

LUDWIK CZERWIECKI

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

CZ. II DOBÓR OPTIMALNYCH WARUNKÓW CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ, SPOSOBU EKSTRAKЦИИ OCHRATOKSYNY A ORAZ JEJ ZAWARTOŚĆ W ZBOŻACH*

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

Opracowano optymalne warunki oznaczania ochratoksyny A w zbożach i oznaczono jej zawartość w próbkach pszenicy i żyta, pochodzących z różnych regionów kraju.

W pierwszej części pracy [1] przedstawiono wyniki badań wpływu na ochratoksynę A: promieniowania UV, rodzaju rozpuszczalnika i pH posługując się jako kryterium oceny zmianami względnej intensywności fluorescencji ochratoksyny. Posłużyły one jako wskazówki do dalszego postępowania analitycznego. Celem niniejszej pracy było zbadanie dalszych istotnych czynników: warunków chromatografii cienkowarstwowej, elucacji ochratoksyny z chromatogramów oraz ekstrakcji i oczyszczania ekstraktów. W oparciu o uzyskane wyniki opracowano optymalną spektrofлуometryczną metodę oznaczania ochratoksyny A w zbożach, którą zbadano próbki pszenicy i żyta z różnych regionów kraju pochodzące ze zbiorów 1976—77 roku.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Aparatura

1) homogenizator typ 302 Unipan, 2) kolumny szklane 17×400 mm, 3) wyparka próżniowa f-my Büchi oraz aparatura wymieniona w pierwszej części pracy.

Odczynniki

1) aceton cz.d.a. 2-krotnie destylowany, 2) amoniak 25% cz.d.a., 3) benzen cz.d.a. 2-krotnie destylowany, 4) chloroform cz.d.a. 2-krotnie destylowany, 5) eter etylowy pro narcosi, 6) n-heksan cz. 2-krotnie destylowany, 7) kwas mrówkowy 90% f-my Merck, 8) kwas fosforowy 85% cz.d.a., 9) kwas solny stęż. cz.d.a., 10) metanol cz.d.a. 2-krotnie destylowany, 11) octan etylu cz. 2-krotnie destylowany, 12) toluen cz.d.a. 2-krotnie destylowany, 13) wodorowęglan sodu cz.d.a., 14) żel krzemionkowy Adsorbosil-1, 15) żel krzemionkowy G-HR, 16) żel krzemionkowy MN-H, 17) żel krzemionkowy Serva, 18) żel krzemionkowy Chempol, 19) colit 545, 20) bibuła chromatograficzna f-my Schleicher a. Schüll, 21) wata baweliana oraz odczynniki wymienione w I-tej części pracy.

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



C-2805

WYKONANIE DOŚWIADCZENIA

Dobór warunków chromatografii cienkowarstwowej i rozpuszczalnika do eluacji

Stosowano płytki szklane pokryte następującymi adsorbentami, warstwą grubości 0,25 mm: żelem krzemionkowym G, adsorbosilem-1, żelem krzemionkowym MN-GHR, MN-H oraz f-my Chemapol i Serva. Płytki aktywowano w suszarce w temperaturze 130°C przez 90 min. Na każdą płytkę nanoszono po 30 μ l wzorca ochratoksyny A (5,0 μ g/cm³) — po trzy plamy dla każdego z badanych eluentów. Chromatogramy rozwijano w niewysyczonej komorze chromatograficznej w mieszaninie benzenu, metanolu i kwasu octowego lodowatego (18+1+1) do wysokości 14 cm, następnie suszono w strumieniu ciepłego powietrza a fluoryzujące w świetle UV plamy zdrapywano i przenoszono do próbek z korkiem szlifowym. Równolegle do osobnych próbek przenoszono pasma żelu nie zawierające badanej toksyny (próbki ślepe), z którymi postępowano analogicznie jak z próbkami badanymi.

Ochratoksynę eluowano 4 cm³ każdego z badanych rozpuszczalników wytrąsając 5 minut (etanolem 95°, etanolem absolutnym, etanolem 70°, metanolem i benzenem z kwasem octowym (99+1)). Roztwory sączone do próbek przez sączek z bibuły, który przemywano następnie 8 cm³ odpowiedniego rozpuszczalnika. Zawartość próbek odparowywano do sucha na łaźni wodnej w temp. 50°C w strumieniu azotu i rozpuszczano w 3 cm³ etanolu 95°.

