

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

БИОАРГАНИЧНАЯ ХИМИЯ
BIOORGANIC CHEMISTRY

УДК 636.085.34:57.083.3
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2019-55-1-69-78>

Поступила в редакцию 05.10.2018
Received 05.10.2018

**И. И. Вашкевич¹, О. С. Купrienko¹, И. В. Горбачева¹, Д. А. Семенов¹,
Н. П. Перебора¹, А. А. Ястребова¹, Г. С. Корнилович², Л. Н. Сухенко²,
А. И. Шибeko², О. В. Свиридов¹**

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

**МЕТОД ПРЯМОГО КОНКУРЕНТНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОХРАТОКСИНА А В КОРМАХ
И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ**

Аннотация. Разработан и испытан набор реагентов «ИФА-ОХРАТОКСИН А» для определения охратоксина А в кормах и пищевой продукции методом прямого конкурентного иммуноферментного анализа в микропланшетном формате. Конъюгат охратоксина А с пероксидазой из корней хрена получен с использованием аминокислотного производного микотоксина, присоединенного к углеводной цепи фермента. Моноклональное антитело к определяемому микотоксину иммобилизовано в лунках планшета через антивидовые антитела барана к иммуноглобулинам мыши. Установлены технико-аналитические параметры набора «ИФА-ОХРАТОКСИН А» и метрологические характеристики методики выполнения измерений. Набор позволяет с надлежащей точностью определять охратоксин А в диапазоне содержания от 5 до 375 мкг/кг, предел количественного определения микотоксина в зерне и в продуктах его переработки составляет 5 мкг/кг.

Ключевые слова: микотоксины, охратоксин А, иммуноферментный анализ

Для цитирования. Метод прямого конкурентного иммуноферментного анализа для определения охратоксина А в кормах и пищевых продуктах / И. И. Вашкевич [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2019. – Т. 55, № 1. – С. 69–78. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2019-55-1-69-78>

**I. I. Vashkevich¹, O. S. Kuprienko¹, I. V. Gorbachova¹, D. A. Semenov¹, N. P. Perebora¹, A. A. Yastrebova¹,
G. S. Kornilovich², L. N. Sukhenko², A. I. Shibeko², O. V. Sviridov¹**

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

**DIRECT COMPETITIVE ENZYME IMMUNOASSAY METHOD FOR THE DETERMINATION
OF OCHRATOXIN A IN FEEDS AND FOODS**

Abstract. A reagent kit EIA-OCHRATOXIN A for the determination of mycotoxin ochratoxin A in feeds and foods by a direct competitive enzyme immunoassay using microtitration plate has been developed and tested. The conjugate of ochratoxin A with horseradish peroxidase was synthesized using the mycotoxin aminoderivative joined to the carbohydrate chain of the enzyme. A monoclonal antibody to the mycotoxin was immobilized on the surface of plate wells through sheep anti-mouse antibodies. 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 ochratoxin A content of agricultural products in a range of 5 to 375 mg/kg with proper accuracy and precision. The limit of quantitative determination of ochratoxin A in grain and cereal foods does not exceed 5 mg/kg.

Keywords: mycotoxins, ochratoxin A, enzyme immunoassay

For citation: Vashkevich I. I., Kuprienko O. S., Gorbachova I. V., Semenov D. A., Perebora N. P., Yastrebova A. A., Kornilovich G. S., Sukhenko L. N., Shibeko A. I., Sviridov O. V. Direct competitive enzyme immunoassay method for the determination of ochratoxin A in feeds and foods. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya khimichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Chemical series*, 2019, vol. 55, no. 1, pp. 69–78 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2019-55-1-69-78>

Охратоксины продуцируются плесневыми грибами рода Аспергилл (*Aspergillus ochraceus*, *A. melleus*, *A. sulphureus*, *A. Petrakii*) и рода Пеницилл (*Penicillium vitridicatum*). Эти микотоксины широко распространенные контаминанты зерновых культур во многих странах и представляют угрозу здоровью человека и животных [1–4].

Охратоксин А (ОТА) является наиболее токсичным соединением из группы охратоксинов. Он обладает нефротоксичным, тератогенным, канцерогенным и иммунодепрессивным действием. Установлена связь между эндемической нефропатией у людей и потреблением ими в пищу продуктов, содержащих ОТА [4]. Среди животных наибольшую чувствительность к этому токсину проявляют свиньи и птицы. Потребление корма, контаминированного ОТА, вызывает нефропатию у свиней, увеличивает чувствительность животных к инфекционным заболеваниям, снижение прироста массы. У цыплят охратоксикоз проявляется поражением почек, печени, мышечного желудка, кишечника. Токсин, поступивший в организм животного с кормом, может оставаться в органах и тканях в течение месяца, делая опасной животноводческую продукцию [5].

