

***Fusarium* illetve *Aspergillus* fajok által termelt toxinok
degradációjának analitikai vizsgálata műgyomorban**

Gál István, Kémia BSc.

ESZTERHÁZY KÁROLY FŐISKOLA, TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR

Témavezető: B. Tóth Szabolcs, adjunktus

Készült az Eszterházy Károly Főiskola Élelmiszertudományi Intézetének
Kémia, Borászati kémia és Borászat Tanszékén

Eger

2012

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
1. Irodalmi áttekintés	3
1.1. A mikotoxinok képződéséről és szervezetbe jutásáról általában.....	3
1.1.1. Aflatoxin B ₁	4
1.1.2. Zearalenon.....	6
1.2. Az aflatoxin B ₁ biológiai hatásai, kémiai jellemzői.....	8
1.3. A zearalenon biológiai hatásai, kémiai jellemzői	9
1.4. Az emberi tápcsatorna felépítése, főbb jellemzői	14
1.4.1. Gyomor	16
2. Célkitűzések	18
3. Anyag és módszer	20
3.1. A felhasznált anyagok forrása.....	20
3.2. A műgyomor modell felépítése, működése	20
3.3. Elvégzett emésztési kísérletek	22
3.4. A mikotoxinok kivonásának menete, elve	40
3.4.1. Az elválasztás elve	40
3.4.2. Folyadék-folyadék extrakció.....	42
3.4.3. Mikotoxin mennyiségének mérése az extraktumban HPLC-vel.....	46
4. Eredmények és kiértékelésük	55
4.1. A kémhatás szerepe (zearalenon)	55
4.2. Az emésztőenzim (pepszin) szerepe (zearalenon).....	56
4.3. A pepszin működését befolyásoló tényezők (zearalenon).....	57
4.4. A szervesetlen és kis molekulatömegű szerves összetevők (zearalenon)	58
4.5. A nagy molekula tömegű szerves összetevők (zearalenon).....	60
4.6. A mucin szerepe (zearalenon).....	60
4.7. A kontaktidő szerepe (aflatoxin B ₁).....	61
4.8. A bélbaktériumok hatása (zearalenon)	61
5. Összegzés	62
5.1. Zearalenon degradációját befolyásoló tényezők	62
5.2. Aflatoxin B ₁ degradációját befolyásoló tényezők	62
6. Köszönetnyilvánítás.....	63
7. Irodalomjegyzék	64

1. Irodalmi áttekintés

1.1. A mikotoxinok képződéséről és szervezetbe jutásáról általában

A penészgombák által szekunder metabolitként termelt toxikus anyagszere termékek a mikotoxinok. Sokféle penészgomba faj termel mikotoxint, a helyzetet pedig bonyolítja, hogy egy faj többféle toxint is termelhet.

A penészgombákat a megtelepedés és mikotoxin termelés elsődleges helyszíne szerint besorolhatjuk szántóföldi és raktári penészgombákra, bár az újabb kutatások szerint¹ ez az elkülönítés nem tekinthető teljes mértékben irányadónak, mivel mindkét helyen előfordulhatnak jelentősebb mértékben.

A megtelepedett penészgombák által termelt mikotoxinok beszennyezik a különböző termesztett haszonnövényeket. Amennyiben ezeket közvetlenül emberi fogyasztásra termesztik, abban az esetben a mikotoxinok való kitettség fokozottabb, mintha a takarmánynövényekből állati eredetű termékek közvetítésével jut a mérgezés az emberi szervezetbe, mivel az állati szervezet annak egy részét lebontja. Utóbbi megállapítás alól azonban kivételt képez, ha a mikotoxin dúsul valamely szövetben, szervben és így koncentráltabb dózist képvisel elfogyasztása esetén.

Tehát az élelmiszerekkel együtt, többek között a penészgombák által termelt különböző mikotoxinokat is a szervezetünkbe jutattunk. A szervezetbe jutáshoz, illetve a felszívódáshoz a mikotoxinoknak keresztül kell haladniuk a tápcsatornán, mely során mind minőségileg, mind mennyiségileg változást szenvedhetnek, azaz elbomolhatnak, illetve átalakulhatnak az emésztés során.

A szájjal, illetve a nyállal rövid ideig érintkezik az élelem a tápcsatornán való áthaladása során, első ízben a gyomorban tölt huzamosabb időt, majd innen a bélrendszerbe történő kerülésével történik meg a felszívódása a mikotoxinokkal egyetemben.

A tanulmányban szereplő *Aspergillus* fajok által termelt aflatoxin B₁, valamint a *Fusarium* fajok által termelt zearalenon mikotoxinokat vizsgáljuk, elsősorban a gyomorban (, pontosabban gyomor modellben, azaz műgyomorban) történő degradációjukat figyelve, valamint a bélbaktériumokkal való kölcsönhatást a bélrendszerre vonatkozólag.

Mivel a 2 féle mikotoxin bizonyos jellemzőiben különbözik, ezért külön-külön, részletesebben a következőekben kerülnek tárgyalásra az eredetük, a képződésükhöz szükséges feltételek és bioszintézisük menete:

¹ Mesterházy Ákos: A mikotoxinok és az élelmiszerbiztonság, a megoldás lehetőségei.

1.1.1. Aflatoxin B₁

Elsősorban raktári penészgombák termelik. Az alábbi táblázat² a legjellemzőbb 3 fajt írja le, valamint toxicitásukat szájon át adagolva patkányok esetén:

Mikotoxin	<i>Aspergillus</i> faj	Termény	LD50 mg/kg
Aflatoxin B ₁	<i>A. flavus</i>	kukorica	7,2
Aflatoxin B ₁	<i>A. parasiticus</i>	diófélék	7,2
Aflatoxin B ₁	<i>A. nomenus</i>	gyapotmag	7,2

1. táblázat

Többek között, mivel az aflatoxinok között ez a legmérgezőbb, ezért a mikotoxin határértéket a 0-8 ppb intervallumban határozták meg³ a különböző élelmiszeripari termékek esetén. Ezek közül itt csak a 0-1 ppb határértékű termékeket mutatom be:

Aflatoxin B ₁ tartalmú termék	Maximálisan megengedett koncentráció (µg/kg)
Csecsemők és kisgyermek számára készült feldolgozott gabonaalapú élelmiszerek és bébitelemek.	0,10
Speciális gyógyászati célokra szánt diétás élelmiszerek kifejezetten csecsemők számára.	0,10
Nyerstej, tejalapú termékek előállításához használt tej és hőkezelt tej.	-
Az anyatej-helyettesítő és anyatej-kiegészítő tápszerek, beleértve a tejalapú anyatej-helyettesítő tápszert és a tejalapú anyatejkiegészítő tápszert.	-

2. táblázat

Képződésének feltételei⁴:

- Hőmérséklet: széles hőmérsékleti skála.
- Relatív páratartalom: > 70 %
- Kémhatás: $4 \leq \text{pH} \leq 8$

Továbbá fontos a megfelelő nedvességtartalom és tápanyag ellátottság is a penészgombák számára a megtelepedéshez, illetve a mikotoxin termeléshez.

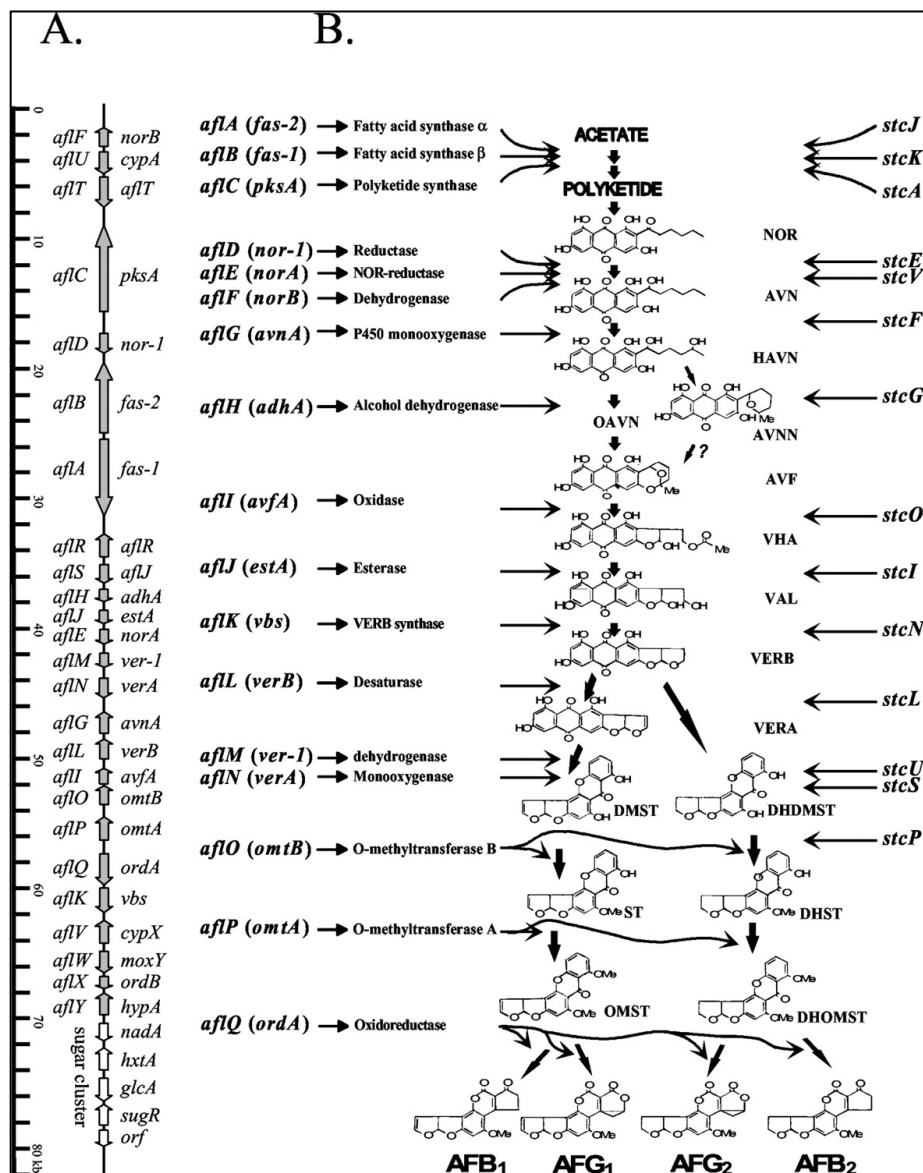
Az aflatoxin B₁ bioszintézise során először hexanoát képződik. Ehhez kapcsolódik egymás után 7 db malonil-CoA, mely során minden egyes kapcsolódás után a malonil-csoport „szabad” végén dekarboxileződésnek kell végbemennie, hogy újabb kondenzáció jöjjön létre. Így minden malonil-CoA kapcsolódás során a 6 C atomos kiindulási vegyület 2 C atommal bővül. Így jön létre a $6 + 2 \times 7 = 20$ C atomból álló vegyület, mely ciklizálódik.

² Abramson (1998) szerint.

³ 1881/2006/EK RENDELET (2006. december 19.) alapján.

⁴ Parádi Tímea: Mikotoxinok az élelmiszerekben című előadása alapján.

A további lépéseket, illetve az adott lépéseket szabályozó gének a következő képről⁵ olvashatóak le:



1. kép (A.: szabályozó génszakasz. B.: az átalakításban résztvevő enzim.)

A keletkezett aflatoxin B₁ (a képen: AFB₁) pedig a már ismertetett útvonalon (növény → állat → ember, illetve növény → ember) bejuthat az emberi szervezetbe. A szervezetbe történő bevitel a tápcsatornán keresztül valósul meg. Ha a bőrfelülettel lép kontaktusba, abban az esetben is lehetséges a szervezetbe kerülése, azaz bőrön át is felszívódik.⁶ Kiürülése a keringéssel a vesén, illetve epén keresztül a bélcsatornán át bélsárral történik.⁷ (A kiürülés ideje a metabolizáció során keletkezett termékek minőségének függvénye.)

⁵ Jiujiang Yu, Perng-Kuang Chang, Kenneth C. Ehrlich, Jeffrey W. Cary, Deepak Bhatnagar, Thomas E. Cleveland, Gary A. Payne, John E. Linz, Charles P. Woloshuk and Joan W. Bennett: Clustered Pathway Genes in Aflatoxin Biosynthesis.

⁶ Boonen, Jente; Malysheva, Svetlana V.; Taevernier, Lien; Diana Di Mavungu, José; De Saeger, Sarah; De Spiegeleer, Bart: Human skin penetration of selected model mycotoxins.

⁷ Dr. Mézes Miklós: Takarmánytartalmak, takarmánytoxikológia.

1.1.2. Zearalenon

Elsősorban szántóföldi penészgombák termelik. A *Fusarium* fajok azonban képesek jelentősebb raktári fertőzéseket is okozni, mivel a mikotoxinok (zearalenon) képződésének kedvező hidegebb hőmérséklet a raktárakban biztosítva van.⁸ jellemző koncentráció intervallum zearalenon esetén 0,001-10,5 ppm.⁹

A zearalenont (, megjegyzendő, hogy a zearalenon féle vegyületekhez legalább 16 féle változat tartozik) termelő *Fusarium* fajok közül a következők jelentősek a gabonafélék fertőzöttsége szempontjából¹⁰:

<i>Fusarium</i> faj	Előfordulás gabonaféléken	Fertőzőképesség kalászon
<i>F. graminearum</i>	+++++	erős
<i>F. culmorum</i>	++	erős
<i>F. crookwellense</i>	++	erős
<i>F. equiseti</i>	++	szaprofita

3. táblázat: + igen ritka, ++ ritkán fordul elő, +++ közepes gyakoriság, ++++ gyakori, +++++ igen gyakori

Mint látható, hogy a *F. graminearum* előfordulása, mint zearalenon termelő faj, igen gyakori a gabonaféléken, melyek fontos és gyakori alapanyagai az emberi élelmiszereknek. Természetesen a takarmánynövényekből is juthat emberbe mikotoxin, de ez „csak” közvetve, állati eredetű élelmiszeripari termékek közvetítésével.

A zearalenon toxicitása: LD₅₀ (egér) > 5000 mg/kg.¹¹ Ennek tükrében az élelmiszerekben megengedett határértéke is magasabb az aflatoxin B₁-hez viszonyítva, mely a 20-200 ppb intervallumban került megállapításra.¹² Ezek közül a 20 ppb határértékkel rendelkezőket ismertetem az alábbiakban:

Zearalenon tartalmú termék	Maximálisan megengedett koncentráció (µg/kg)
Csecsemők és kisgyermek számára készült feldolgozott gabonaalapú élelmiszerek és bébitelek (a feldolgozott kukoricaalapú élelmiszerek kivételével).	20
Csecsemők és kisgyermek számára készült feldolgozott kukoricaalapú élelmiszerek.	20

4. táblázat

Bár a halálos dózisa a zearalenonnak relatíve magas, ez alatt a határérték alatt is képes krónikus vagy akut megbetegedéseket okozni többek között ösztrogén hatása miatt.¹³

⁸ Mesterházy Ákos: A mikotoxinok és az élelmiszerbiztonság, a megoldás lehetőségei.

⁹ Dr. Mézes Miklós: Takarmánytartalmak, takarmánytoxikológia.

¹⁰ *Fusarium* fajok Nelson et al. (1983) szerint.

¹¹ Abramson (1998) szerint.

¹² 1881/2006/EK rendelet (2006. december 19.) alapján.

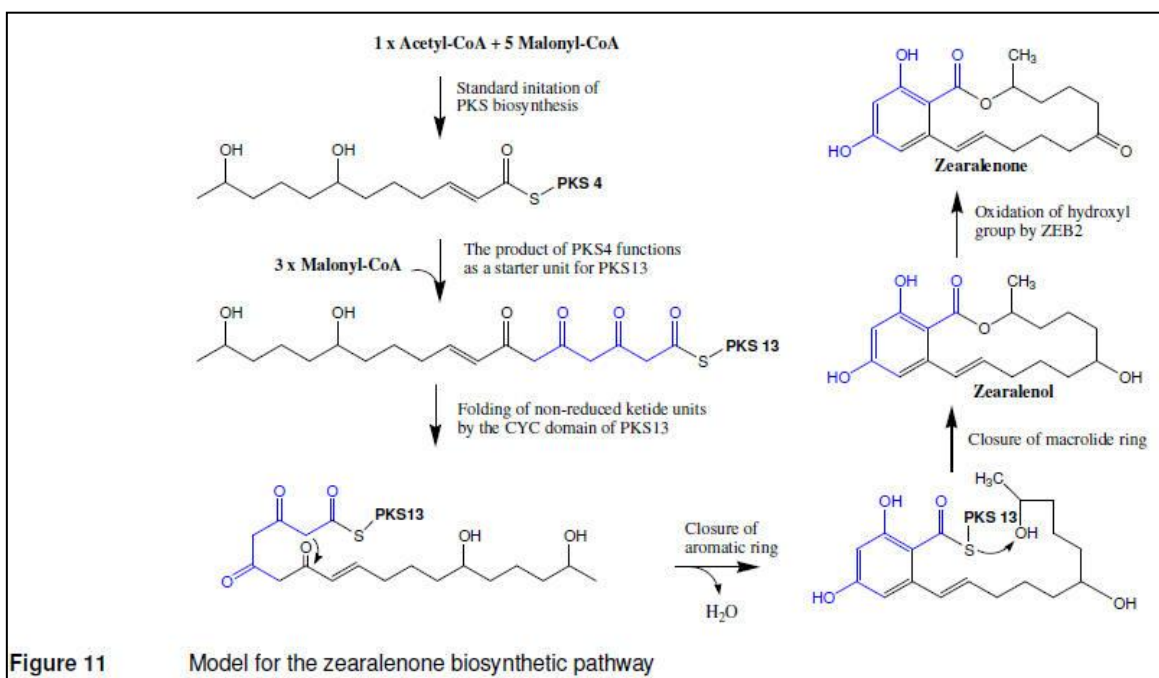
¹³ Mesterházy Ákos: A mikotoxinok és az élelmiszerbiztonság, a megoldás lehetőségei.

Képződésének feltételei¹⁴:

- Hőmérséklet: ~ 10 °C.
- Relatív páratartalom: > 70 %
- Kémhatás: $4 \leq \text{pH} \leq 8$

Továbbá itt is fontos a megfelelő nedvességtartalommal egyetemben a jó tápanyag ellátottság is.

Termelődését a gombában a *zea* nevű gén jelenléte szabályozza.¹⁵ A zearalenon bioszintézise a következő útvonalon megy végbe¹⁶:



2. kép (PKS: poliketid-szintáz enzim. Ketid: metilén- és karbonil-csoportot tartalmazó szerves vegyület.)

A keletkezett zearalenon jellemző szervezetbe jutási útvonala elsősorban: növény → ember, de lehetséges a növény → állat → ember útvonal is. A szervezetbe a tápcsatornán keresztül jut be. Képes adott esetben a bőrön át is felszívódni.¹⁷

A zearalenon kiürülési útvonala függ a metabolizációtól: lehetséges az epén keresztüli kiürülése¹⁸, illetve a bélsár mellett a vizelettel történő távozása¹⁹ a szervezetből.

(A zearalenon szervezetből való kiürülésének időtartama a metabolizáció során keletkezett termékek anyagi minőségétől függ.)

¹⁴ Parádi Tímea: Mikotoxinok az élelmiszerekben című előadása alapján.

¹⁵ Dr. Mézes Miklós: Takarmánytartalmak, takarmánytoxikológia.

