

ISSN 1561-8331 (Print)

ISSN 2524-2342 (Online)

БИОАРГАНИЧНАЯ ХИМИЯ**BIOORGANIC CHEMISTRY**

УДК 573.6.086.83:57.083.3+619.636

<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2018-54-2-180-189>

Поступила в редакцию 05.01.2017

Received 05.01.2017

**Л. В. Дубовская¹, И. В. Горбачева¹, О. С. Куприенко¹, А. А. Ястребова¹,
И. И. Вашкевич¹, 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

**ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ФУМОНИЗИНОВ ГРУППЫ В
В КОРМАХ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ**

Аннотация. Разработан и прошел внутривлабораторные испытания набор реагентов ИФА-ФУМОНИЗИН для определения микотоксинов, относящихся к фумонизинам группы В, в кормах и пищевой продукции методом прямого конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА). В состав набора входят разборный микропланшет, в лунках которого биоспецифически иммобилизовано моноклональное антитело, готовый к использованию раствор конъюгата фумонизина В₁ с пероксидазой из корней хрена, градуировочные растворы, раствор хромогена (ТМБ), субстратный раствор (или готовый к использованию хромоген-субстратный раствор) и стоп-реагент. Установленные технико-аналитические параметры набора и метрологические характеристики методики выполнения измерений соответствуют современному уровню развития ИФА и позволяют с надлежащей точностью определять содержание фумонизинов в диапазоне от 0,11 до 6,0 мг/кг в сельскохозяйственной продукции.

Ключевые слова: микотоксины, фумонизины группы В, иммуноферментный анализ

Для цитирования. Иммуноферментный анализ фумонизинов группы В в кормах и пищевых продуктах / Л. В. Дубовская [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2018. – Т. 54, № 2. – С. 180–189. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2018-54-2-180-189>

**L. V. Dubovskaya¹, I. V. Gorbacheva¹, O. S. Kuprienko¹, A. A. Yastrebova¹, I. I. Vashkevich¹,
G. S. Kornilovich², L. N. Sukchenko², A. L. 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

AN ENZYME IMMUNOASSAY OF FUMONISINS B IN FEEDS AND FOODS

Abstract. A reagent kit EIA-FUMONISIN for the determination of mycotoxins of fumonisin B group in feeds and foods by a direct competitive enzyme immunoassay using microtitration plate has been developed and tested. The evaluated technicoanalytical 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 fumonisin group B content of agricultural products in a range of 0.11 to 6.0 mg/kg with proper accuracy and precision.

Keywords: mycotoxins, fumonisins B, enzyme immunoassay

For citation. Dubovskaya L. V., Gorbacheva I. V., Kuprienko O. S., Yastrebova A. A., Vashkevich I. I., Kornilovich G. S., Sukchenko L. N., Shibeko A. L., 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. 2, pp. 180–189 (In Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2018-54-2-180-189>

Введение. Фумонизины – группа сходных по химическому строению низкомолекулярных соединений, продуцируемых в основном микроскопическими плесневыми грибами рода *Fusarium* (*verticillioides* и *proliferatum*), которые, как правило, поражают кукурузу и в меньшей степени другие зерновые культуры в период их вегетации и при хранении [1]. Контаминация кукурузы данными микотоксинами отмечается во всех регионах ее выращивания, в том числе и в странах с умеренным климатом. На уровень загрязнения в поле влияют технологии возделывания,

устойчивость сорта к грибковым заболеваниям, пораженность насекомыми, климатические условия и другие факторы. Мониторинг контаминации фумонизинами группы *B* кукурузного зерна, собранного в России, показал, что степень зараженности зависит от района произрастания и отличается по годам сбора [2]. Наиболее часто в естественно контаминированных продуктах растительного происхождения обнаруживают фумонизин B_1 (FB_1). Другие представители данной группы микотоксинов – фумонизины B_2 и B_3 (FB_2 и FB_3) – встречаются в значительно меньших количествах. Все они имеют схожие по химическому строению структуры, различающиеся расположением ОН-групп по углеродным атомам С-5 или С-10 (рис. 1). В естественно загрязненных фумонизинами продуктах, как уже было отмечено, преобладает FB_1 и его содержание колеблется от 70 до 80 % от общего содержания микотоксинов данной группы. Встречаемость FB_2 и FB_3 значительно ниже и составляет 15–25 и 3–8 % соответственно [1]. Однако в некоторых случаях было выявлено противоположное соотношение, когда содержание FB_2 выше, чем FB_1 [3].