Ввиду высокой токсичности ОТА входит в число соединений, для которых в нашей стране установлены предельные допустимые уровни содержания в кормах (от 0,01 до 0,05 мг/кг), продовольственном сырье и продуктах питания (не более 0,005 мг/кг). В пищевых продуктах, предназначенных для питания беременных и кормящих женщин, детей раннего, дошкольного и школьного возраста присутствие ОТА не допускается (составляет менее 0,0005 мг/кг). Эти уровни токсина 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».

Часто для определения ОТА используется высокоэффективная жидкостная хроматография с флуоресцентной детекцией [6–9]. Этот метод позволяет обнаруживать ОТА с высокой чувствительностью, точностью и воспроизводимостью, однако требует тщательной трудоемкой пробоподготовки, дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала. Относительно быстрыми, простыми и дешевыми методами исследования зерна, кормов и продуктов питания на содержание в них микотоксинов являются иммунохимические методы, основанные на взаимодействии между антителом и антигеном: иммуноферментный анализ (ИФА) [10–12], иммунофлуоресцентный [13], иммунохроматографический [14] и другие виды иммуноанализа [15]. Ранее разработаны отечественные тест-системы для определения микотоксинов афлатоксина А [16], зеараленона [17], фумонизинов группы В [18], Т-2 токсина [19] и дезоксиниваленола [20] методом ИФА. Целью настоящей работы, выполняемой в рамках Государственной научно-технической программы «Промышленные био- и нанотехнологии-2020», является создание набора реагентов «ИФА-ОХРАТОКСИН А» для определения ОТА в кормах, продовольственном сырье и продуктах питания методом прямого конкурентного ИФА.

Материалы и методы. Охратоксин А, диизопропилкарбодиимид, N-гидроксисукцинимид, этилендиамин, детергенты и бактериостатики приобретены у фирмы «Sigma-Aldrich» (США). Моноклональное антитело (Мат) к ОТА предоставлено ОАО «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения» (РФ). Разборные микропланшеты из полистирола, состоящие из двенадцати 8-луночных полосок (стрипов), куплены у «Greiner bio-one» (Германия). Очищенная пероксидаза из корней хрена (ПХ) получена от фирмы «ДИА-М» (РФ). Препарат поликлональных антител барана к иммуноглобулинам класса G мыши, растворы хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и субстрата (H₂O₂), а также стоп-реагент (раствор H₂SO₄) изготовлены в Институте биорганической химии НАН Беларуси. Измельченные образцы различных зерновых культур и кормов, в которых содержание ОТА установлено с помощью набора реагентов «RIDASCREEN® FAST Ochratoxin» («R-Biopharm AG», Германия) предоставлены ГУ «ЦНИЛхлебопродукт» (РБ). Продукты переработки зерна закуплены в торговой сети г. Минска. Референсные образцы кукурузы, естественно контаминированные микотоксинами, Trilogy Reference

Material, лоты MT-C-9999I и MT-C-9999J (США), и контрольные образцы пшеницы и кукурузы ООО «DTS biotech» (РФ), а также тест-наборы зарубежных производителей предоставлены ОДО «КомПродСервис» (РБ).

Для детекции колориметрического сигнала в ИФА использовали прибор АИФ М/340 («Витязь», Беларусь). Спектр поглощения растворов ОТА снимали в кювете с длиной оптического пути 1 см в приборе Cary 5000 («Agilent», США).

Конъюгат ОТА с ПХ синтезировали следующим образом. К 0,5 мг (1,24 мкмоль) ОТА добавляли 0,2 мг (1,86 мкмоль) N-гидроксисукцинимид в 25 мкл диоксана и затем 0,3 мкл (1,86 мкмоль) диизопропилкарбодиимида в 25 мкл диоксана. Перемешивали при охлаждении до 10 °С в течение 1,5 ч, затем 4–5 ч при 20–25 °С. В реакционную смесь вносили 1,86 мг (31 мкмоль) этилендиамина в 50 мкл диоксана и перемешивали в течение ночи при 20–25 °С. Выпавший осадок отделяли после центрифугирования. Диоксан упаривали, остаток перерастворяли в 100 мкл метанола и снова упаривали растворитель. Затем полученный остаток растворяли в 100 мкл метанола и добавляли к 0,5 мл 1,6 мг/мл раствора ПХ, предварительно окисленной 10 мМ раствором периодата натрия. Инкубировали в течение 2 ч при 20–25 °С. Добавляли раствор NaBH_4 до конечной концентрации боргидрида 0,2 мг/мл и инкубировали при 4 °С в течение 2 ч. Очищали полученный конъюгат гель-хроматографией на колонке с Superose 12 (1×30 см), уравновешенной 0,15 М NaCl.

Микропланшетный иммуносорбент получали путем иммобилизации МАт к ОТА на внутренней поверхности лунок полистирольного планшета, предварительно покрытой антителами барана к иммуноглобулинам класса G мыши. 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 ОТА в ацетонитриле устанавливали спектрофотометрически, используя $\epsilon_{332} = 6330 \text{ (моль/л)}^{-1}\text{см}^{-1}$. Градуировочные пробы ОТА получали путем последовательного разведения исходного раствора микотоксина смесью метанол–вода 70:30.

