Mikotoksini u žitaricama žetve 2013. u Hrvatskoj

Grec, Marijana

Master's thesis / Diplomski rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:707783

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Marijana Grec

MIKOTOKSINI U ŽITARICAMA ŽETVE 2013. U HRVATSKOJ

Diplomski rad

Osijek, rujan, 2014.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju
Katedra za biokemiju i toksikologiju
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Opasnosti vezane uz hranu
Tema rada je prihvaćena na VIII. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 27. svibnja 2014.
Mentor: prof.dr.sc. *Tomislav Klapec,*
Pomoć pri izradi: dr. sc. *Bojan Šarkanj,* poslijedoktorant

MIKOTOKSINI U ŽITARICAMA ŽETVE 2013. U HRVATSKOJ

Marijana Grec, 197/DI

Sažetak:
Žitarice na polju i tijekom skladištenja izložene su različitim vrstama plijesni, što za posljedicu može imati kontaminaciju mikotoksinima. Najčešća je kontaminacija hrane i krmiva aflatoksinima, deoksinivalenolom, fumonizinima, ohratoksinom A i zearalenonom u različitim koncentracijama ovisno o okolišnim uvjetima na polju i u skladištu. Cilj ovog rada bio je odrediti pojavnost mikotoksina u hrvatskim žitaricama žetve 2013. U tu svrhu prikupljena su 24 reprezentativna uzorka žitarica (pšenice, ječma i zobi) namijenjena ljudskoj prehrani. Za određivanje mikotoksina korištena je multimikotoksinska metoda tekućinske kromatografije – tandemske masene spektrometrije (LC-MS/MS). Rezultati su utvrdili prisutnost *Fusarium* mikotoksina, a u manjim koncentracijama detektirani su i mikotoksini rodova *Alternaria, Penicillium, Aspergillus*, ergot alkaloidi te mikotoksini drugih rodova plijesni. Relativno niske prosječne razine kontaminacije dobivene u ovom radu bi se mogle objasniti toplim i suhim vremenom u periodu cvatnje i žetve žitarica.

Ključne riječi: žitarice, mikotoksini, LC-MS/MS, deoksinivalenol, Hrvatska

Rad sadrži: 47 stranica
5 slika
9 tablica
42. literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	prof. dr. sc. *Daniela Čačić Kenjerić,*	predsjednica
2.	prof. dr. sc. *Tomislav Klapec,*	član-mentor
3.	doc. dr. sc. *Natalija Velić,*	član
4.	izv. prof. dr. sc. *Daliborka Koceva Komlenić.*	zamjena člana

Datum obrane: 24. rujna 2014.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Applied Chemistry and Ecology
Subdepartment of Biochemistry and Toxicology
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Foodborne Hazards
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. VIII held on May 27, 2014.
Mentor: *Tomislav Klapec,* PhD, prof.
Technical assistance: *Bojan Šarkanj,* PhD, postdoctoral fellow

MYCOTOXINS IN CEREALS FROM 2013 HARVEST IN CROATIA

Marijana Grec, 197/DI

Summary:
Cereals are naturally exposed to different species of fungi both in the field and during storage, which may result in mycotoxin contamination of cereal grains. Most commonly, food and feeds are contaminated with aflatoxins, deoksynivalenol, fumonisins, ochratoxin A, and zearalenone in a wide range of concentrations, dependent on environmental and storage conditions. The aim of this study was to determine the occurrence of mycotoxins in cereals from 2013 harvest in Croatia. Twenty-four representative samples of cereals (wheat, barley and oats) for human consumption were collected for this purpose. The mycotoxins were determined using a multimycotoxin method by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The results indicated the presence of *Fusarium* mycotoxins although lower concentrations of *Alternaria, Penicillium, Aspergillus*, ergot alkaloids and other fungal metabolites were detected as well. Relatively low average contamination levels observed in this study could be associated with a warm and dry weather during flowering and harvest periods.

Key words: cereals, mycotoxins, LC-MS/MS, deoxynivalenol, Croatia

Thesis contains: 47 pages
5 figures
9 tables
42 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1.	*Daniela Čačić Kenjerić*, PhD, prof.	chair person
2.	*Tomislav Klapec*, PhD, prof.	supervisor
3.	*Natalija Velić*, PhD, assistant prof.	member
4.	*Daliborka Koceva Komlenić*, PhD, associate prof.	stand-in

Defense date:

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Klapecu i dr. sc. Šarkanju na predloženoj temi i stručnoj pomoći tijekom izrade ovoga rada. Također se zahvaljujem članovima povjerenstva prof. dr. sc. Čačić Kenjerić te doc. dr.sc. Velić na korisnim savjetima te radnom timu Centra za analitiku, Odjela za Agrobiotehnologiju, BOKU, Tulln na pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela. Posebna zahvala ide mojoj obitelji i prijateljima.

