

Eszterházy Károly Főiskola
Természettudományi Kar
Kémiai, Borászati kémiai és Borászati Tanszék

**Mikotoxinok bomlásának vizsgálata különböző
adalékanyagok hatására**



Témavezető
B. Tóth Szabolcs
Egyetemi adjunktus

Készítette
Hovanyec Henrietta
kémia szak
nappali tagozat

2014

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	2
2. Mikotoxinokról általánosságban.....	4
2.1 Aflatoxin.....	4
2.2 Ochratoxin.....	5
2.3 Citrinin	6
2.4 Patulin.....	6
2.5 Trichothecének	6
2.5.1 T2-toxin és HT-2 toxin.....	6
2.5.2 Nivalenol és dezoxinivalenol (DON).....	7
2.6 Fumonizinek.....	7
2.7 Zearalenon	8
3. Mikotoxinok megjelenése a növényeken	10
3.1 Megelőzés és védekezés.....	10
4. Mikotoxinok az élelmiszerekben.....	12
4.1 Zearalenon engedélyezett határértékei élelmiszerekben	13
5. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia felépítése, működésének elve	14
5.1.1 Eluens jellemzői	14
5.1.2 Állófázis jellemzői	15
5.1.3 Detektorok jellemzői	16
5.1.4 Kiértékelés.....	16
6. Saját vizsgálatok.....	18
6.1 Kísérleteim célja.....	18
6.2 Mintaelőkészítés.....	18
6.3 Mérés	20
6.4 Eredmények, kiértékelések.....	21
6.4.1 Visszanyerési tesztek.....	21
6.4.2 I. kísérletsorozat	21
6.4.3 II. kísérletsorozat.....	21
6.4.4 III. kísérletsorozat.....	22
6.4.5 IV. kísérletsorozat	23
6.4.6 „Elrontott kísérlet”	23
6.5 Konklúzió.....	24
7. Összefoglalás.....	26
8. Hivatkozások.....	27

1. Bevezetés

Napjainkban egyre növekszik az egészségtudatosan táplálkozók köre. Köztudott, hogy a biotermékek a hagyományos élelmiszerekhez képest sokkal gazdagabbak tápanyagban, rosttartalomban és vitaminokban. Az élelmiszerek előállításához felhasznált gabonák, növények hozzáadott vegyszer és műtrágya nélkül növekedtek, így sokak számára az egészséges táplálkozást a biotermékek fogyasztása jelenti. Saját táplálkozásomban én is igyekszem nagy hangsúlyt fordítani az egészséges ételek fogyasztására, így sokszor választom a biotermékeket. Az elmúlt években hallott mikotoxin-botrányok azonban engem is elgondolkodtattak, hogy valóban érdemes és egészséges-e ezen termékeknek a fogyasztása.



1. ábra

2009-ben a Cerbona visszavonta durum száraztésztából készült termékeit, melyben DON toxint találtak^[1]. Szintén ebben az évben a Tortellino Kft. Által forgalmazott tésztákban DON toxinszennyezést, a bajai Diamant malom tésztaiban pedig fusarium-szennyezést mutattak ki^[2]. Talán az egyik legemlékezetesebb a 2011-ben kirobbant paprika-botrány, melynek következtében a fűszerpaprika több napra lekerült az üzletek polcairól. Az aflatoxin nevű mérge brazil exporttermékekből kerül a neves hazai gyártók (Szegedi Fűszerpaprika Rt., Kalocsai Fűszerpaprika Rt., Sükösdői Házi Pirospaprika Kft.) termékei közé^[3]. Ugyanebben az évben találtak Magyarország piacvezető üzletláncainak pékáruai között különböző toxin-féléket, Spar üzletből származó búzalisztból zearalenont, az Auchan üzletlánc által forgalmazott péksüteményekben pedig DON toxint mutattak ki^[4].

A hallottak nagy szerepet játszottak abban, hogy dolgozatom témájaként válasszam a mikotoxinok vizsgálatát, utánajárjak annak, hogy valóban veszélyeztetik-e az élelmiszereket és megpróbáljak valamilyen megoldást találni ezen élelmiszerek biztonságos fogyasztása érdekében. Kísérleteimben az egészségre egyik legveszélyesebb és hazánkban egyik leggyakrabban előforduló mikotoxin, a zearalenon mennyiségének változását vizsgálom különböző gabona-alapanyagok felhasználásával készített élelmiszerek sütése során. Korábbi kísérletek már bizonyították, hogy a szalalkáli sütés során csökkenti a toxin mennyiségét^{[5],[6]}. Vizsgálataimban ezen kísérletek alapján én is szalalkáli használok, majd olyan kenyeret készítek, melyekbe különböző mennyiségben különböző gabona-alapanyagokat adok

(zabpehely, korpa), hogy megvizsgáljam, ezek az alapanyagok mennyire segítik vagy esetleg gátolják a szalalkáli toxinra kifejtett bontó hatását.

Dolgozatom első részében ismertetem, hogy mik is azok a mikotoxinok és milyen hatással lehetnek szervezetünkre, valamint, hogy hogyan kerülnek az élelmiszerekbe. Ezt követően saját kísérleteimet és eredményeimet mutatom be.

2. Mikotoxinokról általánosságban

Mikotoxinoknak nevezzük a fonalas gombák szaporodása közben termelődő másodlagos anyagcsere termékeket, melyeknek veszélyes élettani hatása bizonyított a növényi, az állati és az emberi szervezetre. Közös jellemzőjük, hogy kis molekulatömeggel rendelkeznek és magasabb hőmérsékleten sem érzékenyek. A szervezetbe bekerülve gátolhatják annak védekező mechanizmusát, ezzel veszélyeztetve egészségünket. A szervezetünkbe metabolitjaikkal együtt kerülnek be, így a különböző szervekben felhalmozódhatnak. Mérgező hatásuk a szervezetben megmarad, mivel a gyomornedv sótartalmának ellenállnak. Vakcina sem készíthető ellenük, mivel antigén hatással nem rendelkeznek.

Az összes mikotoxin még nem ismert, de számuk több ezerre tehető. Csoportosításukat megnehezíti, hogy eltérő szerkezetű toxinokat termelhetnek azok a fajok, melyeket egy gombanemzetségbe tartoznak, viszont a különböző fajoknál előfordulhat hasonló felépítésű toxin képződése. Két nagy csoportot különíthetünk el aszerint, hogy a toxin az elsődleges mezőgazdasági termelés vagy a tárolás során szaporodott el. Ez alapján beszélhetünk szántóföldi vagy raktári penészgombákról. A szárazföldi fajok szántóföldi növényeknél fordulnak elő, már a vetés helyén káros hatással vannak a növényre. Szaporodásuk nagy nedvességtartalmat (20-30%) igényel, szemben a penészgombákkal, melyek jóval kisebb nedvesség és páratartalom mellett is képesek a tárolt termés megfertőzésére. Ma már azonban nem ez a csoportosítás a leghelytállóbb, mivel tudjuk, hogy a raktári penészek is előfordulhatnak a szárazföldön és szárazföldi fajok is lehetnek a tárolt termés helyén. Leggyakoribb mikotoxinok és az őket termelő penészgombák:

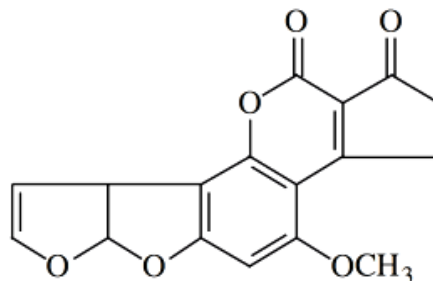
- **Fusarium:** fusarium, T2-toxin, HT-2-toxin, nivalenol, DON, zearalenon
- **Claviceps:** ergot alkaloidák
- **Alternaria:** alternariol
- **Stacyhybotrys:** trichothecin vázasok
- **Aspergillus:** aflatoxin B1, B2, G1, G2, ochratoxin A, patulin
- **Penicilium:** ochratoxin A, citrinin, patulin

2.1 Aflatoxin

1960-ban, az angliai pulyka X-kór során vált ismertté az aflatoxin, mint legelsőként felfedezett mikotoxin. Világszerte ekkortól indult fejlődésnek a mikotoxikológia tudománya.

