https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-67-109
УДК 543.865/.867

Check for updates
CC BY 4.0

Обзорная статья/Review article

Методы и перспективы определения микотоксинов в лекарственном растительном сырье (обзор)

О. В. Тринеева[1]*

1 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (ВГУ), фармацевтический факультет, кафедра фармацевтической химии и фармацевтической технологии, 394006, Россия, Воронеж, Университетская пл., д. 1

***Контактное лицо:** Тринеева Ольга Валерьевна. **E-mail:** trineevaov@mail.ru

ORCID: О. В. Тринеева – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067.

Статья поступила: 18.06.2020. **Статья принята в печать:** 20.07.2020. **Статья опубликована:** 28.08.2020

Резюме

Введение. Микотоксины (МТ) – это вторичные метаболиты микроскопических плесневых грибов, обладающие выраженными токсическими свойствами.

Текст. В настоящее время в пищевой и фармацевтической промышленности приобретает особое значение разработка экспресс-методов определения содержания МТ, обладающих мутагенными, тератогенными и канцерогенными свойствами. Создание методов их аналитического контроля продолжает оставаться в центре внимания крупнейших международных организаций (IUPAC, AOAC International и IFJU), специализированных национальных организаций стран ЕС и США, а также академий и министерств многих стран мира. Указом Президента Российской Федерации (РФ) была утверждена Доктрина продовольственной безопасности РФ № 120 от 30.01.2010 г. Министерством сельского хозяйства РФ был издан приказ «О внедрении плана государственного ветеринарного лабораторного мониторинга» № 780 от 30 мая 2003 г. В нашей стране исследования МТ, согласно плану мониторинга и Рекомендации Комиссии ЕС, ограничиваются определением содержания шести тестированных МТ – суммы афлатоксинов (АФЛ), охратоксинов (ОТ), зеараленона (ЗЕА), трихотеценов (ТТ), патулина (П), Т-2 токсина в сельскохозяйственном пищевом сырье, пищевых продуктах и кормах. МТ являются природными загрязнителями не только зерна злаковых, бобовых, семян подсолнечника, а также овощей и фруктов, но и лекарственного растительного сырья (ЛРС), а также фармацевтических субстанций растительного происхождения, в частности, таких как жирные растительные масла, широко применяемые в фармации в качестве самостоятельных лекарственных средств, а также вспомогательных компонентов для производства лекарственных препаратов, БАД, растворителей инъекционных препаратов и др. В РФ содержание МТ в ЛРС пока не нормируется. Предотвратить загрязнение ЛРС МТ практически невозможно, поэтому необходим строгий контроль данных веществ. Однако, данная проблема и необходимость введения подобного исследования в перечень показателей оценки доброкачественности ЛРС требует углубленного изучения и оценки степени его зараженности. Кроме того, стандартные методы определения нормируемых МТ, обычно, не рассчитаны на выявление трансформированных форм, и их содержание остается неучтенным. Поэтому модифицированные лекарственным растением метаболиты МТ, получили название замаскированных (конъюгированных, трансформированных) растением МТ, содержание которых также необходимо оценивать. МТ могут образовываться также при хранении ЛРС под действием развивающихся в них микроскопических грибов. Так как основой для получения лекарственных средств растительного происхождения являются лекарственные растения, которые относятся к сырью, наиболее контаминированному различными микроорганизмами, вирусами, плесневыми грибами, то при этом заражению может подвергаться не только ЛРС, но и почти все субстанции, и лекарственные растительные препараты (ЛРП). Показано, что МТ сохраняются в высушенном ЛРС более 100 лет. Установлено, что многое ЛРС густо обсеменено плесневыми грибами класса Deuteromycetes, что можно обнаружить при проведении микроскопического анализа. Целью настоящей работы являлась систематизация методов определения основных МТ на основе анализа отечественной литературы для возможного дальнейшего их применения в оценке качества ЛРС и ЛРП на его основе.

Заключение. МТ негативно действуют на организм животных и человека и с трудом поддаются деконтаминации. МТ могут присутствовать в ЛРС без видимого роста плесени. МТ не теряет токсичности в течение многих лет. Полностью исключить образование МТ в сырье не представляется возможным, поэтому задача контролирующих ее качество служб – выявить наличие МТ и сравнить обнаруженное количество с нормами предельного содержания. Содержание МТ в ЛРС в настоящее время в РФ не определяется по ГФ РФ XIV изд. Однако, решением Совета Евразийской экономической комиссии от 26.01.2018 г. № 15 утверждены Правила надлежащей практики выращивания, сбора, обработки и хранения исходного сырья растительного происхождения, в которых прописана недопустимость образования плесени в процессе первичной обработки, хранения и транспортировки ЛРС. Следовательно накопление экспериментального материала, а также развитие фармакопейных методов анализа ЛРС, постоянно ужесточающих требования к качеству, вероятно, может привести к включению данного показателя в фармакопейные статьи (ФС). В связи с чем, интересным представилось проведение обзора существующих методов анализа МТ, с возможным последующим их включением в ОФС и ФС. Традиционными методами анализа МТ является физико-химические методы. Наибольшее распространение нашли хроматографические методы: ВЭЖХ, ГЖХ с применением различных детекторов (масс-спектрометрического, флуоресцентного, амперометрического и т. д.). Особое место среди методов разделения занимает ТСХ. Данные методы, безусловно, способны обеспечить достаточную специфичность и необходимую чувствительность определения, однако являются дорогостоящими, рассчитаны преимущественно на специализированные и хорошо оснащенные стационарные лаборатории, а также требуют высокой квалификации персонала. Ни один из них также нельзя отнести к экспресс-методам. Сложность определения МТ в ЛРС связана с продолжительной и трудоемкой пробоподготовкой, а также с использованием дорогостоящих высокочувствительных методов (ВЭЖХ, ЖХ, ГЖХ), которые не могут быть применены непосредственно на месте производства и переработки ЛРС. Наиболее перспективными являются иммунохимические тест-методы определения МТ, основанные на иммунохимической реакции между антителом и антигеном. Показано, что высокая специфичность и возможность выявления МТ в низких концентрациях в сочетании с существующим разнообразным приборным обеспечением позволяют рассматривать иммунохимические методы анализа как наиболее перспективные для широкого практического использования.

Ключевые слова: микотоксины, лекарственное растительное сырье, методы анализа, микотоксикозы.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Автор осуществлял обзор литературы, его систематизацию и анализ.

Для цитирования: Тринеева О. В. Методы и перспективы определения микотоксинов в лекарственном растительном сырье. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):67–109. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-67-109

© Тринеева О. В., 2020
© Trineeva O. V., 2020

Methods and Prospects for Determination of Mycotoxins in Medicinal Herbal Raw Materials (Review)

Olga V. Trineeva[1]*

1 – Voronezh State University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Technology, 1, University Square, Voronezh, 394006, Russia

***Corresponding author:** Olga V. Trineeva. **E-mail:** trineevaov@mail.ru

ORCID: Olga V. Trineeva – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067.

Received: 18.06.2020. **Revised:** 20.07.2020. **Published:** 28.08.2020

Abstract

Introduction. Mycotoxins (MT) are secondary metabolites of microscopic mold fungi with pronounced toxic properties.

Text. Currently, the development of express methods for determining the content of MT with mutagenic, teratogenic and carcinogenic properties is of particular importance in the food and pharmaceutical industries. The creation of methods for their analytical control continues to be the focus of attention of the largest international organizations (IUPAC, AOAC International and IFJU), specialized national organizations of the EU and the USA, as well as academies and ministries of many countries of the world. By the Decree of the President of the Russian Federation (RF), the Doctrine of Food Security of the RF № 120 dated January 30, 2010 was approved. The Ministry of Agriculture of the RF issued an order «On the implementation of the state veterinary laboratory monitoring plan» № 780 dated May 30, 2003. In our country, MT studies, according to the plan Monitoring and Recommendations of the EU Commission are limited to determining the content of six tested MTs – the sum of aflatoxins (AFL), ochratoxins (OT), zearalenone (ZEA), trichothecenes (TT), patulin (P), T-2 toxin in agricultural raw materials, food products and feed. MTs are natural pollutants not only of grains of cereals, legumes, sunflower seeds, as well as vegetables and fruits, but also of medicinal plant materials (MPM), as well as pharmaceutical substances of plant origin, in particular, such as fatty vegetable oils widely used in pharmacy in as independent drugs, as well as auxiliary components for the production of drugs, dietary supplements, solvents for injection drugs, etc. In the RF, the MT content in MPM is not yet standardized. It is almost impossible to prevent contamination of the MPM MT, therefore, strict control of these substances is necessary. However, this problem and the need to introduce such a study into the list of indicators for evaluating the quality of MPM requires an in-depth study and an assessment of the degree of its infection. In addition, standard methods for determining normalized MTs are usually not designed to detect transformed forms, and their content remains unaccounted for. Therefore, MT metabolites modified by a medicinal plant are called masked (conjugated, transformed) MT plants, the content of which also needs to be evaluated. MTs can also form during storage of MPM under the action of microscopic fungi developing in them. Since the basis for obtaining herbal medicines are medicinal plants, which are raw materials that are most contaminated with various microorganisms, viruses, and molds, not only MPM, but also almost all substances and herbal medicines (HM) can be infected). It has been shown that MTs remain in dried MPM for more than 100 years. It was found that a lot of MPM densely seeded with Deuteromycetes class molds, which can be detected by microscopic analysis. The aim of this work was to systematize the methods for determining the main MT based on the analysis of domestic literature for their possible further use in assessing the quality of MPM and HM based on it.

Conclusion. MTs adversely affect the body of animals and humans and are difficult to decontaminate. MTs may be present in MPM without visible mold growth. MT does not lose toxicity for many years. It is not possible to completely eliminate the formation of MT in raw materials, therefore, the task of controlling its quality of services is to identify the presence of MT and compare the detected amount with the norms of maximum content. The content of MT in MPM is currently not determined in the RF by the RF GF XIV ed. However, by the decision of the Council of the Eurasian Economic Commission dated January 26, 2018 №15, the Rules of Good Practice for the cultivation, collection, processing and storage of raw materials of plant origin were approved, which stipulate the inadmissibility of mold formation during the primary processing, storage and transportation of cattle. Therefore, the accumulation of experimental material, as well as the development of pharmacopoeial methods for the analysis of MPM, constantly tightening quality requirements, can lead to the inclusion of this indicator in pharmacopoeial articles (PA). In this connection, it was interesting to conduct a review of existing methods of MT analysis, with their possible subsequent inclusion in the GPA and PA. The traditional methods of MT analysis are physicochemical methods. The most widely used chromatographic methods: HPLC, GLC using various detectors (mass spectrometric, fluorescence, amperometric, etc.). TLC occupies a special place among the separation methods. These methods, of course, are able to provide sufficient specificity and the necessary sensitivity of the determination, however, they are expensive, designed primarily for specialized and well-equipped stationary laboratories, and also require highly qualified personnel. None of them can also be attributed to express methods. The complexity of determining MT in MPM is associated with long and laborious sample preparation, as well as with the use of expensive highly sensitive methods (HPLC, GLC), which cannot be applied directly at the place of production and processing of MPM. The most promising are immunochemical test methods for determining MT, based on the immunochemical reaction between the antibody and antigen. It was shown that the high specificity and the possibility of detecting MT in low concentrations in combination with the existing diverse instrumentation make it possible to consider immunochemical methods of analysis as the most promising for wide practical use.

Keywords: mycotoxins, herbal raw materials, analysis methods, mycotoxicoses.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. The author carried out a review of the literature, its systematization and analysis.

For citation: Trineeva O. V. Methods and prospects for determination of mycotoxins in medicinal herbal raw materials . *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):67–109. (In Russ.). https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-67-109

ВВЕДЕНИЕ

Микотоксины (МТ) (от греч. *mukes* — гриб и *toxicon* – яд) – это вторичные метаболиты микроскопических плесневых грибов, обладающие выраженными токсическими свойствами. В настоящее время в пищевой и фармацевтической промышленности приобретает особое значение разработка экспресс-методов определения содержания МТ, обладающих мутагенными, тератогенными и канцерогенными свойствами. Создание методов их аналитического контроля продолжает оставаться в центре внимания крупнейших международных организаций (IUPAC, AOAC International и IFJU), специализированных национальных организаций стран ЕС и США, а также академий и министерств многих стран мира. В настоящие время известно более 400 видов МТ. Классы плесневых грибков (рисунок 1), продуцирующих МТ: *Aspergillus,*

Penicillium, Fusarium, Claviceps, Neotyphodium, Myrothecium, Stachybotrys, Trichoderma, Trichothecium. Классифицировать МТ весьма сложно из-за большого разнообразия их химической структуры (таблица 1), биологического действия, штаммов-продуцентов. В медицинских исследованиях руководствуются физиологическим действием МТ, в органической химии – структурой, в биохимии – предшественниками в биосинтезе и др. В таблице 1 суммированы данные об основных МТ, их продуцентах и контаминируемых продуктах.

Предполагают, что с биологической точки зрения МТ выполняют в обмене веществ микроскопических грибов функции, направленные на выживание и конкурентоспособность в различных экологических нишах. Они не являются эссенциальными для роста и развития продуцирующих их микроорганизмов. Экономические потери от МТ только в США оцениваются в размере 10 млрд долларов в год, в странах юго-восточной Азии (Индонезия + Филиппины + Тайланд) – на уровне 400 млн долларов в год, в развивающихся странах до 36 % всех заболеваний прямо или косвенно связаны с МТ. Потери от МТ в Европейском союзе (ЕС) оцениваются более чем 5 миллиардов евро в год [1].

Для контроля пищевой продукции и кормов широко используют традиционные национальные схемы контроля (Федеральные Законы, Ветеринарные НД, ГОСТы, СанПиН 2.3.2.1078-01 и др., ГН 1.2.1323-03 и др.), а также применяют гармонизированные с международными требованиями (Codex Alimentarius, 96/23 ЕС) схемы ветеринарного контроля остатков лекарственных препаратов и МТ в кормах для животных и ксенобиотиков в продукции на всех стадиях ее производства и реализации. Указом Президента Российской Федерации (РФ) была утверждена Доктрина продовольственной безопасности РФ № 120 от 30.01.2010 г. Министерством сельского хозяйства РФ был издан приказ «О внедрении плана государственного ветеринарного лабораторного мониторинга» № 780 от 30 мая 2003 г. В нашей стране исследования МТ, согласно плану мониторинга и Рекомендации Комиссии ЕС, ограничиваются определением содержания шести тестированных МТ – суммы афлатоксинов (АФЛ), охратоксинов (ОТ), зеараленона (ЗЕА), трихотеценов (ТТ), патулина (П), Т-2 токсина в сельскохозяйственном пищевом сырье, пищевых продуктах и кормах.

МТ являются природными загрязнителями не только зерна злаковых, бобовых, семян подсолнечника, а также овощей и фруктов, но и лекарственного растительного сырья (ЛРС), а также фармацевтических субстанций растительного происхождения, в частности, таких как жирные растительные масла, широко применяемые в фармации в качестве самостоятельных лекарственных средств, а также вспомогательных компонентов для производства лекарственных препаратов, растворителей инъекционных препаратов, БАД и др. Лекарственные растения в специализированных хозяйствах растут значительно хуже, чем в естественных экосистемах. В почве под многолетними травами растений семейств Губоцветные, Розовые, Астровые авторы обнаружили нетипичные для природных экосистем токсигенные виды грибов, что представляет потенциальную угрозу накопления МТ в ЛРС [9]. МТ могут образовываться также при хранении ЛРС под действием развивающихся в них микроскопических грибов. Так как основой для получения лекарственных средств растительного происхождения являются лекарственные растения, которые относятся к сырью, наиболее контаминированному различными микроорганизмами, вирусами, плесневыми грибами, то при этом заражению может подвергаться не только ЛРС, но и почти все субстанции, и лекарственные растительные препараты (ЛРП). Так, в странах с влажным, жарким или теплым климатом чаще встречаются афлатоксины, в умеренном климате Европы, Америки и Азии — трихотеценовые МТ. Основные представители МТ представлены в таблице 1.

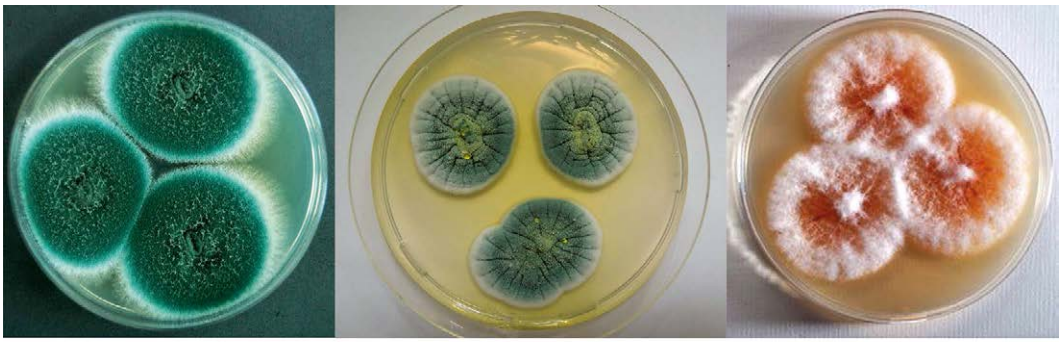
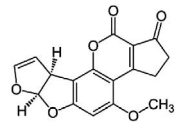
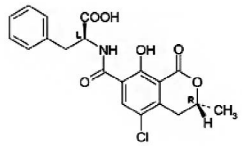
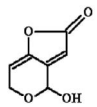
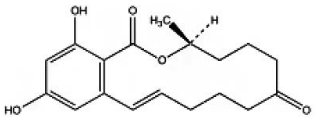
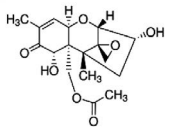


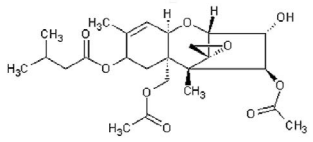
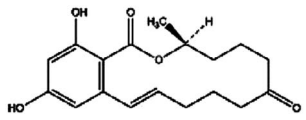
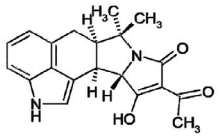
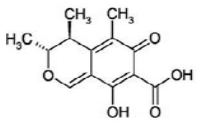
Рисунок 1. Виды плесневых грибов – продуцентов основных МТ:
A – Аспергилл; B – Пенициллиум; C – Фузариум

Figure 1. Types of molds – producers of the main MT:
A – *Aspergillus*; B – *Penicillium*; C – *Fusarium*

Таблица 1. **Характеристика некоторых МТ**

Table 1. **Characteristic of some MT**

МТ MT	Продуцент Producer	Растворимость Solubility	Формула, химический класс Formula, Chemical Class	Климат Climate	Поражаемые объекты Affected objects
Афлотоксин (АФЛ) B_1 Aflotoxin (AFL) B_1	Токсигенные штаммы грибов *Aspergillus flavus* и *parasiticus* Toxigenic strains of the fungi *Aspergillus flavus* and *parasiticus*	Легко растворим в умеренно полярных растворителях (хлороформ, метанол, бензол) Easily soluble in moderately polar solvents (chloroform, methanol, benzole)	 Производное фурокумаринов Furocoumarin derivative	Влажные тропические и субтропические зоны; все сельскохозяйственные зоны России Humid tropical and subtropical zones; all agricultural zones of Russia	Кукуруза, орехи, рис, ячмень, пшеница, молочные продукты Corn, nuts, rice, barley, wheat, dairy products
Охратоксин (ОТ) А Ochratoxin (OT) A	*Aspergillus ochraceus, melleus, sulphureus, petrakii; Penicillium viridicatum*	Легко растворим в хлороформе, ацетоне, бензоле, ацетонитриле, спиртах Easily soluble in chloroform, acetone, benzole, acetonitrile, alcohols	 Группа поликетидов Polyketide group	Страны умеренного климата Temperate climate countries	Ячмень, пшеница, соя, зерна кофе, виноматериалы Barley, wheat, soybeans, coffee beans, wine materials
Патулин (П) Patulin (P)	Различные виды *Penicillium* Various types of *Penicillium*	Растворим в воде и полярных органических растворителях (спиртах, ацетоне, хлороформе), менее растворим в диэтиловом эфире и бензоле, нерастворим в гексане Soluble in water and polar organic solvents (alcohols, acetone, chloroform), less soluble in diethyl ether and benzole, insoluble in hexane	 4-гидроксифуропиран 4-hydroxyfuropyran	Страны умеренного, тропического и субтропического климата Temperate, tropical, and subtropical climates	Фрукты и некоторые овощи Fruits and some vegetables
Зеараленон (ЗЕА) Zearalenone (ZEA)	Гриб *Fusarium graminearum* *Fusarium graminearum* fungus	Легко растворим в хлороформе, ацетоне, ацетонитриле Easily soluble in chloroform, acetone, acetonitrile	 Лактон фенолрезорциловой кислоты Phenolresorcylic acid lactone	Южная часть РФ Southern part of the Russian Federation	Кукуруза, овес, пшеница, ячмень Corn, oats, wheat, barley
Дезоксиниваленол (ДОН) Deoxynivalenol (DON)	Гриб *Fusarium graminearum* *Fusarium graminearum* fungus	Легко растворим в хлороформе, ацетоне, ацетонитриле. Практически не растворим в воде Easily soluble in chloroform, acetone, acetonitrile. Practically insoluble in water	 4-дезоксиниваленол 4-deoxynivalenol	Страны умеренного, тропического и субтропического климата Countries of temperate, tropical and subtropical climate	Кукуруза, пшеница, соя, подсолнечник Corn, wheat, soybeans, sunflowers

МТ MT	Продуцент Producer	Растворимость Solubility	Формула, химический класс Formula, Chemical Class	Климат Climate	Поражаемые объекты Affected objects
Т-2 токсин T-2 toxin	Гриб *Fusarium sporotrichioides* *Fusarium sporotrichioides* fungus	Легко растворим в хлороформе, ацетоне, ацетонитриле. Практически не растворим в воде Easily soluble in chloroform, acetone, acetonitrile. Practically insoluble in water	 12,13-эпокситрихотецены 12,13-epoxytrichotocenes	Страны умеренного, тропического и субтропического климата Countries of temperate, tropical and subtropical climate	Кукуруза, рис, соя, подсолнечник Corn, rice, soybeans, sunflowers
Фуманизин (ФУМ) B_1 Fumanisine (FUM) B_1	Гриб *Fusarium verticillioides, moniliforme* и *proliferatum* *Fusarium verticillioides, moniliforme* and *proliferatum* fungus	Растворимость в воде не более 20 мг/мл. Растворим в метаноле, смеси ацетонитрила с водой Solubility in water no more than 20 mg/ml. Soluble in methanol, a mixture of acetonitrile with water	 Диэфир пропан-1,2,3-трикарбоновой кислоты и 2-амино-12,16-диметил-3,5,10,14,15-пентагидроксиэйкозана Diester of propane-1,2,3-tricarboxylic acid and 2-amino-12,16-dimethyl-3,5,10,14,15-pentahydroxyeycosan	От умеренного климатического пояса до субтропиков From the temperate climate zone to the subtropics	Соя, ячмень, кукуруза, подсолнечник, пшеница Soy, barley, corn, sunflower, wheat
Циклопиазоновая кислота (ЦПК) Cyclopiazonic Acid (CPA)	Грибы *Penicillium cyclopium, P. patulum, P. viridicatum, P. crustosum, P. camemberti* и *Aspergillus A. flavus, A. versicolor, A. tamarii* Fungi *Penicillium cyclopium, P. patulum, P. viridicatum, P. crustosum, P. camemberti* and *Aspergillus A. flavus, A. versicolor, A. tamarii*	Не растворима в воде, но растворима в других растворителях, таких как этанол и диметилсульфоксид Insoluble in water, but soluble in other solvents such as ethanol and dimethylsulfoxide	 Индол-тетрамовая кислота Indole-tetramic acid	Страны умеренного, тропического и субтропического климата Countries of temperate, tropical and subtropical climate	Кукуруза, зерновые и ореховые продукты (арахис, семена подсолнечника) Corn, grain and nut products (peanuts, sunflower seeds)
Цитринин (Ц) Citrinin (C)	Грибы вида *Penicillium citrinum, Monascus (M. Purpureus)* и некоторые виды рода *Aspergillus* Fungi of the species *Penicillium citrinum, Monascus (M. Purpureus)* and some species of the genus *Aspergillus*	Не растворим в воде, но растворяется в этаноле, бензоле, ацетоне и хлороформе Insoluble in water, but soluble in ethanol, benzole, acetone and chloroform	 (3R, 4S)-4,6-дигидро-8-гидрокси-3,4,5-триметил-6-оксо-3H-2-бензопиран-7-карбоновая кислота (3R, 4S)-4,6-dihydro-8-hydroxy-3,4,5-trimethyl-6-oxo-3H-2-benzopyran-7-carboxylic acid	Страны умеренного, тропического и субтропического климата Countries of temperate, tropical and subtropical climate	Злаки, кукуруза, пшеница, овес, рожь, ячмень, рис, кокос, подсолнечное и соевое масла Cereals, corn, wheat, oats, rye, barley, rice, coconut, sunflower and soybean oil

В РФ содержание МТ в ЛРС пока не нормируется. В работе [10] показано, что МТ сохраняются в высушенном ЛРС более 100 лет. Другими авторами [2, 3] также установлено, что многое ЛРС густо обсеменено плесневыми грибами класса *Deuteromycetes*, что можно обнаружить при проведении микроскопического анализа (рисунок 2). Предотвратить загрязнение ЛРС МТ практически невозможно, поэтому необходим строгий контроль за качеством ЛРС в местах его заготовки [11]. Однако, данная проблема и необходимость введения подобного исследования в перечень показателей оценки доброкачественности ЛРС требует углубленного изучения и оценки степени его зараженности. Вопросам изучения загрязнения ЛРС различными экотоксикантами, в т. ч. и МТ, посвящено последнее время много исследований [2–7]. Кроме того, стандартные методы определения нормируемых МТ, обычно, не рассчитаны на выявление трансформированных форм, и их содержание остается неучтенным. Поэтому модифицированные лекарственным растением метаболиты МТ, получили название замаскированных (конъюгированных, трансформированных) растением МТ, содержание которых также необходимо оценивать [8].

Токсичность МТ может быть острой и хронической. Последствия токсического действия МТ могут быть обратимыми и необратимыми. Основные проявления токсического действия МТ представлены в таблице 2. Представляет опасность также синергическое действие МТ (даже в низких дозах), оказывающееся больше суммы действия каждого МТ по отдельности.

В связи с этим обнаружение МТ представляет собой одно из приоритетных направлений развития теоретических и прикладных исследований.

Целью работы являлась систематизация методов определения основных МТ на основе анализа отечественной литературы для возможного дальнейшего их применения в оценке качества ЛРС и ЛРП на его основе.