В состав готового набора «ИФА-ОХРАТОКСИН А» входят следующие компоненты: иммуносорбент, 96-луночный полистирольный планшет, 12 стрипов по 8 лунок, с иммобилизованным МАт к ОТА, 1 планшет; планшет для смешивания, 96-луночный полистирольный планшет, 12 стрипов по 8 лунок, 1 планшет; градуировочные растворы ОТА, жидкие препараты, 5 флаконов, (0,7±0,02) мл. Массовая доля ОТА в диапазоне 0; 5–375 мкг/кг; конъюгат ОТА с ПХ, 11-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-ОХРАТОКСИН А» проводили следующим образом. Навеску (5,00±0,01) г размолотого образца экстрагировали 25,0 мл смеси метанол–вода в объемном соотношении 70:30, фильтровали и доводили рН раствора до значения 6–8. Полученный экстракт использовали для проведения ИФА в течение 2 ч. В лунки планшета для смешивания вносили по 100 мкл рабочего раствора конъюгата ОТА с ПХ, а затем в дубликатах по 50 мкл каждого градуировочного раствора и растворов двух 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 20–25 °С в течение 10 мин в термостате или на воздухе, исключая попадание света на планшет. По окончании времени инкубации удаляли растворы из всех лунок, проводили 5-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 приготовленного хромоген-субстратного раствора. Общее время внесения не превышало 2 мин. Закрытый планшет инкубировали в течение 5 мин

в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре 20–25 °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 ОТА набором реагентов «ИФА-ОХРАТОКСИН А» получены на основании экспериментальных данных в ходе внутрилабораторных испытаний с использованием различных образцов зерна и продуктов их переработки (макаронны, мука, жмых и шрот), кормовой продукции пивоваренной и крахмалопаточной промышленности, спиртового производства, а также кормов.

ОТА добавляли в виде растворов с установленной концентрацией микотоксина к исследуемым пробам продуктов на трех уровнях (8,78, 31,96 и 114,51 мкг/кг). Предварительно на базе ГУ «ЦНИЛхлебпродукт» установлено, что массовая доля ОТА в образцах без добавки находится ниже предела измерений МВИ.МН 2480–2006 «Методика выполнения измерения охратоксина А с использованием тест-системы «РИДАСКРИН ФАСТ Охратоксин А» в зерновых, зернобобовых культурах и продуктах их переработки». 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. Разные группы анализов получены при варьировании факторов «оператор», «время».

Результаты исследований и их обсуждение. ОТА как химическое соединение представляет собой производное изокумарина, присоединенное к L-фенилаланину: N-[(3R)-(5-хлоро-8-гидрокси-3-метил-1-оксо-7-изохроманил)-карбонил]-L-фенилаланин. Остаток фенилаланина содержит свободную карбоксильную группу, через которую может быть осуществлено прямое связывание ОТА с аминокруппами белков. Такой метод получения конъюгатов микотоксина с ПХ, БСА, овальбумином, гемоглобином и другими белками описан в ряде литературных источников [10–14, 21]. Нами предложен новый способ конъюгирования ОТА с ПХ. Он заключается в присоединении ОТА не к полипептидной, а к углеводной цепи фермента (рис. 1). В реакции с этилендиамином получали аминокпроизводное ОТА, которое далее использовали без выделения в чистом виде. Для окисления углеводной цепи гликопротеин ПХ обрабатывали периодатом. Аминокпроизводное ОТА взаимодействовало с окисленным фрагментом углеводной цепи ПХ с образованием основания Шиффа, которое восстанавливали боргидридом до устойчивого вторичного амина. В ИФА показано обратимое связывание синтезированного ферментного конъюгата ОТА со специфическими к охратоксину А МАт.

Конъюгат ОТА с ПХ является одним из базовых компонентов набора реагентов для определения охратоксина А методом прямого ИФА. Стабильность конъюгата в растворе 11-кратного

