

## Determinarea ochratoxinei A din cafea boabe prin metoda HPLC

DELIA BULEA<sup>1</sup>, ADRIAN ȘPAC<sup>2</sup>, VASILE DORNEANU<sup>3</sup>

(1) *Disciplina Chimia mediului și alimentului, Facultatea de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa” Iași*

(2) *Disciplina Chimie - fizică, Facultatea de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa” Iași*

(3) *Disciplina Chimie analitică, Facultatea de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa” Iași*

### HPLC determination of ochratoxin A in roasted coffee beans

---

#### Abstract:

*Aim.* In the present paper we proposed to validate a high performance liquid chromatographic (HPLC) analysis method for ochratoxin A determination and to apply the method for roasted coffee beans.

*Material and method.* The samples of roasted coffee beans were purchased in the Iasi markets. The sample was homogenized with CH<sub>3</sub>OH:NaHCO<sub>3</sub> (80:20) mixture. Sample extract was cleanup by SPE extraction. Ochatoxin A was eluted with chloroform. Organic phase was dried and the residue was redissolved in 0.6 ml mobile phase; 20 μl was injected in the HPLC sistem. The HPLC analysis was performed to an HP 1090 chromatograph equipped with both diode array detector and fluorescence detector. The stationary phase is a Stable Bond SB - C18 column (150 x 4.6 mm; 5 μm). The mobile phase (0.7 ml/min) was a mixture of CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>COOH (99 : 99 : 2). The volume of injected sample is 20 μl. The detection was performed in fluorescence (excitation at 228 nm and emmision at 423 nm).

*Results.* The HPLC method was validated. Ochratoxin A has been found in coffee beans as follows: in 12.5% from the samples, ochratoxin A concentration is under the limit value (5 μg/kg roasted coffee beans), in 2.5% from the samples ochratoxin A exceded the limit value, and in 85% from the sample ochratoxin A is below the limit of detection.

*Discussion.* This research contributes to the evaluation of the presence of ochratoxin A in Romanian food and draw attention upon the risk of consumption of food containing mycotoxins.

**Keywords:** HPLC, ochratoxin A, roasted coffee beans

---

#### Rezumat:

*Scop.* Validarea metodei de determinare a ochratoxinei A prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC) și aplicarea acesteia pe probe de cafea boabe prăjite.

*Material și metodă.* Probele de cafea, achiziționate din rețeaua comercială a orașului Iași, au fost supuse extracției cu un amestec CH<sub>3</sub>OH: NaHCO<sub>3</sub> (în raport de 80:20). Extractele au fost purificate prin extracție în fază solidă (C<sub>18</sub>) pentru reținerea ochratoxinei A. Micotoxina a fost eluată cu cloroform; faza organică a fost evaporată la sec și apoi, reziduu reluat cu 0,6 ml fază mobilă. Un volum de 20 μl a fost supus analizei HPLC. Analiza s-a realizat pe un cromatograf de lichide tip HP 1090 Series II, echipat cu o coloană

---

<sup>1</sup> Bulea Delia, Aleea Păcurari nr. 4, bl. G6, Sc A, et.3, ap 14, Loc. Iași, Jud. Iași, Tel: 0745516130, email: dbulea@yahoo.com

cromatografică tip Stable Bond SB - C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm), folosind ca fază mobilă un amestec de acetonitril : apă : acid acetic (în raport de 99 : 99 : 2). Detectia ochratoxinei A s-a realizat în fluorescență ( $\lambda_{\text{ex}}=228$  nm și  $\lambda_{\text{em}}=423$  nm).

**Rezultate.** Metoda HPLC a fost validată. Într-un număr de 5 probe (12,5% din numărul total de probe), ochratoxina A a fost prezentă sub limita maximă admisă de legislația în vigoare (5 µg/kg cafea boabe prăjită), într-o singură probă concentrația ochratoxinei A a fost peste limita maximă admisă A iar în 34 de probe (85% din numărul total probe) ochratoxina A nu a fost identificată prin metoda aplicată.

