

## Трихотеценовые микотоксины: определение в объектах окружающей среды

В. П. Артюх, О. С. Гойстер, Г. А. Хмельницкий<sup>1</sup>, Н. Ф. Стародуб

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины  
Ул. Леонтовича, 9, Киев, 01030, Украина

<sup>1</sup> Национальный аграрный университет УААН  
Ул. Героев обороны, 15, Киев, 03041, Украина

---

*Описаны основные методы идентификации трихотеценовых микотоксинов, среди которых различные биотесты, тонкослойная хроматография, газожидкостная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия и иммунохимические методы, в том числе ELISA. Рассмотрены перспективы развития инструментальных методов определения микотоксинов на основе использования новых технологических решений.*

---

**Введение.** Целью данного обзора явилась попытка охарактеризовать в сравнительном аспекте методы идентификации микотоксинов в организме и в объектах окружающей среды, сосредоточив основное внимание на токсине Т-2. Такой анализ, по нашему мнению, необходим для дальнейшего решения проблемы экспрессного контроля этого класса токсикантов и разработки эффективных мер лечения и профилактики вызываемых ими заболеваний.

Микромицеты, продуцирующие микотоксины, широко распространены в природе, но наиболее характерны для умеренных широт [1]. Микотоксины при соответствующей влажности и температуре накапливаются в кормах, пищевых продуктах. Различные генерации микромицетов способны продуцировать весьма обширный набор токсинов, таких как афлатоксины, рубратоксины, ократоксины, фумонизины и трихотецетены [2, 3].

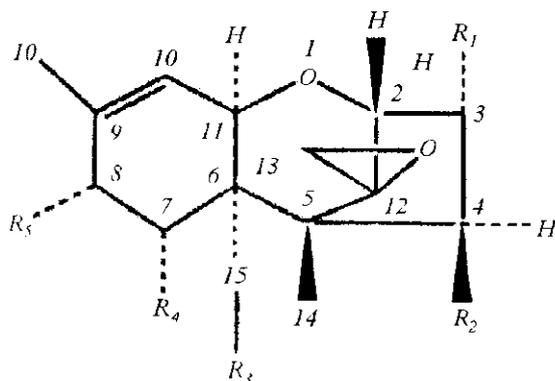
Поскольку нас интересует в основном Т-2 токсин, относящийся к трихотеценам, то основное внимание будет уделено именно этому виду микотоксинов. Трихотецены относятся к семейству химических соединений, получивших название сесквитерпеноидов (*sesquiterpenoids*). Их отличительной чертой является трихотеценовое кольцо,

содержащее олефиновую связь С-9 и эпоксидную группу в области С-12,13. Описано до 150 производных структуры, представленной ниже на схеме [1, 4] (система нумерации и боковые группы тетрациклического трихотеценового ядра).

Продуцентом Т-2, как было установлено в конце 60-х годов, является *Fusarium tricinctum* и в меньшей степени — *Mycothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Cephalosporium* и *Stachybotrys* [5].

Известны случаи массового заболевания и гибели людей в результате употребления продуктов, изготовленных из перезимовавшего в поле зерна (просо, пшеница, ячмень), которое было поражено грибом вида *Fusarium sporotrichioides* [6, 7].

Вышеупомянутые ситуации относятся к событиям чрезвычайным, исключительным, актуальным же является выявление опасности хронического отравления малыми дозами микотоксинов. Микотоксины поражают многие системы и ткани организма человека и животных. Патологические проявления хронического отравления малыми дозами не имеют специфики, по которой можно было бы судить об этиологии заболевания, и поэтому часто диагностируются как инфекционные заболевания или же заболевания иного происхождения. В связи с этим очень важен оперативный контроль уровня загрязнения микотоксинами сырья для комбикормовой и пищевой промышленности.



Идентификация трихотеценов и, в частности, Т-2 представляет определенные трудности, хотя к настоящему времени уже разработана целая система подходов, обеспечивающая контроль за содержанием трихотеценов в продуктах сельскохозяйственного производства растительного происхождения. Стандартные аналитические процедуры включают методы отбора проб, способы экстракции микотоксинов из образцов зерна, продуктов их переработки и биомедицинских препаратов. Из анализа источников литературы, посвященных использованию различных подходов для выявления микотоксинов, вырисовывается картина, в некоторой степени отражающая ретроспективу развития методических подходов к контролю уровня микотоксического загрязнения различных объектов. Это, прежде всего, — развитие доступных и простых скрининговых методов, необходимых для быстрой идентификации. В первое время после возникновения проблемы этим требованиям отвечали биотесты, хотя им присущи существенные недостатки, поскольку они малоспецифичны и с их помощью нельзя определить отдельные виды микотоксинов в анализируемой смеси. Кроме того, для осуществления такого анализа требуется достаточно много времени.

