

# SELEKTIVNA EKSTRAKCIJA MIKOTOKSINA ZEARALENONA NA ČVRSTOJ FAZI

---

**Kudelić, Klara**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Polytechnic in  
Pozega / Veleučilište u Požegi**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:112:398509>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-23**



**VELEUČILIŠTE U POŽEGI**  
STUDIA SUPERIORA POSEGANA

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Polytechnic in Pozega - Polytechnic in  
Pozega Graduate Thesis Repository](#)



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

# VELEUČILIŠTE U POŽEGI



**Klara Kudelić, 1318/13**

## **SELEKTIVNA EKSTRAKCIJA MIKOTOKSINA ZEARALENONA NA ČVRSTOJ FAZI**

***ZAVRŠNI RAD***

Požega, 2017. godine

VELEUČILIŠTE U POŽEGI  
POLJOPRIVREDNI ODJEL  
PREDDIPLOMSKI STRUČNI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

**SELEKTIVNA EKSTRAKCIJA MIKOTOKSINA  
ZEARALENONA NA ČVRSTOJ FAZI**

***ZAVRŠNI RAD***

IZ KOLEGIJA BIOKEMIJA

MENTOR: doc. dr. sc. Krunoslav Miroslavljević

STUDENT: Klara Kudelić

Matični broj studenta: 1318/13

Požega, 2017. godine

*Ovaj rad izrađen je na institutu „École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles“ (ESPCI ParisTech) u laboratoriju „Laboratoire de Sciences Analytiques, Bioanalytiques et Miniaturisation“ (LSABM) u Parizu, Francuska.*

*Prvenstveno se zahvaljujem voditeljici laboratorija LSABM Valérie Pichon što je prihvatila moj zahtjev za odrađivanje stručne prakse te na stručnoj pomoći i vodstvu tijekom izrade ovog rada.*

*Također se zahvaljujem Audrey Combès na stručnoj pomoći oko eksperimentalne izvedbe rada.*

*Zahvaljujem se članovima laboratorija koji su tehničkom pomoći i savjetima pridonijeli izradi ovog rada, a to su Mélanie Cohen, Saida El-Abdelloui, Julia Ríos Gómez i Porkodi Kahirvel.*

*Na kraju se zahvaljujem svim profesorima, tehničarima i studentima s kojima sam dijelila radno mjesto što su mi dopustili da budem dio njihove profesionalne i produktivne radne sredine.*

Sažetak:

Zadatak ovog rada je sinteza čvrste faze za selektivnu ekstrakciju zearalenona te optimizacija procesa ekstrakcije. Zearalenon je mikotoksin koji se često nalazi u hrani. Selektivna ekstrakcija zearalenona primjenjuje se kao metoda pročišćavanja uzorka prije kvalitativne i kvantitativne analize. Za sintezu selektivne čvrste faze koriste se aptameri naziva 5Z28 i 8Z31 visokog afiniteta prema zearalenonu. U procesu optimizacije ispitano je koji parametri ekstrakcije i na koji način utječu na selektivnost čvrste faze. Optimizacijom procesa ekstrakcije utvrđeno je da temperatura i pH vrijednost uzorka imaju veliki utjecaj na zadržavanje zearalenona na čvrstoj fazi. Isto tako, uočena je razlika u afinitetu prema zearalenonu između aptamera. Analiza svih uzoraka pripremljenih u ovom ispitivanju provedena je pomoću LC-UV sustava.

Ključne riječi: zearalenon, ekstrakcija na čvrstoj fazi, aptameri, LC-UV

Abstract:

The aim of this work is synthesis of a solid phase for selective extraction of zearalenone and optimization of extraction procedure. Zearalenone is a mycotoxin often found in food. Selective extraction of zearalenone is used as clean-up method prior to qualitative and quantitative analysis. For synthesis of selective solid phase, aptamers named 5Z28 and 8Z31 with high affinity towards zearalenone were used. In optimization process, parameters of extraction were tested in order to determine their influence on selectivity of a solid phase. Optimization process revealed that temperature and pH have big influence on retention of zearalenone on solid phase. Moreover, the difference in affinity towards zearalenone between two aptamers has been observed. All samples prepared in this assay have been analyzed by LC-UV system.

Key words: zearalenone, solid phase extraction, aptamers, LC-UV

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD.....  | 1  |
| 2. PREGLED LITERATURE.....  | 2  |
| 2.1. Mikotoksini .....  | 2  |
| 2.2. Zearalenon.....  | 2  |
| 2.2.1. Toksičnost .....   | 3  |
| 2.2.2. Metode analize .....   | 3  |
| 2.3. Ekstrakcija.....   | 4  |
| 2.3.1. Ekstrakcija na čvrstoj fazi .....                                | 4  |
| 2.4. Imobilizacija aptamera na čvrstoj fazi .....                       | 5  |
| 2.5. Kromatografija .....   | 7  |
| 2.5.1. Tekućinska kromatografija s UV detektorom .....                  | 7  |
| 3. MATERIJALI I METODE.....   | 8  |
| 3.1. Kemikalije.....  | 8  |
| 3.2. Aparatura i analitički uvjeti analize .....                        | 8  |
| 3.2.1. Granica detekcije i kvantifikacije.....                          | 9  |
| 3.3. Kalibracijske krivulje .....                                       | 9  |
| 3.3.1. Kalibracijska krivulja za ZEA.....                               | 10 |
| 3.3.2. Kalibracijska krivulja za aptamer 5Z28 .....                     | 11 |
| 3.3.3. Kalibracijska krivulja za aptamer 8Z31 .....                     | 12 |
| 3.4. Postupak imobilizacije aptamera.....                               | 13 |
| 3.5. Postupak ekstrakcije zearalenona.....                              | 14 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA.....  | 15 |
| 4.1. Iskorištenje imobilizacije aptamera – kapacitet oligosorbensa..... | 15 |
| 4.2. Utjecaj temperature .....  | 16 |
| 4.3. Utjecaj pH vrijednosti .....                                       | 17 |
| 4.4. Utjecaj sastava otopine.....                                       | 17 |

|   |    |
|---|----|
| 4.5. Utjecaj perkolacijskog volumena.....             | 18 |
| 4.6. Utjecaj postupnog povećanja pH vrijednosti ..... | 19 |
| 5. ZAKLJUČAK.....                                     | 21 |
| 6. LITERATURA.....                                    | 22 |

## 1. UVOD

Zearalenon je česti kontaminant hrane na bazi žitarica. Proizvode ga plijesni roda *Fusarium* za vrijeme vegetacijskog perioda, ali i u lošim uvjetima skladištenja. Njegovo toksično djelovanje utječe na reproduktivne organe životinja. Kao i drugi mikotoksini, u hrani se nalazi u tragovima stoga je za njegovu detekciju neophodna primjena vrlo preciznih i selektivnih metoda analize. Kromatografske metode, kao što su tekućinska i plinska kromatografija, pokazale su se uspješnima u određivanju zearalenona iz uzoraka hrane. Međutim, prisutnost raznih spojeva u pravom uzorku može utjecati na točnost analiza, zbog toga se prije kromatografske analize uzorak mora na neki način pročistiti. Postoje razne metode kojima se zearalenon može izolirati iz uzorka. Jedna od tih metoda je ekstrakcija na čvrstoj fazi. Primjenom selektivnih sorbensa se uzorak prije analize pročišćava, ali i koncentrira, što omogućuje lakšu kvantifikaciju analita. Selektivnost čvrstih faza može se povećati njihovom modifikacijom. Poznata je primjena imobiliziranih antitijela na čvrstoj fazi za selektivnu ekstrakciju različitih molekula, no glavni nedostatak ove metode je visoka cijena. Alternativno rješenje tog problema su aptameri. To su kratke jednolančane DNA ili RNA molekule koje imaju sposobnost selektivnog vezanja molekula zahvaljujući svojoj kompleksnoj trodimenzionalnoj strukturi. Njihovom imobilizacijom na čvrstu fazu dobiva se vrlo selektivni oligosorbens. Uočeno je da parametri poput temperature, pH, prisutnost iona i volumen uzorka uvelike utječu na sposobnost aptamera da selektivno veže analit.

Cilj ovog rada je optimizacija procesa ekstrakcije na čvrstoj fazi s imobiliziranim aptamerima. Istraživanje se odnosi na utjecaj parametara ekstrakcije na mogućnost vezanja zearalenona na čvrstu fazu. Ispitivani su utjecaj temperature, pH, sadržaj soli i volumen uzorka. Svi uzorci pripremljeni tijekom ovog ispitivanja su analizirani LC-UV sustavom.



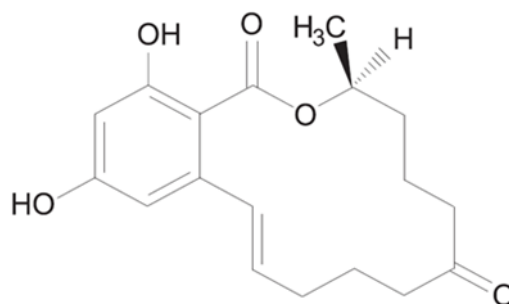
## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Mikotoksini

Riječ mikotoksin potječe od grčke riječi *mykes*, što znači gljiva i latinske riječi *toxicum*, što znači otrov. Mikotoksini su vrlo česti kontaminanti hrane. Najčešće ih nalazimo u žitaricama i proizvodima od žitarica. Proizvode ih plijesni kao sekundarne metabolite. Kontaminacija mikotoksinima najčešće se javlja tijekom vegetacijskog perioda u vlažnim i toplim uvjetima, iako se kontaminacija može javiti i u lošim uvjetima transporta i skladištenja žitarica. Do sada je izolirano više od 300 različitih mikotoksina, a istraživanja se uglavnom bave onim mikotoksinima koji predstavljaju najveći rizik za zdravlje ljudi i životinja. Neki od tih mikotoksina su aflatoksini (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>), okratoksin A (OTA), deoksinivalenol (DON), zearalenon (ZEA), fumonizini (FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>), patulin, toksin T-2, toksin HT-2. Bolesti izazvane djelovanjem mikotoksina nazivaju se mikotoksikoze, a simptomi ovise o vrsti i količini mikotoksina, duljini izloženosti i osjetljivosti organizma (Mašek, 2006). Tijekom dugoročne izloženosti moguća su kancerogena, genotoksična, nefrotoksična, imunotoksična, neurotoksična, hepatotoksična djelovanja (Perši et al., 2011).

