

Marta Huskić

**Strukturalna karakterizacija fumonizina masenom
spektrometrijom**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Mirande Sertić. Ovaj rad napravljen je u sklopu istraživačkog projekta MycotoxA koji financira Hrvatska zaklada za znanost (HRZZ-IP-09-2014-5982).

Zahvaljujem mentorici, doc.dr.sc. Mirandi Sertić na stručnom vodstvu i savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada! Osim iznimne profesionalnosti, hvala joj na brizi, toplini i ohrabrenjima kojima me je vodila kroz ovaj put!

Zahvaljujem svojim prijateljima, a posebno Mihaeli, Danijeli, Ivi i Nicole na podršci, ljubavi i razumijevanju koju su mi pružale! Hvala vam što ste ostale ovdje kada je bilo najteže!

Najveća hvala mojim roditeljima na bezuvjetnoj ljubavi i podršci koju mi pružaju još od malih nogu. Mama i tata, hvala vam za sve!

Ovaj diplomski rad posvećujem svojoj braći, Adi i Svenu - hvala što ste uvijek bili tu.

Voli vas vaš Muc!

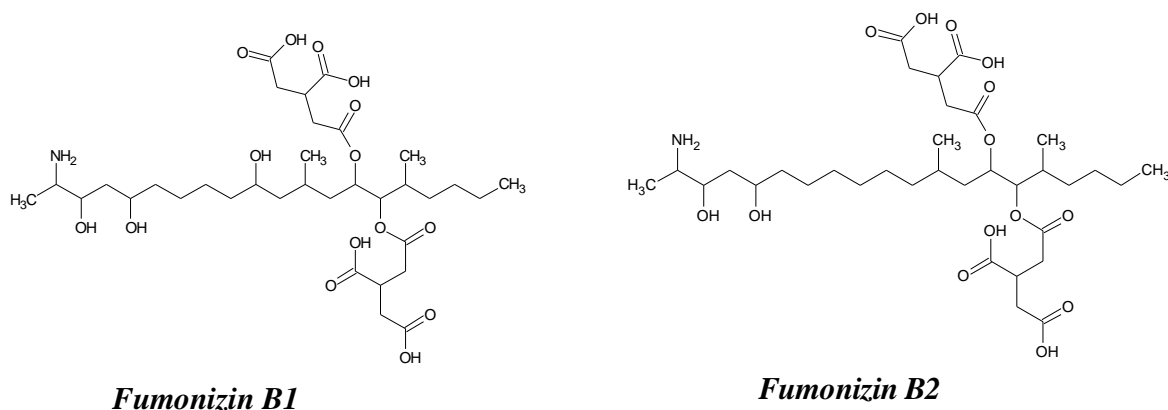
SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Fumonizini.....	1
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	6
3. MATERIJALI I METODE.....	7
3.1 Materijali.....	7
3.1.1 Kemikalije.....	7
3.1.2 Radni instrumenti.....	7
3.1.3 Pribor.....	8
3.1.4 Programski paketi.....	8
3.2 Analitičke metode.....	8
3.2.1 Priprema mobilne faze.....	8
3.2.2 Priprema standardnih otopina.....	9
3.2.3 Uvjeti analize uzorka.....	9
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	11
4.1 Optimizacija kromatografskih uvjeta analize.....	11
4.2 Strukturna identifikacija analita masenom spektrometrijom.....	12
4.2.1 Fumonizin B1.....	13
4.2.2 Fumonizin B2.....	17
4.3 Analiza uzorka.....	21
5. ZAKLJUČCI.....	23
6. LITERATURA.....	24
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	26
7.1. Sažetak.....	26
7.2 Summary.....	27
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1 Fumonizini

Fumonizini su mikotoksini koje proizvode plijesni roda *Fusarium spp.*, primarno *Fusarium verticilloides* (ranije zvana *F. moniliforme*) i *Fusarium proliferatum* (www.msdsvetmanual.com). Također je zabilježena i proizvodnja kod drugih vrsta uključujući *Aspergillus* vrste iz sekcije *Nigri* (*A. niger* i *A. welwitschiae*) i kod najmanje jedne vrste roda *Tolyocladium*, *Tolyocladium inflatum* (Varga i sur., 2015; Haschek i Voss, 2013). Fumonizini pripadaju nedavno otkrivenim toksinima koji su izolirani i kemijski karakterizirani 1988. godine. Poznato je najmanje 28 različitih forma fumonizina, većina označena kao A-serije, B-serije, C-serije i P-serije (Schmale i Munkvold, 2018). Najznačajniji su fumonizini B-serije, točnije fumonizin B1 (FB1) i fumonizin B2 (FB2) koji su približno jednaki po toksičnosti, ali se prirodno pojavljuju u omjeru 3:1 za FB1 u odnosu na FB2. Strukturna formula fumonizina prikazana je na Slici 1.



Slika 1. Strukturne formule fumonizina B1 i fumonizina B2.

Pronalazimo ih diljem svijeta, dok su u Kini i Južnoj Africi pronađene osobito visoke koncentracije koje prelaze 100 ppm. Mnogo niže koncentracije, oko 1 ppm, nalaze se u kukuruzu SAD-a i Južne Amerike, dok u kukuruzu u Kanadi gotovo da nema fumonizina. Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) preporučuje maksimalne razine fumonizina od 4 ppm-a u hrani za ljude i do 100 ppm-a u hrani za životinje, ovisno o kojoj se vrsti hrane i životinja se radi (Tablica 1 i Tablica 2). Također, FDA vjeruje da kontrola fumonizina na ove preporučene razine može smanjiti

izloženost fumonizinima koji se mogu naći u proizvodima kukuruza namijenjenima konzumaciji ljudi i životinja (www.fda.gov).

Tablica 1. Preporučene maksimalne doze fumonizina u ljudskoj hrani.

LJUDSKA HRANA	
<i>PROIZVOD</i>	<i>UKUPNI FUMONIZINI (FB1, FB2, FB3)</i>
Proizvodi od suhog mljevenog kukuruza (npr. granulati, kukuruzno brašno, kukuruzno brašno s udjelom masti <2,25% prema osnovi suhe tvari).	2 ppm
Cijeli ili djelomično degenerirani suhi mljeveni proizvodi od kukuruza (npr. granulati, granulirano kukuruzno brašno, kukuruzno brašno sa sadržajem masti >2,25% prema osnovi suhe tvari)	4 ppm
Suhi mljeveni kukuruz	4 ppm
Očišćeni kukuruz namijenjen za proizvodnju mase	4 ppm
Očišćeni kukuruz namijenjen kopicama	3 ppm

Tablica 2. Preporučene maksimalne dnevne doze fumonizina u životinjskoj hrani.

ŽIVOTINJSKA HRANA	
<i>KUKURUZ I PROIZVODI OD KUKURUZA</i>	<i>UKUPNI FUMONIZINI (FB1, FB2, FB3)</i>
Kopitari i zečevi	5 ppm (ne više od 50% prehrane)**
Svinje i somovi	20 ppm (ne više od 50% prehrane)**
Preživači, perad, telad *	30 ppm (ne više od 50% prehrane)**
Preživači > 3 mjeseca uzgajaju se za klanje i proizvodnju krzna	60 ppm (ne više od 50% prehrane)**
Perad uzgajana za klanje	100 ppm (ne više od 50% prehrane)**
Sve druge vrste ili klase stoke i kućnih ljubimaca	10 ppm (ne više od 50% prehrane)**

*Uključuje laktaciju mliječnih goveda i kokoši koja polažu jaja za ljudsku prehranu

** Na osnovi suhe težine

Koncentracije fumonizina variraju geografski i često se razlikuju između obližnjih lokacija. Tako na kontaminaciju kukuruza fumonizinima utječu klimatski uvjeti u kojima je kukuruz uzgajan. Primjerice proizvodnji fumonizina pogoduju visoka temperatura (20-30 °C) i vlaga (relativna vlaga zraka iznad 98 %), ali i genotip kukuruza (određeni hibridi su otporniji na kontaminaciju fumonizinima od tradicionalnog kukuruza) te oštećenja zrna insektima (Domijan, 2013). Kada insekt ošteti biljku, omogućava lakši ulazak gljivica i razvoj toksina. Otpornost na kukuruzne insekte postignut je genetskom modifikacijom s bakterijom *Bacillus thuringiensis* koja stvara kristalne proteine koji su toksični za mnoge vrste kukaca. U skladu s tim, koncentracije fumonizina bile su niže u GMO kukuruzu nego u nemodificiranim sortama koje su uzgajane pod uvjetima koji pogoduju velikim količinama štete insekata (Haschek i Voss, 2013; Dickman, 2010).

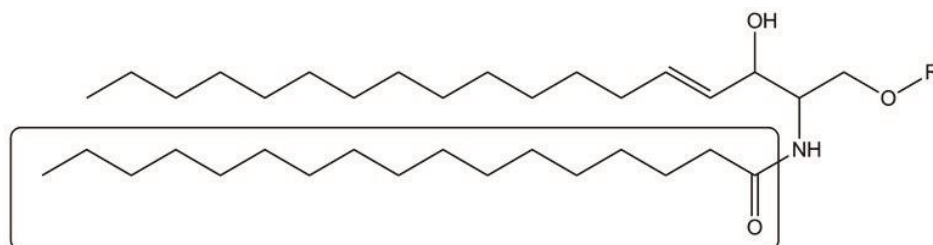
Pokazalo se da je koncentracija fumonizina niža u hrani pripremljenoj iz kukuruza namijenjenoj ljudskoj prehrani (tortilje, kokice, cornflakes) nego u kukuruzu zato što se prilikom pripreme te hrane koriste alkalna otopina, voda i visoka temperatura koje snižavaju koncentraciju fumonizina u njoj. Ekstrudno kuhanje u kombinaciji s dodatkom glukoze pokazalo se kao obećavajuća metoda za značajno smanjenje koncentracija fumonizina i njegovu toksičnost (Voss i sur., 2011).

