

**СЪВРЕМЕННИ АНАЛИТИЧНИ МЕТОДИ ЗА КОНТРОЛ НА МИКОТОКСИНИ
В СУРОВИНИ И ХРАНИ: ОБЗОР**
**MODERN ANALYTICAL METHODS FOR CONTROL OF MYCOTOXINS IN RAW
MATERIALS AND FOODS: A REVIEW**

Милена Цанова^{1*}, Тончо Динев¹, Георги Беев¹, Татяна Далидович²

¹ *Катедра „Биохимия, Микробиология и Физика“, Аграрен факултет, Тракийски
Университет, Студентски град, гр. Стара Загора*

² *Студент специалност Екология, Бакалавър, Аграрен факултет, Тракийски
Университет, Студентски град, гр. Стара Загора*

e-mail: mtzanova@abv.bg

Milena Tzanova^{1*}, Toncho Dinev¹, Georgi Beev¹, Tatiana Dalidovich²

¹ *Department of Biochemistry, Microbiology and Physic, Faculty of Agriculture, Trakia
University, Studentski grad Str., 6000 Stara Zagora, Bulgaria*

² *Student, Ecology, Bachelor, Faculty of Agriculture, Trakia University, Studentski grad Str.,
6000 Stara Zagora, Bulgaria*

e-mail: mtzanova@abv.bg

Резюме

Днес замърсяването с плесени и микотоксини се смята за един от най-важните фактори, определящ безопасността на фуражите и хранителните продукти за консуматора. Тяхното съдържание е в много ниски концентрации. Това определя някои изисквания към аналитичните методи за тяхното определяне: Те трябва да се отличават с високи специфичност, чувствителност и аналитичен добив. Основно приложение намират високоефективна течна хроматография (HPLC), мас спектрометрията и ензим-свързан имуно-сорбентен анализ (ELISA). Всеки един от тези методи има своите предимства и ограничения. Този обзор систематично разглежда прилаганите съвременни методи.

Abstract

Nowadays contamination with molds and mycotoxins is considered to be one of the most important factors determining the feed and food products safety for the consumers. They are contained in very low concentrations. This sets out certain requirements for the analytical methods for their determination: high specificity, sensitivity and recovery. Mainly used methods are high performance liquid chromatography (HPLC), mass spectrometry and enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA). Each of these methods has advantages and deficiencies. In this review are systematically discussed already used modern methods.

Увод

Една от най-важните цели на аграрното производство в целия свят е производството на храни и фуражи с високо качество. През последните години интересът на обществото и на специалистите беше фокусиран върху риска от замърсяване на растителната и животинска продукция с токсични вещества от различен произход включително и микотоксини. Те са продукт на гъбната микрофлора, съпътстваща редица селскостопански продукти в процеса на тяхното производство и съхранение. Днес замърсяването с плесени и микотоксини се смята за един от най-важните фактори, определящ безопасността на фуражите и хранителните продукти за консуматора. Европейското законодателство е безкомпромисно по отношение на безопасността на храните (Регламент 178/2002/ЕО): производителите и търговците на храни и фуражи се задължават да предприемат незабавни мерки и да осигурят тяхното съответствие с критериите описани в Регламент 2073/2005/ЕО. Ето защо системният и

всеобхватен мониторинг на микотоксините за защита на потребителите е особено голямо предизвикателство, поради все по-бързо нарастващото производство на хранителни продукти. В тази връзка, избраният метод за анализ трябва да се определя на базата на подходящи критерии като точност, приложимост, граница на откриваемост, граница на количествено определяне, повторяемост, възпроизводимост, аналитичен добив, селективност, линейност, чувствителност и неопределеност на измерването. Освен това към новосъздаваните методи и техники за анализ се отправят и допълнителни изисквания, включващи: икономичност, бързина и ефикасност, съчетани с възможност за автоматизация.

