

LUDWIK CZERWIECKI¹, KAMILA CZYŻYK², AGNIESZKA KWIECIEŃ¹,
GRAŻYNA WILCZYŃSKA¹

KOLUMNY POWINOWACTWA IMMUNOLOGICZNEGO W ANALIZIE
OCHRATOKSYNY A W ZBOŻACH TECHNIKĄ HPLC
CZ. I. OCENA METODY EKSTRAKЦИИ METANOLEM Z WODĄ

IMMUNOAFFINITY COLUMNS AND DETERMINATION OF OCHRATOXIN A
IN CEREALS BY HPLC
PART I.: EVALUATION OF EXTRACTION USING METHANOL/WATER

¹ Zakład Analizy Żywności
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
02-532 Warszawa, ul. Rakowiecka 36
Kierownik: Prof. dr hab. B. Szteke

² Międzywydziałowe Studium Ochrony Środowiska
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
02-776 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159
Kierownik: prof. dr hab. J. Żelazo

Opisano metodę oznaczania ochratoksyny A w ziarnach zbóż. Stosowano ekstrakcję metanolem z wodą, kolumny powinowactwa immunologicznego (IAC) i technikę HPLC z detekcją fluorymetryczną. Średni odzysk metody wynosił w zależności od poziomu fortyfikacji i rodzaju zboża 65–78 %, granica wykrywalności oraz granica oznaczalności, odpowiednio – 0,015 i 0,025 µg/kg.

WSTĘP

Spośród wielu mikotoksyn, na szczególną uwagę zasługuje ochratoksyna A ze względu na swoje właściwości toksykologiczne. Mikotoksyna ta występuje w różnych surowcach roślinnych i produktach spożywczych. Do produktów najczęściej zanieczyszczonych ochratoksyną zaliczane są zboża i ich przetwory, w których rozwijają się grzyby, m. in. szczepy grzybów należących do rodzaju *Penicillium* i *Aspergillus* [2]. Ochratoksyna A należy do mikotoksyn o właściwościach kancerogennych i immunosupresyjnych (zwierzęta) [1, 9]. Istnieje jednak duże prawdopodobieństwo, zarówno rakotwórczego jak i nefrotoksycznego jej oddziaływania również w stosunku do człowieka [1]. Wskazują na to niektóre dane epidemiologiczne pochodzące z obszarów Półwyspu Bałkańskiego, gdzie obserwowana jest nefropatia u ludzi – tzw. bałkańska endemiczna nefropatia (BEN) [6]. Jej przebieg jest analogiczny jak w przypadku chronicznego zatrucia trzody chlewnej spowodowanego ochratoksyną A zawartą w paszy. BEN ponadto łączy się ze zmianami nowotworowymi układu moczowego [6]. Z tego względu ochratoksyna A została zaklasyfikowana przez

IARC do grupy związków 2 B jako „substancja potencjalnie rakotwórcza dla człowieka” [1, 8]. Jej obecność we krwi ludzi (również w Polsce!) jest pośrednim dowodem narażenia na tę mikotoksynę za pośrednictwem skażonej żywności [5, 8]. Ochratoksynę A wykrywano również w mleku kobiecym oraz w surowicy krwi matki i płodu [10].

W krajach Unii Europejskiej i w Polsce przyjęto wartość 5 µg/kg jako maksymalne dopuszczalne stężenie ochratoksyny A w zbożach [12]. Ze względu na wspomniane szkodliwe właściwości dla zdrowia ochratoksyny A oraz realne zagrożenie skażenia nią zbóż, na całym świecie prowadzone są nieprzerwanie badania, również w aspekcie doskonalenia metod analitycznych. Ponieważ zarówno sposób ekstrakcji ochratoksyny A, jak i oczyszczania ekstraktów posiada decydujący wpływ na końcowy wynik oznaczenia, celem pracy było zbadanie przydatności kolumn powinowactwa immunologicznego w połączeniu z ekstrakcją ochratoksyny A z próbek zbóż mieszaniną metanolu z wodą. Do oznaczania tej mikotoksyny zastosowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

