

УДК: 619:615-541.183

**ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ МІКОТОКСИНУ
МОНІЛІФОРМІНУ****Білан А.В.**

Білоцерківський національний аграрний університет

У статті висвітлюється синтез мікотоксину моніліформіну мікроскопічними грибами, токсичність та останні дослідження. Подано методи, доступні для аналітичного визначення, у тому числі видобуток, очищення та хроматографічне розділення, а також більш швидкі методи для визначення загального вмісту моніліформіну на основі імунологічного розпізнавання. Хроматографічні методи для визначення моніліформіну включають офіційні методи, засновані на високоефективній рідинній хроматографії (ВЕРХ) і поділ флуоресцентних похідних, методи скринінгу на основі тонкошарової хроматографії (ТШХ) та сучасні методи дослідження рідинної хроматографії.

Ключові слова: моніліформін, методи, кукурудза, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium moniliforme*.

Моніліформін – це метаболіт мікроскопічних грибів, що структурно охарактеризований як натрієва або калієва солі 1-гідроксициклобут-1-ен-3,4-діон (рис. 1).

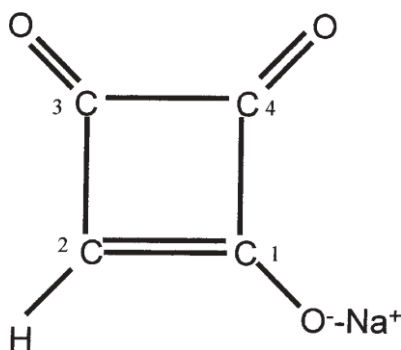


Рис. 1. Структурна формула моніліформіну (натрієва сіль).

Вперше виділений у 1973 році з кукурудзи, що була уражена грибом *Fusarium proliferatum*, як близькоспоріднений вид гриба *Fusarium moniliforme*, звідси й назва моніліформін [2]. Метаболіт продукують принаймні 30 інших видів грибів роду *Fusarium*, що вражають зернові [3-9].

Як повідомляється, в природі моніліформін зустрічається в зерні кукурудзи, пшениці, жита, тритікале, вівса та рису з різних частин світу. Моніліформін виявили в межах 16-25 мкг/г у відібраному вручну запліснявілому зерні кукурудзи із району Транскей [10], та у США [11, 12].

Моніліформін в концентраціях 4,2-530 мкг/г знайшли в ураженій грибами роду *Fusarium* кукурудзі в Польщі [13, 14]. Дослідження зразків продуктів харчування з кукурудзи та борошна з різних країн показали, що кукурудза з Гамбії і Південної Африки містила високі концентрації (3,2 та 2,7 мкг/г відповідно) моніліформіну, тоді як зразки з кукурудзи і кукурудзяного борошна американського походження містили низькі концентрації (0,05 та 0,25 мкг/г) моніліформіну [15, 16]. У польському зерні пшениці і тритікале, природно інфікованих видами *Fusarium*, містився моніліформін в середній кількості 5,9 і 3,5 мкг/г відповідно, не уражене на вигляд зерно пшениці і тритікале містило моніліформін в середньому 0,42 і 0,15 мкг/г [17, 18].

Токсичність моніліформіну. Моніліформін є дуже токсичним метаболітом. На додаток до своєї гострої токсичності для рослин [2], моніліформін виявився надзвичайно токсичним для різних видів тварин, за парентерального введення або через шлунковий зонд. П'ятидесятивідсоткова летальна доза (ЛД₅₀) моніліформіну для півників, курчат і каченят знаходиться в діапазоні від 3,7 до 5,4 мг/кг маси тіла [2], тоді як для щурів і мишей вона коливається від 42 до 50 мг/кг маси тіла. Клінічні ознаки токсичності моніліформіну спостерігаються в більшості постраждалих тварин і в цілому були описані, як прогресуюча м'язова слабкість, розлад дихання, ціаноз, інколи загибель [6].

Мета і завдання – провести порівняння ефективності різних методів виявлення токсину, та зробити висновки щодо доцільності використання того чи іншого методу для дослідження певного виду зразка.

Аналітичні методи для визначення моніліформіну. Для визначення моніліформіну у сільськогосподарській продукції були розроблені аналітичні методи. Багато дослідників використовували тонкошарову хроматографію (ТШХ, англ.TLC) з флуоресцентним проявом або кольоровою реакцією з нінгідрином [2], метилбензотіазолінгідразіном (МВТН) [3, 8, 9], або 2,4-динітрофенілгідразіном [7], щоб визначити моніліформін у грибкових культурах.

