

LUDWIK CZERWIECKI, GRAŻYNA WILCZYŃSKA

OPTIMALIZACJA METOD OZNACZANIA AFLATOKSYN W ŻYWNOSCI Z ZASTOSOWANIEM POSTKOLUMNOWEGO TWORZENIA POCHODNYCH Z BROMEM

OPTIMIZATION OF DETERMINATION OF AFLATOXINS IN FOODS WITH BROMINE POSTCOLUMN DERIVATIZATION

Zakład Analizy Żywności
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
02-532 Warszawa, ul. Rakowiecka 36
e-mail: czerwiecki@ibprs.pl
p.o. kierownika Zakładu: doc. dr hab. R. Jędrzejczak

Opisano optymalne procedury oznaczania aflatoksyn w różnorodnych produktach, m.in. w orzechach i w przetworach zbożowych. Aflatoksyny oznaczano techniką HPLC, po postkolumnowej reakcji z bromem. Średni odzysk metody, w zależności od rodzaju próbki i aflatoksyny, wynosił od 52 do 102 %, a wykrywalność 0,01-0,1 µg/kg.

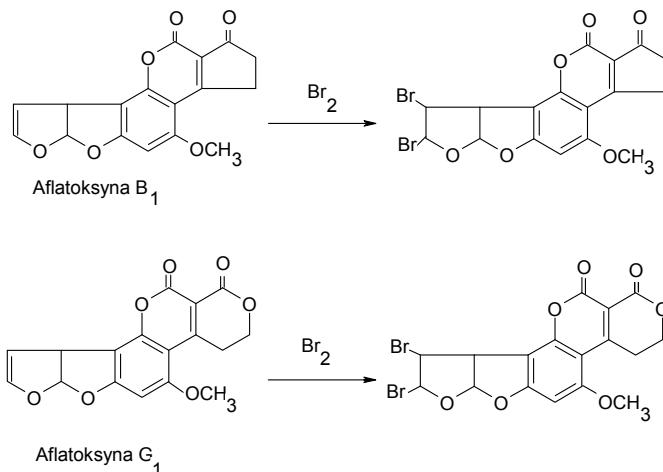
Słowa kluczowe: aflatoksyny, pochodne z bromem, HPLC, produkty spożywcze
Key words: aflatoxins, bromine derivatives, HPLC, foods

WSTĘP

Właściwości toksyczne aflatoksyn są od lat powszechnie znane, toteż nic dziwnego, iż metody ich identyfikacji i oznaczania są bezustannie doskonalone. Współcześnie najczęściej stosowana jest technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (HPLC-RP) z detekcją fluorymetryczną [4, 6, 11]. Ze względu na niską fluorescencję w roztworach nie uwodornionych aflatoksyn - aflatoksyn B₁ i G₁, stosowane są różne sposoby tworzenia intensywnie fluoryzujących postaci tych związków w celu umożliwienia ich analizy metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Istnieją zasadniczo dwa rozwiązania tego problemu: 1) przeprowadzenie reakcji przed podaniem próbki na kolumnę chromatografu cieczowego - tzw. reakcja „prekolumnowa”, 2) reakcja po elucji aflatoksyn z kolumny, przed ich dotarciem do detektora - reakcja „postkolumnowa”. Do kategorii pierwszej zaliczyć można tworzenie pochodnych z kwasem trifluoroctowym (TFA) [5, 6, 12], jest to jednak dosyć kłopotliwe, m.in. ze względu na nietrwałość powstających produktów. Metoda wyklucza np. stosowanie autosamplera i nie pozwala na analizowanie w krótkim czasie większej liczby próbek. Drugi sposób tworzenia pochodnych polega na reakcji aflatoksyny B₁ i G₁ z roztworem jodu lub na reakcji z bromem generowanym elektrochemicznie i jest o wiele korzystniejszy dla potrzeb techniki HPLC [2, 7, 13, 14,].

Chociaż obie ostatnio wymienione metody wydają się być porównywalne, jednak w przypadku roztworu jodu wymagana jest dodatkowa pompa wolna od pulsacji. Natomiast do generowania bromu niezbędne jest urządzenie o zwyczajowej nazwie KOBRA-Cell. Powstający w nim brom w wyniku elektrolizy KBr, znajdującego się w fazie ruchomej, reaguje z aflatoksynami zgodnie z reakcją przedstawioną na ryc.1 tworząc intensywnie fluoryzujące pochodne wykrywane przez detektor.

Połączenie przystawki KOBRA z zestawem do chromatografii cieczowej jest bardzo proste i może być wykonane w krótkim czasie. Na rycinie 2 przedstawiono schemat urządzenia i

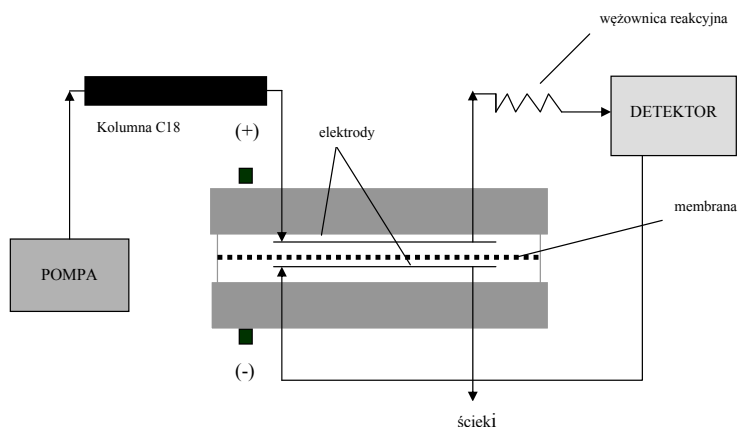


Ryc. 1. Reakcja aflatoksyn z bromem

Fig. 1 Derivatization of aflatoxins with bromine

jego podłączenia do układu HPLC.

