

Zastosowanie LC/QQQ w analizie mykotoksyn grzybów termoopornych

E. Fornal¹⁾, E. Parfieniuk¹⁾, R. Czczeko²⁾, M. Frąć³⁾

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, pełnią 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 środo-

wiskowych: pH, temperatury, światła, tlenu (nawet przy niskich stężeniach O₂). 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 z 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].

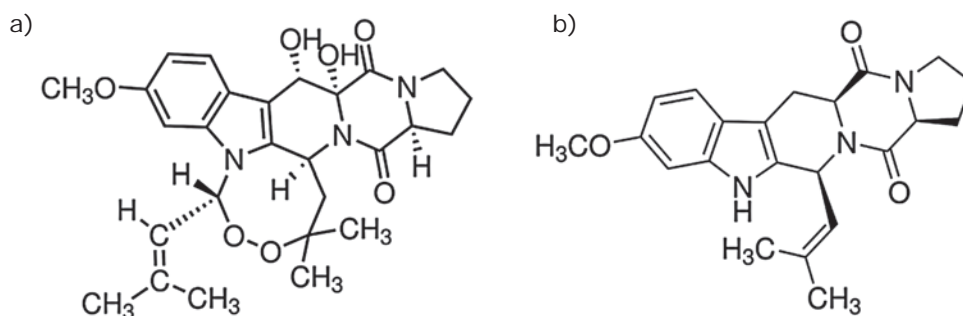
Celem podjętych badań prezentowanych w niniejszej pracy było opracowanie metody HPLC/MS/MS oznaczania fumitremorginy C i werukulogenu (rys. 1) w truskawkach, glebie, soku z truskawek oraz pożywce.

Część eksperymentalna

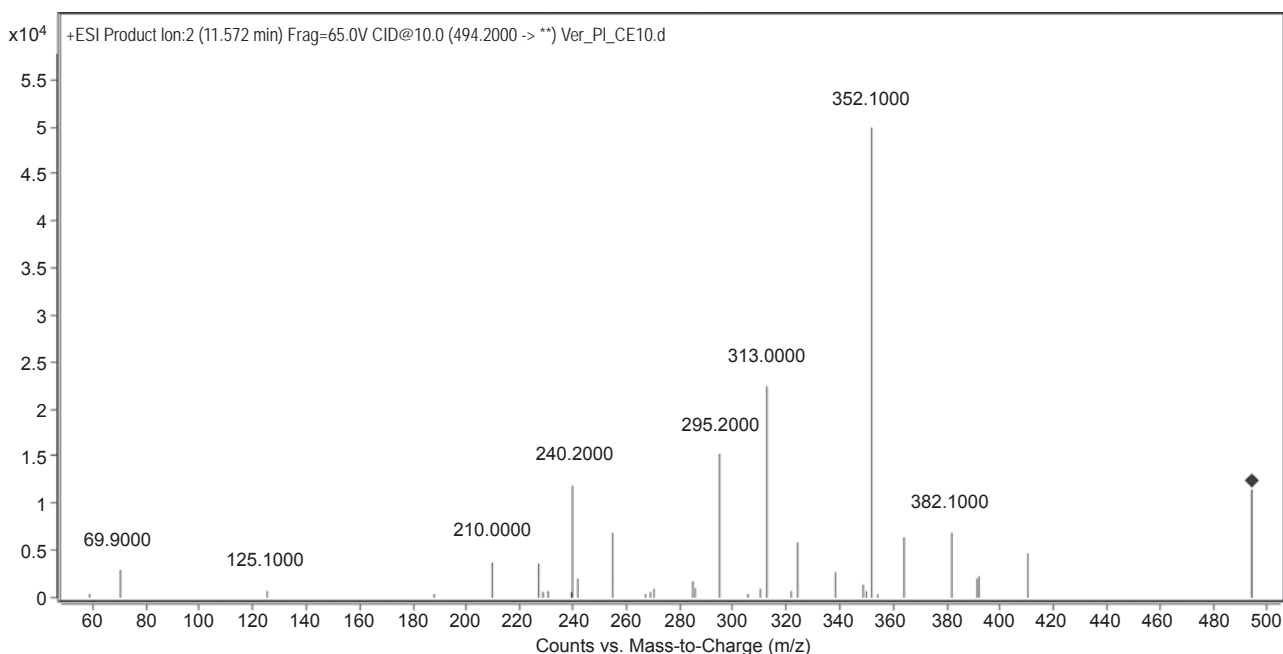
Materiał badawczy stanowiły truskawki, gleba, sok z truskawek i ziemniaczana pożywka (PDA). Analityczne wzorce fumitremorginy C, weruku-