Експрес-метод тонкошарової хроматографії для аналізу моніліформіну в кукурудзі. Метод включає видобуток токсинів сумішшю ацетонітрил/вода (84/16), очищення, ТШХ із флуоресценцією та дериватизацією моніліформіну з орто-фенілендіаміном, межа кількісного визначення 0,1 мкг/г. Vesperer зі співавт. описали ще один розподіл методом ТШХ із флуоресценцією для скринінгу моніліформіну в кукурудзі. Токсин екстрагують сумішшю ацетонітрил/вода (80/20), очищення в аніон твердофазній колонці та хроматографія на пластинах ТШХ. Дериватизацію проводили з 4,5-дихлор-1,2-фенілендіаміном.

Газова хроматографія з мас-спектрометрією (GC-MS) – метод з межею виявлення з 5 пікограм похідних стандарту моніліформіну, однак метод не

набув широкого використання для визначення моніліформіну в кукурудзі або інших зернових культурах.

Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), як правило, краща за ТШХ завдяки її підвищеній чутливості і роздільній здатності. Thiel зі співавт. [10] використовували іонно-обмінну хроматографію для визначення моніліформіну в зразках кукурудзи. Токсин екстрагували дистильованою водою і визначення проводили без додаткового очищення або після очищення на колонках з диетиламіноетилом (DEAE)-Sephadex. Подібна процедура була використана для визначення моніліформіну у вибірці з кукурудзи, яка була пов'язана зі спалахом лейкоенцефаломалаяції у коней штату Пенсильванія, США [10]. Межа кількісного виявлення склала 10 мкг/г [5].

Scott та Lawrence [16] розробили інший метод ВЕРХ з використанням іонно-парного розподілу фаз для визначення моніліформіну у кукурудзі та пшениці. Токсин екстрагували сумішшю ацетонітрил/вода (95/5), концентрували та випаровували за температури близько 50 °С і очищали на Sep-Pak картриджах C₁₈. Повідомляється, що піки концентрації були на рівні від 0,05-1,0 мкг/г кукурудзи, з кількісним виявленням близько 0,01 мкг/г. Тим не менш, хроматографічне розділення було незначним. Thiel описав два методи ВЕРХ із застосуванням іонообмінного та іонного випаровування фаз для аналізу моніліформіну в кукурудзяних екстрактах. Межа виявлення стандарту була на рівні 20 нг. Метод базувався на тривалому очищенні екстракту (4 год) на ДЕАЕ-смоли сефадексу, яка не усуває основних з'єднань за ліофілізації. Sharman зі співавт. [15] описали чутливий метод ВЕРХ визначення моніліформіну в кукурудзі, пшениці, житі та тритикале. Зразки екстрагували сумішшю ацетонітрил/вода (95/5). Екстракти були сконцентровані та випарені за 40 °С, очищені оберненофазовими та аніонообмінними одноразовими колонками. Екстракти мали піки з концентрацією 0,25 і 0,5 мкг/г, а межа кількісного визначення становила 0,05 мкг/г.

Процедури очищення на одноразових SAX колонках із твердофазною екстракцією, описані іншими дослідниками. Тим не менш, C₁₈ колонки SPE використовуються в поєднанні із SAX колонками [15]. Ця процедура потребує меншої кількості розчинників і є більш ефективною. Буфер фосфату натрію (рН 5) був використаний Sharman та співавт. [15], або Filek і Lindner як розчинник для елювання моніліформіну через SAX колонки, що було більш ефективним ніж за використання інших розчинників.

Видобуток і очищення. Типові хроматограми стандарту моніліформіну (20 нг), екстракту моніліформіну із кукурудзи та забрудненого зерна кукурудзи (0,2 мкг/г) показано на рис. 2А-2С, відповідно. В усіх випадках, моніліформін проявлявся у вигляді гострого піку без похідних та добре відрізнявся від інших складових. Межа виявлення чистого моніліформіну (найменша кількість, яку можна було ідентифікувати) була 0,25 нг, яка нижчою ніж межа в 1 нг, про яку

повідомив Thiel, або 0,5 нг флуоресцентного похідного моніліформіну і 4,5-дихлор-1,2-фенілендіаміну Filek і Lindner. Хроматографічна відповідь була