Niezależnie jednak od obranego sposobu przeprowadzania reakcji, w analityce mikotoksyn, w ujęciu kompleksowym, niezbędne jest odpowiednie dostosowanie całego toku analitycznego do



Ryc. 2. Schemat zestawu Kobra - HPLC

Fig. 2 Diagram of Kobra Cell - HPLC set

rodzaju badanego produktu. Takie podejście obejmuje sposób ekstrakcji i oczyszczania ekstraktów, warunki HPLC i detekcji; przy czym nawet pozornie nieznaczne niuanse toku analitycznego wywierają niekiedy decydujący wpływ na końcowy wynik i decydują o jakości metody.

Niniejsza praca jest próbą takiego kompleksowego ujęcia całości postępowania analitycznego w odniesieniu do aflatoksyn B₁, G₁, B₂ i G₂ oznaczanych w możliwie szerokiej gamie produktów spożywczych pochodzenia roślinnego takich jak: orzechy, przetwory zbożowe oraz przyprawy kulinarne.

MATERIAŁY I METODY

W y p o s a ż e n i e

Oznaczenia wykonywano za pomocą zestawu do wysokosprawnej chromatografii cieczowej firmy Knauer składającego się z następujących elementów: pompy K1001, zaworu dozującego z pętlą 100 µl, kolumny chromatograficznej RP-C18 Nucleosil 5µm oraz RP-C18 Nova Pak, Waters wraz z odpowiednimi przedkolumnami, degazera połączonego z systemem chromatograficznym Well Chrom Knauer, komputera z programem integrującym Eurochrom HPLC Software -1.65, Knauer i drukarki.

Stosowano ponadto: ogniwo elektrochemiczne KOBRA Cell do przeprowadzania aflatoksyn B₁ i G₁ we fluoryzujące pochodne, R-Biopharm Rhone LTD; zestaw do chromatografii powinowactwa immunologicznego (statyw, zbiornik na ciecz elucyjną, przewody, pompka strzykawkowa), Vicam; młynek laboratoryjny, typ WZ-1, Społem CZSS; homogenizator laboratoryjny, Waring; generator ultradźwięków, Büchler; naczynka reakcyjne poj. 5 ml, Pierce; mikrostrzykawki poj. 10-100 µl, Hamilton 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, Milipore; 2) metanol do HPLC, Lab-Scan Ltd; 3) acetonitryl do HPLC, Lab-Scan Ltd; 4) benzen cz.d.a., J.T. Baker; 5) kwas azotowy 65% Suprapur, Merck; 6) bromek potasu 99% do spektroskopii IR, Aldrich; 7) wzorce aflatoksyn B₁, B₂, G₂ w substancji a 5 mg oraz aflatoksyny G₁ 10mg, Sigma; 8) roztwory wzorcowe podstawowe aflatoksyn B₁, B₂, G₁ i G₂ o stężeniu 581; 301; 348 i 120 µg/ml, odpowiednio, w mieszaninie benzenu z acetonitrylem (98+2v/v) (stężenia wzorców określono spektrofotometrycznie, wg AOAC [8]); 9) roztwór wzorcowy roboczy mieszaniny aflatoksyn B₁, B₂, G₁, G₂ o stężeniu 1 µg/ml w mieszaninie benzenu z acetonitrylem j. w. oraz roztwory robocze rozcieńczone w zależności od potrzeb; 10) podchloryn sodu, roztwór 5%, POCH S.A. Gliwice; 11) chlorek sodu cz.d.a., POCH S.A. Gliwice; 12) Tween – 20, Sigma (i jego 10% roztwór wodny); 13) kolumnienki powinowactwa immunologicznego (IAC) AFLA Test P, Vicam; 14) sączki bibułowe drobno włókniste, Vicam; 15) sączki ilościowe bibułowe Grade 388, Filtrak; 15) azot sprężony z butli, techniczny.

Do badań, tam gdzie było to niezbędne, stosowano rozdrobnione w młynku laboratoryjnym jednolite próbki orzechów, pszenicy i mąki pszennej, żytniej, kaszy jęczmiennej i gryczanej, makaronów, ciastek, papryki, pieprzu, mieszanek przypraw i suszonych warzyw fortyfikowane odpowiednimi poziomami aflatoksyn. Materiał do badań na obecność aflatoksyn stanowiły również próbki wymienionych produktów zakupione w handlu detalicznym.

M e t o d y k a

Badania wstępne z użyciem roztworów wzorowych

W doświadczeniach z użyciem roztworów wzorowych mieszaniny aflatoksyn B₁, B₂, G₁ i G₂ poprzedzających badania z zastosowaniem matryc spożywczych, określono warunki wysokosprawnej chromatografii cieczowej po reakcji aflatoksyn B₁ i G₁ z bromem generowanym w ogniwie KOBRA połączonym z zestawem do HPLC zgodnie z zaleceniami producenta. Do naczynek reakcyjnych od-

mierzano mieszaninę wzorca aflatoksyn B₁, B₂, G₁, G₂ w ilościach odpowiadających 0,1 μg/kg każdej z aflatoksyn (dla toku analitycznego wcześniej opisanej metody własnej) [6]. Po odparowaniu rozpuszczalnika pozostałość w naczynkach rozpuszczano w 3 ml mieszaniny o składzie: metanol + acetonitryl + woda (15 + 20 + 65 v/v) lub metanol + acetonitryl + woda (20 + 20 + 60 v/v). Następnie wykonywano chromatografię cieczową w różnych wariantach. Jako fazy ruchome stosowano następujące kombinacje rozpuszczalników: metanol + acetonitryl + woda (15 + 20 + 65 v/v) i metanol + acetonitryl + woda (20 + 20 + 60 v/v); oba układy z dodatkiem KBr i HNO₃ w ilościach 120 mg i 100 μl/litr cieczy, odpowiednio. Prędkość przepływu fazy ruchomej zmieniano w zakresie od 0,7 do 1,0 ml/min. Równoległe określono optymalne długości fal wzbudzenia i emisji detektora. Wykonano szereg oznaczeń przy zmiennych długościach fali emisji detektora fluorymetrycznego: 425, 430, 455 nm i przy stałej długości fali wzbudzenia 362 nm. W odrębnych doświadczeniach porównano, przy użyciu wspomnianych roztworów wzorcowych, warunki rozdziału aflatoksyn na kolumnach C18 Nucleosil oraz Nova Pak.

