Roczn. PZH, 1980 T. XXXI, NR 6

LUDWIK CZERWIECKI

WPŁYW CZYNNIKÓW FIZYKOCHEMICZNYCH NA OCHRATOKSYNĘ A ORAZ OZNACZANIE JEJ ZAWARTOŚCI W ZBOŻACH METODĄ SPEKTROFLUORYMETRYCZNĄ

CZ. I. WPŁYW ROZPUSZCZALNIKA, PROMIENIOWANIA UV ORAZ WARTOŚCI pH NA FLUORESCENCJĘ OCHRATOKSYNY A*)

Z Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku
Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: prof. dr *M. Nikonorow*

Zbadano wpływ rodzaju rozpuszczalnika, promieniowania UV oraz wartości pH wodnych roztworów ochratoksyny A na postać widm wzbudzenia i emisji oraz względną intensywność fluorescencji w celu wybrania optymalnych warunków oznaczania ochratoksyny A metodą spektrofluorymetryczną.

Mikotoksyny są związkami o różnej budowie chemicznej. Względnie często spotykane są pochodne kumaryny, cykliczne peptydy, antrachinony, pyrony, steroidy oraz podstawione kwasy tłuszczowe. Do najczęściej spotykanych mikotoksyn mających duże znaczenie z punktu widzenia toksykologicznego oraz w etiologii niektórych chorób zaliczamy m. in. ochratoksyny a zwłaszcza ochratoksynę A ze względu na jej szkodliwy wpływ na wątrobę i nerki wielu gatunków zwierząt.

Ochratoksyna A produkowana głównie przez *Aspergillus ochraceus* występująca najczęściej w zbożach jest pochodną izokumaryny połączoną wiązaniem peptydowym z L-fenyloalaniną.

Do metod jej oznaczania opartych na fluorescencji w UV zaliczamy chromatografię cienkowarstwową z oceną wizualną lub fluorodensytometryczną. Wykrywalność tych metod waha się w granicach od 4—100 μg/kg w zależności od produktu spożywczego i stosowanej metodyki.

W piśmiennictwie nie napotkano dotychczas metod spektrofluorymetrycznych oznaczania tej toksyny z wyjątkiem metody enzymatycznej opisanej przez *Hulta* i *Gatenbecka*.

Także tylko nieliczne prace dotyczyły wpływu na ochratoksynę rodzaju rozpuszczalnika, wartości pH, promieniowania UV, chromatografii cienkowarstwowej czy sposobu eluacji w aspekcie ich oddziaływania na końcowy wynik analizy.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

W celu określenia wpływu wymienionych czynników na końcowy wynik oznaczenia metodą spektrofluorymetryczną zbadano wzorcowe rozwtory ochratoksyny A w różnych rozpuszczalnikach uwzględniając wpływ promieniowania UV oraz wartości pH w wodnych roztworach. Posługiwano się metodą pomiaru względnej intensywności fluorescencji w roztworach oraz chromatografią cienkowarstwową.

---

*) Wyciąg z pracy doktorskiej. Praca wykonana w ramach problemu MR-12.

Aparatura

1) spektrofluorymetr Aminco-Bowman z lampą ksenonowo-rtęciową i fotopowielaczem 1 P-21, 2) spektrofotometr UV — Unicam, 3) pH-metr LBS-66, 4) mieszadło magnetyczne MM-5, 5) mikrowstrząsarka typ 326 m, 6) aparat do powlekania płytek f-my Quickfit.

Odczynniki

1) ochratoksyna A — roztwór podstawowy w chloroformie o stężeniu 70,5 $\mu g/cm^3$ *). Przez rozcieńczenie tego roztworu otrzymano rozwtory robocze o odpowiednich stężeniach w chloroformie, 2) roztwory ochratoksyny A w etanolu 95°, etanolu absolutnym, etanolu 70°, metanolu, chlorofmie, benzenie i benzenie z kwasem octowym (99 + 1) o stężeniu 0,1 $\mu g/cm^3$, 3) roztwór siarczanu chininy w 0,1 n H_2SO_4 o stężeniu 1,0 $\mu g/cm^3$, 4) wzorcowe roztwory $K_2Cr_2O_7$ do określania współczynnika korekcji spektrofotometru, 5) chloroform do spektroskopii f-my *Merck*, 6) benzen do spektroskopii fluorescencyjnej f-my *Merck*, 7) metanol do spektroskopii fluorescencyjnej f-my *Merck*, 8) etanol absolutny do spektroskopii, 9) etanol 95° do spektroskopii fluorescencyjnej f-my *Merck*, 10) etanol 70° do spektroskopii, 11) kwas octowy lodowaty cz.d.a., 12) kwas azotowy stężony, 13) kwas solny stężony, 14) kwas cytrynowy cz.d.a, 15) kwas borny cz.d.a., 16) sodu wodorotlenek cz.d.a., 17) sodu podchloryn — około 5%, 18) żel krzemionkowy G f-my *Merck*, 19) woda redestylowana, 20) azot sprężony w butli.

