Optimizacija HPLC-DAD-MS metode za analizu sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina

Popčević, Monika

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:163:677623

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

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Monika Popčević

Optimizacija HPLC-DAD-MS metode za analizu sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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 je rad financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom Štetni učinci pojedinačnih i kombiniranih mikotoksina *Aspergillus* vrsta (HRZZ-IP-09-2014-5982).

Na kraju ovog napetog puta iskreno želim zahvaliti svojoj mentorici doc.dr.sc. Mirandi Sertić, na iznimno stručnom vodstvu, brojnim savjetima i ohrabrenjima! Osim iznimne profesionalnosti, hvala joj na toplini i zaraznom entuzijazmu kojim me uvijek iznova inspirirala i prenijela mi svoju ljubav prema analitici lijekova, ali i cijeloj struci!

Zahvaljujem svojim prijateljima i prijateljicama! Vi znate da ono kroz što smo zajedno prolazili nikakve riječi ne mogu dostojno opisati; hvala vam što ste usprkos svemu uvijek bili ovdje!

Mojoj dragoj obitelji želim zahvaliti na bezuvjetnoj ljubavi i podršci! Mudrost koju ste mi prenijeli vrijedan je kompas kojim se ravnam na Putu, a misao da na vas uvijek mogu računati ulijeva mi hrabrost. Voli vas vaša Monika!

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1 Mikotoksini 1
1.2 Sterigmatocistin 1
1.3 5-metoksisterigmatocistin 4
1.4 Masena spektrometrija 4
2. OBRAZLOŽENJE TEME 10
3. MATERIJALI I METODE 11
3.1 Materijali 11
3.1.1 Kemikalije 11
3.1.2 Radni instrumenti 11
3.1.3 Pribor 12
3.1.4 Programski paketi 12
3.2 Analitičke metode 12
3.2.1 Priprema mobilne faze 12
3.2.2 Priprema standardnih otopina 13
3.2.3 Priprema ispitivanog uzorka 13
3.2.4 Uvjeti analize uzoraka 13
4. REZULTATI I RASPRAVA 15
4.1 Optimizacija gradijenta 15
4.2 Strukturna karakterizacija analita masenom spektrometrijom 19
4.2.1 Sterigmatocistin 19
4.2.2 5-metoksisterigmatocistin 20
4.3 Potvrda identiteta analita masenom spektrometrijom 21
4.4 Analiza uzoraka 23
5. ZAKLJUČCI 27
6. LITERATURA 28
7. SAŽETAK/SUMMARY 30

1. UVOD

1.1 Mikotoksini

Mikotoksini su poznati kao grupa sekundarnih metabolita plijesni koji u niskim dozama djeluju toksično na kralježnjake (Nielsen, 2003). Sekundarni metaboliti po definiciji su različiti spojevi koji organizmu nisu nužni za njegov rast i preživljavanje, odnosno njihov nedostatak neće odmah izazvati njegovu smrt. Međutim, organizmu koji ih stvara oni su od velike važnosti jer su nositelji različitih važnih bioloških funkcija kao što je obrana od štetnih čimbenika okoliša, komunikacija s drugim organizmima itd. (Bills i Gloer, 2016).

Oni su heterogena skupina spojeva niske molekularne mase kojih je danas poznato oko 1000, a taj broj i dalje raste jer osim što se otkrivaju nove vrste plijesni, razvijaju se i sve bolje analitičke metode za njihovu detekciju i karakterizaciju (Bills i Gloer, 2016). Interes brojnih istraživača za mikotoksine prisutan je zbog ozbiljnog toksičnog potencijala mikotoksina; mutagenost, karcinogenost, hepatotoksičnost, nefrotoksičnost, neurotoksičnost, imunotoksičnost samo su neka od mogućih štetnih djelovanja (Hussein i Brasel, 2001). Mogu uzrokovati smrt ljudi i životinja, a stanja koja uzrokuju jednim se imenom nazivaju mikotoksikozama. Ovisno o količini i trajanju izloženosti mikotoksinima, razlikuju se akutne i kronične mikotoksikoze.

U ljudski organizam oni uglavnom dospijevaju oralnim putem: ingestijom kontaminirane hrane biljnog podrijetla ili hrane animalnog podrijetla u kojoj se nalaze ostaci mikotoksina koje su životinje u svoj organizam unijele kontaminiranom hranom, ili pak njihovi metaboliti (Sweeney i Dobson, 1998). Međutim, značajan put unosa je i inhalacijski, što je poseban problem za ljude koji borave u prostorijama koje su vlažne i tako pogodne za razvoj plijesni. U zadnje vrijeme naglašava se i važnost apsorpcije mikotoksina preko kože, posebno onih lipofilnijih (Kifer, 2015).

Do danas još nije pronađena učinkovita terapija za mikotoksikoze. Jedini način borbe su stroge mjere prevencije kontaminacije hrane koje su određene različitim legislativama. Stoga je

jasno da iako se radi o nezaraznim bolesti, one predstavljaju velik zdravstveni i ekonomski problem (Shi i Yu, 2017).

Neki od najpoznatijih spojeva koji spadaju u skupinu mikotoksina su aflatoksin, okratoksin, zearalenon, citrinin, patulin, fumonizin, trihoteceni te sterigmatocistin.

1.2 Sterigmatocistin

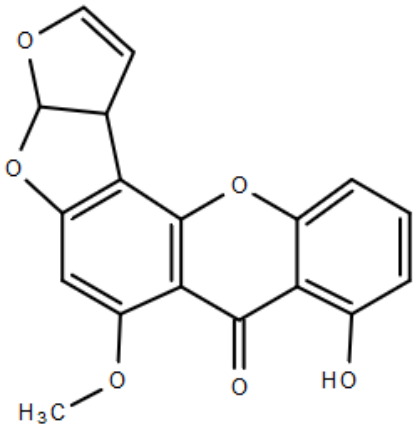
Sterigmatocistin je mikotoksin kojeg kao konačan produkt proizvode plijesni roda *Aspergillus* iz sekcije *Versicolores*: *A. versicolor, A. flavus, A.nidulans, A. chevalieri, A.ruber, A. amstelodami* itd. Jakšić Despot i suradnici nedavno su opisali novu vrstu koja je također proizvođač sterigmatocistina, a imenovali su ga kao *A. pepii*. Tako od ukupno 17 do danas poznatih vrsta plijesni koje pripadaju u sekciju *Versicolores* samo su dvije koje ne proizvode sterigmatocistin (Jakšić Despot i sur., 2017). Međutim, sterigmatocistin je detektiran i kao produkt drugih rodova poput *Penicillium, Bipolaris, Chaetomiuim i Emiricella* (Veršilovskis i De Saeger, 2010; Rabie i sur., 1977) koje su rasprostranjene diljem svijeta. On je i prekursor u biosintezi aflatoksina B1 koji je dokazani humani karcinogen i hepatotoksin. *A. nidulans* i *A.versicolor* ne mogu metabolizirati sterigmatocistin u O-metilsterigmatocistin koji je direktni prekursor aflatoksina pa tvari kontaminirane tim vrstama sadrže visoke razine sterigmatocistina. S druge strane, tvari koje kontaminiraju *A.flavus* i *A.parasiticus* imaju niske razine sterigmatocistina jer je većina konvertirana u aflatoksine (Sweeney i Dobson, 1998; Rank i sur., 2011).

Izoliran je još 1954., ali mu je biološka aktivnost otkrivena tek kasnih 60-tih godina prošloga stoljeća (Terao, 1983).

Sterigmatocistin se kao kontaminant pojavljuje u cijelom nizu živežnih namirnica za ljude te hrane za životinje: kruh, sir, pšenica, riža, zrna kave, ječam, uljana repica, kikiriki, kukuruz itd. (Veršilovskis i De Saeger, 2010). Proizvodnja mikotoksina za određenu vrstu plijesni ovisi o uvjetima okoliša od kojih su najvažnije temperatura i relativna vlažnost stoga kontaminacija

hrane može nastupiti u različito vrijeme: prije žetve ili češće tijekom skladištenja, sukladno preferiranim uvjetima za rast pojedinih plijesni proizvođača sterigmatocistina (Nielsen, 2003).

U slučaju kontaminacije krmiva ili prehrambenih namirnica, dolazi do oralnog unosa sterigmatocistina u ljudski organizam. Međutim, vrlo je značajan i unos konidija plijesni sa stergimatocistinom preko dišnog sustava. Plijesan *Aspergillus versicolor* koja je glavni proizvođač ovog sekundarnog metabolita vrlo se često nalazi u prostorijama koje su oštećene vlagom. Ima sposobnost rasta na podlogama vrlo siromašnim nutrijentima kao što su beton i gips (Nielsen, 2003) i tako predstavlja opasnost za ljude koji borave u takvim prostorijama.



Slika 1. Strukturna formula sterigmatocistina

Molekula sterigmatocistina policiklički je aromatski sustav, sastoji se od ksantonskog prstena fuzioniranog s dihidrodifuranskim prstenom. Od supstituenata ima hidroksilnu i metoksi skupinu. Molekulska masa mu je 324.288 g mol^{-1}, a sažeta molekulska formula $C_{18}H_{22}O_6$ (http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/). Strukturna kemijska formula prikazana je na Slici 1. Kristalizira u obliku žutih kristala koji su dobro topljivi u metanolu, etanolu, acetonitrilu, benzenu i kloroformu. Točka tališta mu je 246ºC (Veršilovskis i de Saeger, 2010).

Prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) sterigmatocistin spada u skupinu 2B karcinogena što znači da je potencijalni karcinogen za ljude obzirom da dokazi za karcinogenezu kod ljudi ne postoje (IARC,

2002). Dokazana je njegova akutna toksičnost na pokusnim životinjama, ali je *in vivo* relativno niska: 10-100 puta manja u odnosu na aflatoksin B1 nakon oralne primjene na štakorima i majmunima. Uzrok leži u slabijoj apsorpciji sterigmatocistina nakon oralne primjene zbog veće lipofilnosti u odnosu na aflatoksin B1 (Veršilovskis i De Saeger, 2010; Terao, 1983). Međutim, na sustavima *in vitro* gdje je mikotoksin u direktnom kontaktu sa stanicama pokazana je jednaka toksičnost sterigmatocistina kao i kod aflatoksina B1 (Terao, 1983). Ciljni organ za karcinogenezu kod štakora bila je jetra, a kod miševa pluća i krvne kapilare. Također, pokazana je citotoksičnost sterigmatocistina u relativno niskim koncentracijama na humanim stanicama A549 te THP-1 stanicama sličnim makrofagima. To predstavlja visok rizik za ljude koji su kronično izloženi takvim koncentracijama u radnom ili životnom okruženju (Jakšić Despot i sur., 2016).

