

LUDWIK CZERWIECKI, GRAŻYNA WILCZYŃSKA

OZNACZANIE OCHRATOKSYNY A W PRZYPRAWACH KULINARNYCH

DETERMINATION OF OCHRATOXIN A IN SPICES

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

Opisano metodę oznaczania ochratoksyny A (OTA) w przyprawach kulinarnych. W zależności od rodzaju matrycy, stosowano różne sposoby ekstrakcji OTA oraz warianty oczyszczania na kolumnach IAC. Średni odzysk metody, w zależności od rodzaju przyprawy wnosil od 61 do 82%.

Słowa kluczowe: ochratoksyna A, kolumny powinowactwa immunologicznego (IAC), HPLC, przyprawy kulinarne

Key words: ochratoxin A, immunoaffinity columns (IAC), HPLC, spices

WSTĘP

Głównym źródłem ochratoksyny A (OTA) w diecie są niewątpliwie zboża i przetwory zbożowe, jest ona jednak wykrywana również w innych produktach, np. w kawie naturalnej, w suszonych owocach, w winie oraz w piwie [5], a także w przyprawach kulinarnych [6, 9, 10]. W badaniach wykonanych w ramach programu oceny pobrania OTA w diecie przez populację krajów członkowskich EU stwierdzono m.in. skażenie tą mikotoksyną ponad połowy zbadanych próbek najczęściej stosowanych przypraw kulinarnych takich jak np.: gałka muszkatołowa, kolendra, różne odmiany pieprzu czy papryki [5]. Unia Europejska określiła w roku 2002 maksymalne dopuszczalne poziomy zanieczyszczenia ochratoksyną A m.in. ziarna zbóż, przetworów zbożowych i rodzynek; w projekcie, w fazie przygotowań są analogiczne wymagania m.in. dla przypraw kulinarnych (korzennych) [15]. Dlatego więc niezbędne staje się opracowywanie odpowiednich metod analitycznych oznaczania ochratoksyny A w coraz szerszym asortymencie surowców oraz produktów spożywczych. Toteż celem niniejszej pracy była adaptacja metod oznaczania ochratoksyny A w przyprawach kulinarnych wraz z podaniem podstawowych charakterystyk analitycznych opracowanych procedur; m.in.: średniego odzysku, powtarzalności, wykrywalności i oznaczalności. Należy zaznaczyć, że w dostępnym piśmiennictwie światowym stosunkowo nieliczne prace dotyczą oznaczania ochratoksyny A w kulinarnych przyprawach ziołowych [2, 14].

Najczęściej obecnie stosowaną techniką analityczną służącą do oznaczania ochratoksyny A jest wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją fluorymetryczną [1, 3, 6, 10, 12, 13]. Ponieważ matryce poszczególnych produktów różnią się niekiedy istotnie, konieczne jest stosowanie odpowiednich metod ekstrakcji oraz oczyszczania ekstraktów w zależności od rodzaju analizowanych próbek. Coraz większe zastosowanie zyskuje oczyszczanie ekstraktów na kolumnach powinowactwa immunologicznego (IAC), w których osadzone na złożu, odpowiednio spreparowane przeciwciała wiążą odwracalnie ochratoksynę A umożliwiając selektywną elucję zanieczyszczeń. Metodę tę wykorzystano do oczyszczania ekstraktów z różnych produktów, w których oznacza się ochratoksynę A [12, 13], a także inne mikotoksyny, np. fumonizyny [4]. Ponieważ w dostępnej literaturze tylko w nielicznych przypadkach opisano zastosowanie tych kolumn w odniesieniu do ochratoksyny A w przyprawach zielonych [2, 14] postanowiono zbadać przydatność tego sposobu oczyszczania.

MATERIAŁY I METODY

W y p o s a ż e n i e

Dysponowano zestawem do wysokosprawnej chromatografii cieczowej firmy Knauer składającym się z następujących elementów: pompy K 1001, zaworu dozującego z pętlą o pojemności 100 µl, kolumny chromatograficznej RP-C18 Nucleosil 5 µmz analogiczną przedkolumną, degazera (urządzenie odgazowujące ciecz elucyjną) połączonego z systemem chromatograficznym, detektora fluorymetrycznego RF/-10AXL, 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, łaźnię ultradźwiękową Büchler, wytrząsarkę laboratoryjną Promax 1020 Heidolph, blok grzejny Pierce, homogenizator laboratoryjny Waring oraz typowe szkło laboratoryjne.

