ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΔΗΜΗΤΡΙΑΚΑ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΤΡΙΠΛΟΥ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟΥ

Π. Τσιάντας, Γ. Μηλιάδης, Γ. Σειραγάκης
Food Allergens Laboratory, Κ. Βάρναλη 40, Νέα Ιωνία, Αθήνα
E-mail: info@foodallergenslab.com

Περίληψη

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα των δημητριακών και των προϊόντων τους είναι η παρουσία μυκοτοξινών. Πρόκειται για ενώσεις μικρής μοριακής μάζας, που προέρχονται από δευτερογενή μεταβολισμό μυκοτοξικογόνων μυκήτων και προκαλούν σοβαρές ασθένειες στα ζώα και τον άνθρωπο, γνωστές ως μυκοτοξικώσεις. Το 25-30% της παγκόσμιας παραγωγής δημητριακών περιέχει μυκοτοξίνες. Κρίνεται λοιπόν αναγκαία η χρήση γρήγορων, εύκολων και αξιόπιστων μεθόδων ταυτόχρονου προσδιορισμού μυκοτοξινών στα δημητριακά. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η διαδικασία επικύρωσης απλής μεθόδου ανάλυσης δημητριακών για τον προσδιορισμό μυκοτοξινών με χρήση υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS). Οι αναλύτες που μελετήθηκαν ήταν οι 4 αφλατοξίνες (B1, B2, G1, G2), η ωχρατοξίνη A, η εμετοξίνη, και η Zearalenone. Τα όρια ανίχνευσης (LOD) της μεθόδου είναι 1μg/kg για κάθε μία από τις αφλατοξίνες, 2μg/kg για την ωχρατοξίνη A, 20μg/kg για την Zearalenone και 100μg/kg για την εμετοξίνη. Τα όρια αυτά καλύπτουν τις νομοθετικές απαιτήσεις της Ευρωπαϊκής Αρχής Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA).

Λέξεις - κλειδιά: *μυκοτοξίνες, υγρή χρωματογραφία, φασματομετρία μαζών, επικύρωση μεθόδου*

Abstract

One of the major problems of cereals and their products is the presence of mycotoxins. These low molecular mass compounds derived from secondary metabolism of certain fungi cause serious diseases in animals and humans, known as mycotoxicoses. 25-30% of world production of grain contain mycotoxins. It is therefore necessary to use fast, easy and reliable methods for the simultaneous determination of mycotoxins in cereals. This paper presents a simple analytical method including the validation procedure, for the determination of mycotoxins by liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS). The analytes tested were the four aflatoxins (B1, B2, G1, G2), ochratoxin A, deoxynivalenol, and zearalenone. The limit of detection (LOD) of the method is 1 μg/kg for each of the aflatoxins, 2 μg/kg for ochratoxin A, 20μg/kg for Zearalenone and 100 μg/kg for the deoxynivalenol. These values cover the legislative requirements of the European Food Safety Authority (EFSA).

Keywords: *mycotoxins, LC-MS/MS, method validation, limits of detection*

1. Εισαγωγή

1.1 Αλφατοξίνες

Η αφλατοξίνες είναι μια ομάδα μυκοτοξινών που περιέχει διάφορες επιμέρους ουσίες. Οι κυριότερες είναι οι B1, B2, G1 και G2 (Σχήμα 1). Οι μυκοτοξίνες αυτές παράγονται από τους μύκητες *Aspergillus flavus* ή *A. parasiticus*. Πρόκειται για σαπροφυτικούς οργανισμούς που μεταδίδονται αγενώς με κονίδια μέσω εντόμων και του ανέμου με αποτέλεσμα να εξαπλώνονται εύκολα στα καλλιεργούμενα φυτά. Σε συνδυασμό με την ύπαρξη ευνοϊκών καιρικών συνθηκών, όπως ζεστό κλίμα και παρατεταμένη ξηρασία, τα σιτηρά γίνονται πιο επιρεπή στην ανάπτυξη αφλατοξινών. Επίσης, ανάπτυξη αφλατοξινών μπορεί να έχουμε και όταν τα σιτηρά αποθηκεύονται χωρίς να έχουν αποξηρανθεί πλήρως ή σε συνθήκες αποθήκευσης αυξημένης υγρασίας και θερμοκρασίας. Στα ζώα προκαλούν ηπατικές βλάβες με πιο ισχυρή την B1 και στον άνθρωπο θεωρούνται καρκινογόνες ουσίες.

