



Multitoxin vizsgálat takarmányokból és alapanyagokból LC-MS/MS mérések során

Deák Edit

Tömegspektrometriai Szeminárium
Budapest, 2016.04.27



**BÁBOLNA
TAKARMÁNY**



**BÁBOLNA
FEED**

Bonafarm Zrt.

BÓLY Zrt.

Pick Szeged Zrt.

DALMAND Zrt.

Sole-Mizo Zrt.

FIORÁCS Kft.

Csányi Pincészet Zrt.

Bonafarm-Bábolna
Takarmány Kft.



- A Bonafarm Csoport több mint 5500 főt foglalkoztat
- A Bonafarm termékek több mint 40 országba kerülnek exportra
- A Bonafarm Mezőgazdaság több mint 30.000 ha területen gazdálkodik
- Közel 350 ezer tonna az éves takarmány előállítás
- A csípőtelki tehenészetben 2.500 tehén évente több mint 20 millió liter tejet termel „CSODAFARM”
- A Csoport évente kb. 350.000 vágósertést állít elő, amely a magyar termelés 8-10%-át adja
- Mohács vágóhíd beruházás évi 1 millió sertés vágókapacitás



Bábolna Takarmány

Bonafarm Mezőgazdaság Takarmányágazat



- Központ: Nagyigmánd
- Fő tevékenységi kör: takarmány előkeverékek (premix), teljes értékű és kiegészítő takarmányok, koncentrátumok gyártása és forgalmazása
- Foglalkoztattok száma: 465 fő
- 700 partner és több mint 1000 termék



Központi laboratórium

- >11.000 minta/2015
- Aminosav vizsgálat
- Zsírsavösszetétel mérés
- Mikro/Makroelem meghatározás
- Triptofán mérés
- Gyógyszerek
- Vitaminok
- Mikotoxinok
- Mikrobiológiai, GMO vizsgálatok
- Tápérték vizsgálat (fehérje, zsír,rost)



A mikotoxinok fonalas gombák másodlagos anyagcsere termékei

- Kis molekulatömeg, nincs antigén hatás
- Ellenállnak a hőmérsékleti hatásoknak
- Elviselik a tárolást
- Kibírják a feldolgozási körülményeket

Több, mint 100.000 faj!



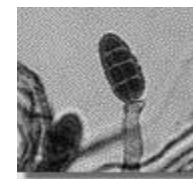
Fusarium sp.



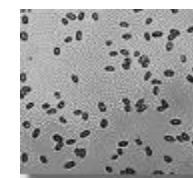
Aspergillus sp.



Penicillium sp.



Alternaria sp.



*Claviceps sp.,
etc.*

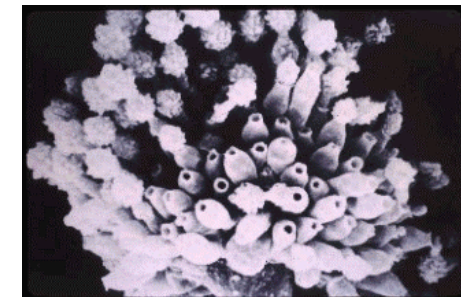
Aflatoxinok

Aspergillus flavus*, *A. parasiticus, *Aspergillus nomius*,
Aspergillus pseudotamarii termelik

Trópusi, szubtrópusi éghajlat, nedves tárolási körülmények kedveznek.

Toxinok: AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂
metabolitok: AFM₁, AFM₂

Elsődleges célszerv a máj!



Aspergillus flavus

Aflatoxinok

Érintett élelmiszerek

- gabonafélék
(kukorica, árpa, köles, zab, rizs, cirok, búza)
- földimogyoró, pisztácia, mandula
- egyéb diófélék
- szójabab
- tej, tejtermékek (sajt)
- tojás



Ochratoxinok

Aspergillus ochraceus

Aspergillus carbonarius

Penicillium verrucosum

Penicillium nordicum

hűvös és mérsékelt éghajlat
nedves tárolási körülmények

Ochratoxin A (B, C, D)

Elsősorban vese károsító!



