



ИННО ХИМИ ЛАБ ХХК

МЭДЭЭЛЛИЙН НЭР:

**ӨАСМ-ЛИПИДТЭЙ ХӨХНИЙ СҮҮ
ОРЛУУЛАГЧИД АФЛАТОКСИНЫГ
ШИНГЭНИЙ ХРОМАТОГРАФ, МАСС
СПЕКТРОМЕТР (ШХ/МС/МС)-Р
ШИНЖЛЭХ**

Зохиолч: Меган Жак

Утас: 77051414
И-мэйл: info@innochem.mn
Вэбсайт: www.medimpex.mn
Фэйсбүүк:
Инно лаборатори
Agilent Demo Center

ӨАСМ-ЛИПИДТЭЙ ХӨХНИЙ СҮҮ ОРЛУУЛАГЧИД АФЛАТОКСИНЫГ ШИНГЭНИЙ ХРОМАТОГРАФ, МАСС СПЕКТРОМЕТР (ШХ/МС/МС)-Р ШИНЖЛЭХ

Хураангуй

Афлатоксин М1 нь сүүнд илэрдэг гол афлатоксины бүлгийн нэгдэл юм. Энэ нь Европийн орнуудад хөхний сүү орлуулагчид хамгийн ихдээ 0.025µг/кг-аас бага байхаар Европийн холбооны (ЕС) зөвлөмжинд тусгагдсан байдаг. Харин Америкийн Нэгдсэн Улсад Хүнс болон Эмийн бодисын хяналтын газраас (FDA) 0.5µг/кг байхаар заасан байдаг байна. Энэхүү аргачлал нь афлатоксин М1, G2, G1, B2 болон В1-г хөхний сүү орлуулагчид өндөр агууламжтай саатуулагч матриц – Липидид (EMR - Lipid) Agilent Bond Elut-г ашиглан ШХ/МС/МС-р тодорхойлох тухай юм.

Энэхүү судалгаанд QuEChERS хандлалтыг ашиглан ӨАСМ—Липидийг дисперс ХФС (dSPE)-р цэвэрлэдэг. Энэхүү арга бүх шатандаа афлатоксины бүх нэгдэлд маш сайн гарцтай (88–113%) болон нарийвчлалтай (RSDs = 1.3–13.6%) байдаг. Энэхүү энгийн хялбар арга нь цомхон тоног төхөөрөмж болон экспертиз шаарддаг бөгөөд хүнсний лабораториудад ашиглахад хялбар байдаг.

Удиртгал

Микотоксинууд нь мөөгөнцөрийн хоёрдогч метаболитууд бөгөөд дэлхийн хэмжээнд хүнсний болон хүнсний нэмэлт бүтээгдэхүүнийг бохирдуулдаг хамгийн түгээмэл тархалттай байдаг нэгдэл юм. Хүнс, хөдөө аж ахуйн байгууллагаас (FAO) дэлхийн газар тариалангийн бүтээгдэхүүний 25% нь микотоксинууд бохирдсан байдаг гэсэн тооцоог гаргасан байна. Ингэж бохирдсоноор эдийн засагт маш их хор хохирол учруулдаг бөгөөд тэр дундаа үр тарианы үйлдвэрүүдэд илүү хохиролтой байдаг [1]. Афлатоксинууд (Хүснэгт 1) нь мөөгөнцөрийн олон төрлөөс үүсдэг *Aspergillus flavus* болон *Aspergillus parasiticus* [2] микотоксины бүлгийн нэгдлүүд юм. Афлатоксин М1 нь хамгийн энгийн сүүнд илэрдэг микотоксин бөгөөд афлатоксин -В1 [3] - р бохирдсон тэжээлийг үхэр идэж боловсруулах үед үүсдэг байна. Хүнс болон эмийн бодисын хяналтын газар (FDA) болон Европийн хороо (ЕС) төрөл бүрийн хүнсний бараа бүтээгдэхүүнд агуулагдах афлатоксины хэмжээ, хязгаарыг тогтоожээ [4,5]. Хүснэгт 2-т FDA болон ЕС-с афлатоксины хэмжээг Америкийн нэгдсэн улс болон Европд тогтоосон хязгаарыг харж болно.

