Mikotoxinok kvantitatív és kvalitatív analízise élelmiszermintákban

Doktori (PhD) értekezés

Készítette:
B.Tóth Szabolcs
okleveles kémia szakos tanár
DOI: 10.18136/PE.2015.577

Témavezető

Dr. Pál László

Készült a
Pannon Egyetem
Állat- és Agrárkörnyezet-tudományi Doktori Iskola keretében

Egyéni felkészülési rendszerben

Pannon Egyetem
2014

Mikotoxinok kvantitatív és kvalitatív analízise élelmiszermintákban

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében
a Pannon Egyetem Állat- és Agrárkörnyezet-tudományi Doktori Iskola tartozóan egyéni felkészülési rendszerben az Eszterházy Károly Főiskola Kémia Tanszék kutató helyen*.

Írta:
B. Tóth Szabolcs

Témavezetők: Dr. Pál László

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

(aláírás)**

A jelölt a doktori szigorlaton …..... % -ot ért el,

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve: …..... …..... igen /nem

…….
(aláírás)

Bíráló neve: …..... ….....) igen /nem

…….
(aláírás)

***Bíráló neve: …..... ….....) igen /nem

…….
(aláírás)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján …....% - ot ért el.

Keszthely, …….
a Bíráló Bizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése….....

……
Az EDT elnöke

Megjegyzés: a * közötti részt az egyéni felkészülők, a ** közötti részt a képzésben résztvevők használják, *** esetleges

1 Tartalomjegyzék

1 Tartalomjegyzék 4
2 Rövidítések jegyzéke: 8
3 Kivonat 9
3.1 Abstract 10
3.2 Auszug 11
4 Bevezetés, a téma jelentősége: 12
5 Célkitűzések 14
6 Szakirodalmi összefoglaló 15
6.1 A mikotoxinok bemutatása, toxicitásuk, élő szervezetekre gyakorolt hatásaik 15
6.2 Ergot alkaloidok 18
6.3 Aflatoxinok 19
6.4 Ochratoxinok 21
6.5 Fuzárium toxinok 23
6.5.1 Zearalenon 25
6.5.2 Deoxynivalenol 26
6.5.3 Nivalenol 26
6.5.4 Fumonizinek 27
6.6 A toxikológiai határértékek problémája 28
6.7 A vizsgált toxinok fizikai tulajdonságai 28
6.8 Biotermékek kérdése 28
I. A biogazdálkodásban engedélyezett tápanyagpótló és talajjavító adalékok 9] 30
II. Növényvédő szerek 30
III. Nem mezőgazdasági eredetű termékek 30
6.9 A mikotoxinok megjelenése magyarországi élelmiszerekben 31
6.10 Mikotoxinok analitikai meghatározási lehetőségei 36
6.10.1 Általános áttekintés 36
6.10.1.1 Trichotecének 37
6.10.1.1.1 A trichotecének analitikai elemzése során a szakirodalm általánosan a következő mintaelőkészítési technikákat alkalmazták: 37
6.10.1.1.2 Trichotecének általános HPLC-MS elemzési paraméterei 38
6.10.1.2 Ochratoxinok 39
6.10.1.2.1 Ochratoxinok mintaelőkésszítési technikái 39

6.10.1.2.2 Ochratoxinok meghatározsásának analitikai paraméterei 40
6.10.1.3 Zearalenon és metabolitjai 41
6.10.1.3.1 Zeralenon és metabolitjainak mintaelőkésszítési technikái 41
6.10.1.3.2 Zeralenon és metabolitjai meghatározsásának analitikai paraméterei .. 41
6.10.1.4 Aflatoxinok 43
6.10.1.4.1 Aflatoxinok mintaelőkészítési paraméterei 43
6.10.1.4.2 Aflatoxinok analitikai meghatározásának lehetőségei 43
6.11 Szabványos vizsgálati módszerek 44
6.11.1 Aflatoxinok 44
MSZ EN 14123/2008 módszer: 44
6.11.2 Ochratoxin-A 46
MSZ EN 14132/2003 módszer 46
6.11.3 Deoxynivalenol, nivalenol, zearalenon 47
7 Kísérleti rész 49
7.1 A vizsgált toxinok köre és a felhasznált anyagok 49
7.1.1 Mikotoxin sztenderdek 50
Aflatoxin B1 50
7.1.2 Térfogatmérés: 51
7.1.3 Tömegmérés: 51
7.2 A mérési paraméterek optimalizálásának metodikája 52
7.3 A toxinok kimutatására kidolgozott saját módszerek ismertetése 55
7.3.1 Az aflatoxinok kimutatására kidolgozott saját módszer ismertetése 56
7.3.1.1 Az aflatoxin B_1, B_2, G_1, G_2 analízisére kidolgozott saját módszer optimalizált mérési paraméterei: 56
7.3.1.2 Aflatoxin M1: 60
7.3.2 Az ochratoxin-A optimalizált kimutatási módszere 63
7.3.2.1 Az ochratoxin analízisre kidolgozott saját módszer mérési paraméterei: ... 63
7.3.3 A deoxynivalenol kimutatására kidolgozott saját módszer ismertetése 67
7.3.3.1 A deoxynivalenol analízisre kidolgozott saját módszer optimalizált mérési paraméterei 67
7.3.4 A nivalenol kimutatására kidolgozott saját módszer ismertetése 70
7.3.4.1 A nivalenol analízisére kidolgozott saját HPLC módszer optimalizált mérési paraméterei 70

7.3.5 A zearalenon kimutatására kidolgozott saját módszer ismertetése 74
7.3.5.1 A zearalenon analízisre kidolgozott saját módszer optimalizált mérési paraméterei 74
7.4 Optimalizált mikotoxin kimutatási módszerek validálási paraméterei 78
7.5 Extrakciós kísérletek eredményei 80
7.5.1 A kidolgozott extrakciós eljárás leírása és fontosabb lépései 85
7.6 Élelmiszeranalitikai vizsgálatok 86
7.6.1 Ochratoxin-A tartalom vizsgálata borokban: egyes magyarországi, a mediterrán országokból, illetve a világ néhány pontjáról származó borok OTA tartalmának összehasonlítása 86
7.6.1.1 Analitikai módszer 87
7.6.1.2 Ochratoxin-A koncentráció meghatározásának módszere 88
7.6.1.2.1 Ochratoxin-A mérőoldat elkészítése 88
7.6.1.2.2 Visszanyerési tesztek 89
7.6.1.2.3 Minta előkészítés: 90
7.6.1.2.4 Eredmények kiértékelése 90
7.6.2 Aflatoxinok hőtranszformációjának vizsgálata élelmiszermintákban 93
7.6.2.1 Mérési paraméterek: 93
7.6.2.2 Aflatoxin koncentrációinak meghatározása: 93
7.6.2.3 Minták, minta előkészítés: 93
7.6.2.4 Extrakció 94
7.6.2.5 Toxin hőstabilitási tesztek 94
7.6.2.6 Visszanyerési tesztek élelmiszermintákból 95
7.6.2.7 Toxin visszanyerési tesztek sütési hő átadó közegekből 96
7.6.2.8 Kísérleti eredmények és értékelésük: 96
7.6.2.9 Keksz sütése, visszanyert toxin mennyiségek 98
7.6.2.9.1 Extrakció 99
7.6.2.10 Aflatoxinok bomlásának vizsgálata réteslap sütési kísérletben 103
7.6.2.10.1 Extrakció: 103
7.6.2.10.2 Eredmények 103
7.6.2.11 Aflatoxin M_1 bomlásának vizsgálata tejben 104
7.6.2.11.1 Extrakció: 104
7.6.2.11.2 Eredmények 104

7.6.3 Biotermékek toxintartalmának vizsgálata ... 107
7.6.3.1 Anyagok és módszerek ... 107
7.6.3.2 Biotermékek mintái ... 107
7.6.3.3 Kalibrációhoz használt mérőoldatok koncentrációi: ... 107
7.6.3.4 Kimutatási paraméterek: ... 107
7.6.3.5 Toxinoldatok koncentrációjának meghatározása ... 108
7.6.3.6 Mintavételezés ... 108
7.6.3.7 Extrakció és tisztítás ... 108
7.6.3.8 Visszanyerési tesztek ... 108
7.6.3.9 Eredmények és értékelésük: ... 109
8 Következtetések ... 112
9 Összefoglalás és új tudományos eredmények ... 115
10 Tézisek ... 117
Theses ... 118
11 Köszönetnyilvánítás: ... 121
12 A témában megjelent publikációk: ... 122
12.1 A témában tartott konferencia előadás poszterrel ... 122
13 Felhasznált szakirodalom jegyzéke ... 125
14 Mellékletek ... 135
14.1 I. Melléklet ... 135
Módszer validálási paraméterek ... 140
Kimutatási határ (LOD) ... 140
Érzékenység (S): ... 140
Meghatározási határ (LOQ) ... 140
Precizitás: ... 141
Konfidencia intervallum ... 141
14.2 II. Melléklet ... 142

2 Rövidítések jegyzéke:

AcDON: acetil-deoxynivalenol
ACN: acetonitril
AcOH: acetic-acid, ecetsav
AFB1: Aflatoxin B_1
AFB2: Aflatoxin B_2
AFG1: Aflatoxin G_1
AFG2: Aflatoxin G_2
AFM1: Aflatoxin M_1
APCI: Atmospheric pressure chemical ionosation, Légköri nyomású kémiai ionizáció
API: Atmospheric pressure ionisation, Légköri nyomású ionizációs technika
BEA: beauvericin,
DeDON: dideoxynivalenol
DON: deoxynivalenol
ECD: electron capture detector, elektronbefogási detektor.
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay, enzimmel kötött immunszorbens módszer
ESI: electrospray ionisation, Elektrospray ionizáció
FB: fumonisin
FID: flame ionisation detector, lángionizációs detektor
FU-C: fusarin C
FUCH: fusarochromanon,
FUP: Fusaproliferin,
FUS: fusarenon
FB_1: fumonizin B1,
FB_2: fumonizin B2
GC: Gas chromatography, gázkromatográfia
HPLC: High performance liquid chromatography, Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
HT-2: HT-2 toxin.
IARC: International Agency for Research on Cancer, Nemzetközi Rákkutató Központ
LOD: limit of detection, kimutatási határ
LOQ: limit of quantification, meghatározás alsó határa
MeOH: metanol
MON: moniliformin
NEO: neosolaniol
NIV: nivalenol
OTA: ochratoxin-A
RP: reversed phase, fordított fázisú
SIM: Selective ion mode, szelektív ion mód
T-2: T-2 toxin,
TIC: Total ion chromatogram, totálion kromatogram
TLC: thin layer chromatography, vékonyréteg kromatográfia
ZON: zearalenon, F2 toxin

3 Kivonat

Mikotoxinok kvantitatív és kvalitatív analízise élelmiszermintákban

A szerző a dolgozatban nyolc kiválasztott mikotoxin (aflatoxin B_1, B_2, G_1, G_2, M_1, ochratoxin-A, deoxynivalenol, nivalenol és zearalenon toxinok) kvantitatív és kvalitatív analízisének paramétereit határozza meg, és a toxinok élelmiszerekből történő kimutatásának analitikai módszereit optimalizálja Shimadzu HPLC-MS 2010 EV készülékre.

A dolgozat első része ismerteti a szerző által kidolgozott új, a mikotoxinok kimutatási határértékének csökkentésére irányuló módszereket, amelyeket a mikotoxinok szabványos és a szakirodalomban megtalálható kimutatási módszerei alapján fejlesztett tovább és optimalizált. Bemutatja az új kimutatási módszerek validálására irányuló méréseket, és megadja az új mérési módszerek alkalmazása esetén a toxinok kimutatási és meghatározási határait. A szerző kifejlesztett egy új, extrakciós minta előkészítési módszert, amely az optimalizált toxin kimutatási technikához kapcsolódik, és a nyolc mikotoxinra mind szilárd, mind folyadék minták esetén alkalmazható. Az új extrakciós módszert összehasonlítja a szabványos és általános minta előkészítési technikákkal.

A dolgozat második része a kidolgozott új eljárások tesztelésével kapcsolatos eredményeket mutatja be. A szerző meghatározta a kiválasztott mikotoxinok koncentrációit különböző, kereskedelmi forgalomban kapható élelmiszer-csoportokból és az élelmiszer-előkészítő készülékekből származó mintákban. Az élelmiszerek vizsgálatai három különböző témakört érintenek. Az első vizsgálati témában magyarországi és külföldi borok ochratoxin-A tartalmát határozta meg. A második témában aflatoxinok hőtranszformációs folyamatait és az aflatoxinok mennyiségének csökkenését vizsgálta eltérő sütési közegekben hőkezelt kolbászban, majd keksz és réteslap sütése során, valamint tej forralása után. A harmadik vizsgálati téma az ökogazdálkodásban előállított bioélelmiszerek mikotoxin tartalmának, a deoxynivalenol, nivalenol és zearalenon koncentráció meghatározására fókuszált.

A dolgozatban a szerző megállapítja a kidolgozott mintaelőkészítési módszer különböző toxinokra jellemző visszanyerési tesztjeinek értékeit. Meghatározza továbbá az alkalmazott Shimadzu 2010 EV HPLC-MS készülékre kidolgozott analitikai eljárás paramétereit, úgy mint retenciós idő ismételhetősége, csúcsterület ismételhetősége, precizitás, linearitási tartomány, érzékenység, LOD és LOQ értékek.

3.1 Abstract

Quantitative and qualitative analysis of mycotoxins in food samples

The author determined parameters of qualitative and quantitative analysis of 8 selected mycotoxins (aflatoxin B1, B2, G1, G2, M1, ochratoxin-A, deoxynivalenol, nivalenol és zearalenon toxinok), and optimize analytical methods for detection of toxin for Shimadzu HPLC-MS 2010 EV apparatus in foodstaffs.

First part of the essay describe the developed new methods to reduce the mycotoxin detection limit which were improved and optimized by standardized and can be present in literature's detection method.

Describes measurements for the validation of new detection methods and gives limits of detection and determination of toxins when using a new measurement methods. The author developed a new extraction sample preparation method which is joined to the optimal toxin detection equipment and adaptable in case of every solid and liquid sapmles of the 8 mycotoxins. Compares the new extraction method with standard and ordinary preparation techniques.

The second part of the thesis presents the results of the testing of new developed procedures.

The author determined the concentrations of selected mycotoxins, from various commercially available food groups and samples of the food preparation appliances. The food studies corcern three different topics. In first investigational theme determines the content of Ochratoxin-A in Hungarian and foreign wines. In the second issue examined heat degradation process of aflatoxins and analysed decrease of amount of aflatoxins in different sausages which fermented in various cooking agent than during biscuits and pies baking, just as after boiling the milk. The third topic bring into fokus to determine the content of mycotoxins (deoxynivalenol, nivalenol and zearalanone) in organic food which produced in organic farming.

In this essay the author establish values of recovery tests which are tipical of different mycotoxins. In addition determine parameters of developed analytical method for Shimadzu 2010 EV HPLC-MS apparatus, as repeatibility of retention time, repeatibility of peak area, precision, linear renge, sensitivity, LOD and LOQ values.

3.2 Auszug

Quantitative und qualitative Analyse von Mykotoxinen in Lebensmittelproben

In der vorliegenden Arbeit bestimmt der Autor die Parameter der quantitativen und qualitativen Analyse im Falle von neun ausgewählten Mykotoxinen (Aflatoxin B1, B2, G1, G2, M1, Ochratoxin-A, Deoxynivalenol, Nivalenol und Zearalenon) und optimiert die analytischen Bestimmungsverfahren bei der Analyse von Toxinen in Lebensmitteln mit HPLC-MS 2010 EV.

Im ersten Teil der Arbeit werden die neu ausgearbeiteten, weiter entwickelten und optimierten Bestimmungsverfahren beschrieben, mit denen die Nachweisgrenzen von Mykotoxinen reduziert werden können. Es werden die Messungen vorgestellt, mit denen die neuen Nachweistechniken validiert werden, weiterhin werden auch die Bestimmungs- bzw. Nachweisgrenzen von Toxinen bei der Verwendung der neuen Messverfahren angegeben. Der Autor hat eine neue auf Extraktion beruhende Probenvorbereitungsmethode entwickelt, die sich an das optimierte Nachweisverfahren von Toxinen knüpft und bei den ausgewählten Mykotoxinen (sowohl bei flüssigen als auch bei festen Proben) gut anzuwenden sind. Die neue Extraktionsmethode wird mit den Standard- und allgemeinen Proben-vorbereitungsmethoden verglichen.

Im zweiten Teil der Arbeit werden die Ergebnisse beim Testen der neuen Verfahren dargestellt. Der Autor hat die Konzentration der ausgewählten Mykotoxinen in verschiedenen, im Handel kaufbaren Lebensmittelgruppen bestimmt. Die Untersuchungen beziehen sich auf drei Bereiche: (1) Ochratoxin-A-Gehalt in ungarischen und ausländischen Weinen, (2) Prozesse bei der Wärmetransformation von Aflatoxinen sowie die Reduktion der Aflatoxinkonzentration im Falle von in verschiedenen Bratmitteln gebackener Wurst, von Keks und Strudelteig sowie beim Erhitzen von Milch, (3) Mykotoxingehalt in Biolebensmitteln aus ökologischem Anbau und Bestimmung von Deoxynivalenol-, Nivalenol- und Zearalenonkonzentration.

4 Bevezetés, a téma jelentősége:

A táplálkozásban felhasznált élelmiszerek a szervezet számára mérgező anyagokat tartalmazhatnak. A mérgező anyagok körében potenciális veszélyforrást jelentenek a különböző gombafajok által termelt másodlagos anyagcseretermékek (mikotoxinok), amelyek különösen gabonaipari termékekben fordulnak elő, de a tápláléklánc valamennyi szegmensében jelentkeznek, így az állati termékekben is megtalálhatók. Külön problémát jelent a biotermékek egyre növekvő népszerűsége, mert ezen termékek fogyasztóinál fokozottan jelentkeznek a mikotoxinok által okozott mérgezésekkel kapcsolatos problémák. Az élelmiszerbiztonsági problémakörnek csak része - de fontos része -, hogy a világ sok országában törtek ki jelentős kárt okozó, gomba eredetű fertőzések következtében előálló mikotoxikózisok, amelyek ugyan nem ragályosak, de milliárdos károkat okoznak a növénytermesztésben, az állattenyésztésben; és többnyire az emberre és az állatra is igen ártalmasak, továbbá komoly élelmiszerbiztonsági kérdést jelentenek. Jelenleg a világ összes országában gondot okoznak a mikotoxinok, elsősorban az élelmiszer alapanyagokban szennyezőkként, másod sorban a mikotoxinokkal szennyezett élelmiszerek formájában.

A különböző mikotoxinok mennyiségének élelmiszerekben történő meghatározása élelmezés-egészségügyi szempontból fontos, mivel a legtöbb mikotoxin káros szervi elváltozásokat és élettani folyamatokat okoz az emberi és állati szervezetekben. A különböző analitikai módszerekkel biztosítható az egyes toxinok mennyiségének és minőségének meghatározása a termelési-, tárolási-, feldolgozási folyamat láncolatában. A főleg takarmánynövényekben, a természetes kontamináció hatására megjelenő mikotoxinok interakciója által kiváltott hatások toxin specifikus azonosítása érdekében a toxinok kimutatására használt analitikai eljárás mennyiségi kimutatási határának csökkentése az elsődleges feladat az analitikai szakemberek számára. A mikotoxinokat termelő gombák jelenléte a mezőgazdasági termékekben sok esetben elkerülhetetlen, mivel számos termelési-tárolási tényező segíti ezt elő. Ennek ellenére kihívásként kell kezelni a mikotoxinok által okozott problémákat, így a mennyiségi szempontokat előtérbe helyező takarmány és élelmiszer termeléssel párhuzamosan a minőségi takarmány és élelmiszer előállítás igényét is stratégiai kérdésként kell kezelni már napjainkban. Az analitikai módszerek fejlesztése ezen stratégiai feladatra adhat megfelelő megoldást azzal, hogy a különböző toxinok kimutatási határainak csökkentésével igazolja a toxin jelenlétét az élelmiszer előállítási folyamatok egyes stádiumában. Ezzel elősegíti a mikotoxinok által okozott betegségek, tünetek, a toxinok

mennyiségének csökkentését, és a toxin terhelési szintek megállapítását, továbbá számszerű kiindulási alapot adhat az ezen a területen dolgozó kutatók számára a káros hatással nem járó mikotoxin mennyiségek megállapítására.

5 Célkitűzések

Kutatómunkám célkitűzései az alábbiak voltak:

1. Az aflatoxin B_1, B_2, G_1, G_2, M_1, deoxynivalenol, nivalenol és zearalenon mikotoxinokra vonatkozó, Shimadzu 2010 EV HPLC MS készülékre adaptálható kimutatási módszerek kidolgozása és optimalizálása.
2. Az optimalizált kimutatási módszerek vizsgált toxinokra vonatkozó kimutatási határainak és meghatározásuk alsó mennyiségi méréshatárainak a meghatározása.
3. Egy új, költséghatékony extrakciós technika kidolgozása a fent említett mikotoxinokra, alkalmazhatóságának igazolása.
4. A vizsgált mikotoxinok meghatározása élelmiszer mintákban az új, általam kidolgozandó extrakciós technika és meghatározási paraméterek alkalmazásával.
5. A jelenleg kereskedelemi forgalomban kapható borok ochratoxin-A tartalmának meghatározása.
6. Aflatoxinok degradációjának tanulmányozása élelmiszer mintákban, különböző közegekben történő sütés folyamán, illetve különböző élelmiszerekben annak kimutatása érdekében, hogy a vizsgált közegek közül melyikben a legnagyobb mértékű az aflatoxinok degradációja.
7. Biogazdálkodásban előállított élelmiszer alapanyagok és élelmiszerek mikotoxin tartalmának vizsgálata. Biotermékek mikotoxin tartalmának meghatározása.

6 Szakirodalmi összefoglaló

6.1 A mikotoxinok bemutatása, toxicitásuk, élő szervezetekre gyakorolt hatásaik

Az antibiotikus hatások első tudományos megfigyelése az 1800-as évek végére tehető, amikor Pasteur mindenki számára jól ismert kísérletében kimutatta, hogy egyes mikrobák hatással vannak a lépfene bacilusára, és ugyanezt tapasztalták más baktériumok és gombák esetében is. Észrevételére azonban az akkori időkben nem figyeltek fel az orvosok, és a mikrobiológusok is csak a primitív szervezetek létért való harcának tartották a folyamatot. Ezért az antibiotikumok felfedezése 1928-ig váratott magára, mikor Fleming a *Penicillium* penészgomba fajok baktériumölő aktivitását tanulmányozta, majd a későbbiekben a tenyészetükből izolált anyagot penicillinnek nevezte el [50]. A penicillin felfedezésének nyilvánosságra hozása után számos antibiotikus hatású anyagot izoláltak különböző penészgombák tenyészetéből. Sokról kiderült, hogy mérgezőek lehetnek állatfajokra, így toxicitásuk miatt el sem jutottak a gyógyászati használatig. Ekkor látott napvilágot egy új, merész felismerés is, hogy a mikroszkopikus gombák egyes másodlagos anyagcsere termékei felelősek lehetnek állati és emberi betegségek kialakulásáért. Ez abban az időben igen haladó gondolat volt.

A gomba méregtan tudománya az 1960-as években alakult ki, amikor Blount (1960) [15] egy új pulykabetegséget írt le, amelyet a később aflatoxinnak nevezett gombaméreg okozott. Nemsokára kimutatták az aflatoxin rákkeltő hatását is (Butler és Barnes, 1964) [3]. Az intenzív kutatások igen gyorsan fedeztek fel újabb és újabb másodlagos gomba eredetű anyagcseretermékeket. 1971-ben Turner már 500 gombafaj 1200 másodlagos anyagcseretermékét rendszerezte, Turner és Alderigde [149] szerint 1983-ban számuk már 2000 felett volt, 1100 gombafajból izolálva, ami fajonként átlagosan kettő másodlagos anyagcsereterméket jelentett. Hawksworth [57] 69.000 gombafajban, amely mintegy 5%-a a létező gombafajoknak, mintegy másfél millióra becsülte a másodlagos anyagcseretermékeket, de más konzervatív becslés is százezres nagyságrendet tartalmazott. 1983-ra az ismert anyagcseretermékek száma már elérte a 3200-at, és Riley (1998) [134] adatai szerint 1996-ra már túlhaladta az 5400-at. Ez viszont még töredéke csak a becsült anyagcseretermékek számának. Cole és Cox [31] mintegy 300 vegyületet tartott gombatoxinnak, és más szerzőkkel együtt (Riley 1998) [134] úgy gondolták, hogy az ismert másodlagos anyagcseretermékek mintegy 10%-a mérgező. A mai ismeretek szerint 6-800 toxikus gomba-anyagcseretermékkel kell számolni. Ezeknek nagyjából a felét ismerjük. A mezőgazdasági gyakorlatban figyelmet

érdemlő gombatoxinok száma azonban lényegesen kisebb, ugyanis csak azon gombanemzetségek és fajok jöhetnek számításba, amelyek a terményeket a szántóföldön vagy a raktározás alatt károsítani képesek.

A mikotoxinok („mycos” *(görög)* gomba és „toxicum” *(latin)* méreg szavakból) penészgombák által termelt, emberekben és/vagy állatokban toxikus válaszokat indukáló anyagok, melyek széles körben elterjedtek. Előfordulásuk természetes, ezért potenciális, nem kiküszöbölhető veszélyt jelentenek. Elsősorban táplálkozás útján kerülnek be a szervezetünkbe, de bőrön keresztül, inhalálás útján is bejuthatnak, és mikotoxikózist okoznak [14,31]. Napjainkban több mint 400 mikotoxin ismert eddig, melyekből kiemelkedő humán- és állategészségügyi jelentőséggel kevesebb, mint 20 rendelkezik. Többségük kémiai struktúrájuk szerint 5 nagy csoportba sorolható:

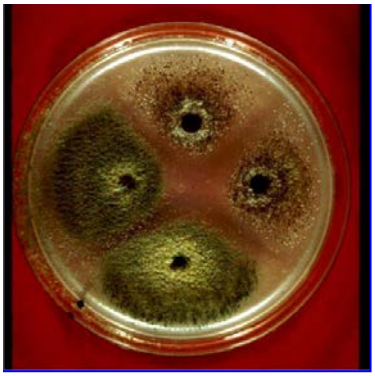
1. **ergot alkaloidok,**
2. **aflatoxinok,**
3. **ochratoxinok**
4. **trichotecének,**
5. **fumonizinek.**

A mikotoxinok léte közegészségügyi, mezőgazdasági és gazdasági szempontból fontos világméretű probléma [111,155]. Ezt bizonyítja például a 2004 októberében hazánkban talált, aflatoxinnal jelentős mértékben szennyezett pirospaprika: az egészségügyi határérték 60-szorosát is elérte egyes mintákban a toxin koncentrációja [95]. Elkerülhetetlen, hogy az élelmiszerek, takarmányok ne fertőződjenek meg gombával a növény elültetésétől a szüretelésig tartó időszak alatt, majd a szállítás és a tárolás során, sőt még a bolti, éttermi, otthoni raktározás során is számolnunk kell a fertőzés megjelenésével. A toxintermelést számtalan tényező befolyásolhatja: maga a gomba faja, mechanikai sérülés, földrajzi hely, hőmérséklet és a páratartalom; ezért a penészgomba jelenléte nem jelenti a mikotoxin jelenlétét is egyben. Mivel a termelt toxinok gyakran nagyon stabilisak, a hővel és kémiai anyagok egy részével szemben, valamint az általános ételkészítési eljárásokkal szemben ellenállóak (utóbbi esetekben főleg a hőhatással kell számolnunk), így az is lehetséges, hogy az élelmiszer tartalmaz toxint, bár a gomba már nincs jelen [83,101]. Tény, hogy a mikotoxinok az egész világon elterjedtek, s az élelmiszerekből való teljes eltávolításuk, esetleges megkötésük lényegében nem lehetséges, ezért nagy figyelmet fordítanak biológiai hatásaik vizsgálatára az egész világon. A mikotoxinok akut (heveny), szubakut (fél heveny) és

krónikus toxicitási tulajdonságot mutathatnak állatokban és az emberben, valamint néhány toxinról ismert, hogy karcinogén, mutagén, teratogén hatású is lehet [133]. Epidemiológiai vizsgálati eredmények összefüggést mutatnak néhány, a természetben előforduló mikotoxin elterjedése, és a daganatos betegségekben szenvedő emberek nagyobb száma között [75]. Az étkezés útján a szervezetünkbe kerülő karcinogének, mint pl. a mikotoxinok, a mesterséges peszticidek, az adalékanyagok, és a főzés során keletkező heterociklikus aminok közül kiemelkednek a természetes eredetű mikotoxinok, mivel a többihez képest sokkal nagyobb, százszor-ezerszer mérgezőbb a hatásuk, és kémiailag igen ellenállók [3].

A mikotoxinok okozta megbetegedések évszázadok óta ismertek. Már a XIII. században leírták a lovak tömeges megbetegedését és elhullását a Batu kán vezette hadjáratban. A leírások alapján ma már egyértelműen azonosítható, hogy a háttérben a stachybotriotoxikózis (*Stachybotrys alternans* és a *S. atra*) állt. Az első nagy néptömegeket érintő fertőzés, mikotoxin okozta betegség az anyarozs (*Claviceps purpurea*) mérgezés, az ergotizmus (ergot alkaloidok okozták) volt a középkorban, melyről csak az 1800-as években ismerték fel, hogy gomba eredetű. A mikotoxinok kutatásával igazán 1960-tól kezdtek el foglalkozni, az Angliában több mint 100.000 pulyka pusztulása okának vizsgálatával. Ez a súlyos állatpusztulás összefüggött a takarmányukban talált négy aflatoxinnal, az aflatoxin B_1, B_2, G_1 és G_2 (B=blue, kék és G=green, zöld, a színkód fluoreszcencia színét, a számkód pedig a relatív kromatográfiás mobilitást jelöli) [15]. Az *Aspergillus flavus* gomba által termelt toxinok, az aflatoxinok akkut és krónikus toxicitását a szakirodalom már bizonyította. A termelt toxinok közül a B_1, G_1, M_1 a mérgezőbb, míg a B_2, G_2, M_2 a kevésbé mérgezőek közé tartozik.

1. ábra: Gombával fertőződött mogyoró



2. ábra: Aflatoxinokat termelő gombák Czapek agaron

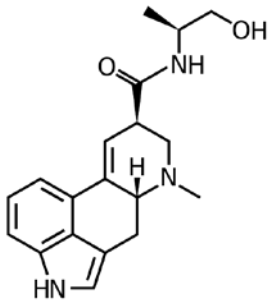
Az aflatoxinok Czapek-agaron zöldessárgás telepeket (2**.** ábra) képeznek. A pulykák főként brazil diót tartalmazó tápjában ez a mikroszkopikus gomba (1. ábra) fordult elő nagy mennyiségben.

6.2 Ergot alkaloidok

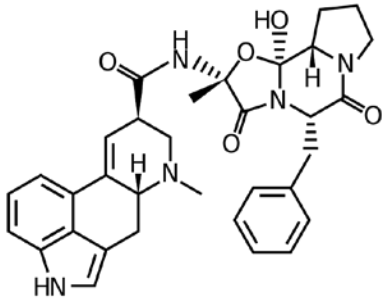
A felsorolás szerinti első csoportba tartozó *ergot alkaloidokat* az anyarozs vagy varjúkörömnek nevezett gabonaparazita gombából *(Claviceps purpurea)* kinyerhető lizergsav származékok alkotják, amelyek egészségkárosító hatását már az 1500-as években ismerték. A végtagvesztéssel járó fájdalmas mérgezést Szent Antal tüzének nevezték el. A mérgezés okozója a tisztítatlan gabonából bekerülő anyarozs toxinja volt. Az anyarozs toxinjainak - ergot alkaloidok – egy részét számos területen használják pozitív és negatív hatásai miatt. Napjainkban 40 különböző anyarozsból származtatott lizergsav származékot különböztetünk meg. A lizergsav származékok szerves oldószerekben jól, vízben nem, vagy csak mérsékelten oldódnak. Az alkaloidokat 4 nagy csoportba oszthatjuk kémiai szerkezetük alapján. A természetben megtalálható ergot alkaloidok alkotják a clavines csoportot. Az amin-alkaloidot (ergometrin, lizergsav-β-propanolamid) a szülés megindítására, gyorsítására, a vérzés csökkentésére használják. A peptid-alkaloidok közül az ergotamin az erős érösszehúzó hatása miatt a vérnyomást emeli. Félszintetikus és szintetikus vegyületei közül a lizergsavas-dietilamint (LSD) pedig elsősorban a drogfüggők átmeneti elmebajt, kábulatot okozó hatása miatt használják.

Kémiai tulajdonságaik közül kiemelendő a viszonylagosan magas olvadáspont, ergotamin esetében 212-214 °C, ergometrin esetében 175-180 °C, az LSD esetében tiszta formában 80-85 °C, tartarát formában 198-200 °C.

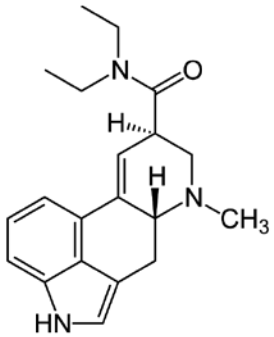
A takarmányozásra szánt termékekben (őröletlen gabonaféléket tartalmazó takarmányok) megengedett legnagyobb ergot-alkaloid koncentráció 1000 mg/kg, 12% nedvességtartalmú magra vonatkoztatva.



3. ábra: Ergometrin



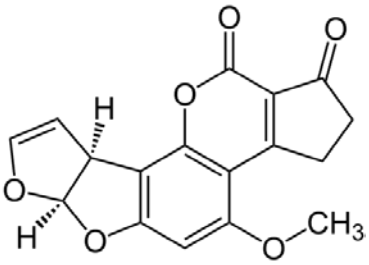
4. ábra: Ergotamin



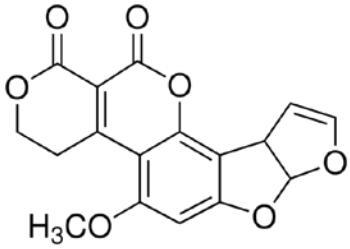
5. ábra: LSD

6.3 Aflatoxinok

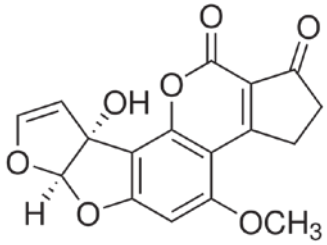
Az aflatoxinok hőstabil difurán-kumarin származékok, elsősorban az *Aspergillus flavus* és az *Aspergillus parasiticus* penészgombák termelik őket. Csoportjukba 18 különböző aflatoxin molekula tartozik, ezek közül a legjelentősebb 5 molekula, az AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 és az AFM1, bár az AFM1 a kérődzők táplálkozása során a szervezetükbe jutó aflatoxinokból a tejben kiválasztódott hidroxilált metabolit, így növényeken nem található meg. A kevés számú, mindenütt előforduló és szerkezetileg meghatározott környezeti karcinogének közé tartoznak, több állatfajnál tapasztalták immunotoxikus és genotoxikus tulajdonságukat. Az 1980-90-es években több esetben írtak le heveny emberi aflatoxikózist Afrikában és Ázsiában [13,15]. Ezek a tragikus események arra figyelmeztetnek, hogy a mikotoxinok halált is okozhatnak. Különösen fontos az óvatosság a gyerekek körében és a hepatitisz B vírust hordozóknál, mert ez a vírus további rizikófaktort jelent az aflatoxin okozta májgyulladás kialakulásához. A takarmányok aflatoxin szennyezettségével elsősorban a trópusi és szubtrópusi országokban kell számolni, ahol a meleg éghajlat miatt az aflatoxint termelő gombák számára kedvezőek az életfeltételek a szaporodáshoz, és így toxintermelésre képesek az olajos magvakon, gabonákon, fűszereken. Figyelembe kell venni azonban, hogy az aflatoxinok a nem megfelelő raktározás során, kontinentális éghajlaton is termelődhetnek [13,15].



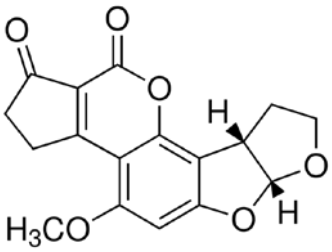
6. ábra: Aflatoxin B1



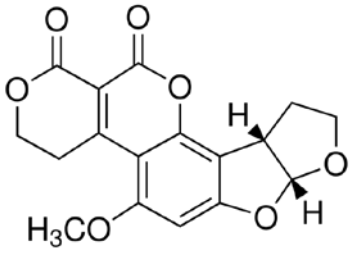
7. ábra: Aflatoxin G1



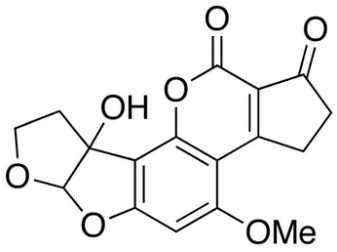
8. ábra: Aflatoxin M1



9. ábra: Aflatoxin B2



10. ábra: Aflatoxin G2



11. ábra: Aflatoxin M2

A legmérgezőbb aflatoxin az AFB_1, melyet a legveszélyesebb ismert természetes humán karcinogénnek tekintenek (IARC (*International Agency for Research on Cancer*) 1993, 1-es csoport). Az egyetlen mikotoxin, mely egy hosszú vizsgálat eredménye szerint szoros kapcsolatba hozható a humán májrák kialakulásával [110]. A heveny AFB_1 mérgezés szimptómái: hányás, hasi fájdalom, hőemelkedés, fulmináns májgyulladás, depresszió, halál [114]. Biológiai fegyverként is alkalmazható, melyet Irak el is készített, majd 1990-ben be is vetett, több ezer ember pusztulását okozva ezzel [40]. A 18 különböző típusú aflatoxin közül a négy domináns molekula toxicitási, karcinogenitási és mutagenitási potenciáljának sorrendje a következő: AFB_1> AFG_1> AFB_2> AFG_2 [11]. A mezei terményekben legnagyobb mennyiségben és leggyakrabban az AFB_1 és AFG_1 toxinok fordulnak elő. Az aflatoxin M_1 és M_2 az aflatoxinokkal szennyezett takarmányt fogyasztó állatok – elsősorban tehenek – tejében kiválasztódó hidroxilált metabolitok. [44]

A fontosabb toxinok biológiai hatásmechanizmusa Riley (1998) [134] szerint a következő: az aflatoxin első lépésben aktiválja az anyagcserét, módosítja a DNS állományt, sejt deregulációt okozva szétrobbantja a makromolekula szintézist, amely sejthalálhoz, ill. alapvetően megváltozott sejtfolyamatokhoz vezet. Igen erős rákkeltő hatású anyag.

A jelenleg érvényben levő szabályozás (1881/2006/EK) szerint az aflatoxin B_1 megengedett legmagasabb határértéke 2 µg/kg, az aflatoxin B_1+B_2+G_1+G_2 együttesen nem haladhatja meg a 4 µg/kg koncentrációt a gabonafélékből készült alapanyagokban. Kukoricafélékből készült termékekben az aflatoxin B_1 megengedett legmagasabb határértéke 5 µg/kg, az aflatoxin B_1+B_2+G_1+G_2 együttesen nem haladhatja meg a 10 µg/kg koncentrációt. [I. melléklet]

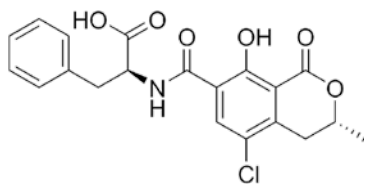
6.4 Ochratoxinok

Az ochratoxinok csoportját 3 toxin alkotja, az ochratoxin-A, az ochratoxin-B és az ochratoxin-C, melyeket főleg néhány *Penicillium* és *Aspergillus* fajhoz tartozó penészgomba termel (*Aspergillus ochraceus, Aspergillus niger, Penicillium verrucosum, penicillium carbonarius*). Kémiai szerkezetüket tekintve β-fenilalaninhoz amid kötéssel kapcsolódó dihidro-izokumarin származékok.

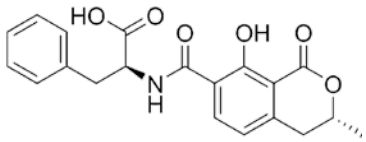
Toxikológiai szempontból a legjelentősebb közülük az ochratoxin-A (OTA), amely L-fenilalaninhoz peptidkötéssel kapcsolódó hidroxikumarin-karbonsav származék, és a molekula még egy klóratomot is tartalmaz. Magyarországi előfordulása is jelentős, a raktári penészgomba toxinok közül a leggyakoribb. 1965-ben izolálták először *Aspergillus ochraceus*-ból. Elsősorban vesekárosító (nefrotoxikus), de teratogén, immunoszupresszív és karcinogén tulajdonságait is leírták már különböző fajoknál [13,75]. Az IARC a lehetséges humán karcinogének csoportjába sorolja (1993, 2B csoport). Az ochratoxikózis tünetei a vese körüli fájdalom, nagy folyadék bevitel, depresszió, étvágytalanság [110].

Az ochratoxin-B molekula az ochratoxin-A molekula klórmentes származéka, toxicitása alacsonyabb, mint az OTA molekula esetében tapasztalható. Az ochratoxin-C molekula az OTA molekula etil-észtere. További ochratoxin származékok (brómszármazékok, aminosav analógok, észterek) is léteznek, melyek toxikológiai szempontból jelenleg nem jelentősek.

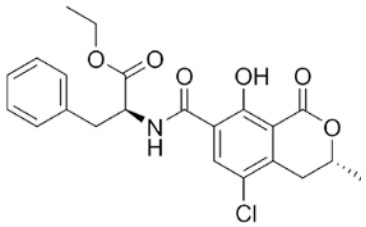
Az OTA sok élelmiszerben jelen van, elsősorban magvakban (árpa, zab, rozs, kukorica, búza, kávé), de gyümölcslevekben, szárított gyümölcsökben, borban és húsban is megtalálható az egész világon, különösen néhány mediterrán országban és a Balkánon figyeltek meg nagyobb mértékű szennyeződéseket [13,20]. Felhalmozódása fehérjékhez kapcsolódva a májban, a vesében és az izomszövetben károsodást okoz. A Balkánon nagyon elterjedt endemikus vese betegségben (nem gyulladásos, krónikus vesebaj, melyben a vese mérete és tömege jelentősen csökken) [14,20], fontos szerepet játszhat az OTA.



12. ábra: Ochratoxin-A



13. ábra: Ochratoxin-B



14. ábra: Ochratoxin-C

A fogyasztói társadalom egészségének megőrzése érdekében a világ legalább 77 államában, így az EU országaiban is szabályozzák, határértékek megadásával előírják a mikotoxinok maximális megengedett koncentrációját élelmiszerekben, (aflatoxinok és OTA esetében 1-20 µg/kg) (1881/2006/EK). Ha több toxikus vegyület van jelen az élelmiszeripari alapanyagokban (pl. Afrikában és Ázsiában gyakori 2 vagy több mikotoxin együttes előfordulása gabonában), még ha koncentrációjuk a biztonsági szint alatt van is, komoly problémát okozhatnak esetleges szinergista, additív hatásuk miatt. Egyes szerzők szerint a rosszindulatú daganatos megbetegedések száma növekszik, amely növekedés a termények és ételek ochratoxin-A szennyezettségéből következik [44].

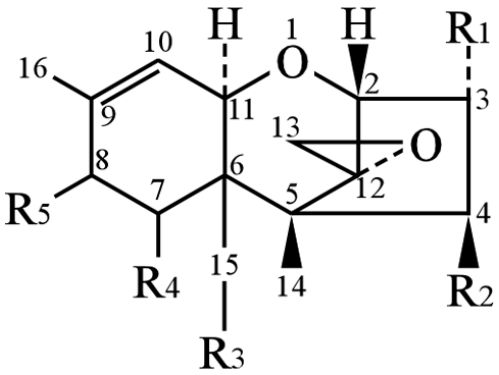
Az ochratoxin-A maximális mennyiségének értékei az Európai Közösségek Bizottságának 2006/576/EC számú (2006. augusztus 17.-i keltezésű) rendelete alapján 12% nedvességtartalmú gabonára vonatkoztatva a következők: gabonafélékben és örleményekben 250 µg/kg, kiegészítő és teljes értékű takarmányokban 100 µg/kg, baromfinak szánt takarmányokban 100 µg/kg. Borokban, szőlőlében, pezsgőkben ez a határérték 2 µg/kg (1881/2006/EK rendelet). [I. melléklet]

Az ochratoxin-A élettani hatásai közül kiemelendő, hogy az ochratoxin-A a fenilalanin szintézist teszi működésképtelenné, ezáltal csökken a glikoneogenezis, majd sejthalál áll be. Egyben fehérje és DNS szintézis gátlás is végbemegy, különösen a vese reagál érzékenyen az OTA jelenlétére.

6.5 Fuzárium toxinok

A fuzárium toxinokat termelő törzsek keretében számos mikotoxint termelő gombafaj létezik, számuk 50 körülire tehető, ezek között több növényi patogén is létezik, amelyek a gabonafélék hervadását, varasodását, fuzáriumos rothadását okozzák. A fuzárium fajok által termelt toxinok a trichotechenek (T2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), (ZON) zearalenon) [139,152]. A kukoricacső fuzáriumos rothadását a *Fusarium graminearum, F. verticillioides, F. proliferatum, F. subglutinans* okozhatja. Ezen utóbbi fumonizin szennyezést is okoz. A *F. graminearum* a búza, árpa, zab jelentős patogénje, és a DON fontos képző tényezője. A gomba a növényi maradványokon telel át, amelyek a következő évben szolgálnak fertőzési forrásként.

A fuzárium toxinok közül a trichotecének csoportját alkotó vegyületek kémiailag szeszkviterpének. Ez több mint 80 kémiailag rokon szerkezetű molekulát jelent, amelyeket kémiai struktúrájuk alapján két fő csoportra lehet osztani. A trichotecén vázas fuzárium toxinok csoportjába tartozó, a természetben előforduló mikotoxinok mindegyike tartalmaz a 15 szénatomból álló láncon egy epoxid gyűrűt, egy olefinkötést a 9. és a 10. szénatom között, és egy epoxi-gyököt a 12. és a 13. szénatomnál. Ez utóbbi atomcsoport alapján nevezik ezeket a vegyületeket 12,13-epoxitrichotecéneknek. A toxicitásuk kémiai alapja a 12,13-epoxid gyűrű, továbbá a 9. és 10. szénatomjuk közötti kettős kötés, amely nagymértékben befolyásolja a trichotecén vázas mikotoxinok mérgezőképességét. A fuzárium fajok által termelt toxinokat A, illetve B típusú trichotecénekre osztjuk, amelyek a kapcsolódó funkciós csoportokban különböznek csak egymástól (15. ábra, 2.táblázat). A deoxynivalenol (DON), más néven vomitoxin, a trichotechenek B csoportjába tartozik.



15. ábra: Fuzárium toxinok trichotecén alapváza

1. táblázat: Trichotecén toxinok funkciós csoportjai különböző kapcsolódási helyen az alapvázra

Trichotecén toxinok	**R1**	**R2**	**R3**	**R4**	**R5**
Deoxynivalenol (DON)	-OH	-H	-OH	-OH	=O
Nivalenol (NIV)	-OH	-OH	-OH	-OH	=O
T-2 toxin	-OH	$-OCOCH_3$	$-OCOCH_3$	-H	$-OCOCH_2CH(CH_3)_2$
HT-2 toxin	-OH	-OH	$-OCOCH_3$	-H	$-OCOCH_2CH(CH_3)_2$
4,15-diacetoxyscripenol (DAS)	-OH	$-OCOCH_3$	$-OCOCH_3$	-H	-H
Fusarenon-X	-OH	$-OCOCH_3$	-OH	-OH	=O

Bár a fuzárium fajok által termelt toxinok száma száznál is nagyobb (a zearalenon csoportba legalább 16 toxin tartozik, és a trichotecének száma is már 80 fölött van), leggyakrabban a 2. táblázatban felsorolt toxinok okoznak mérgezéseket.

2. táblázat: Fontosabb fuzárium toxinok toxicitása Barnes adatai alapján [11]

Vegyület	Állatfaj	LD_{50} (mg/kg)
A típusú trichotecének		
T-2 toxin	patkány	5,2
	csirke	5,0
HT-2 toxin	csirke	7,2
Diacetoxyscirpenol	patkány	7,3
	csirke	3,8
B típusú trichotecének		
Deoxynivalenol (DON)	egér	46,0
3-acetil-DON	egér	34,0
15-acetil-DON	egér	34,0
Nivalenol	patkány	19,5
Fusarenon-X	egér	4,5
	csirke	33,8
Nem trichotecének		
Moniliformin	naposcsibe	4,0
Fumonisin B_1	ló	1-4 (súlyos agykárosodás)
Ösztrogének		
Zearalenon	egér	>5000

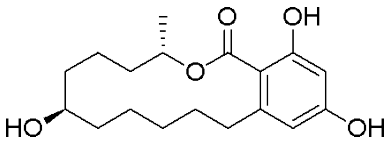
A fontosabb fuzarium toxinok élettani hatásai hasonlóak. A deoxynivalenol első lépésben a fehérjeszintézist gátolja, felborítja a citokinin szabályozást, megváltoztatja a sejt proliferációt és sejthalálhoz vezet. Igen erős immunrendszer gátló. A T-2 toxin ugyancsak igen erős

fehérjeszintézis gátló, aktiválja az endonukleázokat és sejtpusztulást okoz [12]. A fumonisinek a szfinganin N-acetiltranszferáz aktivitást gátolják, a lipidszintézist blokkolják, ami sejt deregulációhoz, illetve sejthalálhoz vezet [111,131].

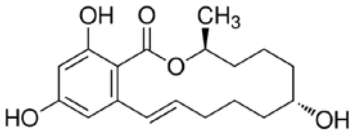
6.5.1 Zearalenon

A *Fuzárium* gombák által termelt *Zearalenon* (F-2) toxin és ennek származékai szerkezetileg β-rezorcilsav laktonok. Toxicitásuk a többi toxinhoz képest ugyan alacsony, de erős ösztrogén hatásuk károsan befolyásolja a sertések, a szarvasmarhák, és a szárnyasok szaporodását is. A toxinnal fertőzött élelmiszerek elfogyasztása embernél is okozhat súlyos tüneteket. A zearalenon toxin elfogyasztása után a szervezetben α- és β-zearalenol keletkezik. A tejben levő metabolitok közül az α-zearalenol háromszor erősebb ösztrogén hatással rendelkezik, mint a zearalenon vagy β-zearalenol. A vérben megjelenő zearalenon és zearalenol átdiffundálnak a vérből a perifériás szövetekbe (méh, tejmirigy és hipotalamusz) és így fejtik ki ösztrogén hatásukat.