Intensywność fluorescencji mierzono przy 380/430 nm. Zawartość ochratoksyny A odczytywano z krzywej wzorcowej w etanolu 95°. Następnie zbadano 24 systemy rozwijające stosując żel MN-H. Wyniki przedstawiono w tabelach I, II.

Wybór optymalnego sposobu ekstrakcji

Wypróbowano 9 różnych wariantów ekstrakcji ochratoksyny A z pszenicy i żyta: I-chloroformem z metanolem (97+3), II-chloroformem z kwasem fosforowym 0,1 M (10+1), III-chloroformem, IV-chloroformem z wodą (10+1), V-benzenem z kwasem octowym lodowatym (95+5), VI-chloroformem z metanolem (80+20), VII-benzenem z wodą (10+1), VIII-benzenem z kwasem fosforowym 0,1 M (10+1) i IX-metanolem z wodą (50+40). 40 g zmielonej, wymieszanej średniej próbki laboratoryjnej pszenicy i żyta fortifikowano ochratoksyną A a następnie homogenizowano 3 min przy 11 tys. obr./min. z 200 cm³ każdego z badanych rozpuszczalników z dodatkiem 5,0 g celitu. Ekstrakty sączone przez sączek karbowany z bibuły do kolb okrągłodennych poj. 250 cm³ (do dalszej analizy pobierano 100 cm³ przesączu). Jednocześnie do innych kolb okrągłodennych poj. 250 cm³ dodawano 100 cm³ każdej ze stosowanych w danym wariantcie mieszaniny ekstrakcyjnej i postępowano dalej jak w przypadku próbek badanych (ślepa odczynnikowa).

Przesącz uzyskany w każdym z wariantów ekstrakcji zagęszczano do sucha w wyparce próżniowej w temp. 50—55°C. W przypadku wariantu V-ego pozostałość kwasu octowego odparowywano na łaźni wodnej w strumieniu azotu do całkowitego zaniku zapachu octu. Pozostałości (warianty I—VIII) rozpuszczano w 50 cm³ chloroformu oraz 40 cm³ n-heksanu. W przypadku wariantu IX-ego do rozpuszczenia pozostałości stosowano 100 cm³ 1% roztworu wodorowęglanu sodowego a po doprowadzeniu pH do 2 przy użyciu 3n kwasu solnego, zakwaszoną fazę wodną ekstrahowano 3-krotnie 60 cm³ chloroformu.

Powstałe emulsje odwirowywano, ekstrakty łączono i odparowywano do sucha w temp. 50—55°C w wyparce próżniowej.

Zawartość kolby przenoszono ilościowo mieszaniną benzenu z kwasem octowym (99+1) do próbek poj. 15 cm³, której zawartość odparowywano do sucha w strumieniu azotu na łaźni wodnej. Pozostałość w próbce rozpuszczano w 0,5 cm³ benzenu z kwasem octowym (99+1) wytrąsając na mikrowstrząsarce. Probówkę przechowywano w lodówce do czasu wykonania chromatografii cienkowarstwowej. Ekstrakty uzyskane wg wariantów I—VIII oczyszczano na kolumnie z celitem. Przygotowanie kolumny: 2g celitu mieszano w zlewce poj. 50 cm³ z 1 cm³ 1,25% roztworem wodorowęglanu sodu. Uzyskaną mieszaninę wypełniano kolumnę zabezpieczoną zatyczką z waty bawełnianej. Ekstrakty rozpuszczone w mieszaninie chloroformu z n-heksanem nanoszono na kolumnę. Eluat odrzucało a kolumnę przemywano 75 cm³ chloroformu. Drugi eluat również odrzucało. Następnie eluowano ochratoksynę 100 cm³ mieszaniny benzenu z kwasem octowym (99+1) do kolb okrągłodennych poj. 250 cm³.

Eluaty odparowywano w wyparce próżniowej w temp. 55°, pozostałość rozpuszczano w mieszaninie benzenu z kwasem octowym (99+1) i przenoszono ilościowo do próbek poj. 15 cm³. Rozpuszczalnik odparowywano w strumieniu azotu a pozostałość w próbkach rozpuszczano w 0,5 cm³ benzenu z kwasem octowym (99+1).

