

HANNA GIRYN, BARBARA SZTEKE

OZNACZANIE ALTERNARIOTOKSYN W WYBRANYCH SUROWCACH  
I PRZETWORACH OWOCOWO-WARZYWNYCHDETERMINATION OF ALTERNARIA-MYCOTOXINS IN SOME RAW  
AND PROCESSED FRUIT AND VEGETABLE PRODUCTS

Z Zakładu Analizy Żywności  
Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie  
Kierownik: doc. dr hab. B. Szteke

*Wykonano badania mające na celu wstępną ocenę występowania w Polsce alternariolu i jego eteru metylowego w owocach, warzywach i ich przetworach. Do tego celu opracowano metodę oznaczania alternariotoksyn przy zastosowaniu techniki chromatografii cienkowarstwowej dwukierunkowej.*

Badania ostatnich 30 lat doprowadziły do wykrycia wielu mitotoksyn wytwarzanych przez grzyby strzępkowe. Toksyny te przyciągają uwagę ze względu na możliwość ich występowania w żywności i paszy dla zwierząt oraz ich wysoką toksyczność [1]. Szybko rozwijające się badania skoncentrowane były głównie na mitotoksynach wytwarzanych przez grzyby rodzaju *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*. Ilość prac dotyczących toksycznych metabolitów wytwarzanych przez grzyby rodzaju *Alternaria* jest dotychczas niewielka.

Grzyby rodzaju *Alternaria* obejmujące ponad 30 gatunków zaliczane są do rodziny *Dematiaceae*, rzędu *Moniliales* klasy *Deuteromycetes* (*Fungi imperfecti*). Są one szeroko rozpowszechnione w glebie i na powierzchni roślin. Pewne gatunki *Alternaria* są saprofitami, a wiele z nich jest patogenami. Mogą one rozwijać się w niskich temperaturach, a do wzrostu wymagają względnie wysokiej wilgotności. Grzyby te atakują nie tylko łodygi, liście i kwiaty, ale mogą też powodować zepsucie dojrzałych owoców, warzyw i zbóż zarówno na polu uprawnym jak i po zbiorze, a także podczas transportu i przechowywania w niskich temperaturach. Mogą one zanieczyszczać pasze dla zwierząt, a w odpowiednich warunkach intensywnie namnażać się i powodować toksykozy [2, 9, 10, 12]. Toksyczne metabolity mogą być wytwarzane przez *Alternaria sp.* we wszystkich opisanych warunkach. Dotychczas poznano około 70 metabolitów tych grzybów o różnej strukturze chemicznej i różnej aktywności biologicznej. Niektóre metabolity wykazują działanie cytotoksyczne, metagenne, teratogenne, fitotoksyczne i zootoksyczne o różnym nasileniu. Wykazano również działanie synergiczne metabolitów [3, 8].

Możliwość skażenia żywności i potencjalne ryzyko toksykologiczne stwierdzono dotychczas w przypadku siedmiu głównych alternariotoksyn należących do różnych grup strukturalnych. Są to: alternariol (AOH), eter metylowy alternariolu (AME),

altenuen (ALT), kwas tenauzowy (TeA) oraz altertoksyny I, II i III (ATX I, II i III). Toksyny te stwierdzono w żywności i w paszach naturalnie skażonych jak i sztucznie zainfekowanych szczepami rodzaju *Alternaria*, m.in. w zbożach, pomidorach, jabłkach, mandarynkach i oliwkach. Poziom zawartości alternariotoksyn wykrywanych w niektórych surowcach roślinnych jest wysoki. Stwierdzono też, że większość szczepów *Alternaria* wyizolowanych z surowców roślinnych wykazuje zdolność do wytwarzania znacznych nieraz ilości toksyn [2–6, 11]. Na tej podstawie badacze uważają, że istnieje potrzeba szerszych badań żywności w celu oceny poziomu naturalnego występowania alternariotoksyn i potencjalnego zagrożenia zdrowia ludzi.

Z uwagi na to, że alternariotoksyny są mitotoksynami wytwarzanymi również w klimacie umiarkowanym, istnieje możliwość skażenia nimi płodów rolnych w Polsce. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki wstępnej oceny występowania wybranych alternariotoksyn w niektórych surowcach i przetworach owocowo-warzywnych, otrzymane przy wykorzystaniu opracowanej w tym celu procedury analitycznej.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły krajowe owoce i warzywa zdrowe i zapleśniałe w naturalny sposób (bez identyfikacji rodzaju grzybów strzępkowych), napoje oraz soki owocowe, owocowo-warzywne i koncentraty pomidorowe.