Следующим этапом было развитие методов на базе использования технологии тонкослойной хроматографии (ТСХ), которая, в отличие от биотестов, обеспечивала высокую специфичность, а также возможность мультипараметрического определения различных микотоксинов, но уступавшая биотестам по чувствительности. Параллельно развивалась газо-жидкостная хроматография (ГЖХ), применение которой стало существенным шагом вперед на пути повышения как чувствительности, так и специфичности в определении микотоксинов.

Внедрение радиоиммунного анализа (РИА), так же как иммунохимического анализа (ИХА) и, в частности, различных модификаций твердофаз-

ного иммуноферментного анализа (ELISA), кардинальным образом расширило возможности количественной оценки токсинов. Эти методы по мере их усовершенствования могут использоваться как для первичного скрининга, так и для подтверждения результатов. Именно они и являются в настоящее время наиболее популярными в практике скрининга микотоксинов, и уже существуют коммерческие наборы для определения Т-2 и других микотоксинов методом ELISA. Аналогичную роль могут выполнять методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и особенно при их целевой адаптации к физико-химическим особенностям этого класса химических соединений [8]. В качестве подтверждающих используется также масс-спектрометрия и ядерно-резонансная спектроскопия. Безусловно, что для подтверждения результатов анализа все упомянутые выше методы могут быть использованы и в сочетании [9].

Биологические методы идентификации трихотеценовых микотоксинов. Приступая к краткому описанию основных методических подходов, мы не претендуем на исчерпывающий их охват, а остановимся лишь на наиболее употребляемых в практике. Для большинства аналитических процедур при определении Т-2 токсина и его производных требуются экстракция и очистка исходного материала. Биологические методы идентификации трихотеценов и, в частности, Т-2 токсина были в числе первых из применяемых для контроля степени загрязненности и нормативной регламентации предельно допустимой загрязненности сельскохозяйственной продукции.

Эти методы отличались простотой и дешевизной, но существенным недостатком была их низкая чувствительность и специфичность. В 1978 году в одних из первых методических рекомендациях даже не упоминалось о трихотеценах [10]. Образцы зерна или зернопродуктов подвергались экстракции с помощью органических растворителей. После удаления последних получали так называемую липидную фракцию, в состав которой (в случае загрязнения зерна) входили микотоксины, поскольку они, как правило, плохо растворялись в воде, но очень хорошо — в органических растворителях. Токсичность этой фракции тестировали с помощью дрожжевой культуры или же испытывали на голубях [10].

Впрочем, биологические методы довольно быстро совершенствовались. До сего дня появляются новые и новые модификации и варианты биотестов с улучшенными характеристиками. Причем используется широкий круг биологических объектов: от позвоночных животных до клеточных культур.

Один из традиционных тестов [11] основан на регистрации раздражения кожи животного (мыши, крысы, кролика, безволосой морской свинки и др.) после нанесения на нее микотоксинов. Величина дозы коррелирует со степенью раздражения, но индивидуальная чувствительность вносит фактор неопределенности и поэтому этот метод считается полуколичественным. В соответствии с одним из вариантов крысе в кожу втирали 2 мкл раствора Т-2 токсина (концентрации 10—60 мкг/мл). Усредненную действующую дозу определяли между концентрациями 10 и 60 мкг/мл через 48 ч после нанесения микотоксина. Отклонение результатов анализа не превышало 1,6 мкг/мл [12]. Распространены также биотесты для оценки загрязнения кормов Т-2 токсином.

В качестве примера можно привести тест с использованием однодневных утят, которые получали Т-2 токсин в дозах 0,25; 0,50 или 1 мкг/г корма на протяжении 7 дней. Первые признаки повреждения верхнего неба утят появлялись спустя 16 ч после начала эксперимента [13]. Традиционным можно считать и биотест на Т-2 токсин, в котором критерием токсичности служит показатель смертности куриных эмбрионов [14].

Известны разработки по использованию клеточных систем [15] для оценки токсического действия Т-2 токсина и его производных. Простейшие подходы включают попытки применения суспензии эритроцитов. Т-2 токсин обладает гемолитической активностью. Механизм такой активности аналогичен эффекту перекиси водорода, сапонина и полиоксиэтилена. Интересно и то, что при этом наблюдается обычный противогемолитический эффект витамина Е, маннитола и гистидина, подавляющих свободнорадикальные процессы, что наводит на спекулятивные размышления относительно некоторых особенностей механизма токсического действия Т-2 токсина. Защитный эффект антиоксидантных агентов был изучен и подтвержден рядом экспериментальных работ как в условиях *in vivo*, так и *in vitro* [16—19].

