

REZULTATI UPORABE IMUNOAFINITETNE KOLONE U ODREĐIVANJU AFLATOKSINA B₁ U STOČNOJ HRANI HPLC TEHNIKOM

THE RESULTATS OF THE USE OF THE IMMUNOAFINITTY COLUMN FOR DETERMINATING AFLATOXIN B₁ IN THE SAMPLES FEED BY HPLC TECHNIQUE

Maja Rutalj, Vera Pomper, D. Majnarić

Izvorni znanstveni članak
UDK: 636.085.65.19.
Primljeno: 15. travanj 2001.

SAŽETAK

Svrha rada bila je utvrditi djelotvornost uporabe imunoafinitetne kolone u razdoblju pripreme uzoraka stočne hrane kod određivanja aflatoksina B₁, kao jednog od pokazatelja njihove higijenske ispravnosti. Uvedena je reverzno-fazna HPLC metoda za određivanje aflatoksina B₁. Aflatoksin B₁ je detektiran, uporabom UV-detektora kod 350 nm. Površina i visina pikova kao i vrijeme zadržavanja reproducibilni su kod većeg broja injektiranja za pojedini uzorak (5-10 injektiranja) što je omogućilo i kvantitativno određivanje. Priprema uzorka tijekom pročišćavanja obavljena je uporabom imunoafinitetne kolone "Easy-Extract" što je omogućilo nižu detekciju i povećalo osjetljivost same metode. Metoda je provjerena apliciranjem poznatih količina standarda toksina na različite uzorke krmiva i krmnih smjesa. Iscrpak (recovery) je od 83-92%. Metoda je brza zahvaljujući pripremi uzorka i može se koristiti za određivanje količina od 5 µg/kg aflatoksina B₁.

UVOD

Redovita kontrola te praćenje higijenske ispravnosti krmiva i krmnih smjesa ne samo da je dužnost proizvođača, već i državnih organa neke zemlje kao i svih onih struktura koje svojim radom mogu utjecati na kakvoću stočne hrane i time umanjiti mogućnost nalaženja štetnih tvari koje bi mogle nepovoljno utjecati ne samo na životinje koje se njima hrane već i na zdravlje ljudi, kao konačne konzumente njihovog mesa, mlijeka ili jaja. Svakako tu treba istaknuti odgovornost svih onih ustanova koje obavljaju kontrolu kao i onih koje svojim znanjem i autoritetom mogu utjecati na donošenje zakonskih odredaba za praćenje kontrole njihove higijenske ispravnosti tijekom

njihove proizvodnje ili prerade, tijekom transporta, skladištenja i konačno prodaje.

Iako današnje tehnologije omogućuju proizvodnju krmiva i krmnih smjesa visoke kakvoće, često se nailazi na higijenski neispravna. Poznato je da su i danas najčešći kontaminanti krmiva i krmnih smjesa baš mikroorganizmi odnosno njihovi toksini. Plijesni, kao velika skupina mikroorganizama, česti su kontaminanti zajedno sa svojim metabolitima - mikotoksinima, jer posjeduju takva fiziološka svojstva da rastu pri velikom rasponu temperature, vlage i pH vrijednosti. Mikotoksini predstavljaju veliku

Mr. sc. Maja Rutalj, dipl. ing.; Mr. sc. Darko Majnarić, dr. vet. med.; Vera Pomper, dipl. ing., HVI Zagreb Veterinarski zavod Križevci, Hrvatska - Croatia.

opasnost ne samo za životinje koje konzumiraju takvu kontaminiranu hranu, već i za čovjeka. Svojim višestrukim toksičnim djelovanjem djeluju i na životinje i ljude bilo kao nefrotoksini, neurotoksini, hepatoksini, estrogini toksini, citotoksini, imunosupresivni, respiratorni, fotosenzibilni te čimbenici odbijanja i povraćanja hrane. Treba spomenuti da prema podacima u literaturi najtoksičniji su upravo aflatoksini, čija se toksičnost manifestira kroz različite oblike oboljenja (aflatoksikoze): Busby i sur. (1984.); Egmond (1989.); Ožegović i Pepeljnjak (1995.).