Uvjet za ostvarivanje toksičnog učinka sterigmatocistina njegova je metabolička aktivacija enzimima citokrom P450 u jetri. Tako nastaje epoksid koji djeluje kao mutagen kovalentno se vežući na molekulu DNA preko N^7 gvanina (Essigmann i sur., 1979). *In vivo* istraživanja na mišjim mononuklearnim stanicama periferne krvi i peritonealnim makrofagima pokazala su negativne imunomodulirajuće učinke sterigmatocistina. Depresija aktivnosti limfocita i cijelog obrambenog sustava domaćina nastupila je zbog smanjene ekspresije i sekrecije važnih proinflamatornih citokina kao što su TNF-α, interleukini 6 i 12 (Zhang i sur., 2012).

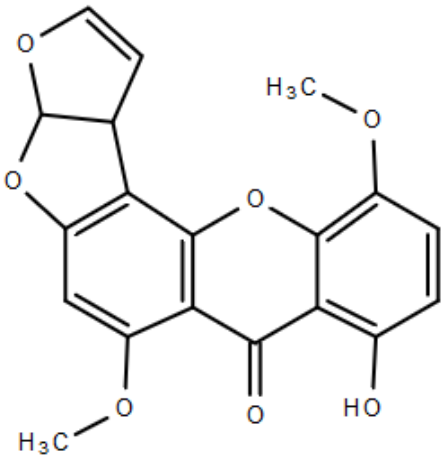
Budući da je sterigmatocistin teško ukloniti jednom kad je proizveden, naglasak je na mjerama prevencije same kontaminacije. Tu spada čuvanje poljoprivrednih proizvoda na nižoj temperaturi te sušenje kako bi se spriječio razvoj plijesni tijekom skladištenja (www.famic.go.jp).

Europska agencija za sigurnost hrane (*European Food Safety Authority*, EFSA) 2013. godine objavila je znanstveno mišljenje o rizicima koje sterigmatocistin predstavlja za zdravlje ljudi i životinja povezano s njegovom prisutnošću u hrani za ljude i životinje. U analiziranim uzorcima LC-MS metodom nisu pronađene značajnije količine sterigmatocistina, štoviše u većini uzoraka bio je ispod granice detekcije ili ispod granice kvantifikacije. Također, zaključeno je da bi trebalo intenzivnije pratiti izloženost ovom mikotoksinu kako bi se prikupilo više podataka na temelju kojih bi se mogao donijeti relevantan zaključak o rizicima koje on predstavlja (EFSA, 2013).

Još je važno spomenuti da ne postoji internacionalna legislativa o maksimalnim dozvoljenim količinama sterigmatocistina u hrani te su stoga potrebna daljnja istraživanja kojima bi se to odredilo (Veršilovskis i De Saeger, 2010).

1.3 5-metoksisterigmatocistin

Derivat sterigmatocistina s metoksi skupinom u položaju 5 također je važan zbog svojih toksičnih svojstava. Struktura mu je prikazana na Slici 2. Kao i sterigmatocistin i aflatoksin B1, on u svojoj strukturi sadrži furofuranski prsten koji je nakon metaboličke aktivacije odgovoran za ispoljavanje toksičnih učinaka, jednakim mehanizmom vezanja na molekulu DNA.



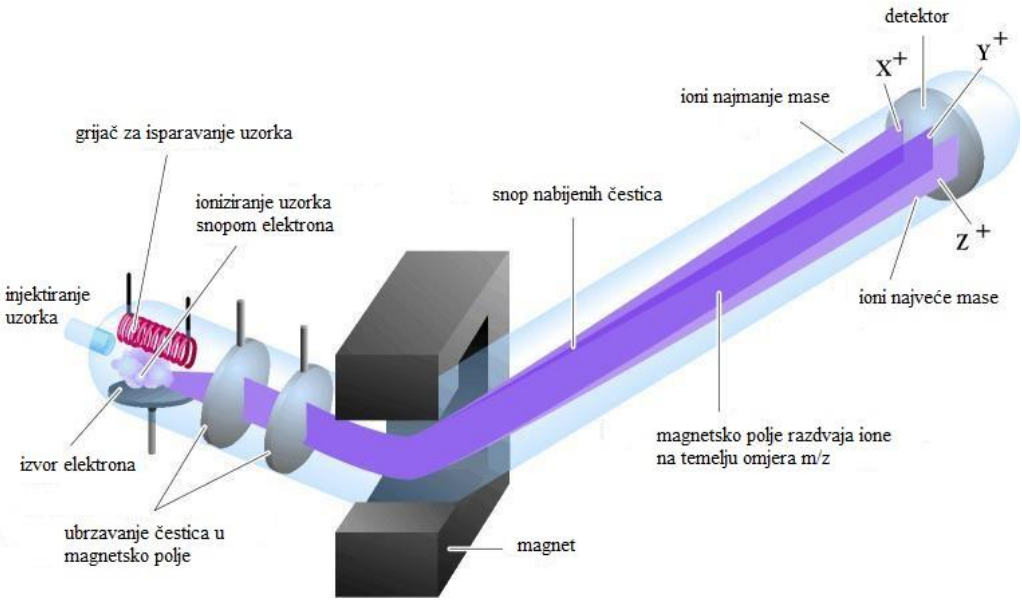
Slika 2. Strukturna formula 5-metoksisterigmatocistina

1.4 Masena spektrometrija

Masena spektrometrija kao analitička tehnika danas je nezaobilazna u suvremenim laboratorijima za istraživanje i razvoj lijekova. Riječ je o vrlo specifičnoj tehnici za određivanje strukture i potvrđivanje identiteta kemijskih spojeva, odnosno lijekova i sirovina za njihovu

proizvodnju (Watson, 1999). Isprva je korištena samo u kvalitativnoj analizi, međutim danas se jednako tako primjenjuje i u kvantitativnoj analizi (Balogh, 2009). U istraživačkim laboratorijima masena spektrometrija uglavnom se nalazi u sklopu vezanog sustava s nekom od kromatografskih tehnika. Takva spregnuta tehnika karakterizirana je visokom selektivnosti, osjetljivosti i niskom granicom detekcije (Nigović, 2015). Ona se stoga primjenjuje za identifikaciju i strukturnu karakterizaciju tragova onečišćenja u lijekovima i gotovim ljekovitim oblicima te za određivanje koncentracije lijeka u biološkim tekućinama kao i njegovih metabolita i njihove strukturne karakterizacije (Watson, 1999; Sertić, 2013). Posebno važno mjesto masena spektrometrija zauzima i u istraživanjima na području proteomike, bilo kao zasebna tehnika, bilo u vezanim sustavima s tekućinskim kromatografom, odnosno kapilarnom elektroforezom (Cindrić i sur, 2009). Analiza molekula poput proteina, peptida i oligonukleotida moguća je zahvaljujući razvoju novih ionizacijskih tehnika kojima su se nadišla ograničenja klasičnih tehnika (Mornar i sur, 2013; Balogh, 2009).

Iako postoji mnogo izvedbi, osnovni princip rada svakog masenog spektrometra je da razdvaja molekule koje su ionizirane na temelju razlike u njihovom omjeru mase i naboja (*m/z*).



Slika 3. Princip rada masenog spektrometra (izvor: http://www.mhhe.com)

Instrument se sastoji od tri osnovna dijela, a to su redom ionizator, analizator masa i detektor. Nakon unosa uzorka u maseni spektrometar, u visokom vakuumu ili neposredno prije ulaza u visoki vakuum, dolazi do ionizacije molekula samog analita. Pritom on postaje pozitivno ili negativno nabijen. Prilikom ionizacije može doći i do fragmentacije molekule u dva ili više fragmenata. Zatim u analizatoru dolazi do razdvajanja iona nastalih u plinovitoj fazi s obzirom na omjer *m/z* djelovanjem magnetskog ili električnog polja kako bi se odredila masa molekule, odnosno mase nastalih fragmenata. Detekcija se vrši pomoću elektronskog pojačala ili scintilacijskog brojača (Mornar, 2013; Sertić, 2013; Watson, 1999). Signal se obrađuje i registrira računalnim sustavom koji ih prikazuje grafički u obliku spektra masa koji pokazuje relativnu zastupljenost različitih ionskih vrsta kao funkciju omjera mase i naboja *m/z* (Nigović, 2015).

Postoje mnogi različiti tipovi ionizacijskih tehnika, dakle različitih vrsta ionizatora, a jednako tako i više vrsta analizatora koji su dostupni na tržištu. Razlikuju se prema načinu rada, cijeni, selektivnosti, osjetljivosti, preciznosti, razlučivanju i naravno, namjeni. Ono što je važno jest da nisu svi ionizatori kompatibilni sa svim tipovima analizatora (Mornar i sur., 2013; Sertić, 2013). Različiti analizatori zahtijevaju različite ionizacijske izvore kao i različite detektore iona. Oni se odabiru ovisno o vrstama analize, a one mogu biti jednostavne analize određenog iona ili kvalitativne i kvantitativne analize kompleksnih smjesa (Cindrić i sur., 2009). Važno je je li analiza usmjerena na identifikaciju nepoznatih spojeva, određivanje strukture onečišćenja ili određivanje sadržaja analita u niskim koncentracijama. Pored tipa analize koja se provodi, važno je i kakva se točno vrsta rezultata očekuje, vrsta analita koji se analizira i njegova fizikalno-kemijska svojstva, kako bi se mogla odabrati adekvatna oprema.

Ionizacija analita može se provesti na nekoliko načina, a svi se oni dijele u dvije velike skupine tehnika na temelju toga koliko energije predaju molekuli analita. Tako postoje tzv. *blage* ionizacijske tehnike (engl. *soft ionization*) kojima se predaje manje energije, a koriste se kada je potrebno dobiti prvenstveno signal molekulskog iona te opsežna fragmentacija nije poželjna. Nasuprot ovoj skupini stoje tzv. *čvrste* ionizacijske tehnike (engl. *hard ionization)* koje analitu predaju veće količine energije, dolazi do opsežne fragmentacije i stoga su korisne u slučajevima kada je potrebno razjasniti strukturu određene molekule. Dakle o tipu ionizatora ovisi stupanj, način i vrsta pucanja kemijskih veza u molekuli analita, odnosno nastajanje različitih fragmenata. (Mornar i sur., 2013; Sertić, 2013). Ovo su neke od danas najčešće korištenih ionizacijskih

tehnika: kemijska ionizacija (engl. *Chemical Ionization*, CI), kemijska ionizaciju pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric-Pressure Chemical Ionization*, APCI), ionizacija fotonima pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Photo Ionization*, APPI), matriksom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI), ionizacija bombardiranjem brzim atomima (engl. *Fast Atom Bombardment*, FAB), ionizacija termoraspršenjem (engl. *Thermospray*) te ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionization*, ESI).