Афлатоксины зөвшөөрөгдөх хамгийн доод хэмжээ маш бага ялангуяа хөхний сүү орлуулагч нэмэлт тэжээл болон сүү сүүн бүтээгдэхүүнд. Дээж бэлтгэл нь бага концентраци мэдрэх чадварыг сайжруулахын тулд матриц интерференцийг зайлуулах шаардлагатай. Immunoaffinity баганууд нь төрөл бүрийн матрицуудад афлатоксин болон микотоксинуудын илрүүлэх шинжилгээнд түгээмэл хэрэглэгддэг [6-9]. Гэхдээ эдгээр баганууд өртөг өндөртэй мөн хүнсний лабораториудад тэр бүр тохиромжтой байгаад байдаггүй. QuEChERS (Хурдан, хялбар, хямд, үр нөлөөтэй, найдвартай, аюулгүй) нь маш энгийн 3 алхамыг хэрэглэдэг (хандлалт, цэвэрлэгээ болон задлан шинжилгээ). Ийм учраас энэ арга нь төрөл бүрийн шинжилгээ болон матрицуудын дээж бэлтгэлд маш тохиромжтой ба үр тариа болон сүү сүүн бүтээгдэхүүнд агуулагдах афлатоксины шинжилгээ ч үүнд багтана [3,10,11]. QuEChERS-г C18 эсвэл PSA-р цэвэрлэнэ. Гэхдээ сүү, мах гэх мэт өндөр липид агуулсан дээжнүүдэд шинжилгээ хийх үед зарим тохиолдолд хязгаар байна. Эдгээр хязгаарууд илрүүлэх нэгдлүүдийг сонгомол биш харилцан үйлчлэлтээс болон ерөнхий липидийн бүлгийн өчүүхэн бага шилжилт хөдөлгөөнөөс үр дүнг тооцно. Бүх үлдэгдэл липидүүд анализын урсгалд цугларч нарийвчлал багатай мэдээлэл, хроматографийн гажиг, засвар үйлчилгээ ихсэх гэх мэт үр дүнд хүргэдэг.

Ажилент дээж бэлтгэлийн кит Enhanced Matrix Removal—Lipid (EMR—Lipid) бол гол шинжлэх липидийн бүлгийг бусад дагалдах нэгдлүүдийг дээжнээс салгаж бага хэмжээ, усанд уусдаггүй нэгдлүүдийн харилцан үйлчлэлийн онцгой хослолыг ашигласан шинэ дэвшилтэт сорбент юм. Энэхүү сорбент нь уургийн тунадасын урсгал болон QuEChERS-ийг энгийн, үр дүнтэй байдлаар цэвэрлэдэг [12,13]. Энэ удаагийн шинжилгээнд хөхний сүү орлуулагчинд 5 төрлийн афлатоксины анализыг хийсэн. Хөхний сүү орлуулагчийг липидийн агууламж болон афлатоксины зохицуулалтын түвшинг энэ матрицад тодорхойлохын тулд сонгосон. QuEChERS хандны дараа EMR—Липид dSPE цэвэрлэгээ явагдаж мөн усгүй MgSO_4 -ыг ашиглан боловсруулж бэлдсэн дээж хэрэггүй матрицыг маш сайн зайлуулдаг. Энэхүү аргачлал нь гурван өөр концентрацийн түвшинд афлатоксины анализад EMR—Липидийн үр ашигтай байдлыг батладаг.

Сорил туршилт

- **Бодис урвалж болон химийн нэгдлүүд**

Бүх урвалжууд HPLC-д зориулсан цэвэршилттэй байна. Ацетонитрил (ACN) болон метанолаг Honeywell (Muskegon, MI, USA)-с худалдан авсан. Усыг EMD Millipore Milli-Q Integral System (Darmstadt, Germany)-г ашиглаж цэвэршүүлсэн. Шоргоолжны хүчил (FA, p/n G2453-85060)-ийг Agilent Technologies компаниас авсан. European Reference Material ERM-BD283 (Whole milk powder low-level aflatoxin M1)-г LGC Standards (Teddington, Middlesex, UK)-аас авсан. Афлатоксин M1 ($10 \mu\text{g/mL}$ in ACN) зарим афлатоксинууд (B1, G1, B2, G2: $20 \mu\text{g/mL}$ each in ACN) болон аммоны формат Sigma-Aldrich, Corp. (St. Louis, MO, USA)-аас авсан. Афлатоксиныг хадгалах стандарт нөхцөл нь $2-8^\circ\text{C}$ (M1) бол -20°C (B1, B2, G1, G2 mix) үйлдвэрлэгчдийн зөвлөснөөр байна. Шингэн байдалтай шууд хэрэглэж болох хөхний сүү орлуулагчийг орон нутгийн хүнсний дэлгүүрээс худалдаж авсан.