Otkriće fumonizina bio je glavni proboj koji je okončao potragu za identificiranjem mikotoksina koji uzrokuju životinjske bolesti povezane s kukuruzom. Biološka raspoloživost, distribucija i toksikokinetika fumonizina proučavana je u više vrsta. Konji su najosjetljivija vrsta životinja na fumonizine, jer ingestijom kontaminirane hrane razvijaju sindrom koji se naziva leukoencefalomalacija kopitara (ELEM). Početni klinički znakovi mogu uključivati nedostatak apetita i neuroloških znakova, uključujući besciljno lutanje, depresiju, hiperosjetljivost ili iznenadnu smrt. Kardiovaskularna disfunkcija uključuje smanjenje brzine otkucaja srca što može pridonijeti znakovima dispneje i edema, a konji s oštećenjem jetre mogu pokazivati hemoragiju i depresiju. Vrijeme od početka kliničkih znakova do smrti može trajati 24 sata do 7 dana. Tipično, ako se dogodi samo oštećenje jetre i prestanak izloženosti fumonizinu, oštećenja jetre mogu biti reverzibilna (Wilson, 2012). Poput ELEM, svinjski plućni edem povezan je s potrošnjom pljesnive hrane. Perad i preživači su manje osjetljivi, a za eksperimentalne je glodavce nefrotoksičan i hepatotoksičan.

U ljudi je izloženost FB1 povezana s razvojem primarnog karcinoma jetre i karcinoma jednjaka koji se učestalo pojavljuju u regijama svijeta (kao Transkeiska regija u Južnoj Africi) u kojima ljudi rabe kukuruz u dnevnoj prehrani. I pojavljivanje defekta neuralne cijevi u nekim je zemljama Srednje Amerike (kao Meksiko i Honduras) povezano s učestalom

konzumacijom kukuruzne hrane kontaminirane s FB1. Ipak se sa sigurnošću ne može povezati razvoj navedenih bolesti u ljudi s izloženosti FB1. Kako je FB1 uzročnik ELEM-a, poremećaja središnjega živčanog sustava (SŽS) u konja, to upućuje na mogućnost da FB1 uzrokuje promjene u mozgu. Nekoliko studija na pokusnim životinjama i na staničnim kulturama stanica podrijetlom iz SŽS-a potvrdilo je da je FB1 neurotoksičan iako mehanizam neurotoksičnosti FB1, pa tako i mehanizam njegove toksičnosti, još nije do kraja razjašnjen (Waskiewicz, 2013).

Dosad je proučavano svega nekoliko mehanizama toksičnosti pa tako i neurotoksičnosti fumonizina na staničnoj razini. Jedan od najvažnijih je remećenje normalnog metabolizma sfingolipida. Sfingolipidi su složeni lipidi građeni od sfingoidne baze (najčešće sfingozin), na koju je vezana masna kiselina, a na sfingoidnu bazu mogu biti vezani i razni supstituenti (Slika 2).

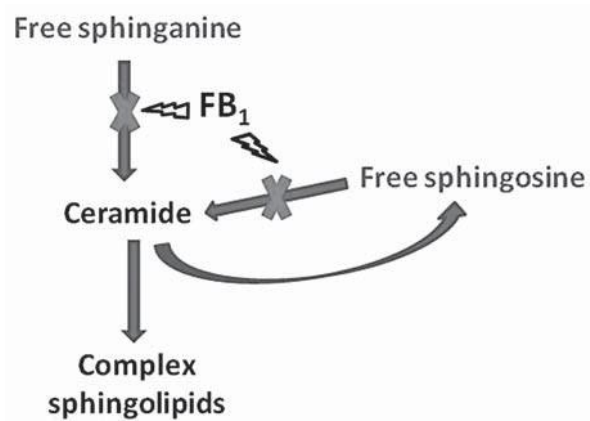


Slika 2. *Kemijska struktura sfingolipida. Osnova sfingolipida je sfingoidna baza na koju je vezana masna kiselina (uokvireno) te razni supstituenti (R) koji definiraju vrstu sfingolipida (primjerice, R: „H“ - ceramid; „fosfokolin“ - sfingomijelin; „šećer“ - glikosfingolipid)*

Neki od poznatijih sfingolipida su ceramid, sfingomijelini i gangliozidi. Sfingolipidi imaju brojne funkcije u stanici; osim što su građevne molekule staničnih membrana, sfingolipidi sudjeluju i u staničnoj signalizaciji kao i u staničnom prepoznavanju. Uočeno je da fumonizini remete normalan metabolizam sfingolipida zbog toga što sa svojom kemijskom strukturom fumonizini nalikuju kemijskoj strukturi sfingoidne baze sfinganina (Wang i sur., 1991).

Pokazalo se da svojim upletanjem u normalan metabolizam sfingolipida fumonizini dovode do akumulacije sfinganina (i u manjoj mjeri sfingozina) što dovodi do poremećaja normalne sinteze složenih sfingolipida (Wang i sur., 1991; Voss i sur., 2007). Fumonizini kompetitivno inhibiraju ključni enzim u metabolizmu sfingolipida – ceramid sintazu što rezultira povećanom koncentracijom slobodnog sfinganina, u krvi, plazmi i tkivima, i malim

povećanjem sfingozina, dok se razine ceramida i SL smanjuju. Mehanizam djelovanja fumonizina prikazan je na Slici 3. Studije na pokusnim životinjama kao i na staničnim kulturama potvrdile su upletanje fumonizina u metabolizam sfingolipida (Kwon i sur., 1997; Kwon i sur., 2000; Osuchowski i Sharma, 2005).



Slika 3. *Pojednostavljeni metabolizam sfingolipida.*

Utvrđeno je i da je oksidacijski stres, iako se pojavljuje poslije drugih zabilježenih promjena, jedan od mehanizama toksičnosti fumonizina. Također, nedavne studije pokazale su da fumonizini remete normalnu homeostazu kalcija u stanici i tako moguće uzrokuju staničnu smrt. Međutim, niti jedan od spomenutih mehanizama toksičnosti fumonizina ne isključuje drugoga već toksični učinak fumonizina jest vjerojatno kombinacija svih spomenutih mehanizama. Za vjerovati je da će daljnja istraživanja ukazati i na druge mehanizme toksičnosti fumonizina (Domijan, 2013; Domijan 2012).

OBRAZLOŽENJE TEME

Fumonizini su skupina strukturno srodnih mikotoksina koji su poznati kao zagađivači kukuruza i prehrambenih proizvoda na bazi kukuruza širom svijeta. *Fusarium verticillioides* i *Fusarium proliferatum* vrste su plijesni uglavnom odgovorne za proizvodnju fumonizina u takvim supstratima. Za razliku od fuzarija, aspergile iz sekcije *Nigri*, proizvođači FB2, toleriraju veću koncentraciju šećera u supstratu i stoga često kontaminiraju grožđe, sušeno voće, ali i luk. Osim toga, aspergile iz sekcije *Nigri* vrlo su često prisutne u zraku zatvorenih prostora (mlinovi, silosi žitarica, vlažni stambeni prostori) te se u njihovim konidijama može naći FB2 koji inhalacijom može dospjeti u organizam. Učinci FB2 nakon unosa inhalacijom slabo su istraženi.

Uzimajući u obzir ranije opisani toksični potencijal fumonizina, kao i činjenicu da ti mikotoksini mogu kontaminirati različite supstrate, od velike je važnosti razviti analitičku metodu za njihovu ekstrakciju, detekciju i kvantifikaciju.

Stoga je cilj ovog diplomskog rada predloženom HPLC-MS/MS metodom odrediti fragmentacijske puteve fumonizina B1 i fumonizina B2 što će omogućiti lakšu strukturnu karakterizaciju, odnosno identifikaciju fumonizina B1 i fumonizina B2 u uzorcima ekstrakta plijesni proizvođača izoliranih iz zraka.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Kemikalije

Standardne supstancije

- fumonizin B1 (Sigma-Aldrich, Steinhem, Njemačka)
- fumonizin B2 (Sigma-Aldrich, Steinhem, Njemačka)

Plinovi

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

Otapala

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

Uzorci

- ekstrakt plijesni proizvođača izoliranih iz zraka

3.1.2. Radni instrumenti

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

3.1.3 Pribor

- Bočice volumena 2,0 mL za uzorkovanje sustavom za tekućinsku kromatografiju (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Generator dušika NM30LA (PEAK Scientific, Renfrewshire, Velika Britanija)
- Kolona za tekućinsku kromatografiju Symmetry C18 dimenzija 150 mm x 4,6 mm, veličina čestica 3,5 μm (Waters, Milford, SAD)
- Stakleni sustav za filtriranje mobilnih faza u tekućinskoj kromatografiji (Sartorius, Goettingen, Njemačka)
- Sustav za pročišćavanje vode Waterpro (Labonco, Kansas City, MI, SAD)

3.1.4 Programski paketi

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

3.2 Analitičke metode

3.2.1 Priprema mobilne faze

Mobilna faza pripremljena je od dva eluenta, gdje je eluent A bio acetonitril + 0,1 % mravlja kiselina, a eluent B ultra čista voda + 0,1 % mravlja kiselina. Metoda korištena u analizi optimizirana je na temelju analitičkih HPLC-MS metoda iz već objavljenih članaka. Mobilna faza profiltrirana je pomoću staklenog sustava za filtriranje mobilnih faza.

3.2.2 Priprema standardnih otopina

Standardne otopine fumonizina B1 i fumonizina B2 pripravljene su otapanjem standarda u ultračistoj vodi koncentracije 0,1 mg/mL, i po potrebi razrijeđene do željenih radnih koncentracija.

3.2.3 Uvjeti analize uzoraka

Identifikacija fumonizina B1 i fumonizina B2 provedena je na tekućinskom kromatografu Agilent 1100, pri čemu je korištena Symmetry (Waters) C18 kolona obrnutih faza, dimenzija 150 mm x 4,6 mm i veličine čestica 3,5 µm. Temperatura kolone iznosila je 35°C. Korištena je gradijentna metoda elucije (Tablica 3), a brzina protoka mobilne faze bila je 1 ml/min. Detekcija je vršena pomoću MS detektora.

Tablica 3. Binarni gradijentni program HPLC-MSⁿ metode za analizu fumonizina B1 i fumonizina B2.