Aspergillus ochraceus

Érintett élelmiszerek

- gabonafélék
(árpa, kukorica, zab, búza)
- földimogyoró
- kávébab
- száraz bab
- szőlő
- sajt
- sertéshús



Trichotecén vázas toxinok

***Fusarium* spp.**

(pl. *F. graminearum*, *F. culmorum*
F. sporotrichioides)

Trichoderma spp.,

Stachybotrys spp.,

Myrothecium spp.,...

**széles körben előfordul,
elsősorban meleg és mérsékelt
éghajlaton**



Fusarium spp.

Érintett élelmiszerek

- gabonafélék

(árpa, kukorica, zab, búza, rozs, köles)

- diófélék
- szójabab
- cukornád



Zearalenon (ZON vagy F2)

Fusarium graminearum

DON-nal együtt fordul elő!

**meleg és mérsékelt éghajlat, hosszú
hűvös, nedves időszakok, magas
nedvességtartalmú környezet**

Ösztrogén hatás, álivarzás



Fumonizinek

Fusarium verticillioides
Fusarium proliferatum
egyéb *Fusarium* fajok
Aspergillus niger



Meleg és mérsékelt éghajlat

Csőpenészesedés, szárkorhadás

Fumonizin B₁, B₂ (B₃, B₄, A₁, A₂)

Miért vizsgáljuk a mikotoxinokat?



- **Európai Unió**
 - Tilos a **Maximum szinteket** meghaladó termékek felhasználása
 - **Kötelező határérték: Aflatoxinok ($B_1+B_2+G_1+G_2$), Aflatoxin M_1 ,**
 - **Ajánlás: Ochratoxin A, Patulin, DON, Fumonizinek (FB1 + FB2) és Zearalenon, T-2 és HT-2 toxinokra**
 - Részletes lista elérhető a szabályozott termékekről valamennyi Mikotoxinra
 - A jogszabályok kitérnek a **Mintavétellel** és **Vizsgálati módszerrel** szemben támasztott követelményekre



Mikor és hol vizsgáljuk a mikotoxinokat?

GYORSVIZSGÁLAT

GYORSVIZSGÁLAT

Előzetes HPLC-s vizsgálat
(beszállítónál vett minta)



Alapanyag beszállítás



Betárolás

(HPLC-s vizsgálat
tételzárás után)

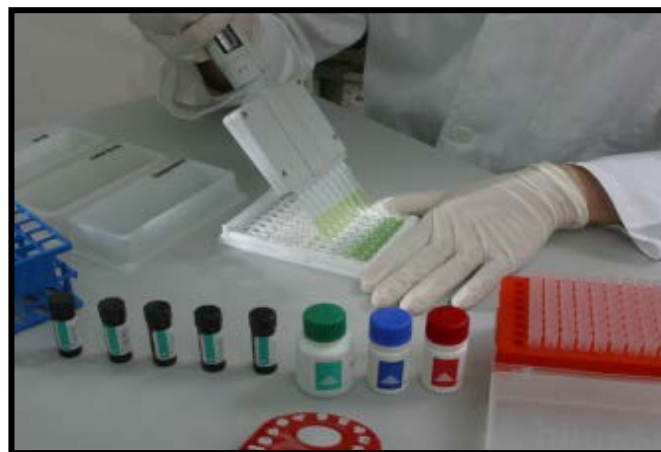
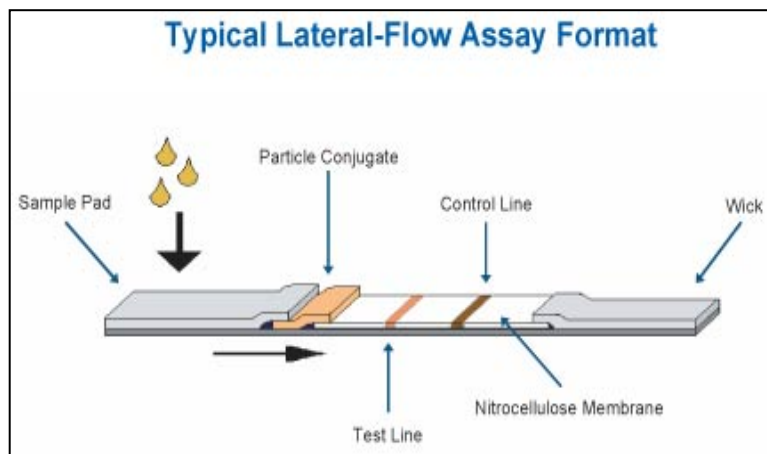


