

Primjenjivost modificirane QuEChERS metode za detekciju mikotoksina sterigmatocistina u krvnoj plazmi zdravih darivatelja krvi

Perišić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:407640>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-19**



Repository / Repozitorij:

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



Ana Perišić

**Primjenjivost modificirane QuEChERS metode
za detekciju mikotoksina sterigmatocistina u
krvnoj plazmi zdravih darivatelja krvi**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

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 zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Danieli Jakšić na stručnom vodstvu, strpljenju i savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se dr. sc. Luki Bočkoru sa Instituta za antropologiju na provođenju LC-MS analize priređenih uzoraka. Također se zahvaljujem svojim prijateljima i svojoj obitelji, koji su mi bili izvor velike podrške tijekom cijelog studija i uvijek me poticali da dajem sve od sebe i ustrajem u svemu što radim.

SADRŽAJ

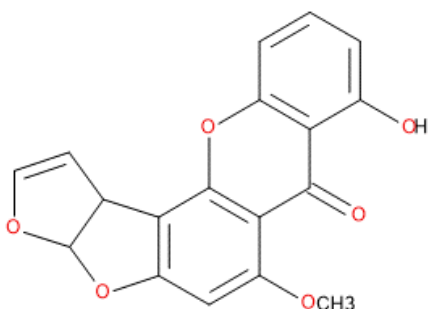
1. UVOD	1
1.1. Struktura i fizikalno kemijska svojstva sterigmatocistina	1
1.2. Proizvođači sterigmatocistina.....	1
1.3. Metabolizam sterigmatocistina i toksični učinci	2
1.4. Pojavnost sterigmatocistina u zatvorenim prostorima.....	4
1.5. Pojavnost sterigmatocistina u hrani i piću.....	5
1.6. Pojavnost sterigmatocistina u biološkim uzorcima	5
1.7. Metode ekstrakcije mikotoksina iz bioloških uzoraka	6
1.8. QuEChERS metoda za pročišćavanje bioloških uzoraka	7
1.9. Metode za detekciju mikotoksina u biološkim uzorcima	8
2. OBRAZLOŽENJE TEME	10
3. MATERIJALI I METODE.....	11
3.1. Materijali	11
3.1.1. Kemikalije.....	11
3.1.2. Radni instrumenti.....	11
3.2. Metode.....	11
3.2.1. Priprema uzoraka krvne plazme.....	11
3.2.2. Detekcija STC-a metodom LC-MS/MS.....	13
3.2.3. Obrada podataka i statistička analiza	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
5. ZAKLJUČAK	17
6. LITERATURA	18
7. SAŽETAK	23
8. SUMMARY	24
Temeljna dokumentacijska kartica	25
Basic documentation card	26

1. UVOD

1.1. Struktura i fizikalno kemijska svojstva sterigmatocistina

Sterigmatocistin (STC) je toksični poliketid molekulske formule C₁₈H₁₂O₆ i molekulske m_{324.3} g/mol. U krutom stanju formira svijetlo žute igličaste kristale. Temperatura tališta mu je 246 °C. Umjereno je topljiv u većini organskih otapala, najlakše topljiv u dimetilsulfoksidu, kloroformu i piridinu, a gotovo netopljiv u vodenim otapalima. Maksimalna apsorpcija u UV spektru pokazuje pri valnim duljinama od 205, 233, 246 i 325 nm, a analiza LC-MS tehnikom nakon ESI ionizacije pokazala je da omjer mase i naboja m/z iznosi 325.0701 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sterigmatocystin>).

Kemijska struktura STC-a sastoji se od ksantenskog prstenastog sustava orto-fuzioniranog na dihidrofuranofuranski dio (slika 1). Bisfuranski prstenski sustav smatra se odgovornim za toksične učinke svih aflatoksina i sterigmatocistina. Za citotoksičnost je odgovoran niz hidroksilnih skupina u strukturi, a za karcinogena svojstva odgovorna je polienska struktura i kumulativna prisutnost ketonskih funkcionalnih skupina (Banfalvi, 2021).



Slika 1. Kemijska struktura STC (nacrtano pomoću Biowia draw 2017, prema Liu i sur., 2014)

1.2. Proizvođači sterigmatocistina

STC produkt je sekundarnog metabolizma plijesni, među kojima se kao glavni proizvođači ističu one iz roda *Aspergillus*, serije *Versicolores*, koja je zbog zajedničkog porijekla pripojena seriji *Nidulantes* (Chen i sur., 2016). Ovoj seriji trenutno pripada 17 vrsta: *A. amoenus*, *A. austroafricanus*, *A. creber*, *A. cvjetkovicii*, *A. fructus*, *A. griseoaurantiacus*, *A. hongkongensis*, *A. jensenii*, *A. protuberus*, *A. puulaauensis*, *A. subversicolor*, *A. sydowii*, *A. tabacinus*, *A. tennesseeensis*, *A. venenatus*, *A. versicolor* i najnovije dodana *A. pepii* (Jakšić Despot i sur., 2017). Najčešće izolirana vrste ove serije je *A. creber*, a slijede je *A. jensenii* i *A. protuberis*. Proizvodnja STC-a ispitana je za 13 pripadnika serije i rezultati su bili pozitivni za 11 vrsta.

Najpotentnijim proizvođačima pokazali su se pripadnici vrsta *A. versicolor*, *A. fructus* i *A. jensenii* koji su proizvodili STC u količinama 10 do 100 puta većim nego pripadnici ostalih vrsta (Jurjević i sur., 2013). Broj sojeva koji je testiran bio je ograničen zbog čega se ne može sa sigurnošću zaključiti da ostale vrste ne bi također proizvodile STC, kada bi se izolirali njihovi sojevi iz nekih drugih uzoraka.

Različiti čimbenici mogu utjecati na proizvodnju STC-a, od duljine uzgoja plijesni, preko vrste korištenog supstrata, temperature, pH i ostalih fizikalnih, kemijskih i bioloških čimbenika. Proučavanjem vrste *A. versicolor* pokazalo se da su optimalni uvjeti za proizvodnju STC-a temperatura u rasponu od 26°C do 34°C i udio vlage od 85% do 90% (Lu i sur., 2018). Na vrsti *A. nidulans* ispitivana je optimalna pH vrijednost, pri čemu se pokazalo da proizvodnju STC stimulira lužnati pH (Delgado-Virgen i Guzman-De-Peña, 2009).

Osim plijesni roda *Aspergillus*, smatra se da STC mogu proizvoditi i plijesni iz rodova *Aschersonia*, *Bipolaris*, *Botryotrichum*, *Chaetomium*, *Emericella*, *Farrowia*, *Fusarium*, *Humicola*, *Moelleriella*, *Monocillium*, *Podospora* (Rank i sur., 2011).

1.3. Metabolizam sterigmatocistina i toksični učinci

Apsorpcija STC nakon oralne primjene se prema dosadašnjim istraživanjima pokazala niskom, a podaci o njegovoj biotransformaciji su nedostadni. Prema dosad objavljenim studijama smatra se da u prvoj fazi metabolizma dolazi do formiranja reaktivnog epoksida djelovanjem enzima citokrom P450 (CYP450) (Essigman i sur., 1979). Također, djelovanjem ovih enzima dolazi do monohidroksilacije i dihidroksilacije čime nastaju različiti hidroksimetaboliti (Pfeiffer i sur., 2014).

