

О. М. ВАСЯНОВИЧ, кандидат сільськогосподарських наук

В. О. ПОСТОЄНКО, доктор сільськогосподарських наук

І. С. САПСАЙ, аспірант

О. А. САМОЙЛОВА, пошукач

Інститут ветеринарної медицини, м. Київ

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ МІКОТОКСИНІВ В КОРМАХ МЕТОДОМ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

У статті проаналізовано літературні джерела та проведено аналіз використання тонкошарової хроматографії для виявлення мікотоксинів при застосуванні різних проявників. Проведено аналіз різних розчинників та проявників для ТШХ.

Ключові слова: мікотоксини, тонкошарова хроматографія, розчинники, силуфолові пластини.

Серед багатьох факторів навколишнього середовища токсичні речовини -мікотоксини, які утворюються пліснявими грибами, в останній час звертають на себе все більше уваги. Токсигенні гриби дуже широко розповсюджені в природі, а при несприятливих умовах (висока вологість, температура) вони можуть вражати різні харчові, кормові, продовольчі субстрати та наносити значну шкоду народному господарству. Не випадково, мікотоксини введені в перелік речовин регламентованих в харчових продуктах, кормах та продовольчій сировині [1].

Згодуювання кормів, забруднених мікотоксинами, завдає тваринництву великих економічних збитків - гинуть тварини, знижується продуктивність, недоодержується прихід. Потенційна і реальна загроза мікотоксинів обумовлюється стабільним виживанням за умов високих температур, обробки мінеральними кислотами, лугами та іншими реагентами. Механізм дії мікотоксинів залежить від їх хімічної будови. Більшість з них відносять до сполук першого класу токсичності, що проявляють дермoneкротичну, мутагенну, тератогенну, ембріотоксичну та канцерогенну дію [2].

Через неможливість запобігти ураженню сільськогосподарських культур і кормів мікроскопічними грибами потрібно приділяти більшу увагу методам визначення наявності мікотоксинів, яких на сьогоднішній день нараховується кілька десятків [3].

У мікотоксикології, часто спостерігаються ефекти синергічної дії токсинів, за якої їх дія різко підсилюється, викликаючи загибель тварин, а також птиці. Спільну дію токсинів визначити дуже складно через її залежність від співвідношення та концентрації окремих видів токсинів, які практично ніколи не повторюються. Іноді наявність мікотоксинів нижча за МДР, але їх загальна дія руйнівна [4].

Найдоступнішим методом визначення спільної дії токсинів у кормах є дослідження на обмежених групах тварин або птиці для яких було виготовлено ці корми, але ця робота довготривала [5].

Токсико-біологічні методи дослідження, в яких задіяні різні тест-системи (мікроорганізми, найпростіші, риби гупі, культура клітин, шкіряна проба на кролях та інш.), не відрізняються високою чутливістю, тому їх застосовують як якісні чи напівкількісні тести.

До аналітичних методів, що дозволяють з високою точністю визначати низькі концентрації мікотоксинів, відносять імунні та фізико-хімічні методи. Перші включають моноклональну афінну хроматографію та імуноферментний аналіз (ІФА); другі хроматографічні - тонкошарову (ТШХ), високоєфективну рідину (ВЕРХ) та газову (ГХ). Мас -спектрофотометрію (МС) використовують як окремий метод або в поєднанні з ГХ чи ВЕРХ [6].

Серед хроматографічних методів найбільш широко застосовують тонкошарову хроматографію. Це зумовлено вдалим співвідношенням таких критеріїв оцінки методу, як швидкість та простота виконання, невисока вартість обладнання, можливість одночасного визначення мікотоксинів різних груп.

Метою нашої роботи було удосконалення методів використання тонкошарової хроматографії в лабораторних визначеннях мікотоксинів.

Матеріали та методи: Дослідження проведені в лабораторії з використанням силуфолових пластин «Сорбфіл» та «Сорбфіл УФ – 254» (ЗАО Сорбполімер, Україна), стандартних розчинів та екстрактів культур грибів-продуцентів мікотоксинів.