Применение более сложных клеточных систем в сочетании с цитологическими методами расширило возможности исследователей [20]. Так, осуществлена оценка цитотоксичности *Fusarium mycotoxins* с помощью чувствительных клеток линии ВНК-21 (культура почечных клеток детенышей хомячков) по метаболической активности расщепления бромистого 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2-5-дифенилтетразолиума (МТТ-тест). Клетки более чувствительны к трихотеценам типа А. Для Т-2 токсина цитотоксичность проявляется при его концентрации 1,6 нг/мл, тогда как для деоксинивале-

нола — 112 нг/мл. Как МТТ-тест (оценка осуществляется по нерастворимому формазану), так и аналогичный МТS-тест (с водорастворимым формазаном) демонстрируют разницу в чувствительности к Т-2 токсину и деоксиниваленолу, которая составляет 2,1 и 141 нг/мл соответственно.

Следует все же заметить, что МТS-тест по сравнению с МТТ-тестом требует меньше времени для постановки и он проще в использовании [13]. Недавними разработками с использованием культуры лимфоцитов показана сравнительная оценка цитотоксичности Т-2 токсина и таких его производных, как диацетоксисцирпенол, ниваленол и деоксиниваленол. Установлено, что трихотецены в разной степени влияют как на индуцируемую митогеном пролиферацию лимфоцитов, так и на синтез иммуноглобулинов [21]. Дальнейшее развитие техники клеточной культуры позволило осуществить скрининговую оценку концентраций микотоксинов *Fusarium*. Применены три калориметрических биометода на мышинных фибробластах (ЗТЗ клетках), в частности, метод, основанный на синтезе ДНК с включением 5-бромо-2-диоксиуридина (BrdU-тест), МТТ-тест и ЛДГ-тест по устойчивости клеточной мембраны (выход лактатдегидрогеназы). Авторы пришли к выводу о том, что BrdU-тест наиболее чувствителен к присутствию Т-2 токсина, так как ответную реакцию регистрировали уже при концентрации 4 нг/мл. В случае же МТТ- и ЛДГ-тестов она достигалась лишь при концентрациях 12 и 18 нг/мл соответственно [22].

Биотесты получили наибольшее развитие при использовании различных штаммов дрожжей. Этому предшествовали длительные исследования по подбору подходящих культур клеток, чувствительных к микотоксинам. Первые варианты сводились к качественному определению трихотеценов по наличию зон подавления роста микроорганизмов в исследуемых экстрактах. Такие тесты проводили в сочетании с тестами на голубях [10]. Недостатки очевидны — это низкая специфичность и сложность разработки четко стандартизированных процедур, которые бы обеспечивали высокую воспроизводимость. Тем не менее, именно биотесты с использованием *Candida pseudotropicalis* и *Torulopsis sp. 86A* получили достаточно серьезное развитие, в ходе которого были устранены некоторые недостатки, присущие первым разработкам. Модификации сделали эти тесты количественными и были оформлены в виде методических указаний [23]. Некоторое представление о характере скрининга штаммов дрожжей, чувствительных к токсину Т-2, может дать работа [24], в которой исследовано несколько десятков штаммов дрожжей, относящих-

ся к девяти различным родам, и при этом показано, что только представители рода *Saccharomyces* обнаруживали незначительную чувствительность к действию Т-2 токсина.

Ряд же других родов оказались нечувствительными: штаммы *Candida castelii* 1476, *Torulaspora globosa* 93, *Debariomyces castelii* 1652, *Hansenula anomala* 2554, 163, *Metschnikowia bicuspidata* 2628, *Pichia bovis* 1106, *Pichia membranaefaciens* 229, *Sporobolomyces roseus* 682, *Zygosaccharomyces bailii* 850. По этой причине дальнейший поиск чувствительной культуры проводили среди штаммов дрожжей из рода *Saccharomyces* и близких к нему таксономических групп. Всего изучено 47 штаммов *Saccharomyces cerevisiae*, один штамм *Saccharomyces lactis*, четыре штамма *Kluveromyces lactis*, восемь штаммов *Kluveromyces marxianus* и один штамм *Z. bailii*. Изучение порога чувствительности штаммов *S. lactis* ВЛМУ 459, штамма *C. pseudotropicalis* 44 пк и *Saccharomyces fragilis* 25-Д к препаратам чистого Т-2 токсина показало, что торможение зоны роста обнаруживается для *S. lactis* ВЛМУ 459 при наличии 20 нг, в то время как для других упоминавшихся выше штаммов это значение составляет 40—50 нг [24].

Упрощенные варианты биотестов [25], основанные на использовании штаммов дрожжей, чувствительных к Т-2 токсину, позволяют осуществлять качественную оценку общей загрязненности зерна трихотеценами. При этом результаты оценки получают в течение 24 ч, т. е. метод нельзя назвать экспрессным, но к положительным его характеристикам можно отнести возможность анализа большого количества проб при относительно низкой стоимости анализа.

Интересно и применение биотестов для изучения зависимости токсичности от структуры микотоксинов, что выполнено с помощью дрожжей *K. marxianus*. Отщепление изовалериановой группы, одной или двух ацетиловых или же двух ацетиловых плюс изовалериановой групп приводит к образованию диацетоксисцирпенола, НТ-2 токсина, Т-2-триола и Т-2-тетраола. Токсичность этих трихотеценов, как было установлено с помощью этого биотеста, была меньшей и по сравнению с токсичностью Т-2 токсина в 7, 36, 276 и 558 раз соответственно [26].

Воплощение идеи биоавтографического метода, который представляет собой совмещение преимуществ ТСХ, позволяющей разделить микотоксины на пластинке, и микробиологического анализа, дало возможность не только количественно оценивать микотоксины, но и одновременно определять несколько их видов в одном образце [27]. Ниже

описан один из вариантов биоавтографического метода, в соответствии с которым анализ экстракта осуществляется в два этапа. Во-первых, после нанесения экстракта проводят двухмерную хроматографию на пластинках типа «Сулифол» в системе диэтиловый эфир:гексан (1:1). Далее пластинку высушивают, наносят на нее в качестве вещества-«свидетеля» раствор Т-2 токсина и хроматографируют вторично в перпендикулярном направлении в системе этил:толуол (3:1). На высушенную пластинку наносят сусло-агар и на его поверхности равномерно распределяют суточную культуру штамма дрожжей *C. pseudotropicalis* 44 пк. После инкубации (16 ч в термостате при температуре 28 °С) отмечают наличие зон подавления роста дрожжей и измеряют их диаметр. Зона подавления роста, идентичная по хроматографической подвижности таковой, вызванной веществом-«свидетелем», указывает на присутствие Т-2 токсина в исследуемом образце. Его количество определяют расчетным путем, причем чувствительность определения в зерне составляет 50 мкг/кг, а в комбикорме — около 90 мкг/кг [27].

Этот же метод, но с использованием культуры *Torulopsis sp.* 86А обеспечивает выявление нескольких микотоксинов одновременно, в том числе Т-2 токсина, с чувствительностью порядка 25 мкг на 1 кг зерна [28]. Таким образом, можно констатировать, что биотесты имеют ряд достоинств и сегодня нельзя утверждать, что потенциальные возможности данного подхода полностью исчерпаны. Во всяком случае, об этом свидетельствуют публикации, продолжающие периодически появляться в печати [29, 30].

Физико-химические методы анализа трихотеценов. Попытки разработать метод определения Т-2 токсина и его производных с помощью классической, в том числе и ионообменной жидкостной хроматографии, не привели к успеху. В молекуле Т-2 токсина отсутствуют не только хромофорная система, но и структурные элементы, позволяющие формировать ее без деструкции при мягких химических воздействиях. Есть сведения о применении иммуноаффинной и жидкостной хроматографии для определения содержания дезоксиниваленола в загрязненном зерне [31], а также жидкостной хроматографии для выявления В-трихотеценов в сочетании с масс-спектрометрией [32].

Более перспективным оказалось использование техники ГЖХ. Она оказалась одним из рутинных методов, применяемых для идентификации микотоксинов как в сельскохозяйственных продуктах, так и в биомедицинских образцах. Все методы анализа реальных объектов с помощью ГЖХ требую-

ют многоступенчатой и длительной процедуры подготовки проб, а также стадии их химической модификации. Имеется ввиду, что перед хроматографией полярные группы микотоксиновых молекул должны быть преобразованы в эфирные или сложноефирные группы. Образцы перед химической модификацией и последующей хроматографией требуют интенсивной очистки.

Использование многочисленных подготовительных операций ограничивает чувствительность метода на уровне 10 нг/мл. Более подробно процедура подготовки анализируемого образца может быть проиллюстрирована кратким изложением схемы одного из вариантов такого анализа Т-2 токсина в сыворотке крови [33]. Процедура начинается с его экстракции из образца с помощью этилацетата, далее следует хроматография экстракта на колонке С18 в обратной фазе и соединение с гептафлуоробутиратангидридом. В свою очередь, производные подвергают хроматографии на колонке OV-17 при различных температурных условиях, а регистрация ведется электрохимическим детектором. Минимально обнаруживаемый уровень Т-2 токсина в сыворотке крови составлял 30 нг/мл. В качестве внутреннего стандарта используется изо-Т-2 токсин. Воспроизводимость анализов достигает в среднем  $95,5 \pm 8,6$  % от введенного микотоксина в пределах концентраций от 40 до 120 нг/мл [33]. ГЖХ была и остается одним из подтверждающих методов анализа микотоксинов в объектах окружающей среды [34, 35].