Ionizacija elektroraspršenjem zahvaljujući svojim karakteristikama najčešće se koristi u spregnutim sustavima tekućinske kromatografije i masene spektrometrije. Tehnika spada u skupinu mekih ionizacijskih tehnika, a postupak se odvija pri atmosferskom tlaku. Pogodna je za analizu malih polarnih molekula, koje ne moraju biti hlapljive, ali jednako je tako primjenjiva i za velike molekule poput proteina i peptida. Tijekom postupka uzorak se ne izlaže zagrijavanju pa je ovo tehnika kojom se mogu ionizirati i termolabilne tvari. Ioni koji nastaju mogu biti pozitivnog ili negativnog naboja i oni ovisno o kemijskoj strukturi analita, to jest broju kemijskih skupina koje se mogu ionizirati, mogu biti jednostruko ili višestruko ionizirani.

Analit otopljen u pokretnoj fazi dolazi s kromatografske kolone HPLC-a preko uske kapilare. Kraj kapilare (igla) na visokom je električnom potencijalu koji iznosi 2 – 5 kV i tako ujedno predstavlja elektrodu. Pod utjecajem spomenutog električnog polja dolazi do raspršenja tekuće faze s uzorkom u fini aerosol sitnih nabijenih kapljica. Raspršivanje i ionizacija događa se pri atmosferskom tlaku u struji vrućeg plina (Cindrić i sur., 2009). Otapalo otparava pod utjecajem plina za sušenje dušika, temperature i električnog potencijala te se kapljice posljedično postupno smanjuju. Tako se nabijene molekule analita pomalo nalaze sve bliže površini kapljica. U trenutku kada se kapljice toliko smanje da se svi ioni nađu na površini, a kulonske sile odbijanja među istovrsnim nabojima prevladaju sile površinske napetosti, kapljice se rasprsnu u manje kapljice ili ostaju samo pojedinačne ionizirane molekule koje prelaze u plinovitu fazu. One potom ulaze u visoki vakuum masenog spektrometra i analizator slijedeći gradijent električnog potencijala i tlaka (Mornar i sur., 2013, Cindrić i sur., 2009).

Brzina protoka mobilne faze kojim se analit dovodi s kolone tekućinskog kromatograma može biti i do 1 ml/min, međutim optimalno uklanjanje pokretne faze i sama ionizacije postiže se pri brzinama manjima od 0,2 ml/min (Watson, 1999).

Prednost ove tehnike ionizacije svakako se nalazi u tome da analitu predaje vrlo malo energije čime je pogodna i za ionizaciju labilnih biomolekula kao što su proteini. Zatim, kompatibilna je sa svim vrstama analizatora te se jednostavno može povezati s tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti ili kapilarnom elektroforezom.

Ograničenje ionizacije elektroraspršenjem jest osjetljivost na pufere, inkompatibilnost s nepolarnim otapalima i nemogućnost ionizacije nepolarnih analita.

Analizatori koji se najčešće koriste u masenoj spektrometriji su kvadrupolni analizator (engl. *Quadropole*), analizator vremena leta (engl. *Time of Flight*, TOF), zatim tandemska masena spektrometrija (MS/MS) te stupica za ione (engl. *Ion Trap*). Određene vrste tandemske masene spektrometrije omogućuju dodatnu fragmentaciju iona te mogu snimati MS^2 spektre, dok stupica za ione može vršiti analizu do MS^n.

Stupica za ione vrlo je često korišteni analizator u masenoj spektrometriji. Kada ioni generirani u ionizatoru dospiju u stupicu za ione, oni bivaju zadržani unutar trodimenzionalnog električnog polja koje se nalazi u vakuumu. Najčešća izvedba ovog analizatora je ona u kojoj do zadržavanja iona dolazi u prostoru koji je okružen dvjema kružnim i dvjema polukružnim elektrodama. Ioni koji se nalaze u stupici osciliraju sve dok se zbog promjene napona iz stupice ne izbace, a potom dolaze do detektora. Tu se otvara mogućnost određeni molekulski ion od interesa zadržati u stupici, a sve ostale ukloniti. Taj izolirani ion zatim se uz pomoć helija može fragmentirati, a nastali fragmenti ponovno selektivno zadržati u stupici i dalje fragmentirati. Na ovaj način moguće je provoditi MS^n analize, odnosno dobiti više strukturnih informacija iz samo jedne analize (Sertić, 2013; Balogh, 2009).

Poput klasične tandemske masene spektrometrije može provoditi sekvencijske analize, ali razlika je u tome da se fragmentacija ovdje događa u istom prostoru kao i izolacija ciljanog iona. MS/MS sastoji se od više kvadrupolnih analizatora u jednom instrumentu te se izolacija ciljanog iona i njegova fragmentacija odvijaju razdvojeno. Može se reći da se kod stupice za ione fragmentacija odvija u vremenu, a kod tandemske spektrometrije u prostoru (Balogh, 2009).

Zahvaljujući mogućnosti provođenja sekvencijske analize, uz pomoć ionske stupice može se na jednostavan i brz način rasvijetliti kemijska struktura kompleksnih molekula u prisutnosti

matriksa. Također, vrlo je pogodna za analizu spojeva u tragovima (npr. onečišćenja u lijekovima) jer se u stupici može selektivno zadržati ciljani analit, a ioni matriksa izbaciti.

Pored brojnih prednosti masene spektrometrije do izražaja dolaze i njeni nedostaci kao visoko sofisticirane analitičke tehnike. Sam uređaj je vrlo skup, a rukovanje njime zahtijeva posebno obrazovanog stručnjaka (Nigović, 2015).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Sterigmatocistin je mikotoksin, odnosno toksični sekundarni metabolit plijesni. Proizvode ga mnoge vrste filamentoznih gljivica, a najznačajniji proizvođači su *Aspergillus versicolor* i *Aspergilllus nidulans*. Sterigmatocistin i njegov 5-metoksi derivat potencijalni su kontaminanti hrane biljnog podrijetla, a njihovi se metaboliti mogu naći i u hrani animalnog podrijetla. Međutim, zbog njegove relativno slabe oralne bioraspoloživosti i činjenice da su njihovi proizvođači učestali u zraku unutarnjih i vanjskih prostora, veću važnost treba pridati inhalacijskom putu unosa konidija koje sadrže mikotoksin. Rizična mjesta kontaminacije stoga su prostorije oštećene vlagom jer su to izrazito povoljna mjesta za rast plijesni *A.versicolor.*

Interes istraživača pobudili su na temelju strukturne sličnosti s dokazanim humanim karcinogenom – aflatoksinom B1. Svi oni sadrže furofuranski prsten koji je odgovoran za njihove toksične učinke. Međunarodna agencija za istraživanje raka je sterigmatocistin svrstala u 2B skupinu karcinogena na temelju dokaza o njegovim toksičnim učincima na životinjama. Također je u *in vitro* istraživanjima pokazao značajan toksični potencijal.

Praćenje razina sterigmatocistina i njegova derivata 5-metoksisterigmatocistina vrlo je važno zbog zdravstvenog rizika koji predstavljaju za zdravlje ljudi i životinja te zbog ekonomskih razloga. Stoga je važno razvijati osjetljive, selektivne i brze metode za njihovu detekciju i kvantifikaciju. LC-MS tehnika dovoljno je osjetljiva, specifična i selektivna metoda koja omogućava rutinsku analizu sterigmatocistina u uzorcima. Za njegovu analizu u uzorcima hrane postoji mnogo razvijenih pouzdanih i točnih metoda. Cilj ovog rada je prilagoditi LC-MS metodu za osjetljivu i brzu istovremenu analizu sterigmatocistina i njegovog derivata 5-metoksisterigmatocistina u ekstraktima plijesni proizvođača izoliranih iz zraka.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Kemikalije

Standardne supstancije

- sterigmatocistin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- 5-metoksisterigmatocistin (Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada)

Plinovi

- dušik (Messer Group, Sulzbach, Njemačka)
- helij (Messer Group, Sulzbach, Njemačka)

Otapala

- acetonitril (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- metanol (J.T. Baker)
- ultračista voda (Labconco, Kansas City, MI, SAD)

Uzorci

- ekstrakt plijesni proizvođača izoliranih iz zraka

3.1.2 Radni instrumenti

- ultrazvučna kupelj (Elma, Singen, Njemačka)
- 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

- Bočice za uzorkovanje 2,0 mL sustavom za tekućinsku kromatografiju (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Celulozni nitratni membranski filteri veličine pora 0,45 μm (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- Eppendorf tubica 1,5 ml (Eppendorf, Hauppauge, SAD)
- Generator dušika NM30LA (PEAK Scientific, Renfrewshire, Velika Britanija)
- Kolona za tekućinsku kromatografiju Symmetry C18 dimenzija 150 mm x 4,6 mm, veličina čestica 3,5 μm (Waters, Milford, SAD)
- 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, CA, SAD)
- LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

3.2 Analitičke metode

3.2.1 Priprema mobilne faze

Mobilna faza pripremljena je od dva eluenta, gdje je eluent A bio metanol čistoće za tekućinsku kromatografiju, a eluent B pročišćena voda. Budući da se radi o razvoju gradijentne metode, korištena su tri različita gradijentna programa s različitim udjelima metanola i vode. Mobilna faza profiltrirana je pomoću staklenog sustava za filtriranje mobilnih faza.

3.2.2 Priprema standardnih otopina

Standardne otopine sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina kupljene su kao pripremljene otopine standardnog spoja u acetonitrilu gdje je koncentracija pojedinog spoja bila 50 µg/mL.

3.2.3 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 -20ºC.

3.2.4 Uvjeti analize uzoraka

Identifikacija sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina provedena je na tekućinskom kromatografu Agilent 1100, pri čemu je korištena Symmetry C18 kolona obrnutih faza, dimenzija 150 mm x 4,6 mm i veličine čestica 3,5 µm. Temperatura kolone iznosila je 35°C. Korištena je gradijentna metoda eluacije (Tablica 1), a brzina protoka mobilne faze bila je 1 ml/min. Detekcija je vršena primjenom detektora s nizom dioda (*engl. Diode array detector,* DAD) na valnoj duljini 330 nm.