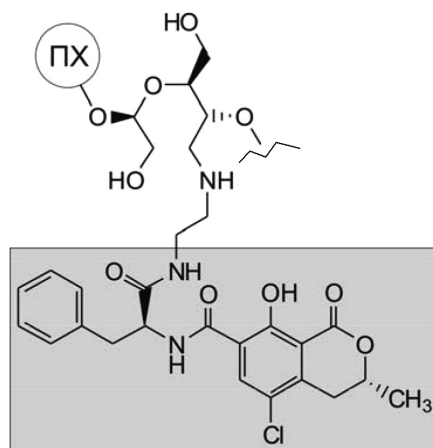


Рис. 1. Схема строения конъюгата охратоксина А с ПХ

Fig. 1. HRP-ochratoxin A conjugate structure scheme

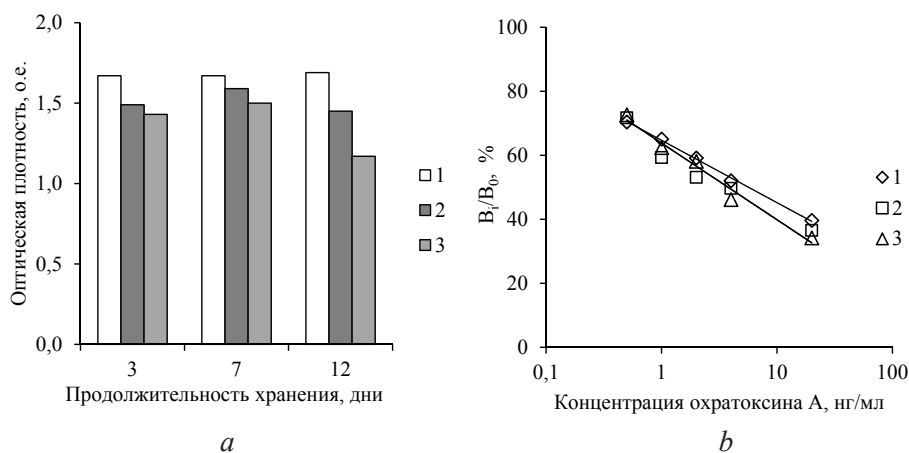


Рис. 2. Связывание конъюгата охратоксина А с ПХ, хранившегося в течение 3–12 дней (а) или 12 дней (b), со специфическими антителами в отсутствие (а) и в присутствии (b) немодифицированного охратоксина А. 1, 2, 3 – хранение соответственно при температурах 4, 20 и 37 °С

Fig. 2. Binding of HPR-ochratoxin A conjugate stored for 3 to 12 days (a) or 12 days (b) to specific antibodies in the absence (a) or presence (b) of unmodified ochratoxin A. 1, 2, 3 – storage at temperatures of 4, 20 and 37 °C, respectively

концентрата проверяли в условиях ускоренного старения. В модельной системе ИФА показано, что для конъюгата, хранившегося при 37 °С в течение 12 дней, колориметрический сигнал уменьшился примерно на 30 % по сравнению с образцом конъюгата, хранившимся при 4 °С (рис. 2, а). В то же время характер взаимодействия конъюгата с антителами в присутствии немодифицированного микотоксина остался неизменным (рис. 2, b). Полученные данные позволяют сделать вывод, что в ферментном конъюгате при хранении происходят незначительные изменения, которые не оказывают существенного влияния на результаты ИФА.

Разработанный набор реагентов «ИФА-ОХРАТОКСИН А» основан на принципе прямого конкурентного ИФА с использованием твердофазного иммуносорбента с адсорбированными антителами. Для проверки аналитических характеристик системы были использованы специфические антитела к ОТА различной природы, которые биоспецифически иммобилизовали в лунках микропланшета через антивидовые иммуноглобулины барана. Поликлональные антитела кролика к ОТА [22] оказались малопригодными из-за высокой чувствительности к присутствию метанола в пробе и существенной зависимости связывания конъюгата от температуры. Для изготовления иммуносорбента, стабильного в условиях анализа и хранения, применяли моноклональные антитела субкласса IgG1, которые давали параметры аналитической чувствительности метода на уровне 1 нг/мл ОТА при иммобилизации в низкой концентрации.

ОТА характеризуется высокой термостабильностью и устойчивостью при хранении в органических растворителях. В водных растворах в зависимости от pH этот микотоксин может присутствовать в виде неионной, моноанионной (ОТА⁻) и дианионной (ОТА²⁻) форм. При физиологических значениях pH 6–8 ОТА в растворах присутствует преимущественно в виде смеси моно- и дианиона. В этой форме микотоксин может взаимодействовать с белками (сывороточными альбуминами) и другими соединениями и образовывать комплексы с катионами щелочных и щелочноземельных металлов. Эти особенности молекулярных взаимодействий ОТА были учтены при разработке аналитического буферного раствора с нейтральным pH, в котором протекают иммунохимические реакции антиген-антитело на твердой фазе и присутствуют в подобранной концентрации наполнители белковой природы, ингибиторы комплексообразования, детергенты и стабилизаторы, совместимые с ИФА-анализом.

ОТА перед проведением ИФА экстрагируют из размолотого образца 70 %-ным раствором метанола в воде. При этом используют пятикратный избыток водно-метанольной смеси по отношению к навеске исследуемого образца. Такой подход позволяет унифицировать способ экстракции, который используется для ИФА других микотоксинов – афлатоксина А, зеараленона, токсина Т-2 и фумонизинов группы В с помощью наборов, разработанных нами ранее [16–19]. С целью

обеспечения одинаковых условий взаимодействия с антителами конъюгата ОТА–ПХ и микотоксина в составе градуировочных и исследуемых проб используется прием предварительного смешивания этих растворов в лунках отдельного планшета, прилагаемого к набору. Затем смесь растворов переносят в лунки планшетного иммуносорбента, где ОТА и его ферментный конъюгат конкурируют за сайты связывания специфических антител, иммобилизованных на внутренней поверхности лунок.

