

Н. Ф. Стародуб¹, проф., Л. Н. Пилипенко², проф., А. В. Егорова², канд.тех.н.,
И. В. Пилипенко², канд.тех.н.

МИКОТОКСИН ПАТУЛИН: ПРОДУЦЕНТЫ, БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ, ИНДИКАЦИЯ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

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

² Одесская национальная академия пищевых технологий

Главная роль в решении проблемы, связанной с предотвращением поражения сельскохозяйственной продукции микроскопическими грибами-продуцентами микотоксинов, отводится профилактике через систему контроля загрязнения продуктов этими веществами, разработке достоверных достаточно чувствительных и экспрессных методов индикации и нормированию безопасных их концентраций. Ежегодный ущерб от развития плесневых грибов на сельскохозяйственных продуктах и промышленном сырье в мире превышает 30 млрд долларов [1]. В настоящее время известно свыше 500 токсических метаболитов, продуцируемых более 250 видами микроскопических грибов. Развитие исследований в области микотоксикологии показало, что интоксикация микотоксинами является не только реальной, но и крайне серьезной угрозой для здоровья населения планеты. Более того, по масштабам опасности хронические микотоксикозы значительно превосходят все известные вспышки острых форм отравлений в Японии, России, Индии, Китае и США с летальным исходом для многих тысяч людей.

Механизмы образования микотоксинов из первичных метаболитов зависят от вида продуцента и условий биосинтеза [2]. Среди них выделяют такие: 1) поликетидный, характерный для афлатоксинов, ократоксинов, патулина и др.; 2) терпеноидный, соответствующий трихотеценовым микотоксинам; 3) опосредованный через цикл трикарбоновых кислот (для рубратотокси-

нов); 4) аминокислотный (когда исходными соединениями являются аминокислоты), что имеет место в случае эргоалкалоидов, циклопиазоновой кислоты и др.; 5) смешанный (сочетание двух и более механизмов), присущий для производных циклопиазоновой кислоты.

Основным для биосинтеза большой группы микотоксинов является поликетидный механизм. В зависимости от числа включенных в молекулу C₂-единиц микотоксина, синтезирующиеся по первому механизму, подразделяются на тетракетиды (патулин), пентакетиды (ократоксин А), гексакетиды, гептакетиды, октакетиды, монокетиды (зеараленон) и декакетиды (афлатоксины) [1, 2]. Несмотря на сложность и трудоемкость исследования механизмов биогенеза микотоксинов, их изучение помимо теоретического имеет большое практическое значение, поскольку является главным условием изыскания способов предотвращения токсинообразования микроскопическими грибами.

Особое внимание к проблеме микотоксинов обусловлено чрезвычайно широким распространением их продуцентов в природе. Плесневые грибы могут контаминировать продукты растительного и животного происхождения на любом этапе их выращивания, переработки, транспортирования и хранения в производственных и домашних условиях. Несоблюдение технологических регламентов производства продуктов, несвоевременная уборка урожая или недостаточная сушка его перед закладкой на хранение, хранение и транспортирование про-

дуктов при недостаточной их защите от увлажнения приводят к размножению токсигенных микромицетов. Размножаясь на пищевых продуктах, многие плесневые грибы не только загрязняют их токсинами, но и ухудшают органолептические свойства, снижают пищевую ценность, приводят к порче этих продуктов и непригодности для технологической переработки, а использование в животноводстве кормов, пораженных плесневыми грибами, является причиной заболеваний и даже гибели животных и птицы. Микотоксины могут попадать в организм человека и через систему пищевых цепей: с молоком и тканями животных [1-3].

Среди микотоксинов, проявивших себя в качестве этиологического фактора ряда алиментарных токсикозов и выделяющихся своей распространенностью, особое место занимает патулин.

Основная цель настоящего обзора заключается в анализе существующих аналитических подходов для определения содержания указанного выше микотоксина, которые бы позволяли эффективно предотвращать его появление в объектах окружающей среды. Особое внимание уделяется возможностям инструментального экспрессного контроля патулина. Для более полного понимания острых стоящей проблемы этому анализу предшествует краткое изложение сведений о продуцентах патулина, их распространенности и биологических эффектах данного микотоксина.

1. Продуценты патулина, его биологическое действие и распространенность.

Патулин — это токсичный лактон (4-гидрокси-4H-фуран[3,2-с]пиран-2-(6H)-один), имеющий эмпирическую формулу C₇H₆O₄ (рисунок). Его молекулярная масса — 154,12 Д. Он термоустойчив, устойчив в растворах кислот и лабилен в щелочной среде. Впервые патулин был выделен в 1943 г. из культуры гриба *Penicillium patulum* (синоним *Penicillium urticae*) как антибиотик. Сначала патулин не считали особо опасным микотоксином, однако в 1954 г. он стал причиной гибели 100 коров в Японии, потреблявших корма, контаминированные продуцентами микотоксина [4].

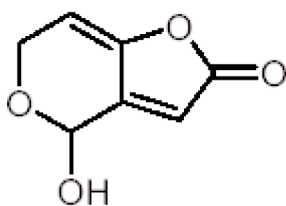


Рис. Структура патулина

Продуцентами патулина могут быть различные виды грибов рода *Penicillium*: *P. expansum*, *P. claviforme*, *P. urticae* (*P. patulum*), *P. cyclopium*, *P. viridicatum*, *P. roqueforti*; а также рода *Aspergillus*: *A. clavatus*, *A. terreus*, *A. giganteus*. Патулин образуют *Byssoschlamys fulva* и *Byssoschlamys nivea*. Вырабатывать патулин может также плесневой грибок *P. mortensii* [3] грибы рода *Paecilomyces* [5]. Наиболее важным продуцентом патулина считается грибок *P. expansum* [6].

