

На правах рукописи



Авдеева Надежда Михайловна

**Пробоподготовка QuEChERS и дисперсионная жидкостно-жидкостная
микроэкстракция при одновременном определении микотоксинов
различных классов хроматографическими методами**

02.00.02 – аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

Саратов 2013

Работа выполнена на кафедре химии ФГБОУ ВПО
«Владимирский государственный университет
имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых»

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор
Амелин Василий Григорьевич

Официальные оппоненты:

Горячева Ирина Юрьевна

доктор химических наук, доцент,
Саратовский государственный университет
им. Н.Г. Чернышевского, профессор
кафедры общей и неорганической химии

Иванов Александр Вадимович

доктор химических наук, доцент,
Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, доцент кафедры
аналитической химии

Ведущая организация:

ФГБУН «Институт геохимии и
аналитической химии им. В.И.
Вернадского Российской академии наук
(ГЕОХИ РАН)»

Защита диссертации состоится 19 декабря 2013 года в 16 часов на заседании диссертационного совета Д 212.243.07 на базе Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, СГУ, Институт химии, I корпус.

С диссертацией можно ознакомиться в ЗНБ им. В.А. Артисевич Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского.

Автореферат разослан «19» ноября 2013 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор химических наук



Русанова Т. Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Микотоксины – вторичные метаболиты жизнедеятельности микроскопических плесневых грибов – загрязняют пищевые продукты растительного, животного происхождения и могут нанести серьезный урон здоровью как животных, так и человека. Чаще всего они находятся в продуктах не по отдельности, одновременное же присутствие нескольких видов микотоксинов приводит к увеличению их токсичного действия в результате синергетического эффекта. Все микотоксины разделяются на несколько классов и отличаются по своим свойствам и строению, что приводит к трудностям их одновременного определения. Существующие в РФ ГОСТ и методические указания на определение микотоксинов в продуктах растительного и животного происхождения основаны на использовании хроматографических методов анализа: ТСХ, ВЭЖХ с флуориметрическим или УФ - детекторами, ГЖХ с детектором по захвату электронов. Для извлечения микотоксинов из анализируемых объектов в основном используют жидкостно-жидкостную экстракцию. Для очистки экстрактов от соэкстрагируемых веществ (белки, жиры, липиды, стеролы, полярные органические кислоты, каротиноиды, хлорофилл) используют твердофазную экстракцию и коммерческие иммуноаффинные колонки для избирательного извлечения микотоксинов (единичных или определенного класса). Обычно данные методики длительны (пробоподготовка может занимать от 3 до 5 ч), трудоемки, требуют больших количеств токсичных органических растворителей и дорогостоящих одноразовых иммуноаффинных колонок, применимых при определении только отдельных классов или единичных нормируемых микотоксинов (афлатоксинов В1, В2, G1, G2, М1, охратоксина А, Т-2, дезоксиниваленола, зеараленона, патулина).

В последнее время для одновременного извлечения микотоксинов и определения их методами ГЖХ (ВЭЖХ)-МС/МС используют пробоподготовку по **QuEChERS** (**Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe**). Однако при такой пробоподготовке определение микотоксинов более доступными хроматографическими методами с флуориметрическим, УФ - и электроннозахватным детекторами затруднено в связи с недостаточной очисткой экстрактов.

Цель данной работы: разработка экспрессного комбинированного способа одновременного определения микотоксинов различных классов в продуктах растительного и животного происхождения, совмещающего пробоподготовку QuEChERS и дисперсионную жидкостно-жидкостной микроэкстракцию с хроматографическим определением.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- Установить возможность комбинации методов пробоподготовки QuEChERS и дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции (**ДЖЖМЭ**) для одновременного извлечения микотоксинов различных классов из одной навески зерна, кормов и продуктов питания.

- Оптимизировать условия пробоподготовки, для получения высокой чистоты экстрактов из различных матриц, необходимой при анализе хроматографическими методами (высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ, флуориметрическим детектированием, газожидкостной хроматографии с детектором электронного захвата).

- Установить оптимальные условия получения производных афлатоксинов и трихотеценовых микотоксинов, хроматографического разделения данных соединений, а также охратоксинов, зеараленона и патулина.

- Разработать методики определения микотоксинов различных классов в зерне, кормах и продуктах питания.

Научная новизна. Установлена возможность одновременного извлечения исследуемых микотоксинов (афлатоксинов M1, B1, B2, G1, G2; трихотеценовых типа А: Т-2 токсина, НТ-2 токсина, Т-2-тетраол токсина, Т-2-триол токсина, неосаланиола, диацетоксискирпенола; трихотеценовых типа В: дезоксиниваленола, ниваленола, 15-ацетилдезоксиниваленола, 3-ацетилдезоксиниваленола, фузаренона Х; охратоксина А и охратоксина В; зеараленона; патулина) из одной навески зерна, кормов и продуктов питания с использованием пробоподготовки QuEChERS.

Предложен способ дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции для дополнительной очистки и избирательного извлечения микотоксинов разных классов (афлатоксинов, трихотеценовых микотоксинов, зеараленона и патулина) из экстракта одной навески, полученного после QuEChERS. Исследовано и оценено влияние различных факторов на условия проведения приготовления образцов при совместном использовании QuEChERS и ДЖЖМЭ.

Практическая значимость.

1. Предложен способ одновременного извлечения двадцати микотоксинов различных классов из одной навески образцов зерна, кормов, пищевых продуктов с использованием пробоподготовки QuEChERS и дополнительного избирательного извлечения из экстракта методом дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции отдельных групп микотоксинов: афлатоксинов и патулина, трихотеценовых микотоксинов, охратоксинов и зеараленона.

2. Разработан способ определения микотоксинов в продуктах растительного и животного происхождения, включающий пробоподготовку QuEChERS, дисперсионную жидкостно-жидкостную микроэкстракцию и последующее определение в экстракте:

- пяти афлатоксинов, двух охратоксинов, зеараленона методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметическим детектированием;

- патулина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ детектированием;

- одиннадцати трихотеценовых микотоксинов методом газожидкостной хроматографии с детектором электронного захвата

Использование данного способа извлечения позволило снизить время анализа, сократить объемы токсичных растворителей, а также снизить себестоимость анализа за счет использования малых количеств насыпных сорбентов и растворителей, недорогостоящего оборудования. Предложенные методики проверены на реальных образцах зерна, кормов и пищевых продуктах. Продолжительность анализа составила 1,5-2 ч.

На защиту выносятся:

- Новый способ одновременного извлечения микотоксинов различных классов, основанный на совмещении методов пробоподготовки QuEChERS и дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции.

- Результаты по оптимизации условий экстракции и очистки экстракта при совместном использовании методов QuEChERS и дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции из одной навески зерна, кормов и продуктов питания для определения двадцати микотоксинов (афлатоксинов M1, B1, B2, G1, G2; трихотеценовых: Т-2 токсина, НТ-2 токсина, Т-2-тетраол токсина, Т-2-триол токсина, неосоланиола, диацетоксискирпенола, дезоксиниваленола, ниваленола, 15-ацетилдезоксиниваленола, 3-ацетилдезоксиниваленола, фузаренона Х; охратоксинов А и В; зеараленона; патулина).

- Оптимальные условия получения производных афлатоксинов и трихотеценовых микотоксинов, селективного и эффективного разделения микотоксинов различных классов хроматографическими методами с различными детекторами.

- Результаты валидации методик и определения микотоксинов различных классов в реальных образцах зерна, кормов и продуктах питания.

Личный вклад автора заключался в проведении экспериментальных исследований по получению производных микотоксинов; в выборе оптимальных условий хроматографического разделения и определении микотоксинов различных классов; в разработке способов извлечения и очистки экстрактов микотоксинов из зерна, кормов и различных продуктов питания, в интерпретации результатов эксперимента, в формулировании научных положений и выводов.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены на следующих конференциях и симпозиумах: Международной молодежной научной конференции «ЛОМОНОСОВ-2011, 2012, 2013» (Москва, МГУ), Международной конференции 5th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, 2011 г. (Прага, Чехия), Всероссийской школе - конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием, 2012 г (Саратов), VI Всероссийской конференции молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием, «Менделеев – 2012» 2012 г. (Санкт-Петербург, СПбГУ), Всероссийской конференции с международным участием, посвящённой 75-летию со дня рождения В.В. Кормачева, 2012 г. (Чебоксары), международной конференции 36th International Symposium on Capillary Chromatography, 2012 г. (г. Рива дель Гардо, Италия), Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, 2013), международной конференции 19th International Symposium on Separation Sciences. New Achievements In Chromatography, 2013 г. (Пореч, Хорватия).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 работ, 6 статей (из них 5 статей опубликованы в журналах из списка ВАК) и 10 тезисов докладов.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 140 страницах, включая введение, 5 глав, выводы, список литературы (146 источников) и одно приложение. Работа содержит 30 рисунков и 13 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, изложены новизна и практическая значимость результатов исследований, представлены основные положения, выносимые на защиту.

В **обзоре литературы** кратко рассмотрены основные классы микотоксинов. Рассмотрены существующие на сегодняшний день способы отбора проб и пробоподготовки образцов различных матриц для извлечения микотоксинов. Представлен обзор хроматографических методов, применяемых для одновременного определения исследуемых веществ разных классов или отдельных микотоксинов. Обсуждены возможные трудности при определении микотоксинов.

