

УДК 632.4: 615.9

## **ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ АНАЛИТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В МИКОТОКСИКОЛОГИИ**

**Г.П. КОНОНЕНКО**

*кандидат химических наук*

**А.А. БУРКИН**

*кандидат биологических наук*

### **РЕЗЮМЕ**

В статье рассмотрено современное состояние методологии контроля пищевых продуктов и кормов на загрязненность микотоксинами и обсуждены пути ее развития. Сообщается о разработке унифицированных методов с использованием непрямого гетерогенного иммуноферментного анализа для определения Т-2 токсина, зеараленона, фумонизина В<sub>1</sub>, 8-оксотрихотененов, афлатоксина В<sub>1</sub>, стеригматоцистина, охратоксина А и роридина А в кормах.

Совершенствование аналитического контроля пищевых продуктов и кормов на содержание микотоксинов в последние десятилетия находилось в центре внимания крупнейших международных организаций – IUPAC, AOAC International и IFJU, специализированных национальных организаций стран Европейского Сообщества и США (AACC и AOCS), а также Академий и министерств многих стран мира. По состоянию на 1999 год AOAC International признаны официальными 35 методов анализа микотоксинов [31]. Осознание опасности интоксикации людей и животных токсинами микогенного происхождения и активный поиск путей выхода из сложившейся ситуации позволяет надеяться на успешное завершение усилий, направленных на сохранение здоровья населения планеты и ветеринарное благополучие.

Начало исследований в этой области было положено в 70–80-е годы XX века созданием методов первого поколения, основанных на использовании адсорбционной хроматографии, спектро- и флуорескопии. При значительном разнообразии отдельных

процедур все они состояли из трех основных этапов – извлечения токсина из материала органическими растворителями, очистки экстракта от сопутствующих веществ при помощи распределения в несмешивающихся жидкостях или адсорбционной хроматографии (силикагель, флоризил) и визуального детектирования токсинов по интенсивности флуоресценции или поглощения. Позже появление инструментальных средств измерений – флуориметров, жидкостных хроматографов высокого давления и сканеров с тонкого слоя, позволило перейти к количественному анализу. К 1990 г. в 26 методах из 30 аттестованных по процедуре АОАС был использован принцип жидкостной хроматографии [30].

В нашей стране развитие методологии аналитических исследований повторяло этот путь. Специалистами профильных НИИ было разработано около 20 методик определения микотоксинов в пищевых продуктах и кормах в качестве ГОСТ, ведомственных указаний и рекомендаций, в которых была использована тонкослойная хроматография (ТСХ) на силикагеле с визуальным детектированием и реже – высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) на силикагеле [21]. Объединение этих двух приемов составило основу недавно вступившего в силу ГОСТ 30711 [8]. Внедрение ТСХ-денситометрии до недавнего времени сдерживалось отсутствием необходимого оборудования. Предложенные в 1989 г. оптимальные условия для инструментального детектирования 4-дезоксиниваленола (сканер САМАГ, Швейцария) на пластинках «Силуфол» (ЧСФР) остались только предметом научных публикаций [13, 16]. Первая методика ТСХ определения микотоксинов в пищевых продуктах и продовольственном сырье на силикагеле «Сорбфил» с использованием отечественного денситометра «Сорбфил» была метрологически аттестована только в 2000 г. [17].

В конце 80-х – начале 90-х годов XX века развитие химии сорбентов позволило внести существенные улучшения в процедуру предварительной очистки экстрактов и завершающей хроматографической стадии. В 1991 и 1995 гг. для межлабораторных испытаний в АОАС International было представлено два метода с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ – метод определения охратоксина А в ячмене и кукурузе и метод определения патулина в яблочном соке [31]. У нас в стране первые методические рекомендации по определению афлатоксинов в кормах с применением этого режима хроматографии были утверждены в 1988 г. [18], а в 1989 г. оптимизированы условия анализа 8-оксотрихотеценов на сорбенте Nucleosil C<sub>18</sub> [15], которые затем стали основой соответствующих методических рекомендаций, утвержденных РАСХН

[19]. Недавно аттестована методика подготовки проб для определения микотоксинов в пищевых продуктах и продовольственном сырье с использованием твердофазной экстракции на сорбентах с обращенными фазами [20].