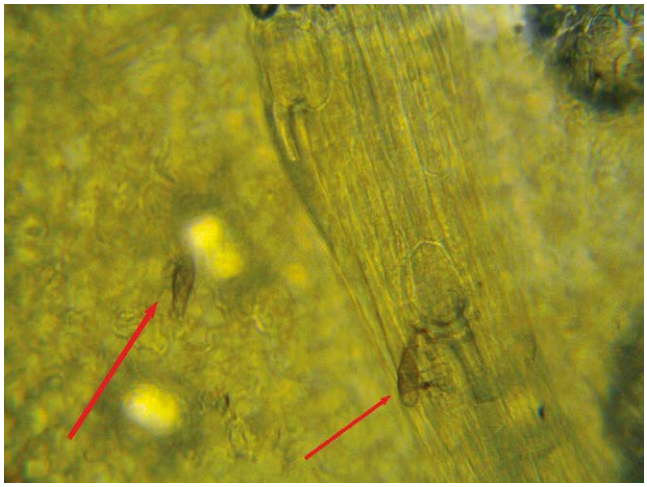


Рис. 2. Вид конидий плесневого гриба класса Deuteromycetes при микроскопическом анализе ЛРС [2, 3]

Figure 2. The type of conidia of the mold fungus of the class Deuteromycetes during microscopic analysis of MPM [2, 3]

Нормативной базой для формирования требований к содержанию МТ в ЛРС первоначально могут послужить действующие нормативные документы (НД) в области пищевой и сельскохозяйственной индустрии. В настоящее время для практической работы хозяйств стран СНГ более приемлемыми считаются европейские допустимые нормы [13–15]. Сравнительная характеристика требований к ПДК различных МТ в России и за рубежом [16, 17] приведены в таблице 3. Очень часто объекты поражаются несколькими видами МТ, которые оказывают взаимоусиливающее действие, и опасны даже в небольших количествах, ниже уровня ПДК [18].

Таблица 2. Характеристика токсических свойств наиболее распространенных МТ [12]

Table 2. Characterization of the toxic properties of the most common MT [12]

МТ MT	**Токсичность** Toxicity	**Кумуляция** Cumulation	**Биологическое действие** Biological action	**Первичный механизм действия** Primary mechanism of action
АФЛ B_1 AFL B_1	Один из наиболее опасных МТ One of the most dangerous MT	+	Острое токсическое действие – гепатропный яд, орган-мишень – печень. Отдаленные последствия действия – канцерогенное, мутагенное и тератогенное Acute toxic effect – hepatropic poison, target organ – liver. Long-term effects of the action – carcinogenic, mutagenic and teratogenic	Образует связь с гуанином (ДНК-аддукт) после метаболической активации в печени Forms a bond with guanine (DNA adduct) after metabolic activation in the liver
ОТ А Ochratoxin A	Высокотоксичный МТ (канцероген второго класса опасности) Highly toxic MT (carcinogen of the second hazard class)	++	Преимущественно поражает почки. При остром токсикозе – патологические изменения выявляются и в печени, и в лимфоидной ткани, и в желудочно-кишечном тракте. Обладает сильным тератогенным действием, вызывает некрозы печени у животных Mostly affects the kidneys. In acute toxicosis – pathological changes are detected in the liver, and in lymphoid tissue, and in the gastrointestinal tract. It has a strong teratogenic effect, causes liver necrosis in animals	Блокируют синтез белков Block protein synthesis

Окончание таблицы 2

МТ **MT**	**Токсичность** **Toxicity**	**Кумуляция** **Cumulation**	**Биологическое действие** **Biological action**	**Первичный механизм действия** **Primary mechanism of action**
П Patuline	Особо опасный МТ Particularly dangerous MT	–	Проявляется как в виде острых токсикозов, так и в виде ярко выраженных канцерогенных и мутагенных эффектов. Вызывает симптомы поражения желудочно-кишечного тракта, такие как язва желудка, кровоизлияния в кишечнике, поражения в двенадцатиперстной кишке и изменение функции кишечного барьера It manifests itself both in the form of acute toxicosis and in the form of pronounced carcinogenic and mutagenic effects. Causes gastrointestinal damage, such as a stomach ulcer, intestinal hemorrhage, damage to the duodenum and changes in the function of the intestinal barrier	Блокирует синтез ДНК, РНК и белков, причем блокирование инициации транскрипции осуществляется за счет ингибирования ДНК-зависимой-РНК-полимеразы It blocks the synthesis of DNA, RNA and proteins, and transcription initiation is blocked by inhibiting DNA-dependent RNA polymerase
ЗЕА ZEA	МТ с выраженной эстрогенной активностью MT with pronounced estrogenic activity	–	Обладает выраженными гормоноподобными (эстрогенными) свойствами, доказано тератогенное действие Has pronounced hormone-like (estrogenic) properties, proven teratogenic effect	Образует связь с эстрогенными рецепторами у млекопитающих Forms a connection with estrogen receptors in mammals
ДОН DON	Второй класс токсичности Second toxicity class	–	Обладает широким спектром токсического действия на быстроделящиеся клетки, такие как клетки желудочно-кишечного тракта, кожи и лимфоидные клетки It has a wide range of toxic effects on rapidly dividing cells, such as cells of the gastrointestinal tract, skin and lymphoid cells	Механизм токсичности сходен с таковым для других ТТ: ингибирование синтеза белка с последующим нарушением синтеза ДНК и РНК, что препятствует метаболизму мембранных фосфолипидов The toxicity mechanism is similar to that for other TTs: inhibition of protein synthesis with subsequent impairment of DNA and RNA synthesis, which inhibits membrane metabolism phospholipids
Т-2	Первый класс токсичности First Class Toxicity	+		
ФУМ B_1 FUM B_1	Канцероген второго класса опасности Carcinogen of the second hazard class	–	Развитие рака, гепатотоксическое и нефротоксическое действие, а также угнетает иммунную систему. Вызывает изменение функции кишечного барьера и оказывают синергическое действие с другими МТ The development of cancer, hepatotoxic and nephrotoxic effects, and also inhibits the immune system. It causes a change in the function of the intestinal barrier and has a synergistic effect with other MTs	Ингибирует синтез церамидов (биосинтез сфинголипидов) Inhibits the synthesis of ceramides (biosynthesis of sphingolipids)
ЦПК CPA	Проявляет токсичность только в высоких концентрациях It shows toxicity only in high concentrations	–	Поражения нервной системы. Угнетение иммунной системы. Некрозы печени, тканей желудочно-кишечного тракта, почек и скелетных мышц Damage to the nervous system. Oppression of the immune system. Necrosis of the liver, tissues of the gastrointestinal tract, kidneys and skeletal muscles	Нарушение метаболизма кальция (оказывает ингибирующее действие на Ca^{2+}-зависимую АТФазу эндоплазматического и саркоплазматического ретикулума) Violation of calcium metabolism (has an inhibitory effect on the Ca^{2+}-dependent ATPase of the endoplasmic and sarcoplasmic reticulum)
Ц C	LD_{50} не известна LD_{50} not known	–	Нефротоксическое действие, стимулирует перекисное окисление липидов в печени, очаговые поражения почек и печени, эмбриотоксический, генотоксический и тератогенный эффекты, обладает тератогенными и канцерогенными свойствами Nephrotoxic effect, stimulates lipid peroxidation in the liver, focal lesions of the kidneys and liver, embryotoxic, genotoxic and teratogenic effects, has teratogenic and carcinogenic properties	Понижение продукции цитокинов, ингибирование синтеза РНК и ДНК, индукция окислительного стресса, ингибирование экспрессии генов Reduces cytokine production, inhibits RNA and DNA synthesis, induces oxidative stress, inhibits gene expression

Таблица 3. Сравнительная характеристика требований к ПДК (мкг/кг) различных МТ в России и за рубежом

Table 3. Comparative characteristics of the requirements for maximum permissible concentration (MPC) (mcg/kg) of various MTs in Russia and abroad

Страна Country	Пищевой продукт Food product	ПДК MPC
Зеараленон *Zearalenone*		
ЕС EU	Зерновые, зернобобовые и масличные культуры Cereals, legumes and oilseeds	75
РФ Russia	Зерновые, зернобобовые и масличные культуры Cereals, legumes and oilseeds	1000
	Фрукты, овощи, соки и пюре Fruits, vegetables, juices and smoothies	50
Т-2 токсин *T-2 Toxin*		
ЕС EU	Продукция из кукурузы и рафинированное кукурузное масло Corn Products and Refined Corn Oil	1000
РФ Russia	Зерновые, зернобобовые и масличные культуры Cereals, legumes and oilseeds	100
	Фрукты, овощи, соки и пюре Fruits, vegetables, juices and smoothies	50
ДОН *DON*		
ЕС EU	Зерновые для непосредственного потребления человеком Cereals for direct human consumption	750
РФ Russia	Зерновые, зернобобовые и масличные культуры Cereals, legumes and oilseeds	1000
США USA	Продукты переработки пшеницы Wheat Processing Products	1000
Охратоксин А *Ochratoxin A*		
ЕС EU	Не переработанные зерновые культуры Unprocessed cereals	5
	Все пищевые продукты, полученные из переработанных зерновых культур All food derived from processed cereals	3
РФ Russia	Зерновые, зернобобовые и масличные культуры Cereals, legumes and oilseeds	50
Афлотоксин B_1 *Aflotoxin B_1*		
ЕС EU	Орехи, сухофрукты, пищевые продукты, полученные из переработанных зерновых культур Nuts, dried fruits, processed foods	2
РФ Russia	Зерновые, зернобобовые и масличные культуры Cereals, legumes and oilseeds	5
	Фрукты, овощи, соки и пюре Fruits, Vegetables, Juices and Smoothies	
США USA	Все пищевые продукты, кроме молока и молочных продуктов All food products except milk and dairy products	20
Фумонизины B_1 и B_2 *Fumonisins B_1 and B_2*		
РФ Russia	БАД Dietary supplement	200
Патулин *Patulin*		
РФ Russia	Консервы овощные, фруктовые, ягодные Canned vegetables, fruits, berries	50
	Чай, кофе, какао Tea, coffee, cocoa	5
ЕС и США EU and USA	Не нормируется Not standardized	–
Цитринин *Citrinin*		
ЕС EC	В пищевых добавках, основанных на рисе, ферментированном красными дрожжами Monascus purpureus In rice supplement fermented with red yeast Monascus purpureus	2000
США и РФ USA and Russia	Не нормируется Not standardized	–

Методы анализа

В настоящее время для определения МТ в различных объектах параллельно развиваются скрининг-методы, количественные аналитические и биологические методы. Скрининг-методы отличаются быстротой и удобны для проведения серийных анализов, позволяют быстро и надежно разделять загрязненные и незагрязненные образцы. В качестве количественных аналитических методов определения МТ используются химические, радиоиммунологические и иммуноферментные методы. Химические методы являются в настоящее время наиболее распространенными и включают стадии выделения и количественного определения МТ. Стадия выделения включает экстракцию и очистку МТ от соединений с близкими физико-химическими характеристиками. Окончательное разделение и количественную оценку МТ проводят с помощью различных методов хроматографии: ГХ, ГЖХ, ТСХ, ВЭЖХ и масс-спектрометрия. Биологические методы применяются для определения МТ, для которых отсутствуют химические методы анализа. Высокочувствительные и высокоспецифичные радиоиммуно-химические и иммуноферментные методы обнаружения, идентификации и количественного определения МТ находят все более широкое применение [19,20]. Обобщенные данные о методах определения различных МТ, включенных в НД, приведены в таблице 4.

Таблица 4. Методы определения различных МТ по НД

Table 4. Methods for the determination of various MT according to regulatory documentation (RD)

№ п/п	НД RD	Объект анализа Object of analysis	МТ MT	Метод Method
1	ГОСТ Р 52828-2007 [21] GOST P 52828-2007 [21]	Вина и виноматериалы Wines and wine materials	Охратоксин А Ochratoxin A	ТСХ TLC
2	ГОСТ 31653-2012 [22] GOST 31653-2012 [22]	Корма Feed	АФЛ B_1, роридин А, ОТ А, стеригматоцистин, Т-2, ЗЕА, ФУМ B_1 AFL B_1, roridin A, OT A, sterigmatocystin, T-2, ZEA, FUM B_1	ИФА IFA
3	ГОСТ Р 51116-97 [23] GOST P 51116-97 [23]	Комбикорма, зерно, продукты его переработки Compound feed, grain, products of its processing	ДОН DON	ВЭЖХ HPLC
4	ГОСТ 28001-88 [24] GOST 28001-88 [24]	Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма Feed grain, products of its processing, compound feed	Т-2, ЗЕА и ОТ А T-2, ZEA and OT A	ТСХ TLC
5	МУК 4.1.220407 [25] MUK 4.1.220407 [25]	Продовольственное сырье и пищевые продукты Food Raw Materials and Food Products	Охратоксин А Ochratoxin A	ВЭЖХ HPLC
6	ГОСТ Р 53162-2008 [26] GOST P 53162-2008 [26]	Зерновые культуры, орехи и продукты их переработки Cereals, nuts and their processed products	АФЛ B_1 и общее содержание АФЛ B_1, B_2, G_1 и G_2 AFL B1 and total content of AFL B_1, B_2, G_1 and G_2	ВЭЖХ HPLC
7	МУ 3940-85 [27] MU 3940-85 [27]	Зерно и зернопродукты Grain and grain products	ДОН (вомитоксин) и ЗЕА DON (vomitoxin) and ZEA	ТСХ и ВЭЖХ TLC and HPLC
8	ГОСТ 34140-2017 [28] GOST 34140-2017 [28]	Продукты пищевые, корма, продовольственное сырье Food products, feed, food raw materials	Более 50 наименований различных МТ More than 50 items of various MT	ВЭЖХ-МС HPLC-MS
9	ГОСТ 32835-2014 [29] GOST 32835-2014 [29]	Продукция соковая Juice products	Патулин и охратоксин А Patulin and ochratoxin A	ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS
10	ГОСТ 31748-2012[30] GOST 31748-2012 [30]	Продукты пищевые, зерновые культуры, орехи и продукты их переработки Food products, cereals, nuts and their processed products	АФЛ B_1 и общее содержание АФЛ B_1, B_2, G_1 и G_2 AFL B_1 and total content of AFL B_1, B_2, G1 and G_2	ВЭЖХ HPLC
11	ГОСТ 30711-2001 [31] GOST 30711-2001 [31]	Продукты пищевые Food products	АФЛ B_1 и M_1 AFL B_1 and M_1	ТСХ и ВЭЖХ TLC and HPLC
12	ГОСТ 28038-2013 [32] GOST 28038-2013 [32]	Продукты переработки плодов и овощей Products of processing fruits and vegetables	Патулин Patulin	ТСХ и ВЭЖХ TLC and HPLC
13	ГОСТ Р 51435-99 [33] GOST P 51435-99 [33]	Сок яблочный, сок яблочный концентрированный и напитки, содержащие яблочный сок Apple juice, concentrated apple juice and drinks containing apple juice		ВЭЖХ HPLC
14	ГОСТ 31691-2012 [34] GOST 31691-2012 [34]	Зерно и продукты его переработки, комбикорма Grain and products of its processing, animal feed	ЗЕА ZEA	ВЭЖХ HPLC
15	ГОСТ ISO 17372-2016 [35] GOST ISO 17372-2016 [35]	Корма для животных Animal feed		
16	ГОСТ EN 15850-2013 [36] GOST EN 15850-2013 [36]	Продукты для детского питания (в т.ч. грудных детей и детей раннего возраста) на основе ячменной, кукурузной и пшеничной муки Products for baby food (including infants and young children) based on barley, corn and wheat flour		
17	МУ 5177-90 [37] MU 5177-90 [37]	Зерно и зернопродукты Grain and grain products	ДОН (вомитоксин) и ЗЕА DON (vomitoxin) and ZEA	ТСХ и ВЭЖХ TLC and HPLC
18	МУ 4082-86 [38] MU 4082-86 [38]	Пищевые продукты Food products	АФЛ AFL	ВЭЖХ HPLC
19	ГОСТ EN 15891-2013 [39] GOST EN 15891-2013 [39]	Продукты пищевые, продовольственное зерно, продукты его переработки и продукты на зерновой основе для питания грудных детей и детей раннего возраста Food products, food grain, products of its processing and grain-based products for feeding infants and young children	ДОН DON	ВЭЖХ HPLC

Окончание таблицы 4

№ п/п	НД RD	Объект анализа Object of analysis	МТ MT	Метод Method
20	ГОСТ EN 15835-2013 [40] GOST EN 15835-2013 [40]	Продукты на зерновой основе для питания грудных детей и детей раннего возраста Grain-based products for feeding infants and young children	Охратоксин А Ochratoxin A	ВЭЖХ HPLC
21	ГОСТ ISO 15141-2-2013 [41] GOST ISO 15141-2-2013 [41]	Продукты пищевые, зерно и зерновые продукты Food products, grain and grain products		
22	ГОСТ Р ЕН 15829-2011 [42] GOST P EN 15829-2011 [42]	Продукты пищевые, сухофрукты Food products, dried fruits		
23	ГОСТ 34108-2017 [43] GOST 34108-2017 [43]	Корма, комбикорма и комбикормовое сырье Feed, compound feed and feed raw materials	Суммы АФЛ B_1,B_2,G_1,G_2, ДОН, ЗЕА, ОТ А, Т-2, сумма ФУМ (по ФУМ B_1) Sums AFL B_1, B_2, G_1, G_2, DON, ZEA, OT A, T-2, the amount of FUM (according to FUM B_1)	ИФА IFA
24	ГОСТ Р 52471-2005 [44] GOST P 52471-2005 [44]	Корма Feed	АФЛ B_1, роридин А, ОТ А, стеригматоцистин, Т-2, ЗЕА, ФУМ B_1 AFL B_1, roridin A, OT A, sterigmatocystin, T-2, ZEA, FUM B_1	ИФА IFA
25	ГОСТ 32587-2013 [45] GOST 32587-2013 [45]	Зерно и продукты его переработки, комбикорма Grain and products of its processing, animal feed	Охратоксин А Ochratoxin A	ВЭЖХ HPLC
26	ГОСТ Р 55448-2013 [46] GOST P 55448-2013 [46]	Корма, комбикорма, комбикормовое сырье Feed, feed, compound feed		

Спектрофотометрия

Метод УФ-спектрофотометрии применяется только для определения чистоты, аутентичности и расчета концентрации стандартных растворов стандартных препаратов МТ. Данные о коэффициентах молярной экстинкции МТ (растворы в метаноле) в максимумах поглощения в УФ-спектре приведены в таблице 5. Большинство МТ обладают собственной флуоресценцией в УФ-свете, что используется для целей их качественного и количественного определения (таблица 6).

Масс-спектрометрия

Предложена методология идентификации и определения из одной навески 300 токсикантов различных классов, в т.ч. и 25 МТ, в пищевых продуктах и продовольственном сырье методом время пролетной масс-спектрометрии высокого разрешения в сочетании с ВЭЖХ [47]. В таблице 7 представлены заряженные частицы, время удерживания и отношения масса/заряд для большинства известных и нормируемых МТ. На рисунке 3 представлена масс-хроматограмма АФЛ.

Таблица 5. Спектральные характеристики МТ

Table 5. Spectral characteristics of MT

МТ	λ_{max}, нм λ_{max}, nm	Количественный λ_{max}, нм Quantitative λ_{max}, nm	E (см²/моль) в количественном λ_{max} E (cm²/mol) in quantitative λ_{max}	МТ	λ_{max}, нм λ_{max}, nm	Количественный λ_{max}, нм Quantitative λ_{max}, nm	E (см²/моль) в количественном λ_{max} E (cm²/mol) in quantitative λ_{max}
АФЛ B_1 AFL B_1	223 265	362	21800	Стигматоцистин Stigmatocystin	246 277	326	15310
АФЛ B_2 AFL B_1	223 265	362	24000	ДОН DON	218	218	4500
АФЛ G_1 AFL B_1	242 265	362	17700	ЗЕА ZEA	236 316	274	12710
АФЛ G_2 AFL B_1	242 265	362	19300	Охратоксин А Ochratoxin A	214	333	6400
АФЛ M_1 AFL B_1	226 265	357	19000	Патулин Patulin	276	276	14500

Таблица 6. **Флуоресценция МТ в УФ-свете**

Table 6. **MT fluorescence in UV light**

№ п/п	МТ	Флуоресценция в УФ-свете UV fluorescence
1	АФЛ B_1 AFL B_1	сине-голубая blue-blue
2	АФЛ B_2 AFL B_2	
3	АФЛ G_1 AFL G_1	зеленая green
4	АФЛ G_2 AFL G_2	
5	АФЛ M_1 AFL M_1	сине-фиолетовая blue violet
6	АФЛ M_2 AFL M_2	
7	Охратоксин А Ochratoxin A	зеленая green
8	Охратоксин В Ochratoxin B	голубая blue
9	Охратоксин С Ochratoxin C	бледно-зеленая pale green
10	ЗЕА ZEA	сине-зеленая blue green
11	ТТ (Т-2, диацетоксискирпенол, ниваленол, ДОН) TT (T-2, diacetoxiskirphenol, nivalenol, DON)	не обладают do not possess

Масс-спектроскопия применена для характеристики, идентификации и подтверждения наличия МТ. В качестве подтверждающих методов практикуют использование масс-спектроскопии. Она обеспечивает определение пикограммовых количеств МТ. Наиболее эффективно использование комбинации методов ГЖХ и масс-спектроскопии. Комбинация ГЖХ и масс-спектроскопии обеспечивает большую специфичность, чем при использовании одной ГЖХ, поэтому она и стала стандартной при определении МТ в биомедицинских образцах. Основной недостаток – необходимость предварительного химического преобразования анализируемых соединений, что требует много времени. Одна из последних разработок совместного использования ГЖХ-масс-спектроскопии, предложенная в 2001 г., представляет собой специфичный и надежный метод идентификации МТ без предварительного химического преобразования компонентов анализируемого образца [50].

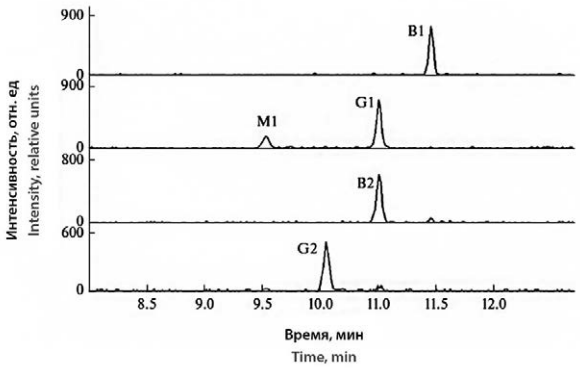


Рисунок 3. **Масс-хроматограммы АФЛ [49]**

Figure 3. **Mass-chromatograms of AFL [49]**

Таблица 7. **Результаты определения основных МТ методом масс-спектрометрии [48]**

Table 7. **The results of determining the basic MT by mass spectrometry [48]**

№ п/п	МТ	Брутто-формула Gross formula	Ион Ion	Время удерживания, мин Retention time, min	m/z
1	АФЛ B_1 AFL B_1	$C_{17}H_{22}O_6$	$[M+H]^+$	11,0	313,07
2	АФЛ G_1 AFL G_1	$C_{17}H_{12}O_7$	$[M+H]^+$	10,5	329,06
3	АФЛ G_2 AFL G_2	$C_{17}H_{14}O_7$	$[M+H]^+$	10,1	331,08
4	АФЛ M_1 AFL M_1	$C_{17}H_{12}O_7$	$[M+H]^+$	9,5	329,06
5	АФЛ B_2 AFL B_2	$C_{17}H_{14}O_6$	$[M+H]^+$	10,5	315,09
6	ДОН DON	$C_{15}H_{20}O_6$	$[M+NH_4]^+$	5,2	314,16
7	ЗЕА ZEA	$C_{15}H_{20}O_6$	$[M-H]^-$	11,4	317,14
8	Ниваленол Nivalenol	$C_{15}H_{20}O_7$	$[M+H]^+$	6,0	313,13
9	ОТ А Ochratoxin A	$C_{20}H_{18}O_6NCl$	$[M+H]^+$	13,4	404,09
10	ОТ В Ochratoxin B	$C_{20}H_{19}O_6NCl$	$[M+H]^+$	12,1	370,13
11	Патулин Patulin	$C_7H_6O_4$	$[M-H]^-$	6,1	153,02
12	Стеригматоцистин Sterigmatocystin	$C_{18}H_{12}O_6$	$[M+H]^+$	14,1	325,07
13	Т-2 T-2	$C_{24}H_{34}O_9$	$[M+H]^+$	12,8	484,25
14	НТ-2 HT-2	$C_{22}H_{32}O_8$	$[M+NH_4]^+$	11,3	425,21
15	ФУМ B_1 FUM B_1	$C_{34}H_{59}O_9N$	$[M+H]^+$	9,9	722,39
16	ФУМ B_2 FUM B_2	$C_{18}H_{12}O_{14}N$	$[M+H]^+$	10,9	706,40
17	Цитринин Citrinin	$C_{13}H_{14}O_5$	$[M+H]^+$	11,8	251,09

Хроматографические методы

Для определения МТ в продуктах питания применяют в основном хроматографические методы. Наиболее распространенными из них в настоящее время являются методики с использованием тонкослойной хроматографии (ТСХ), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), газовой хроматографии (ГХ), масс-спектрометрии (МС) и их сочетаний. Разнообразие в строении и свойствах МТ часто не позволяет определить их одним методом одновременно, что приводит к значительному усложнению и увеличению продолжительности анализа. В последнее время все чаще предлагают методики одновременного

определения МТ методами газовой или жидкостной (в том числе тандемной и сверхскоростной) хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС, ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС, СВЭЖХ-МС/МС). По существующим в России ГОСТ и МУ определение ОТ А, ЗЕА, ДОН, Т-2 проводят каждого в отдельности после очистки экстрактов на хроматографических колонках и затем используют методы ТСХ, ВЭЖХ с флуориметрическим или УФ-детекторами. Токсин Т-2 определяют методом ГЖХ после получения производных с трифторуксусным ангидридом. Предлагаемые методики достаточно сложны, длительны и дорогостоящи.

ТСХ

Для обнаружения, идентификации и количественного определения МТ используют двумерную и одномерную ТСХ. Методы ТСХ доступны почти для всех МТ. Обнаружение и специфическая идентификация разработаны для каждого отдельного МТ. Так, в частности, в работе [51] изучены условия разделения в тонком слое сорбента некоторых представителей МТ (таблица 8). Использованы силикагелевые пластинки Silica Gel G (Merck) размером 20 × 20 см, обработанные 0,4 М водным раствором щавелевой кислоты и активированные последовательным высушиванием при температуре 100 °С – 40 мин и выдерживанием при комнатной температуре. Элюент 1: хлороформ-метилизобутилкетон (4:1); элюент 2: хлороформ-метанол (1:1). Зоны просматривали в УФ-свете при 366 нм и обрабатывали проявителями.

