

# Rapport

Statens tilsyn for planter, fisk, dyr og næringsmidler



## Delrapport 2008: Mattilsynets overvåkings- og kartleggingsprogram for mykotoksiner i næringsmidler 2008-2010.

Per Erik Clasen  
Gunnar S. Eriksen



**Veterinærinstituttet**  
National Veterinary Institute

# Forord

På oppdrag fra Mattilsynet Hovedkontoret, seksjon planter og vegetabilsk mat (MT) har Veterinærinstituttet (VI) analysert mykotoksiner i ulike vegetabilske matvarer solgt på det norske markedet. Prøvene er tatt ut som del av OK programmet for mykotoksiner i næringsmidler. OK programmet ble ikke gjennomført i 2007.

Kartleggingsprosjektet for bearbejdede kornprodukter er ment å gå over 3 år fra 2008 til 2010 for å ta hensyn til at det er variasjon i mykotoksininnhold og fordeling av mykotoksiner i kornet for ulike vekstsesonger. Dette er en forenklet rapport. En mer inngående diskusjon omkring resultatene er tenkt å komme etter 3 år.

Prøvene har blitt analysert på Avdeling for fôr- og næringsmiddelhygiene, Seksjon for kjemi, i perioden april til desember 2008.

Kontaktpersoner i Mattilsynet, Seksjon planter og vegetabilsk mat har vært Ingunn Haarstad Gudmundsdottir og Laila Jensvoll.

Oslo, mars 2009

Per-Erik Clasen  
Overingeniør

Gunnar S. Eriksen  
Seksjonsleder

## Sammendrag

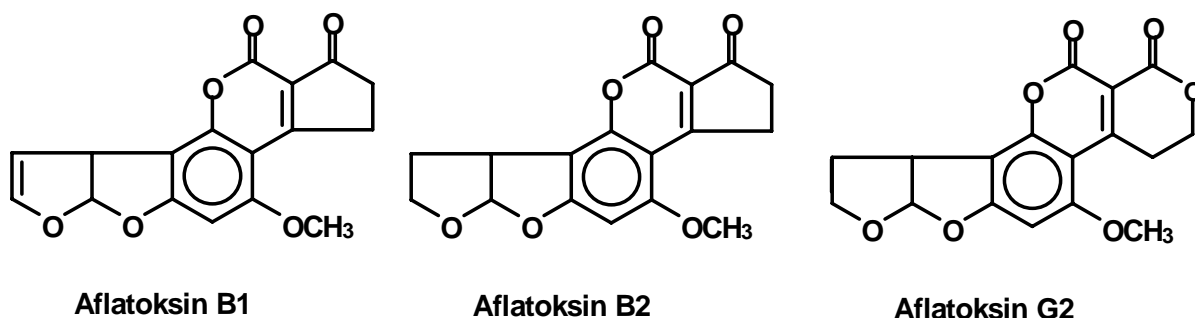
I alt 192 prøver av ulike kornprodukter på det norske markedet fra 2008 sesongen ble samlet inn og analysert for trichothecenet deoxynivalenol (DON), nivalenol, HT-2 og T-2 toksin, samt zearalenon. Alle toksinene dannes av ulike *Fusarium* arter. De fordelte seg på 65 prøver av siktet hvetemel, 52 prøver av sammalt hvetemel, 23 av hvetekli (kruskakli), 31 prøver av havregryn, og 21 prøver av barnemat. Det ble analysert 41 prøver av ulike risprodukter med følgende fordeling: 10 prøver av jasminris, 16 prøver av basmatiris og 15 prøver av andre ristyper. Det ble det analysert for Ochratoksin A i 54 ulike produkter av tørket frukt og patulin i 19 prøver av eplejuice. Konsentrasjonen av DON, som er det *Fusarium*-toksinet som påvises i flest prøver av korn, var uventet høye i siktet hvetemel. Høyeste konsentrasjon av DON i siktet hvetemel var 639 µg/kg, mens det for sammalt hvetemel og kli var henholdsvis 430 og 1093 µg/kg. Høyeste konsentrasjon av DON i havregryn var 520 µg/kg. Som ventet ble det funnet gruppe A trichothecener i havregryn med høyeste verdi på summen av HT-2 og T-2 lik 124 µg/kg. I barnegrøter ble det kun funnet lave verdier av DON med høyeste verdi lik 70 µg/kg. En prøve av hvetekli var over gjeldene grenseverdi for DON på 750 µg/kg. Det ble i alt funnet en prøve over deteksjonsgrensen for aflatoksin B<sub>1</sub> (0,25 µg/kg) av de 10 analyserte jasminris prøvene. 10 av 16 basmatiris prøver var over deteksjonsgrensen med høyeste verdi på 9,83 µg/kg for B<sub>1</sub> og 10,67 µg/kg for summen av aflatoksinerne. Totalt 2 prøver var over grenseverdien for aflatoksin B<sub>1</sub>. Men de to prøvene ble tatt ut fra samme parti. Ochratoksin A ble påvist i 26 av totalt 54 prøver av tørket frukt med høyeste verdi på 2,4 µg/kg (tørket eple). For øvrig var konsentrasjonene relativt lave. Det ble i alt påvist patulin i 9 av totalt 19 prøver av eplejuice/saft med en høyeste verdi lik 24,3 µg/kg. Denne verdien er omtrent halvparten av gjeldende grenseverdi.