В США и европейских странах совершенствование физико-химических методов анализа в эти годы совпало с бурным развитием иммунобиотехнологии, которое привело к созданию нового типа иммуноаффинных сорбентов, специфичных к микотоксинам. Это позволило в рамках существующих методов кардинально повысить эффективность очистки экстрактов от сопутствующих веществ и сделать всю процедуру более безопасной. Если в 1994 г. на аттестацию был предложен только один метод, использующий принцип иммуноаффинной очистки (определение суммы афлатоксинов в кукурузе, арахисе и арахисовом масле на колонках Viscam LP, США) [32], то в 2000–2001 гг. — 7 версий подобных методов для афлатоксинов В<sub>1</sub> и М<sub>1</sub>, охратоксина А и фумонизинов В<sub>1</sub> и В<sub>2</sub>. В нашей стране исследования в области иммуноаффинной хроматографии микотоксинов не проводятся до сих пор.

Перспективы дальнейшей модернизации физико-химических методов анализа сейчас уже хорошо известны. Экстракция суперкритическими жидкостями, активно внедряемая в аналитическую токсикологию [27], может ускорить процедуру извлечения токсинов из проб и позволит отказаться от использования вредных для здоровья органических растворителей. Автоматизация всего процесса от экстракции до обработки результатов компенсирует такие их недостатки, как низкая производительность, длительность и трудоемкость. Комплектация приборов новыми типами детекторов, пред- и постколоночными реакторами сможет расширить их аналитические возможности. Однако при этом неизбежно возрастет их стоимость и возникнут дополнительные требования к обеспечению безопасности работ, помещениям, системе снабжения и квалификации персонала.

Таким образом, в современном исполнении физико-химические методы анализа, безусловно, способны обеспечить достаточную специфичность и необходимую чувствительность определения микотоксинов, являются чрезвычайно дорогостоящими и рассчитанными исключительно на специализированные и хорошо оснащенные стационарные лаборатории.

Возможность создания альтернативных аналитических подходов появилась в начале 70-х годов XX века практически одновременно с началом исследований в этой области и была обеспечена крупными достижениями в области иммунохимии. Иммуниза-

цией лабораторных животных искусственными конъюгированными антигенами, синтезированными на основе гаптенных (аналогов микотоксинов) со специально сформированным функциональным дизайном, были получены антитела, способные специфически связывать низкомолекулярные токсины и их конъюгаты с макромолекулами (ферменты, белки). Это означало возможность разработки методов иммуноанализа, обладающих целым рядом преимуществ в сравнении с физико-химическими.

Основанные на высокоспецифичном взаимодействии антител с гаптенами, на которые они были индуцированы, и способности этих гаптенных, меченых или иммобилизованных в тест-системе, конкурировать со свободным аналогом в анализируемом образце за связывание с активным центром антител, эти методы позволяли проводить избирательное определение содержания аналитов в сложных по составу смесях, таких как нативные экстракты, без предварительной очистки от примесей и с гораздо большей чувствительностью. В зависимости от природы применяемой метки было предложено несколько видов иммунохимического анализа.

Метод торможения агглютинации, возможности которого были продемонстрированы для полуколичественной оценки многих физиологически активных веществ, несмотря на простоту выполнения, не вышел за рамки лабораторного применения в связи с низкой стабильностью реагентов.

Радиоиммунный анализ (РИА), основанный на конкуренции свободного вещества и меченого изотопом аналога за места связывания с антителами, позволял учитывать количество оставшегося изотопа и по разнице определять содержание немеченого вещества в образце. Высокая чувствительность, пригодность для автоматизации и стандартизации, а также точность послужили стимулом для создания таких методов для афлатоксина В<sub>1</sub> [28], зеараленона [37], Т-2 токсина [25] и охратоксина А [35], однако ни один из них не получил распространения на практике из-за ограничений, связанных с радиационной опасностью, малыми сроками хранения радиоактивных веществ, а также с необходимостью использования специальных лабораторных помещений и высокой стоимостью реактивов и оборудования.

Неизотопные методы количественного иммунохимического анализа, такие как спин-иммунологический и флуоресцентный иммуноанализ, основанные на изменении резонансного сигнала или поляризации флуоресценции веществ, меченных свободными радикалами или флуоресцеином, а также иммуносенсорный анализ, предложенный недавно для афлатоксина В<sub>1</sub> [36], просты в испол-

нении и безопасны, но также требуют применения специального и дорогостоящего оборудования.

Достойной альтернативой РИА стал иммуноферментный анализ (ИФА), в котором свободное вещество конкурирует за связывание специфических антител с его аналогом, подвергнутым энзимному мечению либо непосредственно, либо опосредствованно через взаимодействующие с ним иммунореагенты, и оптическая плотность продуктов ферментативной реакции измеряется на фотометрах — малогабаритных, серийно выпускаемых и относительно дешевых приборах. Гомогенная разновидность анализа, получившая название в связи с отсутствием необходимости разделения свободной и связанной метки в условиях стерического исключения субстрата или изменения конформации активного центра фермента, обеспечивала простоту выполнения и высокую экспрессность (несколько минут), была дешева и безопасна, однако несколько уступала РИА по чувствительности. Пример ее использования для афлатоксина В<sub>1</sub> описан в работе Mella et al. [29].

Гетерогенный ИФА, при котором иммунологические реакции проходят с участием реагентов, сорбированных на поверхности ячеек полистироловых планшетов, был представлен двумя вариантами. В первом из них, известном как прямой, иммобилизованные антитела взаимодействуют с присутствующим в реакционной среде свободным анализируемым веществом и его аналогом, меченым ферментом. После инкубации несвязавшиеся компоненты удаляют отмыванием, и добавление субстрата выявляет ферментативную активность, степень которой обратно пропорциональна концентрации определяемого вещества. В рамках этого метода для многовариантного экспресс-тестирования объектов была разработана специальная техника анализа с иммобилизацией разных антител на пористых полиэтиленовых или нитроцеллюлозных носителях, получившая название «иммуноблоттинга». Такие тест-системы предложены в США для одновременного обнаружения афлатоксина В<sub>1</sub>, зеараленона, фумонизина В<sub>1</sub> [22], а также афлатоксинов, зераленона и  $\alpha$ -зеараленола [34].

Во втором, непрямом варианте гетерогенного анализа в конкуренции за связывание с антителами участвуют твердофазный гаптен, конъюгированный с макромолекулярным носителем, обычно белкового типа, и его свободный аналог. Схема выполнения включает 4 основные стадии (рис. 1): I — иммобилизация антигена (АГ) на твердой фазе, II — конкурентное взаимодействие антител (АТ) со свободным и/или иммобилизованным микотоксином, III — мечение твердофазного комплекса «антиген-антитело» ферментным конъюгатом (ФК) и IV — измерение ферментативной активности.

◆ - МИКОТОКСИН

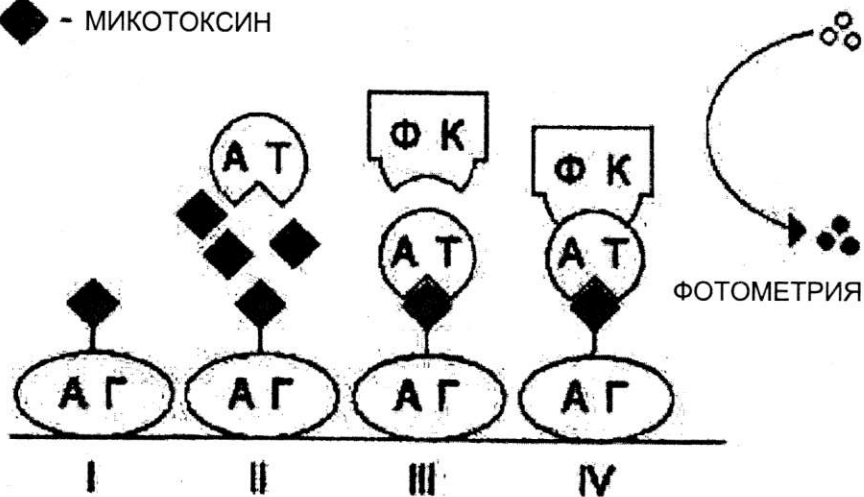


Рис. 1. Схема выполнения непрямого варианта ИФА.

Оба варианта гетерогенного ИФА могли обеспечить все необходимые условия для интенсивной работы. Экспрессность выполнения (от нескольких минут до 3 ч), возможность одновременного испытания десятков образцов (от 40 до 80), дешевизна (затраты на 1 анализ составляли от 2,5 до 5,9% от стоимости хроматографического определения [33]), высокая чувствительность (миллиардные доли в объекте), специфичность и безопасность для оператора подтвердили их несомненную перспективность. Практика использования реагентов, к выпуску которых приступили фирмы-производители биохимических реактивов в США (International Diagnostic Systems Corp. и Neogen Corp.), Великобритании (Cortecs Diagnostics Ltd.) и Германии (R-Biopharm), позволила в 1994–1997 гг. четырем методам гетерогенного иммуноферментного определения афлатоксинов и зеараленона получить статус официальных [31].

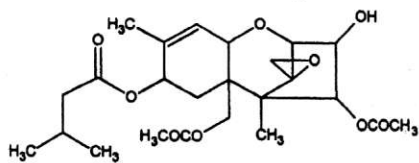
В нашей стране в эти годы развитие методов иммунохимического анализа микотоксинов начато не было, что неизбежно привело к заметному отставанию в области изучения микотоксинов как факторов экологического загрязнения среды и, как следствие этого, к частичной потере контроля над ситуацией. Стало совершенно очевидным, что необходим масштабный мониторинг распространенности микотоксинов в агропродукции, и главным фактором, сдерживающим его проведение, является несовершенство аналитической базы и ограниченные возможности методов, сохраняющих статус официальных.

В 1995 г. специалисты лаборатории микотоксикологии ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии РАСХН приступили к разработке непрямого варианта гетерогенного иммуноферментного анализа для микотоксинов, имеющих первостепенное санитарное значение — фузариотоксинов (Т-2 токсин, зеараленон, фумонизин В<sub>1</sub>, 8-оксотрихотецены), токсинов «плесеней хранения» (афлатоксин В<sub>1</sub>, стеригматоцистин, охратоксин А), а также макроциклического трихотецена роридина А (рис. 2). Исследования по получению соответствующих биологических и биохимических реагентов легли в основу серии публикаций [1–7, 10]. Подбор иммунореагентов проводили по двум критериям — специфичности и чувствительности обнаружения — с учетом особенностей распространности и уровней регламентации токсинов в объектах.

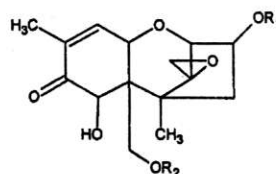
Особый подход к специфичности анализа был необходим для двух групп фузариотоксинов — циклических лактонов β-резорциловой кислоты, известных выраженным эстрогенным действием, и 8-оксотрихотеценов. Групповое определение зеараленона и α-зеараленола [3], которые могут встречаться одновременно в биологических жидкостях и тканях, и избирательный анализ зеараленона [2] были обеспечены специальным комбинированием иммунореагентов — антител и твердофазных антигенов. Для 8-оксотрихотеценов следовало принять во внимание возможность одновременной контаминации объектов тремя структурно родственными соединениями, обладающими и сходной токсичностью — ДОН, 3-ацетил-ДОН и 15-ацетил-ДОН. Решение этой проблемы было найдено через использование иммунореагентов, специфичных к 3,15-диацетил-ДОН, и определение их в объектах в один прием после соответствующей модификации.

Исследования показали, что при внесении суммы экстрактивных веществ разных видов зерна, зерноотходов, белкового сырья растительного происхождения, грубых и комбинированных кормов, полученной при соотношении навеска образца (1 г): объем водного ацетонитрила (5 мл) и 10-кратном разбавлении экстракта буферным раствором, функционирование тест-систем происходит без каких-либо препятствий. Это позволило предложить унифицированные и простые аналитические схемы, основанные на принципе «экстракция-ИФА» [9]. Измерения в 25- или 100-кратных диапазонах с сохранением линейной зависимости приведенных значений оптической плотности и анализируемых количеств обеспечивало определение микотоксинов в объектах на уровнях 10–1000 мкг/кг [11, 12]. Варианты анализа с предельными порогами обнаружения 2 и 4 мкг/кг были разработаны для Т-2 токсина,

зеараленона, афлатоксина В<sub>1</sub> и ократоксина А в связи с необходимостью оценки их остаточных количеств во внутренних органах животных, мышечных тканях и биологических жидкостях и низкими уровнями нормирования в ряде объектов, например в кормах для особо чувствительных животных. Представленное в табл. 1 сопоставление характеристик предложенных методов с данными по регламентации микотоксинов, подтверждает их полное соответствие целям обеспечения контроля безопасности кормов.



T-2 токсин

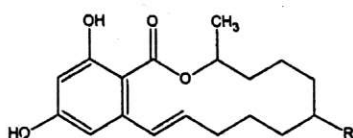


8-Оксотрихотецены

R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H 4-Дезоксиинваленол (ДОН)

R<sub>1</sub>=COCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=H 3-Ацетил-ДОН

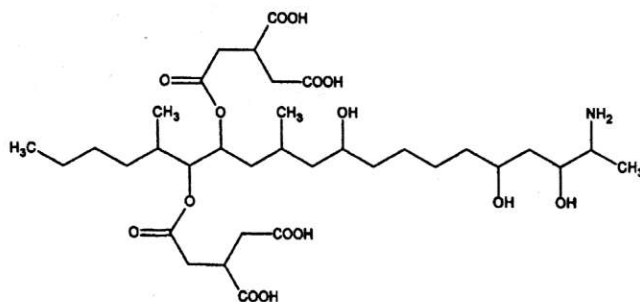
R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=COCH<sub>3</sub> 15-Ацетил-ДОН



Циклические лактоны  
β-резорциловой кислоты

R: =O Зеараленон

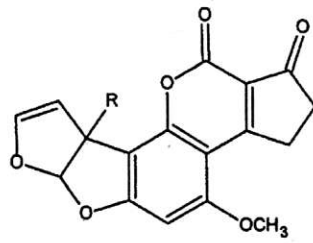
R: α-OH α-Зеараленон



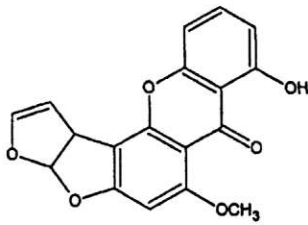
Фумонизин В<sub>1</sub>

Рис. 2. Химическое строение микотоксинов.

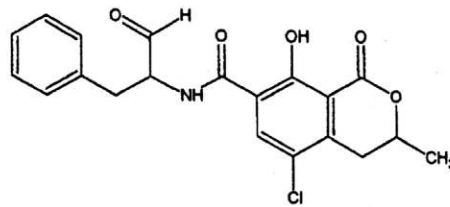




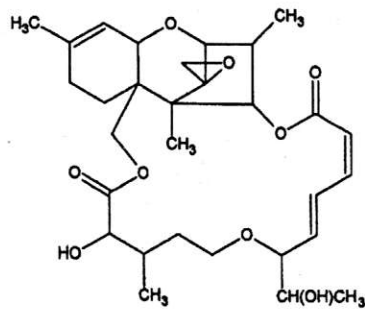
R=H Афлатоксин В<sub>1</sub>  
 R=ОН Афлатоксин М<sub>1</sub>



Стеригматоцистин

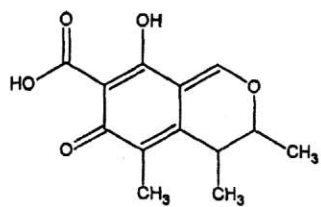


Охратоксин А

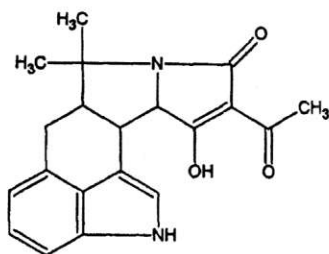


Роридин А

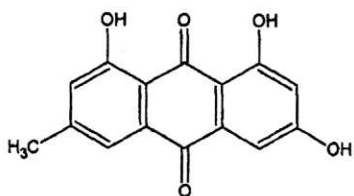
Рис. 2. Продолжение.



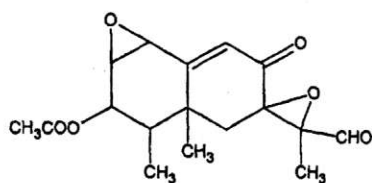
Цитринин



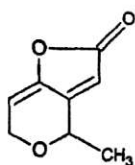
Циклопиазоновая кислота



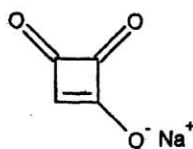
Эмодин



PR-токсин



Патулин



Монилиформин

Рис. 2. Продолжение.

**Характеристики методов непрямого гетерогенного  
иммуноферментного анализа микотоксинов**

Микотоксины	ПДК в кормах, мкг/кг	Диапазон измеряемых содержаний метода, мкг/кг	Объекты анализа
Т-2 токсин	50÷100	4-100 20-500	Зерно: пшеница, овес, рожь, ячмень, кукуруза
8-оксотрихотены: 4-дезоксиниваленол (ДОН, vomitоксин) 3-ацетил-ДОН; 15-ацетил-ДОН	1000	40-1000	
Зеараленон	10÷1000	2-50 20-500 200-5000	Отруби Жмыхи и шроты Глютен Концентраты и премиксы на их основе
Фумонизин В <sub>1</sub>	200÷5000	20-500 200-5000	
Афлатоксин В <sub>1</sub>	10÷50	2-50 20-500	Полноценные комбикорма для сельскохозяйственной птицы, свиней и крупного рогатого скота
Стеригматоцистин	50	20-500	
Охратоксин А	10÷50	4-100 20-500	Грубые корма (сено, солома), травяная мука (Т-2 токсин, роридин А)
Роридин А	100	10-1000	

Применение нового аналитического подхода позволило получить первые сведения о загрязненности зерна микотоксинами на территориях Уральского, Западносибирского, Восточно-Сибирского, Дальневосточного регионов страны и выявить особенности токсинообразования у грибов, доминирующих среди возбудителей фузариоза. Всего было проанализировано более 1400 образцов разных видов зерна и около 700 изолятов 5 видов фузариев. В 1997–2001 гг. специалистами института проведено обследование 960 средних образцов кормов различных видов, взятых от разных партий, поступавших на экспертизу из животноводческих хозяйств. Выполнение подобного объема работ без использования таких методов было бы совершенно невозможным. Преимущества анализа позволили также приступить к усовершенствованию методов ла-

бораторной оценки токсигенности санитарно значимых видов грибов и к развитию новых подходов к аналитической диагностике микотоксикозов животных [23, 24, 26].

В ходе внедрения разработанных методик более 80 специалистов производственных лабораторий, ветеринарной службы и региональных Центров стандартизации и метрологии прошли в Институте краткосрочное обучение технике выполнения анализа и используют его самостоятельно. Так, например, испытательной лабораторией Вологодского ЦСМ в 1998–1999 гг. исследованы 258 образцов продукции на содержание афлатоксина В<sub>1</sub> с применением ИФА и подтверждены хорошая схожесть результатов, экспрессность метода, низкие трудозатраты и безопасность аналитической процедуры для персонала [14].

В соответствии с решением Департамента ветеринарии Минсельхозпрода России с 2000 г. проведены широкие производственные испытания пяти типов тест-систем для иммуноферментного определения микотоксинов, в которых приняли участие 10 предприятий и организаций с различным профилем деятельности – птицеводческие хозяйства (ОАО АК «Саратовптица», Саратовская область; ОАО «Птицефабрика Сеймовская», Нижегородская область; ФГУП ППЗ «Свердловский», Свердловская область; АОЗТ «Птицефабрика Роскар», Ленинградская область; ОАО «Череповецкий бройлер», Вологодская область; ЗАО «Элинар-Бройлер», Московская область); свиноводческое хозяйство – ЗАО «Свинокомбинат Индустриальный» (Краснодарский край); ГУ Республиканский ветеринарно-диагностический центр Удмуртии (г. Ижевск), Самарский центр стандартизации, метрологии и сертификации, ГНУ Всероссийский научно-исследовательский проектно-технологический институт химизации сельского хозяйства РАСХН (Московская область). Всего было исследовано 2175 образцов кормов и выявлено 697 случаев загрязненности микотоксинами. По заключению специалистов производственных лабораторий, все указанные тест-системы обеспечивают высокую чувствительность анализа, позволяют оперативно определять количественное содержание микотоксинов и своевременно решать вопрос об использовании некачественного сырья в хозяйствах, помогают практическим ветеринарным врачам выявлять причины заболеваемости поголовья, вовремя принимать меры по их устранению и тем самым предотвращать потери продуктивности и угрозу падежа. Завершение производственных испытаний означает решение проблемы организации контроля санитарного качества кормов в масштабах страны.

В настоящее время в институте продолжается развитие методов иммуноферментного определения микотоксинов. Получены

иммунореагенты к цитринину, токсину нефропатического действия, часто сопутствующего охратоксину А в объектах, а также к группе мало изученных токсичных метаболитов грибов – циклопиазоновой кислоте, эмодину и PR-токсину. Существует вполне реальная перспектива создания отечественных иммуноферментных тест-систем для анализа афлатоксина М<sub>1</sub>, высокотоксичного контаминанта молочных продуктов. Принципиальных препятствий этому не существует, но имеются трудности с обеспечением необходимым количеством токсина для синтеза иммунореагентов.

С нашей точки зрения, уже сейчас необходимо приступить к планированию исследований по разработке методов иммунохимического определения патулина и монилиформина в силосованных и зерновых кормах. Кстати, эта проблема пока не решена и зарубежными исследователями. Еще предстоит длительная и сложная работа по совершенствованию приемов иммуноферментного определения микотоксинов, направленная на расширение их аналитических возможностей и повышение экспрессности, а также по развитию в стране фундаментальных исследований в области иммуноаффинной хроматографии. Нет никаких сомнений в том, что на современном этапе отечественная наука способна обеспечить бурное развитие всех перспективных направлений аналитической микотоксикологии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Зорян В.Г., Соболева Н.А., Зотова Е.В. Получение антител к роридину А и их применение // Прикладная биохимия и микробиология. – 2000. – Т. 36. – № 4. – С. 428–432.

2. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Соболева Н.А. Получение и аналитические свойства антител с высокой специфичностью к зеараленону // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38. – № 3. – С. 305–311.

3. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Соболева Н.А. Получение антител с групповой специфичностью к зеараленону, его метаболитам и синтетическим аналогам // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38. – № 2. – С. 194–202.

4. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Соболева Н.А., Зотова Е.В. Иммуноферментная тест-система определения афлатоксина В // Прикладная биохимия и микробиология. – 2000. – Т. 36. – № 1. – С. 93–97.

5. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Соболева Н.А., Зотова Е.В. Охратоксин А: исследование контаминации зерна // Прикладная биохимия и микробиология. – 2000. – Т. 36. – № 2. – С. 209–213.

6. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Соболева Н.А., Зотова Е.В. Получение конъюгированных антигенов на основе карбоксиметилоксида зеа-

раленона и их применение в иммуоферментном анализе // Прикладная биохимия и микробиология. – 2000. – Т. 36. – № 3. – С. 328–335.

7. Буркин М.А., Яковлева И.В., Свиридов В.В., Буркин А.А., Кононенко Г.П., Соболева Н.А. Сравнительная иммунохимическая характеристика поликлональных и моноклональных антител к афлатоксину В<sub>1</sub>. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2000. – Т. 36. – № 5. – С. 575–581.

8. ГОСТ 30711-2001 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения содержания афлатоксинов В<sub>1</sub> и М<sub>1</sub>».

9. Кононенко Г.П., Буркин А.А. Перспективы использования методической схемы «Экстракция-ИФА» для определения микотоксинов в кормах. //Тезисы докладов Международной научной конференции «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». – ВНИИВСГЭ. М., 1999.

10. Кононенко Г.П., Буркин А.А., Зотова Е.В., Соболева Н.А. Применение твердофазного конкурентного иммуоферментного анализа для определения фумонизинов группы В. //Прикладная биохимия и микробиология. – 1999. – Т. 35. – № 2. – С. 206–211.

11. Кононенко Г.П., Буркин А.А., Соболева Н.А., Зотова Е.В. Иммуоферментный метод определения Т-2 токсина в контаминированном зерне. //Прикладная биохимия и микробиология. – 1999. – Т. 35. – № 4. – С. 457–462.

12. Кононенко Г.П., Буркин А.А., Соболева Н.А., Зотова Е.В. Методика количественного определения Т-2 токсина в кормах с применением ИФА. // Ветеринария. – 1997. – № 5. – С. 43–45.

13. Кононенко Г.П., Соболева Н.А., Леонов А.Н. Методика определения суммарного содержания дезоксиниваленола и его моноацетатов в контаминированном зерне. //Доклады ВАСХНИЛ. – 1991. – № 2. – С. 27–30.

14. Кулагина Н.Е. Новый метод экономит время и деньги. // Партнеры и конкуренты. – 2000. – № 3. – С. 24–25.

15. Ланин С.Н., Петренко В.В., Леонов А.Н., Кононенко Г.П., Соболева Н.А. Селективная бинарная подвижная фаза для высокоэффективной жидкостной хроматографии 12, 13-эпокситрихотец-9-ен-8-онов. //Химия природных соединений. – 1989. – № 6. – С. 861–863.

16. Леонов А.Н., Соболева Н.А., Кононенко Г.П. Флуориметрическое определение дезоксиниваленола в контаминированном зерне. //Доклады ВАСХНИЛ. – 1989. – Вып. 7. – № 4. – С. 12–15.

17. Методика выполнения измерений массовой доли микотоксинов в пищевых продуктах и продовольственном сырье методом тонкослойной хроматографии М-МВИ-68-00.

18. Методические рекомендации по количественному определению афлатоксинов G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub> в кормах методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии под давлением. – ВАСХНИЛ. М., 1988.

19. Методические рекомендации по количественному определению дезоксиниваленола в зерне с применением обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. – РАСХН. М., 1995.

20. Методические указания «Определение массовой концентрации микотоксинов в продовольственном сырье и продуктах питания. Подготовка проб методом твердофазной экстракции» (МУ 4.1.787-99).

21. Методы анализа чужеродных веществ в пищевых продуктах / Под ред. Подуновой Л.Г. – РРИАЦ. М., 1994.

22. *Abouzed M.M., Pestka J.J.* Simultaneous screening of fumonisin B<sub>1</sub>, aflatoxin B<sub>1</sub>, and zearalenone by line immunoblot: a computer-assisted multianalyte assay system. // *Journal of AOAC International*. – 1994. – V. 77. – N2. – P. 495–501.

23. *Burkin A.A., Zorjan V.G., Soboleva N.A., Kononenko G.P.* T-2 toxin and Roridin A in Blood, Tissues and Excreta of Rats after Oral Administration. // *Baltic J. Lab. Anim. Sci.* – 2000. – N1. – P. 26–32.

24. *Burkin A.A., Kononenko G.P., Soboleva N.A.* Ochratoxin A: Enzyme immunoassay for Residues in Hens. // *Baltic J. Lab. Anim. Sci.* – 2001. – V.I 1. – N3. – P. 160–167.

25. *Chu F.S., Grossman S., Wei R.-D., Mirocha C.J.* Production of Antibody against T-2 Toxin. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1979. – N 1. – P. 104–108.

26. *Eroshkin A.A., Kononenko G.P., Burkin A.A.* Ochratoxin A Transmission in Kidneys and Urine of Rats under Subtoxic Dose Intake. // *Baltic J. Lab. Anim. Sci.* – 2000. – V. 10. – N 2. – P. 79–85.

27. *Handbook of Analytical Therapeutic Drug Monitoring and Toxicology* (Eds. S.H.Y. Wong and L.Sunshine). CRC Press. Boca Raton-New York-London-Tokyo, 1997.

28. *Langone J.J., Van Vunakis H.* Aflatoxin Bi: Specific Antibodies and Their Use in Radioimmunoassay. // *J. of National Cancer Institute*. – 1976. – N 3. – P. 591–595.

29. *Mella C.M., Escobar A., Acosta A.* Homogenous enzyme immunoassay for aflatoxin B<sub>1</sub>. // *Revista de Salud Animal*. – 1988. – V. 10. – N 4. – P. 303–310.

30. *Official Methods of Analysis* (1999) 15<sup>th</sup> Ed., 1990, AOAC, Arlington, VA.

31. *Official Methods of Analysis* (1999) 16<sup>th</sup> Ed., 5<sup>th</sup> Revision, 1999, AOAC International, Gaithersburg, MD.

32. *Official Methods of Analysis* (1999) 16<sup>th</sup> Ed., 5<sup>th</sup> Revision, 1999, AOAC International, Gaithersburg, MD, method 991.31.

33. *Pestka J.J.* Enhanced Surveillance of Foodborne Mycotoxins by Immunochemical Assay. // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* – 1988. – V. 71. – N 6. – P. 1075–1081.

34. *Pestka J.J.* High performance thin layer chromatography ELISA-GRAM. Application of a multi-hapten immunoassay to analysis of the zearalenone and aflatoxin mycotoxin families. // *Journal of Immunological Methods*. – 1991. – V. 136. – N 2. – P. 177–183.

35. *Rousseau D.M., Candlish A.A.G., Siegers G.A., Van Peteghem C.H., Stimson W.H., Smith J.E.* Detection of Ochratoxin A in Porcine Kidneys by a Monoclonal Antibody-Based Radioimmunoassay. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1987. – N 3. – P. 514–518.

36. *Strachan N.J., John P.G., Millar I.G.* Application of an automated particle-based immunoassay for the detection of aflatoxin B<sub>1</sub> in foods.// *Food and Agricultural Immunology*. - 1997. - V. 9. - N 3. - P. 177-183.

37. *Thompson V.S., Maragos Ch.M.* Measurement of fumonisins in corn with a fiber-optic fluoroimmunosensor.// *Advances in Fluorescence Sensing Technology III*, 1997.

38. *Thouvenot D., Morfin R.F.* Radioimmunoassay for Zearalenone and Zearalanol in Human Serum: Production, Properties, and Use of Porcine Antibodies.// *Applied and Environmental Microbiology*. - 1983. - N 1. - P. 16-23.

#### ACHIEVEMENTS AND PROSPECTS OF ANALYTIC INVESTIGATIONS IN MYCOTOXICOLOGY

G.P. KONONENKO, A.A. BURKIN