

王 刚,胡俊强,史建荣,等. 利用大孔吸附树脂与高速逆流色谱联用技术大量制备脱氧雪腐镰刀菌烯醇的方法[J]. 江苏农业科学,2018,46(23):207-211.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.053

# 利用大孔吸附树脂与高速逆流色谱联用技术 大量制备脱氧雪腐镰刀菌烯醇的方法

王 刚, 胡俊强, 史建荣, 徐剑宏

[江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地/农业农村部农产品质量安全风险评估实验室(南京)/江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心/江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所,江苏南京 210014]

**摘要:**脱氧雪腐镰刀菌烯醇是一类危害严重的真菌毒素,针对其毒理学研究与脱毒研究需要大量毒素纯品。采用大孔吸附树脂与高速逆流色谱联用技术,从禾谷镰刀菌 PH-1 的大米培养物中提取并纯化脱氧雪腐镰刀菌烯醇。首先采用 85% 甲醇溶液提取毒素,之后以 XAD-4 大孔吸附树脂柱初步纯化,用 30% 甲醇溶液洗脱;初步纯化产物以高速逆流色谱进行精制,采用乙酸乙酯-水(1:1)溶剂系统进行分离,脱氧雪腐镰刀菌烯醇在 150 min 被洗脱,最终产物纯度为 96.78%,回收率为 76.20%。采用该方法可以从 1 000 g 大米发酵物中一次提取出 500 mg 以上毒素纯品。

**关键词:**脱氧雪腐镰刀菌烯醇;分离纯化;大孔吸附树脂;高速逆流色谱

**中图分类号:**S432.4<sup>+</sup>4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)23-0207-05

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(*deoxynivalenol*,简称 DON)又称呕吐毒素,是一种危害巨大的真菌毒素,主要由镰刀菌产生,常见于受赤霉病侵害的谷物籽粒中。针对 DON 的毒理学研究表明,DON 可以阻滞细胞周期并引发细胞凋亡,进而对哺乳动物的肠道上皮细胞产生毒害,阻碍肠道上皮细胞增殖与分化,同时 DON 也会引发肠道炎症反应,造成呕吐、腹泻等病

症<sup>[1]</sup>。相关研究表明,DON 还具有血液毒性、骨髓毒性以及致癌性<sup>[2-3]</sup>,因此 DON 毒素对于食品安全存在重大威胁。根据最新的 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》,我国对谷物及其制品中 DON 的限量标准为 1 000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

江苏省近年来谷物中 DON 毒素污染情况严重,根据笔者调研结果,2015、2016 年江苏省小麦中 DON 毒素平均含量分别为 $(2\,087 \pm 112) \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $(2\,601 \pm 126) \mu\text{g}/\text{kg}$ ,其平均含量已超过限量标准 2 倍,超标率均在 70% 以上<sup>[4]</sup>。由于 DON 毒素污染,农户近年来蒙受了重大经济损失。因此,DON 的脱毒处理手段对于保障谷物食品安全、维护农户经济利益具有重大意义。

针对 DON 毒素的毒理学研究与脱毒研究需要大量 DON 纯品,但目前 DON 纯品价格极高,严重限制了相关研究的开

收稿日期:2018-06-29

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(17)1003];国家自然科学基金(编号:31471662、U1604234);江苏省自然科学基金青年基金(编号:BK20160595)。

作者简介:王 刚(1987—),男,江苏南京人,博士,助理研究员,主要从事真菌毒素的消减方法研究。E-mail:njcpuww@126.com。

通信作者:徐剑宏,博士,研究员,主要从事真菌毒素评估与治理研究。E-mail:xujianhongnj@126.com。

菌的联合毒性[J]. 农药,2011,50(5):365-367,384.

[8]汤 森,曾鸿鹄,王大力,等. 四环素对费氏弧菌产生毒物兴奋效应(Hormesis)的时间关系和机制[J]. 环境化学,2015,34(11):1981-1987.

[9]石 颖,丁 武,张志超,等. 应用青海弧菌评价常见 8 种兽药的急性毒性[J]. 西北农业学报,2012,21(6):17-21.

[10]Liu S S, Wang C L, Zhang J, et al. Combined toxicity of pesticide mixtures on green algae and photobacteria[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2013, 95(1): 98-103.

[11]郭柔杉,李 翔,陈 婧,等. 采用发光菌法评价果汁中亚硝酸钠生物毒性[J]. 食品与发酵工业,2012,38(2):198-202.

