

УДК 577.1:614.75

БЕРЕЖНА Л.Г., ЦВІЛІХОВСЬКИЙ В.І., КЛИМЕНТЬЄВА Л.В.

ОСНОВНІ ВАЛІДАЦІЙНІ КРИТЕРІЇ МЕТОДУ "OCHRAPREP® КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ОХРАТОКСИНУ А З ВИКОРИСТАННЯМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ"

Проведено оцінку валідаційних критеріїв "повернення" та "коефіцієнт варіації" згідно Рішення 2002/657/ЕС для охратоксину А, вміст якого визначався методом високоефективної рідинної хроматографії із застосуванням при пробопідготовці імуноафінних колонок OCHRAPREP®. Доведено, що величина повернення та коефіцієнту варіації відповідають Рішенню ЕС 657-2002, а отже даний метод є придатним до використання.

Проведена оцінка валідаційних критеріїв "возврат" и "коэффициент вариации" согласно Решения 2002/657/ЕС для охратоксина А, содержание которого определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием для пробоподготовки иммуноаффинных колонок OCHRAPREP®. Доказано, что возврат и коэффициент вариации соответствуют Решению 2002/657/ЕС, таким образом можно сделать вывод, что данный метод пригоден к использованию.

The estimation of such validation characteristics as "recovery" and "coefficient of variation" agrees Decisions 2002/657/EC was carry out for ochratoxin A, which maintenance defined a method of a high performance liquid chromatography with use for sample preparation an immunoaffinity columns OCHRAPREP®. It is shown that return and coefficient of variation correspond to Decision 2002/657/EC, thus it is possible to draw a conclusion that this method is suitable to use.

На сьогоднішній день у зв'язку зі вступом України до СОТ, в нашій країні все більшої актуальності набуває налагодження принципів системи якості на вітчизняних підприємствах і в лабораторіях. Безперечно, це впритул стосується хіміко-аналітичних випробувальних лабораторій, які займаються контролем якості сільсько-господарської сировини та харчової продукції. Враховуючи достатньо жорсткі вимоги в країнах Європейського Союзу до вмісту чужорідних та токсичних сполук в продуктах харчування [1], має бути доведена ефективність та відтворюваність кожного методу, який застосовується для аналізу цих продуктів. Досягнути цього можна, провівши валідацію методу згідно загальноприйнятих та перевірених підходів, які, зокрема, представлено в Рішенні 2002/657/ЕС [2]. Даний документ містить правила для хіміко-аналітичних методик, що використовуються при дослідженні зразків, відібраних відповідно до другого положення Статті 15 Директиви 96/23/ЕС, і визначає загальні критерії інтерпретації отриманих результатів у лабораторіях, які здійснюють офіційний контроль залишків фармакологічно-активних речовин у пробах тваринного походження. При цьому, враховуючи досить докладне та чітке представлення процедури валідації, підбір її критеріїв та опрацювання отриманих

даних. Рішення 2002/657/ЕС загалом можна використати як основу для проведення валідації будь-якого аналітичного методу досліджень.

Варто відмітити, що серед найважливіших напрямків хімічного аналізу безпеки продукції агропромислового комплексу є дослідження вмісту мікотоксинів в сільськогосподарській сировині та продуктах харчування з огляду на їх токсичність та розповсюдженість [3]. Одним з найбільш поширених та токсичних мікотоксинів є охратоксин А, продукт пліснявих грибів родів *Aspergillus* та *Penicillium* [4]. Пліснявими грибами, а отже і їх токсичними метаболітами, можуть бути уражені горіхи, прянощі, зернові культури, корми, призначені для сільськогосподарських тварин тощо [5]. З огляду на вищезазначене, очевидною і нагальною є потреба наявності ефективних і точних методів визначення вмісту охратоксину А в харчових продуктах, сировині та кормах для сільськогосподарських тварин. Одним з таких методів є високоефективна рідинна хроматографія з флуоресцентним детектуванням, що дозволяє виявити охратоксин А в достатньо низьких концентраціях [5].

Метою даної роботи було визначити валідаційні критерії "повернення" та "коефіцієнт варіації" методу "OCHRAPREP[®]" Кількісне визначення охратоксину А з використанням високоефективної рідинної хроматографії для його метрологічної оцінки згідно Рішення 2002/657/ЕС.

Матеріали та методика дослідження

Дослідження проводили при середній температурі оточуючого середовища 25 °С та вологості не більшій за 80 %.

В роботі було використано імуноафінні колонки OCHRAPREP[®], призначені для виділення охратоксину А зі злаків, кави та пива, виробництва компанії R-BIOPHARM RHONE LTD [6].