Chromatografia cienkowarstwowa i oznaczenie spektrofлуориметричне:

na płytkę pokrytą żelom MN-H nanoszono ekstrakty w ilościach 100 μl w pasmach długości 1 cm, szer. 0,3 cm. Analogicznie postępowano z próbką ślepą. Obok nanoszono 30 i 60 μl wzorca ochratoksyny A (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$). Płytki rozwijano w mieszaninie benzenu, metanolu i kwasu octowego (48+4+2) do wysokości 14 cm od linii startu. Po wysuszeniu chromatogramów, fluoryzujące w świetle UV plamy przenoszono do próbek i eluowano toksynę 4 cm^3 metanolu wytrącając 5 min. na mikrowstrząsarce. Eluaty sączone do próbek, sączek przemywano 8 cm^3 metanolu a zawartość próbek odparowywano w strumieniu azotu na łaźni wodnej w temperaturze 55°. Pozostałość rozpuszczano w etanolu 95° (3 cm^3). Intensywność fluorescencji roztworów mierzono wobec siarczanu chininy przy 380/430 nm stosując następujące szczeliny: 5,0; 4,0; 5,0; 2,0; 0,5 i 1,0 mm. Fluorescencję próbki ślepej odczytnikowej odejmowano od fluorescencji próbek badanych. Wyniki w $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ochratoksyny A odczytywano z roboczej krzywej wzorcowej.

Przygotowanie krzywej: krzywą wzorcową wykresano w zakresie 0,02—0,16 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Na płytkę pokrytą żelom MN-H nanoszono wzorce ochratoksyny w ilościach: 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 μl (po dwa powtórzenia na każdą ilość wzorca co po eluacji i rozpuszczeniu odpowiadało stężeniom 0,02—0,16 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$). Płytkę rozwijano w warunkach opisanych poprzednio, fluoryzujące plamy przenoszono do próbek i postępowano analogicznie jak w przypadku oznaczania ochratoksyny w ekstraktach fortyfikowanych próbek pszenicy i żyta.

Równolegle do oddzielnej próbki przenoszono niefluoryzujące pasmo żelu jako próbkę ślepą. Krzywą wykresano wyrażając zależność intensywności fluorescencji od stężenia w warunkach aparaturowych jak wyżej.

Dla każdego z wariantów ekstrakcji przy danym poziomie fortyfikacji (dla pszenicy 30 i 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$) wykonano po 6 równoległych oznaczeń (Tab. III).

W przypadku żyta wykonano po 6 równoległych oznaczeń przy poziomie 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$. W warunkach dotychczasowych badań następujący schemat postępowania przyjęto jako metodę optymalną: oznaczania ochratoksyny A w zbożach (każdy z etapów opisano szczegółowo w poprzedniej części pracy): 1) ekstrakcja 40 g próbki mieszaniną benzenu z kwasem octowym (95+5) z dodatkiem 5 g celitu w homogenizatorze, 2) oczyszczanie na kolumnie z celitem, 3) chromatografia cienkowarstwowa na żelu MN-H z rozwijaniem w mieszaninie benzenu, metanolu i kwasu octowego (48+4+2), 4) elucja z chromatogramu metanolem, 5) oznaczanie intensywności fluorescencji w etanolu 95° przy 380/430 nm, 6) określanie stężenia na podstawie roboczej krzywej wzorcowej po elucji ochratoksyny z chromatogramów.

W celu scharakteryzowania metody wykonano w przypadku pszenicy 10 równoległych oznaczeń przy poziomach fortyfikacji 15 i 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i 4 oznaczenia uzupełniające liczbę oznaczeń do 10 przy poziomach 30 i 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Dla żyta wykonano 10 równoległych oznaczeń dla poziomów 15, 60, i 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i 4 dodatkowe dla poziomu 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Wyniki przedstawiono w tabeli IV.

Badanie pszenicy i żyta na zawartość ochratoksyny A

Opracowaną metodą zbadano 34 próbki zboża z 1976 r. w tym 17 pszenicy i 17 próbek żyta oraz 46 próbek z 1977 r. — 21 próbek pszenicy i 25 próbek żyta*).

W przypadku gdy wizualna ocena chromatogramów nastęrczała pewne trudności ze względu na obecność fluoryzujących plam substancji balastowych o zbliżonych wartościach Rf i barwie fluorescencji do ochratoksyny A, płytkę wstawiano do komory wysyczonej parami amoniaku na 20 min. W warunkach tych obserwowany wzrost intensywności fluorescencji badanych plam z jednoczesną zmianą barwy z jasnoniebieskiej do niebieskofioletowej potwierdzał obecność ochratoksyny A.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Jak wynika z tabeli I najodpowiedniejszym adsorbentem do chromatografii cienkowarstwowej jest żel krzemionkowy MN-H a rozpuszczalnikiem eluującym metanol.

Średni procentowy odzysk wzorca ochratoksyny A eluowanego metanolem wynosi — 80,0%. Dobre rezultaty otrzymano także na żelu MN-GHR — 78,5% i na Adsorbosilu-1 — 78,8% w przypadku tego samego eluenta. Pozostałe adsorbenty i rozpuszczalniki dawały znacznie gorsze wyniki. Zdolność elująca stosowanych eluentów w większości przypadków, począwszy

*) Autor składa serdeczne podziękowania Centrali Przemysłu Zbożowo-Młynarskiego PZZ w Warszawie za udostępnienie do badań próbek zbóż.

Tabela I. Średni procentowy odzysk ochratoksyny A z chromatogramów w zależności od adsorbenta i rozpuszczalnika elującego

Rozpuszczalnik	Adsorbent					
	Merek	Chema-pol	MN-H	MN-GHR	Serva	Adsorbosil-1
Etanol 95°	75,01	58,64	76,80	74,40	60,80	75,80
Etanol absolutny	55,10	49,70	60,60	58,10	44,10	69,00
Etanol 70°	64,80	60,50	68,10	66,40	50,75	69,85
Metanol	76,80	63,40	80,01	78,50	67,80	78,85
Benzen + kwas octowy (99+1)	68,00	53,80	72,30	71,90	66,90	59,60

od etanolu absolutnego wzrastała poprzez etanol 70°, benzen z kwasem octowym (99+1), etanol 95°, do metanolu, za pomocą którego odzyskiwano najwyższe ilości ochratoksyny A z chromatogramów. Spośród 24 zbędanych systemów rozwijających (tabela II) dobre wyniki w badaniach na wzorcowych roztworach ochratoksyny A dawały m.in. mieszanina octanu etylu, kwasu mrówkowego i toluenu (4+1+5) oraz benzenu z kwasem octowym (90+10) lub benzenu, metanolu i kwasu octowego (18+1+1) a także (24+2+1).

Tabela II. Stosowane fazy rozwijające w chromatografii cienkowarstwowej ochratoksyny A

Skład fazy rozwijającej	
1. Eter etylowy + metanol + woda	—60+20+15
2. Eter etylowy + metanol + woda	—50+40+20
3. Eter etylowy + metanol + woda	—60+40+10
4. Eter etylowy + metanol + woda	—60+40+20
5. Eter etylowy + metanol + woda	—60+40+5
6. Eter etylowy + metanol + woda	—80+20+10
7. Eter etylowy + metanol + woda	—60+30+10
8. Eter etylowy + metanol + woda	—80+20+5
9. Eter etylowy + metanol + woda	—50+40+10
10. Eter etylowy + metanol + 5% kwas octowy	—60+10+0,5
11. Eter etylowy + metanol + woda	—94+5+1
12. Eter etylowy + metanol + kwas octowy lodowaty	—96+4+1
13. Benzen + metanol + kwas octowy lodowaty	—50+10+1
14. Benzen + metanol + kwas octowy lodowaty	—60+10+2
15. Benzen + metanol + kwas octowy lodowaty	—18+1+1
16. Benzen + metanol + kwas octowy lodowaty	—24+2+1
17. Aceton + metanol + woda	—80+10+20
18. Aceton + metanol + woda	—80+10+15
19. Benzen + kwas octowy lodowaty	—90+10
20. Toluenu + octan etylu + kwas mrówkowy	—5+4+1
21. Benzen + metanol + kwas octowy lodowaty	—12+2+1
22. Benzen + woda + kwas octowy lodowaty	—90+1+10
23. Benzen + metanol + kwas octowy lodowaty	—90+5+5
24. Aceton + metanol + woda	—70+10+5

Ten ostatni system okazał się szczególnie korzystny w przypadku ekstraktów żyta ze względu na dogodne rozmieszczenie plam substancji towarzyszących w stosunku do plam wzorca ochratoksyny A. System zale-

cany przez *Nesheima* (benzen, metanol, kwas octowy (18+1+1)) dawał dobry rozdział jedynie w przypadku pszenicy a substancje balastowe znajdujące się w ekstraktach z żyta leżały na chromatogramach zbyt blisko plam ochratoksyny.

