ROCZN. PZH 2008, 59, NR 4, 429-435

JACEK POSTUPOLSKI, KRYSTYNA RYBIŃSKA, EWA LEDZION,
JOLANTA KURPIŃSKA-JAWORSKA, MAŁGORZATA SZCZĘSNA, KAZIMIERZ KARŁOWSKI

BADANIA MONITORINGOWE W ZAKRESIE OZNACZANIA POZIOMU TOKSYN T-2 I HT-2 W PRZETWORACH ZBOŻOWYCH

MONITORING PROGRAMME OF T-2 AND HT-2 TOXINS LEVEL IN CEREAL PRODUCTS

Zakład Badania Żywności i Przedmiotów Użytku
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
e-mail: jpostupolski@pzh.gov.pl
Kierownik: doc. dr hab. *K. Karłowski*

Dla potrzeb programu monitoringowego opracowano i zwalidowano metodę oznaczania toksyn T-2 i HT-2 w produktach zbożowych techniką HPLC-MS/MS. Oznaczenia wykonano w 107 próbkach przetworów zbożowych, głównie otrzymanych z owsa. Toksyny T-2 i HT-2 stwierdzono w 43 % próbek, średni poziom zanieczyszczenia w próbkach produktów pochodzących z owsa wynosił 22,5 µg/kg (najwyższy - 109 µg/kg), w pozostałych 7,0 µg/kg. Uzyskane dane wskazują, że wartości tolerowanego dziennego pobrania dla toksyn T-2 i HT-2 nie są przekroczone.

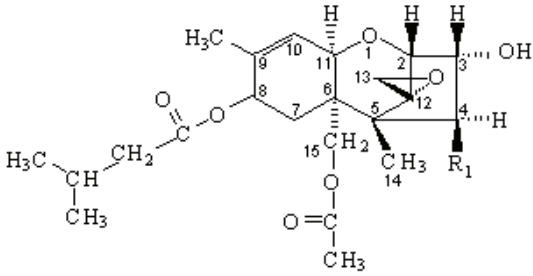
Słowa kluczowe: monitoring, mikotoksyny, toksyny T-2 i HT2, produkty zbożowe
Key words: monitoring, mycotoxins, T-2 and HT-2 toxins, cereal products

WSTĘP

Toksyny T- 2 i HT-2 są mikotoksynami zaliczanymi do trichotecenów typu A (ryc. 1) – licznej grupy wtórnych metabolitów pleśni, wytwarzanych przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, głównie *Fusarium sporotrichioides* jak również *F. poae*, *F. equiseti, F. acuminatum i F. langsethiae. F. sporotrichioides* jest gatunkiem niepatogennym dla zbóż (saprofit) może rozwijać się w temperaturze od -2 do 35 ºC przy dużej aktywności wody (około 0,88). Czynnikiem zwiększającym zanieczyszczenie może być zbyt późny zbiór, szczególnie podczas chłodnej pogody. Toksyna T-2 łatwo metabolizuje do toksyny HT-2, dlatego oznaczane i oceniane są one łącznie [12].

Toksyny T-2 i HT-2 wykrywano w zbożach, głównie w owsie, ale również w pszenicy, życie, jęczmieniu, kukurydzy oraz w soi i fasoli. Tak jak inne trichoteceny nie ulegają onerozkładowi w podwyższonej temperaturze i zachowują stabilność podczas termicznej obróbki żywności [5].

Toksyna T-2 jest związkiem o dużej toksyczności ostrej – LD_{50}, w zależności od gatunku zwierzęcia, wynosi od 0,06 do 10 mg/kg m.c. Toksyny T-2 i HT-2 są związkami o szerokim



Ryc. 1. Budowa toksyn T-2 (R1 = OAc) i HT-2 (R1 = OH)
Structure of T-2 (R1 = OAc) and HT-2 toxin (R1 = OH)

działaniu szkodliwym. Hamują one syntezę DNA i RNA oraz syntezę białka, wywołują w warunkach *in vitro* apoptozę oraz hamują transport elektronów w mitochondriach. Wykazują działanie hematotoksyczne, neurotoksyczne i immunotoksyczne, jak również silnie drażniące skórę i śluzówki [4, 10]. Uważa się, że toksyny T-2 i HT-2 są związkami odpowiedzialnymi za toksyczną aleukię pokarmową na terenie Związku Radzieckiego w latach 1941-47, objawiającą się wymiotami, krwawieniami, leukopenią, zaburzeniami neurologicznymi, a w wielu przypadkach śmiercią [7].

