

МЕТОД СКРИНИНГА КОРМОВЫХ ДОБАВОК ПО ИХ СПОСОБНОСТИ СОРБИРОВАТЬ МИКОТОКСИНЫ *IN VITRO*

Резюме. В статье приведено описание предлагаемого нами способа контроля качества кормовых добавок, позиционируемых производителями как препараты для борьбы с микотоксикозами. Представлена унифицированная лабораторная методика определения способности кормовой добавки к взаимодействию с микотоксинами с применением метода жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией для измерения концентрации микотоксинов в рабочих растворах. Исследования проводились в лаборатории биохимического анализа ФНЦ «ВНИТИП». За три года здесь проанализировали более пятидесяти образцов различных кормовых добавок на способность связывать микотоксины *in vitro*. На основании полученных данных предложен коэффициент эффективности кормовых добавок для оценки их сорбционной активности по отношению к микотоксинам и для проведения скрининга.

Ключевые слова: микотоксины, кормовая добавка, сорбционная емкость, жидкостная хромато-масс-спектрометрия.

METHOD OF FEED ADDITIVES SCREENING BY THEIR ABILITY TO ABSORB MYCOTOXINS *IN VITRO*

Abstract. The article describes our proposed method of quality control of feed additives positioning themselves as preparations for mycotoxicosis control. The unified laboratory technique of determining the ability of feed additives to interact with mycotoxins using liquid chromatography in tandem with mass spectrometry to measure the concentration of mycotoxins in working solutions is described. The research was carried out in the laboratory of biochemical analysis of FSC ARRTPI. For three years more than fifty samples of various feed additives were investigated for their ability to bind mycotoxins *in vitro*. Based on the data presented, an efficiency coefficient of feed recommendations was proposed for assessing sorption activity in relation to mycotoxins and conducting screening.

Key words: mycotoxins, feed additive, sorption capacity, liquid chromatography-mass spectrometry.

ВВЕДЕНИЕ

Существует устойчивое мнение, что если кормовая добавка не взаимодействует с микотоксином *in vitro*, у нее практически нет шансов сделать это *in vivo* [1]. Иными словами, если препарат, находясь в простых условиях рабочего раствора, слабо вступает во взаимодействие с микотоксинами, то в условиях желудочно-кишечного пищеварения он может полностью утратить эту способность.

Пищеварение у птицы имеет особенности, которые необходимо учитывать при моделировании условий желудочно-кишечного тракта в опытах *in vitro*. Общая кислотность (рН)

желудочного сока у кур составляет 1,5–2 ед. Дуоденальный рефлюкс у них был установлен в результате обнаружения в содержимом желудка липазы [2]. Обратная перистальтика способствует нейтральной или слабокислой реакции химуса в тонком отделе кишечника. В связи с этим процессы адсорбции и десорбции микотоксинов у птицы могут иметь иную интенсивность, чем у млекопитающих.

Опыты *in vitro* по определению сорбционной емкости кормовых добавок, как правило, включают несколько этапов, которые соблюдаются исследователями. Однако

УДК 619:615.9:636.52/.58

Научная статья

DOI 10.25741/2413-287X-2023-11-4-211

АЛЕКСАНДР НИКОЛАЕВИЧ ШЕВЯКОВ, ¹
кандидат биологических наук, заведующий лабораторией биохимического анализа

НАДЕЖДА НИКОЛАЕВНА ГОГИНА, ²
кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник отдела физиологии и биохимии