### 2.2. Zearalenon

Zearalenon je mikotoksin kojeg proizvode plijesni roda *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*). Kemijska formula mu je C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub> (Slika 1), a sustavni kemijski naziv 3,4,5,6,9,10-heksahidro-14,16-dihidroksi-3-metil-1H-2-benzoksaciklotetradecin-1,7(8H)-dion. Molekulska masa zearalenona iznosi 318,36 g/mol. Zearalenon je termički stabilan spoj pa ga je teško ukloniti kuhanjem, njegova degradacija je uočena tek na temperaturama većim od 150 °C (EFSA, 2011; Samardžija et al., 2017). Nije topiv u vodi, a stabilan je u različitim organskim otapalima, kao što su acetonitril, metanol, kloroform i aceton.



Slika 1. Strukturna formula zearalenona (Delaš, 2010)

Iako se zearalenon najčešće nalazi u kukuruzu, može ga se naći i u drugim žitaricama kao što su pšenica, ječam, zob, riža, soja, proizvodi od žitarica, orašasti plodovi, sušeno voće, pa čak biljna ulja (EFSA, 2011). Poseban razlog za zabrinutost predstavlja prisutnost zearalenona u velikom broju uzoraka dječje hrane na području EU (Delaš, 2010). Prema IARC-u (eng. *International Agency for Research on Cancer*) zearalenon pripada skupini 3, odnosno ne klasificira se kao kancerogena tvar.

Prema Uredbi Europske komisije (EC 1881/2006), najveća dopuštena količina zearalenona u neprerađenim žitaricama, osim kukuruza, iznosi 100 µg/kg, dok je u neprerađenom kukuruzu najveća dopuštena količina 350 µg/kg. EFSA je 2011. godine utvrdila prihvatljiv dnevni unos zearalenona, TDI (eng. *tolerable daily intake*) od 0,25 µg/kg tjelesne mase.

### **2.2.1. Toksičnost**

Mehanizam djelovanja zearalenona temelji se na strukturnoj sličnosti estrogenu. Zearalenon se veže za receptore estrogena te na taj način izaziva mnoge biokemijske i biološke učinke. Kronična trovanja ili jača akutna trovanja ostavljaju trajne posljedice na reproduktivnim organima. Kod životinja biološka aktivnost zearalenona onemogućuje implementaciju oplodnog jajašca i izaziva neplodnost, a kod ljudi se učinak zearalenona očituje preuranjenim pubertetom. Osim estrogenog učinka, inhibira stvaranje folikularno stimulirajućeg hormona (FSH) što sprječava ovulaciju (Perši et al., 2011; Pleadin et al., 2015).

### **2.2.2. Metode analize**

Prije analiziranja uzoraka na prisutnost zearalenona potrebno je osigurati pravilno uzorkovanje hrane. Postupci pravilnog uzorkovanja provode se prema uredbi Europske komisije (EC 401/2006) prema kojoj su točno utvrđene metode uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razine mikotoksina u hrani.

Iz homogeniziranih uzoraka hrane potrebno je selektivno ekstrahirati zearalenon. Najčešće se ekstrakcija odvija pomoću acetonitrila ili metanola pomiješanim s vodom ili puferom. S obzirom na to da se zearalenon ekstrahira iz vrlo složenog uzorka, potrebno je primijeniti jedan od načina pročišćavanja uzorka kako bi se smanjio matriks efekt, odnosno interferencija ostalih molekula iz uzorka sa analitom tijekom analize. To se najčešće postiže ekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPE; eng. *solid phase extraction*), primjenom imunoafinitetnih kolona ili ekstrakcijom tekuće-tekuće.

Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu zearalenona najčešće se primjenjuje tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC; eng. *high performance liquid chromatography*) u kombinaciji s masenim spektrometrom (MS) kao vrlo pouzdana analitička metoda. Međutim, u literaturi su navedene i druge kromatografske metode analize u kombinaciji s različitim detektorima. Ostale kromatografske metode uključuju plinsku kromatografiju (GC; eng. *gas chromatography*) i tankoslojnu kromatografiju (TLC; eng. *thin layer chromatography*), a kao detektori se koriste spektrofotometrijski, spektrofluorometrijski i detektori koji mjere indeks refrakcije (EFSA, 2011; Pleadin et al., 2015).

Od ostalih nekromatografskih metoda za određivanje zearalenona koristi se komercijalno dostupna imunološka metoda ELISA (eng. *enzyme linked immunosorbent assay*). Iako je ova metoda brza i jednostavna i omogućuje analizu velikog broja uzoraka, neki od nedostataka ove metode su nedovoljna specifičnost te mogućnost *cross*-reakcija sa sličnim spojevima. Zbog toga se ELISA koristi kao orijentacijska metoda (Perši et al., 2011).

### **2.3. Ekstrakcija**

Ekstrakcija je postupak odjeljivanja sastojaka iz smjese. Princip ekstrakcije temelji se na razlici u topljivosti neke tvari u različitim otapalima koja se ne miješaju i ne reagiraju jedno s drugim (Turčinović, 2007). Za ekstrakciju se najčešće koriste organska otapala. Jedan od načina odjeljivanja sastojaka iz smjese je klasična tekuće-tekuće ekstrakcija koja se provodi u lijevku za odjeljivanje. Prednost ove metode je jednostavno izvođenje, a glavni nedostatak je uporaba velike količine otapala što poskupljuje proces te šteti okolišu i zdravlju.

#### **2.3.1. Ekstrakcija na čvrstoj fazi**

Da bi se smanjila potrošnja otapala te povećala selektivnost, razvijene su metode ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE). Ova vrsta ekstrakcije provodi se u SPE kolonama (Slika 2). Perkolacijom uzorka kroz SPE kolonu čvrsta faza adsorbira analit koji se kasnije desorbira eluiranjem pogodnim otapalom. Na taj način uzorak se pročišćava i koncentrira što omogućuje lakšu analizu uzorka, pogotovo kada se radi o spojevima koji se u uzorku nalaze u tragovima. Materijali koji se koriste za punjenje SPE kolona mogu biti razni modificirani silika gelovi te mnoge vrste polimera. Odabir čvrste faze ovisi o svojstvima analita kojeg se želi izolirati iz uzorka. Neki od načina djelovanja čvrste faze su reverzna faza, normalna faza, ionska izmjena i imunoafinitet. U svrhu povećanja selektivnosti ekstrakcije primjenjuje se kombinacija nekoliko načina djelovanja čvrste faze (Walker & Mills, 2002).



Slika 2. SPE kolone (www.starlabsci.com)

Jedan od načina selektivne ekstrakcije analita na čvrstoj fazi je primjena molekularno utisnutih polimera (MIP; eng. *molecularly imprinted polymers*). Karakteristike MIP-a su šupljine koje veličinom, oblikom i položajem odgovaraju analitu. Njihova sinteza je relativno brza i jednostavna, no zahtjeva velike količine specifičnog analita te ovisno o cijeni analita može biti vrlo skupa.

Imobilizacija molekula koje selektivno vežu analit ili strukturnu grupu analita može dodatno povećati selektivnost čvrste faze. Primjer takvih molekula su antitijela i aptameri. Imobilizacija antitijela na čvrstu fazu tvori vrlo selektivni sorbens za ekstrakciju specifičnih analita zbog velikog afiniteta antitijela prema analitu. Ovakvi imunoafinitetni sorbensi su komercijalno dostupni, no relativno skupi. Njihova proizvodnja, odnosno sinteza antitijela je dugotrajna i zahtjeva upotrebu životinja (Pichon et al., 2015).

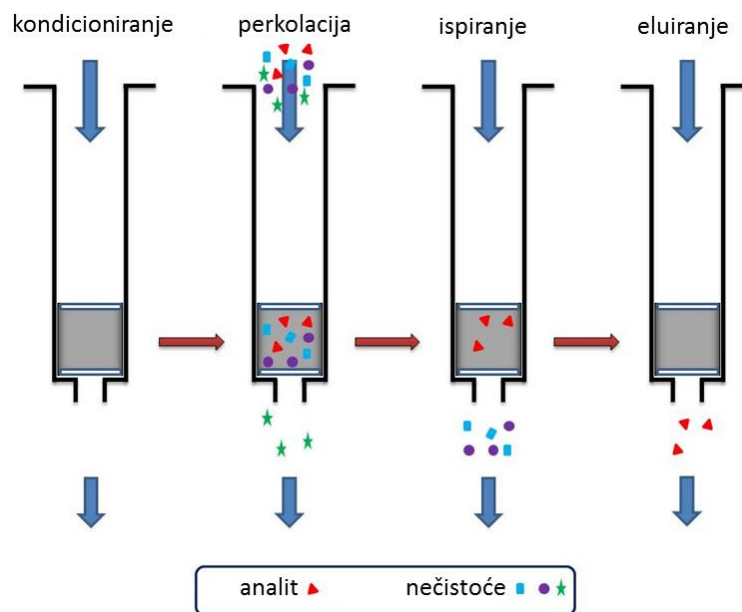
#### **2.4. Imobilizacija aptamera na čvrstoj fazi**

Aptameri su jednolančane DNA ili RNA molekule sastavljene od nekoliko desetaka nukleotida. Imaju sposobnost selektivnog vezanja analita zahvaljujući svojoj specifičnoj trodimenzionalnoj strukturi. Do sada su identificirani aptameri specifični za ione metala, male organske molekule, molekule proteina i stanice (Madru et al., 2009). Princip djelovanja aptamera isti je kao i kod antitijela. Prednost aptamera u odnosu na antitijela je njihova moć regeneracije (postiže se za nekoliko minuta) i način sinteze koji ne zahtjeva upotrebu životinja. Sinteza, selekcija i karakterizacija aptamera se provodi *in vitro* procesom koji se naziva SELEX (eng. *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*).

