

Mikotoxin vizsgálatok élelmiszerekben III.

A T-2 toxin meghatározása vékonyréteg kromatográfiás módszerrel

BATA ÁRPÁD – LÁSZTITY RADOMIR

BME Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék

Érkezett: 1980. március 25.

A Magyarországon uralkodó éghajlat lehetővé teszi számos *Aspergillus*, *Penicillium* és *Fusarium* faj elszaporodását. Így számos mezőgazdasági termény kisebb-nagyobb mértékben fertőzött lehet ezen gombák egy vagy több fajával. A penészes fertőzések mellett, hogy rontják a termék értékét, sajnos sok esetben toxikus anyagok termelése következtében élelmiszer-egészségügyi problémákat is okozhatnak.

Eddigi munkánk során a *Fusarium* fajok toxinjait vizsgáltuk, illetve vizsgáljuk. Korábbi közleményeinkben (1, 2) a *Fusarium* félék által termelt zearalenon és származékainak meghatározásával kapcsolatos kísérletek eredményeiről számoltunk be.

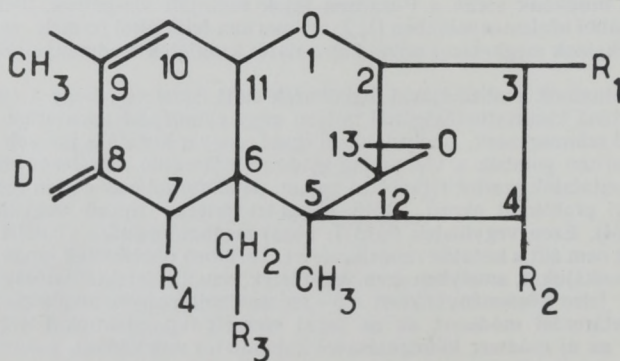
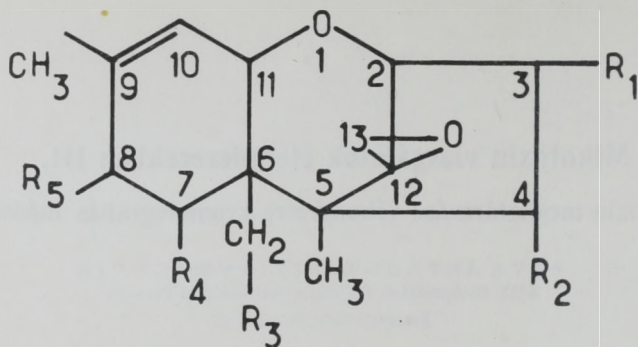
A mikotoxinok analitikájával foglalkozók előtt ismeretes, hogy a zearalenon VRK-n történő kimutathatóságánál milyen nagy előrelépést jelentettek a diazónium típusú színreagensek, amelyek közül egyet magyar kutató is javasolt (3).

A *Fusarium* gombák a viszonylag gyakran előforduló zearalenon mellett az eddigi tapasztalatok szerint ritkábban ugyan, de előfordulásuk esetén igen súlyos egészségügyi problémát okozó 12, 13 epoxi-trichotecen típusú vegyületeket is termelnek (4). Ezen vegyületek (lásd 1. ábra) meghatározására vizuális reagens hosszú ideig nem állt a kutatók rendelkezésére. 1979-ben publikálták japán kutatók (5) azt a munkájukat, amelyben ezen vegyületek vizuális detektálhatóságáról számoltak be. Jelen közleményünkben a p-ánizsaldéhid reagens alkalmazásával végzett meghatározási módszert és az azzal szerzett tapasztalatokat ismertetjük. Tárgyaljuk az új módszer kidolgozásával kapcsolatos munkánkat, valamint a két módszer összehasonlítását.

Vizsgálati anyagok és módszerek

Tanszékünk különböző állami gazdaságokból és mezőgazdasági termelőszövetkezetekből rendszeresen kap takarmány mintákat. E minták minden esetben mikotoxin gyanús takarmányokból származnak. A mintákban – a megbízó kérésére – zearalenon kimutatása volt a cél, de a zearalenon mellett, illetve helyett esetleg előforduló más mikotoxin, így a T-2 toxin meghatározását is el akartuk végezni.

A T-2 toxin meghatározási eljárások tanulmányozásához *Fusarium tricinctum*mal fertőzött kukorica mintát használtunk. (A fertőzést az Országos Állategészségügyi Intézetben Sellyei Gyuláné végezte el.) Kb. 30 g *Fusarium*mal fertőzött kukoricát kézi darálóval dara finomságúra őröltünk, 10 g-ot kimértünk