Другие работы по ТСХ, которые представлены в литературе в значительном количестве, обобщены в таблице 9.

Особенности пробоподготовки

Для извлечения МТ из анализируемых объектов в основном используют жидкостно-жидкостную экстракцию. В настоящее время существует ряд способов одновременного определения МТ. Для одновременного извлечения нескольких токсинов наиболее часто применяют смесь (86:14) ацетонитрила и воды. Наиболее часто используемые экстрагенты для выделения МТ приведены в таблице 10.

Для очистки экстрактов от соэкстрагируемых веществ (белки, жиры, липиды, стеролы, полярные органические кислоты, каратиноиды, хлорофилл) используют твердофазную экстракцию (ТФЭ) и коммерческие иммуноаффинные колонки для избирательного извлечения МТ (единичных или определенного класса).

Иммуноаффинные колонки (ИАФК)

Занимают особое место в ряду иммуноаналитических подходов, представляя собой метод очистки/концентрации, который должен сопровождаться последующим анализом. Сочетание иммуноаффинной очистки/концентрирования с современными системами детекции позволяет выявлять МТ в пикограммовых количествах. Принцип работы ИАФК заключается в том, что в картридж помещен нерастворимый носитель, например, агароза, на котором иммобилизованы специфические антитела (АТ). Носитель может отсутствовать: в этом случае АТ находятся в свободном виде и отделены полупроницаемой мембраной. Экстракт образца пропускается через колонку, при этом МТ связывается с АТ, а остальные экстрагированные соединения проходят через колонку. Затем с помощью элюирующего раствора МТ смывается с колонки и может быть проанализирован с использованием различных методов, чаще всего – ВЭЖХ. ИАФК могут сочетаться и с последующей иммунодетекцией. Совместно с ИАФК может использоваться и ТСХ. Наиболее чувствительное определение обеспечивает иммуноаффинная экстракция в сочетании с ВЭЖХ и масс-спектрометрической детекцией. Хотя ИАФК не используются непосредственно для анализа, имеются работы, в которых на них реализована и очистка образца, и последующая детекция по образованию окрашенных зон.

Таблица 8. Результаты разделения некоторых МТ методом ТСХ

Table 8. The results of the separation of some MT by TLC

МТ	R_f	Флуоресценция Fluorescence	Цвет зон после проявления Color of zones after development	
			H_2SO_4	$FeCl_3$
Аспертоксин Aspertoxin	0,12	Светло-желтая Light Yellow	Зеленовато-желтый Greenish Yellow	–
ОТ В Ochratoxin B	0,20	Голубая Blue	–	Красно-коричневый Red Brown
ОТ А Ochratoxin A	0,48	Зеленая Green	–	Красно-коричневый Red-brown
ЗЕА ZEA	0,72	Слабо-голубая Light Blue	Светло-желтый Light Yellow	Красно-коричневый Red Brown
АФЛ G_1 AFL G_1	0,30	Зеленая Green	Зеленовато-серый Greenish Gray	–
АФЛ B_1 AFL B_1	0,40	Голубая Blue	Зеленовато-серый Greenish Gray	–
ЦПК CPA	0,65	Темная Dark	Красно-коричневый Red Brown	Красно-коричневый Red Brown
Стеригматоцистин Sterigmatocystin	0,85	Оранжевая Orange	Зеленовато-серый Greenish Gray	Зеленый Green

Таблица 9. **ТСХ-методики для определения МТ [52]**

Table 9. **TLC methods for the determination of MT [52]**

МТ	Элюент Eluent	Проявитель Developer	Дополнительная информация Additional Information	Ссылка Link
ОТ А Ochratoxin A	Изопропиловый спирт-водный раствор аммиака 25 % (4:1) Isopropyl alcohol-aqueous solution of ammonia 25 % (4:1)	УФ-свет при 365 нм UV light at 365 nm	Идентификацию и количественное определение проводят методом сканирующей денситометрии Identification and quantification are carried out by scanning densitometry	[21]
	Первое направление: эфир-гексан-хлороформ-муравьиная кислота (30:30:30:1). Второе направление: толуол-этилацетат-муравьиная кислота (55:35:10) The first direction: ether-hexane-chloroform-formic acid (30:30:30:1). Second direction: toluene-ethyl acetate-formic acid (55:35:10)	Насыщенный водный раствор карбоната натрия УФ-свет при 365 нм A saturated aqueous solution of sodium carbonate UV light at 365 nm	–	[52]
АФЛ B_1, ЗЕА, Т-2 и ДОН AFL B1, ZEA, T-2 and DON	Гексан-ацетон (1:1) Hexane-acetone (1:1)	УФ-свет при 365 нм UV light at 365 nm	R_f при совместном присутствии для АФЛ B_1 – 0,45, для ЗЕА – 0,75, для Т-2 – 0,40, для ДОЛ – 0,42 R_f with the joint presence for AFL B_1 – 0.45, for ZEA – 0.75, for T-2 – 0.40, for DOL – 0.42	[53]
Т-2, ЗЕА и ОТ А T-2, ZEA and ochratoxin A	Первое направление: гексан-этилацетат (1:1). Второе направление: толуол-этилацетат-муравьиная кислота (6:3:1) или хлороформ-этилацетат-уксусная ледяная кислота (17:3:1) The first direction: hexane-ethyl acetate (1:1). The second direction: toluene-ethyl acetate-formic acid (6:3:1) or chloroform-ethyl acetate-acetic glacial acid (17:3:1)	20%-й спиртовый раствор серной кислоты. УФ-свет при 365 нм 20 % alcoholic solution of sulfuric acid. UV light at 365 nm	Т-2 на хроматограмме в виде пятна с голубой флюоресценцией. R_f Т-2 составляет 0,23-0,24 или 0,20-0,23 T-2 in a chromatogram in the form of a spot with blue fluorescence. Rf T-2 is 0.23-0.24 or 0.20-0.23	[24]
Патулин Patulin	Первое направление: хлороформ-ацетон (4:1). Второе направление: толуол-этилацетат-муравьиная кислота (5:4:1) The first direction: chloroform-acetone (4:1). The second direction: toluene-ethyl acetate-formic acid (5:4:1)	В камере с парами хлора с последующим опрыскиванием раствором бензидина в муравьиной кислоте и просмотром в УФ-свете при 365 нм. Полуколичественную оценку проводят путем визуального сравнения площади полученного пятна с зонами стандартных растворов МТ In a chamber with chlorine vapor, followed by spraying with a solution of benzidine in formic acid and viewing in UV light at 365 nm. A semi-quantitative assessment is carried out by visual comparison of the area of the spot obtained with the zones of standard MT solutions	Обнаруживается в виде зелено-желтых флуоресцирующих пятен на темно-фиолетовом фоне It is detected in the form of green-yellow fluorescent spots on a dark purple background	[32, 54]
	Первое направление: хлороформ-ацетон (80:20). Второе направление: толуол-этилацетат-муравьиная кислота (50:40:10) The first direction: chloroform-acetone (80:20). Second direction: toluene-ethyl acetate-formic acid (50:40:10)			[55, 56]
	Бензол-уксусная кислота (1:3) Benzene-acetic acid (1:3)		Просмотр в УФ-свете при 254 нм UV viewing at 254 nm	
	Хлороформ-ацетон-муравьиная кислота (80:15:5) или (70:23:7) или (80:18:2) Chloroform-acetone-formic acid (80: 15: 5) or (70:23:7) or (80: 18: 2)		R_f = 0,50 или 0,67 или 0,42 R_f = 0.50 or 0.67 or 0.42	
	Хлороформ-ацетон (70:30) или (80:20) или (90:10) Chloroform-acetone (70:30) or (80:20) or (90:10)		R_f =0,50 или 0,43 или 0,27 R_f = 0.50 or 0.43 or 0.27	

Окончание таблицы 9

МТ	Элюент Eluent	Проявитель Developer	Дополнительная информация Additional Information	Ссылка Link
АФЛ B_1 и M_1 AFL B_1 and M_1	Этиловый эфир-метанол-вода (94:4,5:1,5) или (90:8:2) Ethyl ether-methanol-water (94: 4.5: 1.5) or (90: 8: 2)	Раствор азотной кислоты в воде (1:2) или пары йода в течение 1–2 мин A solution of nitric acid in water (1:2) or iodine vapor for 1–2 minutes	УФ-свет при 365 нм UV light at 365 nm	[31]
	Первое направление: этиловый эфир-метанол-вода (94:4,5:1,5). Второе направление: хлороформ-ацетон-вода (90:10:1) The first direction: ethyl ether-methanol-water (94: 4.5: 1.5). Second direction: chloroform-acetone-water (90: 10: 1)	–	УФ-свет при 365 нм UV light at 365 nm	[52]
ДОН DON	Гексан-ацетон (3:2) Hexane-acetone (3: 2)	10 % спиртовый раствор хлорида алюминия 10 % alcohol solution of aluminum chloride	УФ-свет при 365 нм (пятна с синей флуоресценцией и R_f = 0,25 – 0,30 UV light at 365 nm (spots with blue fluorescence and R_f = 0.25 – 0.30	[52]
	Первое направление: гексан-ацетон (3:2). Второе направление: хлороформ-ацетон-изопропиловый спирт (78:12:10) или эфир-гексан-изопропиловый спирт-вода (77:18:4,5:0,5) The first direction: hexane-acetone (3: 2). The second direction: chloroform-acetone-isopropyl alcohol (78:12:10) or ether-hexane-isopropyl alcohol-water (77: 18: 4,5: 0,5)			
ЗЕА ZEA	Гексан-ацетон (7:3) Hexane-acetone (7:3)	1 пластина 1 plate		[52]
		10 % спиртовый раствор хлорида алюминия 10 % alcohol solution of aluminum chloride	УФ-свет при 365 нм UV light at 365 nm	
		2 пластина 2 plate		
		1 % водный раствор прочной синей В-соли или прочной фиолетовой В-соли и затем 5 % раствор натрия карбоната 1 % aqueous solution of strong blue B-salt or strong purple B-salt and then 5 % sodium carbonate solution	Красно-бордовые пятна Maroon spots	
	Первое направление: гексан-ацетон (7:3). Второе направление: толуол-этилацетат-хлороформ-85 % муравьиная кислота (45:25:25:5) The first direction: hexane-acetone (7:3). The second direction: toluene-ethyl acetate-chloroform-85 % formic acid (45:25:25:5)	10 % спиртовый раствор хлорида алюминия 10 % alcohol solution of aluminum chloride	УФ-свет при 365 нм UV light at 365 nm	

Таблица 10. Выделение МТ из объектов анализа

Table 10. Isolation of MT from objects of analysis

МТ	Экстрагент Extractant	Объект анализа Object of analysis
ТТ МТ типа А и В TT MT type A and B	Смеси воды и ацетонитрила или метанола Mixtures of water and acetonitrile or methanol	–
ЗЕА ZEA	Этилацетат, метанол, хлороформ и смесь ацетонитрила и воды Ethyl acetate, methanol, chloroform and a mixture of acetonitrile and water	Зерно или корма Grain or feed
ОТ А Ochratoxin A	Смесь хлороформа и фосфорной кислоты Mixture of chloroform and phosphoric acid	Ячмень Barley
	Хлороформ Chloroform	Зеленый кофе Green Coffee
	Смесь толуол/HCl, хлороформ/этанол/уксусная кислота и дихлорметан/фосфорная кислота A mixture of toluene/HCl, chloroform/ethanol/acetic acid and dichloromethane/phosphoric acid	Пшеница Wheat
	Трет-бутиловый эфир Tert-Butyl Ether	Детское питание Baby Food
АФЛ AFL	Хлороформ или водно-ацетонитрильная смесь, метанол Chloroform or water-acetonitrile mixture, methanol	–
Патулин Patulin	Этилацетат Ethyl acetate	–

В целом следует отметить, что ИАФК позволяют концентрировать образец и исключать влияние матрикса при дальнейшем анализе, но не всегда могут быть многократно регенерированы, что значительно повышает стоимость анализа. Обычно данные методики длительны (пробоподготовка может занимать от 3 до 5 ч), трудоемки, требуют больших количеств токсичных органических растворителей. Наиболее часто используемые сорбенты для очистки МТ в экстрактах от посторонних примесей приведены в таблице 11.

Установлена возможность одновременного извлечения различных МТ (АФЛ; ТТ типа А: Т-2, НТ-2, Т-2-тетраол токсина, Т-2-триол токсина, неосаланиола, диацетоксисирпенола; ТТ типа В: ДОН, ниваленола, 15-ацетилдезоксиниваленола, 3-ацетилдезоксиниваленола, фузаренона Х; ОТ А и В; ЗЕА; П) из одной навески аналита с использованием пробоподготовки QuEChERS. QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) – быстрый, дешевый, весьма эффективный, надежный и безопасный. Метод основан на извлечении МТ из пробы смесью ацетонитрил/вода, добавлении буферирующих неорганических солей. В результате такой экстракции МТ переходят в органическую фазу, а более полярные примеси – в водный слой. Примеси (некоторые сахара и жирные кислоты), оставшиеся в ацетонитриле, могут быть удалены на дисперсионном сорбенте, содержащем амины (PSA сорбент). Однако из-за кислой природы некоторых МТ использование таких сорбентов не рекомендуется, например, при определении ФУМ.

Таблица 11. Очистка МТ в экстрактах от примесей

Table 11. Purification of MT in extracts from impurities

МТ	Сорбент Sorbent	Объект анализа Object of analysis
МТ	Supelclean LC-CN (силикагель, модифицированный цианопропильными группами) Supelclean LC-CN (silica gel modified with cyanopropyl groups)	–
ЗЕА и П ZEA and Patulin	Sep-Pak с силикагелем Sep-Pak with silica gel	–
МТ	MycoSep®	Зерновые Cereals
ТТ МТ А и В, АФЛ, ОТ, ЗЕА и ФУМ TT MT A and B, AFL, OT, ZEA and FUM	Уголь, цеолит и ионообменные смолы Coal, zeolite and ion exchange resins	Зерновые Cereals
АФЛ, ОТ,ФУМ, ЗЕА, ДОН, Т-2 и НТ-2 AFL, OT, FUM, ZEA, DON, T-2 and HT-2	ИАФК AflaTest, FumoniTest, ZearalaTest (США), Ochra-prep, Donprep (Германия) IAFK AflaTest, FumoniTest, ZearalaTest (USA), Ochra-prep, Donprep (Germany)	–
П Patulin	Сверхсшитые полистиролы (картриджи Purosep, Великобритания) Supercrosslinked polystyrenes (Purosep cartridges, Great Britain)	Соки Juices
ЗЕА ZEA	Сверхсшитые полимеры (Affinimiptm ZON, Polyintell) Super Crosslinked Polymers (Affinimiptm ZON, Polyintell)	Кукуруза и пшеница Corn and Wheat

Появились публикации об успешном применении уникального способа извлечения и концентрирования МТ – дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции (ДЖЖМЭ). Метод основан на использовании системы растворителей: диспергатор, экстрагент, вода. Растворители выбирают таким образом, чтобы диспергатор растворялся, а экстрагент не растворялся в воде. После впрыскивания с помощью шприца смеси в воду или в водный раствор анализируемой пробы экстрагент выделяется в виде микрочастиц отдельной фазой, концентрирующей аналиты. Экстракт выделяют центрифугированием. При одновременном определении МТ различных классов хроматографическими методами часто прибегают к сочетанию QuEChERS и ДЖЖМЭ [57].

ГЖХ

Более перспективным оказалось использование техники ГЖХ. Она служит одним из рутинных методов, применяемых для идентификации МТ. Все методы анализа объектов с помощью ГЖХ требуют многоступенчатой и длительной процедуры подготовки проб, а также стадии их химической модификации [50].

Дериватизация ТТ МТ заключается в переводе гидроксильных групп в трифторацетильные, триметилсилильные, пентафторпропионильные, гептафторбутирильные производные и приводит к повышению летучести целевых аналитов и делает их чувствительными к определению на детекторе электронного захвата (ДЭЗ). В качестве дериватизирующих реагентов используют бис(триметилсилил)ацетамид, триметилсилилимидазол, смесь триметилсилилимидазола и триметилхлорсилана, коммерческие смеси (3:3:2) бис(триметилсилил)трифторацетамид триметилсилилимидазол-триметилхлорсилан и (3:3:2) бис(триметилсилил)ацетамид-триметилсилилимидазол-триметилхлорсилан. Для получения фторацетильных производных применяют гептафторбутирилимидазол, гептафторбутирильный ангидрид, пентафторпропионилимидазол, пентафторпропионильный ангидрид, трифторуксусную кислоту (ТФУК) и ее ангидрид (ТФА). Для дериватизации ТТ МТ типа В, как правило, применяют фторацетильные или триметилсилильные реагенты (рисунки 4 и 5). ГХ-МС используют обычно для идентификации ФУМов, при этом применяют реакции гидролиза, а затем этерификации с 1,2,3-пропантрикарбоновой кислотой и/или ацилирование. ФУМы после гидролиза также можно определять и методом ГХ-ПИД (пламенно-ионизационный детектор). В таблице 12 обобщены описанные в литературе методики анализа МТ методом ГЖХ.

ВЭЖХ

Помимо ГЖХ возможно применение и ВЭЖХ. В качестве официальной методики определения ЗЕА Международной Ассоциацией Официальных Аналитиков (AOAC Int) принят метод ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией (ФЛД) [60]. **Колонки.** В основном используют колонки, заполненные сорбентом C_{18} и C_8 (ОФ ВЭЖХ). В качестве **подвижной фазы (ПФ)** используют смеси метанола или ацетонитрила и воды. **Детектирование.** ТТ типа А мало поглощают УФ-излучение, поэтому наиболее часто для данных МТ используют ФЛД или МС-детектирование. Основным ограничением для метода ВЭЖХ с ФЛД является необходимость перевода МТ в производные, например, при определении АФЛов или ФУМов, так как не все МТ способны интенсивно флуоресцировать. Однако получаемые производные не всегда стабильны. Данную проблему решают подбором условий дериватизации. Переводят АФЛ в производные до разделения на колонке (реакция с ТФУК) или после разделения на колонке (реакция с иодом или бромом). В результате реакции дериватизации происходит насыщение двойных связей в фурановом кольце, что приводит к увеличению интенсивности флуоресценции производных, а также позволяет разделить все исследуемые АФЛ. Установлено, что использование ТФУК позволяет получать устойчивые производные с максимальной интенсивностью флуоресценции (рисунок 8). Важным фактором, определяющим чувствительность определения, являются длины волн возбуждения и детектирования. Установлено, что для пяти АФЛ использование длин волн возбуждения и детектирования 360 и 450 нм является оптимальным, а для ЗЕА и ОТов – 333 и 460 нм. Молекулы ФУМов мало поглощают УФ-излучение, поэтому для их определения методом ОФ ВЭЖХ с адсорбентом С18 и ПФ метанол/раствор фосфорной кислоты используют дериватизацию о-диальдегидом фталевой кислоты с 2-меркаптоэтанолом. Патулин определяют с использованием ВЭЖХ и УФ-детектированием (при длине волны 274 нм). ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС являются также возможными методами при определении патулина, применяя электрораспылительную ионизацию. Для обеспечения надежной идентификации ЗЕА рекомендуют использовать детектор с диодной матрицей, а также применяют ВЭЖХ-МС/МС с химической ионизацией при атмосферном давлении [61]. Применение масс-спектрометрии как с газовой, так и с жидкостной хроматографией в настоящее время становится все более популярным способом определения МТ. Применение такого детектора позволяет работать с экстрактами, не требующими глубокой очистки, метод селективен для типов А и В трихотеценовых МТ и позволяет одновременно определять различные классы МТ. Основные примеры использования ВЭЖХ для анализа МТ обобщены в таблице 13.

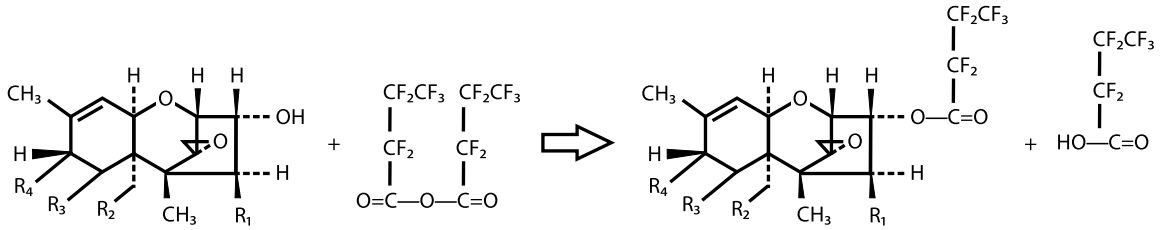


Рисунок 4. Схема реакции дериватизации трихотеценовых МТ

Figure 4. Scheme of the reaction of derivatization of trichothecene MT

Таблица 12. Использование ГЖХ для определения различных МТ [58,59]

Table 12. The use of GLC to determine various MTs [58,59]

Детектор Detector	Дериватизация Derivatization	ПО* Software*	Пробоподготовка Sample preparation	Примеры Examples
Трихотеценовые МТ *Trichothecene MT*				
ДЭЗ Electronic capture detector (DEC)	Дериватизация гидроксильных групп фторацетильными производными (пентафторпропионильный ангидрид) Derivatization of hydroxyl groups with fluoroacetyl derivatives (pentafluoropropionyl anhydride)	Т-2 и НТ-2 7 и 3 мкг/кг T-2 and HT-2 7 and 3 µg/kg	Извлечение смесью ацетонитрил/вода и метанол/вода, очищение экстрактов методом ТФЭ на различных сорбентах и далее ИАФК для очистки каждого МТ Extraction with a mixture of acetonitrile/water and methanol/water, purification of the extracts by TFE on various sorbents and then IAPC for the purification of each MT	НТ-2 и Т-2 в паприке HT-2 and T-2 in paprika
	Триметилсилилимидазол Trimethylsilylimidazole	20–40 мкг/кг	Извлечение ацетонитрилом и водой, очистка на колонах MycoSep® Recovery with acetonitrile and water, purification on MycoSep®	ДОН, ниваленол, 3- и 15-ацетилдезок синиваленол (3-АДОН, 15-АДОН) в кормах DON columns, nivalenol, 3- and 15-acetyldecine sinivalenol (3-ADON, 15-ADON) in feed
	ДОН с переводом в производное при помощи ТФА DON with conversion to derivative using TFAA	5 мкг/кг		
	Ниваленол, ДОН, 3-АДОН, 15-АДОН после их перевода в производное с помощью гептафторбутирильного ангидрида Nivalenol, DON, 3-ADON, 15-ADON after their conversion to a derivative using heptafluorobutyric anhydride	30 мкг/кг		
	Гептафторбутирильный ангидрид в присутствии катализатора диметиламинопиридина Heptafluorobutyric anhydride in the presence of a dimethylaminopyridine catalyst	50–200 мкг/кг	Экстракция смесью ацетонитрила и воды, очистка на колонке с углем и оксидом алюминия Extraction with a mixture of acetonitrile and water, purification on a column with coal and aluminum oxide	12 МТ (верукарол, скирпентриол, Т-2, Т-2 тетраол, изо-Т-2, НТ-2, ДАС, ниваленол, фузаренон X, ДОН, 3-, 15-АдОн) в кукурузе 12 MT (verucarol, skirpentriol, T-2, T-2 tetraol, iso-T-2, NT-2, DAS, nivalenol, fusarenone X, DON, 3-, 15-ADON) in corn
ПИД Flame ionization detector (FID)	ТФУК, полученный дериват выдерживали 1 ч при 60 °С на водяной бане, затем добавляли дигидрофосфат калия TFAA, the resulting derivative was kept for 1 h at 60 °C in a water bath, then potassium dihydrogen phosphate	30–50 мкг/кг	Извлечение метанолом, очистка диихлорметаном и на колонке из оксида алюминия и угля Methanol extraction, purification with dichloromethane and a column of alumina and carbon	Т-2, ДОН и диацетоокси-скирпенол (ДАС) в попкорне T-2, DON and diacetoxoxyphenol (DAS) in popcorn
	Триметилсилиловый эфир Trimethylsilyl ether	75 мкг/кг	Извлечение смесью (84:16) ацетонитрил/вода, очистка экстракта с помощью колонок MycoSep® Extraction of aceto-nitrile / water with a mixture (84:16), purification of the extract using MycoSep® columns	ДОН, ниваленол, 3-АДОН, фузаренон X, Т-2 и НТ-2, ДАС и несоланиол DON, nivalenol, 3-ADON, fusarenone X, T-2 and NT-2, DAS and nesolaniol
МС Mass detector	Гептафторбутирилимидазол. Использовали метод химической ионизации (метан) Heptafluorobutyrylimidazole. Used the method of chemical ionization (methane)	–	–	Неосоланиол, ДАС, Т-2, НТ-2, ДОН, фузаренон X в кукурузе, ячмене, пшенице и комбикормах Neosolaniol, DAS, T-2, NT-2, DON, fusarenone X in corn, barley, wheat and animal feed
МС Mass detector	Триметилсилильные производные Trimethylsilyl derivatives	–	Экстракция смесью ацетонитрил и вода, очистка – колонка с сорбентом Florisil. Разделение – на колонке DB-5 Extraction with a mixture of acetonitrile and water, purification – column with Florisil sorbent. Separation – on DB-5 column	Одновременное определение нескольких трихотеценовых МТ и ЗЕА Simultaneous determination of several trichothecene MT and ZEA

Окончание таблицы 12

Детектор **Detector**	**Дериватизация** **Derivatization**	**ПО*** **Software***	**Пробоподготовка** **Sample preparation**	**Примеры** **Examples**
Охратоксины *Ochratoxins*				
МС Mass detector	Дериватизация с помощью бистриметилсилилтрифторацетамида Derivatization Using bistrimethylsilyl trifluoroacetamide	0,1 мкг/л 0.1 µg/L	Извлечение дихлорметаном, разделение на капиллярной колоне DB-5MS Dichloromethane recovery, separation on a DB-5MS capillary column	Охратоксин А в вине Ochratoxin A in wine
Патулин *Patulin*				
МС Mass detector	Перевод в триметилсилил- или ацетилпроизводные Transfer to trimethylsilyl or acetyl derivatives	0,4 мкг/кг	НФ – колонка SLB-5MS NF – column SLB-5MS	Патулин в яблоках, яблочном соке, джеме, детском питании Patulin in apples, apple juice, jam, baby food
Фумонизины *Fumonisins*				
ПИД (колонка 30 м) или ГХ-МС (колонка 60 м) FID (column 30 m) or GC-MS (column 60 m)	Перевод в производные гептафтормасляным ангидридом Transfer to heptafluorobutyric anhydride derivatives	50 мкг/кг	Гидролиз экстрактов в присутствии соляной кислоты. Извлечение смесью ацетонитрил/вода, очистка – Sep-Pak C_{18}. НФ – DB-5, ПФ – гелий Hydrolysis of extracts in the presence of hydrochloric acid. Recovery with acetonitrile / water, purification – Sep-Pak C_{18}. NF – DB-5, PF – helium	Фумонизины в кукурузе Fumonisins in maize
Одновременное определение МТ различных классов *Simultaneous determination of MT of various classes*				
МС или ПИД MS or FID	Перевод в производные с N,N-диметилтриметилсилилкарбаматом Conversion to derivatives with N,N-dimethyltrimethylsilylcarbamate	–	Экстракты очищали на ИАФК MycoSep® The extracts were purified on a MycoSep® IAPC	Трихотецены А и Б Trichothecene A and B
ДЭЗ DEC	Перевод в трифторпроизводные Transfer to trifluoride derivatives	–	Разделение – на кварцевой капиллярной колонке RtxPesticides® длиной 30 м и внутренним диаметром 0,32 мм (толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мкм) Separation – on an RtxPesticides® quartz capillary column 30 m long and 0.32 mm inner diameter (film thickness of the stationary phase 0.25 µm)	МТ ряда трихотеценов, ОТ А, ЗЕА в зерне и продуктах его переработки, кормах и мясе MT of a number of trichotecenes, OT A, ZEA in grain and its processed products, feed and meat
	Получение производных с ТФА Derivation of derivatives with TFA	0,01–5 мг/кг	Экстракция – ацетонитрил, очистка – QuEChERS в сочетании с ДЖЖМЭ Extraction – acetonitrile, purification – QuEChERS in combination with dispersive liquid-liquid microextraction	ТТ МТ, Т-2, НТ-2, ДОН и ниваленол в зерне и ком-бикормах (рис. 6) TT MT, T-2, NT-2, DON and nivalenol in grain and compound feeds (Fig. 6)
	Получение производных с ТФА (рисунки 6, 7) Derivation of derivatives with TFA (figure 6, 7)	0,1–1,0 мг/кг	Экстракция – ацетонитрил, очистка – QuEChERS Extraction – acetonitrile, purification – QuEChERS	Патулин, ниваленол, дезоксиниваленол, 3- и 15-ацетил-дезоксиниваленол, фузаренон X, диацетоксискирпенол, токсины НТ-2 и Т-2, зеараленон в зерне и кормах Patulin, nivalenol, deoxynivalenol, 3- and 15-acetyl-deoxynivalenol, fusarenone X, diacetoxiskircenol, toxins NT-2 and T-2, zearalenone in grain and feed

Примечание: *Здесь и далее ПО – предел обнаружения.

