

## **Primena imunoafinitetnih kolona u pripremi različitih uzoraka namirnica za određivanje mikotoksina**

**Marijana Ćurčić<sup>1\*</sup>, Žaklina Ljubičić<sup>2</sup>, Gorica Vuković<sup>3</sup>,  
Biljana Antonijević<sup>1</sup>, Zorica Bulat<sup>1</sup>, Vesna Matović<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović”, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd

<sup>2</sup>Zavod za javno zdravlje Sremska Mitrovica, Stari šor 47, Sremska Mitrovica

<sup>3</sup>Gradski Zavod za javno zdravlje Beograd, Bulevar despota Stefana 54a, Beograd

\*Autor za korespondenciju: Marijana Ćurčić, tel: +381113951248;

e-mail: makitox@pharmacy.bg.ac.rs

---

### **Kratak sadržaj**

U analitičkim metodama koje se koriste u monitoringu posebna pažnja se pridaje pripremi uzorka, pa je i cilj ovog rada ispitivanje efikasnosti primene imunoafinitetnih kolona (IAC) za pripremu uzoraka kod određivanja aflatoksina i ohratoksina koje se zasnivaju na principu tečno-čvrste ekstrakcije. Koncentracija aflatoksina i ohratoksina određivana je u ukupno 56 uzoraka različitih namirnica: pšenica, kukuruz, pirinač, ječam i ostala žita (19 uzoraka), brašno i proizvodi od brašna od žita i dodaci za pekarsku industriju (7 uzoraka), voće i povrće (3 uzorka), lešnik, orah, badem, brašno od kokosa (4 uzorka), prženi kakaovac, kikiriki, čajevi, kafa (16 uzoraka), začini (4 uzorka) i meso i proizvodi od mesa (4 uzorka). Dobijeni rezultati ukazuju na prednost primene IAC kolona u pripremi uzoraka, prvenstveno je postignuto povećanje specifičnosti metode usled vezivanja ekstrahovanih analita za inkorporirana specifična antitela i ispiranje ostalih komponenti uzorka, koje mogu ometati dalju analizu. Prednost je generisanje male količine otpadnih organskih rastvarača i smanjenje izloženosti osoblja koje izvodi metodu hromatografskog određivanja mikotoksina. Posebno je od značaja postignuto povećanje osetljivosti metode jer je postignuto da kvantifikacioni limiti za određivanje aflatoksina i ohratoksina budu znatno niži od maksimalno dozvoljenih koncentracija ovih jedinjenja propisanih nacionalnim pravilnikom.

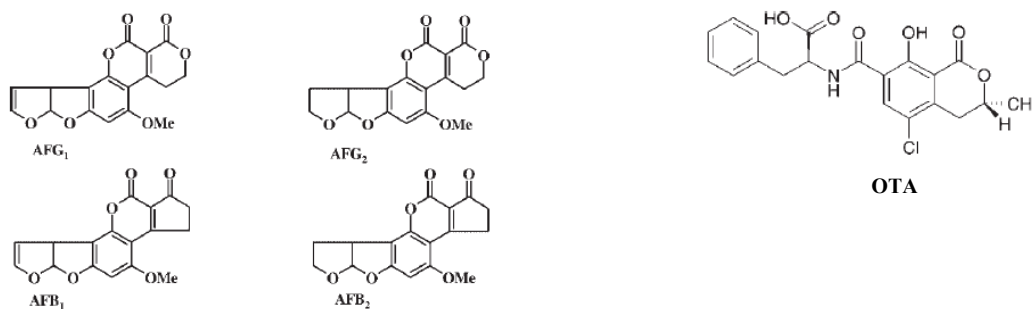
**Ključne reči:** mikotoksini, priprema uzorka, namirnice, imunoafinitetne kolone

