

УДК 619:613.281:543.(544.51)

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ СВОБОДНЫХ ЛИПОФИЛЬНЫХ БИОТОКСИНОВ В МОЛЛЮСКАХ С ПОМОЩЬЮ ВЭЖХ-МС/МС

Владимир Владимирович Захарычев, к.х.н., доцент, zakharychev@inbox.ru

Бажена Олеговна Бревнова, студентка

Александр Владимирович Кузенков, к.х.н., доцент

Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева

Михаил Юрьевич Комарицких, токсиколог

Ольга Николаевна Трубникова, заведующая испытательной референс-лабораторией
ФГБУ "Национальный центр безопасности продукции водного промысла и аквакультуры"

В России отсутствуют подтвержденные на соответствие требованиям ЕС методики анализа содержания липофильных биотоксинов в моллюсках, что затрудняет их экспорт. В работе подобраны условия жидкостного обращено-фазового хроматографического разделения при использовании кислого буферного раствора в качестве подвижной фазы и параметры tandemного масс-спектрометрического детектирования для 9 липофильных биотоксинов: окадаиковой кислоты (OA), динофизистоксинов 1 и 2 (DTX1 и 2), пектенотоксина 2 (PTX2), ессотоксина (YTX), гомоессотоксина (homoYTX), азаспирацидов 1 – 3 (AZA1 – 3). Для OA, PTX2, YTX и AZA1 проведено трехдневное валидационное исследование 54 образцов устриц, гребешков и мидий в соответствии с критериями Решения Комиссии 657/2002/ЕС при концентрациях, равных 0,5; 1 и 1,5 допустимым уровням токсинов в тканях моллюсков. В исследованном диапазоне концентраций проявилась линейная зависимость отклика, восстановление составило 97 – 108 %, внутрилабораторная сходимость была ниже 8,5 % для всех аналитов. Значения предела решения составили 174 мкг/кг для OA, 170 мкг/кг для PTX2, 1083 мкг/кг для YTX, 170 мкг/кг для AZA1. По данным биотоксинам установлены пределы обнаружения и количественного определения, значения расширенной неопределенности измерений. Методика обладает высокой чувствительностью и достаточной селективностью для раздельного детектирования изомерных OA и DTX2. Показана ее пригодность для рутинного лабораторного анализа липофильных морских биотоксинов. **Ключевые слова:** азаспирациды, валидация, высокоэффективная жидкостная хроматография, динофизистоксины, ессотоксины, масс-спектрометрия, морские биотоксины, окадаиковая кислота, пектенотоксины, фикотоксины.

Development of HPLC-MS/MS method for the analysis of free lipophilic biotoxins in mollusks

V.V. Zakharychev, PhD in Chemistry, Assistant professor

B.O. Brevnova, Student

A.V. Kuzenkov, PhD in Chemistry, Assistant professor

D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia

M.Yu. Komaritskikh, Current

O.N. Trubnikova, Head of the laboratory

National Safety Centre for Fisheries and Aquaculture Products

There are no any valid methods in Russia for the determination of lipophilic biotoxins in molluscs compliant with the European Union regulations. The fact makes great hindrance for shellfish export. We have developed reverse-phase chromatographical conditions using acidic buffer as a mobile phase and tandem mass-spectrometric detection parameters for nine biotoxins: okadaic acid (OA), dinophys toxins 1 and 2 (DTX1 and 2), pectenotoxin 2 (PTX2), yessotoxin (YTX), homoyessotoxin (homoYTX), and azaspiracids 1 – 3 (AZA1 – 3). For OA, PTX2, YTX, AZA1 a 3-days validation procedure was performed using the Commission Decision 657/2002/EC as guideline with fifty four samples of tissues of oysters, mussels and scallops fortified with 0,5; 1; 1,5 times of the EU permitted limits of the biotoxins. Linear response in the investigated concentration range was observed; the recovery was within 97 – 108 %, the intermediate precision values were always lower than 8,5 %. The values of decision limit CC α amounted to 174 μ g/kg for OA, 170 μ g/kg for PTX2, 1083 μ g/kg for YTX, 170 μ g/kg for AZA1. The limits of detection and limits of quantitation for these four biotoxins were estimated, as well as expanded uncertainties in measurements. The procedure is highly sensitive and selective enough to determine isomeric OA and DTX2 separately. The suitability of procedure for routine analysis of lipophilic marine biotoxins was shown. **Key words:** azaspiracids, validation, dinophys toxins, high performance liquid chromatography, marine biotoxins, mass-spectrometry, okadaic acid, pectenotoxins, phycotoxins, yessotoxins.
DOI:10.30896/0042-4846.2019.22.7.56-61