**Aparatura i szkło:** Wyparka próżniowa Buchi, wytrząsarka Elpan typ 358 S, generator ultradźwięków Buchler, lampa UV o długości około 260 i 365 nm, mikrostrzykawki poj. 10, 20 i 100  $\mu$ l, naczynka reakcyjne Piercej poj. 5 ml z uszczelką teflonową, kolumny szklane 10  $\times$  300 nm, płytki chromatograficzne 1061 Silica gel Estman Kodak bez indykatora, szkło laboratoryjne ogólnego przeznaczenia.

**Odczynniki i roztwory:** Chloroform, benzen, aceton, octan etylu, metanol, chlorek metylenu, izopropanol – wszystkie cz.d.a. POCH (destylowane wg *Vogela*), heksan cz. Reachim (destylowany wg *Vogela*), etanol 96° cz., kwas octowy lodowaty cz.d.a. POCH, Kiesegel 60 (0,063–0,200 mm) do chromatografii kolumnowej *Merck*, eter etylowy *pro narcosi*, 5%-owy roztwór wodny kwaśnego węgla sodowego, 20%-owy roztwór etanolowy chlorku glinowego, roztwory wzorcowe alternariolu w metanolu (od 1 ng/ $\mu$ l), roztwory wzorcowe eteru metylowego alternariolu w metanolu od 1 ng/ $\mu$ l do 20 ng/ $\mu$ l).

**Przygotowanie próbek i wykonanie oznaczeń**

a) **Ekstrakcja i oczyszczanie:** napoje i soki klarowne (50 ml próbki + 50 ml octanu etylowego), soki owocowe tworzące emulsję, koncentraty oraz shomogenizowane owoce i warzywa (30 ml lub 30 g próbki + 90 ml octanu etylowego) wytrząsano przez 30 min na wytrząsarce (maksymalne oscylacje 350, amplituda 4). Mieszanki przenoszono do rozdzielacza i odrzucano warstwę wodną. Ekstrakt octanowy oczyszczano przez wytrząsanie z roztworem kwaśnego węgla sodowego, dodawanym w objętości równej objętości ekstraktu. Następnie warstwę octanową przenoszono przez sączek z bezwodnym siarczanem sodowym do kolbki okrągłodennej i odparowywano w wyparce próżniowej w temp. 30°C. Suchą pozostałość rozpuszczano w 5 ml chloroformu i наносzono na kolumnę z zawieszonym w heksanie wypełnieniem: 1 g siarczanu sodowego – 2,5 g żelu krzemionkowego – 1 g siarczanu sodowego. Do elucji toksyn z kolumny stosowano 25 ml mieszanki chloroformu z metanolem (9:1). Pierwsze 10 ml eluatu odrzucano, następne 20 ml eluatu zbierano do kolbki okrągłodennej i odparowywano w wyparce próżniowej w temp. 30°C, a pozostałość przenoszono ilościowo chlorkiem metylenu do naczynka reakcyjnego i odparowywano na łaźni grzejszej o temp. 30°C w łagodnym strumieniu azotu. Pozostałość w naczynku rozpuszczano w 200–400  $\mu$ l metanolu.

Tabela I. Układy rozwijające zastosowane w chromatografii cienkowarstwowej dwukierunkowej.  
Solvent systems used in two-dimensional thin layer chromatography.

Kombinacja	Układy rozwijające w dwóch kierunkach	Udział składników (części objętościowe)	Wartość $R_f$	
			AOH	AME
A	1 – benzen : metanol : kwas octowy	90 : 5 : 5	0,25	0,44
	2 – heksan : eter etylowy : : kwas octowy : izopropanol	75 : 25 : 10 : 10	0,28	0,67
B	1 – benzen : etanol	95 : 5	0,10	0,40
	2 – chloroform : aceton	88 : 12	0,32	0,81
C	2 – benzen : metanol	95 : 5	0,10	0,43
	2 – chloroform : metanol	95 : 5	0,28	0,69
D	1 – benzen : etanol	95 : 5	0,10	0,40
	2 – heksan : izopropanol	85 : 15	0,28	0,55
E	1 – benzen : metanol : kwas octowy	90 : 5 : 5	0,25	0,44
	2 – heksan : eter etylowy : kwas octowy	75 : 25 : 10	0,14	0,29