Szkło będące w kontakcie z materiałem toksycznym moczono w rozwtorze 5% podchlorynu sodu a następnie po wypłukaniu i normalnym myciu wytrawiano w stężonym kwasie azotowym.

Wykonanie doświadczenia

Wyznaczanie widm wzbudzenia i emisji oraz pomiar względnej intensywności fluorescencji ochratoksyny A w różnych rozpuszczalnikach: do kolb miarowych poj. 10 cm^3 dodawano pipetą po 1 cm^3 chloroformowego wzorca ochratoksyny (5,0 $\mu g/cm^3$). Chloroform odparowywano w strumieniu azotu, kolby dopełniano do kreski badanymi rozpuszczalnikami: etanolem 95°, etanolem absolutnym, etanolem 70°, metanolem, chloroformem, benzenem, oraz benzenem z kwasem octowym (99 + 1). Otrzymywano rozwtory o stężniu 0,5 $\mu g/cm^3$. Następnie ustalono maksima wzbudzenia i emisji ochratoksyny A w przygotowanych roztworach, wykreślono odpowiednie widma oraz mierzono intensywność fluorescencji (ryc. 1, tab. I).

Wykreślanie krzywych wzorcowych: do kolb miarowych poj. 10 cm^3 dodawano pipetą wzorcowe roztwory ochratoksyny A w badanych rozpuszczalnikach o stężeniu 0,1 $\mu g/cm^3$ w ilościach: 1,0; 2,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; 10,0 cm^3. Kolby uzupełniano do kreski badanymi rozpuszczalnikami co odpowiadało 0,01—0,1 $\mu g/cm^3$ ochratoksyny A.

Mierzono intensywność fluorescencji w zależności od stężenia względem siarczanu chininy przy następujących długościach fal wzbudzenia i emisji: etanol 95° — 380/430 nm, etanol absolutny — 380/428 nm, etanol 70° — 380/440 nm, metanol — 380/425 nm, chloroform — 340/470 nm, benzen — 340/470 nm, benzen + kwas octowy lodowaty — 340/470 nm. Zależność tę przedstawiono na ryc. 2.

Badanie wpływu wartości pH na fluorescencję:

a) przygotowanie wodnego roztworu ochratoksyny A: do zlewki o poj. 150 cm^3 odmierzono 17,75 cm^3 ochratoksyny A (70,5 $\mu g/cm^3$). Zawartość zlewki odparowywano do sucha w strumieniu azotu na łaźni wodnej w temperaturze 50°C, a pozostałość rozpuszczano w wodzie przy użyciu mieszadła magnetycznego przez 5 godzin w temperaturze pokojowej. Roztwór przenoszono ilościowo do kolby miarowej poj. 100 cm^3, którą uzupełniano wodą do kreski. Po dokładnym wymieszaniu kolbę pozostawiono na noc w temperaturze pokojowej. Otrzymano wodny roztwór ochratoksyny A o stężeniu 12,5 $\mu g/cm^3$.

b) przygotowanie buforu boranowo-cytrynianowo-fosforanowego wg. *Teorella* i *Stenhagena:* do kolby miarowej poj. 500 cm^3 dodano 1,77 g kwasu bornego, który rozpuszczano w niewielkiej ilości wody redestylowanej, następnie 7,0 g kwasu cytrynowego, 171,5 cm^3 1n NaOH i 2,28 cm^3 85% kwasu fosforowego. Kolbę uzupeł-

*) stężenie wzorca sprawdzano spektrofotometrycznie.

