

LUDWIK CZERWIECKI

OZNACZANIE WYBRANYCH MIKOTOKSYN W ŻYWNOŚCI
 CZ. II. DOBÓR OPTYMALNYCH WARUNKÓW OZNACZANIA
 FUMONIZYN B₁ I B₂ W PRZETWORACH Z KUKURYDZY METODĄ
 WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

DETERMINATION OF SELECTED MYCOTOXINS IN FOOD
 PART II.: SELECTION OF OPTIMISED CONDITIONS FOR THE DETERMINATION
 OF FUMONIZYN B₁ AND B₂ IN CORN PRODUCTS BY MEANS OF
 HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Zakład Analizy Żywności, Instytut Biotechnologii Przemysłu
 Rolno-Spożywczego
 02-532 Warszawa, ul. Rakowiecka 36
 Kierownik: prof. dr hab. B. Szeke

Opisano optymalne warunki oznaczania fumonizyn B₁ i B₂ w przetworach z kukurydzy. Zbadano przebieg procesu ekstrakcji, oczyszczania ekstraktów, tworzenia fluoryzujących pochodnych fumonizyn oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Średni odzysk metody w zależności od poziomu fortyfikacji oraz rodzaju badanej próbki wynosił 64-95%, granica wykrywalności 15 µg każdej z fumonizyn w kilogramie produktu.

WSTĘP

Fumonizyny należą do mikotoksyn odkrytych w połowie lat 80-tych naszego stulecia. Ich producentami są grzyby strzępkowe należące do rodzaju *Fusarium* [5, 7, 11]. Pod względem chemicznym są to diestry kwasu propano-1,2,3,-trikarboksylowego i długołańcuchowych polihydroksyamin [11]. Spośród fumonizyn przedmiotem największego zainteresowania są fumonizyny B₁ i B₂. Występują one w kukurydzy i w jej przetworach, jak również w paszach, których składnikiem jest kukurydza [2, 7, 11].

Fumonizyny są przyczyną rozmiękczenia istoty białej mózgu u koni (ELEM) oraz obrzęków płuc u trzody chlewnej [4, 8, 11]. Stwierdzono również, iż posiadają one właściwości hepatokancerogenne i hepatotoksyczne [11].

Istnieją przesłanki wskazujące na możliwość szkodliwego działania fumonizyn również w stosunku do człowieka. Częstotliwość np. występowania nowotworów przełyku u ludzi zamieszkujących niektóre obszary Afryki, Chin oraz południowo-wschodnie rejony USA jest silnie skorelowana z obecnością tych mikotoksyn w żywności [5].

I chociaż głównym źródłem fumonizyn, jak się obecnie wydaje, jest kukurydza i jej przetwory, niektóre produkty pochodzenia zwierzęcego, np. mleko mogą zawierać wykrywalne stężenia tych mikotoksyn. Wykazano bowiem możliwość ich przechodzenia do płynów ustrojowych oraz do mleka zwierząt [10,11].

Początkowo uważano, że fumonizyny stanowią problem przede wszystkim w USA, w Chinach i w Afryce. Obecnie wiadomo już, że występują one w kukurydzy i w jej przetworach w wielu krajach Europy, np. we Francji [3].

Niezależnie od prowadzonych badań toksykologicznych i chemicznych fumonizyn, na całym świecie nieprzerwanie trwają prace w dziedzinie ich analityki. Wykorzystywane są takie techniki analityczne jak: chromatografia cienkowarstwowa (TLC) [8], testy immunoenzymatyczne [1], chromatografia gazowa (GC); również połączona ze spektrometrią mas (GC-MS) [7, 15] i wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) [9, 13, 14, 16]. Ta ostatnia jest obecnie najchętniej stosowana z powodu znanych powszechnie jej zalet.

Ze względu na brak chromoforów w cząsteczce fumonizyn nie absorbują one w UV i w zakresie widzialnym światła, a także nie fluoryzują. Utrudnia to detekcję tych mikotoksyn; konieczne jest zatem tworzenie fluoryzujących pochodnych w określonym zakresie widma UV. Do otrzymywania związków o takim charakterze wykorzystuje się reakcje z aldehydem naftaleno-2,3-dikarboksylowym (NDA), 1-cyjano-2-alkilbenzo(f)izoindeolem (CBI) [16] oraz z dialdehydem o-ftalowym (OPA) [13] lub 4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolem (NBD-F) [9].

Chociaż sposób detekcji posiada istotne znaczenie m.in. dla specyficzności i wykrywalności metody, jednak przygotowanie próbki i jej obróbka w celu wyodrębnienia fumonizyn z badanego materiału, decydują o powodzeniu całości postępowania zmierzającego do ich ilościowego oznaczenia. Postępowanie to sprowadza się do ekstrakcji fumonizyn z badanego materiału, oczyszczenia ekstraktu i w końcowej fazie oznaczenia jedną z wymienionych technik analitycznych.

