

**БИОАРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ**  
**BIOORGANIC CHEMISTRY**

УДК 573.6.086.83:57.083.3+619.636

Поступила в редакцию 29.12.2016  
Received 29.12.2016**И. И. Вашкевич<sup>1</sup>, А. А. Ястребова<sup>1</sup>, О. С. Куприенко<sup>1</sup>,  
Г. С. Корнилович<sup>2</sup>, Л. Н. Сухенко<sup>2</sup>, А. И. Шибeko<sup>2</sup>, О. В. Свиридов<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь<sup>2</sup>Центральная научно-исследовательская лаборатория хлебопродуктов, Минск, Беларусь**РЕАГЕНТЫ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИНА Т-2  
В КОРМАХ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ**

**Аннотация:** Разработан и испытан набор реагентов ИФА-ТОКСИН Т-2 для определения токсина Т-2 в кормах и пищевой продукции методом прямого конкурентного иммуноферментного анализа в микропланшетном формате. Установленные технико-аналитические параметры набора и метрологические характеристики методики выполнения измерений соответствуют современному уровню развития иммуноанализа и позволяют с надлежащей точностью определять содержание токсина Т-2 в диапазоне от 30 до 1000 мкг/кг в сельскохозяйственной продукции.

**Ключевые слова:** микотоксины, токсин Т-2, иммуноферментный анализ

**Для цитирования:** Реагенты для иммуноферментного определения токсина Т-2 в кормах и пищевых продуктах / И. И. Вашкевич [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 3. – С. 63–71.

**I. I. Vashkevich<sup>1</sup>, A. A. Yastrebova<sup>1</sup>, O. S. Kuprienko<sup>1</sup>,  
G. S. Kornilovich<sup>2</sup>, L. N. Sukhenko<sup>2</sup>, A. I. Shibeko<sup>2</sup>, O. V. Sviridov<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Institute of Bioorganic Chemistry National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus<sup>2</sup>Central research laboratory of Grain Products, Minsk, Belarus**REAGENTS FOR AN ENZYME IMMUNOASSAY OF T-2 TOXIN IN FEEDS AND FOODS**

**Abstract:** A reagent kit EIA-TOXIN T-2 for the determination of mycotoxin T-2 toxin in feeds and foods by a direct competitive enzyme immunoassay using microtitration plate has been developed and tested. The evaluated parameters of the kit and metrological characteristics of the technique of measurements correspond to the modern level of immunoassay development and provide the determination of T-2 toxin content of agricultural products in a range of 30 to 1000 µg/kg with proper accuracy and precision.

**Keywords:** mycotoxins, T-2 toxin, enzyme immunoassay

**For citation:** Vashkevich I. I., Yastrebova A. A., Kuprienko O. S., Kornilovich G. S., Sukhenko L. N., Shibeko A. I., Sviridov O. V. Reagents for an enzyme immunoassay of T-2 toxin in feeds and foods. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya khimichnykh nauk*. [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 3, pp. 63–71 (In Russian).

**Введение.** Токсин Т-2 представляет собой метаболит грибов *Fusarium*, конкретно *F. Sporotrichioides*, который по экспертным оценкам загрязняет не менее четверти зерновых культур, выращиваемых в мире. Это соединение является одним из самых опасных для здоровья человека и сельскохозяйственных животных микотоксином. Главным механизмом его токсического действия является ингибирование биосинтеза белка, вызывающее апоптоз, что проявляется в болезнях крови и угнетении иммунной системы [1].

Существует международная система обязательного контроля кормов и продуктов на наличие шести основных микотоксинов, в число которых входит токсин Т-2. Для проведения скрининговых исследований содержания микотоксинов в сельскохозяйственной продукции используются наборы реагентов для иммуноферментного анализа (ИФА). Разработка таких наборов и их системное применение в контрольных лабораториях дают очевидный социальный эффект, который состоит в обеспечении качества и безопасности кормов и продовольствия, а значит, в защите

жизни и здоровья человека и животных, охране окружающей среды. Экономическая эффективность разработки современных реагентов для выполнения ИФА заключается в финансовой выгоде последующих мероприятий по существенному снижению потерь и вреда вследствие контаминации продуктов и кормов микотоксинами. В число таких мероприятий входят предотвращение микотоксикозов у животных путем неприменения или обезвреживания кормов, в которых ИФА-наборами будет выявлено высокое содержание микотоксинов, в частности токсина Т-2. Для нашей страны важной экономической составляющей создания и широкого применения ИФА-наборов на микотоксины является импортозамещение. Все эти факторы стали обоснованием задания Государственной программы «Импортозамещающие биотехнологии» на 2013–2015 годы по разработке отечественных наборов реагентов для иммуноферментного определения микотоксинов в кормах для животных, пищевой продукции и продовольственном сырье. В предыдущих публикациях изложены результаты выполнения этого задания, относящиеся к наборам реагентов ИФА-АФЛАТОКСИН [2] и ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН [3]. В данной работе описаны разработка и свойства набора ИФА-ТОКСИН Т-2.