**Discuții.** Această lucrare contribuie la evaluarea prezenței ochratoxinei A în produsele alimentare (cafea boabe) comercializate în România și atrage atenția asupra riscului consumului de alimente contaminate cu micotoxine.

**Cuvinte cheie:** HPLC, ochratoxina A, cafea boabe prăjită

## Introducere

Ochratoxina A (Figura nr. 1) este un metabolit toxic produs de specii din genul *Aspergillus* în zonele tropicale și subtropicale și de specii din genul *Penicillium* în zonele temperate (1). Ochratoxina A a fost izolată pentru prima dată din culturi de *Aspergillus ochraceus* de Van der Merwe și colab. în anul 1965 (2) în timp ce testau capacitatea toxigenă a unor tulpini de micromiceti izolate din diferite boabe de cereale și legume.

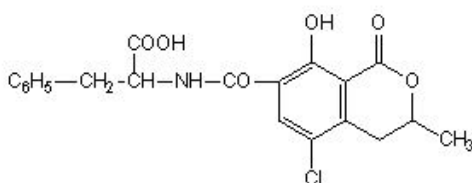


Figura nr. 1 Ochratoxina A – structura chimică

*Penicillium verrucosum* este izolat frecvent din probe de cereale în timp ce *A. ochraceus* contaminează boabele verzi de cafea, condimentele, boabele de cacao, soia și arahide (3).

Studii experimentale au demonstrat acțiunea imunotoxică, neurotoxică, nefrotoxică, teratogenă și cancerigenă a ochratoxinei A. Datorită acțiunii cancerigene, evidențiate pe animale de experiență, ochratoxina A a fost inclusă de Agenția Internațională de Cercetare a Cancerului (1993) în

grupul substanțelor posibil carcinogene – grupul 2B.

## Material și metodă

- balanță;
- baie de ultrasunete;
- micro-seringă Hamilton;
- HP 1090 Series II lichid cromatograf echipat cu detector cu multidiode UV-VIS și detector de fluorescență;
- coloană cromatografică tip Stable Bond SB - C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm);
- standard ochratoxină A (Sigma-Aldrich);
- coloane SPE C<sub>18</sub> (Lida, manufacturing corp.);
- hârtie de filtru cantitativă (Schleicher & Schuell MicroScience);
- acetonitril (puritate HPLC, gradient grade, Riedel de Haën);
- cloroform (puritate HPLC, Sigma Aldrich);
- metanol Chromasolv<sup>R</sup> (puritate HPLC, Riedel de Haën)
- acid acetic glacial 99,99% (Sigma Aldrich);
- sulfat de sodiu (A.C.S. reagent, Sigma Aldrich);
- apă (puritate HPLC, Merck);
- fază mobilă: amestec acetonitril : apă : acetic acid (în raportul 99: 99: 2).

### Procedeu de lucru

#### **Extracția ochratoxinei A și purificarea extractului**

Probele de analizat (cafea boabe prăjită-vrac) au fost supuse extracției în vederea separării ochratoxinei A.

Astfel, o cantitate de 20 grame probă marunțită se agită 20 minute cu un volum de 20 ml amestec  $\text{CH}_3\text{OH} : \text{NaHCO}_3$  3% (80 : 20) după care se filtrează prin hârtie de filtru cantitativă (4, 5). Filtratul se trece prin coloana SPE preconționată prin spălare succesivă cu 4 ml metanol, respectiv cu 4 ml apă purificată. Ochratoxina A este eluată de pe coloană cu un volum de 3 ml cloroform, cu o viteză de 2 ml/min. Faza organică se evaporă la sec; reziduu obținut se reia cu un volum de 0,6 ml fază mobilă și se supune analizei HPLC prin injectarea unui volum de 20  $\mu\text{l}$  în condițiile menționate (6).

În paralel, s-au lucrat probe îmbogățite cu cantități cunoscute de ochratoxină A pentru stabilirea randamentului de extracție.

