

РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ НТ-2 ТОКСИНУ В ЗЕРНІ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ З ФЛЮОРОМЕТРИЧНИМ ДЕТЕКТУВАННЯМ (ВЕРХ/ФЛД)

О. І. Федякова, І. Я. Коцюмбас

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветпрепаратів
та кормових добавок

НТ-2 токсин — представник групи трихотеценових мікотоксинів типу А, які мають генотоксичний та цитотоксичний вплив при надходженні їх з кормом до організму тварин. Цей вплив обумовлений порушеннями процесів синтезу білків, ДНК і РНК. Зміни магістральних синтетичних процесів в організмі спричиняють індукцію апоптозу лімфатичної та кровотворної тканин, активуючи протеїнази (MAP кінрази). Вивчення дозозалежного впливу трихотеценових мікотоксинів на біохімічні процеси в організмі потребує розробки чутливих методів їх визначення в кормах та тканинах тварин. У статті описані етапи розробки методики визначення НТ-2 токсину із застосуванням методу вискоелективної рідинної хроматографії з флюорометричним детектуванням похідних НТ-2 токсину одержаних шляхом реакції його з 1-антроїлнітрилом та 4-диметиламінопіридином на етапі підготовки зразків. Межа чутливості розробленого методу 3 нг/г.

Ключові слова: ТРИХОТЕЦЕНОВІ МІКОТОКСИНИ, НТ-2 ТОКСИН, ЗЕРНО, ВЕРХ, ДЕРИВАТИЗАЦІЯ

Трихотеценові токсини — вторинні метаболіти, що продукуються мікроскопічними грибами роду *Fusarium* (*Myrothecium*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Cylindrocarpum* та *Stachybotry*) за певних умов [1]. Ці речовини володіють канцерогенними, імуносупресорними [2], гепатотоксичними, нефротоксичними та нейротоксичними властивостями [3] і, потрапляючи в організм, можуть приводити до порушення біохімічних процесів. Трихотеценові мікотоксини — стабільні сполуки, стійкі до впливу багатьох хімічних і фізичних факторів. Їх структура не руйнується при зберіганні і переробці сировини та при високих температурах [4].

Разом з найбільш вивченим мікотоксином групи трихотеценів — Т-2 токсином виявляють також НТ-2 токсин, який найчастіше знаходять у зернових (пшениця, кукурудза, овес, ячмінь) і бобових (соя, боби, квасоля) культурах. Основним продуцентом НТ-2 токсину є *Fusarium sporotrichioides* — сапрофітні мікроміцети, які життєздатні за широкого діапазону температур від -2 °С до 35 °С та високій вологості (більше 0,88) [5]. НТ-2 токсин викликає в організмі тварин нейротоксичні і тератогенні зміни та пригнічує імунну систему [6]. Токсичний вплив супроводжується зниженням апетиту і зменшенням живої маси, блювотою, висипами на шкірі і в травному тракті [7]. Ступінь вираження паталогічних змін знаходиться у кореляційній залежності від концентрації НТ-2 токсину в кормі.

Методи, які широко застосовуються в практиці лабораторій для визначення вмісту Т-2 токсину в кормах та харчових продуктах, мало продуктивні та недостатньо чутливі для визначення НТ-2. Наявність токсину не можна оцінити тільки за присутністю чи відсутністю в зразку клітин грибів або їх спор, оскільки плісневі гриби утворюють токсини лише за певних умов, тому корми і харчова сировина не завжди бувають забруднені НТ-2 токсином при наявності мікроміцетів і навпаки — можуть мати високий його вміст за відсутності грибів. Мета роботи — розробка ефективного, чутливого методу, придатного для кількісного визначення трихотеценових мікотоксинів у кормах і харчових продуктах.

Матеріали і методи

Реактиви. У роботі використовували сертифікований стандарт НТ-2 токсину фірми R-biopharm концентрацією 100 мкг/мл. Робочі стандартні розчини готували шляхом розведення в ацетонітрилі (99,9 %, HPLC, Lab Scan) до концентрацій 5, 1 і 0,25 мкг/мл. Для дериватизації НТ-2 токсину в стандартних та дослідних зразках використовували 1-антоїлнітрил (Wako Chemicals) та 4-диметиламінопіридин (Sigma-Aldrich), розчини яких готували у толуолі (99,8 %, HPLC, Lab Scan) у концентраціях 0,325 і 0,3 мг/мл відповідно.