Pozostałe układy rozwijające a zwłaszcza te, których podstawowym składnikiem był eter etylowy (eter etylowy, metanol, woda (60+20+15)), dawały również pozytywne rezultaty rozdzielania, w wyniku jednak długotrwałego stosowania, stwierdzono, że najprawdopodobniej na skutek dużej przenośności par eteru wyniki były niepowtarzalne np. w postaci „podwójnego czoła” chromatogramu co występowało często zwłaszcza w przypadku znacznych wahań temperatury otoczenia. Układ zalecany przez *Fritza* (eter, metanol, woda (5+4+2)) dawał zbyt wysokie wartości R_f (ok. 0,95) co czyniło go nieprzydatnym.

W piśmiennictwie napotkano wiele metod ekstrakcji ochratoksyny A i oczyszczania uzyskanych ekstraktów. Niektóre z nich jak np. metoda ekstrakcji chloroformem wg *Fritza* z późniejszą hydrolizą ekstraktu, lub ekstrakcja n-heksanem a następnie wodorowęglanem sodu i chloroformem nie dawały pozytywnych rezultatów ze względu na niski odzysk i niedostateczny stopień oczyszczania ekstraktów.

W tabeli III przedstawiono wartości procentowego odzysku ochratoksyny A przy zastosowaniu różnych metod ekstrakcji.

Metodami charakteryzującymi się najwyższym odzyskiem były: ekstrakcja chloroformem z kwasem fosforowym, benzenem z kwasem fosforowym oraz benzenem z kwasem octowym (95+5). Jakkolwiek różnice między wartościami średniego odzysku tych metod nie były statystycznie istotne (analiza wariancji z klasyfikacją pojedynczą), ze względu na największą czystość ekstraktów i znacznie szybszy przebieg sączenia, jako optymalną wybrano metodę ekstrakcji benzenem z kwasem octowym (95+5).

W tabeli IV zebrano niektóre oszacowania statystyczne metody na przykładzie pszenicy przy różnych poziomach fortyfikacji.

Jak wynika z przedstawionych danych metoda charakteryzuje się dobrym odzyskiem, który w zależności od poziomu fortyfikacji waha się w granicach 68,7—85,1%. Najwyższy procentowy odzysk obserwowano przy poziomie fortyfikacji 60 $\mu\text{g/kg}$. Najniższą wartość odzysku notowano przy poziomie fortyfikacji 30 $\mu\text{g/kg}$.

Maksymalny błąd standardowy średniej odzysku wynosił 4,2%, współczynnik zmienności V% przybierał różne wartości zależnie od poziomu fortyfikacji przyjmując wartość najwyższą przy poziomie 15 $\mu\text{g/kg}$ — 13,3% oraz najniższą przy poziomie 120 $\mu\text{g/kg}$ — 5,4%. Bardzo zbliżone wartości tych oszacowań obserwowano w przypadku próbek żyta.

Wartość 15 $\mu\text{g/kg}$ ochratoksyny A jest zarazem granicą wykrywalności metody. Według *Nesheima* średnia wartość odzysku ochratoksyny A w próbkach jęczmienia przy wizualnej ocenie chromatogramów wynosiła 81% z granicą wykrywalności 12 $\mu\text{g/kg}$. W badaniach międzylaboratoryjnych metoda ta przy wizualnej ocenie pozwala na odzyskanie 88% dodanej ochratoksyny A. Przy ocenie natomiast fluorodensytometrycznej średni odzysk metody wynosił 121%. Różnica ta zdaniem autora spowodowana była tym, iż na skutek równoległego oznaczania ochratoksyny B w tych samych ekstraktach, plamy obu toksyn leżały tak blisko siebie, że fluorodensytmeter rejestrował łączną fluorescencję obu plam w odróżnieniu od oka, które było w stanie je różnicować.

