

Takarmányok F-2 toxin (zearalenone) tartalmának kémiai vizsgálata

DRUCKER TAMÁS

Országos Takarmányminősítő és Ellenőrző Felügyelőség, Budapest

Érkezett: 1974. január 16

A *Fusarium* nemzetség fajai közül többről megállapították, hogy bizonyos körülmények között anyagcseréjük során állatra és emberre egyaránt veszélyes vegyületeket, toxinokat termelnek. Ezek közül hazánkban legismertebb az ösztrogén szindrómát kiváltó zearalenone, vagy használatosabb nevén F-2 toxin, amelyet főleg a *Fusarium graminearum* és a *Fusarium culmorum* penészfajok egyes törzsei képeznek. (1) Ezek kártétele az utóbbi években egyre gyakoribb. Ennek okát a megváltozott takarmánynövény gazdálkodásban kereshetjük. A nagyüzemi állattenyésztéssel egyidejűleg a fokozott takarmány szükséglet kielégítésére nagymértékben fejlesztették a takarmánynövények, kiváltképp a kukorica termesztését.

Az újabban termesztett nagyhozamú fajták hosszú tenyészidejük és monokultúrás termesztésük miatt fogékonyabbak a penészfertőzések, így a *Fusarium* fertőzése iránt is. A nem megfelelő raktározási körülmények további káros tényezőként hatnak.

Az F-2 kémiai összeg képlete: $C_{18}H_{22}O_5$, szerkezetileg 6-(10-hidroxi-6-oxotransz-1-undecenil)- β -rezorcilsav-lakton. Fehér, U. V. fény alatt zöldes-kéken fluoreszkáló, kristályos vegyület, olvadáspontja: 163–165 °C. U. V. maximumai (etanolban oldva): 236, 274 és 316 nm. Jól oldódik éterben, benzolban, diklórometánban, kloroformban és alkoholban, nem oldódik vízben és petroléterben. Egyaránt adja az olefin, keton, fenolos hidroxid és észtercsoport jellemző reakcióit (2). Hőtűrésére vonatkozóan *Mirocha* és társai végeztek vizsgálatokat, amely szerint vizes-metanolos közegben 111 °C-on enyhe, ennél magasabb hőmérsékleten nagyobb mérvű bomlás észlelhető (3).

A toxin szinte valamennyi háziállatra károsító hatással van, bár elhullást közvetlenül nem idéz elő. A takarmány visszautasítása, korai vetelés, álivarázás: vulva- és tejmirigy duzzanat utal a jelenlétére. A fenti tünetekkel járó károsodások következtében az állatállományban súly- és szaporulat csökkenés jön létre. Az F-2 toxin rendszeres vizsgálatát kártételének egyre gyakoribb jelentkezése tette szükségessé. Az azonos fajon belül előforduló atoxikus törzsek, a takarmány addigi tárolására vonatkozó ismeretek hiánya és a tartósítási céllal alkalmazott hő-, vegyszeres-, vagy egyéb kezelések miatt mikrobiológiai vizsgálattal a takarmány toxikusságát nem lehet megállapítani. Ezért F-2 mérgezésre gyanús esetekben célszerű a párhuzamos kémiai vizsgálat elvégzése.

Mirocha és munkatársai úttörő munkát végeztek a toxin kémiai vizsgálatában. Kukoricából történő kimutatására vékonyrétegekromatográfiás (3), ugyanebből és szénából történő kimutatására gázkromatográfiás módszert dol-

