

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)

БИОАРГАНИЧНАЯ ХИМИЯ
BIOORGANIC CHEMISTRY

УДК 636.085.34:57.083.3
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2018-54-3-319-328>

Поступила в редакцию 20.02.2018
Received 20.02.2018

**И. И. Вашкевич¹, О. С. Куприенко¹, И. В. Горбачева¹, А. А. Ястребова¹, Т. В. Терентьева¹,
Г. С. Корнилович², Л. Н. Сухенко², А. И. Шибeko², О. В. Свиридов¹**

¹*Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь*
²*Центральная научно-исследовательская лаборатория хлебопродуктов, Минск, Беларусь*

ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛА

Аннотация. Разработан и испытан набор реагентов «ИФА-ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛ» для определения дезоксиниваленола (ДОН) в кормах для животных, пищевой продукции и продовольственном сырье методом прямого конкурентного иммуноферментного анализа в микропланшетном формате. Базовые компоненты набора представляют собой поликлональные антитела к ДОН, полученные в результате иммунизации кроликов конъюгатом ДОН с бычьим сывороточным альбумином, и конъюгат пероксидазы из корней хрена с микотоксином. Установлены технико-аналитические параметры набора и метрологические характеристики методики выполнения измерений. Набор позволяет с надлежащей точностью определять ДОН в диапазоне концентраций от 0,2 до 6,0 мг/кг, предел количественного определения исследуемого микотоксина в зерне и продуктах его переработки не превышает 0,2 мг/кг.

Ключевые слова: микотоксины, дезоксиниваленол, иммуноферментный анализ

Для цитирования. Иммуноферментная система для определения дезоксиниваленола / И. И. Вашкевич [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2018. – Т. 54, №3. – С. 319–328. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2018-54-3-319-328>

**I. I. Vashkevich¹, O. S. Kuprienko¹, I. V. Gorbachova¹, A. A. Yastrebova¹, T. V. Terentjeva¹, G. S. Kornilovich²,
L. N. Sukhenko², A. I. Shibeko², O. V. Sviridov¹**

¹*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*
²*Central Research Laboratory of Grain Products, Minsk, Belarus*

ENZYME IMMUNOASSAY KIT FOR THE DETERMINATION OF DEOXYNIVALENOL

Abstract. A reagent kit EIA-DEOXYNIVALENOL for the determination of mycotoxin deoxynivalenol (DON) in feeds and foods by a direct competitive enzyme immunoassay using microtitration plate has been developed and tested. The basic components of the kit are polyclonal antibodies to DON, obtained as a result of immunization of rabbits with a conjugate of DON with bovine serum albumin and a conjugate of horseradish peroxidase with DON. The evaluated parameters of the kit and metrological characteristics of the technique of measurements correspond to the modern level of immunoassay development and provide the determination of DON content of agricultural products in a range of 0.2 to 6.0 mg/kg with proper accuracy and precision. The limit of quantitative determination of DON in grain and cereal foods does not exceed 0.2 mg/kg.

Keywords: mycotoxins, deoxynivalenol, enzyme immunoassay

For citation. Vashkevich I. I., Kuprienko O. S., Gorbachova I. V., Yastrebova A. A., Terentjeva T. V., Kornilovich G. S., Sukhenko L. N., Shibeko A. I., Sviridov O. V. Enzyme immunoassay kit for the determination of deoxynivalenol. *Vesti Natsyonal'noi akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2018, vol. 54, no.3, pp. 319–328 (In Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2018-54-3-319-328>

Введение. Микотоксин дезоксиниваленол (ДОН) является метаболитом *Fusarium culmorum* и *Fusarium graminearum*. Чаще всего этот микотоксин обнаруживают в пшенице, кукурузе, ячмене и продуктах их переработки. Химически ДОН принадлежит к трихотеценам. Попадание токсинов этой группы в организм человека и животного может приводить к возникновению

микотоксикоза, являться причиной нарушения эмбрионального развития (тератогенное действие), запускать процесс некроза внутри клетки (цитотоксическое действие), подавлять активность иммунной системы (иммунодепрессивное действие), воздействовать на кроветворные органы и центральную нервную систему, вызывать лейкопению и геморагию [1].

Присутствие ДОН в зерне и продуктах его переработки не только представляет непосредственную угрозу здоровью людей, но и наносит большой экономический ущерб сельскому хозяйству. Данный микотоксин малотоксичен для птиц благодаря особенностям их метаболизма. Наибольшую опасность токсин представляет для свиней. Поступление ДОН в организм этих животных в очень низких концентрациях вызывает отказ от корма, а в сравнительно высоких – рвоту. Вследствие этого наблюдается существенное снижение прироста живой массы [2, 3]. Быстрое разрушение ДОН в желудочно-кишечном тракте и печени животных приводит к тому, что этот токсин не накапливается в органах и тканях.

В Беларуси установлены предельные допустимые уровни содержания ДОН в кормах, продовольственном сырье и продуктах питания. Они указаны в гигиеническом нормативе «Показатели безопасности и безвредности для человека продовольственного сырья и пищевых продуктов» (постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 21.06.2013 г. № 52), в ветеринарно-санитарных правилах обеспечения безопасности кормов, кормовых добавок и сырья для производства комбикормов (постановление Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 10.02.2011 г. № 10), в технических регламентах таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» и ТР ТС 015/2011 «О безопасности зерна». ДОН считается одним из наименее токсичным среди трихотеценов. В зависимости от вида корма и того, для какого животного он будет использоваться, допустимый уровень микотоксина варьируется от 0,25 до 2,0 мг/кг. Количество ДОН в продовольственном сырье и продуктах питания (за исключением пищевых продуктов, предназначенных для питания беременных и кормящих женщин, детей раннего, дошкольного и школьного возраста, где содержание ДОН не допускается и должно составлять менее 0,05 мг/кг) не может превышать 0,7–1,0 мг/кг.

