



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2007140982/10, 31.03.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
31.03.2006(30) Конвенционный приоритет:  
05.04.2005 АТ А574/2005

(43) Дата публикации заявки: 20.05.2009

(45) Опубликовано: 27.12.2010 Бюл. № 36

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: KURZATKOWSKI W. ET AL. Radioactive  
penicillin G production by immobilized fungal  
vesicles. //Appl. Microbiol. Biotechnol, 1984,  
19, pp.312-315. DAVID B. CARSON ET AL.  
Biodegradation of N-  
phosphonomethyliminodiacetic acid by  
microorganism from industrial activated sludge. //  
Can. J. Microbiol., 1997, 43, pp.97-101.  
LINDENMEIER M. ET AL. (см. прод.)

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную  
фазу: 06.11.2007(86) Заявка РСТ:  
АТ 2006/000129 (31.03.2006)(87) Публикация РСТ:  
WO 2006/105563 (12.10.2006)

Адрес для переписки:  
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):

**ФРОЙДЕНШУСС Мартин (АТ),  
ХОЙБЛЬ Георг (АТ),  
КРСКА Рудольф (АТ),  
ЯУНЕККЕР Гюнтер (АТ),  
БИНДЕР Ева (АТ)**

(73) Патентообладатель(и):

**ЭРБЕР АКЦИЕНГЕЗЕЛЛЬШАФТ (АТ)**

## (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ВТОРИЧНЫХ ПРОДУКТОВ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ, МЕЧЕННЫХ ИЗОТОПАМИ, А ТАКЖЕ ВТОРИЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано для получения внутреннего стандарта в аналитике, в исследованиях обмена веществ при проведении опытов по откармливанию животных, в метаболических исследованиях, при изучении

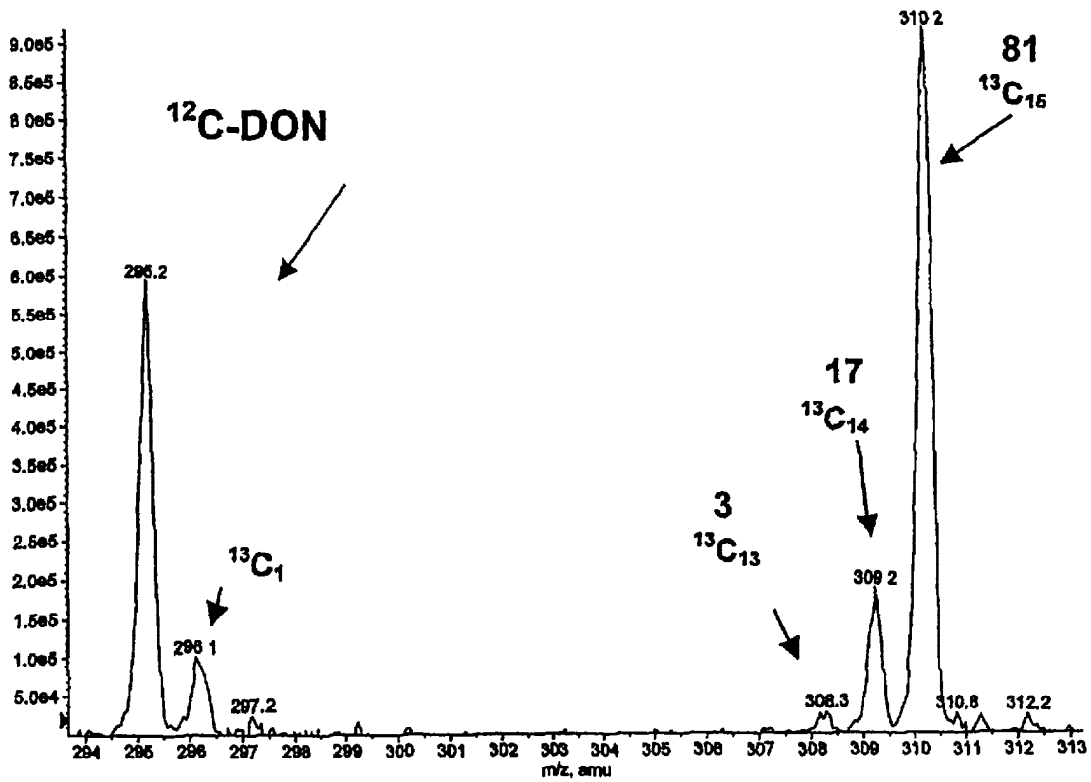
цикла обмена веществ, путей и/или периодов распада, а также интеркалий. Способ получения вторичных продуктов обмена веществ, меченных изотопами, из грибов предусматривает культивирование при иммобилизации грибов на инертном носителе при добавлении жидкой искусственной

культуральной среды. Все атомы углерода, азота и/или серы в указанной среде замещены устойчивыми изотопами, выбранными из группы, включающей  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{33}\text{S}$  и  $^{34}\text{S}$ .