Фумонизины, обладая строением, сходным со сфингозином, ингибируют сфинганин-IV-ацетилтрансферазу, ключевой фермент биосинтеза сфинголипидов, являющихся важными регуляторами разнообразных процессов в клетках [4]. При попадании в организм животных эти токсины могут вызывать острые микотоксикозы и приводить к летальному исходу при отеке легких у свиней и лейкоэнцефаломалиции у лошадей [5]. В хронических экспериментах на мышах и крысах показана нефро- и гепатотоксичность FB_1 [6, 7]. Экологические исследования, проведенные в фермерских хозяйствах на юге Африки и в Китае, показали, что существует корреляция между уровнем контаминации потребляемого в пищу кукурузного зерна и встречаемостью рака пищевода у населения данных регионов [5]. Полагают, что фумонизины могут являться одной из причин развития дефектов нервной трубки у эмбрионов, как следствие, нарушения ими транспорта фолиевой кислоты. Это подтверждено на животных в условиях эксперимента с длительным воздействием FB_1 [8]. Было сделано предположение о схожих эффектах и у человека, которое обосновано статистическими данными, полученными для сельских районов Транскей и Лимпопо, где основным продуктом питания является кукуруза, выращенная в мелких фермерских хозяйствах. В указанных районах частота встречаемости дефектов нервной трубки плода достигает соответственно 61 и 35 случаев на 10000 новорожденных. Этот показатель намного ниже в городских сообществах (частота встречаемости данной патологии составляет 0,99–1,18 случай на 10000 новорожденных), в которых продукты питания проходят обязательный санитарно-гигиенический контроль [5, 8]. Прослеживается связь между длительностью экспозиции и уровнем контаминации потребляемого продукта фумонизином B_1 и риском развития дефектов нервной трубки у эмбриона [9].

Присутствие токсинообразующих грибов в кормах или продуктах питания не должно автоматически связываться с контаминацией соответствующими микотоксинами, так как на этот

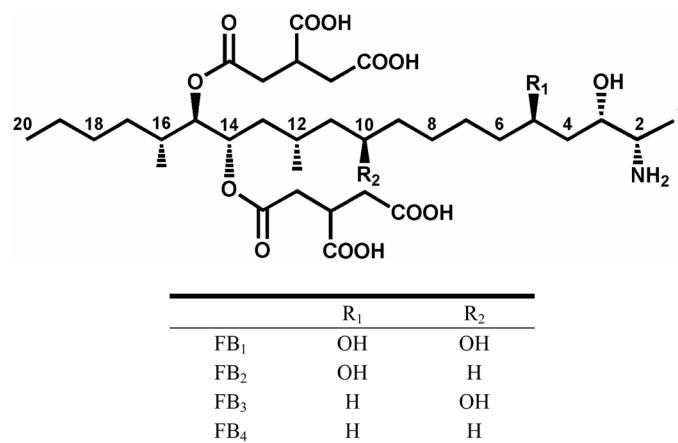


Рис. 1. Структурные формулы фумонизинов группы *B*

Fig. 1. Structural formula of fumonisin *B* group

процесс влияет множество факторов. И наоборот, видимое благополучие (т. е. отсутствие плесени) совсем не гарантирует отсутствие его токсичности, так как грибы могли погибнуть при изменившихся условиях хранения, а большинство микотоксинов обладает повышенной стойкостью к условиям окружающей среды. Поэтому визуальная оценка для определения степени контаминации кормов и продуктов питания недостаточна. Для установления их чистоты используют различные физико-химические методы. Наиболее известные и распространенные из них – тонкослойная и высокоэффективная жидкостная хроматографии. Недостаток первого метода состоит в том, что он дает полуколичественные результаты, а второго – высокая стоимость оборудования и реактивов. В обоих случаях требуется проведение длительной пробоподготовки с удалением основной массы сопутствующих компонентов экстракта, а для определения фумонизина к тому же необходимо получать его флуоресцентные производные. Альтернативой хроматографическим методам является простой в исполнении, недорогой и надежный иммуноферментный анализ (ИФА), позволяющий быстро оценивать содержание фумонизинов группы В в неочищенных экстрактах благодаря использованию высокоспецифичных антител.

Вопросы, касающиеся международной системы обязательного контроля кормов и продуктов на наличие шести основных микотоксинов, в число которых входит ФВ₁ и его аналоги, скрининговых исследований содержания микотоксинов в сельскохозяйственной продукции растительного происхождения с помощью наборов реагентов для ИФА и сложившейся ситуации с такими исследованиями в нашей стране, освещены во вводной части нашей предыдущей статьи [10]. В данной публикации описаны разработка и свойства набора реагентов ИФА-ФУМОНИЗИН.

Материалы и методы. При проведении исследования использовали следующие реактивы: NaCl «Merk» (Германия), NaHCO₃ «Riedel-deHaen» (Германия), сахароза, сорбит, трис, эуксил К-100, пептон казеина, бычий сывороточный альбумин (БСА), ФВ₁ и ФВ₂, Твин-20, перйодат натрия, боргидрид натрия «Sigma-Aldrich» (США), ацетонитрил, метанол «FischerChemicals» (Великобритания), 3',3,5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), перекись водорода, NaHPO₄×2H₂O и диметилсульфоксид (ДМСО) «AppliChem» (Германия), серная кислота х. ч. ГОСТ 4204 (Россия), пероксидаза из корней хрена (ПХ) «Диаэм» (Россия), моногидрат лимонной кислоты ч. д. а. «РОССИ» (Польша), моноклональное антитело (МАт) к фумонизину В₁ ООО «ИЛ Тест-Пушино» (Россия), Sephadex-25, Superose-12 «General Electric Healthcare» (США). Размельченные образцы зерна и корма для животных с размером частиц 1–10 мкм получены в ГУ «ЦНИЛхлебопродукт» (Беларусь). Отсутствие фумонизинов группы В в этих образцах подтверждено набором реагентов «Ridascreen-FAST Fumonizin» R-Biopharm (Германия) согласно МВИ. МН 2560–2006.