**Материалы и методы.** Чистый токсин Т-2, имеющий статус стандарта, поступил от фирмы «Romer Labs» (Австрия), детергенты и бактериостатики приобретены у фирмы «Sigma-Aldrich» (США). Разборные микропланшеты из полистирола, состоящие из двенадцати 8-луночных полосок (стрипов), куплены у «Greiner bio-one» (Германия). Очищенная пероксидаза из корней хрена (ПХ) получена от фирмы «ДИА-М» (РФ). Реагенты для реакции пероксидазного окисления – растворы хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и субстрата ( $H_2O_2$ ), а также стоп-реагент (раствор  $H_2SO_4$ ) поступили от УП «Хозрасчетного опытного производства ИБОХ НАН Беларуси». Измельченные образцы различных кормов, в которых содержание токсина Т-2 установлено с помощью набора реагентов RIDASCREEN® FAST T-2 TOXIN (Германия) и референсный материал предоставлены ГУ «ЦНИЛхлебопродукт» (Беларусь).

В экспериментах применяли воду с удельным электрическим сопротивлением 17–18 МОм·см, очищенную в модульной установке Water Pro Plus («Labconco», США). Для детекции колориметрического сигнала в ИФА использовали прибор АИФ М/340 («Витязь», Беларусь). Масс-спектры получали с использованием масс-селективного детектора Agilent 6120 в комплекте с жидкостным хроматографом Agilent 1200 (США). Спектры MALDI-TOF снимали в масс-спектрометре Microflex LRF («Bruker», Германия).

N-гидроксисукцинимидный эфир гемисукцината Т-2 токсина синтезировали следующим образом: 5 мг (10,8 мкмоль) Т-2 токсина растворяли в 0,2 мл сухого пиридина; добавляли 105 мг (1050 мкмоль) ангидрида янтарной кислоты и 1,3 мг (10,3 мкмоль) 4-диметиламинопиридина; перемешивали реакционную смесь в течение 3 ч при температуре плюс +50 °С. Пиридин упаривали, остаток растворяли в хлороформе, экстрагировали водой 4 раза, водную фазу отбрасывали. К раствору в хлороформе добавляли безводный  $Na_2SO_4$ , затем растворитель упаривали. Об образовании гемисукцината Т-2 токсина судили по результатам ВЭЖХ-МС. Масс-спектр (ESI):  $m/z$  589  $[M+Na]^+$ .  $C_{28}H_{38}O_{12}$ . Вычислено 566. Полученный гемисукцинат Т-2 токсина растворяли в 0,2 мл диметилформамида, содержащего 1,5 мг (13 мкмоль) N-гидроксисукцинимиды и 2,0 мкл (13 мкмоль) диизопропилкарбодиимида. Перемешивали в течение 2 ч при охлаждении до (+4–10) °С, выпавший осадок мочевины отделяли после центрифугирования, растворитель упаривали. Образовавшийся остаток представлял собой N-гидроксисукцинимидный эфир гемисукцината Т-2 токсина.

Для синтеза ферментного конъюгата к раствору 3,7 мг ПХ в 0,5 мл 0,1 М  $NaHCO_3$  (рН 8,3) добавляли раствор 2,8 мг (4,3 мкмоль) N-гидроксисукцинимидного эфира гемисукцината Т-2 токсина в 0,1 мл диметилформамида. Инкубировали в течение 18 ч при комнатной температуре со встряхиванием. Очистку проводили методом гель-фильтрации на колонке с Superose 12 (30×1 см), уравновешенной 0,15 М  $NaCl$  и хранили при –18 °С в 50 %-ном глицерине.

Иммуноген получали следующим образом. К раствору 10 мг бычьего сывороточного альбумина (БСА) в 0,5 мл 0,1 М  $NaHCO_3$  (рН 8,3) добавляли раствор 4,2 мг (6,4 мкмоль) N-гидроксисукцинимидного эфира гемисукцината Т-2 токсина в 0,1 мл диметилформамида. Проводили инкубацию и очистку, как в случае конъюгата с ПХ. Иммуноген лиофилизировали и хранили при –18 °С.

Получение антисыворотки проводили по следующей схеме. Перед каждой иммунизацией готовили эмульсию конъюгата БСА с гемисукцинатом Т-2 токсина и полного адьюванта Фрейнда. Для иммунизации одного кролика использовали 0,45 мг иммуногена. Для получения стабильной эмульсии смесь 0,5 мл раствора антигена и 0,5 мл адьюванта многократно набирали в шприц и с силой выпускали через тонкую иглу. Свежеприготовленную эмульсию в количестве 1 мл вводили подкожно и внутривожно в 15–20 точек спины и шеи каждому кролику. Интервалы между первыми инъекциями составляли 2 недели, а затем проводили иммунизацию 0,25 мг иммуногена один раз в 20–21 день. Со второго цикла, осуществляли периодический отбор проб крови из ушной вены животных. Иммунизацию продолжали в течение 6 мес.

Полученные образцы сыворотки тестировали на наличие связывающей способности в отношении токсина Т-2. Конечный титр поликлональных антител (ПАт) определяли как рабочее разведение антисыворотки в тест-системе, включающей покрытую антикроличьими антителами твердую фазу, при связывании ферментного конъюгата в разведении 1 : 10 000 в отсутствие немеченого токсина Т-2, соответствующего колориметрическому сигналу ПХ около 2,0 оптических единиц.

