

T-2 toxin: výskyt a detekce

DOHNAL V. ^{1,2}, JEŽKOVÁ A. ², KUČA K. ^{1,3}, JUN D. ^{1,3}

¹Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Katedra toxikologie, Hradec Králové

²MZLU, Agronomická fakulta, Ústav technologie potravin, Brno

³Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Centrum pokročilých studií, Hradec Králové

Došlo: 19. března 2007 / Přijato: 4. června 2007

SOUHRN

T-2 toxin: výskyt a detekce

V této práci jsme se zaměřili na výskyt a na metody detekce a stanovení T-2 toxinu, který patří mezi nejtoxičtější fusariové toxiny. Vzhledem ke svým fyzikálně-chemickým vlastnostem a vysoké toxicitě je T-2 toxin též klasifikován jako potenciálně zneužitelný pro vojenské operace a bioterorismus.

Klíčová slova: mycotoxins – mykotoxiny – T-2 toxin – chromatografie – bioterorismus

Čes. slov. Farm.; 2007; 56, 174–177

SUMMARY

T-2 toxin: occurrence and detection

The paper is focused on the occurrence and methods for the detection of T-2 toxin, one of the most toxic trichothecene *Fusarium* mycotoxin. Due to its physical-chemical properties and high toxicity, T-2 toxin is classified as a potential biological warfare agent.

Key words: mycotoxins – T-2 toxin – chromatography – bioterrorism

Čes. slov. Farm.; 2007; 56, 174–177

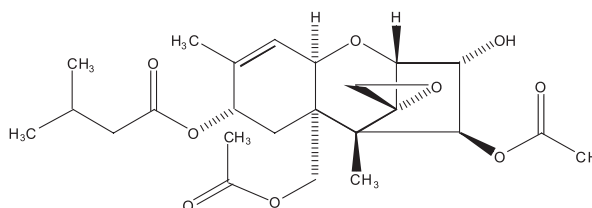
Má

Mykotoxiny jsou přírodní nízkomolekulární toxické látky, vznikající jako sekundární metabolity mikroskopických vláknitých hub. Patří mezi nejběžnější kontaminanty potravinářských surovin a hotových výrobků. Do potravního řetězce pronikají na všech jeho úrovních, počínaje zkrmováním píce a krmiv napadených toxikogenními plísněmi až po nevhodné skladovací podmínky potravin. Při konzumaci způsobují celou řadu onemocnění, souborně nazývaných mykotoxikózy.

V této práci jsme se zaměřili na metody detekce a stanovení T-2 toxinu, který patří mezi nejtoxičtější fusariové toxiny. Vzhledem ke svým fyzikálně-chemickým vlastnostem a vysoké toxicitě je T-2 toxin též klasifikován jako potenciálně zneužitelný pro bioterorismus ^{1,2}.

T-2 toxin

T-2 toxin (též zvaný Fusariotoxin T 2, Insariotoxin či NSC 138780) patří do skupiny trichothecenových



Obr. 1. Chemická struktura T-2 toxinu

mykotoxinů. Obdobně jako jemu příbuzné látky, má i on seskviterpenovou strukturu s epoxidovým kruhem mezi uhlíky v poloze 12 a 13, která je zodpovědná za jeho toxické vlastnosti (obr. 1). Tyto toxiny jsou produkovány zejména plísněmi rodu *Fusarium*. Dělí se podle funkčních skupin do 4 základních skupin na trichotheceny A – D. T-2 toxin patří spolu s HT-2 či diacetoxyscirpenolem do skupiny A trichothecenových mykotoxinů.

Adresa pro korespondenci:

Mgr. Daniel Jun, Ph.D.
Univerzita obrany FVZ
Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové
e-mail: jun@pmfhk.cz

Výskyt T-2 toxinu

Ke kontaminaci obilovin či krmiv dochází na poli, či v průběhu jejich nevhodného skladování. Na růst plísní má vliv zejména vlhkost substrátu (asi 14 %), vodní aktivita (více než 0,65). Optimální podmínky jsou teplota 3–8 °C, aktivita vody 0,75. Některá fusaria (*F. sporotrichoides*, *F. poae*, *F. tricinctum*) dokáží produkovat mykotoxiny i při –4 °C.