В экспериментах применяли воду с удельным электрическим сопротивлением 17–18 МОм·см, очищенную в модульной установке Water Pro Plus (Labconco, США). Для детекции колориметрического сигнала в ИФА использовали многоканальный микропланшетный спектрофотометр АИФ М/340 («Витязь», Беларусь). Спектры MALDI-TOF снимали в масс-спектрометре Microflex LRF («Bruker», Германия).

Синтез конъюгата. Ферментный конъюгат ФВ₁ получали в реакции NH₂-группы микотоксина с альдегидными группами окисленного перйодатом натрия углеводного компонента ПХ с последующим восстановлением основания Шиффа. Для этого 2 мг ПХ активировали с использованием перйодата натрия в течение 1 ч и затем очищали гель-фильтрацией на колонке с Sephadex G-25, уравновешенной 1 мМ натрий ацетатным буферным раствором (рН 4,5). К раствору ПХ добавляли 0,1 мл 10 г/л раствора ФВ₁ в смеси ацетонитрил : вода в соотношении 1:1. Внесением 0,2 М Na₂CO₃ (рН 9,5) доводили рН реакционной среды до 9,0 и инкубировали в течение 18 ч при 10 °С. Затем добавляли 0,1 мл 0,1 М раствора NaBH₄, инкубировали в течение 2 ч при 10 °С и очищали гель-хроматографией на колонке с Superose 12 (1×30 см), уравновешенной 0,15 М NaCl. Содержание остатков ФВ₁ в синтезированном конъюгате ФВ₁-ПХ, определенное масс-спектрометрией MALDI-TOF, составило в среднем 2 молекулы ФВ₁ на одну молекулу фермента (ΔМ = 1 682 Да).

Иммуносорбент. Микропланшетный иммуносорбент получали биоспецифической иммобилизацией МАт к ФВ₁ через пассивно адсорбированные на внутренней поверхности лунок в объеме 0,1 мл поликлональные антитела барана (5,0 мг/л) к мышинным иммуноглобулинам класса G. Для

стабилизации иммобилизованного МАт применяли специальные растворы, содержащие инертные для анализа белки, неорганические соли, сахара и антибактериальные добавки.

Комплектация набора. В состав готового набора ИФА-ФУМОНИЗИН входят следующие компоненты: иммуносорбент, 96-луночный полистирольный планшет, 12 стрипов по 8 лунок с биоспецифически иммобилизованным МАт, готовый к использованию, 1 планшет; планшет для смешивания, 96-луночный полистирольный планшет, 12 стрипов по 8 лунок, 1 планшет; градуировочные растворы, 6 флаконов, $(0,9 \pm 0,02)$ мл, концентрация ФВ₁ в них соответствует концентрации фумонизинов группы В в исследуемых пробах в диапазоне 0; 0,11–6,0 мг/кг (ppm) с учетом фактора разведения при пробоподготовке; конъюгат ФВ₁-ПХ, готовый к использованию раствор, 1 флакон $(14,0 \pm 0,5)$ мл; раствор хромогена (ГМБ), 1 флакон, $(0,7 \pm 0,02)$ мл; субстратный раствор, 1 флакон, $(14,0 \pm 0,5)$ мл; стоп-реагент, 1 флакон, $(14,0 \pm 0,5)$ мл.

Выполнение анализа. Исследуемый образец размалывали на мельнице типа «Циклон» и просеивали через лабораторное сито с отверстиями диаметром 1 мм. Экстракцию микотоксинов из 5,0 г размолотого образца проводили 25 мл 70 %-ного раствора метанола в течение 5–7 мин при постоянном перемешивании. После отстаивания в течение 10 мин раствор фильтровали через бумажный фильтр и (если это необходимо) доводили рН до значения 6–8. В пробирку отбирали 0,1 мл фильтрата и добавляли 0,9 мл дистиллированной воды, полученный раствор перемешивали и в течение последующих 2 ч использовали для проведения ИФА. При выполнении измерений экстракты исследуемых проб с концентрацией фумонизинов, превышающей верхний предел измерений, разводили 7,5 %-ным водным раствором метанола в 2 и более раз, при этом полученный результат умножали на коэффициент разбавления.

В лунки планшета для смешивания восьмиканальным дозатором вносили по 0,1 мл конъюгата, а затем добавляли в дубликатах по 0,1 мл каждого градуировочного раствора или разведенного в 10 раз экстракта каждого исследуемого образца и перемешивали круговыми движениями планшета по поверхности лабораторного стола. Полученные растворы в объеме 0,1 мл отбирали восьмиканальным дозатором и вносили в лунки иммуносорбента, который инкубировали в течение 15 мин в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света при температуре от 20 до 25 °С. По окончании времени инкубации не связавшиеся с антителами соединения удаляли, проводя 4-кратное промывание планшета дистиллированной водой порциями по 0,2 мл на одно промывание каждой лунки. Далее в каждую лунку промытого иммуносорбента вносили 0,1 мл хромоген-субстратного раствора, приготовленного в соотношении 1:20, который под действием фермента в составе связанного с антителами конъюгата преобразуется в окрашенный продукт. Общее время внесения должно быть не более 2 мин. Закрытый планшет инкубировали в течение 10 мин в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре от 20 до 25 °С. По истечении времени инкубации в каждую лунку иммуносорбента вносили 0,1 мл стоп-реагента, который приводит к остановке ферментативной реакции и изменению цвета раствора с голубого на желтый. Интенсивность окрашивания раствора в лунках, которую измеряли на микропланшетном фотометре как величину оптической плотности при длине волны 450 нм, обратно пропорциональна концентрации фумонизинов группы В в градуировочных растворах или исследуемых пробах. Оптическую плотность растворов в лунках следует измерить в течение 15 мин после остановки ферментативной реакции.

