

АНАЛИЗ МИКОТОКСИНОВ: ПОДГОТОВКА ПРОБ

*Н. Ф. Стародуб*¹

*Л. Н. Пилипенко*²

*А. В. Егорова*²

*И. В. Пилипенко*²

*О. С. Гойстер*¹

*Г. А. Хмельницький*³

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев

²Одесская национальная академия пищевых технологий

³Национальный аграрный университет, Киев

E-mail: nikstarodub@yahoo.com

Рассмотрены основные принципы отбора проб и их подготовки для анализа содержания микотоксинов в различных объектах окружающей среды. Главное внимание уделено трихотеценовым микотоксинам, а также зеараленону, афлатоксину и фумонизинам.

Ключевые слова: микотоксины, анализ, отбор и подготовка проб.

Современный аналитический процесс включает ряд важных стадий [1]. Первые четыре из них — выбор анализируемого материала, формирование выборки проб, отбор образцов и подготовка их для анализа — тесно связаны между собой и во многом зависят от особенностей исследуемого объекта, его физико-химических характеристик, специфики определяемого вещества и т. д. Последующие стадии этого процесса направлены на выделение, идентификацию и количественное определение анализируемого вещества, далее следуют статистическая оценка полученных данных и окончательные выводы. Подготовка проб для анализа является крайне необходимой процедурой, поскольку в большинстве случаев нельзя использовать непосредственно исходный материал, иногда еще нужно проводить очистку загрязненного образца, преконцентрацию анализируемой субстанции. Следует отметить, что такие процедуры достаточно важны, так как в значительной степени влияют на окончательный результат анализа. Они имеют ряд особенностей для конкретных обследуемых объектов, анализируемых веществ и используемых методик. Ранее мы [2, 3] уже останавливались на специфике подготовки проб при анализе пестицидов. Цель настоящей статьи — дать обобщенный анализ сведений об особенностях подготовки проб для выявления и количественной оценки содержания микотоксинов в ряде объектов

окружающей среды. Эта группа соединений широко распространена и представляет большую опасность для живых организмов [4, 5]. Основное внимание в обзоре уделено трихотеценовым микотоксинам, хотя для выявления некоторых особенностей работы с ними в поле зрения будут находиться и другие виды микотоксинов, в частности зеараленон, афлатоксин и фумонизины.

Экстракция: общие положения

В последнее время усилия исследователей сосредоточены на развитии способов экстракции с целью повышения ее эффективности путем уменьшения объемов растворителей, сокращения времени процедуры и возрастания уровня ее автоматизации [6]. Особенности выполнения техники экстракции в зависимости от природы образца приведены ниже (рисунок). Если образец представляет собой жидкость, то процесс экстракции характеризуется следующими особенностями: использованием не смешивающегося с образцом растворителя, трудностью выделения полярных и ионных компонентов из водных растворов и необходимостью применения большого объема органического растворителя. Для устранения этих недостатков предложено применять твердофазную экстракцию (ТФЭ) и твердофазную микроэкстракцию (ТФМЭ) [7–9]. В ТФЭ образец просачивается через твердую фазу, аккумулирующую интересующее вещество, которое

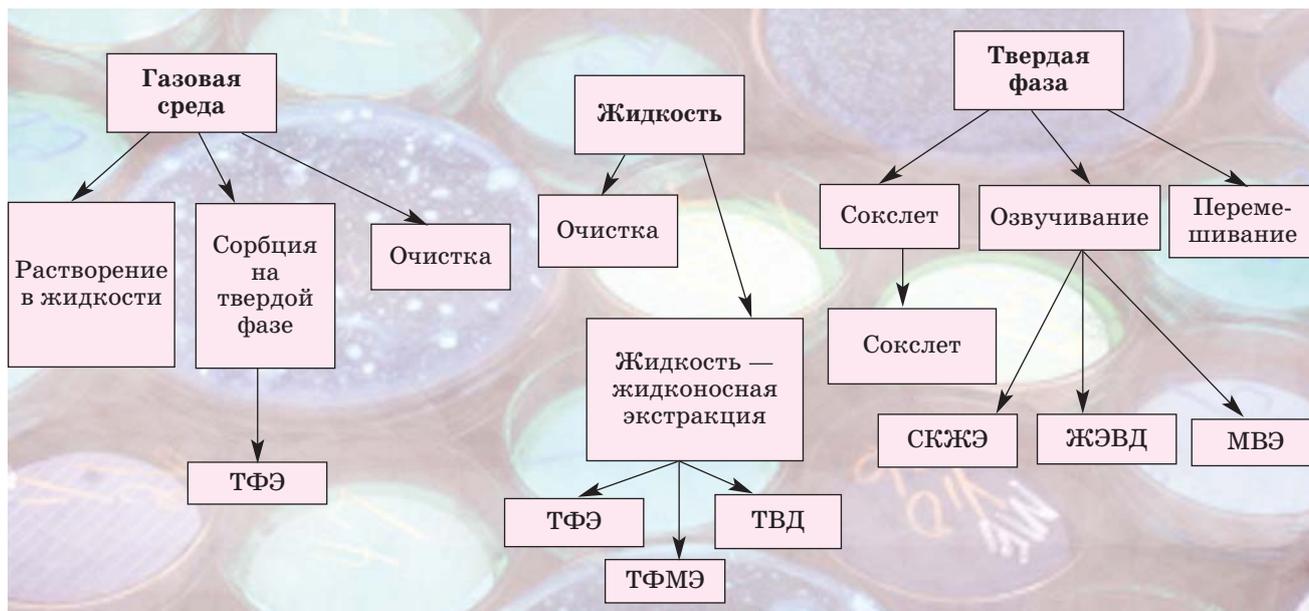
затем будет с нее элюировано. Такая техника открывает возможности получения экстракта с высокой избирательностью для анализируемого вещества и в случае его высокой концентрации. К тому же многие твердофазные селективные системы применяются в виде специальных картриджей, дисков или многоячеечных плат, что способствует автоматизации процесса. Вместе с тем метод ТФЭ имеет и ряд недостатков, основным из которых является то, что экстрагируемое вещество находится в среде, не соответствующей дальнейшим условиям анализа, а следовательно, требуется обязательное высушивание образца и его перерастворение. Этого можно избежать, применяя ТФМЭ, являющуюся в действительности техникой без растворителя. В ней волокна, покрытые полимерами, находятся между образцом и растворителем. Десорбция вещества достигается легко при газовой-жидкостной хроматографии [8, 9]. Интересным вариантом этой техники является применение встряхивания при сорбции и термического воздействия при десорбции (ТВД) [10]. Вместе с тем обе рассмотренные техники зависят от природы сорбента и нередко не обеспечивают полной экстракции, что ограничивает их применение.

