

# Ispitivanje prisutnosti sterigmatocistina u pivu metodom tankoslojne kromatografije

---

Šmehil, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:163:291806>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Ana Šmehil

**Ispitivanje prisutnosti sterigmatocistina u pivu  
metodom tankoslojne kromatografije**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Mikrobiologija s parazitologijom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za mikrobiologiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Daniele Jakšić.

*Srdačno se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Danieli Jakšić na stručnom vodstvu, strpljenju i svim savjetima pruženima tijekom izrade ovog diplomskog rada. Također se zahvaljujem svim prijateljima s fakulteta i izvan njega bez kojih ne bih bila tu gdje jesam jer su me uvijek motivirali i poticali da dam sve od sebe. Posebno hvala mom dečku Romanu koji mi je bio velika podrška tijekom cijelog studiranja i hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj ljubavi i potpori.*

## SADRŽAJ

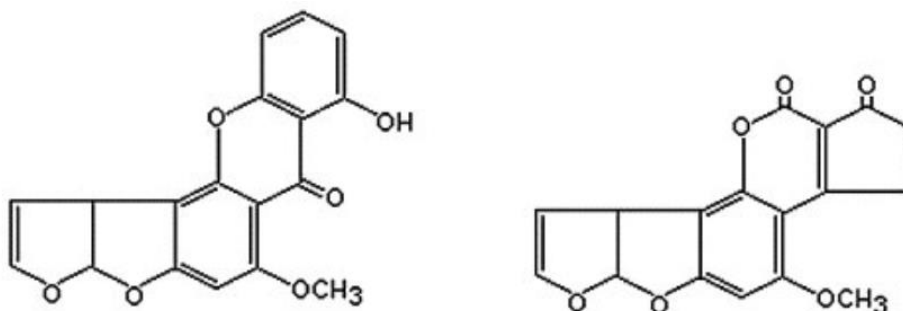
|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD .....  | 1  |
| 1.1. Sterigmatocistin .....  | 1  |
| 1.1.1. Struktura i fizikalno-kemijska svojstva .....   | 1  |
| 1.1.3. Biosinteza .....  | 2  |
| 1.1.4. Analitičke metode za detekciju .....  | 3  |
| 1.2. Značaj STC za ljude .....   | 4  |
| 1.2.1. Toksični učinci .....   | 4  |
| 1.2.2. Zastupljenost STC-producirajućih plijesni u zatvorenim prostorima .....                 | 5  |
| 1.2.3. Pojavnost STC u hrani i piću .....  | 5  |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME .....   | 8  |
| 3. MATERIJALI I METODE .....   | 9  |
| 3.1. MATERIJALI .....  | 9  |
| 3.1.1. Kemikalije .....  | 9  |
| 3.1.2. Radni instrumenti .....   | 9  |
| 3.2. METODE .....  | 9  |
| 3.2.1. Priprema ekstrakata piva .....  | 9  |
| 3.2.2. Ispitivanje prisutnosti STC-a ekstraktima piva metodom tankoslojne kromatografije ..... | 10 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA .....  | 14 |
| 5. ZAKLJUČCI .....   | 18 |
| 6. LITERATURA .....  | 19 |
| 7. SAŽETAK .....   | 23 |
| 8. SUMMARY .....   | 24 |
| 9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD                                   |    |

## 1. UVOD

### 1.1. Sterigmatocistin

#### 1.1.1. Struktura i fizikalno-kemijska svojstva

Sterigmatocistin je poliketidni derivat, mikotoksin molekulske formule  $C_{18}H_{12}O_6$  i molekulske mase 324,28 g/mol. U krutom stanju je kristal svijetlo-žute boje, nalik na iglice. Temperatura tališta mu je 246 °C. Relativno je dobro topljiv u organskim otapalima, kao što su kloroform i benzen, metanol, etanol i acetonitril, a slabije je topljiv u vodenim otopinama. Slabo fluorescira, ali postoje načini kako mu se fluorescencija može pojačati (primjerice izlaganjem visokoj temperaturi kroz kraće vremensko razdoblje ili reakcijom s otopinom aluminijevog klorida), što se onda i primjenjuje kod analitičkih metoda kako bi im se povećala osjetljivost. Maksimalna apsorpcije u UV spektru pokazuje pri valnim duljinama od 245 nm i 325 nm (Septien i sur., 1993; Cox i Cole, 1977). Ovaj mikotoksin dijeli brojne strukturalne i biološke karakteristike s aflatoksinom B1. Aflatoksini i sterigmatocistini su furofuranski metaboliti plijesni. Dok je u strukturi aflatoksina B1 dihidrodifuranski prsten kondenziran s kumarinskim prstenom, kod STC-a je kondenziran sa ksantonskom jezgrom supstituiranom hidroksi- i metoksi- skupinom (Veršilovskis i De Saeger, 2010; Mašek i Šerman, 2006).



**Slika 1.** Usporedba strukture sterigmatocistina (lijevo) i aflatoksina B1 (desno) (preuzeto iz Liu i sur., 2014.)

#### 1.1.2. Proizvođači

Plijesni koje sintetiziraju STC uglavnom su pripadnici roda *Aspergillus*, a glavni proizvođači unutar ovog roda pripadaju sekciji *Nidulantes* seriji *Versicolores*. Većina pripadnika ove sekcije proizvodi STC, ali količina koju sintetiziraju značajno varira ovisno o vrsti. Najučestalije identificirane vrste ove sekcije, a ujedno i vrlo potentni proizvođači STC-a su *A. creber* i *A.*

*jensenii*. Oni proizvode STC u količinama koje su 10-100 puta veće od ostalih vrsta unutar sekcije. (Jakšić i sur., 2017; Jurjević i sur., 2013). Osim plijesni roda *Aspergillus*, STC-producirajuće plijesni su i one iz rodova *Aschersonia*, *Bipolaris*, *Botryotrichum*, *Chaetomium*, *Emericella*, *Farrowia*, *Fusarium*, *Humicola*, *Moelleriella*, *Monocillium*, *Podospora* (Rank i sur., 2011). Različiti čimbenici utječu na tvorbu STC-a od strane STC-producirajućih plijesni. Važan čimbenik za kontrolu sinteze ovog mikotoksina najviše je istražen kod vrste *A. nidulans*. Utvrđeno je da se biosinteza STC-a smanjuje u kiselom pH, dok je optimalna temperatura varijabilna ovisno o vrsti. Primjerice, kod vrste *A. versicolor* STC se optimalno proizvodi na temperaturi 27-29 °C., dok je optimalna temperatura proizvodnje STC-a kod vrsta iz roda *Bipolaris* niža i iznosi 23°C (Rabie i sur., 1976).

### **1.1.3. Biosinteza**

Sterigmatocistin dijeli svoj biosintetski put s najpotentnijim karcinogenim mikotoksinima koji su nam poznati, aflatoksinima (AF) (Zingales i sur., 2020). Konkretno, on je biogeni prekursor aflatoksina B1 (AFB1) i aflatoksina G1 (AFG1) (Caceres i sur., 2020; Peraica i Rašić, 2020). Biosinteza STC-a (i aflatoksina B1) kreće iz acetyl-CoA i malonil-CoA koji zajedno formiraju norsolorinsku kiselinu. Ova se reakcija odvija uz djelovanje enzima norsolorinska kiselina sintaza. Nizom sljedećih reakcija, norsolorinska se kiselina (NOR) prevodi u versikolorin B (VERB), koji je, osim za sintezu STC-a, međuprodukt i za sintezu aflatoksina B2 i aflatoksina G2. Dehidrogenacijom VERB nastaje veriskolorin A (VERA), a njega demetilsterigmatocistin sintaza prevodi u dimetilsterigmatocistin (DMST). Metilacijom slobodne hidroksilne skupine na poziciji 11 uz O-metiltransferazu I i II, iz dimetilsterigmatocistina nastaje sterigmatocistin. Metilacijom i druge slobodne hidroksilne skupine nastaje O-metilsterigmatocistin (OMST), koji se onda prevodi u AFB1 i AFG1 (Steyn i sur., 1980).



kromatografske metode, dok je samo mali broj imunokemijskih metoda za detekciju STC-a uopće i opisan u znanstvenoj literaturi (EFSA, 2013). Imunokemijska metoda koja se može primijeniti je enzimski povezani imunosorbentni test (ELISA). Ova je metoda jednostavna, brza i ekonomski pristupačna, međutim spojevi koji su strukturno slični STC-u, primjerice aflatoksini, mogu davati lažno pozitivne rezultate. Pozitivne je rezultate zato potrebno potvrditi primjenom pouzdanijih metoda (Lešić i sur., 2019). Glavna prednost ove metode je brza analiza velikog broja uzoraka. U literaturi, ELISA metode za detekciju STC-a koje koriste poliklonalna protutijela zahtijevaju njegovu derivatizaciju prije analize. Takva derivatizacija podrazumijeva više laboratorijskog rada i vremena. S druge strane, ELISA metode koje koriste monoklonalna protutijela ne zahtijevaju derivatizaciju, ali zahtijevaju opsežnu pripremu uzorka prije analize (Singh i sur., 2019). Kromatografske metode koje se mogu primijeniti za detekciju i određivanje STC-a uključuju tankoslojnu kromatografiju (TLC), plinsku kromatografiju, tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC) te tekućinsku kromatografiju spregnutu sa spektrometrijom masa (LC-MS) (EFSA, 2013). Zbog jednostavnosti izvedbe te ekonomske pristupačnosti, najčešće se koristi TLC s fluorescentnom detekcijom. S obzirom na slabu nativnu fluorescenciju pod UV svjetlom, kako bi se STC vizualizirao na TLC ploči, uobičajeno se koristi postupak derivatizacije. Najčešći pristup je prskanje TLC ploče otopinom aluminijevog klorida, nakon što se ploča razvije te zagrije na temperaturi od 180 °C. Limiti detekcije (LOD) za ovu metodu u rasponu su od 50-140 µg/kg, što ju svrstava među niskoosjetljive metode. Službeno validirana metoda se također temelji na TLC uz sprejanje otopinom AlCl<sub>3</sub> i ima limit kvantifikacije od 100 µg/kg (EFSA, 2013). Osim potrebe za derivatizacijom i visokog LOD, nedostatak ove metode je ujedno i slaba selektivnost. Sve ovo razlog je tome što se danas TLC uglavnom primjenjuje samo kao kvalitativna orijentacijska metoda za detekciju STC-a. Za precizno kvantitativno određivanje STC-a, koriste se sofisticiranije tehnike, kao što su HPLC i LC-MS, kojima limiti detekcije variraju ovisno o vrsti matriksa, ali mogu biti i do tisuću puta niži nego kod TLC (Lešić i sur., 2019).

## **1.2. Značaj STC za ljude**

### **1.2.1. Toksični učinci**

Osim biosintetskog puta i fizikalno-kemijskih sličnosti, STC s aflatoksinom B1 dijeli i toksična djelovanja. Toksičnost i mutagenost STC-a proučavana je na većem broju različitih laboratorijskih životinja te staničnih kultura (Rašić i sur., 2020; Díaz Nieto i sur., 2018, EFSA, 2013). Do sada još nisu opisani slučajevi akutnog ili kroničnog trovanja ljudi i domaćih



životinja STC-om, ali istraživanja su pokazala da on primarno toksično djeluje na jetru i na bubrege (Peraica i Rašić, 2020). S obzirom na relativno nisku akutnu oralnu toksičnost te značajnu fizikalno-kemijsku sličnost aflatoksinu koji je karcinogen grupe 1 (dokazan karcinogen za ljude) prema IARC-u (IARC, 1993.), većina je istraživanja usmjerena proučavanju njegove mutagenosti i potencijalne kancerogenosti. Kancerogenost STC-a dokazana je na različitim pokusnim životinjama, ali i dalje nema dovoljno dokaza da je karcinogen i za ljude, stoga ga je IARC svrstao u skupinu 2B kancerogena (IARC, 1987).

Mehanizmi mutagenog učinka STC-a proučavani su na bakterijskim stanicama te na stanicama sisavaca i oni prije svega uključuju metaboličku aktivaciju STC-a u spojeve koji zatim formiraju DNA adukte. Ako se DNA adukti ne poprave, povećava se vjerojatnost fiksacije mutacija te nastajanja tumorskih stanica (EFSA, 2013). Metabolička aktivacija podrazumijeva nastajanje reaktivne epoksi skupine ili hidrosilaciju aromatskog prstena i nastajanje katehola. S obzirom na to da je katehol pronađen u mikrosomima jetri kod ljudi i štakora u većoj mjeri nego epoksid, smatra se da je put nastajanja katehola češći (Lešić i sur., 2019) Nadalje, STC u in vivo uvjetima pokazuje citotoksičnost, inhibira stanični ciklus i mitozu te povećava nastajanje reaktivnih kisikovih specija (ROS) i lipidnu peroksidaciju, što također povećava rizik nastajanja karcinoma (Viegas i sur., 2018). STC se povezuje i sa slabljenjem imunskog odgovora te narušavanjem ravnoteže stečenog imunskog sustava (Zingales i sur., 2020).

### **1.2.2. Zastupljenost STC-producirajućih plijesni u zatvorenim prostorima**

Glavni proizvođači STC-a, plijesni roda *Aspergillus*, sekcije *Nidulantes* serije *Versicolores*, okolišni su kontaminanti široko rasprostranjeni diljem svijeta. Detektirani su u različitim uzorcima okoliša, uključujući uzorcima kućne prašine, zraka u zatvorenim prostorima i stambenog materijala unutar vlažnih zgrada (Jakšić i sur., 2016., Jakšić i sur., 2020; Kubosaki i sur., 2020). Plijesni koje spadaju u ovu sekciju također su jedne od najčešćih plijesni koje kontaminiraju sirovu i procesuiranu hranu te ljekovito bilje. Razlog njihove široke rasprostranjenosti je prilagodljivost različitim temperaturama, različitim uvjetima vlažnosti zraka i širokom rasponu aktiviteta vode supstrata koje kontaminiraju (Samson i sur., 2019; Samson i sur., 2014).