Międzynarodowa Agencja ds. Badań nad Rakiem (IARC) zaklasyfikowała w 1993 r toksynę T-2 do grupy 3 (związków nieuznanych za rakotwórcze dla ludzi) [3]. Komitet Naukowy ds. Żywności (SCF) Komisji Europejskiej oceniając toksyny T-2 i HT-2 ustanowił łączne tymczasowe tolerowane dzienne pobranie (TDI) na poziomie 0,06 μg/kg masy ciała [3]. Wartość ta odpowiadała oszacowaniu dokonanemu przez Komitet Ekspertów FAO/WHO ds. Substancji Dodatkowych do Żywności (JECFA) [5].

Ocena pobrania w krajach Wspólnoty Europejskiej wskazuje, że obecność toksyn T-2 i HT-2 może stanowić zagrożenie dla zdrowia publicznego. Komisja Europejska uznała za priorytetowe opracowanie wiarygodnej metody, o niskiej granicy wykrywalności (LOD), adekwatnej do wartości TDI, pozwalającej na zebranie większej liczby danych o występowaniu tych toksyn oraz określenie czynników odpowiedzialnych za występowanie toksyn T-2 i HT-2 w zbożach i produktach zbożowych, w szczególności w owsie i jego przetworach [1].

Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006 przewiduje rozważenie zasadności ustanowienia najwyższego dopuszczalnego poziomu dla toksyny T-2 i HT-2 w zbożach i produktach zbożowych [8].

Obecnie nie są znane znormalizowane metody oznaczania toksyn T-2 i HT-2 w żywności. Do oznaczeń ilościowych stosowane są: technika chromatografii gazowej z detektorami ECD (GC-ECD) lub sprzężona ze spektrometrią mas GC-MS (typowe LOD T-2/HT-2 około 10 ng/g) oraz wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (HPLC-MS/MS) (typowe LOD T-2/HT-2 poniżej 5 ng/g). Wartości odzysku dla obu wymienionych technik wynoszą 70–120%. Z uwagi na zadowalające parametry analityczne, proste i szybkie przygotowanie próbki do badania (pojedyncza ekstrakcja, bez konieczności otrzymywania pochodnych) do oznaczania poziomu T-2 i HT-2 za metodę z wyboru uznaje się obecnie technikę HPLC-MS/MS; jednak powszechne jej wykorzystanie przez laboratoria jest ograniczone z powodu wysokich kosztów [6].

Realizując postanowienia Rozporządzenia Komisji (WE) nr 1881/2006 w ramach krajowych badań monitoringowych w Zakładzie Badania Żywności i Przedmiotów Użytku NIZP - PZH podjęto w 2007 r. prace mające na celu:

– opracowanie, zwalidowanie i akredytowanie metody analitycznej oznaczania toksyn T-2 i HT-2 w środkach spożywczych, zgodniej z obowiązującymi przepisami,
– zbadanie poziomów zanieczyszczenia toksynami T-2 i HT-2 produktów zbożowych, szczególnie uzyskanych z owsa, pochodzących z terenu całego kraju.

MATERIAŁY I METODYKA

Próbki

Próbki produktów zbożowych pobierane w 2007 roku przez Stacje Sanitarno-Epidemiologiczne z obrotu detalicznego z terenu całego kraju, przesyłano do Laboratorium Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego - Państwowego Zakładu Higieny. Próbki, o masie nie mniejszej niż 1 kg były pobrane zgodnie z zasadami określonymi w Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 401/2006 [9]. Do Laboratorium przekazano łącznie 107 próbek w tym 65 próbek płatków owsianych (61 %), pozostałe 42 próbki stanowiły płatki jęczmienne i pszenne, kasze oraz mąka.

Metodyka oznaczania

Do oznaczania poziomu T-2 i HT-2 zastosowano zmodyfikowaną metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężoną ze spektrometrią mas (HPLC-MS/MS), opracowaną przez *Sulyoka* i wsp [11]. Użyto odczynników o czystości analitycznej z firmy Merck, za wyjątkiem acetonitrylu i octanu amonowego do spektrometrii masowej (Baker) oraz wzorców toksyn T-2, HT-2, a także HT-2 znakowanej izotopowo (Biopure). Woda była oczyszczona przez odwróconą osmozę i demineralizację.