[12]郭柔杉,李 翔,潘 力. 发光费氏弧菌对常用色素的生物毒性评价[J]. 食品工业科技,2013,34(2):210-213.

[13]李 翔,潘 力,王 斌. 黄曲霉毒素对费氏弧菌发光的影响[J]. 微生物学报,2011,51(12):1669-1674.

[14]杨 洁,张金萍,徐亚同,等. 11 种农药对淡水发光细菌青海弧

菌 Q67 的毒性研究[J]. 环境污染与防治,2011,33(4):20-24.

[15]董玉瑛,雷炳莉,马 静,等. 助溶剂对发光菌生物毒性测试的影响[J]. 化工学报,2006,57(3):636-639.

[16]刘树深,刘 芳,刘海玲. 20 种水溶性有机溶剂对发光菌的毒性效应[J]. 中国环境科学,2007,27(3):371-376.

[17]贾继民,张建江,王 君,等. 海洋发光菌应用于三种有机毒物毒性效应的评估[J]. 实用预防医学,2012,19(9):1299-1301.

[18]袁东星,邓永智,林玉晖. 蔬菜中有机磷农药残留的发光菌快速检测[J]. 环境化学,1997,16(1):77-81.

[19]马 勇,黄 燕,贾玉玲,等. 发光细菌急性毒性测试方法的优化研究[J]. 环境污染与防治,2010,32(11):48-52.

[20]Villa S, Migliorati S, Monti G S, et al. Toxicity on the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* (Beijerinck). II: Response to complex mixtures of heterogeneous chemicals at low levels of individual components[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2012, 86(4):93-100.

展。由于 DON 毒素立体结构复杂,手性中心众多,因此针对 DON 的全合成工艺至今仍未开发成功。国内外均有关于从镰刀菌发酵物中提取并分离 DON 毒素的报道,其分离手段包括硅胶柱色谱、制备型液相以及高速逆流色谱等,其产量最高达每批次 100 mg 左右<sup>[5-8]</sup>。

大孔吸附树脂是一类内部具有孔洞结构的交联高分子材料,由于其具有高吸附容量以及可再生的优点,因此被广泛应用于天然产物的分离纯化中,其纯化原材料来源包括细菌发酵液<sup>[9]</sup>、真菌发酵液<sup>[10-11]</sup>、植物组织<sup>[12-13]</sup>甚至动物组织<sup>[14]</sup>。然而单一运用大孔吸附树脂难以获得高纯度化合物<sup>[15]</sup>,往往还需要后续精制纯化手段。高速逆流色谱是一类基于液液分配原理的液相色谱系统<sup>[16]</sup>,尤其适合天然产物的纯化。大孔吸附树脂与高速逆流色谱均具有成本低、适用范围广的优势,因此,关于二者联用分离纯化天然产物的研究时常见诸报道<sup>[17-18]</sup>。

本研究介绍了 1 种大孔吸附树脂层析与高速逆流色谱联用的技术;首先接种禾谷镰刀菌菌株 PH-1 至大米培养基中进行固体发酵,之后以甲醇水溶液(体积分数为 85%)提取发酵物中的 DON,提取物经大孔吸附树脂初步纯化后,用高速逆流色谱进行精制,最终获得纯度达 96.78% 的 DON 化合物,每批次可以获得 500 mg 以上的毒素纯品,为后续毒素降解研究提供了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

1.1.1 试剂 DON 毒素标准品,购自上海 Romer Labs 公司;色谱纯甲醇,购自德国 Merck 公司;CDCl<sub>3</sub>,购自美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司;其他试剂均为国产分析纯。

大孔吸附树脂 XAD-2、XAD-4、XAD-7HP、XAD-11180、XAD-1180N 与阴离子交换树脂 FPA91-OH、IRA67 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。大孔吸附树脂在使用之前均用甲醇浸泡 24 h,再用去离子水彻底冲洗至流出液不含甲醇。阴离子交换树脂在使用之前以饱和 NaCl 溶液浸泡 24 h,再用去离子水彻底冲洗。

大米培养基成分为 350 g 大米与 120 mL 去离子水,混合均匀后进行高压蒸汽灭菌处理。

1.1.2 仪器 主要仪器包括 OptiChrome-300 PLUS(高速逆流色谱仪),江阴逆流科技公司;Waters e2695 高效液相色谱仪(HPLC),美国 Waters 公司;AB Sciex 5600(高分辨质谱仪),美国 AB Sciex 公司;DRX-600(核磁共振波谱仪),德国 Bruker 公司。

