Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

Četvrti simpozijum o mikotoksinima, Sarajevo, 14 juni 1991

Ožegović, Ladislav (urednik)

1996.

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/handle/123456789/824

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI
BOSNE I HERCEGOVINE

SPECIJALNA IZDANJA
VOL. CIII

Odjeljenje medicinskih nauka
Vol. 17

ČETVRTI SIMPOZIJUM O MIKOTOKSINIMA

(Sarajevo, 14 Juni 1991)

Redakcioni odbor
Seid Huković, Ladislav Ožegović, Džemal Rezaković

Glavni urednik
Ladislav Ožegović
Redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

SARAJEVO 1996

ODREĐIVANJE T-2 TOKSINA I NJEGOVIH HIDROLITIČKIH METABOLITA U SERUMU METODOM GASNE HROMATOGRAFIJE – MASENE SPEKTROMETRIJE

PREDRAG RADOŠEVIĆ, N. DOGOVIĆ

Vojnomedicinska kademija, Beograd
Vojnotehnički institut, Beograd

Apstrakt. T-2 toksin, HT-2 toksin i T-2 triol su ekstrahovani na čvrstoj fazi C-18 iz razblaženog uzorka seruma u visokom prinosu (preko 80%), za razliku od T-2 tetraola (oko 10%). Derivatizacija je vršena pomoću anhidrida trifluorsirćetne kiseline, a derivatizovani toksini razdvojani na kapilarnoj koloni HP-1 i detektovani masenom spektrometrijom uz praćenje karakterističnih jona. Detekcione granice metode su: T-2 toksin 15 μg/l, HT-2 toksin 5 μg/l, T-2 triol 3 μg/l i T-2 tetraol 40 μg/l. Preciznost metode je zadovoljavajuća, sem za vrlo niske koncentracije T-2 toksina.

UVOD

T-2 toksin je, pored makrocikličnih trihotecena, svakako jedan od najtoksičnijih Fusarium toksina (Ueno, 1983). Mada se, na sreću, u prirodi retko sreće (Gilbert, 1989), mikotoksikoze izazvane ovim toksinom vrlo su teške i sa ozbiljnim posledicama. Simptomi trovanja su nespecifični (Ueno i sar., 1984), a jedina pouzdana dijagnoza trovanja je detekcija i identifikacija toksina u biološkom materijalu. Međutim, T-2 toksin podleže vrlo brzoj i kompleksnoj razgradnji (Sintov i sar., 1988), što ukazuje na značaj određivanja i metabolita pored nepromenjenog toksina u biološkom materijalu. Metabolička razgradnja T-2 toksina u organizmu se odvija pod uticajem nekoliko enzimskih sistema, od kojih je najznačajniji hidrolitički (Pfeiffer i sar., 1988; Corley i sar., 1986). Karboksilesteraze kao nosioci hidrolitičkog metaboličkog puta razgrađuju ovaj toksin na više metabolita od kojih su najvažniji HT-2 toksin i T-2 tetraol kao krajnji hidrolitički metabolit.

Koncentracije T-2 toksina i njegovih metabolita u biološkom materijalu, čak i u uslovima teških akutnih trovanja, vrlo su male, tako da se za njihovo određi-

vanje zahteva izuzetno osjetljiva metoda. Kapilarna gasna hromatografija, uz prethodnu derivatizaciju ekstrakta uzorka sa fluoriranim acilirajućim agensima i detekciju na elektronapsorpcionom detektoru (Black i sar., 1987), ili masenoselektivnom detektoru (Begley i sar.; D'Agostino i sar., 1986), predstavlja metodu izbora.

Cilj ovog rada je bio razvijanje brze i jednostavne, a u isto vreme dovoljno osetljive metode za određivanje T-2 i HT-2 toksina, T-2 tiola i T-2 tetraola u plazmi u slučaju akutnih trovanja T-2 toksinom.