Обнаружено [6, 7], что токсичность патулина не является системной, а только местной. Это согласуется с опытами по изучению подострой токсичности на грызунах, которые сопровождались желудочно-кишечным изъязвлением и воспалением [8, 9]. Эти эффекты могут быть вызваны нарушениями кишечного барьера при концентрациях патулина приблизительно 1 мг/кг [10], которые обнаруживаются в яблочных соках.

В других исследованиях [3, 11] отмечается, что при внутрибрюшинном введении токсина беременным мышам у потомства развивались злокачественные опухоли. ЛД₅₀ патулина для мышей при внутрибрюшинном введении составляет 7,7-7,8 мг/кг, при пероральном — 17-18 мг/кг. Гибель животных наступала в течение 48-72 ч при нарастании явлений цианоза конечностей и судорог. При гистологических исследованиях выявлено застой в легких и очаги некроза в печени. Поэтому временное максимально допустимое ежедневное потребление патулина (PMTDI) человеком определенное на уровне 0.4×10^{-9} г/кг массы тела, является оправданным [11], и его содержание в пищевых продуктах должно регламентироваться. Всемирная организация здравоохранения установила рекомендуемый максимум концентрации патулина в яблочном соке — 0,05 мг/кг [12].

Международное агентство по

изучению рака на основании исследования токсичности патулина в 1986 г. отнесло его к канцерогенам 3 группы или веществам, для которых имеется недостаточно данных для достоверной классификации [13]. В имеющихся экспериментальных исследованиях не уточнены также особенности поглощения и метаболизма патулина в организме человека. Поэтому с соблюдением этических правил Хельсинской Декларации были проведены исследования сыроворотки крови добровольцев, потреблявших сок с предельно допустимым уровнем патулина [14].

Согласно результатам, полученным в экспериментах с использованием стабильного растворимого изотопа [¹³C₂]-патулина, через 1 ч после приема сока с предельно допустимой дозой в 49,9 нг/кг никаких следов его в сыроворотке крови не было обнаружено [15]. Однако, по данным [14], вопрос о метаболизме патулина остается нерешенным. В модельных экспериментах [16] идентифицировали приблизительно 10 различных пар стереометрических аддуктов, которые могут появиться в организме и для их обнаружения должны использоваться чувствительные методы — газо-жидкостная хроматография и масс-спектрометрия (GC-MS). Последний может быть рекомендован для детектирования глутатион-патулиновых (GSH-PAT) аддуктов [17]. Однако реактивность патулина в организме может вовлекать и другие нуклеофильные или ферментативные GSH-реакции. Адаптация метода с использованием стабильного раствора изотопа (SIDA) к исследованиям *in vitro* показала возможность обнаружения очень маленьких количеств патулина в крови за счет взаимодействия его с глутатионом крови [14]. В этих экспериментах *in vitro* установлено [14], что при добавлении к 9 см³ цельной крови 100 нг патулина только 6,1% микотоксина детектируется через 2 мин.

Хотя по имеющимся сведениям [18, 19] патулин не проявлял мутагенной активности в тесте Эймса на микроорганизмах *Salmonella typhimureum*, все же пришли к заключению о его способности повреждать хромосомы и Британский комитет по изучению мутагенных пищевых компонентов, продуктов питания и окружающей среды клас-

сифицировал его как мутаген [20]. В обзоре Объединенного экспертного комитета ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам (JECFA) на основе имеющихся сведений делается заключение, что патулин не имеет негативных репродуктивных или тератогенных эффектов, но проявляет эмбриотоксичность [21]. Несмотря на то, что недавние исследования на мышах не продемонстрировали имунотоксичности, в относительно высоких дозах патулин имеет иммунодепрессивные свойства [22]. Сделано заключение [21], что патулин генотоксичен, но это неадекватно канцерогенности в экспериментах на животных.

Обнаружение у патулина высокой токсичности, мутагенных и канцерогенных свойств стало основанием для отнесения его к особо опасным микотоксинам. Именно поэтому JECFA снизил временное максимально допустимое поступление патулина в организм человека с 1,0 до 0,4 мкг/кг массы тела в день. Это связано с "концентрацией нулевого воздействия" (no effect level) — КНВ, которая связана с допускаемой суточной дозой для человека (ДСД) формулой: ДСД = 0,01 КНВ. При концентрациях до 43 нг/кг наблюдается отсутствие эффекта при 100% гарантированной безопасности.

Национальными и международными группами рекомендовано для используемых в питании человека яблочных продуктов содержание остаточных количеств патулина не более 50 мкг/кг [23], в то время как большинство стран регламентируют уровень патулина в соке от 20 до 50 мкг/кг [21].

Патулином преимущественно могут быть контаминированы фрукты и некоторые овощи. Токсин обнаруживается в яблоках, грушах, абрикосах, персиках, черешне, винограде, бананах, клубнике, голубике, бруснике, облепихе, томатах, а также в продуктах их переработки — фруктовых соках, компотах, пюре, джемах, напитках, морсах. Наиболее часто он встречается в яблоках. Анализируя особенности локализации патулина в некоторых продуктах питания, следует отметить, что именно в яблоках он концентрируется в основном в подгнившей части, в то время как в неповрежденной части плода обнаруживается только около 1% общего количества токсина. Для

томатов, независимо от размеров подгнившего участка, патулин распределяется равномерно по всей ткани [24]. Экспериментально установлено, что цитрусовые плоды и некоторые овощные культуры (картофель, лук, редис, редька, баклажаны, цветная капуста, тыква, хрен) обладают естественной резистентностью к заражению продуцентами патулина.

