

JOANNA KAWA-RYGIELSKA

JEDNOCZESNA IDENTYFIKACJA TRICHOTECENÓW TYPU A I B ORAZ ZEARELENONU W PRODUKTACH KUKURYDZIANYCH

Streszczenie

Materiał badawczy stanowiło 27 produktów przemiału ziarna kukurydzy, tj. mąki (n = 12) i kasze kukurydziane (n = 15), zakupionych w marketach w 2008 roku. Zawartość trichotecenów typu A i B oraz zearalenonu w badanym materiale oznaczono przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC MS/MS. W wyniku przeprowadzonych analiz w mąkach kukurydzianych stwierdzono obecność 9 z 12 analizowanych mikotoksyn. Były to mikotoksyny: NIV, DON, 3-AcDON, 15-AcDON, DAS, HT-2, T-2, T-2 TETRAOL, ZON. W tej grupie produktów nie stwierdzono występowania jedynie trzech mikotoksyn: FUS-X, NEO, T-2 TRIOL. W kaszach kukurydzianych zidentyfikowano 6 mikotoksyn. Były to: NIV, DON, 3-AcDON, 15-AcDON, HT-2, ZON. Dominującą mikotoksyną, występującą w największym stężeniu we wszystkich badanych próbach był DON.

Słowa kluczowe: trichoteceny, zearalenon, mąka kukurydziana, kasza kukurydziana

Wprowadzenie

Jedną z najliczniejszych grup mikotoksyn wytwarzanych przez grzyby z rodzaju *Fusarium* są trichoteceny (DON, NIV, T-2, HT-2, DAS), obejmujące ponad 150 naturalnie występujących związków. Trichoteceny ze względu na nieznacznie zróżnicowaną strukturę szkieletu podstawowego i podstawników zostały podzielone na cztery grupy związków: A, B, C, D, z których najistotniejsze są dwie pierwsze. Do grupy A należą m.in.: toksyna T-2, toksyna HT-2, neosolaniol, diacetoksyscirpenol, monoacetyloksyscirpenol. Natomiast grupę B reprezentują: deoksyniwalenol, fuzarenon- X, niwalenol [2, 5].

W wielu doniesieniach opisywano współwystępowanie trichotecenów: zwłaszcza niwalenolu i deoksyniwalenonu oraz zearalenonu, ponieważ wszystkie te mikotoksyny są wytwarzane przez te same gatunki *Fusarium*. Głównym źródłem ZEN jest ziarno kukurydzy porażone przez patogeny kolb: *F. graminearum* i *F. culmorum* [2].

Z uwagi na powszechne występowanie i wielokierunkowy sposób działania wobec różnych organizmów mikotoksyny fuzaryjne stanowią bezpośrednie zagrożenie dla zwierząt i człowieka z racji obecności w łańcuchu pokarmowym. Na poziomie komórkowym trichoteceny odpowiedzialne są za hamowanie biosyntezy białka, redukcję aktywności enzymów, zaburzenia w przepuszczalności błon cytoplazmatycznych, zaburzenia w podziałach komórkowych, indukowanie aberracji chromosomowych i zaburzenia w przebiegu cyklu komórkowego [5, 6, 9].

Celem podjętych badań była ocena zawartości trichotecenów typu A i B oraz zearelenonu w mąkach i kaszach kukurydzianych, dostępnych na rynku polskim, stosując technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC MS/MS pozwalającą na identyfikację kilkunastu mikotoksyn jednocześnie [7, 8].

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiły mąki i kasze kukurydziane zakupione w marketach wrocławskich w 2008 roku. Zakupione produkty pochodziły od różnych producentów z całego kraju, po 3 próby od każdego producenta. Łącznie przeanalizowano 27 produktów, w tym 12 stanowiły mąki kukurydziane podzielone na 4 grupy i oznaczone w pracy symbolami producentów (M20, M21, M30, M31) oraz 15 kasze kukurydziane podzielone na 5 grup, oznaczone w pracy symbolami (K21, K23, K32, K33, K34).