Морские биотоксины синтезируются некоторыми микроводорослями. Они способны накапливаться в организме фильтрующих моллюсков (мидий, устриц, гребешков). Употребление в пищу контаминированных биотоксинами моллюсков

приводит к серьезным отравлениям, в ряде случаев завершающимся смертельным исходом.

В моллюсках обнаруживают паралитические (сакситоксин и его аналоги), амнестические (домоевая кислота и ее изомер-

ры), диарейные и азаспирацидные (AZA) токсины [18]. Последние 2 группы являются липофильными соединениями. К числу диарейных токсинов моллюсков относятся окадаиковая кислота (OA), ее изомеры и гомологи – динофизистоксины (DTX), а также отличающиеся по строению пектено-токсины (PTX) и ессотоксины (YTX).

В странах Евросоюза согласно Регламенту (ЕС) № 853/2004 [17] допустимый общий уровень содержания в 1 кг моллюсков и продуктов из них окадаиковой кислоты, динофизистоксинов и пектено-токсинов составляет 160 мкг эквивалентов окадаиковой кислоты, ессотоксинов – 1 мг эквивалентов ессотоксина, азаспирацидов – 160 мкг эквивалентов аза-спирацида. Регламент Комиссии (ЕУ) № 786/2013 [9] увеличил разрешенную предельно допустимую концентрацию ессотоксинов до 3,75 мг/кг эквивалентов ессотоксина. Согласно Регламенту Комиссии (ЕУ) № 15/2011 [8] контролю подлежат 13 липофильных биотоксинов: OA, DTX1, DTX2, DTX3, PTX1, PTX2, YTX, 45-OH-YTX, homoYTX, 45-OH-homoYTX, AZA1, AZA2, AZA3. Эквивалентность токсичности следует вычислять в соответствии с рекомендациями Европейского агентства по безопасности пищевых продуктов (EFSA) [6]. В России в соответствии с техническим регламентом ТР ЕАЭС 040/2016 [4] среди всех липофильных биотоксинов в моллюсках ограничено содержание только OA до уровня, не превышающего 160 мкг/кг.

Разработаны многочисленные методы обнаружения и анализа биотоксинов, включающие хроматографические, в т.ч. с химической дериватизацией, иммуноферментные и биопробы *in vivo* и *in vitro* [5]. В соответствии с Регламентом Комиссии (ЕС) № 2074/2005 [10] в странах ЕС официальным методом обнаружения биотоксинов остаются испытания на мышах или крысах [13]. К его недостаткам можно отнести значительную вариабельность результатов, низкий уровень детекции, ограниченную специфичность, а также неэтичность.

Поэтому в соответствии с Регламентом Комиссии (ЕУ) № 15/2011 [8] референтным подтверждающим методом для

официального контроля признана высоко-эффективная жидкостная хроматография с трехквадрупольным масс-анализатором (ВЭЖХ-МС/МС). Утвержденные в России стандарты определения OA [3] предусматривают применение исключительно скринингового иммуноферментного метода [2], обладающего высокой перекрестной чувствительностью к DTX.

При экспорте в страны ЕС отечественные производители и экспортеры сталкиваются с проблемой определения содержания необходимого спектра липофильных биотоксинов в моллюсках и продукции из них.

Цель работы – разработка и валидация методики одновременного определения липофильных биотоксинов в моллюсках.