Druga faza metabolizma obuhvaća reakcije glukuronidacije STC i monohidroksi-STC, zatim sulfokonjugacije monohidroksi-STC i formiranje glutationskog adukta monooksigeniranog STC (EFSA, 2013). Izlučivanje matičnog konjugiranog STC-a i njegovih metabolita odvija se putem žuči i urina. Ipak, struktura većine njegovih metabolita nije do kraja razjašnjena i potrebna su dodatna istraživanja kako bismo imali više informacija o njegovom metabolizmu (Viegas i sur., 2020).

Toksična djelovanja STC dijeli sa AFB1, što je očekivano s obzirom na njihov zajednički biosintetski put i strukturne sličnosti. Mikotoksin AFB1 prema IARC-u je kategoriziran kao karcinogen skupine 1 (IARC, 1993), što je usmjerilo ispitivanja toksičnosti STC-a upravo u smjeru potencijalne mutagenosti i karcinogenosti.

Provedena su istraživanja na velikom broju različitih laboratorijskih životinja i staničnih kultura što je omogućilo da se pretpostavi mehanizam mutagenog učinka STC-a. Na EFSA Panelu o kontaminantima u hranidbenom lancu zaključeno je da STC, nakon što se metabolički aktivira u egzo epoksid, reagira s DNA formirajući adukate. Ukoliko ne dođe do popravka ovih adukata, povećava se vjerojatnost fiksacija mutacija te nastajanja tumorskih stanica (EFSA, 2013). Osim egzo-epoksida, za reakciju s DNA može biti odgovoran i produkt hidroksilacije STC-a, katehol. Pronađen je u mikrosomima jetre kod ljudi i štakora u većoj mjeri nego epoksid i smatra da je put nastajanja katehola češći nego put nastajanja epoksida (Lešić i sur., 2019). Novije spoznaje upućuju i na direktni genotoksični učinak STC putem nekovalentnih interakcija s DNA (Jakšić i sur., 2019).

Različitim istraživanjima pokušavalo se usporediti genotoksičnost STC i AFB1, ali izravna usporedba nije bila moguća iz više razloga. Nije se mogla sa sigurnošću znati točna koncentracija ovih toksina u ispitivanim sustavima, kao niti učinkovitost metaboličkih puteva aktivacije/detoksikacije niti brzina popravka induciranih adukata.

Citotoksičnost STC-a temelji se na zaustavljanju staničnog ciklusa i mitoze što dovodi do apoptoze stanica. Osim toga, dolazi do povećanja proizvodnje ROS-a i lipidne peroksidacije u uvjetima in vivo (Liu i sur., 2014).

Akutna oralna toksičnost je relativno niska, a ciljani organi u kojima se događaju opisani toksični mehanizmi su jetra i bubrezi. STC se pokazao hepatotoksičan za štakore, miševe, majmune i zamorce. Pojavnost hepatocelularne nekroze i hemoragije raste kako se povećava doza i trajanje izloženosti. U bubrežima dolazi do degradacije hijalina, tubularne nekroze i hemoragije što je otkriveno kod štakora i majmuna izloženim STC-u. Pokazalo se da metaboliti aspergila iz serije *Versicolores*, među kojima je i STC, dovode do pokretanja imunskog odgovora u dišnim putevima laboratorijskih životinja nakon respiratorne izloženosti (Sivakumar i sur., 2001).

Karcinogenost STC-a nakon dugotrajne oralne izloženosti dokazana je na miševima u dvjema studijama (Zwicker i sur., 1974) i na štakorima u pet studija (Purchase i van der Watt, 1970). Dokazana je i karcinogenost na miševima i štakorima nakon dugotrajne intraperitonealne, dermalne i subkutane izloženosti. Kancerogenost STC-a za ljude još uvijek nije dokazana te ga je IARC kategorizirao kao karcinogen skupine 2B (IARC, 1987).

1.4. Pojavnost sterigmatocistina u zatvorenim prostorima

Plijesni roda *Aspergillus*, serije *Versicolores* rasprostranjene su u okolišu diljem svijeta. Detektirane su različitim uzorcima okoliša, uključujući zrak u zatvorenim prostorima, stambeni materijal unutar vlažnih zgrada, kućnu prašinu i ventilacijske sustave (Jakšić Despot i sur., 2016).

Smatra se da vrsta *A. versicolor* pronađena u zatvorenim prostorima može proizvesti do 1% ukupne biomase STC-a (Nielsen i sur., 2003). Ova vrsta pokazala je sposobnost rasti na jako siromašnim podlogama poput betona i gipsa. Nakon inokulacije uzoraka spora ove vrste na borovo drvo, tapete, gips, gipsenu ploču i ivericu provedena je detekcija tehnikama HPLC-DAD i TLC te su STC i 11-metoksi-STC detektirani u svakom od izoliranih uzoraka (Nielsen i sur., 1998).

Tijekom ispitivanja stanova s vidljivim rastom plijesni, provedenog u sjevernoj Njemačkoj, STC detektiran je u 2 od 11 sakupljenih uzoraka prašine s tapeta. Zaključeno je da većina sojeva *A. versicolor* izoliranih iz prašine s tapeta može proizvoditi sterigmatocistin in vitro i da se sterigmatocistin može pronaći u prašini s tapeta u zatvorenim prostorima (Engelhart i sur., 2002). Ispitivanje pojavnosti 17 mikotoksina u građevinskom materijalu u vlažnim zgradama u Finskoj pokazalo je da je STC prisutan u najvećoj mjeri među ispitivanim toksinima. Detektiran je u 24% uzoraka, a u najvećoj mjeri proizvodila ga vrsta *A. versicolor*, što je u skladu s očekivanjima (Tuomi i sur., 2000). Pojavnost STC u zatvorenim prostorima ponovo je potvrđena u istraživanju poplavom oštećenih zgrada i domova (Bloom i sur., 2007, Jakšić i sur., 2021). STC je detektiran i u naseljenim kućama i jedinicama za gospodarenje otpadom (Vishwanath i sur., 2011).

U Republici Hrvatskoj plijesni proizvođači STC, aspergili iz serije *Versicolores*, detektirani su u stambenim gradskim prostorima nepogođenim vlagom te u mlini žitarica (Jakšić Despot, 2016) te u obnovljenim i neobnovljenim kućama nakon poplave u Gunji 2014. godine te u kućama u Gornjem Stupniku koje nisu bile pogođene poplavom (Jakšić i sur., 2021). Mikotoksin STC dokazan je u prašini u mlinu žitarica (Jakšić Despot i sur., 2016) te u kućnoj prašini (Jakšić i sur., 2021).

U istraživanju provedenom u Hrvatskoj procijenjena je izloženosti ljudi STC-u putem zraka u mlinu žitarica (Jakšić Despot i sur., 2016). Uzimajući u obzir maksimalnu koncentraciju STC-a detektiranoj u prašini u mlinu te prosječni volumen zraka udahnut tijekom osmosatnog radnog vremena (Straumfors i sur., 2015.) procijenjeno je da ljudi mogu udahnuti 0,42 µg STC dnevno.

Stoga zatvoreni prostori mogu predstavljati značajni izvor izloženosti ljudi mikotoksinu STC bilo direktno putem prašine ili indirektno preko plijesni koje proizvode STC.