Ekstrakcja aflatoksyn z różnych produktów spożywczych

Do ekstrakcji aflatoksyn z badanych matryc zastosowano metody opisane w procedurach metodycznych firmy Vicam przeznaczone do ich oznaczania w różnych produktach i surowcach spożywczych [1]; tam gdzie było to niezbędne wprowadzano odpowiednie modyfikacje.

a) Orzechy arachidowe, laskowe

Naważkę 50,0 g zmielonej próbki i 10,0 g NaCl ekstrahowano w homogenizatorze przez 2 min 250 ml mieszaniny metanolu z wodą (70 + 30 v/v). Homogenat sączono przez sączek fałdowany z bibuły. Następnie pobierano 30 ml przesącza, który rozcieńczano 60 ml wody. Po dokładnym wymieszaniu roztwór sączono ponownie przez sączek drobno włóknisty.

b) Papryka sproszkowana, chili

Naważkę 25,0 g próbki i 5,0 g NaCl ekstrahowano w homogenizatorze przez 2 min. 100 ml mieszaniny metanolu z wodą (80 + 20 v/v). Homogenat sączono przez sączek fałdowany z bibuły. Następnie pobierano 10 ml przesącza, który rozcieńczano 40 ml wody. Po dokładnym wymieszaniu roztwór sączono przez sączek drobno włóknisty.

c) Pieprz czarny

Naważkę 25,0 g zmielonej próbki i 5,0 g NaCl ekstrahowano w kolbie Erlenmayera 100 ml mieszaniny metanolu z wodą (80 + 20 v/v) wytrząsając na wytrząsarce w czasie 45 min. Ekstrakt sączono przez sączek fałdowany z bibuły. Następnie pobierano 5 ml przesącza, który rozcieńczano 20 ml 10% roztworu Tween-20. Po dokładnym wymieszaniu roztwór sączono przez sączek drobno włóknisty.

d) Pszenica, mąka

Naważkę 50,0 g zmielonej próbki pszenicy i 10,0 g NaCl ekstrahowano w homogenizatorze przez 2 min 200 ml mieszaniny metanolu z wodą (80 + 20 v/v). W przypadku mąki 50,0 g próbki i 10,0 g NaCl wytrząsano z 200 ml mieszaniny jw. na wytrząsarce w czasie 45 min. Homogenaty sączono przez sączek fałdowany z bibuły. Następnie pobierano 10 ml przesącza, który rozcieńczano 40 ml wody. Po dokładnym wymieszaniu roztwór sączono ponownie przez sączek drobno włóknisty.

Opisane sposoby ekstrakcji zastosowano, w późniejszych etapach pracy również do produktów handlowych badanych na obecność aflatoksyn

Oczyszczanie ekstraktów

Dla określenia optymalnych warunków oczyszczania ekstraktów z badanych matryc na kolumnach powinowactwa immunologicznego (IAC), stosowano metody opisane w procedurach firmy Vicam [1] oraz własne modyfikacje w zależności od potrzeb.

a) Orzechy laskowe, arachidowe

Na kolumnkę IAC umieszczoną w zestawie do chromatografii powinowactwa immunologicznego nanoszono 15 ml rozcieńczonego ekstraktu i po spłynięciu cieczy złoże przemywano 20 ml wody i osuszano. Oba eluaty odrzucano, a aflatoksyny eluowano z kolumny do naczynka reakcyjnego 2 ml metanolu.

Eluat odparowywano w strumieniu azotu w temperaturze 40°C, a pozostałość bezpośrednio przed analizą HPLC rozpuszczano w 3 ml mieszaniny metanolu, acetonitrylu i wody (20 + 20 + 60 v/v).

b) Papryka, chili

Na kolumnię IAC nanoszono 4 ml rozcieńczonego ekstraktu i po spłynięciu cieczy złoże przemywano 20 ml mieszaniny metanolu z wodą (20 + 80 v/v). Oba eluaty odrzucano, a aflatoksyny eluowano z kolumny 1 ml metanolu i postępowano wg opisu podanego wyżej.

c) Pieprz czarny

Na kolumnię IAC nanoszono 4 ml rozcieńczonego ekstraktu i po spłynięciu cieczy złoże osuszano strumieniem powietrza, przemywano 20 ml wody i ponownie osuszano. Oba eluaty odrzucano, a aflatoksyny eluowano z kolumny 1 ml metanolu reakcyjnego i postępowano wg opisu podanego w poprzednich częściach pracy.

d) Pszenica, mąka

Na kolumnię IAC nanoszono 4 ml rozcieńczonego ekstraktu i po spłynięciu cieczy kolumnę osuszano strumieniem powietrza, przemywano 5 ml wody i ponownie osuszano. Oba eluaty odrzucano, a aflatoksyny eluowano z kolumny 1 ml metanolu reakcyjnego; dalej postępowano jak wyżej.