Материалы и методы. Для ВЭЖХ использовали ацетонитрил (PanReac, Испания), метанол (J.T. Baker, Нидерланды), муравьиную кислоту (≥ 98 %; Fluka, Германия) и формиат аммония ($\geq 99,0$ %; Fluka, Германия). Деионизированную воду получали в системе Milli-Q (Millipore, США). Стандартами служили OA O9381-25UG (>95 %; Sigma-Aldrich, Германия) и сертифицированные аттестованные референтные образцы токсинов (NRC, Канада): CRM-AZA1 (1,24 мкг/мл), CRM-AZA2-b (1,22 мкг/мл), CRM-AZA3 (1,04 мкг/мл), CRM-DTX1-b (8,51 мкг/мл), CRM-DTX2-b (3,78 мкг/мл), CRM-PTX2 (8,60 мкг/мл), CRM-YTX (5,30 мкг/мл), CRM-hYTX (5,80 мкг/мл).

Анализы проводили с помощью жидкостного хромато-масс-спектрометра с тройным квадруполем Bruker EVOQ Qube (Германия). Для пробоподготовки применяли ножевую мельницу Knifetec 1095 (FOSS, Дания), встряхиватель Вортекс V3 (ELMI, Латвия), центрифугу Eppendorf 5810 R (Германия), одноканальные дозаторы Eppendorf Research Plus (Германия), шприцевые мембранные ПТФЭ фильтрующие насадки с размером пор 0,45 мкм OlimPeak (Teknokroma, Испания). Раковины моллюсков тщательно промывали проточной водой, затем в щель между створками вводили нож, перерезая мышцы-замыкатели. Приоткрыв одну из створок, внутренность промывали водой и отделяли ножом тело моллюска от дру-

гой створки. Навеску (100 г) моллюсков помещали на 5 мин на сито для стекания воды. Ткань перемалывали в мельнице. Навеску ($1,00 \pm 0,01$ г) гомогенизата переносили в центрифужную пробирку. При проведении валидационных исследований перед экстракцией к ней добавляли 1 мл одного из стандартных растворов смеси 4 токсинов в метаноле (ОА, РТХ2 и АЗА1 в концентрациях 80, 160 и 240 нг/мл, УТХ – 0,5; 1 и 1,5 мкг/мл) и тщательно перемешивали. К образцу вносили 4,5 мл метанола и гомогенизировали на вортексе в течение 3 мин на максимальной скорости. После центрифугирования при 4000 об/мин в течение 10 мин и 20 °С надосадочную жидкость переносили в мерную колбу объемом 10 мл. Повторяли экстракцию осадка 4,5 мл метанола. После центрифугирования при 4000 об/мин в течение 10 мин и 20 °С надосадочную жидкость отделяли, оба экстракта объединяли и доводили конечный объем до 10 мл метанолом. Полученный экстракт фильтровали через мембранный ПТФЭ фильтр и вводили в хроматографическую систему.

Для приготовления подвижной фазы А (5 мМ формиата аммония и 13,3 мМ муравьиной кислоты в воде) 0,315 г формиата аммония и 0,5 мл муравьиной кислоты растворяли в 1 л воды; а подвижной фазы В (90 % ацетонитрила, 10 % метанола с 5 мМ формиата аммония и 13,3 мМ муравьиной кислоты) – в смеси 100 мл метанола и 900 мл ацетонитрила.

Стандартные растворы готовили следующим образом. Образец ОА (25 мкг) растворяли в 3 мл метанола, получая исходный раствор с концентрацией 8,33 мкг/мл. Необходимое количество исходного раствора ОА и сертифицированных стандартных растворов других токсинов с известными концентрациями разводили метанолом, получая стандартные растворы для добавки к холостым образцам, содержащим 80; 160; 240 нг/мл ОА, РТХ2, АЗА1 и 0,5; 1,0; 1,5 мкг/мл УТХ, или холостым экстрактам моллюсков, получая серию матричных градуировочных растворов с концентрациями 2; 4; 8; 16; 24; 32 нг/мл ОА, РТХ2, АЗА1 и 12,5; 25;

50; 100; 150; 200 нг/мл УТХ, что соответствует содержанию аналитов в матрице 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 допустимого уровня (ДУ).