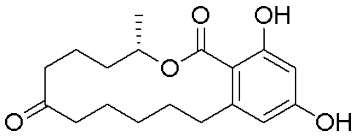
Zearalenon típusok:



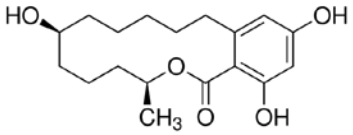
16. ábra: α-zeara**lanol**



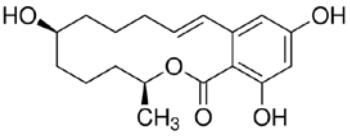
17. ábra: α-zeara**lenol**



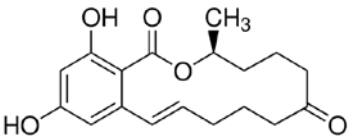
18. ábra: zeara**lanon**



19. ábra: β-zeara**lanol**



20. ábra: β-zeara**lenol**



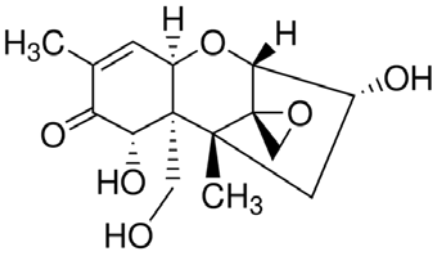
21. ábra: zeara**lenon**

A zearalenon az ösztrogén receptorokra kötődik, ösztrogén-választ vált ki, és felborítja a nemi hormonok egyensúlyát. Méh és petefészek duzzadás, méh előreesés, abortálás gyakori következmény, de pusztulás ritkán kíséri állatoknál a zearalenon mérgezést. A zearalenon maximális megengedett szintje feldolgozatlan gabonafélékben a 1881/2006/EK rendelet alapján (a kukorica kivételével) 100 µg/kg, kukoricában 200 µg/kg, közvetlen emberi

fogyasztásra szánt gabonalisztben 75 µg/kg, kukoricalisztben 200 µg/kg, csecsemőknek szánt ételekben 20 µg/kg. Ezen szintek takarmányozásra szánt termékekben a zearalenonra vonatkoztatva a rendelet alapján takarmány alapanyagokban, gabonafélékben 2 mg/kg, takarmány kukorica melléktermékekben 3 mg/kg, malacoknak szánt takarmányokban 100 µg/kg. [I. melléklet]

6.5.2 Deoxynivalenol

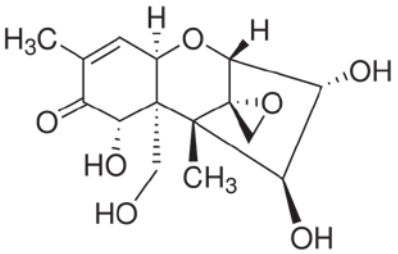
A deoxynivalenol (DON) vagy más néven vomitoxin kémiailag szerkezetét tekintve epoxi-terpenoid. A búza, árpa, zab, rozs, rizs, tritikálé, cirok szennyezője. Állatoknál 1 mg/kg feletti koncentrációban csökkenti a takarmányfogyasztást, 5 mg/kg felett takarmány visszautasítást okoz. Károsítja a bél nyálkahártyát sertéseknél, májmegnövekedést okoz, vérzések keletkezhetnek az állaton, illetve az agy szerotonin szintje csökken. T-2 tioxinal együtt szinergista, vagyis egymás hatását erősítik. Emberi szervezetben szédülést, hányást, rosszullétet, hasmenést és bőr irritációt okozhat. Élelmezés-egészségügyi szintje az 1881/2006/EK rendelet alapján feldolgozatlan gabonafélékben (a durumbúza, zab és kukorica kivételével) 1250 µg/kg, feldolgozatlan durumbúzában, zabban és kukoricában 1750 µg/kg. Takarmányozásra szánt termékekben a megengedett szintje a rendelet alapján gabonafélék és gabonakészítményekben 8 mg/kg, kukorica melléktermékekben 12 mg/kg. [I. melléklet]



22. ábra: Deoxynivalenol

6.5.3 Nivalenol

A nivalenol toxint *Fusarium, Stachyobotrys és Trichoderma* fajok termelhetik. A nivalenol irritáló, immunszupresszív hatású, hányást, vérzést indukál az agyban és a tüdőben, csontvelő-károsító és DNS szintézis gátló hatású vegyület. Napi maximális beviteli mennyisége 0,7 µg/testtömeg kg. [I. melléklet] Állatoknál csökkent étvágyat és takarmány visszautasítást okoz.



23. ábra: Nivalenol

A következő táblázatban összefoglalóan láthatjuk a mikotoxin szennyezéseket okozó toxinok emberi és állati szervezetre gyakorolt hatásait (3. táblázat).

6.5.4 Fumonizinek

A fuzárium gombák által termelt fumonizinek közül megkülönöztetjük a fumonizin A1, A2, fumonizin B1, B2, B3, B4 toxinokat. A legjelentősebb mérgezéseket okozó toxin ezek közül a fumonizin B1, kukoricából, kukorica alpú élelmiszerekből világszerte kimutatták. A fumonizin B1 tüdőödémát okoz sertésekben, máj és vesekárosító hatású. A toxikus hatásának biomarkere a szervezetben a szfinganin/szfingozin arány megemelkedése. Kérődző állatok jobban tolerálják a fumonizin B1 toxint etetés hatására, míg ezzel ellentétben a lovak kifejezetten érzékenyek a fumonizinekkel szemben. A tolerálható napi bevitel a fumonizinekre 2 µg/ttkg

3. táblázat: Mikotoxinok emberi és állati szervezetre gyakorolt hatása (Mesterházy és munkatársai közleményei alapján) [79,91]

Mikotoxin	Szennyezett termék	Mikotoxin hatás	
		Érintett fajok	Patológiai hatás
Aflatoxin (B_1,$B_{,2}$, G_1, G_2, M_1, M_2)	kukorica, búza, rizs, gyapotmag, füge földimogyoró, dió, tej, tojás, sajt	madarak: kacsa, pulyka, csirke, fácán, fürj emlősök: fiatal sertések, vemhes koca, kutya, borjú, szarvasmarha, juh, macska, majom, ember, hal	máj toxicitás, epevezeték hiperplázia, vese és bélvérzés (karcinogén hatás)
Ochratoxin-A	gabona magvak, száraz bab, penészes földimogyoró, sajt, kávé, szőlő, szárított gyümölcs, bor, mazsola	sertés, kacsa, tyúk, patkány, ember	nefrotoxicitás, sertés nefropátia, enyhe vesekárosodás, enteritis, teratogén és karcinogén hatás
Trichotecének (T- 2, nivalenol, DON, HT-2, fusarenon X)	kukorica, búza, kereskedelmi szarvasmarha táp, keverék takarmány, zab, árpa	sertés, szarvasmarha, tyúk, pulyka, ló, kutya, egér, macska, ember	emésztési rendellenességek, belső vérzés ödéma,
Zearalenon	kukorica, penészes széna, kereskedelmi pellet, táp	sertés, tejelő szarvasmarha, tyúk, pulyka, juh, patkány, egér	ösztrogén hatások, heresorvadás, vetélés, petefészek sorvadás, tejmirigyek növekedése

Az eddigi leírtakból látható, hogy a különböző toxinok igen eltérő módon hatnak egy állatra. Több toxin fertőzése egyazon növényen is lehetséges, amely eredményeként a toxinok hatása összeadódhat a szervezetben, hiszen egy több toxint tartalmazó étel vagy takarmány,

egyszerre több helyen (máj, vese,) támadhatja hatásosan az élő szervezet különböző egységeit.

6.6 A toxikológiai határértékek problémája

A természetes eredetű és mesterségesen adott toxin közötti hatás igen eltérő lehet. Például, állatkísérletekben 5-10-szeres koncentrációban kellett deoxynivalenolt adni az állatoknak, hogy a természetes szennyezés 1 ppm-es hatását reprodukálni tudják (*Miller és Trenholm, 1994*) [94]. Ezek a tények és más adatok is arra utalnak, hogy inkább a szinergista, egymás hatását erősítő hatásmechanizmus a jellemző, de az is biztosnak látszik, hogy ehhez számos ismert, vagy eddig nem ismert méreganyag, illetve a méreg hatását elősegítő, de önmagában kevéssé toxikus anyag jelenléte is szükséges lehet.

6.7 A vizsgált toxinok fizikai tulajdonságai

4. táblázat: A vizsgált toxinok néhány fontos jellemzője.

Toxin neve	olvadáspont (°C)	oldószere	molekulatömeg (g/mol)	λ_{max} (nm)
Aflatoxin B_1	268-269	acetonitril, toluol, benzol, metanol.	312,3	365
Aflatoxin B_2	286-289	acetonitril, toluol, benzol, metanol	314,3	365
Aflatoxin G_1	244-246	acetonitril, toluol, benzol, metanol	328,3	365
Aflatoxin G_2	237-240	acetonitril, toluol, benzol, metanol	330,3	365
Aflatoxin M_1	297-299	acetonitril, toluol, benzol, metanol	328,3	365
Ochratoxin-A	168-169 xilolban	acetonitril, metanol, etil-acetát	403,82	215, 333 (etanolban)
Deoxynivalenol	151-153	acetonitril	296,3	218
Nivalenol	138-140 (monohidrát)	acetonitril	312,3	218
Zearalenon	162-163	acetonitril	318,4	236

6.8 Biotermékek kérdése

A mikotoxinok az élelmiszer gyártási folyamatok során nem bomlanak el, nem, vagy csak kis mértékben módosulnak, mivel kémiai szerkezetük és fizikai tulajdonságaik révén a gyártási

folyamatok paraméterei nem érik el azt a hőmérsékletet, illetve más fizikai-kémiai paramétert, amelyek hatására a toxinok elbomlanának. Még nagyobb veszélyt jelentenek a bio táplálkozásban használt élelmiszer alapanyagok, mert ezen táplálkozási formában a biokertészetekből származó alapanyagokat használják fel az ételek elkészítéséhez, de mivel ezen alapanyagok termesztésében nem használhatóak növény védőszerek (peszticidek, fungicidek), amelyek a gombák elszaporodását meggátolnák a gabonanövényeken, ezért a mikotoxinok, amelyeket egyes gombafajok termelnek, nagyobb mértékben jelentkezhetnek az alapanyagokon [2,109]. A deoxynivalenol és a nivalenol termeléséért a különböző Fuzárium fajok a felelősek, amely fajok összesen mintegy 190 féle toxint termelnek. A toxinok csoportosítása szempontjából Trichotecene-A illetve B típusra oszthatóak, amelyek közül a DON és a NIV a B típusba tartoznak (2. táblázat). A Zearalenon termeléséért is egyes fuzárium fajok felelősek, mint például *F. Avenaceum, F. garminearum, F. Colmorum, F. Equisetti, F. Lateritium.*

A mikotoxinok felhalmozódás a magvas terményekben nem az egész termény keresztmetszetét érinti, hanem csak bizonyos szegmenseit a magnak. A gabonán megtelepedő gombák toxinjaikat a szem felületén, ebben az esetben a gabonaszem külső héjában, esetleg nagyobb mértékű szennyezés esetén a magban is raktározhatják. Tehát egy általában véve átlagos gabonaszem külső héjától a mag közepe felé haladva a toxin koncentrációja csökken. Ezért okoz és okozhat nagy gondot az egészséges táplálkozásban elterjedt hántolatlan biotermékek használata, vagy a magról lehántott külső héj fogyasztása, mint rostanyag. A táplálkozásban ezek a rost anyagok fontos szerepet töltenek be, de nem mindegy, hogy milyen áron fogyasztunk biotermékeket és ezzel együtt rostanyagokat. A modern táplálkozásban használt rostanyagok, mint például búzakorpa, nagy mennyiségben tartalmazhatnak toxint.

A mai magyarországi szabályozás nem teszi lehetővé a termékek sarzs szerinti minden toxinra kiterjedő vizsgálatát. Ha figyelembe vesszük azt a lehetőséget is, hogy egy termékben nem csak egy toxin található, akkor hatványozottan kerülhet előtérbe a probléma, mivel a toxinok mérgezési értékeinek módosulására a toxin kombinációkban nincsenek adatok.

A toxin-fertőzés jelentette gondok a biotermékeknél hatványozottan jelentkezhetnek, minthogy a hatékony növényvédő szerek túlnyomó többségének felhasználása tiltott. A biogazdálkodásban rejlő mikotoxin probléma megértéséhez tekintsük át röviden a biogazdálkodás lényegét. A **biogazdálkodás** (más néven: *öko gazdálkodás, organikus gazdálkodás*) olyan gazdálkodási forma, mely szerves trágyázáson, biológiai növényvédelmen és természetes biológiai ciklusokon alapul, a szintetikus műtrágya és (szintetikus)

növényvédő szerek mellőzésével [36]. A 140/1999 (IX.3.) kormányrendelet és egy hozzá kapcsolódó miniszteri rendelet tartalmazza a biogazdálkodás szabályait, melyek tulajdonképpen azonosak az EU 2092/91/EGK vagy 834/2007/EK számú biorendeletével.[9]

A következőekben tekintsük át a biogazdálkodásban használt szereket, mert többen közülük potenciális toxinbeviteli forrásnak tekinthetők.

I. A biogazdálkodásban engedélyezett tápanyagpótló és talajjavító adalékok [9]

Istállótrágya, hígtrágya, vizelet, szalma, tőzeg, gombatrágya, gilisztahumusz, háztartási hulladék vagy növényi maradványok komposztja, húsüzemi és halászati melléktermékek, élelmiszeripari és textilipari melléktermékek, moszatfélék, fűrészpor, forgács, fahamu, természetes foszfátkőzet, lúgsalak, káliumkőzet, kálium-szulfát, mészkő, magnéziumkőzet, meszes magnézium-kőzet, Epsom-só (magnézium-szulfát), gipsz (kalcium-szulfát), nyomelemek (bór, réz, vas, mangán, molibdén, cink), kén (ellenőrzés után!), kőliszt, agyag (bentonit, perlit), kalcium-klorid (ellenőrzés után), elsősorban almafák kezelésére mész- és magnéziumhiány esetén).

II. Növényvédő szerek

Piretrin-készítmények természetes (krizantém)-alapanyagból (lehetőleg szinergikusan), derris- és kvasszia-készítmények, ryania-készítmények, propolisz, kovaföld, kőliszt, metilaldehid-készítmények csapdákhoz, kén, bordói és burgundi lé, nátrium-szilikát, szódabikarbóna, káliszappan, feromonok, *Bacillus thuringiensis* készítmények, víruskészítmények, növényi és állati olajok, paraffinolaj.

III. Nem mezőgazdasági eredetű termékek

1. Élelmiszer-adalékok

Kalcium-karbonát, tejsav, szén-dioxid, almasav, tokoferol, lecitin, citromsav, borkősav, kalcium-hidrogén-foszfát, alginit, agar-agar, karragénmoha, mézga, pektin, karbonátok, argon, nitrogén, oxigén

2. Ízesítők

Természetes eredetű fűszerek és adalékok

3. Víz és só

Ivóvíz, konyhasó (különböző arányú nátrium- és kálium-klorid keverékek)

4. Mikroorganizmusok

70/524/EGK szerint engedélyezett mikroorganizmusok

5. Ásványi anyagok, vitaminok

70/524/EGK szerint engedélyezett vitaminok, amelyek lehetőleg a természetben előforduló anyagokból származzanak, illetve természetes vitaminokkal azonos szintetikus vitaminok, amelyeket csak együregű gyomrú állatok kaphatnak.

A biotermékek termesztésénél felhasznált növény védőszerek, illetve gombaölő szerek kérdése azért ellentmondásos, mert a gyenge mérgeknek számító, gyorsan lebomló fungicideknél százszor-ezerszer mérgezőbb és igen ellenálló, nem bomlékony gombatoxinok elkerülik a bio élelmiszereket előállító szervezetek és felhasználók figyelmét, és ezzel pontosan egy olyan lakossági réteg válhat kiemelten veszélyeztetetté, amelyik a természetes élelmiszerekben a reklámok alapján bízik. A legnagyobb problémát a *Fusarium* fajok okozzák, az élelmiszer- és takarmánybiztonságot ezek fenyegetik leginkább. Egészen a legutóbbi egy-két évtizedig az európai országok többségében a toxinokat termelő gombákkal szembeni rezisztencianemesítés nem folyt, kivéve Magyarországot, ahol a rezisztenciaviszonyok tanulmányozásának körülbelül 30 éves hagyománya van. A biogazdálkodásban felhasznált növények termesztésének egyik járható útja ugyanis a rezisztencia-nemesítéssel előállított, gombapatogénekkel szemben ellenálló növények használata lenne. A nagyobb európai rezisztencia-nemesítési kutatóprogramok 10-20 évvel később indultak, mint a magyarországiak, részben éppen a magyar eredmények alapján. Mesterházy és munkatársai (1972, 1993) [79,91] már korai munkáikban részletesen taglalták a gombafertőzést és a toxikológiai problémákat, azok állategészségügyi és humán hatásait vizsgálva. Az 1990-es években is számos összefoglaló tanulmány született magyar nyelven ebben a témában [38].

6.9 A mikotoxinok megjelenése magyarországi élelmiszerekben

A mikotoxinok, vagyis a penészgombák másodlagos anyagcseretermékei napjainkban igen sok gondot okoznak az élet minden területén. Az emberek napi kontaktusba kerülhetnek a táplálkozás során a toxinokkal anélkül, hogy tudnák, tisztában lennének azzal a veszéllyel, amelyet a toxinok hatásai jelentenek számunkra. A táplálékláncban megjelenő káros anyagok – mikotoxinok – legveszélyesebb képviselői a gombák toxinjai közül kerülnek ki. Ezen méreganyagok a napi élelmiszerekben összetevőként jelentkeznek, mivel sok esetben az alapanyag tartalmazza azokat [83].

A mikotoxinok a mikroszkopikus gombák másodlagos anyagcsere termékei. A penész jelenléte az élelmiszerben nem jelenti automatikusan a mikotoxinok jelenlétét is, mivel a gomba eddig nem tisztázott biokémiai inger hatására termeli a toxint. A toxinképződéshez megfelelő hőmérséklet, oxigén, szubsztrátum és páratartalom szükséges. Ugyanaz a gombafaj többféle mikotoxin egyidejű szintetizálására is képes lehet, ugyanakkor egy adott mikotoxint számos gombafaj is képes termelni [5. táblázat]. A penészes élelmiszerek fogyasztásának betegséget okozó hatása régóta ismert. A gyakorlatban egy-egy élelmiszer sok esetben egyszerre több mikotoxinnal lehet szennyezett. Ez nehezíti az egyes mikotoxinok veszélyességének pontos megállapítását. Az élelmiszerek mikotoxin szennyezettsége jelentős egészségügyi kockázatot jelent a fogyasztó egészségére, toxikológiai szempontból az egyik legfontosabb élelmezés egészségügyi kérdés.

5. táblázat: *Fuzárium* fajok (Nelson et al, 1983) [106] mikotoxinjai és magyarországi előfordulásuk gabonafélékben. (Mesterházy és munkatársai) [61]

Fuzárium faj	Előfordulás gabonafélékben	Fertőzőképesség kalászokon	Mérgező anyagcsere termékek
F. graminearum	+++++	Erős	DON, 3AcDON, 15AcDON, NIV, ZON, DeDON
F. culmorum	++	Erős	DON, 3AcDON, NIV, ZON,
F. avenaceum	+++	Mérsékelt	MON
F. crookwellense	++	Erős	NIV,FUS, ZON
F. poae	+++	Mérsékelt	NIV, FUS
F. sporotrichioides	++	Mérsékelt	T-2, HT-2, NEO
F. tricinctum	+	Gyenge	MON
F. chlamydosporum	+	Gyenge[k]	MON
F. semitectum	+	szaprofita	BEA
F. equiseti	++	szaprofita	FUCH, ZON
F. acuminatum	+	Gyenge	T-2, MON
F. moniliforme	++++[k]	Mérsékelt[k]	FB_1, FB_2, FB_3, FU-C
F. subglutinans	+++++k	Mérsékelt	MON, BEA, FUP
F. proliferatum	++ [k]	Gyenge	FB_1, FB_2, MON, BEA, FUS
F. anthophilum	+ [k]	Szaprofita	MON
F. solani	++	Szaprofita	MON
F. oxysporum	++	Szaprofita	MON
Microdochium nivale (F. nivale)	+++	Mérsékelt	nincs

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

A már ismert mikotoxinok száma napjainkban mintegy 400 féle lehet, - és ez a szám csak bővülhet. Ezen toxinok mintegy fele mérgező, jelentős részüket élelmiszerekben is kimutatták. Kémiai szerkezetük változatos, keletkezési körülményeik eltérőek.

A mikotoxinok általában jelentős biológiai aktivitással rendelkező anyagok, amelyek között számos rákkeltő hatású is van. Rendszerint kémiailag stabilak, az élelmiszeripari feldolgozás során alkalmazott hőhatásnak és a vegyi anyagok nagy részének ellenállnak. [18]

Hazánkban az egyik legfontosabb élelmiszer alapanyag, a búza legutóbb 1996-1999 között szenvedett jelentős területre kiterjedő kalász fuzárium járványt, a közvetlen és közvetett károkat 1998-ban mintegy 25 milliárd Ft-ra becsülték [29,79,155]. Az USA-ban és Kanadában 1995-2000 között évente felléptek pusztító járványok gabonanövényeken, az összesített károk itt is milliárdosak. Kínában sok millió hektáron minden évben jelentkezik a mikotoxikózis különböző toxinok termelésével; de nincs a Földgolyónak olyan része, ahol kisebb-nagyobb gyakorisággal nem károsítana. Ugyanez érvényes a kukoricára is, amely toxikológiailag a búzánál is rosszabb helyzetben van.

A szennyezett gabonatermékek a közvetlen emberi fogyasztás mellett, a gabonát felhasználó állattenyésztésen keresztül, közvetve is veszélyeztetetik a népességet. A gyengébb gyarapodásból, reprodukciós zavarokból, esetleg elhullásból eredő gazdasági problémák is nagy gondot okoznak. A toxinok állati termékekben is jelentkezhetnek, s könnyű belátni, hogy az állati takarmányozásban felhasznált alapanyagok révén az élelmiszerbiztonságban is problémát jelentenek, hiszen az emberi fogyasztásra szánt állati eredetű alapanyagokból készített élelmiszerekben kimutatható toxinok az emberi szervezetbe kerülve veszélyforrásként jelentkezhetnek. Az élelmiszer alapanyagok fertőzöttségének vizsgálata során kiderült, hogy azon kultúrák is szennyezettek lehetnek toxinokkal, amelyek rendszeres, de esetleg nem elégséges vegyszeres kezelés hatása alatt álltak, hogy a toxint termelő gombák szaporodását megakadályozzák. Mivel a gomba spórája a körülöttünk levő levegőben is jelen van, ha megfelelő táptalajt talál magának, azon megtelepedve szaporodásnak indul. Így azon termények, élelmiszer alapanyagok, amelyeken a növény védőszeres (peszticides, fungicides) kezelés a termelési technológia miatt kizárt, vagy korlátozott mértékben alkalmazható, fokozott veszélynek vannak kitéve.

Korábban a gabonaszemekből izolálható gombákat szántóföldi és raktári eredetű csoportokra osztották fel. Bár ez a felosztás jelentőségét nem veszítette el teljesen, kiderült, hogy nem minden esetben alkalmazható, mivel a jellegzetes szántóföldi kórokozónak tartott *Fusarium* nemzetség tagjai raktári betegséget is tudnak okozni, és számos, a képződéséhez hideg környezetet igénylő toxin mennyisége a kalászos gabonák esetében éppen a tárolás közben emelkedik lényegesen (**zearalenon, T-2 toxin**), de kukoricában ezek koncentrációi már betakarításkor is magasak lehetnek. Kiderült továbbá, hogy az *Aspergillus flavus*, egy jellegzetesen raktári kórokozóként ismert gomba, az **aflatoxin** termelője, az érzékeny kukorica hibrideket a szántóföldön is fertőzni tudja, és a betakarított termésben igen jelentős

aflatoxin koncentráció mérhető, ha forró, száraz nyarak vannak. Erre vonatkozóan különösen az Amerikai Egyesült Államokban nagyszámú statisztikai adat áll rendelkezésre.

Az ochratoxin-A előfordulása igen gyakori az élelmiszerekben, nagyobb mennyiségben a kávéban, gabonában, babban, szárított gyümölcsökben és borban található. A borban jelenlétét először 1995-ben mutatták ki [128]. A borok többsége tartalmazhat ochratoxin-A-t, ezért az emberi szervezetbe jutásának egyik fő módja az élvezeti cikk fogyasztása. A bor tömegélelmiszernek tekinthető, ezért kiemelt hangsúlyt kap a benne lévő idegen anyagok mennyiségének a meghatározása. Az ochratoxin-A mennyiségét borban az előbb említett okok miatt az Európai Közösség 2 µg/L koncentrációban maximálta (1881/2006/EK).

Az ochratoxin-A tartalom szempontjából a bor bizonyult a legjobban szennyezett forrásnak. A borba az ochratoxin-A a borkészítési technológia miatt kerül bele [128]. Napjainkban a világon elterjedt borokat 3 fő kategóriába oszthatjuk: fehér, rosé és vörös borok. A 3 típusú bornak a borkészítési technológiája eltérő. A fehér borok, illetve a rosé borok készítésénél a szőlő mustot rövid ideig tartják a héjon a nem kívánatos tannin anyagok, a rosé bornál pedig a túl sok színanyag kioldódásának elkerülése végett. A héjon áztatás időtartama miatt a vörösborok tartalmazhatják a legtöbb toxint. A párás, meleg időjárás kedvez a mikotoxinokat termelő gombák megjelenésének a szőlő héján. A szőlő héján megtelepedett gomba a szőlőszemben található anyagokból táplálkozik és a toxint, amelyet termel, a szőlő héjában, nagyobb fertőzés esetén a szőlő húsában, bogyójában hagyja. A vörösbor készítése során a ledarált szőlőt 2-4 hétig a héjon áztatják a színanyagok (antocianin és polifenol vegyületek) minél jobb kioldódása végett. Ebben a lépésben a kontakt idő hosszúsága és az erjedésből származó alkoholos extrakciós közeg jelenléte miatt az ochratoxin-A szinte maximálisan beoldódik a mustba, majd a borba. Az erjesztési technológia ezen stádiumában indul meg ugyanis az alkoholos erjedés, amely nagy részben le is zajlik a héjon áztatás végére, és a keletkezett alkohol nagymértékben elősegíti az ochratoxin-A kioldódását [108]. A vörösborkészítés technológiai lépései között találhatunk még derítést is, amely során a borban kolloid állapotban lévő anyagokat koagulálva a borból eltávolíthatóvá, szűrhetővé tesszük. A derítés eredményeként a kolloid szemcsék felületére kötődött kis mennyiségű ochratoxin-A eltávozik a borból, de ez csak elenyésző része az összes OTA mennyiségének.

A technológia szempontjából érdekes vizsgálati minta a fehérborok közül a híres tokaji aszú fajta, mivel a technológiájában a héjon áztatás szintén megjelenik, mint a vörös boroknál.

Lényeges szempont még a tokajinál, hogy a Tokaj-Hegyaljai borvidék mikroklímájához hozzátartozó nedves, meleg éghajlat miatt megtelepedő, aszúsodást okozó Botrytis Cinerea gomba mellett megjelenhetnek még más gombafajok is a szőlő növényen, amelyek termelhetnek mikotoxinokat is. Analitikai vizsgálatok néhány mikotoxint ki is mutattak a tokaji borokban, de nem volt jellemző a toxin jelenléte minden borban, csak azokon területeken, ahol az aszúsodás helyett – amelyet a Botrytis okozott – a szőlő más gomba által történő penészesedése indult meg, és a szedésnél ezeket a fürtöket gazdasági okokból, valamint a munkások hanyag munkavégzése miatt aszúsodott szemnek könyvelték el.
2005-ban Záray és munkatársai átfogó vizsgálatot végeztek mintegy 50-50 mintán *(Detemination of Ochratoxin-a in hungarian wines*) [159] magyarországi és olaszországi borok ochratoxin-A tartalmának összehasonlításával, amely vizsgálat eredményeként kiderült, hogy a magyarországi borokban kimutatható mennyiségben nem volt jelen a keresett toxin.

Sok élelmiszer elkészítése során felhasználhatunk olyan alapanyagokat, amelyek tartalmazhatnak mikotoxint. Igen sok tévhit kering arról, hogy a sütés során a húsból eltávozik, elroncsolódik a benne lévő mérgező anyag. Ez a mikotoxinok nagy részénél azért sem igaz, mert a sütés hőmérséklete a tiszta toxinok nagy részének termikus bomlási hőmérsékletét sem éri el. Emiatt a toxin nem szenved károsodást, feltételezés szerint nem is degradálódik [17,29,88,101].

6.10 Mikotoxinok analitikai meghatározási lehetőségei

6.10.1 Általános áttekintés

A mikotoxinok analitikai vizsgálatára többféle módszer is alkalmazható. Napjainkban a legelterjedtebbek a következőek: ELISA, TLC, HPLC-MS és GC-MS módszerek.

A vizsgálatok készülékigényét elsősorban a megkívánt elemzés szintje szabja meg. A vékonyréteg kromatográfia sok esetben jó minőségi elválasztást eredményez bizonyos koncentráció határig, de teljességgel alkalmatlan kis koncentrációjú minták mennyiségi meghatározásra. Abban az esetben, ha mennyiségileg akarjuk a toxinokat a kívánt mintában meghatározni, műszeres mérésre van szükségünk, amelyek közül a legelterjedtebb módszerek a GC-MS illetve HPLC-MS vagy HPLC-MS/MS technikák. Az egyszerű GC meghatározás a használt detektorok (FID, ECD) kimutatási határaiból adódóan sok esetben nem megfelelő módszer, de a kapcsolt technika alkalmazásával (MS) a kimutatási határ már teljességgel megfelelő szintre hozható a minták vizsgálata során.

Általánosan alkalmazott technika a HPLC-MS technika, amellyel a mikotoxinok szinte teljes spektruma kimutatható. A méréseim során a HPLC-MS kapcsolt rendszerrel határoztam meg a vizsgált minták toxin tartalmát.

Minden analitikai kimutatási módszer lényegi lépése a minta előkészítés. A minta előkészítési eljárás megfelelő megválasztása a kimutatási módszer alapja, ezért lényeges a pontos kidolgozása. A mikotoxinok kimutatása során használt minta előkészítési technikák alapja a szilárd-folyadék, a folyadék-folyadék extrakció, illetve a szilárd fázisú extrakciós (SPE) oszlopokkal, valamint immunoaffinitás (IA) oszlopokkal történő toxin kinyerés a mintákból. Ezen technikák hátránya sok esetben a drága SPE vagy IA oszlop. Előnyük, hogy specifikusan, csak a vizsgálni kívánt toxint vonják ki a mintából, amely abban az esetben hátrányos is lehet, ha a toxinok egymásra gyakorolt szinergista hatását vizsgáljuk egy mintában. A SPE és IA oszlopok másik hátránya, hogy a fizikai-kémiai tulajdonságokból adódóan az oszlopoknak van egy maximális, telítési koncentrációja minden toxinra, amely felett már nem adszorbeál toxint a mintából, ezért a mintában lévő teljes toxin mennyiséget nem köti meg.

A szakirodalomban talált igen nagyszámú hivatkozás kivonataként a következő részben összefoglalom a trichotecének, ochratoxinok, aflatoxinok és zearalenon metabolitok kimutatási technikáinak lényeges paramétereit. Kitérek a mintaelőkészítés, tisztítás, elválasztás és detektálás leggyakrabban alkalmazott módszereire és fázisaira, valamint egyes mikotoxinok elemzése során a szakirodalomban fellelhető kimutatási határ (LOD), meghatározás alsó határa (LOQ), analitikai elválasztásra használt kolonna típusokra, extrakciós módszerek, valamint az analitikai eljáráshoz tartozó precizitás és visszanyerés értékeket.

6.10.1.1 Trichotecének

6.10.1.1.1 A trichotecének analitikai elemzése során a szakirodalm általánosan a következő mintaelőkészítési technikákat alkalmazták:

A minta halmazállapota szerinti felosztás alapján a szilárd mintákból – úgy, mint gabona, liszt, kávé – az általános mintaelőkészítések történeti áttekintése során D. Royer és munkatársai először ACN/H_2O folyadék-szilárd fázisú extrakciót alkalmaztak különböző arányú elegyösszetételben [37]. A SPE oszlopok megjelenésével és fejlődésével a gyártók által ajánlott MycoSep oszlopokkal történő extrakció lépett előtérbe, melyek először különböző állófázis töltetekkel rendelkező oszlopokat használva – úgy, mint aktív szén töltetes, ioncserélő gyantás töltetek kerültek felhasználásra a mintaelőkészítések során [26, 37,40,41,49, 68,69,81,130,138,]. A MycoSep oszlopok kezdeti használata mellett alternatív technikaként különböző gyártók által elkészített, eltérő töltettel rendelkező SPE oszlopokat is használtak a trichotecének kivonatolására. A különböző SPE töltetek lehettek immunaffinitás töltettel rendelkező [47,164], polimer fordított fázisú és anion cserélő töltetes [85], illetve fordított fázisú töltetek [149,164]. Ezen töltetek egy része a DON kimutatása során nem rendelkezett megfelelő visszanyerési értékkel [37]. Egyes kutatók, úgy mint R.P. Huopalathi és munkatársai egy alternatív extrakciós technikaként használtak szuperkritikus folyadék extrakciót is, amelyet zsírtalanítás utáni alkalmazva a mintaelőkészítésben, az MS kimutatási technikának is megfelelő mintaelőkészítési procedúrát hoztak létre [139].

Plattner és Maragos a trichotecének mintaelőkészítési technikájában erősen javasolta a mindenféle tisztító lépés elhanyagolását a mintaelemzés során. Kísérleteik során ACN/H_2O mintát tartalmazó elegyet injektáltak az LC-MS rendszerbe, amely során a SPE oszlopom mosása során eluálódó komponensek kimutatási aránya nőtt. Összehasonlításukban kimutatták, hogy a MycoSep oszlopok nem segítik elő megfelelően a trichotecének kimutatását, különösen DON és NIV-re nézve. [130,131]

6.10.1.1.2 Trichotecének általános HPLC-MS elemzési paraméterei

A trichotecének analitikai elemzése során LC-MS technika alkalmazásában kifejezetten fordított fázisú RP-C18-as töltettel rendelkező kolonnát, és eluensként ACN/H_2O vagy Metanol/H_2O elegyet használtak, főként izokratikus, de esetenként gradiens módban. A metanol használata során a tapasztalatok azt mutatták, hogy az MS érzékenységét fokozza a metanol, illetve az ecetsav, valamint nátrium-acetát használata is hasonló hatással van a kimutatásra. [26, 48,49, 68,69,75,77,80,131,136,149,151].

A tömegspektrometriás kimutatások során több kutató is alkalmasnak találta mind a kettő APCI és ESI ionizációs módot is. Razzazi munkatársai és más kutatócsoportok bizonyította legmagasabb ionizációs hatásfokot A-típusú trichotecének esetében a pozitív ion módban [42,97] valamint a B típusú trichotecének esetében a negatív ion módban lehet elérni [41,87,97]. Az APCI ionizáció alkalmazása esetében a szimpla MS használata során SIM módban alacsonyabb kimutatási határt produkálnak a tömegspektrométerek, mint ESI módban. Ennek oka az APCI nagyobb fragmentációs képességében rejlik. [40,41,151,].

Általánosan elmondható, hogy az LC-MS kimutatási technikák során a minta toxintartalmának visszanyerésére a mátrixból az irodalmi módszerek a trichotecének esetében 70% és 108%-os visszanyeréseket említenek [23,40,49, 81,85,97]. A szakirodalmi módszerek szerint vonatkozattási anyagként a reserpin [149], dexamethason [40] és a nafcillin [23] említik meg, illetve sok esetben alkalmazzák az eredeti minta toxintartalmának meghatározására a sztenderd addíció módszerét.

A trichotecének HPLC-MS rendszerrel történő kimutatása során a szakirodalmi cikkekben mért és publikált kimutatási határ értékei LOD 0,2-250,0 µg/kg tartományban, a meghatározási határa LOQ 1,5- 100,0 µg/kg értékek között mozog, amely értékek nagymértékben függnek a kimutatott toxin minőségétől.

6.10.1.2 Ochratoxinok

6.10.1.2.1 Ochratoxinok mintaelőkésszítési technikái

Az ochratoxinok előfordulása a természetben szilárd és folyadék halmazállapotú mintában lehetséges. Szilárd fázisú mintákból az ochratoxinok kioldására a szakirodalomban több típusú oldószert találunk, úgy mint víz [73], etil- acetát [64], kloroform[7,8,102] és a metanol-víz[74,130], acetonitril-víz [68,69], hexán-acetonitril [85] és diklór-metán-etanol keverékek [80]. Az adalékanyagok alkalmazásával az extrakció során úgy mint nátrium-hidrogén-karbonát [30,74], foszforsav [64, 80,105,141] vagy magnézium-klorid, fokozhatjuk az OTA kitermelés hatékonyságát [90,99]

Kokkonen ás munkatársai a vizsgálataik során acetonitrilt és hexánt alkalmaztak az extrakcióhoz szilárd-folyadék extrakció esetében, amely oldószerek alkalmazása leírásuk szerint megkönnyíti a töményítést a folyamat végén [98].

A folyadék mintákból történő extrakció során előnyben részesítik a SPE protokollokat, amely SPE mintaelőkészítési oszlopok töltete változó összetételt mutat a szakirodalmi cikkek alapján, úgy mint a fordított fázisokat [116,122], az anion cserélő anyagból álló tölteteket [141] valamint a kovaföldet is [141], vagy egyes polimer abszorbenseket, amely általában fordított fázisú (RP) anion cserélő funkcionalitásúak [85,105,122,121]. Ezen túlmenően, Gross- Steinmeyer és munkatársai még alkalmaztak preparatív HPLC technika után RP SPE technikát is a mintaelőkészítés folyamatában [97,63].

Alternatív technikaként ebben az esetben is megjelent – úgy mint a trichotecének esetében az immunaffinitás oszlopok használata, [6,8,16,74,99,122,123], amelyeket ma már rutin mintaelőkészítési eljárásban használnak a LC-FL detektálás alkalmazása esetében. Az immunaffinitás oszlopok előnyei az LC-FL detektálás esetében nem elhanyagolhatóak, de az LC-MS detektálás használatakor komoly hátrányt jelentenek. Az immunaffinitás oszlopok töltete specifikusan antitesteken keresztül csak az ochratoxinokat köti meg a mátrixból, de az eluálás során az antitestek és az oszlop anyaga is eluálódhat, amely az MS-ben komoly zavaró hatást eredményeznek, valamit megdrágítják a mintaelőkészítési módszert is [121,149]. Az immunaffinitás oszlopok és a megfelelő töltetes SPE oszlopok visszanyerési illetve ochratoxin megkötési képessége összemérhető, így a SPE oszlopok használta olcsóbbá teszi a mintaelőkészítési lépéseket.

A folyadék mintákból történő előkészítés során alkalmazott folyadék-folyadék extrakciós módszerek is alkalmazhatóak, bár nem automatizálhatóak. Folyadék-folyadék extrakció

esetében sokszor alkalmaztak a szakirodalmi cikkek toluolt vagy etil-acetátot, illetve ezeket az oldószereket szilárd mintákból történő extrakció során is alkalmazták az ochratoxinok savas, ionos jellegét kihasználva. Ezen technikák által a szerves fázisban megjelenő OTA-t szilikagél töltettel rendelkező SPE oszlopokon könnyen szeparálhatjuk [90,99,112]. Lindenmeier és munkatársai kimutatták, hogy a folyadék-folyadék extrakció teljesítménye összevethető az immunaffinitás oszlopok használata során mért extrakciós teljesítményekkel. Az immunaffinitás oszlopok használata során komoly zavaró mátrixot jelent az ochratoxinok esetében is az oszlop, de savas hatása miatt a kávé is. [99]. Az MS kimutatások során egyes esetekben belső sztenderdek használatát ajánlják, mégpedig az ochratoxin-a D3-metilészterét. [25]

6.10.1.2.2 Ochratoxinok meghatározsásának analitikai paraméterei

Az OTA kimutatása során az analitikai elválasztásra kifejezetten RP-C18-as oszlopokat ajánlanak metanol/H_2O, ACN/H_2O és a metanol/ACN/H_2O elegyekkel eluensként izokratikus és gradiens módban is. A kimutatás során az ochratoxinok eluálódását a pH elősegíti, így az eluens összetételébe ecetsavat vagy trifluor-ecetsavat ajánlanak alkalmazni [141,80,105,116-56,112].

A tömegspektrometriás illesztő egységek közül az APCI és ESI alkalmazását is javasolják, de azt ESI használata során az ionizációs hatásfok sokkal jobb, mint APCI esetében, azért az ajánlott mód az ESI használata. [16,90]. Az ESI forrás alkalmazása esetében a fragmentációt és bőséges ionképződést elősegíti még az eluensben a nátrium- és kálium-ionok jelenléte [16,63,90]. Az ionizációs módok közül az ESI alkalmazása esetében a pozitív ionizációt javasolják a szakcikkek [7,16,63,103,121].

Az ochratoxinok mennyiségi elemzése során az ESI detektor alkalmazása és pozitív ionizációs mód esetében a módszerek kimutatási határa mátrixtól függően LOD 0,01-0,1 µg/kg tartományban, a meghatározási határa LOQ 0,06- 1,0 µg/kg értékek között mozog hármas kvadrupól MS alkalmazása mellett. A szakirodalomba található módszerek visszanyerése általában 70%-és 108 % között ingadozik. [80,116,6,56]. A módszerek linearitási tartománya mintegy három nagyságrenden keresztül nem változik, amely igen jó alkalmazhatóságot eredményez. [8,90,112,121].

Az analitikai módszerek validálása során mind külső, mint belső sztenderdeket alkalmaztak. Belső sztenderdként a [D5]-OTA vegyületet, vagy a sztenderd addíciót alkalmazták. [99]

Az EU jelenlegi módszer validálási kritériumai között szerepel a módszerek kidolgozása során alkalmazandó ajánlásként a mátrix hatások csökkentése miatti pH beállítás. [41,85] A mennyiségi adatok összehasonlítása során a szakcikkek alternatív detektor alkalmazását is ajánlják a HPLC-MS helyett, ilyen az FL detektort [6,16,25,105, 121,122,].

6.10.1.3 Zearalenon és metabolitjai

A zearalenon és metabolitjainak igen erős rákkeltő hatású vegyületei miatt különös jelentőséggel kell megválasztani az extrakciós és kimutatási technikát, mivel a metabolitok egymáshoz igen hasonló szerkezeti képletei és kis eltérései miatt nem minden technika alkalmas a megfelelő toxin azonosítására, vagy hamis, nem szignifikáns eredményt ad a toxin mennyiségére nézve a metabolitok együttes mérésével.

6.10.1.3.1 Zeralenon és metabolitjainak mintaelőkésszítési technikái

Szilárd fázisú minták – mint gabona - extrakciója során használatos oldószerek az ACN/H2O, metanol/H2O különböző összetételű elegyeit alkalmazták [23,37,43,65,69,120,140], amelyek alkalmazása során sokszor használnak az extrakció elősegítésére metafoszforsavat vagy nátrium-kloridot.

Lényeges elem a zearalenon és metabolitjai elemzése során, hogy az eléggé hasonló szerkezeti képlettel rendelkező metabolitokat is ki tudjuk vonni a mintánkból, ezért az alkalmazott extrakciós módszerek közül a SPE technika és immunaffinitás oszlopok használata is lényeges lehet, bár a szakirodalmi eredmények a folyadék-folyadék extrakciót javasolják több esetben, mivel a SPE és az immunaffinitás oszlopok sokszor eléggé specifikusak. A SPE oszlopok alkalmazása esetében többféle töltetet használtak úgy mint RP, anion cserélő és immunaffinitás [120,124], Florisil [65], MycoSep [37,43,49,69,140] és aktív szenes [5,23,160] tölteteket. A szakirodalmi hivatkozások alapján a legszélesebb alkalmazhatóságúnak az RP anioncserélő töltetek bizonyultak [85,92,96,119,123]. A MycoSep oszlopok visszanyerési tesztjei alacsony visszanyerési hányadot mutattak, mintegy 30-40%-osat, amelyek eredményeképpen a MycoSep extrakciós módszerek így teljesen megbízhatatlanok lettek egyes metabolitokra nézve [37,49,69,140]. Az immunaffinitás oszlopok a szennyező mátrixhatásuk miatt itt is ismét alkalmatlanok voltak az LC-MS vagy MS/MS detektálás alkalmazása során.

6.10.1.3.2 Zeralenon és metabolitjai meghatározsásának analitikai paraméterei

Az LC analízis során a szakirodalomban fellelhető kimutatási módszerek által használt analitikai oszlopok általános töltetei RP-C18 és RP-C8-as töltetek voltak, eluensként

metanol/H_2O, ACN/H_2O és a metanol/ACN/H_2O keverékeket használva izokratikus illetve gradiens módban, amely eluensekhez a kromatográfiás elválasztás segítése érdekében ammónium-acetátot, hangyasavat vagy ecetsavat adtak. [37,49,85,96,118 ,120, 158].

A tömegspektrometriás elemzések során mind APCI mind ESI ionforrást alkalmaztak a zearalenon és metabolitjainak kimutatására pozitív és negatív ion módban is. A vizsgálatok során kiderült, hogy az APCI korona kisülési közegben keletkező komponensek rontják egyes metabolitok kimutathatóságát, ezért csak egyes metabolitok kimutatásában ajánlott az alkalmazása [37,49,86]. Az ESI ionforrás alkalmazása során általánosan a negatív ionizációs módban lett szelektívebb és érzékenyebb a kimutatás, mint a pozitív ionizációs módban, amelynek oka a savas fenolos csoportok instabilabbak pozitív módú ionizáció esetében. [43,120]

A szakirodalmi módszerek az LC-MS technika alkalmazása esetében a kimutatási határt µg/kg koncentráció határba illesztik be szilárd minták esetében, míg folyadék minták esetében egyes kimutatásoknál ng/kg nagyságrendet is elérhetnek [155,160]. A visszanyerési tesztek során az egyes metabolitok visszanyerési arányai széles tartományban, mintegy 40-130%-os tartományban mozognak, amely persze erősen metabolit függő értékek. [43,118]. A szakirodalomban fellelhető módszerek LOD értéke 0,1 és 3,0 µg/kg vagy µg/L tartományban, illetve LOQ értéke 0,2 és 10,0 µg/kg vagy µg/L tartományban mozog, amely tartomány erősen mátrixfüggő.[39,49,71,85,92,118, 113]

6.10.1.4 Aflatoxinok

6.10.1.4.1 Aflatoxinok mintaelőkészítési paraméterei

Az aflatoxinok analíziséhez alkalmazott mintaelőkészítési technikák a szakirodalmi hivatkozások alapján igen változatos képet mutatnak. A minta közvetlen beadagolása miatt az immunaffinitás oszlopok használata is elterjedt, de alternatív módként alkalmazzák a SPE oszlopokat RP- C18-as töltettel, polimer töltettel, valamint aktív szenes töltettel is. Mindegyik módszer jelentős és MS-ben jól alkalmazható szelektivitást mutat az aflatoxinokra. [4,59,60,82,103,115,]

6.10.1.4.2 Aflatoxinok analitikai meghatározásának lehetőségei

A HPLC vizsgálatok során az analitikai oszlop szinte kivétel nélkül RP-C18-as töltetű, az eluens metanol/H_2O és ACN/H_2O keverékei izokratikus és gradiens módban alkalmazva. Egyes esetekben az eluenshez ecetsavat, hangyasavat, trifluor-ecetsavat illetve ammónium sókat adagolnak annak érdekében, hogy az ionizációs hatásfok javuljon. [24,59,60,72,85,98,103, 115,144,]

Az LC-MS kimutatási technika alkalmazása esetében a szakirodalmi cikkek az ESI pozitív módot használják többet, amely esetében nagy mennyiségű protonált ion keletkezik. Az ionok keletkezésének mértékét az eluensbe történő nátrium-ion adagolásával lehet növelni. [4,68,104]. A szakcikkek majdnem fele az ESI pozitív ionizáció mellett az APCI pozitív ionizációt is használja igen jó LOD és LOQ értékekkel. [59,60,77,102,144].

Az aflatoxinok szakirodalomban talált LC-MS kimutatási módszerei között nagyon sok esetben nem használnak belső sztenderdeket, a kalibráció túlnyomó részt szabványos, egyszerű külső kalibrációs megoldást alkalmaznak. A mintaelőkészítési technikák jelentős szelektivitása miatt a mátrixhatás ebben az esetben nem érvényesül az MS-ben. [4,68,102].A módszerek LOD értékei 0,1-2,5 µg/kg vagy µg/L, az LOQ értékei 1-5 µg/kg vagy µg/L között változnak. A módszerek visszanyerési tesztjei a különböző aflatoxinokra 77-110% között változnak. [77,82,85,98,102,103]

6.11 Szabványos vizsgálati módszerek

A jelenleg érvényben levő, általam vizsgált mikotoxinokra a következő Magyar Szabvány szerinti módszerek álltak rendelkezésemre. A Magyar Szabvány szerinti módszereket kivonatolva, minta előkészítésre és meghatározási paraméterekre leszűkítve közlöm.

6.11.1 Aflatoxinok

MSZ EN 14123/2008 módszer: Élelmiszerek. Az aflatoxin B_1és az aflatoxin B_1, B_2, G_1 és G_2 összegének meghatározása mogyoróban, földimogyoróban, pisztáciában, fügében és fűszerpaprika-őrleményben. Az alkalmazott módszer: HPLC módszer oszlop utáni származékképzéssel és immunaffinitás-oszlopon történő tisztítással.

A módszer elve: homogenizált mintából acetonitril-víz 60/40 v/v arányú eleggyel oldjuk ki az aflatoxinokat, amely elegyet erőteljesen rázunk 20 percen át. Ezután centrifugáljuk, majd foszfát-puffert (pH=7,4) adunk hozzá Az extrahált mintát immunaffinitás oszloppal (Wicam, Afla test, esetleg más típusú) tisztítjuk. Az oszlopról történő eluálást metanol: ecetsav 98:2 v/v arányú elegyével végezzük. A kinyert aflatoxinokat Kobracell használatával, oszlop utáni származékképzéssel fordított fázisú HPLC technikával határozzuk meg. Mobil fázis ionmentes víz : metanol : acetonitril 60:20:20 v/v aránnyal.

A szilárd minta előkészítés során 5 g mintához 20 mL extraháló elegyet és 0,5 g NaCl-ot adva intenzíven rázatjuk 20 percig, majd lecentrifugáljuk a mintát. A felülúszó 4 mL-ét véve (amely megfelel 1 g mintának), főzőpohárban adunk hozzá 40 mL foszfát puffert, majd összekeverés után immunaffinitás oszlopon tisztítjuk úgy, hogy az oszlopon az áramlási sebesség 1 csepp/sec legyen. Az oszlopot átmossuk 2x10 mL desztillált vízzel, majd eluáljuk az oszlopról a komponenseket 2 mL metanol:ecetsav 98:2 v/v arányú eleggyel. A mintát szárazra pároljuk, majd visszaoldjuk metanolban.

A vizsgálat során a Kobracell működéséhez 4 mol/dm^3 koncentrációjú HNO_3 oldat és 120 mg/ L koncentrációjú KBr oldat szükséges.
Eluens: víz:acetonitril:metanol 60:20:20 v/v arányú elegye + 830 µL 4 M HNO_3 / 1 L eluens és 120 mg KBr/ 1 L eluens.
Eluens térfogatáram: 1 mL/perc.
Kromatográfiás oszlop: LiChrosphel C-18.

Gerjesztési hullámhossz: 365 nm.

Emissziós hullámhossz: 483 nm.