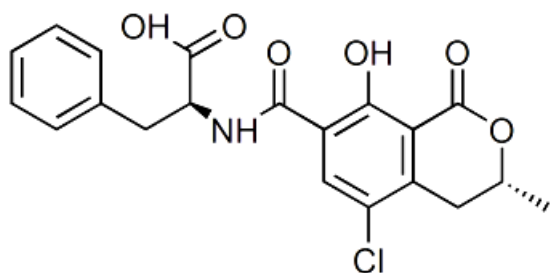
Az aflatoxin többszörösen konjugált policiklusos vegyületet, melyet egyaránt termelhetnek *Aspergillus*, *Flavus* és *Parasiticus* penészgombák. A közel 20 típusa közül természetben az aflatoxin B1, B2, G1, G2 és M1 fordul elő. Metanolban, acetonban, kloroformban jól, vízben kevésbé oldódnak^[7].

Előfordulása a trópusi országokban gyakori, mivel termelődésének a 30-35°C-os hőmérséklet és a 80% feletti páratartalom kedvez, így hazánkban természetes előfordulásával nem kell számolni, azonban az importcikkék tartalmazhatják (zab, szója, rizs, kukorica, mogyoró, fűszerek, paprika, kávé). Májkárosító és rákkeltő hatású vegyületek, melyek nagyobb dózisban halált is okozhatnak.



2. ábra Aflatoxin B1 szerkezete

2.2 Ochratoxin



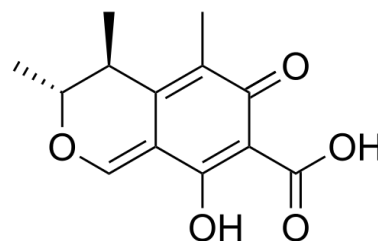
3. ábra Ochratoxin A szerkezete

Az ochratoxint legnagyobb mennyiségben a *Penicillium* és *Aspergillus* termeli, de más penészgombáknál is előfordulhat. A raktári penészek közül a leggyakoribbnak számítanak, de előfordulásuk már a szántóföldön is lehetséges. Három típusa, az A, B és C ismert, melyek közül legveszélyesebbnek az

ochratoxin A tekinthető, a másik kettő csak kismértékben vagy egyáltalán nem fejt ki hatását. Széles hőmérséklettartományban képesek a szaporodásra, így hazánkban is igen elterjedtek. Dihidro-kumarinhoz kapcsolódó β -fenilalanin építi fel. Hüvelyesekben, gabonákban, kávéban, szójában, fűszerekben, aszalt gyümölcsökben megtalálható. Erősen vesekárosító, a szervezetbe bekerülve a gyomorban felszívódik, majd a vér fehérjéihez kötődik és végül a vesébe jutva aktiválódik. Emellett ivarszerveket és magzatot károsító, daganatképző hatása is ismert.

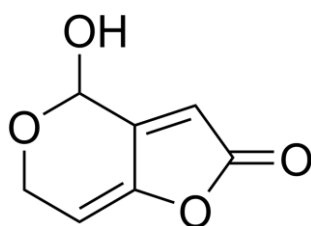
2.3 Citrinin

A citrinint először *Penicillium citrinum*-ból izolálták, de több gombafaj is elő tudja állítani 25-30°C körüli hőmérséklet-optimumon. A vegyület kumarin származék. Gabonaféléken fordulhat elő, de élelmiszereinkben nem gyakori. Önmagában ritkán, inkább más toxinokkal együtt fejt ki toxikus hatását. A szervezetben a vese megnagyobbodását, elszíneződését és ciszták kialakulását idézheti elő.



4. ábra Citrinin szerkezete

2.4 Patulin

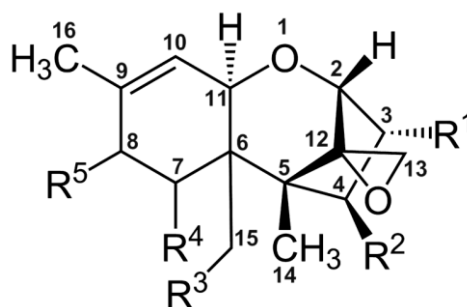


5. ábra Patulin szerkezete

Nagyrészt az *Aspergillus* és *Penicillium* fajok termelik. A patulinnak korábban antibakteriális hatást tulajdonítottak, így baktériumok ellen való alkalmazása is felmerült, bár jótékony hatása nem volt bizonyított. Azóta DNS károsító hatását mutatták ki, a korábban felsorolt toxinokhoz képest viszont gyenge méreg. Előfordulása a rothadó gyümölcsökön gyakori.

2.5 Trichothecének

Leggyakoribb termelőik a *Fusarium* fajok, melyek már 0-10 °C hőmérsékleten is képesek a szántóföldi növény megfertőzésére. Szeszkviterpén típusú vegyületek, melynek toxicitása a 12,13-epoxid gyűrűvel és a 9.-10. szénatom közötti kettős kötéssel van összefüggésben. Legfontosabb képviselőik a T2-toxin, a HT-2-toxin, a nivalenol és a DON.

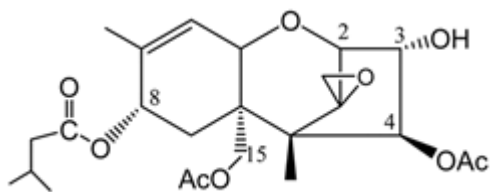


6. ábra Trichothecén-váz

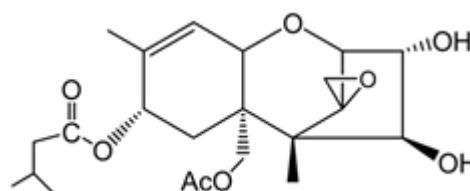
2.5.1 T2-toxin és HT-2 toxin

Ritka, de a legtoxikusabb trichothecén-váz vegyület a T2-toxin, deacetilált formája a HT-2 toxin. A hűvös és csapadékos körülményeket kedvelik, így a szántóföldön és a tárolás helyén is egyaránt megtalálhatók ezen feltételek mellett. A T2-toxin zsírolékony vegyület, így a szervezetben felszívódhat és a májban metabolizálódhat. A szervezetben gátolja a

fehérjék szintézisét és a szaporodásbiológiai zavarokat okozhat. Állati kísérleteken keresztül bizonyított, hogy mindkét toxin 95%-a 72 órán belül kiürült a szervezetből^[8].



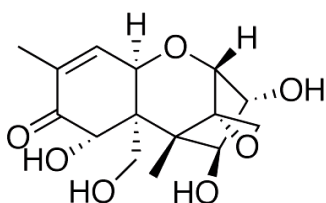
7. ábra T-2 toxin szerkezete



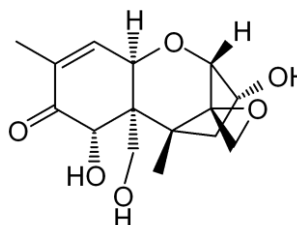
8. ábra HT-2 toxin szerkezete

2.5.2 Nivalenol és dezoxinivalenol (DON)

A két vegyület felépítése egy –OH csoportban különbözik, szerkezetüket tekintve epoxi terpenoidok. Nagyon stabil vegyületek, őrlés, feldolgozás során sem bomlanak le. Előfordulhatnak árpában, búzában, kukoricában, zabban, rozsban. A többi mikotoxinhoz képest sem annyira mérgezők, nincs rákkeltő hatásuk és halált csak nagyon nagy mennyiség elfogyasztásakor okozhatnak. DON szerkezetbe kerülésekor a tünetek lehetnek szédülés, fejfájás, hányás illetve hasmenés. A nivalenol eggyel több –OH csoporttal rendelkezik, így a tünetek még a DON-nál is enyhébbek.