Do ekstrakcji stosuje się przeważnie mieszaninę metanolu z wodą [9, 12, 13, 16], a do oczyszczania ekstraktów kolumny z wypełnieniem o silnych właściwościach anionowych [9, 12, 13] lub posiadające wypełnienie typu ODS (oktadecylo silanowe) [16].

W zależności od zastosowanego typu kolumny zanieczyszczenia obecne w wyciągach wymywa się metanolem [13] lub metanolem z wodą w odpowiednim stosunku [9]. Fumonizyny eluuje się metanolem z kwasem octowym [9, 13] lub mieszaniną chloroformu, metanolu i kwasu octowego [16].

Kolejnym etapem analizy jest reakcja tworzenia fluoryzujących pochodnych z odpowiednim odczynnikiem, o czym wspomniano wcześniej.

W tej postaci fumonizyny są chromatografowane na kolumnach C-18. Stosowane fazy ruchome stanowią kombinacje metanolu, buforu fosforanowego, acetonitrylu z wodą w różnych stosunkach lub z dodatkiem kwasów organicznych [9, 12, 13, 16].

Długość fali wzbudzenia i emisji fluorescencji, w zależności od rodzaju fluoryzującej pochodnej mierzy się w zakresie od 335–460 nm (wzbudzenie) i 440–500 nm (emisja) [9, 13].

Celem niniejszej pracy było opracowanie, względnie adaptacja metody oznaczania fumonizyny B₁ i B₂ w przetworach z kukurydzy techniką HPLC. Umożliwi to w przyszłości badanie tego typu produktów (niektóre z nich reklamowane są jako tzw. „zdrowa żywność”) na obecność tych mikotoksyn.

Prześlędzono zatem wszystkie etapy procesu analitycznego, a więc: ekstrakcję fumonizyn, oczyszczanie ekstraktów oraz warunki reakcji tworzenia fluoryzujących

pochodnych fumonizyn z dialdehydem o-ftalowym (OPA). Określono również warunki wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

MATERIAŁY I METODYKA

Wyposażenie

Wykorzystano zestaw do wysokosprawnej chromatografii cieczowej firmy Milton Roy/LDC Analytical składający się z następujących elementów: pompy izokratycznej Constametric III, kolumny Nova Pak C-18, 3,9 x 300 mm z przedkolumną C-18, detektora fluorymetrycznego Fluoro-Monitor III z filtrami 370/440 nm, zaworu dozującego Rheodyne 721 z pętlą o pojemności 20 μ l. Pracę zestawu kontrolowano za pomocą komputera z programem sterującym i integrującym Axxiom 727. Do rejestracji chromatogramów wykorzystano drukarkę Epson XL-400.

Stosowano ponadto: wyparkę próżniową Büchi, blok grzejny Pierce wraz z naczynkami reakcyjnymi poj. 5 ml, wytrząsarkę laboratoryjną Elpan 358S, młynek udarowy Wz-1, łaźnię ultradźwiękową, Büchler, mikrostrzykawkę Hamilton poj. 100 μ l oraz typowe szkło laboratoryjne takie jak: kolby miarowe, kolby stożkowe pipety, rozdzielacze.

Odczynniki i materiały pomocnicze

1. woda do wysokosprawnej chromatografii cieczowej redestylowana z nad 0,5 g KMnO_4 i 5 g NaOH dodanych na każde 2 litry wody, 2. chloroform cz.d.a., POCH Gliwice, dwukrotnie destylowany suszony wstępnie bezwodnym CaCl_2 , 3. n-heksan cz., POCH Gliwice, 4. acetonitryl i metanol o czystości HPLC, BDH, 5. kwas octowy lodowaty cz.d.a., POCH Gliwice, 6. 0,1 M KOH, 7. dialdehyd o-ftalowy (OPA), Lancaster (roztwór do upochodniania fumonizyn przygotowywany w następujący sposób: 20 mg OPA rozpuszczano w 0,5 ml metanolu i 2,5 ml 0,1 M tetraboranu sodowego, następnie dodawano 25 μ l 2-merkaptetoetanolu), 7. 2-merkaptetoetanol, BDH, 8. tetraboran disodowy, BDH, 9. kolumny SPE Supelclean LC-SAX, 3ml, Supelco, 10. wzorzec fumonizyny B₁, Sigma, 11. wzorzec fumonizyny B₂, Sigma, 12. roztwór podstawowy fumonizyny B₁ w acetonitrylu z wodą (1+1) o st. 0,5 mg/ml, 13. roztwór podstawowy fumonizyny B₂ w acetonitrylu z wodą (1+1) o st 1 mg/ml, 14. roztwór roboczy mieszaniny fumonizyny B₁ i B₂ o stężeniu 0,1 mg/ml (w rozpuszczalniku, jak poprzednio), 15. celit 545, POCH Gliwice, 16. żel krzemionkowy do chromatografii kolumnowej 0.063–0,200 mm, Merck z dodatkiem 1% wody, 17. tlenek glinu do chromatografii kolumnowej, obojętny, V st. aktywności, Woelm, 18. bibuła filtracyjna jakościowa, POCH Gliwice, 19. azot sprężony z butli.