Podle dat zveřejněných v rámci projektu SCOOP (Scientific Co-operation on Questions relating to Food) financovaného Evropskou komisí vyplývá, že z 3420 vzorků potravin testovaných v období březen 2002 až leden 2003 bylo 20 % pozitivních na obsah T-2 toxinu³⁾. Nejčastěji bývají napadeny obilniny, zejména proso či oves.

Limity

Vědecký výbor pro potraviny stanovil ve vyhlášce EC 856/2005 předběžnou přípustnou kombinovanou denní dávku pro T-2 toxin a HT-2 toxin ve výši 0,06 µg/kg tělesné hmotnosti⁴⁾. Odhadovaný denní příjem těchto mykotoxinů však převyšuje tuto normu. Proto je nyní pozornost zaměřena na výzkum jejich toxikologických vlastností a vývoj citlivé metody jejich stanovení.

Vliv na zdraví

Letální dávka T-2 toxinu se liší podle způsobu podání. U myši je při per os podání asi 0,5 mg/kg, intravenózně 3,8 mg/kg, 2,1 mg/kg, dermálně přes 10 mg/kg živé váhy. Zřejmě nejvýznamnějším toxickým účinkem T-2 toxinu je jeho působení na syntézu peptidů, a to až již při zahájení syntézy, prodlužování peptidového řetězce, tak i při jeho terminaci. Ovlivňuje tak tvorbu peptidických vazeb skrze interferenci s peptidyltransferasou⁵⁾.

V buňkách zvyšuje peroxidaci lipidů v buněčných membránách, proto jsou jako profylaktika testovány antioxidanty. Některé z nich vykazují nadějně výsledky (vitamin E), u jiných jako například vitamínu C tento účinek pozorován nebyl⁶⁾. Dalším účinkem je potlačení imunity, a tím i možnost sekundárních infekcí. Je řazen mezi radiomimetické látky, tj., zvyšuje účinky radioaktivního záření na organismus.

Hlavními cestami biotransformace trichothecenů jsou oxidace, de-epoxidace a hydrolyza například karboxylesterasami. Vzniklé produkty jsou polárnější a mají mnohem menší toxicitu než původní T-2 toxin. Z těla jsou trichotheceny vylučovány hlavně jako glukuronové konjugáty.

Ze zdravotního hlediska je významná chronická otrava, zvaná alimentární toxická aleukie (ATA), která se projevuje při dlouhodobějším příjmu trichothecenových mykotoxinů v potravě. V roce 1913 byl zaznamenán masivní výskyt (ATA) na Sibiři. Za druhé světové války zemřelo v bývalém Sovětském svazu přes 17 000 lidí po konzumaci prosa napadeného *F. poae* a *F. sporotrichoides*. Onemocnění probíhá v několika fázích. V průběhu první fáze se projevují gastroenterostinálními (GIT) symptomy, které trvají 3–9 dní. Druhá fáze přináší pocit zlepše-

ní zdravotního stavu, ale začíná se projevovat anémie a dochází ke změnám v krevním obrazu. Pokud nedojde k přerušení příjmu kontaminované potravy, nastává po několika týdnech třetí fáze, při které se objevují nekrotické léze v dýchacích cestách a v GIT. Časté jsou i bakteriální infekce a problémy s krvácivostí⁷⁾.

Možné zneužití T-2 toxinu

Byly izolovány kmeny *F. sporotrichoides*, schopné produkovat až 4,1 g T-2 toxinu/kg infikovaného prosa. V době genetického inženýrství může po začlenění vhodného genu do DNA plísně výrazně zvýšit produkci konkrétního toxinu. Příprava mykotoxinů je tedy finančně i technicky nenáročná, a proto je nutné očekávat i jejich možné zneužití k teroristickým útokům vůči civilnímu obyvatelstvu. V případě T-2 toxinu tomuto nahrávají i jeho další vlastnosti, jako je jeho netěkavost, tepelná stabilita, špatná rozpustnost ve vodě i vysoká životaschopnost jeho producenta. Vzhledem k tomu, že se jedná o netěkavou látku, v úvahu připadá hlavně jeho aplikace ve formě aerosolu, která je z technického hlediska velmi snadno proveditelná. Ve formě aerosolu jsou trichotheceny podobně účinné jako yperit. Poškození kůže nastává již při 400× nižších koncentracích než u yperitu. Aerosol také usnadňuje vstřebávání trichothecenů, zejména je-li velikost jeho částic v rozmezí 1 až 10 µm, kdy dochází k průniku těchto částic až hluboko do plic. Jeho inhalační toxicita je srovnatelná s yperitem či lewisitem. Z dalších forem možného použití T-2 toxinu je možné jmenovat letecký postřik ve formě prachu, kapiček či kouře. Z hlediska zneužití pro bioterorismus je podstatným faktem i to, že dosud není známo žádné antidotum.