Mérési idő: 20 perc.

Kimutatási határ HPLC módszerrel (LOD): 0,1 µg/kg.

Meghatározás alsó határa (LOQ): 1,0 µg/kg.

Az aflatoxinok kimutatására a szakirodalomban több, elérő detektálási technikát alkalmazó cikk jelent meg [23,38,39,45,132], amelyekben általánosan használt kimutatási módszerek többsége OPLC, HPLC-UV, HPLC- FLD, DAD, PDA detektort használ, kevésbé elterjedten MS, MS/MS azonosítást.

6.11.2 Ochratoxin-A

MSZ EN 14132/2003 módszer. Élelmiszerek. Az ochratoxin-A meghatározása árpában és pörkölt kávéban. HPLC-módszer immunaffinitás-oszlopos tisztítással.

A minta előkészítés során acetonitril:víz 60/40 v/v arányú elegyével vonjuk ki az ochratoxin-A-t. Az extraktumot centrifugáljuk, majd foszfát puffert (pH=7,4) adunk hozzá. Alapos összekeverés után immunaffinitás oszlopon tisztítjuk. A toxin oszlopról való eluálására metanol:ecetsav 98:2 v/v arányú arányú elegyét használjuk. Az így nyert eluátum OTA tartalmát HPLC technikával határozzuk meg.
A vizsgálat menete: a minta előkészítés során 5 g megfelelően előkészített mintához 20 mL extraháló elegyet (acetonitril:víz 60:40 v/v) adva intenzíven rázatjuk 1 percig, majd 20 percig síkrázón rázatjuk és a mintát lecentrifugáljuk. A felülúszó 4 mL-es részletéhez főzőpohárban adunk 40 mL foszfát puffert, majd immunaffinitás oszlopon tisztítjuk úgy, hogy az oszlopon az áramlási sebesség 1 csepp/sec legyen. Az oszlopot 2x10 mL desztillált vízzel átmossuk, majd eluáljuk az oszlopról a komponenseket 2 mL metanol:ecetsav 99:1 v/v arányú eleggyel. A mintát szárazra pároljuk, majd visszaoldjuk acetonitril:víz:jégecet 99:99:2 v/v arányú elegyében. A HPLC-s vizsgálatot azonnal el kell végezni.
Eluens térfogatáram: 1 mL/perc.
Eluens: acetonitril:víz:jégecet 99:99:2 v/v arányú elegye.
Kromatográfiás oszlop C-18 LiChrpsphel 100 (5µm).
Gerjesztési hullámhossz: 333 nm.
Emissziós hullámhossz: 460 nm.
Mérési idő: 15 perc.
Kimutatási határ HPLC módszerrel (LOD): 0,2 µg/kg.
Meghatározás alsó határa (LOQ): 1,0 µg/kg.

További, nem szabványos kimutatási módszerek ismeretesek a szakirodalomból aflatoxinokra és ochratoxin-A-ra [42,51,132,56,64], amelyek adott mérőkészülékre optimalizáltak. A szakirodalomban általánosan használt kimutatási módszerek többsége ELISA, HPLC-UV, HPLC- FLD, DAD, PDA detektort használ, kevésbé elterjedten MS, MS/MS azonosítást.

6.11.3 Deoxynivalenol, nivalenol, zearalenon

A deoxynivalenol, nivalenol valamint zearalenonra nem álltak rendelkezésemre szabványos módszerek, ezért a kimutatási módszerek optimalizálását összefoglaló szakirodalmak alapján végeztem [44,117], amelyre *Peter Zöllner, Bernhard Mayer-Helm* mikotoxinok mérési paramétereit összefoglaló cikke szolgált alapul. (6. táblázat).

6. táblázat: A vizsgált toxinok szakirodalomban talált kimutatási módszereinek paraméterei [44,117]

Toxin	*Mátrix*	*Minta előkészítés*	*Kimutatási technika*	*LOD/LOQ µg/kg v. µg/L*	*Precizitás %*
DON, NIV	liszt	extrakció ACN/H_2O 84:16, tisztítás MycoSep 227 és 216 oszloppal	Izokratikus: RP-18 H_2O/ACN/MeOH 82:9:9 APCI−egyszeres kvadrupol MS, Full scan, SIM	1-10 / 10-100	3,5-7,7
	gabona	extrakció ACN/H_2O 80:20, tisztítás MycoSep 225	RP-18 Izokratikus: H_2O/MeOH—65:83 0.1mM NaCl ESI± egyszeres kvadrupol MS,Full scan, SIM	20-50/100	5
	sör, maláta	maláta extrakció ACN/H_2O 84:16, tisztítás: MycoSep 227 kolonna, sör: gáztalanítás, SPE ChemElut 1020 kolonna	RP-18 gradiens: H_2O/MeOH/ACN NH_4OAc-al ESI± hármas kvadrupol MS SRM	2/10	7
	gabona alapú ételek	extrakció ACN/H_2O 85:15, tisztítás: MycoSep 226 kolonna	RP-18 gradiens mód: H_2O/MeOH ESI±(APCI ±), hármas kvadrupol MS, SRM	0,2/10	-
Zearalenon	liszt	extrakció ACN/H_2O 21:4, tisztítás SPE	RP-18 gradiens mód: H_2O with 1% HCOOH/ACN ESI + egyszeres kvadrupol, Full scan	5/15	8,4
	kukorica	extrakció ACN/H_2O 75:25, tisztítás MycoSep 224	RP-18 Izokratikus: H_2O/ACN—60:40 APCI +/(−) egyszeres kvadrupol MS, SIM	0,12/0,17	1-7,4
	liszt	extrakció ACN/H_2O 75:25, tisztítás MycoSep 226 kolonna	RP-18 Gradient: H_2O+ 1% ACN 5mM NH_4OAc-al és HCOOH-al, pH= 4/ACN APCI− ioncsapda, SRM	3/10	-
AFB1, AFB2, AFG1, AFG2,	mogyoró	SPE RP-18 töltettel	RP-18 Izokratikus: H_2O/MeOH—55:45 ESI + egyszeres kvadrupol MS, SIM	0,1/-	-
	gabona alapú élelmiszerek	extrakció ACN/H2O 85:15, tisztítás MycoSep 226	RP-18 gradiens: H_2O/MeOH ESI− hármas kvadrupol MS, SRM	1,9	9
	sajt	extrakció 0.1% HCOOH ACN/hexán—55:45	RP-18 gradiens: 0.1% AcOH H2O/ACN ESI + hármas kvadrupol MS, SRM	0,8/5	-
Ochratoxin -A	sör, kávé	keverés (sör)/extrakció (kávé) vizes 0,4M $MgCl_2$, folyadék/folyadék extrakció toluollal, tisztítás SPE	RP-18 gradiens: 0.05% TFA H_2O/MeOH ESI± hármas kvadrupol MS , Full scan	1,4/126 [D5]-OTA	3,6
	bor	extrakció SPE RP 18	RP-18 izokratikus: vizes 2.5% AcOH/MeOH—68.5:31.5 ESI + hármas kvadrupol MS, SRM	0,05/0,15	6-16
	rizs, bab, liszt, sör, bor	extrakció MeOH/víz 3% $NaHCO_3$—50:50 (szilárd mintákból), Immuna. oszlop	RP-18 izokratikus: H_2O/MeOH/ACN1:1:1 ESI + hármas kvadrupol MS, SRM	0,02-0,05	6-16

A 6. táblázatban felsorolt kimutatási módszerek és extrakciós technikák a teljesség igénye nélkül kerültek felsorolásra az adott összefoglaló cikkek alapján, mivel a [117] szakcikk a mikotoxinok méréséhez felhasznált minta előkészítési és mérési technikákat foglalja össze. A felsoroltakból is megállapítható, hogy a vizsgált mikotoxinok elválasztására általánosan használt kromatográfiás oszlop fordított fázisú C18-as oszlop volt. Az extrakciós technikák az általánosan használt oldószere az acetonitril. Használata az extrakció során extrahálószer-elegyben (víz, metanol segédoldószerekkel) történik mind a szilárd-folyadék, mind a folyadék-folyadék extrakciónál.

A kromatográfiás paraméterek toxinonként és vizsgálatonként eltérőek, ezért a vizsgálati paraméterek általánosításának nincs értelme, de kiindulási információkat biztosítanak a módszerfejlesztéshez.

A használt ionforrás típusa is eltérő, ezt is toxinonként érdemes meghatározni, mivel minden toxinnál szerepelhet mind a két ionforrás a vizsgálatokban, pozitív és negatív ionizációs módban is.

A szabványos vizsgálati módszerek kritikája

A szabványos vizsgálati módszerekben (MSZ EN 14123/2008 és MSZ EN 14132/2003) az aflatoxinok és az ochratoxin-A azonosítására használt technika minta előkészítési és mérési alkalmazhatósága a bonyolult többlépéses előkészítési technika illetve a speciális mérőberendezés alkalmazása miatt körülményes lehet. Az aflatoxinok és az ochratoxin-A esetében a módszerek meghatározásának alsó határa (LOQ) 1 µg/kg, amely az élelmiszerekben megengedett határérték nagyságrendileg mért fele mennyisége (bor esetében határérték 2 µg/kg OTA-ra, gabonafélékre aflatoxin B1 esetén szintén 2 µg/kg). A csecsemőtápszerek illetve speciális gyógyászati ételekben a megengedett maximális aflatoxinok esetében 0,1 µg/kg, ochratoxin-A esetében 0,5 µg/kg a határérték, amelyet már a fent említett szabványos módszerekkel nem lehet megfelelő pontossággal kimutatni. A precízebb, alacsonyabb kimutatási határú módszerekkel pontosabban és biztosabban lehetne meghatározni a toxin minimális jelenlétét is a mintában, ezzel biztosítva azt, hogy az egyik legveszélyeztetettebb korosztály –a csecsemők -, illetve a betegek a lehető legbiztosabban toxinmentes élelmiszert fogyaszthassanak.

7 Kísérleti rész

7.1 A vizsgált toxinok köre és a felhasznált anyagok

Az elemzés alá eső minták köre a téma jellegéből adódóan igen tág, ezért kutatásaimat a legkiemelkedőbb humán- és állategészségügyi jelentőséggel bíró toxinokra fókuszáltam és vizsgálandó mintákat rendszereztem a minta minősége és a vizsgálati szempontok szerint. Az 7. táblázatban foglaltam össze azokat a vizsgálati területeket, amelyeken kutatásokat végeztem néhány jelentős, fő szennyeződést előidéző toxin (deoxynivalenol, nivalenol, ochratoxin-A, aflatoxin B_1, B_2, G_1, G_2, M_1, zearalenon) meghatározására szolgáló analitikai és minta előkészítési módszerek fejlesztése érdekében.

7. táblázat: A kutatásaimban vizsgált toxinok és a vizsgált minták összefoglalása.

Toxin	Minta típusa	Vizsgálati terület
Ochratoxin-A, aflatoxinok, deoxynivalenol, nivalenol, zearalenon	sztenderd minták minta előkészítés	a
Ochratoxin-A, aflatoxinok, deoxynivalenol, nivalenol, zearalenon	sztenderd minták módszer fejlesztés	b
Ochratoxin-A	élelmiszer/bor	c
Deoxynivalenol, nivalenol, zearalenon	bio termesztésből származó élelmiszerek, készáruk	d
Aflatoxin B_1, B_2, G_1, G_2, M_1	félkész termékek, húskészítmények, keksz, tej	e

a) A szabványos mérési módszerek továbbfejlesztése, új mérési módszerek kidolgozása Shimadzu 2010 EV HPLC-MS rendszerre
b) Minta előkészítési paraméterek fejlesztése, illetve új minta előkészítési módszerek kidolgozása ochratoxin-A-ra, deoxynivalenolra, nivalenolra, zearalenonra, aflatoxinokra.
c) Ochratoxin-A tartalom vizsgálata borokban, összehasonlítva a magyarországi, illetve a mediterrán országokból, valamint a világ néhány más pontjáról származó borok OTA tartalmát.
d) Bio termelésben előállított, boltban megvásárolható élelmiszerek alapanyagok és készáruk toxintartalmának vizsgálata deoxynivalenolra, nivalenolra, zearalenonra.
e) Aflatoxinok hőtranszformációjának vizsgálata általános sütési módok használata során.

Első lépésben optimalizálnom kellett a toxinok kimutatási módszereit az általam használt Shimadzu HPLC-MS 2010EV készülékre (Kyoto, Japán), mivel a szabványos módszerekben megadott készülékkel nem rendelkeztem. A megfelelő kimutatási határ eléréséhez figyelembe kellett vennem a készülék paramétereit, illetve a különböző toxinok fizikai-kémiai tulajdonságait. A vizsgált toxinok fontosabb, a minta előkészítési és a mérési paraméterek beállítása szempontjából lényeges tulajdonságait az 4. táblázatban foglaltam össze.

7.1.1 Mikotoxin sztenderdek

A kísérleteim során felhasznált mikotoxinok a Sigma-Aldrich (Saint Louise, Missouri 63103 USA) gyártmányok voltak, és felhasználásig -20 ºC-on tároltam őket:

Aflatoxin B1: tisztaság> 98%, CAS szám:1162-65-8, termékszám: A6636 Sigma, *Aspergillus flavusból*,

Aflatoxin B2: tisztaság> 98%, CAS szám:720-81-7, termékszám: A9887 Sigma *Aspergillus flavusból*,

Aflatoxin G1: tisztaság> 99%, CAS szám:1165-39-5, termékszám: A0138 Sigma, *Aspergillus flavusból*

Aflatoxin G2: tisztaság> 98%CAS szám:7241-98-7, termékszám: A0263 Sigma,

Aflatoxin M1: tisztaság> 98%, CAS szám: 6795-23-9, termékszám: A6428 Sigma, *Aspergillus flavusból*.

Ochratoxin-A: tisztaság: analitikai sztenderd, CAS szám:303-47-9, termékszám:32937-5MG, szállító: Sigma-Aldrich (Saint Louise, Missouri 63103 USA).

Deoxynivalenol: termékszám: D0156-5MG, CAS szám: 51481-10-8, minőség: analitikai sztenderd,

CAS szám: 51481-10-8, termékszám: 34124 Fluka, 100 µg/mL deoxynivalenol acetonitrilben (Sigma-Aldrich, Saint Louise, Missouri 63103 USA).

Nivalenol: termékszám:(Fluka), CAS szám:23282-20-4, minőség: analitikai sztenderd 100 µg/mL, acetonitrilben oldva,

Zearalenon: termékszám: 32939-5MG, minőség: analitikai sztenderd, 1000 mg/L acetonitrilben oldva.

A toxinoldatok készítésénél acetonitrilt (CAS szám: 75-05-8, termékszám: 271004 Sigma-Aldrich, 99,8 % tisztaságú) használtam oldószerként [127]. Az élelmiszerminták toxin-analízisénél HPLC minőségű acetonitril (termékszám: 34851, CAS: 75-05-8, Chromasolv

gradient grade, for HPLC, ≥99.9%) és jégecet (ecetsav tartalom ≥99.7%) is a Sigma-Aldrichtól származtak. A desztillált vizet saját desztilláló berendezésben állítottuk elő, elektromos vezetése 7 µS volt. A metanol a Merck cégtől (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) származott. A vizsgálatokhoz felhasznált etanol (VWR BDH Prolabo) a VWR magyarországi forgalmazójától (Spektrum-3D) cégtől származtak.
A vizsgálatok során felhasznált tömeg- és térfogatmérő eszközök a következők voltak:

7.1.2 Térfogatmérés:

Biohit Proline pipetta (10-100 µL, széria szám: 9091614, pontatlanság 0,17 %), Biohit Proline pipetta (100-1000 µL széria szám: 10093309, pontatlanság 0,37 %), szállító: Biohit PLC. (Laippatie 1, 00880 Helsinki, Finland).
Mintatartóknak 1,5 mL térfogatú, szilikon/PTFE zárótárcsával rendelkező, nem átlátszó mintatartó üvegeket használtam, szállító/gyártó: Vialab Magyarország KftLa-Pha-Pack GmbH (Langerwehe, Deutschland).

7.1.3 Tömegmérés:

Sartorius analitikai mérleg: Sartorius A200S (Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland)
A folyadék-folyadék (Liq-Liq) extrakciós vizsgálatokhoz Eppendorf Centrifuge 5810 R típusú centrifugát (Eppendorf Ag, Hamburg, Germany) és körkörös síkrázó gépet (Bühler KS15A, Fischer Scientific Ltd, UK) használtam.

7.2 A mérési paraméterek optimalizálásának metodikája

A különböző mikotoxinokra kidolgozott saját kimutatási módszerek paraméterei a következő metodika alapján határoztam meg:

1) mérőoldatsor készítése
2) a tömegspektrométer tuning-file beállításai mellett, valamint a szakirodalmi és szabvány módszerekből összeállított általános eluens összetétel (amely toxincsoportonként változott) és analitikai paraméterek mellett az egyes toxinok tömegspektrumának felvétele.
3) rendszeralkalmasság vizsgálata:
    i) kolonna teszt
    ii) mérőoldatsorból a töményebb oldattal az analitikai oszlopon történő elválasztás paramétereinek meghatározása PDA illetve MS detektor segítségével. Az MS detektor beállítási paraméterei a tuning-file paraméterei voltak., míg az ionforrás a szakirodalomban ajánlott ionforrás volt. A meghatározott paraméterek az áramlási sebesség, eluens összetétel voltak.
    iii) Az eluens összetételének változtatásával az egyes toxinok retenciós idejének megállapítása PDA és MS detektor segítségével,
    iv) szelektivitás és reprodukálhatóság meghatározása saját kalibrációs oldatokból elkészített különböző toxint tartalmazó oldatból állapítottam meg.
4) MS paraméterek meghatározása,
    i) a kisebb koncentrációjú mikotoxinokat tartalmazó kalibráló oldatokal az MS paraméterek optimalizálása full scan és SIM módban,
        (a) Ionforrások (APCI, ESI) alkalmasságának vizsgálata pozitív és negatív ionizációs módban az egyes toxinokra, a legalkalmasabb ionizációt adó ionforrás és mód kiválasztása.
        (b) A megfelelő fragmentáció beállítása a Q-array (ionizációs) feszültség változtatásával 40, 70 és 80 V-on.
        (c) A vizsgált mikotoxinok tömegspektrumainak bevitele a spektrumkönytárba.

5) a mérőoldatsorozat felhasználásával a mérési módszerek LOD és LOQ értékeinek meghatározása az optimalizált beállításokkal
6) valós, (toxint nem tartalmazó) mátrixot alkalmazva a mintaelőkészítési technikák kidolgozása után az LOD és LOQ értékek meghatározása egyes toxinokra sztenderd addíció módszerével.
   a) a mintaelőkészítési technikák visszanyerési tesztjeinek megállapítása.

A rendelkezésemre álló mikotoxinokból mérőoldatsorozatot készítettem.

Első lépésben a mérőoldaltokból az alapbeállítások segítségével a különböző mikotoxinok tömegspektrumait vettem fel annak megállapítása érdekében, hogy a tömegspektrométerben megjelenik-e a toxin, illetve alapbeállításokkal milyen fragmensek látszanak a tömegspektrumban, mivel a HPLC-MS szoftvere nem tartalmazott tömegspektrum könyvtárat az azonosítás elősegítésére.

A szakirodalomból illetve a szabványos módszerekből kiindulva RP-C18-as kolonnát alkalmaztam. Rendelkezésemre állt 4 gyártó által készített C18-as kolonna, amelyeken a mikotoxinok elválasztásának jellemzőit vizsgáltam. A 4 oszlop a következő volt: Restek Pinnacle DB-C18 (250mm x 4,6mm x 5µm), YMC-Pack Pro C18 (100mm x 4,6mm x 3µm), Phenomenex Gemini C18 (150mm x 4,6mm x 5 µm), ACE 5 C18 (150mm x 4,6mm x 5µm). Az analitikai oszlopok küzül a Restek Pinnacle oszlop bizonyult a legmegfelelőbbnek, mivel ennek az oszlopnak voltak a legjobbak a retenciós idő szórása, csúcsszélesedés és szelektivitás paraméterei a vizsgált toxinokra.

A szelektivitás meghatározása először PDA majd MS detektor segítségével történt a fentebb leírt módon. A szelektivitás és reprodukálhatóság meghatározására az általam elkészített mikotoxin mérőoldatokból mixet készítettem, először külön a trichotecénekből, majd aflatoxinokból. Ochratoxinok közül csak ochratoxin-A sztenderd vegyületem lévén aflatoxin mixet használtam.

A mérőoldatsor töményebb oldataiból – általában 100-250 mg/L – felvettem az adott mikotoxin tömegspektrumát különböző ionforrásokkal és ionizációs módban is. Az MS detektorban történő fragmentáció típusa, mértéke és foka nagymértékben függ az alkalmazott illesztőegységtől (APCI illetve ESI), valamint az ionizációtól (pozitív vagy negatív). A kettő, rendelkezésemre álló illesztő egység alkalmasságát a tuning file-ban tárolt paraméterek beállításai alapján végeztem el. A kettő interfésszel felvett spektrumok közül a megfelelő –

nagyobb intenzitású jelet adó – illesztőegységet és ionizációt használtam a további mérésoptimalizáláshoz. Az így kapott mérési paraméterek finomítását, úgy mint illesztőegység hőmérséklet, fragmentáció feszültsége, porlasztó gáz illetve szárító gáz térfogatárama, detektor feszültsége már a kalibrációs oldat kisebb koncentráció tartományába tartozó mérőoldatának használatával végeztem el. A megfelelő fragmentáció beállításához az ionizációs (Q-array) feszültség változtatásával is próbálkoztam 40, 70 és 80 V-on.

A toxinokra jellemző fragmensek elkülönítése és a megfelelő beállítások megtartása mellett kisebb koncentrációjú mikotoxin oldatokat is elemeztem az adott beállításokkal, annak ellenőrzése érdekében, hogy a tömegspektrométer beállításának paraméterei megfelelőek az azonosításhoz.

A szelektivitás, reprodukálhatóság, szórás, S/N viszony, LOD, LOQ kiszámítása a készülék szoftverének (Shimadzu LCMS solution Ver.3.20.216) adott kritérium beállítása és a szoftver által számított adatok felhasználása által történt.

Az optimalizálás és a kalibráció során a tömegspektrométert a tuning file paraméterei alapján állítottam be (kalibráláshoz polietilén-glikol mix, PEG 200, PEG 600, PEG 1000 + raffinózt használtam), ebben a mérési fázisban nem változtattam a beállításokon.

7.3 A toxinok kimutatására kidolgozott saját módszerek ismertetése

A kimutatáshoz használt készülékShimadzu HPLC-MS 2010 EV (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) modell. Az irodalmi tapasztalatok alapján nem próbálkoztam más állófázist tartalmazó oszlopokon elválasztani a mintákat, hanem maradtam a fordított fázisú C18-as oszlop mellett, a Restek cég Pinnacle DB C18-as oszlopát (Restek Corporation, USA, 110 Benner Circle, Bellefonte PA 16823) használtam erre a célra. A HPLC rendszer pumpája 40 MPa nyomásig volt képes megfelelően tartani a térfogatáramot, ezért a kis szemcseméretű (1-2 µm) oszlopok nagy nyomásesése miatt az 5 µm szemcseméretű oszlopot használtam. (Pinnacle DB RP C18 250 mm x 4,6 mm x 5 µm, katalógus szám: 9414575-700, szériaszám:07060142T). A HPLC-MS készülék felépítése a következő:

Kontroller:	CBM-20A
Pumpa:	Shimadzu LC 20 AB, 2 csatornás pumpa
Injektor:	Shimadzu autosampler SIL 20A
Kolonnatér:	Shimadzu CTO-20A
PDA detektor:	SPD-M 20A
Tömegspektrométer:	Shimadzu 2010 EV, APCI és ESI forrással.

Megjegyzés:

A módszerek kidolgozása során a kalibrációs görbéket MsOffice-Excel-program segítségével ábrázoltam a dolgozatban, mivel a mérésre felhasznált Shimadzu 2010 EV LCMS készülék szoftverje *LCMS solution Version 3.20.216* által készített kalibrációs egyenesek konvertált és nyomtatott képei a dolgozatba történő beillesztés után nem voltak megfelelően kivehetőek.

A szoftverben történő kalibrációs egyenesek kiértékelése során egy kalibrációs pont 3 párhuzamos mérés közötti RSD értéke 10 % alatt fogadtam el a Horwitz görbe adataiból kiindulva [146]. A mérések kiértékelését *LabSolution LCMS solution Version 3.20.216 (The Program Built 2004.08.26. 3:15:54)* verziójával végeztem el.

7.3.1 Az aflatoxinok kimutatására kidolgozott saját módszer ismertetése

Az aflatoxinokat tartalmazó mérőoldatokat acetonitril oldószerrel, saját törzsoldatból történő hígítással készítettem el. Az aflatoxin (AFB_1, AFB_2, AFG_1, AFG_2, AFM_1) mérőoldatok koncentrációit a 8. táblázat tartalmazza.

8. táblázat: Aflatoxin mérőoldatok koncentrációi acetonitril oldatban

Acetonitrilben oldott aflatoxin mérőoldatok koncentrációi									
0,05 µg/L	0,5 µg/L	1 µg/L	2 µg/L	4 µg/L	10 µg/L	50 µg/L	200 µg/L	500 µg/L	1000 µg/L

A mintákat a felhasználásig -5°C hőmérsékleten tároltam.

7.3.1.1 Az aflatoxin B_1, B_2, G_1, G_2 analízisére kidolgozott saját módszer optimalizált mérési paraméterei:

Eluens: ionmentes víz: metanol:acetonitril 60:20:20 v/v arányú elegye

Eluens térfogatáram: 1 mL/perc

Kolonna: Pinnacle DB C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)

Kolonnatér hőmérséklete: 40 °C

Ionizációs mód: APCI (+)

CDL hőmérséklet: 300 °C

Illesztőegység hőmérséklet: 400 °C

Blokk hőmérséklet: 250 °C

Porlasztó gáz térfogatáram: 2 L/perc

Szárító gáz térfogatáram: 5 L/perc

Detektor feszültség: 1500 V

Felbontás: 0,2 sec

Pásztázás sebessége: 4000 amu/sec

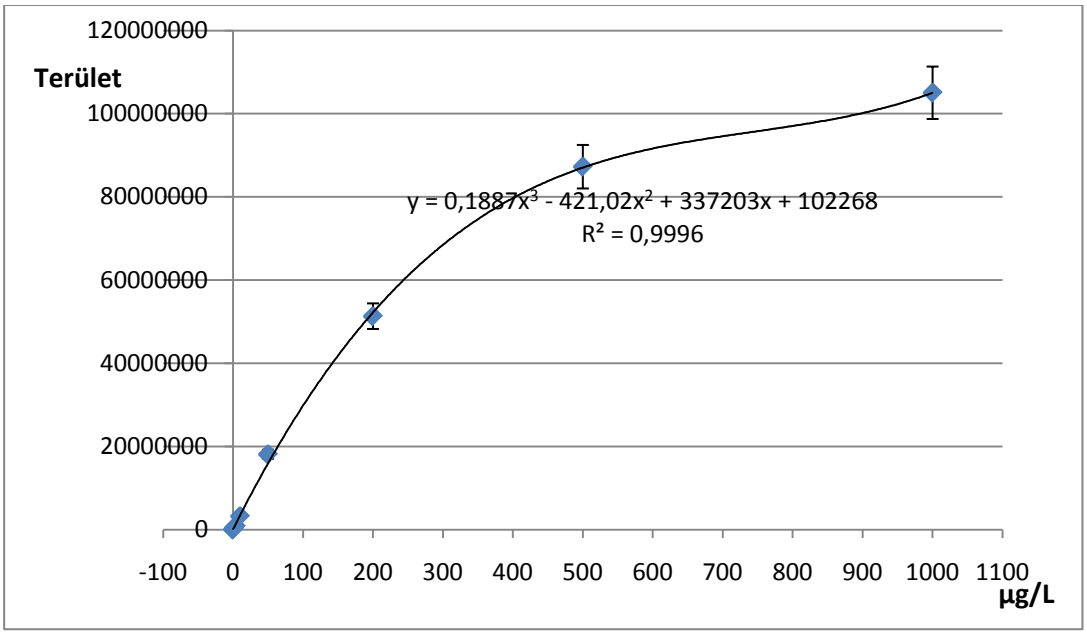
Tömegtartomány: 100-800 amu, full scan

Detektálási időablak 0-25 perc

Injektált mintatérfogat: 10 µL

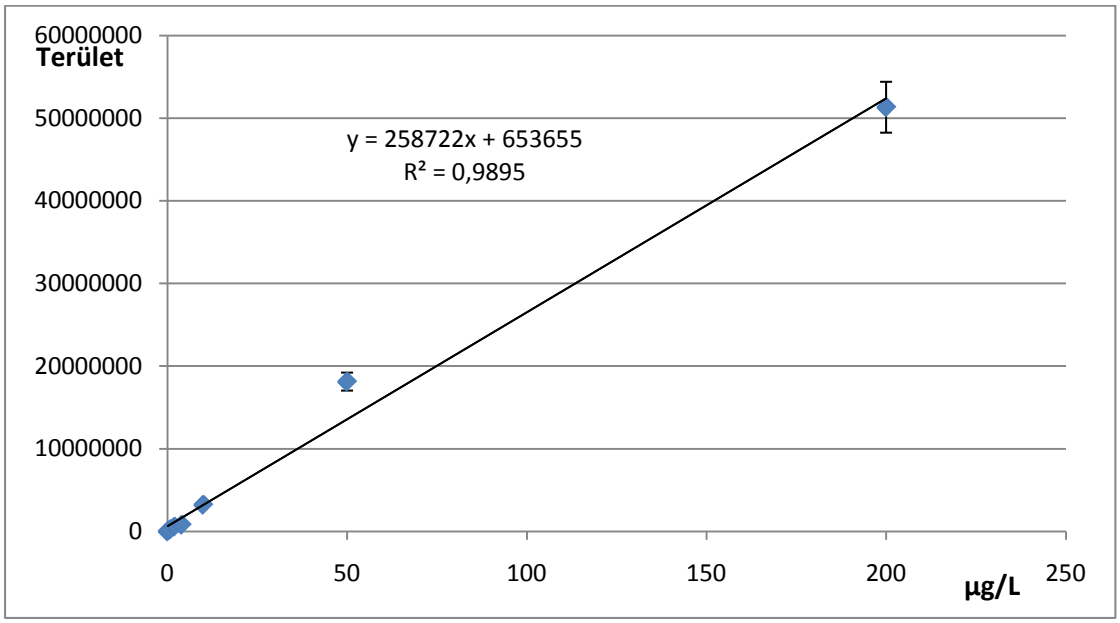
Ismétlésszám: 3

Az aflatoxin B_1 kalibrációs görbéjét a következő ábrákon (25, 26, 27 ábra) mutatom be. A kalibráció során a készülék a vizsgált mikotoxin csúcs alatti területének képzésében az adott toxinra jellemző 5 fragmens intenzitását vette figyelembe. Ezen fragmensek az AFB_1 esetében a jelen vizsgálati paraméterek alapján 312,65 m/z, 286,7 m/z, 282,6 m/z, 272,65 m/z, 256,7 m/z voltak (II. melléklet). A 25. ábrán jól látható, hogy az aflatoxin B_1 kalibrációja során

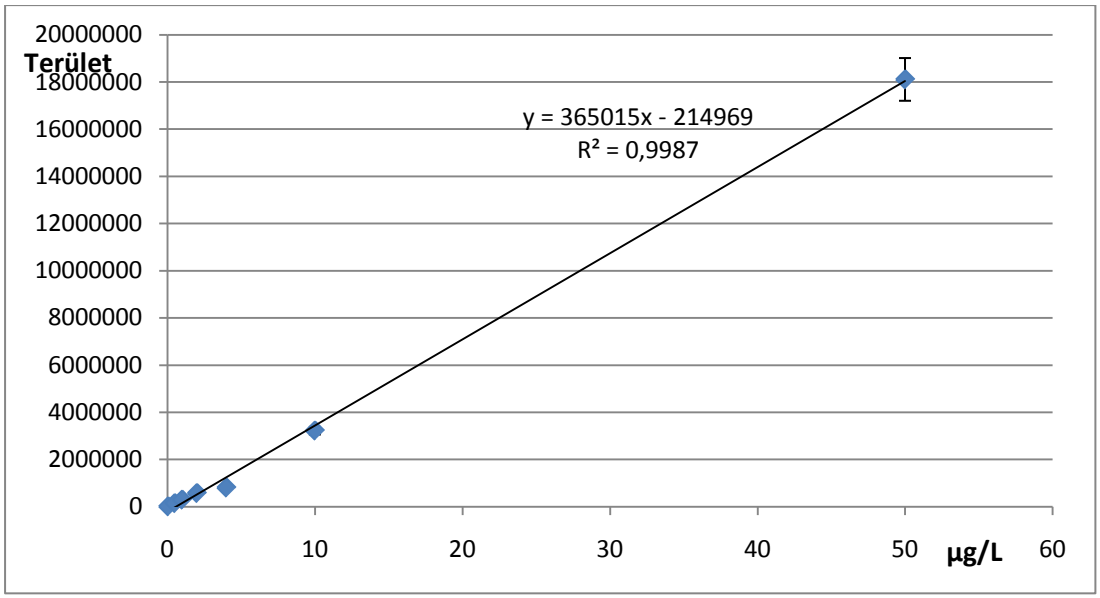


25. ábra: Aflatoxin B1 HPLC kromatogramok csúcsa alatti terület vs. koncentráció kalibrációs görbéje, az AFB1 mérőoldatok teljes koncentráció-tartományában (0,05-1000 µg/L)

kapott pontokra görbe illeszthető. A görbe determinációs együtthatójának R^2=0,9996, amely értéke megfelelő lenne, de a görbe utolsó harmadában (500 µg/L fölött) a terület/koncentráció viszony változása nem elfogadható, ezért a 200 µg/L koncentrációig felvett pontokból már felvehető a közelítőleg lineáris mérési tartomány. A kalibrációs pontok konfidencia intevalluma RSD=4-10% között változott. A 26. ábrán a 0,05-200 µg/L koncentrációban felvett kalibrációs egyenest, a 27. ábrán a 0,05-50 µg/L koncentráció tartományban felvett kalibrációs egyenest láthatjuk. A további aflatoxinok kalibrációja során kapott kimutatási határértékeket a fejezet végén foglalom össze.

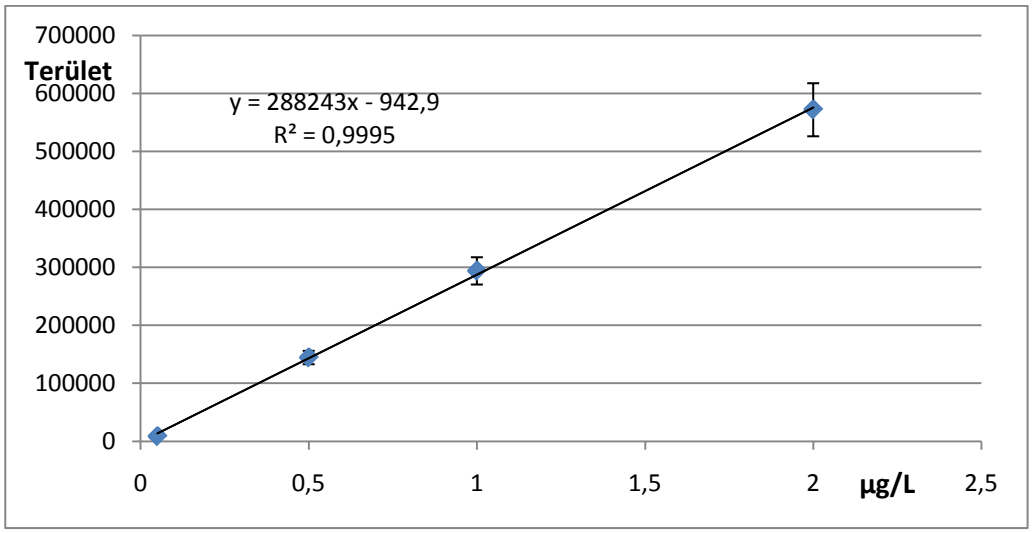


26. ábra: Aflatoxin B1 kalibrációs egyenesének lineáris tartománya a 0,05-200 µg/L koncentráció határok között



27. ábra: Aflatoxin B1 kalibrációs egyenesének lineáris tartománya a 0,05-50 µg/L koncentráció határok között

A 26. ábrán a kalibrációs görbe teljes mérési adatsorból kiemelt lineáris mérési tartománya látható a 0,05-200 µg/L koncentráció-határok között. Aflatoxin B_1-re a kalibrációs egyenes



28. ábra: Aflatoxin B1 kalibrációs egyenesének kis koncentráció-tartományban (0,05-2 µg/L) felvett kalibrációs pontjai.

determinációs együtthatójának értéke R^2=0,9895, míg a 27. ábra ábrázolt, a 0,05-50 µg/L koncentráció-tartományban felvett kalibrációs egyenes determinációs együtthatójának értéke R^2=0,9987.

Az Aflatoxin B_2, G_1, G_2 toxinok mérési módszere és paraméterei megegyeznek az aflatoxin B1 mérési paramétereivel.

Az aflatoxin B_2 esetében a kromatográfiás csúcs alatti területek számításánál a következő fragmens ionokat vettem figyelembe: 314,9 m/z, 302,8 m/z, 288,85 m/z, 271,5 m/z, 258,9 m/z voltak (II. melléklet).

Aflatoxin G_1 esetében a következő ionok alapján történt a kalibrációs egyenes felvétele: 328,7 m/z, 314,75 m/z, 284,7 m/z, 272,7 m/z, 256,65 m/z (II. melléklet).

Aflatoxin G_2 esetében a kalibrációs egyenes felvétele a 331,05 m/z, 328,15 m/z, 312,7 m/z, 286,65 m/z, 260,65 m/z (II. melléklet).

Aflatoxin M_1 esetében: 328,85 m/z, 266,00 m/z, 258,1 m/z, 245,75 m/z, 237,8 m/z fragmens ionok kiértékelése alapján történt a kalibrációs egyenes felvétele (II. melléklet).

Az összehasonlítás végett a II. mellékletben a 29. ábrán bemutatom az aflatoxin B_1, B_2, G_1, és G_2 mérése során készített TIC kromatogramjait és a jellemző csúcsok tömegspektrumait. A kromatogramokból látható a relatív retenciós idők különbözősége is.

Az aflatoxin B_2, G_1, és G_2 toxinok, valamint az aflatoxin M_1 kalibrációs egyenesének lineáris koncentráció tartománya 0,05-200 µg/L volt.

Az aflatoxin B_1 tömegspektrumából látható, hogy a toxin 312,3 g/mol molekulatömegéből adódóan az APCI (+) ionizáció használatával a molekulaion 312,65 m/z $(M+H)^+$ tömeg/töltés hányadosnál jelenik meg a tömegspektrumban. Az aflatoxin B_2 molekulánál, ahol a molekulatömeg 314,3 g/mol, a jellemző ion a 314,9 m/z tömeg/töltés hányadosnál jelentkezik. Az aflatoxin G_1 molekula 328,7 g/mol tömegének jellemző ionja a tömegspektrumban 328,65 m/z tömeg/töltés hányadosnál jelenik meg. Az aflatoxin G_2-nél a 330,3 g/mol molekulatömegre 331,05 m/z tömeg/töltés hányadosnál megjelenő molekulaiont találunk. Ezen ionok mellett megjelenik a tömegspektrumban az $(M+H)^+$ töltéssel jelentkező, az ionizációra jellemző +1 m/z tömeggel növelt ion tömege is. Látható a tömegspektrumokból az is, hogy az aflatoxin molekulák fragmentálódása ezen ionizáció feszültség mellett nem jelentős.

Az AFG1 esetében a kidolgozott módszer LOD értéke 0,00254 µg/kg, kalibrációs egyenesének konfidencia intervalluma RSD=3-10%között mozgott. AFG2 esetében LOD= 0,00127 µg/kg, kalibrációs egyenesének konfidencia intevalluma RSD=6-10% között volt megállapítható. Az AFB1 esetében az LOD= 0,00636 µg/kg, a kalibrációs egyenesének konfidencia intevalluma RSD=4-10% közötti tartományban adható meg. Az AFG2 esetében az LOD= 0,000254 µg/kg volt, a szabvány módszer 0,1 µg/kg értékével szemben. Az AFG2 eseténben a kalibrációs egyenes konfidencia intevalluma RSD=4-10% között mozgott.A kidolgozott módszer LOQ értékei AFB1, AFB2, AFG1 és AFG2 esetében 0,05 µg/kg volt a szabvány módszer 1 µg/kg értékével szemben.

7.3.1.2 Aflatoxin M1:

Készülék: Shimadzu LCMS-2010 EV

Kolonna: Pinnacle DB C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)

Detektor: PDA (330 nm)

Eluens: Acetonitril : Víz : Ecetsav 25:75:5 v/v arányú elegye

Illesztőegység hőmérséklet: 380 °C

Ionizációs mód: APCI(+)

CDL hőmérséklet: 300 °C

Fűtőblokk: 250 °C

Porlasztó gáz térfogatáram: 2 L/perc

Szárító gáz térfogatáram: 4 L/perc

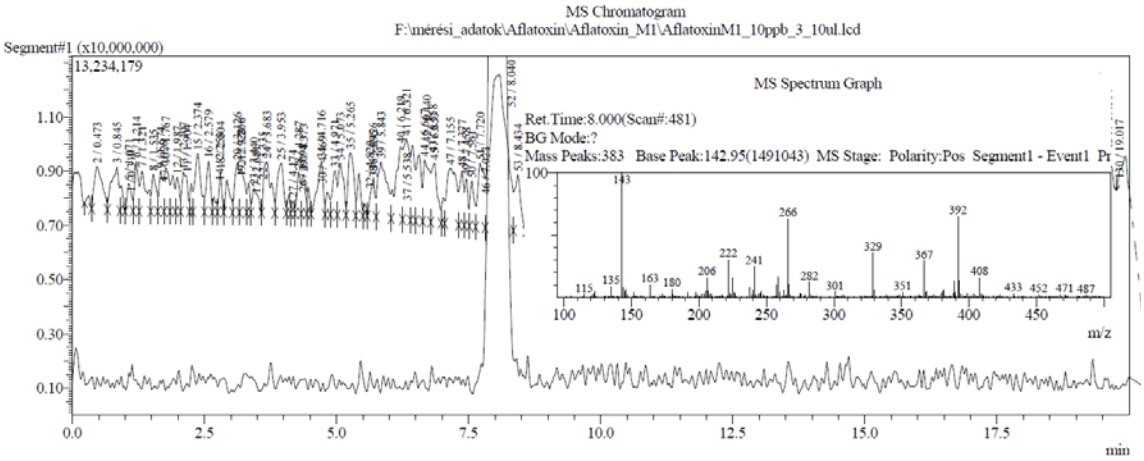
Ionforrás: APCI (+)

Eluens áramlási sebesség: 1 mL/perc

Detektálási időablak: 0-25 perc

Injektált mintatérfogat: 10 µL

Az aflatoxin M1 toxin vizsgálata során, TIC módban, 10 µg/L koncentrációjú mérőoldatból, APCI (+) ionizációt alkalmazva, a 30. ábrán látható kromatogramot kaptam. A kromatogram zajos alapvonalából a kiértékelő szoftver segítségével emeltem ki a 328,85 m/z tömeg/töltés hányadossal rendelkező, aflatoxin M1-re jellemző molekulaion csúcsot. A módszer előnye, hogy ilyen kis koncentrációnál és jel/zaj aránynál is megkülönböztethető a molekula-csúcsjel a zajtól.



30. ábra: Aflatoxin M_1 molekula kromatogramja és tömegspektruma 10 µg/L koncentrációjú sztenderd oldatból APCI(+) ionizáció hatására. A bal felső kromatogram az elemzés során full scan módban felvett TIC, az alsó kromatogram az aflatoxin M1 molekula 328.85 m/z tömeg/töltés hányadosú fragmens intenzitását mutatja 10 szeres erősítés mellett.

Az aflatoxinok kimutatására kidolgozott és optimalizált mérési paraméterek a szabványos módszerekkel összehasonlítva a felhasznált eluens összetételét figyelembe véve más paraméterekben nem egyezik meg. Különbség mutatkozik még a szabvány módszer és a kidolgozott módszer között a különböző aflatoxinok külön-külön történő kimutatásában is,

illetve a kimutatási határokban is. A vizsgált aflatoxin M1 esetében a meghatározás alsó határa 0,05 µg/kg, míg a szabványos vizsgálati módszer esetében 1,0 µg/kg volt az érték, amely mintegy hússzoros meghatározási alsó határának növekedését jelenti. A kidolgozott módszerem a kimutatás alsó határában a 0,1 µg/kg-os értékről 0,00254 µg/kg értékre történő javulást mutatott.

Az aflatoxin M1 kimutatása a szabványos módszerben nem szerepelt. A kidolgozott módszerben ennek a toxinnak a kimutatása a felhasznált eluensben és paraméterekben eltér a többi aflatoxintól. Az aflatoxin M1 meghatározásának alsó határa szintén 0,05 µg/kg, kimutatásának alsó határa 0,000636 µg/kg volt. A kalibrációs egyenes pontjainak konfidencia intevalluma RSD=6-10% közötti eltérést mutatott.

A kimutatási határ és a mérés alsó határának számításánál az oldatkészítésre használt acetonitrilt 20°C hőmérsékletre megadott sűrűségét figyelembe vettem a mértékegységek konvertálása során.

7.3.2 Az ochratoxin-A optimalizált kimutatási módszere

Az azonosításhoz és a kalibrációhoz a következő ochratoxin-A-ból származó fragmenseket használtam fel: 405,9 m/z, 403,9 m/z, 385,95 m/z, 837,9 m/z, 300,95 m/z, 297,95 m/z, 256,9 m/z (Melléklet).

Az ochratoxin-A mérőoldatok készítésénél acetonitrilt használtam oldószerként.

Az ochratoxin-A módszerének a fejlesztése során a következő mérőooldat koncentrációkat használtam fel (9. táblázat):

9. táblázat: Ochratoxin-A mérőoldat koncentrációi acetonitriles oldatban

Ochratoxin-A mérőoldatok koncentrációi								
0,01µg/L	0,05 µg/L	0,1 µg/L	0,2 µg/L	1 µg/L	10 µg/L	25 µg/L	50 µg/L	75 µg/L

7.3.2.1 Az ochratoxin analízisre kidolgozott saját módszer mérési paraméterei:

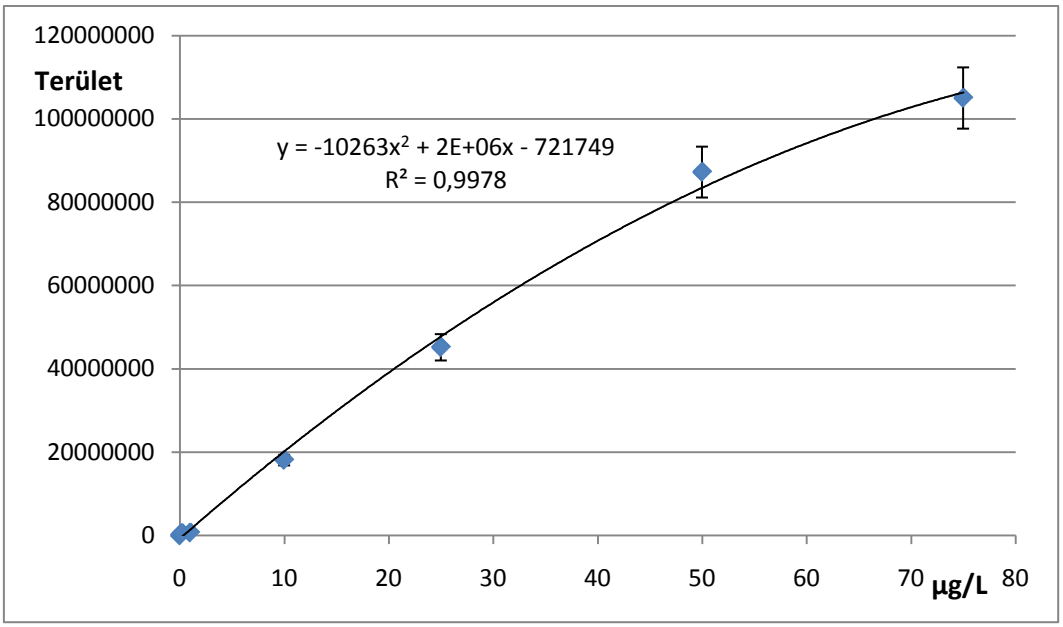
Az OA kimutatási módszerének optimalizálása során a készülék beállításainak finomításához először egy nagyobb koncentrációjú OA mérőoldatot használtam (20 mg/L), amely esetében megállapítottam a toxin tömegspektrumából a fragmenseit. A készülék beállításának finomításához a mérőoldat OTA sorból az 1 µg/L oldatot használtam.

