

Assessment of the Conformity of the Methods for Aflatoxin B₁ and Deoxynivalenol Determination in Grain and Feeds by Method of High-Performance Liquid Chromatography

O.M. Yakubchak[†], O.A. Laposha[†], S.V. Midyk^{*†}, T.V. Taran[†], I.V. Zabarna[‡]

[†] National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Potetchina st., 16, Kyiv, 03041;

[‡] The State Agrarian and Engineering University in Podilia, Shevchenko str, 13, Kamianets-Podilskyi, Ukraine, 32300

*e-mail: svit.mid@gmail.com

Received: August 28, 2018; Accepted: September 27, 2018

DOI: 10.17721/moca.2018.xx-xx

The suitability of methods for determination of residual amounts of aflatoxin B₁ and deoxynivalenol in grain, products and feeds from grain by the method of high-performance liquid chromatography with validation criteria was evaluated: linearity, detection limit, specificity, intralaboratory reproducibility, correctness (return). It was concluded that the methods for determining in cereal cultures of aflatoxin B₁ and deoxynivalenol content with purification on immunoaffinity columns by the method of high-performance liquid chromatography are suitable for the study of grain, products and feeds from grain and can be used by laboratories for conducting similar studies. Adapted methods of mycotoxins determination are highly sensitive and meet European requirements according to their parameters. The recovery percentage is 85.8 ± 3.65% for all the concentrations of aflatoxin B₁ analyzed. It corresponds to the minimum allowable value according to Commission Decision 2002/657 / EC, with the coefficient of variation (CV,%) being 2.13 ± 0.67 and is in accordance with Commission Decision 2002/657 / EC. The recovery rate is 89.2 ± 5.3% for all analyzed concentrations of deoxynivalenol, which corresponds to the minimum allowable value according to Commission Decision 2002/657 / EC, the coefficient of variation (CV, %) is 9.4 ± 1.65 and is suitable

Keywords: mycotoxins, aflatoxin B₁, deoxynivalenol, grain, feed, high-performance liquid chromatography

Оцінка придатності методик з визначення афлатоксину B₁ та деоксиніваленолу в зерні і кормах методом високоефективної рідинної хроматографії

O.M. Якубчак[†], O.A. Лапоша[†], С. В. Мідик^{*†}, Т.В. Таран[†], І. В. Забарна[‡]

[†] Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Полковника Потехіна, 16, м.Київ, 03041;

[‡] Подільський державний аграрно-технічний університет, вул. Шевченка 13, м. Кам'янець-Подільський, Україна, 32300; *e-mail: svit.mid@gmail.com

Надійшла: 28 серпня 2018 р; Прийнята: 27 вересень 2018 р

DOI: 10.17721/moca.2018.xx-xx

Проведено оцінку придатності методик для визначення залишкових кількостей афлатоксину B₁ та деоксиніваленолу в зерні, продуктах і кормах із зерна методом високоефективної рідинної хроматографії за валідаційними критеріями: лінійність, межа виявлення, специфічність, внутрішньолабораторна відтворюваність, правильність (повернення). Встановлено, що методики з визначення у зернових культурах вмісту афлатоксину B₁ та деоксиніваленолу з очисткою на імуноафінних колонках методом високоефективної рідинної хроматографії є придатними для дослідження зерна, продуктів і кормів із зерна та можуть використовуватися лабораторіями для проведення аналогічних досліджень. Адаптовані методики з визначення мікотоксинів є високочутливими та за своїми параметрами відповідають європейським вимогам. Для всіх проаналізованих концентрацій афлатоксину B₁ відсоток повернення складає 85.8±3.65%, що відповідає мінімально допустимим значенням згідно Commission Decision 2002/657/EC, при цьому коефіцієнт варіації (CV, %) складає 2.13±0.67 і є відповідним згідно Commission Decision 2002/657/EC. Для всіх проаналізованих концентрацій деоксиніваленолу відсоток повернення складає 89.2±5.3%, що відповідає мінімально допустимим значенням згідно Commission Decision 2002/657/EC, коефіцієнт варіації (CV, %) складає 9.4±1.65 і є відповідним.

Ключові слова: мікотоксини, афлатоксини B₁, деоксиніваленол, зерно, корми, високоефективна рідинна хроматографія

Мікотоксини – це продукти життєдіяльності (метаболіти) мікроскопічних грибів (плісень), які можуть вражати кормові рослини під час їх вегетації та зберігання. Вони присутні майже в усіх видах сільськогосподарських продуктах в усьому світі [1].

Мікотоксини – найбільш небезпечні для здоров'я тварин і людини. Вони можуть забруднювати продукти харчування та корми на всіх стадіях виробництва, зберігання, транспортування та реалізації. Є природними забруднювачами зерна злакових, бобових, насіння соняшнику, а також овочів і фруктів. Дослідження, які проводилися як вітчизняними так і зарубіжними вченими свідчать про можливість високої частоти і ступеню ураженості харчових продуктів і кормів. Нині виділено близько 350 видів мікроскопічних грибів, які продукують близько 400 мікотоксинів, з яких більшість викликають аліментарні токсикози тварин і людини. Мікотоксини виробляються різними штамми грибів і кожен штам може продукувати декілька мікотоксинів. Значна кількість мікотоксинів володіють імунодепресивними, мутагенними, алергенними, тератогенними і канцерогенними властивостями, сприяють зниженню загальної резистентності організму, розвитку інфекційних і неінвазивних хвороб. Наявність мікотоксинів у кормах призводить до погіршення продуктивності, репродуктивності та імунного стану тварин, спричиняє ряд їх захворювань [1–7].

Одним із показників безпечності харчових продуктів і кормів є дослідження вмісту мікотоксинів. Поширеними мікотоксинами є афлатоксини В₁, В₂, G₁, G₂ та деоксиніваленон. Цими токсинами можуть бути уражені зернові культури, корми, призначені для сільськогосподарських тварин, і готові харчові продукти.

Ряд світових вчених проводять дослідження щодо удосконалення, спрощення процесу, скорочення часу пробопідготовки, зниження собівартості та одночасного визначення максимальної кількості мікотоксинів [4, 8–12].

