

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

Pauković, Matea

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:163:611414>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-06**



Repository / Repozitorij:

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



Matea Pauković

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

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2024.

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

Najprije zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Danieli Jakšić na uloženom vremenu i ukazanoj pomoći, strpljenju i trudu tijekom pisanja i izrade ovog diplomskog rada. Zahvaljujem dr. sc. Luki Bočkoru sa Instituta za antropologiju na provođenju LC-MS analize priređenih uzoraka.

Zahvaljujem svojim roditeljima, sestri i djedu za bezuvjetnu podršku i vjeru u mene. Također, hvala svim prijateljima te kolegama na međusobnoj potpori, pomoći i svim zajedničkim trenucima koji su mi uljepšali studentske dane.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Sterigmatocistin (STC).....	1
1.1.1. Svojstva, biosinteza i metabolizam STC-a	1
1.1.2. Toksičnost STC-a.....	3
1.1.3. Plijesni proizvođači STC-a.....	4
1.1.4. Pojavnost STC-a u prehrambenim proizvodima i okolišu.....	5
1.1.5. Procjena izloženosti STC-u	7
1.2. Metode ekstrakcije mikotoksina iz bioloških uzoraka	8
1.2.1. Tekućinsko-tekućinska ekstrakcija (LLE)	8
1.2.2. Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE)	8
1.2.3. Pročišćavanje imunoafinitetnim kolonama (IAC).....	9
1.2.4. QuEChERS	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME	11
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. Materijali	12
3.1.1. Kemikalije	12
3.1.2. Radni instrumenti	12
3.2. Metode.....	13
3.2.1. Uzorkovanje.....	13
3.2.2. Ekstrakcija analita iz uzoraka urina.....	13
3.2.3. Pročišćavanje ekstrakta.....	13
3.2.4. LC/MS analiza.....	14
3.2.5. Obrada podataka	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
5. ZAKLJUČCI.....	19
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	20
7. LITERATURA	21
8. SAŽETAK	29
9. SUMMARY	30

Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card

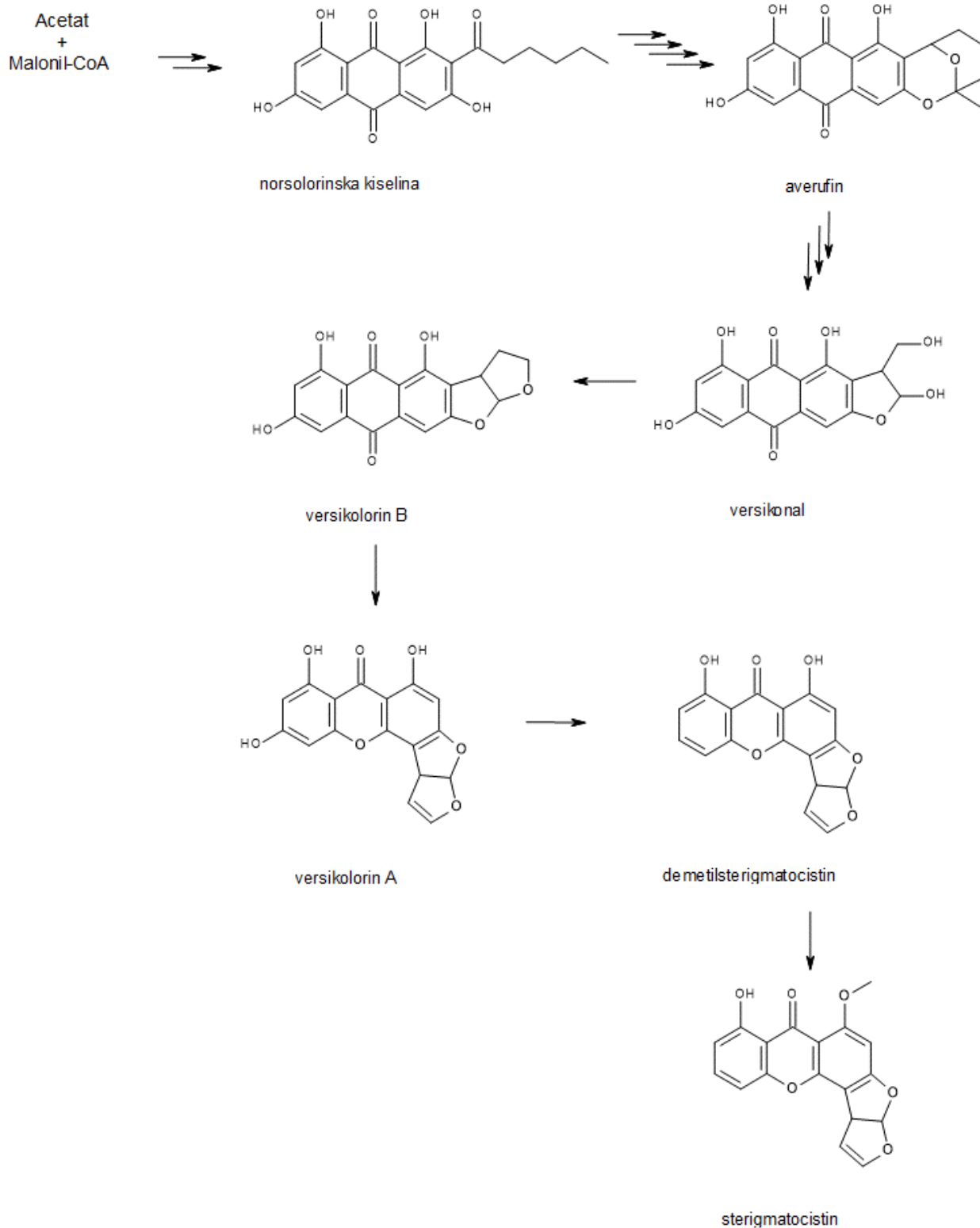
1. UVOD

1.1. Sterigmatocistin (STC)

1.1.1. Svojstva, biosinteza i metabolizam STC-a

Sterigmatocistin (STC) je sekundarni metabolit plijesni prvi puta izoliran 1954. godine iz kultura *A. versicolor* (Soriano del Castillo, 2007). Poliketidni je mikotoksin sa furofuranskim prstenom u svojoj strukturi. Kancerogen je i genotoksičan te strukturno sličan aflatoksinima čiji je prekursor u biosintetskom putu. Molekulska masa iznosi 324.28 g/mol, a molekulska formula je C₁₈H₁₂O₆. Ima slabu fluorescenciju koja se prilikom analize tankoslojnom kromatografijom može pojačati derivatizacijom (Versilovskis i De Saeger, 2010), a apsorpcijski maksimumi u acetonu prilikom UV/ VIS spektroskopije su na 329 i 319 nm (Zhu i Lin, 2007). Dobro je topljiv u organskim otapalima poput kloroforma, acetonitrila, metanola i etanola, te relativno topljiv u puferiranim vodenim otopinama pri različitim pH vrijednostima (EFSA, 2013; Septien i sur., 1993).

STC dijeli biosintetski put sa aflatoksinima, jednim od najtoksičnijih sekundarnih metabolita plijesni. Pritom su uključeni brojni geni i enzimi. Sintaze masnih kiselina α i β te poliketid sintaza su uključene u nastajanje poliketidnog kostura, odnosno norsolorinske kiseline iz početnog acetata i malonil-CoA. U daljnjim su koracima uključeni enzimi poput reduktaza, dehidrogenaza, monooksigenaza, oksidaza i esteraza koji dovode do nastanka versikonala. Gen *stcN* kodira za versikolorin B sintazu (VERB) koja sudjeluje u ključnom koraku nastanka versikolorina B iz versikonala. U tom koraku dolazi do zatvaranja bisfuranskog prstena koji je zaslužan za vezanje na DNA i mutagenu aktivnost STC-a. U naredna dva koraka nastaju versikolorin A i demetilsterigmatocistin enzimskom aktivnošću dehidrogenaza i monooksigenaza. STC u konačnici nastaje djelovanjem O-metiltransferaze B (O-metiltransferaza I) kodirane genom *stcP* (Díaz Nieto i sur., 2018; Yu i sur., 2004).



