



Научная сессия БГМУ,
25 января 2024 г., г. Минск

Республиканское унитарное предприятие
«Научно-практический центр гигиены»
г. Минск, Республика Беларусь

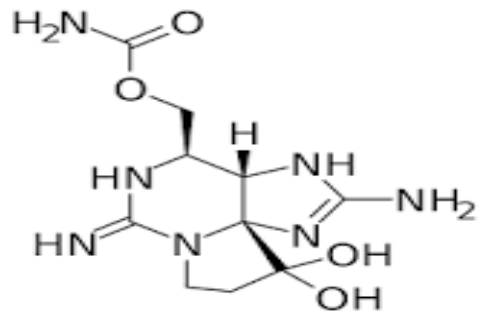
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАЛИТИЧЕСКОГО ЯДА САКСИТОКСИНА В МОЛЛЮСКАХ МЕТОДОМ ВЭЖХ

**Авторы: Фёдорова Т.А., Полянских Е.И.,
Филатченкова Е.В., Лавринович Н.А.**

Минск 2024

Сакситоксин

Сакситоксин — органическое соединение, пуриновый алкалоид, нейротоксин небелковой природы, продуцируемый некоторыми видами динофлагеллятов (*Alexandrium* sp., *Gymnodinium* sp., *Pyrodinium* sp.), а также некоторыми цианобактериями (*Anabaena* sp., *Aphanizomenon* sp., *Lyngbya* sp., *Planktothrix* sp.)



Своё название сакситоксин получил от съедобных моллюсков рода *Saxidomus*, накапливающих сакситоксин и его производные при питании динофлагеллятами и цианобактериями в периоды их бурного размножения («красные приливы»). Употребление в пищу моллюсков в такое время приводит к отравлениям сакситоксином.

Сакситоксин — бесцветные кристаллы, растворим в полярных растворителях и нерастворим в неполярных органических растворителях, устойчив в кислых средах. Разлагается в растворах щёлочей и при $t > 110$ °С.

Механизм действия сакситоксина — блокада потенциал-зависимых натриевых каналов нервных волокон, которая блокирует проведение нервных импульсов и вызывает параличи мышц, в частности дыхательной мускулатуры. ЛД₅₀ — 8 мкг/кг (мышь, подкожно), 2 мкг/кг (человек, перорально).



Нормирование

```
graph TD; A[Нормирование] --> B[ТР ТС 021/2011  
«О безопасности пищевой  
продукции»]; A --> C[ТР ТС 040/2016  
«О безопасности рыбы и  
рыбной продукции»]; B --> D[не более 0,8 мг/кг]; C --> D;
```

ТР ТС 021/2011

«О безопасности пищевой
продукции»

ТР ТС 040/2016

«О безопасности рыбы и
рыбной продукции»

не более 0,8 мг/кг

ТНПА на методы испытаний

- ❑ **ГОСТ EN 14526-2015** Продукты пищевые. Определение сакситоксина и DC-сакситоксина в мидиях. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением предколоночной дериватизации методом пероксидного или периодатного окисления
(до 01.02.2023 в РБ)
- ❑ **ГОСТ EN 14526-2022** Продукция рыбная пищевая. Определение содержания токсинов группы сакситоксина в моллюсках. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением предколоночной дериватизации методом пероксидного или периодатного окисления
(с 01.02.2023 в РБ)

Сравнительный анализ ТНПА

ГОСТ EN 14526-2015

- 2 токсина
- Прободготовка
 - Экстракция
 - а) 0,2 М раствор уксусной кислоты на магнитной мешалке при комнатной температуре
 - б) 0,1 М раствор соляной кислоты
 - **Очистка экстракта** – метод твердофазной экстракции (ТФЭ) картридж C18
 - **Предколоночная дериватизация**
 - а) пероксидная
 - б) периодатная
- **Условия хроматографирования**
 - жидкостной хроматограф с флуоресцентным детектором
 - длина волны поглощения **340 нм**
 - длина волны эмиссии **400 нм**
 - колонка C18- ODS-Hypersil
 - подвижная фаза: А - формиат аммония (0,1 М), Б- формиат аммония (0,1 М) с AcN ,
 - скорость потока элюента 0,75 мл/мин, градиентный режим элюирования ;
 - объем вводимой пробы 20 мкл.
 - Идентификация аналита – по времени удерживания
 - Количественное определение по градуировочному графику, построенному в диапазоне **концентраций от 0,05 до 0,3 мкг/см³**

ГОСТ EN 14526-2022

- 11 токсинов
- Прободготовка
 - Экстракция
 - а) 0,2 М уксусной кислотой на вихревой мешалке мешалке, затем нагревание
 - **Очистка экстракта** – метод твердофазной экстракции (ТФЭ) картридж C18
 - **Предколоночная дериватизация**
 - а) пероксидная
 - б) периодатная
- **Условия хроматографирования**
 - жидкостной хроматограф с флуоресцентным детектором
 - длина волны поглощения 340 нм
 - длина волны эмиссии 400 нм
 - колонка C18- ODS-Hypersil
 - подвижная фаза: А - формиат аммония (0,1 М), Б- формиат аммония (0,1 М) с AcN , градиентный режим элюирования ;
 - -скорость потока элюента 0,75 мл/мин;
 - -объем вводимой пробы 20 мкл.
 - Идентификация аналита – по времени удерживания
 - Количественное определение по градуировочному графику, **построенному по 5 точкам**

