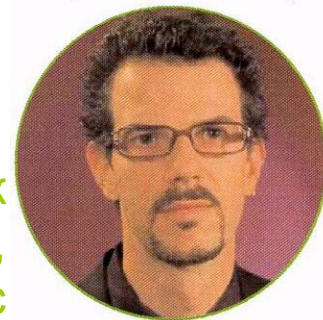


Эксперт месяца...



Доктор Александрос Янникурис, доктор наук
Координатор по исследованию гликомиксов,
Alltech Inc

История микотоксинов

Это не удивительно, что в 60-х годах возникла озабоченность микотоксинами и произошло открытие афлатоксинов, но примеры их отрицательного действия известны на протяжении всей истории человечества и показывают, что они существовали еще на самых начальных этапах развития сельскохозяйственного производства (1). Например, некоторые упоминания об эрготизме в Ветхом Завете (2) говорят о том, что фузариотоксины, такие как Т-2 токсин и зеараленон, имеют отношение к упадку цивилизации этрусков (3) и Афинскому кризису, которые имели место в 5 веке до нашей эры (4).

Контроль микотоксинов

С целью повышения осведомленности и исходя из возросшего в последнее время количества работ, направленных на стратегию по обеспечению контроля микотоксинов на различных уровнях пищевой и кормовой цепи, важно осознавать, что микотоксины представляют собой такой тип риска, которого избежать невозможно. То, что необходимо – это аналитические инструменты, которые могут работать как селективный «разведывательный радар» и определить необходимость в веществе, которое бы устранило этот риск. Определение присутствия микотоксинов является первым этапом в разработке адекватных защитных методов и требует совершенствования методов отбора проб и измерения микотоксинов. Из-за пагубного влияния, оказываемого микотоксинами, содержащимися в хлебных злаках или фуражном зерне, предельно допустимая концентрация в пище и кормах некоторых микотоксинов должна быть строго ограничена, причем для большинства из них на уровне мкг/кг и мг/кг. Главной проблемой при разработке аналитических методов является многообразие молекул микотоксинов – около 500 идентифицировано на данный момент – при одинаково демонстрируемой токсичности и экономических потерях.

Кроме того, контаминация микотоксинами зависит от условий окружающей среды, которые благоприятствуют росту плесени и интенсивному синтезу микотоксинов. По этим причинам необходимо внедрять методы, позволяющие определять микотоксин в нескольких матрицах, которые могли бы в свою очередь повысить экстракцию токсина и влиять на связанные микотоксины (5,6). Широкое химическое разнообразие метаболитов плесневых грибов ведет к множеству химических структур, которые могут оказаться в экстракте, таким образом сделать их поиск затрудненным и провоцировать ошибки.

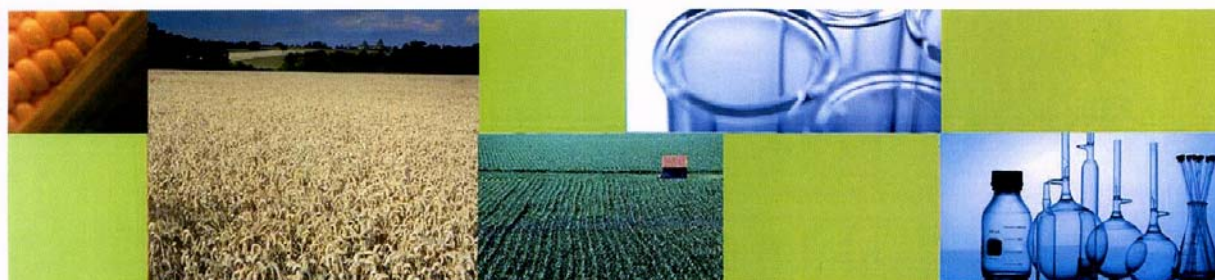
Анализ микотоксинов

Первым оценочным инструментом пищевых продуктов кормов является визуальное наблюдение признаков контаминации плесенью и подсчет колоний грибов. Однако такая оценка плохо коррелирует с наличием микотоксинов, оставляя нам анализ микотоксинов в качестве высокопроизводительного инструмента для скрининга, основанного на идентификации грибов. Все еще комплексность этой задачи представляет проблему из-за вариации различных типов синтезов микотоксина в природе. Еще более комплексной представляется техника, которая может быть использована для непрямого распознавания токсигенных и нетоксигенных штаммов грибов путем определения нестабильных метаболитов.

