Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Wydział Chemii

NAUKA I PRZEMYSŁ
lubelskie spotkania studenckie

Praca zbiorowa

WYDAWNICTWO UNIWERSYTETU MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ
LUBLIN 2025

Recenzenci:
Prof. dr hab. Małgorzata Teresa Kaczmarek
Prof. dr hab. inż. Mariola Saternus
Prof. dr hab. Joanna Gościańska
Dr hab. Karolina Wieszczycka, prof. PP
Dr hab. Łukasz Klapiszewski, prof. PP
Dr hab. inż. Agata Jakóbik Kolon, prof. PŚ
Dr hab. Dariusz Błażej Wyrzykowski, prof. UG
Dr hab. Renata Siedlecka
Dr hab. Monika Kalinowska, prof. PB
Dr hab. inż. Magdalena Regel-Rosocka, prof. PP
Dr hab Ilona Sadok
Dr hab. inż. Joanna Kluczka, prof. PŚ
Dr Joanna Kończyk
Dr Agnieszka Tomczyk

Opracowanie redakcyjne i skład:
Dr hab. Agnieszka Gładysz-Płaska

Wydrukowano z materiałów powierzonych przez Autorów,
bez opracowania redakcyjnego wykonanego
przez Wydawnictwo UMCS.

© Wydawnictwo UMCS, Lublin 2025

ISBN 978-83-227-9906-2

WYDAWNICTWO UNIWERSYTETU MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ
20-031 Lublin, ul. Idziego Radziszewskiego 11
tel. 81 537 53 04
www.wydawnictwo.umcs.eu
e-mail: wydawnictwo_sekretariat@mail.umcs.pl

DZIAŁ HANDLOWY
tel./fax 81 537 53 02, 81 537 53 03
e-mail: wydawnictwo@umcs.eu
Księgarnia internetowa: www.wydawnictwo.umcs.eu

WYSOKOPIGMENTOWE OWOCE – WYMAGAJĄCA MATRYCA VS. KONKURENCYJNE PARAMETRY ANALITYCZNEJ METODY LC-MS/MS OZNACZANIA MYKOTOKSYN

A. JASTRZĘBSKI[1], A. KRZYSZCZAK-TURCZYN[1], M. GROCHOWICZ[2], I. SADOK[1], [1]Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Wydział Medyczny, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Chemii Biomedycznej i Analitycznej, ul. Konstantynów 1J, 20-708 Lublin, [2]Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych, Katedra Chemii Polimerów, ul. Gliniana 33, 20-614 Lublin

Abstrakt: Wysokopigmentowe owoce charakteryzują się dużą zawartością związków z grupy polifenoli – antocyjanów. W swoim składzie posiadają również szeroką gamę innych substancji chemicznych. Są bogate w związki prozdrowotne, pomagające utrzymać organizm człowieka w dobrym stanie ogólnym. Z drugiej strony owoce są podatne na zakażenia grzybicze i związaną z tym produkcję mykotoksyn. Są to związki toksyczne dla organizmów żywych, dlatego ich monitorowanie w żywności jest uważane za wysoce priorytetowe. Technika LC-MS/MS jest częstym wyborem przy oznaczania tego typu związków toksycznych, lecz jest ona jednocześnie podatna na występowanie efektu matrycowego, który objawia się obniżeniem (rzadziej wzmocnieniem) wydajności jonizacji analitów w obecności innych składników matrycy próbki. Dlatego etap przygotowania próbki jest kluczowy, a poszukiwanie nowych sposobów na oczyszczenie ekstraktu przed analizą LC-MS/MS jest wyzwaniem dla wielu badaczy. Celem badań wstępnych była ocena efektywności kopolimerów otrzymanych na bazie 4-winylopirydyny w kontekście oczyszczania ekstraktu otrzymanego z porzeczki czarnej przed ilościowym oznaczaniem wybranych mykotoksyn metodą LC-ESI-MS/MS. Wyniki są obiecujące i świadczą o dużym potencjale badanych materiałów polimerowych w kierunku upraszczania składu ekstraktów owoców wysokopigmentowych przed oznaczeniami mykotoksyn metodą LC-MS/MS.

Wprowadzenie: Wysokopigmentowe owoce (np. truskawki, wiśnie, czereśnie, porzeczki czarne, porzeczki czerwone, maliny, borówki) są doskonałym źródłem przeciwutleniaczy, witamin, błonnika, minerałów oraz związków z grupy polifenoli, takich jak kwasy fenolowe, stilbeny, taniny, antocyjany, flawonoidy [1]. Dlatego pełnią istotną rolę w dobrze zbilansowanej diecie. Niestety w wyniku mechanicznych uszkodzeń, czy też złych warunków zbioru, transportu, przechowywania i obróbki, owoce są narażone na psucie i związany z tym rozwój grzybów oraz pleśni, co z kolei prowadzi do zanieczyszczenia żywności mykotoksynami. Pod względem analitycznym, w szczególności w kontekście oznaczeń z wykorzystaniem metod LC-ESI-MS/MS (chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas z jonizacją poprzez elektrorozpylanie), stanowią trudną, skomplikowaną i wymagającą matrycę. Mykotoksyny to metabolity wtórne produkowane przez grzyby strzępkowe (Tab. 1). Omawiane związki występują naturalnie w środowisku. Skutkami spożycia żywności zanieczyszczonej mykotoksynami mogą być zarówno ostre, jak i przewlekłe schorzenia i choroby, takie jak: nowotwory, uszkodzenia wątroby, spadek odporności [2], dlatego spożycie żywności zanieczyszczonej tą grupą związków niesie ze

sobą duże ryzyko dla zdrowia człowieka i zwierząt. Ponadto, zakażenie zbóż mykotoksynami powoduje również duże straty ekonomiczne [2].

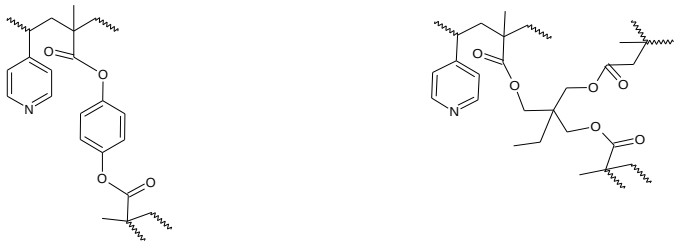
Tabela 1. Wybrane mykotoksyny i organizmy je produkujące [3].

Mykotoksyna	Aflatoksyny	Ochratoksyny	Patulina	Zearalenon
Rodzaj/gatunek grzyba odpowiedzialnego za produkcję mykotoksyny	*Aspergillus flavus* *A. parasiticus* *A. nomius* *Penicillium*	*Aspergillus* *Penicillium* *A. ochraceus* *P. nordicum* *P. verrucosum*	*Aspergillus terreus* *A. clavatus* *Penicillium* *Penicillium carneum* *P. clavigerum* *P. griseofulvum*	*Fusarium* *F. graminearum* *F. culmorum*