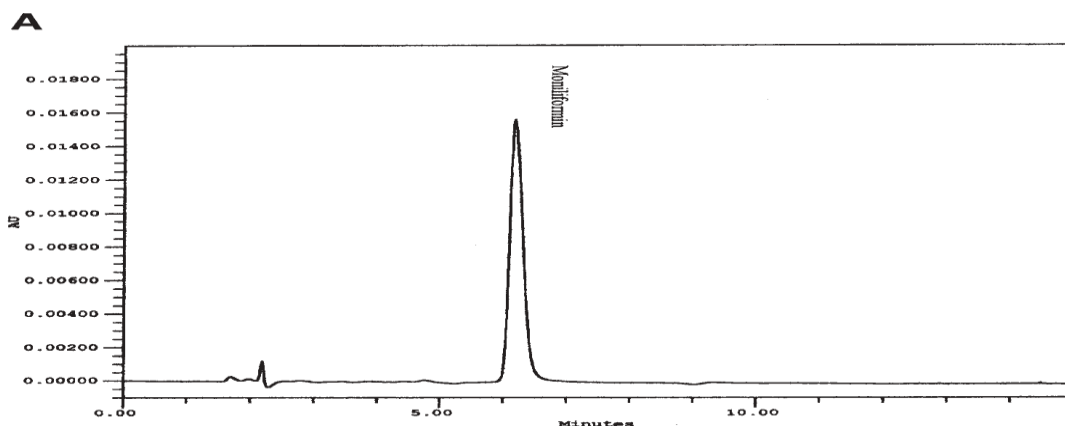


Рис. 2А. Хроматограма стандартного розчину моніліформіну (доза 20 нг).

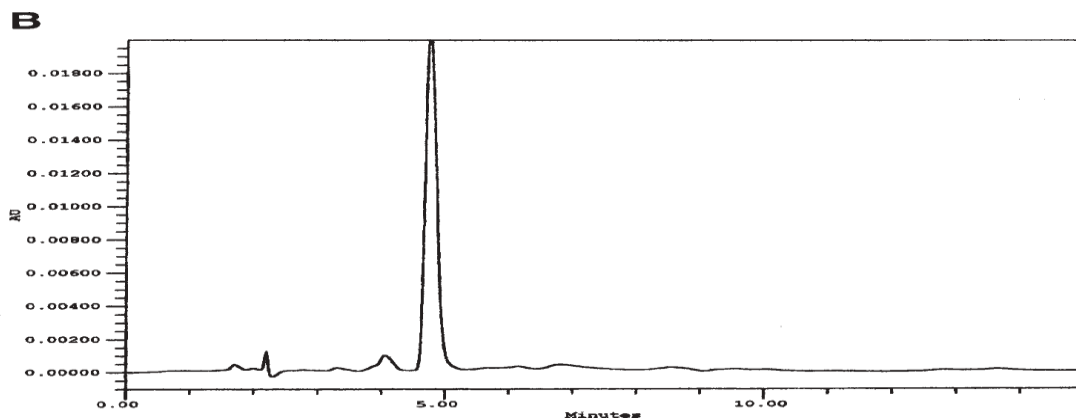


Рис. 2В. Хроматограма моніліформіну зі зразків кукурудзи, 0,05 г.

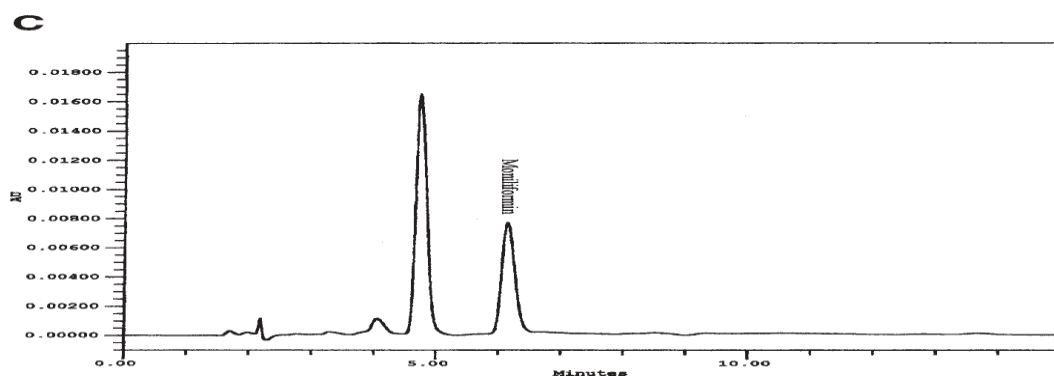


Рис. 2С. Хроматограма зразка кукурудзи забрудненого моніліформіном (0,2 мкг / г), 0,05 г кукурудзи.