Температурный оптимум образования патулина наблюдается при 21-30 °С. Токсин обладает термоустойчивостью и может сохраняться в процессе технологической переработки. В ряде продуктов из яблок он был обнаружен в концентрациях до 16 мг/кг. Однако, видимо, это следует рассматривать как исключение, поскольку обычно наблюдаются более низкие его концентрации — менее 10×10^{-9} мг/кг [25].

Патулин весьма устойчив в кислых средах — при pH 3,5 — 5,5 даже при повышенных температурах и лабилен в щелочной среде [26]. При промышленной переработке сочного растительного сырья, например, яблок, путем вакуумного концентрирования и кратковременной тепловой обработки пастеризацией (90 °С в течение 10 мин) концентрация патулина снижается в соке лишь на 18,4-18,8%. В процессе хранения упакованного сока его уровень также незначительно уменьшается.

В 1996 г. нормативы по содержанию микотоксинов введены в 77 странах мира. Предельно допустимая концентрация патулина, согласно медико-биологическим требованиям, предъявляемым к фруктовым и овощным сокам, пюре, составляет не более 0,05 мг/кг. В продуктах детского и диетического питания присутствие даже следов патулина не допускается. Периодичность контроля продукции по этому показателю предусмотрена нормативно-правовыми документами [27, 28]. В частности, согласно Методическим указаниям о порядке и периодичности проверки продовольственного сырья и пищевых продуктов в отношении их безопасности, контроль на наличие патулина проводят 1 раз в квартал для овощей и картофеля, фруктов, винограда и ягод. В консервированных изделиях его определяют при содержании в партии сырья нестандартных плодов более 2,2% и 9,8% для косточко-

вых и семечковых, соответственно. Кроме того, этот показатель определяется в консервированных продуктах при показателе числа Говарда более 0.

Почва, как источник эпифитной микрофлоры, может контаминировать ее в плоды через механически поврежденные участки [29]. При этом грибы, минуя барьеры естественного иммунитета растительного сырья, непосредственно получают доступ к питательному субстрату. Поэтому использование для технологической переработки плодов с поврежденной поверхностью может привести к высоким концентрациям патулина в соке [30].

В плодах бананов, ананасов, винограда, персиков, абрикосов, черной смородины, вишни, томатов, пораженных коричневой гнилью, обнаружен низкий уровень патулина [5, 6, 31].

Теоретически патулин рассценивается как индикатор качества. Задача исключения порчи продуктов, и, в частности, яблок, при транспортировании, хранении и переработке является фактически трудновыполнимой. Поэтому целесообразно применять эффективный метод удаления патулина. Он может быть исключен на этапе инспекции растительного сырья — путем удаления испорченных подгнивших потемневших частей яблок. Этот подход снижает концентрацию патулина до 90 % от его исходного уровня, но трудоемок и весьма продолжителен. Фильтрация через древесный уголь практически удаляет весь патулин из яблочного сока. Патулин инактивирует многие ферменты вследствие высокой аффинности к сульфгидрильным группам [33]. Поэтому ограничить количество патулина можно за счет введения компонентов, содержащих сульфгидрильные группы, в виде натуральных пищевых добавок типа зерна, мяса, сыра. Обработка диоксидом серы также может быть применена для снижения уровня патулина [].

В литературе приводятся результаты медико-биологических исследований, подтверждающие тератогенность патулина [32]. Кроме того, он способен нарушать функции митохондриальных и цитоплазматических мембран, что создает опасность для организма человека и особенно детей [29]. Известны также

данные о его иммунодепрессивном действии [33].

Сообщается о содержании патулина в яблочных соках в Австрии [6, 34], Бразилии [35], Италии [31], Испании [36], Южной Африки [37], Турции [38, 39], Великобритании [40-42]. В целом, более 50% образцов соков, анализируемых в мире, содержали детектируемые уровни патулина [6, 43], причем его концентрация часто превышала регламентированные уровни.

Интересно отметить, что брожение при производстве сидра приводит к понижению уровня патулина в готовом продукте [34]. Об этом довольно часто упоминается в литературе, однако имеются исключения, когда содержание патулина сохранялось более 0,1 мг/кг [44].

Среди 29 образцов продукции из яблок отечественного производства и 14 образцов соков импортного производства, а также 7 видов сидра, которые регулярно потребляются взрослыми и детьми Бельгии, патулин был обнаружен в 79; 86 и 43% этих образцов, соответственно, однако ни в одном из них не было превышения его допустимого безопасного уровня [5]. Эти исследования показали также отсутствие статистически достоверных различий в концентрациях патулина в осветленных (7,8 нг/кг) и неосветленных (10,7 нг/кг) яблочных соках, а также в соках промышленного и домашнего приготовления.

2. Аналитические подходы к контролю уровня патулина в продуктах питания.

2.1. Пути подготовки образцов для анализа.

При анализе продуктов питания основной задачей является получение средних образцов или средних проб, представительных по распределению концентрации микотоксина для всей партии. Выполнение этой задачи зависит от содержания микотоксина, свойств продукта (сырой, обработанный, жидкий, пастообразный и т.д.), способа подготовки образца. С точки зрения распределения загрязнения патулином все продукты можно разделить на две большие группы, а именно: с высокой степенью неоднородности и с однородным характером загрязнения. Для однородных продуктов (фруктовых и овощных соков, на-

питков, повидла, джема) представительный средний образец может быть меньшим и составлять около 100-200г при условии, что продукт происходит из одной партии. Чистоту и аутентичность стандартного препарата патулина устанавливают, используя следующие его характеристики (табл. 1) [45, 46].

Для извлечения патулина из об-

анализом.

2.2. Традиционные аналитические методы.