W badanym materiale oznaczano zawartość trichotecenów typu A i B oraz zearelenonu, stosując metodę jednoczesnej identyfikacji 12 mikotoksyn zgodnie z metodyką podaną przez Klotzel [7, 8].

Oznaczenie mikotoksyn wykonano w pracowni chromatograficznej Katedry Technologii Rolnej i Przechowalnictwa UP we Wrocławiu przy użyciu zestawu HPLC/MS/MS firmy Varian. Oznaczano następujące mikotoksyny NIV, DON, FUS-X, 3-AcDON, 15-AcDON, DAS, HT -2, T-2, T-2 TRIOL, T-2 TETRAOL, NEO, ZON. Wzorce mikotoksyn pochodzące z firmy Biopure (Tulln), Austria, wykorzystano do przygotowania roztworów kalibracyjnych. Do oznaczeń mikotoksyn pobierano 25 g próby poddane rozdrobieniu i homogenizacji. Ekstrakcję mikotoksyn z badanego materiału prowadzono przy użyciu mieszaniny acetonitrylu : woda. W badaniach zastosowano kolumnienki Bond Elut Mycotoxin firmy Varian (USA). Chromatograficzny rozdział A i B trichotecenów prowadzono w kolumnie Synergii Fusion RP 80A, wyposażonej w przedkolumnę Fusion-Rp 4×2 mm firmy Phenomenex. Kolumnę wstępnie kondycjonowano mieszaniną acetonitrylu z wodą (50:50 v/v). Eluent przepływał przez chromatograf cieczowy z prędkością 0,2 ml/min. Tak rozdzielona próba była następnie analizowana tandemową spektrometrią masową (MS/MS) typu 1200L, wyposażoną w moduł jonizacji przez rozpylanie w polu elektrycznym. Spektrometr masowy użyto wyłącznie w trybie trzech quadropoli. Kalibrację MS/MS przeprowadzano za pomocą roztworu PPG (glikol polipropylenowy). Ustawiano parametry (ciśnienie, temperatura,

napięcia detektora, igły, kapilary dla gazu nebulizującego i osuszającego) zgodnie z danymi producenta. Kontrole systemu, jak również wszelkie obliczenia obsługiwał program komputerowy Star Chromatography Work-Station w wersji 6.6. Zawartość mikotoksyn w analizowanym materiale podano w $\mu\text{g}/\text{kg}$ próby.

Wyniki i dyskusja

Zawartość mikotoksyn w badanych grupach produktów przedstawiono w tab. 1. We wszystkich analizowanych próbach stwierdzono obecność mikotoksyn fuzaryjnych, przy czym ich skład ilościowy i jakościowy był różny i uzależniony od rodzaju produktu (mąki lub kasze), a w obrębie grup od producenta. Całkowita ilość mikotoksyn zawartych w mąkach kukurydzianych kształtowała się na poziomie od 500 do 8500 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Tak wysoką zawartość mikotoksyn odnotowano tylko w próbach pochodzących od producenta oznaczonego symbolem M30. Zawartość mikotoksyn była w tym przypadku 5 - 10-krotnie większa od zawartości analogicznych mikotoksyn w pozostałych

Tabela 1

Identyfikacja mikotoksyn w produktach przemiału ziarna kukurydzy.
Determination of mycotoxins in maize-grain- milled products.

Lp. Pos.	Toksyna Toxin	Stężenie miktoksyn w próbach [$\mu\text{g}/\text{kg}$] Concentration of mycotoxins in samples [$\mu\text{g}/\text{kg}$]								
		Mąka kukurydziana Corn flour				Kasza kukurydziana Corn grits				
		Symbol producenta Producer symbol								
		M 20	M21	M30	M31	K21	K23	K32	K33	K24
1	T2- tetraol	15	61	667	47	-	-	-	-	-
2	NIV	-	22	172	-	-	-	-	-	-
3	DON	287	996	5217	527	134	82	786	244	345
4	FUS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	NEO	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	15-AcDON	79	166	628	78	58	54	212	100	93
7	3-AcDON	13	77	296	6	10	7	18	5	12
8	T2-triol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	DAS	-	-	38	-	-	-	-	-	-
10	HT-2	-	32	655	-	-	-	-	-	-
11	T2-toxin	-	11	923	-	-	-	-	-	-
12	ZON	47	9	33	27	48	11	28	231	19

mąkach pochodzących od innych producentów. Zawartość mikotoksyn w kaszach kukurydzianych osiągnęła niższy poziom, od 150 do 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ produktu.