Késztermék



Toxinvizsgálat CSAK
laboratóriumban lehetséges
(HPLC)

Szűrővizsgálat: tesztcsík, ELISA, fluorimetria



Megerősítő vizsgálatok: HPLC-UV/FLD; HPLC-MS/MS

Immunkromatográfiás tesztcsík

- **antitestek használatán** alapul, amelyek specifikusak a vizsgált mikotoxin(ok)ra
- **Kvalitatív eredmény** (igen/nem válasz) adott kimutatási határhoz képest
- **Kvantitatív** eredmények olvasóval kombinálva
- Gyors és könnyű **Egyszerű** vizsgálat (minták egyesével)



- **antitestek használatán** alapul, amelyek specifikusak a vizsgált mikotoxinra
- detektálás **színreakción** keresztül (vizuálisan vagy fotométerrel)
- **kvantitatív**, szemi-kvantitatív vagy kvalitatív eredmények
- **nagy számú minta vizsgálata** lehetséges (microplate kialakítás)

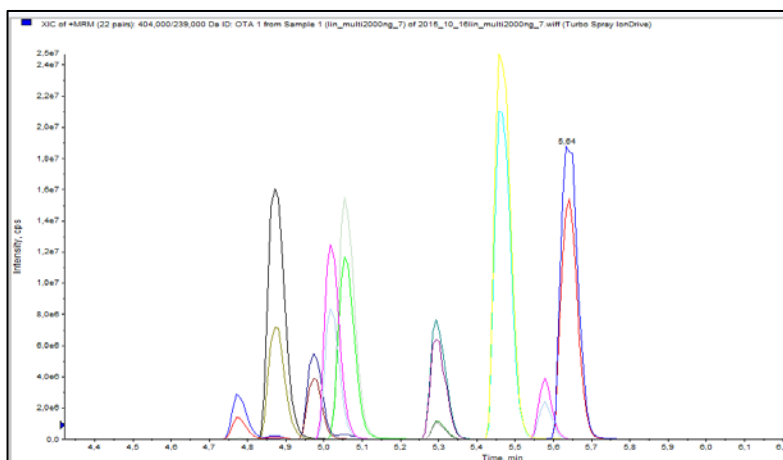


Referencia vizsgálatok

Mikotoxin	Műszeres háttér	Származékképzés
Aflatoxinok	HPLC-FLD	Oszlop után fotokémiai, elektrokémiai
Ochratoxin A	HPLC-FLD	
DON	HPLC-UV (GC-ECD)	
Fumonizinek	HPLC-FLD HPLC-MS	Oszlop előtt (OPA)
T-2	HPLC-FLD HPLC-MS	Oszlop előtt
Zearalenon	HPLC-FLD	