Nejnámějším, i když dosud ne zcela potvrzeným případem použití trichothecenů jako zbraně, je případ tzv. „žlutého deště“. V 70. a na začátku 80. let minulého století se objevily domněnky, že zbraně s aerosolem obsahujícím trichotheceny byly použity proti civilnímu obyvatelstvu v Laosu, Kambodži a Afganistánu. Jednotlivé případy intoxikací měly společné symptomy, jako je zvýšená krvácivost, nauzea, horečka, závratě apod. V nedávné minulosti bylo podezření, že na biologické zbrani s náplní T-2 toxinu eventuálně aflatoxinů pracoval i Irák.

Kromě přímého využití toxinu proti lidem je možné využití i jeho producentů – plísní – k napadení obilí. Větší rozsah napadení obilovin má dopad jak na lidské zdraví, tak i na ekonomiku daného státu.

Detekce a stanovení T-2 toxinu

Vzhledem k dominantnímu zastoupení trichothecenů skupin A a B jsou také metody stanovení trichothecenů zaměřeny právě na tyto dvě skupiny.

Příprava vzorků k vlastnímu stanovení spočívá v odstranění matrice, ve které má být T-2 toxin stanovován. Nejčastěji jsou aplikovány různé extrakční postupy. Kapalinová extrakce je prováděna, vzhledem k jeho nerozpustnosti ve vodě, nižšími alkoholy a polárními organickými rozpouštědly, jako jsou methanol, ethanol, aceton, acetonitril apod., či jejich směsí s vodou¹⁵⁾. Dále

jsou využívány extrakce na pevné fázi (solid phase extraction, SPE)²⁰⁾, iontoměniče²¹⁾ či superkritická fluidní extrakce (supercritical fluid extraction, SFE)²²⁾.

Metody zjišťování přítomnosti T-2 toxinu lze rozdělit do dvou skupin, na screeningové a analytické⁸⁾. Screeningové metody, jako jsou tenkovrstvá chromatografie (TLC)²³⁾ nebo ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)²⁴⁾, jsou rychlé, nenáročné na laboratorní vybavení a jsou i relativně přesné.

Při TLC probíhá stanovení na tenké vrstvě sorbentu zakotveného na vhodné podložce; ke kvantifikaci slouží různé fyzikálně-chemické metody, jako jsou například intenzita fluorescence skvrny, její absorpce v ultrafialové či viditelné oblasti. Celý proces je možné automatizovat. K vyhodnocování chromatogramu pak slouží přístroje podobné scannerům, tzv. denzitometry. Výhodou TLC metod při stanovení stopových množství látek je možnost použití velkého objemu vzorku. Negativem je její malá separační účinnost, a tím i neschopnost oddělit od sebe strukturně podobné látky.

Další screeningovou metodou zavedenou pro stanovení T-2 toxinu je ELISA. Podstatou metody je interakce analytu a protilátky s vázaným barveným enzymem. Ke kvantifikaci je opět využívána celá řada nejčastěji optických metod. Na rozdíl od TLC je méně přesná, je však rychlejší a má větší výtěžnost. Pro stanovení jsou využívány jak monoklonální, tak polyklonální protilátky. Citlivost ELISA lze zvýšit značením protilátek například fluorescenčními či chemiluminiscenčními látkami⁹⁾. I přes toto zlepšení citlivosti není ELISA schopna dosáhnout detekčních limitů srovnatelných s chromatografickými metodami s hmotnostní detekcí.

K analytickému stanovení T-2 toxinu slouží zejména chromatografické metody – plynová a kapalinová chromatografie v kombinaci s detekcí v ultrafialové oblasti, fluorescenčně (po derivatizaci) či hmotnostním detektorem.