MATERIAŁ I METODY

Wyposażenie

Wykorzystano zestaw do wysokosprawnej chromatografii cieczowej firmy Knauer składający się z następujących elementów: pompy do gradientu K 1001, zaworu dozującego z petlą o pojemności 100 µl, kolumny chromatograficznej RP-C18 Nucleosil 5 µm z analogiczną przedkolumną, degazera (urządzenie odgazowujące ciecz elucyjną) połączonego z systemem chromatograficznym, detektora fluorymetrycznego RF/-10AXL Shimadzu oraz komputera z programem integrującym Eurochrom HPLC Software 1.65 Knauer i drukarki Canon. Stosowano ponadto: zestaw do chromatografii powinowactwa immunologicznego (statyw, zbiornik na ciecze elucyjne, przewody, strzykawka) Vicam, młynek laboratoryjny WŻ-1, Spółem, CZSS łaźnia ultradźwiękowa Büchler, wytrząsarka laboratoryjna Promax 1020, Heidolph, blok grzewczy Pierce, wyparka próżniowa Büchi, homogenizator laboratoryjny Waring, mikrostrzykawkę do HPLC poj. 10 i 100 µl Hamilton, naczynka reakcyjne poj. 5 ml Pierce oraz typowe szkło laboratoryjne takie jak m.in: pipety, cylindry i kolby miarowe.

Odczynniki i materiały pomocnicze

1. Woda do HPLC oczyszczana w systemie osmozy odwróconej na filtrze Millipore, 2. chlorek sodu cz.d.a., POCH Gliwice, 3. kwas o-fosforowy 85% cz. d. a. Chempur i jego wodny roztwór 0,25 N, 4. metanol do HPLC, Lab-Scan Ltd., 5. propanol-2 HPLC, Lab-Scan Ltd, 6. acetonitryl do HPLC, Lab-Scan Ltd, 7. ciecz elucyjna: 0,25N kwas ortofosforowy: acetonitryl: propanol-2 (55:19:28), 8. wzorzec ochratoksyny A w substancji, Sigma, 9. roztwór wzorcowy ochratoksyny A o stężeniu 5 µg/ml w mieszaninie benzenu z kwasem octowym (99+1) oraz roztwory wzorcowe robocze rozcieńczone w zależności od potrzeb, 10. kompleks trifluorku boru w metanolu, Merck, 11. bufor do elucji mikotoksyn z kolumny IAC (mycotoxin wash buffer), Vicam, 12. kolumny powinowactwa immunologicznego Ochra-Test, Vicam, 13. saszki bibułowe fałdowane, Vicam, 14. saszki bibułowe drobnowiątkowe, Vicam, 15. azot sprężony w butli.

Do badań stosowano jednolite próbki pszenicy i żyta nie zawierające wykrywalnych poziomów ochratoksyny A.

METODY BADAŃ

Wykorzystano jedną z procedur do oznaczania ochratoksyny A opisaną przez producenta kolumn powinowactwa immunologicznego (ekstrakcja i oczyszczanie na kolumnach IAC), Vicam [7], którą zmodyfikowano (głównie w odniesieniu do etapu wysokosprawnej chromatografii cieczowej) w Zakładzie Analizy Żywności wykorzystując niektóre nie opublikowane w ogólnie dostępnym piśmiennic-

twie dane Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego [4] i dopasowano do stosowanej dotychczas w Zakładzie metodyki [3].

Ekstrakcja ochratoksyny A i oczyszczanie ekstraktów na kolumnach powinowactwa immunologicznego

50 g rozdrobnionej próbki pszenicy z dodatkiem 5 g NaCl ekstrahowano 100 ml mieszaniny metanolu z wodą (80:20) w homogenizatorze w czasie 1 min. Homogenat sączono do zlewki poj. 200 ml przez sączek faldowany. Do dalszej analizy pobierano 10 ml klarownego przesączu, który rozcieńczano 40 ml wody. Po dokładnym wymieszaniu, roztwór sączono do kolejnej zlewki poj. 200 ml przez sączek drobnowiątkowy. Następnie 10 ml klarownego przesączu наносono na kolumnę IAC. Elucję prowadzono przy prędkości przepływu 1–2 krople/sek. regulując przepływ pompką strzykawkową. Złoże osuszano przepuszczając przez kolumnę powietrze. Następnie kolumnę przemywano 10 ml buforu (Mycotoxin wash buffer) z prędkością jak poprzednio. Oba eluaty odrzucano, a kolumnę przemywano 10 ml wody, po czym złoże osuszano ponownie strumieniem powietrza. Eluat odrzucano. Ochratoksynę A eluowano 1,5 ml metanolu z prędkością 1 kropla/sek. do naczynka reakcyjnego. Eluat odparowywano do sucha w bloku grzejnym, w temp. 60°C, w strumieniu azotu. Suchą pozostałość, bezpośrednio przed analizą HPLC, rozpuszczano w 1 ml mieszaniny metanolu z wodą (1:1).