Обработку результатов проводили с применением прилагаемого к набору шаблона в формате Microsoft Excel. В соответствующие графы шаблона вносили полученные в условиях повторяемости данные измерения оптической плотности градуировочных растворов C_0 – C_5 и растворов исследуемых проб. С помощью предложенного шаблона автоматически производился расчет параметров связывания конъюгата ФВ₁-ПХ с иммобилизованным МАт для градуировочных растворов C_1 – C_5 и для раствора исследуемой пробы относительно градуировочного раствора C_0 , строили градуировочный график, по которому рассчитывали концентрацию фумонизинов группы В в исследуемых пробах с учетом разведений при проведении пробоподготовки, С, мг/кг (ppm).

При разработке набора ИФА-ФУМОНИЗИН его технико-аналитические параметры настраивались с учетом установленных в Беларуси предельно допустимых уровней содержания фумо-

низинов группы *B* в пищевых продуктах (не выше 2 мг/кг для взрослого населения и 0,2 мг/кг для детей и беременных женщин), кормах и комбикормах (не выше 5 мг/кг) [11].

Метрологические характеристики методики выполнения измерений концентрации фумонизинов набором реагентов ИФА-ФУМОНИЗИН получены на основании экспериментальных данных в ходе внутрилабораторных испытаний с использованием образцов зерна злаковых и зернобобовых культур (кукуруза, зерновая смесь, соя), продуктов их переработки (отруби ржаные, шрот сои, кукурузная мука и комбикорма). При этом концентрации микотоксина находились в начальном (0,19 мг/кг), среднем (1,65 и 2,43 мг/кг) и конечном (3,46, 5,42 мг/кг) отрезках градуировочного графика. Подготовленные образцы проанализированы в условиях повторяемости в лаборатории с изменяющимся фактором: «время + оператор».

Показатели прецизионности и правильности определены соответственно по СТБ ИСО 5725-3 и СТБ ИСО 5725-4, а оценки неопределенности выполнены, как описано в руководствах [12, 13].

Результаты исследований и их обсуждение. В наборе реагентов для определения фумонизинов группы *B* использовали метод прямого твердофазного конкурентного ИФА. В иммуноаналитической системе происходит прямая конкуренция между определяемым веществом и конъюгатом, находящимися в растворе, за сайты связывания с антителом, адсорбированным на носителе. Твердофазная адсорбция образующегося иммунного комплекса дает возможность быстро отделить его от других компонентов реакционной среды. Использование ферментной метки позволяет визуализировать степень иммунохимического взаимодействия при добавлении на последней стадии анализа субстрата с образованием окрашенного продукта. При этом количество адсорбированного в лунках микропланшета конъюгата обратно пропорционально количеству определяемого вещества, находящегося в исследуемой или градуировочной пробе. В предложенном нами наборе используется моноклональное антитело, при получении которого использовали ФВ₁, конъюгированный с белком-носителем через аминокислотную группу.

Все представители фумонизинов группы *B* имеют очень схожую структуру и различаются лишь наличием или отсутствием ОН-групп при атомах углерода С-5 и С-10. Используемое нами моноклональное антитело направлено на удаленную от NH₂-группы часть молекулы, содержащую два остатка тригаллиловой кислоты, которая неизменно присутствует в структуре всех представителей фумонизинов данной группы. Поэтому конъюгат ФВ₁ с ферментом получен в реакции конденсации с участием NH₂-группы у С-2 микотоксина и альдегидных функций окисленных олигосахаридных цепей ПХ. Образовавшееся основание Шиффа трансформировано в устойчивый алкиламин восстановлением NaBH₄. Строение бифункционального конъюгата ФВ₁-ПХ схематически показано на рис. 2.

Это производное ФВ₁ активно связывается с выбранным МАт и по конкурентному механизму вытесняется немечеными фумонизинами группы *B*. Количественная оценка показывает, что концентрации ФВ₁ и ФВ₂, вызывающие 50 %-ное ингибирование связывания ФВ₁-ПХ, соотносятся как 4,5 и 6,5 нг/мл (рис. 3). Микотоксины других классов не обладают ингибиторной активностью в отношении реакции комплексообразования между ФВ₁-ПХ и МАт (перекрестные реакции <0,1 %) и, следовательно, их присутствие в анализируемом образце не влияет на результаты количественного определения данной группы микотоксинов.