Popis oznaka, kratica i simbola

CXP	*Collision cell exit potential,* Izlazni potencijal kolizijske ćelije
DON	Deoksinivalenol
DS	*Dilution solvent*, Otapalo za razrjeđivanje
EFSA	*European Food Safety Authority*, Europska agencija za sigurnost hrane
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*, Enzimski imuno-test
ES	*Extraction solvent,* Otapalo za ekstrakciju
HACCP	*Hazard analysis and critical control points,* Analiza opasnosti i kritične kontrolne točke
HAH	Hrvatska agencija za hranu
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography,* Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
LC	*Liquid Chromatography*, Tekućinska kromatografija
LC-MS/MS	*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry / Mass Spectrometry,* Tekućinska kromatografija – tandem masena spektrometrija
LOD	Limit detekcije
MALDI	*Matrix Assisted Laser Desorptive Ionisation,* Laserska desorptivna ionizacija potpomognuta matriksom
MRM	*Multiple Reaction Monitoring,* Praćenje višestrukih reakcija
sMRM	*Scheduled multiple reaction monitoring,* Planirano praćenje višestrukih reakcija
OTA	Ohratoksin A
S/N	Odnos signala i šuma
TDI	*Tolerable Daily Intake,* Tolerirani dnevni unos
ZEA	Zearalenon

Sadržaj

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 3
   2.1. MIKOTOKSINI 4
   2.2. PLIJESNI PRODUCENTI MIKOTOKSINA 7
   2.3. Prisutnost u hrani 8
   2.4. Zakonska regulativa 9
   2.5. Analitičke tehnike i metode za određivanje mikotoksina 11
   2.6. Tekućinska kromatografija – tandemska masena spektrometrija (LC-MS/MS) 13
      2.6.1. Principi rada 14
      2.6.2. Validacija 17
3. EKSPERIMENTALNI DIO 18
   3.1. ZADATAK 19
   3.2. MATERIJALI I METODE 19
      3.2.1. Uzorkovanje 19
      3.2.2. Kalibracijske otopine mikotoksina 20
      3.2.3. Priprema uzorka 20
      3.2.4. Instrument i uvjeti 21
      3.2.5. Validacija 23
4. REZULTATI 24
5. RASPRAVA 35
6. ZAKLJUČCI 40
7. LITERATURA 43

1. UVOD

Žitarice na polju i tijekom skladištenja izložene su različitim vrstama plijesni, što za posljedicu može imati kontaminaciju mikotoksinima. Okolišni uvjeti koji pogoduju proizvodnji mikotoksina su vlaga i temperatura, koncentracija kisika, fizička oštećenja te prisutnost spora plijesni (Pleadin i sur., 2012). Prema podacima koji se nalaze na stranicama European Mycotoxin Awareness Network (EMAN, 2014), podržane od Europske komisije, Programa za kvalitetu života i upravljanje živim resursima, gruba procjena tijekom jedne godine je da 25 % biljaka koje se koriste za hranu ljudi i životinja sadrži manje ili veće količine mikotoksina, iako se procjenjuje da je postotak i mnogo viši (>90 %). Mikotoksini predstavljaju veliku opasnost u prehrambenoj industriji zbog potencijalne akutne toksičnosti, ali i karcinogenosti, imunotoksičnosti, reproduktivne i razvojne toksičnosti, itd.

Studije mikotoksina u Hrvatskoj u proteklih nekoliko desetljeća pokazale su češću kontaminaciju žitarica sa ZEA i fumonizinima (80 do 100 %) nego s OTA (do 40 %) ili AFB_1, koja je bila rijetka (Domijan i sur., 2005, Pleadin i sur., 2013). Kako je njihova pojavnost najčešća u žitaricama i proizvodima od žitarica, a koji predstavljaju i najzastupljenije namirnice u ukupnom unosu hrane, postoji opravdana potreba za razvojem novih metoda za njihovo određivanje. Zahtjev koji se stavlja na takve metode su istovremena analiza različitih mikotoksina dakle razvoj tzv. multimikotoksinskih metoda. Nadalje, takve metode moraju biti selektivne i specifične, te moraju biti robustne, odnosno osiguravati brzu i jednostavnu analizu te ponovljive rezultate. Danas se stoga sve više primijenjuje LC-MS/MS metoda za mikotoksinske analize kao jedna od najbržih i s najvećom osjetljivošću.

