

**О. В. ПРЩЕНКО,****Ю. М. НОВОЖИЦЬКА,** кандидат ветеринарних наук

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи.

**ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА СУЧАСНИХ МЕТОДІВ ВИЗНАЧЕННЯ МІКОТОКСИНІВ**

У статті наведено результати порівняльного вивчення сучасних методів визначення мікотоксинів у зерні та продуктах його переробки, які використовуються в лабораторіях України та країн Європейського співтовариства.

*Ключові слова:* мікотоксини, вискоефективна рідинна хроматографія, тонкошарова хроматографія, імуноферментний аналіз, вискоефективна хроматомаспектрометрія

Ряд захворювань людей та тварин обумовлені присутністю токсинів природного походження-мікотоксинів у зерні та продуктах його переробки. Токсини природного походження мають не меншу небезпеку ніж токсини хімічного походження.

Захворювання, обумовлені мікотоксинами, як правило, не мають характерної клінічної картини або ж перебігають безсимптомно і ускладнюються вторинною мікрофлорою, тому реєструються під іншими діагнозами. Значна кількість мікотоксинів має віддалені ефекти: тератогенний, мутагенний, ембріотоксичний, канцерогенний. Для них характерною є імуносупресивна дія та відсутність сенсифікуючих властивостей [1].

До того ж це досить хімічностійкі сполуки. Їх присутність обумовлена наявністю міцелію токсикогенного гриба, а продукування мікотоксинів пов'язане зі зміною вологості та температурного режиму.

Основними об'єктами забруднення мікотоксинами є сільськогосподарська продукція і, в першу чергу, зерно, яке можливе на всіх стадіях їх вирощування, зберігання, переробки і транспортування [1].

Україна є досить потужною аграрною державою, яка може постачати зерно на свій ринок та ринки країн Європи. Торговельно-економічні відносини різних країн призводять до того, що переглядаються максимально допустимі рівні мікотоксинів в сировині та продукції рослинного та тваринного походження. Постає питання удосконалення методів визначення мікотоксинів і наукового обґрунтування їх максимально-допустимих рівнів. Це буде сприяти визнанню результатів лабораторних досліджень у різних країнах, а також призведе до недопущення неякісної продукції в обіг для населення, неякісних кормів для тварин. Більш точний контроль та недопущення вмісту мікотоксинів в сировині рослинного походження призводить до виготовлення більш якісної продукції. Навіть невеликий вміст мікотоксинів в сировині та продукції рослинного походження є досить нестабільним, а їх кількості можуть, в залежності від температурно-вологого стану, з часом збільшуватись. Наявність мікотоксинів, крім того, прямо пропорційно залежить від присутності міцелію гриба-продуцента мікотоксинів. Особливістю небезпеки мікотоксинів для здоров'я людини і тварин є їх здатність проявляти дію в ультрамінімальних дозах, які не можливо виявити за допомогою низько чутливих методів [1]. Ось чому важливо розробляти та використовувати більш чутливі методи аналізу, що дасть можливість виявити найменші кількості мікотоксинів.

**Метою роботи** було порівняння чутливості, специфічності, точності сучасних та давно відомих методів виявлення мікотоксинів, які використовуються на сьогоднішній час. Встановлення вимог до методів визначення мікотоксинів.

Питання виявлення мікотоксинів розглядається вже досить давно, а отже існують і багато методів. Одні використовують для скринінгового аналізу (тонкошарова хроматографія-ТШХ, імуноферментний аналіз-ІФА), інші для підтвердження (вискоефективна рідинна хроматографія з флуоресцентним детектуванням-ВЕРХ, рідинна маспектрометрія-LS-MS). Відповідно до цілей використання данні методи мають свої недоліки, переваги та межі визначення, які необхідно враховувати при виборі методу аналізу мікотоксинів.

Таблиця 1

**Порівняльна характеристика чутливості методів визначення мікотоксинів.**

Продукція	МДР*, мг/кг	Межа кількісного визначення, мг/кг			
		ТШХ	ІФА	ВЕРХ	LS-MS
1	2	3	4	5	6
<b>Зеараленон</b>					
Комбікорми	2,0-3,0[2,3] 0,1-0,5[5]	0,02-0,04	0,02	0,008-0,05	0,025-0,5[7]
Зерно (кукурудза, овес)	1,0-3,0[4] 0,1[6] 2,0-3,0[5]	0,02-0,04	0,02	0,008-0,05	0,025-0,5[7]
<b>Т-2 токсин</b>					
Комбікорми	0,2-0,25[2,3]	0,1	0,06	-	0,005-0,1[8]
Зерно (кукурудза, овес)	0,1-0,2[4] 0,06[6]	0,1	0,01	-	0,005-0,1[8]
<b>Фумонізин</b>					
Комбікорми	5,0[6] 5,0-50[5]	-	0,07	-	-
Зерно (кукурудза)	5,0[6] 60,0[5]	-	0,07	-	-