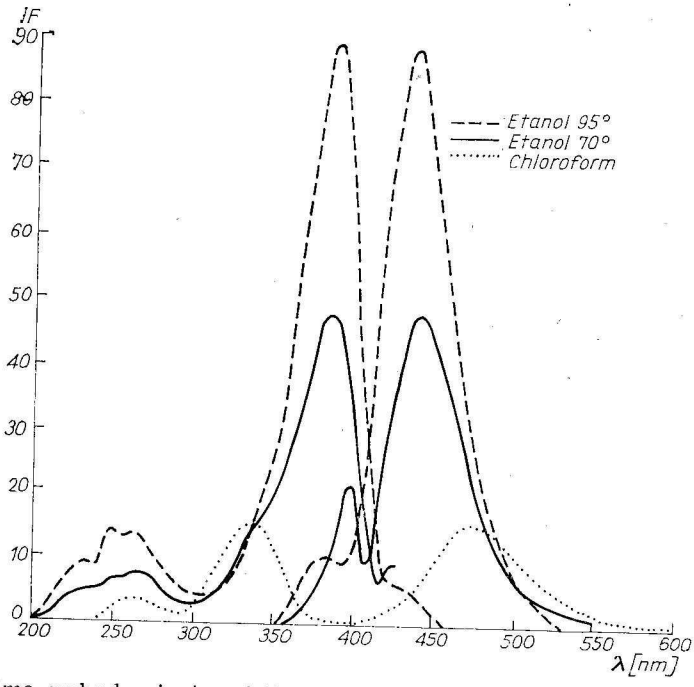
niano wodą redestylowaną do kreski i po dokładnym wymieszaniu, z roztworu tego pobierano po 10,0 cm³ i przenoszono do kolb miarowych poj. 50 cm³, do których dodawano następnie 0,1 n HCl w ilościach 2,35—19,05 cm³ oraz wodę do końcowej objętości. Otrzymano roztwory buforowe o następujących wartościach pH (po oznaczeniu na pH-metrze): 6,0; 6,25; 6,65; 6,9; 7,0; 7,8; 8,2; 8,5; 8,9; 9,0; 9,3; 9,5; 9,7; 10,1; 10,5; 10,8; 11,0; 11,2; 11,3; 11,5; 11,9.

c) pomiar intensywności fluorescencji: do kolb miarowych poj. 10 cm³ odpipetowano po 400 μl wodnego roztworu ochratoksyny A, kolby uzupełniano do kreski przygotowanymi roztworami buforowymi. Otrzymano roztwory o stężeniu 0,5 μg/cm³ ochratoksyny. Następnie mierzono fluorescencję otrzymanych roztworów przy 380/440 nm. Równolegle, w celu porównania, zmierzono także fluorescencję wodnego roztworu ochratoksyny A (pH 6,7—6,8) o identycznym stężeniu. W pomiarach uwzględniono fluorescencję próbek ślepych tzn. roztworów buforowych nie zawierających ochratoksyny. Zależność intensywności fluorescencji od pH przedstawiono na ryc. 3.

Badanie wpływu promieniowania UV na ochratoksynę A w różnych rozpuszczalnikach: badania wykonano w następujących roztworach o stężeniu 0,1 μg/cm³: w etanolu 95°, etanolu absolutnym, etanolu 70°, metanolu, chloroformie, benzenie i benzenie z kwasem octowym (99 + 1). Badane roztwory w szczelnie zamkniętych kuwetach kwarcowych naświetlano 2 godziny w spektrofluorymetrze światłem o dł. fali 360 nm przy maksymalnych szerokościach szczelin wejściowych, mierząc w odstępach 30 min. intensywność fluorescencji. Wyniki ujęto w tabeli II. Naświetlane roztwory po odparowaniu i rozpuszczeniu w chloroformie nanoszono na płytki pokryte żelem krzemionkowym równolegle z wzorcem nie naświetlanym. Jedną płytkę rozwijano w mieszaninie benzenu, metanolu i kwasu octowego (18 + 1 +1), drugą w eterze, metanolu i wodzie (60 + 20 +15). Po wysuszeniu, chromatogramy obserwowano pod lampą UV.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Na ryc. 1 ograniczono się tylko do przedstawienia widm wzbudzenia i emisji ochratoksyny A (0,5 μg/cm³) w etanolu 95°, etanolu 70°, oraz w chloroformie. W pozostałych rozpuszczalnikach tj. w metanolu, etanolu absolutnym postać widm wzbudzenia i emisji była zbliżona do widm



Ryc. 1. Widma wzbudzenia i emisji ochratoksyny A w różnych rozpuszczalnikach

w etanolu 95°, a widma w benzenie i benzenie z kwasem octowym odpowiadały charakterem widmom w chloroformie. Ochratoksyna w etanolu 95° w stężeniu nie przekraczającym 0,5 μg/cm³ posiada maksima wzbudzenia: 233, 250, 263 i 380 nm przy emisji 430 nm (ryc. 1, tab. I).