Poznato je da stvaranju aflatoksina pogoduju sadržaj vlage u supstratu, relativna vlaga zraka temperatura okoliša, sadržaj kisika i CO₂ u zraku. Oni vrlo često nastaju tijekom skladištenja ali i na poljima tijekom vegetacije. Zbog gore navedenih uvjeta nađeni su na svim vrstama žitarica (naročito na polomljenim zrnima) ali i na sušenoj krmu, sušenom voću i povrću, zatim u mesu pilića i svinja kao i u jajima što se pripisuje hrani zagađenoj aflatoksinima: Löttsch i Leistner, 1977.; Pantović i Adamović, 1980.

Cilj rada bio je korištenjem HPLC metode utvrditi uspješnost pripreme uzoraka krmiva i krmnih smjesa preko imunoafinitetne kolone za aflatoksine u odnosu na "klasičnu" pripremu uzoraka ekstrakcijom s organskim otapalima.

MATERIJAL I METODE

Uzorci u kojima je određivan aflatoksin B₁ bili su uzorci krmiva (kukuruz, ječam, pšenica, raž, suncokretova sačma) kao i industrijski proizvedene krmne smjese. Svi ti uzorci najčešće su sakupljeni na terenu od strane inspektora ili dostavljeni od proizvođača na ispitivanje higijenske ispravnosti u okviru redovne kontrole. Dopremljeni uzorci u Zavodu su čuvani u uvjetima koji odgovaraju uvjetima skladištenja krmiva i krmnih smjesa. Tijekom 2000. i 2001. analizirano je 18 uzoraka (7 krmiva i 11 krmnih smjesa). Do sada se za određivanje aflatoksina i ostalih mikotoksina koristila tankoslojna kromatografija (TLC) uz fluorodensitometriju i kao kvalitativna i djelomično kvantitativna metoda: Beckwith i Stoloff (1968.); Beljaars i sur. (1975.). Međutim, danas je najčešća metoda izbora, tekućinska kromatografija (HPLC)

uz UV ili fluorescentni detektor što omogućuje nižu granicu detekcije, a time i kvalitetniji rad analitičara; Walter i sur. (1976.); Norman i sur. (1981.); Paulsch i sur. (1988.).

Metode tekućinske kromatografije prema gore navedenim autorima u odnosu na radnu temperaturu kolone i mobilne faze su nešto izmijenjene. U analizi je korištena Li Chrsorb RP-18 kolona, 5 μm (200 x 4,6 mm) Hewlett-Packard, loop 20 μL, mobilno razdoblje H₂O: ACN (65 : 35) protoka 1 mL/minuti, te detekcija aflatoksina B₁ kod 350 nm.

Priprema uzoraka klasičnim načinom obuhvaća razdoblje ekstrakcije organskim otapalima, razdoblje odmašćivanja, otparavanja ekstrakta i konačno identifikaciju; (Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i metodama fizikalnih, kemijskih i mikrobioloških analiza stočne hrane NN53/91.).

Detekcija 2 ng standarda aflatoksina B₁ registrirana je kao signal koji je 2.5 do 3 puta veći od osnovnog šuma i uzeta kao granica detekcije što omogućuje određivanje 8 μg/kg aflatoksina B₁ u krmivima i krmnim smjesama.

Linearnost je potvrđena uzastopnim injiciranjem (10 injiciranja) 20 μL standardnih otopina aflatoksina B₁ od: 0.05; 0.1; 0.125; 0.25; i 0.5 μg/mL. Jednadžba pravca izračunata je metodom najmanjih kvadrata iz rezultata analize (omjer visine pika standarda B₁ i odgovarajuće koncentracije analita). Tablica 1 prikazuje srednje vrijednosti visine pika u odnosu na koncentraciju aflatoksina B₁.