goztak ki (5). Az egyéb takarmány alapanyagok és keverékek vizsgálatára Eppley dolgozott ki eljárást, amelyben a vékonyrétegkromatográfiás analízist megelőzően oszlopkromatográfiás tisztítást javasol (6). E források alapján igyekeztünk olyan eljárást kidolgozni, amely rutinszerű és egyúttal minden használatos takarmány alapanyagra és keverékre alkalmazható. A munkaigényes oszlopkromatográfiás tisztítás helyett a megfelelően szelektív dibrom-kinon-klorimid alapú előhívószert alkalmaztuk, amely segítségével az F-2 toxin észlelése 5 ppm. takarmánybeli koncentráció felett biztonságossá válik még olyan esetekben is, amikor a kifejlesztett vékonyrétegkromatogramon az F-2 foltja U. V. lámpa alatt vizuálisan nem különül el az egyéb komponensektől. Ez a kimutatási határ nem minden esetben elegendő, mert sertéseknél a tüneteket kiváltó toxinkoncentráció 1 ppm körüli érték (szarvasmarháknál 14 ppm.). Ezért sertéstápok esetében, amennyiben a vékonyrétegkromatogram előhívása után bizonytalan az eredmény, célszerű elvégezni a minta gázkromatográfiás elemzését, amelynek kimutatási határa 0,5 ppm. alatt van.

Anyag és módszer

Szükséges vegyszerek:

Diklórmetán alt.

Petroléter v. hexán

10% vizet tartalmazó metanol

Kloroform, víztelenített

Benzol, víztelenített

Metanol, víztelenített

Dibrom-kinon-klorimid

Piridin, vízmentes

Bis-trimetil-szilil-acetamid

F-2 (zearalenone) standard.

1. Kivonás

40 g takarmányt finomra darálunk és diklórmetánnal Soxhlet készüléken 16 órán keresztül extraháljuk. A kapott extraktumot szirupsűrűségűre bepároljuk, majd 50 cm³ petroléterrel és 50 cm³ 10% vizet tartalmazó metanollal rázóülsőbe átmoszuk. Kirázás és elválasztás után a metanolos fázist, amennyiben sok pigment anyagot tartalmaz, ismételtén 25 cm³ petroléterrel kirázzuk és elválasztjuk. A metanolos fázist kinyerésesen bepároljuk.

2. Vékonyrétegkromatográfiás vizsgálat

A kivonás során nyert extraktumot víztelenített kloroformmal 4 cm³-re felhígítjuk és ebből 0,05 cm³-t, 110 C°-on egy órán át aktivált szilikagél lemezre (Kieselgel G, 0,3 mm vastagságban) felcseppentünk. Mellé felcseppentünk az F-2 standardból megfigyelhető mennyiségnyit (0,5–1 µg). 97:3 arányú kloroform-metanol, vagy 93:7 arányú benzol-metanol futtatószerrel kifejlesztjük a lemezt. Az F-2 folt kb. 0,5 R_f értéknél U. V. lámpa alatt zöldeskék színnel fluoreszkál. További ellenőrzésként befűjjük a lemezt frissen készített dibrom-kinon-klorimid 0,4%-os metanolos oldatával, majd 10%-os Na₂CO₃ vizes oldatával. Az F-2 folt látható fényben lassan az intenzív ibolya színből barnássárgává változik. Amennyiben sok olajos részt tartalmaz a felfuttatandó extraktum, előfordul, hogy az F-2 folt egy kicsit feljebb vándorol a vékonyréteg lemezen, mint a standard F-2 folt. Ilyen esetben az extraktum és a standard folt mellé cseppentünk fel extraktum és standard oldatot egy foltban és így futtassuk a lemezt.

3. Gázkromatográfiás vizsgálat

Az F-2 gázkromatográfiás analízise trimetilszilil-éter származék készítése után vált lehetővé. A származék készítéséhez bis-trimetilszilil-acetamid (továbbiakban BSA) szililező reagenst alkalmaztunk, amelynek kezelésénél vízmentes körülményeket kell biztosítani (9).

Szililezés:

A kivonási eljárás után nyert extraktumot 4 cm^3 kloroformban feloldjuk és ebből 1 cm^3 -t zárható fedéllel ellátott fiolába átviszünk, majd a kloroformot vízfürdőben nitrogén árammal elpárologtatjuk. A szárazra párolt kivonathoz $0,1\text{ cm}^3$ piridint (KOH-val szárított) és $0,1\text{ cm}^3$ BSA-t adunk. A lezárt fiolát az anyag feloldódásáig rázogattuk, 5 perc elteltével a szililezés befejeződik és az oldat gázkromatográfálásra alkalmas.

