0.10 <sup>c</sup>	98
	MeOH	1.5 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.51 ± 0.01 <sup>c</sup>	100
100	ACN	1.5 ± 0.04 <sup>c</sup>	1.46 ± 0.05 <sup>c</sup>	97
	MeOH	1.5 ± 0.09 <sup>c</sup>	1.49 ± 0.06 <sup>c</sup>	100

a – соответствует доле афлатоксина в %, остающегося после 24-часовой экспозиции;  
c, d – средние значения и стандартное отклонение в трех повторах, индексы показывают степень различия в парах 0–24 часа (индексы c-c – незначительная, индексы c-d – значительная).  
Источник: Diaz G.J., Cepeda S.M., Martos P.A. Stability of aflatoxins in solution. Journal of AOAC International, 2012, vol. 95, no. 4, pp. 1084–1088.

хранения проб микотоксинов в ожидании анализа, что существенно расширяет возможности исследований распространения и содержания микотоксинов с применением ВЭЖХ.

## Выводы

Метод классической жидкостной хроматографии имеет большой потенциал при выявлении как минимум некоторых групп микотоксинов, обладая высокой чувствительностью и позволяя производить точное количественное определение.

Несмотря на некоторые недостатки (как, например, требования к квалификации персонала, использование специализированных и дорогостоящих средств очистки и концентрирования исходной пробы, ограничения, связанные с собственной природой микотоксинов), хроматографическое определение данной группы веществ с флуориметрическим детектированием следует расценивать как важный и показательный метод. При соблюдении порядка пробоподготовки результат такого определения имеет высокую репрезентативность.

Нужно принимать во внимание, что в статье подробно разбирается лишь метод классической жидкостной хроматографии с FL-детектированием дериватов микотоксинов. Однако внутри самого метода можно выделить два блока операций, влияющих на результат определения:

- 1) хроматографическое разделение на нормально- или обращенно-фазовой колонке;
- 2) детектирование веществ, прошедших разделение.

Различные сочетания хроматографических колонок и подвижной фазы, а также применение градиентной элюции позволяют существенно улучшить разделение микотоксинов. Переход от классической хроматографии к ультравысокоэффективной (УВЭЖХ, UHPLC) с давлением 60–130 МПа повышает качество разделения и на порядок снижает время разделения. В зависимости от длины привитого радикала можно существенно варьировать условия и качество разделения в обоих методах.

Детектирование также можно производить множеством способов. Одним из наиболее перспективных и широко распро-

страненных в настоящее время стал метод масс-спектрометрии в различных реализациях. Подобные детекторы позволяют значительно повысить пределы обнаружения и чувствительность метода, получить возможность определять не только группу афлатоксинов, охратоксин и зеараленон. Практически все микотоксины могут быть определены на системе ВЭЖХ/МС (УВЭЖХ/МС) с различными вариантами масс-спектрометрического детектора.