### 1.2 DON 的分析定量方法

利用 Waters e2695 高效液相色谱仪检测样品中的 DON 含量,采用外标法对 DON 进行定量。色谱柱为 ACE C<sub>18</sub> 柱[十八烷基硅烷(ODS),4.6 μm × 150 mm,5 μm,Phenomenex],柱温为 35 ℃,流动相为 33% 甲醇水溶液,流速为 0.6 mL/min,检测波长为 218 nm。该色谱条件下 DON 的保留时间为 6.8 min。

每组试验均设置 3 组平行试验,最终检测结果以 3 组试验的平均值表示。

DON 在树脂上的吸附率用如下公式表示:

$$Q_e = \frac{V_0(C_0 - C_e)}{m}$$

式中: $Q_e$  表示树脂吸附容量(μg/g); $C_0$ 、 $C_e$  分别表示样品溶液初始 DON 浓度以及吸附后残留 DON 浓度(μg/mL); $V_0$  表示初始样品溶液体积(mL); $m$  表示树脂质量(g,干质量)。

### 1.3 固体发酵与样品制备

将禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)接种至 PDA 培养基上,于 25 ℃ 培养 7 d,将菌丝体接种至大米培养基上,于 25 ℃ 培养 21 d。

发酵结束后将大米烘干,粉碎;用 1 L 85% 甲醇溶液提取 DON 毒素,共提取 2 次,合并提取液,减压蒸馏至干,残余油状物即为供试样品。

### 1.4 大孔吸附树脂柱色谱参数优化

1.4.1 不同树脂对 DON 的吸附容量测定 用 10% 乙醇溶液重悬供试样品,至 DON 终浓度约为 500 μg/mL。取 50 mL 溶液加入 250 mL 三角烧瓶中,加入 1 g 预处理树脂,室温下振荡吸附 12 h。取上清溶液,以甲醇稀释 10 倍后用 HPLC 法检测 DON 含量。

1.4.2 XAD-4 树脂吸附条件的优化 取 1 g 预处理的 XAD-4 树脂,加至 50 mL 供试溶液中,分别调节供试溶液 pH 值(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)以及吸附温度(25、30、35、40 ℃),振荡吸附 12 h。取上清溶液,以甲醇稀释 10 倍后用 HPLC 法检测 DON 含量。

1.4.3 吸附等温线方程 分别取 1 g 预处理的 XAD-4 树脂,加入含有不同浓度 DON 的供试溶液,以最佳吸附条件静态吸附 2 h,取上清用 HPLC 法检测残余 DON 含量,计算不同浓度下树脂吸附容量,并作出吸附等温线。

采用 Langmuir 吸附模型与 Freundlich 吸附模型拟合吸附行为。

Langmuir 吸附方程:

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{1}{Q_m} C_0 + \frac{1}{Q_m \times K_L}$$

Freundlich 吸附方程:

$$\ln Q_e = \frac{1}{n} \ln C_e + \ln K_F$$

式中: $Q_e$  为吸附容量; $C_e$  为吸附达到平衡时溶液中 DON 浓度; $Q_m$  为 Langmuir 模型中的理论最大吸附量; $K_L$ 、 $K_F$ 、 $1/n$  为经验常数。

1.4.4 洗脱条件的优化 称取 9 份已吸附饱和的 XAD-4 树脂各 1 g,分别用不同质量浓度的乙醇溶液进行解吸附,检测洗脱溶液中的 DON 浓度。

确定最优洗脱浓度后,取 20 g 吸附饱和的 XAD-4 树脂装入玻璃层析柱,以乙醇溶液进行洗脱,洗脱流速为 2 BV/h,分部收集流出液,检测 DON 浓度。流出液经减压蒸馏至干,供高速逆流色谱分离纯化。

### 1.5 高速逆流色谱纯化 DON 毒素

将去离子水与等体积乙酸乙酯混合,充分混匀后静置过夜分层,分离上下相,即为高速逆流色谱溶剂系统。将上相以 20 mL/min 流速泵入高速逆流色谱,随后以 1.5 mL/min 流速泵入下相,同时开启旋转,转速设置为 1 040 r/min,待系统平衡。