Tabela I. Fluorescencja ochratoksyny A w różnych rozpuszczalnikach (0,5 μg/cm³)

Rozpuszczalnik	Długość fali wzbudzenia nm	Długość fali emisji nm	Względna intensywność fluorescencji
Etanol 95°	233	430	9,0
	250	430	14,0
	263	430	14,0
	380	430	90,0
Etanol absolutny	233	428	10,0
	250	428	13,0
	263	428	13,0
	380	428	90,0
Etanol 70°	233	440	5,0
	250	440	7,0
	263	440	7,0
	380	440	49,0
Metanol	233	425	9,0
	250	425	15,0
	263	425	14,0
	315	425	8,0
	380	425	95,0
Chloroform	260	470	3,0
	340	470	15,0
Benzen	340	470	10,3
Benzen + kwas octowy (99 + 1)	340	470	18,0

Jak wynika z tabeli II bardzo zbliżone rezultaty otrzymano dla roztworów ochratoksyny o tym samym stężeniu w etanolu absolutnym, etanolu 70° i metanolu. Powyżej stężenia 0,5 μg/cm³ w roztworach etanolu 95° obserwowano nowe maksimum wzbudzenia przy 340 nm z emisją przy 450 nm.

W roztworach etanolu absolutnego o stężeniu przekraczającym 0,5 μg/cm³ obserwowano maksimum wzbudzenia — 340 nm z emisją przy 448 nm.

W metanolu powyżej tego stężenia pojawiało się maksimum 340/450 nm. Stężenie 0,5 μg/cm³ w wymienionych rozpuszczalnikach wydaje się być zarazem stężeniem granicznym tj. takim, powyżej którego zależność między intensywnością fluorescencji a stężeniem przestaje mieć liniowy charakter.

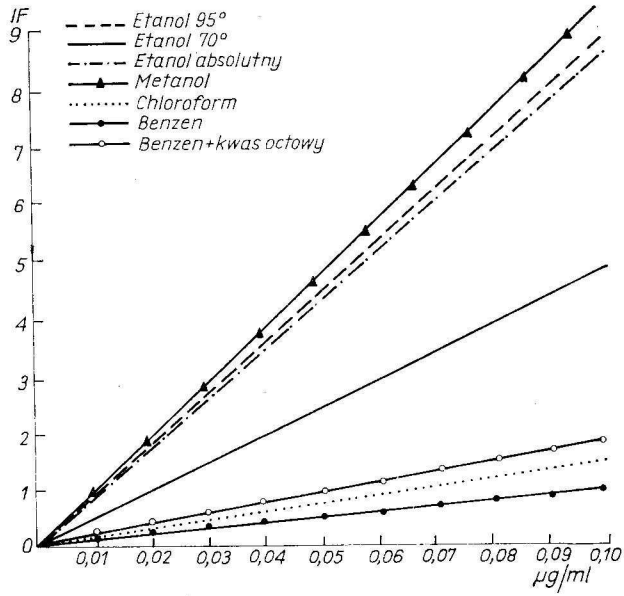
W roztworach chloroformowych (ryc. 1) maksimum wzbudzenia i emisji wynosiło 340/470 nm, podobnie jak w przypadku benzenu i mieszaniny benzenu z kwasem octowym (99 + 1).

Tabela II. Wpływ światła UV na ochratoksynę A w różnych rozpuszczalnikach (0,1 μg/cm³)

Rozpuszczalnik	Względna intensywność fluorescencji	Czas ekspozycji (minuty)
Etanol 95° (380/430 nm)	13,00	0
	13,10	30
	13,00	60
	13,05	90
	13,00	120
Etanol absolutny (380/428 nm)	13,20	0
	13,20	30
	13,20	60
	13,15	90
	13,20	120
Etanol 70° (380/440 nm)	5,40	0
	5,40	30
	5,40	60
	5,40	90
	5,40	120
Metanol (380/425 nm)	13,50	0
	13,50	30
	13,50	60
	13,55	90
	13,45	120
Chloroform (340/470 nm)	2,10	0
	2,10	30
	2,00	60
	2,15	90
	2,10	120
Benzen (340/470 nm)	1,60	0
	1,60	30
	1,60	60
	1,55	90
	1,55	120
Benzen+kwas octowy (99+1) (340/470 nm)	2,50	0
	2,50	30
	2,50	60
	2,50	90
	2,50	120

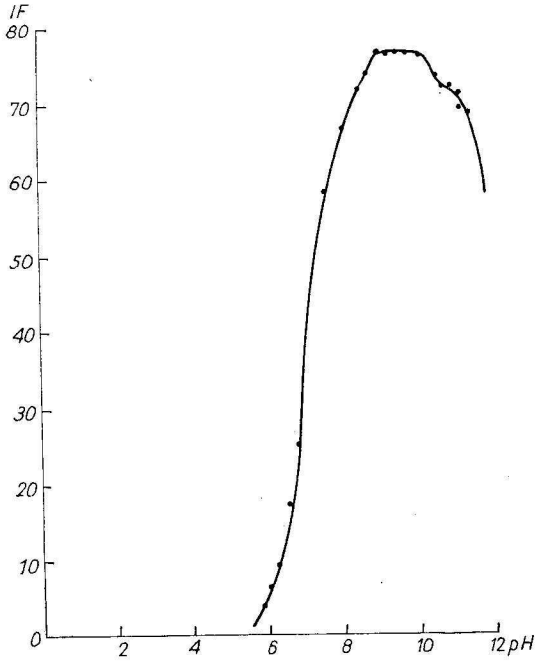
Nieco odmienne rezultaty otrzymali Nelly i West. Roztwory ochratoksyny A w etanolu absolutnym w stężeniach $1,2 \cdot 10^{-4}$ — $4,8 \cdot 10^{-4}$ M (48,36—193,4 μg/cm³) posiadały następujące długości fal wzbudzenia: 270, 312 i 345 nm z emisją przy 465 nm. Dla roztworów w stężeniach $1,5 \cdot 10^{-6}$ — $1,2 \cdot 10^{-4}$ M (0,604—48,36 μg/cm³): 230, 333 nm z emisją przy 465 nm. Dla stężeń $8 \cdot 10^{-9}$ — $1,5 \cdot 10^{-6}$ M (0,00322–0,604 μg/cm³): 230, 376 nm przy emisji 426 nm i dla roztworów w stężeniach $1,9 \cdot 10^{-7}$ — $3,0 \cdot 10^{-5}$ M (0,076—1,2 μg/cm³): 230, 333 nm przy emisji 465 nm.

Tę różnorodność w występowaniu maksimów wzbudzenia i emisji w zależności od stężenia autorzy ci tłumaczą efektem jonizacji (roztwory rozcieńczone) i procesem doń przeciwnym (roztwory stężone), ponieważ zakwaszone roztwory ochratoksyny A posiadały podobne widma do roz-



Ryc. 2. — Krzywe wzorcowe ochratoksyny A w różnych rozpuszczalnikach.

tworów stężonych, a zalkalizowane — do roztworów rozcieńczonych. Ze względu na fakt, iż w roztworach alkoholowych intensywność fluorescencji ochratoksyny A przybierała najwyższe wartości, z wyjątkiem etanolu 70° (tab. I, ryc. 2) rozpuszczalniki te są najbardziej przydatne z punktu widzenia analitycznego.



Ryc. 3. — Zależność intensywności fluorescencji ochratoksyny A od wartości pH w wodnych roztworach.

Fluorescencja ochratoksyny w chloroformie, benzenie oraz mieszaninie benzenu z kwasem octowym była znacznie słabsza (6—9 razy) niż w wymienionych poprzednio rozpuszczalnikach. W badaniach roztworów wodnych ochratoksyny poza przesunięciem emisji w kierunku fal dłuższych — 440 nm przy wzbudzeniu: 233, 250, 340 i 380 nm na uwagę zasługuje wyraźny wpływ wartości pH na intensywność fluorescencji. Jak wynika z ryc. 3 wartość fluorescencji ochratoksyny A w roztworach o różnym pH osiąga maksimum w pH 9,0—10,1. (ryc. 3).

Intensywność fluorescencji w buforze o pH 9,3 jest 3,5 razy wyższa niż w wodzie o pH 6,7—6,8. Zależność tę próbowano wykorzystać w niniejszej pracy do celów analitycznych (możliwość zwiększenia granicy wykrywalności). Próby jednak z alkalicznymi roztworami wodno-alkoholowymi nie przyniosły oczekiwanych rezultatów z uwagi na to, że wzrost intensywności fluorescencji nie kompensował poprzedniego jej spadku spowodowanego rozcieńczaniem etanolu wodą.