Aktualnym wyzwaniem analitycznym jest oznaczanie mykotoksyn na coraz niższym poziomie stężeń oraz opracowywanie narzędzi analitycznych dostarczających rzetelnych wyników, dlatego poprawa parametrów analitycznych istniejących metod jest wysoce pożądana. Szczególnie restrykcyjne wymagania dotyczą żywności dla dzieci i niemowląt, których podstawą diety są produkty otrzymane z owoców. Z drugiej strony, LC-ESI-MS/MS jest obecnie złotym standardem biorąc pod uwagę oznaczanie zarówno prozdrowotnych, jak również toksycznych związków. Etap przygotowania próbki jest niezwykle istotny i obligatoryjny, szczególnie przed oznaczeniami analitów w bogatych i skomplikowanych matrycach. Jego głównym celem jest wyizolowanie oznaczanego związku i uproszczenie składu próbki, aby pozbyć się związków, które mogą zaburzać pomiar analityczny. Jednakże często stosując różne techniki ekstrakcji, oprócz analitu ekstrahują się również związki interferujące, które mogą powodować problemy analityczne podczas oznaczeń LC-ESI-MS/MS, takie jak zanieczyszczenie elementów aparatu, pogorszenie czułości metody oraz efekt matrycowy (ang. matrix effect, ME) [4,5]. który objawia się wzmocnieniem lub osłabieniem efektywności jonizacji analitów (głównie w źródłach jonów typu electrospray ESI) w próbkach rzeczywistych w porównaniu do roztworów wzorcowych. Źródłem ME mogą być składniki matrycy próbki, protokół przygotowania próbki, jakość rozdziału chromatograficznego, dodatki do faz ruchomych, jak również typ jonizacji. Jonizacja przez elektrorozpylanie jest bardziej podatna na wpływ ME w porównaniu do źródeł jonizacji charakteryzujących się gorszą czułością, np. jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym (ang. atmospheric pressure chemical ionisation, APCI), czy fotojonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym [6,7]. Ponadto, ME może być zmienny i trudny do prognozowania [5,6]. Optymalizacja etapu przygotowania próbki często jest obligatoryjna, aby zmniejszyć ME i otrzymać dobre wartości odzysków, dokładności, precyzji i czułości metody. Dlatego celowym jest poszukiwanie nowych sposobów na uproszczenie matrycy próbki na tym etapie do analizy LC-ESI-MS/MS.

Część eksperymentalna: Celem badań była ocena efektywności mikrosfer 4-winylopirydyny usieciowanych 1,4-dimetakrylanem hydrochinonu (kopolimer 1) oraz trimetakrylanem trimetylolopropanu (kopolimer 2) (Rys. 1) w kontekście oczyszczania ekstraktu otrzymanego z porzeczki czarnej przed ilościowym oznaczaniem wybranych mykotoksyn (ochratoksyny A (OTA), gliotoksyny (GLIO), zearalenonu (ZEA), sterygmatocystyny (STER)).

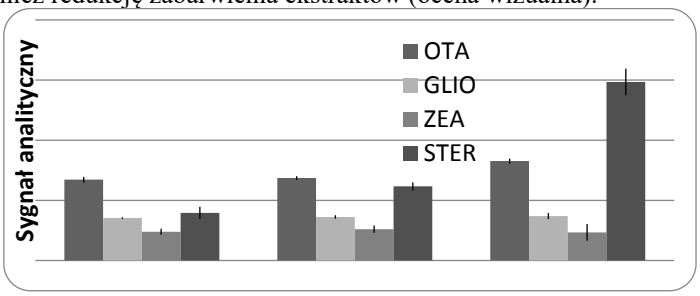
Kopolimer 1 Kopolimer 2



Rys. 1. Wzory strukturalne kopolimeru 1 oraz 2.

Kopolimery otrzymano zgodnie z opublikowanym protokołem i scharakteryzowano fizykochemicznie [8,9]. Zastosowanie monomerów (1,4-dimetakrylan hydrochinonu oraz trimetakrylan trimetylolopropanu) pozwoliło na uzyskanie wysokiego stopnia usieciowania i stabilnej porowatej struktury, jak również na wzbogacenie funkcjonalizacji materiału sorpcyjnego [9]. Zhomogenizowaną pulpę owocową (10 g) wytrząsano z acetonitrylem (10 mL, przez 2 min), a następnie z solą QuEChERS (Agilent Technologies, p.n. 5982-6650) (1 min). Po odwirowaniu, 1 mL otrzymanego ekstraktu oczyszczano za pomocą badanych sorbentów (kopolimer 1 i kopolimer 2) (wytrząsanie 2 min). Po odwirowaniu, ekstrakt odparowano i rozpuszczono w roztworze H_2O:0,2M NH_4HCO_3:CH_3OH (30:5:65, v/v/v). Przygotowane próbki analizowano metodą LC-ESI-MS/MS w trybie polaryzacji dodatniej oraz wykorzystując metodę dMRM (z ang. dynamic multiple reaction monitoring). Rozdział przeprowadzono z wykorzystaniem kolumny chromatograficznej Zorbax Ecplise Plus C18 (2,1 × 100 mm, 1,8 µm) i fazy ruchomej składającej się z H_2O:0,2M NH_4HCO_3 (95:5, v/v) (rozpuszczalnik A) i CH_3OH:0,2M NH_4HCO_3 (95:5, v/v) (rozpuszczalnik B). Kontrola oznacza wynik otrzymany dla ekstraktu pozbawionego etapu dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej (ang. dispersive solid phase extraction, dSPE), czyli etapu wytrząsania z badanymi kopolimerami.