Относительно недорогим и в то же время чрезвычайно чувствительным и селективным методом определения ДОН является иммуноферментный анализ (ИФА). В его основе лежит специфическое взаимодействие антитела с антигеном, чем определяются высокие аналитические характеристики этого метода. Для определения ДОН предложены прямой [4, 5] и непрямой [5–8] конкурентный ИФА. Как правило, прямой ИФА по сравнению с непрямым является более удобным и менее продолжительным.

Целью настоящей работы, выполняемой в рамках Государственной научно-технической программы «Промышленные био- и нанотехнологии–2020», является создание набора реагентов «ИФА-ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛ» для определения ДОН в кормах для животных, пищевой продукции и продовольственном сырье методом прямого ИФА.

Настоящая статья является продолжением цикла работ, посвященных разработке наборов ИФА для определения микотоксинов в кормах и продуктах питания [9–12].

Материалы и методы. Чистый ДОН, имеющий статус стандарта, поступил от фирмы «Romer Labs» (Австрия), диизопропилкарбодиимид, N-гидроксисукцинимид, бычий сывороточный альбумин (БСА), детергенты и бактериостатики приобретены у фирмы «Sigma-Aldrich» (США). Разборные микропланшеты из полистирола, состоящие из двенадцати 8-луночных полосок (стрипов), производства «Greiner bio-one» (Германия). Очищенная пероксидаза из корней хрена (ПХ) получена от фирмы «ДИА-М» (РФ). Растворы хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и субстрата (H_2O_2), а также стоп-реагент (раствор H_2SO_4) изготовлены в Институте биорганической химии НАН Беларуси. Измельченные образцы различных зерновых культур, в которых содержание ДОН установлено с помощью набора реагентов «RIDASCREEN® FAST DON» («R-Biopharm AG», Германия) и референсный материал предоставлены ГУ «ЦНИЛхлебопродукт» (Беларусь). Продукты переработки зерна закуплены в торговой сети г. Минска.

Для детекции колориметрического сигнала в ИФА использовали прибор АИФ М/340 («Витязь», Беларусь). Спектры MALDI-TOF снимали в масс-спектрометре Microflex LRF («Bruker», Германия). Спектры ультрафиолетового поглощения растворов ДОН и его производных записывали в кювете с длиной оптического пути 1 см в приборе Cary 5000 («Agilent», США).

Конъюгаты БСА и ПХ с ДОН синтезировали с использованием 3-гемисукцината ДОН, полученного по ранее описанным методикам с некоторыми изменениями [5, 13]. 5,0 мг (17,0 мкмоль) ДОН и 10 мг (84,0 мкмоль) фенилборной кислоты растворяли в 0,2 мл сухого пиридина, перемешивали в течение 18 ч при температуре 20–25 °С. Затем добавляли 34 мг (340 мкмоль) ангидрида янтарной кислоты и 4 мг (34 мкмоль) 4-диметиламинопиридина. Перемешивали в течение 2 ч при 40 °С. Пиридин упаривали, остаток растворяли в 0,2 мл ацетона, добавляли 0,1 мл воды, 4 мкл трифторуксусной кислоты и 4 мг пентаэритрита. Перемешивали в течение 1,5 ч при 40 °С. Растворители упаривали, остаток растворяли в хлороформе и проводили хроматографию на колонке, заполненной силикагелем, элюируя смесью хлороформ–метанол. К 1,5 мг (5,1 мкмоль) выделенного 3-гемисукцината ДОН в 0,05 мл диметилформамида добавляли 0,9 мг (7,7 мкмоль) N-гидроксисукцинимида и 1,2 мкл (7,7 мкмоль) диизопропилкарбодиимида в 0,1 мл диметилформамида. Перемешивали при 4–10 °С в течение 1 ч, затем при температуре 20–25 °С в течение 2 ч. Осадок диизопропилмочевины отделяли после центрифугирования. Раствор добавляли к 0,5 мл 15 г/л раствора БСА или к 1,0 мл 4 г/л раствора ПХ в 0,1 М NaHCO₃. Перемешивали в течение 3 ч при 20–25 °С, затем конъюгат ДОН–БСА обессоливали на колонке с Sephadex G-25, конъюгат ДОН–ПХ очищали методом гель-хроматографии на колонке с Superose 12 (1 × 30 см). Содержание остатков микотоксина в конъюгатах определяли с помощью масс-спектрометрии MALDI TOF.

Поликлональные антитела (ПАт) к ДОН получали в результате иммунизации кроликов конъюгатом ДОН–БСА. Перед каждой иммунизацией получали эмульсию иммуногена ДОН–БСА и полного адъюванта Фрейнда. Первые две инъекции проводили, используя 0,45 мг иммуногена, с интервалом в 2 недели. Затем проводили иммунизацию с использованием 0,25 мг конъюгата ДОН–БСА один раз в 3 недели. Начиная с 4 цикла, осуществляли периодический отбор проб крови из ушной вены животных. Иммунизацию продолжали в течение 6 месяцев. Полученные образцы сыворотки тестировали на наличие связывающей способности в отношении ДОН–ПХ. Титры антител определяли как рабочее разведение антисыворотки в тест-системе, включающей покрытую антикроличьими антителами твердую фазу, при связывании ДОН–ПХ в отсутствие немеченого ДОН в пределах от 2,0 до 2,3 оптических единиц колориметрического сигнала ПХ.