Note: *Hereinafter, the software is the detection limit.

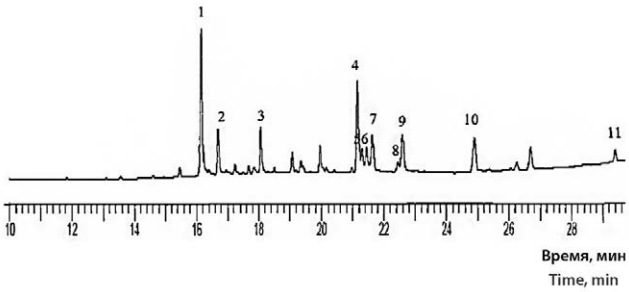


Рисунок 5. Хроматограмма стандартной смеси трифторпроизводных трихотеценовых МТ:

1 – Т-2-тетраол; 2 – ниваленол; 3 – дезоксиниваленол; 4 – 15-ацетилдезоксиниваленол; 5 – 3-ацетилдезоксиниваленол; 6 – неосоланиол; 7 – фузаренон Х; 8 – диацетоксискирпенол; 9 – Т-2-триол; 10 – НТ-2; 11 – Т-2

Figure 5. Chromatogram of a standard mixture of trifluoride derivatives of trichothecene MT:

1 – T-2-tetraol; 2 – nivalenol; 3 – deoxynivalenol; 4 – 15-acetyldeoxynivalenol; 5 – 3-acetyldeoxynivalenol; 6 – neosolaniol; 7 – fusarenenone X; 8 – diacetoxiskirphenol; 9 – T-2-triol; 10 – HT-2; 11 – T-2

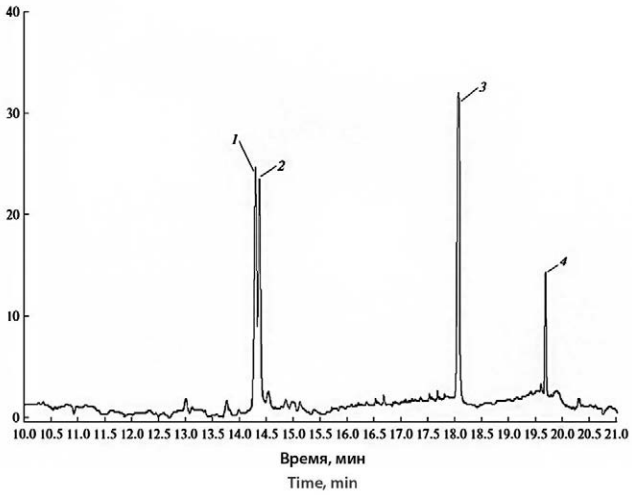


Рисунок 6. Хроматограмма стандартной смеси МТ:

1 – ниваленол; 2 – ДОН; 3 – НТ-2; 4 – Т-2

Figure 6. Chromatogram of a standard mixture of MT:

1 – nivalenol; 2 – DON; 3 – HT-2; 4 – T-2

Разработаны простые, экономичные и быстрые методики одновременного определения восьми МТ различных классов из зерна и кормов (рисунки 9 и 10). Молекулы АФЛов, ЗЕА и ОТов способны интенсивно флуоресцировать, в связи с этим их можно определять одновременно с помощью ФЛД, путем смены длин волн возбуждения и детектирования в течение анализа [65].

Электрохимические методы

В настоящее время разработан современный метод определения ОТ А и П в винопродукции – капиллярный электорофорез [66], получивший признание в

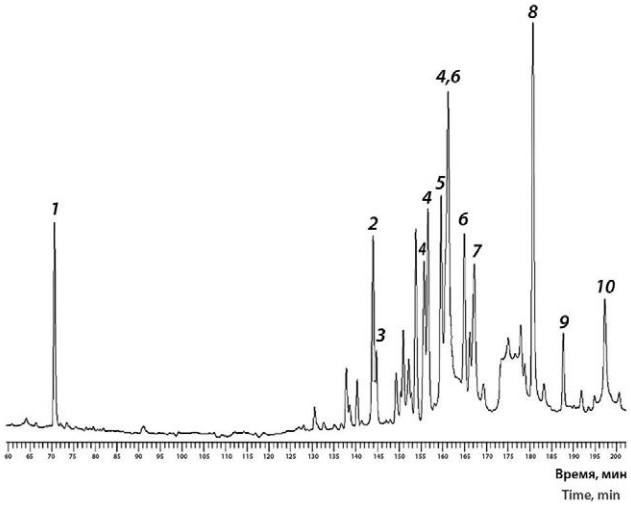


Рисунок 7. Хроматограмма стандартной смеси производных МТ:

1 – патулин (2 мкг/мл); 2 – ниваленол (17 мкг/мл); 3 – ДОН (17 мкг/мл); 4 – 15-ацДОН (17 мкг/мл); 5 – Фузаренон Х (8 мкг/мл), 6 – 3-ацДОН (8 мкг/мл); 7 – ДАС (13 мкг/мл); 8 – НТ-2 (3 мкг/мл), 9 – ЗЕА (2 мкг/мл); 10 – Т-2 (17 мкг/мл)

Figure 7. Chromatogram of a standard mixture of MT derivatives:

1 – patulin (2 µg/ml); 2 – nivalenol (17 µg/ml); 3 – DON (17 µg/ml); 4 – 15-acDON (17 µg/ml); 5 – Fusarenone X (8 µg/ml); 6 – 3-acDON (8 µg/ml); 7 – DAS (13 µg/ml); 8 – HT-2 (3 µg/ml); 9 – ZEA (2 µg/ml); 10 – T-2 (17 µg/ml)

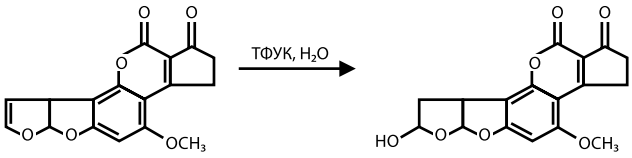


Рисунок 8. Схема реакции получения производных АФЛ с ТФУК

Figure 8. Reaction scheme for the preparation of AFL derivatives with trifluoroacetic acid

странах Евросоюза (рисунок 11). Экспериментальным путем были подобраны: буферный раствор, длина волны спектрофотометрического детектора, напряжение, дозирование пробы (пневматическое при 30 мБар – для ОТ А); время анализа (12 минут – для ОТ А), температура термостатирования капилляра (25 °С – для ОТ А). Наилучшие результаты по экстракции МТ показал растворитель хлористый метилен. Методику предложено внести в проект технического регламента на вино [67].

Преимущество капиллярного электрофореза в высокой эффективности разделения компонентов, наличие отечественной приборной базы, малых объемах анализируемой пробы и буферного раствора, экспрессности анализа, в отсутствии дорогостоящих хроматографических колонок, насосов, необходимых для ВЭЖХ и упрощенной пробоподготовке.

Таблица 13. Использование ВЭЖХ для определения различных МТ [62-64]

Table 13. The use of HPLC to determine various MT [62-64]

Детектор Detector	Дериватизация Derivatization	Условия анализа Analysis Conditions	ПО Software	Примеры Examples
Трихотеценовые МТ *Trichothecene MT*				
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 360 и 470 нм соответственно Fluorescence detector (FD) with excitation and detection wavelengths of 360 and 470 nm, respectively	Постколоночная дериватизация Post-column derivatization	ПФ – ацетонитрил/вода и НФ – C_{18} Mobile phase (MP) – acetonitrile/water and NF – C_{18}	2–20 мкг/кг 2–20 µg/kg	ДОН и ниваленол в хлебных злаках DON and nivalenol in cereals
	Предколоночная дериватизация – кумарин-3-карбонилхлорид Pre-Column Derivatization – Coumarin-3-Carbonyl Chloride	ПФ – вода/ацетонитрил с добавлением 0,75 % уксусной кислоты MP – water/acetonitrile with the addition of 0.75 % acetic acid	Т-2 – 10 мкг/кг; ДАС, Т-2, НТ-2, несоланиол – 15 мкг/кг; ниваленол, 3-АДОН, 15-АДОН, фузаренон X – 0,2–1 мкг/кг T-2 – 10 µg/kg; DAS, T-2, HT-2, nesolaniol – 15 µg/kg; nivalenol, 3-ADON, 15-ADON, fusarenone X – 0,2–1 µg/kg	ДАС, Т-2, НТ-2, несоланиол, ниваленол, 3-АДОН, 15-АДОН, фузаренон X DAS, T-2, NT-2, nesolaniol, nivalenol, 3-ADON, 15-ADON, fusarenone X
УФ-детектор (218 нм) UV detector (218 nm)	–	Экстракция полиэтиленгликолем, очистка экстрактов с помощью ИАФК. ПФ – ацетонитрил и вода Extraction with polyethylene glycol, purification of extracts using immunoaffinity columns (IAFC). MP – acetonitrile and water	ДОН – 20 мкг/кг DON – 20 µg/kg	ДОН, 3- и 15-АДОН в зерновых, муке, травах, пиве DON, 3- and 15-ADON in cereals, flour, herbs, beer
УФ-детектор (224 нм) UV detector (224 nm)	–	НФ-ВЭЖХ, колонка с адсорбентом Силасорб-600, ПФ – гексан/ изопропанол/вода Stationary phase (SP)-HPLC, silabar-600 adsorbent column, MP – hexane/isopropanol/water	100 мкг/кг 100 µg/kg	ДОН DON
МС MS	–	Экстракция смесью ацетонитрил – вода, очистка на колонках MycoSep®. Разделение – на колонке Synergi Hydro с градиентным элюированием Extraction with a mixture of acetonitrile – water, purification on MycoSep® columns. Separation – on a Synergi Hydro column with a gradient elution	0,5–1 мкг/кг 0.5–1 µg/kg	Т-2, НТ-2, ДОН, фузаренон X, ниваленол, 3-АДОН, 15-АДОН в зерновых T-2, NT-2, DON, fusarenone X, nivalenol, 3-ADON, 15-ADON in cereals
ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS and HPLC-MS/MS	Способ ионизации – химическая ионизации при атмосферном давлении. *m/z* для ДАС, Т-2, НТ-2 – 263,0; 307,3; 183,2 соответственно The ionization method is chemical ionization at atmospheric pressure. m/z for DAS, T-2, NT-2 – 263.0; 307.3; 183.2, respectively	Экстракция – ацетонитрилом, очистка экстрактов – на колонках MycoSep®. ПФ – ацетат аммония в воде и метаноле Extraction with acetonitrile; purification of extracts with MycoSep® columns. PF – ammonium acetate in water and methanol	0,3 (Т-2, ДАС) и 1 (НТ-2) мкг/кг 0.3 (T-2, DAS) and 1 (HT-2) µg/kg	ДАС, Т-2, НТ-2 в зерновых DAS, T-2, NT-2 in cereals

Детектор Detector	Дериватизация Derivatization	Условия анализа Analysis Conditions	ПО Software	Примеры Examples
ВЭЖХ-ДМД (220 нм) HPLC-diode array detector (DAD) (220 nm)	–	Сверхкритическая флюидная экстракция, разделение на колонке ODS Hypersil с ПФ – вода/ацетонитрил Supercritical fluid extraction, separation on an ODS Hypersil column with PF – water / acetonitrile	100–500 мкг/кг 100–500 mcg/kg	Трихотецены типа B в пшенице Trichotensen type B in wheat
ВЭЖХ с ФЛД HPLC with FD	Производные HT-2, полученные по реакции с 1-антроилнитрилом и 4-диметиламинопиридином HT-2 derivatives obtained by reaction with 1-anthroyl nitrile and 4-dimethylaminopyridine	–	3 нг/л 3 ng/l	HT-2 токсин HT-2 toxin
Афлатоксины *Aflatoxins*				
ФЛД (440 нм) FD (440 nm)	–	Экстракция метанолом, очистка экстракта на ИАФК. ПФ (18:64:18) метанол/вода/ацетонитрил Extraction with methanol, purification of the extract on IAFC. MP (18:64:18) methanol/water/acetonitrile	0,1 мкг/кг 0.1 µg/kg	АФЛ B_1, B_2, G_1, G_2 в зерновых, фруктах, орехах AFL B_1, B_2, G_1, G_2 in cereals, fruits, nuts
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 360 и 440 нм соответственно FD with excitation and detection wavelengths of 360 and 440 nm, respectively	Предколоночная дериватизация с ТФУК Pre-column derivatization with TFAA	ПФ – (70:17:17) вода/ацетонитрил/метанол MP – (70:17:17) water/acetonitrile/methanol	0,3 мкг/кг 0.3 µg/kg	АФЛ в арахисе, орехах, семенах тыквы, кукурузы и в арахисовом масле AFL in peanuts, nuts, pumpkin seeds, corn and peanut butter
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 365 и 440 нм соответственно FD with excitation and detection wavelengths of 365 and 440 nm, respectively	Постколоночная дериватизация АФЛов с иодом Post-column derivatization of AFLs with iodine	Разделение – на колонке Spherisorb ODS с ПФ – (60: 30:10) вода/ацетонитрил/метанол Separation – on a Spherisorb ODS column with PF – (60: 30:10) water/acetonitrile/methanol	–	АФЛ в кукурузе, арахисовом масле, сорго, солоде AFL in corn, peanut butter, sorghum, salt
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 362 и 418 нм соответственно FD with excitation and detection wavelengths of 362 and 418 nm, respectively	Постколоночная дериватизация АФЛов с бромом Post-column derivatization of AFLs with bromine	Извлечение смесью метанола и воды, очистка экстрактов на ИАФК. ПФ – 40%-ная смесь (5:4) метанол/ацетонитрил и вода. Разделение – на колонке Spherisorb ODS2 Extraction of a mixture of methanol and water, purification of extracts using IAA. PF – 40 % mixture (5: 4) methanol/acetonitrile and water. Separation – on a Spherisorb ODS2 column	0,06 мкг/кг 0.06 µg/kg	АФЛ B_1 в различных специях AFL B1 in various spices
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 366 и 440 нм соответственно FD with excitation and detection wavelengths of 366 and 440 nm, respectively	Постколоночная фотохимическая дериватизация Post-column photochemical derivatization	Извлечение смесью метанола и фосфатного буферного раствора, очистка твердофазной микроэкстракцией. ПФ – (54:38:8) вода/ацетонитрил/метанол, НФ – C_{18} Extraction with a mixture of methanol and phosphate buffer solution, purification by solid-phase microextraction. MP – (54: 38: 8) water/acetonitrile / methanol, SP – C_{18}	0,035–0,2 мкг/кг 0.035–0.2 µg/kg	АФЛ в хлебных злаках AFL in cereals

Продолжение таблицы 13

Детектор Detector	**Дериватизация** Derivatization	**Условия анализа** Analysis Conditions	**ПО** Software	**Примеры** Examples
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 365 и 435 нм соответственно FD with excitation and detection wavelengths of 365 and 435 nm, respectively	–	Выделение и очистка от примесей – ИАФК. ПФ (25:75) – ацетонитрил и вода, НФ – сорбент XDB-08 Isolation and purification from impurities – IAFC. MP (25:75) – acetonitrile and water, SP – sorbent XDB-08	0,04 мкг/л 0.04 µg/L	АФЛ M_1 в молоке и молочных продуктах AFL M_1 in milk and dairy products
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Электрораспылительная ионизация. *m/z* для афлатоксинов B_1 и M_1 312 и 327 соответственно Electrospray ionization. m/z for aflatoxins B_1 and M1 312 and 327, respectively	Очистка на ИАФК MycoSep®. ПФ – ацетонитрил/водный раствор 4-метилморфолина Purification by IAFC MycoSep®. MP – acetonitrile/aqueous solution of 4-methylmorpholine	0,59–0,66 и 14-9,2 нг/л 0.59–0.66 and 14-9.2 ng/l	АФЛ B_1 и M_1 в молоке и молочных продуктах AFL B_1 and M_1 in milk and dairy products
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 340 и 450 нм соответственно FD with excitation and detection wavelengths of 340 and 450 nm, respectively	АФЛ B_1, G_1, B_2, G_2 переводили в йод-производные AFLs B_1, G_1, B_2, G_2 were converted into iodine derivatives	Сочетание пробоподготовки по QuEChERS и ДЖЖМЭ. Жидкостной хроматограф Flexar LC; колонка Kromasil 100-5 C_{18}, 5 см, 4,6 × 150 мм; градиентное элюирование: ПФ – ацетонитрил/вода (от 0 до 11 мин 30/70; от 12 до 25 мин 35/65) Combination of sample preparation according to QuEChERS and DLLME. Flexar LC Liquid Chromatograph; Kromasil 100-5 C_{18} column, 5c m, 4.6 × 150 mm; gradient elution: MP – acetonitrile/water (from 0 to 11 min 30/70; from 12 to 25 min 35/65)	B_1 и G_1 – 0,1; B_2 и G_2 – 0,08 мкг/кг B_1 and G_1 – 0.1; B_2 and G_2 – 0.08 µg/kg	АФЛ B_1, B_2, G_1 и G_2 в зерне и кормах AFL B_1, B_2, G_1 and G_2 in grain and feed
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 360 и 418 нм соответственно FD with excitation and detection wavelengths of 360 and 418 nm, respectively	–	Сочетание пробоподготовки по QuEChERS и ДЖЖМЭ. Жидкостной хроматограф Flexar LC. Разделение на колонке (150 × 4,6 мм) Kromasil100 – 3,5 C_{18} (5 мкм) с ПФ ацетонитрил–вода–метанол (40:40:20) Combination of sample preparation according to QuEChERS and DLLME. Liquid chromatograph Flexar LC. Separation on a column (150 × 4.6 mm) of Kromasil100 – 3.5 C18 (5 µm) with PF acetonitrile – water – methanol (40:40:20)	–	АФЛ B_1 и M_1 в молоке и молочных продуктах AFL B_1 and M_1 in milk and dairy products
Охратоксины Ochratoxins				
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 333 и 460 нм соответственно FD with excitation and detection wavelengths of 333 and 460 nm, respectively	–	Экстракция смесью метанола и воды, экстракты очищали на ИАФК Extraction with a mixture of methanol and water, the extracts were purified on IAFC	0,3 мкг/кг 0.3 µg/kg	ОТ в лекарственных травах OT in medicinal herbs
УФ-детектор (236 нм) UV detector (236 nm)	Применяют дериватизацию три фтористым бором в метаноле Derivatization with boron trifluoride in methanol	ПФ – 2%-я (по объему) уксусная кислота в смеси (1:1) ацетонитрил/вода MP – 2 % (by volume) acetic acid in a mixture (1:1) acetonitrile/water	–	ОТ А в пшенице OT A in wheat

Детектор Detector	Дериватизация Derivatization	Условия анализа Analysis Conditions	ПО Software	Примеры Examples
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Химическая ионизация при атмосферном давлении или электрораспылительную ионизация. *m/z* 404.0; 239.0; 357.9; 221.1 Chemical ionization at atmospheric pressure or electrospray ionization. m/z 404.0; 239.0; 357.9; 221.1	Градиентное элюирование, ПФ – метанол и вода/ацетат аммония и уксусная кислота Gradient elution, PF – methanol and water/ammonium acetate and acetic acid	0,3 мкг/кг 0.3 µg/kg	ОТ А в зерновых и фруктах OT A in grains and fruits
ЗЕА *ZEA*				
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 274 и 418 нм соответственно FD with excitation and detection wavelengths of 274 and 418 nm, respectively	–	Экстракция – ацетонитрилом, очистка – ИАФК. ПФ – ацетонитрил/уксусная кислота Extraction – with acetonitrile, purification – IAPC. MP – acetonitrile/acetic acid	0,07 мкг/кг 0.07 µg/kg	ЗЕА в зерне и зерновых продуктах ZEA in grain and cereal products
УФ-детектор (236, 274 и 316 нм) UV detector (236, 274 and 316 nm)	–	Извлечение смесью метанол-воды, очистка на колонке с сорбентом Florisil. НФ – C_{18} и ПФ – метанол/ацетонитрил/вода Extraction with a mixture of methanol-water, cleaning on a column with Florisil sorbent. SP – C_{18} and MP – methanol/acetonitrile/water	0,07 мг/кг 0.07 mg/kg	ЗЕА в кукурузе ZEA in corn
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Электрораспылительная ионизация Electrospray ionization	–	1 мкг/кг 1 µg/kg	ЗЕА одновременно с другими МТ ZEA simultaneously with other MT
Патулин *Patulin*				
УФ-детектор (273 нм) UV detector (273 nm)	–	Экстракты очищали методом ТФЭ. ПФ – гексан/этилацетат/уксусная кислота The extracts were purified by TFE. MP – hexane/ethyl acetate/acetic acid	10 мкг/кг 10 mcg/kg	Соки Juice
ВЭЖХ-ДМД (275 нм) HPLC-DMD (275 nm)	–	НФ – C_{18}. ПФ – ацетонитрил/вода SP – C_{18}. MP – acetonitrile/water	0,5 мкг/кг 0.5 mcg/kg	Яблоки и яблочный сок, мед, сахар, карамель, уксус и другие продукты Apples and apple juice, honey, sugar, caramel, vinegar and other products
СВЭЖХ-МС/МС SVEZH-MS/MS	*m/z* 108.7; 80.8	Разделение – на колонке Acquity UPLC BEH C_{18}, ПФ – ацетонитрил и раствора ацетата аммония Separation – on the Acquity UPLC BEH C_{18} column, MP – acetonitrile and ammonium acetate solution	1 мкг/кг 1 µg/kg	Продукты на основе яблок Apple-based products

Окончание таблицы 13

Детектор Detector	**Дериватизация** Derivatization	**Условия анализа** Analysis Conditions	**ПО** Software	**Примеры** Examples
Фумонизины Fumonisins				
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 335 и 440 нм соответственно FD with excitation and detection wavelengths of 335 and 440 nm, respectively	Перевод в производные с использованием о-диальдегида фталевой кислоты Translation into derivatives using phthalic acid o-dialdehyde	ПФ – метанол и раствор дигидрофосфата натрия MP – methanol and sodium dihydrogen phosphate solution	–	ФУМ B_1, B_2 в кукурузе FUM B_1, B_2 in corn
ФЛД FD	Перевод в производные с использованием нафталин-2,3-дикарбоксиальдегида Translation into derivatives using naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde	Экстракция – смесью метанол/вода, очистка на ИАФК Extraction – with a mixture of methanol/water, purification on IAFC	–	ФУМ B_1 и B_2 в пшенице FUM B_1 and B_2 in wheat
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	–	Пробоподготовка на ИАФК. Разделение на колонке XBridge, ПФ – метанол и муравьиная кислота Sample Preparation at IAFC. Separation on an XBridge column, MP – methanol and formic acid	ФУМы B_1 и B_3 – 0,025 мкг/кг, B_2 – 0,5 мкг/кг FUMs B_1 and B_3 – 0.025 µg/kg, B_2 – 0.5 µg/kg	ФУМы B_1, B_2, B_3 в травяном чае и лекарственных растениях FUMs B_1, B_2, B_3 in herbal tea and medicinal plants
Одновременное определение МТ различных классов Simultaneous determination of MT of various classes				
ФЛД FD	Перевод в производные с использованием кумарин-3-карбонилхлорида Conversion into coumarin-3-carbonyl chloride derivatives	Экстракты очищали на ИАФК MycoSep® The extracts were purified on MycoSep® IAFC	–	ТТ типа А и В Type A and B TT
ФЛД с длинами волн возбуждения и детектирования 360 и 450 нм соответственно для АФЛов; 333 нм и 460 нм – для ОТов и ЗЕА соответственно. Для патулина – УФ-детектор (274 нм) FD with excitation and detection wavelengths of 360 and 450 nm, respectively, for AFLs; 333 nm and 460 nm for OTs and ZEA, respectively. For patulin – UV detector (274 nm)	–	Извлечение – методы QuEChERS и ДЖЖМЭ совместно. Разделение – на колонке 4,6 × 250 мм SUPELCOSIL™ LC. Градиентное элюирование: ПФ – CH_3CN:CH_3COOH 1%-й вод. 30:70, CH_3CN:CH_3COOH 50:50, CH_3CN:CH_3COOH 60:40, CH_3CN:CH_3COOH 70:30 Extraction – QuEChERS and DLLME methods together. Separation – on a 4.6 × 250 mm SUPELCOSIL™ LC column. Gradient elution: MP – CH_3CN: CH_3COOH 1% water. 30:70, CH_3CN: CH_3COOH 50:50, CH_3CN: CH_3COOH 60:40, CH_3CN: CH_3COOH 70:30	–	АФЛ (B_1, B_2, G_1, G_2), ОТ (А и В), ЗЕА и П в зерне и кормах AFL (B_1, B_2, G_1, G_2), OT (A and B), ZEA and P in grain and feed
ВЭЖХ-МС HPLC-MS	–	Экстракты очищали на ИАФК MycoSep® Extracts were purified on MycoSep® IAFC	–	ТТ типа А, В и ЗЕА в кукурузном зерне Type A, B and ZEA TT in corn grain