Gázkromatográfiás körülmények:

A gázkromatográfiás elemzéseket Chrom-31 típusú készülékkel végeztük, lángionizációs detektorral működtetve.

Kolonna: $4\text{ mm } \varnothing \times 3000\text{ mm}$ rozsdamentes acél.

Töltet: 5% SE(30, szilanizált chromosorb W (80–100 mesh) hordozón.

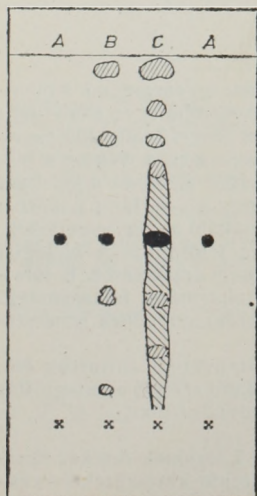
Termosztát hőfoka: $255\text{ }^\circ\text{C}$

Injektor hőfoka: $295\text{ }^\circ\text{C}$

N_2 vivőgáz térfogatsebessége: $30\text{ cm}^3/\text{perc}$.

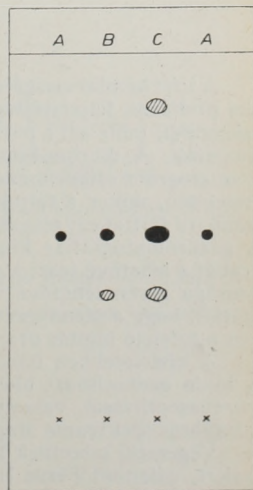
A megadott körülmények között $1\text{ }\mu\text{l}$ szililezett oldatot betáplálva a gázkromatográfba 31,57 perces retenciós időnél jelentkezik az F-2 csúcsa (1-es és 2-es ábra).

Az adatokból kiszámított korrigált retenciós térfogat: $420\text{ cm}^3/\text{perc}$.



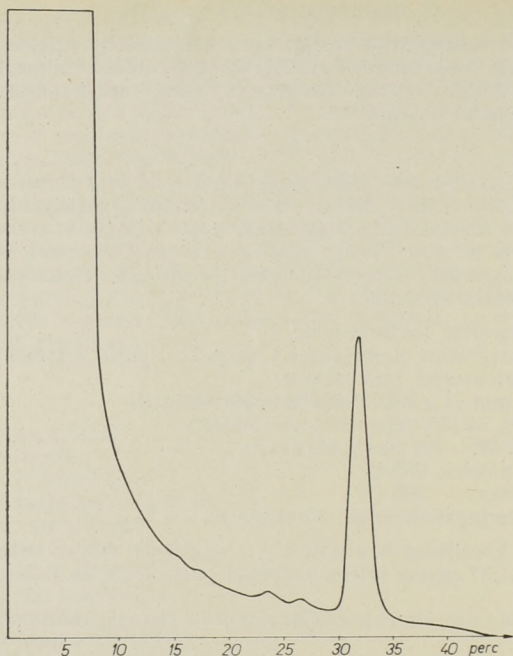
1. ábra

Benzol-metanol (5:95) futtatószerrel kifejlesztett kromatogram U. V. fényben látható képének sémája