Sorbens koji se koristi kao čvrsta faza za imobilizaciju aptamera mora posjedovati određena svojstva kao što su kemijska i biokemijska inertnost, dobra mehanička stabilnost i ravnomjernost. Sorbens mora biti aktiviran kako bi se omogućilo vezanje aptamera za

njegovu površinu i mora biti hidrofilan kako bi se spriječile nespecifične reakcije. Pore unutar sorbensa moraju biti velike zbog veličine aptamera. Proces imobilizacije ne smije negativno utjecati na specifično djelovanje aptamera. Da bi se povećalo iskorištenje imobilizacije, aptameri mogu biti modificirani molekulama koje služe kao vezivna molekula između površine sorbensa i aptamera. Aptameri se na površinu sorbensa mogu imobilizirati kovalentnim i nekovalentnim vezama. Sintetizirani oligosorbens (čvrsta faza + aptamer) se stavlja u SPE kolonu između dvije frite (Pichon et al., 2015; Chapuis-Hugon et al., 2011).

Ekstrakcija analita pomoću oligosorbensa provodi se u nekoliko koraka (Slika 3). Najprije je potrebno kondicionirati oligosorbens vezivnim puferom (BB, eng. *binding buffer*). Temperatura, pH i sadržaj iona u puferu utječu na trodimenzionalnu strukturu aptamera koja omogućuje vezanje analita za vrijeme perkolacije uzorka. Poželjno je da uzorak bude otopljen u otopini sastava sličnog BB. Nakon perkolacije, ispiranjem se uklanjaju nečistoće dok analit ostaje vezan za oligosorbens. Na kraju, eluiranjem sa odgovarajućim otapalom aptamer se denaturira i otpušta analit. Prije ponovne upotrebe oligosorbensa, potrebno ga je kondicionirati kako bi se aptamer ponovno renaturirao. Kada se ne koristi, oligosorbens se čuva u otopini BB na 4 °C.



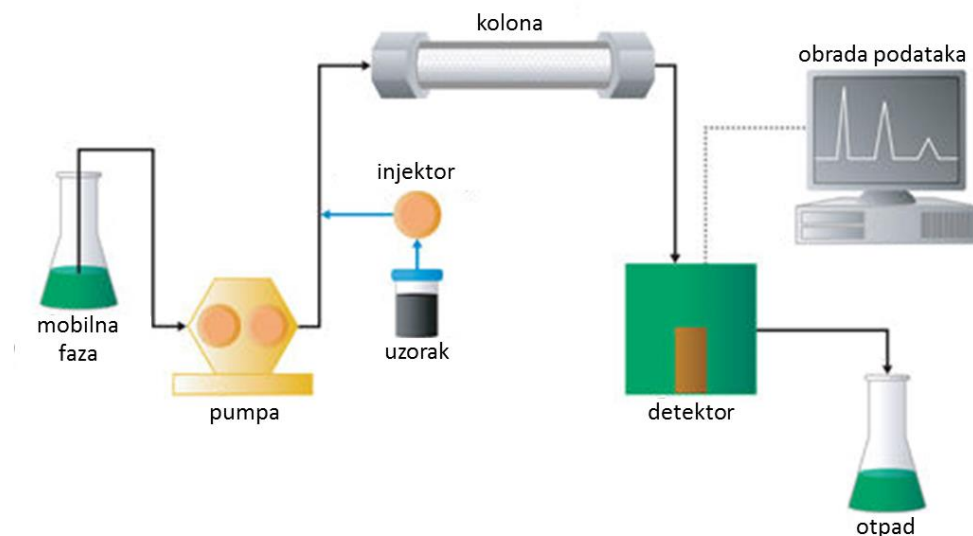
Slika 3. Postupak ekstrakcije na čvrstoj fazi (Lucci et al., 2012)

## 2.5. Kromatografija

Kromatografija je analitička metoda razdvajanja sastojaka iz smjese kojom se sastojci razdvajaju raspodjelom između stacionarne i mobilne faze, služe za kvalitativno i kvantitativno određivanje sadržaja smjese. Kromatografske metode imaju veoma široku primjenu u različitim granama kemije jer su primjenjive za analizu velikog broja tvari, od jednostavnih atoma i iona do kompleksnih spojeva kao što su proteini. Najjednostavniji primjer kromatografije je kromatografija na papiru gdje se uzorak nanese na papir, koji je u ovom slučaju stacionarna faza. Dno papira se uroni u otapalo koje se kreće stacionarnom fazom i sa sobom nosi sastojke iz smjese (Banović, 1999).

### 2.5.1. Tekućinska kromatografija s UV detektorom

Sustav tekućinske kromatografije povezane sa UV detektorom (Slika 4) sastoji se od spremnika mobilne faze, pumpe, kolone (u grijaču), injektora uzorka i detektora. Analiza uzoraka pomoću LC-UV sustava odvija se prolaskom tekuće mobilne faze kroz stacionarnu fazu u koloni pri čemu se analit zadržava u koloni, a detektorom se mjeri vrijeme zadržavanja. UV detektor mjeri sposobnost analita da apsorbira zračenje određene valne duljine. Na temelju razlike u vremenu zadržavanja i iznosu apsorbirane valne duljine izoliraju se i detektiraju razni analiti iz uzorka. Rezultat analize prikazuje se u obliku kromatograma. Vrh krivulje na kromatogramu služi za identifikaciju sastojka, a površina ispod krivulje nam govori o koncentraciji analita u uzorku (Cindrić et al., 2009). Kod nekih analiza je potrebno kontrolirati temperaturu kolone. U tom slučaju kolona se stavlja u grijač koji drži temperaturu konstantnom.



Slika 4. Shematski prikaz LC-UV sustava (www.waters.com)

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Kemikalije

Tijekom ispitivanja korištene su kemikalije: standardna otopina zearalenona (ZEA), Trizma klorovodik (Tris-HCl), natrijev klorid (NaCl), kalijev klorid (KCl), kalcijev klorid ( $\text{CaCl}_2$ ) octena kiselina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), natrijev acetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ), magnezijev klorid ( $\text{MgCl}_2$ ), natrijev hidrogenfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), trietilamin ( $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$ ) i cijanobromid aktivirana sefaroza proizvođača Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, Francuska), natrijeva lužina (NaOH) i klorovodična kiselina (HCl) proizvođača Fluka (Saint Quentin Fallavier, Francuska), acetonitril (ACN) i metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) HPLC čistoće proizvođača Carlo Erba (Val de Reuil, Francuska). Voda visoke čistoće dobivena je primjenom Milli-Q sustava za pročišćavanje (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, Francuska).

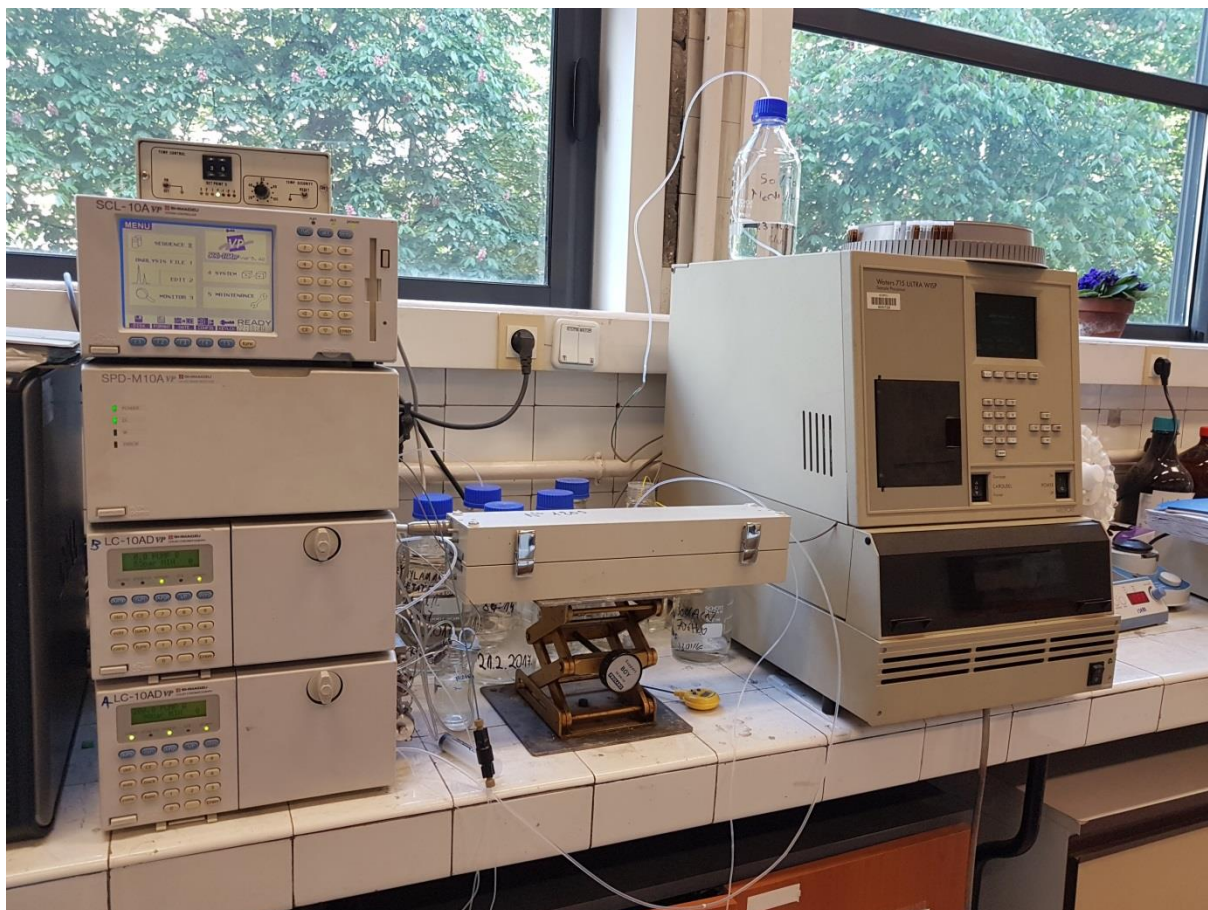
Ispitivani aptameri specifični za zearalenon su 5'-amino modificirani aptameri s C12 vezivnom molekulom: 5Z28 ( $5'\text{CCTATAGTGGCCGCATATCTTTTTTGCGGTCGCTTGGCTC-3}'$ ) i 8Z31 ( $5'\text{TCATCTATCTATGGTACATTACTATCTGTAATGTGATATG-3}'$ ), sintetizirani i počišćeni HPLC metodom od proizvođača Eurogentec (Angers, Francuska).