Хроматографическое разделение осуществляли в колонке с обращенно-фазовым сорбентом Acclaim 120 C18 (размер частиц 3 мкм; Thermo Fisher Scientific, США) длиной 50 мм и внутренним диаметром 2,1 мм при 40 °С, объемной скорости потока подвижной фазы 0,3 мл/мин, объеме вводимой пробы 20 мкл. Использовали режим градиентного элюирования: 0 мин 10 % фазы В, 4 – 6 мин 80 % фазы В, 6,5 – 9 мин 10 % фазы В.

Аналиты детектировали в условиях ионизации электроспреем с напряжением на капилляре 4000 В при положительной (ESI⁺) и 3000 В при отрицательной (ESI⁻) ионизации. Температура конуса и нагревателя осушающего газа составляла 200 и 300 °С. Энергию соударений оптимизировали для каждого токсина.

Результаты исследований и обсуждение. Для анализа липофильных морских биотоксинов в моллюсках имеется два основных варианта ВЭЖХ-МС: с кислотой [15] или щелочной [12] подвижной фазой. Поскольку в нашей лаборатории для рутинного анализа остатков и загрязнителей токсинов традиционно используют кислотную подвижную фазу, мы сосредоточились на разработке методики для тех же условий. Существует ЕС-гармонизированная стандартная операционная процедура для определения липофильных морских биотоксинов в моллюсках методом ВЭЖХ-МС/МС [14], но в ней не уточняются методы МС-детектирования. При этом результаты МС-анализа чрезвычайно чувствительны к методу МС-детектирования, используемому для количественного определения [16]. В зависимости от последнего содержание, например, окарбиновой кислоты, может увеличиваться на 42 % или уменьшаться на 40 % по сравнению с действительным значением. На результат также влияет количество регистрируемых МRM-переходов (и соответственно количество одновременно определяемых токсинов), а также марка ацетонитрила в составе подвижной фазы.

Таблица 1
Значения фактора эквивалентности
токсичности липофильных биотоксинов

Группа токсинов	Аналог	Фактор эквивалентности токсичности
ОА (эквиваленты ОА)	ОА	1
	DTX1	1
	DTX2	0,6
АЗА (эквиваленты АЗА)	АЗА1	1
	АЗА2	1,8
	АЗА3	1,4
УТХ (эквиваленты УТХ)	УТХ	1
	homoУТХ	1
	45-ОН-УТХ	1
	45-ОН-homoУТХ	0,5
РТХ (эквиваленты РТХ)	РТХ1	1
	РТХ2	1

Эти параметры не отражены в референтном методе [14]. Приведенный пример показывает, что метод может давать существенные ошибки при определении концентрации токсинов в образцах [16].

Поэтому в режиме сканирования ионов-продуктов мы самостоятельно подобрали по 2 перехода фрагментации для каждого токсина с наиболее интенсивными сигналами, а также оптимизировали значения энергии соударений (табл. 1), соответствующие каждому переходу, изменяя их от 10 до 70 В с шагом 5 В. Во

всех случаях сигнал первого перехода использовали для количественного определения аналитов. Несмотря на рекомендацию регистрировать ОА и ДТХ в режиме отрицательной ионизации [11, 14], мы не добились появления сигналов этих веществ при сканировании; ожидаемый характерный сигнал иона $[M-H]^-$ отсутствовал. Также при анализе на наличие ОА, ДТХ и РТХ в режиме положительной ионизации мы не детектировали ионов $[M+Na]^+$ и соответствующих им осколков, рекомендуемых для регистрации [11, 14]. Напротив, ионные переходы $[M+NH_4]^+ > [M+H-4H_2O]^+$ для ОА и ДТХ и $[M+NH_4]^+ > [M+H-2H_2O]^+$ для РТХ обладали наибольшей интенсивностью сигналов.

Поскольку изомерные ОА и ДТХ2 неразличимы для масс-спектрометрии, подобрали оптимальные условия для их хроматографического разделения (табл. 2).