1.5. Pojavnost sterigmatocistina u hrani i piću

Kontaminacija plijesnima roda *Aspergillus* serije *Versicolores* utvrđena je u sirovoj i procesuiranoj hrani te u ljekovitom bilju. Uvjeti koji pogoduju ubrzanom rastu vrste *A. versicolor* i njezinoj proizvodnji STC-a su visoka vlažnost zraka i temperatura iznad 26°C pa se zato glavnim razlogom kontaminacije smatraju loši uvjeti skladištenja. STC do sada je detektiran u žitaricama poput pšenice, kukuruza i ječma, u zrnima kave, začinima, orašastim plodovima, u hrani za životinje te u siru i pivu (Versilovskis i sur., 2008; Šmehil, 2022). Pojedine zemlje odredile su maksimalne dozvoljene količine STC-a u hrani. One u Češkoj i Slovačkoj iznose 5 µg kg⁻¹ za rižu, povrće, krumpir, brašno, perad, meso i mlijeko te 20 µg kg⁻¹ za ostalu hranu (Stroka i sur., 2004).

Obzirom na nedostatnost podataka o prisutnosti STC u hrani, Europska Agencija za sigurnost hrane (EFSA) nije mogla utvrditi granice izloženosti (engl. margins of exposure, MOE) koje se inače određuju za tvari koje su genotoksične i kancerogene, pa tako nije niti kategoriziran rizik od izloženosti STC-u za ljudsko zdravlje (EFSA, 2013).

Međutim, dosadašnja istraživanja inkriminiraju sir i rižu kao moguće značajne izvore izloženosti ljudi STC putem hrane.

1.6. Pojavnost sterigmatocistina u biološkim uzorcima

Ispitivanja humanih bioloških uzoraka na STC do sada su provedena tek nekoliko puta. Ispitivani su uzorci kanceroznog tkiva, urina i pune krvi pacijenata oboljelih od raka jetre ili želuca (Tian i sur., 1995) u usporedbi sa zdravom (kontrolnom) skupinom. Primijećene su značajnije koncentracije DNA-STC adukata u rasponu od 65 do 113 µg kg⁻¹ tjelesne mase kod 4 od ukupno 13 pacijenata, dok je kod kontrolne skupine to bio slučaj u samo jednog od 14 zdravih pojedinaca. Analizom krvne plazme utvrđene su značajno više razine STC-a u pacijenata koji boluju od ciroze jetre (0.626 ng/ml) i pacijenata koji boluju od hepatocelularnog karcinoma (2.02 ng/ml) u odnosu na kontrolnu skupinu (0.014 ng/ml) uz pozitivnu korelaciju koncentracija STC i tumorskog biljega alfa-fetoproteina (Hušanašu i sur., 2011). Istraživanje koje su proveli Cao i suradnici 2018. također su izmjerene više razine STC u urinu (0.91-3.05 µg/L, 10/30 pacijenata) i krvnoj plazmi (1.06-3.23 µg/L, 12/30 pacijenata) pacijenata koji boluju od hepatocelularnog karcinoma u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu gdje su izmjerene

koncentracije STC u krvnoj plazmi bile 0.88-2.05 $\mu\text{g/L}$ (4/30 pacijenata), a u urinu 0.75-2.12 $\mu\text{g/L}$ (3/30 pacijenata). Navedena istraživanja direktno upućuju na moguću ulogu STC-a u patogenezi kroničnih upalnih i malignih bolesti.

1.7. Metode ekstrakcije mikotoksina iz bioloških uzoraka

Najčešće korištena tehnika za ekstrakciju mikotoksina iz bioloških uzoraka bila je ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. liquid-liquid extraction, LLE) samostalno ili uz naknadno pročišćavanje ekstrakcijom na čvrstoj fazi (engl. solid-phase extraction, SPE). Slijedi ju razdvajanje imunoafinitetnim kolonama (engl. immunoaffinity columns, IAC), a ostale manje korištene tehnike bile su razrjeđivanje (dilute-and-shoot), LLE spregnuta s IAC, SPE spregnuta s IAC i SPE samostalno (Escrivá i sur., 2017).

LLE je tehnika u kojoj se organsko otapalo dodaje u vodenu otopinu analita nakon čega analit zbog većeg afiniteta prema organskom otapalu prelazi iz vodenog u organski sloj (Berk, 2018). Bitna stavka je da se koristi organsko otapalo koje se ne miješa s vodom ili se slabo miješa. Metoda je kompatibilna s plinskom kromatografijom (GC) s obzirom da je ekstrakcijsko sredstvo organsko otapalo. U nekim slučajevima nakon LLE ekstrakcije može se organski sloj osušiti koristeći bezvodni natrijev sulfat kako bi se uklonio ostatak vode prije analize GC-om. Kako bi se mogla izvesti tekućinska kromatografija (LC) često je uključen još jedan korak nakon LL ekstrakcije, a to je isparavanje organskog otapala i rekonstitucija analita u prikladnom otapalu.

SPE je tehnika koja se temelji na razlici u afinitetima tvari koje su otopljene ili suspendirane u tekućini (mobilnoj fazi) za krutinu kroz koju uzorak prolazi (za stacionarnu fazu) (Buszewski i Szultka, 2012). Najčešće se tekući uzorak propušta kroz adsorbent na koji se veže željeni analit, zatim se korištenjem otapala odgovarajuće jačine ispiru neželjene nečistoće, a na kraju se malom količinom odgovarajućeg otapala ispiru i analit. Također je moguće selektivno adsorbirati neželjene nečistoće i pustiti analit da prođe te ga odmah prikupiti. Većina stacionarnih faza temelji se na silicijevom dioksidu koji može biti slobodan (SPE normalne faze) ili vezan za određenu funkcionalnu skupinu. Funkcionalne skupine koje se pritom koriste obuhvaćaju lance ugljikovodika različitih duljina (SPE reverzne faze), amonijeve ili amino skupine (za anionsku izmjenu) te sulfonsku kiselinu ili karboksilnu skupinu (za kationsku izmjenu) (Żwir-Ferenc i Biziuk, 2006).

IAC pripremaju se vezanjem antitijela specifičnih za određeni analit na posebno aktiviranu podlogu čvrste faze i pakiranjem podloge suspendirane u vodenoj puferskoj otopini u uložak

(Scott i Trucksess, 1997). Ekstrakt ili tekući uzorak propušta se kroz kolonu pri čemu se analit specifično veže za protutijelo. Kako bi se lakše protjerale tekućine kroz IAC obično se koriste štrcaljke s blagim pritiskom, a ponekad je dovoljan i gravitacijski protok. Kolona se ispire vodom ili vodenom otopinom pri čemu se uklanjaju nečistoće, a zatim se analit eluira malim volumenom otapala kao što je metanol, acetonitril ili dimetil sulfoksid. Proizvedene su komercijalne IAC za ekstrakciju brojnih mikotoksina, poput aflatoksina, okratoksina, fumonizina, zearalenona i deoksinivalenola.

1.8. QuEChERS metoda za pročišćavanje bioloških uzoraka

Ime QuEChERS metode zapravo je akronim njezinog opisa na engleskom: „brza, jednostavna, jeftina, učinkovita, robusna i sigurna“. Metoda je originalno razvijena za analizu višerazrednih brojnih ostataka pesticida u različitim poljoprivrednim proizvodima u kojima je sadržaj vode visok (Anastassiades i sur., 2003). Kasnije se počela primjenjivati za analizu različitih onečišćenja u hrani i okolišu, poput antibiotika (Stubbings i sur., 2009), hormona, policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAH) (Smoker i sur., 2010) i mikotoksina (Sospedra i sur., 2010). Metoda se temelji na razdvajanju dviju tekućina korištenjem prikladnog otapala i na pročišćavanju disperzivnom SPE ekstrakcijom.