O d c z y n n i k i o r a z m a t e r i a ł y p o m o c n i c z e

1) woda do HPLC oczyszczana w systemie osmozy odwróconej na filtrze Milipore; 2) chlorek sodu cz.d.a., POCH Gliwice; 3) wodorowęglan sodu cz.d.a.; 4) kwas o-fosforowy 85% cz.d.a., Chempur i jego wodny roztwór 0,25 N; 5) metanol do HPLC, Lab-Scan Ltd.; 6) propanol-2 HPLC, Lab-Scan Ltd; 7) acetonitryl do HPLC, Lab-Scan Ltd; 8) n-heksan frakcja z nafty cz., Chempur; 9) ciecz elucyjna: 0,25N kwas ortofosforowy + acetonitryl + propanol-2 (55 + 19 + 28 v/v); 10) wzorzec ochratoksyny A w substancji, 5 mg, Sigma; 11) roztwór wzorcowy ochratoksyny A o stężeniu 5 µg/ml w mieszaninie benzenu z kwasem octowym (99+1) oraz roztwory wzorcowe robocze rozcieńczane w zależności od potrzeb; 12) bufor PBS-0,01 % Tween-20, Vicam; 13) bufor PBS (mycotoxin wash buffer), Vicam; 14) kolumny powinowactwa immunologicznego (IAC) Ochra-Test, Vicam; 15) sączki bibułowe fałdowane, Vicam; 16) sączki bibułowe drobno-włókniste, Vicam; 17) azot sprężony w butli.

Do badań stosowano jednolite próbki przypraw: pieprzu czarnego, papryki czerwonej, kolendry, imbiru oraz goździków. Próbki pieprzu i goździków rozdrabniano w młynku laboratoryjnym, pozostałe surowce zakupiono w postaci rozdrobnionej. Badania wykonywano na fortyfikowanych i nie fortyfikowanych próbkach badanych produktów.

M e t o d y k a

Do ekstrakcji ochratoksyny A z przypraw kulinarnych i oczyszczania ekstraktów na kolumnach IAC zastosowano metody opisane w procedurach firmy Vicam przeznaczone do oznaczania ochratoksyny A w próbkach kawy naturalnej, bądź modyfikacje własne procedur oznaczania ochratoksyny A w próbkach, kukurydzy, sorgo oraz pasz [7, 8]. Ostatni etap analizy – rozdział i oznaczenie za pomocą techniki HPLC, realizowano wg postępowania opisanego we wcześniej publikacji [3].

Ekstrakcja metanolem z wodą i oczyszczanie ekstraktów

20 g rozdrobnionej próbki przyprawy ekstrahowano w homogenizatorze, przez 2 min, 100 ml mieszaniny metanolu z wodą (80 +20 v/v). Homogenat sączono przez sączek faldowany. Przesącz wykorzystywano do zbadania następujących wariantów oczyszczania ekstraktów:

a) 10 ml klarownego przesącza rozcieńczano 40 ml wody. Po dokładnym wymieszaniu w generatorze ultradźwięków, rozcieńczony ekstrakt sączono przez sączek drobno-włóknisty. Następnie na kolumnę IAC nanoszono 10 ml klarownego rozcieńzonego ekstraktu i po spłynięciu cieczy, złoże osuszano strumieniem powietrza. Kolumnę przemywano kolejno 10 ml buforu PBS do mikotoksyn i 10 ml wody. Po osuszeniu kolumny, ochratoksynę A eluowano 1,5 ml metanolu. Eluat odparowywano do sucha w bloku grzejnym w temp. 60°C, w strumieniu azotu. Suchą pozostałość, bezpośrednio przed analizą HPLC, rozpuszczano w 0,5 ml mieszaniny metanolu z wodą (1 + 1 v/v);

b) 10 ml ekstraktu rozcieńczano 40 ml 5% wodnego roztworu Tween-20 i po wymieszaniu roztwór sączono przez sączek drobno-włóknisty. Dalej postępowano, jak poprzednio;