Ovaj rad je baziran na multimikotoksinskoj metodi koju su razvili Sulyok i sur. (2006) te su je kasnije nadopunili Malachová i sur. (2014). Metoda je korištena i za semi-kvantitativni *screening* pljesnivih uzoraka hrane kao što su kruh, sir, rajčice i jabuke, kao i za istraživanje same produkcije metabolita plijesni.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MIKOTOKSINI

Mikotoksini (*mykes* - grč. gljiva, *toxikon* - grč. otrov) su toksični sekundarni metaboliti određenih filamentoznih gljiva, prvenstveno plijesni, niske molekularne mase (M_r<700) (Turner i sur., 2009). Uglavnom se smatraju neizbježnim onečišćivačima hrane za ljude i životinje i predstavljaju veliki problem u cijelom svijetu. Najčešće onečišćuju žitarice, ali i druge namirnice kao što su voće, povrće, mahunarke, uljarice. Nemaju funkciju pri rastu i razvoju plijesni, ali su korisni u obrani od drugih mikroorganizama, uključujući druge plijesni. Biosinteza mikotoksina ovisi o uvjetima okoline odnosno fizikalno-kemijskim parametrima (količina slobodne vode – a_w, temperatura, količina kisika, kemijski sastav i pH supstrata), ali i o genetskoj predispoziciji soja plijesni da na povoljnom supstratu stvori sekundarne metabolite. Optimalna temperatura za proizvodnju većine mikotoksina je između 20 i 30 °C, a aktivitet vode treba biti iznad 0,7. Plijesni rastu u širokom rasponu pH, iako im izrazito kisela ili bazična podloga ne odgovara (Bennett i Klich, 2003; HAH, 2014).

Mikotoksini su kemijski vrlo različite strukture (**Slika 1**) s raznovrsnim biološkim učincima. Mogu ući u prehrambeni lanac čovjeka ili životinja direktnom ili indirektnom kontaminacijom. Kod direktne kontaminacije prehrambeni je materijal kontaminiran mikotoksikogenim plijesnima, dok do indirektne kontaminacije dolazi najčešće konzumacijom mesa, mlijeka ili jaja životinja koje su konzumirale hranu kontaminiranu mikotoksinima. Budući da plijesni produciraju mikotoksine, jedini način da oni dospiju u hranu je prilikom kontaminacije hrane plijesnima. Ako se uspješno spriječi porast plijesni pri svim koracima proizvodnje hrane, problem kontaminacije mikotoksinima bi nestao (Murphy i sur., 2006).

Mikotoksini uzrokuju bolesti, tzv. mikotoksikoze. Do razvoja bolesti dolazi nakon unošenja mikotoksina hranom u probavni sustav. Kad su prisutni u hrani u dovoljno velikim količinama, mikotoksini mogu imati toksični učinak od akutnog (visoke doze, kratko izlaganje), kroničnog (niže doze, dugotrajna izloženost), uz mutagene, karcinogene, teratogene, dermatotoksične, imunosupresivne, neurotoksične, i druge posljedice, te mogu dovesti i do smrti. Neki mikotoksini mogu reagirati s nukleinskim kiselinama i inhibirati biosintezu makromolekula DNA i RNA ili proteina. Drugi djeluju na strukturu i funkciju bioloških membrana ili komponenti citoskeleta, a neki mikotoksini imaju i usmjereno djelovanje na razna područja energijskog metabolizma. Danas se akutne mikotoksikoze javljaju u zemljama lošeg poljoprivredno-veterinarskog standarda, prerade, transporta i skladištenja hrane biljnog i životinjskog podrijetla (HAH, 2014).