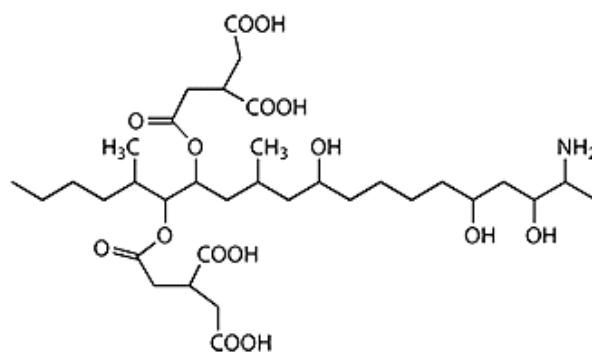
10. ábra Nivalenol



9. ábra Dezoxinivalenol szerkezete

2.6 Fumonizinek

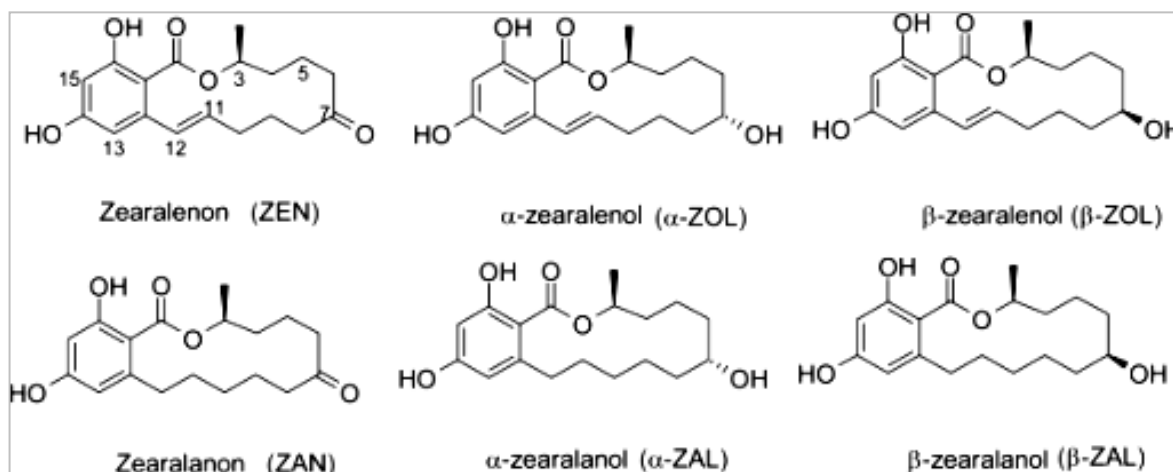
Nemrégiben felfedezett Fusarium-toxin. Előfordulása kukoricában a leggyakoribb. Magyarországon 1993-96 között végzett vizsgálatokkal a penészes minták 70%-ában kimutatták. Jelenleg hat típusa ismert, melyek közül a B₁ a legveszélyesebb. Humán-egészségügyi jelentőségük nagy, rákkeltő hatásuk bizonyított, továbbá lovaknál agylágyulást, sertéseknél tüdővizenyőt, patkányokban májrákot okozott^[9].



11. ábra Fumonizín B₁ szerkezete

2.7 Zearalenon

Kísérleteimhez zearalenont használtam, mivel ez az egyik leggyakrabban előforduló mikotoxin az élelmiszerekben, emellett alacsony ételmeztársági határértékkel rendelkezik és UV detektorral könnyen kimutatható. A vegyületet szintén a Fusarium-toxinok közé sorolható, szerkezetét tekintve kumarinszármazék. Képződése már alacsony hőmérsékleten (10°C) megkezdődhet és a betakarítás után is folytatódhat abban az esetben, amikor a termés kezelését és szárítását nem megfelelő körülmények között hajtják végre. Szervezetbe bekerülve a bélrendszerben kötődik meg, a sejteken belül pedig metabolitjaira alakul tovább, melyek glükuronsavval kapcsolódnak. Ennek a szerves savnak az idegen anyagok kiválasztásában van fontos szerepe^[10]. A véráramba bekerülve kiürülése már nem vagy csak hosszú idő után valósul meg.



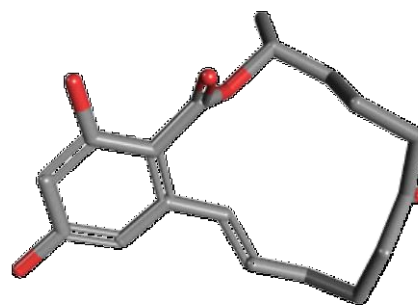
12. ábra Zearelenon típusai

Két típusa ismert, az α - és β -zearalenol, melyek egymásnak sztereoizomerjei. Előbbi a zearalenonnál négyszer aktívabb. Vizsgálatok alapján kimutatták, hogy az

állatfajok közül a sertés a legérzékenyebb a zearalenonra, mivel a szervezetében a metabolizáció során alfa-zearaleollá alakul. Emberek esetében szintén ez az átalakulás megy végbe. Bizonyított ösztrogén hatással rendelkezik, szaporodásbiológiai zavarokat okozhat.

A vegyület fizikai tulajdonságai a következők:

- Molekula képlete: $C_{18}H_{22}O_5$
- Molekula tömege: 318.36428 g/mol
- Színtelen, jellegzetes szagú, kristályokból áll
- Olvadáspont: $159^{\circ}C - 163^{\circ}C$
- Forráspont: $600.4^{\circ}C$
- Sűrűség: $0,79\text{ g/cm}^3$
- Vízben oldhatatlan
- $[\alpha]_{546} = -170.5^{\circ}$
- UV abszorpció acetonitrilben: 236 nm ($\epsilon = 30889$), 274 nm ($\epsilon = 12623$), 314nm ($\epsilon = 5780$)
- Engedélyezett felső határérték a kenyérben 50, feldolgozatlan gabonában 100, feldolgozatlan kukoricában maximum 200 ppb ($\mu\text{g/kg}$) lehet.



13. ábra Zearalenon 2D szerkezete

3. Mikotoxinok megjelenése a növényeken

A mikotoxinok megjelenése már a növény növekedésekor elkezdődhet, a növény megfertőzése pedig a tárolás során is folytatódhat ugyanazzal vagy akár egy másik toxinfajta megjelenésével. Aratás után leggyakrabban az *Aspergillus* és *Penicillium* fajok megjelenésére lehet számítani. Hazánkban a hőmérséklet a *Fusarium* fajok elterjedésének a legkedvezőbb, ezek a fajok már a szántóföldön megkezdik a növény fertőzését. A gombák a betakarítás után elpusztulnak, azonban toxinjaik továbbra is a növényen maradnak. Észrevételük nehéz, mivel a legtöbb penészgombával szemben a *Fusarium* fajok között vannak olyanok is, melyek nem látszódnak meg a növényen. A *Fusarium* fajok által okozott fertőzést fuzáriózishoz nevezzük. A gombák az előző évi vetésből megmaradt szerves anyagokon képesek áttelelni gombaképleteik segítségével, így már a talajban megkezdik a növény megfertőzését. Erős esőzés során, amikor a gabona megdől, a gombaspórák könnyen a növényre kerülhetnek. Fertőzésének kialakulásához illetve a gomba szaporodásához az ezt követő meleg és nedves idő kedvező feltételeket biztosít. Leggyakrabban a kalászon figyelhető meg, a fertőzött először szalmasárga színűvé válik, majd fehér vagy rózsaszínű penészbevonat képződhet rajta.



14. ábra *Fusarium*-fertőzött kalász^[11]

3.1 Megelőzés és védekezés

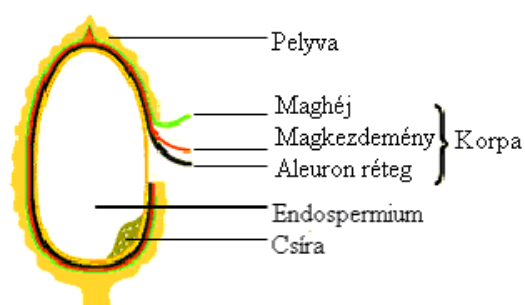
A leghatékonyabb módszernek a megelőzés bizonyul, mivel fertőzött gabonáról már nagyon nehéz a szennyező anyagok eltávolítása. Már a vetésnél törekedni kell az egészséges vetőmagok kiválasztására. El kell kerülni a kalászos és a kukorica-előveteményt. Csökkentheti a fertőzés kialakulásának valószínűségét a tarlómaradványok átforgatása, az árvakelések és gyomok irtása. Az őszi nitrogéntrágyázás meggyorsítja a

fertőzött növényi maradványok lebontását. Szintén csökkenti a fertőzés veszélyét a késői vetés, az optimális tápanyagellátás (mezo- és mikorelemek pótlása) és a szakszerűen előkészített talaj^[12].