Analiza HPLC s-a realizat astfel: un volum de 20  $\mu\text{l}$  probă (obținută prin dizolvarea reziduuului obținut în urma prelucrării probei într-un volum de 0,6 ml fază mobilă) a fost supus analizei pe un cromatograf de lichide tip HP 1090 Series II, echipat cu o coloană cromatografică tip Stable Bond SB - C18 (150 x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ), folosind ca fază mobilă un amestec de acetonitril : apă : acid acetic (în raport de 99 : 99 : 2). Detectia ochratoxinei A s-a realizat în fluorescență ( $\lambda_{\text{ex}}$ =228 nm și  $\lambda_{\text{em}}$ =423 nm) (7).

### Rezultate și discuții

#### **Specificitatea**

Pentru determinarea specificității metodei au fost analizate probe conținând ochratoxina A și o probă conținând faza mobilă utilizată ca solvent al probelor injectate. La timpul de retenție al ochratoxinei A nu s-a obținut nici un semnal în cromatograma corespunzătoare fazei mobile, rezultă deci faptul că nu există interferenți (8, 9, 10).

#### **Identificarea picurilor**

Identificarea picului corespunzător ochratoxinei A se realizează în funcție de timpul de retenție. În condițiile menționate, timpul de retenție pentru ochratoxina A este de 9,5 min. În figura nr. 2 este prezentată cromatograma pentru soluția standard de ochratoxină A.

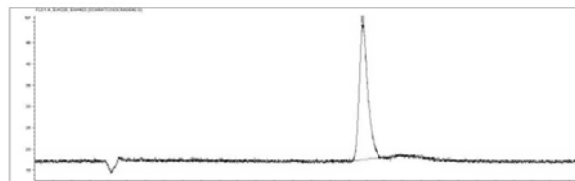


Figura nr. 2 Cromatograma pentru soluția standard de ochratoxină A

#### **Validarea metodei de determinare a ochratoxinei A prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC)**

Pentru determinarea cantitativă a ochratoxinei A, metoda de analiză prin HPLC prezentată a fost validată, urmărindu-se următorii parametri: stabilitatea în timp a soluției, linearitatea, limita de detecție și limita de cuantificare, precizia sistemului, precizia metodei, exactitatea metodei.

#### **Stabilitatea soluției**

Pentru a determina stabilitatea soluției de ochratoxină A a fost analizată o probă cu o concentrație de 19,5 ng/ml ochratoxină A după ce a fost menținută la temperatura camerei 2, 3 și 10 zile. Rezultatele experimentale sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1

Stabilitatea soluției

Nr.	Ziua	Arie pic	Date statistice
1	0	33,8	Arie medie =32,45 SD = 1,3379 RSD (%) = 4,1230
2	2	30,9	
3	3	33,3	
4	10	31,8	

În concluzie, probele în fază mobilă conținând ochratoxină A pot fi stocate la temperatura camerei cel puțin 10 zile, fără a apărea degradarea acestui compus, având în vedere faptul că aria picului corespunzător ochratoxinei A este aproximativ constantă (în acest caz, deviația standard relativă având valoarea de 4,1230%).

### Linearitate, limita de detecție și limita de cuantificare

Pentru studiul linearității au fost analizate șase serii de soluții, pentru fiecare cromatogramă a fost calculată aria picului corespunzător

ochratoxinei A, iar valoarea ariei medii a fost reprezentată grafic funcție de concentrație. Prin analiză statistică au fost calculate ecuația dreptei de regresie, coeficientul de corelație (r) și eroarea standard de regresie. Folosind panta dreptei de regresie și eroarea standard a acestei drepte s-au calculat valorile limitei de detecție și a limitei de cuantificare.

În tabelul nr. 2 sunt prezentate ariile picurilor corespunzătoare ochratoxinei, iar în figura nr. 3 este reprezentată dreapta de calibrare a ochratoxinei A.

Tabelul 2

Ariile picurilor ochratoxinei A obținute în studiul linearității metodei

Ochratoxin A (ng/ml)	Arie pic						Arie medie
	I	II	III	IV	V	VI	
9,765625	20,000	17,1	15,9	13,8	18,1	17,8	17,12
19,53125	33,800	26,7	30,9	25,4	26,2	33,3	29,38
39,06250	56,100	53,4	45,1	47,9	42,6	48,7	48,97
78,12500	95,000	86,7	93,3	89,3	85,8	80,6	88,45
156,2500	177,30	172,8	165,8	165,7	164,5	158,3	167,40
312,5000	337,80	328,5	331,9	302,5	306,8	321,5	321,50
625,0000	628,40	614,50	619,70	602,10	559,90	611,50	606,02
937,5000	898,74	904,2	898,4	905,4	909,7	914,8	905,21
1250,000	1232,1	1194,8	1166,5	1192,6	1041,4	1202,2	1171,60

Deoarece cantitatea de ochratoxină A din probe este mică, ecuația curbei de calibrare a fost calculată pentru concentrații cuprinse între 9,765625 și 39,0625 ng/ml.

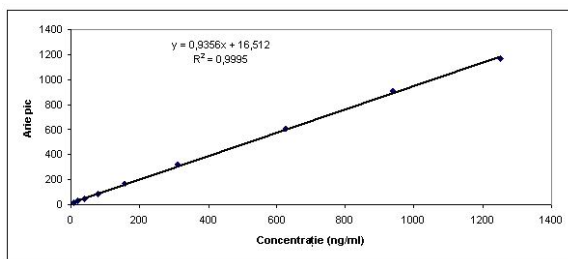


Figura nr. 3 Dreapta de calibrare a ochratoxinei A

După calculul statistic s-a obținut ecuația curbei de calibrare:

$$\text{Arie pic} = 1,0750780952381 \times \text{concentrația} + 7,325$$

Valoarea coeficientului de corelație (r) este 0,9983 iar eroarea standard a curbei de regresie (SE) este 1,3229431474665. Folosind aceste valori s-au calculat limita de detecție (LD) și limita de cuantificare (LQ) cu formulele (1) și (2):

$$LD = \frac{3 \cdot SE}{\text{panta}} = \frac{3 \cdot 1,3229431474665}{1,0750780952381} = 3,69 \text{ ng / ml} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10 \cdot SE}{\text{panta}} = \frac{10 \cdot 1,3229431474665}{1,0750780952381} = 12,31 \text{ ng / ml} \quad (2)$$

**Precizia și exactitatea**

Prima etapă în determinarea preciziei o reprezintă studiul preciziei sistemului. Astfel, o soluție de concentrație de 20 ng/ml a fost analizată de cinci ori. Ariile picurilor corespunzătoare ochratoxinei A pentru cele cinci determinări sunt prezentate în tabelul nr. 3.

Tabelul 3

Precizia sistemului la determinarea ochratoxinei A

Nr.	Arie pic	Date statistice	
1	26,7	Arie medie =	29,16
2	30,4	SD =	2,5344
3	30,7	RSD (%) =	8,6912
4	26,2		
5	31,8		

Pentru aceste valori, deviația relativă standard (RSD %) a fost calculată ca fiind 8,6912%. Pentru concentrații în probă de ordinul ng, valoarea este bună, deci sistemul este precis.

Precizia și exactitatea metodei au fost determinate prin calcularea valorii medii a 3 determinări la trei concentrații diferite în jurul valorii de interes – 39.0625 ng/ml, 19.53125 ng/ml și respectiv, 9.765625 ng/ml (concentrația urmărită  $\pm 50\%$ ).

Întregul experiment a fost realizat în zile diferite, de alt analist, cu scopul de a obține informații despre robustețea metodei.

Utilizând ecuația curbei de calibrare și ariile picurilor au fost calculate concentrațiile pentru fiecare probă. A fost determinată regăsirea ca procent din valoarea concentrației teoretice, regăsirea medie și precizia metodei exprimată prin deviația standard relativă din regăsirea calculată. Pentru aceste două grupuri de date (I și II), valorile obținute sunt prezentate în tabelul nr. 4.

Tabelul 4

Precizia și exactitatea metodei

Nr.	Concentrația teoretică (ng/ml)	Arie pic		Concentrația calculată (ng/ml)		Regăsire (%)	
		I	II	I	II	I	II
1	9,765625	20,0	17,1	11,79	9,09	120,7	93,1
2		18,1	13,8	10,02	6,02	102,6	61,6
3		17,8	15,9	9,74	7,98	99,7	81,7
4	19,53125	33,8	26,7	24,63	18,02	126,1	92,3
5		26,2	25,4	17,56	16,81	89,9	86,1
6		33,3	30,9	24,16	21,93	123,7	112,3
7	39,0625	56,1	53,4	45,37	42,86	116,1	109,7
8		42,6	47,9	32,81	37,74	84,0	96,6
9		48,7	45,1	38,49	35,14	98,5	90,0
						Media =	99,2 %
						Minim =	61,6 %
						Maxim =	126,1 %
						Deviația standard (SD) =	16,7206
						Deviația standard relativă (RSD %) =	16,9629 %

După prelucrarea statistică a ambelor seturi de determinări a rezultat o valoare de 16,9629 % a deviației standard relative ceea ce demonstrează precizia metodei; regăsirea medie fiind de 99,2%

(pe intervalul 61,6 – 126,1%), ceea ce demonstrează exactitatea metodei.

Valoarea medie (18 valori și o precizie de 95%, valoarea t din testul Student fiind de 2,11),

intervalul de încredere pentru regăsire este de 83,29 – 115,00%.

### Aplicație la determinarea ochratoxinei A din probe de cafea boabe prăjite

Metoda de analiză validată a ochratoxinei A prin HPLC a fost aplicată la determinarea ochratoxinei A din probe de cafea boabe.

Probele au fost procurate din rețeaua comercială a orașului Iași și anume din unități ce comercializează produse vrac. S-au analizat 40 de probe de cafea boabe prăjite, de diferite sorturi

(Columbia – 10 probe, Jacobs- 10 probe, Indonezia- 8 probe, Brazilia- 4 probe, Robusta- 2 probe, India- 1 probă, cafea decofeinizată- 5 probe).

În urma analizei prin HPLC, cromatogramele obținute au fost prelucrate, stabilindu-se aria picurilor corespunzătoare ochratoxinei A și, folosind ecuația dreptei de regresie, s-a calculat conținutul în ochratoxină A pentru probele de cafea (valori prezentate în tabelul nr. 5).

Tabelul 5

Conținutul în ochratoxină A			
Nr. crt.	Nr. probă	Denumire probă	Ochratoxină A (μg/kg probă cafea boabe)
1.	3	Cafea Indonezia	0,77
2.	4	Cafea Indonezia	0,87
3.	5	Cafea Indonezia	1,06
4.	6	Cafea Indonezia	0,55
5.	10	Cafea Columbia	9,47
6.	40	Cafea India	3,35