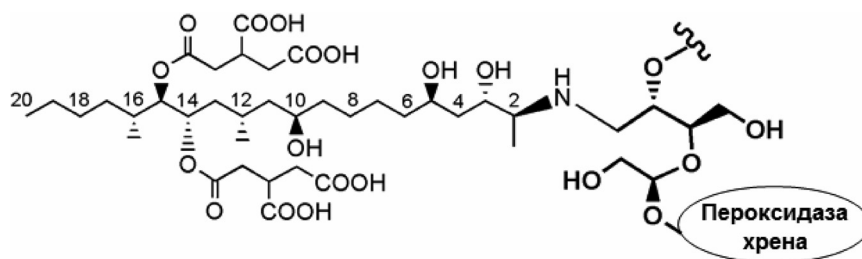


Рис. 2. Структура конъюгата фумонизина В₁ и пероксидазы из корней хрена

Fig. 2. Structure of fumonisin B₁ and horseradish peroxidase conjugate

Представленные результаты позволяют сделать вывод, что полученный конюгат ФВ₁ с ПХ является бифункциональным, сочетает в себе свойства как антигена, так и фермента, характеризуется стабильными показателями энзиматической активности и сродства к иммобилизованному МАт.

Базовым компонентом набора ИФА-ФУМОНИЗИН является разборный пластмассовый микропланшет, лунки которого покрыты МАт к ФВ₁, перекрестно реагирующим с другими представителями фумонизинов группы В. При изготовлении иммуносорбента использовали метод биоспецифической иммобилизации МАт, который позволяет существенно снизить расход данного иммунореагента и при этом сохранить его аналитические характеристики [14] и увеличить устойчивость антитела к метанолу в ИФА-системе.

Градуировочные пробы как компоненты разработанного набора – это растворы на основе стабилизированных водно-органических сред с подобранными точными концентрациями ФВ₁, проверенными по международным стандартам и независимыми физико-химическими методами.

Раствор хромогена (ТМБ) и субстратный раствор перед использованием смешивают в соотношении 1:20 и применяют на заключительной стадии анализа. Внесение в лунки иммуносорбента хромоген-субстратного раствора инициирует ферментативную реакцию перекисного окисления, катализируемую адсорбированной на стенках планшета пероксидазы в составе конюгата с ФВ₁.

Стоп-реагент – разбавленная в подобранной концентрации H₂SO₄, останавливающая ферментативный процесс с изменением окраски продуктов реакции и фиксацией ее на уровне и во времени, которые оптимальны для надежного определения микотоксинов в исследуемых пробах.

Применение описанных компонентов набора ИФА-ФУМОНИЗИН, согласно инструкции, кратко изложенной в разделе материалы и методы, позволяет используя значения оптической плотности, определенные в лунках с градуировочными растворами, содержащими известные концентрации ФВ₁, построить градуировочный график и с его помощью определять содержание фумонизинов в анализируемых образцах. При этом количество адсорбированного в лунках микропланшета конюгата обратно пропорционально количеству определяемого вещества, находящегося в исследуемой или градуировочной пробе. Градуировочный график строят, откладывая по оси абсцисс (логарифмическая шкала) значения концентрации ФВ₁ в градуировочных пробах, а по оси ординат – $\text{Logit } B/B_0$ ($\text{Lg} B/B_0 / (1 - B/B_0)$), где B_0 – оптическая плотность градуировочного раствора, не содержащего ФВ₁, B – оптическая плотность растворов в лунках с заданной концентрацией внесенного ФВ₁. Данное представление результатов позволяет с помощью встроенных инструментов Excel, рассчитывающих линию тренда по методу наименьших квадратов, линеаризовать градуировочный график, представленный на рис. 4.

В табл. 1 приведены значения технико-аналитических параметров набора реагентов ИФА-ФУМОНИЗИН по результатам независимых ИФА, которые были выполнены в ходе внутрилабораторных испытаний опытной партии набора. Установленные в результате испытаний технико-аналитические показатели набора ИФА-ФУМОНИЗИН соответствуют ТУ ВУ 100185129.152–2015 и общим требованиям качества иммуноанализа, что обеспечивает необходимую точность количественного определения фумонизинов группы В в сельскохозяйственной продукции.

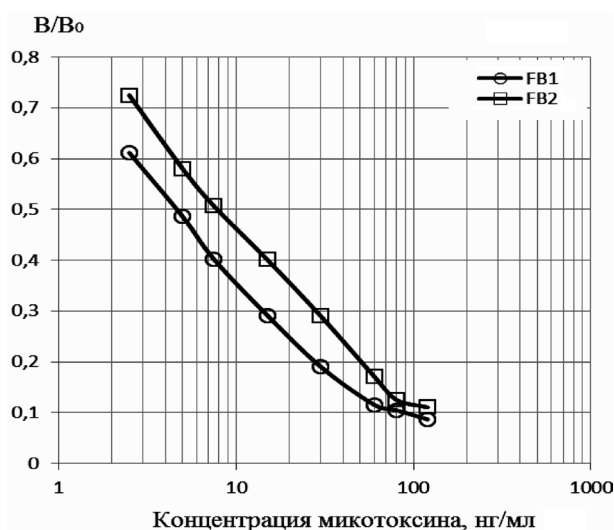


Рис. 3. Определение кросс-реактивности моноклонального антитела, используемого в наборе ИФА-ФУМОНИЗИН