T a b e l a III. Procentowy odzysk ochratoksyny A z fortifikowanych próbek pszenicy i żyta w zależności od sposobu ekstrakcji

Poziom fortyfikacji μg/kg	Sposób ekstrakcji																	
	I		II		III		IV		V		VI		VII		VIII		IX	
	P	Z	P	Z	P	Z	P	Z	P	Z	P	Z	P	Z	P	Z	P	Z
30	60,8	61,2	64,1	64,6	53,5	53,5	56,2	55,8	67,9	67,5	58,3	57,9	57,5	58,1	63,3	62,7	49,1	48,5
120	73,9	—	75,5	—	68,2	—	70,3	—	80,2	—	71,3	—	70,8	—	74,5	—	—	—

I — $\text{CHCl}_3 + \text{CH}_3\text{OH}$ (97+3); II — $\text{CHCl}_3 + \text{H}_3\text{PO}_4$ (10+1); III — CHCl_3 ; IV — $\text{CHCl}_3 + \text{H}_2\text{O}$ (10+1); V — $\text{C}_6\text{H}_6 + \text{CH}_3\text{COOH}$ (95+5); VI — $\text{CHCl}_3 + \text{CH}_3\text{OH}$ (80+20); VII — $\text{C}_6\text{H}_6 + \text{H}_2\text{O}$ (10+1); VIII — $\text{C}_6\text{H}_6 + \text{H}_3\text{PO}_4$ (10+1) IX — $\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ (30+40).

P — pszenica

Ż — żyto

Dla każdego poziomu fortyfikacji i sposobu ekstrakcji wykonano $n = 6$ oznaczeń.

Tabela IV. Zestawienie oszacowań statystycznych metody oznaczania ochratoksyny A w pszenicy

Poziom fortyfikacji $\mu\text{g/kg}$	Średni odzysk		Odechylenie standardowe		Błąd standar- dowy średniej odzysku %	Przedział ufności średniego odzysku	
	$\bar{x}$ ($\mu\text{g/cm}^3$)	%	S	V%		odzysk bezwzględny	%
15	0,0139	69,50	0,00185	13,3	4,2	0,0126—0,0152	63,00—76,00
30	0,0275	68,75	0,00256	9,3	2,9	0,0257—0,0293	64,25—73,25
60	0,0681	85,12	0,00422	6,2	1,9	0,0651—0,0711	81,37—88,87
120	0,1286	80,37	0,00699	5,4	1,7	0,1236—0,1336	77,25—83,50

Dane w kolumnach 2—8 obliczono dla $n = 10$ i $\alpha = 0,05$

Fritz i *Donath* stosując ekstrakcję chloroformem z późniejszą hydrolizą kwasem solnym w zależności od produktu odzyskiwali metodą fluorodensytometryczną od 68,6—83,0% dodanej ochratoksyny A przy współczynniku zmienności V% równym 2,8—5,5%. Przy ocenie wizualnej współczynnik ten wzrastał do 40%.

Średni odzysk ochratoksyny dla poziomów fortyfikacji 900—1800 $\mu\text{g/kg}$ w ryżu, mące owsianej i kukurydzianej wynosił 76—92% w metodzie opisanej przez *Fun Sun Chu*. Współczynnik zmienności V% wahał się w granicach 1,4—6,6%, granica wykrywalności wynosiła 10—50 $\mu\text{g/kg}$. Według metody *Scotta* dla produktów zbożowych średnie wartości procentowego odzysku ochratoksyny A wahały się w granicach 80—100% dla poziomów fortyfikacji 125—250 $\mu\text{g/kg}$ przy granicy wykrywalności 25 $\mu\text{g/kg}$.

Jak wynika z tego krótkiego porównania różnych metod opracowana w niniejszej pracy metoda charakteryzuje się dobrymi parametrami odzysku, precyzji i wykrywalności a dzięki zastosowanemu sposobowi ekstrakcji i oczyszczania ekstraktów stwarza możliwość również wizualnej oceny półilościowej chromatogramów z granicą wykrywalności do 3 $\mu\text{g/kg}$ ochratoksyny A w pszenicy i życie. Jest niewiele doniesień krajowych dotyczących zanieczyszczenia w Polsce zbóż i produktów zbożowych ochratoksyną A.

Juszkiewicz i wsp. wykrywali ochratoksynę A w śrutach żyta i pszenicy pochodzących z 1974 roku w ilościach 50—200 $\mu\text{g/kg}$ w 5% przebadanych próbek. Podobnie w mieszkankach paszowych pochodzących z 1976 roku wykrywali oni ochratoksynę w ilościach 10—50 $\mu\text{g/kg}$.