W wyniku przeprowadzonych analiz w mąkach kukurydzianych stwierdzono obecność 9 z 12 analizowanych mikotoksyn. Były to mikotoksyny: NIV, DON, 3-AcDON, 15-AcDON, DAS, HT-2, T-2, T-2 TETRAOL, ZON. W tej grupie produktów nie występowały jedynie trzy mikotoksyny: FUS-X, NEO, T-2 TRIOL.

W kaszach kukurydzianych zidentyfikowano 6 mikotoksyn, były to: NIV, DON, 3-AcDON, 15-AcDON, HT-2, ZON. Toksyny NIV i HT-2 występowały tylko w jednej próbie, ich zawartość nie przekraczała 24 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Dominującą mikotoksyną, występującą w największych ilościach był DON. Zawartość tej mikotoksyny w badanych produktach mieściła się w przedziale od 82 do 786 $\mu\text{g}/\text{kg}$ w kaszach kukurydzianych oraz od 287 do 5217 $\mu\text{g}/\text{kg}$ w mąkach (tab. 2). Zawartość tej mikotoksyny w badanych produktach stanowiła 60 - 70 % wszystkich mikotoksyn występujących w próbach.

We wszystkich analizowanych produktach stwierdzono obecność następujących mikotoksyn: DON, 15-AcDON, 3-AcDON oraz ZON. Pozostałe zidentyfikowane toksyny występowały w 20 - 50 % analizowanych prób. Porównując średnie zawartości mikotoksyn w badanych grupach produktów zdecydowanie wyższe ilości większości mikotoksyn stwierdzono w mąkach kukurydzianych. Jedyny wyjątek stanowił zearalenon, którego maksymalna zawartość w kaszach była prawie 5-krotnie wyższa niż w mąkach kukurydzianych. Jak wynika z badań wielu autorów, deoksyniwalenol (DON, womitoksyna) z racji powszechnego występowania i toksyczności jest uważany za najważniejszą mikotoksynę zanieczyszczającą produkty pochodzenia zbożowego przeznaczone na cele spożywcze i paszowe [4, 6]. Dopuszczalna zawartość deoksyniwalenolu zgodnie z wymogami Unii Europejskiej w mące i produktach zbożowych przeznaczonych do spożycia nie powinna przekraczać 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a w przypadku zearalenonu 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [5]. Zawartość tych mikotoksyn w niektórych poddanych analizie próbach została przekroczona. Stwierdzono wysoką zawartość DON w mąkach i kaszach pochodzących od trzech producentów, przy czym w jednej grupie M30 wartość ta została przekroczona aż 10-krotnie. Stężenie ZON zostało przekroczony 3-krotnie tylko w kaszach pochodzących od jednego producenta K33. Jak podają inni autorzy, stężenie ZON w ziarnach zbóż uprawianych na terenie Europy wynosiło od kilku $\mu\text{g}/\text{kg}$ surowca do kilku tysięcy $\mu\text{g}/\text{kg}$ surowca, a największe jej stężenie stwierdza się w ziarnach kukurydzy [16]. Zanieczyszczenie zearalenonem dotyczy nie tylko zbóż, ale również produktów wytworzonych z udziałem tego surowca [2, 16]. Podobnie trichoteceny mogą występować nie tylko w kukurydzy, ale również stwierdzono ich obecność w ziarnach jęczmienia, żyta, pszenicy, soi, a także ze względu na swoją stabilność w procesach chemicznych, technologicznych, w półproduktach oraz gotowych produktach żywnościowych [1, 3]. Ich obecność stwierdzono w takich wyrobach, jak: płatki śniadaniowe, makaron, chleb czy piwo [9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16].