Экспериментальная часть. Реактивы. В работе использовали стандартные растворы в ацетонитриле по 100 мкг/мл: дезоксиниваленола, ниваленола, фузаренона X, 15-ацетилдезоксиниваленола, 3-ацетилдезоксиниваленола, диацетоксискирпенола, НТ-2 токсина (RomerLabs Diagnostic GmbH, Германия), Т-2 токсина, Т-2 триола, Т-2 тетраола, неосоланиола, зеараленона, патулина (Stylab, Россия), стандартную смесь афлатоксинов в ацетонитриле (TS-108, Trilogy Analytical Laboratory, США): В1 (2,0 мкг/мл), В2 (0,50 мкг/мл), G1 (2,0 мкг/мл) и G2 (0,50 мкг/мл), стандартный раствор афлатоксина М1 0,5 мкг/мл в ацетонитриле (RomerLabs Diagnostic GmbH, Германия), стандартные растворы 10 мкг/мл в ацетонитриле: охратоксина А (RomerLabs Diagnostic GmbH, Германия) и охратоксина В (Fluka, Германия).

Аппаратура. В работе применяли жидкостной хроматограф Flexar LC (Perkin-Elmer, США) с УФ - и флуориметрическим детекторами, газовый хроматограф Clarus-600 с детектором по захвату электронов (ДЗЭ) (Perkin-Elmer, США). Одновременное разделение афлатоксинов, зеараленона, патулина и охратоксинов проводили на хроматографической колонке SUPELCOSIL™LC-18 5 мкм, 4,6 x 250 мм. Длины волн возбуждения и детектирования на флуориметрическом детекторе - для афлатоксинов 360 нм и 450 нм соответственно, для охратоксинов и зеараленона 333 нм и 460 нм соответственно. Для определения патулина применяли УФ – детектор, длина волны детектирования 274 нм. Капиллярную колонку Rtx-CL Pesticides® (Restek Corporation, США) длиной 30 м и внутренним диаметром 0,32 мм (толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мкм) использовали для разделения трихотеценовых микотоксинов.

Для характеристики эффективности процесса пробоподготовки рассчитывали коэффициент концентрирования (**K**) и степень извлечения (**R**) микотоксинов из

образцов: $K = \frac{c_k}{c_o}$; $R = \frac{c_k V_k}{c_o V_o} \cdot 100$; - где c_k и c_o – концентрация аналита в конечном

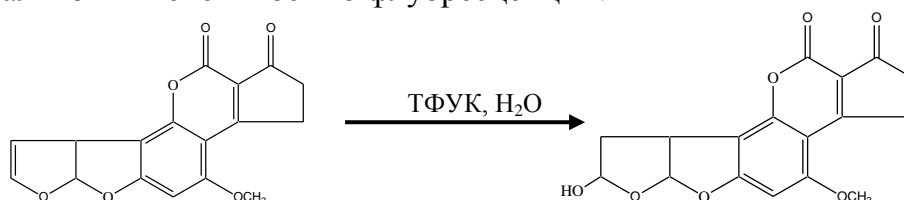
анализируемом растворе и начальная концентрация аналита в исходной пробе; V_k и V_o – объем конечного анализируемого раствора-концентрата и объем пробы.

Выбор условий хроматографического разделения различных классов микотоксинов. В данной главе показан выбор оптимальных условий одновременного разделения четырех различных классов микотоксинов (афлатоксинов, охратоксинов, патулина и зеараленон) методом ВЭЖХ и условия разделения одиннадцати трихотеценовых микотоксинов методом газо-жидкостной хроматографии.

Молекулы *афлатоксинов, зеараленона и охратоксинов* имеют плоскую сопряженную π - систему, благодаря которой способны интенсивно флуоресцировать.

Поэтому исследуемые соединения можно определять одновременно с помощью флуориметрического детектора, путем смены длин волн возбуждения и детектирования в течение анализа. Для определения *патулина* использовали УФ-детектирование. Благодаря параллельному использованию УФ и флуориметрического детекторов в одном приборе стало возможным одновременное определение девяти микотоксинов разных классов.

Афлатоксины и патулин являются гидрофильными соединениями: увеличение объема воды в подвижной фазе позволяет разделять данные вещества. Однако в этом случае происходит тушение флуоресценции афлатоксинов. Для решения этой проблемы переводили афлатоксины в производные с трифторуксусной кислотой (ТФУК) и йодом до разделения их на колонке. В результате реакции дериватизации происходит насыщение двойных связей в фурановом кольце, что приводит к увеличению интенсивности флуоресценции производных, а также позволяет разделить все исследуемые афлатоксины. Установлено, что использование трифторуксусной кислоты позволяет получать устойчивые производные с максимальной интенсивностью флуоресценции:



Применение 50 мкл трифторуксусной кислоты является оптимальным объемом дериватирующего агента для получения производных с максимальным выходом продукта. В выбранных условиях разделения при параллельном использовании флуориметрического и УФ- детекторов также возможно определение патулина, применение трифторуксусной кислоты позволяет чувствительно определять данный токсин.

Охратоксины и зеараленон являются гидрофобными соединениями, поэтому в используемых подвижных фазах ацетонитрила гораздо больше, чем воды. Также установлено, что использование 1 % раствора уксусной кислоты вместо воды в подвижной фазе позволяет наиболее чувствительно определять микотоксины в связи с протонированием гидроксильной группы у охратоксинов. Зеараленон в выбранных хроматографических условиях отделяется от охратоксинов, поэтому данные соединения определяли одновременно.

Для одновременного разделения девяти исследуемых микотоксинов разных классов использовали градиентное элюирование. Подвижную фазу меняли от более к менее полярной, а также варьировали скорость потока элюента. Замена воды на водный раствор уксусной кислоты позволяет селективно разделять все исследуемые микотоксины. На рис. 1 представлена хроматограмма смеси микотоксинов в оптимальных условиях разделения.

Селективность и эффективность разделения микотоксинов в подобранных условиях проверяли на разных хроматографических колонках Symmetry® C18, SUPELCOSIL™LC18 размерами 150 x 3,9 мм, 250 x 4,6 мм (диаметром зерна сорбента 5 мкм). Установлено, что с увеличением размера колонки эффективность разделения микотоксинов увеличивается. Поэтому колонка 250 x 4,6 мм позволяет наиболее эффективно и селективно разделять данные соединения.

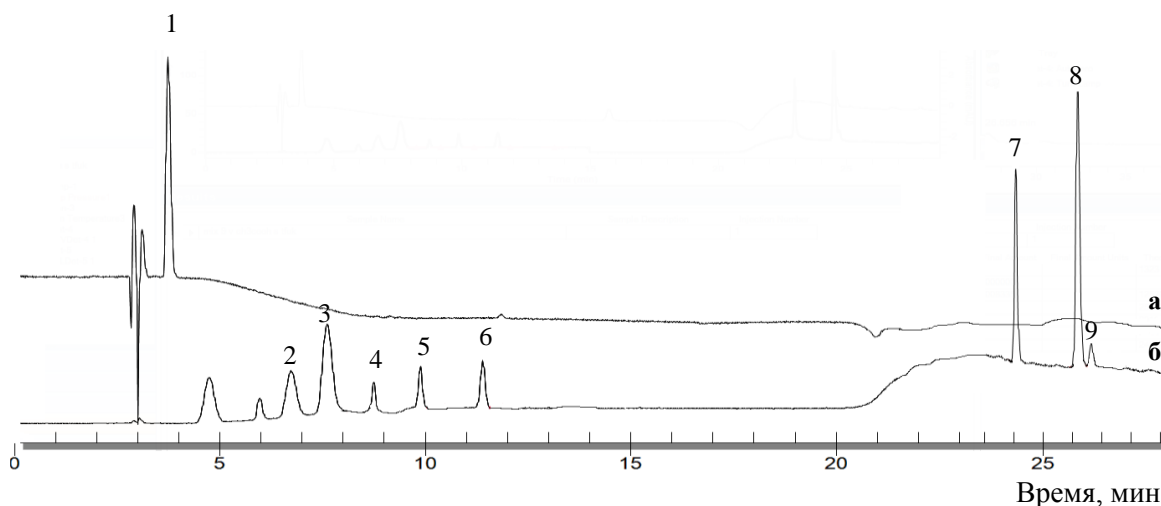


Рис. 1. Хроматограмма стандартной смеси микотоксинов, полученная при параллельном использовании УФ – (а) и флуориметрического (б) детекторов: патулин (1,0 мкг/мл) (1), афлатоксин G2 (0,01 мкг/мл) (2), афлатоксин В2 (0,01 мкг/мл) (3), афлатоксин М1 (0,01 мкг/мл) (4), афлатоксин G1 (0,01 мкг/мл) (5), афлатоксин В1 (0,01 мкг/мл) (6), охратоксин В (0,01 мкг/мл) (7), охратоксин А (0,01 мкг/мл) (8), зеараленон (0,02 мкг/мл) (9). Условия разделения:

Подвижная фаза		Скорость потока, мл/мин	Время, мин	Длины волн ФЛД, нм	Длины волн УФ детектора, нм
CH ₃ CN	CH ₃ COOH 1% вод.				
30	70	1,3	5	360,450	274
30	70	1,4	10	360,450	274
50	50	1,4	0,5	333,460	274
60	40	0,7	0,5	333,460	274
70	30	0,7	14	333,460	274

Чувствительность определения микотоксинов также зависит от температуры колонки. Установлено, что при температуре 30 °С термостата колонки наблюдается наибольшая интенсивность флуоресценции микотоксинов.

