

Mikotoxin vizsgálatok az élelmiszerekben

V. Néhány fusariotoxin párhuzamos kimutatása kapilláris gázkromatográfiával

BATA ÁRPÁD, VÁNYI ANDRÁS, LÁSZTITY RADOMIR

* Budapesti Műszaki Egyetem, Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék, Budapest 1111, Műegyetem rkp. 3.

** Országos Állategészségügyi Kutató Intézet Budapest 1149, Tábornok utca 1.

Bevezetés

A takarmányok gyakran több gombafajjal is fertőzöttek lehetnek, de azonos gombafaj is több mikotoxint képes termelni. Ezért régi törekvés olyan analitikai módszer kidolgozása, amelynek segítségével egyidejűleg, egy elemzéssel több toxin kimutatható. *Stoloff és munkatársai* (1) aflatoxin, ochratoxin, zearalenon, sterigmatocistin és patulin egyidejű vizsgálatára kidolgozott módszert ismertetett.

Ezt az eljárást módosították *Scott és munkatársai* (2). *Roberts és munkatársai* (3) 14 toxin szimultán vizsgálatáról számoltak be. *Josefsson és Möller* (4), valamint *Pliszczynska és Jüszkiewicz* (5) is foglalkoztak ún. multimikotoxin kimutatási módszerek kidolgozásával. *Gimemo* (6) módszere 10 mikotoxin, míg *Takeda és munkatársai* (7) eljárása 14 toxin kimutatására alkalmas. Az említett szerzőkön kívül több kutató foglalkozott a kérdés megoldásával, azonban a gyakorlatban széles körben nem terjedtek el ezek a módszerek. Ennek oka az, hogy hosszadalmas tisztítási eljárást igényelnek, valamint az, hogy néhány toxin vonatkozásában az érzékenyséjük rossz, nem elégítik ki a gyakorlati igényeket.

Az előzőekben ismertetett vékonyréteg kromatográfiás vizsgálati módszereken túlmenően *Engström és munkatársai* (8) nagynyomású folyadék-kromatográfiás multimikotoxin meghatározási módszert dolgoztak ki.

Európa kontinentális éghajlatú országaiban, így Magyarországon is, a takarmányok gombás eredetű minőségromlásában és a mikotoxinok okozta állatmegbetegedések létrejöttében a *Fusarium* gombák fontos szerepet játszanak. Ezért igény merült fel olyan toxinkimutatási módszer iránt, amely alkalmas több fusariotoxin (4–6) párhuzamos kimutatására igen kis koncentrációtartományban.

Munkánk során kapilláris GLC-t alkalmaztunk *Fusarium* gombák által termelt leggyakoribb szekunder metabolitok kimutatására.

Módszer

Készülékek

- a) Vákuum rotadeszt készülék (MTA Kutatási Eszközök Kivitelező Vállalat, Hungary)
- b) Block Thermostat (MTA Kutatási Eszközök Kivitelező Vállalat, Hungary)

- c) Packard gázkromatográf, 427 modell, FID detektorral, HP 3390 A integrátorral
- d) Screw cap vials (Pierce, Rockford, I11. USA)
- e) Kolonna üveg kapilláris, Hewlett Packard gyártmányú kapilláris húzón húzva és Grob és munkatársai módszere szerint nedvesítve.

Reagensok

- a) Minden felhasznált oldószer kereskedelmi készítmény volt (Reanal, Hungary), felhasználás előtt kétszer desztillálva.
- b) Mikotoxin standardok: 1 mg/cm³ zearalenon (Supelco 4-6318), 0,5 mg/cm³ T-2 toxin (Supelco 4-6322), 0,5 mg/cm³ diacetoxiscirpenol (Supelco 4-6315), 0,7 mg/cm³ deoxinivalenol, 0,5 mg/cm³ HT-2 toxin (dr. Palyusik M.).
- c) BSTFA (Pierce, Rockford I11. USA).
- d) Kieselgél 60 (Merck).

Extrakció és tisztítás

10 g búzát darafinomságúra darálunk. A megdarált búzát 200 cm³ etilacetáttal szobahőmérsékleten 2 órán keresztül extraháljuk úgy, hogy extrahálás közben az elegyet többször összerázzuk. Az extrakció befejeztével a szerves oldatot leszűrjük és félretesszük. A maradékot 200 cm³ metanol-víz (6+4 v/v) elegyével két órát szobahőmérsékleten újból extraháljuk. Az oldószert leszűrjük és a két szűrletet egyesítjük. Az oldatból a vizet 10 g vízmentes Na₂SO₄-tal megkötjük, majd az oldószert vákuum rotadeszt berendezéssel bepároljuk. A bepárlás után olajosan folyó maradékot kapunk. Ezt a maradékot 2 cm³ benzol-aceton (1+1 v/v) elegyben feloldjuk és 10×1 cm Kieselgél 60 géllal töltött oszlopra öntjük. Az oszlopról 20 cm³ benzollal az extrakt lipid tartalmát eluáljuk. A vizsgálandó mikotoxinokat 20 cm³ benzol-aceton (1+1 v/v) eleggyel eluáljuk. A toxinokat tartalmazó eluátumot vákuum rotadeszten ismételtelen bepároljuk.