Tablica 1. Binarni gradijentni program HPLC-DAD-MS^n metode za analizu sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina

Vrijeme (min)	*Udio eluenta A (%)*	*Udio eluenta B (%)*
0	52	48
$0 \rightarrow 4$	52	48
$4 \rightarrow 20$	90	10
$20 \rightarrow 22$	52	48
$22 \rightarrow 27$	90	10

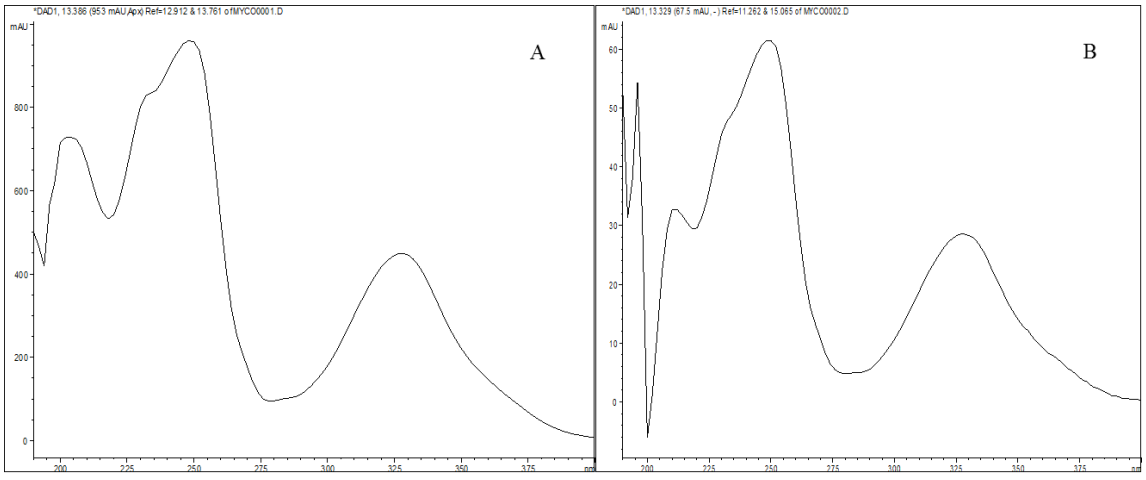
Strukturna karakterizacija provedena je masenim spektrometrom koji se sastojao od elektrosprej ionizatora i analizatora stupice za ione. Analiza se provodila koristeći elektrosprej ionizaciju u pozitivnom načinu snimanja. Temperatura izvora iona iznosila je 325°C, a napon na kapilari 3,5 kV. Kao plin za sušenje koristio se dušik pri protoku 6,0 L/min i pri tlaku 10,0 psi. Spektar snimanja masa iona bio je isprva u rasponu *m/z* od 100 do 800, a zatim smanjen na od 100 do 500. Kao plin za koliziju korišten je helij. Broj iona zadržanih u analizatoru iznosio je 10 000, a zadržavani su do 200 ms.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Optimizacija gradijenta

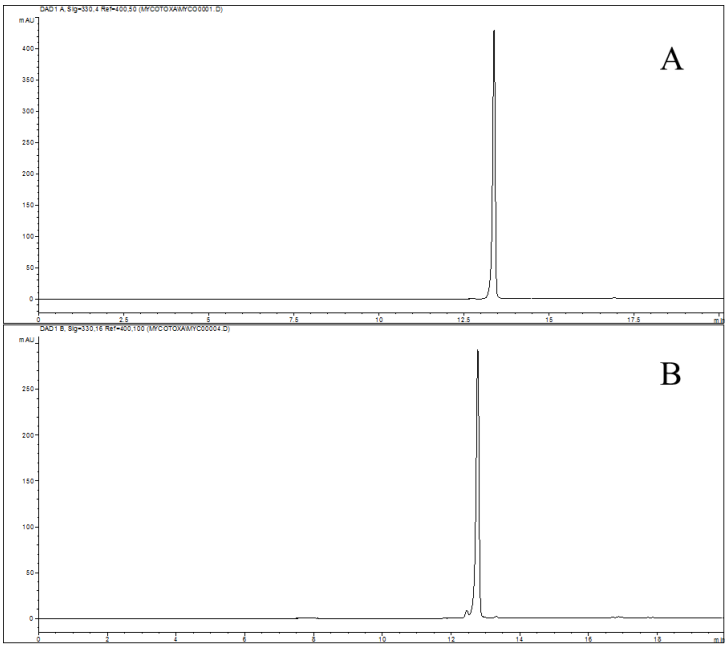
Iako postoji više razvijenih LC/MS metoda za analizu sterigmatocistina u različitim uzorcima hrane, od kojih su mnoge razvijene za istovremenu analizu i nekih drugih mikotoksina, dostupno je malo metoda za istovremenu analizu sterigmatocistina i njegovog 5-metoksi derivata u ekstraktima. Ovaj derivat u posljednje vrijeme sve više dobiva na važnosti te je važno razviti pouzdane metode za njegovu identifikaciju. Budući da su koncentracije mikotoksina koje se trebaju detektirati u uzorcima relativno niske, maseni spektrometar je detektor izbora upravo zbog svoje osjetljivosti i selektivnosti.

Na početku rada snimljeni su UV-Vis spektri oba spoja DAD-detektorom kako bi se odabrala valna duljina snimanja kromatograma. Iz usporedbe na Slici 4 vidljivo je kako su im apsorpcijski maksimumi vrlo slični te su identificirani kao 254 nm i 330 nm. U ovom radu odabrana valna duljina snimanja je 330 nm.



Slika 4. UV-Vis spektri (A) sterigmatocistina i (B) 5-metoksisterigmatocistina.

Kako bi se pronašao optimalan gradijentni program, prvo su snimljeni pojedinačni kromatogrami standarda sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina kako bi se ustanovilo njihovo vrijeme zadržavanja. Mobilna faza sastojala se od metanola kao eluenta A i visokopročišćene vode kao eluenta B. Brzina protoka mobilne faze podešena je na 1 ml/min. Za početne uvjete eluacije odabran je sljedeći gradijentni program: prvih 6 min eluacija ide pod stalnim uvjetima od 48% eluenta B, zatim se do 14. min njegov udio smanjuje do 10% i taj udio se drži sljedećih 11 min da bi se tijekom zadnjih 14 min vratio na 48%. Pri ovim uvjetima tako je ustanovljeno da 5-metoksisterigmatocistin s kolone eluira prije sterigmatocistina. Vremena zadržavanja redom su im 12,777 i 13,386 min. Snimljeni kromatogrami prikazani su na Slici 5.



Slika 5. UV/Vis kromatogram (A) sterigmatocistina i (B) 5-metoksisterigmatocistina. *Uvjeti analize: Symmetry kolona C18 4,6x150mm, 3,5 µm, temperatura kolone 35 ºC, mobilna faza A: metanol, B: voda; brzina protoka 1,0 ml/min; gradijent: 0-6 min 48% B, 6-14 min 48 → 10% B, 14-25 min 10% B, 25-26 min 10 → 48% B, 26-40 min 48% B. Valna duljina detekcije 330 nm.*

.

U početku, u preliminarnim ispitivanjima, metoda je trajala 40 minuta kako bi se utvrdilo vrijeme zadržavanja pojedinih analita. Nakon toga, trajanje metode skraćeno je prvo na 25 minuta, a zatim na 27 minuta jer se tako postavlja dodatna sigurnost da se sve iz uzorka eluira s kolone, iako oba analita eluiraju puno ranije.

Nakon toga, mijenjani su uvjeti gradijentne eluacije kako bi se odredili optimalni uvjeti u kojima će faktor razlučivanja biti najveći, a trajanje analize najkraće. Tako su postavljeni uvjeti za prvi gradijent bili sljedeći: prvih 6 min udio eluenta B bio je 48%, u sljedećih 12 min spušta se na 10%, zatim se tijekom 2 min vraća na početni udio te tijekom zadnjih 5 min ponovno pada na 10%. Vrijeme zadržavanja 5-metoksi derivata sterigmatocistina bilo je 13,794 min, a samog sterigmatocistina 14,550 min te je postignuto razlučivanje R_s=3,5.

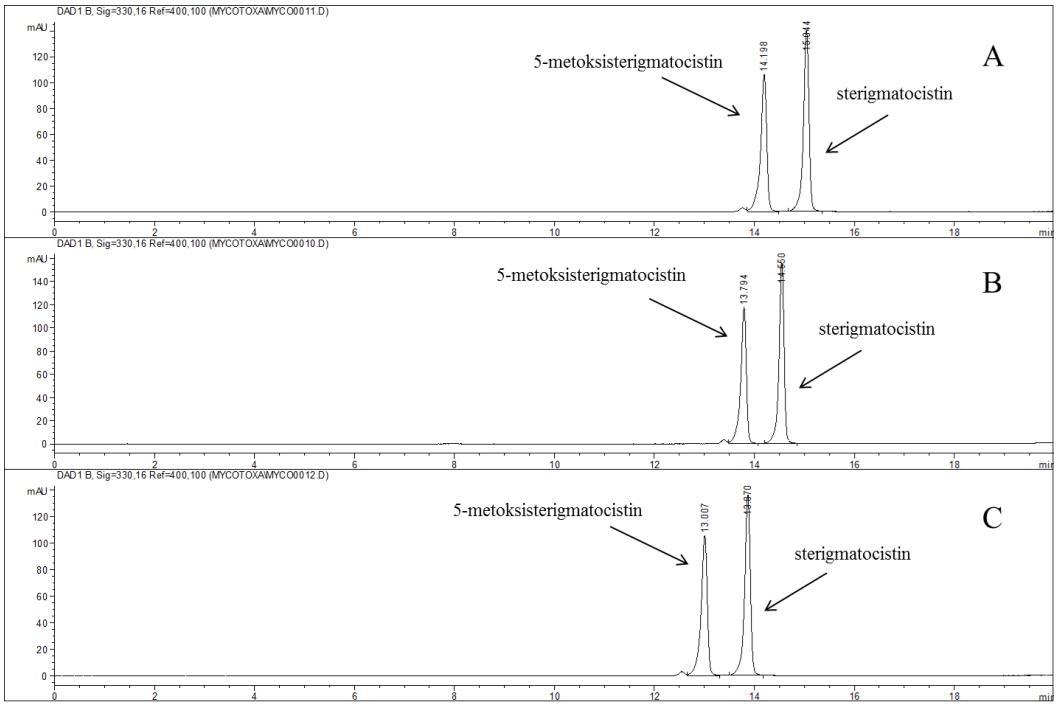
U sljedećem programu nakon početnih 6 min izokratne eluacije s 48% eluenta B, smanjenje njegovog udjela na 10% produljeno je na 14 min. Nakon toga, tijekom 2 min udio mu se povećava na 48% te tijekom zadnje 3 min smanjuje na 10%. U ovom slučaju vremena zadržavanja su se povećala na 14,198 min za 5-metoksisterigmatocistin i 15,044 min za sterigmatocistin. Uz to, povećao se i faktor razlučivanja koji ovdje iznosi 4,0.

Ispitan je još i gradijent gdje početno izokratno eluiranje s 48% eluenta B traje 4 min, a njegovo smanjivanje do 10% narednih 16 min. Potom se tijekom 2 min udio vraća na početnu vrijednost da bi se posljednjih 5 min ponovno spuštala na 10%. U ovom je slučaju faktor razlučivanja jednake vrijednosti kao i u prethodnom gradijentnom programu. Međutim, vremena zadržavanja analita nešto su kraća i iznose 13,007 min za 5-metoksisterigmatocistin te 13,870 min za sterigmatocistin.