将经大孔吸附树脂处理后的样品用少量下相溶解,通过进样阀泵入高速逆流色谱仪,以 1.5 mL/min 流速洗脱,检测波长为 220 nm。

分部收集流出液,合并富含 DON 的馏分,通过 N<sub>2</sub> 吹扫去除部分溶剂,剩余溶液置于冷藏室进行结晶,将得到的晶体分别以色谱纯甲醇或 CDCl<sub>3</sub> 溶解,用 LC-MS(液相色谱-质谱联用)与 NMR(核磁共振)法测定其分子量及分子结构。

2 结果与分析

2.1 大孔吸附树脂的筛选

本研究选取了 5 种大孔吸附树脂与 2 种阴离子交换树脂(表 1),分别检测其对发酵提取物中 DON 的吸附能力。静态吸附试验结果表明,XAD-4 树脂对于 DON 的吸附容量最高,达 545.76 μg/g(图 1),因此选用 XAD-4 树脂作为吸附

剂进行 DON 毒素的纯化。

从表 1 可以看出,阴离子交换树脂对于 DON 的吸附能力明显低于大孔吸附树脂,考虑到阴离子交换树脂的吸附取决于被吸附物质的解离状态,因此,笔者推测在中性 pH 值条件下 DON 主要以分子形式存在。

2.2 吸附参数的优化

由于环境因素如温度、pH 值等均会对大孔吸附树脂的吸附容量产生影响,因此对吸附时的温度、pH 值均进行了初步优化。从图 2-A 可以看出,随着温度的上升,DON 的吸附容量逐渐降低。由于吸附过程在通常情况下是放热行为,因此该现象符合勒夏忒列原理。从图 2-B 可以看出,当吸附溶液 pH 值在 7~8 范围内时,DON 的吸附容量最高,但在一个较广泛的 pH 值 5~9 范围内,DON 的吸附容量没有明显变化,说明 DON 在此 pH 值范围内并无明显解离现象。

表 1 选用的树脂及其理化性质

| 树脂型号      | 性质         | 平均孔径<br>(nm) | 比表面积<br>(m <sup>2</sup> /g) | 孔隙容量<br>(mL/g) | 基质           |
|-----------|------------|--------------|-----------------------------|----------------|--------------|
| XAD-2     | 非极性大孔吸附树脂  | 9            | 300                         | 0.65           | 苯乙烯-二乙烯基苯高聚物 |
| XAD-4     | 非极性大孔吸附树脂  | 10           | 750                         | 0.98           | 苯乙烯-二乙烯基苯高聚物 |
| XAD-7HP   | 弱极性大孔吸附树脂  | 30~40        | 380                         | 0.50           | 聚丙烯酸酯        |
| XAD-1180  | 非极性大孔吸附树脂  | 20           | 800                         | 1.82           | 苯乙烯-二乙烯基苯高聚物 |
| XAD-1180N | 非极性大孔吸附树脂  | 30~40        | 450                         | 1.40           | 苯乙烯-二乙烯基苯高聚物 |
| FPA91-OH  | 强碱性阴离子交换树脂 | 30           | ND                          | 0.80           | 聚丙烯酸酯        |
| IRA67     | 弱碱性阴离子交换树脂 | ND           | ND                          | 1.60           | 聚丙烯酸酯        |

