

MICHELANGELO PASCALE*, MIRIAM HAIDUKOWSKI*, ANGELO VISCONTI*,
GABRIELLA AURELI**, MARIA GRAZIA D'EGIDIO**, ERSILIO DESIDERIO**,
LUCA PLIZZARI***, MARIA CORBELLINI***

Confronto tra metodi ELISA e HPLC per la determinazione del deossinivalenolo (DON) in frumento tenero e duro

INTRODUZIONE

Il Regolamento CE n. 1881/2006 del 19 dicembre 2006 ha raggruppato e aggiornato tutte le disposizioni previste in precedenti regolamenti (almeno 18) che definivano i limiti massimi ammissibili per alcuni contaminanti (comprese le micotossine) nei prodotti alimentari. In particolare, il Regolamento ha fissato, tra l'altro, i livelli massimi ammissibili per il deossinivalenolo (DON), una micotossina prodotta da *Fusarium* spp., in cereali e prodotti derivati. Tali limiti per il frumento duro non trasformato sono stati fissati a 1750 ng/g e per altri cereali non trasformati, compreso il frumento tenero, a 1250 ng/g.

A seguito di tale normativa, la necessità da parte degli operatori del settore cerealicolo di migliorare la qualificazione delle partite in funzione della destinazione d'uso finale rende necessario lo sviluppo/validazione di metodi rapidi, e nello stesso sensibili e affidabili, per la determinazione del DON nelle partite.

I metodi analitici più comunemente utilizzati per la determinazione del DON sono metodi gas-cromatografici (GC) che prevedono l'utilizzo di rivelatori a cattura di elettroni (ECD) o a spettrometria di massa (MS) e metodi HPLC che utilizzano rivelatori UV o MS (Krska et al., 2001; Langseth & Rundberget, 1998). Sebbene tali metodi analitici siano accurati, precisi e sensibili, essi richiedono una fase preliminare di purificazione (*clean-up*) del-

* Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche (ISPA-CNR)

** Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Unità di Ricerca per la Valorizzazione Qualitativa dei Cereali (CRA-QCE)

*** Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Unità di Ricerca per la Selezione dei Cereali e la Valorizzazione delle Varietà Vegetali (CRA-SCV)

l'estratto, tempi lunghi di analisi, l'impiego di personale specializzato e generalmente sono costosi.

Attualmente non esistono metodi ufficiali per la determinazione del DON in cereali e prodotti derivati, ma recentemente è stato realizzato uno studio interlaboratorio per la validazione di un metodo HPLC/UV (Mac Donald et al., 2005) che prevede la purificazione del campione con colonnina a immunoaffinità. Tale metodo è stato sottoposto al CEN (European Committee for Standardization) per una eventuale adozione a livello europeo.

In letteratura sono riportati numerosi metodi rapidi basati su tecniche immunometriche per la determinazione di DON in cereali e prodotti derivati: saggi ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), metodi immunocromatografici-dipstick, immunosaggi basati sulla Polarizzazione di Fluorescenza e biosensori basati sulla Risonanza Plasmonica di Superficie (Kolossova et al., 2008; Lippolis et al., 2006; Schneider et al., 2004; Tüdös et al., 2003). Tra questi, i più utilizzati test di screening nei laboratori di analisi sono i saggi ELISA che utilizzano anticorpi monoclonali e consentono la determinazione simultanea di un numero elevato di campioni. Questi saggi sono di facile impiego e hanno costi contenuti, rispetto ai metodi strumentali. Tuttavia i saggi ELISA possono dare risultati falsi positivi e possono dare una sovrastima del reale contenuto di DON a causa dell'elevata cross-reattività dell'anticorpo verso gli analoghi strutturali del DON (3 acetil-DON e 15 acetil-DON).