MATERIJAL I METODE

Hemikalije

Pojedinačni osnovni standardni rastvori T-2 toksina, HT-2 toksina i T-2 triola (SIGMA) napravljeni su rastvaranjem u etilacetatu, tako da je krajnja koncentracija bila 0,1 mg/ml. T-2 tetraol (SIGMA) rastvoren je pomoću metanola u istoj koncentraciji. Mešoviti standardni rastvor mikotoksina za kontaminaciju seruma napravljen je razblaživanjem sledećih zapremina osnovnih rastvora: 50 μl T-2 tetraola, 50 μl T-2 triola, 100 μl HT-2 toksina i 200 μl T-2 toksina u normalnom sudu od 10 ml sa etilacetatom.

Metoksihlor (PolyScience Corp.) je rastvoren pomoću benzola u koncentraciji od 1 mg/l i predstavlja interni standard za hromatografska određivanja.

Metanol, etilacetat, benzol i anhidrid trifluorsirćetne kiseline (TFAA) proizvodnje Merck su p.a. hemikalije.

Aparatura

Određivanja su vršena na gasnohromatografskom-masenospektroskopskom sistemu Hewlett Packard 5970 B uz injiciranje bez splitovanja, temperaturu injektora od 250°C i temperaturu detektora 300°C. Za hromtografiranje je upotrebljena kapilarna kolona HP-1 dimenzija 12 m/0,2 mm i temperaturski program zagrevanja kolone od 150°C do 280°C uz brzinu zagrevanja od 10°C/min. Jonizacija TFA derivata toksina postignuta je strujom elektrona od 70 eV na masenom spektrometru, a praćeni su samo karakteristični joni navedeni u tabeli br.1.

Tabela 1. ODABRANI KARAKTERISTIČNI JONI IZ MASENIH SPEKTARA ZA PRAĆENJE POJEDINIH JEDINJENJA

Toksin	m/e
T-2 tetraol	217,271,327,330,455,569
T-2 triol	121,234,455,569
HT-2 toksin	121,205,455,472,532
T-2 toksin	121,180,327,401,478
METOKSIHLOR	227

