

MIKOTOKSINŲ KIEKIO ĮVERTINIMAS GRŪDUOSE ELISA METODU, NAUDOJANT SKIRTINGUS FOTOMETRUS

Bronislava BUTKUTĖ, Audronė MANKEVIČIENĖ

Lietuvos žemdirbystės institutas
Akademija, Dotnuva, Kėdainių rajonas
El.p.: brone@lzi.lt; audre@lzi.lt

Santrauka

Pateikiama plati literatūros apžvalga apie dažniausiai javų grūdus ir jų produktus užteršiančių mikotoksinų įvairovę, jų biologinę prigimtį, savybes, nustatymo metodus. Mikotoksiniams nustatyti „Veratox“ imunofermentiniais testais (*NEOGEN Europe Ltd*, Škotija) pritaikytas daugiakanalis automatinis fotometras *Multiskan MS*. Prietaiso kompiuteryje sukurta programa su duomenų apskaičiavimo metodu *Point to Point*, įgalinančia absorbcijos dydžius išreikšti atitinkamą mikotoksinų koncentracija ir tiesiogiai matavimo metu apskaičiuoti rezultatus, išreikštus šiomis dimensijomis: deoksinivalenolio (DON) mg kg^{-1} , kitų mikotoksinų – $\mu\text{g kg}^{-1}$. Ištirta bangos ilgio įtaka mikotoksinų nustatymo tikslumui ir duomenų atkartojimui prietaisu *Multiskan MS*, ištirtos ir nustatytos „Genesis Lite“ programos galimybės (kalibracinės kreivės pasirinkimas, jos modifikavimas), siekiant pagerinti mikotoksinų kiekybinio nustatymo tikslumą daugiakanaliu fotometru *Multiskan MS*. Nustatyta, kad optimalus šviesos filtras yra λ 650 nm. Palyginti duomenys, gauti prietaisais *Multiskan MS* ir *StatFax 300 Plus*, apskaičiuotos standartinės regresijos paklaidos bei determinacijos koeficientai. DON nustatant ELISA metodu rezultatų nuskaitymui naudojant fotometrą *Multiskan MS*, duomenys gauti tikslesni nei naudojant *Stat Fax@303 Plus*, fotometru *Multiskan MS* užfiksuojami užterštumo mikotoksinu pėdsakai. Atlikus ZEN analizes 38 grūdų mėginiuose, T-2 toksino analizes 53 mėginiuose ir ochratoksino analizes 36 bei aflatoksino 57 mėginiuose, nustatyta, kad abu prietaisai šiems mikotoksinų rezultatams nuskaityti yra lygiaverčiai.

Reikšminiai žodžiai: mikotoksinais, nustatymo metodai, ELISA metodas, *Multiskan MS*, *StatFax 300 Plus*.

Įvadas

Aplinkoje egzistuoja didelė mikotoksinų įvairovė, kurią lemia gamtinės sąlygos, žemės ūkyje naudojamos cheminės medžiagos, dirvožemio ir ūkininkavimo sistemų įvairovė, efektyvių derliaus nuėmimo ir džiovavimo technologinių įrengimų stygius ir daugelis kitų veiksnių.

Mikotoksinais yra biologiškai labai aktyvių, skirtingų chemine struktūra ir savybėmis cheminių junginių grupė. Kadangi mikotoksinų įvairovė labai didelė, nagrinėjant jų poveikį žmonėms ar gyvūnams, išskiriamos pavojingiausių ir labiausiai išplitusių mikotoksinų grupės. Vidurio ir šiaurės Europos kraštų grūduose, pašaruose ir maisto produktuose labiausiai paplitę šie mikotoksinais: trichotecenai, zearalenonas, fumonizinais, ochratoksinais, aflatoksinais.

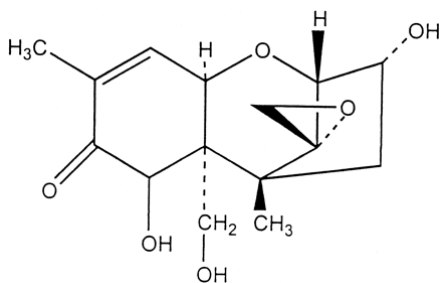
Lietuvos sąlygomis užauginti grūdai dažniausiai būna užteršti zearalenonu (ZEN), trichotecenų grupės mikotoksinais – deoksinivalenoliu (DON), T-2 toksinu /Baliukonienė, Bakutis, 2002; Mankevičienė, Auškalnienė, 2004; Mankevičienė ir kt., 2006/ bei ochratoksinu, kurių cheminė struktūra ir formulės nurodyti 1 paveiksle. Minėtų trichotecenų, zearalenono ir kitų mikotoksinų (nivalenolio, HT-2 toksino, fumonisino) producentai yra *Fusarium* genties rūšys: *F. graminearum* Schwabe, *F. culmorum* (W.G. Sm.) Sacc., *F. poae* (Peck) Wollenw. *F. sporotrichioides* Sherb. ir kt. /Schollenberger ir kt., 2002; Bennett, Klich, 2003/. ES institucijos riboja šių mikotoksinų ir ochratoksino A, produkuojamo grybų *Aspergillus* ir *Penicillium*, kiekius maistiniuose ir pašariniuose produktuose bei žaliavose¹. Didesni mikotoksinų kiekiai sukelia mikotoksikozes, o jos, priklausomai nuo patekusio į organizmą kiekio, gali pasireikšti ūmia arba lėtine forma. Ūmios toksikozių formos paprastai baigiasi mirtimi. Dažniausiai grūdai, pašarai ar maisto produktai nėra užteršti tokiu mikotoksinų kiekiu, kuris galėtų sukelti toksikozes, tačiau vartojant nuolat ir didelį kiekį produktų, užterštų netgi mažų koncentracijų mikotoksinais, gali sumažėti produkcija, imunitetas, reprodukcija ir kt.

Lietuvoje, kaip ir kitose Europos šalyse, veikia valstybinė kontrolės sistema, nukreipta didžiausių leidžiamų koncentracijų (DLK) viršijimo faktams nustatyti ir produktų realizacijai sustabdyti. Moksliniu požiūriu ne mažiau reikšmingos koncentracijos, mažesnės už DLK, nes žmonių sveikatai svarbu ne tik tai, kiek maiste yra tų teršalų, o kiek žmogus jų gauna su maistu, bei teršalų kilmė ir sąlygos, turinčios įtakos jų kaupimuisi. Todėl iškilo būtinybė moksliskai įvertinti kontrolės bei mokslo institucijose sukauptus duomenis, išaiškinti taršos priežastis ir numatyti galimas prevencijos priemones. Problemos aktualumą patvirtina ir tai, kad ES Maisto produktų mokslinis komitetas daug dėmesio skiria priemonėms, skirtoms maisto taršos prevencijai ir teikia siūlymus Europos Komisijai, ruošiančiai norminius aktus.

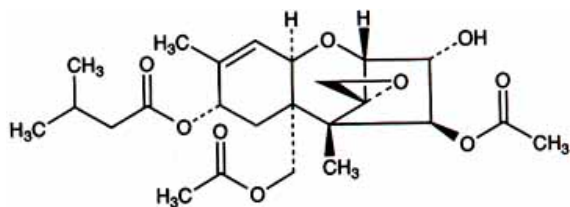
Mikotoksinų nustatymo metodai ir jų taikymas žemės ūkio produkcijos tyrimams. Mikotoksinų kiekiai yra tokie maži, dažniausiai analizinės chemijos sąvoka vadinami pėdsakais, o dėl didžiulių cheminės struktūros skirtumų neįmanoma taikyti vieno metodo visų mikotoksinų kiekybinei analizei. Kiekybinio įvertinimo metodų yra labai daug ir įvairių. Pagrindiniai mikotoksinų nustatymo metodai pateikti 1 lentelėje. Jie vystėsi ir tobulėjo kartu su naujų individinių junginių aptikimu, su besivystančiu cheminės analizės atlikimo technikos ir metodų progresu /Barna-Vetro ir kt., 1994; Krska ir kt., 2001; Gilbert, Anklam, 2002; Gaag ir kt., 2003; Osenbruggen, Pettersson, 2002; 2005; Trucksess, 2006/. Pirmieji mikotoksinų vertinimo metodai rėmėsi plonasluoksnės chromatografijos TLC (thin-layer chromatography) principu /Takeda ir kt., 1979; Filtenborg ir kt., 1983/, vėliau šiam tikslui buvo pritaikyta efektyvioji skysčių chromatografija (angliškai high-performance liquid chromatography HPLC) – aflatoksinams, patulinui, ochratoksinui A, ir kt. /Scudamore, MacDonald, 1998; Delmulle ir kt., 2006/, dujų chromatografija (gas chromatography GC) – trichotecenamams, zearalenonui ir t.t.

