

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet



Zavod za ispitivanje hrane i prehrane

Opasnosti vezane uz hranu



Propisi za vježbe

Priredio:
Bojan Šarkanj

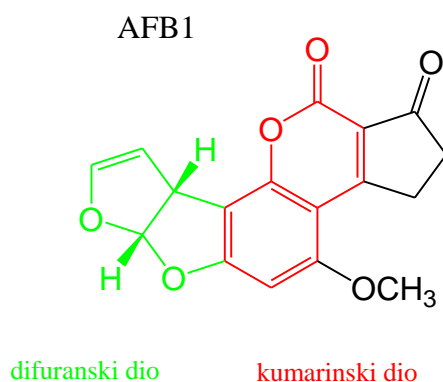
2009

V1: Određivanje aflatoksina u kikirikiju HPLC-om

Uvod:

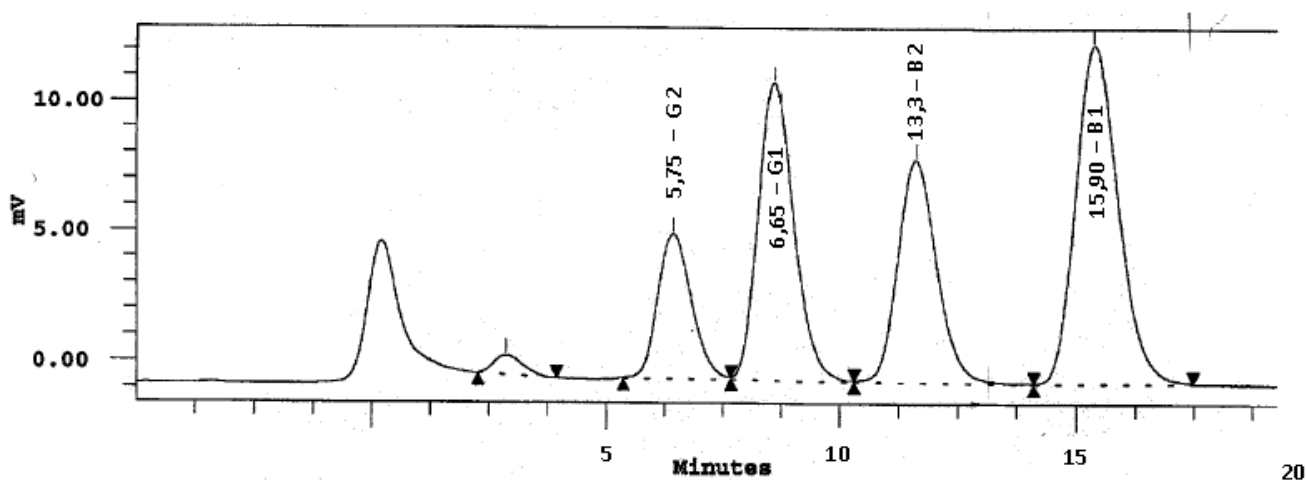
Otkrivanje aflatoksina je počelo u ljeto 1960. godine zbog pojave nove bolesti pura na farmama u okolini Londona. Budući da takva bolest nije bila poznata, nazvana je „X bolešću pura“. Uginulo je oko 100000 komada peradi, uz nekrozu jetre kao uzrok smrti. Ubrzo nakon toga bolesti se pojavila i u Cheshiru, a jedina poveznica između obje erupcije bolesti bilo je brašno od brazilskog kikirikija u krmivu. Slična bolest peradi zabilježena je i u Brazilu i Africi. Ustanovljeno je da je većina toksičnih uzoraka bila jako kontaminirana plijesnima koje su izolirane i identificirane kao *Aspergillus flavus*.