¹⁶ <http://www.rasmusfrandsen.dk/zealenone.htm> (Letöltve: 2012. november 22.)

¹⁷ Boonen, Jente; Malysheva, Svetlana V.; Taevernier, Lien; Diana Di Mavungu, José; De Saeger, Sarah; De Spiegeleer, Bart: Human skin penetration of selected model mycotoxins.

¹⁸ Dr. Mézes Miklós: Takarmánytartalmak, takarmánytoxikológia.

¹⁹ Fitzpatrick DW, Arbuckle LD, Hassen AM: Zearalenone metabolism and excretion in the rat: effect of different doses.

1.2. Az aflatoxin B₁ biológiai hatásai, kémiai jellemzői

A májban metabolizálódik²⁰: részben e szervben közvetlenül, akut módon fejti ki hatásait, részben a metabolizáció során keletkező intermedierek útján okoz krónikus betegségeket.

Maga az aflatoxin B₁ metabolizációja során a **májsejtek nekrozisát** (elhalását) **idézi elő**, mivel a sejtek fehérjéivel reakcióba lépve gátolja a létfontosságú anyagok anyagcseréjét: a zsíroket, szénhidrátokét. Továbbá gátló hatásuk a fehérje szintézisben is megmutatkozik.

A májon kívül genomiális hatásait a májban történő oxidációja során képződő epoxidjai útján fejti ki. Ezek az anyagok képesek a DNS bázisai közé, kovalens kötést létesítve, beékelődni és ez által megváltoztatni a DNS szerkezetét.²¹ Ez a szerkezetváltozás ahhoz vezet, hogy a DNS osztódás során történő megkettőződése (replikáció) lassul, valamint lelassul a DNS-ről RNS-re történő információ átírása (transzkripció) és közvetve a fehérjeszintézis. A legnagyobb kárt az okozza, hogy a DNS javítási folyamatok is lelassulnak, aminek következtében a DNS-ben mutáció léphet fel. Ez az interkalációnak nevezett folyamat tehát erősen **mutagén hatású**.

Az interkaláció kihat a p53 nevű fehérjét kódoló génre is²²: a 249-es kodon 3. nukleotidjának bázisa megváltozik guaninról (G) timinre (T), aminek hatására hibás a transzkripció során átírt információ és diszfunkcionális fehérje képződik a transláció során. Ez a fehérje (lenne) a felelős a sejt működési zavara esetén a javításban szerepet játszó fehérjék szintézisének elindításában, illetve súlyosabb esetben a sejthalál indukálásában (apoptózis), mely a rákos sejtburjánzást hivatott meggátolni, és egy kaszkád soron át elvezet a kaszpáz-3 és kaszpáz-7 proteáz enzimek aktiválódásához, a sejt lebontásához. Ebben az esetben viszont ez a mechanizmus működésképtelen, amely a rákos sejtek fennmaradásához, illetve rákos folyamatok elindulásához vezet, melyeket összefoglalóan **onkogén** hatásnak nevezhetünk.

Az aflatoxin B₁ (AFB₁) az epoxidáción kívül más útvonalon is metabolizálódhat. Ezek közül alábbiak a jellemzők²³:

Hidroxiláció: AFB₁ → AFB₂ (aflatoxin B₂)/AFQ₁ (aflatoxin Q₁)/AFM₁ (aflatoxin M₁)

O-demetiláció: AFB₁ → AFP₁ (aflatoxin P₁)

Redukció: AFB₁ → Aflatoxicol

²⁰ Ananth S. Bommakanti, and Farid Waliyar: Importance of aflatoxins in human and livestock health.

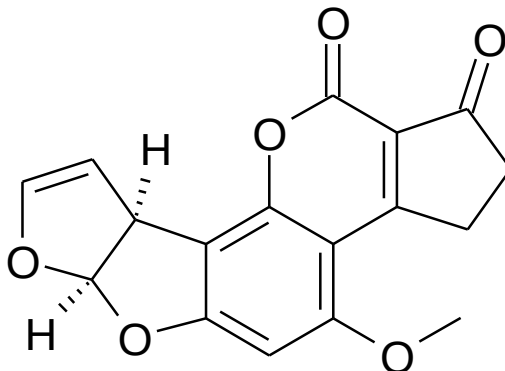
²¹ [http://en.wikipedia.org/wiki/Intercalation_\(chemistry\)#DNA_intercalation](http://en.wikipedia.org/wiki/Intercalation_(chemistry)#DNA_intercalation) (Hozzáférés: 2012. november 25.)

²² F. Aguilar, S. P. Hussain, and P. Cerutti: Aflatoxin B₁ induces the transversion of G→T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes.

²³ Dr. Mézes Miklós: Takarmánytartalmak, takarmánytoxikológia.

Az aflatoxinok közül ez a legmérgezőbb.²⁴

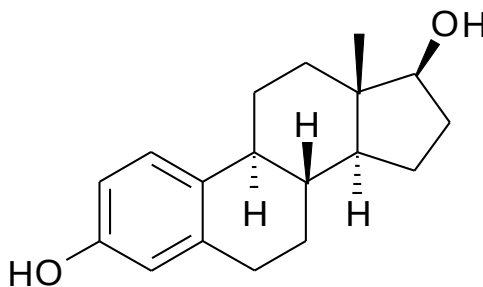
Az aflatoxin B₁ egy furano-kumarin származék.²⁵ Nem triviális elnevezés: ciklopenta(c)furo(3', 2' : 4, 5)furo(2, 3H)(1)benzopirán-1, 11-dion, 2, 3, 6a, 9a-tetrahidro-4-metoxi-, (6aR, 9aS)-. Összegképlete: C₁₇H₂₂O₆. Szerkezete:



3. kép

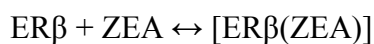
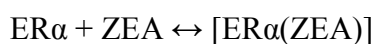
1.3. A zearalenon biológiai hatásai, kémiai jellemzői

Toxicitása mögött elsősorban az általa kiváltott ösztrogénhatás áll.²⁶ A zearalenon képes a 17β-ösztradiol nevű hormon helyettesítésére²⁷, annak receptorain, az ösztrogén receptorokon. A 17β-ösztradiol egy szteránvázis vegyület (szteroid), szerkezete:



4. kép

Az ösztrogén receptoroknak 2 formája létezik: α ösztrogén receptor és β ösztrogén receptor. A 17β-ösztradiol igen fontos tulajdonsága az, hogy képes mindkét féle ösztrogén receptorhoz kapcsolódni: az alfa (ERα) és béta (ERβ) változathoz is. Mivel a zearalenon (ZEA) képes helyettesíteni a 17β-ösztradiolt, ezért a mikotoxin is képes mindkettőhöz kötődni egyensúlyi folyamatban, melynek során egy receptor-ligand komplex jön létre:



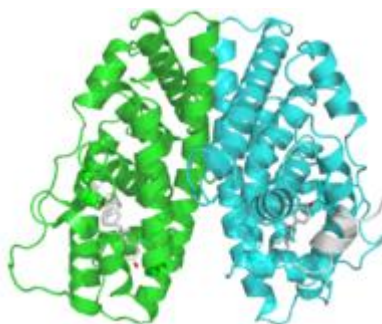
²⁴ 466/2001/EK rendelet (2001. március 8.) alapján.

²⁵ Parádi Tímea: Mikotoxinok az élelmiszerekben című előadása alapján.

²⁶ Mesterházy Ákos: A mikotoxinok és az élelmiszerbiztonság, a megoldás lehetőségei.

²⁷ http://www.knowmycotoxins.com/hu/documents/AsktheexpertBillCloseanswers_hu_000.pdf (Letöltés: 2012. október 6.)

Az ER α dimer fehérjének (ligandkötő régió) szerkezetének képe²⁸:



5. kép

Az ER β dimer fehérjének (ligandkötő régió) szerkezetének képe²⁹:



6. kép

A keletkezett komplex vegyület genom hatását a DNS általa szabályozott szakaszain (génjein) fejti ki azáltal, hogy a promoter régió megfelelő szekvenciáihoz kapcsolódik³⁰ (Hormone Response Elements, HRE: hormon válaszadó elemek) a DNS-kötő régiója segítségével. A HRE egy elkülönült, 3 nukleotidból felépülő, és azoknak pár darab invertált ismétlődéséből (megfelelő bázispárok ellentétes szálirányú olvasatából) felépülő rész, mely lehetővé teszi a komplex vegyület receptor részének dimerként való kapcsolódását. Az ösztrogénre specializálódott hormon válaszadó rész: ERE (Estrogen Response Elements). Itt transzkripciós faktorként működik a komplex vegyület, azaz gátló, illetve serkentő hatása van a génnek DNS-ről RNS-re való átíródására (transzkripcióra).³¹ A képződött mRNS a riboszómákban a fehérjék szintézisére van hatással. Mindamellet, hogy ez által **megzavarja a fehérjeszintézis normál működését**, a komplex molekula receptor részének ERE szakaszhoz történő kötődése során a DNS sérülése, károsodása lehetséges.³²

²⁸ http://en.wikipedia.org/wiki/File:PBB_Protein_ESR1_image.png (Letöltés: 2012. november 3.)

²⁹ http://en.wikipedia.org/wiki/File:Estrogen_receptor_beta_1U3S.png (Letöltés: 2012. november 3.)

³⁰ http://phd.sote.hu/mwp/phd_live/vedes/export/kakucsr.m.pdf (Letöltés: 2012. október 6.)

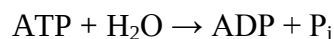
³¹ http://phd.sote.hu/mwp/phd_live/vedes/export/kakucsr.m.pdf (Letöltés: 2012. október 6.)

³² http://en.wikipedia.org/wiki/Estradiol#Mechanism_of_action_on_cancer_cell_proliferation (Hozzáférés: 2012. november 3.)

Ez nagyobb komplex vegyület koncentráció mellett értelemszerűen fokozottabban fennáll, azaz valószínűbb esemény. A sérülés hatására fokozódik a sejtosztódás, illetve a DNS másolás. Ennek hátterében az eukarióta sejt DNS sérülésre adott válasza áll: akár az első vagy második növekedési szakaszban (G_1 , G_2), akár a DNS replikációs szakaszban (S) van a sejtciklus, ezt a DNS sérülése megzavarja, stimulálja és elkezdődik a DNS javítása.³³ Eredményeként sejtszintű átalakulás (rákosodás), illetve a rákos sejtek szaporodása következhet be. Az ösztrogén onkogénként viselkedik ez esetben. **Rákkeltő és rák fenntartó** hatása.

Nem genom hatások: az ösztrogén befolyással bír az tüszőérést stimuláló hormonra (FSH, Follicle Stimulating Hormone), gátolja annak kiválasztódását.³⁴

A menete a következő³⁵: egy receptor-ligand komplex (G-fehérje) keletkezik. Ez képes az alábbi reakciót katalizálni:



A folyamat során aktiválódik az adenilát-cikláz nevű (egyébként inaktív) enzim. A továbbiakban ez az enzim katalizálja a ciklikus AMP (cAMP) keletkezését:



A cAMP hat a protein-kináz-A enzimre, mely foszforiláció útján további enzimeket aktiválhat. (Az FSH az agyalapi mirigy elülső lebenyében termelődik.)

Fenti kaszkád folyamatsor többek között kihat a gonadotropin (FSH; LH, Luteinizing Hormone, sárgatest serkenő hormon) felszabadító hormonra (Gonadotropin Releasing Hormone, GnRH).³⁶ A GnRH felszabadulása, szekréciója állandó frekvenciájú pulzáló folyamatban történik, mely frekvencia megszabja az FSH, LH kiválasztódását. A megváltozott G-fehérje szint megzavarja ezt az állandósult frekvenciát, ezáltal gátolja az FSH szekrécióját.

Sértések esetében, zearalenon koncentrációtól függően, az alábbi tüneteket eredményezte az FSH szekréció felborulása³⁷:

- **1-3 ppm** (termékenyítés előtti kocasüldő): a szeméremtest megduzzadása és kivörösödése, a mellbimbók és tejmirigyek megnagyobbodása, petefészek- és

³³ http://en.wikipedia.org/wiki/Estradiol#Mechanism_of_action_on_cancer_cell_proliferation (Hozzáférés: 2012. november 3.)

³⁴ http://www.knowmycotoxins.com/hu/documents/AsktheexpertBillCloseanswers_hu_000.pdf (Letöltés: 2012. október 6.)

³⁵ Gál Béla: Biológia 11.

³⁶ Liposits Zsolt: Szteroid hormonhatások a központi idegrendszerben. (A hivatkozás a felszabadító hormon (RH) tekintetében csak az LH felszabadítására utal LHRH-ként, ez gyakorlatilag a GnRH.)

³⁷ http://www.knowmycotoxins.com/hu/documents/AsktheexpertBillCloseanswers_hu_000.pdf (Letöltés: 2012. október 6.)

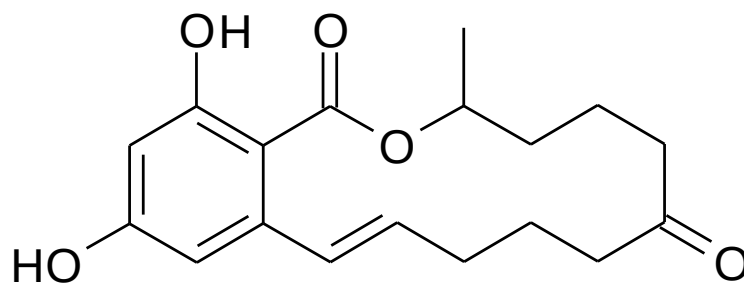
méhduzzanat, méh ödéma, sárgatest visszamaradása és szexuális inaktivitás, az ivari ciklus meghosszabbodása.

- **3-10 ppm** (kocák): álvemhesség (sárgatest visszamaradása), az alomszám csökkenése, a malacok születési súlyának csökkenése és egyenetlensége, gyenge, halvaszületett és lábszétcsúszásos malacok születése, a választás és termékenyítés közötti időszak meghosszabbodása.
- **30 ppm <** : teljes embrióelhalás kocák esetén. A sperma minőségének romlása, a rendellenes spermiumok arányának növekedése, a libidó csökkenése, szőrhullás, tasak ödéma kanok esetében. Minden állatnál végbél- és hüvelyelöesés, teljesítménycsökkenés.

Egyértelműen **nőgyógyászati betegségeket okoz**. Emellett a hím sertéseknél **termékenység csökkenést eredményez**.

További nem genom hatásként megfigyelték, hogy felborítja a Ca^{2+} ionok homeosztázisát, illetve hatással van különböző ioncsatornákra.³⁸ A kalpain nevű cisztein-proteáz enzim kalcium ion hatására aktiválódik és inaktíválja az anti-apoptikus fehérjét (például a Bcl-2) és aktiválja az apoptózisért felelős, azt végrehajtó enzimeket, a kaspázokat.³⁹ Az aktivált kaspázok (3, 7, 9, 12) közül a kaspáz-3 és kaspáz-7 a sor vége, melyek képesek a sejt fehérjéit hasítani, ezt a 2 kaspázt a kaspáz-9 is képes már aktiválni (kaspáz-kaspád). Tehát **sejtpusztulást is kiválthat**.

Maga a zearalenon konkrétan fenolos β -resorcin sav lakton.⁴⁰ A vegyület másféle, nem triviális elnevezése: (3S, 11E)-14, 16-dihidrox-3-metil-3, 4, 5, 6, 9, 10-hexahidro-1H-2-benzoxaciklotetradékén-1, 7 (8H)-dion. Összegképlete: $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_5$. Szerkezete:



7. kép

A zearalenon hőstabil vegyület.⁴¹ Ennek következtében képes megmaradni többek között a gabonafélékből sültt egyes készítményekben.

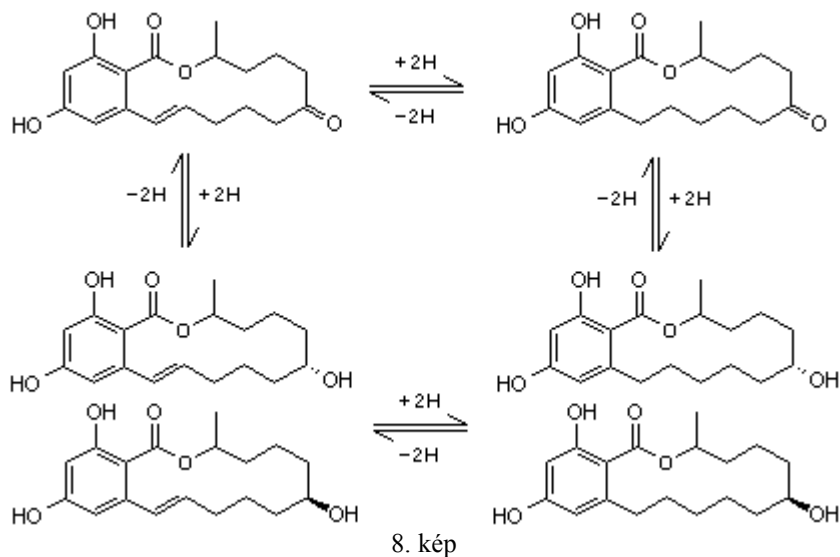
³⁸ http://phd.sote.hu/mwp/phd_live/vedes/export/kakucsr.m.pdf (Letöltés: 2012. október 6.)

³⁹ Jánossy Judit: Kalcium szabályozta sejtsztódás és túlélés vizsgálata mieloeritroid sejtekben. (Letöltés: 2012. október 6.)

⁴⁰ Parádi Tímea: Mikotoxinok az élelmiszerekben című előadása alapján.

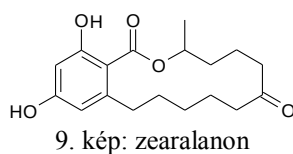
⁴¹ Richard Lawley: Zearalenone.

A szerkezetbe jutása után, az ott lévő körülmények (, például enzimek) hatására hidrogéneződhet a kettős kötésben résztvevő két szén atomon és/vagy a 7-es helyzetű szénen és a hozzá kapcsolódó oxigénen (karbonil-csoporton). A metabolitjai dehidrogéneződéssel vissza is alakulhatnak. Ezt a körfolyamatot az alábbi ábra szemlélteti:

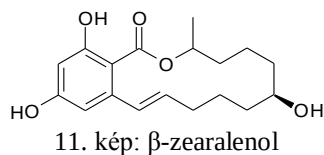
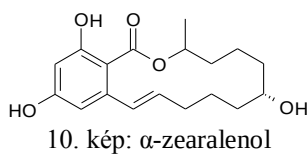


Az alábbi metabolitjai keletkezhetnek:

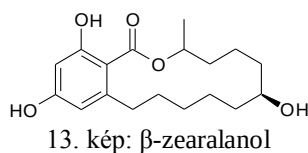
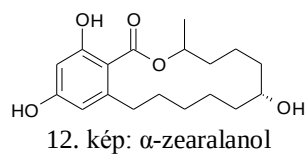
- A kettős kötés hidrogéneződése esetén:



- A karbonil-csoport hidrogéneződése esetén:



- A kettős kötés és a karbonil-csoport hidrogéneződése esetén:



Az α és β vegyületek a keletkezett –OH csoport térállásában különböznek.