Рисунок 9. Общая схема определения восьми МТ в зерне и кормах при использовании пробоподготовки QuEChERS и ДЖЖМЭ [57]

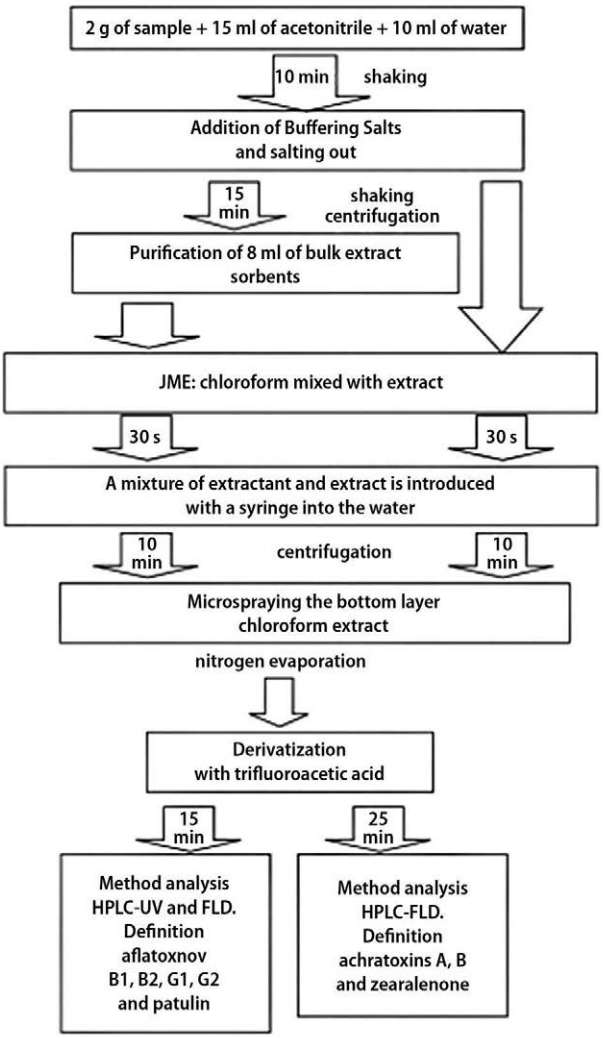


Figure 9. General scheme for the determination of eight MT in grain and feed using QuEChERS sample preparation and dispersive liquid-liquid microextraction [57]

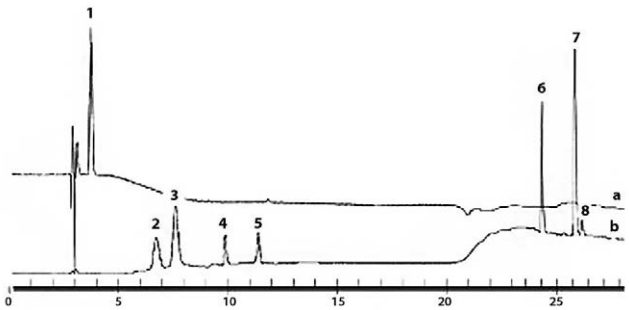


Рисунок 10. Хроматограмма стандартной смеси МТ, полученная при параллельном использовании УФ- (a) и флуориметрического (b) детекторов:

1 – патулин; 2 – АФЛ G_1; 3 – АФЛ B_1; 4 – АФЛ G_2; 5 – АФЛ B_2; 6 – ОТ B; 7 – ОТ A; 8 – ЗЕА [57]

Figure 10. Chromatogram of a standard MT mixture obtained using parallel UV (a) and fluorimetric (b) detectors:

1 – patulin; 2 – AFL G_1; 3 – AFL B_1; 4 – AFL G_2; 5 – AFL B_2; 6 – OT B; 7 – OT A; 8 – ZEA [57]

В последнее время достаточно активно разрабатываются различные биохимические, в том числе иммунохимические, методы определения МТ. Такие методы анализа являются удобным инструментом для первичного скрининга больших партий продукции благодаря своей простоте, экспрессности и относительно невысокой стоимости. Среди них следует отметить работы по использованию различных биосенсоров для решения данной аналитической задачи. Однако, примеры работ по применению биосенсоров для определения МТ пока немногочисленны [68]. Разработаны новые амперометрические биосенсоры на основе планарных платиновых электродов, модифицированных многослойными углеродными нанотрубками (УНТ), наночастицами золота и иммобилизованного фермента – тирозиназы для определения МТ патулина в области концентраций $1 \cdot 10^{-6} – 8 \cdot 10^{-12}$ моль/л в пищевых продуктах. Использование биосенсоров для определения отдельных МТ обусловлено еще тем, что они являются удобным инструментом для выполнения таких анализов благодаря своей чувствительности, селек-

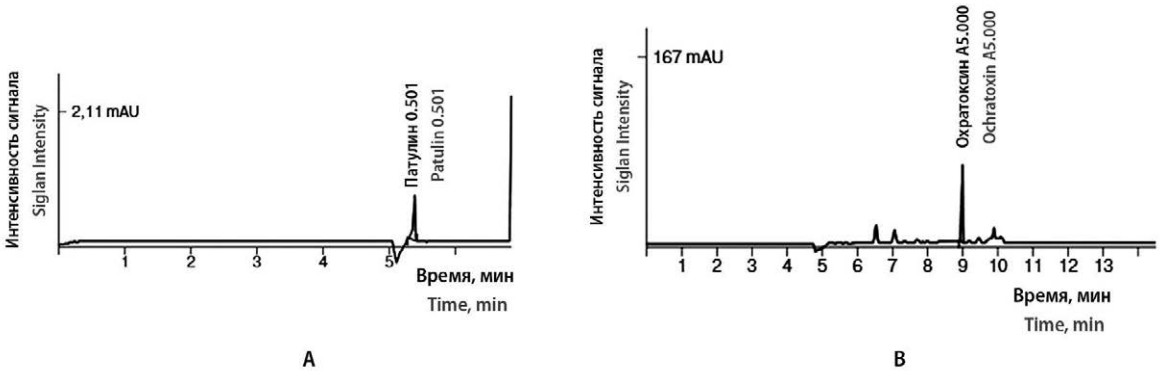


Рисунок 11. Электрофореграммы:
А – стандартного раствора патулина; В – стандартного раствора ОТ А

Figure 11. Electrophoregrams:
A – standard solution patuline; B – standard solution OT A

тивности, относительной простоте и экспрессности выполнения, в том числе и для первичного скрининга больших партий образцов. Для определения некоторых МТ предложены амперометрические холинэстеразные (ХЭ) биосенсоры на основе планарных платиновых электродов, в том числе и модифицированных УНТ. В работе [69] впервые было отмечено ингибирующее действие АФЛ B_1 на этот фермент. Авторы использовали это свойство МТ для разработки соответствующего биосенсора. Отметим, что рассматриваемые холинэстеразные биосенсоры разработаны на основе другого первичного преобразователя (трансдъюсера) и другого способа иммобилизации фермента. Известно, что ХЭ катализирует гидролиз тиохолиновых эфиров по следующему уравнению:

$$C_3H_7COSCH_2CH_2N^+(CH_3)_3Cl^- + H_2O \xrightarrow{\text{ХЭ}} C_3H_7COOH + \underset{\text{(тиол) (thiol)}}{HSCH_2CH_2N^+(CH_3)_3Cl^-}.$$

Продукт реакции тиол электрохимически активен. На печатном платиносодержащем электроде тиол подвергается окислению:

$$2(CH_3)_3N^+CH_2CH_2SH \rightarrow 2H^+ + 2e^- + (CH_3)_3N^+CH_2CH_2S-SCH_2CH_2N^+(CH_3)_3.$$

Изучение действия АФЛ B_1, ОТА и ЗЕА на иммобилизованную ХЭ, входящую в состав биочувствительной части амперометрического биосенсора, показало, что в их присутствии наблюдается уменьшение величины тока окисления продукта ферментативного гидролиза субстрата по сравнению с контрольными опытами, проведенными в отсутствие в растворе МТ. Таким образом, АФЛ B_1, ОТА и ЗЕА оказывают ингибирующее действие на иммобилизованную ХЭ в составе биосенсора. Полученные результаты показывают, что предлагаемые холинэстеразные биосенсоры могут быть использованы для определения содержания МТ в пищевых продуктах.

В работе [70] описано определение АФЛ B_1 на графитовых печатных электродах, на поверхность которых иммобилизировали иммунореагенты. Авторами работы в качестве метки, обеспечивающей возникновение аналитического сигнала, использовали ферменты. Субстратом служил 1-нафтилфосфат, окисление которого в 1-нафтол катализирует щелочную фосфатазу. Возникающий ток регистрировали методами дифференциальной импульсной вольтамперометрии. В других работах описано определение АФЛ B_1 электрохимическим методом с помощью иммуносенсора электрохимического импеданса на стеклоуглеродном электроде, модифицированного силикагель-ионной жидкостью с образованием биопленки в пыльце пчел [71]. В данной работе авторами для увеличения чувствительности сенсора была использована в качестве модификатора ионная жидкость гексафторфосфат 1-амил-2,3-диметилимидазолия. Сенсор дает линейный отклик в диапазоне 0,1–10 нг/мл АФЛ B_1 с пределом обнаружения 0,01 нг/мл.

Описан способ вольтамперометрического определения АФЛ B_1, включающий следующие операции: АФЛ B1 переводят из пробы в раствор и проводят вольтамперометрическое накопление МТ в перемешиваемом растворе в течение 30 с при потенциале электролиза $E_э = (0,0 + 0,05)$ В относительно насыщенного хлоридсеребряного электрода на фоне хлората аммония (NH_4ClO_4), pH 2,0–3,0 с последующей регистрацией анодных пиков при скорости развертки 30 мВ/с, а концентрацию АФЛ B1 определяли по высоте пика в диапазоне $E_n = (0,625 \pm 0,045)$В методом добавок аттестованных смесей [72].

Разработан способ определения АФЛ B_1 методом дифференциальной полярографии [73]. Авторами для совместного определения АФЛ B_1 и G_1 был предложен в качестве фонового электролита 0,1 М по $(CH_3)_4NBr$ и по LiCl, содержащего 40 % CH_3OH. Образец, содержащий АФЛ B_1 и G_1, растворяли в 2 мл CH_3OH, прибавляли 3 мл фона и полярографировали от –1,0 до –1,5 В при 25 ± 1 °С. Потенциалы пиков полуволны были соответственно $E_{1/2} = (-1,33 \pm 0,02)$ В и $E_{1/2} = (-1,25 \pm 0,02)$ В относительно AgCl – анода.

Иммунохимические методы (ИХМ) анализа

Важным направлением в контроле МТ является разработка и внедрение в практику ИХМ. Из-за высокой чувствительности, специфичности, экспрессности, портативности, сравнительно низкой стоимости оборудования, отсутствия существенной пробоподготовки, возможности обнаружения МТ на месте без привлечения квалифицированного персонала ИХМ основаны на специфическом взаимодействии определяемого вещества-антигена (АГ) и антител (АТ). Идентификацию и количественное определение комплекса проводят с помощью введенной метки. ИХМ эффективно применяют для анализа большого количества образцов. Они пригодны в основном для избирательного определения одного или небольшого числа МТ. Для подтверждающего анализа используют уже более точные и высокочувствительные хроматографические методы [74]. В настоящее время преобладающее количество работ по определению МТ в различных объектах посвящено ИХМ анализа. Описаны различные варианты ИФА [75–77].

Получение АТ

Основой любого иммуноанализа является взаимодействие АТ с АГ – МТ, различие лишь в способах детекции взаимодействия и условиях проведения анализа. В 1976 г. Лангоном и Ван Вунакисом были получены первые АТ на МТ – поликлональные АТ на АФЛ B_1. С их использованием был разработан радиоиммуноанализ АФЛ и проведены первые измерения в образцах кукурузы и арахиса. Первые моноклональные АТ на МТ (АФЛ B_1) были описаны Сан с соавт. в 1983 г. Позже появились моноклональные АТ и на остальные МТ. В настоящее время разработаны стандартные процедуры иммунизации животных, получения и тестирования поли- и моноклональных АТ. Поликлональные АТ против МТ, как правило, получают иммунизацией кроликов. Для определения ОТА, ЗЕА, ДОН, Т-2 получены АТ (IgY), выделенные из желтка куриных яиц. Большую чувствительность и специфичность определения МТ обеспечивают моноклональные АТ, которые широко применяют в последнее время. Современные технологии получения рекомбинантных АТ также используют при определении МТ методом ИФА.

Получение конъюгатов МТ с белками

МТ – низкомолекулярные соединения, не обладающие собственной иммуногенностью, поэтому перед иммунизацией необходима их пришивка к белку-носителю. Способы пришивки индивидуальны для каждого МТ.

В качестве ферментативной метки при определении МТ обычно используют пероксидазу хрена (ПХ), реже – щелочную фосфатазу (ЩФ). Активность фермента определяют, как правило, фотометрическим или хемилюминесцентным методом. Кроме ферментных, могут быть использованы флуоресцентные метки на основе европия, тетраметилродамина, квантовых точек и др. Твердой фазой в ИФА может быть не только поверхность лунки микропланшета, но и, например, магнитные частицы. Гарден и Стратен предложили автоматическую систему анализа, в которой в качестве твердого носителя использовались микросферы. Шарики иммобилизовали в проточной ячейке прибора, после чего проводили конкурентное связывание и детекцию образовавшихся иммунных комплексов посредством взаимодействия с антивидовыми АТ, меченными фосфатазой.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА)

ИФА является гетерогенным методом, для его реализации используют микропланшеты на 96 или 384 ячейки, на поверхность которых иммобилизуют иммунореагенты. Наиболее часто применяют *прямой конкурентный ИФА,* в котором определяемое вещество конкурирует с меченным ферментом АГ за связывание с АТ, иммобилизованными на твердом носителе (рисунок 12). После инкубации несвязавшиеся компоненты удаляют промывкой. Ферментативную активность носителя определяют по реакции с субстратом, она обратно пропорциональна концентрации определяемого МТ. В варианте *непрямого конкурентного ИФА* с твердой фазой связан АГ, коньюгированный с макромолекулярным носителем [например, бычьим сывороточным альбумином (БСА)]. При проведении анализа к пробе добавляют специфические АТ. Свободный АГ и конъюгат АГ, инкубированный на твердой фазе, конкурируют за связывание со специфическими АТ в растворе. Для определения количества связанных АТ добавляют антивидовые АТ, меченные ферментом. Чувствительность определения МТ по разным схемам сопоставима, однако введение дополнительных стадий в непрямом формате требует большего времени для проведения анализа. Поскольку МТ являются моновалентными АГ, для их определения используют преимущественно конкурентные форматы ИФА, схемы которых представлены на рисунке 13.

Широко производятся и получили статус официальных коммерческие тест-наборы для контроля содержания наиболее распространенных МТ методом твердофазного ИФА. Значительное внимание уделяется разработке сенсорных устройств, которые позволяют проводить экспресс-определение загрязнителей в полевых условиях и не требуют высококвалифицированного персонала. При определении МТ некоторые успехи достигнуты в разработке иммуносенсоров – сенсорных устройств, основанных на регистрации взаимодействия АГ – АТ. Иммуносенсоры позволяют регистрировать сигнал, генерируемый в процессе иммунохимической реакции и преобразуемый в измеряемый электрический сигнал. Принцип действия большинства сенсоров основан на различных форматах конкурентного твердофазного ИФА (рисунок 13). АТ или аналит, конъюгированный

Рисунок 12. **Основные этапы ИФА [22]**

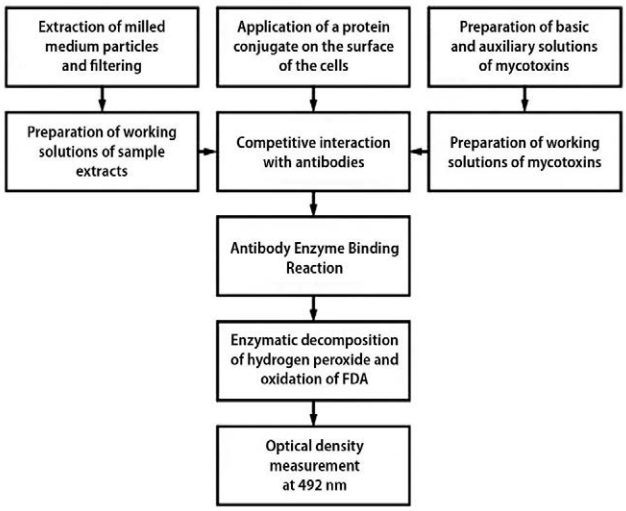


Figure 12. **The main stages of IFA [22]**

с белком, иммобилизуют на поверхность сенсорного элемента путем ковалентного связывания, физической адсорбции или включения в гель. Аналитический цикл включает следующие основные стадии: 1) конкурентное взаимодействие с образованием иммунного комплекса, 2) регистрация аналитического сигнала, 3) регенерация сенсорного слоя, заключающаяся в разрушении образовавшегося иммунокомплекса, путем изменения pH, введения небольших количеств органических растворителей или других органических соединений. Это позволяет использовать один сенсорный элемент для 50-100 циклов измерения. Примеры сенсоров, разработанных для определения МТ, представлены в таблице 14.

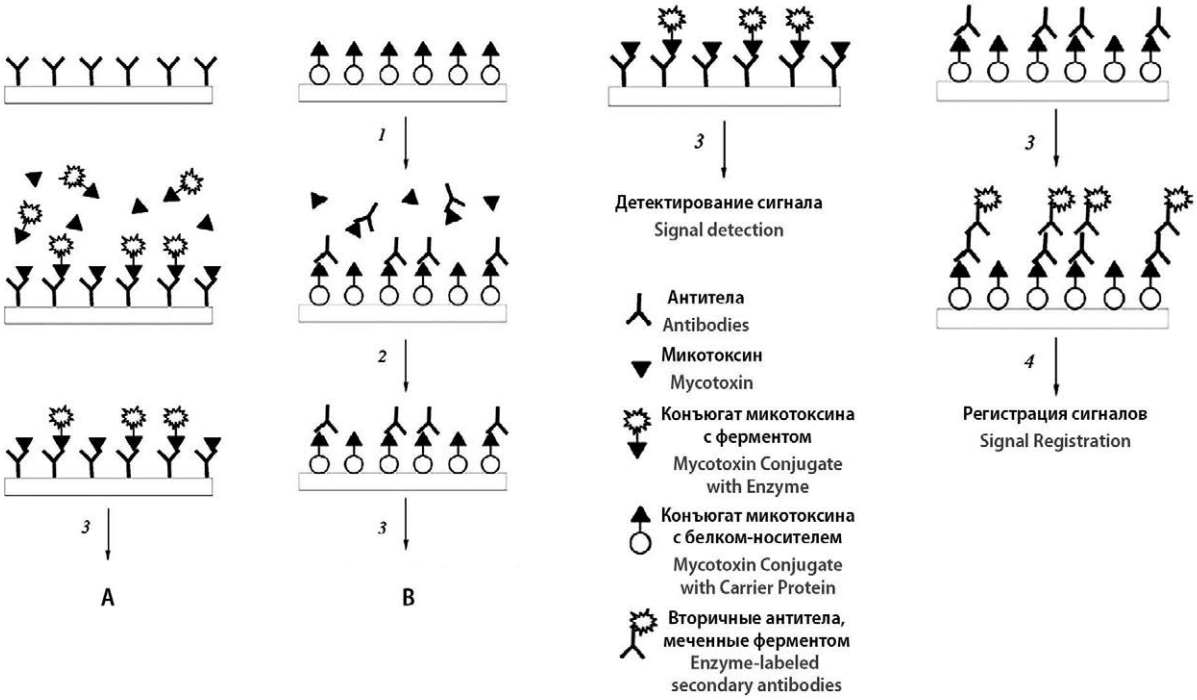


Рисунок 13. **Варианты ИХМ анализа:**

А) прямой, включающий следующие стадии: 1 – добавление образца в смеси с коньюгатом; 2 – промывка; 3 – добавление субстрата. В) непрямой, включающий следующие стадии: 1 – добавление образца в смеси с АТ; 2 – промывка; 3 – добавление вторичных АТ, меченных ферментом; 4 – добавление субстрата

Figure 13. **Variants of the immunochemical method of analysis:**

A) direct, comprising the following stages: 1 – adding a sample to a mixture with conjugate; 2 – washing; 3 – adding a substrate. B) indirect, including the following stages: 1 – adding a sample to a mixture with antibodies; 2 – washing; 3 – adding secondary antibodies labeled with an enzyme; 4 – adding a substrate

Таблица 14. **Виды сенсоров, применяемых в ИХМ анализа [71, 79]**

Table 14. **Types of sensors used in immunochemical methods of analysis [71, 79]**

Вид сенсора Type of sensor	Принцип работы Principle of operation	Достоинства Advantages	Недостатки Disadvantages
Флуориметрические/колориметрические сенсоры Fluorimetric/colorimetric sensors	Иммунореагенты иммобилизуют на различных участках оптического волокна, планарных волноводах или микрогранулах. Используют флуоресценцию в качестве регистрируемого сигнала. Наличие собственной флуоресценции МТ позволяет реализовать неконкурентный формат иммуноанализа без использования каких-либо меток Immunoreagents are immobilized in various sections of the optical fiber, planar waveguides or micro-granules. Use fluorescence as a recorded signal. The presence of MT fluorescence of its own makes it possible to implement a non-competitive format for immunoassay without using any labels	Открывают широкие возможности для мультианализа (мультисенсорные системы для одновременного определения нескольких МТ) It opens up great opportunities for multi-analysis (multisensor systems for simultaneous detection of several MTs)	Требуются дальнейшие усилия по увеличению чувствительности и времени жизни сенсора, снижению времени отклика и независимая валидация данных Further efforts are required to increase the sensitivity and lifetime of the sensor, reduce response time and independent data validation
Спектрофотометрические сенсоры Spectrophotometric sensors	Основаны на регистрации окраски продукта ферментативной реакции Based on registration of the color of the product of the enzymatic reaction	–	Существуют только единичные работы для определения МТ There are only few works to determine MT
Пьезоэлектрические сенсоры Piezoelectric sensors	Пьезокварцевый сенсор представляет собой пластину тонко срезанного кристалла природного или синтетического α-кварца, на обеих сторонах которой сформированы электроды из разных металлов – Ag, Au, Pt, Al, Ni, Cr и др. Под действием напряжения кристалл начинает колебаться. При изменении массы на поверхности пластины частота колебаний изменяется, что является аналитическим сигналом данной системы. АТ иммобилизованы на кварцевой пластине только за счет магнита, и их удаление обеспечивается просто снятием магнитного поля и последующей промывкой A piezoelectric quartz sensor is a plate of a finely cut crystal of natural or synthetic α-quartz, on both sides of which electrodes are formed from different metals – Ag, Au, Pt, Al, Ni, Cr, etc. Under the influence of voltage, the crystal begins to oscillate. When the mass on the surface of the plate changes, the oscillation frequency changes, which is the analytical signal of this system. ATs are immobilized on a quartz plate only due to a magnet, and their removal is provided simply by removing the magnetic field and subsequent washing	Применение магнитных частиц существенно упрощает регенерацию сенсора The use of magnetic particles is essential simplifies sensor regeneration	–
Оптоволоконные иммуносенсоры Fiber-optic immunosensors	На границе раздела фаз оптоволокно – внешняя среда с более низким индексом преломления (например, жидкость) образуется нераспространяющаяся волна. Флуоресцентные молекулы, адсорбированные на границе, могут поглощать энергию от этой волны и флуоресцировать. Часть излучения попадает в оптоволокно и уходит обратно, где может быть зарегистрирова. На поверхности оптоволокна иммобилизованы АТ, за связывание с которыми конкурируют свободные МТ, содержащиеся в пробе, и конъюгат МТ с флуоресцентной меткой At the interface, the optical fiber is an external medium with a lower refractive index (for example, liquid) a non-propagating wave is formed. Fluorescent molecules adsorbed at the boundary can absorb energy from this wave and fluoresce. Part of the radiation enters the fiber and goes back where it can be registered. ATs are immobilized on the surface of the fiber, free MTs contained in the sample compete for binding, and MT conjugate with a fluorescent label	Технологическая простота миниатюризации и возможность проводить анализ в режиме реального времени Technological simplicity of miniaturization and the ability to conduct real-time analysis	Имеет ограничение по чувствительности и в значительной степени подвержен влиянию растворителей, так как они изменяют индекс преломления среды It has a sensitivity limit and is largely affected by solvents, since they change the refractive index of the medium