Do probówki typu falcon odważano 4,0 g próbki z dokładnością do 0,01 g, dodawano 12 ml roztworu do ekstrakcji (80 cz. acetonitrylu, 1 cz. kwasu octowego, 19 cz. wody) i homogenizowano w homogenizatorze UltraTurax przez 3 min. Homogenat odwirowywano przez 20 min przy 4000 x *g*. 1ml klarownego ekstraktu przenoszono do fiolek autosamplera i dodawano roztwór wzorca wewnętrznego (U-[13C22] HT-2 Toxin). Do analizy chromatograficznej zastosowano chromatograf cieczowy Water Alliance 2695 z kolumną C18–Atlantis™ dC18 3µm 100 Å, 2,1 x 100 mm, Waters. Warunki pracy chromatografu: skład fazy ruchomej; metanol 70%., woda 30 % z dodatkiem 0,05 mM octanu amonowego, przepływ fazy ruchomej 0,2 ml/min; podawana objętość 10 µl; temperatura kolumny 40 ºC, temperatura autosamplera 10 ºC; czas analizy 4,5 min.

Warunki pracy spektrometru masowego MS/MS (Waters Quattro Micro API) były następujące: tryb MRM, jonizacja ES+,

parametry źródła:		**parametry analizatora:**	
Kapilara	2,80 kV	Rozdzielczość LM 1	14,0
Ekstraktor	2,00 V	Rozdzielczość HM 1	14,0
RF ogniskowanie	0,1 V	Energia jonu 1	0,7
Temperatura żródła	100 ºC	Wejście	-1
Temperatura odparowania	400 ºC	Wyjście	2
Przepływ gazu na stożku (N_2)	60 l/h	Rozdzielczość LM 2	13,5
Przepływ gazu odparowującego (N_2)	800 l/h	Rozdzielczość HM 2	13,5
		Energia jonu 2	0,7
		Powielacz	650 V
		Gaz kolizyjny (Ar)	3,0 mBar

Oznaczane jony podano w Tabeli I.

Tabela I. Jony macierzyste i potomne oraz parametry ESI/MS/MS
Pattern and daughter ions and ESI/MS/MS conditions

Toksyna /IS	Jon	Jon macierzysty (m/z)	Jon potomny (m/z)	Dwell	Napięcie na stożku	Napięcie kolizyjne	Opóźnienie
HT-2 ilościowy	$[HT\text{-}2 + NH_4]^+$	442,2	215,2	0,2	20	17,0	0,020
HT-2 jakościowy	$[HT\text{-}2 + NH_4]^+$	442,2	263,1	0,1	20	17,0	0,020
HT-2 C13 (IS) jakościowy	$[HT\text{-}2^{C13} + NH_4]^+$	464,3	229,0	0,1	20	17,0	0,020
HT-2 C13 (IS) ilościowy	$[HT\text{-}2^{C13} + NH_4]^+$	464,3	278,1	0,2	20	17,0	0,020
T-2 ilościowy	$[HT\text{-}2 + NH_4]^+$	484,3	185,1	0,2	20	22,0	0,020
T-2 jakościowy	$[HT\text{-}2 + NH_4]^+$	484,3	215,2	0,1	20	22,0	0,020

Oznaczenie ilościowe wykonano metodą wzorca zewnętrznego, stosując wzorce toksyn T-2, i HT-2 z dodatkiem wzorca wewnętrznego (toksyny HT-2) znakowanej węglem C^{13}. Wynik dla każdej z toksyn otrzymano z 5. punktowej krzywej wzorcowej.

Ww. metodę oznaczania toksyn T-2 i HT-2 zwalidowano, a następnie akredytowano zgodnie z PN-EN-ISO/IEC 17025. W ramach kontroli jakości z próbkami badanymi regularnie analizowano próbki kontrolne, sprawdzając odzysk.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Opracowana metoda oznaczania toksyn T-2 i HT-2 w przetworach zbożowych techniką HPLC-MS/MS spełnia wymagania dla metod stosowanych w urzędowej kontroli; uzyskane parametry skuteczności podano w Tabeli II.

Laboratorium Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku NIZP-PZH sprawdziło z powodzeniem opracowaną metodę poprzez udział w międzylaboratoryjnych badaniach biegłości FAPAS, Wielka Brytania (z-score = 0,5).

Tabela II. Parametry skuteczności metody
Performance of method parameters

Toksyna	T-2	HT-2
Granica wykrywalności	3 µg/kg	4 µg/kg
Granica oznaczalności	5 µg/kg	7 µg/kg
Odzysk	75 %	87 %
Powtarzalność	8 %	12 %
Niepewność	17 %	17 %

Uzyskane wyniki oznaczania toksyn, skorygowane o odzysk, przedstawiono w Tabeli III.

