

A patulin előfordulása és hatástalanítása az élelmiszerekben II.

FARKAS JÓZSEFNÉ és SCHREINER ERNŐNÉ*

Érkezett: 1977. december 30.

Mint arról előző közleményünkben (1) szó volt, a patulint szobahőmérsékleten igen stabilisnak és hővel szemben ellenállónak találták. Könnyen reakcióba lép azonban SH-csoportokat tartalmazó vegyületekkel, valamint SO_2 -dal, ezt a tulajdonságát remélték hatástalanítására felhasználni. Kísérleteinkben ezekre a kérdésekre kerestük a feleletet.

Vizsgálati anyagok és módszerek

Patulin (rein) Serva gym. (Feinbiochemica, Heidelberg)

Ultraibolya spektrofotometria (Spektromom 202 és

Perkin-Elmer UV spektrofotométer)

Vékonyrétegekromatográfia

Polygram Sil G ill. Sil G₂₅₄ késZRétegen, toluol – etilacetát – hangyasav (60:30:10), valamint butanol – ecetsav – víz (4:1:5) eleggyel történt. A patulin előhívószereül o-fenilédiamin 0,3%-os propanolos oldatának 20%-os kénsavval alkotott 1:1 elegyét használtuk.

A patulin stabilitásának vizsgálata modell-oldatokban

Tiszta patulinból különböző töménységű (0,015 mg/cm³, 0,003 mg/cm³, 0,0015 mg/cm³) vizes oldatokat készítettünk és szobahőmérsékleten tároltuk. A koncentráció változását spektrofotométerrel 277 nm-en mértük. Az adatok szerint a toxinbomlás sebessége függ a kezdeti koncentrációtól és még 32 nap múlva is megtaláltuk az eredeti toxinnak 40 – 70%-át (1. táblázat).

Ezt követőleg megvizsgáltuk a patulin termostabilitását. 0,01 mg/ml toxin-tartalmú oldatokat három különböző pH-értéken (3,3; 5,5 és 7,5), 96 °C-on, légköri nyomáson 10, 20 és 30 percig hőkezeltük. (A 3,3 pH-t citrát, a 7,5 pH-t foszfátpufferrel állítottuk be.) Az oldatok extinkcióját 277 nm-en mértük. A 2. táblázat az az előbb számított toxin-maradékot mutatja az eredeti érték %-ában kifejezve.

A patulin tehát savas közegben sokkal jobban ellenáll a hőkezelésnek, mint a semlegeshez közelebb eső pH-n.

Ha a patulin ilyen nagy mértékben termostabilis, vajon van-e más lehetőség a detoxikálásra az élelmiszerekben? Erre szóba jöhetnek olyan vegyületekkel való reakciók, melyek engedélyezett élelmiszer-adalékanyagok. Ilyen szer a kénessav. Pohland és Allen (2) közleményükben a patulin ultraibolyaabszorpciós spektrumá-

* Kertészeti Egyetem Élelmiszerkémiai Tanszéki Csoport, Budapest

Patulin bomlása szobahőmérsékleten

(A számadatok a toxin maradékot mutatják, az eredeti anyag %-ában kifejezve)

Kezdeti koncentráció mg/l	0 nap	22 nap	26 nap	32 nap
15	100	86,6	80,0	73,3
3	100	66,6	66,6	50,0
1,5	100	66,6	66,6	40,0

Patulin bomlása hőkezelés hatására

pH	0 perc	10 perc	20 perc	30 perc
3,3	100	90,5	85,7	84,5
5,5	100	37,0	20,2	10,7
7,5	100	6,0	2,4	2,0

ban kénessav hatására rövid idő alatt bekövetkező erőteljes változásról tesznek említést. Megpróbálva reprodukálni a (hiányosan) leírtakat, az alábbi kísérlet-sorozatokat végeztük:

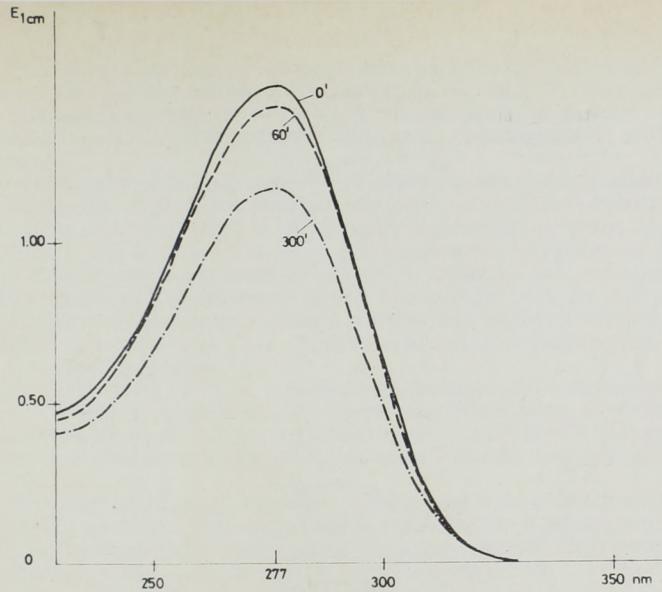
Kénessav hatásának vizsgálata patulinra

0,015 mg/cm³ koncentrációjú patulin oldatot 0,6 mg/cm³ koncentrációjú KHSO₃ oldattal egyenlő arányban elegyítettünk (mólarány 1:50), szobahőmérsékleten történő tárolás közben az oldat ultraibolya spektrumát óránként felvettük (1. ábra). (A pH érték kezdetben 4,8 volt.)

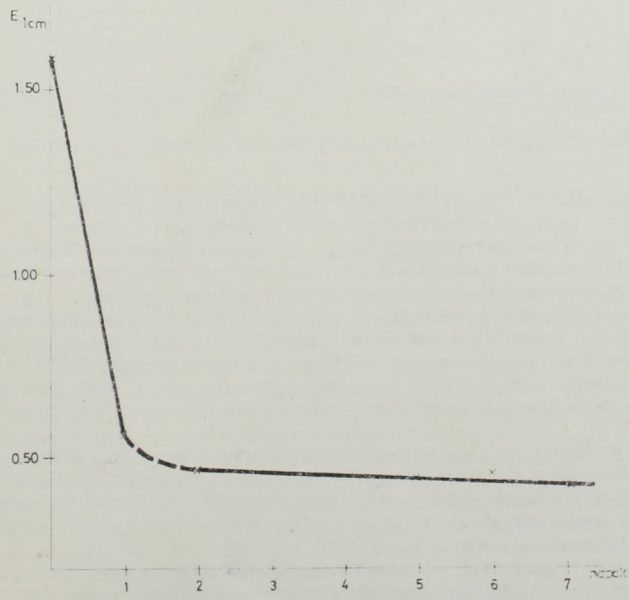
Ellentétben az említett irodalmi adatokkal, az abszorpciós maximum helye az elegyítés után nem változott és az extinkció is sokkal lassabban csökkent a tárolási idő alatt.

A vizsgálatot ugyanilyen koncentrációjú oldatokkal, de citromsavas pufferral 3,5 pH-n stabilizált körülmények között megismételtük. Az extinkciós értékek és az idő között a 2. ábrán látható összefüggést kaptuk.

A görbe lefutásából látható, hogy viszonylag gyors a csökkenés az első 24 óra alatt, de a 2–12 nap között nem számottevő. Az extinkció értékekből a megmaradt toxin mennyiségre következtetve megállapítható, hogy 24 óra múlva az eredeti patulinnak még mintegy 36%-át, 7 nap múlva pedig 26%-át megtaláltuk változatlan állapotban. Az abszorpciós maximum helye 277 nm-en maradt. A bomlás üteme nem tekinthető kielégítőnek ilyen koncentrációviszonyok között. BURROUGHES (3) vizsgálatai szerint 15 ppm patulin és 2000 ppm SO₂-ot tartalmazó oldatban a reakció két nap alatt 90%-os toxincsökkenést eredményez.



1. ábra KHSO_3 -ot tartalmazó patulinoldat abszorpciós görbéinek változása



2. ábra Patulint és KHSO_3 -ot tartalmazó oldat extinkciójának változása az idő függvényében



3. ábra
Cisztein és patulin egymáshatása — az abszorpciós görbék változása

Szulfhidril csoportokat tartalmazó vegyületek és a patulin egymáshatásának vizsgálata

Az SH-csoportot tartalmazó vegyületeket (ciszteint és glutationt) és a patulint különböző molarányokban reagáltattuk egymással (1:1, 2:1 és 3:1), a reakció lefolyását vékonyrétegekromatográfiásan és spektrofotométerrel követtük nyomon. Az oldat patulinkoncentrációja a vékonyrétegekromatográfiás vizsgálatoknál 1 mg/cm³, a spektrofotometriás vizsgálatoknál 0,01 mg/cm³ volt.

A spektrofotometriás vizsgálatok szerint a reakcióelegyek abszorpciós görbéi csak kezdetben mutatták a patulinra jellemző lefutást 277 nm-es maximummal, 20 perc eltelte után az intenzitás csökkent és a maximum eltolódott mintegy 10 nm-rel. Ugyanakkor a görbék a vizsgált tartományban (190 és 300 nm között) egy újabb maximuma is keletkezett, mely az idő múlásával egyre nagyobb lett (3. ábra).

Mind a cisztein, mind a glutation molarányának emelése a patulin gyorsabb eltűnését eredményezte. A ciszteines kezelés esetén az 1:1 molaránynál a nyolcadik napon a toxinnak mintegy 73%, a 2:1 molaránynál 59%-a és a 3:1 molaránynál 43%-a volt kimutatható. Glutationnal való reakció esetén ezek az értékek 87%, 80% ill. 54% voltak.

Időnként mintát véve a szobahőmérsékleten tartott különböző molarányú reakcióelegyekből, párhuzamosan vékonyrétegekromatográfiás vizsgálatokat is végeztünk patulinra nézve (a toluolos futtatóval) és az aminosavakra nézve (a butanolos futtatóval).

A patulin kimutatására o-feniléndiamint, az aminosavakéra ni nhidrin 0,3%-o acetonos oldatát használtuk. Színreakciót egyik reagenssel sem adó esetleges reakciótermék(ek) jelenlétét — esetleges fluoreszcenciájuk alapján — a fluoreszcein indikátort tartalmazó vékonyrétegen való kromatográfiával próbáltuk meg állapítani.

Az első szembetűnő változás — a patulin foltjának halványodása ($R_f = 0,47$) — a legnagyobb molarányok esetében már 3 óra múlva bekövetkezett, de teljesen csak három nap múlva tűnt el. A legkisebb molarányoknál ehhez négy nap volt szükséges. A startpontok felett ($R_f = 0,1$) ugyanakkor megjelent egy új folt, mely gyenge fluoreszcenciát mutatott, de szemmel is láthatóan halványsárga színű volt. A foltok nagysága a molaránnyal együtt fokozatosan nőtt. Az aminosavak ninhidrin pozitív foltjait végig ki lehetett mutatni, bár csökkenő intenzitással. A két, szulfhidril csoportot tartalmazó vegyület viselkedésében különbségeket nem tudtunk tenni ezzel a módszerrel.

A reakciótermék azonban — Hofmann és munkatársai (4) közleményével ellentétben — Ciegler és munkatársai (5) szerint nem ártalmatlan, sőt csirkeembírónál teratogénnek bizonyult. (Ciegler ugyanakkor azt is megállapította, hogy a patulin — cisztein reakció terméke két ninhidrin-negatív és négy ninhidrin pozitív vegyület.)

Az a tény tehát, hogy a patulin „eltűnik” egy reakció során, még nem jelent biztosítékot arra nézve, hogy nem veszélyes többé. Ezért vizsgálatainkat a reakciótermékek szerkezetének és toxicitásának megállapítása, valamint e termékek visszaalakulási lehetőségeinek felderítése irányában folytatjuk.

IRODALOM

- (1) Farkasné-Schreiner: ÉVIKE, 23, 26, 1977.
- (2) Pohland, A. E. és Allen, R.: J. of the AOAC 53, 688, 1970.
- (3) Burroughs, L. F.: J. of the AOAC, 60, 1, 1977.
- (4) Hofmann, K. et al.: Fleischwirtschaft 51, 1534, 1974.
- (5) Ciegler, A.; Beckwith, A. C.; Jackson, L. K.: Applied and Environmental Microbiology, 31, 5, 1976.

НАЛИЧИЕ И ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ ПАТУЛИНА В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ II.

Фаркаш Й-нэ и Шреинер Э-нэ

Авторы исследовали стабильность патулина в процессе хранения и под действием термообработки. Применяли метод УФ спектрофотометрии и тонкослойную хроматографию. Установили, что водный раствор в концентрации 1,5–15 мг/л, храненный при комнатной температуре еще и через 32 дней сохранит 40–70% содержания действующего вещества. Изучая термостабильность патулина на трех видах рН (3,3; 5,5 и 7,5) установили, что в кислой среде токсин более устойчивый к термообработке. В случае рН 3,3 термообработка продолжающаяся 30 минут способствует только 15,5%-ой, а при рН 7,5 термообработка способствует 98%-ной потере агента. Дальнейшие исследования проводили по изучению реакции патулина с KHSO_3 , а также соединениями содержащих сульфидрильные группы. Установили, что при реакции с KHSO_3 при рН 3,5 место максимума абсорпции реакционной смеси не изменилось, концентрация в первых 24 часах быстро уменьшалась с 2-го по 12 суток в значительной степени не изменилась. Патулин ступит в реакцию также и с соединениями содержащих сульфидрильные группы (цистеин и глутатион), на тонкослойной хроматографии удалось обнаружить образование

одного нового соединения. Максимум абсорбционной кривой реакционной смеси сместился, а в то же время при 200 нм образовался один новый максимум. В случае цистеиновой обработки при соотношении 1 : 1 моль на восьмой день ещё можно обнаружить 73% токсина, при соотношении моль 3 : 1 обнаружили 43%. В случае глутаминовой обработки эта величина составляла 87% и 54%.

VORKOMMEN UND INAKTIVIERUNG DES PATULINS IN LEBENSMITTELN II.

J. Farkas und E. Schreiner

Die Stabilität des Patulins wurde während Lagerung und auf Einwirkung von Wärme untersucht, wobei ultraviolette Spektrophotometrie und Dünnschichtchromatographie als Untersuchungsmethoden angewendet wurden. Es wurde dabei festgestellt, dass wässrige Lösungen von Patulin von einer Konzentration von 1,5–15,0 mg/Liter bei Lagerung bei Zimmertemperatur 40–70% ihres Gehaltes an Aktivsubstanz sogar nach 32 Tagen aufbewahren. Beim Studium der Thermostabilität des Patulins bei drei unterschiedlichen pH-Werten (3,3, 5,5) wurde festgestellt, dass der Widerstand des Toxins gegen Wärmebehandlung in einem sauren Medium viel stärker ist. Während der Verlust an Aktivsubstanz bei einer Wärmebehandlung von 30 Minuten bei pH 3,3 bloss 15,5% betrug, erreichte er bei pH 7,5 schon 98%.

Es wurde ferner die Reaktion von Patulin mit KHSO_3 und mit Verbindungen studiert, die eine Sulfhydrylgruppe enthalten. Es wurde dabei beobachtet, dass bei der Reaktion mit KHSO_3 bei pH 3,5 die Lage des Absorptionsmaximums des Reaktionsgemisches unverändert blieb, die Konzentration sich während die ersten 24 Stunden rasch verminderte, in den folgenden 2–12 Tagen wies jedoch keine wesentliche Änderung auf. Patulin reagiert auch mit eine Sulfhydrylgruppe enthaltenden Verbindungen (Cystein und Glutathion). Es gelang mittels Dünnschichtchromatographie die Bildung einer einzigen neuen Verbindung nachzuweisen. Der Gipfelwert der Absorptionskurven der Reaktionsgemische wurde verschoben, zu gleicher Zeit bildete sich ein neuer Gipfelwert bei 200 nm. Bei der Behandlung mit Cystein war bei einem Molverhältnis von 1:1 noch 73% des Toxins am 8-ten Tag und bei einem Molverhältnis von 3:1 43% nachweisbar, während bei einer Behandlung mit Glutathion diese Werte 87% bzw. 54% betragen.