Prvi korak u ovoj metodi je usitnjavanje i uzimanje potrebne veličine uzorka, ovisno o matrici uzorka te sadržaju vode ili masti. Nakon toga slijedi ekstrakcija prikladnim otapalom, a najčešće se koristi acetonitril (MeCN). Njegove prednosti su što se njime može ekstrahirati najširi raspon organskih spojeva bez da se koekstrahiraju brojne lipofilne tvari. Može prodrijeti u vodenu frakciju matrice uzorka i omogućiti jednostavno odvajanje dviju faza nakon dodatka soli u sljedećem koraku. Pokazalo se da su uporabom MeCN puno manje smetnje lipofilnih spojeva poput voskova, lipida i pigmenata nego pri uporabi drugih organskih otapala (Lehotay i sur., 2001). Također, ukoliko dođe do ko-ekstrakcije lipofilnih tvari, moguće ih je ukloniti dodatnim pročišćavanjem nekim drugim nepolarnim otapalom od kojih se acetonitril dobro odvaja, npr heksanom (Argauer i sur., 1997).

Nedostaci njegove primjene su veći volumen ekspanzije tijekom isparavanja u GC-u, štetan učinak na detektore dušikovog fosfita (NPD) i elektrolitičke vodljivosti (ELCD) (ali neki GC ulazi mogu očistiti prednji dio otapala iz sustava) te njegova veća cijena i toksičnost, no unatoč tome najčešće je odabirano otapalo. Omjer MeCN i uzorka kod kojeg se pokazala najveća stopa oporavka ekstrakcije je 1:1. Učinkovitost se može dodatno poboljšati određenim modifikacijama poput zakiseljavanja otapala mravljom kiselinom, octenom kiselinom ili

limunskom kiselinom, kao i kombiniranjem MeCN s drugim otapalima poput etil acetata, metanola, diklormetana i heksana. Najveća učinkovitost ekstrakcije postignuta je zakiseljavanjem MeCN dodatkom 1% octene kiseline.

Sljedeći korak u metodi je isoljavanje pri čemu u originalnoj metodi koriste $MgSO_4$ i $NaCl$. Ostale opcije su magnezijev klorid, natrijev nitrat, natrijev sulfat, litijev klorid i fruktoza, ali je odvajanje najbolje primjenom prvih dviju soli (Rejczak i Tuzimski, 2015). Zbog egzotermne reakcije hidratacije, dodavanjem $MgSO_4$ dolazi do otpuštanja topline, a povišena temperatura pogoduje ekstrakciji nepolarnih mikotoksina. Dodavanje $NaCl$ uz $MgSO_4$ dodatno pospješuje odvajanje jer $NaCl$ kontrolira polarnost ekstrakcijskog otapala i time povećava selektivnost ekstrakcije. Optimalan omjer $NaCl$ i $MgSO_4$ za raspodjelu vodene i organske faze je 1:4 jer dovodi do najboljeg oporavka i najmanje koekstrakcije.

Posljednji korak je pročišćavanje i sušenje MeCN ekstrakata pomoću d-SPE epruveta (2 mL ili 15 mL). Najkorišteniji sorbenti u dosadašnjim ispitivanjima bili su primarni sekundarni amin (PSA) i $MgSO_4$. Zabilježeno je da PSA, slab anionski izmjenjivač, učinkovito eliminira masne i organske kiseline, a donekle može ukloniti i šećere i neke pigmente poput antocijanidina. U procesu čišćenja, $MgSO_4$ se obično koristi kao sol za sušenje MeCN ekstrakata jer učinkovito uklanja zaostalu vodu pa nema potrebe za uparavanjem ekstrakta prije analize. Uz PSA i $MgSO_4$, razvijeni su i drugi sorbenti za uklanjanje smetnji poput oktadecil silicija (C18) kao sorbenta reverzne faze koji može zadržati masti, vitamine i minerale. Također, razvijen je sorbent na bazi cirkonija Z-Sep koji se temelji na cirkonijevom oksidu i Z-Sep Plus koji se sastoji od cirkonijevog oksida i C18. Posljednja dva sorbenta učinkovitije smanjuju razinu masti i pigmenta u matricama u odnosu na PSA i C18 (Hamed i sur., 2017).

1.9. Metode za detekciju mikotoksina u biološkim uzorcima

Problemi koji se javljaju kod određivanja mikotoksina u biološkim uzorcima su obično jako niske koncentracije i vezanost određenih mikotoksina u obliku glukuoronida.

Razvoj tekućinske kromatografije spregnute s tandemskom masenom spektrometrijom (LC-MS/MS) omogućio je multibiomarkersko određivanje mikotoksina u biološkim uzorcima pri iznimno niskim koncentracijama u kakvima su često prisutni u okolišu. LC-MS/MS zadnjih je godina najčešće korištena tehnika detekcije mikotoksina u biološkim uzorcima, a ostale alternative bile su tekućinska kromatografija s fluoresencijskim detektorom (LC-FD), plinska kromatografija s tandemskom masenom spektrometrijom (GC-MS/MS) i imunoenzimaska (ELISA) metoda (Escrivá i sur., 2017). GC odvajanje ograničeno je na hlapljive i termički

stabilne analite, dok LC odvajanje omogućuje analizu šireg spektra spojeva, uključujući termički nestabilne spojeve i ionske kemikalije. Brža analiza postiže se kombiniranjem LC i GC s tandemskom MS detekcijom, a razvoj QuEChERS tehnike povećao je upotrebu GC-MS/MS i LC-MS/MS (Zhao i sur., 2014).

Posljednjih godina razvijene su metode za analizu krvne plazme i urina na više meta odjednom, takozvano multibiomarkersko određivanje. Procjena izloženosti mikotoksinima pri tom se vrši mjerenjem definiranih biomarkera (Baldwin i sur., 2011). Tipičnim biomarkerima izloženosti smatramo same matične mikotoksine, njihove proteinske ili DNA adukte i njihove glavne metabolite faze 1 ili faze 2 (npr. konjugati glukuronida). Tako su za AFB1, koji je strukturno srodan STC-u, najvažniji biomarkeri izloženosti adukt AFB1-lizin i metabolit prve faze aflatoksin M1 (AFM1).

Koristeći multibiomarkerski pristup i LC-MS/MS metodu za analizu provedeno je 2014. u Njemačkoj ispitivanje uzoraka urina zdravih dobrovoljaca na 23 mikotoksina, primjerice deoksinivalenol (DON), deoksinivalenol-3-glukuronid (DON-3-GlcA), T-2 toksin (T-2), fumonizin B1 (FB1) i fumonizin B2 (FB2). Prije istraživanja ispunili su upitnik o učestalosti konzumiranja hrane (FFQ) u posljednja 24 sata te je uspoređivanjem podataka o njihovoj prehrani i rezultata o izloženosti mikotoksinima dobiven prvi uvid u izloženost mikotoksinima u srednjoj Europi povezanoj s prehranom (Gerding i sur., 2014).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Budući da su podaci o direktnoj izloženosti ljudi kancerogenom mikotoksinu STC jako ograničeni, a radi se o mikotoksinu koji je visoko zastupljen u okolišu, odlučili smo istražiti koncentracije STC u krvi dobrovoljnih darivatelja kako bismo procijenili izloženost ljudi zdrave populacije ovom mikotoksinu. Pri tome je važno optimizirati metodu kojom bi se mogao detektirati i kvantificirati STC u biološkim uzorcima.

