Strukturna karakterizacija ohratoksina A HPLC-ESI-MS/MS metodom

Marušić, Andrija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:792236

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Andrija Marušić

Strukturna karakterizacija ohratoksina A HPLC-ESI-MS/MS metodom

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Mirande Sertić. Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom Štetni učinci pojedinačnih i kombiniranih mikotoksina Aspergillus vrsta (HRZZ-IP-09-2014-5982).

Najprije se iskreno zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Mirandi Sertić na ukazanom povjerenju, strpljenju i iznimnom stručnom vodstvu te brojnim savjetima tijekom izrade diplomskog rada! Posebno joj se zahvaljujem na iskazanom entuzijazmu i inspiraciji koju prenosi prema analitici lijekova, struci i radu u znanosti!

Zahvaljujem također svim svojim prijateljima s kojima sam proživio studentske dane i koji su iste učinili ljepšima!

Najveće hvala mojoj obitelji i roditeljima koji su uvijek bili uz mene, pružali mi bezrezervnu ljubav i podršku te me dodatno ohrabrivali i motivirali!

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Mikotoksini 1
1.2. Ohratoksini 2
1.3. Ohratoksin A 3
1.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) 7
1.5. Masena spektrometrija 9
2. OBRAZLOŽENJE TEME 12
3. MATERIJALI I METODE 13
3.1. Materijali 13
3.1.1. Kemikalije, standardne supstancije, uzorci i plinovi 13
3.1.2. Radni instrumenti 13
3.1.3. Pribor 14
3.1.4. Programski paketi 14
3.2. Metode 15
3.2.1. Priprema standardnih otopina 15
3.2.2. Priprema ispitivanog uzorka 15
3.2.3. Uvjeti kromatografske i spektrometrijske analize 15
4. REZULTATI I RASPRAVA 17
4.1. Strukturna karakterizacija masenom spektrometrijom 17
4.1.1. Ispitivanje utjecaja brzine protoka plina za sušenje na rezultate analize 17
4.1.2. Analiza masenih spektara ohratoksina A 20
5. ZAKLJUČCI 28
6. LITERATURA 29
7. SAŽETAK/SUMMARY 31
7.1. Sažetak 31
7.2. Summary 32
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. Mikotoksini

Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti plijesni. Oni mogu kontaminirati hranu te ovisno o koncentraciji izazvati trovanja kako životinja tako i ljudi (Pepeljnjak i sur., 2008). Sekundarni metaboliti se definiraju kao male organske molekule koje proizvode organizmi, ali nisu nužne za njihov rast razvoj i reprodukciju. Međutim, u specifičnim okolnostima igraju važnu ulogu u signalizaciji, razvoju i uspostavljanu interakcija s drugim organizmima (Olmedo Monfil i Casas-Flores, 2014).

Mikotoksine možemo često pronaći kao kontaminante hrane. Osim toga, uz značajne štete u gospodarstvu, uzročnici su i brojnih bolesti. Te se bolesti nazivaju mikotoksikoze. Iz tog razloga mikotoksini predstavljaju ozbiljan problem za ljude i životinje u mnogo država u svijetu. FAO (engl. *Food and Agriculture Organization*) procjenjuje da je 25 % hrane koja je proizvedena u svijetu kontaminirano mikotoksinima (www.hah.hr).

Mikotoksini su većinom stabilni kemijski spojevi različite strukture i biološkog učinka, u pravilu su bez boje i okusa te su otporni na povišenu temperaturu (www.hah.hr). Najčešće plijesni koje proizvode mikotoksine i kontaminiraju žitarice su vrste iz rodova *Fusarium*, *Penicillium* i *Aspergillus*. Oni tvore čitav niz različitih mikotoksina. (Pepeljnjak i sur., 2008). Kao kontaminanti hrane, najznačajniji toksini su: aflatoksini (AFB_1, AFM_1), ohratoksini (OTA), zearalenon (ZEA, F-2), fumonizini (FB_1, FB_2), trihoteceni (T-2 toksin) i patulin (PAT) (www.hah.hr).

Plijesni mogu rasti i proizvoditi mikotoksine na žitaricama u polju prije žetve, nakon žetve, tijekom transporta, obrade i skladištenja (www.hah.hr).

Pojavnost mikotoksina ovisi o vrsti plijesni, uvjetima klime te fizikalno-kemijskim čimbenicima, poput temperature (-5 do 60 ^{o}C), sadržaja vode u namirnici (više od 13 %), koncentraciji plinova u atmosferi i sastavu same namirnice.

Veće doze mikotoksina uzrokuju akutna trovanja, dok dugotrajni unos malih koncentracija može rezultirati estrogenim, imunosupresivnim ili čak karcinogenim učincima. Odbijanje

hrane te njen smanjen metabolizam su, uz reproduktivne poremećaje te imunosupresiju, najčešći učinci kroničnog unosa mikotoksina kod životinja (Pepeljnjak i sur., 2008).

Mikotoksine možemo susresti u različitoj hrani. Tako se oni mogu nalaziti u žitaricama, brašnu, kruhu, mahunarkama, riži, mlijeku i mliječnim proizvodima, mesu i suhomesnatim prerađevinama, maslinama i maslinovom ulju, kavi, sušenom voću, vinu, pivu, sokovima, začinima i čajevima.

Najviše dopuštene količine mikotoksina (µg/kg jestivog dijela namirnice) u hrani i hrani za životinje u RH propisane su Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 146/12) te Pravilnikom o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje (NN 80/10, NN111/10, NN 124/12) (www.hah.hr).

Razumijevanje kemije mikotoksina je od iznimne važnosti za napredak u praćenju i reduciranju izloženosti tim spojevima. Plijesni koje ih proizvode su povezane s bolestima koje mogu izazvati velike ekonomske i zdravstvene gubitke te iziskuju značajne investicije u njihovo praćenje i kontrolu. S druge strane mnogo značajnih lijekova je otkriveno pomoću studija o spojevima koji su povezani s plijesnima. Njihovi prirodni produkti su jedni od najvažnijih terapeutika i vodećih spojeva za istraživanje i daljnji razvoj lijekova, što uključuje razvoj terapija raka, malarije, bakterijskih i gljivičnih infekcija, neuroloških i kardiovaskularnih bolesti te autoimunih poremećaja (Bills i Goer, 2016).

1.2. Ohratoksini

Ohratoksini pripadaju grupi mikotoksina koji su proizvedeni kao sekundarni metaboliti plijeni, prvenstveno rodova *Aspergillus* i *Penicillium*. Te plijesni rastu kod posebnih uvjeta temperature i vlažnosti. Ohratoksini uključuju ohratoksin A (OTA), ohratoksin B (OTB), ohratoksin C (OTC) i ohratoksin α (OTα), od kojih se OTA smatra najtoksičnijim (Meulenberg, 2012).

1.3. Ohratoksin A

Ohratoksin A (OTA) je mikotoksin kojeg često nalazimo kao kontaminanta u različitoj hrani, kako za ljude tako i za životinje. Njegov metabolizam ima velik utjecaj na njegovu toksičnost zbog svojeg potencijalnog karcinogenog učinka.

OTA je sekundarni metabolit gljivica. U hladnijim klimatskim područjima proizveden je od strane *Penicillium* vrsta, dok su u toplijim (sub)tropskim područjima njegov glavni proizvođač gljivice iz porodice *Aspergillus*. OTA se pojavljuje po cijelome svijetu u hrani za ljude i životinje te je opisana njegova pojava na pšenici, kikirikiju, kukuruzu, raži, ječmu, grahu, riži, začinima, brašnu, kruhu i drugim namirnicama koje sadrže žitarice (Yang i sur., 2015).

Prema IARC-u (engl. *International Agency for Research on Cancer*) , OTA je mikotoksin s mogućim karcinogenim učinkom u ljudi te je svrstan u skupinu 2B (IARC, 1993). Dovodi se u vezu s razvojem endemske nefropatije (EN) i tumora bubrežne nakapnice i mokraćovoda u ljudi. Ova bolest zahvaća prvenstveno ruralnu populaciju u dijelovima Bosne i Hercegovine, Bugarske, Rumunjske i Srbije, a u Hrvatskoj je riječ o 14 sela u Brodsko-posavskoj županiji (Pepeljnjak i sur., 2008).

Riječ je o potentnom nefrotoksinu koji primarno djeluje na bubrege i povezan je s teškim bubrežnim bolestima (Shi i Yu, 2017). Toksičan je za sve ispitane višestanične sisavce. Osim nefrotoksičnog djelovanja, OTA ima hepatotoksično, neurotoksično, imunosupresivno, teratogeno, genotoksično i karcinogeno djelovanje. Prema vrijednostima LD 50 nakon oralne primjene OTA, najosjetljiviji su psi (0.2 mg/kg tj. t.) i svinje (1 mg/kg tj. t.), dok su najotporniji štakori (20- 30 mg/kg tj. t.) i miševi (46-58 mg/kg tj. t.) (Pepeljnjak i sur., 2008).

Zbog svoje sličnosti s fenilalaninom, OTA inhibira biosintezu makromolekula (proteini, RNA, DNA) i ATP-a, povećava lipidnu peroksidaciju te negativno utječe na metabolizam glukoze i homeostazu kalcija. OTA specifično izaziva poremećaj u sustavu transporta organskih aniona, lokaliziran u četkastoj i bazolateralnoj membrani proksimalnih tubula što dovodi do njihove degradacije i posljedičnog nefrotoksičnog učinka toksina. OTA djeluje i genotoksično te karcinogeno uzrokujući oksidacijska oštećenja DNA i stvaranje DNA adukata

koji su dokazani u bubrežnom tkivu ljudi oboljelih od endemske nefropatije i tumora bubrežne nakapnice i mokraćovoda (Pepeljnjak i sur., 2008).