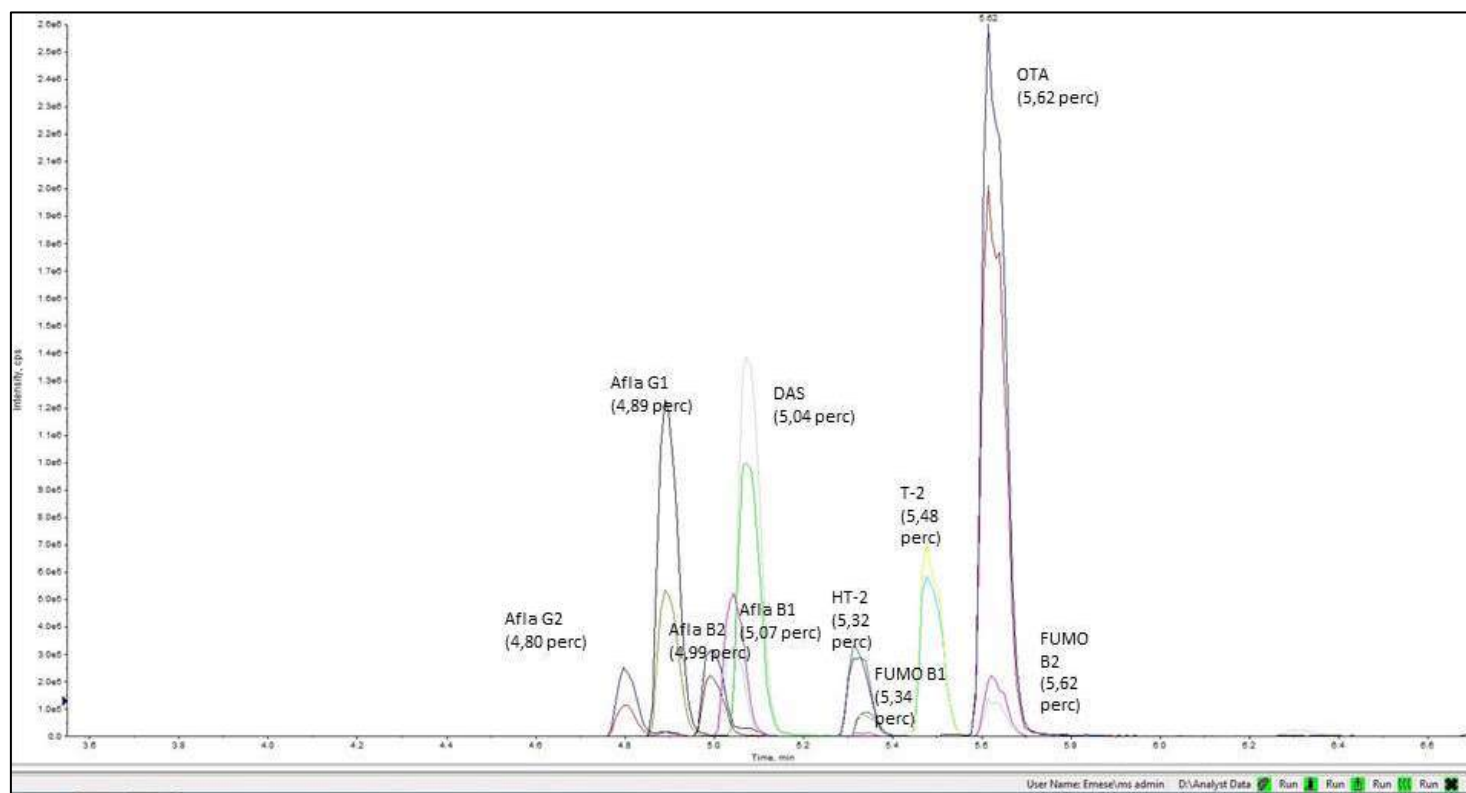
Agilent 1290 + ABSciex QTRAP 6500 UHPLC-MS/MS

- 10 mikotoxin vizsgálata 17 perc alatt
- Komponensek megbízható azonosítása
- Nagy érzékenység, nagy szelektivitás
- Ioncsapdás technológia
- ESI/APCI ionforrás