Важным условием проведения анализа с использованием разработанного ИФА-набора и получения надежных результатов является также соблюдение коротких временных режимов проведения иммунохимических и ферментативных реакций. Быстрый анализ в комбинации с внесением избытка конъюгата ОТА–ПХ позволяют исследовать подготовленные экстракты без стадий предварительной очистки и разведения и снизить неспецифические матрикс эффекты, негативно влияющие на качество выполняемых исследований. Применение согласованных по свойствам и концентрациям компонентов набора «ИФА-ОХРАТОКСИН А» позволяет по значениям оптической плотности в лунках с градуировочными растворами с известной концентрацией микотоксина построить градуировочный график и с его помощью установить содержание ОТА в анализируемых образцах. Для удобства расчетов результатов анализа сделан перевод истинной концентрации ОТА в градуировочных растворах (0,1–75 нг/мл) в массовую долю (мкг/кг) микотоксина в образцах путем умножения на коэффициент 5, учитывающий массу экстрагируемого образца, объем экстракта и степень его разбавления при пробоподготовке. Это позволяет находить значение массовой доли ОТА в исследуемом образце сразу по градуировочному графику.

Типичный градуировочный график (рис. 3) представляет собой зависимость от десятичного логарифма массовой доли ОТА, где $\text{logit} \frac{B_i}{B_0} = \log \frac{B_i / B_0}{1 - B_i / B_0}$, B_i – среднее значение оптической плотности для i -го градуировочного раствора, о.е., B_0 – среднее значение оптической плотности для градуировочного раствора с массовой долей 0 мкг/кг ОТА, о.е.

В табл. 1 приведены значения технико-аналитических параметров набора реагентов «ИФА-ОХРАТОКСИН А» по результатам независимых ИФА, которые были выполнены в ходе внутрилабораторных испытаний опытной партии набора. Полученные значения соответствуют параметрам, заложенным в ТУ ВУ 100185129.163–2017, и общим требованиям качества иммуноанализа, что обеспечивает определение микотоксина ОТА в сельскохозяйственной продукции и продуктах питания с высокой чувствительностью и надлежащим уровнем достоверности.

Измеренные значения массовой доли ОТА в референсных образцах пшеницы и кукурузы, естественно контаминированных микотоксинами, оказались в предписанных диапазонах и практически совпали с результатами, полученными с использованием наборов «RIDASCREEN® FAST Ochratoxin» и «OCHRATOXIN A ELISA» (табл. 2).

Метрологические характеристики методики выполнения измерений с помощью набора реагентов «ИФА-ОХРАТОКСИН А» определяли в соответствии с СТБ ИСО 5725–3–2002 и СТБ ИСО 5725–4–2002. Исходя из полученных значений оценок показателей прецизионности и правильности, матрицы сгруппированы в следующие группы с близкими показателями значений: 1) зерно, мукомольно-крупяные, хлебобулочные и макаронные изделия; 2) масличные культуры и продукты масложировой промышленности, зернобобовые культуры, кормовая продукция пивоваренной и крахмалопаточной промышленности, спиртового производства, корма.

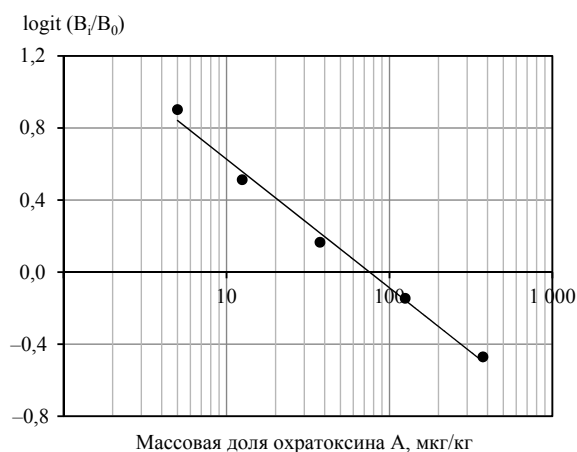


Рис. 3. Градуировочный график набора реагентов «ИФА-ОХРАТОКСИН А»

Fig. 3. EIA-OCHRATOXIN A kit calibration plot

Т а б л и ц а 1. Техничко-аналитические параметры набора «ИФА-ОХРАТОКСИН А»

Table 1. Technical-analytical parameters of EIA-OCHRATOXIN A kit

| Наименование показателя | Предписанное значение | Полученные значения ⁵ |
|--|-------------------------------------|----------------------------------|
| Соотношение $B_0, B_1, B_2, B_3, B_4, B_5^1$, о.е. | $B_0 > B_1 > B_2 > B_3 > B_4 > B_5$ | – |
| B_0 , о.е. | 1,3–2,7 | 1,4–2,2 |
| B_5 , о.е., не более | 0,6 | 0,38–0,55 |
| B_1/B_0 , %, не более | 95 | 86,2–92,5 |
| B_4/B_0 , %, не более | 40 | 32,5–39,0 |
| Чувствительность ² , мкг/кг, не более | 5,0 | Менее 5,0 |
| IC_{50}^3 , мкг/кг, в пределах | 35,0–125,0 | 49,0–72,3 |
| Коэффициент вариации (К.В.) ⁴ , %, не более | 15 | 8,3–13,2 |

¹ B_0 – B_5 – средние значения оптической плотности, выраженной в оптических единицах (о.е.) в лунках, содержащих градуировочные растворы C_0 – C_5 с увеличивающимся содержанием охратоксина А.