注:ND 表示无可靠数据。

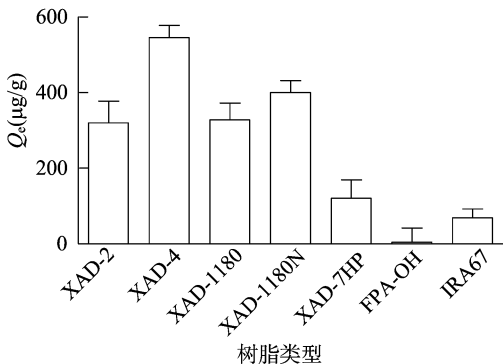


图1 不同树脂对 DON 吸附容量的影响

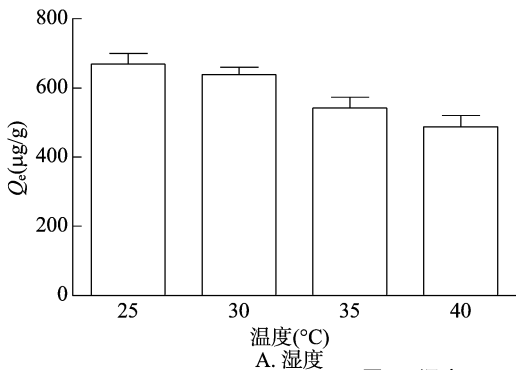


图2 湿度、pH 值对 DON 吸附容量的影响

2.4 洗脱条件的优化

由于乙醇溶液具有廉价易得、低毒环保的优点,因此通常

情况下均采用乙醇溶液作为大孔吸附树脂的洗脱溶液。本试验中筛选了质量浓度范围在 10%~100% 的乙醇溶液,分别

表 2 XAD-4 树脂对 DON 吸附行为的 Langmuir 与 Freundlich 等温吸附模型参数

| Langmuir 吸附模型 |                                    | Freundlich 吸附模型 |  |
|---------------|------------------------------------|-----------------|--|
| 类别            |                                    | 类别              |  |
| 线性方程          | $C_e/Q_e = 0.001\ 3C_e + 0.031\ 6$ | 线性方程            | $\ln Q_e = 0.245\ 1\ln C_e + 5.090\ 2$ |
| $Q_{\max}$    | 769.23                             | $K_F$           | 162.42                                 |
| $K_L$         | 0.041                              | $1/n$           | 0.245 1                                |
| $R^2$         | 0.999 7                            | $R^2$           | 0.790 4                                |

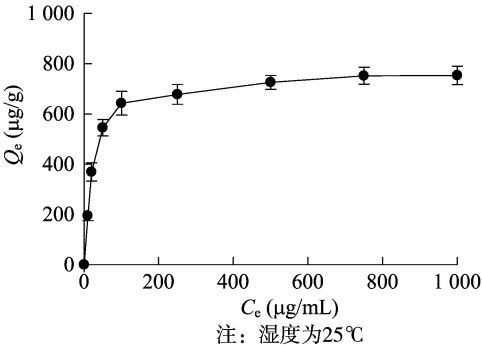
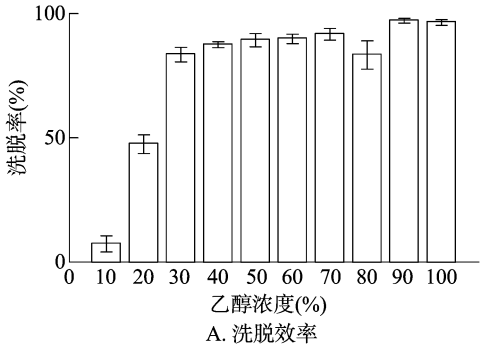


图3 XAD-4 树脂对于溶液中 DON 的吸附等温线  
考察其对 XAD-4 树脂吸附 DON 的洗脱能力。从图 4-A 可以看出,当乙醇浓度达 30% 时,其对 DON 的洗脱率已超过



80%,因此,选择 30% 乙醇溶液作为洗脱溶剂。  
之后又采用 20 mL 大孔吸附树脂柱进行动态洗脱,洗脱溶剂为 30% 乙醇溶液,洗脱曲线见图 4-B,可见 DON 在 3 BV 范围内即可基本洗脱完毕。  
2.5 高速逆流色谱的最终纯化

采用高速逆流色谱作为最终纯化手段,选用相关文献报道的溶剂体系<sup>[7]</sup>,以乙酸乙酯-水(体积比=1:1)作为双相体系,采用有机相作为固定相,以水相作为流动相,对经过大孔吸附树脂初步纯化的样品进行精制。从图 5 可以看出,DON 组分在 150 min 开始流出,至 180 min 基本结束。收集相关组分,经过 N<sub>2</sub> 吹扫出去部分溶剂后,采用低温结晶的方法获得 DON 晶体,通过 HPLC 及 NMR 检测其纯度,得到的 DON 晶体纯度达 96.78% (图 6),最终回收率为 76.20%。