<i>Vrijeme (min)</i>	<i>Udio eluenta A* (%)</i>	<i>Udio eluenta B** (%)</i>
0	25	75
1	25	75
5	40	60
10	40	60
12	25	75
17	25	75

*eluent A: ACN + 0.1 % mravlje kiseline

**eluent B: ultračista voda + 0.1 % mravlje kiseline

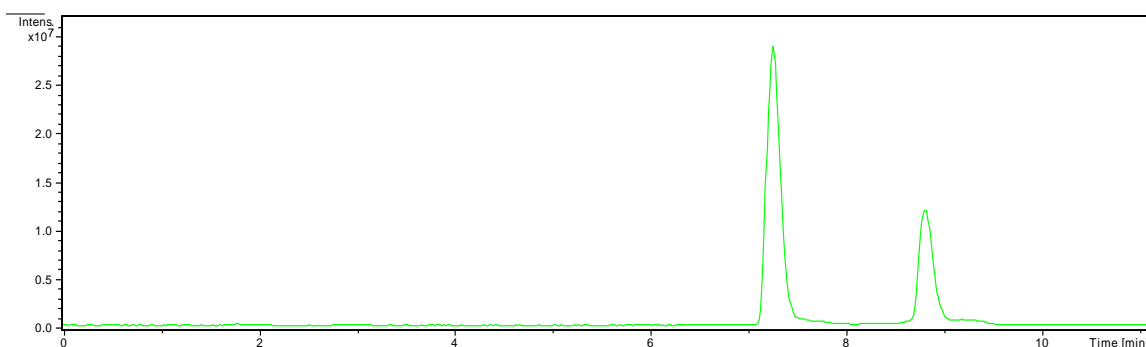
Strukturna karakterizacija provedena je masenim spektrometrom koji se sastojao od elektrosprej ionizatora i analizatora stupice za ione. Analiza se provodila koristeći elektrosprej ionizaciju u pozitivnom načinu snimanja. Temperatura izvora iona iznosila je 325°C, a napon na kapilari 3,5 kV. Kao plin za sušenje koristio se dušik pri protoku 6,0 L/min i kao plin za sušenje pri tlaku 10,0 psi. Optimalan spektar snimanja masa iona bio je u

rasponu m/z od 300 do 760. Kao plin za koliziju korišten je helij. Broj iona zadržanih u analizatoru iznosio je 30 000, a zadržavani su do 200 ms.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Optimizacija kromatografskih uvjeta analize

Mobilna faza sastojala se od eluenta A, koji sadrži acetonitril + 0,1 % mravlje kiseline, i eluenta B, koji sadrži ultra pročišćenu vodu + 0,1 % mravlje kiseline. Protok mobilne faze podešen je na brzinu od 1 ml/min. Elucija je tekla sljedećim gradijentim programom: prvu min elucija je išla pod uvjetima od 75 % eluenta B, zatim smo do 5. min smanjivali udio eluenta B na 60 % što je trajalo idućih 10 min, i onda smo od 15. do 17. min povećavali udio eluenta B na 75 % i tako držali do 25. min (Tablica 3). Na ovaj način ustanovljeno je da fumonizin B1 eluira prvi s vremenom zadržavanja 6,9 min, a fumonizin B2 eluira drugi s kolone s vremenom zadržavanja na 8,6 min. Snimljeni kromatogram prikazan je na Slici 4.

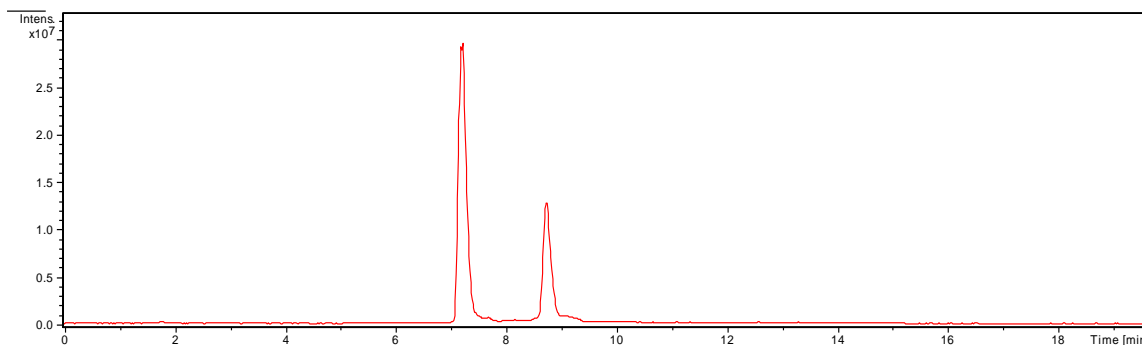


Slika 4. TIC kromatogram fumonizina B1 i fumonizina B2.

Uvjeti analize: Symmetry kolona C18 4.6x150mm, 3.5 μ m, temperatura kolone 35 $^{\circ}$ C, mobilna faza A: acetonitril + 0,1 % mravlja kiselina, B: ultra pročišćena voda + 0,1 % mravlja kiselina; brzina protoka 1.0 ml/min; gradijent: 0-1 min 75 % B, 1-5 min 75 % \rightarrow 60 % B, 5-15 min 60 % B, 15-17 min 60 % \rightarrow 75 % B, 17-25 min 75 % B.

Metoda je u početku trajala 25 min kako bismo sa sigurnošću utvrdili vrijeme zadržavanja pojedinih analita. Nakon toga smo, mijenjanjem gradijenta nakon elucije oba analita smanjili trajanje metode na 17 min i na taj način skratili vrijeme analize. Povećali smo udio acetonitrila i tako ubrzali eluciju, a razlučivanje je ostalo i dalje više nego zadovoljavajuće.

Poboljšana metoda od 17 min imala je drugačiji gradijentni program, a od prve metode razlikovala se samo u zadnja 3 koraka. Nakon što smo postepeno smanjivali postotak eluenta B od 1. do 5. min, taj postotak od 60 % držali smo do 10. min kada smo opet iduće 2 min povisivali postotak eluenta B na 75 % i držali ga tako do 17. min (Tablica 3). Snimljeni kromatogram prikazan je na Slici 5.



Slika 5. MS kromatogram fumonizina B1 i fumonizina B2.

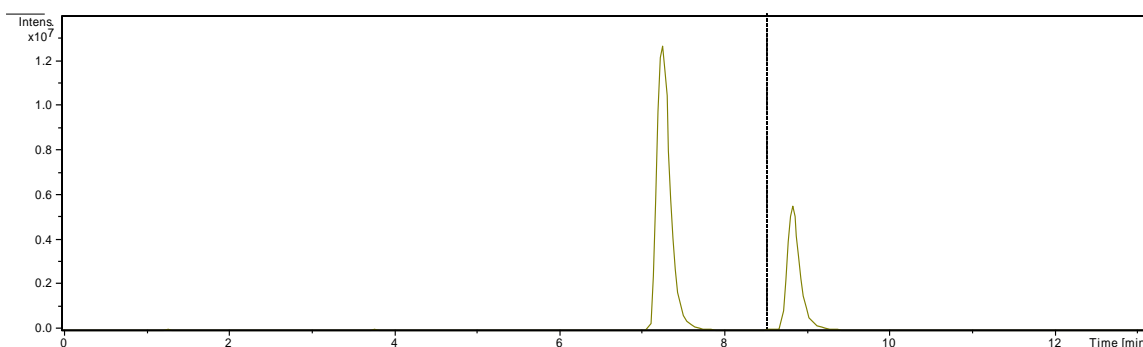
Uvjeti analize: Symmetry kolona C18 4.6x150mm, 3.5 μ m, temperatura kolone 35 °C, mobilna faza A: acetonitril + 0,1 % mravlja kiselina, B: ultra pročišćena voda + 0,1 % mravlja kiselina; brzina protoka 1.0 ml/min; gradijent: 0-1 min 75 % B, 1-5 min 75 % \rightarrow 60 % B, 5-10 min 60 % B, 10-12 min 60 % \rightarrow 75 % B, 12-17 min 75 % B.

4.2 Strukturna identifikacija analita masenom spektrometrijom

Cilj strukturne karakterizacije identificirati je specifične fragmente za pojedine analite, u ovom slučaju fumonizina B1 i fumonizina B2, na temelju kojih bi se mogla vršiti potvrda njihova identiteta. Kao analizator koristili smo stupicu iona koja nam omogućuje dobivanje spektra molekulskog iona, ali također i omogućava daljnju fragmentaciju tog molekulskog iona i nastalih fragmenata.

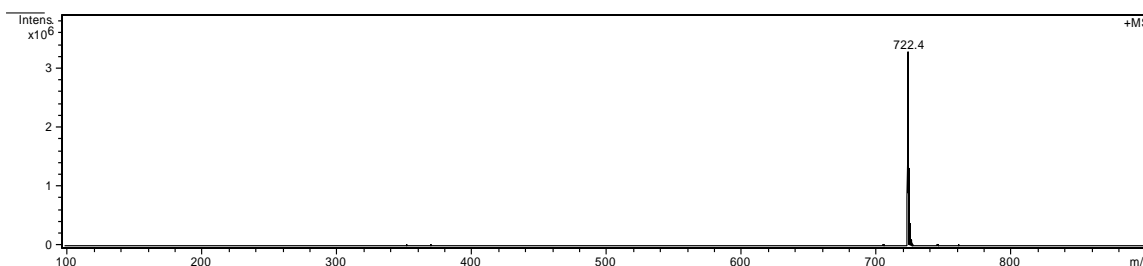
4.2.1 Fumonizin B1

Korištena je smjesa dva standarda, a na masenom spektrometru korištena je opcija da se u različitim vremenskim fragmentima provodi analiza različitih iona, odnosno njihova fragmentacija. Tako je do 8,4. min provedena analiza fumonizina B1, a nakon toga analiza fumonizina B2 što je prikazano na Slici 6.



Slika 6. TIC kromatogram smjese standarda fumonizina B1 i fumonizina B2.

Ionizacijom fumonizina B1 nastao je protonirani molekularni ion $[M+H]^+$ pri m/z 722 koji je vrlo velikog intenziteta. MS spektar fumonizina B1 prikazan je na Slici 7.

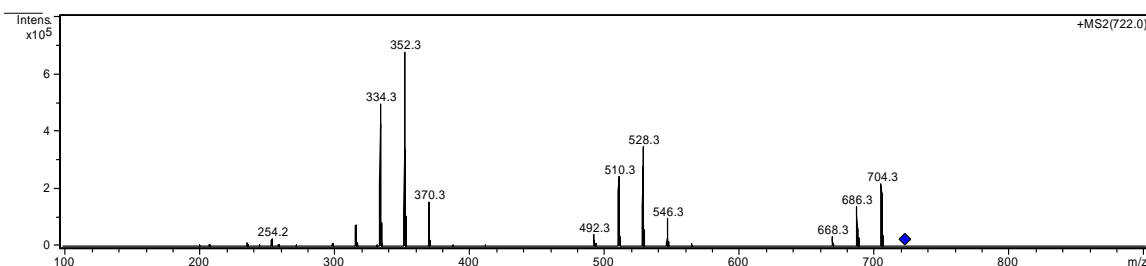


Slika 7. Maseni spektar fumonizina B1.