Tabela 2

Toksyny fuzaryjne w produktach kukurydzianych.
Fusarium toxin in corn products.

Typ próby Sample type	Toksyna Toxin	Odsetek pozytywnych prób [%] Percentage of positive samples [%]	Liczba prób pozytywnych Number of positive samples	Toksyny w pozytywnych próbkach [µg/kg] Toxins in positive samples [µg/kg]			
				Zakres Range		Wartość średnia Mean value	Mediana Median
				Min min	Max max		
Mąki	T2- tetraol	100	12	15	667	197,5	54
kukurydziane	NIV	50	6	22	172	97	97
Corn flours	DON	100	12	287	5217	1756,8	761,5
	FUS	0	0	0	0	0	0
(n = 12)	NEO	0	0	0	0	0	0
	15-AcDON	100	12	78	628	237,8	122,5
	3-AcDON	100	12	6	296	98	45
	T2-triol	0	0	0	0	0	0
	DAS	25	3	38	38	38	38
	HT-2	50	6	32	655	343,5	343,5
	T2-toxin	50	6	11	923	467	467
	ZON	100	12	9	47	29	30
Kasze	T2- tetraol	-	0	-	-	-	-
kukurydziane	NIV	20	3	19	19	19	19
Corn grits	DON	100	15	82	786	318,2	244
(n = 15)	FUS	-	0	-	-	-	-
	NEO	-	0	-	-	-	-
	15-AcDON	100	15	54	212	103,4	93
	3-AcDON	100	15	5	18	10,4	10
	T2-triol	-	0	-	-	-	-
	DAS	-	0	-	-	-	-
	HT-2	20	3	24	24	24	24
	T2-toxin	-	0	-	-	-	-
	ZON	100	15	11	231	67,4	28

Dzięki zastosowaniu metody HPLC MS/MS w badanych produktach kukurydzianych stwierdzono współwystępowanie kilku mikotoksyn z grupy trichotecenów oraz zearalenonu jednocześnie. Jak wiadomo, zarówno mąki, jak i kasze kukurydziane stanowią surowiec do produkcji wielu produktów odgrywających znaczącą rolę w żywieniu dzieci oraz w dietetyce, chociażby: płatki, chrupki, chleb chrupki czy kaszki błyskawiczne dla małych dzieci. Zastosowanie szybkich i precyzyjnych metod analitycznych wydaje się niezbędne do oceny bezpieczeństwa produktów spożywczych.

Wnioski

1. We wszystkich analizowanych produktach stwierdzono obecność mikotoksyn fuzaryjnych.
2. W wyniku przeprowadzonych analiz w mąkach kukurydzianych stwierdzono obecność 9 z 12 analizowanych mikotoksyn. Były to mikotoksyny: NIV, DON, 3-AcDON, 15-AcDON, DAS, HT-2, T-2, T-2 TETRAOL, ZON.
3. W kaszach kukurydzianych zidentyfikowano 6 mikotoksyn, były to: NIV, DON, 3-AcDON, 15-AcDON, HT-2, ZON.
4. Dominującą mikotoksyną, występującą w największych stężeniach, był DON. Zawartość tej mikotoksyny w badanych kaszach kukurydzianych mieściła się w przedziale od 82 do 786 µg/kg, a w mąkach kukurydzianych od 287 do 5217 µg/kg.
5. Stężenie DON zostało przekroczone w mąkach i kaszach kukurydzianych pochodzących od producentów M21, M30, K32, a stężenie ZON zostało przekroczone w kaszkach pochodzących od producenta K33.