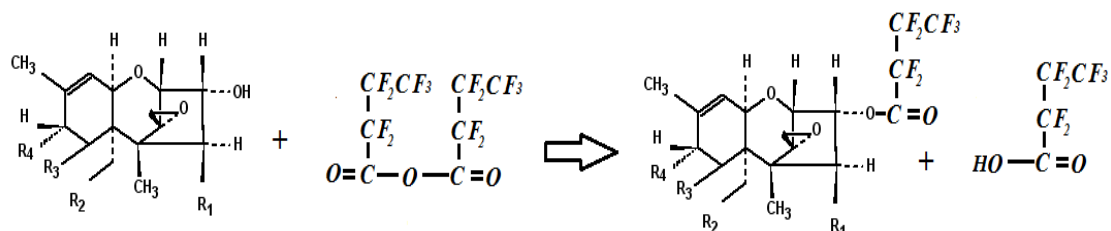
Важным фактором, определяющим чувствительность определения, являются длины волн возбуждения и детектирования. Установлено, что для пяти афлатоксинов использование длин волн возбуждения и детектирования 360 и 450 нм является оптимальным, а для зеараленона и охратоксинов – 333 и 460 нм. Для патулина поглощение максимально при длине волны 274 нм.

Трихотеценовые микотоксины относятся к сесквитерпенам, наличие гидроксильных групп у данных соединений позволяет переводить их в легколетучие производные, которые высокочувствительны в ГЖХ с детекторами ДЭЗ и ПИД. Использование детектора, основанного на принципе электронного захвата, позволяет повысить чувствительность метода в 3-50 раз, по сравнению с использованием ПИД. По данной причине газожидкостную хроматографию с детектором электронного захвата применяли для определения трихотеценовых микотоксинов.

В данной работе использовали капиллярные колонки длиной 30 м, неподвижная жидкая фаза, которых состоит из 95% диметилполисилоксана и 5 % фенила, толщина пленки составляла 0,25 и 0,5 мкм. Применяемая неподвижная жидкая фаза является неполярной, может выдерживать температуры выше 300 °С, подходит для разделения

галогенсодержащих соединений, алкалоидов и пестицидов. Данная неподвижная фаза удовлетворительно подходит для разделения смеси фторпроизводных трихотеценовых микотоксинов. Ее толщина влияет на разделение трихотеценовых и с увеличением толщины пленки неподвижной фазы от 0,25 до 0,5 мкм эффективность разделения незначительно ухудшается. Линейное программирование температуры от 120 °С до 280 °С позволяет селективно разделять исследуемые микотоксины.

В качестве дериватирующих агентов использовали трифторуксусную кислоту, трифторуксусный ангидрид (ТФА), пентафторпропионовый ангидрид (ПФПА), гептафтормасляный ангидрид (ГФМА). В результате реакции дериватизации образ:



Увеличение количества фтора в молекуле ангидрида, приводит к повышению чувствительности определения, поэтому наибольшие значения площадей хроматографических пиков трихотеценовых микотоксинов наблюдали при использовании гептафтормасляного ангидрида. Установлены оптимальные условия проведения реакции дериватизации трихотеценовых микотоксинов с гептафтормасляным ангидридом: применение 50 мкл дериватирующего агента, 50 мг гидрокарбоната натрия и выдерживание 15 мин при 60 °С (рис. 2).

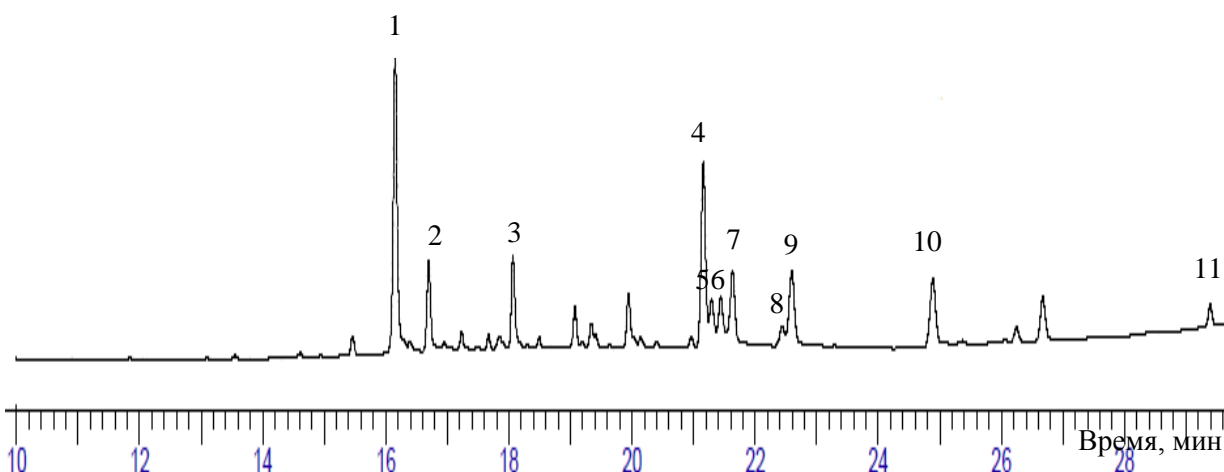


Рис. 2. Хроматограмма стандартной смеси трифторпроизводных трихотеценовых микотоксинов с концентрацией 0,1 мкг/мл: Т-2-тетраол (1), ниваленол (2), дезоксиниваленол (3), 15-ацетилдезоксиниваленол (4), 3-ацетилдезоксиниваленол (5), неосоланиол (6), фузаренон Х (7), диацетоксискирпенол (8), Т-2 триол (9), НТ-2 (10), Т-2 (11). Условия разделения:

Подвижная фаза	Скорость потока, мл/мин	Температура инжектора, °С	Температура детектора, °С	Температура термостата колонки, °С	Время, мин	Скорость нагрева, °С/мин
азот	2,0	250	300	120	1,0	5,0
				170	2,0	8,5
				220	5,0	7,0
				280	1,0	-

Пробоподготовка при определении микотоксинов в зерне, кормах и пищевых продуктах. В данной главе рассмотрена возможность применения совместно двух способов пробоподготовки QuEChERS и дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции для одновременного извлечения микотоксинов разных классов из одной навески зерна и кормов, мяса и молочных продуктов.

Выбор условий QuEChERS для одновременного извлечения микотоксинов из одной навески. Масса навески для извлечения микотоксинов. Экстракцию микотоксинов осуществляли из сложных органических матриц. С увеличением массы от 2 до 10 г навески увеличивается фон матрицы, степень извлечения микотоксинов незначительно изменяется, по этой причине установлено, что 2 г образца зерна, кормов и мяса и 5 г для молока и молочных продуктов вполне достаточно для проведения анализа.

Экстракция микотоксинов. Установлено, что для извлечения микотоксинов из сухих образцов таких, как зерно или корма, оптимальным оказалось использование 15,0 мл ацетонитрила и 10,0 мл воды. Для образцов мяса 15,0 мл ацетонитрила (без добавления воды) достаточно, чтобы получить максимальные степени извлечения микотоксинов. При извлечении микотоксинов из молока соотношение ацетонитрил: вода (10:5) является оптимальным. Установлено, что время перемешивания с выбранными растворителями также влияет на степень извлечения микотоксинов. Оптимальное время для извлечения микотоксинов из молока составило 30 мин, а зерна, кормов и мяса – 10 мин.

Влияние высаливателей и буферизирующих солей. Использовали разные соотношения солей для получения наилучших степеней извлечения. Применение 4,0 г безводного $MgSO_4$, 1,0 г $NaCl$, 1,0 г $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ и 0,5 г $Na_2HC_6H_5O_7 \cdot 1,5H_2O$ позволяет максимально извлекать микотоксины из всех исследуемых матриц (зерно, корма, мясо и молоко).

Очистка экстракта. Установлены оптимальные соотношения масс сорбентов необходимых для очистки экстрактов микотоксинов. Применение в качестве сорбентов 200 мг DSC-18 и 200 мг Bondesil PSA является оптимальным и позволяет извлекать микотоксины (исключая охратоксины и зеараленон) в диапазоне 50-80% в зависимости от компонента и используемой матрицы образца. Добавление 950 мг сульфата магния, необходимого для удаления воды, достаточно для получения максимальных степеней извлечения микотоксинов.

Выбор условий ДЖЖМЭ для извлечения микотоксинов. Экстракты, полученные после QuEChERS недостаточно чистые, компоненты матрицы мешают определить исследуемые микотоксины методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ - и флуориметрическим детекторами или методом газожидкостной хроматографии с детектором электронного захвата. Поэтому для дополнительной очистки и избирательного извлечения микотоксинов применяли метод дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции.

Объем диспергатора. В данной работе микроэкстракцию сочетали с методом QuEChERS, поэтому в качестве диспергатора использовали только ацетонитрил (экстракт). Установлено, что с увеличением объема диспергатора степень извлечения микотоксинов увеличивается, за исключением трихотеценовых микотоксинов для которых 2 мл ацетонитрильного экстракта оказались оптимальными. Для остальных микотоксинов использование 4 мл диспергатора позволяет получать максимальные

степени извлечения. Важно также соотношение вносимого диспергатора в воду. Установлено, что при анализе всех исследуемых матриц оптимальным является использование соотношения ацетонитрильного экстракта и воды для трихотеценовых микотоксинов - 2:8, для охратоксинов и ЗОН- 4:10. При извлечении афлатоксинов и патулина из зерна и кормов соотношение диспергатора и воды - 2:5 является оптимальным, для извлечения афлатоксинов из мяса – 2:5, а из молока – 3:7.