лінійною ($R^2 = 1,00$) між 0,25 і щонайменше 20 нг моніліформіну, який вводили в колонку. Межа кількісного визначення моніліформіну в зерні кукурудзи становила 0,025 мкг/г, яка нижче ніж 0,1 мкг/г з повідомлення Shepherd and Gilbert. Середні темпи відновлення моніліформіну в зразках

кукурудзи та концентраціях в діапазоні від 0,025 до 1 мкг/г варіювали від 96 до 98 % (табл. 1). Ці темпи відновлення вищі, ніж 70-80 % про які повідомляли інші дослідники [15, 16]. Видобуток і темпи відновлення порівняли для піків моніліформіну в концентрації 1 мкг/г.

Відмічено, що 1 % водний розчин ТВАНС, і тетрабутиламоній-гідроксид (ТВАН) або тетрабутиламоній-гідрофосфат (ТВАНР) (Sigma Chemical Co, Сент-Луїс, Міссурі) дорівнюють 1 % розчину ТВАНС. Але видобуток з 1 % ТВАНС є кращою процедурою, а екстракти були чистішими і фільтрувалися швидше, ніж інші екстракти. Розчином ТВАНР екстрагували тверді зразки, а ТВАНС використовували для водних розчинів.

Таким чином, проводити фільтрацію під дією сили тяжіння дуже важко. В екстрактах утворюється товстий шар емульсії. Розчин ТВАН екстрагує жовті пігменти і велику кількість твердих частинок. Схожі середні темпи відновлення (близько 98 %) були записані з ТВАНС, можливе рішення сполучення ТВАНС і ТВАНР (таб.1).

Таблиця 1

Відновлення моніліформіну в зразках меленої кукурудзи

Доза моніліформіну, (мкг/г)	Середній час (%)	Діапазон (%)	Кількість проб (n)
0,025	96,5	86,3-109,9	9
0,050	96,2	83,0-109,1	12
0,250	97,2	88,3-102,2	12
1,0	97,8	95,4-105,7	15

Висновки: в усіх 3-х випадках були отримані подібні хроматограми. Моніліформін не виявлений в зразках, отриманих із ТВАН. Цілком можливо, що токсин був нестабільним в лужному рН (12,5) за екстракції розчинником. Порівняно з раніше опублікованими методами ВЕРХ для визначення моніліформіну в кукурудзі, цей метод був кращим з погляду ефективності та очищення зразка, що призводить до підвищення коефіцієнта вилучення і хроматографічного розділення. Час, необхідний для повного аналізу 15 зразків, становив приблизно 8-9 годин.

Процедури екстракції дослідного зразка та очищення, що описані вище, підходять для аналізу вмісту моніліформіну в зерні кукурудзи і кукурудзяній муці, але не підходять для кукурудзяних пластівців, чипсів та продуктів з екструдованої кукурудзи через зниження швидкості відновлення.

Список літератури.