Na temelju ovih podataka, treći gradijentni program odabran je kao optimalan zbog visokog razlučivanja uz najkraća vremena zadržavanja analita. Shema ovog gradijenta prikazana je u Tablici 1. u poglavlju 3.2.4.

Tablica 2. Usporedba vremena zadržavanja i faktora razlučivanja sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina za tri različita gradijentna programa.

Gradijentni program	$t_{R\ (sterigmatocistin)}$ / min	$t_{R\ (5\text{-}metoksisterigmatocistin)}$ / min	R_s
A	15,044	14,198	3,5
B	14,550	13,794	4,0
C	13,870	13,007	4,0



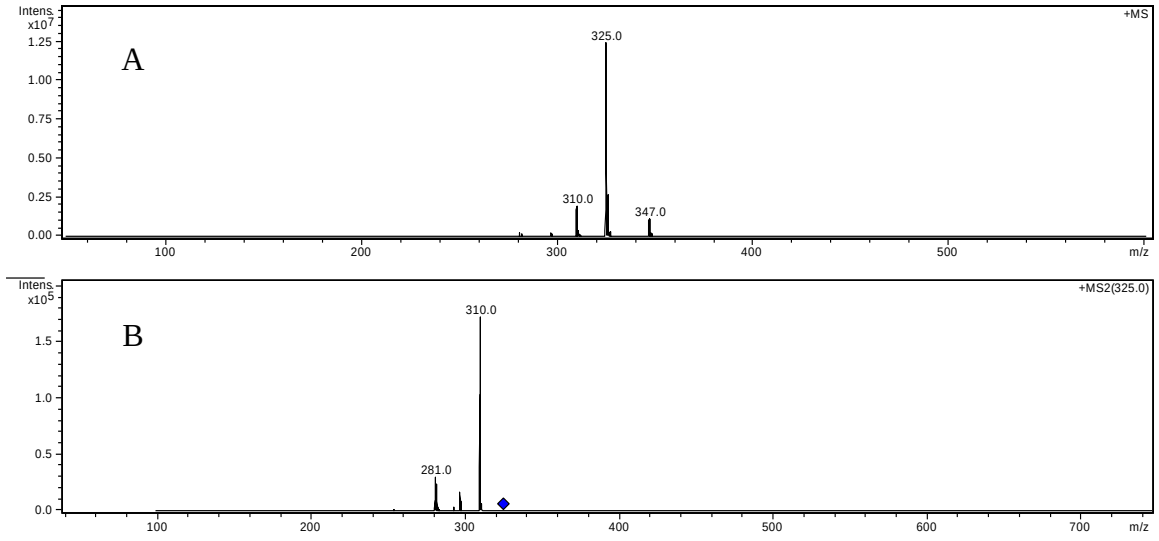
Slika 6. UV/Vis kromatogrami 5-metoksisterigmatocistina i sterigmatocistina.
Uvjeti analize: Symmetry kolona C18 4,6x150mm, 3,5 µm, temperatura kolone 35 °C, mobilna faza A: metanol, B: voda; brzina protoka 1,0 ml/min, valna duljina detekcije 330 nm.
Gradijent: (A) 0-6 min 48% B, 6-18 min 48 → 10% B, 18-20 min 10% → 48% B, 20-25 min 48 → 10% B. (B) 0-6 min 48% B, 6-20 min 48 → 10% B, 20-22 min 10% → 48% B, 22-25 min 48 → 10% B. (C) 0-4 min 48% B, 4-20 min 48 → 10% B, 20-22 min 10% → 48% B, 22-27 min 48 → 10% B.

4.2 Strukturna karakterizacija analita masenom spektrometrijom

Strukturna karakterizacija sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina masenom spektrometrijom provedena je elektrosprej ionizacijom u pozitivnom načinu snimanja. Cilj je identificirati karakteristične fragmente za pojedini analit na temelju kojih bi se mogla vršiti potvrda njihovog identiteta tijekom analize uzoraka. Uporaba analizatora stupice iona vrlo je pogodna u ovom slučaju jer osim dobivanja spektra molekulskog iona, omogućava i daljnju fragmentaciju molekulskog iona i nastalih fragmenata.

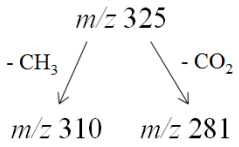
4.2.1 Sterigmatocistin

MS spektar sterigmatocistina pokazuje protonirani molekulski ion $[M+H]^+$ pri *m/z* 325 koji je očekivano najvećeg intenziteta. Uz njega su još vidljivi aduktor s natrijem $[M+Na]^+$ pri *m/z* 347 te nastali fragmentni ion pri *m/z* 310. Zatim je snimljen ESI-MS^2 spektar molekulskog iona pri *m/z* 325. Ondje se ističe fragment *m/z* 310 koji je bio vidljiv i na MS spektru, samo što je ovdje on dominantni ion. Uz njega se još pojavio jedan fragment manjeg intenziteta pri *m/z* 281. Ovi spektri prikazani su na Slici 7.



Slika 7. MS spektar sterigmatocistina te ESI-MS^2 spektar njegovog molekulskog iona *m/z* 325.

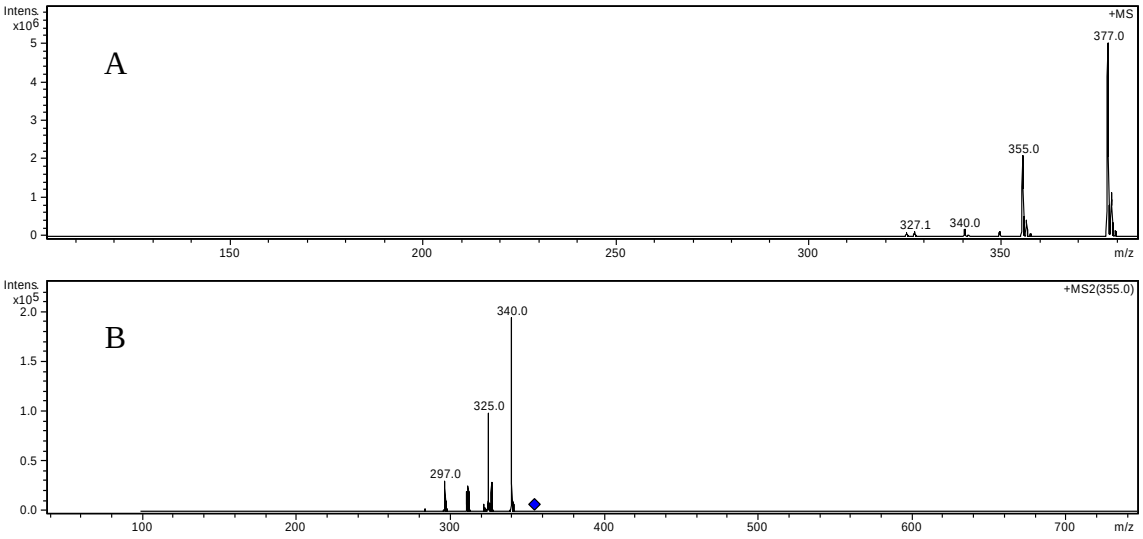
Glavni fragmentni ion *m/z* 310 nastao je eliminacijom fragmenta mase 15 Da iz molekulskog iona *m/z* 325, a ta razlika odgovara gubitku metilne skupine. Drugi nastali fragmentni ion *m/z* 281 manjeg je intenziteta, a nastao je gubitkom mase od 44 Da što upućuje na dekarboksilaciju. Predložena fragmentacijska shema prikazana je na Slici 8.



Slika 8. Predložena fragmentacijska shema sterigmatocistina

4.2.2 5-metoksisterigmatocistin

Snimljen je i maseni spektar standarda 5-metoksisterigmatocistina. Kao i u slučaju sterigmatocistina, ionizacijom je nastao protonirani molekulski ion $[M+H]^+$ pri *m/z* 355 te aduktor s natrijem $[M+Na]^+$ pri *m/z* 377.



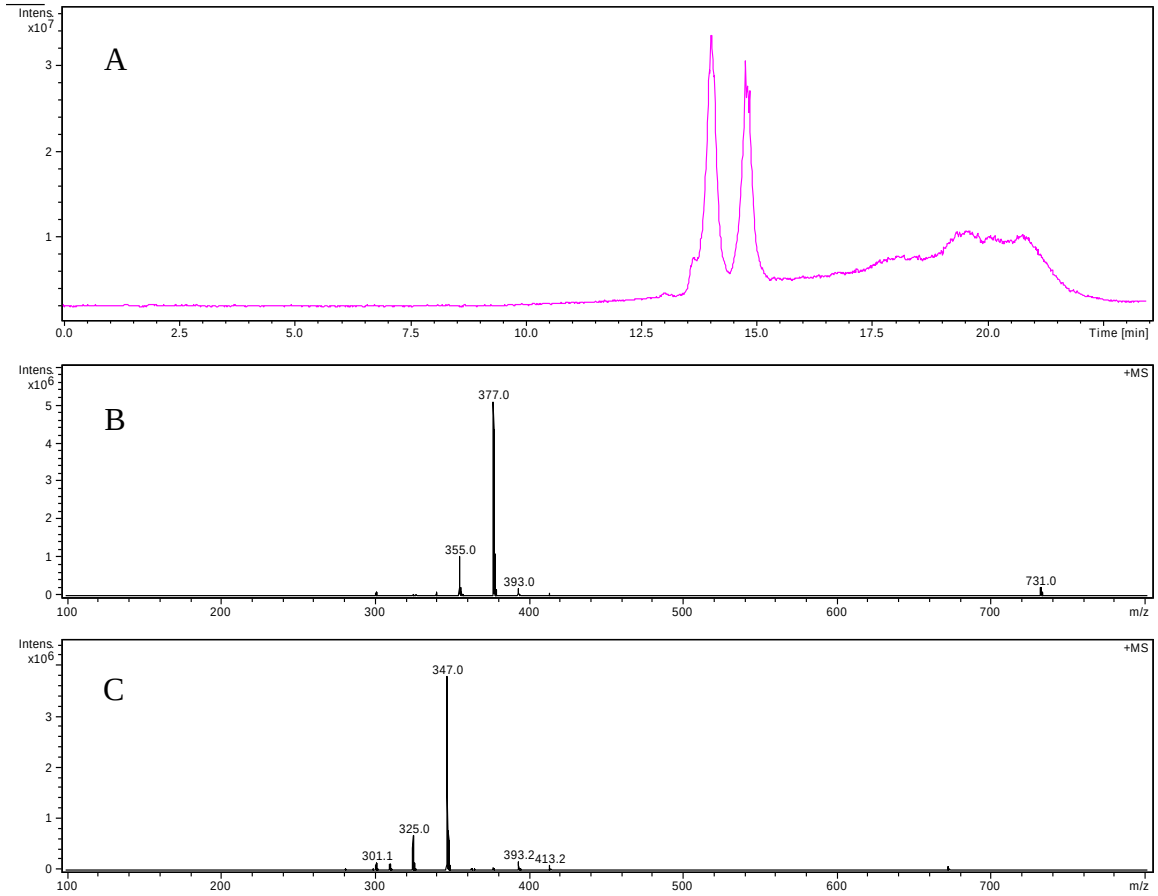
Slika 9. MS spektar 5-metoksisterigmatocistina (A) te ESI-MS^2 spektar njegovog molekulskog iona *m/z* 355 (B)

Međutim, ovdje je aduktor s natrijem ion najvećeg intenziteta. Također, vidljiva su i dva fragmentna iona vrlo malog intenziteta pri *m/z* 340 i 327. Na MS^2 spektru molekulskog iona, vidljiv je dominantan fragment *m/z* 340 ta dva manjeg intenziteta *m/z* 325 i 297. Ovi su spektri prikazani na Slici 9. Fragmentacijom molekulskog iona dobiven je fragmentni ion *m/z* 340, a razlika u masi od 15 Da nastala je odcjepljivanjem metilne skupine.