Это обычно делают путем применения газовой хроматографии в комбинации с детекцией масс спектрометрией (7) или, как совсем недавно, с помощью электронного носа (8).



Supported by



Точное определение концентрации микотоксинов напрямую связано с правильностью отбора пробы и ее репрезентативностью, которая может быть достигнута только путем взятия большого количества образцов большей массы. Было установлено, что правильный объем пробы должен быть 1,25-10 кг в зависимости от матрицы корма, и от 50 до 100 образцов надо отобрать для последующей гомогенизации и выделения аналитического образца массой от 62,5 до 500 г.

Объем пробы должен быть однородным и не превышать по массе другие образцы более, чем на 5%. Не имеет значения, часть партии будет в конечном счете выбракована по плану отбора проб, или наоборот, часть плохой партии будет задействована в плане отбора проб (риск продавца/покупателя или ложный отрицательный результат). Степень этого риска находится в прямой зависимости от степени вариативности, связанной с процедурой определения микотоксинов. Эта задача даже более сложная из-за различий в установленных ПДК в разных странах. Ошибки, связанные с процедурой отбора средней пробы, могут достигать свыше 80%, 10% при отборе аналитического образца и менее 10% на остальных этапах процедуры анализа.

Для эффективности и предупреждения ошибок при анализе микотоксинов, следует придерживаться принципов гарантии качества. В противном случае степень неточности анализа будет очень значительной. Четкая техника отбора проб, если проведена несоответствующим образом, будет влиять на среднюю пробу и в дальнейшем привести к серьезнейшим ошибкам в конечных результатах. Тренинг персонала необходим во избежание посторонних влияний при отборе пробы партии и средней пробы в зависимости от вида продукта. Если использовать соответствующий инструмент и приспособления, то на этапе подготовки отбора проб можно предупредить неточность анализа. Наконец, процедуру анализа должен проводить опытный специалист. Для того, чтобы гарантировать качество конечного результата важно использовать соответствующее и сертифицированные стандартные образцы наряду с валированными методами анализа (11).

С одной стороны, для кого-то достаточно быстрого и чувствительного определения микотоксинов с использованием дешевых и простых в использовании (даже в полевых условиях) скрининг тестов. Недостатком при этом являются недостаточная селективность, перекрестная реактивность (12) и флюктуация результата в зависимости от условий окружающей среды, если они применяются в полевых условиях (рН, температура, эффект матрицы и конкурентные взаимодействия, и т.п.) (13). Эти результаты требуют в дальнейшем подтверждения более надежными методами, которые демонстрируют точность выявления и количественного определения микотоксинов.

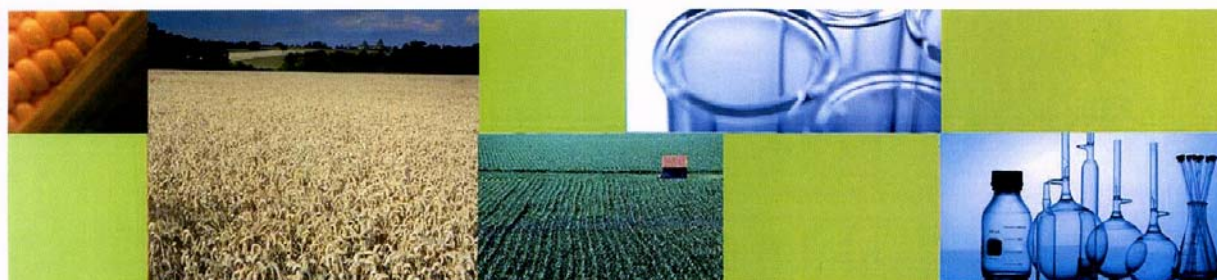
Сенсоры и биосенсоры

В качестве скрининг инструмента метод на основе иммунологической реакции использует антитела, полученные специально для определения микотоксинов. Высокая специфичность связана с гомологичностью между местом связывания – активным центром открытого для антител (эпитопов) для субстрата (микотоксина). Этот метод страдает от перекрестной реактивности упомянутой ранее, по причине существования аналогов в матрице. Эти полуколичественные или качественные методы могут иметь различную интерпретацию: радиоактивные (РИА); флуорогенные (ФИА) или хромогенные (ИФА).

ИФА обычно выбирают в качестве части плана контроля микотоксинов из-за его скорости и большого количества образцов, которое можно анализировать одновременно полуколичественно или качественно на определенном уровне концентрации токсина. Другим путем является использование боковой проточной иммунофилтрации – иммунострипов – с иммобилизованными антителами на их поверхности. В качестве сенсоров и биосенсоров также используют антитела, ферменты, бактерии, рецепторы, ДНК, или трансдукцию оптического электрохимически детектируемого сигнала (используя поверхностный плазменный резонанс, инфракрасную спектроскопию). Эти методы позволяют быстро проанализировать зерно на содержание основных групп регулируемых микотоксинов без особых пределов обнаружения на уровне от 0,5 до 20 мкг/кг, но требуют использования с осторожностью вновь по причине перекрестной реактивности возможности получения ложного положительного результата.



Supported by



Тонкослойная хроматография может применяться в тех же случаях, что и ИФА, но с большей воспроизводимостью и меньшей перекрестной реактивностью, но при этом требует хорошей очистки экстракта и, следовательно, больше времени для проведения самого анализа.

Новым развивающимся направлением является использование геномики и транскриптогеномики в качестве инструмента для анализа микотоксинов. Эти технологии используют способность живых клеток в ответ на присутствие химических веществ оставлять специфические характерные признаки в виде экспрессии гена в зависимости от типа вещества. Они могут превратиться в новый инструмент для скрининга с развитием ДНК-микрочипов, которые будут определять степень экспрессии гена специфических клеток в присутствии экстракта микотоксина из пищи или корма (14).

ВЭЖХ

Во-вторых, имея дело с широким спектром химических структур, большинство других методов основаны на жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Высокоэффективная жидкостная хроматография (или хроматография высокого давления) используется для выделения, идентификации и количественного определения соединений в соответствии с их химическими свойствами. В ВЭЖХ используются колонки, которые содержат хроматографический материал (неподвижная фаза), насос, который двигает подвижную фазу через колонку, а также детектор, который показывает время удержания молекул. Время удержания молекул варьирует в зависимости от взаимодействия между фазами, анализируемое вещество находится в подвижной фазе. ВЭЖХ до сих пор представляет собой «хороший стандарт» в определении микотоксинов, так как доступен и имеет низкие пределы обнаружения. Однако, что справедливо, этот метод требует сложную, долгую экстракцию и очистку, а следовательно, и имеет высокую стоимость.

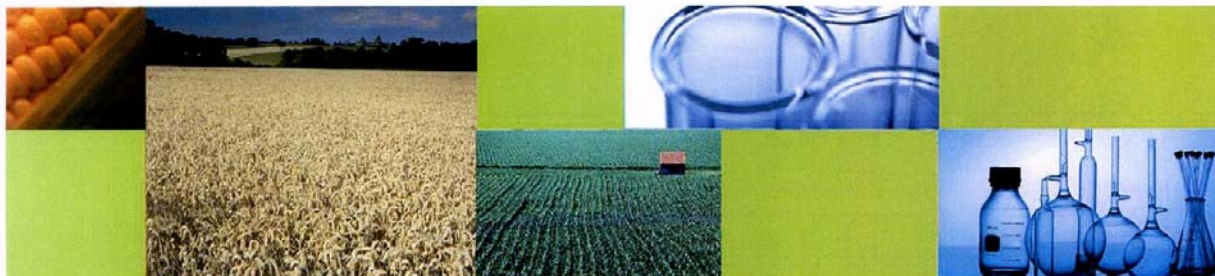
Даже если предварительная очистка и концентрирование позволяют снизить пределы обнаружения, их ограничения определяются спецификой экстракции детекции, а также условий анализа в отношении каждого отдельного токсина или группы микотоксинов (например, афлатоксинов).. Возможность определения нескольких микотоксинов поэтому ограничена и заставляет выбирать, какие микотоксины будут анализироваться. В зависимости от количества токсинов и лимита желаемой детекции получение быстрых результатов будет нереальным. Отметим, что недетектируемые результаты не обязательно означают неизмеримость, а обычно основываются на специфическом предельно допустимом уровне микотоксина для определенного региона.

Что не за горами?

Детекция микотоксинов может быть достигнута различными путями с использованием различных методов разделения, таких как газовая или жидкостная хроматография: электрофорез. Новые технологии предлагают сверхбыстрое элюирование аналита через капиллярную систему, уменьшающую продолжительность анализа методом ВЭЖХ. После чего можно выбрать совокупность присоединенных детекторов для определения микотоксинов. Флуориметрический детектор и детектор на основе диодной матрицы, судя по доступной базе данных ассоциации химиков-аналитиков, являются наиболее популярными и обсуждаемыми методами. Некоторыми моментами в этих методах, которые особо отмечаются, являются: совместимость инструментов, высокая производительность при количественном анализе, слабое взаимодействие с матрицей. Основным ограничением для этого метода является необходимость соблюдать специальные условия хроматографической сепарации аналита, которая обеспечивала бы флуоресценцию, в противном случае – необходима дополнительная дериватизация образца.



Supported by



Другая проблема заключается в уровне восстановления, стабильности дериватов и перекрытии элюированных соединений. Таким образом, требуется мультикомпонентное достижение быстрого определения нескольких аналитов для различных матриц.

Двухмерная масс спектрометрия (МС), совмещенная с сепаративной хроматографией, представляется новым методом анализа микотоксинов. Этот подход позволяет разделить по атомным массам всех элементов, присутствующих в образце, и чистое разделение микотоксинов после специфичной фрагментации. Поскольку многие компоненты имеют похожую интактную массу, добавление другого компонента позволяет определить искомым аналит по характерным только ему признакам. Количественное определение достигается путем специального мониторинга множественных фрагментов ионов в течение времени хроматографического элюирования. Анализ в значительной степени повышается по чувствительности и точности (17). Добавление хроматографического этапа дает время-зависимую элюцию всех типов, при одновременном определении нескольких веществ в образце.

Лимитирующие факторы проявляются в супрессии эффективности ионизации под влиянием матрицы и большом различии микотоксинов, которые могут быть обнаружены, а также отсутствие некоторых калибровочных стандартов. Недавняя работа позволила определить и дереплицировать около 500 различных метаболитов плесневых грибов, хотя только качественно (18). Другой интересный аспект ЖХ-МС метода – возможность работать непосредственно с сырым экстрактом, получаемым путем заливки экстракта и его фильтрации, что значительно ускоряет процедуру анализа.

Другая технология, которая также доступна, но, возможно, менее популярна, чем предыдущая – капиллярный электрофорез в сочетании с флуоресцентным и УФ детекторами может использоваться таким же образом, как и ВЭЖХ. Спектрометрия ионной подвижности и волновая спектрометрия ионной подвижности -масс спектрометрия являются другими методами предлагаемыми для анализа следовых количеств микотоксинов (15).

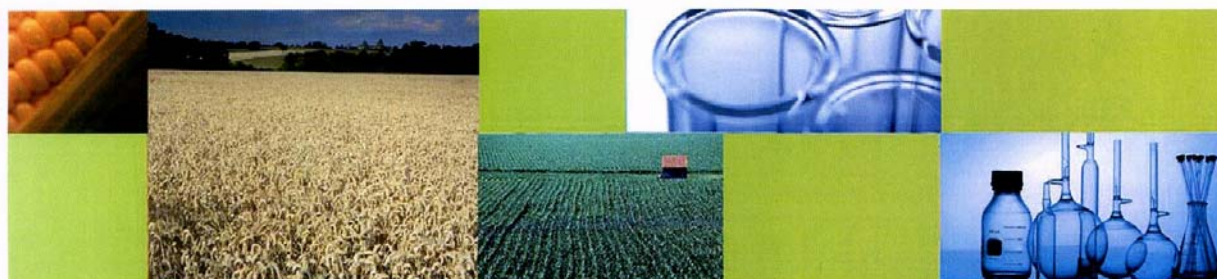
Методика масс спектрометрии благодаря новейшим разработкам интерфейса и миниатюрности компонентов, становится распространенным прибором практически в любой аналитической лаборатории. Благодаря способности мультidetекции, качеству, скорости, надежности и стоимости этого инструмента он устанавливается непосредственно в лабораториях производителей кормов и пищевых продуктов. Наконец, возможность применения этой технологии для анализа бесконечного количества других контаминантов (таких как пестициды, меланин и проч.) или для анализа важных компонентов делает ее универсальной.

