

Oznaczanie fumonizyn B₁ i B₂ w kukurydzy i paszach metodą chromatografii cieczowej

HENRYKA WIŚNIEWSKA-DMYTROW, ANNA KOZAK, JAN ŻMUDZKI

Zakład Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Wiśniewska-Dmytrow H., Kozak A., Żmudzki J.

Determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn and fodder by liquid chromatography

Summary

A liquid chromatographic method has been developed for the simultaneous determination of fumonisins B₁ and B₂ (FB₁ and FB₂) in corn and fodder. The samples were extracted with methanol-water (80+20, V/V). The extracts were then purified on immunoaffinity columns. Fumonisins were quantified after deriving them from o-phthalaldehyde on a fluorescence detector. The separation was carried out on a C₁₈ reversed-phase column with a mobile phase of methanol – 0,1 M sodium dihydrogen phosphate (80+20, V/V), pH=3,35.

Recoveries of FB₁ and FB₂ in samples fortified at 37.5, 75.0, 150.0 and 300.0 µg/kg were between 61.1 and 94.1% with coefficients of variation below 10%.

This method permits the definition of 2 µg FB₁ and 5 µg FB₂ in 1 kg of corn and fodder.

Keywords: fumonisin, fodder.

Fumonizyny stanowią grupę mikotoksyn wytwarzanych głównie przez pleśnie *Fusarium moniliforme* i *Fusarium proliferatum* (2, 7, 24). Grzyby te są powszechnymi patogenami kukurydzy. Zasadzają rośliny już w początkowych fazach wegetacji oraz później w trakcie magazynowania. Nagromadzone w tkankach roślinnych fumonizyny zachowują swą toksyczność aż poza okres przetwarzania kukurydzy na pasze bądź środki spożywcze.

W warunkach naturalnych spośród siedmiu poznanych fumonizyn, najczęściej i w największych stężeniach stwierdzana jest fumonizyna B₁ (FB₁) i fumonizyna B₂ (FB₂) (3, 15, 20, 26). Są one silnymi zootoksynami; mogą stanowić czynnik etiologiczny leukoencefalomalacji u koni i obrzęku płuc u świń (4, 8, 9, 21, 23). W piśmiennictwie weterynaryjnym opisano przypadki śmiertelnych zatruc świń i koni kukurydzą skażoną FB₁ i FB₂ (5, 10). Poza zatruciami ostrymi spowodowanymi wysokimi dawkami fumonizyn, bardzo ważne znaczenie zdrowotne i ekonomiczne ma działanie niższych dawek tych mikotoksyn. Fumonizyny skażające pasze mogą przyczyniać się do zmniejszenia przyrostów wagowych zwierząt, zwiększania zużycia paszy i wzrostu zachorowalności.

Jest więc rzeczą zrozumiałą, że związki o tak ujemnym oddziaływaniu na organizmy zwierzęce wzbudzają duże zainteresowanie środowisk naukowych i praktyków. W piśmiennictwie, zwłaszcza krajowym, odczuwa się brak danych na temat stopnia skażenia fu-

monizynami żywności i pasz oraz do oceny zagrożenia, jakie mogą one stanowić dla zdrowia ludzi i zwierząt. Do badań w tym zakresie niezbędne są odpowiednie metody ilościowego oznaczania zawartości fumonizyn.

Opracowano wiele metod analitycznych oznaczania FB₁ i FB₂ w różnorodnym materiale: w kulturach grzybowych, kukurydzy, paszach i artykułach żywnościowych. Najczęściej fumonizyny ekstrahuje się z badanego materiału wodnym roztworem metanolu lub acetonitrylu, następnie oczyszcza na kolumnach wypełnionych fazą stałą (żel krzemionkowy, oktadecyl na żelu krzemionkowym, jonowymieniacze) oraz oznacza jakościowo i ilościowo metodą chromatografii cieczowej (LC-RP). Fumonizyny nie posiadają grup chromoforowych, nie mogą więc być wykrywane bez uprzedniego przeprowadzenia reakcji derywatywacji. Początkowo tworzono pochodne fumonizyn z bezwodnikiem maleinowym i oznaczano je na detektorze UV (17). Technika ta była używana z powodzeniem do analiz kultur grzybowych, lecz okazała się zbyt mało czuła do analiz fumonizyn w naturalnie skażonych próbkach kukurydzy. Obecnie najczęściej oznacza się przedkolumnowe pochodne fumonizyn na detektorze fluorescencyjnym. Do tworzenia fluoryzujących pochodnych stosowane są odczynniki reagujące z pierwszorzędową grupą aminową fumonizyn: fluorescamina, o-ftalaldehyd, naftaleno-2,3-dikarboksy-aldehyd (12, 16). Fluorescamina nie daje zadowalających re-

zultatów, ponieważ dla pochodnych fumonizyn na chromatogramie występują dwa piki. Pozostałe reagenty tworzą pochodne o wysokiej czułości, lecz o różnej stabilności.