1.4. Az emberi tápcsatorna felépítése, főbb jellemzői

Az emberi gyomor vázlatos felépítése⁴²:

1. Szájüreg:

A táplálék aprózódik a fogak által illetve a nyállal keveredik. A nyál tartalmazza az alábbi főbb komponenseket:

- Víz.
- Szervetlen sók ionjai.
- Immunglobulinok: bakteriosztatikus hatású anyagok.
- Mucin: glükoproteid, összetett fehérje. Nem fehérje része szénhidrát. (Mucinózus nyál.)
- Amiláz enzim: α -amiláz, amely a keményítőt és a glikogént maltózra bontja. (Szerózus nyál.)
- Lizozim enzim: elkezdi a murein glikozidkötéseit bontani. A murein a baktériumok sejtfalának alapanyaga: bakteriosztatikus hatás.

A nyelv továbbítja a táplálékot a garatba.

2. Garat:

Megtörténik a nyelés.

3. Nyelőcső:

A táplálék perisztaltikus mozgással halad tovább (, a tápcsatorna egészében is).

4. Gyomor:

Az emésztés lényegében itt kezdődik meg. A táplálék a gyomornedvvel keveredik. A gyomornedv tartalma:

- HCl (pH $\approx$ 2, az amiláz enzim tönkremegy).
- Mucin: kicsapódik savas közegben és ez által védi a sejtfalakat.
- Intrinsic faktor: fehérje, mely a B₁₂ vitamin felszívódását segíti.
- Pepszinogén: pepszinogén + HCl $\rightarrow$ pepszin. A pepszin fehérjéket bont kisebb polipeptidekké.
- Csecsemőknél kimozin enzim is található a gyomorban, mely az anyatej emésztésében segít.

5. Patkóbél:

A gyomorból az emésztés alatt álló táplálék a patkóbélbe kerül. Itt először az epe lép be a májból:

⁴² Gál Béla: Biológia 11 című tankönyve alapján.

- Víz.
- Ionok.
- Epesavak: koleszterinből képződnek. A lipázt aktiválják, segítik kölcsönhatását.
- Epefesték: a hemoglobin porfirin vázának májban történő bomlása során keletkeznek. Porfirin váz $\rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{biliverdin}$. A biliverdin redukciója során bilirubin keletkezik: biliverdin $\rightarrow$ bilirubin.

Ezután a hasnyál lép be a hasnyálmirigyből. A hasnyál összetétele:

- Tripszinogén: tripszinogén + enterokináz (a bélfal sejtjeiből) $\rightarrow$ tripszin. A tripszin a bázikus aminosava között bontja a kötéseket, valamint katalizálja önmaga képződését.
- Kimotripszinogén: kimotripszin képződik belőle, mely az aromás oldalláncú aminosavak mentén bont.
- Lipáz: lipid + lipáz $\rightarrow$ monoglicerid + 2 zsírsav (, a zsíroknak csak egy része bomlik).
- Amiláz: amiláz + keményítő (és más poliszacharidok) $\rightarrow$ maltóz. Az amiláz képes működni, mivel a patkóbélben már újból lúgos a kémhatás.
- Nukleáz: nukleinsav + nukleáz $\rightarrow$ nukleotidok (, csak részben megy végbe).

6. **Vékonybél:**

A vékonybélben a vékonybél falából kilépő vékonybélnedvvel keveredik az emésztés alatt álló táplálék. A vékonybélnedv összetétele:

- Lipáz: lipid + lipáz $\rightarrow$ monoglicerid + 2 zsírsav.
- Nukleáz: nukleinsav + nukleáz $\rightarrow$ nukleotidok. a bontás tovább megy: nukleotid $\rightarrow$ nukleozid + P_i .
- Maltáz: maltóz + maltáz $\rightarrow$ 2 α ,D-glükóz.
- Szacharáz: szacharóz + szacharáz $\rightarrow$ α ,D-glükóz + β ,D-fruktóz.
- Erepszin: peptidáz. Dipeptid + erepszin $\rightarrow$ 2 aminosav.

7. **Vastagbél:**

A tápanyagok felszívódnak. A vastagbél falán (cellulóz-bontó) baktériumok vannak: vitaminokat termelnek (B összetevői, K), cellulózt bontanak. E baktériumok alkotják a bélflórát. A bélsárral ürülő anyagok:

- Mucin tartalmú anyagok: a vastagbélben termelődnek, melyek a salakanyagok továbbítását szolgálják a bélrendszer e szakaszában.
- Tovább bomlott epefesték: barna színű vegyület keletkezik.

1.4.1. Gyomor

A gyomor perisztaltikus mozgása következtében a táplálék, illetve a gyomornedv elkeveredik.

A gyomor bevezető, illetve kivezető nyílásán gyűrű alakú záróizom helyezkedik, melyek lezárják ideális esetben a gyomrot, biztosítva benne egy bizonyos mértékű inert közeget, levegő (O₂) kis mértékben juthat csak be a gyomorba.

A gyomorban kifejezetten fontos jellemzők (paraméterek):

- Hőmérséklet
- Kémhatás
- Gyomornedv összetétel

A gyomornedv tartalmára vonatkozólag, illetve a gyomorban lévő paraméterek értékét tekintve irodalmi forrás⁴³ az alábbiakat határozza meg:

Hőmérséklet: 37 ± 2 °C

Kémhatás: pH = $1,30 \pm 0,02$

Gyomornedv összetétel:

Szervetlen összetevők:

- **NaCl** (175,3 g/l)
- **NaH₂PO₄** (88,8 g/l)
- **KCl** (89,6 g/l)
- **CaCl₂·2 H₂O** (22,2 g/l)
- **NH₄Cl** (30,6 g/l)
- **HCl** (37 m/m %)

Kis molekulatömegű szerves összetevők:

- **glükóz** (65 g/l)
- **glükoron sav** (2 g/l)
- **urea** (25 g/l)
- **glükozamin-hidroklorid** (33 g/l)

Nagy molekulatömegű szerves összetevők:

- **BSA** (Bovine Serum Albumin, szarvasmarha szérumalbumin)
- **pepszin**
- **mucin**

⁴³ Carolien H. M. Versantvoort, Agnes G. Oomen, Erwin Van de Kamp, Cathy J. M. Rompelberg, Adriënne J. A. M. Sips: Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food.

A gyomornedv összeállításánál a különböző anyagokból az alábbi táblázatban feltüntetett (térfogat vagy tömeg) mennyiségeket alkalmazták:

Vegyület	Bevitt mennyiség
NaCl	15,7 ml
NaH ₂ PO ₄	3,0 ml
KCl	9,2 ml
CaCl ₂ .2 H ₂ O	18 ml
NH ₄ Cl	10 ml
HCl	6,5 ml
glükóz	10 ml
glükoron sav	10 ml
urea	3,4 ml
glükozamin-hidroklorid	10 ml
BSA	1 g
pepszin	2,5 g
mucin	3 g

5. táblázat

A mesterségesen összeállított tápcsatornába fentiek mellett mikotoxinnal szennyezett táplálékot juttattak.

2. Célkitűzések

A műgyomorban történő emésztési kísérletek során annak felderítése a legfőbb cél, hogy adott mikotoxin adott körülmények között szenved-e degradációt. Amennyiben pedig bomlás tapasztalható, akkor az milyen körülménnyel vagy körülményekkel hozható összefüggésbe.

Ennek érdekében a különböző kiindulási, kísérleti, illetve bomlási paraméterek függvényében kerül vizsgálat alá a többi körülmény, illetve eredmény. (A kísérletek kezdetekor az idő (kontaktidő) került kijelölésre alap paraméterként, melynek függvényében kerülnek vizsgálatra az adott minták értékei, azonban a kísérletek eredményei, kivitelezési lehetőségei ezen a terven nagy mértékben módosítottak.) Ezek alapján, illetve a közöttük lévő korreláció figyelembevételével történik a bomlás hátterének feltárására tett válasz megadása.

Az in vitro megfigyelés során modellünknel cél volt az, hogy az emberi gyomrot a vizsgálat szerint fontos szempontokból jól leképezze az emésztési kísérlet, míg az említett szempontokon kívül eső összetevőket gyakorlatilag elhanyagolja. A műgyomor elsősorban így inkább kémiai modellje a szervnek, mint a biológiailag megfelelő leképezése. Természetesen az ilyen „vegyi” jellegű rendszer megalkotása szerepelt a célok között. Továbbá ez szolgált „helyszínül” a bélbaktériumokkal történő kísérlethez is, mely szintén a célok között szerepelt, mint a további tápcsatorna szakaszokban történő esetleges degradáció kimutatási módja.

Mint az irodalmi áttekintésben látható volt, a mikotoxinok igen jelentősen befolyásolják egészségünket, ezért igen nagy jelentőséggel bírhat annak ismerete, hogy a tápcsatorna adott szakaszában ebből mennyi bomlik el. Ennek ismerete segítséget nyújthat többek között a:

- határértékek precízebb beállításához,
- adott esetben a szervezetbe került mikotoxin semlegesítésére, amíg az fel nem szívódott a tápcsatornából,
- új mikotoxin mentesítési eljárások kidolgozásához.

A fentiekén kívül még számos területen is hasznosíthatóak lehetnek az eredmények.

A rögzített cél ez irányú elérése azért is lehet kiemelkedően fontos, mivel más módja az effajta vizsgálatoknak jelenleg nem áll rendelkezésre. Konkrétan fogalmazva: az élő emberi szervezetben, azaz emberekkel nem állhat szándékunkban ilyen kísérleteket

elvégezni. Ennek ellenére mégis fontos lenne információkat gyűjteni a kérdéssel kapcsolatosan.

Ezek a célkitűzések, illetve a mögöttük álló motivációs erők.

3. Anyag és módszer

3.1. A felhasznált anyagok forrása

A legtöbb alapanyag a Sigma-Aldrichtól került beszerzésre. Az alábbi táblázat tartalmazza a beszerzett vegyületek nevét, CAS számát és tételszámát:

Vegyület neve	CAS-szám	Tételszám
nátrium-klorid	7647-14-5	S7653 (Sigma-Aldrich)
nátrium-dihidrogénfoszfát	7558-80-7	S8282 (Sigma-Aldrich)
kálium-klorid	7447-40-7	P9333 (Sigma-Aldrich)
kalcium-klorid 2-hidrát	10035-04-8	C5080 (Sigma-Aldrich)
ammónium-klorid	12125-02-9	31107 (Sigma-Aldrich)
glükóz	50-99-7	G5767 (Sigma-Aldrich)
glükoron sav	6556-12-3	G5269 (Sigma)
urea	57-13-6	33247 (Sigma-Aldrich)
glükozamin hidroklorid	66-84-2	G4875 (Sigma)
emberi szérumalbumin	70024-90-7	A9511 (Sigma)
mucin (I-S típus)	84195-52-8	M3895 (Sigma)
pepszin (felnőtt forma)	9001-75-6	P7000 (Sigma)
sósav	7647-01-0	339253 (Sigma-Aldrich)
zearalenon	17924-92-4	Z2125 (Sigma)
aflatoxin B ₁	1162-65-8	A6636 (Sigma)
acetonitril	75-05-8	34851 (Sigma-Aldrich)

6. táblázat

A bélbaktérium szuszpenzió az alábbi gyártótól került megvételre:

Anyag neve	Gyártó cég, terméknév	Tételszám
bélbaktérium (szuszpenzió)	Sanofi-Aventis Zrt., Normaflore	4821120A

7. táblázat

3.2. A műgyomor modell felépítése, működése

A műgyomorban lévő gyomornedv az alábbi paraméterek szerint lett kialakítva (vastagon szedve a megváltoztatott/kibővített összetevők, paraméterek, világos szürkén szedve a kihagyott összetevők):

Hőmérséklet: **37 ± 3 °C**

Kémhatás: **pH = 0 - 14**

Gyomornedv összetétel:

Szervetlen összetevők:

- NaCl (175,3 g/l)
- NaH₂PO₄ (88,8 g/l)
- KCl (89,6 g/l)

- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (22,2 g/l)
- NH_4Cl (30,6 g/l)
- HCl (37m/m %)

Kis molekulatömegű szerves összetevők:

- glükóz (65 g/l)
- glükoron sav (2 g/l)
- urea (2,5 g/l)
- **glükózamin-hidroklorid** (33 g/l)

Nagy molekulatömegű szerves összetevők:

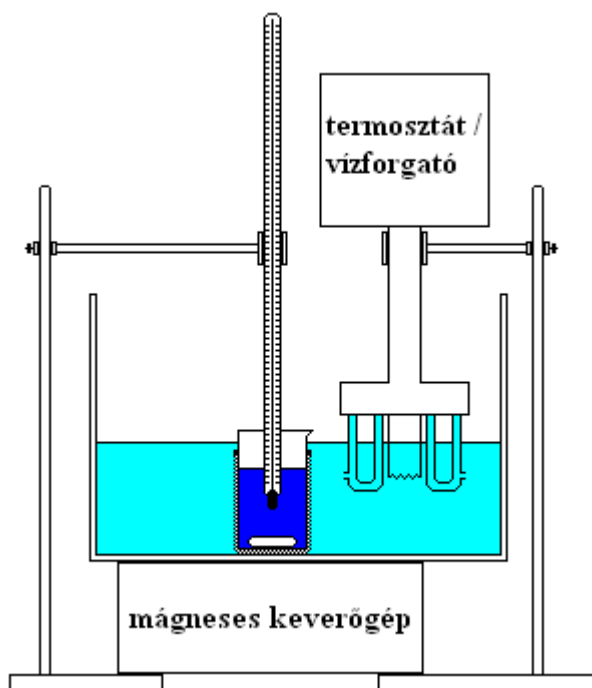
- **HSA** (Human Serum Albumin, emberi szérumalbumin)
- pepszin
- mucin

További anyagok:

- H_2O (desztillált víz)
- **bélbaktérium szuszpenzió**
- **cc. NaOH**

A gyomor modellünk nyílt rendszer.

A műgyomor (gyomor modell) összeállításának rajza:



14. kép

A higanyos hőmérő (bal oldalon) szolgál a hőmérséklet mérésére, monitoringjára a belső főzőpohárban. A főzőpohárba egy fémháló van ráhúzva, hogy megnövelje az átlag

sűrűségét ne mozgassa azt a felhajtóerő, illetve az alumíniumedényben áramló termosztáló folyadék. A termosztáló folyadék megfelelő hőmérsékletéről és áramoltatásáról egy elektromos termosztát/vízforgató berendezés gondoskodik (jobb oldalon). Azért van szükség közvetítő közegre a főzőpohárban lévő gyomornedv megfelelő hőmérsékleten tartásához, mivel ha a gyomornedv a fűtőszállal közvetlenül érintkezik, akkor nagyobb hőt kap, ami a gyomorban le nem játszódó folyamatokat eredményezhet. A főzőpohárban egy mágneses keverő biztosítja a gyomornedv keveredését, egyszersmind reprezentálva a perisztaltikát. Egy-egy kísérlet után a reakciók befagyasztásra kerülnek, a keletkezett termék (minta) lehűtve, a fagyasztóban kerül tárolásra mérőlombikokban, csiszolatos dugóval lezárva.

A kémhatás előzetesen pH mérő készülékkel kerül beállításra cc. HCl segítségével. A gyomornedv (oldat) összeállítása és pH beállítása után kerül beinjektálásra a mikotoxin oldat a gyomornedvbe, majd ezt 20-35 perces emésztés (inkubálás) követi a műgyomor leírásánál rögzítettek szerint.

3.3. Elvégzett emésztési kísérletek

Mindenekelőtt a szükséges oldatokat kellett előállítani az alábbiak szerint:

NaCl oldat elkészítése:

NaCl (175,3 g/l):

1 l = 1000 ml $\rightarrow$ 175,3 g

200 ml $\rightarrow$ 175,3 g : 5 = 35,06 g

NaH₂PO₄ oldat elkészítése:

NaH₂PO₄ (88,8 g/l):

1 l = 1000 ml $\rightarrow$ 88,8 g

200 ml $\rightarrow$ 88,8 g : 5 = 17,76 g

KCl oldat elkészítése:

KCl (89,6 g/l):

1 l = 1000 ml $\rightarrow$ 89,6 g

200 ml $\rightarrow$ 89,6 g : 5 = 17,92 g

CaCl₂·2 H₂O oldat elkészítése:

CaCl₂·2 H₂O (22,2 g/l):

1 l = 1000 ml $\rightarrow$ 22,2 g

200 ml $\rightarrow$ 22,2 g : 5 = 4,44 g

NH₄Cl oldat elkészítése:

NH₄Cl (30,6 g/l):

1 l = 1000 ml → 30,6 g

200 ml → 30,6 g : 5 = 6,12 g

Glükóz oldat elkészítése:

C₆H₁₂O₆ (65 g/l):

1 l = 1000 ml → 65 g

200 ml → 65 g : 5 = 13 g

Glükoron sav oldat elkészítése:

C₆H₁₀O₇ (2 g/l):

1 l = 1000 ml → 2 g

200 ml → 2 g : 5 = 0,4 g

Urea oldat elkészítése:

CO(NH₂)₂ (25 g/l):

1 l = 1000 ml → 25 g

200 ml → 25 g : 5 = 5 g

Ezek után következtek a kísérletek:

1. kísérlet (2012.03.02.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

15,7 ml NaCl

3,0 ml NaH₂PO₄

9,2 ml KCl

18 ml CaCl₂·H₂O

HCl pH beállításhoz

KIS MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES (OLDATOK):

10 ml C₆H₁₂O₆

MIKOTOXIN:

250 µl ZEA (36 ppm)

pH ≈ 1,33

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - 37,0 °C (START)

35:00 - 37,6 °C (VÉGE)

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 39,8 °C.

2. kísérlet (2012.03.09.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

15,7 ml NaCl

3,0 ml NaH₂PO₄

9,2 ml KCl

18 ml CaCl₂·H₂O

10 ml NH₄Cl

HCl pH beállításhoz

KIS MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES (OLDATOK):

10 ml C₆H₁₂O₆

10 ml C₆H₁₀O₇

3,4 ml CO(NH₂)₂

MIKOTOXIN:

250 µl ZEA (32 ppm)

pH ≈ 1,33

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - 36,5 °C (START)

35:00 - 37,5 °C (VÉGE)

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 38,8 °C.

3. kísérlet (2012.03.09.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

15,7 ml NaCl

3,0 ml NaH₂PO₄

9,2 ml KCl

18 ml CaCl₂·H₂O

10 ml NH₄Cl

HCl pH beállításhoz

KIS MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES (OLDATOK):

10 ml C₆H₁₂O₆

10 ml C₆H₁₀O₇

MIKOTOXIN:

250 µl ZEA (32 ppm)

pH ≈ 1,32

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - 37,5 °C (START)

35:00 - 37,0 °C (VÉGE)

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 39,2 °C.

4. kísérlet (2012.03.09.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

15,7 ml NaCl

3,0 ml NaH₂PO₄

9,2 ml KCl

18 ml CaCl₂·H₂O

10 ml NH₄Cl

HCl pH beállításhoz

KIS MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES (OLDATOK):

10 ml C₆H₁₂O₆

3,4 ml CO(NH₂)₂

MIKOTOXIN:

250 µl ZEA (32 ppm)

pH ≈ 1,33

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - 37,0 °C (START)

35:00 - 37,3 °C (VÉGE)

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 38,7 °C.

Víz folyhatott a mintába.

5. kísérlet (2012.03.23.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

15,7 ml NaCl

3,0 ml NaH₂PO₄

9,2 ml KCl

18 ml $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

10 ml NH_4Cl

HCl pH beállításhoz

KIS MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES (OLDATOK):

10 ml $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$

NAGY MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES:

1,25 g pepszin

MIKOTOXIN:

250 μl ZEA (11 ppm)

$\text{pH} \approx 1,27$

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - 24,0 °C (START)

05:51 - 37,0 °C

45:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 38,2 °C.