## Innledning

Mykotoksiner er sekundære metabolitter produsert av ulike sopparter. Ikke alle sopparter produserer mykotoksiner. Noen arter produserer kun et enkelt mykotoksin, mens andre kan produsere flere. Enkelte mykotoksiner kan også produseres av flere typer sopparter. Noen av de mest kjente mykotoksinene inkluderer aflatoksiner, ochratoksin A, trichothecener, zearalenon og fumonisiner. Kjente sopparter er *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps*, *Alternaria* etc. Klima har en stor innvirkning på hvilke type sopparter som dominerer i et enkelt område og på årlige variasjoner.

## Aflatoksiner

Aflatoksiner er en gruppe strukturelt svært like mykotoksiner (muggsoppgifter) produsert av soppartene *Aspergillus flavus* og *A. parasiticus*. De vanligst forekommende i næringsmidler er aflatoksinene B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> og G<sub>2</sub>, der B<sub>1</sub> (se figur 1) normalt dominerer. Aflatoksin B<sub>1</sub> var et av de første mykotoksinene som ble isolert og karakterisert. *Aspergillus* artene trives best under varme, fuktige klimatiske forhold. Det er derfor land i de subtropiske områdene som er særlig utsatt for soppvekst og toksindannelse. Peanøtter, pistasjnøtter, paranøtter, mais, ris, bomullsfrø, fiken og krydder er blant utsatte næringsmidler.

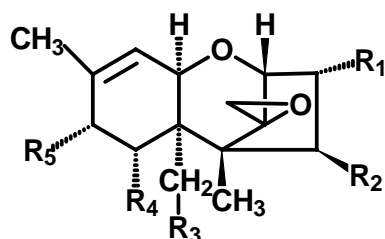


Figur 1. De kjemiske strukturene for aflatoxin B1, B2 og G2.

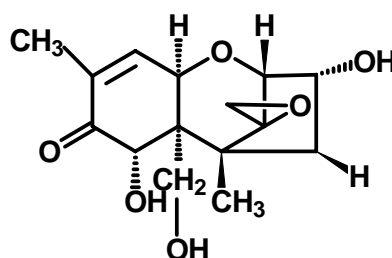
Aflatoxin B<sub>1</sub> er levertoksiske både for dyr og mennesker, og sterkt leverkreftfremkallende. Toksinet er klassifisert som humant karsinogen av IARC (1993); «Sufficient evidence for carcinogenicity to human», Klasse 1. Det er i flere epidemiologiske undersøkelser fra Afrika funnet en klar sammenheng mellom eksponering for hepatitt B virus, inntak av aflatoxiner og leverkreft. WHO-eksperter (JECFA, 1999) vurderte disse spørsmålene, og fant at risikoen for leverkreft assosiert med inntak av aflatoxiner er betydelig lavere i befolkningsgrupper hvor hepatitt B er sjelden (som i Norge). Aflatoxin B<sub>1</sub> er i tillegg vist å ha nyretoksiske effekt og virke immunosuppressivt på forsøksdyr.

## Trichothecener

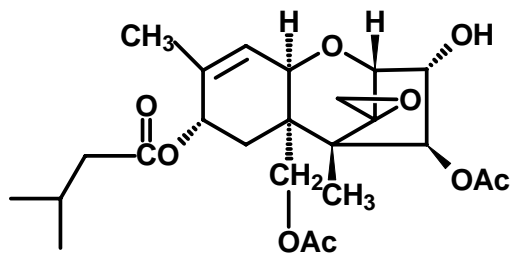
Trichothecenene er den største gruppa av fusarium toksiner. Trichothecenene kan deles opp i gruppene A, B, C og D. Det er først og fremst gruppe A og B trichothecener som dannes av *Fusarium* arter. Gruppe B omfatter bl.a. 4-deoksynivalenol (DON) (se figur 2), som er det fusarium toksinet som påvises oftest og i høyest konsentrasjoner både i Norge og det meste av verden (Sundheim et al. 1988, Chelkowski 1989, Langseth og Elen 1996, 1997). I tillegg tilhører 3-acetyl-DON, nivalenol og fusarenon-X denne gruppa av trichothecener. Til gruppe A hører bl.a. T-2 toksin (T-2) og HT-2 toksin (HT-2). Hovedforskjellen i den kjemiske strukturen mellom Gruppe A og B trichothecenene er antall hydroksyl-grupper i strukturen og karbonylgruppen som en finner i gruppe B trichothecener, men ikke i gruppe A trichothecener. Disse ulikhetene medfører forskjell i polaritet mellom gruppe A og B trichothecener. Gruppe B trichothecener er de mest polare.



Trichothecener



Deoxynivalenol (DON)



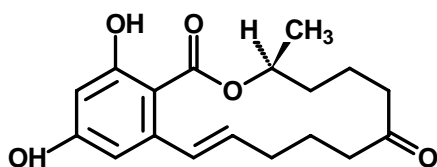
T-2 toxin

Figur 2. De kjemiske strukturene for DON og HT-2 toksin.

Toksisiteten av trichothecenene på det subcellulære planet skyldes i stor grad deres evne til å hemme proteinsyntesen. Symptomene på dyr for gruppe B trichothecenene er normalt förvegring, redusert förutnyttelse, diaré og tildels oppkast. Redusert förinntak og redusert tilvekst har blitt observert hos slaktegris med för som inneholder ned til 1-2 mg DON pr. kg (Bergsjø et al. 1993, Øvernes et al. 1997). Men lave doser av DON har også vist seg å være immunstimulerende. Toksisiteten av nivalenol synes å være på samme nivå som for DON, men det er gjort langt færre föringsforsøk med dette toksinet (Eriksen og Alexander 1998). Gruppe A trichothecenene er generelt mer toksiske enn gruppe B. T-2 er antydnet å være ca. 10 ganger mer akutt toksisk enn DON (European Commission 1994). Det er vist at T-2 kan indusere DNA fragmentering karakteristisk for apoptose (programmert celledød. Dette er nøye regulert i celler, og endringer i reguleringen av dette kan få store konsekvenser blant annet under utviklingen og i utvikling av kreft). Trichothecener kan gi nekroser, indre blødninger, og endring av blodparametere. Gruppe A toksinene synes å være relativt sterkt immunsuppressive (JECFA, 2001).