Не все стандарты контролируемых в ЕС биотоксинов в настоящее время коммерчески доступны, хотя их ассортимент со временем расширяется. Поэтому гармонизированная в ЕС стандартная операционная процедура [14] предполагает допустимым считать факторы отклика для аналогичных токсинов одинаковыми и

Таблица 2
Условия детектирования, фрагментация ионов биотоксинов,
относительная интенсивность сигналов ($I_{отн.}$), время удерживания аналитов (τ)
и линейность калибровочных зависимостей (R^2)

Соединение	Режим ионизации	Энергия соударений	Ионы-предшественники, m/z	Дочерние ионы, m/z	$I_{отн.}, \%$	τ , мин	R^2
ОА	ESI ⁺	20	822,5 $[M+NH_4]^+$	733,5 $[M+H-4H_2O]^+$	100	4,51	0,995
	ESI ⁺	30	822,5	267,1	44		
ДТХ1	ESI ⁺	20	836,5 $[M+NH_4]^+$	747,2 $[M+H-4H_2O]^+$	100	5,18	0,998
	ESI ⁺	30	836,5	823,2	40		
ДТХ2	ESI ⁺	20	822,5 $[M+NH_4]^+$	733,5 $[M+H-4H_2O]^+$	100	4,70	0,995
	ESI ⁺	30	822,5	267,1	40		
РТХ2	ESI ⁺	20	876,6 $[M+NH_4]^+$	823,0 $[M+H-2H_2O]^+$	100	4,81	0,997
	ESI ⁺	20	876,6	805,0	55		
УТХ	ESI ⁻	30	1141,5 $[M-H]^-$	1061,3 $[M-SO_3H]^-$	100	4,90	0,998
	ESI ⁻	60	1141,5	855,5	30		
homoУТХ	ESI ⁻	30	1155,5 $[M-H]^-$	1075,5 $[M-SO_3H]^-$	100	4,86	>0,999
	ESI ⁻	60	1155,5	869,5	30		
АЗА1	ESI ⁺	30	842,5 $[M+H]^+$	824,5 $[M+H-H_2O]^+$	100	5,33	0,991
	ESI ⁺	40	842,5	806,5	15		
АЗА2	ESI ⁺	30	856,5 $[M+H]^+$	838,5 $[M+H-H_2O]^+$	100	5,53	0,997
	ESI ⁺	40	856,5	820,5	15		
АЗА3	ESI ⁺	30	828,5 $[M+H]^+$	810,5 $[M+H-H_2O]^+$	100	4,92	0,997
	ESI ⁺	40	828,5	792,5	15		

использовать ОА для не прямой количественной оценки содержания DTX1 и DTX2, PTX2 – для PTX1, AZA1 – для AZA2 и AZA3, YTX – для homoYTX, 45-OH-YTX и 45-OH-homoYTX. Предлагается использовать те же условия детектирования с регистрацией MRM-переходов для гомологичных или гидроксильированных ионов схожих токсинов.

Разработанную методику валидировали в соответствии с рекомендациями Решения Комиссии 2002/657/ЕС [7].

Для оценки специфичности метода исследовали 20 холостых образцов моллюсков, при этом на хроматограммах отсутствовали пики, интерферирующие с пиками аналитов.

С целью компенсации матричных эффектов калибровочные растворы стандартов готовили, используя холостой экстракт ткани моллюсков. Линейность калибровочной зависимости определяли по площади пиков аналитов на хроматограммах серии из 6 матричных градуировочных растворов с концентрациями 2; 4; 8; 16; 24; 32 мкг/мл ОА, PTX2 и AZA1 и 12,5; 25; 50; 100; 150; 200 мкг/мл YTX, что соответствует содержанию аналитов в матрице 0,125; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 ДУ. Все зависимости в исследованных диапазонах имели линейный характер с коэффициентами корреляции (R^2) от 0,991 до >0,999.