Продолжение таблицы 14

Вид сенсора Type of sensor	**Принцип работы** Principle of operation	**Достоинства** Advantages	**Недостатки** Disadvantages
Анализ с использованием молекулярно импринтированных полимеров (МИП) или полимеров с молекулярными отпечатками Analysis using molecularly imprinted polymers (MIP) or polymers with molecular imprints	Получаются в результате кополимеризации функционального и сшивающего мономеров в присутствии молекул-шаблонов. При полимеризации комплексы мономеров фиксируются в определенных позициях жесткой полимерной структуры. Последующее удаление шаблона приводит к возникновению в полимере молекулярных отпечатков – полостей, комплементарных молекуле-шаблону по размеру, форме и расположению функциональных групп. Такие участки способны к повторному высокоспецифичному взаимодействию с шаблоном или его структурным аналогом Obtained by copolymerization of functional and crosslinking monomers in the presence of template molecules. During polymerization, the monomer complexes are fixed in certain positions of the rigid polymer structure. Subsequent removal of the template leads to the appearance of molecular imprints in the polymer – cavities complementary to the template molecule in size, shape and location of functional groups. Such areas are capable of repeated highly specific interaction with the template or its structural analogue	Могут быть созданы практически для любой низкомолекулярной структуры, стабильны в широких диапазонах pH и температур, работают (в отличие от АТ) в органических растворителях, характеризуются низкой стоимостью They can be created for almost any low molecular weight structure, stable in wide ranges of pH and temperature, work (unlike AT) in organic solvents, are characterized by low cost	Относительно невысокая аффинность, вероятность деформации и потери селективности при изменении состава растворителя Relatively low affinity, and the probability of deformation. and selectivity loss when changing the composition of the solvent
Электро-химические иммуносенсоры Electrochemical immunosensors	Устройства основаны на совмещении взаимодействия АГ-АТ с электрохимическим преобразователем сигнала (электродом) – каталитически неактивным материалом, к которому относятся золото и некоторые углеродные материалы. Для их создания, как правило, используют ферменты, связанные с либо с АТ, либо с АГ. При этом электроактивный продукт может генерироваться ферментом из соответствующего субстрата. В других видах электрохимических иммуносенсоров используется эффект прямого биоэлектрокатализа – появления электрокаталитического тока на электроде при взаимодействии АГ и АТ, меченного ферментом, без дополнительного добавления субстрата. В качестве метки, обеспечивающей возникновение аналитического сигнала, используют ферменты. Субстратом служит 1-нафтилфосфат, окисление которого в 1-нафтол катализирует ЩФ. Возникающий ток регистрируют методами дифференциальной импульсной вольтамперометрии либо хроноамперометрии The devices are based on combining the interaction of antigenus-antibodies with an electrochemical signal converter (electrode) – a catalytically inactive material, which includes gold and some carbon materials. To create them, as a rule, enzymes associated with either antibodies or antigenus are used. In this case, the electroactive product can be generated by the enzyme from the corresponding substrate. In other types of electrochemical immunosensors, the effect of direct bioelectrocatalysis is used – the appearance of an electrocatalytic current on the electrode during the interaction of antigens and antibodies labeled with an enzyme without additional substrate addition. Enzymes are used as a label providing the occurrence of an analytical signal. The substrate is 1-naphthylphosphate, the oxidation of which to 1-naphthol catalyzes alkaline phosphatase. The arising current is registered by methods of differential pulse voltammetry or chronoamperometry	Определение малых количеств компонента, дешевизна большинства электрохимических преобразователей и детекторов, а также простота их использования Determination of small amounts of a component, low cost of most electrochemical converters and detectors, as well as ease of their use	Дрейф сигнала и сложность регенерации АТ. Регенерирующие растворы могут снижать связывающую способность иммобилизованных АТ, а повторная иммобилизация для каждого анализа делает процесс крайне нетехнологичным Signal drift and antibodies regeneration complexity. Regenerating solutions can reduce the binding ability of immobilized antibodies, and repeated immobilization for each analysis makes the process extremely low-tech

Вид сенсора Type of sensor	Принцип работы Principle of operation	Достоинства Advantages	Недостатки Disadvantages
Сенсоры на основе эффекта поверхностного плазмонного резонанса (ППР-сенсоры) Surface plasmon resonance sensors (PPR sensors)	Для тонких электропроводящих пленок на поверхности между средами с разным показателем преломления описано явление ППР, выраженность которого зависит от свойств пленки на границе раздела фаз. Сигнал прямо пропорционален массе вещества, связавшегося с чувствительным слоем. На поверхность сенсора наносят конъюгат МТ, с которым взаимодействуют высокомолекулярные АТ из раствора. В результате образования иммунокомплекса изменяются оптические характеристики сенсорного слоя, что приводит к изменению угла ППР (угла, при котором интенсивность отраженного света уменьшается в результате резонанса со свободными электронами на поверхности сенсора). На основе полученных сенсограмм рассчитывают кинетические характеристики процесса и содержание определяемого МТ For thin electrically conductive films on the surface between media with different refractive indices, the SPR phenomenon is described, the severity of which depends on the properties of the film at the phase boundary. The signal is directly proportional to the mass of the substance bound to the sensitive layer. MT conjugate is applied to the surface of the sensor, with which high molecular weight antibodies from the solution interact. As a result of the formation of the immunocomplex, the optical characteristics of the sensor layer change, which leads to a change in the SPR angle (the angle at which the intensity of the reflected light decreases as a result of resonance with free electrons on the sensor surface). Based on the obtained sensograms, the kinetic characteristics of the process and the content of the determined MT	Измерения в реальном времени; для анализа необходим очень малый объем пробы; чип может быть регенерирован и использован многократно; метод автоматизирован Measurements are calculated in real time; analysis requires a very small sample volume; the chip can be regenerated and reused; automated method	Чрезвычайно высокая чувствительность системы к примесям в анализируемом образце и, как следствие, необходимость тщательной подготовки проб. Стоимость анализа (чипов и реагентов) в целом довольно высока Extremely high sensitivity of the system to impurities in the analyzed sample and, as a consequence, the need for thorough sample preparation. The cost of analysis (chips and reagents) is generally quite high

Разработаны ИФА тест-системы для определения в кормах Т-2, ДОН, ЗЕА, ФУМ B_1, ОТ А, цитринина и АФЛ B_1 и др. Так, например, внедрены наборы реагентов для прямого конкурентного ИФА в микропланшетном формате в кормах и пищевых продуктах таких МТ, как АФЛ B_1, ЗЕА [79], ФУМов группы В и Т-2 [80]. Разработаны методики одновременного тест-определения нескольких МТ (ЗЕА, ОТА и ФУМ B_1) методом мембранного иммунофильтрационного анализа с применением в качестве ферментной метки – ЩФ [81], а также одновременного тест-определения ДОН и суммы Т-2 и НТ-2 методом мембранного иммунофильтрационного анализа с применением ПХ. Путем непрямого конкурентного ИФА проводят количественное определение Т-2, АФЛ B_1, ФУМ B_1, ОТ А, ЗЕА, ДОН [82].

Метод ИФА обладает рядом существенных преимуществ, таких как высокая производительность (одновременно на одном планшете проводится несколько десятков анализов), низкая стоимость, малый объем тестируемого образца, способность обеспечить приемлемую точность и быстроту, более простая подготовка проб, чем для ТСХ или ВЭЖХ. Метод относительно экологичен, поскольку исключает большое количество токсичных реагентов. Однако МТ мало растворимы в водной среде, поэтому для выполнения анализа требуется экстракция органическими или водно-органическими смесями. Экстракт не может непосредственно использоваться в ИФА и требует разбавления до минимального содержания органической составляющей, – как правило, не более 5 %. Поскольку минимальная концентрация МТ, выявляемая в конечной реакционной смеси, фиксирована, разбавление пробы пропорционально ухудшает чувствительность аналитического метода в целом. Вторым существенным недостатком ИФА является большая продолжительность взаимодействий между иммобилизованными в лунке микропланшета и находящимися в растворе иммунореагентами; в результате общее время определения составляет 2–3 часа. Для решения этих проблем был предложен вариант проведения ИФА МТ в экстрактах с использованием в качестве твердой фазы магнитных наночастиц [83]. У метода имеются дополнительные ограничения, связанные в большей степени с матричным эффектом и перекрестной чувствительностью, то есть идентифицируется не только искомый МТ, но и в различной степени его аналоги и метаболиты. Например, при определении Т-2 на конечное его содержание будет оказывать влияние НТ-2, если он тоже присутствует в образце; ЗЕА, как правило, определяется вместе с α- и β-зеараленолом и т.д. Поэтому для таких объектов должны применяться другие методы исследования, например ВЭЖХ [84]. *Поэтому*, несмотря на высокую специфичность АТ, определение МТ в сложных матриксах требует детальной оптимизации протоколов анализа [85].

Гомогенные ИХМ анализа

Наиболее распространенным гомогенным ИХМ анализа является поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (ПФИА). Его широкое применение связано с простотой методики определения, малым временем выполнения, наличием портативной переносной аппаратуры. Формат проведения анализа предполагает конкуренцию определяемого вещества и трейсера (определяемого вещества или его аналога, связанных с флуоресцентной меткой) за ограниченное число мест связывания с АТ. В качестве метки, как правило, используют молекулу флуоресцеина, аналитическим сигналом служит величина поляризации флуоресценции метки. За время жизни возбужденного синглетного состояния флуоресцеина (4 нс) происходит практически полная деполяризация флуоресценции, что приводит к малому значению поляризации. В присутствии АТ образуется иммунокомплекс, скорость вращения резко снижается, полной деполяризации флуоресценции не происходит, что приводит к высокой величине поляризации флуоресценции. При наличии аналита в растворе он связывается с АТ, трейсер остается свободным и величина поляризации флуоресценции снижается. Таким образом, значение аналитического сигнала, как и в других конкурентных методах, находится в обратной зависимости от концентрации определяемого вещества. В отличие от рассмотренных ранее методов, ПФИА не требует разделения аналита и иммунокомплекса, что и определяет быстроту и простоту процедуры определения. Как правило, образование иммунокомплексов протекает с высокой скоростью. Из других преимуществ следует выделить методическую простоту ПФИА, из недостатков – влияние матрикса пробы (не отделяемого перед проведением измерений) на регистрируемый сигнал [86, 87].

Сочетание капиллярного электрофореза и взаимодействия АГ-АТ позволяет совмещать эффективное электрофоретическое разделение аналитов с их определением с высокой чувствительностью, например, при использовании флуоресцентных детекторов с лазерным возбуждением. В этом методе используют иммунореагенты, аналогичные таковым в ПФИА. Процедура анализа включает инкубирование образца с раствором АТ и трейсера и последующее разделение этой смеси в капилляре под действием электрофоретических сил. Капиллярный электрофорез позволяет напрямую визуализировать образование и диссоциацию иммунокомплекса, что упрощает интерпретацию результатов.

Неинструментальные ИХМ

На фоне общего внимания к разработке быстрых скрининговых методов для определения МТ особый интерес вызывают неинструментальные тест-методы, пригодные для проведения анализа *on-site,* на месте производства и переработки продукции. Возможность

проведения скрининга во внелабораторных условиях, даже в отсутствие электрической сети, позволяет оперативно выделить загрязненные партии продукции и предотвратить их объединение с большими объемами сырья при дальнейшей переработке, транспортировке, хранении. Результаты, получаемые с помощью неинструментальных тест-методов, оцениваются на основе визуального детектирования. В связи с этим субъективизм восприятия человека, интерпретирующего конкретные результаты, является одним из основных источников погрешности. Для визуализации полученных результатов используют различные метки: ферменты, коллоидные частицы (как правило, частицы коллоидного золота), флуоресцентные метки, липосомы, содержащие солюбилизированные красители. В большинстве случаев неинструментальные тесты дают качественную оценку концентрации, характеризующую присутствие (либо отсутствие) целевого аналита в концентрации выше установленного контрольного уровня. Как правило, при разработке неинструментальных тестов определения МТ стараются достичь ПО, соответствующего законодательно установленному максимально допустимому содержанию данного МТ в анализируемом продукте. Небольшое число тестов предполагает полуколичественную оценку на основе сравнения интенсивности окраски. В настоящее время ряд фирм производит большое количество тест-методов для определения МТ в различных объектах; постоянно разрабатываются новые тесты.

Иммунохроматографические тесты

Иммунохроматографические тесты, называемые также стрипами или стрип-полосками (*immunochromatographic strip tests*), представляют собой уникальный удобный в использовании одностадийный метод, не требующий ни аппаратуры, ни реагентов. Процедура анализа состоит в погружении тест-полоски до заданного уровня в анализируемый образец с визуальной оценкой результатов через определенное время. Как правило, стрип-полоска состоит из пористой мембраны-носителя и адсорбента (рисунок 14). После погружения полоски в анализируемый раствор его компоненты начинают перемещаться вдоль мембраны к адсорбенту, закрепленному в верхней части. Анализируемый раствор, таким образом, играет роль подвижной фазы. Вместе с компонентами раствора движутся и иммунореагенты, предварительно нанесенные на нижнюю часть мембраны. Для определения МТ наиболее часто используют меченные коллоидным золотом специфические АТ. Частицы коллоидного золота диаметром около 40 нм образуют зоны красного цвета.

Разработаны и доведены до коммерческого производства иммунохроматографические тесты для определения АФЛ, ДОН, ОТА, Т-2 и ЗЕА [88]. Некоторые производители предлагают также специальные портативные устройства (ридеры) для обработки результатов анализа. Их использование позволяет повысить чувствительность определения и устранить субъективизм восприятия цвета человеком. Публикуемые в настоящее время исследовательские работы направлены на расширение круга определяемых МТ, применение тестов для анализа новых объектов и повышение их чувствительности. Разработано также несколько стрип-тестов с ферментной меткой для одновременного определения нескольких МТ (АФ B1, Т-2, 3-ацДОН, роридина А и ЗЕА в образцах зерна). Для определения структурно-родственных МТ (АФЛ B1, B2, G1 и G2, а также ЗЕА и α-зеараленола) предложен тест-метод, сочетающий разделение методом ТСХ, перенесение разделенных зон МТ на мембрану с привитыми специфическими АТ и последующее иммунохимическое определение. Разработаны высокочувствительные иммунохроматографические тест-системы детекции ЗЕА и Т-2 с использованием наночастиц магнетита в качестве маркера [89]. Основное преимущество иммунохроматографии – быстрое (5–15 мин) получение результата. Однако метод иммунохроматографии не является количественным; он может использоваться лишь для предварительного скрининга, свидетельствующего о наличии МТ в концентрации выше пороговой.

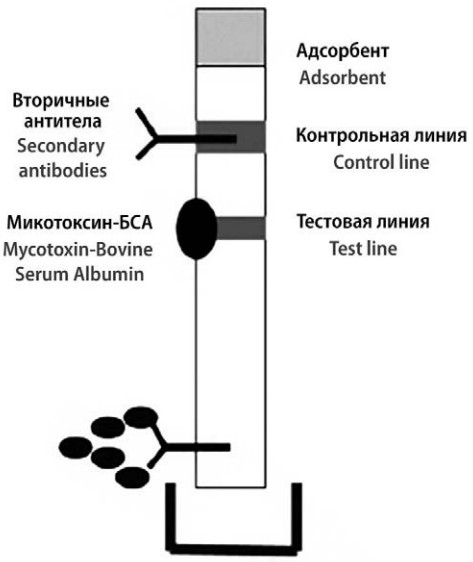


Рисунок 14. Иммунохроматографический стрип-тест [71]

Figure 14. Immunochromatographic strip test [71]

Иммунофилтрационные тесты

Традиционные иммунофильтрационные тест-методы [*flow-through* или *immunofiltration assay (IFA*) или *enzyme-Unked immunofiltration assay (ELIFA)*] основаны на использовании полимерных мембран с привитыми специфическими АТ. Мембрану помещают на слой адсорбента, поглощающий проходящую через мембрану жидкость. При прохождении анализируемого раствора сквозь мембрану присутствующий в нем

МТ образует иммунокомплекс с АТ, нанесенными на тест-зону мембраны. Затем добавляют раствор конъюгата аналита с ферментом; последним шагом является введение хромогенного субстрата, который в присутствии ферментных меток вызывает развитие окраски. Использование в качестве метки коллоидного золота позволяет избежать использования хромогенного субстрата, однако в отличие от иммунохроматографических стрип-тестов, в иммунофильтрационных тестах такая метка не получила широкого распространения из-за низкой чувствительности. Формат метода, основанный на использовании ферментной метки, использован при определении ОТ А в пшенице, Т-2 в пшенице, кукурузе, овсе и ржи.

Для снижения себестоимости и времени проведения анализа предложены различные подходы, в частности одновременное определение одного МТ в нескольких образцах параллельно, а также одновременное определение нескольких МТ в одном образце. Для одновременного скрининга нескольких МТ в одном образце создан прототип ячейки с восемью лунками для одновременного иммунофильтрационного определения семи МТ: АФЛ B_1, Фум B_1, Т-2, роридина А, ДОН, диацетоксисскирпенола и ОТ А. Мембраны с нанесенными специфическими АТ фиксируют под каждой лункой, восьмую мембрану используют как отрицательный контрольный тест. Под мембраны помещают слой адсорбента. Процедура анализа совпадает с таковой для определения одного аналита, за исключением того, что в лунки вносят смесь конъюгатов. Иммунофильтрационные тесты с использованием мембран имеют такие достоинства, как простота и экспрессность (время анализа составляет 5–25 мин). Имеется ряд недостатков: для проведения анализа необходимо выполнять последовательное добавление реагентов, входящих в комплектацию тест-набора; на получаемые результаты влияет присутствие мешающих компонентов в образце, а также недостаточная чувствительность анализа. Для устранения выше указанных недостатков был предложен колоночный тест-метод, в котором в качестве носителя используют гель. Замена мембраны-носителя на гель, приготовленный на основе сефарозы с привитыми специфическими АТ, позволяет повысить чувствительность определения МТ. Анализ проводится в колонке для твердофазной экстракции и включает стадии последовательного пропускания образца, АГ, коньюгированного с ПХ, и хромогенного субстрата через объем геля. Включение АТ в объем геля позволяет концентрировать МТ по принципу, аналогичному действию ИАФК, т.о. гель с иммобилизованными АТ служит одновременно для выделения, концентрирования и определения. Использование колонок позволяет также включать дополнительный очищающий слой, необходимый для матриц обладающих интенсивной окраской. Очищающий слой может быть помещен над или под детектирующим слоем (рисунки 15, А и В). При анализе матриц, не обладающих интенсивной окраской, очищающий слой не используют (рисунок 15, С). Для упрощения процедуры анализа возможно введение в колонку конъюгата на дополнительном пористом фильтре (рисунок 15, D). Одновременное определение двух МТ стало возможным при введении в колонку двух регистрирующих иммунослоев, с привитыми АТ, специфичными к соответствующим МТ (рисунок 15, Е). Как и в случае мембранных тестов, для упрощения интерпретации результатов время развития окраски геля и ее интенсивность подбирают близкими для обоих аналитов. Формат проведения анализа в колонках позволяет использовать больший объем пробы, что позволяет достичь уникально высокой для тест-методов чувствительности.

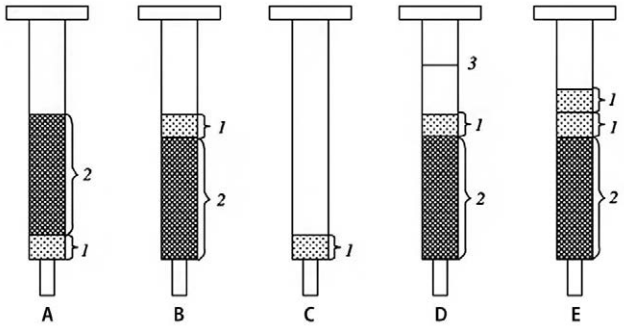


Рисунок 15. Тест-колонки для определения МТ методом иммунофильтрации:

1 – детектирующий иммунослой; 2 – очищающий слой; 3 – пористый фильтр с нанесенным коньюгатом [70]

Figure 15. Test columns for determining MT by immunofiltration:

1 – detecting immunolayer; 2 – a cleaning layer; 3 – porous filter coated with conjugate [70]

Иммунофильтрация – быстрый и удобный в использовании метод, который не требует сложного оборудования и специальной подготовки. Однако интерпретация результатов для образцов с концентрацией, близкой к пороговой, неоднозначна, а количественный анализ требует дополнительной унификации и калибровки. ПО иммунофильтрации хотя и выше, чем в ИФА, но может быть близок к нему. Разработаны иммунофильтрационные тесты как на отдельные МТ, так и для одновременного определения нескольких МТ с компьютерной обработкой результатов.

В результате сопоставительного анализа определены преимущества и недостатки методик измерений МТ (таблица 15), основанных на вышеуказанных методах. Установлено, что идеального метода измерений, отвечающего всем предъявляемым требованиям, не существует. Однако, использование в лабораторной практике экспресс-методик ИФА, благодаря простоте и скорости проведения испытаний, а также высокой чувствительности и экономичности, является наиболее перспективным в настоящий момент.

Таблица 15. Результаты сравнительного анализа определения МТ различными методами [90]

Table 15. The results of a comparative analysis of the determination of MT by various methods [90]

Метод Method	**Характеристики** Specifications	
	Достоинства Advantages	**Недостатки** Disadvantages
ТСХ TLC	• Низкий ПО. • Возможность работы с малыми и сверхмалыми количествами образца. • Возможность проведения количественного анализа • Low Software. • Ability to work with small and ultra-small quantities of the sample. • Ability to conduct quantitative analysis	• Длительное время анализа (2,5–3) ч. • Сложность пробоподготовки. • Многоэтапность. • Большой расход реагентов. • При использовании УФ-детекции – отсутствие высокой точности. • Необходима высокая квалификация персонала. • Использование дорогостоящего оборудования и вспомогательных материалов • Long analysis time (2.5 – 3) h. • The complexity of sample preparation. • Multi-stage. • High consumption of reagents. • When using UV detection – the lack of high accuracy. • Highly qualified staff is needed. • Use of expensive equipment and auxiliary materials
ВЭЖХ HPLC	• Низкий ПО; • Возможность работы с малыми и сверхмалыми количествами образца; • Высокая точность количественного анализа; • Воспроизводимость; • Возможность одновременного определения 10-ти и более МТ в одном образце; • Защита анализируемых веществ от воздействия дневного света • Low Software. • Ability to work with small and ultra-small quantities of the sample. • High accuracy of quantitative analysis. • Reproducibility. • The ability to simultaneously determine 10 or more MTs in one sample. • Protection of analytes from exposure to daylight	• Длительное время анализа (2,5 – 3) ч. • Сложность пробоподготовки. • Значительный расход реагентов. • Требует обслуживания высококвалифицированным персоналом. • Требует использования дорогостоящего оборудования и вспомогательных материалов • Long analysis time (2.5 – 3) h. • The complexity of sample preparation. • Significant consumption of reagents. • Requires service by highly qualified personnel. • Requires the use of expensive equipment and auxiliary materials
ИФА IFA	• Экспрессность и высокая производительность. • Простота и удобство пробоподготовки и анализа. • Высокая чувствительность и специфичность метода. • Гибкость – анализ может быть проведен вручную или автоматически. • Экономичность. • Удобство в использовании. • Не требует специальных знаний • Expressness and high performance. • Simplicity and convenience of sample preparation and analysis. • High sensitivity and specificity of the method. • Flexibility – analysis can be carried out manually or automatically. • Profitability. • Ease of use. • Does not require special knowledge	• Визуальная (субъективная) оценка результатов исследования. • Пригоден в основном для избирательного определения одного или небольшого числа МТ. • Для подтверждающего анализа используют более точные и высокочувствительные хроматографические методы • Visual (subjective) assessment of the results of the study. • Suitable mainly for the selective determination of one or a small number of MT. • For confirmatory analysis using more accurate and highly sensitive chromatographic methods

Таким образом, можно отметить бурное развитие различных направлений использования ИХМ для определения МТ, как инструментальных, так и неинструментальных. Важность их контроля обусловлена высоким уровнем загрязнения, обнаружением все новых МТ, расширением групп продуктов питания и кормов, контаминированных МТ. ИХМ анализа являются удобным инструментом для первичного скрининга больших партий продукции, благодаря своей простоте, экспрессности и невысокой стоимости. В настоящее время продолжается поиск путей повышения чувствительности, упрощения процедуры и сокращения времени анализа, снижения матричного эффекта образца [50, 70].

Биологические методы

В первое время широко использовались для определения МТ. В качестве тест-объектов используют широкий круг биологических объектов: от позвоночных животных до клеточных культур различных микроорганизмов (куриные эмбрионы, различные лабораторные животные, культуры клеток и тканей). Образцы

зерна подвергаются экстракции с помощью органических растворителей, а полученную липидную фракцию, содержащую МТ, тестируют с помощью дрожжевой культуры или же испытывают на голубях. Один из традиционных тестов основан на регистрации раздражения кожи животного после нанесения на нее МТ. Величина дозы коррелирует со степенью раздражения, но индивидуальная чувствительность вносит фактор неопределенности и поэтому этот метод считается полуколичественным. Известны разработки по использованию клеточных систем для оценки токсического действия Т-2 и его производных. Простейшие подходы включают попытки применения суспензии эритроцитов (Т-2 обладает гемолитической активностью). Применение более сложных клеточных систем в сочетании с цитологическими методами расширило возможности исследователей. Биотесты получили наибольшее развитие при использовании различных штаммов дрожжей. Этому предшествовали длительные исследования по подбору подходящих культур клеток, чувствительных к МТ. Первые варианты сводились к качественному определению МТ по наличию зон подавления роста микроорганизмов в исследуемых экстрактах. Такие тесты проводили в сочетании с тестами на голубях. Биологические методы довольно быстро совершенствуются. Появляются новые модификации и варианты биотестов с улучшенными характеристиками. Так запатентован способ определения МТ в кормах, основанный на кормлении кур, предварительно сенсибилизированных АГ из грибов рода *Aspergillus, Penicillum и Fusarium*, исследуемым кормом. Наличие МТ в корме оценивают по силе аллергической реакции [91].

Эти методы отличаются простотой и дешевизной, хотя им присущи существенные недостатки, такие как малая специфичность, низкая чувствительность, сложность разработки четко стандартизированных процедур, которые бы обеспечивали высокую воспроизводимость и с их помощью нельзя определить отдельные виды МТ в анализируемой смеси. Кроме того, для осуществления такого анализа требуется достаточно много времени. Биологические методы обычно применяются в тех случаях, когда отсутствуют химические методы выявления МТ или в дополнение к ним в качестве подтверждающих тестов.

Биоавтографический метод, который представляет собой совмещение преимуществ ТСХ и микробиологического анализа, дает возможность не только количественно оценивать МТ, но и одновременно определять несколько их видов в одном образце. При этом, после нанесения экстракта проводят двухмерную хроматографию на пластинках типа «Сулифол» в системе диэтиловый эфир:гексан (1:1). Далее пластинку высушивают, наносят на нее в качестве вещества-свидетеля раствор Т-2 токсина и хроматографируют вторично в перпендикулярном направлении в системе этанол-толуол (3:1). На высушенную пластинку наносят сусло-агар и на его поверхности равномерно распределяют суточную культуру штамма дрожжей *C. pseudotropicalis*. После инкубации (16 ч в термостате при температуре 28 °С) отмечают наличие зон подавления роста дрожжей и замеряют их диаметр. Зона подавления роста, идентичная по хроматографической подвижности таковой, вызванной веществом-свидетелем, и указывает на присутствие Т-2 в исследуемом образце.

В настоящее время для оценки зараженности зерна грибами *Fusarium* стали разрабатывать и применять молекулярные методы, позволяющие характеризовать присутствие представителя микобиоты по количественным показателям. В обзоре [92] представлены молекулярные методы выявления трихотеценовых МТ. Использованы методы молекулярной идентификации, основанные на выявлении ДНК патогенов с помощью ПЦР. ПЦР может быть использована для выявления МТ-продуцирующих видов рода *Fusarium*. Недавно предложен интегрированный способ ранней диагностики контаминации микотоксигенными штаммами *Fusarium*. Он включает в себя быстрое экстрагирование ДНК из образцов с последующим группоспецифическим анализом в ПЦР. Специфичность разработанного авторами флюорогенного варианта ПЦР в реальном времени подтверждена при исследовании 9 видов *Fusarium* и 33 других видов грибов. При помощи ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) можно оценить количество ДНК-мишени патогена или группы сходных патогенов относительно серии разведений стандартных проб с целевой ДНК известной концентрации. Затем полученные данные приводят к общей концентрации ДНК, выделенной из анализируемого образца, тем самым выразив количество исследуемого патогена. Новый метод – цифровая ПЦР (цПЦР) позволяет определить количество целевого объекта путем подсчета абсолютного числа принадлежащих ему копий ДНК-мишени в исследуемой пробе. Методы ПЦР также имеют неоспоримые преимущества перед микробиологическими методами вследствие высокой скорости анализа, возможности одновременного тестирования большого количества образцов и возможности количественной оценки присутствия того или иного объекта (или группы объектов). Важным дополнительным достоинством молекулярных методов является допустимость проведения анализа исследователем, имеющим навыки только работы в области молекулярной диагностики. Однако для молекулярно-генетических методов существуют ограничения, к которым относятся дороговизна приборов и реактивов и строгие требования к организации помещений лаборатории [93]. Этот метод может явиться альтернативой тестам, базирующимся на выявлении АТ к МТ.