Fig. 3. Determination of cross-reactivity of the monoclonal antibody used in the EIA-FUMONISIN

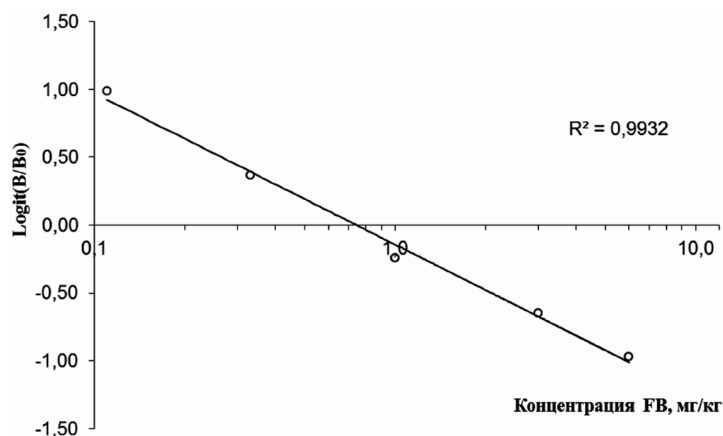


Рис. 4. Градуировочный график

Fig. 4. Calibration curve

Таблица 1. Техничко-аналитические параметры набора ИФА-ФУМОНИЗИН

Table 1. Technicoanalytical parameters of EIA-FUMONISIN

Наименование показателя	Предписанное значение (по ТУ100185129.152-2015)	Полученные значения
Соотношение $B_0, B_1, B_2, B_3, B_4, B_5^1$, о.е.	$B_0 > B_1 > B_2 > B_3 > B_4 > B_5$	$B_0 > B_1 > B_2 > B_3 > B_4 > B_5$
B_0 , о. е.	от 1,5 до 2,8	1,8–2,6
B_5 , о.е., не более	0,35	0,13–0,25
B_1/B_0 , %	от 80 до 96	87–93
B_5/B_0 , %	от 5 до 25	12–28
Чувствительность, мг/кг, не более	0,11	< 0,06
Коэффициент вариации ² , %, не более	15	9–12

Примечания: 1. B_0 – B_5 – значения оптической плотности растворов в лунках, содержащих градуировочные пробы с увеличивающейся концентрацией ФВ₁ (C_0 – C_5) соответственно, измеряемые в оптических единицах (о.е.).

2. Коэффициент вариации для результатов определения концентрации ФВ₁ в лунках, содержащих градуировочный раствор C_3 .

Определение метрологических характеристик методики выполнения измерений содержания фумонизинов группы B в зерновых культурах и продуктах их переработки набором реагентов ИФА-ФУМОНИЗИН проводилось в соответствии с существующими требованиями и действующими правилами [11, 12]. В табл. 2. приведены полученные относительные значения показателя повторяемости σ_r , показателя промежуточной прецизионности $\sigma_{I(ТО)}$ с изменяющимся фактором «время+оператор», предела повторяемости r , предела промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «время+оператор» $r_{I(ТО)}$ и относительной расширенной неопределенности U измерений концентрации фумонизинов в исследуемых пробах при доверительной вероятности $P = 0,95$.

Таблица 2. Метрологические характеристики методики выполнения измерений с использованием набора реагентов ИФА-ФУМОНИЗИН

Table 2. Metrological characteristics of the measurement technique using EIA-FUMONISIN

Диапазон измерений, мг/кг	σ_r , %	$\sigma_{I(ТО)}$, %	r , %	$r_{I(ТО)}$, %	U , %
От 0,11 до 6,00 включительно	5,7	9,3	16,0	26,0	23,0

Примечание. Предел измерений определяется значением величины нижней границы диапазона измерений.

Из данных табл. 2 следует, что разработанная методика обеспечивает получение результатов измерений содержания фумонизинов группы B с надлежащими параметрами точности.

Следует отметить, что ранее Всероссийским НИИ ВГСЭ разработан иммуноферментный набор реагентов для определения ФВ₁ в кормах, изготавливаемый фирмой Фарматекс (РФ), и введен

в действие ГОСТ 31653–2012, согласно которому производится контроль содержания ряда микотоксинов в кормах, в том числе и ФВ₁ [15]. В нашей стране наиболее популярным является набор RIDASCREEN® FAST Fumonisin, производимый фирмой R-Biopharm AG (Германия) [16]. Потребительские и технико-аналитические характеристики наборов представлены в табл. 3. Анализ приведенных данных показывает, что отечественное иммуноаналитическое изделие требует существенно меньших затрат труда и времени на подготовку и выполнение ИФА, чем российский аналог. Эксплуатационные характеристики наборов RIDASCREEN® FAST Fumonisin и ИФА-ФУМОНИЗИН схожи, но последний характеризуется более высокой чувствительностью и, как предполагается, будет обходиться потребителю намного дешевле.