1.2 Εμετοξίνη (Deoxynivalenol, DON)

Η δεσοξυνυβαλενόλη (John L. Richard, 2007), γνωστή και ως εμετοξίνη ή DON (Σχήμα 1) παράγεται κυρίως από τον μύκητα *Fusarium graminearum* και ανήκει στην κατηγορία των μυκοτοξινών που ονομάζονται τριχοθηκίνες. Η DON μπορεί να συνυπάρχει μαζί με την zearalenone, μια άλλη μυκοτοξίνη που παράγεται από τέτοιους μύκητες. Οι κυριότερες καλλιέργειες που προσβάλλονται από την τοξίνη αυτή είναι το καλαμπόκι, το σιτάρι, η βρώμη και το κριθάρι. Ο μύκητας ευνοείται σε υγρές και δροσερές συνθήκες καθώς και από την παρουσία ανέμου, που διευκολύνει τη μετάδοση των κονιδίων εντός των καλλιεργειών. Η τοξίνη είναι ανοσοκατασταλτική και προκαλεί νεφρικά προβλήματα στα ζώα. Οι χοίροι είναι από τα πλέον ευαίσθητα ζώα και αποφεύγουν να τρώνε μολυσμένα σιτηρά, αν φάνε προκαλείται εμετός, από όπου και το όνομα της τοξίνης, ενώ παρόμοια είναι τα συμπτώματα και στον άνθρωπο.

1.3 Ζεαραλενόνη (Zearalenone, ZEA)

Η ζεαραλενόνη (Σχήμα 1) παράγεται μαζί με τη δεσοξυνυβαλενόνη από τους μύκητες *Fusarium graminearum* και *F. culmorum.* Πρόκειται για μια φαινολική λακτόνη που είναι οιστρογονική όταν καταναλωθεί από χοίρους. Κόκοι που έχουν μολυνθεί έχουν χαρακτηριστικό ρόζ χρώμα που συνδέεται με μια ροζ χρωστική ουσία η οποία παράγεται ταυτόχρονα με την ζεαραλενόνη. Τις περισσότερες φορές η μυκοτοξίνη αυτή εντοπίζεται στο καλαμπόκι, αλλά έχει εντοπιστεί και σε άλλες καλλιέργειες όπως σιτάρι, κριθάρι, σύκαλη και σόργο. Γενικά τα είδη του γένους *Fusarium* αναπτύσσονται καλά σε υγρές και δροσερές συνθήκες. Η ζεαραλενόνη στις περισσότερες καλλιέργειες εμφανίζεται πριν την συγκομιδή των προϊόντων. Ωστόσο, όταν οι συνθήκες αποθήκευσης των προϊόντων είναι κατάλληλες για την ανάπτυξη των μυκήτων, σχηματίζεται και μετασυλλεκτικά. Η πιο αξιοσημείωτη επίδραση της τοξίνης αυτής είναι ότι προκαλεί πρώιμη ανάπτυξη των μαστών και άλλες οιστρογονικές επιδράσεις σε θηλυκούς χοίρους. Τα επίπεδα ζεαραλενόνης που προκαλούν τις συνέπειες αυτές κυμαίνονται από 0,5 εώς 1 μg/g.

1.4 Ωχρατοξίνη Α (Ochratoxin, OTA)

Η ωχρατοξίνη Α (Σχήμα 1) παράγεται κυρίως από τους μύκητες *Aspergillus ochraceus* και *Penicillium verrucosum.* Σε ορισμένες καλλιέργειες όπως στα σταφύλια παράγεται λόγω των ευνοϊκών συνθηκών ανάπτυξης του μύκητα κατά την διάρκεια της αποθήκευσης των προϊόντων. Ορατά συμπτώματα σχηματισμού της τοξίνης είναι η ύπαρξη κιτρινωπής, μπλέ-πράσινης και μαύρης μούχλας αντίστοιχα για τα είδη *Aspergillus ochraceus,* του γένους *Penicillium* και *Aspergillus niger*. Οι μύκητες αυτοί μπορούν να μολύνουν εύκολα

