

ESZTERHÁZY KÁROLY FŐISKOLA
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
Élelmiszertudományi Intézet
Kémiai, Borászati kémiai és Borászat Tanszék
Kémia alapszak

Mikotoxinok és metabolitjaik felhalmozódásának vizsgálata a
házityúk (*Gallus gallus domesticus*) szervezetében

Készítette:

Molnár Zsófia
kémia BSc

Konzulens:

B. Tóth Szabolcs
adjunktus

2012

Tartalom

Bevezetés.....	2
A mikotoxinok általános megjelenése magyarországi viszonylatban	3
Kémiai struktúra alapján 5 csoportba oszthatóak:.....	6
Ergotalkaloidok.....	6
Trichotecének.....	6
Aflatoxinok	7
Fumonizinek	7
Ochratoxinok	8
Emberi szervezetbe a toxin bejutása a táplálkozás által :	10
Zearalenon:.....	11
Fusarium graminearum (Gibberella Zea), F. culmorum fertőzések	11
HPLC.....	13
Kromatográf főbb részei:.....	13
HPLC-MS készülék általános felépítése	14
Házityúk (Gallus gallus domesticus)	17
A házityúk felépítése:	17
Házityúk jellemzői:	17
Legfontosabb testrészei fogyasztási szempontból:.....	18
Kísérleti rész:	19
Felhasznált anyagok:	19
Felhasznált eszközök:	19
Minta előkészítés, kísérlet tematikája:.....	19
Kimutatási módszerek érvényessége	20
Zearalenon kimutatásának paraméterei:	20
Extrakció	21
Visszanyerési Tesztek eredményei:	22
Mintaelőkészítés:	22
Eredmények és értékelésük:	24
Felhasznált irodalmak:.....	27
Melléklet.....	28

Bevezetés

Rohanó világunkban jelentős hangsúlyt kap az ételek gyors elkészíthetősége, egészségre gyakorolt hatása. Hazánkban is és világszerte legnépszerűbb állati eredetű élelmiszer a baromfi hús. Az éves fogyasztás mértéke az Európai Unió országaiban évről évre növekvő tendenciát mutat. Egészséges húsként szerepel az emberi táplálkozásban, a csecsemőktől az idős emberekig mindenkinek az egészséges hús, erőleves alapanyag jut eszébe. Ezzel szemben mint tudjuk, a haszonállat táplálkozása során megevett anyagok alkotóelemeinek egy része a biológiai folyamatok útján beépül/beépülhet a gazdaállat szervezetébe, ahol élettanilag pozitív, semleges illetve negatív hatásokat produkálhat hosszabb rövidebb időn belül.

Sajnálatos módon a növényvédelem nem megfelelő alkalmazása és a gabonafélék helytelen tárolása következtében nagyobb a lehetősége a gombák megjelenésének, elterjedésének és ezzel arányosan megnövekedhet a mikotoxinok jelenléte is. A biogazdálkodások által termelt mezőgazdasági termékek és fogyasztási cikkek nagyobb veszélynek vannak kitéve, hiszen a vegyszermentes termelés következtében a gombaféléknek kedvezőbb környezeti feltételeket biztosítanak, ezért nagyobb az eshetősége annak, hogy valamilyen gomba nemzetség fertőzi meg a terméket ami a mikotoxinok megjelenésének nagyobb kockázatát vonja maga után.

A bio élelmiszerek fogyasztásának előtérbe kerülése azzal a kockázattal jár, hogy a fogyasztó azt hiszi egészségesen és megfelelően táplálkozik, viszont ezeknek a termékeknek a fogyasztásával megnő a lehetősége annak, hogy az egészségre káros mikotoxinok és szennyeződések észrevétlenül bejuthassanak az emberi szervezetbe.

A toxinok nem csak közvetlenül juthatnak be az emberi szervezetbe, hanem az állati húsok fogyasztásával közvetetten is, hiszen a gabonákat takarmányozási célra is használjuk, az állatok elfogyasztják és az abban található különböző mikotoxinok beépülhetnek a vérükbe és egyéb olyan szerveikbe, amiket mindennap fogyasztunk.

Kutatásom célja az volt, hogy megvizsgáljam a húsok között napjainkban legelterjedtebb fogyasztási cikk a baromfi hús illetve a házi tyúk szervezetében felhalmozdik-e az egyik legelterjedtebb mikotoxin, a Zearalenont, amely az emberi szervezetre is káros lehet.

A mikotoxinok általános megjelenése magyarországi viszonylatban

A mikotoxinok a mikroszkópikus gombák másodlagos anyagcsere termékei. A penész jelenléte az élelmiszerben nem jelenti automatikusan a mikotoxinok jelenlétét is, mivel a gomba eddig nem tisztázott biokémiai inger hatására termeli a toxint. A toxinképződéshez megfelelő hőmérséklet, oxigén, szubsztrátum és páratartalom szükséges. Ugyanaz a gombafaj többféle mikotoxin egyidejű szintetizálására is képes lehet, ugyanakkor egy adott mikotoxint számos gombafaj képes termelni [1. Táblázat]. A penészes élelmiszerek fogyasztásának betegséget okozó hatása régóta ismert. A gyakorlatban egy-egy élelmiszer sok esetben egyszerre több mikotoxinnal lehet szennyezett. Ez nehezíti az egyes mikotoxinok veszélyességének pontos megállapítását. Az élelmiszerek mikotoxin szennyezettsége jelentős egészségügyi kockázatot jelent a fogyasztó egészségére, toxikológiai szempontból az egyik legfontosabb ételmezés-egészségügyi kérdés. A már ismert mikotoxinok száma napjainkban mintegy 400 féle lehet, - és ez a szám csak bővíthet. Ezen toxinok mintegy harmada, fele mérgező, jelentős részüket élelmiszerekben is kimutatták. Kémiai szerkezetük változatos, keletkezési körülményeik eltérőek. Általában jelentős biológiai aktivitással rendelkező anyagok, amelyek között számos rákkeltő hatású is van. Rendszerint kémiaiilag stabilak, az élelmiszeripari feldolgozás során alkalmazott hőhatásnak, vegyi anyagok nagy részének ellenállnak. [1]

1. táblázat: *Fusarium* fajok Nelson et al. (1983) szerint mikotoxinjaik és előfordulásuk gabonafélékben, előfordulás magyar viszonyokra módosítva. (Mesterházy és munkatársai)

<i>Fusarium</i> faj	Előfordulás gabonafélékben	Fertőzőképesség kalászon	Mérgező anyagcsere termékek
<i>F. graminearum</i>	+++++	Erős	DON, 3AcDON, 15AcDON, NIV, ZON, DeDON
<i>F. culmorum</i>	++	Erős	DON, 3AcDON, NIV, ZON,
<i>F. avenaceum</i>	+++	Mérsékelt	MON
<i>F. crookwellense</i>	++	Erős	NIV, FUS, ZON
<i>F. poae</i>	+++	Mérsékelt	NIV, FUS
<i>F. sporotrichioides</i>	++	Mérsékelt	T-2, HT-2, NEO
<i>F. tricinctum</i>	+	Gyenge	MON
<i>F. chlamydosporum</i>	+	Gyenge ^k	MON
<i>F. semitectum</i>	+	szaprofita	BEA
<i>F. equiseti</i>	++	szaprofita	FUCH, ZON
<i>F. acuminatum</i>	+	Gyenge	T-2, MON
<i>F. moniliforme</i>	++++ ^k	Mérsékelt ^k	FB ₁ , FB ₂ , FB ₃ , FU-C
<i>F. subglutinans</i>	+++++ ^k	Mérsékelt	MON, BEA, FUP
<i>F. proliferatum</i>	++ ^k	Gyenge	FB ₁ , FB ₂ , MON, BEA, FUS
<i>F. anthophilum</i>	+ ^k	Szaprofita	MON
<i>F. solani</i>	++	Szaprofita	MON
<i>F. oxysporum</i>	++	Szaprofita	MON
<i>Microdochium nivale</i> (<i>F. nivale</i>)	+++	Mérsékelt	nincs

Előfordulás: +++++ igen gyakori, ++++ gyakori, +++ közepes gyakoriság, ++ ritkán fordul elő, + igen ritka, kukoricán

Toxinok : DON: deoxynivalenol , AcDON: acetyl deoxynivalenol, NIV: nivalenol , ZON: zearalenon , DeDON: dideoxynivalenol, MON: moniliformin, FUS: fusarenon, NEO: neosolaniol, BEA: beauvericin, FUCH: fusarochromanon, FB: fumonisin B, FU-C: fusarin C, FUP: Fusaproliferin, T-2: T-2 toxin, HT-2: HT-2 toxin.

Hazánkban a búza (mint élelmiszer alapanyag) legutóbb 1996-1999 között szenvedett jelentős területre kiterjedő kalász fuzárium járványt, a közvetlen és közvetett károkat 1998-ban mintegy 25 milliárd Ft-ra becsülik [Mesterházy és Mtsai]. Az USA-ban és Kanadában 1995-2000 között évente felléptek pusztító járványok gabonanövényeken, az összesített károk itt is milliárdosak. Kínában sok millió hektáron minden évben jelentkezik a mikotoxikózis különböző toxinok termelésével; de nincs a földgolyónak olyan része, ahol kisebb-nagyobb gyakorisággal ne károsítana. Ugyanez érvényes a kukoricára is, amely toxikológiailag a búzánál is rosszabb helyzetben van.

A szennyezett gabonatermékek közvetlen emberi és állati felhasználásán túl jelentős részben a gabonát felhasználó állattenyésztés is veszélyezteteti. A gyengébb gyarapodásból, reprodukciós zavarokból, esetleg elhullásból eredő gazdasági problémák is nagy gondot okoznak. A toxinok állati termékekben is jelentkezhetnek, s könnyű belátni, hogy az állati takarmányozásban felhasznált alapanyagok révén az élelmiszerbiztonságban problémát jelent, hiszen az emberi fogyasztásra szánt állati alapanyagokból készített élelmiszerekben kimutatható toxinok az emberi szervezetbe kerülve veszélyforrásként jelentkezhetnek. Az élelmiszer alapanyagok fertőzöttségének vizsgálata során kiderült, hogy azon kultúrák is szennyezettek lehetnek toxinokkal, amelyek rendszeres, de esetleg nem elégséges vegyszeres kezelés hatása alatt álltak, amely kezelések pontosan a toxint termelő gombák szaporodását voltak hivatottak megakadályozni. Mivel a gomba spórája a körülöttünk levő levegőben is jelen van, és abban az esetben, ha megfelelő táptalajt talál magának azon megtelepedve szaporodásnak indul, így azon termények, élelmiszer alapanyagok, amelyeken a növény védőszeres (peszticides, fungicides) kezelés eleve a termelési technológia miatt kizárt vagy csak nagyon korlátozott, fokozott veszélynek vannak kitéve.