c) 10 ml ekstraktu rozcieńczano jak wyżej i po przesączeniu nanoszono na kolumnę IAC 10 ml klarownego, rozcieńzonego ekstraktu. Po osuszeniu złoża przez kolumnę przepuszczano kolejno: 10 ml 5% wodnego roztworu Tween-20 w buforze PBS oraz 10 ml wody. Po ponownym osuszeniu kolumny, ochratoksynę wmywano 1,5 ml metanolu i po odparowaniu rozpuszczalnika pozostałość rozpuszczano w 0,5 ml mieszaniny metanolu z wodą (1 + 1 v/v);

d) 10 ml ekstraktu rozcieńczano 40 ml wody. Po dokładnym wymieszaniu i przesączeniu przez sączek drobno-włóknisty, 10 ml klarownego ekstraktu nanoszono na kolumnę IAC. Po osuszeniu złoża przez kolumnę przepuszczano kolejno: 10 ml 5% wodnego roztworu Tween-20 w buforze PBS oraz 10 ml wody. Po ponownym osuszeniu kolumny, ochratoksynę wmywano 1,5 ml metanolu, a ekstrakt przygotowywano do analizy HPLC jak w poprzednich wariantach;

e) 20 ml przesączonego, nierozcieńzonego ekstraktu metanolowo-wodnego, wytrząsano z trzema porcjami, po 10 ml każda, n-heksanu. Warstwy n-heksanowe odrzucano. Pobierano 10 ml fazy wodnej, którą rozcieńczano 40 ml wody i sączono przez sączek drobno-włóknisty. Następnie na kolumnę IAC nanoszono 10 ml klarownego rozcieńzonego ekstraktu i postępowano jak w wariantcie a).

Ekstrakcja roztworem wodorowęglanu sodu i oczyszczanie ekstraktów

5 g rozdrobnionej próbki przyprawy ekstrahowano w homogenizatorze w czasie 2 min 100 ml 1% roztworu wodorowęglanu sodu. Homogenat sączono przez sączek faldowany i do dalszej analizy pobierano 20 ml klarownego przesącza, który rozcieńczano 20 ml buforu PBS-0,01% Tween. Rozcieńczony przesącz wytrząsano na wytrząsarce laboratoryjnej w czasie 10 min. Następnie na kolumnę IAC nanoszono 10 ml przesączonego przez sączek drobno-włóknisty roztworu i po spłynięciu cieczy złoże osuszano strumieniem powietrza. Na kolumnę nanoszono 10 ml buforu PBS-0,01% Tween, po czym kolejno przepuszczano powietrze i 10 ml wody. Po ponownym osuszeniu złoża, ochratoksynę A eluowano 1,5 ml metanolu. Po odparowaniu eluatu suchą pozostałość, bezpośrednio przed analizą HPLC, rozpuszczano w 0,5 ml mieszaniny metanolu z wodą (1 + 1 v/v).

Badanie funkcjonowania kolumny IAC

20 ml przesączonego ekstraktu (po ekstrakcji 1% roztworem NaHCO_3) fortyfikowano wzorcem OTA w ilości odpowiadającej poziomowi 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ próbki. Ekstrakt rozcieńczono 20 ml buforu PBS-0,01% Tween-20, po czym całość wytrząsano na wytrząsarce przez 10 min. Na kolumnę IAC nanesiono 10 ml rozcieńzonego, przefiltrowanego ekstraktu i prowadzono kolejno elucję wg schematu: ekstrakt → eluat 1, bufor → eluat 2, woda → eluat 3, metanol → eluat 4. Zebrane eluaty odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem w temp. 60°C. Po przeniesieniu metanolem pozostałości po odparowaniu do naczynek reakcyjnych, roztwory metanolowe odparowywano (w bloku grzejnym, w strumieniu azotu), a pozostałość rozpuszczano w 0,5 ml mieszaniny metanolu z wodą (1 + 1 v/v).