Микропланшетный иммуносорбент получали биоспецифической иммобилизацией ПАт к токсину Т-2 (в титре 1 : 10 000) через пассивно адсорбированные на внутренней поверхности лунок очищенные ПАт овцы к иммуноглобулинам класса G кролика из раствора объема 0,1 мл с концентрацией 5 мг/л. Для стабилизации иммобилизованных ПАт применяли специальные растворы, содержащие инертные для анализа белки, неорганические соли, сахара и антибактериальные добавки.

Градуировочные растворы Т-2 токсина приготавливали объемно-весовым методом, используя водно-метанольный раствор.

В состав готового набора ИФА-ТОКСИН Т-2 входят следующие компоненты: иммуносорбент, 96-луночный полистирольный планшет, 12 стрипов по 8 лунок с биоспецифически иммобилизованными ПАт, готовый к использованию, 1 планшет; планшет для смешивания, 96-луночный полистирольный планшет, 12 стрипов по 8 лунок, 1 планшет; градуировочные растворы, жидкие препараты с условной (с учетом фактора разведения при пробоподготовке) величиной концентрации токсина Т-2:  $C_0$  – 0 мкг/л;  $C_1$  – 30 мкг/л;  $C_2$  – 100 мкг/л;  $C_3$  – 300 мкг/л;  $C_4$  – 1000 мкг/л; 5 флаконов, (0,7±0,02) мл; конъюгат, 11-кратный концентрат, жидкий препарат, 1 флакон, (1,2±0,02) мл; раствор для разведения конъюгата, жидкий препарат, 1 флакон, (12,0±0,5) мл; промывочный раствор, 10-кратный концентрат, жидкий препарат, 1 флакон (30,0±0,5) мл; раствор хромогена, жидкий препарат, 1 флакон (0,7±0,02) мл; субстратный буферный раствор, жидкий препарат, 1 флакон (14,0±0,5) мл; стоп-реагент, жидкий препарат, 1 флакон (14,0±0,5) мл.

Методика применения набора ИФА-ТОКСИН Т-2 состоит в следующем. Образец корма или пищевого продукта размалывали на мельнице типа «Циклон» и просеивали через лабораторное сито с отверстиями диаметром 1 мм. Точную навеску (5,0 г) размолотого образца экстрагировали 25 мл смеси метанол–вода в объемном соотношении 70:30, фильтровали, доводили рН до значения 6–8. В пробирку отбирали дозатором 0,5 мл фильтрата и добавляли 0,5 мл дистиллированной воды. Раствор перемешивали и добавляли 3 мл раствора метанола, приготовленного в объемном соотношении метанол–вода 35:65. Закрывали пробирку пробкой, раствор перемешивали и использовали для проведения ИФА в течение 2 ч. При анализе каждой пробы выполняли два параллельных определения одного образца.

*Приготовление рабочих растворов некоторых компонентов набора.* Раствор конъюгата получали непосредственно перед использованием путем смешивания одной части концентрата и 10 частей раствора для разведения. Концентрат промывочного раствора разбавляли водой в 10 раз. Для приготовления хромоген-субстратной смеси раствор хромогена разводили субстратным буферным раствором в 21 раз (соотношение по объему 1:20).

В ходе анализа в лунки планшета для смешивания вносили по 100 мкл конъюгата, а затем добавляли в дубликатах по 50 мкл каждого градуировочного раствора и растворов проб каждого исследуемого образца. Немедленно после перемешивания отбирали восьмиканальным дозатором и вносили в лунки микропланшетного иммуносорбента по 100 мкл градуировочных растворов или растворов исследуемых проб вместе с конъюгатом. Закрытый иммуносорбент инкуби-

ровали в течение 30 мин в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре от +20 до +25 °С. По окончании времени инкубации удаляли растворы из всех лунок и с применением восьмиканального дозатора проводили 4-кратное промывание планшета промывочным раствором порциями по 200 мкл на одно промывание каждой лунки, выдерживая заполненные лунки не менее 10 с. Далее в каждую лунку промытого планшета-иммуносорбента восьмиканальным дозатором вносили 100 мкл хромоген-субстратного раствора. Закрытый планшет инкубировали в течение 10 мин в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре от +20 до +25 °С. По истечении времени инкубации в каждую лунку планшета восьмиканальным дозатором вносили 100 мкл стоп-реагента, растворы в лунках перемешивали круговыми движениями планшета по поверхности лабораторного стола. В течение не более 15 мин после добавления стоп-реагента измеряли оптическую плотность в каждой лунке на микропланшетном фотометре при длине волны 450 нм.

Обработку результатов измерений проводили с применением прилагаемого к набору шаблона в формате Microsoft Excel. В соответствующие графы шаблона вносили полученные в условиях повторяемости результаты измерения оптической плотности градуировочных растворов  $C_0$ – $C_4$  и растворов исследуемых проб. Шаблон автоматически рассчитывает параметры связывания ферментного конъюгата токсина Т-2 с иммобилизованными ПАг для градуировочных растворов  $C_1$ – $C_4$  и для раствора неизвестной пробы относительно градуировочного раствора  $C_0$ , строит градуировочную зависимость и рассчитывает массовую долю токсина Т-2 в исследуемой пробе,  $C$ , мкг/кг (ppb).