Eluens: acetonitril:víz:jégecet 99:99:2 v/v arányú elegye
Eluens térfogatáram: 0,4 mL/perc
Kolonna: Pinnacle DB C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)
Kolonna tér hőmérséklete: 40 °C
Illesztőegység hőmérséklet: 300 °C
Ionizációs mód: ESI (+)
CDL hőmérséklet: 250 °C
Fűtőblokk hőmérséklet: 200 °C
Porlasztó gáztérfogatáram: 1 L/perc
Szárító gáz térfogatáram: 5 L/perc
Detektor feszültség: 1500 V
Felbontás: 0,5 sec
Pásztázás sebessége: 2000 amu/sec
Tömegtartomány: 50-800 full scan

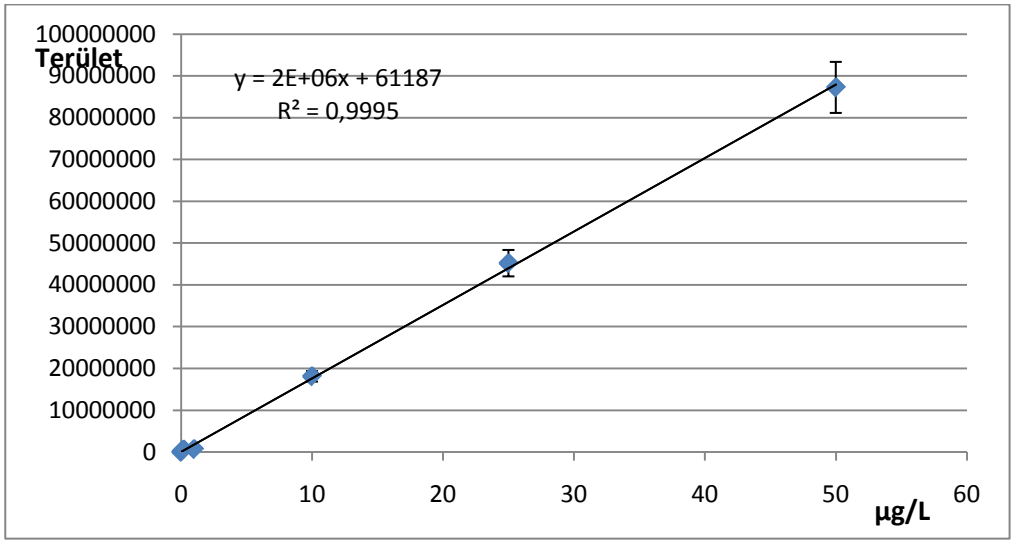
Detektálási időablak 0-25 perc

Injektált mintatérfogat: 10 µL

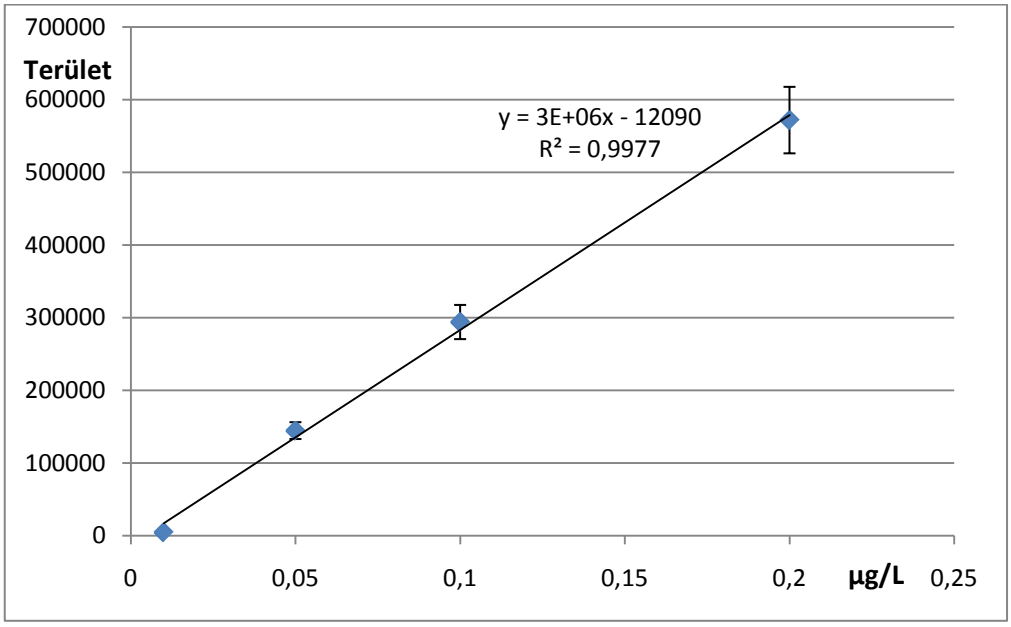
Ismétlésszám: 3



31. ábra: Ochratoxin-A kalibrációs egyenese az adott mérési paraméterek mellett 0,01-75 µg/L koncentráció tartományban ESI (+) ionizációban felvéve



32. ábra: Ochratoxin-A sztenderd oldatok kalibrációs pontjai a 0,01-50 µg/L koncentráció tartományban ESI (+) ionizációban felvéve



33. ábra: Ochratoxin-A mérőoldatok kalibrációs pontjai a 0,01-0,2 µg/L koncentráció tartományban ESI(+) ionizációban felvéve

Az ochratoxin-A mikotoxin mérőoldatokból felvett kalibrációs egyeneseit elemezve megállapítható, hogy a kalibrációs oldatsor teljes koncentráció tartományában a kalibrációs függvény nem lineáris. A híg oldatok 0,01-50 µg/L koncentráció tartományában azonban az adott mérési paraméterek mellett lineárisnak tekinthető a koncentráció-csúcsterület függvénykapcsolat, amely tartományban az egyenes determinációs együtthatója R^2=0,9995. A kalibrációs pontok konfidencia intervalluma RSD=4-10% eltétésen belül található.

Mivel a kalibrációs oldatsor ebben az esetben nagy koncentráció tartományt ölel át, azért a 0,01 µg/L-0,2 µg/L tartományban külön ábrázolva a kalibrációs egyenest, megállapítható, hogy a kapott pontok egyenesre illeszkednek, valamint ebben a tartományban a determinációs együttható értéke R^2=0,9977.

Az optimalizált módszer az eredeti módszerhez viszonyítva az eluens összetételben hasonlít, a kimutatási határa (LOD) 0,00127 µg/kg a szabvány módszer 0,2 µg/kg határával szemben, mag a meghatározás alsó határa (LOQ) 0,01 µg/kg a szabvány 1 µg/kg értékével szemben.

A II. Melléklet tartalmazza az ochratoxin-a mérőoldat 100 ng/L koncentrációjú oldatából ESI(+) ionizációs módban készített tömegspektrumot, amelyen a fragmensek is látszanak. Az ochratoxin-A molekula tömegspektrumában a 403,8 g/mol molekulatömeghez tartozó ESI (+) módban felvett tömegspektrumokban az $(M+H)^+$ ionizációnak megfelelően a 404,8 és 405,9

m/z tömeg/töltés hányadosú ionok is megjelennek, de a bázis csúcs a molekula 403,9 m/z tömeg/töltés hányadosú fragmense.

7.3.3 A deoxynivalenol kimutatására kidolgozott saját módszer ismertetése

A deoxynivalenol kimutatásának optimalizálásához A Fluka cég által elkészített deoxynivalenol mérőoldatot (100 µg/mL) használtam. Az acetonitrillel megfelelő koncentrációjúra hígított mérőoldat mintákat a felhasználásig -5°C hőmérsékleten tároltam.
Az azonosításhoz és a kalibrációhoz a következő tömeg/töltés arányú, a deoxynivalenolból származó fragmenseket használtam fel: 294,95 m/z, 265,05 m/z, 247,05 m/z, 203,85 m/z (lásd II. Melléklet).
A deoxynivalenol toxin kimutatására felhasznált mérőoldatok koncentrációit a 10. táblázat tartalmazza.

10. táblázat: Deoxynivalenol mérőoldatok koncentrációi acetonitril oldatban

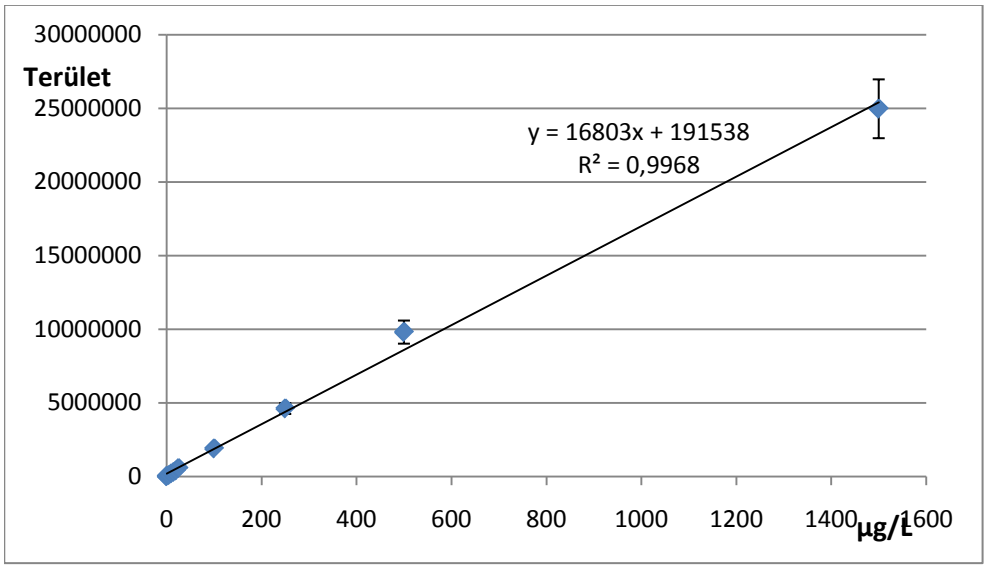
Deoxynivalenol mérőoldatok koncentrációi										
0,05 µg/L	0,5 µg/L	5 µg/L	10 µg/L	15 µg/L	20 µg/L	25 µg/L	100 µg/L	250 µg/L	500 µg/L	1500 µg/L

7.3.3.1 A deoxynivalenol analízisre kidolgozott saját módszer optimalizált mérési paraméterei

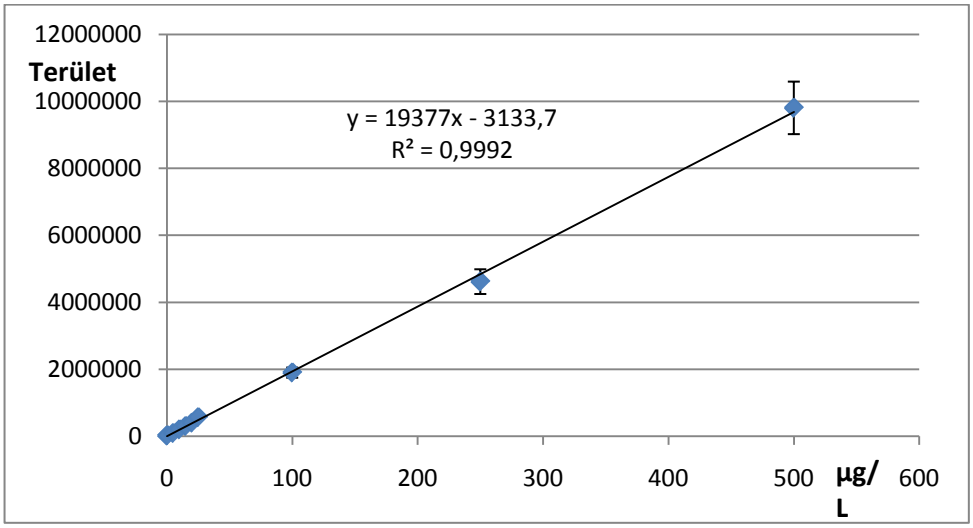
Eluens: acetonitril:víz 30:70 (v/v) arányú elegye
Eluens térfogatáram: 1mL/perc
Kolonna: Pinnacle DB C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)
Kolonnatér hőmérséklete: 40 °C
Ionizációs mód: ESI (-)
CDL hőmérséklet: 200 °C
Illesztőegység: 370 °C
Fűtőblokk hőmérséklet: 250 °C
Porlasztó gáz térfogatáram: 1,5 L/perc
Szárító gáz térfogatáram: 5 L/perc
Detektor feszültség: 1500 V
Felbontás: 0,2 sec
Pásztázás sebessége: 2000 amu/sec
Tömegtartomány: 50-600 full scan
Detektálási időablak 0-15 perc

Injektált minta térfogat: 10 µL

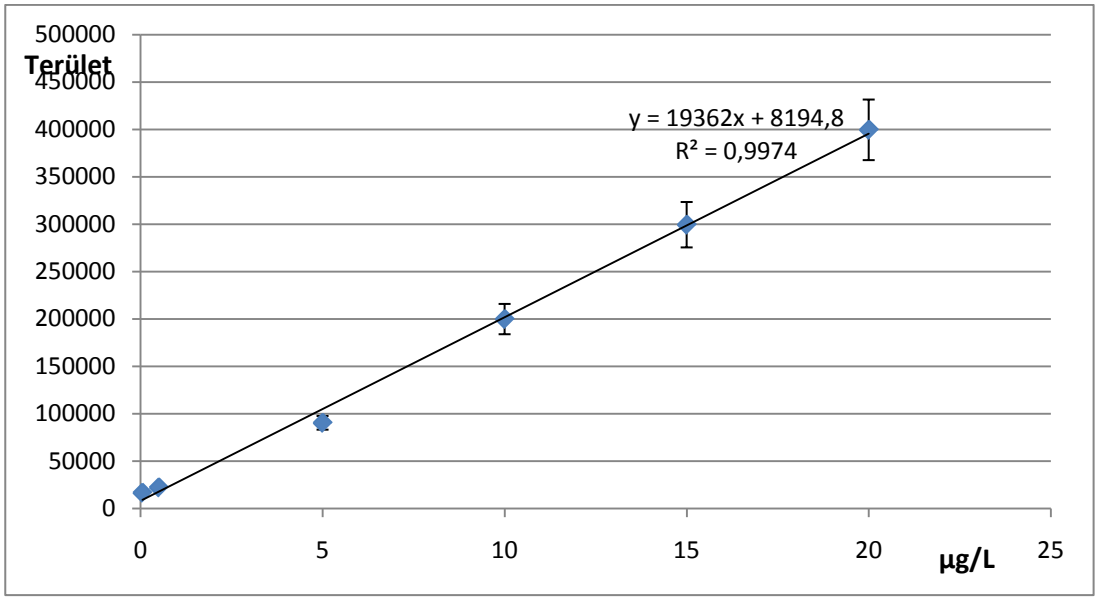
Ismétlésszám: 3



34. ábra: Deoxynivalenol toxin kalibrációs egyenese a 0,05-1500 µg/L koncentrációtartományban



83. ábra: Deoxynivalenol toxin kalibrációs egyenese a 0,05-500 µg/L koncentrációtartományban



36. ábra: Deoxynivalenol toxin kalibrációs egyenese a 0,05-20 µg/L koncentrációtartományban

A deoxynivalenol kalibrációs görbéje, azaz a kromatográfiás csúcs alatti terület-koncentráció függvény a 0,05-1500 µg/L koncentráció tartományban (34. ábra) R^2 = 0,9968 értékből kiindulva lineárisnak mondható. A kalibrációs egyenes konfidencia intervalluma 4-10% közötti eltérést mutat. A kisebb koncentrációtartományban - 0,05-500 µg/L - felvett (83. ábra) kalibrációs egyenes a determinációs együttható értéke R^2=0,9992 a linearitás kis mértékben javult a nagyobb koncentráció tartományhoz képest. A koncentrációtartományokat szűkítve 0,05-20 µg/L-es tartományban az R^2=0,9974, amely adatok alapján elmondható, hogy a kalibrációs egyenes a mérő oldatok koncentráció tartományában lineáris.

A kidolgozott módszer a szakirodalmakban talált módszerekhez képest csak az analitikai kolonna típusában hasonlít, a többi paraméter az optimalizálás során változtatásra került a szakirodalmi módszerekhez képest a készülék tulajdonságait figyelembe véve [60,151,65, 85,23,74,97,81].

Az optimalizált módszer az eredeti módszerhez viszonyítva az eluens összetételben hasonlít, a kimutatási határa (LOD) 0,00127 µg/kg a szabvány módszer 0,1 µg/kg határával szemben, mag a meghatározás alsó határa (LOQ) 0,05 µg/kg a szabvány 0,5 µg/kg értékével szemben.

7.3.4 A nivalenol kimutatására kidolgozott saját módszer ismertetése

A nivalenol kimutatásának optimalizálásához nivalenol törzsoldatot, 100 µg/mL koncentrációjú nivalenolt használtam. Az acetonitrillel megfelelő koncentrációjúra hígított mérőoldatokat a felhasználásig -5°C hőmérsékleten tároltam.

Az azonosításhoz és a kalibrációhoz a következő tömeg/töltés arányú, a nivalenolból származó fragmenseket használtam fel: 312,05 m/z, 294,95 m/z, 283,00 m/z, 264,90 m/z, 204,95 m/z (lásd Melléklet).

A nivalenol toxin kimutatására felhasznált mérő oldatok koncentrációit a 11. táblázat tartalmazza.

11. táblázat: Nivalenol mérőoldatok koncentrációi acetonitrilben oldva

Nivalenol mérőoldatok koncentrációi									
0,01 µg/L	0,1 µg/L	1 µg/L	2,5 µg/L	5 µg/L	10 µg/L	25 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	150 µg/L

7.3.4.1 A nivalenol analízisére kidolgozott saját HPLC módszer optimalizált mérési paraméterei

Eluens: ionmentes víz: acetonitril:metanol 75:20:5 v/v arányú elegye

Eluens térfogat-áram: 1mL/perc

Kolonna: Pinnacle DB C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)

Kolonnatér hőmérséklete: 40 °C

Ionizációs mód: APCI (+)

CDL hőmérséklet: 300 °C

Illesztőegység: 400 °C

Fűtőblokk hőmérséklet: 250 °C

Porlasztó gáz térfogat-áram: 2 L/perc

Szárító gáz térfogat-áram: 5 L/perc

Detektor feszültség: 1500 V

Felbontás: 0,2 sec

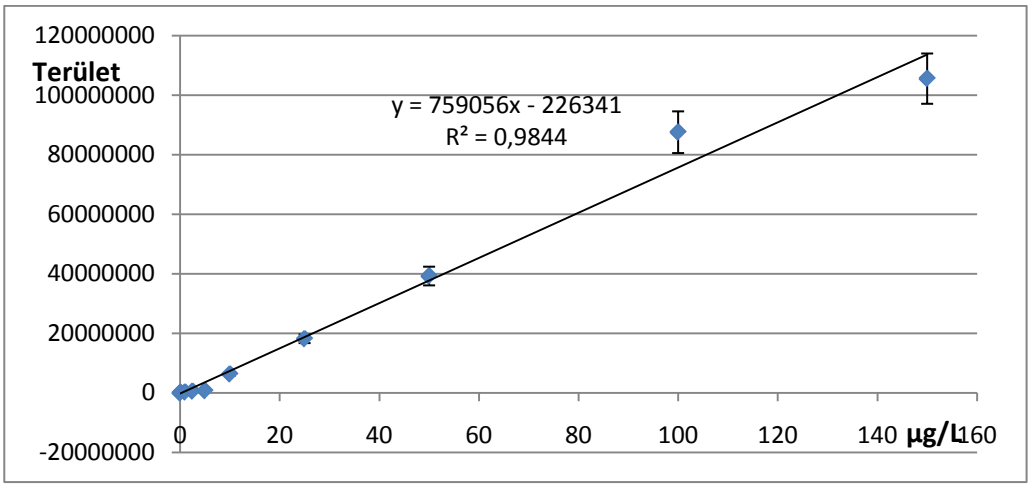
Pásztázás sebessége: 4000 amu/sec

Tömegtartomány: 100-800 full lcan

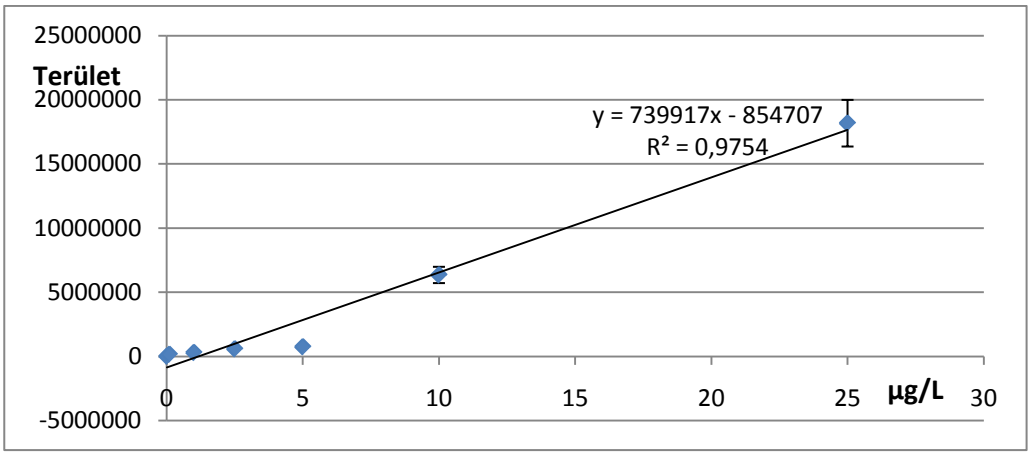
Detektálási időablak 0-25 perc

Injektált minta térfogat: 10 µL

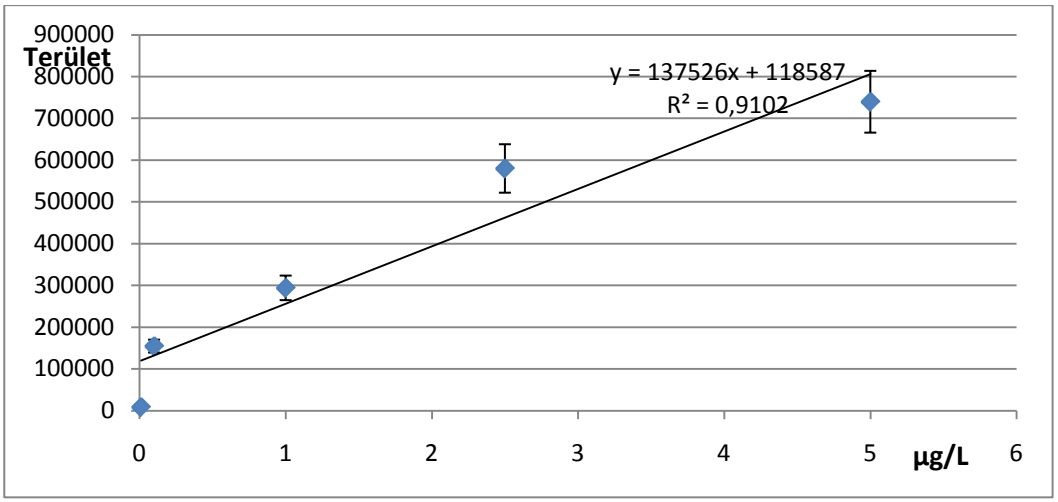
Ismétlésszám: 3



38. ábra: Nivalenol kalibrációs egyenese APCI(+) módban a 0,01-150 µg/L koncentráció tartományban

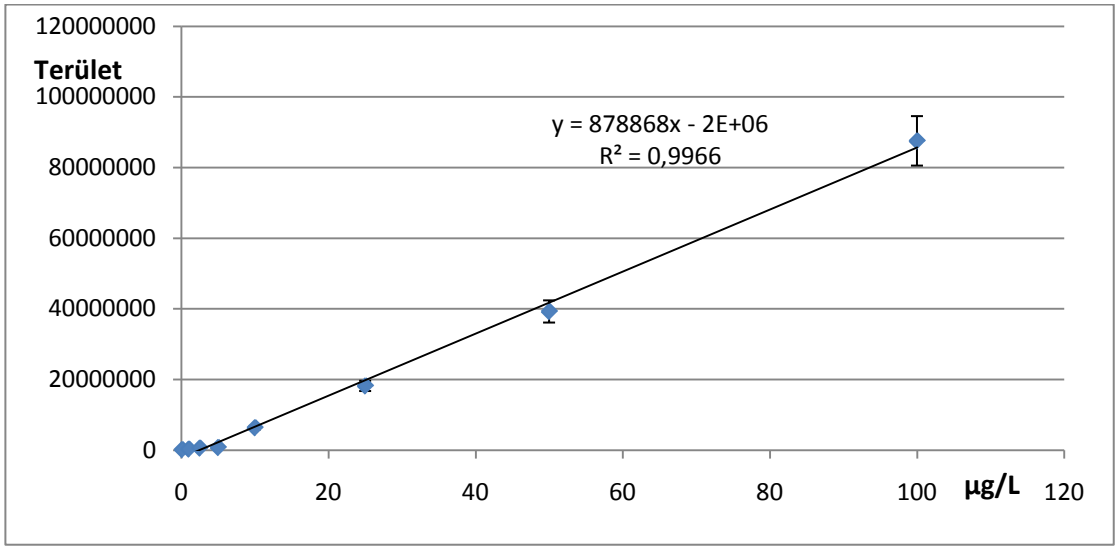


39. ábra: Nivalenol kalibrációs egyenese APCI (+) módban a 0,01-25 µg/L koncentráció tartományban



40. ábra: Nivalenol kalibrációs egyenese APCI (+) módban a 0,01-5 µg/L koncentráció tartományban

A nivalenol kalibráció görbéjéről a 0,01 és 150 µg/L koncentráció tartományban megállapítható, hogy a mérési pontok nem esnek egy egyenesre, amely a determinációs együttható R^2= 0,9844 értékéből is látszik (38. ábra). A kalibrációs egyenes pontjai RSD= 4 - 10% közötti konfidencia intervallumba estek. A 39. ábrán (R^2=0,9754) és 40. ábrán (R^2=0,9102) látható kalibrációs görbék a nivalenol koncentráció 0,01-25 µg/L és 0,01-5 µg/L tartományba esnek, és megállapítható, hogy a 0,01 µg/L-es és 5 µg/L koncentrációjú mérőoldatok csúcs alatti terület-értékei nem illeszkednek a kalibrációs egyenesekre. A 0,01 µg/L koncentrációjú mérő oldat esetében valószínűsíthető, hogy a készülék kimutatási határa közelében lehet a koncentráció, ezért a detektor nem ad megfelelő jelet erre a koncentráció értékre. Az 5 µg/L –es koncentrációjú mérőoldat, illetve a mérőoldatsort újra elkészítve hasonló kalibrációs egyenest kaptam. A kalibrációs egyenes pontjai közül az egyenesre nem illeszkedő 0,01 µg/L és a 150 µg/L koncentrációhoz tartozó mérési pontpárokat kivéve a 41. ábrán látható egyenest kapjuk, amely a mérési tartomány lineáris ágát jelzi R^2=0,9966 értékű determinációs együtthatóval.



41. ábra: A nivalenol kalibrációs egyenese APCI (+) módban 0,1-100 µg/L koncentráció tartományban

A nivalenol tömegspektrumában (II. Melléklet 42.ábra) kicsi intenzitással megjelenő molekulaion a (312 m/z) a molekula jelentős fragmentálódását jelzi APCI (+) ionizáció és az adott mérési paraméterek mellett. Jellemző ionként jelenik meg még a 283 m/z tömeg/töltés arányú ion, amely egy CH_2-O csoport leszakadását jelzi a molekula fragmentációja során.

Az optimalizált módszer az eredeti módszerhez viszonyítva az eluens összetételben hasonlít, a kimutatási határa (LOD) 0,00636 µg/kg a szabvány módszer 0,5 µg/kg határával szemben, mag a meghatározás alsó határa (LOQ) 0,1 µg/kg a szabvány 0,5 µg/kg értékével szemben.

7.3.5 A zearalenon kimutatására kidolgozott saját módszer ismertetése

A zearalenon kimutatásának optimalizálásához zearalenon sztenderdet (termékszám:32939) használtam. Az acetonitrillel megfelelő koncentrációjúra hígított mérőoldat mintákat a felhasználásig -5°C hőmérsékleten tároltam.

Az azonosításhoz és a kalibrációhoz a következő tömeg/töltés arányú, a zearalenonból származó fragmenseket használtam fel: 319,00 m/z, 300,95 m/z, 282,95 m/z, 275,00 m/z, 257,00 m/z (lásd II.Melléklet).

A zearalenon kalibrációjához felhasznált mérő oldatok koncentrációit a 12. táblázat tartalmazza.

12. táblázat: Zearalenon mérőoldatok koncentrációi acetonitriles oldatban

Zearalenon mérőoldatok koncentrációi							
0,05 µg/L	0,5 µg/L	5 µg/L	10 µg/L	25 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	250 µg/L

7.3.5.1 A zearalenon analízisre kidolgozott saját módszer optimalizált mérési paraméterei

Eluens: ionmentes víz: acetonitril 60:40 (v/v) arányú elegye

Eluens térfogatáram: 1mL/perc

Kolonna: Pinnacle DB C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)

Kolonna tér hőmérséklete: 40 °C

Ionizációs mód: APCI (+)

CDL hőmérséklet: 300 °C

Illesztőegység: 400 °C

Fűtőblokk hőmérséklet: 250 °C

Porlasztó gáz térfogatáram: 2 L/perc

Szárító gáz térfogatáram: 5 L/perc

Detektor feszültség: 1500 V

Felbontás: 0,2 sec

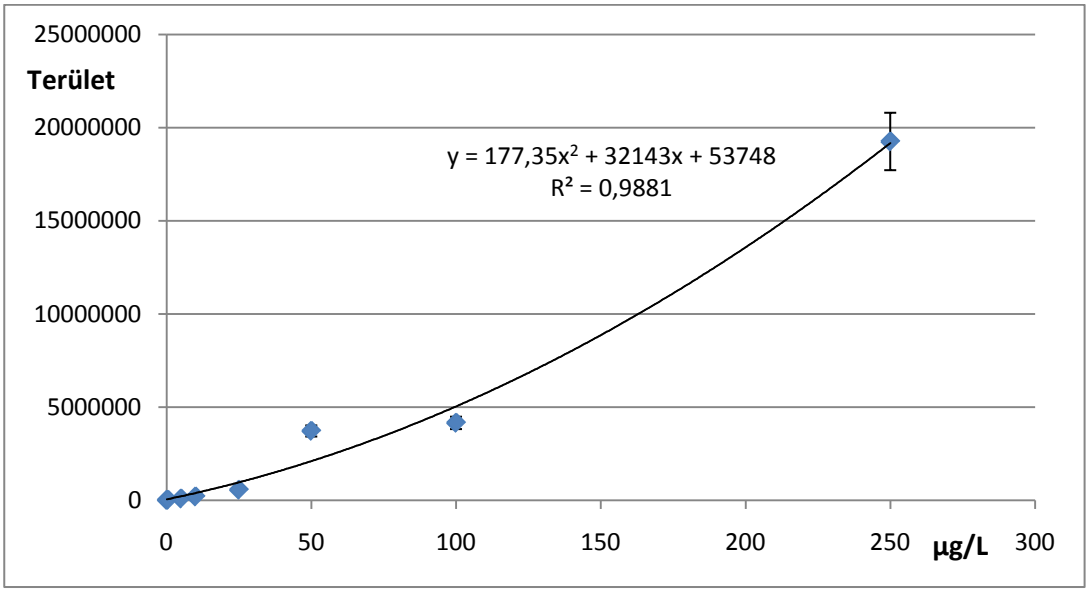
Pásztázás sebessége: 4000 amu/sec

Tömegtartomány: 100-800 full scan

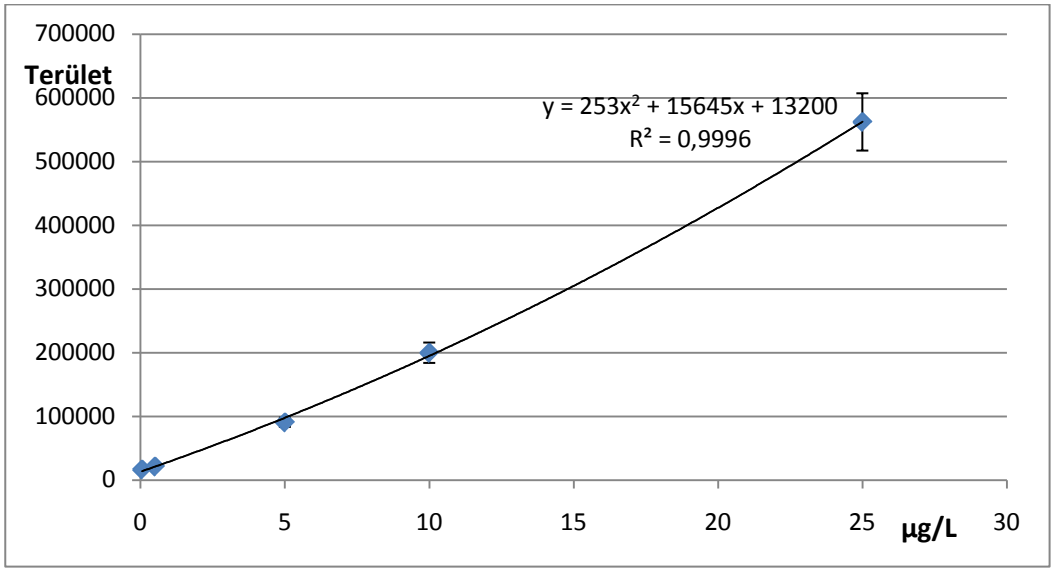
Detektálási időablak 0-25 perc

Injektált mintatérfogat: 10 µL

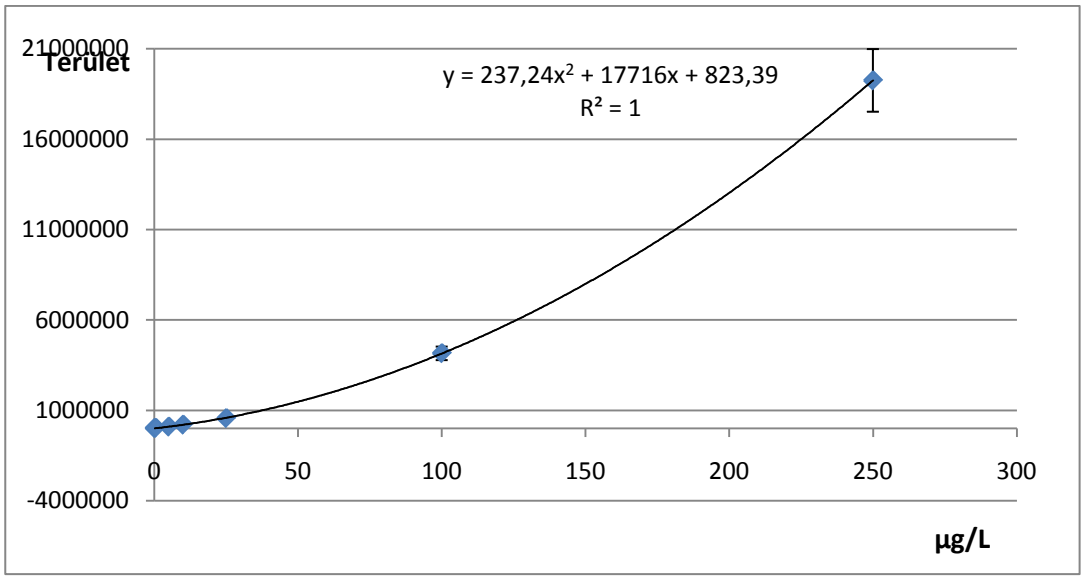
Ismétlésszám: 3



43.ábra: Zearalenon kalibrációs görbe APCI(+) ionizáció mellett a 0,05-250 µg/l koncentráció tartományban



44.ábra: Zearalenon kalibrációs görbe APCI(+) ionizáció mellett a 0,05-25 µg/l koncentráció tartományban

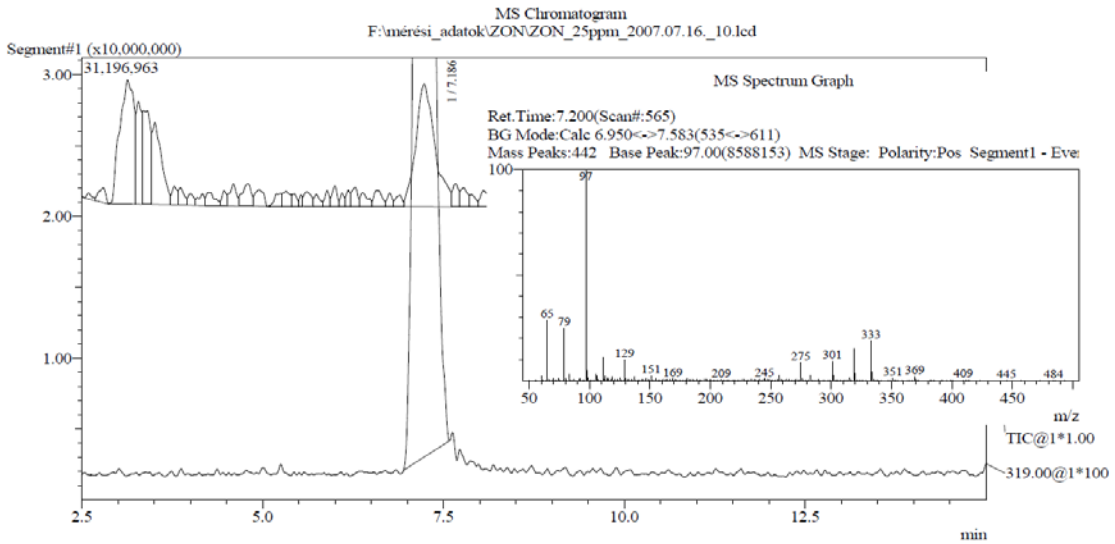


45. ábra: Zearalenon kalibrációs görbéje APCI(+) ionizáció mellett a 0,05-250 µg/L koncentráció tartományban

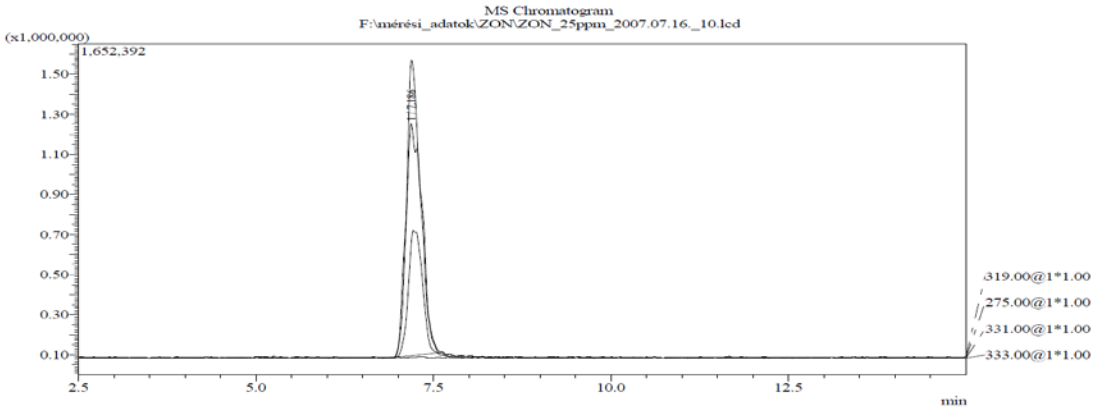
A zearalenon toxin mérőoldatok 0,05-250 µg/L koncentráció tartományáról felvett kalibrációs görbéről megállapítható, hogy a kapcsolat a csúcs alatti terület és a koncentráció között nem lineáris (43. ábra). A kapott eredmények valamilyen hibát sejtettek a mérésben, ezért a kalibrációs görbe pontjainak újramérésével próbálkoztam, amely esetében hasonló lefutású görbét kaptam. Ezek után a kalibrációs mérő oldatsor újbóli elkészítésével és lemérésével próbálkoztam, amelynek eredményeként a koncentráció-jel kapcsolat szintén hasonló lett. Ezek után megállapítható, hogy a zearalenon kalibrációs görbéjének nem lineáris a koncentráció-jel kapcsolat. A 43. ábrán látható kalibrációs egyenes R^2=0,9881 értékű determinációs együtthatójú görbéje a mérési pontok újramérése után is egyértelműen látszott, hogy az 50 µg/L koncentrációjú minta mérési pontját (45. ábra) kiemelve a kalibrációs görbe R^2=1 determinációs együtthatót adnak a pontok. A kalibrációs pont kihagyása javít a kalibrációs egyenes determinációs együtthatójának értékén, de nem szükségszerű kihagyni a pontot. A kalibrációs görbe pontjainak konfidencia intevalluma RSD=5-10% között volt megadható.

A zearalenon toxin fragmentációjára jellemző volt, hogy az eredeti molekula 318,4 g/mol tömegű molekulája a tömegspektrumon az APCI(+) ionizációnak megfelelően $(M+H)^+$ 319,00 m/z tömeg/töltés arányú ionnal jelent meg. Jellemző fragmensei voltak még a 275, 331 és 333

m/z tömeg/töltés arányú ionok, amelyből a 333 m/z töltésű valószínűen egy CH_2 csoport hozzákötődése során keletkezhetett, illetve a 275 m/z töltésű ion pedig szén és kettő oxigén kilépésével keletkezhetett.



46. ábra: Zearalenon 25 mg/l koncentrációjú sztenderd oldat TIC kromatogramja (felül), és a 319 m/z tömeg/töltés arányú fragmens kromatogramja (alul) a TIC kromatogramon belül, APCI (+) módban



47. ábra: A zearalenon 275, 319, 331 és 333 m/z tömeg/töltés arányú ionjainak intenzitása a csúcson belül.

Az optimalizált módszer a szakirodalmi módszerhez viszonyítva az eluens összetételben és a használt kolonna típusában hasonlít, a kimutatási határa (LOD) 0,00127 µg/kg az irodalmi módszer 0,1 µg/kg határával szemben, míg a meghatározás alsó határa (LOQ) 0,05 µg/kg a irodalmi módszer 0,1 µg/kg értékével szemben.

7.4 Optimalizált mikotoxin kimutatási módszerek validálási paraméterei

A 13. táblázatban összefoglaltam a mikotoxinokra általam kidolgozott optimalizált vizsgálati módszerek és a szabványos, valamint az irodalmi vizsgálati módszerek kimutatási és meghatározási határait.

13. táblázat: A mikotoxinokra vonatkozó szabványos, valamint a szakirodalomból származó és az általam kidolgozott módszerek kimutatási határértékei és meghatározási határértékei

Toxin	LOD szabvány módszer illetve szakirodalom µg/kg	LOQ szabvány illetve szakirodalom µg/kg	Szakirodalmi ionforrás	LOD saját injektált toxin mennyisége µg/kg	LOQ saját módszer µg/kg	Saját alkalmazott ionforrás
Aflatoxin B_1 [102,77]	0,1	1,0	APCI (+)	0,00254	0,05	APCI (+)
Aflatoxin B_2 [102,77]	0,1	1,0	APCI (+)	0,00127	0,05	APCI (+)
Aflatoxin G_1 [102,77]	0,1	1,0	APCI (+)	0,00636	0,05	APCI (+)
Aflatoxin G_2 [102,77]	0,1	1,0	APCI (+)	0,000254	0,05	APCI (+)
Aflatoxin M_1 [85,98]	0,1	1,0	APCI (+) /ESI(+)	0,000636	0,05	APCI (+)
Deoxynivalenol [97]	0,18	0,5	ESI(±) / APCI(±)	0,00127	0,05	ESI (-)
Ochratoxin-A	0,2	1,0	PDA	0,00127	0,01	ESI (+)
Ochartoxin-A [112]	0,02	0,06	ESI(±)	0,00127	0,01	ESI (+)
Nivalenol [97]	0,18	0,5	ESI(±) / APCI(±)	0,00636	0,01	APCI (+)
Zearalenon [43]	0,12	0,17	APCI+	0,00127	0,05	APCI (+)

A 13. táblázat oszlopait kiértékelve megállapítható, hogy a szabványos módszerekben a különböző toxinokra (aflatoxin B_1, illetve aflatoxin B_2, G_1, G_2 valamint ochratoxin-A) adott vizsgálati metódusok és készülékek mellett megadott LOD és LOQ értékeket a vizsgálatok Shimadzu 2010-EV készülékre történő optimalizálása során sikerült elérni, illetve több esetben nagyságrendileg csökkenteni. Az LOD értékek esetében általában a szabvány módszerekben maghatározott érték 1/15-1/300-ed részét sikerült kimutatnom, míg a LOQ értékeket összehasonlítva 1/10-1/100 részére sikerült leszorítani az értékeket a kidolgozott és optimalizált mérési módszerekkel.

Mind az LOD és LOQ értékek csökkentése a pontosabb toxin koncentráció meghatározást teszi lehetővé, valamint a toxin jelenlétének a biztonságosabb kimutathatóságát garantálja.

Az összehasonlító adatokból levonható az a következtetés is, hogy alkalmas a készülék a fent említett toxinok detektálására a vizsgálati paraméterek és koncentrációtartományok betartásával.

További paraméterek:

14. táblázat: Kidolgozott módszerek linearitási atrtománya, érzékenysége és precizitása

	linearitási tartomány µg/L	***illeszkedés egyenesre R^2***	***érzékenység $S_{átlag}$***	***precizitás max RSD %***	***linearitási tartomány szakirodalom µg/L***	***precizitás szakirodalmi %***
Aflatoxin B_1	0,05-200	0,9895	258722	± 5%	5-200, külső kalibráció[102-77]	9-20
Aflatoxin B_2	0,05-200	0,9904	187856	± 8 %	5-200, külső kalibráció[102-77]	9-20
Aflatoxin G_1	0,05-200	0,9892	192764	±8 %	5-200, külső kalibráció[102-77]	9-20
Aflatoxin G_2	0,05-200	0,9943	212600	±7 %	5-200, külső kalibráció[102-77]	9-20
Aflatoxin M_1	0,05-200	0,9917	176872	±7 %	5-200, külső kalibráció[102-77]	9-20
Deoxynivalenol	0,05-500	0,9992	19377	±10 %	16-1600, belső kalibráció nélkül [97],	*1,2-16,6*
Ochratoxin-A	0,01-50	0,9995	200000	±8 %	0,06-2,5, külső kalibráció [112]	n.a.
Nivalenol	0,1-100	0,9966	878868	±10 %	16-1600, belső kalibráció nélkül [97],	*1,2-16,6*
Zearalenon	0,05-250 nem lineáris	1	53681	±9 %	0,17-83, külső kalibráció[43]	1,1-7,4

15. táblázat: Mikotoxin mérőoldatok felhasználásával elvégzett kolonnateszt eredményei, ismételhetőség.

Toxin	***retenciós idő ismételhetősége PDA %***	***Csúcsterület ismételhetősége PDA RSD %***	***retenciós idő ismételhetősége MS RSD %***	***Csúcsterület ismételhetősége MS RSD %***
Aflatoxin B_1	0,83	1,2	0,38	1,2
Aflatoxin B_2	0,38	0,8	0,41	0,8
Aflatoxin G_1	0,37	1,3	0,38	1,2
Aflatoxin G_2	0,39	0,7	0,39	0,75
Aflatoxin M_1	0,38	0,5	0,4	0,55
Deoxynivalenol	0,41	0,7	0,41	0,7
Ochratoxin-A	0,34	0,5	0,38	0,5
Nivalenol	0,32	0,6	0,83	0,75
Zearalenon	0,31	0,5	0,37	0,6

7.5 Extrakciós kísérletek eredményei

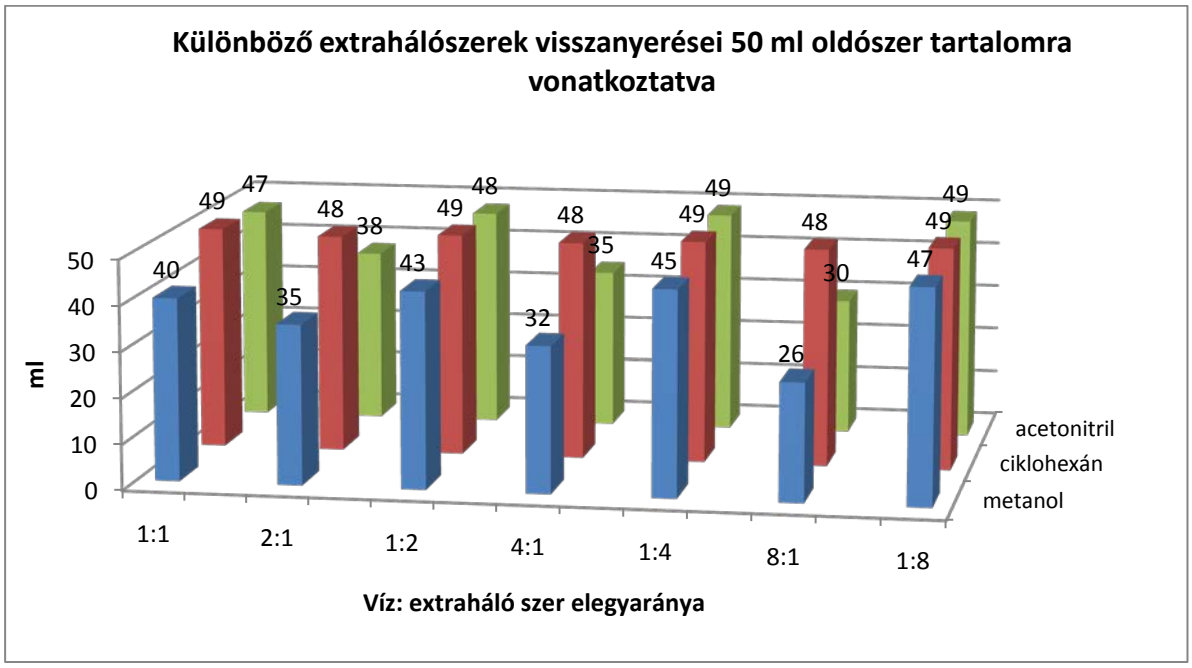
Az extrakciós kísérletek során, részben felhasználva a szabványos módszerekben megadott és a szakirodalomban [1,110,117] leírt eljárásokat (7. táblázat), újabb mikotoxin extrakciós technikát dolgoztam ki a 8 vizsgált mikotoxinra. Mennyiségüket az általam kidolgozott és a toxinokra optimalizált mérési paraméterekkel mértem.

Az extrakciós művelet elvégzésére a szilárd-folyadék (SPE), illetve a folyadék-folyadék (LLE) extrakciós technikát alkalmaztam. Az extrakciós technikák hatékonyságának növelése érdekében az új technika kidolgozása során a következő típusú extrakciós oszlopokat és technikákat használtam:

- Mycosept oszlopok (AflaTest, OchraTest, ZearaleTest, DonTest, Vicam immonoaffinitás oszlopok)
- C18-as töltetes oszlop (Resprep SPE C18 200 mg töltettel, 3 mL)
- C8 töltetes oszlop (Isolute SPE C8, 200 mg, 3 mL)
- CarboPrep aktív szén töltettel rendelkező oszlop (Resprep SPE 250 mg, 3mL)
- Folyadék-folyadék extrakciós technika.

A biológiai mátrixokból történő extrakció során kétféle halmazállapotú minta extrakciójára kell számítani: szilárd és folyadék. A szilárd halmazállapotú minták általában nem szárazak, 12 % körüli az átlagos nedvességtartalmuk. A folyadék halmazállapotú biológiai minták fő alkotórésze a víz. Az extrakció során ebből a vizes mátrixból kell eltávolítani a mikotoxint úgy, hogy az extraháló szerként használt szerves fázisba kerüljön nagy része. A szakirodalomban [1,110,117] említett extrakciós szerek közül a metil-alkoholt, ciklohexánt és acetonitrilt használtam összehasonlítás alapjául, mivel a polaritásuk különböző (Dielektromos konstans értékei $(\varepsilon)_{293,15K}$: víz:80,1 ; acetonitril: 37,5; ciklohexán:2,02), illetve a toxinok általános oldószerei. A kísérletek elején meg kellett győződnöm arról, hogy az extraháló szer mekkora részét tudom visszanyerni az extrakció végén, mivel a poláris molekulájú oldószerek (acetonitril és metanol), kivétel az apoláris ciklohexán, jól oldódnak vízben. A vizsgálatok során a belső sztenderdek beszerzése nem volt megalapozott, illetve a mintaelőkészítési technika minél olcsóbbá tétele szempontjából sem volt elfogadható. Az oldatból történő oldószer szétválasztás elősegítésére a kisózás módszerét használtam, mivel ezzel a módszerrel elősegíthető a szerves és a szervetlen fázisok szétválasztása az oldódási viszonyok megváltoztatásával. A kisózott extraháló szerek mennyiségének maximalizálása volt a célom, mivel ha túl sok extraháló szer marad a vizes fázisban, akkor az jelentősen befolyásolhatja a

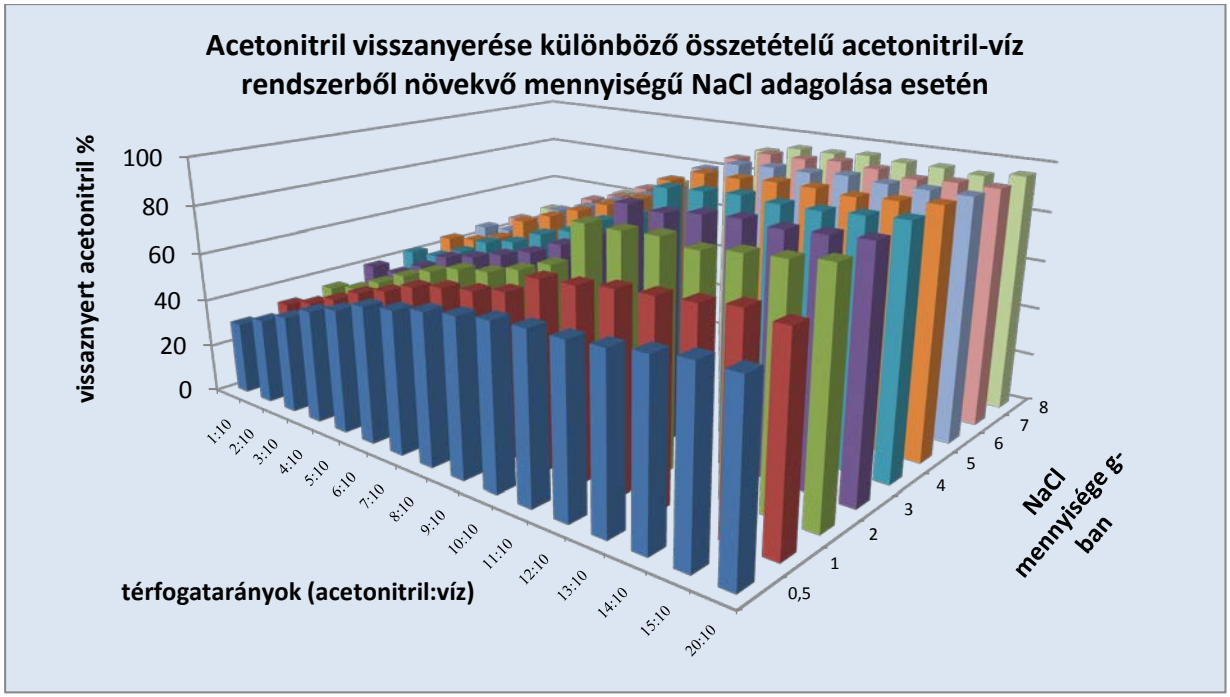
toxin oldhatóságát a vizes fázisban, és a toxin megoszlását a két fázis között. A kisózási vizsgálatok eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy az egyébként egymással elegyedő folyadékok esetében (metanol-víz, acetonitril-víz) a NaCl adagolásával a vizes fázisból kiválasztható a szerves fázis. A keletkező vizes elektrolit oldat és a szerves fázis közötti egyensúly úgy áll be, hogy a szerves fázis elkülönül az elektrolit oldattól. Az elektrolit, nem vagy csak kis mértékben oldódik acetonitrilben, illetve metanolban. (Nátrium-klorid oldhatósága metanolban 14g/1000 g metanol, míg acetonitrilre nézve 0,003 g/1000 g acetonitril [19]), a NaCl koncentrációja abban az esetben telítettnek vehető a vizes fázisban, ha marad feleslegben feloldatlan só az oldatban. Ekkor kaphatjuk a legjobb fázisok közötti szétválást. A következő 1. diagrammon láthatjuk a különböző extraháló szerek (metanol, ciklohexán, acetonitril) kisózása után visszamért térfogatait, különböző víz-szerves oldószer térfogatarányok esetében.