¹ http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out44_en.pdf;
http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out65_en.pdf;
http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out88_en.pdf;
http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out123_en.pdf.

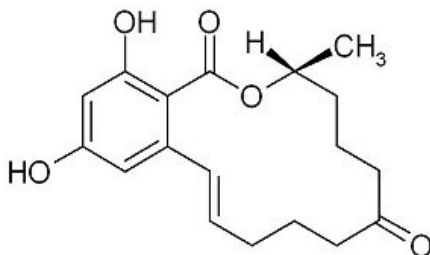
/Scott ir kt., 1993; Seidel ir kt., 1993; Croteau ir kt., 1994/, imunofermentiniai metodai /Pestka, Abouzied, 1995/ ir kt. Artimosios srities infraraudonųjų spindulių (AIRA) spektroskopija – naujas metodas, plačiai naudojamas žemės ūkio, maisto pramonės ir kt. objektų kokybei vertinti. Analizė atliekama greitai, nenaudojami reagentai, nesuardoma tiriamą medžiaga. Rezultatai rodo, kad metodą galima taikyti produktų klasifikavimui ir saugius ir nesaugius /Dowell ir kt., 2002; Pettersson, Åberg, 2003; Kos ir kt., 2004/. Mikotoksinų nustatymo metodo pasirinkimas priklauso nuo reikiamo nustatymo tikslumo, trukmės ar įrangos kainos.



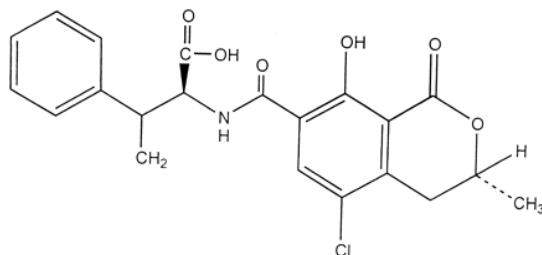
Deoksinivalenolis (DON), B trichotecenų grupės mikotoksinas, $C_{15}H_{20}O_6$, kurį produkuoja *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* ir kt. *Fusarium* spp.



T-2 toksinas, A trichotecenų grupės mikotoksinas, $C_{24}H_{34}O_9$, kurį produkuoja *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. tricinctum* ir kt.



Zearalenonas (ZEN), 6-(10-hidroksi-6-okso-trans-1-undecenil)-β-rezorciklinės rūgšties laktonas, $C_{18}H_{22}O_5$. Dažniausiai produkuojamas *Fusarium culmorum* ir *F. graminearum* ir kt. *Fusarium* rūšys



Ochratoksinas, L- fenilalanin N-(5-chloro-3,4-dihidro-8-hidroksi-3-metil-1-okso-1H2-benzopiran-7-il)karbonil-(R)-izokumarinas, $C_{20}H_{18}ClNO_6$. Dažniausiai produkuoja *Aspergillus ochraceus* ir *Penicillium verrucosum*

1 paveikslas. Mikotoksinų cheminė struktūra ir jų pagrindiniai producentai pagal Kos, Krska, http://www.lfra.co.uk/eman2/fsheet2_5.asp ir Bennett, Klich, 2003

Figure 1. Chemical structure of mycotoxins and their major producers according to Kos, Krska, http://www.lfra.co.uk/eman2/fsheet2_5.asp ir Bennett, Klich, 2003

1 lentelė. Mikotoksinų nustatymo metodai
Table 1. Mycotoxin determination methods

Metodas <i>Method</i>	Mikotoksinas <i>Mycotoxin</i>	Aprašymas <i>Description</i>	Naudojimas <i>Use</i>	Pastabos <i>Notes</i>
1	2	3	4	5
Plonasluoksnių chromatografija (TLC) <i>Thin layer chromatography</i>	ZEN; Trichotecenai A, B; Aflatoksinai ZEN; Trichothecenes A, B; Aflatoxins	Grūdų ištrauka iš dalies išvaloma prieš uždedant ant plonasluoksnių chromatografinių plokštelių. Lyginama fluorescuojančių standartų migracija UV šviesoje. Trichotecenai nefluorescuoja <i>Grain extract is partly cleaned before placing on thin layer chromatography plates. Migration of fluorescenting standards in the UV light is compared. Trichothecenes do not fluoresce</i>	Naudojama aflatoksinų ir ZEN identifikavimui bei kiekybiniam vertinimui, aflatoksinų aptikimo riba 1–3 ppb, ZEN aptikimo riba – 50 ppb. <i>Is used for aflatoxins and ZEN identification and quantification, aflatoxin limit of detection 1–3 ppb, ZEN limit of detection 50 ppb.</i>	Lėtas, brangus, bet tikslus ir patikimas. Trichotecenų nustatymo riba yra santykinai žema <i>Slow, costly but accurate and reliable. Trichothecene limit of detection is relatively low</i>
Dujų chromatografija (GC, GLC) <i>Gas chromatography</i>	ZEN; Trichotecenai A Trichothecenes A	Paruošiami grūdų ekstraktai, matuojami trimetilsililo esteriniai junginiai <i>Grain extracts are prepared, trimethylsilylic ester compounds are measured</i>	Tiksliai įvertina ZEN, T-2, MAS ir DAS kiekius <i>Precisely estimates ZEN, T-2, MAS and DAS contents</i> Modifikuota GC technika naudojama ir kt. mikotoksinams nustatyti <i>Modified GC equipment is also used for the determination of other mycotoxins</i>	Tikslesnis nei TLC vertinant trichotecenus <i>More accurate than TLC for trichothecene estimation.</i> Jautrus, brangus, reikalinga aukšta kvalifikacija <i>Sensitive, costly, high qualification is necessary</i>
Efektiviųjų skysčių chromatografija (HPLC)	Visi mikotoksinais All mycotoxins	Grūdų ekstraktai išvalomi ir frakcionuojami. Kiekvienai mikotoksinų grupei, priklausomai nuo jų cheminės	Tipinė nustatymo riba DON javuose yra 100–1600 ng g ⁻¹ (HPLC-UV), 6–40 ng g ⁻¹ (HPLC-MS), 20 ng g ⁻¹	Standartizuotas, jautrus, nustatymo riba gali būti tik 3–6 µg kg ⁻¹ , brangus, dide-

1 lentelės tęsinys
Table 1 continued

1	2	3	4	5
<i>High performance liquid chromatography</i>		struktūros, naudojami skirtingi detektoriai bei ekstraktų paruošimo metodai <i>Grain extracts are cleaned and fractionated. Different detectors and extract preparation methods are used for each group of mycotoxins depending on their chemical structure</i>	(HPLC-FLD) <i>Common limit of detection of DON in cereals is 100–1600 ng g⁻¹ (HPLC-UV), 6–40 ng g⁻¹ (HPLC-MS), 20 ng g⁻¹ (HPLC-FLD)</i>	lės investicijos ir aukšta darbuotojų kvalifikacija <i>Standardised, sensitive, limit of detection can be only 3–6 µg kg⁻¹, costly, heavy investment and high qualification of staff are needed</i>
Atmosferinio slėgio cheminė jonizacija <i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>	ZEN ir kt. <i>ZEN and others</i>	Tai viena iš HPLC atmainų su MS detektoriumi. Junginiai identifikuojami pagal molekulinę masę <i>It is one of HPLC versions with MS detector. Compounds are identified according to molecular mass</i>	Nustatymo jautrumas labai didelis ne tik mikotoksinams, bet ir jų dariniams <i>Detection sensitivity is very high not only for mycotoxins but also for their derivatives</i>	Jautrus, brangus, didelės investicijos, aukšta darbuotojų kvalifikacija <i>Sensitive, costly, heavy investment, high qualification of staff</i>
Imunofermen-tinis metodas (ELISA) <i>Immuno-enzymic method</i>	Aflatoksinai, ZEN, DON, T-2 ir kt. <i>Aflatoxins, ZEN, DON, T-2 and others</i>	Ruošiama metanolinė arba vandeninė grūdų ištrauka. Naudojamas specialios plokštelės su antikūnių-fermentų konjugatais <i>Methanolic or aqueous extraction of grain is prepared. Special plates with antibody – enzyme conjugates are used</i>	Metodas daugiau skirtas monitoringams vykdyti <i>The method is designed more for monitoring</i>	Vienas pigesnių kiekybinio vertinimo metodų, greitas, pakankamai tikslus <i>One of the cheaper quantitative estimation methods, rapid, sufficiently accurate</i>