Підготовка зразків стандартних розчинів НТ-2 токсину. Для дослідження відбирали відповідну аликвоту стандартного розчину і висушували її. До сухого залишку додавали дериватизуючі реагенти — 1-антоїлнітрил та 4-диметиламінопіридин. Дериватизовану суміш інкубували 15 хв за температури 50 °С, а потім охолоджували впродовж 15 хв на льодяній бані. Охолоджений дериватизат висушували на роторному випарювачі при температурі 30 °С, а сухий залишок перерозчиняли у мобільній фазі.

Підготовка зразків зерна. До 5 г подрібненого зразка зерна додавали 10 мл 80 % розчину метилового спирту. Суміш енергійно струшували впродовж 10 хв. Одержані екстракти центрифугували протягом 5 хв за величини фактора розділення 3000 g та температури 4 °С. Аликвоту супернатанту розводили водою у співвідношенні 1:5. 10 мл розведеного розчину (еквівалентно 1 г зразка) одержаного екстракту очищували від надлишків матриці методом імуно-афінної хроматографії із застосуванням колонок, які містили антитіла до Т-2, НТ-2 токсинів на поверхні стаціонарної фази (R-biopharm, Німеччина). Очищені екстракти випаровували в потоці азоту та додавали реагенти для утворення флуоресціюючого комплексу з НТ-2 токсином.

Параметри хроматографічної системи. Роботу виконано на системі для високоефективної рідинної хроматографії виробництва Varian (США). Колонка Microsorb 100 C18 (5мкм*250мм*4,6мм), Varian (США). Бінарна градієнтна система елюентів складалася із рухомої фази А: води та рухомої фази В: ацетонітрилу. Елюенти були фільтровані і дегазовані. Параметри програми зміни градієнту фаз наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Зміна градієнту рухомої фази

	А (вода), %	В (ацетонітрил), %
0 хв	30	70
8 хв	0	100
14 хв	0	100
18 хв	20	80
20 хв	0	100
25 хв	30	70

Швидкість потоку елюенту становила 1 мл/хв. Об'єм проби для ін'єкції складав 0,05 мл. Температура колонки 40 °С. Довжина хвилі збудження флуоресцентного детектора 380 нм, довжина хвилі емісії 470 нм. Тривалість аналізу — 60 хв, включаючи час необхідний для стабілізації колонки — 40 хв. При розробці умов розділення частково враховувались умови описані в літературі [8–11], які можна було відтворити за наявного хроматографічного та допоміжного обладнання.

Результати й обговорення

Опираючись на дані, одержані з літератури, а також експериментальним шляхом було підібрано параметри зміни градієнту елюентів та умови проведення реакції дериватизації. За різними літературними джерелами [9, 10] для дериватизації трихотеценових мікотоксинів використовують: 1-нафтоїлхлорид, 2-нафтоїлхлорид, пірен-1-кабонілціанід, 4-диметил-

амінопіридин, 1- та 4-антроїлнітрил у різних концентраціях та співвідношенні. Вибрані та оптимізовані умови проведення реакції утворення флуоресціюючих похідних НТ-2 токсину, передбачають додавання до сухого залишку екстракту зразка 50 мкл 4-диметиламінопіридину та 50 мкл 1-антроїлнітрилу. Суміш інкубували протягом 15 хв за температури 50 °С і охолоджували на льодяній бані впродовж 15 хв. Після завершення реакції реакційну суміш випаровували до сухого залишку на роторному випарювачі.

Утворення комплексу НТ-2 токсину з дериватизуючим реагентом дериват відбувалось за схемою представленою на рисунку 1.