W badaniach własnych nie zaobserwowano wpływu światła UV na ochratoksynę w badanych rozpuszczalnikach. Wyniki zarówno bezpośredniego pomiaru intensywności fluorescencji roztworów ochratoksyny A w określonych odstępach czasu (tab. II) ani chromatografia cienkowarstwowa (jednolite plamy o wartościach R_f analogicznych do plam wzorca nie naświetlanego) nie sugerują aby światło, a zwłaszcza światło otaczające miało być czynnikiem katalizującym rozkład czy innego rodzaju przemianę cząsteczki ochratoksyny, przynajmniej w stopniu, który mógłby być przyczyną błędów analitycznych.

Nelly i West nie obserwowali także zmian w widmach fluorescencji czy UV naświetlanych roztworów ochratoksyny A, wspominając wprawdzie o występowaniu na chromatogramach dodatkowych plam: jednej odpowiadającej wzorcowi ochratoksyny A oraz drugiej o analogicznej barwie fluorescencji ale nieco innej wartości R_f pochodzącej od niezidentyfikowanego związku, który mógłby powstać ewentualnie pod wpływem naświetlania roztworów macierzystych.

WNIOSKI

1. Ochratoksynę A można oznaczać spektrofluorymetrycznie w etanolu 95°, etanolu absolutnym, metanolu, przy czym promieniowanie UV a tym bardziej światło otaczające nie wydają się być czynnikami wpływającymi istotnie na wyniki oznaczania.
2. Fluorescencja wodnych roztworów ochratoksyny A jest zależna od wartości pH i osiąga swe maksimum w zakresie pH 9,0—10,1. Zależności tej nie udało się wykorzystać w celu zwiększenia wykrywalności, ze względu na fakt, iż wzrost intensywności fluorescencji roztworów wodno-alkoholowych nie kompensował poprzedniego jej spadku spowodowanego rozcieńczaniem etanolu wodą.

Л. Червецки

ВЛИЯНИЕ ФИЗИКОХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ОХРАТОКСИН А И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЕГО СОДЕРЖАНИЯ В ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУРАХ СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Ч. I. Влияние растворителей, ультрафиолетовых лучей и pH на флуоресценцию охратоксина А

Резюме

В результате проведённых исследований установлено, что наиболее пригодными растворителями для измерений флуоресценции охратоксина А явля-

ются: этанол 95°, абсолютный этанол и метанол. В этих растворителях интенсивность флуоресценции была в 6—9 раз больше чем в хлороформе, бензоле и бензоле с уксусной кислотой и приблизительно в 2 раза больше чем в этаноле 70°.

Были получены спектры возбуждения и эмиссионные спектры охратоксина А в исследуемых растворителях.

В результате подвержения исслекуемых растворов охратоксина А действию ультрафиолетовых лучей не установлено изменений интенсивности флуоресценции в этих растворах и дополнительных пятен на хроматограммах.

В исследованиях водных растворов охратоксина А установлена зависимость интенсивности флуоресценции от pH. При pH 9,0—10,1 наблюдали максимум флуоресценции охратоксина А.

L. Czerwiecki

EFFECT OF PHYSICOCHEMICAL FACTORS ON OCHRATOXIN A AND DETERMINATION OF ITS CONTENT IN CEREALS BY SPECTROFLUOROMETRY

Part I. Effects of solvent, ultraviolet radiation and pH value on ochratoxin A fluorescence

Summary

It was found in the reported investigations that ethanol 95°, absolute ethanol and methanol were the most suitable solvents for measuring ochratoxin A fluorescence. In these solvents fluorescence intensity was 6—9 times higher than in chloroform, benzene and benzen with acetic, acid, and about twice as high as in 70° ethanol.

Spectra of ochratoxin fluorescence excitation and emission in the tested solvents were plotted.

After irradiation of the tested solutions of ochratoxin A with ultraviolet rays no changes of fluorescence intensity were found in the tested solutions, and no additional spots were observed on chromatograms.

In testing aqueous solutions of ochratoxinn A a relationship was noticed between fluorescence intensity and pH. At pH 9.0—10.1 the fluorescence of ochratoxin A was found to be maximal.

PIŚMIENNICTWO

Wykaz piśmiennictwa znajduje się w pracy doktorskiej dostępnej w Bibliotece Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie.

Dn. 28.VI.1980 r.
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24