Odrębny rodzaj badań stanowiły doświadczenia na modelowych roztworach standardów aflatoksyn przeprowadzone wg następującego schematu:

- wariant I: do trzech naczynek reakcyjnych pobierano po 5 µl mieszaniny wzorców aflatoksyn (1 µg/ml) i po usunięciu rozpuszczalnika w strumieniu azotu w temperaturze pokojowej pozostałość rozpuszczano 1 ml metanolu, a rozpuszczalnik ponownie usuwano jak poprzednio. Bezpośrednio przed wykonaniem analizy HPLC suchą pozostałość rozpuszczano w 3 ml mieszaniny metanolu, acetonitrylu i wody (20 + 20 + 60 v/v);
- wariant II: wariant ten stanowił powtórzenie postępowania opisanego wyżej; jedynie rozpuszczalniki odparowywano w temperaturze 40°C;
- wariant III: do kolbki stożkowej pobierano 5 µl mieszaniny wzorców aflatoksyn (1 µg/ml) i po usunięciu rozpuszczalnika w strumieniu azotu w temperaturze pokojowej, do kolbki dodawano 15 ml mieszaniny metanolu i wody (23 + 77 v/v). Po dokładnym wymieszaniu zawartość kolbki przenoszono ilościowo na kolumnę IAC i po przemyciu złoża 20 ml wody, aflatoksyny eluowano 1 ml metanolu.

Wg opisanego schematu dla wariantu III wykonano 4 równoległe doświadczenia, przy czym metanolowe eluaty, w dwóch naczynkach reakcyjnych, odparowywano w strumieniu azotu w temperaturze 40°C, a suchą pozostałość, bezpośrednio przed analizą HPLC, rozpuszczano w 3 ml mieszaniny metanolu, acetonitrylu i wody (20 + 20 + 60 v/v). Objętość dwóch pozostałych eluatów w naczynkach uzupełniano powyższą mieszaniną do 3 ml. Kontrolę, wzorzec odniesienia, stanowiło 5 µl mieszaniny wzorców aflatoksyn (1 µg/ml), który odparowano i rozpuszczano ponownie w 3 ml mieszaniny metanolu, acetonitrylu i wody.

W kolejnych etapach pracy wykonano: 1) oczyszczanie ekstraktów badanych produktów (uprzednio fortyfikowanych aflatoksynami) oraz 2) oczyszczanie ekstraktów produktów handlowych, w ramach badań na występowanie w nich aflatoksyn, wg schematu: elucja z kolumny IAC 1 ml metanolu → uzupełnienie objętości eluatu do 3 ml, mieszaniną metanolu, acetonitrylu i wody (20 + 20 + 60 v/v).

Analiza HPLC

Na kolumnę Nova Pak nanoszono po 100 µl roztworów uzyskanych w badaniach modelowych oraz oczyszczanych w różny sposób ekstraktów produktów spożywczych fortyfikowanych aflatoksynami i ekstraktów produktów handlowych, w ramach badań na występowanie w nich aflatoksyn (schemat po elucji z kolumny IAC: 1 ml metanolu → uzupełnienie do objętości 3 ml mieszaniną metanolu, acetonitrylu i wody). Fazę ruchomą stanowił układ: metanol, acetonitryl, woda (20 + 20 + 60) z dodatkiem 120 mg 99 % KBr i 100 µl 65 % kwasu azotowego/l cieczy, prędkość przepływu wynosiła 0,7 ml/min. Stosowano detektor fluorescencyjny przy długości fali $\lambda = 362/430$ nm. Zawartość aflatoksyn w próbkach obliczano z trzypunktowej krzywej wzorcowej, dobierając stężenia wzorców i ich objętości w

zależności od przewidywanych poziomów aflatoksyn w badanych matrycach i korzystając z programu integracyjnego dla wzorca zewnętrznego.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Jak wykazały badania wstępne, korzystniejsze warunki rozdziału czterech analizowanych aflatoksyn uzyskano dla układu rozwijającego stanowiącego mieszaninę metanolu, acetonitrylu i wody (20 + 20 + 60 v/v) z dodatkiem KBr i HNO₃, w porównaniu z mieszaniną o nieco zmodyfikowanym składzie: metanol, acetonitryl, woda (15 + 20 + 65 v/v) – również z dodatkiem KBr i HNO₃. Wyraźny wpływ na rozdział chromatograficzny posiadał również rozpuszczalnik wzorca aflatoksyn/ekstraktu; piki lepiej rozdzielone otrzymano w przypadku zastosowania jako solwenta mieszaniny o składzie: metanol, acetonitryl, woda (20 + 20 + 60 v/v).

Robocza, długość fali wzbudzenia i emisji fluorescencji dla wszystkich badanych aflatoksyn wynosiła: 362/430 nm. Większą powtarzalność odpowiedzi detektora i lepszy rozdział zapewniała kolumna Nova Pak, w porównaniu z kolumną wypełnioną Nucleosilem, co ilustrują przedstawione w tabeli I powierzchnie pików aflatoksyn i ich wartości RSD % oraz chromatogramy jako ryciny 3 i 4.

Tabela I. Powtarzalność rozdziału aflatoksyn na różnych kolumnach

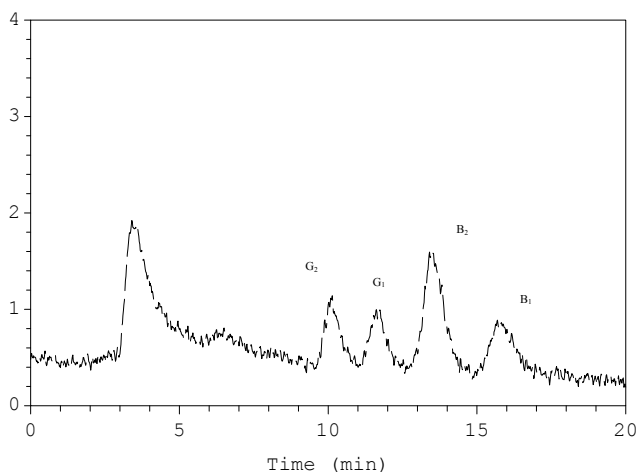
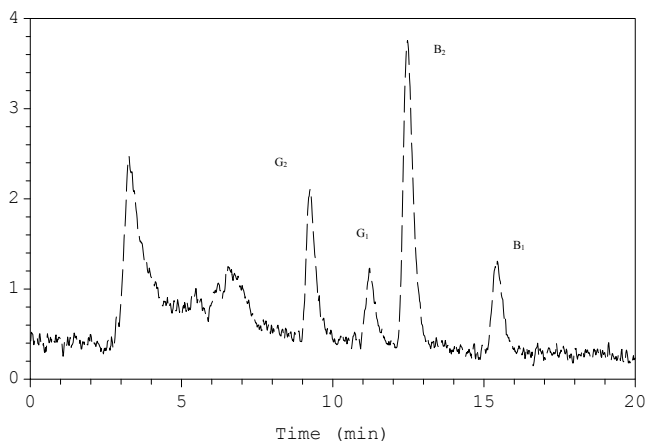
Table I. Separation repeatability of aflatoxins on several chromatographic columns