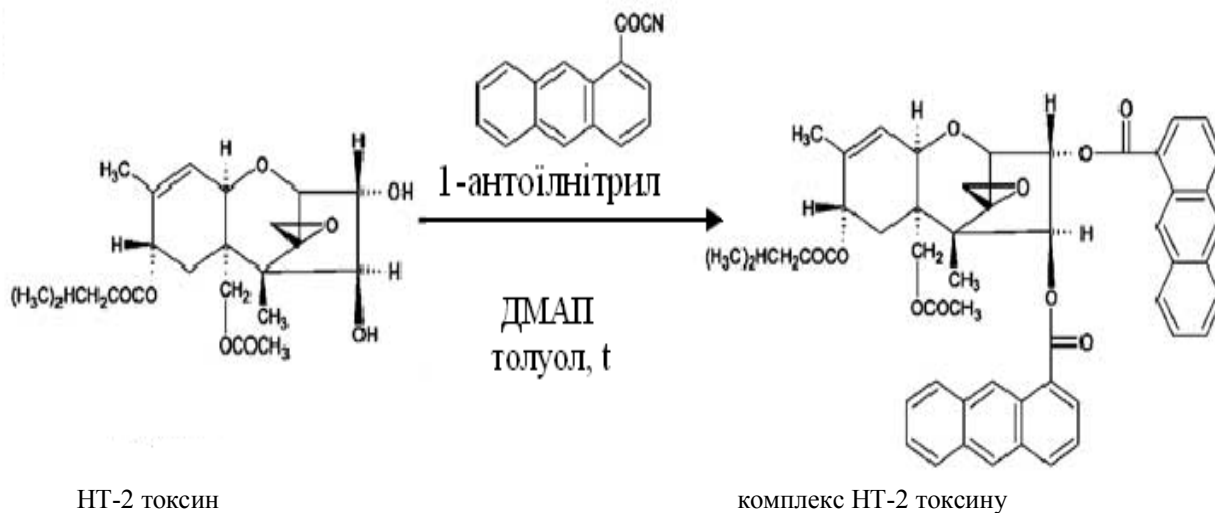


Рис. 1. Схема утворення флуоресціюючих похідних НТ-2 токсину з дериватизуючим реагентом

Зразок висушений у роторному випарювачі розчиняли в 1 мл розчину ацетонітрил:вода 80:20 (v/v). Порівняння хроматограм представлених на рисунку 2., показує наявність піку з часом утримання 14,5 хв у зразку експериментально контамінованому НТ-2 токсином, та відсутність піку аналіту в контрольних зразках зерна вільних від НТ-2 токсину (б).

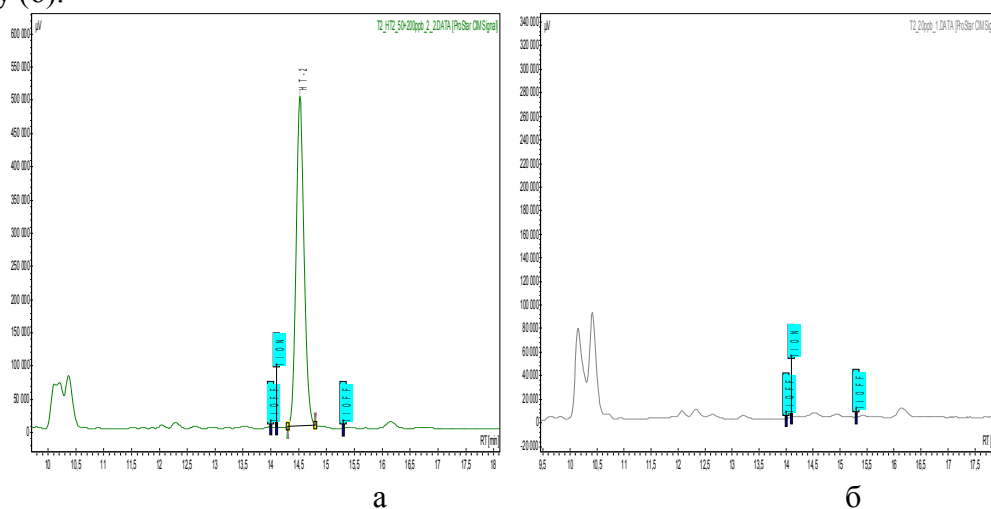


Рис. 2. Хроматограми зразків зерна, фортифікованого НТ-2 токсином в концентрації 200 нг/г зразка (а) та вільного від токсину (б)

З метою перевірки стабільності утвореного комплексу НТ-2 токсину дослідження проводились безпосередньо після підготовки зразка, а також через 2, 4, 8 і 24 години. Приготовані зразки зберігалися у герметично закритих віалах, в холодильнику за температури 4 °С. Порівняння одержаних результатів (табл. 2) дає підставу вважати утворені

комплекси стабільними протягом вказаного періоду. Відмінність одержаних результатів не перебільшує 1,82 %.