Tabela III. Wyniki oznaczania poziomów toksyn T-2 i HT-2 w produktach zbożowych
Results of determination of T-2 and HT-2 toxins in cereal products

Parametry	Ogółem	Przetwory z owsa	Pozostałe
Liczba próbek ogółem	107	65	42
% próbek > LOD	43	60	14
% próbek > 50µg/kg (T-2 + HT-2)	7,4	9,2	4,7
Średnia (T-2 + HT-2) µg/kg	11,7	22,5	7,0
Mediana (T-2 + HT-2) µg/kg	3	6,9	1,5
Wartość maksymalna (T-2 + HT-2) µg/kg	109	109	95,6

Toksyny T-2 i HT-2 stwierdzono w 46 próbkach (43 %). Średni poziom zanieczyszczenia tymi toksynami w zbadanych próbkach wynosił 11,7 µg/kg, w próbkach produktów pochodzących z owsa 22,5 µg/kg, w pozostałych 7,0 µg/kg. W przypadku próbek dla których uzyskano wynik poniżej granicy wykrywalności (dla obu toksyn) przyjęto poziom 1,5 µg/kg t.j. połowę wartości granicy wykrywalności metody. W produktach otrzymanych z owsa toksyny T-2 i HT-2 stwierdzono w 60 % próbek, a w pozostałych – w 14% próbek. Najwyższy poziom zanieczyszczenia (109 µg/kg) oznaczono w próbce płatków owsianych. Należy zwrócić uwagę, że w 8 próbkach stwierdzono przekroczenie zawartości 50 µg/kg. Poziom ten rozważano na posiedzeniach Komitetu Ekspertów ds Zanieczyszczeń Rolnych Komisji Europejskiej jako propozycję najwyższego dopuszczalnego zanieczyszczenia do ustanowienia w nowelizowanym Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 1881/2006.

Uzyskane poziomy zanieczyszczenia dla badanych produktów są zbliżone do danych pochodzących z innych krajów Europy Północnej, np w Niemczech w latach 2006-07 średni poziom zanieczyszczenia płatków owsianych wynosił 10-20 µg/kg. [13]. Zbliżone poziomy toksyn T-2 i HT-2 były również stwierdzone w innych krajach leżących w tej samej strefie klimatycznej [1].

W 2001 r. Komitet Naukowy ds. Żywności przyjął opinię zawierającą ocenę toksyn T-2 i HT-2 ustanawiając łączne tymczasowe tolerowane dzienne pobranie (TDI) na poziomie 0,06 µg/kg masy ciała. GEMS/Food dla krajów Europy Środkowej podaje, że dzienne spożycie owsa wynosi 2 g [2]. Przyjmując tę wartość jako dzienne spożycie w kraju produktów otrzymanych z owsa dzienne pobranie toksyn T-2 i HT-2 z tymi przetworami wynosi 0,0006 µg/kg m.c., co odpowiada ok. 1 % TDI.

WNIOSKI

1. Opracowana metoda oznaczania toksyn T-2 i HT-2 w przetworach zbożowych techniką HPLC-MS/MS spełnia wymagania stawiane metodom stosowanym w kontroli urzędowej w zakresie granicy oznaczalności, precyzji, odzysku i niepewności wyniku.
2. W produktach pochodzących z owsa (płatki owsiane) stwierdzano częściej obecność toksyn T-2 i HT-2 oraz ich wyższe zawartości (22,5 µg/kg) niż w pozostałych przetworach zbożowych (7,0 µg/kg).
3. Uzyskane dane wskazują, że wartości tolerowanego dziennego pobrania dla toksyn T-2 i HT-2 nie są przekroczone, jednak należy podkreślić, że powstawanie toksyn *Fusarium* jest uzależnione od warunków pogodowych i poziomy zanieczyszczenia w latach o niekorzystnych warunkach klimatycznych mogą być wielokrotnie wyższe.
4. Celowe jest kontynuowanie badań monitoringowych w tym zakresie, rozszerzając je o nowe grupy produktów, szczególnie dla niemowląt i małych dzieci.

J. Postupolski, K. Rybińska, E. Ledzion, J. Kurpińska-Jaworska,
M. Szczęsna, K. Karłowski

BADANIA MONITORINGOWE W ZAKRESIE OZNACZANIA POZIOMU TOKSYN T-2 I HT-2 W PRZETWORACH ZBOŻOWYCH

STRESZCZENIE

W celu realizacji krajowego planu monitoringu żywności opracowano, zwalidowano i akredytowano metodę oznaczania toksyn T-2 i HT-2 w produktach zbożowych. Do analizy toksyn zastosowano metodę pojedynczej ekstakcji i oznaczania techniką HPLC/MS-MS ESI+. Prametry skuteczności metody (odzysk, precyzja i niepewność wyniku) są zgodne z kryteriami podanymi w Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 401/2006. Granica wykrywalności metody dla toksyny T-2 wynosi 3 µg/kg, a dla toksyny HT-2 4 µg/kg. Próbki do badań były pobierane przez stacje sanitarno – epidemiologiczne z terenu całego kraju. Oznaczenia wykonano w 107 próbkach przetworów zbożowych, otrzymanych głównie z owsa. Toksyny T-2 i HT-2 stwierdzono w 43 % próbek, średni poziom zanieczyszczenia w próbkach produktów pochodzących z owsa wynosił 22,5 µg/kg (najwyższy- 109 µg/kg w płatkach owsianych), w pozostałych (płatki pszenne i jęczmienne, kasze, mąka) 7,0 µg/kg. Uzyskane dane wskazują, że wartości tolerowanego dziennego pobrania (TDI) dla toksyn T-2 i HT-2 nie są przekroczone.

J. Postupolski, K. Rybińska, E. Ledzion, J. Kurpińska-Jaworska,
M. Szczęsna, K. Karłowski

MONITORING PROGRAM OF T-2 AND HT-2 TOXINS LEVEL IN CEREAL PRODUCTS

SUMMARY

In framework of the national monitoring program in Poland HPLC method for determination of T-2 and HT-2 toxins in cereal products was developed, validated and accredited. Simply, one-step extraction and HPLC MS/MS ESI+ method was used for determination both toxins. Performance of method

(recovery, precision and uncertainty of results) is in line with Commission Regulation No 401/2006. Limit of detection for T-2 and HT-2 toxins is 3 ad 4 µg/kg, respectively. Samples were taken by sanitary inspection from all region of country. 107 samples cereal products (mainly from oats) were tested. T-2 and HT-2 toxins were detected in 43 % samples, mean level in oats products was 22.5 µg/kg (maximum level 109 µg/kg in oat flakes), in other samples (wheat and barley flakes, grouts, flours) – 7.0 µg/kg. Intake of T-2/HT-2 toxin by the consumer in Poland is much lower than the TDI.

PIŚMIENNICTWO

1. European Commission. Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States, 2003.
2. GEMS/Food regional diets: regional per capita consumption of raw and semi-processed agricultural commodities, prepared by the Global Environment Monitoring System/Food Contamination Monitoring and Assessment Programme. WHO 2006. http://www.who.int/foodsafety/chem/gems_regional_diet.pdf.
3. IARC,. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; Vol. 56: Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 1993 397-433; Lyon.
4. *Ishigami, N.*: i wsp.: Apoptosis in the developing mouse embryos from T-2 toxin-inoculated dams. Histol. Histopathol. 1999,14,729-33.
5. JECFA. Summary and Conclusions of the Fifty-sixth meeting Geneva. Mycotoxins. 2001, http://www.fao.org/waicent/faoinfo/economic/esn/jecfa/jecfa56.pdf. 7.
6. *Krska R, Molinelli A.:* Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends. Bioanal Chem. Anal. 2007, 387, 145-8.
7. *Lutsky, I* i wsp.: The role of T-2 toxin in experimental alimentary toxic aleukia: a toxicity study in cats. Toxicol. Appl. Pharmacol.1978, 43, 111-124.
8. Rozporządzenie Komisji (WE) NR 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych. Dz. Urz. UE 2006, L 364, 5-24 (ze zmianami)
9. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 401/2006 z dnia 23 lutego 2006 r. ustanawiające metody pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli poziomów mikotoksyn w środkach spożywczych. Dz. Urz. UE 2006, L 70, 12-34.
10. Scientific Commitee on Food. Opinion on Fusarium toxins – part 5: T-2 and HT-2 toxins, 2000. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out74_en.pdf. 12.
11. *Sulyok M., Krska R., Schuhmacher R..:* A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. Anal Bioanal Chem. 2007, 389, 1505-23.
12. *Thrane U.* i wsp.*:* Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae, Fusarium poae,* and *Fusarium sporotrichioides*. Int. J. Food Microbiol. 2004, 95, 257-66.
13. *Usleber E.*: Improvement and Validation of Methods of Analysis for Type A Trichothecenes (T-2 Toxin and HT-2 Toxin) and Occurrence of these Mycotoxins in Foods in Germany. Fifth Fusarium Toxin Forum. Brussels, January 2008

Otrzymano: 22.07.2008 r
Akceptowano: 12.09.2008 r