При разработке набора ИФА-ТОКСИН Т-2 его технико-аналитические характеристики и диапазон измерений подбирались экспериментально с учетом установленных в Беларуси предельно допустимых уровней содержания токсина Т-2 кормах, кормовых добавках и сырье для производства комбикормов (не выше 100 мкг/кг) [4]. Метрологические характеристики методики выполнения измерений массовой доли токсина Т-2 набором реагентов ИФА-ТОКСИН Т-2 получены на основании экспериментальных данных в ходе внутрिलाбораторных испытаний с использованием образцов зерна злаковых и зернобобовых (пшеница, кукуруза, соя), продуктов их переработки (отруби ржаные, гречневая крупа), соевого шрота и комбикормов. При этом концентрации микотоксина находились на начальном (72 мкг/кг), среднем (170–375 мкг/кг) и конечном (550–800 мкг/кг) отрезках градуировочной кривой. Подготовленные образцы анализировали в условиях повторяемости в лаборатории с изменяющимся фактором: «время + оператор». Показатели прецизионности и правильности определяли соответственно по СТБ ИСО 5725-3 и СТБ ИСО 5725-4, а оценки неопределенности делали, как описано в руководствах [5, 6].

**Результаты и их обсуждение.** Токсин Т-2 имеет молекулярную массу 466,5 г/моль и представляет собой 3-гидрокси-4,15-диацетокси-8-изобутирилокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен или (по-другому) 12,13-эпокситрихотец-9-ен-3а,4b,8a,15-тетрол-4,15-диацетат-8-изовалериат. Как следует из химического строения, показанного на рис. 1, данный микотоксин относится к трихотеценам, химическим соединениям, также получившим название сесквитерпеноидов. Характерная особенность этого семейства, которое включает почти треть всех известных микотоксинов, состоит в том, что они имеют тетрациклическое трихотеценовое ядро, содержащее двойную связь у С9 и эпоксидную группу при С12, С13. Особенностью трихотеценов А, к которым относятся токсин Т-2 и его аналог НТ-2 (неацетилированная ОН-группа у С4), является присутствие у С8 функциональной группы, отличной от карбонильной, которая характерна для трихотеценов В. В литературе описаны несколько способов синтеза белковых конъюгатов токсинов Т-2 и НТ-2, пригодных для получения поли- [7–10] или моноклональных (МАг) [11, 12] антител к этому гаптену, а также для использования в непрямом [10, 11] или прямом [8, 9, 12] ИФА. Так, для получения иммуногенного конъюгата с бычьим сывороточным альбумином описан синтез гемиглутарата Т-2 токсина [8]. В работе [10] синтезированный данным способом конъюгат использован для получения поликлональных антител, которые в комбинации с твердофазным антигеном на основе альбумина кролика или желатина, ацилированных N-гидроксисукцинимидным эфиром гемиглутарата токсина Т-2, применялись при конструировании тест-системы непрямого конкурентного ИФА. В одной из ранних работ [8] описана система прямого конкурентного ИФА, для которой имму-

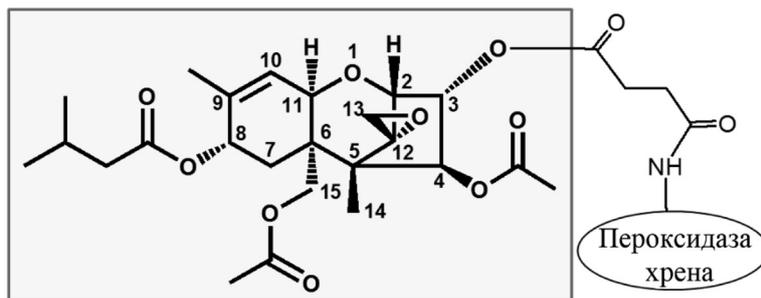


Рис. 1. Схема строения конъюгата токсина Т-2 и пероксидазы хрена (структурная формула токсина Т-2 выделена)

Fig. 1. The scheme of the structure of the conjugate toxin T-2 and horseradish peroxidase (the structural formula of toxin T-2 is delineated)

нореагенты были получены на основе токсина Т-2, ацилированного янтарным ангидридом, а затем присоединенного через водорастворимый карбодиимид к альбумину или ПХ. Сукцинильное производное токсина НТ-2, конъюгированное с ПХ, оказалось полезным в системе высокочувствительного прямого ИФА токсина Т-2, включавшей МАт, которое было получено иммунизацией мышей гомологичным конъюгатом токсина НТ-2 с альбумином [12]. В этой же лаборатории разработана система гетерологичного прямого ИФА для токсина Т-2 в молоке, для которой поликлональные антитела вырабатывались у животных, иммунизированных конъюгатом альбумина человека с гемисукцинатом токсина Т-2, а меченым антигеном служил гемисукцинат токсина НТ-2, конъюгированный с ПХ [9]. Сообщалось также о модификации ОН-группы у атома С3 токсина Т-2 йодусной кислотой и (или) 1,1'-карбонилдиимидазолом для последующего присоединения к белку с образованием устойчивой связи [13]. В диссертационной работе [14] рассмотрены многие методические вопросы получения иммунореагентов, конструирования гомологичных и гетерологичных (в отношении иммуногена и меченого антигена на основе токсинов Т-2 и НТ-2) систем ИФА, а также метрологической валидации и практического применения этих систем.