Микропланшетный иммуносорбент получали биоспецифической иммобилизацией ПАт к ДОН (в титре 1:20 000–1:50 000) на внутренней поверхности лунок полистирольного планшета, предварительно покрытой очищенными ПАт овцы к иммуноглобулинам класса G кролика. Стабилизацию иммобилизованных антител проводили специальным раствором, содержащим инертные для анализа белки, неорганические соли, сахара и антибактериальные добавки.

При приготовлении градуировочных проб точную концентрацию исходного раствора ДОН в ацетонитриле устанавливали спектрофотометрически, используя $\epsilon_{217} = 6825 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Градуировочные пробы ДОН получали путем последовательного разведения исходного раствора ДОН буферным раствором с нейтральным значением pH. Для удобства расчетов результатов анализа сделан перевод истинных концентраций ДОН в градуировочных растворах (0; 10–300 нг/мл) в массовые концентрации (мг/кг) микотоксина в образцах путем умножения на коэффициент 20, учитывающий массу экстрагируемого образца, объем экстракта и степень его разбавления при пробоподготовке. Это позволяет при расчетах находить значение массовой концентрации ДОН в исследуемом образце сразу по градуировочному графику.

В состав готового набора «ИФА-ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛ» входят следующие компоненты: иммуносорбент, 96-луночный полистирольный планшет, 12 стрипов по 8 лунок, с иммобилизованным ПАт к ДОН, 1 планшет; градуировочные растворы ДОН, жидкие препараты, 5 флаконов, (0,7 ± 0,02) мл. Массовая концентрация ДОН в диапазоне 0; 0,2–6,0 мг/кг; конъюгат ДОН–ПХ, 21-кратный концентрат, жидкий препарат, 1 флакон, (1,0 ± 0,02) мл; раствор для разведения конъюгата, жидкий препарат, 1 флакон, (20,0 ± 0,5) мл; промывочный раствор, 10-кратный концентрат, жидкий препарат, 1 флакон (30,0 ± 0,5) мл; раствор хромогена ТМБ, жидкий препарат, 1 флакон, (0,7 ± 0,02) мл; субстратный буферный раствор, жидкий препарат, 1 флакон, (14,0 ± 0,5) мл; стоп-реагент, жидкий препарат, 1 флакон, (15,0 ± 0,5) мл.

Анализ с использованием набора «ИФА-ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛ» проводили следующим образом. Навеску (5,0 ± 0,1) г размолотого образца экстрагировали 100 мл дистиллированной воды, фильтровали и доводили pH раствора до значения 6–8. Полученный экстракт использовали

в течение последующих 2 ч для проведения ИФА. В лунки планшета для смешивания вносили по 150 мкл конъюгата ДОН–ПХ, а затем прибавляли в дубликатах по 50 мкл каждого градуировочного раствора и растворов параллельных проб каждого исследуемого образца. Немедленно после перемешивания отбирали восьмиканальным дозатором и вносили в лунки микропланшетного иммуносорбента по 100 мкл градуировочных растворов и растворов проб вместе с конъюгатом. Иммуносорбент заклеивали изолирующим листком или закрывали крышкой и инкубировали при температуре от 20 до 25 °С в течение 30 мин в термостате или на воздухе, исключая попадание света на планшет. По окончании времени инкубации удаляли растворы из всех лунок, проводили 3-кратное промывание планшета промывочным раствором порциями по 200 мкл на одно промывание каждой лунки. Далее в каждую лунку промытого иммуносорбента восьмиканальным дозатором вносили 100 мкл хромоген-субстратного раствора. Общее время внесения не превышало 2 мин. Закрытый планшет инкубировали в течение 15 мин в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре от 20 до 25 °С. По истечении времени инкубации в каждую лунку планшета восьмиканальным дозатором вносили 100 мкл стоп-реагента и перемешивали растворы в лунках круговыми движениями планшета по поверхности лабораторного стола. В течение не более 15 мин после добавления стоп-реагента измеряли оптическую плотность в каждой лунке на микропланшетном фотометре при длине волны 450 нм.

Метрологические характеристики методики выполнения измерений массовой доли ДОН набором реагентов «ИФА-ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛ» получены на основании экспериментальных данных в ходе внутрилабораторных испытаний с использованием образцов зерна злаковых и зернобобовых культур (пшеница, кукуруза, горох) и продуктов их переработки (гречневая крупа, мука пшеничная, макаронны). Для каждого образца проводилось четыре серии измерений, состоящих из двух результатов единичных измерений на каждом из уровней ($n=8$). Каждая серия измерений получена при соблюдении условий повторяемости, т.е. в пределах короткого интервала времени, одним и тем же оператором с использованием одной и той же мерной посуды, одних и тех же партий реактивов (тест-систем) одного типа, одного и того же оборудования в лаборатории. Разные группы анализов получены при варьировании факторов «оператор», «время».