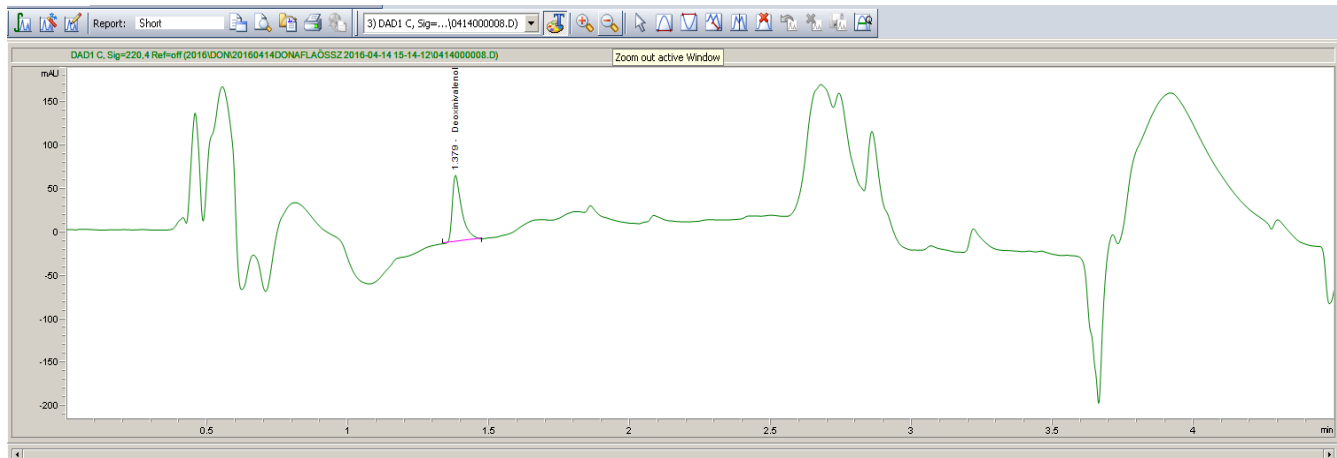
HPLC-ESI-MS/MS

- Egyszerű mintaelőkészítés, nem igényel IA oszlopot
- 90 perces extrakció AcN:H₂O:AcOH elegyével vagy vízzel
- Szűrés - hígítás - injektálás



	LOQ (ppb)	Takarmányra vonatkoztatva (ppb)
Deoxynivalenol	10	80
Deoxynivalenol-3-glükózid	0,5	4
Nivalenol	2,5	20
Zearalenon	0,5	4
Aflatoxinok	0,125	1
Diacetoxyscirpenol	2	16
Ochratoxin A	2	16
HT-2 toxin	2	16
T-2 toxin	0,5	4
Fumonizinek	10	80