Проанализировав большой литературный материал, мы выбрали для создания иммуноферментного набора реагентов конструкцию прямого конкурентного ИФА. Меченный ферментом токсин Т-2 синтезирован путем ацилирования ОН-группы у С3 микотоксина янтарным ангидридом с последующим получением N-гидроксисукцинимидного эфира и взаимодействием этого эфира с  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-группами остатков лизина ПХ. Химическое строение конъюгата схематично показано на рис. 1. Иммуноген на основе БСА получали по аналогичной схеме. Содержание остатков токсина Т-2 в конъюгатах с ПХ и БСА, определенное масс-спектрометрией MALDI-TOF, составило соответственно 1,8 и 7,5 молекул Т-2 в одной молекуле белка.

Иммунизацию проводили в группе из трех кроликов. У кролика №3 наблюдался наибольший титр антисыворотки (порядка 1:10 000). Пик выработки ПАт пришелся на пятый забор крови, что отражено на рис. 2. Количественная оценка ингибиторной активности микотоксинов в отношении связывания ферментного конъюгата токсина Т-2

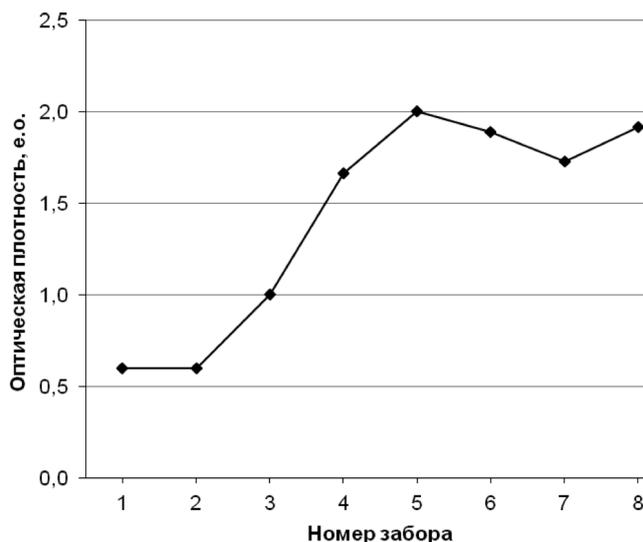


Рис. 2. Результат тестирования серии антисывороток кролика №3 в разведении 1 : 10 000 от первого до восьмого забора крови

Fig. 2. The result of testing a series of rabbit antiserum №3 at a 1:10.000 dilution from the first to the eighth blood sampling

с выбранным ПАт показала, что концентрации токсинов Т-2 и НТ-2, вызывающие уменьшение связывания на 50 % (кросс-реактивности), соотносятся как 100 и 10. Микотоксины других классов не обладали способностью конкурентно ингибировать комплексообразование данного конъюгата и ПАт (перекрестные реакции < 0,1 %) и, следовательно, их присутствие в анализируемом образце не может влиять на результаты количественного определения токсина Т-2.

Набор реагентов ИФА-ТОКСИН Т-2 основан на принципе прямого конкурентного ИФА. Микотоксины экстрагировали из размолотого образца раствором метанол–вода 70:30. В лунки планшета для предварительного смешивания вносили конъюгат токсина Т-2 с ПХ и добавляли градуировочные растворы с известной концентрацией токсина Т-2 и подготовленные к анализу растворы проб, перемешивали и переносили смесь в лунки планшетного иммуносорбента. Во время последующей инкубации токсин Т-2 в составе градуировочного раствора или исследуемой пробы конкурирует с конъюгатом токсина Т-2 и ПХ за связывание с ПАт, биоспецифически иммобилизованными через антивидовые антитела на внутренней поверхности лунок иммуносорбента. После промывки, в ходе которой из лунок удаляли не прореагировавшие с антителами компоненты, к системе добавляли приготовленный хромоген-субстратный раствор, который позволяет визуализировать реакции антиген–антитело. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации токсина Т-2 в анализируемом образце или градуировочном растворе. Затем добавляли стоп-реагент, останавливающий цветную реакцию и одновременно изменяющий окраску раствора. Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряли на микропланшетном фотометре как величину оптической плотности при длине волны 450 нм. По результатам измерений оптической плотности градуировочных растворов с известным содержанием токсина Т-2 строили градуировочную зависимость, с помощью которой определяли массовую долю токсина Т-2 в анализируемых образцах.

Базовым компонентом набора ИФА-ТОКСИН Т-2 является разборный пластмассовый микропланшет (иммуносорбент), лунки которого покрыты ПАт к токсину Т-2. Биоспецифическая иммобилизация ПАт существенно снижала расход данного иммунореагента при получении иммуносорбента с заданными аналитическими характеристиками и увеличивала устойчивость антител к метанолу в ИФА-системе. Градуировочные пробы как компоненты разработанного набора – это растворы на основе стабилизированных водно-органических сред с подобранными точными концентрациями токсина Т-2, проверенными по международным стандартам и независимыми физико-химическими методами. Конъюгат антигена с ферментом представляет собой бифункциональное химическое соединение на основе токсина Т-2 и ПХ, имеющее высокие и ста-