Származékképzés

A szárazra párolt anyagot 2 cm³ acetonban oldjuk. Az acetonos oldatból 200 mm³-t egy screw cap vial edénybe tesszük és N₂ árammal bepároljuk. Az edénybe 200 mm³ BSTFA reagenst mérünk, jól lezárjuk azt és 15 percig 60 °C-on blokk termosztátban melegítjük. A reakcióelegyet a reakció lezajlása után lehűlni hagyjuk és a reakcióelegyből 1 mm³-t injektálunk be a gázkromatográfba.

Gázkromatográfiai meghatározás

A készülékben használt oszlopot 8 mm O.D., 3 mm I. D. Pyrex üvegből húztuk, Hupe Bush Hewlett Packard húzókészülékkel. Az üveg felületének dezaktiválását Grob (9, 10) szerint, míg a töltést statikus módszerrel végeztük el. A fázisarány $\beta = \text{gáztérfogat/nedvesítő térfogat} = 250$ volt.

Gázkromatográfiai paraméterek:

Oszlop: 14 m 0,25 mm I. D. SE 52-vel falon nedvesített üvegekapilláris

Termosztát hőmérséklete: 180–260 °C 3 °C/min.

Injektor hőmérséklete: 260 °C

Detektor hőmérséklete: 260 °C

Vivógáz: H₂, belépő nyomás: 40 kPa

A módszer visszanyerésének és szórásának megállapítása

Az 1. táblázatban vizsgált 5 anyag 11 párhuzamos részéből számolt visszanyerés és szórás értékeket mutatjuk be 100 µg/kg koncentráció szinten.

1. táblázat

5 vizsgált *Fusarium* toxin visszanyerési és szórási értékei

Toxin neve	Visszanyerés %	Szórás %
Zearalenone	78	12
T-2 toxin	67	17
HT-2 toxin	75	13
Diacetoxiscirpenol	83	11
Deoxinivalenol	64	19

Eredmények és értékelésük

Az ismertetett módszerrel 19 db takarmánymintát vizsgáltunk meg. A mintákat úgy válogattuk össze, hogy azok az előzetes állatorvosi jelzések alapján *Fusarium* toxin pozitív gyanúsak voltak. Az eredmények közléséből kihagytuk azokat a mintákat (7 db), amelyekben mikotoxint kimutatni nem tudtunk. Az eredményeket a 2. táblázatban mutatjuk be. A táblázatban látható, hogy a vizsgált anyagok mindegyikét sikerült mintából is kimutatni. A minták nagy részénél több toxint találtunk. Ez a vizsgálati tapasztalat alátámasztja azt a hipotézist, hogy *Fusarium*os fertőzés esetén egyszerre több mikotoxin keletkezik és az állatokban fellelő szindrómát több anyag mérgező hatásának az eredője. Esetenként előfordult, hogy egyes toxinok hatása dominál, akkor a vizsgálat is csak egy domináns toxint tudott kimutatni, a többi mennyisége ilyenkor a kimutatósi határon alul van. Az 1. ábrán mind az öt mikotoxint tartalmazó minta kromatogramját mutatjuk be.

2. táblázat

Vizsgálati eredmények

Minta megnevezése	Zearalenone mg/kg	T-2 toxin mg/kg	HT-2 toxin mg/kg	Diacetoxiscirpenol mg/kg	Deoxinivalenol mg/kg
Feldebrő I.	5,7	0,3	∅	0,8	∅
Feldebrő II.	3,2	1,4	—	0,5	∅
Adony I.	0,2	1,9	0,2	∅	∅
Adony II.	∅	0,2	∅	∅	0,5
Adony III.	∅	0,4	∅	∅	1,3
Import I.	7,5	∅	∅	2,1	∅
Import II.	3,7	∅	∅	2,0	∅
Pápa I.	∅	4,1	∅	∅	∅
Pápa II.	∅	5,8	∅	∅	∅
Baja I.	1,3	4,4	0,7	∅	∅
Baja II.	0,7	3,8	0,5	∅	0,2



1. ábra

Mind az öt vizsgált mikotoxint tartalmazó kevert minta kromatogramja

Öt mikotoxin Kovács-index értékei

Sorszám	Név	Index
1	Deoxinivalenol	2287
2	Diacetoxiscirpenol	2362
3	HT-2	2714
4	T-2	3135
5	Zearalenon	3192

Index számítás

A gyakorlatban a legelterjedtebb az index számítási rendszer. A rendszer alapját, mint referencia anyagok, a n -alkánok képezik. Ezek kémiaiilag semlegesek, az általánosan használatban levő állófázisokon jól eluálthatók. A számítás módja (11):

$$I_x^T = 100 \left[n \left(\frac{\lg R_x - \lg R_z}{\lg R_{z+n} - \lg R_z} \right) + z \right]$$

- I = index érték az ismeretlen anyagra
 R_x = Az ismeretlen anyag korrigált retenciós ideje
 R_z = a z szénatomszámú normál alkán korrigált retenciós ideje
 R_{z+n} = a $(z+n)$ szénatomszámú normál alkán korrigált retenciós ideje
 n = a két n -alkán szénatomszámainak különbsége
 T = hőmérséklet °K

A vizsgált öt mikotoxinra meghatároztuk a Kovács-féle retenciós indexet és azt a 3. táblázatban mutatjuk be.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetünket fejezzük ki dr. Palyusik Mátyásnak a standardok rendelkezésünkre bocsátásáért.