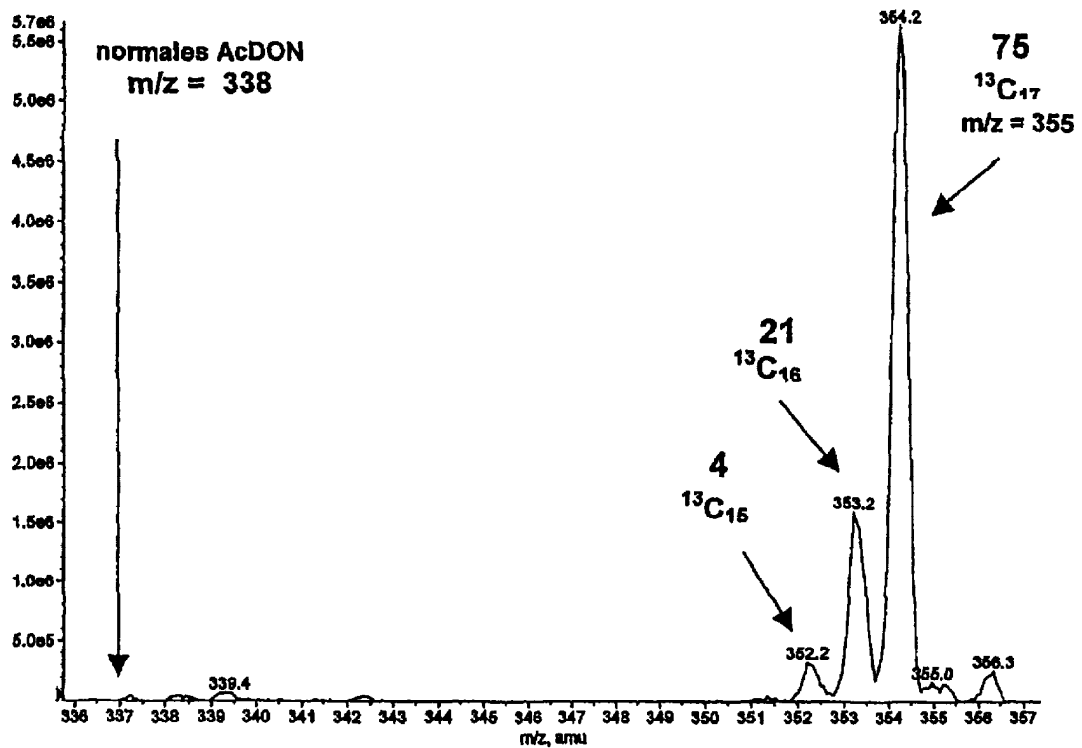
Предложен также вторичный продукт обмена веществ, меченный изотопами, из грибов. Изобретение обеспечивает получение целевого продукта с высокой чистотой, составляющей по меньшей мере 95%. 2 н. и 11 з.п. ф-лы, 2 ил.

RU 2407797 C2

RU 2407797 C2



ФИГ.1



ФИГ.2

(56) (продолжение):

Quantification of ochratoxin A in foods by a stable isotope dilution assay using high-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry. // Journal of Chromatography A, 2004, 1023, pp.57-66.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.  
*C12P 1/02* (2006.01)  
*C12P 1/04* (2006.01)

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2007140982/10, 31.03.2006**

(24) Effective date for property rights:  
**31.03.2006**

(30) Priority:  
**05.04.2005 AT A574/2005**

(43) Application published: **20.05.2009**

(45) Date of publication: **27.12.2010 Bull. 36**

(85) Commencement of national phase: **06.11.2007**

(86) PCT application:  
**AT 2006/000129 (31.03.2006)**

(87) PCT publication:  
**WO 2006/105563 (12.10.2006)**

Mail address:  
**129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO  
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",  
pat.pov. E.E.Nazinoj**

(72) Inventor(s):

**FROJDENShUSS Martin (AT),  
KhOJBL' Georg (AT),  
KRSKA Rudol'f (AT),  
JaUNEKKER Gjunter (AT),  
BINDER Eva (AT)**

(73) Proprietor(s):

**EhRBER AKT'sIENGEZELL'ShAFT (AT)**

(54) **METHOD FOR PREPARING ISOTOPE-MARKED SECONDARY METABOLIC PRODUCTS, AS WELL AS SECONDARY METABOLIC PRODUCTS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

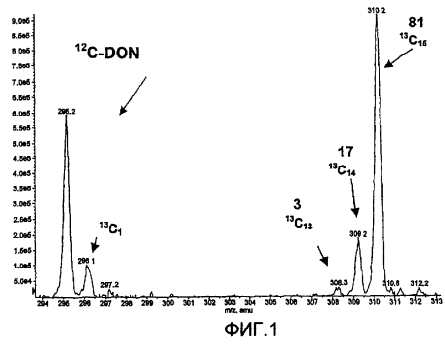
SUBSTANCE: method for preparing isotope-marked secondary metabolic products of fungi provides immobilised fungi growing on an inert carrier with an artificial fluid culture medium added. All carbon, nitrogen and/or sulphur atoms in the specified medium are substituted by stable isotopes chosen from the group including <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>33</sup>S and <sup>34</sup>S. Also, an isotope-marked secondary metabolic product made of fungi is presented.

EFFECT: high-purity end product preparation.

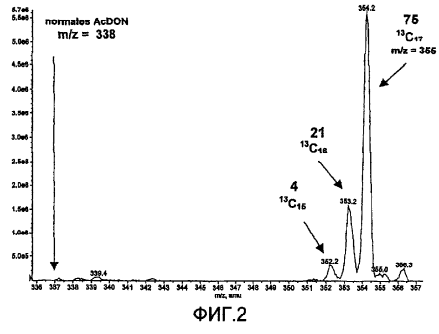
13 cl, 2 dwg, 9 ex

RU 2 407 797 C2

RU 2 407 797 C2



ФИГ.1



ФИГ.2

RU 2407797 C2

RU 2407797 C2

Настоящее изобретение относится к способу изготовления вторичных продуктов обмена веществ, помеченных изотопами, из грибов или бактерий в жидкой искусственной культуральной питательной среде, а также к вторичным продуктам обмена веществ из грибов или бактерий.