² Чувствительность – минимальное количество охратоксина А, определяемое набором, которое рассчитано на основании значения 2 SD (удвоенного значения среднего квадратичного отклонения) от среднего арифметического значения B_0 , мкг/кг (в терминах массовой доли).

³ IC_{50} – содержание охратоксина А в мкг/кг, соответствующее величине $B_{IC}/B_0 = 50\%$.

⁴ К. В. – коэффициент вариации результатов определения массовой доли охратоксина А в лунках, содержащих градуировочный раствор C_3 , %.

⁵ Диапазон значений, полученных в ходе внутрिलाбораторных испытаний.

Т а б л и ц а 2. Определение охратоксина А в контрольных образцах пшеницы и кукурузы

Table 2. Ochratoxin A measurement in wheat and corn reference probes

| Контрольный образец | Диапазон установленной массовой доли охратоксина А ¹ , мкг/кг | Массовая доля охратоксина А, найденная с использованием наборов ИФА, мкг/кг | | |
|----------------------|--|---|---|----------------------------------|
| | | «ИФА-ОХРАТОКСИН А», ИБОХ НАН Беларуси | «RIDASCREEN® FAST Ochratoxin», Германия | «OCHRATOXIN A ELISA», Нидерланды |
| Кукуруза МТ-С-9999 I | 1,8–7,1 | 6,7 | 8,0 | 5,7 |
| Кукуруза МТ-С-9999 J | 3,2–14,0 | 14,3 | 16,0 | 12,3 |
| Кукуруза С100–01–2 | 8,0–12,0 | 9,0 | 9,7 | 10,2 |
| Пшеница С100–01–2 | 2,0– 3,0 | < 5 ² | < 5 ² | 2,6 |

¹ Диапазон содержания охратоксина А указан в паспорте контрольного образца.

² Предел количественного определения охратоксина А наборами «ИФА-ОХРАТОКСИН А» и «RIDASCREEN® FAST Ochratoxin» составляет 5 мкг/кг.

Показатели прецизионности в виде относительных величин установлены для вышеперечисленных групп матриц как максимальные из соответствующих оценок относительных величин по всем входящим в группы продуктам. Значения всех рассчитанных показателей приведены в табл. 3.

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

Table 3. Metrological characteristics of the procedure for ochratoxin A measurement using EIA-OCHRATOXIN A kit

| Измеряемая величина | Диапазон измерений, мкг/кг | Группы продуктов | σ_p , % | $\sigma_{I(ТО)}$, % | r , % | $r_{I(ТО)}$, % | U , % |
|-----------------------------|------------------------------|---|----------------|----------------------|---------|-----------------|---------|
| Массовая доля охратоксина А | от 5,0 до 375,0 включительно | Зерно, мукомольно-крупяные, хлебобулочные и макаронные изделия | 9,6 | 10,2 | 26,9 | 28,5 | 18,0 |
| | | Масличные культуры и продукты масложировой промышленности, зернобобовые культуры, кормовая продукция пивоваренной и крахмалопаточной промышленности, спиртового производства, корма | 12,4 | 14,9 | 34,8 | 41,6 | 28,0 |

Заключение. В основе разработанного набора реагентов «ИФА-ОХРАТОКСИН А» лежит прямой конкурентный ИФА. Аналитические характеристики набора соответствуют требованиям, предъявляемым к современным методам количественного анализа. Набор позволяет быстро и с высокой достоверностью проводить исследование сельскохозяйственной продукции растительного происхождения, может быть использован для определения охратоксина А в зерне и продуктах его переработки в диапазоне 5–375 мкг/кг. Созданный набор не уступает лучшим импортным аналогам и может замещать их в практике контроля безопасности кормов, пищевой продукции и продовольственного сырья. Набор «ИФА-ОХРАТОКСИН А» прост в эксплуатации, может быть использован заводскими, ветеринарными, медико-санитарными и метрологическими лабораториями.