К гомогенату тканей моллюсков добавляли 0,5; 1,0 и 1,5 ДУ смеси ОА, AZA1, PTX2 и YTX. Брали по 6 образцов с каждой концентрацией этих токсинов. Эксперименты проводили в течение 3 дней с различными видами моллюсков: в 1-й день устрицы *Crassostrea gigas*, во 2-й день гребешки *Mizuhopecten yessoensis*, в 3-й день мидии *Mytilus edulis*, свободными от токсинов. Определяли восстановление аналитов и рассчитывали его выборочное стандартное отклонение (SD) (табл. 3). Диапазон восстановления составил 97 – 108 % с относительным стандартным отклонением (RSD) менее 8,5 % для всех токсинов. В соответствии с Решением Комиссии 657/2002/ЕС [7] для аналитов с концентрацией ≥ 10 мкг/кг восстановление должно находиться в пределах 80 – 110 %, а внутрилабораторный коэффици-

Таблица 3
Суммарные значения восстановления ОА, PTX2, YTX и AZA1 из моллюсков с добавлением аналитов (n=18)

Соединение	Уровень добавки, мкг/кг	Восстановление, %	SD, %	RSD, %
ОА	80	108	9,7	8,5
	160	102	6,5	6,3
	240	102	5,9	5,7
PTX2	80	108	7,2	6,7
	160	105	5,1	4,9
	240	97	7,4	7,7
YTX	500	105	8,6	8,2
	1000	105	6,4	6,0
	1500	102	7,3	7,2
AZA1	80	104	8,7	8,4
	160	100	5,2	5,2
	240	100	4,5	4,5

ент вариации, рассчитанный по уравнению Хорвитца [7], не может превышать 16 % для 1000 и 21 % для 160 мкг/кг аналита.

Предел разрешения ($CC\alpha$) для вероятности ошибки $\alpha=5$ % (табл. 4) рассчитали по уравнению: $CC\alpha = ДУ + 1,64SD$, где 1,64 – одностороннее t-значение для $P=0,05$. Если концентрация токсина в образце равна или превышает $CC\alpha$, то с вероятностью $1 - \alpha$, т.е. 95 %, можно считать значение ДУ повышенным, а образец несоответствующим нормативным требованиям.

Для ОА, PTX2, DTX2 и AZA1 рассчитали значения расширенной неопределенности (U) при коэффициенте охвата $k=2$ для концентраций, соответствующих ДУ, согласно руководству ИСО/МЭК 98-3:2008 [1] с учетом неопределенностей концентраций стандартных растворов аналитов, указанных в сертификатах. Это

Таблица 4
Значения ДУ, пределов решения, обнаружения, количественного определения и расширенной неопределенности для ОА, PTX2, YTX и AZA1

Соединение	ДУ, мкг/кг	Предел решения, мкг/кг	Предел обнаружения, пг/мкл	Предел количественного определения, пг/мкл	Расширенная неопределенность, %
ОА	160	174	0,62	2,06	10
PTX2	160	170	0,05	0,17	20
YTX	1000*	1083	1,85	6,15	20
AZA1	160	170	0,03	0,09	20

*В 2013 г. значение увеличено до 3750 мкг/кг [9].

следует учитывать при изменении серии стандарта. Также в области элюирования анализов измерили значение сигнала шума (N) холостых образцов и определили пределы обнаружения и количественного определения токсинов соответственно как 3N и 10N (см. таблицу 4). Наименьшее значение предела обнаружения (0,03 пг/мкл, что соответствует его содержанию 0,3 мкг/кг пробы) получили для AZA1, наибольшее (1,85 пг/мкл, эквивалентное 18,5 мкг/кг пробы) – для УТХ.

Заключение. Разработана методика одновременного совместного определения липофильных биотоксинов в моллюсках. Подобраны хроматографические условия, позволяющие селективно выявлять изомерные токсины ОА и ДТХ2. Для ОА, РТХ2, УТХ и AZA1 проведена валидация в соответствии с требованиями Решения Комиссии 657/2002/ЕС. Показано, что селективность, степень извлечения (97 – 108 %), внутрилабораторная сходимость (<8,5 %) и линейность ($R^2 > 0,98$) в диапазоне исследованных концентраций (2 – 32 мкг/мл ОА, РТХ2 и AZA1, 12,5 – 200 мкг/мл УТХ) соответствуют валидационным критериям Решения 657/2002/ЕС. Установлены пределы решения, обнаружения и количественного определения, рассчитаны значения расширенной неопределенности.