Prema nazivu plijesni je i toksin imenovan aflatoksinom (i.e. toksin plijesni *Aspergillus flavus*). Aflatoksinini su definirani kao derivati difuranokumarina (slika), u prirodi dolaze kao sekundarni metaboliti plijesni i to najčešće *Aspergillus* vrste (*A. flavus*, *A. parasiticus* i *A. nomius*). Aflatoksin B₁ je najjači prirodni karcinogen i kad se općenito koristi termin aflatoksin u jednini, podrazumijeva se aflatoksin B₁.



Za izolaciju aflatoksina (AFT) iz kikirikija koriste se Imunoafinitetne kolone koje imaju nosač s antitijelima na koje se vežu aflatoksinini. Nečistoće prolaze kroz kolonu i analiza pročišćenog ekstrakta se provodi na HPLC-u. Svo posuđe koje se koristi mora biti dobro oprano deterdžentom i isprano s deioniziranom vodom, radi uklanjanja mogućih interferirajućih tvari.

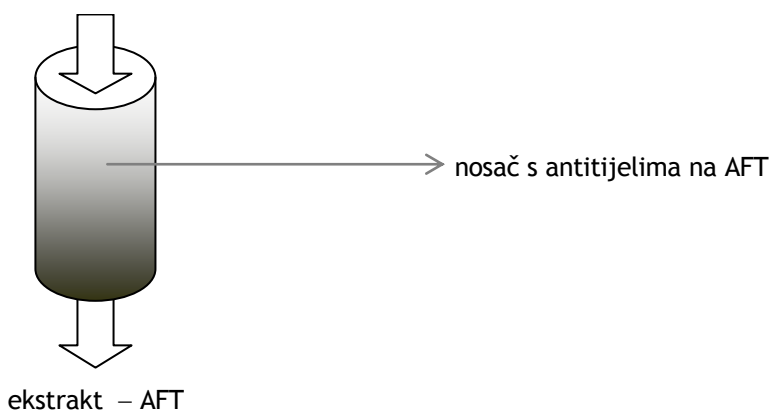
Primjer kromatograma aflatoksina



Prečišćavanje imunoafinitetnom kromatografijom:

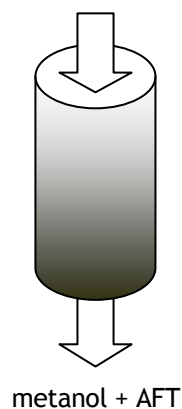
Korak 1

ekstrakt + AFT



Korak 2

metanol



Prolaskom ekstrakta kroz kolonu se AFT veže za antitijela. Nakon ispiranja nečistoća iz ekstrakta vodom, kroz kolonu se propušta metanol, pri čemu dolazi do denaturacije bjelančevinskih molekula antitijela i oslobađanja vezanog AFT-a.

Kemikalije:

Mješavina aflatoksina B₁, B₂, G₁, G₂ (u acetonitrilu)

Metanol, HPLC čistoće

Acetonitril, HPLC čistoće

Natrij klorid, p.a.

Heksan, HPLC čistoće

Trifluoroctena kiselina, p.a.

Standardi:

Razrjeđivanjem standarda AFT-a prirediti pet otopina za kalibracijsku krivulju raspona 1-400 ppb.

Pribor i oprema:

AflaTest™ imunoafinitetne kolone (Vicam), nabrani filter papir, stakleni štapići, filteri od mikrovlakana (1,5 μm, 11 cm), staklene kivete, staklene čaše od 200, 100 i 50 mL, erlenmeyer tikvice sa čepom od 50 mL, tehnička vaga, lijevak za filtriranje, vakuum manifold & vakuum pumpa, automatske pipete, accu-jet pipetor i staklene pipete od 10 mL, dispnzete za acetonitril i metanol, štoperica, blender, vortex mješalica, EvapSystem, HPLC

HPLC uvjeti:

Kolona: reverzno-fazna C18, 4,6 x 150 mm (5 µm punjenje)

Mobilna faza: acetonitril : voda (30:70)

Protok: 0,6 mL/min

Detektor: Fluorescentni (ex = 360; em = 440)