Pomimo dużego wyboru metod analitycznych, nadal istnieją problemy utrudniające uzyskanie dokładnych i powtarzalnych wyników oznaczania fumonizyn w różnych matrycach. Dotyczą one głównie wydajności ekstrakcji oraz odzysków związanych ze stosowaniem do oczyszczania ekstraktów kolumn z różnymi wypełnieniami.

W oparciu o dostępne w piśmiennictwie metody i doświadczenia własne opracowano procedurę analityczną oznaczania FB_1 i FB_2 w kukurydzy i paszach.

Zasada metody

Fumonizynę B_1 i B_2 ekstrahuje się z badanego materiału 80% alkoholem metylowym. Ekstrakt oczyszcza się na kolumnkach powinowactwa immunologicznego Fumoni-Test™. Fumonizyny eluuje się z kolumnek alkoholem metylowym. Analizę fumonizyn przeprowadza się metodą chromatografii cieczowej (LC) po utworzeniu pochodnych fumonizyn z o-ftalodialdehydem w obecności merkaptotetanolu. Rozdziału dokonuje się na kolumnie z odwróconą fazą C_{18} stosując fazę ruchomą o składzie alkohol metylowy – 0,1 M diwodorofosforan sodu (80 + 20, V/V) o $pH=3,35$.

Aparatura i sprzęt laboratoryjny

1. Chromatograf cieczowy z detektorem fluorescencyjnym i kolumną analityczną z odwróconą fazą C_{18} (np. Spherisorb S5 ODS 2, 250 mm × 4,6 mm).

2. Typowy sprzęt laboratoryjny: butla ze sprężonym azotem, łaźnia wodna z termoregulacją, mieszadło typu Vortex, pH-metr, pompka wodna, próżniowy odparowywacz obrotowy, waga laboratoryjna i analityczna, wstrząsarka, zestaw do odparowywania w strumieniu azotu z kontrolowaną temperaturą, zestaw do ekstrakcji do fazy stałej.

3. Typowe szkło laboratoryjne.

Odczynniki i roztwory

1. Alkohol metylowy, woda – czystości HPLC.

2. Acetonitryl, chlorek sodu, diwodorofosforan sodu, o-ftalodialdehyd (OPA), kwas o-fosforowy stężony, mer-

kaptoetanol (2-hydroksyetylmerkaptan, MCE), Tween-20, węglan sodu – cz.d.a.

3. Czteroboran sodu cz.d.a., roztwór 0,1 M. Rozpuścić na gorąco 3,8 g czteroboranu sodu w 100 ml wody.

4. Bufor przemywający do kolumnek powinowactwa immunologicznego. Do kolby stożkowej pojemności 500 ml odważyć 12,5 g chlorku sodu, 2,5 g węglanu sodu, dodać kroplę Tween-20 i 500 ml wody. Dobrze wymieszać.

5. Faza ruchoma do HPLC. Wymieszać 800 ml alkoholu metylowego z 200 ml 0,1 M diwodorofosforanu sodu. Doprowadzić do $pH=3,35$ za pomocą stężonego kwasu o-fosforowego.

6. Kolumnienki powinowactwa immunologicznego FumoniTest™ firmy Vicam.

7. Odczynnik do tworzenia pochodnej OPA/MCE. Rozpuścić 40 mg OPA w 1 ml alkoholu metylowego. Dodać 5 ml 0,1 M czteroboranu sodu i 50 μ l MCE, dobrze wymieszać. Odczynnik jest trwały przez 1 tydzień w temperaturze pokojowej.

8. Roztwory wzorcowe podstawowe FB_1 i FB_2 , 1000 μ g/ml. Odważyć po kilkanaście miligramów wzorców analitycznych FB_1 i FB_2 , przenieść do oddzielnych kolbek ze szlifem i rozpuścić w równoważnych ilościach mililitrów mieszaniny acetonitryl-woda (1+1, V/V). Z roztworu podstawowego sporządzić roztwory robocze FB_1 i FB_2 o stężeniu 50 μ g/ml i 2,5 μ g/ml oraz roztwór roboczy mieszany FB_1 i FB_2 o stężeniu 2,5 μ g/ml; wszystkie w mieszaninie acetonitryl-woda (1+1, V/V).