logenu i TPP oraz mrówczan amonu zakupiono w Sigma Aldrich, zestawy Quechers w Agilent Technologies a metanol o czystości LC/MS nabyto w Merck Millipore.

Próbki do analizy przygotowano metodą buforowanej ekstrakcji QuEChERS (metoda EN 15662). 10 g próbki odważano do próbówki, dodawano wzorzec wewnętrzny TPP, 10 ml acetonitrylu i mieszaninę soli 4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1 g cytrynianu sodu, 0,5 g półtorawodzianu cytrynianu disodu. Próbki intensywnie wytrząsano, a następnie wirowano. Pobierano 1 ml supernatantu i przenoszono do próbówki



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



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

z sorbentem PBS. Próbkę 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 mykotoksyn próbek truskawek, gleby, soku z truskawek i pożywki. Próbkę kalibracyjną 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 100 mm, 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.

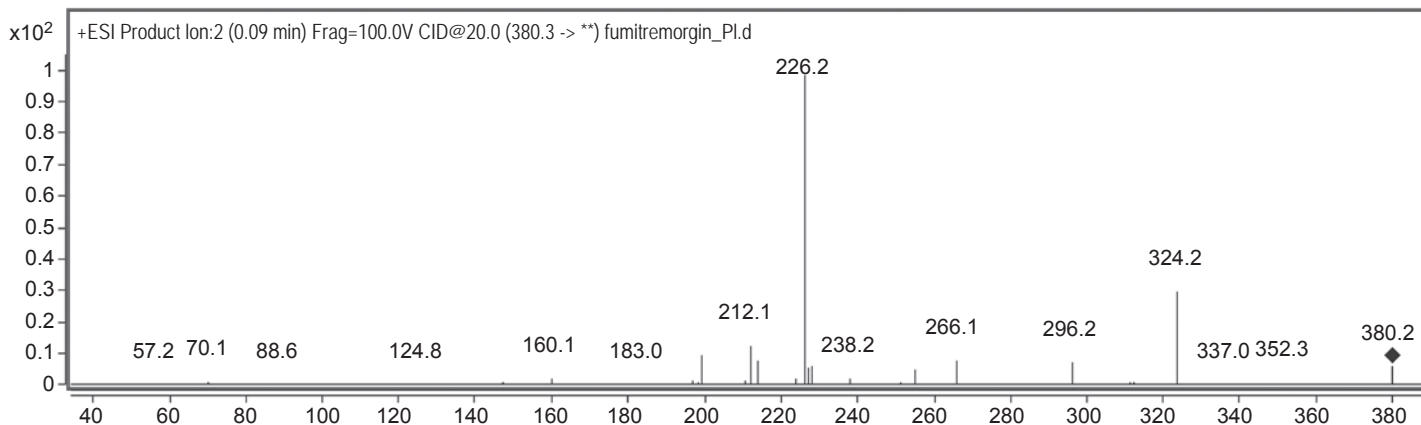
Wyniki

W pierwszym etapie opracowania metody HPLC/MS/MS stwierdzono, że protonowane jony werukulogenu $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 512,6 bardzo łatwo odszczepiają cząsteczkę wody tworząc jony fragmentacyjne o m/z 494,2. Optymalizację napięcia fragmentora przeprowadzono zatem kierując się dwoma przesłankami: uzyskania maksymalnie dużej ilości jonów $[\text{M}+\text{H}]^+$ oraz możliwie najkorzystniejszego stosunku jonów $[\text{M}+\text{H}]^+$ i $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$. Jednakże nawet przy niskiej energii frag-