Результаты исследований и их обсуждение. Производное ДОН для синтеза иммуногена и пероксидазного конъюгата получали в несколько стадий по ранее предложенной схеме [5, 13]. ДОН, в котором на гидроксильные группы при С7 и С15 предварительно была поставлена защита, обрабатывали янтарным ангидридом. После снятия защитной группы образовывался 3-гемисукцинат ДОН, который присоединяли к БСА и ПХ по методу активированных эфиров через промежуточный N-гидроксисукцинимидный эфир. Таким образом получены конъюгаты ДОН–БСА и ДОН–ПХ (рис. 1). Содержание остатков ДОН в конъюгатах, определенное масс-спектрометрией MALDI-TOF, составило 16 и 1 молекул ДОН в одной молекуле БСА и ПХ соответственно.

В тест-системах для определения ДОН описано применение как поликлональных [6–8], так и моноклональных [4, 5] антител. Конъюгат ДОН–БСА использован для иммунизации кроликов с целью получения ПАт, специфичных в отношении ДОН. В наших экспериментах наблюдалось постепенное возрастание количества специфических антител в сыворотке крови иммунизированных животных. Начиная с пятого забора крови, существенно увеличилась аффинность ПАт, что проявилось в увеличении чувствительности ИФА. Однако в случае разрабатываемой

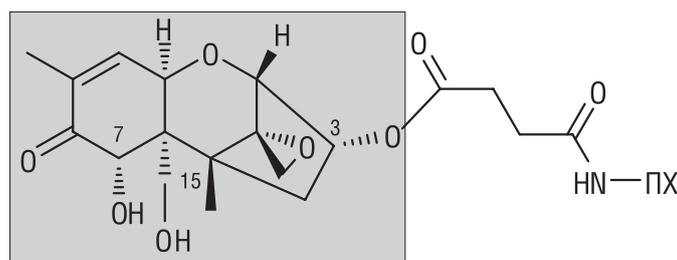


Рис. 1. Схема строения конъюгата ДОН–ПХ

Fig. 1. A scheme of DON–HRP conjugate structure

тест-системы ИФА для ДОН не было особой необходимости использовать высокоафинные антитела последних заборов, поскольку их применение привело бы к дополнительной стадии разведения исследуемых проб. Поэтому для дальнейшей работы использовали антисыворотку от четвертого забора крови у кролика №2. Показано отсутствие кросс-реактивности (менее 0,01 %) полученных ПАт по отношению к трихоцетеновым микотоксинам (Т-2 и НТ-2) и токсинам других классов.

Иммуносорбент для определения ДОН получали путем биоспецифической иммобилизации ПАт к ДОН в подобранном разведении через аффинно-очищенные антивидовые ПАт овцы. При таком способе иммобилизации сохраняется нативная конформация специфических антител и обеспечивается их большая доступность для антигена, в качестве которого выступает ДОН в составе градуировочных растворов и подготовленных к анализу исследуемых проб, а также в конъюгате с ферментом.

Ферментный конъюгат ДОН–ПХ является обязательным компонентом иммуноаналитической системы, к стабильности которого предъявляются повышенные требования. Устойчивость буферного раствора конъюгата (21-кратный концентрат) со стабилизирующими добавками проверяли в условиях ускоренного хранения. Согласно этому методу выдерживание в течение 10 дней тестируемого раствора при температуре 37 °С примерно соответствует хранению при температуре 4 °С в течение года. В результате хранения ДОН–ПХ при повышенных температурах наблюдали некоторое уменьшение колориметрического сигнала, соответствующего связыванию конъюгата со специфическими антителами (рис. 2, *a*). В то же время характер взаимодействия конъюгата с антителами в присутствии немодифицированного ДОН остался неизменным (рис. 2, *b*). Полученные данные позволяют сделать вывод, что незначительные изменения, происходящие в ферментном конъюгате при хранении, не оказывают существенного влияния на результаты ИФА. Применение буфера для разведения конъюгата, содержащего инертные белки и детергент в качестве основных ингредиентов, позволяет поддерживать рабочий титр конъюгата на уровне 1 : 10 000 при проведении анализа.

Стабилизированные буферные растворы ДОН с точными концентрациями данного микотоксина выступают в качестве градуировочных проб и служат для построения градуировочного графика. Предписанное содержание микотоксина в них дано в терминах массовой концентрации с учетом фактора разведения при подготовке пробы из исследуемого сухого образца продукции.