1	2	3	4	5	6
<b>Деоксініваленол</b>					
Комбікорми	1,0[2,6] 0,2-5,0[2,5]	0,2	0,1	0,3	-
Зерно (кукурудза, овес)	0,5-2,0[4] 1,0[6] 8,0-12[5]	0,2	0,1	0,35	-
<b>Охратоксин А</b>					
Комбікорми	0,005[6] 0,05-0,1[5]	0,01	0,0006	0,00008-0,0001	0,0025-0,05 [9]
Зерно (кукурудза, овес)	0,005[6] 0,25[5]	0,01	0,0006	0,00008-0,0001	0,0025-0,05 [9]
<b>Афлатоксин В1</b>					
Комбікорми	0,025-0,5 <sup>1</sup> [2] 0,002 <sup>3</sup> [6]	0,001	-	0,00005	0,001-0,02[10]
Зерно (кукурудза, овес)	0,005-0,1 <sup>2</sup> [4] 0,002 <sup>3</sup> [6]	0,001	-	0,00005	0,001-0,02[10]

Примітка: \*МДР-максимально-допустимий рівень

Такий метод, як **тонкошарова хроматографія (ТШХ)** має велике розповсюдження. Аналітична ТШХ є скринінговим, якісним методом аналізу речовин. Необхідно пам'ятати, що інтенсивність кольору плям є досить приблизною кількісною характеристикою. Така оцінка можлива при використанні універсальних проявників, тоді детектування проводиться візуально або за допомогою денситометра. Точність аналізу залежить від чистоти реактивів, кваліфікації фахівця, оскільки важливе візуальне сприйняття. Цей метод використовується в лабораторіях, як альтернативний метод визначення мікотоксинів.

**Імуноферментний метод (ІФА)** є досить чутливим при досить низьких концентраціях оскільки ґрунтується на взаємодії антигену-мікотоксину з антитілом. Оцінка реакції проводиться автоматично на спеціальній апаратурі, що дозволяє стандартизувати ці методи. Це скринінговий метод, що дозволяє за короткий термін провести дослідження великої кількості зразків. Є досить специфічним, високочутливим методом, з високим відсотком відтворюваності, про що свідчать міжлабораторні порівняльні дослідження та збіжність результатів в порівнянні з іншими високоточними методами.

Метод **рідинної хроматографії (ВЕРХ)** з флуорисцентним детектором використовують, як підтверджувальний метод визначення мікотоксинів. Як спосіб аналізу, ВЕРХ входить до складу групи методів, яка, зважаючи на складність досліджуваних об'єктів, включає попереднє розділення вихідної складної суміші на відносно прості компоненти. Сучасні можливості дозволяють використовувати імуноафінну хроматографію для очистки зразків, що ґрунтується на утворенні комплексу антиген-антитіло. Це підвищує відсоток вилучення аналіту з проби, що дозволяє більш точно детектувати мікотоксин на приладі. Принцип **рідинної хроматографії** полягає в розділенні компонентів суміші, заснованому на відмінності в рівноцінному розподілі їх між двома фазами, що не змішуються, одна з яких нерухома, а інша рухома. Відмінною особливістю ВЕРХ є використання високого тиску (до 400 бар) і дрібнозернистих сорбентів (заввищай 3-5 мкм, зараз до 1,8 мкм). Це дозволяє розділяти складні суміші речовин швидко і повно (середній час аналізу від 3 до 30 хв). Метод потребує високоточного обладнання, кваліфікованого персоналу, реагентів особливої чистоти. За даних умов аналіз потребує невеликої кількості реагентів, затрат часу та надає досить високий відсоток вилучення аналіту.