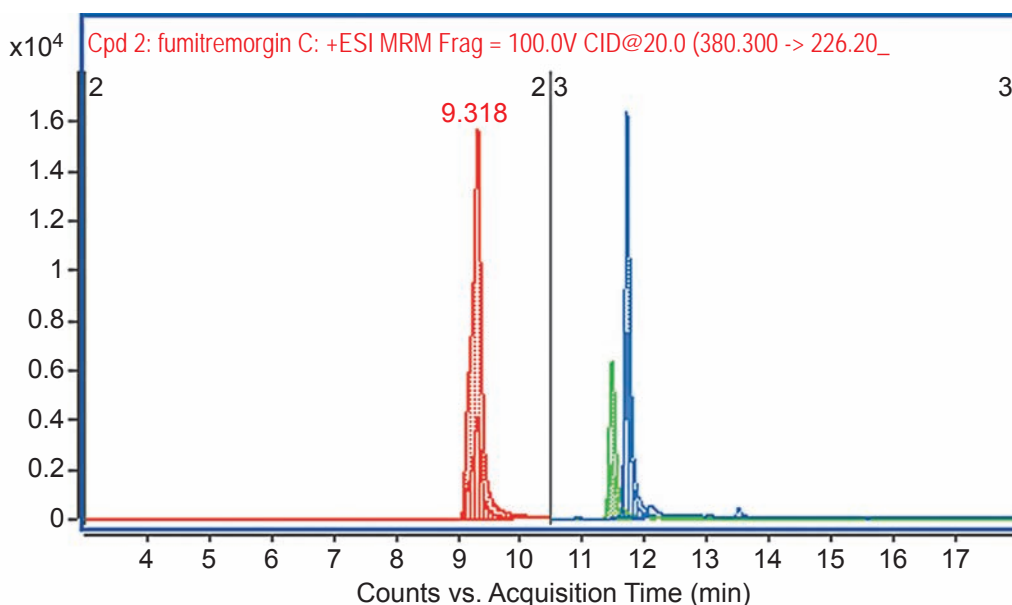
mentora (65V), którą wybrano jako optymalną, nadal dominującym jonem był jon $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$. W celu zapewnienia wysokiej czułości metody, kilku miligramów mykotoksyny na kilogram badanego produktu, wymaganej w przypadku oznaczania mykotoksyn postanowiono poddać fragmentacji zarówno jony protonowane werukulogenu jak i jony powstałe w wyniku ich dehydratacji. Rysunek 2 przedstawia widmo fragmentacyjne LC/MS/MS jonów $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ werukulogenu uzyskane przy

Tabela 1. Monitorowane przejścia MRM

związek	rodzaj jonu	prekursor [m/z]	fragment [m/z]	fragmentor [V]	energia kolizji [eV]
fumitremorgin C	$[\text{M}+\text{H}]^+$	380,0	226,2	100	20
fumitremorgin C	$[\text{M}+\text{H}]^+$	380,0	324,2	100	10
werukulogen	$[\text{M}+\text{H}]^+$	512,6	352,1	65	10
werukulogen	$[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$	494,2	352,1	65	10
werukulogen	$[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$	494,2	313,0	65	10
TPP	$[\text{M}+\text{H}]^+$	327,1	151,9	100	40
TPP	$[\text{M}+\text{H}]^+$	327,1	77,0	100	40



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)

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*).

Podczas jonizacji poprzez elektrozpylenie fumitremorgin C tworzy jony protonowane

$[M+H]^+$ m/z 380,0. Jony te w celu kolizyjnej nas skutek zderzeń z obojętnymi cząsteczkami azotu fragmentują tworząc charakterystyczne jony fragmentacyjne. Największą intensywność obserwowano dla jonów 226,2 przy energii kolizji 20 eV oraz 324,2 przy energii kolizji 10 eV (rysunek 3), rozpady te wybrano do monitorowania w metodzie MRM.