В свое время весьма эффективным оказалось введение в практику анализа микотоксинов с помощью ИХА и РИА [36, 37]. Это стало возможным после получения специфических антител к Т-2 токсину. Токсин экстрагировали метанолом, затем этот экстракт отмывали гексаном и пропускали через колонку Ser-Pak C18 (обратная фаза). Далее экстракт упаривали для удаления органического растворителя, разбавляли 0,1 М натрий-фосфатным-буфером (рН 7,6) и анализировали с помощью РИА, используя осаждение сульфатом аммония комплекса антиген—антитело для отделения несвязанного Т-2 токсина.

Экстракция и очистка Т-2 токсина позволяет добиться воспроизводимости анализа в пределах 78—85 % для кукурузы и 90—95 % для пшеницы от исходного количества. Ser-Pak-рафинирование позволяет избавиться от мешающих соединений и дает возможность определять данный токсин при концентрации 1,0 и 2,5 мкг/кг в кукурузе и пшенице соответственно. Воспроизводимость внутреннего контроля достигает 84 и 103 % для 1—20 мкг/кг Т-2 токсина в образцах пшеницы и

2,3—20 мкг/кг — в образцах кукурузы. Вариант РИА для определения Т-2 токсина в биологических жидкостях [37] обеспечивал чувствительность такого же порядка и колебался в пределах от 2 до 5 нг/мл. Возможности ИХА можно расширить за счет получения различных типов антител [38, 39], а также создавая разные методические схемы его выполнения [40].

В частности, разработан метод определения содержания Т-2 токсина в зерне на основе непрямого варианта твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа с использованием меченых ферментом вторых антител. Этот метод позволяет определять содержание токсина в диапазоне 30—1000 нг/г [41].

В другом случае моноклональные антитела к Т-2 токсину конъюгировали с пероксидазой хрена и использовали в варианте прямого конкурентного определения микотоксина, при этом чувствительность анализа составляла не менее 10 нг/мл [42].

Предложен более сложный вариант анализа на основе гомогенного конкурентного метода с использованием комплементарно опосредованного лизиса липосом. Для этого солянокислый Т-2 токсин через аминогруппу присоединяли к фосфатидилэтаноламину. Синтезированный таким образом комплекс внедряли в мембрану липосом. Во внутреннюю полость липосом в качестве свободного маркера помещали карбоксифлуоресцеин. В реакционную смесь, содержащую липосомы с фиксированным на их поверхности Т-2 токсином, вносили свободный Т-2 токсин в составе анализируемой пробы и моноклональные анти-Т-2 токсин антитела. В реакционной смеси происходило конкурентное связывание моноклональных антител со свободным токсином в растворе и токсином на поверхности липосом. Далее липосомы, на поверхности которых образовался комплекс Т-2 токсин—моноклональные антитела, разрушались и в раствор освобождался карбоксифлуоресцеин. То есть, чем больше было Т-2 токсина в исследуемом образце, тем меньше карбоксифлуоресцеина оказывалось в свободном растворе. Этот метод обеспечивает чувствительность на уровне 2 нг/мл, что в 10 раз выше, чем у ELISA, и при использовании тех же антител сравнимо с результатами, полученными РИА методом [42]. В качестве подтверждающих методов, кроме упоминавшейся ГЖХ [35], практикуют использование масс-спектропии.

Масс-спектропия применена для характеристики, идентификации и подтверждения наличия микотоксинов. Она обеспечивает определение пикограммовых количеств микотоксинов [43, 44]. Наиболее эффективно использование комбинации

методов ГЖХ и масс-спектрологии [45], а также HPLC—TCL [46]. Комбинация ГЖХ и масс-спектрологии обеспечивает большую специфичность, чем при использовании одной ГЖХ [47, 48], поэтому она и стала стандартной при определении микотоксинов как в сельскохозяйственных продуктах, так и в биомедицинских образцах. Ее чувствительность достигает 1 нг/мл.

Основной недостаток — необходимость предварительного химического преобразования анализируемых соединений, что требует много времени. Одна из последних разработок совместного использования ГЖХ—масс-спектрологии [49], предложенная в 2001 г., представляет собой специфичный и надежный метод идентификации микотоксинов без предварительного химического преобразования компонентов анализируемого образца. Этот метод позволяет достичь чувствительности на уровне 0,1 нг/мл.

Всем рассмотренным выше методам определения микотоксинов присущ один недостаток, существенно затрудняющий оперативный контроль за уровнем загрязнения сырья для пищевой и комбикормовой промышленности, поскольку ни один из них нельзя отнести к экспресс-методам и эффективны они лишь в условиях стационарной лаборатории при наличии высококвалифицированного персонала. В настоящее время существует проблема оперативного контроля микотоксинов с помощью экспресс-методов и приборов, пригодных к применению в полевых условиях.