## Zearalenon

Zearalenon er et annet mykotoksin som kan produseres av *Fusarium* (se figur 3). Zearalenon dannes av de samme *Fusarium* artene som produserer DON. Zearalenon absorberes raskt etter inntak og omdannes til  $\alpha$ - og  $\beta$ - Zearalenol i kroppen. I gris og mennesker skilles det meste ut som  $\alpha$ -zearalenol, og da vesentlig gjennom urinen (JECFA, 2000). Halveringstida hos mennesker er ca 22 timer. Zearalenon er lite akutt toksisk, men har østrogenlignende effekt.  $\alpha$ -zearalenol har ca 5 ganger sterkere østrogen effekt enn zearalenon. Zearalenon er vist å gi ulike reproduksjonsforstyrrelser og hormonelle forstyrrelser. Det er også observert økt frekvens av dødfødte, mindre kull og endret fertilitetssyklus hos gris. Det er gjort få studier av effekten av zearalenon på immunsystemet, men andre østrogener er kjent for å påvirke immunsystemet. Zearalenon er i likhet med trichothecenene betraktet som ikke klassifiserbar som humant karsinogen, klasse 3 (IARC 1993).

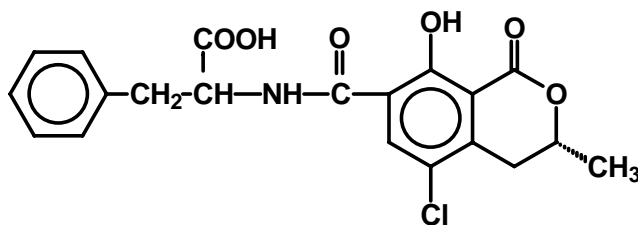


Zearalenon

Figur 3. Den kjemiske strukturen for Zearalenon.

## Ochratoksin A

Ochratoksin A er det mest kjente *Penicillium*-toksinet (se figur 4). Det er senere beskrevet flere ochratoksin-metabolitter, men ochratoksin A er den metabolitten som forekommer oftest i naturlig kontaminert mat og fôr. Ochratoksin A påvises oftest i korn, belgfrukter, kaffebønner, enkelte tørkede frukter, samt saft og vin produsert av druer. Det er først og fremst enmagede dyr, inklusiv mennesket, som er følsomme for ochratoksin. Hos drøvtyggere brytes ochratoksin i stor grad ned i vomma til ochratoksin  $\alpha$ , som har meget lav toksisitet. (Krogh, 1987), slik at inntak av kumelk ikke har vært betraktet som en kilde til ochratoksin. Toksinet er nyretoksisk, og er antatt å være hovedårsaken til de såkalte muggnefrosene hos svin, observert i Danmark siden 1920-tallet. Det har lenge vært mistanke om at ochratoksin er en viktig årsaksfaktor til Balkan nefropati, en endemisk nyrelidelse hos landsbybefolkningen i områder av Romania, Bulgaria og tidligere Jugoslavia. Selv om det er nyreskaden som er mest uttalt, har nyere forskning vist at ochratoksin også har andre effekter, som har vært av vel så stor betydning ved risikovurderinger og beregning av akseptabelt daglig inntak for mennesker. Ochratoksin A er karsinogen i en del forsøksdyr. Undersøkelser kan også tyde på at det er sammenheng mellom høy eksponering for ochratoksin A og kreft i urinveiene hos mennesker, men bevismaterialet er ikke entydig. Ochratoksin A er i dag klassifisert som «Mulig humant karsinogen» (klasse 2B) av International Agency for Research on Cancer (IARC 1993). I nyere risikovurderinger antas det at ochratoksin er indirekte gentoksisk, og dermed at det finnes en terskel der doser lavere enn dette ikke har effekt (EFSA, 2006). I tillegg svekker ochratoksin immunforsvaret. Det er forskere i dag som mener at ochratoksin og enkelte andre mykotoksiner, spesielt i kornet, kan ha vært en viktig medvirkende årsak til en rekke epidemier i Europa fram til siste århundreskiftet. Toksinenes evne til å svekke immunforsvaret gjorde menneskene mer mottakelig for andre sykdommer. Ochratoksin A er også funnet å kunne skadefosteret og eventuelt medføre at embryoet dør.

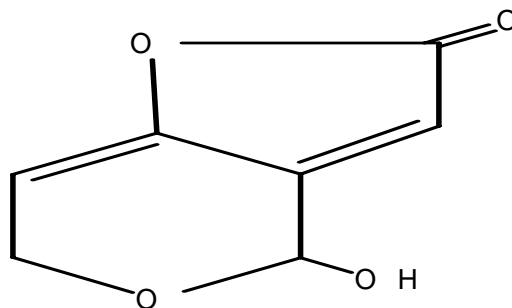


Ochratoksin A

Figur 4. Den kjemiske strukturen for ochratoksin A.