Al fine di verificare l'efficienza del metodo ELISA, utilizzato per la determinazione del DON nel frumento nell'ambito delle attività previste dal progetto, è stato effettuato uno studio interlaboratorio (ring test) per la sua validazione. I risultati del "ring test" sono riportati in un altro capitolo di questo Quaderno (Brera et al., 2008). Il presente studio ha voluto invece valutare le prestazioni del metodo ELISA mediante la determinazione dei livelli di DON in campioni di frumento tenero e duro naturalmente contaminati e il confronto dei risultati con quelli ottenuti con metodo HPLC, metodo di riferimento sottoposto al CEN per una eventuale adozione a livello europeo.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati mediante HPLC (Pascale et al., 2002) un totale di 259 campioni di frumento tenero e 341 campioni di frumento duro raccolti nelle annate agrarie 2005-2006, 2006-2007 e 2007-2008. I campioni sono stati selezionati sulla base dei livelli di contaminazione da DON determinati mediante analisi ELISA (kit RIDASCREEN® DON, r-biopharm) di 1451 campioni di frumento tenero e 2730 di frumento duro.

Le analisi HPLC sono state effettuate presso l'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA) del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari. Le analisi ELISA del frumento tenero sono state effettuate presso l'Unità di Ricerca per la Selezione dei Cereali e la Valorizzazione delle Varietà Vegetali del Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA-SCV), S. Angelo Lodigiano (LO) e quelle del frumento duro presso l'Unità di Ricerca per la Valorizzazione Qualitativa dei Cereali del Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA-QCE), Roma.

Analisi HPLC. Le analisi del DON sono state effettuate utilizzando il metodo di analisi riportato da Pascale et al., 2002 basato sulla purificazione degli estratti con minicolonne a immunoaffinità e determinazione della tossina mediante HPLC con rivelatore UV. Ciascun campione (25 g) di frumento macinato, dopo aggiunta di 5 g di polietilenglicole (PEG 8000) e 100 mL di acqua distillata, è stato omogeneizzato ad alta velocità per 2 minuti. Gli estratti sono stati filtrati con carta da filtro (Whatman N. 1) e poi con filtro a microfibre di vetro (Whatman GF/A) e 2 mL di estratto filtrato sono stati caricati su minicolonna a immunoaffinità DONtest HPLC (VICAM, Watertown, USA) ed eluiti lentamente a un flusso di 1 goccia/secondo. Successivamente, la minicolonna è stata lavata con 5 mL di acqua distillata a un flusso di 2 gocce/secondo e portata a secco. La tossina, trattenuta dagli anticorpi monoclonali, è stata eluita con 1,5 mL di metanolo (per HPLC) a un flusso di 1 goccia/secondo. L'estratto raccolto in una provetta è stato portato a secco con flusso di azoto, e ripreso in 500 mL di fase mobile. 100 mL di questa soluzione sono stati iniettati in HPLC. L'analisi è stata eseguita mediante HPLC con rivelatore UV a serie di diodi (DAD) impostato a 220 nm (Agilent Technology Series 1100) e colonna a fase inversa Synergi Hydro RP 80A, 3 × 15 cm, 4 µm (Phenomenex, USA). Come fase mobile è stata utilizzata una miscela isocratica acetonitrile-acqua (10/90, v/v) a un flusso di 1.0 mL/min.

La quantificazione della tossina è stata effettuata mediante confronto con la retta di calibrazione ottenuta con soluzioni standard di DON a diversa concentrazione. I campioni il cui contenuto di DON superava 3000 ng/g sono stati rianalizzati, previa opportuna diluizione dell'estratto con acqua distillata prima della purificazione su colonna a immunoaffinità.

I recuperi medi, ottenuti contaminando artificialmente con DON campioni di controllo a livelli di 100 - 500 - 1000 e 2000 ng/g (3 repliche), sono stati maggiori dell'85% con deviazioni standard relative (CV) minori del 10%. Il limite di rivelabilità del metodo è risultato pari a 20 ng/g (basato su un rapporto segnale-rumore 3:1). Il DON standard utilizzato per gli esperi-

menti di recupero e per le curve di calibrazione per l'analisi HPLC è stato acquistato dalla Sigma-Aldrich (Milano).