1 lentelės tęsinys

Table 1 continued

1	2	3	4	5
AIRa spektroskopija	DON, fumonisinas ir kt.	Remiasi optinių duomenų ir chemiškai nustatytų duomenų statistiniu ryšiu	Naudojamas retai, atliekant pavienių grūdų skenavimus	Greitas metodas, be reagentų, bet skenavimui būtinas brangus prietaisas
<i>AIRa spectroscopy</i>	<i>DON, fumosine and others</i>	<i>Is based on statistical correlatrion between the data determined optically and chemically</i>	<i>Is used rarely for scanning of individual grain</i>	<i>Rapid method, no reagents, but a costly instrument is needed for scanning</i>

Mikotoksinų analizės klausimais pasaulyje aktyviai dirbama jau apie 40 metų. Mikotoksinų vertinimo metodai paprastai yra sūdomi oficialių laboratorijų ar reguliavimo tarnybų ir aprobeuojami tarptautinių organizacijų, tokių kaip AOAC (Association of Official Analytical Chemists), IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), ISO (International Organisation for Standardisation), CEN (European Committee for Standardisation), NMKL (Nordic Committee of Food Anglysis) ir profesinių organizacijų, tokių kaip IDF (International Dairy Federation) ir kt. Nacionaliniai standartizavimo komitetai yra taip pat įtraukiami į metodų vertinimo grandinę. Naujausi standartais pripažinti metodai mikotoksinams nustatyti yra HPLC metodai su tiriamų ėminių ekstraktų paruošimu, juos išvalant imunoafininėmis kolonėlėmis. Keletas mikotoksinų nustatymo metodų buvo įvertinti vykdant ES finansuojamą projektą (4th Framework Programme 1996-2000, contract N^o: CE-2045-96). 56-ame jungtiniame FAO ir WHO (World Health Organization) ekspertų komiteto posėdyje (56th Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, 6–15 February 2001) buvo aptarta mikotoksinų DON, T-2 ir HT-2 analizavimo būklė. Tarplaboratoriniai tyrimų palyginimai aiškiai parodė, kad būtina tobulinti tiek DON, tiek T-2 ir HT-2 toksinų analizavimo metodus, siekiant geresnio duomenų atkuriamumo, atkartojamumo ir tikslumo /Gilbert, Anklam, 2002/.

Nors HPLC sulaukė oficialaus daugelio tarptautinių organizacijų pripažinimo bei įteisinimo, metodas turi daug trūkumų: analizė sudėtinga ir trunka ilgai, naudojami toksiški reagentai, reikia didelių investicijų. Greitesnis ir pigesnis – imunofermentinis metodas ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay) leidžia išvengti minėtų chromatografijos metodų trūkumų. Literatūroje nedaug duomenų apie mikotoksinų vertinimo skirtingais metodais rezultatų sąryšį. Vienoje iš amerikiečių ataskaitų teigiama, kad ELISA ir chromatografiniais metodais gautus duomenis sieja glaudus ryšys /Chu ir kt., 1999/. Natūraliai užterštų 6 kviečių grūdų mėginių su DON kiekiu 0,7–12 mg g⁻¹ analizė parodė gerą IAC-HPLC ir ELISA duomenų atitikimą ($r = 0,997$). Taigi ELISA metodas gali būti naudojamas kaip alternatyvus ir pakankamai tikslus greitai

įvertinti mikotoksinų kiekį žemės ūkio ir maisto produktuose. Kai kurie testų rinkiniai yra įteisinti AOAC (Association of Official Analytical Chemists)² ir kt. organizacijų /Park ir kt., 1989; Trucksess ir kt., 1989; Bennett ir kt., 1994/.

Imunofermentinis mikotoksinų kiekio nustatymas ELISA testu. Pagrindiniai ir pripažinti imunofermentinių rinkinių komerciniai tiekėjai yra *r-Biopharm* (Darmstadt, Vokietija), *NEOGEN Europe Ltd* (Škotija), *Romer Labs* (Austrija) firmos. Kompanijos, gaminančios testų rinkinius, skirsto juos į tiksluosius bei ekspres (greituosius). Pastarieji mažiau tikslūs ir suteikia informaciją tik apie tiriamo produkto saugumą. Tikslieji imunofermentiniai mikotoksinų nustatymo rinkiniai nustato tiriamo objekto užterštumą vienu ar kitu mikotoksinu tam tikro intervalo diapazone.

NEOGEN Europe Ltd korporacija tiekia testų rinkinius nustatyti kiekams šių mikotoksinų: aflatoksinų, DON, ZEN, fumonisinų, T-2 toksinų ir ochratoksinų. Laisvi toksinai ar mikotoksinų - fermentų konjugatai fiksuojami antikūniais, reakcijos metu susidaro spalvotas junginys. Spalvos intensyvumas yra atvirkščiai proporcingas toksinų koncentracijai. Mikrokanalėlių su ėminių ekstraktais optinis tankis nuskaitomas ir lyginamas su standartų serijos optiniais tankiais ir apskaičiuojamas mikotoksinų kiekis ppm ar ppb (mg kg^{-1} ar $\mu\text{g kg}^{-1}$). Tyrimus atliekant bet kurios kompanijos testų rinkiniais kiekybiniam mikotoksinų įvertinimui pagal spalvos intensyvumą, koreliuojantį su mikotoksinų kiekiu standartiniuose tirpaluose ir tiriamame objekte, reikalinga įranga. Nustatymo tikslumas pagal optinį tankį priklauso ne tik nuo imunofermentinės analizės tikslumo ir patikimumo, bet ir prietaiso, išmatuojančio šį tankį, jautrumo. Paprastai kiekviena kompanija, gaminanti testus, rekomenduoja fotometrus su instaliuota programa, skirta tik šioms analizėms atlikti. *NEOGEN Europe Ltd* korporacija kartu su „Veratox“ testų rinkiniu siūlo *Stat Fax@303 Plus* fotometrą. LŽI turimo daugiakanalio programuojamo fotometro *Multiskan MS* galimybės yra didelės: prietaisas plačiai naudojamas medicinos, farmacijos mokslinių ir praktinių, molekulinės biologijos tyrimų srityse bei žemės ūkio objektams tirti /Mäkelä ir kt., 1994; Butkute, 2000; Tikka ir Koistinaho, 2001; Šlepetienė, Butkutė, 2003; Avila-Segura ir kt., 2004; Rufo ir kt., 2004/. Prietaise įmontuoti 8 skirtingi šviesos filtrai, kurie gali būti keičiami kitais, reikalingais konkrečiai analizei, tad prietaisą įmanoma taikyti įvairioms analizėms kiekybiškai įvertinti. Fotometras turi programinę įrangą, instaliuotą prietaiso mikrokompiuteryje, automatiškai pagal pasirinktą programą fotometruoja analizuojamus tirpalus mikroplokštelėje, spausdintine forma greitai pateikia duomenis, išreikštus reikiamais dydžiais – ekstinkcijos koeficientu ar analitės kiekiais. Prietaisas Lietuvos žemdirbystės institute naudojamas gliukozinolatų kiekiui rapsų sėklose ir išpaudose nustatyti, vėliau pritaikytas humuso ir huminių medžiagų tyrimams ir kt. /Butkutė, 2000; Šlepetienė, Butkutė, 2003/. Programinė įranga „Genesis“, skirta darbui su *Multiskan* tipo instrumentais, suteikia dar daugiau lankstumo ir operatyvumo šį fotometrą naudojant praktikoje /Elms ir kt., 2001; Šlepetienė, Liaudanskienė, 2005/.