Snimljen je ESI-MS² spektar molekularnog iona pri m/z 722 (Slika 8) gdje fragmentirani ion m/z 704 odgovara gubitku mase od 18 Da što upućuje na gubitak jedne molekule vode. Zatim fragmentirani ion m/z 686 ukazuje na gubitak od 36 Da što povezuje s gubitkom dvije molekule vode, dok ion m/z 668 povezuje s gubitkom od tri molekule vode na kosturu molekule fumonizina B1.

Na Slici 8 možemo vidjeti i fragmentne ione koji ukazuju na gubitak od 176 Da povećanih za jednu, dvije ili tri molekule vode odnosno 18, 36 ili 54 Da što bi sveukupno iznosilo gubitak od 194, 212 i 230 Da. Pa tako fragmentirani ion m/z 546 ukazuje na gubitak od samo 176 Da što ukazuje na odcjepljenje jedne trikarboksilne kiseline. Ion m/z 528 izgubio je trikarboksilnu kiselinu i jednu molekulu vode, ion m/z 510 trikarboksilnu kiselinu i dvije molekule vode, dok je fragmentirani ion m/z 492 izgubio masu od 230 Da što odgovara trikarboksilnoj kiselinu i tri molekule vode.

I posljednja skupina fragmentiranih iona u načelu odgovara gubitku mase od 352 Da, točnije m/z 370, što odgovara masi dvije trikarboksilne kiseline koje se nalaze na molekuli fumonizina B1. Posljednja dva iona umanjena su za jednu odnosno dvije molekule vode. Ion m/z 352 koji je nastao odcjepljivanjem dvije trikarboksilne kiseline i jedne molekule vode, a ion m/z 334 dvije trikarboksilne kiseline i dvije molekule vode. Dobiveni fragmenti u skladu su s literaturom (Josephs, 1996).



Slika 8. ESI-MS² spektar molekulskog iona m/z 722.

Također, provedena je daljnja MS³ analiza fragmentnih iona m/z 528, m/z 334, m/z 704 i m/z 686, čime je dobiven MS³ spektar.

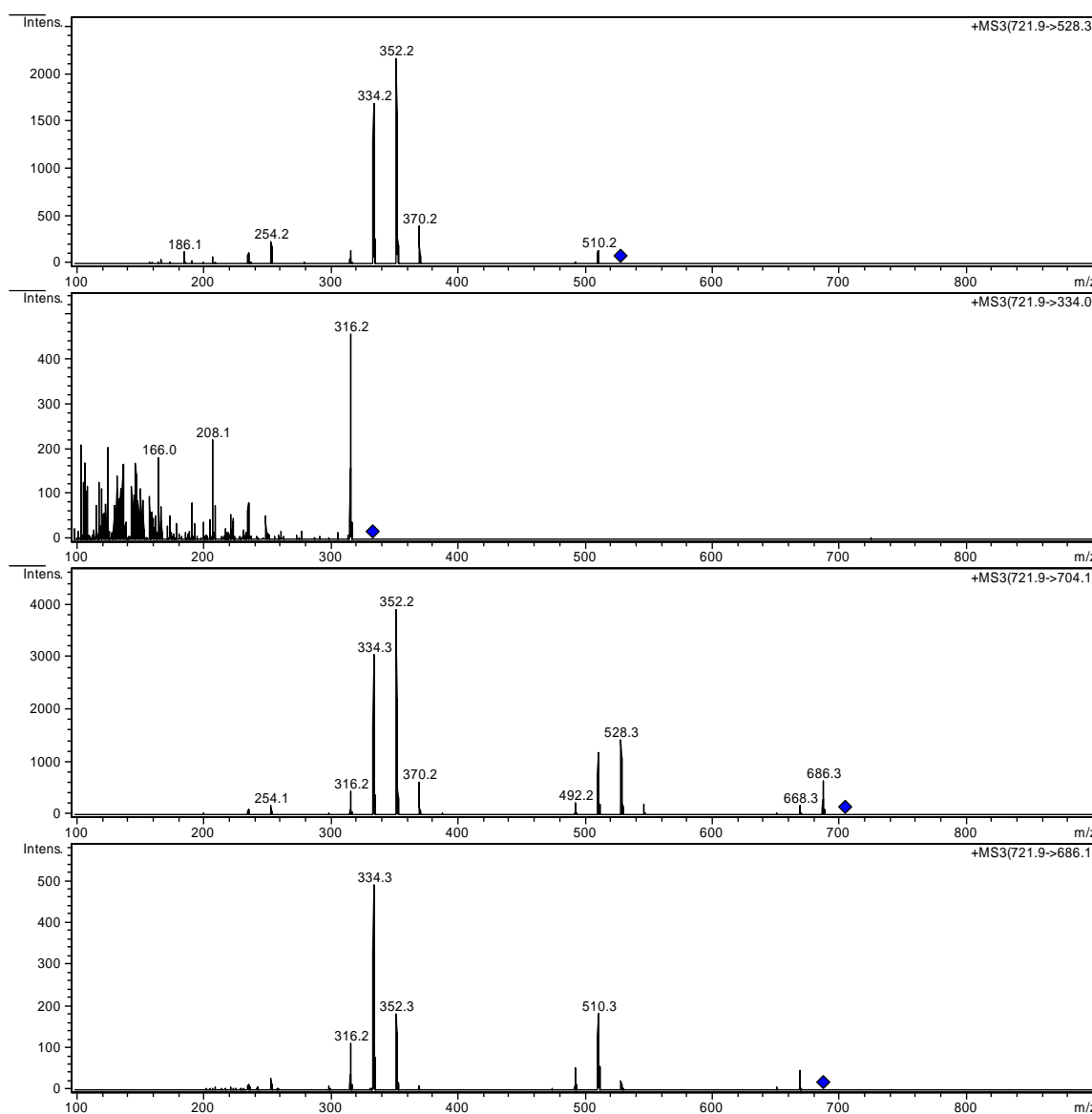
Analiza iona m/z 528 dovodi nas do već poznatih fragmenata kao što su m/z 352, m/z 334, m/z 370, m/z 510, ali također i do nekih novih poput m/z 254 i m/z 186. Fragmentacijski ion pri m/z 254 odgovara gubitku 2-metil-heksilnog lanca nakon što se odvojila trikarboksilna kiseline ($528 \rightarrow 254$), dok ion pri m/z 186 nakon gubitka trikarboksilne kiseline odgovara gubitku 2, 6-dimetil-dekilog lanca ($528 \rightarrow 186$).

Zatim nas analiza iona m/z 334 dovodi do tri nova fragmenta pri m/z 316, m/z 208 i m/z 166. Fragmentacijski ion m/z 316 dobiva se gubitkom jedne molekule vode ($334 \rightarrow 316$).

Odcjepljenjem 4-metil-oktilnog lanca nastaje ion m/z 208, dok ion m/z 166 nastaje kidanjem 2, 6-dimetil-dekilog lanca, poput iona m/z 186.

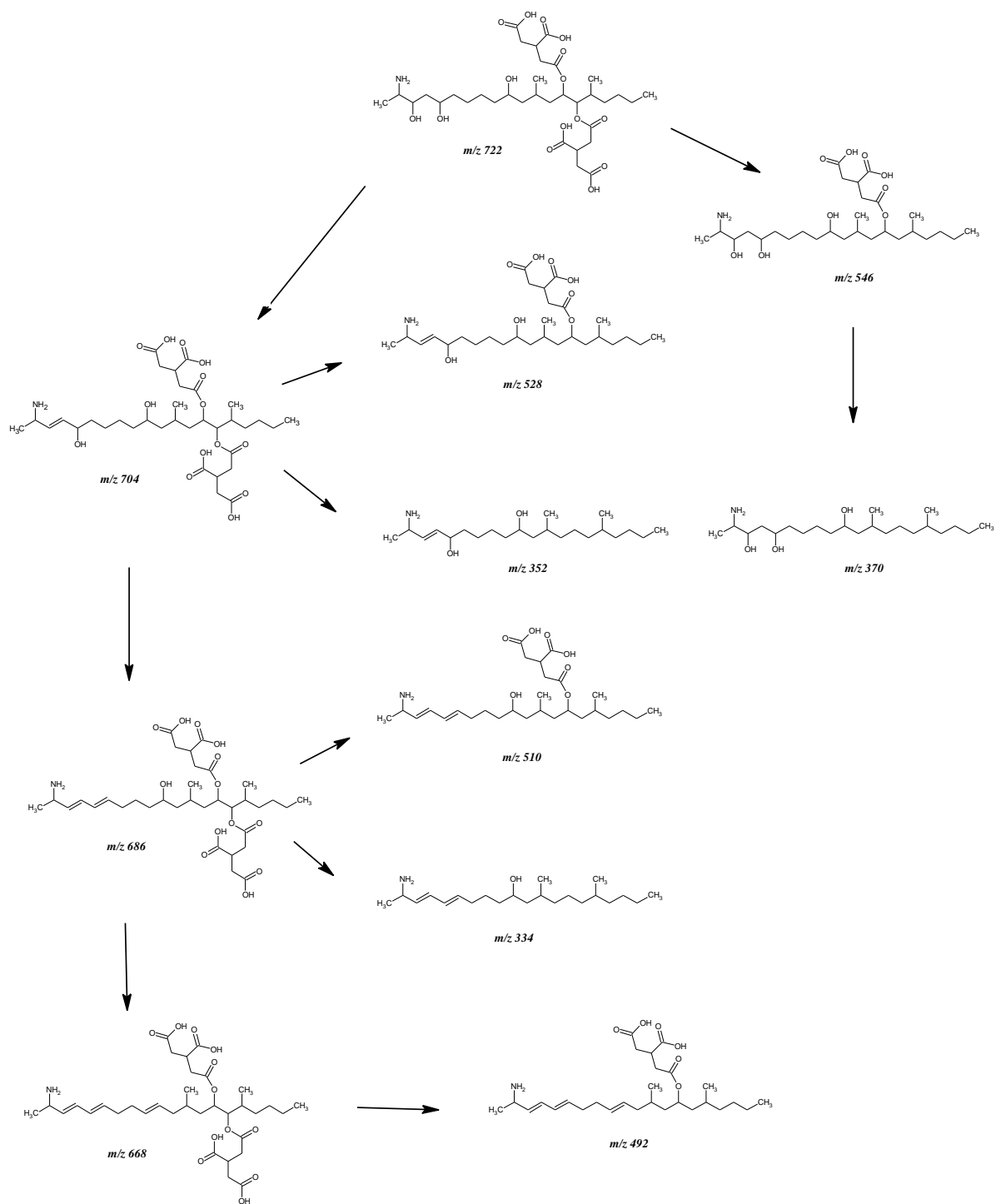
Fragmentirani ion m/z 704 daljnjom analizom dovodi nas do brojnih poznatih fragmenata kao što su m/z 352, m/z 334, m/z 370, m/z 492, m/z 528, m/z 668, m/z 686 i dva nova fragmenta, m/z 316 i m/z 254, koja smo objasnili na prethodnim primjerima analize MS^3 spektara.