Rodzaj kolumny	Powierzchnia piku aflatoksyny B ₁ [mVmin]	Powierzchnia piku aflatoksyny B ₂ [mVmin]	Powierzchnia piku aflatoksyny G ₁ [mVmin]	Powierzchnia piku aflatoksyny G ₂ [mVmin]
Nucleosil C18	0,481	0,878	0,393	0,414
	0,499	0,869	0,320	0,360
	0,402	0,878	0,360	0,392
	0,483	0,887	0,326	0,355
	0,426	0,957	0,306	0,392
	0,443	0,924	0,347	0,382
SD µg/kg/RSD %	0,03791/8,33	0,03439/3,83	0,03157/9,23	0,02207/5,77
Nova Pak C18	0,418	1,337	0,287	0,577
	0,439	1,313	0,276	0,570
	0,430	1,322	0,290	0,577
	0,424	1,314	0,276	0,582
	0,434	1,332	0,284	0,593
	0,414	1,313	0,259	0,589
SD µg/kg /RSD %	0,00958/2,24	0,01049/0,79	0,01120/4,04	0,00850/1,46

SD – odchylenie standardowe

RSD% -względne odchylenie standardowe

Chociaż, zbiór procedur opublikowanych przez firmę Vicam [1] zawierał opisy postępowania analitycznego odnoszące się do aflatoksyn w badanych w niniejszej pracy produktach, w niektórych przypadkach, np. do orzechów, stosowano mieszaninę ekstrakcyjną metano-

Ryc. 3. Rozdział aflatoksyn B₁, B₂, G₁, G₂ na kolumnie NucleosilFog. 3 Separation of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ on Nucleosil columnRyc. 4. Rozdział aflatoksyn B₁, B₂, G₁, G₂ na kolumnie Nova PakFig. 4 Separation of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ on Nova Pak column

lu z wodą w proporcjach (80+20 v/v), a nie (60+40 v/v). W badaniach wykorzystano bowiem doświadczenia zdobyte podczas stosowanej wcześniej metody oznaczania w orzechach arachidowych aflatoksyn, po reakcji z TFA [6]. Jedyną zmianą wprowadzoną na wstępnym etapie prac była próba elucji aflatoksyn z kolumny IAC 2 ml, zamiast 1ml metanolu i rozpuszczanie pozostałości, po odparowaniu eluatu, w 3 ml mieszaniny metanolu, acetonitrylu i wody (20+20+60 v/v). Postępowano tak również w przypadku ekstraktów pozostałych matryc. Ze względu na małą powtarzalność wyników i odzyski rzędu <50 – 60 %, po wykluczeniu bezpośredniego wpływu reakcji z bromem i ewentualnego oddziaływania różnorodnych czynników podczas chromatografii powinowactwa immunologicznego, przyjęto założenie, że jedną z przyczyn może być sposób odparowywania eluatu z kolumny. Przeprowadzono

zatem kontrolne oznaczenia na wzorcach aflatoksyn wg opisanych w części doświadczalnej trzech wariantów. Wyniki ujęto w tabeli II.

Tabela II. Odzysk aflatoksyn z roztworów modelowych
Table II. Recovery of aflatoxins from model solutions

Wariant	Aflatoksyna B ₁ µg/kg	Aflatoksyna B ₂ µg/kg	Aflatoksyna G ₁ µg/kg	Aflatoksyna G ₂ µg/kg
I	5,269	5,344	5,122	5,383
	4,825	5,571	4,876	5,542
	4,215	4,726	3,823	4,311
Średnia	4,770	5,214	4,607	5,079
Odzysk%	95,4	104,2	92,1	101,6
II	2,867	3,249	1,000	1,221
	3,994	4,857	2,110	2,321
	4,462	5,131	4,404	4,873
Średnia	3,774	4,412	2,505	2,805
Odzysk%	75,5	88,2	50,1	56,1
III Eluat odparowywany	3,472	4,147	2,104	2,202
	3,052	4,117	1,983	2,191
Średnia	3,262	4,132	2,043	2,196
Odzysk %	65,2	82,6	40,9	43,9
III Eluat nie odparowywany	4,356	5,048	4,154	4,010
	4,017	5,021	3,966	3,980
Średnia	4,186	5,034	4,060	3,995
Odzysk %	83,7	100,7	81,2	79,9

Analiza wspomnianych danych może sugerować, że zwłaszcza aflatoksyny G₁ i G₂ są szczególnie wrażliwe na temperaturę podczas odparowywania (pomimo nadmuchu strumieniem azotu) - niskie wartości odzysku dla tych aflatoksyn wynoszące 40 – 50 % otrzymano w wariantach doświadczeń na wzorcach, w których odparowywano metanol w temp. 40°C odpowiadający eluatom z kolumny IAC (jak w przypadku analizy produktu). W pozostałych wariantach - I i III (wersja bez odparowywania eluatu), odzyski dla wszystkich aflatoksyn były poprawne.