Kontaminacija i obrada uzorka

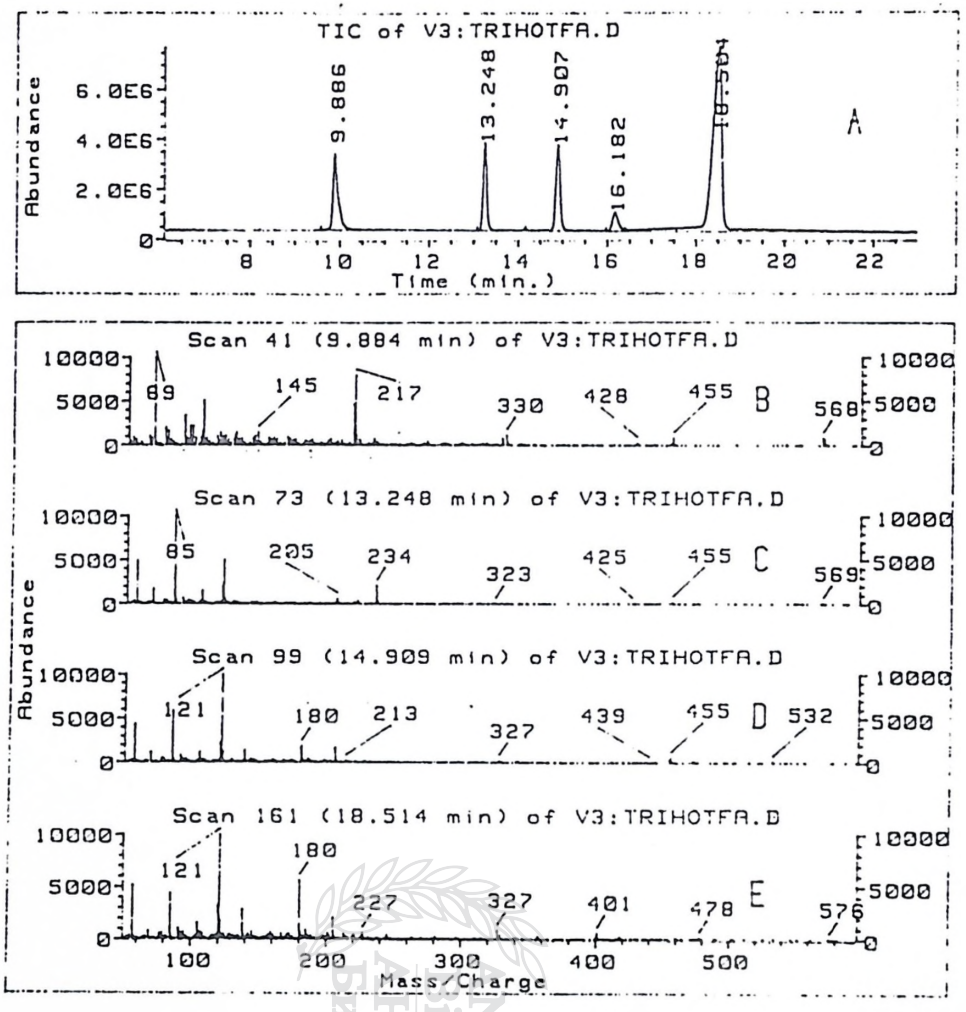
Za ispitivanje prinosa ekstrakcije i konstrukciju baždarnih dijagrama upotrebljen je "srednji uzorak" dobijen od velikog broja pojedinačnih uzoraka seruma zdravih ljudi. Uzorci seruma su kontaminirani sa različitim zapreminama mješovitog standardnog rastvora: 50, 100, 200 i 300 μl je pipetirano u suve epruvete, organski rastvarač je uparen strujom vazduha, a na ostatak je dodato po 10 μl metanola i po 2 ml seruma. Uzorci su razblaženi sa po 4 ml demineralizovane vode i dobro izmešani na "Vortex" mešalici. Toksini iz ovako pripremljenih uzoraka su ekstrahovani na čvrstoj fazi C-18 (SEP PAK-C18 minikolonice Waters) prethodno kondicioniranoj metanolom i demineralizovanom vodom. Posle nanošenja uzorka, kolona je isprana vodom, a toksini eluirani sa 2 ml metanola (brzina protoka je bila 3 ml/min.). Pre derivatizacije metanol je uparen strujom suvog vazduha. Derivatizacija je vršena sa po 100 μl TFAA, zagrevanjem 20 minuta na temperaturi od 60°C. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu i uklanjanja viška anhidrida uparavanjem, derivatizovani ekstrakti su rastvoreni u 50 μl benzolskog rastvora internog standarda i po 1 μl injiciran u gasni hromograf.