Metody badań

Badania na roztworach wzorcowych

Ustalenie warunków reakcji z dialdehydem o-ftalowym (OPA)

W pierwszej fazie badań określono optymalne warunki tworzenia fluoryzujących pochodnych fumonizyn w reakcji z dialdehydem o-ftalowym. W tym celu do naczynek reakcyjnych odmierzano po 5 μ l roztworu roboczego fumonizyn, 45 μ l mieszaniny acetonitrylu z wodą (1+1) i 200 μ l roztworu OPA. Zawartość naczynek dokładnie mieszano (20–30 sek.) w łaźni ultradźwiękowej. Następnie wykonywano analizę chromatograficzną (HPLC) nanosząc roztwór na kolumnę chromatografu cieczowego po upływie czasu (mierzonego od zakończenia procesu mieszania roztworów): 0; 5; 8; 10 i 16 minut.

Ustalenie warunków wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Analizę chromatograficzną wzorców fumonizyny B₁ i B₂ po reakcji z OPA wykonywano na kolumnie chromatograficznej Nova Pak C-18. Jako fazy ruchome stosowano następujące kombinacje rozpuszczalników:

– acetonitryl, woda, kwas octowy (50+50+1),

- acetonitryl, metanol, woda, kwas octowy (14+49+36+1), (40+12+47+1),
- metanol, woda, kwas octowy (50+50+1), (70+28+2), (80+18+2), (75+23+2) oraz (75+24+1)

Prędkość przepływu fazy ruchomej zmieniano w zakresie od 0,9 do 1,5 ml/min, długości fali wzbudzenia i emisji detektora fluorymetrycznego wynosiły odpowiednio 370/440 nm.

Ustalenie warunków elucji fumonizyn z różnego typu kolumn

Kolumna SPE-SAX

Kondycjonowanie: kolumnę przemywano 2,5 ml mieszaniny metanolu z wodą (3+1) z prędkością 2 ml/min. Następnie наносono 10 ml roztworu wzorcowego fumonizyn w mieszaninie metanolu z wodą (3+1) lub (w osobnym doświadczeniu) w mieszaninie acetonitrylu z wodą (3+1). Prędkość elucji ustalono na 2 ml/min. Eluaty odrzucano, a kolumnę przemywano ponownie 3 ml metanolu z prędkością jak poprzednio, eluat odrzucano. Fumonizyny eluowano 14 ml lub 20 ml mieszaniny metanolu z kwasem octowym (199+1) oraz (198+2).

W odrębnym wariancie badań kolumnę kondycjonowano 3 ml mieszaniny metanolu z wodą (3+1), a następnie 6 ml metanolu z kwasem octowym (199+1) i 8 ml metanolu z wodą (3+1). Po naniesieniu analizowanego roztworu, jak poprzednio, i przemyciu kolumny 2,5 ml metanolu, fumonizyny eluowano 14 lub 20 ml mieszaniny metanolu z kwasem octowym (199+1) lub w oddzielnych doświadczeniach 14 ml mieszaniny acetonitrylu z wodą (4+1)¹⁾.

Kolumna z żelem krzemionkowym

Przygotowanie kolumny: na dnie strzykawkii jednorazowej Luer poj. 5 ml umieszczano zwitek waty, a następnie 0,5 g żelu krzemionkowego. Kolumnę kondycjonowano przemywając 10 ml chloroformu. Następnie наносono 2 ml roztworu chloroformowego zawierającego znaną ilość fumonizyn (wzorzec roboczy odparowywano, a pozostałość rozpuszczano w chloroformie), prędkość przepływu ustalono na 2 ml/min. Kolumnę przemywano 3 ml chloroformu i 4 ml n-heksanu z prędkością jak wyżej.

Fumonizyny eluowano 10 ml mieszaniny chloroformu z kwasem octowym (198+2) lub (190+10) (w osobnym doświadczeniu).

Kolumna z celitem

Kolumnę (jak poprzednio) wypełniano mieszaniną 0,5 g celitu i 0,25 ml 0,5% roztworu wodorowęglanu sodowego. Bezpośrednio po wypełnieniu na kolumnę наносono 2 ml standardowego roztworu chloroformowego fumonizyn. Kolumnę przemywano 3 ml chloroformu i 4 ml n-heksanu. Fumonizyny eluowano 15 ml mieszaniny metanolu z kwasem octowym (190+10). We wszystkich przypadkach prędkość przepływu rozpuszczalników wynosiła 1,5 ml/min.