Na podstawie przeprowadzonych badań przyjęto następujący, optymalny schemat oznaczania aflatoksyn w próbkach badanych produktów: 1) ekstrakcja metanolem z wodą w różnych proporcjach w zależności od rodzaju próbki (zgodnie z opisem podanym w części doświadczalnej), 2) oczyszczanie na kolumnach IAC (uwaga jak wyżej) - przy czym aflatoksyny należy eluować 1 ml metanolu, a eluat uzupełniać do objętości 3 ml mieszaniną metanolu, acetonitrylu i wody (20 + 20 + 60 v/v), 3) HPLC na kolumnie Nova Pak, z detekcją fluorymetryczną przy 362/430 nm, po reakcji z bromem generowanym elektrochemicznie i faza ruchomą: metanol, acetonitryl, woda (20 + 20 + 60 v/v) z dodatkiem KBr i HNO₃.

W celu określenia podstawowych parametrów metody, próbki badanych produktów fortyfikowano aflatoksynami na poziomach:

- orzechy arachidowe 0,1; 1,0; 10,0 µg/kg;
- papryka mielona i pieprz czarny 1,0; 5,0; 10,0 µg/kg;

- pszenica i mąka 0,5; 1,0; 3,0 µg/kg.

Stopnie fortyfikacji próbek dobrano na podstawie maksymalnych dopuszczalnych poziomów aflatoksyn w produktach spożywczych obowiązujących w Polsce i w krajach Unii Europejskiej [3, 9]. I tak np. maksymalna dopuszczalna zawartość aflatoksyny B₁ w orzechach arachidowych wynosi 2 µg/kg, podobnie jak w produktach zbożowych i ziarnie zbóż [3]. Wyniki dla poszczególnych produktów zebrano w tabelach III-IV.

Tabela III. Odzyskiwalność i precyzja metody oznaczania aflatoksyn w różnych produktach

Table III. Recovery and precision of the method of aflatoxins determination in several products

Poziom fortyfikacji µg/kg	Orzechy				Poziom fortyfikacji µg/kg	Papryka				Pieprz czarny			
	Aflatoksyna					Aflatoksyna				Aflatoksyna			
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
0,1 Odzysk% SD RSD%	99,5 0,00165 1,7	99,9 0,00190 1,9	97,9 0,00170 1,7	94,8 0,00105 1,1	1,0 Odzysk% SD RSD%	80,5 0,0094 1,2	83,7 0,0145 1,7	93,4 0,0344 3,7	70,0 0,0273 3,9	101,0 0,0259 2,6	90,3 0,0125 1,4	101,6 0,0253 2,5	92,9 0,0345 3,8
1,0 Odzysk% SD RSD%	87,5 0,04884 5,6	91,9 0,02177 2,4	87,3 0,04330 5,0	84,5 0,00635 0,8	5,0 Odzysk% SD RSD%	82,8 0,0658 1,6	84,9 0,0851 2,0	86,7 0,0505 1,2	54,03 0,2258 8,3	100,8 0,0552 1,1	89,7 0,0703 1,6	95,3 0,2075 4,3	78,3 0,1686 4,3
10,0 Odzysk% SD RSD%	95,4 0,74951 7,8	88,1 0,08516 1,0	89,5 0,44150 4,9	74,8 0,07250 1,0	10,0 Odzysk% SD RSD%	77,8 0,0775 1,0	81,5 0,1190 1,5	81,1 0,2482 3,1	51,6 0,2106 4,1	93,0 0,4786 5,1	91,3 0,0565 0,6	89,0 0,2751 3,1	79,7 0,1095 1,4

SD – odchylenie standardowe

RSD_r% -względne odchylenie standardowe dla wyników w obrębie laboratorium

Tabela IV. Odzyskiwalność i precyzja metody oznaczania aflatoksyn w różnych produktach

Table IV. Recovery and precision of the method of aflatoxins determination in several products

Poziom fortyfikacji µg/kg	Pszenica				Mąka pszenna			
	Aflatoksyna				Aflatoksyna			
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
0,5 Odzysk% SD RSD%	95,0 0,0239 5,0	95,5 0,0160 3,4	93,2 0,0255 5,5	99,9 0,0100 2,0	92,0 0,0167 3,6	90,1 0,0134 3,0	82,9 0,0279 6,7	96,7 0,0152 3,1
1,0 Odzysk% SD RSD%	82,9 0,0065 0,8	84,9 0,0425 5,0	77,9 0,0407 5,2	92,7 0,0542 5,8	79,0 0,0227 2,9	92,8 0,0302 3,2	81,9 0,0527 6,4	100,0 0,0183 1,8
3,0 Odzysk% SD RSD%	82,0 0,1584 6,4	86,2 0,0686 2,6	81,9 0,0954 3,9	91,0 0,0700 2,6	69,5 0,0239 5,0	91,3 0,0045 0,2	73,9 0,0702 3,2	99,2 0,0492 1,6

SD – odchylenie standardowe

RSD_r% -względne odchylenie standardowe dla wyników w obrębie laboratorium

Jak widać z prezentowanych danych, wartości średniego odzysku aflatoksyn B₁, B₂, G₁ oraz G₂ kształtowały się, w zależności od rodzaju produktu, aflatoksyny oraz poziomu fortyfikacji, w granicach od ok. 52 do 102 %. Jego maksymalna wartość dla aflatoksyny B₁, wynosiła w przypadku pieprzu czarnego -101 % oraz 99,5% w próbkach orzechów arachidowych. W większości przypadków wartości tego parametru przekraczały 70% dla aflatoksyn; najniższy odzysk stwierdzono w próbce papryki - aflatoksyna G₂ – 51,6 %, przy fortyfikacji 10 µg/kg (tabele III, IV). Generalnie, przytoczone wielkości średniego odzysku aflatoksyn z badanych produktów były porównywalne z danymi, na które powołują się oryginalne procedury analityczne firmy Vicam [1].

Powtarzalność metody w obrębie laboratorium, określona względnym odchyleniem standardowym RSD_r, była bardzo dobra i wynosiła od 0,6 do 8,3% (aflatoksyna B₂ w pieprzu i G₂ w papryce), tabele III i IV. Chociaż wartości tych nie można odnieść do wymagań określających parametry metod zawartych w Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 401/2006 [10] ze względu na brak takich danych w odnośnych wymaganiach; podane wcześniej wartości odzysku mieszczą się generalnie w akceptowanych granicach określanych we wspomnianym dokumencie.