ФНЦ «ВНИТИП», г. Сергиев Посад, Московская область

¹  alex.shevy@mail.ru

²  n.n.gogina@mail.ru

Поступила в редакцию: 06.11.2023

Одобрена после рецензирования: 07.11.2023

Принята в публикацию: 09.11.2023

Research article

DOI 10.25741/2413-287X-2023-11-4-211

ALEXANDER N. SHEVYAKOV, ¹
NADEZHDA N. GOGINA, ²

FSC ARRTPI RAS

¹  alex.shevy@mail.ru

²  n.n.gogina@mail.ru

Received by editor office: 06.11.2023

Accepted in revised: 07.11.2023

Accepted for publication: 09.11.2023

не всегда параметры метода проведения опытов будут одинаковыми. Так, при различных методах определения концентраций микотоксинов в рабочих растворах (ИФА, ТСХ, ВЖХ, ВЖХ-МС) химические (кислотность растворов, концентрация микотоксинов) и физические параметры (доля кормовой добавки в пробирке, время и температура инкубации растворов) приводят к несоответствию данных в подобных исследованиях [3]. Требуется разработка единого достоверного способа *in vitro*, позволяющего реально оценивать качество сорбента. Конечно, следует понимать, что результаты лабораторного эксперимента не всегда будут отражаться в условиях *in vivo*. Тем не менее специалисты на производстве, имея на руках результаты лабораторных исследований, смогут сделать выбор в пользу той или иной кормовой добавки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Цель настоящей работы — отработка параметров методики определения сорбционной емкости кормовых добавок по отношению к микотоксинам в опыте *in vitro* и разработка коэффициента их эффективности, который может быть использован для скрининга предлагаемых кормовых добавок для профилактики микотоксикозов.

Объектом исследований стали кормовые добавки для сорбции микотоксинов в кормах для сельскохозяйственных животных и птицы, а также уголь активированный как активный сорбент. Концентрация микотоксинов в рабочих растворах измерялась по методу ЖХ-МС/МС согласно ГОСТ 34140-2017 «Продукты пищевые, корма, продовольственное сырье» [4]. При исследованиях приме-

няли следующее оборудование: рН-метр-милливольтметр, весы лабораторные, автоматические дозаторы, орбитальный шейкер-инкубатор, центрифугу лабораторную (до 10 000 об/мин), магнитную мешалку, жидкостной хроматограф и масс-спектрометр, оснащенный источником электрической ионизации. Хроматографическое разделение смесей выполнено при температуре 25°C на колонке Gemini® C18 длиной 150 мм, диаметром 4,6 мм, диаметр частиц — 5 мкм. Использовались стандартные растворы микотоксинов с высокой степенью концентрации.

Кормовые добавки исследовали в четырех дозировках с параллельным «холостым» опытом. Рабочий раствор содержал микотоксины и не содержал кормовые добавки. Их вносили в количестве 0,05; 0,1; 0,2; 0,5% к объему рабочего раствора (10 см³), что соответствует 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 кг в 1 т комбикорма. Навески кормовых добавок помещали в полипропиленовые центрифужные пробирки объемом 50 мл. Для приготовления рабочих растворов использовали стандартные растворы микотоксинов с высокой концентрацией (производство Romer Labs®, Австрия), которые вносили в водный раствор соляной кислоты и перемешивали при помощи магнитной мешалки в течение 15 мин. Микотоксины в рабочих растворах применяли в двух концентрациях: одна была приближена к максимально допустимым уровням в зерне согласно ТР ТС 015/2011 «О безопасности зерна» [5] (концентрация 2), другая — составляла половину данных значений (концентрация 1). Затем к навескам добавляли рабочие растворы микотоксинов в объеме 10 мл при помощи автоматического дозатора. Пробирки помещали в орбитальный шейкер-