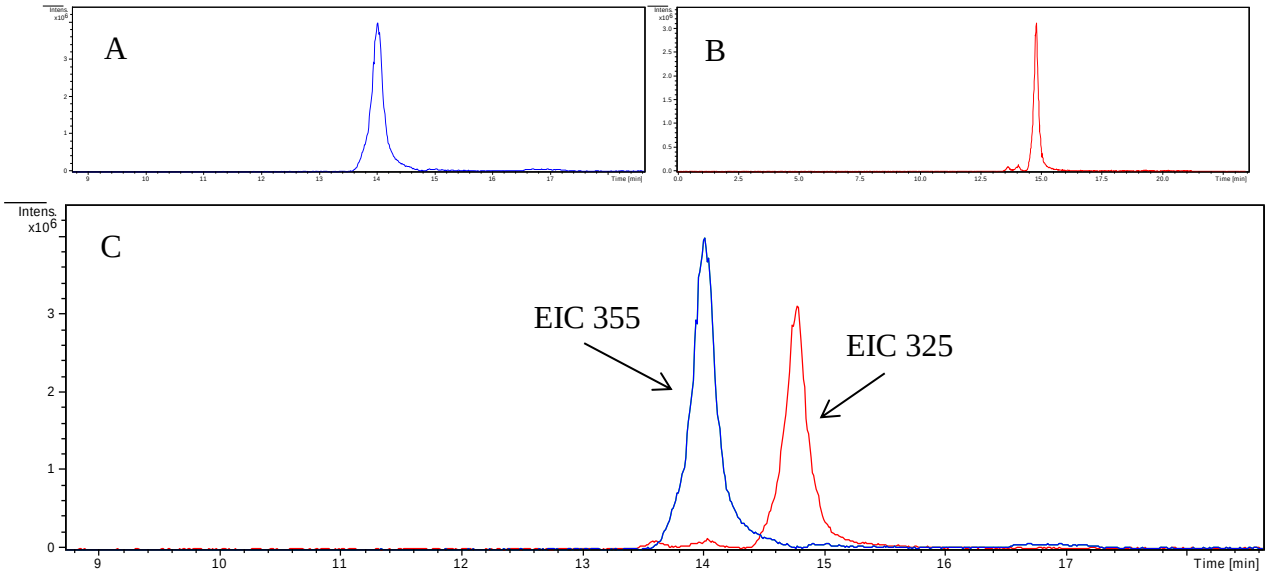
4.3 Potvrda identiteta analita masenom spektrometrijom

Masenom spektrometrijom može se dobiti karakteristični kromatogram toka ukupnih iona (engl. *total ion chromatogram,* TIC) na temelju kojeg se dobiva opća slika svih analita u uzorku. Međutim, u takvom kromatogramu često nije postignuto zadovoljavajuće razlučivanje, odnosno ne postoji bazna separacija pikova. Ovdje se nalazi velika prednost masene spektrometrije jer ona u tom slučaju nudi odlično rješenje. Naime, radi se o mogućnosti snimanja kromatograma izoliranih iona (engl. *extracted ion chromatogram,* EIC) kada se posebno izdvaja kromatogram pojedinog iona od interesa. Na taj način nije nužno osigurati potpuno razdvajanje pikova da bi se osigurala kvantifikacija analita.

Tako je i ovdje nakon snimanja kromatograma toka ukupnih iona smjese standarda sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina vidljivo da njihovi pikovi nisu potpuno razdvojeni na baznoj liniji (Slika 10). Međutim, prvo je potrebno utvrditi koji pik pripada kojem analitu; stoga su analizirani fragmenti u dobivenim MS spektrima. Prvi pik imao je dominantne ione pri *m/z* 355 i 377 na temelju čega je zaključeno da se radi o 5-metoksisterigmatocistinu jer su upravo to ioni koji pripadaju protoniranom molekulskom ionu, odnosno aduktoru s natrijem. MS spektar drugog pika sadržavao je pak ione karakteristične za sterigmatocistin, a to su *m/z* 325 i 347 gdje je prvi protonirani molekulski ion, a drugi aduktor s natrijem. Kromatogrami izoliranih molekulskih iona *m/z* 355 i 325 preko kojih je moguće vršiti kvantifikaciju analita prikazani su na Slici 11.



Slika 10. TIC kromatogram smjese standarda sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina (A). MS spektri prvog pika (B) i drugog pika (C).

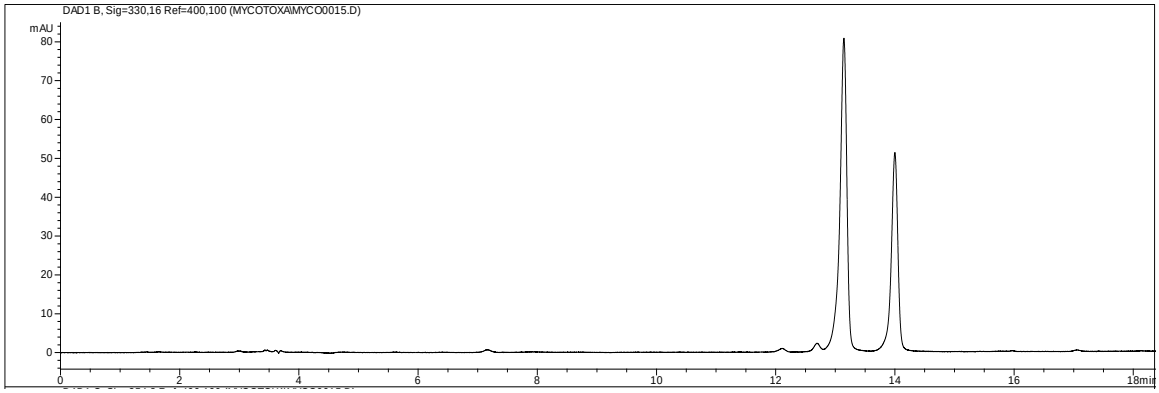


Slika 11. Kromatogrami izoliranih iona EIC (355) (A), EIC (325) i EIC (355 i 325) (C).

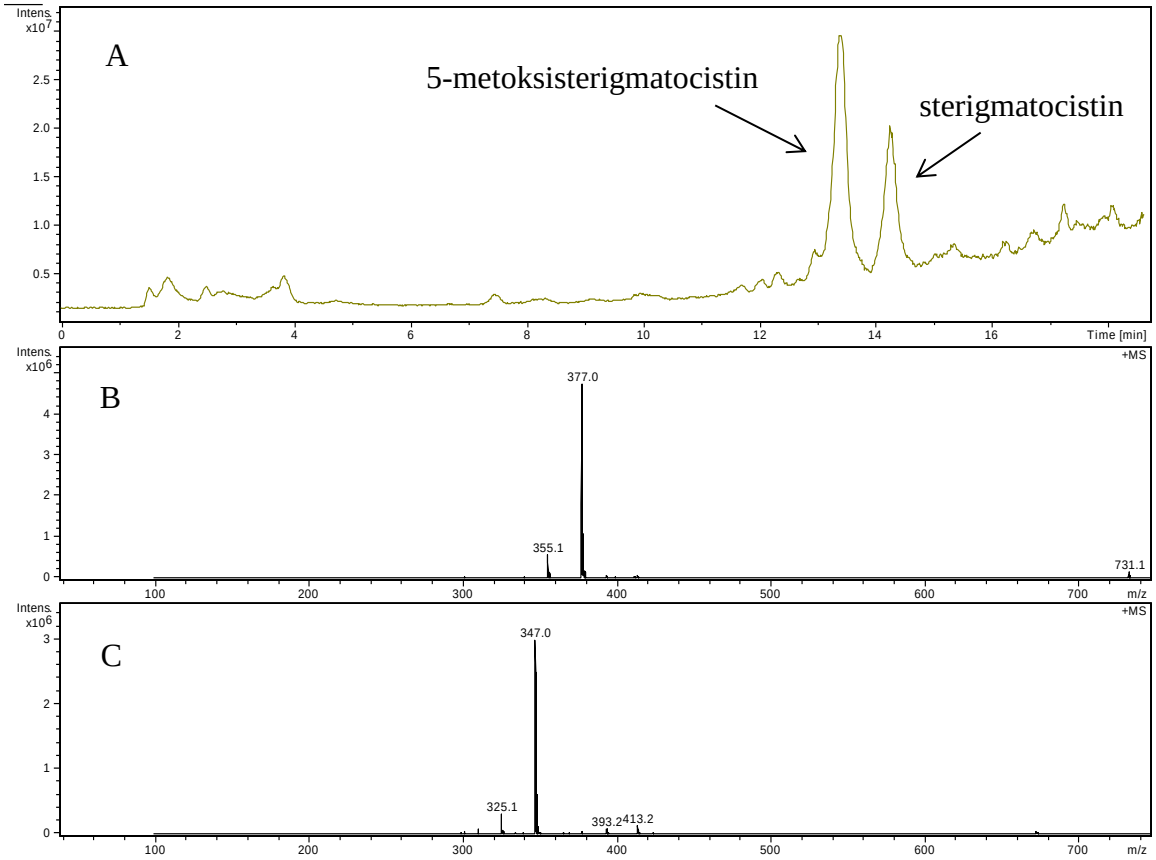
4.4 Analiza uzoraka

Prije primjene metode na uzorak, najprije je provjereno ima li matriks uzorka značajan utjecaj na rezultate. Zato je pripremljen uzorak u koji je dodan standard analita poznate koncentracije, odnosno sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina, da bi se osigurala njihova prisutnost u uzorku koja je iznad granice detekcije. Nakon separacije analita na HPLC-u, snimljen je TIC kromatogram na kojem se vide pikovi oba analita. Snimanjem masenog spektra prvog pika očekuju se ioni s omjerima *m/z* karakterističnim za 5-metoksisterigmatocistin. Snimljeni spektar to i potvrđuje jer su dobiveni ioni s *m/z* 377 i 355 koji pripadaju njegovom aduktoru s natrijem i protoniranom molekulskom ionu. Vidljiv je još jedan ion *m/z* 731, međutim on je vrlo malog intenziteta. Isto je učinjeno i za drugi pik za koji se pretpostavlja da pripada sterigmatocistinu što potvrđuje i njegov MS spektar. Dominantni ioni su *m/z* 347 i 325 koji predstavljaju aduktor s natrijem te protonirani molekulski ion sterigmatocistina. Vidljivi su još ioni *m/z* 393 i 413 koji su veoma slabog intenziteta. Iz ovoga se zaključuje da matriks u danima uvjetima analize nema značajnog utjecaja na rezultate, odnosno metoda je dovoljno selektivna.