Wyniki: Powierzchnia sygnałów analitycznych pochodzących od OTA, GLIO i ZEA w ekstraktach oczyszczanych badanymi polimerami nieznacznie wzrosła lub pozostała niezmieniona w porównaniu do kontroli (ekstrakt bez etapu dSPE) (Rys. 2). Podczas gdy sygnał analityczny pochodzący od STER wzrósł znacznie w ekstraktach wytrząsanych z kopolimerem 1 lub kopolimerem 2 (Rys. 2). Zastosowanie badanych materiałów spowodowało również redukcję zabarwienia ekstraktów (ocena wizualna).



Rys. 2. Zmiany sygnałów analitycznych wybranych mykotoksyn w ekstraktach przed i po traktowaniu kopolimerami 1 oraz 2.

Wnioski: Kopolimer 1 oraz kopolimer 2 zostały wytypowane do badań ze względu na potwierdzoną wysoką efektywność w adsorpcji związków w grupy polifenoli, w szczególności flawonoidów i antocyjanów [9]. Dodatkowo, wykazano, że kopolimery wykazują większą efektywność adsorpcji flawonoidów w porównaniu do standardowo stosowanych materiałów sorpcyjnych, takich jak: PSA (ang. primary secondary amine) czy GCB (ang. graphitized carbon black) [9]. W niniejszym komunikacie zademonstrowano, że badane materiały polimerowe wykazują potencjał jako adsorbenty do doczyszczania próbek owoców przed oznaczeniami mykotoksyn metodą LC-ESI-MS/MS. Uzyskane wyniki badań wstępnych sugerują ograniczoną adsorpcję wybranych mykotoksyn na badanych sorbentach, przy jednoczesnej redukcji zabarwienia ekstraktu. Dalsze prace będą koncentrować się na ocenie parametrów analitycznych metody (w tym efektu matrycowego) wykorzystującej badane kopolimery. Badane materiały mogą znaleźć zastosowanie na etapie dSPE przygotowania ekstraktów owoców wysokopigmentowych do oznaczeń wielu mykotoksyn metodą LC-ESI-MS/MS.

Podziękowanie: Praca powstała dzięki wsparciu Narodowego Centrum Nauki, Polska w ramach projektu Miniatura-8 nr 2024/08/X/ST4/00739.

Literatura:

1. Y. Yang, G. Li, D. Wu, J. Liu, X. Li, P. Luo, N. Hu, H. Wang, Y. Wu, Trends Food Sci. Technol. 96 (2020) 233.
2. H.S. Hussein, J.M. Brasel, Toxicology. 167 (2001) 101.
3. R. A. El-Sayed, A. B. Jebur, W. Kang, F. M. El-Demerdash, Journal of Future Foods 2, 2 (2022), 91.
4. Y. Yang, G. Li, D. Wu, J. Liu, X. Li, P. Luo, N. Hu, H. Wang, Y. Wu, Trends Food Sci. Technol. 96 (2020) 233.
5. E. Chambers, D. M. Wagrowski-Diehl, Z. Lu, J. R. Mazzeo, J. Chromatogr. B. 852 (2007) 22.
6. D. Patel, IJPBS. 2, 1 (2011) 559.
7. W. Zhou, S. Yang, P.G. Wang, Bioanalysis. 9 (2017) 1839.
8. M. Grochowicz, Ł. Szajnecki, B. Gawdzik, Adsorpt. Sci. Technol. 33 (2015) 609.
9. A. Krzyszczak-Turczyn, M. Grochowicz, I. Jonik, I Sadok, Food Chem. 463 (2025) 141312.