Існують різні методи визначення мікотоксинів, але перевага надається арбітражним кількісним підтверджуючим методам. Так, застосовують метод високоефективної рідинної хроматографії (HPLC) з метою визначення вмісту афлатоксину В₁ та суми афлатоксинів В₁, В₂, G₁ та G₂ у зернових культурах [13]. Деоксиніваленон визначають також методом високоефективної рідинної хроматографії з використанням імуноафінних колонок, але в Україні не має чинного нормативного документа за цим методом. Нині в Україні регламентується визначення деоксиніваленолу тільки методом імуноферментного аналізу [14]. Існують також європейські стандартизовані методи визначення мікотоксинів у різних матрицях (харчові продукти) [15, 16].

Гармонізація Українського законодавства до

світових норм та норм, прийнятих у ЄС, вимагає узгодження національних вимог до контролю за безпечністю кормів для продуктивних тварин, що дасть можливість експортувати сільськогосподарську продукцію за межі України. Відповідним чином мають бути переглянуті вимоги до методів контролю вмісту мікотоксинів у кормовій сировині та кормах.

У зв'язку з гармонізацією законодавства України до вимог ЄС та членством України в СОТ особливої актуальності набуває впровадження системи якості в незалежних лабораторіях та в лабораторіях на потужностях із виробництва харчових продуктів і кормів. Зокрема це стосується хіміко-аналітичних випробувальних лабораторій, які займаються контролем безпечності та якості харчових продуктів [17]. Необхідно зазначити, що в країнах Європейського Союзу вимоги до вмісту чужорідних та токсичних сполук в продуктах харчування достатньо жорсткі [18]. При цьому має бути доведена ефективність та відтворюваність кожного методу, який застосовується для аналізу харчових продуктів і кормів [19]. Досягнути цього можна, провівши оцінку придатності (валідацію) методу згідно загальноприйнятих та перевічених підходів, які, зокрема, представлено в Commission Decision 2002/657/EC [20]. Цей нормативно-правовий акт містить правила для хіміко-аналітичних методик, що використовуються під час дослідження проб, відібраних відповідно до другого положення статті 15 Директиви 96/23/EC і визначає загальні критерії інтерпретації отриманих результатів у лабораторіях. З урахуванням послідовного, докладного та чіткого викладення процедури валідації, підбору її критеріїв та опрацювання отриманих даних, Commission Decision 2002/657/EC можна використати як основу для проведення валідації будь-якого аналітичного методу досліджень.

Метою роботи було визначення придатності методик для виявлення залишкових кількостей афлатоксину В₁ та деоксиніваленолу в зерні та кормах методом високоефективної рідинної хроматографії за валідаційними критеріями: лінійність, межа виявлення, специфічність, внутрішньолабораторна відтворюваність, правильність (повернення).

Матеріали і методи досліджень

Дослідження проводили на базі Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК (УЛЯБП АПК) Національного університету біоресурсів і природокористування (НУБіП) України, у складі якої знаходиться науково-дослідний центр моніторингу якості та безпеки агроресурсів і продукції АПК. Він забезпечений сучасним вимірювальним обладнанням, автоматизованими комп'ютерними системами, чисельними базами даних. УЛЯБП АПК – атестована Всеукраїнським державним

науково-виробничим центром стандартизації, метрології, сертифікації та захисту прав споживачів (Укрметртестстандарт). Система управління якістю УЛЯБП АПК побудована відповідно до вимог ДСТУ ISO/IEC 17025:2006 (ISO/IEC 17025:2005), що підтверджено Атестатом акредитації національного агентства з акредитації України.

Під час оцінки придатності методики з визначення вмісту афлатоксину B_1 у зернових культурах методом високоефективної рідинної хроматографії (HPLC) використовували рідинний хроматограф Shimadzu LC-20A з флуоресцентним детектором. Для аналізу застосовували аналітичні обернено-фазні колонки C18: Supelco Ascentis™, довжиною 150 мм, внутрішнім діаметром 4.6 мм, сорбентом з розміром часток 5.0 мкм та передколонку хроматографічну обернено-фазну Supelguard™ Ascentis™, довжиною 20.0 мм, внутрішнім діаметром 4.0 мм, сорбентом з розміром часток 5.0 мкм, 5 μ m kit.

Для оцінки придатності методики з визначення вмісту деоксиніваленолу (ДОН) в зернових культурах методом HPLC з очисткою на імуноафінних колонках використовували рідинний хроматограф Ultimate 3000 з діодно-матричним детектором. Для аналізу застосовували колонку хроматографічну Supelco Discovery C18, довжиною 250.0 мм, внутрішнім діаметром 4.6 мм, розміром часток 5.0 мкм.

Рухома фаза для визначення афлатоксину B_1 – ацетонітрил:вода:метанол (2:6:2), яка містить калію бромід у концентрації 0.12 г/л та 200 мкл/л азотної кислоти; для визначення деоксиніваленолу використовували рухома фазу ацетонітрил:вода:метанол (3:94:3).

Умови хроматографічного аналізу для визначення афлатоксину B_1 :

- 1) швидкість потоку: 1 см³/хв;
- 2) об'єм уведення: 20 мкл;
- 3) температура термостата колонки: 40°C;
- 4) довжини хвиль: λ_{ex} = 362 нм; λ_{em} = 440 нм.

Умови хроматографічного аналізу для визначення деоксиніваленолу:

- 1) швидкість потоку: 1 см³/хв;
- 2) об'єм уведення: 20 мкл;
- 3) температура термостата колонки: 30°C;
- 4) температура автосамплера: + 13°C
- 5) довжина хвилі: 218 нм.

Контролем слугували проби зерна злакових культур (пшениця, ячмінь), які попередньо були проконтрольовані на відсутність у них цільових аналітів. Внесення мікотоксинів у контрольні зразки до рівня необхідної концентрації проводили стандартними розчинами. Використовували стандартний сертифікований зразок афлатоксину B_1 із концентрацією 25 мкг/мл виробництва Trilogy та стандартний зразок деоксиніваленолу з концентрацією 1000 мкг/мл виробництва Sigma-aldrich. Стандарти зразки та дослідні проби

зберігали за відповідних умов мікроклімату приміщень з підготовки проб: температура – 20±5 °С, вологість – до 80%. Паралельно готували зразки з додаванням відповідних мікотоксинів та проводили контроль чистоти реактивів.