Для обнаружения, идентификации и количественного определения микотоксина патулина используют различные виды хроматографии: одно- и двумерная тонкослойная хроматография (ТСХ) для серийных исследований; высокоэффективная

ния снизилось с 12,1 и 16,1 до 6,3 и 8,5 мин соответственно. Процесс выделения патулина обычно сопровождается экстракцией 5-НМФ, который образуется при термической обработке яблочного сока [5, 43]. Разделение патулина и 5-НМФ является критическим этапом при использовании жидкостной хроматографии высокого давления

Таблица 1

Коэффициенты молярной экстинкции, стандартный и рабочий растворы патулина

Молекулярная масса	Длина волны максимума поглощения, нм	Коэффициент молярной экстинкции в метаноле, см ² /моль	Растворитель для приготовления стандартного раствора	Концентрация микотоксина в растворе, мкг/см ³	
				стандартном	рабочем
154,0	276	14500	Бензол-ацетонитрил	10,0	10,0

разца применяют этилацетат с последующей очисткой экстракта карбонатом натрия [47]. Для этого можно использовать и так называемый бифазный диализный метод с применением флоризиловых патронов и патронов из кварцевого геля [43]. Для идентификации и количественного определения патулина рекомендован ТСХ-метод с различными системами растворителей и дериватизацией с 0,5% 3-метил-2-бензотиазолин-гидразоном (МВТН) [43].

Подготовка образца по Brause [48] включает взятие навески (5 см³) и тщательное ее перемешивание (1 мин) в 10 см³ этилацетата. Верхнюю часть (после разделения слоев) объединяют с последующими порциями этилацетатного экстракта. Объединенные экстракты обрабатывают 2 см³ бикарбоната натрия, при этом нижний водный слой отбрасывают, а остальную часть упаривают на ротаторном испарителе (при 40 °С в токе азота) и немедленно растворяют в уксусной кислоте (рН 4,0). Полученные образцы подвергают глубокому замораживанию (-20 °С) для длительного хранения перед

жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с УФ-фотометрическим и флуориметрическим детектированием для постановки серийных и для арбитражных анализов. Хроматографирование в первом направлении осуществляют смесью хлороформа с ацетоном (4:1), а во втором — смесью толуола, метилацетата и муравьиной кислоты (5:4:1). При этом патулин обнаруживается в виде желтых флуоресцирующих пятен [45-47].

Обзор методов определения патулина показывает, что ТСХ-методы более трудоемки, дают меньшее разрешение и более низкую чувствительность в сравнении с методом ВЭЖХ, что можно проиллюстрировать результатами, приведенными в табл. 2. Методом ВЭЖХ патулин идентифицируется по сравнительным характеристикам выхода токсина для испытуемого образца и стандарта.

Изучение эффективности использования ацетонитрила как мобильной фазы показало возможность полного разделения пиков гидроксиметилфурфуrolа (5-НМФ) и патулина при снижении длительности разделения — время задержа-

(HPLC-метод). Патулин определяют в обратной фазе HPLC на C18 колонке, элюент — 5-10 % ацетонитрил, скорость 1 см³/мин. Детектирование проводится в УФ-лучах при длине волны 276 нм. Линейный коэффициент регрессии стандартной кривой для патулина при концентрации в диапазоне от 1 до 2000 нг/дм³ равен 0,999995. Точность определения патулина от 93,1 до 96,6%, коэффициент варьирования результатов — менее 3%. Предел экспериментального обнаружения 0,05 нг.

Высокая чувствительность (линейный ответ в диапазоне концентраций 0,05 — 0,5 нанограммов, введенных в колонку) и воспроизводимость (RSD в пределах 1,0-4,0%) присуща газовым хроматографическим методам [48].

Несмотря на все перечисленные выше достоинства хроматографических методов, все же будущее в области анализа патулина, как и микотоксинов вообще, за более точными и специфическими иммунохимическими методами, основанными на взаимодействии антиген-антитело.

Таблица 2

Сравнительная оценка методов определения патулина (при уровне загрязнения 0,1 мг/кг)

Метод	*Rs, %	**RS _R , %	***R _r , %	****RR, %	Чувствительность анализа, мг/кг	Степень извлечения, %
ТСХ	42	65	118	182	0,012	75
ВЭЖХ	13	18	36	50	0,005	75

Примечания: 1.*внутри **межлабораторные среднееквadraticные отклонения;

2. ***отклонение результатов от среднего арифметического значения для двух параллельных определений, выполненных в одной лаборатории; 3. ****в разных лабораториях.

2.3. Иммунохимический анализ.

Патулин, также как и другие микотоксины, является низкомолекулярным соединением, поэтому он может быть антигеном, но не может служить в качестве иммуногена. Такое свойство эти соединения приобретают после конъюгирования с белками-носителями [49]. Для ряда микотоксинов (Т2, афлатоксин, зеараленон та охратоксин) имеются коммерческие препараты антител, а для патулина и выше указанных микотоксинов разработаны и тест-наборы на основе ELISA-метода (Sigma, США). Сообщается [50] и о получении поликлональных антител к патулину, хотя их специфичность остается не высокой. К сожалению, коммерческих препаратов моноклональных антител к данному микотоксину нам не удалось выявить, несмотря на большой интерес практики к постановке различных видов иммунохимического анализа, включая и его инструментальные, а именно, биосенсорные разновидности, о которые речь будет идти ниже. Как уже сообщалось [14, 15], изотопный анализ патулина позволяет выявлять этот микотоксин при концентрации 12 нг/см³.

2.4. Современные инструментальные методы экспрессного анализа.

