

LUDWIK CZERWIECKI¹, KAMILA CZYŻYK², GRAŻYNA WILCZYŃSKA¹,
AGNIESZKA KWIECIEN¹

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

IMMUNOAFFINITY COLUMNS AND DETERMINATION
OF OCHRATOXIN A IN CEREALS BY HPLC
PART II. EVALUATION OF EXTRACTION USING ACETONITRILE /WATER

¹Zakład Analizy Żywności Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
02-532 Warszawa, ul. Rakowiecka 36
Kierownik: prof. dr hab. B. Szteke
e-mail: czerwiecki@ibprs.pl

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

Do oznaczania ochratoksyny A w ziarnach zbóż wykorzystano ekstrakcję mieszaniną acetonitrylu z wodą. Do oczyszczania ekstraktów zastosowano kolumny powinowactwa immunologicznego (IAC), a ochratoksynę A analizowano techniką HPLC z detekcją fluorymetryczną. Średni odzysk metody wynosił 74-89%, granica wykrywalności oraz granica oznaczalności, odpowiednio 0,015 i 0,025 µg/kg.

WSTĘP

Ochratoksyna A jest mikotoksyną o szerokim spektrum niekorzystnego oddziaływania na organizm ludzki i zwierzęcy. Jest m.in. związkami nefrotoksycznym [1, 5], posiada właściwości immunosupresyjne [1, 8]; nie można też wykluczyć działania rakotwórczego ochratoksyny A w stosunku do człowieka [1, 7]. Głównym jej źródłem są zboża i przetwory zbożowe. Zatem wiarygodne i pewne metody wykrywania i oznaczania ochratoksyny A odgrywają znaczącą rolę w dziedzinie szeroko pojętego bezpieczeństwa żywności i surowców rolnych.

Praca jest kontynuacją badań opisanych w pierwszej części publikacji, dotyczących zastosowania kolumn powinowactwa immunologicznego i techniki HPLC w analizie ochratoksyny A [4]. Zastosowano wtedy ekstrakcję metanolem z wodą (80:20). Ponieważ niezależnie od metody oczyszczania ekstraktów, sposób ekstrakcji posiada decydujący wpływ na końcowy wynik oznaczenia, celem pracy było zbadanie wpływu nowej mieszaniny eks-

trakcyjnej – acetonitrylu z wodą (60:40) na podstawowe parametry charakteryzujące metodę analityczną. Do oczyszczania ekstraktów, podobnie jak w poprzedniej publikacji, zastosowano kolumny powinowactwa immunologicznego.

MATERIAŁ I METODY

Wyposażenie

Wykorzystano zestaw do wysokosprawnej chromatografii cieczowej firmy Knauer składający się z elementów wymienionych we wcześniejszej publikacji [4].

Odczynniki i materiały pomocnicze

Również wszystkie stosowane odczynniki i materiały pomocnicze, włącznie z acetonitrylem do HPLC i wodą oraz z kolumnami powinowactwa immunologicznego wymieniono w części I pracy [4].

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

METODY BADAŃ

Zbadano jedną z procedur ekstrakcji ochratoksyny A i oczyszczania ekstraktów, zalecaną przez producenta kolumn powinowactwa immunologicznego (IAC) [6]. W przypadku wysokosprawnej chromatografii cieczowej, zastosowano własną, sprawdzoną w Zakładzie Analizy Żywności Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, metodykę [2, 3].

Ekstrakcja ochratoksyny A i oczyszczanie ekstraktów na kolumnach powinowactwa immunologicznego

50 g rozdrobnionej próbki pszenicy lub żyta ekstrahowano 100 ml mieszaniny acetonitrylu z wodą (60:40) w homogenizatorze w czasie 1 min. Homogenat sączono do zlewki poj. 200 ml przez sączek fałdowany. 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 drobnowłóknisty. 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 z wykorzystaniem detekcji fluorymetrycznej, przy długościach fali wzbudzenia i emisji 330/460 nm, wykonywano analogicznie jak to opisano poprzednio [4] nanosząc 100 µl badanego ekstraktu na kolumnę RP C18 Nucleosil.

Do wykreślenia krzywej wzorcowej sporządzano roztwory wzorcowe o różnych stężeniach w zakresie i w ilościach odpowiadających poziomom fortyfikacji od 0,05 µg/kg do 100 µg/kg. Zawartość ochratoksyny A w próbce obliczano na podstawie wykreślonej krzywej wzorcowej.