Nerasta literatūros šaltinių apie kiekybinį mikotoksinų kiekio grūduose tyrimą ELISA testu, naudojant programuojamą fotometrą *Multiskan MS*. Daugelio nuomone, *Multiskan* tipo fotometrai yra vieni iš jautriausių pasaulyje žinomų fotometrų ir pritaikyti

² <http://www.aoac.org/testkits/testedmethods.html#Toxin>;
<http://www.aoac.org/testkits/TKDATA5.HTM>

mikroikiams analizuoti. Mokslo tikslams reikalinga pasiekti didelį duomenų tikslumą ir atkartojamumą.

Tikintis, kad fotometru *Multiskan MS* pavyks nustatyti mažesnes mikotoksinų koncentracijas, nei naudojant *Stat Fax@303 Plus*, šiuo darbu siekta tiksliam mikotoksinų DON, T-2 toksinų, ZEN, ochratoksinų kiekių javų grūduose įvertinimui pritaikyti daugiakanalį fotometrą *Multiskan MS* su programine įranga „Genesis Lite“ ir palyginti mikotoksinų analizavimo tikslumą šiuo prietaisu bei fotometru *Stat Fax@303 Plus*.

Tyrimų sąlygos ir metodai

Mikotoksinais DON, ZEN, T-2 toksinai, ochratoksinais (bendrasis kiekis), aflatoksinai (bendrasis kiekis) grūduose buvo nustatyti ELISA (imunofermentiniu) metodu /Wilkinson ir kt., 1992/, naudojant *NEOGEN Europe „Veratox“* (toliau vadinama „Veratox“) diagnostinius mikotoksinų nustatymo testus. Imunofertimentinių reakcijų intensyvumo pagal optinį tankį įvertinimui buvo naudojami fotometras *Stat Fax@303 Plus* ir programuojamas daugiakanalis fotometras *Multiskan MS*.

Mėginių paruošimo ir analizės „Veratox“ testų rinkiniais eiga. Tirti įvairių veislių žieminių ir vasarinių javų grūdų mėginiai, kurie analizėms sumalti laboratoriniu malūnu „IKA A11 Basic“.

Zearalenonas (ZEN). Aptikimo riba – 10 µg kg⁻¹, standartai – 0, 25, 75, 150, 500 µg kg⁻¹, akučių skaičius – 48. Vienu rinkiniu galima ištirti iki 38 mėginių. Darbo eiga: 5 g sumalto mėginio užpilama 25 ml 70 % metanolu ir 3 min. maišoma, naudojant didelio greičio purtyklę. Filtruojama pro „Watman“ # 1 filtrą. Gautas ekstraktas 1:5 skiedžiamas distiliuotu vandeniu. Į testo sumaišymo juosteles supilstomas konjugatas po 100 µl. Supilstomi kontrolės ir mėginių ekstraktai po 100µl. Po 100µl gauto tirpalo perkeliama į juosteles su antikūnais ir inkubuojama 5 min. Atliekama plovimo procedūra su distiliuotu vandeniu. Supilsčius substratą po 100 µl, vėl inkubuojama 5 minutes. Sulašinamas „Red-stop“ tirpalas, kuris sustabdo imunofertimentinę reakciją. Kiekybinis mikotoksinų įvertinimas atliekamas su fotometrais *Stat Fax@303 Plus* ir *Multiskan MS*.

Deoksinivalenolis (DON). Aptikimo riba – 0,1 mg kg⁻¹, standartai – 0, 0,25; 0,5; 1; 2 mg kg⁻¹, akučių skaičius – 48, vienu rinkiniu galima ištirti iki 38 mėginių. Darbo eiga: 10 g sumalto mėginio užpilama 100 ml distiliuoto H₂O ir 3 min. maišoma, naudojant didelio greičio purtyklę. Filtruojama pro „Watman“ # 1 filtrą. Tolesnė atlikimo ir vertinimo procedūra tokia pati kaip ZEN.

T-2 toksinas (T-2). Aptikimo riba – 7,5 µg kg⁻¹, standartai – 0; 25; 50; 100; 250 µg kg⁻¹, nustatymo ribos – 25–250 ppb, akučių skaičius – 48, vienu rinkiniu galima ištirti iki 38 mėginių. Darbo eiga: 10 g sumalto mėginio užpilama 50 ml 50 % metanolu ir 3 min. maišoma, naudojant didelio greičio purtyklę. Filtruojama pro „Watman“ # 1 filtrą. Tolimesnė atlikimo ir vertinimo procedūra tokia pati kaip ZEN.

Ochratoksinas (bendrasis kiekis). Aptikimo riba – 1,0 µg kg⁻¹, standartai – 0; 2; 5; 10; 25 µg kg⁻¹, nustatymo ribos – 2–25 ppb, akučių skaičius – 48, vienu rinkiniu galima ištirti iki 38 mėginių. Darbo eiga: 10 g sumalto mėginio užpilama 40 ml 50 % metanolu ir 5 min. maišoma, naudojant didelio greičio purtyklę. Filtruojama pro „Watman“ # 1 filtrą. Tolesnė atlikimo ir vertinimo procedūra tokia pati, kaip ZEN, tačiau po sumaišymo ir substrato sulašinimo procedūros inkubuojama 10 minučių.

Aflatoksinas (bendrasis kiekis). Aptikimo riba – $1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, standartai – 0; 5; 15; $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, nustatymo ribos – 5–50 ppb, akučių skaičius – 48, vienu rinkiniu galima ištirti iki 40 mėginių. Darbo eiga: 5 g sumalto mėginio užpilama 25 ml 70 % metanolu ir 3 min. maišoma, naudojant didelio greičio purtyklę. Filtruojama pro „Watman“ # 1 filtrą. Į testo sumaišymo juosteles supilstomas konjugatas po 100 μl . Supilstomi kontrolinio varianto ir mėginių ekstraktai po 100 μl . Po 100 μl gauto tirpalo perkeliama į juosteles su antikūnais ir inkubuojama 5 min. Atliekama plovimo procedūra su distiliuotu vandeniu. Supilstomas substratas po 100 μl , vėl inkubuojama 3 minutes. Sulašinamas „Red-stop“ tirpalas sustabdyti imunofermentinę reakciją. Kiekybinis mikotoksinų įvertinimas atliekamas su *Stat Fax@303 Plus* prietaisu ir fotometru *Multiskan MS*.

Norint tiksliai parinkti šviesos filtrą mikotoksinų kiekiui įvertinti bei atkartoti duomenis, tirpalai fotometruoti *Multiskan MS* prietaisu su jame įmontuotais šviesos filtrais: $\lambda = 405, 450, 490, 540, 590, 620, 650, 690 \text{ nm}$. Duomenų apdorojimui pritaikyta programa „Genesis Lite“.

Norint įsitikinti, ar žemų koncentracijų parodymai nėra susiję su pašalinėmis reakcijomis, buvo naudojamas grynas kristalinis deoksinivalenolis *BioChemica* ($\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_6$), kurio molekulinė masė – 298,30. Iš darbinio tirpalo, kuriame DON koncentracija 1 mg ml^{-1} arba $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ skiedimo būdu, naudojant atitinkamas kintamo tūrio mikropipetes (Labsystems), pagaminta skirtingos DON koncentracijos tirpalų serija (0,001; 0,01; 0,05; 0,2; $0,6 \mu\text{g ml}^{-1}$), kuri pagal grūdų užterštumo mikotoksinais analizės eigą atitinka 0,005; 0,05; 0,25; 1,00; $3,00 \mu\text{g DON 1kg grūdų}$.

Tyrimų rezultatai

Mikotoksinų kiekio nustatymo ELISA metodu tikslumo palyginimas, matuojant skirtingais fotometrais. Pirminio grūdų užterštumo mikotoksinu DON imunofermentiniu (ELISA) metodu tyrimo metu nustatyta, kad programuojamu daugiakanaliu fotometru *Multiskan MS* fiksuojamos mažesnės mikotoksino koncentracijos, nei naudojant fotometrą *Stat Fax@303 Plus* (2 lentelė).