Analiza HPLC

Analizę HPLC wykonywano korzystając z własnych rozwiązań stosowanych w ubiegłych latach [3].

Na kolumnę RP C18 Nucleosil, наносono 100 µl badanego ekstraktu. Ciecz elucyjną stanowiła mieszanina o składzie: 0,25 N H₃PO₄:acetonitryl:propanol-2 w proporcjach objętościowych 55:19:28, prędkość przepływu wynosiła 0,9 ml/min. Stosowano detektor fluorymetryczny przy czułości (Sens. 2, Gain 2) i długości fali λ=330/460 nm.

Dla wykreślenia krzywej wzorcowej sporządzano roztwory wzorcowe o stężeniach 0,05; 0,5 oraz 5 µg/ml w ilościach odpowiadających poziomom fortyfikacji 0,05µg/kg do 100 µg/kg, w zależności od potrzeb. Zawartość ochratoksyny A w próbce obliczano na podstawie krzywej wzorcowej.

Potwierdzanie obecności ochratoksyny A

W celu potwierdzenia wyników pozytywnych, tworzone estry metylowe ochratoksyny A. Do reakcji estryfikacji do naczynka reakcyjnego przenoszono 500 µl ekstraktu. Rozpuszczalnik odparowywano do sucha w bloku grzejnym w temp. 60 °C w strumieniu azotu. Następnie do suchej pozostałości w naczynku dodawano 200 µl kompleksu BF₃ w metanolu, naczynko szczelnie zamykano i ogrzewano 15 minut w bloku grzejnym w temperaturze 60 °C. Po schłodzeniu, do mieszaniny reakcyjnej dodawano 200 µl metanolu, zawartość naczynka mieszano w łaźni ultradźwiękowej. W sposób analogiczny prowadzono reakcję estryfikacji wzorca ochratoksyny A pobierając odpowiednie ilości wzorca roboczego. Analizę HPLC wykonywano наносząc na kolumnę kolejno po 100 µl tak zmodyfikowanej próbki, a następnie zmodyfikowanego wzorca.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W celu określenia podstawowych parametrów statystycznych metody, próbki pszenicy i żyta fortyfikowano ochratoksyną A na poziomie: 0,1; 1,0 i 10 µg/kg.

Wartości średniego odzysku, odchylenie standardowe i współczynniki zmienności dla badanych poziomów fortyfikacji przedstawiono w tabelach I, II.

Średni odzysk ochratoksyny A w fortyfikowanych próbkach pszenicy wynosił około 70% (68,8–73,3%) w zależności od poziomu fortyfikacji. Jest to w pełni zgodne z danymi podanymi przez Vicam [7] w odniesieniu do pasz z kukurydzy. Zwraca uwagę b. dobra precyzja

Tabela I. Średni odzysk i powtarzalność metody oznaczania ochratoksyny A w próbkach pszenicy.
Mean recovery and repeatability of the method in wheat samples.

Poziom fortyfikacji $\mu\text{g/kg}$					
10,0		1,0		0,1	
Wynik $\mu\text{g/kg}$	Odzysk %	Wynik $\mu\text{g/kg}$	Odzysk %	Wynik $\mu\text{g/kg}$	Odzysk %
6,7881	67,9	0,7429	74,3	0,0790	79,0
6,4482	64,5	0,7140	71,4	0,0659	65,9
6,5100	65,1	0,7303	73,0	0,0752	75,2
6,6989	67,0	0,6698	67,0	0,0846	84,8
7,4516	74,5	0,6949	69,5	0,0625	62,5
6,8585	68,6	0,7193	71,9	0,0734	73,4
7,3291	73,3	0,7351	73,5	–	–
6,9444	69,4	0,6450	64,5	–	–
6,8759	68,8	0,6294	62,9	–	–
6,9184	69,2	0,7020	70,2	–	–
Średnie stężenie $\mu\text{g/kg}$ /Średni odzysk					
6,8823/68,8		0,6983/69,8		0,0735/73,3	
Odchylenie standardowe SD $\mu\text{g/kg}$ /RSD					
0,3161/4,59		0,0387/5,54		0,0082/11,15	