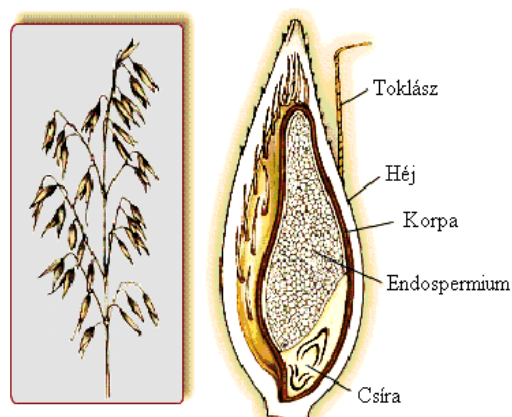
Vegyszeres kezelésekkel, fermentációs eljárásokkal, toxin megkötő adszorbensekkel, probiotikumokkal speciális enzimekkel a toxin mennyisége lényegesen csökkenthető, viszont ezek a hasznos tápanyagok károsodását okozhatják^[13]. Feldolgozás közben és az után (sütéskor) már a toxin teljes mennyisége nem távolítható el, legfeljebb csak csökkenthető.

4. Mikotoxinok az élelmiszerekben

A toxinok gabonaféléken, mint felületi szennyező anyagok jelennek meg. Feldolgozás során már nem lehetséges a toxint teljesen mennyiségének eltávolítása, de mennyisége csökkenthető. Fehér liszt esetében kicsi az előfordulásának valószínűsége, mivel a gabona feldolgozása során először egy tisztítást végeznek a szennyeződések eltávolítására, majd őrlik és szitálják, így el tudják választani a magbelsőt a héjtól. Hátránya, hogy így a liszt már csak fehérjét és nagy mennyiségű keményítőt tartalmaz. Korpának nevezzük a gabonák maghéjból és aleuronszemcsékből álló részeit. Ezek a részek a belső magnál sokkal gazdagabbak fehérjében, rostokban, esszenciális zsírsavakban, vitaminokban. Ezeknek az összetevőknek köszönhetően a szervezet számára segíti az anyagcsere-folyamatok működését, gátolja a zsírok és szénhidrátok felszívódását. Vízoldékony rostjai csökkentik a vér koleszterinszintjét, a magas vérnyomást és a szív és érrendszeri problémák kialakulását. A zab esetében a belső héj a mag szerves részét képezi, attól nem választható el, így zabpehely készítésénél a héjat nem tudják eltávolítani. Feldolgozáskor a zabot megtisztítják, majd előkészítés után az egész szemeket hengerek között lapítják. Így a zabpehely, a korpához hasonlóan rengeteg egészségre jótékony hatású anyagot tartalmaz, azonban nem szabad megfeledkezni arról, hogy a maghéj a magnak az a része, ahol a mikotoxinok képződhetnek. Különösen a biotermékek esetében nehéz a toxin eltávolítása, mivel a bionövények termesztésekor vegyszeres kezelés nem megengedett, a hőkezelés pedig a toxinok nagy részére nincs hatással.



15. ábra Búzaszem felépítése



16. ábra Zabszem felépítése

4.1 Zearalenon engedélyezett határértékei élelmiszerekben

Az alábbi táblázat tartalmazza a vizsgálataimhoz használt zearalenon élelmiszerekben engedélyezett felső határértékeit $\mu\text{g/kg}$ mennyiségben megadva. Kísérleteimben az engedélyezett határértékeknél nagyobb mennyiséget használtam a könnyebb kimutatás érdekében.

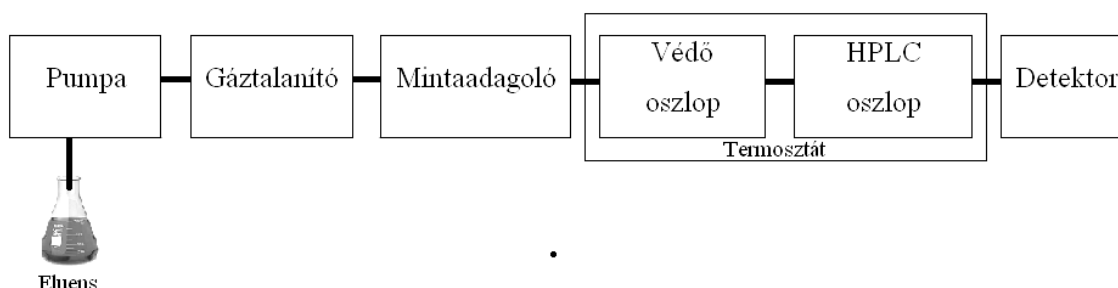
A zearalenon szervezet által maximálisan tolerált mennyisége $0,2 \mu\text{g}$ testsúlykilogrammonként, ez a mennyiség tehát még tüneteket nem idéz elő azonban tartós fogyasztás esetén felhalmozódhat a szervezetben.

Zearalenon	Felső határértékek ($\mu\text{g/kg}$)
Feldolgozatlan gabonafélék a kukorica kivételével	100
Feldolgozatlan kukorica	200
Közvetlen emberi fogyasztásra szánt gabonafélék, gabonaliszt, korpa mint közvetlen emberi fogyasztásra szánt késztermék és csíra	75
Közvetlen emberi fogyasztásra szánt kukorica, kukoricaliszt, kukoricakorpa, kukoricadara kukoricaacsíra és finomított kukoricaolaj	200
Kenyér (beleértve a kis pékárukat), tésztafélék, kekszek, gabonaszeletek és reggeli gabonapelyhek, kivéve a kukoricaszeleteket és kukoricaalapú reggeli pelyheket	50
Kukoricaszeletek és kukoricaalapú reggeli pelyhek	50
Csecsemők és kisgyermekek számára készült feldolgozott gabonaalapú élelmiszerek és bébitelemek (a feldolgozott kukoricaalapú élelmiszerek kivételével)	20
Csecsemők és kisgyermekek számára készült feldolgozott kukoricaalapú élelmiszerek	20

1. Táblázat Zearalenon határértékei élelmiszerekben ^[14]

5. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) felépítése, működésének elve

A HPLC (High Performance Liquid Chromatography) egy kromatográfiás eljárás, mely egyaránt használható a vegyületek azonosítására, elválasztására és mennyiségi meghatározására. Előnye a többi kromatográfiás módszerhez képest, hogy nem illékony anyagok mérésére is képes, így különböző gyógyszer-hatóanyagok, növényvédők, polimerek és minden ion mérését lehetővé teszi.



17. ábra Kromatográfiás rendszer elvi felépítése

A módszer lényege, hogy a bejuttatott minta a nagymértékű nyomás hatására komponenseire bomlik. A nagy nyomást az áramló eluens okozza. A pumpa biztosítja, hogy az eluensben lévő folyadék áramoltatása egyenletes legyen. A gáztalanító az oldószerben oldott gázok kivonására szolgál, ezek a gázok a levegőből is bekerülhetnek az oldószerbe és ott buborékok formájában zavarhatják a vizsgálatot. Az előoszlop megszűri a folyadékot. A termosztát biztosítja a vizsgálatához a megfelelő hőmérsékletet. A védő oszlop használata ajánlott, mivel olcsóbb és könnyen kicserélhető, megvédi a HPLC oszlopot a mintában lévő szennyeződésektől. Az automatikusan vagy manuálisan a rendszerbe juttatott minta az áramló oldószerrel elegyedve az állófázisba jut. Az állófázison a komponensek szétválasztódnak, így megfelelő berendezésekkel könnyen detektálhatók.

5.1.1 Eluens jellemzői

Az eluens (mozgófázis) minősége több feltételnek is meg kell feleljen. Az eluensnek tisztának, jó viszkozitásúnak, az állófázisnál polárosabbnak kell lennie, jó UV-fény áteresztőképességgel kell rendelkezzen, valamint fontos, hogy a minta komponensek jól oldódjanak a mozgófázisban. A legalkalmasabb oldószer a víz, mivel a víz kis viszkozitású és 190 nm-ig a fényt nem nyeli el. A víz a szerves anyagok nagy részét nem

oldja, így valamilyen szerves oldószer hozzákeverésével kell biztosítani a mintánk mozgófázisban való oldódását. Kitűnő szerves oldószer a metanol, etanol, 2-propanol és az acetonitril, azonban az első három a vízzel erős hidrogén-kötés kialakítására képes, ami a viszkozitás szempontjából nem túl kedvező. Az acetonitril csak dipól-dipól kölcsönhatásokat tud a vízzel létrehozni, amely már egy gyengébb kötés, így a leggyakrabban használt eluens víz és acetontiril keveréke.