Ovdje je zanimljivo primijetiti da u masenim spektrima nisu dominantni protonirani molekulski ioni $[M+H]^+$, nego su to aduktori analita s natrijem $[M+Na]^+$.

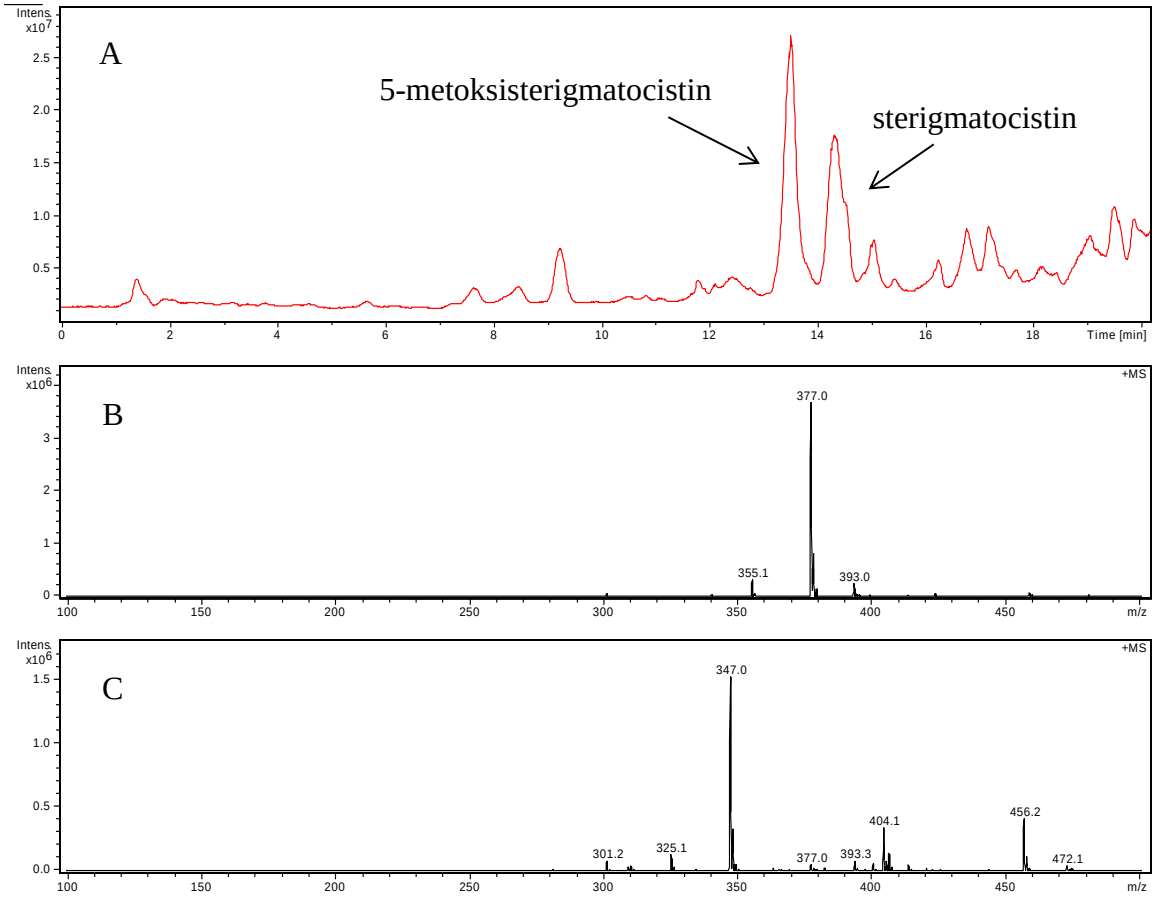


Slika 12. Uv/Vis kromatogram uzorka u koji su dodani standdardi analita poznate koncentracije. *Uvjeti analize: Symmetry kolona C18 4,6x150mm, 3,5 µm, temperatura kolone 35 ºC, mobilna faza A: metanol, B: voda; brzina protoka 1,0 ml/min, valna duljina detekcije 330 nm. Gradijent: 0-4 min 48% B, 4-20 min 48 → 10% B, 20-22 min 10% → 48% B, 22-27 min 48 → 10% B.*



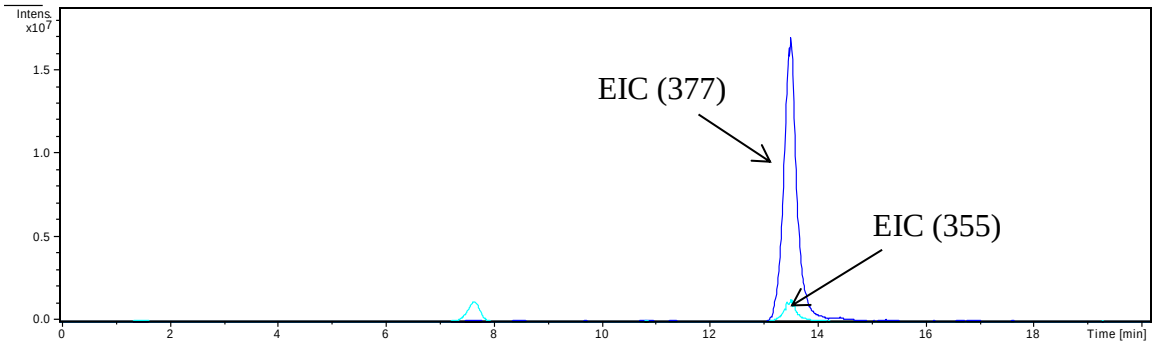
Slika 13. TIC kromatogram uzorka u koji su dodani standardi sterigmatocistina i 5-metoksistergimatocistina (A). Maseni spektri prvog (B) i drugog velikog pika (C).

Nakon provjeravanja utjecaja matriksa uz pomoć masenog detektora, metoda je primijenjena i na uzorku. Kao i u prethodnom slučaju, iz kromatograma ukupnog toka iona potvrđen je identitet analita snimanjem masenih spektara. Na temelju već spominjanih iona karakterističnih omjera *m/z* za pojedini analit utvrđeno je koji pik pripada sterigmatocistinu, a koji 5-metoksisterigmatocistinu. Međutim, njihovi pikovi nisu bili razdvojeni na baznoj liniji te je stoga precizna kvantifikacija nemoguća (Slika 14). Stoga je ovdje iskorištena mogućnost analize kromatograma izoliranih iona.

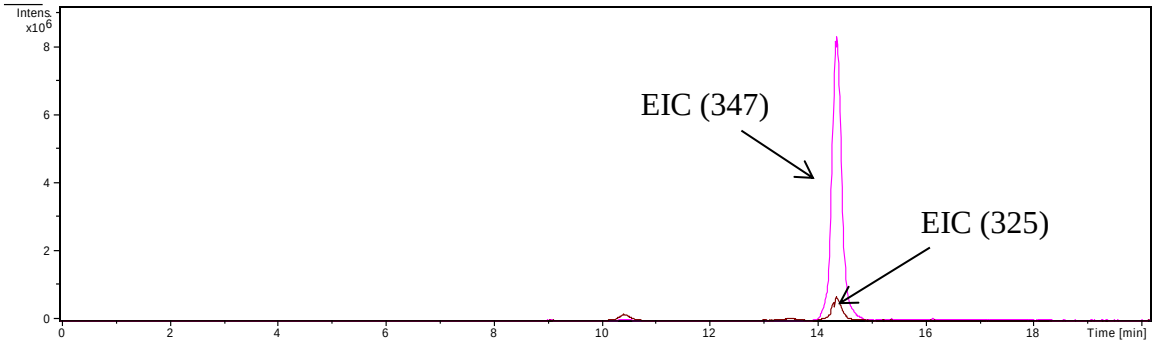


Slika 14. TIC kromatogram uzorka (A). Maseni spektri prvog (B) i drugog velikog pika (C).

Tako su za 5-metoksisterigmatocistin odabrani ioni za koje je snimljen kromatogram izoliranog iona bili *m/z* 377 i 355. Zajedno su prikazani na Slici 15. Za sterigmatocistin su to bili ioni *m/z* 347 i 325 (Slika 16).



Slika 15. EIC kromatogram iona *m/z* 377 i 355 (5-metoksisterigmatocistin).



Slika 16. EIC kromatogram iona *m/z* 347 i 325 (sterigmatocistin).

Na ovaj način moguće je sa sigurnošću utvrditi identitet analita, sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina, u uzorku ekstrakta plijesni proizvođača izoliranih iz zraka. Također je moguće i kvantitativno određivanje ovih analita, što će biti predmet daljnjih istraživanja. Predložena HPLC-DAD-MS metoda prikladna je za istovremenu analizu sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina.

5. ZAKLJUČCI

Tijekom optimizacije LC-MS metode za analizu sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina u esktraktima plijesni izoliranih iz zraka ispitivani su različiti gradijentni programi kako bi se postiglo zadovoljavajuće razdvajanje analita uz prihvatljivo trajanje metode. Rješenje koje ovaj rad predlaže je: 0-6 min 48% B, 6-14 min 48 → 10% B, 14-25 min 10% B, 25-26 min 10 → 48% B, 26-40 min 48% B gdje je eluent B visoko pročišćena voda, a A metanol.

Nakon postignute separacije analita, njihova identifikacija provedena je na vrlo osjetljivom masenom detektoru gdje je ionizacija vršena elektrosprej raspršivanjem. Tako su utvrđeni karakteristični molekulski i fragmentni ioni za svaki analit na temelju kojih se oni mogu identificirati u složenim uzorcima. Također, iako nije postignuta separacija analita na baznoj liniji u TIC kromatogramu, kvantifikaciju je moguće provesti iz EIC kromatograma.

Analizom uzorka u koji su dodani standardi analita, utvrđeno je da matriks uzorka nema značajan utjecaj na separaciju analita te je uspješno potvrđen identitet analita.

