

Студ. В.Д. Давыденков
Науч. рук. доц. Н.И. Заяц
(кафедра физико-химических методов сертификации продукции, БГТУ)

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОХРАТОКСИНА А В РЫБЕ И ПТИЦЕ МЕТОДОМ ВЭЖХ-ФЛД С ОЧИСТКОЙ ЭКСТРАКТА МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ НА ИММУНОАФФИННЫХ КОЛОНКАХ

Охратоксин А – микотоксин, продуцируемый микроскопическими грибами родов *Aspergillus* и *Penicillium*. Основными продуцентами охратоксина А являются *A. ochraceus* и *P. verrucosum*.

В экспериментах *in vivo* показано нефротоксическое, канцерогенное, тератогенное, эмбриотоксическое, нейротоксическое и иммунотоксическое действие охратоксина А. Международное агентство по изучению рака классифицирует охратоксин А как соединение, потенциально канцерогенное для человека. Этот яд опасен также для домашних животных, птиц и рыб.

Охратоксин А выявляется повсеместно в качестве природного загрязнителя продовольственного и кормового зерна, кофе и какао-бобов, винограда и специй и его содержание регламентируется регламентами Таможенного союза на уровне 5 мкг/кг.

Определение охратоксина А проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Метод включает в себя следующие этапы: экстракцию охратоксина А из пробы, очистку экстракта, определение охратоксина А с помощью ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием (ВЭЖХ-ФЛД). Для очистки экстракта используют колоночную хроматографию, твердофазную экстракцию, бикарбонат и др.

Цель работы – валидация (подтверждение пригодности к применению) методики ВЭЖХ-ФЛД определения охратоксина А в рыбе и птице с очисткой экстракта методом твердофазной экстракции на иммуноаффинных колонках. Иммуноаффинные колонки содержат специфические антитела, связанные с твердым материалом субстрата. Когда проба проходит через колонку, антитела селективно связываются с охратоксином (антигенам) и образуют комплекс антитело-антиген. Все другие компоненты пробы вымываются из колонки. В качестве валидируемых характеристик были выбраны следующие рабочие характеристики методики: специфичность, линейность, правильность (смещение), повторяемость, внутрилабораторная воспроизводимость, неопределенность.

Для определения линейности был проведен анализ 6 модельных растворов с концентрациями охратоксина 0,25; 0,50; 1,00; 2,50; 5,00; 10,00 нг/см³ и построен график зависимости концентрации от площади хроматографического пика.

Повторяемость и внутрिलाбораторную воспроизводимость оценивали по результатам восьми анализов экспериментальных образцов по две параллели на трёх различных концентрациях для каждой матрицы, проводимых двумя аналитиками в разные дни. По полученным результатам рассчитывали среднее квадратическое отклонение повторяемости S_r и внутрелабораторной воспроизводимости S_{TO} .

С целью получения оценки смещения проводили измерения восьми образцов с известными концентрациями охратоксина А. Смещение рассчитывали как разность между измеренным значением и известным, а степень извлечения R_e – как отношение измеренного значения к известному в процентах. Массовую долю охратоксина А в мкг/кг определяли с использованием калибровочного графика. В формулу для расчета массовой доли был введен поправочный коэффициент $f = 1,2$ связанный с потерями охратоксина при пробоподготовке. Он был установлен экспериментально по смещению, которое при проведении оценки на значимость оказалась значимым для всех видов продукции (объектов) и всех диапазонов измерений и составило в среднем 20 %.

Полученные результаты показателей точности и расширенная неопределенность измерений (U , %) представлены в таблице.

Таблица – Показатели точности и неопределенность измерений охратоксина А

Диапазон измеряемой концентрации, мкг/кг	S_r , мкг/кг	S_r , %	S_{TO} , мкг/кг	S_{TO} , %	R_e , %	U , %
<i>Рыба</i>						
0,22–0,23	0,004	1,62	0,012	4,72	92,6	9,98
2,22–2,70	0,01	0,40	0,181	7,32	96,3	15,5
4,64–5,25	0,007	0,13	0,21	4,21	98,3	8,96
<i>Птица</i>						
0,20–0,26	0,006	2,21	0,019	7,46	94,0	15,8
2,28–2,67	0,007	0,26	0,13	5,17	98,4	11,0
4,16–5,17	0,007	0,14	0,41	8,15	94,0	17,3

Таким образом, по экспериментальным данным были установлены и валидированы рабочие характеристики ВЭЖХ-ФЛД методики определения охратоксина А в рыбе и птице с очисткой экстракта на иммуноаффинных колонках.