5 В настоящее время все большее значение приобретают вещества, помеченные изотопами, в частности, в технологии с использованием жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (LCMS), обеспечивающей эффективный спектрометрический анализ с большим выходом продукта. Технология может быть  
10 использована с множеством потенциальных анализируемых веществ, причем никакого ограничения молекулярной массы нет, однако с обнаружением отдельных веществ могут возникнуть проблемы, так что ассоциировать как спектры разложения, так и отдельные молекулярные пики приходится соответствующим образом. Чтобы  
15 добиться при этом правильного применения технологии и методов жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией, все большее значение приобретает использование так называемых внутренних стандартных веществ. Внутренними стандартами являются такие вещества, которые имеют очень большое сходство с настоящими целевыми анализируемыми веществами, т.е., в частности, если  
20 это возможно, имеют идентичную молекулярную структуру, но только с другим молекулярным весом. Поэтому идеальными внутренними стандартами оказываются помеченные изотопами молекулы целевых анализируемых веществ, т.е. молекулы, в которых один или несколько атомов замещаются их изотопами. В настоящее время такие вещества изготавливаются с помощью органического синтеза, когда, например,  
25 водород или углерод замещаются соответствующими более тяжелыми изотопами.

Однако в этой связи при анализах с помощью жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией оказалось, что желательнее, чтобы помеченные изотопами вещества, используемые в качестве внутренних стандартов, различались  
30 молекулярными массами по меньшей мере на величину, равную 3, с тем чтобы можно было добиться четкого разделения целевых анализируемых веществ, и чтобы, если это возможно, использовались вещества, состоящие из возможно меньшего количества изотопомеров.

Путь к изготовлению растительных или микробиологических метаболитов  
35 проходит через биосинтез соответствующих растений и/или микробов. При этом к культуральным питательным средам примешиваются питательные вещества, помеченные радиоактивным способом, а ингредиенты питательной среды в определенном проценте встраиваются в анаболические и метаболические циклы  
40 микробиологических или растительных структур, так что изотопы включаются в состав продуктов обмена веществ. Недостатком этого способа является то, что при его использовании мечение получается неполным, и обычно образуется смесь самых разных изотопомеров, в результате чего применение таких помеченных изотопами  
45 веществ, т.е. растительных или микробиологических метаболитов, помеченных изотопами, в качестве внутренних стандартов представляется не очень подходящим, поскольку при использовании таких веществ находит применение не один стандарт, а целая гамма изотопомеров, из-за чего направленное обнаружение целевых веществ с помощью спектрометрии с использованием жидкостной хроматографии с масс-  
50 спектрометрической детекцией (LCMS) представляется невозможным, а если и возможным, то крайне сложным.

Целью настоящего изобретения является создание такого способа изготовления вторичных продуктов обмена веществ, помеченных изотопами, из грибов или

бактерий, в которых все или почти все атомы углерода, азота или серы в исходном продукте замещаются устойчивыми изотопами, благодаря чему получается единый конечный продукт, помеченный изотопами, который спектрометрическим способом, в частности с использованием жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией, определяется просто и надежно. Изобретение относится также к изготовлению продукта обмена веществ, который может быть с уверенностью использован в качестве внутреннего стандарта или в способе спектрометрического анализа, в частности, с использованием жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией.

Для решения этой задачи способ согласно настоящему изобретению осуществляется таким образом, чтобы синтез происходил за счет иммобилизации грибов или бактерий на инертном носителе при добавлении жидкой искусственной культуральной среды, в которой все атомы углерода, азота и/или серы, в основном, замещаются устойчивыми изотопами. Благодаря тому, что синтез происходит за счет иммобилизации грибов или бактерий на инертном носителе при добавлении жидкой искусственной культуральной среды, в которой все атомы углерода, азота и/или серы, в основном, замещаются устойчивыми изотопами, из грибов и бактерий удастся изготовить продукт обмена веществ, помеченный изотопами, в котором все атомы или по меньшей мере 95% из них, которые после выращивания могут быть извлечены из культуральной среды, а именно атомы углерода, азота или серы, замещены содержащимися в культуральной среде устойчивыми изотопами питательных веществ, помеченных изотопами, благодаря чему может быть получен целевой продукт, помеченный изотопами, а не смесь различных гомологов с варьируемым количеством атомов изотопов, как это было многократно описано в соответствии с уровнем техники. Таким образом, благодаря этому способу изготовления может быть получен вторичный продукт обмена веществ, помеченный изотопами, который может использоваться целенаправленно и который может быть четко и однозначно идентифицирован во всех анализах или метаболических исследованиях.

В соответствии с одним из усовершенствованных вариантов изобретения способ осуществляется таким образом, что в качестве источника углерода в жидкой искусственной культуральной среде использованы сахара или сахарные спирты, в частности D-[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-глюкоза, <sup>13</sup>C-сахароза, <sup>13</sup>C-глицерин и/или <sup>13</sup>C-ацетаты, в качестве источников азота - <sup>15</sup>N-аминокислоты, <sup>15</sup>N-нитраты, <sup>15</sup>N-соединения аммония или <sup>15</sup>N-мочевина, а в качестве источников серы - <sup>33</sup>S-сульфаты или <sup>34</sup>S-сульфаты, <sup>34</sup>S-сульфиды или <sup>34</sup>S-аминокислоты. В то время как источники углерода, азота или серы, полностью помеченные изотопами, содержатся в жидкой искусственной культуральной среде, при выращивании продуктов обмена веществ из грибов или бактерий гриб или бактерия вынуждены встраивать в продукт обмена веществ соответственно помеченный изотоп, так что можно добиться того, чтобы вторичные продукты обмена веществ из грибов или бактерий в большой степени, если не полностью, были помечены, т.е. замещены, соответствующими изотопами.