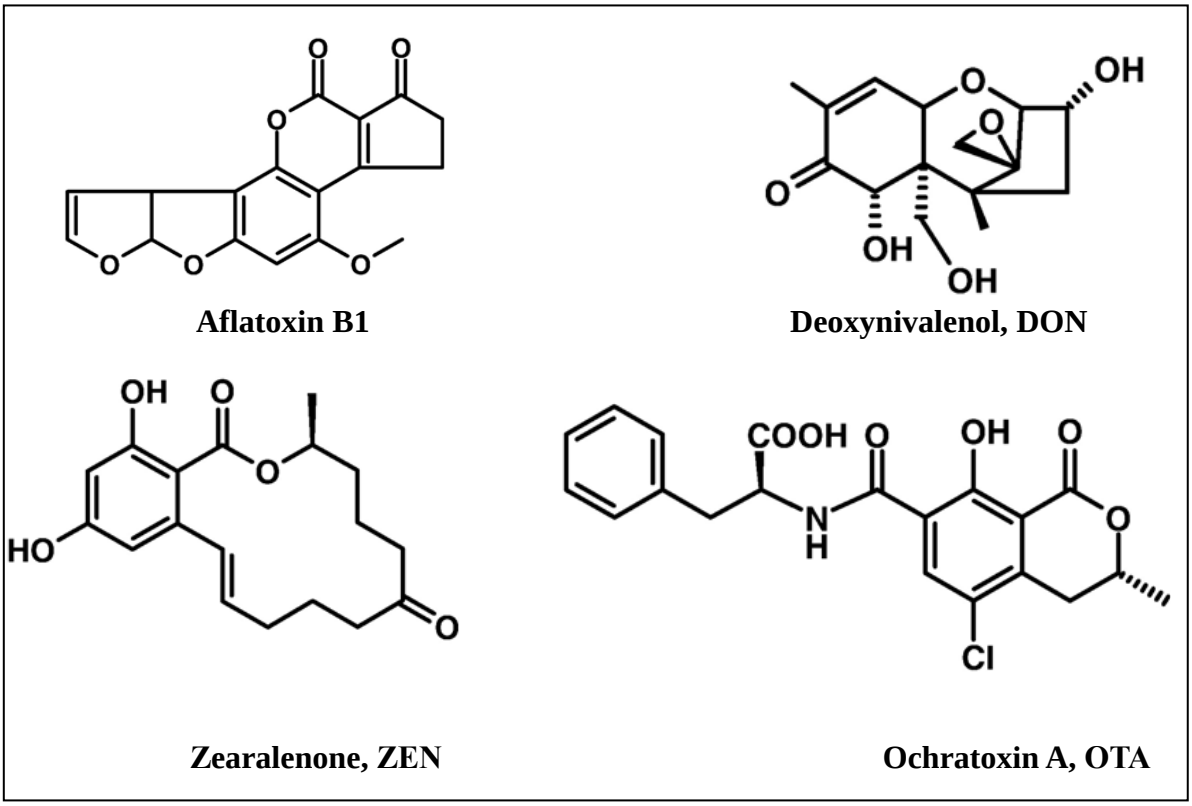
τα αποθηκευμένα προϊόντα όταν βρίσκονται σε υψηλή σχετική υγρασία και θερμοκρασία. Η ωχρατοξίνη είναι κυρίως νεφροτοξική αλλά σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να βλάψει και το συκώτι. Επίσης, έχει την τάση να συσσωρεύεται στους ιστούς του σώματος και δύσκολα απομακρύνεται από αυτούς.

1.5 Μέθοδοι προσδιορισμού των μυκοτοξινών

Οι περισσότερες αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών είναι εξειδικευμένες για μια τοξίνη ή για μια μικρή ομάδα μυκοτοξινών. Η ανάπτυξη μεθόδων ταυτόχρονου προσδιορισμού πολλών μυκοτοξινών με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS) αποτέλεσε σημαντική λύση του παραπάνου προβλήματος (E. Streit, C. Schwab, M. Sulyok, et al, 2007).

1.6 Επικύρωση μεθόδου

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε επικύρωση μιας απλής και σύντομης μεθόδου εκχύλισης για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 7 ενώσεων μυκοτοξινών με χρήση LC-MS/MS. Η επικύρωση περιλαμβάνει έλεγχο ορθότητας, πιστότητας, ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης και γραμμικότητας του ανιχνευτή.



Σχήμα1: Συντακτικοί τύποι των κυριότερων μυκοτοξινών

2. Μεθοδολογία

2.1 Μέθοδος εκχύλισης

Ζυγίζονται 5g αλεσμένου και καλά ομογενοποιημένου δείγματος και προστίθενται 10 mL MeOH που περιέχει 1% HCOOH. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση με το χέρι για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 5min. Το υπερκείμενο διάλυμα διηθείται από

φίλτρο με διάμετρο πόρων 0,45μm και εγχύεται στο LC-MS/MS (Commission of the European Union).