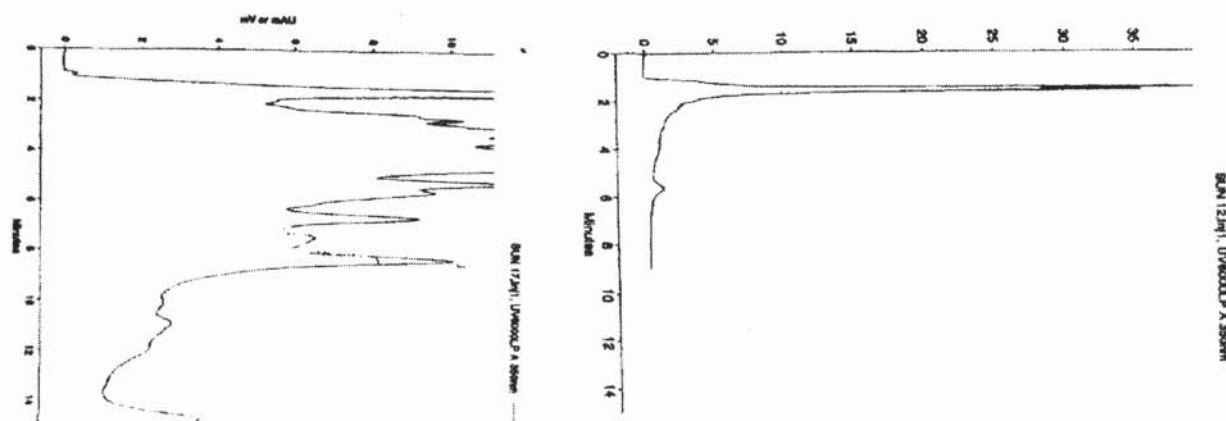
Tablica 1. Vrijednost visine pika o odnosu na koncentraciju B₁

Table 1. Average height of pick regarding the concentration of B₁

ng standarda B ₁ ng of standard B ₁	Srednja vrijednost visine pika*10 ³ MV Average height of pick regarding *10 ³
1.0	0.64
2.0	1.21
2.5	1.62
5.0	3.23
10.0	6.22

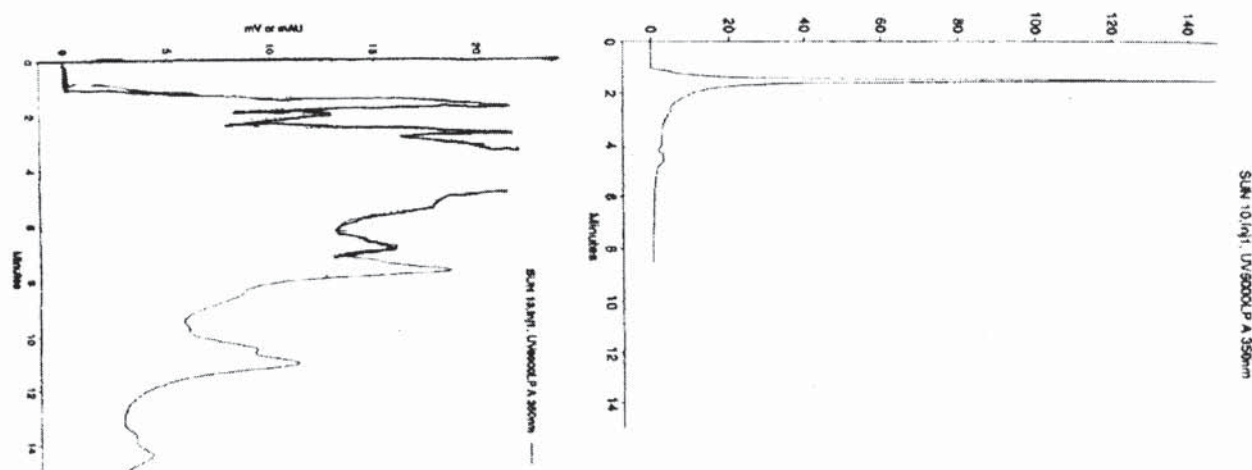
Slika 1. Kromatogram suncokretove sačme obrađen ekstrakcijom (lijevo) i preko IAC (desno)