Lietuvoje išaugintų javų grūduose mikotoksinų koncentracijos, įvertintos skirtingais fotometrais, varijavo panašiose ribose, nustatyti artimi vidutiniai kiekiai mėginiuose (3 lentelė). 76 grūdų mėginiuose DON koncentracijų kitimo ribos, nustatytos matuojant *Stat Fax@303 Plus*, buvo $0\text{--}0,60 \text{ mg kg}^{-1}$ ir $0\text{--}0,69 \text{ mg kg}^{-1}$ – matuojant *Multiskan MS*. Ištirtuose 38 grūdų mėginiuose ZEN kiekis svyravo nuo 0 iki $0,08$ (*Stat Fax@303 Plus*) ir nuo 0 iki $0,09 \text{ mg kg}^{-1}$ (*Multiskan MS*). Panašūs rezultatai gauti ištyrus 53 mėginiuose T-2 toksinus, kurių koncentracijos varijavo nuo 0 iki $0,14 \text{ mg kg}^{-1}$ (*Stat Fax@303 Plus*) ir nuo 0 iki $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$ (*Multiskan MS*), 36 mėginiuose ochratoksinų koncentracijos varijavo nuo 0 iki $59,2 \mu\text{g kg}^{-1}$, atlikus matavimus su *Stat Fax@303 Plus* ir nuo 0 iki $51,7 \mu\text{g kg}^{-1}$, atlikus matavimus su *Multiskan MS*. Vertinant aflatoksinų analizių duomenis, gautus *Stat Fax@303 Plus*, nustatyta, kad koncentracijos varijavo nuo 0 iki $2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$. *Multiskan MS* į mažas šių mikotoksinų koncentracijas reagavo jautriau, nors kiekiai varijavo nuo 0 iki $2,8 \mu\text{g kg}^{-1}$. Visų mikotoksinų kiekių, įvertintų abiem fotometrais, varijacijos koeficientas didelis.

2 lentelė. Vasarinių miežių ir vasarinių kviečių grūdų užterštumas mikotoksinu DON
Table 2. Spring barley and spring wheat grain contamination with mycotoxin DON

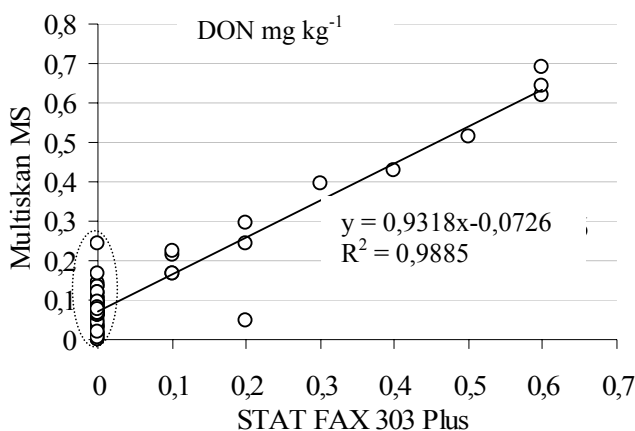
Vasarinių javų grūdai Grain of spring cereals	Naudoti fotometrai / Photometers used	
	Stat Fax@303 Plus	Multiskan MS
	DON kiekis mg kg ⁻¹ / DON content mg kg ⁻¹	
Vasariniai miežiai 'Luokė' Spring barley	0,0	0,122
Vasariniai miežiai 'Barke' Spring barley	0,0	0,126
Vasariniai miežiai 'Henni' Spring barley	0,0	0,091
Vasariniai kviečiai 'Baldus' Spring wheat	0,1	0,227
Vasariniai kviečiai 'Hena' Spring wheat	0,73	0,742
Vasariniai kviečiai 'Munk' Spring wheat	0,37	0,398

3 lentelė. DON, ZEN, T-2 toksino, ochratoksino ir aflatoksino duomenų variavimas, analizuojant skirtingais fotometrais

Table 3. DON, ZEN, T-2 toxin, ochratoxin, and aflatoxin data variation as influenced by different photometers

	Vidur- kis Mean	Mažiausias kiekis Lowest content	Didžiausias kiekis Highest content	Stand. nuokrypis Stand. deviation	Variacijos koeficientas % Variation coefficient %
DON mg kg ⁻¹ , n = 76					
Stat Fax@303 Plus	0,05	0,00	0,60	0,14	266,54
Multiskan MS	0,12	0,00	0,69	0,14	116,21
ZEN mg kg ⁻¹ , n = 38					
Stat Fax@303 Plus	0,01	0,00	0,08	0,02	180,14
Multiskan MS	0,01	0,00	0,09	0,03	183,08
T-2 toksinas mg kg ⁻¹ , n = 53					
Stat Fax@303 Plus	0,01	0,00	0,14	0,02	225,66
Multiskan MS	0,01	0,00	0,15	0,03	218,48
Ochratoksinas µg kg ⁻¹ , n = 36					
Stat Fax@303 Plus	5,05	0,00	59,20	14,08	278,63
Multiskan MS	4,99	0,00	51,70	12,98	259,84
Aflatoksinas µg kg ⁻¹ , n = 57					
Stat Fax@303 Plus	0,554	0,00	2,00	0,62	111,65
Multiskan MS	0,912	0,00	2,80	0,89	97,75

Dviem fotometrais įvertintos DON koncentracijų vertės koreliavo nepakankamai glaudžiai: determinacijos koeficientas R^2 0,885, o duomenis siejo regresijos lygtis $y = 0,9318x + 0,0726$, kai y – *Multiskan MS* nustatytos vertės, o x – *Stat Fax@303 Plus* (2 pav.). Dauguma ištirtų mėginių su *Stat Fax@303 Plus* rodė DON koncentraciją lygią 0: šiuo fotometru mažesnės negu $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ DON koncentracijos yra prilyginamos nuliui (2 pav., apvesta). Tuo tarpu *Multiskan MS* parodymuose atsispindi ir mažiausi mikotoksinų kiekiai.

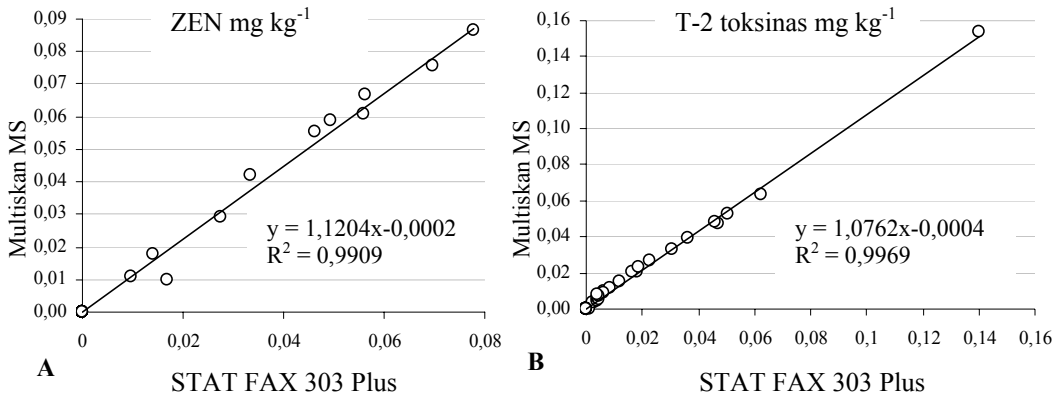


2 paveikslas. DON ($n = 76$) duomenų, nustatytų skirtingais fotometrais, koreliacija
Figure 2. Correlation of DON ($n = 76$) data determined by different photometers

ZEN ir T-2 toksinų koncentracijų, įvertintų skirtingais fotometrais, palyginimas, atlikus regresines koreliacines analizes, rodo, kad šių mikotoksinų tyrimui abu prietaisai yra lygiaverčiai, determinacijos koeficientai labai aukšti: $R^2 = 0,9909$ – ZEN ir $R^2 = 0,9969$ – T-2 toksinui (3A, 3B pav.).