У роботі було використано імуноафінні колонки AFLAPREP® та DONPREP®, призначені для виділення афлатоксинів B_1 , B_2 , G_1 і G_2 і деоксиніваленолу зі злаків, виробництва компанії R-BIOPHARM RHONE LTD. Дослідження проводили згідно методичних рекомендацій щодо використання зазначених колонок [21–22].

Методика визначення афлатоксину B_1 . Оскільки в ДСТУ EN 12955-2001 [13] чітко не зазначено вид та виробників імуноафінних колонок, які необхідно застосовувати під час аналізу, нами для постановки методики було використано колонки AFLAPREP®, які роблять процедуру очищення зразків більш зручною. При цьому підвищується чутливість методу за рахунок збагачення аналізу та очищення його від компонентів матриці, збільшується швидкість аналізування. Тому запропонована нами робоча методика впливає із використаної нами колонки AFLAPREP®. Для цього зважували 50 г гомогенізованої проби і додавали 5 г натрію хлористого та 100 см³ 80 % метанолу.

Для підтвердження наявності афлатоксину B_1 у зразку методом HPLC необхідно проводити дериватизацію, котра підвищує природну флуоресценцію токсину під УФ-світлом і робить їх детекцію більш легкою. Традиційно для цієї мети використовують складну хімічну дериватизацію. Однак вона має суттєві обмеження, котрі можливо подолати за допомогою лунки КОБРА.

Під час електрохімічної дериватизації афлатоксину B_1 на лунці КОБРА виникає реакція зв'язування з бромідом (час реакції 4 сек за кімнатної температури). При цьому не потрібно додаткового обладнання і щоденної підготовки реагентів, на відміну від застосування йоду [13] в якості деривату.

Отже, оцінку придатності та валідацію робочої методики проводили з урахуванням використовуваних нами вищезазначених імуноафінних колонок і лунки КОБРА. Згідно методичних рекомендацій щодо використання імуноафінних колонок AFLAPREP® [21] та ДСТУ EN 12955-2001 [13] процедура оцінки придатності методики включає такі основні етапи: екстракція метанолом, фільтрація, утримання афлатоксинів, відмивання, елюювання, визначення афлатоксинів за допомогою високоефективної хроматографії. Подальша валідація показала, що запропонована нами робоча методика є оптимальною для рідинного хроматографа Shimadzu (Японія) в умовах цієї лабораторії.

Визначення деоксиніваленолу згідно розробленої нами методики включає такі основні етапи: екстракція деіонізованою водою, фільтрація

(центрифугування), утримання деоксиніваленолу в імуноафінній колонці DONPREP®, відмивання імуноафінної колонки DONPREP®, елюювання деоксиніваленолу з імуноафінної колонки DONPREP®, випаровування елюату, розведення рухомою фазою, визначення деоксиніваленолу за допомогою вискоэффективної хроматографії. При цьому відбирали 25 г дрібно перемеленої проби ячменю, додавали 5 г натрію хлориду, додавали 200 см³ дистильованої води та екстрагували 30 хв на шейкері. Екстракт відфільтровували та пропускали через імуноафінну колонку DONPREP®. Методику відпрацьовували на рідинному хроматографі Dionex ICS 3000 (США).

Оцінювання придатності методик проводили відповідно до Commission Decision 2002/657/EC, що забезпечує виконання Директиви Ради ЕС 96/23/EC, яка стосується ефективності аналітичних методів та інтерпретації результатів [20].

Результати досліджень та їх обговорення

Оцінку валідаційних критеріїв (лінійність, межа виявлення, межа кількісного визначення, специфічність, внутрішньолабораторна відтворюваність, правильність) та їх параметрів розпочинали з визначення типу обраного методу. В даному випадку метод HPLC є кількісним. Це аналітичний метод, який визначає кількість або масову частку речовини таким чином, що вона може бути виражена у вигляді числового значення відповідних одиниць [20]. Одним із найважливіших критеріїв кількісного аналітичного методу є правильність – ступінь близькості між середнім значенням, що отримано із серії результатів досліджень та прийнятим значенням. Даний критерій відображає, наскільки отриманий результат відповідає фактичному значенню і для його визначення дослідники зобов'язані використовувати сертифікований референтний матеріал. У разі його відсутності дозволено використовувати спосіб додавання стандартів до чистої матриці з наступним визначенням аналізу та відповідним розрахунком відсотку повернення (П). Згідно рекомендацій вище зазначеного рішення для речовин зі встановленим максимально допустимим рівнем (МДР), зразок потрібно збагатити аналітом

у трьох концентраціях, що становлять 0.5; 1 та 1.5 від МДР по десять зразків для кожної. МДР афлатоксину В₁ згідно Commission Regulation EC №1881/2006 [18] для зерна та продуктів із зернових культур становить 2 мкг/кг.

Матрицю (борошно ячменю) на вміст/відсутність афлатоксину В₁ було проаналізовано оператором І. Згідно отриманих даних у матриці афлатоксин В₁ відсутній.

Основні критерії валідації для кількісного підтверджуючого методу *визначення вмісту афлатоксину В₁* у зернових культурах згідно Commission Decision 2002/657/EC:

- лінійність (калібрувальна крива);
- межа виявлення (LOD);
- межа кількісного визначення (LOQ);
- специфічність (селективність);
- внутрішньолабораторна відтворюваність;
- правильність (повернення).

Визначення лінійності [20] проводили використовуючи наявні стандартні розчини афлатоксинів В₁ було приготовлено десять концентрацій, враховуючи нуль – 0 нг/см³; 0.05 нг/см³; 0.1 нг/см³; 0.5 нг/см³; 1.0 нг/см³; 2.0 нг/см³; 5.0 нг/см³; 10.0 нг/см³; 20.0 нг/см³; 40.0 нг/см³ (не менше ніж у трьох паралелях) (рис. 1).