REZULTATI I DISKUSIJA

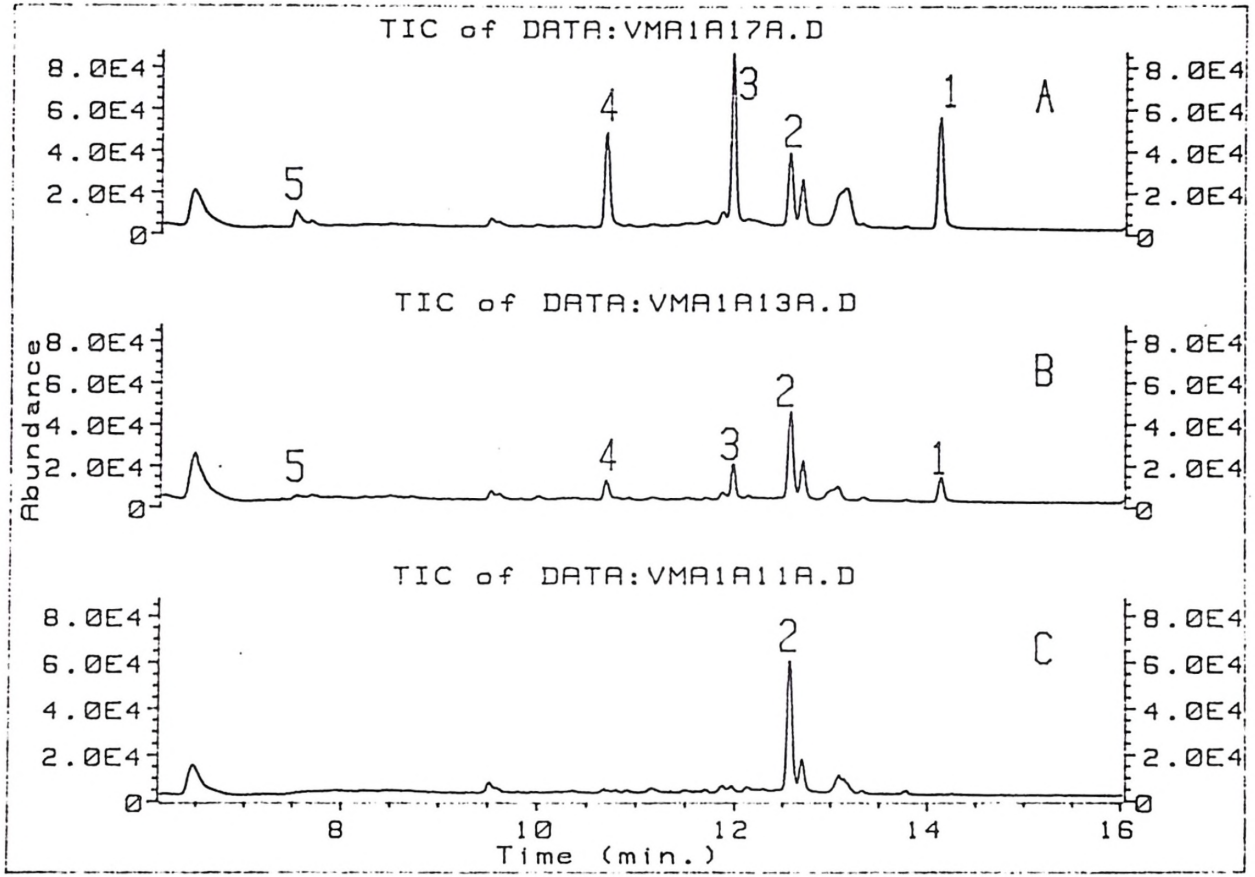
T-2 toksin i njegovi metaboliti su slabo do umereno polarna organska jedinjenja, tako da se ne mogu direktno analizirati na uobičajenim hromatografskim kolonama bez modifikacije strukture. Za derivatizaciju alkoholnih grupa obično se koriste silirajući ili fluorirani acilirajući agensi. U literaturi se navodi da su TFA stabilniji od trimetilsilil derivata trihotecena (Kienz i Verweij, 1986). U preliminarnim istraživanjima to se i kod nas pokazalo, pa smo se u daljem radu opredelili za TFAA kao derivatizacioni reagens.

Međutim, analizirajući TFA derivate trihotecena masenom spektrometrijom uz elektronsku jonizaciju, uočljivo je da se ne dobijaju fragmenti jačeg intenziteta na većim masama (slika br.1). Prateći jone na niskim masama, pogoršava se odnos signal/šum, što direktno utiče na donju granicu određivanja. Značajno poboljšanje osjetljivosti postiglo bi se primjenom blaže forme jonizacije kao što je na primjer hemijska jonizacija, gdje se stimuliše fragmentacija na visokim masama, a molekulski jon je često i osnovni jon u masenom spektru (D'Agostino i sar., 1986).

Na slici br.2 prikazani su hromatogrami seruma sa i bez dodatka toksina. Prinos ekstrakcije na čvrstoj fazi C-18 za T-2, HT-2 i T-2 triol veći je od 80%, dok je za T-2 tetraol ispod 10% što je i za očekivati s obzirom na veliku polarnost ovog jedinjenja. Primjenom smole XAD-2 za ekstrakciju povećao bi se prinos za T-2 tetraol (Heyndrickx A. i sar., 1984), ali bi se značajno produžilo vrijeme ekstrakcije i povećala potrošnja hemikalija.