Skirtingais prietaisais įvertintos ochratoksino ($n = 36$) ir bendrojo aflatoksino kiekių ($n = 57$) vertės taip pat koreliavo pakankamai glaudžiai: atitinkami determinacijos koeficientai ir regresijos lygtys buvo $R^2 = 0,9882$; $y = 0,9051x + 0,2824$ ir $R^2 = 0,9379$; $y = 1,3952x + 0,1388$.

Palyginamieji tyrimai rodo, kad tik DON koncentracijų įvertinimui *Multiskan MS* buvo jautresnis, kitų tirtų mikotoksinų nustatymui abu fotometrai buvo lygiaverčiai. Norint įsitikinti, ar *Multiskan MS* žemų koncentracijų parodymai nėra susiję su pašalinėmis reakcijomis, atliktas papildomas tyrimas naudojant gryno DON tirpalus. DON nustatymo palyginimui skirtingais fotometrais buvo parengta tirpalų serija iš gryno kristalinio mikotoksino. Kalibracinė kreivė šiam tyrimui parengta kaip įprasta DON nustatymui grūduose. Tyrimų rezultatai apibendrinti 4 lentelėje.



3 paveikslas. ZEN (A, n=38) ir T-2 toksino (B, n = 53) duomenų variavimas ir koreliacija

Figure 3. ZEN (A, n=38) and T-2 toxin (B, n = 53) data variation and correlation

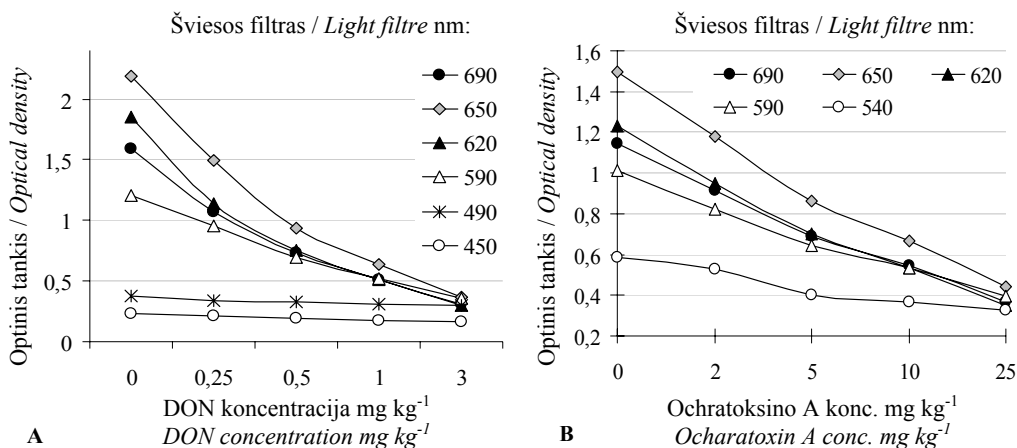
DON nustatymo tirpaluose, pagamintuose iš gryno kristalinio mikotoksino, tikslumas, nustatant skirtingais fotometrais, panašus. Tačiau akivaizdu, kad aptikti mažas DON koncentracijas *Stat Fax@303 Plus* neįmanoma arba gaunamos didesnės paklaidos. *Multiskan MS* yra jautresnis ir reaguoja į mažiausius mikotoksino pėdsakus. Toks dėsningumas pasitvirtino ir analizuojant tirpalų seriją, pagamintą iš grūdų standarto ekstrakto su žinomu DON kiekiu ir gryno kristalinio mikotoksino tirpalo.

4 lentelė. DON koncentracijos tirpaluose, pagamintuose iš gryno mikotoksino, palyginimas, matuojant skirtingais fotometrais

Table 4. Comparison of DON concentration in solutions produced from pure mycotoxin when measured using different photometers

Teorinė DON konc. mg kg ⁻¹ <i>Theoretical DON conc. mg kg⁻¹</i>	<i>Multiskan MS</i>			<i>Stat Fax@303 Plus</i>
	1 pakartojimas <i>1st replication</i>	2 pakartojimai <i>2nd replication</i>	Vidurkis <i>Mean</i>	
0,005	0	0,026	0,013	0
0,05	0,079	0,041	0,060	0
0,25	0,226	0,249	0,238	0,2
1	0,954	0,980	0,967	1
3	3,104	3,246	3,175	3,2
R ²	0,996	0,998	0,999	0,999

Šviesos filtro parinkimas imunofermentinei reakcijai. Aiškiai išreikšta absorbcija, kintanti proporcingai nustatomos medžiagos koncentracijai, yra ypač svarbus veiksnys taikant fotometrinius metodus analitinėje chemijoje. Paprastai prieš taikant fotometrinių metodą vienos ar kitos medžiagos kiekiui nustatyti, pirmiausia nustatoma, kokio ilgio šviesos bangas spalvotas tirpalas absorbuoja labiausiai. Optiniai tankiai, priklausomai nuo nustatomos medžiagos koncentracijos, turėtų kisti kuo platesniame intervale. Kadangi ankstesni bandymai demonstravo fotometro *Multiskan MS* pranašumą, palyginti su *Stat Fax303 Plus*, nutarta patikslinti, kuris iš įmontuotų į prietaisą filtrų yra tinkamiausias mikotoksinams nustatyti „Veratox“ imunofermentiniais testais. Prietaise *Stat Fax303 Plus* įmontuotas šviesos filtras su $\lambda = 650$ nm. Tirta bangos ilgio įtaka mikotoksinų ochratoksino ir DON nustatymo tikslumui ir duomenų atkartojimui prietaisu *Multiskan MS*. Didžiausios absorbcijos nustatytos naudojant šviesos filtrą 650 nm (4 pav.), nors absorbcijos skirtumai tarp nulinio ir didžiausio mikotoksinų standarto buvo panašūs naudojant prietaise įmontuotus filtrus: 590, 620, 650, 690 nm. Sprendžiant pagal absorbcijos kitimo kreives, neverta šiam tikslui naudoti 540 nm ir trumpesnių bangų šviesos filtrus.



4 paveikslas. DON (A) ir ochratoksino (B) standartinių tirpalų optinio tankio priklausomumas nuo šviesos filtro parinkimo

Figure 4. The dependence of optimal density of DON (A) and ochratoxin (B) standard solutions on the choice of light filter

Matuojant fotometru *Multiskan MS* su skirtingais šviesos filtrais dvi standartinių tirpalų serijas, kurių viena buvo naudojama kaip mėginių serija su nežinomais ochratoksino kiekiais, kita, kaip ir įprasta, – standartinių tirpalų kreive, nustatyta, kad su mažiausia paklaida ir glaudžiausiu determinacijos koeficientu ochratoksino kiekis buvo įvertintas 650 nm šviesos filtru (5 lentelė). Matuojant su $\lambda = 540$ nm ir trumpesnių bangų šviesos filtrais, gautosios reikšmės blogiausiai atitiko teorines mikotoksino vertes: didžiausios standartinės paklaidos bei mažesni determinacijos koeficientai tarp teorinių ir nustatytų reikšmių. Šis tyrimas patvirtino ankstesnį teiginį, kad 540 nm ir trumpesnių

bangų šviesos filtrai netaikytini mikotoksinų kiekybiniam vertinimui „Veratox” imunofermentiniais testais.