5.1.2 Állófázis jellemzői

Az állófázisok rendkívül sokfélék lehetnek. Az elválasztás hatékonyságának szempontjából fontos a megfelelő szemcseméret és azok eloszlása, az oszlop alakja, a töltet szerkezete és pórusmérete valamint annak stabilitása.

A szemcseméretnek meghatározó szerepe van az oszlopban lévő nyomásesés és áramlási erősség kialakításában, továbbá az elválasztás felbontóképességét is befolyásolja. Minél kisebb a szemcsék mérete, annál nagyobb az oszlop felbontóképessége. A kisebb felbontóképességű oszlopokban a szemcseméret 40-400 μm . A szemcsék legkedvezőbb alakja a gömbszimmetrikus alak, ezzel tudjuk a legkedvezőbb áramlási viszonyokat és a legkisebb nyomásesést biztosítani. Fontos, hogy az állófázis ellenállóképes legyen különböző hatásokkal szemben, mint például pH és hőmérsékletváltozás.

Az álló és mozgófázis polaritása alapján két típusú, a normál fázisú és a fordított fázisú folyadékkromatográfia ismert. Normál fázisú HPLC jellemzője, hogy az állófázis mindig polárisabb a mozgófázisnál. Az állófázis anyaga itt lehet szilikagél, módosított szilikagél ($-\text{NH}_2$, NO_2 , $-\text{CN}$ csoporttal módosítják a felületét) vagy alumínium-oxid. Leggyakrabban állófázisként szilikagélt használnak, ez az anyag kiváló a kis molekulatömegű anyagok elválasztására. A vegyület SiO_4 tetraéderekből épül fel, a felületét szilanol-csoportok borítják. Ez a szerkezet biztosítja a nagy mechanikai stabilitást, így az rendszerben alkalmazott nyomás az 1000 bar-t is elérheti. Egyetlen hátránya, hogy jó vízmegkötő képességgel rendelkezik, a felületén adszorbeált víz pedig megakadályozza, hogy a komponens az állófázishoz hozzáférjen.

Fordított fázis esetében az állófázis apolárisabb, mint a mozgófázis. Itt is a szilikagél alapú állófázisok használata a leggyakoribb. Ez esetben a szilikagélt az előállítás során alkilcsoportokat tartalmazó klórszilánnal reagáltatják, ezzel létre tudják hozni az apoláris fázist.

5.1.3 Detektorok jellemzői

A detektorok^[15] képesek a mintában lévő komponensek kimutatására azok fizikai vagy kémiai tulajdonságuk alapján. Folyadékkromatográfiában leggyakrabban használt detektorok az UV, UV-VIS abszorpciós detektorok, fluoreszcenciás, elektrokémiai, vezetőképesség mérő, törésmutató-különbséget mérő, radiokémiai, polarimetriás és fényszórás-különbségen alapuló detektorok. Legtöbb minta esetében az UV-detektorok használhatók.

5.1.4 Kiértékelés

A kromatogram a kolonnáról eluálódó komponenseket detektorjelét mutatja meg az idő függvényében.

A retenciós idő kiszámításával a mintában lévő komponensek minőségére tudunk következtetni. A retenciós idő az *i*-edik komponens mozgófázisba kerülésétől a detektor által mért maximális koncentráció között eltelt idő. Ha a csúcs szimmetrikus, akkor a csúcs maximumának az idejével egyenlő. A holtidő az az idő, ami a mozgófázisnak szükséges a kromatográfion való áthaladásához. A holtidőt úgy tudjuk meghatározni, hogy a mintához olyan komponenst teszünk, ami a kolonnán nem kötődik meg, viszont a folyamat végén detektálni tudjuk. Ennek a meg nem kötődött komponensnek a retenciós ideje megegyezik a holtidővel. A redukált retenciós időt a retenciós idő és holtidő különbsége adja.

A kromatogramon lévő csúcsok területének kiintegrálásával meghatározható a mintában lévő komponensek mennyisége, a csúcs magassága a koncentrációval arányos. A mennyiségi elemzésnek több módszere ismert. A legegyszerűbb, viszont legkevésbé pontos módszer amikor a vizsgált komponens százalékos arányát adjuk meg az összes csúcs területösszegének százalékában. A módszer figyelmen kívül hagyja a detektor eltérő érzékenységet. A kalibrációs módszer alkalmazásakor minden komponensre külön kalibrációs egyenest kell készíteni, mely egy minimum öt pontból álló egyenes különböző koncentráció-tartományokban. A módszer több időt igényel, viszont sokkal pontosabb meghatározást tesz lehetővé. Szintén pontos meghatározás végezhető el a belső standard alkalmazásával. Ilyenkor már a mintaelőkészítés során kell a mintához egy ismert koncentráció vegyületet adni, amely a mintában biztosan nem fordul elő, de kémiai tulajdonságaiban hasonlít annak komponenseihez. Ez a vegyület a mérendő anyaghoz hasonlóan viselkedik az előkészítéskor, így a belső standard és a mérendő anyag

koncentrációjának aránya nem változik. A leolvasott csúcsmagasságaik aránya megegyezik a mintaelőkészítés előtti koncentráció arányával, ezzel a mérendő anyag valós koncentrációját is meg tudjuk határozni.

6. Saját vizsgálatok

6.1 Kísérleteim célja

Kísérleteim fő célja a mikotoxinok mennyiségének csökkentése sütés során továbbá annak megfigyelése, hogy a különböző gabona adalékanyagok felhasználása hogyan befolyásolja a toxin bontását. Vizsgálataimban egy normál háztartásban is könnyen elkészíthető kenyér-féléket készíték. Térfogatnövelő szerként szalalkálit alkalmazok, mivel korábbi kísérletek alapján ez az anyag bizonyult leghatékonyabbnak a toxin bontására^[5]. Vizsgálataim a zearalenon mennyiségi változásának megfigyelésére irányulnak, mivel ez az egyik leggyakrabban előforduló toxin az élelmiszerekben. Gabona-adalékanyagként zabpelyhet és korpát használok. Ezen alapanyagok a biotermékek gyakori alkotói, házilag készített kenyerek elkészítéséhez is már egyre többen használják, mivel könnyen beszerezhetők. Előnyei továbbá, hogy a búzához képest sokkal nagyobb rosttartalommal rendelkeznek és a tésztát is lazítják.

6.2 Mintaelőkészítés

Vizsgálataim során négy kísérletsorozatot végeztem, mindegyikben három párhuzamos méréssel.

Mintaelőkészítés folyamatai:

1. Pogácsák készítése

Hozzávalók 3 kis pogácsához:

- 25 g búzaliszt
- 35 cm³ víz
- csipet só (0,2 g)
- kiskanál cukor (1 g)
- 2 g térfogatnövelő

Az előírt mennyiségű lisztet, vizet, sót és cukrot összedolgoztam, térfogatnövelő szerként szalalkálit alkalmaztam. A recept alapján 3 kis pogácsát tudtam készíteni. Kísérletsorozataim mindegyikében 5×3



18. ábra

pogácsát készítettem, melyből az első 3 volt a kontroll minta, az ezt követő 4×3 pogácsa alapja szintén az előírt recept, viszont itt már zabpehely és korpa is került adalékanyagként a pogácsákhoz 1 illetve 2 g mennyiségben.

2. Pogácsák szennyezése

Az első kísérletsorozat volt a kontroll, a II., III. és IV. sorozatnál a pogácsákat sütés előtt félbevágtam, és mindegyikre 50 µL zearalenont tettem egyre nagyobb koncentrációban. A pogácsákat összehajtottam, sütőbe tettem.

Kísérlet	I.	II.	III.	IV.
Hozzáadott ZEA	—	50 µL 25 mg/L	50 µL 100 mg/L	50 µL 250 mg/L

2. Táblázat Pogácsákhoz hozzáadott ZEA mennyisége

3. Sütés

A sütés Indesit márkájú légkeveréses sütőben történt 180 °C-on 15-20 percig, a pogácsák teljes kiszáradásáig.