#### 3.2. Aparatura i analitički uvjeti analize

Za kromatografsku analizu uzoraka primijenjen je LC-UV sustav (Slika 5) koji se sastoji od Waters 715 injektora uzoraka (Waters, Saint Quentin en Yvelines, Francuska) i Shimadzu sustava (Shimadzu, Marne la Vallée, Francuska) uključujući sustav za dovod otapala (LC-10AD) i UV detektor (SPDM-10A).

Zearalenon je analiziran pomoću Waters Atlantis C18 kolone dimenzija  $150 \times 2.1$  mm i veličine čestica  $3 \mu\text{m}$  (Waters, Saint Quentin en Yvelines, Francuska) na  $35^\circ\text{C}$  s mobilnom fazom sastavljenom od acetonitrila i vode (55:45, V/V). Brzina strujanja mobilne faze je postavljena na  $0,2 \text{ mL/min}$ , a injektirani volumen uzorka iznosio je  $5 \mu\text{L}$ . Zearalenon je detektiran UV detekcijom na valnoj duljini od  $236 \text{ nm}$ .

Aptameri 5Z28 i 8Z31 analizirani su korištenjem Waters Atlantis C18 kolone dimenzija  $100 \times 3.0$  mm, veličine čestica  $3 \mu\text{m}$  (Waters, Saint Quentin en Yvelines, Francuska) na  $40^\circ\text{C}$  s mobilnom fazom sastavljenom od trietilamonijevog acetata i acetonitrila (85:15, V/V). Brzina strujanja mobilne faze iznosila je  $0,5 \text{ mL/min}$ . Injektiran je volumen uzorka od  $25 \mu\text{L}$ , a detekcija je izvedena UV detektorom na valnoj duljini od  $260 \text{ nm}$ .



Slika 5. Shimadzu LC-UV sustav, kolona u grijaju, Waters injektor uzoraka (izvor: autor)

### 3.2.1. Granica detekcije i kvantifikacije

Kod kromatografske analize granice detekcije (LOD, eng. *limits of detection*) i kvantifikacije (LOQ, eng. *limits of quantification*) predstavljaju najmanju količinu uzorka koja se može detektirati i kvantificirati. Ove vrijednosti se određuju prema omjeru signal/šum ( $S/N$ , eng. *signal to noise*). LOD se određuje omjerom  $S/N=3$ , a LOQ omjerom  $S/N=10$ .

Određeni LOD za ZEA iznosi  $0,007 \mu\text{g/mL}$ , a LOQ iznosi  $0,02 \mu\text{g/mL}$ . Za oba aptamera određen je LOD od  $0,3 \mu\text{g/mL}$  i LOQ od  $1 \mu\text{g/mL}$ .

### 3.3. Kalibracijske krivulje

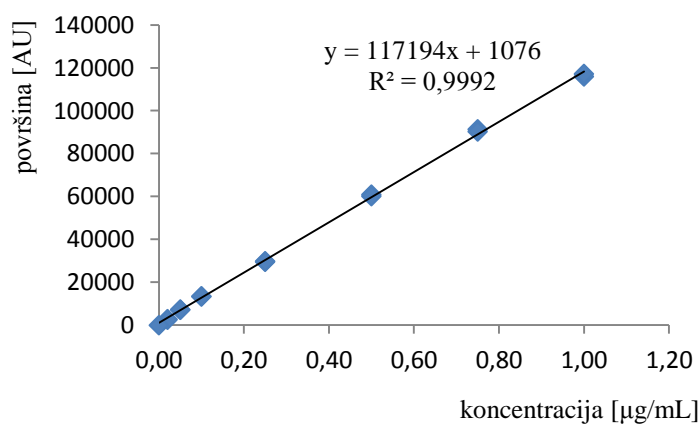
Pripremljene su otopine ZEA i aptamera 5Z28 i 8Z31 poznatih koncentracija razrjeđivanjem standardnih otopina. ZEA uzorci razrijeđeni su otopinom  $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$  (80:20), a uzorci aptamera pripremljeni su razrjeđivanjem s otopinom  $200 \text{ mmol/L Na}_2\text{HPO}_4$  i  $5 \text{ mmol/L MgCl}_2$  ( $\text{pH}=8$ ). Pomoću rezultata dobivenih analizom uzoraka poznatih koncentracija napravljene su kalibracijske krivulje. Svaki uzorak poznate koncentracije analiziran je dva puta.



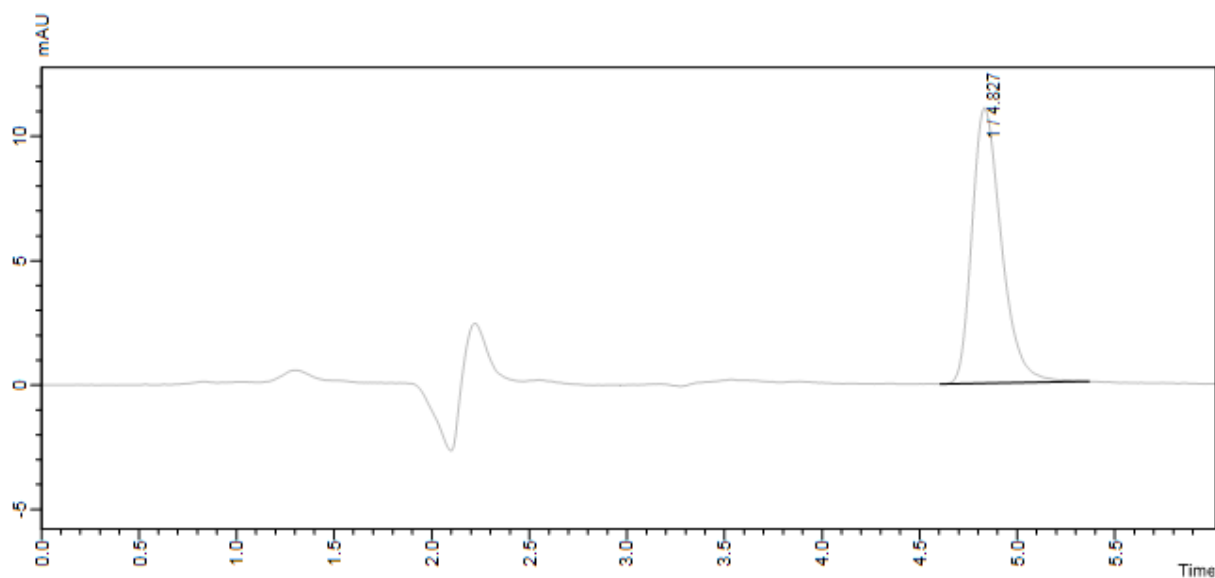
### 3.3.1. Kalibracijska krivulja za ZEA

Tablica 1. Kalibracijske točke za ZEA

| uzorak | koncentracija [ $\mu\text{g/mL}$ ] |
|--------|------------------------------------|
| 1      | 1,00                               |
| 2      | 0,75                               |
| 3      | 0,50                               |
| 4      | 0,25                               |
| 5      | 0,10                               |
| 6      | 0,05                               |
| 7      | 0,02                               |
| blank  | 0,00                               |



Slika 6. Kalibracijska krivulja za ZEA

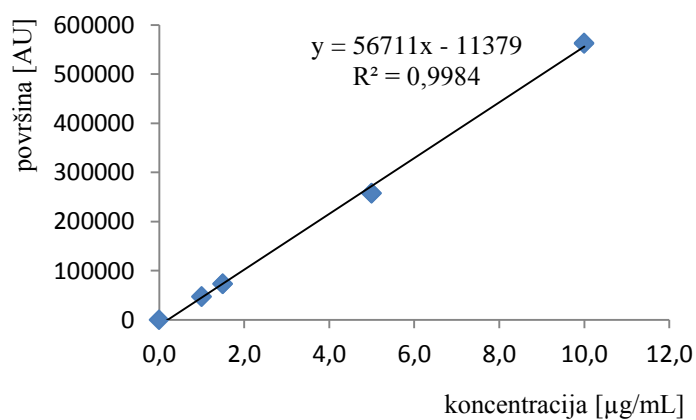


Slika 7. Kromatogram zearalenona, konc.: 1  $\mu\text{g/mL}$ , vrijeme zadržavanja: 4,83 min

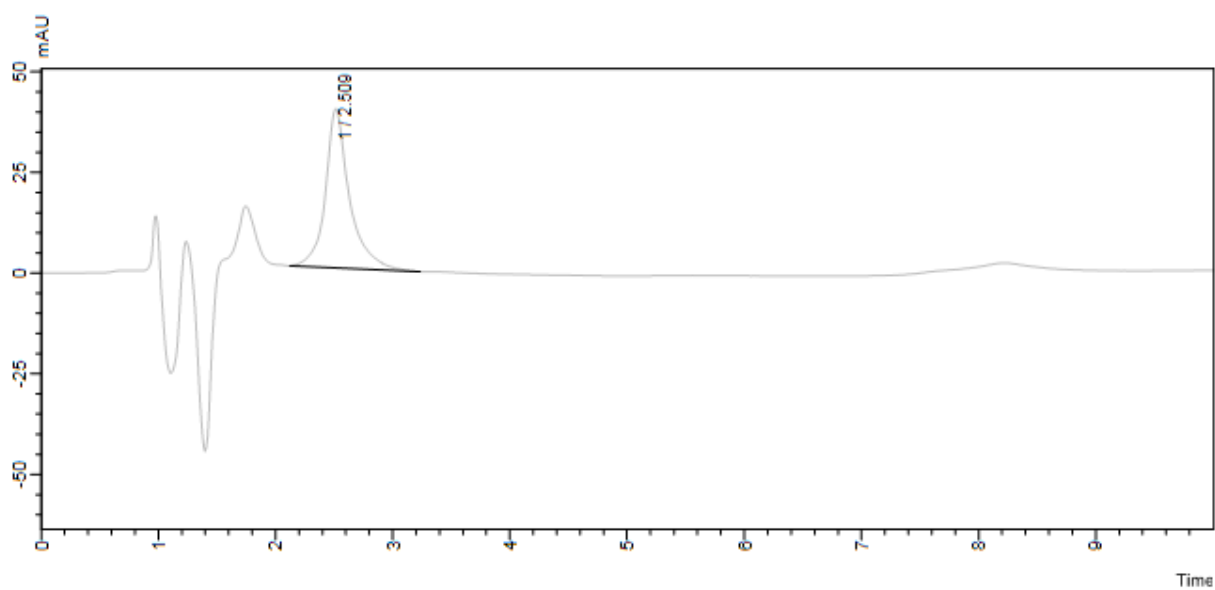
### 3.3.2. Kalibracijska krivulja za aptamer 5Z28