Wysokosprawną chromatografią cieczą (HPLC)

Uzyskane w opisanych poprzednio wariantach oczyszczania ekstraktów oraz wszystkie badane eluaty z kolumny IAC analizowano za pomocą HPLC. Na kolumnę chromatograficzną nanoszono po

100 µl analizowanych roztworów. Ciecz elucyjną stanowiła mieszanina o składzie: 0,25 N kwas ortofosforowy + acetonitryl + propanol (55+19+28 v/v), którą tłoczono z prędkością 0,9-1,0 ml/min. Stosowano detektor fluorymetryczny przy długości fali 330/460 nm. Zawartość ochratoksyny A w próbce oraz jej odzysk obliczano z krzywej wzorcowej sporządzonej z odpowiednio rozcieńczonych roztworów wzorcowych ochratoksyny A.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W materiałach opublikowanych przez firmę Vicam [7, 8] zawierających procedury oznaczania OTA w różnych produktach i surowcach roślinnych nie było odrębnej metodyki opracowanej dla przypraw kulinarnych. Dlatego w pierwszej fazie badań sprawdzono, a następnie zmodyfikowano wybrane procedury przeznaczone dla innych produktów niż przyprawy kulinarne. Zbadano zatem zarówno sposoby postępowania z roztworami po ekstrakcji (rozcieńczanie, sączenie), jak i funkcjonowanie kolumn powinowactwa IAC w zależności od rodzaju badanej próbki. Przydatność poszczególnych wariantów oceniano na podstawie otrzymanych wyników odzysku ochratoksyny A. Ekstrakcję metanolem z wodą stosowano do próbek kolendry, imbiru, pieprzu czarnego, papryki i goździków nie fortyfikowanych i fortyfikowanych ochratoksyną A na poziomie 5 µg/kg. Dla kontroli przygotowano także roztwory wzorcowe ochratoksyny A o stężeniach odpowiadających danemu poziomowi fortyfikacji, przy czym roztwory te poddawano identycznemu postępowaniu jak w przypadku próbek (ekstrakcja, rozcieńczanie, oczyszczanie na kolumnach IAC, HPLC).

Ekstrakcja metanolem z wodą wraz z rozcieńczaniem i oczyszczaniem na kolumnie IAC w wariancie podstawowym (a), nie przyniosła pozytywnych rezultatów ze względu na bardzo niskie odzyski ochratoksyny A z badanych próbek (tabela I); maksymalny odzysk – 48%, też niezadowalający, otrzymano jedynie w przypadku kolendry. Na uwagę zasługuje jedynie wysoka wartość tego parametru dla czystego wzorca OTA – 91%. Wprowadzono, więc kolejne modyfikacje rozcieńczania ekstraktów metanolowo-wodnych – stosowano różne media rozcieńczające i rozcieńczenia oraz modyfikowano przebieg elucji na kolumnach IAC. Zbadane warianty postępowania przedstawiono zebrano w tabeli I.

Jak wynika z danych zawartych w tabeli I, żaden z wariantów rozcieńczania i chromatografii na kolumnach IAC nie dawał zadowalających rezultatów; jedynie wariant z odtluszczeniem ekstraktów, można by uznać za poprawny – w odniesieniu do kolendry i papryki – odzyski 68 i 71%, odpowiednio. Postępowanie to jednak uznano za zbyt uciążliwe i czasochłonne, aby mogło być stosowane w analizie rutynowej. Zastanawiający jest przy tym niezwykle niski odzysk OTA w przypadku goździków, niezależnie od sposobu postępowania. Dlatego w dalszych badaniach zastosowano inny sposób ekstrakcji ochratoksyny A z przypraw; sprawdzono skuteczność ekstrakcji nowym rozpuszczalnikiem ekstrakcyjnym – 1% roztworem wodorowęglanu sodowego. Analizy wg tego wariantu wykonano dla próbek przypraw i wzorca OTA na poziomie fortyfikacji 5 µg/kg. Wyniki badań wstępnych – średnie z dwóch powtórzeń, zebrano w tabeli II.

Odnotowano wyraźną poprawę wartości odzysku OTA ze wszystkich badanych surowców, jednak odzysk z goździków – rzędu 18%, był w dalszym ciągu nie do przyjęcia.

Zbadano funkcjonowanie kolumny IAC na różnych etapach elucji zanieczyszczeń i ochratoksyny A w odniesieniu do ekstraktu z goździków uzyskanego w sposób omówiony powyżej. W tabeli III zebrano wartości odzysków OTA w poszczególnych eluatach z kolumny IAC.