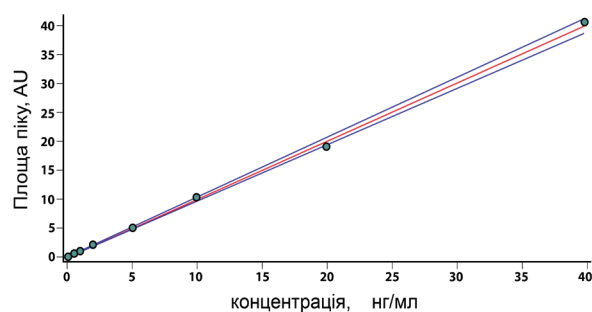


Рис. 1. Градувальний графік для визначення афлатоксину В₁.

Згідно отриманих даних (рис. 1, табл. 1), відгук приладу на досліджуваних концентраціях аналіту є лінійним і метод може використовуватися для кількісного визначення афлатоксину В₁ у дослідних пробах зерна.

Таблиця 1. Регресійний аналіз для методу визначення вмісту афлатоксину В₁.

Регресія	$a + bx$
a =	0.0245 (95% довірчий інтервал $a \pm 0.0296$)
b =	1.0017 (95% довірчий інтервал $b \pm 0.0299$)
Залишкова дисперсія S_y :	0.0355
СКВ методу ($S_{x0} = S_y/b$):	0.0354
Коефіцієнт варіації $V_{x0} = S_{x0}/\bar{x}_{sp}$ (%):	10.779
Межа виявлення:	0.0335 ($X_c = 0.0167$) концентрація, нг/см ³
Критерій збіжності (d) для N=2,3,4 (%):	0.9997
Лінійність даних:	Задовільно {PG=0.1813; F(1;7;0.99)=5.592}
Однорідність дисперсій:	Задовільно {PG=2.945; X ₂ (8;0.95)=15.51}

Межа виявлення [20] для даного аналітичного стандарту на обладнанні, що використовувалось, становить 0.03 нг/мл афлатоксину B_1 у розчині. Отже, межа виявлення афлатоксину B_1 є прийнятною.

Межа кількісного визначення [20] згідно Commission Regulation EC 1881/2006 МДР афлатоксину B_1 для всіх злаків і всіх продуктів, отриманих зі злаків, становить 2.0 мкг/кг. Згідно цієї

директиви найнижча концентрація афлатоксину B_1 , яка складає 0.5 від МДР становить 1.0 мкг/кг (табл. 2).

Згідно отриманих нами даних межа кількісного визначення для даного методу на обладнанні, що використовувалось, становить 0.89 мкг/кг афлатоксину B_1 , що відповідає вимогам директиви [20].

Таблиця 2. Результати внутрішньолабораторної відтворюваності для кількісної підтверджуючої методики визначення вмісту афлатоксину B_1 ($n=20$).

Концентрація афлатоксину B_1 (К)						
№ оператора	додано 1 мкг/кг		додано 2 мкг/кг		додано 3 мкг/кг	
	К, нг/мл	K_1 , мкг/кг	К, нг/мл	K_1 , мкг/кг	К, нг/мл	K_1 , мкг/кг
$K_{\text{середнє}}$	0.45	0.89	0.84	1.67	1.26	2.53
S	0.01	0.02	0.02	0.05	0.02	0.04
CV, %	2.34	2.34	2.68	2.68	1.38	1.38
$CV_{\text{середнє}} = 2.13 \pm 0.67$						

Для визначення специфічності і селективності було проаналізовано 10 незалежних проб холостої матриці (борошно ячменю). У них афлатоксину B_1 не виявлено, отже, критерії специфічності і селективності валідовані (підтверджені).

Для визначення критерію відтворюваності даної методики проводили такі маніпуляції: холосту матрицю (борошно ячменю) збагачували афлатоксином B_1 у концентраціях, еквівалентних 0.5; 1 та 1.5 МДР, тобто: 1.0; 2.0 та 3.0 мкг/кг. Кожна з наведених концентрацій була проаналізована в 10 паралелях.

Даний експеримент був відтворений аналогічно в інших умовах (зміна температури оточуючого середовища, партії реактивів) та з іншим оператором.

Після цього вираховували концентрацію афлатоксину B_1 у кожній проаналізованій пробі і обрахували середню концентрацію, стандартне відхилення та коефіцієнт варіації (CV, %) у збагачених зразках (формула 1):

$$CV = \frac{S}{K_c} \cdot 100, \% \quad (1)$$

де S – стандартне відхилення; K_c – середнє значення отриманої концентрації аналіту.

Перерахунки зроблено за формулою 2:

$$K_1 = K \cdot 2, \text{ мкг/кг} \quad (2)$$

де K_1 – концентрація афлатоксину B_1 , мкг/кг; K – концентрація афлатоксину B_1 , отримана в результаті хроматографічного аналізу проби, нг/см³; $K \cdot 2$, так, як K – це концентрація в 1 см³, відповідно ми отримуємо концентрацію нг/см³, а 2 – це коефіцієнт перерахунку, згідно методики, що ідентично мкг/кг).

Для більш повної оцінки отриманих даних було обчислено коефіцієнт варіації, що характеризує відносний ступінь відхилення вимірних значень

від середнього арифметичного.

Коефіцієнт варіації (CV) було обраховано з метою порівняльного аналізу результатів, отриманих двома операторами. CV характеризує внутрішньолабораторну відтворюваність і становить: для концентрації 1 мкг/кг – 2.34%; для концентрації 2 мкг/кг – 2.68%; для концентрації 3 мкг/кг – 1.38%. $CV_{\text{середнє}} = 2.13 \pm 0.67$, що згідно Commission Decision 2002/657/EC не має бути > 20%, а, отже, є відповідним.

Правильність визначається наступними способами: застосування сертифікованих стандартних зразків у випадку проведення повторних вимірювань сертифікованого референс-матеріалу потрібно враховувати наведені в табл. 3 діапазони відхилення для встановленого експериментальним шляхом середнього значення масової частки від сертифікованого значення [20].