Stoga su ciljevi ovoga rada:

- optimizirati metodu ekstrakcije STC iz krvne plazme
- na temelju dobivenih rezultata koncentracije STC u plazmi zdravih dobrovoljnih darivatelja krvi procijeniti izloženost zdrave populacije STC-u
- utvrditi poveznicu prisustva STC u krvnoj plazmi obzirom na metodu pripreme uzoraka, dob i spol ispitanika

Rezultati ovoga istraživanja omogućili bi primjenu metode obrade uzorka krvi kod procjene izloženosti ljudi i životinja STC-u i za evaluaciju njegove toksikokinetike. Također bi otvorilo mogućnost istraživanja uloge STC u inicijaciji i tijeku kroničnih upalnih i malignih bolesti kod ljudi povezanih s izloženosti STC-u.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- sterigmatocistin (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, SAD)
- acetonitril i ledena octena kiselina (Panreac Quimica SLU, Darmstadt, Njemačka)
- metanol (VWR Chemicals, Prolabo, Radnor, Pennsylvania, SAD)
- mravlja kiselina (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- mješavina soli: magnezijev sulfat, natrijev klorid, natrijev citrat tribazični dihidrat, natrijev citrat dibazični seskvihidrat (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, SAD)

3.1.2. Radni instrumenti

- termomikser (Eppendorf ThermoMixer C, Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- centrifuga (Tabletof Centrifuge Z 326 K, Hermle, LaborTechnik, Wehingen, Njemačka)
- SPE kolona (Strata X-A Polymeric SPE, Phenomenex, Torrance, Kalifornija, SAD)
- vakuum pumpa (Rocker 300 Oil Free Vacuum Pump, Rocker Scientific Co., Ltd, New Taipei City, Taiwan)
- termovakuum uparivač (Concentrator Plus, Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- vezani sustav tekućinske kromatografije sa masenom spektrometrijom (6550 iFunnel QTOF MS, Agilent, Santa Clara, CA, SAD)

3.2. Metode

3.2.1. Priprema uzoraka krvne plazme

Ovo istraživanje odobrilo je Etičko povjerenstvo Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu (HZTM) (KLASA: 007-07/23-01/02, Ur. Broj: 383-23-06/6-23-2, od 16. svibnja 2023.). Istraživanje je provedeno u HZTM u Zagrebu u skladu sa svim primjenjivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje i sigurnost osoba koje su sudjelovale u ovom znanstvenom istraživanju uključujući Helsinšku deklaraciju, Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske, Zakon o krvi i krvnim pripravcima.

Za provedbu analize prikupljeno je 94 uzoraka krvi dobrovoljnih darivatelja krvi u dobi od 18 do 65 godina. Uzorci su do obrade čuvani na temperaturi od 4°C ne dulje od 24 h. Ekstrakcija STC-a provedena je modifikacijom QuEChERS metode prema Anastassiades i sur. 2003, uz određene izmjene prema prirodi analita. Uzorci krvi u BD Vacutainer® EDTA epruvetama

centrifugirani su brzinom 2000 g tijekom 10 minuta, na sobnoj temperaturi, kako bi odvojili krvni serum od ostatka krvi. Supernatant, volumena oko 2,5ml prenesen je u polipropilenske epruvete za centrifugiranje (15 ml) te nam je služio za daljnju obradu kao uzorak seruma. Dodano je po 5 ml smjese acetonitrila s 1% ledene octene kiseline u svaku epruvetu koje su zatim zatvorene čepom s navojem te snažno protresene 30-tak sekunda pomoću Vortex miksera pri najvećoj brzini.

Potom je provedeno isoljavanje čime smo u uzorcima odvojili organsku od vodene faze. Za to je korištena smjesa soli sastava MgSO_4 ($4,0 \pm 0,1$ g) i NaCl ($1,0 \pm 0,1$ g) te je dodano oko 0,5 g smjese u svaku epruvetu s uzorkom. Epruvete su ponovo snažno protresene 30 sekunda s pomoću Vortex miksera pri najvećoj brzini nakon čega je slijedila inkubacija u termomikseru (40°C , 1000 rpm, 10 min). Za učinkovito razdvajanje organskog i vodenog sloja uzorci su centrifugirani na 3000 g tijekom 10 minuta, na sobnoj temperaturi.

Uzorci su obrađeni na 3 načina: M1: s propuštanjem kroz SPE (N=38), M2: bez propuštanja (N=64) i M3: M1+M2 (N =8).

Uzorci odabrani za obradu na prvi način (M1), propušteni su kroz SPE kolonu Strata X-A Polymeric SPE, Phenomenex. Slijedili smo upute proizvođača kolone, uz izmjenu da nismo podešavali pH dodatkom pufera. Kolona za ekstrakciju sa silikatnim ionskim izmjenjivačem kondicionirana je tako što smo kroz nju propustili 1ml metanola, a zatim 1 ml pročišćene vode. Nakon toga, po 1 mL acetonitrilnog supernatanta svakog uzoraka nakon centrifugiranja je propušten kroz SPE kolonu, brzinom 1-2 kapi po sekundi. Na kraju je kolona eluirana s 1 ml 100% metanola, a eluati su skupljeni u polipropilenskim mikroeprevetama. Pročišćavanje je za svaki uzorak provedeno u duplikatu.

Drugi način obrade uzoraka (M2) podrazumijevao je direktno sakupljanje 1 ml acetonitrilnog dijela supernatanta svakog uzorka nakon isoljavanja i centrifugiranja u polipropilenske mikroeprevete, u duplikatu.

Od uzoraka odabranih za treći način obrade (M3) prikupljeni su alikvoti acetonitrilnog dijela supernatanta direktno nakon isoljavanja i centrifugiranja u polipropilenske mikroeprevete, a alikvot istih uzoraka (1 ml) paralelno je propušten kroz SPE kolonu prema istoj proceduri kao za prvu skupinu uzoraka.

Svi pripremljeni ekstrakti upareni su do suha u vakuum-uparivaču na temperaturi od 60°C te pohranjeni u zamrzivaču (-20°C) do analize.

3.2.2. LC-MS/MS metoda određivanja STC

Suhi ekstrakti resuspendirani su u metanolu, a zatim su analizirani tekućinskom kromatografijom spregnutom s tandemskom masenom spektrometrijom (LC-MS/MS). LC-MS analize provedene su na 1290 UHPLC spojenom na 6550 iFunnel QTOF MS s Jet Stream ESI izvorom (Agilent, Santa Clara, CA, SAD). Razdvajanje je provedeno na Zorbax Extend-C18 Rapid Resolution HT koloni dimenzija 2,1 x 50 mm i promjera 2,8 mikrona (Agilent, Santa Clara, CA, SAD). Mobilna faza A sastojala se od ultračiste vode/0,1% mravlje kiseline, a mobilna faza B od 100% acetonitrila. Gradijent mobilne faze i brzine protoka prikazani su u tablici 1.