Tabela I. Ekstrakcja OTA metanolem z wodą; warianty oczyszczania na kolumnach IAC
OTA extraction with methanol and water: clean-up variants on IAC column

Wariant postępowania	Rodzaj próbki	Odzysk OTA (%)
a) <u>Rozcieńczenie</u> : 10 ml ekstraktu + 40 ml H ₂ O <u>Chromatografia na kolumnie IAC</u> : 10 ml rozcieńczonego ekstraktu, 10 ml buforu PBS, 10 ml H ₂ O, elucja OTA metanolem	Imbir Kolendra Goździki <u>Wzorzec OTA</u>	10,9 48,4 4,1 <u>91,3</u>
b) <u>Rozcieńczenie</u> : 10 ml ekstraktu + 40 ml 5 % wodnego roztworu Tween-20 <u>Chromatografia na kolumnie IAC</u> : jak w wariantcie a)	Kolendra	3,2
c) <u>Chromatografia na kolumnie IAC</u> : 10 ml rozcieńczonego ekstraktu jak w wariantcie b), 10 ml 5 % Tween-20 w buforze PBS, 10 ml H ₂ O, elucja OTA metanolem	Kolendra	1,6
d) <u>Rozcieńczenie</u> : 10 ml ekstraktu + 40 ml H ₂ O <u>Chromatografia na kolumnie IAC</u> : 10 ml rozcieńczonego ekstraktu, 10 ml 5 % Tween-20 w buforze PBS, 10 ml H ₂ O, elucja OTA metanolem	Kolendra	38,3
e) <u>Odtłuszczenie</u> : 3-krotna ekstrakcja n-heksanem 20 ml ekstraktu metanolowo-wodnego <u>Rozcieńczenie</u> : 10ml odtłuszczonego ekstraktu + 40 ml H ₂ O <u>Chromatografia na kolumnie IAC</u> : 10 ml rozcieńczonego ekstraktu, 10 ml buforu PBS, 10 ml H ₂ O, elucja OTA metanolem	Imbir Kolendra Pieprz czarny Papryka Goździki <u>Wzorzec OTA</u>	22,4 68,2 22,8 70,8 2,84 <u>93,7</u>

Sumaryczny odzysk ochratoksyny A ze wszystkich eluatów opuszczających kolumnę był bliski 100 % (96 %). Na podstawie analizy uzyskanych frakcji stwierdzono, że złożone w kolumnach nie jest odpowiednie dla matrycy goździków. Należy przypuszczać, że niektóre składniki tego surowca, np. eugenol, blokują miejsca aktywne przeciwciał specyficznych dla ochratoksyny A i dlatego znaczna jej część ulega wymyciu już na etapie nanoszenia na kolumnę ekstraktu (tabela III, eluat 1). Należy podkreślić, że nieliczne prace dotyczące oznaczania ochratoksyny A w przyprawach kulinarnych [2, 14, 16] nie wymieniają goździków jako materiału do badań.

Porównując zbadane warianty ekstrakcji i oczyszczania na kolumnach IAC można przyjąć, że najbardziej odpowiednia do wszystkich badanych przypraw, z wyjątkiem goździków, okazała się ekstrakcja 1% roztworem wodnym wodorowęglanu sodu; ze względu na stosunkowo wysokie wartości średniego odzysku dla większości zbadanych rodzajów próbek, ten sposób ekstrakcji uznano za optymalny. Na podstawie przeprowadzonych badań przyjęto następujący schemat oznaczania ochratoksyny A w próbkach imbiru, kolendry, pieprzu czarnego i papryki: 1) ekstrakcja 1% roztworem NaHCO₃; 2) rozcieńczenie ekstraktu buforem PBS-0,01% Tween-20; 3) nanoszenie ekstraktu na kolumnę powinowactwa immunologicznego i wymywanie roztworem PBS/Tween, a następnie wodą oraz 4) elucja OTA metanolem.