Список использованных источников

1. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems / Council for Agricultural Science and Technology. – Ames, Iowa, USA, 2003. – 199 p.
2. Krogh, P. Ochratoxins: occurrence, biological effects and causal role in disease / P. Krogh // *Natural Toxins: proceedings of the 6th International Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins, Uppsala, August 1979* / eds. D. Eaker, T. Waldstrom. – Oxford: Pergamon Press, 1980. – P. 673-680. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-024952-0.50085-5>
3. El Khoury, A. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status / A. el Khoury, A. Atoui // *Toxins*. – 2010. – Vol. 2, №4. – P. 461-493. <https://doi.org/10.3390/toxins2040461>
4. Reddy, L. Ochratoxins—food contaminants: impact on human health / L. Reddy, K. Bhoola // *Toxins*. – 2010. – Vol. 2. – P. 771–779. <https://doi.org/10.3390/toxins2040771>
5. 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
6. Rapid Determination of Ochratoxin A in Cereals and Cereal Products by Liquid Chromatography / J. Blesa [et al.] // *J. Chromatogr. A*. – 2004. – Vol. 1046. – P. 127-131. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.086>
7. Reinhard, H. Reversed-Phase Liquid Chromatographic Behavior of Mycotoxins Citrinin and Ochratoxin A / H. Reinhard, B. Zimmerli // *J. Chromatogr. A*. – 1999. – Vol. 862. – P. 147–159. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(99\)00929-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(99)00929-2)
8. Screening on the Occurrence of Ochratoxin A in Green Coffee Beans of Different Origins and Types / S. Romani [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2000. Vol. 48. – P. 3616-3619. <https://doi.org/10.1021/jf990783b>
9. Determination and Survey of Ochratoxin A in Wheat, Barley and Coffee-1997 / M. W. Trucksess [et al.] // *J. AOAC Int.* – 1999. – Vol. 82. – P. 85–89.
10. Development of a Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Determination of Ochratoxin A / F.-Y. Yu [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. – Vol. 53. – P. 6947–6953. <https://doi.org/10.1021/jf0513922>
11. Identification of a high-affinity monoclonal antibody against ochratoxin A and its application in enzyme-linked immunosorbent assay / X. Zhang [et al.] // *Toxicon*. – 2015. – Vol. 106. – P. 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.09.028>
12. Охратоксин А: исследование контаминации зерна / Г. П. Кононенко [и др.] // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2000. – Т. 36, № 2. – С. 209–213.
13. Determination of ochratoxin A by polyclonal antibodies based sensitive time-resolved fluoroimmunoassay / B. Huang [et al.] // *Arch. Toxicol.* – 2006. – Vol. 80. – P. 481–485. <https://doi.org/10.1007/s00204-006-0112-2>
14. Enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunoassay for ochratoxin A: investigation of analytical conditions and sample matrix on assay performance / X.-H. Wang [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2007. – Vol. 389. – P. 903–911. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1506-6>
15. Урусов, А. Е. Иммунохимические методы анализа микотоксинов (обзор) / А. Е. Урусов, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев // *Прикл. биохимия и микробиология*. – 2010. – Т. 46, № 3. – С. 276–290.
16. Новый набор реагентов для иммуноферментного определения афлатоксина В1 в кормах и пищевых продуктах / И. И. Вашкевич [и др.] // *Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук*. – 2016. – № 2. – С. 69–75.
17. Новый набор реагентов для иммуноферментного определения зеараленона в кормах и пищевых продуктах / И. И. Вашкевич [и др.] // *Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук*. – 2016. – № 4. – С. 72–79.
18. Реагенты для иммуноферментного определения токсина Т-2 в кормах и пищевых продуктах / И. И. Вашкевич [и др.] // *Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук*. – 2017. – № 3. – С. 63–71.
19. Иммуноферментный анализ фумонизинов группы В в кормах и пищевых продуктах / Л. В. Дубовская [и др.] // *Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук*. – 2018. – Т. 54, № 2. – С. 180–189. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2018-54-2-180-189>
20. Иммуноферментная система для определения дезоксиниваленола / И. И. Вашкевич [и др.] // *Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук*. – 2018. – Т. 54, № 3. – С. 319–328. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2018-54-3-319-328>
21. Clarke, J. R. Comparative Studies on the Specificity and Sensitivity of Rabbit and Laying-hen Antisera to Ochratoxin A. / J. R. Clarke, R. R. Marquardt, A. A. Frohlich // *Food Agric. Immunol.* – 1995. – Vol. 7. – P. 33–42.
22. Семенов Д. А. Иммуноферментная тест-система для количественного определения охратоксина А в пищевых продуктах и кормах с использованием экстракции микотоксина водным раствором / Д. А. Семенов, О. С. Куприенко, А. А. Ястребова // *Инновационные технологии в пищевой промышленности: материалы XVI Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 5-6 окт. 2017 г.* / Нац. акад. наук Беларуси, РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по продовольствию»; редкол.: З. В. Ловкис [и др.]. – Минск : Беларус. навука, 2017. – С. 230–232.