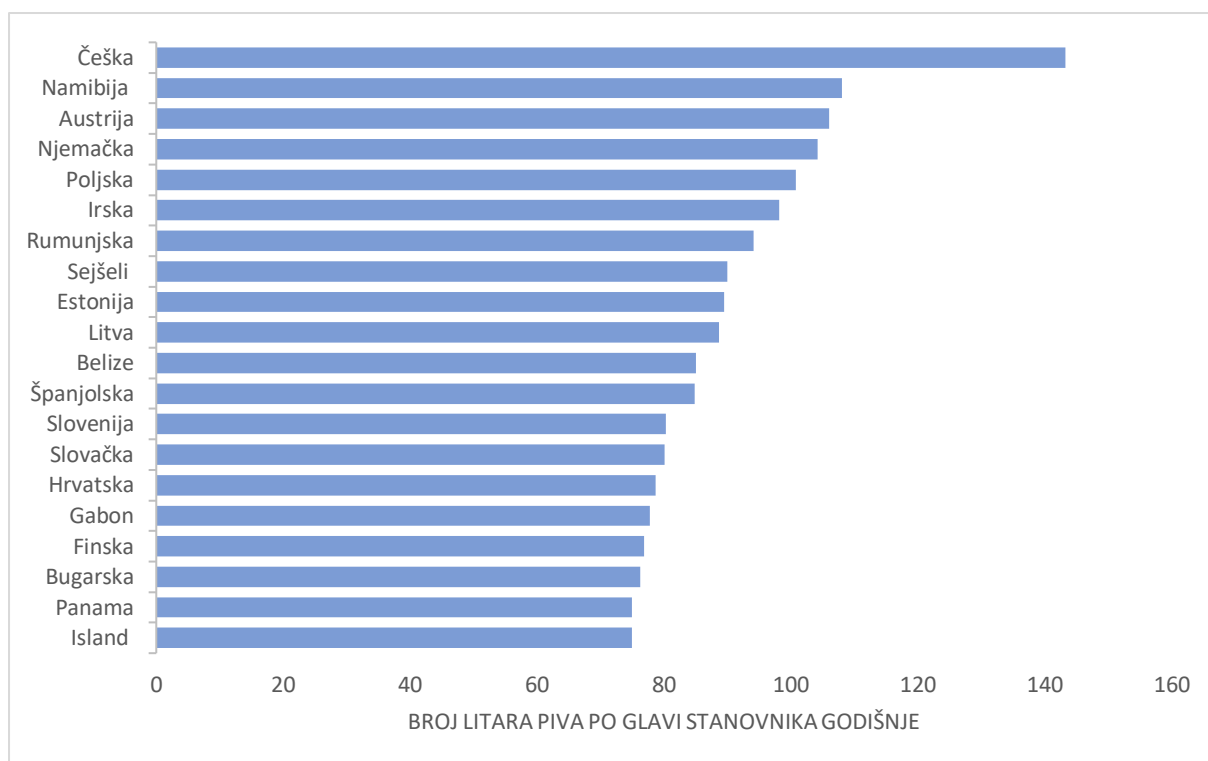
### **1.2.3. Pojavnost STC u hrani i piću**

Kontaminacija STC-om do sada je utvrđena u žitaricama, kao što su pšenica, kukuruz i ječam, u zrnima kave, začinima, orašastim plodovima, u hrani za životinje te u siru i pivu. U pivu se kontaminacija događa osobito u blizini površine, zbog kvarenja plijesni tijekom zrenja i

skladištenja (Kobayashi i sur., 2018; Lu i sur., 2018). *A. versicolor* brzo raste i proizvodi velike količine STC-a u uvjetima visoke vlažnosti zraka (raspona 85% do 90%) i temperature iznad 26°C (Lu i sur., 2018), stoga se glavnim razlogom kontaminacije smatraju loši uvjeti skladištenja.

Iako ima dostupnih podataka o pojavnosti STC-a u hrani za ljude i hrani za životinje, nije mnogo uloženo u kontrolu takvih kontaminacija. Pojedine su zemlje odredile maksimalne dozvoljene količine STC-a u hrani. One u Češkoj i Slovačkoj iznose 5 µg kg<sup>-1</sup> za rižu, povrće, krumpir, brašno, perad, meso i mlijeko te 20 µg kg<sup>-1</sup> za ostalu hranu. Međutim, bitno je spomenuti da su, zbog relativno niskih vrijednosti maksimalnih dozvoljenih količina STC-a u hrani, LOD vrijednosti konvencionalnih metoda prilično nezadovoljavajuće (Stroka i sur., 2004).

Podaci o kontaminaciji piva ovim mikotoksinom vrlo su limitirani. Zadnje istraživanje čiji je cilj bilo utvrđivanje pojavnosti STC-a u uzorcima piva metodom LC/MS provedeno je u Kini 2016. godine i ni u jednom od 101 analiziranog uzorka, nije detektirana prisutnost STC-a (Zhao i sur., 2016). Istraživanja o pojavnosti STC-a u uzorcima piva prikupljenih u Republici Hrvatskoj (RH) do sada nisu provedena. S 80 litara piva godišnje po glavi stanovnika, Hrvatska je po potrošnji ovog alkoholnog pića među prvih petnaest država u svijetu (slika 3). Uzimajući u obzir moguću prisutnost STC u skladištima gdje se čuvaju i sirovine za proizvodnju piva te kontaminaciju ječma plijesnima proizvođačima STC-a, moguće je očekivati STC u krajnjem proizvodu. Kada pojavnosti STC-a pridružimo veliku razinu potrošnje ovog popularnog pića, možemo očekivati nepovoljan učinak na zdravlje izloženih ljudi.



**Slika 3.** Statistički podaci potrošnje piva u Hrvatskoj i u svijetu 2022. godine (podaci preuzeti sa <https://worldpopulationreview.com/>).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Sterigmatocistin je mikotoksin kojeg proizvode različiti rodovi plijesni među kojima su najrasprostranjenije plijesni roda *Aspergillus* iz serije *Versicolores*. Ovaj mikotoksin se zbog svojih toksičnih učinaka svrstava u skupinu 2B kancerogena prema IARC-u. Podaci o kontaminaciji hrane i pića ovim mikotoksinom vrlo su limitirani, ali visoka pojavnost STC-producirajućih plijesni unutar zatvorenih prostora, uključujući prostore u kojima se skladišti hrana i sirovine za njenu proizvodnju, upućuje nas da su takvi skladišni prostori potencijalni izvor kontaminacije sirovina i gotovih proizvoda hrane ovim mikotoksinom. Do sada još nije provedeno istraživanje pojavnosti STC-a u uzorcima piva prikupljenih unutar RH, a općenito je vrlo malo podataka o njegovoj pojavnosti u pivu u svijetu. Stoga su postavljeni ciljevi ovoga rada:

- optimizirati metodu ekstrakcije piva i ispitati njenu primjenjivost za dokazivanje mikotoksina STC-a u pivu
- analizirati uzorke piva različitih proizvođača, prikupljenih u RH na prisustvo mikotoksina STC-a
- procijeniti zdravstvene rizike koji mogu proizići iz konzumacije kontaminiranih proizvoda.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. MATERIJALI**

##### **3.1.1. Kemikalije**

- Sterigmatocistin, STC (Sigma Aldrich, Darmstad, Njemačka)
- Acetonitril p. a. (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- Ledena octena kiselina (Kemig, Zagreb, Hrvatska); radna otopina 1 % v/v u vodi
- Magnezijev sulfat (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev klorid (Kemig, Zagreb, Hrvatska)

##### **3.1.2. Radni instrumenti.**

- Analitička vaga (Kern ABJ, KERN & SOHN GmbH, Balingen, Njemačka)
- Ultrazvučna vodena kupelj
- Termomikser (Eppendorf ThermoMixer® C, Eppendorf, Njemačka)
- Centrifuga (Table top Centrifuge Z 326 K, Hermle, LaborTechnik, Njemačka)
- Kolone Bond Elut Mycotoxin (Bond Elut Mycotoxin, Agilent, Santa Clara, USA)
- Termo-vakuum uparivač (Concentrator Plus, Eppendorf, Njemačka)
- UV komora (UVP EPI CHEMI darkroom, Cambridge Manufacturing Co Ltd., Brakey Road Corby, UK)

#### **3.2. METODE**

##### **3.2.1. Priprema ekstrakata piva**

Za analizu je prikupljeno 100 uzoraka po 50 ml uzorka različitih piva raznih dobavljača (Tablica 1), a ukupno je ispitano 58 uzoraka. Uzorci su do analize čuvani u zamrzivaču na temperaturi od -20 °C. Ekstrakcija STC-a provedena je modifikacijom postupka opisanome u Stroka i sur. (2004.) te prema uputama proizvođača SPE kolone (Bond Elut Mycotoxin, Agilent, Santa Clara, USA). Na dan analize uzorci su temperirani na sobnoj temperaturi, nakon čega su se u epruvete odvojili alikvoti od 5 ml. Alikvoti su zatim degasirani na ultrazvučnoj kupelji tijekom 40 minuta. Nakon degasiranja, u svaku je epruvetu dodano po 5 ml smjese otapala acetonitrila (p. a.) i ledene octene kiseline (1 % v/v) i inkubirano u termomikseru na temperaturi 40 °C (1000 rpm, 10 minuta). Kako bi se razdvojila organska od vode faze u svaku epruvetu dodana je smjesa soli sastava MgSO<sub>4</sub> (2,0 ± 0,1 g) i NaCl (0,50 ± 0,1 g), a uzorci su zatim ponovno inkubirani u termomikseru pod istim uvjetima (40 °C, 1000 rpm, 10 minuta). Nakon centrifugiranja na 3350 g tijekom 10 minuta, na sobnoj temperaturi, 2 ml supernatanta

propušteno je kroz SPE<sup>1</sup> kolonu sa silikatnim ionskim izmjenjivačem (Bond Elut Mycotoxin, Agilent, Santa Clara, USA) brzinom 1-2 kapi/sekundi u polipropilensku mikroepruvetu. Eluati su ukoncentrirani do suha u vakuum uparivaču na 60 °C. Dobro zatvoreni suhi ekstrakti čuvani su u zamrzivaču na -20 °C maksimalno tjedan dana do analize.

### **3.2.2. Ispitivanje prisutnosti STC-a ekstraktima piva metodom tankoslojne kromatografije**

Na dan analize ekstrakti su se temperirali na sobnoj temperaturi, otopili u 150 µl metanola (p.a.) te su se zatim inkubirali u termomikseru 15 minuta, na temperaturi od 40°C i brzini od 1000 rpm. Metanolni ekstrakti potom su centrifugirani (3350 g, 10 minuta) kako bi se istaložile nečistoće, a bistri se nadtalog nanosio na TLC ploče silikagel 60, bez indikatora.

Kao mobilna faza korištena je smjesa otapala toluen:etil-acetat:mravlja kiselina (90% v/v) 5:4:1 v/v/v prema Samson i sur. 2011., a kao standard korištena je otopina STC-a u acetonitrilu (0,002 M). Uzorci su na ploče nanošeni u volumenu od 20 µL, a standard u volumenima od 1-5 µL (0,65-3,25 µg STC/spot). Nakon razvijanja ploča u zatvorenoj komori tijekom 40 minuta, ploče su osušene fenom te ravnomjerno poprskane 80%-tnom otopinom aluminijeva klorida (AlCl<sub>3</sub>) u 60%-tnom etanolu. Ploče su zatim zagrijavane na temperaturi od 130°C tijekom 8 minuta te su se odmah nakon toga promatrale u UV komori pod svjetlošću valne duljine 365 nm.

Kako bi se ispitala primjenjivost opisanog postupka ekstrakcije, odabrana su 3 uzorka piva koji su u početnom koraku ekstrakcije obogaćeni sa matičnom otopinom STC u acetonitrilu (0,002 M) što je odgovaralo 3,45 µg STC-a na TLC ploči. Također je ispitan utjecaj matriksa ekstrakta na detekciju STC-a te je ista matična otopina STC-a u acetonitrilu (0,002 M) dodana u metanolni ekstrakt neposredno prije nanošenja na TLC ploču pri čemu je masa STC-a na ploči bila 8,65 µg. Uzimajući u obzir minimalnu količinu STC na TLC ploči koju je moguće vizualizirati (0,32 µg) te opisani ekstrakcijski protokol pretpostavljeni limit detekcije ove metode je 1,3 µg/mL.

Pod istim uvjetima provedena je i analiza metoksi derivata STC-a, 5-metoksisterigmatocistina (5-MET), ali ti rezultati nisu dio ovog diplomskog rada.

---

1 SPE- engl. solid phase extraction

**Tablica 1. Analizirani uzorci piva**

| Oznaka uzorka | Tip pive   | Vol. % alkohol | Ambalaža |
|---------------|--|----------------|----------|
| 1             | Pasterizirano, lager, svijetlo   | 4,6            | Staklo   |
| 3             | Lager, svijetlo  | 5,0            | Staklo   |
| 8             | Pasterizirano, lager, svijetlo   | 4,6            | Limenka  |
| 11            | Nepasterizirano, nefiltrirano, ale, crno   | 5,4            | Staklo   |
| 12            | Nepasterizirano, nefiltrirano, ale, svijetlo   | 5,5            | Staklo   |
| 14            | Pasterizirano, lager, crno, jako   | 6,0            | Limenka  |
| 15            | Pasterizirano lager svijetlo   | 4,0            | Limenka  |
| 16            | Pasterizirano, lager, crno   | 4,4            | Limenka  |
| 18            | Pasterizirano, svijetlo  | 4,0            | Limenka  |
| 20            | Irsko tamno pivo, Dry stout, craft   | 4,3            | Staklo   |
| 22            | Lager, svijetlo  | 4,4            | Staklo   |
| 34            | Lager, tamno, jako   | 7,5            | Staklo   |
| 35            | Pasterizirano, crno  | 5,0            | Staklo   |
| 36            | Pasterizirano, lager, svijetlo   | 5,0            | Limenka  |
| 37            | Pasterizirano, lager, svijetlo   | 4,0            | Limenka  |
| 38            | Pasterizirano, nefiltrirano, ale, specijalno, svijetlo   | 5,3            | Limenka  |
| 39            | Pasterizirano, bezalkoholno  | 0,0            | Limenka  |
| 40            | Pasterizirano, lager, svijetlo   | 4,5            | Staklo   |
| 41            | Mješavina svijetlog lager piva i osvježavajućeg bezalkoholnog pića od limunovog soka (pasterizirano) | 2,0            | Limenka  |
| 42            | Pasterizirano, lager, svijetlo   | 5,0            | Limenka  |
| 43            | Pasterizirano, lager, svijetlo   | 5,0            | Limenka  |
| 44            | Pasterizirano, pilsner, svijetlo   | 5,0            | Limenka  |

|    |  |     |         |
|----|--|-----|---------|
| 45 | Pasterizirano, lager, svijetlo   | 4,0 | Limenka |
| 46 | Pasterizirano, lager, svijetlo   | 4,0 | Limenka |
| 47 | Svijetlo   | 4,0 | Limenka |
| 48 | Pšenično, svijetlo pivo s finim kvascem-mutno  | 5,3 | Limenka |
| 49 | Pasterizirano, crno  | 5,0 | Limenka |
| 50 | Pasterizirano, lager, crno, jako   | 7,3 | Limenka |
| 51 | Nepasterizirano, nefiltrirano, ale, svijetlo   | 5,1 | Staklo  |
| 52 | IPA (indijsko ale, svijetlo)   | 4,7 | Staklo  |
| 53 | Mutno i nefiltrirano, ale, specijalno, pšenično, svijetlo, s dodatkom kore naranče i korijandera | 5,4 | Staklo  |
| 54 | Tradicionalni wit  | 4,3 | Staklo  |
| 55 | Nepasterizirano i nefiltrirano, ale, mutno, refermentirano, s talogom                            | 6,3 | Staklo  |
| 57 | Pasterizirano, lager, svijetlo   | 5,0 | Limenka |
| 59 | Nepasterizirano, nefiltrirano, pilsner, svijetlo   | 5,0 | Staklo  |
| 61 | Svijetlo, ale  | 3,8 | Staklo  |
| 62 | Svijetlo, ale  | 4,6 | Limenka |
| 63 | Ale s okusom (med)   | 5,0 | Staklo  |
| 64 | Tamno stout s aromom čokolade  | 4,5 | Staklo  |
| 66 | Ale s okusom (banana bread)  | 5,2 | Staklo  |
| 68 | Svijetlo, ale, jako  | 8,0 | Staklo  |
| 69 | Ale, tamno, Rich malty amber   | 4,7 | Staklo  |
| 70 | Kölsch ale, pilsner, svijetlo, craft   | 4,5 | Staklo  |
| 71 | Nepasterizirano, nefiltrirano, blond ale   | 4,1 | Staklo  |
| 73 | Ale, svijetlo  | 4,1 | Staklo  |
| 75 | Jantarno ale   | 4,4 | Limenka |

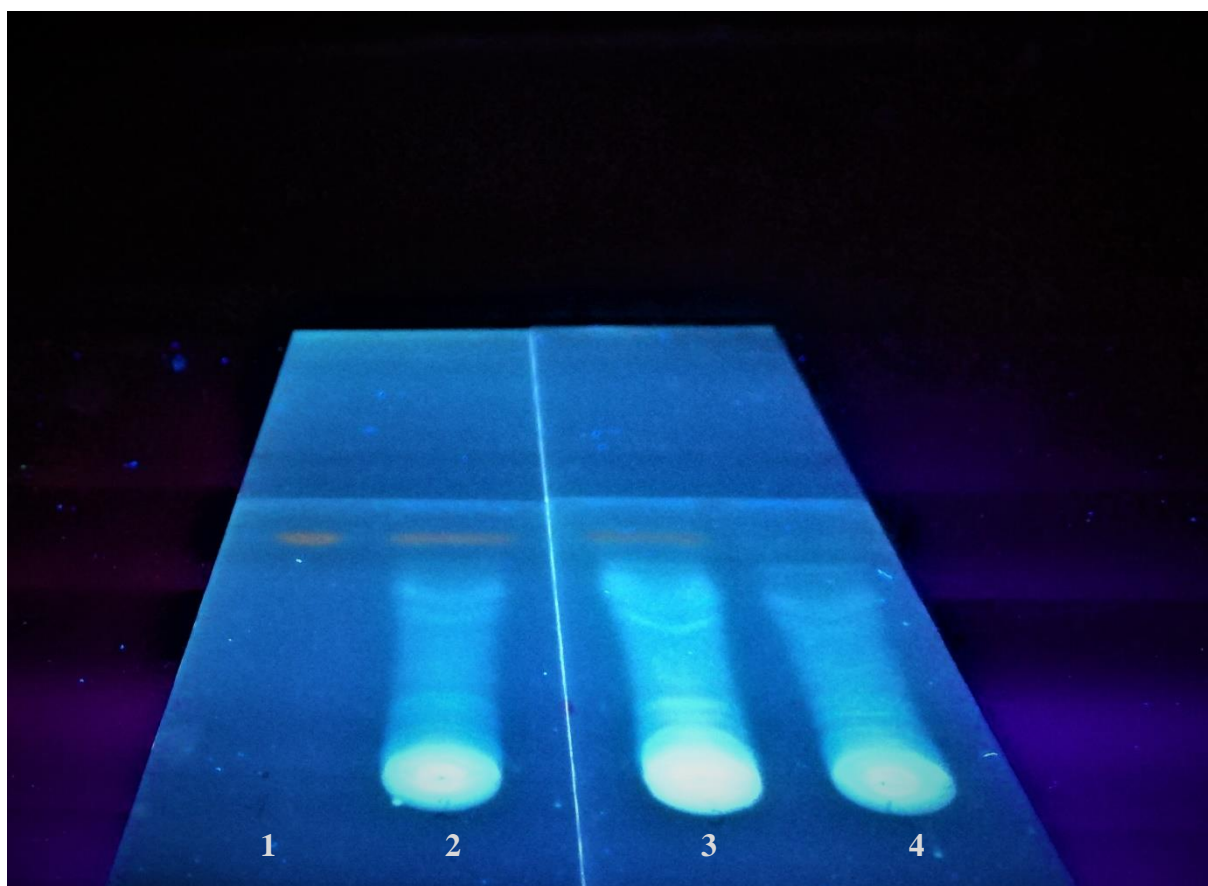


|    |  |     |          |
|----|--|-----|----------|
| 76 | Pilsner, svijetlo, pšenično  | 5,5 | Staklo   |
| 77 | Svijetlo   | 5,1 | Staklo   |
| 79 | Nepasterizirano, nefiltrirano, ale, tamno, u boci koja sadrži hranjivi talog | 6,5 | Staklo   |
| 80 | Ale, svijetlo  | 5,2 | Staklo   |
| 83 | Lager, svijetlo  | 5,2 | Staklo   |
| 84 | Svijetlo   | 5,5 | Staklo   |
| 85 | Lager, svijetlo  | 5,0 |          |
| 86 | Pasterizirano, svijetlo  | 5,0 | Staklo   |
| 89 | Pasterizirano, lager, svijetlo   | 5,0 | Staklo   |
| 91 | Pale ale, svijetlo   | 5,0 | Točionik |
| 92 | Lager, pale  | 5,0 | Točionik |
| 93 | Pilsner, svijetlo  | 5,0 | Limenka  |

---

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

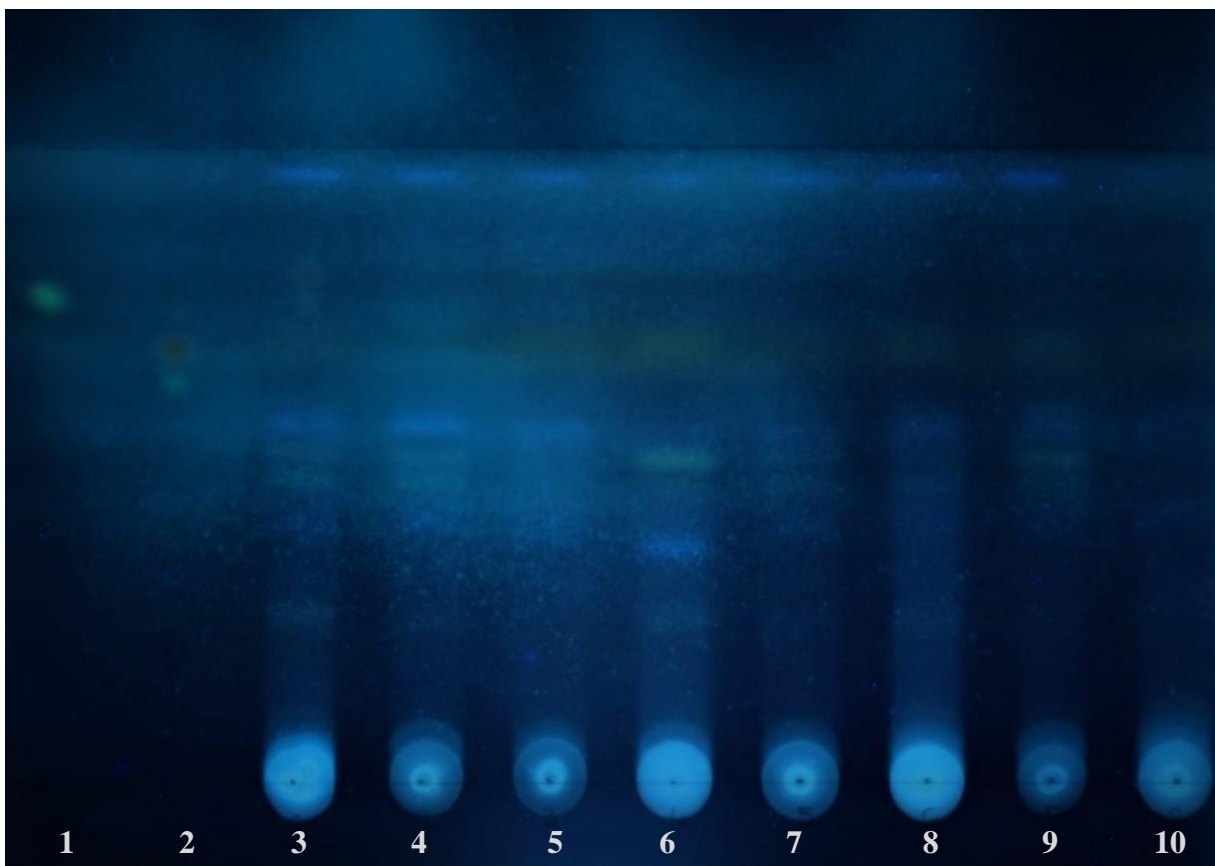
Kromatogrami uzoraka obogaćenih sa matičnom otopinom STC-a u acetonitrilu (0,003 M) u početnom koraku ekstrakcije pokazali su prisutnost STC-a, čime je dokazano da primijenjeni postupak ekstrakcije omogućava izdvajanje STC-a iz matriksa piva te njegovu detekciju metodom TLC (slika 4, oznaka 3). Ispitivanje utjecaja matriksa pokazalo je da ne utječe na položaj zadržavanja STC-a na TLC ploči (slika 4, oznaka 2). U ovom istraživanju postignuti limit detekcije STC-a iznosi 1,3 µg/mL. Prema literaturnim podacima usporedivih TLC tehnika LOD vrijednosti kreću se između 2-140 µg/kg (EFSA, 2013). U istraživanju koje su proveli Stroka i suradnici (2004.) postignut je LOD od 2-11 µg/kg. Međutim, u tom istraživanju korištena stacionarna faza visoke djelotvornosti (amino-derivatizirani HP-TLC ploča). Nadalje, u svom istraživanju su Stroka i suradnici ispitivali prisutnost STC-a u žitaricama, a ne u pivu.



**Slika 4.** TLC ploče silikagel 60 (bez indikatora) razvijane u mobilnoj fazi toluen/etil-acetat/mravlja kiselina 90% 5:4:1 v/v/v, gledane u mračnoj komori pod svjetlošću valne duljine 265 nm. Narančasta fluorescencija odgovara STC-u. Uzorci i standardi nanaseni na startnu liniju TLC ploče na slici su označeni brojevima od 1 do 4, pri čemu je;

1. Standard STC 0,002 M (4,86  $\mu\text{g}$  STC u 5  $\mu\text{L}$ )
2. Uzorak obogaćen sa matičnom otopinom STC neposredno prije nanošenja na TLC (8,64  $\mu\text{g}$  STC u 20  $\mu\text{L}$ )
3. Uzorak obogaćen sa matičnom otopinom STC odmah nakon degasiranja (3,46  $\mu\text{g}$  STC u 20  $\mu\text{L}$ )
4. Uzorak bez dodanog STC

Opisanom metodom analizirano je ukupno 58 uzoraka pive, a STC nije detektiran niti u jednom uzorku. Međutim, u 21/58 uzoraka uočena je narančasta fluorescencija koja bi se s obzirom na boju i položaj zadržavanja na TLC mogla pripisati metabolitima srodnim STC-u (slika 5).



**Slika 5.** TLC ploča silikagel 60 (bez indikatora) razvijena u mobilnoj fazi toluen : etil-acetat : mravlja kiselina 90% 5 : 4 : 1 v/v/v, prskana 80% gledana u mračnoj komori pod svjetlošću valne duljine 365 nm. Uzorci (20  $\mu\text{L}$ ) i standardi (1  $\mu\text{L}$ ) nanesen su na startnu liniju TLC ploče (oznake 1-10) pri čemu je:

1. Standard STC u acetonitrilu (0,97  $\mu\text{g}$  STC)
2. Standard (5-MET-STC) ( 1,4  $\mu\text{g}$  5-MET-STC)
3. Uzorak 1
4. Uzorak 3

5. Uzorak 8
6. Uzorak 11
7. Uzorak 12
8. Uzorak 14
9. Uzorak 15
10. Uzorak 16

Ovakav rezultat u skladu je i s većinom ostalih provedenih istraživanja gdje se ovaj toksin u uzorcima piva uglavnom nije detektirao, iako je u uzorcima hrane često dokazan. Primijenjena metoda tankoslojne kromatografije jednostavna je za izvedbu, ali ne spada u visoko osjetljive metode, stoga je moguće da je STC u uzorcima prisutan, ali da su količine premale da bi ih se ovakvom metodom dokazale. Jedno od prvih istraživanja pojavnosti STC-a u hrani u Europi provedeno je u Ujedinjenom kraljevstvu 1983. godine. Od 523 analizirana uzoraka, 17 ih je bilo pozitivno na prisutnost STC-a. Nedostatak ovog istraživanja je da je metoda imala relativno visok limit detekcije (LOD) od 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Buckle, 1983). Druga velika studija provedena je u Brazilu, u istom desetljeću, gdje STC nije detektiran niti u jednom uzorku, no opet je LOD primijenjene metode bio visok (35  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Soares i Rodriguez-Amaya, 1989). Bertuzzi i sur. su u razdoblju između 2014. i 2015. godine analizirali prisutnost STC-a u različitim uzorcima riže proizvedene u Italiji. Nakon ekstrakcije i pročišćavanja, STC je analiziran HPLC-MS/MS-om i detektiran u svih 49 uzoraka neprocesuirane riže te u velikoj količini uzoraka smeđe i prokuhane riže, dok je kontaminacija bijele riže bila manja (Bertuzzi i sur., 2017). Najnovije istraživanje proveli su Pietri i sur. 2022. godine. Oni su HPLC metodom analizirali prisutnost STC-a i ohratoksina A u 107 uzoraka proizvoda ribanog sira kupljenih u Italiji. Ovo je istraživanje posebno zanimljivo zbog toga što je STC nađen u čak 94,4% svih uzoraka. Detektiran je u svim uzorcima u kojima je detektiran i ohratoksin, a LOD metode je za STC bio 6,87  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Do danas je vrlo mali broj istraživanja posvećen ispitivanju prisustva STC-a u pivu. Najznačajnija je analiza 26 uzoraka različitih piva skupljenih u Latviji gdje je STC detektiran u samo 2 uzorka u koncentracijama 4-8  $\mu\text{g/kg}$  (Veršilovskis i sur., 2008). Od novijih studija, najznačajnije je ono Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA), koja je u razdoblju između 2013. i 2014. godine provela opsežno istraživanje o pojavnosti STC-a u hrani, s ciljem da prikupi reprezentativne podatke o njegovoj pojavnosti u Europi. Analiza je provedena na uzorcima žitarica, proizvoda od žitarica (uključujući i 50 uzoraka piva) i orašastog voća. EFSA je u svojem istraživanju koristila metodu koju su 2014. godine objavili Sasaki i sur., a ona je uključivala degasiranje te imunoafinitetno pročišćavanje, nakon čega su slijedile plinska

kromatografija i masena spektroskopija. Iako je toksin detektiran u 10% svih analiziranih uzoraka, u uzrocima piva nije pronađen. Najnovije istraživanje pojavnosti STC-a u pivu provedeno je u Japanu 2019. godine. Yoshinari i sur. su tada LC-MS/MS metodom analizirali uzorke prosa, azuki graha, riže, kukuruznog, raženog, heljadinog i pšeničnog brašna, proizvoda od ječma te uzorke piva i vina kupljenih u lokalnim supermarketima i maloprodajnim dućanima. U tom istraživanju STC opet nije detektiran niti u jednom uzorku piva (Yoshinari i sur., 2019).

## 5. ZAKLJUČCI

U ovom diplomskom radu opisana je metoda pripreme uzoraka piva radi analiziranja prisutnosti mikotoksina STC-a metodom tankoslojne kromatografije. Pri tome je određen limit detekcije STC-a u pivu od 32,4 µg/L. Ni u jednom od 58 analiziranih uzoraka piva različitih tipova i proizvođača nije dokazan STC. Međutim, u nekim uzorcima (21/58) narančasta fluorescencija koja se po položaju zadržavanja na silikagel ploči nalazi u blizini položaja koji odgovara STC-u upućuje na moguću prisutnost metabolita srodnih STC-u, primjerice 5-METSTC. Dobiveni su rezultati u skladu s rezultatima prijašnjih istraživanja koja su za detekciju STC-a u uzorcima piva kupljenih s nekih drugih tržišta koristila istu metodu, a STC je rijetko dokazan i u uzorcima piva analiziranih osjetljivijim analitičkim tehnikama, primjerice LC/MS. Ovi rezultati upućuju na sigurnost konzumacije piva, obzirom na prisustvo STC-a, što je važna spoznaja s obzirom na veliku potrošnju piva u Hrvatskoj. Međutim, treba uzeti u obzir ograničenja primijenjene metode te mogućnost prisutnosti STC-a u količinama koje su ispod limita detekcije. Stoga je uputno iste uzorke analizirati osjetljivijim kromatografskim tehnikama, primjerice LC/MS.