Таблица 1. Схема опыта по изучению сорбционной емкости кормовой добавки

Концентрация микотоксинов в рабочем растворе, соответствующая содержанию в корме, мкг/кг	Концентрация водородных ионов в растворе, ед. рН адсорбция/десорбция	Время инкубации для адсорбции/десорбции, мин	Норма ввода в рацион (кг/т) / навеска на 10 мл рабочего раствора (г)
<i>Концентрация 1</i>			
Афлатоксин В1 10,0 ± 1,50 Охратоксин А 25,0 ± 4,20 Фумонизин В1 500 ± 50 Т-2 токсин 50 ± 10 Дезоксиниваленол 500 ± 100 Зеараленон 500 ± 50	1,0–1,5/5,0–5,5	30/60	0,5/0,005
			1,0/0,01
			2,0/0,02
			5,0/0,05
		60/180	0,5/0,005
			1,0/0,01
			2,0/0,02
			5,0/0,05
<i>Концентрация 2</i>			
Афлатоксин В1 20,0 ± 3,50 Охратоксин А 50,0 ± 7,25 Фумонизин В1 1000 ± 100 Т-2 токсин 100 ± 20 Дезоксиниваленол 1000 ± 200 Зеараленон 1000 ± 100	2,5–3,0/6,5–7,4	30/60	0,5/0,005
			1,0/0,01
			2,0/0,02
			5,0/0,05
		60/180	0,5/0,005
			1,0/0,01
			2,0/0,02
			5,0/0,05

инкубатор при температуре $40 \pm 1^\circ\text{C}$ на 30 или 60 мин для имитации условий желудка. После центрифугирования (не менее 4000 об/мин) и отбора аликвоты для анализа кислая среда удалялась, а к осадку был добавлен натрий-фосфатный буферный раствор. Десорбцию микотоксинов проводили в течение 60 или 180 мин при температуре $40 \pm 1^\circ\text{C}$ и кислотности (рН), указанной в схеме опыта, что соответствует слабокислым/нейтральным или щелочным условиям тонкого отдела кишечника (табл. 1).

Способность кормовой добавки сорбировать микотоксины (сорбционная емкость) определяли по разности между адсорбцией и десорбцией микотоксинов и вычисляли по формуле:

$$CE = 100 \times \frac{(C - A) - D}{C},$$

где CE — сорбционная емкость, %;

C — концентрация микотоксина в исходном рабочем растворе, мкг/кг;

A — концентрация микотоксина в рабочем растворе после инкубации в среде, имитирующей условия желудка, — адсорбция, мкг/кг;

D — концентрация микотоксина в рабочем растворе после инкубации в среде, имитирующей условия кишечника, — десорбция, мкг/кг.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За период с 2020 по 2023 гг. мы исследовали более пятидесяти образцов различных по составу кормовых добавок. Для отработки параметров методики использовали кормовые добавки, нерастворимые в воде и обладающие сорбционной активностью к микотоксинам. При изучении влияния вариабельности параметров методики (кислотность растворов, концентрация микотоксинов, доля кормовой добавки, время инкубации) на сорбционную емкость кормовой добавки были проведены по 24 эксперимента для каждого из заявленных микотоксинов для одного объекта (кормовая добавка, уголь активированный). В таблице 2 представлены некоторые результаты исследований при инкубации растворов 60 мин при адсорбции и 180 мин при десорбции. При их обобщении установлено, что кислотность рабочего раствора (рН) влияет на способность кормовых добавок изменять концентрацию микотоксинов в нем. Отмечено увеличение сорбционной емкости кормовых добавок к микотоксинам от 18 до 40% при смещении рН в сторону уменьшения (кислая среда). Массовая доля кормовой добавки в рабочем растворе способна изменять концентрацию микотоксинов в рабочем растворе в прямо пропорциональной зависимости. С увеличением времени инкубации рабочего раствора незначительно (до 10%) возрастает сорбционная емкость. При повышении концентрации микотоксинов в рабочем растворе в два раза сорбционная емкость снижается в среднем на 12%, поэтому при постановке методики важно учитывать значение этой переменной. Также в методике важно учитывать

Таблица 2. Сорбционная емкость активированного угля и кормовой добавки при изменении кислотности растворов, концентрации микотоксинов, массы навески, %