- **Дээж бэлтгэл**

Шингэн хөхний сүү орлуулагчийг (10мл) 50мл-ийн центрфуг тубд хийгээд дээр нь хяналтын стандарт дээжийг нэмнэ. Хоёр керамик нэгэн төрөл болгогч болон 10мл ACN-ыг нэмсний дараа дээжийг 2 минутын турш эргүүлнэ. Оригинал (буфергүй, 10гр дээж) QuEChERS савласан давсыг дээж рүү нэмнэ. Дээжийг 2 минутын турш механик сэгсрэгчээр сэгсэрсний дараа 5,000 rpm-д 5 минутын турш центрфугдэнэ. Ус (5мл)-ыг EMR—Lipid dSPE туб руу нэмж эргүүлсний дараа 5мл боловсруулаагүй дээжний ханд нэмнэ. Үүний дараа дээжийг шууд эргүүлж, олон туб бүхий сэгсрэгч дээр 60 секунд дахин сэгсэрнэ. Дээжийг 5,000rpm-д 5 минут центрфугдээд шүүж 15мл-ийн центрифугийн тубд хийнэ. Савласан усгүй магнийн сульфат (MgSO_4)-ыг хандруу нэмнэ. Давсыг жигд тараахын тулд дээжийг 60 минут сэгсэрч 5,000rpm-д 3 минутын турш центрифугдэнэ. Тунасан усыг 1.5гр MgSO_4 (шинэ савласан)-тай 15мл-ийн центрифуг туб руу салгаж хийнэ. Үүнийгээ шууд сэгсэрч 60 минутын турш дахин сэгсэрнэ. 5,000rpm-д 3 минут центрифугдсний дараа бэлэн болсон дээжээ (1мл) $16 \times 100\text{мм}$ шилэн тест тубруу шилжүүлж хуурай болтол 50°C -т азотын дор ууршуулна. Шаардлагатай бол хоосон матрицыг улам хуурай болохаас өмнө шалгах стандартыг нэмнэ. Дээжийг 0.1% FA/ACN (80/20)-тай $100 \mu\text{L}$ усаар дахин сэлбэж хамгийн багадаа 2 минут сэгсэрнэ. Хэрэв шаардлагатай бол дээжийг хэт авиагаар цохиж, центрифугдэнэ. Эцсийн бэлэн болсон дээжийг хуруу шилэнд хийж ШХ/МС/МС багажруу оруулна. Зураг 1-д дээж бэлтгэлийн процессыг үзүүлсэн байна.

- **Харьцуулах стандарт ба чанарын хяналт**

Афлатоксины ажлын уусмалыг ACN-д нөөц уусмалаас $2 \mu\text{g/mL}$ (афлатоксин M1) болон $10 \mu\text{g/mL}$ (афлатоксин G2, G1, B2, болон B1) авч бэлтгэсэн. Афлатоксин M1-ийн концентрацийг өөр өөр зохицуулах хязгаартай тааруулахын тулд нэмэлт афлатоксинуос 5 дахин бага хийсэн. Калибратор болон ЧХ-н стандартуудын 100х эцсийн концентрацийг ажлын уусмалыг тохирох хэмжээгээр шингэлснээр бэлтгэсэн. Хүснэгт 4-д хөхний сүү орлуулагч дахь харьцуулах болон ЧХ стандартын эцсийн концентрацийг үзүүлсэн байна. Ажлын уусмал болон бүх

харьцуулах, ЧХ стандартуудыг 2–8 °C-т хуваан хуруу шилэнд хадгалсан. Хөхний сүү орлуулагч хоосон матрицуу хандлагдахаас нь өмнө 100 µL харгалзах ЧХ стандартыг нэмнэ. Матрицад тохирох харьцуулах стандартын хувьд 10 µL-ийг 990 µL хоосон бланк ACN хандруу улам хуурай болохоос нь өмнө нэмнэ.