Таблиця 3. Мінімальна правильність кількісних методів.

Масова частка	Діапазон
≤ 1 мкг/кг	від мінус 50% до +20%
>1 мкг/кг–10 мкг/кг	від мінус 30% до +10%
≥10 мкг/кг	від мінус 20% до +10%

У випадку, коли референс-матеріали відсутні, правильність можна оцінювати шляхом визначення повернення від додавання відомих кількостей речовини, що досліджується, до холостої матриці. Кількісним показником правильності у цьому випадку буде відсоток повернення.

Визначення повернення проводили шляхом додаванням активного інгредієнту до холостої проби. Додавали точну кількість активного інгредієнту (афлатоксину B_1) до холостої проби у концентраціях, відповідно, 0.5; 1.0; 1.5 МДР.

Відсоток повернення розраховують за формулою 3, довірчий інтервал для відсотку повернення за формулою 4:

$$RP = \frac{V_1}{V_2} \cdot 100\%, \quad (3)$$

$$RP = \left(\frac{x - 2.23 \cdot s / \sqrt{10}}{v_2} \cdot 100 \right), (95\% \ n = 10) \quad (4)$$

де v_1 - повернена кількість, v_2 - додана кількість, x – середнє 10 визначень; s – стандартне відхилення (σ_{n-1}).

Проведення оцінки критерію повернення щодо придатності методики з визначення вмісту афлатоксину В₁ визначали за наступною схемою:

– проаналізували 10 холостих проб, щоб переконатись у чистоті матриці (можна використати дані, отримані під час визначення попередніх параметрів) і збагатили 10 аліквот на рівні 0.5; 1.0 та 1.5 МДР, тобто, 1.0; 2.0 та 3.0 мкг/кг. Визначили концентрацію, що присутня в кожній пробі;

– визначили повернення для кожної проби, використовуючи формулу (3), зазначену вище;
– вираховували середнє значення повернення та коефіцієнт варіації ($CV = CB/Kc \cdot 100$) з десяти результатів для кожного рівня.

Було проаналізовано по 20 проб борошна ячменю на кожну концентрацію: 1 мкг/кг (0.5 МДР); 2 мкг/кг (1 МДР) і 3 мкг/кг (1.5 МДР). Перерахунки робили за наступною формулою:

$$K = ((C \cdot 2)/1000) \cdot 1000, \quad (5)$$

де K – концентрація афлатоксину В₁, мкг/кг борошна; C – концентрація афлатоксину В₁ у пробі, нг/см³ (за градувальними розчинами); 2 – коефіцієнт перерахунку згідно методики; 1000 – коефіцієнт перерахунку з нанограм на мікрограми; 1000 – коефіцієнт перерахунку маси на 1 кг.

Згідно отриманих даних для доданої концентрації афлатоксину В₁ (1 мкг/кг) фактична отримана концентрація становить 0.89 ± 0.02 мкг/кг (табл. 4).

Таблиця 4. Середні значення результатів визначення повернення для афлатоксину В₁ у трьох концентраціях, $n=20$.

	Концентрація афлатоксину В ₁					
	додано 1 мкг/кг		додано 2 мкг/кг		додано 3 мкг/кг	
	С, нг/мл	К, мкг/кг	С, нг/мл	К, мкг/кг	С, нг/мл	К, мкг/кг
$K_{\text{середнє}}$	0.45	0.89	0.84	1.67	1.26	2.53
S	0.01	0.02	0.02	0.05	0.02	0.04
CV, %	2.34	2.34	2.68	2.68	1.38	1.38
П, %	-	89.4	-	83.7	-	84.3

При цьому відсоток повернення складає 89.4 ± 2.34 %, що відповідає мінімально допустимим значенням (для концентрації > 1 мкг/кг – 10 мкг/кг повернення має становити 70–110 %) [20].

Коефіцієнт варіації для даної доданої концентрації складає 2.34 %, що згідно Commission Decision 2002/657/EC є відповідним, оскільки є не > 20 %.

Згідно отриманих даних для доданої концентрації афлатоксину В₁ (2 мкг/кг) фактична отримана концентрація становить 1.67 ± 0.05 мкг/кг; при цьому відсоток повернення складає 83.7 ± 2.68 %, що відповідає мінімально допустимим значенням.

Коефіцієнт варіації для доданої концентрації складає 2.68 %, що є відповідним.

Згідно отриманих даних для доданої концентрації 3 мкг/кг афлатоксину В₁ фактична отримана концентрація становить 2.53 ± 0.04 мкг/кг; при цьому відсоток повернення складає 84.3 ± 1.38 %, що відповідає мінімально допустимим значенням.

Коефіцієнт варіації для доданої концентрації 3 мкг/кг складає 1.38 %, що є відповідним.

Отже, згідно отриманих даних для всіх проаналізованих концентрацій афлатоксину В₁

відсоток повернення складає 85.8 ± 3.65 %, що відповідає мінімально допустимим значенням (для концентрації ≥ 1 –10 мкг/кг відсоток повернення має складати 70–110 %), при цьому коефіцієнт варіації (CV, %) складає 2.13 ± 0.67 і є відповідним, оскільки згідно Commission Decision 2002/657/EC не має бути > 20 % (табл. 5).

Наступним етапом нашої роботи було оцінити придатність методики виконання вимірювання для деоксиніваленолу.

У зв'язку з тим, що в Україні не має національного стандарту на визначення деоксиніваленолу методом HPLC була розроблена, апробована та валідована робоча методика з визначення вмісту деоксиніваленолу в зернових культурах методом високоефективної рідинної хроматографії з очисткою на імуноафінних колонках. Використання специфічних імуноафінних колонок спрощує і прискорює складну процедуру пробопідготовки в хроматографічному аналізі, робить можливим точно визначити кількість даного мікотоксину в пробі після проведення процедури екстракції. За допомогою імуноафінних колонок аналіт збагачується та очищується від компонентів матриці. Переваги імуноафінних колонок: покращення якості пробопідготовки, підвищення

чутливості методу HPLC, швидкість аналізу, зручність процедури очистки проб.

З метою оцінки придатності методики виконання вимірювання для деоксиніваленолу використовували ті ж самі критерії, що і для афлатоксину В₁ [20].

Матрицю (борошно ячменю) на вміст/відсутність деоксиніваленолу було проаналізовано оператором І. Згідно отриманих даних деоксиніваленол був виявлений у матриці в кількості 0.0438 мг/кг.

Для деоксиніваленолу згідно Commission Regulation (EC) 1881/2006 МДР або дозволена

межа для цільного зерна ячменю становить 1.25 мг/кг, 0.75 мг/кг – для продуктів його переробки. Згідно з Обов'язковим мінімальним переліком досліджень сировини, продукції тваринного та рослинного походження, комбікормової сировини, комбікормів, вітамінних препаратів та ін. [24] МДР деоксиніваленолу у кормах для тварин складає 1.0 мг/кг. Згідно чинного ДСТУ 3769-98 [23] МДР для ячменю, що використовується в промислових цілях та для експорту, становить 1.0 мг/кг, для ячменю, що використовують в кормових цілях – 0.5 мг/кг.

Таблиця 5. Метрологічні характеристики оцінки придатності методики виконання вимірювання для афлатоксину В₁.

Критерій валідації (згідно директиви ЕС 657-2002)	Вимоги до критерію (згідно директиви ЕС 657-2002)	Отриманий результат	Відповідність
Відтворюваність (внутрішньо-лабораторна)	CV ≤ 20 %	Концентрація 1 мкг/кг: CV = 2.34%. Концентрація 2 мкг/кг: CV = 2.68 %. Концентрація 3 мкг/кг: CV = 1.38 %. CV _{середнє} = 2.13±0.67 %	відповідає
Калібрувальні криві	Лінійність на досліджуваних концентраціях	Відгук приладу на досліджуваних концентраціях аналіту (0–40 нг/мл) є лінійним	відповідає
LOD	Індивідуальна для окремого обладнання	0.03 нг/мл	відповідає
LOQ	Індивідуальна для окремого методу	0.89 мкг/кг	відповідає
Правильність (повернення)	Повернення: 70 % – 110 % CV ≤ 20 %	Концентрація 1 мкг/кг: повернення 89.4 ± 2.34 %, CV = 2.34 %. Концентрація 2 мкг/кг: повернення 83.7 ± 2.68 % CV = 2.68 %. Концентрація 3 мкг/кг: повернення 84.3 ± 1.38 %; CV = 1.38 %; Повернення середнє: 85.8 ± 3.65 %; CV _{середнє} = 3.65 %.	відповідає

LOQ – limit of quantitation (межа кількісного визначення). LOD – limit of detection (межа виявлення). CV – коефіцієнт варіації.

Лінійність (калібрувальна крива). З наявних стандартних розчинів деоксиніваленолу було виготовлено 7 концентрацій з урахуванням нульової – 0 мкг/см³; 0.0625 мкг/см³; 0.125 мкг/см³; 0.250 мкг/см³; 0.5 мкг/см³; 1.0 мкг/см³; 2.0 мкг/см³, які досліджені у трьох паралелях (рис.2).

Згідно отриманих даних (рис.2, табл.6), відгук приладу досліджуваних концентрацій аналіту є

лінійним, тому метод може використовуватися для кількісного визначення деоксиніваленолу в пробах.

Межа виявлення для даного аналітичного стандарту на обладнанні, що використовувалось, становить 0.009 мкг/см³ деоксиніваленолу у розчині. Отже, межа виявлення деоксиніваленолу є прийнятною [20].

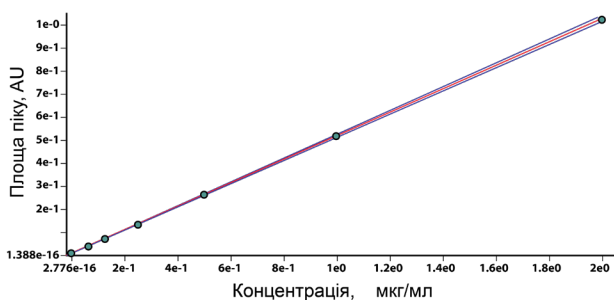


Рис. 2. Градувальний графік для визначення деоксиніваленолу.

Межа кількісного визначення. Згідно чинного ДСТУ 3769-98 [23] МДР для ячменю становить 0.5 мкг/кг. У процесі експерименту було встановлено нижню концентрацію деоксиніваленолу в пробі ячменю (0.24 ± 0.02 мкг/кг), яку можна

кількісно обрахувати з використанням рідинного хроматографа Ultimate 3000 з діодно-матричним детектором (табл. 6). Згідно отриманих даних межа кількісного визначення (LOQ) для даної методики на обладнанні, що використовується, складає 0.24 мкг/кг деоксиніваленолу.

Специфічність і селективність. Для визначення даних показників було проаналізовано 10 незалежних проб холостої матриці (борошно ячменю): середня концентрація деоксиніваленолу становила 0.0438 мкг/кг, стандартне відхилення (СВ) – 0.0039.

Середнє значення 10 проаналізованих незалежних проб холостої матриці становить ≈ 43.8 мкг/кг. У подальшому для визначення таких критеріїв як внутрішньолабораторна відтворюваність та відсоток повернення під час спайкування холостої проби необхідно враховувати вказане значення концентрації холостого зразка.

Таблиця 6. Регресійний аналіз для методу визначення вмісту деоксиніваленолу.

Регресія	a + bx
a =	0.0005 (95% довірчий інтервал a \pm 0.0023)
b =	0.5121 (95% довірчий інтервал b \pm 0.0057)
Залишкова дисперсія S_y :	0.002
СКВ методу ($S_{x0} = S_y/b$):	0.004
Коефіцієнт варіації $V_{x0} = S_{x0}/\bar{X}_{ср}$, (%):	1.897
Межа виявлення:	0.009 ($X_c = 0.004$) Концентрація, мкг/ см ³
Критерій збіжності (d) для N=2,3,4 (%):	0.9999
Лінійність даних:	Задовільно {PG=0.2696; F(1;5;0.99)=6.608}
Однорідність дисперсій:	Задовільно {PG=-29.89; X2(6;0.95)=12.59}

Внутрішньолабораторну відтворюваність виконували за наступною схемою: холосту матрицю (борошно ячменю) збагачували деоксиніваленолом у концентраціях, еквівалентних 0.5; 1.0 та 1.5 МДР, тобто: 250, 500 та 750 мкг/кг. Кожна концентрація була проаналізована в 10 паралелях; даний експеримент було повторено в інших умовах (зміна температури оточуючого середовища, партії реактивів) та з іншим оператором.