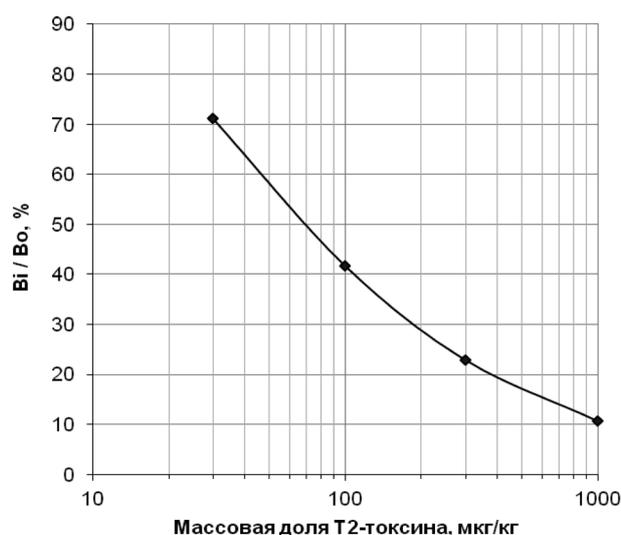


Рис. 3. Типичный градуировочный график набора реагентов ИФА-ТОКСИН Т-2

Fig. 3. Typical calibration curve of EIA-TOXIN T-2 reagent kit

бильные показатели энзиматической активности и средства к иммобилизованным ПАт. Главные компоненты раствора хромогена (ТМБ) и субстратный раствор ( $H_2O_2$ ) после смешивания взаимодействуют в ходе ферментативной реакции на заключительной стадии анализа и дают окрашенные продукты. Стоп-реагент (разбавленная  $H_2SO_4$ ) останавливает ферментативный процесс с изменением окраски продуктов реакции и фиксацией ее на уровне и во времени, которые оптимальны для надежного определения путем регистрации колориметрического сигнала в видимой области спектра многоканальным планшетным спектрофотометром. В результате строили типичный калибровочный график в полулогарифмических координатах, представленный на рис. 3.

В табл. 1 приведены значения технико-аналитических параметров набора реагентов

ИФА-ТОКСИН Т-2 по результатам независимых ИФА, которые были выполнены в ходе внутрилабораторных испытаний опытной партии набора. Установленные в результате испытаний технико-аналитические показатели набора ИФА-ТОКСИН Т-2 соответствуют ТУ ВУ 100185129.151-2015 и общим требованиям качества иммуноанализа, что обеспечивает количественное определение токсина Т-2 в сельскохозяйственной продукции.

Таблица 1. Технико-аналитические параметры набора ИФА-ТОКСИН Т-2

Table 1. Technical and analytical parameters of EIA-TOXIN T-2 reagent kit

Наименование показателя	Предписанное значение	Полученные значения <sup>5</sup>
Соотношение $B_0, B_1, B_2, B_3, B_4$ <sup>1</sup> , о.е.	$B_0 > B_1 > B_2 > B_3 > B_4$	$B_0 > B_1 > B_2 > B_3 > B_4$
$B_0$ , о.е.	1,4–2,7	1,6–2,2
$B_4$ , о.е., не более	0,6	0,4–0,6
$B_1/B_0$ , %, не более	95	73–87
$B_4/B_0$ , %, не более	35	22–30
Чувствительность <sup>2</sup> , мкг/кг, не более	30	< 30
$IC_{50}$ <sup>3</sup> , мкг/кг, в пределах	50–200	106–190
Коэффициент вариации <sup>4</sup> ,%, не более	15	8–13

Примечания: <sup>1</sup>  $B_0$ – $B_4$  – средние значения оптической плотности растворов в лунках, содержащих градуировочные растворы с увеличивающейся концентрацией токсина Т-2 ( $C_0$ – $C_4$ ) соответственно, измеряемые в оптических единицах (о. е.); <sup>2</sup> минимальная массовая концентрация токсина Т-2, определяемая набором, которая получена в результате измерения градуировочных растворов и рассчитана на основании удвоенного значения среднего квадратичного отклонения от среднего арифметического значения  $B_0$ ; <sup>3</sup> массовая концентрация токсина Т-2 при 50 %-ном связывании от  $B_0$ , полученная в результате измерения градуировочных растворов; <sup>4</sup> для результатов определения массовой концентрации токсина Т-2 в лунках, содержащих градуировочный раствор  $C_3$ ; <sup>5</sup> диапазон значений, полученных в ходе внутрилабораторных испытаний.

Определение метрологических характеристик методики выполнения измерений содержания токсина Т-2 в зерновых и зернобобовых культурах и продуктах их переработки, кормах и комбикормах набором реагентов ИФА-ТОКСИН Т-2 проводили в соответствии с существующими требованиями и действующими правилами. В табл. 2 приведены полученные относительные значения показателя повторяемости  $\sigma_r$ , показателя промежуточной прецизионности  $\sigma_{I(TO)}$  с изменяющимся фактором «время+оператор», предела повторяемости  $r$ , предела промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «время+оператор»  $r_{I(TO)}$  и относительной расширенной неопределенности  $U$  измерений массовой доли токсина Т-2 в указанной продукции растительного происхождения при доверительной вероятности  $P = 0,95$ .