Tablica 2. Kalibracijske točke za 5Z28

| uzorak | koncentracija [ $\mu\text{g/mL}$ ] |
|--------|------------------------------------|
| 1      | 10,0                               |
| 2      | 5,0                                |
| 3      | 1,5                                |
| 4      | 1,0                                |
| blank  | 0,0                                |



Slika 8. Kalibracijska krivulja za 5Z28

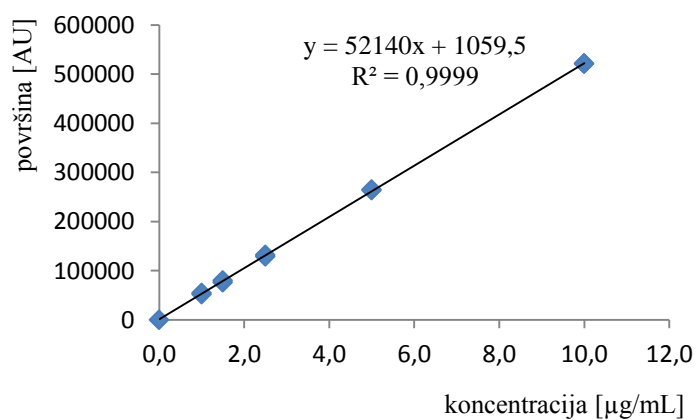


Slika 9. Kromatogram aptamera 5Z28, konc.: 10  $\mu\text{g/mL}$ , vrijeme zadržavanja: 2,91 min

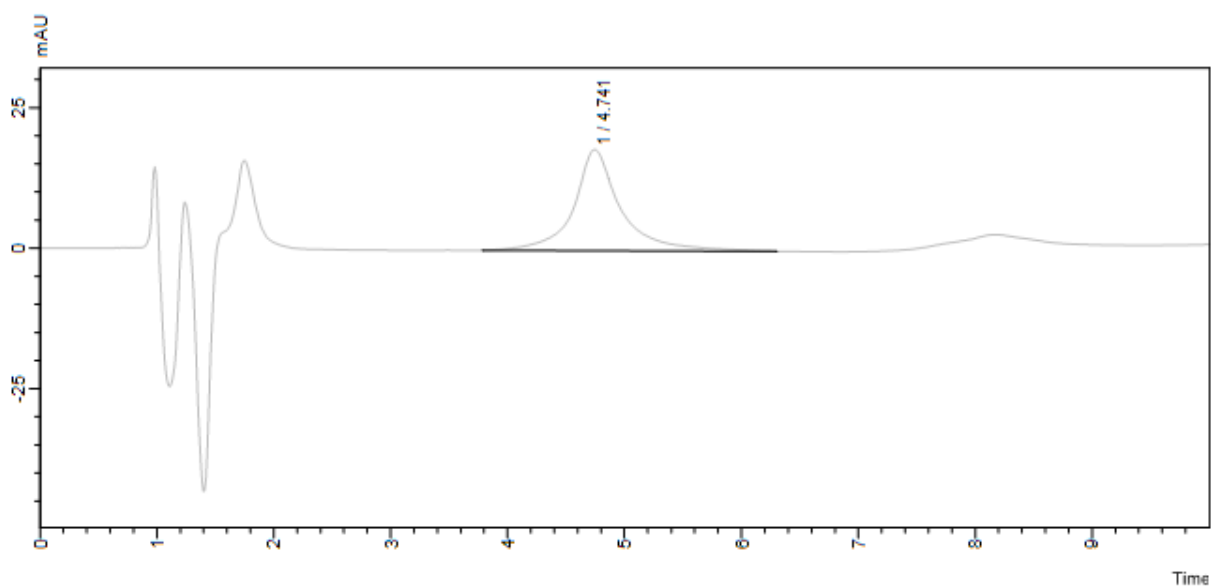
### 3.3.3. Kalibracijska krivulja za aptamer 8Z31

Tablica 3. Kalibracijske točke za 8Z31

| uzorak | koncentracija [ $\mu\text{g/mL}$ ] |
|--------|------------------------------------|
| 1      | 10,0                               |
| 2      | 5,0                                |
| 3      | 2,5                                |
| 4      | 1,5                                |
| 5      | 1,0                                |
| blank  | 0,0                                |



Slika 10. Kalibracijska krivulja za 8Z31



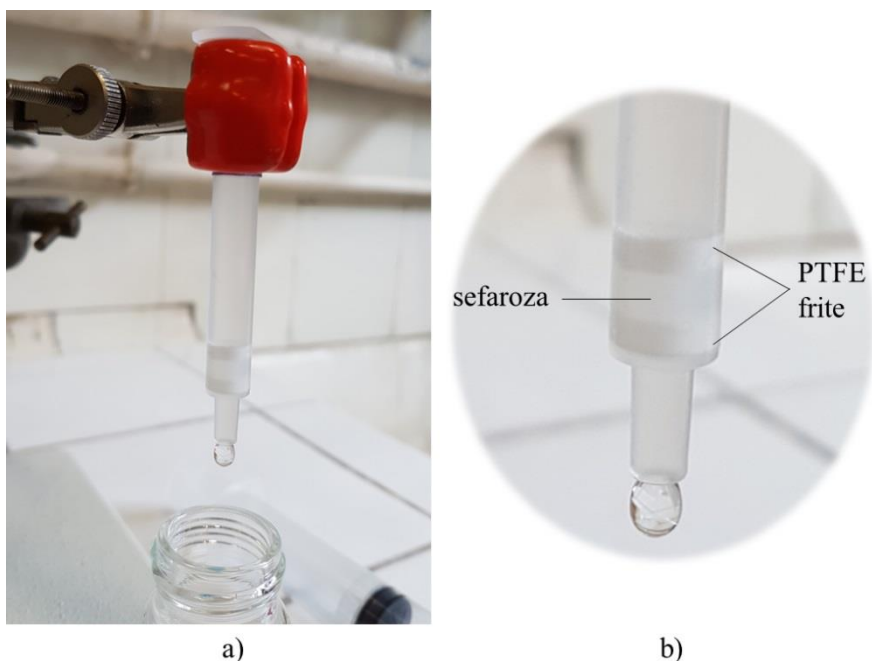
Slika 11. Kromatogram aptamera 8Z31, konc.: 10  $\mu\text{g/mL}$ , vrijeme zadržavanja: 4,74 min

### 3.4. Postupak imobilizacije aptamera

Prije imobilizacije, otopine aptamera koncentracije 1 g/L (otopina pripremljena rekonstitucijom aptamera u otopini 200 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  i 5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , pH=8) su denaturirane zagrijavanjem na 75 °C u trajanju od 5 minuta. Otopine aptamera su nakon toga ohlađene na sobnu temperaturu tijekom 30 minuta.

35 mg izvagane sefaroze se stavi u Eppendorf vialu. Sefaroza se ispiri šest puta s 1 mL HCl (pH=3) i dva puta s 1 mL  $\text{H}_2\text{O}$ . Tijekom ovog postupka sefaroza nabubri i ima strukturu gela. Nakon toga se sefarozi dodaje 175  $\mu\text{L}$  otopine 200 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  i 5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  (pH=8). Smjesa sefaroze i otopine se premjesti u stakleni insert. Kada se čestice sefaroze istalože, otopina iznad gela se uklanja. Na gel se doda 150  $\mu\text{L}$  otopine aptamera koncentracije 1 g/L te se sve zajedno miješa preko noći rotacijom brzine 2 rpm.

Gel se zatim stavlja u SPE kolonu između dvije PTFE frite (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Francuska), a višak tekućine koji prolazi kroz gel se sakuplja u vialu na dnu SPE kolone kako bi se utvrdila količina aptamera koja se nije imobilizirala (Slika 12). Gel se zatim ispiri tri puta sa 1 mL otopine 0,2 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH=8) koja se skuplja u vialu na dnu SPE kolone. Blokiranje preostalih aktivnih grupa na sefarozi postiže se propuštanjem 0,1 mol/L Trizma otopine (pH=8) tijekom 2 sata. Nakon toga se gel ispiri tri puta sa 2 mL acetatnog pufera (0,1 mol/L  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ; 0,1 mol/L  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ; 0,5 mol/L NaCl, pH=4) i 2 mL Trizma pufera (0,1 mol/L Trizma i 0,5 mol/L NaCl, pH=8).



Slika 12. Postupak imobilizacije aptamera a); uvećani prikaz b)

### 3.5. Postupak ekstrakcije zearalenona

Prvi korak ekstrakcije je kondicioniranje sintetiziranog oligosorbensa. Kondicioniranje se postiže propuštanjem 1 mL vezivnog pufera kroz SPE kolonu. Ekstrakcija zearalenona se provodi perkolacijom otopine zearalenona pripremljene s vezivnim puferom. Tijekom ispitivanja provedena je ekstrakcija perkolacijom 1 mL, 5 mL i 10 mL uzorka zearalenona. Oligosorbens se zatim ispiri sa 500  $\mu$ L vezivnog pufera. Eluiranje se postiže propuštanjem 250  $\mu$ L otopine H<sub>2</sub>O:ACN (60:40, V/V) kroz SPE kolonu. Različite frakcije sakupljane su nakon prolaska kroz SPE kolonu u viala te su analizirane LC-UV sustavom.

Tijekom ispitivanja korišteni su vezivni puferi različitog sastava i pH vrijednosti da bi se utvrdilo kako ovi parametri utječu na iskorištenje ekstrakcije zearalenona (Tablica 4). Vezivni pufer korišten za pripremu uzorka zearalenona određene koncentracije koristi se i za kondicioniranje i ispiranje oligosorbensa. Također, ekstrakcija je provedena na sobnoj i na sniženoj temperaturi (4 °C). Otopine korištene za ekstrakciju na sniženoj temperaturi nalazile su se u ledenoj kupelji.