metody; wartości RSD rzędu 4%, zwłaszcza przy wyższych poziomach ochratoksyny A $>1 \mu\text{g/kg}$. W przypadku próbek żyta wartości średniego odzysku były zbliżone – 65–78%. Nie są to zbyt wysokie wartości tego parametru, ale metoda charakteryzuje się dużą stabilnością, którą sprawdzono na przestrzeni długiego okresu czasu. W krajach Unii Europejskiej istnieją obecnie określone zalecenia w odniesieniu do podstawowych parametrów analitycznych dla metod oznaczania mikotoksyn, w tym także, ochratoksyny A w produktach rolnych i spożywczych [11]. Są one następujące:

- średni odzysk: dla poziomu fortyfikacji $<1 \mu\text{g/kg}$ 50–120%;
- średni odzysk: dla poziomu fortyfikacji $1\text{--}10 \mu\text{g/kg}$ 70–110%;
- RSD dla poziomu fortyfikacji $<1 \mu\text{g/kg}$ $<40\%$;
- RSD dla poziomu fortyfikacji $1\text{--}10 \mu\text{g/kg}$ $<20\%$.

Zestawiając te wymagania z wartościami uzyskanymi w niniejszej pracy można stwierdzić, że uzyskane wyniki średniego odzysku lekko wykraczają poza dolną granicę wytycznych dla poziomu fortyfikacji $1\text{--}10 \mu\text{g/kg}$. Jednak ze względu na wspomnianą bardzo dobrą precyzję metodę należy uznać za poprawną i przydatną w oznaczaniu ochratoksyny A w zbożach.

Określono także granice wykrywalności metody w doświadczeniu z próbkami ślepyimi odczynnikowymi. Obliczone i potwierdzone empiryczne wartości tych parametrów są następujące: granica wykrywalności LOD ok. $0,015 \mu\text{g/kg}$, granica oznaczalności LOQ $0,025\text{--}0,03 \mu\text{g/kg}$. Stosowano następujące wzory: $\text{LOD} = \bar{X}sl + 3\text{SD}$ oraz $\text{LOQ} = \bar{X}sl + 6\text{SD}$, w których: $\bar{X}sl$ i SD stanowią, odpowiednio – średnią wartość sygnału detektora wy-

Tabela II. Średni odzysk i powtarzalność metody oznaczania ochratoksyny A w próbkach żyta.
Mean recovery and repeatability of the method in rye samples.

Poziom fortyfikacji $\mu\text{g}/\text{kg}$			
10,0		1,0	
Wynik $\mu\text{g}/\text{kg}$	Odzysk %	Wynik $\mu\text{g}/\text{kg}$	Odzysk %
6,4093	64,1	0,6914	69,1
6,6207	66,2	0,8251	82,5
6,8416	68,4	0,7567	75,7
6,2976	63,0	0,7556	75,6
6,0856	61,0	0,9227	92,3
6,2420	62,4	0,8232	82,3
6,7967	68,0	0,7206	72,1
6,6410	66,4	0,8004	80,0
6,3282	63,3	0,7648	76,5
6,7960	65,1	0,7479	74,8
Średnie stężenie $\mu\text{g}/\text{kg}$ /Średni odzysk			
6,5059/65,1		0,7808/78,1	
Odchylenie standardowe SD $\mu\text{g}/\text{kg}$ /RSD			
0,2674/4,11		0,0654/8,37	

rażoną w jednostkach stężenia i odchylenie standardowe tego parametru. Na podkreślenie zasługują te niezwykle niskie wartości parametrów wykrywalności i oznaczalności, co świadczy dodatkowo bardzo korzystnie o metodzie.