1. diagram: Különböző extraháló szerekkel végzett visszanyerési tesztek az extraháló szerek visszanyert mennyiségeit megjelenítve

Az 1. diagramon látható, hogy a metanol visszanyerési hányada a legkevesebb a három oldószer közül, a ciklohexánt és az acetonitrilt közel azonos mennyiségben sikerült visszanyernem. A további extrakciós kísérletekben az acetonitrilt használtam extraháló szerként, mivel az acetonitrilben a mikotoxinok nem, vagy csak kis mértékben bomlanak, illetve lépnek vele reakcióba, acetonitriles oldatukban a vizsgált toxinok hosszabb idő elteltével is stabilak maradnak [50]. Ez metanolos oldatukra nem mondható el.

Az acetonitril / minta (jelen esetben desztillált víz) térfogatarány pontos beállítására és a NaCl megfelelő mennyiségének a megállapítására a megoszlás és az acetonitril visszanyerés igazolására a következő kísérletet végeztem el. Eltérő összetétellel, 16 különböző térfogatarányú acetonitril-víz elegyet készítettem, majd 9 különböző mennyiségben (0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8 g) adagoltam az így keletkezett elegyekhez NaCl-ot, ezek után mértem az extraháló szer (acetonitril) visszanyerést.



2. diagram: Acetonitril visszanyerési aránya az acetonitril-víz rendszerből különböző elegyösszetétel és növekvő mennyiségű NaCl adagolása esetében

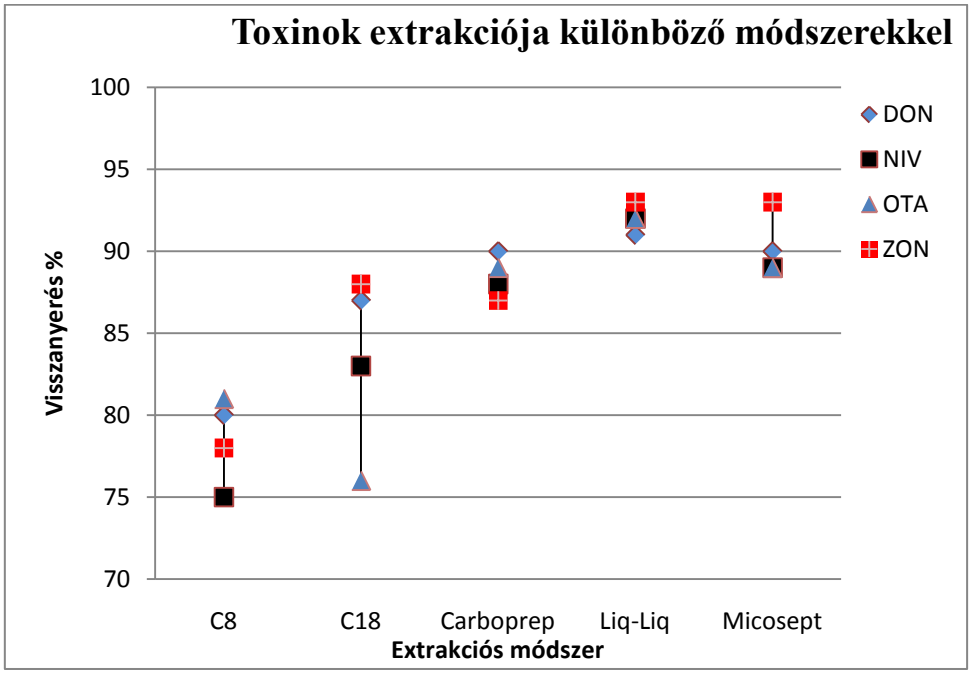
A kísérletekből kiderült, hogy 1:1 arányú acetonitril/minta arány esetén (50:50 mL) és 5 g NaCl adagolása mellett kaptam a legnagyobb visszanyerési arányt az extraháló szerből. Tapasztalataim jól egyeztek Li és munkatársai (1995) [69], valamint Kapp-Soo (1977) [76] megfigyeléseivel, akik az acetonitril-víz-só rendszerek folyadék-folyadék egyensúlyát, a komponensek fázisok közötti megoszlását és az acetonitril visszanyerési lehetőségét tanulmányozták.

Ezek után az extrakciót mikotoxinokat is tartalmazó oldatokkal végeztem el. Különböző, a vizsgált 4 toxinnal (DON, NIV, ZON, OTA) szennyezett folyadék mintákból extraháltam a toxinokat az optimálisnak talált minta/acetonitril aránnyal (1:1), illetve 2:1 és 1:2 arányú minta/acetonitril mennyiséggel 5 g NaCl adagolása mellett. Ezekből a vizsgálatokból azt az

eredményt kaptam, hogy a legjobb visszanyerést toxinokra nézve ismét az 1:1 térfogatarány (50:50 mL) mellett 5 g NaCl-ot adagolása mellett érhető el.

Az extrakciós technika teljessé tétele érdekében a szerves fázis és vizes elektrolit elválasztásának elősegítése végett a szeparálódást centrifugálással segítettem elő. A centrifugálásnál 10.000 1/min fordulatszámot alkalmaztam, 4 °C hőmérsékleten. A toxin mennyiségének meghatározása előtt az acetonitril oldatot rotációs vákuumbepárló berendezéssel (t=25 °C) bepároltam, majd a toxint acetonitrilben visszaoldottam.

Az extrakciós módszer alkalmazhatóságának, a különböző SPE oszlopok, valamint a saját folyadék-folyadék extrakciós technika hatékonyságának és a toxin visszanyerés hatásfokának megállapítására, az előzőekben megállapított acetonitril/minta arány betartása mellett elvégeztem a különböző toxinok extrakcióját az általam elkészített, meghatározott toxin mennyiséget (10 ng toxint, vagyis 1 mL 10 µg/L koncentrációjú toxinoldatot) tartalmazó mintákból. Az SPE extrakciós oszlopokat az extrakció előtt kondicionáltam. Az immunoaffinitás oszlopokat a felhasználói útmutatóban javasolt paraméterek alapján kondicionáltam, a többi SPE oszlopot 3 mL desztillált víz, 3 mL acetonitril, majd 3 mL desztillált víz felhasználásával kondicionáltam, majd N_2 áram segítségével szárítottam. A 3-3 párhuzamos extrakciós mérés eredményeinek összefoglalását, az egyes toxinok extrakcióval történt visszanyerési hatásfokát a következő táblázatban láthatjuk.



3. diagram: Különböző toxinok extrakciói során mért visszanyerési arányok különböző extrakciós fázisokon

16. táblázat: Különböző toxinok extrakciói során mért visszanyerési arányok különböző extrakciós fázisokon az eredeti mennyiség százalékában kifejezve

	DON	NIV	OTA	ZON
C8	80 % ±7%	75% ±11%	81% ±8%	78%±10%
C18	87% ±6%	83% ±8%	76% ±6%	88%±7%
Carboprep	90% ±10%	88% ±5%	89%±8%	87%±8%
Liq-Liq	91% ±5%	92% ±6%	92%±3%	93%±5%
MicoSep	90% ±4%	89% ±3%	89%±5%	93%±5%

A négy különböző toxinra vizsgálva a visszanyeréseket, megállapítottam, hogy a C8-as illetve C18-as fázissal rendelkező oszlopokon a visszanyerés hatásfoka nem volt megfelelő számomra, valamint igen nagy volt a mérések szórása is (3. diagram). A CarboPrep oszlop, amely aktív szén töltettel rendelkezett, 90 % körüli toxin visszanyerést biztosított, ami az aktív szén tulajdonságainak ismeretében érthető is. Az immunaffinitás oszlop a toxinok 90-95 %-át kötötte meg, valamint az immunaffinitás oszlophoz hasonlóan a folyadék-folyadék extrakció (1:1 arányú acetonitriles extrakció 5 g NaCl adagolása mellett) is hasonlóan jó visszanyerést biztosított.

Aflatoxin B_1, B_2, G_1, G_2 esetében is elvégeztem az extrakciós kísérletet, és a következő visszanyerési hatásfok értékeket kaptam 2 ng aflatoxin adagolása esetében.

17. táblázat: Aflatoxinok visszanyerhetősége különböző extrakciós technikákkal

Extrakció módszer	Toxinok			
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
C8	71 % ±7%	75% ±11%	82% ±9%	88%±9%
C18	65% ±12%	85% ±8%	82% ±8%	87%±8%
Carboprep	87% ±11%	88% ±7%	89%±8%	87%±8%
Liq-Liq	92% ±5%	90% ±5%	92%±6%	90%±5%
MicoSep	92% ±4%	89% ±3%	93%±5%	91%±5%

Az aflatoxinok extrakciós kísérleti adatai alapján megállapítható, hogy a legjobb visszanyerési eredményeket a MicoSep speciális immunoaffinitás oszlopok adták, de az általam kidolgozott folyadék-folyadék (Liq-Liq) extrakciós technika is hasonló eredményt mutatott.

7.5.1 A kidolgozott extrakciós eljárás leírása és fontosabb lépései

Tegyünk a folyadék mintához azonos térfogatú acetonitrilt, majd jól rázzuk össze a mintával. Javasolt térfogat 50.0-50.0 mL (Ha szilárd mintát használunk kiindulásként, akkor adott mennyiségű (5-10,00 g) reprezentatív szilárd mintát tegyünk 50.0 mL mennyiségű acetonitrilbe.)

Adjunk a felrázott mintához körülbelül 5 g NaCl-ot, majd alaposan rázzuk össze a rendszert. Az extrakció teljessé tétele szempontjából rázassuk 15 percig lezárt edényben a rendszert. A rázatás után tegyük centrifugába az elegyet, majd centrifugáljuk 4 °C hőmérsékleten 10.000 1/min fordulatszámon 5 percig. A centrifugálás után a felső fázist válasszuk el az alsó fázistól. A felső fázis az acetonitriles fázis lesz, amelyet szárítsunk be N_2 áram alatt vagy rotációs vákuumbepárló segítségével, majd oldjuk vissza a maradékot 500 µL tiszta acetonitrilben.

A rotációs vákuumbepárló javasolt lombiktérfogata 100 mL. A teljes visszaoldás érdekében hagyjuk 1 percig az acetonitrilt a lezárt lombikba, közben rázogassuk meg néhányszor a lombik falára felkenődött toxin beoldása érdekében.

A kidolgozott minta előkészítési eljárás összehasonlítása a szabványos illetve szakirodalmi módszerekkel.

A kidolgozott extrakciós eljárás a szakirodalmi illetve szabványos kimutatási módszerek extrakciós eljárásaival összehasonlítva, a kidolgozott módszer minta előkészítési lépéseinek számában csökkenés tapasztalható. A mintaelőkészítési lépésszám csökkenés esetleges hibaforrás kiküszöbölést jelent. A könnyen beszerezhető és az extrakció után könnyen eltávolítható oldószer használatával anyag és költséghatékonyabb a minta előkészítés a SPE illetve IA minta előkészítő oszlopok árait is figyelembe véve. Az extrakciónál alkalmazott acetonitrilben a mikotoxinok nem bomlanak, míg a szabványos illetve szakirodalmi módszerekben használ metanolban jelentős degradációt szenvedhetnek a toxinok [50].

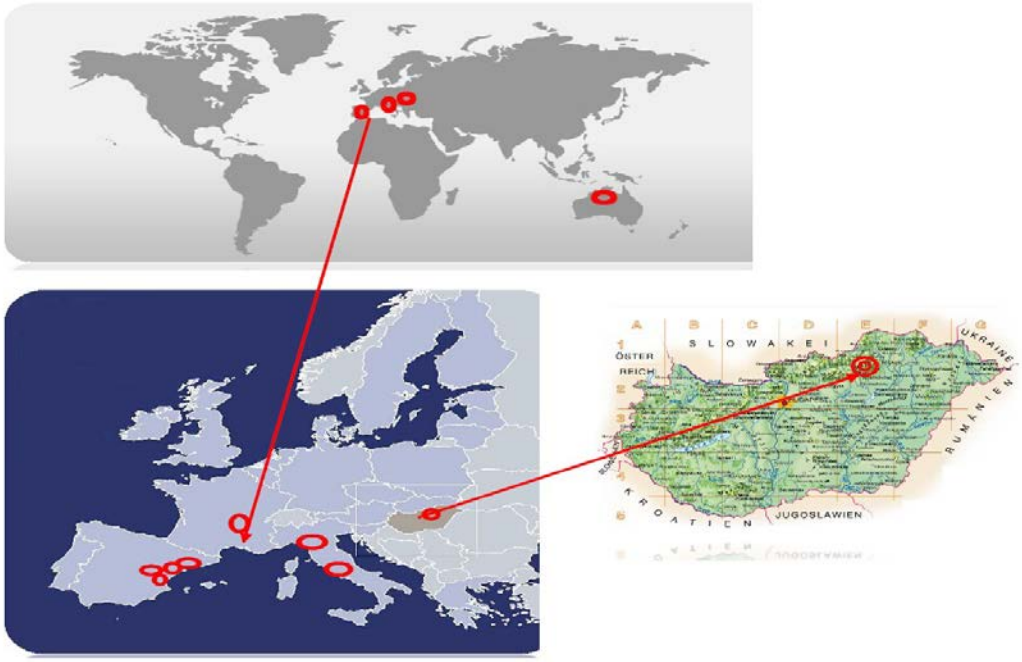
7.6 Élelmiszeranalitikai vizsgálatok

7.6.1 Ochratoxin-A tartalom vizsgálata borokban: egyes magyarországi, a mediterrán országokból, illetve a világ néhány pontjáról származó borok OTA tartalmának összehasonlítása

A kutatásaim során magyarországi és mediterrán országokból származó borok saját vizsgálati módszeremmel meghatározott OTA tartalmát hasonlítottam össze. A vizsgálat időszerűségét az elmúlt években (2003-2007) Magyarországon is jelentősebben megváltozott éghajlati körülmények inspirálták. Az említett időszakban az éghajlat Magyarországon melegedett, a csapadék mennyiségének változása és a napsütéses órák számának növekedése elősegíthette a gombák megjelenését a szőlő bogyón.

Az általam vizsgált borminták köre a mediterrán éghajlaton, illetve a Magyarországon termett vörös borszőlőből készített borokra korlátozódott. A minták beszerzéséül a legkézenfekvőbb utat választottam, a kereskedelmi láncokban kapható borokat vásároltam. Ezek a minták jól reprezentálják az adott területen előállított borokat, mivel nagy tételben és megközelítőleg állandó minőségben készítik őket. A borok árkategória szerint a közép kategóriában estek, így minőségi boroknak számítottak (1000-3000 Ft/üveg kategória). Ezeket a borokat adják el a legnagyobb tételben, vagyis ezek jutnak el a legtöbb emberhez. A rosszabb minőségű, olcsóbb borokat nem vontam be a vizsgálatokba, mert gyártástechnológiájuk sok esetben kétséges. Termőhely szerint a magyarországi borokban nem tettem különbséget, viszont a mediterrán borok közül a Spanyolországból, Olaszországból származó borokat kerestem elsősorban, mert ezekre az országokra jellemző a tenger jelenléte miatt a meleg, párás mediterrán éghajlat.

A vizsgálati borminták magyarországi, illetve olaszországi hipermarketekből, borászatokból származtak. A vizsgálati minták beszerzése vásárlás útján történt. A borok származási helyét Magyarország, Európa és a Föld kontinens-térképén a 48. ábra illusztrálja.



48ábra: Borok származási helyei borvidékekre lebontva

18. táblázat: Ochartoxin-A vizsgálatra felhasznált borminták

Minta száma	Minta neve, évjárat	Minta száma	Minta neve, évjárat
1	Vino tinto Valencia Espana 2006	**15**	Egri Bikavér, Thummerer, 2002
2	Crianza la Mancha Alambrada dry 1999 Espana	**16**	Egri Bikavér, Egervin, 2005
3	Tio de la Bota clásico Espana tinto	**17**	Egri Bikavér, Pók Tamás, 2004
4	Sangria Espana	**18**	Egri Kékfrankos, Egervin, 2006
5	Tio de la Bota clásico Espana blanco	**19**	Egri Kékfrankos, Egervin, 2007
6	Borelli Montepulciano d'abruzzo 2005 Italia	**20**	Egri Cabernet Sauvignon, 2005
7	Zuru agrican selection 2006	**21**	Zweigelt, Egervin, 2003
8	Palacio el conde reserva 2003 Valencia	**22**	Egri Bikavér, Egri Korona Borház, 2006
9	Tempanillo 2006 Espana	**23**	Egri Kékfrankos, Varga Pincészet, 2005
10	Vina alambrada la Mancha Espana white wine	**24**	Kékfrankos, Ostoros-Novaj Bor Rt, 2005
11	Vina alambrada la Mancha Espana red wine	**25**	Zweigelt, Ostoros-Novaj Bor Rt, 2006
12	Cangaroo Island Cabernet Sauvignon	**26**	Cabernet Sauvignon, Ostoros-Novaj Bor Rt, 2005
13	Beaujoalis Primeur 2007	**27**	Egri Leányka, Egervin, 2006
14	Vino frizzante Lambrusco 2006	**28**	Egri Leányka, Egri Korona Borház, 2005

7.6.1.1 Analitikai módszer

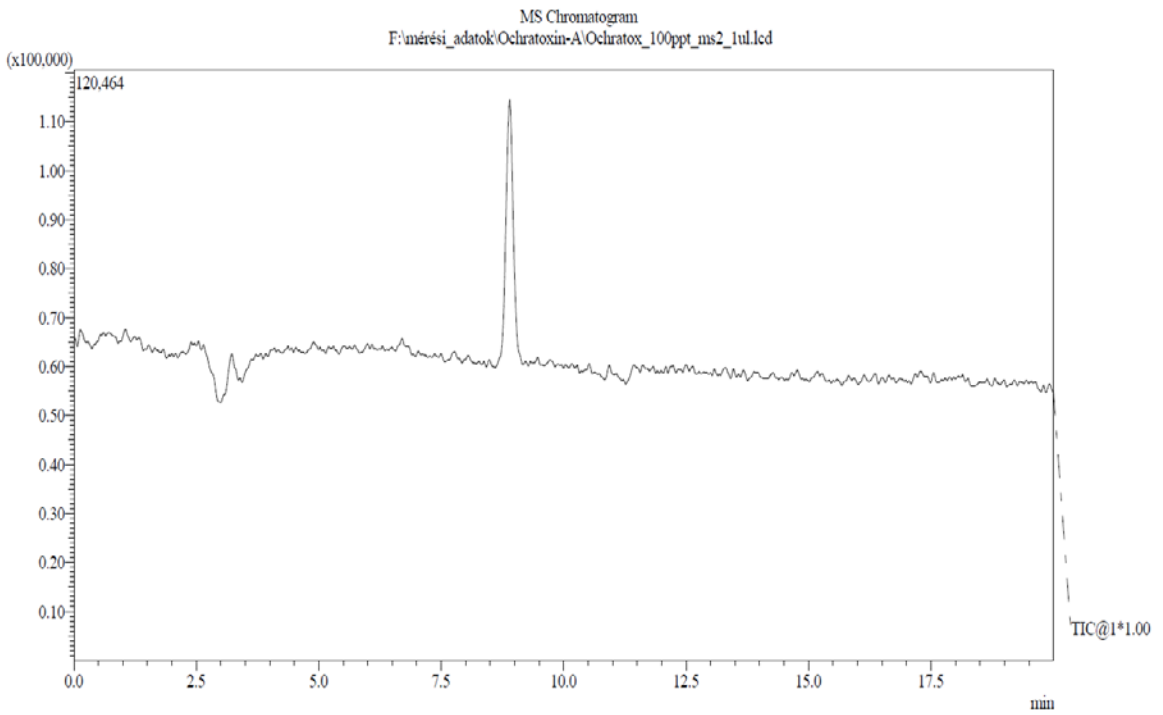
A mérési paraméterek megfelelnek a Shimadzu HPLC-MS 2010 EV (Kyoto, Japán) készülékre optimalizált mérési paramétereknek.

7.6.1.2 Ochratoxin-A koncentráció meghatározásának módszere

A minta ochratoxin-A mennyiségének meghatározására két módszert alkalmaztam. Az első esetben mérőoldatok segítségével felvett kalibrációs egyenes felhasználásával a mért toxin jellemző fragmenseinek intenzitásából származó csúcs alatti terület alapján határoztam meg a toxin koncentrációját. Azon boroknál, ahol kimutatható volt az ochratoxin-A, ***sztenderd addíció*** módszerével a kiindulási minta 100 mL-hez 10 ng (5 mL 2000 ng/L) mennyiségű ochratoxin-A-t adtam, majd a kidolgozott extrakciós módszerrel kinyerve a toxint, a kidolgozott mérési paraméterek alapján, a csúcs alatti terület változásából következtettem az eredeti, borban lévő mennyiségre.

7.6.1.2.1 Ochratoxin-A mérőoldat elkészítése

A törzsoldat ochratoxin-A koncentrációja 100 µg/mL volt, acetonitrilben oldva. Ebből az oldatból acetonitrillel hígítva készült 100 mL 1000 ng/mL oldat, amelyet sötét üvegben, 0 °C hőmérsékleten tároltam a felhasználásig. Ebből az oldatból készült a 10, 20, 50, 100, 500, 1000, 2000 ng/L ochartoxin-A koncentrációjú kalibrációs oldatsor. Az így elkészített oldatokat maximum 7 napig használtam. A HPLC-MS készülék használhatóságát a készített



49. ábra: Ochratoxin-A 100 ng/L koncentrációjú sztenderd oldat TIC kromatogramja ESI(+) módban

mérőoldatsor lemérésével ellenőriztem, valamint a ochartoxin-A oldatok segítségével vettem fel a kalibrációs oldatsort is. A 100 ng/L koncentrációjú mérő toxin oldat TIC kromatogramja a 49. ábrán látható.

7.6.1.2.2 Visszanyerési tesztek

19. táblázat: Visszanyerési tesztek százalékos adatai az ochratoxin-A mérés során modell-elegyekből

Minta neve	Sztenderd minta *ochratoxin–A* koncentrációja (ng/L)	visszanyerés ± RSD %
1, mérőoldat	100	92 ± 7%
2, mérőoldat	1000	96 ± 5%
3, bor matrix	100	89 ± 8%
4, bor matrix	1000	94 ± 6%

A visszanyerési teszteket a 0,1 és 1 µg/L koncentrációjú ochratoxin-A tartalmú oldatokkal végeztem kétféle módszerrel és háromszori ismétlésszámmal (19. táblázat). Az első esetben a 0,1 µg/L koncentrációjú ochratoxin-A oldatot állítottam elő úgy, hogy a bor modellezésére desztillált víz : etanol 90:10 v/v arányú elegyének 2850 µL térfogatrészéhez adtam a toxint, mégpedig 150 µL 2000 ng/L koncentrációjú ochratoxin-A mérőoldatot. Az 1 µg/L koncentrációjú ochratoxin–A oldat modellezéséhez a 2000 ng/L koncentrációjú mérő oldatból 1500 µL-t kellett volna kimérnem, amely térfogat-többlet már nagyon megváltoztatta volna a víz/etanol arányt a 3 mL összes oldattérfogatúra tervezett mintában. Ezért a 1500 µL térfogatú, 2000 ng/L koncentrációjú mérő oldatrész kimérése után azt N_2 áram segítségével bepároltam, majd a maradék toxint visszaoldottam 3 mL víz:etanol 90:10 v/v arányú keverékében. (1, 2 visszanyerési mérőoldat).

A második esetben (3, 4 visszanyerési minta) olyan bormintához (normál mátrix) tettem hozzá az ochratoxin-A sztenderdet az előző esetben leírt módon és arányban, amely az elővizsgálat során nem tartalmazott ochratoxin-A-t. Az extrahálást a saját kidolgozott extrakciós módszerrel végeztem el mindkét esetben. A visszanyerési tesztek során használt borok magyarországi pincészetekből származtak, ochratoxin-A-t nem tartalmaztak. A visszanyerési teszteket 3 ismétlésszámban végeztem el.

7.6.1.2.3 Minta előkészítés:

A borminták előkészítése során 100 mL bormintát és 100 mL acetonitrilt, valamint 10 g NaCl-ot elegyítettem, rázótölcsérbe tettem, majd 30 percig extraháltam rázógép segítségével. A 30 perc letelte után a tölcséreket tartóba téve a két fázis szétválásáig pihentettem azokat. Amikor a két fázis szétvált, a kiextrahált toxint tartalmazó felső fázist - szeparálása után – rotációs vákuumbepárló berendezés segítségével szárazra pároltam. A száraz mintát acetonitril 2000 µL térfogatú mennyiségében ultrahangos fürdő segítségével visszaoldottam, majd 12.000 1/perc fordulaton centrifuga segítségével a szilárd és kolloid szennyezőktől megtisztítottam, majd mintánként 1,7 – 1,9 mL tiszta, mért térfogatú extraktumot, amely az összes térfogat tisztája volt, szárazra pároltam, és 400 µL acetonitrilben visszaoldottam. (Az extrakció során a 2000 µL teljes acetonitril mért térfogat csökkenését a számítás során figyelembe vettem).

7.6.1.2.4 Eredmények kiértékelése

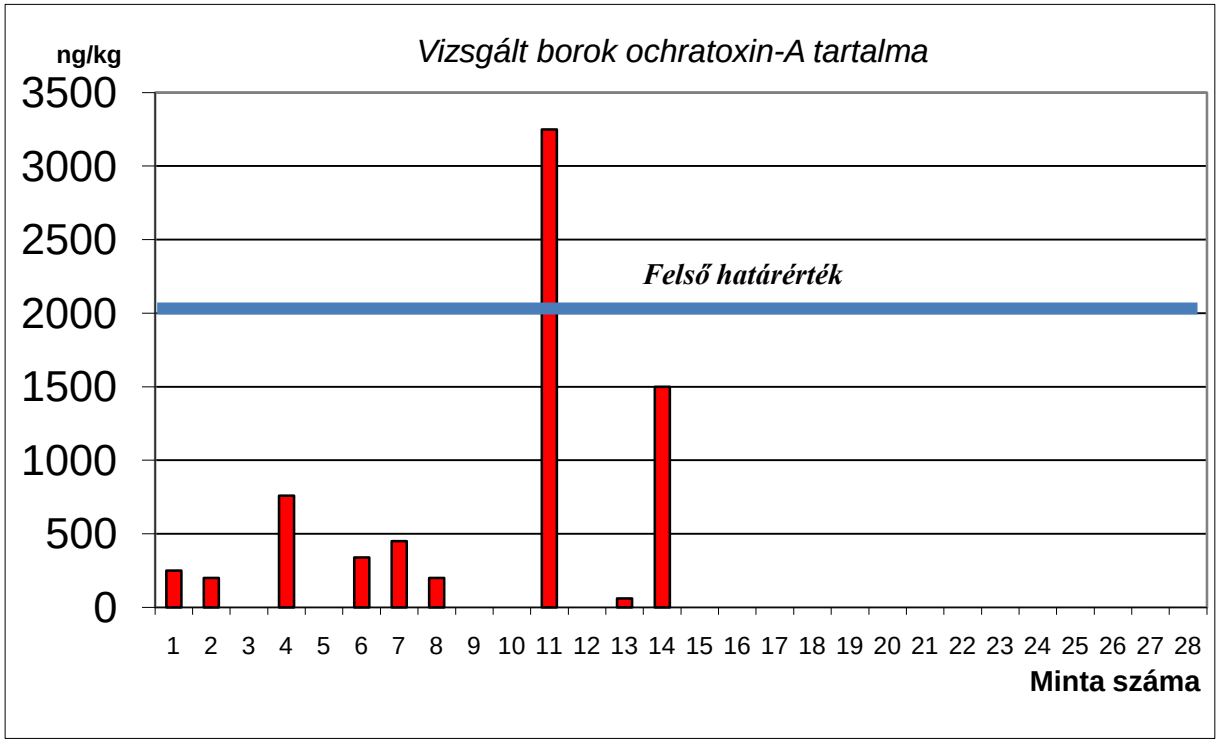
A mérő oldatok vizsgálatánál láttuk, hogy a visszanyerési tesztekben a hozzáadott ochratoxin-A mennyisége 89-96 %-ban visszanyerhető volt, amely bizonyítja, hogy az általam alkalmazott extrahálási módszer alkalmazható a minták ochratoxin-A tartalmának kimutatására.

A vizsgálati borok toxin-tartalmának mérése során azoknál a bormintáknál, ahol ochratoxin-A-t mutattam ki, sztenderd addíciós módszer segítségével ellenőriztem az ochratoxin-A kalibrációs egyenes alapján mért mennyiségének az értékét. A sztenderd addíciós módszerrel és a kalibrációs egyenessel meghatározott toxin-mennyiségek közötti eltérés 3,4%-4,9 % volt. Az elemzések során a magyarországi borokban nem találtam ochratoxin-A-t, ennek ellenére megismételtem a vizsgálatot, a mintákhoz 1 ng ochratoxin-A-t adva az extrakciós módszer tesztelése miatt. A borminta-vizsgálatok során a kalibrációs oldatsor alapján kapott ochratoxin-A koncentrációk és a sztenderd addíciós módszerrel mért koncentrációk között 2,0-4,1 % eltérést tapasztaltam.

A vizsgálati borokból kimutatott OTA mennyiségeit az alábbi táblázatban foglaltam össze és a 4. diagramban hasonlítom össze őket egymással, valamint az élelmiszer-egészségügyi határértékkel.

20. táblázat: Vizsgált borok ochratoxin-A tartalma, n.d: a mintából nem mutatható ki OTA a módszerrel

Sample no.	Sample name	OTA (ng/L)	Sample no.	Sample name	OTA (ng /L)
1	Spanish wine1, 2006	**250**	15	Egri Bikavér Thummerer, 2002	**n.d.**
2	Spanish wine 2, 1999	**200**	16	Egri Bikavér Egervin, 2005	**n.d.**
3	Tio de la Bota clásico Espana tinto, Spanish 2006	**n.d.**	17	Egri Bikavér Pók Tamás, 2004	**n.d.**
4	Spanish wine 4, 2006	**760**	18	Egri Kékfrankos, Egervin, 2006	**n.d.**
5	Tio de la Bota clásico Spanish blanco	**n.d.**	19	Egri Kékfrankos, Egervin, 2007	**n.d.**
6	Italian wine 1, 2005	**340**	20	Egri Cabernet Sauvignon, 2005	**n.d.**
7	African wine 1, 2006	**450**	21	Zweigelt, Egervin, 2003	**n.d.**
8	Spanish wine 6, 2003	**200**	22	Egri Bikavér, Egri Korona Borház, 2006	**n.d.**
9	Spanish wine 7, 2006	**n.d.**	23	Egri Kékfrankos, Varga Pincészet, 2005	**n.d.**
10	Vina alambrada la Mancha Spanish white wine	**n.d.**	24	Kékfrankos, Ostoros-Novaj Wine Ltd, 2005	**n.d.**
11	Spanish wine 9, 2004	**3250**	25	Zweigelt, Ostoros-Novaj Wine Ltd, 2006	**n.d.**
12	Kangaroo Island Cabernet Sauvignon, 2006	**n.d.**	26	Cabernet Sauvignon, Ostoros-Novaj Wine Ltd, 2005	**n.d.**
13	French wine 1, 2007	**61**	27	Egri Leányka, Egervin, 2006	**n.d.**
14	Italia wine 2, 2006	**1500**	28	Egri Leányka, Egri Korona Borház, 2005	**n.d.**



4. diagram: Ochratoxin-A tartalom a vizsgált borokban

Megállapítható az eredményekből, hogy az ochratoxin-A a magyarországi borokban nem volt kimutatható koncentrációban, míg a mediterrán országokból származó borok egy részében kimutatható volt. A kimutatott OTA-t tartalmazó borok közül csak az egyik mintában volt a megengedettnél nagyobb mennyiségben a toxin (*Spanish (red) wine 9, 2004.* 11. számú minta**)**, a többi minta határérték alatti koncentrációkat tartalmazott. Aggasztó viszont, hogy a borfogyasztó közönség minden rétegének számára elérhető vizsgált borok közül számos, a mediterrániumból származó kedvelt bor tartalmaz ochratoxin-A-t.

A szakirodalmi cikkek eredményeivel összehasonlítva [160] a kapott eredmények összhangban vannak az eddigi vizsgálatokkal, vagyis a mediterrániumból származó borok kis hányadában kimutatható az OTA, míg a magyarországi borokban nem mutatható ki a toxin. Kivételt képez a vizsgált borvidékek közül a Tokaji borvidék, ahol kimutatható volt néhány minta esetében az OTA a *Botrytis cinerea* gombával együtt megtelepedő penészgombák miatt, de ennek évenkénti előfordulási valószínűsége kicsi.

7.6.2 Aflatoxinok hőtranszformációjának vizsgálata élelmiszermintákban

A vizsgálatok során tiszta Aflatoxin B_1, B_2, G_1, G_2, M_1-el szennyezett élelmiszermintákat (kolbász, réteslap, keksz és tej), az élelmezésben szokásos módon hőhatásnak tettem ki (különböző közegekben történő sütés, illetve forralás), majd a hőhatás után vizsgáltam a maradék aflatoxin tartalmat a mintákban, illetve az olajos/zsíros hő átadó közegben. A kolbászt zsírban és olajban 210-230 °C, a réteslapot 200 °C, a kekszet 250 °C, a tejet pedig a forrás hőmérsékletén (101,3 °C) hőkezeltem.
Az élelmiszer-hőkezelési vizsgálatok során tiszta Aflatoxin B_1, B_2, G_1, G_2, M_1-el szennyezett élelmiszer-mintákat (kolbász, réteslap, keksz és tej), a sütéshez napraforgóolajat és olívaolajat, valamint sertészsírt használtam fel. Az élelmiszer-hőkezeléshez szabályozható hőmérsékletű, termosztát kapcsolóval ellátott elektromos melegítő lapot alkalmaztam.

7.6.2.1 Mérési paraméterek:

A mérési paraméterek megfelelnek a Shimadzu HPLC-MS 2010 EV (Kyoto, Japán) készülékre optimalizált mérési paramétereknek.

7.6.2.2 Aflatoxin koncentrációinak meghatározása:

A visszanyerési tesztek és a vizsgálat utáni minták koncentrációit sztenderd addíciós módszerrel határoztam meg, minden esetben 1 µg aflatoxint (100 µg/mL koncentrációjú aflatoxin mérőoldatból 10 µL mennyiséget) adtam az extraktum egyik részletéhez, miután az extraktumok tisztáját kettő 500-500 µL-es részre osztottam.

7.6.2.3 Minták, minta előkészítés:

Mivel nem volt arra lehetőségem, hogy toxinokkal etessem az állatokat és testrészeikből készült termékeket vizsgáljam, ezért magam szennyeztem be egy húsipari terméket, amely szárazkolbász volt. A kolbász előzetes vizsgálata során a vizsgált 4 aflatoxin nem volt kimutatható benne. A szennyezés úgy történt, hogy a számított mennyiségű, acetonitrilben oldott toxint juttattam az ismert tömegű kolbász-mintába 25 µL térfogatú, adott koncentrációjú (1000 µg/mL) toxinoldat formájában, , majd elpárologtatva az acetonitrilt, a toxint bedolgoztam a termékbe a mintalap (kolbászkarika) hajtogatásával. A húsipari terméken kívül még réteslap és keksz mintákat is szennyeztem az előbbiekben leírt módon. A

nyers kekszmasszát a következő alapanyagok összegyúrásával készítettem: szódabikarbóna, só, szalalkáli (ammónium-hidrogén-karbonát), szója lecitin, kristálycukor, porcukor, inulin, keményítő szirup, tejpor, pálmazsír, vanília aroma, víz, citromsav, búzakorpa, búzaliszt. A toxint acetonitriles oldat formájában juttattam a meggyúrt kekszmasszába, majd beledolgoztam.

A réteslap boltban vásárolt általános összetételű kereskedelmi réteslap volt. Szennyezése a felületre juttatott acetonitriles toxin oldattal történt. A réteslap és kekszmintákat szintén vizsgáltam toxinra a szennyezés előtt, bennük toxint nem találtam. Az így készített szennyezett termékeket 2 óráig pihentettem. A toxinokat külön kezeltem, egymásra gyakorolt hatásukat nem vizsgáltam a sütés során. 3 párhuzamos mintával dolgoztam minden toxin és minden minta esetében.

A kolbász sütése zsírban, napraforgóolajban és olívaolajban történt. A további minták elkészítése a hagyományos receptek szerint zajlott le.

7.6.2.4 Extrakció

A sütés után az olajokat és a kolbászt hűtöttem, majd extraháltam. Az olaj esetében 10-10 mL volt az olaj- acetonitril arány. Az extrakciós rendszerhez 2 g NaCl-ot adagoltam, majd 20 perc extrakciós idő letelte után a szétválasztott oldat acetonitriles részét szárazra pároltam rotációs vákuumbepárló segítségével, majd 1000 µL acetonitrilben visszaoldva 10 percig fagyasztóban -20 °C hőmérsékleten tároltam, és 14.000 1/perc fordulaton centrifugával tisztítottam. A kapott tiszta oldatot elemeztem.

A keksz és réteslap mintákból az extrakciót közvetlen az elkészített minta 10,00 g mennyiségével végeztem a fent leírtak alapján úgy, hogy 20,00 mL acetonitrilt tettem a mintákra extraháló szerként.

7.6.2.5 Toxin hőstabilitási tesztek

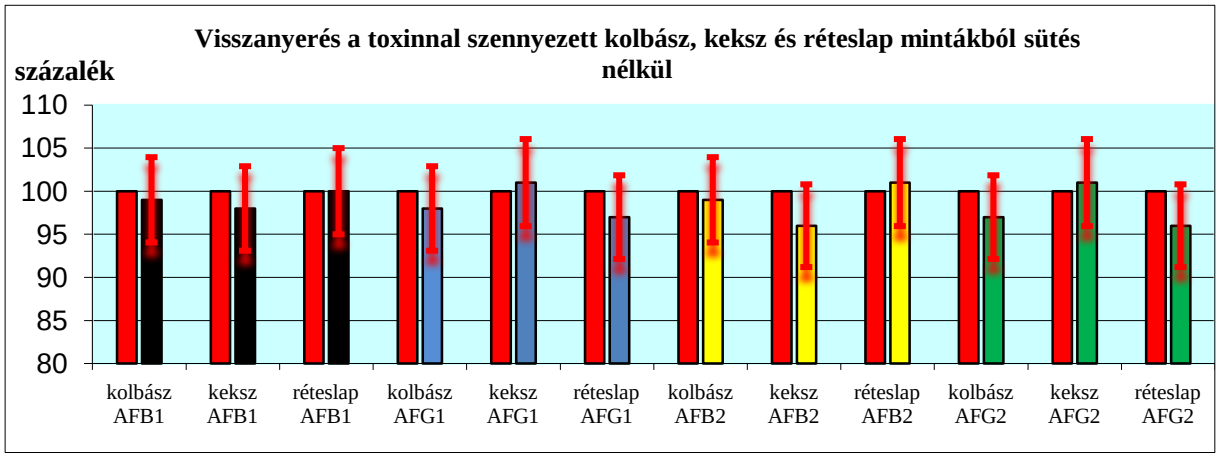
A sütési vizsgálathoz először elvégeztem az aflatoxinok hőstabilitási tesztjét. A teszt során 4 mL-es mintatartó üvegekbe 25-25 µg különböző aflatoxint tartalmazó oldatot tettem, majd a mintatartókat az acetonitril oldószer elpárolgása után 30 percre 250 °C hőmérsékletű légkeverésű sütőbe helyeztem. Lehűlés után visszaoldottam acetonitrilben a benne lévő toxinokat, majd visszamértem a mennyiségüket. A visszamérés során AFB1 esetében 3,2%-al, AFB2 esetében 4,6 %-al, AFG1 esetében 3,9 %-al, AFG2 esetében 5,1 %-al kaptam kevesebb toxint, mint a kísérlet előtt. Kísérleti eredményeim összhangban vannak az aflatoxinok

vonatkozó legújabb termikus stabilitási információkkal [68,159], amelyek szerint az aflatoxinok bomlása már olvadáspontjukon megkezdődhet, de nem bomlanak le a szokásos sütési/főzési körülmények között.

7.6.2.6 Visszanyerési tesztek élelmiszermintákból

A visszanyerési tesztek során a minták toxinkoncentrációját úgy állítottam be, hogy azonos tömegű mintára azonos mennyiségű, különböző minőségű toxint juttattam (25 µg), és a sütés, valamint hő közlése nélkül a mintáról extraháltam a toxinokat a kidolgozott módszerrel. A következő táblázatban összefoglaltam és az 5. diagramon bemutatom az egyes toxinok visszanyerési arányait. A párhuzamos mérések szórása 3,2 % és 4,5 % között volt.

5. diagram: Hőkezelés nélküli élelmiszermintákból visszanyert toxinok mennyiségei százalékban kifejezve 25 µg adagolt toxinra vonatkoztatva. A piros oszlopok az adagolt toxin azonos kiindulási mennyiségét (25-25µg, 100%) jelzik. Az oszlopokon jelzett hibavonalak a mérések szórását mutatja.



21. táblázat: 25 µg toxinnal szennyezett, hőkezelés nélküli kolbászból, réteslapból és kekszből visszanyert toxinok tömege (a táblázat az 5. diagram adatait tartalmazza)

Adagolt afla toxin mennyisége (µg/minta)	*Visszanyert aflatoxin mennyisége (µg/minta)*			
	toxin	**kolbász**	**keksz**	**réteslap**
25	AFB1	24,7 ± 3,2%	24,.6± 4,1%	24,9± 4,5%
25	AFB2	24,6 ± 3,3%	23,9± 3,5%	25,2± 3,2%
25	AFG1	24,3± 4,1%	25,3± 3,3%	24,2± 3,7%
25	AFG2	24,2± 3,9%3	25,3± 3,6%	24,03± 4,3%

7.6.2.7 Toxin visszanyerési tesztek sütési hő átadó közegekből

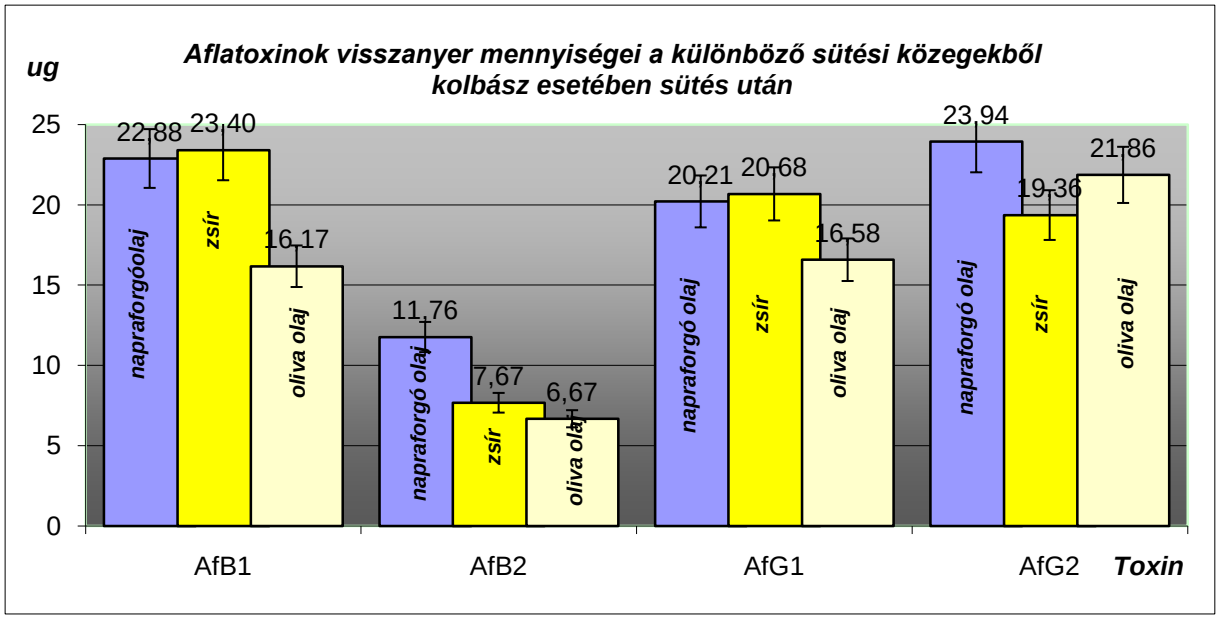
A kísérlet során a kolbász sütése után kiderült, hogy sem a zsiradékban sült, sem a növényi olajban sütött kolbászban nem volt kimutatható mennyiségben az adagolt aflatoxin, hanem átkerült a sütési közegbe. Ebből az okból a sütési közegből történő toxin extrakcióra toxinonként visszanyerési teszteket végeztem el, úgy, hogy 25 µg aflatoxint adagoltam a sütési közegek 20-20 mL-éhez. A sütési közeget olajok esetében nem melegítettem, zsír esetében a hígan folyós állapot eléréséig melegítettem, amely 45 °C hőmérsékleten következett be. Ennek ezért volt jelentősége, hogy ne érjük el az extraháló szerként alkalmazott acetonitril forráspontját. Az extrakció során a 20 mL sütési közeghez 20 mL acetonitrilt adtam, majd 5 g NaCl-ot. 30 percig rázattam síkrázó segítségével, majd hűtéssel és centrifugával segítettem a két fázis elválását. Az acetonitriles fázist rotációs vákuumbepárló berendezés segítségével bepároltam, majd 1000 µL acetonitrilben feloldottam a bepárolt anyagot. Az 1000 µL acetonitriles fázist -10 °C-ra hűtöttem, majd 14.000 1/perc fordulatszámon centrifugálással tisztítottam. Az oldat tisztáját használtam fel az analitikai vizsgálatra. A visszanyerési tesztek eredményeit ebben az esetben is toxinonként 3 párhuzamos vizsgálat eredményei alapján állapítottam meg (22. táblázat)

22. táblázat: Visszanyerési teszt eredményei 25µg adagolt aflatoxinnal szennyezett zsiradékból és növényi olajokból acetonitriles extrakció után. A visszanyerési teszt során nem történt sütési hőfokra történő melegítés.

Adagolt afla toxin mennyisége (µg/minta)	***Visszanyert aflatoxin mennyisége (µg/minta)***			
	toxin	**olívaolaj**	**napraforgóolaj**	**sertészsír**
25	aflatoxin B_1	22,3 ±5%	24,3 ±9%	24,1 ±4%
25	aflatoxin B_2	23,1 ±7%	24,0 ±3%	24,7 ±9%
25	aflatoxin G_1	23,5 ±4%	24,5 ±5%	24,5 ±7%
25	aflatoxin G_2	22,4 ±8%	23,8 ±6%	24,3 ±7%

7.6.2.8 Kísérleti eredmények és értékelésük:

A kolbász sütése során három különböző sütési közeget vizsgáltam, amelyek a következőek voltak: napraforgóolaj, olívaolaj és sertészsír. Mindhárom közegben ugyanazon mennyiségű toxinnal szennyezett kolbász mintát sütöttem ki és vizsgáltam, hogy a zsírban, illetve a kolbászban mennyi lesz a toxin mennyisége a sütés után. A sütési idő minden esetben 3 perc volt a minta kis tömege miatt.



6. diagram: A sütési kísérletben felhasznált különböző sütési közegekből visszanyert aflatoxinok mennyiségei sütés után, kolbászthasználva szennyező forrásként.

23. táblázat: Mérési adatok és szórásuk az aflatoxinok visszanyer mennyiségei a különböző sütési közegekből kolbász esetében sütés után

Adagolt afla toxin mennyisége (µg/minta)	*Sütés után visszanyert aflatoxin mennyisége (µg/minta)*			
	toxin	**olívaolaj**	**napraforgóolaj**	**sertészsír**
25	aflatoxin B_1	16,17 ±6%	22,88 ±9%	23,40 ±8%
25	aflatoxin B_2	6,67 ±8%	11,76 ±7%	7,67 ±9%
25	aflatoxin G_1	16,58 ±8%	20,21 ±8%	20,68 ±9%
25	aflatoxin G_2	21,86 ±8%	23,94 ±7%	19,36 ±8%

A sütési procedúra elvégzése után a zsírokat és a kisütött kolbászt is elemeztem a toxintartalmakra. Az elemzés során megállapítottam, hogy a kisütött kolbász mintákban nem volt kimutatható a szennyező aflatoxin. A sütési közegből viszont kimutathatóak voltak a szennyezésre felhasznált toxinok.

Ennek az lehet a magyarázata, hogy a sütés során a kolbász zsírtartalmával együtt a sütési közegbe vándorolhatott át az adott aflatoxin.