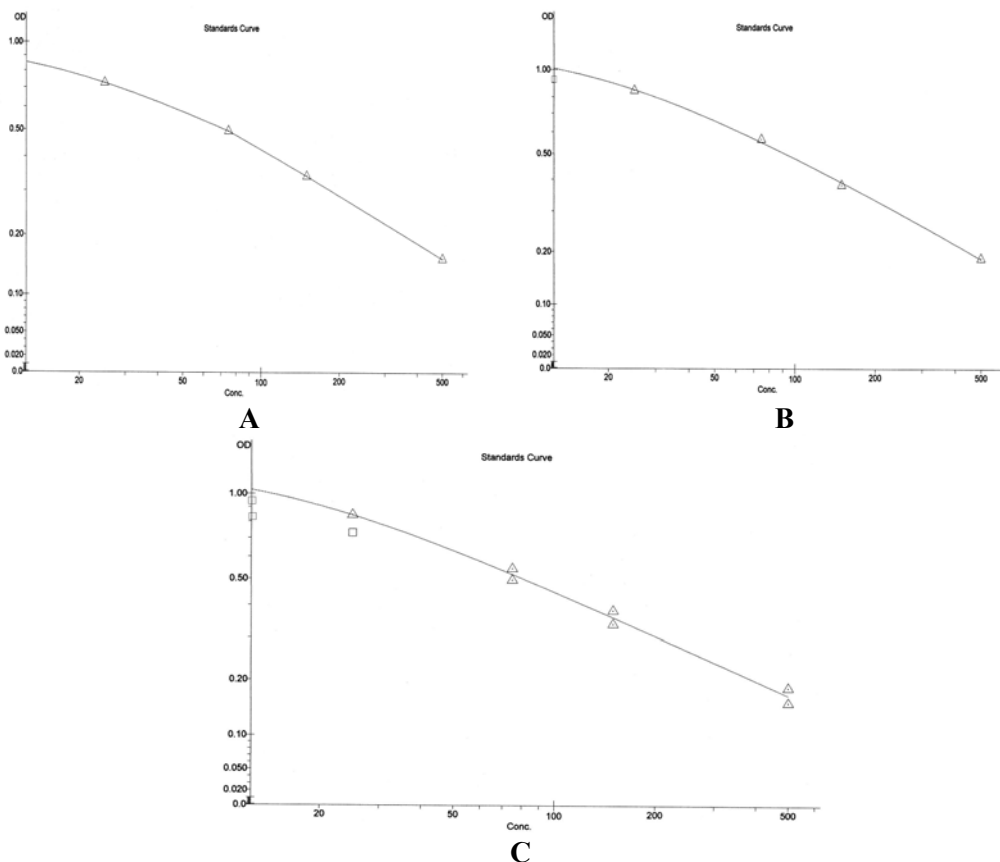
5 lentelė. Ochratoksinų kiekio ($\mu\text{g kg}^{-1}$) tirpaluose su žinoma koncentracija nustatymo skirtingais šviesos filtrais palyginimas

Table 5. Comparison of determination of ochratoxin content ($\mu\text{g kg}^{-1}$) in the solutions with known concentration using different light filters

Teorinė ochratoksinų koncentracija <i>Theoretical ochratoxin concentration</i>	Ochratoksinų koncentracija, naudojant skirtingus šviesos filtrus <i>Ochratoxin concentration using different light filters</i>					
	$\lambda =$ 690 nm	$\lambda =$ 650 nm	$\lambda =$ 620 nm	$\lambda =$ 590 nm	$\lambda =$ 540 nm	$\lambda =$ 490 nm
0	0	0	0	0	0	0
2,00	1,929	1,959	1,942	1,88	2,087	2,415
5,00	5,529	5,211	5,53	5,561	5,896	6,774
10,00	10,14	10,11	10,15	10,2	11,58	16,16
25,00	25,03	24,94	25,09	25,96	25,43	27,81
R^2	0,9994	0,9999	0,9995	0,9995	0,9961	0,9644
St. paklaida Sy/x <i>St. error</i>	0,3357	0,1552	0,3264	0,3228	0,8942	2,9646

Programos „Genesis Lite“ taikymo galimybės mikotoksinų analizėms. Programos „Genesis Lite” naudojimas suteikė daugiau lankstumo ir operatyvumo šio daugiakanalio fotometro praktiniam naudojimui. Pamatavus standartinius su žinomomis mikotoksino koncentracijomis tirpalus, apskaičiuojamas regresijos koeficientas tarp standarto teorinių reikšmių ir pamatuotųjų. „Genesis Lite“ programoje galima pasirinkti absorbcijos ir mikotoksinų koncentracijos duomenų palyginimo, sąryšio būdą: tiesinės, kvadratinės, logaritminės ar pusiaulogaritinės regresijos lygčių tipus kiekvieno individualaus tyrimo metu. Labiausiai nutolusius nuo teorinių taškus kalibraciniame grafike galima atmesti, galima naudoti vieną ar kelias standartų linijas, jų vidurkį ir perskaičiuoti duomenis iš naujo. Tokiu būdu pasiekiamas didesnis mikotoksinų nustatymo tikslumas. 8 A, B, C paveiksluose parodytos ZEN kalibracinės kreivės, kai naudojamos 2 standartinių tirpalų serijos atskirai (A ir B) bei abi standartų serijos kartu (C).

Tikslumui padidinti labiausiai nutolę taškai: nulinis kalibraciniame grafike B ir abu nuliniai bei vienas iš sekančių taškų, t.y. standartas su ZEN koncentracija $25 \mu\text{g kg}^{-1}$, pašalinti iš kreivės C. Optinio tankio ir ZEN koncentracijų ryšys R^2 padidėjo nuo 0,987 A atveju ir iki 1,00 C atveju.



8 paveikslas. ZEN standartinė kreivė: naudojant I serijos (A), II serijos (B) ir I+II serijų (C) standartinius tirpalus

Figure 8. ZEN standard curve: using standard solutions of the 1st series (A), 2nd series (B) and 1st + 2nd series (C)

Išvados

1. Palyginus mikotoksinų kiekio analizavimo „Veratox“ imunofermentiniais testais (*NEOGEN Europe*) duomenis, gautus fotometrais *Multiskan MS* ir *Stat Fax@303 Plus*, apskaičiavus standartinės paklaidas bei determinacijos koeficientus, nustatyta, kad prietaisas *Multiskan MS* yra jautresnis DON nustatymui ir reaguoja į mažiausius šių mikotoksinų pėdsakus.

2. Atlikus ZEN, T-2 toksino ir ochratoksino analizes nustatyta, kad abu fotometrai šių mikotoksinų rezultatų nuskaitymui yra lygiaverčiai.

3. Nustatyta, kad optimalus šviesos filtras yra λ 650 nm, iširtos ir nustatytos „Genesis Lite“ programos galimybės (kalibracinės kreivės pasirinkimas, jos modifikavimas), siekiant pagerinti mikotoksinų kiekybinio nustatymo tikslumą daugiakanaliu fotometru *Multiskan MS*.

Gauta 2007 06 01
Pasirašyta spaudai 2007 06 22

LITERATŪRA

1. Avila-Segura M., Lyne J.W., Meyer J.M., Barak P. Rapid spectrophotometric analysis of soil phosphorus with a microplate reader // *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. - 2004, vol. 35, iss. 3-4, p.547-557
2. Baliukonienė V., Bakutis B. Kviečių ir miežių mikotoksikologinis ir mikrobiologinis įvertinimas sandėliavimo metu // *Veterinarija ir zootechnika*. - 2002, t. 17 (39), p. 14-22
3. Barna-Vetro I., Gyongyosi A., Solti L. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of *Fusarium* T-2 and zearalenone toxins in cereals // *Applied and Environmental Microbiology*. - 1994, vol. 60, iss. 2, p. 729-731
4. Bennett G.A., Nelsen T.C., Miller B.M. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of zearalenone in corn, wheat and pig feed: collaborative study // *Journal of AOAC International*. - 1994, vol. 77, p. 1500-1509
5. Bennett J.W., Klich M. Mycotoxins // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2003, vol. 16, iss. 3, p. 497-516
6. Butkutė B. Gliukozinolatai rapsų sėklose ir jų nustatymo metodų palyginimas // *Žemės ūkio mokslai*. - 2000, t. 3, p. 41-50
7. Chu F.S., Li B., Liu H., Yu W. Mycotoxin research at FRI in 1999 // *Annual Report*. - 1999, p.41-47. <http://www.wisc.edu/fri/annrpt/myco99.pdf>
8. Croteau S.M., Prelusky D.B., Trenholm H.L. Analysis of trichothecene mycotoxins by gas chromatography with electron capture detection // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. - 1994, vol. 42, p. 928-933
9. Delmulle B., De Saeger S., Adams A. et al. Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 16 mycotoxins on cellulose filters and in fungal cultures // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. - 2006, vol. 20 iss. 5, p. 771-776
10. Dowell F.E., Pearson T.C., Maghirang E.B. et al. Reflectance and transmittance *Fusarium* spectroscopy applied to detecting fumonisin in single corn kernels infected with verticillioides // *Cereal Chemistry*. - 2002, vol. 79, iss. 2, p. 222-226
11. Elms J., Denniss S., Smith M. et al. Development and Validation of a Monoclonal Based Immunoassay for the Measurement of Fungal Alpha-Amylase: Focus on Peak Exposures // *Annals of Occupational Hygiene*. - 2001, vol. 45, iss. 2, p.89-95
12. Filtenborg O., Frisvad J.C., Svendsen J.A. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures // *Applied and Environmental Microbiology*. - 1983, vol. 45 iss. 2, p. 581-585
13. Gaag der B., Spath S., Dietrich H. et al. Biosensors and multiple mycotoxin analysis // *Food control*. - 2003, vol. 14, p. 251-254
14. Gilbert J., Anklam E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs // *Trends in Analytical Chemistry*. - 2002, vol. 21, No. 6-7, p. 468-486
15. Kos G., Krska R., Lohninger H., Griffiths P. A comparative study of mid-infrared diffuse reflection (DR) and attenuated total reflection (ATR) spectroscopy for the detection of fungal infection on RWA2-corn // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. - 2004, vol. 378, iss. 1, p. 159-166
16. Krska R., Baumgartner S., Josephs R. The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals // *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. - 2001, vol. 371, iss. 3, p. 285-299
17. Krska R., Welzig E., Berthiller F. et al. Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance // *Food Additives & Contaminants*. - 2005, vol. 22, iss. 4, p. 345-353