Микотоксин	Сорбционная емкость															
	Активированный уголь								Кормовая добавка							
	рН 1,0–1,5/5,0–5,5				рН 2,5–3,0/6,5–7,4				рН 1,0–1,5/5,0–5,5				рН 2,5–3,0/6,5–7,4			
	Дозировка, кг/т корма								Дозировка, кг/т корма							
	0,5	1,0	2,0	5,0	0,5	1,0	2,0	5,0	0,5	1,0	2,0	5,0	0,5	1,0	2,0	5,0
<i>Концентрация 1</i>																
Афлатоксин В1	97	100	100	100	96	96	99	100	100	100	100	100	99	92	89	94
Охратоксин А	100	100	100	100	99	99	99	100	31	30	47	75	20	20	30	52
Фумонизин В1	100	100	100	100	93	98	100	100	25	40	69	98	26	39	65	98
Т-2 токсин	100	100	100	100	98	99	100	100	0	10	12	22	0	8	10	20
Дезоксиниваленол	97	99	99	100	93	94	95	97	0	0	0	2	0	0	0	0
Зеараленон	100	100	100	100	99	100	100	100	12	22	56	86	10	20	52	79
<i>Концентрация 2</i>																
Афлатоксин В1	96	100	100	100	90	90	96	100	100	100	100	100	99	95	93	90
Охратоксин А	98	99	100	100	99	99	100	100	15	33	52	77	15	20	25	62
Фумонизин В1	100	100	100	100	100	100	100	100	21	39	52	92	18	42	69	91
Т-2 токсин	78	79	80	99	70	85	89	99	0	10	12	20	0	8	10	12
Дезоксиниваленол	89	91	96	97	85	89	88	99	0	0	0	2	0	0	0	2
Зеараленон	100	100	100	100	99	99	99	100	10	18	56	78	10	19	50	68

отношение содержания микотоксина и кормовой добавки в рабочем растворе при интерпретации результатов исследования. Причем для каждого микотоксина концентрация должна быть приближена к условиям *in vivo*. Мы предлагаем использовать значения ПДК в зерне.

Таким образом, унифицированная методика определения сорбционной емкости кормовых добавок, предназначенных для профилактики микотоксикозов у сельскохозяйственной птицы, имеет особенности. Так, она требует применения растворов со следующим рН: кислая среда — 1,0–1,5 (адсорбция) и кислотно-нейтральная среда — 5,0–5,5 (десорбция), что соответствует условиям пищеварения в желудочно-кишечном тракте птицы. Измерение показателей необходимо проводить в четырех повторах с прямо пропорциональным увеличением содержания кормовой добавки в растворе. Только при наличии данных о прямо пропорциональном увеличении сорбционной емкости можно делать заключение о высокой достоверности результатов. Устанавливается динамика дозировок кормовой добавки — от 0,5 до 5,0 кг/т корма. Время инкубации для адсорбции составляет 30 мин, для десорбции — 60 мин. Концентрация микотоксинов в рабочих растворах должна быть приближена к предельно допустимым концентрациям в зерне.

Придерживаясь этих принципов, при проведении исследований и статистической обработки полученных сравнительных данных мы вывели формулу коэффициента эффективности (КЭ) кормовой добавки для оценки ее сорбционной способности по отношению к микотоксинам:

$$КЭ = \frac{a + 5t + 5d + 1,5f + 2z + 2o}{6},$$

где *a* — средняя сорбционная емкость в четырех дозировках к афлатоксину В1, %;

t — средняя сорбционная емкость в четырех дозировках к Т-2 токсину, %;

d — средняя сорбционная емкость в четырех дозировках к дезоксиниваленолу, %;

f — средняя сорбционная емкость в четырех дозировках к фумонизину В1, %;

z — средняя сорбционная емкость в четырех дозировках к зеараленону, %;

o — средняя сорбционная емкость в четырех дозировках к охратоксину А, %.

Вычисления проводят с точностью до первого десятичного знака, а окончательный результат испытания регистрируют в протоколе с округлением до целого числа.

Исходя из коэффициента эффективности определяют способности кормовой добавки для сельскохозяйственной птицы сорбировать микотоксины: слабоэффективная способность от 16 до 30, норма-эффективная — от 30 до 100, высокоэффективная — от 100 до 275.