Үр дүн ба хэлэлцүүлэг

- *Аргын оновчлол*

EMR—Липид нь уургийн тунадас болон QuEChERS ажлын урсгалын аль алинд ашиглагдана. Урьдчилсан шалгалтаар шингэн хөхний сүү орлуулагчны афлатоксины анализ нь уургийн тунадас болон QuEChERS ажиллаагаанд хоёуланд нь боломжтойг илрүүлсэн. Гэхдээ уламжлалт уургийн тунадастай холбоотой шингэрүүлэлтийн зэргийг өсгөхийн тулд QuEChERS аргачлалыг энэ арга зүйд сонгосон. Урьдчилсан туршилтын дараа оригинал QuEChERS хандалсан давснуудыг сонгосон, гэхдээ AOAC болон EN давснууд аль аль нь боломжтой.

Дохионоос-дуу чимээ (S/N) шалгуур үзүүлэлтэд тулгуурлан, энэ нь афлатоксин M1-н тоо хэмжээг хүссэн хязгаарт хүргэх шаардлагатай үед концентрацийг ихэсгэх замаар тодорхойлогддог. 5х, 10х болон 20х-ийн концентрациудыг өгөгдсөн багажны тохиргоогоор тооцоолсон ба 10х концентраци LOQ-д тохиромжтой байсан бөгөөд аргачлалд тохирч байсан. Зураг 2-д хөхний сүү орлуулагчинд агуулагдах афлатоксиныг QuEChERS хандлалт, EMR—Липид цэвэрлэгээ болон MgSO₄-тай дээжээ боловсруулж бэлтгэсний дараа ШХ/МС/МС dMRM дээр уншуулсан хроматограммыг үзүүлжээ.

- *Матрицыг зайлуулах*

Шингэн хөхний сүү орлуулагчид өөх тос, уураг, нүүрсустөрөгч, витамин болон минерал гэх мэт өөр өөр төрлийн матриц нэгдлүүд байдаг. Энэхүү комплекс матриц нь дээж бэлтгэлийг илүү төвөгтэй болгодог ба ялангуяа афлатоксины концентраци ерөнхийдөө маш бага байдаг нь илүү төвөгтэй болгодог байна. Зураг 3-д цэвэрлээгүй мөн 10х концентраци C18/PSA эсвэл EMR—Lipid dSPE цэвэрлэсэн хөхний сүү орлуулагчын матриц бланк дээжийн ШХ/МС full scan давхацсан хроматограммыг үзүүлсэн байна. Цэвэрлээгүй матриц бланктай харьцуулах үед C18/PSA ялангуяа хроматограммын сүүлд элirч буй хэсэгт маш бага матрицыг устгадаг. Гэхдээ, EMR— улаанаар харуулсан липид нь өөрийн өвөрмөц нөлөөний механизмаараа дээж бэлтгэх үед эцсийн 10х концентрацитай байсан ч их хэмжээний матриксыг зайлуулдаг.

Матрицын үр нөлөөг дараах хүүхдийн тэжээлийн дээд хариу (талбай) болон түүнтэй тэнцэх растворитель стандартуудыг харьцуулан үнэлсэн (Хүснэгт 5). Дээжийг афлатоксин M1-ийн 0.025 нг/мл, афлатоксин G2, G1, B2, B1-ийн 0.125 нг/мл-ийн концентрацид шингээсэн. Энэ арга нь матрицын ямар ч нөлөөгүйгээр матрицыг авч хаях боломжтойг харуулдаг.

- *Шугаман байдал ба LOQ*

Шугаман хязгаар афлатоксин M1-д 0.01-2.50 нг/мл, нялх хүүхдийн тэжээл дэх афлатоксин G2, G1, B2, B1 0.05-12.5 нг/мл байв. Хүснэгт 6-д энэ судалгаанд тохируулгын зай, R² хэмжээтэй регресс/жин, афлатоксин тус бүрийн LOQ-г харуулав. LOQ-г арга барил дээр үндэслэн туршилтаар тодорхойлсон. Афлатоксин M1-ийн LOQ нь АНУ-ын түвшин болон Европын дээд хэмжээнээс доогуур үргэлжилдэг.