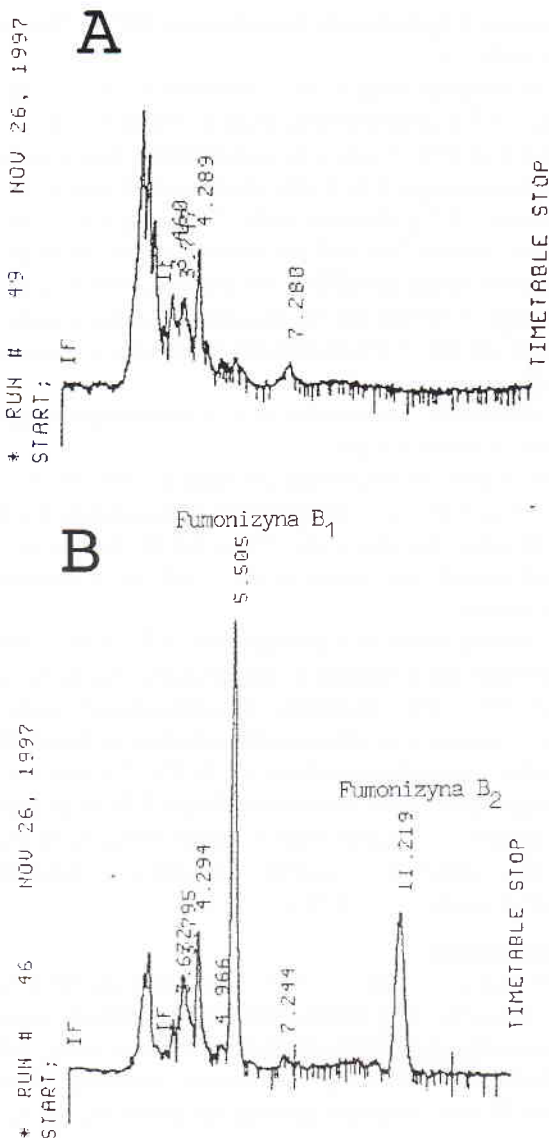
Postępowanie

Ekstrakcja FB_1 i FB_2 . Do kolby stożkowej poj. 250 ml odważyć 50 g rozdrobnionego materiału (kukurydza, mieszanka paszowa), dodać 5 g chlorku sodu, 100 ml 80% alkoholu metylowego i szczelnie zamknąć. Wstrząsać przez 30 min. Ekstrakt przesączyć przez sącdek karbowany z bibuły szybkoścącej, odrzucić pierwsze 10 ml przesączu. Pozostały przesącz dokładnie wymieszać i pozostawić do oczyszczania na kolumnkach powinowactwa immunologicznego.

Oczyszczanie ekstraktu. Do zlewki poj. 50 ml odmierzyć 5 ml przesączu i dodać 20 ml buforu przemywającego do kolumnek powinowactwa immunologicznego. Przesączyć przez sącdek drobnowłóknisty do następnego zlewki poj. 100 ml i dokładnie wymieszać.

Tab. 1. Ocena statystyczna wyników oznaczania fumonizyny B_1 (FB_1) i fumonizyny B_2 (FB_2) w próbkach kukurydzy, $n = 6$

Wskaźniki precyzji i dokładności	FB_1/FB_2			
Wzmocnienie, μ g/kg	37,5/37,5	75,0/75,0	150,0/150,0	300,0/300,0
Średnia arytmetyczna, \bar{x} , μ g/kg	30,8/22,9	70,6/67,4	126,9/116,2	233,0/231,0
Odchylenie standardowe, s , μ g/kg	2,7/1,6	6,9/6,4	9,3/10,9	16,0/16,3
Odzysk, %	82,0/61,1	94,1/89,8	84,6/77,5	77,7/77,0
Współczynnik zmienności, CV, %	8,8/7,1	9,8/9,6	7,3/9,3	6,9/7,1



Ryc. 1. Chromatogramy fumonizyn B₁ i B₂.