Традиционно используемые способы экстракции базируются на применении ультразвука и принципа Сокслета [6]. Их усовершенствование связано с развитием сверхкритической жидкостной экстракции (СКЖЭ), жидкостной экстракции при высоком давлении (ЖЭВД) и микроволновой

экстракции (МВЭ). Поскольку при экстракции важным является увеличение растворимости веществ, повышение их диффузии, уменьшение вязкости растворителя, а также улучшение десорбции анализируемого вещества с поверхности матрикса, то повышение температуры при выполнении СКЖЭ, наряду с использованием сверхкритических растворителей, является вполне оправданным [11]. В случае ЖЭВД поддерживается оптимальное сочетание температуры и давления в системе. МВЭ может сочетать все указанные выше условия в дополнение к эффекту микроволнового излучения [12, 13]. Одним из недостатков такой экстракции является то, что в этом случае требуется дополнительная фильтрация конечного содержимого образца. Несмотря на уже достигнутые успехи в развитии техники экстракции, обеспечение ее высокой эффективности, простоты, низкой стоимости и минимальности применения растворителей, широкое использование которых может причинить вред состоянию окружающей среды, требует дальнейших исследований в этом направлении.

Особенности формирования выборки при анализе объектов окружающей среды

Микромицеты рода *Fusarium*, которые способны продуцировать опасные микотоксины, контаминируют широкий спектр объектов окружающей среды [4, 5], при этом важно то, что они очень часто встречаются



Основные варианты использования техники экстракции в зависимости от состояния образца

в кормах животных. Особую опасность представляют микотоксины, включающие такие группы токсических агентов, как трихотецены, монилиформин, зеараленон и фузонизины [14]. Идентифицировано более 150 трихотеценовых токсических агентов, среди которых наиболее опасными и часто встречающимися являются Т-2, дезоксиниваленол, ниваленол, вомиотоксин и ангуидин [15]. Кроме *Fusarium*, трихотецены продуцируются такими микромицетами, как *Trichoderma* и *Stachybotrys cephalosporium*, а также рядом других [16]. Биологический эффект трихотеценов проявляется на уровне желудочно-кишечного тракта, дермато-, иммуно-, гемато- и генотоксичности [17]. Преимущественными продуцентами Т-2 микотоксина являются *F. sporotrichioides* и *F. poae* [18]. Для большинства видов животных ЛД₅₀ Т-2 микотоксина составляет 5 мг/кг массы [19], хотя уже при дозе, равной 0,1 мг/кг, наблюдаются существенные изменения в биохимических показателях мозга [14]. В бывшем СССР предельно допустимой дозой Т-2 микотоксина в зерне пищевого и фуражного назначения считалась доза 100 нг/г [20]. Другой представитель трихотеценов — вомиотоксин менее токсичен, чем Т-2, но более распространен [19]. Для него величина ЛД₅₀ колеблется в пределах 50–70 мг/кг массы тела животного, хотя он тоже проявляет биологический эффект при значительно меньших дозах (0,001 мг/кг). Поэтому экспертами комитетов ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам установлен его допустимый лимит на уровне 1 мкг/кг массы тела животных [21]. Поэтому, учитывая приведенные выше величины токсичности и допустимые концентрации отдельных трихотеценов, следует ориентироваться на уровень чувствительности применяемых методов, с одной стороны, а с другой — на подбор высокоэффективных способов экстракции этих соединений из различных объектов окружающей среды, чтобы не допустить их потери в процессе подготовки проб к анализу.

Безусловно, анализу на наличие этих токсинов подвергаются самые различные корма животных: зерно, фураж, корнеплоды, сено и т. д. Что касается продуктов питания человека, то в поле зрения санитарных врачей находится все, начиная от зерна, муки, мяса различных животных, орехов, овощей и заканчивая чаем, цитрусовыми и такими напитками, как пиво, вино и пр. Уровень указанных выше токсинов у животных контролируется в крови, моче и в различных тканях.