Tablica 1 Gradijent mobilne faze i brzine protoka

	Vrijeme (min)	Udio mobilne faze A (%)	Udio mobilne faze B (%)	Brzina protoka (ml/min)
1	8:00	40.00	60.00	0.200
2	10:00	5.00	95.00	0.200
3	10:30	85.00	15.00	0.700
4	11:10	5.00	95.00	0.700
5	14:30	5.00	95.00	0.700
6	15:30	85.00	15.00	0.400

Naknadno vrijeme od 3 minute dodano je na 40,00% A i 60% B da bi se kolona uravnotežila prije sljedećeg uzorkovanja. Temperatura kolone postavljena je na 40°C. Agilent Dual Jet Stream elektrosprej (ESI) izvor korišten je u načinu pozitivne ionizacije s dušikom kao plinom za sušenje, nebulizatorom i plaštnim plinom. Parametri (temperatura plina omotača, naponi ESI izvora i mlaznice, napon TOF fragmentora, energije sudara i stope prikupljanja mase) optimizirani su kako bi se postigli najbolji odgovori analita u potrebnim rasponima koncentracija. Za analizu su primijenjeni sljedeći optimizirani uvjeti: temperatura plina za sušenje 220°C; protok plina za sušenje 14 L/min; tlak nebulizatora 40 psi; protok plina omotača 11 L/min, temperatura plina omotača 250°C. Kalibracija TOF mase provodila se svakodnevno u modu visoke rezolucije (4 GHz) i niskom rasponu mase (1700 m/z). Referentne mase korištene za korekciju mase unutar serije bile su m/z 121,0509 i 922,0098.

Analit STC detektiran je u ekstraktima krvne plazme na temelju prisustva ionskih produkata m/z 325,0911 i 310,0680 prema masenom spektru prethodno utvrđenom za standard STC.

3.2.3. Obrada podataka i statistička analiza

Cilj statističke analize bio je utvrditi utječe li metoda pripreme uzoraka (sa i bez SPE kolone) te obilježja ispitanika (dob i spol) na prisutnost STC u uzorcima. Dob, spol i primijenjena metoda pročišćavanja predstavljale su kategorijske varijable, a za procjenu povezanosti tih varijabli i rezultata detekcije STC korišteni su hi-kvadrat(χ) i Fisherov test. Hi-kvadrat test korišten je kada je neka kategorijska varijabla mogla poprimiti tri ili više stanja (dob ispitanika), a Fisherov test korišten je kada je mogla poprimiti samo dva stanja (spol ispitanika i primijenjena metoda pročišćavanja kroz SPE kolonu). Za izvedbu testova korišten je softver GraphPad Prism 10. Razina statističke značajnosti u svim testovima bila je $\alpha < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati prisutnosti STC u plazmi dobrovoljnih darivatelja krvi prikazani su obzirom na primijenjenu metodu analize (tablica 2), te dobnu skupinu (tablica 3) i spol ispitanika (tablica 4). STC je detektiran u ukupno 21/94 prikupljenih uzoraka krvne plazme i to samo u tragovima (<100 molekula). Pri tome je STC detektiran u 18% uzoraka analiziranih nakon propuštanja kroz SPE kolonu te u 27% uzoraka krvne plazme priređenih bez prethodnog pročišćavanja kroz SPE (tablica 2). Za uzorke M1 i M2 nije utvrđena statistički značajna povezanost metode obrade uzoraka i prisutnosti STC u krvnoj plazmi ($p=0,4701$).

Tablica 2. Utjecaj prethodnog pročišćavanja ekstrakata SPE metodom na rezultate analize

Metoda pripreme uzoraka	Broj uzoraka priređen naznačenom metodom/Ukupni broj uzoraka	Broj uzoraka pozitivnih na STC/ Broj uzoraka priređen naznačenom metodom
M1	38/94	7/38
M2	64/94	17/64

M1- skupina uzoraka pročišćenih kroz SPE kolonu prije analize

M2- skupina uzoraka koji nisu pročišćeni kroz SPE kolonu prije analize

Ukupno osam uzoraka krvne plazme priređeno je paralelno sa i bez upotrebe SPE kolone (M3). U 2/8 uzorka STC je detektiran prije propuštanja kroz kolonu, dok nakon propuštanja kroz kolonu STC nije detektiran. Tri uzorka pokazala su se pozitivnima i prije i nakon propuštanja kroz SPE kolonu, a u preostala tri uzorka STC nije detektiran ni prije ni nakon propuštanja kroz kolonu.

Najveći udio pozitivnih uzoraka pokazao se u dobnoj skupini iznad 50 godina (26,1%), zatim u skupini od 31 do 50 godina (23,7%), a najmanji udio u dobnoj skupini ispod 30 godina (8,3%) (tablica 3). Nije zabilježena statistički značajna povezanost dobnih skupina i prisutnosti STC u krvnoj plazmi ($p= 0,4474$).

Tablica 3. Prisutnost STC u krvnoj plazmi obzirom na razlike u dobi ispitanika

DOBNA SKUPINA	Broj uzoraka u naznačenoj dobnoj skupini	Broj uzoraka pozitivnih na STC	Postotak pozitivnih uzoraka
od 18 do 30 godina	12	1	8,3

od 31 do 50 godina	59	14	23,7
od 51 do 65 godina	23	6	26,1

Veći udio pozitivnih uzoraka detektiran je u muškaraca (23%) nego u žena (14,3%) (tablica 4), ali bez statistički značajna povezanost prisutnosti STC u krvnoj plazmi obzirom na spol ispitanika ($p > 0,999$).

Tablica 4. Prisutnost STC u krvnoj plazmi obzirom na razlike u spolu ispitanika

SPOL	broj uzoraka	broj pozitivnih uzoraka	postotak pozitivnih uzoraka
MUŠKI	87	20	23
ŽENSKI	7	1	14,3

Iako je STC u krvnoj plazmi detektiran tek u tragovima, rezultati ovog istraživanja predstavljaju prvi nalaz STC u ljudskoj krvnoj plazmi i biološkim uzorcima u Hrvatskoj. Također možemo pretpostaviti da je opisana metoda prikladna za određivanje STC u biološkim matriksima.

Prema podacima dostupnim u literaturi STC je rijetko prisutan u krvnoj plazmi zdravih donora. Tako su Hušanašu i suradnici (2011) detektirali STC u krvnoj plazmi 1/14 zdravih ispitanika u koncentraciji 0.014 ng/ml, dok su Cao i suradnici (2018) detektirali STC kod 4/30 zdravih ispitanika u koncentraciji 0.88-2.05 µg/L. Metoda pripreme uzoraka koju su koristili Cao i suradnici (2018) uključivala je enzimsku obradu glukuronidazom što je vjerojatno utjecalo na veće koncentracije detektiranog STC u odnosu na rezultate ovoga rada.

Uspoređujući rezultate analize uzoraka koji su analizirani i prije pročišćavanja u SPE kolonama i nakon pročišćavanja u SPE kolonama, možemo pretpostaviti da se tijekom metode pročišćavanja gubi dio analita. Ipak, od koristi bi bilo provesti ispitivanje s većim brojem uzoraka obrađenim na oba načina uz obogaćivanje uzoraka STC-om kako bi se sa sigurnošću utvrdilo u kolikoj mjeri metoda pročišćavanja utječe na rezultate detekcije STC.

Ovaj rad može predstavljati temelj za buduća istraživanja kojima se bi se pratila izloženost STC-u populacije ljudi koja boluje od kroničnih upalnih i malignih bolesti koje se mogu etiološki povezati sa STC.

5. ZAKLJUČCI

U radu je prikazana metoda pripreme uzoraka pune krvi u svrhu dokazivanja mikotoksina STC u uzorcima krvne plazme zdravih dobrovoljnih darivatelja krvi različitog spola i dobi.