## Patulin

Patulin er en metabolitt som blant annet kan produseres av soppsektene *Penicillium* og *Aspergillus*. Patulin er blitt funnet i en rekke matvarer som aprikos, pære, eple, oliven og korn. Eple er allikevel det næringsmidlet hvor en finner de høyeste mengdene. Soppsektene som produserer patulin trives som de fleste soppsektene, i fuktige omgivelser. Det er derfor viktig å ha fokus på god råvarekvalitet og god produksjonshygiene. Patulin er ikke klassifisert som karsinogen. Patulin kan forårsake skade på nyre og påvirke immunforsvaret ved at det påvirker DNA syntesen. Akutte effekter kan være pustevansker og lungeødem (JECFA, 1995).



P a t u l i n

*Figur 5. Den kjemiske strukturen for patulin.*

## **Hensikten med prosjektet**

Hensikten med prosjektet er å få en oversikt over innholdet av ulike mykotoksiner i utvalgte næringsmidler solgt på det norske markedet. Hovedfokus har vært å få en oversikt over nivåene av trichothecener og zearalenon i bearbeidet korn solgt på det norske markedet. Det vil si ulike kornprodukter som er klare for pakking og salg. Hovedproduktene har vært siktet hvetemel, sammalt hvete og hvetekli, samt havregryn og ulike barnegrøter. Målet er å få et best mulig estimat på inntaket av de ulike trichothecenene via kornproduktene. I tillegg har det vært et mål å identifisere de viktigste kildene til de ulike trichothecenene. På grunn av HT-2 og spesielt T-2 sin toksiske effekt har det vært nødvendig å senke deteksjonsgrensene i analyser av korn for disse toksinene.

Det ble også besluttet å kartlegge aflatoksin (B1, B2, G1 og G2) i ris solgt på det norske markedet: Dette skyldtes en rapport utgitt av Livsmedelverket i 2007 hvor de fant flere partier, med overskridelser av grenseverdier for aflatoksiner, spesielt i basmatiris.

De siste årene har det vært et stadig økende antall produkter av diverse tørkede frukter i norske butikker. Nivået av ochratoksin A i rosiner har blitt undersøkt tidligere, men vi har lite data fra det norske markedet når det gjelder andre slags tørket frukt.

Det var også ønskelig fra Mattilsynets side å kartlegge patulin nivået i ulike eplejuice og saft- produkter med spesielt fokus på de små produsentene.

Kartleggingen av nivået av trichothecener (DON, NIV, T-2 og HT-2) og zearalenon i norsk matkorn er tenkt å gå over tre år for deretter og evalueres. Hvilke andre mykotoksiner og næringsmidler det rettes fokus på kan variere de tre årene prosjektet pågår.

## **Grenseverdier**

Det er fastsatt grenseverdier for de fleste av de mykotoksinene som dette prosjektet omhandler. Unntaket er NIV, HT-2 og T-2 toksin.

Grenseverdien for DON i ulike typer mel av korn er satt til 750 µg/kg. Grenseverdi for aflatoksin B1 i ris er satt til 2 µg/kg, mens summen av alle aflatoksinene ikke skal overskride 4 µg/kg. Grenseverdi for ochratoksin A i tørkede frukter er satt til 10 µg/kg. Grenseverdien for patulin i juice og saft produkter er satt til 50 µg/kg.

## Materiale og Metoder

Alle prøvene som inngår i årets undersøkelse ble tatt ut av de lokale distriktskontorene i perioden fra april 2008 til november 2008. Distriktskontorene fulgte Mattilsynets interne retningslinjer for prøveuttak, "Prøvetakings- og analysemetoder ved kontroll av mykotoksiner (muggsoppgifter) i næringsmidler" (datert 07.04.2008) ved uttak av prøver. Disse retningslinjene skal sikre at prøvetaking og analysemetoder ved offentlig kontroll av mykotoksiner i næringsmidler utføres ensartet. Retningslinjen er basert på oppbyggingen kommisjonsforordning (EF) nr 401/2006. Nedenfor følger en oversikt over mengde hvete, havre og ris (tabell 1) som ble tatt i forhold til partiets størrelse. Tabell 2 viser en tilsvarende oversikt for tørket frukt. Tabell 3 viser en oversikt over mengde fruktsaft som ble tatt ut i forhold til partiets størrelse.

*Tabell 1: Antall enkeltprøver av korn/kornprodukter, avhengig av vekten på partiet*

Partiets vekt (tonn)	Antall enkeltprøver	Samleprøvens vekt (kg)
0,05	3	1
0,05-0,5	5	1
0,5-1	10	1
1-3	20	2
3-10	40	4
10-20	60	6
20-50	100	10

Kilde : Retningslinjer for prøveuttak, datert 07.04.2008

*Tabell 2: Antall enkeltprøver av tørket frukt (unntatt fiken), avhengig av vekten på partiet*

Partiets vekt (tonn)	Antall enkeltprøver	Samleprøvens vekt (kg)
0,1	10	1
0,1-0,2	15	1,5
0,2-0,5	20	2
0,5-1,0	30	3
1,0-2,0	40	4
2,0-5,0	60	6
5,0-10,0	80	8
10,0-15,0	100	10

Kilde : Retningslinjer for prøveuttak, datert 07.04.2008



**Tabell 3: Minste antall enkeltprøver av fruktsaft som skal tas fra partiet**

Produktform	Partiets volum eller vekt (L)	Minste antall enkeltprøver som skal tas ut	Samleprøvens minste volum eller vekt (L)
Bulk (fruktsaft, cider, vin)	-	3	1
Flasker/pakninger med fruktsaft, cider	50	3	1
	50-500	5	1
	>500	10	1
Flasker/pakninger med vin	50	1	1
	50-500	2	1
	>500	3	1

Kilde : Retningslinjer for prøveuttak, datert 07.04.2008

Mengden av hver enkeltprøve skal ligge så nær opp til 100 gram som mulig. Totalt ble det tatt ut 192 prøver av ulike kornprodukter som fordelte seg mellom 65 prøver av siktet hvetemel, 52 sammalt hvetemel, 23 hvetekli, 21 havregryn og 21 barnemat prøver. Videre ble det tatt ut 41 prøver av ris, 54 prøver av tørket frukt og 19 prøver av eplejuice og saft.