Таблица 3. Техничко-аналитические и эксплуатационные характеристики иммуноферментных наборов для определения фумонизинов группы В

Table 3. Technicoanalytical and operating characteristics of immunoassay kits for fumonisins B group determination

Параметры	ИФА-ФУМОНИЗИН (ИБОХ НАН Беларуси)	Фарматекс (ВНИИ ВГСЭ, РФ)	RIDASCREEN® FAST Fumonisin (R-Biopharm AG, Германия)
Подготовка проб (время и состав раствора для экстракции)	5–7 мин встряхивание, 10 мин; метанол:вода = 7:3	16 ч, ацетонитрил:вода = 6:1	2–3 мин встряхивание, 10 мин; метанол:вода = 7:3
Приготовление рабочих растворов экстрактов	Разведение в 10 раз	Разведение в 10 раз	Разведение в 14 раз
Подготовка компонентов набора к выполнению измерений	Не требуется	Предварительная иммобилиза- ция антигена (16 ч) и пригото- вление градуировочных проб	Не требуется
Время проведения анализа	(15+10) мин (20–25 °С)	(60+60+45) мин (22–25 °С)	(10+5) мин (20–25 °С)
Диапазон измерений, мг/кг	0,11–6,0	0,05–5,0	0,22–6,0

Заключение. Разработанный набор реагентов ИФА-ФУМОНИЗИН имеет современную конструкцию, основан на принципе конкурентного связывания определяемого и меченного ферментом ФВ₁ с МАт, биоспецифически иммобилизованным в 96 лунках разборного микропланшета, содержит эффективные вспомогательные реагенты и дает возможность одновременно исследовать 43 образца на содержание фумонизинов группы В. Техничко-аналитические параметры набора и метрологические характеристики методики выполнения измерений соответствуют современному уровню ИФА и требованиям контроля безопасности пищевых продуктов и кормов. Изделие устойчиво при хранении и применении в обычных лабораторных условиях.

Список использованных источников

1. Rheeder, J. P. Production of Fumonisin Analogs by Fusarium Species / J. P. Rheeder, W. F. O. Marasas, H. F. Vismer // *Appl. Environ. Microbiol.*, May – 2002. – Vol. 68, N 5. – P. 2101–2105.
2. Буркин, А. А. Контаминация фузариотоксинами зерна кукурузы и риса на основных территориях возделывания культур в Российской Федерации / А. А. Буркин, Г. П. Кононенко // *Сельскохозяйственная биология*. – 2008. – № 5. – С. 88–90.
3. Weidenborner, M. Encyclopedia of food mycotoxins / M. Weidenborner. – Springer-Verlag Berlin, 2001. – 294 p. Doi 10.1007/978-3-662-04464-3.
4. Voss, K. A. Reproductive and sphingolipid metabolic effects of fumonisin B₁ and its alkaline hydrolysis product in LM/Bc mice: hydrolyzed fumonisin B₁ did not cause neural tube defects. / K. A. Voss, R. T. Riley, M. E. Snook, J. G. Waes // *Toxicol. Sci.* – 2009. – Vol. 112. – P. 459–467.
5. Wild, C. P. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue / C. P. Wild, Y. Y. Gong // *Carcinogenesis*. – 2010. – Vol. 31(1). – P. 71–82.
6. Gelderblom, W. C. Toxicity and carcinogenicity of the Fusarium moniliforme metabolite, fumonisin B₁, in rats / W. C. Gelderblom, N. P. Kriek, W. F. Marasas, P. G. Thiel // *Carcinogenesis*. – 1991. – Vol. 12 (7). – P. 1247–1251.
7. An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and Fusarium moniliforme / K. A. Voss [et al.] // *Environ Health Perspect.* – 2001. – Vol. 109, Suppl 2. – P. 259–266.
8. Maternal fumonisin exposure and risk for neural tube defects: Mechanisms in an in vivo mouse model / J. Gelineau-van Waes [et al.] // *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* – 2005. – Vol. 73, N. 7. – P. 48–497.

9. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas–Mexico border / S. A. Missmer [et al.] // *Environ Health Perspect.* – 2006. – Vol. 114, N 2. – P. 237–241.
10. Новый набор реагентов для иммуноферментного определения афлатоксина В₁ в кормах и пищевых продуктах / И. И. Вашкевич [и др.] // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук.* – 2016. – № 2. – С. 69–75.
11. Ветеринарно-санитарные правила обеспечения безопасности кормов, кормовых добавок и сырья для производства кормов [Электронный ресурс] : утверждены постановлением М-ва с/х и продовол. Респ. Беларусь, 10.02.2011, №10 // Законодательство Республики Беларусь. – Режим доступа: <http://pravo.newsby.org/belarus/postanov4/pst623.htm>
12. Руководство ЕВРАХИМ/СИТАК. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях: под общ. ред. Л. А. Конопелько. – СПб.: ВНИИМ им. Д. И. Менделеева, 2002. – 149 с.
13. Barwick, V. J. VAM Project 3.2.1. Development and Harmonisation of Measurement. Uncertainty Principles. Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data / V. J. Barwick, S. L. R. Ellison. – LGC (Teddington) Ltd, 2000. – 87 p.
14. Сравнение различных методов иммобилизации моноклональных антител для твердофазного конкурентного анализа / Л. В. Дубовская [и др.] // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук.* – 2007. – № 4. – С. 78–82.
15. ГОСТ 31653–2012. Корма. Метод иммуноферментного определения микотоксинов. – Введ. 01.07.2013. – М.: Межгос. совет по стандартизации, метрологии и сертификации: Фед. агентства по техн. регулированию и метрологии. – 2012. – 12 с.
16. Инструкция для количественного определения фумонизина в кормах и продуктах питания набором RIDASCREEN®FAST Fumonisin [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://food.r-iopharm.com/products/ridascreenfast-fumonisin/>