18. Mäkelä S., Davis V.L., Tally W.C. et al. Dietary estrogens act through estrogen receptor-mediated processes and show no antiestrogenicity in cultured breast cancer cells // *Environmental Health Perspectives*. - 1994, vol. 102, p. 572–578

19. Mankevičienė A., Auškalnienė O. Kukurūzų grūdų užterštumas toksiškais pelėsiniais grybais ir mikotoksinais // *Gyvininkystė: mokslo darbai / LVA GI*. - 2004, t. 45, p. 58–70

20. Mankevičienė A., Gaurilčikienė I., Dabkevičius Z. et al. Mycotoxin contamination of Lithuania-grown cereal grain and factors determining it // *Ekologija*. - 2006, Nr. 3, p. 21–27

21. Osenbruggen van W.A., Pettersson H. Analysis of relevant *Fusarium* mycotoxins in cereals-the state of the art // *Food safety of cereals: A chain-wide approach to reduce Fusarium Mycotoxins / (Eds) O.E. Scholten et al. - EC, Brussels, 2002, FAIR-CT98-4094. - 84 p.*

22. Park D.L., Miller B.M., Nesheim S. et al. Visual and semi-quantitative spectrophotometric ELISA screening method for aflatoxin B1 in corn and peanut products. Follow-up collaborative study // *Journal of AOAC*. - 1989, vol. 72, p. 638–643

23. Pestka J.J., Abouzied M.N. Enzyme-linked immunosorbent assays have been successfully applied to the screening of mycotoxins in a diverse array of foods // *Food Technology*. - 1995, vol. 49, iss. 2, p. 120–128

24. Pettersson H., Åberg L. Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals // *Food Control*. - 2003, vol. 14, iss. 4, p. 229–232

25. Rufo C., Hammock B.D., Gee S.J. et al. Robust and Sensitive Monoclonal Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Herbicide Molinate // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. - 2004, vol. 52, p. 182–187

26. Schollenberger M., Terry Jara H., Suchy S. et al. *Fusarium* toxins in wheat flour collected in an area in southwest Germany // *International Journal of Food Microbiology*. - 2002, Bd. 72, heft, S. 85–89

27. Scott P.M., Kanhere S.R., Weber D. Analysis of Canadian and imported beers for *Fusarium* mycotoxins by gas chromatography-mass spectrometry // *Food Additives and Contaminants*. - 1993, vol. 10, iss. 4, p. 381–389

28. Scudamore K.A., MacDonald S.J. A collaborative study of an HPLC method for determination of ochratoxin A in wheat using immunoaffinity column clean-up // *Food Additives and Contaminants*. - 1998, vol. 15, iss. 4, p. 401–410

29. Seidel V., Lang B., Fraißler S. et al. Analysis of trace levels of trichothecene mycotoxins in Austrian cereals by gas chromatography with electron capture detection // *Chromatographia*. - 1993, vol. 37, iss. 3–4, p. 191–201

30. Šlepetienė A., Butkutė B. Use of a multichannel photometer (Multiskan MS) for determination of humic materials in soil after their dichromate oxidation // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. - 2003, vol. 375, p. 1260–1264

31. Šlepetienė A., Liaudanskienė I. Huminių rūgščių ir fulvorūgščių fotometrinis nustatymas Multiskan MS, adaptavus programą Genesis Lite // *Žemdirbystė: mokslo darbai / LŽI, LŽŪU*. - Akademija, 2005, t. 89, p. 31–38

32. Takeda Y., Isohata E., Amano R., Uchiyama M. Simultaneous extraction and fractionation and thin layer chromatographic determination of 14 mycotoxins in grains // *Journal of AOAC*. - 1979, vol. 62, iss. 3, p. 573–578

33. Tikka T.M., Koistinaho J.E. Monocycline Provides Neuroprotection Against N-Methyl-D-aspartate Neurotoxicity by Inhibiting Microglia // *The Journal of Immunology*. - 2001, vol. 166, p. 7527–7533

34. Trucksess M.W. Mycotoxins // *Journal of AOAC International*. - 2006, vol. 89, iss. 1, p. 270–284

35. Trucksess M.W., Stack M.E., Nesheim S. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxins B1, B2 and G1 in corn, cotton seed, peanuts, peanut butter and poultry feed. Collaborative study // Journal of AOAC. - 1989, vol. 72, p. 957–962

36. Wilkinson A.P., Ward C.M., Morgan M.R.A. Immunological analysis of mycotoxins // Plant Toxin Analysis / (Eds.) H.F. Lins-Kens, J.F. Jackson. - Berlin, 1992, p. 185–225

ISSN 1392-3196

Zemdirbyste / Agriculture, vol. 94, No. 2 (2007), p. 18–35

UDK 632.4.01/08:631.576.331.2(045)

ESTIMATION OF MYCOTOXIN CONTENT IN GRAIN BY ELISA METHOD USING DIFFERENT PHOTOMETERS

B. Butkutė, A. Mankevičienė

Summary

This study provides a wide overview of literature about the diversity of most common mycotoxins occurring in cereal grain and their products as well as about their biological nature, properties, and detection methods. For mycotoxin determination by Veratox immunoenzyme tests (*NEOGEN Europe Ltd*, Scotland) we used a multichannel automatic photometer *Multiskan MS*. The programme developed in the instrument's micro-computer with data computing method *Point to Point*, enabling expression of absorption values as concentration of a respective mycotoxin and immediate calculation of results during measuring, expressed by these dimensions: deoxynivalenol (DON) mg kg⁻¹, other mycotoxins µg kg⁻¹. The effect of wavelength on mycotoxin determination and on accuracy and data repeatability of the instrument *Multiskan MS* were estimated, possibilities of the programme Genesis Lite were tested and ascertained (choice of calibration curves, their modification) with a view to improving mycotoxin quantitative determination accuracy by a multichannel photometer *Multiskan MS*. Optimal light filter was found to be λ 650 nm. Data generated by the instruments *Multiskan MS* and *StatFax 300 Plus* were compared, standard regression errors and determination coefficients were calculated. When DON was determined by ELISA method and a photometer *Multiskan MS* was used for result reading, the obtained data were more accurate than those obtained by *Stat Fax@303 Plus*, and mycotoxin traces recorded by a photometer *Multiskan MS*. Having done ZEN analyses in 38 grain samples, T-2 toxin analyses in 53 samples, ochratoxin analyses in 36 samples, and aflatoxin analyses in 57 samples, it was found that both instruments produced the same readings of the mycotoxins tested.

Key words: mycotoxins, determination methods, ELISA method, *Multiskan MS*, *StatFax 300 Plus*.

Padėka. Dėkojame Lietuvos valstybiniam mokslo ir studijų fondui bei Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerijai, rėmusiems tyrimus pagal projektą „Kenksmingos medžiagos žemės ūkio produkcijoje: rizikos veiksniai ir prevencija“ (registracijos Nr. M-07002).