Objaśnienia: A – ekstrakt kukurydzy wolnej od fumonizyn; B – ekstrakt kukurydzy naturalnie skażonej 98,0 µg/kg FB₁ i 20,0 µg/kg FB₂

Kolumnkę powinowactwa immunologicznego FumoniTest™ podłączyć do zestawu do ekstrakcji do fazy stałej. Nanieść na nią 10 ml rozcieńzonego i przesączonego ekstraktu. Po wsiąknięciu ekstraktu pod wpływem siły ciężkości przepłukać kolumnkę 2 razy po 10 ml buforu przemywającego każdorazowo i 10 ml wody. Wyciek z kolumnki odrzucić. Osuszyć kolumnkę stosując słabą próżnię do zaniku śladów wody na adsorbencie. FB₁ i FB₂ eluować 1 ml alkoholu metylowego. Eluat zebrać do próbki poj. 5 ml, odparować do sucha w delikatnym strumieniu azotu w temperaturze nie przekraczającej 35°C. Suchą pozostałość rozpuścić w 0,1 ml mieszaniny acetonitryl-woda (1+1, V/V) i dobrze wymieszać.

Tworzenie pochodnych fumonizyn. Do suchej pozostałości rozpuszczonej w 0,1 ml mieszaniny acetonitryl-woda (1+1, V/V) dodać 0,2 ml mieszaniny reakcyjnej OPA/MCE i dobrze wymieszać. Po 1 minucie dozować na kolumnę chromatograficzną.

Analiza chromatograficzna. Pochodne FB₁ i FB₂ analizować w chromatografii cieczowej wyposażonej w detektor fluorescencyjny (długość fali wzbudzenia – 335 nm, emisji – 440 nm) i kolumnę chromatograficzną z odwróconą fazą C₁₈. Rozdział prowadzić w układzie izokratycznym, w temperaturze pokojowej przepuszczając fazę ruchomą z szybkością 1 ml/min. Przybliżony czas trwania analizy około 20 min.

Zawartość fumonizyn w badanej próbce wyliczyć z krzywych wzorcowych. W celu wykreślenia krzywych wzorcowych należy na kolumnę chromatograficzną nanieść pochodne FB₁ i FB₂ uzyskane w reakcji znanych wzrastających ilości fumonizyn z mieszaniną reakcyjną OPA/MCE. W tym celu do próbek poj. 5 ml należy odpipetować po 0, 15, 30, 60 i 100 µl standardu roboczego mieszanego FB₁ i FB₂ zawierającego po 2,5 µg obu fumonizyn w 1 ml. Następnie dodać odpowiednio: 100, 85, 70, 40 i 0 µl mieszaniny acetonitryl-woda (1+1, V/V). Do każdej próbki dodać po 200 µl mieszaniny reakcyjnej OPA/MCE i dobrze wymieszać. Po upływie jednej minuty od dodania OPA/MCE utworzone pochodne dozować na kolumnę chromatograficzną. Wykreślić krzywe wzorcowe odkładając na osi rzędnych ilość ng FB₁ lub FB₂ zawartych w 20 µl naniesionego roztworu po reakcji, na osi odciętych – uzyskane pola powierzchni.

W opisanych warunkach rozdziału chromatograficznego, na kolumnie Spherisorb S5 ODS 2, czas retencji pochodnej FB₁ wynosi około 5,6 min.; pochodnej FB₂ około 11,0 min.

Obliczenia. Stężenia poszczególnych fumonizyn (C) w próbkach badanych w µg/kg obliczyć wg wzoru:

$$C = A \times \frac{W}{m},$$

w którym:

A – ilość ng FB₁ lub FB₂ odczytana z krzywej wzorcowej,

W – współczynnik rozcieńczenia,

m – masa próbki wzięta do tworzenia pochodnej, g.

Dla opisanej procedury analitycznej W = 15, m = 1.

Wyniki i omówienie

Doboru warunków opisanej powyżej procedury postępowania analitycznego ilościowego oznaczania FB₁ i FB₂ w kukurydzy i mieszankach paszowych dokonano po określeniu parametrów analizy chromatograficznej, sprawdzeniu wydajności ekstrakcji różnymi rozpuszczalnikami oraz stopnia oczyszczania i wydajności kolumnek z różnymi wypełnieniami.

Przy wyborze odczynnika do tworzenia pochodnych FB₁ i FB₂ przetestowano mieszaninę o-ftalodialdehydu z merkptoetanolem oraz naftaleno-2-3-dikarboksy-aldehydu (NDA). Uzyskano wyniki zgodne z danymi ze światowego piśmiennictwa (1, 12, 14, 16, 19, 22, 25). Stwierdzono, że pochodne z OPA/MCE są stabilne przez 5 minut; po 30 minutach następuje rozkład 15% fluoryzującej pochodnej. Bardziej stabilne okazały się pochodne z NDA, jednak są one bardziej kłopotliwe w wykonaniu, a otrzymane wyniki charak-

teryzowały się mniejszą powtarzalnością niż w przypadku zastosowania mieszaniny OPA/MCE.