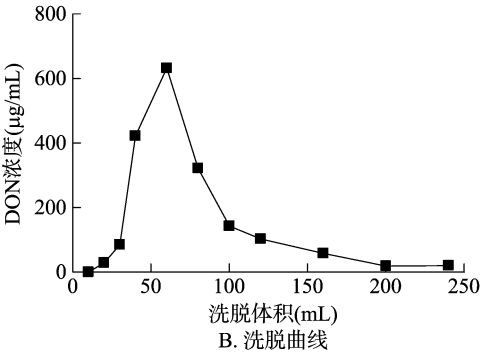


图4 不同质量浓度乙醇溶液对 DON 的洗脱效率与洗脱曲线

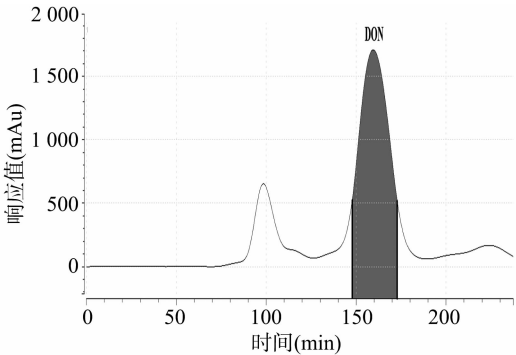


图5 高速逆流色谱分离 DON 色谱

3 结论与讨论

本研究介绍了 1 种通过大孔吸附树脂柱层析与高速逆流色谱联用技术分离纯化真菌毒素 DON 的方法,通过该方法可以获得纯度达 96.78% 的 DON 纯品,并且一个批次可以制备超过 500 mg 毒素纯品。该方法较为简便,并且步骤较少,易于放大,因此有助于快速获得大量毒素纯品以供后续相关研究。  
目前,大孔吸附树脂纯化技术常用于液体样品的净化处理,但限于 DON 毒素在液体培养基中产量较低,因此本研究

采用大米发酵物作为毒素来源,导致杂质较多,前处理步骤较为繁琐。在后续研究中,笔者计划对液体发酵条件进行优化,同时拟对高产毒菌株进行基因操作,以期获得能够在液体培养基中大量产生毒素的菌株,便于进一步放大毒素生产规模。

参考文献:

[1] Payros D, Alassane - Kpemb I, Pierron A, et al. Toxicology of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms[J]. Archives of Toxicology,2016,90(12):2931 - 2957.  
[2] Marin S,Ramos A J,Cano - Sancho G,et al. Mycotoxins:occurrence, toxicology, and exposure assessment [J]. Food and Chemical Toxicology,2013,60:218 - 237.  
[3] Escriva L, Font G, Manyes L. In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade;a review [J]. Food and Chemical Toxicology,2015,78:185 - 206.  
[4] Dong F,Wang S,Yu M,et al. Natural occurrence of deoxynivalenol and deoxynivalenol - 3 - glucoside in various wheat cultivars grown in Jiangsu province, China[J]. World Mycotoxin Journal,2017,10 (3):285 - 293.  
[5] 郭文博,韩 铮,杨俊花,等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇的制备与鉴定 [J]. 分析测试学报,2015,34(8):928 - 933.