Для увеличения выхода вторичных продуктов обмена веществ, помеченных изотопами, из грибов или бактерий процесс в соответствии с одним из усовершенствованных вариантов выполнения изобретения осуществляется таким образом, что жидкая искусственная культуральная среда дополнительно содержит смесь, составленную из неорганических солей или кислот и оснований с ионами Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup>, Zn<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>, B<sup>+++</sup>, а также CO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Когда в жидкой

искусственной культуральной среде содержатся соли или кислоты и основания с ионами  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{+++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{B}^{+++}$ , а также  $\text{CO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^-$ ,  $\text{PO}_4^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , получается, что все посторонние ионы, возможно, содержащиеся в грибах или бактериях наряду углеродом, водородом, азотом и серой, поставляются надежно и в достаточном количестве, благодаря чему наряду с быстрым выращиванием возможен и большой выход.

Для дальнейшего увеличения выхода в качестве инертного носителя используется естественный или искусственный носитель с большой внутренней поверхностью, в частности силикат, слоистый силикат, цеолит, бентонит, обожженная глина, диатомовая земля, пластмассы и т.п. Благодаря использованию инертного носителя с большой внутренней поверхностью с помощью способа согласно данному изобретению по сравнению с обычными способами, осуществляемыми без инертного носителя с большой внутренней поверхностью, добиваются увеличения выхода по меньшей мере на 50%. Такое увеличение выхода делает способ не только более экономичным, но и более надежным в отношении получения достаточного количества желательных конечных продуктов в виде вторичных продуктов обмена веществ, помеченных изотопами, с тем чтобы разумно использовать их в качестве внутреннего стандарта при проведении анализов, а также метаболических исследований.

Максимальное увеличение выхода согласно изобретению может быть достигнуто, в частности, за счет того, что в качестве инертного носителя с большой внутренней поверхностью используются силикат алюминия, например диатомовая земля, в частности кизельгур, изюлуты НМ-N или цеолит, или слоистый силикат, в частности вермикулит из группы слюдяных минералов в естественном или обработанном виде. У этих веществ, в частности, свойства поверхности, как-то: поверхностное натяжение, пористость и т.п. способствуют особенно хорошему обмену на поверхности носителя. Аналогичным образом соответствующее увеличение выхода может быть достигнуто за счет применения инертных носителей из пластмассы, например из пенопласта, полиамида, силикона, полиэтилена, полипропилена, политетрафторэтилена, полиэфира и т.п., причем использование естественных носителей с большой внутренней поверхностью в зависимости от изготавливаемых продуктов обмена веществ также приводит к увеличению выхода.

В целях максимального ускорения процесса при одновременном большом выходе изобретение усовершенствовано настолько, что изготовление продукта производится в температурном интервале от 3 до 45°C, в частности от 10 до 35°C. В этой связи частично благоприятным оказалось то обстоятельство, что способ изготовления не всегда осуществляется при неизменной температуре и что изменение температуры в заданных пределах также может способствовать увеличению выхода, т.е. ускорению реакций, т.е. обмена.

Для получения максимально чистого конечного продукта способ согласно изобретению осуществляется таким образом, чтобы вторичные продукты обмена веществ, помеченные изотопами, производились путем извлечения и концентрации, например путем комбинирования таких этапов, как экстракция в системах твердое вещество - жидкость и жидкость - жидкость, центрифугирование, фильтрация и выпаривание. После получения вторичных продуктов обмена, помеченных изотопами, оказалось целесообразным, чтобы продукты подвергались дальнейшей очистке, причем согласно изобретению предпочтительно, чтобы этими способами очистки были хроматографический способ, в частности колоночная хроматография, препаративная тонкослойная хроматография, ионообменная хроматография, афинная



хроматография, эксклюзивная хроматография и/или препаративная жидкостная хроматография высокого давления. В соответствии с такими способами переработки и очистки удастся получить вторичные продукты обмена веществ из грибов и бактерий, в которых по меньшей мере 90% атомов углерода, азота или серы замещены соответствующими устойчивыми изотопами, и, таким образом, могут быть получены продукты, обладающие соответствующей разностью масс относительно анализируемых веществ, достаточной для того, чтобы, например, с помощью жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (LCMS) отличить их от естественных тяжелых изотопов и тем самым получить устойчивый, однозначно идентифицируемый внутренний стандарт для проведения анализов такого рода.

Изобретение относится также к вторичному продукту обмена веществ, помеченному ионами, из грибов и бактерий, в котором все атомы углерода, азота и/или серы, в основном, полностью, в частности по меньшей мере на 95%, замещены устойчивыми изотопами.

Такие вторичные продукты обмена веществ, помеченные изотопами, из грибов и бактерий согласно одному из усовершенствованных вариантов осуществления изобретения используются в качестве внутренних стандартов в аналитике, в исследованиях обмена веществ при проведении опытов по откармливанию животных, в метаболических исследованиях, при изучении цикла обмена веществ, путей и/или периодов распада, а также интеркаляций. Во всех названных областях применения существенное значение имеет факт обретения стабильности и однозначности в определении стандарта, т.е. факт получения однозначно идентифицируемого и отслеживаемого вещества в ходе проведения опыта или разложения с тем, чтобы можно было однозначно продолжить выполнение отдельных этапов способа или процесса.