Таким образом, метод ВЭЖХ с FL-детектированием, а также в сочетании с другими методами детектирования следует считать, наравне с другими распространенными методами, уместным в практике проведения научных исследований и, с определенными ограничениями, в практике коммерческого анализа, а благодаря возможностям масштабирования блочные системы ВЭЖХ можно адаптировать для анализа практически любых микотоксинов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kolawole O. [et al.]. Low doses of mycotoxin mixtures below EU regulatory limits can negatively affect the performance of broiler chickens: A longitudinal study. *Toxins*, 2020, vol. 12, no. 7.
2. Betina V. Production, isolation, separation and purification. In: Betina V. [ed.]. *Mycotoxins*. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, Netherlands, 1984, pp. 183–215.
3. Berthiller F. [et al.]. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, vol. 119, no. 1–2, pp. 33–37.
4. Саркисов А.Х. Микотоксикозы (грибковые отравления). М.: Сельхозгиз, 1954. 215 п.
5. The Cambridge World History of Human Disease. Ed. Kiple K.F. Cambridge University Press, 1993.
6. McElhinney C. [et al.]. Mycotoxins in farm silages – a 2-year Irish national survey. *Grass and Forage Science*, 2016, vol. 71, no. 2, pp. 339–352.
7. Rasmussen R.R. [et al.]. Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, vol. 397, no. 2, pp. 765–776.
8. Kosicki R. [et al.]. Multiannual mycotoxin survey in feed materials and feedingstuffs. *Animal Feed Science and Technology*, 2016, vol. 215, pp. 165–180.
9. Streit E. [et al.]. Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, vol. 93, no. 12, pp. 2892–2899.
10. Ellis W.O. [et al.]. Aflatoxins in food: Occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1991, vol. 30, no. 4, pp. 403–439.
11. Kok W.T. Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, 1994, vol. 659, no. 1–2, pp. 127–137.
12. Davis N.D., Diener U.L. Confirmatory test for the high pressure liquid chromatographic determination of aflatoxin B1. *Journal of AOAC International*, 1980, vol. 63, no. 1, pp. 107–109.
13. Sedova I., Kiseleva M., Tutelyan V. Mycotoxins in tea: Occurrence, methods of determination and risk evaluation. *Toxins*, 2018, vol. 10, no. 11, pp. 444.
14. NC M.-R. [et al.]. Mutagens and carcinogens called aflatoxins and their hydroxylated metabolites in food for domestic cats. *Biochem. Anal. Biochem.* OMICS Publishing Group, 2018, vol. 7, no. 04.
15. Beaver R.W. Degradation of aflatoxins in common HPLC solvents. *Journal of High Resolution Chromatography*, 1990, vol. 13, no. 12, pp. 833–835.
16. Kiseleva M. [et al.]. Stability of mycotoxins in individual stock and multi-analyte standard solutions. *Toxins*, 2020, vol. 12, no. 2, p. 94.
17. Diaz G.J., Cepeda S.M., Martos P.A. Stability of aflatoxins in solution. *Journal of AOAC International*, 2012, vol. 95, no. 4, pp. 1084–1088.

## Сведения об авторе

Иван Владимирович Артамонов – младший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Вологодский научный центр Российской академии наук». Российская Федерация, 160014, г. Вологда, ул. Горького, д. 56а; e-mail: iv.artamonov@outlook.com

## APPLICABILITY OF THE METHOD OF FLUORIMETRIC DETECTION AND CLASSICAL LIQUID CHROMATOGRAPHY IN THE DETERMINATION OF MYCOTOXINS IN VARIOUS MATRICES

Artamonov I.V.

*Mycotoxins are an important group of chemical compounds in economic terms, but at the same time they are extremely diverse in structure and properties which makes it impossible to use any one method to search for them and quantify them in different matrices. Given the impact of these compounds on living organisms, often leading to mass intoxication and death of farm animals, poisoning among food consumers, the importance of finding means of decontamination of raw materials and substrates is obvious. At the first stage of this process, the mycotoxin content in various matrices is searched for and quantified. It is necessary to note the variety of existing methods that allow determining the concentration of mycotoxins with different accuracy and efficiency. The method of high-performance liquid chromatography has taken an important place among others due to its versatility and high accuracy. The purpose of the research is to consider the possibilities of one of the methods which allow determining with high accuracy the content of the most economically important samples due to the high toxicity, variety of effects caused and wide prevalence of mycotoxins: aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, fumonisin – HPLC method with fluorimetric detection (FLD). The tasks of the research are: analysis of existing methods for determining mycotoxins and variations of these methods, factors affecting the quality of determination and reproducibility of the results. The HPLC-FLD method in various versions is quite indicative. It has high accuracy and repeatability of the result which can be used in scientific research. This is its scientific novelty.*

*Mycotoxins, chromatography, fluorimetric detection, HPLC.*

## Information about the author

Ivan V. Artamonov – Junior Researcher, Federal State Budgetary Institute of Science “Vologda Research Center of the Russian Academy of Sciences”. 56A, Gorky Street, Vologda, 160014, Russian Federation; e-mail: iv.artamonov@outlook.com