Na 17 próbek pszenicy z 1976 r zbadanych w niniejszej pracy, ochratoksynę stwierdzono w jednej próbce w ilości poniżej 15,0 $\mu\text{g/kg}$. Na 17 zbadanych próbek żyta z tego samego roku w 5 stwierdzono obecność ochratoksyny w ilościach: <15,0, <15,0, 20,0, 22,0, 29,8 $\mu\text{g/kg}$.

W 21 próbkach pszenicy pochodzącej z 1977 roku ochratoksynę A stwierdzono w 2 próbkach — 15,0 i 25,0 $\mu\text{g/kg}$. W przypadku żyta na 25 próbek zbadanych w 8 stwierdzono obecność ochratoksyny A w ilościach: <15,0, <15,0, 18,0, 18,0, 19,5, 20,0, 21,0, 24,5 $\mu\text{g/kg}$. Na podstawie przytoczonych danych widać, że częstotliwość występowania ochratoksyny A w życie jest znacznie wyższa niż w pszenicy.

WNIOSKI

1. Najodpowiedniejszym adsorbentem do chromatografii cienkowarstwowej jest żel MN-H a rozpuszczalnikiem eluującym metanol.

2. Zastosowanie ekstrakcji benzenem z kwasem octowym (95+5) oraz eluacji z kolumny celitowej mieszaniną benzenu i kwasu octowego (90+10) zapewnia uzyskanie ekstraktów o znacznym stopniu czystości. Umożliwia to wykorzystanie metody do oznaczania ilościowego z granicą wykrywalności 3 $\mu\text{g/kg}$.

3. Celowe wydaje się zbadanie innych gatunków zbóż krajowych na zawartość ochratoksyny A.

Л. Червецки

ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ОХРАТОКСИН А
И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЕГО СОДЕРЖАНИЯ
В ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУРАХ СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Ч. II. Подбор оптимальных условий тонкослойной хроматографии, способа экстракции охратоксина А и его содержание в зерновых культурах

Резюме

В результате проведенных исследований было установлено, что лучшим адсорбентом для тонкослойной хроматографии является силикагель MN-H, а элюирующим растворителем — метанол.

Метод экстракции бензолом и уксусной кислотой (95 + 5) а также очистка на колонке с целитом обеспечивают получение достаточно хорошо очищенных экстрактов.

Средняя степень извлечения в зависимости от количества введенного охратоксина А (15—120 мкг/кг) колебалась в пределах 68,7—85,1% для пшеницы, коэффициент изменчивости V% — 4,2—13,3.

Сходные значения были получены в случае ржи.

Разработанный метод может также использоваться для полук количественного определения охратоксина А с непосредственной визуальной оценкой хроматограмм. В этом случае нижний предел обнаружения составляет 3 мкг/кг.

L. Czerwiecki

EFFECT OF PHYSICO-CHEMICAL FACTORS ON OCHRATOXIN A AND
DETERMINATION OF ITS CONCENTRATION IN CEREALS BY
SPECTROFLUORIMETRY

Part II. Choice of optimal parameters of thin-layer chromatography, method of ochratoxin A extraction and its concentration in cereals

Summary

It was found in the reported investigations that silica gel MN-H was the adsorbent most suitable for thin-layer chromatography and methanol was the best eluting solvent. The method of extraction with benzene with acetic acid (95 + 5) and purification on a cellite column makes possible obtaining extracts of high purity.

The mean recovery rate of the method ranged, depending on the fortification level (15—120 $\mu\text{g/kg}$), from 68.7% to 85.1% for wheat, and the variability index V% was 4.2—13.3%.

Similar values were obtained with rye samples.

This method can be used also for semiquantitative determination of ochratoxin A with visual evaluation immediately on the chromatogram, with detectability limit — 3 $\mu\text{g/kg}$.

PIŚMIENNICTWO

1 Czerwiecki L.: Wpływ czynników fizykochemicznych na ochratoksynę A oraz oznaczanie jej zawartości w zbożach metodą spektrofлуориметриyczną. Cz. I. Wpływ rozpuszczalnika, promieniowania UV oraz wartości pH na fluorescencję ochratoksyny A. Roczn. PZH, 1980, 31, 567.

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

Dn. 29.XI.1980 r.

00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24