Tabela II. Średni odzysk ochratoksyny A (ekstrakcja 1% NaHCO₃)
Mean recovery ochratoxin A (extraction with 1% NaHCO₃)

Rodzaj próbki	Odzysk OTA (%)
Imbir	78,7
Kolendra	53,4
Pieprz czarny	65,2
Papryka czerwona	74,2
Goździki	17,9
Wzorzec OTA	91,3

Tabela III. Odzysk ochratoksyny A z goździków w eluatach z kolumn IAC
Recovery of ochratoxin A in cloves IAC column eluates

Rodzaj eluatu z kolumny IAC	Odzysk OTA w %
Eluat 1 po naniesieniu ekstraktu	55,4
Eluat 2 po elucji buforem OBS/Tween-20	0,00
Eluat 3 po przemyciu wodą kolumny	21,2
Eluat 4 po elucji OTA metanolem	39,6
Sumaryczny odzysk OTA	96,2

W celu określenia podstawowych parametrów statystycznych metody, próbki badanych przypraw fortyfikowano ochratoksyną A na poziomie: 5 i 15 µg/kg. Wartości średniego odzysku, odchylenia standardowego i współczynnika zmienności zebrano w tabeli IV, przy czym, tam gdzie było to konieczne, w obliczeniach uwzględniono uprzednio oznaczoną naturalną zawartość ochratoksyny A w próbkach.

Jak wynika z przedstawionych danych, wartości średniego odzysku ochratoksyny A, w zależności od poziomu fortyfikacji i rodzaju próbki, zawierały się w granicach od 61 do 82%, przy czym wyraźnie niższe odzyski stwierdzono w przypadku próbek kolendry i pieprzu czarnego. Być może, przyczyną jest, podobnie jak w przypadku goździków, jeden lub więcej składników zawartych w tych przyprawach, które destabilizują pracę kolumny IAC. Wymaga to dalszych badań; być może generalna zmiana sposobu ekstrakcji i/lub oczyszczania ekstraktów (dodatkowe oczyszczanie przed chromatografią na kolumnach IAC) przyniosłoby pozytywne rezultaty. Interesujące byłoby również zbadanie w doświadczeniach modelowych wpływu wyizolowanych i zidentyfikowanych składników omawianych przypraw na funkcjonowanie kolumn powinowactwa immunologicznego.

Powtarzalność metody w obrębie laboratorium określona względnym odchyleniem standardowym RSD% wynosiła od 1,4 do 7,8%, co mieści się w akceptowanych granicach [11].

Dla pełniejszego scharakteryzowania metody wyznaczono również granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ); wynoszą one, odpowiednio: 0,02 i 0,06 µg/kg. Nato-

Tabela IV. Średni odzysk ochratoksyny A z próbek przypraw po ekstrakcji 1% NaHCO₃
Mean recovery of ochratoxin A extracted with 1% NaHCO₃ from spices

Poziom fortyfikacji	Imbir	Kolendra	Pieprz czarny	Papryka
5 µg/kg				
Średni odzysk %	80,1	61,4	63,8	75,8
SD	0,1358	0,2389	0,1568	0,1984
RSD %	3,4	7,8	4,9	5,2
15 µg/kg				
Średni odzysk %	81,6	70,8	75,0	79,5
SD	0,1689	0,3364	0,2918	0,5889
RSD %	1,4	3,2	2,6	4,6

SD – odchylenie standardowe

RSD% – względne odchylenie standardowe (współczynnik zmienności)

miast zakres liniowości metody zawierał się w szerokim przedziale stężeń ochratoksyny A, bo od 0,02 do 600 µg/kg, a jej praktyczny zakres roboczy wynosił 0,02-15 µg/kg.

Należy wspomnieć, że w wyselekcjonowanych próbkach przypraw stosowanych do badań odzysku metody stwierdzono następujące, naturalne poziomy ochratoksyny A w: imbirze 4 µg/kg, w kolendrze 3,5 µg/kg, w pieprzu czarnym 3,4 µg/kg oraz w papryce czerwonej 4,6 µg/kg.

WNIOSKI

1. Metoda ekstrakcji ochratoksyny A roztworem NaHCO₃ oraz oczyszczania ekstraktów na kolumnach IAC okazała się przydatna do kolendry, imbiru, papryki i pieprzu czarnego.

2. W przypadku ekstraktów z goździków stwierdzono, niezależnie od sposobu ekstrakcji, przedwczesną elucję ochratoksyny A z kolumn IAC, w związku z czym opisana metoda oznaczania ochratoksyny A nie może być stosowana do tego surowca.

3. Zawartości ochratoksyny A w pilotażowo zbadanych próbkach przypraw mogą świadczyć o realnym zagrożeniu skażeniem tą mikotoksyną omawianych produktów.

L. Czerwiecki, G. Wilczyńska

DETERMINATION OF OCHRATOXIN A IN SPICE

Summary

The method of determination of ochratoxin A in some spices: coriander, cloves, ginger, paprika, black pepper was described. Depending on kind of matrix, extraction with metanol/water (80/20) or with solution of 1% NaHCO₃ and several variants of clean-up on IAC columns were investigated. The most useful extraction solvent appeared water solution of 1% NaHCO₃. In case of cloves only, none of the methods of extraction and clean-up variants was appropriate. The mean recovery of the method, dependent on kind of sample, was 61-82% and RSD% 1.4 and 7.8. The estimated LOD and LOQ were 0.02 and 0.06 µg/kg, respectively. In samples of spice used for method preparation, ochratoxin A was detected on the level 3.4-4.6 µg/kg.

PIŚMIENNICTWO

1. *Abbas H. K., Mirocha Ch. J.* i wsp.: Rapid solvent efficient method for liquid chromatographic determination of ochratoxin A in corn barley, and kidney: collaborative study. *J. AOAC Int.* 1992, 75, 481-487.
2. *Akiyama H., Kikuchi Y., Chen D., Goda Y., Takatori M., Ichinoe M., Toyoda M.*: A rapid analytical method of ochratoxin A (OTA) in foods and natural contamination of OTA in red pepper. *Revue Medicine Veterinaire. Mycotox 98. International Symposium Mycotoxins in Food Chain. Processing and Toxicological Aspects.* 2-4 July, Toulouse, 1998, 502.
3. *Czerwiecki L.*: Determination of ochratoxin A in infant and children cereal foods by reversed phase – high performance liquid chromatography (RP-HPLC). *Polish Journal of Food and Nutrition Science* 1994, 3, 67-73.
4. *Domijan A.D., Peraica M., Jurjevic Z., Ivic D., Cvetkovic B.*: Fumonisin B₁, fumonisin B₂, zearalenone and ochratoxin A contamination of maize in Croatia. *Food Add. Contam.* 2005, 22, 677-680.
5. *Miraglia M., Brera C., Pazzaglioni B., Grossi S.*: Reports on tasks for scientific cooperation. Report of experts participating in task 3.2.7. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states. January 2002, 1-153.
6. *Nakajima M., Tsubouchi H., Miyabe M.* i wsp.: Survey of aflatoxin B₁ and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. *Journal of Agric. and Food Chem.* 1997, 9, 77-83.
7. *Ochratest. Instrukcja stosowania.* Vicam, 4 kwiecień, 1977, 27.
8. *Ochratest Instrukcja stosowania.* Vicam, 4 kwiecień, 1977, 29.
9. *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.
10. *Pittet A., Tornare D., Huggett A.*, i wsp.: Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 3564-3569.
11. Richtlinie 2002/26/EG der Kommission vom 13 März 2002, 30-43.
12. *Scudamore K. A., Donald Mac, J.C.*: A collaborative study of an HPLC method for determination of ochratoxin A in wheat using immunoaffinity column clean-up. *Food Add. Contam.* 1998, 15, 401-410.
13. *Thellmann A., Weber W.*: Determination of ochratoxin A in cereals, malt and beer, after preconcentration and separation on an immunoaffinity columns, by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Deutsche Lebensm. Rundsch.* 1997, 93, 1-3.
14. *Thirumala-Devi K., Mayo M.A., Gopal Reddy* i wsp.: Occurrence of ochratoxin A in black pepper, coriander, ginger and turmeric in India. *Food Add. Contam.* 2001, 18, (9), 830-835.
15. Verordnung (EG) Nr. 472/2002 der Kommission vom 12 März 2002 zur Änderung der Verordnung Nr. 466/2001 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln.
16. *Vrabcheva T., Gareis M., Bresch H., Bodeecheitel C., Engel G., Majerus P., Rosner H., Wolff J.*: Occurrence of ochratoxin A and B in spices and herbs. *Revue Medicine Veterinaire. Mycotox 98. International Symposium Mycotoxins in Food Chain. Processing and toxicological aspects.* 2-4 July, Toulouse, 1998, 553.

Otrzymano: 2005.09.15