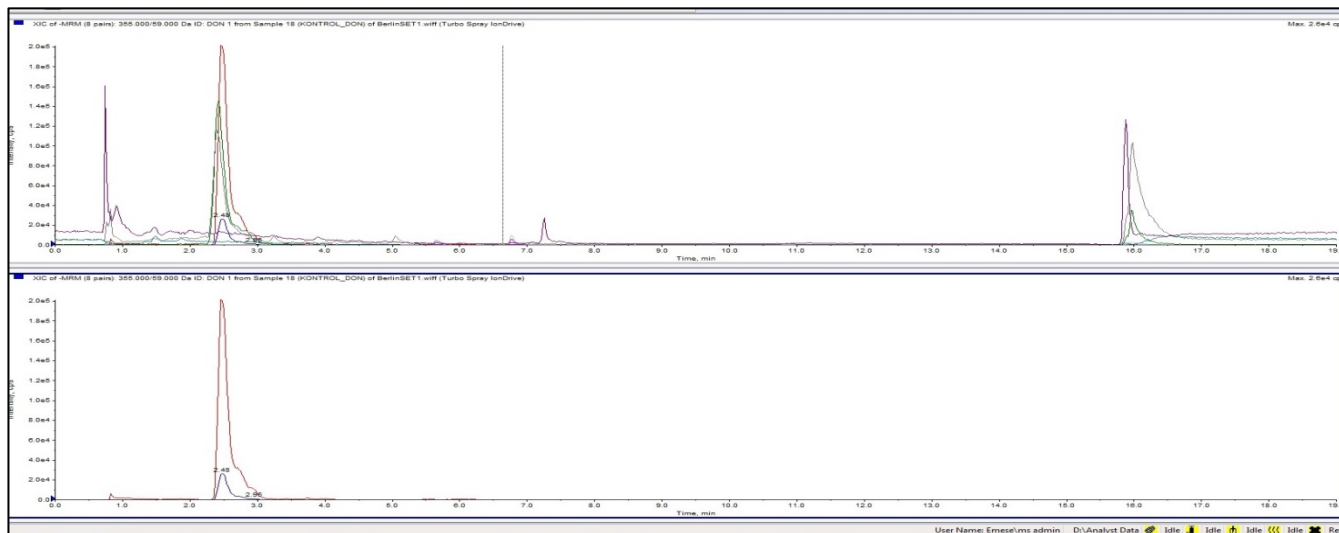
HPLC-DAD vs. HPLC-MS/MS



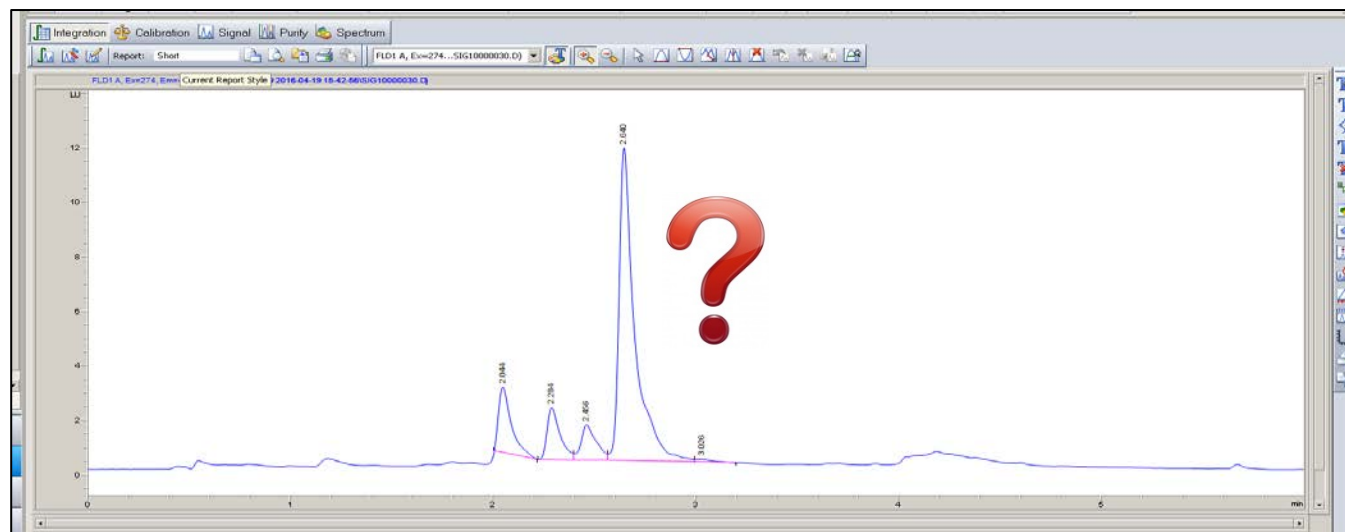
Deoxynivalenol



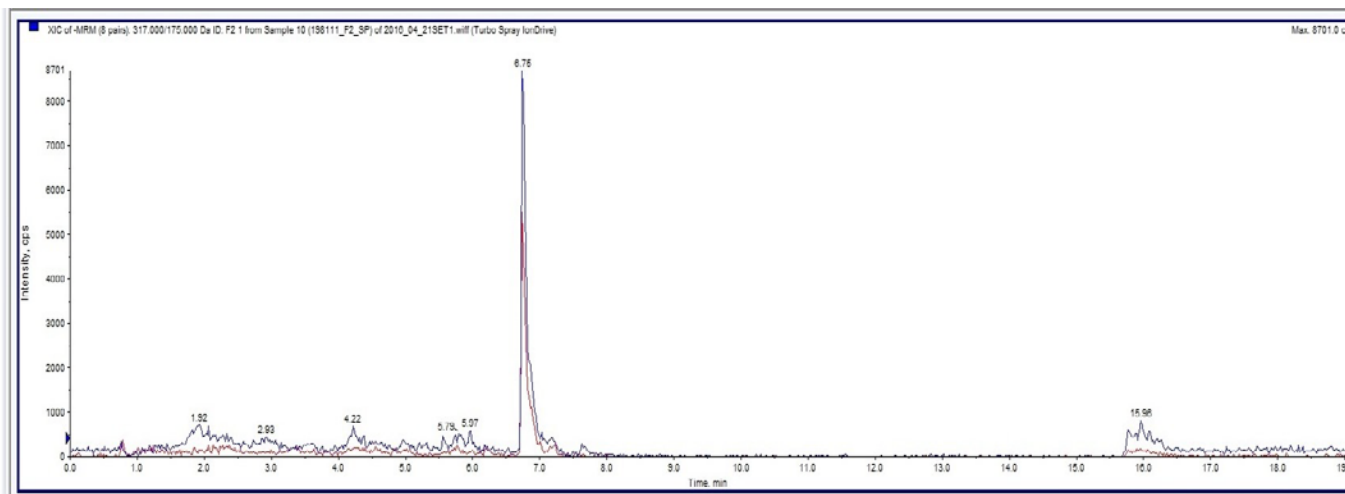
Diódasoros
detektálás



HPLC-FLD vs. HPLC-MS/MS

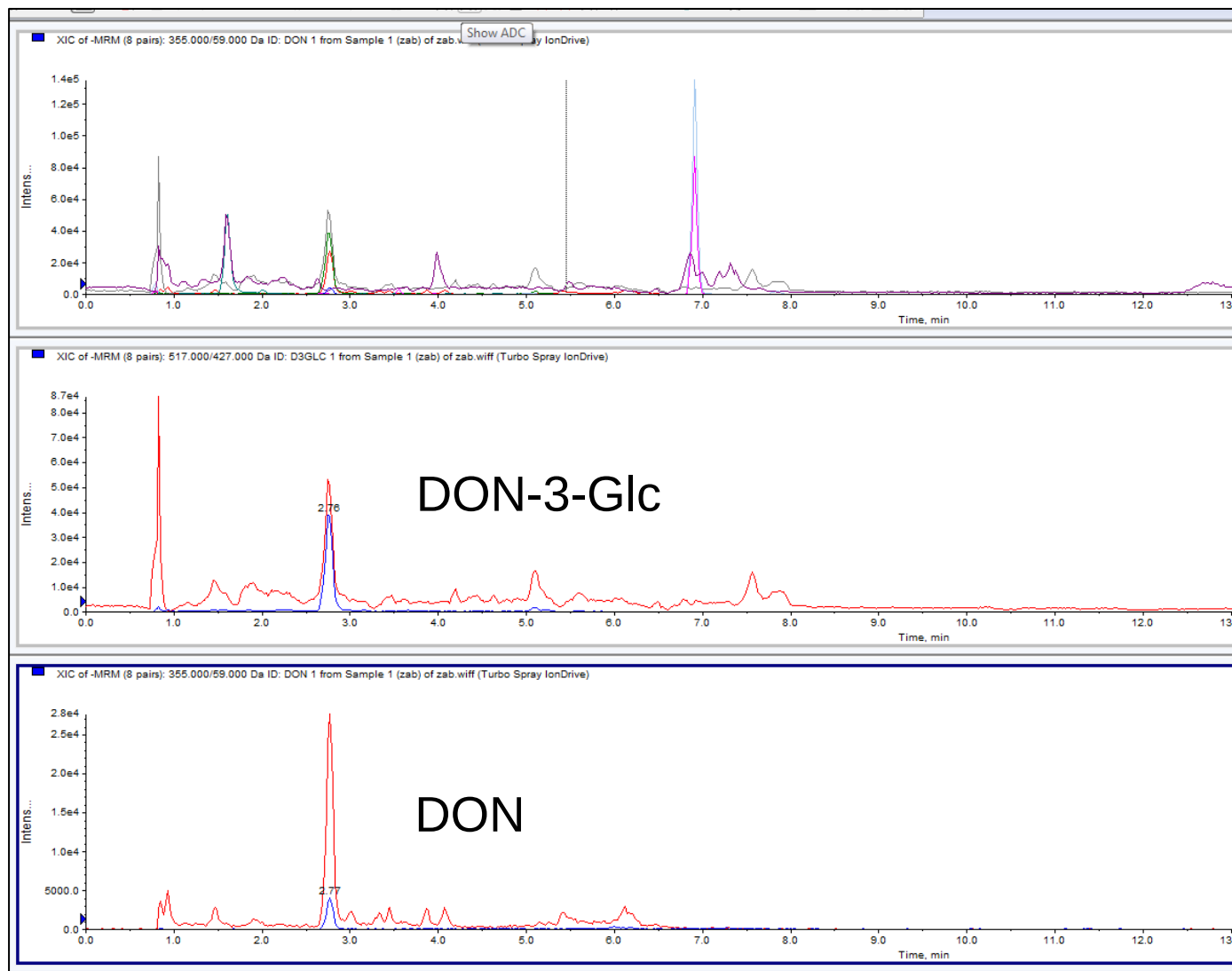


Zearalenon
(HPLC-FLD):
Szofver: 7039 ppb



Zearalenon
(HPLC-MS/MS): 17 ppb

Maszkolt toxinok



Gazdanövény a
xenobiotikumokkal
szembeni védekezése



extrahálható
konjugátumot
képeznek belőlük
**maszkolt
mikotoxin**

VAGY

sejtfal-
komponensekké
rögzítik vagy más
biopolimerekhez,
extrahálhatatlanul
kötik őket
rejtett mikotoxin