Kolumna z tlenkiem glinu

Kolumnę wypełniano 1,5 g tlenku glinu. Następnie наносono kolejno: 3 ml roztworu chloroformowego fumonizyn, 3 ml chloroformu i 15 ml mieszaniny metanolu z kwasem octowym (190+10); prędkość przepływu, jak poprzednio.

Eluaty przeznaczone do analizy HPLC odparowywano do sucha w bloku grzejnym w strumieniu azotu, w temperaturze nie przekraczającej 60°C, do pozostałości dodawano kolejno: 50 µl mieszaniny acetonitrylu z wodą i 200 µl roztworu OPA. Zawartość naczynek dokładnie mieszano w łaźni ultradźwiękowej. Następnie wykonywano analizę chromatograficzną, наносząc

¹⁾ W pierwszej fazie opisanych badań, również w przypadku kolumn wymienionych w dalszych częściach pracy, wszystkie eluaty opuszczające kolumnę poddawano analizie chromatograficznej w celu ustalenia warunków w jakich fumonizyny opuszczają kolumnę.

na kolumnę Nova Pak C-18 przereagowaną mieszaniną (czas 0), stosując jako fazę rozwijające układy wymienione we wcześniejszym opisie metody.

Ustalenie warunków ekstrakcji fumonizyn z próbek przetworów kukurydzianych, oczyszczania ekstraktów oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Ekstrakcja i oczyszczanie ekstraktów

a) 25 g średniej próbki laboratoryjnej produktu (kaszka kukurydziana, kukurydza popcorn, płatk kukurydziane) wytrząsano 30 min. na wytrząsarce mechanicznej z 50 ml mieszaniny metanolu z wodą (3+1). W przypadku kukurydzy popcorn i płatków śniadaniowych stosowano uprzednie rozdrabnianie w młynku udarowym. Ekstrakty sączono przez sączek karbowany z bibuły, pH roztworów doprowadzano za pomocą 0,1 M KOH do wartości 6,9–7,1 (jedynie w przypadku płatków i kukurydzy popcorn). Do dalszej analizy pobierano 10 ml przesącza, który наносono na uprzednio kondycjonowane kolumny zgodnie z procedurą opisaną dla roztworów wzorcowych²⁾. Zagęszczone w wyparce próżniowej eluaty przenoszono ilościowo metanolem lub mieszaniną metanolu z kwasem octowym (199+1) (równoległe doświadczenie). Zawartość naczyniek odparowywano w bloku grzejnym w temperaturze 50°C w strumieniu azotu.

b) 25 g średniej próbki laboratoryjnej produktu wytrząsano, jak poprzednio ze 100 ml mieszaniny acetonitrylu z wodą (1+1). Ekstrakty sączono przez sączek karbowany z bibuły. Do dalszej analizy pobierano 10 ml przesącza, który наносono na uprzednio kondycjonowane kolumny zgodnie z procedurą opisaną wcześniej. Zagęszczone w wyparce próżniowej eluaty przenoszono ilościowo metanolem lub mieszaniną metanolu z kwasem octowym (199+1) (równoległe doświadczenie). Zawartość naczyniek odparowywano w bloku grzejnym w temperaturze 50°C w strumieniu azotu.

Reakcja z OPA

Do pozostałości w naczynkach dodawano 200 μ l metanolu lub mieszaniny metanolu z kwasem octowym (199+1) (równoległe doświadczenie). Do reakcji z OPA, po dokładnym wymieszaniu zawartości naczyniek, pobierano 50 μ l powyższych roztworów dodając 200 μ l roztworu OPA, jak opisano wcześniej (temp. 60°C, czas „0”). W analogiczny sposób wykonywano reakcję z OPA dla roztworów wzorcowych fumonizyn.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa

Stosowano kolumny chromatograficzne i układy rozwijające wymienione w punkcie dotyczącym badań na roztworach wzorcowych. Równoległe chromatografowano roztwory standardowe po reakcji z OPA. Zawartość fumonizyn obliczano za pomocą programu integrującego Axiom na podstawie porównania powierzchni pików próbek i standardów. Zawartość fumonizyn wyrażano w μ g/kg produktu.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Sposób wykonania reakcji fumonizyn z OPA zaczerpnięto z pracy *Stack'a i Eppley'a* [13]. Zbadano przy tym stabilność powstających pochodnych chromatografując mieszaniny wzorców fumonizyn poddane reakcji z OPA po upływie czasu (licząc od chwili dodania reagentów i wymieszania): 0; 5; 8; 10 i 16 minut. Stwierdzono, że fluoryzujące pochodne obu fumonizyn z OPA nie należą do stabilnych (tabela I).