A pH beállítás 30:00-nál történt meg.

6. kísérlet (2012.03.23.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

15,7 ml NaCl

3,0 ml NaH_2PO_4

9,2 ml KCl

18 ml $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

10 ml NH_4Cl

HCl pH beállításhoz

KIS MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES (OLDATOK):

10 ml $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$

10 ml $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$

3,4 ml $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$

NAGY MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES:

1,25 g pepszin

MIKOTOXIN:

250 µl ZEA (11 ppm)

pH ≈ 1,55

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - 24,0 °C (START)

06:18 - 37,0 °C

35:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 38,4 °C.

7. kísérlet (2012.03.30.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

34,65 ml H₂O

KIS MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES (OLDATOK):

5 ml C₆H₁₀O₇

NAGY MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES:

0,165 g pepszin

MIKOTOXIN:

250 µl ZEA (11 ppm)

pH ≈ NINCS BEÁLLÍTVA

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - START

03:17 - 37,0 °C

30:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 37,5 °C.

8. kísérlet (2012.03.30.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

34,65 ml H₂O

HCl pH beállításhoz

KIS MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES (OLDATOK):

5 ml C₆H₁₀O₇

NAGY MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES:

0,165 g pepszin

MIKOTOXIN:

250 µl ZEA (11 ppm)

pH ≈ 1,30

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - START

03:48 - 37,0 °C

30:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 37,5 °C.

9. kísérlet (2012.03.30.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

37,95 ml H₂O

KIS MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES (OLDATOK):

1,7 ml CO(NH₂)₂

NAGY MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES:

0,165 g pepszin

MIKOTOXIN:

250 µl ZEA (11 ppm)

pH ≈ NINCS BEÁLLÍTVA

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - START

04:48 - 37,0 °C

30:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 37,5 °C.

10. kísérlet (2012.03.30.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

37,95 ml H₂O

HCl pH beállításhoz

KIS MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES (OLDATOK):

1,7 ml CO(NH₂)₂

NAGY MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES:

0,165 g pepszin

MIKOTOXIN:

250 µl ZEA (11 ppm)

pH ≈ 1,45

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - START

03:38 - 37,0 °C

30:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 37,5 °C.

11. kísérlet (2012.04.06.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

15,7 ml NaCl

3,0 ml NaH₂PO₄

9,2 ml KCl

18 ml CaCl₂·H₂O

10 ml NH₄Cl

23,4 ml H₂O

MIKOTOXIN:

250 µl ZEA (11 ppm)

pH ≈ NINCS BEÁLLÍTVA

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - START

05:00 - 37,0 °C

30:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 38,5 °C.

Minimális (37,0 °C alatti) hőmérsékleti kiugrás értéke: 36,7 °C.

12. kísérlet (2012.04.06.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

79,3 ml H₂O

HCl pH beállításhoz

MIKOTOXIN:

250 µl ZEA (11 ppm)

pH ≈ 1,37

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - START

05:07 - 37,0 °C

30:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 38,0 °C.

13. kísérlet (2012.04.06.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

3,0 ml NaH₂PO₄

76,3 ml H₂O

MIKOTOXIN:

250 µl ZEA (11 ppm)

pH ≈ NINCS BEÁLLÍTVA

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - START

04:58 - 37,0 °C

30:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 37,8 °C.

14. kísérlet (2012.04.06.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

10 ml NH₄Cl

69,3 ml H₂O

MIKOTOXIN:

250 µl ZEA (11 ppm)

pH ≈ NINCS BEÁLLÍTVA

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - START

05:10 - 37,0 °C

30:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 37,9 °C.

15. kísérlet (2012.04.20.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

7,85 ml NaCl

1,5 ml NaH₂PO₄

4,6 ml KCl

9 ml CaCl₂·H₂O

5 ml NH₄Cl

HCl pH beállításhoz

KIS MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES (OLDATOK):

5 ml C₆H₁₂O₆

5 ml C₆H₁₀O₇

1,7 ml CO(NH₂)₂

NAGY MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES:

0,5 g HSA

1,25 g pepszin

MIKOTOXIN:

250 µl ZEA (11 ppm)

pH ≈ 1,18

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - START

09:41- 37,0 °C

35:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 38,1 °C.

A keverés 01:50-nél lett bekapcsolva.

A gyomortartalom összeállításánál zavaros, pépes oldat/elegy jött létre, mely a kísérlet végére kitisztult.

16. kísérlet (2012.04.27.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

39,65 ml H₂O

NAGY MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES:

0,5 g HSA

MIKOTOXIN:

250 µl ZEA (11 ppm)

pH ≈ NINCS BEÁLLÍTVA

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - START

08:47 - 37,0 °C

30:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 38,2 °C.

17. kísérlet (2012.05.04.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

39,65 ml H₂O

NAGY MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES:

0,5 g HSA

1,25 g pepszin

MIKOTOXIN:

250 µl ZEA (11 ppm)

pH ≈ NINCS BEÁLLÍTVA

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - START

03:41 - 37,0 °C

30:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 39,5 °C.

A gyomortartalom összeállításánál zavaros, pépes oldat/elegy jött létre, mely a kísérlet végére kitisztult.

18. kísérlet (2012.05.04.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

39,65 ml H₂O

HCl pH beállításhoz

NAGY MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES:

0,5 g HSA

1,25 g pepszin

MIKOTOXIN:

250 µl ZEA (11 ppm)

pH $\approx$ 1,81

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - START

10:17 - 37,0 °C

30:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 38,1 °C.

A gyomortartalom összeállításánál zavaros, pépes oldat/elegy jött létre, mely a kísérlet végére kitisztult.

1. kísérlet (újra) (2012.10.12.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

15,7 ml NaCl

3,0 ml NaH₂PO₄

9,2 ml KCl

18 ml CaCl₂·H₂O

HCl pH beállításhoz

KIS MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES (OLDATOK):

10 ml C₆H₁₂O₆

MIKOTOXIN:

250 µl ZEA (12 ppm)

pH $\approx$ 1,65

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - START

04:16 - 37,0 °C

30:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 37,6 °C.

19. kísérlet (2012.10.19.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

2,62 ml NaCl

0,5 ml NaH₂PO₄

1,53 ml KCl

3 ml CaCl₂·2 H₂O

1,67 ml NH₄Cl

HCl pH beállításhoz

KIS MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES (OLDATOK):

1,67 ml C₆H₁₂O₆

1,67 ml C₆H₁₀O₇

0,57 ml CO(NH₂)₂

NAGY MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES:

0,17 g HSA

0,5 g mucin

0,42 g pepszin

MIKOTOXIN:

250 µl ZEA (12 ppm)

pH ≈ 1,03

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - START

02:43 - 37,0 °C

30:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 38,2 °C.

A gyomortartalom összeállításánál zavaros, pépes oldat/elegy jött létre, mely a kísérlet végére is megmaradt.

20. kísérlet (2012.10.19.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

2,62 ml NaCl

0,5 ml NaH₂PO₄

1,53 ml KCl

3 ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

1,67 ml NH_4Cl

HCl pH beállításhoz

KIS MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES (OLDATOK):

1,67 ml $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$

1,67 ml $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$

0,57 ml $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$

NAGY MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES:

0,17 g HSA

0,5 g mucin

0,42 g pepszin

MIKOTOXIN:

250 μl ZEA (12 ppm)

pH $\approx 1,82$

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - START

05:02 - 37,0 °C

30:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 37,7 °C.

A gyomortartalom összeállításánál zavaros, pépes oldat/elegy jött létre, mely a kísérlet végére is megmaradt.

21. kísérlet (2012.10.25.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

13,2 ml H_2O

HCl pH beállításhoz

NAGY MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES:

0,1 g mucin

MIKOTOXIN:

250 μl ZEA (12 ppm)

pH $\approx 1,66$

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - START

10:14 - 37,0 °C

25:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 37,6 °C.

22. kísérlet (2012.10.26.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

2,62 ml NaCl

0,5 ml NaH₂PO₄

1,53 ml KCl

3 ml CaCl₂·2 H₂O

1,67 ml NH₄Cl

HCl pH beállításhoz

KIS MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES (OLDATOK):

1,67 ml C₆H₁₂O₆

1,67 ml C₆H₁₀O₇

0,57 ml CO(NH₂)₂

NAGY MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES:

0,17 g HSA

0,5 g mucin

0,42 g pepszin

MIKOTOXIN:

250 µl ZEA (12 ppm)

pH ≈ 0,34

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - START

08:47 - 37,0 °C

30:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 37,9 °C.

A gyomortartalom összeállításánál zavaros, pépes oldat/elegy jött létre, mely a kísérlet végére is megmaradt.

23. kísérlet (2012.10.26.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

2,62 ml NaCl

0,5 ml NaH₂PO₄

1,53 ml KCl

3 ml CaCl₂·2 H₂O

1,67 ml NH₄Cl

HCl pH beállításához

KIS MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES (OLDATOK):

1,67 ml C₆H₁₂O₆

1,67 ml C₆H₁₀O₇

0,57 ml CO(NH₂)₂

NAGY MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES:

0,17 g HSA

0,5 g mucin

0,45 g pepszin

BÉLBAKTÉRIUM:

2,5 ml Normaflore

MIKOTOXIN:

250 µl ZEA (12 ppm)

pH ≈ 1,91

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - START

04:00 - 37,0 °C

30:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 37,7 °C.

A gyomortartalom összeállításánál zavaros, pépes oldat/elegy jött létre, mely a kísérlet végére is megmaradt.

24. kísérlet (2012.11.08.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

79,3 ml H₂O

NaOH pH beállításához

MIKOTOXIN:

250 µl ZEA (12 ppm)

pH $\approx$ 11,02

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - START

06:13 - 37,0 °C

30:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 38,2 °C.

25. kísérlet (2012.11.08.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

79,3 ml H₂O

NaOH pH beállításhoz

MIKOTOXIN:

250 µl aflatoxin B₁ (8 ppm)

pH $\approx$ 11,70

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - START

05:33 - 37,0 °C

30:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 37,7 °C.

26. kísérlet (2012.11.08.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

2,62 ml NaCl

0,5 ml NaH₂PO₄

1,53 ml KCl

3 ml CaCl₂·2 H₂O

1,67 ml NH₄Cl

HCl pH beállításhoz

KIS MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES (OLDATOK):

1,67 ml C₆H₁₂O₆

1,67 ml C₆H₁₀O₇

0,57 ml $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$

NAGY MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES:

0,17 g HSA

0,5 g mucin

0,45 g pepszin

MIKOTOXIN:

250 μl aflatoxin B₁ (8 ppm)

$\text{pH} \approx 1,65$

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - START

04:41 - 37,0 °C

30:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 38,2 °C.

A gyomortartalom összeállításánál zavaros, pépes oldat/elegy jött létre, mely a kísérlet végére is megmaradt.

27. kísérlet (2012.11.08.)

ÖSSZETEVŐK:

SZERVETLEN (OLDATOK):

2,62 ml NaCl

0,5 ml NaH_2PO_4

1,53 ml KCl

3 ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

1,67 ml NH_4Cl

HCl pH beállításához

KIS MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES (OLDATOK):

1,67 ml $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$

1,67 ml $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$

0,57 ml $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$

NAGY MOLEKULATÖMEGŰ SZERVES:

0,17 g HSA

0,5 g mucin

0,45 g pepszin

MIKOTOXIN:

250 µl aflatoxin B₁ (8 ppm)

pH ≈ 1,82

TERMOSZTÁLÁSI VISZONYOK:

00:00 - START

05:21 - 37,0 °C

20:00 - VÉGE

MEGJEGYZÉS:

Maximális hőmérsékleti kiugrás értéke: 38,1 °C.

A gyomortartalom összeállításánál zavaros, pépes oldat/elegy jött létre, mely a kísérlet végére is megmaradt.

3.4. A mikotoxinok kivonásának menete, elve

Az emésztési kísérlet végén kapott oldatot (gyomornedvet) előkészítve (szükség esetén kiolvasztva) megtörtént belőlük a mikotoxin kivonása, majd mennyiségük meghatározása, visszamérése. Ez a következő eredményekkel járt, illetve fázisokból állt:

3.4.1. Az elválasztás elve

A kivonás során fontos az adott komponens vízben való **oldhatósága**, így **polaritása**, illetve a későbbiekben fontos lehet **kémhatása** is. Az elválasztás, illetve a későbbi kiértékelés szempontjából fontos adatok:

1. Szervetlen összetevők⁴⁴:

- NaCl: **poláris** anyag, só. Vízben **jól oldódik**, oldhatóság: 36,0 g/100 g (20 °C). **Nem hidrolizál** oldódása során.
- NaH₂PO₄: **poláris** anyag, só. Vízben **nagyon jól oldódik**, oldhatóság: 85,2 g/100 g (20 °C). **Savasan hidrolizál** (pK_s = 7,21): $\text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{HPO}_4^{2-}$.
- KCl: **poláris** anyag, só. Vízben **jól oldódik**, oldhatóság: 34,0 g/100 g (20 °C). **Nem hidrolizál** oldódása során.
- CaCl₂·2 H₂O: **poláris** anyag, só. Vízben **nagyon jól oldódik**, oldhatóság: 130,1 g/100 g (20 °C). **Nem hidrolizál** oldódása során.
- NH₄Cl: **poláris** anyag, só. Vízben **jól oldódik**, oldhatóság: 37,2 g/100 g (20 °C). **Savasan hidrolizál** (pK_s = 9,25): $\text{NH}_4^+ + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{NH}_3$.

⁴⁴ Az adatok közvetlen vagy közvetett forrása: Matematikai, fizikai, kémiai összefüggések, Négyjegyű függvénytáblázatok (, összeállítók: Dr. Hortobágyi István, Dr. Rajkovits Zsuzsanna, Dr. Wajand Judit).

- HCl: **poláris** anyag, sav. Vízben **jól oldódik**, oldhatóság: 62,1 g/100 g (20 °C). **Savas** oldódása során: $\text{HCl} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{Cl}^-$.
- NaOH: **poláris** anyag, bázis. Vízben **nagyon jól oldódik**, oldhatóság: 109 g/100 g (20 °C). Lúgos oldódása során: $\text{NaOH} \rightarrow \text{Na}^+ + \text{OH}^-$.
- H_2O : **poláris** anyag, amfoter.

2. Kis molekulatömegű szerves összetevők:

- $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$: **poláris** anyag. Vízben **nagyon jól oldódik**, oldhatóság: 91 g/100 g (25 °C).⁴⁵ **Semleges** oldódása során.
- $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$: **poláris** anyag. Vízben **jól oldódik**, oldhatóság: 48,5 g/100 g (25 °C). **Enyhén savas** oldódása során ($\text{pK}_s = 11,31$)⁴⁶: $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_5\text{COOH} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{C}_5\text{H}_9\text{O}_5\text{COO}^-$.
- $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$: **poláris** anyag. Vízben **nagyon jól oldódik**, oldhatóság: 108 g/100 g (20 °C). **Nem hidrolizál** oldódása során ($\text{pK}_s = 26,9$).⁴⁷

3. Nagy molekulatömegű szerves összetevők:

- HSA: **poláris** anyag (a fehérjék számos poláris részt tartalmaznak). Vízben **oldódik**, oldhatóság: 5 g/100 g (25 °C).⁴⁸ **Savas** **hidrolizál** oldódása során ($\text{pK}_s \sim 8,5$).⁴⁹ $\text{Fehérje-SH} \rightarrow \text{Fehérje-S}^- + \text{H}^+$.
- Mucin: **poláris** anyag (a fehérjék számos poláris részt tartalmaznak). Vízben **eléggé oldódik**, oldhatóság: 0,1 g/100 g (25 °C).⁵⁰ **Semleges** oldódása során.
- Pepszin: **poláris** anyag. Vízben **eléggé oldódik**, mivel a HCl hatására protonált (ionos) formában van jelen. Oldhatóság: 0,05 g/100 g (25 °C).⁵¹ Mivel a pepszinogén HCl-dal aktiválható, azaz H^+ ion felvétellel válik pepszinné, így maga a pepszin (, melyet a kísérletek során alkalmazunk és nem pepszinogénből állítjuk elő közvetve) **semleges** közegben gyakorlatilag **savas** oldódása során: $\text{pepszin} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{pepszinogén}$.

4. Mikotoxin:

- Zearalenon ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_5$, F-2 mikotoxin, ZEA): nagyméretű apoláris csoportokat tartalmaz, **apoláris**. Vízben **rosszul oldódik**, oldhatóság: 0,002 g/100 g (25 °C).⁵²

⁴⁵ <http://en.wikipedia.org/wiki/Glucose> (Hozzáférés: 2012. december 2.)

⁴⁶ <http://www.drugbank.ca/drugs/DB03156> (Hozzáférés: 2012. december 2.)

⁴⁷ <http://hu.wikipedia.org/wiki/Karbamid> (Hozzáférés: 2012. december 1.)

⁴⁸ <http://www.guideschem.com/dictionary/70024-90-7.html> (Hozzáférés: 2012. december 2.)

⁴⁹ Tong, Grace C.: Characterization of Cys-34 in serum albumin.

⁵⁰ http://www.caslab.com/Mucin_type_I-S_CAS_84195-52-8/ (Hozzáférés: 2012. december 2.)

⁵¹ <http://www4.mpbio.com/ecom/docs/proddata.nsf/1dc4471b047ea37e8525645d006ac0d5/9f63c0d7264f3bc852567ae004f9159?OpenDocument> (0,01 M-os HCl oldatban.) (Hozzáférés: 2012. december 2.)

⁵² <http://en.wikipedia.org/wiki/Zearalenone> (Hozzáférés: 2012. december 2.)

- Aflatoxin B₁ (C₁₇H₂₂O₆, AFB₁): **apoláris** anyag, nagyobb méretű apoláris csoportokat tartalmaz. Vízben **rosszul oldódik**, oldhatóság: 0,001 - 0,002 g/100 g (25 °C).⁵³

A fenti anyagok besorolása (vízben való) oldhatóság (L) szerint:

- 80 g/100 g ≤ : nagyon jól oldódik.
- 30 g/100 g ≤ L < 80 g/100 g: jól oldódik
- 1 g/100 g ≤ L < 30 g/100 g: oldódik
- 0,01 g/100 g ≤ L < 1 g/100 g: eléggé oldódik
- L < 0,01 g/100 g: rosszul oldódik

Fentiek alapján az alábbi táblázatot alkothatjuk meg, melyen belül elsősorban a polaritás (és oldhatóság) a lényeges a kivonás szempontjából:

Vegyület neve	Polaritása	Oldhatósága (vízben)	Kémhatása
nátrium-klorid	poláris	jól oldódik	semleges
nátrium-dihidrogénfoszfát	poláris	nagyon jól oldódik	savas
kálium-klorid	poláris	jól oldódik	semleges
kalcium-klorid 2-hidrát	poláris	nagyon jól oldódik	semleges
ammónium-klorid	poláris	jól oldódik	savas
sósav	poláris	jól oldódik	savas
nátrium-hidroxid	poláris	nagyon jól oldódik	lúgos
víz	poláris	-	semleges
glükóz	poláris	nagyon jól oldódik	semleges
glükoron sav	poláris	jól oldódik	enyhén savas
urea	poláris	nagyon jól oldódik	semleges
emberi szérumalbumin	poláris	oldódik	savas
mucin	poláris	eléggé oldódik	semleges
pepszin	poláris	eléggé oldódik	savas
zearalenon	apoláris	rosszul oldódik	-
aflatoxin B ₁	apoláris	rosszul oldódik	-

8. táblázat

Tehát a kivonás a gyomortartalomból, azaz a minta előkészítés megvalósítható a poláris-apoláris fázisok közti megoszlás alapján, mint az összetevők polaritása (oldhatósága) mutatja.

3.4.2. Folyadék-folyadék extrakció

A poláris molekulák általában ellentétes pólusaikkal kapcsolódnak össze (elektrosztatikus vonzás, dipol-dipol kölcsönhatás), amely egy stabilabb energetikai állapothoz vezet számukra, mivel csökken energiájuk. Viszont ha apoláris molekulával kell kapcsolódnuk (dipol-indukált dipol kölcsönhatás), abban az esetben ez számukra kevésbé jó energetikai

⁵³ <http://www.chemyq.com/En/xz/xz1/2929qxpjm.htm> (Hozzáférés: 2012. december 2.)

szempontból, mivel egy magasabb energiaszintet képvisel a poláris molekulával kapcsolódáshoz képest. Ezért a poláris anyagok „kiszorítják” maguk közül az apolárisakat, így tapasztalhatjuk azt, hogy a poláris anyagok polárisakban, míg az apoláris anyagok apolárisakban oldódnak jól.

2 db eltérő polaritású fázis között egy adott anyag mindig bizonyos arányban oldódik. A polárisabbak inkább a polárisabb fázisban, míg az apolárisabbak inkább az apoláris fázisban. Azonban az adott fázisokban kialakuló koncentrációk aránya állandó:

$$K = c_{\text{poláris}} / c_{\text{apoláris}} \quad (1)$$

Fenti egyenletben (1) a K a megoszlási hányados, amely kifejezi, melyik oldószerben oldódik jobban az illető anyag. Ha:

$K \rightarrow 0$, akkor az apoláris fázisban oldódik kiválóan.

$K \rightarrow \infty$, akkor a poláris fázisban oldódik kiválóan.

Megfelelően kicsi vagy nagy K beállítása esetén (, attól függően milyen fázisból, illetve milyen fázisba akarunk anyagot extrahálni) a kivonandó anyag jelentős része kioldható egyik fázisból a másikba.

Mivel a kísérletek során mindkét fázis folyadék, ezért ún. oldószeres extraakcióról beszélünk. Ekkor az adott polaritású oldószerből, az abban oldott ellentétes polaritású oldott anyagot oldjuk át egy ellentétes polaritású oldószerbe.

Esetünkben a poláris oldószer a víz, melyből az abban oldott apoláris mikotoxinokat extraháljuk ki apoláris fázisba, azaz acetonitrilbe.

A 2 fázis szétválása érdekében a poláris fázist NaCl segítségével telítjük, az idegen ionhatás pedig az acetonitril oldhatóságának csökkenését eredményezi a vízben. Ez az ún. kisózás módszere.

Az extrakció során rázóhenger került alkalmazásra, mely csiszolatos dugóval/parafilmmel került lezárásra. Ez lehetőséget adott a gyomornedv közvetlen mérésére is anélkül, hogy egyéb mérőedényzeteken át kellett volna a mintát mozgatni, mely a kontaminációt, illetve veszteséget csökkentette.

A kirázás menetét: extrakció előtt lemérjük a minták térfogatát, illetve a használt acetonitril (ACN) térfogatát is feljegyezzük, valamint az extrakció során elválasztott acetonitril térfogatot ($V_{\text{ext.}}$) is rögzítjük. Az apoláris fázis a poláris fázis fölött helyezkedik el, mivel: $\rho_{\text{H}_2\text{O}} > \rho_{\text{ACN}}$ ⁵⁴, azaz $1 \text{ g/cm}^3 > 0,786 \text{ g/cm}^3$. Így lehetőség nyílik arra, hogy automata pipettával a pontos térfogatú, tiszta és elvált apoláris fázis eltávolítható legyen.

⁵⁴ <http://hu.wikipedia.org/wiki/Acetonitril> (Hozzáférés: 2012. december 2.)

A kapott értékeket, alkalmazott eljárásokat és megfigyeléseket az alábbi táblázat tartalmazza (Sorszám: a kísérlet sorszáma, melynél az adott gyomornedv készült):

Sor-szám	Dátum (2012)	V _{minta}	V _{ACN}	V _{ext.}	Megjegyzés (gyomornedv; lezárás)
1.*	ELVESZETT				
1. újra	10.12.	56 cm ³	20 cm ³	9,5 cm ³	Színtelen, átlátszó oldat; parafilm.
2.	09.28.	79 cm ³	20 cm ³	2 cm ³	Színtelen, átlátszó oldat, fehér kicsapódások; parafilm.
3.	09.28.	76 cm ³	20 cm ³	5 cm ³	Színtelen, átlátszó oldat, fehér kicsapódások; parafilm.
4.	09.28.	69 cm ³	20 cm ³	6 cm ³	Színtelen, átlátszó oldat, fehér kicsapódások; parafilm.
5.	09.28.	68 cm ³	20 cm ³	5 cm ³	Színtelen, átlátszó oldat; parafilm. Fázishatáron vastag emulzió.
6.	09.28.	81 cm ³	20 cm ³	2 cm ³	Színtelen, átlátszó oldat; parafilm. Fázishatáron vékony emulzió.
7.	09.28.	39 cm ³	20 cm ³	12 cm ³	Színtelen, opálos oldat, fehér kicsapódások; parafilm. Fázishatáron vékony emulzió.
8.	09.28.	42 cm ³	20 cm ³	11 cm ³	Színtelen, átlátszó oldat; csiszolatos dugó.
9.	09.28.	39 cm ³	20 cm ³	2 cm ³	Színtelen, opálos oldat, sárga kicsapódások; parafilm. Fázishatáron vastag emulzió.
10.	09.28.	40 cm ³	20 cm ³	10 cm ³	Színtelen, átlátszó oldat; parafilm.
11.	09.28.	82 cm ³	20 cm ³	2 cm ³	Színtelen, átlátszó oldat; parafilm.
12.**	09.28.	84 cm ³	30 cm ³	8,5 cm ³	Színtelen, átlátszó oldat; parafilm.
13.	09.28.	82 cm ³	30 cm ³	12 cm ³	Színtelen, átlátszó oldat; parafilm.
14.	09.28.	82 cm ³	30 cm ³	9 cm ³	Színtelen, átlátszó oldat; parafilm.
15.	09.28.	45 cm ³	20 cm ³	7 cm ³	Barna, opálos oldat; csiszolatos dugó. Fázishatáron vastag emulzió.
16.	09.28.	42 cm ³	10 cm ³	6 cm ³	Sárga, átlátszó oldat; parafilm. Fázishatáron vastag emulzió.
17.	10.05.	42 cm ³	30 cm ³	3 cm ³	Sárga, átlátszó oldat; parafilm. Fázishatáron vastag emulzió.
18.	09.28.	43 cm ³	20 cm ³	8 cm ³	Barna, opálos oldat; parafilm. Fázishatáron vastag emulzió.
19.	10.19.	13 cm ³	10 cm ³	1,25 cm ³	Sárga, opálos oldat; parafilm. Fázishatáron vastag emulzió.
20.	10.19.	14 cm ³	10 cm ³	2,5 cm ³	Sárga, opálos oldat; parafilm. Fázishatáron vastag emulzió.
21.	10.25.	13 cm ³	10 cm ³	6 cm ³	Színtelen, opálos oldat; parafilm. Fázishatáron vékony emulzió.
22.	10.26.	13 cm ³	10 cm ³	1,25 cm ³	Sárga, opálos oldat; parafilm. Fázishatáron vastag emulzió.
23.	10.26.	16,5 cm ³	15 cm ³	1,75 cm ³	Sárga, opálos oldat; parafilm. Fázishatáron vastag emulzió.

24.	11.09.	80 cm ³	20 cm ³	1,5 cm ³	Szintelen, átlátszó oldat; parafilm.
25.	11.09.	80 cm ³	30 cm ³	13 cm ³	Szintelen, átlátszó oldat; parafilm.
26.	11.09.	12 cm ³	15 cm ³	1,25 cm ³	Sárga, opálos oldat; parafilm. Fázishatáron vastag emulzió.
27.	11.09.	13 cm ³	15 cm ³	1,25 cm ³	Sárga, opálos oldat; parafilm. Fázishatáron vastag emulzió.

9. táblázat (*: a későbbiekben 1. minta alatt az 1. (újra) minta értendő; **: a mérőlombikja nem volt lezárva)

Az elválasztott apoláris oldat gömblombikokba kerül elhelyezésre, hogy minél hamarabb elpárologjon az apoláris oldószer. Amennyiben „magától” nem párolódik be a minta, abban az esetben rotációs desztilláció (rotadeszt) segítségével történik meg a bepárlás.

Ezután a visszamaradt anyag térfogatának függvényében történik meg a mikotoxin felvétele folyadék fázisba 1 × vagy 2 × 500 µl acetonitril segítségével. Ezzel a minta előkészítés be is fejeződik. Az előkészítés adatai, megjegyzései (bepárlás és visszaoldás):

Minta	Dátum (2012)	V _{ACN}	Megjegyzés (visszaoldott oldat)
1.	10.12.	2 × 500 µl	Rotadesztelt. Szintelen, átlátszó oldat.
2.	10.12.	2 × 500 µl	Bepárlódott. Szintelen, átlátszó.
3.	10.12.	2 × 500 µl	Bepárlódott. Szintelen, átlátszó.
4.	10.12.	2 × 500 µl	Bepárlódott. Szintelen, átlátszó.
5.	10.12.	2 × 500 µl	Bepárlódott. Szintelen, átlátszó.
6.	10.12.	2 × 500 µl	Bepárlódott. Szintelen, átlátszó.
7.	10.12.	2 × 500 µl	Bepárlódott. Szintelen, átlátszó.
8.	10.12.	2 × 500 µl	Bepárlódott. Szintelen, átlátszó, vörösbarna kicsapódás.
9.	10.12.	2 × 500 µl	Bepárlódott. Szintelen, átlátszó.
10.	10.12.	2 × 500 µl	Bepárlódott. Szintelen, átlátszó.
11.	10.12.	2 × 500 µl	Bepárlódott. Szintelen, átlátszó.
12.	10.12.	2 × 500 µl	Bepárlódott. Sárga, átlátszó, sárga kicsapódás.
13.	10.12.	1 × 500 µl	Rotadesztelt. 500 µl folyadék megmaradt bepárlás után. Szintelen, átlátszó.
14.	10.12.	2 × 500 µl	Bepárlódott. Szintelen, átlátszó.
15.	10.12.	2 × 500 µl	Bepárlódott. Szintelen, átlátszó, fehér kicsapódás.
16.	10.12.	1 × 500 µl	Rotadesztelt. 500 µl folyadék megmaradt bepárlás után. Szintelen, átlátszó.
17.	10.12.	2 × 500 µl	Bepárlódott. Szintelen, átlátszó.
18.	10.12.	2 × 500 µl	Bepárlódott. Sárga, átlátszó, világosbarna kicsapódás.
19.	10.25.	2 × 500 µl	Rotadesztelt. Opálos, átlátszó.
20.	10.25.	2 × 500 µl	Rotadesztelt. Szintelen, átlátszó.
21.	10.25.	2 × 500 µl	Rotadesztelt. Szintelen, átlátszó, fehér kicsapódás.
22.	11.09.	2 × 500 µl	Rotadesztelt. Szintelen, átlátszó.
23.	11.09.	2 × 500 µl	Rotadesztelt. Szintelen, átlátszó.
24.	11.09.	2 × 500 µl	Rotadesztelt. Szintelen, átlátszó.
25.	11.09.	2 × 500 µl	Rotadesztelt. Szintelen, átlátszó.
26.	11.09.	2 × 500 µl	Rotadesztelt. Szintelen, átlátszó, fehér kicsapódás.
27.	11.09.	2 × 500 µl	Rotadesztelt. Pirosas, átlátszó.

10. táblázat

Ezután a minták (1000 µl) nagyteljesítményű kromatográfiás (HPLC) vizsgálatra kerülnek.

3.4.3. Mikotoxin mennyiségének mérése az extraktumban HPLC-vel

A keletkezett minták (extraktumok) az alábbi beállításokkal rendelkező HPLC készüléken (LaChrom L-7100 System) kerülnek vizsgálatra. A HPLC általános részei⁵⁵:

Eluens tároló: az eluens tárolására alkalmas, megfelelő térfogatú (többnyire) üvegedényzet. **Jelen esetben eluensként H₂O és acetonitril kerül felhasználásra.**

Kigázósító egység (degasser): feladata az eluensekbe oldódott gázok eltávolítása. Ez 2 okból is fontos: a pulzálásmentes, állandó nyomású áramlást akadályozza, mivel a szivattyúk működését befolyásolják (, a gázok összenyomhatóak a folyadékokkal szemben). A másik fontos ok, hogy a detektorba érve a nyomás lecsökkenése/megszűnése mellett a gázok kitágulnak, gázbuborékok keletkeznek, melyek zavarhatják a detektort.

Szivattyú: feladata az állandó és pulzálásmentes nyomás kialakítása, egyúttal a megfelelő térfogatáram létrehozása. **Áramlási sebesség: 0,7 ml/perc.**

Keverőegység: a kisnyomású keverő a szivattyú előtt helyezkedik el. A keverés mértékének szabályozása az adott eluensből történő szívási időtartam beállításával történik. Izokratikus elúció esetén a szívási időtartam azonos, időben állandó, míg gradiens elúció esetén a szívási időtartam változik az időben. **Gradiens elúció került alkalmazásra.**

Mintaadagoló: automata mintaadagoló (autosampler). Autosampler használata esetén előre beprogramozott mintatáblázat (mintavétel: honnan, mennyit, hányszor) alapján vételez megfelelő térfogatokat a berendezés a mintatartóba helyezett mintákból, így akár 50-100 vagy ennél több minta is vizsgálható folyamatosan, megszakítás nélkül, lehetővé téve akár a napi 24 órás működést is. **Az 1000 µl-ből vételezett térfogat: 10 µl.**

Állófázis és mozgófázis: fordított fázisú folyadékkromatográfiát alkalmaztunk. Az állófázis apolárisabb, mint a mozgó fázis. Állófázisnak csak azok az adszorpcióra képes anyagok alkalmasak, amelyek mechanikailag stabilisak és apoláris felülettel rendelkeznek: Módosított szilikagél (szilikagél felülete -C₆H₁₃, -C₈H₁₇, -C₁₈H₃₇, -C₆H₅ csoporttal módosítva). **Jelen esetben az alábbi kolonnát alkalmaztuk: Pinacelle RP C18 (250mm×4,6mm×5 µm). Kolonna termosztát: 40 °C. Mozgó fázis (eluens) összetétele: V_{ACN} : V_{H₂O} = 15 : 85 V/V.**

Detektor: a detektor megválasztásánál figyelembe kell venni, hogy milyen mennyiségű és anyagi minőségű komponenst akarunk elválasztani az oldatból. A detektorokban átfolyós küvetát alkalmazunk általában, melyek ürtartalma változó (1-10 µl). **Jelen esetben UV diódasoros detektort alkalmaztunk.**

⁵⁵ <http://ttk.pte.hu/analitika/letoltesek/jegyzet/ch07s03.html> alapján (Hozzáférés: 2012. december 2.)

A detektálás paraméterei eltértek a 2 mikotoxin esetén:

- Aflatoxin B₁:
 - $\lambda = 312 \text{ nm}$
 - Aflatoxin B₁ kimutatási határ a módszerrel: 5 $\mu\text{g/kg}$.
 - Detektálás alsó határa: 2 $\mu\text{g/l}$.
- Zearalenon:
 - $\lambda = 236 \text{ nm}$
 - Zearalenon kimutatási határ a módszerrel: 1 $\mu\text{g/kg}$.
 - Detektálás alsó határa: 0,1 $\mu\text{g/l}$.

A mérés elve, menete:

A vizsgálat módja, hogy egy ún. kollonában elhelyezkedő pórusos állófázison (C18) egy, a kimutatni kívánt komponenset (mikotoxin) tartalmazó vivő anyagot (eluens, mozgó fázist) áramoltatunk át oly módon, hogy a kolonna bemeneténél túlnyomást hozunk létre és a kialakuló nyomáskülönbség biztosítja az áramlást. Ennek alapja az, hogy az adott állófázis felszínén (polaritástól függően) különböző mértékben kötődnek meg az eluens komponensei, tehát megoszlásuk az álló és mozgó fázisban eltér. Esetünkben minél apolárisabb az anyag, annál inkább megkötődik az álló fázis felszínén, ami azt eredményezi, hogy az adott komponens a többihez képest nagyobb időintervallum alatt ér át. Ezt az időt hívjuk retenciós, azaz visszatartási időnek. Ez alapján minőségileg elválasztható a többi összetevőtől a mikotoxin.

Az álló fázisról előzőekben már értekeztünk. Ezek mellett azonban az eluens (mozgó fázis) összetétele is fontos a meghatározás szempontjából. Vizsgálatunkban a mikotoxin mellett 2 összetevőből áll az eluens:

- Víz (H₂O): erősen poláris anyag. Az eluens fontos összetevője relatíve kisebb retenciós ideje miatt, valamint a többi anyag vízben kerül oldásra.
- Acetonitril (CH₃CN, ACN): tartalmaz poláris (–CN) és apoláris (–CH₃) csoportot is, amelynek eredményeképpen amfipatikus tulajdonságokat élvez. Legnagyobb szerepe (, annak biztosítása mellett, hogy a vizsgálandó apoláris anyag az eluensben ne különüljön el másik fázisként, hanem abban oldva maradjon.) abban áll, hogy a vizsgálat ideje alatt (, mely több órát is igénybe vehet) mérsékli a mikotoxinok bomlását alacsony reaktivitású tulajdonsága folytán.

A fenti összetevők minősége erősen befolyásolja retenciós idejüket. Minél apolárisabb egy komponens, annál inkább megkötődik a szilárd fázison, tehát nő retenciós ideje. Viszont apolárisabb tulajdonságánál fogva jobb oldhatóságot biztosít a mikotoxinok számára,

melynek retenciós ideje így csökken. Tehát a legapolárisabb, és ezáltal legnagyobb visszatartási idejű összetevő (mikotoxin) retenciós idejéhez egyre inkább közelítenek. A 2 vagy több érték közelítése a detektálás után/alapján megalkotásra kerülő függvényképen (kromatogramon) az alapvonalból kiemelkedő függvénycsúcsok egymáshoz közelítését, rosszabb esetben egymásra torlódását eredményezik, amely a kiértékelést megnehezítheti, illetve lehetetlenné teheti.

Az eluens komponenseinek koncentrációja is befolyásolja a retenciós időt. A kolonna által megköthető, adott körülmények között maximális anyagmennyiségek oly jelentősen nem tudnak változni, mint amilyen mértékben változtathatóak az eluensbeli koncentrációk. Ez pedig azt eredményezi, hogy ha egy komponensből többet injektálunk a kolonnára, akkor az hamarabb halad át rajta, mivel relatíve kisebb része kötődik meg. E mellett az acetonitril növeli a mikotoxinok oldhatóságát az eluensben, így annak is megnő a koncentrációja a mozgó fázisban, ezáltal szintén gyorsabb átérést tesz lehetővé. A gyors átérésnek, azaz a kis retenciós időnek hátulütője viszont az, hogy a fentiekben leírtak szerint a függvénycsúcsok egymásra torlódhatnak.

Az eluens összetevői mellett fontosak még a következő fizikai paraméterek: hőmérséklet és a pumpák által kifejtett nyomás.

Még ha a kolonna külsején állandó hőmérsékletet biztosítunk, akkor is az eluensben egy adott keresztmetszetre nézve eltérő hőmérsékleti viszonyok alakulnak ki. A kolonna falához közelebbi folyadékarom nagyobb hőmérsékletű lesz, míg a kolonna közepén lévő folyadékarom kisebb. A nagyobb hőmérsékletű folyadék sűrűsége lecsökken. A sűrűség csökkenés hatására az adott folyadékarom gyorsabban fog áramlani, mivel ugyanakkora térfogata kisebb tömegű, így kisebb a tehetetlensége is. Ez azt eredményezi, hogy áramlási profilja fordított parabolika alakot ölt és ez annál jobban elnyúlik, minél nagyobb hőmérsékleti különbségek alakulnak ki az egyes folyadékaromok között. Mivel így az eluensben a vizsgálandó komponens is fordított parabolikászerűen „elnyúlik”, ezért a detektálás során a függvénycsúcsok kiszélesednek, azaz zónaszélesedés történik, ami a kiértékelésben hibát okozhat.

A pumpanyomás a térfogatáram nagyságát befolyásolja. Fontos, hogy állandó nyomást biztosítsunk, különben a létrejövő függvénycsúcsok kiértékelésében hiba léphet fel: a nyomás nagyságától függően több vagy kevesebb ideig van a detektorban a vizsgált komponens, így mennyiségi meghatározását akadályozza. A térfogatáram változásával a retenciós idők is megváltoznak, ami a minőségi analízist rontja.

Egy-egy mérés hosszú időt vesz igénybe, ezért meg kell próbálni a nagyobb koncentrációjú oldatok, elegyek azon jó tulajdonságát reprodukálni, hogy a retenciós idejük csökken, viszont ki kell küszöbölni a függvénycsúcsok egymásra torlódását. Ennek egyik módja az állandó koncentrációjú (izokratikus) elúció helyett a változó koncentrációjú (gradiens) elúció alkalmazása.

A mérés szempontjából meghatározó az a tény, hogy a HPLC készülékbe beinjektált mintában lévő vizsgálandó komponens mennyisége a vizsgálat kezdetén és végén (méréskor, illetve detektáláskor) eltér: egy része megkötődik az állófázison. Azonban a mérés során a ténylegesen (a mérés kezdetén) fennálló koncentráció viszonyokra vagyunk kíváncsiak. Ennek a problémának a megoldására ún. standard mikotoxin oldatokat alkalmazunk: 12 ppm-es oldatokat átáramoltatva a rendszeren vizsgáljuk a kialakuló csúcs alatti területeket. A minták csúcsterületeinek (A_{minta}) standardhoz (A_{standard}) viszonyított aránya meg fog egyezni a standardhoz ($c_{\text{standard}} = 12 \text{ ppm}$) viszonyított minta mikotoxin koncentrációjának (c_{minta}) arányával:

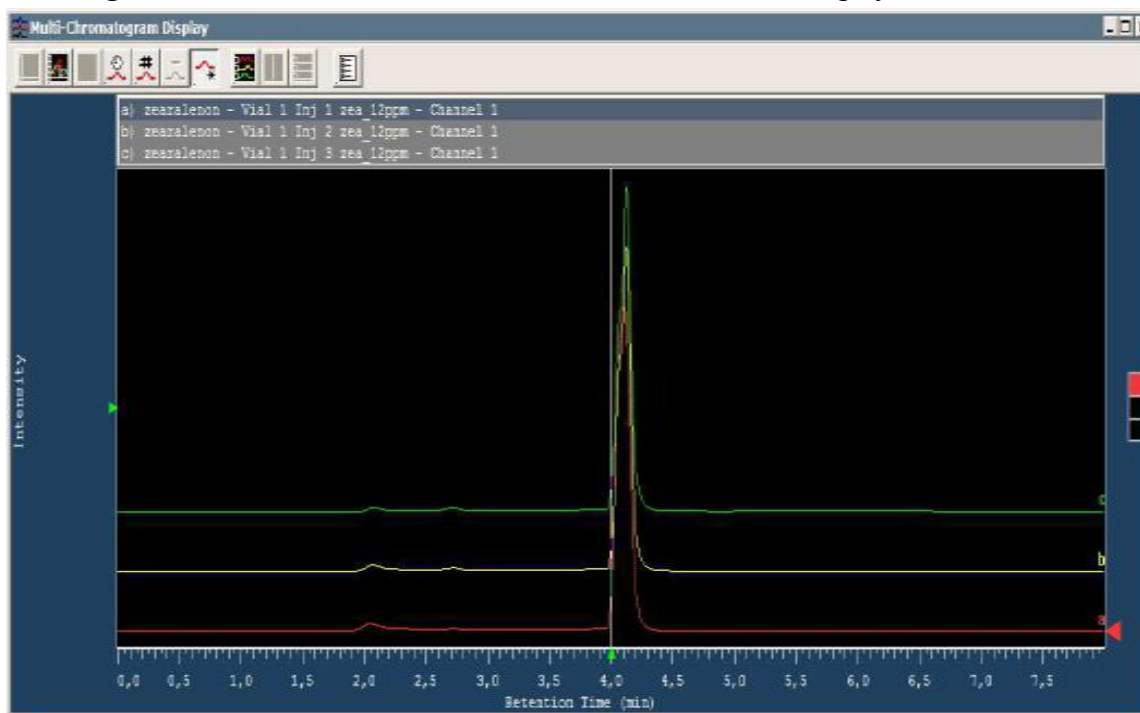
$$c_{\text{minta}} : 12 \text{ ppm} = A_{\text{minta}} : A_{\text{standard}} \quad (2)$$

Fenti egyenlőtlenséget (2) átrendezve:

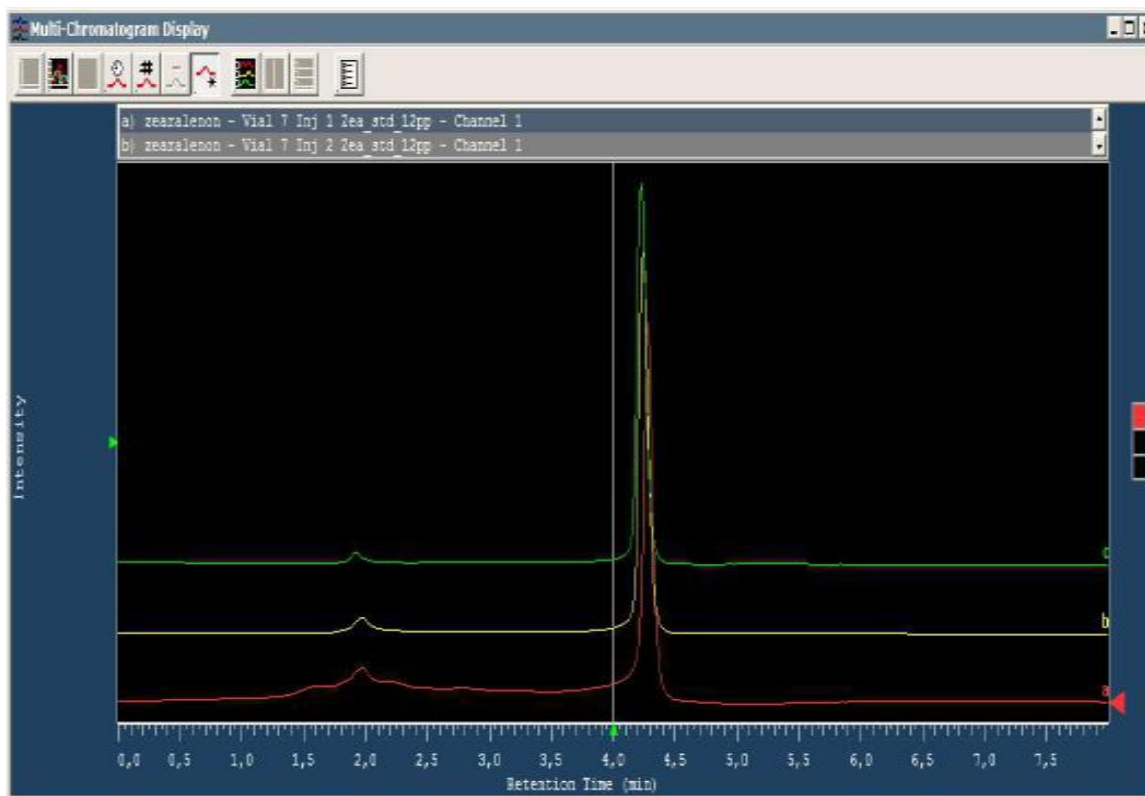
$$c_{\text{minta}} = (A_{\text{minta}} : A_{\text{standard}}) \cdot 12 \text{ ppm} \quad (3)$$

Tehát az egyenlet (3) alapján A_{minta} alapján meghatározható c_{minta} .

Az alábbi képeken látható, hogy a kromatográfiás programmal előállított kromatogramokon a zearalenon standardok csúcsa a retenciós tengely 4-es értékénél van:



15. kép



16. kép

A mérések során a retenciós érték növekedése, illetve eltolódása volt tapasztalható, mint azt az első (15. kép) és a később felvett (16. kép) kromatogram mutatja.

A detektálás UV diódasorral történik. $10 \text{ nm} < \lambda_{\text{UV}} < 400 \text{ nm}$. Meghatározott intenzitású (I_0) UV sugarakkal besugározva a (H vagy Z típusú) detektorban a vizsgált minta egy meghatározott (d) rétegvastagságú mennyiségét, az abból kilépő sugarak intenzitásából (I) a Lambert-Beer törvény alapján a koncentrációra (c) következtetni lehet:

$$I = I_0 \times 10^{-\epsilon dc} \quad (4)$$

Ezt az egyenletet (4) átrendezve kapjuk a transzmittancia (T) értéket:

$$T = I / I_0 = 10^{-\epsilon dc} \quad (5)$$

A T tizes alapú negatív logaritmusát véve kapjuk az abszorbancia (A) értékét:

$$-\lg(T) = A = -\lg(I / I_0) = \epsilon dc \quad (6)$$

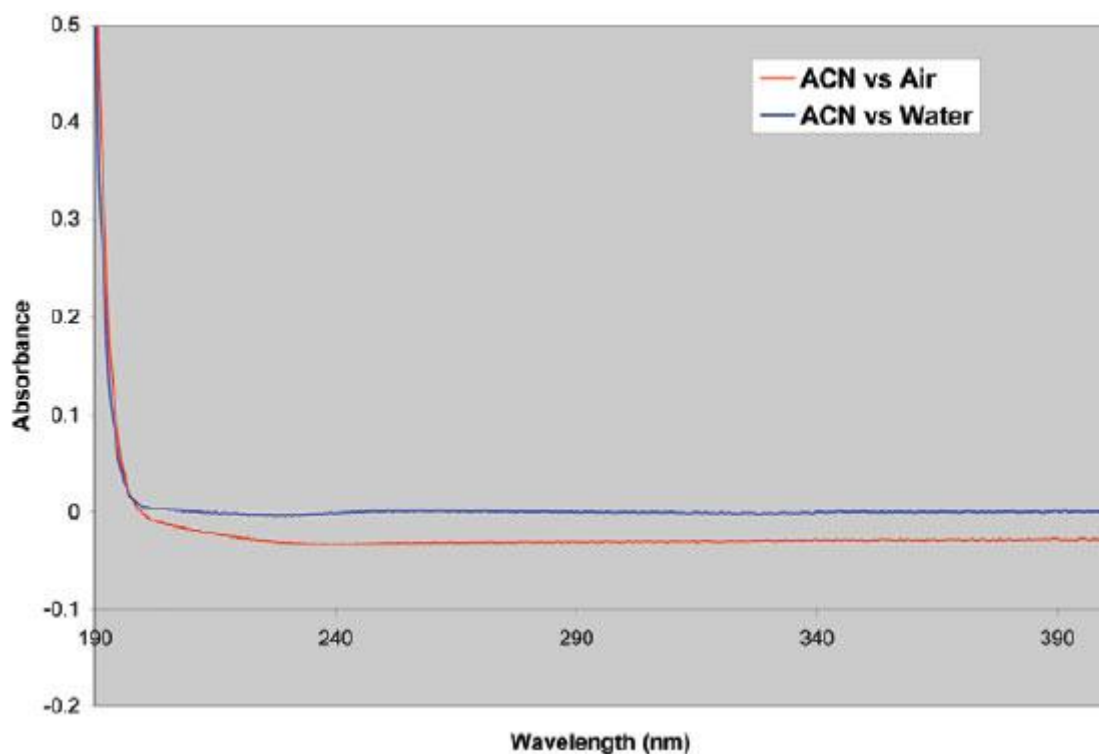
Az egyenletekben (4) (5) (6) ϵ az elnyelő közeg moláris abszorpciós együtthatója.

A gyakorlatban az abszorbancia (A) értéket használjuk, mivel ennek értéke egyenesen arányos c-vel.

Lehetőleg azon a hullámhossz tartományon mérünk, ahol a vizsgálandó komponensnek a legnagyobb az abszorpciója, és ezzel párhuzamosan az eluens többi összetevőjének lehetőleg relatíve kisebb.

Így került kiválasztásra az 2 db mérési hullámhossz: $\lambda_{\text{AFBI}} = 312 \text{ nm}$ és $\lambda_{\text{ZEA}} = 236 \text{ nm}$.

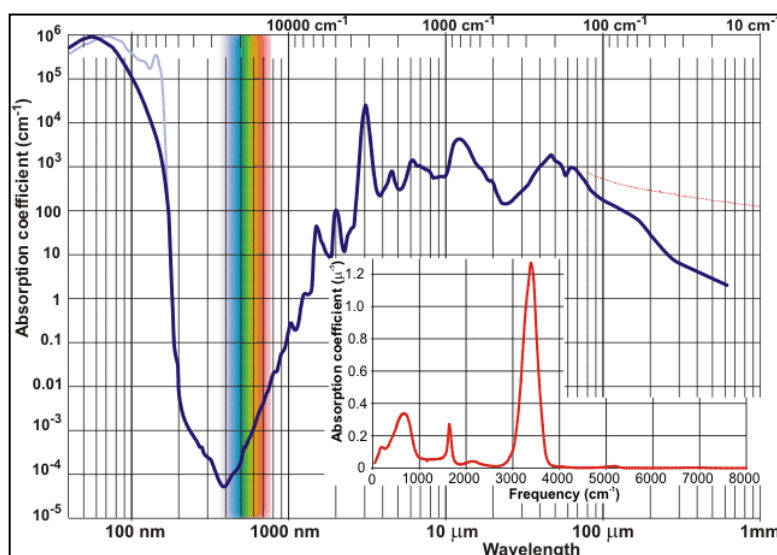
A kiválasztott mérési hullámhosszok az alábbi okoknál fogva kerültek kiválasztásra.
Az acetonitril abszorpciós spektruma vízben és levegőben⁵⁶:



17. kép (A kék görbe a vízben való abszorbancia.)

Mint az ábráról leolvasható: $A_{ACN(min)}$ esetén $\lambda_{ACN(min)} \approx 228$ nm. Ez a minimális abszorbanciával rendelkező hullámhossz (λ_{min}). Továbbá látható, hogy $\lambda_x > 228$ nm esetén (az UV tartományban) $A_x \approx A_{ACN(min)}$. Tehát 228 nm-nél nagyobb mérési hullámhossz megfelelő acetonitrilre nézve.

A víz abszorpciós spektruma⁵⁷:



18. kép

⁵⁶ Shi-heng Liu: Quality Evaluation of HPLC-Grade Acetonitrile.

⁵⁷ <http://www.lsbu.ac.uk/water/vibrat.html> (Letöltve: 2012. november 24.)

A kép alapján látható, hogy: $A_{H_2O(min)}$ esetén $\lambda_{H_2O(min)} \approx 400$ nm. Ez a minimális abszorbanciával rendelkező hullámhossz (λ_{min}). Továbbá $\lambda_y > \sim 200$ nm esetén (az UV tartományban) $A_y < 0,01$. Tehát 200 nm-nél nagyobb mérési hullámhossz megfelelő vízre nézve.

Az acetonitril és víz esetére meghatározott hullámhossz kritériumok alapján a $\lambda_{mérés} > 228$ nm határozható meg feltételként, mivel a 2 feltétel közül ($\lambda > 228$ nm és $\lambda > 200$ nm) ez a szigorúbb.

A mikotoxinok abszorbancia (λ_{max}) értékei⁵⁸:

Mikotoxin	Molekula tömeg	Oldószer	Abszorbivitás	Max (nm)
Aflatoxin B1	312	Kloroform	22,300	353
Zearalenone	318	Etanol	29,700	236
Zearalenone	318	Etanol	13,909	274
Zearalenone	318	Etanol	6,020	316

11. táblázat

Az aflatoxin B₁ mérésére alkalmas hullámhossz értékek:

$\lambda_{max} = 353$ nm. A kloroform nem tud H-híd kötést létesíteni, míg a mérés során alkalmazott víz képes. Víz esetén az aflatoxin B₁ mikotoxin O atomjának nemkötő e^- párpai is gerjesztődhetnek ($n \rightarrow \pi^*$), és ezek gerjesztéséhez (, a konjugált kötések ($\pi \rightarrow \pi^*$) gerjesztésével együtt) már több energia kell, mintha csak $\pi \rightarrow \pi^*$ gerjesztés történne. A többlet miatt szükségessé váló nagyobb energiához (ϵ) kisebb hullámhossz (λ) tartozik: $\epsilon = f \cdot h$, ahol f a frekvencia, h pedig a Planck-állandó. Mivel $f = c / \lambda$ és $\epsilon \sim f \Rightarrow \epsilon \sim 1 / \lambda \Rightarrow$ ha ϵ nő, akkor λ csökken (, ahol c a fény sebessége vákuumban). Ezért alacsonyabb hullámhosszon mérünk maximum abszorbanciát (hipszokróm eltolódás). Így alacsonyabb hullámhosszon folytatjuk le a mérést (, amely > 228 nm): $\lambda_{AFB1} = 312$ nm.

A zearalenon mérésére alkalmas hullámhossz értékek:

$\lambda_{max(1)} = 236$ nm, $\lambda_{max(2)} = 274$ nm, $\lambda_{max(3)} = 316$ nm. (A legnagyobb abszorbivitása a $\lambda_{max(1)}$ értéknek van, ez a legideálisabb.) Mivel 236 nm > 228 nm, ezért ez a legalkalmasabb a mérésre, illetve ez lett kiválasztva mérési hullámhossznak: $\lambda_{ZEA} = 236$ nm.

A kapott csúcs alatti területek (A_{minta}) alapján a következő egyenlettel számítható vissza a mikotoxin tartalom értéke 1 ml (= 1000 μ l) visszaoldott extraktumra μ g/ml-ben:

$$m_{mikotoxin(1ml)} = (A_{minta} : A_{standard}) \cdot 12 \text{ ppm} \quad (7)$$

A mikotoxin tartalom a felhasznált acetonitrilben, illetve a mintában:

$$m_{mikotoxin(ACN)} = m_{mikotoxin(1ml)} \cdot (V_{ACN} : V_{ext.}) \quad (8)$$

$$m_{mikotoxin(ACN)} = m_{mikotoxin(minta)} \quad (9)$$

⁵⁸ <http://www.fao.org/docrep/x5036e/x5036E0c.htm> alapján. (Hozzáférés: 2012. november 24.)

A mikotoxin tartalom megmaradása (%-ban):

$$\text{Megmaradás(\%)} = m_{\text{mikotoxin(minta)}} : m_{\text{mikotoxin(injektált)}} \cdot 100 \quad (10)$$

A gyomornedvbe injektált mikotoxin mennyisége (tömege) az alábbi egyenlet szerint számítható ki:

$$m_{\text{mikotoxin(injektált)}} = c_{\text{mikotoxin}} \cdot V_{\text{mikotoxin}} \quad (11)$$

Az egyenletben (11) a $c_{\text{mikotoxin}}$ a gyomorba injektált mikotoxin tömegkoncentrációja, a $V_{\text{mikotoxin}}$ a gyomorba injektált mikotoxin térfogata.

Az egyes mintákra kapott csúcs alatti területek (3 mérés átlaga) és a mikotoxin megmaradás %-ban (a 95% < megmaradást 100%-nak tekintve):

Minta száma	Csúcs alatti területek	Megmaradás(%)
1.	177569	100
2.	188241	100
3.	187021	100
4.	208169	100
5.	203350	100
6.	238649	93,52
7.	36873	60,82
8.	125873	100
9.	116725	45,95
10.	421960	33,22
11.	111942	44,07
12.	0	0
13.	722070	71,07
14.	336629	44,18
15.	444256	49,97
16.	446257	29,28
17.	116257	45,77
18.	734339	72,27
19.	316911	100
20.	626573	100
21.	640536	41,52
22.	0	0
23.	295638	100
24.	0	0
25.	6363	100
26.	0	0
27.	1330	100

12. táblázat

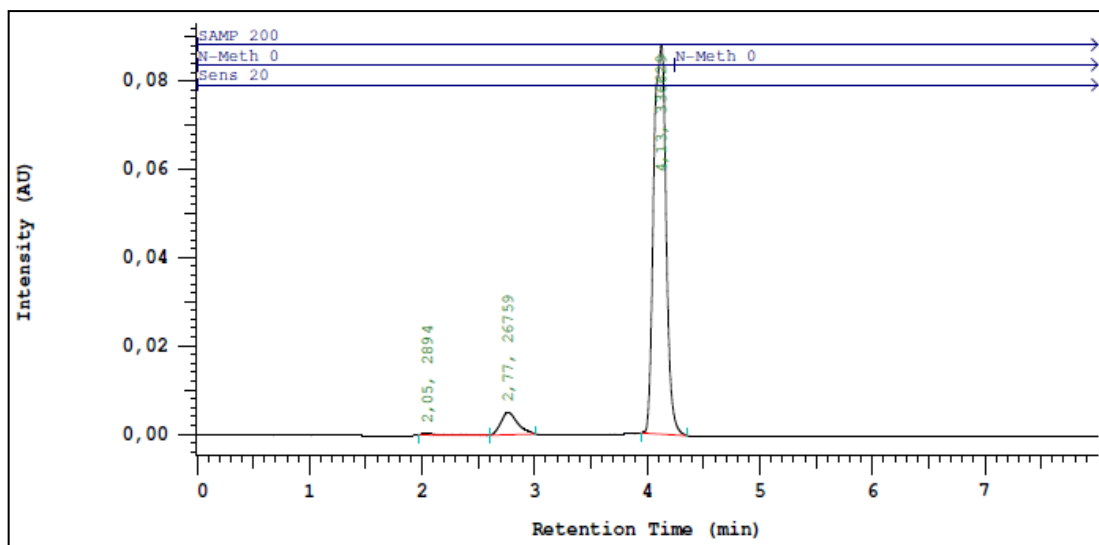
A narancssárgával jelölt minta (12.) valószínűleg tartósan O₂ hatásának volt kitéve, mivel a tároló mérőlombikjának csiszolatos dugója eltűnt. Ezért ezzel az eredménnyel nem számolunk az eredmények kiértékelésénél.

A pirossal jelölt mintáknál nem történ degradáció.

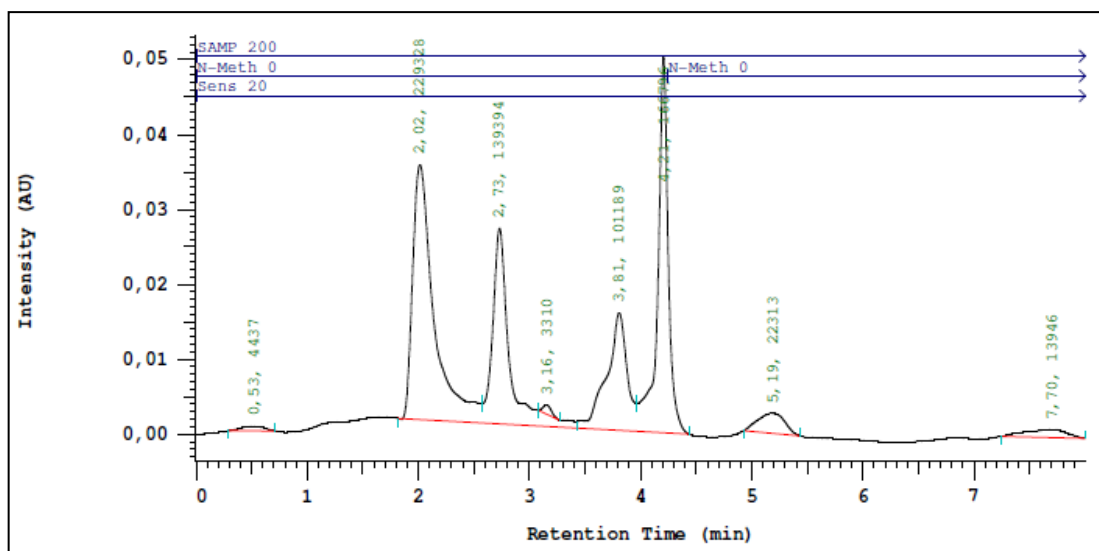
A zölddel jelölt mintáknál a degradáció 100 %-os volt, azaz a megmaradás 0 %-os.

Az eredmények kiszámításának alapja a HPLC-vel végzett méréseknél kapott kromatogramok megfelelő retenciós idejénél (4-nél) jelentkező csúcsok alatti területek.

2 minta kromatogramja:



19. kép (A 14. minta kromatogramja.)



20. kép (A 16. minta kromatogramja.)

4. Eredmények és kiértékelésük

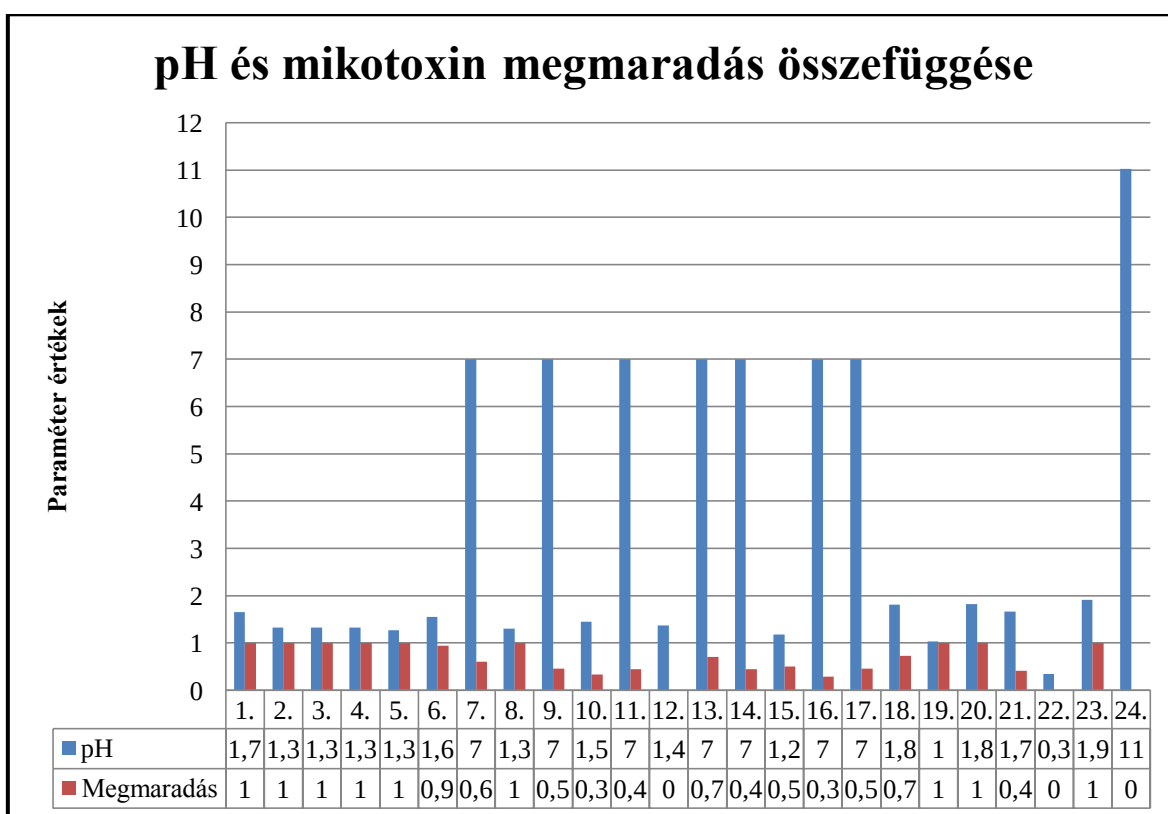
4.1. A kémhatás szerepe (zearalenon)

Gyakorlatilag egyirányú megfeleltetés tapasztalható a be nem állított, illetve lúgos kémhatású oldatok (pH = 2,5-11,5) és a mikotoxin degradációt szenvedett oldatok között: minden nagyobb kémhatású oldatban degradáció történt.

Be nem állított és lúgos kémhatású oldatok: 7., 9., 11., 13., 14., 16., 17., 24.

Degradációt szenvedett oldatok: 6., 7., 9., 10., 11., 13., 14., 15., 16., 17., 18., 21., 22., 24.

Ez az összefüggés az alábbi diagramon is kitűnik:



21. kép (A pH értékeknél a 7 arra utal, hogy nem történt pH beállítás.)

Tehát elsősorban a kémhatástól függ a degradáció mértéke és ez a többi paraméteren felül áll az alapján, hogy ilyen szoros összefüggésben áll vele.

Megjegyzendő, hogy a zearalenonnal szemben az aflatoxin B₁ még pH = 11,7 mellett sem szenvedett semmiféle degradációt.

Azonban a zearalenon esetében történt degradáció megsavanyított minták esetében is, azaz a kémhatáson kívül ez esetekben jelen van egy másodlagos faktor: 6., 10., 15., 18., 21., 22. Az emésztési kísérletben a figyelem elsősorban az emésztő enzimre, a pepszinre terelődik, hiszen igen reaktív vegyületről van szó, amely nem kizárt, hogy reakcióba lépett a mikotoxinnal. A következőkben erre próbál a tanulmány választ keresni.

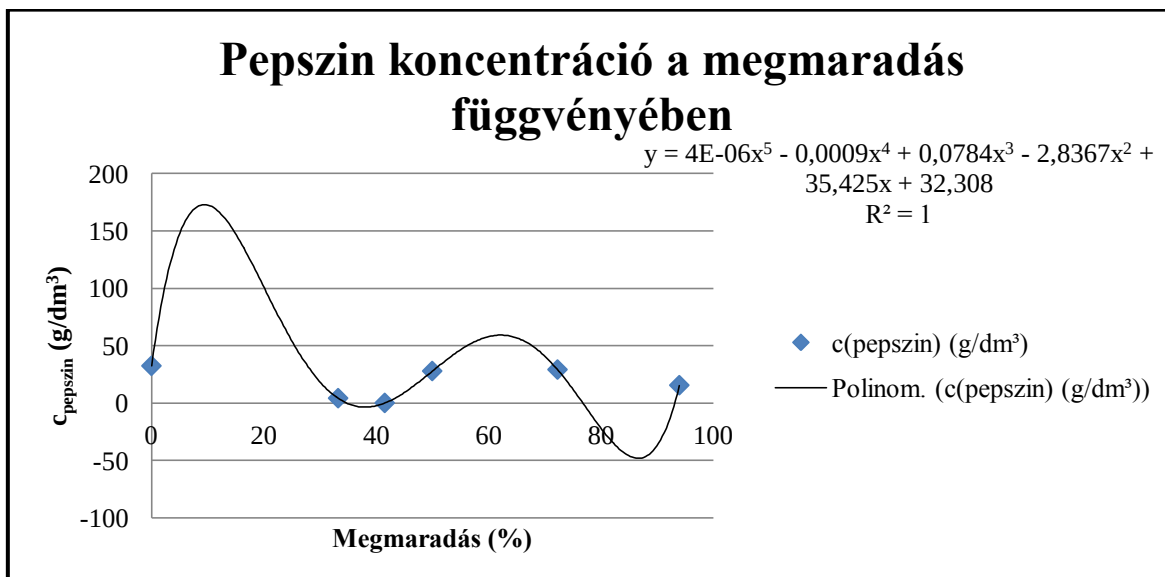
4.2. Az emésztőenzim (pepszin) szerepe (zearalenon)

A 21. mintát kivéve mindegyik minta tartalmazott pepszint, amint az alábbi táblázatból kiolvasható:

c(g/dm ³)/minta	6.	10.	15.	18.	21.	22.
NaCl	30,489	0	27,4401	0	0	31,702
NaH ₂ PO ₄	3,28889	0	2,96	0	0	3,41538
KCl	10,1768	0	9,15911	0	0	10,5452
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	4,93333	0	4,44	0	0	5,12308
NH ₄ Cl	3,77778	0	3,4	0	0	3,93092
glükóz	8,02469	0	7,22222	0	0	8,35
glükoron sav	0,24691	0	0,22222	0	0	0,25692
urea	1,04938	1,0625	0,94444	0	0	1,09615
HSA	0	0	11,1111	11,6279	0	13,0769
pepszin	15,4321	4,125	27,7778	29,0698	0	32,3077
mucin	0	0	0	0	7,69231	38,4615
mikotoxin	0,00034	0,00069	0,00061	0,00064	0,00231	0,00231
pH	1,55	1,45	1,18	1,81	1,66	0,34
megmaradás(%)	93,9524	33,2238	49,9705	72,2745	41,5228	0

13. táblázat

Itt az összefüggés nem olyan egyértelmű, mint a kémhatás esetében, azonban megfelelő (itt ötödfokú polinom) függvény segítségével kimutatható:



22. kép

Tehát matematikailag igazolható összefüggés a megmaradás és a pepszin koncentráció között.

Viszont a változó megmaradási értékek arra is utalnak, hogy a pepszin hatását a többi komponens erősen befolyásolja. Magának a pepszinnek a működését befolyásoló (önmagukban jóllehet indifferens) összetevők a következőekben kerülnek tárgyalásra.

4.3. A pepszin működését befolyásoló tényezők (zearalenon)

A szélesebb körű elemzéshez valamennyi pepszintartalmú kísérlet paraméterei szükségesek:

c(g/dm ³)/minta	5.	6.	8.	10.	15.
NaCl	36,3178	30,489	0	0	27,440111
NaH ₂ PO ₄	3,91765	3,28889	0	0	2,96
KCl	12,1224	10,1768	0	0	9,1591111
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	5,87647	4,93333	0	0	4,44
NH ₄ Cl	4,5	3,77778	0	0	3,4
glükóz	9,55882	8,02469	0	0	7,2222222
glükoron sav	0	0,24691	0,2381	0	0,2222222
urea	0	1,04938	0	1,0625	0,9444444
HSA	0	0	0	0	11,111111
pepszin	18,3824	15,4321	3,92857	4,125	27,777778
mucin	0	0	0	0	0
mikotoxin	0,0004	0,00034	0,00065	0,0006875	0,0006111
pH	1,27	1,55	1,3	1,45	1,18
megmaradás(%)	100	93,9524	100	33,223831	49,970499

15. táblázat

c(g/dm ³)/minta	18.	19.	20.	22.	23.
NaCl	0	31,702	29,4376	31,702	24,9773
NaH ₂ PO ₄	0	3,41538	3,17143	3,4153846	2,69091
KCl	0	10,5452	9,792	10,545231	8,30836
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0	5,12308	4,75714	5,1230769	4,03636
NH ₄ Cl	0	3,93092	3,65014	3,9309231	3,09709
glükóz	0	8,35	7,75357	8,35	6,57879
glükoron sav	0	0,25692	0,23857	0,2569231	0,20242
urea	0	1,09615	1,01786	1,0961538	0,86364
HSA	11,627907	13,0769	12,1429	13,076923	10,303
pepszin	29,069767	32,3077	30	32,307692	27,2727
mucin	0	38,4615	35,7143	38,461538	30,303
mikotoxin	0,0006395	0,00231	0,00214	0,0023077	0,00182
pH	1,81	1,03	1,82	0,34	1,91
megmaradás(%)	72,27449	100	100	0	100

16. táblázat

Mint fentiekből látszik az alábbi (piros színnel jelölt) gátló faktorok hatnak a pepszinre:

- Szervetlen sók + glükóz: 5., 19., 20., 23. minták esetében egyértelműen gátolnak (5.), illetve gátlást erősítenek (19., 20., 23.).
- Glükoron sav: 8., 19., 20., 23. minták esetében egyértelműen gátol (8.), illetve gátlást erősít (19., 20., 23.).
- Mucin: szerepe nem egyértelmű. 19., 20., 23. mintáknál gátlást erősít.

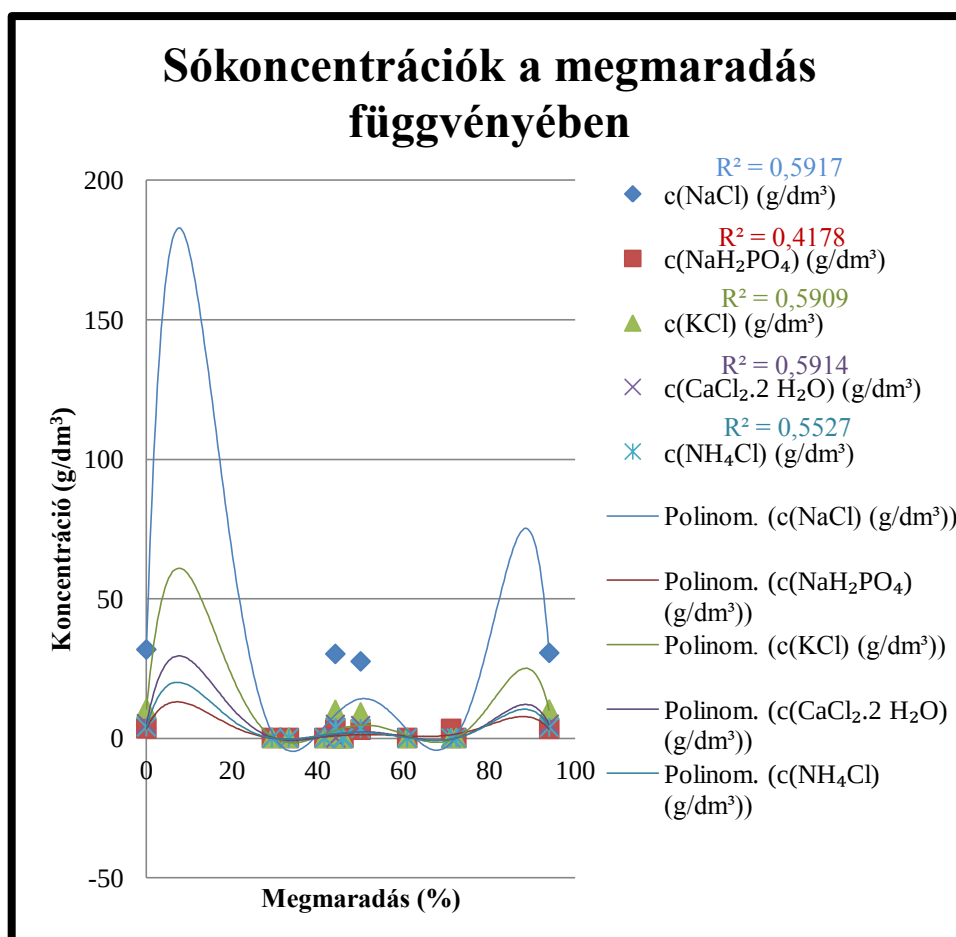
Ezekkel ellentétben az alábbi (kék színnel jelölt) serkentő faktorok hatnak a pepszinre:

- Urea: 6., 10., 15., 22. mintánál egyértelműen serkent (10.), túlkompenzálással serkent (6.), serkentést erősít (22.), illetve erősítéssel egybekötött túlkompenzálással serkent (15.).
- HSA: 15., 18., 22. minták esetében egyértelműen serkent (18.), serkentést erősít (22.), illetve erősítéssel egybekötött túlkompenzálással serkent (15.).
- Mucin: szerepe nem egyértelmű. 22. mintánál serkent.

A mucin szerepe igen kettős, ugyanazon összetétel mellett (, de eltérő kémhatású közegben) egyik esetben gátol, míg a másik esetben serkent. Ezt a kérdést a későbbiekben kerül részletesebb kiértékelésre.

4.4. A szervesetlen és kis molekulatömegű szerves összetevők (zearalenon)

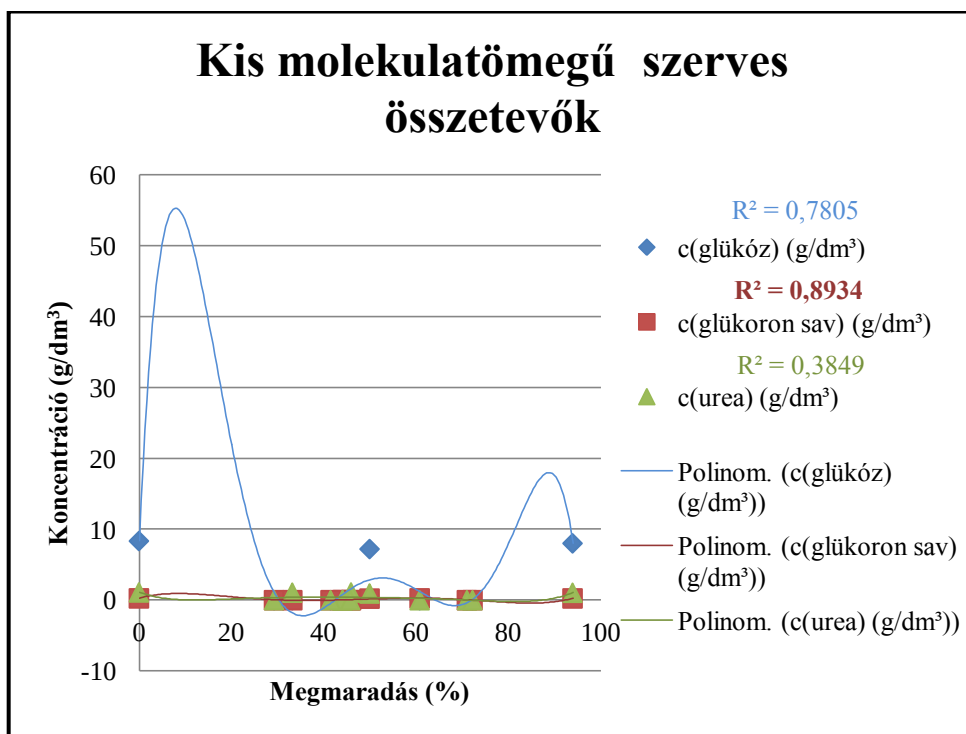
A szervesetlen vegyületek alatt elsősorban a só koncentrációk lehetnek hatással a degradációra. Azonban a koncentrációjukat a degradációt szenvedett minták megmaradási %-ában ábrázolva (kivéve a lúgosított mintát) még hatodfokú polinom sem képes megfelelően ($R^2 > 0,85$) illeszkedni a pontokra:



23. kép

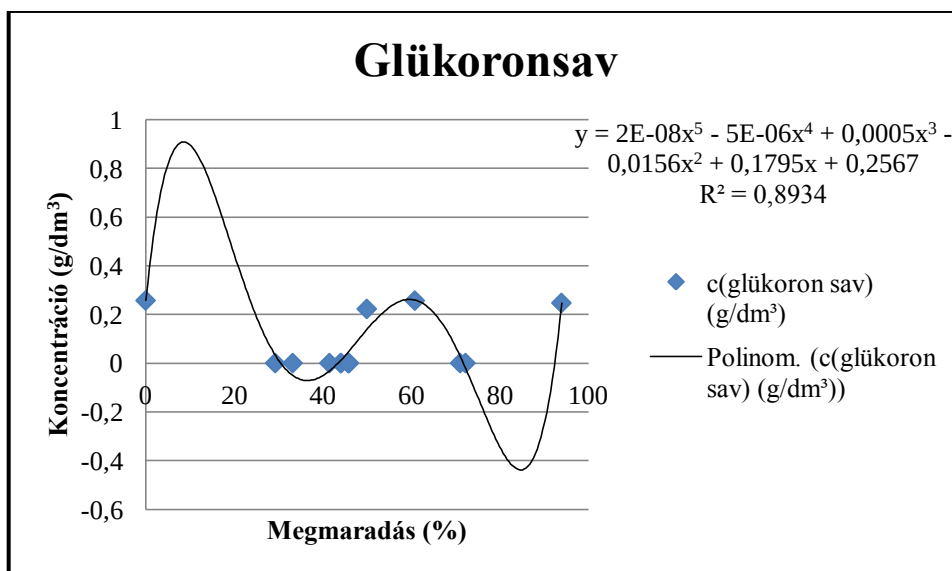
A kis molekulatömegű szerves összetevőknél viszont más a helyzet.

Ha ezek koncentrációját ábrázoljuk a megmaradás függvényében, akkor a glükoron savval szorosabb összefüggést találhatunk egy ötödfokú polinom segítségével:



24. kép

A glükoron sav görbéje igen jól illeszkedik a pontokra ($R^2 = 0,8934$). Ez jobban látszik, ha kifejezetten csak a glükoron sav kerül ábrázolásra:



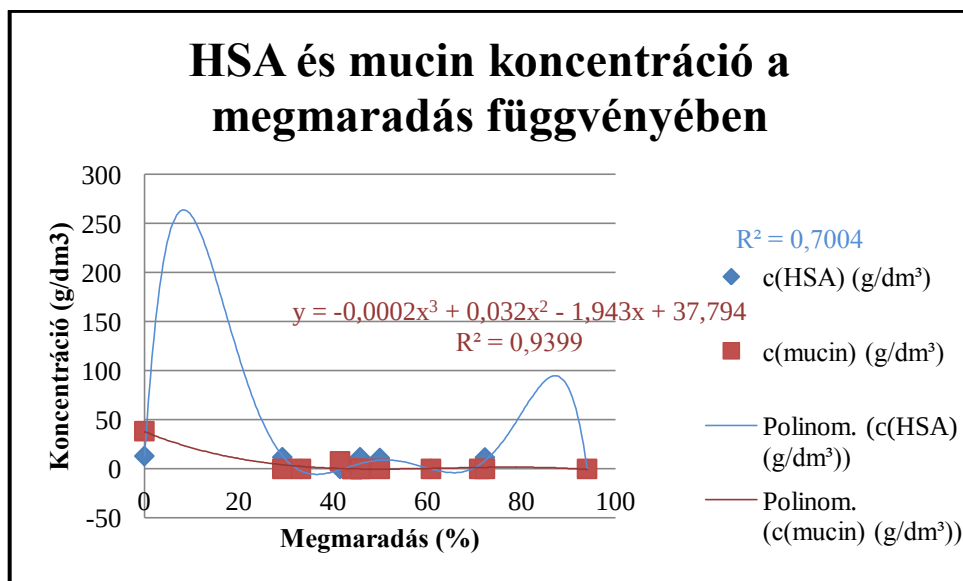
25. kép

Tehát a glükoronsav is befolyásolja a megmaradás alakulását, azonban ezt közvetve, nem önmagában gyakorolja, mivel ha nincs gátlható (vagy serkenthető) faktor, akkor nincs hatással a degradációra (2., 3. minta ezt igazolja).

A nagy molekulatömegű szerves vegyületeket is meg kell vizsgálni arra nézve, hogy befolyásolják-e a megmaradást.

4.5. A nagy molekula tömegű szerves összetevők (zearalenon)

Mivel a pepszint már megvizsgáltuk, ezért e részben a HSA és a mucin kerül mélyebb elemzésre. A megmaradást az alábbiak szerint befolyásolja koncentrációjuk:



26. kép

A HSA hatodfokú polinommal eléggé közelíti a mérési eredményeket ($R^2 = 0,7004$), azonban a mucin harmadfokú polinom görbéje megfelelően illeszkedik a pontokra ($R^2 = 0,9399$). Ez alapján a HSA és a mucin szintén szorosabb összefüggést mutat a megmaradással.

A mucin már az előzőekben is ki lett emelve „kettős tulajdonsága” folytán. Ezért hosszabban is értékelni kell szerepét.

4.6. A mucin szerepe (zearalenon)

A mucin önmagában is hatással van a zearalenon degradációjára (21. minta alapján), azt bontja. Amennyiben viszont pepszinnel érintkezésbe lép, akkor a 2 bontó hatású anyag egymást kölcsönösen gátolja (19., 20., 23. minták alapján). Azonban szélsőségesen kis kémhatás (pH = 0,34) esetén a mucin szintén bontó anyagként viselkedett. Ennek hátterében az állhat, hogy ezen a pH értéken a pepszin tönkremegy (hidrolizálnak a fehérjei), míg a mucin „csak” kicsapódást szenved, de nem bomlik el, így a felületével érintkező zearalenonnal reakcióba képes lépni, miközben a pepszin már nem gátolja hatását.

Tehát a kémhatás, valamint a pepszin után a mucin a harmadik jelentősebb faktor, ami nagyobb befolyással bír a zearalenon degradációra.

4.7. A kontaktidő szerepe (aflatoxin B₁)

2 db azonos minta (26. és 27.) esetén, melyben az összetétel és a körülmények is közel azonosak voltak az egyik minta esetén (26.) 0 %-os megmaradást, míg a másik minta (27.) esetén 100 %-os megmaradást lehetett detektálni. A 2 minta:

Minta száma	26.	27.
NaCl 157,3 g/l (ml)	2,62	2,62
NaH ₂ PO ₄ 88,8 g/l (ml)	0,5	0,5
KCl 89,6 g/l (ml)	1,53	1,53
CaCl ₂ ·2 H ₂ O 22,2 g/l (ml)	3	3
NH ₄ Cl 30,6 g/l (ml)	1,67	1,67
glükóz 65 g/l (ml)	1,67	1,67
glükoron sav 2 g/l (ml)	1,67	1,67
urea 25 g/l (ml)	0,57	0,57
HSA (g)	0,17	0,17
pepszin (g)	0,45	0,45
mucin (g)	0,5	0,5
bélbaktérium (ml)	0	0
H ₂ O (ml)	0	0
pH	1,65	1,82
t_{inkubáció} (min)	30	20
T _{max} (°C)	38,2	38,1
Megmaradás (%)	0	100

17. táblázat

A 2 minta közötti lényegesebb különbség az emésztési idő volt. Ez alapján feltételezhető, hogy a kontaktidő nagyobb befolyással bír az aflatoxin B₁ bomlására.

Megjegyzendő, hogy a zearalenon minták komplexitása miatt a kontaktidő ott nem került behatóbb tanulmányozásra.

4.8. A bélbaktériumok hatása (zearalenon)

A bélbaktériumokkal végzett kísérlet során 100 %-os megmaradást lehetett mérni (23. minta) a zearalenon tekintetében. Ebből arra lehet következtetni, hogy a bélbaktériumok vagy nem léptek kölcsönhatásba a zearalenonnal, vagy valamilyen más komponens elpusztította őket (például a pepszin), mielőtt ez megtörténhetett volna.

5. Összegzés

5.1. Zearalenon degradációját befolyásoló tényezők

A kísérletek alapján a zearalenon degradációjáért elsősorban a kémhatás felelős, mely, ha nem elég savas, akkor a mikotoxin bomlásnak indul. Emellett másodsorban a pepszin felelős a bomlásért. A pepszin hatását egyes anyagok serkentik, míg mások gátolják. Ezek a következők:

Serkentők:

- HSA (, matematikailag kimutatható összefüggés volt a mikotoxin bomlás, illetve koncentrációja között).
- Urea.

Gátlók:

- Glükoron sav (, matematikailag kimutatható összefüggés volt a mikotoxin bomlás, illetve koncentrációja között).
- Mucin (, matematikailag kimutatható összefüggés volt a mikotoxin bomlás, illetve koncentrációja között).
- Szervetlen sók és glükóz.

Harmadlagosan pedig a mucin is képes volt önállóan bontani a zearalenont.

Arra vonatkozólag, hogy a bélbaktériumokkal reagál-e a zearalenon, nem volt tapasztalható minden kétséget kizáró eredmény.

5.2. Aflatoxin B₁ degradációját befolyásoló tényezők

A kísérletek alapján a kémhatás nincsen rá komolyabb befolyással.

A bomlását tekintve erős a gyanú, hogy a gyomorban töltött idő (kontaktidő) nagyban befolyásolja annak mértékét.

6. Köszönetnyilvánítás

A legmélyebb köszönettel B. Tóth Szabolcs adjunktusnak tartozom, aki témavezetőmként segített a problémák megoldásában, illetve a nehézségeken való átlendülésben. Segítségével és tanácsaival megalapozta e tanulmány, illetve a benne fekvő munka eredményességét.

Szintén köszönettel és hálával tartozom Tóthné Balog Ágnesnek, Ági néninek, aki a laboratóriumi munkámat segítette minden téren.

Továbbá köszönöm mindenkinek, aki mögöttem állt és támogatott ebben a munkámban.

7. Irodalomjegyzék

Mesterházy Ákos: A mikotoxinok és az élelmiszerbiztonság, a megoldás lehetőségei.

1881/2006/EK RENDELET (2006. december 19.)

Parádi Tímea: Mikotoxinok az élelmiszerekben

Jiujiang Yu, Perng-Kuang Chang, Kenneth C. Ehrlich, Jeffrey W. Cary, Deepak Bhatnagar, Thomas E. Cleveland, Gary A. Payne, John E. Linz, Charles P. Woloshuk and Joan W. Bennett: Clustered Pathway Genes in Aflatoxin Biosynthesis.

Boonen, Jente; Malysheva, Svetlana V.; Taevernier, Lien; Diana Di Mavungu, José; De Saeger, Sarah; De Spiegeleer, Bart: Human skin penetration of selected model mycotoxins.

Dr. Mézes Miklós: Takarmánytartalmak, takarmánytoxikológia.

<http://www.rasmusfrandsen.dk/zealenone.htm> (Letöltve: 2012. november 22.)

Fitzpatrick DW, Arbuckle LD, Hassen AM: Zearalenone metabolism and excretion in the rat: effect of different doses.

Ananth S. Bommakanti, and Farid Waliyar: Importance of aflatoxins in human and livestock health.

[http://en.wikipedia.org/wiki/Intercalation_\(chemistry\)#DNA_intercalation](http://en.wikipedia.org/wiki/Intercalation_(chemistry)#DNA_intercalation) (Hozzáfértés: 2012. november 25.)

F. Aguilar, S. P. Hussain, and P. Cerutti: Aflatoxin B1 induces the transversion of G-->T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes.

466/2001/EK rendelet (2001. március 8.)

http://www.knowmycotoxins.com/hu/documents/AsktheexpertBillCloseanswers_hu_000.pdf (Letöltés: 2012. október 6.)

http://en.wikipedia.org/wiki/File:PBB_Protein_ESR1_image.png (Letöltés: 2012. november 3.)

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Estrogen_receptor_beta_1U3S.png (Letöltés: 2012. november 3.)

http://phd.sote.hu/mwp/phd_live/vedes/export/kakucsr.m.pdf (Letöltés: 2012. október 6.)

http://en.wikipedia.org/wiki/Estradiol#Mechanism_of_action_on_cancer_cell_proliferation (Hozzáfértés: 2012. november 3.)

Gál Béla: Biológia 11.

Liposits Zsolt: Szteroid hormonhatások a központi idegrendszerben.

Jánossy Judit: Kalcium szabályozta sejtosztódás és túlélés vizsgálata mieloeritroid sejtekben. (Letöltés: 2012. október 6.)

Richard Lawley: Zearalenone.

Carolien H. M. Versantvoort, Agnes G. Oomen, Erwin Van de Kamp, Cathy J. M. Rompelberg, Adriënné J. A. M. Sips: Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food.

Matematikai, fizikai, kémiai összefüggések, Négyjegyű függvénytáblázatok (, összeállítók: Dr. Hortobágyi István, Dr. Rajkovits Zsuzsanna, Dr. Wajand Judit).

<http://en.wikipedia.org/wiki/Glucose> (Hozzáférés: 2012. december 2.)

<http://www.drugbank.ca/drugs/DB03156> (Hozzáférés: 2012. december 2.)

<http://hu.wikipedia.org/wiki/Karbamid> (Hozzáférés: 2012. december 1.)

<http://www.guidechem.com/dictionary/70024-90-7.html> (Hozzáférés: 2012. december 2.)

Tong, Grace C.: Characterization of Cys-34 in serum albumin.

http://www.caslab.com/Mucin_type_I-S_CAS_84195-52-8/ (Hozzáférés: 2012. december 2.)

<http://www4.mpbio.com/ecom/docs/proddata.nsf/1dc4471b047ea37e8525645d006ac0d5/9f63c0d7264f3bcb852567ae004f9159?OpenDocument> (0,01 M-os HCl oldatban.) (Hozzáférés: 2012. december 2.)

<http://en.wikipedia.org/wiki/Zearalenone> (Hozzáférés: 2012. december 2.)

<http://www.chemyq.com/En/xz/xz1/2929qxpjm.htm> (Hozzáférés: 2012. december 2.)

<http://hu.wikipedia.org/wiki/Acetonitril> (Hozzáférés: 2012. december 2.)

<http://ttk.pte.hu/analitika/letoltesek/jegyzet/ch07s03.html> (Hozzáférés: 2012. december 2.)

Shi-heng Liu: Quality Evaluation of HPLC-Grade Acetonitrile.

<http://www.lsbu.ac.uk/water/vibrat.html> (Letöltve: 2012. november 24.)

<http://www.fao.org/docrep/x5036e/x5036E0c.htm> (Hozzáférés: 2012. november 24.)