Заключение

Сложность определения микотоксина можно отметить по количеству методов, которые используются более или менее эффективно для анализа их присутствия. Сложность при их применении и использовании также многообразна по причине свойств микотоксинов, их химических различий, метаболизации в другие типы молекул. Комплексность их взаимодействий с матрицей представляет собой другую сложность. В этом отношении микотоксины могут находиться в форме конъюгированных метаболитов одного или нескольких гликозидов или остатков глюкуронизидов, что маскирует микотоксины при анализе. Постоянное совершенствование аналитических инструментов и процедуры экстракции поможет нивелировать ошибки, также лучше понять, предсказать и выявлять наличие микотоксинов в полевых условиях.



Supported by



Библиография:

1. Pittet A, Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an update review, *Rev. Med. Vet.* (1998), 149, 479–492
2. Schoental R, Mycotoxins and the Bible, *Perspect. Biol. Med.* (1984), 28, 117–120.
3. Schoental R, Mycotoxins, porphyrias and the decline of the Etruscans, *J. Appl. Toxicol.* (1991), 11, 453–454.
4. Schoental R, Mycotoxins in food and the plague in Athens, *J. Nutr. Med.* (1994), 4, 83–85.
5. Berthiller F, Dall'Asta C, Schumacher R, Lemmens M, Adam G, Krska R, Masked Mycotoxins: Determination of a Deoxynivalenol Glucoside in Artificially and Naturally Contaminated Wheat by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* (2005), 53, 3421-3425.
6. Zhou B, Li Y, Gillespie J, He GQ, Horsley R, Schwarz P, Doehlert matrix design for optimization of the determination of bound deoxynivalenol in barley grain with trifluoroacetic acid (TFA), *J. Agric. Food Chem.* (2007), 55, 10141-10149.
7. Demyttenaere JCR, Morina RM, Sandra P, Monitoring and fast detection of mycotoxin-producing fungi based on headspace solid-phase microextraction and headspace sorptive extraction of the volatile metabolites. *J. Chromatogr. A* (2003), 985, 127-135.
8. Presicce DS, Forleo A, taurino AM, Zuppa M, Siciliano P, Laddomada B, Logrieco A, Visconti A. Response evaluation of an E-nose towards contaminated wheat by *Fusarium poae* fungi. *Sens. Act. B* (2006), 118, 433-438.
9. Pitchford JB, USDA Grain Inspection Handbook. United States Department of Agriculture Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration Federal Grain Inspection Service Program Handbook - Book1 (1995).
10. Whitaker TB, Johansson AS, Slate AB, Sampling Feeds for Mycotoxin Analysis - Book/Chapter. (2005) pp. 1-23.
11. Brera C, Miraglia M. Quality Assurance in Mycotoxin Analysis. *Microchem. J.* (1996), 54, 465-471
12. Erbs M, Hartmann N, Bucheli TD, Determination of the cross-reactivities for alpha-zearalenol, beta-zearalenol, zearalanone, alpha-zearalanol, and beta-zearalanol on three commercial immunoaffinity columns targeting zearalenone. *J. AOAC Intern.* (2007), 90, 1197–1202.
13. Schneider E, Curtui V, Seidler C, Dietrich R, Usleber E, Märtlbauer E, Rapid methods for deoxynivalenol and other trichothecenes. *Toxicol. Lett.* (2004), 153, 113–121.
14. Nageli H, Transcriptomics as a tool for the determination of trichothecenes. World Mycotoxin Forum, the 5th Conference – Abstract book (2008), pp. 60
15. Cigic IK, Prosen H, An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. *Int. J. Mol. Sci.* (2009), 10, 62-115.
16. Maier NM, Buttinger G, Welhartzki S, Gavioli E, Lindner W, Molecularly imprinted polymer-assisted sample clean-up of ochratoxin A from red wine: merits and limitations. *J. Chromatogr. B* (2004), 804, 103-111.
17. Berthiller F, Schumacher R, Buttinger R, Krska R, Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* (2005), 1062, 209-216.
18. Nielsen KF, Smedsgaard J, Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for derpication by standardized liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. *J. Chromatogr. A* (2003), 1002, 111-136.



Supported by