Зоны загрязнения продуктов микотоксинами часто видны визуально. Как правило, микотоксины неравномерно распределены в пищевых продуктах. При идентификации типа микотоксина достаточно отобрать образцы загрязнений, однако при оценке уровня загрязнения образцы должны быть тщательно перемешаны или даже гомогенизированы. Важно и количество отбираемых образцов. Оно должно быть достаточным, с одной стороны, для осуществления анализа, а с другой — для заключения об удельной интенсивности загрязнения. Для жидкостей, сыпучих веществ или компактных твердых объектов это может составлять несколько килограммов массы, а для небольших отдельных объектов (типа орехов) — до нескольких сотен штук. В дальнейшем отобранные образцы могут быть разделены на отдельные части для осуществления параллельных анализов [22].

Подготовка образцов для анализа

Основным приемом подготовки образца для анализа является тот или иной тип экстракции, общие принципы которой изложены выше. Среди микотоксинов встречаются как растворимые в воде, так и те, что растворяются лишь в полярных или неполярных растворителях, и это следует учитывать в процессе осуществления экстракции [23].

При анализе жидкостей с заранее предполагаемым низким содержанием микотоксинов их концентрируют с использованием вакуумного испарителя. Так, в случае анализа различных метаболитов микотоксина Т-2 в моче [24] ее концентрируют испарением при низком давлении. Затем образец наносят сначала на колонку с амберлитом ХАД-2 с последующей его элюцией метанолом, а затем на колонку с Florisil и элюируют смесью хлороформа с метанолом в различных соотношениях в зависимости от набора выделяемых метаболитов. Аналогичные процедуры предварительной очистки выполняют и при анализе фекальных масс, но предварительно осуществляют ряд дополнительных процедур — экстракцию образца с помощью 50%-го водного раствора метанола (в соотношении 1:4), смешивание с ацетоном (в соотношении 1:2,5), далее высушивание экстракта, растворение остатка в воде и, наконец, экстракцию хлороформом. Для анализа могут быть использованы как водные образцы, так и находящиеся в хлороформе. При работе с тканями, в частности с печенью,

предлагается подобный алгоритм экстракции и предварительной очистки образца перед анализом [25]. Имеется сообщение [26] о выделении Т-2 микотоксина и его производных из культуры фильтрованием гомогената через подушку целита 545, а затем перемешиванием фильтрата с амберлитом ХАД-4 в течение 12 ч. Далее следует промывание сорбента водой и элюирование микотоксина ацетоном с последующим его высушиванием для дальнейшего перерастворения в метаноле и анализа соответствующим методом. Согласно другим авторам [27], экстракция может быть осуществлена смесью метанола и хлороформа с последующей обработкой продукта ацетоном. Затем экстракт наносится на колонку кремнезема, с которой микотоксины элюируют *n*-гексаном, смесью *n*-гексан–ацетон, ацетоном и метанолом. Полученные фракции анализируют тонкопленочной хроматографией.

Для экстрагирования Т-2 микотоксина из зерна предлагается использовать 40% -й водный раствор метанола, причем соотношение растворителя и образца должно быть 2:1 [28]. Другие исследователи используют для этих целей смесь ацетонитрила с водой (5:1) [20]. При экстракции Т-2 микотоксина и диацетоксискирпенола из листьев и ветвей растений после ацетонитрила применяют эфир для обезжиривания полученного продукта. В зависимости от дальнейших целей основной ацетонитриловый экстракт выпаривают с помощью вакуумного испарителя и затем растворяют осадок в смеси метанола и воды в соотношении 1:1 или 1:5. Следующий этап подготовки образца заключается в нанесении его на колонку с амберлитом ХАД-2 и элюции микотоксинов метанолом [29]. Для экстрагирования дезоксиниваленола также используют 10,5% -й водный раствор ацетонитрила [30]. Данный вид трихотеновых микотоксинов выделяли из риса и с помощью двухступенчатой экстракции: сначала 70% -м, а затем 100% -м метанолом. Затем обе фракции объединяли и, более того, подвергали их усущке для концентрирования содержимого. Далее экстракт насыщали хлористым натрием, фильтровали и после удаления из него метанола обрабатывали двукратным объемом этилацетата [31]. Для одновременной экстракции таких трихотеновых микотоксинов, как дезоксиниваленол и ниваленол, Такака Т. и соавт. [32] предлагают использовать смесь ацетонитрила и воды в соотношении 3:1. Этот растворитель позволяет экстрагировать до 87% дезоксиниваленола и 86% ниваленола

из полированного риса и пшеницы при их исходной концентрации 300 мкг/кг. Для обезжиривания авторы рекомендуют использовать *n*-гексан. После такой обработки образца им удавалось с помощью двухступенчатой хроматографии на колонках Florisil и Sep-pak выявить указанные выше микотоксины с чувствительностью 2 мкг/кг.

Из содержимого рубца жвачных животных трихотены экстрагировали с помощью этилацетата, а афлатоксин, охратоксин и зеараленон — с применением CHCl_3 [33]. Этилацетат используют для выделения полного набора трихотенов [34]. Этот же растворитель применяли и для экстрагирования Т-2 микотоксина и его производных из испражнений животных [35]. Далее экстракт обрабатывали эфиром, высушивали и перерастворяли в метаноле, а после добавления пятикратного объема воды наносили на колонку с амберлитом ХАД-2 с последующим элюированием микотоксинов 90% -м водным раствором метанола.