Slika 1. Biosinteza STC-a (nacrtano u BIOVIA Draw 2024, prilagođeno prema Díaz Nieto i sur., 2018)

Metabolizmom STC-a nastaju mono- i dihidroksimetaboliti te toksični egzo-epoksidi (Pfeiffer i sur., 2014). Većina CYP enzima jetre i pluća ljudi, s naglaskom na CYP3A4 (Yamazaki i sur.,

1995), metabolizira STC. Iznimka su enzimi CYP1A potporodice te ljudski CYP1B1 ispitan u dva *S. Typhimurium* soja (Shimada i sur., 1996; Shimada i sur., 1992).

Krol (2011) je predložio, a Pfeiffer i sur., (2014) potvrdili da se hidroksilacija odvija na aromatskom prstenu na položajima C11 i/ili C9 pri čemu nastaju kateholi. Formiranje C9 - hidroksi-STC katehola predstavlja glavni metabolički put STC-a, a daljnja oksidacija dovodi do stvaranja reaktivnih elektrofilnih kinona.

Essigmann i sur., (1979) su izolirali 1,2-dihidro-2-(N7 -gvanil)-1- hidroksi-STC, produkt hidrolize adukta DNA sa epoksidom STC-a. Epoksidacija DNA može dovesti do mutacija i posljedično razvoja karcinoma, no procijenjeno je da metabolički put nastanka epoksida (egzo-STC-1,2-oksida) ima manji udio u ukupnom metabolizmu STC-a (Pfeiffer i sur., 2014).

Od reakcija druge faze, detektirani su glukuronidi STC-a te sulfatni konjugati i glukuronidi monohidroksi-STC-a (Cabaret i sur., 2010). Također, zabilježen je i GSH-adukt koji je prema Pfeiffer i sur. (2014) najvjerojatnije adukt 9-hidroksi-STC-8,9-kinona.

1.1.2. Toksičnost STC-a

Osim strukture, aflatoksini i STC dijele sličnost u mehanističkim te kancerogenim i genotoksičnim učincima (Kiesling, 1986). Također, utvrđeni su njihovi aditivni proapoptički učinci (Liu i sur., 2014). Akutna oralna toksičnost STC-a je u odnosu na aflatoksine relativno niska sa LD₅₀ između 120 mg/kg tjelesne mase i 166 mg/kg tjelesne mase, a jetrom i bubrezima kao ciljnim organima. Tumorigenost je zapažena nakon oralne, supkutane, dermalne i peritonealne administracije na testiranim životinjama (majmuni, miševi, štakori, ribe) (EFSA, 2013). Gastričnom intubacijom STC-a, kod miševa je zapažena pojava adenokarcinoma pluća (Huang i sur., 2004), a jednokratnom supkutanom injekcijom u mladih miševa također dolazi do razvoja tumora pluća, ali i jetre (Fujii i sur., 1976). Zapažen je i toksični učinak na stanice probavnog sustava pri čemu je zabilježen porast incidencije razvoja karcinoma (Kusunoki i sur., 2011), ali i intestinalne metaplazije u mongolskih skočimiša inficiranih *H. pylori* (Ma i sur., 2003). Procjenom dostupnih saznanja o učincima administracije STC-a u životinja, a nepostojanjem adekvatnih dokaza o kancerogenosti u ljudi, IARC je svrstao STC u skupinu 2B, skupinu toksina s mogućim kancerogenim učinkom u ljudi (IARC, 1976).

Predložena su dva mehanizma mutageneze. Prvi je stvaranje STC-N7-gvanin adukata nakon aktivacije STC-a epoksidacijom furofuranskog prstena. Drugi mehanizam predlaže nastanak katehola hidroksilacijom aromatskog prstena (Pfeiffer i sur., 2014). Oštećenje DNA, osim što

dovodi do mutagenosti i posljedične indukcije razvoja tumora, može dovesti i do zaustavljanja staničnog ciklusa u G2/M ili G0/G1 fazi (Jiang i sur., 2017; Liu i sur., 2014).

Primijećeno je da STC djeluje toksično i drugim mehanizmima. Osim DNA-dvolančanim lomovima (Liu i sur. 2014), citotoksičnost je uzrokovana i smanjenjem količine ATP-a (Kawai i sur., 1984). Zapažena je i proizvodnja ROS-ova te inhibicija antioksidativnih enzima koji dovode do oksidativnog stresa stanice (Zingales i sur., 2020). Također, mikotoksin uzrokuje i povećanu propusnost mitohondrijske membrane što pogoduje otpuštanju citokroma c, aktivaciji kaspazne kaskade i posljedično dovodi do apoptoze (Martinou i Youle, 2011). Navedene učinke su zapazili i Liu i sur. (2014) tretiranjem HepG2 stanica, pri čemu je utvrđen IC₅₀ 7.3 μM te Gao i sur. (2015) tretiranjem tijekom razdoblja od 24 sata (IC₅₀ 3 μM).

Također, pokazano je da su pneumociti osjetljivi na STC koji je sa IC₅₀ = 3,7 μM (Bünger i sur., 2004) odnosno IC₅₀ 0.9–2.3 μg/mL u istraživanju koje su proveli Jakšić Despot i sur., (2016) uzrokovao izuzetno citotoksično djelovanje na stanične linije ljudskog adenokarcinoma pluća (A549). Štetni učinci STC-a na pluća su potkrijepljeni i nakon intratrahealnog usađivanja STC-a u Wistar štakora u koncentracijama od 0.3 mg STC/kg mase pluća. Pritom je alkanim komet testom zabilježen porast jednolančanih lomova u odnosu na kontrolu (Jakšić i sur., 2020).

Zamijećena je i neuralna citotoksičnost tretiranjem neuro-2a stanične linije mišjeg neuroblastoma (Bünger i sur., 2004).

1.1.3. Plijesni proizvođači STC-a

STC je sekundarni metabolit plijesni pronađen u vrsta rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Emericella*, *Chaetomium*, *Botryotrichum* i *Humicola* (Rank i sur., 2011). No, proizvodnja STC-a je najznačajnija u plijesni roda *Aspergillus* i to podrodova *Nidulantes*, *Circumdati* i *Cremeri* (Houbraken i sur., 2020).

Pojedine vrste sekcija *Aenei* i *Nidulantes* podroda *Nidulantes* su u nemogućnosti dovršiti biosintetski put do aflatoksina zbog nefunkcionalnosti ili gubitka gena za enzim O-metiltransferaza II potrebnog za sintezu O-metil-sterigmatocistina, direktnog prekursora aflatoksina (Yu i sur., 2004). Stoga dolazi do nakupljanja STC-a umjesto aflatoksina. Sekcija *Nidulantes* je od velikog značaja jer je pod nju svrstana vrsta *A. nidulans*, ali i *A. versicolor*, plijesan koja u najvećoj mjeri proizvodi STC (Barnes i sur., 1994). *A.versicolor* je široko rasprostranjena plijesan pronađena u tlu, prehrambenim proizvodima te u zraku, prašini i građivnim materijalima unutarnjih prostora koji su prethodno bili poplavljeni (Veršilovskis i De

Saeger, 2010; Engelhart i sur., 2002; Gravesen i sur., 1999). Kserofilna je plijesan sa optimumom aktiviteta vode i temperature za rast od 0,78 do 0,98, odnosno 25-27 °C (Piecková i Jesenská, 1999). Vujanović i sur. (2001) su pokazali da je sporulacija *A. versicolor* veća što su veći aktivitet vode (>0,86) i temperatura (>18 °C) te da je za sve *Aspergillus* vrste pritom primijećena značajnija akumulacija mikotoksina. Pri aktivitetu vode od 1.00 sinteza i akumulacija STC-a može doseći toliku razinu da čini 1 % biomase plijesni *A. versicolor* (Nielsen, 2003). Smatra se da bi intoksikacija ovom plijesni i njezinim metabolitima mogla biti uzrok tzv. "Sick building syndrome" bolesti sa simptomima iritacije nosne sluznice, očiju, grla, glavobolje te umora (Delanoe i sur., 2020; Tuomi i sur., 2000).

Vrste *A. flavus* i *A. parasiticus* su plijesni podroda *Circumdati* i najznačajniji su proizvođači aflatoksina. Također su u mogućnosti sintetizirati STC, no u njih su pronađene manje količine jer se većina prevede u aflatoksine (Yu i sur., 2004). Te su plijesni povezane sa kontaminacijom orašastih plodova, leguminoza i ulja sjemenki, a primijenjuju se i u biotehnologiji (EFSA, 2020; Cleveland i sur., 2009). Od velikog su značaja za ljudsko zdravlje s obzirom da su najznačajniji proizvođači aflatoksina, a *A. flavus* je jedna od najčešćih plijesni koja uzrokuje invazivne aspergiloze (Hedayati i sur., 2007).