Analisi ELISA. Le analisi del DON sono state effettuate utilizzando il protocollo r-biopharm allegato al kit. Ciascun campione (5 g) di frumento macinato, dopo aggiunta di 25 mL di acqua distillata, è stato omogeneizzato vigorosamente per 3 minuti. Gli estratti sono stati filtrati con carta da filtro (Whatman N. 1). A 50 µL di tali estratti, opportunamente trasferiti nei pozzetti della piastra, sono stati addizionati 50 µL di enzima-coniugato e 50 µL di soluzione contenente l'anticorpo. Dopo lenta agitazione, il tutto è stato incubato per 30 min a temperatura ambiente. Dopo rimozione completa delle soluzioni presenti nei pozzetti e ripetuti lavaggi (n=3) con soluzione PBS, sono stati aggiunti nei pozzetti 100 µL del substrato/cromogeno e la piastra è stata incubata per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo aggiunta della soluzione bloccante è stata effettuata la lettura spettrofotometrica (a 450 nm) entro 10 minuti dall'aggiunta.

La quantificazione della tossina è stata effettuata mediante confronto con la curva di calibrazione ottenuta con le soluzioni standard di DON a diversa concentrazione forniti con il kit. I campioni il cui contenuto di DON superava 500 ng/g sono stati rianalizzati, previa opportuna diluzione dell'estratto con acqua distillata.

I recuperi medi, ottenuti contaminando artificialmente con DON campioni di controllo a livelli di 100 - 500 - 2000 ng/g (3 repliche), sono stati maggiori dell'85% con deviazioni standard relative (CV) minori del 20%. Il limite di rivelabilità del metodo è risultato pari a 18,5 ng/g.

Le specifiche tecniche dei due metodi a confronto sono riportate in tabella 1.

	ELISA ^a	HPLC ^c
Specificità	NO ^b	SI
Accuratezza	85-110%	85-90%
Precisione (DSR)	15-20%	5-8%
Limite di rivelabilità (LOD)	18,5 ng/g	20 ng/g
Intervallo di linearità	18,5-500 ng/g	20-3000 ng/g
Tempo di analisi (<i>per 10 campioni</i>)	1 ora	3 ore
Costo per campione	20-30 euro	50-60 euro
^a RIDASCREEN® DON; ^b >100% cross-reattività con 3 Ac-DON e -19% con 15-Ac-DON; ^c clean-up dell'estratto con colonne a immunoaffinità DONtest™ HPLC. DSR = Deviazione Standard Relativa; LOD = Limit of Detection.		

Tab. 1 *Specifiche tecniche/performance dei due metodi messi a confronto (ELISA e HPLC) applicati al frumento*

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sia per il frumento duro che per il frumento tenero, quasi tutti i campioni risultati contaminati da DON con analisi ELISA sono risultati contaminati anche con analisi HPLC. La tecnica ELISA ha dato risultati “falsi positivi” solo nell’1,5% dei campioni analizzati di frumento tenero (4 campioni su 259) e nel 3,5% dei campioni di frumento duro (12 campioni su 341) e risultati “falsi negativi” rispettivamente nell’1,2% e 1,8% di campioni di frumento tenero e duro (tabb. 2 e 3). Tuttavia, queste discordanze sono state osservate solo a bassi livelli di contaminazione (<100 ng/g).

Il confronto tra i livelli di tossina determinati con le due tecniche analitiche (ELISA e HPLC) per la totalità dei campioni di frumento tenero (n=222) e frumento duro (n=256) contaminati da DON a livelli maggiori di 18,5 ng/g ha mostrato una buona linearità, con coefficienti di correlazione (r) rispettivamente di 0,9684 (intervallo di contaminazione 18,5-7150 ng/g) e 0,9888 (intervallo di contaminazione 18,5-13600 ng/g). Poiché la maggior parte dei campioni contaminati rientrava nell’intervallo 18,5-1500 ng/g per il

FRUMENTO TENERO		
	n. campioni/totale analizzati	%
Falsi positivi	4/259	1,5
Falsi negativi	3/259	1,2
$[DON]_{ELISA} < [DON]_{HPLC}^a$	21/222 ^b	9,5
$[DON]_{ELISA} > [DON]_{HPLC}^a$	196/222 ^b	90,5
$[DON]_{ELISA} > 1,5 [DON]_{HPLC}^a$	87/196	44,4
^a $[DON]_{ELISA}$ = concentrazione di DON determinata con ELISA; $[DON]_{HPLC}$ = concentrazione di DON determinata con HPLC; ^b campioni contaminati a livelli > LOD (18,5 ng/g).		