2.2 Υγροχρωματογραφία LC-MS/MS

Χρησιμοποιήθηκε στήλη Eclipse XDB C-18, μήκους 15 cm, εσωτερικής διαμέτρου 2,1mm και μεγέθους σωματιδίων 3,5μm, θερμοστατούμενη στους 40° C. Χρησιμοποιήθηκε βαθμωτή έκλουση με την εξής σύσταση διαλυτών:
A: 80% νερό, 20% μεθανόλη, 5mM $HCOONH_4$ και 0,1% HCOOH
B: 5mM $HCOONH_4$, 0,1% HCOOH σε μεθανόλη.
Το πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον πίνακα 1:

Πίνακας 1: Πρόγραμμα έκλουσης διαλυτών

Χρόνος (min)	**%A**	**%B**
0	100	0
2	100	0
12	50	50
30	0	100
40	0	100
40.5	100	0

Οι παράμετροι για τους αναλύτες στο LC-MS/MS φαίνονται στον πίνακα 2:

Πίνακας 2: Παράμετροι στο LC-MS/MS (χρόνος έκλουσης, θραύσματα, ενέργειες διάσπασης και όρια ανίχνευσης)

	~RT,	MRMs	Dwell (s)	Cone(V)>Collision(eV)	LOD
DON	4,5	297>203,1>249	2	30>20, 30>10	100
G2	13	331>245>313	0,5	30>30, 50>20	1
G1	13,7	329>243>311	0,5	50>25, 30>20	1
B2	14,4	315>287,2>259	0,5	50>30, 50>25	1
B1	15,1	313>285>241	0,5	20>40, 40>20	1
ZEN	20,9	319>187>283	1	10>20, 30>10	20
OTA	21,1	403,9>239>220,9	1	30>40, 30>20	2

3. Αποτελέσματα και συζήτηση

3.1 Πιστότητα και ορθότητα

Για την εκτίμηση της αναπαραγωγιμότητας πραγματοποιήθηκαν (από δύο αναλυτές) αναλύσεις εμβολιασμένων δειγμάτων αλεύρου σε 2 επίπεδα, με συγκεντρώσεις όπως φαίνονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Επίπεδα εμβολιασμού μυκοτοξινών σε αλέυρι

Μυκοτοξίνη	**Μικρό επίπεδο C_1, μg/kg**	**Μεγάλο επίπεδο C_2, μg/kg**
B1	5	50
B2	5	50
G1	5	50
G2	5	50
DON	500	5000
ZEN	100	1000
OTA	10	100

Τα αποτελέσματα για το μικρό επίπεδο, σε μg/kg παρουσιάζονται στον πίνακα 4:

Πίνακας 4: Τιμές ορθότητας και πιστότητας για το μικρό επίπεδο εμβολιασμού

(N=8)	**B1**	**B2**	**G1**	**G2**	**DON**	**ZEN**	**OTA**
ΟΡΘΟΤΗΤΑ							
Μέση τιμή, μg/kg	4.21	4.72	4.60	4.16	510	104.6	9.06
% μέση ανάκτηση	84.9	88.6	91.8	87.9	106.6	104.7	105.0
Όρια % ανάκτησης (Καν. 519/2014)	50 – 120				70-120	70-120	70-110
ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ							
$\%RSD_R$	9.8	6.4	4.8	8.0	11.7	7.3	11.6
Ανώτατη %RSD (Καν. 519/2014)	35.5				40	40	30

Τα αποτελέσματα για το μεγάλο επίπεδο, σε μg/kg παρουσιάζονται στην πίνακα 5:

Πίνακας 5: Τιμές ορθότητας και πιστότητας για το μεγάλο επίπεδο εμβολιασμού

(N=8)	**B1**	**B2**	**G1**	**G2**	**DON**	**ZEN**	**OTA**
ΟΡΘΟΤΗΤΑ							
Μέση τιμή, μg/kg	43.7	52.5	44.5	40.1	5246	762	78.5
% μέση ανάκτηση	87.3	105	89.0	80.3	105	76.2	78.5
Όρια % ανάκτησης (Καν. 519/2014)	50 - 120				70-120	70-120	70-110
ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ							
$\%RSD_R$	9.2	5.6	6.8	9.3	5.9	9.9	6.5
Ανώτατη %RSD (Καν. 519/2014)	25.1				40	40	30

Από τους παραπάνω πίνακες προκύπτει ότι πληρούνται τα κριτήρια του Ευρωπαϊκού Κανονισμού σε σχέση με την ορθότητα και την πιστότητα (Κανονισμός ΕΕ αριθμ. 519/2014).