Tablica 4. Sastav i pH vezivnih pufera

| pufer      | sastav pufera   | pH            |
|------------|---|---------------|
| <b>BB1</b> | Trizma 20 mmol/L, NaCl 100 mmol/L, MgCl <sub>2</sub> 5 mmol/L, KCl 5 mmol/L, CaCl <sub>2</sub> 1 mmol/L | 8             |
| <b>BB2</b> | Trizma 20 mmol/L, NaCl 100 mmol/L, KCl 5 mmol/L, MgCl <sub>2</sub> 2 mmol/L, CaCl <sub>2</sub> 1 mmol/L | 5             |
| <b>BB3</b> | Trizma 20 mmol/L, NaCl 100 mmol/L, KCl 5 mmol/L, MgCl <sub>2</sub> 2 mmol/L                             | 5             |
| <b>BB4</b> | Trizma 20 mmol/L, NaCl 100 mmol/L, KCl 5 mmol/L, CaCl <sub>2</sub> 1 mmol/L                             | 5             |
| <b>BB5</b> | Trizma 20 mmol/L, NaCl 100 mmol/L, KCl 5 mmol/L   | 5             |
| <b>BB6</b> | Trizma 20 mmol/L, NaCl 100 mmol/L   | 5             |
| <b>BB7</b> | Trizma 20 mmol/L  | 5; 6;<br>7; 8 |

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Iskorištenje imobilizacije aptamera – kapacitet oligosorbensa

Aptameri naziva 5Z28 i 8Z31 odabrani su za imobilizaciju na polimeru sefarozi. U istraživanju Chen et al. (2013) izolirano je nekoliko jednolančanih DNA molekula specifičnih za zearalenon, a najveći afinitet prema zearalenonu uočen je kod aptamera 5Z28 i 8Z31.

Aptameri se na čvrstu fazu mogu vezati kovalentnim i nekovalentnim vezama (Pichon et al., 2015). U ovom radu kao čvrsta faza odabrana je cijanobromid aktivirana sefaroza na temelju rezultata prethodnih istraživanja. Madru et al. (2011) i Chapuis-Hugon et al. (2011) ispitivali su iskorištenje postupaka kovalentne i nekovalentne imobilizacije aptamera specifičnih za kokain i okratoksin A. Rezultati istraživanja pokazali su da se kovalentnom imobilizacijom aptamera postiže veća stabilnost oligosorbensa i veće iskorištenje imobilizacije. Od polimera koji kovalentno imobiliziraju aptamere najbolje rezultate pokazuje CNBr-aktivirana sefaroza.

Kromatografskom analizom otopina skupljenih u viala nakon punjenja SPE kolone oligosorbensom utvrđene su količine aptamera koje se nisu imobilizirale. Oduzimanjem te količine aptamera od početne količine koja iznosi 150 µg izračuna se količina imobiliziranih aptamera na sefarozi. Iz ovih podataka se izračuna iskorištenje imobilizacije. Za aptamer 5Z28 iskorištenje iznosi 17,7 %, a za aptamer 8Z31 iznosi 28,7 % (Tablica 5). Slični rezultati dobiveni su u prethodnim istraživanjima iskorištenja imobilizacije u kojima su utvrđene vrijednosti iskorištenja 19 % i 25 % za aptamer specifičan za kokain (Madru, 2009; 2011), te 29 % i 37 % za aptamer specifičan za OTA (Chapuis-Hugon, 2011; Hadj Ali, 2014). Ako se uzme u obzir pretpostavka da 1 mol aptamera može adsorbirati 1 mol zearalenona, može se izračunati teoretski kapacitet koji za aptamer 5Z28 iznosi 0,6757 µg zearalenona, a za aptamer 8Z31 iznosi 1,095 µg zearalenona. Podatak o teoretskom kapacitetu je vrlo važan da ne bi došlo do prezasićenja oligosorbensa tijekom ispitivanja parametara ekstrakcije. Zbog toga su pripremljeni uzorci za ispitivanje parametara ekstrakcije koji sadrže 10 % od maksimalnog teoretskog kapaciteta.

Tablica 5. Iskorištenje imobilizacije

|   | <b>5Z28</b> | <b>8Z31</b> |
|---|-------------|-------------|
| <b>količina imobiliziranog aptamera* [μg]</b> | 26,5        | 43,1        |
| <b>iskorištenje imobilizacije [%]</b>         | 17,7        | 28,7        |
| <b>kapacitet oligosorbensa** [μg]</b>         | 0,6756      | 1,095       |
| <b>masa ZEA za ekstrakciju***[μg]</b>         | <b>0,06</b> | <b>0,11</b> |

\*u odnosu na količinu od 150 μg aptamera dodanih sefarozi

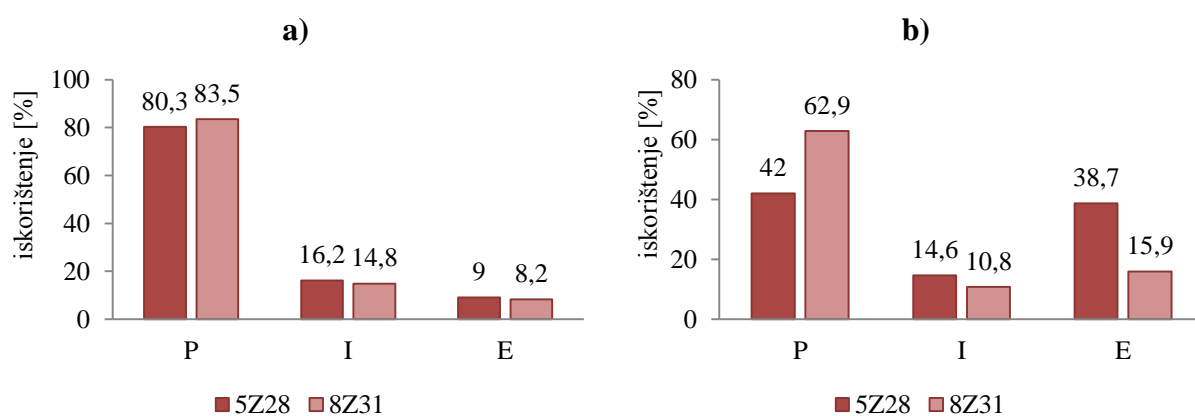
\*\*maksimalna količina ZEA koja se može ekstrahirati (teoretski kapacitet)

\*\*\*10 % od maksimalnog kapaciteta

## 4.2. Utjecaj temperature

Ispitivanje utjecaja temperature na selektivnost oligosorbensa izvedeno je na temperaturi od 20 i od 4 °C. Ekstrakcije su provedene perkolacijom 1 ml uzorka pripremljenog u vezivnom puferu navedenog u Tablici 4 kao BB1 čija pH vrijednost iznosi 8. Količina ZEA u uzorku namijenjenog za ekstrakciju na oligosorbensu koji sadrži aptamer 5Z28 iznosi 0,06 μg, a za aptamer 8Z31 iznosi 0,11 μg.

Iz rezultata ekstrakcija prikazanih na Slici 13. vidljivo je da se većina analita gubi u perkolacijskom koraku. Kod sobne temperature aptameri 5Z28 i 8Z31 adsorbirali su 9 %, odnosno 8,2 % zearalenona iz uzorka. Snižanjem temperature postotak adsorbiranog zearalenona se povećava, no nedovoljno. Na sniženoj temperaturi se selektivnost aptamera 5Z28 povećala više nego selektivnost aptamera 8Z31. Na temelju ovih rezultata sve ostale ekstrakcije u ovom radu provedene su na 4 °C.



Slika 13. Rezultati ekstrakcije ZEA provedene na temperaturi od 20 °C a); na temperaturi od 4 °C b)

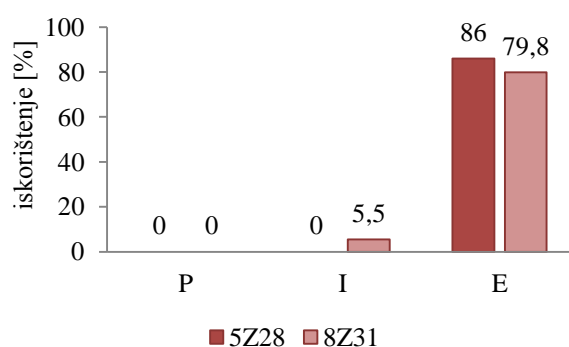
### 4.3. Utjecaj pH vrijednosti

Za ispitivanje utjecaja pH vrijednosti na selektivnost oligosorbensa uzorci zearalenona pripremljeni su s otopinom BB2 čija pH vrijednost iznosi 5 (Tablica 4). Ekstrakcija je provedena na 4 °C. Rezultati ekstrakcije uspoređeni su s rezultatima navedenima u prethodnom poglavlju, odnosno s rezultatima ekstrakcije provedene korištenjem otopine BB1 na 4 °C (Slika 13 b). Svi ostali parametri ekstrakcije, kao što su masa zearalenona u uzorcima, perkolacijski volumen, volumen za ispiranje i volumen otopine za eluiranje, ostaju isti kao u prethodnom ispitivanju.

Rezultati ekstrakcije provedene korištenjem otopine BB2 prikazani na Slici 14 pokazuju visoke vrijednosti iskorištenja ekstrakcije. Selektivnost oba oligosorbensa se znatno povećala u odnosu na selektivnost zabilježenu korištenjem otopine pH vrijednosti 8. Ispiranjem oligosorbensa koji sadrži aptamer 8Z31 gubi se 5,5 % zearalenona.

### 4.4. Utjecaj sastava otopine

U prethodnim ekstrakcijama uzorci zearalenona su pripremljeni razrjeđivanjem koncentrirane otopine zearalenona u puferskim otopinama koje sadrže mnoge otopljene soli. U literaturi je navedeno da sastav puferskih otopina utječe na trodimenzionalnu strukturu aptamera te na taj način utječe na iskorištenje ekstrakcije. Chapuis-Hugon (2011) u svom radu ističe važnost prisutnosti kationa na selektivnost aptamera specifičnog za okratoksin A. Uzimajući u obzir ove podatke, pripremljeno je nekoliko puferskih otopina sa smanjenom količinom otopljenih soli da se utvrdi koji ioni i na koji način utječu na selektivnost aptamera specifičnih za zearalenon. Modifikacijom sastava pufera BB2 pripremljene su otopine od kojih je svaka sadržavala po jednu sol manje od prethodne. Zadnja pripremljena otopina sadrži samo Trizmu. Vrijednost pH svih otopina iznosi 5.