b) Chromatografia cienkowarstwowa dwukierunkowa: na płytce pokryte żelem krzemionkowym nanoszono po 20  $\mu$ l ekstraktu próbki oraz roztwory wzorcowe. Do rozwijania płytek używano układy rozwijające podane w tabeli I, przy czym stosowano głównie kombinację A (benzen:metanol:kwas octowy 90:5:5 oraz heksan:eter:kwas octowy:izopropanol 75:25:10:10). Pozostałe układy stosowano tylko w przypadku analizowania niektórych materiałów oraz dla potwierdzenia obecności toksyn wykrytych przy układach A. W tym celu prowadzono również fortyfikowanie ekstraktów próbek na płytkach chromatograficznych (tabela I). Chromatogramy oceniano w krótko- i długofalowym zakresie promieniowania UV, porównując fluorescencję badanych ekstraktów oraz wzorców. Zwiększenie intensywności fluorescencji toksyn uzyskiwano przez spryskiwanie płytek etanolem roztworem chlorku glinowego i ogrzewanie przez 5 min w temp. 100°C. Granica wykrywalności metody wynosi 3  $\mu$ g/kg.

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Przy zastosowaniu opracowanej metody zbadano łącznie 110 próbek różnych produktów żywnościowych. Rodzaj i liczbę zbadanych próbek oraz liczbę próbek, w których wykryto skażenie przynajmniej jedną z badanych alteriotoksyn przedstawiono w tabeli II. Jak wynika z tej tabeli, około 50% zapleśniałych próbek jest skażonych przez alternariotoksyny. Szczegółowe wyniki analiz przedstawiono w tabeli III. Wskazują one, że w badanych próbkach zapleśniałych surowców roślinnych częściej stwierdzany jest alternariol niż eter metylowy alternariolu.

Alternariol wykryto w 14 z 32 badanych próbek zapleśniałych owoców i warzyw, w tym w 6 próbkach malin, w stężeniu od 3,5  $\mu$ g/kg do 420  $\mu$ g/kg; w pojedynczych próbkach truskawek, agrestu, czarnych jagód, w stężeniu od kilku do kilkunastu  $\mu$ g/kg, w dwóch próbkach czarnych porzeczek (3,5 i 30  $\mu$ g/kg) oraz w trzech próbkach zapleśniałych pomidorów, w stężeniu od 3,5 do 420  $\mu$ g/kg. Śladowe ilości alternariolu stwierdzono w trzech próbkach czarnych porzeczek, malin i pomidorów,

w stężeniu 10, 33 i 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , odpowiednio (tabela III). Nie wykryto alternariotoksyn w żadnej z badanych czterech próbek zapleśniałych jabłek, dwóch wiśni, dwóch kolorowej porzeczki i dwóch marchwi.

Tabela II. Badany produkt spożywczy i liczba próbek skażonych alternariotoksynami.  
Foodstuffs used in the study and number of samples contaminated by  
*Alternaria* – mycotoxins.

Lp. Produkt spożywczy	Liczba próbek	
	zbadanych	skażonych
1. Owoce i warzywa: jabłka, morele, maliny, agrest, truskawki, czarne i kolorowe porzeczki, czarne jagody, wiśnie, pomidory, marchew, w tym:		
– zdrowe	12	0
– zapleśniałe	32	14
2. Soki owocowe	20	1
3. Napoje owocowe	12	1
4. Soki pomidorowe	6	1
5. Koncentraty pomidorowe	4	1
6. Soki Bobo-Frut, w tym:		
– owocowo-warzywne	17	0
– owocowe	7	0
Razem	110	17

Tabela III. Zawartość AOH i AME ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) stwierdzona w badanych próbkach żywności.  
AOH and AME contents ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) found in analyzed samples of food.