Külön jelentős probléma a *biotermékek kérdése*, ugyanis a gondok hatványozottabban jelentkezhetnek, minthogy a hatékony növényvédő szerek túlnyomó többségének felhasználása tiltott. A biogazdálkodás a következő definíción alapszik:

A **biogazdálkodás** (más néven: *ökogazdálkodás, organikus gazdálkodás*) olyan gazdálkodási forma, mely szerves trágyázáson, biológiai növényvédelmen és természetes biológiai ciklusokon alapul, a szintetikus műtrágya és (szintetikus) növényvédő szerek mellőzésével. A 140/1999 (IX.3.) kormányrendelet és egy hozzá kapcsolódó miniszteri rendelet tartalmazza a biogazdálkodás szabályait, melyek tulajdonképpen azonosak az EU 2092/91 számú biorendeletével.

Az 1960-as években ismerhette meg a világ a mikotoxinokat. Az Egyesült Királyságban aflatoxinnal szennyezett takarmánnyal etetett pulykák pusztulását okozta. Ezen pulyka pusztulás után kezdték el a kutatók kutatni a nagymértékű pusztulás okát, és kiderítették, hogy egy mérgeanyag felelős érte. A mérgeanyagról beigazolódott, hogy gomba termelte, amely felfedezés után kezdtek komolyabb kutatásba a témában.

A természetben a mikotoxinok globális problémát jelentenek, jelenlétük állandó, és csak védekezéssel elkerülhető. A mikotoxinok a gombák másodlagos anyagcseretermékei, amelynek termelődésének faktora a gomba szervezetében még nem meghatározott folyamat. A mikotoxinok száma több százezerre tehető, de ezek közül csak alig néhány tucat mérgező. Jelenlétük szükséges rossz és jó is lehet.

A gombák rendkívül jó alkalmazkodó szervezetek, éppen ezért bárhol fellelhetőek. A toxin képződéshez megfelelő hőmérséklet, páratartalom, szubsztrátum és oxigén szükséges. Aerob körülmények között széles körben előfordulnak állati takarmányokban.

A mikotoxinok a gombák káros másodlagos anyagcseretermékeinek heterogén csoportja. Az legmérgezőbb gombamérgeket figyelembe, úgy mint Zearalenon, Deoxynivalenol, Nivalenol, Aflatoxinok, Ochratoxinok, általánosan elmondható, hogy a jellemző termelő anyatestük 3 gombafajból kerül ki.

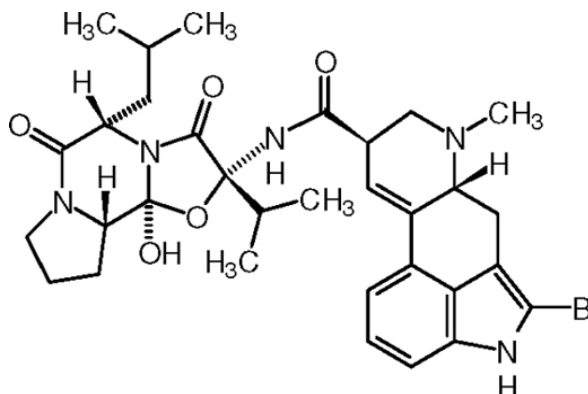
Legtöbbjük három gomba nemzetséghez tartozik:

- Aspergillus
- Penicillium
- Fusarium

Változatos kémiai szerkezetűek és keletkezési körülményeik is eltérőek lehetnek. Általában stabilak, vegyi anyagok nagy részével és hőhatással szemben is igen ellenállóak.

Kémiai struktúra alapján 5 csoportba oszthatóak:

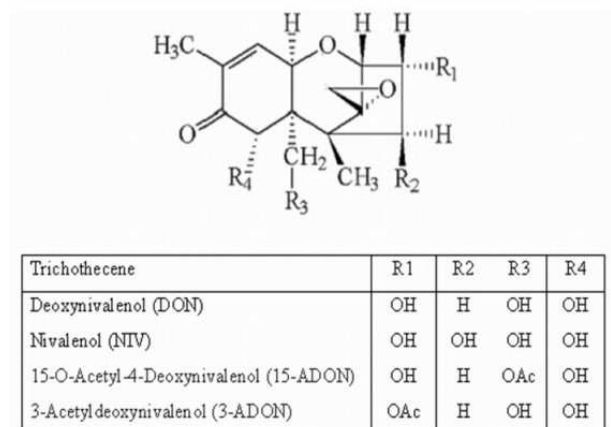
Ergotalkaloidok



1.kép Ergotalkaloid struktúra

A *Claviceps* tömlősgombákai vaio fertozes következtében reketes-~~ma~~ elváltozások figyelhetőek meg a gabonanövényen .A lizergsav az egyik reprezentása. Származékai között található a lizergsavdietilamid azaz LSD , ami az egyik legerősebb idegrendszeri hatással bíró szintetikus készítmény.

Trichotecének



2. kép Trichotecén alapváz

Számos *Fusarium* faj termeli , de elsősorban a *Fusarium Graminearum* és *Fusarium sporotrichioides*. Magán a növényen és a betakarítás után is termelődhet.

Hatásai: szöveti irritációt okozhatnak , bőr és nyálkahártya elhalásokat, illetve a bélcsatornában sérüléseket, vérzéseket okozhatnak.

Aflatoxinok

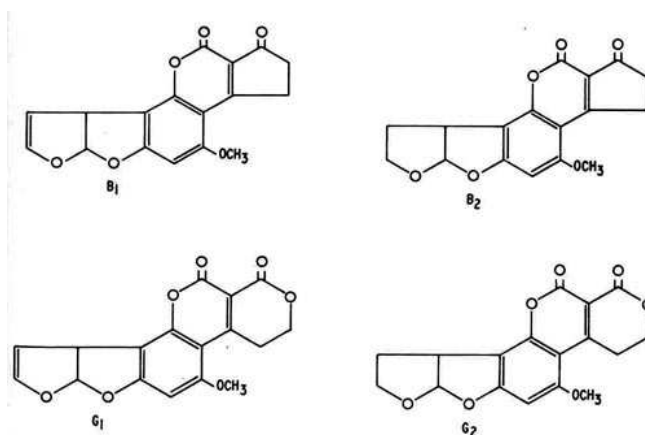


Fig. 1 Structures of aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂.

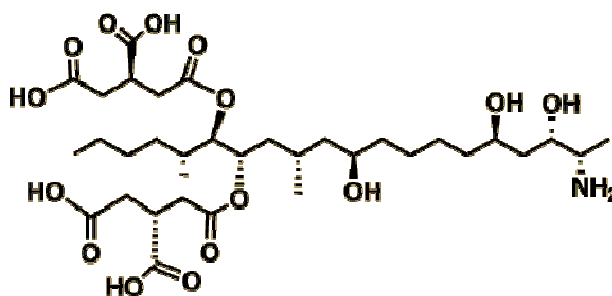
3. kép Aflatoxinok

Ezt a mikotoxint az *Aspergillus flavus* és *Aspergillus parasiticus* termeli. Gyakran előfordulnak élelmiszer ipari termékekben.

A legmérgezőbb aflatoxin az AFB₁, melyet a legveszélyesebb ismert természetes humán karcinogénnek tekintik (IARC (*International Agency for Research on Cancer*) 1993, 1-es csoport). Az egyetlen mikotoxin, mely egy hosszú vizsgálat eredménye szerint erősen kapcsolódik a májrák kialakulásához emberben. Az AFB₁ heveny bevitel tünetei: hányás, hasi fájdalom, hőemelkedés, heves májgyulladás, depresszió, halál. Ezért is alkalmazható és alkalmazták is biológiai fegyvernek, amelyet Irak el is készített, majd 1990-ben be is vetette több ezer ember pusztulását okozva ezzel. A 18 különböző típusú aflatoxin közül a négy domináns toxicitási, karcinogenitási és mutagenitási potenciáljának sorrendje a következő: AFB₁ > AFG₁ > AFB₂ > AFG₂.

Hatásuk: erős mérgező , karcinogén , mutagén és immunszuppresszív hatásúak.

Fumonizinek



4. kép Fumonizin B1 szerkezete

Fusarium moniliforme és rokon gombafajai által termelt mikotoxin. Előfordulása takarmányokban és étkezési célra használt kukoricában egyaránt felfedezhető.

Hatásai: rákkeltő hatásuk az egész világon ismert, lovak esetén agylágyulást, sertések esetén mellvízkört és tüdővizényőt okoz.

Ochratoxinok.

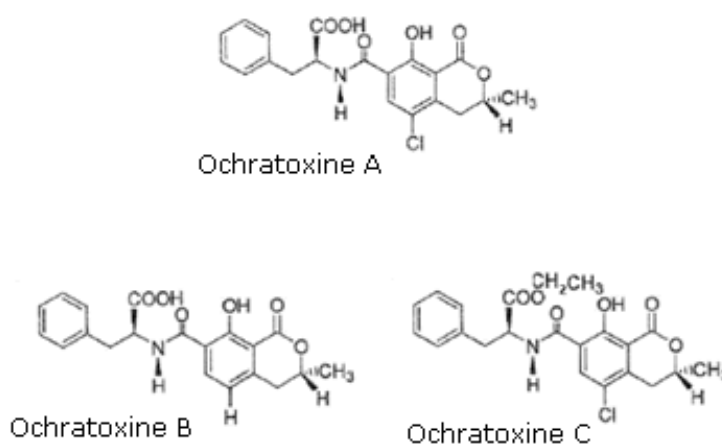


Figure 5 : Ochratoxines A, B et C.

5. kép Ochratoxinok szerkezete

Számos gomba termeli, de legfőképpen az *Aspergillus ochraceus* és *Penicillium verrucosum*. Előfordulás: főleg zab, kukorica, árpa és búza.

Hatása: különböző szervek károsodása, valamint az izomban és vérben is megtalálható.

Az OA sok élelmiszerben jelen van, elsősorban magokban (árpa, zab, rozs, kukorica, búza), de gyümölcsleveken, borban és húsban is megtalálható az egész világon, különösen néhány mediterrán országban és a Balkánon figyeltek meg nagyobb kitettséget. Ott egy endemikus vese betegség (nem gyulladásos, krónikus vesebaj, melyben a vese mérete és tömege jelentősen csökken) is nagyon elterjedt, melyben fontos szerepet játszhat az OA.