---

## 1. Uvod

Mikotoksini su mnogobrojna i hemijski raznovrsna grupa jedinjenja, sekundarnih metabolita gljivica, među kojima se po svom toksikološkom značaju izdvajaju aflatoksini (AFT) i ohratoksini (OTA). Proizvodi su *Aspergillus* i *Penicillium* vrsta (1, 2), a za njihov nastanak su, osim prisustva spora određenih sojeva gljivica, važni i faktori iz životne sredine kao što su visoka vlažnost, temperatura ili fizičko oštećenje semena, što sve zajedno rezultuje kontaminacijom hrane za ljude i životinje tokom skladištenja i obrade (1-4). Do izloženost ljudi aflatoksinima i ohratoksina dolazi prvenstveno putem kontaminiranih namirnica, kao što su koštunjavo voće, sočivo, pasulj, grašak, kafa, kakaovac, čajevi, meso, mleko, dok se značajnim izvorom ohratoksina smatra i vino poreklom iz zemalja našeg okruženja (2, 3).

Hemijska struktura aflatoksina i ohratoksina se razlikuje (Slika 1; AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> i AFG<sub>2</sub> predstavljaju podgrupe AFT) i povezuje se sa njihovim toksičnim svojstvima. Toksičnost ovih jedinjenja se objašnjava građenjem halo-estara koji predstavljaju alkilirajuće agense ili epokside koji reaguju sa nukleofilnim centrima, posebno na DNK, te mogu da inhibiraju sintezu nukleinskih kiselina, a takođe i sa nukleofilnim centrima enzima ili molekula uključenih u humoralni imunski sistem. Laktonski prsten se takođe smatra odgovornim za citotoksičnost i karcinogenost posredovane alkilovanjem, dok interakcija laktonskog prstena sa -SH grupama proteinskih struktura dodatno potencira toksičnost ovih jedinjenja (3, 4).



Slika 1. Hemijske strukture aflatoksina i ohratoksina ispitivanih u ovom radu  
Figure 1. Chemical structure of examined aftaroxins and ochratoxins

Ciljni organ toksičnog dejstva aflatoksina je jetra gde se kao posledica akutnog trovanja primarno razvija nekroza, a usled produžene izloženosti hepatitis pa i ciroza (2-4). Prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje karcinoma (**International Agency for Research on Cancer - IARC**) aflatoksini su svrstani u humane karcinogene (grupa 1), a osnov za ovakvu klasifikaciju je upravo učestalost razvoja karcinoma jetre (5).

Za razliku od aflatoksina, ohratoksini primarno deluju na bubreg gde oštećuju proksimalne tubule. Smatra se da su ovi efekti posredovani, između ostalog, i povećanom lipidnom peroksidacijom u mikrozomima bubrega (2-4). Prema IARC klasifikaciji, ohratoksini pripadaju grupi mogućih karcinogena za ljude (grupa 2B) što je zasnovano na podacima o pojavi karcinoma bubrega (5).

Maksimalno dozvoljene koncentracije (MDK) aflatoksina i ohratoksina u namirnicima u R. Srbiji utvrđene su važećim pravilnikom i za AFB1 iznose od 2 do 12  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , za sumu AFB1, AFB2, AFG1 i AFG2 od 4 do 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , dok je MDK za OTA od 2 do 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (6). U cilju zaštite zdravlja ljudi i bezbednosti hrane na tržištu Srbije, razvoj analitičkih metoda za određivanje koncentracije aflatoksina i ohratoksina u namirnicima ima veliki značaj u kontroli bezbednosti hrane i prevenciji izloženosti ljudi i životinja. U dostupnoj literaturi najčešće se sreću sledeće analitičke metode za određivanje mikotoksina: enzimski imunosorbent eseji, tankoslojna hromatografija i visoko efikasna tečna hromatografija spregnuta sa različitim vrstama detektora od kojih je za potvrđivanje najznačajnija masena spektrometrija. Zahtevi za osetljivost i tačnost konformativnih metoda date su kriterijumima Evropske regulative za pravilno izvođenje analitičkih metoda za određivanje mikotoksina (7). U analitičkim metodama koje se koriste u monitoringu posebna pažnja se pridaje pripremi uzorka u kojoj se najčešće se koriste multifunkcionalne, modifikovane QuEChERS (*Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe*) ili polimerne revrznofazne kolone za tačno-čvrstu ekstrakciju (4, 8, 9). Cilj ovog rada bio je ispitivanje efikasnosti primene tačno-čvrstih imunoafinitetnih kolona (IAC) za pripremu uzoraka kod određivanja aflatoksina i ohratoksina.

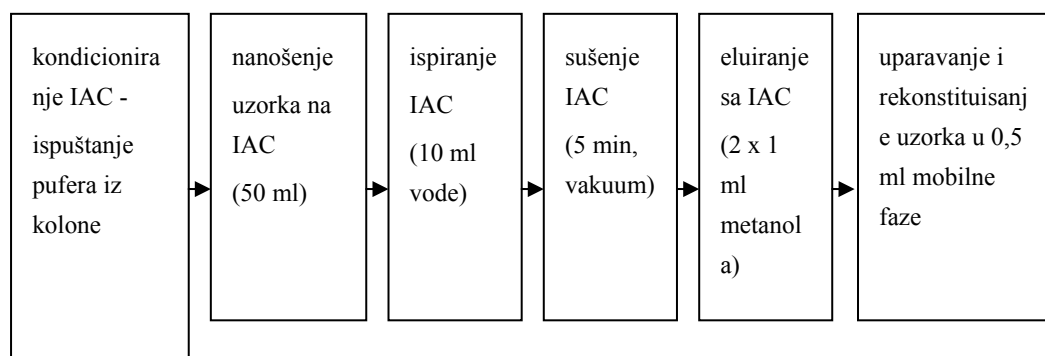
## 2. Eksperimentalni deo

U radu su korišćene hemikalije analitičkog stepena čistoće, nabavljene iz komercijalnih izvora. U osnovnom standardu smeše, aflatoksini su se nalazili u koncentracijama 2,02  $\mu\text{g}$  AFB1/ml, 2,03  $\mu\text{g}$  AFG1/ml, 0,5  $\mu\text{g}$  AFB2/ml, 0,54  $\mu\text{g}$  AFG2/ml u acetonitrilu. Opseg kalibracione krive za određivanje AFB1 i AFG1 je bio 0,20-10,10 ng/ml, a za određivanje AFB2 i AFG2 0,05-2,5 ng/ml. Osnovni standard ohratoksina koncentracije 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bio je rastvoren u smeši benzena i sirćetne kiseline (99/1; V/V), a opseg kalibracione krive za određivanje ohratoksina bio je 2,5-100 ng/ml.

Koncentracija aflatoksina i ohratoksina određivana je u ukupno 56 uzoraka različitih namirnica prema važećem pravilniku (6): pšenica, kukuruz, pirinač, ječam i ostala žita (19 uzoraka), brašno i proizvodi od brašna od žita i dodaci za pekarsku

industriju (7 uzoraka), voće i povrće (3 uzorka), lešnik, orah, badem, brašno od kokosa (4 uzorka), prženi kakaovac, kikiriki, čajevi, kafa (16 uzoraka), začini (4 uzorka) i meso i proizvodi od mesa (4 uzorka). Uzorci su bili: pšenična krupica, pirinač, soja, proizvodi od žitarica (pahuljice), kukuruz kokičar, kukuruzno brašno, kikiriki, kikiriki flips, snek proizvodi, lešnik pasta, seckani lešnik, crni čaj, crni čaj sa kamilicom i sa dodatkom jabuke i cimeta, zeleni čaj sa dodatkom limuna, domaći čajevi od nane, kamilice i hibiskusa, smeša za crni hleb, kukuruzni hleb, začini i hrana za decu.

Priprema uzoraka je vršena mlevenjem i homogenizacijom, a zatim ekstrakcijom mikotoksina iz 20 g homogenata sa 100 ml smeše metanola i vode (80/20; v/v). Ekstrakt (10 ml) je nakon filtriranja razblaživan sa 40 ml fosfatnog pufera (pH 7,2) i propuštan preko IAC kolone (*AflaCLEAN, LCTech, Product No 10514*) koja je pripremana ispiranjem destilovanom vodom (10 ml) i sušenjem u struji vazduha, a eluiranje je vršeno dva puta sa po 1 ml metanola. Mikotoksin, koji se nalazi vezan u koloni, eluira se metanolom koji najpre u potpunosti denaturiše strukturu antitela, a zatim dovodi do oslobađanja mikotoksina. Metanol se iz eluata uparava u struji azota, a ostatak se zatim rekonstituiše u 0,5 ml mobilne faze (Slika 2). Uzorci sa većim sadržajem masti su pripremani na opisani način, osim što je pre ekstrakcije dodavano 2 g NaCl radi izolovanja (9).



**Slika 2. Procedura za pripremu uzoraka za analizu aflatoksina i ohratoksina primenom IAC kolona**

**Figure 2. Sample preparation procedure for determination of aflatoxins and ochratoxins using IAC columns**

Određivanje je vršeno metodom visoko efikasne tečne hromatografije sa fluorescentnim detektorom (HPLC-FLD) (*Agilent 1100, FLD*) (9). Za razdvajanje je korišćena kolona Zorbax Eclipse XDB C18, 4,6x150 mm, 5 µm (*Agilent, Part No 993967-902*), a mobilnu fazu činila je smeša vode, acetonitrila i metanola u odnosu 60:20:20; V/V/V, pri protoku od 1,2 ml/min. Za prevođenje aflatoksina B1 u

fluorescentni aflatoksin B<sub>2a</sub> korišćen je UV-reaktor za postkolonsku derivatizaciju. Parametri na osnovu kojih je procenjivan kvalitet metode određivanja aflatoksina i ohratoksina korišćenjem IAC kolona za pripremu uzorka bili su osetljivost, linearnost, preciznost, tačnost, specifičnost, selektivnost, primenljivost i efikasnost metode (7).

### 3. Rezultati i diskusija

Primenjena metoda za određivanje aflatoksina i ohratoksina koja je obuhvatala pripremu uzoraka korišćenjem IAC kolona i određivanje sa HPLC-FD lineama je u opsegu ispitivanih koncentracija. Metoda je precizna, na šta ukazuje koeficijent varijacije koji ne prelazi 10% ni za jedan od ispitivanih analita, a retenciona vremena, kvantifikacioni limiti i tačnost određivanja ispitivanih mikotoksina prikazani su u Tabeli I *Recovery* vrednosti određene „spajkovanjem uzoraka” ukazuju da je primena ove metode zadovoljavajuća za AFB<sub>2</sub> i OTA ali i da postoji potreba za daljom optimizacijom metode.

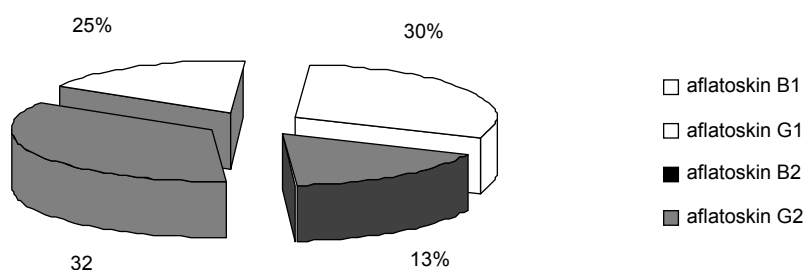
**Tabela I** Hromatografski parametri ispitivanih mikotoksina nakon pripreme uzoraka korišćenjem IAC kolone

**Table I** Chromatographical parameters of determined micotoxins after sample preparation using IAC columns

	AFG1	AFG2	AFB2	AFB1 (AFB <sub>2a</sub> )	OTA
retenciono vreme (min)	6	5	8	7	4
limit detekcije (µg/kg)	0,03	0,01	0,03	0,01	0,08
limit kvantifikacije (µg/kg)	0,1	0,02	0,1	0,02	0,25
relativna standardna devijacija (%)	16,98	10,52	14,16	6,39	7,21
tačnost (%)	46,32	10,09	70,74	28,61	101,07

Prema standardu SRPS CEN/TR 16059:2012 i Evropskoj regulativi za pravilno izvođenje analitičkih metoda za određivanje mikotoksina, rezultati ukazuju na efikasnost primene IAC kolona u pripremi uzoraka što je potvrđeno linearnošću za sve ispitivane opsege koncentracija mikotoksina ( $r \geq 0,999$ ). Postignuto povećanje pouzdanosti metode, prvenstveno povećanjem specifičnosti i selektivnosti metode, objašnjava se vezivanjem ekstrahovanih analita za inkorporirana specifična antitela, kao

i ispiranjem ostalih komponenti uzorka koje mogu ometati dalju analizu, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (4, 10, 11). Posebno je od značaja postignuto povećanje osetljivosti metode jer je postignuto da kvantifikacioni limiti za određivanje aflatoksina i ohratoksina budu znatno niži od MDK vrednosti ovih jedinjenja propisanih važećim pravilnikom (6). Još jedna od prednosti primene IAC kolona u odnosu na primenu tečno-tečne ekstrakcije je generisanje manje količine otpada od organskih rastvarača, dok se pri tečno-tečnoj ekstrakciji generiše mnogo veća količina otpadnih organskih rastvarača. Takođe je od značaja manja mogućnost izloženosti organskim rastvaračima osoblja laboratorije koje radi na pripremi uzoraka za određivanje mikotoksina (6, 9-11). IAC kolone se čuvaju na sobnoj temperaturi, međutim vreme upotrebe je ograničeno na 12 meseci od proizvodnje, a cena im je visoka što može predstavljati ograničavajući faktor za njihovu primenu. Metoda određivanja aflatoksina i ohratoksina uz primenu IAC kolona je specifična, precizna i osetljiva, a upravo primena IAC kolona čini metodu jednostavnom za izolovanje aflatoksina i ohratoksina, što i drugi autori navode kao jednu od najvećih prednosti tehnika za pripremu uzorka koje se zasnivaju na principu imunoafinitetne hromatografije (6, 11, 12). Prema zahtevima SRPS CEN/TR 16059:2012, ispitivana metoda ispunjava zahteve pouzdanosti, primenljivosti i nesigurnosti merenja, ipak, rezultati upućuju na potrebu za daljom optimizacijom (10).



**Slika 3. Udeo pojedinačnih aflatoksina čije su koncentracije iznad vrednosti MDK**  
**Figure 3. Contribution of single aflatoxins which concentrations are above MAC values**

U odnosu na ukupan broj uzoraka aflatoksini su određeni u koncentracijama većim od vrednosti MDK u tri uzorka, lešnik pasta i snek proizvodima, dok udeo

pojedinačnih aflatoksina u uzorcima u kojima njihova koncentracija prelazi MDK vrednost iznosi od 13% za aflatoksin B1 do 32% za aflatoksin G1 (Slika 3). Detekcija aflatoksina u koncentraciji iznad vrednosti MDK u samo tri ispitivana uzorka ukazuje na dobre uslove skladištenja ispitivanih namirnica, prvenstveno na odgovarajuću vlažnost i temperaturu. Za razliku od aflatoksina, prisustvo ohratoksina primenjenom metodom nije utvrđeno ni u jednom uzorku u koncentraciji većoj od MDK vrednosti.

#### **4. Zaključak**

U prikazanom radu potvrđena je efikasnost primene IAC kolona za pripremu uzoraka za određivanje aflatoksina i ohratoksina HPLC/FLD metodom. *Recovery* vrednosti ukazuju da je primena ove metode zadovoljavajuća za AFB2 i OTA i da postoji potreba za daljom optimizacijom metode. Prednost primeni IAC kolona daje generisanje male količine otpadnih organskih rastvarača i smanjenje izloženosti osoblja koje izvodi metodu hromatografskog određivanja mikotoksina. Posebno je od značaja što su postignuti kvantifikacioni limiti za određivanje aflatoksina i ohratoksina znatno niži od MDK vrednosti ovih jedinjenja propisanih važećim pravilnikom.

#### **5. Zahvalnica**

Istraživanja su sprovedena u okviru projekta III46009 Ministarstva nauke, prosvete i tehnološkog razvoja.

#### **6. Literatura**

1. Turner NW, Subrahmanyam S, Piletsky SA. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analytica Chimica Acta*. 2009; 632(2): 168-80.
2. Sinovec Z, Sinovec S, Resanović R. Mikotoksini, pojava, efekti i prevencija. Beograd: Fakultet veterinarske medicine, 2006.
3. FAO, 1995. Food and Agriculture Organization. Worldwide regulations for mycotoxins: A compendium. FAO Food and Nutrition Paper. 1995.
4. Sforza S, Dall'Asta C, Marchelli R. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass spectrometry Reviews*. 2006; 25(1): 54-76.

5. IARC, 1993. International Agency for cancer Research – IARC: Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to human, Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. 1993; 56: 397-488.
6. Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja („Službeni glasnik Republike Srbije”, 29/2014, 37/2014 – ispravka, 39/2014; 72/2014, 80/2015, 84/2015 i 35/2016).
7. Commission of the European Communities - Commission Regulation (EC) No. 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Official Journal of the European Union 2006; L70:12–34
8. Wacoo AP, Wendi D, Vuzi PC, Hawumba JF. Methods for detection of aflatoxins in agricultural food crops. Journal of Applied Chemistry. 2014; 13: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/706291>.
9. Barbas C, Dakus A, Majors RE. Separation of Aflatoxins by HPLC, Environmental, Food Safety. [http://www.agilent.com/chem/food\\_safety/januar\\_2009](http://www.agilent.com/chem/food_safety/januar_2009). Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, EURACHEM/CITAC Guide EURACHEM web site: <http://www.uni-stuttgart.de/eurachem/pdf/valid.pdf/2005>.
10. Standard SRPS CEN/TR 16059:2012. Analiza hrane — Kriterijumi performansi metoda analize za određivanje mikotoksina, koje su validovane u jednoj laboratoriji. 2012.
11. Wilcox J, Donnelly C, Leeman D, Marley E. The use of immunoaffinity columns connected in tandem for selective and cost-effective mycotoxin clean-up prior to multi-mycotoxin liquid chromatographic–tandem mass spectrometric analysis in food matrices. Journal of Chromatography A. 2015; 1400: 91-7.
12. Xie J, Peng T, He JL, Shao Y, Fan CL, Chen Y, Jiang WX, Chen M, Wang Q, Pei XY, Ding SY. Preparation and characterization of an immunoaffinity column for the selective extraction of aflatoxin B 1 in 13 kinds of foodstuffs. Journal of Chromatography B. 2015; 998: 50-6.



# **Application of immunoaffinity columns for different food item samples preparation in micotoxins determination**

**Marijana Ćurčić<sup>1\*</sup>, Žaklina Ljubičić<sup>2</sup>, Gorica Vuković<sup>3</sup>,  
Biljana Antonijević<sup>1</sup>, Zorica Bulat<sup>1</sup>, Vesna Matović<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Toxicology, Akademik Danilo Soldatović”, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade

<sup>2</sup>Public Health Institut Sremska Mitrovica, Stari šor 47, Sremska Mitrovica

<sup>3</sup>Public Health Institute of Belgrade, Bulevar despota Stefana 54a, Belgrade

---

## **Summary**

In analytical methods used for monitoring of what special attention is paid to sample preparation. Therefore, the objective of this study was testing the efficiency of immunoaffinity columns (IAC) that are based on solid phase extraction principles used for samples preparation in determining aflatoxins and ochratoxins. Aflatoxins and ochratoxins concentrations were determined in totally 56 samples of food items: wheat, corn, rice, barley and other grains (19 samples), flour and flour products from grain and additives for the bakery industry (7 samples), fruits and vegetables (3 samples), hazelnut, walnut, almond, coconut flour (4 samples), roasted cocoa beans, peanuts, tea, coffee (16 samples), spices (4 samples) and meat and meat products (4 samples). Obtained results indicate advantage of IAC use for sample preparation based on enhanced specificity due to binding of extracted molecules to incorporated specific antibodies and rinsing the rest molecules from sample which could interfere with further analysis. Additional advantage is the usage of small amount of organic solvents and consequently decreased exposure of staff who conduct micotoxins determination. Of special interest is increase in method sensitivity since limit of quantification for aflatoxins and ochratoxins determination method is lower than maximal allowed concentration of these toxins prescribed by national rule book.

**Key words:** mycotoxins, sample preparation, foodstuffs, immunoaffinity columns

---