

1. Mykotoksyny i aflatoksyny

Dzięki łatwości dostosowywania się do warunków środowiskowych grzyby mogą występować w plantacjach zbóż i roślin. Sprawia to, iż wydzielane przez te organizmy związki chemiczne przenikają do produktów spożywczych. Wśród związków tych ważną grupę stanowią mykotoksyny, wykazujące działanie mutagenne i chorobotwórcze na organizmy żywe, w tym także ludzi. Aflatoksyny (AF) to mykotoksyny produkowane

przez bakterie z grupy *Aspergillus*, obejmują związki AFB1, AFB2, AFG1 i AFG2 oraz ich metabolity AFM1, AFM2 i AFL. Związki te są hepatotoksyczne i mutagenne, gdyż posiadają zdolność wbudowywania się w strukturę DNA, zaburzając naturalne procesy jego replikacji i transkrypcji. W Polsce AF są wpisane na listę substancji mutagennych od 1996 r., a ich dopuszczalny poziom w żywności nie może przekraczać 2 µg/kg.

2. Metody oznaczania aflatoksyn

Wśród metod analitycznych umożliwiających oznaczanie aflatoksyn najczęściej stosowana jest chromatografia cieczowa (LC) sprzężona ze spektrometrią mas (MS lub MS/MS). Wynika to z niekwestionowanych zalet takiego połączenia, do których należą możliwość jednoczesnego oznaczania wielu analitów, wysoka selektywność w trybie monitorowania wybranych fragmentacji (MRM) oraz łatwość automatyzacji. Niestety, analiza techniką LC-MS wymaga czasochłonnego przygotowania próbki, obejmującego jej oczyszczenie i zatężenie analitu, tak aby zminimalizować interferujący wpływ matrycy. Kolejnym problemem jest duże zużycie toksycznych rozpuszczalników organicznych. Na tym tle

chromatografia nadkrytyczna (SFC, ang. Supercritical Fluid Chromatography) jest przyjazną środowisku alternatywą dla LC, wyróżniającą się szybkością analiz i wysoką rozdzielczością dzięki zastosowaniu dużych szybkości przepływu. Przewiduje się, iż sprzężenie SFC z ekstrakcją płynem nadkrytycznym (SFE, ang. Supercritical Fluid Extraction) zapewni precyzję i dokładność analiz próbek o zróżnicowanych matrycach,

a ograniczenie dostępu światła i powietrza zminimalizuje degradację związków wrażliwych.

3. Cel planowanych badań

Prowadzone badania mają na celu zweryfikowanie możliwości zastosowania technik SFC-MS/MS i SFE-SFCMS/MS w analizie aflatoksyn i ich metabolitów oraz wskazanie istniejących ograniczeń w tym zakresie. Zakładanym efektem prac będą zautomatyzowane procedury analityczne oznaczania AF w ludzkich płynach ustrojowych (SFC-MS/MS) oraz produktach spożywczych w formie stałej (SFE-SFC-MS/MS).

4. Plan badań

a) Dobór warunków eksperymentalnych umożliwiających rozdzielenie pików pochodzących od badanych związków za pomocą SFC (kolumna chromatograficzna, szybkość przepływu fazy ruchomej, dodatek współrozpuszczalnika, gradient fazy ruchomej, temperatura kolumny).

b) Dobór parametrów pracy spektrometru mas pracującego w trybie MRM (napięcie kapilary źródła jonów typu elektro-spray i tryb jego pracy, przepływ gazu nebulizującego, temperatura źródła, energia kolizji), ukierunkowany na uzyskanie trzech niezależnych przejść dla każdego analitu, oraz zapewnienie najwyższej czułości, stosunku sygnału do szumu i selektywności. Określenie głównych szlaków fragmentacyjnych.

c) Walidacja metody oznaczania AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1, AFM2 i AFL. Zbadanie konieczności stosowania wzorca wewnętrznego w celu minimalizacji wpływu matrycy.

d) Opracowanie procedury przygotowania próbek biologicznych do analizy. Badania prowadzone z użyciem certyfikowanych materiałów odniesienia ludzkiego moczu i surowicy w postaci liofilizatu (SFC-MS/MS).

e) Badanie wpływu ciśnienia, temperatury i szybkości przepływu CO₂ w stanie nadkrytycznym oraz czasu statycznej i dynamicznej ekstrakcji, dodatku współrozpuszczalnika i objętości próbki na wydajność ekstrakcji aflatoksyn z wzorcowych matryc żywności (SFE-SFC-MS/MS).

f) Oznaczanie aflatoksyn w produktach spożywczych (SFE-SFC-MS/MS).