Slika 14. Rezultati ekstrakcije ZEA provedene s otopinom BB2 (pH=5)



Tablica 6. Rezultati ekstrakcije ZEA provedene upotrebom vezivnih pufera s različitim sastavom

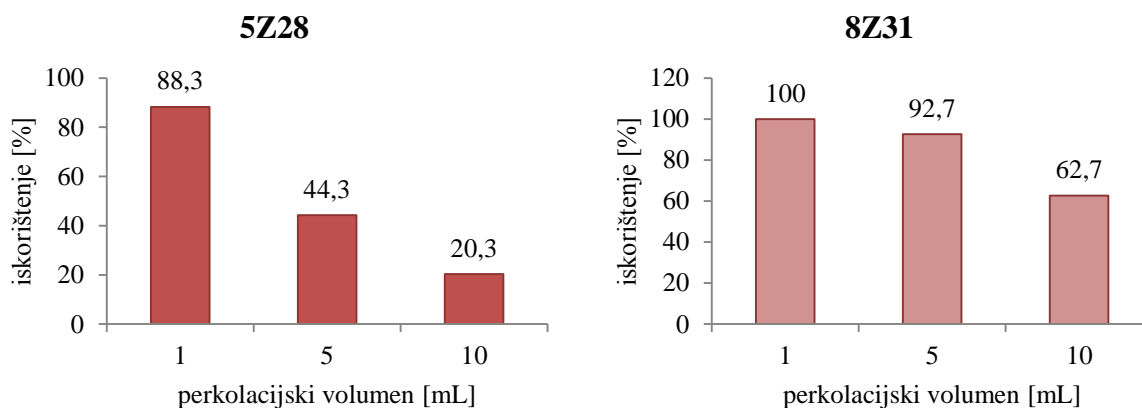
| pufer      | Iskorištenje [%] |       |
|------------|------------------|-------|
|            | 5Z28             | 8Z31  |
| <b>BB3</b> | 89,7             | 94,5  |
| <b>BB4</b> | 83,6             | 86,7  |
| <b>BB5</b> | 77,3             | 96,4  |
| <b>BB6</b> | 99,0             | 100,0 |
| <b>BB7</b> | 88,3             | 100,0 |

Sastav pojedinog pufera naveden je u Tablici 4. Količina zearalenona u uzorcima, perkolacijski volumen, volumen za ispiranje, volumen za eluiranje i temperatura otopina tijekom ekstrakcije su isti kao u prethodnom ispitivanju.

Rezultati ispitivanja utjecaja sastava otopine na selektivnost oligosorbensa prikazani su u Tablici 5. Ovi rezultati pokazuju dobru selektivnost oba oligosorbensa čak i ako tijekom ekstrakcije u uzorku nisu prisutne soli. Za ekstrakciju zearalenona na aptameru 5Z28 zabilježene su vrijednosti iskorištenja između 77,3 i 99 %. Aptamer 8Z31 adsorbirao je od 86,7 % do čak 100 % zearalenona iz uzoraka. Selektivnost aptamera 8Z31 se generalno povećala u odnosu na selektivnost zabilježenu uporabom pufera BB2 (pH=5) za ekstrakciju, isto tako povećala se njegova selektivnost u odnosu na aptamer 5Z28. Ovim ispitivanjem dokazano je da prisutnost soli u uzorku ne utječe negativno na sposobnost oligosorbensa da adsorbira zearalenon.

#### 4.5. Utjecaj perkolacijskog volumena

Ekstrakcijom se, uz pročišćavanje, ujedno vrši i koncentriranje uzorka, što je jako važno kod ekstrakcije analita koji se u pravom uzorku nalaze u tragovima. Kao što je već spomenuto, zearalenon je u pravom uzorku prisutan u vrlo malim koncentracijama, stoga je potrebno analizirati relativno veliku količinu uzorka da bi se iz uzorka izolirala količina analita koju je moguće detektirati kromatografskom metodom. Međutim, povećanjem volumena uzorka oligosorbens gubi selektivnost te se dio analita gubi u perkolacijskom koraku ekstrakcije. Zbog toga je potrebno eksperimentalno odrediti najveći volumen uzorka koji je moguće provesti kroz oligosorbens, a da se pri tome ne gubi njegova selektivnost.



Slika 15. Rezultati ekstrakcije ZEA provedene perkolacijom različitih volumena uzorka

Za ispitivanje utjecaja volumena na selektivnost oligosorbensa pripremljeni su uzorci zearalenona volumena 5 i 10 mL te su rezultati uspoređeni s rezultatima ekstrakcije 1 mL uzorka. Količina zearalenona u uzorcima je ista neovisno o volumenu. Za pripremu uzoraka upotrijebljen je vezivni pufer BB7 (pH=5). Volumen za ispiranje, volumen za eluiranje i temperatura otopina isti su kao i u prethodno provedenim ekstrakcijama.

Na Slici 15. prikazani su rezultati koji pokazuju da se selektivnost aptamera 5Z28 znatno smanjila povećanjem perkolacijskog volumena. Perkolacijom 5 mL uzorka gubi se 55,7 % zearalenona, a perkolacijom 10 mL gubi se 79,7 % zearalenona. Aptamer 8Z31 pokazuje bolje rezultate, perkolacijom 5 mL uzorka iskorištenje ekstrakcije je i dalje visoko, no daljnjim povećanjem volumena iskorištenje se smanjuje. Ovi rezultati pokazuju da povećanje volumena uzorka ima veći negativni efekt na aptamer 5Z28, dok se povećanjem volumena uzorka na 5 mL ekstrakcijom na oligosorbensu koji sadrži aptamer 8Z31 može odvojiti gotovo sav zearalenon iz uzorka.

#### 4.6. Utjecaj postupnog povećanja pH vrijednosti

U poglavlju 4.3 prikazan je utjecaj pH vrijednosti pufera na vezanje zearalenona i oligosorbensa. Uzorci zearalenona za ekstrakciju u svrhu utvrđivanja utjecaja prisutnosti iona u puferu i perkolacijskog volumena pripremljeni su u puferskim otopinama čija pH vrijednost iznosi 5 jer je ispitivanjima utvrđeno da je ta pH vrijednost optimalna za adsorpciju zearalenona na oligosorbens. U poglavlju 4.4. navedeni su rezultati koji pokazuju da otopljene soli u vezivnom puferu ne utječu na iskorištenje ekstrakcije. Prethodno poglavlje prikazuje rezultate koji ukazuju na slabiju selektivnost aptamera 5Z28 u odnosu na aptamer 8Z31 ako se poveća perkolacijski volumen uzorka. Na temelju svih ovih rezultata postavljeni su uvjeti za

ekstrakciju zearalenona ako se BB otopini za pripremu uzoraka postupno mijenja pH vrijednost. Otopina BB7 se pokazala kao optimalna za pripremu uzoraka zearalenona te su zbog toga pripremljene otopine BB7 s modificiranim pH vrijednostima, odnosno pH vrijednost otopine BB7 podešena je na 6, 7 i 8. Pripremljeno je po 5 mL uzorka u svakoj otopini. Zbog gubitka selektivnosti aptamera 5Z28 perkolacijom 5 mL uzorka, ekstrakcija zearalenona provedena je isključivo na oligosorbensu koji sadrži aptamer 8Z31. Količina zearalenona u svim uzorcima iznosi 0,11 µg. Volumen za ispiranje, volumen za eluiranje i temperatura otopina tijekom ekstrakcije ostaje ista kao i u prethodnom ispitivanju.

Tablica 6. prikazuje rezultate ekstrakcija. Iskorištenje ekstrakcije provedene korištenjem otopine BB7 pH vrijednosti 6 iznosi 91,8 %. Ovaj rezultat je gotovo identičan iskorištenju ekstrakcije provedene korištenjem otopine BB7 pH vrijednosti 5 (Slika 15). Kod pH vrijednosti 7 primjećuje se pad iskorištenja za otprilike 10 %, no iskorištenje je i dalje relativno visoko. Ekstrakcijom uzorka pripremljenog s puferom pH vrijednosti 8 gubi se oko 40 % zearalenona u perkolacijskom koraku. Ovi rezultati pokazuju da je optimalno pH područje otopine koja se koristi za pripremu uzoraka zearalenona kiselo do neutralno. Lužnata sredina negativno utječe na selektivnost aptamera.

Tablica 7. Rezultati ekstrakcije ZEA provedene korištenjem otopine BB7 različitih pH vrijednosti

| <b>BB7<br/>pH</b> | <b>iskorištenje [%]</b> |
|-------------------|-------------------------|
| <b>6</b>          | 91,8                    |
| <b>7</b>          | 82,5                    |
| <b>8</b>          | 61,6                    |

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu provedena je optimizacija procesa ekstrakcije zearalenona na čvrstoj fazi s imobiliziranim aptamerima. U tu svrhu sintetizirana su dva oligosorbensa visokog afiniteta prema mikotoksinu zearalenonu. Oligosorbensi su sintetizirani procesom imobilizacije aptamera 5Z28 i 8Z31 na sefarozu. Iskorištenje imobilizacije iznosi 17,7 % za aptamer 5Z28 i 28,7 % za aptamer 8Z31. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima provedenih imobilizacija aptamera u istim uvjetima opisanih u radovima drugih autora.

Iz svih prikazanih rezultata zaključuje se da je za ekstrakciju zearalenona imobilizacijom aptamera na čvrstoj fazi potrebno osigurati nisku temperaturu te kiseli medij, odnosno zakiseljavanje uzorka prije ekstrakcije dodatkom kiseline ako je to potrebno. Aptamer 8Z31 generalno pokazuje bolju selektivnost, veće iznose iskorištenja ekstrakcija te manju osjetljivost na promjenu parametara ekstrakcije, osobito povećanja volumena uzorka. Prema provedenim ispitivanjima, prisutnost mineralnih soli u pravom uzorku ne bi trebala negativno utjecati na iskorištenje ekstrakcije.