Сегодняшние требования практики к методам контроля качества пищевых продуктов резко возросли. Они включают целый ряд положений, а именно, высокий уровень избирательности и чувствительности анализа, его экспрессность и низкую себестоимость, возможность проведения обследований в полевых условиях, в режимах on line и of line. Кроме того, весьма важным является возможность одновременной проверки нескольких однотипных образцов или образцов разного происхождения и, наконец, обеспечение электронной обработки полученных результатов, а также их автоматическая передача в специализированные лаборатории и контролирующие инстанции. Выполнение всех этих требований возможно с разработкой и внедрением принципиально новых инструментальных аналитических средств. К таким перспективным средствам можно уверенно отнести те, которые базируются на принципах биосенсорики. Они наиболее полно приближаются ко всему комплексу жестких

требований практики не только в области биотехнологий, но и медицинской диагностики и экологического мониторинга [51-56]. К настоящему времени разработаны иммунные биосенсоры для определения в воде и продуктах питания содержания ряда низкомолекулярных токсических веществ, таких как: тяжелые металлы, фосфорорганические пестициды, атразин, симазин, нилфенол и Т2 микотоксин [57-60]. К сожалению, в литературе мы не обнаружили сведений о разработке биосенсоров для контроля уровня патулина, но таковые имеются для ряда других микотоксинов, включая: Т2 микотоксина, афлатоксина и

тела, иммобилизованные на поверхности оптического преобразователя. "Ингибиторный", когда образец с микотоксином смешивался со специфическими антителами, а оставшаяся не прореагировавшая их часть, связывалась с конъюгатом, предварительно сорбированном на поверхности того же типа преобразователя [61]. В обоих случаях использовали поликлональные антитела. Линейные области откликов биосенсора были 12,0 — 25000 нг/см³ и 3,0 — 98,0 нг/см³ для "конкурентного" и "ингибиторного" анализов соответственно. Специфичность анализа зависела от специфичности использованных антител

Таблица 3

Перекрестные реакции антител к афлатоксину В₁ к другим разновидностям афлатоксина

Афлатоксин	% перекреста	Афлатоксин	% перекреста
В ₁	100	М ₁	35,09
В ₂	67,5	М ₂	1,67
Г ₁	65,5	В _{2a}	33,41
Г ₂	50,13	Г _{2a}	15,53

деоксиниваленола [61-63]. Чтобы представить возможности биосенсорного контроля микотоксинов вообще, ниже мы рассмотрим имеющиеся сведения в этом отношении. Это необходимо сделать с той точки зрения, что принципиально биосенсорное определение патулина не будет принципиально отличаться от того, которое разработано для других микотоксинов. Поэтому важно знать, а что же оно дает при контроле уровня низкомолекулярных токсинов в объектах окружающей среды и что можно ожидать от него в случае применения для обнаружения патулина. Следует, прежде всего, отметить, что почти все предложенные биосенсорные устройства для контроля микотоксинов являются оптическими и базируются на использовании явления поверхностного плазмонного резонанса (ППР) или эллипсометрии полного внутреннего отражения (ТИРЕ).

Так, для определения афлатоксина разработан биосенсор на основе ППР и он испытан при выполнении анализа в двух алгоритмах. "Конкурентный", когда свободный микотоксин в растворе и его конъюгат с белком конкурировали за анти-

(Табл. 3). После каждого анализа поверхность биосенсора регенерировали с помощью 1 М этаноламина с 20% ацетонитрилом, рН 12,0. Общее время анализа составляло в пределах 20-30 мин.

В случае анализа афлатоксина прямым способом, когда иммобилизованные специфические антитела взаимодействовали с указанным токсином, а результат этого взаимодействия регистрировали с помощью ППР, удавалось достичь чувствительности 50 нг/мл [57]. При этом общее время анализа составляло 10 мин.

Для определения деоксиниваленола был разработан такой же тип иммунного биосенсора, а анализ выполняли "конкурентным" способом, когда данный микотоксин был конъюгирован с казеином и иммобилизован на поверхности оптического преобразователя [63]. В данном случае использовали моноклональные антитела. Установлено, что оптимальная область определяемых концентраций составляет 2,5-30 нг/см³. Для анализа готовили образцы экстракцией 80% ацетонитрилом с последующим их 10 кратным разбавлением буфером. Пове-

**Сравнение результатов анализа деоксиниваленола с помощью
иммунного биосенсора и традиционного метода (ЖХ и МС)**

Образец	Результат анализа (мкг/кг) с помощью		Различие, %
	ЖХ и МС	Биосенсора*	
1	870	951 (8,0)	9
2	250	331 (4,4)	28
3	170	201 (7,2)	17
4	760	983 (6,1)	26
5	415	297 (7,2)	-33
6	1115	1148 (4,3)	3
7	180	165 (1,3)	-9
8	1370	1379 (14,1)	1
9	900**	1359 (14,4)	41
10	595**	1051 (9,0)	55

Примечание: 1 —*в скобках — стандартное отклонение;

2 — **анализ предварительно высушенных образцов.

рхность биосенсора регенерировали 6 М гуанидинхлоридом и последовательно использовали до 500 раз. Сравнительная эффективность работы биосенсора с традиционным методом жидкостной хроматографии в комбинации с масс-спектроскопией (ЖХ и МС) приведена в табл. 4. Полученные результаты демонстрируют относительно удовлетворительное совпадение, характерное для небольших выборок (n=4).