Figure 1. Chromatogram of the sunflower meal prepared by extraction (left) and the use of IAC (right)



Slika 2. Kromatogram krmne smjese obrađen ekstrakcijom (lijevo) i preko IAC (desno)

Figure 2. Chromatogram of the samples feed prepared by extraction (left) and the use of IAC (right)



Isti uzorci krmiva paralelno su obrađeni uporabom imunoafinitetne kolone (IAC) za aflatoksine i dobiveni eluat korišten za identifikaciju i određivanje B₁ HPLC metodom. Treba napomenuti da su metode na temelju reakcije antigen - antitijela danas već rutina, zahvaljujući visokoj osjetljivosti i specifičnosti; Leitao i sur. (1988.). Korištene su "EASY-EXTRACT" imunoafinitetne kolone proizvođača Rhone-Poulens Diagnostics LTD za određivanje aflatoksina (Carval i sur., 1990. i Sharman i sur., 1989.). Kromatogrami su kasnije uspoređivani. Iz njih se lijepo vidi prednost

pročišćavanja uzoraka preko "Easy-Extract" kolone. Slike 1; 2. Gotovo potpuna eliminacija "matriksa" omogućila je i detekciju od 1 ng standarda B₁ (kao signal koji je 2,5 do 3 puta veći od osnovnog šuma) i time pomakla granicu određivanja aflatoksina B₁ na 5 µg/kg krmiva i/ili krmnih smjesa. Da bi se utvrdio eventualni gubitak aflatoksina rađen je i tzv. "recovery test" apliciranjem količine standarda od 5 µg/kg i 10 µg/kg na uzorke krmiva i krmnih smjesa, obrađenih imunoafinitetnom kolonom. Iscrpak "recovery" za razinu od 5 µg/kg iznosio je 83%, a za razinu od 10 µg/kg 92%.

Tablica 2. Količina aflatoksina B₁ u uzorcima krmiva i krmnih smjesa
Table 2. Aflatoxin levels in samples of feed

	Uzorak - Sample	Broj uzoraka Number samples	Količina Aflatoksina B ₁ Aflatoxin levels B ₁ IAC µg/kg	Količina aflatoksina B ₁ Aflatoxin levels B ₁ extrak. µg/kg	MDK µg/kg
Krmiva - Feedstuffs	Raž -Rye	1	<5	<8	50
	Pšenica - Wheat	1	<5	<8	50
	Ječam - Barley	1	<5	< 8	50
	Kukuruz - Maize	2	<5 7	<8 8	50
	Suncokretova sačma Sunflower meal	2	18 7	24 < 8	50
	Krmne smjese - Mix fodder		11	19	10
		16		8	30
		*20		*28	10
		*12		*18	10
		*24		*30	20
		<5		<8	10
		<5		<8	30
		7		<8	30
		13		10	20
		<5		<8	10
		29		25	50

REZULTATI

Obrađeno je 18 uzoraka krmiva i krmnih smjesa različitih proizvođača. Tablica 2. pokazuje nađene količine aflatoksina B₁ obradom uzoraka preko imunoafinitetne kolone (IAC), metodom ekstrakcije i MDK vrijednost (maksimalno dozvoljena količina kontaminanta) prema Pravilniku o kakvoći stočne hrane NN 26/98.

