



УКРАЇНА

(19) UA (11) 80629 (13) C2
(51) МПК (2006)
C12Q 1/02
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ В КОРМАХ МІКОТОКСИНІВ ІЗ ГРУПИ 12,13-ЕПОКСИ- Δ^9 -ТРИХОТЕЦЕНІВ

1

(21) a200601201
(22) 07.02.2006
(24) 10.10.2007
(72) ТРУФАНОВ ОЛЕГ ВІКТОРОВИЧ, UA
(73) ІНСТИТУТ ПТАХІВНИЦТВА УКРАЇНСЬКОЇ
АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК, UA
(56) SU A 1 1424494, 15.08.1989.
SU A2 660653, 05.05.1979.
SU A1 1508574, 07.01.1991.
Binder J. A yeast bioassay for trichothecenes. Nat
Toxins. 1999; 7(6):401-6 (ABSTRACT).
Kathryn H. Engler et al.: "A colorimetric technique for
detecting trichothecenes and assessing relative
potencies", Applied and environmental microbiology,
May 1999, p. 1854-1857.
Widestrand J. et al.: "A rapid and sensitive cytotoxicity
screening assay for trichothecenes in cereal

2

samples", Food Chem Toxicol. 2003 Oct;
41(10):1307-13 (ABSTRACT).

(57) Спосіб визначення в кормах мікотоксинів із
групи 12,13-епокси- Δ^9 -трихотеценів, що включає
екстракцію досліджуваної проби, тонкошарову
хроматографію екстракту, нанесення на
хроматографічну пластинку агаризованого
поживного середовища та біоавтографічне
виявлення мікотоксинів за допомогою штаму
Candida pseudotropicalis 44 пк, який відрізняється
тим, що в поживне середовище для тест-
організму вносять α -нафтил ацетат у концентрації
0,16 г/л середовища.

Винахід відноситься до методів визначення
токсичних речовин з використанням чутливих тест-
організмів.

З метою визначення токсичних речовин у
різних субстратах використовують біологічні,
імунологічні, хімічні та фізико-хімічні методи
аналізу. Біологічні методи аналізу, на відміну від
інших, дають змогу безпосередньо оцінити рівень
токсичності досліджуваного зразка. Недоліком
біологічних методів є порівняно низька чутливість.
Мікотоксини з групи 12,13-епокси- Δ^9 -трихотеценів
відносяться до сполук, що істотно забруднюють
зерно і продукти його переробки. Одними із
найбільш поширених трихотеценових мікотоксинів
типу А на території України є Т-2 токсин та його
метаболіт НТ-2 токсин [2, 3].

На сьогодні відома досить велика кількість
біологічних методів оцінювання загальної
токсичності та вмісту трихотеценових мікотоксинів
у харчових та кормових субстратах [4, 5, 6, 7, 8]. У
нашій країні довгий час головним арбітражним
методом залишалася шкіряна проба на кролях.
Методи з використанням чутливих до
трихотеценових мікотоксинів дріжджів активно
розроблюються та широко використовуються за
кордоном [5, 6]. Недоліком більшості з цих методів

є неспроможність до якісного визначення
токсичного фактору. Тому виникло питання про
вдосконалення біоавтографічного методу
визначення трихотеценових мікотоксинів типу А,
що дає змогу виявляти ці сполуки як кількісно, так і
якісно.

Найближчим аналогом є спосіб визначення у
кормах мікотоксинів із групи 12,13-епокси- Δ^9 -
трихотеценів [1]. За вказаним способом
мікотоксини з групи 12,13-епокси- Δ^9 -трихотеценів
визначають шляхом нанесення екстракту
досліджуваної проби на хроматографічну
пластинку, з подальшим розділенням компонентів
проби у системі розчинників, нанесенням на
пластинку агарного поживного середовища та
виявленням мікотоксинів за допомогою чутливого
штаму *Candida pseudotropicalis* 44 пк. Якісним
показником служить хроматографічна рухливість
(Rf), а кількісним - діаметр зони затримки росту.
Метод є простим, економічним та інформативним.
Недоліком методу є його недостатня чутливість у
порівнянні з імунологічними та фізико-хімічними
методами, що використовуються для аналізу
12,13-епокси- Δ^9 -трихотеценів. Внаслідок цього не
завжди є можливим визначення мікотоксинів,

(13) C2

(11) 80629

(19) UA

присутніх у зразках зерна у кількостях, що спричиняють погіршення його якості.

