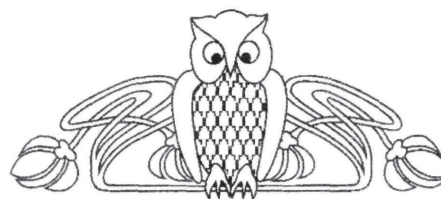


УДК 543.426

РАЗРАБОТКА ИММУНОХИМИЧЕСКИХ ТЕСТ-МЕТОДОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКОТОКСИНОВ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ

М.А. Карагушева, Е.Ю. Басова, И.Ю. Горячева

Саратовский государственный университет,
кафедра общей и неорганической химии
E-mail: goryachevaiy@info.sgu.ru



Статья посвящена разработке быстрых методов определения микотоксинов в продуктах питания. Для детекции микотоксинов применялась колонка, содержащая детектирующий иммунослой.

В качестве носителя для специфических антител использовался гель на основе цианоактивированной сефарозы 4В. Результаты анализа оценивались визуально. Разрабатываемые колонки



применяли для определения охратоксина А (ОТА) в пиве с контрольным уровнем 0,2 нг/мл и афлатоксина М1 (АфМ1) в молоке с контрольным уровнем 0,05 нг/мл.

Development of Immunochemical Tests for Mycotoxin Detection in Foodstuffs

M.A. Karagusheva, E.Yu. Basova, I.Yu. Goryacheva

The article is devoted to the development of rapid test methods for mycotoxin screening in foodstuffs. The method is based on the column with detection immunolayer. As the immunolayer gel on the base on CN-activated Sepharose 4B was used. The method used visual detection. The developed method was used for ochratoxin A detection in beer with cut-off level at 0.2 ng/ml and for aflatoxin M1 detection in milk with cut-off level at 0.05 ng/ml.

Введение

Микотоксины – вторичные метаболиты некоторых видов микроскопических грибов, которые представляют собой широкую группу токсикантов природного происхождения. Присутствие микотоксинов в продуктах питания представляет угрозу иммунной системе человека. Иммунодепрессивный эффект микотоксинов повышает чувствительность организма к вирусным и бактериальным инфекциям, приводит к злокачественному перерождению клеток, развитию аллергических изменений в организме, что определяет важность изучения этой проблемы. Микотоксины чаще всего обнаруживают в продуктах растительного и сельскохозяйственного происхождения. В организм человека и животных микотоксины попадают, прежде всего, с продуктами питания. Микотоксины обладают высокой термостойкостью и поэтому сохраняются при термической обработке. Одними из наиболее распространенных и опасных микотоксинов являются охратоксин А и группа афлатоксинов, которые присутствуют в зерне и продуктах на его основе [1], сухофруктах [2], кофе [3], какао-порошке и зернах какао [4], шоколаде [5], красном перце [6], виноградном соке [7], оливковом масле [8], пиве [9], а также в продуктах животного происхождения: молоке и молочных продуктах [10], субпродуктах [11]. Таким образом, возникает проблема определения и контроля микотоксинов в пищевой продукции и продовольственном сырье.

В настоящее время разработаны различные методы аналитического определения микотоксинов. Традиционно для определения

микотоксинов в различных объектах применяется ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием. В последние годы широкое распространение получило также масс-спектрометрическое детектирование микотоксинов [12].

Обладая неоспоримыми достоинствами, хроматографические методы длительны и требуют использования дорогого оборудования; не могут быть применены непосредственно на месте производства и переработки сельхозпродукции. В связи с этим развиваются методы быстрого и недорогого скрининга микотоксинов в пищевых продуктах: твердофазный иммуоферментный анализ [13], электрохимические иммуносенсоры [14], поляризационный флуоресцентный иммуноанализ [15], биосенсоры (основанные на измерении флуоресценции) [16], тонкослойная хроматография с денсиметрическим детектированием [17].