RASPRAVA

Iz tablice 2 je vidljivo da je obrađeno 18 uzoraka krmiva i krmnih smjesa što je relativno mali broj uzoraka, te treba biti oprezan prilikom donošenja zaključaka o nalaženju ovog konta-

minanta u stočnoj hrani. Vidljivo je da u 3 uzorka (16.7%) količina nađenog aflatoksina B₁ je iznad dozvoljene količine za tu vrstu krmne smjese, prema važećem Pravilniku o kakvoći stočne hrane NN 26/98. Nađena količina aflatoksina B₁ u krmivima, je ispod MDK vrijednosti, no treba ipak s puno pažnje prilaziti analizi suncokretove sačme zbog čestog nalaza aflatoksina B₁ u njoj.

Kako je cilj rada bio komparacija metode, pripreme uzoraka krmiva i krmnih smjesa ekstrakcijom i uporabom imunoafinitetne kolone za identifikaciju aflatoksina B₁ HPLC metodom, osvrnut ćemo se na dobivene kromatograme. Vidljivo je iz svih kromatograma nakon uporabe imunoafinitetnih kolona da je "matriks" gotovo eliminiran što svakako potvrđuje opravdanost njihove uporabe (slika 2-2a ; 3-3a).

ZAKLJUČAK

Uporaba imunoafinitetnih kolona za aflatoksin B₁ pokazala se opravdanom i korisnom. Poznato je da određivanje tragova mikotoksina i/ili njihovih metabolita nije jednostavna analitička metoda upravo zbog pripreme uzorka. Upravo zato, smanjenje "matriksa" velika je pomoć analitičaru, a treba istaknuti da korištenje imunoafinitetne kolone znatno skraćuje postupak pripreme uzorka 25 do 30 minuta u odnosu na 2 do 3 sata klasičnim načinom. Nadalje, s obzirom na potrebne volumene i visoke cijene organskih otapala, ova metoda je ekonomičnija i ekološki prihvatljivija. Kako iste imunoafinitetne kolone služe za određivanje i ostalih aflatoksina B₂, G₁ i G₂ potrebno je prilagoditi HPLC uvjete i za njihovo određivanje što bi omogućilo brzo i točnije određivanje aflatoksina u žitaricama, njihovim meljavama a time i industrijski proizvedenim krmnim smjesama. Prema podacima Haberle i sur. (1990.), aflatoksin G₁ je određivan u domaćoj pšenici, (na sreću nađen u dozvoljenim količinama) a uzimajući u obzir uvjete koji često pogoduju rastu plijesni pa time i nalaženju mikotoksina određivanje aflatoksina pokazalo se opravdanim i potrebitim. Treba napomenuti da je Državni zavod za normizaciju i mjeriteljstvo RH prihvatio europsku normu za određivanje aflatoksina u žitaricama, lupinastom voću i njihovim proizvodima baš metodom HPLC i čišćenjem uzorka preko imunoafinitetne kolone pa se može očekivati da će se time voditi i odbor za izdavanje normi i metoda za analizu krmiva.