3.2 L.O.D και L.O.Q

Στις χρωματογραφικές μεθόδους που έχουν γραμμή βάσης, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης ορίζονται από το λόγο Σήμα προς Θόρυβο. Ως όριο ανίχνευσης ορίστηκε η μικρότερη συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα, η κορυφή του οποίου δίνει λόγο Σήμα προς Θόρυβο ίσο προς 3, ενώ ως όριο ποσοτικοποίησης ίσο προς 10. Με βάση τα παραπάνω, από τα αποτελέσματα των μετρήσεων βρέθηκαν τα όρια ανίχνευσης όπως φαίνονται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μυκοτοξινών

Μυκοτοξίνη	**LOD, μg/kg**	**LOQ, μg/kg**
Aflatoxin B1	1	3
Aflatoxin B2	1	3
Aflatoxin G1	1	3
Aflatoxin G2	1	3
DON	100	300
ZEN	20	60
OTA	2	6

3.3 Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα δεν είναι προαπαιτούμενη για μία μέτρηση, αφού η μέτρηση μπορεί να γίνει επίσης με απ' ευθείας σύγκριση με ένα πρότυπο διάλυμα ή με τη μέθοδο «εγκλωβισμού» της επιφάνειας του δείγματος ανάμεσα στην επιφάνεια 2 πρότυπων διαλυμάτων. Παρά τούτο έγινε μελέτη γραμμικότητας για λόγους επικύρωσης.

Για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα αλεύρου στα οποία η συγκέντρωση των μυκοτοξινών κυμαινόταν από το LOD ως το εκατονταπλάσιο του. Οι στατιστικές παράμετροι της γραμμής αναφοράς φαίνονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7: Στατιστικές παράμετροι της γραμμής αναφοράς *(N=7)*

	B1	B2	G1	G2	OTA	ZEN	DON
Κλίση της ευθείας (b)	94.2	46.3	92.1	32.4	26.3	78.8	43.5
Τεταγμένη επί την αρχή (a)	179.9	48.3	114.0	30.1	37.1	159.4	29.7
Τυπική απόκλιση του b *(S_b)*	5.79	2.24	4.72	1.34	1.73	7.95	0.66
Τυπική απόκλιση του a *(S_a)*	249.8	96.5	203.6	57.9	74.5	343.1	28.5
Συντελεστής συσχέτισης *(r)*	0.991	0.994	0.993	0.996	0.989	0.980	0.999
($a \pm t_{st} \times S_a$) περιλαμβάνει το μηδέν?	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ

Με στατιστική επεξεργασία των δεδομένων προέκυψε γραμμική συσχέτιση για όλες τις ενώσεις, με συντελεστή συσχέτισης r να έχει τιμές > 0,98, ενώ η τιμή της παραμέτρου ($a \pm t_{st}*S_a$) περιλαμβάνει το μηδέν για όλες τις ενώσεις, γεγονός που υποδηλώνει ότι όλες οι γραμμές είναι ευθείες και διέρχονται από την αρχή των αξόνων.

3.4 Συζήτηση

Το εργαστήριό μας με την παρούσα διαδικασία επικύρωσης έλαβε διαπίστευση από το ΕΣΥΔ. Η μέθοδος είναι πολύ απλή και σύντομη στη χρήση. Διαπιστώθηκε έντονο το φαινόμενο της επίδρασης του υποστρώματος στη μέτρηση (matrix effect) και για το λόγο αυτό οι μετρήσεις γίνονται με χρήση προτύπων διαλυμάτων που περιέχουν το υπόστρωμα. Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου καλύπτουν τα θεσμοθετημένα μέγιστα επιτρεπτά όρια της Ευρωπαϊκής Ένωσης που είναι σε επίπεδο μg/kg (ppb) (Κανονισμός ΕΚ 1881/2006).

4. Βιβλιογραφία

4.1 Ελληνική

- Κανονισμός (ΕΚ) αριθμ. 1881/2006 της επιτροπής για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα.
- Κανονισμός (ΕΕ) αριθμ. 519/2014 της Επιτροπής για τα κριτήρια επίδοσης αναλυτικών μεθόδων μυκοτοξινών.

4.2 Ξένη

- John L. Richard (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. International Journal of Food Microbiology 119 (2007) 3–10.
- Elisabeth Streit, Christina Schwab, Michael Sulyok, Karin Naehrer, Rudolf Krska και Gerd Schatzmayr (2013). Multi-Mycotoxin Screening Reveals the Occurrence of 139 Different Secondary Metabolites in Feed and Feed Ingredients. Toxins 2013, 5, 504-523; doi:10.3390/toxins5030504
- Commission of the European Union, EU Reference Laboratories:http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/srm/meth_QuPPe.pdf