2. ábra

Ugyanazonkromatogram előhívás után természetesen fényben látható képének sémája



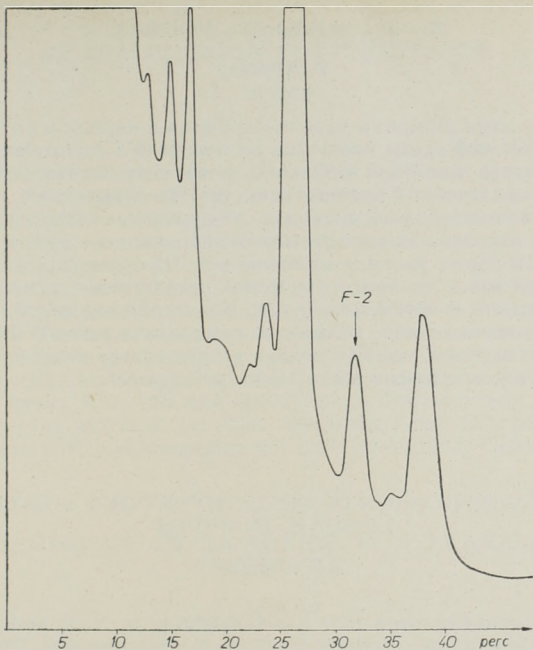
3. ábra
BSA-val szililezett F-2 standard oldat gázkromatogramja

Következtetések

A leírt kémiai vizsgálatok megbízhatóság tekintetében egyenrangúak a biológiai próbával, felszereltségi igényt és vizsgálati időt figyelembe véve előnyösebbek annál, mint azt a párhuzamosan végzett patkány és tengerimalac kísérletek igazolták. A dibróm-kinon-klorimid hatóanyagú előhívó szer a vékonyrétegkromatogram értékelésénél megnöveli a döntés biztonságát azokban a kérdéses esetekben, mikor a foltok szétválása nem tökéletes, vagy U. V. lámpa alatt a standard folttal egymagasságban levő más jellegű fluoreszkáló anyag jelentkezik. A gázkromatográfiás kimutatás érzékenységénél fogva felülmúlja a biológiai próbát s lehetővé teszi a toxin tartalom pontos mennyiségi értékelését. E tulajdonsága révén lehetővé válik a toxinnal szennyezett takarmány felhasználása azáltal, hogy a szennyezettség mértékének és az állat érzékenységének ismeretében megfelelő hígítás után etethető lesz.

A kísérletekben felhasznált F-2 toxint laboratóriumunkban állítottuk elő. A toxin azonosítását biológiai próbával, kémiailag vékonyrétegkromatográfiás összehasonlítással, valamint a kikristályosított toxin olvadáspontja, U. V. és infravörös spektruma alapján végeztük.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani Dr. Etter Lászlónak értékes tanácsaiért, valamint Fésűs Ilonának és Mayer Gézának a toxin kinyeréséhez szükséges tenyészetek előállításáért.



4. ábra
BSA-val szililezett F-2 pozitív sertéstáp kivonat gázkromatogramja

IRODALOM

- (1) Christensen, C. M., Nelson, C. H., Mirocha, C. J.: *Applied Microbiology*, 13, 653, 1965.
- (2) Urry, W. H., Wehrmeister, H. L., Hodge, E. B., Hidy, P. H.: *Tetrahedron Letters*, 27, 3109, 1966.
- (3) Christensen, C. M., Nelson, C. H., Mirocha, C. J.: *Applied Microbiology*, 3, 497, 1967.
- (4) Mirocha, C. J., Christensen, C. M., Nelson, C. H.: *Biotechnology and Bioengineering*, 10, 469, 1968.
- (5) Mirocha, C. J., Harrison, J., Nichols, A. A., McClintock: *Applied Microbiology*, 5, 797, 1968.
- (6) Eppley, R. M.: *Journal of the A. O. A. C.*, 1, 74, 1968.
- (7) Palyusik, M.: *Magyar Állatorvosok Lapja*, 6, 297, 1973.
- (8) Ványi, A., Dankó, Gy., Aldásy, P., Erős, T., Szigeti, G.: *Magyar Állatorvosok Lapja*, 6, 308, 1973.
- (9) Pierce Chemical Co.: *Silylation methods, technique and reagents*, Rockford, USA, 1967.

ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ТОКСИНА Ф - 2 (Zearalenone) В КОРМАХ

Т. Друккер

Некоторые виды фузариум размножающиеся в кормах в случае хороших условий окружающей среды продуцируют токсин Ф - 2 (zearalenone). Частые заболевания скотов токсином требовало, чтобы систематическим занимались химическим выявлением ядовитых веществ. Из химических исследований тонкослойной хроматографией возможно обнаружить концентрацию токсинов выше 5 ppm с использованием проявителя дибромхинонхлорида, как в основных материалах корма так и в комбикормах. При меньших концентрациях или для определения точного количества предлагается газохроматографическое исследование. В этом случае предел выявления токсина Ф - 2 находится ниже 5 ppm значение точного количества содержания токсина Ф - 2 в кормах является очень важным, так как только в этом случае возможно вычислить величину разжижения не способствующих заболеванию.