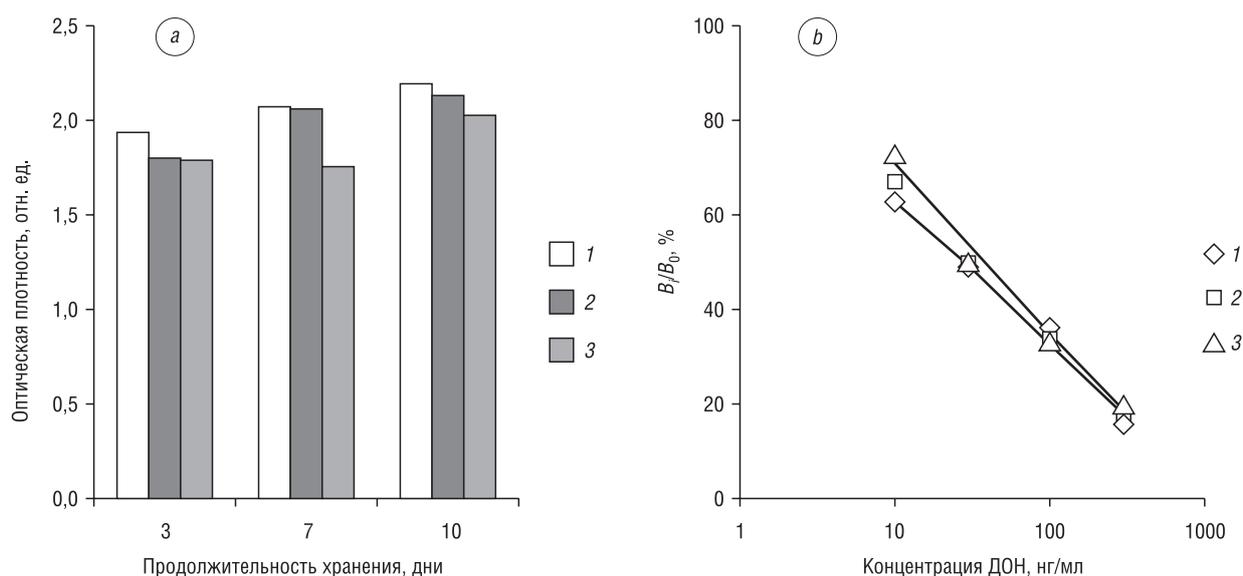


Рис. 2. Связывание конъюгата ДОН–ПХ, хранившегося в течение 3–10 дней (*a*) или 10 дней (*b*), со специфическими антителами в отсутствие (*a*) и в присутствии (*b*) немодифицированного ДОН. 1, 2, 3 – хранение соответственно при температурах 4, 20 и 37 °С

Fig. 2. The binding of DON-HPR conjugate stored for 3 to 10 days (*a*) or 10 days (*b*) to specific antibodies in the absence (*a*) or presence (*b*) of unmodified DON. 1, 2, 3 – storage at temperatures of 4, 20 and 37 °С

Разработанный набор реагентов «ИФА-ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛ» основан на принципе прямого конкурентного ИФА. Микотоксин экстрагируют из размолотого образца дистиллированной водой. Для проведения анализа не требуется дополнительных стадий очистки и разведения экстракта. С целью обеспечения одинаковых условий взаимодействия с антителами конъюгата ДОН–ПХ и микотоксина в составе градуировочных и исследуемых проб используется прием предварительного смешивания этих растворов в отдельном планшете, прилагаемом к набору. Затем смесь растворов переносят в лунки планшетного иммуносорбента, где ДОН и его ферментный конъюгат конкурируют за сайты связывания специфических антител, иммобилизованных на внутренней поверхности лунок. Для удаления из лунок иммуносорбента избытка растворимых иммунореагентов используется специальный промывочный раствор. Затем вносят хромоген-субстратный раствор, который позволяет визуализировать реакцию антиген–антитело. Наблюдаемая окраска раствора в лунке становится тем интенсивнее, чем меньше концентрация ДОН в градуировочном растворе или анализируемом образце. Использование стоп-реагента позволяет остановить ферментативную реакцию и делает более удобным измерение оптической плотности растворов в лунках. Полученные значения оптической плотности в лунках, в которые вносились градуировочные растворы, используются для построения градуировочной зависимости и определения массовой концентрации ДОН в анализируемых образцах.

Обработка результатов измерений проводится с применением специально разработанного шаблона в формате Microsoft Excel. В соответствующие графы шаблона вносят полученные в условиях повторяемости результаты измерения оптической плотности градуировочных растворов и растворов исследуемых проб. Программа автоматически рассчитывает параметры связывания конъюгата ДОН–ПХ иммобилизованными антителами, строит градуировочную зависимость и находит массовую долю ДОН в образце.

Типичный градуировочный график (рис. 3) представляет собой зависимость B_i/B_0 , % от натурального логарифма концентрации ДОН, где B_i – среднее значение оптической плотности для i -го градуировочного раствора, о.е.; B_0 – среднее значение оптической плотности для градуировочного раствора, не содержащего ДОН, о.е.

В табл. 1 приведены значения технико-аналитических параметров набора реагентов «ИФА-ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛ» по результатам независимых ИФА, которые были выполнены в ходе внутрилабораторных испытаний опытной партии набора. Полученные значения соответ-

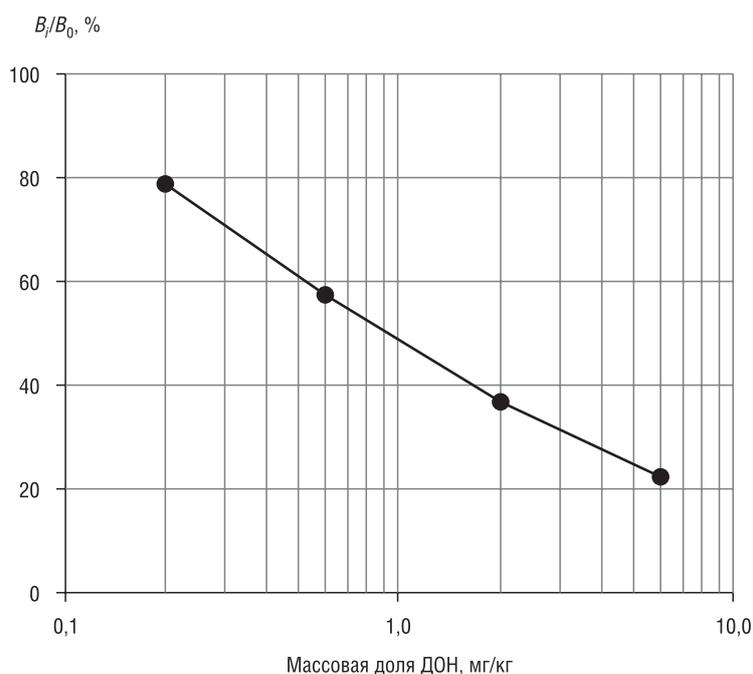


Рис. 3. Градуировочный график набора реагентов «ИФА-ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛ»

Fig. 3. EIA-DEOXYNIVALENOL kit calibration plot

ствуюць параметрам, заложеным в ТУ ВУ 100185129.164–2017, и общим требованиям качества иммуноанализа, что обеспечивает определение микотоксина ДОН в сельскохозяйственной продукции и продуктах питания в надлежащем диапазоне концентраций и с необходимой точностью. Измеренные значения массовой концентрации ДОН в референсных образцах пшеницы и кукурузы, естественно контаминированных микотоксинами, оказались в предписанных диапазонах.