Potwierdzanie obecności ochratoksyny A

W celu potwierdzenia wyników pozytywnych, tworzone estry metylowe ochratoksyny A używając jako reagenty metanolewego kompleksu trifluorku boru [4].

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Dla określenia podstawowych parametrów statystycznych metody, próbki pszenicy fortyfikowano ochratoksyną A na poziomie: 0,1; 1,0; 10 i 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. W przypadku żyta zbadano poziom fortyfikacji 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Wartości średniego odzysku, odchylenie standardowe i jego względną miarę (RSD%) dla badanych poziomów fortyfikacji przedstawiono w tabelach I, II.

Średni odzysk ochratoksyny A w fortyfikowanych próbkach pszenicy wahał się w zależności od rodzaju zboża i poziomu fortyfikacji w granicach 74,4-88,6%. Wartości te były wyższe niż w przypadku ekstrakcji mieszaniną metanolu z wodą (65,1-78,1%) – co stwierdzono w pierwszej części publikacji [4]. Jest to zgodne z danymi podanymi przez Vicam [6] w odniesieniu do pszenicy. Precyzja metody, jako wartość względnego odchylenia standardowego (RSD%) dla badanego zakresu fortyfikacji zawierała się w granicach 8,5-13,4%. Należy zwrócić uwagę, że w porównaniu z wynikami uzyskanymi w wariacie ekstrakcji metanolem z wodą [4] były to jednak wartości wyższe; jest to szczególnie wyraźne przy poziomie fortyfikacji 1 i 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (pszenica) (tabela I). Wartości RSD w metodzie metanolowej wynosiły, odpowiednio: 5,5 i 4,6% [4]. Można zatem uznać, że metoda „acetonitrylowa” charakteryzuje się mniejszą precyzją, ale większym odzyskiem, a zatem większą

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 $\mu\text{g}/\text{kg}$							
100,0		10,0		1,0		0,1	
$\mu\text{g}/\text{kg}$	odzysk %	$\mu\text{g}/\text{kg}$	odzysk %	$\mu\text{g}/\text{kg}$	odzysk %	$\mu\text{g}/\text{kg}$	odzysk %
83,9020	83,9	9,2895	92,9	0,9082	90,8	0,0618	61,8
82,7451	82,7	8,4445	84,4	0,7694	76,9	0,0612	61,2
92,6971	92,7	8,8493	88,5	0,9058	90,6	0,0803	80,3
90,7776	90,8	8,1120	81,1	0,9272	92,7	0,0808	80,8
83,4400	83,4	6,9289	69,3	0,9241	92,4	0,0804	80,4
98,2585	98,3	7,9887	79,9	0,8769	87,7	0,0817	81,7
-	-	7,6613	76,6	0,7570	75,7	-	-
-	-	8,9387	89,4	0,8511	85,1	-	-
-	-	8,9841	89,8	0,6965	69,7	-	-
-	-	8,4992	85,0	0,9013	90,1	-	-
Średnie stężenie $\mu\text{g}/\text{kg}$ /średni odzysk							
88,6367/88,6		8,3696/83,7		0,8518/85,2		0,0744/74,4	
Odchylenie standardowe SD $\mu\text{g}/\text{kg}$ /RSD%							
6,2894/7,1		0,7141/8,5		0,0816/9,6		0,0100/13,4	

Tabela II. Średni odzysk i powtarzalność metody oznaczania ochratoksyny A w próbkach żyta fortyfikowanych na poziomie 10 µg/kg
Mean recovery and repeatability of the method in rye samples at fortification level 10 µg/kg