В соответствии с одним из вариантов усовершенствования изобретения в области проведения анализов или исследований обмена веществ, путей распада и т.п. в качестве продуктов обмена веществ используются микотоксины, в частности трихотецины, как, например, ниваленол, деоксиниваленол, 3-ацетил-деоксиниваленол, 15-ацетил-деоксиниваленол, фузаренон X, Т-2 токсин, НТ-2 токсин, DAS, фумонизины, как-то: фумозин В1, В2 или В3, охратоксины, такие как: охратоксин А, В, С или D, цеараленоны, монилиформин или афлатоксины, такие как: афлатоксин В1, В2 G1 или G2. Микотоксины приобретают все большее значение в этиологии заболеваний животных, и поэтому для изготовления таких веществ в достаточных количествах необходимо организовать их промышленное производство с тем, чтобы впоследствии с помощью химически максимально однозначных, т.е. чистых веществ, можно было провести токсикологические ветеринарные исследования. Поскольку микотоксины представляют серьезную угрозу для здоровья людей и животных, их анализ является темой глобального значения, так как, в частности, уже многие страны определились с допустимыми ориентировочными и предельными значениями для использования таких веществ. Идентификация, или квантификация, таких микотоксинов с точки зрения их использования в качестве внутренних стандартов, которые идентифицируются однозначно и поэтому обеспечивают качественный анализ соответствующего токсина, означает значительный прогресс в деле обнаружения таких опасных веществ.

Аналогичным образом, такое же жизненно важное значение для здоровья людей, т.е. для обнаружения вредных веществ в продуктах питания и в изделиях вкусовой промышленности, имеет качественная идентификация, или отслеживание, токсинов, в

частности, в соответствии с одним из усовершенствованных вариантов осуществления изобретения, эндоксинов и экзотоксинов, в особенности, бактериальных токсинов *Escherichia coli* sp., *Salmonella* sp., *Clostridium* sp., *Bacillus* sp. или *Staphylococcus* sp. Применение таких продуктов обмена веществ, как антибиотики, в частности

5 антибиотиков, образованные актиномицетином, как, например, тетрациклин, стрептомицин или аминогликозид, антибиотики, образованные с помощью *Bacillus* sp., как, например, бацитрацин или полимиксин, антибиотики, образованные с помощью *Penicillium*, как, например, пенициллин или гризеофульвин, или

10 цефалоспорины, образованные с помощью *Cephalosporium*, также приобретает все большее значение, в частности, в случае заболеваний или обнаружения таких веществ в продуктах питания или изделиях вкусовой промышленности, причем и в отношении этих веществ не следует забывать, что вещества, с помощью которых удается

15 качественная идентификация продуктов обмена веществ, как, например, антибиотиков, имеют жизненно важное значение для общества.

В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения в качестве продуктов обмена веществ находят применение такие чистые вещества, помеченные в определенной степени, как  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , соответственно  $^{33}\text{S}$  или  $^{34}\text{S}$ , благодаря чему, с

20 одной стороны, обеспечивается возможность однозначного обнаружения немеченых веществ, т.е. продуктов обмена веществ, а с другой - гарантируется надежное обнаружение изотопов, образующихся естественным путем, а в конечном счете, может быть получено однозначно отслеживаемое вещество для проведения анализов или

25 осуществления способа обнаружения.

Ниже изобретение подробно поясняется на примерах, которые иллюстрируют процесс изготовления продуктов обмена веществ, помеченных изотопами в высокой степени.

#### Пример 1

#### Изготовление деоксиниваленола [U- $^{13}\text{C}_{15}$ ] (DON), помеченного изотопами в высокой степени

Для изготовления  $^{13}\text{C}$ -DON, полностью помеченного изотопами, гриб *Fusarium*, а именно *Fusarium graminearum*, инокулируется на инертном материале носителя, а

35 именно на вермикулите, и инкубируется в искусственной культуральной среде, состоящей из 0,5 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2,0 г  $\text{NaNO}_3$ , 0,7 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,0 г  $\text{KCl}$ , 15 г D-[U- $^{13}\text{C}_6$ ]-глюкозы, 1,5 г  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 15 мг  $\text{Fe}(\text{II})\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  или 20 мг  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  и содержащей в качестве единственного источника углерода D-[U- $^{13}\text{C}_6$ ]-глюкозу. Через 5 недель при

40 температуре около  $28^\circ\text{C}$  токсичный материал экстрагируется этилацетатом, а затем путем экстракции, хроматографии и кристаллизации очищается до достижения стандартного качества (степень чистоты  $>98\%$ ).

На одну рабочую заправку приготавливаются около 40 мл инкубационной заправки. Затем весь токсичный материал подвергается дальнейшей обработке.

45 Из 1000 мл заправки получают 5-50 мг [7,5-17,5 мг] [U- $^{13}\text{C}_{15}$ ]-DON, полностью помеченного изотопами.

Очищенный продукт характеризуется с помощью следующих аналитических методов:

$^1\text{H}$  NMR и  $^{13}\text{C}$ -NMR

LC-MS/MS Q-Trap для определения доли  $^{13}\text{C}$ -изотопа. Определение чистоты и концентрации относительно эталонного материала с помощью UV/VIS и HPLC-DAD. Регулировка концентрации.

Контроль качества с помощью UV/VIS, HPLC-DAD, LC-MS/MS Q-Trap. Такой  $^{13}\text{C}_{15}$ -деоксиниваленол ( $^{13}\text{C}_{15}$ -DON), помеченный изотопами в высокой степени, может быть использован, например, в качестве внутреннего стандарта. Такой внутренний стандарт имеет более тяжелую молекулярную массу ровно на 15 г/моль, и поэтому его сигнал в масс-спектре (фиг.1) появляется ровно на 15 а.е.м. (атомная единица массы) выше сигнала анализируемого вещества. Поскольку все прочие химические и физические свойства  $^{13}\text{C}$ -DON, полностью помеченного изотопами, идентичны свойствам анализируемого вещества, такой внутренний стандарт демонстрирует точно в такой же степени, что и анализируемое вещество, фрагментацию, ионизацию вещества, и, следовательно, выход ионизации. Это означает, что величины сигналов фрагментов, или ионов вещества, у внутреннего стандарта и анализируемого вещества полностью сопоставимы, а поскольку концентрация внутреннего стандарта при анализе известна, то из этого можно делать непосредственные выводы относительно концентрации анализируемого вещества, благодаря чему такой деоксиниваленол, помеченный изотопами в высокой степени, представляет собой почти идеальный внутренний стандарт.