²⁾ W odrębnych doświadczeniach wykonano próby dodatkowego oczyszczania ekstraktów za pomocą roztworów *Carrez'a* oraz ekstrakcji n-heksanem przed naniesieniem na kolumnę. W późniejszej fazie badań zrezygnowano z tego sposobu oczyszczania ekstraktów ze względu na jego małą skuteczność.

Tabela I. Wpływ czasu na przebieg reakcji fumonizyn B₁ i B₂ z OPA w temperaturze otoczenia (ok. 20°C) (wielkości powierzchni pików stanowią średnie z 6 równoległych pomiarów)
Influence of reaction time on derivatisation of fumonizins B₁ i B₂ with OPA in ambient temperature

Czas (min.)	Powierzchnia pików (mV)	
	Fumonizyna B ₁	Fumonizyna B ₂
0	3429	1714
5	3324	1609
8	2953	1438
10	2522	1301
16	2426	1182

Jak wynika z danych zamieszczonych w tabeli I naniesienie analizowanej próbki na kolumnę chromatografu cieczowego powinno nastąpić w przedziale czasowym 0–5 min, bowiem zmiany wielkości powierzchni pików pochodnych fumonizyny B₁ i B₂ są wtedy nieznaczne, co umożliwia poprawne wykonanie analizy.

Dla określenia powtarzalności reakcji w tych warunkach wykonano serię oznaczeń chromatograficznych ustalając czasy retencji pochodnych obu fumonizyn i wielkości powierzchni pików (tabela II).

Dane w tabeli II wskazują na dobrą powtarzalność reakcji – współczynnik zmienności V% 3,6 – 3,9, w opisanych warunkach.

Podczas ekstrakcji fumonizyn z próbek badanego materiału (płatki kukurydziane, kaszka kukurydziana, kukurydza popcorn) metanolem z wodą (3+1) w pierwszej fazie badań wystąpiły trudności związane z otrzymaniem zadowalającego odzysku; jego wartości wahały się w granicach 15–30%. Badając przyczyny tego zjawiska przeprowadzono badania na wzorcach i ekstraktach stosując wymywanie fumonizyn z kolumn różnego typu stosując odpowiednie układy elucyjne wymienione w części doświadczalnej pracy. Wykonano również ekstrakcję fumonizyn z fortyfikowanych próbek badanych produktów wg [6] acetonitrylem z wodą (1+1). Uzyskane wartości średniego odzysku we wszystkich przypadkach były poniżej 50%.

Momentem krytycznym procesu analitycznego okazała się słaba rozpuszczalność fumonizyn w metanolu. Wg bowiem metody oryginalnej [13] w końcowym etapie postępowania poprzedzającym analizę HPLC należy rozpuścić zagęszczony eluat z kolumny SAX w metanolu i pobrać odpowiednią objętość ekstraktu do wykonania reakcji z OPA.

W pracy będącej przedmiotem niniejszej publikacji zastosowano do rozpuszczania wspomnianego zagęszczonego eluatu mieszaninę metanolu z kwasem octowym (199+1) poprawiając rozpuszczalność fumonizyn. Wyeliminowano dzięki temu błąd gruby metody i wynikający stąd słaby odzysk; pobierana do dalszej analizy objętość ekstraktu zawierała proporcjonalnie mniejszą zawartość fumonizyn w stosunku do ich zawartości w ogólnej objętości końcowego ekstraktu (1:4).

W dalszych badaniach na ekstraktach stwierdzono również, że istotny wpływ na odzyskiwalność fumonizyn wywiera wartość pH ekstraktu przed naniesieniem na ko-

Tabela II. Powtarzalność reakcji tworzenia pochodnych fumonizyn z OPA
 Repeatability of derivatisation reaction fumonisins with OPA

Powierzchnia piku (mV)	
Fumonizyna B ₁	Fumonizyna B ₂
4511	2762
4371	2578
4362	2616
4283	2590
4637	2780
4313	2680
4501	2773
4121	2500
$\bar{x} = 4387$	$\bar{x} = 2659$
SD = 159 RSD% = 3,64	SD = 105 RSD% = 3,94

SD – odchylenie standardowe

RSD – względne odchylenie standardowe (współczynnik zmienności)

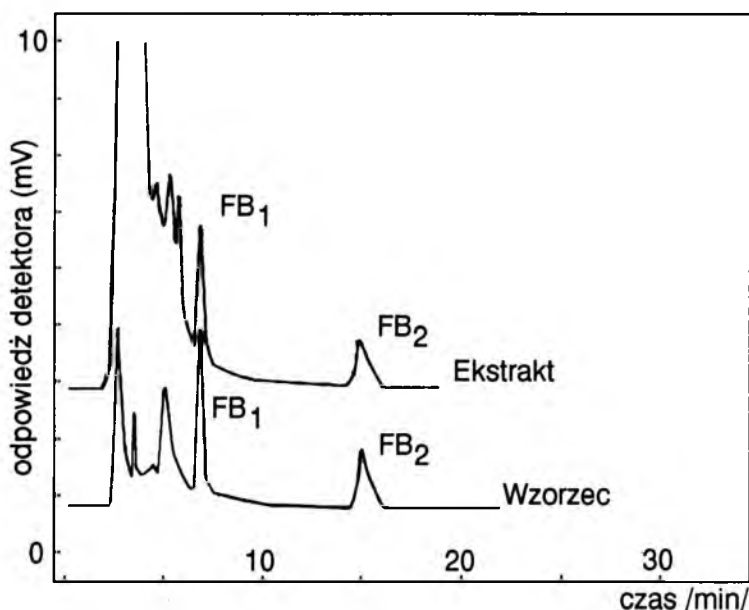
lumnę SAX. Jako optymalne okazało się pH w zakresie 6,9–7,1. Dla ekstraktów z płatków kukurydzianych i kukurydzy popcorn niezbędne było doprowadzenie pH do tej wartości za pomocą 0,1 M roztworu KOH.

W przypadku zastosowania metody odbiałczania ekstraktów roztworami Carrez'a, w celu dodatkowego ich oczyszczenia, fumonizyny ulegały adsorpcji na stosowanych w pracy kolumnach. Również oczyszczanie ekstraktów na kolumnach z celitem, tlenkiem glinu i z żelazem krzemionkowym nie przyniosło pozytywnych wyników; fumonizyny adsorbowały się, a ekstrakty zawierały znaczne ilości substancji interferujących.

Najodpowiedniejszym sposobem oczyszczania ekstraktów metanolowo-wodnych była chromatografia na kolumnie SAX, z elucją fumonizyn za pomocą 20 ml mieszaniny metanolu z kwasem octowym (199+1).

W celu określenia optymalnych warunków wysokosprawnej chromatografii cieczowej zbadano układy rozwijające złożone z wody i kombinacji trzech modyfikatorów: acetonitrylu, metanolu i kwasu octowego. Zbadano wpływ siły eluotropowej (gEA) układów oraz rodzaju modyfikatorów na efekt rozdzielania fumonizyn B₁ i B₂ i substancji interferujących oraz na ich czasy retencji. Wartości współczynnika gEA w pozostałych zbadanych układach wahały się w granicach od 320 do 460 i zapewniały dobry rozdział fumonizyn. Najlepsze rezultaty otrzymamy w układzie acetonitryl, metanol, woda (75+24+1) o sile eluotropowej gEA 412, przy przepływie 0,9 ml/min. Współczynniki pojemnościowe k' w tych warunkach dla fumonizyny B₁ i B₂ wynosiły odpowiednio 8,4 i 19,7, a odpowiadające im czasy retencji: 6,7 i 14,9 min. Wprawdzie w przypadku fumonizyny B₂ dają się zaobserwować zwiększone nieco wartości współczynnika k' oraz czasu retencji odbiegające nieco od optymalnych (współczynnik k' powinien zasadniczo przyjmować wartości w przedziale od 1 do 10), jednak mieszczą się one jeszcze w granicach

dopuszczalnych i nie wpływają ujemnie na wynik analizy chromatograficznej, wydłużając jedynie nieco czas jej trwania.



Ryc. 1. Chromatogram ekstraktu kaszki kukurydzianej fortyfikowanej fumonizynami i roztworu standardowego. Układ rozwijający: metanol, woda, kwas octowy (75+24+1).

Objaśnienia: FB₁ – fumonizyna B₁

FB₂ – fumonizyna B₂

Układ wg *Stack'a* i *Eppley'a* [13] złożony z acetonitrylu, wody i kwasu octowego (50+50+1) o gEA 365 powodował nadmierne wydłużenie czasów retencji (o około 30% w stosunku do układu poprzedniego), a piki fumonizyn, zwłaszcza fumonizyny B₂ były rozmyte. Jet to zrozumiałe ze względu na znacznie wyższe wartości k' . Zwiększenie prędkości przepływu do 1,5 ml/min, usuwało radykalnie tę niedogodność, jednak podczas analizy ekstraktów obserwowano niedostateczny rozdział fumonizyny B₁ od substancji balastowych (zdolność rozdzielcza $R_s < 1$). Należy zaznaczyć, że wspomniani autorzy stosowali kolumnę RP-18 o nieco innej charakterystyce (μ Bondapak 3,9x150 mm), co tłumaczy powyższe różnice.