Выбор экстрагента и его объема. В качестве экстрагентов использовали растворители, в которых растворимость микотоксинов выше, чем в диспергаторе. Установлено, что оптимальный результат для двух типов трихотеценовых микотоксинов достигается при использовании 300 мкл хлороформа, для афлатоксинов, охратоксинов, патулина и зеараленона максимальные значения степени извлечения получены при применении 400 мкл хлороформа (рис.3).

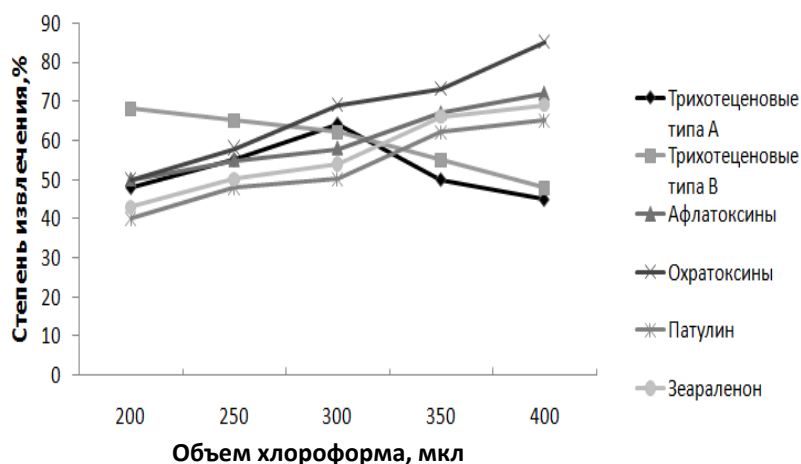


Рис. 3. Зависимость степени извлечения микотоксинов от объема хлороформа.

Влияние pH среды. Исследуемые микотоксины различаются по химической структуре, поэтому pH среды проведения дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции может оказывать

влияние на степень извлечения данных веществ. Установлено, что в щелочной среде (pH = 11) выше извлечение трихотеценовых типа В: дезоксиниваленола, 15-ацетилдезоксиниваленола, 3-ацетилдезоксиниваленола, фузаренона X, ниваленола. Увеличение щелочности среды также позволяет лучше извлекать микотоксины типа А этого класса, однако не так значительно, как для типа В. Для лучшего массопереноса между водным раствором и органическими растворителями (для всех остальных исследуемых микотоксинов) лучшим оказалось применение раствора с pH = 4,5, в этом случае достигаются максимальные степени извлечения у охратоксинов, афлатоксинов, патулина, зеараленона.

Влияние ультразвука. Обработка пробы ультразвуком способствует большему диспергированию экстрагента. Установлено, что при проведении микроэкстракции с хлороформом влияние ультразвука на степень извлечения микотоксинов незначительно.

Влияние скорости и продолжительность центрифугирования. Установлено, что центрифугирование проб в течение 10 мин со скоростью 2700 об/мин является оптимальным условием при проведении дисперсионной жидкостно-жидкостно микроэкстракции, дальнейшее увеличение продолжительности данной стадии не оказывает влияние на степень извлечения.

Способы одновременного определения микотоксинов в зерне, кормах и пищевых продуктах из одной навески. В данной главе представлены результаты определения микотоксинов в зерне, кормах и продуктах питания при совместном использовании QuEChERS и микроэкстракции. Рассмотрены традиционные способы

извлечения микотоксинов и сопоставлены с представленной в данной работе методикой.

Одновременное определение микотоксинов в зерне и кормах. Большинство методик закрепленных в ГОСТ и методических указаниях в РФ пригодны для извлечения и определения только небольшого числа микотоксинов (патулина, пяти афлатоксинов, охратоксина А, зеараленона, дезоксиниваленола и Т-2 токсина). Одновременное определение микотоксинов позволяет значительно сократить время пробоподготовки и количество реактивов необходимых для анализа. Были сравнены характеристики существующих утвержденных методик и разработанной нами. Как видно из табл. 1, совместное применение QuEChERS и ДЖЖМЭ позволило значительно сократить объемы токсичных растворителей, время и стоимость анализа, что является приоритетным при определении микотоксинов. Степени извлечения микотоксинов, полученные разработанным методом, удовлетворительны и позволяют извлекать микотоксины практически на том же уровне, что и по методикам, изложенным в ГОСТ и методических указаниях.

Таблица 1. Сравнение методик определения микотоксинов разных классов в зерне, кормах и продуктах питания.

Микотоксин	Методика	Способ пробо-подготовки	Общий объем растворителей, мл	R, %	Примерная стоимость пробоподготовки для одного образца, отн.ед.	Метод определения	Время анализа, ч
Афл. В1, В2, G1, G2	ГОСТ Р 53162-2008	ЖЖЭ:CH ₃ CN: H ₂ O:CH ₃ OH Иммуно-аффинная колонка	60	60-90	680	ВЭЖХ-ФЛД	2-3
ЗОН	МУ 5177-90	ЖЖЭ CH ₃ CN: H ₂ O Очистка (гексаном, бензолом)	335	85-90	1560	ВЭЖХ-УФ	4-5
ДОН	МУ 5177-90	ЖЖЭ CH ₃ CN:H ₂ O Очистка на колонке с Al ₂ O ₃ , активированным углем	145	80-85	920	ВЭЖХ-УФ	4-5
Т-2 токсин	МУ 3184-84	ЖЖЭ CH ₃ CN:KCl Очистка (гексаном, бензолом)	315	50-60	1450	ГЖХ-ДЭЗ	3-4,5
Охратоксин А	МУК 4.1.2204-07	ЖЖЭ CH ₃ CN:H ₂ O Иммуно-аффинные колонки	155	88,80	520	ВЭЖХ-ФЛД	2-3
Патулин	ГОСТ 28038-89	ЖЖЭ CH ₃ COOC ₂ H ₅ : H ₂ O Колонка с силикагелем	250	80	1300	ВЭЖХ-УФ	4-5
Одновременное определение 19 микотоксинов		QuEChERS ДЖЖМЭ	15,5	60-100	90	ГЖХ-ДЭЗ, ВЭЖХ-ФЛД, УФ	1,5-2

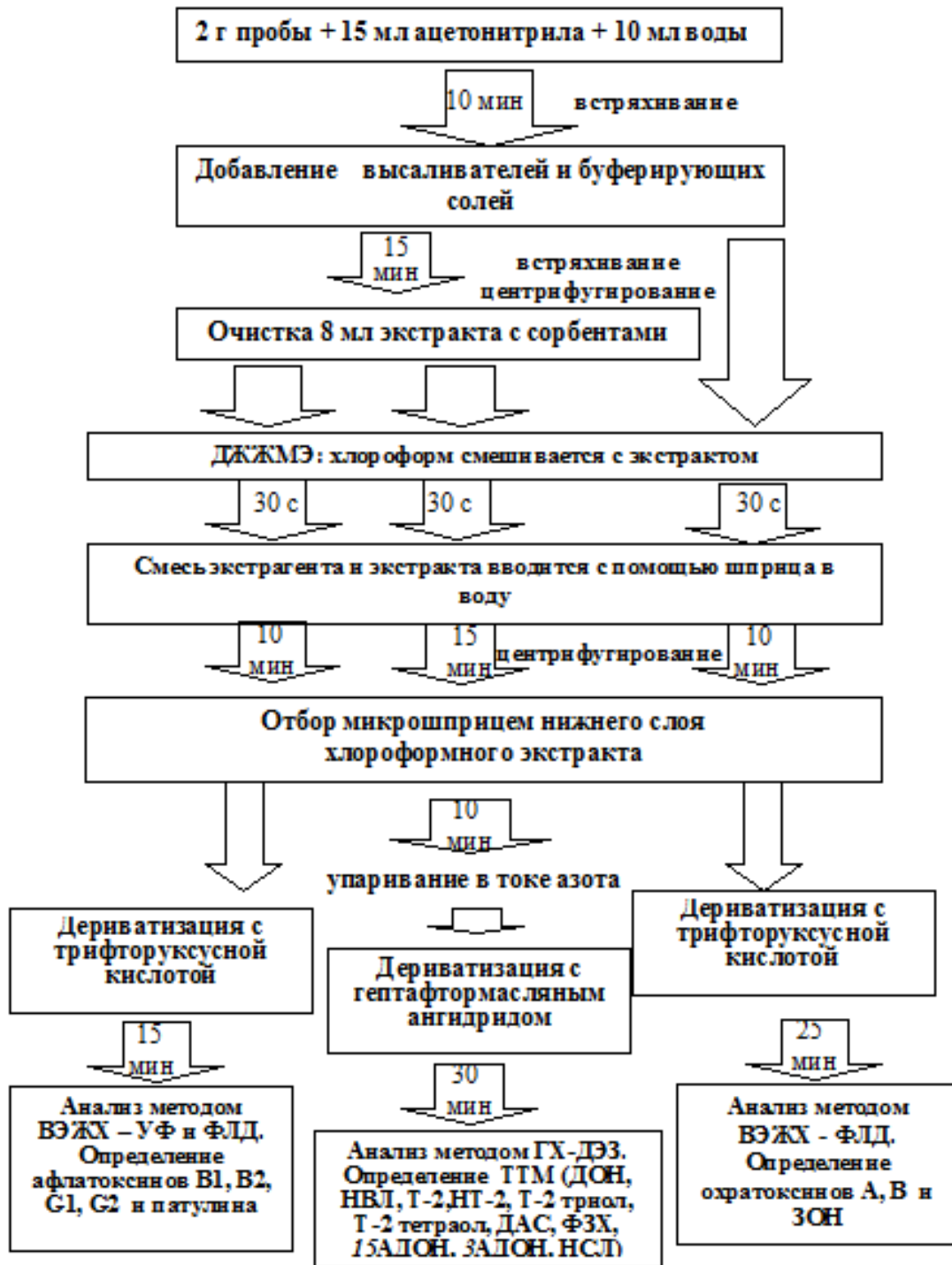


Рис. 4. Схема определения микотоксинов в зерне, кормах и мясе. (Продолжительность анализа 1,5-2,0 ч.)