На фиг.1  $\text{C}_{12}$ -DON и  $\text{C}_{13}$ -DON представлены в общем масс-спектре. На той же фиг.1 наряду с молекулярными пиковыми значениями  $^{13}\text{C}_{15}$ -DON и каждого из  $^{12}\text{C}$ -DON со значениями, равными 295,2 и 310,2 соответственно, показано также распределение соединений, в которых не все атомы С являются мечеными и, таким образом, состоят не из одного типа изотопов (изотопомеры). В случае естественного образования деоксиниваленола - это  $^{13}\text{C}_1$ -DON, что соответствует естественному распределению между  $\text{C}_{12}$  и  $\text{C}_{13}$ .

#### Пример 2

##### Изготовление $^{13}\text{C}$ -фумонизина, помеченного изотопами в высокой степени

Для изготовления  $^{13}\text{C}$ -фумонизина, полностью помеченного изотопами  $^{13}\text{C}$ , 1000 мл жидкой среды, состоящей из 0,5 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 г  $\text{KNO}_3$ , 0,7 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,0 г  $\text{KCl}$ , 17,5 г  $\text{D-[U-}^{13}\text{C}_6\text{]-глюкозы}$ , 1,5 г  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 15 мг  $\text{Fe(II)SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  и 20 мг  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , с  $\text{D-[U-}^{13}\text{C}_6\text{]-глюкозой}$  как единственным источником углерода, нанесенные на кубик пенопласта размером 1x1x1 см, инокулируются с помощью *Fusarium moniliforme* и инкубируются при температуре 28°C и при 70% относительной влажности в инкубаторе. Через 3 недели токсичный материал экстрагируется с помощью смеси растворителей в соотношении ацетонитрила к  $\text{H}_2\text{O}$ , равном 1:1, а затем очищается до достижения стандартного качества (степень чистоты >98%) путем экстракции и таких этапов хроматографии, как ионообменная хроматография, колоночная флеш-хроматография, тонкослойная хроматография и HPLC.

На 1000 мл заправки получают 80-240 мг  $^{13}\text{C}$ -фумонизинов (HPLC-FLD).

#### Пример 3

Изготовление  $[\text{U-}^{13}\text{C}_{17}]$ -3-ацетил-деоксиниваленола, помеченного изотопами в высокой степени

Для изготовления  $[\text{U-}^{13}\text{C}_{17}]$ -3-ацетил-деоксиниваленола, помеченного изотопами в высокой степени, 1000 мл искусственной жидкой среды, состоящей из 0,5 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 г  $\text{KNO}_3$ , 0,7 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,0 г  $\text{KCl}$ , 17,5 г  $\text{D-[U-}^{13}\text{C}_6\text{]-глюкозы}$ , 1,5 г  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 15 мг  $\text{Fe(II)SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  и 20 мг  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  и содержащей  $[\text{U-}^{13}\text{C}_6\text{]-глюкозу}$ , полностью помеченную изотопами, в качестве единственного источника углерода, нанесенные на диатомовую землю, а именно на изолют НМ-N, инокулируются с помощью *Fusarium*

graminearum и инкубируются при температуре 28°C в течение 9 дней в инкубаторе. Через 9 дней токсичный материал собирается, экстрагируется с помощью ацетонитрила и H<sub>2</sub>O-ацеотропа, а затем очищается до достижения стандартного качества (степень чистоты >98%) путем экстракции, хроматографии, кристаллизации, Büchi-MPLC и перекристаллизации. Из заправки можно получить 15-50 мг высокочистого конечного продукта. Контроль чистоты осуществлялся с помощью анализа LC-UV и с помощью капиллярной колонки C18.

Полученный таким путем 3-ацетал-деоксиниваленол, помеченный изотопами, имеет по сравнению с 3-ацетал-деоксиниваленолом без помеченных изотопов на 17 молей большую молекулярную массу. 3-ацетал-деоксиниваленол без помеченных изотопов имеет молекулярную массу M/z=338, а продукт, полностью помеченный изотопами, имеет молекулярную массу, равную 355. На фиг.2 изображен масс-спектр чистого <sup>13</sup>C-3-ацетил-деоксиниваленола, из которого видно, что продукт удалось пометить на 75% и что распределение изотопов продукта является распознаваемым. В этом случае распределение продукта и изотопомеров, не полностью помеченных изотопами, зависит от чистоты изотопов исходного продукта <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-глюкозы, и при использовании абсолютно чистой <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-глюкозы оно еще явно может сместиться в направлении продукта, полностью помеченного изотопами. Однако из фиг.2 отчетливо видно, что изотопомеров, имеющих менее 13 <sup>13</sup>C-атомов, практически нет, так что и <sup>13</sup>C-3-ацетал-деоксиниваленол с успехом может быть использован в качестве внутреннего стандарта.