Метод **рідинної хромато-мас-спектрометрії (LC-МС)** є одним із сучасних гібридних методів, який поєднує можливості хроматографічного і мас-спектрометричного аналізів. Мас-спектрометрія дає найкращі результати, коли проба містить одну речовину, а хроматографія стикається з великими труднощами при ідентифікації компонентів складних сумішей, передусім сумішей органічних і неорганічних сполук, однак є найефективнішим методом розділення. Поєднання можливостей мас-спектрометрії і хроматографії у рамках єдиного хромато-мас-спектрометричного методу дає змогу як детектувати, так і ідентифікувати невеликі концентрації органічних сполук у комплексних сумішах, притаманних, зокрема, мікотоксинам. Метод призначений для розв'язання складних аналітичних задач, а саме: ідентифікації та кількісного аналізу складних сумішей невідомих сполук з чіткою ідентифікацією молекул сполук, тому вважається підтверджувальним методом у дослідженні мікотоксинів.

Методи повинні вибиратись виходячи з їх практичного застосування, але перевага надається методам, які валідовані. Регламент комісії ЄС 401/2006 встановлює загальні критерії, яким повинні відповідати методи аналізу, для контролю рівня мікотоксинів. Керівництво для розробки числових значень критеріїв ефективності розроблено Комісією Codex Alimentarius.

Таблиця 2

Розрахунок числових значень критеріїв ефективності[11].

Рівень концентрації (РК), мг/кг	Межа визначення	Показник вилучення аналізу	Точність	Повернення (%)
≥0,1	РК*1/10	РК*1/5	Величина HorRat ≤2	80-110
<0,1	РК*1/5	РК*2/5	<22% (за рівнянням Горвіца/Томпсона)	60-115
0,001	РК*1/5	РК*2/5	за рівнянням Горвіца/Томпсона	40-120

Примітка: Ці критерії можуть застосовуватись, якщо методи пройшли повну процедуру затвердження. Що стосується таких методів, як PCR та Elisa, для них повинен застосовуватись інший набір критеріїв.

Метод повинен примінятись для відповідної аналітичної мети по відповідним зразкам продуктів або категоріям продуктів. До того ж має бути встановлено, при яких рівнях концентрацій (РК) має застосовуватись метод, іншими словами повинен бути встановлений

діапазон значень.

Для  $PK \geq 0,1$ , мінімально допустимий діапазон складає  $PK \pm 3CB_{в}$ , за імовірності 99%

Для  $PK < 0,1$ , мінімально допустимий діапазон складає  $PK \pm 2CB_{в}$ , за імовірності 95 %

де  $CB_{в}$  - стандартне відхилення відтворюваності.

Розрахунок та оцінка відсотку повернення аналіту є частиною підтвердження правильності вибраного методу.

Якщо національним законодавством не вимагаються певні методи визначення рівнів мікотоксинів, лабораторії, які акредитовані за ISO17025, можуть вибрати будь-який метод, якщо вибраний метод відповідає наступним критеріям:

Таблиця 3

**Критерії ефективності для методів визначення мікотоксинів[12]**

Рівень концентрацій, мкг/кг	RSD <sub>p</sub> , %	Збіжність (precision) RSD <sub>R</sub> , %	Повернення %
<b>Афлатоксин М1</b>			
0,01-0,05	розрахована, як $0,66 \times RSD_{R}$ при зацікавленій концентрації	як отримано з рівняння Горвіца	60 - 120 %
> 0,05			70 - 110 %
<b>Афлатоксини В1, В2, G1, G2</b>			
<1,0	розрахована, як $0,66 \times RSD_{R}$ при зацікавленій концентрації	як отримано з рівняння Горвіца	50 - 120 %
1-10			70 - 110 %
> 10			80 - 110 %
<b>Охратоксин А</b>			
<1	≤ 40	≤ 60	50 - 120
1 - 10	≤ 20	≤ 30	70 - 110
<b>Патулін</b>			
<20	≤ 30	≤ 40	50 - 120
20 - 50	≤ 20	≤ 30	70 - 105
> 50	≤ 15	≤ 25	75 - 105
<b>Деоксиніваленол</b>			
> 100 - ≤ 500	≤ 20	≤ 40	60 - 110
> 500	≤ 20	≤ 40	70 - 120
<b>Зеараленон</b>			
≤ 50	≤ 40	≤ 50	60 - 120
> 50	≤ 25	≤ 40	70 - 120
<b>Фумонизин В1 или В2</b>			
≤ 500	≤ 30	≤ 60	60 - 120
> 500	≤ 20	≤ 30	70 - 110
<b>Т-2 токсин</b>			
50 - 250	≤ 40	≤ 60	60 - 130
> 250	≤ 30	≤ 50	60 - 130
<b>НТ-2 токсин</b>			
100 - 200	≤ 40	≤ 60	60 - 130
> 200	≤ 30	≤ 50	60 - 130

*Примітка:* значення застосовуються як до В1, так і до суми В1, В2, G1, G2.