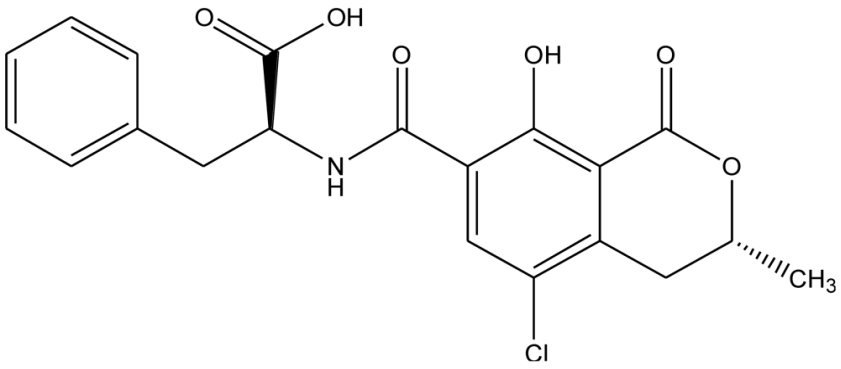
Krajem devedesetih godina prošlog stoljeća provedeno je određivanje učestalosti OTA u krvi opće populacije u 5 najvećih Hrvatskih gradova: Rijeci (0,18 ng/mL), Splitu (0,25 ng/mL), Zagrebu (0,26 ng/mL), Varaždinu (0,59 ng/mL) i Osijeku (0,68 ng/mL). Na temelju ovih rezultata procijenjen je dnevni unos OTA od 0,4 ng/kg tj. t., što je niže od podnošljivog dnevnog unosa koji je propisan od strane WHO-a (engl. *World Health Organization*) te iznosi 16 ng/kg tj. t. Međutim, OTA u ljudima ima dugo vrijeme poluživota (35 dana) što pridonosi činjenici da čak i unos malih koncentracija izaziva dugo vrijeme izloženosti, a time raste i mogući toksičan učinak samog mikotoksina (Pepeljnjak i sur., 2008).

Sprječavanje razvoja plijesni, a posljedično i stvaranja mikotoksina i kontaminaciju uskladištenih usjeva te posljedična intoksikacija životinja i ljudi može se spriječiti ili smanjiti na nekoliko načina: 1) pravovremenim branjem uroda i sušenjem na vlagu 13-14 % ili čuvanjem u anaerobnim uvjetima; 2) uklanjanjem oštećenih i kontaminiranih zrna; 3) u slučaju pregrijavanja kukuruzne mase, provoditi hlađenje provjetravanjem i izbjegavati eleviranje jer se time povećava širenje kontaminacije. Premda je prevencija kontaminacije najsigurnija i najjeftinija metoda, u sprječavanju intoksikacije životinja mogu se primijeniti i neki fizikalni, kemijski i biološki postupci koji su popisani u Tablica 1 (Pepeljnjak i sur., 2008).

Tablica 1. *Dekontaminacija i biodegradacija OTA*

METODE	UČINAK	LITERATURA
FIZIKALNE METODE		
Adsorbensi	**Adsorpcija**	
Hidratizirani natrijevi i kalcijevi alumosilikati	1,3 mg/g adsorbenta	Galvano i sur., 2001
Bentonit	1,9-9 mg/g	Huwig i sur., 2001
Kolestiramin	9,6 mg/g	Huwig i sur., 2001
Aktivni ugljen	91-119 mg/g	Galvano i sur., 2001
Glukomanan	12,5 %	Yannikouris i Jouany, 2002
Termička obrada	**Degradacija**	
250 °C / 40 min	76 % u brašnu	Peraica i sur., 2002
KEMIJSKE METODE	**Degradacija**	
Amonijak i kalcij hidroksid / 96 °C	90-100 % u krmivu	Peraica i sur., 2002
BIOLOŠKE METODE	**Biodegradacija**	
Lactobacillus acidophilus	95 % u tekućem bujonu	Fuchs i sur., 2008
Phaffia rhodozyma	90 % / 15 dana / 20 °C	Peteri i sur., 2007
Trichosporon mycotoxinivorans	30 % OTA→OTα / 48 h u bujonu	Molnar i sur., 2004
Rhizopus sp.	95 % / 16 dana u YES bujonu	Varga i sur., 2005
Aspergillus niger	100 % OTA→OTα / 7 dana u YES bujonu	Varga i sur., 2000

OTA ili 7-karboksil-5-kloro-8-hidroksil-3,4-dihidro-3-R- metilizokumarin-7-L- beta-fenilalanin (Wu i sur., 2011) je kiralna molekula molekulske mase 403.815 g/mol, a sažeta molekulska formula glasi $C_{20}H_{18}ClNO_6$. Strukturna kemijska formula prikazana je na Slici 1. U krutom stanju riječ je o bijelom kristaliničnom prahu čija je točka taljenja 169 °C (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/).

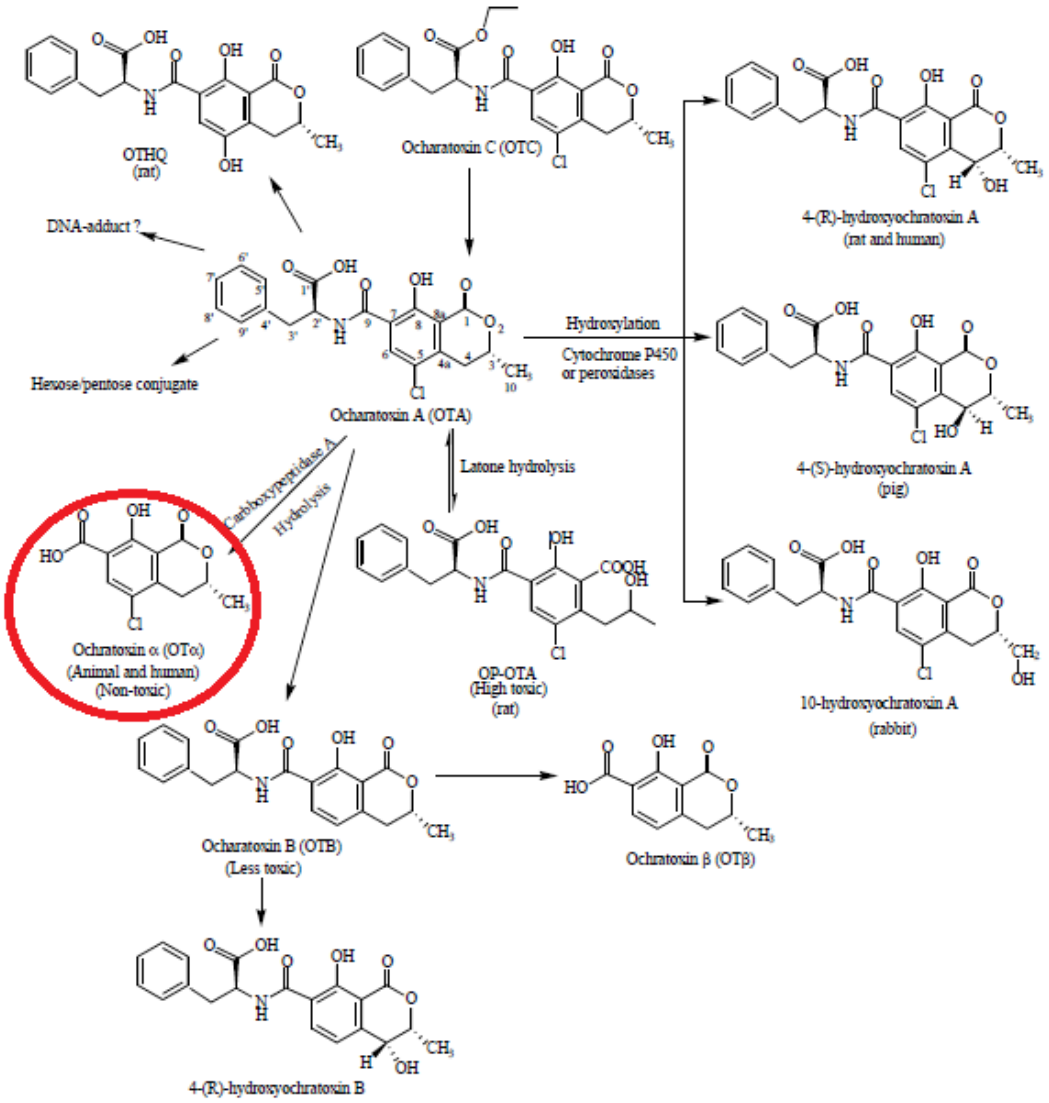


Slika 1. *Kemijska struktura OTA*

U životinjama i ljudima OTA se metabolizira preko bubrega, jetre i crijeva. Hidroliza, hidroksilacija, otvaranje laktonskog prstena i konjugacija su glavni metabolički putevi. OTα formiran cijepanjem peptidne veze u OTA je glavni metabolit, ne samo u životinjama i ljudima, nego i u mikroorganizmima i enzimskim sustavima. Smatra ga se netoksičnim produktom. Predloženi metabolizam OTA u životinja i ljudi prikazan je na slici 2 (Wu i sur., 2011).

In vivo biotransformacija OTA u životinja i ljudi je slaba, a eliminacija metabolita spora, što igra važnu ulogu u njegovoj toksičnosti, karcinogeosti i organ specifičnosti. Većina metabolita poput OTα i OTB su manje toksični od roditeljske molekule. Međutim, neki metaboliti poput lakton otvorenog OTA (OP-OTA) imaju veću toksičnost od same OTA molekule. Nakon unosa od strane životinja OTA može biti metabolizirana u različite produkte. Metaboliti imaju različit toksikološki profil na ljudima i različitim životinjama. Nadalje, OTA može izazvati zdravstvene probleme u ljudi preko hrane životinjskog podrijetla.

Zbog ekstremne toksičnosti OTA, nije etično izučavati njegov metabolizam na ljudima. Stoga su samo *in vitro* metode korištene za dobivanje informacija o metabolizmu u ljudi. (Wu i sur., 2011).



Slika 2. *Predloženi metabolički put OTA u životinja i ljudi s crveno zaokruženim najčešćim metabolitom OTα.*

1.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Još tridesetih godina prošlog stoljeća kromatografija polako postaje rutinska laboratorijska metoda. Danas je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) postala standard u farmaceutskoj industriji. Radi se o separacijskoj tehnici koja može uspješno i reproducibilno razdvojiti sastojke smjese radi njihovog dokazivanja, pročišćavanja ili određivanja sadržaja (Sertić, 2013).

Načelo metode je da tekuća mobilna faza pod tlakom prolazi čeličnom kolonom napunjenom stacionarnom fazom (Nigović, 2016.). To je tehnika koja se koristi za separaciju otopljenih tvari. Tvari iz otopina u različitoj mjeri stupaju u interakciju sa stacionarnom i tekućom mobilnom fazom na osnovu razlika u adsorpciji, ionskoj izmjeni, razdiobi između faza, razlici u veličini čestica i na osnovu stereokemijskih interakcija. Na osnovu tih interakcija čestice različitih tvari imaju različita vremena zadržavanja na kromatografskoj koloni (Cindrić i sur., 2009).

