



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **101007** (13) **U**  
(51) МПК (2015.01)  
**G01N 30/00**  
**A61P 31/10** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2015 00787</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Білан Андрій Валерійович (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>02.02.2015</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>Білан Андрій Валерійович,</b>
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.08.2015</b>	вул. Героїв Чорнобиля, 5, кв. 118, м. Біла Церква, Київська обл., 09111 (UA)
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.08.2015, Бюл.№ 16</b>	

**(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЗЕАРАЛЕНОНУ**

**(57) Реферат:**

Спосіб визначення зеараленону на хроматографічних пластинах після ТШХ, який відрізняється тим, що використовують інші хімічні проявники з описом кольорів, які утворюються при реакції з токсином.

UA 101007 U



Корисна модель належить до галузі мікробіології, а саме до мікотоксикології, і може бути використана у лабораторіях ветеринарної медицини для діагностики та профілактики зеараленотоксикозу сільськогосподарських тварин та птиці.

Аналогом корисної моделі є спосіб визначення зеараленону в культурах грибів роду *Fusarium* [1], який базується на проведенні тонкошарової хроматографії і обробці пластин 20 % розчином сірчаної кислоти в метанолі. Недоліком цього способу є обмеженість в речовинах - проявниках, або реагентах.

Прототипом корисної моделі був вибраний спосіб визначення здатності грибів роду *Fusarium* продукувати зеараленон [2]. Фузарії культивують на зернових субстратах протягом 14 діб при температурі 24 °С, а потім від 2 до 8 тижнів при температурі 8-12 °С [2, 3]. Екстрагують зеараленон водним ацетоном, знежирюють екстракт гексаном та переекстрагують зеараленон в хлороформ і наявність токсину визначають методом тонкошарової хроматографії (ТШХ). За наявності значної кількості коекстрактивних речовин в екстракті, проводять повторну очистку. Хлороформний екстракт із токсином випаровують, залишок розчиняють в 100 мкл ацетону та наносять по 20 мкл на пластини для ТШХ "Sorbfill", як речовину-свідок на пластини наносять стандартний розчин кристалічного зеараленону. Хроматографію проводять в системі розчинників толуол-етилацетат-мурашина кислота (5:4:1). Після підйому фронту розчинників на висоту 10 см пластину виймають, висушують та обприскують 20 % розчином сірчаної кислоти в метанолі з наступним прогріванням за температури 120 °С протягом 5-10 хвилин. На хроматограмі зеараленон проявляється у вигляді плям жовтого кольору. Хроматографічна рухливість ( $R_f$ ) F-2 токсину досліджуваних зразків та стандарту складає 0,5.

Недоліками такого методу є обмеженість в речовинах проявників, а інколи і їх відсутність, що не дозволяє проявити зеараленон і переконатися у його присутності.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб визначення зеараленону шляхом використання інших речовин-реагентів, що забезпечить виявлення слаботоксигенних штамів [3].

Задача вирішується тим, що для прояву присутності зеараленону на пластинах ТШХ, використовують наступні проявники: 50 % сірчану кислоту в метанолі; свіжо приготований 1 %-ний водний розчин червоної кров'яної солі ( $K_3Fe(CN)_6$ ), 2 % водний розчин хлориду заліза (III) ( $FeCl_3$ ) (1:1) та концентрованої соляної кислоти (HCl); концентровану сірчану кислоту; розчин швидкої фіолетової Б солі; 0,7 %-ний водний сольовий буферний розчин pH 9,0 (суміш містила 50 мл 0,025 Н борату натрію і 4,6 мл 0,1 Н HCl); 50 %-ну сірчану кислоту; біс-діазотований бензидин; хлорид алюмінію; 20 % спиртовий розчин хлориду алюмінію; розчин сульфату церію (IV) (1 % розчин  $Ce(SO_4)_2$  в 3 Н сірчаної кислоти); розчин 2,4-динітрофенілгідразину (1 г –  $C_6H_6N_4O_4$ , концентрованої сірчаної кислоти - 7,5 мл, етанолу - 75 мл і води - 170 мл); розчин хлориду заліза (III) (3 % розчин в етанолі).

Етапи вирішення даного завдання наведено у нижчезазначених прикладах.

Приклад 1. Для розробки методу, як продуценти зеараленону використовують штами фузаріїв *F. culmorum* і *F. graminearum*, які є активними продуцентами зеараленону та *F. sporotrichiella* var. *roae* - із низькою токсигенною активністю. Після культивування, екстракції, очищення екстракту, хроматографії проводять підтвердження наявності зеараленону, як речовину-проявник використовують 50 % сірчану кислоту в метанолі із наступним нагріванням протягом 10-20 хв при 120 °С. Зеараленон спочатку жовтіє і пізніше стає коричневого кольору.