LITERATURA – REFERENCES

1. Beckwith, A. C., L. Stoloff (1968): Fluorodensitometric Measurement of Aflatoxin Thin-layer Chromatograms. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 49, 740-743.
2. Beljaars, P. R., J. C. H. M. Schumans, P. S. Kopen (1975): Quantitative Fluorodensitometric Determination and Survey of Aflatoxins in Nutmeg. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 58, 263-271.
3. Busby, W. F. Jr., G. N. Wogan in C. E. Searle (Editor) (1984): Aflatoxins in Chemical Carcinogens, Vol. 2 (ACS Monograph Series, No 182) American Chemical Society, Washington DC, 1984. p 945.
4. Carvajal, Magda, Francis Mulholland, R. Colin Carner (1990): Comparison of the EASI-EXTRACT immunoaffinity concentration procedure with the AOAC CB method for the extraction and quantitation of aflatoxin B₁ in raw ground unskinned peanuts: *Journal of Chromatography* 511, 379-383.
5. Egmond, H. P. (1989): Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. *Food Additives and Contaminants* 6, 139-188.
6. Haberle, Vjera, Josipa Lučić (1990): Prilog ispitivanju zagađenosti domaće pšenice aflatoxinom Zbornik radova XIX sastanka prehrambeno-sanitarnih kemičara Pula.
7. HRVATSKA NORMA HRN EN 12955 - DZNM Glasilo 7-8/20 00.
8. Leitao, J., G. De-Saint-Blanquat, J. R. Bailly, C. Paillas (1988): Quantitation of Aflatoxins from various strains of *Aspergillus* in foodstuffs. *J. of Chromatogr.* 435 1, 229-234.
9. Löttsch, R., L. Leistner (1977): Transmission of Aflatoxins into Eggs and Egg Products. *An. Nutr Alim*, 31, 499-508.
10. Davis Norman, D., Urban L. Diener (1981): Confirmatory Test for the High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxin B₁. *J. Assoc. Off. Anal. Chem* 63, 107-109.
11. Official Methods of analysis of the AOAC, edited by S. Williams 14th ed. (1984). 477-500.
12. Ožegović, L., S. Pepeljnjak (1995): Mikotoksikoze, Školska knjiga, Zagreb.
13. Paulsch, W. E., E. A. Sizoo, H. P. Van-Egmond (1988): Liquid-chromatographic Determination of Aflatoxins in Feedstuffs Containing Citrus Pulp. *J. Assoc. Off. Anal. Chem* 71, 957-961.
14. Pantović, D., V. M. Adamović (1980.): Kontaminacija nekih namirnica mikotoksinima uz osvrt na postojeće propise o njihovim maksimalno dozvoljenim količinama. *Hrana i ishrana*, 21. 177-180.
15. Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i metodama fizikalnih, kemijskih i mikrobioloških analiza stočne hrane NN 53/91.
16. Pravilnik o kakvoći stočne hrane NN 26/98.
17. Sharman, M., A. L. Patey, J. Gilbert (1989): Application of an immunoaffinity column sample clean-up to determination of aflatoxin M₁ in cheese. *J. of Chromatogr* 474, 457-461.
18. Pons Walter, A. Jr. (1976): High Pressure Liquid Chromatographie Determination of Aflatoxins in Corn. *J. Assoc. Off. Anal. Chem* 56, 101-105.

SUMMARY

The method of reverse phase high pressure liquid chromatography (HPLC) was introduced to determine Aflatoxin B₁ in feed samples within the framework of regular control of hygienic correctness of feed at the Veterinary Institute in Križevci. The preparation of samples during purification was made by using immunoaffinity column "Easy-Extract" which enables lower detection and increase of sensibility of the method itself. Aflatoxin B₁ was detected by UV absorbency at 350 nm. Peak height and, retention time were reproducible at multiple injection (5-10) for each sample. The method was confirmed by application of B₁ standard amounts in different feed samples. Recovery was from 83-92%. The method is fast, due to sample preparations and can be used for determination of 5 µg/kg amounts.



Poljopromet d.d.
V i r o v i t i c a

S. Radića 132, 33000 VIROVITICA

telefoni:

centrala	033 730-702
komercijala	033 730-221
tvornica stočne hrane	033 730-225
silos	033 730-790
mлин	033 730-710
pekara	033 730-220
octara	033 726-974

PRIMAMO,

sušimo, dorađujemo, skladištimo i isporučujemo sve vrste žitarica i uljarica

PROIZVODIMO:

- sve vrste pšeničnog brašna
- sve vrste gotovih smjesa, dopunske krmne smjese i vipo dodatke - brašnate i peletirane u ambalaži i rinfuzi - uz vlastiti tov svinja i proizvodnju prasadi
- veliki broj vrsta kruha, peciva, kolača, bureka i drugo
- octove: alkoholni, jabučni, vinski - samo iz kvalitetne prirodne sirovine.

dugoročno smo orjentirani isključivo na kvalitetu proizvoda kojima se postižu vrhunski rezultati i zadovoljstvo naših kupaca

Potražite naše proizvode; Mikeš, vipo i ostale jer se nećete razočarati.