## Analysemetode for bestemmelse av zearalenon

Prøvene ble analysert etter ZearalaTest Instruction Manual fra Vicam L.P, Watertown, MA, USA med noen modifikasjoner.

25,0 g av den malte kornprøven ble tatt ut og tilsatt 125 mL acetonitril - vann (75 + 25, v+v).

Prøven ble ekstrahert først 3 min ved bruk av Ultra Turrax blender, deretter 1 time på ristemaskin.

10 mL prøve-ekstrakt ble fortynnet med 50 mL PBS-løsning og 30 mL av dette ekstraktet ble overført til en immunoaffinitetskolonne (Vicam). Kolonnen ble deretter vasket med 20 mL vann, for deretter å bli sugd tørr før zearalenon ble eluert ut med 2 mL metanol. Eluatet ble dampet inn til tørrhet, løst i 100 µL acetonitril + 200 µL 0,1 M fosforsyre, mikset og satt på ultralyd i 10 min.

Ekstraktet ble igjen mikset før det ble sentrifugert ved 10 000 rpm gjennom et filter (Costar Spinn). Zearalenon ble kvantifisert på HPLC utstyrt med fluorescens detektor. Eksitasjonsbølglengden var da 270 nm og emisjonsbølglengden 465 nm. Analysekolonnen var en C18 kolonne med forkolonne. Mobilfasen bestod av acetonitril-0,01 M fosforsyre (40+60, v+v). Flow-hastigheten var 1 mL/min og injeksjonsvolumet 75 µL.

## Analysemetode for bestemmelse av DON, nivalenol (NIV), HT-2 toxin, T-2 toxin

Metoden er basert på opprensning ved bruk av MycoSep#225 kolonner fra Romers Lab.

25 g av den malte kornprøven ble tatt ut og ekstrahert med 125 mL acetonitril - vann (84 + 16, v+v) i en time. 5 mL av ekstraktet ble rensert opp på MycoSep™ #225 kolonne (Romers Lab.). 3 mL av det opprensede ekstraktet ble overført til et derivatiseringsglass og dampet inn til tørrhet under nitrogen. Residuet ble løst i 1 mL benzen for å fjerne rester av vann, før ekstraktet igjen ble dampet inn til tørrhet. Trichothecenene ble derivatisert ved 60°C i en time etter tilsetning av 100 µL pentafluoropropionsyre anhydrid (PFPA) og 500 µL 0,4 M imidazol i toluen-acetonitril (85+15, v+v). Ekstraktet ble fortynnet med 500 µL heksan, og overskudd av derivatiseringsreagens fjernet ved vasking med 1 mL 5 % NaHCO<sub>3</sub> og deretter 1 mL vann. Natriumsulfat ble tilsatt for å fjerne rester av vann, og ekstraktet analysert på GC-MS utstyrt med splittless injektor og autosampler. Injeksjonsvolumet var 1 µL. Massespektrometeret ble operert i EI<sup>+</sup> 70eV, SIM mode. Fusarenon-X ble benyttet som intern GC standard for DON og NIV. Dette ble gjort for å kompensere for variasjon i instrument responsen. Tilsvarende ble det brukt Neosolaniol som internstandard for HT-2 og T-2

toksin. Kvantifiseringen var basert på en ekstern matrisks assistert standardkurve bestående av de ulike trichothecenene.

## Analysemetode for bestemmelse av Aflatoksinene B1, B2, G1 og G2

Metoden baserer seg i stor grad på metode; Norsk Standard, NS-EN 12955; Bestemmelse av aflatoksin B1 og summen av aflatoksinene B1,B2,G1 og G2 i korn, nøtter og produkter av disse. 40 gram prøve ble veid inn og tilsatt 200 mL acetonitril-vann (60+40). Prøven ble deretter ristet på ristemaskin i 60 min. Løsninga ble filtrert gjennom et foldefilter, og 2 mL prøve-ekstrakt tilsatt 50 mL PBS-buffer. Prøve-ekstraktet ble deretter overført til en immunoaffinitetskolonne (Aflaprep, Rhône Diagnostics). Ekstraktet passerte kolonnen med jamn hastighet, 1-2 mL/min, til det var ca 1-2 mm igjen over stasjonærfasen. Kolonnen ble vasket med 10 mL vann, for deretter å bli sugd fullstendig tørr. Aflatoksinene ble eluert med 0,5 mL metanol, deretter ytterligere 0,75 mL metanol over i graderte spissrør. Metanolen ble i hvert tilfelle tilsatt kolonnen 1 min før elueringen startet. Kolonnen ble deretter sugd tørr. Vann ble til slutt tilsatt ekstraktet slik at totalvolumet ble 3,0 mL. Aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> og G<sub>2</sub> ble kvantifisert på HPLC utstyrt med autosamplere, fluoresens-detektor (Shimadzu RF 530), og Kobra-celle (spennings-enhet) som var plassert mellom analysekolonnen og detektoren. Eksitasjonsbølglengden var 365 nm og emmisjonsbølglengden 435 nm. Kolonnen var en 150 x 4,6 mm i.d. Waters NovaPak, 5µm kolonne, og mobilfasen bestod av acetonitril + metanol + vann (18 + 27 + 55, v/v/v) tilsatt 120 mg kaliumbromid og 350 µL salpetersyre (4 mol/L) pr. liter mobilfase. Injeksjonsvolumet var 150 µL for både prøver og standarder. Aflatoksinene ble eluert ut i løpet av 5-10 min.

## Analysemetode for bestemmelse av Ochratoksin A

Metoden baserer seg i stor grad på metode; Norsk Standard; NS-EN14132 og NS-EN 14133.

Hele prøven ble malt med vann i forholdet 1kg/2L vann. Men for enkelte prøvetyper var det nødvendig å tilsette mer vann for å sikre tilstrekkelig kontakt mellom prøven og løsningen. Dette skyldes at prøven "sugde" de seg til så mye vann. 60 gram av denne slurryen ble veid inn og tilsatt 4 mL 1 M HCl, 5 gram NaCl og 40 mL kloroform. Prøven ble først ekstrahert med stavmikser (Ultra Turrax) i 3 min, deretter 1 time på ristemaskin. Etter ekstraksjonen ble ekstraktet filtrert og sentrifugert. Deretter ble 20 mL av kloroform fasen tilsatt 20 mL av 0,5 M NaHCO<sub>3</sub>. Etter forsiktig ekstraksjon ble 10 mL av vannfasen tatt ut og fortynnet med 30 mL mL PBS-buffer og 350 µL 1 M HCl. Dette ekstraktet ble deretter overført til Ochraprep® immunoaffinitetskolonner (Rhône-Diagnostics, Scotland). Kolonnen ble vasket med 15 mL vann før ochratoksin ble eluert med 3 mL metanol-eddiksyre 98+2 (v/v). Eluatet ble dampet inn til tørrhet under nitrogen, og inndampningsresten gjenoppløst i acetonitril-0,1 M fosforsyre 1+2 (v/v). Ochratoksin A ble kvantifisert på HPLC utstyrt med fluorescensdetektor (Shimadzu RF 10 AXL). Eksitasjonsbølglengden var 390 nm og emisjonsbølglengden 440 nm. Mobilfasen bestod av metanol-0,01 M fosforsyre 65+35 (v/v), og flowhastigheten 1 mL/min. Injeksjonsvolumet var 75 µL for både prøver og standarder.

## Analysemetode for bestemmelse av Patulin

Metoden er egenutviklet.

5 mL av eplejuiceprøven ble ekstrahert med 2 \* 5 mL av etylacetat. For begge ekstraksjonene ble etylacetat overført til spissrør gjennom et foldefilter tilsatt tørket natriumsulfat. Etylacetat ekstraktet ble dampet inn til tørrhet med nitrogen og reløst i 100 µL etylacetat og 900 µL heksan.

Dette ekstraktet ble påsatt en silikakolonne som på forhånd var kondisjonert med 5 mL heksan + etylacetat (90+10, v+v). Kolonnen ble deretter vasket med 5 mL heksan+etylacetat (85+15, v+v). Patulin ble deretter eluert med 5 mL heksan+etylacetat (50+50, v+v) og overført til derivatiseringsglass. Dette ekstraktet ble dampet inn til tørrhet og reløst i 1 mL benzen for deretter å bli dampet inn til tørrhet igjen. Prøven ble løst i 100 µL BSTFA og derivatisert ved 60 °C i 30 min. Løsningen ble så fortynnet med 1 mL heksan og ekstrahert med først 1 mL natrimhydrogenkarbonat og deretter med 1 mL rensset vann.

Til slutt ble prøveekstraktet (heksanfasen) tørket med natriumsulfat og overført til GC-MS prøveglass. GC-MS`en er utstyrt med splittless injektor og autosampler. Injeksjonsvolumet var 1 µL. Massespektrometeret ble operert i EI<sup>+</sup> 70eV, SIM mode.

## Kvalitetssikring

Laboratoriet har vært akkreditert siden april 1998 og analysemetodene for bestemmelse av aflatoksiner, ochratoksin A og trichothecener har vært akkreditert siden da.

Metodene for bestemmelse av zearalenon og patulin er ikke akkreditert. Men metodene er fullvalidert og har de samme metodekrav som de akkrediterte analysene.

I hver analyseserie som blir utført, blir det også kjørt referanseprøve eller kontrollprøve samt standard tilsetningsprøver. Hvis disse prøvene ikke kom innenfor akseptable grenser, ville analyseserien bli kjørt på nytt igjen. Alle prøveresultatene i rapporten er korrigert for gjenfinning.

## Resultater og Diskusjon

Median, maks og min. verdier for ulike kornprodukter ment for det norske markedet er, gjengitt i tabellene fra 4-11.