Что касается иммунобиосенсорного анализа Т2 микотоксина, то было установлено следующее [60, 64]. В случае ППР иммунного биосенсора и "прямого" анализа минимальное количество микотоксина, которое удавалось выявить, составляло 100 нг/см³. При "конкурентном" анализе достигалась чувствительность на уровне 10 нг/см³. Приблизительно такой же она была, когда применяли так называемый анализ "донасыщения", который на поминал описанный выше "конкурентный" анализ. Причем во всех случаях уровни чувствительности были сопоставимы как с использованием моно-, так и поликлональных антител, хотя диапазон регистрируемых концентраций был значительно шире в последнем случае. Чувствительность иммунного биосенсора на основе TIRE была значительно больше, чем установленные выше уровни. Даже при выполнении "прямого" анализа, она составляла 0,15 нг/см³. Безусловно, что постановка "прямого" анализа значительно проще, чем остальных вариантов. К тому же общее время его проведения занимает лишь около 10 мин, что тоже существенно меньше, чем для остальных. В последнее время [65] разработаны и условия постановки иммунного биосенсора на основе пьезокристаллов. Чувствительность такого биосенсора достигала уровня в 0,15 нг/мл при выполне-

нии "прямого" анализа.

Весьма интересным в рассматриваемом плане является проточно-инжекционный иммуноанализ с флуоресцентной детекцией для выявления фумонизина В₁ и В₂ в кукурузе [66]. Его чувствительность составляла 1 мг/кг.

Заключение

Изложенный выше анализ существующих сведений литературы дает основание сделать соедающее заключение. Во-первых, патулин является одним из широко распространенных весьма неблагоприятных для организма микотоксинов, уровень которого должен быть строго регламентирован и постоянно контролироваться в продуктах питания и, особенно, во фруктах и изделиях из них. На сегодня основными средствами контроля этого микотоксина является жидкостная хроматогра-

фия с масс-спектроскопией. Однако их ограничения в отношении оперативности выполнения анализа и его стоимости не позволяют осуществлять широкий скрининг и производить проверки качества продуктов в полевых условиях, в режимах on line и of line. Перспектива совершенствования аналитических средств лежит в развитии иммунохимического анализа и современного направления инструментального анализа на основе достижений биосенсорики. Сделанные шаги в отношении последнего демонстрируют широкие возможности биосенсоров для выполнения самых строгих требований практики при контроле уровня микотоксинов, в том числе и патулина. Это, прежде всего, касается чувствительности анализа, экспрессности, простоты и дешевизны его выполнения.

ЛИТЕРАТУРА

- Донченко Л.В., Надыкта В.Д. // Безопасность пищевой продукции. — М.: ДеЛи принт, 2005. — 539с.
- International Food Safety handbook: science, international regulation and control / Edited by K.V.Heijden, M.Younes, L.Fishbein.-New York, 1999. — 811р.
- Харченко С.Н., Литвин В.П., Тарабара И.М. Справочник по микозам и микотоксикозам сельскохозяйственных животных. — Киев.: Урожай, 1982. — 168с.
- Hopmans E.C. Patulin: a Mycotoxin in Apples, Perishables Handling Quarterly. — 1997. — 91. — P. 5-7.
- Tangnif E.K., Theysf R., Mignoletf E. et al. Patulin in domestic and imported apple-based drinks in Belgium: occurrence and exposure assessment. // Food Additives and Contamin. — 2003. — 20, N 5. — P. 482-489.
- Pittet A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds: a decade in review. Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millennium. /Proceedings of the Xth International IUPAC symposium on Mycotoxins and phycotoxins, edited by W. J. de Koe, R. A. Samson, H. P. Van