References

1. Rheeder J. P., Marasas W. F. O., Vismer H. F. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, vol. 68, no. 5, pp. 2101–2105. Doi: 10.1128/aem.68.5.2101–2105.2002
2. Burkin A. A., Kononenko G. P. Fusariotoxins content in maize and rice grain harvested in the main regions of cultivation in the Russian Federation. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya = Agricultural biology*, 2008, no. 5, pp. 88–90 (in Russian).
3. Weidenborner M. *Encyclopedia of food mycotoxins*. Berlin Heidelberg, Springer–Verlag, 2001. 294 p. Doi: 10.1007/978-3-662-04464-3
4. Voss K. A., Riley R. T., Snook M. E., Waes J. G. Reproductive and sphingolipid metabolic effects of fumonisin B1 and its alkaline hydrolysis product in LM/Bc mice: hydrolyzed fumonisin B1 did not cause neural tube defects. *Toxicological Sciences*, 2009, vol. 112, pp. 459–467. Doi: 10.1093/toxsci/kfp215
5. Wild C. P., Gong Y. Y. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis*, 2010, vol. 31, no. 1, pp. 71–82. Doi: 10.1093/carcin/bgp264
6. Gelderblom W. C., Kriek N. P., Marasas W. F., Thiel P. G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats. *Carcinogenesis*, 1991, vol. 12, no. 7, pp. 1247–1251. Doi: 10.1093/carcin/12.7.1247
7. Voss K. A., Riley R. T., Norred W. P., Bacon C. W., Meredith F. I., Howard P. C., Plattner R. D., Collins T. F., Hansen D. K., Porter J. K. An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and *Fusarium moniliforme*. *Environmental Health Perspectives*, 2001, vol. 109, no. S2, pp. 259–266. Doi: 10.1289/ehp.01109s2259
8. Waes G. J., Starr L., Maddox J., Aleman F., Voss K. A., Wilberding J., Riley R. T. Maternal fumonisin exposure and risk for neural tube defects: Mechanisms in an in vivo mouse model. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 2005, vol. 73, no. 7, pp. 487–497. Doi: 10.1002/bdra.20148
9. Missmer S. A., Suarez L., Felkner M., Wang E., Merrill A. H. Jr., Rothman K. J., Hendricks K. A. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas–Mexico border. *Environmental Health Perspectives*, 2006, vol. 114, no. 2, pp. 237–241. Doi: 10.1289/ehp.8221
10. 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. *Vesti Nacyyanal'noj 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).
11. Veterinary and sanitary rules to ensure safety of feed, feed additives and raw materials for feed production, approved by the Decree of the Ministry of Agriculture and Food of the Republic of Belarus from 10.02.2011, no. 10.
12. Konopel'ko L. A. (ed.). *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. St. Petersburg, D.I. Mendeleev Institute for Metrology (VNIIM), 2002. 149 p. (in Russian).
13. Barwick V. J., Ellison S. *VAM Project 3.2.1. Development and Harmonisation of Measurement. Uncertainty Principles. Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data*. LGC (Teddington) Ltd, 2000. 87 p.
14. Dubovskaya L. V., Sleptsova N. M., Epshteyn T. V., Vashkevich I. I., Sviridov O. V. Comparison of different methods of immobilization of monoclonal antibodies for solid competitive analysis. *Vesti Nacyyanal'noj akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2007, no. 4, pp. 78–82 (in Russian).
15. *State Standard 31653–2012. The method of enzyme immunoassay to determine mycotoxins*. Moscow, Interstate council for standardization, metrology and certification: Federal agency for technical regulation and metrology, 2012. 12 p. (in Russian).
16. *Instructions for the quantitative determination of fumonisin in feed and food products using the RIDASCREEN®-FAST Fumonisin*. Available at: <https://food.r-biopharm.com/products/ridascreenfast-fumonisin/> (accessed 31 December 2017).

Информация об авторах

Дубовская Людмила Васильевна – ст. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: dubovskaya@iboch.bas-net.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). E-mail: irinagorbachyowa@yandex.by

Куприенко Ольга Сергеевна – 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.bas-net.by

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

Вашкевич Ирина Игнатъевна – 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.bas-net.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 – нач. 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, Республика Беларусь). E-mail: cnilhp@ya.ru

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

Information about the authors

Ludmyla V. Dubovskaya – 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: dubovskaya@iboch.bas-net.by

Irina V. Gorbacheva – Junior 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: irinagorbachyowa@yandex.by

Olga S. Kuprienko – 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.bas-net.by

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

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.bas-net.by

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

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

Oleg V. Sviridov – D. Sc. (Chemistry), Senior Researcher, 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.bas-net.by