С помощью ТФЭ экстрагировали зеараленон и охратоксин А из почвы [36]. Для этой цели использовали колонки, наполненные сорбентом С8. Предварительно обрабатывали образцы из почвы в течение 30 мин смесью метанол — вода (9:1), содержащей аскорбиновую кислоту (1,7%), с последующей нейтрализацией содержимого выпариванием его в потоке азота и растворением в фосфорной кислоте. Таким способом удается экстрагировать 85,8 и 93,4% охратоксина и зеараленона при воспроизведении результатов 5,1 и 12,8% соответственно. Воспроизводимость анализов составляет 8,5 и 15% при концентрациях 0,2–30 мкг/кг охратоксина и 1–100 мкг/кг зеараленона. Сообщается [37], что экстракция охратоксина А более интенсивно осуществляется смесью водного раствора бикарбоната натрия с метанолом, чем в случае применения смеси водного раствора фосфорной кислоты и метанола.

Для экстрагирования зеараленона из зерен пшеницы и крупы была успешно применена техника МВЭ [38]. Подобраны растворители, установлены оптимальные показатели для времени и температуры. В частности показано, что при использовании смеси метанола с ацетонитрилом в соотношении 1:1 (по объему) при 80 °С в течение 5 мин удается экстрагировать до 92% данного микотоксина из заранее приготовленного образца. При этом стандартное отклонение результатов от опыта к опыту было в пределах 12%, что согласуется с требованиями законодательства

ЕС. Иной подход для элюирования общего зеараленона и его α -производного из зерна пшеницы основан на использовании усиленной жидкостной экстракции [39]. Стационарная фаза колонки представлена C_{18} -полимером, а в качестве растворителя используется смесь ацетонитрил–метанол–вода, содержащая 15 ммоль ацетата аммония в соотношении 10:55:35 со скоростью протекания 1 мл в минуту через объем 11 мл при давлении, равном 1500 psi, и температуре 50 °С. В диапазоне концентраций 50–200 нг/г зерна удается экстрагировать около 96% зеараленона и 98,4% его α -производного. При этом стандартное отклонение результатов не превышает 4,6%. Испытания этого способа экстрагирования показали его пригодность для анализа загрязнения данными микотоксинами овса, ржи и дерти. Однако в случае риса экстрагирование α -зеараленона не было столь успешным.

ТФЭ сочетали с последующей иммуноаффинной хроматографией для подготовки образцов пшеницы, ржи, ячменя и овса перед определением в них охратоксина А и зеараленона с помощью жидкостной хроматографии высокого давления с флуоресцентной регистрацией [40]. Таким способом удается экстрагировать не менее 68 и 78% соответственно охратоксина А (0,6 и 2,5 мкг/кг) и зеараленона (9 и 25 мкг/кг), предварительно добавленных в указанные выше образцы. Стандартное отклонение результатов от опыта к опыту для этих микотоксинов колеблется в пределах 2–15 и 2–19%. Для экстрагирования и очистки зеараленона из зерна пшеницы и риса были испытаны три типа ТФЭ (С-18, кремниевые и Florisil-картриджи), а также иммуноаффинная хроматография [41]. Оказалось, что картриджи с Florisil-сорбентом обеспечивают большую степень экстракции этого микотоксина, чем картриджи, наполненные С-18 и, особенно, кремниевыми сорбентами, которые вообще малоэффективны. При этом смесь метанола с 1%-м водным раствором хлористого натрия в соотношении 8:2 или 6:4 оказалась наиболее подходящей в сравнении с другими испытанными системами. Осуществлен поиск новых растворителей для экстрагирования охратоксина А из продуктов питания и, в частности, из виноградного вина [42]. Показано, что экстракция смесью раствора карбоната натрия и полиэтиленгликоля (5% $NaHCO_3$ и 1% полиэтиленгликоля 8000) с последующей иммуноаффинной хроматографией обеспечивают высвобождение около 76% данного токсина при исходной его концент-

рации 0,05–1 мкг/кг массы, с уровнем воспроизводимости результатов 8 и 12% соответственно. Такая экстракция происходит более интенсивно, чем в случае использования смесей на основе метанола.

Предпринята попытка объединить экстрагирование фумонизинов из образцов кукурузы и очистку полученного продукта в единый процесс с помощью ионообменной хроматографии [43]. Для этого колонку предварительно промывали метанолом и смесью метанола и воды (3:1). Затем небольшую порцию кукурузы помещали в специальную верхнюю часть колонки и вносили туда аликвоту смеси метанола и воды (3:1). Экстрагирование продолжалось в течение 1 ч, после чего колонку промывали метанолом и 4 раза смесью метанола с уксусной кислотой (95,5:0,5). Собранные фракции объединяли, высушивали в потоке азота при 60 °С и растворяли в метаноле для последующего анализа.