Plynová chromatografie vyžaduje vzhledem k nízké těkavosti T-2 toxinu zpravidla derivatizaci jeho hydroxylové skupiny a následné stanovení ve formě trimethylsilyl-heptafluorobutyryl-trifluoroacetyl či jiného derivátu. Limity detekce závisí na použitém detektoru. U plamenově ionizačního detektoru (FID) bylo dosaženo u silyl-derivátu limitu detekce 8 µg/l u piva¹⁰⁾, s detekcí se záchytem elektronů (ECD) 60 µg/kg v obilninách¹¹⁾. Necitlivějším metodou je detekce hmotnostní (MS). Touto detekcí lze dosáhnout úroveň 0,1–0,5 µg/kg¹²⁾.

Ačkoliv plynová chromatografie, zejména v kombinaci s hmotnostní detekcí, poskytuje dostatečně nízké detekční limity, nutnost derivatizace ji činí mnohem komplikovanější než kapalinovou chromatografii (HPLC). K HPLC separaci jsou v drtivé většině používány kolony s reverzní fází. T-2 toxin je pak detekován měřením refrakčního indexu, dále v ultrafialové oblasti záření, přes fluorescenci (po derivatizaci) až po hmotnostní detekci, která je opět nejcitlivější.

Fluorescenční detekce patří mezi velmi citlivé a selektivní metody. Velmi málo látek je schopno fluoreskovat. Ani T-2 toxin neobsahuje žádný fluorofor a není tedy schopen vyzařovat fluorescenci. Je proto nutné zavést do jeho molekuly takový fluorofor. Bývá proto deri-

vatizován, například 1-antroylchloridem¹³⁾ či kumarin-3-karbonylchloridem¹⁴⁾. Detekční limity se pohybují kolem 5 µg/kg resp. 0,6 µg/kg pšenice.

Nejvíce používanou metodou pro stanovení T-2 toxinu v environmentálních vzorcích je však HPLC v kombinaci s MS detekcí¹⁵⁾. Limity detekce se liší od náročnosti MS instrumentace a použité matrice, počínaje 9 až 15 µg/kg v pšenici u jednoduchého kvadrupólu^{16, 17)}, přes 3 µg/kg v pšenici u iontové pasti¹⁸⁾ až po 0,3 µg/kg u trojitého kvadrupólu¹⁹⁾.

ZÁVĚR

Detekce a stanovení obsahu T-2 toxinu v potravinách, krmivech či jiných environmentálních vzorcích v posledních letech nabývá na důležitosti vzhledem k jeho negativnímu působení na lidský organizmus a také z hlediska jeho potenciálního zneužití teroristy. Metodika detekce a stanovení T-2 toxinu směřuje ke kapalinové chromatografii s hmotnostní detekcí s předchozím předčištěním vzorku extrakcí na pevné fázi. Tento postup je rychlý, má vysokou citlivost a je možné stanovit i stopová množství T-2 toxinu.

LITERATURA

1. **Russel, R., Patterson, M.:** *Mycolog. Res.*, 2006; 110, 1003-1010.
2. **Brndiar, M., Kačerovský, J., Malíř, F. et al.:** *Voj. Zdrav. Listy*, 2003; 72, 203-207.
3. **Schothorst, R. C., Van Egmond, H. P.:** *Toxicol. Lett.*, 2004; 153, 133-143.
4. Vyhláška Evropské komise EC 856/2005.
5. **Vacková, M., Šplíňo, M., Smetana, J.:** *Voj. Zdrav. Listy*, 2005; 2, 60-62.
6. **D'mello, J. P. F., Placinta, C. M., Macdonald, A. M. C.:** *Anim. Feed Sci. Tech.*, 1999; 80, 183-205.
7. **Sudakin, D. L.:** *Toxicol. Lett.*, 2003; 143, 97-107.
8. **Ler S. G., Lee, F. K., Gopalakrishnakone, P.:** *J. Chromatogr. A*, 2006; 1133, 1-12.
9. **Yu, H., Raymonda, J. W., McMahon, T. M., Campagnari, A. A.:** *Biosens. Bioelectron.*, 2000; 68, 829-840.
10. **Garda, J., Macedo, R. M., Faria, R. et al.:** *Food Control*, 2005; 16, 423-428.
11. **Kotal, F., Holadová, K., Hajšlová, J. et al.:** *J. Chromatogr. A*, 1999; 830, 219-225.
12. **Onji, Y., Aoki, Y., Tani, N. et al.:** *J. Chromatogr. A*, 1998; 815, 59-65.
13. **Pascale, M., Haidukowski, M., Visconti, A.:** *J. Chromatogr. A*, 2003; 989, 257-264.
14. **Dall'asta, C., Galaverna, G., Biancardi, A. et al.:** *J. Chromatogr. A*, 2004; 1047, 241-247.
15. **Zöllner, P., Mayer-Helm, B.:** *J. Chromatogr. A*, 2006; 1136, 123-169.
16. **Fuchs, E., Rabus B., Handl, J., Binder, E. M.:** *Mycotoxin Res.*, 2003; 19, 56-60.
17. **Razzazi-Fazeli, E., Rabus, B., Cecon, B., Böhm, J.:** *J. Chromatogr. A*, 2002; 968, 129-142.
18. **Berger, U., Oehme, M., Kuhn, F.:** *J. Agric. Food Chem.*, 1999; 47, 4240-4245.

19. **Berthiller, F., Schuhmacher, R., Buttinger, G., Krška, R.:** J. Chromatogr. A, 2005; 1062, 209-216.
20. **Valle-Algarra, F. M., Medina, A., Gimeno-Adelantado, J. V. et al.:** Talanta, 2005; 66, 194-201.
21. **Schollenberger, M., Müller, H.-M., Rühle, M et al.:** Int. J. Food Microbiol., 2005; 97, 317-326.
22. **Josephs, R. D., Krška, R., Grasserbauer, M., Broekaert, J. A. C.:** J. Chromatogr. A, 1998; 795, 297-304.
23. **Sokolović, M., Šimpraga, B.:** Food Control, 2006; 17, 733-740.
24. **Cavaliere, C., D'Ascenzo, G., Foglia, P. et al.:** Food Chem., 2005; 92, 559-568.

ZPRÁVY

VYBRANÉ KURZY, SEMINÁŘE A STÁŽE IPVZ V ZÁŘÍ, V ŘÍJNU A V LISTOPADU 2007

Katedra farmaceutické technologie a kontroly léčiv

IPVZ, Ruská 85, 100 05 Praha 10
Vedoucí: doc. RNDr. Pavel Komárek, Ph.D.
tel.: 271 019 278, 271 019 307, fax: 271 019 361
e-mail: komarek@ipvz.cz

205001 Kurz – Zabezpečování jakosti ve farmaceutické výrobě – 11. část

Určeno pro pracovníky ve výrobě léčiv a souvisejících oblastech, přednostně pro absolventy předešlých částí.
Program: Farmaceutické zabezpečování jakosti, aktuální otázky v oblasti systému jakosti, legislativa.
Vedoucí: PharmDr. M. Janoušek
Místo konání: Praha 4, Budějovická 15
Předpokládaná cena: 500 Kč
2. 10. 2007

205002 Kurz – Správná laboratorní praxe (SLP)

Určeno pro zájemce o udělení certifikátu SLP SÚKL nebo osvědčení SLM MZP a pro pracovníky testovacích zařízení již zařazených do Národního programu SLP.
Program: Regulace SLP v ČR, vztah k požadavkům EU a OECD. Uplatňování principů SLP. Aktuální problematika v oblasti SLP.
Vedoucí: RNDr. M. Pešák, CSc.
Místo konání: Praha 4, Budějovická 15
Předpokládaná cena: 500 Kč
13. 11. 2007

205003 Kurz – Léčivé rostliny

Určeno pro široký okruh zájemců o zdroje přírodních léčiv a jejich aktuálního využití.
Program: Nové trendy v oblasti fytofarmak a rostlinných nutraceutik.
Vedoucí: doc. RNDr. P. Komárek, Ph.D.
Místo konání: Praha 10, Ruská 85, IPVZ
Předpokládaná cena: 500 Kč
20. 11. 2007

205007 Odborná stáž – Biochemická analytika

Určeno pro farmaceuty z běžných i specializovaných biochemických pracovišť.
Program: Nové metody bioanalytiky v souladu s požadavky na správnou laboratorní praxi.
Školitel: prof. RNDr. M. Tichý, CSc.
Místo konání: Hradec Králové, Sokolská 581, FN, Ústav klinické biochemie a diagnostiky
Předpokládaná cena: 500 Kč
31. 10. 2007