Наиболее перспективными являются иммунохимические тест-методы определения микотоксинов, основанные на иммунохимической реакции между антителами и антигеном. Индикация образовавшегося комплекса *антитело-антиген* может быть осуществлена, если в один из исходных компонентов ввести метку, которая легко детектируется. Самый простой способ детекции – визуальный. Иммунохимические тест-методы позволяют анализировать большое количество образцов с целью подтверждения наличия или отсутствия микотоксинов в объекте по определенному концентрационному уровню. Экспрессность выполнения, высокая специфичность антител к связыванию, точность, возможность проведения эксперимента вне лабораторных условий – все эти критерии способствовали внедрению иммунохимических методов в практику.

Общим недостатком перечисленных методов является не всегда достаточная чувствительность из-за малого объема используемой пробы. В связи с этим целью работы была разработка иммунохимического метода, позволяющего объединить концентрирование и иммунохимическое определение микотоксинов.



Экспериментальная часть

Для определения микотоксинов применялась трубка емкостью 1 мл, в которую помещали детектирующий иммунослой, который представляет собой гель на основе сефарозы 4В с активированными цианогруппами. Эти активированные группы использовались для пришивки вторичных антимышиных кроличьих антител. Для достижения оптимального результата применялась смесь сефарозы 4В с привитыми вторичными кроличьими антивидовыми антимышиными антителами и с блокированными глицином активными группами. Следующим этапом являлось связывание первичных специфических антител с вторичными антителами. Полученный гель, специфичный к микотоксинам, переносили в колонку и помещали между фритами (рисунок).



Схема колонки для проведения анализа

При проведении анализа первой стадией явилось внесение в колонку анализируемого раствора, затем, после промывки, добавляли конъюгат микотоксина (ОТА или АфМ1) с пероксидазой хрена. После проведения инкубации (3–5 мин) колонки промывали раствором буфера. Добавляли субстрат и визуально регистрировали интенсивность развивающейся окраски, которая обратно пропорциональна концентрации определяемого антигена. Если микотоксины в пробе отсутствуют, то происходит связывание с антителами конъюгата с пероксидазой хрена. Последняя вызывает каталитическую реакцию субстрата, в результате развивается синяя окраска детектирующего иммунослоя.

Результаты и обсуждение

В качестве объекта исследования были выбраны пиво и молоко. Высокое содержание микотоксинов, и прежде всего ОТА и афлатоксинов, в продуктах питания предопределило существование во многих странах

законодательно установленного максимального содержания этих микотоксинов. В частности, в странах ЕС установлено максимальное содержание ОТА в пиве на уровне 0,2 нг/мл, АфМ1 в молоке 0,05 нг/мл. Эти значения и были использованы в качестве контрольного уровня.

Определение ОТА в пиве. Варьируемыми параметрами, позволяющими влиять на чувствительность определения, являлись концентрация (разведение) специфических антител и конъюгата и объем образца. Оптимизация условий показала, что получить указанный выше контрольный уровень ОТА в образцах пива можно при использовании 3 мл образца, разведении антител 1/600 и конъюгата 1/100; время развития окраски при этом составляет 3 мин. При анализе образца, искусственно загрязненного ОТА с концентрацией 0,2 нг/мл, в таких экспериментальных условиях развитие окраски не происходило. Для анализа следующих сортов пива: темное пастеризованное фильтрованное, светлое пастеризованное не фильтрованное использовали очищающий слой (Bondesil-NH₂) с целью удаления матричного эффекта. Анализ светлого пастеризованного фильтрованного пива не требует наличия очищающего слоя.

Определение АфМ1 в молоке. При определении АфМ1 в молоке необходима стадия пробоподготовки. Для этого проводили центрифугирование с целью отделения жировой фракции. Водорастворимый АфМ1 оставался в молочной сыворотке, которая подвергалась анализу. Сыворотку объемом 3 мл пропускали через колонку, при найденном оптимальном разведении антител 1/300 и конъюгата 1/100, время развития окраски 5 мин. Для контроля параллельно анализировали молоко, искусственно загрязненное АфМ1 с концентрацией 0,05 нг/мл. Показано, что предлагаемый тест-метод имеет чувствительность на уровне 0,05 нг/мл.

