



СУЧАСНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ МІКОТОКСИНУ ПАТУЛІНУ – ОДНОГО З ПОШИРЕНИХ КОНТАМІНАНТІВ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ

А.Л. Носенко, О.А. Маршалкіна, Є.О. Фоміна, К.В. Молчанова, Є.Г. Мистецький
Інститут екології та токсикології імені Л.І. Медведя, Київ, Україна

Резюме. Была проведена адаптация и модификация методики количественного определения микотоксина патулина в яблочном соке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с UV/VIS детекцией на основании стандарта ISO 8128-1 "Яблочный сок, концентраты яблочного сока и напитки, содержащие яблочный сок — Определение содержания патулина — Часть 1: Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии". Представленная к рассмотрению методика имеет удовлетворительные метрологические показатели, она экономична, а также экологически выгодна. Необходима дальнейшая разработка возможности применения данной методики и к другим продуктам питания, уменьшения предела количественного определения патулина.
Ключевые слова: ВЭЖХ, микотоксины, патулин.

Summary. The article describes mycotoxin patulin quantitative determination in apple juice, which is a modified method, based on the ISO standard 8128-1:1993 "Apple juice, apple juice concentrates and drinks containing apple juice — Determination of patulin content — Part 1: Method using high-performance liquid chromatography.". The described method has satisfactory metrological parameters and is both economically and environmentally beneficial. Further work is to be aimed at the possibility of its application to other food and at the reduction of the patulin quantitative determination limit.
Key words: HPLC, mycotoxins, patulin.

Мікотоксини — токсичні вторинні метаболіти, що продукуються пліснявими грибами і є поширеними контамінантами харчових продуктів та сировини, що використовується для їх виробництва. Дана група токсинів включає таких представників, як афлатоксини, трихотеценові мікотоксини, охра-токсини, фумонізін, зеараленон та його похідні, патулін та ін. Найчастіше вплив мікотоксинів пов'язують з канцерогенною та імуносупресивною дією. І хоча найбільше занепокоєння викликають афлатоксини, канцерогенну дію яких доведено, ряд інших мікотоксинів, зокрема фумонізін, патулін, охратоксин та інші, також становлять небезпеку для здоров'я людини і регламентуються вітчизняними та міжнародними нормативними документами, що зумовлює необхідність існування ефективних методик визначення їх вмісту в харчових продуктах.

На даний момент в Україні регламентується вміст таких мікотоксинів у різноманітних групах харчових продуктів: афлатоксини B₁ та M₁, зеараленон, Т-2 токсин, дезоксиніваленон та патулін [1].

Патулін є мікотоксином, який продукується рядом мікроскопічних грибів, що належать до родів *Penicillium*, *Aspergillus* та *Byssosclamyces*, серед яких найпоширенішим його продуцентом є *Penicillium expansum*. Патулін виявляється у багатьох вражених гниллю овочах, фруктах та злаках, проте найхарактернішим його джерелом є яблука та продукти їх переробки [2].

Патулін має властивості антибіотика широкого

спектру дії, проте не використовується з лікувальною метою, оскільки було доведено його гостру токсичність у мишей, тератогенність у курячих ембріонів, імуносупресивну дію у мишей та кролів, здатність інактивувати ензими через високу спорідненість до сульфгідрильних груп [3]. Даних щодо хронічного впливу патуліну на людей недостатньо, однак описано випадки гострого отруєння після прийому всередину, що супроводжувались зміною поведінкових реакцій, конвульсіями, ультрацією, набряками, ентероколітом, нудотою та блюванням [4].

Патулін підлягав розгляду Міжнародною агенцією з вивчення раку (IARC, 1976р.; 1985р.) і був віднесений до групи 3, тобто до речовин, канцерогенність яких для людей та тварин не має достатньо доказів [5].

З 1995 року ряд країн запровадили нормування вмісту патуліну, в основному у фруктах та продуктах їх переробки. В більшості країн було встановлено допустиму межу вмісту патуліну на рівні 50 мкг/кг [6], зокрема, стандартом Codex Alimentarius, що регламентує вміст контамінантів та токсинів у харчових продуктах (Codex general standard for contaminants and toxins in foods), вміст патуліну у яблучному соці не повинен перевищувати 50 мкг/кг [7].

В Україні вміст патуліну регламентується в наступних категоріях харчових продуктів:

- овочі та картопля;
- фрукти і виноград;

- ягоди;
- гриби засушені;
- консерви овочеві в скляній, алюмінієвій і цільноотягнутій жерстяній тарі (овочеві соки);
- консерви фруктові і ягідні та соки у скляній, алюмінієвій та цільноотягнутій жерстяній тарі;
- консерви фруктові, ягідні та соки у збірній жерстяній тарі.

Допустимий вміст патуліну в даних продуктах встановлено на рівні 50 мкг/кг. Згідно з медико-біологічними вимогами, встановленими в Україні, наявність патуліну в продуктах дитячого харчування не допускається (має бути меншою за 20 мкг/кг) [1].

За хімічною структурою патулін є полікетидним лактоном (рис. 1)

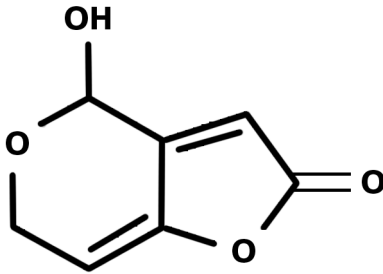


Рис. 1. Хімічна будова патуліну (4-гідрокси-4Н-фуоро[3,2-с]піран-2(6Н)-он)

Патулін стійкий до температурної обробки, особливо в кислому середовищі, тому пастеризація не сприяє його знешкодженню. Патулін руйнується при ферментації, тому не виявляється ні в алкогольних напоях, виготовлених з фруктів, ні в оцтах, що готуються з фруктових соків. Патулін має властивість зв'язуватись з білками. Тому очистка соків, що включає центрифугування, ферментативну обробку та різні види фільтрації, дозволяє значно знизити вміст патуліну, оскільки понад 70% його залишається в м'якоті, вміст білків в якій значно вищий, ніж в рідкій частині. Патулін активно реагує з сірковмісними речовинами, що дозволяє досягти зниження його вмісту шляхом застосування антиоксидантів та антибактеріальних препаратів, що містять сірку в своєму складі, а також аскорбінової кислоти, тіаміну, піридоксину та кальцію пантотенату [3, 4].

Біологічна активність патуліну зменшується в лужному середовищі та у присутності молекул, до складу яких входить меркаптогрупа, зокрема цистеїну або глутатіону [3,4].

Визначення вмісту патуліну в харчових продуктах. Для визначення вмісту патуліну в харчових продуктах було запропоновано декілька методів. Найбільш поширена схема аналізу включає рідинну екстракцію етилацетатом, очистку екстракту та подальше кількісне визначення із застосуванням тонкошарової хроматографії або вискоєфективної рідинної хроматографії.

При визначенні вмісту патуліну у продуктах переробки яблук основною проблемою є те, що в процесі підготовки проби разом з ним екстрагується

5-гідроксиметилфурфурол (рис. 2), продукт дегідратації кетопентоз у кислому середовищі або при термічній обробці. Вміст даної речовини значно перевищує рівні вмісту патуліну в об'єктах, що аналізуються і може суттєво впливати на якість результатів аналізу.

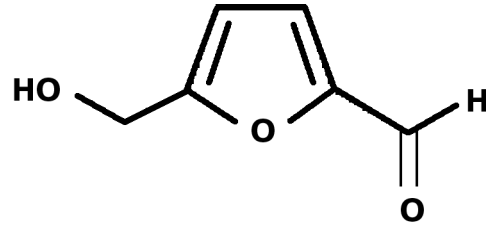


Рис. 2. Хімічна будова 5-гідроксиметил-фурфуролу (5-гідроксиметил-2-фуральдегід)

Першим методом, що широко використовувався для визначення патуліну, був метод тонкошарової хроматографії, але на даний момент найбільш поширеним є метод вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). В літературі також зустрічається ряд альтернативних методів визначення патуліну, зокрема мас-спектрометрія, капілярний електрофорез, міцелярна електрокінетична хроматографія. Проте вони не є поширеними через те, що мають високу вартість аналізу або ж недостатню чутливість [4].

На даний час існує ряд офіційних методик з визначення патуліну, зокрема

- стандарт ISO 8128-1 "Яблучний сік, концентрати яблучного соку та напої, що містять яблучний сік — Визначення вмісту патуліну — Частина 1: Метод вискоєфективної рідинної хроматографії" (ISO 8128-1:1993 Apple juice, apple juice concentrates and drinks containing apple juice — Determination of patulin content — Part 1: Method using high-performance liquid chromatography.);

- стандарт ISO 8128-2 "Яблучний сік, концентрати яблучного соку та напої, що містять яблучний сік - Визначення вмісту патуліну — Частина 2: Метод тонкошарової хроматографії" (ISO 8128-2:1993 Apple juice, apple juice concentrates and drinks containing apple juice — Determination of patulin content — Part 2: Method using thin-layer chromatography.);

- офіційний метод AOAC 947.18 "Патулін в яблучному соці. Метод тонкошарової хроматографії" (AOAC Official Method 947.18 Patulin in apple juice. Thin-Layer Chromatographic Method.);

- офіційний метод AOAC 995.10 "Патулін в яблучному соці. Метод вискоєфективної рідинної хроматографії" (AOAC Official Method 995.10 Patulin in apple juice. Liquid Chromatographic Method.).

В Україні затверджено два нормативні документи з визначення патуліну: ГОСТ 28396-89 "Зернова сировина, комбікорми. Метод визначення патуліну" (ГОСТ 28396-89 (СТ СЭВ 6540-88) Зерновое сырье, комбикорма. Метод определения патулина.) та ДСТУ 4947:2008 "Фрукти, овочі та продукти їх перероблення. Методи визначення вмісту мікотоксину патуліну".

Метод тонкошарової хроматографії має декілька варіацій, однак принципова його схема включає екстракцію органічним розчинником (найчастіше етилацетатом), очистку на хроматографічній колонці з силікагелем та виявлення з допомогою хроматографічних пластин з силікагелем при проявленні 3-метил-2-бензотіазолінону гідразоном (метод AOAC 947.18) або бензидином (ГОСТ 28396-89).

Оскільки патулін є відносно полярною молекулою і має специфічний спектр поглинання з максимумом, що відповідає довжині хвилі 276 нм, на даний момент для його визначення найширше використовуються метод високоефективної рідинної хроматографії з UV/VIS-детекцією. Даний метод є більш чутливим, ніж метод тонкошарової хроматографії і дозволяє ефективно розділяти патулін та 5-гідроксиметилфурфурол.

У даній статті наведено результати попередніх досліджень за допомогою модифікованої методики визначення патуліну в яблучному соці методом оберненофазної ВЕРХ на основі стандарту ISO 8128-1 "Яблучний сік, концентрати яблучного соку та напої, що містять яблучний сік — Визначення вмісту патуліну — Метод високоефективної рідинної хроматографії".

Реактиви. Патулін, аналітичний стандарт (вміст основної речовини не менше 98%) — "Sigma-Aldrich", Бельгія; тетрагідрофуран (CHROMASOLV Plus for HPLC) — "Sigma-Aldrich", Бельгія; етилацетат (pure) — "Acros Organics", Бельгія; 5-(гідроксиметил)фурфурол (вміст основної речовини не менше 98%) — "Acros Organics", Бельгія; натрію карбонат безводний (х.ч.) — НПП "Альфарус"; льодяна оцтова кислота — ЗАО "Северодонецкое объединение "Азот"; натрію ацетат (чда) — ООО "Химлаборреактив".

Приготування розчинів аналітичного стандарту патуліну. Основний, робочий та градувальні розчини аналітичного стандарту патуліну були приготовані відповідно до стандарту ISO 8128-1 шляхом розчинення в ацетатному буферному розчині (pH=4,0).

Підготовка проби. Проба освітленого яблучного соку (5 мл) екстрагувалась трічі порціями етилацетату по 5 мл. Об'єднані фази етилацетату екстрагувались 1,4 г/л розчином натрію карбонату, органічна фаза відбиралась, водна екстрагувалась новою порцією етилацетату. Етилацетат був зібраний в колбу для випарювання та випарений спочатку на водяній бані при температурі 40°C до об'єму 1–2 мл, подальше випарювання досуха здійснювалось під током азоту. Одержаний сухий залишок перерозчиняли в ацетатному буферному розчині (pH=4,0) та хроматографували.

ВЕРХ-аналіз. ВЕРХ-аналіз проводився на хроматографічній системі Dionex Summit з UV/VIS-детектором та автосамплером в наступних умовах: колонка хроматографічна Varian (довжина 250 мм, внутрішній діаметр 4,6 мм, розмір часток сорбента 5 мкм); рухома фаза: тетрагідрофуран : вода у співвідношенні 99:1 об/об; довжина хвилі детекту-

вання: 276 нм; об'єм проби, що вводиться в хроматограф: 30 мкл; температура термостату колонок: 20°C. Збір та обробка даних здійснювались з допомогою програмного забезпечення Chromeleon Chromatography Management.

Результати. Проаналізовано проби яблучного соку без внесення та з внесенням різних концентрацій стандартної речовини (табл. 1). На основі одержаних результатів було статистично обчислено СКВ методу, що становило 3,39%, середній процент повернення — 85%, встановлено лінійний діапазон кількісного визначення патуліну в межах 25–300 мкг/кг, межу кількісного визначення методики, що дорівнює 25мкг/кг, а також доведено специфічність даної методики (рис. 3).

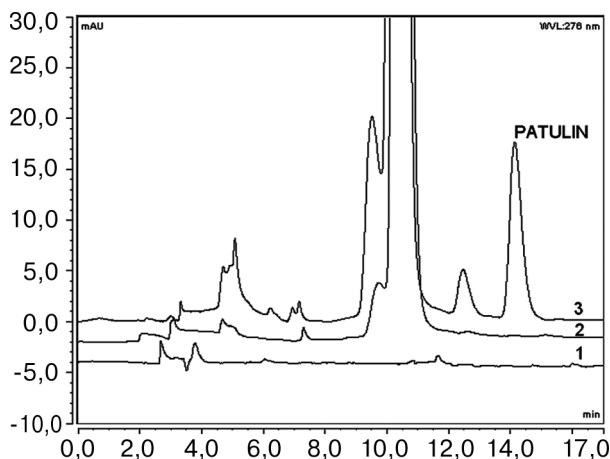


Рис.3. Хроматограми: 1 — "холостий" проб реактивів; 2 — "холостий" проб матриці (зразок яблучного соку, що не містить патулін); 3 — зразок яблучного соку зі внесеним патуліну на рівні 100мкг/кг

Висновки

На основі одержаних результатів можна зробити висновок, що представлена до розгляду методика визначення кількісного вмісту мікотоксину патуліну в яблучному соці методом ВЕРХ є ефективною та відтворюваною. Досліджений метод є порівняно швидким та економічним, забезпечує отримання достовірних результатів і може бути рекомендований для широкого використання при аналізі яблучного соку. Додатковою перевагою даної методики є те, що незначним є обсяг застосування органічних розчинників, що несуть загрозу навколишньому середовищу та потребують додаткових затрат на утилізацію. Можливість застосування даної методики потребує подальшої розробки і адаптації до інших матриць, зокрема соків з інших видів фруктів та овочів. Також необхідним є доопрацювання методики з метою зменшення межі кількісного визначення, що зробить можливим контроль вмісту патуліну у продуктах дитячого харчування, в яких даний токсин нормується на нижчому рівні.

ЛІТЕРАТУРА

1. Медико-биологические требования и санитарные нормы качества продовольственного сырья и пищевых продуктов / Збірник важливих офіційних матеріалів з санітарних та протиепідемічних питань. –К., 1995. –Т. 1, ч. 2. –С. 53–246.
2. Общий стандарт по предотвращению и уменьшению степени загрязнения патулином яблочного сока и его ингредиентов в других напитках (CAC/RCP 50–2003) / Свежие плоды, овощи и фруктовые соки. –М.: Весь мир, 2007. –С. 262–270.
3. Free and bound patulin in cloudy apple juice / Katleen Baert, Bruno De Meulenaer, Chitundu Kasase [et al.] // Food Chemistry. –2007. –Vol. 100, N. 3. –P. 1278–1282.
4. Patulin in food: state-of-the-art and analytical trends / Sandra Jussara Nunes da Silva, Paula Zilles Schuch, Carmem Ronise Bernardi [et al.] // Rev. Bras. Frutic. –2007. –Vol. 29, N. 2. –P. 69–72.
5. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs volumes 1–42. Supplement 7. –World Health Organization, International Agency for Research on Cancer (IARC), 1987. –440 p.
6. http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/suppl_7/index.php
7. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003 (FAO FOOD AND NUTRITION PAPER 81). –165 p.
8. <http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e07.htm#bm07.5.2>
9. Codex general standard for contaminants and toxins in foods (CODEX STAN 193-1995). –52 p.
10. http://www.codexalimentarius.net/download/standards/17/CXS_193e.pdf
11. AOAC Official Method 995.10 Patulin in apple juice. Liquid Chromatographic Method // Official methods of analysis of AOAC International, 18th edition. –2005.
12. ISO 8128-1:1993 Apple juice, apple juice concentrates and drinks containing apple juice — Determination of patulin content — Part 1: Method using high-performance liquid chromatography.

Поступила 13.02.09