Unutar podroda *Cremeri*, plijesni *A. Inflatus* i *A. Oregonensis* proizvode STC (Rank i sur., 2011).

1.1.4. Pojavnost STC-a u prehrambenim proizvodima i okolišu

U većini radova iz razdoblja druge polovice 20. stoljeća, analizom žitarica kromatografskim metodama, STC nije detektiran ili je detektiran u relativno vrlo malom broju uzoraka (Scudamore i sur., 1997; Pande i sur., 1990; Sugimoto i sur., 1977). Slični rezultati su dobiveni analizom proizvoda na bazi žitarica (Stroka i sur., 2004; Soares i Rodriguez-Amaya, 1989). Pri tom su korištene metode sa LOD vrijednostima 2 µg/kg ili većim. U novije vrijeme se sve više primijenjuju softiciranije i osjetljivije analitičke metode pritom detektirajući prisutnost STC-a u pojedinim namirnicama. Veršilovskis i sur., (2008a) su koristeći LC-MS/MS analitičku metodu u 14 % uzoraka žitarica iz 2006. te u 35 % uzoraka žitarica iz 2007. godine detektirali STC. Pritom je LOD iznosio 0,15 µg/kg, a LOQ 0,30 µg/kg. Također, analizom 29 uzoraka kruha LC-MS/MS metodom (LOD 0,15 µg/kg), STC je pronađen u njih 5 u rasponu koncentracija od 2,4 do 7,1 µg/ kg. No zaključeno je da konzumacija analiziranih kruhova sa

pronađenim koncentracijama STC-a ne predstavlja ozbiljan rizik za ljudsko zdravlje (Veršilovskis i Mikelson, 2008c).

Zbog učestale konzumacije piva u relativno velikim količinama, njegovo analiziranje je od nemale važnosti. Veršilovskis i sur., (2008b) su u 2 od 26 uzoraka HPLC metodom detektirali STC. No u ispitivanju provedenom na pivima sa hrvatskog tržišta, STC nije pronađen (Šmehil, 2022).

Začini, zrna kave, voće i povrće te sirevi su također ispitivani na STC, pri čemu je postotak pozitivnih uzoraka uglavnom bio vrlo malen (EFSA, 2013).

Ispitivanja prehrambenih proizvoda na kontaminaciju STC-om postoje, ali je broj istih limitiran. Također, velik broj metoda korištenih za analizu je imalo visoke vrijednosti LOD-a i LOQ-a zbog čega je nemoguće sa sigurnošću procijeniti stvarnu kontaminaciju prehrambenih proizvoda STC-om. Također, unutar Europske Unije ne postoje regulative niti utvrđeni maksimalni limiti za prehrambene namirnice.

Osim ingestijom kontaminiranih namirnica, inhalacija je još jedan put izloženosti plijesnima, ali i mikotoksinima. Dosad provedena istraživanja pokazuju da unutarnji prostori sa visokom stopom vlažnosti pogoduju razvoju plijesni i nakupljanju STC-a. Analizom građevnih materijala poplavljenih prostorija ili prostorija visoke vlažnosti, STC je pronađen u 25 od 62 ispitana uzorka. Pritom su uzorci analizirani GC-MS/MS metodom, a utvrđene koncentracije su iznosile od 1.9 do 1,100 pg/mg. Također, od 8 uzoraka istaložene prašine i 8 uzoraka prašine u zraku, STC je detektiran u po 1 uzorku. Iako su pronađene niske koncentracije, u 6 uzoraka pozitivnih na STC, *Aspergillus* vrste nisu identificirane (Bloom i sur., 2007). To potvrđuje da brojne, široko rasprostranjene plijesni proizvode STC te da je od velike važnosti provoditi daljnja ispitivanja o njegovim proizvođačima. Također, analizom građevnih materijala finskih zgrada, mikotoksin je detektiran u 24% uzoraka te je utvrđeno da je od svih mikotoksina, upravo on najzastupljeniji (Tuomi i sur., 2020). Šegvić Klarić i sur. (2019) su analizom zraka i prašine u poplavljenim kućama u hrvatskom selu Gunji detektirali STC u koncentracijama do 0,59 mg/g. Jakšić Despot i sur., (2016) su analizom prašine iz žitnih mlinova utvrdili maksimalnu koncentraciju STC-a od 2,35 µg/g te su, uzimajući u obzir prosječnu količinu prašine brašna u mlinovima, frekvenciju disanja i volumen udahnutog zraka prilikom osmosatnog boravka u navedenim prostorima, utvrdili da bi dnevna doza inhaliranog STC-a mogla dostizati i 0,42 µg. Navedene količine udahnutog STC-a su usporedive sa vrijednosti IC50 za THP-1 makrofagima slične stanice. Također, 1 mjesec nakon inhalacije STC-a po cijeloj površini pluća štakora

detektirane su granulomatozne lezije sastavljene od akumuliranih makrofaga i T-limfocita (Sumi i sur., 1994). Navedena istraživanja ukazuju na važnost praćenja i daljnjih ispitivanja inhalacije, ali i drugih potencijalnih izvora i puteva intoksikacije STC-om.

1.1.5. Procjena izloženosti STC-u

Pretraživanjem literature, pronađen je vrlo mali broj radova na temu analize ljudskih bioloških uzoraka radi detekcije STC-a. Tian i sur. (1995) su analizirali 61 uzorak kanceroznog tkiva, urina ili pune krvi pacijenata oboljelih od raka jetre ili želuca. Zamjetnije koncentracije DNA-STC adukata u rasponu koncentracija od 65 do 113 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tjelesne mase su pronađene u 4 od ukupno 13 pacijenata. Također, Hušanašu i sur., (2011) su analizom krvi i urina detektirali STC u pacijenata s cirozom jetre te značajnije koncentracije u oboljelih od hepatocelularnog karcinoma. U urinu pacijenata oboljelih od ciroze jetre STC je detektiran u koncentraciji od 1.053 ng/ml, a kod pacijenata oboljelih od hepatocelularnog karcinoma STC je detektiran u koncentraciji 9.39 ng/ml. Dodatno je utvrđena i pozitivna korelacija STC-a i tumorskog biljega alfa-fetoproteina (Hušanašu i sur., 2011). Pozitivne rezultate su dobili i Cao i sur. (2018) detektiravši STC u urinu u 33% i u 40 % uzoraka seruma pacijenata sa hepatocelularnim karcinomom. Navedena istraživanja potkrjepljuju moguću ulogu STC-a u patogenezi kancerogenih bolesti.

1.2. Metode ekstrakcije mikotoksina iz bioloških uzoraka

Biološki uzorci posjeduju kompleksan matriks, a traženi analiti su prisutni često u niskim koncentracijama. Adekvatnom obradom uzorka uklanjaju se interferencije koje mogu maskirati analite u tragovima i utjecati na osjetljivost analitičke metode. Najčešće primjenjivane metode su ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE), tekućinsko-tekućinska ekstrakcija (LLE) te pročišćavanje imunoafinitetnim kolonama (IAC). Radi što uspješnijeg pročišćavanja i pripreme uzorka za analizu, u primjeni su i kombinacije navedenih metoda (Escrivá i sur., 2017).

1.2.1. Tekućinsko-tekućinska ekstrakcija (LLE)

Tekućinsko-tekućinska ekstrakcija (LLE) je jedna od najprimjenjivanijih metoda ekstrakcije željenog analita iz raspoloživog uzorka. Temelji se na distribuciji tvari između dvije tekuće faze koje se međusobno ne miješaju, odnosno organskog i vodenog otapala. Analit se tijekom protresanja raspodjeljuje u fazu za koju ima veći afinitet, a tekuće faze nakon odstojanja formiraju jasno odvojena dva sloja. Iako je ova metoda dugotrajna, iziskuje manualni rad te su potrebni relativno veliki volumeni često toksičnih otapala (Walker i Mills, 2002; Šcigalski i Kosobucki, 2020), ona je s druge strane jednostavna i prikladna za velik broj analita. Stoga se nastoje razvijati modifikacije metode s namjerom povećanja efikasnosti, automatizacije i minijaturizacije. Primjer takvih su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), ubrzana ekstrakcija otapalom (ASE) te disperzivna tekućinsko-tekućinska mikroekstrakcija (DLLME). Također, LLE se nerijetko kombinira sa drugim ekstrakcijskim metodama pri čemu je kombinacija sa ekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPE) jedna od najčešće korištenih tijekom analize mikotoksina u urinu (Escrivá i sur., 2017).

1.2.2. Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE)

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE) je česta metoda ekstrakcije, pročišćavanja, ali i ukoncentriravanja analita. Temelji se na selektivnom vezanju analita iz tekućeg uzorka na čvrsti sorbens pri čemu se odvaja od brojnih komponenata uzorka, a potom se eluira otapalom prikladnim za daljne analitičke korake. S obzirom na svojstva analita koji želimo ekstrahirati, koriste se različiti sorbensi od kojih su reverzno-fazni, normalno-fazni te ionsko-izmjenjivački sorbensi najosnovniji. Prednosti SPE metode su raznolikost adsorbirajućih materijala, upotreba manjih volumena otapala, ukoncentriravanje analita te kompatibilnost s različitim analitičkim metodama (Badawy i sur., 2022; Turner i sur., 2009). Mane su nepostojanje univerzalne kolone

koja bi uspješno vezala analite različitih svojstava, utjecaj pH i otapala na uspješnost ekstrakcije, visoka varijabilnost u dobivenim rezultatima, te cijena samih SPE kolona (Liakh i sur., 2019; Turner i sur., 2009). Jedna od novijih modifikacija postojeće metode su disperzivna ekstrakcija na čvrstoj fazi (dSPE). Za rliku od konvencionalne SPE metode, u dSPE metodi se adsorbens dodaje u uzorak koji se zatim snažno miješa te centrifugira. Pritom se interferencije vežu na adsorbens, a analit ostaje u supernatantu. Ova je metoda stoga iznimno jednostavna, štedi vrijeme, dostupni su različiti sorbensi te je zbog uporabe manjih količina adsorbensa i otapala, ekološki prihvatljivija (Ścigalski i Kosobucki, 2020; Anastasiades et al, 2003).

1.2.3. Pročišćavanje imunoafinitetnim kolonama (IAC)

Metoda pročišćavanja imunoafinitetnim kolonama je temeljena na interakciji analita sa protutijelima imobiliziranim na inertnom materijalu koji je uložen u puferiranu kolonu. Analit se prilikom propuštanja uzorka kroz kolonu veže za visokospecifična protutijela što omogućuje ekstrakciju i u uvjetima kompleksnog matriksa. Fosfatnim puferom se uklanjaju eventualni koekstrakti, a prikladnim otapalom se provodi elucija analita. Pritom se najčešće koriste mali volumeni acetonitrila ili metanola koji ometaju interakciju analita sa protutijelom. Ključni parametri uključeni u procjenu performansa IAC metode su avidnost i specifičnost protutijela za analit te kapacitet kolone. Dostupne su imunoafinitetne kolone za brojne analite pa tako i za mikotoksine poput aflatoksina, zearalenona, ohratoksina A i fumonizina. Prednosti su izvrstan analitički prinos i specifičnost za analit, no nedostatak je visoka cijena. Razvijene su i kolone koje omogućuju istodobnu ekstrakciju većeg broja mikotoksina. No, kompleksnost i visoki troškovi proizvodnje te nedovoljna učinkovitost ekstrakcije svih analita, iziskuju daljnji razvoj i optimizaciju navedenih kolona (Zhang i Banerjee, 2020; Şenyuva i Gilbert, 2010).

1.2.4. QuEChERS

QuEChERS metoda obrade uzorka prvi je puta opisana 2003. godine radi ekstrakcije pesticida i uklanjanja interferencija iz matriksa voća i povrća (Anastasiades i sur., 2003). Metodu čine prvi korak ekstrakcije analita acetonitriplom i odvajanje tekućih faza isoljavanjem te drugi korak dodatnog pročišćavanja disperzivnom ekstrakcijom na čvrstoj fazi (dSPE). S obzirom na jednostavnost i učinkovitost, ali i uštedu i vremena i novca, ove se metoda počela primijenjivati i radi ekstrakcije brojnih drugih analita poput pesticida, farmaceutika i postojanih polutanata iz različitih matriksa (Rejczak i Tuzimski, 2015). Prvim se korakom uklanjaju hidrofilnije interferencije poput proteina i aminokiselina te je omogućeno uspješno ekstrahiranje relativno

širokog spektra lipofilnijih tvari. Drugi korak ove metode uklanja šećere, organske kiseline, pigmente, lipide i druge nepolarne interferencije što omogućava dodatno pročišćavanje i povećanje selektivnosti i osjetljivosti analitičke metode (Kanu, 2021). Radi ekstrakcije analita različitih fizikalno-kemijskih svojstava, opisane su i dvije modifikacije originalne QuEChERS metode koje uključuju i dodatak pufera radi regulacije pH ekstrakta (EN 15662:2008, 2008; AOAC International, 2007) Prednosti ove metode su između ostalog jednostavnost, visoki analitički prinos, preciznost, točnost i ekološka prihvatljivost (Lehotay, 2004). No, primijećeno je da dodatnim pročišćavanjem ekstrakta putem dSPE, dolazi do gubitaka analita prilikom ekstrakcije mikotoksina. Stoga su se počele predlagati primjene alternativnih metoda pročišćavanja ili provođenje samo prvog koraka QuEChERS metode (Dong i sur., 2019; Zhang i sur., 2018; Arroyo-Manzanares i sur. 2013; Tamura i sur., 2011).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

STC je kancerogeni mikotoksin skupine 2B po IARC-u kojeg u najvećoj mjeri proizvode ubikvitarne plijesni roda *Aspergillus*. S obzirom da je izloženost ljudi STC-u nedovoljno istražena, a njegovi plijesni proizvođači su česti kontaminanti prehrambenih namirnica i visoko zastupljeni u okolišu, od velikog je značaja direktno ispitivanje izloženosti STC-u analizom bioloških uzoraka.

Većina ksenobiotika, pa tako i mikotoksini i njihovi metaboliti, izlučuju se urinarnim putem. Osim toga, uzorkovanje je neinvazivno, a prikupljanje većih volumena uzoraka je jednostavnije i prihvatljivije. Navedeni razlozi čine urin izuzetno prikladnim biološkim uzorkom za analizu. No, kao i svi biološki uzorci, posjeduje kompleksan matriks zbog čega je potrebna adekvatna obrada i korištenje sofisticiranih analitičkih metoda detekcije.

Iz svega navedenog proizlaze sljedeći ciljevi rada:

- optimizirati QuEChERS metodu ekstrakcije STC-a iz uzoraka ljudskog urina
- ispitati prisutnost STC-a u ljudskim uzorcima urina LC-MS metodom
- utvrditi poveznicu prisustva STC-a u urinu s obzirom na metodu pripreme uzoraka, dob i spol ispitanika
- procijeniti javnozdravstveni rizik za izloženost kancerogenom mikotoksinu u zdravoj populaciji na području Republike Hrvatske na uzorku dobrovoljnih darivatelja krvi

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- Soli - roQ QuEChERS Kits (Phenomenex, Torrance, SAD)
- Acetonitril (Panreac Química SLU, Barcelona, Španjolska)
- Ledena octena kiselina (Panreac, Barcelona, Španjolska); radna otopina 1 % v/v u vodi
- Metanol (VWR Chemicals BD, SAD)
- Destilirana voda

3.1.2. Radni instrumenti

- Vorteks (Vortex technoKartell TK3S, Kartell spa, Noviglio, Italija)
- Termomikser (Eppendorf ThermoMixer C, Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Centrifuga (Tabletop Centrifuge Z 326 K, Hermle LaborTechnik GmbH, Wehingen, Njemačka)
- Termo-vakuum uparivač (Concentrator Plus, Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Vakuum pupma (Rocker 300 Oil Free Vacuum Pump, Rocker Scientific Co., Ltd, New Taipei City, Taiwan)
- Vakuum komora (24 Position Vacuum Manifold Kit, PerkinElmer, Massachusetts, SAD)
- SPE kolone (Strata-X-A 33 mikrom Polymeric Strong Anion, Phenomenex, Torrance, SAD)
- Vezani sustav tekućinske kromatografije sa masenom spektrometrijom (1290 UHPLC/ 6550 iFunnel QTOF MS Jet Stream ESI izvor, Agilent, Santa Clara, CA, SAD)

3.2. Metode

3.2.1. Uzorkovanje

Za analizu je prikupljeno 94 uzoraka urina zdravih dobrovoljnih darivatelja krvi. 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.). Uzorkovanje 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.

3.2.2. Ekstrakcija analita iz uzoraka urina

Obrada uzoraka te ekstrakcija STC-a provedena je modifikacijama QuEChERS metode opisane u Anastassiades i sur. (2003). U 4 mL uzorka urina dodano je 8 mL smjese acetonitrila i ledene octene kiseline (1% v/v) te je uzorak vorteksiran 1 minutu. Zatim je dodano 0,8 grama roQ QuEChERS Kits smjese magnezijevog sulfata, natrijevog klorida, natrijevog citrata tribazičnog dihidrata te natrijevog citrata dibazičnog seskvihidrata kako bi pospješili odvajanje slojeva u idućim koracima. Uslijedilo bi vorteksiranje te inkubiranje na termomikseru pri 1000 rpm i temperaturi od 40°C tijekom 10 minuta. Uzorci su potom centrifugirani na 3000 g i 20°C tijekom 10 minuta.

3.2.3. Pročišćavanje ekstrakta

38/94 uzoraka je obrađeno propuštanjem kroz SPE kolonu. Pritom su korištene Strata-X-A 33 mikrom Polymeric Strong Anion kolone (Phenomenex, Torrance, SAD). 1 mL supernatanta dobivenog i pipetiranog iz prethodnog koraka centrifugiranja je propušteno kroz kolonu. Kolona je neposredno prije nanošenja uzorka kondicionirana modifikacijom uputa proizvođača (1 ml metanola, a potom 1 mL destilirane vode). Nakon nanošenja uzorka, kroz kolonu je propušteno 1 mL metanola kako bi eluirali analit, a eluati su skupljeni u polipropilenske Eppendorf mikroeprevete zapremine 1,5 mL. Brzina protjecanja je održavana na 1-2 kapi u sekundi. Za takvih 5/38 uzoraka, provedena je analiza sa i bez propuštanja kroz kolonu. Nadtalozni ostalih uzoraka (N = 56) nisu pročišćeni SPE metodom već je prikupljen alikvot od po 1 ml organskog sloja dobivenog centrifugiranjem ekstrakta priređenog postupkom QuEChERS.

Metanolni ekstrakti propušteni kroz kolonu te acetonitrilni ekstrakti koji nisu bili propušteni kroz kolonu upareni su do suha te čuvani u zamrzivaču (-20 °C) do LC/MS analize.

3.2.4. LC/MS analiza

LC/MS analiza je provedena na 1290 UHPLC sustavu spregnutim sa 6550 iFunnel QTOF MS uređajem sa Jet Stream ESI izvorom. Separacija je provedena na Zorbax Extend-C18 Rapid Resolution HT koloni s dimenzijama 2,1x50 mm i promjerom čestica od 2,8 mikrona. Pokretna faza A se sastojala od H₂O/0,1% mravlje kiseline, a pokretna faza B od 100% acetonitrila. Gradijent pokretne faze i brzine protoka prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Sastav gradijenta mobilne faze i brzine protoka

	Vrijeme (min)	A%	B%	Protok (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

Mobilna faza sastava 40 % A i 60 % B faze je nakon odjeljivanja sastavnica u koloni propuššana tijekom 3 minute radi uspostavljanja ekvilibrija prije idućeg uzorka. Temperatura je održavana na 40 °C. Primijenjen je pozitivan način ionizacije Agilent Dual Jet Stream electrospray (ESI) izvora s dušikom kao plinom za sušenje, raspršivanje i plinskim omotačem. Optimizirani su temperatura plina omotača, ESI izvor i naponi mlaznice, napon TOF fragmentora, energije sudara i stope prikupljanja mase radi što boljeg analitičkog odgovora u traženom rasponu koncentracija. Prilikom analize primijenjena je temperatura plina za sušenje od 220 °C i brzine protoka od 14 L/min te tlak plina za raspršivanje od 40 psi. Nadalje, protok plina omotača je održavan na 11 L/min pri 250 °C. Kalibracija TOF mase je izvođena svakodnevno u modu visoke rezolucije (4 GHz) i niskom rasponu mase (1700 m/z). Referentne mase korištene za korekciju mase unutar analize su bile m/z 121.0509 i 922.0098.

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

3.2.5. Obrada podataka

Rezultati su podvrgnuti statističkoj analizi Fisherovim testom pri čemu je korišten GraphPad Prism 10 softver. Cilj je bio utvrditi utječu li u statistički značajnoj mjeri primijenjene metode pročišćavanja ekstrakta, spol te dob na detekciju STC-a. Pritom je prisutstvo i odsustvo STC-a u uzorku predstavljalo 2 kategorijske varijable. Statističkom analizom su dobivene p-vrijednosti, uz razinu statističke značajnosti $\alpha < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

94 uzoraka urina zdravih pacijenata podvrgnuto je obradi opisanom metodom. STC je detektiran u njih 17, no u iznimno malim količinama (<100 molekula). Od ukupnog broja uzoraka, 38 ih je podvrgnuto dodatnom koraku pročišćavanja ekstrakcijom na čvrstoj fazi. Tim se korakom nastojalo postići dodatno uklanjanje komponenata matriksa koji bi mogli utjecati na ionizaciju analita, a također SPE kolona omogućava ukocentriravanje analita s obzirom na očekivane niske koncentracije. Dobiveni rezultati pokazuju da je STC detektiran u 6/38 tako obrađenih uzoraka, odnosno 16 % (Tablica 2).

STC je detektiran u 13/61 (21 %) uzoraka koji nisu bili propušteni kroz SPE kolonu (Tablica 2.)

Tablica 2. Rezultati dobiveni obradom i LC-MS analizom bioloških uzoraka urina

Način obrade uzorka	Broj uzoraka	Broj pozitivnih uzoraka	Postotak pozitivnih uzoraka
SPE metodom	38	6	16 %
Bez SPE metode	61	13	21 %
Ukupni rezultati	94	17	18 %

Nadalje, STC je za 2/5 uzoraka analiziranih paralelno sa i bez propuštanja kroz SPE kolonu detektiran samo u ekstraktu priređenom bez propuštanja uzorka kroz SPE kolonu. Dobiveni rezultati mogu se objasniti na nekoliko načina. Izostanak detekcije STC-a može biti posljedica interakcija STC-a sa interferencijama u matriksu i obrascima fragmentiranja različitim od onih za STC. Nadalje, razlog može biti i potreba za dodatnom optimizacijom kondicioniranja SPE kolone primjerice primjenom fosfatnog pufera ili inkubacijom kolone na povišenoj temperaturi kako bi se povećala učinkovitost elucije STC-a sa kolone. S obzirom da su glukoronidi značajni metaboliti druge faze metabolizma STC, enzimska obrada uzorka urina mogla bi utjecati na koncentracije detektabilnog STC-a.

U ovom istraživanju detektirane količine STC-a u svim slučajevima iznimno male pa je moguće da ne postoji značajna razlika u prisustvu STC-a u uzorcima obrađenim sa ili bez propuštanja kroz kolonu. To je i potvrđeno provedbom Fisherovog statističkog testa kojim nije utvrđena statistički značajna razlika između pojavnosti STC i primijenjene metode pripreme uzoraka ($p=0,6042$).

U uzorcima urina žena STC nije detektiran, dok je prisustvo STC-a utvrđeno u 20 % uzoraka urina muškaraca (Tablica 3.). Iako bi ovakav nalaz na prvu mogao upućivati da je intoksikacija muškaraca značajnija, treba uzeti u obzir da je broj analiziranih uzoraka urina žena premalen te su potrebna daljna ispitivanja s opsežnijim brojem uzoraka kako bi se utvrdile pouzdanije razlike u izloženosti mikotoksinu STC-u među spolovima. P-vrijednost dobivena Fischerovim testom ($p=0,3437$) upućuje da ne postoji statistički značajna povezanost spola i prisustva STC-a u urinu.

Tablica 3. Ovisnost prisutnosti STC-a u uzorku o spolu

Spol	Broj uzoraka	Broj pozitivnih uzoraka	Postotak pozitivnih uzoraka
Muški	87	17	20 %
Ženski	7	0	0 %

Nadalje, STC je u najvećoj mjeri bio prisutan u uzorcima najstarije dobne skupine, odnosno u skupini od 60 do 69 godina. Također, mikotoksin je detektabilan u visokom postotku i kod najmlađe dobne skupine od 19-29 godina (Tablica 4.). No, s obzirom da se radi tek o tragovima toksina, možemo pretpostaviti da nema opasnosti za zdravlje ljudi. Fisherov test je potvrdio da dob i detekcija STC-a nemaju statistički značajnu povezanost ($p=0,0906$).

Tablica 4. Ovisnost prisutnosti STC-a u uzorku o dobi

Dob/godina	Broj uzoraka	Broj pozitivnih uzoraka	Postotak pozitivnih uzoraka
19-29	11	4	36 %
30-39	18	1	6 %
40-49	37	5	14 %
50-59	21	4	19 %
60-69	7	3	43 %

Provedeno istraživanje predstavlja prvo ispitivanje prisutnosti mikotoksina STC-a u urinu u Republici Hrvatskoj. Dosad su provedena ispitivanja na uzorcima pacijenata sa kroničnim bolestima jetre i želuca, no broj takvih istraživanja je vrlo malen. Unatoč tomu, rezultati svih ispitivanja su u određenoj mjeri utvrdili prisutnost STC. Istraživanje koje su proveli Hušanašu

i sur. (2011) upućuju na obećavajuću korelaciju intoksikacije STC-om i razvoja kroničnih bolesti jetre. Naime, utvrđene su 200 puta veće koncentracije STC-a u urinu pacijenata sa cirozom i nekoliko stotina puta (1800x) veće koncentracije za hepatocelularni karcinom u odnosu na kontrolne uzorke (55/166). Dosadašnja istraživanja također upućuju na niske koncentracije STC u kontrolnim skupinama tj. u zdravoj populaciji. Prema podacima dostupnim u literaturi STC je rijetko prisutan u krvnoj plazmi zdravih donora. Tako su Hušanaš i suradnici (2011) detektirali STC u urinu 1/14 zdravih ispitanika u koncentraciji 0.005 ng/ml, dok su Cao i suradnici (2018) detektirali STC kod 3/30 zdravih ispitanika u koncentraciji 0.75-2.12 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.

Iako su ovim istraživanjem detektirane vrlo malene količine STC-a, one mogu upućivati na izloženost putem kontaminirane hrane ili prisustva STC-a u okolišu, primjerice u kućnoj prašini. Koncentracije STC-a mogu biti povećane u uvjetima velike vlage, npr. nakon poplava (Jakšić i sur., 2021) pa možemo pretpostaviti da bi se to odrazilo i na koncentracije detektirane u urinu ili krvi izloženih ljudi. Koncentracije u dosad analiziranim skupinama prehrambenih proizvoda su uglavnom bile nižih vrijednosti te nije utvrđen rizik za ljude (EFSA, 2013). S obzirom na brojne mehanizme toksičnosti te mogući kancerogeni učinak, dobiveni pozitivni rezultati u pojedinim uzorcima potvrđuju potrebu daljnjih ispitivanja na većem broju uzoraka i kontinuirano praćenje izloženosti navedenom mikotoksinu.

Rezultati ovoga rada pokazali su da se STC na jednostavan i brz način može ekstrahirati iz kompleksnog matriksa urina, a primjena osjetljive LC-MS metode ukazala je na mogućnost detekcije STC-a već u tragovima.

5. ZAKLJUČCI

U ovom je diplomskom radu prikazana optimizirana QuEChERS metoda obrade i LC-MS analiza ljudskih uzoraka urina radi ekstrakcije i detekcije mikotoksina STC-a.

Rezultatima je pokazana uspješnost ekstrakcije STC-a i zadovoljavajuće uklanjanje interferencija matriksa. No, s obzirom da postoji mogućnost gubitka analita dodatnim pročišćavanjem SPE metodom, potrebna su daljnja ispitivanja i optimizacija uvjeta kondicioniranja kolone i elucije analita.

Opisana analiza uzoraka ljudskog urina predstavlja prvo takvo na području Republike Hrvatske pri čemu je STC u 18 % uzoraka detektiran u tragovima (približno ≤ 100 molekula). Time se može zaključiti da izloženost spomenutom toksinu trenutno ne predstavlja ozbiljan javnozdravstveni problem u ispitivanoj populaciji zdravih dobrovoljnih darivatelja krvi. Međutim, opisana metoda omogućava primjenu na uzorcima prikupljenim kod specifičnih skupina ljudi izloženih STC-u ili radi utvrđivanja uzročno-posljedične veze između kroničnih upalnih i malignih bolesti te izloženosti STC-u.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

ASE – accelerated solvent extraction

DLLME – dispersive liquid-liquid microextraction

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

dSPE – dispersive solid-phase extraction

EFSA – The European Food Safety Authority

GSH – glutation

IARC – The International Agency for Research on Cancer

LOD – limit of detection

LOQ – limit od quantification

LC- MS – liquid chromatography with mass spectrometry

MAE – microwave-assisted extraction

SPE – solid-phase extraction

SPME – solid-phase microextraction

STC – sterigmatocistin

UAE – ultrasound-assisted extraction

QuEChERS – Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe

7. LITERATURA

- AOAC International. AOAC Official Method 2007.01. Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate. 2007. *J AOAC Int*, 2007, 90, 485-520.
- Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher 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, 412-431.
- Arroyo-Manzanares N, Huertas-Pérez JF, Gámiz-Gracia L, García-Campaña AM. A new approach in sample treatment combined with UHPLC-MS/MS for the determination of multiclass mycotoxins in edible nuts and seeds. *Talanta*, 2013, 115, 61-67.
- Badawy MEI, El-Nouby MAM, Kimani PK, Lim LW, Rabea EI. A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis. *Anal Sci*, 2022, 38, 1457–1487
- Barnes SE, Dola TP, Bennett JW, Bhatnagar D. 1994. Synthesis of sterigmatocystin on a chemically defined medium by species of *Aspergillus* and *Chaetomium*. *Mycopathologia*, 1994, 125, 173–178.
- 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.
- Cabaret O, Puel O, Botterel F, Pean M, Khoufache K, Costa JM, Delaforge M, Bretagne S. Metabolic detoxication pathways for sterigmatocystin in primary tracheal epithelial cells. *Chem Res Toxicol*, 2010, 23, 1673-1681.
- Cao X, Li X, Li J, Niu Y, Shi L, Fang Z, Zhang T, 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 Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1073, 191–200.
- Cleveland TE, Yu J, Fedorova N, Bhatnagar D, Payne GA, Nierman WC, Bennett JW. Potential of *Aspergillus flavus* genomics for applications in biotechnology. *Trends Biotechnol*, 2009, 27, 151-157.

- Delanoe A, Heutte N, Gente S, Seguin V, Garon D. Relationships between Exposure to Bioaerosols, Moldy Surface and Symptoms in French Mold- Damaged Homes. *Atmosphere*, 2020, 11, 223.
- Díaz Nieto CH, Granero AM, Zon MA, Fernández H. Sterigmatocystin: A mycotoxin to be seriously considered. *Food Chem Toxicol*, 2018, 118, 460-470.
- Dong H, Xian Y, Xiao K, Wu Y, Zhu L, He J. Development and comparison of single-step solid phase extraction and QuEChERS clean-up for the analysis of 7 mycotoxins in fruits and vegetables during storage by UHPLC-MS/MS. *Food Chem*, 2019, 274, 471-479.
- 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 J*, 2013, 11, 3254. Dostupno na: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3254> [7.5.2024].
- EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), Schrenk D, Bignami M, Bodin L, Chipman JK, del Mazo J, Grasl Kraupp B, Hogstrand C, Hoogenboom LR, Leblanc J-C, Nebbia CS, Nielsen E, Ntzani E, Petersen A, Sand S, Schwerdtle T, Vleminckx C, Marko D, Oswald IP, Piersma A, Routledge M, Schlatter J, Baert K, Gergelova P, Wallace H. Scientific opinion – Risk assessment of aflatoxins in food. *EFSA J*, 2020, 18, 112.
- EN 15662:2008. Foods of plant origin–Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction and partitioning and cleanup by dispersive SPE - QuEChERS method, 2008.
- Engelhart S, Looock A, Skutlarek D, Sagunski H, Lommel A, Färber H, Exner M. Occurrence of Toxicogenic *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, 251.
- 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. U. S. A.*, 1979, 76, 179-183.

- Fujii K, Kurata H, Odashima S, Hatsuda Y. Tumor induction by a single subcutaneous injection of sterigmatocystin in newborn mice. *Canc Res*, 1976, 36, 1615–1618.
- Gravesen S, Nielsen PA, Iversen R, Nielsen KF. 1999. Microfungal contamination of damp buildings - examples of risk constructions and risk materials. *Environ Health Persp*, 1999, 107, 505–508.
- Hedayati MT, Paqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 2007, 153, 1677–1692.
- Houbraken J, Kocsub S, Visagie CM, Yilmaz N, Wang XC, Meijer M, Kraak B, Hubka V, Bensch K, Samson RA, Frisvad JC. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Stud Mycol*, 2020, 95, 5 – 169.
- Huang XH, Zhang XH, Li YH, Wang JL, Yan X, Xing LX, Wang FR. Carcinogenic effects of sterigmatocystin and deoxynivalenol in NIH mice. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2004, 26, 705–708.
- Huțanașu C, Sfarti C, Trifan A, Cojocariu C, Singeap 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 (International Agency for Research on Cancer). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring substances. *IARC Press*, 1976, 10, 245.
- Jakšić D, Čurtović I, Kifer D, Rašić D, Kopjar N, Micek V, Peraica M, Šegvić Klarić M. Single - dose toxicity of individual and combined sterigmatocystin and 5-methoxysterigmatocystin in rat lungs. *Toxins*, 2020, 12, 734.
- Jakšić Despot D, Kocsubé S, Bencsik O, Kecskeméti A, Szekeres A, Vágvölgyi C, Varga J, Šegvić Klarić M. Species diversity and cytotoxic potency of airborne sterigmatocystin - producing *Aspergilli* from the section *Versicolores*. *Sci Total Environ*, 2016, 562, 296-304.
- 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*, 31, 2021, 730–744.

- Jiang X, Wang J, Xing L, Shen H, Lian W, Yi L, Zhang D, Yang H, Liu J, Zhang X. Sterigmatocystin induced checkpoint adaptation depends on Chk1 in immortalized human gastric epithelial cells in vitro. *Arch Toxicol*, 2017, 91, 259–270.
- Kanu AB. Recent developments in sample preparation techniques combined with high-performance liquid chromatography: A critical review. *J Chromatogr A*, 2021, 27, 1654.
- Kawai K, Nakamaru T, Nozawa Y, Maebayashi Y, Yamazaki M, Natori S. Inhibitory effect of sterigmatocystin and 5,6- dimethoxysterigmatocystin on ATP synthesis in mitochondria. *Appl. Environ. Microbiol*, 1984, 48, 1001–1003.
- Kiessling KH. Biochemical mechanism of action of mycotoxins. *Pure Appl Chem*, 1986, 58, 327–338.
- Krol ES. Metabolic detoxication pathways for sterigmatocystin in primary tracheal epithelial cells: structural identification of glutathione adducts. *Chem Res Toxicol*, 2011, 24, 1339-1340.
- Kusunoki M, Misumi J, Shimada T, Aoki K, Matsuo N, Sumiyoshi H, Yamaguchi T, Yoshioka H. Long-term administration of the fungus toxin, sterigmatocystin, induces intestinal metaplasia and increases the proliferative activity of PCNA, p53, and MDM2 in the gastric mucosa of aged Mongolian gerbils. *Environ Health Prev Med* , 2011, 16, 224–231.
- Lehotay SJ. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) approach for determining pesticide residues. U: Pesticide Analysis in Methods in Biotechnology. Vidal Martinez JL, Garrido Frenich A, urednici, SAD, Humana Press, 2004.
- Liakh I, Pakiet A, Sledzinski T, Mika A. Modern Methods of Sample Preparation for the Analysis of Oxylipins in Biological Samples. *Molecules*, 2019, 24,1639.
- Liu Y, Du M, Zhang G. Proapoptotic activity of aflatoxin B1 and sterigmatocystin in HepG2 cells. *Toxicol Rep*, 2014, 1, 1076-1086.
- Ma F, Misumi J, Zhao W, Aoki K, Kudo M. Long-term treatment with sterigmatocystin, a fungus toxin, enhances the development of intestinal metaplasia of gastric mucosa in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *Scand J Gastroenterol*, 2003, 38, 360–369.

- Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell*, 2011, 21, 92–101.
- Nielsen KF. Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genet Biol*, 2003, 39, 103-117.
- Pande N, Saxena J, Pandey H. Natural occurrence of mycotoxins in some cereals. *Mycoses*, 1990, 33, 126-128.
- 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.
- Piecková E, Jesenská Z. Microscopic fungi in dwellings and their health implications in humans. *Ann Agric Environ Med*, 1999, 6, 1-11.
- 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.
- Ścigalski P, Kosobucki P. Recent Materials Developed for Dispersive Solid Phase Extraction. *Molecules*, 2020, 25, 4869.
- Scudamore KA, Hetmanski MT, Chan HK, Collins S. Occurrence of mycotoxins in raw ingredients used for animal feeding stuffs in the United Kingdom in 1992. *Food Addit Contam*, 1997, 14, 157-173.
- Şenyuva HZ, Gilbert J. Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review. *J Chromatogr B*, 2010, 878, 115-132.
- Septien I, Cutuli MT, Garcia ME, Suarez G, Blanco JL. Solubility and stability of sterigmatocystin in different organic solvents. *Toxicon*, 1993, 31, 1337- 1340.
- Shimada T, Hayes CL, Yamazaki H, Amin S, Hecht SS, Guengerich FP, Sutter TR. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res*, 1996, 56, 2979-2984.
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Guengerich FP. Rat pulmonary microsomal cytochrome P-450 enzymes involved in the activation of procarcinogens. *Mutat Res*, 1992, 284, 233-241.

- Soares LM, Rodriguez-Amaya DB. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. *J Assoc Off Anal Chem*, 1989, 72, 22-26.
- Soriano del Castillo JM. Micotoxinas en alimentos. Španjolska, Ediciones Díaz de Santos, 2007, str. 363.
- Stroka J, Dasko L, Spangenberg B, Anklam E. Determination of the mycotoxin, sterigmatocystin, by thin-layer chromatography and reagent-free derivatisation. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2004, 27, 2101-2111.
- Sugimoto T, Minamisawa M, Takano K, Sasamura Y, Tsuruta O. Detection of ochratoxin A, citrinin and sterigmatocystin from stored rice by natural occurrence of *Penicillium viridicatum* and *Aspergillus versicolor*. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 1977, 18, 176-181.
- Sumi Y, Nagura H, Takeuchi M, Miyakawa M. Granulomatous lesions in the lung induced by inhalation of mold spores. *Virchows Archiv*, 1994, 424, 661-668.
- Šegvić Klarić M, Jakšić D, Kocsube S, Kopjar N, Kifer D, Rašić D, Sulyok M, Šarkanj B, Peraica M. Biodiversity and toxic properties of aspergillus section versicolores - what do floods have to do with it? HDBMB 2019: Crossroads in Life Science, Lovran, 2019, 36-36.
- Šmehil, A. 2022. Ispitivanje prisutnosti sterigmatocistina u pivu metodom tankoslojne kromatografije. Diplomski rad. Zagreb. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.
- Tamura M., Uyama A., Mochizuki N., Development of a multi-mycotoxin analysis in beer-based drinks by a modified QuEChERS method and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal Sci*, 2011, 27, 629-635.
- 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-Kähkölä P, Mussalo-Rauhamaa H, Haahtela T. Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66, 1899-1904.

- Turner NW, Subrahmanyam S, Piletsky SA. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Anal Chim Acta*, 2009, 632, 168-180.
- Veršilovskis A, Bartkevičs V, Miķelsone V. Sterigmatocystin presence in typical Latvian grains. *Food Chem*, 2008a, 109, 243-248.
- Veršilovskis A, De Saeger S. Sterigmatocystin: occurrence in foodstuffs and analytical methods -an overview. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54, 136-147.
- Veršilovskis A, De Saeger S, Mikelsone V. Determination of sterigmatocystin in beer by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *World Mycotoxin J*, 2008b, 1, 161-166.
- Veršilovskis A, Mikelsone V. Sterigmatocystin presence in different Latvian bread samples. Proceedings of the 3rd Baltic Conference on Food Science and Technology FOODBALT-2008, Jelgava, 2008c, 156-160.
- Vujanović V, Smoragiewicz W, Krzysztyniak K. Airborne fungal ecological niche determination as one of the possibilities for indirect mycotoxin risk assessment in indoor air. *Environ Toxicol*, 2001, 16, 1-8.
- Walker V, Mills GA. Solid-phase extraction in clinical biochemistry. *Ann Clin Biochem*, 2002, 39, 464-477.
- Yu J, Chang PK, Ehrlich KC, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA, Linz JE, Woloshuk CP, Bennett JW. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70, 1253-1262.
- Zhang K, Banerjee K. A Review: Sample Preparation and Chromatographic Technologies for Detection of Aflatoxins in Foods. *Toxins*, 2020, 12, 539.
- Zhang B, Chen X, Han SJ, Li M, Ma TZ, Sheng WJ, Zhu X. Simultaneous Analysis of 20 Mycotoxins in Grapes and Wines from Hexi Corridor Region (China): Based on a QuEChERS–UHPLC–MS/MS Method. *Molecules*, 2018, 23, 1926.
- Zhu F, Lin Y. Three xanthenes from a marine-derived mangrove endophytic fungus. *Chem Nat Compd*, 2007, 43, 132–135.

Zingales V, Fernandez-Franzon M, Ruiz MJ. Sterigmatocystin-induced cytotoxicity via oxidative stress induction in human neuroblastoma cells. *Food Chem Toxicol*, 2020, 136, 110956.

8. SAŽETAK

Sterigmatocistin (STC) je kancerogeni i genotoksični mikotoksin kojeg u najvećoj mjeri proizvode ubikvitarne plijesni roda *Aspergillus*. Mikotoksin je detektiran u brojnim prehrambenim namirnicama, ali i u unutarnjim prostorima sa visokom stopom vlažnosti i poviješću prethodnih poplava. Zabilježeni su brojni mehanizmi kojima ispoljava štetne učinke na organizam, a s obzirom da dijeli biosintetski put i strukturnu sličnost s kancerogenim aflatoksinom B1, potrebna je učinkovita, osjetljiva i dovoljno jednostavna metoda detekcije u biološkim uzorcima. Obradom 94 uzoraka urina zdravih dobrovoljnih darivatelja krvi nastojala se procijeniti izloženost mikotoksinu STC-u. Pritom je korištena optimizirana QuEChERS metoda ekstrakcije i pročišćavanja uzorka. STC je u tragovima detektiran u 18 % uzoraka pri čemu je 61/94 uzoraka obrađen pojednostavljenom QuEChERS metodom, a 38/94 uzoraka je dodatno pročišćeno ekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPE). Nije utvrđena statistički značajna razlika u detekciji STC-a s obzirom na metodu pripreme uzoraka. Također nije utvrđen utjecaj dobi i spola ispitanika na prisustvo STC-a u urinu. Dobiveni rezultati pokazali su da u odabranoj zdravoj populaciji dobrovoljnih darivatelja krvi nije utvrđen rizik izloženosti mikotoksinu STC-u. Rezultati također upućuju na prikladnost opisane metode za primjenu u daljnjim istraživanjima usmjerenim na detekciju STC-a u biološkim uzorcima.

9. SUMMARY

Sterigmatocystin (STC) is a carcinogenic and genotoxic mycotoxin predominantly produced by ubiquitous molds of the genus *Aspergillus*. The mycotoxin has been detected in numerous foodstuffs as well as in indoor environments with high humidity and a history of previous flooding. Numerous mechanisms by which it exerts harmful effects on the organism have been documented. Given that it shares a biosynthetic pathway and structural similarity with the carcinogenic aflatoxin B1, there is a need for an effective, sensitive, and sufficiently simple method for its detection in biological samples. By analyzing 94 urine samples from healthy blood donor volunteers, we aimed to assess exposure to the mycotoxin STC. An optimized QuEChERS method for extraction and sample purification was employed. STC was detected in trace amounts in 18 % of samples, with 61/94 samples processed using the simplified QuEChERS method, and 38/94 samples further purified using solid-phase extraction (SPE). No statistically significant difference was found in the detection of STC with respect to the sample preparation method. Additionally, the influence of age and gender on the presence of STC in urine was not statistically significant. The obtained results indicated that there was no risk of STC exposure in the selected healthy population of blood donor volunteers. The results also indicate the suitability of the described method for application in further research aimed at detecting STC in biological samples.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

PRIMJENJIVOST MODIFICIRANE QuEChERS METODE ZA DETEKCIJU MIKOTOKSINA STERIGMATOCISTINA U URINU ZDRAVIH DARIVATELJA KRVI

Matea Pauković

SAŽETAK

Sterigmatocistin (STC) je kancerogeni i genotoksični mikotoksin kojeg u najvećoj mjeri proizvode ubikvitarne plijesni roda *Aspergillus*. Mikotoksin je detektiran u brojnim prehrambenim namirnicama, ali i u unutarnjim prostorima sa visokom stopom vlažnosti i poviješću prethodnih poplava. Zabilježeni su brojni mehanizmi kojima ispoljava štetne učinke na organizam, a s obzirom da dijeli biosintetski put i strukturnu sličnost s kancerogenim aflatoksinom B1, potrebna je učinkovita, osjetljiva i dovoljno jednostavna metoda detekcije u biološkim uzorcima. Obradom 94 uzoraka urina zdravih dobrovoljnih darivatelja krvi nastojala se procijeniti izloženost mikotoksinu STC-u. Pritom je korištena optimizirana QuEChERS metoda ekstrakcije i pročišćavanja uzorka. STC je u tragovima detektiran u 18 % uzoraka pri čemu je 61/94 uzoraka obrađen pojednostavljenom QuEChERS metodom, a 38/94 uzoraka je dodatno pročišćeno ekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPE). Nije utvrđena statistički značajna razlika u detekciji STC-a s obzirom na metodu pripreme uzoraka. Također nije utvrđen utjecaj dobi i spola ispitanika na prisustvo STC-a u urinu. Dobiveni rezultati pokazali su da u odabranoj zdravoj populaciji dobrovoljnih darivatelja krvi nije utvrđen rizik izloženosti mikotoksinu STC-u. Rezultati također upućuju na prikladnost opisane metode za primjenu u daljnjim istraživanjima usmjerenim na detekciju STC-a u biološkim uzorcima.

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

Rad sadrži: 30 stranica, 1 grafički prikaz, 4 tablice i 72 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: biološki uzorci, procjena izloženosti, sterigmatocistin, urin, QuEChERS

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 izboru* 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
Schrototova 39/1st floor, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

APPLICABILITY OF THE MODIFIED QuEChERS METHOD FOR THE DETECTION OF THE MYCOTOXIN STERIGMATOCYSTIN IN URINE OF HEALTHY BLOOD DONORS

Matea Pauković

SUMMARY

Sterigmatocystin (STC) is a carcinogenic and genotoxic mycotoxin predominantly produced by ubiquitous molds of the genus *Aspergillus*. The mycotoxin has been detected in numerous foodstuffs as well as in indoor environments with high humidity and a history of previous flooding. Numerous mechanisms by which it exerts harmful effects on the organism have been documented. Given that it shares a biosynthetic pathway and structural similarity with the carcinogenic aflatoxin B1, there is a need for an effective, sensitive, and sufficiently simple method for its detection in biological samples. By analyzing 94 urine samples from healthy blood donor volunteers, we aimed to assess exposure to the mycotoxin STC. An optimized QuEChERS method for extraction and sample purification was employed. STC was detected in trace amounts in 18 % of samples, with 61/94 samples processed using the simplified QuEChERS method, and 38/94 samples further purified using solid-phase extraction (SPE). No statistically significant difference was found in the detection of STC with respect to the sample preparation method. Additionally, the influence of age and gender on the presence of STC in urine was not statistically significant. The obtained results indicated that there was no risk of STC exposure in the selected healthy population of blood donor volunteers. The results also indicate the suitability of the described method for application in further research aimed at detecting STC in biological samples.

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

Thesis includes: 30 pages, 1 figure, 4 tables and 72 references. Original is in Croatian language.

Keywords: assessment of exposure, biological samples, sterigmatocystin, urine, QuEChERS

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.