На хроматографічну пластину на відстані 1,5 см від нижнього краю пластини й 1 см від бокових країв наносили мікрошприцем розчин мікотоксинів у межах чутливості методів. Пластини з нанесеним екстрактом сушили у витяжній шафі та хроматографували у відповідній системі розчинників. Фронт розчинників повинен піднятися на висоту 10-12 см від старту. Пластину виймали, сушили та проглядали в УФ променях з відповідною довжиною хвилі. Інші умови проведення ТШХ детально описані в літературі [7].

Результати досліджень: Процес визначення мікотоксинів в пробах складається з двох етапів: їх екстрагування з проби кормів та часкової очистки екстракту від коекстрактивних речовин, що заважають аналізу; процедури розділення на пластинках з сорбентом для хроматографії з використанням суміші органічних розчинників, що забезпечують оптимальний поділ аналізованої речовини.

Стадія очищення екстрактів від коекстрактивних речовин залишається одним з основних етапів визначення мікотоксинів.

Крім загальноприйнятих методів очистки в лабораторії використовується метод розгонки силуфолових пластин в гексані. Для цього пластину розміщували в хроматографічній камері і тримали її після підняття фронту гексану до краю пластини, витримуючи після цього одну годину. Пластину висушували і ставили в систему розчинників до підняття фронту на висоту 10-12 см від старту. Після висушування під витяжною шафою пластину продивлялися в променях УФ з довжиною хвилі 365 та 254 нм.

Таблиця №1

Кольорові реакції – підтвердження наявності мікотоксинів

Мікотоксини	Рухлива фаза та її співвідношення	Колір ТШХ	Rf	Проявник
1	2	3	4	5
Т-2 токсин	ЕТ (етилацетат; толуол) 3:1(толуол: етилацетат: мураш.кислота) 6:1:1	Темно-сірий (без проявника) УФ-голубий (з проявником)	0,42 ТЕМ – 0,29	20 % спиртовий розчин H ₂ SO ₄ t 130 °C – 3 хв
Зеараленон	ТЕМ 6:3:1	Блакитно-сірий (без проявника) Зелений (з проявником)	0,54	20 % спиртовий розчин AlCl ₃ , t 80 °C – 5 хв
Вомітоксин	ТЕМ 5:4:1 Б:Е (бензол-етилацетат) 6:2	Голубий (без проявника), Жовтий (з проявником)	0,2 0,3	10 % спиртовий розчин AlCl ₃ , t 93 °C 15 хв

1	2	3	4	5
Авфлатоксин В ₁	ТЕМ 6:3:1, 5:4:1	Фіолетовий (без проявника), Жовтий (з проявником)	0,36	Водний розчин ННО ₃ 3:1
Авфлатоксин В ₂	ТЕМ 6:3:1	Фіолетовий (без проявника), Жовтий (з проявником)	0,31	Водний розчин ННО ₃ 3:1
Авфлатоксин G ₁	ТЕМ 6:3:1	Зелений без проявника), Жовтий (з проявником)	0,28	Водний розчин ННО ₃ 3:1
Патулін	ТЕМ 6:3:1, 5:4:1	Фіолетовий (без проявника), Жовтий (з проявником)	0,36	Камера з хлором 0,5 % розчин гідро хлориду бензидину КМnO ₄ – знебарв.
Стеригматоцистин	ТЕМ 6:3:1	Зелено-жовтий (без проявника), цегляно-червоний (з проявником)	0,78	20 % спиртовий розчин AlCl ₃ t 80 °C – 5 хв
Косва кислота	ТЕМ 5:4:1	Темно-фіолетовий (без проявника), цегляно-червоний (з проявником)	0,2	1 % розчин FeCl ₃
Охратоксин	ТЕМ 5:4:1	Зелено-голубий (без проявника), темно-голубий (з проявником)	0,59	В парах аміаку
Цитринін	Е: Ацетон: Н ₂ O 1:1:1	Жовтий (без проявника), голубий (з проявником)	0,5	20 % спиртовий розчин AlCl ₃ t 80 °C – 5 хв

Основні складності, які виникають при такому дослідженні, пов'язані з наявністю на пластині в пробі речовин, що також піддаються флуоресценції. Для підтвердження надійності хроматографічного методу ми застосовували ряд тестів, що ґрунтуються на отриманні різних за кольором плям (табл.№1).

Сама методика базується на прямому нанесенні проявників на пляму з мікотоксином, оприскування або розміщенні її в парах проявників. Для виявлення Т-2 токсину, зеараленону, вомітоксину, стеригматоцистину та цитриніну, пластини, після обробки проявником, додатково прогривають. Після чого колір плями мікотоксину змінюється.