A sütési közegekből kimutathatóak voltak az aflatoxinok, de eltérő mennyiségben. A visszanyerési tesztek során igazolódott, hogy az általam javasolt módszerrel ki lehet nyerni a toxint a sütési közegekből. feltételezésem az, hogy a visszanyert toxin mennyiségeinek különbsége az eltérő sütési közegek, úgymint a napraforgóolaj, az olívaolaj és a sertészsír, valamint az aflatoxinok reakciójában keresendő [88,148].

A 6. diagramról megállapítható, hogy az AFB1, AFB2, AFG1 toxinok esetében a legkisebb visszanyerhető mennyiséget az olívaolajban történő sütés során kaptam. Megállapítható továbbá, hogy a szennyező aflatoxinok közül az AFB1 és AFG1 a legkevésbé bomlottak el a zsírban és a napraforgó-olajban történt sütés során. Az AFB2 és AFG2 toxinok legnagyobb mennyiségei a napraforgóolajban történő sütés során maradtak meg.

A toxinok típusait vizsgálva megállapítható, hogy az AFB1 toxin mennyisége legnagyobb mértékben olívaolajban, legkisebb mértékben zsírban csökken, az AFB2 toxin mennyisége legnagyobb mértékben olívaolajban, legkisebb mértékben napraforgóolajban csökken. Az AFG1 toxin mennyiségének legnagyobb csökkenését olívaolajban, a legkisebb csökkenését zsírban történő sütés során tapasztaltam. Az AFG2 toxin mennyiségének legnagyobb mértékű csökkenése zsírban, legkisebb mértékű csökkenése napraforgóolajban volt tapasztalható.

Az aflatoxinok mennyiségének legnagyobb mértékű csökkenése az olívaolajban történt sütés során volt tapasztalható, a legkisebb mértékű csökkenés a napraforgóolajban történt sütés során volt megállapítható.

A sütési közegek toxintartalmát és a toxin átoldódását vizsgálva megállapítottam, hogy a legnagyobb toxin mennyiséget a napraforgóolajból lehetett extrahálni a sütés után, míg a legkevesebb mennyiséget az olíva olajból. Ennek az oka valószínűleg az olíva olajban található telítetlen zsírsavak és antioxidáns vegyületek nagyobb számában keresendő, mivel ezen anyagok reakcióba léphetnek a toxinokkal a sütés 210-220 °C hőmérsékletén is. Az olajban található telítetlen kötéseket tartalmazó vegyületek aktív kötései reakcióba léphetnek a toxinnal.

A témában készült eddigi szakirodalmi vizsgálatokkal és azok eredményeivel összevetve a vizsgálatom eredményeit megállapítható, hogy a szakirodalomban publikált hasonló eredményre jutottam az olívaolaj esetében [88]. A napraforgóolajban és a sertészsírban illetve a kolbásszal történő sütési kísérletekre, valamint az aflatoxinok bomlására ezekben a közegeben a szakirodalomban adatokat nem voltak fellelhetőek.

7.6.2.9 Keksz sütése, visszanyert toxin mennyiségek

A keksz elkészítése az alapanyagokból kézi gyúrással történt. A nedves tésztából 3 cm átmérőjű, 0,5 cm magasságú, korong alakú mintákat készítettem, majd a minták közepére 50 µg aflatoxint tartalmazó (50 µL, 1000 µg/L koncentrációjú) aflatoxin mérő oldatot tettem. Az acetonitril oldószer elpárolgása után a kekszlapot négyszer félbe hajtottam, majd újra

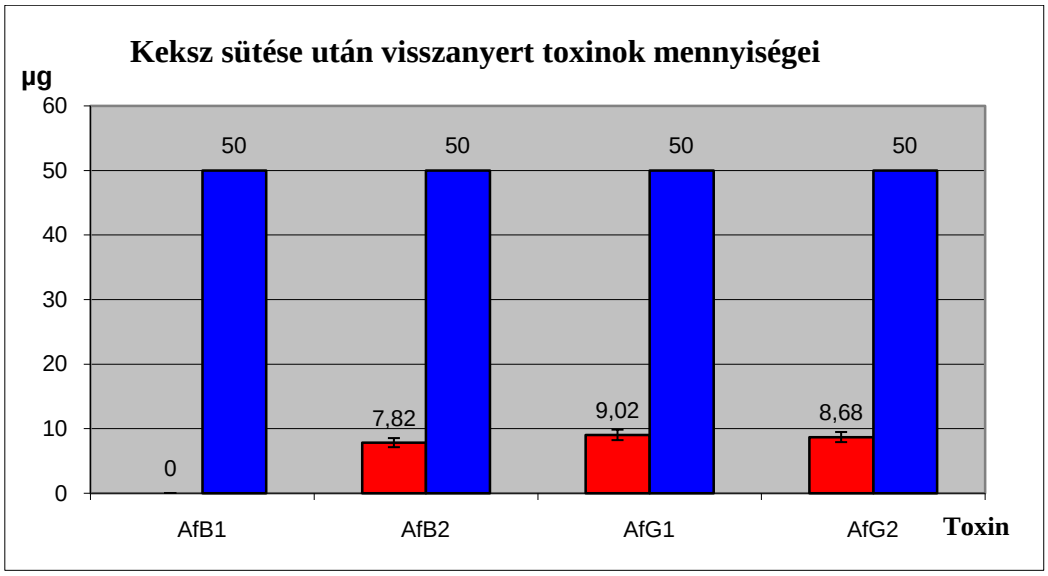
körülbelül 0,5 cm vastagságra nyújtottam kézzel. Ezzel a lépéssel oszlattam el a toxint a tésztában.

Sütési paraméterek: 25 perc 250 °C hőmérsékletű sütőben, légkeverés mellett.

7.6.2.9.1 Extrakció

A kekszmintákat a sütés után hagytam szoba hőmérsékletre hűlni, majd lemértem tömegüket. Ezek után csiszolatos Erlenmeyer lombikba téve a kézzel összetört keksz mintát, arra annyi acetonitrilt tettem, hogy a folyadék szintje ellepje az összetört keksz mintát. Ez általában 10 g-os mintánál 20 mL acetonitril volt. A tömegeket és az adagolt térfogatokat feljegyeztem a későbbi számítások miatt. Síkrázó berendezéssel segített 1 óra extrakciós idő letelte után a lehető legtöbb acetonitrilt oldószert visszanyertem a mintákról a minta tisztájának leszívásával, amelyeknek a mennyiségét szintén feljegyeztem, majd rotáció vákuumbepárló segítségével az acetonitrilt eltávolítottam. A maradék száraz anyagot 1 mL acetonitrilben visszaoldottam, majd a folyadékmintát 14.000 1/perc fordulatszámon centrifugáltam. Az oldat tisztájából 500 µL-t vettem ki, és ebből végeztem el az analitikai vizsgálatot.

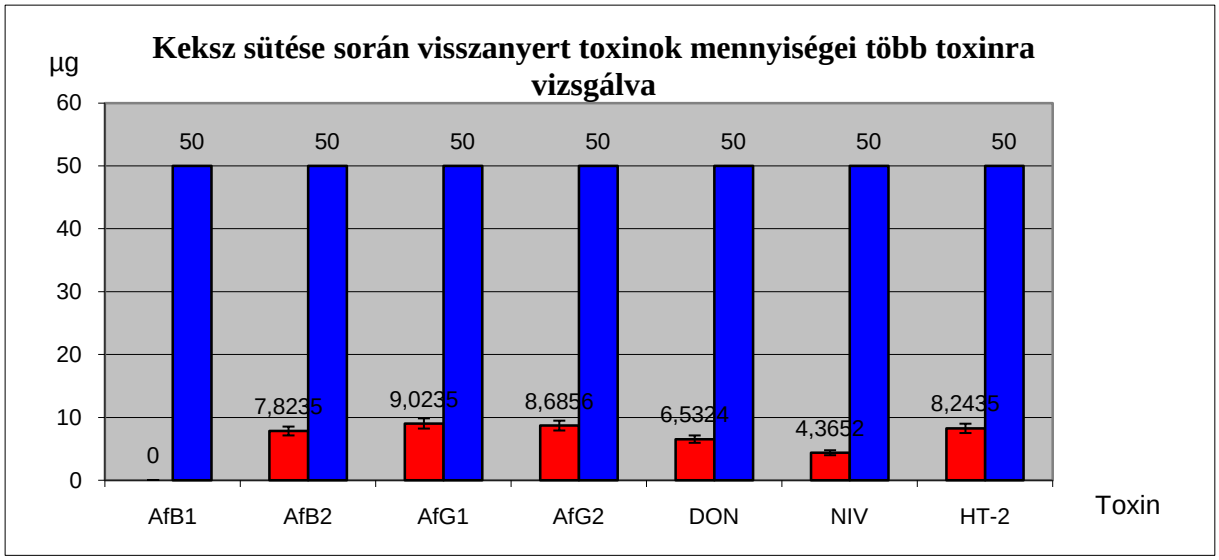
A számítások során korrigáltam a visszanyert extraháló szer (acetonitril) mennyiségeket, valamint arányosítottam a visszanyert toxin mennyiségeket azonos tömegű száraz minta tömegekre, mivel a kekszlapok tömegei nem voltak azonosak. A kekszmintákból sütés után visszanyert toxinok mennyiségét a 7. diagram tartalmazza.



7. diagram: Keksz sütése után visszanyert toxinok mennyisége 50 µg adagolt toxinra vonatkoztatva.

A diagram piros sávjai a kekszből a sütés után extrahált különböző aflatoxin mennyiségeket mutatják. A sütési hőmérséklet 250 °C volt, amely hőfokokon a 4. táblázat adatai szerint a toxinok olvadáspontját sem érjük el, ennek ellenére a hozzáadott toxin mennyiségéhez képest az extrahált toxin mennyisége a sütés után nagymértékben csökkent [12,145]. Az aflatoxinok bomlásáról a szakirodalomban felellhető hivatkozások alapján mind a kettő lehetőséget megtaláljuk a bomlásra, egyes szakirodalmak szerint az aflatoxinok kis hőmérsékleten is bomlanak [68], más irodalmak szerint hőstabilak, és a főzés, sütés, pörkölés során sem bomlanak [159]. Ennek oka a keksz alapanyagaiban keresendő, mivel a sütés nélküli kekszből extrakcióval nagyobb mennyiségű aflatoxint tudtam visszanyerni (19. táblázat). Nem bizonyított, de feltételezhető, hogy a felhasznált szalalkáli (ammónium-hidrogén-karbonát) bomlásánál keletkező ammónia gáz a sütés során a kekszen belül rövid ideig, de reaktív közeget hozhat létre, amely hatására a toxinok bomlást szenvedhetnek [67]. Szakirodalmi forrás is utal arra, hogy az aflatoxinokat teljesen le lehet bontani autoklávozással ammónia jelenlétében. Ennek igazolására még kísérleteket folytatok, de az előkísérleteim és szakirodalmi adatok [67] bizonyítottnak mutatják ezt a feltevést. Az előkíséreltek során a szalalkálit nem tartalmazó kekszekből a toxinok visszanyerése kétszerese-háromszorosa volt, mint a szalalkálit tartalmazó mintákból visszanyert toxin mennyisége. A kekszmintákból származó extraktumok tömegspektrometriás vizsgálatai során a kekszből eddig nem sikerült kimutatni bomlástermékeket, amelyek feltételezhetően a toxinból származtak volna, ezért a mérések alapján megállapítható, hogy a toxinok lekötődtek, esetleg teljesen elbomlottak.

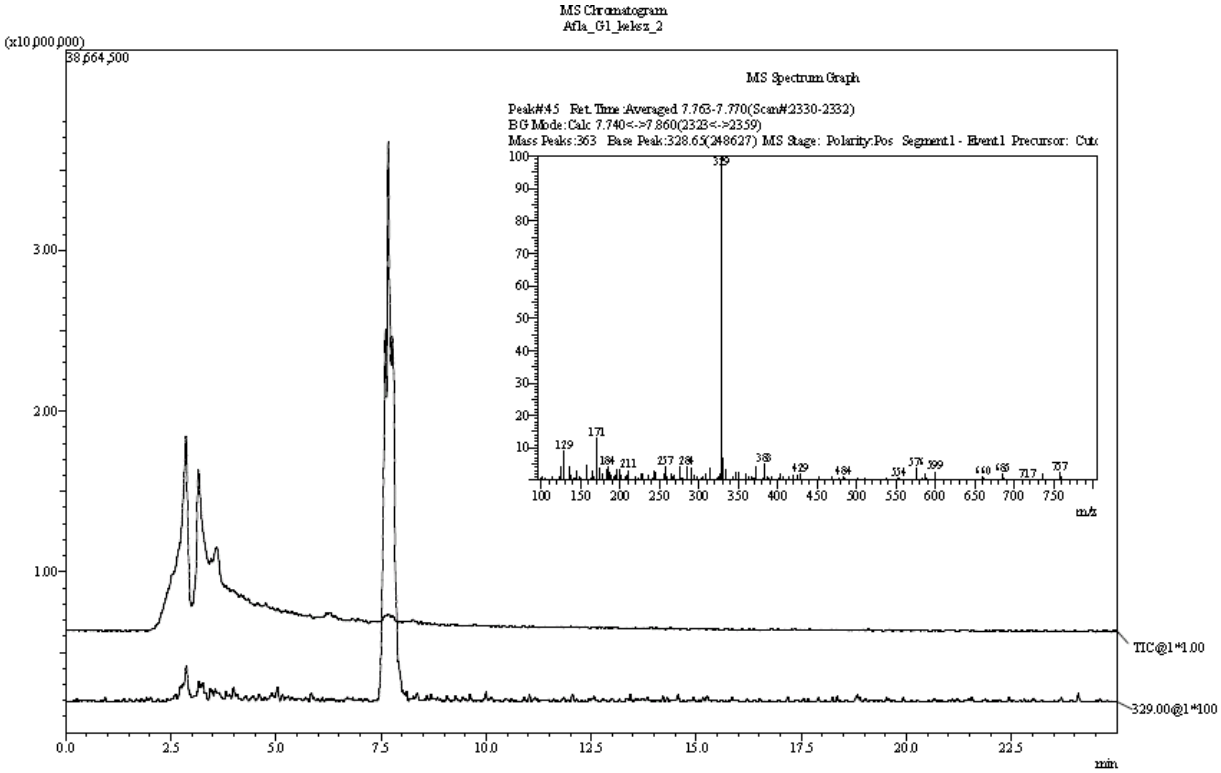
További vizsgálatok során elvégeztem néhány más toxinnal is a kekszek szennyezését a fentebb leírtak szerint, és hasonló eredményre jutottam. Deoxynivalenol, nivalenol és HT-2 toxinokkal történt szennyezés után a kekszből visszanyert toxinok mennyiségét a következő, 8. diagramon ábrázoltam.



8. diagram: Keksz sütése után visszanyert toxinok mennyisége 50 µg adagolt toxinra vonatkoztatva. A kék oszlopok a keksz mintára mért, a piros a kekszről visszanyert toxin mennyiséget jelzik.

Itt is jól látható, hogy több típusú toxin esetében is tendenciálisan kis mennyiségű aktív toxin nyerhető vissza a kekszből sütés után. A toxinok visszanyerési arányai a 8,7% és 18,47% közötti tartományba estek. Megállapítható tehát, hogy a kekszben lévő toxinok mennyiségének nagy része elbomlik a sütés során (aflatoxinok, trichotecének, úgy mint DON, NIV, HT-2), így nem kerül át a fogyasztók szervezetébe a teljes szennyező mennyiség. A keksz sütése után a toxin mennyiségének kimutathatóságát jól szemlélteti az 50. ábra, amelyen az aflatoxin G_1 kekszből visszanyert mennyiségét lehet látni a hozzá tartozó tömegspektrummal együtt. A tömegspektrumban jól detektálható az ionizációs módból adódó, az [M+H] molekulatömegnek megfelelő 328+1, vagyis 329 m/z tömeg/töltés arányú molekulaion.

A szakirodalmi hivatkozások alapján [40] és 1996-ban Amra, Mahmoud, Taha és El-Azab [58] vizsgálta az aflatoxin B_1 és AFG1 bomlását kekszek sütése után, amely vizsgálatok következtetése a kettő toxin bomlására nézve az volt, hogy a legnagyobb mértékben az ammónium-hidrogén-karbonát jelenléte segíti elő az AFB1 és AFG1 toxinok bomlását. Ezt az eredményt alátámasztottam a vizsgálataimmal, míg a vizsgált toxinok körét kiterjesztettem további aflatoxinokra és trichotecén származékokra. Kimutatható, hogy a sütés során mindegyik felhasznált toxin bomlott. A bomlás mértéke nem egyenletes minden toxinra, de bíztató eredményeket mutatnak a mért értékek.



50.ábra: Aflatoxin G1 visszamérése a keksz mintából sütés után. A felső kromatogram a kekszminta extraktum elemzésének TIC kromatogramja, az alsó kromatogram az aflatoxin G1-re jellemző 329 m/z ion kromatogramja

7.6.2.10 Aflatoxinok bomlásának vizsgálata réteslap sütési kísérletben

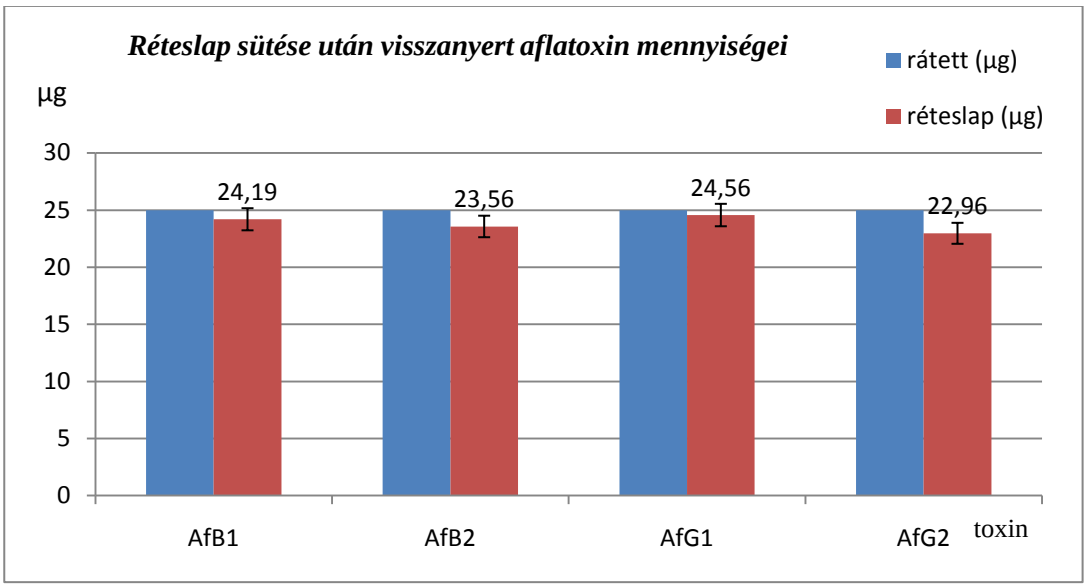
A réteslapokkal végzett sütési kísérletekhez kereskedelemben vásárolt réteslapokat használtam. A tésztából 10x10 cm méretű mintákat vágtam ki, majd a minták közepére 25 µg aflatoxint tartalmazó (25 µL, 1000 µg/L koncentrációjú) aflatoxin mérőoldatot tettem és oszlattam szét. Az acetonitril oldószer elpárolgása után a réteslapot négyszer félbe hajtottam, majd újra nyújtottam rajta. Ezzel a lépéssel oszlattam el a toxint a tésztában.

Sütési paraméterek: 15 perc 250 °C hőmérsékletű sütőben, légkeverés mellett.

7.6.2.10.1 Extrakció:

A réteslapok extrakciójánál alkalmazott módszer megegyezik a kekszminták extrakciójánál alkalmazott módszerrel.

7.6.2.10.2 Eredmények



9. diagram: Réteslap sütése után visszanyert aflatoxinok mennyiségei µg-ban. A mérési adatokat a 24. táblázat tartalmazza

A réteslap sütése után a visszanyert mikotoxinok mennyiség értékeiből kiderül, hogy a sütési procedúra során az aflatoxinokra nézve nem történt jelentősebb változás, vagyis a sütés után a toxinok kinyerhetőek a réteslapból.

A mérési eredményeket a következő, 24. táblázat tartalmazza:

24. táblázat: Réteslap sütése során felhasznált és visszamért toxin mennyiségek

Mikotoxin	Réteslapra tett toxin (µg)	Réteslapból visszamért (µg)	visszamért toxin %
Aflatoxin B1	25,00	24,19±3,7 %	96,76
Aflatoxin B2	25,00	23,56 ±3,5 %	94,24
Aflatoxin G1	25,00	24,56 ±3,9 %	98,24
Aflatoxin G2	25,00	22,96 ±4,5 %	91,84

7.6.2.11 Aflatoxin M_1 bomlásának vizsgálata tejben

A következőkben megvizsgáltam a tej aflatoxin M_1-el történő szennyezése után a toxin bomlását általános forralási procedúrában.

A tej szennyezése 25 µg aflatoxin M_1 toxinnal történt. Az aflatoxin M_1 vizsgálata során 2,8 % tejzsír tartalmú tejet használtam fel, amely tejminta 100 mL térfogatához 25 µL 1000 µg/L koncentrációjú aflatoxin M_1 mérő oldatot adagoltam. 3 párhuzamos mintával dolgoztam. A visszanyerési tesztek alapján a 25 µg aflatoxin M_1 toxinból 24,7 µg-ot nyertem vissza RSD= 4% a forralás nélküli tejből. A visszanyert aflatoxin M_1 nagy aránya meggyőzően bizonyítja, hogy az extrakciós módszerem alkalmazható. A tej forralása 101,3 °C hőmérsékleten történt 5 percen keresztül történt.

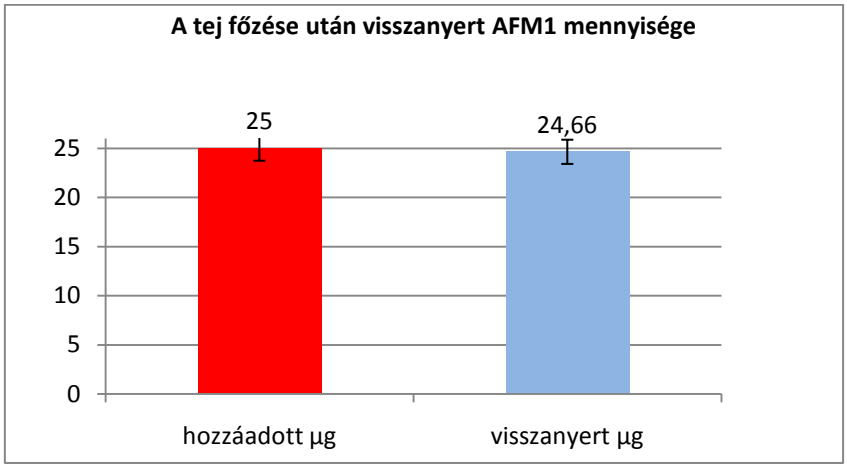
7.6.2.11.1 Extrakció:

50 mL tejmintához 50 mL acetonitrilt adtam extraháló szerként, valamint 5 g NaCl-ot. A szétváló fázisok közül az acetonitriles fázist elkülönítettem, térfogatát lemértem, majd rotációs vákuumbepárló segítségével eltávolítottam az oldószert. A maradék extraktumot 1 mL acetonitrilben visszaoldottam, majd 14.000 1/perc fordulatszámon centrifugáltam. Az oldat tisztájából 500 µL mennyiséget használtam az analitikai vizsgálathoz.

7.6.2.11.2 Eredmények

A tejből főzés után visszanyert toxin mennyisége alapján (10. diagram) megállapítható, hogy az aflatoxin M_1 nem bomlott el a forralás alatt. Ebben az esetben kimondhatjuk, hogy a tejet szennyező toxin semmilyen változáson nem megy keresztül a forralás során, szinte teljes mértékben a fogyasztott termékben marad. Ezt a megállapítást igazolja a forralás nélküli tejjel végzett toxin visszanyerési teszt eredményeinek és a forralás utáni extrahált toxin

mennyiségének az összehasonlítása, amely azt mutatja, hogy szinte ugyanannyi a visszanyert toxin mennyiség a tej forralása után, mint forralás nélkül.



10. diagram: A tej főzése után kinyerhető Aflatoxin M1 mennyisége µg-ban

Összefoglalva az élelmiszerek hőkezelési kísérleteinek mérési eredményeit, elmondható, hogy a sütés során a toxinok mennyiségének nagy rész átkerül a sütési közegbe. Egyes toxinok esetében (aflatoxin B_2) a sütési közegben lévő toxin mennyisége nagymértékben csökken, vagy megkötődés vagy bomlás miatt, de a többi toxin aktív formában visszanyerhető a sütési közegből. Valószínűsíthető, hogy a sütési hőmérsékleten (220-250 °C) a toxinok többsége nem szenved termikus bomlást. A tej forralása során az ***Aflatoxin M1*** hődegradációjára nincs lehetőség a tej forráspontján (101.3 °C) , amelyet a mérési eredmények is alátámasztanak.

Szignifikáns különbség mutatkozik a napraforgóolajban, illetve az olíva olajban történt sütés között. Az olíva olaj a négy féle toxinból kevesebbet tartalmazott, mint a napraforgóolaj, illetve a zsír.

Az ***Aflatoxin B2*** olajba illetve a zsírba átkerülő és abból kimutatható mennyisége a legkevesebb. A maradék toxin nem volt kimutatható az olajokban és zsírban sütött termékekben sem. Az okok tisztázására még további kísérleteket folytatok.

A mért eredmények alapján levont következtetéseimet arra a megállapításra jutottam, hogy az aflatoxinok mennyisége zsírban, étolajban sütés során jelentősen nem változnak, hőstabilak maradnak, míg olívaolajban történő sütés hatására csökken a mennyiségük. Ammónium-hidrogén-karbonát jelenlétében a sütés során változik az aflatoxinok mennyisége. Az aflatoxin M1 bomlása a tejben nem jelentős, amely eredménnyel a szakirodalmi eredményeket alá

tudom támasztani.[29,89], bár a szakirodalmi cikkek nagy többségben UHT és pasztőrözött tejek vizsgálatáról illetve a sajtkészítés során a toxin csökkenéséről szólnak, az általam alkalmazott módszerhez kismértékben hasonló módszerrel elvégzett vizsgálatot *Choudhary, P. L.; Sharma, R. S.; & Borkartria, V. N..1998*-as cikkében olvashatunk csak [29].

7.6.3 Biotermékek toxintartalmának vizsgálata

7.6.3.1 Anyagok és módszerek

Méréseim során a bio-táplálkozásban termelt élelmiszerek és alapanyagok toxintartalmát vizsgáltam HPLC-MS módszerrel deoxynivalenolra (DON), nivalenolra (NIV), és zearalenonra (ZON). A vizsgálatok alapanyagaként reformtáplálkozásra szakosodott boltokból és kisebb illetve nagyobb hipermarketekből származó, biogazdálkodásban termesztett élelmiszereket és ezekből előállított termékeket vizsgáltam.

7.6.3.2 Biotermékek mintái

A vizsgálati mintákat sorrendben a 25. táblázat tartalmazza.

25. táblázat: A biotermékek DON, NIV, ZEA tartalmának vizsgálatára felhasznált minták

bio köles	teljes kiőrlésű búzaliszt
bio kenyér,	rozsliszt,
bio rizs,	kukoricaliszt
bio búza,	kukoricapehely
barna rizs,	barna kenyér
bio kukoricadara	bio zsömle
bio kukoricaliszt	pászka
Graham liszt	durumliszt

7.6.3.3 Kalibrációhoz használt mérőoldatok koncentrációi:

A deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV) és zearalenon (ZON) toxin alapoldatokból acetonitril segítségével készítettem el a kalibrációhoz szükséges mérőoldat sorozatot, amelyet elkészítés után hűtőben, sötét üvegben tároltam.

26. táblázat: DON, NIV és ZEA mérőoldatok koncentrációi

DON	0,05 µg/L	0,1 µg/L	0,5 µg/L	1,0 µg/L	5 µg/L	10 µg/L	20 µg/L
NIV	0,1 µg/L	0,5 µg/L	1 µg/L	5 µg/L	10 µg/L	25 µg/L	50 µg/L
ZEA	0,1 µg/L	0,5 µg/L	1 µg/L	5 µg/L	10 µg/L	25 µg/L	50 µg/L

7.6.3.4 Kimutatási paraméterek:

A deoxynivalenol, nivalenol és zearalenon toxinok kimutatási paraméterei megegyeztek a Shimadzu HPLC-MS 2010 EV (Kyoto, Japán) készülékre optimalizált kimutatási módszerek paramétereivel. A kimutatási módszert kiegészítettem még PDA detektor alkalmazásával is.

7.6.3.5 Toxinoldatok koncentrációjának meghatározása

A mintákban lévő toxinok mennyiségi meghatározásánál két párhuzamos módszert használtam. A toxin mérőoldatok felhasználásával felvett kalibrációs egyenest és a sztenderd addíció módszerét használtam azoknál a mintáknál, ahol találtam toxint. Az analitikai vizsgálatok során a minták toxinkoncentrációja több esetben is nagyobbnak bizonyult, mint a kalibrációs oldatsor pontjai által meghatározott értékek, ezért ilyenkor a mintát 100 szorosára hígítottam az extrakció után acetonitril felhasználásával.

7.6.3.6 Mintavételezés

A minták magyarországi hipermarketekből, illetve mindenki számára elérhető biotermékeket árusító boltokból származtak. A vásárlás után a gabonaféléket és az alapanyagokat hűvös, páramentes helyen tároltam, míg a kész élelmiszereket a minta előkészítésig hűtőbe tettem. A minták beszerzésénél ügyeltem arra, hogy a termék úgynevezett „biogazdálkodásban előállított”, illetve „bio-termék” címkével rendelkezzen.

7.6.3.7 Extrakció és tisztítás

A mintákból 20-20 g-ot 50 mL acetonitrilben extraháltam állandó keverés mellett 15 percig, majd 5 perc pihentetés után az oldat tisztájából 40 mL-t gömblombikba tettem. Az extraktumot rotációs vákuumbepárló segítségével 60 °C-os vízfürdőn bepároltam, majd a maradékot 2 mL acetonitril/metanol (80:20) v/v arányú elegyben visszaoldottam ultrahangos fürdő segítségével. Mivel a minták kolloid oldat tulajdonságait mutatták, ezért 20 percre -20 °C-os hűtőbe tettem, majd 12.000 1/perc fordulatszámon centrifugáztam azokat. Az oldat tisztájából 1900 µL mennyiséget tisztított N_2 gáz segítségével szárazra pároltam, majd a maradékot 400 µL mennyiségű acetonitrilben feloldottam.

7.6.3.8 Visszanyerési tesztek

Az extrakciós folyamat ellenőrzésére külön párhuzamos méréseket végeztem olyan búza minta felhasználásával, amely nem tartalmazott toxint (DON, NIV, ZON) a méréseim szerint. 10 g búza mintához adtam DON esetében 1, 10 és 100 ng toxint tartalmazó oldatot, NIV esetében 10, 100, 200 ng toxint tartalmazó oldatot, ZON esetében pedig 100, 200, 500 ng toxint tartalmazó oldatot. Az oldószer elpárolgása után a toxinok kinyerését az „Extrakció és tisztítás” című fejezetben leírtak szerint ugyanazon módszerrel végeztem.

A visszanyerési tesztek eredményeit az 27. táblázatban mutatom be. A közölt adatok 3 párhuzamos mérés átlagából adódtak.

27. táblázat: A sztenderd mintákból visszanyert toxinok mennyiségei különböző toxinokra vizsgálva

DON mennyisége (ng * g^{-1})	**visszanyert % ± RSD (%)**
0,1	88 ± 7
1	92 ± 4
10	96 ± 5
NIV mennyisége (ng * g^{-1})	
1	93 ± 4
10	90 ± 6
20	95 ± 4
ZEA mennyisége (ng * g^{-1})	
10	96 ± 4
20	94 ± 8
50	92 ± 5

7.6.3.9 Eredmények és értékelésük:

A bio élelmiszer minták toxinkoncentrációjának meghatározása során kapott eredményeket a következő táblázatban foglaltam össze és a 10. diagramon mutatom be.

28. táblázat: A bio termelésben termesztett alapanyagok és késztermékek toxinkoncentrációjának mérési eredményei

Minta	**DON (µg kg^{-1})**	**NIV (µg kg^{-1})**	**Zearalenon (µg kg^{-1})**
köles	515	n.d.	n.d.
bio kenyér	114	642	597
bio rizs	n.d.	213	283
bio búza	n.d.	n.d.	n.d.
barna rizs	210	875	823
bio kukoricadara	792	305	297
bio kukoricaliszt	n.d.	936	886
Graham liszt	302	698	720
teljes kiőrlésű liszt	492	322	288
rozsliszt	575	1109	1039
Durum liszt	185	n.d.	n.d.
kukoricaliszt	207	n.d.	n.d.
bio kukoricapehely	317	111	116
barna kenyér	214	370	374
bio zsömle	n.d.	589	627
pászka	n.d	n.d	n.d

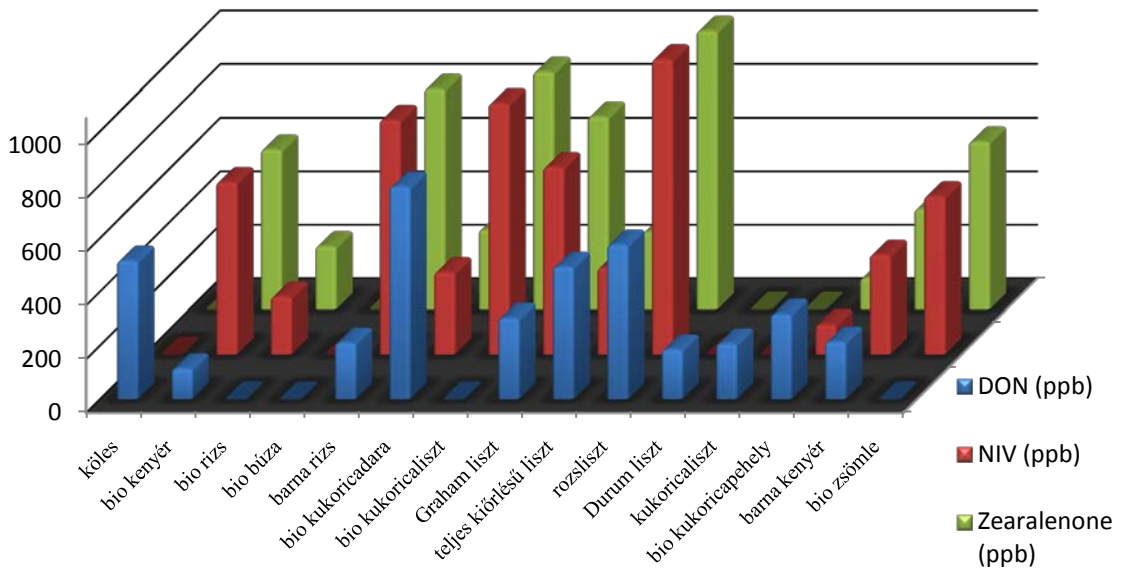
n.d.: nem detektálható, kimutatási határ alatti koncentráció

A 28. táblázat adataiból is kiderül, hogy a biotermékek tartalmaznak toxinokat, bár nem minden esetben lehetett kimutatni minden toxin jelenlétét az élelmiszerekben.

A deoxynivalenol esetében az élelmezésügyi határérték kekszek, gabonapelyhek esetében 500 µg/kg, gabonalisztek esetében 750 µg/kg, így egyedül a bio kukoricadara lépte túl a megengedett határértéket.

A **nivalenol** esetében a 0,7 µg/testtömeg kg-ra megadott határértéket nézve, egy átlagosan 70 kg-os emberre számolva 49 µg nivalenol mennyiség lenne maximum megengedett, ennek az értéknek általában 5-10 szeresét mutattam ki a mérések során egy kilogramm élelmiszermintában, bár ezen termékekből napi 1 kg fogyasztása nem általános tendencia.

A **zearalenon** megengedett koncentrációja a közvetlen emberi fogyasztásra szánt gabonalisztben 75 µg/kg, kukoricalisztben és kukorica termékekben 200 µg/kg, kenyérben és kukoricapehelyben 50 µg/kg, amely határértékeket a minták toxinkoncentrációja többségében átlépett.



10. diagram: A 3 vizsgált toxin koncentrációja a vizsgálati bio élelmiszer mintákban

Általánosan megállapítható az is, hogy azokban a mintákban, ahol a nivalenol illetve a zearalenon szennyezés mértéke nagy, ott a másik toxin koncentrációja is hasonlóan magas. A deoxynivalenol esetében ez nem mondható el, mivel vannak olyan minták – például a köles, a bio kukoricadara, a teljes kiőrlésű liszt, a durum liszt és a kukoricaliszt –, ahol egyedül csak a DON toxin mutatható ki, illetve a többi toxinnál nagyobb koncentrációban van jelen.

A deoxynivalenol esetében a toxin koncentrációja a bio kukoricaliszt mintában lépte át a megengedett határértéket, a többi termék esetében nem (I. Melléklet), de megközelíti azt. A

zearalenon esetében a vizsgált toxinok koncentrációi az élelmezésügyi határérték felett vannak, a mért érték sokszor többszöröse a megengedett határértéknek. Az eredmény gyanakvásra adott okot, hogy a meghatározás során esetleg mérési vagy számolási hiba történt, de az újramérés során 6 %-on belüli eltéréssel hasonló eredményeket kaptam.

A késztermékek közül a bio kenyér és bio zsömle nagyobb mennyiségben tartalmazott nivalenolt és zearalenont, mint a többi termék. Teljes érvényű következtetést nem lehet levonni arra nézve, hogy az alapanyaguk milyen mértékben tartalmazhatott toxint, mert a kész termékek alapanyaga nem tekinthető azonosnak, de az biztosan megállapítható, hogy a nyersanyagként felhasznált gabona tartalmazta a vizsgált toxinokat [6,15,26,91,152].

Két vizsgált termék: a bio-búza és a pászka nem tartalmazott toxint. Valószínűsíthető, hogy a nyersanyagként felhasznált búza nem kapott fertőzést, vagy a minta azon része, amelyet vizsgáltam, toxinmentes volt. Mivel tudjuk, hogy az alapanyagok feldolgozásánál a különböző őrlésekből származó sarzsok más-más szennyezési értékeket képviselhetnek, ezért érthető lehet a belőlük készült fél- és késztermékek toxintartalma közötti eltérés is.

A biotermékek vizsgálatát összefoglalva megállapítható, hogy a biológiai gazdálkodásban termelt élelmiszer alapanyagok és belőlük előállított vizsgált termékek tartalmaznak deoxynivalenolt, nivalenolt és zearalenon toxinokat. Megállapítható, hogy a vizsgált élelmiszerek közül több mintában élelmezési határérték feletti koncentrációban lehetett kimutatni toxint. A vizsgált minták kis részében (2 minta) nem találtam kimutatható mennyiségben a 3 vizsgált toxinból.

A szakirodalmi hivatkozások [6,15,25,91,152] is foglalkoznak a gabonafélék mikotoxin szennyezéseivel. A hivatkozásokban felsorolt cikkek vizsgálati fókuszába a fuzárium toxinok állnak. A vizsgálataikból kisebb-nagyobb mértékű szennyeződések kimutathatóak a gabonában, egyes esetekben kiugró, határérték feletti toxin szinteket mérve. A szakcikkek többsége kis vizsgálati mintaszámmal és főleg az alapanyagokban vizsgálódott, míg az általam elvégzett vizsgálat az alapanyagokban és a termékekben is keresett és detektált toxinokat. Bár az alapanyag és a terméke között nem volt az előállítási folyamat szerint összefüggés.

8 Következtetések

A vizsgált 8 mikotoxin AFB_1, AFB_2, AFG_1, AFG_2, AFM_1, DON, NIV, ZEA esetében a rendelkezésemre álló Shimadzu HPLC-MS 2010 EV készülékre optimalizált analitikai módszerek kimutatási és meghatározási határát a szabvány módszerekhez, és a szakirodalmi hivatkozásokhoz képest alacsonyabb értékre sikerült beállítanom. Az aflatoxinok esetében a kidolgozott módszerek LOD értékeit az általam összehasonlításra használt szabvány és szakirodalmi módszerek értékekeihez képes csökkentettem, az AFB1 esetében 1/40 részére, AFB2 esetében 1/80 részére, AFG1 esetében 1/15 részére, AFG2 esetében 1/40 részére, és AFM1 esetében 1/157 részére.

A további vizsgált mikotoxinok közül a deoxynivalenol LOD értékét 1/140-ed részére, míg az ochratoxin-A LOD értékét 1/160 részére a szabvány módszer, és 1/15 részére a szakirodalmi módszerekhez képest, míg a nivalenol esetében 1/28-ad, a zearalenon LOD értékét 1/94 részére csökkentettem [43,77,85,97,98,102].

A szabvány és a kidolgozott módszerek LOQ értékeinek összehasonlítása alapján elmondható, hogy az aflatoxinok esetében 1/20 részére, deoxynivalenol esetében 1/10 részére, míg ochratoxin-A esetében az LOQ értéket 1/100 részére csökekntettem a szabványos módszerhez képest, míg a szakirodalmi módszerek LOQ értékéhez képest 1/6 részére sikerült csökkenteni. Nivalenol esetében 1/50 és zearalenon esetében 1/3 részére csökkentettem.

A kidolgozott extrakciós módszer alkalmasságát elvégzett visszanyerési tesztekkel bizonyítottam a vizsgálatok alapját képező 8 toxinokra, illetve összehasonlítottam, az általam kidolgozott módszer visszanyerési értékeit a szakirodalomban használt C8, C18, Carboprep és MycoSep SPE oszlopok visszanyerési értékeivel, amely összehasonlítás alapján elmondható, hogy a kidolgozott módszerem 90 % körüli toxin visszanyerési értékei megfelelnek a szakirodalmi módszerekben használt SPE és IA oszlopok visszanyerési értékeinek. Az elvégzett vizsgálatok során alkalmaztam a mikotoxinok különböző analitokból történő kivonására.

A kidolgozott mintaelőkészítési technika és toxin meghatározási módszerek alkalmazásával vizsgáltam különböző élelmiszerekben a toxin tartalmat. Minden esetben sztenderd addíció módszerével biztosítottam a toxinok pontos koncentrációjának meghatározását azokban a mintákban, ahol találtam toxint. A kidolgozott extrakciós és mérési módszerekkel elvégzett toxin kimutatási vizsgálatok során az élelmiszerek közül a bor ochratoxin-A tartalmának elemzése alapján elmondható, hogy a mediterrán éghajlatról

származó borok tartalmazhatnak ochratoxin-A-t. A magyarországi –főleg Egri Borvidékről - származó borokban nem sikerült kimutatni az ochratoxin-A toxint.

Az aflatoxinok – AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 - hőtranszformációjára végzett kísérletekből megállapítható, hogy az aflatoxinok étolajban és zsírban sütés során nem, vagy csak kis mértékben bomlanak el, olívaolajban történő sütés hatására a bomlás jelentős. Pékárú, úgy mint keksz sütése során az aflatoxinok jelentősen bomlanak, a bomlást a kekszben alapanyagai között felhasznált ammónium-hidrogén-karbonát segíti, míg a réteslap sütése során az aflatoxinok nem szenvedtek bomlást.

Az aflatoxin M_1 tejben történő bomlási vizsgálataiból levonható az a következtetés, hogy a tejben forralás hatására nem változik jelentősen a toxin mennyisége.

A gabonatermékek és alapanyagaik DON, NIV, és ZON toxinokra végzett vizsgálataimból megállapítható, hogy egyes gabona alapanyagok toxin tartalma jelentős, a toxinok megjelenése az alapanyagban és termékekben nem egyértelmű a bio és normál gazdálkodásban termelt és előállított termékek között.

Méréseket végeztem a különböző toxinok felhasználásával, hogy a valós mátrixban is teljesülnek-e a kidolgozott módszerek mérőodlatokra megadott LOD és LOQ értékei, valamint a retenciós idő és csúcsterület megbízhatóságára is végeztem vizsgálatokat, amelyek eredményeit a 32 és 33. táblázatban közlöm.

29. táblázat: Valós mátrixban meghatározott toxinok retenciós idő és csúcsterület ismételhetősége Restek C18-as oszlopon.

	retenciós idő ismételhetősége MS RSD %	***Csúcsterület ismételhetősége MS RSD %***	***mátrix***
Aflatoxin B_1	0,38	1,3	olajok*
Aflatoxin B_2	0,41	0,8	olajok*
Aflatoxin G_1	0,38	1,2	olajok*
Aflatoxin G_2	0,39	0,75	olajok*
Aflatoxin M_1	0,4	0,55	tej
Deoxynivalenol	0,41	0,7	búza
Ochratoxin-A	0,38	0,5	bor
Nivalenol	0,83	0,75	búza
Zearalenon	0,37	0,6	búza

**…kolbász, réteslap, keksz, Oliva olaj, napraforgó, sertészsír*

30. táblázat: Valós mátrixban meghatározott toxin visszanyerési tesztek, LOD és LOQ értékek összehasonlítása a szakirodalmi cikkek értékeivel.

	mátrix	*koncentráció*	*visszanyerés RSD %*	*LOD saját módszer µg/kg*	*LOQ saját módszer µg/kg*	*visszamyerés szakirodalmi % mátrix*
Aflatoxin B_1	kkr*	25 µg	98,8 ± 4,7 %	0,00254	0,05	78-86 [68]
	olaj **	25 µg	94 ± 5%			mogyoró
Aflatoxin B_2	kkr*	25 µg	98 ± 3,5 %	0,00127	0,05	78-86 [68]
	olaj **	25 µg	95,6 ± 7%			mogyoró
Aflatoxin G_1	kkr*	25 µg	98,4 ± 4,1 %	0,00636	0,05	78-86 [68]
	olaj **	25 µg	96,8 ± 5%			mogyoró
Aflatoxin G_2	kkr*	25 µg	98 ± 4,3 %	0,000254	0,05	78-86 [68]
	olaj **	25 µg	94 ± 7%			mogyoró
Aflatoxin M_1	tej	25 µg	98,8 ± 4 %	0,000636	0,05	80-98 [85]
						tej
Deoxynivalenol	búza	0,1 µg/kg	88 ± 7%	0,00127	0,05	46-95 [97]
	búza	1,0 µg/kg	92 ± 4%			gabona, kenyér
	búza	10,0 µg/kg	96 ± 5%			46-95 [97]
Ochratoxin-A	bor	0,1 µg/L	89 ± 8%	0,00127	0,01	78-88 [112]
		1,0 µg/L	94 ± 6%			sör
Nivalenol	búza	1,0 µg/kg	93 ± 4%	0,00636	0,01	46-95 [97]
	búza	10,0 µg/kg	90 ± 6%			gabona, kenyér
	búza	20,0 µg/kg	95 ± 4%			
Zearalenon	búza	10,0 µg/kg	96 ± 4%	0,00127	0,05	78-130 [43]
	búza	20,0 µg/kg	94 ± 8%			kukorica
	búza	50,0 µg/kg	92 ± 5%			

**… kolbász, keksz, réteslap*
***… Oliva olaj, napraforgó, sertészsír*

LOD és LOQ értékek vizsgálata valós mátrixban

A mérőoldatok felhasználásával számított LOD és LOQ értékek teljesülését valós mátrixban is ellenőriztem. A valós mátrixot a vizsgálati minták adták abban az esetben, amikor az nem volt szennyezett toxinnal. A DON, NIV, ZEA esetében az LOD és LOQ értékek meghatározása toxinmentes búza segítségével történt. A mérőoldatok segítségével meghatározott LOD és LOQ értékeket a valós mátrixban is tarthatóak voltak.

9 Összefoglalás és új tudományos eredmények

A dolgozatban az ochratoxin-A, aflatoxin B_1, B_2, G_1, G_2, M_1, deoxynivalenol, nivalenol és zearalenon mikotoxinok kvantitatív és kvalitatív analízisével, valamint élelmiszermintákból történő kimutatási lehetőségeivel kapcsolatos kutatási eredményeimet foglaltam össze.

Rendszerezve összefoglaltam és elemeztem a mikotoxinok analitikájának szabványos vizsgálati módszereit, a szakirodalmi cikkekben publikált toxin-analitikai eljárások kimutatási paramétereit, az extraháló szer minőségére vonatkozó ajánlásokat, és az alkalmazott extrakciós technikákat. A rendelkezésemre álló Shimadzu 2010 EV HPLC-MS készülékre optimalizáltam a vizsgált mikotoxinok kimutatási módszereit. Igazoltam, hogy az általam optimalizált analitikai módszerek kimutatási határai megfelelőek a toxinok vizsgálatára. Összehasonlítottam a szabvány módszerekhez és a mérvadó szakirodalmi hivatkozásokhoz képest a kidolgozott analitikai módszerek LOD és LOQ értékeit, precizitását, lineáris tartományukat, a toxinokra vonatkoztaott visszanyerési tesztjeit. A különbözó toxinok analízisére meghatározott LOD és LOQ értékek legalább egy nagyságrenddel kisebbek a szakirodalmi módszerek értékeihez képest.

Elemeztem a toxinok kinyerésére javasolt extrakciós technikákat és megvizsgáltam a kiválasztott extraháló szerek extrakciós hatékonyságát. A tapasztalatok alapján új toxin-extrakciós technikát dolgoztam ki, amely eredményességét ellenőriztem és igazoltam a vizsgált toxinok esetén. A kidolgozott extrakciós technikában alkalmazott acetonitriles extrakció paramétereit optimalizáltam.

A kifejlesztett módszerrel élelmiszerminták analízisét végeztem el, a kiválasztott toxinokra fókuszálva. A vizsgálatok során elemeztem magyarországi és mediterrán országokból származó borminták ochratoxin-A (OTA) tartalmát, és összefüggéseket kerestem a kimutatott OTA tartalom, valamint a termőhely és az éghajlat között. Megállapítottam, hogy a mediterrán éghajlati körülmények között termesztett szőlőből készült borok tartalmazhatnak OTA-t, néhány esetben az OTA koncentráció átlépte a megengedett határértéket. A vizsgálatok során a magyarországi bormintákból nem tudtam kimutatni az OTA szennyezést.

Méréseket végeztem az aflatoxinok sütés közbeni hőtranszformációjára, mértem az aflatoxin mennyiségének a változását a hőhatásnak kitett termékben és a hőt közlő közegben. Megállapítottam, hogy az aflatoxin B_2 kivételével az általam vizsgált toxinok stabil, aktív formában megmaradnak a sütési közegben (napraforgóolaj, olíva olaj és zsír esetében). Kimutattam, hogy az olíva olajban történő sütés esetében az olajba átkerült aflatoxinok aktív

mennyiségei a legalacsonyabbak a többi hő közlő közeghez képest. A kekszek sütése során valószínűsíthető, hogy a keksz alapanyagába bekevert szalalkáli (ammónium-hidrogén-karbonát) bomlása során keletkező ammónia roncsolhatja a toxint.

Vizsgáltam az öko gazdálkodásban előállított bio élelmiszer alapanyagok és bio élelmiszerek mikotoxin tartalmát deoxynivalenolra, nivalenolra és zearalenonra nézve. A vizsgált alapanyagokból és élelmiszermintákból kimutattam az elemzett toxinokat, amelyek közül néhány koncentrációja az egészségügyi határértéket is átlépte.

10 Tézisek

1. Új, analitikai technikát dolgoztam ki és optimalizáltam aflatoxin B_1, B_2, G_1, G_2, M_1, ochratoxin-A, deoxynivalenol, nivalenol és zearalenon toxinokra Shimadzu 2010 EV HPLC-ESI/APCI-MS rendszerre.