Svrha ispitivanja provedenih u ovom radu je optimizacija procesa ekstrakcije zearalenona iz pravih uzoraka, no da bi se potvrdila njezina učinkovitost potrebno je primijeniti ovu metodu na pravim uzorcima te provesti ispitivanja ponovljivosti ekstrakcije.

## 6. LITERATURA

1. Banović M. (1999) *Analitička kemija*. 2. izd. Zagreb: Školska knjiga
2. Blažek D. (2015) *Ekstrakcija pesticida iz uzorka čaja raspršenjem čaja kroz čvrstu fazu*. Diplomski rad, Zagreb: Sveučilište u Zagrebu.
3. Chapuis-Hugon F. et al. (2011) New extraction sorbent based on aptamers for the determination of ochratoxin A in red wine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400, str. 1199–1207.
4. Chen X. et al. (2013) Selection and identification of ssDNA aptamers recognizing zearalenone. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, str. 6573–6581.
5. Cindrić M.; Marković A.; Horvatić A. (2009) Sprengute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina*, 45 (3), str. 218-232.
6. Delaš F. (2010) *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*. Osijek, Hrvatska agencija za hranu, str. 31-49.
7. European Food Safety Authority (2011) Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA Journal*, 9(6):2197.
8. European Food Safety Authority (2014) Evaluation of the increase of risk for public health related to a possible temporary derogation from the maximum level of deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins for maize and maize products. *EFSA Journal*, 2(5):3699
9. Hadj Ali W.; Pichon V. (2014) Characterization of oligosorbents and application to the purification of ochratoxin A from wheat extracts. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, str. 1233-1240.
10. International Agency for Research on Cancer (1993) *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Vol 56.
11. Kosir M. (2016) *Određivanje glifosata ionskom kromatografijom*. Diplomski rad, Zagreb: Sveučilište u Zagrebu.
12. Lakhin A. V.; Tarantul V. Z.; Gening L. V. (2013) Aptamers: Problems, Solutions and Prospects. *Acta Naturae*, 5 (4), str. 34–43.

13. Lucci P. et al. (2012) Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis. U: Azevedo Calderon L., ur., *Chromatography – The Most Versatile Method of Chemical Analysis*. Rijeka: Intech, str. 127-164.
14. Madru B. et al. (2009) Determination of Cocaine in Human Plasma by Selective Solid-Phase Extraction Using an Aptamer-Based Sorbent. *Analytical Chemistry*, 81, str. 7081–7086.
15. Madru B.; Chapuis-Hugon F.; Pichon V. (2011) Novel extraction supports based on immobilised aptamers: Evaluation for the selective extraction of cocaine. *Talanta*, 85, str. 616-624.
16. Mašek T.; Šerman V. (2006) Utjecaj mikotoksina na zdravlje i proizvodnost preživača. *Krmiva*, 48, str. 19-31.
17. Official journal of the European Union (2006) *Commission Regulation (EC) No 401/2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs*.
18. Official journal of the European Union (2006) *Commission Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs*.
19. Pejić S. (2016) *Pojavnost mikotoksina u komercijalnim pivima hrvatskih industrijskih i craft pivovara*. Diplomski rad, Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.
20. Perši N. et al. (2011) Mikotoksini u žitaricama i hrani životinjskog podrijetla. *Veterinarska stanica* 42 (4), str. 335-345.
21. Pichon V.; Brothier F.; Combès A. (2015) Aptamer-based-sorbents for sample treatment—a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, str. 681–698.
22. Pleadin et al. (2015) Fuzarijski mikotoksini u hrani i hrani za životinje. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 10 (1-2), str. 6-13.
23. Rozgaj S.; Glasnović A. (2007) *Tehnološke operacije*. 1. izd. Zagreb: Profil
24. Samardžija M. et al. (2017) Estrogeni učinci zearalenona u farmских životinja i opasnosti za zdravlje ljudi i životinja. *Veterinarska stanica*, 48 (2), str. 109-118.
25. Šarić G. K.; Milaković Z.; Krstanović V. (2011) Toksičnost Fusarium toksina. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 6 (3-4), str. 112-116.

26. Sokolović M. (2005) Značaj trikotecenskih mikotoksina u hrani za perad. *Stočarstvo*, 59 (4), str. 289-300.
27. Strugačevac L. (2015) *Usporedba ELISA I LC-MS/MS tehnike u analizi aflatoksina u kukuruzu*. Diplomski rad, Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.
28. Tonic-Ribarska J. et al. (2012) Development and validation of a bioanalytical LC-UV method with solid-phase extraction for determination of valproic acid in saliva. *Acta Pharmaceutica*, 62, str. 211–220
29. Turčinović D.; Halasz I. (2007) *Opća kemija 1*. 2. izd. Zagreb: Školska knjiga.
30. Turner N. W.; Subrahmanyam S; Piletsky S. A. (2009) Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632, str. 168–180.
31. Vučilovski J. (2016) *Razvoj i validacija HPLC metode za karakterizaciju bioaktivnog sastava biljnih sirovina*. Diplomski rad, Zagreb: Sveučilište u Zagrebu.
32. Walker V.; Mills G. A. (2002) Solid-phase extraction in clinical biochemistry. *Annals of Clinical Biochemistry*, 39, str. 464-477.
33. [https://www.pmf.unizg.hr/download/repository/5\\_AK2\\_ekstr\\_krom\\_elektro.pdf](https://www.pmf.unizg.hr/download/repository/5_AK2_ekstr_krom_elektro.pdf) (26.6.2017.)
34. [http://www.waters.com/webassets/cms/category/media/other\\_images/primer\\_e\\_lcsystem.jpg](http://www.waters.com/webassets/cms/category/media/other_images/primer_e_lcsystem.jpg) (1.7.2017.)
35. [http://www.starlabsci.com/silica-spe-cartridge\\_p94.html](http://www.starlabsci.com/silica-spe-cartridge_p94.html) (1.7.2017.)

## **POPIS SLIKA**

Slika 1. Strukturna formula zearalenona (Delaš, 2010)

Slika 2. SPE kolone (www.starlabsci.com)

Slika 3. Postupak ekstrakcije na čvrstoj fazi (Lucci et al., 2012)

Slika 4. Shematski prikaz LC-UV sustava (www.waters.com)

Slika 5. Shimadzu LC-UV sustav, kolona u grijaču, Waters injektor uzoraka (izvor: autor)

Slika 6. Kalibracijska krivulja za ZEA

Slika 7. Kromatogram zearalenona, konc.: 1 µg/mL, vrijeme zadržavanja: 4,83 min

Slika 8. Kalibracijska krivulja za 5Z28

Slika 9. Kromatogram aptamera 5Z28, konc.: 10 µg/mL, vrijeme zadržavanja: 2,91 min

Slika 10. Kalibracijska krivulja za 8Z31

Slika 11. Kromatogram aptamera 8Z31, konc.: 10 µg/mL, vrijeme zadržavanja: 4,74 min

Slika 12. Postupak imobilizacije aptamera a); uvećani prikaz b)

Slika 13. Rezultati ekstrakcije ZEA provedene na temperaturi od 20 °C a); na temperaturi od 4 °C b)

Slika 14. Rezultati ekstrakcije ZEA provedene s otopinom BB2 (pH=5)

Slika 15. Rezultati ekstrakcije ZEA provedene perkolacijom različitih volumena uzorka

## **POPIS TABLICA**

Tablica 1. Kalibracijske točke za ZEA

Tablica 2. Kalibracijske točke za 5Z28

Tablica 3. Kalibracijske točke za 8Z31

Tablica 4. Sastav i pH vezivnih pufera

Tablica 5. Iskorištenje imobilizacije

Tablica 6. Rezultati ekstrakcije ZEA provedene upotrebom vezivnih pufera s različitim sastavom



Tablica 7. Rezultati ekstrakcije ZEA provedene korištenjem otopine BB7 različitih pH vrijednosti

### **POPIS KRATICA**

AFB<sub>1</sub> – aflatoksin B<sub>1</sub>

AFB<sub>2</sub> – aflatoksin B<sub>2</sub>

AFG<sub>1</sub> – aflatoksin G<sub>1</sub>

AFG<sub>2</sub> – aflatoksin G<sub>2</sub>

BB – vezivni pufer (eng. *binding buffer*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

DON – deoksinivalenol

EFSA – Europska agencija za sigurnost hrane (eng. *European Food Safety Authority*)

ELISA - imunoenzimski test (eng. *enzyme linked immunosorbent assay*)

EU – Europska Unija

FB<sub>1</sub> – fumonizin B<sub>1</sub>

FB<sub>2</sub> – fumonizin B<sub>2</sub>

FSH – folikularno stimulirajući hormon

GC – plinska kromatografija (eng. *gas chromatography*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*)

IARC – Međunarodna agencija za istraživanje raka (eng. *International Agency for Research on Cancer*)

LC – tekućinska kromatografija (eng. *liquid chromatography*)

LOD – granica detekcije (eng. *limits of detection*)

LOQ – granica kvantifikacije (eng. *limits of quantification*)

MIP – molekularno utisnuti polimeri (eng. *molecularly imprinted polymers*)

MS – masena spektrometrija

OTA – okratoksin A

PTFE – politetrafluoretilen; teflon

RNA – ribonukleinska kiselina

SELEX – postupak sinteze aptamera (eng. *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*)

S/N – omjer signal/šum (eng. *signal to noise*)

SPE – ekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. *solid phase extraction*)

TDI – prihvatljivi dnevni unos (eng. *tolerable daily intake*)

TLC – tankoslojna kromatografija (eng. *thin layer chromatography*)

ZEA – zearalenon

## **IZJAVA O AUTORSTVU RADA**

Ja, **Klara Kudelić**, pod punom moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću, izjavljujem da sam isključivi autor završnog/diplomskog rada pod naslovom **Selektivna ekstrakcija mikotoksina zearalenona na čvrstoj fazi** te da u navedenom radu nisu na nedozvoljen način korišteni dijelovi tuđih radova.

U Požegi, 11. rujna 2017.

Ime i prezime studenta

---