**Oznaczanie aflatoksyny B1 oraz M1 w wybranych produktach spożywczych metodą chromatografii cienkowarstwowej**

**WPROWADZENIE**

Aflatoksyna B to mykotoksyna, będąca metabolitem wtórnym grzybów pleśniowych, głównie *Aspergillus flavus*. Aflatoksyna M powstaje w wątrobie na drodze hydroksylacji aflatoksyny B i jest wydalana do mleka, moczu i kału osobników narażonych na spożycie żywności zanieczyszczonej aflatoksyną B.

**ZASADA METODY**

Chromatografia cienkowarstwowa (ang. thin layer-chromatography, TLC) jest metodą analityczną umożliwiającą rozdział i identyfikację związków chemicznych, wykorzystującą różnice w szybkości przemieszczania się poszczególnych składników badanej mieszaniny
w podłożu wykonanym z adsorbenta stanowiącego fazę nieruchomą. Do oznaczania aflatoksyn stosuje się płytkę z żelem krzemionkowym (Ø 60 µm), a fazą ruchomą jest mieszanina chloroformu z metanolem w proporcji 47:3.

**ODCZYNNIKI**

metanol

chloroform

heksan

10% NaCl

wzorzec aflatoksyny M1 i B1 2,5 µg/ml

PRODUKTY SPOŻYWCZE

Orzeszki ziemne, kawa ziarnista, płatki kukurydziane, owsiane, migdały, mleko,

750 μl supernatantu otrzymanego w pierwszym etapie ekstrakcji z 50 g orzechów brazylijskich (opakowanie po okresie przydatności do spożycia).

**WYKONANIE**

1. Pierwszym etapem jest **ekstrakcja materiału badanego** wg. poniższych kroków:

(**UWAGA!** w przypadku próbki mleka pominąć etap ważenia (pkt . 1) i etap filtrowania (pkt. 4), a w przypadku próbki orzechów brazylijskich postępowanie rozpocząć od pkt. 5)

1. Odważyć 200 mg produktu do probówki typu Eppendorf 1,5 ml

2. Dodać 1 mL mieszaniny metanol/woda (70/30; v/v) i dokładnie zworteksować (60 s)

3. Odwirować (10 min, 15000 rpm)

4. Supernatant przefiltrować (0,45 µm, PTFE) do probówki szklanej

5. Pobrać 750 µL supernatantu do probówki typu Eppendorf 2,0 ml

6. Dodać równą objętość 10% NaCl (ok. 750 µL), zworteksować

7. Następnie dodać 500 µL heksanu, zworteksować ok. 60 s (odtłuszczanie)

8. Po rozdziale faz (ok. 60 s) ostrożnie usunąć fazę heksanową (górną) pipetą automatyczną

9. Dodać 500 µL chloroformu i ekstrahować próbkę przez inwersję (ok. 10 razy) – aflatoksyna przechodzi do warstwy chloroformowej

10. Odstawić probówkę do rozdziału faz (górna faza powinna być mętna, dolna – klarowna),
a następnie usunąć warstwę wodną (górną)

11. Powtórzyć ekstrakcję (jak w pkt. 9) przez ponowne dodanie 500 µL chloroformu,
a następnie usunąć górną fazę. **Uwaga!** Rozdział faz na tym etapie może trwać nawet 10-15 min i jest on trudno dostrzegalny - zachować szczególną precyzję, przy odciąganiu (użyć pipety automatycznej w zakresie 10-100 µl)

12. Gotowy ekstrakt przenieść do krystalniczki i odparować do sucha na pokrywie łaźni wodnej rozgrzanej do 100 °C

1. **Przygotowanie komory chromatograficznej** - do zlewki odmierzyć 47 ml chloroformu i 3 ml metanolu, wymieszać i przelać ostrożnie do rynienki szklanej znajdującej się w komorze chromatograficznej, komorę przykryć szklaną pokrywą i odczekać ok. 15 min w celu nasycenia komory parami rozpuszczalnika.
2. **Naniesienie próbek na płytkę.** W tym celusuchą pozostałość rozpuścić w 300 µl chloroformu. Tak otrzymany roztwór oraz roztwory wzorcowe nanieść na płytkę chromatograficzną za pomocą szklanej kapilarki w objętości około 30 µl (zaznaczyć ołówkiem linię startową w odległości ok. 1 cm od dolnego brzegu płytki).
3. **Rozwijanie chromatogramu** - płytkę chromatograficzną umieścić w komorze
i pozostawić na około 30 min (proces przerwać w momencie kiedy czoło eluentów znajdzie się w odległości ok. 0,5 cm od górnego brzegu płytki).
4. **Wywołanie chromatogramu** – płytkę wyciągnąć z komory, zaznaczyć linię czoła rozpuszczalnika, a następnie płytkę wysuszyć suszarką. Wynik odczytać z wykorzystaniem lamy kwarcowej w świetle UV.
5. **Interpretacja wyniku:** próby zawierające aflatoksynę B1 i M1 wykazują fluoryzującą plamę na wysokości plamy wzorca. Uwaga! Może pojawić się fluorescencyjna plama na linii startu i/lub na czole rozpuszczalnika, pochodząca od ciał balastowych - nie jest ona brana pod uwagę. W celu identyfikacji próbki badanej należy policzyć współczynnik podziału Rf i porównać z Rf wzorca.

**Sposób obliczania współczynnika podziału Rf na przykładzie trzech substancji wzorcowych 1, 2, 3 oraz mieszaniny M.**

Rf jest definiowany jako stosunek drogi, jaką na płytce przebył dany związek (droga a), do drogi, jaką w tym czasie przebyło czoło rozpuszczalnika (droga b). Wartość współczynnika Rf mieści się w granicach 0-1.





Zadania:

1. W bazie PubChem wyszukaj ile wynosi LD50 dla aflatoksyny B1w dawce doustnej dla szczura.
2. W rozporządzeniu Komisji (WE) 2023/915 w sprawie najwyższych dopuszczalnych poziomów niektórych zanieczyszczeń w żywności znajdź Najwyższe Dopuszczalne Poziomy (NSD) aflatoksyny B1 i M1 w żywności (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32023R0915>). Jakie inne zanieczyszczenia żywności są ujęte w rozporządzeniu (załącznik 1).
3. Sprawdź dla jakich produktów Główny Inspektorat Sanitarny (GIS) wydał w ciągu ostatnich dwóch lat ostrzeżenia dotyczące przekroczenia NSD mykotoksyn (https://www.gov.pl/web/gis/ostrzezenia). Jakie zanieczyszczenia żywności występowały najczęściej?
4. Zapoznaj się opinią Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. European Food Safety Authority, EFSA) dotyczącą ryzyka zanieczyszczeniem żywności aflatoksynami z 2020 r (doi: 10.2903/j.efsa.2020.6040). Czy istnieje ryzyko narażenia populacji UE na zanieczyszczenia aflatoksynami? Odpowiedź uzasadnij.

**Wykrywanie alergenów (orzechów ziemnych) w żywności metodą paskową.**

**OZNACZANIE ALERGENÓW (ORZESZKI ZIEMNE)**

Postępować zgodnie z załączoną instrukcją do zestawów Food Check. Oznaczenia wykonywać na dowolnych produktach spożywczych np. czekoladzie, mleku czy pieczywie. Wyniki zinterpretować.