- Egmond, J. Gilbert and M. Sabino (Wageningen: W. J. de Koe). — 2001. — P. 153-172.
7. Fremy J.M., Castegnaro M.J.J., Gleizes E. et al. Procedures for destruction of patulin in laboratory wastes. // *Food Addit. Contam.* — 1995. — 12. — P. 331-336.
 8. Mckinley E. R., Carlton W.W. Patulin mycotoxicosis in Swiss ICR mice. // *Food, Cosmetics and Toxicology.* — 1980. — F18. — P. 181-187.
 9. Speijers G. J. A., Franken M. A. M., van Leeuwen F. X. R. Subacute toxicity study of patulin in the rat: effects on the kidney and the gastro-intestinal tract. // *Food and Chemical Toxicology.* — 1988. — 26. — P. 23-30.
 10. Manfoud R., Maresca M., Garmy N., Fantini J. The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione. // *Toxicol. And Appl. Pharmacol.* — 2002. — 181. — P. 209-218.
 11. JECFA, Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants in Food: Patulin. Forty-fourth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives // *WHO Food Additives Series 35* - Geneva: WHO: 1996. — P. 377-402.
 12. van Egmond H.P. Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. // *Food Addit. Contam.* — 1989. — 6. — P. 139-188.
 13. IARC. Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation / IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans; Lyon :IARC, 1986. — 40. — P. 83-98.
 14. Rychlik, M. Rapid degradation of the mycotoxin patulin in man quantified by stable isotope dilution assay. // *Food Additives and Contamin.* — 2003. — 20, N 9. — P. 829-837.
 15. Rychlik M., Schieberle P. Quantification of the mycotoxin patulin by a stable isotope dilution assay. // *J. of Agricult. and Food Chem.* — 1999. — 47. — P. 3749-3755.
 16. Fliege R., Metzler M. Electrophilic properties of patulin. N-acetylcysteine and glutathione adducts. // *Chemical Research in Toxicology.* — 2000. — 13. — P. 373-381.
 17. Sewram V., Nair J., Nieuwoudt T.W. et al. Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. // *J. Chromat.* — 2000. — 887A. — P. 365-374.
 18. Hopkins J. The production of [5 polyclonal antibodies against patulin hemiglutarate. // *Food Chem. Toxic.* — 1993. — 31. — P. 455.
 19. Pfeiffer, E., Gross, K., Metzler, M. Aneuploidogenic and clastogenic potential of the mycotoxins citrinin and patulin. // *Carcinogenesis.* — 1998. — 19. — P. 1313-1318
 20. United Kingdom Committee on Toxicity, Mutagenicity and Carcinogenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment / Annual Report, HMSO, London. — 1992. United Kingdom Committee on Toxicity, Mutagenicity and Carcinogenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment, Annual Report, HMSO, London, 1992.
 21. Food and Agricultural Organization, World Health Organization, Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants / 44th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Tech. Report Series, WHO, Geneva. — 1995. — v. 859. Food and Agricultural Organization, World Health Organization, Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants, 44th Report of the Joint PAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Tech. Report Series, Vol. 859, WHO, Geneva, 1995.
 - Food and Agricultural Organization, Worldwide regulations for mycotoxins, a compendium. FAO Food and Nutrition Paper No. 64, 1996.
 22. Llewellyn G. C., McCay J. A., Brown R. D. et al. Immunological evaluation of the mycotoxin patulin in female B6C3F(1) mice. // *Food and Chem. Toxicol.* — 1998. — 36. — P. 1107-1115.
 23. Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the EEC, Code of Practice: General, Physical, Chemical and Microbiological Criteria for Fruit and Vegetable Juices and Nectars in the European Community, 1990.
 24. Rychlik M., Schieberle P. Model studies on the diffusion behavior of the mycotoxin patulin in apples, tomatoes, and wheat bread. // *Europ. Food Res. and Technol.* — 2001. — 212. — P. 274-278.
 25. Fremy J.M., Castegnaro M.J.J., Gleizes E. et al. Procedures for destruction of patulin in laboratory wastes. // *Food Addit. Contam.* — 1995. — 12. P. 331-336.
 26. Harrison, M. A. Presence and stability of patulin in apple products: A review. // *J. Food Safety.* — 1989. — 9. — P. 147-153.
 27. FDA/CFSAN Federal Register 63 FR 20449 April 24, 1998. Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP); Procedures for the Safe and Sanitary Processing and Importing of Juice; Food Labeling: Warning Notice Statement; Labeling of Juice Products; Proposed Rules. Hyperlink <http://www.verity.fda.gov/search07cgi/s07is.dll>
 28. МР 4.4.4-108-2004. Методические указания. Порядок и периодичность контроля продовольственного сырья и пищевых продуктов по показателям безопасности, утв. 02.07.04г., № 329 (Взамен МБ 5.08.07/1232-96).
 29. Sydenham E. W., Vismer H. F., Marasas W. F. O. et al. The influence of deck storage and initial processing on patulin levels in apple juice. // *Food Additives and Contaminants.* — 1997. — 14. — P. 429-434.
 30. Dirheimer G. Recent advances in the genotoxicity of mycotoxins. // *Rev. Med. Véter.* — 1998. — 149. — P. 605-616.
 31. Beretta, B., Gaiaschi A., Galli C. L., Restani P. Patulin in apple-based foods: occurrence and safety evaluation. // *Food Addit. and Contamin.* — 2000. — 17. — P. 399-406.
 32. Frayssinet C. La patuline. / *Cahiers de nutrition et de dietetique.* — 1984. — 19. — P. 1-37.
 33. Food and Agriculture Organisation / World Health Organisation (FAO/WHO), Joint F AO I WHO Expert Committee on Food Additives, Fifty-sixth Meeting, 6-15 February 2001 (Geneva: WHO), pp. 1-33 [<http://www.fao.org/es/ESN/Jecfa/jecfa56.pdf>].
 34. Steiner I., Werner D., Washuttl J. Patulin in fruit juices. Part 2. Degradation of patulin. // *Ernahrungl Nutrition.* — 1999b. — 23. — P. 251-255.
 35. Manchisky M., Midio A.F. Incidencia de patulina en jugo de manzana industrializado. // *Alimentaria.* — 1996. — 276. — P. 61-64.
 36. Prieta J., Moreno M.A., Diaz S. et al. Survey of patulin in apple juice and children's apple food by the diphasic dialysis membrane procedure. // *J. of Agricult. and Food Chem.* — 1994. — 42. — P. 1701-1703.
 37. Shephard G. S. Patulin in South African commercial apple products. // *Food Control.* — 2001. — 12. — P. 73-76.
 38. Karadenizm F., Eksi A. The correlation of fumaric acid with patulin, L-lactic acid and HMF in apple juice concentrate. // *Fruit Processing.* — 1997. — 12. — P. 475-478.
 39. Gokmen V., Acar J. Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and patulin in apple juice by reversed-phase liquid chromatography. // *J. Chromatog. A.* — 1999. — 847. — P. 69-74.
 40. Ministry of Agriculture, Fisheries and Foods (MAFF), Survey of Apple Juice for Patulin. — *Food Surveillance Information Sheet.* — 1995. — P.74.
 41. Ministry of Agriculture, Fisheries and Foods (MAFF), Survey of Apple Juice