Таблиця 2

Стабільність комплексу НТ-2 токсин — дериват

	Висота піку, мкВ	Площа піку, мкВ×хв
Після пробопідготовки	71451,8	12128,7
Через 4 год	72013,0	12366,5
Через 8 год	72039,9	12250,8
Через 24 год	74474,1	12545,2

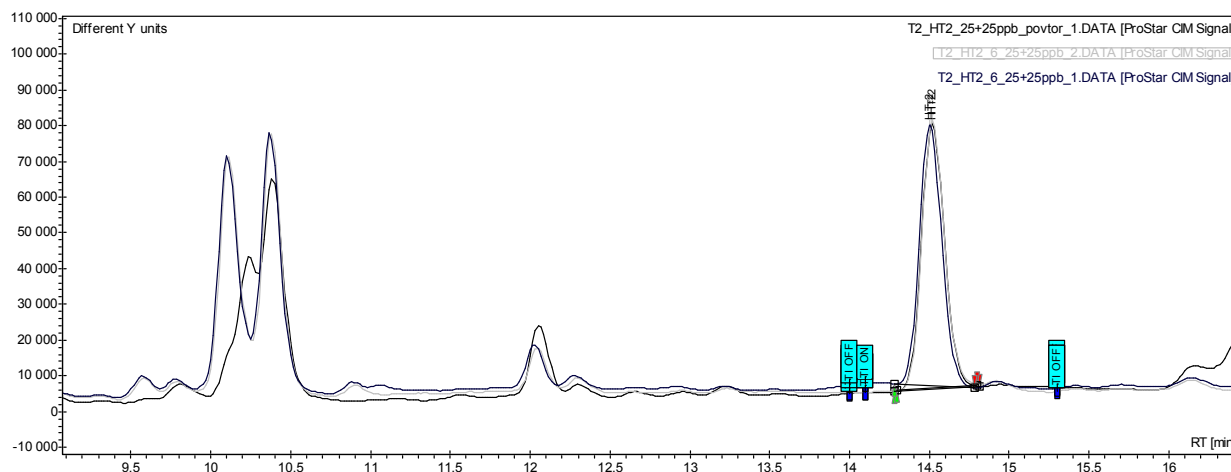


Рис. 3. Хроматограми стандартних зразків НТ-2 токсину, концентрацією 25 нг/мл через 4, 8 та 24 години після приготування зразків

Для перевірки придатності розробленої методики та встановлення лінійності залежності площі піку від концентрації було приготовлено серію зразків, які містили НТ-2 токсин у концентраціях 3, 6, 12.5, 25, 50, 100, 200 нг/мл.

Значення площі піків аналіту в приготовлених модельних розчинах представлено у таблиці 3.

Таблиця 3

Площі піків різних концентрацій НТ-2 токсину

	3 нг/мл	6 нг/мл	12,5 нг/мл	25 нг/мл	50 нг/мл	100 нг/мл	200 нг/мл
Серія 1	1298,7	2893,5	5516,1	11949,0	19589,0	45000,4	83136,2
Серія 2	1362,2	2776,9	5439,4	12325,8	19599,1	45170,0	83391,7
Серія 3	1405,0	2825,7	5442,8	12387,8	19709,8	45375,6	83109,5
Середнє	1355,3	2832,033	5466,1	12220,87	19632,63	45182	83212,47

Аналіз одержаних даних показує відсутність лінійної залежності у всьому діапазоні вибраних концентрацій, що обумовлює необхідність побудови декількох калібрувальних кривих, якщо передбачається проведення аналізу зразків з високим вмістом НТ-2 токсину. Лінійна залежність площ піків у діапазоні низьких концентрацій (3–25 нг/г), найбільш свідчать про придатність розробленої методики для надійного визначення низьких концентрацій НТ-2 токсину в зерні.

Висновки

Розроблена методика дає можливість визначати вміст НТ-2 токсину в зерні методом високоефективної рідинної хроматографії. Чутливість методики 3 нг/г. Враховуючи можливу

наявність в зерні представників різних класів токсинів, у тому числі і трихотеценових доцільно розробити комплексний метод визначення Т-2 і НТ-2 токсину.

Перспективи подальших досліджень. Слід вивчити дозозалежний вплив представників різних класів токсинів в зерні на біохімічні процеси в організмі тварин.

O. I. Fedyakova, I. Y. Kotsiumbas

DEVELOPMENT OF DETECTION HT-2 TOXIN IN CEREALS BY HIGH-PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD WITH FLUORESCENCE DETECTING (HPLC/FLD)

S u m m a r y

HT-2 toxin is a mycotoxin produced by several species of fungi. It is determined by genetic factors and the environmental condition of their growth and save. The result about development condition of detection HT-2 toxin by HPLC are given. Data of sample preparation and derivatisation are presented in this article. Limit of method detection — 3 ppb.