Мета винаходу - підвищення чутливості методу визначення мікотоксинів із групи 12,13-епокси- Δ^9 -трихотеценів.

Поставлена мета досягається модифікацією поживного середовища шляхом внесення α -нафтил ацетату, що знижує стійкість тест-організму *Candida pseudotropicalis* 44 пк до 12,13-епокси- Δ^9 -трихотеценів.

Спосіб здійснюється таким чином.

1. Екстракція та очищення екстракту. Беруть 25г розмеленого зерна або комбікорму, вносять у конічну колбу ємністю 500мл, додавають 20мл 10 %-ного розчину Nad і перемішують. Потім додають 120мл ацетону і суміш струшують протягом 1год., після чого фільтрують через паперовий фільтр. До 100мл фільтрату додають 20мл 15 %-ного розчину ацетату свинцю і 30мл води, перемішують і витримують протягом 10хв. Потім фільтрують, 120мл фільтрату вносять у ділильну лійку, додають 40мл гексану, струшують і після розподілу фаз відділяють нижній водно-ацетоновий шар. До водно-ацетонового шару додають двічі по 20мл гексану, кожен раз струшуючи, і після розподілу фаз вилучають верхній шар (гексан). Потім до водно-ацетонового екстракту у ділильну лійку двічі додають по 40мл хлороформу, кожного разу струшують і для подальшого аналізу після розподілу фаз відбирають нижній шар (хлороформ). Хлороформові екстракти об'єднують, додають 5-7г безводного сірчанокислого натрію, струшують і залишають на 10хв. Розчин фільтрують, фільтрат впарюють. Сухий залишок розчиняють в 1-2 мл бензолу, впарюють, а залишок розчиняють в 100мкл бензолу.

2. Хроматографія та біоавтографічне виявлення Т-2 та НТ-2 токсинів. У розплавлене агарне поживне середовище додають розчин α -нафтил ацетату у такій кількості, щоб кінцева його концентрація у середовищі становила 0,16г/л.

На хроматографічні пластинки наносять 5-50мкл екстракту досліджуваних зразків та 10нг Т-2 і 100нг НТ-2 токсину (у якості речовин-свідків). Далі пластинки хроматографують у системі розчинників етилацетат-толуол 3:1 та висушують. Після цього на контрольні пластинки наносять звичайне агарне поживне середовище, вільне від α -нафтил ацетату, а на дослідні - середовище, що містить α -нафтил ацетат у концентрації 0,16г/л. На пластинки наносять водну емульсію клітин дріжджів штаму *Candida pseudotropicalis* 44пк та витримують 18-20 годин при температурі 32°C, після чого реєструють характер росту тест-організму, замірюючи діаметр зон затримки росту, що спостерігається за наявності Т-2 або НТ-2 токсину.

3. Визначення маси Т-2 та НТ-2 токсинів, що були нанесені на пластинку для хроматографії. Масу Т-2 чи НТ-2 токсину, що викликає зону затримки росту, визначають за формулами ліній регресії, що виражають залежність між масою Т-2 чи НТ-2 токсину та діаметром відповідних зон. На малюнку наведено лінії та рівняння регресії для цих мікотоксинів та діаметрів зон, що

спостерігаються при вирощуванні дріжджів *C. pseudotropicalis* 44пк на звичайному середовищі та середовищі, що містить 0,16г/л α -нафтил ацетату.

1 - лінія регресії для НТ-2 токсину, звичайне середовище;

рівняння регресії: $y = 490,6e^{0,11x}$,
коефіцієнт апроксимації: $R^2 = 0,99$.