Приклад 2. Після культивування фузаріїв, екстракції, очищення екстракту та хроматографії пластинку сушать і послідовно обприскують свіжо приготованим 1 %-ним водним розчином червоної кров'яної солі ( $K_3Fe(CN)_6$ ), 2 % водним розчином хлориду заліза (III) ( $FeCl_3$ ) (1:1) та концентрованої соляної кислоти (HCl). Зеараленон проявляється у вигляді плям з інтенсивним синім забарвленням.

Приклад 3. Після культивування фузаріїв, екстракції, очищення екстракту та хроматографії, обприскують ТШХ пластини концентрованою сірчаною кислотою і нагрівають протягом 10 хв при 110 °С. Зеараленон утворює коричнево-чорні плями.

Приклад 4. Після культивування фузаріїв, екстракції, очищення екстракту та хроматографії, обробляють ТШХ пластини розчином швидкої фіолетової Б солі. Чутливість методу була на рівні 80 нг/г зеараленону і 200 нг/г для зеараленолу.

Приклад 5. Після культивування фузаріїв, екстракції, очищення екстракту та хроматографії, обприскують пластини 0,7 %-ним водним сольовим розчином буферного розчину pH 9,0 (суміш містила 50 мл 0,025 Н борату натрію і 4,6 мл 0,1 Н HCl). Зеараленон утворює коричнево-чорні плями.

Приклад 6. Після культивування фузаріїв, екстракції, очищення екстракту та хроматографії, пластини обробляють 50 %-ною сірчаною кислотою і нагрівають протягом 5 хв при 120 °С. Зеараленон утворював лілові плями під видимим світлом.

5 Приклад 7. Після культивування фузаріїв, екстракції, очищення екстракту та хроматографії, використовують реагент біс-діазотований бензидин, який утворює цегляно-червоний колір похідних зеараленону

Приклад 8. Після культивування фузаріїв, екстракції, очищення екстракту та хроматографії, використовують розпилення хлориду алюмінію для підвищення флуоресценції зеараленону.

10 Приклад 9. Після культивування фузаріїв, екстракції, очищення екстракту та хроматографії, обприскують пластини 20 % спиртовим розчином хлориду алюмінію і оглядають їх під ультрафіолетовими лампами з довжиною хвилі 366 і 254 нм, зеараленон проявлявся плямами яскраво-синьої флуоресценції, особливо в світлі 366 нм. Потім пластину нагрівають і знову розпилюють розчин хлориду алюмінію (без підігріву) і спостерігають при 366 і 254 нм УФ-світлі. Зеараленон мав яскраву синьо-фіолетову флуоресценцію з поліпшеним контрастом по

15 відношенню до фону після другого обприскування.

Приклад 10. Після культивування фузаріїв, екстракції, очищення екстракту та хроматографії, обробляють пластини розчином сульфату церію (IV) (1 % розчин  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  в 3 Н сірчаної кислоти). Зеараленон давав характерний жовто-коричневий колір після нагрівання протягом 10 хв при 110 °С.

20 Приклад 11. Після культивування фузаріїв, екстракції, очищення екстракту та хроматографії, обробляють пластини розчином 2,4-динітрофенілгідразину (1 г -  $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_4$  концентрованої сірчаної кислоти - 7,5 мл, етанолу - 75 мл і води - 170 мл). Зеараленон давав характерний темно-оранжевий колір після нагрівання протягом 10 хв при 110 °С.

25 Приклад 12. Після культивування фузаріїв, екстракції, очищення екстракту та хроматографії, обробляють пластини розчином хлориду заліза (III) (3 % розчин в етанолі). Зеараленон давав характерний світло-фіолетовий колір після нагрівання протягом 10 хв при 110 °С.

30 Отже, спосіб дозволить проявляти F-2 токсин, більшим переліком реагентів, які мають високу хімічну чутливість. Використання способу в насінневих інспекціях забезпечить зменшення забруднення токсигенними мікроміцетами зерна. Крім цього використання корисної моделі мікотоксикологами може застосовуватись при вивченні ареалу поширення продуцентів зеараленону.

Джерела інформації:

1. Правила визначення зеараленону в кормах // Методичні вказівки по санітарно мікологічній оцінці та поліпшенню якості кормів. - К., 1998. - С. 68-74.

35 2. Eugenio C.P., Christensen C.M., Mirocha C.J. Factors affecting production of the mycotoxins F-2 by *Fusarium roseum* // *Phytopathology*. - 1970. - V. 60. - № 7. - P. 1055-1057.

3. Mirocha C.J., Christensen C.M., Nelson G.H. F-2 (zearalenon) estrogenic mycotoxin from *Fusarium* // *Microorg. toxins. Acad. Press*. - 1971, - № 7. - P. 107.

#### 40 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення зеараленону на хроматографічних пластинах після ТШХ, який **відрізняється** тим, що використовують інші хімічні проявники з описом кольорів, які утворюються при реакції з токсином.

45