O. И. Федякова, И. Я. Коцюмбас

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НТ-2 ТОКСИНА В ЗЕРНЕ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ФЛЮОРОМЕТРИЧНЫМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ (ВЭЖХ / ФЛД)

А н н о т а ц и я

НТ-2 токсин — представитель группы трихотеценовых микотоксинов типа А, имеющих генотоксическое и цитотоксичное влияние при поступлении их с кормом в организм животных. Это влияние обусловлено нарушениями процессов синтеза белков, ДНК и РНК. Нарушение магистральных синтетических процессов в организме вызывают индукцию апоптоза лимфатической и кроветворной тканей, активируя протеинкиназы (МАР киназы). Изучение дозо-зависимого влияния трихотеценовых микотоксинов на биохимические процессы в организме требует разработки чувствительных методов их определения в кормах и тканях животных. В статье описаны этапы разработки методики определения НТ-2 токсина с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с флюорометричным детектированием производных НТ-2 токсина полученных путем реакции его с 1-антроилнитрилом и 4-диметиламинопиридином на этапе подготовки образцов. Предел чувствительности разработанного метода 3 нг/г.

1. *Sudakin D. L.* Trichothecenes in the environment: relevance to human health / D. L. Sudakin // [Toxicology Letters](#). — Vol. 143. — P 97–107.

2. *Артюх В. П.* Трихотеценовые микотоксины: природа, биотрансформация, биологические эффекты / В. П. Артюх, О. С. Гойстер, Г. А. Хмельницкий, Н. Ф. Стародуб // *Совр. пробл. токсикол.* — 2002. — № 4. — С. 19–26.

3. *Schiefer H. B.* Systemic effects of topically applied trichothecenes. Comparative study of various trichothecenes in mice / H. B. Schiefer, D. C. Hancock, A. R. Bhatti // *J. Vet. Med.* — 1986. — Vol. 33. — P. 373–376.

4. *Ueno Y.* Trichothecene mycotoxins / Y. Ueno // *Mycology, chemistry, and toxicology. Adv Nutr Res.* — 1989. — Vol. 3. — P. 301–353.
5. *Moss M. O.* Fusarial toxins: are they a cause for concern? / M. O. Moss // *Vet. J.* — 2003. — Vol. 165. — P. 184–185.
6. *Котик А. Н.* Случаи микотоксикозов сельскохозяйственных птиц в Украине в 1974–96 гг. / А. Н. Котик, В. А. Труфанова // *Птахівництво (Борки, Харків. обл.) : міжвідомчий тем. наук. збірник.* — 1997. — В. 47. — С. 92–100.
7. *Артюх В. П.* Трихотеценовые микотоксины: природа, биотрансформация, биологические эффекты / В. П. Артюх, О. С. Гойстер, Г. А. Хмельницкий, Н. Ф. Стародуб // *Совр. пробл. токсикол.* — 2002. — № 4. — С. 19–26.
8. *Carmen Cervero M.* Determination of trichothecenes, zearalenone and zearalenols in commercially available corn-based food / M. Carmen Cervero, M. Angeles Castillo, R. Montes, E. Hernández // *Rev. Iberoam. Micol.* — 2007. — № 24. — P. 52–55.
9. *Omurtag G. Z.* Occurrence of T-2 toxin in processed cereals and pulses in Turkey determined by HPLC and TLC / G. Z. Omurtag, D. Yazicio // *Food Addit. Contam.* — 2001. — № 18. — P. 844–849.
10. *Lippolis V. Visconti* Improvement of detection sensitivity of T-2 and HT-2 toxins using different fluorescent labeling reagents by high-performance liquid chromatography / V. Lippolis, M. Pascale, C. M. Maragos, A. Visconti // [Talanta](#). — 2008. — № 74. — P. 1476–1483.
11. *Hooper D. G. Straus* Mycotoxin Detection in Human Samples from Patients Exposed to Environmental Molds / D. G. Hooper, V. E. Bolton, F. T. Guilford, D. C. Straus // *International Journal of Molecular Sciences.* — 2009. — № 10. — P. 1465–1475.

Рецензент: завідувач лабораторії живлення великої рогатої худоби, доктор сільськогосподарських наук Вудмаска І. В.