205008 Odborná stáž – Mikrobiologická kontrola

Určeno pro pracovníky zabývající se mikrobiologickou kontrolou léčiv.
Program: Teorie a praxe mikrobiologických kontrolních metod dle platného lékopisu a ostatních norem. Správná praxe v mikrobiologické laboratoři.
Školitel: Mgr. M. Svatošová
Místo konání: Praha 10, Šrobárova 48, SÚKL
Předpokládaná cena: 1000 Kč
7.–8. 11. 2007

205009 Odborná stáž – Plynová chromatografie

Určeno pro pracovníky zabývající se plynovou chromatografií.
Program: Princip, metody, vývoj, aplikace nových metod, validace, test způsobilosti systému, možnost využití metody v kontrole léčiv.
Školitel: Ing. I. Imrichová
Místo konání: Praha 10, Šrobárova 48, SÚKL
Předpokládaná cena: 1000 Kč
21.–22. 11. 2007

Katedra lékárenství

IPVZ, Ruská 85, 100 05 Praha 10
Vedoucí: doc. RNDr. Jiří Portych, CSc.
tel. 271 019 259, 271 019 270
e-mail: portych@ipvz.cz

213004 Kurz k problematice návykových látek

Určeno pro výrobce a distributory návykových látek, kteří s těmito látkami zacházejí v souvislosti s výkonem své profese.
Program: Platná legislativa vztahující se k návykovým látkám. Charakteristika a vlastnosti těchto látek. Užití v praxi, zneužívání a sociální důsledky.
Vedoucí: PharmDr. M. Pancová
Místo konání: Praha 10, Ruská 85
Předpokládaná cena: 1500 Kč
5.–6. 11. 2007

213005 Kurz pro prodejce vyhrazených léčiv

Určeno pro prodejce vyhrazených léčiv.
Program: Účel a způsob použití, nežádoucí účinky, fyzikálně chemické vlastnosti, aplikační formy, mikrobiální čistota, skladování, prodej a zneškodňování léčiv.
Vedoucí: PharmDr. M. Pancová
Místo konání: Praha 4, Budějovická 15
Předpokládaná cena: 6000 Kč
12.–21. 11. 2007

213013 Odborná stáž – Příprava cytostatik

Určeno pro farmaceuty, farmaceutické laborantky.
Program: Příprava pracoviště, pracovníků a materiálů pro práci s cytostatiky. Vlastní příprava, kontrolní a dokumentační činnost.
Školitel: PharmDr. P. Šeděnková
Místo konání: Ostrava, 17. listopadu 1790, FNsp, lékárna
Předpokládaná cena: 600 Kč
9. 10. 2007

213014 Odborná stáž – Příprava cytostatik

Určeno pro farmaceuty, kteří se zabývají touto problematikou.
Program: Příprava pracoviště, pracovníků a materiálů pro práci s cytostatiky za aseptických podmínek. Návčik přípravy, kontrolní a dokumentační činnost. Účast při tvorbě chemoterapeutického režimu.
Školitel: Mgr. L. Doležalová
Místo konání: Brno, Žlutý kopec 7, Masarykův onkologický ústav, lékárna
Předpokládaná cena: 1200 Kč
16.–17. 10. 2007 a 13.–14. 11. 2007
Další termíny dle dohody.

213015 Odborná stáž – Příprava a kontrola očních přípravků

Určeno pro farmaceuty připravující v lékárnách oční přípravky.
Program: Předpisy a vybavení pracoviště pro přípravu očních přípravků. Příprava vybraných očních kapek a mastí. Chemická a fyzikálně chemická kontrola a kontrola sterility očních přípravků podle ČL 2005.
Školitel: Mgr. E. Kopecká
Místo konání: Praha 4, Krčská 54, Lékárna Krčská
Předpokládaná cena: 1200 Kč
23.–24. 10. 2007

213016 Odborná stáž – Příprava cytostatik

Určeno pro farmaceuty a farmaceutické laborantky zabývající se touto problematikou.
Program: Příprava pracoviště pro práci s cytostatiky za aseptických podmínek. Vlastní příprava a kontrolní a dokumentační činnost. Použití cytostatik v léčbě dětských pacientů ve FN Motol.
Školitel: PharmDr. P. Horák
Místo konání: Praha 5, V Úvalu 84, FN v Motole, lékárna
Předpokládaná cena: 1200 Kč
24.–25. 10. 2007