4. Extrakció

Sütés után a pogácsákat hagytam kihűlni, lemértem tömegüket, majd összetörtem és mindegyiket külön Erlenmeyer lombikba tettem. Az első két kísérletsorozatnál 40, a második kettőnél 30 cm³ acetonitrilt öntöttem a pogácsákra. Rázatógépen (Edmunt Bühler KS-15A) hagytam a lombikokat egy napig. Az acetonitrilt leöntöttem a pogácsákról, gömblombikba tettem.

5. Bepárlás rotadeszten

A pogácsákról leöntött acetonitrilt rotadeszten szárazra pároltam.

6. Visszaoldás

A gömblombikokban maradt száraz anyagot 1 ml acetonitrilben visszaoldottam és mintatartóba tettem.

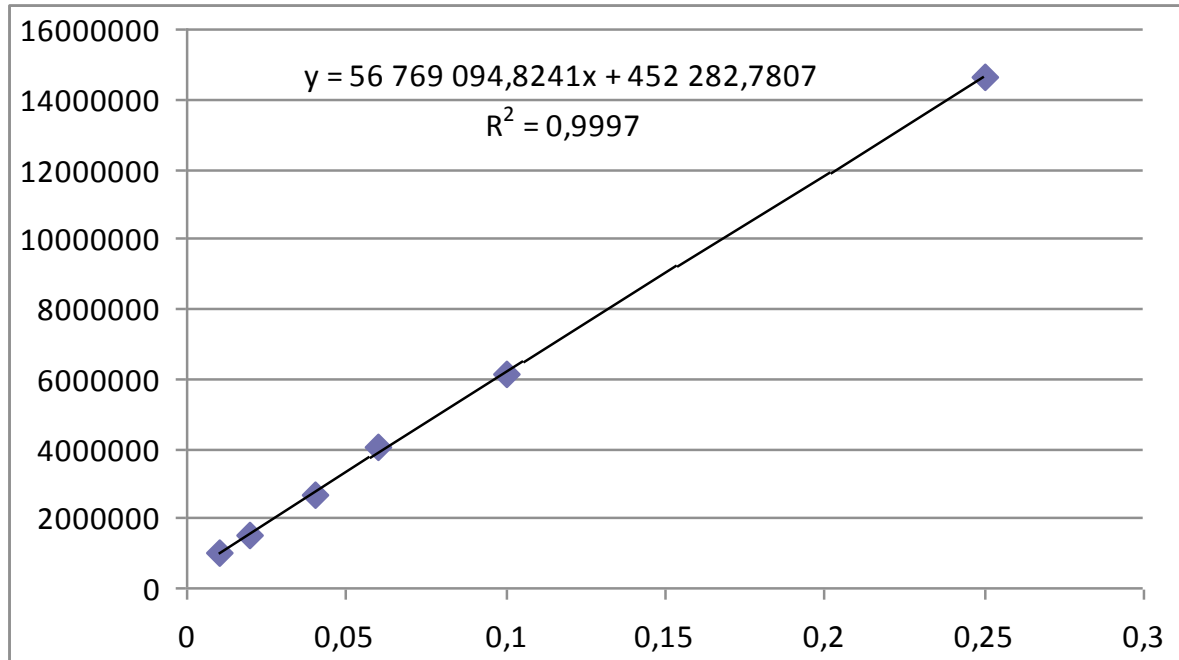
6.3 Mérés

A mérés kivitelezéséhez Achroma L-7000 rendszerű HPLC készüléket használtam.

A mérési paraméterek a következők:

- Típus: Merck HITACHI
- UV Detektor: L-7400
- Pumpa: L-7100
- Autosampler: L-7200
- Kolonnatér: L-7360
- Komatográfiás oszlop: Restek Pinnacle DB-C 18 250x4, 6x5µm
- Eluens: acetonitril/víz 15/85 v/v
- Áramlási sebesség: 0,7 ml/perc
- Detektálás: UV 236 nm, 276nm, 316 nm
- Injektált mennyiség 10 µl
- Kimutatási határ: LOD 1,25 µg/kg LOQ 4 µg/kg

Méréshez használt standard kalibrációs egyenese:



19. ábra Mérésekhez használt ZEA standard kalibrációs egyenese

6.4 Eredmények, kiértékelések

6.4.1 Visszanyerési tesztek

Toxin nélküli pogácsákból 2×3 darabot készítettem. A kisütött pogácsák mindegyikét zearalenon standard oldattal szennyeztem, az első 3 pogácsához 10, a második 3-hoz 1 mg/L ZEA-t adtam. A korábbiakhoz hasonlóan a pogácsákhoz acetonitrilt adtam, extraháltam, rotadeszten bepároltam és HPLC-n mértem a visszanyert ZEA mennyiséget. Visszanyerési tesztek eredményei biztosították a módszer hatékonyságáról:

10 mg/L ZEA 94 ± 5 %

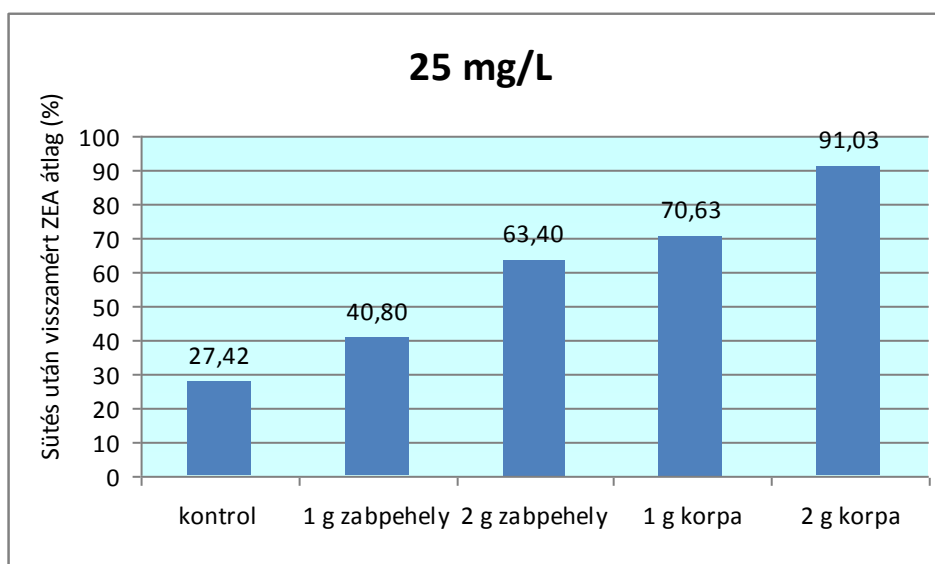
1 mg/L ZEA 92 ± 6 %

6.4.2 I. kísérletsorozat

Az első kísérlet volt a kontrol, ahol a mintába nem tettem toxint. A kapott eredmények biztosították arról, hogy a hozzávalók egyike sem szennyezett, mivel a mérés során zearalenon a mintából nem volt kimutatható.

6.4.3 II. kísérletsorozat

A sütések során a pogácsákon visszamaradt ZEA átlaga a következő diagrammon látható:

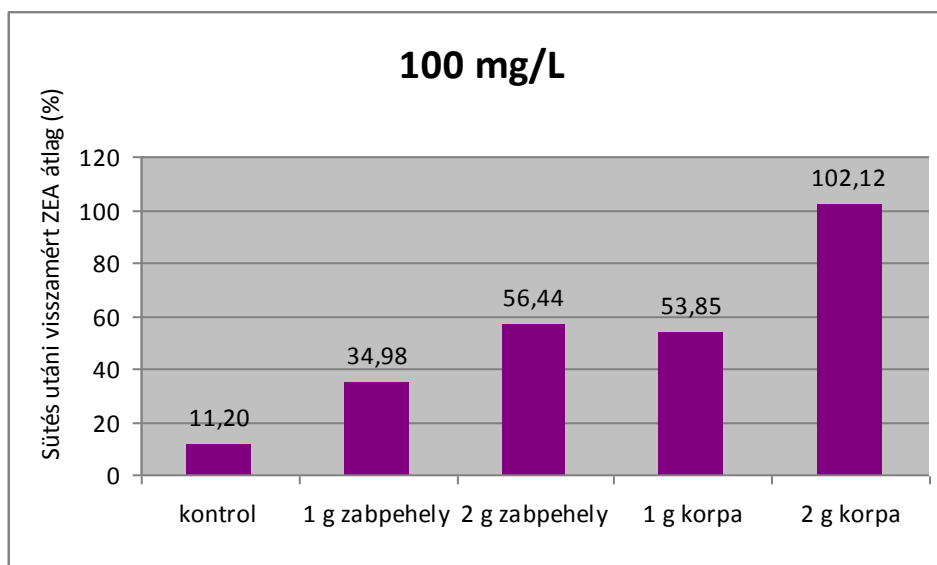


20. ábra 25 mg/L ZEA hozzáadásakor sütés után a pogácsákon visszamaradt ZEA mennyiség