CHEMICAL INVESTIGATION OF THE CONTENT OF F-2 TOXIN (ZEARALENONE) IN FEEDS

T. Drucker

Some species of *Fusarium* that are multiplying in feeds under favourable environmental conditions, produce F-2 toxin (zearalenone). The increasing frequency of the occurrence of animal diseases caused by this toxin required regular investigations of the possibility of the chemical detection of the poisoning substance. Of the chemical tests, detection by thin layer chromatography with the use of dibromoquinone chlorimide as developing agent is suitable for the routine examination of both basic feeds and combined feeds provided the toxin concentration exceeds 5 mg/kg. In case of lower concentrations or when an accurate quantitative determination is needed, the use of the gas chromatographic method is suggested. In that case the detection limit of the F-2 toxin ranges below 0.5 mg/kg. The accurate knowledge of the contents of F-2 toxin in feeds is of prominent importance since the ratio of dilutions needed to reduce the toxin contents to a level causing already no intoxications can be calculated on the basis of this value.

CHEMISCHE UNTERSUCHUNG DES GEHALTES AN F-2 TOXIN (ZEARALENON) IN FUTTERMITTELN

T. Drucker

Einige Spezies von *Fusarium*, die sich unter günstigen Umgebungsbedingungen in Futtermitteln vermehren, fähig sind F-2 Toxin (Zearalenon) zu erzeugen. Die je öfter vorkommenden, durch dieses Toxin verursachten Tiererkrankungen erforderten eine Möglichkeit zum systematischen chemischen Nachweis des Giftstoffes. Von den chemischen Untersuchungen ist der Nachweis durch Dünnschichtchromatographie unter Anwendung von Dibromchinonchlorimid als Entwickler sowohl bei Grundfuttern wie auch bei Futtergemischen routinemässig durchführbar, falls die Toxinkonzentration 5 mg/kg übersteigt. Bei geringeren Toxinkonzentrationen oder zu einer genaueren quantitativen Bestimmung wird eine gaschromatographische Untersuchung empfohlen, wobei sich die Nachweisbarkeitsgrenze des F-2 Toxins unter 0,5 mg/kg befindet. Die genaue quantitative Kenntnis des Gehaltes von Futtermitteln an F-2 Toxin ist äusserst wichtig, weil man das Mass der schon keine Erkrankungen verursachenden Futtermittelverdünnungen nur auf Grund dieses Gehaltes berechnen kann.

L'ANALYSE CHIMIQUE DE LA TOXINE F-2 (ZÉARALÉNONE) DES FOURRAGES

T. Drucker

Quelques espèces de *Fusarium* croissant dans les fourrages produisent, entre conditions favorables d'environnement, de la toxine F-2 (zearalénone). Les maladies d'animaux causées par la toxine devenant de plus en plus fréquentes, il devient nécessaire de déceler régulièrement, par voie d'analyse chimique, la substance toxique. Parmi les méthodes chimiques, le déçèlement à chromatographie en couches minces, utilisant le réactif de p-dibromure quinone chlorimide, se prête à l'analyse de routine, dans le domaine de concentration de toxine supérieur à 5 p. p. m., dans les matières premières des fourrages ainsi que dans les fourrages complexes. A des concentrations plus faibles on recommande, afin d'effectuer l'analyse quantitative exacte, la chromatographie en phase gazeuse. Avec cette méthode la limite inférieure du déçèlement est au-dessous de 5 p. p. m. La connaissance exacte de la teneur en toxine F-2 des fourrages est très importante, car c'est le seul moyen qui permet de calculer les dilutions pas nocives aux animaux.