Lp.	Produkt spożywczy	Liczba próbek badanych/skażonych	Zawartość AOH	Zawartość AME
1.	Maliny zapleśniałe	6/6	420,0	nie wykryto
2.	Maliny zapleśniałe		52,0	” ”
3.	” ”		46,0	33,0
4.	” ”		42,0	nie wykryto
5.	” ”		3,5	” ”
6.	” ”		3,5	” ”
7.	Truskawki zapleśniałe	3/1	3,0	” ”
8.	Agrest zapleśniały	2/1	5,0	” ”
9.	Czarna jagoda zapleśniała	1/1	11,0	” ”
10.	Czarne porzeczki zapleśniałe	2/2	30,0	10,0
11.	” ” ”		3,5	” ”
12.	Pomidory zapleśniałe	7/3	420,0	100,0
13.	” ”		7,0	nie wykryto
14.	” ”		3,5	” ”
15.	Napój malinowy	12/1	ślady	” ”
16.	Sok pomidorowy	6/1	ślady	” ”
17.	Koncentrat pomidorowy	4/1	ślady	” ”

## WNIOSKI

1. Stwierdzenie obecności alternariotoksyn w zapeśnialych owocach i warzywach, a także w niektórych przetworach owocowo-warzywnych wskazuje, że zastosowanie do ich produkcji surowców o nieodpowiedniej jakości może być przyczyną skażenia gotowych przetworów.

H. Giryn, B. Szteke

## DETERMINATION OF ALTERNARIA-MYCOTOXINS IN SOME RAW AND PROCESSED FRUIT AND VEGETABLE PRODUCTS

## Summary

The purpose of the study was the assessment of *Alternaria*-mycotoxins contamination in some raw and processed plant products. The analytical method for detection of alternariol (AOH) and alternariol methyl ether (AME) is described. After extraction and purification of sample crude extracts by column chromatography on silica gel, the qualitative and quantitative analyses were carried out by two-dimensional TLC.

There were 110 samples analyzed – 44 (included 32 moulded) raw plant samples and 56 processed plant products. Levels of *alternaria*-mycotoxins found in fruits and tomatoes visibly rotten ranged between 3 do 420  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for AOH and 10 to 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for AME. Trace amounts of AOH were detected in 3 samples of processed products.

## PIŚMIENICTWO

1. Council of Agricultural Science and Technology (CAST): Mycotoxins, economic and health risk. Task force report No 116, CAST, Ames, IA, 1989, 92. – 2. Harwig J., Scott P.M., Stoltz D.R., Blanchfield B.J.: Toxins of molds from decaying tomato fruit. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1979, 38, 267. – 3. King D. Jr., Schade J.: *Alternaria* toxins and their importance in food. *J. Food Protection*, 1984, 47, 886. – 4. Logrieco A., Bottalico A., Solfrizzo M., Mulw G.: Incidence of *Alternaria* species in grains for mediterranean countries and their ability to produce mycotoxins. *Mycologia*, 1990, 82, 501. – 5. Logieco A., Bottalico A., Visconti A., Vurro M.: Natural occurrence of *Alternaria*-mycotoxins in some plant products. *Microbiol. Aliment. Nutrit.*, 1988, 6, 13. – 6. Mislivec P.C., Bruce V.R., Stack M.E., Bandler R.: Molds and tetauzonic acid in fresh tomatoes used for catsup production. *J. Food Protection*, 1987, 50, 38. – 7. Nishimura S., Nakatsuka S.: Trends in host selective toxin research in Japan. W: Kohmoto K., Durbin R.D. (E.D.), Host specific toxins: Recognition and specificity factors in plant disease. *Univ. Fac. Agric., Tottori*, 1989, 19. – 8. Palmisano F., Visconti A.: *Alternaria* mycotoxins in foodstuffs, natural occurrence and analytical aspects. *Il prodotto Chimico*, 1988, 3, 29. – 9. Rhodes M.E.: *Food Mycology*. G.K. Hall and Co., Boston 1979, 29. – 10. Seeliger H.P.R., Heimer T.: Diagnostik pathogener Pilze des Menschen und seiner Umwelt. *Lehrbuch und Atlas*. Thieme Verlag, Stuttgart 1981.

11. Stinson E.E., Osman S.F., Heisler E.G., Siciliano J., Bills D.D.: Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges and lemons. *J. Agric. Food. Chem.*, 1981, 29, 790. – 12. Wawrzkiwicz K., Gluch A., Rubaj B., Wróbel M.: *Alternaria* sp. grzyb oportunistyczno-patogenny. *Med. Wet.*, 1991, 1, 27.

Dn. 1994.11.20

02-532 Warszawa, ul. Rakowiecka 36