#### Пример 4

##### Изготовление [U-<sup>13</sup>C<sub>17</sub>]-15-ацетил-деоксиниваленола, помеченного изотопами в высокой степени

Для изготовления [U-<sup>13</sup>C<sub>17</sub>]-15-ацетил-деоксиниваленола, помеченного изотопами в высокой степени, культуральная среда, состоящая из 0,5 г K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,0 г NaNO<sub>3</sub>, 0,7 г MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2,0 г KCl, 15 г D-[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-глюкозы, 1,5 г NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 мг Fe(II)SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O и 20 мг ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, инокулируется на крупнозернистом носителе филлосиликате с помощью Fusarium graminearum и инкубируется в инкубаторе при температуре 28°C. Через 9 дней токсичный материал собирается, экстрагируется с помощью этилацетата, а затем очищается до получения стандартного качества (степень чистоты >98%) путем экстракции, хроматографии и кристаллизации. В качестве альтернативы кристаллизации может быть также использован этап очистки с помощью препаративной HPLC.

Из ферментационной заправки могут быть получены около 30-60 мг высокочистого целевого продукта.

#### Пример 5

##### Изготовление [U-<sup>13</sup>C<sub>15</sub>]-ниваленола или [U-<sup>13</sup>C<sub>17</sub>]-фузаренона-X, помеченных изотопами в высокой степени

Для изготовления [U-<sup>13</sup>C<sub>15</sub>]-ниваленола или [U-<sup>13</sup>C<sub>17</sub>]-фузаренона-X, помеченных изотопами в высокой степени, жидкая среда, состоящая из 0,5 г K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,0 г NaNO<sub>3</sub>, 0,7 г MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2,0 г KCl, 15 г D-[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-глюкозы, 1,5 г NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 мг Fe(II)SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O или 20 мг ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, с [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-глюкозой как единственным источником углерода и инертным филлосиликатом, инокулируется с помощью Fusarium nivale и инкубируется при температуре 28°C в течение 5 недель. После этого токсичный материал экстрагируется с помощью метанола и хлорида

метилена, а затем очищается до достижения стандартного качества (степень чистоты >98%) путем экстракции, хроматографии и кристаллизации. В порядке альтернативы кристаллизации может быть использован также этап дополнительной очистки с помощью препаративной HPLC.

#### Пример 6

##### Изготовление [U-<sup>13</sup>C<sub>20</sub>]-охратоксина А, помеченного изотопами в высокой степени

Для изготовления целевого вещества гриб *Petromyces albertensis* ферментируется на инертном носителе филлосиликате с помощью искусственной жидкой среды, состоящей из 0,5 г K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,0 г NaNO<sub>3</sub>, 0,7 г MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2,0 г KCl, 15 г D-[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-глюкозы, 1,5 г NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 мг Fe(II)SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O или 20 мг ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O и содержащей в качестве единственного источника углерода <sup>13</sup>C-глюкозу, полностью помеченную изотопами. Затем колбы инкубируются в инкубаторе на 6 недель при температуре 28°C и влажности воздуха 70%, после чего они экстрагируются с помощью толуола. Целевое вещество, как и в предыдущих примерах, очищается с помощью колоночной хроматографии и перекристаллизуется.

#### Пример 7

##### Изготовление [U-<sup>13</sup>C<sub>18</sub>]-цеараленона, помеченного изотопами в высокой степени

Для изготовления [U-<sup>13</sup>C<sub>18</sub>]-цеараленона, помеченного изотопами в высокой степени, 1000 мл жидкой среды, состоящей из 0,5 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 г KNO<sub>3</sub>, 0,7 г MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2,0 г KCl, 17,5 г D-[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-глюкозы, 1,5 г NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 мг Fe(II)SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O и 20 мг ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, с D-[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-глюкозой как единственным источником углерода, нанесенные на пористую, обожженную глину в виде гранулята, а именно на Seramis или Лесса, инокулируются с помощью *Fusarium semitectrum* и инкубируются в инкубаторе при температуре 28°C и относительной влажности воздуха 70%. Через 3 недели токсичный материал экстрагируется с помощью чистого петролейного эфира и смеси петролейного эфира с этилацетатом в соотношениях 4:1 и 2:1, а затем очищается до достижения стандартного качества (степень чистоты >98%) с помощью экстракции и нескольких этапов хроматографии, как-то: ионообменная хроматография, колоночная флеш-хроматография с использованием силикагеля, тонкослойная хроматография и препаративная HPLC.

#### Пример 8

##### Изготовление <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-рокквевортина С, помеченного изотопами в высокой степени

Для изготовления рокквевортина С, полностью помеченного изотопом азота <sup>15</sup>N, 1000 мл жидкой среды, состоящей из 0,8 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,7 г MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,0 г KCl, 17,5 г D-глюкозы, 1,0 г <sup>15</sup>NH<sub>4</sub> <sup>15</sup>NO<sub>3</sub>, 1,5 г NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 мг Fe(II)SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 20 мг ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, с <sup>15</sup>NH<sub>4</sub> <sup>15</sup>NO<sub>3</sub> как единственным источником азота, наносятся на крупнозернистый кизельгур, инокулируются с помощью пенициллина и инкубируются в инкубаторе при температуре 12°C и влажности воздуха 70%. Через 48 дней токсичный материал экстрагируется с помощью смеси органических растворителей, состоящей из хлороформа и метанола в соотношении 9:1, а затем очищается до достижения стандартного качества (степень чистоты >98%) путем жидкостной экстракции, колоночной флеш-хроматографии с использованием силикагеля и препаративной HPLC. На 1000 мл заправки получают 300 мг <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-рокквевортина С (HPLC-FLD).