В предложенной нами методике девятнадцать микотоксинов извлекали одновременно из зерна и кормов методом QuEChERS. Полученный экстракт делили на три части и проводили дисперсионную жидкостно-жидкостную микроэкстракцию, отдельно для афлатоксинов и патулина, охратоксинов и зеараленона, трихотеценовых микотоксинов. Общая схема пробоподготовки представлена на рис. 4.

Степень извлечения микотоксинов оценивали по добавкам двух различных уровней, ее значение варьируется от 48 до 100 % в зависимости от выбранной

матрицы (пшеница, ячмень, кукуруза, шрот рапсовый, жмых рапсовый, комбикорм на зерновой основе, силос). Установлено, что использование микроэкстракции позволило эффективно сконцентрировать микотоксины из экстракта зерна и кормов, в зависимости от условий пробоподготовки для микотоксинов различных классов коэффициент концентрирования составляет 10,6 – 74,6. Нижняя граница определяемых содержаний для микотоксинов в зерне и кормах составляет 0,1 – 40 мкг/кг. Относительное стандартное отклонение не превышает 0,1. Предел обнаружения (c_{min}) и предел определения (c_{lim}) для микотоксинов определяли по соотношению сигнал : шум = 3:1 и 10:1 соответственно. В табл. 6 представлены аналитические характеристики методики определения микотоксинов в зерне и кормах.

Таблица 2. Аналитические характеристики методики определения девятнадцати микотоксинов в зерне и кормах ($n=3$; $P=0,95$).

Микотоксин	Диапазон линейности, мкг/мл	r^2	Добавки, мкг/кг	$R, \%$	K	s_r	c_{min} , мкг/кг. Зерно	c_{lim} , мкг/кг. Зерно	c_{min} , мкг/кг. Корма	c_{lim} , мкг/кг. Корма
НВЛ	0,05-2,0	0,9955	50;100	64±6	12,2	0,05	10	20	15	40
ДОН	0,08-2,0	0,9976	50; 100	62±8	11,8	0,09	20	30	20	50
15АДОН	0,08-2,0	0,9945	50; 100	57±7	10,9	0,08	20	30	20	50
3АДОН	0,08-2,0	0,9940	50; 100	56±6	10,7	0,08	20	30	20	50
ФЗХ	0,08-2,0	0,9868	50; 100	58±4	11,1	0,09	20	30	20	50
ДАС	0,05-2,0	0,9964	50; 100	62±8	11,9	0,04	15	25	15	40
НГ-2	0,05-2,0	0,9935	50; 100	72±8	13,8	0,05	8	20	10	30
Т-2 токсин	0,05-2,0	0,9867	50; 100	80±5	15,3	0,05	15	30	10	30
Т-2 триол	0,05-2,0	0,9923	50; 100	70±6	13,4	0,04	10	25	25	50
Т-2 тетраол	0,05-2,0	0,9897	50; 100	71±5	13,5	0,05	10	20	10	30
НСЛ	0,05-2,0	0,9993	50; 100	69±8	13,1	0,05	10	20	15	40
Афл.В1	0,001-0,05	0,9983	1,0;5,0	80±5	32,6	0,03	0,1	0,3	1,0	4,0
Афл.В2	0,001-0,05	0,9991	1,0;5,0	75±4	30,6	0,05	0,1	0,3	1,5	5,0
Афл. G1	0,001-0,05	0,9989	1,0;5,0	65±4	26,5	0,08	0,1	0,3	1,0	4,0
Афл. G2	0,001-0,05	0,9972	1,0;5,0	78±8	31,8	0,03	0,1	0,3	1,5	5,0
Охр. А	0,025-0,25	0,9975	10;25	91±9	74,6	0,02	1,0	2,5	2,0	10
Охр. В	0,05-0,25	0,9964	10;25	85±8	69,7	0,05	2,0	5,0	2,5	15
ЗОН	0,1-1,0	0,9874	50;100	64±8	52,5	0,09	4,0	10	5,0	20
Пагулин	0,5-10	0,9893	100;200	52±4	21,3	0,07	20	50	40	80

В качестве примера, на рис. 5 представлены хроматограммы экстракта из пшеницы с добавлением микотоксинов. Применение QuEChERS и ДЖЖМЭ позволило устранить мешающее влияние матрицы. Результаты определения разных видов кормов и зерна представлены в таблице 3

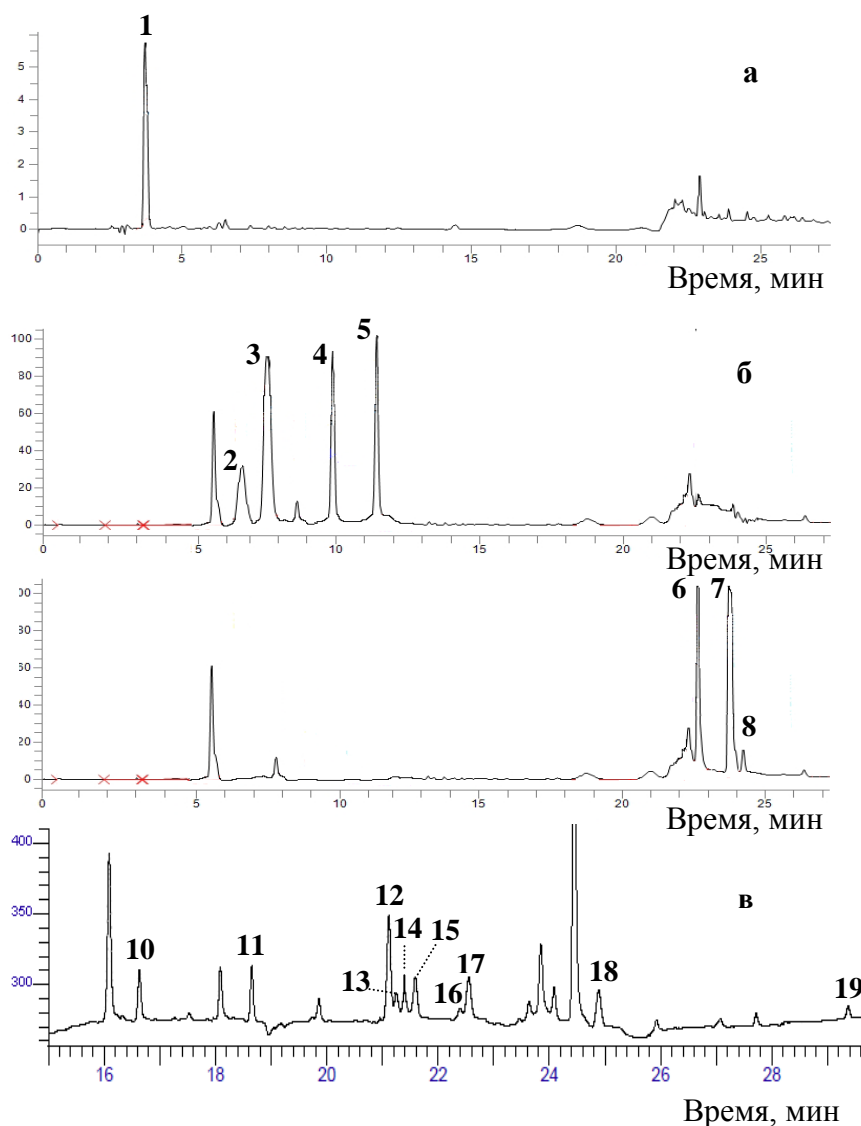


Рис. 5. Хроматограммы экстракта пшеницы с добавлением микотоксинов. Определение микотоксинов методами ВЭЖХ - УФ (а), - ФЛД (б) и ГХ-ДЭЗ (в): патулин (50 мкг/кг) (1), афлатоксин G2 (5,0 мкг/кг) (2), афлатоксин B2 (5,0 мкг/кг) (3), афлатоксин G1 (5,0 мкг/кг) (4), афлатоксин B1 (5,0 мкг/кг) (5), охратоксин В (25 мкг/кг) (6), охратоксин А (25 мкг/кг) (7), зеараленон (50 мкг/кг) (8), Т-2-тетраол (50 мкг/кг) (9), ниваленол (50 мкг/кг) (10), ДОН (11) (50 мкг/кг), 15АДОН (50 мкг/кг) (12), 3АДОН (50 мкг/кг) (13), неосоланиол (50 мкг/кг) (14), фузаренон Х (50 мкг/кг) (15), ДАС (50 мкг/кг) (16), Т-2 триол (50 мкг/кг) (17), НТ-2 (50 мкг/кг) (18), Т-2 (50 мкг/кг) (19).