– Межа визначення (detection limits) методів, що використовуються не встановлені, оскільки значення збіжності надаються при зацікавлених концентраціях

– Значення збіжності розраховується з рівняння Горвіца, тобто:

$$RSD_R = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

де:

–  $RSD_R$  – відносне стандартне відхилення, розраховане з результатів, отриманих за умов відтворюваності  $[(sR/\bar{\sigma}) \times 100]$

–  $C$  - показник концентрації (тобто  $1 = 100g/100g$ ,  $0,001 = 1\ 000\ mg/kg$ )

Це загальне рівняння збіжності, яке було отримане, як незалежне від досліджуваної речовини (аналіту) та матриці, але виключно залежить від концентрації для більшості звичайних методів аналізу.

**Висновки.**

1. Перед проведенням лабораторного контролю за залишками мікотоксинів у конкретному харчовому продукті або кормах необхідно вивчити максимально-допустимий рівень, межу кількісного визначення методу, відповідність методу критеріям ефективності.

2. Для отримання конкурентоспроможних результатів лабораторного дослідження необхідне використання підтверджуючих методів визначення рівнів мікотоксинів.

**Список використаної літератури:**

1. Ветеринарна мікотоксикологія: навчальний посібник / [Духницький В. Б., Хмельницький Г. О., Бойко Г. В., Іщенко В. Д.] – К., 2010. – 203с.

2. Обов'язковий мінімальний перелік досліджень сировини, продукції тваринного та рослинного походження, комбікормової сировини, комбікормів, вітамінних препаратів та ін., які слід проводити в державних лабораторіях ветеринарної медицини і за результатами яких видається ветеринарне свідоцтво (ф-2): за №549/9148 від 28.04.2004/ Міністерство юстиції України. – Офіц. вид. – К.: 2004. – 44с.

3. Комбікорм повнораціонний для сільськогосподарської птиці: ДСТУ 4120:2002. – [Чинний від 2003-04-01]. – К.: Держстандарт України, 2003. – 17 с. – (Державний стандарт України).
4. Кукурудза. Технічні умови: ДСТУ 4525:2006. – [Чинний від 2007-07-01]. – К.: Держстандарт України, 2007. – 18с. – (Державний стандарт України).
5. Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding (Text with EEA relevance) (2006/576/EC)
6. Ветеринарно-санитарные правила обеспечения безопасности кормов, кормовых добавок и сырья для производства комбикормов: в редакции постановления Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь 20.05.2011 №33– Минск, 2011. – 34с.
7. Зерно, зернобобові та продукти їх перероблення. Визначення вмісту зеараленону методом рідинної хроматомас-спектрометрії: ДСТУ 4988:2008. – [Чинний від 2009-01-01]. – К.: Держстандарт України, 2009. – 22 с. – (Державний стандарт України).
8. Зерно, зернобобові та продукти їх перероблення. Визначення вмісту Т2 токсину методом рідинної хроматомас-спектрометрії: ДСТУ 4987:2008. – [Чинний від 2009-01-01]. – К.: Держстандарт України, 2009. – 22 с. – (Державний стандарт України).
9. Зерно, зернобобові та продукти їх перероблення. Визначення вмісту охратоксину А методом рідинної хроматомас-спектрометрії: ДСТУ 4991:2008. – [Чинний від 2009-01-01]. – К.: Держстандарт України, 2009. – 20 с. – (Державний стандарт України).
10. Зерно, зернобобові та продукти їх перероблення. Визначення вмісту афлатоксинів В1, В2, G1, G2 методом рідинної хроматомас-спектрометрії: ДСТУ 4990:2008. – [Чинний від 2009-01-01]. – К.: Держстандарт України, 2009. – 23 с. – (Державний стандарт України).
11. Совместная программа ФАО/ВОЗ по стандартам на пищевые продукты. Комиссия Codex Alimentarius. Руководство по процедуре. Двадцатое издание. Всемирная организация здравоохранения Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН. Рим, 2011.
12. Регулювання Комісії ЄС № 401/2006 від 23.02.2006 щодо методів відбору та аналізу проб в рамках державного контролю рівня мікотоксинів в харчових продуктах.