Афлатоксин М1 (AFM1)

Афлатоксинът М1 (AFM1) е метаболит на AFB1 и е се среща в продукти от животински произход. Много строг е контролът на детските храни. През последните години най-високи нива на AFM1 са открити в проби от страни от Южна Азия, следвани от африканските страни. Наличието на AFM1 в мляко и млечни продукти от Европа е сравнително ниска поради строгите правила за тези токсини (Iqbal et al, 2015). Като основна аналитична технология в мониторинговите изследвания за AFM1 в мляко и млечни продукти остава ELISA, последван от HPLC, тънкослойна хроматография (TLC) и флуориметрията (Shephard et al, 2012). Хроматографските методи се отличават с много ниски граници на откриване и висок аналитичен добив. Тънкослойна хроматография се използва най-рядко. Най-ефективни се оказват HPLC-MS/MS методите, които могат да се прилагат за едновременно определяне на няколко микотоксина и не изискват дълга проботготовка. Сравними по чувствителност са ултра-чувствителните ELISA тестове за определяне AFM1 в мляко и млечни продукти за кърмачета, за които има специални изисквания по отношение на нивото на замърсяване (Guan et al, 2011; Kanungo et al, 2011). Ниската граница на откриване (0.003- 0,005 µg/kg) и високият аналитичен добив (около 100%) се дължат отчасти на използването на чувствителни магнитни наночастици, които увеличават реактивната повърхност.

Афлатоксини (AFB1, AFB2, AFG1 и AFG2)

Най-широко приложение за определяне на AFB1, AFB2, AFG1 и AFG2 намират автоматизирания хроматографски техники. Въпреки бързия напредък в LC-MS методите за определяне на афлатоксини се налагат HPLC-FLD методи със следколонна фотохимична UV дериватизация, например в зехтин, фъстъчено и сусамово масло (Bao et al., 2010). Подобна техника е приложима и при определяне на афлатоксини едновременно с други микотоксини (Brera et al, 2011; Soleimany et al, 2011). Santini et al (2010) описват метод за анализ на четирите основни афлатоксина и техни метаболити в бозайници.

На база на имунологичните методи са одобрени две търговски системи от AOAC – ELISA тест кит за определяне на афлатоксини в царевича и имуноафинитетни колони (IAC) за определяне на афлатоксини във фъстъци и царевича чрез HPLC или флуорометър (Lupo et al, 2011). Разработени са алтернативни биосензорни методи – пиезоелектрични (Spinella et al, 2013), оптични (Szekacs et al, 2009) и електрохимични (Välilmaa et al, 2010).

Фумонизими

Фумонизимите се характеризират с липса на добър хромофорен ефект. Поради това, хроматографските методи за откриването им като цяло разчитат на използването на маспектрометрия или дериватизация и детекция чрез флуорисцентен или UV детектор. Успешно се използват флуорисцентни маркери, напр. о-фталов алдехид

(Soleimany et al, 2011). Комбинирането на флуорисцентен с фотодиоден детектор (PDA) позволява извършването на мултимикотоксинен анализ. От новите аналитични методи за анализ на фумонизини в зърнени проби, брашно от маниока, месо, чай, билкови настойки, пиперки и бира, най-широко приложение намират LC-MS и HPLC-MS/MS (Ediage et al, 2011). Резултатите получени по двата метода- LC-MS или HPLC-MS/MS са абсолютно сравними и заменими, което е доказано при едно мащабно междулабораторно сравнение между 12 лаборатории (Senyuva et al., 2010). Развитие бележат и имунологичните методи като ELISA и поточната детекция (Kadir & Tothill, 2010).

Охратоксини

HPLC показва добра точност и аналитичен добив, докато ELISA като цяло занижава съдържанието на охратоксин А (ОТА). Remiro et al (2010) валидират HPLC-метод с IAC пречистване за едновременно откриване на ОТА и неговите аналози-охратоксин Б (ОТВ), охратоксин С (ОТС) и метил ОТА в червено вино. Reiter et al (2011), представят нов HPLC-FLD метод с електрохимична клетка за анализ на ОТА в зърнени култури, при който се използва имунна ултрафилтрация за пречистване при пробоподготовката. При използването на имунната ултрафилтрация (неимобилизирани антитела) и електрохимична клетка се елиминира матричният ефект при окисление. Yu et al (2011) сравняват пряк конкурентен хемилуминисцентен ELISA тест с конвенционален колориметричен ELISA тест за анализ на 21 различни селскостопански стоки, при което установяват по-добри показатели при първия подход. Разработването и валидирането на мултитоксинни аналитични процедури, вкл. ОТА привличат вниманието на редица изследователски групи. Vreza et al (2011) валидират HPLC-FLD метод за афлатоксини и ОТА в детските храни и в червен пипер. Frenich et al (2011) разработват UHPLC-MS / MS за афлатоксини, ОТА, цитринин, ВЕА и ениатини А, А1 и В1 в яйца в комбинация с QuEChERS-екстракционна процедура. HPLC-MS/MS-метод с фото йонизация е представен от Capriotti et al (2010) за афлатоксини, ОТА, ZEA и DON в зърнени култури. Повечето мулти-токсинни методи показват сравними резултати и са приложими за рутинен анализ.

Трихотецени

Описани са няколко метода за определяне на Т-2 на базата на традиционната хроматография, имунологични тестове и мас-спектроскопия. Meneely et al (2011) описват в обзорна статия тенденциите в аналитичните методи за определяне на някои микотоксини, а именно Т-2, НТ-2 и DON в зърнени храни и продукти. HPLC с различни детектори продължават да бъдат широко използвани и описвани в литературата, от които най-често е UV или UV-DAD (за DON) и флуоресценция (за Т-2 и НТ-2). Методът LC-DAD за определяне на Т-2 и НТ-2 в култури от *Fusarium langsethiae* в овесени храни и други *in vitro* средства, се описват от Medina et al (2010). Trucksess et al (2010) публикуват метод за DON в някои основни пшенични хранителни продукти, включително хляб, зърнени закуски, макаронени изделия, солети и бисквити. Пробите се екстрахираха с вода, съдържаща 5% полиетилен гликол и се пречистват чрез IAC. Soleimany et al (2011) използват обратно-фазова HPLC-PDA и HPLC-FL и след колоната дериватизация за едновременно определяне на 12 микотоксина. Микотоксините са определени чрез двата детектора, а трихотецетените са открити чрез PDA. Това е добра новина за лабораториите, които нямат достъп до MS техника.

Най-използван е HPLC-MS/MS-метод (Ediage et al, 2011; Skrbic et al, 2011). Той е приложим за едновременно определяне на няколко микотоксина само чрез предварителна еднократна екстракция без SPE-пречистване. Romagnoli et al (2010)

определят количествено едновременно DON, ZEA, T-2 и HT-2 в храни чрез използване на нова мулти-микотоксична IAC, налична вече на пазара (DZT MS-PREP[®] произведено от R-Биофарм, Darmstadt, Германия). Авторите изтъкват предимствата от комбинирането на IAC и HPLC-MS/MS, като ефективност за отстраняване на матрично пречене, чисти хроматограми, висока селективност, ниски LOD и разделяне на широка гама от молекули с различни физико-химични свойства с еднократно инжектиране. Jin et al (2010) описват метод UHPLC-MS/MS за едновременно определяне на 10 микотоксини в зърнени култури: DON, 3-ацетил-DON, 15-ацетил-DON, NIV, fusarenon X, moniliformin, ZEA, ZAN, OTA и OTB. Точното определяне се постига чрез използване на търговска ¹³C₁₅-DON като вътрешен стандарт, който компенсира загубите и отстранява матричните ефекти. Vendl et al (2010) съобщават за анализ на DON, ZEA, DON-3-Glc, 3-ацетил-DON, ZEA-4-глюкозид, α-zearalenol (А-зол), β-zearalenol (β-зол), α-zearalenol-4-глюкозид, β-zearalenol-4-глюкозид и зearаленон-4-сулфат в 84 зърнени проби чрез използване на HPLC-MS/MS. HILIC-HPLC-MS/MS е бил използван от Beyer et al (2010), за да се измери DON и DON-сулфонат, които се получават след обработка на замърсени храни с натриев бисулфит.

Зеараленон

Най-често използваните методи за определяне на ZEA едновременно с редица други микотоксини са HPLC-MS/MS и UHPLC-MS/MS (Han et al, 2011; Ediage et al, 2011). Desmarchelier et al (2010) разработват два различни начина за пречистване - QuEChERS и ASE и определят 17 микотоксина в зърнени стоки, включително ZEA. Използват троен квадруполен MS в положителен ESI режим за всички микотоксини, с изключение на ZEA, чийто заряд се неутрализира в отреденото му време на задържане. Два LC-ESI-MS/MS-метода за мултитоксинни анализи на DON, T-2, HT-2 и ZEA в зърнени закуски и бебешки храни са предложени от Romagnoli et al (2010). Zachariasova et al (2010), разработват метод за контрол на 32 микотоксини в бира. След утаяване на протеините с ацетонитрил, измерването се извършва чрез UHPLC-ESI-MS с орбитален филтър в два полярни режима при два последователни хроматографски етапа. Като вътрешен стандарт се използва ¹³C₁₈-ZEA. В сравнение с HPLC-MS/MS обхватът на анализираните вещества чрез HPLC-FLD е ограничен. Въпреки това чувствителността и селективността на двата метода е сравнима. Trucksess et al (2011) разработват и валидират метод за количествено определяне на ZEA в диетични добавки, соя, зърнени храни и различни зърнени продукти след IAC пречистване. Soleimany et al. (2011) въвеждат HPLC-UV-FLD-метод и използват фотохимичен реактор за повишаване на откриването и следколонната дериватизация за едновременно откриване на 12 микотоксини (ZEA заедно с афлатоксини, OTA, DON, фумонизимите T-2 и HT-2) в зърнени култури след IAC пречистване. Wu et al (2011) използват HPLC свързан с изпарителен детектор за разсейване на светлината за определяне на ZEA в ечемик след QuEChERS пречистване. Последователно имуноното взаимодействие (използвайки конкурентните условия на ELISA) и ензимна реакция с пероксидаза от хрян (HRP) се извършва върху микрочип. Получените аналитичните добиви са 101-103%, а времето за анализ е около 15 минути. Zhang et al (2011) разработват имуноанализ със забавена във времето флуоресценция за едновременна детекция на ZEA и DON. Вместо флуоресцентни багрила са използвани белязани антители със самарий и европий.

Извод

В последните години са разработени модерни високотехнологични методи за мониторинг на микотоксини в храни и фуражи с много висока чувствителност, отличаващи се с високи аналитични добиви и отговарящи на изискванията,

регламентирани в европейското законодателство. Това са хроматографски, флуориметрични и имунологични методи. HPLC се оказва приложима за едновременно определяне на няколко микотоксина и често включва предварително IAC пречистване и следколонна дериватизация. Универсално приложим като мултитоксинен метод обаче се оказва HPLC с масдетектор в тандем с маспегрометрията. Добра алтернатива за рутинни анализи, извършвани и на място са имунохимичните методи, които също се отличават с висока специфичост и чувствителност, но имат и някои предимства: бързи за изпълнение и не изискват скъпо оборудване и висококвалифициран персонал.

Литература

- Регламент № 178/2002 на Европейския парламент и на съвета от 28.01.2002г. за установяване на общите принципи и изисквания на законодателството в областта на храните, за създаване на Европейски орган за безопасност на храните и за определяне на процедури относно безопасността на храните, <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/BG/TXT/?uri=celex%3A32002R0178>
- Регламент № 2073/2005 на комисията от 15 ноември 2005 година относно микробиологични критерии за храните, <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/BG/TXT/?uri=CELEX:32005R207>
- Bao, L., Trucksess, M.W. and White, K.D., 2010. Determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in olive oil, peanut, and sesame oil. *Journal of AOAC International* 93: 936-942.
- Beyer, M., Danicke, S., Rohweder, D. and Humpf, H.U., 2010. Determination of deoxynivalenol-sulfonate (DONs) in cereals by hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Mycotoxin Research* 26: 109-117.
- Brera, C., Debegnach, F., De Santis, B., Pannunzi, E., Prantera, E., Gregori, E. and Miraglia, M., 2011. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods and paprika by HPLC with fluorescence detection: a single-laboratory validation study. *Talanta* 83: 1442-1446.
- Capriotti, A.L., Foglia, P., Gubbiotti, R., Rocchia, C., Samperi, R. and Lagana, A., 2010. Development and validation of a liquid chromatography/atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometric method for the analysis of mycotoxins subjected to Commission Regulation (EC) No 1881/2006 in cereals. *Journal of Chromatography A* 1217: 6044-6051.
- Desmarchelier, A., Oberson, J.M., Tella, P., Gremaud, E., Seefelder, W. and Mottier, P., 2010. Development and comparison of two multiresidue methods for the analysis of 17 mycotoxins in cereals by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 7510-7519.
- Ediage, E.N., Di Mavungu, J.D., Monbaliu, S., Van Peteghem, C. and De Saeger, S., 2011. A validated multianalyte LC-MS/MS method for quantification of 25 mycotoxins in cassava flour, peanut cake and maize samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 5173-5180.
- Frenich, A.G., Romero-Gonzalez, R., Gomez-Perez, M.L. and Vidal, J.L.M., 2011. Multi-mycotoxin analysis in eggs using a QuEChERS-based extraction procedure and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218: 4349-4356.
- Guan, D., Li, P., Zhang, Q., Zhang, W., Zhang, D. and Jiang, J., 2011. An ultra-sensitive monoclonal antibody-based competitive enzyme immunoassay for aflatoxin M₁ in milk and infant milk products. *Food Chemistry* 125: 1359-1364.
- Han, Z., Ren, Y., Zhou, H., Luan, L., Cai, Z. and Wu, Y., 2011. A rapid method for simultaneous determination of zearalenone, α -zearalenol, β -zearalenol, zearalanone, α -zearalanol and β -zearalanol in traditional Chinese medicines by ultra-high-performance

- liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 879: 411-420.
- Iqbal, S.Z., Jinap, S., Pirouz, A.A. and Ahmad Faizal, A.R., 2015, Aflatoxin M₁ in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review, *Trends in Food Science & Technology*, 46, 110-119
- Jin, P.G., Han, Z., Cai, Z.X., Wu, Y.J. and Ren, Y.P., 2010. Simultaneous determination of 10 mycotoxins in grain by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using ¹³C₁₅-deoxynivalenol as internal standard. *Food Additives and Contaminants Part A* 27: 1701-1713.
- Kadir, M.K.A. and Tothill, I.E., 2010. Development of an electrochemical immunosensor for fumonisins detection in foods. *Toxins* 2: 382-398.
- Kanungo, L., Pal, S. and Bhand, S., 2011. Miniaturised hybrid immunoassay for high sensitivity analysis of aflatoxin M₁ in milk. *Biosensors and Bioelectronics* 26: 2601-2606.
- Lupo, A., Quain, A., Fitzsimmons, A. and Allan, A., 2011. Validation study of immunoaffinity column chromatography coupled with solution fluorometry or HPLC for the detection of aflatoxin in peanuts and corn. *Journal of AOAC International* 94: 572-588.
- Medina, A., Valle-Algarra, F.M., Jimenez, M. and Magan, N., 2010. Different sample treatment approaches for the analysis of T-2 and HT-2 toxins from oats-based media. *Journal of Chromatography B* 878: 2145-2149.
- Meneely, J.P., Ricci, F., Van Egmond, H.P. and Elliot, C.T., 2011. Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. *Trends in Analytical Chemistry* 30: 192-203.
- Reiter, E.V., Cichna-Markl, M., Chung, D.-H., Shim, W.-B., Zentek, J. and Razzazi-Fazeli, E., 2011. Determination of ochratoxin A in grains by immuno-ultrafiltration and HPLC-fluorescence detection after postcolumn derivatisation in an electrochemical cell. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400: 2615-2622.
- Remiro, R., Ibáñez-Vea, M., González-Peñas, E. and Lizarraga, E., 2010. Validation of a liquid chromatography method for the simultaneous quantification of ochratoxin A and its analogues in red wines. *Journal of Chromatography A* 1217: 8249-8256.
- Romagnoli, B., Ferrari, M. and Bergamini, C., 2010. Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in breakfast cereals and baby food by HPLC and tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 45: 1075-1080.
- Santini, A., Ferracane, R., Meca, G. and Ritieni, A., 2010. Comparison and improvement of the existing methods for the determination of aflatoxins in human serum by LC-MS/MS. *Analytical Methods* 2: 884-889.
- Senyuva, H., Gilbert, J. and Stroka, J., 2010. Determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn by LC/MS with immunoaffinity column cleanup: interlaboratory study. *Journal of AOAC International* 93: 611-621.
- Shephard, G.S., Berthiller, F., Burdaspal, P., Crews, C., Jonker, M.A., Krska, R., MacDonald, S., Malone, B., Maragos, C., Sabino, M., Solfrizzo, M., Van Egmond, H.P. and Whitaker, T.B., 2012. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2010-2011. *World Mycotoxin Journal*, 5(1): 3-30.
- Skrbic, B., Malachova, A., Zivancev, J., Veprikova, Z. and Hajslova, J., 2011. *Fusarium* mycotoxins in wheat samples harvested in Serbia: a preliminary survey. *Food Control* 22: 1261-1267.
- Soleimany, F., Jinap, S., Rahmani, A. and Khatib, A., 2011. Simultaneous detection of 12 mycotoxins in cereals using RP-HPLC-PDA-FLD with PHRED and a post-column derivatization system. *Food Additives and Contaminants Part A* 28: 494-501.
- Spinella, K., Mosiello, L., Palleschi, G. and Vitali, F., 2013, Development of a qcm (quartz

- crystal microbalance) biosensor to the detection of aflatoxin b1, *Open Journal of Applied Biosensor*, 2(4), 112–119.
- Szekacs, A., Adanyi, N., Szekacs, I., Majer-Baranyi, K. and Szendro, I. 2009, Optical waveguide light-mode spectroscopy immunosensors for environmental monitoring, *Applied Optics*, 48, (4), B151–B158.
- Trucksess, M.W., Bao, L., Weaver, C.M. and White, K.D., 2010. Determination of deoxynivalenol in processed foods. *Journal of AOAC International* 93: 1236-1242.
- Trucksess, M.W., Fu, W.-S., Oles, C.J. and White, K.D., 2011. Determination of zearalenone in botanical dietary supplements, soybeans, grains, and grain products by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography: single-laboratory validation. *Journal of AOAC International* 94: 589-595.
- Välímáa, A.-L., Kivisto, A.T., Leskinen, P.I. and Karp, M.T., 2010, A novel biosensor for the detection of zearalenone family mycotoxins in milk, *Journal of Microbiological Methods*, 80(1), 44–48.
- Vendl, O., Crews, C., MacDonald, S., Krska, R. and Berthiller, F., 2010. Occurrence of free and conjugated *Fusarium* mycotoxins in cereal-based food. *Food Additives and Contaminants Part A* 27: 1148-1152.
- Wu, J., Zhao, R., Chen, B. and Yang, M., 2011. Determination of zearalenone in barley by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection and natural occurrence of zearalenone in functional food. *Food Chemistry* 126: 1508-1511.
- Yu, F., Vdovenko, M.M., Wang, J. and Sakharov, S., 2011. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assays with chemiluminescent and colorimetric detection for the determination of ochratoxin A in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 809-813.
- Zachariasova, M., Cajka, T., Godula, M., Malachova, A., Veprikova, Z. and Hajslova, J., 2010. Analysis of multiple mycotoxins in beer employing ultra-high-resolution mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24: 3357-3367.
- Zhang, J., Gao, L., Zhou, B., Zhu, L., Zhang, Y. and Huang, B., 2011. Simultaneous detection of deoxynivalenol and zearalenone by dual-label time-resolved fluorescence immunoassay. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91: 193-197.