I posljednji analizirani ion m/z 686 nam također pokazuje tri poznata fragmenta, m/z 510, m/z 334 i m/z 352, i jedan novi, m/z 316, koji je objašnjen kod analize fragmenta m/z 334. Opisani spektri prikazani su na Slici 9.

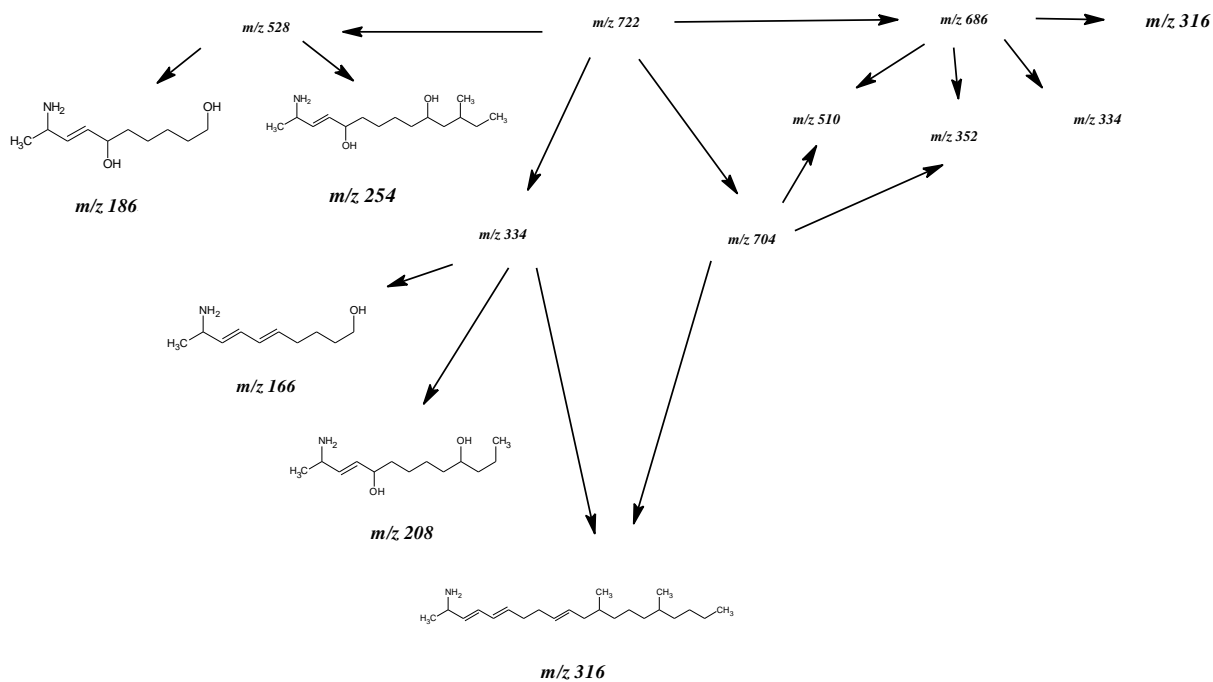


Slika 9. ESI- MS^3 spektri fragmentiranih iona m/z 528, m/z 334, m/z 704 i m/z 686.

Na temelju dobivenih fragmentnih iona na Slikama 10 i 11 prikazani su predloženi putovi fragmentacije fumonizina B1 i fumonizina B2.



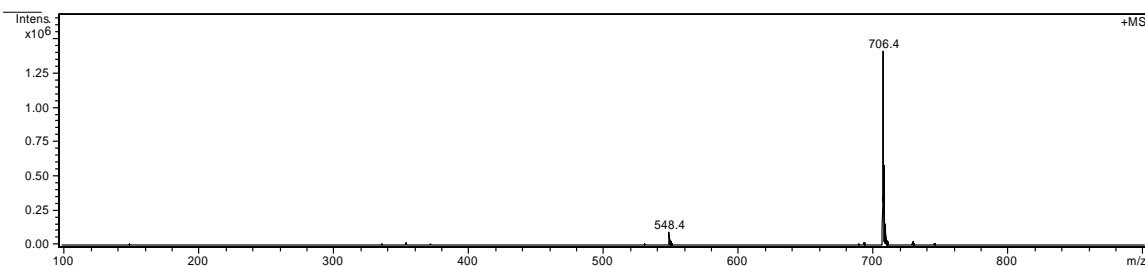
Slika 10. Predloženi putovi fragmentacije fumonizina B1



Slika 11. Predloženi putovi fragmentacije fumonizina B1 – nastavak.

4.2.2 Fumonizin B2

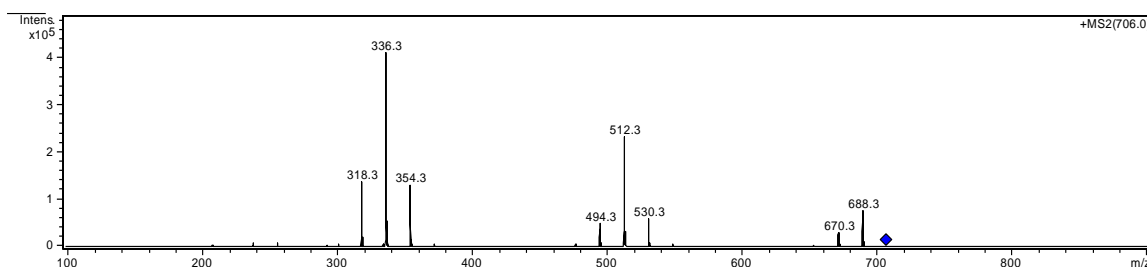
Snimljen je i maseni spektar fumonizina B2 koji pokazuje protonirani molekulski ion $[M+H]^+$ pri m/z 706, a na istom spektru zapažen je i fragmentni ion $[M+H]^+$ pri m/z 548 što je prikazano na Slici 12.



Slika 12. Maseni spektar fumonizina B2.

Fragmentacijom molekulskog iona m/z 706 dobili smo slične fragmentacijske putove kao i kod fragmentacije fumonizina B1 (Slika 13).

Dobiveni fragmenti nastali su odcjepljenjem jedne do dvije trikarboksilne kiseline u kombinacijama s ili bez gubitka jedne, dvije ili tri molekule vode.



Slika 13. ESI-MS² spektar molekuskog iona m/z 706.

Fragmentirani ion m/z 354 ukazuje na razliku u masi od 352 Da što odgovara dvjema trikarboksilnim kiselinama, ion m/z 336 također je nastao odcjepljivanjem dvije trikarboksilne kiseline, ali se kod njega još odcjepila i jedna molekula vode. Iz iste skupine, razlici mase od 388 Da koja odgovara dvjema trikarboksilnim kiselinama i dvjema molekulama vode, odgovara fragmentirani ion m/z 388.

Iduća skupina fragmentiranih iona odgovara odcjepljenju jedne trikarboksilne kiseline m/z 530, jedne trikarboksilne kiseline i jedne molekule vode m/z 512 te jedne trikarboksilne kiseline i dvije molekule vode m/z 494.

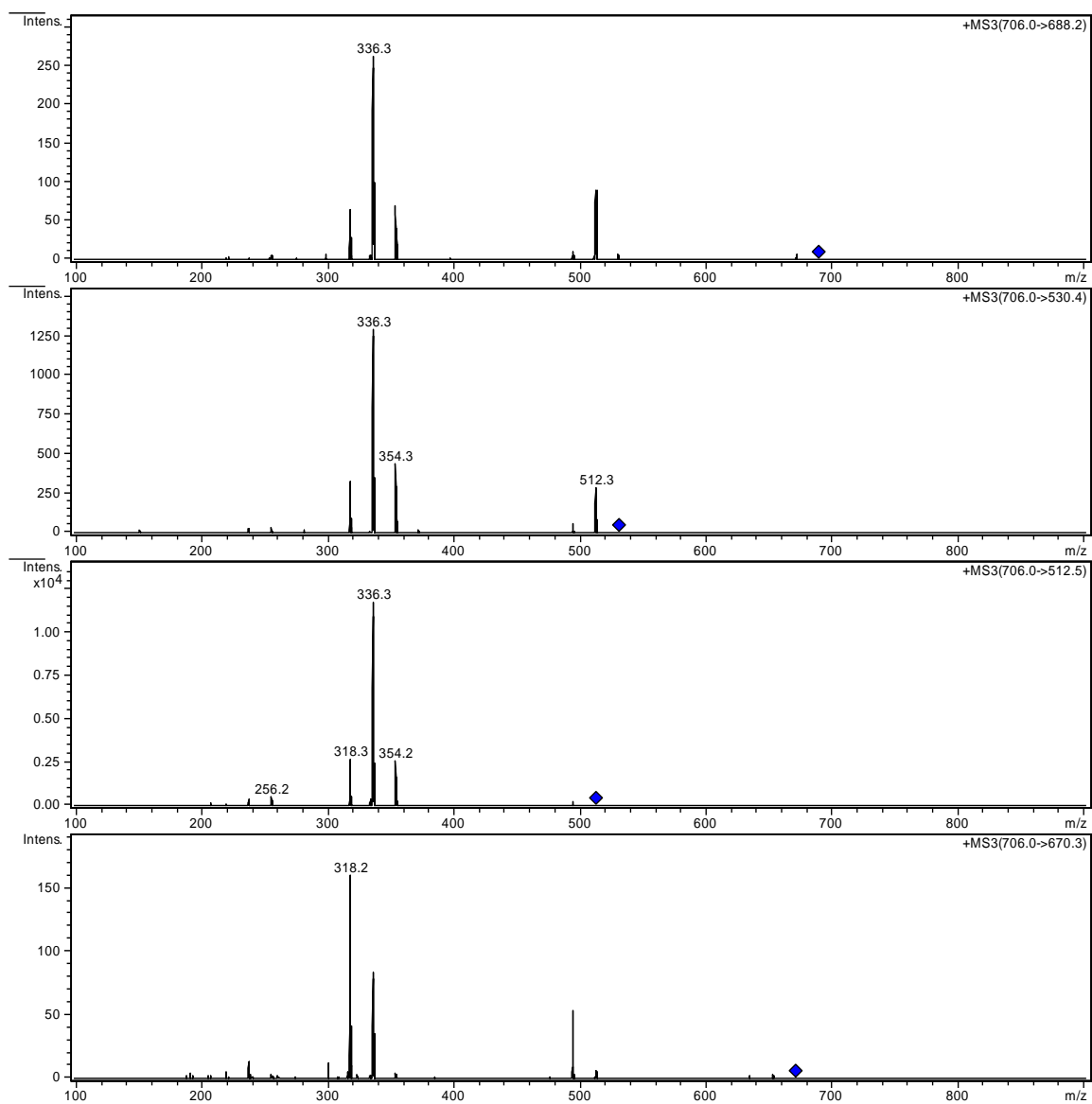
Posljednja skupina iona nastala je odcjepljivanjem jedne i dvije molekule vode. Ion m/z 688 ima razliku u masi od 18 Da što odgovara jednoj molekuli vode, a ion m/z 670 ima razliku od 36 Da što bi odgovaralo dvjema molekulama vode.