Nekoliko je potencijalni nedostataka opisane metode obzirom na moguće gubitke analita:

- u fazi prelaska iz plazme u acetonitril zbog jakog vezanja za proteine plazme ili prisustva metabolita STC (npr. glukuronida)
- u fazi elucije sa SPE kolone zbog nedostatnog ispiranja metanolom na sobnoj temperaturi. Uputno bi bilo ispitati ispiranje s kolone uz povišenu temperaturu ili uz drugi eluens
- različite nekovalentne interakcije s polipropilenskim materijalom

STC je detektiran samo u tragovima (<100 molekula) u 21 od 94 uzoraka i iz toga se može zaključiti da izloženost STC-u ne predstavlja zdravstveni rizik za zdravu populaciju. Dobiveni rezultati nadovezuju se na istraživanja u kojima je STC pronađen u vlažnim zatvorenim prostorima te hrani i piću kao izvora izloženosti STC-u.

Ovim istraživanjem napravljen je put za buduća istraživanja procjene izloženosti ljudi i životinja STC-u i evaluaciju njegove toksikokinetike. To bi bilo osobito važno za osobe koje borave u područjima gdje su otkrivene povećane koncentracije STC-a ili za procjenu utjecaja STC-a na kronične upalne ili maligne bolesti.

6. LITERATURA

- Anastassiades M, Lehotay SJ, Štajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and ‘dispersive solid-phase extraction’ for the determination of pesticide residues in produce. *JAOAC Int*, 2003, 86(2), 412–431.
- Baldwin TT, Riley RT, Zitomer NC, Voss KA, Coulombe RA Jr, Pestka JJ, Williams DE, Glenn AE. The current state of mycotoxin biomarker development in humans and animals and the potential for application to plant systems. *World Mycotoxin J*, 2011. 4, 257–270.
- Banfalvi G. Janus-Faced Molecules against Plant Pathogenic Fungi. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22), 12323.
- Berk Z. *Food Process Engineering and Technology*, 2018, 11, 289-310.
- Bloom E, Bal K, Nyman E, Must A, Larsson L. Mass spectrometry-based strategy for direct detection and quantification of some mycotoxins produced by *Stachybotrys* and *Aspergillus* spp. in indoor environments. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73, 4211-4217.
- Buszewski B, Szultka M. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Critic Rev in Anal Chem*, 2012, 42 (3), 198-213.
- Cao X, Li X, Li J, Niu Y, Shi L, Fang Z,... Ding H. Quantitative determination of carcinogenic mycotoxins in human and animal biological matrices and animal-derived foods using multi-mycotoxin and analyte-specific high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods. *J Chromatogr B*, 2018, 1073, 191–200.
- Chen AJ, Frisvad JC, Sun BD, Varga J, Kocsube S, Dijksterhuis J, Kim DH, Hong SB, Houbraken J, Samson RA. *Aspergillus* section *Nidulantes* (formerly *Emericella*): polyphasic taxonomy, chemistry and biology. *Stud Mycol*, 2016, 84:1–118.
- Delgado-Virgen F, Guzman de Peña D. Mechanism of sterigmatocystin biosynthesis regulation by pH in *Aspergillus nidulans*. *Braz J Microbiol*, 2009, 40 933-942.
- 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.

- Engelhart S, Loock A, Skutlarek D, Sagunski H, Lommel A, Farber H, Exner M. Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68, 3886-3890.
- Escrivá L, Font G, Manyes L, Berrada H. Studies on the Presence of Mycotoxins in Biological Samples: An Overview. *Toxins*, 2017, 9(8), 25.
- Essigmann JM, Barker LJ, Fowler KW, Francisco MA, Reinhold 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.
- Gerding J, Cramer B, Humpf HU. Determination of mycotoxin exposure in Germany using an LC-MS/MS multibiomarker approach. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58, 2358–2368.
- Hamed AM, Moreno-González D, Gámiz-Gracia L, García-Campaña AM. Evaluation of a new modified QuEChERS method for the monitoring of carbamate residues in high-fat cheeses by using UHPLC-MS/MS. *J Sep Sci*, 2017, 40, 488-496.
- Huțanașu C, Sfarti C, Trifan A, Cojocariu C, Sîngeap AM, Spac A, Stanciu C. High levels of sterigmatocystin in patients with chronic liver diseases. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 2011, 115, 33-37.
- IARC. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs volumes 1–42. IARC Monogr, Suppl 7, Lyon, IARC, 1987, 10, 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 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, 296-304.
- 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*, 2016, 16, 63-72.

- Jakšić D, Šegvić Klarić M, Crmolatac I, Šijaković Vujičić N, Smrečki V, Górecki M, Pescitelli G, Piantanida I. Unique aggregation of sterigmatocystin in water yields strong and specific circular dichroism response allowing highly sensitive and selective monitoring of bio-relevant interactions. *Mar Drugs*, 2019, 17, 629.
- Jakšić D, Sertić M, Kifer D, Kocsubè S, Mornar Turk A, Nigović B, Šarkanj B, Krska R, Sulyok M, Šegvić Klarić M. Fungi and their secondary metabolites in water-damaged indoors after a major flood event in eastern Croatia. *Indoor Air*, 2021, 31(3), 730-744.
- Jurjević Ž, 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.
- Lehotay SJ, Lightfield AR, Harman-Fetcho JA, Donoghue DA. Direct sample introduction (DSI)/GC/MS-MS for the analysis of pesticide residues in eggs. *J Agric Food Chem*, 2001, 49, 4589–4596.
- Lešić T, Kmetič I, Kiš M, Vulić A, Kudumija N, Zadavec 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.
- Nielsen KF. Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genet Biol*, 2013, 39, 103-117.
- Nielsen KF, Thrane U, Larsen TO, Nielsen PA, Gravesen S. Production of mycotoxins on artificially inoculated building materials. *Int Biodeterior Biodegrad*, 1998, 42, 9- 16.
- Pfeiffer E, Fleck SC, Metzler M. Catechol Formation: A Novel Pathway in the Metabolism of Sterigmatocystin and 11-Methoxysterigmatocystin. *Chem Res Toxicol*, 2014, 27, 2093-2099.
- Purchase IF, van der Watt JJ. Carcinogenicity of sterigmatocystin. *Food Cosmet Toxicol*, 1970, 8, 289-295.

- Rank C, Nielsen KF, Larsen TO, Varga J, Samson RA, Frisvad JC. Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biol*, 2011, 115, 406-420.
- Rejczak T, Tuzimski T. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chem*, 2015, 13, 980–1010.
- Scott PM, Trucksess MW. Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. *J AOAC Int*, 1997, 80(5), 941.
- Sivakumar V, Thanislass J, Niranjali S, Devaraj H. Lipid peroxidation as a possible secondary mechanism of sterigmatocystin toxicity. *Hum Exp Toxicol*, 2001, 20, 398- 403.
- Smoker M, Tran K, Smith RE. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in shrimp. *J Agric Food Chem*, 2010, 58, 12101–12104.
- Sospedra I, Blesa J, Soriano JM, Mañes J. Use of the modified quick easy cheap effective rugged and safe sample preparation approach for the simultaneous analysis of type A and B-trichothecenes in wheat flour. *J Chromatogr A*, 2010, 1217, 1437–1440.
- Straumfors A, Uhlig S, Eriksen GS, Heldal KK, Eduard W, Krska R, Sulyok M. Mycotoxins and other fungal metabolites in grain dust from Norwegian grain elevators and compound feed mills. *World Mycotoxin J*, 2015, 8, 361–378.
- 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, 2101-211.
- Stubbings G, Bigwood T. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach. *Anal. Chim Acta*, 2009, 637, 68–78.
- Šmežil A. Ispitivanje prisutnosti sterigmatocistina u pivu metodom tankoslojne kromatografije. Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko- biokemijski fakultet. 2022
- Tian H, Lou J, Du C. Determination of sterigmatocystin in cancerous tissues, blood and urine in patients with liver and stomach cancer. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*, 1995, 29, 276-278.