Для визначення вмісту охратоксину А, як матрицю було обрано зерно ячменю. Проби зерна ячменю грубого помелу масою по 50 г збагачували розчином охратоксину А (0,2 мкг/мл в рухомій фазі), відбираючи при цьому наступні аліквоти: для концентрації 1,5 мкг/кг – 375 мкл; для концентрації 3 мкг/кг – 750 мкл; для концентрації 4,5 мкг/кг – 1125 мкл. Екстракцію охратоксину А проводили 60 % розчином ацетонітрилу, перемішуючи на шейкері при високій швидкості протягом 2 хв, після чого екстракт фільтрували через паперовий фільтр. Відбирали 4 мл фільтрату (що, згідно методу досліджень, відповідає 1 г зразку) та розводили 44 мл фосфатного буферу (рН 7,2). За допомогою вакуумної установки твердофазної екстракції розведений фільтрат пропускали через імуноафінну колонку OCHRAPREP[®] для закріплення молекул охратоксину А у фазі моноклональних антитіл колонки. Колонку промивали 20 мл фосфатного буферу, після чого елюювали зв'язаний охратоксин А пропусканням через колонку 1,5 мл десорбційного розчину, що містив 98 об'ємів метанолу та 2 об'єми оцтової кислоти, після чого імуноафінну колонку промивали 1,5 мл деіонізованої води. Елюат загальним об'ємом 3 мл збирали у пляшечку для аналізу на рідинному хроматографі Shimadzu LC 20A з флуоресцентним детектором RF-10A XL. Умови хроматографічного аналізу:

1. швидкість потоку 1 мл/хв;
2. об'єм уведення: 20 мкл;
3. температура термостата колонки: 40 °С;
4. довжини хвиль: $\lambda_{\text{ex}} = 333 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{em}} = 443 \text{ нм}$;
5. рухома фаза: ацетонітрил/вода/оцтова кислота (51:47:2 об:об:об);
6. хроматографічна колонка з оберненою фазою Agilent Zorbax ODS – довжина 250 мм; внутрішній діаметр 4,6 мм; розмір часток 5,0 мкм.

Результати та обговорення

Перш ніж розпочинати оцінку будь-яких валідаційних критеріїв чи параметрів, необхідно визначити тип обраного методу. В даному випадку, метод є кількісним, так як згідно Рішення 2002/657/ЕС [2] це аналітичний метод, який визначає кількість або масову частку речовини таким чином, що вона може бути виражена у вигляді числового значення відповідних одиниць. Одним з найважливіших критеріїв кількісного аналітичного методу є правильність – ступінь близькості між середнім значенням, що отримано з серії результатів досліджень та прийнятим значенням. Даний критерій відображає, наскільки отриманий результат відповідає фактичному значенню, і для його визначення дослідники зобов'язані використовувати сертифікований референтний матеріал. В разі його відсутності дозволено використовувати спосіб додавання стандартів до чистої матриці з наступним визначенням аналізу, та відповідним розрахунком відсотку повернення (П). Згідно рекомендацій вищезазначеного рішення [2], для речовин зі встановленим максимально допустимим рівнем (МДР), проби потрібно збагатити аналітом у трьох концентраціях, що становлять 0,5; 1 та 1,5 від МДР по шість зразків для кожної. МДР охратоксину А, згідно Регламенту ЕС No 1881/2006 [1], для цільного зерна становить 5 мкг/кг, та 3 мкг/кг для продуктів його переробки. Не дивлячись на токсичність та шкідливість для здоров'я людей і тварин, охратоксин А в Україні не нормується, тому підбір досліджуваних концентрацій здійснювався відповідно до європейських норм. В роботі було використано 18 проб зерна ячменю грубого помелу, збагаченого охратоксином А у концентраціях: 1,5 мкг/кг, 3 мкг/кг та 4,5 мкг/кг по шість проб для кожної.

З таблиці 1 видно, що для доданої концентрації охратоксину А 1,5 мкг/кг, фактична отримана концентрація становила $1,38 \pm 0,15$ мкг/кг, при цьому величина повернення складала $92,0 \pm 10,4$ %, що відповідає мінімально допустимим значенням згідно Рішення 2002/657/ЕС [2], а саме від 70 % до 110 %.

Таблиця 1

Концентрація та величина повернення від доданого значення (1,5 мкг/кг або 100 %) охратоксину А в пробах зерна ячменю грубого помелу

	Концентрація охратоксину А (К)							
	проба 1	проба 2	проба 3	проба 4	проба 5	проба 6		
Паралель 1	0,38	0,36	0,37	0,32	0,38	0,36	СКВ*	
Паралель 2	0,36	0,38	0,31	0,23	0,37	0,31		
К_{середня}, нг/мл	0,37	0,37	0,34	0,27	0,38	0,34	0,34	0,04
К_{середня}, мкг/кг	1,48	1,49	1,35	1,09	1,51	1,35	1,38	0,15
П, %	98,9	99,3	90,3	73,2	100,8	89,7	92,0	10,4

* – стандартне квадратичне відхилення.