Na primjeru jednog uzorka pokazana je prikladnost primjene vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije za analizu sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina zahvaljujući separacijskoj moći HPLC-a te visokoj osjetljivosti i selektivnosti MS-a.

6. LITERATURA

1. Balogh MP. Atmospheric Ionization Methods. U: Mass Spectrometry Primer. Milford, Waters, 2009, str. 17-22.
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. EFSA-CONTAM. Scientific opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. *EFSA J*, 2013, 11.
5. Essigmann JM, BArker LJ, Fowler KW, Francisco MA, Reinholdt VN, Wogan GN. Sterigmatocystin-DNA interactions: Identification of a major adduct formed after metabolic activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76, 179-183.
6. Hussein HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 2001, 197, 101-134.
7. IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. International Agency for Research on Cancer. Lyon, IARC Press, 2002.
8. Jakšić Despot D, Kocsubé S, Bencsik O, Kecskeméti A, Szekeres A, Vágvölgyi C, Varga J, Šegvić Klarić M. New sterigmatocystin-producing species of *Aspergillus* section *Versicolores* from indoor air in Croatia. *Mycol Progress*, 2017, 16, 63-72.
9. Jakšić Despot D, Kocsubé S, Bencsik O, Kecskeméti A, Szekeres A, Vágvölgyi C, Varga J, Šegvić Klarić M. Species diversity and cytotoxic potency of airborne sterigmatocystin-producing Aspergilli from the section *Versicolores*. *Science of the Total Environment*, 2016, 562, 296-304.
10. Kifer D. Učinak aflatoksina B1, sterigmatocistina i okratoksina A na otpuštanje citokina u ljudskim keratinocitima. Diplomski rad. Zagreb, 2015.
11. McGraw-Hill Education. http://www.mhhe.com, pristupljeno 5.6.2017.
12. Mornar A, Sertić M, Nigović B. Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda – praktikum. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2013.
13. Nielsen KF. Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genetics and Biology*, 2003, 39, 103-117.

14. Nigović B. Interna skripta za predavanja. Masena spektrometrija, Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, Spregnute tehnike, 2015.
15. PubChem. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/, pristupljeno 30.5.2017.
16. Rabie CJ, Steyn M, van Schalkwyk GC. New species of Aspergillus producing sterigmatocystin. *Appl Environ Microbiol*, 1977, 33, 1023-1025.
17. Rank C, Nielsen KF, Larsen TO, Varga J, Samson RA, Frisvad JC. Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biology*, 2011, 115, 406-420.
18. Sertić M. Nove kapilarnoelektroforetske i kromatografske metode u analitici statina. Doktorski rad. Zagreb, 2013.
19. 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. *Food Science and Nutrition*, 2017, 1549-7852.
20. Sterigmatocystin: description of substance, 2010., www.famic.go.jp, pristupljeno 5.6.2017.
21. Sweeney MJ, Dobson ADW. Mycotoxin production by Aspergillus, Fusarium ad Penicillium species. *Int J Food Microbiol*, 1998, 43, 141-158.
22. Terao K. Sterigmatocystin- a Masked Potent Carcinogenic Mycotoxin. *Toxin Rev*, 1983, 2, 77-110.
23. Veršilovskis A, De Saeger S. Sterigmatocystin: occurrence in foodstuffs and analytical methods- an overview. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54, 136-147.
24. Zhang Y, Yao ZG, Wang J, Xing LX, Xia Y, Zhang XH. Effects of sterigmatocystin on TNF-α, IL-6 and IL-12 expression in murine peripheral blood mononuclear cells and peritoneal macrophages *in vivo. Mol Med Rep*, 2012, 5, 1318-1322.
25. Watson DG. Mass Spectrometry. U: Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists. Edinburgh, Elsevier, 1999, str. 168-193.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Mikotoksini kao toksični sekundarni metaboliti plijesni predstavljaju vrlo značajne kontaminante uzrokujući mikotoksikoze kod ljudi i životinja. Osim ingestijom kontaminirane hrane, vrlo značajan put unosa je i inhalacijom konidija s mikotoksinima. Kod sterigmatocistina ovaj je put izrazito važan jer se njegov glavni proizvođač plijesan *Aspergillus versicolor* vrlo često nalazi u prostorijama koje su oštećene vlagom. Međunarodna agencija za istraživanje raka smješta ga u skupinu 2B karcinogena. Svoj mutageni učinak ostvaruje kovalentnim vezanjem na molekulu DNA nakon metaboličke aktivacije. Njemu sličan metabolit 5-metoksisterigmatocistin također je važan jer ima slične učinke.

Zbog svoje visoke osjetljivost i selektivnosti, za metodu analize odabrana je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti povezana s masenom spektrometrijom. Cilj rada bio je optimizirati uvjete za istovremenu analizu sterigmatocistina i njemu sličnog metabolita 5-metoksisterigmatocistina. Tako je odabran gradijentni program eluacije s najboljim razlučivanjem i najkraćim vremenom analize. Uz pomoć masenog detektora, utvrđeni su karakteristični ioni za pojedini analit na temelju kojih se vršila njihova strukturna karakterizacija te potvrda identiteta u uzorcima. Koristeći kromatogram izoliranih iona pojedinog analita moguća je precizna kvantifikacija analita usprkos tome što u kromatogramu ukupnog toka iona njihovi pikovi nisu bili potpuno razdvojeni. Provjerom utjecaja matriksa na rezultate analize, utvrđeno je da on nije značajan. Predložena HPLC-DAD-MS metoda prikladna je za istovremenu analizu sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina.

Mycotoxins are toxic secondary metabolites of molds, which represent important contaminants because they can cause mycotoxicosis in humans and animals. They enter human body not only by ingestion of contaminated food, but also by inhalation of conidia containing mycotoxins. For sterigmatocystin this pathway is very important since its main producer, mold *Aspergillus versicolor*, is often found in water-damaged rooms. International Agency for Research on Cancer has categorized it as group 2B carcinogen. After metabolic activation it covalently binds the DNA molecule thus expressing its mutagenic effect. Sterigmatocystin-related metabolite 5-methoxysterigmatocystin is also important because it possesses similar properties.

Due to its high sensitivity and selectivity, the technique of choice was high performance liquid chromatography mass spectrometry. The aim of this thesis was to optimize the conditions for the simultaneous analysis of sterigmatocystin and related metabolite 5-methoxysterigmatocystin. The gradient elution program with high resolution and shortest analysis time was chosen. The characteristic ions for the analytes were determined using the MS detector and they were utilized for structural characterization and identity confirmation in samples. Using extracted ion current chromatogram of each analyte precise quantification is possible, although the peaks in total ion current chromatogram were not completely separated. The influence of the sample matrix was tested and the results showed no significant effect. The proposed HPLC-DAD-MS method is appropriate for simultaneous analysis of sterigmatocystin and 5-methoxysterigmatocystin.

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

OPTIMIZACIJA HPLC-DAD-MS METODE ZA NALIZU STERIGMATOCISTINA I 5-METOKSISTERIGMATOCISTINA

Monika Popčević

SAŽETAK

Mikotoksini kao toksični sekundarni metaboliti plijesni predstavljaju vrlo značajne kontaminante uzrokujući mikotoksikoze kod ljudi i životinja. Osim ingestijom kontaminirane hrane, vrlo značajan put unosa je i inhalacijom konidija s mikotoksinima. Kod sterigmatocistina ovaj je put izrazito važan jer se njegov glavni proizvođač plijesan *Aspergillus versicolor* vrlo često nalazi u prostorijama koje su oštećene vlagom. Međunarodna agencija za istraživanje raka smješta ga u skupinu 2B karcinogena. Svoj mutageni učinak ostvaruje kovalentnim vezanjem na molekulu DNA nakon metaboličke aktivacije. Njemu sličan metabolit 5-metoksisterigmatocistin također je važan jer ima slične učinke.

Zbog svoje visoke osjetljivost i selektivnosti, za metodu analize odabrana je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti povezana s masenom spektrometrijom. Cilj rada bio je optimizirati uvjete za istovremenu analizu sterigmatocistina i njemu sličnog metabolita 5-metoksisterigmatocistina. Tako je odabran gradijentni program eluacije s najboljim razlučivanjem i najkraćim vremenom analize. Uz pomoć masenog detektora, utvrđeni su karakteristični ioni za pojedini analit na temelju kojih se vršila njihova strukturna karakterizacija te potvrda identiteta u uzorcima. Koristeći kromatogram izoliranih iona pojedinog analita moguća je precizna kvantifikacija analita usprkos tome što u kromatogramu ukupnog toka iona njihovi pikovi nisu bili potpuno razdvojeni. Provjerom utjecaja matriksa na rezultate analize, utvrđeno je da on nije značajan. Predložena HPLC-DAD-MS metoda prikladna je za istovremenu analizu sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina.

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

Rad sadrži: 31 stranica, 16 grafičkih prikaza, 2 tablice i 25 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Sterigmatocistin, 5-metoksistergmatocistin, LC-MS

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

Rad prihvaćen: srpanj 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharamacy
Department of of Analytics and Control of Medicines
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

OPTIMIZATION OF HPLC-DAD-MS METHOD FOR THE ANALYSIS OF STERIGMATOCYSTIN AND 5-METHOXYSTERIGMATOCYSTIN

Monika Popčević

SUMMARY

Mycotoxins are toxic secondary metabolites of molds, which represent important contaminants because they can cause mycotoxicosis in humans and animals. They enter human body not only by ingestion of contaminated food, but also by inhalation of conidia containing mycotoxins. For sterigmatocystin this pathway is very important since its main producer, mold *Aspergillus versicolor*, is often found in water-damaged rooms. International Agency for Research on Cancer has categorized it as group 2B carcinogen. After metabolic activation it covalently binds the DNA molecule thus expressing its mutagenic effect. Sterigmatocystin-related metabolite 5-methoxysterigmatocystin is also important because it possesses similar properties.

Due to its high sensitivity and selectivity, the technique of choice was high performance liquid chromatography mass spectrometry. The aim of this thesis was to optimize the conditions for the simultaneous analysis of sterigmatocystin and related metabolite 5-methoxysterigmatocystin. The gradient elution program with high resolution and shortest analysis time was chosen. The characteristic ions for the analytes were determined using the MS detector and they were utilized for structural characterization and identity confirmation in samples. Using extracted ion current chromatogram of each analyte precise quantification is possible, although the peaks in total ion current chromatogram were not completely separated. The influence of the sample matrix was tested and the results showed no significant effect. The proposed HPLC-DAD-MS method is appropriate for simultaneous analysis of sterigmatocystin and 5-methoxysterigmatocystin.

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

Thesis includes: 31 pages, 16 figures, 2 tables and 25 references. Original is in Croatian language.

Keywords: sterigmatocystin, 5-methoxysterigmatocystin, LC-MS

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
Maja Šegvić Klarić, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Anita Hafner, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2017.