ЛИТЕРАТУРА

1. ГОСТ Р 54500.3 – 2011. Руководство ИСО/МЭК 98-3:2008. Неопределенность измерения. Часть 3. Руководство по выражению неопределенности измерения. М.: Стандартинформ, 2012; 109 с.
2. МР 01.016 – 07. Методические рекомендации. Экспресс-определение окадаиковой кислоты в моллюсках с помощью тест-системы DSP-Check производства фирмы Parapharm Laboratories Co., Ltd, Япония.
3. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 29 августа 2017 г. № 106 "О перечне стандартов, в результате применения которых на добровольной основе обеспечивается соблюдение требований технического регламента Евразийского экономического союза "О безопасности рыбы и рыбной продукции" (ТР ЕАЭС 040/2016), и перечне стандартов, содержащих правила и методы исследований (испытаний) и измерений, в том числе правила отбора образцов, необходимые для применения и исполнения требований технического регламента Евразийского экономического союза "О безопасности рыбы и рыбной продукции" (ТР ЕАЭС 040/2016) и осуществления оценки соответствия объектов технического регулирования".

4. Технический Регламент Евразийского экономического союза "О безопасности рыбы и рыбной продукции" (ТР ЕАЭС 040/2016).
5. Anonymous. Marine biotoxins. FAO Food and Nutrition Paper, 80. Rome: FAO Publ. 2004; 278 p.
6. Anonymous. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Marine Biotoxins in Shellfish – Summary on regulated marine biotoxins. The EFSA Journal. 2009; 1306:1 – 23.
7. Commission Decision 657/2002/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results.
8. Commission Regulation (EU) No 15/2011 of 10 January 2011 amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards recognized testing methods for detecting marine biotoxins in live bivalve molluscs.
9. Commission Regulation (EU) No 786/2013 of 16 August 2013 amending Annex III to Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council as regards the permitted limits of yessotoxins in live bivalve molluscs.
10. Commission Regulation (EC) № 2074/2005 of 5 December 2005 laying down implementing measures for certain products under Regulation (EC) № 853/2004 of the European Parliament and of the Council and for the organisation of official controls under Regulation (EC) № 854/2004 of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) № 882/2004 of the European Parliament and of the Council, derogating from Regulation (EC) № 852/2004 of the European Parliament and of the Council and amending Regulations (EC) № 853/2004 and (EC) № 854/2004.
11. Gerssen A., Mulder P., van Rhijn H., de Boer J. Mass spectrometric analysis of the marine lipophilic biotoxins pectenotoxin-2 and okadaic acid by four different types of mass spectrometers. J. Mass Spectrometry. 2008; 43(8):1140 – 1147.
12. Gerssen A., Mulder P.P., McElhinney M.A., de Boer J. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions. J. Chromatography A. 2009; 1216(9):1421 – 1430.
13. EU Harmonized Standard Operating Procedure for detection of Lipophilic toxins by Mouse Bioassay. Version 5, June 2009. Vigo: CRLMB. 2009; 14 p.
14. EU-Harmonized Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS. Version 5. Vigo: EU-RL-MB, AESAN. 2015; 33 p.
15. McNabb P., Selwood A.I., Holland P.T. et al. Multiresidue method for determination of algal toxins in shellfish: single laboratory validation and interlaboratory study. J. AOAC Int. 2005; 88(3):761 – 772.
16. Otero P., Alfonso C. Analysis of marine toxins: gaps on food safety control of marine toxins. In: Botana L.M., Alfonso A. (Ed.). Phycotoxins: chemistry and biochemistry, 2nd ed. Chichester: John Wiley and Sons, 2015; 1 – 22.
17. Regulation (EC) № 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin.
18. Yasumoto T. Historic considerations regarding seafood safety. In: Botana L.M. (Ed.). Seafood and freshwater toxins. Pharmacology, physiology, and detection. New York, Basel: Marcel Dekker Inc. 2000; 1 – 17.