Megnevezés

T-2 toxin

HT-2 toxin

Neosolaniol

Diacetoxyscirpenol

R₁

OH

OH

OH

OH

R₂

OCOCH₃

OH

OCOCH₃

OCOCH₃

R₃

OCOCH₃

OCOCH₃

OCOCH₃

OCOCH₃

H

H

H

OH

R-

OCOCH₂CH/CH₃/₂

OCOCH₂CH/CH₃/₂

OH

OH

Megnevezés

Fusarenon X

Nivalenol

Doxinivalenol

R₁

OH

OH

OH

R₂

OCOCH₃

OH

H

R₃

OH

OH

OH

R₄

OH

OH

OH

belőle és egy 400 cm³-es Erlenmayer lombikba tettük. Mintegy 200 cm³ etilacetáttal 3 órán keresztül szobahőmérsékleten extraháltuk. Az extrakció befejezésével az elegyet leszűrtük és vákuumban („Rotadeszt” készülék) közel szárazra pároltuk. Az olajos maradékhoz 30 cm³ metanol:víz (4:1) elegyet adtunk majd 50 cm³ petroléterrel extraháltuk. A petroléteres extrakció a minta lipid mentesítését szolgálja. A vizes fázist vízmentes Na₂SO₄-tal megszáritottuk és szárazra pároltuk (7). A száraz maradékot 2–3 cm³ benzolban feloldottuk és 15 × 2 cm-es Kiesegel-60 oszlopra vittük. Az oszlopot először 30 cm³ benzollal, majd 20 cm³ benzol-aceton (8:2)-nal eluáltuk. A benzol-acetonos fázis tartalmazza a toxint. A toxint tartalmazó frakciót szárazra pároltuk és 0,1 cm³ benzolban feloldottuk. A VRK futtatáshoz Silufol elnevezésű, gyári készítésű lapot használtunk. Az első toxin meghatározásnál a lemezre 0,5, 1,0 és 2,0 mg/cm³ toxin standard oldatból 10–10 mm³ vittünk fel. A feloldott mintából 10 mm³-t cseppentettünk fel. A futtatást benzol-aceton (12:7) elegyben végeztük el. Az előhívás

0,5 cm³ p-ánizsaldehid
85 cm³ metanol
10 cm³ ecetsav
5 cm³ cc H₂SO₄

reagenssel végeztük el. A reagenssel való lefújás után a lemezt pár percre 120 C°-os szárítószekrénybe helyeztük, majd hosszú hullámhosszú u.v. fényben R_f = 0,5 értéknél fluoreszkáló foltot kaptunk. A mintát akkor tekintettük pozitívnak, ha a reagenssel való lefújás után R_f = 0,5 értéknél a standarddal azonos magasságban is fluoreszkáló folt jelent meg.

Számos kísérletet végeztünk a célból, hogy a toxint vizuálisan detektálhatóvá tegyük. Kísérleteinkkel csak tovább növeltük a toxin fluoreszcenciáját kiváltó eddig ismert anyagok számát (pl. SbCl₅). Eredményesen hasznosítottuk munkánkban a bevezetőben említett közleményben (4) ismertetett előhívási metodikát. Utóbbi szerint a lapra 2 mm³ 0,2, 0,1, 0,2 és 0,5 mg/cm³ koncentrációjú standard oldatot és a mintából 2 mm³ cseppentettünk fel. A futtatást benzol-aceton 12:7 elegyben végeztük. A felfuttatott lapot megszáritottuk, majd 3%-os 4-(p-nitrobenzil) piridin (kloroform: széntetraklorid 2:3 elegyben) lefújtuk és 30 percre 150 C°-os szárítószekrénybe helyeztük. A lap lehülése után 10%-os tetraetilénpentamin vizes oldatával lefújtuk. A lap megszáradásával egyidőben a T-2 toxin foltja R_f = 0,5 értéknél szürkés-kék színben jelenik meg. A folt kb. 1 óráig megtartja a színét (4).

Eredmények és értékelésük

A bázisként használt F tricinctummal fertőzött kukoricán kívül mintegy 10 mintát vizsgáltunk meg mindkét módszerrel.

A p-ánizsaldehides reagens alkalmazásánál problémát jelentett, hogy már lefújás előtt számos fluoreszkáló foltot tartalmazott a lemez a kérdéses tartományban. Így igen nehéz volt annak eldöntése, hogy a reagenssel való lefújás hatására új folt keletkezett-e, vagy sem. Ezen problémán úgy egyeztetni segített, hogy a mintából két párhuzamos vizsgálatot végeztünk és a lefújt lapot összehasonlítottuk az ugyanabból a mintából származó, de előhívás nélküli kromatogrammal. Az elvégzett 10 vizsgálat közül 2 esetben pozitív gyanús mintát találtunk.

Ugyanezt a 10 mintát újólág megvizsgáltuk az új reagenst alkalmazva előhívószernek. A minták közül a pozitív gyanús minták esetében 0,3 ppm és 0,4 ppm koncentrációjú T-2 toxin tartalmat találtunk.

A módszer visszanyerési hányadának és szórásának meghatározására 10 db 0,5 ppm toxin koncentrációjú kukorica mintát készítettünk analitikai tisztaságú toxin hozzáadásával. A meghatározás szórását ±21%-nak, visszanyerési hatásfokát 70%-osnak találtuk.