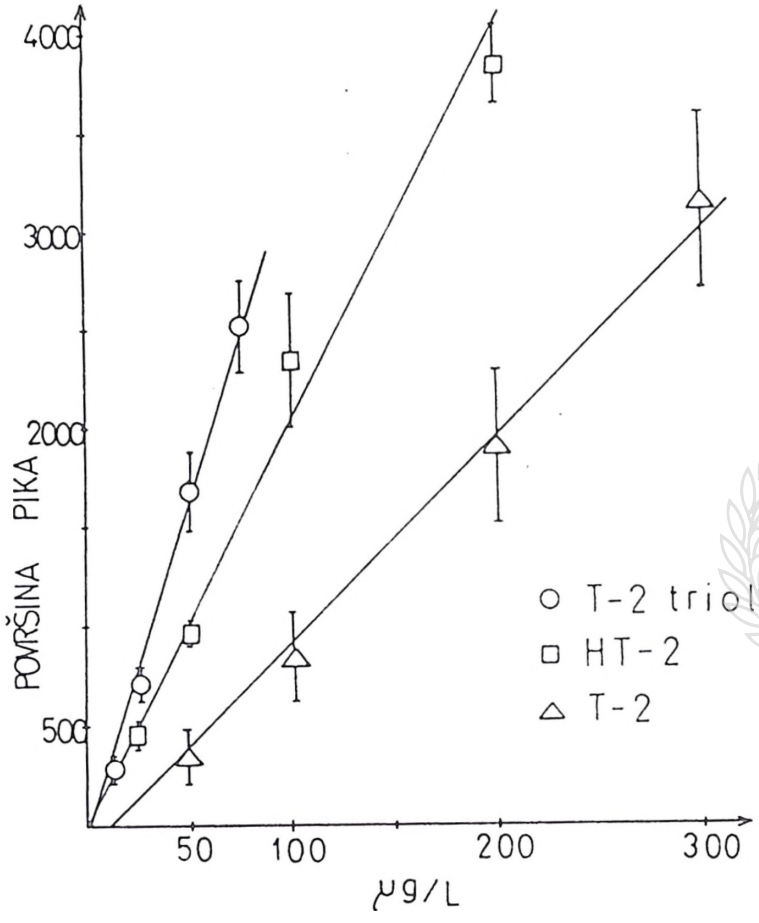


Sl. 1. Hromatogram i maseni spektri TFA derivata trihotecena: A - ukupan jonski hromatogram; maseni spektri: B-200 ng T-2 tetraola, C-100 ng T-2 triola, D-200 ng HT-2 toksina, E-200 ng T-2 toksina. Pik na 16,182 min. je interni standard



Sl. 2. Hromatogrami obrađenih uzoraka seruma. 1 T-2 toksin, 2 interni standard, 3 HT-2 toksin, 4 T-2 triol, 5 T-2 tetraol. A-serum sa: 200 μg/l T-2 toksina, 100 μg/l HT-2 toksina, 50 μg/l T-2 triola i 50 μg/l T-2 tetraola, B-serum sa: 50 μg/l T-2 toksina, 25 μg/l HT-2 toksina, 12,5 μg/l T-2 triola, C-serum bez dodatka toksina.

Baždarne krive za ispitivane toksine (osim za T-2 tetraol, gdje su dobijeni niski prinosi ekstrakcija) su prikazane na slici br. 3. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost od 5 određivanja. Preciznost je najlošija za niske koncentracije T-2 toksina i iznosi oko 30%, dok je za veće koncentracije ispod 20%. Postignute su sledeće detekcione granice: T-2 toksin 15 $\mu g/l$, HT-2 toksin 5 $\mu g/l$, T-2 triol 3 $\mu g/l$ i T-2 tetraol 40 $\mu g/l$.