References

1. *Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems*. USA, Iowa, Council for Agricultural Science and Technology, 2003. 199 p.
2. Krogh, P. Ochratoxins: occurrence, biological effects and causal role in disease. *Proc. 6th Int. Symp. on Animal, Plant and Microbial Toxins "Natural Toxins"*. Uppsala, 1980, pp. 673–680. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-024952-0.50085-5>
3. El Khoury A., Atoui A. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins*, 2010, vol. 2, no. 4, pp. 461–493. <https://doi.org/10.3390/toxins2040461>
4. Reddy L., Bhoola K. Ochratoxins – food contaminants: impact on human health. *Toxins*, 2010, vol. 2, no. 4, pp. 771–779. <https://doi.org/10.3390/toxins2040771>
5. Ahmadyishin R. A., Kanarskiy A. V., Kanarskaya Z. A. Mycotoxins are food contaminants. *Vestnik Kazanskogo tehnologicheskogo universiteta = Bulletin of the Kazan Technological University*, 2007, no. 2, pp. 88–103 (in Russian).
6. Blesa J., Berrada H., Soriano J. M., Moltó J. C., Mañes J. Rapid Determination of Ochratoxin A in Cereals and Cereal Products by Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2004, vol. 1046, pp. 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.086>
7. Reinhard, H. и Zimmerli, B. Reversed-Phase Liquid Chromatographic Behavior of Mycotoxins Citrinin and Ochratoxin A. *Journal of Chromatography A*, 1999, vol. 862, pp. 147–159. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(99\)00929-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(99)00929-2)
8. Romani S., Sacchetti G., Chaves López C., Pinnavaia G.G., Dalla Rosa M. Screening on the Occurrence of Ochratoxin A in Green Coffee Beans of Different Origins and Types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, vol. 48, pp. 3616–3619. <https://doi.org/10.1021/jf990783b>
9. Trucksess M. W., Giler J., Young K., White K. D., Page S. W. Determination and Survey of Ochratoxin A in Wheat, Barley and Coffee-1997. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 1999, vol. 82, pp. 85–89.
10. Yu F.-Y., Chi T.-F., Liu B.-H., Su C.-C. Development of a Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Determination of Ochratoxin A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, vol. 53, pp. 6947–6953. <https://doi.org/10.1021/jf0513922>
11. Zhang X., Sun M., Kang Y., Xie H., Wang X., Song H., Li X., Fang W. Identification of a high-affinity monoclonal antibody against ochratoxin A and its application in enzyme-linked immunosorbent assay. *Toxicon*, 2015, vol. 106, pp. 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.09.028>
12. Kononenko G. P., Burkin A. A., Zotova E. V., Soboleva N. A. Ochratoxin A: Contamination of grain. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2000, vol. 36, no. 2, pp. 177–180. <https://doi.org/10.1007/bf02737916>
13. Huang B., Tao W., Shi J., Tang L., Jin J. Determination of ochratoxin A by polyclonal antibodies based sensitive time-resolved fluoroimmunoassay. *Archives of Toxicology*, 2006, vol. 80, стр. 481–485. <https://doi.org/10.1007/s00204-006-0112-2>
14. Wang X.-H., Liu T., Xu N., Zhang Y., Wang S. Enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunoassay for ochratoxin A: investigation of analytical conditions and sample matrix on assay performance. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, vol. 389, pp. 903–911 <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1506-6>
15. Urusov A. E., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Immunochemical methods of mycotoxin analysis (A review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2010, vol. 46, no. 3, pp. 253–266. <https://doi.org/10.1134/s0003683810030038>
16. Vashkevich I. I., Terentjeva T. V., Kornilovich G. S., Sukhenko L. N., Shibeko A. I., Sviridov O. V. New reagent kit for enzyme immunoassay of aflatoxin B1 in feeds and foods. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2016, no. 2, pp. 69–75 (in Russian).
17. Vashkevich I. I., Terentjeva T. V., Kornilovich G. S., Sukhenko L. N., Shibeko A. I., Sviridov O. V. A new kit of reagents for the ELISA determination of zearalenone in feeds and foods. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2016, no. 4, pp. 72–79 (in Russian).
18. 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 toxin T-2 in feeds and foods. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2017, no. 3, pp. 63–71 (in Russian).
19. Dubovskaya L. V., Vashkevich I. I., Kuprienko O. S., Gorbachova I. V., Kornilovich G. S., Sukhenko L. N., Shibeko A. I., Sviridov O. V. An enzyme immunoassay of fumonisins B in feeds and foods. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2018, vol. 54, no. 1, pp. 180–189 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2018-54-2-180-189>
20. 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. *Vestsi Natsyyanal'nai 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>
21. Clarke J. R., Marquardt R. R., Frohlich A. A. Comparative Studies on the Specificity and Sensitivity of Rabbit and Laying-hen Antisera to Ochratoxin A. *Food and Agricultural Immunology*, 1995, vol. 7, pp. 33–42. <https://doi.org/10.1080/09540109509354863>
22. Semenov D. A., Kuprienko O. S., Yastrebova A. A. Immunoenzyme test system for the quantitative determination of ochratoxin A in food and feed using the extraction of mycotoxin with an aqueous solution. *Materialy XVI Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii "Innovatsionnyye tekhnologii v pishchevoy promyshlennosti"* [Materials of the XVI Int. Scientific and Practical Conf. "Innovative Technologies in the Food Industry"]. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2017, pp. 230–232 (in Russian).

Информация об авторах

Вашкевич Ирина Игнатьевна – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Академика 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. Академика 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. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь).

Семенов Дмитрий Александрович – науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь).

Перебора Надежда Павловна – мл. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь).

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

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. Академика 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).

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

Nadezhda P. Perebora – 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

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 the 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 the 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