Na podstawie przeprowadzonych, szczegółowo opisanych powyżej badań, przyjęto następujący schemat oznaczania fumonizyn w przetworach kukurydzianych: 1) ekstrakcja mieszaniną metanolu z wodą (3+1), 2) oczyszczanie na kolumnie SAX po uprzednim doprowadzeniu pH ekstraktu do ok. 6,9–7,1 (wariant z przemywaniem kolumny 2,5 ml metanolu i elucja fumonizyn 14 ml mieszaniny metanolu z kwasem octowym /199+1/), 3) rozpuszczanie suchej pozostałości eluatu z kolumny w mieszaninie metanolu z kwasem octowym (199+1), 4) reakcja z OPA (wariant „0”) , 5) HPLC na

Tabela III. Odzyskiwalność i precyzja metody na przykładzie kaszki kukurydzianej, płatków kukurydzianych oraz kukurydzy popcorn (α = 0,05)

Recovery and precision of the method for corn groats, corn flakes, popcorn

Fumonizyna/produkt	Poziom fortyfikacji μg/kg	Średni odzysk %	Przedział ufności średniego odzysku %	SD %	RSD %
B ₁ /kaszka	100	75,25	68,20–82,25	11,1	14,7
	200	72,50	66,74–71,06	3,4	5,0
	400	73,10	69,00–77,29	5,8	8,0
	800	72,63	67,91–77,35	6,6	9,1
	1600	79,50	76,30–82,80	3,1	3,9
B ₂ /j.w.	100	85,90	78,24–93,60	12,1	14,1
	200	75,00	69,48–74,44	7,7	5,4
	400	78,10	74,88–81,32	4,5	5,7
	800	78,70	75,05–82,35	5,3	6,5
	1600	86,30	82,39–90,15	3,7	4,3
B ₁ /płatki	200	74,33	67,30–81,36	6,7	8,9
	400	78,16	75,81–80,51	1,9	2,4
B ₂ /j.w.	200	89,20	79,96–98,44	8,8	9,8
	400	95,10	89,16–101,04	4,8	5,1
B ₁ /popcorn	800	64,57	57,08–72,06	8,1	12,6
B ₂ /j.w.	800	74,14	67,09–81,18	8,3	11,2

α – poziom istotności,

SD – odchylenie standardowe,

RSD – względne odchylenie standardowe (współczynnik zmienności)

kolumnie Nova Pak RP-18 z fazą ruchomą: metanol, woda, kwas octowy (75+24+1), przy prędkości przepływu 0,9 ml/min z detekcją fluorymetryczną przy 370/440 nm.

W celu określenia podstawowych parametrów statystycznych metody, próbki kaszki kukurydzianej, płatków kukurydzianych i kukurydzy popcorn fortyfikowano fumonizynami na poziomach: 100; 200; 400; 800 i 1600 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Wartości średniego odzysku będącego miarą błędu bezwzględnej metody, odchylenie standardowe i przedział ufności średniego odzysku przedstawiono w tabeli III.

Określono również granicę wykrywalności metody (średnia wartość sygnału próbki ślepej plus trzy odchylenia standardowe), która wynosiła 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ produktu dla każdej z oznaczanych fumonizyn. Jako granicę oznaczalności obrano 4-krotną wartość granicy wykrywalności, co stanowi 60,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Uzyskane podstawowe parametry analityczne metody są porównywalne do cytowanych przez niektórych autorów. Jedynie w przypadku kukurydzy popcorn wartość średniego odzysku – ok. 66% obu fumonizyn, była niższa w porównaniu z pozostałymi produktami będącymi przedmiotem niniejszej pracy.

Stack i wsp. [13] w metodzie oznaczania fumonizyn w kukurydzy i jej przetworach odzyskiwali około 67–71% dodanych mikotoksyn. Zakres zbadanych stężeń wynosił od 250 do 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Współczynnik zmienności V% wahał się w granicach od 3 do 5%, granica wykrywalności metody wynosiła 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Scott i *Lawrance* [9] oznaczając fumonizyny w przetworach z kukurydzy za pomocą techniki HPLC, po reakcji z NBD-F osiągnęli wartości średniego odzysku 94% dla fumonizyny B₁ i 80% dla fumonizyny B₂. Zakres poziomów fortyfikacji zbadanych przez tych autorów zawierał się w przedziale od 125 do 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a granica wykrywalności wynosiła 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Należy podkreślić, że uzyskana wartość tego parametru, w pracy będącej przedmiotem niniejszej publikacji, jest prawie 6-krotnie niższa.