Nakon što analit prijeđe kroz kolonu, moramo ga odrediti i dokazati. To postižemo primjenom različitih detektora, poput ultraljubičastog spektrofotometra, detektora s nizom fotosenzitivnih dioda (engl. *Diode Array Detector*, DAD), fluorescencijskog detektora (engl. *Fluorescence Detector*, FLD), elektrokemijskog detektora (engl. *Electrochemical Detector*, ED), detektora indeksa loma (engl. *Refractive Indeks Detector*, RID) ili detektora raspršenja svjetlosti u uparenom uzorku (engl. *Evaporative Light-Scattering Detector*, ELSD) (Sertić, 2013).

HPLC povezan s DAD detektorom ili s FLD detektorom se pokazao kao odlična tehnika za određivanje mikotoksina. Većina HPLC protokola se može koristiti za njihovu analizu te su uvršteni u službene metode. U praksi HPLC-FLD metode se koriste za detekciju mikotoksina u hrani, a metode s DAD detektorom se mogu koristiti samo za analizu mikotoksina proizvedenih od strane plijesni i nisu praktične za analizu u hrani (Shi i Yu, 2017).

Prednosti HPLC tehnike su mogućnost analize nehlapljivih i termolabilnih tvari, visoka preciznost, automatiziranost, selektivnost, velika brzina analize, visoka rezolucija, osjetljivost i ponovljivost. Međutim tehnika ima i neke nedostatke, kao što su visoka cijena, velika potrošnja organskih otapala, nepostojanje univerzalnog detektora za sve analite i različite vrste analiza te složenost tehnike što zahtjeva posebno obrazovanog stručnjaka (Nigović, 2016; Sertić, 2013).

Danas se HPLC tehnika povezuje u složene sustave s nizom drugih načina dokazivanja i određivanja sadržaja razdvojenih sastavnica smjese, poput vezanog sustava tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (LC-MS), nuklearne magnetske rezonancije (LC-NMR) ili infracrvene spektrometrije (LC-IR) i dr. (Sertić, 2013).

1.5. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija je metoda koja se danas u analitici lijekova koristi za određivanje strukture i potvrdu identiteta ljekovitih tvari, određivanje molekulskih masa, a kao spregnuta tehnika s kromatografskim metodama (GC-MS, LC-MS) u istraživanju i razvoju lijekova, kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi onečišćenja, strukturnoj karakterizaciji i proteomici. Metoda je vrlo osjetljiva i specifična posebno za identifikaciju i strukturnu karakterizaciju onečišćenja i određivanje lijekova i njihovih metabolita u biološkim tekućinama (Nigović, 2016).

Masena spektrometrija radi na principu generiranja nabijenih molekula ili fragmenata molekula u visokom vakuumu ili neposredno prije nego što uzorak uđe u visoki vakuum. Ionizirane molekule nastaju u plinskoj fazi. Jednom kad ih ioniziramo, a kad su u plinskoj fazi, možemo s njima manipulirati ovisno o tome koristimo li električno ili magnetsko polje kako bi odredili molekulsku masu ili masu pojedinog fragmenta nastalog fragmentacijom (Nigović, 2016; Watson, 1999). Ova analitička tehnika služi za razdvajanje ioniziranih molekula na temelju razlike u omjeru mase i naboja (*m/z*), a sam instrument se sastoji od tri glavna dijela - ionizatora, analizatora i detektora (Sertić, 2013).

Ionizacija analita može se provesti na nekoliko načina. Na osnovu toga razlikujemo: ionizaciju djelovanjem snopa elektrona (engl. *Electron Impact*; EI), kemijsku ionizaciju (engl. *Chemical Ionization*, CI), elektrosprej ionizaciju (engl. *Electrospray Ionization*; ESI), kemijsku ionizaciju pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric-Pressure Chemical Ionization*; APCI), ionizaciju fotonima pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Photo Ionization*; APPI), matriksom potpomognutu ionizaciju laserskom desorpcijom (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization;* MALDI), ionizaciju bombardiranjem brzim atomima (engl. *Fast Atom Bombardment*; FAB) i ionizaciju termoraspršenjem (engl. Thermospray). Sve tehnike ionizacije može se podijeliti u dvije osnovne skupine na osnovu količine energije koju predaju molekuli analita. Tako imamo podjelu na tzv. *blage* ionizacijske tehnike (engl. *soft ionization*) i *čvrste* ionizacijske tehnike (engl. *hard ionization*). Podjela se temelji na osnovi količine energije koju se predaje molekuli te posljedično i samoj fragmentaciji molekule analita. Kod *blagih* tehnika prevladava molekulski ion, dok kod *čvrstih* tehnika imamo izraženu fragmentaciju analita te nam služe za razjašnjenje strukture molekula na osnovi fragmenata (Nigović, 2016; Mornar i sur., 2013; Sertić, 2013).

Elektrosprej ionizacija je jedna od najzastupljenijih tehnika ionizacije u vezanom sustavu LC-MS i kompatibilna je sa svim analizatorima. Uzorak iz kromatografske kolone prolazi kroz usku kapilaru čiji se kraj nalazi na visokom potencijalu (2-5 kV). Dolazi do raspršenja uzorka na atmosferskom tlaku. Otapalo se većinom izbacuje sa strujom dušika (N2). Nabijene molekule ulaze u vakuum MS preko elektrostatski nabijenih pločica. Moguće je odrediti male molekule ali i velike molekule, poput proteina i peptida. Spektar može biti jednostavan, sadržavajući samo molekulski ion ili možemo imati fragmentaciju (Nigović, 2016; Cindrić i sur., 2009; Watson, 1999). Male molekule tipično postoje jedino kao jednostruko nabijene ($M+H^+$, $M-H^-$ ili kao radikal kationi M+) dok velike molekule mogu ionizirati na više mjesta i tvoriti višestruko nabijene analite (Balogh, 2009). Radni protok je između 5 µl i 1000 µl u minuti a sama ionizacija može biti pozitivna ili negativna ovisno o primijenjenom naponu. Metoda je pogodnija za polarne molekule. (Cindrić i sur., 2009; Watson, 1999).

Analizator je dio spektrometra masa koji razdvaja ione na osnovu različitog omjera mase i naboja. Različiti analizatori zahtijevaju različite ionizacijske izvore i različite detektore (Cindrić i sur., 2009). Najvažniji analizatori za razdvajanje iona su magnetski analizator, kvadrupolni, stupica za ione (engl. *Ion-trap*), analizator vremena leta (engl. *Time of flight*; TOF) i tandemska masena spektrometrija (MS/MS) (Nigović, 2016).

Stupica za ione je analizator koji koristi i električno i magnetsko polje za zadržavanje iona unutar vakuuma. Iako ima više varijanti, najčešće se koristi analizator s dvije kružne i dvije polukružne elektrode. Kada ioni uđu u stupicu, osciliraju sve dok uslijed promjene napona ne budu izbačeni van. Time je moguće zadržati samo jedan ion, a ostale ione ukloniti iz stupice. Taj izolirani ion se može primjenom plina helija dalje fragmentirati, a fragmentirani ion koji dobijemo moguće je ponovo izolirati i dalje dodatno fragmentirati. To je glavna prednost stupice za ione jer ona omogućuje izolaciju i fragmentaciju iona na istom prostoru te MS^n analizu. Ostale vrste tandemske masene spektroskopije većinom omogućuju snimanje do MS^2 spektara (Sertić, 2013).

Na tržištu se mogu naći brojne kombinacije ionizatora i analizatora. Osnovna razlika između njih je u načinu rada i cijeni. Osim toga razlikuju se i u selektivnost, osjetljivosti, preciznosti i razlučivanju. Tako imamo različite uređaje za različite uzorke i različite namjene analize (identifikacija nepoznatih spojeva, strukturna karakterizacija onečišćenja, određivanje

sadržaja analita u vrlo niskim koncentracijama). Upravo zbog toga prije same analize treba pažljivo i ciljano odabrati odgovarajući uređaj s prikladnim tipom ionizatora i analizatora (Sertić, 2013).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Ohratoksin A (OTA) je sekundarni metabolit plijesni, mikotoksin koji proizvode plijesni iz porodice *Aspergillus* i *Penicillium*. OTA je česti kontaminant hrane, kako za životinje, tako i za ljude. Najčešće se pojavljuje na pšenici, kukuruzu, raži, ječmu, grahu, riži, kikirikiju, začinima, brašnu, kruhu i drugim namirnicama koje sadrže žitarice. Za njegov razvoj pogodni su uvjeti veće vlažnosti te se ovisno o klimatskim utjecajima u većoj ili manjoj mjeri pojavljuje na polju prije žetve ili tokom skladištenja kad imamo neadekvatne uvjete u skladištima.

OTA je primarno nefrotoksičan, ali ima i hepatotoksično, neurotoksično, imunosupresivno, teratogeno, genotoksično i karcinogeno djelovanje. Svrstava se u karcinogene 2B kategorije (IARC, 1993). Metabolizira se u različite metabolite koji mogu biti manje ili više toksični od početnog spoja. Najznačajniji metabolit je OTα koji se smatra netoksičnim.

Cilj ovog rada je predloženom HPLC-ESI-MS/MS metodom provesti strukturnu karakterizaciju ohratoksina A. Masena spektrometrija spregnuta s tekućinskom kromatografijom je idealna tehnika za analizu i strukturnu karakterizaciju ohratoksina A. Na temelju dobivenih fragmenata moguće je opisati mehanizme fragmentacije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije, standardne supstancije, uzorci i plinovi

Kemikalije

- Acetonitril za tekućinsku kromatografiju (Lach-ner, Neratovice, Češka)
- Octena kis. (Panreac, Castellar de Valles, Španjolska)
- Metanol (J.T. Baker)

Standardne supstancije

- Ohratoksin A (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)

Uzorci

- Ekstrakt plijesni proizvođača izoliranih iz zraka

Plinovi

- Dušik (Messer Group, Sulzbach, Njemačka)
- Helij (Messer Group, Sulzbach, Njemačka)

3.1.2. Radni instrumenti

- Vezani sustav tekućinske kromatografije (Agilent 1100 chromatograph, Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka) i masene spektrometrije LC/MSD Trap VL (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

3.1.3. Pribor

- Boce za mobilnu fazu sustava za tekućinsku kromatografiju (Agilent Technologies, SAD)
- Bočice za uzorkovanje 1,5 mL sustavom za tekućinsku kromatografiju (Agilent Technologies, SAD)
- Generator dušika NM30LA (PEAK Scientific, Renfrewshire, Velika Britanija)
- Kolona za tekućinsku kromatografiju Symmetry C18 4,6 x 150 mm, 3,5 μm (Waters, Milford, SAD)
- Rainin mikropipete promjenjivog volumena (Mettler, Toledo)
- Stakleni sustav za filtriranje mobilnih faza u tekućinskoj kromatografiji (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- Sustav za pročišćavanje vode WaterPro (Labonco, Kansas City, MI, SAD)

3.1.4. Programski paketi

- ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema standardnih otopina

Standardne otopine ohratoksina A su pripremljene otapanjem standardnog spoja u acetonitrilu koncentracije 1 mg/mL i razrijeđene prema potrebi.