Wyznaczono również liniowość odpowiedzi detektora, której zakres zawierał się w przedziale stężeń 0,02–800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (wartość współczynnika korelacji $r = 0,998$). Jako roboczy zakres krzywej wzorcowej przyjęto przedział 0,1–300 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Warto zauważyć, że jego maksymalna wartość była równa wyznaczonej empirycznie pojemności kolumny IAC – wynosiła ona ok. 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (powyżej tego stężenia obserwowano spadek wartości średniego odzysku ochratoksyny A).

WNIOSKI

1. Opisana metoda odznacza się dobrymi parametrami analitycznymi, a szczególnie doskonałą precyzją i bardzo niską granicą wykrywalności i oznaczalności; jest też liniowa w szerokim zakresie stężeń ochratoksyny A, co w pełni koresponduje z pojemnością kolumny IAC.

2. Ze względu na wymienione powyżej cechy, metodyka w pełni nadaje się do ilościowego oznaczania ochratoksyny A w pszenicy i życie.

L. Czerwiecki, K. Czyżyk, A. Kwiecień, G. Wilczyńska

IMMUNOAFFINITY COLUMNS AND DETERMINATION OF OCHRATOXIN A
IN CEREALS BY HPLC
PART I.: EVALUATION OF EXTRACTION USING METHANOL/WATER

Summary

The method for ochratoxin A determination in cereals (wheat, rye) was described. Application of immunoaffinity columns (IAC) for clean-up of extracts was investigated. The ochratoxin A content was determined by high-performance liquid chromatography using C₁₈ column and fluorimetric detection at 330 nm (excitation) and 460 nm (emission). The mean recovery of ochratoxin A was 65–78%. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0,015 and 0,025 µg/kg, respectively. The positive results were confirmed by reaction with BF₃ complex in methanol.

PIŚMIENICTWO

1. *Castegnaro M., Gregor Mc. D.*: Carcinogenic risk assessment of mycotoxins. *Revue Medicine Veterinaire. Mycotox 98. International Symposium Mycotoxins in Food Chain. Processing and Toxicological Aspects.* 2–4 July, Toulouse, 1998, 671.
2. Codex Alimentarius Commission. Position paper on ochratoxin A. CX/FAC 99/14, 1999.
3. *Czerwiecki L.*: Determination of ochratoxin A in infant and children cereal foods by reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC). *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1994, 3/44 (2), 67–73.
4. *Czerwiecki L.* i wsp.: Ocena zanieczyszczenia zbóż polskich i słowackich wybranymi mikotoksynami i florą grzybową. *Sprawozdanie IBPRS, Warszawa, 2003, 1–43.*
5. *Goliński P.*: Ochratoksyna A w organizmie ludzkim jako wynik zanieczyszczenia nią żywności. *Roczn. Akademii Rolniczej w Poznaniu. Rozprawy Naukowe*, 1987, 168, 4.
6. IARC Monographs on the evaluation of cancerogenic risks of chemicals to human. Vol. 56: Some naturally occurring substances: some food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC, Lyon, 1993.
7. *Ochrates: Instruction Manual, Vicam, 1997, April 4, 29.*
8. *Pittet A.*: Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review. *Revue Medicine Veterinaire. Mycotox 98. International Symposium Mycotoxins in Food Chain. Processing and Toxicological Aspects.* 2–4 July, Toulouse, 1998, 479–492.
9. *Pohland A.E., Nesheim S., Friedman L.*: Ochratoxin A: A review. *Pure Appl. Chem.* 1992, 64, 1029–1046.
10. *Postupolski J.*: Ochratoksyna A w dziennych racjach pokarmowych, surowicy krwi matki i płodu oraz w mleku kobiecym. *Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej wykonana w PZH, Warszawa, 1999.*
11. Richtlinie 2002/26/EG der Kommission vom 13 März 2002 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle der Ochratoxin A-Gehalte in Lebensmitteln.
12. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 13 stycznia 2003 r. w sprawie maksymalnych poziomów zanieczyszczeń chemicznych i biologicznych, które mogą znajdować się w żywności, dozwolonych substancji dodatkowych, substancji pomagających w przetwarzaniu albo na powierzchni żywności. *Dz.U. nr 37, poz. 326.*

Otrzymano: 2003.10.30