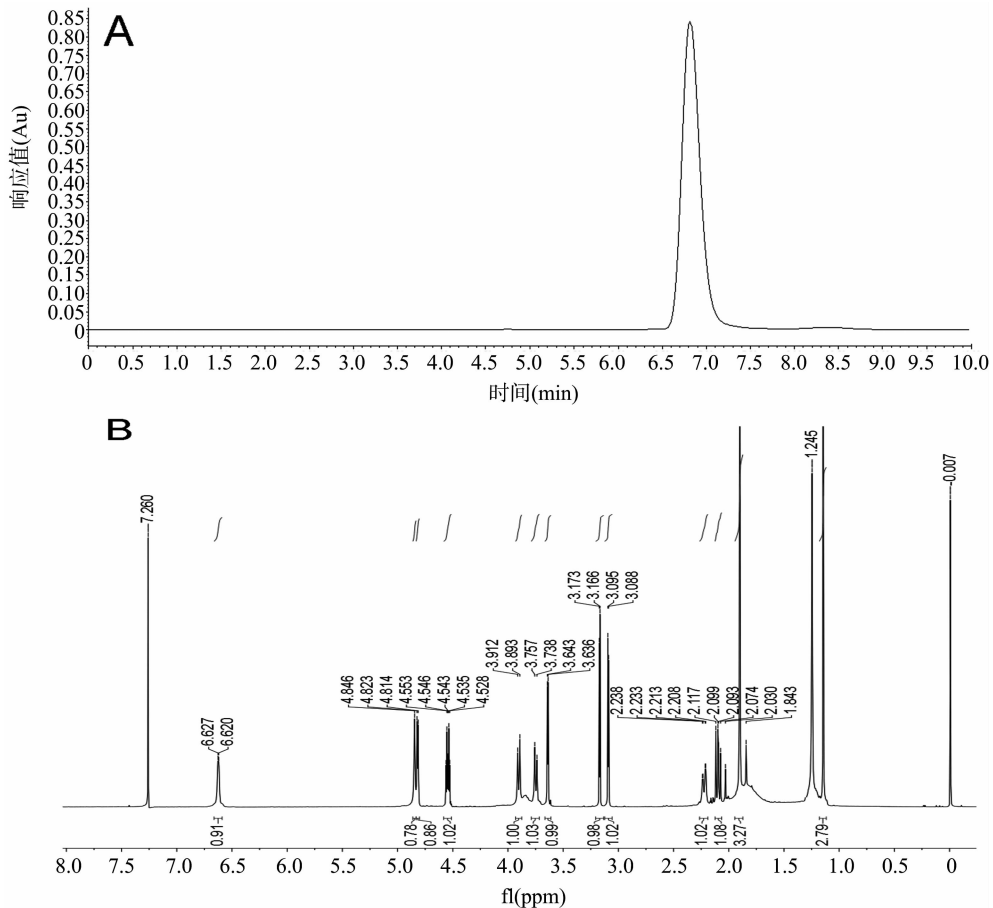


图6 纯化 DON 产品的 HPLC 结果(A)与 <sup>1</sup>H-NMR 波谱(B)

- [6] Miller J D, Taylor A, Greenhalgh R. Production of deoxynivalenol and related compounds in liquid culture by *Fusarium graminearum* [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1983, 29(9): 1171–1178.
- [7] He Jian Wei, Yang R, Zhou Ting, et al. Purification of deoxynivalenol from *Fusarium graminearum* rice culture and mouldy corn by high-speed counter-current chromatography [J]. Journal of Chromatography a, 2007, 1151(1/2): 187–192.
- [8] Zhao Z, Song S, Liu N, et al. Large-scale preparation and multi-dimensional characterization of high-purity mycotoxin deoxynivalenol in rice culture inoculated with *Fusarium graminearum* [J]. Analytical Methods, 2014, 6(17): 6651–6657.
- [9] Bai C L, Zhao G R. Separation of salvianic acid A from the fermentation broth of engineered *Escherichia coli* using macroporous resins [J]. Journal of Separation Science, 2015, 38(16): 2833–2840.
- [10] Du Z Q, Wang K, Tao Y, et al. Purification of baicalin and wogonoside from *Scutellaria baicalensis* extracts by macroporous resin adsorption chromatography [J]. Journal of Chromatography B, 2012, 908: 143–149.
- [11] Yao L Y, Zhu Y X, Liu C Q, et al. Preparative separation and purification of fumigaclavine C from fermented mycelia of *Aspergillus fumigatus* CY018 by macroporous adsorption resin [J]. Journal of Chromatography B, 2015, 989: 122–128.
- [12] Leyton A, Vergara-Salinas J R, Perez-Correa J. Purification of phlorotannins from *Macrocytis pyrifera* using macroporous resins [J]. Food Chemistry, 2017, 237: 312–319.
- [13] Li H J, Liu Y, Yi Yu Etao, et al. Purification of quercetin-3-O-sophoroside and isoquercitrin from *Poa cynosuroides* leaves using macroporous resins followed by Sephadex LH-20 column chromatography [J]. Journal of Chromatography B, 2017, 1048: 56–63.
- [14] Zhang F X, Wang Z, Xu S Y. Macroporous resin purification of grass carp fish (*Ctenopharyngodon idella*) scale peptides with *in vitro* angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory ability [J]. Food Chemistry, 2009, 117(3): 387–392.
- [15] Shan T, Sun W, Wang X, et al. Purification of ustiloxins a and B from rice false smut balls by macroporous resins [J]. Molecules, 2013, 18(7): 8181.
- [16] Foucault A P, Chevotot L. Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification [J]. Journal of Chromatography a, 1998, 808(1): 3–22.
- [17] Qu L, Xin H, Su Y, et al. Combined application of macroporous resin and high speed counter-current chromatography for preparative separation of three flavonoid triglycosides from the leaves of *Actinidia valvata* Dunn [J]. Journal of Separation Science, 2012, 35(7): 883–892.
- [18] Shaheen N, Yin L, Gu Y X, et al. Separation of isorhamnetin 3-sulphate and astragalin from *Flaveria bidentis* (L.) Kuntze using macroporous resin and followed by high-speed countercurrent chromatography [J]. Journal of Separation Science, 2015, 38(11): 1933–1941.