Из данных табл. 2 следует, что разработанная методика обеспечивает получение результатов измерений массовой доли токсина Т-2 с надлежащими параметрами точности.

Таблица 2. Метрологические характеристики методики выполнения измерений с использованием набора реагентов ИФА-ТОКСИН Т-2

Table 2. Metrological characteristics of the measurement procedure using EIA-TOXIN T-2 reagent kit

Диапазон измерений, мкг/кг	$\sigma_r$ , %	$\sigma_{I(TO)}$ , %	$r$ , %	$r_{I(TO)}$ , %	$U$ , %
30,0–1000,0	8,2	9,6	23	27	20

Примечание. Предел измерений определяется значением величины нижней границы диапазона измерений.

**Заключение.** Разработанный набор реагентов ИФА-ТОКСИН Т-2 имеет современную конструкцию, основан на принципе конкурентного связывания определяемого и меченного ферментом токсина Т-2 с ПАт, биоспецифически иммобилизованными в 96 лунках разборного микропланшета, содержит эффективные вспомогательные реагенты и дает возможность одновременно исследовать 43 образца на содержание токсина Т-2. Технико-аналитические параметры набора и метрологические характеристики методики выполнения измерений соответствуют современному уровню ИФА и требованиям контроля безопасности пищевых продуктов питания и кормов. Изделие устойчиво при хранении и применении в обычных лабораторных условиях.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems / Task Force Report. Council for Agricultural Science and Technology. Ames, Iowa, USA. – 2003. – N. 139. – 199 p.
2. Новый набор реагентов для иммуноферментного определения афлатоксина В<sub>1</sub> в кормах и пищевых продуктах / И. И. Вашкевич [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хім. навук. – 2016. – № 2. – С. 69–75.
3. Новый набор реагентов для иммуноферментного определения зеараленона в кормах и пищевых продуктах / И. И. Вашкевич [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хім. навук. – 2016. – № 4. – С. 72–79.
4. Ветеринарно-санитарные правила обеспечения безопасности кормов, кормовых добавок и сырья для производства комбикормов: утв. постановлением Мин-ва сельск. хоз-ва и продовол. Респ. Беларусь 10.09.2014. – № 48.
5. Руководство ЕВРАХИМ/СИТАК. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях: под общ. ред. Л. А. Конопелько. – СПб.: ВНИИМ им. Д. И. Менделеева. – 2002. – 149 с.
6. VAM Project 3.2.1. Development and Harmonisation of Measurement. Uncertainty Principles. Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data. LGC (Teddington) Ltd. – 2000. – 87 p.
7. Production of antibody against T-2 toxin / F.S. Chu [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1979. – Vol. 37. – P. 104–108.
8. Enzyme-linked immunosorbent assay for T-2 toxin / J. J. Pestka [et al.] // J. Am. Oil Chem. Soc. – 1981. – Vol. 58. – P. 940A–944A.
9. Esgin, S. Development and application of an enzyme immunoassay for the detection of T-2 toxin in milk / S. Esgin, E. Märthbauer, G. Terplan // Arch. Lebensmittelhyg. – 1989. – Vol. 40. – P. 109–112.
10. Иммуноферментный метод определения токсина Т-2 в контаминированном зерне / Г. П. Кононенко [и др.] // Прикл. биохимия и микробиология. – 1999. – Т. 35. – С. 457–462.
11. Production of a monoclonal antibody to T-2 toxin with strong cross-reactivity to T-2 metabolites / E. H. Gendloff [et al.] // Phytopathology. – 1987. – Vol. 77. – P. 57–59.
12. Hack, R. A monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for the detection of T-2 toxin at pictogram level / R. Hack, E. Märthbauer, G. Terplan // Lett. Appl. Microbiol. – 1989. – Vol. 9. – P. 133–135.
13. Improved methods for conjugating selected mycotoxins to carrier proteins and dextran for immunoassays / H. Xiao [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 1995. – Vol. 43. – P. 2092–2097.
14. Hocke, K.B. Entwicklung und validierung von enzymimmuntests zum nachweis von T-2 toxin und HT-2 toxin sowie vorkommen dieser mykotoxine in lebensmitteln des deutschen markets : Inaugural-dissertation zur erlangung der tiermedizinischen doktorwürde / K.B. Hocke. – München, 2008. – 112 p.