Проведено сравнительное изучение эффективности способов подготовки образцов при экстрагирования фумонизинов из кукурузы и ее продуктов с помощью различных растворителей, а также при очистке полученных экстрактов [44]. Оказалось, что экстракция фумонизинов смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1:1 и последующая иммуноаффинная хроматография более эффективны при подготовке указанных выше образцов для анализа, чем использование для этих целей смеси метанола с водой (1:1) и затем проведение анионообменной хроматографии. Хотя отмечено, что первая система может вносить и некоторые погрешности в результаты анализа. В этой связи представляют интерес данные о том, что с помощью смеси метанол–ацетонитрил–вода (в соотношении 1:1:2) удается выделить менее 5% фумонизинов B_1 и B_2 , добавленных к рисовой муке из расчета 500 нг/г [45]. При повышении температуры до 40–50 °С, снижении рН смеси до 3,3 с помощью 0,1 М натрийцитратного буфера повышается эффективность экстракции обоих фумонизинов до уровня 20–25%. Однако это наблюдается лишь в узком диапазоне варьирования указанных выше условий. Так, повышение температуры до 60 °С или доведение рН смеси до значений 4–6 резко снижает интенсивность экстракции фумонизинов. Вместе с тем применение 0,1 М раствора натриевой соли ЭДТА обеспечивает за три этапа экстракции почти 50%-е их извлечение. Обращает на себя внимание тот факт, что устойчивость обоих фумонизинов существенно изменяется в отдельных об-

разцах и в присутствии различных ингредиентов. При внесении в образец глюкозы через 24 ч сохраняется лишь 25% фумонизинов.

Что касается Т-2 микотоксина, то следует отметить его достаточно высокую устойчивость в водных растворах [46]. При температуре от 4 до 37 °С он сохраняется на протяжении трех недель. При дальнейшем увеличении температуры его стабильность снижается. В среде для культуры ткани как в присутствии белков, так и без них он сохраняет более высокую стабильность, чем в среде Хенкса. Особенности стабильности микотоксинов следует учитывать при подготовке образцов для анализа, чтобы избежать потери их в течение этого процесса. Вместе с тем важно знать и способы инактивации микотоксинов для предотвращения опасности их влияния на исследователя и окружающую среду. Так, Т-2 микотоксин инактивируется в течение 30 мин раствором, содержащим 2,5% гипохлорита натрия и 0,25 н. едкого натрия [47]. Важные сведения получены при изучении стабильности некоторых трихотеценов в различных средах. Установлено [48], что ацетонитрил является наиболее подходящим растворителем для сохранения этих видов токсинов. Так, дезоксиваленол и ниваленол в этом растворителе остаются стабильными в течение 24 месяцев при температуре –18 °С. Однако они в значительной степени разлагаются по истечении этого срока, а также через 12 месяцев в случае сохранения при температуре 25 °С. Несомненно, эти сведения важны для того, чтобы ориентироваться, при каких условиях и в каких растворителях должны сохраняться подготовленные для анализа образцы, во избежание потери содержимого в процессе хранения.

В процессе исследования эффективности различных веществ для извлечения афлатоксина В₁ из отдельных продуктов и кормов было установлено [49], что экстрагирующие растворы на основе метанола более приемлемы по сравнению с теми, которые включают ацетонитрил. Последний растворитель способен более интенсивно взаимодействовать с основным матриксом анализируемого объекта и более активно поглощает воду, что препятствует экстрагированию данного микотоксина. Известно, что афлатоксины растворимы в слегка полярных и нерастворимы в полностью неполярных растворителях. Для их экстрагирования используют такие органические растворители, как ацетон, хлороформ и метанол [50]. Вместе с тем небольшое количество воды в них

способствует проникновению органических веществ в образец и повышает эффективность экстракции. Обработка полученного продукта гексаном позволяет его обезжирить [51]. Считается [50, 51], что для выделения и очистки этих микотоксинов наиболее подходящими являются картриджи для ТФЭ и иммуноаффинной хроматографии. Причем связывающая фаза может быть полярной (кремниевые картриджи) или неполярной (С₂, С₈, С₁₈, циклогексильные либо фениловые картриджи). Предложены и мультифункциональные колонки с иммуноаффинной хроматографией, а также ряд приспособлений для очистки экстрагированных фумонизинов [50]. Международная федерация производства молока, Международный союз чистой и прикладной химии и Международный союз атомной энергии совместно с Организацией ООН по вопросам продовольствия и сельского хозяйства (ФАО) осуществили проверку метода определения афлатоксина М₁ в молоке путем иммуноаффинной очистки с последующей тонкослойной хроматографией [52]. Было показано, что при концентрации этого токсина, равной 0,5 мкг/л, воспроизводимость результатов составляет 34–53%.

Следует обратить внимание на необходимость проведения дополнительной очистки полученных экстрактов при анализе микотоксинов с целью удаления приобретенной ими окраски за счет самого образца. Во многих случаях такая процедура не является строго обязательной, особенно при последующем анализе содержания микотоксинов иммуно-химическими методами. Однако при осуществлении различных хроматографических процедур прибегают к предварительной хроматографии экстрактов с помощью сорбентов С₁₈ или амберлит XAD-2 (XAD-4), колонок типа SAX или Florisil [26, 29, 35, 36, 43, 44]. Кроме того, на этапе удаления жира также достигается снижение уровня окраски экстракта [20, 25, 27, 32].