1. Springer J.P. Structure and synthesis of moniliformin, a novel cyclobutane microbial toxin / [J.P. Springer, Clardy J., R.J. Cole, et al.] // *J. Am. Chem. Soc.*– 1974. – № 96. – P. 2267–2268.
2. Cole R.J. Toxin from *Fusarium moniliforme*: effects on plants and animals / [R.J. Cole, J.W. Kirsey, H.G. Culte, et al.] // *Science* .– 1973. – № 179. – P. 1324–1326.
3. Production of moniliformin by Canadian isolates of *Fusarium* / [J.M. Farber, G.W. Sanders, G.A. Lawrence, and P.M. Scott] // *Mycopathologia* .– 1988. – № 101. – P. 187–190.
4. Marasas W.F.O. Moniliformin production in *Fusarium* section *Liseola* / [W.F.O. Marasas, P.G. Thiel, C.J. Rabie, et al.] // *Mycologia* .– 1986. – № 78. – P. 242–247.
5. Marasas W.F.O. Toxicity and moniliformin production by four recently described species of *Fusarium* and two uncertain taxa / [W.F.O. Marasas, P.G. Thiel, E.W. Sydenham, et al.] // *Mycopathologia* .– 1991. – № 113. – P. 191–197.
6. Rabie C.J. Moniliformin, a mycotoxin from *Fusarium fusarioides* / [C.J. Rabie, A. Lubben, A.I. Louw, et al.] // *J. Agric. Food Chem.*– 1978. – № 26. – P. 375–379.
7. Rabie C.J. Moniliformin production and toxicity of different *Fusarium* species from Southern Africa / [C.J.Rabie, W.F.O.Marasas, P.G. Thiel, et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.*– 1982. – № 43. – P. 517–521.
8. Schutt F. Moniliformin production in the genus *Fusarium* / F. Schutt, H.I. Nirenberg, and G. Deml // *Mycotoxin Research* .– 1998. – № 14. – P.35–40.
9. Scott P.M. Formation of moniliformin by *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium culmorum* / [P.M. Scott, H.K. Abbas, C.J.Mirocha, et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* .– 1987. – № 53. – P.196–197.
10. Thiel P.G. Natural occurrence of moniliformin together with deoxynivalenol and zearalenone in Transkeian corn / P.G. Thiel, C. J. Meyer, and W.F.O. Marasas // *J. Agric. Food Chem.*– 1982. – № 30. – P.308–312.
11. Thiel P.G. Natural occurrence of moniliformin and fusarin C in corn screenings known to be hepatocarcinogenic in rats / [P.G. Thiel, W.C.A. Gelderblom, W.F.O. Marasas, et al.] // *J. Agric. Food Chem.*– 1986. – № 34. – P.773–775.
12. Kellerman T.S. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁ / [T.S. Kellerman, W.F.O. Marasas, P.G. Thiel, et al.] // *Onderstepoort J. Vet. Res.* – 1990. – № 57. – P.269–275.
13. Lew H. Occurrence of the mycotoxin moniliformin in maize (*Zea mays* L.) ears infected by *Fusarium subglutinans* (Wollenw. & Reinking) Nelson et al. / [H. Lew, J. Chelkowski, P. Pronczuk, and W. Edinger] // *Food Additives and Contaminants.*– 1996. – № 13. – P.321–324.
14. Logrieco A. Natural occurrence of beauvericin in preharvest *Fusarium subglutinans* infected corn ears in Poland. / [A. Logrieco, A. Moretti, A. Ritieni, et al.] // *J. Agric. Food Chem.*– 1993. – № 41. – P.2149–2152.
15. Sharman M. A survey of the occurrence of the mycotoxin moniliformin in cereal samples from sources worldwide. / M. Sharman, J. Gilbert, and J. Chelkowski // *Food Additives and Contaminants.*– 1991. – № 8. – P.459–466.

16. Scott P.M. Liquid chromatographic determination and stability of the *Fusarium* mycotoxin moniliformin in cereal grains / P.M. Scott and G.A. Lawrence // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* – 1987. – № 70. – P.850–853.
17. Lew H. Moniliformin in wheat and triticale grain / [H. Lew, J. Chelkowski, W. Wakulinski, and W. Edinger] // *Mycotox. Res.* – 1993. – № 9. – P. 66–71.
18. Yu S.R. A survey of moniliformin contamination in rice and corn from Keshan Disease endemic and non-KSD areas in China / [S.R. Yu, X.J. Liu, Y.H. Wang, and J. Liu] // *Biomed. Environ. Sci.* – 1995. – № 8. – P.330–334.

Хроматографические методы определения микотоксина монилиформина

А.В. Билан

В статье освещается синтез микотоксина монилиформина микроскопическими грибами, токсичность и последние исследования, проведенные исследователями. Освещены методы, доступные для аналитического определения, в том числе добыча, очистка и хроматографическое разделение, а также более быстрые методы для определения общего содержания монилиформина на основе иммунологического распознавания.

Хроматографические методы для определения монилиформина включают официальные методы, основанные на высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) – разделение флуоресцентных производных, методы скрининга на основе тонкослойной хроматографии (ТСХ) и современные методы исследования жидкостной хроматографии.

Ключевые слова: монилиформин, методы, кукуруза, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium moniliforme*.

Chromatographic methods definition mycotoxin moniliformin

A.V. Bilan

The article deals with the synthesis of mycotoxin moniliformin microscopic fungi, toxicity and recent research. It was given techniques available to the analytical determination, including the extraction, purification and chromatographic separation and faster methods for determining the total content moniliformin based on immunological recognition. Chromatographic methods for determination moniliformin include formal methods based on high performance liquid chromatography (HPLC) and separation of fluorescent derivatives, screening methods based on thin-layer chromatography (TLC) and modern methods of liquid chromatography.

Key words: moniliformin, methods, corn, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium moniliforme*.