Таким образом, с помощью иммунохимических методов можно осуществлять контроль за содержанием микотоксинов в продуктах питания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (грант 2007-3-1.3-28-01-229).



Библиографический список

1. *Entwisle A.C., Williams A.C., Mann P.J. et al.* Liquid chromatographic method with immunoaffinity column cleanup for determination of ochratoxin A in barley: collaborative study // *J. of AOAC Intern.* 2000. Vol.83, №6. P.1377–1383.
2. *Iamanaka B.T., Taniwaki M.H., Menezes H.C. et al.* Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil // *Food Addit. Contam.* 2005. Vol.22(12). P.1258–1263.
3. *Entwisle A.C., Williams A.C., Mann P.J. et al.* Combined phenyl silane and immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of ochratoxin A in roasted coffee: collaborative study // *J. of AOAC Int.* 2001. Vol.84, №2. P.444–450.
4. *Amézqueta S., González-Peñas E., Murillo M., López de Cerain A.* Validation of a high-performance liquid chromatography analytical method for ochratoxin A quantification in cocoa beans // *Food Addit. Contam.* 2004. Vol.21, №11. P.1096–1106.
5. *Bonvehi J.S.* Occurrence of ochratoxin A in cocoa products and chocolate // *J. Agric. Food Chem.* 2004. Vol.52, №20. P.6347–6352.
6. *Papachristou A., Markaki P.* Determination of ochratoxin A in virgin olive oils of Greek origin by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography // *Food Addit. Contam.* 2004. Vol.21, №1. P.85–92.
7. *Wiecki L.C., Wiczynska G., Kwiecien A.* Ochratoxin A: an improvement clean-up and HPLC method used to investigate wine and grape juice on the Polish market // *Food Addit. Contam.* 2005. Vol.22, №2. P.158–162.
8. *Papachristou A., Markaki P.* Determination of ochratoxin A in virgin olive oils of Greek origin by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography // *Food Addit. Contam.* 2004. Vol.21, №1. P.85–92.
9. *Visconti A., Pascale M., Centonze G.* Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2000. Vol.888, №1–2. P.321–326.
10. *Sorensen L.K., Elbæk T.H.* Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* 2005. Vol.820, №2. P.183–196.
11. *Chiavaro E., Cacchioli C., Berni E., Spotti E.* Immunoaffinity clean-up and direct fluorescence measurement of aflatoxins B1 and M1 in pig liver: Comparison with high-performance liquid chromatography determination // *Food Additives and Contaminants.* 2005. Vol.22(11). P.1154–1161.
12. *Sorensen L.K., Elbæk T.H.* Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* 2005. Vol.820, №2. P.183–196.
13. *Matrella R., Monaci L., Milillo M.A. et al.* Ochratoxin A determination in paired kidneys and muscle samples from swines slaughtered in southern Italy // *Food Control.* 2006. Vol.17, №2. P.114–117.
14. *Alarcon S.H., Micheli L., Palleschi G., Compagnone D.* Development of an electrochemical immunosensor for ochratoxin A // *Anal. Lett.* 2004. Vol.37, №8. P.1545–1558.
15. *Shim W.B., Kolosova A.Y., Kim Y.J. et al.* Fluorescence polarization immunoassay based on a monoclonal antibody for the detection of ochratoxin A. // *Intern. J. Food Sci. Tech.* 2004. Vol.39, №8. P.829–837.
16. *Ngundi M.M., Shriver-Lake L.C., Moore M.H. et al.* Array biosensor for detection of ochratoxin A in cereals and beverages // *Anal. Chem.* 2005. Vol.77, №1. P.148–154.
17. *Santos E.A., Vargas E.A.* Immunoaffinity column clean-up and thin layer chromatography for determination of ochratoxin A in green coffee // *Food Addit. Contam.* 2002. Vol.19, №5. P.447–458.