## References

1. Niyo K. (ed.), CAST 2003, Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems, *Council for Agricultural Science and Technology, Task Force Report 139*, Ames, Iowa, USA, pp. 1–199.
2. Vashkevich I. I., Terent'eva T. V., Kornilovich G. S., Sukhenko L. N., Shibeko A. I., Sviridov O. V., “New reagent kit for enzyme immunoassay of aflatoxin B<sub>1</sub> in feeds and foods”, *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2016, no. 2, pp. 69–75.
3. Vashkevich I. I., Terent'eva T. V., Kornilovich G. S., Sukhenko L. N., Shibeko A. I., Sviridov O. V., “A new kit of reagents for the ELISA determination of zearalenone in feeds and foods”, *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryia khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemistry Series], 2016, no. 4, pp. 72–79.
4. *Veterinarно-sanitarnye pravila obespecheniia bezopasnosti kormov, kormovykh dobavok i syr'ia dlia proizvodstva kombikormov, utverzhdennye postanovleniem Ministerstva sel'skogo khoziaistva i prodovol'stviia Respubliki Belarus' ot 10.09.2014, №48* [Veterinary and sanitary rules to ensure safety of feed, feed additives and raw materials for feed production, approved by the Decree of the Ministry of Agriculture and Food of the Republic of Belarus from 10.09.2014, no. 48], 2011.
5. Rukovodstvo EVRAKХИМ / СИТАК, *Kolichestvennoe opisaniie neopredelelnosti v analiticheskikh izmereniiaxh* [Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement], Translated by Konopel'ko, L. A., VNIIM im. D.I. Mendeleeva, St. Petersburg, RU, 2002.
6. Barwick V. J., Ellison S., *VAM Project 3.2.1. Development and Harmonisation of Measurement. Uncertainty Principles. Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data*, LGC (Teddington) Ltd, Teddington, UK, 2000.
7. Chu F. S., Grossman S., Wei R. D., Mirocha C. J., “Production of antibody against T-2 toxin”, *Applied and Environmental Microbiology*, 1979, vol. 73, no. 1, pp. 104–108.
8. Pestka J. J., Lee S. C., Lau H. P., Chu F. S., “Enzyme-linked immunosorbent assay for T-2 toxin”, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1981, vol. 58, pp. 940A–944A.
9. Esgin S., Märthbauer E., Terplan G., “Development and application of an enzyme immunoassay for the detection of T-2 toxin in milk”, *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 1989, vol. 40, pp. 109–112.
10. Kononenko G. P., Burkin A. A., Soboleva N. A., Zotova E. V., “Enzyme-linked immunosorbent assay for toxin T-2 determination in contaminated grain”, *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiiia* [Applied biochemistry and microbiology], 1999, vol. 35, no. 4, pp. 457–462.
11. Gendloff E. H., Pestka J. J., Dixon D. E., Hart L. P., “Production of a monoclonal antibody to T-2 toxin with strong cross-reactivity to T-2 metabolites”, *Phytopathology*, 1987, vol. 77, pp. 57–59.
12. Hack R., Märthbauer E., Terplan G., “A monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for the detection of T-2 toxin at pictogram level”, *Letters in Applied Microbiology*, 1989, vol. 9, pp. 133–135.

13. Xiao H., Clarke J. R., Marquardt R. R., Frohlich A. A., “Improved methods for conjugating selected mycotoxins to carrier proteins and dextran for immunoassays”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, vol. 43, no. 8, pp. 2092–2097.

14. Hocke K. B., *Entwicklung und validierung von enzymimmuntests zum nachweis von T-2 toxin und HT-2 toxin sowie vorkommen dieser mykotoxine in lebensmitteln des deutschen markts: Inaugural-dissertation zur erlangung der tiermedizinischen doktorwürde*, München, DE, 2008.

### Информация об авторах

*Вашкевич Ирина Игнатъевна* – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vashkevich@iboch.bas-net.by.

*Ястребова Анна Андреевна* – науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: aliraflame@yandex.ru.

*Куприенко Ольга Сергеевна* – науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: olga\_garbuz@iboch.bas-net.by.

*Корнилович Галина Сергеевна* – зам. директора по науке, Центральная научно-исследовательская лаборатория хлебопродуктов (пос. Октябрьский, 222220, Минская обл., Смолевичский р-н). E-mail: cnilhp@ya.ru.

*Сухенко Лилия Николаевна* – нач. отдела, Центральная научно-исследовательская лаборатория хлебопродуктов (пос. Октябрьский, 222220, Минская обл., Смолевичский р-н). E-mail: cnilhp@ya.ru.

*Шибeko Анна Ивановна* – вед. инженер-химик, Центральная научно-исследовательская лаборатория хлебопродуктов (пос. Октябрьский, 222220, Минская обл., Смолевичский р-н). E-mail: cnilhp@ya.ru.

*Свиридов Олег Васильевич* – д-р хим. наук, ст. науч. сотрудник, зав. лаб., Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sviridov@iboch.bas-net.by.

### Information about the authors

*Irina I. Vashkevich* – Ph. D. (Chemistry), Leading Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus).

E-mail: vashkevich@iboch.bas-net.by.

*Anna A. Yastrebova* – Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aliraflame@yandex.ru.

*Olga S. Kuprienko* – Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: olga\_garbuz@iboch.bas-net.by.

*Galina S. Kornilovich* – Principal Director of Scientific Research, Central Research Laboratory of Grain Products (Oktyabrsky vil., 222220, Minsk reg., Smolevichi distr., Republic of Belarus). E-mail: cnilhp@ya.ru.

*Liliya N. Sukhenko* – Head of Department, Central Research Laboratory of Grain Products (Oktyabrsky vil., 222220, Minsk reg., Smolevichi distr., Republic of Belarus). E-mail: cnilhp@ya.ru.

*Anna I. Shibeko* – Leading Chemical Engineer, Central Research Laboratory of Grain Products (Oktyabrsky vil., 222220, Minsk reg., Smolevichi distr., Republic of Belarus). E-mail: cnilhp@ya.ru.

*Oleg V. Sviridov* – D. Sc. (Chemistry), Senior Researcher, Head of Laboratory, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sviridov@iboch.bas-net.by.