В таблиці 2 подано дані аналізу проб, збагачених охратоксином А в концентрації МДР – 3 мкг/кг. Відповідно, отримано середнє значення концентрації $3,11 \pm 0,06$ мкг/кг, що становило $103,7 \pm 1,9$ % від фактичної і відповідає вимогам Рішення 2002/657/ЕС.

Таблиця 2

**Концентрація та величина повернення від доданого значення
(3 мкг/кг або 100 %) охратоксину А в пробах зерна ячменю грубого помелу**

	Концентрація охратоксину А (К)							
	проба 1	проба 2	проба 3	проба 4	проба 5	проба 6		
Паралель 1	0,76	0,75	0,73	0,81	0,77	0,81		СКВ
Паралель 2	0,80	0,75	0,81	0,76	0,77	0,79		
К_{середня}, нг/мл	0,78	0,75	0,77	0,78	0,77	0,80	0,77	0,01
К_{середня}, мкг/кг	3,12	3,03	3,09	3,14	3,09	3,20	3,11	0,06
П, %	104,0	100,8	103,0	104,6	103,2	106,7	103,7	1,9

Аналогічно було проаналізовано проби, які містили охратоксин А в концентрації 4,5 мкг/кг. Згідно отриманих обчислень (табл. 3), величина повернення склала $86,7 \pm 7,1$ %, що відповідає абсолютній величині $3,90 \pm 0,32$ мкг/кг.

Таблиця 3

**Концентрація та величина повернення від доданого значення
(4,5 мкг/кг або 100 %) охратоксину А в пробах зерна ячменю грубого помелу**

	Концентрація охратоксину А (К)							
	проба 1	проба 2	проба 3	проба 4	проба 5	проба 6		
Паралель 1	0,81	0,92	0,96	0,98	0,99	1,14		СКВ
Паралель 2	0,86	1,02	0,96	1,12	0,95	0,97		
К_{середня}, нг/мл	0,83	0,97	0,96	1,05	0,97	1,05	0,97	0,08
К_{середня}, мкг/кг	3,34	3,89	3,85	4,21	3,89	4,22	3,90	0,32
П, %	74,3	86,5	85,5	93,6	86,5	93,9	86,7	7,1

Для більш повної оцінки отриманих даних було обчислено коефіцієнт варіації, що характеризує відносний ступінь відхилення вимірних значень від середнього арифметичного. Для доданої концентрації 1,5 мкг/кг охратоксину А коефіцієнт варіації становив 11 %. Згідно загальноприйнятих статистичних підходів [7], це свідчить про середню мінливість варіаційного ряду і є прийнятним. Для концентрації охратоксину А на рівні МДР – 3 мкг/кг даний коефіцієнт склав всього 1,9 %, що говорить про незначну мінливість варіаційного ряду і відповідає вимогам Рішення 2002/657/ЕС [2]. Так само в допустимих межах знаходився коефіцієнт варіації для концентрації 4,5 мкг/кг – 8,2 %.

Висновок

Згідно отриманих даних, для всіх проаналізованих концентрацій охратоксину А середня величина повернення склала $94,1 \pm 8,7$ %, що відповідає мінімально допустимим значенням Рішення 2002/657/ЕС, при цьому коефіцієнт варіації становить 7,1 %, який згідно вищезазначеного документу не повинен перевищувати 20 %, а отже є відповідним. Таким чином, за отриманими валідаційними критеріями, даний метод аналізу вмісту охратоксину А є придатним до використання.

ЛІТЕРАТУРА

1. COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs // Official Journal of the European Union. – 20.12.2006. – L 364/5.
2. COMMISSION DECISION of 14 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (notified under document number C(2002) 3044), text with EEA relevance 2002/657/EC. // Official Journal of the European Union. – 17.08.2002. – L 221. – P. 8.
3. **Папаян Т.** Микотоксини: економічний ризик і контроль. // Животноводство Росії. – 2002. – № 8. – С. 16 – 20.
4. **Смирнов В.В., Зайченко А.М., Рубежняк И.Г.** Микотоксини: фундаментальні і прикладні аспекти // Сучасні проблеми токсикології. – 2000. – № 1. – С. 10 – 15.
5. **Маркс Г., Шустер Р., Ротхант М.** ВЭЖХ-Аналіз Микотоксинів з їх автоматичною ідентифікацією при допомозі бібліотеки електронних спектрів поглинання // Hewlett-Packard Comp. – № 12. – P. 5091-8692.
6. OCHRAPREP® Quantitative detection of Ochratoxin A using HPLC // R-BIOPHARM. – Version: P14/v9/26.01.05. – P. 1 – 6.
7. **С.Н. Ланач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич** "Статистика в науці та бізнесі" // Київ, "Моріон" 2002. – С. 104.

*Національний університет біоресурсів і природокористування,
Українська лабораторія якості та безпеки продукції АПК
м. Київ*

Надійшло до редакції 24.01.2009