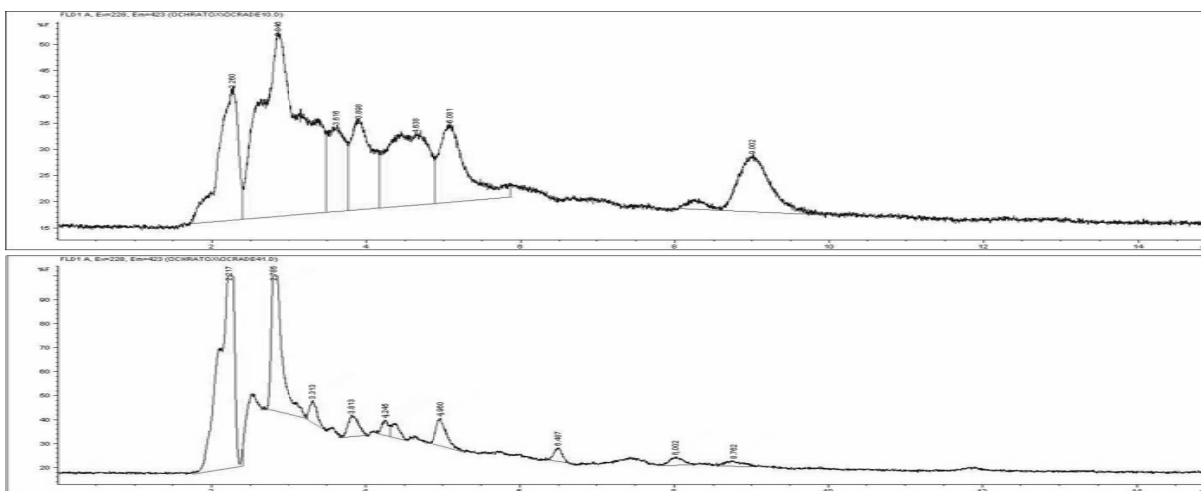


Figura nr. 4 Două dintre cromatogramele obținute la analiza probelor de cafea boabe prin metoda HPLC.

Din analiza datelor obținute în urma determinării ochratoxinei A din cele 40 probe de cafea boabe prăjite, s-a constatat că într-o singură probă (2,5% din numărul total de probe)

ochratoxina A este prezentă într-o cantitate mai mare decât limita maximă admisă de legislația în vigoare (5 μg/kg cafea boabe prăjite) (11); în 5 probe (2,5% din numărul total de probe)

ochratoxina A se găsește în concentrații sub limita maximă admisă, iar într-un număr de 34 probe (85% din numărul total de probe) ochratoxina A nu a fost identificată prin metoda aplicată.

#### Concluzii

Metoda corespunde parametrilor de validare și a fost aplicată cu bune rezultate la determinarea ochratoxinei A din probele de cafea boabe prăjite.

Această lucrare contribuie la evaluarea prezenței ochratoxinei A în produsele alimentare (cafea boabe vrac) comercializate în România.

Având în vedere consumul crescut de cafea în rândul populației adulte este necesară adoptarea unor măsuri în vederea protejării sănătății consumatorului, o măsură importantă fiind evitarea comercializării produselor cu un nivel ridicat de contaminare cu ochratoxină A.

#### Bibliografie

1. Eskola M, Study of trichotecene and ochratoxin A. In: *Finnish cereales: Occurrence and Analytical Techniques* (Dissertation), EELA Publications Helsinki, 2002.
2. Van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L - Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxins A, B, and C metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh; *Journal of Chemical Society* **1965**, 7083–7088.
3. Kuiper-Goodman T, Scott PM, Watanabe H- Risk assessment of the mycotoxin zearalenone; *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **1987**, 7:253-306.
4. Vargas EA, Alves dos Santos E- Determination of Ochratoxin A in Green coffee by Immunoaffinity column Clean up and LC, *AOAC D-2 Collaborative Study*, c:MD/projetos/pre-collaborative study/method pre-collaborative; 2002.
5. Suárez-Quiroz ML, Gonzales-Rios O, Barel M- Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxinogenesis in green coffee; *Food Microbiology* **2004**; 21:629-634.
6. Saez JM, Medina A, Gimeno-Adelantado J et al. - Comparison of different sample treatments for the analysis of ochratoxin A in must, wine and beer by liquid chromatography, *Journal of Chromatography* **2004**; 1029:125-133.
7. \*\*\* *Natural toxins*. In: AOAC Official Methods of Analysis, 2000: 46 – 50.
8. Roman L, Bojiță M, Săndulescu R; *Validarea metodelor de analiză și control*, Ed. Medicală, București, 1998.
9. Oprean R., Rozet E, Dewé W et al. *Ghid de validare a procedurilor analitice cantitative*, Ed. Medicală Universitară „Iuliu Hațieganu”, Cluj Napoca, 2007.
10. \*\*\* *Manualul calității în medicina de laborator*, Societatea Română pentru asigurarea și controlul extern al calității în medicina de laborator, Ed. Cartea Universitară, București, 2004.
11. \*\*\* *Maximum levels for certain contaminants in foodstuffs*. In: Commission regulation (EC) No 1881/2006, 19 December 2006.