Literatura

- [1] Castells M., Marín S., Sanchis V., Ramos A.J.: Fate of mycotoxins in cereals during extrusion cooking: a review. *Food Addit Contam.*, 2005, **22** (2), 150-157.
- [2] Cervero M.C., Castillo M.A., Montes R., Hernandez E.: Determination of trichothecenes, zearalenone and zearalenols in commercially available corn – based foods in Spain. *Rev Iberoam Micol.*, 2007, **24**, 52-55.
- [3] Cetin Y., Bullerman L.B.: Confirmation of reduced toxicity of deoxynivalenol in extrusion processed corn grits by the MTT bioassay. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 1949-1955.
- [4] Dall'Asta C., Sforza G. S., Galaverna G., Dossena A., Marchelli R.: Simultaneous detection of type A and type B trichothecenes in cereals by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using NaCl as cationization agent. *J. Chromatogr. A*, 2004, **1054** (1-2), 389-395.
- [5] Gordon S.: Committee on Natural Toxins and Food Allergens, *J. AOAC INT.*, 2007, **90** (1), 1-17.
- [6] Jestoi M., Somma M.C., Kouva M., Veijalainen P., Rizzo A., Ritieni A., Peltonen K.: Levels of mycotoxins and sample cytotoxicity of selected organic and conventional grain – based products purchased from Finnish and Italian markets. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2004, **48**, 299-307.
- [7] Klotzel M., Gutsche B., Lauber U., Humpf H.: Determination of 12 type A and B trichothecenes in cereals by liquid chromatography – electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53** (23), 8904-8910.
- [8] Klotzel M., Lauber U., Humpf H.: A new solid phase extraction clean-up method for the determination of 12 type A and B trichothecenes in cereals and cereal – based food by LC – MS/MS. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2006, **50**, 261-269.
- [9] Mateo J.J., Mateo R., Jimenez M.: Accumulation of type A Trichothecenes in maize, wheat and rice by *Fusarium sporotrichioides* isolates under diverse culture conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, 2002, **72** (1-2), 115 -123.
- [10] Reinehr Ch.O., Furlong E.B.: Profile of the alcohols produced in fermentations with malt contaminated with trichothecenes. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 2003, **46** (4), 587-593.

- [11] Schollenberger M., Muller H-M., Ruffle M., Terry-Jara H., Suchy S., Plank S., Drochner W.: Natural occurrence of *Fusarium* toxins in soy food marketed in Germany. *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, **113** (2), 142-146.
- [12] Schollenberger M., Terry-Jara H., Muller H-M., Suchy S., Drochner W., Muller H-M.: *Fusarium* toxins in wheat flour collected in an area in southwest Germany. *Int. J. Food Microbiol.*, 2002, **72** (1-2), 85-89.
- [13] Schollenberger M., Drochner W., Ruffle M., Suchy S., Terry-Jara H., Muller H-M.: Trichothecene toxins in different groups of conventional and organic of bread of the German market. *J. Food Compos. Anal.*, 2005 **18** (1), 69-78.
- [14] Schollenberger M., Muller H-M., Ruffle M., Suchy S., Plank S., Drochner W.: Survey of *Fusarium* toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany. *Int. J. Food Microbiol.*, 2005, **97** (3), 317-326.
- [15] Varbcheva T., Geglel R., Usleber E.: First survey on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in Bulgarian wheat. *Mycopathology*, 1996, **136** (1), 47-52.
- [16] Weidenborner M.: *Mycotoxins in Foodstuffs*. Springer S. Berlin, 2008, pp. 110-330.

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF TRICHOHECENES OF TYPE A AND B, AND ZEARELENONE IN CORN-PRODUCTS

S u m m a r y

The material investigated were 27 maize grain-milled products, i.e.: corn flour (n = 12) and corn grits (n = 15) purchased in supermarkets in 2008. Contents of trichothecene of A and B types and of Zearalenone were determined in the material investigated using a high performance liquid chromatography (HPLC) with MS/MS. Based on the analyses performed, it was found that the corn flours contained 9 of 12 mycotoxins under investigation. The mycotoxins found were as follows: NIV, DON, 3-AcDON, 15-AcDON, DAS, HT-2, T-2, T-2 TETRAOL, and ZON. It was reported that three mycotoxins were not present in this group, namely: FUS-X, NEO, and T-2 TRIOL. Six toxins were identified in the corn grits analysed, i.e.: NIV, DON, 3-AcDON, 15-AcDON, HT-2, and ZON. DON was found to be a prevailing toxin of the highest concentration in all the samples studied.

Key words: trichothecenes, zearalenone, corn flour, corn grit 