Выявление и количественное определение содержания микотоксинов в объектах окружающей среды является чрезвычайно важным, при этом необходимо обеспечить объективность анализа, его воспроизводимость и адекватность конкретным ситуациям. Ввиду этого еще в 1995 г. Европейская комиссия обсуждала возможность стандартизации всех этапов осуществления анализа [53, 54]. Исходя из приведенных выше сведений для микотоксинов, растворимых в органических средах (типа Т-2, охратоксина, цитринина, фузариевой кислоты), наиболее приемлемой является процедура подготовки

образца, которая включает экстрагирование их с помощью смесей хлороформа, метанола и этилацетата с применением эфира или *n*-гексана для обезжиривания полученного продукта. Как правило, для дальнейшего анализа необходимо его высушивание в потоке азота и растворение в метаноле. В случае использования иммунных методов анализа микотоксина Т-2 целесообразным является применение смеси ацетонитрила с водой в соотношении 5:1, которая обеспечивает и более эффективную экстракцию водорастворимых микотоксинов (типа фумонизинов В₁ и В₂), чем смесь метанола и воды или одной воды, хотя в этом отношении весьма перспективными оказались водные растворы Na₂ЭДТА. Следует отметить, что смесь ацетонитрила и воды (3:1) признана эффективной и для одновременной экстракции дезоксиниваленола и ниваленола [32]. Современный уровень развития техники экстрагирования базируется на использовании специальных картриджей с различными наполнителями, которые подобраны для того или иного вида микотоксинов. Кроме того, предложен целый ряд иммуноаффинных методов выделения и очистки групп этих токсинов и их отдельных представителей. В частности, в последнее время появились сообщения о разработке автоматизированной системы для ТЭФ, иммуноэкстракции и иммунофильтрации [55–57] для многих соединений. Описан вариант микроэкстракции, когда можно использовать буквально микролитры таких растворителей, как бензол, толуол, этилбензол, октанол, ксилен и др. [58]. Имеется сообщение и о возможности практического применения тонкопленочной микроэкстракции [59]. Дальнейшее развитие техники иммуноэкстракции предполагает применение импринтинг-вариантов, когда полимер моделирует специфические сайты связывания микотоксина, как это предложено для направленного выделения охратоксина А [60].

1. *Jinno K.* Modern sample preparation techniques // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2002. — V. 373. — P. 1–2.
2. *Стародуб Н. Ф., Стародуб В. М.* Биосенсоры и контроль пестицидов в воде и продуктах // *Химия и технология воды.* — 2001. — V. 23, №6. — С. 612–638.
3. *Стародуб Н. Ф., Стародуб В. М.* Биосенсорный контроль загрязнения воды некоторыми органическими веществами // *Там же.* — 2002. — Т. 24, № 5. — С. 447–472.
4. *Артюх В. П., Гойстер О. С., Хмельницкий Г. А., Стародуб Н. Ф.* Трихотеценовые микотоксины: определение в объектах окружающей среды // *Биополимеры и клетка.* — 2003. — Т. 19, №3. — С. 1–8.
5. *Артюх В. П., Гойстер О. С., Хмельницкий Г. О., Стародуб М. Ф.* Трихотеценовые микотоксины: природа, биотрансформация, биологические эффекты // *Совр. пробл. токсикол.* — 2002. — №4. — С. 19–26.
6. *Camel V.* Extraction techniques // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2002. — V. 372. — P. 39–40.
7. *Dean J.R.* Extraction methods for environmental analysis. — Chichester: John Wiley and Sons, 1998. — 371 p.
8. *Thurman E. M., Mills M. S.* Solid phase extraction: principles and practice. — New York: John Wiley and Sons, 1998. — 344 p.
9. *Pawliszyn J.* Solid phase microextraction: Theory and practice. — New York: John Wiley and Sons, 1997. — 264 p.
10. *Baltussen E., Sandra P., David F., Cramers C.* Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles // *J. Microcolumn Sep.* — 1999. — V. 11, N10. — P. 737–747.
11. *Ramsey E.D.* Analytical supercritical fluid extraction techniques. — Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998.
12. *Richter B. E., Jones B. A., Ezzell J. L. et al.* Technique for Sample Preparation // *Anal. Chem.* — 1996. — V. 68. — P. 1033–1039.
13. *Camel V.* Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples // *Trends Anal. Chem.* — 2000. — V. 19. — P. 229–248.
14. *Conkova E., Laciakova A., Kovac G., Seidel H.* Fusarial toxins and their role in animal diseases // *Vet. J.* — 2003. — V. 165. — P. 214–220.
15. *Pittet A.* Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds — an updated review // *Rev. de Med. Veter.* — 1998. — V. 149. — P. 479–492.
16. *Ticha J., Kaisrova A., Lucny M.* Toxinogenic moulds and their metabolites in cereals // *Mlynsko-pekařensky prumysl.* — 1984. — V. 4. — P. 113–114.