Т а б л и ц а 1. Техніко-аналітычныя параметры набору
«ИФА-ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛ»

Table 1. Technical-analytical parameters of EIA-DEOXYNIVALENOL kit

Наименование показателя	Предписанное значение	Полученные значения ⁵
Соотношение $B_0, B_1, B_2, B_3, B_4^1$, о.е.	$B_0 > B_1 > B_2 > B_3 > B_4$	$B_0 > B_1 > B_2 > B_3 > B_4$
B_0 , о.е.	от 1,3 до 2,7	1,58–2,2
B_4 , о.е., не более	0,6	0,38–0,55
B_1/B_0 , процент, не более	95	73,2–86,5
B_4/B_0 , процент, не более	40	21,5–30,0
Чувствительность ² , мг/кг, не более	0,2	0,2
IC_{50}^3 , мг/кг, в пределах	0,8–2,5	1,1–1,9
Коэффициент вариации (КВ) ⁴ , процент, не более	15	8,3–13,2
Содержание ДОН (пшеница, ДТС 100-03-3), мг/кг	$1,5 \pm 0,3$	1,4–1,5
Содержание ДОН (кукуруза, МТ-С-9999I), мг/кг	1,1–1,6	1,4–1,6

¹ B_0 – B_4 – средние значения оптической плотности, выраженной в оптических единицах (о.е.) в лунках, содержащих градуировочные растворы C_0 – C_4 с увеличивающейся концентрацией ДОН.

² Чувствительность – минимальная концентрация ДОН, определяемая набором, которая рассчитана на основании значения $2SD$ (удвоенного значения среднего квадратичного отклонения) от среднего арифметического значения B_0 , мг/кг (в терминах массовой концентрации).

³ IC_{50} – массовая концентрация ДОН в мг/кг, соответствующая $B_{IC}/B_0 = 50\%$ (т.е. соответствующая половине максимальной оптической плотности в лунках).

⁴ КВ – коэффициент вариации результатов определения концентрации ДОН в лунках, содержащих градуировочный раствор C_3 , процент.

⁵ Диапазон значений, полученных в ходе внутрилабораторных испытаний.

Образцы для проведения эксперимента по оценке метрологических показателей приготовлены путем введения добавки ДОН в виде растворов с установленной концентрацией микотоксина к исследуемым пробам продуктов на трех уровнях (табл. 2). В ходе предварительных исследований на базе ГУ «ЦНИЛхлебпродукт» установлено, что массовая доля ДОН в образцах без добавки находится ниже предела измерений МВИ.МН 2477-2006 «Методика выполнения измерения ДОН с использованием тест-системы «РИДАСКРИН ФАСТ ДОН» в зерновых, зернобобовых культурах и продуктах их переработки».

Метрологические характеристики методики выполнения измерений с помощью набора реагентов «ИФА-ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛ» определяли в соответствии с СТБ ИСО 5725-3-2002 и СТБ ИСО 5725-4-2002. Правильность измерений оценивали по степени извлечения добавленного микотоксина, которая определяется отношением обнаруженной массовой доли ДОН в пробах с добавкой к теоретически рассчитанной величине.

Для измерения предела количественного обнаружения каждый продукт исследовали в 10 параллелях, проводили идентичную пробоподготовку и по градуировочному графику определяли массовую долю ДОН. Пределы измерения для каждой исследуемой группы продуктов представляют собой рассчитанную массовую долю ДОН, эквивалентную среднему значению содержания микотоксина в холостом образце продукта плюс шесть стандартных отклонений.

Т а б л и ц а 2. Результаты оценки показателей извлечения и предела обнаружения

T a b l e 2. Results of evaluation of recovery and detection limit indices

Группа продуктов	Уровень измерений	Образец	Внесенная массовая доля добавки ДОН, мг/кг	Степень извлечения, %	Предел обнаружения, мг/кг
Зерновые культуры	1	Горох	0,31	100,8	0,19
	2	Пшеница	1,02	104,4	
	3	Кукуруза	4,55	99,5	
Продукты переработки зерновых культур	1	Макароны	0,31	104,4	0,18
	2	Мука пшеничная	1,02	95,9	
	3	Крупа гречневая	3,45	102,0	

В результате проведенных исследований показано, что степень извлечения ДОН составляет более 90 %, а предел количественного обнаружения совпадает со значением первой градуировочной пробы и равен 0,2 мг/кг.

На основании данных внутрилабораторных экспериментов установлены также показатели точности и метрологические характеристики при доверительной вероятности $P=0,95$ (табл. 3) методики выполнения измерений содержания ДОН в зерне и продуктах его переработки: показатель повторяемости σ_r , показатель промежуточной прецизионности $\sigma_{I(ТО)}$ с изменяющимся фактором «время + оператор», предел повторяемости r , предел промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «время + оператор» $r_{I(ТО)}$.