2. Új, optimalizált paraméterű mintaelőkészítési eljárást dolgoztam ki, amely 1:1 v/v arányú, javasolt 50-50 mL, illetve szilárd minta esetén 10g-50 mL minta-acetonitril arány megtartása mellett 5 g NaCl adagolásával segített toxin szeparációt tesz lehetővé folyadék mintákból, lecsökkentve a mintaelőkészítési lépések számát.

3. Kísérletileg igazoltam az új minta előkészítési technika alkalmazhatóságát az adott toxinokra sztenderd oldatok segítségével valós mátrixban is. Meghatároztam a kidolgozott analitikai módszerek vizsgált toxinokra vonatkozó kimutatási határait és a toxinok mennyiségi mérésének alsó határait élelmiszermátrixban is. A szakirodalmi módszerekhez és a rendelkezésemre álló szabványos módszerek értékeihez képest csökkentettem az LOD értékeket 1/15-1/300-ad, az LOQ értékeket 1/10-1/100 részére.

4, Az új mintaelőkészítési és analitikai technika alkalmazásával meghatároztam a deoxynivalenol, nivalenol és zearalenon mikotoxinok mennyiségét a bio élelmiszermintákban. Kísérletileg bizonyítottam a mediterrán országokból és magyarországi pincészetekből származó borok ochratoxin-A tartalmának eltérését, és kauzális összefüggést igazoltam a toxintartalom és a termőhely éghajlati viszonyai között.

5, Megállapítottam, hogy az aflatoxinokkal szennyezett különböző élelmiszerek hőkezelése során az aflatoxinok átkerülhetnek a sütési közegbe, és meghatároztam az aflatoxinok koncentráció csökkenésének mértékét a különböző sütési közegekben. Megállapítottam továbbá, hogy legnagyobb mértékben az olíva olajban bomlanak le az aflatoxinok sütés közben. Kimutattam, hogy a keksz sütése során az aflatoxinok jelentős része elbomlik. Igazoltam, hogy a tejmintákban az aflatoxin M1 toxin koncentrációja a főzés hatására nem csökken.

Theses

1. New optimized HPLC-MS analytical and extraction techniques have been developed for the determination of Aflatoxin B1, B2, G1, G2, M1, Ochratoxin-A, Deoxynivalenol, Nivalenol and Zearalenone mycotoxins for Shimadzu 2010 EV HPLC-ESI/APCI-MS system.
2. New, optimized sample preparation method were developed, in which case 1:1 v/v ratio, suggested 50-50 mL or in a case of solid sample while retaining 10g-50 mL sample-acetonitrile rate, helped with 5 g NaCl, toxin separation allows from fluid samples, reducing the number of sample preparation steps.
3. Experimentally were proved the adaptability of new sample preparation technique by means of specific toxin standard solutions in real matrix. The developed analytical method's detection limits were specified and lower limits of quantitative measurement of toxins in food matrix. Compared with standard methods from the literature and available methods, I reduced the value of LOD for 1/15-1/300, LOQ values for 1/10-1/100.
4. The amount of Deoxynivalenol, Nivalenol and Zearalenone mycotoxins in food samples especially in organic foods were proved with new sample preparation and analytical method. Tentatively were confirmed differences between the Ochratoxin-A concentrations of wines produced in Mediterranean countries and in Hungary and have been proved correlation the toxin content and climatic conditions in the region.
5. It was shown that Aflatoxins could be transfered from the foods fried in oils and lard to the frying media during the frying process. The decreasing of the concentrations of Aflatoxins in various frying media was determined. The highest rates for degradation of Aflatoxins were detected in olive oils. It was shown that Aflatoxins were degradated in biscuits under normal baking procedure. It was demonstrated that Aflatoxin M1 was not destroyed in the milk samples under normal cooking conditions.

Zusammenfassung und Thesen

Zusammenfassung

Unsere Lebensmittel können Stoffe enthalten, die als giftig für den menschlichen Organismus gelten. Unter den giftigen Stoffen bedeuten die von verschiedenen Pilzarten ausgeschiedenen sekundären Stoffwechselprodukte (Mykotoxine) eine potentielle Gefahrenquelle. Mykotoxine kommen insbesondere in Getreideprodukten vor, aber sie sind in allen Segmenten der Nahrungskette, so auch in tierischen Produkten zu finden.

In meiner Arbeit verfolge ich das Ziel, die Anwesenheit von Mykotoxinen in verschiedenen Lebensmittelproben zu untersuchen, Zusammenhänge zwischen dem Mykotoxingehalt und dem Herstellungsverfahren bzw. dem Standort zu suchen. Ich habe die Wärmedegradation von ausgewählten Mykotoxinen im Laufe von Backexperimenten verfolgt, sowie die Anwesenheit von Mykotoxine ausscheidenden Pilzen in Klimaanlagen in Ungarn untersucht.

Thesen

1. Ich habe ein neues analytische Messverfahren für Aflatoxin B1, B2, G1, G2, M1, Ochratoxin-A, Deoxynivalenol, Nivalenol und Zearalenon Toxine mit dem System Shimadzu 2010 EV HPLC-ESI/APCI-MS ausgearbeitet und optimiert.
2. Ich habe ein neues Probenvorbereitungsverfahren mit optimierten Parametern ausgearbeitet, das, bei Beibehaltung des Verhältnisses 1:1 v/v, empfohlenen 50-50mL, bzw. bei festen Proben 10g-51mL (Probe-Azetonitril) eine mit Zugabe von 5g NaCl unterstützte Toxin-Separation aus flüssigen Proben ermöglicht, wobei die Vorbereitungsschritte reduziert werden.
3. Die Anwendbarkeit der neuen Probenvorbereitungstechnik wurde im Falle der gegebenen Toxine mit Hilfe von Standardlösungen auch in realer Matrix experimentell sichergestellt. Ich habe die Nachweisgrenzen der ausgearbeiteten Messverfahren bezüglich der untersuchten Toxine und die unteren Messgrenzen der quantitativen Bestimmungen der Toxine auch in Lebensmittelmatrix bestimmt. Im Vergleich zu den Verfahren in der Fachliteratur und den mir zur Verfügung stehenden Standardverfahren habe ich die LOD-Werte auf 1/15-1/300 und die LOQ-Werte auf 1/10-1/100 reduziert.
4. Mit der neuen Probenvorbereitungs- und analytischen Verfahren habe ich die Menge der Mykotoxine Deoxynivalenol, Nivalenol und Zearalenon in Biolebensmittelprobe bestimmt. Die Abweichungen zwischen den Ochratoxin-A-Gehalten von Weinen aus Ungarn und aus Mittelmeerländern, sowie kausale Zusammenhänge zwischen Toxingehalt und Klimaverhältnisse am Entstehungsort habe ich experimentell ausgewiesen.
5. Ich habe festgestellt, dass die Aflatoxine bei der Wärmebehandlung der verschiedenen mit Aflatoxinen verunreinigten Lebensmitteln in das Bratenfett gelangen können, und ich habe die Reduktion der Aflatoxinkonzentration in den verschiedenen Bratmitteln bestimmt. Ich habe weiterhin festgestellt, dass sich die Aflatoxine am meisten beim Braten in Olivenöl abbauen. Es wurde weiterhin

bestätigt, dass sich die Aflatoxine beim Backen von Keksen zum großen Teil abbauen. Es wurde bewiesen, dass sich der Aflatoxin-M1-Gehalt beim Kochen von Milch nicht änderte.

11 Köszönetnyilvánítás:

Köszönettel emlékezem Dr. Liszi János Tanár Úrra a témavezetésben nyújtott segítségéért, valamint köszönöm, hogy a munkám során segítő kezet nyújtott problémáimban. Köszönöm Dr. Dallos András tanár úrnak a dolgozatom megírásában nyújtott segítségét és témavezetői munkáját; illetve minden egyes kollegámnak, aki támogatott és segített abban, hogy a doktori dolgozatom elkészüljön. Nem utolsó sorban köszönöm Dr. Murányi Zoltán tanár úrnak, hogy segítette a munkámat.

Köszönöm Edinának a sok türelmet.

12 A témában megjelent publikációk:

1. B. Tóth Szabolcs, Murányi Zoltán, Dallos András, Jolánkay Rita:
   Analysis of Deoxynivalenol, Nivalenol, Zearalenone in Food by LC–APCI–MS.
   Chromatographia, Springer Volume 73: Supplement 1, 171 - 174 (2011),
   DOI:10.1007/s10337-011-1990-x, Online ISSN:1612-1112, Print ISSN 0009-5893

2. Rita Jolánkay, Szabolcs B. Tóth, László Wágner, Ferenc Husvéth:
   Mycotoxins in the food chains: Appearance of the toxins in the sheep milk and milk products.
   Cereal Research Communications Volume 36: Suppl. B, 365 - 366 (2008)
   DOI: 10.1556/CRC.36.2008.Suppl.B.33

3. László Rácz, József Rácz, Csaba Csutorás, Szabolcs B. Tóth, Mihály Óvári, Gyula Záray:
   Effect of variety of grapes on trace element and ochratoxin-a contents of Hungarian red wines.
   Toxicological and Environmental Chemistry Vol 92: marc-april, 609 - 616 (2011)
   DOI:10.1080/0277224100359163

4. Jolánkay Rita, Fischl Géza, B. Tóth Szabolcs, A. Torres-Acosta, Wágner L., Husvéth Ferenc:
   Mycotoxins and moulds – a major source of biotic stressors affecting animal nutrition.
   Cereal Research Communications Vol 37, 623 - 626 (2009), DOI: 10.1556/623 CRC.37.2009.Suppl.5

5. Jolánkay Rita, B. Tóth Szabolcs, Wágner László, Husvéth Ferenc:
   Mikotoxinok az élelmiszerláncban: megjelenésük a juhtejben és a kefírben.
   Animal welfare, ethology and housing system Volume 4: Issue 2, 769 - 772 (2008),
   (ISBN:978-963-9639-24-9)

12.1 A témában tartott konferencia előadás poszterrel

1. B.Tóth Szabolcs, Kiss Attila: **Az aflatoxinok hőtranszformációjának vizsgálata különböző élelmiszermintákban,**
Centenáriumi vegyészkonferencia Sopron, 2007.05.29-06.01. P25

2. Jolánkay Rita, B. Tóth Szabolcs, Wágner László, Galamb Eszter, Husvéth Ferenc:
   Mikotoxinok nyomonkövetése az élelmiszerláncban: takarmánytól a juhtejig.
   XIV. ITF Konferencia Keszthely, Magyarország, 2008.04.03 - 2008.04.05.

3. Szabolcs B.Toth, Csaba Csutorás, László Rácz: **Analysis of Ochratoxin-A content of wines originating from the Mediterranean and Hungary,**
   XIII Italian-Hungarian Symposium onSpcetrochemistry, enviromnetal and food safety, Bologna 2008.04.20-24, Book of Abstract, P120

4. Szabolcs B.Toth: Csaba Csutorás, László Rácz, Attila Kiss: **Analysis of micotoxin content of reform nutrition;**

XIII Italian-Hungarian Symposium onSpcetrochemistry, enviromnetal and food safety, Bologna 2008.04.20-24, Book of Abstract, P119

5. B. Tóth Szabolcs: Szarvas József, Jolánkai Rita, Lénárt Boglárka, Csutorás Csaba, Rácz László: **Mikotoxinokat termelő gombák jelenléte légkondicionáló berendezésekben.**
51. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés, Nyíregyháza, 2008.06.30-07.02.

6. Jolánkay Rita, Wágner László, Sharandak Pavlo, B. Tóth Szabolcs, Husvéth Ferenc: **Mikotoxinok megjelenése az élelmiszerláncban.**
50 th Jubile Georgikon Scientific Conference, Keszthely, Keszthely, Magyarország, 2008.09.25 - 2008.09.26.

7. Szabolcs B. Tóth, Rita Jolankai, József Szarvas, Zoltán Murányi: **Analysis of metabolic products of fungi growing in air conditioning systems by HPLC-MS**
XXXVI CSI Budapest,2009.08.30-09.03,

8. Szabolcs B. Tóth, Rita Jolankai, Zoltán Murányi, András Dallos: **Determination of mycotoxins in healthy foods with special regard to deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone**
XXXVI CSI Budapest,2009.08.30-09.03

9. Szabolcs, B. Tóth, R. Jolankai, J. Szarvas, Z. Murányi:
Analysis of metabolic products of fungi growing in air conditioners by HPLC-MS (new results)
XVI. International Symposium on Separation Science, Rome, Olaszország, 2010.09.06 - 2010.09.10.

10. B. Tóth Szabolcs, Murányi Zoltán, Dallos András, Jolánkay Rita:
Determined Mycotoxins in Health foods- with especially Deoxynivalenol, Nivalenol, Zearalenone, (New results).
XVI International Symposium on Separation Science, Rome, Olaszország, 2010.09.06 - 2010.09.10.

11. B. Tóth Szabolcs, Végh Éva:
Zearalenon (F2 toxin) bomlásának vizsgálata élelmiszerekben különböző térfogatnövelő szerek hatására
MKE 1. Nemzeti Konferencia, Sopron, 2011.05.22-25-

12. B. Tóth Szabolcs, Végh Éva:
Examination of heat degradation of Zearalenon (F-2 toxin) by some different leavening agents.
17 International Symposium on Separation Science ,Cluj-Napoca, Románia, 2011.09.05 - 2011.09.09.

13. B. Tóth Szabolcs:
Degradation of different mycotoxins by ozone.
*17 Intenational Symposium on Separation Science,*Cluj-Napoca, Románia, 2011.09.05 - 2011.09.09.

14. B. Tóth Szabolcs, Gál István

Analysis of degradation of *Fusarium and Aspergillus* species produced by toxin sin vitro digestion

9th. Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Siófok , 2013.09.04.06, ISBN: 978-963-89335-2-2

15. B Tóth Szabolcs

Reduction of quantity of mycotoxins in food products by different leavening agents, analysis of metabolite

19th International Symposium on Separation Sciences: New Achievements in Chromatography. Porec, Horvátország, 2013.09.25-2013.09.28.p. 96.

16. B. Tóth Szabolcs,

Examination of degradation of different mycotoxin and degradation products with ozone-enriched medium by hplc-ms technique

19th International Symposium on Separation Sciences: New Achievements in Chromatography. Porec, Horvátország, 2013.09.25-2013.09.28.p. 93.

13 Felhasznált szakirodalom jegyzéke

[1.] A new approach to managing mycotoxins World Poultry, Reed Volume 19,No 2. (2003)

[2.] Abdulrahman O. Musaiger, Jassim H. Al-Jedah, Reshma D'souza: Occurrence of contaminants in foods commonly consumed in Bahrain Food Control 19, 854–861, (2008)

[3.] Abramson, D.: Mycotoxin formation and environmental factors. In: Sinha K. K. and Bhatnagar, D. Mycotoxins in agriculture and food safety. Marcel Dekker Inc., New York, 511. pp. 255-278, (1989)

[4.] A. Kussak, C.-A. Nilsson, B. Andersson, J. Langridge,: Determination of aflatoxins in dust and urine by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry., Rapid Commun. Mass Spectrom. 9, 1234. (1995)

[5.] A. Lagana, A. Bacaloni, M. Castellano, R. Curini, I. De Leva, A. Faberi, S. Materazzi,: Sample preparation for determination of macrocyclic lactone mycotoxins in fish tissue, based on on-line matrix solid-phase dispersion and solid-phase extraction cleanup followed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry., J. AOAC Int. 86 729. (2003)

[6.] A. Leitner, P. Zöllner, A. Paolillo, J. Stroka, A. Papadopoulou-Bouraoui, S. Jaborek, E. Anklam, W. Lindner,:i mproving LC-MS/MS analyses in complex food matrices, Part II - mass spectrometry., Anal. Chim. Acta 453. (2002)

[7.] A. Mally, H. Keim-Heusler, A. Amberg, M. Kurz, H. Zepnik, P. Mantle,W. Volkel, G.C. Hard,W. Dekant: Ochratoxin A: Apoptosis and Aberrant Exit from Mitosis due to Perturbation of Microtubule Dynamics?, Toxicol. Appl. Pharmacol. 206. (2005)

[8.] A.M. Timperio, P. Magro, G. Chilosi, L. Zolla,: Assay of ochratoxin A in grape by high-pressure liquid chromatography coupled on line with an ESI-mass spectrometry., J. Chromatogr. B 832 (2006)

[9.] A TANÁCS 2092/91/EGK RENDELETE: A mezőgazdasági termékek ökológiai termeléséről, valamint a mezőgazdasági termékeken és élelmiszereken erre utaló jelölésekről (1991R2092— HU— 14.05.2008 — 031.001— 1) (http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1991R2092:20080514:HU:PDF)

[10.] Ana Valero, Sonia Marin, Antonio J. Ramos, Vicente Sanchis: Survey: Ochratoxin A in European special wines, Food Chemistry 108, 593–599 (2008)

[11.] Barnes, J. M. and Butler, W. H.: Carcinogenic activity of aflatoxin to rats. Nature 202:1016. (1964)

[12.] Bennett J.W., & Klich M.: Mycotoxins, Clinical Microbiology Reviews, 16(3), 497-516. (2003)

[13.] Bennett, G. A., Richard, J. L. Influence of processing on Fusarium mycotoxins in contaminated grains. Food Technology, 50, 235–238. (1996).

[14.] Berek, L., Perti, I. B., Mesterházy, Á., Téren, J. and Molnár, J.: Effect of mycotoxins on human immune functions in vitro. Toxicology in vitro 15:25-30. (2001)

[15.] Blount, W. P.: A new turkey disease problem in England characterized by heavy mortality. Q. Poul. Bull. 27:1 (1960)

[16.] B.P.-Y. Lau, P.M. Scott, D.A. Lewis, S.R. Kanhere,: Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications, J. Mass Spectrom. 35 (2000)

[17.] Brown, K. L.:Spore resistance and ultra heat treatment processes. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement, 76, 67S–80S. (1994).

[18.] Bullermann Lloyd B.; Bianchini Andreia: Stability of mycotoxins during food processing International journal of food microbiology ISSN 0168-1605 CODEN IJFMDD

[19.] Burgess, J. Metal Ions in Solution. New York: Ellis Horwood. ISBN 0-85312-027-7, (1978).

[20.] Caixeta, A.T., Moreira, R., Castell-Perez, M. E.: Impingement drying of potato chips. Journal of Food Process Engineering, 25(1), 63–90. (2002).

[21.] Carlberg, D. M.. Cleanroom microbiology for the non-microbiologist (2nd ed.). Boca Raton, FL: CRC Press (pp. 40–51). (2005)

[22.] CAST. Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems. Ames, IA, USA: Council for Agricultural Science and Technology. (2003)

[23.] C. Cavaliere, G. D'Ascenzo, P. Foglia, E. Pastorini, R. Samperi, A.Lagana,: Fumonisins, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals, Food Chem. 92 (2005)

[24.] C. Cavaliere, P. Foglia, E. Pastorini, R. Samperi, A. Lagana, : A sensitive confirmatory method for aflatoxins in maize based on liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry., J. Chromatogr. A 1101 (2006)

[25.] C. Dall'Asta, G. Galaverna, A. Dossena, R. Marchelli, : Reversed-phase liquid chromatographic method for the determination of ochratoxin A in wine., J. Chromatogr. A 1024 (2004)

[26.] C. Dall Asta, S. Sforza, G. Galaverna, A. Dossena, R. Marchelli, : Simultaneous detection of type A and type B trichothecenes in cereals by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using NaCl as cationization agent., J. Chromatogr.A 1054 (2004)

[27.] Cenkowski, C. Pronyk, D. Zmidzinska, W.E. Muir: Decontamination of food products with superheated steam Journal of Food Engineering 83, 68–75 (2007)

[28.] Chelkowski, J.: Distribution of Fusarium species and their mycotoxins in cereal grains. 45-64. In: Sinha K. K. and Bhatnagar, D. (Eds.) Mycotoxins in agriculture and food safety. Marcel Dekker Inc.. New York. (1998)

[29.] Choudhary, P. L.; Sharma, R. S.; & Borkartria, V. N.. Effect of chilling and heating on aflatoxin M1 content of contaminated Indian cow's milk. Egyptian Journal of Dairy Science, No. 26, pp. (223–229) (1998)

[30.] Collier, C. P., Townsend, C. T.: The resistance of bacterial spores to superheated steam. Food Technology 10, 477–481. (1956)

[31.] Cole, R. J., Cox, R. H.: Handbook of toxic fungal metabolites.. New York, Academic Press, 937 pp. (1981)

[32.] Commission Regulation EC No. 472/2002 of 12 March 2002 amending Regulation (EC) No. 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, Official Journal of the European Communities 16.3. (2002).

[33.] Creppy E.: Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicol. Lett. 127 19–28. (2002)

[34.] Douglas, W. J. M. Drying paper in superheated steam. Drying Technology, 12(6), 1341–1355. (1994).

[35.] Drusch S., Ragab W.: Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. J. Food Prot. 65 (1514-1527). 2003)

[36.] Dr. Lucskai Attila, Az ökológiai gazdálkodás. FVM Képzési és Szaktanácsadási Intézet, Budapest, 2006. http://hu.wikipedia.org/wiki/Biogazd%C3%A1lkod%C3%A1s

[37.] D. Royer, H.-U. Humpf, P.A. Guy,: Analysis of moniliformin in maize plants using hydrophilic interaction chromatography., Food Addit. Contam. 21 (2004)

[38.] Engelhart, S., A. Loock, D. Skutlarek, H. Sagunski, A. Lommel, H. Farber, and M. Exner: Occurrence of toxigenic Aspergillus versicolor isolates and sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments. Appl. Environ. Microbiol. 68:3886-3890. (2002)

[39.] E.O. van Bennekom, L. Brouwer, E.H.M. Laurant, H. Hooijerink, M.W.F. Nielen, : Confirmatory analysis method for zeranol, its metabolites and related mycotoxins in urine by liquid chromatography-negative ion electrospray tandem mass spectrometry., Anal. Chim. Acta 473 (2002)

[40.] E. Razzazi-Fazeli, J. B¨ohm, K. Jarukamjorn, J. Zentek,: Simultaneous determination of major B-trichothecenes and the de-epoxy-metabolite of deoxynivalenol in pig urine and maize using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry., J. Chromatogr. B, 796 (2003)

[41.] E. Razzazi-Fazeli, J. B¨ohm, W. Luf,: Determination of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using liquid chromatography–mass spectrometry with negative ion atmospheric pressure chemical ionisation , J. Chromatogr. A 854 (1999)

[42.] E. Razzazi-Fazeli, B. Rabus, B. Cecon, J. Bohm: Simultaneous quantification of A-trichothecene mycotoxins in grains using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry., J. Chromatogr. A 968 (2002)

[43.] E. Rosenberg, R. Krska, R.Wissiack, V. Kmetov, R. Josephs, E. Razzazi, M. Grasserbauer, : High-performance liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry as a new tool for the determination of the mycotoxin zearalenone in food and feed., J. Chromatogr. A 819 (1998)

[44.] Etzel R.A.: Mycotoxins. Journal of American Medical Associate. 287 425–427. (2002)

[45.] EU Commission Decision 2002/67/EC implementing Council Directive 96/23/EC considering the performance of analytical methods and the interpretation of results, Brussels, 2002.

[46.] Fazekas, B., Tar, A., Kovacs, M.. Aflatoxin and ochratoxin A content of spices in Hungary. Food Additives and Contaminants, 22(9), 856–863. (2005)

[47.] F.A. Meky, P.C. Turner, A.E. Ashcroft, J.D. Miller, Y.-L. Qiao, M.J. Roth, C.P. Wild: Development of a urinary biomarker of human exposure to deoxynivalenol., Food Chem. Toxicol. 41 (2003)

[48.] F. Berthiller, C. Dall'Asta, R. Schuhmacher, M. Lemmens, G. Adam, R. Krska: Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry., J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 3421.

[49.] F. Berthiller, R. Schuhmacher, G. Buttinger, R. Krska,: Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry., J. Chromatogr. A 1062 (2005) 209.

[50.] Fleming A.: On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. Br. J. Exp. Pathol. 10 226- 236. (1929)

[51.] Forgacs, J. Mycotoxicoses—the neglected diseases. Feedstuffs 34:124-134. (1962)

[52.] Garrido, M. D., Jordano, R., Martinez, P., Jodral, M., Pozo, R..: Fungal contamination of commercial spices. Acta Alimentaria, 189(81), 83–84. (1988)

[53.] Gareis, M., Bauer, J., Enders, C., Gedek, B.: Contamination of cereals and feed with Fusarium mycotoxins in European countries. In: Chelkowski, J. (Ed.): Fusarium mycotoxins, ptaxonomy and pathogenicity. Elsevier, Amsterdam, 441-472. (1989)

[54.] Giraudi, G., Anfossi, L., Baggiani, C., Giovannoli, C., Tozzi, C.: Solid-phase extraction of ochratoxin A from wine based on a binding hexapeptide prepared by combinatorial synthesis Journal of Chromatography A, 1175 174–180 (2007)

[55.] Gowda, N. K. S., & Ledoux, D. R. Use of antioxidants in amelioration of mycotoxin toxicity: A review. Animal Nutrition and Feed Technology, Vol. 8, Jan, pp. 1-11,0972-2963(2008).

[56.] G.S. Shephard, A. Fabiani, S. Stockenström, N. Mshiliceli, V. Sewram,: Quantitation of ochratoxin A in South African wines, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 1102.

[57.] Hawksworth, D. L.: The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. Mycol. Res. 95:641. (1991)

[58.] H. A. Amra, S. A. Z. Mahmoud, A. H. Taha, M. A. El-Azab: Fate of aflatoxins B1 and G1 residues during biscuit processing, Mycotoxin Research, September 1996, Volume 12, Issue 2, pp 99-104

[59.] H.K. Abbas, W.P. Williams, G.L. Windham, H.C. Pringle, W. Xie, W.T. Shier, : Aflatoxin and fumonisin contamination of commercial corn (Zea mays) hybrids in Mississippi., J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 5246.

[60.] H.K. Abbas, R.D. Cartwright, W. Xie, W.T. : Effect of temperature, rainfall and planting date on aflatoxin and fumonisin contamination in commercial Bt and non-Bt corn hybrids in Arkansas, Shier, Crop Prot. 25 (2006)

[61.] http://www.kfki.hu/chemonet/osztaly/eloadas/mesterhazya.html (2009)

[62.] H. Xiao, R.R. Marquardt, D. Abramson, A.A. Frohlich: Metabolites of ochratoxins in rat urine and in a culture of Aspergillus ochraceus., Appl. Environ. Microbiol. 62 (1996)

[63.] H. Zepnik, A. Pahler, U. Schauer, W. Dekant: Ochratoxin A-induced tumor formation: is there a role of reactive ochratoxin A metabolites?, Toxicol. Sci. 59 (2001)

[64.] I. Losito, L. Monaci, F. Palmisano, G. Tantillo, : Determination of ochratoxin A in meat products by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionisation sequential mass spectrometry., Rapid Commun. MassSpectrom. 18 (2004)

[65.] I. Schneweis, K. Meyer, G. Engelhardt, J. Bauer : Occurrence of zearalenone-4-beta-D-glucopyranoside in wheat., J. Agric. Food Chem. 50 (2002)

[66.] Isil Var, Bulent Kabak , Zerrin Erginka: Reduction in ochratoxin A levels in white wine, following treatment with activated carbon and sodium bentonite Food Control 19 592–598.

[67.] Jarvis, B. B.. Chemistry and toxicology of molds isolated from water damaged buildings, p. 43-52. In J. W. deVries, M. W. Trucksess, and L. S. Jackson, Mycotoxins and food safety. Kluwer Academic/Plenum Publications, New York, N.Y. (2002)

[68.] J. Blesa, J.M. Soriano, J.C. Molto, R. Marin, J. Manes, : Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography., J. Chromatogr. A 1011 (2003)

[69.] Jin Wo Lee, Jin Gi Seo, Dong Won Park: Salt effect in liquid-liquid equlibrium for solvent water acetonitrile system Journal of the Chorean Institute of Chemical Engineering. Vol.33 (1995)

[70.] J. Jodlbauer, P. Z¨ollner, W. Lindner, : Determination of zeranol, taleranol, zearalenone, α- and β-zearalenol in urine and tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Chromatographia 51 (2000)

[71.] J. Jodlbauer, P. Z¨ollner, W. Lindner, : Determination of zearalenone and its metabolites alpha- and beta-zearalenol , Mycotoxin Res. 16A (2000)

[72.] J.L. Wang-Buhler, S.J. Lee, W.G. Chung, J.F. Stevens, H.P. Tseng, T.H.Hseu, C.H. Hu, M. Westerfield, Y.H. Yang, C.L. Miranda, D.R. Buhler,: Cloning, mapping, developmental/tissue expression, and aflatoxin B1 activation by baculovirus expressed enzyme. Comp. Biochem. Physiol., Part C Toxicol. and Pharmacol. 140 (2005)

[73.] J.R. Hancock, P.A. D'Agostino: Mass spectrometric identification of toxins of biological origin , Anal. Chim. Acta 457 (2002)

[74.] J.W. Park, S.-H. Chung,Y.-B. Kim: Natural Occurrence of Ochratoxin A in Musts, Wines and Grape Vine Fruits from Grapes Harvested in Argentina, J. Agric. Food Chem. 53 (2005)

[75.] Kaplan, N.M., Palmer, B.F., Revankar, S. G: Clinical implications of mycotoxins and Stachybotrys, Southwestern. Am. J. Med. Sci. 325 262-274. (2003)

[76.] Kapp-Soo Do: Liquid-liquid equlibrium for water acetonitrile salt system, Journal of the Chorean Institute of Chemical Engineering vol 15, (1977)

[77.] K.A. Scudamore, M.T. Hetmanski, P.A. Clarke, K.A. Barnes, J.R. Startin: Analytical methods for the determination of sterigmatocystin in cheese, bread and corn products using HPLC with atmospheric pressure ionization mass spectrometric detection., Food Addit. Contam. 13 (1996)

[78.] K. Gross-Steinmeyer, J. Weymann, H.-G. Hege, M. Metzler: Metabolism and lack of DNA reactivity of the mycotoxin ochratoxin a in cultured rat and human primary hepatocytes., J. Agric. Food Chem. 50 (2002)

[79.] Kovács F, Mesterházy Á: A környezet szennyeződése penészgombákkal és mikotoxinokkal, Agrártermelés - környezetvédelem - népegészségügy: a Környezetvédelmi és Területfejlesztési Minisztérium által támogatott kutatási program 1997. évi tanulmányainak összefoglalója, Budapest: Magyar Tudományos Akadémia,. pp. 28-50. (Magyarország az ezredfordulón) (ISBN:963-508-070-0) (1998)

[80.] K. Jorgensen, M. Vahl,: Analysis of ochratoxin A in pig kidney and rye flour using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS)., Food Addit. Contam. 16 (1999)

[81.] K. Suga, N. Mochizuki, K. Harayama, H. Yamashati,: Analysis of Trichothecenes in Malt and Beer by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, J. Am. Brew. Chem.63 (2005)

[82.] L.E. Edinboro, H.T. Karnes, : Determination of aflatoxin B1 in sidestream cigarette smoke by immunoaffinity column extraction coupled with liquid chromatography/mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1083 (2005)

[83.] Lloyd B. Bullerman, Andreia Bianchini: Stability of mycotoxins during food processing International Journal of Food Microbiology 119 140–146, (2007)

[84.] L.M. Mallis, A.B. Sarkahian, H.A. Harris, M.-Y. Zhang, O.J. McConnell: Determination of rat oral bioavailability of soy-derived phytoestrogens using an automated on-column extraction procedure and electrospray tandem mass spectrometry., J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 25;796(1):71-86. (2003)

[85.] L.K. Sorensen, T.H. Elbaek,: Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry., J. Chromatogr. B 820 (2005)

[86.] L. Pallaroni, C. von Holst, : Determination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry., J. Chromatogr. A 993 (2003)

[87.] L. Pallaroni, E. Bjorklund, C. von Holst, : Optimization of atmospheric pressure chemical ionization interface parameters for the simultaneous determination of deoxynivalenol and zearalenone using HPLC/MS,J. Liq. Chromatogr. Related Technol. 25 (2002)

[88.] Mahjoub A and Bullerman LB. Effects of storage time, sunlight, temperature, and frying on stability of aflatoxin B1 in olive oil. Lebensm. Wiss. U. Technol.,; 21: 29 - 32.1745-4557,(1988)

[89.] Martins, M. L.; & Martins, H. M.. Aflatoxin M1 in raw and ultra high temperature treated milk commercialized in Portugal. Food Additives and Contaminants, Vol. 17, No. 10, pp. (871-874) (2000)

[90.] M. Becker, P. Degelmann, M. Herderich, P. Schreier, H.-U. Humpf, J.Chromatogr. A 818 (1998)

[91.] Mesterházy Á: Resistance, Pathogenicity and Fusarium spp. influencing toxin (DON) contamination of wheat varieties In: Chelkowski J: Third Eur. Seminar on Fusarium - mycotoxins, taxonomy, pathogenicity and host resistance, Radzikow:. p. 25. (1992)

[92.] M. Horie, H. Nakazawa,: Determination of trenbolone and zeranol in bovine muscle and liver by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry., J. Chromatogr. A 882 (2000)

[93.] Miraglia M., van Egmod H., Brera C., Gilbert J: Mycotoxins and Phycotoxins – Development in Chemistry, Toxicology and Food Safety. Printed in the USA, (1998)

[94.] Miller, J. D. and H. L. Tremholm: Mycotoxins in Grain. Compounds other than aflatoxin.. Eagan Press., 552 pp. (1994)

[95.] Móricz Á.M., Fatér Zs., Otta K.H., Tyihák E., Mincsovics E.: Overpressured layer chromatographic determination of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 in red paprika. Microchem. J. 85, 140-144. (2007)

[96.] M. Kleinova, P. Z¨ollner, H. Kahlbacher, W. Hochsteiner, W. Lindner, : Concentration levels of zearalenone and its metabolites in urine, muscle tissue, and liver samples of pigs fed with mycotoxin-contaminated oats., J.Agric. Food Chem. 50 (2002)

[97.] M. Klotzel, B. Gutsche, U. Lauber, H.-U. Humpf,: Determination of 12 type A and B trichothecenes in cereals by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry., J. Agric. Food . Chem. 53 (2005)

[98.] M. Kokkonen, M. Jestoi, A. Rizzo, : The effect of substrate on mycotoxin production of selected Penicillium strains.,Food Addit. Contam. 22 (2005)

[99.] M. Lindenmeier, P. Schieberle, M. Rychlik,: Quantification of Ochratoxin A in foods, J. Chromatogr.A1023 (2004)

[100.] M. Reinsch, A. T¨opfer, A. Lehmann, I. Nehls, U. Panne,: Determination in Ochratoxin-A in fodd and beer. Food Chem. 100 (2007)

[101.] M. Samar, S.L. Resnik, H.H.L. González, A.M. Pacin, M.D. Castillo: Deoxynivalenol reduction during the frying process of turnover pie covers: Food Control 18 1295–1299, (2007)

[102.] M. Vahl, K. Jorgensen, Z. Lebensm: Determination of Aflatoxins in Food Using LC/MS/MS, . Unters. Forsch. A 206 (1998)

[103.] M.Walton, P. Egner, P.F. Scholl, J.Walker, T.W. Kensler, J.D. Groopman,: Liquid chromatography electrospray-mass spectrometry of urinary aflatoxin biomarkers: characterization and application to dosimetry and chemoprevention in rats., Chem. Res. Toxicol. 14 (2001)

[104.] M. Ventura, A. Gomez, I. Anaya, J. Diaz, F. Broto, M. Agut, L. Comellas,: Determination of aflatoxins B1, G1, B2 and G2 in medicinal herbs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry., J. Chromatogr. A 1048 (2004)

[105.] M.Ventura, C.Vallejos, I.A. Anaya, F. Broto-Puig, M. Agut, L. Comellas: Analysis of ochratoxin a in coffee by solid-phase cleanup and narrow-bore liquid chromatography-fluorescence detector-mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 51 (2003).

[106.] Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO., Fusarium species: an illustrated manual for identification. University Park, Pennsylvania: Pennsylvania State University Press. 193 p, (1983)

[107.] Nicholas W. Turner, Sreenath Subrahmanyam, Sergey A. Piletsky: Analytical methods for determination of mycotoxins: A review Analytica Chimica Acta 632 168–180, (2009)

[108.] Pascal Clouvel, Bonvarlet L., Martinez A., Lagouarde P., Dieng I., Martin P.: Wine contamination by ochratoxin A in relation to vine environment International Journal of Food Microbiology 123 74–80, (2008)

[109.] Palyusik M, Vitainé Ratko C: A takarmányok gombás fertőzöttségének és a fertőzött takarmányok etetésének következményei. A gazdasági károk csökkentésének és megelőzésének módjai, valamint a védekezés lehetőségei, Budapest: Agroinform Kiadó - Stratégiakutató Intézet. 194 p. (1972)

[110.] Payne, G. A. and M. P. Brown.: Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. Annual Rev. Phytopathology. 36:329-62. (1998)

[111.] Payne, G. A.. Process of contamination by aflatoxin producing fungi and their impacts on crops. In, Mycotoxins in Agriculture and Food Safey. K.K. Sinha and D. Bhatnagar. Marcel Dekker, Inc. New York. (1998)

[112.] P. Degelmann, M. Becker,M. Herderich, H.U. Humpf, : Determination of ochratoxin A in beer by high – performance liquid chromatography., Chromatographia 49 (1999).

[113.] P.E. Joos, M. Van Ryckeghem,: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry of some anabolic steroids., Anal. Chem. 71 (1999)

[114.] Peraica M., Radic B., Lucic A., Pavlovic M.: Toxic effects of mycotoxins in Humans. Bull. World Health Organ. 77 754–766. (1999)

[115.] P.F. Scholl, S.M. Musser, J.D. Groopman, : Synthesis and characterization of aflatoxin B1 mercapturic acids and their identification in rat urine., Chem. Res. Toxicol. 10 (1997)

[116.] P. Zölner, A. Leitner, D. Lubda, K. Cabrera, W. Lindner: Application of a chromolith speedROD RP-18e HPLC column: Determination of ochratoxin A in different wines by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Chromatographia 52 (2000).

[117.] Peter Zöllner, Bernhard Mayer-Helm: Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1136 123–169 (2006)

[118.] P. Zöllner, D. Berner, J. Jodlbauer, W. Lindner,: Determination of zearalenone and its metabolites alpha- and beta-zearalenol in beer samples by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry., J. Chromatogr. B 738 (2000)

[119.] P. Zollner, J. Jodlbauer, M. Kleinova, H. Kahlbacher, T. Kuhn, W. Hochsteiner, W. Lindner,: Concentration levels of zearalenone and its metabolites in urine, muscle tissue, and liver samples of pigs fed with mycotoxin-contaminated oats., J. Agric. Food Chem. 50 (2002)

[120.] P. Zöllner, J. Jodlbauer, W. Lindner,: Determination of zearalenone in grains by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction with RP-18 columns or immunoaffinity columns., J. Chromatogr. A 858 (1999).

[121.] Peltola, J., M. A. Andersson, T. Haahtela, M. Mussalo-Rauhamaa, F. A. Rainey, R. M. Kroppenstedt, R. A. Samson, and M. S. Salkinoja-Salonen.: Toxic-metabolite-producing bacteria and fungus in an indoor environment. Appl. Environ. Microbiol. 67:3269-3274. (2001)

[122.] P.M. Scott, S.R. Kanhere, B.P.-Y. Lau, D.A. Lewis, S. Hayward, J.J. Ryan,T. Kuiper-Goodman,: Ochratoxin A and β2-Microglobulin in BEN Patients and Controls, Food Addit. Contam. 15 (1998) .

[123.] P.M. Scott, M.W. Trucksess, : Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis., J. AOAC Int. 80 (1997)

[124.] P. Songsermsakul, G. Sontag, M. Cichna-Markl, J. Zentek, E. Razzazi- Fazeli,: Determination of zearalenone and its metabolites in urine, plasma and faeces of horses by HPLC–APCI–MS, J. Chromatogr. B (2006).

[125.] Radostina Manova, Rositsa Mladenova: Incidence of zearalenone and fumonisins in Bulgarian cereal production. Food Control 20 362–365 (2009)

[126.] Rafai, P., Bata, A., Jakab, L.: Evaluation of mycotoxincontaminated cereals for their use in animal feeds in Hungary. Food Additives and Contaminants, 17, 799–808. (2000).

[127.] Rainer Walcz: Standards for mycotoxins , Analytix, (2006/2)

[128.] Ratola, N., Abade, E., Simo es, T., Venancio, A., Alves, A.. Evolution of ochratoxin A content from must to wine in Port wine microvinification. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 382, 405–411. (2005)

[129.] *Report on Carcinogens, Twelfth Edition* U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service National Toxicology Program, (2011),

[130.] R.D. Plattner,: HPLC/MS analysis of fusarium mycotoxins, fumonisins and deoxynivalenol. Nat. Toxins 7 (1999).

[131.] R.D. Plattner, C.M. Maragos,: Determination of deoxynivalenol and nivalenol in corn and wheat by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry. J. AOAC Int. 86 (2003)

[52] R. Ghali, K. Hmaissia-khlifa, H. Ghorbel, K. Maaroufi, A. Hedili: Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in tunisian foods Food Control 19 921–924, (2008)

[132.] Richard J.L., Payne G.A: Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems.. Task Force Report 139. Council for Agricultural Science and Technology. Ames, Iowa. (2003)

[133.] Richard, J. L., R. D. Plattner, J. May, and S. L. Liska.. The occurrence of ochratoxin A in dust collected from a problem household. Mycopathologia 146:99-103. (1999)

[134.] Riley, R. T.: Mechanistic interactions of mycotoxins: theoretical considerations. 227-253. In: Sinha K. K. and Bhatnagar, D.: Mycotoxins in agriculture and food safety.. Marcel Dekker Inc. New York, 511. pp. (1998)

[135.] R. Krska, M. Freudenschuss, C. Hametner, E. Szente, P. Zöllner, : Purity assessment of commercially available crystalline deoxynivalenol., J.AOA, Int. 87 (2004)

[136.] R. Kroesa, D.Mullerb, J. Lambec, M.R.H. Lo, J. van Klaverene, J. Kleinerf,,R. Masseyg, S. Mayerh, I. Urietai, P. Vergerj, A. Viscontik: Assessment of intake from the diet Food and Chemical Toxicology 40 327–385. (2002)

[137.] R. Labuda, A. Parich, F. Berthiller, D. Tancinova: Incidence of trichothecenes and zearalenone in poultry feed mixtures from Slovakia., J. Food Microbiol. 105 (2005)

[138.] R.P. Huopalathi, J. Ebel, J.D. Henion,:Determination of zeranol, taleranol, zearalenone, a- and ß-zearalenol in urine and tissue by high-performance liquid chromatography, J. Liq. Chromatogr. Related Technol. 20 (1997)

[139.] S. Biselli, L. Hartig, H. Wegener, C. Hummert, : Analysis of Fusarium Toxins Using LC-MS-MS: Application to Various Food and Feed , LC–GC Eur. 17 (2004)

[140.] S. Biselli, L. Hartig, H. Wegener, C. Hummert,: Comparison and improvement of the existing methods for the determination of aflatoxins in human serum by LC-MS/MSm Anal. Methods, (2010)

[141.] S. De Saeger, F. Dumoulin, C. Van Peteghem: Quantitative determination of ochratoxin A in kidneys by liquid chromatography/mass spectrometry., Rapid Commun. Mass Spectrom. 18 (2004)

[142.] Skaug, M. A., E. Eduard, and F. C. Stormer. Ochratoxin A in airborne dust and fungal conidia. Mycopathologia 151:93-98. (2000)

[143.] T.F. Schatzki, W.F. Haddon, : Rapid, non-destructive selection of peanuts for high aflatoxin content by soaking and tandem mass spectrometry., J. Agric. Food Chem. 50 (2002)

[144.] The mycotoxin factbook: Food & feed topicsEds Barug D. et al. Wageningen, Wageningen Academic Publishers, 2006.

[145.] Thomas P.J. Linsinger, Ralf D. Josephs: Limitations of the application of the Horwitz equation, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 25, No. 11, (2006)

[146.] Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Tjamos, E.C.: Aspergillus spp., distribution, population composition and ochratoxin A production in wine producing vineyards in Greece. International Journal of Food Microbiology 111 (supplement 1), 61–66. (2006)

[147.] Tripathi, S. & Mishra, H.N.. Enzymatic coupled with UV degradation of aflatoxina B1 in red chili powder. Journal of Food Quality. Vol.33, SUPPL. s1, pp. 186-203, ISSN, (2010)

[148.] T. Tuomi, L. Saarinen, K. Reijula, : Detection of polar and macrocyclic trichothecene mycotoxins from indoor environments., Analyst 123 (1998).

[149.] Turner, W. B. and Alderigde, D. C.: Fungal Metabolites II.. Academic Press, 631 pp. (1983)

[150.] U. Berger, M. Oehme, F. Kuhn: Quantitative determination and structure elucidation of type A- and B-trichothecenes by HPLC/ion trap multiple mass spectrometry., J. Agric. Food Chem. 47 (1999).

[151.] Valcheva, A.:Distribution of zearalenone and deoxynivalenol and their producers from genus Fusarium as natural contaminators of wheat and maize. Animal Sciences (Bulg), 3–4, 163–166. (2003).

[152.] Visconti, A., Pascale, M.: Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of Chromatography A, 815, 133–140. (1998).

[153.] Vrabcheva, T.: Occurrence of fumonisin B1 in Bulgarian corn and corn products. Plant Science (Bulg), 41, 185–189. (2004).

[154.] Vrabcheva, T., Gessler, R., Usleber, E., Martlbauer, E.: First survey on the natural occurrence of Fusarium mycotoxins in Bulgarian wheat. Mycopathologia, 136, 47–52. (1996).

[155.] Vrabcheva, T., Lazarova, S., & Beev, G.. Occurrence of Fusarium species in Bulgarian cereal grains. Plant Science (Bulg), 41, 240–243. (2004)

[156.] Vrabcheva, T., Stroka, J., & Anklam, E. Occurrence of Fumonisin B1 in Bulgarian maize samples determined by ELISA and TLC methods using different clean up steps. Mycotoxin Research, 18, 46–56. (2002).

[157.] X. Fang, J. Chen, D. Guo, G. Wang,: Detection and identification of zeranol in chicken or rabbit liver by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry., J. AOAC Int. 85 (2002)

[158.] Zavier T.V. and Menon K.R.K.: Aflatoxin on ginger and ginger products and the effect of heating on their stability, As. J. Food Ag-Ind. (2010)

[159.] Záray Gyula, Berente Bálint, Móricz Ágnes, H-Otta Klára, Lékó László, Rácz László:Determination of ochratoxin A in Hungarian wines. Microchemical Journal 79, 103 - 107 (2005)

[160.] Zilinskas R.A.: Iraq's biological weapons. The past as future? JAMA 278 418-424. (1997)

[161.] Zimmerli, B., Dick, R., Ochratoxin-A in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment. Food Additives and Contaminants 13, 655–668. (1996)

[162.] Z. Ryu. D, Hanna MA, Eskridge KM, Bullerman LB: Heat stability of zearalenone in an aqueous buffered model system. Journal of Agricultural Food Chemistry. 12; 51:1746-8 (2003)

[163.] Z. Sypecka, M. Kelly, P. Brereton, : Deoxynivalenol and zearalenone residues in eggs of laying hens fed with a naturally contaminated diet: effects on egg production and estimation of transmission rates from feed to eggs., J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 5463.

14 Mellékletek

14.1 I. Melléklet

Élelmiszerek mikotoxin tartalmának megengedett felső értékei 1881/2006/EK Európai Bizottság rendelete (részletek).

(21) Az Élelmiszerügyi Tudományos Bizottság 1994. szeptember 23-i véleményében arra a következtetésre jutott, hogy az aflatoxinok genotoxikus karcinogénnek számítanak ([5]). E véleményt alapul véve helyénvaló az élelmiszerek összes aflatoxintartalmát (B_1, B_2, G_1 és G_2 aflatoxinok összege), valamint külön a B_1 aflatoxin – mely messze a legmérgezőbb vegyület – mennyiségét korlátozni. A csecsemők és kisgyermekek élelmiszerében lévő M_1 aflatoxin tekintetében az analitikai eljárások terén végbement fejlődés fényében fontolóra kell venni a jelenlegi felső határérték csökkentését.

(22) Az ochratoxin-A (OTA) tekintetében az ÉTB 1998. szeptember 17-én tudományos véleményt ([6]) fogadott el. Az élelmiszerekre vonatkozó kérdések tudományos vizsgálatában a tagállamok által a Bizottságnak nyújtott támogatásról és a tagállamok együttműködéséről (SCOOP) szóló, 1993. február 25-i 1993/5/EGK tanácsi irányelv ([7]) keretében elvégezték az OTA-nak a Közösség lakossága általi, élelmiszer útján történő bevitelének a felmérését ([8]). Az Európai Élelmiszer-biztonsági Hatóság (EFSA) a Bizottság kérésére 2006. április 4-én az élelmiszerben lévő ochratoxin-A tekintetében aktualizált tudományos véleményt ([9]) fogadott el az új tudományos információk figyelembevételével, és a megengedhető heti bevitelt (TWI) 120 ng/testsúlykilogramm értékben rögzítette.

(23) E véleményeket alapul véve helyénvaló felső határértékeket megállapítani a gabonafélék, gabonakészítmények, szárított szőlő, pörkölt kávé, bor, szőlőlé és a csecsemők és kisgyermekek számára készült élelmiszerek tekintetében, melyek mind jelentős mértékben hozzájárulnak az általános emberi, illetve a veszélyeztetett fogyasztói csoportok, pl. a gyermekek OTA-expozíciójához.

(24) Az olyan élelmiszerben, mint például a szárított gyümölcsben – a szárított szőlő kivételével –, a kakaóban és a kakaóból készült termékekben, fűszerekben, húskészítményekben, a zöld kávéban, a sörben és az édesgyökérben lévő OTA felső határértékei meghatározásának, valamint a különösen a szárított szőlőben és a szőlőlében lévő OTA felső határértékei felülvizsgálatának helyénvalóságát az EFSA legújabb tudományos szakvéleménye fényében kell mérlegelni.

(25) A patulin tekintetében az ÉTB 2000. március 8-i ülésén ([10]) ideiglenesen megállapított megengedhető maximális napi bevitelként (PMTDI) jóváhagyta a 0,4 µg/testsúlykg értéket.

(26) Az 1993/5/EGK irányelv keretében 2001-ben SCOOP-feladat elvégzésére került sor „A patulin táplálék általi felvételének felmérése az Európai Unió tagállamainak lakossága körében" címmel ([11]).

(27) E felmérést alapul véve és tekintettel a PMTDI-re, a fogyasztóknak az elfogadhatatlan mértékű szennyeződéstől való megvédése érdekében meg kell állapítani az egyes élelmiszerekben lévő patulin felső határértékeit. E felső határértékeket felül kell vizsgálni és szükség esetén csökkenteni kell, figyelembe véve a tudományos és technológiai ismeretek fejlődését és az almalében és egyéb italok almaléből készült összetevőiben lévő patulinszennyeződés megelőzéséről és csökkentéséről szóló, 2003. augusztus 11-i 2003/598/EK bizottsági ajánlás ([12]) végrehajtását.