Проаналізувавши літературні джерела та провівши досліди в лабораторних умовах було запропоновано ряд схем застосування проявників для різних мікотоксинів. Як використання того чи іншого проявника дає можливість підтвердити наявність токсинів пліснявих грибів.

Описані методи можуть успішно використовуватись у лабораторіях з визначення мікотоксинів. Спосіб застосування тонкошарової хроматографії відзначається простотою і швидкістю виконання, не складною підготовкою проб та є економічно вигідним.

Висновки:

1. Модернізовано методику проявлення мікотоксинів на тонкошаровій хроматографії, яка дає можливість ідентифікувати той чи інший мікотоксин не застосовуючи додаткової очистки від коекстрактивних речовин.

2. Застосування кольорових реакцій дає можливість спеціалістам збільшити межу виявлення того чи іншого мікотоксину в пробі.

Список використаної літератури:

1. Хмельницький Г. О. Обґрунтування системи контролю кормів за вмістом Т-2 токсину // Г. О. Хмельницький, В. Б. Духницький, Г. В. Бойко / Тези доповідей конференції проф.-викл. складу і аспірантів навчально-наукового інституту ветеринарної медицини, якості і безпеки продукції АПК. – 2004. – С. 112-113.

2. Васянович О. М. [та ін.] Моніторингові дослідження мікобіоти кормів з різних регіонів України // О. М. Васянович [та ін.] / Ветеринарна біотехнологія. – 2004. – № 4. – С. 27-30.

3. Григоренко М. С. Моніторинг кормів уражених грибами –продуцентами мікотоксинів / М. С. Григоренко // Ветеринарна біотехнологія. – 2010. – №17. – С. 66-71.

4. Huwig, A., S. Freimund, O. Käppeli, and H. Dutler. 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. Tox. Lett. 122: 179-188.

5. Апшмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л., 1962. – 180 с.

6. Міждержавний стандарт. Зерно фуражне, продукти його переробки, комбікорми. Метод визначення токсичності ДСТУ 3570-97/ГОСТ 13496.7-97.-Затв.28.02.98р.№125, введений в дію 01.07.99 р.

7. Скринінг-метод одночасного виявлення афлатоксину В₁, патуліну, стеригматоцистину, Т-2 токсину, зеараленону та вомітоксину в різних кормах. – Затв. Держдепартамент вет. мед. Мін. АПК України 09.04.1996р.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МИКОТОКСИНОВ В КОРМАХ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ /

О. Н. Васянович, В. А. Постоенко, И. С. Сапсай, Е. А.Самойлова

В статье проанализированы литературные данные использования тонкослойной хроматографии для определения микотоксинов при помощи разных проявителей. Показано, что описанные методы хроматографии, направленные на выявления микотоксинов, могут успешно использоваться в микотоксинологических лабораториях. Метод тонкослойной хроматографии примечателен простотой и скоростью выполнения несложной подготовки проб, а также является экономически выгодным.

Проведен анализ разных растворителей, а также разных проявителей в тонкослойной хроматографии.

Использование цветных реакций позволяет специалистам не только подтвердить наличие токсина, но и повышает предел обнаружения микотоксинов в образце.

Ключевые слова: микотоксины, тонкослойная хроматография, растворители, силуфоловые пластины.

DETERMINATION OF THE MYCOTOXIN CONTENT IN FEED USING THIN LAYER CHROMATOGRAPHY / O.M. Vasianovych,

V. O. Postoienko, I.S. Sapsai, H.A. Samoylova

The paper shows the analysis of literature data of thin layer chromatography for mycotoxin detection using different revealing reagents. It is approved all described methods of chromatography can be successfully used in mycotoxicological laboratories. Method of thin layer chromatography is noticeable to its simplicity, sample quick and easy preparation, as well as economically grounded.

Analysis of different solvents as well as revealing reagents used in thin layer chromatography have been conducted.

The use of color reactions enables professionals not only confirm the presence of a toxin, but also increases the limit of detection of mycotoxins in the sample.

Keywords: mycotoxins, thin layer chromatography, solvents, silufof plates.

Рецензент – доктор ветеринарних наук В. Л. Коваленко

Рукопис надійшов 18. 09. 2014 року