A tapasztalatok alapján a következő értékelés tehető:

A p-anízsaldehiddel végzett előhívás esetén számos zavaró folt jelenik meg a kérdéses R_f érték közül, ami zavarja a kromatogram kiértékelését. A meghatározás megbízhatóságának növelést csak több különböző futtatószerben történő futtatás alkalmazásától lehet remélni.

A nitrobenzil-piridin-tetraetilpentaamin előhívóval kezelt lapokon az $R_f = 0,5$ érték közül a zavaró folt nem jelent meg. Ezzel az előhívási módszerrel 0,3–0,5 ppm. koncentrációjú T–2 toxin mutatható ki. Szennyező anyagoktól származó foltokat a kromatogramban csak magas, 0,8 feletti R_f értéknél tapasztaltunk. A módszer érzékenysége az általunk alkalmazott körülmények között 0,1 ppm.

A kapott alacsony visszanyerési és a magas szórás érték azt jelzi, hogy a meghatározási módszer további kidolgozása és begyakorlása szükséges. Várhatóan megfelelő tapasztalattal a visszanyerés növelése és a szórás csökkentése is elérhető.

I R O D A L O M

- (1) Bata Á., Galács J., László R.: ÉVIKE Sajtó alatt.
- (2) Bata Á., Kiss E., László R.: ÉVIKE. Sajtó alatt
- (3) Sarudi I.: Z.U.L. 154. 61. 1974.
- (4) Takitani S., Asabe Y., Kato T., Suzuki M. és Ueno Y.: J. of Chrom. 172, 335, 1979.
- (5) Mycotoxins. Elsevier Scin. Pub. Com. Amsterdam, Oxford, New York (1974).
- (6) Rodricks J. U.: Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems Am. Chem. Soc. Washington, 1976.
- (7) Szathmáry Cs. J., Mirocha C. J., Palyusik M. és Pathre S. U.: Applied and Env. Micr. 32, (4), 579, 1976.

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МИКОТОКСИНОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ. III.

A. Bata и P. Ластуть

Авторы, из среди токсинов гриба фузариум, занимаются тонкослойно-

Авторы, из среди токсинов гриба фузариум, занимаются тонкослойно-хроматографическим определением соединений ряда трихотекан. Авторы сравнивали возможности определения токсина Т–2. В случае проведения проявления при помощи анисового альдегида, установили, что в данный метод определению применимо только в случае концентрации 0,5 pp m или высшей концентрации, однако и в случае подобной высокой концентрации ряд веществ мешают определению. Проверяли применимость 4- (п-нитробензил) придина, и тетраэтилен- пентамина. Данный метод при концентрации pp m 0,1 и высшей оказался подходящим для определения грибов в комбикормах и кормовых концентратах. При проведении исследований не наблюдали никаких действий мешающих определению.

MYCOTOXIN-UNTERSUCHUNGEN IN LEBENSMITTELN. III. BESTIMMUNG DES T–2–TOXINS MIT EINER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHEN METHODE

Á. Bata und R. László

Von den Toxinen der Fusariumpilze wurde die Bestimmung der Verbindungen mit einem Trichotecangerüst mittels Dünnschichtchromatographie studiert. Bei dieser Arbeit wurden die Bestimmungsmöglichkeiten des T–2-toxins miteinander

verglichen. Bei der Entwicklung mit p-Anisaldehyd wurde gefunden, dass diese Art der Bestimmung nur bei einer Konzentration von nur 0,5 ppm oder bei höheren Konzentrationen anwendbar ist, jedoch sogar bei solchen hohen Konzentrationen die Bestimmung von zahlreichen Substanzen störend beeinflusst wird. Die Anwendbarkeit von 4-(p-Nitrobenzyl) pyridin und Tetraäthylenpentamin wurde untersucht. Die Methode erwies sich als anwendbar bei einer Konzentration von 0,1 ppm oder höher bei der Analyse von Getreiden, Mischfuttern und Nährmitteln. Bei den untersuchten Fällen wurde kein die Bestimmung störender Einfluss beobachtet.

MYCOTOXIN INVESTIGATIONS IN FOODS. III. DETERMINATION OF T-2 TOXIN BY A THIN-LAYER CHROMATOGRAPHIC METHOD

Á. Bata and R. Lásztity

Of the toxins of *Fusarium* fungi, the determination of compounds having a trichotecan skeleton by thin-layer chromatography was studied. In the course of this study, possibilities of the determination of T-2 toxin were compared. On development with p-anisaldehyde it was found that the determination can be applied only at a concentration of 0.5 ppm or higher but even at such high concentrations a great number of substances may interfere with the determination. On testing the suitability of 4-(p-nitrobenzyl)-pyridine and tetraethylene pentamine the method proved suitable in case of cereals, mixed fodders and nutrients at concentrations of 0.1 ppm or higher. In the examined cases no effects interfering with the determination were observed.