Mikotoxin	Átlag (µg/kg)	Range (µg/kg)	Jelvezteséggel korrigált érték (µg/kg)
Aflatoxin B1	12,0	6,7-17,2	13,7
Ochratoxin A	164	95-233	190
Zearalenone	144	82-206	91,4
Deoxynivalenol	1139	781-1496	1146
Fusarium toxin T2	273	234-312	260,9
Fusarium toxin HT2	396	346-446	381
Fumonisin B1	1616	1135-2097	1334
Fumonisin B2	503	324-681	496
Fumonisin B1+B2	2083	1486-2680	1830

An iceberg floating in a blue ocean under a blue sky with white clouds. The visible tip of the iceberg is on the left, and the much larger, submerged part is on the right. The text is overlaid on the image, with the top part on the visible tip and the bottom part on the submerged part.

Szakirodalmi adatok

SAJÁT KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK

MIKOTOXINOK SZINERGIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA

MASZKOLT/REJTETT MIKOTOXINOK VIZSGÁLATA

TOXINKÖTŐK TESZTELÉSE

IN VITRO EMÉSZTÉSI KÍSÉRLETEK

Jövőbeli tervek...

- Vitamin mérés takarmányból
- Gyógyszer maradvány meghatározás
- Peszticid vizsgálat



Some people think scientists exclaim

Eureka!



When doing experiments.

But they're way more likely to say...

Bollocks!



oh...shit!



F*ck!



Arse!



Stupid piece-
of-crap machine!



I hate
Science!



twisteddoodles.com

KÖSZÖNÖM A FIGYELMET!