Після цього вираховували концентрацію кожного проаналізованого зразка і обрахували середню концентрацію, стандартне відхилення та коефіцієнт варіації (CV %) у збагачених зразках.

Коефіцієнт варіації було обраховано з метою порівняльного аналізу результатів, отриманих двома операторами. Коефіцієнт варіації (CV) характеризує внутрішньолабораторну відтворюваність і становить: для концентрації 250 мкг/кг – 8.7 %; для концентрації 500 мкг/кг – 11.3 %; для концентрації 750 мкг/кг – 8.2 %. $CV_{\text{середнє}} = 9.4 \pm 1.65$ є відповідним, оскільки згідно Commission Decision 2002/657/ЕС не має бути > 20 %.

Повернення. Визначення повернення проводили додаванням активного інгредієнту до холостої

проби. Додали точну кількість активного інгредієнту (аналіту) до холостої проби у концентраціях відповідно 0.5; 1.0; 1.5 МДР виміряних по одному разу.

Відсоток повернення розраховували згідно формули 3. Довірчий інтервал для відсотку повернення – згідно формули 4.

Під час проведення оцінки придатності методики визначення деоксиніваленолу відсоток повернення визначали за наступною схемою:

– проаналізували 10 холостих зразків, щоб переконатись у чистоті матриці і збагатили 10 аліквот на рівні 0.5; 1.0 та 1.5 МДР, тобто на рівні 250; 500 та 750 мкг/кг. Визначили концентрацію, що присутня в кожній пробі;

– визначили повернення для кожної проби, використовуючи формулу (3), зазначену вище;

– вираховували середнє значення повернення та коефіцієнт варіації ($CV = СВ/Кс \cdot 100$) із десяти результатів для кожного рівня.

Було проаналізовано по 20 проб борошна ячменю на кожну концентрацію: 250 мкг/кг (0.5 МДР); 500 мкг/кг (1.0 МДР) і 750 мкг/кг (1.5 МДР). Перерахунки зроблено за формулою 6:

$$K = (C \cdot 1000)/1, \quad (6)$$

де К – концентрація ДОН, мг/кг борошна; С – концентрація ДОН у пробі, мг/см³ (за калібровкою); 1000 – перерахунок на мг/кг; 1 – коефіцієнт перерахунку за умови пропускання через колонку 8 см³ екстракту (еквівалентно 1 г проби).

Згідно отриманих даних (табл. 8) для доданої концентрації деоксиніваленолу (250 мг/кг) фактична отримана концентрація становить 236.7±8,7 мг/кг; при цьому відсоток повернення складає 94.7±8.2%, що відповідає мінімально допустимим значенням згідно Commission Decision 2002/657/EC (для концентрації ≥ 10 мг/кг відсоток повернення має складати 80–110 %).

Коефіцієнт варіації для даної доданої концентрації складає 8.7%, що не має бути > 20%, а, отже, є відповідним.

Таблиця 8. Середні значення результатів визначення повернення для деоксиніваленолу в трьох концентраціях, (n=20).

Показники	Концентрація деоксиніваленолу, мг/кг		
	250	500	750
K _{середня} ¹ мг/кг	236.7	444.5	630.8
K _{середня} ¹ мг/кг	2.37	4.45	6.3
S	20.6	50.2	52.0
CV, %	8.7	11.3	8.2
П, %	94.7	88.9	84.1

Згідно отриманих даних для доданої концентрації деоксиніваленолу (500 мг/кг) фактична отримана концентрація становить 444.5±11.3 мг/кг; при цьому відсоток повернення складає 88.9±10.0%,

Література

- Slobodchikova, I., & Vuckovic, D. Liquid chromatography – high resolution mass spectrometry method for monitoring of 17 mycotoxins in human plasma for exposure studies. *Journal of Chromatography A*. 2018, 1548, 51–63. doi:10.1016/j.chroma.2018.03.030
- Madalena, M., Sobral, C., Faria, M. A., Cunha, S. C., & Ferreira, I. Toxicological interactions between mycotoxins from ubiquitous fungi: Impact on hepatic and intestinal human epithelial cells. *Chemosphere*. 2018, 202, 538–548. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.03.122
- Huang, S., Zheng, N., Fan, C. Y., Cheng, M., Wang, S., Jabar, A., Cheng, J. B. Effects of aflatoxin B1 combined with ochratoxin A and/or zearalenone on metabolism, immune function, and antioxidant status in lactating dairy goats. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2018, 31 (4), 505-513. doi:10.5713/ajas.17.0279
- Huang, X. J., Wang, S. M., Mao, D., Miao, S., Hu, Q., & Ji, S. Optimized QuEChERS Method Combined with UHPLC-MS/MS for the Simulta-

що відповідає мінімально допустимим значенням [20].

Коефіцієнт варіації для даної доданої концентрації складає 11.3%, що є відповідним.

Для доданої концентрації деоксиніваленолу (750 мг/кг) фактична отримана концентрація становить 630.8±8.2 мг/кг; при цьому відсоток повернення складає 84.1±10.0%, що відповідає мінімально допустимим значенням. Коефіцієнт варіації для даної доданої концентрації складає 8.2%, що є відповідним.

Отже, згідно отриманих даних для всіх проаналізованих концентрацій деоксиніваленолу відсоток повернення складає 89.2±5.3%, що відповідає мінімально допустимим значенням згідно Commission Decision 2002/657/EC (для концентрації ≥ 10 мг/кг відсоток повернення має складати 80–110%), при цьому коефіцієнт варіації (CV, %) складає 9.4±1.65, що є відповідним.