IRODALOM

- (1) Stoloff, L. et al.: J.A.O.A.C. 54, 91 1970.
- (2) Scott, P. M. - von Walbeck, W. - Kennedy, B. és Amjadi, D.: J. Agr. Food Chem. 20, 1103, 1972.
- (3) Roberts, B. A. - Patterson, W.: J.A.O.A.C. 58, 1178, 1975.
- (4) Josefsson, B.G.E. - Möller, T.E.: J.A.O.A.C. 60, 1369, 1977.
- (5) Pliszczynska, J. P. és Juszkievicz, T.: Archives de l'Institut Pasteur de Tunis, (3-4) 279, 1977.
- (6) Gimeno, A.: J.A.O.A.C. 62, 579, 1979.
- (7) Takeda, Y. - Isohata, E. - Amano, R. és Uchiyama, M.: J.A.O.A.C., 62, 573, 1979.
- (8) Engström, G.W. - Richard, J. L. és Cysewski, S. J.: Agr. Food. Chem. 25, 833, 1977.
- (9) Grob, K. - Grob, G. és Jr. Grob, K.: Chromatographia, 4, 181, 1977.
- (10) Jr. Grob, K. - Grob, G. és Grob, K.: J. Chromatogr. 156. 1, 1978.
- (11) Kovács, E.: Helv. Chim. Acta. 41, 1915, 1958.

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКОТОКСИНОВ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ
V. Параллельное определение некоторых фузариотоксинов капиллярной газовой
хроматографией

A. Bata, A. Vani, P. Lásztity

Авторы разработали метод для параллельного определения пять фузария микотоксинов (деоксиниваленол, диацетоксисцирпенл, HT-2, T-2, зearаленин).

Зерновые образцы экстрагировали этилацетатом, потом смесью метанол-вода в соответствии 6:4. Очистку образца проводили колонной хроматографией Кизельгель-60. На очищенных образцах проводили деривацию при помощи BSTFA (N,O-bis)триметилсиллил/трифлуорацетамидом. Исследования проводили на стене увлажненной капиллярной колоны SE-52. Определили индекс ретенции Ковача на 5-ти исследованных микотоксинах. Добавлением чистых микотоксинов к хлебным зернам исследовали возможность обратного их получения и их рассев. Обратное получение составляло 70-80%, рассев 10-18%. Разработанные методы применяли на практических образцах.

MYCOTOXINUNTERSUCHUNGEN IN LEBENSMITTELN
V. Paralleler Nachweis einiger Fusariotoxine mittels kapillarer
Gaschromatographie

Á. Bata, A. Ványi und R. Lásztity

Zum parallelen Nachweis von fünf Mycotoxinen (Deoxynivalenol, Diacetoxyscirpenol, HT-2, Zearalenon) wurde eine Methode entwickelt. Das Getreidemuster wurde mit Äthylacetat, sodann mit einem 6:4 Gemisch von Methanol:Wasser gereinigt. Das gereinigte Muster wurde mit BSTFA (N,O-bis/trimethylsilyl/trifluoracetamid) zu seinem Derivat umgesetzt. Die Untersuchungen wurden an einer mit SE 52 auf den Wänden benetzten kapillaren Säule durchgeführt. Der Kováts-sche Retentionsindex der untersuchten fünf Mycotoxine wurde bestimmt. Zurückgewinnungs- und Streuungsuntersuchungen wurden mit Gemischen von Getreiden und reinen Toxinen durchgeführt, wobei die Rückgewinnung 70-80%-ig, die Streuung 10-18%-ig war. Die entwickelte Methode wurde an Mustern aus der Praxis angewendet.

MYCOTOXIN INVESTIGATIONS IN FOODS
V. Parallel detection of some fusariotoxins by capillary gas chromatography

Á. Bata, A. Ványi and R. Lásztity

A method was developed for the parallel determination of five mycotoxins (desoxynivalenol, diacetoxyscirpenol, HT-2, T-2, zearalenon). The sample of the cereal was extracted by ethyl acetate and then by a 6:4 mixture of methanol and water. The purification of the sample was carried out by kieselgel 60 column chromatography. The purified sample was converted by BSTFA (N,O-bis/trimethylsilyl/trifluoracetamide) to its derivative. The investigations were carried out on a capillary column wetted with SE 52 on its walls. The retention index according to Kováts of the examined five mycotoxins was determined. Recovery and scattering tests were carried out with the use of pure toxins mixed up with cereals. The percentage of recoveries were between 70 and 80% whereas that of the scatterings between 10 and 18%. The developed methods were applied on samples withdrawn from the practice.