Предвестником решения этой проблемы можно считать публикацию, посвященную разработке экспрессного метода определения микотоксинов (фузазины) на основе использования явления поверхностного плазменного резонанса (ППР) [50]. ППР-сенсор для обнаружения фузазинов обладает чувствительностью на уровне 50 нг/мл при длительности анализа, не превышающей 10 мин. Ожидается, что стоимость одного анализа будет на порядок ниже таковой методом ELISA, поэтому перспективность разработок в этом направлении кажется очевидной. Несомненно, что по чувствительности ППР-анализ уступает многим упоминавшимся выше методам определения микотоксинов. К бесспорным преимуществам можно отнести возможность использования ППР-устройств в полевых условиях, прежде всего, для скрининга объектов окружающей среды и мониторинга состояния фуражного и продовольственного зерна в местах длительного хранения и на предприятиях пищевой промышленности.

**Выводы.** Современные методы позволяют обнаруживать микотоксины в биологических образ-

цах и объектах окружающей среды с высокой точностью и избирательностью, но лишь в последнее время появились отдельные работы, посвященные созданию методов, обеспечивающих, выполнение анализа в режиме реального времени и в полевых условиях.

Следовательно, можно констатировать, что на сегодня существует обширный арсенал методов определения трихотеценов как в объектах окружающей среды, так и в биомедицинских препаратах. Дальнейшие усилия, как нам кажется, должны быть направлены на создание специальных инструментальных методов, основанных на биосенсорной технологии, и, что радует, в литературе начинают появляться первые сообщения о разработке подобных методов, в частности, с использованием оптических иммуносенсоров.

V. P. Artyukh, O. S. Goister, G. A. Khmel'nitsky, N. F. Starodub

Trichothecene micotoxins: determination in environment

#### Summary

The basic methods of identification of trichothecene toxins are described in the review including biomethods, thin layer chromatography, high performance liquid chromatography, immunoenzyme assay (ELISA), gas-liquid chromatography, mass spectrometry. The future trends of development of the instrumental methods based on new technological decisions are briefly discussed regarding mycotoxins determination.

В. П. Артюх, О. С. Гойстер, Г. А. Хмельницький, М. Ф. Стародуб

Трихотеценові мікотоксини: визначення в об'єктах довкілля

#### Резюме

Описано основні методи ідентифікації трихотеценових мікотоксинів, серед яких різні біометоди, тонкошарова хроматографія, газо-рідинна хроматографія, високоефективна рідинна хроматографія, імуноферментні методи (ELISA), мас-спектрометрія. Розглянуто перспективи розвитку інструментальних методів визначення мікотоксинів на базі використання нових технологічних рішень.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Committee on protection against mycotoxins. Board on Toxicology and Environmental Health Hazards, Commission on Life Sciences, National Research Council // Protection. Against Trichothecene Mycotoxins.—Washington: Nat. Acad. press, 1983.—127 p.
2. Ciegler A. Mycotoxins: occurrence, chemistry, biological activity // *Lloydia*.—1975.—38, N 1.—P. 21—35.
3. Ciegler A., Bennett J. W. Mycotoxins and mycotoxicoses // *Bioscience*.—1980.—30, N 8.—P. 512—515.
4. Cole R. J., Cox R. H. The trichothecenes // *Handbook of Toxic Fungal Metabolite* / Eds R. J. Cole, R. H. Cox.—New York: Acad. press, 1981.—P. 152—263.
5. Bamdurg J. R., Riggs N. V., Strong F.M. The structure of toxins from two strains of *Fusarium tricinctum* // *Tetrahydrom*.—1968.—24.—P. 3329—3333.
6. Сиркусов А. Х. Микотоксикозы.—М.: Изд-во ГИСХЛ, 1954.—216 с.