Tab. 2 Prestazioni del kit RIDASCREEN®DON per la determinazione di deossinivalenolo (DON) in frumento tenero

FRUMENTO DURO		
	n. campioni/totale analizzati	%
Falsi positivi	12/341	3,5
Falsi negativi	6/341	1,8
$[DON]_{ELISA} < [DON]_{HPLC}^a$	52/256 ^b	20,3
$[DON]_{ELISA} > [DON]_{HPLC}^a$	204/256 ^b	79,7
$[DON]_{ELISA} > 1,5 [DON]_{HPLC}^a$	60/204	29,4
^a $[DON]_{ELISA}$ = concentrazione di DON determinata con ELISA; $[DON]_{HPLC}$ = concentrazione di DON determinata con HPLC; ^b campioni contaminati a livelli > LOD (18,5 ng/g).		

Tab. 3 Prestazioni del kit RIDASCREEN®DON per la determinazione di deossinivalenolo (DON) in frumento duro

FRUMENTO TENERO			
DON (ng/g)	n. campioni	r	$y = ax \pm b$
18,5 - 7150	222	0,9684	$y = 0,841x - 36,336$
18,5 - 1500	199	0,8997	$y = 0,815x - 16,175$
18,5 - 300	78	0,6075	$y = 0,701x + 1,891$
300 - 1500	121	0,8509	$y = 0,806x - 7,812$

Tab. 4 Parametri di correlazione lineare ELISA vs HPLC per il frumento tenero

FRUMENTO DURO			
DON (ng/g)	n. campioni	r	$y = ax \pm b$
18,5 - 13600	256	0,9888	$y = 1,016x - 68,017$
18,5 - 2000	217	0,9581	$y = 0,901x - 1,567$
18,5 - 300	101	0,8287	$y = 0,937x - 12,829$
300 - 2000	116	0,9304	$y = 0,883x - 16,974$

Tab. 5 Parametri di correlazione lineare ELISA vs HPLC per il frumento duro

frumento tenero (199 campioni su 222) e 18,5-2000 ng/g (217 campioni su 256) per il frumento duro, si è ritenuto opportuno valutare la correlazione dei risultati ottenuti con i due metodi in questo intervallo di concentrazione. Anche in questo caso è stata osservata una buona correlazione: $r=0,8997$ per il frumento tenero e $r=0,9581$ per il frumento duro (tabb. 4 e 5; figg. 1 e 2).

Va sottolineato che i livelli di DON determinati con metodo ELISA sono risultati meno accurati a bassi livelli di contaminazione (<300 ng/g), soprattutto per il frumento tenero per cui è stato osservato un coefficiente di correlazione (r) di 0,6075 tra i risultati ottenuti con il metodo ELISA e quelli ottenuti con il metodo HPLC (tab. 4), mentre il coefficiente di correlazione per il frumento duro, pari a $r=0,8287$, risulta ancora elevato (tab. 5).

Dall'analisi HPLC sono risultati positivi alla contaminazione da DON 222 campioni di frumento tenero e 256 campioni di frumento duro dei quali, rispettivamente, il 9,5% e il 20,3% con valori ELISA inferiori a quelli HPLC, il 90,5% e il 79,7% con valori superiori. Inoltre nell'ambito di questi ultimi due gruppi (concentrazione di DON determinata con ELISA superiore a quella determinata con HPLC) il contenuto di tossina è risultato sovrastimato di almeno 1,5 volte nel 44,4% dei campioni di frumento tenero e nel 29,4% dei campioni di frumento duro (tabb. 2 e 3). Dal confronto fra i dati HPLC ed ELISA emerge, quindi, la tendenza di quest'ultimo metodo a sovrastimare le concentrazioni di DON rispetto alla determinazione cromatografica. Questo dato può in parte trovare spiegazione nel fatto che l'anticorpo utilizzato nel test ELISA, oltre al DON, ha affinità per altri metaboliti del

DON, in particolare i precursori acetilati, anche essi tossici. Considerando il valore medio dei livelli di DON determinati con le due tecniche analitiche nei

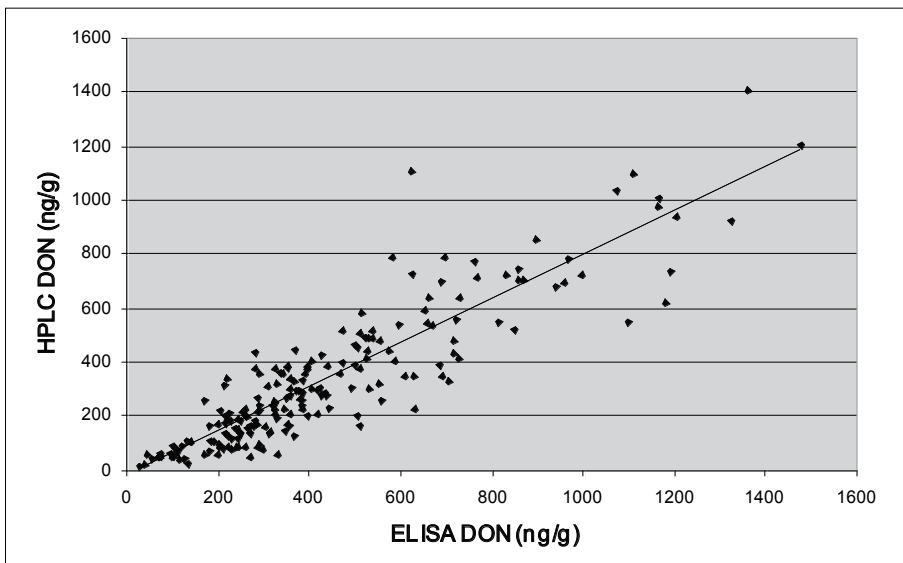


Fig. 1 *Frumento tenero* - Regressione lineare ELISA vs HPLC ($r = 0,8997$, $n = 199$, intervallo di contaminazione DON = 18,5 - 1500 ng/g)

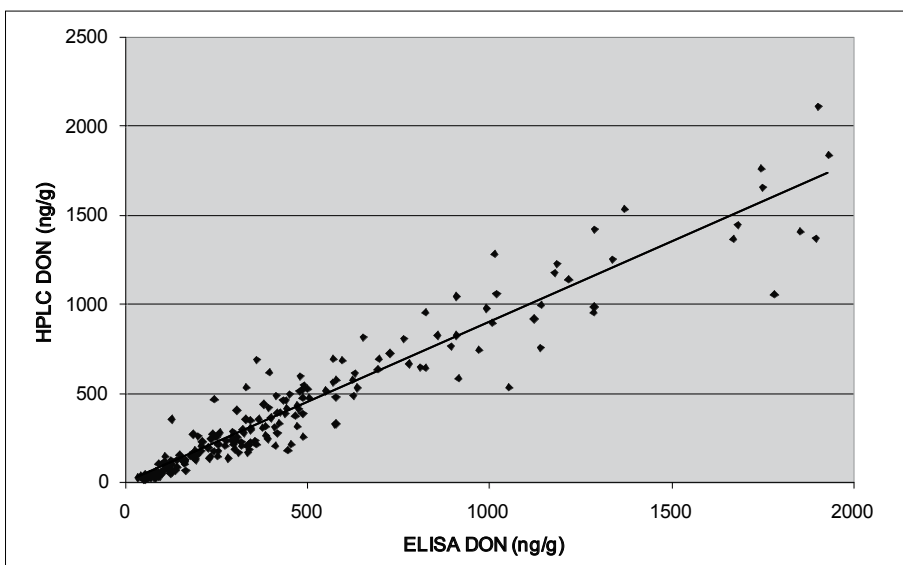


Fig. 2 *Frumento duro* - Regressione lineare ELISA vs HPLC ($r = 0,9581$, $n = 217$, intervallo di contaminazione DON 18,5 - 2000 ng/g)

FRUMENTO TENERO			
DON (ng/g)	n. campioni	Valor medio ELISA (ng/g)	Valor medio HPLC (ng/g)
18,5 - 7150	222	686	571
18,5 - 1500	199	430	334
18,5 - 300	78	197	140
300 - 1500	121	579	459

Tab. 6 *Confronto dei risultati (valor medio) ottenuti con metodo ELISA e HPLC per il frumento tenero*

FRUMENTO DURO			
DON (ng/g)	n. campioni	Valor medio ELISA (ng/g)	Valor medio HPLC (ng/g)
18,5 - 13600	256	993	941
18,5 - 2000	217	427	383
18,5 - 300	101	145	123
300 - 2000	116	701	636

Tab. 7 *Confronto dei risultati (valor medio) ottenuti con metodo ELISA e HPLC per il frumento duro*

campioni analizzati, l'entità della sovrastima risulta comunque limitata, in particolar modo per il frumento duro (tabb. 6 e 7).

CONCLUSIONI

I risultati di questo studio, insieme a quelli ottenuti dallo studio interlaboratorio (ring test) per la validazione del metodo ELISA per la determinazione di DON in frumento che hanno mostrato una buona concordanza con i criteri di rendimento riportati nel Regolamento CE n. 401/2006 (Brera et al., 2008, in questo Quaderno), garantiscono l'affidabilità dei risultati ottenuti con la tecnica ELISA dai due laboratori (CRA-SCV, S. Angelo Lodigiano e CRA-QCE, Roma) coinvolti nelle analisi di monitoraggio previste dal progetto.

Pertanto, i risultati di questo studio mettono in evidenza che la tecnica ELISA può essere utilizzata quale tecnica di screening per la determinazione dei livelli di DON in frumento tenero e frumento duro nelle fasi immediatamente successive alla raccolta per permettere la separazione delle partite in base al contenuto di tossina. Bisogna tuttavia tener presente che la tecnica ELISA utilizzata in questo studio (kit RIDASCREEN® DON, r-Biopharm) può produrre risultati falsi positivi e/o falsi negativi, sebbene a bassi livelli di

contaminazione (<100 ng/g), e che i risultati sono meno attendibili a bassi livelli di contaminazione da DON (<300 ng/g), in particolare per il frumento tenero. Inoltre, in generale, è stata osservata una sovrastima, più marcata nel tenero, del reale contenuto di micotossina determinato con metodo HPLC. Pertanto è consigliabile la conferma dei risultati ottenuti con ELISA mediante metodi HPLC, soprattutto in prossimità dei valori limite previsti dall'attuale legislazione.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i sigg. G. Panzarini e V. Antonacci (ISPA-CNR) per il supporto tecnico nelle analisi HPLC del DON e la dott.ssa M. Cattaneo (CRA-SCV) per il coordinamento delle attività relative alle analisi ELISA del frumento tenero.

RIASSUNTO

È stata valutata l'affidabilità di un metodo ELISA (RIDASCREEN® DON, r-Biopharm) nell'analisi del deossinivalenolo (DON) in campioni di frumento tenero e duro. I risultati delle analisi di 259 campioni di frumento tenero e 341 campioni di frumento duro, raccolti nelle annate agrarie 2006-2008, sono stati confrontati con quelli ottenuti con un metodo di riferimento HPLC basato sulla purificazione degli estratti con minicolonne a immunoaffinità. È stata osservata una bassa percentuale di risultati falsi positivi (1,5% per il frumento tenero e 3,5% per il frumento duro) e falsi negativi (1,2% per il frumento tenero e 1,8% per il frumento duro) a livelli di contaminazione <100 ng/g. L'analisi comparativa dei risultati ottenuti con le due metodiche analitiche ha evidenziato, nella totalità dei campioni contaminati da DON, una buona correlazione sia per il frumento tenero ($r=0,9684$, $n=222$, intervallo di contaminazione 18,5-7150 ng/g), sia per il frumento duro ($r=0,9888$, $n=256$, intervallo di contaminazione 18,5-13600 ng/g), sebbene, in generale, l'ELISA ha sovrastimato il contenuto di DON rispetto all'HPLC. Le analisi di DON con metodo ELISA sono risultate meno accurate a livelli di contaminazione <300 ng/g, soprattutto per il frumento tenero. L'ELISA potrebbe essere utilizzato come metodo di screening per la determinazione di DON in frumento tenero e duro sebbene una conferma dei risultati con un metodo più affidabile, come per esempio l'HPLC, è necessaria soprattutto in prossimità dei valori limite previsti dall'attuale legislazione.

ABSTRACT

Comparison between ELISA and HPLC methods for the determination of deoxynivalenol (DON) in common and durum wheat. The reliability of an ELISA method (RIDASCREEN® DON, r-Biopharm) in the analysis of deoxynivalenol (DON) in common and durum

wheat has been evaluated. 259 common wheat samples and 341 durum wheat samples harvested in 2006-2008 growing seasons were analyzed and the results compared with those obtained with a reference method based on immunoaffinity columns clean-up and HPLC analysis. A low percentage of false positives (1.5% for soft wheat and 3.5% for durum wheat) and false negatives results (1.2% for soft wheat and 1.8% for durum wheat) has been observed at levels of contamination <100 ng/g. A good correlation was observed for all positives samples of both common wheat ($r=0.9684$, $n=222$, range of contamination 18.5-7150 ng/g) and durum wheat ($r=0.9888$, $n=256$, range of contamination 18.5-13600 ng/g). DON levels determined by ELISA were less accurate at levels lower than 300 ng/g, especially for common wheat. In general, the ELISA method over-estimated DON content as compared to the HPLC one. ELISA could be used as a screening method for the determination of DON in common and durum wheat, although confirmatory analyses by more robust methods, such as HPLC, are required for contamination levels that approach the legal limits.

BIBLIOGRAFIA

- KOLOSOVA A.Y., SIBANDA L., DUMOULIN F., LEWIS J., DUVEILLER E., VAN PETEGHEM C., DE SAEGER S. (2008): *Lateral-flow colloidal gold-based immunoassay for the rapid detection of deoxynivalenol with two indicator ranges*, «Analytica Chimica Acta», 616, pp. 235-244.
- KRSKA R., BAUMGARTNER S., JOSEPHS R. (2001): *The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals*, «Fresenius Journal Analytical Chemistry», 371 (3), pp. 285-299.
- LANGSETH W., RUNDBERGET T. (1998): *Instrumental methods for determination of non-macrocytic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures*, «Journal of Chromatography A», 815, pp. 103-121.
- LIPPOLIS V., PASCALE M., VISCONTI A. (2006): *Optimization of a fluorescence polarization immunoassay for rapid quantification of deoxynivalenol in durum wheat based products*, «Journal of Food Protection», 69, pp. 2712-2719.
- MACDONALD S.J., CHAN D., BRERETON P., DAMANT A., WOOD R. (2005): *Determination of deoxynivalenol in cereals and cereal products by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: Interlaboratory study*, «Journal of AOAC International», 88, pp. 1197-1204.
- PASCALE M., BOTTALICO A., PANCALDI D., PERRONE G., VISCONTI A. (2002): *Occurrence of deoxynivalenol in cereals from experimental fields in various Italian regions*, «Petria», 12, pp. 123-129.
- SCHNEIDER E., CURTUI V., SEIDLER C., DIETRICH R., USLEBER E., MÄRTLBAUER E. (2004): *Rapid methods for deoxynivalenol and other trichothecenes*, «Toxicology Letters», 153, pp. 113-121.
- TÜDÖS A.J., LUCAS-VAN DEN BOS E.R., STIGTER E.C. (2003): *Rapid surface plasmon resonance-based inhibition assay of deoxynivalenol*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 51, pp. 5843-5848.