Существуют данные об использовании методик оценки содержания МТ в зернопродуктах и комбикормах всего за 3–4 часа путем определения процента снижения активности глюкоамилазы, иммобилизованной глутаральдегидным способом на предварительно

кондиционированном по стандартной методике анионите АВ-17-2П. Оценку результатов осуществляют путем сравнения каталитической активности фермента в присутствии вытяжки из чистого продукта и при инкубации фермента с экстрактом зараженного МТ зерна или комбикорма [94].

Детоксикация загрязненных МТ продуктов

В настоящее время с этой целью применяют комплекс мероприятий, которые можно разделить на механические, физические, биологические и химические методы детоксикации МТ. Механические методы детоксикации связаны с отделением загрязненного сырья (материала) вручную или с помощью электронно-колориметрических сортировщиков. Физические методы основаны на достаточно жесткой термической обработке материала (например, автоклавирование), а также связаны с ультрафиолетовым облучением и озонированием. Биологические методы основаны на обработке сырья определенными культурами микроорганизмов, разлагающих МТ. Наиболее выраженную обезвреживающую способность проявил *Bacillus subtilis – 2006* (снижение загрязнения МТ происходило на 87 %) [95]. Химический метод предполагает обработку материала сильными окислителями. Анализ различных разработок препаратов, нейтрализующих МТ, показывает, что для этой цели применяются препараты различной природы: минерального, растительного, химического происхождения и комплексные. Адсорбенты ингибируют поступление МТ из желудочно-кишечного тракта, снижают токсическое воздействие на организм и предотвращают контаминацию этими соединениями и их метаболитами конечных продуктов, предназначенных для потребления человеком. Методом адсорбции эффективно удаляются полярные МТ (это в основном АФЛ, в некоторой степени ФУМы). В то же время неполярные токсины одними адсорбентами практически не сорбируются, а другими сорбируются недостаточно эффективно. Эффективны органические адсорбенты на основе глюканов дрожжевой клетки, хитозана и других биополимеров, гуминовых веществ, способных эффективно адсорбировать широкий спектр МТ. Разработан фитопрепарат для нейтрализации МТ, представляющий собой натуральный растительный экстракт, в состав которого входят органические кислоты [96]. К сожалению, каждый из названных методов имеет свои существенные недостатки: применение механических и физических методов не дает высокого эффекта, а химические методы приводят к разрушению не только МТ, но и полезных нутриентов и, кроме этого, нарушают их всасывание. Использование химических препаратов для обработки семян, в т. ч. ЛРС, имеет ряд отрицательных последствий, среди которых загрязнение окружающей среды, накопление опасных химических веществ как в почве, так и в продукции растениеводства и фармацевтической промышленности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Значительная часть продукции растительного происхождения, в т. ч. и ЛРС всех стран мира подвержена контаминации МТ. Они негативно действуют на организм животных и человека и с трудом поддаются деконтаминации. МТ могут присутствовать в ЛРС без видимого роста плесени. Понемногу накапливаясь в организме, МТ через десятилетия могут вызвать тяжелые заболевания, в том числе онкологические. Сложность проблемы защиты человека от микотоксикозов усугубляется тем, что сырье, содержащее МТ не теряет токсичности в течение многих лет. Полностью исключить образование МТ в сырье не представляется возможным, поэтому задача контролирующих ее качество служб – выявить наличие МТ и сравнить обнаруженное количество с нормами предельного содержания. Содержание МТ в ЛРС в настоящее время не определяется по ГФ РФ XIV изд. [97]. Однако, решением Совета Евразийской экономической комиссии от 26.01.2018 г. № 15 утверждены Правила надлежащей практики выращивания, сбора, обработки и хранения исходного сырья растительного происхождения [98], в которых прописана недопустимость образования плесени в процессе первичной обработки, хранения и транспортировки ЛРС. Следовательно, накопление экспериментального материала, а также развитие фармакопейных методов анализа ЛРС, постоянно ужесточающих требования к качеству, вероятно приведет к включению данного показателя в фармакопейные статьи (ФС). В связи с чем, интересным представилось проведение обзора существующих методов анализа МТ, с возможным последующим их включением в ОФС и ФС.

Традиционными методами анализа МТ является физико-химические методы. Наибольшее распространение нашли хроматографические методы: ВЭЖХ, жидкостная, ГЖХ с применением различных детекторов (масс-спектрометрического, флуоресцентного, амперометрического и т.д.). Особое место среди методов разделения занимает ТСХ. В последние годы ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС/МС стали одними из основных инструментальных методов мониторинга загрязнений пищевых продуктов МТ [11]. Данные методы, безусловно, способны обеспечить достаточную специфичность и необходимую чувствительность определения, однако являются дорогостоящими, рассчитаны преимущественно на специализированные и хорошо оснащенные стационарные лаборатории, а также требуют высокой квалификации персонала. Ни один из них также нельзя отнести к экспресс-методам.

Сложность определения МТ в ЛРС связана с продолжительной и трудоемкой пробоподготовкой, а также с использованием дорогостоящих высокочувствительных методов (ВЭЖХ, ЖХ, ГЖХ), которые не могут быть применены непосредственно на месте производства и переработки ЛРС. Наиболее перспективными являются иммунохимические тест-методы определения МТ, основанные на иммунохимической реакции

между АТ и АГ. Иммунохимические тест-методы позволяют анализировать большое количество образцов с целью подтверждения наличия или отсутствия МТ в объекте по определенному концентрационному уровню. Экспрессность выполнения, высокая специфичность АТ к связыванию, точность, возможность проведения эксперимента вне лабораторных условий – все эти критерии способствуют внедрению ИХМ в практику. В связи с этим развиваются методы быстрого и недорогого скрининга МТ: твердофазный ИФА, электро-химические иммуносенсоры, ПФИА, биосенсоры (основанные на измерении флуоресценции), ТСХ с денсиметрическим детектированием. Они не уступают по своей чувствительности, специфичности и простоте проведения анализа лабораторным методам. В настоящее время существует проблема оперативного контроля МТ с помощью экспресс-методов и приборов, пригодных к применению в полевых условиях. Решением проблемы стало использование явления поверхностного плазменного резонанса (ППР). К бесспорным преимуществам можно отнести возможность использования ППР-устройств в полевых условиях, прежде всего, для скрининга ЛРС на местах их естественного произрастания и длительного хранения и на предприятиях фармацевтической промышленности [50]. Общим недостатком перечисленных методов является не всегда достаточная чувствительность из-за малого объема используемой пробы [99]. Показано, что высокая специфичность и возможность выявления МТ в низких концентрациях в сочетании с существующим разнообразным приборным обеспечением позволяют рассматривать ИХМ анализа как наиболее перспективные для широкого практического использования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахмадышин Р. А., Канарский А. В., Канарская З. А . Микотоксины – контаминанты кормов. *Вестник Казанского технологического университета*. 2007;2:88–103.
2. Мальцева А. А., Коренская И. М. О зараженности растительного сырья плесневыми грибами класса *Deuteromycetes*. *Сеченовский вестник*. 2017;1(23):9–10.
3. Гудкова А. А. Определение микробиологической чистоты, присутствия плесневых грибов и содержания микотоксинов в лекарственном растительном сырье (на примере травы горца почечуйного). *Биофармацевтический журнал*. 2018;10(6):28–32.
4. Тринеева О. В., Сливкин А. И., Дортгулыев Б. Определение микотоксинов в плодах и масле облепихи крушиновидной. *В сборнике: Фармацевтический кластер как интеграция науки, образования и производства сборник материалов 5-й международной научно-практической телеконференции*. 2015. С. 149–152.
5. Тринеева О. В., Сливкин А. И., Дортгулыев Б. Определение микробиологической чистоты и микотоксинов в лекарственном растительном сырье и масляных препаратах на его основе (на примере плодов облепихи крушиновидной и листьев крапивы двудомной). *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2015;3:124–128.
6. Тринеева О. В. Теоретические и методологические подходы к стандартизации и оценке качества лекарственного растительного сырья и масляных экстрактов на его основе. Дис. ... д. фарм. наук. 2017. 441 с.
7. Гравель И. В. Необходимость оценки безопасности лекарственного растительного сырья по содержанию экотоксикантов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2012;2:37–39.
8. Соколова Г. Д. Замаскированные микотоксины. *Успехи медицинской микологии*. 2015;14:311–314.
9. Свистова И. Д., Парамонов А. Ю. Влияние лекарственных растений на микромицеты и биологическую активность почвы. *Проблемы медицинской микологии*. 2011;13(3):50–53.
10. Буркин А. А., Толпышева Т. Ю., Кононенко Г. П. Сохранность вторичных метаболитов грибов в гербарных образцах лишайников. *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*.2012;3:28–32.
11. Сатюкова Л. П., Смирнова И. Р., Михалев А. В. Современные методы определения микотоксинов в кормах. *РЖ «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»*. 2011;2(6):37–39.
12. Хайруллин Р. М., Уразбахтина Д. Р. Новый подход к экологически безопасному контролю уровня микотоксинов в продукции растениеводства. *Биомика*.2012;2(2):68–75.
13. Сеидова Г. М. Контаминация афлатоксинами некоторых сортов чая и некоторых зерновых культур в Азербайджане. *Проблемы медицинской микологии*. 2007;9(4):31–33.
14. Мазыгула Е. Д., Харламова М. Д. Оценка токсичности и экологической опасности сырья и кормов, содержащих микотоксины. *Вестник РУДН, серия Экология и безопасность жизнедеятельности*. 2015;1:50–56.
15. Ганибалов Ф. Б. Виды рода *Alternaria* в семенах зерновых культур России. *Микология и фитопатология*. 2008;42(4):359–368.
16. Науменко Н. В., Ботвинникова В. В., Соттникова В., Гржива Л., Белоглазова Н. В. Микотоксины и безопасность продуктов питания: явные и скрытые угрозы. *Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии*. 2020;8(1):105–111.
17. СанПин 2.3.21078-01 «Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов» от 14.11.2001/22.03.02. Available at: http://www.service-holod.ru/SanPiN2/SanPiN_2_3_2_1078_01.htm.
18. Дубина И. Н., Рябинкова И. М., Притыченко А. В., Притыченко А. Н. Мониторинг содержания микотоксинов в кормах. *Репозиторий Витебской ордена «Знак Почета» государственной академии ветеринарной медицины*. 2015;51(1-1):37–41.
19. Медянцева Э. П., Май Тхи Тхань Х., Варламова Р. М., Тарасова Е. Ю., Сахапова Г. Р., Будников Г. К. Определение некоторых микотоксинов амперометрическими холинэстеразными биосенсорами. *Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки*. 2012;154(1):101–111.
20. Стёпкин Ю. И., Скопинцева В. Л., Оболонский М. Ф. Использование метода иммуноферментного анализа в лабораторной практике при контроле микотоксинов. *Научно-медицинский вестник Центрального Черноземья*. 2014;57:67–70.
21. ГОСТ Р 52828-2007. Вина и виноматериалы. Определение содержания охратоксина А. Метод тонкослойной хроматографии. М.: *Изд-во Стандартинформ*, 2008. 7 с.
22. ГОСТ 31653-2012. Метод иммуноферментного определения микотоксинов. М.: *Изд-во Стандартинформ*, 2012. 16 с.
23. ГОСТ Р 51116-97. Комбикорма, зерно, продукты его переработки. Метод определения содержания дезоксиниваленола. М.: *Изд-во* Стандартинформ, 1999. 14 с.
24. ГОСТ 28001-88. Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения микотоксинов: Т-2 токсина, зеараленона и охратоксина А. М.: *Изд-во Стандартинформ*, 1990. 15 с.
25. МУК 4.1.2204-07. Обнаружение, идентификация и количественное определение охратоксина А в продовольственном сырье и пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. М.: *Изд-во Стандартинформ*, 2007. 6 с.
26. ГОСТ Р 53162-2008. Продукты пищевые. Определение афлатоксина В1 и общего содержания афлатоксинов В1, В2, G1 и G2 в зерновых культурах, орехах и продуктах их переработки. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. М.: *Изд-во Стандартинформ*, 2008. 15 с.
27. МУ 3940-85. Методические указания по обнаружению, идентификации и определению содержания дезоксиниваленола (вомитоксина) и зеараленона в зерне и зернопродуктах. М.: *Министерство здравоохранения СССР. Главное санитарно-профилактическое управление*. 1990. 14 с.

28. ГОСТ 34140-2017. Продукты пищевые, корма, продовольственное сырье. Метод определения микотоксинов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (с Поправкой). М.: *Изд-во Стандартинформ*, 2017. 19 с.
29. ГОСТ 32835-2014. Продукция соковая. Определение микотоксинов методом тандемной высокоэффективной жидкостной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) (Переиздание). М.: *Изд-во Стандартинформ*, 2015. 16 с.
30. ГОСТ 31748-2012. Продукты пищевые. Определение афлатоксина B1 и общего содержания афлатоксинов B1, B2, G1 и G2 в зерновых культурах, орехах и продуктах их переработки. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. М.: *Изд-во Стандартинформ*, 2014: 19 с.
31. ГОСТ 30711-2001. Продукты пищевые. Методы выявления и определения содержания афлатоксинов B(1) и M(1). Минск. *Издательство стандартов,* 2001. 16 с.
32. ГОСТ 28038-2013. Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения микотоксина патулина. М.: *Изд-во Стандартинформ*, 2014. 23 с.
33. ГОСТ Р 51435-99. Сок яблочный, сок яблочный концентрированный и напитки, содержащие яблочный сок. Метод определения содержания патулина с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. М.: *Изд-во Стандартинформ*, 2018. 7 с.
34. ГОСТ 31691-2012. Зерно и продукты его переработки, комбикорма. Определение содержания зеараленона методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. М.: *Изд-во Стандартинформ*, 2013. 13 с.
35. ГОСТ ISO 17372-2016. Корма для животных. Определение содержания зеараленона методами иммуноаффинной колоночной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии. М.: *Изд-во Стандартинформ*, 2016. 20 с.
36. ГОСТ EN 15850-2013. Определение зеараленона в продуктах для детского питания на кукурузной основе, ячменной, кукурузной и пшеничной муке, поленте и продуктах на зерновой основе для питания грудных детей и детей раннего возраста. Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта и флуориметрическим детектированием. М.: *Изд-во Стандартинформ*, 2015. 20 с.
37. МУ 5177-90. Методические указания по обнаружению, идентификации и определению содержания дезоксиниваленола (вомитоксина) и зеараленона в зерне и зернопродуктах. М.: *Министерство здравоохранения СССР. Главное санитарно-профилактическое управление*, 1990. 5 с.
38. МУ 4082-86. Методика определения афлатоксинов в пищевых продуктах с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Сборник методических документов, необходимых для обеспечения применения Федерального закона от 12 июня 2008 г. № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию». М.: *Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора*, 2009. 76 с.
39. ГОСТ EN 15891-2013. Определение дезоксиниваленола в продовольственном зерне, продуктах его переработки и продуктах на зерновой основе для питания грудных детей и детей раннего возраста. Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта и спектрофотометрического детектирования в ультрафиолетовой области спектра. М.: *Изд-во Стандартинформ*, 2014. 19 с.
40. ГОСТ EN 15835-2013. Продукты пищевые. Определение охратоксина А в продуктах на зерновой основе для питания грудных детей и детей раннего возраста. Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта и флуориметрического детектирования. М.: *Изд-во Стандартинформ*, 2013. 28 с.
41. ГОСТ ISO 15141-2-2013. Продукты пищевые. Определение содержания охратоксина А в зерне и зерновых продуктах. Часть 2. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с очисткой бикарбонатом. М.: *Изд-во Стандартинформ*, 2016. 16 с.
42. ГОСТ Р ЕН 15829-2011. Продукты пищевые. Определение охратоксина А в коринке, изюме, кишмише, смесях сушеных фруктов и инжире сушеном. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта и детектирования по флюоресценции. М.: *Изд-во Стандартинформ*, 2015. 15 с.
43. ГОСТ 34108-2017. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение содержания микотоксинов прямым твердофазным конкурентным иммуноферментным методом. М.: *Изд-во Стандартинформ*, 2017. 23 с.
44. ГОСТ Р 52471-2005. Корма. Иммуноферментный метод определения микотоксинов. М.: *Изд-во Стандартинформ*, 2006. 15 с.
45. ГОСТ 32587-2013. Зерно и продукты его переработки, комбикорма. Определение охратоксина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. М.: Изд-во *Стандартинформ*, 2016. 19 с.
46. ГОСТ Р 55448-2013. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение содержания охратоксина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием. М.: *Изд-во Стандартинформ*, 2014. 16 с.
47. Амелин В. Г., Андоралов А. М., Волкова Н. М. и др. Идентификация и определение токсикантов с использованием стандартной добавки в пищевых продуктах, продовольственном сырье и кормах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / время пролетной масс-спектрометрии высокого разрешения. *Аналитика и контроль*. 2015;19(2):189–207.
48. Амелин В. Г., Большаков Д. С., Авдеева Н. М., Подколзин И. В., Никешина Т. Б. Идентификация и определение контаминантов различных классов в пищевых продуктах и кормах методом масс-спектрометрии высокого разрешения с использованием стандартной добавки. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2017;15:171–210.
49. Амелин В. Г., Тимофеев А. А. Идентификация и определение микотоксинов и пищевых добавок в кормах методом вэжх–время-пролетной масс-спектрометрии высокого разрешения. *Журнал аналитической химии*. 2016;71(4):428–435.
50. Артюх В. П., Гойстер О. С., Хмельницкий Г. А., Стародуб Н. Ф. Трихотеценовые микотоксины: определение в объектах окружающей среды. *Biopolymers and Cell*. 2003;19(3):216–223.
51. Bilan A. The separation and detection of several mycotoxins by thin-layer chromatography. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2015;2(122):99–102.
52. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. Руководство Р 4.1.1672-03 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 30 июня 2003 г.). М.: *Минздрав России*, 2004. С. 94–95.
53. Мокшина Н. Я., Селеменев В. Ф., Скопинцева В. Л. и др. Определение микотоксинов в пищевых продуктах методом тонкослойной хроматографии. *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2005;5(2):254–259.
54. Погосян А. И., Гельфанд С. Ю., Цимбалаев С. Р. Способ количественного определения патулина в пищевых продуктах. Патент РФ 2056044 от 10.03.1996 г. Бюл. № 31.
55. Погосян А. И., Гельфанд С. Ю. Способ определения патулина в пищевых продуктах. Патент SU1585754 от 15.08.1990 г. Бюл. № 30.
56. Амелин В. Г., Третьяков А. В., Карасева Н. М., Никешина Г. Б., Абраменкова О. И. Способ определения микотоксинов в продуктах животного и растительного происхождения. Патент РФ 2514828 от 11.07.2012 г. Бюл. № 13.
57. Авдеева Н. М. Пробоподготовка QuEChERS и дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция при одновременном определении микотоксинов различных классов хроматографическими методами. Автореферат дис. ... канд. хим. наук. Саратов, 2013. 22 с.
58. Амелин В. Г., Карасева Н. М., Третьяков А. В. Одновременное определение микотоксинов ряда трихотеценов, охратоксина А, зеараленона в зерне и продуктах его переработки, кормах и мясе методом газожидкостной хроматографии. *Журнал аналитической химии*. 2013;68(1):64–70.
59. Амелин В. Г., Карасева Н. М., Третьяков А. В. Сочетание метода QUECHERS с дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракцией и получением производных при определении микотоксинов в зерне и комбикормах газожидкостной хроматографией с детектором по захвату электронов. *Журнал аналитической химии*. 2013;68(6):612–618.
60. Федорова Т. А., Булгакова О. А. Усовершенствование метода определения зеараленона в пищевых продуктах. *Здоровье и окружающая среда*. 2015;2(25):219–221.
61. Амелин В. Г., Карасева Н. М., Третьяков А. В. Хроматографические методы определения микотоксинов в пищевых продуктах. *Журнал аналитической химии*. 2013;68(3):212–223.

62. Карасева Н. М., Амелин В. Г., Третьяков А. В. Определение афлатоксинов В1 И М1 в молоке: быстрый и простой способ пробоподготовки. *Молочная промышленность*. 2013;9:55–56.
63. Амелин В. Г., Никешина Т. Б., Карасева Н. М. Экспрессный способ определения афлатоксинов В1, В2, G1, G2 в зерне и кормах. *Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные*. 2013;3:12–15.
64. Карасева Н. М., Амелин В. Г., Третьяков А. В. Сочетание QUECHERS и дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции при определении афлатоксинов В1 и М1 в молоке и молочных продуктах методом ВЭЖХ. *Журнал аналитической химии*. 2014;69(5):510–515.
65. Авдеева Н. М., Амелин В. Г., Третьяков А. В. Одновременное извлечение восьми микотоксинов различных классов из зерна, кормов и их определение методом ВЭЖХ. *Ветеринария сегодня*. 2014;1:27–34.
66. Гонтарева Е. Н. Новый метод определения микотоксинов в винах Кубани. *В сборнике: Научное решение актуальных проблем производства, качества и безопасности сельхозпродукции Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт табака, махорки и табачных изделий Российской академии сельскохозяйственных наук*. 2010. 113–116 с.
67. Гонтарева Е. Н. Микотоксины под контролем. *Методы оценки соответствия*. 2011;1:15–17.
68. Варламова Р. М., Медянцева Э. П., Хамидуллина Р. Р., Будников Г. К. Определение патулина амперометрическими тирозиназными биосенсорами на основе электродов, модифицированных углеродными нанотрубками и наночастицами золота. *Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки*. 2016;158(3):351–368.
69. Медянцева Э. П., Май Тхи Тхань Х., Варламова Р. М. и др. Определение некоторых микотоксинов амперометрическими холинэстеразными биосенсорами. *Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки*. 2012;154(1):101–111.
70. Горячева И. Ю., Русанова Т. Ю., Бурмистров Н. А., Де Саегер С. Иммунохимические методы определения микотоксинов. *Журнал аналитической химии*. 2009;64(8):788–806.
71. Zaijun L., Zhongyun W., Xiulan S., Yinjun F., Peipei C. A sensitive and highly stable electrochemical impedance immunosensor based on the formation of silica gel-ionic liquid biocompatible film on the glassy carbon electrode for the determination of aflatoxin B[I] in bee pollen. *Talanta*. 2010;80(5):1632–1637.
72. Гаврилова М. А., Слепченко Г. Б., Дерябина В. И. Способ количественного определения афлотоксина В1 методом дифференциальной вольтамперометрии. Патент РФ 25347322 от 26.07.2013. Бюл. № 34.
73. Gajan R. J., Nesheim H., Campbell A. D. Note on identification of anatoxins by oscillographic polarography. *J. Assoc. Offic. Agric. Chemist*. 1964;47(1):27–28.
74. Карасева Н. М., Амелин В. Г., Третьяков А. В. Одновременное определение патулина, трихотеценовых микотоксинов и зеараленона в зерне и кормах. *Ветеринария сегодня*. 2013;2(5):29–34.
75. Урусов А. Е., Петракова А. В., Возняк М. В., Жердев А. В., Дзантиев Б. Б. Экспрессные иммуноферментные методы определения микотоксинов. В сборнике: «БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ»: материалы VIII Московского Международного Конгресса. ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д. И. Менделеева. 2015. С. 394–396.
76. Кононенко Г. П., Пирязева Е. А., Зотова Е. В., Разоков Ш. И., Мирзоев Д. М. Микотоксины и токсинпродуцирующие микроскопические грибы в хлопковом жмыхе из Таджикистана. *РЖ «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»*. 2019;1(29):31–38.
77. Буркин А. А., Толпышева Т. Ю., Кононенко Г. П. Сохранность вторичных метаболитов грибов в гербарных образцах лишайников. *Вестник Московского университета. Серия 16: Биология*. 2012;3:28–32.
78. Урусов А. Е., Жердев А. В., Дзантиев Б. Б. Иммунохимические методы анализа микотоксинов (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*. 2010;46(3):276–290.
79. Вашкевич И. И., Терентьева Т. В., Корнилович Г. С. и др. Новый набор реагентов для иммуноферментного определения зеараленона в кормах и пищевых продуктах. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия химических наук*. 2016;4:72–79.
80. Разоков Ш. И., Мирзоев Д. М., Кононенко Г. П., Буркин А. А. Микотоксины в бобах арахиса, выращенного в Таджикистане. *РЖ «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»* 2018;4(8):74–77.
81. Бурмистрова Н. А., Русанова Т. Ю., Юрасов Н. А., Де Саегер С., Горячева И. Ю. Одновременное определение нескольких микотоксинов иммунофильтрационным тест-методом. *Журнал аналитической химии*. 2014;69(6):586–595.
82. Хмара И. Н., Кощаев А. Г., Лунева А. В., Кощаева О. В. Анализ зараженности зернового сырья микотоксинами. *Сборник научных трудов Ставропольского научно-исследовательского института животноводства и кормопроизводства*. 2013;3(6):290–293.
83. Петракова А. В., Урусов А. Е., Жердев А. В., Дзантиев Б. Б. Иммуноферментный анализ микотоксинов в водно-органических средах на примере определения афлатоксина В1. *Успехи медицинской микологии*. 2013;11:290–293.
84. Тужикова Т., Титова М. ИФА-наборы для определения микотоксинов. *Комбикорма*. 2011;1:45–49.
85. Стёпкин Ю. И., Скопинцева В. Л., Оболонский М. Ф. Использование метода иммуноферментного анализа в лабораторной практике при контроле микотоксинов. *Научно-медицинский вестник Центрального Черноземья*. 2014;57:67–70.
86. Нестеренко И. С., Комаров А. А, Вылегжанина Е. С. и др. Экспрессные иммунохимические методы определения микотоксинов в зерне и кормах. *Ветеринарная медицина*. 2012;11:25–26.
87. Миронов А. Н. и др. Современные подходы к вопросу стандартизации лекарственного растительного сырья. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2013;2:52–56.
88. Урусов А. Е., Костенко С. Н., Свешников П. Г., Жердев А. В., Дзантиев Б. Б. Определение охратоксина А иммунохроматографическим методом. *Журнал аналитической химии*. 2011;66(8):884–890.
89. Петракова А. В., Урусов А. Е., Жердев А. В., Лью Л., Ксю Ч., Дзантиев Б. Б. Применение наночастиц магнетита для разработки высокочувствительных иммунохроматографических тест-систем для определения микотоксинов. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2017;53(4):420–426.
90. Белякова З. Ю., Савостеева М. И., Макеева И. А. Методы определения микотоксинов в пищевых продуктах. *В сборнике: «Фундаментальные и прикладные исследования по безопасности и качеству пищевых продуктов». Сборник научных трудов VIII Международной конференции молодых учёных и специалистов. Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт технологии консервирования»*. 2014. С. 25–27.
91. Джубандыкова М. С., Фадеева Т. В., Сатылганов Т. Т., Ларин С. А. Способ определения микотоксинов в кормах. Авторское свидетельство SU1751664 от 30.07.92 г. Бюл. № 28.
92. Липницкий А. В., Антонов В. А., Гришина М. А. Молекулярно-генетические подходы к идентификации грибов – продуцентов трихотеценовых микотоксинов (обзор). *Проблемы медицинской микологии*. 2007;9(3):16–20.
93. Гагкаева Т. Ю., Гаврилова О. П., Орина А. С., Казарцев И. А., Ганнибал Ф. Б. Сравнение методов выявления в зерне токсинопродуцирующих грибов рода FUSARIUM. *Микология и фитопатология*. 2017;51(5):292–298.
94. Ковалева Т. А., Холявка М. Г. Разработка нового способа быстрого определения токсичности зернопродуктов и комбикормов. *Научный журнал «Успехи современного естествознания» Российской Академии Естествознания*. 2008;2:45–46.
95. Еремеев И. М., Иванов Е. Н., Иванов А. А. Использование биологического метода для обезвреживания кормов от микотоксинов. *РЖ «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»*. 2012;2(8):21–24.
96. Кондакова И. А., Левин В. И., Льгова И. П., Ломова Ю. В. Фитопрепарат для инактивации микотоксинов, возникающих в зерновой массе. *Вестник Рязанского государственного агротехнологического университета им. П. А. Костычева*. 2018;4(40):18–23.

97. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. Available at: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php (дата обращения 15.06.2020).
98. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 26.01.2018 № 15 «Об утверждении Правил надлежащей практики выращивания, сбора, обработки и хранения исходного сырья растительного происхождения». Available at: http://www.eaeunion.org/,27.02.2018 (дата обращения 15.06.2020).
99. Карагушева М. А., Басова Е. Ю., Горячева И. Ю. Разработка иммунохимических тест-методов для определения микотоксинов в продуктах питания. *Известия Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология.* 2008;8(1):39–42.

REFERENCES

1. Akhmadyshin R. A., Kanarskii A. V., Kanarskaya Z. A. Mycotoxins are feed contaminants. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta = Bulletin of the Technological University.* 2007;2:88–103. (In Russ.).
2. Maltseva A. A., Korenskaya I. M. About infection of plant materials with mold fungi of the class *Deuteromycetes*. *Sechenovskii vestnik = Sechenov Medical Journal.* 2017;1(23):9–10. (In Russ.).
3. Gudkova A. A. Determination of the presence of pleased mushrooms, mikotoxins and microbiological cleanliness in medicinal vegetative raw material (on the example of *Herba polygonum persicaria* L.). *Biofarmacevticheskij zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals.* 2018;10(6):28–32. (In Russ.).
4. Trineeva O. V., Slivkin A. I., Dortgulyev B. Determination of mycotoxins in fruits and buckthorn oil of buckthorn. In: *Pharmaceutical cluster as an integration of science, education and production, a collection of materials from the 5th international scientific and practical teleconference.* 2015. P. 149–152. (In Russ.).
5. Trineeva O. V., Slivkin A. I., Dortgulyev B. Determination of microbiological purity and mycotoxins in medicinal plant materials and oil preparations based on it (for example, buckthorn buckthorn fruits and dioica nettle leaves). *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvenogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy.* 2015;3:124–128. (In Russ.).
6. Trineeva O. V. Theoretical and methodological approaches to standardization and quality assessment of medicinal plant materials and oil extracts based on it. The dissertation ... Dr. of Sci. (Pharm.). 2017. 441 p. (In Russ.).
7. Gravel I. V. Necessity for safety evaluation of medicinal herbs by contents of ecotoxicants. *Vedomosti Nauchnogo centra ekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2012;2:37–39. (In Russ.).
8. Sokolova G. D. Disguised mycotoxins. *Uspekhi medicinskoj mikologii.* 2015;14:311–314. (In Russ.).
9. Svistova I. D., Paramonov A. Ju. Influence of medical herbs on micromycetes and biological soil activity. *Problemy medicinskoj mikologii = Problems in medical mycology*. 2011;13(3):50–53. (In Russ.).
10. Burkin A. A., Tolpysheva T. Yu., Kononenko G. P. Safety of fungal secondary metabolites in herbarial lichen specimens. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya*. 2012;(3):28-32. (In Russ.).
11. Satyukova L.P., Smirnova I. R., Mikhalev A. V. Contemporary methods on determining the mycotoxins in feeds. *Rossijskij zhurnal «Problemy veterinarnoj sanitarii, gigieny i ekologii*. 2011;2(6):37–39. (In Russ.).
12. Khairullin R. M., Urazbakhtina D. R. New approach to ecologically safe control the level of mycotoxins in plant growing production. *Biomika = Biomics*. 2012;2(2):68–75. (In Russ.).
13. Seidova G. M. The Contamination by aflAtoxines of some kinds of tea and some cereals in Azerbaijan. *Problemy medicinskoj mikologii = Problems in medical mycology*. 2007;9(4):31–33. (In Russ.).
14. Mazygula E. D. Kharlamova M. D. Assessment of toxicity and environmental hazards of raw materials and feed containing mycotoxins. *Vestnik Rossijskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: Ekologiya i bezopasnost' zhiznedeyatel'nosti.* 2015;1:50–56. (In Russ.).
15. Gannibal Ph. B. Species of the genus Alternaria in cereal seeds in Russia. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology.* 2008;42(4):359–368. (In Russ.).
16. Naumenko N. V., Botvinnikova V. V., Šottníková V., Hřivna L., Beloglazova N. V. Mycotoxins and security of food products: obvious and hidden threats. *Vestnik Yuzhno-Ural'skogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Pishchevye i biotekhnologii = Bulletin of South Ural State University, Series «Food and Biotechnology».* 2020;8(1):105–111. (In Russ.).
17. SanPin 2.3.21078-01 «Hygienic requirements for the quality and safety of food raw materials and food products» from 14.11.2001/22.03.02. Available at: http://www.service-holod.ru/SanPiN2/SanPiN_2_3_2_1078_01.htm (In Russ.).
18. Dubina I. N., Ryabinkova I. M., Pritychenko A.V., Pritychenko A.N. Monitoring the content of mycotoxins in feed. *Repozitorij Vitebskoj ordena «Znak Pocheta» gosudarstvennoj akademii veterinarnoj mediciny.* 2015;51(1-1):37–41. (In Russ.).
19. Medyantseva E.P., May Thi Thanh H., Varlamova R.M., Tarasova E. Yu., Sakhapova G.R., Budnikov G.K. Determination of some mycotoxins by amperometric cholinesterase biosensors. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki.* 2012;154(1):101–111. (In Russ.).
20. Styopkin Yu. I., Skopintseva V. L., Obolenckiy M. F. Applying enzyme immunoassay in the laboratory at the control of mycotoxins. *Nauchno-medicinskij vestnik Central'nogo CHernozem'ya.* 2014;57:67–70. (In Russ.).
21. GOST R 52828-2007. Wines and wine materials. Determination of ochratoxin A. Thin layer chromatography method. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2008. 7 p. (In Russ.).
22. GOST 31653-2012. Enzyme immunoassay for the determination of mycotoxins. Moscow: *Publishing house of standards*, 2012. 16 p. (In Russ.).
23. GOST R 51116-97. Compound feed, grain, products of its processing. Method for determining the content of deoxynivalenol. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 1999. 14 p. (In Russ.).
24. GOST 28001-88. Feed grain, products of its processing, animal feed. Methods for the determination of mycotoxins: T-2 toxin, zearalenone and ochratoxin A. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 1990. 15 p. (In Russ.).
25. MUK 4.1.2204-07. Detection, identification and quantification of ochratoxin A in food raw materials and food products by high performance liquid chromatography. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2007. 6 p. (In Russ.).
26. GOST R 53162-2008. Food Products. Determination of aflatoxin B1 and the total content of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in cereals, nuts and their processed products. Method of high performance liquid chromatography. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2008. 15 p. (In Russ.).
27. MU 3940-85. Guidelines for the detection, identification and determination of the content of deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone in grain and grain products. Moscow: *Ministerstvo zdravoohraneniya SSSR. Glavnoe sanitarno-profilakticheskoe upravlenie.* 1990. 14 p. (In Russ.).
28. GOST 34140-2017. Food products, feed, food raw materials. Method for the determination of mycotoxins using high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection (as amended). Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2017. 19 p. (In Russ.).
29. GOST 32835-2014. Juice products. Determination of mycotoxins by tandem high performance liquid chromatography/mass spectrometry (HPLC-MS/MS) (Reprint). Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2015. 16 p. (In Russ.).
30. GOST 31748-2012. Food Products. Determination of aflatoxin B1 and the total content of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in cereals, nuts and their processed products. Method of high performance liquid chromatography. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2014: 19 p. (In Russ.).
31. GOST 30711-2001. Food Products. Methods for detecting and determining the content of aflatoxins B (1) and M (1). Minsk. *Standartov Publishing House*, 2001. 16 p. (In Russ.).
32. GOST 28038-2013. Products of processing fruits and vegetables. Methods for the determination of mycotoxin patulin. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2014. 23 p. (In Russ.).

33. GOST R 51435-99. Apple juice, concentrated apple juice and drinks containing apple juice. Method for determining the content of patulin using high performance liquid chromatography. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2018. 7 p. (In Russ.).
34. GOST 31691-2012. Grain and products of its processing, animal feed. Determination of zearalenone content by high performance liquid chromatography. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2013. 13 p. (In Russ.).
35. GOST ISO 17372-2016. Pet food. Determination of zearalenone content by immunoaffinity column chromatography and high performance liquid chromatography. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2016. 20 p. (In Russ.).
36. GOST EN 15850-2013. Determination of zearalenone in corn-based baby foods, barley, corn and wheat flour, polenta and cereal-based foods for infants and young children. HPLC method using immunoaffinity column purification of the extract and fluorimetric detection. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2015. 20 p. (In Russ.).
37. MU 5177-90. Guidelines for the detection, identification and determination of the content of deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone in grain and grain products. Moscow: *Ministerstvo zdravoohraneniya SSSR. Glavnoe sanitarno-profilakticheskoe upravlenie*, 1990. 5 p.
38. MU 4082-86. Methodology for the determination of aflatoxins in foods using high performance liquid chromatography. A collection of methodological documents necessary to ensure the application of the Federal Law of June 12, 2008 No. 88-ФЗ «Technical Regulations for Milk and Dairy Products». Moscow: *Federal'nyj centr gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzora*, 2009. 76 p. (In Russ.).
39. GOST EN 15891-2013. Determination of deoxynivalenol in food grain, its processed products and grain-based products for feeding infants and young children. HPLC method using immunoaffinity column purification of the extract and spectrophotometric detection in the ultraviolet region of the spectrum. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2014. 19 p. (In Russ.).
40. GOST EN 15835-2013. Food Products. Determination of ochratoxin A in cereal-based products for feeding infants and young children. HPLC method using immunoaffinity column purification of the extract and fluorimetric detection. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2013. 28 p. (In Russ.).
41. GOST ISO 15141-2-2013. Food Products. Determination of ochratoxin A content in grain and cereal products. Part 2. High performance liquid chromatography with bicarbonate purification. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2016. 16 p. (In Russ.).
42. GOST R EN 15829-2011. Food Products. Determination of ochratoxin A in cinnamon, raisins, raisins, dried fruit mixes and dried figs Method of high performance liquid chromatography using immunoaffinity column purification of the extract and detection by fluorescence. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2015. 15 p. (In Russ.).
43. GOST 34108-2017. Feed, compound feed, compound feed raw materials. Determination of mycotoxin content by direct solid-state competitive enzyme immunoassay. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2017. 23 p. (In Russ.).
44. GOST R 52471-2005. Stern. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of mycotoxins. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2006. 15 p. (In Russ.).
45. GOST 32587-2013. Grain and products of its processing, animal feed. Determination of ochratoxin A by high performance liquid chromatography. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2016. 19 p. (In Russ.).
46. GOST R 55448-2013. Feed, compound feed, compound feed raw materials. Determination of the content of ochratoxin A by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. Moscow: *Standartinform Publishing House*, 2014. 16 p. (In Russ.).
47. Amelin V. G., Andoralov A. M., Volkova N. M. et al. The Identification and determination of toxicants in food products and raw food materials by HPLC / TOF high resolution mass spectrometry. *Analitika i kontrol = Analytics and Control*. 2015;19(2):189–207. (In Russ.).
48. Amelin V. G., Bolshakov D. S., Avdeyeva N. M., Podkolzin I. V., Nikeshina T. B. Identification and determination of contaminants of different classes in food products and feed by high resolution mass spectrometry with standard addition method. *Trudy Federal'nogo centra ohrany zdorov'ya zhivotnyh = FGBI «Federal Centre for Animal Health»*. 2017;15:171–210. (In Russ.).
49. Amelin V. G., Timofeev A. A. Identification and determination of mycotoxins and food additives in feed by HPLC–high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Zhurnal analiticheskoj himii = Journal of Analytical Chemistry*. 2016;71(4):428–435. (In Russ.).
50. Artyukh V. P., Goister O. S., Khmelnitsky G. A., Starodub N. F. Trichothecene micotoxins: determination in environment. *Biopolymers and Cell*. 2003;19(3):216–223. (In Ukraine).
51. Bilan A. The separation and detection of several mycotoxins by thin-layer chromatography. *Naukovii visnik veterinarnoï meditsini*. 2015;2(122):99–102. (In Ukraine).
52. Guidance on methods for monitoring the quality and safety of dietary supplements. Guide R 4.1.1672-03 (approved by the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation on June 30, 2003). M.: *Minzdrav Rossii*, 2004. P. 94–95. (In Russ.).
53. Mokshina N. Ya., Selemenev V. F., Skopintseva V. L. et al. Determination of mycotoxins in food by thin layer chromatography. *Sorbcionnye i hromatograficheskie processy = Sorption and chromatography processes*. 2005;5(2):254–259. (In Russ.).
54. Pogosyan A.I., Gelfand S. Yu., Tsimbalaev S.R. Method for the quantitative determination of patulin in food products. RF patent 2056044 of 10.03.1996, Bull. Number 31. (In Russ.).
55. Poghosyan A. I., Gelfand S. Yu. Method for determining patulin in food products. Patent SU1585754 of 15.08.1990, Bull. Number 30. (In Russ.).
56. Amelin V. G., Tretyakov A. V., Karaseva N. M., Nikeshina G. B., Abramenkova O. I. Method for the determination of mycotoxins in products of animal and plant origin. RF patent 2514828 dated July 11, 2012, Bull. Number 13. (In Russ.).
57. Avdeeva N. M. QuEChERS sample preparation and dispersive liquid-liquid microextraction with the simultaneous determination of mycotoxins of various classes by chromatographic methods. Abstract dis. ... Cand. of Sci. (Chem.). Saratov, 2013. 22 p. (In Russ.).
58. Amelin V. G., Karaseva N. M., Tretyakov A. V. Simultaneous determination of mycotoxins of a number of trichothecenes, ochratoxin A, zearalenone in grain and its processed products, feed and meat by gas-liquid chromatography. *Zhurnal analiticheskoj himii = Journal of Analytical Chemistry*. 2013;68(1):64–70. (In Russ.).
59. Amelin V.G., Karaseva N.M., Tretyakov A.V. Combination of the QUECHERS method with dispersive liquid-liquid microextraction and production of derivatives for the determination of mycotoxins in grain and compound feeds by gas-liquid chromatography with an electron capture detector. *Zhurnal analiticheskoj himii = Journal of Analytical Chemistry*. 2013;68(6):612–618. (In Russ.).
60. Fiodorova T. A., Bulgakova O. A. Optimization of method for determining zearalenone in food. *Zdorov'e i okruzhayushchaya sreda*. 2015;2(25):219–221. (In Belarus).
61. Amelin V. G., Karaseva N. M., Tretyakov A. V. Chromatographic methods for the determination of mycotoxins in food products. *Zhurnal analiticheskoj himii = Journal of Analytical Chemistry*. 2013;68(3):212–223. (In Russ.).
62. Karaseva N. M., Amelin V. G., Tretyakov A. V. Determination of aflatoxins B1 and M1 in milk: a quick and easy method for sample preparation. *Molochnaya promyshlennost' = Dairy Industry*. 2013;9:55–56. (In Russ.).
63. Amelin V. G., Nikeshina T. B., Karaseva N. M. Rapid Method for Detection of Aflatoxins B1, B2, G1, G2 in Grains and Feeds. *Rossijskij veterinarnyj zhurnal. Sel'skohozyajstvennye zhivotnye*. 2013;3:12–15. (In Russ.).
64. Karaseva N. M., Amelin V. G., Tretyakov A. V. Combination of QUECHERS and dispersive liquid-liquid microextraction in the determination of aflatoxins B1 and M1 in milk and dairy products by HPLC. *Zhurnal analiticheskoj himii = Journal of Analytical Chemistry*. 2014;69(5):510–515. (In Russ.).
65. Avdeeva N. M., Amelin V. G., Tretyakov A. V. Simultaneous detection of eight mycotoxins of different classes from grain and feeds and their identification with the help of HPLC. *Veterinariya segodnya = Veterinary Science Today*. 2014;1:27–30. (In Russ.).

66. Gontareva E.N. A new method for the determination of mycotoxins in wines of the Kuban. *In: Scientific solution of pressing problems of production, quality and safety of agricultural products State Scientific Institution All-Russian Research Institute of Tobacco, Shag and Tobacco Products of the Russian Academy of Agricultural Sciences*. 2010. 113–116 p. (In Russ.).
67. Gontareva E.N. Mycotoxins under control. *Metody ocenki sootvetstviya*. 2011;1:15–17. (In Russ.).
68. Varlamova R. M., Medyantseva E. P., Hamidullina R. R., Budnikov H. C. Determination of patulin using amperometric tyrosinase biosensors based on electrodes modified with carbon nanotubes and gold nanoparticles. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*. 2016;158(3):351–368. (In Russ.).
69. Medyantseva E. P., May Thi Thanh H., Varlamova R. M. et al. Determination of some mycotoxins by amperometric cholinesterase biosensors. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*. 2012;154(1):101–111. (In Russ.).
70. Goryacheva I. Yu., Rusanova T. Yu., Burmistrov N.A., De Saeger S. Immunochemical methods for the determination of mycotoxins. *Zhurnal analiticheskoj himii = Journal of Analytical Chemistry*. 2009;64(8):788–806. (In Russ.).
71. Zaijun L., Zhongyun W., Xiulan S., Yinjun F., Peipei C. A sensitive and highly stable electrochemical impedance immunosensor based on the formation of silica gel-ionic liquid biocompatible film on the glassy carbon electrode for the determination of aflatoxin B[I] in bee pollen. *Talanta*. 2010;80(5):1632–1637.
72. Gavrilova M. A., Slepchenko G. B., Deryabin V. I. Method for the quantitative determination of aflotoxin B1 by differential voltammetry. RF patent 25347322 from 07.26.2013. Bull. Number 34. (In Russ.).
73. Gajan R. J., Nesheim H., Campbell A. D. Note on identification of anatoxins by oscillographic polarography. *J. Assoc. Offic. Agric. Chemist*. 1964;47(1):27–28.
74. Karaseva N. M., Amelin V. G., Tretyakov A. V. Simultaneous detection of patulin, trichothecene mycotoxi and zearalenone in grain and feed. *Veterinariya segodnya = Veterinary science today*. 2013;2(5):29–34. (In Russ.).
75. Urusov A. E., Petrakova A. V., Wozniak M. V., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Express enzyme-linked immunosorbent assays for the determination of mycotoxins. *In: «BIOTECHNOLOGY: STATE AND PROSPECTS OF DEVELOPMENT»: materials of the VIII Moscow International Congress. CJSC Expo-Biochemical Technologies, RCTU named after D. I. Mendeleev*. 2015. P. 394–396. (In Russ.).
76. Kononenko G. P., Piryazeva E. A., Zotova E. V., Razokov Sh. I., Mirzoev D. M. Mycotoxins and toxin-producing microscopic fungi in cotton-seed cake from Tajikistan. *Rossijskij zhurnal «Problemy veterinarnoj sanitarii, gigieny i ekologii*. 2019;1(29):31–38. (In Russ.).
77. Burkin A. A., Tolpysheva T. Yu., Kononenko G. P. Safety of fungal secondary metabolites in herbarial lichen specimens. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16: Biologiya = Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2012;3:28–32. (In Russ.).
78. Urusov A. E., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Immunochemical Methods of Mycotoxin Analysis (Review). *Prikladnaya biohimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*. 2010;46(3):276–290. (In Russ.).
79. Vashkevich I. I., Terentieva 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. *Izvestiya Nacional'noj akademii nauk Belarusi. Seriya himicheskih nauk. = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Chemical Series*. 2016;4:72–79. (In Belarus).
80. Razokov Sh. I., Mirzoev D. M., Kononenko G. P., Burkin A. A. Mycotoxins in beans of peanuts grown in Tajikistan. *Rossijskij zhurnal «Problemy veterinarnoj sanitarii, gigieny i ekologii*. 2018;4(8):74–77. (In Russ.).
81. Burmistrova N.A., Rusanova T. Yu., Yurasov N.A., De Saeger S., Goryacheva I. Yu. Simultaneous determination of several mycotoxins by immunofiltration test method. *Zhurnal analiticheskoj himii = Journal of Analytical Chemistry*. 2014;69(6):586–595. (In Russ.).
82. Khmara I. N., Koshchaev A. G., Luneva A. V., Koshchaeva O. V. Analysis of mycotoxin contamination of grain raw materials. *Sbornik nauchnyh trudov Stavropol'skogo nauchno-issledovatel'skogo instituta zhivotnovodstva i kormoproizvodstva*. 2013;3(6):290–293. (In Russ.).
83. Petrakova A. V., Urusov A. E., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Enzyme-linked immunosorbent assay for mycotoxins in aqueous-organic media by the example of the determination of aflatoxin B1. *Uspekhi medicinskoj mikologii*. 2013;11:290–293. (In Russ.).
84. Tuzhikova T., Titova M. ELISA kits for the determination of mycotoxins. *Kombikorma*. 2011;1:45–49. (In Russ.).
85. Styopkin Yu. I., Skopintseva V. L., Obolenckiy M. F. Applying enzyme immunoassay in the laboratory at the control of mycotoxins. *Nauchno-medicinskij vestnik Central'nogo CHernozem'ya*. 2014;57:67–70. (In Russ.).
86. Nesterenko I. S., Komarov A. A., Vylegzhanina E. S. et al. Express immunochemical methods for the determination of mycotoxins in grain and feed. *Veterinary medicine*. 2012;11:25–26. (In Russ.).
87. Mironov A. N., Sakaeva I. V., Sakanyan E. I., Korsun L. V., Mochkina O. A. Current approaches to standartization of herbal substances. *Vedomosti Nauchnogo centra ekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2013;2:52–56. (In Russ.).
88. Urusov A. E., Kostenko S. N., Zherdev A. V., Dzantiev B. B., Sveshnikov P. G. Immunochromatographic assay for the detection of ochratoxin A. *Zhurnal analiticheskoj himii = Journal of Analytical Chemistry*. 2011;66(8):884–890. (In Russ.).
89. Petrakova A. V., Urusov A. E., Zherdev A. V., Dzantiev B. B., Liu L., Xu C. Application of magnetite nanoparticles for the development of highly sensitive immunochromatographic test systems for mycotoxin detection. *Prikladnaya biohimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*. 2017;53(4):420–426. (In Russ.).
90. Belyakova Z. Yu., Savosteeva M.I., Makeeva I.A. Methods for determination of mycotoxins in food products. *In: «Fundamental and applied research on food safety and quality.» Collection of scientific papers of the VIII International Conference of Young Scientists and Specialists. Federal State Budget Scientific Institution «All-Russian Research Institute of Conservation Technology»*. 2014. P. 25–27. (In Russ.).
91. Dzhubandykova M. S., Fadeeva T. V., Satylganov T. T., Larin S. A. Method for the determination of mycotoxins in feed. Copyright certificate SU1751664 dated July 30, 1992, Bull. Number 28. (In Russ.).
92. Lipnitsky A. V., Antonov V. A., Grishina M. A. Molecular-genetic approaches to identification of fungi-produceRS of trichothecene mycotoxins (review). *Problemy medicinskoj mikologii*. 2007;9(3):16–20. (In Russ.).
93. Gagkaeva T. Yu., Gavrilova O. P., Orina A. S., Kazartsev I. A., Gannibal ph. b. comparison of methods for identification of toxin-producing FUSARIUM fungi in the cereal grain. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2017;51(5):292–298. (In Russ.).
94. Kovaleva T. A., Kholyavka M. G. Development of a new method for the rapid determination of toxicity of grain products and animal feed. *Nauchnyj zhurnal «Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya» Rossijskoj Akademii Estestvoznaniya*. 2008;2:45–46. (In Russ.).
95. Eremeev I. M., Ivanov E. N., Ivanov A. A. Using the biological method for decontamination of feeds from mycotoxins. *Rossijskij zhurnal «Problemy veterinarnoj sanitarii, gigieny i ekologii*. 2012;2(8):21–24. (In Russ.).
96. Kondakova I. A., Levin V. I., Lgova I. P., Lomova Ju. V. Phytopreparation to inactivate mycotoxins arising in the grain mass. *Vestnik Ryazanskogo gosudarstvennogo agrotekhnologicheskogo universiteta im. P. A. Kostycheva*. 2018;4(40):18–23. (In Russ.).
97. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV ed. Available at: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php (accessed 15.06.2020). (In Russ.).
98. Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission dated January 26, 2018 No. 15 «On approval of the Rules of Good Practice for the cultivation, collection, processing and storage of plant-based feedstock». Available at: http://www.eaeunion.org/,27.02.2018 (accessed 15.06.2020). (In Russ.).
99. Karagusheva M. A., Basova E. Yu., Goryacheva I. Yu. Development of immunochemical test methods for the determination of mycotoxins in food. *Izvestiya Saratovskogo universiteta. Seriya Himiya. Biologiya. Ekologiya*. 2008;8(1):39–42. (In Russ.).