W celu pełnego scharakteryzowania metody określono także jej granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) w µg/kg ; wynoszą one, odpowiednio: dla orzechów 0,01 i 0,02, dla przypraw 0,05 i 0,1 podobnie jak dla zbóż i mąki.

Jak wynika z przytoczonych danych, LOD oraz LOQ dla wszystkich aflatoksyn w badanych produktach są rzędu setnych bądź dziesiątych części µg na kilogram produktu, co koresponduje z maksymalnymi dopuszczalnymi poziomami aflatoksyn w produktach spożywczych obowiązującymi w Polsce i w krajach Unii Europejskiej [3,9]. Przykładowo, maksymalne poziomy aflatoksyny B₁ w orzechach przeznaczonych do bezpośredniej konsumpcji wynoszą 2 µg/kg, a sumy aflatoksyn B₁, B₂, G₁, G₂ - 4,0 µg/kg, analogicznie jak w zbożach i produktach zbożowych, a w przyprawach kulinarnych, odpowiednio 5 i 10 µg/kg [3, 9]. Zestawienie tych ilości z przytoczonymi wartościami LOD i LOQ świadczy o pełnej przydatności opisanych metod w analizie mikotoksyn w badanych produktach. Należy jeszcze wspomnieć o bardzo szerokim zakresie roboczym metody obejmującym przedział stężeń aflatoksyn, wynoszącym od 0,01 do 30 µg/kg, który pokrywał się praktycznie z zakresem liniowości detektora fluorometrycznego.

Opisaną, optymalną dla poszczególnych surowców metodą zbadano próbki handlowe - ogółem 86 próbek, różnego rodzaju orzechów, pszenicy, mąki i innych przetworów zbożowych, wyrobów cukierniczych oraz przypraw kulinarnych i warzyw suszonych. Wyniki zebrano w tabeli V.

We wszystkich przebadanych produktach stwierdzano zawartości aflatoksyn poniżej dopuszczalnych maksymalnych poziomów obowiązujących w polskim i europejskim ustawodawstwie [3, 9].

Najliczniejszą liczbę próbek skażonych stanowiły orzechy, ciastka i mieszanki przypraw kulinarnych. Dla próbek orzechów pistacjowych i arachidowych stwierdzono skażenie aflatoksynami z grupy B, podobnie jak i dla ciastek. W przypadku próbek mąki pszennej, aflatoksyny wykryto w mące wysoko glutenowej, ale ich poziomy były również znacznie niższe od dopuszczalnych.

Tabela V. Zawartość aflatoksyn w wybranych produktach

Table V. Aflatoxins content in selected products

Produkt/l. próbek	Aflatoksyna B ₁ µg/kg [min-max]	Aflatoksyna B ₂ µg/kg [min-max]	Aflatoksyna G ₁ µg/kg [min-max]	Aflatoksyna G ₂ µg/kg [min-max]
Orzechy laskowe/15	0,02 – 1,47	0,02 – 1,72	0,02 – 1,09	0,02 – 0,08
% skażonych	93,3	46,7	53,3	40,0
Orzechy arachidowe/6	0,01 – 0,04	0,07	<0,01	<0,01
% skażonych	50,0	25,0	<0,01	<0,01
Orzechy pistacjowe/3	0,03	0,02	<0,01	<0,01
% skażonych	33,3	33,3	0,0	0,0
Orzechy inne/6: nerkowca, macadamia, pini, brazylijski, migdał	0,01 – 0,16	0,02 – 0,04	0,03 – 0,3	0,01 – 0,03
% skażonych	66,7	66,7	50,0	66,7
Pszenica ziarno/7	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
% skażonych	0,0	0,0	0,0	0,0
Mąka pszenna/10	0,18 – 0,33	0,26 – 0,40	0,17 – 0,18	0,13 – 1,53
% skażonych	20,0	20,0	20,0	20,0
Mąka żytnia i otręby żytnie/6	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
% skażonych	0,0	0,0	0,0	0,0
Kasza jęczmienna/7	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Kasza gryczana/4	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
% skażonych	0,0	0,0	0,0	0,0
Kukurydza/1	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
% skażenia	0,0	0,0	0,0	0,0
Makarony/3	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
% skażonych	0,0	0,0	0,0	0,0
Ciastka/3	0,06 – 0,31	0,21	<0,05	<0,05
% skażonych	66,7	33,3	0,0	0,0
Przyprawy (mieszanki)/10	0,05 – 0,5	0,05-0,26	0,05 – 0,71	0,13
% skażonych	90,0	70,0	40,0	10,0
Papryka mielona, pieprz czarny, warzywa suszone/5	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
% skażonych	0,0	0,0	0,0	0,0

WNIOSKI

1. Przedstawione metody są przydatne do oznaczania aflatoksyn B₁, B₂, G₁ i G₂ w szerokiej gamie surowców i produktów roślinnych, takich jak: orzechy i ich przetwory, przyprawy kulinarne, zboża i produkty zbożowe.
2. Opracowane metodyki spełniają wymagania krajowe oraz międzynarodowe stawiane procedurom analitycznym stosowanym do śladowej analizy aflatoksyn w żywności.
3. W pobranych próbkach handlowych zbadanych produktów stwierdzono nieznaczne zawartości aflatoksyn – poniżej dopuszczalnych maksymalnych poziomów obowiązujących w polskim i europejskim ustawodawstwie.

L. Czerwiecki, G. Wilczyńska

OPTIMALIZACJA METOD OZNACZANIA AFLATOKSYN W ŻYWNOŚCI Z ZASTOSOWANIEM POSTKOLUMNOWEGO TWORZENIA POCHODNYCH Z BROMEM

Streszczenie

Opisano metodę oznaczania aflatoksyn B₁, B₂, G₁ i G₂ w orzechach, przyprawach kulinarnych, zbożach i przetworach zbożowych. W ramach optymalizacji metody, w zależności od badanej matrycy, wybrano optymalne warunki ekstrakcji, oczyszczania ekstraktów, HPLC i detekcji. Aflatoksyny ekstrahowano mieszaniną metanolu i wody (80+20 v/v) lub (70+30 v/v), ekstrakty oczyszczano na kolumnach IAC z zastosowaniem różnych wariantów elucji i oznaczano na kolumnach C18 Nucleosil lub Nova PAK stosując fazę rozwijającą: metanol + acetonitryl + woda (20 +20 +60 v/v). Do detekcji aflatoksyn, po postkolumnowej reakcji aflatoksyny B₁ i G₁ z bromem, zastosowano detektor fluorymetryczny przy 362/430 nm. Średni odzysk metody w zależności od rodzaju matrycy i aflatoksyny i wynosił od 52 do 102 %, a RSD % (względne odchylenie standardowe) zawierało się w granicach 0,2 do 8,3. Granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) wynosiły, odpowiednio: dla orzechów 0,01 i 0,02 µg/kg, dla przypraw i przetworów zbożowych 0,05 i 0,1 µg/kg. Zawartości aflatoksyn w zbadanych 86 produktach handlowych były poniżej maksymalnych dopuszczalnych poziomów obowiązujących w aktualnym ustawodawstwie.

L. Czerwiecki, G. Wilczyńska

OPTIMIZATION OF DETERMINATION OF AFLATOXINS IN FOODS WITH BROMINE POSTCOLUMN DERIVATIZATION

Summary

The method for determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁ i G₂ in nuts, culinary spices, cereals and cereal products was described. To optimize the analytical procedure in several products, condition of proper extraction, clean-up, HPLC and detection were selected. After extraction by means of methanol and water (80+20 v/v) or (70+30 v/v), clean-up on IAC columns, HPLC on C18 columns - Nucleosil and Nova Pak with mobile phase-methanol, acetonitrile, water (20+20+60 v/v) was performed. For fluorometric detection at 362/430 nm, post-column derivatization of aflatoxin B₁ and G₁ with bromine was carried out. The mean recovery of the method depending on matrix and aflatoxin, was 52-102 % at RSD % 0,2-8,3. LOD and LOQ, respectively were: 0.01 and 0.02 µg/kg for nuts and 0.05 and 0.1 µg/kg for culinary spices and cereal products. The concentrations of aflatoxins in 86 samples of foods from market were below the permissible maximum levels legally binding.

PIŚMIENNICTWO

1. Aflatest, Instrukcja stosowania. Procedury HPLC. Vicam, 5 maja, 1999, 71-86.
2. Artykuły żywnościowe. Oznaczanie aflatoksyny B₁ i sumy aflatoksyny B₁, B₂, G₁ i G₂ w zbożach, orzechach i produktach z nich otrzymany. Metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej z uzyskaniem pochodnej po rozdziale na kolumnie i oczyszczaniu na kolumnie powinowactwa immunologicznego. Polska Norma PN-EN 12955, czerwiec 2001.
3. Commission Regulation (EC) No1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.

4. *Czerwiecki L.*: Mikotoksyny w żywności. Wykrywanie i oznaczanie. Rozprawa habilitacyjna. IBPRS, Warszawa, 1993, 1-275.
5. *Czerwiecki L., Szymczyk K.*: Oznaczanie aflatoksyn B₁, B₂, G₁, G₂ w orzechach arachidowych za pomocą chromatografii cieczowej wysokociśnieniowej. Prace Instytutów i Laboratoriów Badawczych Przemysłu Spożywczego, 1994, 49, 55-62.
6. *Czerwiecki L., Wilczyńska G.*: Adaptacja oraz walidacja metody oznaczania aflatoksyn B₁, B₂, G₁, G₂ w wybranych produktach spożywczych. Sprawozdanie ZAŻ/IBPRS, 2000, 1- 16.
7. *Kok W. Th., van Neer C., H., Traag W. A., Tuinstra L. G. M. Th.*: Determination of aflatoxins in cattle feed by liquid chromatography and post-column derivatization with electrochemically generated bromine. Journal of Chromatography, 1986, 367, 231-236.
8. Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists, 13, ed., 1980. Chapter 26, Natural Poisons, 414-434
9. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22 grudnia 2004 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie maksymalnych poziomów zanieczyszczeń chemicznych i biologicznych, które mogą znajdować się w żywności, składnikach żywności, dozwolonych substancjach dodatkowych, substancjach pomagających w przetwarzaniu albo na powierzchni żywności.. Dz. U. RP z dnia 6 stycznia 2005.
10. Rozporządzenie Komisji (WE) NR 401/2006 z dnia 23 lutego 2006 r. ustanawiające metody pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli poziomów mikotoksyn w środkach spożywczych.
11. *Sharman M., Gilbert J.*: Automated aflatoxin analysis of foods and animal feeds using immunoaffinity column clean-up and high performance liquid chromatographic determination. J. Chrom., 1991, 543, 220-225.
12. *Tarter E.J., Hanchay J-P., Scott P. M.*: Improved liquid chromatographic method for determination of aflatoxins in peanut butter and other commodities. J. Assoc Anal. Chem., 1984, 67 (3), 557-560.
13. *Traag W. A., van Trijp J. M. P., Tuinstra L. G. M., Kok W. Th.*: Sample clean-up and post-column derivatization for the determination of aflatoxin B₁ by liquid chromatography. Journal of Chromatography, 1987, 396, 389-394.
14. *Trucksess M. W., Stack M., Nesheim S.* i wsp.: Immunoaffinity column coupled with solution fluorymetry or liquid chromatography postcolumn derivatization for determination of aflatoxins in corn, peanuts and peanut butter: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1991, 74, 81-88.

Otrzymano: 8.02.2007 r.