17. *Ostry V.* Filamentous microscopic fungi (moulds), mycotoxins and human health. — Praha: SZU, 1998. — 20 p.
18. *Moss M. O.* Mycotoxins // *Mycolog. Res.* — 1996. — V. 100. — P. 513–523.
19. *Moss M. O.* Fusarial toxins: are they a cause for concern? // *Vet. J.* — 2003. — V. 165. — P. 184–185.
20. *Кононенко Г. П., Буркин А. А., Соболева Н. А., Зотова Е. В.* Иммуноферментный метод определения Т-2 токсина в контаминированном зерне // *Приклад. биохим. и микробиол.* — 1999. — Т. 35, №4. — С. 457–462.
21. *WHO.* Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. 56th report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives // *WHO Technical Report Series 906.* — Geneva, 2002.
22. *Jaimez J., Fente C. A., Vazquez B. I. et al.* Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis // *J. Chromatogr.* — 2000. — V. 882. — P. 1–10.
23. *Steyn P. S.* Mycotoxins, general view, chemistry and structure // *Toxicol. Let.* — 1995. — V. 82/83. — P. 843–851.
24. *Yoshizawa T., Sakamoto T., Kuwamura K.* Structures of deepoxytrichothecene metabolites from 3'-hydroxy HT-2 toxin and T-2 tetraol in rats // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1985. — V. 50, N 3. — P. 676–679.
25. *Yoshizawa T., Sakamoto T., Okamoto K.* In vitro formation of 3'-hydroxy T-2 and 3'-hydroxy HT-2 Toxins from T-2 by liver homogenates from mice and monkeys // *Ibid.* — 1984. — V. 47, N 1. — P. 130–134.
26. *Swanson S. P., Rood H. D., Behrens J. C., Sanders P. E.* Preparation and characterization of the deepoxy trichothecenes: deepoxy HT-2, deepoxy T-2 triol, deepoxy T-2 tetraol. Deepoxy 15-monoacetoxyscirpenol and deepoxy scierpentiol // *Ibid.* — 1987. — V. 53, N 12. — P. 2821–2826.
27. *Ishii K., Ueno V.* Isolation and characterization of two new trichothecenes from *Fusarium sporotrichioides* strain M-1-1 // *Ibid.* — 1981. — V. 42, N 3. — P. 541–543.
28. *Vesonder R. F., Ciegler A., Burmeister H. R., Jensen A. H.* Acceptance by swine and rats corn amended with trichothecenes // *Ibid.* — 1979. — V. 38, N 2. — P. 344–346.
29. *Mirocha C. J., Abbas H. K., Treeful L.* Bean G. T-2 toxin and diacetoxyscirpenol metabolism by *Baccharis* spp // *Ibid.* — 1988. — V. 54, N 9. — P. 2277–2280.
30. *Schneider L., Pichler H., Krska R.* An enzyme linked immunoassay for the determination of deoxynivalenol in wheat based on chicken egg yolk antibodies // *Frasenius J. Anal. Chem.* — 2000. — V. 367. — P. 98–100.
31. *Clifford L. J., Jia Q., Pestka J. J.* An improved method for the purification of the trichothecene deoxynivalenol (vomitoxin) from *Fusarium graminearum* culture // *J. Agric. Food Chem.* — 2003. — V. 51. — P. 521–523.
32. *Tanaka T., Yoneda A. et al.* Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry // *J. Chromatogr.* — 2000. — V. 882, N1–2. — P. 23–28.
33. *Kiessling K.H., Pettersson H., Sandholm K., Olsen M.* Metabolism of aflatoxin. Ochratoxin, zearalenone and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa and rumen bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1984. — V. 47, N 5. — P. 1070–1073.
34. *Plattner R. D., Tjarks L. W., Beremand M. N.* Trichothecenes accumulated in liquid culture of a mutant of *Fusarium sporotrichioides* NRRL 3299 // *Ibid.* — 1989. — V. 55, N 9. — P. 2190–2194.
35. *Visconti A., Mirocha C. J.* Identification of various T-2 toxin metabolites in chicken excreta and tissues // *Ibid.* — 1985. — V. 49, N 5. — P. 1246–1250.
36. *Mortensen G. K., Strobel B.W., Hansen H. Ch. B.* Determination of zearalenone and ochratoxin A in soil // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2003. — V. 376 — P. 98–101.
37. *Moller T. E., Nyberg M.* Ochratoxin A in raisins and currants: basic extraction procedure used in two small marketing surveys of the occurrence and control of the heterogeneity of the toxins in samples // *Food Addit. Contamin.* — 2003. — V. 20, N11. — P. 1072–1076.
38. *Pallaroni L., Von Holst Ch., Eskilsson C. S., Bjorklund E.* Microwave-assisted extraction of zearalenone from wheat and corn // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2002. — V. 374 — P. 161–166.
39. *Urraca J. L., Marazuela M. D., Moreno-Bond M. C.* Analysis for zearalenone and α -zearalenone in cereals and swine feed using accelerated solvent extraction and liquid chromatography with fluorescence detection // *Anal. Chem. Acta* — 2004. — V. 524, N1–2. — P. 175–183.
40. *Eskola M., Kokkonen M., Rizzo A.* Application of manual and automated systems for purification of ochratoxin A and zearalenone in cereals with immunoaffinity columns // *Agricult. Food Chem.* — 2002. — V. 50. — P. 41–47.
41. *Llorens A., Mateo R., Mateo J. J., Jimenez M.* Comparison of extraction and clean-up procedures for analysis of zearalenone in corn, rice and wheat grains by high-performance liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection // *Food*