7. Bhat V. R., Ramakrishna J., Sashidhar R. B. Outbreak of mycotoxicosis in Kashmir Valley // *Nutr. News India*.—1989.—10, N 1.—P. 1—3.
8. Jimenez M., Mateo J. J., Mateo R. Determination of type A trichothecenes by high-performance liquid chromatography with coumarin-3-carbonyl chloride derivatisation and fluorescence detection // *J. Chromatogr. A*.—2000.—870.—P. 473—481.
9. Omurtag G. Z., Yazicio D. Determination of T-2 toxin in grain and grain products // *J. Environ. Sci. Health B*.—2000.—35, N 6.—P. 797—807.
10. Методические указания по определению токсичности зерновых культур и продуктов их переработки, пораженных грибами рода фузариум секции *Sporotrichiella*.—М: изд-во МЗ СССР, 1978.—5 с.
11. Wannemacher R. W., Jr., Bunner D. L., Neufeld H. A. Toxicity of trichothecenes and other related mycotoxins in laboratory animals // *Mycotoxins and Animal Foods* / Eds J. E. Smith, R. S. Henderson. Boca Raton: CRC press, 1991. P. 499—552.
12. Hayes M. A., Schiefer H. B. A method for accurate measurement of cutaneous irritancy of trichothecenes // *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*—1990.—10, N 3.—P. 103—105.
13. Shlosberg A. S., Klinger Y., Malkinson M. H. Muscovy ducklings, a particularly sensitive avian bioassay for T-2 toxin and diacetoxyscirpenol // *Avian. Dis.*—1986.—30, N 4.—P. 820—824.
14. Rotter B. A., Thompson B. K., Prelusky D. B., Trenholm H. L. Evaluation of potential interactions involving trichothecene mycotoxins using the chick embryotoxicity bioassay // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*—1991.—21, N 4.—P. 621—624.
15. Milo-Goldzweig I., Joffe A. Z., Yagen B. Trichothecene-induced hemolysis. I. The hemolytic activity of T-2 toxin // *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*—1983.—70, N 3.—P. 343—347.
16. Leal M., Shimada A., Ruiz F., Gonzalez de Mejia E. Effect of lycopene on lipid peroxidation and glutathione-dependent enzymes induced by T-2 toxin *in vivo* // *Toxicol. Lett.*—1999.—1091, N 2.—P. 1—10.
17. Mezes M., Barta M., Nagy G. Comparative investigation on the effect of T-2 mycotoxin on lipid peroxidation and antioxidant status in different poultry species // *Res. Vet. Sci.*—1999.—66, N 1.—P. 19—23.
18. Atroshti F., Rizzo A., Sankari S., Biese I., Westermarck T., Veijalainen P. Liver enzyme activities of rats exposed to ochratoxin A and T-2 toxin with antioxidants // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*—2000.—64, N 4.—P. 586—592.
19. Shokri F., Heidari M., Gharagozloo S., Ghazi-Khansari M. *In vitro* inhibitory effects of antioxidants on cytotoxicity of T-2 toxin // *Toxicology*.—2000.—146, N 2—3.—P. 171—176.
20. Rotter B. A., Thompson B. K., Clarkin S., Owen T. C. Rapid colorimetric bioassay for screening of *Fusarium* mycotoxins // *Nat. Toxins*.—1993.—1, N 5.—P. 303—307.
21. Thuvander A., Wikman C., Gadhasson I. *In vitro* exposure of human lymphocytes to trichothecenes: individual variation in sensitivity and effects of combined exposure on lymphocyte function // *Food Chem. Toxicol.*—1999.—37, N 6.—P. 639—648.
22. Widstrand J., Lundh T., Pettersson H., Lindberg J. E. Cytotoxicity of four trichothecenes evaluated by three colorimetric bioassays // *Mycopathologia*.—1999.—147, N 3.—P. 149—155.
23. Методические указания по количественному определению T-2 токсина в зерне и комбикормах / Главное управление ветеринарии Госагропрома СССР.—М., 1987.—11 с.
24. Болтянская Э. В., Куваева И. Б., Кроякова Е. А. Скрининг штаммов дрожжей, чувствительных к токсину T-2 // *Вопр. питания*.—1988.—№ 6.—С. 67—68.
25. Binder J. A yeast bioassay for trichothecenes // *Nat. Toxins*.—1999.—7, N 6.—P. 401—406.
26. Madhyastha M. S., Marquardt R. R., Abramson D. Structure-activity relationships and interactions among trichothecene mycotoxins as assessed by yeast bioassay // *Toxicol.*—1994.—32, N 9.—P. 1147—1152.
27. Котик А. Н., Труфанова В. А. Определение трихотеценовых микотоксинов в кормах и культурах грибов биоавтографическим методом // *Тр. Всесоюз. ин-та зерна и продуктов его переработки*.—1987.—Т. 65.—С. 127—130.
28. Котик А. Н., Труфанова В. А. Биоавтографический метод определения трихотеценовых микотоксинов в зерне и продуктах его переработки // *Гигиена и санитария*.—1989.—№ 9.—С. 53—54.
29. Engler K. H., Coker R., Evans I. H. J. A novel colorimetric yeast bioassay for detecting trichothecene mycotoxins // *Microbiol. Meth.*—1999.—35, N 3.—P. 207—218.
30. Engler K. H., Coker R. D., Evans I. H. Uptake of aflatoxin B<sub>1</sub> and T-2 toxin by two mycotoxin bioassay microorganisms: *Kluyveromyces marxianus* and *Bacillus megaterium* // *Arch. Microbiol.*—2000.—174, N 16.—P. 381—385.
31. Cahill L. M., Kruger S. C., McAlice B. T., Ramsey C. S., Prioli R., Kohn B. Quantification of deoxynivalenol in wheat using an immunoaffinity column and liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*.—1999.—859, N 1.—P. 23—28.
32. Razzari-Fazeli E., Bohm J., Luf W. Determination of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using liquid chromatography-mass spectrometry with negative ion atmospheric pressure chemical ionisation // *J. Chromatogr. A*.—1999.—854, N 1.—P. 245—255.
33. Yagen B., Bialer M., Sintov A. Gas chromatographic assay with pharmacokinetic applications for monitoring T-2 and HT-2 toxins in plasma // *J. Chromatogr.*—1985.—343, N 1.—P. 67—75.
34. Тутельян В. А., Эллер К. С., Соболев В. С. Методические указания по обнаружению, идентификации и определению содержания T-2 токсина а пищевых продуктах и продовольственном сырье.—М., 1984.—9 с.
35. Schothorst R. C., Jekel A. A. Determination of trichothecenes in wheat by capillary gas chromatography with flame ionisation detection // *Food Chem.*—2001.—73, N 1.—P. 111—117.
36. Chu F. S., Grossman S., Wei R. D., Microcha C. J. Production of antibody against T-2 toxin // *Appl. and Environ. Microbiol.*—1979.—37.—P. 104—108.
37. Lee S., Chu F. S. Radioimmunoassay of T-2 toxin in corn and wheat // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*—1981.—64, N 1.—P. 156—161.
38. Gendloff E. H., Pestka J. J., Swanson S. P., Hart L. P. Detection of T-2 toxin in *Fusarium sporotrichioides*-infected corn by enzyme-linked immunosorbent assay // *Appl. and Environ. Microbiol.*—1984.—47, N 57.—P. 1161—1163.
39. Brimfield A. A., Miller M., Finkelman F. D., Chu S. F. Preparation and characterization of monoclonal antibodies to the trichothecene mycotoxin T-2 // *Appl. and Environ. Microbiol.*—1985.—49, N 1.—P. 168—172.
40. Fan T. S. L., Zhang G. S., Chu F. S. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for T-2 toxin in biological fluids // *J. Food Protec.*—1984.—47, N 12.—P. 964—967.
41. Кононенко Г. П., Буркин А. А., Соболева Н. А., Зотова Е. В. Иммуноферментный метод определения T-2 токсина в контаминированном зерне // *Прикл. биохимия и микробиология*.—1999.—35, № 4.—С. 457—462.
42. Ramakrishna N., Lacey J., Candlish A. A., Smith J. E., Goodbrand I. A. Monoclonal antibody-based enzyme linked

- immunosorbent assay of aflatoxin B1, T-2 toxin, and ochratoxin A in barley // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*—1990.—73, N 1.—P. 71—76.
43. *Ligler F. S., Bredehorst R., Talebian A., Shriver L. C., Hammer C. F., Sheridan J. P., Vogel C. W., Gaber B. P.* A homogeneous immunoassay for the mycotoxin T-2 utilizing liposomes, monoclonal antibodies, and complement // *Anal. Biochem.*—1987.—163, N 2.—P. 369—375.
44. *Mirocha C. J., Punthre S. V., Pawlosky R.J., Hewelson D. W.* Mass spectra of selected trichothecenes // *Modern Methods in the Analysis and Structure Elucidation of Mycotoxins* / Ed. R. J. Cole.—New York: Acad. press, 1986.—P. 353—392.
45. *Vesonder R. F., Rohwedder W. K.* Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of mycotoxins // *Modern Methods in the Analysis and Structure Elucidation of Mycotoxins* / Ed. R. J. Cole.—New York: Acad. press, 1986.—P. 335—352.
46. *Onurtag G. Z., Yazicio D.* Occurrence of T-2 toxin in processed cereals and pulses in Turkey determined by HPLC and TLC // *Food Addit. Contam.*—2001.—N 18.—P. 844—849.
47. *Tanaka T., Yoneda A., Inoue S., Sugiura Y., Ueno Y.* Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.*—2000.—882D, N 1—2.—P. 23—28.
48. *Kostiainen R., Matsuura K., Nojima K.* Identification of trichothecenes by frit-fast atom bombardment liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry // *J. Chromatogr.*—1991.—538, N 12.—P. 323—330.
49. *Niels K. F., Thran U.* Fast methods for screening of trichothecenes in fungal cultures using gas chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.*—2001.—929, N 1—2.—P. 75—78.
50. *Mullett W., Lai E. P. C., Yeung J. M.* Immunoassay of fumonisins by a surface plasmon resonance biosensor // *Anal. Biochem.*—1998.—258.—P. 161—167.

УДК 619:615.93:004.13:636.084  
Надійшла до редакції 17.01.02