Заключення

На основі проведених експериментальних досліджень встановлено, що методики з визначення вмісту афлатоксину В₁ методом високоефективної рідинної хроматографії та визначення вмісту деоксиніваленолу методом високоефективної рідинної хроматографії з очисткою на імуноафінних колонках є придатними для дослідження зерна, зернових продуктів і кормів із нього та можуть використовуватися лабораторіями для проведення аналогічних досліджень. Адаптовані методики з визначення мікотоксинів є високочутливими та за своїми параметрами відповідають європейським вимогам.

- neous Determination of 15 Mycotoxins in Liquorice. *Journal of Aoac International*. 2018, 101 (3), 633–642. doi:10.5740/jaoacint.17-0365
- Sieger, M., Kos, G., Sulyok, M., Godejohann, M., Krska, R., & Mizaikoff, B. Portable Infrared Laser Spectroscopy for On-site Mycotoxin Analysis. *Scientific Reports*. 2017, 7. doi:10.1038/srep44028
- da Silva, E. O., Bracarense, A., & Oswald, I. P. Mycotoxins and oxidative stress: where are we? *World Mycotoxin Journal*. 2018, 11(1), 113–133. doi:10.3920/wmj2017.2267
- Adekoya, I., Obadina, A., Phoku, J., De Boevre, M., De Saeger, S., & Njobeh, P. Fungal and mycotoxin contamination of fermented foods from selected south african markets. *Food Control*. 2018, 90, 295–303. doi:10.1016/j.foodcont.2018.02.040
- Soares, R. R. G., Azevedo, A. M., Fernandes, P., Chu, V., Conde, J. P., & Aires-Barros, M. R. A simple method for point-of-need extraction, concentration and rapid multi-mycotoxin immunodetection in feeds using aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography A*. 2017, 1511, 15–24. doi:10.1016/j.chroma.2017.07.004

9. Zhu, R. Y., Zhao, Z. Y., Wang, J. H., Bai, B., Wu, A. B., Yan, L. P., & Song, S. Q. A simple sample pretreatment method for multi-mycotoxin determination in eggs by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2015, 1417, 1–7. doi:10.1016/j.chroma.2015.09.028.
10. Sun, W. S., Han, Z., Aerts, J., Nie, D., Jin, M. T., Shi, W., Wu, A. B. A reliable liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of multiple mycotoxins in fresh fish and dried seafoods. *Journal of Chromatography A*. 2015, 1387, 42–48. doi:10.1016/j.chroma.2015.01.071
11. Karami-Osboo, R., & Mirabolfathi, M. A Novel Dispersive Nanomagnetic Particle Solid-Phase Extraction Method to Determine Aflatoxins in Nut and Cereal Samples. *Food Analytical Methods*. 2017, 10 (12), 4086–4093. doi:10.1007/s12161-017-0975-2
12. Banati, H., Darvas, B., Feher-Toth, S., Czeh, A., & Szekacs, A. Determination of Mycotoxin Production of Fusarium Species in Genetically Modified Maize Varieties by Quantitative Flow Immunocytometry. *Toxins*. 2017, 9 (2). doi:10.3390/toxins9020070.
13. DSTU EN 12955-2001 Vyznachannia aflatoksynu V1 ta sumy aflatoksyniv V1, V2, G1 ta G2 u zernovykh kulturakh, fruktakh z tverdoiu shkirkoiu ta pokhidnykh vid nykh produktakh Metodom vysokoefektyvnoi ridynnoi khromatohrafii za dopomohoiu postkolonkovoi deryvatyzatsii ta ochyshchannia na imunnii kolontsi (EN 12955:1999, IDT).
14. DSTU 8168:2015 Zernovi kultury, produkty yikh pererobiannia, kombikormy. Metod vyznachennia vmistu dezoksynivalenolu.
15. EN 15891:2010. Vyznachennia deoksynivalenolu v prodovolchomu zerni, produktakh yoho pererobky ta produktakh na zernovii osnovi dlia kharchuvannia hrudnykh ditei i ditei rannoho viku.
16. EN 15791:2009 Vyznachennia deoksynivalenolu v kormakh – metodom VERKh iz UF-detektuvanniam ta ochystkoiu na imunoafinnii kolontsi
17. Berezhna L.H., Tsvilikhovskiy V.I., Klymenteva L.V. Osnovni validatsiini kryterii metodu «Ochraprep» Kilkisne vyznachennia okhratoksynu A z vykorystanniam vysokoefektyvnoi ridynnoi khromatohrafii. *Zhurnal Khromatohrafichnoho tovarystva*. 2008, VIII, 3,4, 34–38 (in Ukrainian).
18. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union. – 20.12.2006. – L 364/5.
19. Novozhytska Yu.M., Ivanova O.V., Dobrozhan Yu.V. Otsinka prydatnosti pidtverdzhuiuchykh metodiv dlia vyznachennia zalyskovykh kilkostei veterynarykh preparativ u produktakh tvarynnoho pokhodzhennia. *Naukovyi visnyk veterynarnoi medytsyny*. 2015, 2, 14–18 (in Ukr.).
20. Commission Decision of 14 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (notified under document number C(2002) 3044), text with EEA relevance 2002/657/EC. Official Journal of the European Union. – 17.08.2002. – L 221. – P. 8.
21. AFLAPREP®. Immunoaffinity columns for use in conjunction with HPLC or LC-MS/MS. For *in vitro* use only. R-BIOPHARM RHÔNE LTD, 2016, 23 p.
22. DONPREP®. Immunoaffinity columns for use in conjunction with HPLC or LC-MS/MS. For *in vitro* use only. R-BIOPHARM RHÔNE LTD, 2016, 23 p.
23. DSTU 3769-98 Lachmin furazhnyi – tekhnichni umovy.
24. Obov'iazkovyi minimalnyi perelik doslidzhen syrovyny, produktsii tvarynnoho ta roslynnoho pokhodzhennia, kombikormovoi syrovyny, kombikormiv, vitaminnykh preparativ ta in. Nakaz Derzhavnoho departamentu veterynarnoi medytsyny Ukrainy vid 03.11.1998 roku, №16 (in Ukr.).