Ilość oznaczona µg/kg	Odzysk %
8,6999	87,0
8,5747	85,7
7,4120	74,1
8,8732	88,7
9,7952	98,0
8,8375	88,3
Średnie stężenie µg/kg	Średni odzysk %
8,6988	87,0
Odechylenie standardowe SD µg/kg	Względne odchylenie standardowe RSD%
0,7646	8,8

dokładnością. W przypadku próbek żyta wartości średniego odzysku dla poziomu fortyfikacji 10 µg/kg były zbliżone jak dla pszenicy, średnia wartość tego parametru wynosiła ok. 87% (żyto) przy RSD 8,8%. Średni odzysk dla tego samego poziomu wzmocnienia i zboża w metodzie „metanolowej” był znacznie niższy – 65%, podobnie jak prawie 2-krotnie mniejszy był współczynnik RSD – 4,1% [4]. Niezależnie od tego, uzyskane wartości parametrów średniego odzysku jak i RSD% (odchylenie standardowe w warunkach powtarzalności) obu metod spełniają wymagania wymienione w wytycznych Komisji Europejskiej, jakie są stawiane metodom oznaczania ochratoksyny A w żywności [9]. Metoda opisana powyżej odznacza się wyraźnie większym odzyskiem (o ok. 15%) dla poziomów fortyfikacji 1,0; 10 µg/kg (pszenica) w porównaniu z postępowaniem przedstawionym w pierwszej części pracy (ekstrakcja metanolem) [4]. Dla żyta różnica ta jest jeszcze większa, bo dochodzi do ok. 22%. Charakteryzuje się ona natomiast wyraźnie gorszą precyzją w stosunku do metody „metanolowej”.

Granice wykrywalności i oznaczalności opisanej obecnie metody określono w sposób analogiczny jak w poprzedniej pracy [4]. Są one identyczne w obu wersjach ekstrakcji i wynoszą, odpowiednio: LOD: 0,015 µg/kg, LOQ: 0,025-0,03 µg/kg.

Liniowość odpowiedzi detektora obejmowała obszar stężeń zawartych w przedziale 0,02-800 µg/kg (wartość współczynnika korelacji $r = 0,998$). Jako roboczy zakres krzywej wzorcowej przyjęto przedział 0,1-300 µg/kg. Wartość 300 µg/kg stanowi zarazem maksymalne stężenie ochratoksyny A jakie może być naniesione na kolumnę IAC, a więc określa jej pojemność.

WNIOSKI

1. Opisana metoda, w której zastosowano ekstrakcję acetonitrylem z wodą, charakteryzuje się, podobnie jak metoda ekstrakcji metanolem, dobrymi parametrami analitycznymi,

przy czym jej odzysk, dla większości zbadanych poziomów fortyfikacji był wyższy, przy gorszej precyzji, niż w przypadku ekstrakcji metanolem z wodą.

2. Ponieważ wspomniane parametry metody „acetonitrylowej” i „metanolowej” mieszczą się w zaleceniach Komisji Europejskiej, można uznać oba sposoby ekstrakcji jako równocenne i przydatne w ilościowej analizie ochratoksyny A w pszenicy i życie. W pewnych jednak przypadkach wydaje się bardziej korzystne stosownie metody ekstrakcji z metanolem, która mimo mniejszej dokładności odznacza się lepszą precyzją.

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

IMMUNOAFFINITY COLUMNS AND DETERMINATION
OF OCHRATOXIN A IN CEREALS BY HPLC
PART II. EVALUATION OF EXTRACTION USING ACETONITRILE/WATER

Summary

Ochratoxin A from wheat and rye grain was extracted with acetonitrile:water (60:40). After clean-up of extracts using immunoaffinity columns (IAC), ochratoxin was determined by high-performance liquid chromatography using C_{18} column and fluorometric detection at 330 nm excitation and 460 nm emission. The mean recovery of ochratoxin A at fortification levels 0,1-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, was 74-89%. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0,015 and 0,025 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The positive results were confirmed by reaction with BF_3 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. *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.
3. *Czerwiecki L. i wsp.*: Ocena zanieczyszczenia zbóż polskich i słowackich wybranymi mikotoksynami i florą grzybową. *Sprawozdanie IBPRS, Warszawa, 2003, 1-43.*
4. *Czerwiecki L., Czyżyk K., Kwiecień A., Wilczyńska G.*: Kolumny powinowactwa immunologicznego w analizie ochratoksyny A w zbożach techniką HPLC. *Cz. I. Ocena metody ekstrakcji metanolem z wodą. Roczn. PZH 2004, 55, 133-138.*
5. IARC: 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 b.
6. *Ochrates: Instruction Manual, Vicam, 1997, April 4, 31.*
7. *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.
8. *Pohland A. E., Nesheim S., Friedman L.*: Ochratoxin A: A review. *Pure Appl. Chem.* 1992, 64, 1029-1046.
9. 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.

Otrzymano: 2004.01.26