Rysunek 4 prezentuje chromatogram MRM fumitremorgi-

ny C, werukulogenu i wzorca wewnętrznego TPP, czas retencji związków odpowiednio 9,3 min, 11,5 min i 11,7 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.

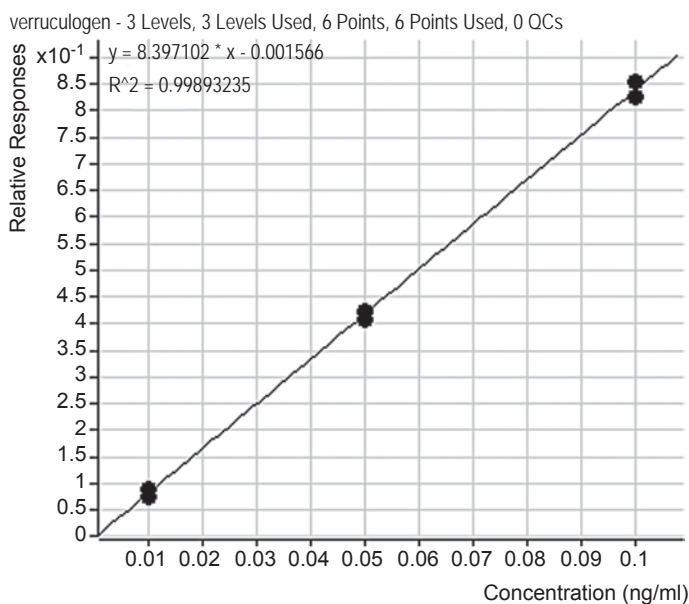
Limit oznaczenia ilościowego metody ustalono na 0,001 mg/kg. Dla wszystkich przejść MRM we wszystkich czterech matrycach stosunek sygnału do szumów przy tym stężeniu mykotoksyn w próbce przekraczał dziesięć. Rysunek 5 przedstawia krzywą kalibracyjną werukulogenu izolowanego z pożywki.

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.

Tabela 2. Efekt matrycowy werukulogenu

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



Rys. 5. Krzywa kalibracyjna dla werukulogenu w pożywce

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

Literatura

- [1] J. Mendez, J. Rubido, Planeta Med. 36 (1979), 36, 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.

Praca została przedstawiona w postaci referatu na VIII Ogólnopolskim Sympozjum „Nauka i przemysł – metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości”, 9-11 czerwca 2015, Lublin oraz w monografii „Nauka i przemysł – metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości” pod red. Z. Hubickiego, UMCS, Lublin, 2015.

¹⁾ Pracownia Zastosowań Metod Separacji i Spektroskopii, Interdyscyplinarne Centrum Badań Naukowych, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, e-mail: eforنال@kul.pl, eforنال@poczta.onet.pl;

²⁾ Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie;

³⁾ Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej, Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina, Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, Lublin.



POLON-IZOT sp. z o.o.

Mierząc oszczędzasz

Precyzyjny Miernik Grubości i Gramatury Model PI-MGG01



Laboratoryjny miernik grubości i gramatury działający zgodnie z normami PN-EN ISO 536 oraz PN-ISO 4593

Automatyczny, laserowy i fluorescencyjny cyfrowy aparat do mierzenia jednocześnie grubości i gramatury materiału z papieru i wszelkiego rodzaju tworzyw, w tym folii.

Próbka zgodnie z normami jest podczas pomiaru automatycznie obciążana, co gwarantuje wysoką precyzję i dokładność pomiaru.

- zakres pomiarowy grubości: 0... 50 mm;
- dokładność odczytu grubości: 0.001 mm;
- zakres pomiarowy gramatury: 0... 450 g/m²;
- dokładność odczytu gramatury: 0.01 g/m².

DYSTRYBUCJA:



DONSERV®

DONSERV ul. Michała Spisaka 31, 02-495 Warszawa

☎ 22 863-19-30, fax: 22 863-19-33

@ info@donserv.pl

www.donserv.pl