### *Kornprodukter*

*Tabell 4-----Siktet hvetemel*

	DON µg/kg	NIV µg/kg	HT-2 µg/kg	T-2 µg/kg	ZEA µg/kg
Median	191	9	i.p.	i.p.	2,7
Maks	639	10	i.p.	i.p.	15,9
Min	8	8	i.p.	i.p.	2,5
Mean	204	2,7	i.p.	i.p.	1,5

i.p. = ikke påvist

Tabell 5-----Sammalt hvetemel

	DON µg/kg	NIV µg/kg	HT-2 µg/kg	T-2 µg/kg	ZEA µg/kg
Median	164	9	i.p.	i.p.	4,0
Maks	430	27	i.p.	i.p.	7,8
Min	5	8	i.p.	i.p.	2,5
Mean	145	3,2	i.p.	i.p.	2,6

i.p. = ikke påvist

Tabell 6-----Hvetekli (Kruskakli)

	DON µg/kg	NIV µg/kg	HT-2 µg/kg	T-2 µg/kg	ZEA µg/kg
Median	382	20	i.p.	i.p.	7,6
Maks	1093	25	i.p.	i.p.	21,3
Min	28	14	i.p.	i.p.	2,4
Mean	383	8,7	i.p.	i.p.	7,7

i.p. = ikke påvist

Tabell 7-----Havregryn

	DON µg/kg	NIV µg/kg	HT-2 µg/kg	T-2 µg/kg	ZEA µg/kg
Median	325	13	35	10	4,4
Maks	520	18	100	24	10,1
Min	20	8	15	5	3,3
Mean	285	3,2	38	9,6	1,9

i.p. = ikke påvist

Tabell 8-----Barnegrøter

	DON µg/kg	NIV µg/kg	HT-2 µg/kg	T-2 µg/kg	ZEA µg/kg
Median	17	i.p.	16	i.p.	2,7
Maks	70	i.p.	16	i.p.	2,7
Min	5	i.p.	16	i.p.	2,7
Mean	17	i.p.	4,3	i.p.	1,7

i.p. = ikke påvist

65 av totalt 65 prøver av siktet hvetemel (100 %) ble funnet å inneholde DON over deteksjonsgrensen. Deteksjonsgrensene for samtlige trichothecener er satt til 5 µg/kg. NIV ble kun påvist i 2 av 65 prøver (3,1 %). Det ble ikke funnet HT-2 og T-2 i siktet hvetemel. Tilsvarende for Zearalenon (ZEA) ble det funnet 4 prøver (6,1 %) over deteksjonsgrensen (2,0 - 2,5 µg/kg).

45 av totalt 52 prøver (87 %) av sammalt hvetemel ble funnet å inneholde DON over deteksjonsgrensen. Videre for NIV ble funnet kun 3 av 52 prøver (5,8 %) over deteksjonsgrensen. Det ble ikke funnet HT-2 og T-2 i prøver av siktet hvetemel. Tilsvarende for ZEA ble det funnet 4 prøver (7,7 %) over deteksjonsgrensen.

23 av totalt 23 prøver (100 %) av hvetekli (kruskakli) ble funnet å inneholde DON over deteksjonsgrensen. Videre for NIV ble det funnet 7 av 23 prøver (30 %) over deteksjonsgrensen. Det ble ikke funnet HT-2 og T-2 i prøver av siktet hvetemel. Tilsvarende for ZEA ble det funnet hele 18 prøver (78 %) over deteksjonsgrensen. En prøve av hvetekli ble etter korrigering av utvidet usikkerhet funnet å inneholde over grenseverdien for DON. En annen prøve av hvetekli ble etter korrigering av utvidet usikkerhet funnet å inneholde under grenseverdien for DON.

Snittverdien av DON i siktet hvetemel (tabell 4), sammalt hvetemel (tabell 5) og hvetekli (tabell 6) var henholdsvis 204, 145 og 383 µg/kg. Det at snittverdien er høyere for siktet hvetemel sammenlignet med sammalt var svært overraskende. Fra Norgesmøllene er det blitt oppgitt at sammalt hvete består av hele korn mens siktet hvetemel ligger på omtrent 80 % av kornet, det vil si det ytterste skallet (20 %) er tatt bort. Normalt finner en de høyeste konsentrasjonene i de ytre delene av kornet. Snittverdien av DON i hvetekli bekrefter dette. DON konsentrasjonen i de ulike delene av hvetekornet kan variere fra år til år. Hvilke faktorer som påvirker hvor langt inn i kornet toksinene havner er lite undresøkt, men smittetidspunktet kan være avgjørende. En må allikevel være forsiktig med å trekke konklusjoner ut av dette fordi en ikke kan sammenligne prøve for prøve for siktet hvetemel og sammalt hvete da utgangskornet for produktene høyst sannsynlig ikke er de samme.

Nivået av DON generelt i hvete solgt på det norske markedet tilsier at det er nyttig å foreta en kartlegging over flere år, spesielt gjelder dette for år hvor en finner mye DON i kornet. Det at et parti av hvetekli inneholdt over grenseverdien (750 µg/kg) for DON, viser at det er nødvendig med en overvåking av disse produktene.

Det ble totalt analysert totalt 31 prøver av havregryn. Nivået av DON er relativt lave, men det at Median verdien (tabell 7) ligger omtrent halvparten av grenseverdien viser at trichothecen nivåene i havregryn bør overvåkes. Nivået av HT-2 og T-2 i havregryn var som forventet relativt lave da tidligere resultater fra korn høstet 2007 gav lave resultater av HT-2 og T-2 toksin. Men tabell 4 viser at maksimumsverdien av summen av HT-2 og T-2 ble funnet til å være 124 µg/kg i et parti av havregryn, noen som må betraktes som relativt høyt.

Veterinærinstituttet utførte på oppdrag for Statens næringsmiddeltilsyn i perioden fra 2000 - 2001, en kartleggingsstudie hvor en så på fordelingen av trichohecener mellom skalldelen av kornet mot kjernedelen av kornet. I tillegg ble det kjøpt inn kornprodukter fra butikker i Oslo området. Resultatene derfra viser at for havre så befant over 90 % av mengden av trichohecene seg i Skalldelen av kornet. Analyse av havregryn prøver fra butikker gav lave mengder av trichohecener. Tilsvarende analyser av hveteprodukter fra butikker gav svært lave resultater for siktet hvetemel, mens det ble funnet relativt lave resultater for hvetekliprodukter, men klart høyere enn siktet hvetemel. Denne undersøkelsen samsvarer dermed ikke helt med årets undersøkelse ved at en ikke bare fant relativt høye verdier av DON i siktet hvetemel, men også høyere verdier i siktet hvetemel sammenlignet med sammalt hvete.