- *Сэргээлт ба дахин давтах чадвар*

QC стандартуудыг (n = 6) афлатоксин M1-ийн 0.025, 0.25, 2.00 нг/мл концентрацид хоосон шингэн хүүхдийн тэжээлийг шингээн бэлтгэсэн. Мөн G2, G1, B1, B2 афлатоксинуудын хувьд 0.125, 1.25, 10.0 нг/мл-ийн QC

стандартуудыг бэлтгэсэн. Дараа нь жишээнүүдийг тэмдэглэлд нарийвчлан дурдсан журмыг ашиглан гаргаж авсан. Калибраторыг өмнө нь тайлбарласны дагуу бэлтгэж нийт $n = 6$ болгож хариу үйлдэлд ямар ч өөрчлөлт байгаагүй эсэхийг шалгахын тулд нийт $n = 6$ шахалт хийсэн. Prespike QC-ийн жишээнүүдийн сэргээлтийг матрицтай тохирсон калибровчийн муруйн эсрэг хариулт дээр үндэслэн тооцоолсон. Зураг 4, 5-д сэргээлт болон Харьцангуй Стандарт хазайлт (RSD) мэдээллийг харуулав. QC-ийн гурван түвшинд таван афлатоксины дундаж эдгэрэлт ойролцоогоор 101%, RSD дундаж $5.0\% <$ байв.

- *Дээж*

Афлатоксин агуулсан нялх хүүхдийн тэжээлийн стандартыг худалдаж авах боломжгүй байв. Тиймээс цаашид үнэлэхийн тулд Европын лавлах материал (ERM) - BD283 (бага түвшний афлатоксин M1 агуулсан бүхэл сүүний нунтаг агуулсан) олж авсан. Энэ стандарт хэмжээ $0.111 + 0.018$ мкг/кг байсан [17]. ERM-ийн гэрчилгээний тайланд бүхэл сүүний нунтаг стандартыг үйлдвэрлэгчийн нарийвчилсан зөвлөмжийн дагуу шинэчлэн боловсруулсан. Товчхондоо 10 г бүхэл сүүний зуурмагт 100 мл ус нэмж, 10 дахин их шингээж болно. Тиймээс сэргээсэн сүүний концентраци нь мэдэгдсэн концентрациас арав дахин бага буюу 0.0093-0.0129 нг/мл байх ёстой. Сэргээсэн дээжийг өмнө нь нарийвчлан тайлбарласан аргын дагуу гаргаж авсан. Үүссэн дээж ($n = 1$) болон калибраторын бүрэн багц болон QC-ийн гурван түвшинг ($n = 3$) багтаасан багц жишээнүүдэд шинжилгээ хийсэн. Үүссэн дээж нь уг аргын LOQ-тай (афлатоксин M1-ийн хувьд 0.01 нг/мл) ойролцоо тоон үзүүлэлт авна гэж тооцогдож байсан тул 0.01 нг/мл-ийн илүү LOQ QC ($n = 3$) оруулав. Хүснэгт 7-д үр дүнг харуулав. ERM-BD283 нь 0.0101 нг/мл байсан ба энэ нь лавлах материалын хүсэн хүлээсэн хэмжээнд багтдаг. Энэ нь хуурай (ус нэмсэн) болон шингэн хүүхдийн тэжээлийн жишээнүүдийг шинжлэх энэ аргын боломжийн олон талт чадварыг харуулж байна.

Дүгнэлт

ШХ/МС/МС-р хөхний сүү орлуулагчинд агуулагдах афлатоксинуудын анализид зориулсан энгийн үр дүнтэй арга нь илүү боловсронгуй болон хөгжин байна. Дээжүүдийг хандлан бэлтгэхдээ QuEChERS-ийн арга аргачлал, Ажилент дээж бэлтгэлийн кит (Bond Elut EMR—Lipid) dSPE цэвэрлэгээ болон $MgSO_4$ -р боловсруулсан дээжийг ашигласан. Энэхүү арга нь маш сайн сэргэгдэх чадвар (дундажаар 101%) болон нарийвчлал (дундаж RSD $< 5.0\%$)-аар хангадаг.

Энэ арга нь EMR-Lipid ашиглан хүсээгүй аналит алдагдалгүйгээр матрицыг их хэмжээгээр арилгаж байгааг харуулдаг. Тоног төхөөрөмжийн өндөр цэвэр цэмцгэр байдал нь хроматографийг сайжруулж засвар үйлчилгээ болон асуудлыг шийдвэрлэх чадварыг багасгаж цаг зав, мөнгө төгрөгийг хэмнэдэг. Энэ шийдэл нь бага туршлага, тоног төхөөрөмж шаарддаг бөгөөд хүнсний лабораторид хялбархан нэвтрүүлж болно. Энэ хэрэглээнд зөвхөн нэг анги микотоксин дээр төвлөрсөн боловч EMR-Lipid олон үлдэгдэл хэрэглэхэд зориулагдсан. Иймээс Immunoaffinity багануудаас ялгаатай нь EMR-Липидийг олон ангиллын микотоксины шинжилгээнд хялбархан хэрэглэж болно. Цаашдын ажил нь EMR-Lipid цэвэрлэгээг бусад нарийн түвэгтэй, өндөр өөхтэй жишээнүүдтэй хамт үргэлжлүүлэн судлах болно.

Инно Хими Лаб ХХК – ийн танилцуулга:

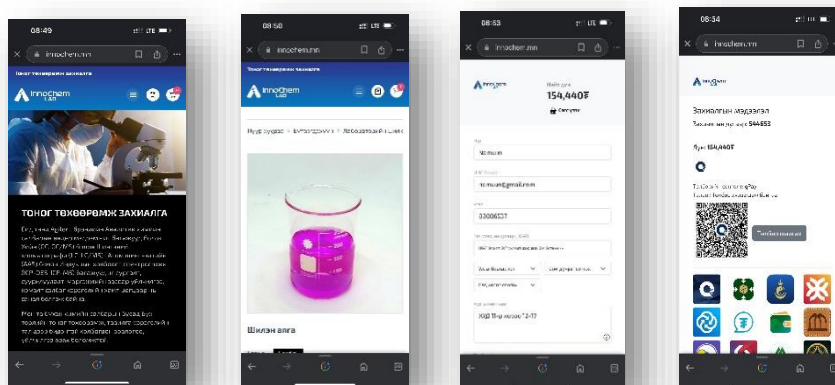
Үйлчилгээний нэр төрөл:

- Хүнс, хүрээлэн буй орчны шинжилгээний лабораторийн шинжилгээ
- Химийн тоног төхөөрөмж, багаж хэрэгсэл, бодис, урвалжийн худалдаа
- Химийн тоног төхөөрөмжийн суурилуулалт, засвар үйлчилгээ
- Химич, химийн мэргэжилтний сургалт, зөвлөгөө

Бүтээгдэхүүний нэр төрөл:

- Тоног төхөөрөмж
- Багаж хэрэгсэл
- Урвалж, уусмал
- Стандарт бодис, оношлуур
- Химийн бодис
- Шил сав, дагалдах хэрэгсэл

Хэрэглэгчидийнхээ цаг завьг хэмнэх, тасралтгүй ажиллагааг дэмжих үүднээс www.innochem.mn онлайн худалдааны сайтыг нэвтрүүлээд байна.



Инно лаборатори

- Химийн лабораторийн мэргэжилтнүүдэд өндөр хүчин чадал бүхий тоног төхөөрөмжтэй ажиллах орчин бүрдүүлэх, чадамжийг сайжруулах
- Хүнсний болон хүрээлэн буй орчны аюулгүй байдлыг хангахад лабораторийн шинжилгээг олон улсын стандартын дагуу нэвтрүүлж хувь нэмрээ оруулах

Шинжилгээний хүрээ:

- Пестицидийн үлдэгдлийн шинжилгээ
- Усанд болон тосонд уусдаг витаминь шинжилгээ
- Хүрээлэн буй орчны бохирдлын шинжилгээ