Т а б л и ц а 3. Метрологические характеристики методики выполнения измерений дезоксиниваленола с использованием набора реагентов «ИФА-ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛ»

T a b l e 3. Metrological characteristics of the procedure for deoxynivalenol measurement using EIA-DEOXYNIVALENOL kit

Диапазон измерений, мг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r , %	Относительное стандартное отклонение прецизионности с изменяющимся фактором «время+оператор» $\sigma_{I(ТО)}$, %	Относительное значение предела повторяемости r , %	Относительное значение предела промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «время+оператор» $r_{I(ТО)}$, %
От 0,2 до 6,0	7,5	7,8	21	22

Заключение. Разработанный набор реагентов «ИФА-ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛ» имеет современную конструкцию, основанную на прямом конкурентном ИФА. Технический уровень и аналитические характеристики набора соответствуют требованиям, предъявляемым к современным изделиям иммуноаналитической техники. Набор может быть использован для определения ДОН в зерне и продуктах его переработки в диапазоне 0,2–6,0 мг/кг. Созданный набор не уступает лучшим импортным аналогам и может замещать их в практике контроля безопасности кормов для животных, пищевой продукции и продовольственного сырья заводскими, ветеринарными, медико-санитарными и метрологическими лабораториями. Набор «ИФА-ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛ» прост в эксплуатации, позволяет быстро и с высокой достоверностью проводить исследование сельскохозяйственной продукции растительного происхождения.

Список использованных источников

1. Микотоксины, загрязняющие корма и пищевые продукты / Д. М. Мирзоев [и др.] // Кишоварз. – 2014. – № 2. – С. 31–32.
2. Ахмадышин, Р. А. Микотоксины – контаминанты кормов / Р. А. Ахмадышин, А. В. Канарский, З. А. Канарская // Вестн. Казан. технол. ун-та. – 2007. – № 2. – С. 88–103.
3. Фисинин, В. И. Свойства и токсичность дезоксиниваленола / В. И. Фисинин, П. Ф. Сурай // Животноводство России. – 2012. – № 5. – С. 11–14.
4. Maragos, C. M. Monoclonal Antibodies for the Mycotoxins Deoxynivalenol and 3-Acetyl-Deoxynivalenol / C. M. Maragos, S. P. McCormick // Food Agric. Immunol. – 2000. – Vol. 12. – P. 181–192. <https://doi.org/10.1080/09540100050140722>

5. Casale, W.L. Enzyme-linked immunosorbent assay employing monoclonal antibody specific for deoxynivalenol (vomitoxin) and several analogs / W.L. Casale, J.J. Pestka, L. P. Hart // *J. Agr. Food Chem.* – 1988. – Vol. 36, №3. – P. 663–668. <https://doi.org/10.1021/jf00081a064>
6. Кононенко, Г.П. Опыт разработки и применения иммунореагентов для анализа 12,13-эпокситрихотец-9-ен-8-онов / Г.П. Кононенко, А.А. Буркин // *Имунопатология, аллергология, инфектология.* – 2009. – №2. – С. 16.
7. An enzyme-linked immunosorbent assay for deoxynivalenol in wheat, utilizing novel hapten derivatization procedures / E.N.C. Mills [et al.] // *Food Agric. Immunol.* – 1990. – Vol. 2, №3. – P. 109–118. <https://doi.org/10.1080/09540109009354710>
8. Deoxynivalenol in commercial beer – screening for the toxin with an indirect competitive ELISA / L. Niessen [et al.] // *Mycotoxin Res.* – 1993. – Vol. 9, №2. – P. 99–109. <https://doi.org/10.1007/bf03192241>
9. Новый набор реагентов для иммуноферментного определения афлатоксина В1 в кормах и пищевых продуктах / И.И. Вашкевич [и др.] // *Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук.* – 2016. – №2. – С. 69–75.
10. Новый набор реагентов для иммуноферментного определения зеараленона в кормах и пищевых продуктах / И.И. Вашкевич [и др.] // *Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук.* – 2016. – №4. – С. 72–79.
11. Реагенты для иммуноферментного определения токсина Т-2 в кормах и пищевых продуктах / И.И. Вашкевич [и др.] // *Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук.* – 2017. – №3. – С. 63–71.
12. Иммуноферментный анализ фумонизинов группы В в кормах и пищевых продуктах / Л.В. Дубовская [и др.] // *Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук.* – 2018. – Т. 54, №2. – С. 180–189.
13. Synthesis of stable isotope labeled 3-acetyldeoxynivalenol / M. Bretz [et al.] // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2005. – Vol. 49. – P. 1151–1153. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500153>