## 6. LITERATURA

- Beer consumption by country, 2022., <https://worldpopulationreview.com/country-rankings/beer-consumption-by-country>, pristupljeno 10.4.2022.
- Bertuzzi T, Romani M, Rastelli S, Mulazzi A, Pietri A. Sterigmatocystin occurrence in paddy and processed rice produced in Italy in the years 2014-2015 and distribution in milled rice fractions. *Toxins*, 2017, 9, 86. Buckle AE. The occurrence of mycotoxins in cereals and animal feed-stuffs. *Vet Res Commun*. 1983, 7, 171-186.
- Caceres I, Khoury AA, Khoury RE, Lorber S, Oswald IP, Khoury AE, Atoui A, Puel O, Bailly JD. Aflatoxin biosynthesis and genetic regulation: A Review. *Toxins*, 2020, 12, 150.
- Cox RH, Cole RJ. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of fungal metabolites, aflatoxins, and sterigmatocystins. *J Org Chem*, 1977, 42, 112-114.
- Díaz Nieto CH, Granero AM, Zon MA, Fernández H. Sterigmatocystin: A mycotoxin to be seriously considered. *Food Chem Toxicol*, 2018, 118, 460–470.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. *EFSA Journal*, 2013, 11, 3254. Dostupno na: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3254> [4.5.2022].
- IARC. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs volumes 1–42. IARC Monographs Supplement 7. 1987, 43-46.
- IARC. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monogr Eval Carcinog risks to Humans*, 1993, 56, 489-521.
- Jakšić D, Čurtović I, Kifer D, Rašić D, Kopjar N, Micek V, Peraica M, Šegvić Klarić M. Single-dose toxicity of individual and combined sterigmatocystin and 5-methoxysterigmatocystin in rat lungs. *Toxins*, 2020, 12, 734.
- 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 Prog*, 2017, 16, 63-72.
- 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*. *Sci Total Environ*, 2016, 562, 296-

- Jurjević Z, Peterson SW, Solfrizzo M, Peraica M. Sterigmatocystin production by nine newly described *Aspergillus* species in section *Versicolores* grown on two different media. *Mycotoxin Res*, 2013, 29, 141-145.
- Kobayashi N, Kubosaki A, Takahashi Y, Yanai M, Konuma R, Uehara S, Chiba T, Watanabe M, Terajima J, Sugita-Konishi Y. Distribution of sterigmatocystin-producing *Aspergilli* in Japan. *Food Saf (Tokyo)*, 2018, 6, 67-73.
- Kubosaki A, Kobayashi N, Watanabe M, Yoshinari T, Takatori K, Kikuchi Y, Hara-Kudo Y, Terajima J, Sugita-Konishi Y. A new protocol for the detection of sterigmatocystin-producing *Aspergillus* section *Versicolores* using a high discrimination polymerase. *Biocontrol Sci*, 2020, 25, 113-118.
- Lešić T, Kmetič I, Kiš M, Vulić A, Kudumija N, Zadravec M, Murati T, Pleadin J. Sterigmatocystin - prekursor aflatoksina B1 u hrani i hrani za životinje. *HČPTBN*, 2019, 14, 105-112.
- Liu Y, Du M, Zhang G. Proapoptotic activity of aflatoxin B1 and sterigmatocystin in HepG2 cells. *Toxicol Rep*, 2014, 1, 1076-1086.
- Lu X, Luo C, Xing J, Han Z, Li T, Wu W, Xu H, Zhan R, Chen W. Optimization of storage conditions of the medicinal herb *Ilex asprella* against the sterigmatocystin producer *Aspergillus versicolor* using response surface methodology. *Toxins*, 2018, 10, 499.
- Mašek T, Šerman V. Utjecaj mikotoksina na zdravlje i proizvodnost preživača. *Krmiva*, 2006, 48, 19-31.
- Peraica M, Rašić D. Rizik izloženosti najvažnijim mikotoksinima roda *Aspergillus* za ljudsko zdravlje. *Glasilo biljne zaštite*, 2020, 20, 340-345.
- Pietri A, Leni G, Mulazzi A, Bertuzzi T. Ochratoxin A and sterigmatocystin in long-ripened grana cheese: occurrence, wheel rind contamination and effectiveness of cleaning techniques on grated products. *Toxins*, 2022, 14, 306.
- Rabie C, Lubben A, Steyn M. Production of sterigmatocystin by *Aspergillus versicolor* and *Bipolaris sorokiniana* on semisynthetic liquid and solid media. *Appl Environ Microbiol*, 1976, 32, 206-208.
- Rank C, Nielsen KF, Larsen TO, Varga J, Samson RA, Frisvad JC. Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biol*, 2011, 115, 406-420.
- Rašić D, Jakšić D, Hulina Tomašković A, Kifer D, Kopjar N, Rumora L, Želježić D, Peraica M, Šegvić Klarić M. Sterigmatocystin moderately induces oxidative stress in male Wistar rats after short-term oral treatment. *Mycotoxin Res*, 2020, 36, 181-191.



- Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B. Food and indoor fungi. Utrecht, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, 2011.
- Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol*, 2014, 78, 141–173.
- Sasaki R, Hossain MZ, Abe N, Uchigashima M, Goto T. Development of an analytical method for the determination of sterigmatocystin in grains using LCMS after immunoaffinity column purification. *Mycotoxin Res*, 2014, 30, 123-129.
- Septien I, Cutuli MT, Garcia ME, Suarez G, Blanco JL. Solubility and stability of sterigmatocystin in different organic solvents. *Toxicon*, 1993, 31, 1337-1340.
- Singh G, Velasquez L, Huet AC, Delahaut P, Gillard N, Koerner T. Development of a polyclonal antibody-based indirect competitive ELISA for determination of sterigmatocystin in wheat and corn flours. *Food Addit Contam, Part A: Chem, Anal, Control, Exposure Risk Assess*, 2019, 36, 327-335.
- Soares LM, Rodriguez-Amaya DB. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. *J - Asso Off Anal Chem*, 1989, 72, 22-26.
- Steyn PS, Vlegaar R, Wessels PL. The biosynthesis of aflatoxin and its congeners. U: The biosynthesis of mycotoxins - a study in secondary metabolism. New York, Academic Press, 1980, str. 105-155.
- Stroka J, Dasko L, Spangenberg B, Anklam E. Determination of the mycotoxin, sterigmatocystin, by thin-layer chromatography and reagent-free derivatisation. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2004, 27, 2101-2111.
- Veršilovskis A, De Saeger S, Mikelsone V. Determination of sterigmatocystin in beer by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *World Mycotoxin J*, 2008, 1, 161-166.
- Veršilovskis A, De Saeger S. Sterigmatocystin: occurrence in foodstuffs and analytical methods--an overview. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54, 136–147.
- Viegas C, Nurme J, Piecková E, Viegas S. Sterigmatocystin in foodstuffs and feed: aspects to consider. *Mycology*, 2018, 11, 91-104.
- Yabe K, Matsushima K, Koyama T, Hamasaki T. Purification and characterization of O-methyltransferase I involved in conversion of demethylsterigmatocystin to sterigmatocystin and of dihydrodemethylsterigmatocystin to dihydrosterigmatocystin

- during aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64, 166-171.
- Yoshinari T, Takeuchi H, Kosugi M, Taniguchi M, Waki M, Hashiguchi S, Fujiyoshi T, Shichinohe Y, Nakajima M, Ohnishi T, Hara-Kudo Y, Sugita-Konishi Y. Determination of sterigmatocystin in foods in Japan: method validation and occurrence data. *Food Addit Contam Part A*, 2019, 36, 1404-1410.
- Zhao Y, Huang J, Ma L, Liu S, Wang F. Aflatoxin B1 and sterigmatocystin survey in beer sold in China. *Food Addit Contam, Part B*, 2016, 10, 64-68.
- Zingales V, Fernández-Franzón M, Ruiz M. Sterigmatocystin: Occurrence, toxicity and molecular mechanisms of action - A review. *Food Chem Toxicol*, 2020, 146, 111802.