Выводы

Унифицированная методика предоставит возможность получать более точные данные о сорбционной емкости кормовых добавок для птицы. Даже если исследования будут проведены с другими параметрами, то, используя приобретенные знания, можно будет прогнозировать активность адсорбентов к микотоксинам в условиях пищеварения у птицы. Однако следует помнить, что условия опыта *in vitro* не могут абсолютно соответствовать условиям *in vivo*. Использование коэффициента эффективности кормовых добавок позволит научно обоснованно проводить их скрининг. Учитывая, что в 98% комбикормов обычно содержатся три и более видов микотоксинов [6], данный комплексный подход к оценке сорбционной активности кормовых добавок по отношению к микотоксинам поможет производителям сельскохозяйственной продукции сделать правильный выбор препарата для борьбы с микотоксикозами с учетом соотношения цены/качества.

Литература

1. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety EFSA Journal Reference number of the call for proposal: CFP/EFSA/FEEDAP/2009/01. — DOI: 10.2903/sp.efsa.2009.EN-22.
2. Бердников, П. П. Изолированный секреторный желудочек у уток / П. П. Бердников // Физиологический журнал СССР им М.И. Сеченова. — 1986. — № 12. — С. 1696–1699.
3. Гогина, Н. Н. Методы оценки сорбционной емкости кормовых добавок *in vitro* (обзор) / Н. Н. Гогина // Птицеводство. — 2021. — № 12. — С. 20–23. — DOI: 10.33845/0033-3239-2021-70-12-20-23. — EDN IEUUYV.
4. ГОСТ 34140-2017. Метод определения микотоксинов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Food products, feed, food raw materials. Method for determination of mycotoxins by high performance liquid chromatography — mass spectrometry — Введ. 2018-07-01. — М.: Стандартинформ, 2017. — 20 с.
5. Технический регламент Таможенного Союза ТР ТС 015/2011 "О безопасности зерна" от 9 декабря 2011 г. № 874 ИС «Техэксперт: 6 поколение», 31 с.
6. Шевяков, А. Н. Микотоксины в кормах: лабораторные методы обнаружения, обзор полученных результатов / А. Н. Шевяков, Н. Н. Гогина, Л. М. Круглова, А. А. Грозина // Птицеводство. — 2019. — № 1. — С. 11–15. — DOI: 10.33845/0033-3239-2019-68-1-11-15. — EDN MSOBWH.

Literature

1. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety EFSA Journal Reference number of the call for proposal: CFP/EFSA/FEEDAP/2009/01. — DOI: 10.2903/sp.efsa.2009.EN-22.
2. Berdnikov, P. P. Isolated secretory ventricle in ducks / P.P. Berdnikov // Physiological Journal of the USSR named after M.I. Sechenov. — 1986. — № 12. — pp. 1696–1699.
3. Gogina, N. N. Methods of assessing the sorption capacity of feed additives *in vitro* (review) / N. N. Gogina // Poultry farming. — 2021. — № 12. — pp. 20–23. — DOI: 10.33845/0033-3239-2021-70-12-20-23. — EDN IEUUYV.
4. GOST 34140-2017. Method for determination of mycotoxins by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. Food products, feed, food raw materials. Method for determination of mycotoxins by high performance liquid chromatography — mass spectrometry. — Intro. 2018-07-01. — Moscow: Standardinform, 2017. — 20 p.
5. Technical Regulations of the Customs Union TR TS TS015/2011 "On the safety of grain" of December 9, 2011 № 874 IS "Teheksper: 6 generation", 31 p.
6. Shevyakov, A. N. Mycotoxins in feed: laboratory methods of detection, review of the results obtained / A. N. Shevyakov, N. N. Gogina, L. M. Kruglova, A. A. Grozina // Poultry farming. — 2019. — № 1. — pp. 11–15. — DOI: 10.33845/0033-3239-2019-68-1-11-15. — EDN MSOBWH. ■