Toxinok élőlényekre gyakorolt hatása lehet akut, szubakut és krónikus , néhányukról ismert karcinogén , mutagén, immunszuppresszív, teratogén és neurológikus hatásuk.

Bár több mint 300 mikotoxin ismert, de a leggyakoribbak az előfordulás és toxicitás szempontjából a vomitoxinok , aflatoxinok , ochratoxinok , zearalenonok , fumonizinok és T-2 toxinok.

Ezek a gabonafélék betakarítása előtt, után és közben is különböző környezeti feltételek mellett megtalálhatóak.

2. táblázat: A gombák számára kedvező körülmények gabonán

I. Takarmány nedvesség tartalma	10-14 % vagy ennél magasabb
II. Raktár relatív páratartalma	70-75 % felett
III. Gabona szemek fizikai állapota	Rovaroknak és nem megfelelő betakarításnak köszönhető sérült szemek
IV. Raktározás	Lyukas tető és nedvesség

A mikotoxinok felhalmozódnak az állati vesében, májban és emésztőrendszerben. Az esetleges mérgező maradványok jelenléte az élelmezés céljából nevelt állatok esetében , például hús és tojás az emberi egészségre kockázatot jelenthetnek.

A gomba fertőzések érintik az érzékszervi jellemzőket és toxikózis kockázatát vonják maguk után.

A mikotoxinok hatása függ a szervezetbe jutott toxinok számától, az expozíció időtartamától illetve az élőlény toxinokra való érzékenységétől.

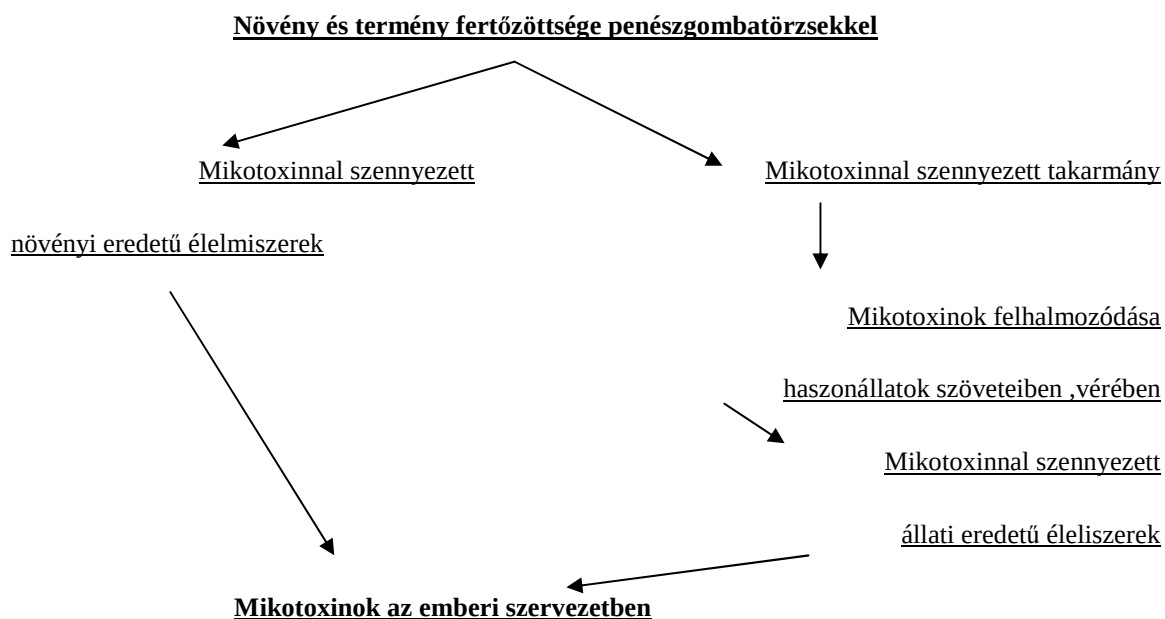
A mikotoxinok világszerte nagy figyelmet kaptak az elmúlt néhány évtizedben.

Ennek három fő oka van egyrészt a mikotoxinok hatása az emberi szervezetre , másrészt a szennyezett takarmányok és állatállomány csökkenése miatt bekövetkező gazdasági veszteségek , harmadrészt pedig a mikotoxin szennyeződés előfordulása nemzetközi kereskedelmi import – exportban.

Tehát a mikotoxinok és gabonatermékek termelésének szabályozása nagyon fontos szerepet kap a mezőgazdasági ágazatban.

A toxinok bőrön keresztül, inhalálás útján is bekerülhetnek az emberi szervezetbe, de elsősorban táplálkozás útján jutnak be.

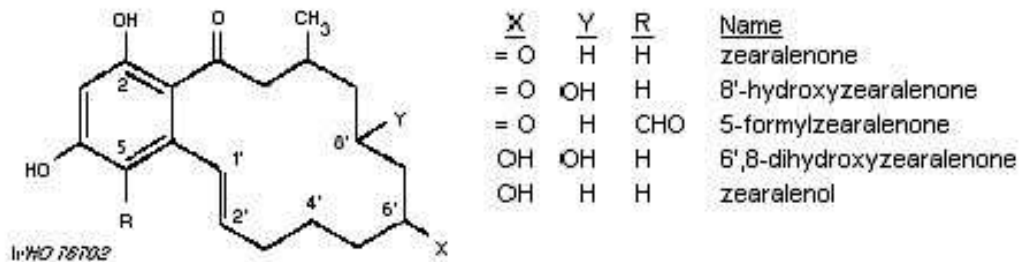
Emberi szervezetbe a toxin bejutása a táplálkozás által :



3. táblázat: Néhány mikotoxin előfordulásának és hatásának bemutatása

<u>Mikotoxinok</u>	<u>Előfordulás</u>	<u>Toxint termelő gombafajok</u>	<u>Érzékeny fajok</u>	<u>Hatásuk</u>
Aflatoxinok , B1,B2 , G1 és G2	Kukorica , mogyoró	Aspergillus flavus Aspergillus parasiticus	Ember , összes háziállat és baromfi	Karcinogén, májtoxicitás , immun - szuppresszív
Ochratoxin A	Árpa , búza	Aspergillus ochraceus Penicillium verrucosum	Ember , főleg sertés és baromfi	Karcinogén, vesetoxikus, köszvény
T – 2 toxin , DAS	Mogyoró	Fusarium tricinctum	Főleg sertés és baromfi	Száj elváltozások, étvágytalan -ság, csökkentheti a tojástermelést
DON Vomitoxin	Árpa , búza és kukorica	Fusarium graminearum Fusarium crookwellense Fusarium culmorum	Ember , főleg sertés és tejelő állatok	Emberi toxikózis, dermatotoxi -kus , étvágytalan -ság
Zearalenon	Búza , kukorica	Fusarium graminearum Fusarium culmorum Fusarium crookwellense	Főként sertés és tejelő állatok	Karcinogén, ösztrogén és reproduktív betegségek
Fumonizin B1 és B2	Kukorica	Fusarium moniliforme Fusarium proliferatum	Ember, főként sertés , baromfi és ló	Karcinogén , neurológiai betegségek, máj károsodás

Zearalenon:



(3S,11E)-14,16-dihydroxy-3-methyl-3,4,5,6,9,10-hexahydro-1H-2-benzoxacyclotetradecine-1,7(8H)-dione

6. kép Zearalenon szerkezete

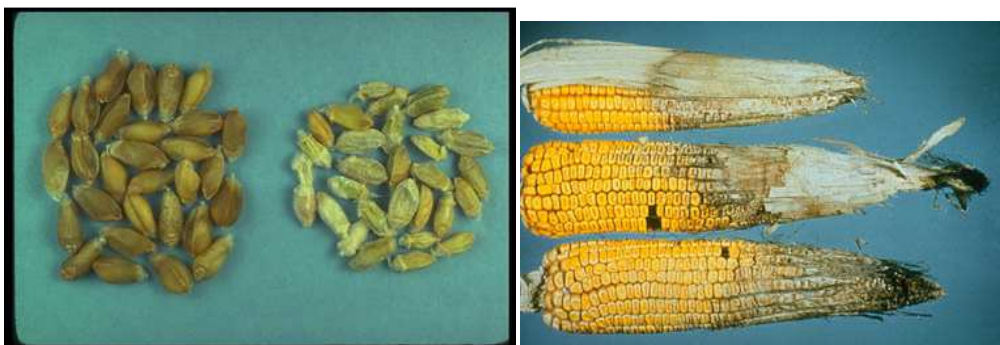
A zearalenont vagy másképpen F-2 toxint elsősorban a *Fusarium graminearum* illetve a *Fusarium culmorum* és *Fusarium crookwellense* gombafaj termeli.

Megtalálható főként a búzában és kukoricában de más gabonatermékekben való előfordulásuk sem kizárt, valamint más gombafajok által termelt mikotoxinnal együtt is előfordulhat, mely erősítheti vagy gyengítheti a toxin hatását.

Hatásaira főként a sertés és tejelő állatok érzékenyek, de a baromfiak is érzékenyek. Karcinogén, ösztrogén és reprodukív betegségek előidéző hatása ismert. Ösztrogén hormon hatása például szarvasmarha esetén vetélés, petefészek ciszták és egyéb szaporodásbiológiai zavarok kialakulásáért felelős.

Ezek az hatások megfigyelhetők a sertés, tyúk, pulyka, juh, patkány és egér esetén is.

Fusarium graminearum (Gibberella Zea), F. culmorum fertőzések



7. kép: Fusarium graminearum (Gibberella Zea) fertőzések



8.kép : Fusarium Culmorum fertőzések

HPLC

(High Performance Liquid Chromatography avagy Nagyhatékonyságú folyadék kromatográfia)

Ez a műszer nagy hatékonyságú és gyors vizsgálatokat tesz lehetővé bizonyos körülmények között, hiszen egyszerre több minta alkotóit is vizsgálhatjuk vele.

Ennél az analitika módszernél a mozgó fázis folyadék halmazállapotú.

Kromatográf főbb részei:

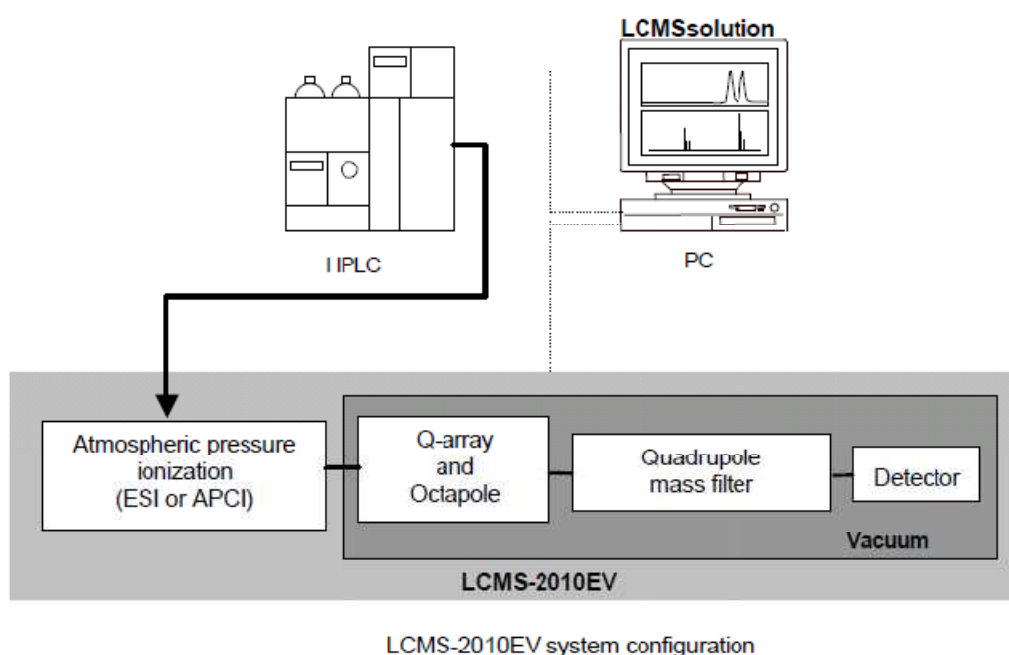
1. oldószertartályok
2. keverőszelep
3. nagynyomású szivattyú
4. nyomáskiegyenlítő
5. előtétkolonna
6. bemérőegység
7. analitikai oszlop
8. detektor

Hatékonyságának növelését a megosztó fázisok alkalmazása mellett apró szemcseméretű töltetekkel lehet elérni. Ezeknek a tölteteknek az átmérője 3 – 10 μm nagyságú és tömören helyezkednek el, ezért megnöveli a kolonnában az áramlási ellenállást. Ahhoz, hogy megfelelő sebességgel (1-10 cm^3/min) tudjon áramlani benne a mozgófázis , megfelelő nyomást kell alkalmazni , ami igen nagy 10^7 Pa nyomással lehetséges. Az ilyen nagyságrendű nyomást elérni speciális szerkezeti anyagból készült és kémiai ellenálló dugattyús folyadékpumpákkal lehetséges .

A nagy nyomás használatának következtében az eluens és a minta sem tartalmazhat oldott gázokat és szennyeződések. Az oldott gázok a detektorban felszabadulva jel pulzálását idézhetik elő. A szennyeződések pedig a töltet szemcsék közötti apró járatokat eltömíthetik. Ezeket a hibákat megfelelő minta előkészítéssel ki lehet küszöbölni. Ilyen minta előkészítés lehet az eluens ultrahangos kirázatása illetve a minta megfelelő szűrése, ami lehet vákuumszűrés és megfelelő pórusméretű szűrés.

HPLC-MS készülék általános felépítése

A tömegspektrometria olyan vizsgálati módszer, amelynél ionos részecskéket választunk el fajlagos töltéssűrűségekre eső tömegük (m/z) szerint csökkentett nyomáson, elektromos, vagy mágneses mezők segítségével. Az elválasztott ionok intenzitását folyamatosan mérjük, s így egy ionáram intenzitás-fajlagos tömeg függvénykapcsolathoz, vagyis a tömegspektrumhoz jutunk. Az így kapott tömegspektrum a minőségi információ alapja, ugyanis nincs két olyan szerves vegyület, amelynek a tömegspektruma, vagyis a karakterisztikus tömegspektruma azonos lenne.



4. ábra: A Shimadzu LCMS 2010 EV rendszer általános felépítése (forrás: LCMS manual book)

A tömegspektrométer felépítése általánosan a következő képen alakul (4.ábra):

1. Mintabeviteli rendszer (közvetlen illetve közvetett mintabeviteli módok)
2. Az ionforrás az ionoptikával,
3. az analizátor,
4. a detektor,
5. a vákuumrendszer.
6. Szabályzó és adatkezelő szoftver.

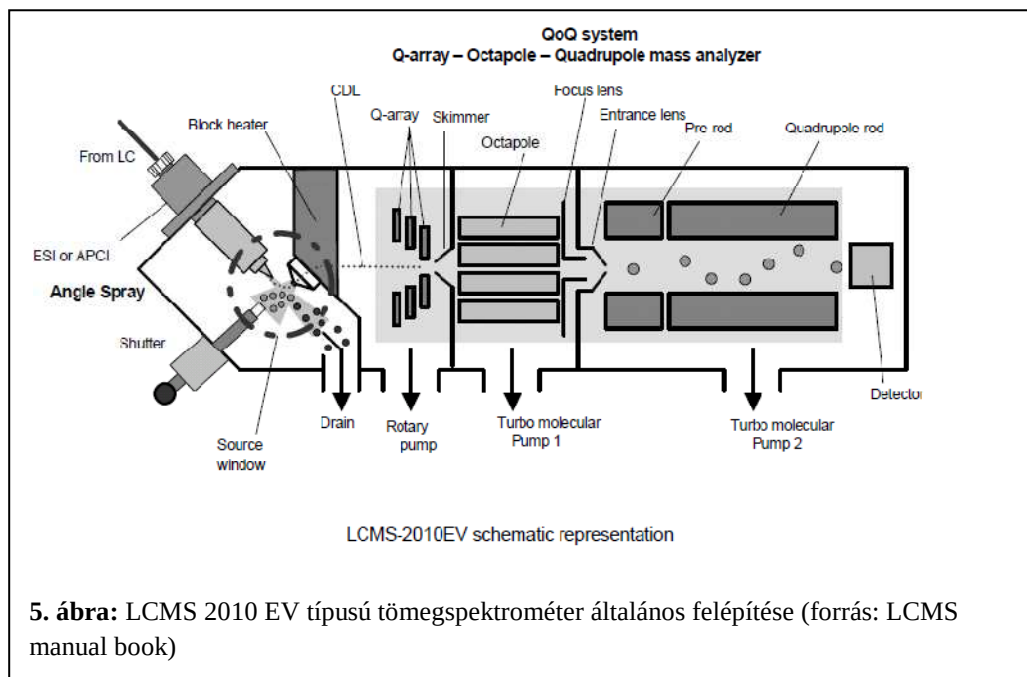
A tömegspektrométer analizátor és detektor részében nagyvákuumot hozunk létre. Ennek oka, hogy az előállított ionok atmoszférikus nyomáson könnyen elnyelődnének az egymással illetve egyéb, más gázmolekulákkal történő ütközések miatt. Tudjuk, hogy a közepes szabad úthossz fordítottan arányos a nyomással. Atmoszférikus nyomáson a közepes szabad úthossz 10^{-8} m, így a valószínűsége annak, hogy az ionok elérjék a detektort, gyakorlatilag nulla. Körülbelül 110 Pa-ra való csökkentésével a közepes szabad úthossz megnövelhető 12 m-re. Az alkalmazott nyomástartomány alapján kétféle vákuumról beszélhetünk: elővákuum tartomány ($p > 10^{-3}$ Pa) és nagyvákuum-tartomány (10^{-1} Pa $< p < 10^2$ Pa).

Sajátos ionforrásnak tekinthető a folyadékkromatográfiás (HPLC) elválasztáshoz illeszkedő electrospray ionizáció ESI és az atmoszférikus nyomású kémiai ionizációs (APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization) interfész, amelyek ma a legelterjedtebben alkalmazottak, ahol az ionizáció atmoszférikus nyomáson történik, csak a képződő ionokat juttatjuk a tömegspektrométer vákuumterébe.

Az API interfész általánosan 4 részre bontható:

- o a folyadék bejuttatására spray formájában;
- o az interfész atmoszférikus nyomású része, ahol az ionok keletkeznek: (ESI), illetve (APCI) vagy más technikával;
- o ionmintázó egység;
- o atmoszférikus nyomás–vákuum interfész.

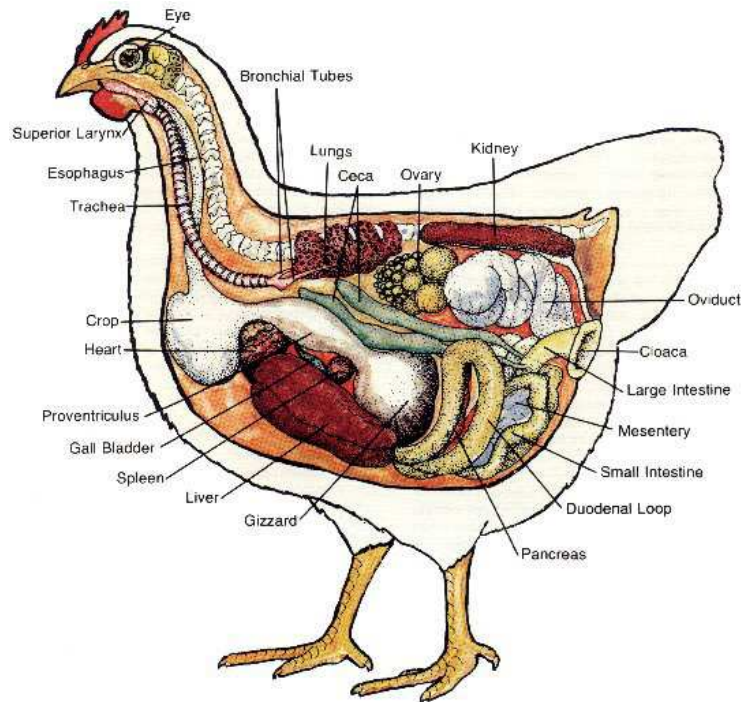
Az LC-MS interfész működési elve a következő. Az analitikai oszlopról érkező eluent és a vizsgálandó anyagot beporlasztják az interfész atmoszférikus nyomású térrészébe. A porlasztás végezhető pneumatikus módon, mint a fűtött APCI interfészben vagy egy erős elektromos tér segítségével, mint az ESI esetében. Az aeroszorból gázfázisú ionokat hoznak. Az ionokat, együtt az oldószergőzőkkel és a szárítógázként alkalmazott nitrogénnel, egy kis nyíláson keresztül mintázzák. A minta kisebb nyomású térbe kerül, ahol nagy sebességgel kitágul. A kitágult gáz magját egy mintavevő kúp (úgynevezett *skimmer*) segítségével egy alacsonyabb nyomású térrészbe vezetik. Ez a térrész tartalmazza az ionoptikát, melynek segítségével optimálisan lehet a vizsgálandó ionokat fókuszálni és bejuttatni a tömeg analizátorba.



Házityúk (*Gallus gallus domesticus*)

A gerinchúrosok (Chordata) törzsébe, a madarak (Aves) osztályába, a tyúkalakúak (Galliformes) rendjébe és ezen belül a fácánfélék (Phasianidae) családjába tartozik .

A házityúk felépítése:



9. kép : házityúk felépítése

Házityúk jellemzői:

- tojással szaporodik
- fiókák fészekhagyók
- testüket tollazat fedi
- csőrük van
- kaparóláb
- három ujj előre egy pedig hátra néz
- tollmentes lábrész a csüd
- szárnyuk van
- tollazatuk igen változatos és színes
- hímet kakasnak nevezik
- nőtényt tojónak

- a legkeresettebb fogyasztási cikk

Legfontosabb testrészei fogyasztási szempontból:

1. Mell
2. Comb
3. Szív
4. Zúza
5. Máj
6. Szárny
7. Lábak

Kísérleti rész:

Felhasznált anyagok:

A felhasznált anyagok közül a zearalenon a Sigma-Aldrich cégtől kerültek beszerzésre, míg a kromatográfiás elválasztáshoz és extrakcióhoz használt acetonitril a VWR cégtől (BDH Prolabo), a felhasznált víz pedig saját előállítású desztillált víz volt, 0,22 µm-es membrán szűrőn történő szűrés után. Vezetőképessége 5 µS.

A SPE oszlopok a Supelco C18-as és Restek Carboprep oszlopok voltak.

Felhasznált eszközök:

A kromatográfiás méréshez felhasznált folyadékkromatográf Merck-Hitachi (LaChrom) L7000 típusú folyadék kromatográf volt, amely a következő alegységekből állt: UV Detektor:L-7400, Pumpa:L-7100, Autosampler:L-7200, Kolonnatér:L-7360.

A kromatográfiás elválasztáshoz Restek Pinnacle RP C18 (250mm*4,6mm*5µm) oszlopot használtam.

A tömegspektrometriás méréshez Shimadzu HPLC-MS 2010 EV single quad készüléket használtam.

Minta előkészítés, kísérlet tematikája:

A vizsgálat első lépéseként olyan tápot kellett találni, amely nem tartalmaz semmilyen toxint. Ez első hallásra könnyű feladat, de sajnos a tápok nagy része szennyezett valamilyen toxinnal. Mivel a szinergista hatást ki akartuk küszöbölni, ezért az első feladat a megfelelő, toxinmentes táp keresése. A toxinmentes táp, azért fontos, mert ha a táp, amivel dolgozok szennyezett akkor nem kapok valós értékeket, így a kutatás eredményét megváltoztathatja. Mivel ha már eleve lenne benne egy ismeretlen mennyiségű mikotoxin, akkor ez a toxin befolyásolhatja az általam vizsgált Zearalenon toxin hatását illetve mennyiségét.

Ezután a toxin mentes tápot F – 2 toxinnal szennyeztem be, mégpedig a megengedett toxin koncentráció mennyiség maximális értékéig. A szennyezett táp mennyisége 10 gramm volt, nagyobb szemcseméretű részeket válogatva belőle. A 10 grammra jutattam rá a zearalenon toxint, a 3 mg/kg értéknek megfelelően 30 µg zearalenon toxint acetonitrilben oldva. A jelen szabályozás szerint a kukorica melléktermékek, tápok 3 mg/kg értékig tartalmazhatnak zearalenont. Ezt az értéket állítom be.

A vizsgálat szempontjából fontos volt a fiatal egyed vizsgálata, mert lényeges, hogy a lehető legkevesebb szennyeződést, illetve méreganyagot egyen vagy fertőződjön meg a kísérlet előtt. Negyedik szempont a csirkék nevelése volt kontrollált körülmények között. Ezalatt azt értem, hogy a táplálkozását ellenőrzés alatt kellett tartani, nehogy véletlenül toxinnal szennyezett táplálékot kapjon. Ezzel megelőzve az egyéb toxin mérgezést és kiürülését.

A következő az volt, hogy az alanyunk csak egy fajta mikotoxinnal szennyezett tápot megkapja illetve elfogyassza. Ez a mikotoxin a Zearalenon azaz F – 2 toxin volt.

Az etetés utáni időszakot különböző időközönkénti mintavételezés követte. Ezek az időközök az alábbiak voltak: 1 óra, 5 óra és 24 óra.

Tehát megvizsgálható volt, hogy mennyi idő kell ahhoz, hogy az F-2 toxin felszívódjon és eljusson az alany vizsgált szerveibe.

Kimutatási módszerek érvényessége

Zearalenon kimutatásának paraméterei:

Az első lépésben a toxin kimutatását HPLC-UV technikával végeztem. A kimutatási paraméterek a következők voltak:

Zearalenon $\lambda_{\max}$: 236 nm , 274 nm , 316 nm

Típus: Merck – Hitachi (LaChrom L-7000 system)

Interface : D-7000

UV detektor: L-7400

Pumpa : L-7100

Automata minta adagoló : L - 7200

Kolonna tér típusa: L - 7360

Kolonna : Restek Pinnacle RP C18-as (250 mm • 4,6 mm • 5 μ m)

Kolonntér : 40 °C

Eluens : víz / acetonitril (75 / 25) elegye izokratikus módban

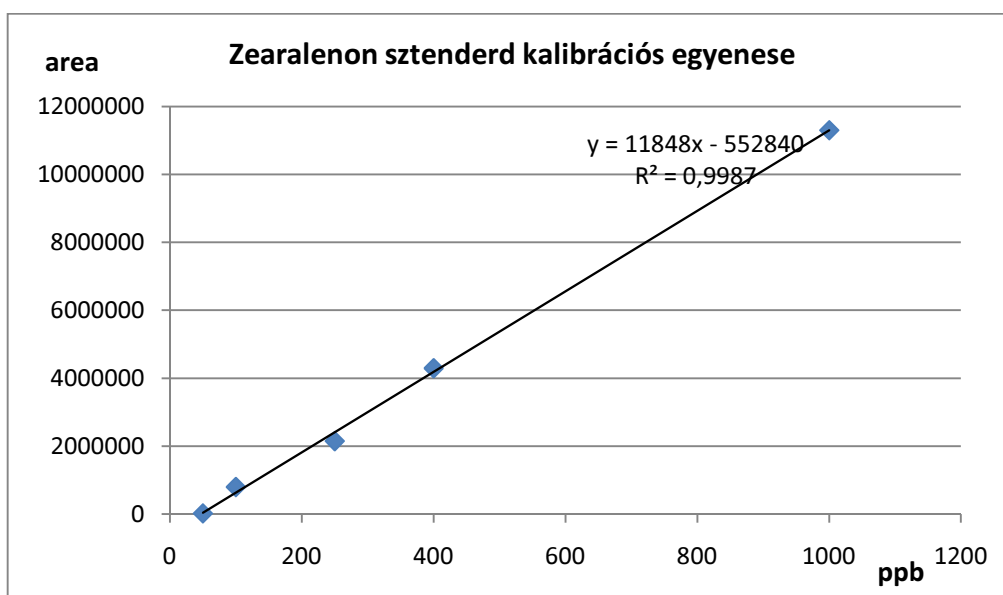
Áramlási sebesség: 0,7 ml / perc

Detektálási időablak: 0-10 perc

Detektálási hullámhosszak: 236 nm , 274 nm , 316 nm,

A diagramot 3 párhuzamos mérés adatai alapján készítettem el.

A sztenderd zearalenon oldatok koncentrációi 50, 100, 250, 400 és 1000 ppb (μ g/l) voltak.



1. diagram: zearalenon kalibrációs egyenese 236 nm-en

Extrakció

A vizsgálati mintából irodalmak alapján [1,2] a vizsgálati mintákból az extrahálást acetonitrillel végeztem el. Az extrakció megfelelő hatékonyságának ellenőrzésére defibrillált marhavért szennyeztem zearalenon toxinnal, és a toxin visszanyerési tesztjét ezen a mintán végeztem el. A visszanyerési tesztek során 3 különböző módszert alkalmaztam, úgy mint folyadék-folyadék extrakció, illetve 2 különböző SPE extrakció C18-as fázissal és Carboprep fázissal, 3 párhuzamos mérés alapján.

A visszanyerési tesztek paraméterei és eredményei a következők voltak:

Visszanyerési teszt:

Zearalenon toxinra a következő visszanyerési teszteket végeztem el vérből (defibrillált marhavér):

1. *Folyadék – folyadék extrakcióval*

Extraháló szer : acetonitril , kizsózással.

2. *SPE C18 – as kolonnával*

Kondicionálás : víz , metanol , acetonitril , víz

3. *Carboprep kolonnával*

Kondicionálás : víz , metanol , acetonitril , víz

Visszanyerési Tesztek eredményei:

1. Folyadék – folyadék extrakció : (20 µg) $91 \pm 5 \%$
2. SPE C – 18 kolonna (20 µg) : $93 \pm 7 \%$
3. Carboprep kolonna (20 µg) : $85 \pm 7 \%$

A visszanyerési tesztekkel megállapítható, hogy a folyadék-folyadék extrakció is alkalmazható a zearalenon toxin kinyerésére. Azért is választottam ezt a technikát, mivel a SPE extrakcióban a minta előkészítésben több lépés van, amely minden lépés hibaforráshoz vezethet.

A vizsgálat során igaz nem folyadék-folyadék, hanem inkább szilárd állapotú minta és folyadék közötti extrakció történik, de a mintákban a szabad toxin feltehetően a sejtközi térben lesz megtalálható, vagy gyengén kötött formába, amelyekből az acetonnitril képes kiextrahálni a toxint.

Mintaelőkészítés:

A mintavételezés után a következő szerveket vizsgáltam. Vizsgálandó szervek: mell, szív, comb, máj, zúza, bél.

4. táblázat: a vizsgálati minták tömegei grammban.

Minta száma		1.Csirke: 1 óra	2.Csirke: 5 óra	3.Csirke: 24 óra
1	Mell	23,6247 g	20,4000 g	42,6591 g
2	Szív	3,4358 g	3,1306 g	3,5706 g
3	Comb	40,7270 g	34,1672 g	36,1806 g
4	Máj	22,6356 g	13,7808 g	17,6995 g
5	Zúza	17,2285 g	22,9421 g	22,7194 g
6	Bél	35,3075 g	33,3595 g	46,3196 g

Minden egyes mintát külön – külön egy mérőlombikba helyeztem, majd annyi acetonnitrilt adtam hozzá, hogy a mintákat ellepje a folyadék szintje. A hozzáadott acetonnitril mennyiségét pontosan mértem.

5. táblázat: a vizsgálati mintákhoz adott acetonitril mennyisége cm³-ben

Minta száma		<u>1.Csirke</u>	<u>2.Csirke</u>	<u>3.Csirke</u>
1	Mell	20	20	20
2	Szív	10	10	10
3	Comb	20	20	20
4	Máj	10	10	15
5	Zúza	20	20	25
6	Bél	50	40	40

Mintáimat ezután 1 órán keresztül rázattam rázógéppel 150 fordulat/percen.

A vizsgálandó mintáimról ezután leöntöttem az acetonitrilt a benne oldott anyagokkal együtt. A visszanyert acetonitril oldat mennyiségei változtak, ezért mértem a mennyiségét is a későbbi esetleges koncentrációsámítás miatt.

6. táblázat: Az extrakció után visszanyert extraháló oldat mennyisége cm³-ben

Minta száma		<u>1.Csirke</u>	<u>2.Csirke</u>	<u>3.Csirke</u>
1	Mell	21,5	20,5	16
2	Szív	12,5	10	10,5
3	Comb	21	21	21
4	Máj	10	9,5	14,5
5	Zúza	21	19,5	24
6	Bél	46	37	36,5

A visszanyert oldat maximális mennyisége több esetben is magasabb volt, mint a rátett extraháló oldat mennyisége, ennek magyarázata a szervek víztartalmában keresendő.

Ezeket a visszamért oldattérfogatokat rotációs vákuumdesztilláló berendezés segítségével szárazra pároltam. A mintákat szárazon tartottam a mérés megkezdéséig.

A bepárlás után 1000 µl acetonitrilben visszaoldottam a száraz mintákat, centrifugálás segítségével tisztítottam, majd 1 ml-es fiolába tettem.

Eredmények és értékelésük:

Kiértékelés:

A 11ppm –es Zearalenon 236 nm-en 4,46 retenciós időt mutató csúccsal jellemezhető.

A sztenderd zearalenon minta csúcsának retenciós idejéhez viszonyítva a különböző mintákból kapott kromatogramok kiértékelése után a következő megállapításokat tettem (6. táblázat). A minták kiértékelése során 236, 274 és 316 nm-en is elemeztem a kromatogramokat (a zearalenon 3 jellemző abszorbancia maximuma), a szerves mátrix kiküszöbölése céljából. A kromatogramok egy részét a melléklet tartalmazza.

7. táblázat: A vizsgálatok után a mintákban kimutatott zearalenon jelenléte

	1.minta	2. minta	3.minta
1. Mell	n. d.	n. d.	pozitív
2. Szív	n. d.	pozitív	pozitív
3. Comb	n. d.	n. d.	n. d.
4. Máj	pozitív	pozitív	pozitív
5. Zúza	n.d.	pozitív	pozitív
6. Bél	pozitív	pozitív	pozitív

n.d. nincs kimutatható mennyiségben toxin HPLC-UV technikával.

A vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a 236 nm, 274 nm, 316 nm felvett sztenderd 11 ppm-es zearalenon minta kromatogramja alapján a vizsgálati mintákból HPLC-UV technika segítségével kimutatható volt a zearalenon toxin jelenléte.

A szennyezéstől számított különböző mintavételezési idők függvényében vizsgálva a toxin megjelenését az egyes szervekben elmondható, hogy a szennyezés után 1 órával mintavételezett mintákban a bélben, májban volt kimutatható a zearalenon toxin. A toxin ilyen arányú megjelenésének a magyarázata a Gallus gallus domesticus emésztésében illetve tápanyag feldolgozásában rejlik. A májban, mint első méregtelenítő szervben várható a megjelenése a toxinnak, a bélben az emésztési folyamat gyorsasága miatt lehet kimutatni. A zúzában mint gyomorhoz a kapcsolódó szervben még nem volt kimutatható a toxin jelenléte.

A második mintavételezési időben, a szennyezés után 5 órával a máj, zúza, bél mellett a szívből is ki lehetett mutatni a toxint. Ennek magyarázata a vér keringtetésében fontos szerepet játszó szív a toxint tartalmazó vér szállítása során értelem szerűen felveszi a zearalenont. Megfigyelhető még az is, hogy a zúzában már megjelent, de a májból nem ürül ki a toxin ennyi idő alatt, mivel a jelenléte kimutatható.

A harmadik minta sorban, a szennyezés után 24 órával vett mintában egyedül a combban nem mutatható ki a toxin jelen vizsgálati módszerrel, a bélben, zúzában, májban és szívben szintén, úgy mint az előző vizsgálat során kimutatható volt. Az újabb szerv a mell, amelyben megjelent a toxin. A megjelenés feltételezett oka, hogy a vérből, mint szállító rendszerből lassan történik a beépülése a különböző anyagoknak a mellbe, így a toxinnak is. Érdeemes megemlíteni, hogy a bélben még mindig kimutatható volt a toxin jelenléte, ami magyarázható azzal, hogy nem ürült ki a bélrendszerből, bár szakcikkek alapján a Gallus gallus domesticus emésztése gyors, ami alapján feltételezhető, hogy nem csak a salakanyagban, hanem a szerv falában is található toxin. Ugyanez igaz lehet a zúzára is. A máj egyértelműen mint méregtelenítő szerv szerepel a rendszerben, ezért abban mint szervben biztosan megtalálható a toxin.

Ezzel együtt megállapítható, hogy a csirke különböző szerveiben a toxin kimutatható.

Továbbá megállapítható, hogy a toxin jelenléte a szennyezéstől számított növekvő intervallumban a minták különböző részeiből eltérő mértékben volt kimutatható.

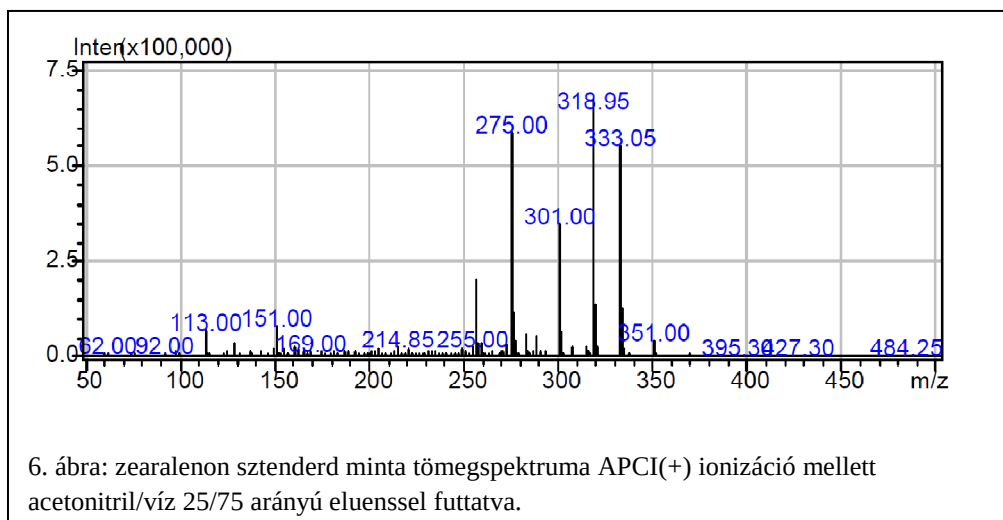
Az F-2 toxin megjelenése az előre várt sorrendnek nagyjából megfelelően volt kimutatható:

1. Bél
2. Máj
3. Zúza
4. Szív
5. Mell

A zearalenon metabolitjainak minősége és megjelenése tömegspektrometriás úton igazolható, amely mérések folyamatban vannak.

Jelen vizsgálatok a HPLC-APCI-MS készüléken folynak a metabolitok kimutatására. A mellékletben csatolt TIC és tömegspektrumok a zearalenon toxin jelenlétét a mintában és a sztenderdben mutatják, valamint az APCI pozitív módban mért tömegspektrumokat és

zearalenon minták fragmentálódása során A jelen esetben alább becsatolt zearalenon tömegspektrum az APCI (+) módban történő fragmentációt mutatja. A zearalenon molekulaionjának tömege 318 m/z, az ionizálási technika miatt (M+H) ion keletkezik, amely a 318,95 m/z tömeggel jelentkezik. A további fragmentek a molekula bomlásából illetve az oldószer és a molekula kapcsolatából keletkeznek.



6. ábra: zearalenon sztenderd minta tömegspektruma APCI(+) ionizáció mellett acetonitril/víz 25/75 arányú eluenssel futtatva.

A továbbiakban a mintákban azonosítom a zearalenon toxin, keresem az esetleges metabolitokat. Az ionizációs technika alapján nem csak APCI(+) hanem ESI ionizációt is alkalmazok a különböző fragmentációs módok alapján történő jobb azonosítás végett.

Felhasznált irodalmak:

[1] J. Jodlbauer, P. Zöllner and W. Lindner: Determination of zeranol, taleranol, zearalenone, α - and β -zearalenol in urine and tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Chromatographia* Volume 51, Numbers 11-12 (2000)

[2]**Duca,RaduCorneliu;Bravin,Frederique;Delaforge,Marcel;Vladescu,Luminita;Badea,Irinel Adriana;Criste, Rodica Diana**: Development of a New HPLC Method Used for Determination of Zearalenone and Its Metabolites in Broiler Samples. Influence of Zearalenone on the Nutritional Properties of Broiler Meat, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011-07-27

[3]Songsermsakul P, Sontag G, Cichna-Markl M, Zentek J, Razzazi-Fazeli E.: Determination of zearalenone and its metabolites in urine, plasma and faeces of horses by HPLC-APCI-MS, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2006 Nov 7;843(2):252-61. Epub 2006 Jul 7.