Kao i kod fumonizina B1 snimljen je MS³ spektar određenih fragmentiranih iona pri m/z 688, m/z 530, m/z 512 i m/z 670 (Slika 14). Fragmentacijom iona m/z 688 dobiva se najintenzivniji signal na m/z 336 što odgovara gubitku dvije trikarboksilne kiseline.

Pri m/z 530 vidimo tri poznata fragmenta m/z 336, m/z 354 i m/z 512 koji redom odgovaraju odcjepljenju jedne molekule vode i jedne trikarboksilne kiseline (m/z 336), gubitku jedne trikarboksilne kiseline (m/z 354) i gubitku jedne molekule vode (m/z 512).

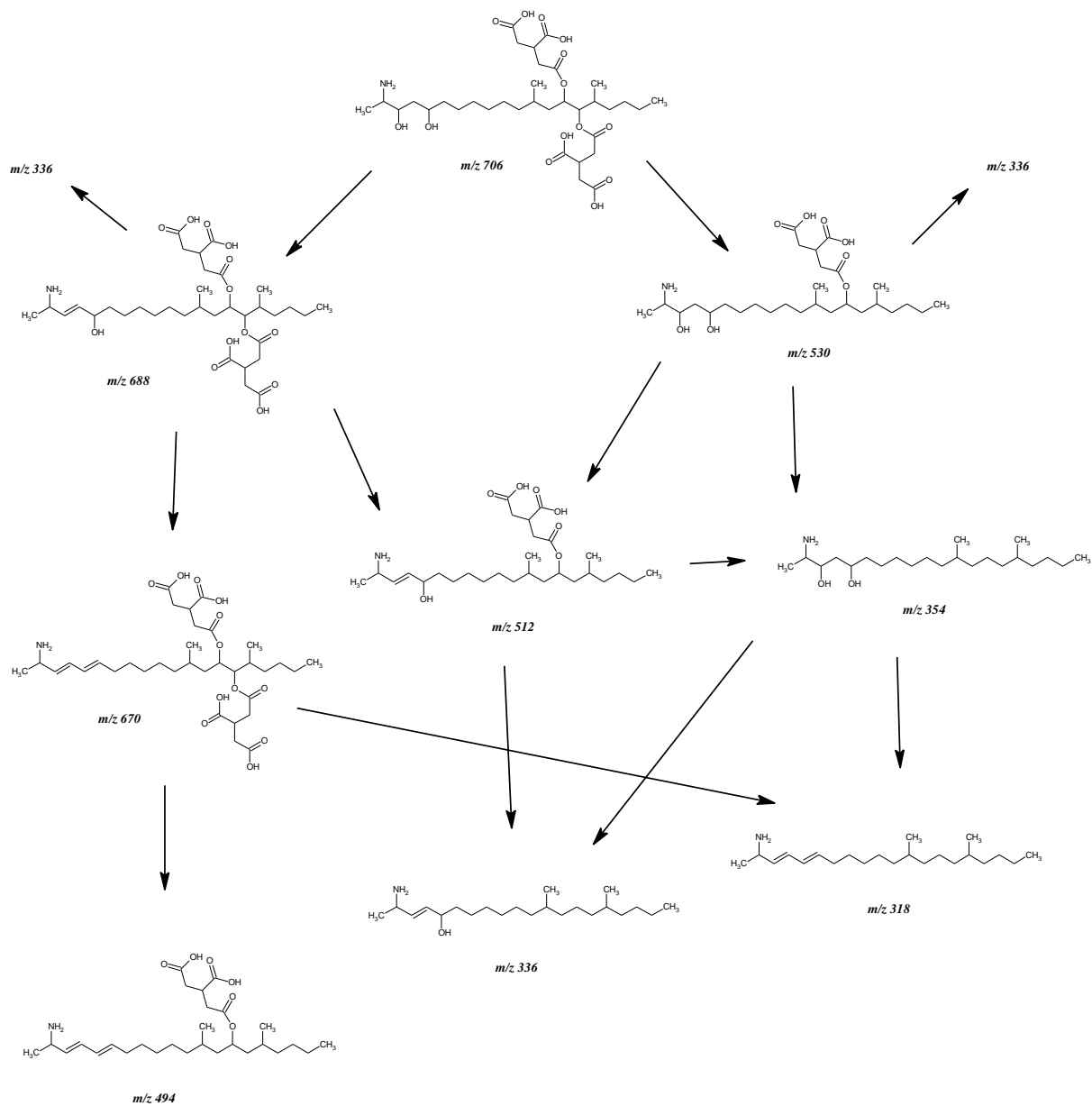
Daljnjom MS³ analizom m/z 512 dobivamo tri poznata fragmenta pri m/z 318, m/z 336 i m/z 354.

I posljednji odabrani fragment pri m/z 670 pokazuje nam najintenzivniji signal također pri m/z 318 što u ovom slučaju odgovara gubitku dvije trikarboksilne kiseline.



Slika 14. ESI- MS³ spektar fragmentiranih iona m/z 688, m/z 530, m/z 512 i m/z 670.

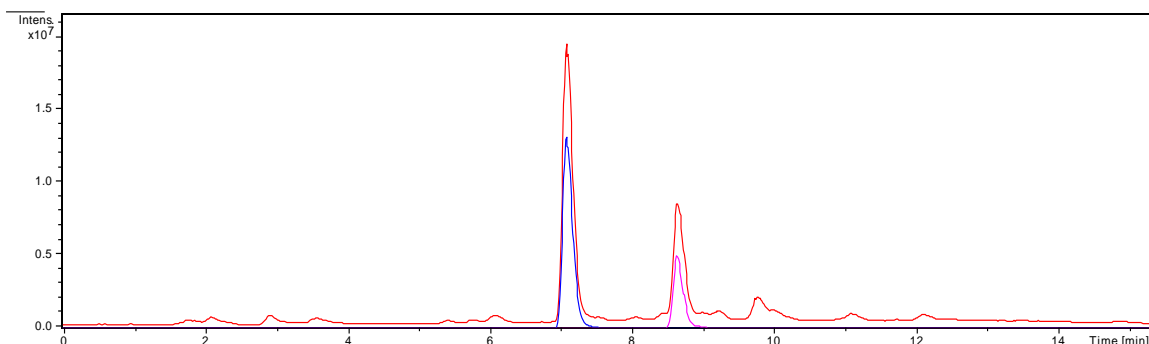
Opisani put fragmentacije fumonizina B2 prikazan je na Slici 15.



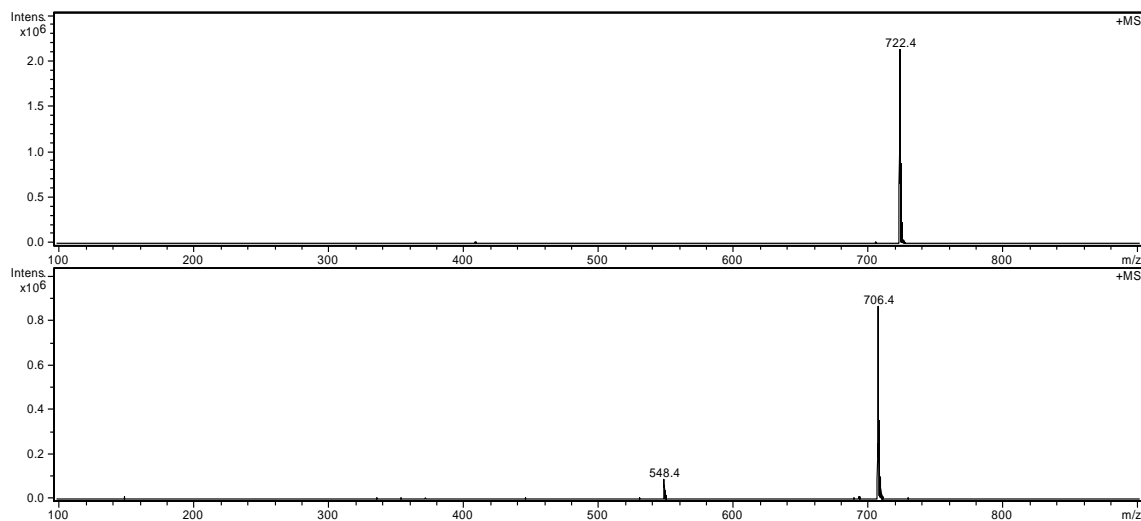
Slika 15. Predloženi putovi fragmentacije fumonizina B2.

4.3. Analiza uzorka

Prije primjene metode za analizu uzorka, ispitan je utjecaj matriksa. U uzorak su dodani standardi fumonizina B1 i B2 poznate koncentracije. Na TIC kromatogramu vidljivo je da matriks uzorka nema značajan utjecaj na rezultate analize (Slika 16 i 17). Budući da maseni detektor nudi mogućnost prikaza *extracted ion* kromatograma (EIC), vidimo da nema nikakvog utjecaja matriksa uzorka na mogućnost identifikacije i kvantitativnog određivanja analita.

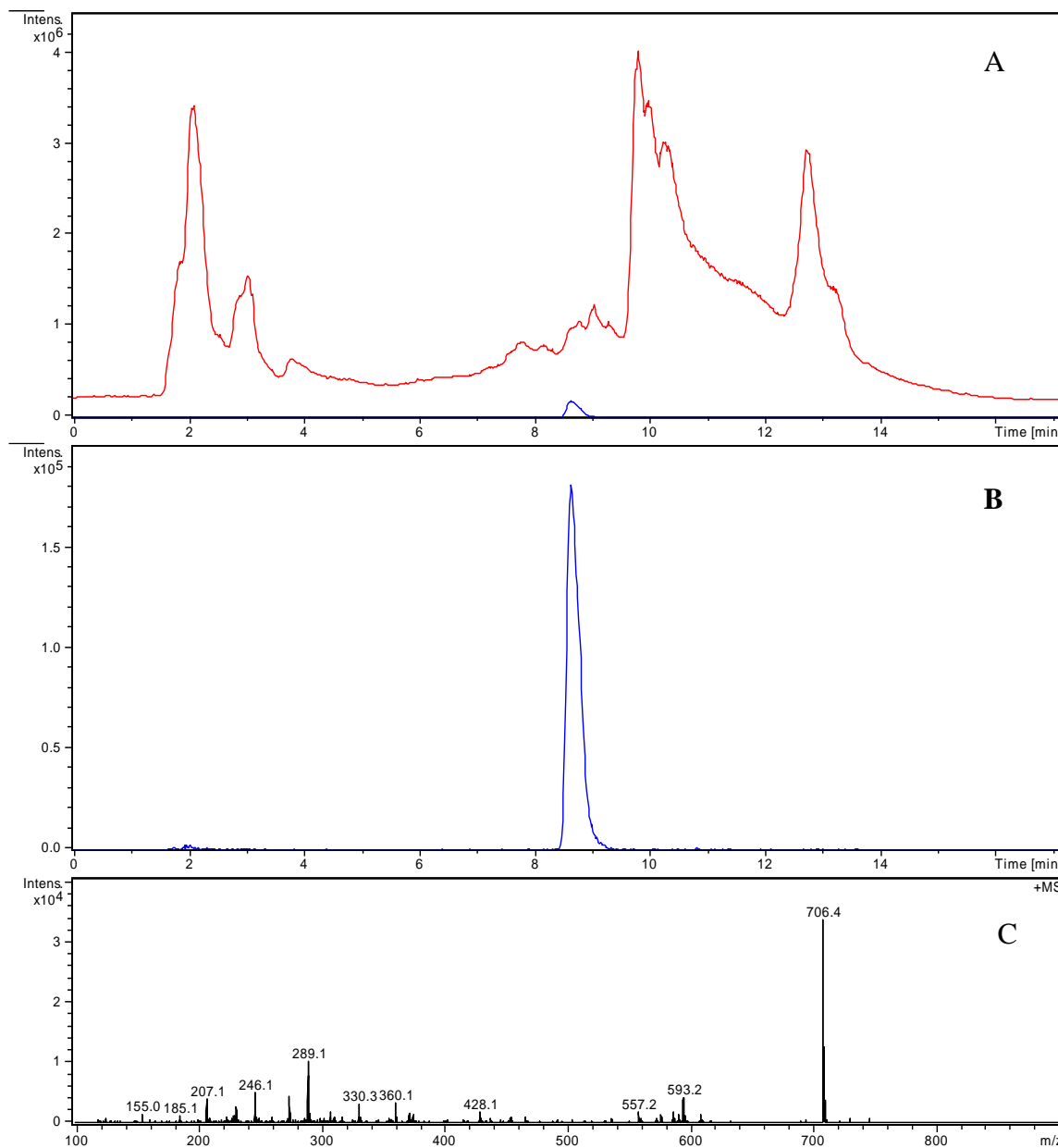


Slika 16. TIC kromatogram uzorka u koji su dodani standardi fumonizina B1 i B2 poznate koncentracije (crvena linija), kao i EIC 722,5 (plava linija) i EIC 706,5 (roza linija).



Slika 17. MS spektri prvog pika (A) i drugog drugog (B). Iz m/z vidljivo je da odgovaraju molekulskim ionima fumonizina B1 (m/z 722), odnosno fumonizina B2 (m/z 706).

Metoda je zatim primijenjena za analizu realnog uzorka ekstrakta plijesni proizvođača izoliranog iz zraka. Na Slici 18 prikazan je TIC kromatogram (A) realnog uzorka s EIC 706 (B) koji odgovara očekivanom analitu fumonizina B2.



Slika 18. TIC kromatogram realnog uzorka ekstrakta plijesni (A), EIC iona m/z 706 (B) i maseni spektar pika analita (C).

5. ZAKLJUČCI

Optimizacijom kromatografskih uvjeta analize smjese fumonizina B1 i fumonizina B2 postigli smo zadovoljavajuće rezultate od kojih se može naglasiti vrijeme analize koje se smanjilo s 25 na 17 min. Uvjeti analize bili su sljedeći: 0-1 min 75 % B, 1-5 min 75 % → 60 % B, 5-10 min 60 % B, 10-12 min 60 % → 75 % B, 12-17 min 75 % B. Eluent A bio je acetonitril + 0,1 % mravlja kiselina, eluent B ultra pročišćena voda + 0,1 % mravlja kiselina.

Odabranom HPLC-MS metodom omogućeno nam je odjeljivanje komponenata smjese fumonizina i njihova detekcija na temelju omjera mase i naboja (m/z) nabijenih čestica.

Fragmentacijski putovi fumonizina B1 u početku se uglavnom temelje na gubitku jedne (m/z 704) pa zatim dvije (m/z 686) i tri (m/z 668) molekule vode. Paralelno s gubitkom molekula vode odvija se i odcjepljenje jedne ili dvije trikarboksilne kiseline. Pa je tako ion m/z 528 izgubio trikarboksilnu kiselinu i jednu molekulu vode, ion m/z 510 trikarboksilnu kiselinu i dvije molekule vode, a fragmentnom ionu m/z 492 odcjepila se jedna trikarboksilna kiselina i čak tri molekule vode. Ostala četiri fragmenta nastala su odcjepljivanjem jedne trikarboksilne kiseline (m/z 546), dvije trikarboksilne kiseline (m/z 370), dvije trikarboksilne kiseline i jedne molekule vode (m/z 352) te dvije trikarboksilne kiseline i dvije molekule vode (m/z 334).

Daljnjom analizom odabranih iona dobiveni su MS^3 spektri u kojima se javljaju novi fragmentni ioni koji odgovaraju gubitku postraničnih lanaca, ali se također javljaju i već spomenuti fragmenti iz MS^2 analize fumonizina B1. Fragmentni ion m/z 316, koji odgovara gubitku od dvije trikarboksilne kiseline i tri molekule vode, strukturno je vrlo sličan ionu m/z 334 jer se razlikuju po masi u samo 18 Da što odgovara jednoj molekuli vode. Nadalje zanimljivi fragmentni ioni su ion m/z 208 koji nastaje odcjepljenjem 4-metil-oktilnog lanca te ion m/z 166 koji nastaje kidanjem 2, 6-dimetil-dekilog lanca jednako kao i fragmentni ion m/z 186.

Fragmentacijom molekuskog iona m/z 706 dobili smo slične fragmentacijske puteve kao i kod fragmentacije fumonizina B1. Dobiveni fragmenti nastali su odcjepljenjem jedne do dvije trikarboksilne kiseline u kombinacijama s ili bez gubitkom jedne, dvije ili tri molekule vode. MS^3 spektar fumonizina B2 pokazuje nam iste fragmentne ione poput onih vidljivih već u MS^2 spektru.

6. LITERATURA

1. Dickman KG, Grollman A.P. *Comprehensive Toxicology*, 2010, str. 163.
2. Domijan A. Rezultati nedavnih studija o mehanizmu neurotoksičnosti fumonizina B1. *Krmiva*, Zagreb, 2013, 25-30.
3. Domijan A. Fumonizin B1: neurotoksični mikotoksin. Zagreb, 2012.
4. Fumonisin Toxicosis, <https://www.msdsvetmanual.com>, pristupljeno 15.03.2018.
5. Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds, 2001., <https://www.fda.gov>, pristupljeno 27.03.2018.
6. Haschek WM, Voss KA. *Toxicologic Pathology (Third Edition)*, 2013, str. 1187–1258.
7. International Agency for Research on Cancer (IARC). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 82. Lyon: IARC; 2002.
8. Josephs JL. Detection and Characterization of Fumonisin Mycotoxins by Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Using Ion Trap and Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 1996, 1333-1344.
9. Kwon OS, Sandberg JS, Slikker Jr W. Effects of fumonisin B1 treatment on blood-brain barrier transfer in developing rats. *Neurotoxicol Teratol*, 1997, 151-155.
10. Kwon OS, Slikker Jr W, Davies DL. Biochemical and morphological effects of fumonisin B1 on primary cultures of rat cerebrum. *Neurotoxicol Teratol*, 2000, 565-572.
11. Osuchowski MF, Sharma RP. Fumonisin B1 induces necrotic cell death in BV-2 cells and murine cultured astrocytes and is antiproliferative in BV-2 cells while N2A cells and primary cortical neurons are resistant. *NeuroToxicol*, 2005, 981-992.
12. Schmale DG, Munkvold GP. Mycotoxins in Crops: A Threat to Human and Domestic Animal Health, *The Plant Health Instructor*, 2018, DOI: 10.1094/PHI-I-2009-0715-01.
13. Varga J, Baranyi J, Chandrasekaran M, Vágvölgyi C, Kocsubé S. Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: an update. *Acta Biologica Szegediensis*, 2015, 59, 151-167.

14. Voss KA, Riley RT, Gelineau-van Waes J. Reproductive and Developmental Toxicology. AP, 2011, str. 725-737.
15. Voss KA, Smith GW, Haschek WM. Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Animal Feed Sci Technol*, 2007, 299-325.
16. Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill Jr AH. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *J Biol Chem*, 1991, 14486-14490.
17. Waskiewicz A, Golinski P. Mycotoxins in foods, feeds and their components. *Krmiva*, Zagreb, 2013, 35-45.
18. Wilson AD. Clinical Veterinary Advisor. Elsevier, 2012, str. 214-215.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. Sažetak

Fumonizini su grupa mikotoksina koje proizvode plijesni roda *Fusarium*, prvenstveno plijesan *F. verticillioides* (nekada *F. moniliforme*). Izolirano je preko 28 fumonizina, a najučestaliji i najtoksičniji je fumonizin B1 (FB1). Fumonizini su nađeni širom svijeta kao zagađivači različitih namirnica, međutim najčešće zagađuju kukuruz te hranu pripremljenu iz kukuruza. FB1 ima različite toksične učinke ovisno o životinjskoj vrsti. U ljudi je izloženost FB1 povezana s razvojem primarnog karcinoma jetre i karcinoma jednjaka te je od strane Međunarodne organizacije za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) klasificiran kao mogući karcinogen (grupa 2B).

Koristeći vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije (HPLC-MS) dobili smo metodu visoke osjetljivosti i selektivnosti. Optimizacijom kromatografskih uvjeta analize postigli smo zadovoljavajuće rezultate, a cilj rada bio je strukturna karakterizacija fumonizina B1 i fumonizina B2. Predloženi su fragmentacijski putovi fumonizina B1 i fumonizina B2 koji mogu biti korisni u daljnjoj analizi fumonizina. Fragmentacijski putovi fumonizina B1 (m/z 722) i fumonizina B2 (m/z 706) uglavnom se temelje na gubitku jedne do tri molekule vode (18, 36 ili 54 Da). Kod fumonizina B1 bi to bili fragmentni ioni m/z 704, m/z 686 i m/z 668, dok bi gubitak vode kod fumonizina B2 odgovarao fragmentnim ionima m/z 668 i m/z 670 odnosno gubitku samo jedne ili dvije molekule vode. Također značajan gubitak kod oba mikotoksina je odcjepljenje trikarboksilne kiseline u ili bez kombinacije s vodom. Pa je tako kod fumonizina B1 odcjepljenje jedne trikarboksilne kiseline značajno za ion m/z 546, a kod fumonizina B2 m/z 530. Gubitak od dvije trikarboksilne kiseline odgovara ionu m/z 546 kod FB1, a ionu m/z 530 kod FB2. Fragmentacijski putovi gubitka trikarboksilne kiseline i vode vrlo su slični kod fumonizina B1 i fumonizina B2. Za fumonizin B1 značajni su ioni m/z 528, m/z 352, m/z 510, m/z 334 i m/z 492, a za fumonizina B2 karakteristični su ioni m/z 512, m/z 494, m/z 336 i m/z 318. Daljnjom analizom odabranih iona fumonizina B1 i fumonizina B2 dobiveni su MS³ spektri u kojima se javljaju novi fragmentni ioni koji odgovaraju gubitku postraničnih lanaca kod fumonizina B1, ali se također javljaju i već spomenuti fragmenti iz MS² analiza fragmentih iona m/z 722 i m/z 706.

7.2. Summary

Fumonisinins are a group of mycotoxins produced by *Fusarium spp*, primarily *F. verticillioides* (formerly *F. moniliforme*). More than 28 fumonisinins were isolated, the most frequent and most toxic of them is fumonisin B1 (FB1). Fumonisinins have been found worldwide as pollutants of various foods, but most commonly pollute corn and maize food. FB1 has different toxic effects depending on the animal species. In humans, FB1 exposure is associated with the development of primary liver cancer and esophageal cancer and it is classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as a possible carcinogen (Group 2B).

Using a coupled system of high performance liquid chromatography and mass spectrometry (HPLC-MS), we obtained a method of high sensitivity and selectivity. By optimizing the chromatographic conditions of analysis we have achieved satisfactory results, and the object of the study was the structural characterization of fumonisin B1 and fumonisin B2. Proposed fragmentation pathways of fumonisin B1 and fumonisin B2 may be useful in the further analysis of fumonisinins.

Fragmentation pathways of fumonisin B1 and fumonisin B2 are mainly based on the loss of one to three molecules of water (18, 36 or 54 Da). For fumonisin B1, these would be fractional ions m/z 704, m/z 686 and m/z 668, while loss of water with fumonisin B2 corresponded to m/z 668 and m/z 670 fragments, respectively, loss of only one or two molecules of water. Also significant loss of both mycotoxins is the separation of tricarboxylic acid in or without the combination with water. Thus, for fumonisin B1, a tricarboxylic acid is significantly reduced for ion m/z 546 and for fumonisin B2 m/z 530. The loss of two tricarboxylic acids corresponds to m/z 546 at FB1 and m/z ion 530 at FB2. Fragmentation routes of loss of tricarboxylic acid and water are very similar to fumonisin B1 and fumonisin B2. For fumonisin B1, significant ions are m/z 528, m/z 352, m/z 510, m/z 334 and m/z 492, and for fumonisin B2 are m/z 512, m/z 494, m/z 336 and m/z 318. Further analysis of the selected fumonisin B1 and fumonisin B2 ions generated MS³ spectra with new fragment ions corresponding to the loss of crosslinked chains in fumonisin B1, but there are also already mentioned fragments from MS² analysis of fragmented ions m/z 722 and m/z 706.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

STRUKTURNA KARAKTERIJZACIJA FUMONIZINA MASENOM SPEKTROMETRIJOM

Marta Huskić

SAŽETAK

Fumonizini su grupa mikotoksina koje proizvode plijesni roda *Fusarium*, prvenstveno plijesan *F. verticillioides* (nekada *F. moniliforme*). Izolirano je preko 28 fumonizina, a najučestaliji i najtoksičniji je fumonizin B1 (FB1). Fumonizini su nađeni širom svijeta kao zagađivači različitih namirnica, međutim najčešće zagađuju kukuruz te hranu pripremljenu iz kukuruza. FB1 ima različite toksične učinke ovisno o životinjskoj vrsti. U ljudi je izloženost FB1 povezana s razvojem primarnog karcinoma jetre i karcinoma jednjaka te je od strane Međunarodne organizacije za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) klasificiran kao mogući karcinogen (grupa 2B). Koristeći vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije (HPLC-MS) dobili smo metodu visoke osjetljivosti i selektivnosti. Optimizacijom kromatografskih uvjeta analize postigli smo zadovoljavajuće rezultate, a cilj rada bio je strukturalna karakterizacija fumonizina B1 i fumonizina B2. Predloženi su fragmentacijski putovi fumonizina B1 i fumonizina B2 koji mogu biti korisni u daljnjoj analizi fumonizina. Fragmentacijski putovi fumonizina B1 (m/z 722) i fumonizina B2 (m/z 706) uglavnom se temelje na gubitku jedne do tri molekule vode (18, 36 ili 54 Da). Kod fumonizina B1 bi to bili fragmentni ioni m/z 704, m/z 686 i m/z 668, dok bi gubitak vode kod fumonizina B2 odgovarao fragmentnim ionima m/z 668 i m/z 670 odnosno gubitku samo jedne ili dvije molekule vode. Također značajan gubitak kod oba mikotoksina je odcjepljenje trikarboksilne kiseline u ili bez kombinacije s vodom. Pa je tako kod fumonizina B1 odcjepljenje jedne trikarboksilne kiseline značajno za ion m/z 546, a kod fumonizina B2 m/z 530. Gubitak od dvije trikarboksilne kiseline odgovara ionu m/z 546 kod FB1, a ionu m/z 530 kod FB2. Fragmentacijski putovi gubitka trikarboksilne kiseline i vode vrlo su slični kod fumonizina B1 i fumonizina B2. Za fumonizin B1 značajni su ioni m/z 528, m/z 352, m/z 510, m/z 334 i m/z 492, a za fumonizin B2 karakteristični su ioni m/z 512, m/z 494, m/z 336 i m/z 318. Daljnjom analizom odabranih iona fumonizina B1 i fumonizina B2 dobiveni su MS³ spektri u kojima se javljaju novi fragmentni ioni koji odgovaraju gubitku postraničnih lanaca kod fumonizina B1, ali se također javljaju i već spomenuti fragmenti iz MS² analiza fragmentih iona m/z 722 i m/z 706.

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

Rad sadrži: 27 stranica, 18 grafičkih prikaza, 3 tablice i 18 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Fumonizin B1, Fumonizin B2, masena spektrometrija

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

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

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

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

Rad prihvaćen: travanj 2018.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

STRUCTURE CHARACTERIZATION OF FUMONISIN BY MASS SPECTROMETRY

Marta Huskić

SUMMARY

Fumonisin are a group of mycotoxins produced by *Fusarium spp*, primarily *F. verticillioides* (formerly *F. moniliforme*). More than 28 fumonisins were isolated, the most frequent and most toxic of them fumonisin B1 (FB1). Fumonisin have been found worldwide as pollutants of various foods, but most commonly pollute corn and maize food. FB1 has different toxic effects depending on the animal species. In humans, FB1 exposure is associated with the development of primary liver cancer and esophageal cancer and it is classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as a possible carcinogen (Group 2B). Using a coupled system of high performance liquid chromatography and mass spectrometry (HPLC-MS), we obtained a method of high sensitivity and selectivity. By optimizing the chromatographic conditions of analysis we have achieved satisfactory results, and the object of the study was the structural characterization of fumonisin B1 and fumonisin B2. Proposed fragmentation pathways of fumonisin B1 and fumonisin B2 may be useful in the further analysis of fumonisins. Fragmentation pathways of fumonisin B1 and fumonisin B2 are mainly based on the loss of one to three molecules of water (18, 36 or 54 Da). For fumonisin B1, these would be fractional ions m/z 704, m/z 686 and m/z 668, while loss of water with fumonisin B2 corresponded to m/z 668 and m/z 670 fragments, respectively, loss of only one or two molecules of water. Also significant loss of both mycotoxins is the separation of tricarboxylic acid in or without the combination with water. Thus, for fumonisin B1, a tricarboxylic acid is significantly reduced for ion m/z 546 and for fumonisin B2 m/z 530. The loss of two tricarboxylic acids corresponds to m/z 546 at FB1 and m/z ion 530 at FB2. Fragmentation routes of loss of tricarboxylic acid and water are very similar to fumonisin B1 and fumonisin B2. For fumonisin B1, significant ions are m/z 528, m/z 352, m/z 510, m/z 334 and m/z 492, and for fumonisin B2 are m/z 512, m/z 494, m/z 336 and m/z 318. Further analysis of the selected fumonisin B1 and fumonisin B2 ions generated MS^3 spectra with new fragment ions corresponding to the loss of crosslinked chains in fumonisin B1, but there are also already mentioned fragments from MS^2 analysis of fragmented ions m/z 722 and m/z 706.

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

Thesis includes: 27 pages, 18 figures, 3 tables and 18 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Fumonisin B1, Fumonisin B2, Mass spectrometry

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

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

The thesis was accepted: April 2018.