Det ble totalt analysert totalt 21 prøver av ulike bærgrøter (tabell 8). Prøvene viste som forventet lave verdier av de ulike trichohecenene samt zearalenon. Disse resultatene samsvarer med tidligere resultater av analyser utført for Mattilsynet.

### *Risprodukter*

*Tabell 9----Jasminris*

	Afla B1 µg/kg	Afla B2 µg/kg	Afla G1 µg/kg	Afla G2 µg/kg	Afla Tot. µg/kg
Median	0,25	i.p.	i.p.	i.p.	0,25
Maks	0,25	i.p.	i.p.	i.p.	0,25
Min	0,25	i.p.	i.p.	i.p.	0,25
Mean	0,14	i.p.	i.p.	i.p.	0,14

i.p. = ikke påvist

*Tabell 10----Basmatiris*

	Afla B1 µg/kg	Afla B2 µg/kg	Afla G1 µg/kg	Afla G2 µg/kg	Afla Tot. µg/kg
Median	0,90	0,20	0,55	0,15	0,96
Maks	9,8	0,84	0,55	0,15	10,7
Min	0,26	0,12	0,55	0,15	0,26
Mean	1,5	0,15	0,13	0,08	1,7

*Tabell 11----Andre risprodukter*

	Afla B1 µg/kg	Afla B2 µg/kg	Afla G1 µg/kg	Afla G2 µg/kg	Afla Tot. µg/kg
Median	i.p.	i.p.	i.p.	i.p.	i.p.
Maks	i.p.	i.p.	i.p.	i.p.	i.p.
Min	i.p.	i.p.	i.p.	i.p.	i.p.

i.p. = ikke påvist

Kun en prøve (totalt 10 prøver) av jasminris ble funnet å inneholde aflatoksin B1 over deteksjonsgrensen (tabell 6). For andre risprodukter (totalt 15 prøver) enn jasmin og basmatiris ble det ikke funnet aflatoksiner over deteksjonsgrensen. Det ble analysert totalt 16 prøver av basmatiris. 10 av prøvene (63 %) ble funnet å inneholde aflatoksin B1 over deteksjonsgrensen. Ett parti ble etter korrigerings av utvidet usikkerhet funnet å inneholde over grenseverdien for aflatoksin B1 og total aflatoksin.

Bakgrunnen for ønske om å kartlegge nivået av aflatoksin i ris solgt på det norske markedet var en rapport utgitt av Livsmedelverket i Sverige utgitt i 2007. Her ble det funnet flere overskridelser av spesielt basmati risprøver men også to partier av jasminris.

Resultatene fra undersøkelsen utført her i Norge bekrefter til en viss grad resultatene fra Sverige, men med gjennomgående lavere verdier sammenlignet med den svenske undersøkelsen. I Norge ble det imidlertid kun funnet spormengder av aflatoksin B1 i en prøve av jasminris. Høyst sannsynlig ble den svenske undersøkelsen basert på prøver fra en annen vekstsesong enn prøvene fra den norske undersøkelsen og kan derfor forklare nivåforskjellen mellom de to undersøkelsene.

#### ***Tørket frukt***

Ochratoksin A ble påvist i 26 av totalt 54 prøver (48 %) av tørket frukt med en maks verdi på 2,4 µg/kg (tørket eple). Median verdien ble funnet å være 0,20 µg/kg. Ochratoksin A ble hovedsakelig funnet i rosiner og aprikoser. Verdiene var gjennomgående lave.

Hensikten med å kartlegge nivået av ochratoksin i tørket frukt har vært det stadig økende tilbud og forbruk av ulike produkter av tørkede frukter og blandinger. Generelt vekker ikke nivåene av ochratoksin i denne undersøkelsen bekymring. Men produkter som rosiner hvor enkelte barn kan ha et høyt forbruk av, bør overvåkes kontinuerlig.

I perioden fra 1995-2006 har Veterinærinstituttet på oppdrag for den gang SNT utført overvåking av typiske juleprodukter. Resultater fra ochratoksin analyse av rosiner viser at i denne perioden hadde høyere resultater sammenlignet med årets undersøkelse. Men denne undersøkelsen gikk over flere år, så en kan ikke trekke konklusjoner om at en generelt finner lavere konsentrasjoner av ochratoksin i rosiner i dag.

#### ***Eplejuiceprodukter***

Totalt 19 prøver av ulike eplejuiceprodukter ble analysert for patulin. 9 prøver (47 %) ble funnet over deteksjonsgrensen med en median verdi på 8,6 µg/kg. Høyeste innhold av patulin ble målt til 24,3 µg/kg.

Årsaken til at en ønsket å kartlegge patulin innholdet i norsk produsert eplejuice var at en ønsket mer informasjon om nivået av patulin i produkter fra småprodusenter, da dette ikke har vært tilstrekkelig kartlagt tidligere. Nivået av patulin i denne undersøkelsen var gjennomgående lavt.

Men den høyeste prøven som ble målt til 24,3 µg/kg er omtrentlig halvparten av den tillatte mengden i epleprodukter. Det vil derfor synes som fornuftig å ha en viss kontroll med patulin nivået ved unormalt fuktige somre eller høst.