[4]J. Jodlbauer, P. Zöllner and W. Lindner: Determination of zeranol, taleranol, zearalenone, α - and β -zearalenol in urine and tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *CHROMATOGRAPHIA* Volume 51, Numbers 11-12 (2000), 681-687, DOI: 10.1007/BF02505405

[5] Szabolcs B. Tóth, Rita Jolankai, Zoltan Muranyi and Andras Dallos: Analysis of Deoxynivalenol, Nivalenol, Zearalenone in Food by LC–APCI–MS, *CHROMATOGRAPHIA* Volume 73, Supplement 1 (2011), 171-174, DOI: 10.1007/s10337-011-1990-x

<http://www.spectroscopyonline.com/spectroscopy/data/articlestandard/spectroscopy/072005/146485/article.pdf>

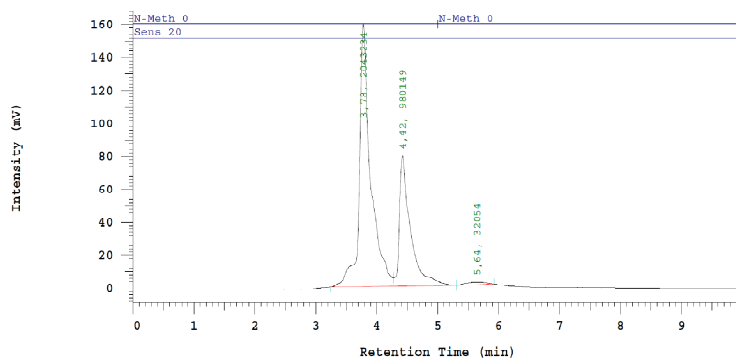
Melléklet

D-7000 HSM: Samples Series: 0470 Report: original System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12.04.25 15:44 Reported: 12.06.07 08:26
 Processed: 12.04.25 15:54
 Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\0470\
 Processing Method: zearalenon_120416
 System(acquisition): Sys 1 Series:0470
 Application: Samples Vial Number: 18
 Sample Name: 1/4 Vial Type: UNK
 Injection from this vial: 1 of 1 Volume: 10,0 ul
 Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: zearalenon_120416
 Column Type: Developed by: Szabi
 Pump A Type: L-7100
 Solvent A: ACNO Solvent B: h2o
 Solvent C: H2O Solvent D:
 Method Description: zearalenon toxin

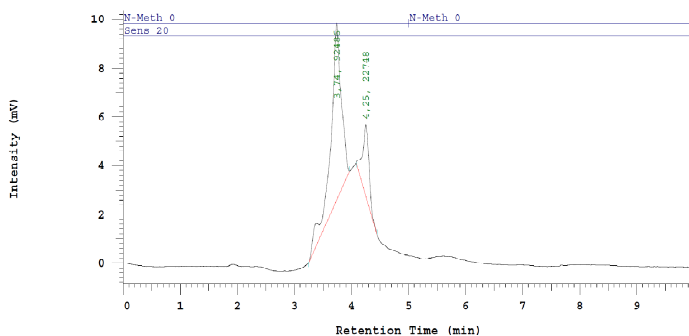
10. kép: 1 órás mintavételezés 4-es minta (máj) kromatogramja

D-7000 HSM: Samples Series: 0468 Report: original System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12.04.25 15:22 Reported: 12.06.07 08:26
 Processed: 12.04.25 15:32
 Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\0468\
 Processing Method: zearalenon_120416
 System(acquisition): Sys 1 Series:0468
 Application: Samples Vial Number: 16
 Sample Name: 1/2 Vial Type: UNK
 Injection from this vial: 1 of 1 Volume: 10,0 ul
 Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: zearalenon_120416
 Column Type: Developed by: Szabi
 Pump A Type: L-7100
 Solvent A: ACNO Solvent B: h2o
 Solvent C: H2O Solvent D:
 Method Description: zearalenon toxin

11. kép: 1 órás mintavételezés 2-es minta (mell) kromatogramja

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12.04.25 15:11

Reported: 12.06.07 08:25

Processed: 12.04.25 15:21

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\0467\
Processing Method: zearalenon_120416

System(acquisition): Sys 1

Series:0467

Application: Samples

Vial Number: 15

Sample Name: ZEA 11ppm

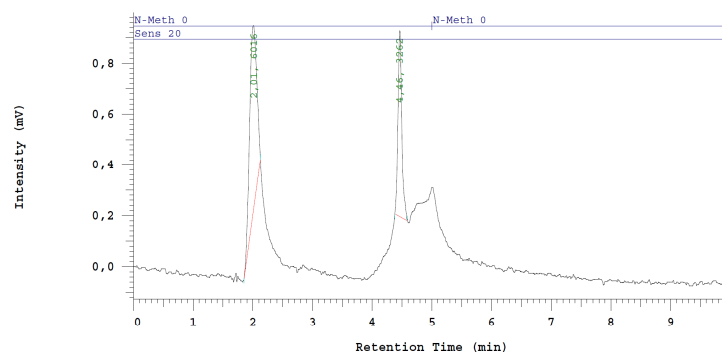
Vial Type: UNK

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10,0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: zearalenon_120416

Column Type:

Developed by: Szabi

Pump A Type: L-7100

Solvent A: ACNO

Solvent B: h2o

Solvent C: H2O

Solvent D:

Method Description: zearalenon toxin

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12.04.25 15:33

Reported: 12.06.07 08:26

Processed: 12.04.25 15:43

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\0469\
Processing Method: zearalenon 120416

System(acquisition): Sys 1

Series:0469

Application: Samples

Vial Number: 17

Sample Name: 1/3

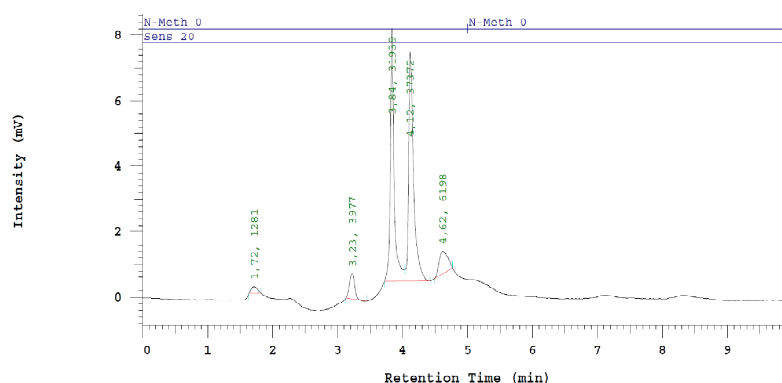
Vial Type: UNK

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10,0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: zearalenon_120416

Column Type:

Developed by: Szabi

Pump A Type: L-7100

Solvent A: ACNO

Solvent B: h2o

Solvent C: H2O

Solvent D:

Method Description: zearalenon toxin

12. kép: 1 órás mintavételezés 3-es minta (comb) kromatogramja

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12.04.25 15:55

Reported: 12.06.07 08:27

Processed: 12.04.25 16:05

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\0471\

Processing Method: zearalenon_120416

System(acquisition): Sys 1

Series:0471

Application: Samples

Vial Number: 19

Sample Name: 1/5

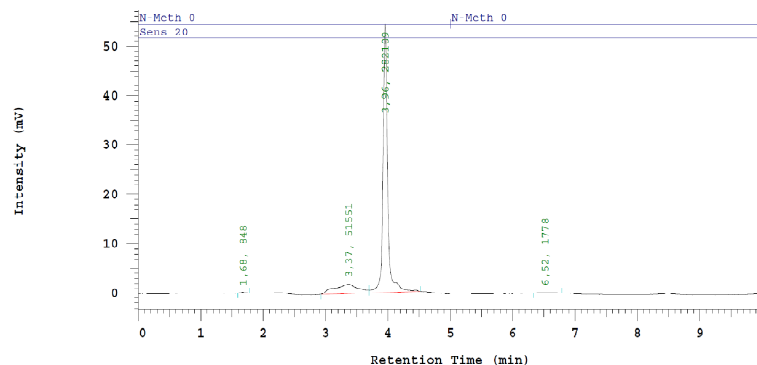
Vial Type: UNK

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10,0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: zearalenon_120416

Column Type:

Developed by: Szabi

Pump A Type: L-7100

Solvent A: ACNO

Solvent B: h2o

Solvent C: H2O

Solvent D:

Method Description: zearalenon toxin

13. kép: 1 órás mintavételezés 5-es minta (zúza) kromatogramja**D-7000 HPLC System Manager Report**

Analyzed: 12.04.25 16:06

Reported: 12.06.07 08:27

Processed: 12.04.25 16:17

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\0472\

Processing Method: zearalenon_120416

System(acquisition): Sys 1

Series:0472

Application: Samples

Vial Number: 20

Sample Name: 1/6

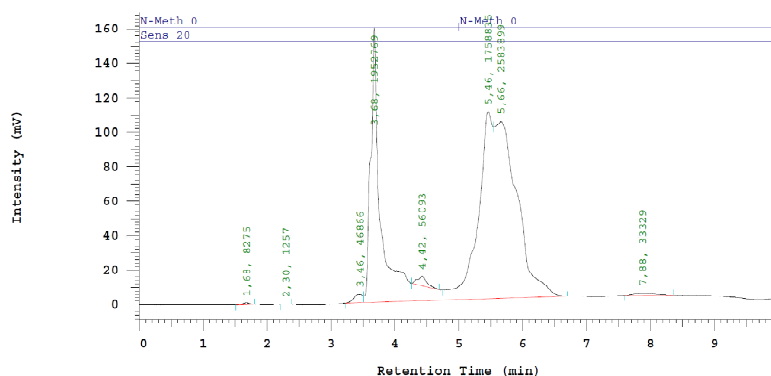
Vial Type: UNK

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10,0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: zearalenon_120416

Column Type:

Developed by: Szabi

Pump A Type: L-7100

Solvent A: ACNO

Solvent B: h2o

Solvent C: H2O

Solvent D:

Method Description: zearalenon toxin

14. kép: 1 órás mintavételezés 6-es minta (bél) kromatogramja

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12.04.25 16:29

Reported: 12.06.07 08:28

Processed: 12.04.25 16:39

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\0474\

Processing Method: zearalenon_120416

System(acquisition): Sys 1

Series:0474

Application: Samples

Vial Number: 22

Sample Name: 2/2

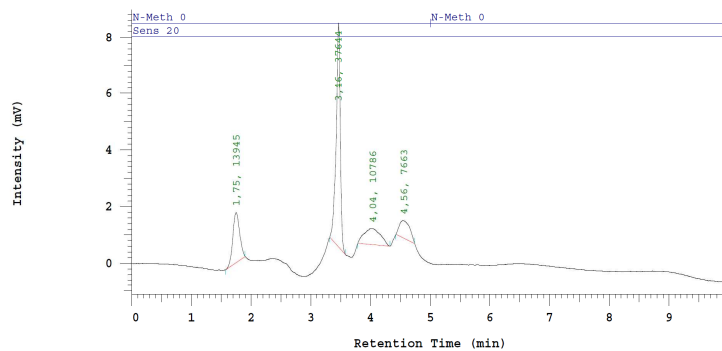
Vial Type: UNK

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10,0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: zearalenon_120416

Column Type:

Developed by: Szabi

Pump A Type: L-7100

Solvent A: ACNO

Solvent B: h2o

Solvent C: H2O

Solvent D:

Method Description: zearalenon toxin

5. kép: 5 órás mintavételezés 2-es minta (szív) kromatogramja**D-7000 HPLC System Manager Report**

Analyzed: 12.04.25 17:25

Reported: 12.06.07 08:33

Processed: 12.04.25 17:35

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\0479\

Processing Method: zearalenon_120416

System(acquisition): Sys 1

Series:0479

Application: Samples

Vial Number: 27

Sample Name: 9/1

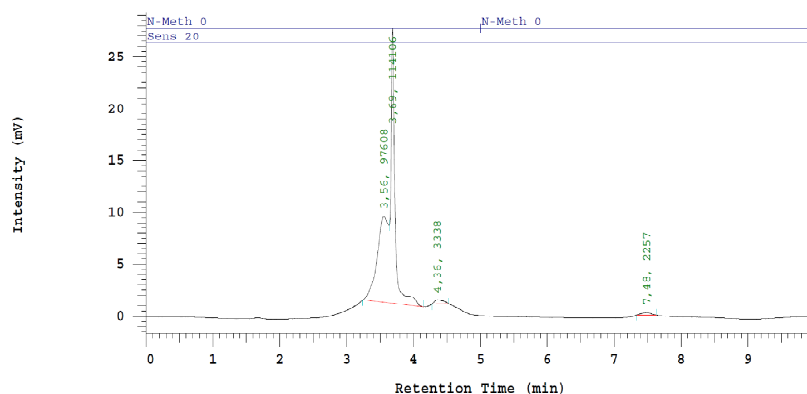
Vial Type: UNK

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10,0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: zearalenon_120416

Column Type:

Developed by: Szabi

Pump A Type: L-7100

Solvent A: ACNO

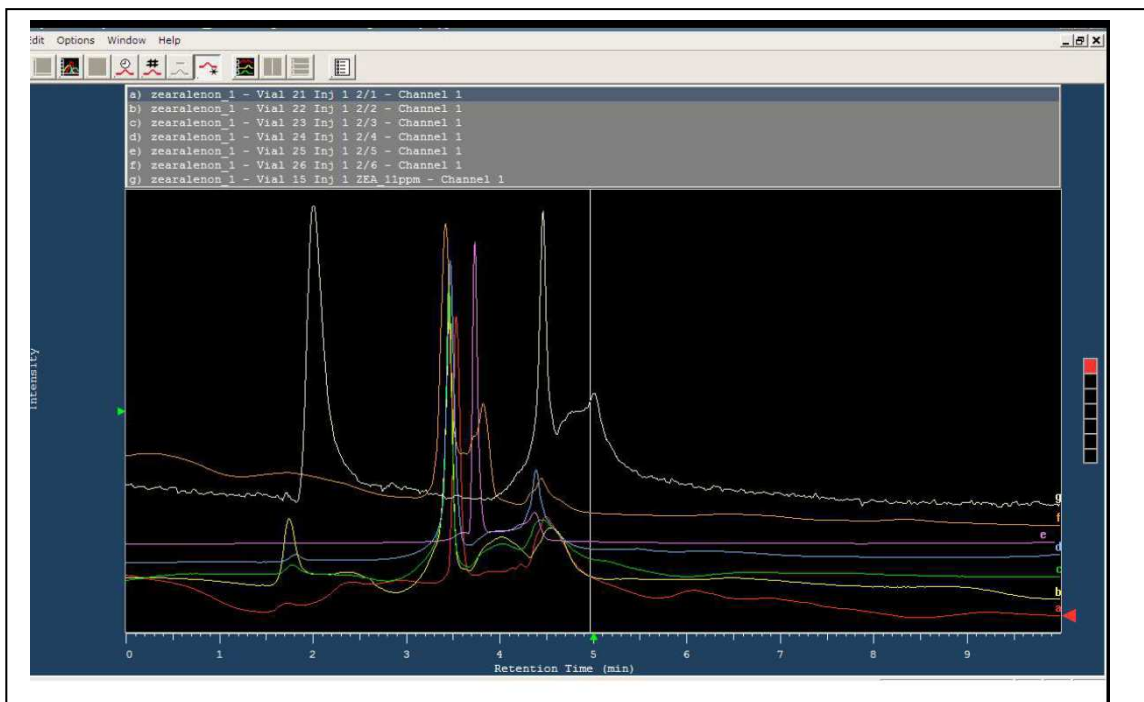
Solvent B: h2o

Solvent C: H2O

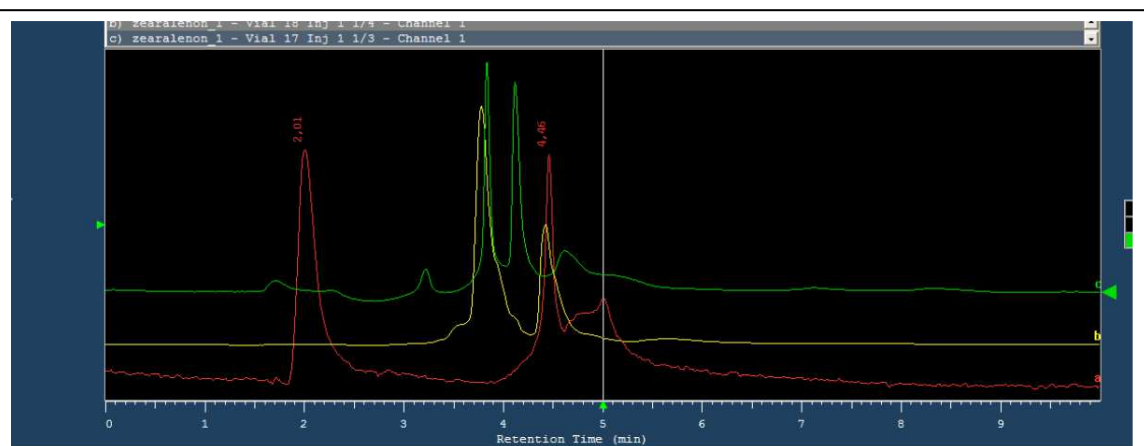
Solvent D:

Method Description: zearalenon toxin

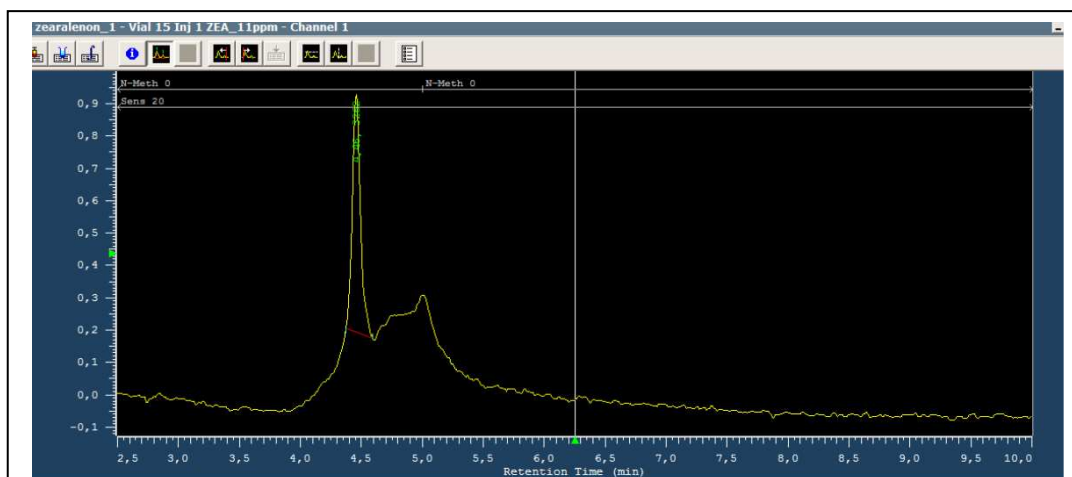
16. kép: 5 órás mintavételezés 6-es minta (bél) kromatogramja



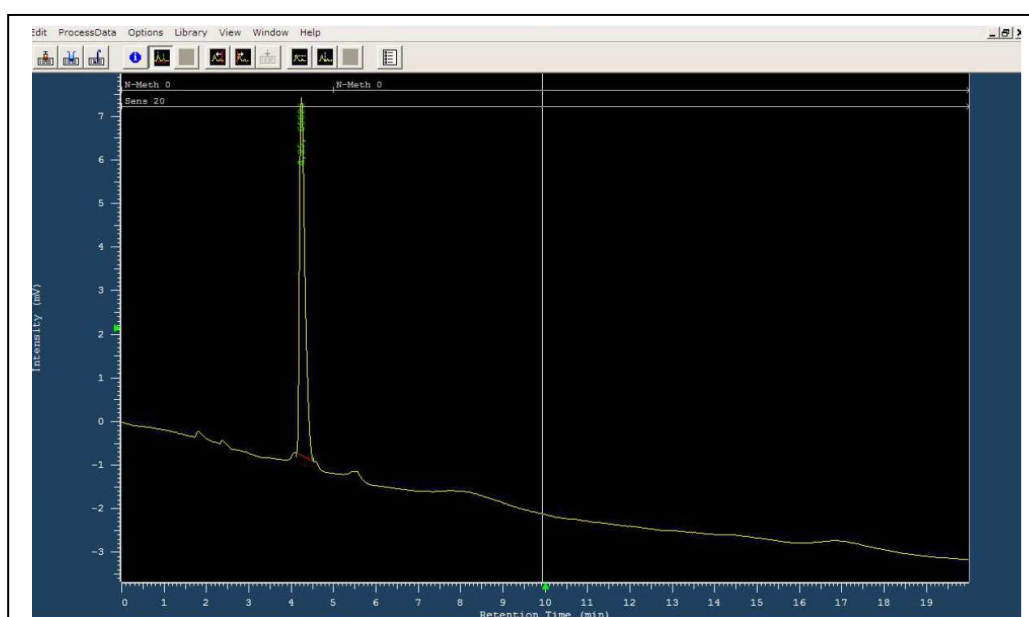
17. kép:2. Széria vizsgálata 316 nm-en: a „g” kromatogram a ZEA std minta kromatogramja, 4,46 mp-es csúcsa egyezik a 2/4-es minta (máj), 2,5 (zúza), 2/6 (bél) kromatogramjával, a többiben feltételezhetően megtalálható a ZEA.



18. kép: Zearalenon sztenderd minta kromatogramja 316 nm-en (11 ppm-es, sárga) 4,46 mp retenciós idővel megjelenő csúcs és az 1/4-es minta (máj) 4,45-ös csúcsa megegyezik.



19. kép: Zearalenon toxin kromatogramja 316 nm –en



20. kép: Zearalenon toxin kromatogramja 236 nm –en