(28) A *Fusarium*-toxinok tekintetében az ÉTB több véleményt fogadott el: a dezoxinivalenol értékeléséről 1999 decemberében ([13]), 1 µg/testsúlykg-os megengedhető napi beviteli szintet (TDI) megállapítva, a zearalenon értékeléséről 2000 júniusában ([14]), 0,2 µg/testsúlykg-os ideiglenes megengedhető napi beviteli szintet megállapítva, a fumonizinek értékeléséről 2000 októberében ([15]) (frissítve 2003 áprilisában) ([16]), 2 µg/testsúlykg-os megengedhető napi beviteli szintet megállapítva, a nivalenol értékeléséről 2000 októberében ([17]), 0,7 µg/testsúlykg-os ideiglenesen megengedhető napi beviteli szintet megállapítva, a T-2 és HT-2 toxinokról 2001 májusában ([18]), 0,06 µg/testsúlykg-os kombinált ideiglenesen megengedhető napi beviteli szintet megállapítva és a trichotecénekről mint csoportról 2002 februárjában ([19]).

([5]) Az élelmiszerügyi tudományos bizottság jelentései, 35. sorozat, Az élelmiszerügyi tudományos bizottság véleménye az aflatoxinokról, az ochratoxin-A-ról és a patulinról, 45–50. o., http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/reports/scf_reports_35.pdf

([6]) Az élelmiszerügyi tudományos bizottság véleménye az ochratoxin-A-ról (kinyilvánítva 1998. szeptember 17-én). http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out14_en.html

([7]) HL L 52., 1993.3.4., 18. o.

([8]) Tudományos együttműködési feladatokról szóló jelentések, 3.2.7 feladat: „Az ochratoxin-A táplálék általi felvételének felmérése az Európai Unió tagállamainak lakossága körében" http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/task_3-2-7_en.pdf

([9]) Az EFSA élelmiszerláncban előforduló szennyező anyagokkal foglalkozó tudományos testületének a Bizottság kérésére elkészített, az élelmiszerben előforduló ochratoxin A-val kapcsolatos szakvéle-

([11]) Tudományos együttműködési feladatokról szóló jelentések, 3.2.8 feladat: „A patulin táplálék általi felvételének felmérése az Európai Unió tagállamainak lakossága körében" http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/3.2.8_en.pdf

([12]) HL L 203., 2003.8.12., 34. o.

([13]) Az élelmiszerügyi tudományos bizottság (ÉTB) *Fusarium*-toxinokról szóló véleménye, 1. rész: Dezoxinivalenol (DON), (kinyilvánítva: 1999. december 2-án). http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out44_en.pdf

([14]) Az élelmiszerügyi tudományos bizottság (ÉTB) *Fusarium*-toxinokról szóló véleménye, 2. rész: Zearalenon (ZEA), (kinyilvánítva: 2000. június 22-én). http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out65_en.pdf

([15]) Az élelmiszerügyi tudományos bizottság (ÉTB) *Fusarium*-toxinokról szóló véleménye, 3. rész: Fumonizin B_1 (FB_1), (kinyilvánítva: 2000. október 17-én). http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out73_en.pdf

([16]) Az élelmiszerügyi tudományos bizottságnak a fumonizin B_1, B_2 és B_3-ról szóló, aktualizált véleménye (kinyilvánítva 2003. április 4-én). http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out185_en.pdf

([17]) Az élelmiszerügyi tudományos bizottság (ÉTB) *Fusarium*-toxinokról szóló véleménye, 4. rész: Nivalenol, (kinyilvánítva: 2000. október 19-én). http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out74_en.pdf

([18]) Az élelmiszerügyi tudományos bizottság (ÉTB) *Fusarium*-toxinokról szóló véleménye, 5. rész: T-2 és HT-2 toxin (elfogadva: 2001. május

2. szakasz: Mikotoxinok

Élelmiszerek [1]		Felső határértékek (µg/kg)		
2.1.	**Aflatoxinok**	B_1	A B_1, B_2, G_1 és G_2 összege	M_1
2.1.1.	Az emberi fogyasztás vagy élelmiszer-összetevőként történő felhasználás előtt válogatásnak vagy egyéb fizikai kezelésnek alávetett földimogyoró	8,0 [5]	15,0 [5]	—
2.1.2.	Az emberi fogyasztás vagy élelmiszer-összetevőként történő felhasználás előtt válogatásnak vagy egyéb fizikai kezelésnek alávetett diófélék	5,0 [5]	10,0 [5]	—
2.1.3.	Közvetlen emberi fogyasztásra vagy összetett élelmiszerek összetevőjeként történő felhasználásra szánt földimogyoró, diófélék és ezek feldolgozott termékei	2,0 [5]	4,0 [5]	—
2.1.4.	Az emberi fogyasztás vagy élelmiszer-összetevőként történő felhasználás előtt válogatásnak vagy egyéb fizikai kezelésnek alávetett szárított gyümölcs	5,0	10,0	—
2.1.5.	Közvetlen emberi fogyasztásra vagy összetett élelmiszerek összetevőjeként történő felhasználásra szánt szárított gyümölcs és annak feldolgozott termékei	2,0	4,0	—
2.1.6.	Valamennyi gabonaféle és a gabonafélékből származó valamennyi termék, beleértve a feldolgozott gabonatermékeket is, a 2.1.7., 2.1.10. és 2.1.12. pontban felsorolt élelmiszerek kivételével	2,0	4,0	—
2.1.7.	Az emberi fogyasztás vagy élelmiszer-összetevőként történő felhasználás előtt válogatásnak vagy egyéb fizikai kezelésnek alávetett kukorica	5,0	10,0	—
2.1.8.	Nyerstej [6], tejalapú termékek előállításához használt tej és hőkezelt tej	—	—	0,050

Élelmiszerek [1]		Felső határértékek (µg/kg)		
2.1.9.	Az alábbi fűszerfajták: *Capsicum spp.* (annak szárított termései, egészben vagy őrleményként, beleértve a chilit, a chiliport, a cayenne-t és a paprikát) *Piper spp.* (annak gyümölcsei, beleértve a fehér- és a feketeborsot) *Myristica fragrans* (szerecsendió) *Zingiber officinale* (gyömbér) *Curcuma longa* (kurkuma)	5,0	10,0	—
2.1.10.	Csecsemők és kisgyermekek számára készült feldolgozott gabonaalapú élelmiszerek és bébiételek [3], [7]	0,10	—	—
2.1.11.	Az anyatej-helyettesítő és anyatej-kiegészítő tápszerek, beleértve a tejalapú anyatej-helyettesítő tápszert és a tejalapú anyatej-kiegészítő tápszert [4], [8]	—	—	0,025
2.1.12.	Speciális gyógyászati célokra szánt diétás élelmiszerek [9], [10] kifejezetten csecsemők számára	0,10	—	0,025
2.2.	**Ochratoxin-A**			
2.2.1.	Feldolgozatlan gabonafélék	5,0		
2.2.2.	Feldolgozatlan gabonafélékből származó valamennyi termék, beleértve a feldolgozott gabonatermékeket és a közvetlen emberi fogyasztásra szánt gabonaféléket, a 2.2.9. és 2.2.10. pontban felsorolt élelmiszerek kivételével	3,0		
2.2.3.	Szárított szőlő (fekete mazsola, mazsola és malagaszőlő)	10,0		
2.2.4.	Pörkölt babkávé, őrölt pörkölt kávé, az oldható kávé kivételével	5,0		
2.2.5.	Oldható kávé (instant kávé)	10,0		
2.2.6.	Bor (beleértve a pezsgőt, és kivéve a likőrborokat és a minimum 15 térfogatszázalék alkoholt tartalmazó borokat) és gyümölcsbor [11]	2,0 [12]		
2.2.7.	Ízesített bor, ízesített boralapú italok és ízesített boralapú koktélok [13]	2,0 [12]		
2.2.8.	Szőlőlé vagy koncentrált szőlőléből készített szőlőlé, szőlőnektár, must vagy mustkoncentrátumból készített must közvetlen emberi fogyasztásra [14]	2,0 [12]		
2.2.9.	Csecsemők és kisgyermekek számára készült feldolgozott gabonaalapú élelmiszerek és bébiételek [3], [7]	0,50		
2.2.10.	Speciális gyógyászati célokra szánt diétás élelmiszerek [9], [10] kifejezetten csecsemők számára	0,50		
2.2.11.	Zöld kávé, szárított szőlőtől eltérő szárított gyümölcs, sör, kakaó és kakaótermékek, likőrborok, húskészítmények, fűszerek és édesgyökér	—		
2.3.	**Patulin**			
2.3.1.	Gyümölcslevek, koncentrált gyümölcslevekből készített gyümölcslevek és gyümölcsnektárok [14]	50		

Élelmiszerek ([1])		Felső határértékek (µg/kg)
2.3.2.	Szeszes italok ([15]), almabor és almából készült vagy almalevet tartalmazó más erjesztett italok	50
2.3.3.	Szilárd almatermékek, beleértve a közvetlen fogyasztásra szánt almakompótot és almapürét, a 2.3.4. és 2.3.5. pontban felsorolt élelmiszerek kivételével	25
2.3.4.	Csecsemők és kisgyermekek számára készült almalé és almából készült szilárd termékek, beleértve az almakompótot és az almapürét ([16]), így címkézve és eladva ([4])	10,0
2.3.5.	Csecsemők és kisgyermekek számára készült feldolgozott gabonaalapú élelmiszerektől eltérő bébiételek ([3]), ([4])	10,0
2.4.	**Dezoxinivalenol** ([17])	
2.4.1.	Feldolgozatlan gabonafélék ([18]), ([19]) kivéve durumbúza, zab és kukorica	1 250
2.4.2.	Feldolgozatlan durumbúza és zab ([18]), ([19])	1 750
2.4.3.	Feldolgozatlan kukorica ([18])	1 750 ([20])
2.4.4.	Közvetlen emberi fogyasztásra szánt gabonafélék, gabonalisztek (beleértve a kukoricalisztet, a kukoricakorpát és a kukoricadarát ([21])), korpa mint közvetlen emberi fogyasztásra szánt késztermék és csíra, a 2.4.7. pontban felsorolt élelmiszerek kivételével	750
2.4.5.	Tészta (száraz) ([22])	750
2.4.6.	Kenyér (beleértve a kis pékárukat), tésztafélék, kekszek, gabonaszeletek és reggeli gabonapelyhek	500
2.4.7.	Csecsemők és kisgyermekek számára készült feldolgozott gabonaalapú élelmiszerek és bébiételek ([3]), ([7])	200
2.5.	**Zearalenon** ([17])	
2.5.1.	Feldolgozatlan gabonafélék ([18]) ([19]) a kukorica kivételével	100
2.5.2.	Feldolgozatlan kukorica ([18])	200 ([20])
2.5.3.	Közvetlen emberi fogyasztásra szánt gabonafélék, gabonaliszt, korpa mint közvetlen emberi fogyasztásra szánt késztermék és csíra, a 2.5.4., 2.5.7. és 2.5.8. pontban felsorolt élelmiszerek kivételével	75
2.5.4.	Közvetlen emberi fogyasztásra szánt kukorica, kukoricaliszt, kukoricakorpa, kukoricadara kukoricacsíra és finomított kukoricaolaj ([21])	200 ([20])
2.5.5.	Kenyér (beleértve a kis pékárukat), tésztafélék, kekszek, gabonaszeletek és reggeli gabonapelyhek, kivéve a kukoricaszeleteket és kukoricaalapú reggeli pelyheket	50
2.5.6.	Kukoricaszeletek és kukoricaalapú reggeli pelyhek	50 ([20])

Élelmiszerek [1]		Felső határértékek (µg/kg)
2.5.7.	Csecsemők és kisgyermekek számára készült feldolgozott gabonaalapú élelmiszerek és bébiételek (a feldolgozott kukoricaalapú élelmiszerek kivételével) [3], [7]	20
2.5.8.	Csecsemők és kisgyermekek [3], [7] számára készült feldolgozott kukoricaalapú élelmiszerek	20 [20]
2.6.	**Fumonizinek**	B_1 és B_2 összege
2.6.1.	Feldolgozatlan kukorica [18]	2 000 [23]
2.6.2.	Kukoricaliszt, kukoricakorpa, kukoricadara, kukoricacsíra és finomított kukoricaolaj [21]	1 000 [23]
2.6.3.	Közvetlen emberi fogyasztásra szánt kukoricaalapú élelmiszerek, a 2.6.2. és 2.6.4. pontban felsorolt élelmiszerek kivételével	400 [23]
2.6.4.	Csecsemők és kisgyermekek számára készült feldolgozott kukoricaalapú élelmiszerek és bébiételek [3], [7]	200 [23]
2.7.	**T-2 és HT-2 toxin** [17]	A T-2 és HT-2 toxin összege
2.7.1.	Feldolgozatlan gabonafélék [18] és gabonakészítmények	

3. szakasz: Fémek

Élelmiszerek [1]		Felső határértékek (mg/kg nedves tömeg)
3.1.	**Ólom**	
3.1.1.	Nyerstej [6], tejalapú termékek előállításához használt tej és hőkezelt tej	0,020
3.1.2.	Anyatej-helyettesítő és anyatej-kiegészítő tápszerek [4], [8]	0,020
3.1.3.	Szarvasmarhafélék, juh, sertés, és baromfi húsa (a belsőségek kivételével) [6]	0,10
3.1.4.	Szarvasmarhafélék, juh, sertés, baromfi belsőségei [6]	0,50
3.1.5.	Hal színhúsa [24], [25]	0,30
3.1.6.	Rákfélék, kivéve a tarisznyarák barna húsát, valamint a homár és a hasonló nagy rákfélék (*Nephropidae* és *Palinuridae*) fejének és fejtorának a húsát [26]	0,50
3.1.7.	Kéthéjú kagylók [26]	1,5
3.1.8.	Lábasfejűek (zsigerek nélkül) [26]	1,0
3.1.9.	Gabonafélék, nagymagvú hüvelyesek és hüvelyesek	0,20
3.1.10.	Zöldségfélék, a káposztafélék, leveles zöldségek, friss fűszernövények és gombák kivételével [27]. A burgonya esetében a felső határérték a hámozott burgonyára alkalmazandó.	0,10

Módszer validálási paraméterek

Kimutatási határ (LOD)

A kimutatási határ definiálására több megfogalmazás is létezik. Definíció szerint a kimutatási határ az a koncentráció – anyagmennyiség arány, amelyhez tartozó jel értéke megegyezik a vak minta közepes jelének és a vak minta jel háromszoros korrigált tapasztalati szórásának összegével.

Egy másik definíció szerint a kimutatási határ a mért alkotónak az a legkisebb koncentrációja vagy mennyisége, amely a vak mintától megbízhatóan megkülönböztethető, vagy másik módon megfogalmazva az alapvonalzaj háromszorosának megfelelő magasságú jelet adó koncentráció, illetve a standard deviáció háromszorosaként is definiáljuk. Erre egy példa:

$$LOD = \frac{3\,s}{S}$$

ahol az s….az alapvonal szórása vagy standard deviációja
S… az analitikai érzékenység

Érzékenység (S):

Definiálhatjuk az analitikai válaszjelnek a koncentráció szerinti deriváltjaként.

$$S = \frac{c_2 - c_1}{x_2 - x_1}$$

Meghatározási határ (LOQ)

Az a legkisebb koncentráció vagy anyagmennyiség, amely még elfogadható pontossággal és precizitással határozható meg. Az analitikai mérőgörbe legalsó értékelhető pontja.

Azt a legkisebb koncentrációt is jelenti, mely még megfelelő helyességgel és precizitással meghatározható. Ennek értékét a vak minta válaszjele és ennek tapasztalati szórása segítségével lehet megadni. A meghatározási határ a módszer jellemzőin kívül attól is függ, hogy az adott feladat esetén mekkora hiba engedhető meg. A meghatározási határ kiszámításakor a precizitás és a helyesség elfogadható szintjét is meg kell adni. Általánosan a precizitás értékének többnyire 10 % RSD alatt kell lennie.

A LOQ-t sok esetben a standard deviáció tízszeresének vesszük:

$$LOQ = \frac{10s}{S}$$

ahol az s….az alapvonal szórása vagy standard deviációja
S… az analitikai érzékenység

Jelen esetben a mérések során a precizitás értékét az alacsony koncentrációtartományra való figyelemmel RSD=10 %-ban szabtam meg.

Precizitás:

Mintaoldat többszöri injektálásával lehet igazolni, hogy a készülékhez kapcsolt, az analitikai evlálasztásér felelős és azonosításhoz tartozó részei megfelelően működnek. Általánosan egy kromatográfiád rendszernél az egyik lényeges hibaforrás az injektáló egység. Az injektor megfelelő működése esetében a csúcsterületek között csak kismértékű ingadozást figyelhetünk meg. Alacsony koncentráció tartományban a csúcsterületek ingadozása általában RSD= 5-20% között jelentkezik.

Konfidencia intervallum

Az analitikai mérés célja a minél jobb valódi érték becslése. Abban az esetben, ah nem lép fel módszeres hiba, akkor a mintaátlaggal becsülhetjük a valódi értéket. Ha a mérési eredmények normál eloszlásúnak tekinthetőek, akkor meg tudunk adni egy intervallumot, amelyet megbízhatósági vagy konfidencia intervallumnak nevezünk, amely értéken belül az átlagérték körül ott adott valószínűséggel (1-α) ott lesz a valódi érték. A konfidencia intervallum számításához a Student-eloszlás t-értéke, a mérések száma (n-1) valamint a valószínűségi szint (1-α) alapján meghatározható, vagy a hozzá tartozó táblázatokból kikereshető. Az átlagra vonatkozó konfidencia intervallum:

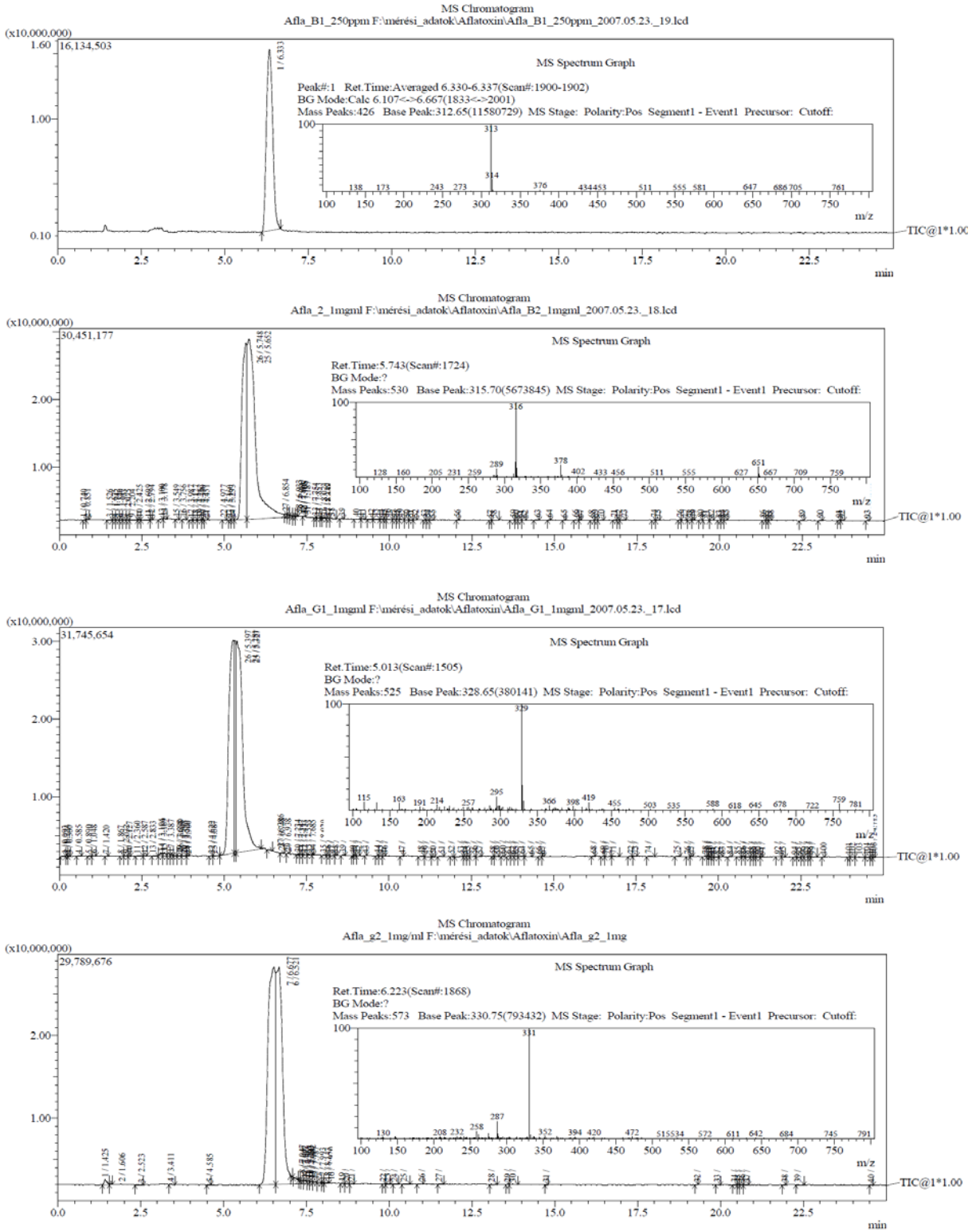
$$\Delta x = \frac{s \cdot t_{(n-1, 1-\alpha)}}{\sqrt{n}}$$

Ha a mérési eredményekről feltételezhető, hogy normál eloszlásúak, valamint nem terheli módszeres hiba, akkor statisztikai szempontból a párhuzamos mérések eredményeként egy

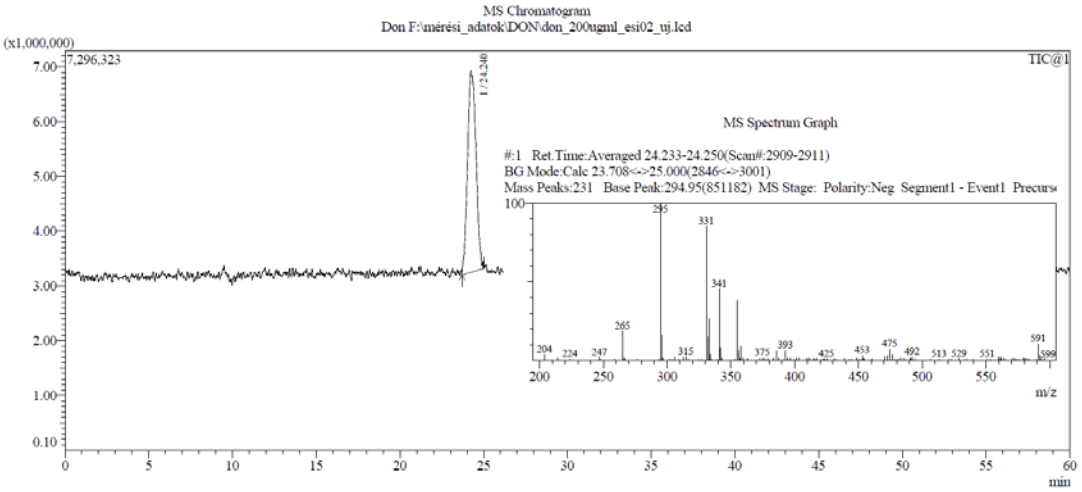
$$x \pm \Delta x$$

intervallumot lehet megadnunk, amely intervallumon belül 1-α valószínűséggel helyezkednek el a valódi értékek.

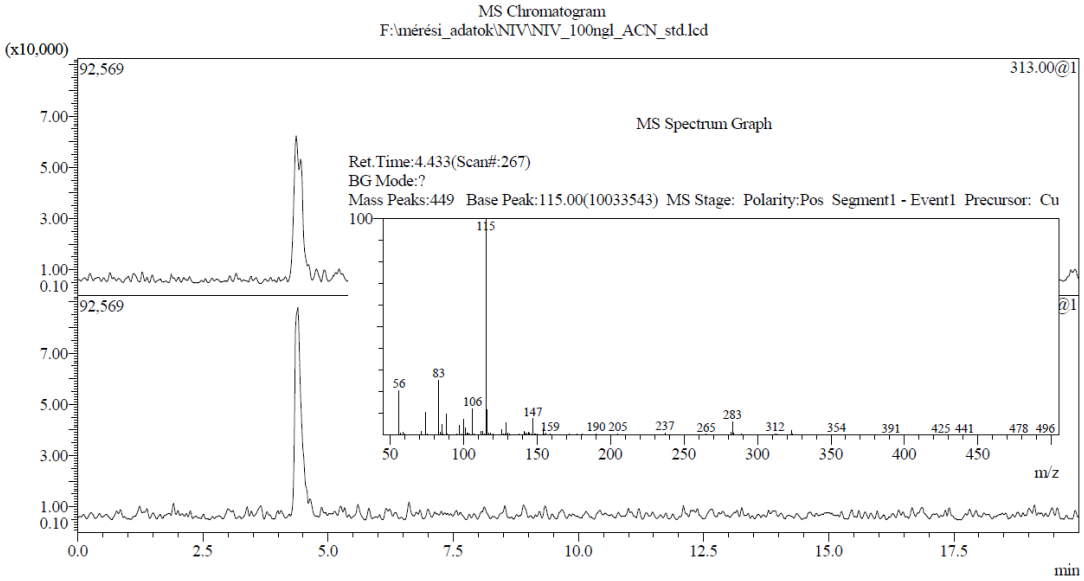
14.2 II. Melléklet



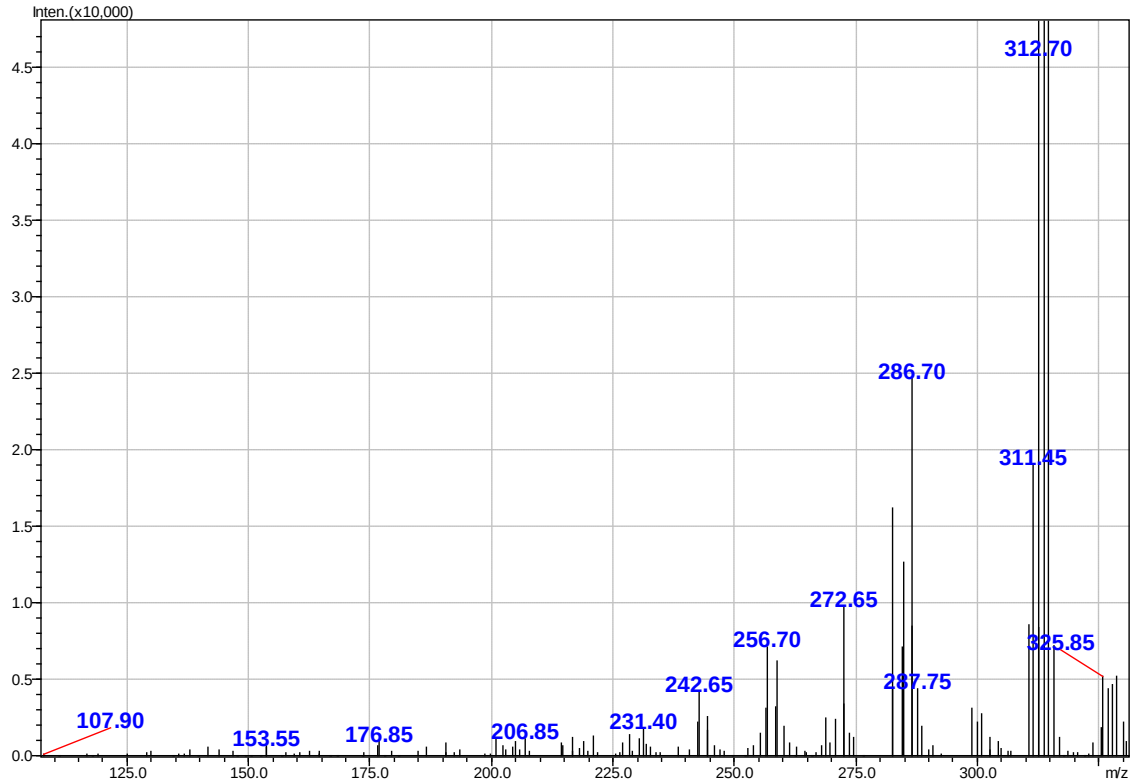
29. ábra: Aflatoxin B_1, B_2, G_1 és G_2 kromatogramja, valamint a jellemző csúcsok tömegspektruma APCI(+) ionizáció alkalmazása esetében



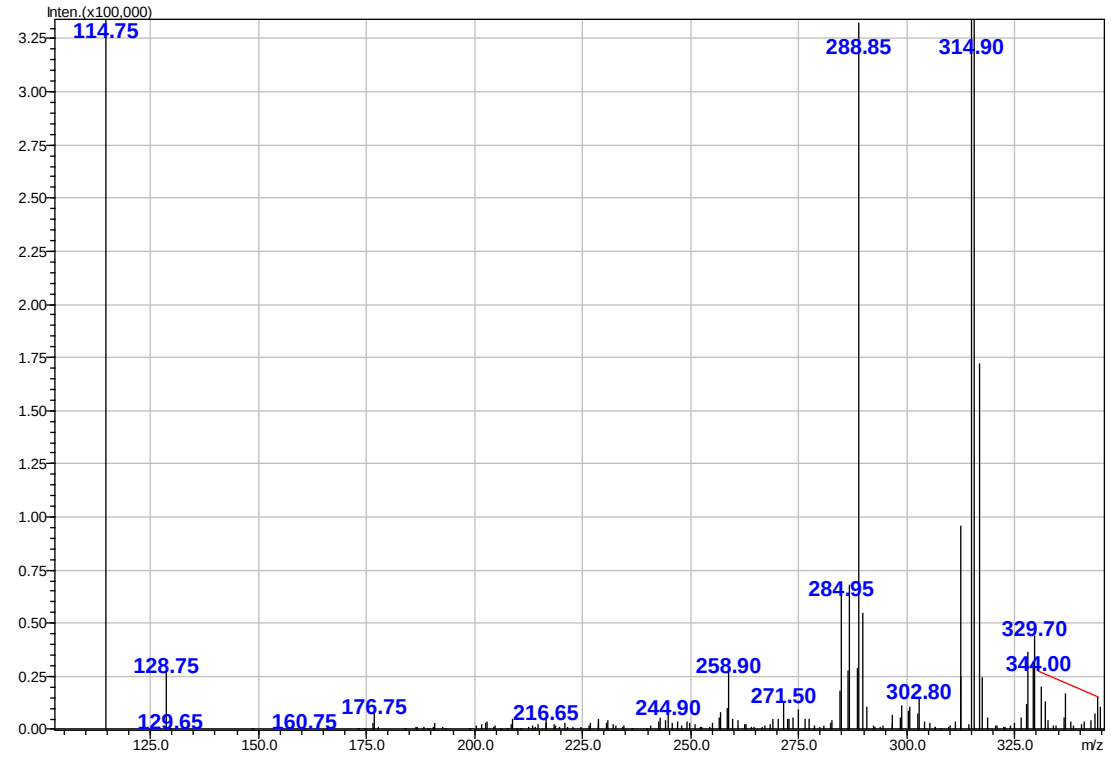
37. ábra: Deoxynivalenol 200 µg/L koncentrációjú sztenderd oldatának ESI (-) ionizációval felvett kromatogramja 0,3 mL/perc térfogatáram esetében.



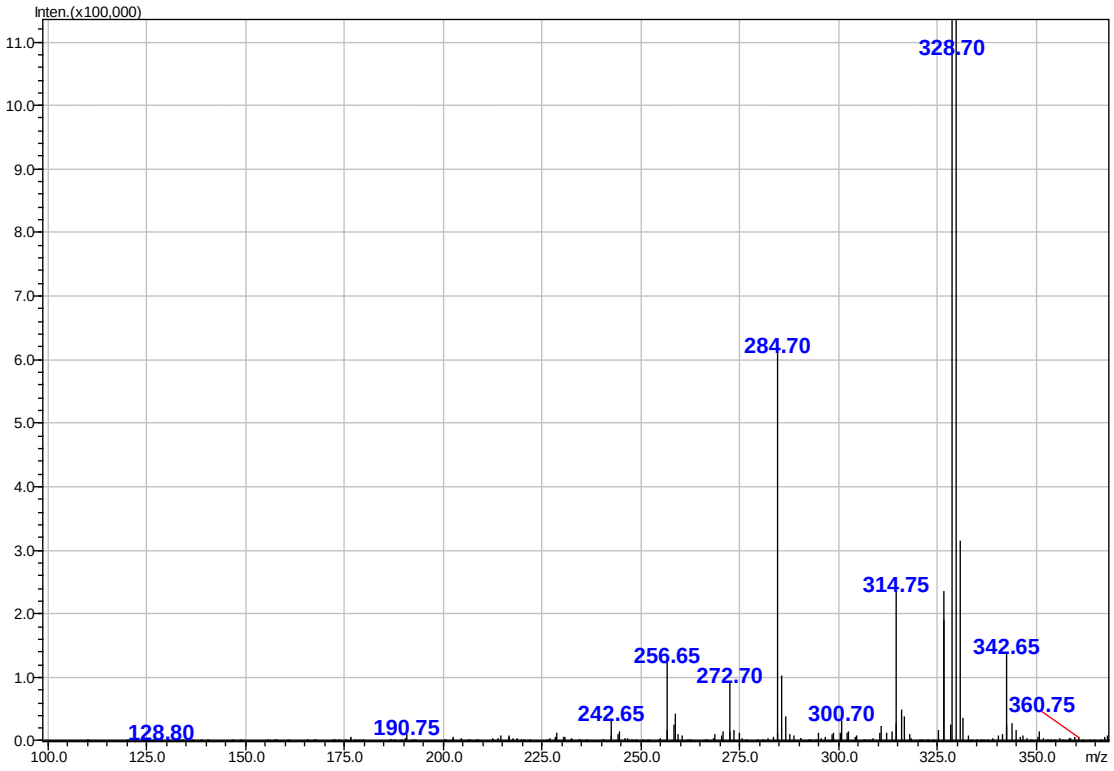
42. ábra: A Nivalenol toxin HPLC-MS kromatogramja APCI (+) ionizáció mellett, a kromatogramból kiszűrve az alapmolekulára jellemző 312 és 313 m/z tömeg/töltés arányú ionokat.



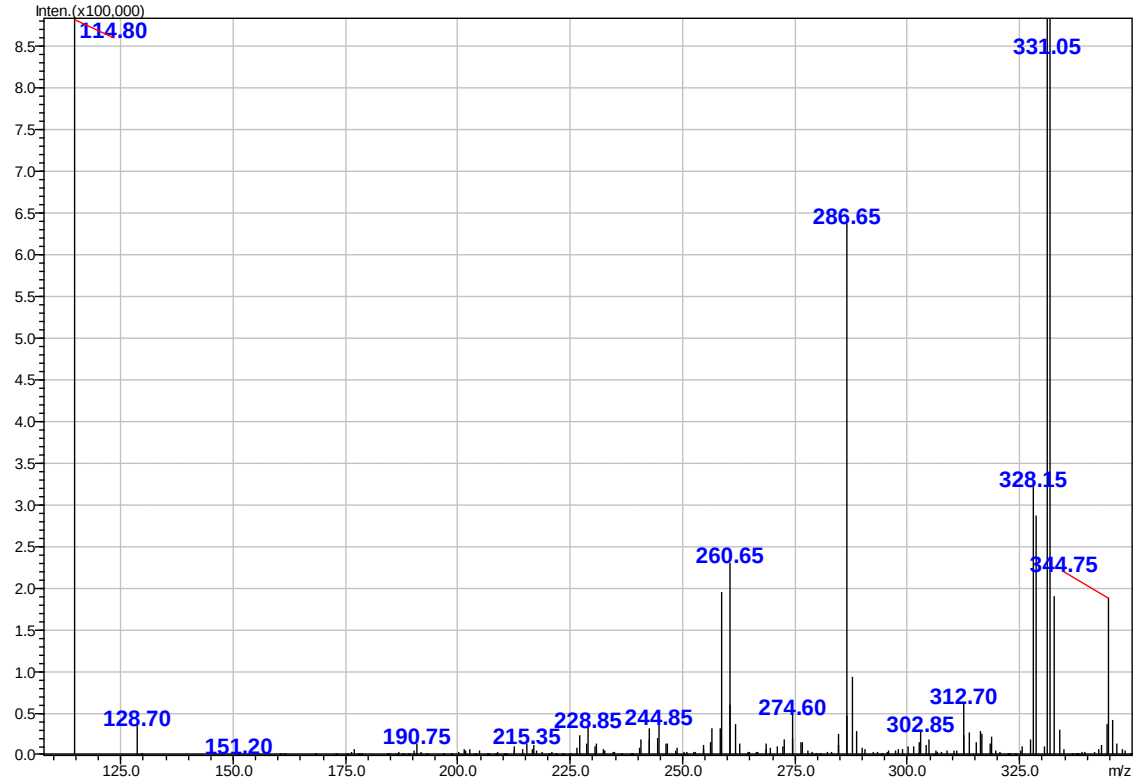
57. ábra: Aflatoxin B_1 sztenderd tökmegspektruma APCI(+) ionizáció mellett



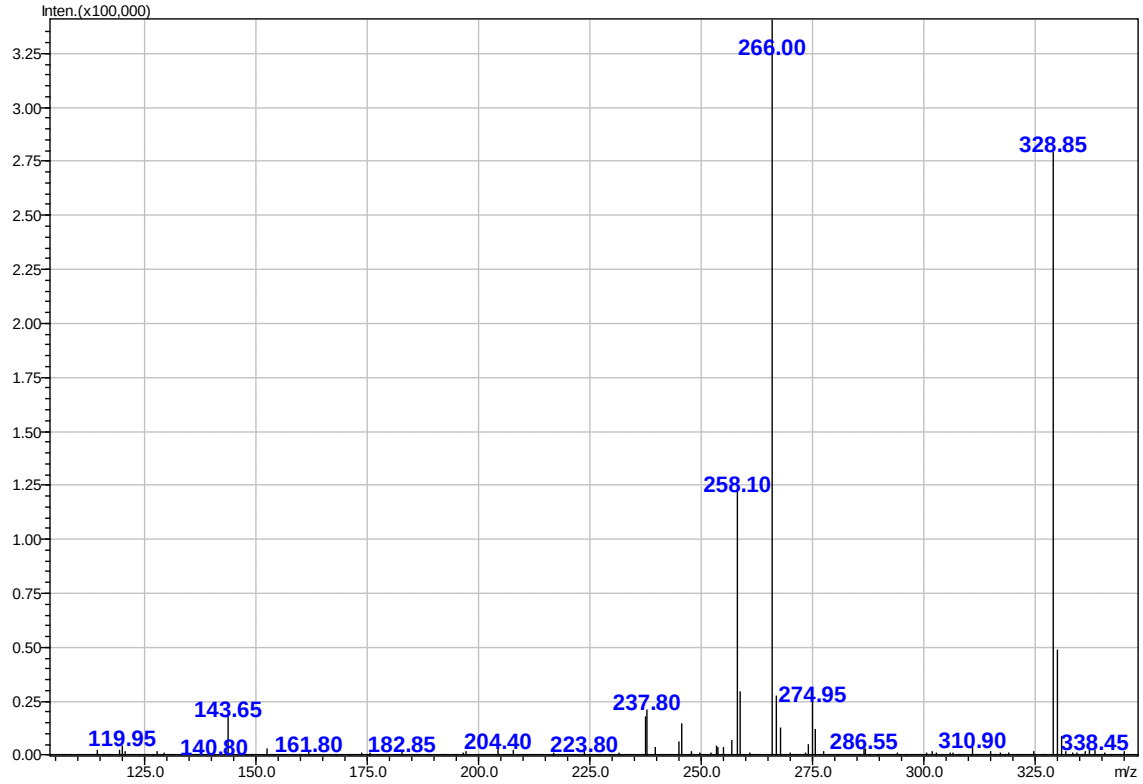
58. ábra: Aflatoxin B_2 sztenderd tömegspektruma APCI(+) ionizáció mellett



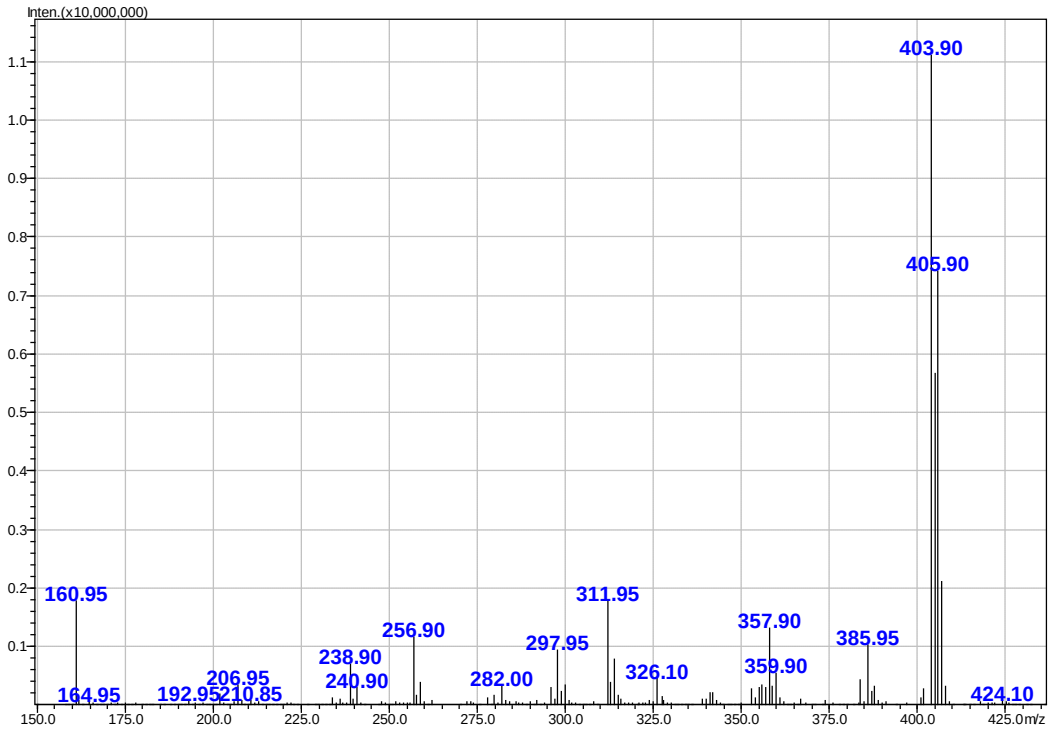
59. ábra: Aflatoxin G_1 sztenderd tömegspektruma APCI(+) ionizáció mellett



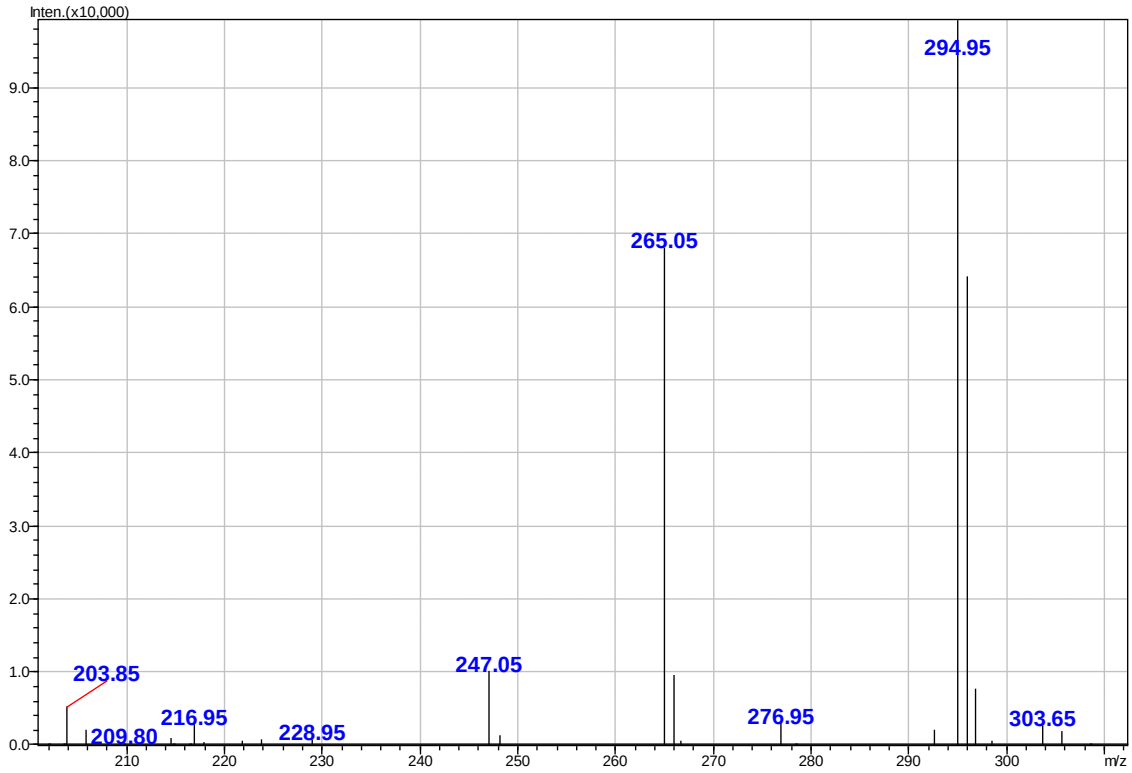
60. ábra: Aflatoxin G_2 sztenderd tömegspektruma APCI(+) ionizáció mellett



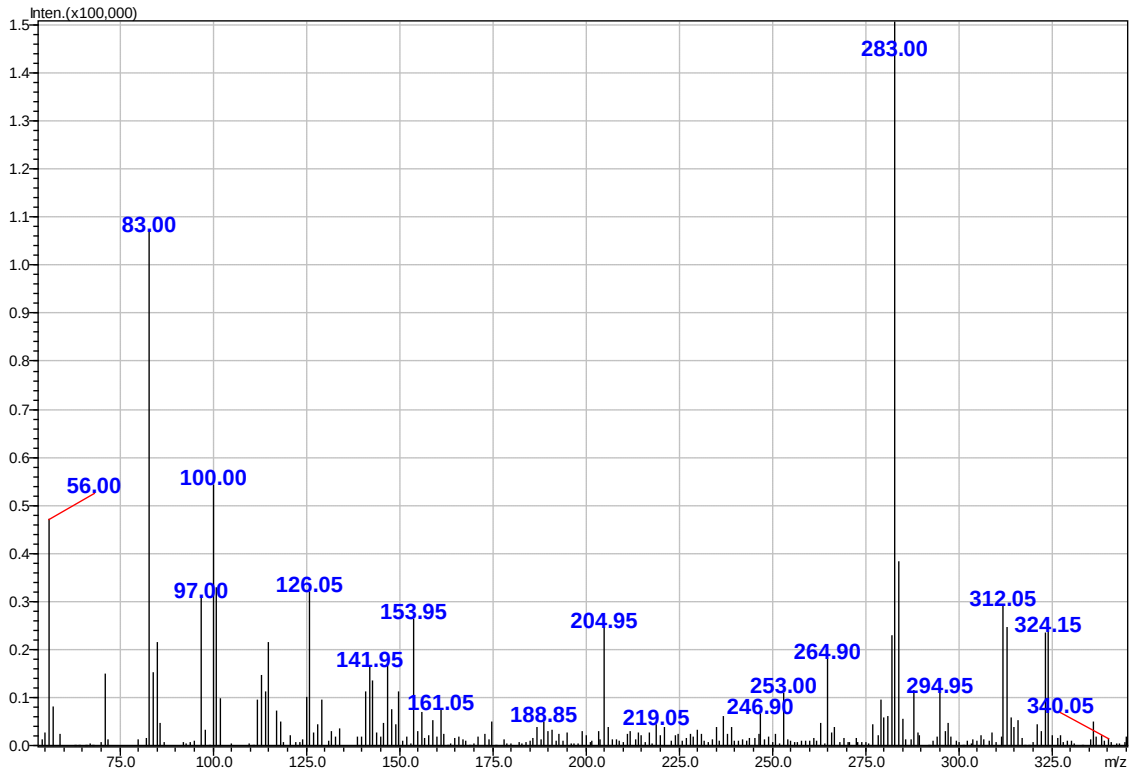
61. ábra: Aflatoxin M_1 sztenderd tömegspektruma APCI(+) ionizáció mellett



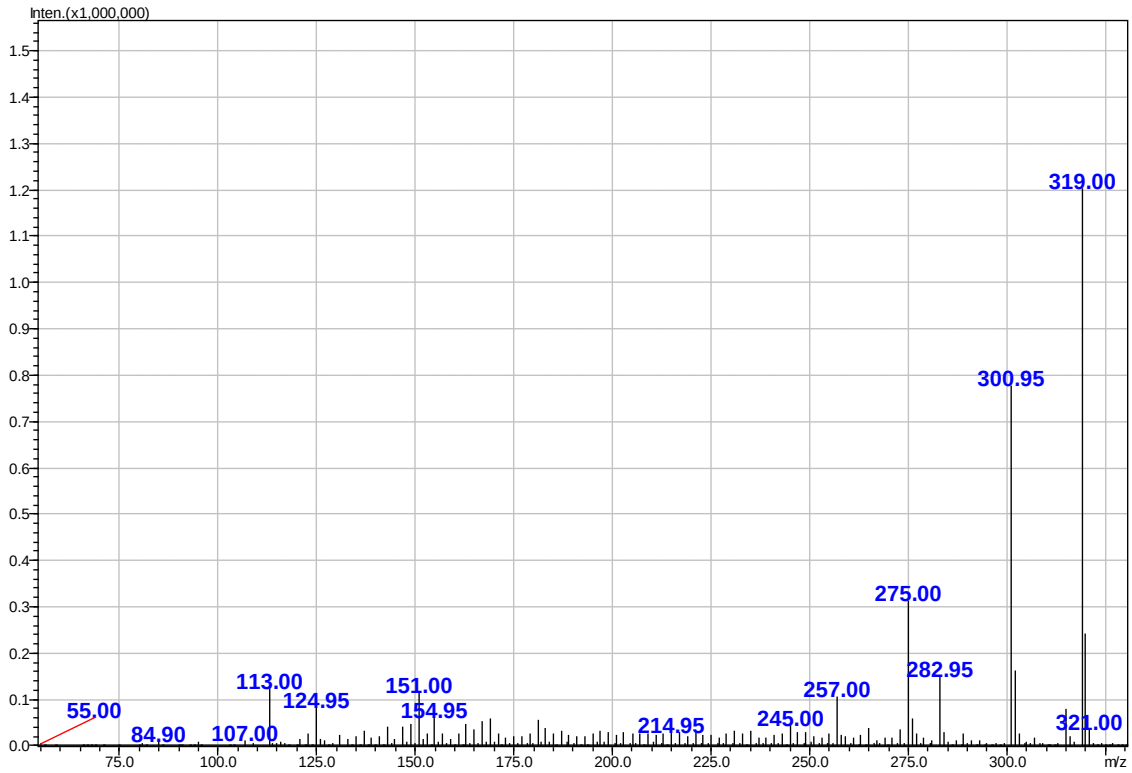
62. ábra: Ochratoxin-a molekula ESI(+) módban felvett tömegspektruma.



63. ábra: Deoxynivalenol sztenderd tömegspektruma ESI(-) ionizáció mellett



64. ábra: Nivalenol sztenderd tömegspektruma APCI(+) ionizáció mellett



65. ábra: Zearalenon sztenderd tömegspektruma APCI(+) ionizáció mellett