#### Пример 9

##### Изготовление <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-<sup>33</sup>S-пенициллина, помеченного изотопами в высокой степени

Для изготовления пенициллина, полностью помеченного изотопом азота  $^{15}\text{N}$  и изотопом серы  $^{33}\text{S}$ , 1000 мл жидкой среды, состоящей из 1,0 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 г  $\text{MgCl}_2$ , 20,0 г D-глюкозы, 1,0 г  $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ , 0,5 г  $\text{Na}_2^{33}\text{SO}_4$ , 1,5 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 5 мг  $\text{Fe(II)Cl}_2$ , 5 мг  $\text{ZnCl}_2$ , с  $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  в качестве единственного источника азота и с  $\text{Na}_2^{33}\text{SO}_4$  в качестве единственного источника серы, нанесенные на маленькие кубики пенопласта, инокулируются с помощью *Penicillium notatum* и инкубируются в инкубаторе при температуре  $28^\circ\text{C}$  и влажности воздуха 70%. Через 30 дней токсичный материал экстрагируется с помощью этилацетата, а затем очищается до достижения стандартного качества (степень чистоты  $>98\%$ ) путем жидкостной экстракции, колоночной флеш-хроматографии с использованием силикагеля и с помощью HPLC (высокопроизводительная препаративная жидкостная хроматография). На 1000 мл заправки получают 500 мг  $^{15}\text{N}_2$ - $^{33}\text{S}$ -пенициллина (HPLC-FLD).

#### Формула изобретения

1. Способ получения вторичных продуктов обмена веществ, меченных изотопами, из грибов в жидкой искусственной культуральной среде, отличающийся тем, что культивирование ведут при иммобилизации грибов на инертном носителе при добавлении жидкой искусственной культуральной среды, в которой все атомы углерода, азота и/или серы, замещены устойчивыми изотопами, выбранными из группы, включающей  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{33}\text{S}$  и  $^{34}\text{S}$ .

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве источника углерода в жидкой искусственной культуральной среде используют сахара или сахарные спирты, в частности, В-[U- $^{13}\text{C}_6$ ]-глюкозу,  $^{13}\text{C}$ -сахарозу,  $^{13}\text{C}$ -глицерин и/или  $^{13}\text{C}$ -ацетаты, в качестве источников азота  $^{15}\text{N}$ -аминокислоты,  $^{15}\text{N}$ -нитраты,  $^{15}\text{N}$ -соединения аммония или  $^{15}\text{N}$ -мочевину, а в качестве источников серы  $^{33}\text{S}$ -сульфаты или  $^{34}\text{S}$ -сульфаты,  $^{34}\text{S}$ -сульфиды или  $^{34}\text{S}$ -аминокислоты.

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что жидкая искусственная культуральная среда дополнительно содержит смесь, выбранную из неорганических солей или кислот и оснований с ионами  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{+++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{B}^{+++}$ , а также  $\text{CO}_3^{--}$ ,  $\text{SO}_4^{--}$ ,  $\text{PO}_4^{---}$ ,  $\text{NO}_3^-$ .

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве инертного носителя используют естественный или искусственный носитель, в частности силикат, слоистый силикат, цеолит, бентонит, обожженную глину, диатомовую землю, пластмассы.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что в качестве инертного носителя используют силикат алюминия, например цеолит или слоистый силикат, в частности вермикулит из группы слюдяных минералов в естественном или обработанном виде.

6. Способ по п.4, отличающийся тем, что в качестве пластмассового инертного носителя используют пенопласт, полиамид, силикон, полиэтилен, полипропилен, политетрафторэтилен, полиэфир.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что культивирование ведут в температурном интервале от  $3$  до  $45^\circ\text{C}$ , в частности от  $10$  до  $35^\circ\text{C}$ .

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что вторичные продукты обмена веществ, меченные изотопами, выделяют путем извлечения и концентрации, например, путем комбинирования таких этапов, как экстракция в системах твердое вещество-жидкость и жидкость-жидкость, центрифугирование, фильтрация и выпаривание.

9. Способ по п.8, отличающийся тем, что в качестве способов очистки используют

хроматографический способ, в частности колоночную хроматографию, препаративную тонкослойную хроматографию, ионообменную хроматографию, аффинную хроматографию, эксклюзивную хроматографию и/или препаративную жидкостную хроматографию высокого давления.

5 10. Вторичный продукт обмена веществ, меченный изотопами, из грибов, полученный способом по любому из пп.1-9 для получения внутреннего стандарта в аналитике, в исследованиях обмена веществ при проведении опытов по откармливанию животных, в метаболических исследованиях, при изучении цикла  
10 обмена веществ, путей и/или периодов распада, а также интеркаляций.

11. Продукт обмена веществ по п.10, отличающийся тем, что продукт обмена веществ представляет собой микотоксины, в частности трихотецины, как например, ниваленол, деоксиниваленол, 3-ацетил-деоксиниваленол, 15-ацетил-деоксиниваленол, фузаренон X, Т-2 токсин, НТ-2 токсин, DAS, фумонизины, как то: фуозин В1, В2 или  
15 В3, охратоксины, такие как: охратоксин А, В, С или D, цеараленоны, монилиформин или афлатоксины, такие как: афлатоксин В1, В2, G1 или G2.

12. Продукт обмена веществ по п.10, отличающийся тем, что продукт обмена веществ представляет собой антибиотики, образованные с помощью *Penicillium*, как, например, пенициллин или гризеофульвин, или цефалоспорины, образованные с  
20 помощью *Serphalosporium*.

13. Продукт обмена веществ по любому из пп.10-12, где чистое вещество, меченное в определенной степени как  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{33}\text{S}$  или  $^{34}\text{S}$  составляет по меньшей мере 95%.

25

30

35

40

45

50