3.2.2. Priprema ispitivanog uzorka

Čiste kulture aspergila kultura *Versicolores* priređene su na CYA agaru inokulacijom po 3µl suspenzije izolata na tri mjesta na agaru. Upotrebom metalnog cilindra sa svake su porasle kulture uzeta po tri kružna isječka promjera 6 mm. Oni su zatim prebačeni u Eppendorf tubice s 1000 µl organskog otapala koje se sastojalo od metanola, diklormetana i etil-acetata, redom u omjerima 1:2:3 uz 1 % (v/v) mravlje kiseline. Ekstrakcija je provedena na ultrazvučnoj kupelji tijekom jednog sata, a ekstrakti su nakon toga izolirani u nove Eppendorf tubice uz pomoć sterilne šprice i filtriranjem kroz filtre pora 0,45 µm (Sartorius, Njemačka). Ekstrakti su u struji dušika upareni do suhog ostatka te pohranjeni na -20 ºC.

3.2.3. Uvjeti kromatografske i spektrometrijske analize

Identifikacija ohratoksina A provedena je na Agilent 1100 kromatografskom sustavu, na koloni obrnutih faza Symmetry (Waters) C18 dimenzija 150 mm x 4,6 mm i veličine čestica 3,5 µm. Provedena je izokratna eluacija. Protok mobilne faze je bio 0,6 mL/min, a temperatura kolone bila je podešena na 35 °C. Kromatogrami su snimani na trima valnim duljinama: 237 nm, 254 nm i 330 nm detektorom s nizom dioda (*engl. Diode array detector,* DAD).

Strukturna karakterizacija provedena je masenim spektrometrom koji se sastojao od elektrosprej ionizatora i analizatora stupice za ione. Korišten je instrument Agilent 6300 Series Ion Trap. Za elektrosprej ionizaciju korištena temperatura na izvoru iona iznosila je 325°C , a napon na kapilari 3,5 kV. Korišteni plin za sušenje bio je dušik pri odgovarajućem protoku. Maseni spektri većinom su snimani u rasponu *m/z* od 200 do 500, a djelomično i u rasponu od 100 do 500 te u rasponu od 100 do 800. Korišteni plin za koliziju bio je helij.

Svakodnevno, prije prve analize HPLC sustav ispiran je mobilnom fazom, a na kraju radnog dana acetonitrilom.

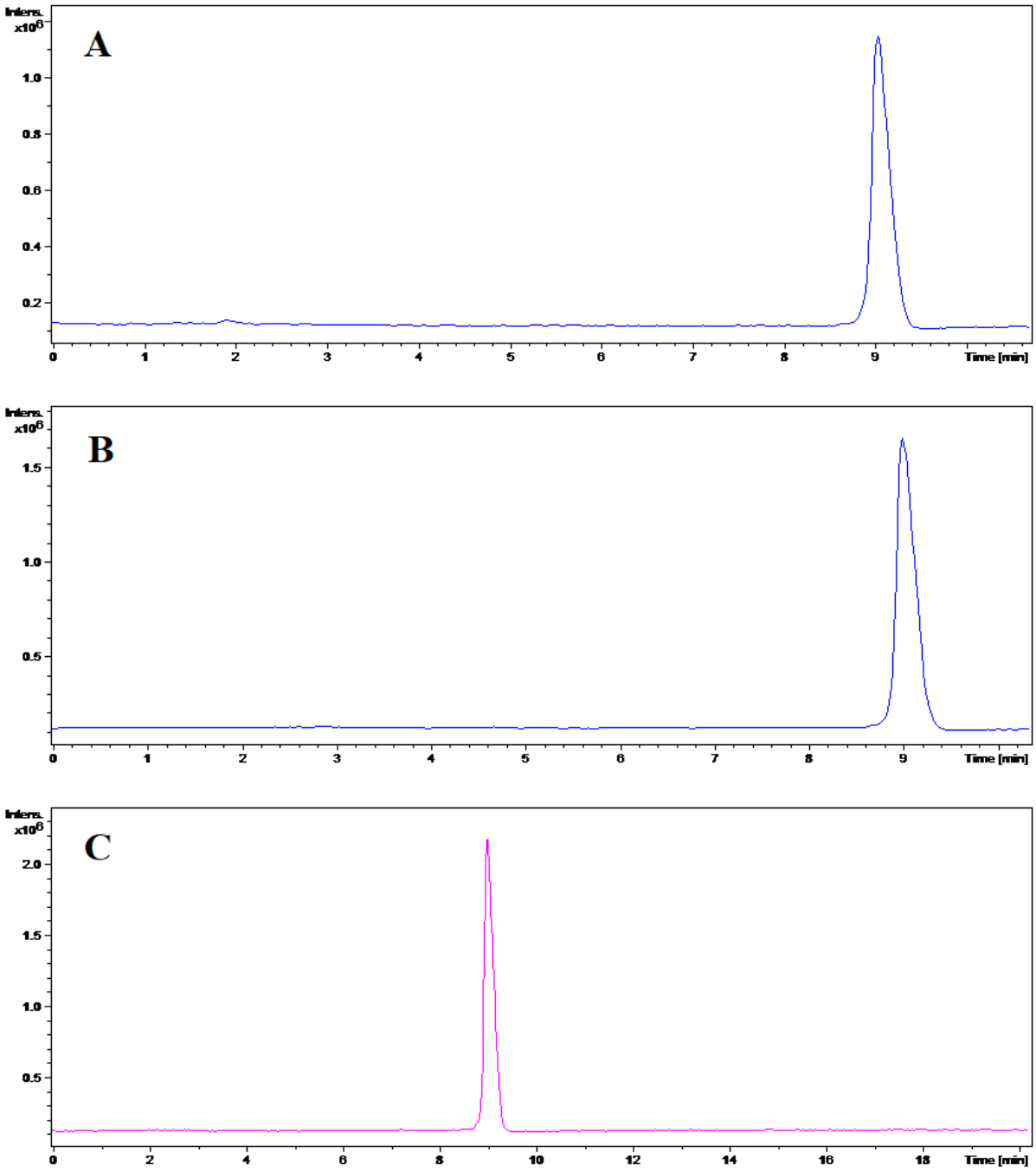
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Strukturna karakterizacija masenom spektrometrijom

Strukturna karakterizacija ohratoksina A provedena je masenom spektrometrijom pri čemu je korištena elektrosprej ionizacija i analizator ionska stupica. Osnovni cilj analize je identifikacija karakterističnih fragmenata analita kako bi se pomoću njih mogla vršiti njegova identifikacija tijekom analize uzoraka složenog matriksa. Upotreba analizatora ionska stupica je u ovom slučaju pogodna jer, osim dobivanja masenog spektra molekulskog iona, omogućava i daljnju fragmentaciju molekulskog iona i nastalih fragmenata.

4.1.1. Ispitivanje utjecaja brzine protoka plina za sušenje na rezultate analize

Plin koji se koristi za sušenje u postupku ionizacije analita je dušik. Kako bi imali što jasniji i veći pik analita, prvo je provedena optimizacija uvjeta masenospktrometrijske analize. Točnije, proveden je izbor odgovarajućeg protoka plina za sušenje. Ispitivani protoci plina za sušenje bili su 6 L/min, 8 L/min i 10 L/min. Prilikom toga dobiveni su kromatogrami toka ukupnih iona (eng. *Total Ion Chromatogram, TIC)* prikazani na Slici 3.



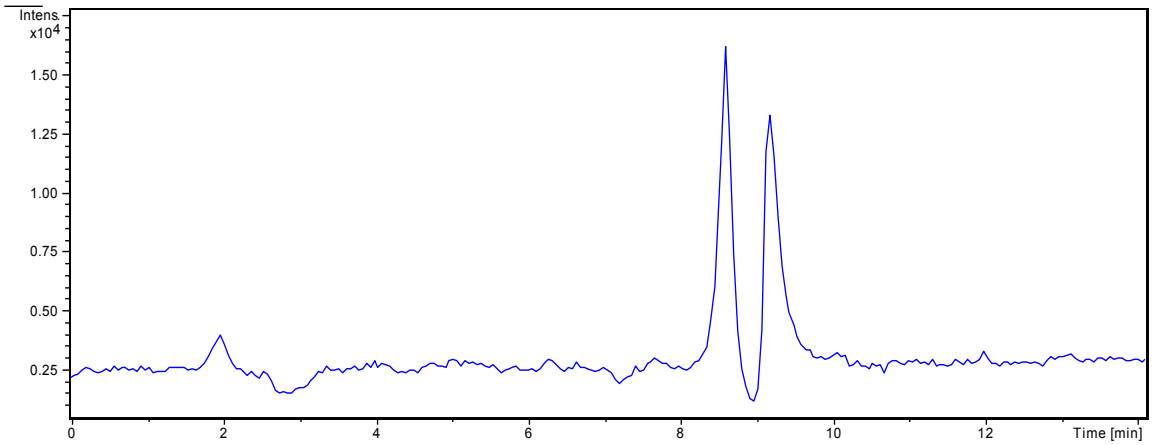
Slika 3. *TIC kromatogrami standarda OTA koncentracije 10 µg/L i brzine protoka plina za sušenje 10 L/min (A), 8 L/min (B) i 6 L/min (C)*

Na osnovu dobivenih kromatograma izračunate su površine ispod pikova kako bi se sa sigurnošću odredilo kod kojih uvjeta analize imamo najbolje pikove. Rezultati su prikazani u Tablici 2 i iz nje je uočljivo da je uvjerljivo najveća površina ispod pika na slici 3C, dobivenog kod protoka plina za sušenje od 6 L/min.

Taklica 2. *Prikaz površina ispod pika u ovisnosti o protoku plina za sušenje*

Kromatogrami Slike 3	PROTOK ($Lmin^{-1}$)	POVRŠINA ISPOD PIKA
C	6	27 892 588
B	8	21 092 655
A	10	14 438 509

Iz dobivenih podataka vidljivo je da optimalan protok plina za sušenje iznosi 6 L/min. Međutim, kod MS^2 analize pri korištenju ovog protoka došlo je do cijepanja pikova. Na Slici 4 vidljivo je cijepanje signala na TIC kromatogramu prilikom MS^2 analize fragmenta OTA m/z 404.

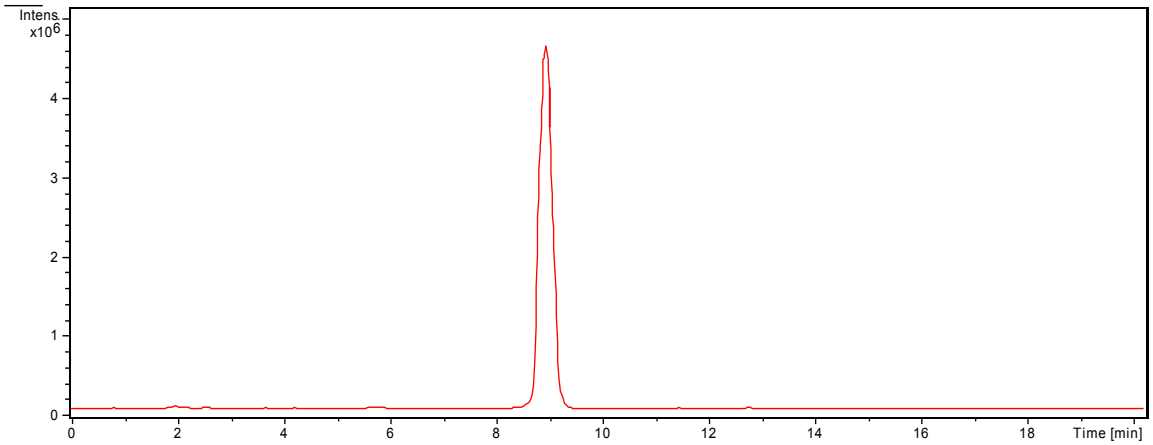


Slika 4. *TIC kromatogram od fragmenta OTA s m/z omjerom 404. Vidljivo je cijepanje glavnog pika na 2 manja pika*

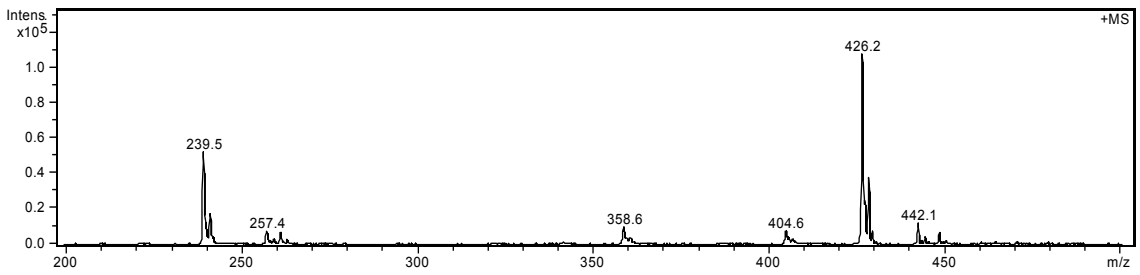
Kako bi se izbjeglo cijepanje pikova i riješilo novonastali problem, bilo je potrebno prilagoditi protok plina za sušenje. Rješenje je bilo korištenje protoka dušika od 10 L/min. Iako je ukupna površina pika manja nego kod protoka od 6 L/min prilikom TIC MS analize, taj protok nam omogućuje jasnije rezultate kod MS^n analize.

4.1.2. Analiza masenih spektara ohratoksina A

Nakon optimizacije uvjeta analize, provodi se daljnja analiza otopine standarda OTA. Prvo se snima kromatogram ukupne ionske struje (Slika 5) te maseni spektar analita. Na priloženom kromatogramu, nakon usporedbe s kromatogramom dobivenim DAD detektorom, uočljiv je pomak u vremenu zadržavanja (t_r) za analit. Taj pomak je uzrokovan vremenom potrebnim da analit prijeđe put od DAD detektora (koji analit snima odmah po njegovu izlasku s kromatografske kolone) do masenog detektora.



Slika 5. *TIC kromatogram standarda OTA koncentracije 50 µg/mL uz protok plina za sušenje od 6 L/min*



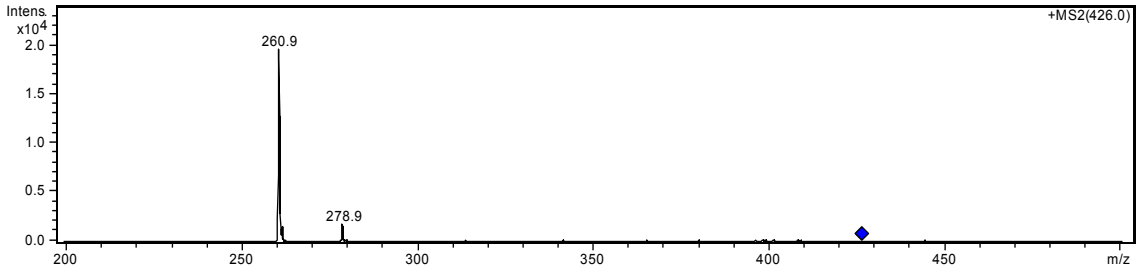
Slika 6. *Maseni spektar OTA, standarda OTA koncentracije 50 µg/mL uz protok plina za sušenje od 6 L/min*

Maseni spektar OTA prikazan na Slici 6 pokazuje izraženi fragment molekulskog iona kao aduktora s natrijem $[M+Na]^+$ pri m/z 426. Osim toga uočljivi su još i fragmenti m/z omjera 239, 257, 358, 404 te 442. Fragment m/z 404 predstavlja protonirani molekulski ion $[M+H]^+$, dok fragment m/z 442 predstavlja aduktor molekulskog iona s kalijem $[M+K]^+$.

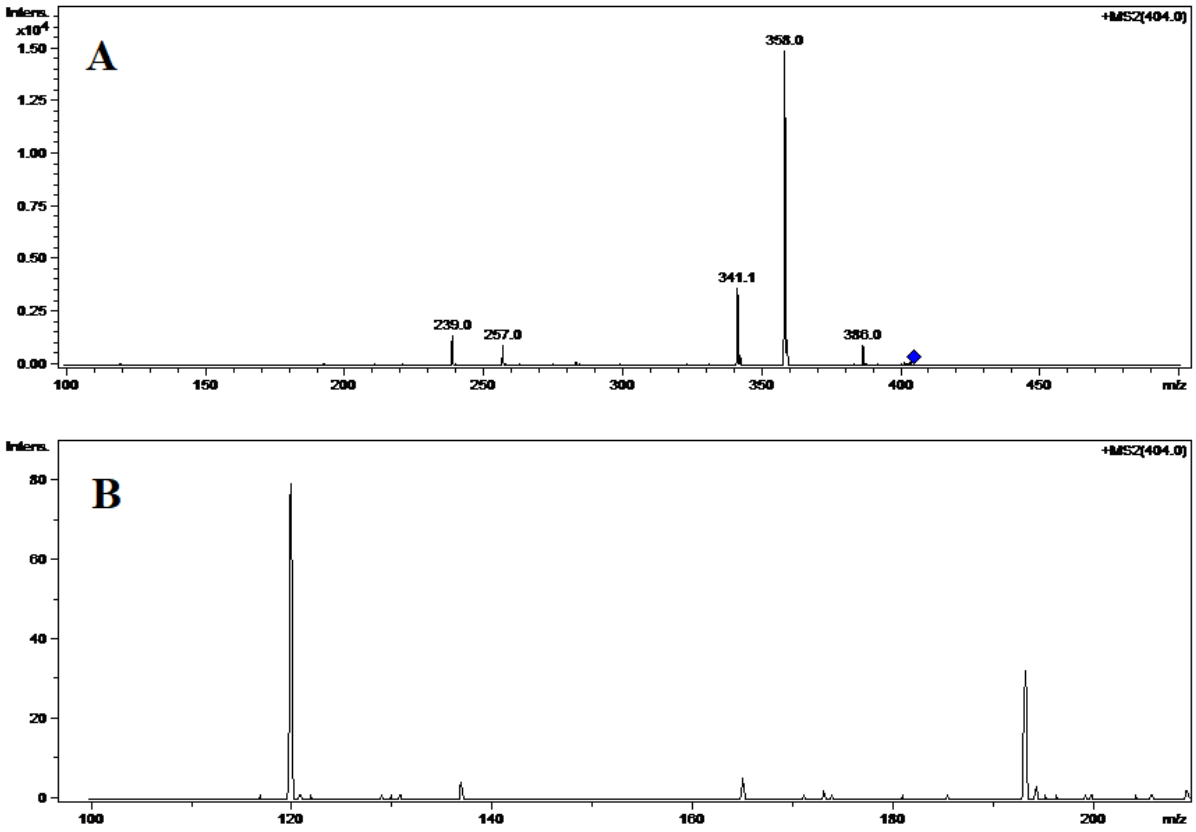
Kod fragmentiranog iona m/z 239 došlo je do gubitka mase (404 → 239) od 165 Da. To odgovara cijepanju amidne veze u molekuli OTA uz nastanak fragmenta OTα bez OH skupine i odcjepljenja fenilalanina. Što se tiče fragmenta m/z 358 uočljiv je gubitak mase od 46 Da što odgovara gubitku COOH skupine i još jednog vodikovog atoma. Dobiveni rezultati odgovaraju rezultatima koje su dobili J.Fernandes i suradnici 2013. godine i rezultatima istraživanja Yanga i suradnika iz 2015. godine.

Prilikom analize uočen je i fragment m/z 257, koji je ranije bio opisan tek od strane Hancocka i D' Agostina 2001. godine. Naime, riječ je o fragmentu za kojeg se, na osnovu molekulske mase pretpostavlja da odgovara molekulskom ionu bez fenilalanina, ali s dodanom molekulom vode (fragment m/z 239 + H_2O). Za potvrdu strukture fragmenta potrebna su daljnja istraživanja pomoću NMR i IR spektrometrije.

Budući da je u masenom spektru OTA najintenzivniji signal molekulskog iona u aduktoru s natrijem m/z 426, prvo je snimljen njegov MS^2 spektar. U tako snimljenom spektru, prikazanom na Slici 7, nakon fragmentacije uočljiva su 2 fragmenta. Najintenzivniji je fragment m/z 261, koji odgovara fragmentu m/z 239, ali kao aduktoru s natrijem. Drugi fragment m/z omjera 279 odgovara fragmentu m/z 257 u aduktoru s natrijem. Od fragmenata molekulskog iona još je analiziran i fragment m/z 404. Na njegovom MS^2 spektru uočljivi su fragmenti m/z 239, 257, 341, 386 i glavni pik m/z 358 (Slika 8A). Novouočeni fragment m/z 341 odgovara daljnjem raspadu fragmenta m/z 358 u odnosu na koji dolazi do gubljenja atoma dušika i stvaranja dvostruke veze što je bilo uočeno i u ranije navedenim istraživanjima iz 2013. i 2015. godine. Također, na osnovu podataka o fragmentaciji OTA, koje su sakupili Yang i suradnici 2015., istražena je pojavnost fragmenta m/z 120 koji možemo vidjeti na uvećanom dijelu kromatograma na Slici 8B. Taj fragment je jako slabog intenziteta i teško ga je razlikovati od šuma. Na osnovu m/z omjera i podataka koje su predstavili, pretpostavlja se da je riječ o drugom fragmentu OTA koji nastane uz nastajanje fragmenta m/z omjera 239 opisanog ranije. Dakle pretpostavlja se da je riječ o fenilalaninu bez COOH skupine uz manjak još jednog vodikovog atoma.



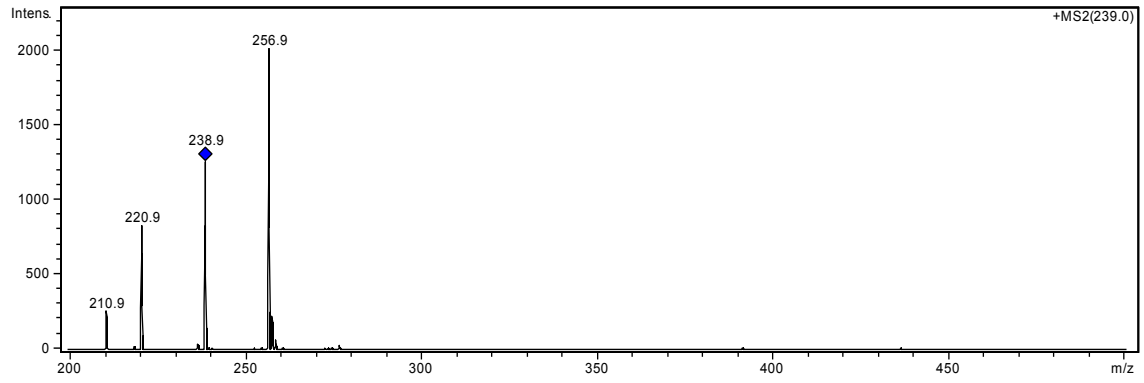
Slika 7. *MS^2 spektar molekulskog iona u aduktoru s natrijem m/z 426, standarda OTA koncentracije 50 µg/mL uz protok plina za sušenje od 10 L/min*



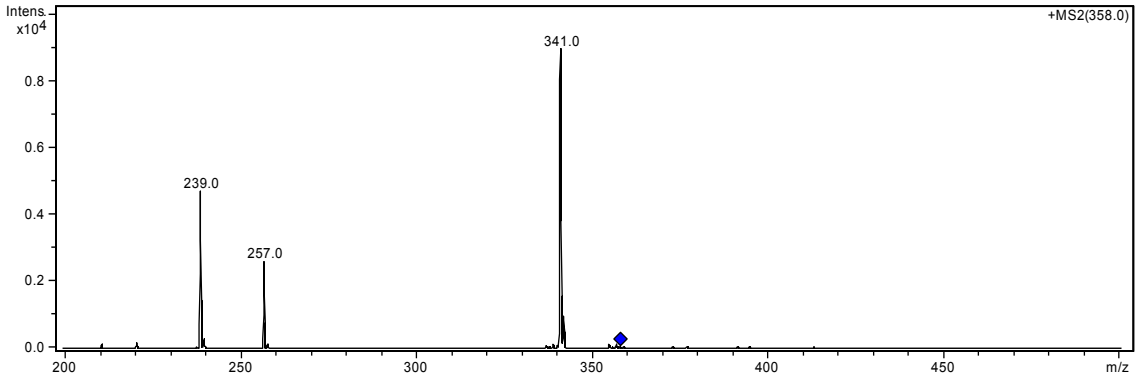
Slika 8. *MS^2 analiza molekulskog iona m/z 404 (A) uz uvećani dio kromatograma između m/z 100 i 250 kako bi se uočilo fragment m/z 120 (B), standarda OTA koncentracije 50 µg/mL uz protok plina za sušenje od 10 L/min*

Osim molekulskog iona i njegovog najznačajnijeg aduktora određivani su i MS^2 spektri ostalih fragmenata OTA nastalih MS analizom. Fragment m/z 239 daje MS^2 analizom tri izražena fragmenta m/z omjera 257, 239 i 221 što je vidljivo na Slici 9. Osim njih pojavljuje se i još neopisani fragment m/z 211. Yang i suradnici su 2015. opisali fragment m/z 193, a razlika između novouočenog fragmenta i fragmenta m/z 193 je 18 Da. To odgovara molekulskoj masi H_2O. Iz tog razloga, može se pretpostaviti da je fragment m/z 211 zapravo fragment m/z 193 + H_2O. Međutim, za konačnu potvrdu strukture fragmenta potrebna su daljnja istraživanja pomoću NMR i IR spektrometrije.

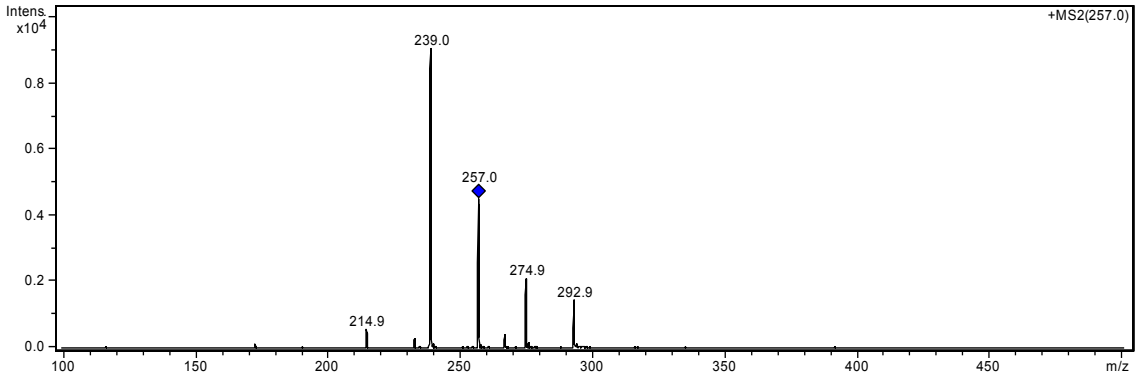
Fragment m/z 358 MS^2 analizom daje tri fragmenta. Najjači pik je m/z 341, a još imamo i m/z 237 te m/z 257 što je vidljivo na Slici 10. Nadalje, na Slici 11 moguće je vidjeti MS^2 spektar fragmenta m/z 257. On daje jedan značajni fragment m/z 239, ali imamo i fragmente m/z 215, 275 i 293. Za detaljniju analizu ova 3 navedena fragmenta potrebna su dodatna istraživanja.



Slika 9. *MS^2 analiza fragmenta m/z 239, standarda OTA koncentracije 50 µg/mL uz protok plina za sušenje od 10 L/min*

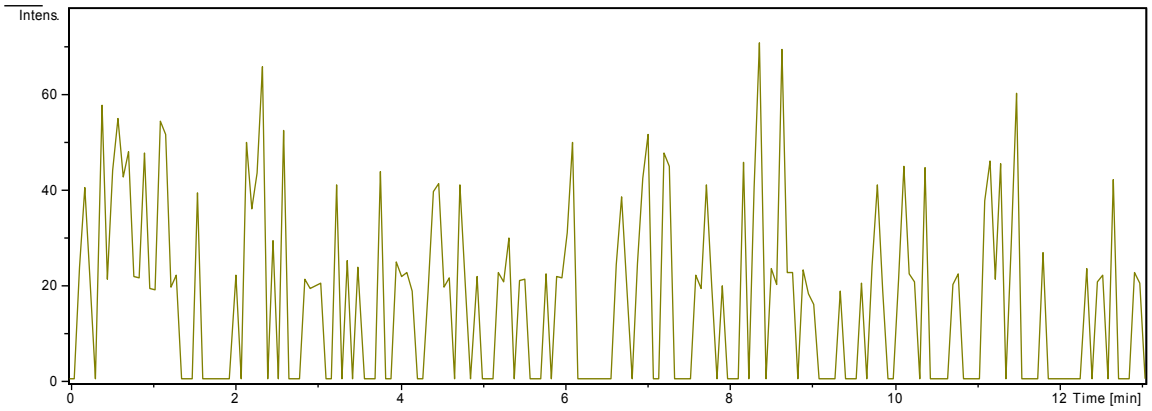


Slika 10. *MS^2 analiza fragmenta m/z 358, standarda OTA koncentracije 50 µg/mL uz protok plina za sušenje od 10 L/min*



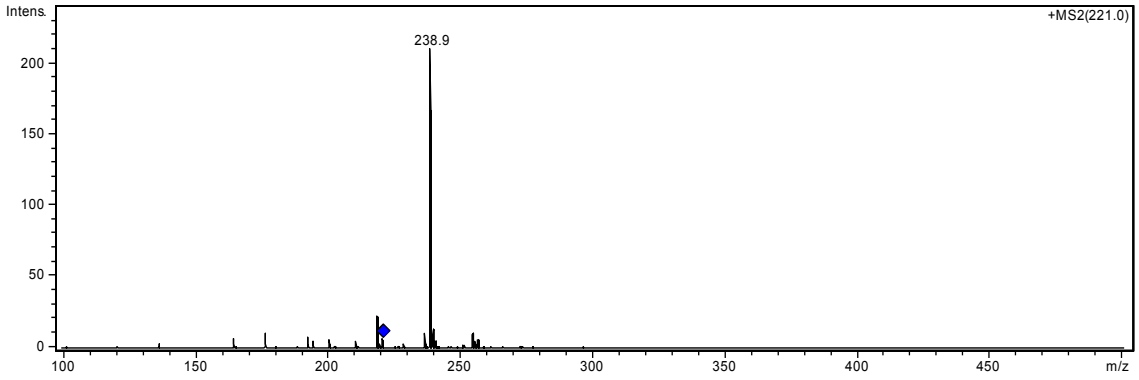
Slika 11. *MS^2 analiza fragmenta m/z 257, standarda OTA koncentracije 50 µg/mL uz protok plina za sušenje od 10 L/min*

Pošto su snimljeni MS^2 spektri svih fragmenata koji su se pojavili nakon MS analize OTA, pristupilo se snimanju MS^3 spektara. Međutim, niti na jednom MS^3 spektru nije se moglo uočiti ništa osim šuma (Slika 12). Iz tog razloga snimljeni su još MS^2 spektri od fragmenata m/z 386 i 221.

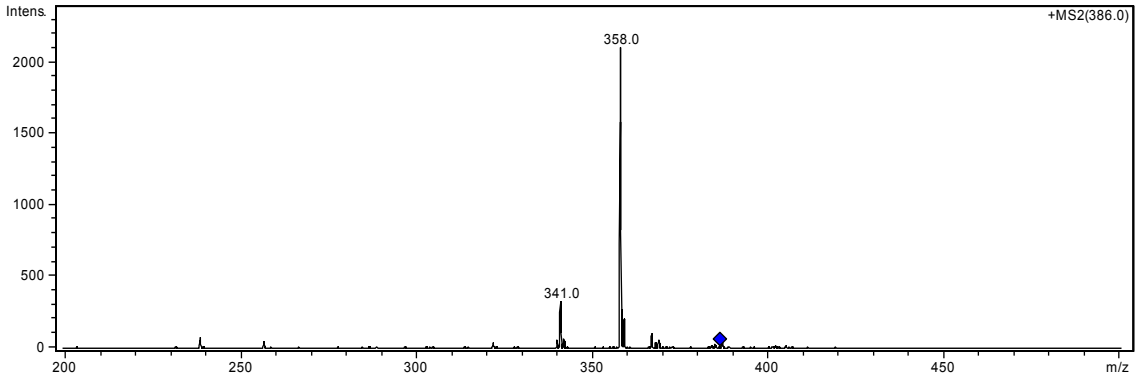


Slika 12. *MS^3 analiza fragmenta m/z 426, standarda OTA koncentracije 50 µg/mL uz protok plina za sušenje od 10 L/min*

Na MS^2 spektru fragmenta m/z 221 uočljiv je pik na m/z 239 (Slika 13), dok manji fragmenti nisu uočeni. S druge strane, MS^2 spektar m/z 386 pokazuje najveći pik na m/z 358, te manji pik m/z 341 (Slika 14). Svakako treba imati na umu da su signali vrlo slabi zbog vrlo niskih koncentracija traženih fragmenata.



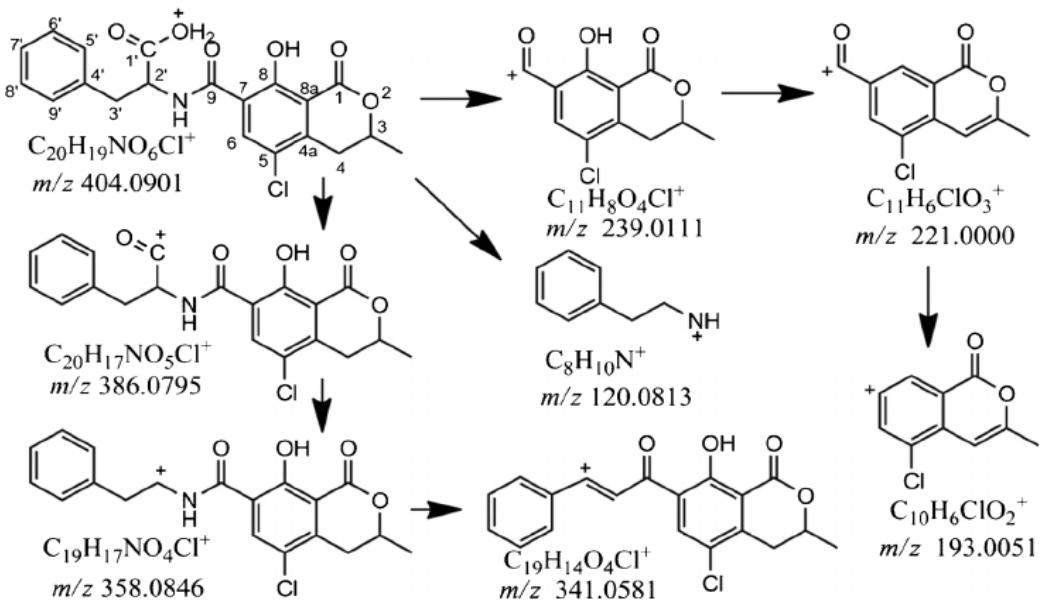
Slika 13. *MS^2 analiza fragmenta m/z 221, standarda OTA koncentracije 50 µg/mL uz protok plina za sušenje od 10 L/min*



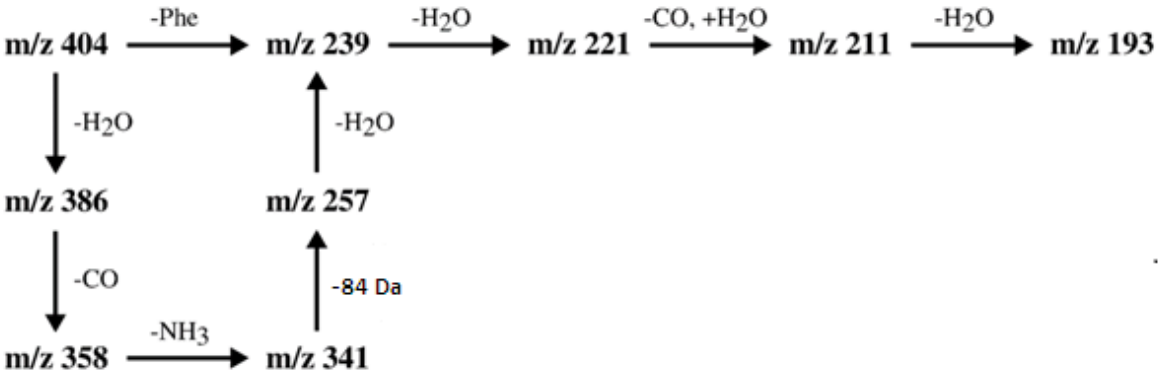
Slika 14. *MS^2 analiza fragmenta m/z 386, standard OTA koncentracije 50 µg/mL uz protok plina za sušenje od 10 L/min*

Fragmentacija ohratoksina A je vrlo kompleksna i rezultati istraživanja upućuju da se fragmentacijski putovi međusobno isprepliću. Međutim, iz dobivenih rezultata za fragmentaciju OTA možemo upotpuniti pretpostavljen fragmentacijski put od strane Yanga i suradnika iz 2015. prikazan na Slici 15. Pretpostavljen upotpunjen fragmentacijski put prikazan je na Slici 16.

Za još precizniju determinaciju fragmentacije OTA i preciznu strukturnu karakterizaciju fragmenata potrebno je provesti daljnja istraživanja.



Slika 15. *Predloženi mehanizam fragmentacije OTA od strane Yanga i sur., 2015.*



Slika 16. *Predloženi prošireni mehanizam fragmentacije OTA*

5. ZAKLJUČCI

Upotrebom vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i masene spektrometrije (MS) provedena je strukturna karakterizacija ohratoksina A. Odgovarajuća HPLC metoda omogućuje razdvajanje OTA od drugih toksina i ostalih onečišćenja koja mogu biti prisutna u uzorku, dok masena spektrometrija omogućuje strukturnu karakterizaciju i određivanje fragmentacijskih putova OTA.

Nakon analize tekućinskom kromatografijom uz mobilnu fazu sačinjenu od metanola:vode:octene kiseline = 70:30:1, v/v %, provedena je analiza standardnih otopina OTA pomoću masenog spektrometra. Korištena je elektrosprej ionizacija i detektor ionska stupica. Dodatno su optimizirani uvjeti na masenom spektrometru, posebice brzina protoka plina za sušenje koji je utjecao na oblik i veličinu pika.

Detaljnom MS analizom i dobivenim MS i MS^2 spektrima utvrđeni su karakteristični fragmenti ohratoksina A pomoću kojih se on može identificirati u složenim uzorcima. Također je predložena fragmentacijska shema.

Pretpostavljena su dva glavna puta fragmentacije OTA. U prvome dolazi do cijepanja amidne veze u molekuli i nastanka fragmenta m/z 239. U drugom predloženom fragmentacijskom putu najprije dolazi do gubitka vode (m/z 386), a potom do gubitka karbonilne skupine pri čemu nastaje fragment m/z 358. U nastavku dolazi do pregradnje i gubljenja amonijaka, a iz nastalog fragmenta m/z 341 nastaje karakteristični fragment m/z 257. Izdvajanjem vode ponovno se dobiva fragment m/z 239 koji je karakterističan i za prvi predloženi fragmentacijski put. Daljnjom analizom je utvrđeno da se fragment m/z 239 postupno cijepa do fragmenta m/z 193.

6. LITERATURA

1. Balogh MP. What are Mass Spectrometers? How Do They Work? U: Mass Spectrometry Primer. Milford, Waters, 2009, str. 9-12.
2. Bills GF, Gloer JB. Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. *Microbiology Spectrum,* 2016, 4, 1-32.
3. Cindrić M, Marković A, Horvatić A. Spregnute tehnike tekućinski kromatograf-spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina*, 2009, 45, 218-232.
4. Fernandes PJ, Barros N, Camara JS. A survey of the occurrence of ochratoxin A in Madeira wines based on a modified QuEChERS extraction procedure combined with liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Food Res Int*, 2013, 54, 293-301.
5. Hancock JR, D' Agostino PA. Mass spectrometric identification of toxins of biological origin. *Anal Chim Acta* 2002, 457, 71-82.
6. IARC Working Group. Ochratoxin A. U: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 56: Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Lyon, IARC, 1993, str. 489-510.
7. Meulenberg EP. Imunochemical Methods of Ochratoxin A Detection: A Review. *Toxins*, 2012, 4, 244-266.
8. Mornar A, Sertić M, Nigović B. Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda – praktikum. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2013.
9. Nigović B. Interna skripta – predavanja. Masena spektrometrija, Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), Vezani sustavi u analitici lijekova, 2016.
10. Olmedo Monfil V, Casas-Flores S. Molecular Mechanisms of Biocontrol in *Trichoderma* spp. and Their Applicatios in Agriculture. U: Biotechnology and Biology of Trichoderma. Gupta VK, Schmoll M, Herrera-Estrella A, Upadhyay RS, Druzhinina I, Tuohy MG. Elsevier, 2014, str. 429-453.