References

1. Mirzoev D. M., Razokov S. I., Sattorov S. S., Sulaymon H. N., Kononenko G. P., Burkin A. N. Mikotoksiny, zagryzayushchie korma i pischevye produkty. *Kishovarz* [Kishovarz], 2014, no. 2, pp. 31–32 (in Russian).
2. Ahmadyishin R. A., Kanarskii A. V., Kanarskaya Z. A. Mycotoxins are food contaminants. *Vestnik Kazanskogo tehnologicheskogo universiteta = Herald of Kazan Technological University*, 2007, no. 2, pp. 88–103 (in Russian).
3. Fisinin V. I., Surai P. F. Properties and toxicity of deoxynivalenol. *Zhivotnovodstvo Rossii* [Cattle breeding in Russia], 2012, no. 5, pp. 11–14 (in Russian).
4. Maragos C. M., McCormick S. P. Monoclonal Antibodies for the Mycotoxins Deoxynivalenol and 3-Acetyl-Deoxynivalenol. *Food and Agricultural. Immunology*, 2000, vol. 12, no 3 pp. 181–192. <https://doi.org/10.1080/09540100050140722>
5. Casale W. L., Pestka J. J., Hart L. P. Enzyme-linked immunosorbent assay employing monoclonal antibody specific for deoxynivalenol (vomitoxin) and several analogs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1988, vol. 36, no. 3, pp. 663–668. <https://doi.org/10.1021/jf00081a064>
6. Kononenko G. P., Burkin A. A. Experience in the development and use of immunoreagents for the analysis of 12, 13-epoxy-trichothec-9-en-8-ones. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, allergology, infectology*, 2009, no. 2, p. 16 (in Russian).
7. Mills E. N. C., Alcock S. M., Lee H. A., Morgan M. R. A. An enzyme-linked immunosorbent assay for deoxynivalenol in wheat, utilizing novel hapten derivatization procedures. *Food Agricultural. Immunology*, 1990, vol. 2, no. 3, pp. 109–118. <https://doi.org/10.1080/09540109009354710>
8. Niessen L., Böhm-Schrami M., Vogel H., Donhauser S. Deoxynivalenol in commercial beer – screening for the toxin with an indirect competitive ELISA. *Mycotoxin Research*, 1993, vol. 9, no. 2, pp. 99–109. <https://doi.org/10.1007/bf03192241>
9. Vashkevich I. I., Terentieva T. V., Kornilovich G. S., Sukhenko L. N., Shibeko A. I., Sviridov O. V. A new set of reagents for the immunosorbent assay of aflatoxin B1 in feed and food products. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2016, no. 2, pp. 69–75 (in Russian).
10. Vashkevich I. I., Terentieva T. V., Kornilovich G. S., Sukhenko L. N., Shibeko A. I., Sviridov O. V. A new set of reagents for the enzyme immunoassay of zearalenone in food and food. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*. 2016, no. 4, pp. 72–79 (in Russian).
11. Vashkevich I. I., Yastrebova A. A., Kuprienko O. S., Kornilovich G. S., Sukhenko L. N., Shibeko A. I., Sviridov O.V. Reagents for the enzyme immunoassay for the detection of T-2 toxin in feed and food *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2017, no. 3, pp. 63–71 (in Russian).
12. Dubovskaya L. V., Vashkevich I. I., Kuprienko O. S., Gorbachova I. V., Kornilovich G. S., Sukhenko L. N., Shibeko A. I., Sviridov O. V. Immunoenzymatic analysis of group B fumonisins in feed and food products. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2018, vol. 54, no. 2, pp. 180–189 (in Russian).
13. Bretz M., Beyer M., Cramer B., Humpf H. U. Synthesis of stable isotope labeled 3-acetyldeoxynivalenol. *Moleculiar. Nutrien. Food Research*, 2005, vol. 49, pp. 1151–1153. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500153>

Информация об авторах

Вашкевич Ирина Игнатьевна – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Акад. В.Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vashkevich@iboch.by

Куприенко Ольга Сергеевна – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Акад. В.Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: olga_garbuz@iboch.by

Горбачева Ирина Владимировна – мл. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Акад. В.Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь).

Ястребова Анна Андреевна – науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Акад. В.Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: yastrebova@iboch.by

Терентьева Татьяна Викторовна – науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Акад. В.Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь).

Корнилович Галина Сергеевна – зам. директора по науке, Центральная научно-исследовательская лаборатория хлебопродуктов (222220, Минская обл., Смолевичский р-н, пос. Октябрьский, Республика Беларусь). E-mail: cnilhp@ya.ru

Сухенко Лилия Николаевна – начальник отдела, Центральная научно-исследовательская лаборатория хлебопродуктов (222220, Минская обл., Смолевичский р-н, пос. Октябрьский, Республика Беларусь). E-mail: cnilhp@ya.ru

Шибeko Анна Ивановна – вед. инженер-химик, Центральная научно-исследовательская лаборатория хлебопродуктов (222220, Минская обл., Смолевичский р-н, пос. Октябрьский). E-mail: cnilhp@ya.ru

Свиридов Олег Васильевич – д-р хим. наук, зав. лаб., Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Акад. В.Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sviridov@iboch.by

Information about the authors

Irina I. Vashkevich – Ph. D. (Chemistry), Leading Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V.F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vashkevich@iboch.by

Olga S. Kuprienko – Ph. D. (Chemistry), Senior Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V.F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: olga_garbuz@iboch.by

Irina V. Gorbachova – Junior Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V.F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus).

Anna A. Yastrebova – Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V.F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yastrebova@iboch.by

Tatiana V. Terentieva – Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V.F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus).

Galina S. Kornilovich – Deputy Director for Science, Central Research Laboratory of Grain Products (Minsk reg., Smolevichi distr., 222220, Oktyabrsky vil., Republic of Belarus). E-mail: cnilhp@ya.ru

Liliya N. Sukhenko – Head of Department, Central Research Laboratory of Grain Products (Minsk reg., Smolevichi distr., 222220, Oktyabrsky vil., Republic of Belarus). E-mail: cnilhp@ya.ru

Anna I. Shibeko – Leading Engineer-Chemist, Central Research Laboratory of Grain Products (Minsk reg., Smolevichi distr., 222220, Oktyabrsky vil., Republic of Belarus). E-mail: cnilhp@ya.ru

Oleg V. Sviridov – D. Sc. (Chemistry), Head of Laboratory, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V.F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sviridov@iboch.by