Таблица 3. Результаты определения микотоксинов в зерне и кормах ($n=3$, $P=0,95$).

Микотоксин	Пшеница	Ячмень	Кукуруза	Шрот рапсовый	Жмых рапсовый	Комби-корм	Силос
НВЛ	160,3±9,8	-	-	-	-	-	-
ДОН	210,0±14,5	-	-	180,1±9,5	210,4±16,8	-	-
15АДО	-*	-	-	-	-	-	-
3АДОН	-	-	-	-	-	10,4±0,5	-
ФЗХ	-	-	-	-	-	-	-
ДАС	-	-	-	-	-	20,5±1,8	-
НТ-2	-	-	307,0±5,4	-	-	-	49,8±5,2
Т-2	19,4±0,9	-	1400±82	13,2±0,65	-	-	399,8±19,9
Т-2 триол	-	-	-	-	-	-	-
Т-2 тетраол	-	-	-	-	-	-	25,5±1,6
НСЛ	-	-	-	-	-	-	-
Афл В1	-	1,1±0,2	-	-	-	-	-

Продолжение табл. 3							
Афл В2	-	-	-	3,6±0,25	-	-	-
Афл G1	-	-	-	-	17,0±0,8	-	-
Афл G2	-	-	0,1±0,008	-	0,6±0,04	-	0,1±0,01
Охр А	-	41,1±0,1	-	-	-	-	-
Охр В	-	-	-	-	-	2,5±0,3	-
ЗОН	-	14,2±0,8	-	-	-	-	-
Патулин	-	-	-	-	-	-	30,8±2,5
s_r	0,05-0,07	0,04-0,08	0,06-0,08	0,05-0,07	0,05-0,08	0,05-0,09	0,05-0,09

-* не обнаружено

Одновременное определение микотоксинов в мясе и субпродуктах мясных. На сегодняшний день в РФ микотоксины не нормируются в мясе и мясных продуктах, нет утвержденных методик определения исследуемых веществ в данных объектах. Известно, что микотоксины, попадая с кормом в желудочно-кишечный тракт сравнительно быстро обезвреживаются, превращаясь в менее токсичные или нетоксичные соединения. Однако, некоторые микотоксины в зависимости от дозы потребления задерживаются в организме в течение нескольких недель и могут быть обнаружены в тканях животных, получавших загрязненные микроскопическими грибами корма. Разработанная нами методика позволяет извлекать восемнадцать микотоксинов разных классов одновременно из одной навески (2 г) методом QuEChERS. Экстракцию образцов проводили с применением 15 мл ацетонитрила, без добавления воды (рис. 4). Экстракт, полученный после данной стадии, делили и проводили ДЖЖМЭ отдельно для разных классов микотоксинов. Степень извлечения данных соединений находится в диапазоне 40-100 %. Предел обнаружения для разных видов матриц изменяется от 2 до 30 мкг/кг. В табл. 4 представлены характеристики методик определения для разных видов мяса и субпродуктов (говядина, свинина, курица печень свиная, почки свиные, селезенка свиная).

Таблица 4. Аналитические характеристики определения микотоксинов в мясе и субпродуктах мясных ($n=3$; $P = 0,95$)

Микотоксин	Диапазон линейности, мкг/мл	r^2	Добавки, мкг/кг	$R, \%$	K	s_r	C_{min} , мкг/кг. Мясо	C_{lim} , мкг/кг. Мясо	C_{min} , мкг/кг. Субпродукты	C_{lim} , мкг/кг. Субпродукты
НВЛ	0,08-2,0	0,9955	100;200	60±2	12,3	0,05	20	50	25	65
ДОН	0,1-2,0	0,9976	100;200	58±5	11,9	0,05	20	50	25	60
15АДОН	0,1-2,0	0,9945	100;200	55±8	11,3	0,08	25	60	30	70
3АДОН	0,1-2,0	0,9940	100;200	45±8	9,2	0,09	25	60	30	70
ФЗХ	0,1-2,0	0,9868	100;200	50±5	10,2	0,05	25	60	30	70
ДАС	0,1-2,0	0,9964	100;200	42±4	8,6	0,04	20	55	25	50
НГ-2	0,08-2,0	0,9935	100;200	67±5	13,7	0,05	15	50	20	50
Т-2 токсин	0,08-2,0	0,9867	100;200	70±4	14,4	0,02	15	45	20	50
Т-2 триол	0,1-2,0	0,9923	100;200	66±6	13,5	0,04	20	50	25	60
Т-2 тетраол	0,1-2,0	0,9897	100;200	69±6	14,1	0,05	20	50	15	35
НСЛ	0,1-2,0	0,9993	100;200	60±2	12,3	0,05	20	50	25	60

Афл.В1	0,05-0,25	0,9983	5,0;10	58±8	22,1	0,03	2,0	10	10	30
Афл. В2	0,05-0,25	0,9991	5,0;10	56±7	21,3	0,05	2,5	15	8,0	15
Афл. G1	0,05-0,25	0,9989	5,0;10	55±8	20,9	0,04	2,0	10	10	30
Афл. G2	0,05-0,25	0,9972	5,0;10	56±6	21,3	0,05	2,5	15	10	25
Охр.А	0,05-0,5	0,9975	10;50	95±8	72,4	0,02	2,0	5,0	4,0	20
Охр. В	0,08-0,5	0,9964	10;50	89±7	67,8	0,04	4,0	10	8,5	25
ЗОН	0,1-1,0	0,9874	50;100	54±4	41,1	0,05	5,0	15	15	45

Некоторые хроматограммы экстрактов данных объектов исследования представлены на рис. 6, 7. Установлено присутствие микотоксинов в субпродуктах свинных: обнаружен охратоксина А в печени ($5,0 \pm 0,1$, $s_r=0,02$) и почках ($2,5 \pm 0,2$, $s_r=0,08$), а также афлатоксина В1 в печени свиной ($0,20 \pm 0,007$, $s_r=0,04$). Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0,08.

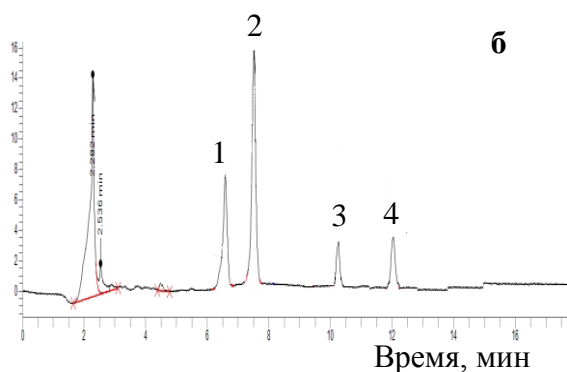
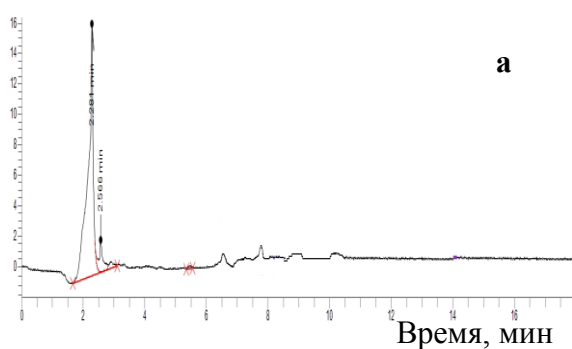


Рис. 6. Хроматограмма экстракта мяса свинины без добавления (а) и с добавлением (б) афлатоксинов (25 мкг/кг): G2 (1), В2 (2), G1 (3), В1 (4).

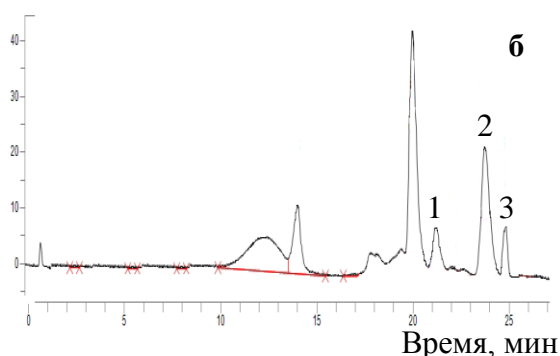
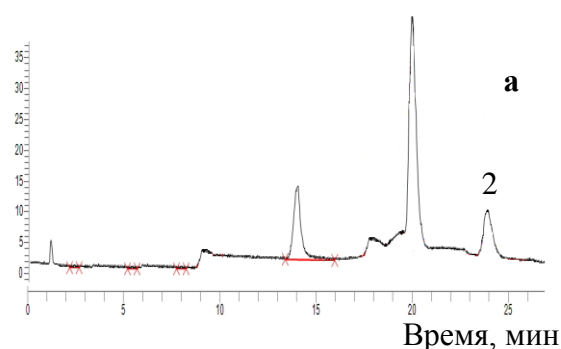


Рис. 7. Хроматограмма экстракта печени свинины без добавления (а) и с добавлением (б): Охратоксина В (50 мкг/кг) (1), Охратоксина А (50 мкг/кг) (2), Зеараленона (100 мкг/кг) (3).

Одновременное определение микотоксинов в молоке и молочных продуктах.

Аналитические характеристики методики определения афлатоксина М1 (метаболита В1) и четырех микотоксинов данного класса (В1, В2, G1, G2) в молоке, кефире и сыре представлены в табл. 5. Афлатоксины извлекали из исследуемых образцов совместно методами QuEChERS и ДЖЖМЭ, с использованием смеси ацетонитрил и вода (10:5). Схема пробоподготовки для молока и молочных продуктов представлена на рис. 8. Афлатоксины удовлетворительно извлекаются из исследуемых объектов, степень извлечения составляет 50-74%. Коэффициент концентрирования в зависимости от определяемого микотоксина варьируется от 36,6 до 39,0. Относительное стандартное отклонение результатов не превышает 0,08. Предел обнаружения для афлатоксинов составил 0,1-0,25 мкг/кг. При извлечении

афлатоксинов из сыра чувствительность снижается, это связано с влиянием матрицы образца.

Таблица 5. Аналитические характеристики определения микотоксинов в молоке и молочных продуктах ($n=3$; $P = 0,95$).

Микотоксин	Диапазон линейности, мкг/мл	Добавки, мкг/кг	r^2	$R, \%$	K	s_r	C_{min} , мкг/кг. Жидкие молочные продукты	C_{lim} , мкг/кг. Жидкие молочные продукты	C_{min} , мкг/кг. Сыры	C_{lim} , мкг/кг. Сыры
B1	0,01-0,15	0,5;1,0	0,9983	65±10	39,0	0,02	0,1	0,25	0,12	0,30
B2	0,01-0,15	0,5;1,0	0,9991	61±8	36,6	0,04	0,1	0,3	0,15	0,40
G1	0,01-0,15	0,5;1,0	0,9989	64±6	38,4	0,02	0,1	0,25	0,15	0,35
G2	0,01-0,15	0,5;1,0	0,9972	62±6	37,2	0,04	0,1	0,25	0,15	0,35
M1	0,01-0,15	0,5;1,0	0,9992	62±8	37,2	0,02	0,2	0,4	0,25	0,45

Для определения афлатоксинов M1 и B1 в молоке и молочных продуктах рекомендован ГОСТ 30711-2001. Для извлечения афлатоксинов используют жидкостно-жидкостную экстракцию, для очистки экстрактов применяют колонки с силикагелем. Степень извлечения микотоксинов данным способом составляет около 60 %. На пробоподготовку затрачивается около 200 мл растворителей. Продолжительность анализа одной пробы 4-5 ч.

Использование предлагаемого способа определения микотоксинов в молоке позволяет значительно снизить объемы токсичных растворителей и стоимость пробоподготовки (в 15-20 раз).

Схема пробоподготовки молока и молочных продуктов представлена на рис. 8.

Результаты определения пяти афлатоксинов в разных образцах молока и молочной продукции представлены в табл. 6. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0,08. Продолжительность анализа не более 1,5 ч.

Таблица 6. Результаты определения афлатоксинов в молоке и молочных продуктах ($n= 3$; $P = 0,95$).

Матрица	Найдено, мкг/кг									
	B1	s_r	G1	s_r	B2	s_r	G2	s_r	M1	s_r
Молоко с фермы	-	-	-	-	-	-	-	-	0,10±0,01	0,1
Кефир «Ополье», 1%	-	-	-	-	-	-	-	-	0,10±0,005	0,05
Напиток кисло-молочный «Тан» 1,8%	-	-	-	-	-	-	-	-	0,12±0,007	0,06
Сыр «Российский»	0,67±0,04	0,06	0,20±0,02	0,08	-	-	-	-	0,37±0,04	0,1
Сыр «Дваро»	-	-	-	-	-	-	-	-	0,31±0,02	0,06
Сыр «Гауда»	-	-	-	-	-	-	-	-	0,27±0,02	0,07

*- не обнаружено

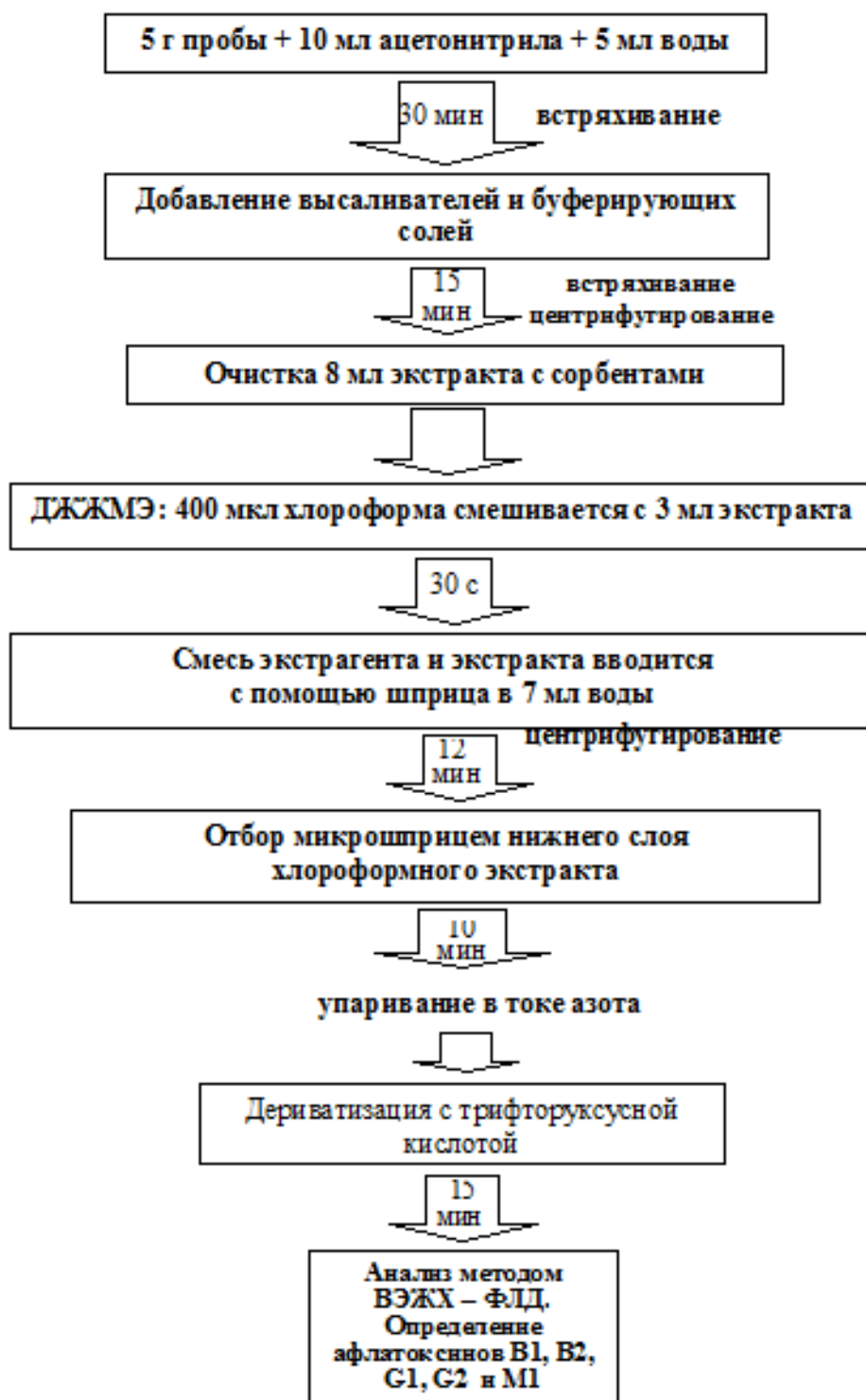


Рис. 8. Схема пробоподготовки для молока и молочных продуктов при определении афлатоксинов (продолжительность анализа 1-1,5 ч).

На рис. 9 представлена хроматограмма экстракта из молока в отсутствие и присутствии афлатоксинов. Как следует из рисунка, матрица образца после пробоподготовки не влияет на определение афлатоксинов.

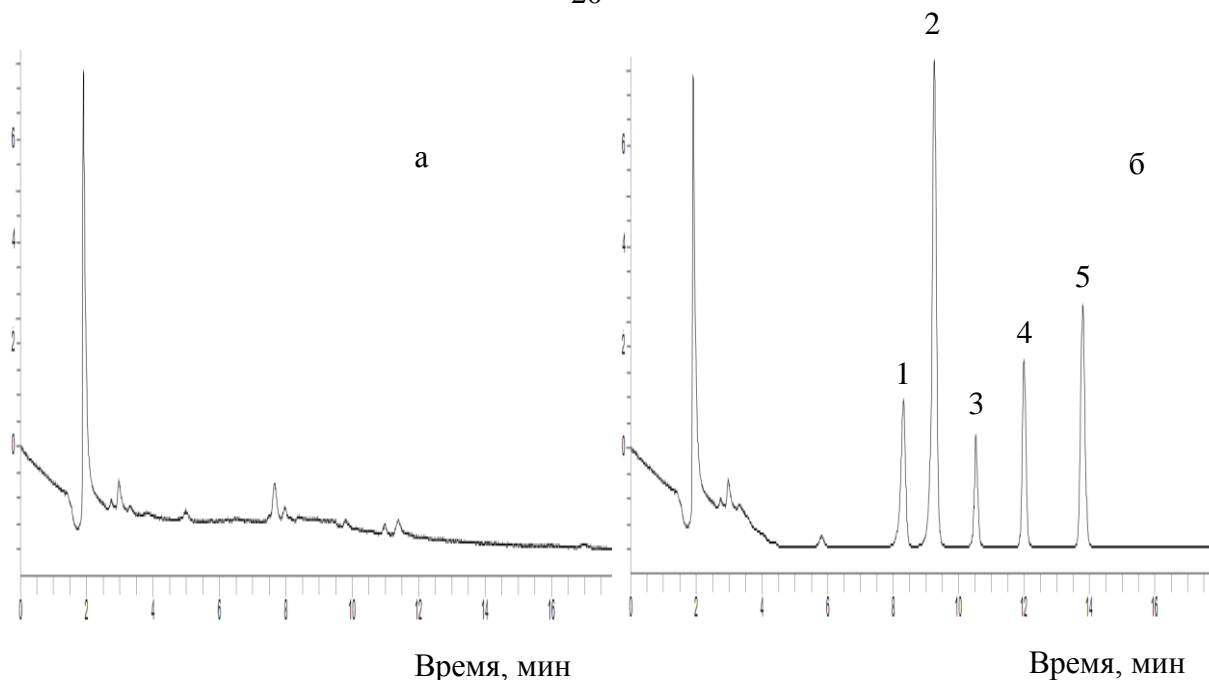


Рис. 9. Хроматограмма экстракта из молока в отсутствие (а) и присутствии афлатоксинов (0,5 мкг/кг): G2 (1), B2 (2), M1 (3), G1 (4), B1 (5).

ВЫВОДЫ

1. Предложен новый подход для одновременного извлечения микотоксинов различных классов, основанный на совместном использовании методов QuEChERS и ДЖЖМЭ, позволяющий получить экстракты, компоненты матрицы которой не мешают определению микотоксинов при проведении анализа методами ВЭЖХ-УФ, ФЛД и ГЖХ-ДЭЗ.

2. Определены оптимальные условия проведения пробоподготовки QuEChERS для одновременного извлечения микотоксинов различных классов из одной навески зерна и кормов, мяса, молочных продуктов (масса навески, объемы водной и органической фаз, природа и масса буферирующих солей и сорбентов).

3. Показана возможность и установлены оптимальные условия дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции микотоксинов из экстрактов, полученных методом QuEChERS. Изучено влияние различных факторов на проведение ДЖЖМЭ (объем и природа экстрагента, объем диспергатора, влияние pH водного раствора, время и скорость центрифугирования, влияние ультразвука). Степень извлечения микотоксинов из пищевых продуктов растительного и животного происхождения при совмещении QuEChERS и ДЖЖМЭ составила 40-100 %.

4. Предложены способы одновременного определения девятнадцати микотоксинов в зерне и кормах, восемнадцати микотоксинов в мясе и мясных продуктах, пяти афлатоксинов в молоке и молочных продуктах. Пределы определения для микотоксинов в зерне и кормах составили 0,3 - 80 мкг/кг, для мясной продукции 5 - 70 мкг/кг, для молока и молочных продуктов 0,25 - 0,45 мкг/кг. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0,1. Показано, что совместное применение методов QuEChERS и ДЖЖМЭ позволяет значительно снизить себестоимость и продолжительность анализа.

5. Оптимизированы условия получения производных афлатоксинов и трихотеценовых микотоксинов при их определении на ВЭЖХ с флуориметрическим

детектором и на ГЖХ с детектором электронного захвата соответственно. Высокая чувствительность определения достигнута оптимизацией условий дериватизации ТТМ с гептафтормасляным ангидридом и афлатоксинов с трифторуксусной кислотой.

6. Экспериментально установлены условия хроматографического разделения девяти микотоксинов различных классов (афлатоксинов, охратоксинов, патулина и зеараленона и одиннадцати микотоксинов класса трихотеценовых типа А и В (дезоксиниваленола, ниваленола, 15-ацетилдезоксиниваленола, 3-ацетилдезоксиниваленола, фузаренона Х, НТ-2, Т-2 токсина, Т-2 триола, Т-2 тетраола, неосоланиола, диацетоксискирпенола).

Основное содержание диссертации отражено в следующих публикациях:

Статьи в журналах из списка ВАК:

1. *Карасева Н.М., Амелин В.Г., Третьяков А.В.* Одновременное определение микотоксинов ряда трихотеценов, охратоксина А, зеараленона в зерне и продуктах его переработки, кормах и мясе методом газожидкостной хроматографии // Журн. аналит. химии. 2013. Т. 68. № 1. С. 64–70.

2. *Карасева Н.М., Амелин В.Г., Третьяков А.В.* Хроматографические методы определения микотоксинов в пищевых продуктах растительного и животного происхождения // Журн. аналит. химии. 2013. Т. 68. № 3. С. 212–223.

3. *Карасева Н.М., Амелин В.Г., Третьяков А.В.* Сочетание метода QuEChERS с дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракцией и получением производных при определении микотоксинов в зерне и комбикормах газожидкостной хроматографией с детектором по захвату электронов // Журн. аналит. химии. 2013. Т. 68. № 6. С. 612–618.

4. *Карасева Н.М., Амелин В.Г., Третьяков А.В.* Определение афлатоксинов В1 и М1 в молоке: быстрый и простой способ пробоподготовки // Молочная промышленность. 2013. № 9. С. 10-11.

5. *Карасева Н.М., Амелин В.Г., Никешина Т.Б.* Экспрессный способ определения афлатоксинов В1, В2, G1, G2 в зерне и кормах // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. 2013. № 3. С. 12-15.

Статьи в научных журналах:

1. *Карасева Н.М., Амелин В.Г., Третьяков А.В.* Одновременное определение патулина, трихотеценовых микотоксинов и зеараленона в зерне и кормах // Ветеринария сегодня. 2013. №2 (5). С. 25-30.

Тезисы докладов на конференциях:

1. *Карасева Н.М.* Определение афлатоксинов в зерновых культурах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Материалы XVIII Международной научной конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2011». М.: МАКС Пресс. [Электронный ресурс]. 2011.

2. *Karaseva N.M., Tretyakov A. V., Amelin V.G.* Simultaneous detection of trichothecenes, zearalenone and ochratoxin A in cereals, feed and meat by gas chromatography with electron capture detector // Book of Abstracts 5th Int. Symp. on Recent Advances in Food Analysis. 2011. P. 294.

3. *Карасева Н.М.* Совмещение дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции и получения производных микотоксинов при определении их в зерне и кормах методом газожидкостной хроматографии с детектором по захвату электронов // Материалы XIX Международной научной конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2012». М.: МАКС Пресс. [Электронный ресурс]. 2012. С 31.

4. **Карасева Н.М.** Совместное использование QuEChERS и дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции для извлечения и определения десяти микотоксинов разных классов из зерна и кормов при определении микотоксинов в пищевых продуктах животного и растительного происхождения // Химия биологически активных веществ: Межвузовский сборник научных трудов Всероссийской школы - конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием. Саратов: Изд-во "КУБиК". 2012. С. 247.

5. **Карасева Н.М.** Применение жидкостно-жидкостного микроэкстракционного концентрирования с диспергированием экстрагента для определения микотоксинов НТ-2 и Т-2 в зерне и кормах // Менделеев-2012. Аналитическая химия. VI Всероссийская конференция молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием. Тезисы докладов. СПб.: Изд-во «Соло». 2012. С.72.

6. **Карасева Н.М.** Определение микотоксинов в кормах и зерне при совместном использовании метода QuEChERS и дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции // Современные проблемы химической науки и образования: сб. материалов Всерос. конф. с междунар. участием, посвящённой 75-летию со дня рождения В.В. Кормачева: в 2 т. Т. I. Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та. 2012. С. 268.

7. **Karaseva N.M., Amelin V.G., Tretyakov A.V.** Application of dispersive liquid-liquid microextraction and derivatization combined with QuEChERS for the determination of trichothecene mycotoxins in cereal products by capillary gas chromatography with electron-capture detector // Abstract Book 36th ISCC And 9th GC/GC Symposium. Riva del Garda, Italy. 2012. P. 184.

8. **Карасева Н.М.** Определения десяти микотоксинов различных классов в зерне и кормах из одной навески // Материалы XX Международной научной конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013». М.: МАКС Пресс. [Электронный ресурс]. 2013.

9. **Карасева Н.М., Амелин В.Г., Третьяков А.В.** Одновременное определение афлатоксинов, охратоксина А, зеараленона и патулина в зерне и кормах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Материалы сезонной научной школы в области аналитической хроматографии и капиллярного электрофореза. Краснодар.: «ОфисАльянс». 2013. С. 80.

10. **Karaseva N.M., Amelin V.G., Tretyakov A.V.** Combination QuEChERS, dispersion liquid-liquid microextraction and HPLC with fluorescence detection for simultaneous extraction and determination of eight mycotoxins in cereal and feed // Abstract Book 19th International Symposium on Separation Sciences New Achievements In Chromatography Porec.Croatia.[Электронный ресурс]. 2013.

Методические рекомендации:

Карасева Н.М., Амелин В.Г., Третьяков А.В. Методические рекомендации по определению трихотеценовых микотоксинов (ниваленол, дезоксиниваленол, НТ-2 и Т-2) в кормах и зерне методом газожидкостной хроматографии. Владимир: ФГБУ ВНИИЗЖ:14 с. Утв. 26.06.12.

Автор выражает глубокую благодарность кандидату химических наук Алексею Викторовичу Третьякову, заведующему лабораторией химического анализа Федерального центра охраны здоровья животных, за предоставленную возможность использования аналитического оборудования и коллекции стандартных образцов микотоксинов, а также за помощь в обсуждении результатов работы и подготовке диссертации.