Również *Shepard* i *Sydenham* [12] opisali metodę oznaczania fumonizyn w postaci pochodnych z aldehydem o-diftalowym (OPA). Autorzy odzyskiwali średnio 99,5 i 85,9% fumonizyny B₁ i B₂ odpowiednio; granica wykrywalności metody była rzędu 50–100 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Jak wynika z przedstawionych badań, metoda oznaczania fumonizyn będąca przedmiotem niniejszej pracy, charakteryzuje się dobrymi parametrami średniego odzysku i bardzo dobrą wykrywalnością.

WNIOSKI

1. Opisana metoda oznaczania fumonizyn w przetworach z kukurydzy może być wykorzystana w rutynowych badaniach produktów na obecność tych mikotoksyn.

2. Postuluje się rozszerzenie zastosowania metody, po przeprowadzeniu stosownych badań, do oznaczania fumonizyn w kukurydzy.

L. Czerwiecki

DETERMINATION OF SELECTED MYCOTOXINS IN FOOD
PART II.: SELECTION OF OPTIMISED CONDITIONS FOR THE DETERMINATION
OF FUMONIZYN B₁ AND B₂ IN CORN PRODUCTS BY MEANS OF
HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Summary

The aim of this study was to perform a optimised method for determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn products. The manner of extraction and clean-up of corn products extracts as well conditions of reaction of fumonisins with OPA was described. The main steps of optimised analytical procedure were: extraction of sample with methanol and water (3+1), clean-up of extracts on SAX column, derivatisation with OPA, and determination by means of RP-HPLC. The mobile phase was a mixture of methanol, water and acetic acid (75+24+1). Fluorometric detection was made at 370/440 nm. The mean recovery of fumonisins dependent on fortification level and product was 64-95%, limit of detection for each of fumonisins was 15 µg/kg.

PIŚMIENNICTWO

1. *Azcona-Olivera J.I., Abouzied M.M., Plattner R.D.* i in.: Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins fumonisins B₁, B₂, B₃. *J. Agr. Food Chem.*, 1992, 40, 531-534.
2. *Bullerman L.B., Tsai W-Y.J.*: Incidence and levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn and corn-based foods and feeds. *J. Food Prot.*, 1994, 57, 541- 546.
3. *Dragoni I., Piantanida L., Trilly Y.*: Occurrence of fumonisins in corn feedstuffs intended for pig consumption. IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Rome, 27-31 May, 1996, 39.
4. *Kellerman T.S., Marasas W.F.O., Thiel P.G.* i in.: Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁. *Onderpoort. J. Vet. Res.*, 1990, 57, 269-275.
5. *Oswailer G.D., Kehrl M.E., Stabel J.R.* i in.: Effects of fumonisin-contaminated corn screenings on growth and health of feeder calves. *J. Anim. Sci.*, 1993, 71, 459-466.
6. *Pascale M., Visconti A.*: Improvement of recoveries in the extraction of fumonisins B₁ and B₂ from maize. *Int. Seminar on Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*, Martina Franca, May, 9-13, 33, 1995.
7. *Pestka J.J., Azcona-Olivera J.I., Plattner R.D.* i in.: Comparative assessment of fumonisin in grain-based foods by ELISA, GC-MS, and HPLC. *J. Food Prot.*, 1994, 57, 169-172.
8. *Rice L.G., Ross P.F.*: Methods for detection and quantitation of fumonisins in corn, cereal products and animal excreta. *J. Food. Prot.*, 1994, 57, 536-540.
9. *Scott P.M., Lawrence G.A.*: Liquid chromatographic determination of fumonisins with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan. *J. Ass. Anal. Chem. Int.*, 1992, 75, 829-834.
10. *Scott P.M., Delgado T., Prelusky D.D.* i in.: Determination of fumonisins in milk. *J. Environ. Sci. Health. B.*, 1994, 29, 989-998.
11. *Shephard G.S., Thiel P.G., Sydenham E.W.*: Liquid chromatographic determination of the mycotoxin fumonisin B₂ in physiological samples. *J. Chrom. A.*, 1995, 692, 39- 43.
12. *Shephard G.S., Sydenham E.W., Thiel P.G.* i in.: Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liq. Chrom.*, 1990, 13, 2077-2087.
13. *Stack M.E., Eppley R.M.*: Liquid chromatographic determination of fumonisins B₂ and B₂ in corn and corn products. *J. Ass. Off. Anal. Chem. Int.*, 1992, 75, 835-837.

14. Sydenham E.W., Shephard G.S., Thiel P.G.: Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂, and B₃ in foods and feeds. J. Ass. Off. Anal. Chem. Int., 1992, 75, 313–318.

15. Sydenham E.W., Gledeblom W.C.A., Thiel P.G. i in.: Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁ mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. J. Agr. Food Chem., 1990, 38, 285–289.

16. Ware G.M., Francis O., Knan S.S. i in.: Determination of fumonisin B₁ in corn by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. Anal. Lett., 1993, 26, 1751–1764.

Warszawa, dnia 1997.12.09