## 7. SAŽETAK

Sterigmatocistin (STC) je citotoksični i genotoksični mikotoksin kojeg dominantno proizvode plijesni roda *Aspergillus* iz serije *Versicolores*. Ove su plijesni široko rasprostranjene u prirodi, ali i unutar zatvorenih prostora, u koje spadaju i oni u kojima se skladišti hrana i sirovine za njenu proizvodnju, što upućuje na mogućnost kontaminacije te hrane i sirovina ovim mikotoksinom. Kontaminacija STC-om do sada je utvrđena u žitaricama, zrnima kave, začинима, orašastim plodovima, u hrani za životinje te u siru, dok o pojavnosti ovog mikotoksina u pivu nema mnogo literaturnih podataka. S obzirom na visoku potrošnju ovog popularnog pića u Hrvatskoj i u svijetu može se pretpostaviti nepovoljan učinak na zdravlje izloženih ljudi uslijed izloženosti ovom mikotoksinu. Kako bi se detektirala pojava STC-a u pivu prikupljeno je 58 uzoraka piva s hrvatskog tržišta. Ekstrakcija je provedena kombiniranjem ekstrakcije acetonitriplom uz isaljavanje te pročišćavanje pomoću SPE kolona. Tako pripremljeni ekstrakti analizirani su metodom tankoslojne kromatografije uz limit detekcije od 1,3 µg/ml. Analizom nije dokazana prisutnost STC-a niti u jednom ispitanom uzorku. Međutim u 21/58 uzoraka utvrđeno je prisustvo analita koji po boji fluorescencije i položaju zadržavanja na TLC ploči upućuju na moguće prisustvo metabolita STC-a. Analiza istih ekstrakata osjetljivijim kromatografskim tehnikama omogućit će precizniju interpretaciju ovih opažanja te omogućiti detekciju nižih koncentracija STC-a u uzorcima.

## 8. SUMMARY

Sterigmatocystin (STC) is a cytotoxic and genotoxic mycotoxin predominantly produced by molds of the genus *Aspergillus*, section *Versicolores*. These molds are widespread in nature, but also in indoor spaces, including those that store food and raw materials for its production, which indicates the possibility of contamination of food and raw materials with this mycotoxin. STC contamination has so far been identified in cereals, coffee beans, spices, nuts, animal feed, and cheese, while there isn't much literature data on the occurrence of this mycotoxin in beer. Given the high consumption of this popular drink in Croatia and the world, we can expect a negative effect on the health of exposed people, due to exposure to this mycotoxin. To detect the occurrence of STC in beer, 58 samples of beer were collected from the Croatian market. Extraction was performed by combining acetonitrile extraction with salting, and purification using SPE columns. Thus prepared extracts were analyzed by thin-layer chromatography with a limit of detection of 1,3 µg/mL. The STC was not detected in any of the tested samples. Taking into account resemblance in fluorescence and the spot on chromatograms 21/58 samples may be related to the metabolates of STC. Further analysis of the same extracts by application of more sensitive chromatographic techniques will allow a more accurate interpretation of these observations and allow the detection of lower STC concentrations in the samples.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za mikrobiologiju  
Schrottova 39/I. kat, 10000 Zagreb

Diplomski rad

### Ispitivanje prisutnosti sterigmatocistina u pivu metodom tankoslojne kromatografije

Ana Šmehil

#### SAŽETAK

Sterigmatocistin (STC) je citotoksični i genotoksični mikotoksin kojeg dominantno proizvode plijesni roda *Aspergillus* iz serije *Versicolores*. Ove su plijesni široko rasprostranjene u prirodi, ali i unutar zatvorenih prostora, u koje spadaju i oni u kojima se skladišti hrana i sirovine za njenu proizvodnju, što upućuje na mogućnost kontaminacije te hrane i sirovina ovim mikotoksinom. Kontaminacija STC-om do sada je utvrđena u žitaricama, zrnima kave, začinima, orašastim plodovima, u hrani za životinje te u siru, dok o pojavnosti ovog mikotoksina u pivu nema mnogo literaturnih podataka. S obzirom na visoku potrošnju ovog popularnog pića u Hrvatskoj i u svijetu može se pretpostaviti nepovoljan učinak na zdravlje izloženih ljudi uslijed izloženosti ovom mikotoksinu. Kako bi se detektirala pojavnost STC-a u pivu prikupljeno je 58 uzoraka piva s hrvatskog tržišta. Ekstrakcija je provedena kombiniranjem ekstrakcije acetonitrilom uz izolavanje te pročišćavanje pomoću SPE kolona. Tako pripremljeni ekstrakti analizirani su metodom tankoslojne kromatografije uz limit detekcije od 1,3 µg/ml. Analizom nije dokazana prisutnost STC-a niti u jednom ispitanom uzorku. Međutim u 21/58 uzoraka utvrđeno je prisustvo analita koji po boji fluorescencije i položaju zadržavanja na TLC ploči upućuju na moguće prisustvo metabolita STC-a. Analiza istih ekstrakata osjetljivijim kromatografskim tehnikama omogućit će precizniju interpretaciju ovih opažanja te omogućiti detekciju nižih koncentracija STC-a u uzorcima.

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

Rad sadrži: 24 stranice, 5 grafička prikaza, 1 tablicu i 38 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: sterigmatocistin, pivo, TLC, STC

Mentor: **Dr. sc. Daniela Jakšić**, *poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Daniela Jakšić**, *poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2022.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of microbiology  
Schrottova 39/1st floor, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Investigation of the presence of sterigmatocystin in beer by thin-layer chromatography

Ana Šmehil

#### SUMMARY

Sterigmatocystin (STC) is a cytotoxic and genotoxic mycotoxin predominantly produced by molds of the genus *Aspergillus*, section *Versicolores*. These molds are widespread in nature, but also in indoor spaces, including those that store food and raw materials for its production, which indicates the possibility of contamination of food and raw materials with this mycotoxin. STC contamination has so far been identified in cereals, coffee beans, spices, nuts, animal feed, and cheese, while there isn't much literature data on the occurrence of this mycotoxin in beer. Given the high consumption of this popular drink in Croatia and the world, we can expect a negative effect on the health of exposed people, due to exposure to this mycotoxin. To detect the occurrence of STC in beer, 58 samples of beer were collected from the Croatian market. Extraction was performed by combining acetonitrile extraction with salting, and purification using SPE columns. Thus prepared extracts were analyzed by thin-layer chromatography with a limit of detection of 1,3 µg/mL. The STC was not detected in any of the tested samples. Taking into account resemblance in fluorescence and the spot on chromatograms 21/58 samples may be related to the metabolates of STC. Further analysis of the same extracts by application of more sensitive chromatographic techniques will allow a more accurate interpretation of these observations and allow the detection of lower STC concentrations in the samples

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

Thesis includes: 24 pages, 5 figures, 1 table and 38 references. Original is in Croatian language.

Keywords: sterigmatocystin, beer, TLC, STE

Mentor: **Daniela Jakšić, Ph.D.** *Postdoctoral research and teaching assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Reviewers: **Daniela Jakšić, Ph.D.** *Postdoctoral research and teaching assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*  
**Dr. sc. Maja Šegvić Klarić, Ph.D.** *Full professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*  
**Ana-Marija Domijan, Ph.D.** *Full professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

The thesis was accepted: June 2022.