- for Patulin. — Food Surveillance Information Sheet. — 1996. — P. 97.
42. Ministry of Agriculture, Fisheries and Foods (MAFF), Survey of Apple Juice for Patulin. — Food Surveillance Information Sheet. — 1999. — P. 173.
 43. Chao-Ling Laj, You-Min Fun and Daniel Yang-Chin Shin. Detection of mycotoxin patulin in apple juice// J. Food and Drug Analysis.- 2000.- 8(2).- P. 85-96.
 44. Pfohl-Leszkowicz A. La patuline. Les Mycotoxines dans l'Alimentation: Evaluation et Gestion du Risque - (Paris: Technique et Documentation), 1999. — P. 279-294.
 45. Руководство Р 4.1.1672-03. 4.1. Методы контроля. Химические факторы. Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России. — М., 2004. — 240с.
 46. Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов / Под ред. И.М. Скурихина, В.А. Тутельяна. — М.: Брандес, Медицина, 1998. — 348с.
 47. ГОСТ 28038-89. Продукты переработки плодов и овощей. Метод определения микотоксина патулина. — 1989. — 8с.
 48. Brause A.R., Trucksess M.W., Thomas F.S., Page S.W. Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography: collaborative study. // J. of AOAC Intern. — 1996. — 79. — P. 451-455.
 49. Кульберг А.Я. Молекулярная иммунология. — М., 1985. — 228 с.
 50. McElroy L.J., Weiss C.M. The production of polyclonal antibodies against the mycotoxin derivative patulin hemiglutarate // Can. J. Microbiol. — 1993. — 39. — P. 861.
 51. Стародуб М.Ф., Стародуб В.М. Имуносенсори: витоки виникнення, досягнення та перспективи. // Укр. біохім. журн. — 2000. — 72, № 4-5. — С.147-163.
 52. Starodub V.M., Starodub N.F. Electrochemical and optical biosensors: origin of development, achievements and perspectives of practical application. In book of NATO series "Novel processes and control technologies in the food industry", Ed. Bozoglu F. at al., Amsterdam. — 2001. — P. 63-94.
 53. Стародуб Н.Ф., Стародуб В.Н. Биосенсоры и контроль пестицидов в воде и пищевых продуктах. // Химия и технология воды. — 2001. — 23, № 6. — С.612-638..
 54. Стародуб Н.Ф., Стародуб В.Н. Экспрессный контроль токсичных веществ и патогенных микроорганизмов. // Иммунный анализ и иммунные сенсоры. — Укр. біохім. журн. — 2002 — 74, № 4. — С.5 — 23.
 55. Стародуб Н.Ф., Стародуб В.М. Биосенсоры на основе фотолюминесценции пористого кремния. Общая характеристика и применение для медицинской диагностики. // Sensors Electronics and Microsystem Technologies. — 2004. — 2. — P. 63-83.
 56. Стародуб Н.Ф., Стародуб В.М. Биосенсоры на основе фотолюминесценции пористого кремния. — Применение для мониторинга окружающей среды. // Sensors Electronics and Microsystem Technologies. — 2005. — 1. — P. 63-71.
 57. Nabok A.V., Ray A.K., Starodub N.F., Dowker K.P. Enzyme-indicator optrodes for detection of heavy metal ions and pesticides. Biochemical and biomolecular sensing. Ed. Liberman R.A. Proceedings SPIE. — 2000. — 4200. — P.32-41.
 58. Starodub N.F., Dzantiev B.B., Starodub V.M., Zherdev A.V. Immunosensor for the determination of the herbicide simazine based on an ion-selective field-effect transistor. // Anal. Chim. Acta. — 2000. — 424. — P.37-43.
 59. Стародуб Н.Ф., Стародуб В.М. Биосенсорный контроль загрязнения воды некоторыми химическими органическими веществами. // Химия и технология воды. — 2002. — 24, N 5. — P. 447-472.
 60. Nabok A.V., Tsargorodskaya A., Hassan A.K., Starodub N.F. Total internal reflection ellipsometry and SPR detection of low molecular weight environmental toxins. // Appl. Surface Science. — 2005. — 246. — P. 381-386.
 61. Daly S.J., Keating G.J., Dillon P.P. et al. Development of surface plasmon resonance-based immunoassay for aflatoxin B1. // J. Agricult. And Food Chem. — 2000. — 48, N11. — P. 5097-5104.
 62. 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.
 63. Tudos A.J., Lucas-van den Bos E.R., Stigter E.C.A. Rapid surface plasmon resonance-based inhibition assay of deoxynivalenol. // J. of Agricult. And Food Chem. — 2003. — 51, N 20. — P. 5843-5848.
 64. Starodub N.F., Nabok A.V., Tsargorodskaya A. et al. Control of T2 mycotoxin in solutions and foods by biosensors based on SPR and TIRE. / In Proc. Sensor+Test ,2006.- Nurenberg, 2006. — P. 87-92.
 65. Nabok A.V., Tsargorodskaya A., Holloway A. et al. Registration of T2 Mycotoxin with Total Internal Reflection Ellipsometry. // Biosensors and Bioelectronics. — 2007.-22.-P.885-890.
 66. Paepens C., De Saeger S., Sibanda L. et al. A flow-through enzyme immunoassay for the screening of fumonisins in maize. // Anal. Chem. Acta. — 2004. — 523. — P. 229-235

*М. Ф. Стародуб, Л. М. Пилипенко,
А. В. Егорова, І. В. Пилипенко*

МИКОТОСИН ПАТУЛІН: ПРОДУЦЕНТИ, БІОЛОГІЧНА ДІЯ, ІНДИКАЦІЯ В ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ

Розглянуті існуючі дані літератури, щодо продуцентів мікотоксину патуліну та його біологічної дії. Проаналізовано методичні підходи, що традиційно використовуються для його виявлення, приділена основна увага сучасним інструментальним методам аналізу на основі принципів біосенсорики.

*N. F. Starodub, L. N. Pilipenko,
A. V. Egorova, I. V. Pilipenko*

PATULIN MYCOTOXIN: PRODUCERS, BIOLOGICAL EFFECTS, INDICATION IN FOODSTUFFS

The existing data literature data about micotoxin patuline producers and it biological effects were considered. The methodical approaches that are traditionally used for this micotoxin revealing were analyzed. The main attention to modern instrumental methods of analysis based on the principles of biosensorics was given.