Rozdziały pochodnych FB₁ i FB₂ przeprowadzano na kolumnach chromatograficznych analitycznych z odwróconą fazą C₁₈: Hypersil H5 ODS (firmy Hichrom Ltd) i Spherisorb S5 ODS 2 (firmy Phase Sep. Ltd) (13, 22). W celu uzyskania optymalnych warunków rozdziału sprawdzano fazy mobilne o różnym składzie: alkohol metylowy – 0,1 M diwodorofosforan sodu (68+32; 30+10; 80+20; V/V), acetonitryl – 0,05 M diwodorofosforan potasu (40+60, V/V) i acetonitryl – woda – kwas octowy lodowaty (49,5+49,5+1,0; 55+45+10; V/V/V) (1, 14, 19). Szybkość przepływu fazy mobilnej regulowano w zakresie od 1,0 do 1,5 ml/min. Ponieważ istotnym czynnikiem mającym wpływ na rozdział pochodnych fumonizyn jest właściwa kwasowość, wybraną fazę mobilną modyfikowano stężonym kwasem o-fosforowym w zakresie pH od 3,0 do 3,8.

Ekstrakcję fumonizyn z próbek kukurydzy i pasz przeprowadzano stosując homogenizację badanej próbki lub wytrząsanie z mieszaninami rozpuszczalników o różnej polarności. Na podstawie danych literaturowych wybrano najczęściej zalecane mieszaniny: alkohol metylowy z wodą i acetonitryl z wodą o różnym procentowym udziale poszczególnych składników (23, 24, 25, 26, 27). Każda ekstrakcja była wykonana w 2-krotnym powtórzeniu.

Optymalizacji warunków oczyszczania ekstraktów dokonywano na zestawie ciśnieniowym Baker-12G przy zastosowaniu techniki SPE wykorzystując kolumnienki C₁₈ (oktadecylowe, 6 ml, 500 mg, firmy Baker) i kolumnienki powinowactwa immunologicznego (FumoniTest™, firmy Vicam). W przypadku stosowania kolumnienek FumoniTest™ postępowano zgodnie z dołączoną do nich instrukcją stosowania (6).

Na uprzednio przygotowane do pracy kolumnienki C₁₈ nanoszono roztwory wzorcowe fumonizyn bądź też ekstrakty z kukurydzy lub pasz wzmocnione fumonizynami o znanych stężeniach. Kolumnienki przemywano 20% acetonitrylem lub 25% alkoholem metylowym i mieszaniną acetonu z octanem etylu w różnych objętościach. Po wysuszeniu, fumonizyny eluowano 50 lub 70% acetonitrylem.

Kolumnienki powinowactwa immunologicznego FumoniTest™ zawierające przeciwciała monoklonalne dla fumonizyn wymywano różnymi objętościami buforu wymywającego i wody destylowanej. Elucję fumonizyn przeprowadzano alkoholem metylowym lub mieszaniną alkohol metylowy-woda (4+1, V/V).

Precyzję i dokładność opracowanej procedury analitycznej ustalono po przeprowadzeniu badań, w których wykonano oznaczenia fumonizyn w stężeniach 37,5; 75,0; 150,0 i 300,0 µg/kg w próbkach kukurydzy i mieszanek paszowych. Do badań przygotowano serie po 6 próbek dla każdego poziomu stężenia.

Zebrane wyniki poddano ocenie statystycznej określając wartości średnich arytmetycznych (\bar{x}), odchylenia

nie standardowe (s) i współczynniki zmienności (CV). W tab. 1 zestawiono wyniki oznaczeń wykonanych w próbkach kukurydzy. Wartości współczynników zmienności określające precyzję metody nie przekraczały 10%, a więc mieszczą się w granicach przyjmowanych do oznaczeń metodą LC (CV < 10%). Odzycki metody dla czterech poziomów stężeń zawierały się w przedziale od 77,7 do 94,1% dla FB₁ i od 61,1 do 89,8% dla FB₂.

Metoda pozwala na oznaczenie FB₁ w stężeniach powyżej 2 µg i FB₂ powyżej 5 µg w 1 kg badanego materiału.