A II. mérés eredményei alapján jól látható, hogy a toxin mennyisége a hozzáadottnál minden esetben kevesebb lett, mely a szalalkálinak, vagyis az ammónium-

hidrogén-karbonátnak köszönhető. A kísérlet a búzaliszttel készített pogácsák esetében bizonyult a leghatékonyabbnak. 25 mg/L-es koncentrációt alkalmazva az 1 g korpa még a 2 g zabpehelynél is jobban gátolta a szalalkáli hatását, 2 g korpánál pedig a hozzáadott toxin nagy része kimutatható volt.

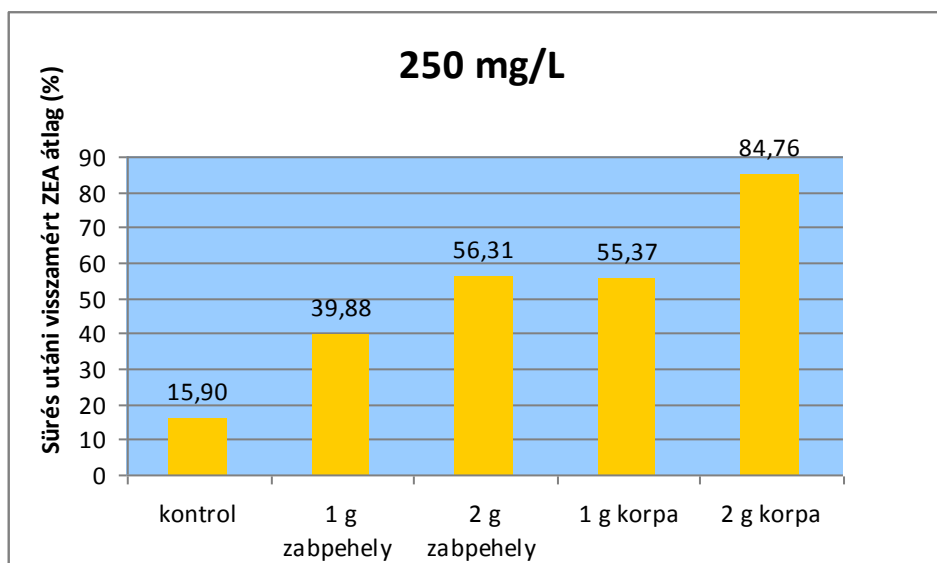
6.4.4 III. kísérletsorozat



21. ábra 100 mg/L ZEA hozzáadásakor sütés után a pogácsákon visszamaradt ZEA mennyiség

A III. mérésnél az előbbinél négyszer nagyobb toxinmennyiséggel dolgoztam. Azt várnánk, hogy a nagyobb toxinkoncentráció hozzáadásakor nagyobb mennyiség fog a pogácsán visszamaradni, azonban pont fordítva történt, a 2 g korpa kivételével mindegyik mérésnél a hozzáadott toxin kevesebb százaléka maradt vissza. A 2 g korpa esetében visszamaradt rendkívül magas toxinkoncentráció annak tudható be, hogy a pogácsák készítésekor a szalalkáli elfogyott, így a 3 db 2 g korpás pogácsákhoz az előírt 2 g helyett 1,25 g szalalkáli tudtam csak tenni. Viszont ez is azt bizonyítja, hogy a szalalkáli valóban nagy mértékben hozzájárul a toxin bontásához.

6.4.5 IV. kísérletsorozat



22. ábra 250 mg/L ZEA hozzáadásakor sütés után a pogácsákon visszamaradt ZEA mennyiség

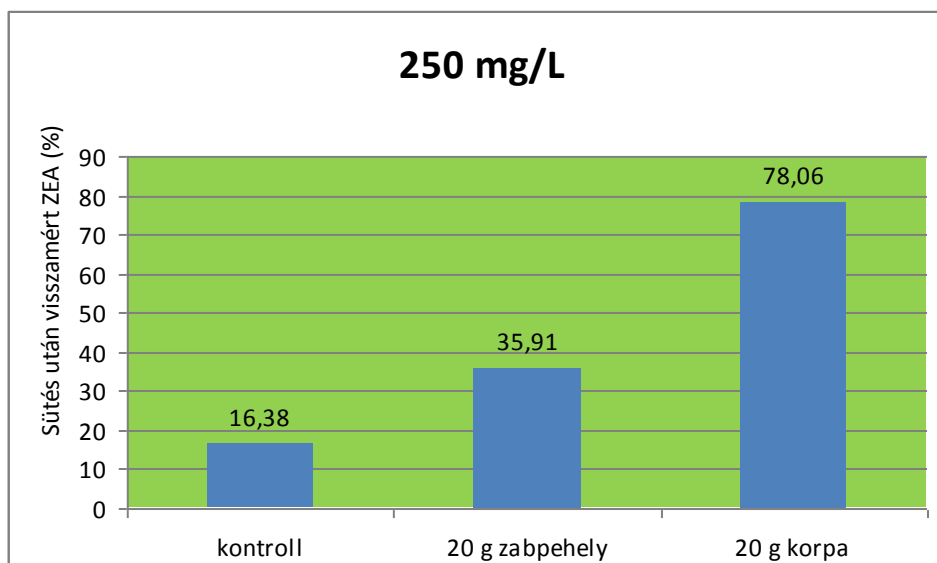
A IV. mérésnél 250 mg/L-es koncentrációt alkalmazva a III. méréshez hasonló eredményeket kaptam, a toxin mennyisége csak nagyon kis mértékben volt nagyobb, valószínűleg azért, mert itt a toxin-koncentráció már túl nagy volt a hozzáadott szalalkálihoz képest, így a térfogat-növelő már ennél jobban nem tudta kifejteni hatását. A 2 g korpa esetében itt is az előírtnál kevesebb szalalkálit tudtam csak alkalmazni, jól látható ez alkalommal is, hogy a többihez képes jóval kevesebb toxin bomlott a kevesebb térfogatnövelő hatására.

6.4.6 „Elrontott kísérlet”

Vizsgálataim során volt egy kísérletsorozat, mely véletlenül nem az előírt hozzávalók arányában készült. Bár nem egy előre eltervezett kísérlet, úgy gondolom érdemes megnézni itt is a kapott eredményeket, mert kismértékben megváltoztatja az eddigi elképzeléseket a zabpehely ill. a korpa szalalkálival kifejtett toxinbontó hatásával kapcsolatban.

A kontroll minta az eredeti recept alapján készült, zabpehely és korpa esetében azonban fele-fele arányban volt jelen a liszt és az adalékanyag. Érdekes, hogy míg az előbbi kísérlet tapasztalatai alapján azt vártuk volna, hogy több visszamaradó toxin lesz jelen, mivel eddig is a zabpehely ill. korpa akadályozhatta a bontást, itt pont, hogy kevesebb lett. A IV. kísérlet során, ahol szintén 250 mg/L koncentrációt használtam, az 1

és 2 g zabpehely mellett 50 és 60 % ZEA maradt vissza, itt viszont ennek majdnem csak a fele, tehát több mennyiség bomlott el. Korpa esetében is csökkent a toxin mennyisége a korábbi pogácsákhoz képest.



23. ábra 250 mg/L ZEA hozzáadásakor sütés után a pogácsákon visszamaradt ZEA mennyiség

6.5 Konklúzió

Az összes kísérletsorozatnál jól látható volt, hogy a hozzáadott toxin mennyisége minden esetben csökkent. Az elővizsgálatok bizonyították, hogy a toxin lúgos közegben bomlik. A szalalkáli (ammónium-hidrogén-karbonát) hő hatására ammóniává, széndioxiddá és vízzé alakul. Ez a meglehetősen lúgos közeg teszi lehetővé a toxin bontását. Látható volt, hogy ahol a hozzávaló hiányában kevesebb szalalkáli került a tésztához, a toxin majdnem teljes mennyisége megmaradt a tésztán.

A következő táblázat összefoglalja a három kísérlet eredményeit, az adatok a pogácsákon visszamaradt toxin mennyiségét mutatják százalékban.

	Kontrol	+ 1g zabpehely	+ 2g zabpehely	+ 1g korpa	+ 2g korpa
25 mg/L	27,42	40,80	63,40	70,63	91,03
100 mg/L	11,20	34,98	56,44	53,85	102,12
250 mg/L	15,90	39,88	56,31	55,37	84,76

3. táblázat Kísérletek során visszamaradt ZEA (%)

A kísérletek a búzaliszt esetében bizonyultak a leghatékonyabbnak, itt maradt vissza a legkevesebb toxin a pogácsákon. A zabpehely és a korpa már meggátolta a koncentráció csökkenését, vagyis a toxin bontását. Itt valószínűleg először a zabpehely ill. korpa valamely összetevőjével lépett először reakcióba a szalalkáli, majd utána a toxinnal.

A három kísérletet összehasonlítva, vagyis a 25, 100 és 250 mg/L-es koncentrációk alkalmazásánál egyértelműen megállapítható, hogy a legsikeresebb bomlás a 100 mg/L-es toxin-koncentráció esetében volt, hígabb és töményebb koncentrációt alkalmazva már kevesebb toxin bomlott. Valószínűsíthető, hogy a reakció során autokatalitikus folyamatok játszódnak le, mely során a toxin bomlásakor keletkező termékek visszahatnak a bomlási folyamatokra, így még jobban segítve a toxin bontását. Ennek bizonyítására azonban még érdemes lenne kísérleteket végezni több különböző toxinkoncentrációval. Egy másik magyarázat lehet még az is, hogy a felületen a nagyobb koncentrációjú toxin nagyobb arányban volt jelen, így több ammóniával érintkezhetett a sütés során, ami még több toxin bontásának kedvez. Adalékanyagok alkalmazásakor nagyobb volt a visszamaradó toxin mennyisége, így megállapíthatjuk, hogy ezen anyagok hozzáadása megakadályozza a bontási folyamatot.

Bár az „elrontott kísérlet” során a pogácsák minőség szempontjából a liszt és adalékanyag 1:1 arányban történő felhasználása miatt fogyasztásra alkalmatlanok, mégis indokolja további vizsgálatok elvégzését, hogy magyarázható legyen a korábbiak alapján várt közel 100%-os visszamaradó toxinmennyiség helyett kapott 36%-os érték. Kérdéses tehát, hogyha valóban a zabpehely és a korpa gátolja a szalalkáli hatását, akkor nagyobb mennyiség alkalmazása esetében mitől lesz kevesebb a visszamaradó toxin mennyisége.

7. Összefoglalás

Az élelmiszerek előállítása szempontjából fontos, hogy a fogyasztók biztonságosan fogyasztható élelmiszerekhez jussanak, ez pedig csak akkor valósítható meg, ha már a magok vetésétől, a növénytermesztésen és feldolgozáson át minden folyamat biztonságos körülmények között zajlik. A mikotoxinok már a vetés során elkezdhetik a növény megfertőzését és ez tovább folytatódhat a raktározás során, majd fogyasztáskor a szervezetbe kerülve fejtik ki mérgező hatásukat. A több ezer fajta között vannak rákkeltő, immunrendszer működését gátló hatású, mutagén, fejlődési rendellenességet okozó, ösztrogén hatású, idegrendszeri ártalmakat okozó vegyületek.

Kísérleteim során célom volt a gabonákban előforduló toxin mennyiségének csökkentése a sütés során, jelen esetben szalalkáli alkalmazásával. Továbbá vizsgáltam, hogy a zabpehely és a korpá milyen hatással van a toxin mennyiségének változására.

Eredményeim minden esetben bizonyították a szalalkáli toxin-bontó hatását, bár 100%-os bontást sehol sem értem el. Ez is mutatja tehát, hogy a megelőzés mindennél fontosabb, mert a toxin eltávolítása teljes mértékben nem lehetséges.

Napjainkban az egészséges táplálkozás részeként két leggyakrabban alkalmazott gabona-alapanyagot, a zabpehelyet és korpát használtam fel a sütéseim során. Kísérleteimből az is egyértelműen látható, hogy a felhasznált alapanyagok a toxin bontását gátolják. Így, amennyiben a hozzávalók bármelyike is tartalmazott volna toxint, a zabpehelyes és korpás kenyér az egészség szempontjából károsabb lett volna a fehér kenyérhez képest.

A legnagyobb mértékben a korpá gátolta meg a szalalkáli hatását, így korpás kenyerek sütése során ajánlatosabb lenne másstérfogatnövelőszert alkalmazni.

További céljaim között szerepel más adalékanyagok és térfogatnövelőszerek vizsgálata illetve a sütés során keletkezett bomlástermékek megfigyelése.

8. Hivatkozások

- [1] *hvg.hu*. Letöltés dátuma: 2014. február 20, forrás:
http://hvg.hu/itthon/20090629_cerbona_fuzarium_toxin_teszt
- [2] *Medical Online*. Letöltés dátuma: 2014. február 20, forrás:
http://www.medicalonline.hu/cikk/fuzarium_toxin_tobb_termeket_visszavonta_a_tortellino_kft_es_a_diamant_is
- [3] *Index*. Letöltés dátuma: 2014. február 20, forrás: [index.hu](http://index.hu/gazdasag/magyar/pap041027/):
<http://index.hu/gazdasag/magyar/pap041027/>
- [4] *hvg.hu*. Letöltés dátuma: 2014. február 20, forrás:
http://hvg.hu/plazs/20110516_hogyan_kerul_toxin_kenyerbe
- [5] Végh, É. (2010). *Zearalenon hőtranszformációjának vizsgálata élelmiszerekben eltérő térfogatnövelő szerek hatására*. Eger.
- [6] Pokorny, G. (2012). *Jelentősebb mikotoxinok hőtranszformációjának vizsgálata élelmiszerekben, eltérő térfogatnövelő szerek hatására*. Eger.
- [7] *Egészségügyi Minisztérium*. Letöltés dátuma: 2014. február 25, forrás:
<http://www.eum.hu/archivum/jo-tudni/amit-aflatoxinrol>
- [8] Kovács-Weber, M. (2008). *A T-2 toxin lipidperoxidációs folyamatokra és a glutation redoxrendszerre, valamint az immunrendszer egyes elemeire kifejtett hatásának vizsgálata brojlércsirkében*. Gödöllő.
- [9] Tóth, Á. *A fumonizinek és hatásuk az állatok egészségügyi állapotára*. Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, Kaposvár.
- [10] Krifaton, C. (2012). *Biomonitoring rendszerek fejlesztése az aflatoxin-B1 és a zearalenon vizsgálatára*. Gödöllő.
- [11] *Agrárágazat*. Letöltés dátuma: 2014. február 25, forrás:
<http://www.pointernet.pds.hu/ujsagok/agraragazat/2013/09/201309130.html>
- [12] Ábrahám, R., Érsek, T., Kuroli, G., Németh, L., & Reisinger, P. (2011). *Növényvédelem*. Debreceni Egyetem, Nyugat-Magyarországi Egyetem, Pannon Egyetem.
- [13] Lásztity, R. *A fusarium és a mikotoxinok*. Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Alkalmazott Biotechnológiai és Élelmiszertudományi Tanszék.
- [14] *Az Európai Unió Hivatalos Lapja*. Letöltés dátuma: 2014. február 25, forrás:
<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/ALL/;jsessionid=1kPcTbXVJ6F8FLM2zHDPyFGXZlnynB62rGhdJp4MrJpvmxgcRpNN!2112478130?uri=CELEX:32006R1881>
- [15] Pokol, G., Simon, A., Horvai, G., Bezúr, L., Dudás, K. M., Gyurcsány, R., és mtsai. (2011). *Analitikai kémia*. Budapest: Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem.