

## **WYSTĘPOWANIE DEOKSYNIWALENOLU W WYBRANYCH PRODUKTACH ZBOŻOWYCH**

**Krystyna Szymczyk, Witt Wilczyński, Renata Jędrzejczak, Marcin Bryła**

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego

ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

krystyna.szymczyk@ibprs.pl

### **Streszczenie**

W latach 2007–2011 oznaczono zawartość deoksyniwalenolu (DON) w 633 próbkach ziarna zbóż i produktów zbożowych techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem UV (HPLC-UV) po oczyszczeniu ekstraktów badanych próbek na kolumnach powinowactwa immunologicznego (IAC). Obecność DON stwierdzono w 50% badanych próbek, w zdecydowanej większości na poziomie znacznie niższym niż dopuszczalne wartości określone w Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 1881/2006. Przekroczenia dopuszczalnych zawartości odnotowano w 3 próbkach słodu, 2 próbkach mąki pszennej i 1 próbce pszenicy, tj. łącznie w 1% badanych próbek. Najczęściej DON występował w ziarnie jęczmienia, pszenicy i mące pszennej (odpowiednio 66%, 65%, 63%), najrzadziej w życie i mące żytniej.

**Słowa kluczowe:** deoksyniwalenol (DON), trichoteceny, produkty zbożowe, HPLC

### **DEOKSYNIWALENOL OCCURENCE IN SELECTED CEREALS**

#### **Summary**

Within the 2007–2011 period concentration of deoxynivalenol (DON) was determined in 633 samples of corn and cereals using a HPLC-UV instrument and immunoaffinity columns as extract clean-up tool. DON was found in approximately one half of all analysed samples, in majority of cases at levels significantly lower than acceptable limits specified in the 1881/2006 European Commission Regulation. The latter limits were exceeded only in 3 samples of malt, 2 samples of wheat flour, and 1 sample of wheat i.e. in approximately 1% of all analysed samples. DON was most often found in barley, wheat, and wheat flour (66%, 65%, 63% of all analysed samples of the given kind, respectively), least frequently in rye and rye flour.

**Key words:** deoxynivalenol (DON), trichothecenes, cereals, HPLC

## WPROWADZENIE

Deoksyniwalenol (DON) należy do trichotecenów grupy B i jest wytwarzany głównie przez grzyby rodzaju *Fusarium*. Występuje najczęściej w zbożach (pszenica, kukurydza, jęczmień, owies, ryż) oraz w przetworach zbożowych (mąka, makaron, pieczywo, płatki). Powstaje na różnych etapach uprawy zbóż, w czasie dojrzewania na polu, zbioru i przechowywania, szczególnie przy dużej wilgotności i umiarkowanej temperaturze występujących w okresie wegetacyjnym.

Trichoteceny wykazują wielokierunkowe, niekorzystne działanie na organizm ludzki, mogą powodować m.in. zaburzenia procesów odpornościowych i choroby nowotworowe [Czerwiecki 2005]. DON jest jednym z mniej toksycznych związków z grupy trichotecenów, ale jest najczęściej wykrywaną toksyną z tej grupy. Jego obecność może być wskaźnikiem występowania innych, bardziej toksycznych trichotecenów [Jajić i in. 2008]. DON jest uważany za bardzo stabilny związek zarówno podczas przechowywania/mielenia ziarna, jak i podczas procesów przetwarzania i gotowania produktów spożywczych, tzn. nie ulega rozpadowi w wysokiej temperaturze [Simsek i in. 2012].

Najwyższe dopuszczalne poziomy (NDP) mikotoksyn (w tym DON) w produktach spożywczych i surowcach stosowanych do ich wytwarzania określono w Rozporządzeniu Komisji (WE) Nr 1126/2007. Dopuszczalna zawartość DON wynosi m.in.: 1750 µg/kg dla nieprzetworzonych zbóż: pszenicy durum, owsa i kukurydzy, 1250 µg/kg dla nieprzetworzonych zbóż innych niż pszenica durum i owies, 750 µg/kg dla przetworzonych produktów zbożowych do bezpośredniego spożycia, 500 µg/kg dla chleba, pieczywa cukierniczego, przekąsek i płatków zbożowych.

Publikowane w ostatnich latach dane literaturowe potwierdzają powszechne występowanie DON w zbożach i przetworach zbożowych praktycznie na całym świecie. DON wykryto prawie we wszystkich badanych próbkach pszenicy, jęczmienia i żyta analizowanych w latach 1999–2005 w Republice Czeskiej, jednak jego stężenie przekraczało dopuszczalny poziom jedynie w przypadku dwóch spośród przebadanych 263 próbek [Haislová i in. 2007]. W raporcie dotyczącym występowania DON w Serbii przedstawiono wyniki analizy 139 próbek zebranych w latach 2004 i 2005. Pozytywne wyniki uzyskano w 47,4% badanych próbek ziarna słonecznika, 44,7% próbek kukurydzy, 37,5% próbek pszenicy, 25% próbek jęczmienia. Przekroczenia dopuszczonych poziomów wystąpiły tylko w 3 próbkach (nieco powyżej 2%) [Jajić i in. 2008].

Badania produktów kukurydzianych w Hiszpanii i Indonezji wykazały obecność DON odpowiednio w około 27% i 60% badanych próbek, nie stwierdzono jednak przekroczeń

dopuszczalnych poziomów [Castillo i in. 2008, Setyabudi i in. 2012]. Analizując 65 próbek pszenicy durum w Tunezji w 2007 roku, uzyskano wyniki pozytywne w przypadku 83% próbek, a zawartość DON wahała się od 7200 µg/kg do 54000 µg/kg [Bensassi i in. 2010]. Tak wysokie zawartości DON autorzy tłumaczą niekorzystnymi warunkami klimatycznymi. Przedłużające się okresy deszczowe i niewystarczające wysuszenie ziarna w czasie zbioru (lipiec, sierpień) sprzyjały rozwojowi grzybów i wytwarzaniu mikotoksyny. Podobnie wysokie wyniki uzyskano, badając zawartość DON w 40 próbkach kukurydzy zebranej w październiku 2010 roku na terenie Chorwacji [Pleadin i in. 2012]. Obecność DON stwierdzono w 85% badanych próbek, maksymalna zawartość wynosiła 17920 µg/kg. Wysoka zawartość DON w badanych próbkach była spowodowana głównie dużą wilgotnością i niską temperaturą w czasie sezonu wegetacyjnego kukurydzy danego roku w Chorwacji.

Wyniki badań wykonanych w Polsce w ostatnich latach dotyczą głównie oznaczeń mikotoksyn (w tym DON) w zbożach [Korbas i in. 2009, Solarska i in. 2010a, b] i paszach [Cegielska-Radziejewska i in. 2009] i nie dotyczą przetworów zbożowych.

Celem pracy była ocena zawartości DON w wybranych produktach zbożowych.

### **MATERIAŁ I METODY BADAŃ**

Materiał do badań stanowiły próbki ziarna zbóż i przetworów zbożowych (mąka, pieczywo, makarony, kasze, płatki) dostępnych w handlu detalicznym lub dostarczonych przez krajowych producentów. W latach 2007–2011 oznaczenia zawartości DON wykonywano wg własnej, akredytowanej procedury badawczej PB-ZAŻ 56 (2005), w której wykorzystano technikę HPLC z detektorem UV. Oczyszczanie ekstraktów przeprowadzono na kolumnach powinowactwa immunologicznego (IAC). Po rozdrobnieniu próbki (50 g), DON ekstrahowano w homogenizatorze 200 ml wody z dodatkiem 10,0 g polietylenoglikolu (PEG) w czasie 2 minut. Homogenat sączono przez sączek bibułowy, a następnie przez sączek drobnowłóknisty. 1 ml klarownego ekstraktu oczyszczano na kolumnach IAC (VICAM) zgodnie z zaleceniami producenta. Deoksyniwalenol eluowano 1 ml metanolu z prędkością 1 kropli/s do naczynka reakcyjnego. Eluat odparowywano do sucha w bloku grzejnym, w temp. 60°C, w strumieniu azotu. Suchą pozostałość w naczynku, bezpośrednio przed analizą HPLC, rozpuszczano w 300 µl mieszaniny acetonitryl:metanol:woda (10:5:85).

Do analizy chromatograficznej wykorzystano zestaw do wysokosprawnej chromatografii cieczowej LDC Analytical z detektorem UV-Spektromonitor 3100. Próbkę podawano na kolumnę chromatograficzną typu RP – C18, Nova Pack: 4 µm, 3,9 mm x 330 mm, z przedkolumną (Waters), za pomocą pętli dozującej o pojemności 100 µl. Jako ciecz

elucyjną zastosowano mieszaninę rozpuszczalników: acetonitryl:metanol:woda (10:5:85), przepływ cieczy 0,6 ml/min. Kolumna pracowała w temperaturze pokojowej, widmo UV rejestrowano przy długości fali 218 nm. Kalibrację detektora UV wykonano, stosując certyfikowany wzorzec DON (Sigma), w zakresie stężeń od 20 µg/kg do 2000 µg/kg.

Granica oznaczalności wykorzystanej metody wynosiła LOQ = 20 µg/kg, powtarzalność wyrażona współczynnikiem zmienności była < 10%, dokładność wyrażona odzyskiem – powyżej 93%. Procedura badawcza została sprawdzona z wynikiem pozytywnym w międzylaboratoryjnych badaniach biegłości w programie FAPAS.

### WYNIKI I DYSKUSJA

W latach 2007–2011 oznaczono zawartość DON w 631 próbkach ziarna zbóż (żyto, pszenica, jęczmień, kukurydza), słoju i przetworów zbożowych takich jak: mąka (żytnia, pszenna, gotowe mieszanki piekarskie), makarony, kasze, płatki zbożowe, pieczywo (chleby, bułki, pieczywo cukiernicze). Wyniki uzyskane w poszczególnych latach przedstawiono w tabeli 1.

**Tabela 1.** Zawartość DON w badanych próbkach w poszczególnych latach  
*DON concentration in test samples by year of analysis*

rok	Liczba próbek (% próbek)				Zawartość DON w próbkach pozytywnych w µg/kg			
	n	< LOQ	≥ LOQ	> NDP	min.	max.	mediana	średnia
2007	129	68	61 (47)	2 (1,6)	20	1280	49	148
2008	100	48	52 (52)	0	21	670	47	90
2009	143	89	54 (38)	1 (0,7)	21	850	65	134
2010	116	52	64 (55)	2 (1,7)	20	2280	78	188
2011	143	58	85 (59)	1 (0,7)	20	1420	113	172
razem	631	315	316 (50)	6 (1)				

W poszczególnych latach obecność DON stwierdzono w 38% do prawie 60% analizowanych próbek (średnio 50%). W zdecydowanej większości badanych próbek (prawie 99%) zawartość DON nie przekraczała jednak dopuszczalnych wartości. Tylko w 6 próbkach, co stanowi ok.1% badanych próbek, ustalone limity zostały przekroczone. Ostatnio obserwuje się niewielki systematyczny wzrost liczby próbek zawierających DON, oznaczanej średniej zawartości DON oraz wartości mediany.

W poszczególnych grupach produktów zawartość DON była zróżnicowana, uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 2. DON najczęściej występował w próbkach ziarna jęczmienia, pszenicy oraz mąki pszennej (w ponad 60% zbadanych próbek), znacznie rzadziej

w próbkach słodu (42%), kukurydzy (27%), ziarna żyta (12%) i mąki żytniej (22%). Przekroczenia dopuszczalnych zawartości DON stwierdzono w 3 próbkach słodu (1280 µg/kg, 1180 µg/kg, 890 µg/kg), 2 próbkach mąki pszennej (1420 µg/kg, 850 µg/kg) oraz w 1 próbce ziarna pszenicy (2280 µg/kg).

W pozostałych grupach produktów spożywczych DON występował w płatkach zbożowych (58%), makaronach (54%), pieczywie (50%), rzadziej w kaszach – 42% badanych próbek, na poziomie poniżej dopuszczalnych wartości.

**Tabela 2.** Zawartość DON oznaczona w poszczególnych grupach badanych próbek  
*DON concentration in selected groups of cereal products*

	n	Liczba próbek (% próbek)		Zawartość DON w próbkach pozytywnych w µg/kg			
		<LOQ	≥ LOQ	min.	max.	mediana	średnia
mąka żytnia	55	43	12 (22)	21	190	55	71
mąka pszenna	164	61	103 (63)	20	1420	78	78
mieszanki piekarskie	67	34	33 (49)	20	720	64	134
<b>mąki razem</b>	<b>286</b>	<b>138</b>	<b>148 (52)</b>	<b>20</b>	<b>1420</b>	<b>69</b>	<b>143</b>
pszenica	52	18	34 (65)	20	2280	108	275
żyto	17	15	2 (12)	165	310	240	238
jęczmień	32	11	21 (66)	20	570	87	121
kukurydza	37	27	10 (27)	20	86	67	60
<b>ziarno razem</b>	<b>138</b>	<b>71</b>	<b>67 (49)</b>	<b>20</b>	<b>2280</b>	<b>46</b>	<b>96</b>
słód	48	28	20 (42)	20	1280	87	290
pieczywo	60	30	30 (50)	20	370	46	96
makarony	35	16	19 (54)	21	220	44	69
płatki	33	14	19 (58)	20	350	57	106
kasze	31	18	13 (42)	20	480	45	74

Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi. W raporcie Komisji Europejskiej z 2003 r. [Report SCOOP Task 3.2.10] przedstawiono wyniki badań zawartości DON w zbożach i produktach spożywczych w 12 krajach Europy. 57% spośród przebadanych około 12 tys. próbek zawierało deoksyniwalenol, w większości na stosunkowo niskich poziomach; zawartość DON na poziomie >500µg/kg odnotowano tylko w 6% badanych próbek. Najczęściej DON występował w próbkach kukurydzy (89%), pszenicy i mąki pszennej (61%).

Podobne wyniki uzyskano, analizując zawartość mikotoksyn, w tym DON, w ziarnie zbóż i przetworach zbożowych (mąka, kasze, makaron, płatki owsiane) znajdujących się w placówkach handlowych województwa podkarpackiego [Stanisławczyk i in. 2010]. Najwyższą średnią zawartość DON stwierdzono w ziarnie zbóż i mące, natomiast

w przypadku jednej próbki mąki (około 1% badanych próbek) maksymalne stężenie badanej mikotoksyny (784  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) przekraczało dopuszczony poziom 750  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Stosunkowo duża częstotliwość występowania DON w zbadanych próbkach jęczmienia (66%), wysoka średnia znaleziona w pozytywnych próbkach słodu (290  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), a także fakt, że przekroczenie dopuszczalnej zawartości DON stwierdzono w 3 próbkach słodu wskazują na możliwość obecności DON w piwie produkowanym na bazie słodu. Potwierdzają to wyniki badań wykonanych na Uniwersytecie Rolniczym w Lublinie, gdzie we wszystkich zbadanych 91 próbkach piwa (57 wyprodukowanych w Polsce i 34 importowanych) stwierdzono obecność DON w zakresie stężeń 6–70,2  $\mu\text{g}/\text{L}$ . Z danych literaturowych wynika, że zawartość DON w piwie jest generalnie niska i nie przekracza 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  [Kuzdraliński i in. 2013]. Z kolei w żadnej z 50 próbek piwa badanych w Turcji nie wykryto obecności DON. Jednak granica oznaczalności stosowanej metody analitycznej wynosiła 125 $\mu\text{g}/\text{L}$  [Omurtag i Beyoglu 2007].

#### **WNIOSKI**

1. Deoksyniwalenol występował najczęściej w próbkach ziarna jęczmienia (66% zbadanych próbek), pszenicy (65%) i mąki pszennej (63%), zaś najrzadziej w próbkach żyta (12%), mąki żytniej (22%) i kukurydzy (27%).
2. W 99% spośród 631 próbek zbadanych w latach 2007–2011 DON występował poniżej dopuszczalnych poziomów określonych przez Rozporządzenie Komisji (WE). Przekroczenie dopuszczalnych poziomów zawartości DON stwierdzono tylko w 3 próbkach słodu, 2 próbkach mąki pszennej oraz w 1 próbce pszenicy.
3. Najwyższe średnie zawartości DON obserwowano w próbkach słodu, ziarna pszenicy i żyta.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bensassi F., Zaied C., Abid S., Hajlaoui M.R., Bacha H. (2010). Occurrence of deoxynivalenol in durum wheat in Tunisia. *Food Control.*, 21, 281-285
2. Castillo M.A., Montes R., Navarro A., Segarra R. (2008). Occurrence of deoxynivalenol and nivalenol in Spanish corn-based food products. *J. Food Comp. Anal.*, 21, 423-427
3. Cegielska-Radziejewska R., Szablewski T., Karolczak K., Kaczmarek A., Kijowski J. (2009). Ocena zawartości mikotoksyn w zbożach paszowych i paszach metodą immunoenzymatyczną. *Nauka. Przyr. Technol.*, 3, 4, 114-122
4. Czerwiecki L. (2005). Mikotoksyny i pleśnie – zagrożenie jakości zdrowotnej ziarna zbóż i ich przetworów oraz pieczywa. *Prz. Zboż.-Młyn.*, 8, 11-3
5. Haišlová J., Lancová K., Sehnalová M., Krplová A., Zachariášová M., Moravcová H., Nedělník J., Marková J., Ehrenbergerová J. (2007). Occurrence of trichothecene mycotoxins in cereals harvested in Czech Republic. *Czech J. Food Sci.*, 25, 6, 339-350
6. Jajić I., Jurić V., Abramović B. (2008). First survey of deoxynivalenol occurrence in crops in Serbia. *Food Control.*, 19, 545-550
7. Korbas M., Horoszkiewicz-Janka J., Krawczyk R., Pieczul K. (2009). Zawartość mikotoksyn w ziarnie jęczmienia jarego uprawianego w systemie ekologicznym. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin*, 49 (3), 1561-1564
8. Kuzdraliński A., Solarska E., Muszyńska M. (2013). Deoxynivalenol and zearalenone occurrence in beers analysed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. *Food Control*, 29, 22-24
9. Omurtag G.Z., Beyoglu D. (2007). Occurrence of deoxynivalenol (vomitoxin) in beer in Turkey detected by HPLC. *Food Control.*, 18, 163-166
10. Pleadin J., Sokolović M., Persi N., Zadravec M., Jaki V., Vulić A. (2012). Contamination of maize with deoxynivalenol and zearalenone in Croatia. *Food Control*, 28, 94-98
11. REPORT EC SCOOP TASK 3.2.10. (2003). Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States. [<http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/task3210.pdf>]
12. PB-ZAŽ 56 wyd. 2, 2005, Procedura badawcza, Wybrane surowce i produkty spożywcze pochodzenia roślinnego. Oznaczanie deoksyniwalenolu (DON) metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)
13. Rozporządzenie Komisji (WE) NR 1126/2007 z dnia 28 września 2007 r. zmieniające Rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy

- niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych w odniesieniu do toksyn *Fusarium* w kukurydzy i produktach z kukurydzy. (Dz. Urz. WE L 255/14)
14. Setyabudi F.M.C.S., Nuryono N., Wedhastri S., Mayer H.K., Razzazi-Fazeli E. (2012). Limited survey of deoxynivalenol occurrence in maize kernels and maize-products collected from Indonesian retail market. *Food Control.*, 24, 123-127
  15. Simsek S., Burgess K., Whitney K.L., Gu Y., Qian S.Y. (2012). Analysis of Deoxynivalenol and Deoxynivalenol-3-glucoside in wheat. *Food Control*, 26, 287-292
  16. Solarska E., Kuzdraliński A., Wójcik W., Targoński Z. (2010a). Mikotoksyny w pszenżycie ozimym uprawianym w ekologicznym systemie produkcji. *J. Res. Appl. Agric. Eng.*, Vol 55 (4), 102-107
  17. Solarska E., Kuzdraliński A., Potocka E. (2010b). Mikotoksyny w życie ozimym uprawianym w ekologicznym systemie produkcji. *J. Res. Appl. Agric. Eng.*, Vol 55 (4), 108-112
  18. Stanisławczyk R., Rudy M., Świątek B. (2010). Występowanie mikotoksyn w zbożach i przetworach zbożowych znajdujących się w placówkach handlowych województwa podkarpackiego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 6 (73), 58-66