Na ryc. 1 przedstawiono chromatogramy ekstraktów kukurydzy nie skażonej FB₁ i FB₂ i kukurydzy naturalnie skażonej 98,0 µg FB₁ i 20,0 µg FB₂ w 1 kg kukurydzy.

Przygotowana metoda została sprawdzona pod względem przydatności we wstępnych badaniach monitorowych nad stopniem skażenia kukurydzy i pasz fumonizynami w kraju.

Piśmiennictwo

- Bennett G. A., Richard J. L.: J. AOAC Int. 77, 501, 1994.
- Bezuidenhout S. C., Gerlderblom W. C. A., Gorst-Allman C. P., Horak R. M., Marasas W. F. O., Spiteller G., Vleggaar R.: J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1984, 743, 1988.
- Chu F. S., Li G. Y.: Appl. Environ. Microbiol. 60, 847, 1994.
- Colvin B. M., Cooley A. J., Beaver R. W.: J. Vet. Diagn. Invest. 5, 232, 1993.
- Colvin B. M., Harrison L. R.: Mycopathologia 117, 79, 1992.
- FumoniTest™ Instruction Manual, Vicam L.P., USA, 1997.
- Gelderblom W. C. A., Jaskiewicz K., Marasas W. F. O., Thiel P. G., Horak R. M., Vleggaar R., Kriek N. P. J.: Appl. Environ. Microbiol. 54, 1806, 1988.
- Haschek W. M., Motelin G., Ness D. K., Harlin K. S., Hall W. F., Versonder R. F., Peterson R. E., Beasley V. R.: Mycopathologia 117, 83, 1992.
- Motelin G. K., Haschek W. M., Ness D. K., Hall W. F., Harlin K. S., Schaeffer D. J., Beasley V. R.: Mycopathologia 126, 27, 1994.
- Osweiler G. D., Ross P. F., Wilson T. M., Nelson P. E., Witte S. T., Carson T. L., Rice I. G., Nelson H. A.: J. Vet. Diagn. Invest. 4, 53, 1992.
- Holcomb M., Sutherland J. B., Chiarelli M. P., Korfmacher W. A., Thompson H. C. Jr., Lay J. O. Jr., Hankins L. J., Cerniglia C. E.: J. Agric. Food Chem. 41, 357, 1993.
- Hopmans E. C., Murphy P. A.: J. Agric. Food Chem. 41, 1655, 1993.
- Pestka J. J., Azcona-Olivera J. I., Plättner R. D., Minervini F., Doko M. B., Visconti A.: J. Food Protection 57, 169, 1994.
- Rice L. G., Ross P. F., Dejong J.: J. AOAC Int. 78, 1002, 1995.
- Scudamore K. A., Nawaz S., Hetmanski M. T.: Food Additiv. Contam. 15, 30, 1998.
- Shephard G. S., Sydenham E. W., Thiel P. G., Gelderblom W. C. A.: J. Liq. Chromatogr. 13, 2077, 1990.
- Siler D. J., Gilchrist D. G.: J. Chromatogr. 238, 167, 1982.
- Sydenham E. W., Gelderblom W. C. A., Thiel P. G., Marasas W. F. O.: J. Agric. Food Chem. 38, 285, 1990.
- Sydenham E. W., Shephard G. S., Thiel P. G.: J. AOAC Int. 75, 313, 1992.
- Sydenham E. W., Shephard G. S., Thiel P. G., Marasas W. F. O., Rheeder J. P., Peralta Sanhueza C. E., Gonzales H. H. L., Resnik S. L.: J. Agric. Food Chem. 41, 891, 1993.
- Sydenham E. W., Thiel P. G., Marasas W. F. O., Shephard G. S., Schalkwyk D. J. V., Koch K. R.: J. Agric. Food Chem. 38, 1900, 1990.
- Sydenham E. W., Shephard G. S., Thiel P. G., Stockenström S., Snijman P. W.: J. AOAC Int. 79, 688, 1996.
- Thiel P. G., Marasas W. F. O., Sydenham E. W., Shephard G. S., Gelderblom W. C. A.: Mycopathologia 117, 3, 1992.
- Visconti A., Doko M. B.: JAOAC 77, 546, 1994.
- Ware G. M., Francis O., Kuan S. S., Umrigar P., Carman A., Carter L.: Analytical Letters 26, 1751, 1993.
- Yamashita A., Yoshizawa T., Aiura Y., Sanchez P. C., Dizon E. I., Arim R. H., Sardjono: Biosci. Biotech. Biochem. 59, 1804, 1995.

Adres autora: mgr Henryka Wiśniewska-Dmytrow, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy