

## ZASTOSOWANIE LC/QQQ W ANALIZIE MYKOTOKSYN GRZYBÓW TERMOOPORNYCH

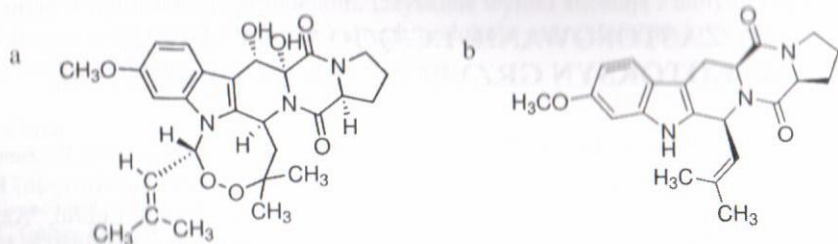
**E. FORMAL<sup>1</sup>, E. PARFIENIUK<sup>1</sup>, R. CZECZKO<sup>2</sup>, M. FRAC<sup>3</sup>,** <sup>1</sup>Pracownia Zastosowań Metod Separacji i Spektroskopii, Interdyscyplinarne Centrum Badań Naukowych, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, ul. Konstantynów 1F, 20-708 Lublin, <sup>2</sup>Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin; <sup>3</sup>Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej, Zakład Badań Systemu Gleba - Roślina, Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin.

**Abstrakt:** Grzyby odporne na pasteryzację są poważnym problemem dla przemysłu spożywczego. Mogą one zatrwać szkodliwymi mykotoksynami przetwory z truskawek i innych owoców. Dlatego skażone partie owoców należy szybko wykrywać i eliminować. Do zakażenia owoców termoopornymi grzybami może dojść między innymi poprzez kontakt owoców z glebą. Konieczne jest zatem opracowanie metod pozwalających na szybką, pewną i czułą analizę mykotoksyn grzybów termoopornych w glebie oraz w owocach i ich przetworach.

**Wprowadzenie:** Sektor owoców miękkich, a szczególnie produkcja truskawek, pełni bardzo ważną rolę w produkcji rolniczej na całym świecie. Polska należy do największych producentów tego gatunku w Europie, specjalizując się w szczególności w produkcji truskawek przeznaczonych dla przetwórstwa. Grzyby termooporne mogą powodować psucie przetwarzanych termicznie produktów, zwłaszcza owocowych. Skażenie surowców rolniczych następuje często w wyniku kontaktu z glebą, a zanieczyszczone zarodnikami surowce mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumentów poprzez wytwarzane toksyczne metabolity, do których należą specyficzne dla pleśni ciepłoopornych *Neosartorya fischeri* mykotoksyny, takie jak werukulogen i fumitremorginy [1-4].

Fumitremorginy i werukulogen należą do alkaloidów indolowych i wytwarzane są przez grzyby termooporne w różnych warunkach środowiskowych: pH, temperatury, światła, tlenu (nawet przy niskich stężeniach O<sub>2</sub>). Mogą działać na ośrodkowy układ nerwowy, powodując drżenie, drgawki i śmierć. Mykotoksyny te produkowane są przez grzyby z gatunku *N. fischeri* na różnych podłożach mikrobiologicznych, jednakże dotychczas dostępne są tylko fragmentaryczne dane dotyczące ich produkcji i występowania w próbkach środowiskowych: glebie, surowcach rolniczych czy żywności, głównie w powodu braku dostępnych, zoptymalizowanych metod ich detekcji w tych matrycach. Czułe i selektywne oznaczenia tych mykotoksyn w złożonych matrycach można prowadzić z wykorzystaniem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas [5,6].

Celem podjętych badań prezentowanych w niniejszej pracy było opracowanie metody HPLC/MS/MS oznaczania fumitremorginy C i werukulogenu (rys. 1) w truskawkach, glebie, soku z truskawek oraz pożywce.



Rys.1. Wzór strukturalny a) werukulogenu i b) fumitremorginy C.

**Część eksperymentalna:** Materiał badawczy stanowiły truskawki, gleba, sok z truskawek i ziemniaczana pożywka (PDA). Analityczne wzorce fumitremorginy C, werukulogenu i TPP oraz mrówczan amonu zakupiono w SigmaAldrich (Poznań). Zestawy Quechers produkcji Agilent Technologies zakupiono w Labstore (Warszawa), metanol o czystości LC/MS nabyto w Merck Millipore (Warszawa).

Próbki do analizy przygotowano metodą buforowanej ekstrakcji QuEChERS (metoda EN 15662). 10 g próbki odważano do próbówki, dodawano wzorec wewnętrzny TPP, 10 ml acetonitrylu i mieszaninę soli 4 g MgSO<sub>4</sub>, 1 g NaCl, 1g cytrynianu sodu, 0,5 g półtorawodzianu cytrynianu disodu. Próbki intensywnie wytrząsano, a następnie wirowano. Pobierano 1 ml supernatantu i przenoszono do próbówki z sorbentem PBS. Próbki wytrząsano i wirowano. Oczyszczony ekstrakt poddawano analizie LC/MS/MS. Krzywe kalibracyjne przygotowano dodając odpowiednie ilości roztworu fumitremorginy C i werukulogenu w metanolu do wolnych od mykotozyn próbek truskawek, gleby, soku z truskawek i pożywki. Próbki kalibracyjne poddawano następnie ekstrakcji.

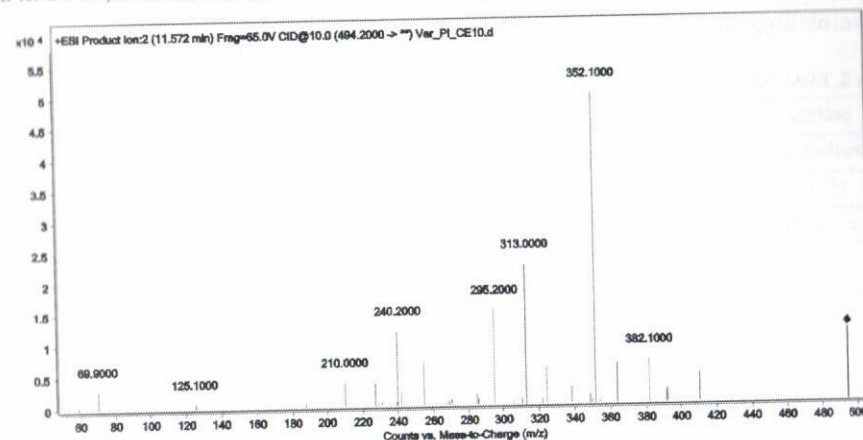
Analizy LC/MS/MS wykonano z wykorzystaniem chromatografu cieczowego Agilent Technology UHPLC seria 1290 Infinity sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas Agilent Technology 6460 Triple Quad LC/MS ze źródłem jonów Agilent Technology Jet-Stream ESI. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie Agilent Zorbax Plus C18, 2,1 x 100mm, średnica ziarna: 1,8 μm. Jako fazę ruchomą stosowano 5 mM mrówczan amonu i 0.01% kwas mrówkowy w wodzie (A) i w metanolu (B). Elucja liniowa gradientowa 6 do 98% B w 15 min, 3 min 98%B, kondycjonowanie kolumny 2 min, szybkość przepływu fazy ruchomej 0,5 ml/min. Objętość dozowanej próbki 5 μl. Parametry spektrometru masowego: źródło jonów ESI pracujące w trybie jonów dodatnich, temperatura gazu rozpylającego 325°C, przepływ gazu 5 l/min, ciśnienie nebulizera 35 psi, temperatura gazu ściskającego 300°C, przepływ gazu ściskającego 11 l/min. W tabeli 1 przedstawiono monitorowane przejścia MRM.

**Wyniki:** W pierwszym etapie opracowania metody HPLC/MS/MS stwierdzono, że protonowane jony werukulogenu [M+H]<sup>+</sup> m/z 512,6 bardzo łatwo odszczepiają cząsteczkę wody tworząc jony fragmentacyjne o m/z 494,2. Optymalizację napięcia fragmentatora przeprowadzono zatem kierując się dwoma przesłankami: uzyskania maksymalnie dużej ilości jonów [M+H]<sup>+</sup> oraz możliwie najkorzystniejszego stosunku jonów [M+H]<sup>+</sup> i [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>. Jednakże nawet przy niskiej energii fragmentatora (65V), którą wybrano jako optymalną, nadal dominującym jonem był jon [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>. W celu zapewnienia wysokiej czułości metody, kilku miligramów mykotoksyny na kilogram badanego produktu, wyma-

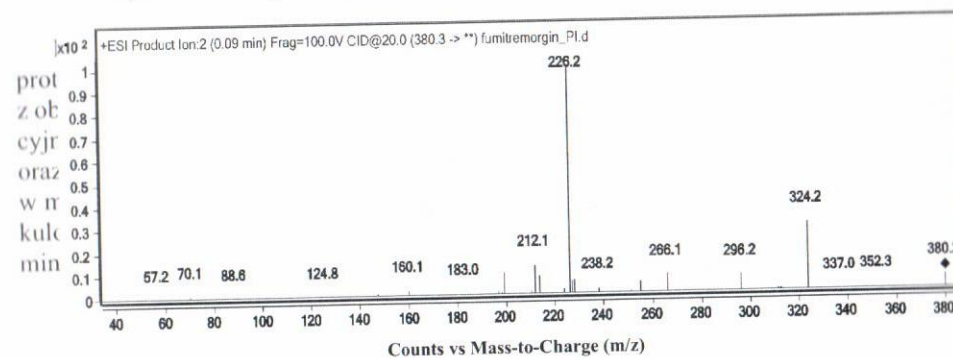
Tabela 1. Monitorowane przejścia MRM.

związek	rodzaj jonu	prekursor [m/z]	fragment [m/z]	fragmentor [V]	energia kolizji [eV]
fumitremorginy C	[M+H] <sup>+</sup>	380,0	226,2	100	20
fumitremorginy C	[M+H] <sup>+</sup>	380,0	324,2	100	10
werukulogen	[M+H] <sup>+</sup>	512,6	352,1	65	10
werukulogen	[M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	494,2	352,1	65	10
werukulogen	[M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	494,2	313,0	65	10
TPP	[M+H] <sup>+</sup>	327,1	151,9	100	40
TPP	[M+H] <sup>+</sup>	327,1	77,0	100	40

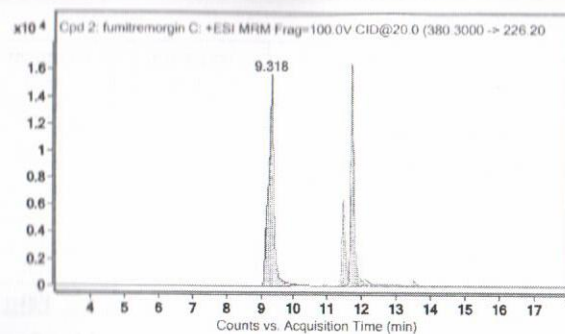
ganej w przypadku oznaczania mykotozyn postanowiono poddać fragmentacji zarówno jony protonowane werukulogenu jak i jony powstałe w wyniku ich dehydratacji. Rysunek 2 przedstawia widmo fragmentacyjne LC/MS/MS jonów [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> werukulogenu uzyskane przy energii kolizji 10 eV. W widmie tym jony fragmentacyjne m/z 352,1 i 313,0 mają najwyższą intensywność i te rozpady wybrano do rejestrowania razem z rozpadem jonu m/z 512,6 do m/z 352,1 w metodzie MRM (od ang. *multiple reaction monitoring*).



Rys.2. Widmo fragmentacyjne LC/MS/MS werukulogenu, energia fragmentacji 10 eV.



Rys.3. Widmo fragmentacyjne LC/MS/MS fumitremorginy C, energia fragmentacji 20 eV.



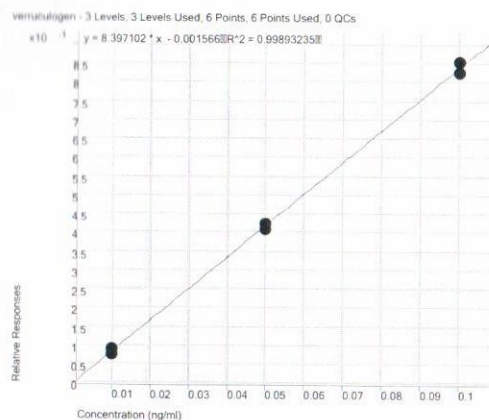
Rys.4. Chromatogram MRM fumitremorginy C (9,32 min), werukulogenu (11,49 min) i standardu wewnętrznego TPP (11,75 min).

Dla próbek truskawek, gleby i soku z truskawek dokonano oceny efektu matrycowego, któremu ulegają mykotoksyny podczas analizy LC/MS/MS. W tabeli przedstawiono efekt matrycowy, któremu ulega werukulogenu (tab. 2). Zaobserwowano wzmocnienie sygnału MS werukulogenu we wszystkich trzech badanych matrycach.

Tabela 2. Efekt matrycowy werukulogenu.

próbka	efekt matrycowy [%]
truskawka	30,41
gleba	28,92
sok z truskawek	35,28

Limit oznaczenia ilościowego metody ustalono na 0,001 mg/kg. Dla wszystkich przejść MRM we wszystkich czterech matrycach stosunek sygnału do szumów przy tym stężeniu mykotoksyn w próbce przekraczał dziesięć. Rysunek 4 przedstawia krzywą kalibracyjną werukulogenu izolowanego z pożywki.



Rys.5. Krzywa kalibracyjna dla werukulogenu w pożywce.

**Wnioski:** Opracowana metoda LC/MS/MS umożliwia oznaczanie fumitremorginy C i werukulogenu w truskawkach, glebie, soku z truskawek i pożywce. Metoda jest czuła i selektywna.

**Badania finansowane przez Narodowe Centrum Nauki (Polska), projekt Sonata4: DEC-2012/07/D/NZ9/03357.**

#### Literatura:

1. J. Mendez, J. Rubido, *Planta Med.* 36 (1979) 219.
2. M.R. Loizzo, G.A. Statti, R. Tundis et al., *Acta Pharm. Jugosl.* 40 (1990) 569.
3. K. Hostettmann, M. Hostettmann, A. Marston: *Preparative Chromatography Techniques. Applications in Natural Product Isolation.* Springer-Verlag, Berlin 1986.
4. M.K. Seikel, In "Biochemistry of Phenolic compounds" (Harborne J.B. ed.) Academic Press, London 1964, str. 34-37.
5. L.M. Kawashima, L.M.V. Soares, P.R. de Massaguer, *Braz. J. Microbil.* 33 (2002) 269.
6. E. Verga, T. Glauner, F. Berthiller, R. Krska, R. Schuhmacher, M. Sulyok, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 5087.