Sl. 3. Baždarni dijagrami za određivanje T-2 toksina, HT-2 toksina I T-2 triola u serumu. Rasponi označavaju standardnu devijaciju. Korelacioni koeficijenti: ○ r=0,9880, □ r= 0,9925, △ r= 0,9579

Snimajući u masenoj spektrometriji samo pojedine jone iz spektra postoji opasnost gubitka specifičnosti analize. Da bi se ispitala "čistoća" pikova, upoređeni su odnosi intenziteta pojedinih jona iz masenog spektra u smeši standarda sa odnosom istih jona iz realnog uzorka. Razlike u odnosima ni u jednom slučaju nisu veće od 20%, što se smatra prihvatljivim i potvrđuje visoku specifičnost detekcionog sistema.

ANU BiH АНУ БиХ

DETERMINATION OF T-2 TOXIN AND ITS HYDROLITIC METABOLITES IN SERUM BY GAS CHROMATOGRAPHY–MASS SPECTROMETRY

S u m m a r y

Simple and sensitive method for determination of T-2 toxin and its hydrolitic metabolites (HT-2 toxin, T-2 triol and T-2 tetraol) in serum is developed. The method is based on solid phase extraction by SEP PAK C-18 cartridges and derivatisation of extracts by trifluoroacetic anhydride. Derivatives are separated on HP-1 capillary column. Detection mode on mass selective detector was select ion monitoring. Detection limits for T-2 toxin, HT-2 toxin, T-2 triol and T-2 tetraol are 15, 5, 3, and 40 $\mu g/l$ respectivelly. Precission is acceptable except for very small concentration of T-2 toxin.

L I T E R A T U R A

Begley, P., Foulger, B., Jeffery, P., Black, R. (1986): *Detection of trace levels of trichothecenes in human blood using capillary gas chromatography-electron capture negative ion chemical ionisation mass spectrometry*. J. of Chromatogr., 367, 87-101.

Black, R., Clarke, R., Read, R. (1987): *Detection of trace levels of trichothecene mycotoxins in environmental residues and foodstaffs using gas chromatography with mass spectrometric or electroncapture detection*. J. of Chromatogr., 388, 365-378.

Corley, R., Swanson, S., Gullo, G., Johnson, L., Beasley, V., and Buck, W. (1986): *Disposition of T-2 Toxin, a Trichothecene Mycotoxin, in Intravascularly Dosed Swine*. J.Agric.Food. Chem., 34, 868-875.

D'Agostino, P., Provost, L. Drover, D. (1986): *Analysis of trichothecene mycotoxins in human blood by capillary column gas chromatography-ammonia chemical ionization mass spectrometry*. J. of Chromatogr., 367, 77-86.

Gilbert, J. (1989): *Current views on the occurrence and significance of Fusarium toxins*. J. of Appl. Bacteriol.-Sumposium Suppl., 89-98.

Heyndrickx, A., Sookvanichsilp, N., and van Den Heede, M. (1984): *Gas chromatography and toxicological determination of trichothecenes in biological and environmental samples associates with "Yellow Rain"*. First World Congress of New Compounds in Biological and Chemical Warfare: Toxicological Evaluation. Ghent, 110-131.

Kientz, C. and Verweij, A. (1986): *Trimethylsilylation and trifluoroacetylation of a number of trichothecenes followed by gas chromatographic analysis on fused-silica capillary columns*. J. of Chromatogr., 355, 229-240.

Pffeifer, R., Swanson, S., Buck, W. (1988): *Metabolism of T-2 Toxin in Rats: Effects of Dose, Route and Time*. J.Agric.Food. Chem., 36, 1227-1232.

Sintov, A., Bialer, M. and Yagen, B. (1988): *Pharmacocinetics and protein binding of trichothecene mycotoxins, T-2 toxin and HT-2 toxin, in dogs*. Toxicon, 26, 153-160.

Ueno, Y. (1983): *Toxicology*. U: Trichothecenes-Chemical, Biological and Toxicological Aspects (Yoshio Ueno ed.), 135-137. Kodansha l.t.d., Tokyo and Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Oxford and New York.

Ueno, Y., Muto, A., and Kobayashi, J. (1989): *Toxicological properties of T-2 toxin and related trichothecenes*. First World Congress of New Compounds in Biological and Chemical Warfare: Toxicological Evaluation, 160-172, Ghent.

ANU BiH АНУ БиХ