Vrijeme analize: 20 min

Retencijska vremena: $G_2 = 5,75$ min; $G_1 = 6,65$ min; $B_2 = 13,30$ min; $B_1 = 15,90$ min

Volumen injekcije: 100 µL

Volumen lupe: 20 µL

Postupak:**Ekstrakcija uzorka**

- 1) Samljeti 27 g uzorka 1 min, tako da 95% prolazi kroz sito od 20 mesha (ne usitnjavati do finog praha)
- 2) Odvagati 25 g uzorka i 5 g NaCl i prenijeti u blender. Uz 125 mL otopine metanol : voda = 60 : 40 isprati čaše i dodati u blender, miješati 1 min velikom brzinom. Profiltrirati ekstrakt u čistu čašu do 200 mL kroz nabrani filter papir
- 3) Odvojiti 20 mL u čistu čašu od 100 mL i razrijediti s 20 mL deionizirane vode
- 4) Dobro promiješati sa staklenim štapićem i profiltrirati kroz filter od mikrovlakana u čistu čašu do 100 mL
- 5) Uzeti po 2 puta 10 mL za paralele i propustiti kroz imunoafinitetnu kolonu

Pročišćavanje na imunoafinitetnim kolonama

- 6) Postaviti kadnicu za otpad u manifold, imunoafinitetne kolone pripremiti odsijecanjem 3 mm s kraja poklopca kolone, vratiti poklopac na koji se sada pričvrsti staklena kolona (tzv. rezervoar otapala). Imunoafinitetnu kolonu i rezervoar otapala pričvrstiti na vakuum manifold
- 7) Pustiti da se s kolone ispere tekući sloj
- 8) Propustiti 10 mL ekstrakta uzorka da prolazi kroz kolonu približnom brzinom 1 kap/sec, pustimo da prođe zrak kroz kolone
- 9) Propustimo dva puta po 10 mL deionizirane vode da prolazi kroz kolonu približnom brzinom 2 kapi/sec, pustiti da prođe zrak kroz kolone
- 10) Izvaditi kadnicu za otpad i postaviti označene epruvete za eluciju
- 11) Eluirati s 1 mL metanola (HPLC-čistoće) brzinom od 1 kap/sec, pustiti da zrak prođe kroz kolone
- 12) Otpariti na termobloku uz vakuum na 65°C

Rekonstitucija, predkolonska derivatizacija i HPLC-analiza

- 13) Otparenom ostatku dodati 200 µL heksana i 50 µL trifluoroctene kiseline, vorteksirati 30 sec
- 14) Ostaviti na mirovanju točno 5 min
- 15) Dodati 1950 µL otopine acetonitril : voda = 25 : 75, i vorteksirati 30 sec
- 16) Isprati lupu sa 100 µL uzorka, injektirati 100 µL uzorka u HPLC

Sve analize napraviti u duplikatu, izraziti rezultat u ppb (na dvije decimale) te izračunati srednju vrijednost ± standardna devijacija.

Interpretacija rezultata:

Komentirati rezultate u odnosu na maksimalnu dozvoljenu razinu aflatoksina u kikirikiju od 2,0 µg/kg prema 'Pravilniku o toksinima, metalima, metaloidima te drugim štetnim tvarima koje se mogu nalaziti u hrani' (Narodne novine 16/05, članak 16, tablica 1).

Literatura:

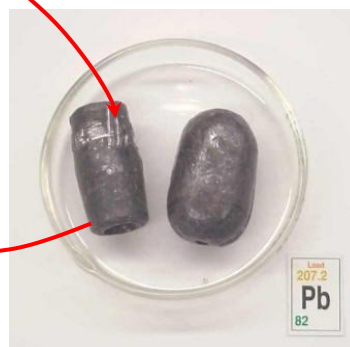
Vicam (1999): AflaTest® Instruction manual.

Yentür G., Er B., Özkan M.G., Öktem A.B. (2006): Determination of aflatoxins in peanut butter and sesame samples using high-performance liquid chromatography method. *Eur Food Res Technol* **224**, 167-170.

V2: Određivanje olova u mesu

Uvod:

Olovo se nalazi prirodno raspodijeljeno u okolišu (u zemljinoj kori - 13 ppm), ali prirodni izvori malo doprinose ukupnom udjelu olova u hrani, dok je većim dijelom to doprinos industrijske emisije (baterije, antidetinatori u gorivu, neki pesticidi...). U kontaminiranim područjima se iz tla nakuplja u biljkama (biljna hrana daje najveći doprinos dnevnom unosu) i životinjama koje se hrane s kontaminiranim biljkama (najviše u iznutricama, i školjkašima). Vegetacija uz ceste je sadržavala značajne količine olova, ali od kada je zabranjena upotreba olova u gorivima, značajno su se smanjile količine olova u biljkama. Olovo se može otopiti iz keramičkih ili lončanih posuda u dodiru s kiselim namirnicama ili iz improviziranih kotlova za destilaciju rakije. U starijim zgradama se mogu još naći olovne cijevi koje se postupno zamjenjuju polimernim ili čeličnim. Olovo može u hranu dospjeti i iz sačme u tkivu ustrijeljene divljači, a jedno vrijeme je bila aktualna kontaminacija vina, pri čemu su grla boca omatana olovnim folijama (tokom stajanja olovo se nataloži na grlo boce i ispire prilikom točenja vina).



Kemikalije:

HNO₃ (69%, p.a.)
H₂O₂ (30%, suprapur)
Demineralizirana voda
NH₄H₂PO₄
Mg(NO₃)₂

Standardi:

Standard olova (1 g/L)

Pribor:

Nož, vaga, staklene čaše, kivete, uređaj za mikrovalno razaranje uzorka, atomski apsorpcijski spektrofotometar, multipraktik

Postupak:

PRIPREMA UZORKA:

- 1) Uzorak pripremiti neposredno prije analize homogenizacijom na multipraktiku (uzorak treba biti sobne temperature)
- 2) Odvagati 0,5 g uzorka u dvije paralele

MIKROVALNO RAZARANJE UZORKA:

- 3) Digestija uzorka sa 3 ml HNO₃, 1 ml H₂O₂, i 4 mL demineralizirane vode
- 4) Nakon mikrovalnog razaranja razrijediti do 50 mL sa demineraliziranom vodom

ANALIZA NA ATOMSKOM APSORPCIJSKOM SPEKTROFOTOMETRU:

Interpretacija rezultata:

Komentirati rezultate u odnosu na maksimalnu dozvoljenu razinu olova u mesu i proizvodima od mesa prema 'Pravilniku o prehrambenim aditivima' (NN 81/08, članak 45, lista 8.), obzirom na ispitivani uzorak mesa

Literatura:

Nordberg G.F., Fowler B.A., Nordberg M., Friberg L. (2007): *Handbook on the toxicology of metals*, Academic Press.

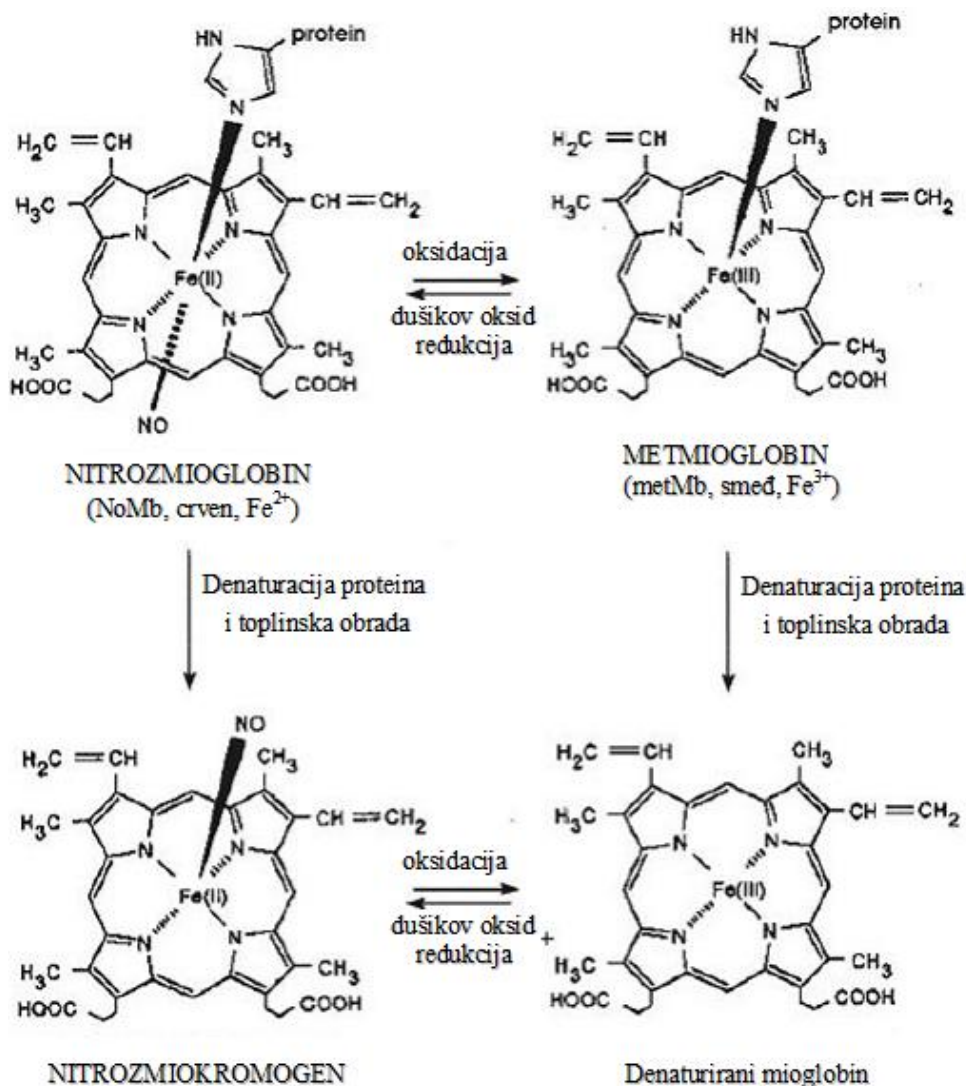
Klapec T. (2008): *Osnove toksikologije s toksikologijom hrane*, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek.

V3: Određivanje nitrata / nitrita u mesu

Uvod:

Dodatak nitrata i nitrita u salamuru rezultira nastankom specifične svijetlocrvene boje salamurenog mesa. Naime, vezanjem dušikovog monoksida (NO) za željezo u hemu porfirinskog prstena mioglobina nastaje nitrozomioglobin. Nastali nitrozomioglobin kuhanjem, ali i tijekom dužeg skladištenja, prelazi u termostabilni nitrozomiokromogen koji je odgovoran za poželjnu svijetlocrvenu boju proizvoda. Dušikov monoksid koji stupa u reakciju nastaje direktnom redukcijom nitrita, dok su nitrati rezerva koja redukcijom prelazi u nitrite. No, ne sudjeluju svi dodani nitriti u tvorbi nitrozilmioglobina. Naime, značajan dio nitrita ostaje nepromijenjen, dok jedan dio ulazi u druge reakcije. Otprilike 17% dodanih nitrita s aminima tvori nitrozoamine kojima se pripisuju kancerogena svojstva.

Određivanje nitrata i nitrita pomoću uređaja FIA star 5000 analyser vrši se spektrofotometrijski na 540 nm. Rezultirajuća boja nastaje reakcijom prisutnih nitrita sa sulfanilamidom u kiseloj sredini čime nastaju diazo spojevi, koji zatim sa NED reagensom daju ljubičasto-plavu boju.



Kemikalije:

Zasićena otopina boraksa (50 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ u 1 L vruće destilirane vode)

Taložni reagens I (10,6 g $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3\text{H}_2\text{O}$ u 100 mL destilirane vode)

Taložni reagens II (220 g $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \times 2\text{H}_2\text{O}$ u 30 mL ledene octene, dopuniti do 1 L destiliranom vodom)

Amonijev klorid pH 9,6 - 9,7 (pomiješati 20 mL konc. HCl i 500 mL H_2O , dodati 10 g EDTA i 55 mL NH_4OH , dopuniti do 1L) - za pripremu pufera razrijediti 1:1 destiliranom vodom

Sulfanilamid reagens (otopiti 5 g sulfanilamida u 250 mL dest. vode, dodati 25 mL konc. HCl, dopuniti sa dest vodom do 500 mL)

NED reagens (otopiti 0,5 g N-(1-naftil)-etilendiamindiklorida u 500 mL dest. vode)

Standardi:

1000 ppm - 6,068 g NaNO_3 otopiti u 1 L vode (stock otopina)

20 ppm - 2 mL stock otopine razrijediti sa 98 mL dest. vode

Pribor:

Nož, vaga, staklene čaše, stakleni lijevci, pipete, stakleni štapići, Ultra turrax, odmjerne tikvice od 200 mL, vodena kupelj, štoperica, naborani filter papir, FIA star 5000 analyser, multipraktik, erlenmeyerove tikvice od 100, 200 mL

Postupak:**PRIPREMA UZORKA:**

- 1) Uzorak pripremiti neposredno prije analize homogenizacijom na multipraktiku (uzorak treba biti sobne temperature)
- 2) Odvagati 10 g (na 3 decimale) uzorka u dvije paralele u tikvicama od 100 mL

EKSTRAKCIJA:

- 3) U odvagane uzorke dodati po 10 mL zasićene otopine boraksa i oko 80 mL vruće destilirane vode (zagrijane na oko 80°C)
- 4) Homogenizirati Ultra-Turraxom 1 min
- 5) Pažljivo isprati zaostatke uzorka s uređaja i kvantitativno prebaciti u tikvicu od 200 mL
- 6) Zagrijavati uzorak u kipućoj vodenoj kupelji točno 15 min, povremeno promućkati

TALOŽENJE PROTEINA:

- 7) Polako ohladiti uzorak na sobnu temperaturu (oko 20 - 30 min, ne hladiti pod mlazom vode)
- 8) Dodati 2 mL taložnog reagensa I, dobro promućkati; dodati 2 mL taložnog reagensa II, dobro promućkati
- 9) Dopuniti tikvice destiliranom vodom do oznake, promućkati i inkubirati na sobnoj temperaturi oko 30 min
- 10) Nakon inkubacije profiltrirati preko nabranog filter papira, prvih nekoliko mililitara baciti, a zatim skupiti 50 - 100 mL filtrata

Analiza na FIA star 5000

Proračun:

$$\text{Nitriti: } C = 6,068 \times 200 \times \frac{\text{konc nitrita [mg/L]}}{\text{masa uzorka [g]}} \text{ [mg / kg]}$$

$$\text{Nitrati i nitriti: } C = 6,068 \times 200 \times \frac{\text{konc nitrita i nitrata [mg/L]}}{\text{masa uzorka [g]}} \text{ [mg / kg]}$$

Interpretacija rezultata:

Komentirati rezultate u odnosu na maksimalnu dozvoljenu razinu nitrata / nitrita u mesu i proizvodima od mesa prema 'Pravilniku o prehrambenim aditivima' (NN 81/08, članak 45, lista 8.), obzirom na ispitivani uzorak mesa.

Literatura:

Hill M. (1996): *Nitrates and nitrites in food and water*, Woodhead Publishing.