Цель работы

- **Оптимизировать пробоподготовку определения сакситоксина в моллюсках**
- **Рассчитать метрологические характеристики метода**



Схема подготовка проб

5 г гомогенизированной пробы
+ 5 см³ 0,2 М CH₃COOH

Экстракция



Центрифугирование
при 10000 об/мин, 10 мин



Декантирование,
отбор экстракта 1 см³



ТФЭ:
Картридж C18 ODS, 3 см³



Дериватизация:
В вialsу 1,5 см³ :
0,275 см³ РПД
0,1 см³ пробы
0,02 см³ CH₃COOH

ВЭЖХ анализ

Условия хроматографирования

- жидкостной хроматограф **Agilent Technologies 1260 Series** с флуоресцентным детектором
- колонка HyperClone ODS (C18) (4,0 x 250 мм, 5мкм)
- длина волны поглощения **340 нм**
- длина волны эмиссии **400 нм**
- температура термостата **30 °С**;
- объем вводимой пробы **20 мкл**;
- Подвижная фаза

А – формиат аммония молярной концентрацией

$c = 0.1$ моль/дм³, **Б** – формиат аммония молярной концентрацией $c = 0,1$ моль/дм³ в 5% ацетонитриле

- скорость подвижной фазы **0,75 мл/мин**
- режим градиентного элюирования (0 - 100% **Б**) от 0 до 20 минут
- **Идентификацию** **аналита** проводили по совпадению времени удерживания **аналита** в пробе с временем удерживания **аналита** в градуировочном растворе (**t=18 мин**)
- **Количественное определение** сакситоксина осуществляли методом абсолютной калибровки
- диапазон концентраций градуировочных растворов (**0,05 – 0,30**) мкг/см³
- диапазон определяемых концентраций сакситоксина составляет от **0,2** до **1** мг/кг

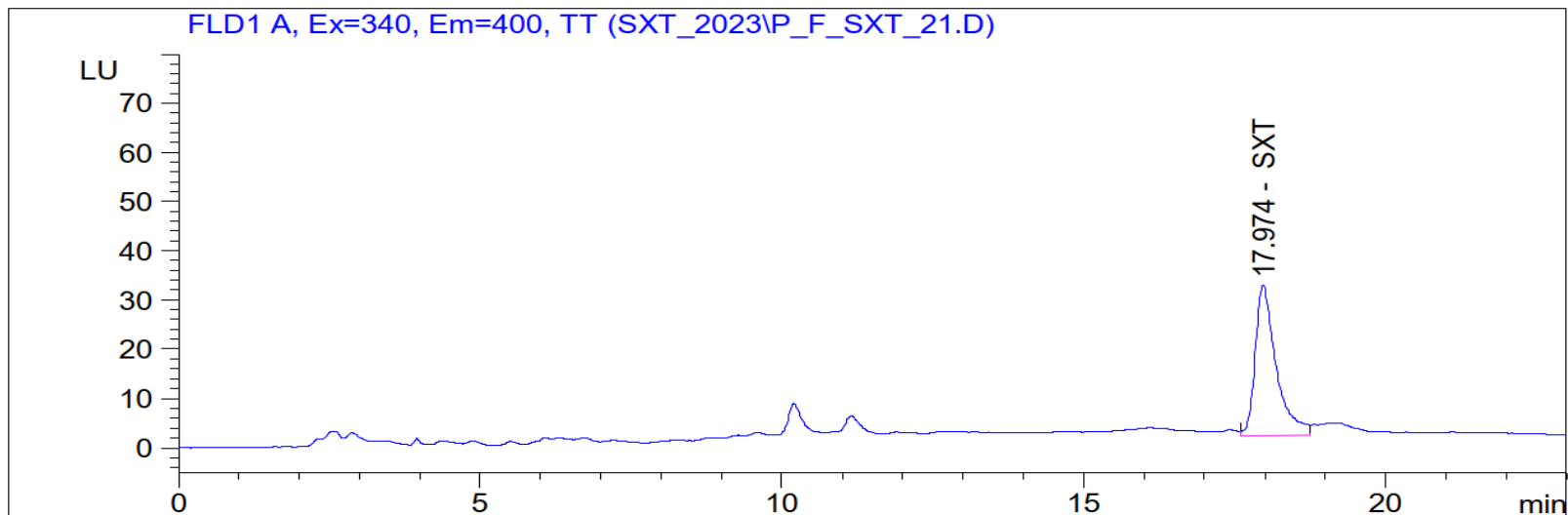


Рисунок 1 - Хроматограмма референсного образца с содержанием сакситоксина 0,45 мг/кг ($0,48 \pm 0,06$) мг/кг

Таблица 1 – Метрологические характеристики метода

Наименование показателя	$K_{гр}, \%$	Повторяемость $s_r, \%$	Промежуточная прецизионность $s_{I(ТО)}, \%$	Предел повторяемости $r, \%$	Предел промежуточной прецизионности $r_{I(ТО)}, \%$
Сакситоксин	3,0	5,4	8,4	15,0	17,2

Заключение

- **Оптимизированы условия пробоподготовки определения сакситоксина в моллюсках методом ВЭЖХ**
- **Рассчитаны метрологические характеристики метода**
- **ГОСТ EN 14526 успешно освоен и внедрен в область деятельности лаборатории химии пищевых продуктов государственного предприятия «НПЦГ»**