11. Pepeljnjak S, Cvetnić Z, Šegvić Klarić M. Okratoksin A i zeralenon: Kontaminacija žitarica i krmiva u Hrvatskoj (1977-2007) i utjecaj na zdravlje životinja i ljudi. *Krmiva*, 2008, 50, 147-159.

12. Ochratoxin A. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ochratoxin_a#section=Top, pristupljeno 19.06.2018.

13. Sertić M. Nove kapilarno elektroforetske i kromatografske metode u analitici statina. Doktorski rad. Zagreb, 2013, str. 20-25.

14. Shi H, Yu P. Advanced synchrotron-based and globarsourced molecular (micro) spectroscopy contributions to advances in food and feed research on molecular structure, mycotoxin determination and molecular nutrition. *Crit Rev Food Sci*, 2017, 1549-7852.

15. Što su mikotoksini?, 20013., https://www.hah.hr/sto-su-mikotoksini/, pristupljeno 20.06.2018.

16. Yang S, Zhang H, De Saeger S, De Boevre M, Sun F, Zhang S, Cao X, Wang Z. In vitro and in vivo metabolism of ochratoxin A: a comparative study using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole/time-of-flight hybrid mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407, 3579-3589.

17. Watson DG. Mass Spectrometry. U: Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists. Edinburgh, Elsevier, 1999, str. 167-193.

18. Wu Q, Dohnal V, Huang l, Kuča K, Wang X, Chen G, Yuan Z. Metabolic Pathways of Ochratoxin A. *Curr Drug Metab*, 2011, 12, 1-10.

7. SAŽETAK

7.1. Sažetak

Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti plijesni. Oni mogu kontaminirati hranu te izazvati štetne učinke kako u životinja, tako i u ljudi te zbog toga predstavljaju ozbiljne probleme za gospodarstvo i zdravlje ljudi. U organizam najčešće ulaze ingestijom kontaminirane hrane, ali mogu ući i preko dišnih puteva. Ohratoksin A je jedan od najznačajnijih mikotoksina, proizvod plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium*. Svrstan je u skupinu 2B karcinogena, a primarni štetni učinak ostvaruje na bubrezima.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti povezana s masenom spektrometrijom se zbog svoje visoke osjetljivosti i selektivnosti pokazala kao odlična metoda analize mikotoksina u različitim uzorcima. Posebno pogodna za analizu MS^n spektara se pokazala metoda gdje se koristi maseni spektrometar s analizatorom ionska stupica i elektrosprej tehnikom ionizacije.

Cilj ovog rada bio je optimizirati uvjete za identifikaciju i analizu ohratoksina A te što preciznije opisati njegovu fragmentaciju. Tako je najprije odabran optimalan protok plina za sušenje prilikom ionizacije uzorka, a potom je provedena fragmentacija i MS^n analiza uz pomoć masenog detektora. Utvrđeni su karakteristični fragmenti i opisan je put fragmentacije na temelju čega se može vršiti identifikacija analita ili potvrda identiteta spoja u uzorku. Pretpostavljena su dva glavna puta fragmentacije OTA. U prvome dolazi do cijepanja amidne veze u molekuli i nastanka fragmenta m/z 239. U drugom predloženom fragmentacijskom putu najprije dolazi do gubitka vode (m/z 386), a potom do gubitka karbonilne skupine pri čemu nastaje fragment m/z 358. U nastavku dolazi do pregradnje i gubljenja amonijaka, a iz nastalog fragmenta m/z 341 nastaje karakteristični fragment m/z 257. Izdvajanjem vode ponovno se dobiva fragment m/z 239 koji je karakterističan i za prvi predloženi fragmentacijski put. Daljnjom analizom je utvrđeno da se fragment m/z 239 postupno cijepa do fragmenta m/z 193.

7.2. Summary

Mycotoxins are toxic secondary metabolites of fungi. They can contaminate food and cause harmful effects both in animals and humans and therefore cause serious problems for human economy and health. In the organism they usually enter through ingestion of contaminated food, but can also enter through the respiratory tract. Ochratoxin A is one of the most important mycotoxins, a product of fungi from *Aspergillus* and *Penicillium*. It is classified as a category 2B carcinogen and has primary adverse effect on the kidneys.

High performance liquid chromatography associated with mass spectrometry due to its high sensitivity and selectivity proved to be an excellent method of analysis. A method using the mass spectrometer with ion trap analyzer and electrospray ionization technique has been shown as particularly suitable for MS^n spectrum analysis.

The goal of this study was to optimize the conditions for identification and analysis of ochratoxin A, as well as to describe its fragmentation as accurately as possible. First, the optimum drying gas flow rate was selected for the ionization of the sample, followed by fragmentation and MS^n analysis using a mass detector. Characteristic fragments were identified and a fragmentation path was described, based on which identification of an analyte or identity of a compound in a sample could be performed. Two main pathways of OTA fragmentation are assumed. In the first pathway, the cleavage of the amide bond and formation of the m/z 239 fragment occurs. In the second proposed fragmentation pathway loss of water (m/z 386) occurs first, followed by loss of the carbonyl group resulting in formation of the m/z 358 fragment. Subsequently, ammonia is removed and lost, and from the resulting m/z 341 fragment, the characteristic m/z 257 fragment is formed. The loss of water again yields to the m/z 239 fragment which is also characteristic for the first proposed fragmentation pathway. Further analysis showed that the m/z 239 fragment gradually cleaved to the m/z 193 fragment.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Strukturna karakterizacija ohratoksina A HPLC-ESI-MS/MS metodom

Andrija Marušić

SAŽETAK

Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti plijesni. Oni mogu kontaminirati hranu te izazvati štetne učinke kako u životinja, tako i u ljudi te zbog toga predstavljaju ozbiljne probleme za gospodarstvo i zdravlje ljudi. U organizam najčešće ulaze ingestijom kontaminirane hrane, ali mogu ući i preko dišnih puteva. Ohratoksin A je jedan od najznačajnijih mikotoksina, proizvod plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium*. Svrstan je u skupinu 2B karcinogena, a primarni štetni učinak ostvaruje na bubrezima.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti povezana s masenom spektrometrijom se zbog svoje visoke osjetljivosti i selektivnosti pokazala kao odlična metoda analize mikotoksina u različitim uzorcima. Posebno pogodna za analizu MS^n spektara se pokazala metoda gdje se koristi maseni spektrometar s analizatorom ionska stupica i elektrosprej tehnikom ionizacije.

Cilj ovog rada bio je optimizirati uvjete za identifikaciju i analizu ohratoksina A te što preciznije opisati njegovu fragmentaciju. Tako je najprije odabran optimalan protok plina za sušenje prilikom ionizacije uzorka, a potom je provedena fragmentacija i MS^n analiza uz pomoć masenog detektora. Utvrđeni su karakteristični fragmenti i opisan je put fragmentacije na temelju čega se može vršiti identifikacija analita ili potvrda identiteta spoja u uzorku. Pretpostavljena su dva glavna puta fragmentacije OTA. U prvome dolazi do cijepanja amidne veze u molekuli i nastanka fragmenta m/z 239. U drugom predloženom fragmentacijskom putu najprije dolazi do gubitka vode (m/z 386), a potom do gubitka karbonilne skupine pri čemu nastaje fragment m/z 358. U nastavku dolazi do pregradnje i gubljenja amonijaka, a iz nastalog fragmenta m/z 341 nastaje karakteristični fragment m/z 257. Izdvajanjem vode ponovno se dobiva fragment m/z 239 koji je karakterističan i za prvi predloženi fragmentacijski put. Daljnjom analizom je utvrđeno da se fragment m/z 239 postupno cijepa do fragmenta m/z 193.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 32 stranice, 16 grafičkih prikaza, 2 tablice i 18 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Ohratoksin A, HPLC, masena spektrometrija, fragmentacija

Mentor: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Biljana Nigović, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Maja Šegvić Klarić, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: Srpanj, 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutycal Analysis
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Structural characterization of ochratoxin A with HPLC-ESI-MS/MS method

Andrija Marušić

SUMMARY

Mycotoxins are toxic secondary metabolites of fungi. They can contaminate food and cause harmful effects both in animals and humans and therefore cause serious problems for human economy and health. In the organism they usually enter through ingestion of contaminated food, but can also enter through the respiratory tract. Ochratoxin A is one of the most important mycotoxins, a product of fungi from *Aspergillus* and *Penicillium*. It is classified as a category 2B carcinogen and has primary adverse effect on the kidneys.

High performance liquid chromatography associated with mass spectrometry due to its high sensitivity and selectivity proved to be an excellent method of analysis. A method using the mass spectrometer with ion trap analyzer and electrospray ionization technique has been shown as particularly suitable for MS^n spectrum analysis.

The goal of this study was to optimize the conditions for identification and analysis of ochratoxin A, as well as to describe its fragmentation as accurately as possible. First, the optimum drying gas flow rate was selected for the ionization of the sample, followed by fragmentation and MS^n analysis using a mass detector. Characteristic fragments were identified and a fragmentation path was described, based on which identification of an analyte or identity of a compound in a sample could be performed. Two main pathways of OTA fragmentation are assumed. In the first pathway, the cleavage of the amide bond and formation of the m/z 239 fragment occurs. In the second proposed fragmentation pathway loss of water (m/z 386) occurs first, followed by loss of the carbonyl group resulting in formation of the m/z 358 fragment. Subsequently, ammonia is removed and lost, and from the resulting m/z 341 fragment, the characteristic m/z 257 fragment is formed. The loss of water again yields to the m/z 239 fragment which is also characteristic for the first proposed fragmentation pathway. Further analysis showed that the m/z 239 fragment gradually cleaved to the m/z 193 fragment.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 32 pages, 16 figures, 2 tables and 18 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Ochratoxin A, HPLC, mass spectrometry, fragmentation

Mentor: **Miranda Sertić**, **Ph.D.***Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Miranda Sertić**, **Ph.D.***Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Biljana Nigović, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Šegvić Klarić, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July, 2018.