- Additiv. Contamin. — 2002. — V. 19, N 3. — P. 271–281.
42. *Serra R., Mendonca C., Abrunhosa L. et al.* Determination of ochratoxin A in vine grapes: comparison of extraction procedures and method validation // *Anal. Chem. Acta.* — 2004. — V. 513. — P. 41–47.
 43. *Valazques C., Llovera M., Pena E. et al.* Linking extraction and purification of maize samples for fumonisin analysis // *Food Addit. Contam.* — 1999. — V. 18, N 3. — P. 125–128.
 44. *De Girolamo A., Solfrizzo M., von Holst Ch., Visconti A.* Comparison of different extraction and clean-up procedures for the determination of fumonisins in maize and maize-based food products // *Ibid.* — 2001. — V. 18, N 1. — P. 59–67.
 45. *Kim E. K., Scott P. M., Lau B. P.-Y., Lewis D. A.* Extraction of fumonisins B₁ and B₂ from white rice flour and their stability in white rice flour, cornstarch, cornmeal and glucose // *J. Agric. Food Chem.* — 2002. — V. 50. — P. 3614–3620.
 46. *Trusal L.R.* Stability of T-2 mycotoxin in aqueous media // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1985. — V. 50, N 5. — P. 1311–1312.
 47. *Department of Defense-Department of Army, 32 CFR, part 627.* The biological defense safety program (Technical safety requirements). DA pamphlet 385-69. Final Rule.
 48. *Widestrand J., Pettersson H.* Effect of time, temperature and solvent on the stability of T-2-toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol and nivalenol calibrants // *Food Additiv. Contamin.* — 2001. — V. 18, N 11. — P. 987–992.
 49. *Stroka J., Petz M., Joerissen U., Anklam E.* Investigation of various extractants for the analysis of aflatoxin B₁ in different food and feed matrices // *Ibid.* — 1999. — V. 16, N 8. — P. 331–338.
 50. *Jaimés J., Fente C.A., Vazquez B.I. et al.* Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis // *J. Chromatogr.* — 2000. — V. 882. — P. 1–10.
 51. *Moss M. O., Smith J. E.* *Mycotoxins: Formation, analysis and significance.* — Chichester: John Wiley and Sons, 1979.
 52. *Grasso F., Fremy J. M., Bevis S., Dragassi S.* Joint IDF-IUPAC-IAEA (FAD) interlaboratory validation for determining aflatoxin M₁ in milk by using immunoaffinity clean-up before thin-layer chromatography // *Food Additiv. Contamin.* — 2004. — V. 21, N 4. — P. 348–457.
 53. *De Koe W. J.* Natural toxins // Chairman panel discussion. — 1995. — N 3. — P. 280.
 54. *Wilkes J. G., Sutherland J. B.* Sample preparation and high-resolution separation of mycotoxins possessing carboxyl groups // *J. Chromatogr.* — 1998. — V. 717B. — P. 135–156.
 55. *Banza R., Rois A., Gomes-Hens A., Valcarcel M.* Supercritical fluid immunoextraction: a new approach for immunoassay automation // *Anal. Chem. Acta.* — 2004. — V. 518. — P. 151–156.
 56. *Morais S., Maquieira A., Puchades R.* Immunofiltration: A new methodology for preconcentration and determination of organic pollutants // *Anal. Chem.* — 1999. — V. 71. — P. 1905–1909.
 57. *Kataoka H.* Automated sample preparation using in-tube solid-phase microextraction and its application — review // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2002. — V. 373. — P. 31–45.
 58. *Theis A. L., Waldack A. J., Hansen S. M., Jeannot M. A.* Headspace solvent microextraction // *Anal. Chem.* — 2001. — V. 73. — P. 5651–5654.
 59. *Bruheim I., Lin X., Pawliszyn J.* Thin-film microextraction // *Ibid.* — 2003. — V. 75 — P. 1002–1010.
 60. *Jodldauer J., Maier N.M., Linder W.* Towards ochratoxin A selective molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction // *J. Chromatogr.* — 2002. — V. 945A. — P. 45–63.

**АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ:
ПІДГОТОВКА ПРОБ**

*М. Ф. Стародуб¹
Л. М. Пилипенко²
О. В. Єгорова²
І. В. Пилипенко²
О. С. Гойстер¹
Г. О. Хмельницький³*

¹ Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

² Одеська національна академія харчових технологій

³ Національний аграрний університет, Київ

E-mail: nikstarodub@yahoo.com

Розглянуто основні принципи відбору проб та підготовки їх для аналізу вмісту мікотоксинів у різних об'єктах навколишнього середовища. Головну увагу приділено трихотецевим мікотоксинам, а також зеараленону, афлатоксину та фумонізінам.

Ключові слова: мікотоксини, аналіз, відбір та підготовка проб.

**ANALYSIS MYCOTOXINS:
PREPARATION OF SAMPLES**

*M. F. Starodub¹
L. M. Pilipenko²
O. V. Egorova²
I. V. Pilipenko²
O. S. Gojster¹
G. O. Chmel'nitsky³*

¹ Palladin Institute of Biochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

² Odessa National Academy of food technologies

³ National Agricultural University, Kyiv

E-mail: nikstarodub@yahoo.com

Analysis of main principles of selection of samples and their preparation for the determination of mycotoxins content in different environment objects is presented. The main attention was addressed to trichothecenes mycotoxins and zearalenone, aflatoxin and fumonisins.

Key words: mycotoxins, analysis, selection and preparation of samples.