2 - лінія регресії для НТ-2 токсину, середовище з α -нафтил ацетатом;

рівняння регресії: $y = 48, Se^{0,17x}$,
коефіцієнт апроксимації: $R = 0,98$.

3 - лінія регресії для Т-2 токсину, звичайне середовище;

рівняння регресії: $y = 21,6e^{0,15x}$,
коефіцієнт апроксимації: $R^2 = 0,99$.

4 - лінія регресії для Т-2 токсину, середовище з α -нафтил ацетатом;

рівняння регресії: $y = 4,0e^{0,16x}$,
коефіцієнт апроксимації: $R^2 = 0,97$.

Числовий коефіцієнт, що міститься у рівнянні регресії біля числа e , вказує на зміщення точок та лінії тренду відносно осі Y (вертикальної): чим менше значення цього коефіцієнту, тим меншою є маса токсину, що потрібна для затримки росту тест-організму, тобто тим вище чутливість методу. Шляхом знаходження числового значення відношення цього коефіцієнту у рівнянні ліній регресії, що відображує діаметри зон на звичайному середовищі, до відповідного коефіцієнту на модифікованому середовищі, знаходять у скільки разів підвищується чутливість методу: по відношенню до Т-2 токсину у - 5,4 рази ($21,6 : 4,0 = 5,4$), а до НТ-2 токсину - приблизно у 10,1 рази ($490,6 : 48,8 \approx 10,1$).

4. Визначення концентрації Т-2 та НТ-2 токсинів у досліджуваному субстраті. Кількість Т-2 чи НТ-2 токсину в пробі визначають за формулою:

$$X = \frac{2 \times 100 \times B}{25 \times A}, \text{ де}$$

X - концентрація Т-2 чи НТ-2 токсину в пробі (мкг/кг);

A - кількість екстракту, нанесеного на пластинку (мкл);

B - кількість Т-2 або НТ-2 токсину (нг), що відповідає величині зони відсутності росту тест-мікроорганізму;

100 - об'єм екстракту (мкл);

25 - маса проби (г);

2 - коефіцієнт, що враховує втрати мікотоксинів у процесі екстракції і очищення.

При наявності 2-х або більше повторних зон відсутності росту тест-мікроорганізму, розрахунок проводять окремо по кожній зоні, а потім обчислюють середньоарифметичне значення.

Джерела інформації:

1. Авторское свидетельство СССР № 660653, кл. A23K1/00, G 0 IN 33/02, 1979.

2. Труфанова В. А. Частота контамінації мікотоксинами кормів для птиці //Ветеринарна медицина України. - 2004. - № 9. - с. 26-28.

3. Труфанов О. В. НТ-2 токсин - распространенный фактор загрязнения зерна в Украине // Птахівництво: Міжвід. темат. наук. зб. ЛП УААН. - Харків, 2005. - Вип. 57. - С. 500.

4. Babich H., Borenfreund E.. Cytotoxicity of T-2 Toxin and Its Metabolites Determined with the Neutral Red Cell Viability Assay //Applied and environmental microbiology. - 1991. -Vol. 57. - P. 2101-2103.

5. Binder J. A yeast bioassay for trichothecenes //Natural Toxins. - 2000. -Vol. 7.-P. 401-406.

6. Engler K. H., Coker R. D., Evans I. H. A colorimetric technique for detecting trichothecenes and assessing relative potencies //Applied and environmental microbiology. - 1999. -Vol. 65. -P. 1854-1857.

7. Widestrand J., Lundh T., Pettersson H., Lindberg J. E.. A rapid and sensitive cytotoxicity screening assay for trichothecenes in cereal samples //Food and Chemical Toxicology. - 2003 - Vol. 41 - P. 1307-1313.

8. Yike I., Allan T., Sorenson W. G., Dearborn D. G. Highly sensitive protein translation assay for trichothecene toxicity in airborne particulates: comparison with cytotoxicity assays //Applied and environmental microbiology - 1999. - Vol. 65.-P. 88-94.