- Tuomi T, Reijula K, Johnsson T, Hemminki K, Hintikka EL, Lindroos O, Kalso S, Koukila-Kahkola P, Mussalo-Rauhamaa H, Haahtela T. Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66, 1899-1904.
- Versilovskis 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.
- Viegas C, Nurme J, Piecková E, Viegas S. Sterigmatocystin in foodstuffs and feed: aspects to consider. *Mycology*, 2018, 11(2):91-104.
- Vishwanath V, Sulyok M, Weingart G, Kluger B, Taubel M, Mayer S, Schuhmacher R, Krska R. Evaluation of settled floor dust for the presence of microbial metabolites and volatile anthropogenic chemicals in indoor environments by LC-MS/MS and GC-MS methods. *Talanta*, 2011, 85, 2027-2038.
- Warth B, Sulyok M, Berthiller F, Schuhmacher R, Krska R. New insights into the human metabolism of the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone. *Toxicol Lett*, 2013, 220(1):88–94.
- Yu J, Chang P-K, Ehrlich KC, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA, Linz JE, Woloshuk CP, Bennet JW. Clustered Pathway Genes in Aflatoxin Biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 70, 1253-1262.
- Zhao MA, Feng YN, Zhu YZ, Kim JH. Multi-residue method for determination of 238 pesticides in Chinese cabbage and cucumber by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: comparison of different purification procedures, *J Agric Food Chem*, 2014, 62, 11449.
- Zwicker GM, Carlton WW, Tuite J. Long-term administration of sterigmatocystin and *Penicillium viridicatum* to mice. *Food Cosmet Toxicol*, 1974, 12, 491-497.
- Żwir-Ferenc A, Biziuk M. Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications. *Polish J of Environ Stud*, 2006, 15, 677-690.

7. SAŽETAK

Podaci o izravnoj izloženosti ljudi mikotoksinu sterigmatocistinu (STC) su ograničeni, iako je STC vrlo prisutan u zatvorenim prostorima. Stoga smo odlučili provesti analizu krvne plazme dobrovoljnih darivatelja krvi kako bismo procijenili izloženost zdravih osoba ovom mikotoksinu. Metoda za ekstrakciju STC-a iz uzoraka krvne plazme (N = 94) slijedila je modificiranu QUECHERS metodu, u kojoj je ekstrakcija zakiseljenim acetonitrilom kombinirana s dodatkom soli i pročišćavanjem putem SPE kolona. Pripremljeni ekstrakti analizirani su metodom LC-MS/MS. Analiza je potvrdila prisutnost STC-a u 21/94 uzoraka, ali samo u tragovima, iz čega se može zaključiti da izloženost STC-u ne predstavlja zdravstveni rizik u populaciji obuhvaćenoj istraživanjem. U budućnosti bi se ova metoda mogla koristiti za procjenu izloženosti ljudi i životinja STC-u i evaluaciju njegove toksikokinetike. To bi bilo osobito važno za osobe koje borave u područjima gdje su otkrivene povećane koncentracije STC-a ili za procjenu utjecaja STC-a na kronične upalne ili maligne bolesti.

8. SUMMARY

The data on direct human exposure to the mycotoxin sterigmatocystin (STC) is limited, even though STC is highly prevalent in indoor environments. Thus, we decided to conduct an analysis of blood plasma from voluntary blood donors to assess the exposure of healthy individuals to this mycotoxin. The method for extracting STC from blood plasma samples (N = 94) followed the modified QUECHERS method, in which acidic acetonitrile extraction was combined with the addition of salts and purification through SPE columns. The prepared extracts were analyzed using the LC-MS/MS method. The analysis confirmed the presence of STC in 21/94 samples, but only in trace amounts, allowing us to conclude that STC exposure does not pose a health risk to the studied population. In the future, this method could be used in assessing human and animal exposure to STC and evaluating its toxicokinetics. This would be particularly important for individuals residing in areas where increased concentrations of STC have been detected, or to evaluate implication of STC in chronic inflammatory or malignant diseases.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Primjenjivost modificirane QuEChERS metode za detekciju mikotoksina sterigmatocistina u krvnoj plazmi zdravih darivatelja krvi

Ana Perišić

SAŽETAK

Podaci o izravnoj izloženosti ljudi mikotoksinu sterigmatocistinu (STC) su ograničeni, iako je STC vrlo prisutan u zatvorenim prostorima. Stoga smo odlučili provesti analizu krvne plazme dobrovoljnih darivatelja krvi kako bismo procijenili izloženost zdravih osoba ovom mikotoksinu. Metoda za ekstrakciju STC-a iz uzoraka krvne plazme (N = 94) slijedila je modificiranu QuEChERS metodu, u kojoj je ekstrakcija zakiseljenim acetonitrilom kombinirana s dodatkom soli i pročišćavanjem putem SPE kolona. Pripremljeni ekstrakti analizirani su metodom LC-MS/MS. Analiza je potvrdila prisutnost STC-a u 21/94 uzoraka, ali samo u tragovima, iz čega se može zaključiti da izloženost STC-u ne predstavlja zdravstveni rizik u populaciji obuhvaćenoj istraživanjem. U budućnosti bi se ova metoda mogla koristiti za procjenu izloženosti ljudi i životinja STC-u i evaluaciju njegove toksikokinetike. To bi bilo osobito važno za osobe koje borave u područjima gdje su otkrivene povećane koncentracije STC-a ili za procjenu utjecaja STC-a na kronične upalne ili maligne bolesti.

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

Rad sadrži: 24 stranica, 4 tablice i 51 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: sterigmatocistin, krv, plazma, SPE, LC-MS/MS, STC

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

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

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

Dr. sc. Miranda Sertić, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2024.

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

Applicability of the modified QuEChERS method for the detection of the mycotoxin sterigmatocystin in the blood plasma of healthy blood donors

Ana Perišić

SUMMARY

The data on direct human exposure to the mycotoxin sterigmatocystin (STC) is limited, even though STC is highly prevalent in indoor environments. Thus, we decided to conduct an analysis of blood plasma from voluntary blood donors to assess the exposure of healthy individuals to this mycotoxin. The method for extracting STC from blood plasma samples (N = 94) followed the modified QuEChERS method, in which acidic acetonitrile extraction was combined with the addition of salts and purification through SPE columns. The prepared extracts were analyzed using the LC-MS/MS method. The analysis confirmed the presence of STC in 21 out of 94 samples, but only in trace amounts, allowing us to conclude that STC exposure does not pose a health risk to the studied population. In the future, this method could be used in assessing human and animal exposure to STC and evaluating its toxicokinetics. This would be particularly important for individuals residing in areas where increased concentrations of STC have been detected, or to evaluate implication of STC in chronic inflammatory or malignant diseases.

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

Thesis includes: 24 pages, 4 tables and 51 references. Original is in Croatian language.

Keywords: sterigmatocystin, blood, plasma, SPE, LC-MS/MS, STC

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

Reviewers: **Daniela Jakšić, Ph.D.** *Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Maja Šegvić Klarić, Ph.D., *Full professor with tenure, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Miranda Sertić, Ph.D., *Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

The thesis was accepted: July 2024.