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКОТОКСИНОВ /**  
 О. В. Прищенко, Ю. М. Новожицкая

*В статье приведены результаты сравнительного изучения современных методов определения микотоксинов в зерне и продуктах его переработки, используемых в лабораториях Украины и стран Европейского сообщества.*

*Ключевые слова: микотоксины, высокоэффективная жидкостная хроматография, тонкослойная хроматография, иммуноферментный анализ, высокоэффективная хроматомасспектрометрия*

**MODERN METHODS OF MYCOTOXINS DETERMINATION. (COMPARATIVE CHARACTERISTICS) /** O. Prishchenko, Y. Novozhitskaja

*There are many human and animal diseases caused by the presence in cereals and its products of naturally occurring toxins - mycotoxins. These toxins are not less dangerous than chemical toxins.*

*Diseases caused by mycotoxins mostly have not specific clinical picture or asymptomatic. Also such diseases are complicated by secondary microflora and accepted as other diagnoses. Many of mycotoxins possess long-term effects: teratogenic, mutagenic, embryotoxic, carcinogenic. They are characterized by immunosuppressive effect and absence by sensitizing properties.*

*In addition mycotoxins are quite chemically stable compounds. Their presence is due to the presence of toxigenic fungus mycelium and production of mycotoxins associated with changes of humidity and temperature.*

*The main objects of mycotoxin contamination are agricultural products especially grain. Contamination is possible at all stages of production, storage, processing and transportation of such products.*

*Today mycotoxins determining and scientific substantiation of its maximum permissible levels are actual problems. High quality products production provided by precise laboratory control and prevention of contamination of raw materials. Specific hazard of mycotoxin action to human and animal health is their ability to demonstrate the negative effect at low concentrations, which can not be detected by low-sensitive methods. Therefore it is important to develop and use in practice more sensitive methods of determination.*

*The purpose of our work was to compare sensitivity, specificity and accuracy of modern and well-known detection methods for mycotoxins that are used today. Installation requirements for methods determination of mycotoxins.*

*Question about detection of mycotoxins has been asked for some time and therefore there are many methods of its determination. Some of them are used for screening analysis (thin layer chromatography, ELISA), other confirm results (high performance liquid chromatography with fluorescence detection, LS-MS). Depending of aim all these methods have their advantages, disadvantages and limits of determination that should be considered when we choose the method.*

*Such method as thin layer chromatography (TLC) is widely spread. Analytical TLC is a screening, qualitative method of substances analysis. The intensity of the color stain is pretty approximate quantitative characteristic. Such an assessment is possible when universal developers are using and detection is performing visually or by using densitometer. The accuracy of the detection depends on the reagents purity and qualification of specialists because visual assessment is very important. In laboratories this method is used as an alternative method for mycotoxins determination.*

*ELISA method is based on the interaction of antigen to antibody and sensitive at low concentrations of mycotoxins. Evaluation of the reaction is carried out automatically by special equipment that allows to standardize these methods. This is a screening method that allows to conduct examination of numerous samples for a short time. This is quite specific, highly sensitive method.*

*The method of liquid chromatography (HPLC) is used as a confirmatory method for mycotoxins determination. As a method of analysis, HPLC is part of methods that, given the complexity of the objects, includes the separation of complex mixtures on simple components. The modern capabilities allow use immunoaffinity chromatography for purification of samples based on the formation of antigen-antibody complex. This improves recovery of the analyte from the sample, which allows more accurate detect mycotoxin with the help of appliance. This method requires sensitive equipment, qualified personnel and high purity reagents. At that rate, method needs small amounts of reagents, expenses of time and provides a fairly high percentage recovery.*

*Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) is one of modern hybrid methods that combines chromatographic and mass spectrometric analysis. Combining capabilities of mass spectrometry and chromatography under the single chromatography-mass spectrometry method allows us to detect and identify of small concentrations of mycotoxins. This is a confirming method in the determination of mycotoxins.*

*Methods should be selected based on their practical application, but priority is given to methods that are validated. Commission Regulation EC 401/2006 establishes common criteria to methods determination for mycotoxins. Manual for the development of numerical values is developed by the Codex Alimentarius Commission.*

*The method should be used for appropriate analytical purposes or products categories. Moreover it must be established in which concentration levels should be method apply. Calculation and evaluation of the recovery percentage are part of confirmation correctness of the selected method.*

*Keywords: mycotoxins, high performance liquid chromatography, thin layer chromatography, ELISA, LS-MS-MS.*

**Рецензенти**—кандидат ветеринарних наук **Г. В. Київська**,  
завідувач відділу гармонізації законодавства до міжнародних вимог **М. П. Осташок**

Рукопис надійшов 19.08.2014 року.