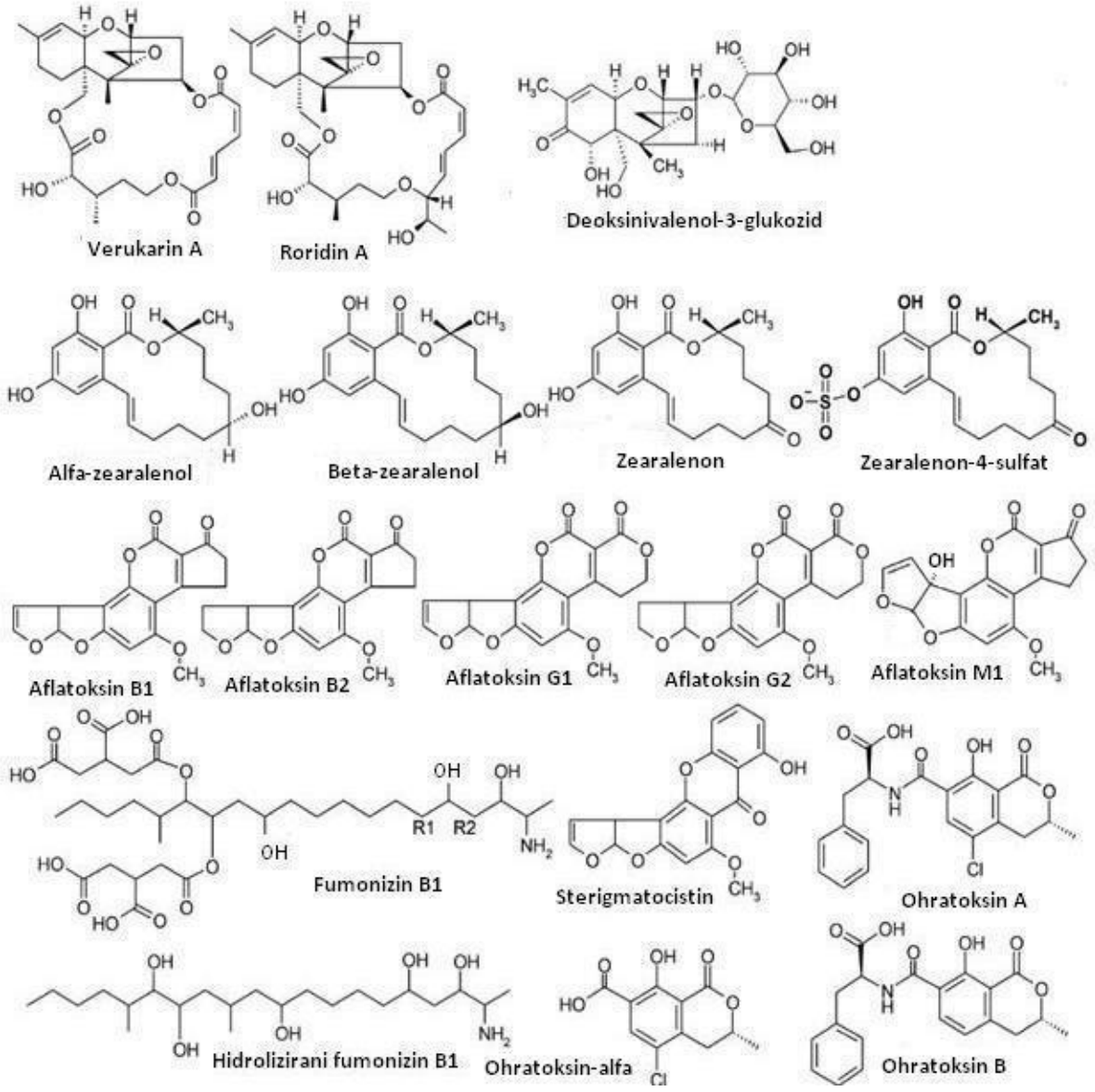
Dosad je poznato više od 400 različitih mikotoksina, a među njima su najznačajniji aflatoksini, ohratoksin A, fumonizin B1 i B2, zearalenon, T-2 i HT-2 toksin, deoksinivalenol, patulin i citrinin.

Geografska rasprostranjenost mikotoksina vezana je uz klimatske uvjete rasta pojedinih vrsta plijesni. Tako se npr. aflatoksini nalaze češće i u većim koncentracijama na krmivima u tropskom i suptropskom području (Južna Amerika, Oceanija, Indonezija), a ohratoksini, zearalenon i trihoteceni u umjerenom klimatskom području (Sjeverna Amerika, Europa, Azija i Rusija) (HAH, 2012).

Najvažniji prirodni predstavnici aflatoksina su aflatoksin B1 (AFB1), aflatoksin B2 (AFB2), aflatoksin G1 (AFG1), aflatoksin G2 (AFG2), aflatoksin M1 (AFM1), aflatoksin M2 (AFM2). Oznake B i G dobili su prema boji fluorescencije (eng. blue, green) a plijesni ih proizvode na žitaricama prije žetve, tijekom pohranjivanja i za vrijeme prerade. Najčešće se nalazi najtoksičniji i najjači karcinogen AFB1. AFM1 i AFM2 su hidroksilirani produkti AFB1 i AFB2, a nalaze se u mlijeku i jajima životinja i majčinom mlijeku (Peraica i Rašić, 2012). Na temelju epidemioloških istraživanja, Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC, 2012) je procijenila da postoji dovoljno dokaza da su aflatoksini karcinogeni za ljude.

Najvažniji ohratoksini su ohratoksin A (OTA), ohratoksin B, ohratoksin C i ohratoksin α. U prirodi se najčešće nalazi najtoksičniji OTA, koji se osim u žitaricama (ječam, raž, kukuruz, raž, riža, pšenica) i drugim namirnicama biljnog podrijetla (kava, orasi, kikiriki, začini, sušeno voće, grožđice, vino, pivo) može naći i u namirnicama životinjskog podrijetla (svinjsko i pileće meso, mlijeko, sir) i njihovim prerađevinama. Pretpostavlja se da je OTA mogući uzročnik endemske nefropatije, bolesti koja se javlja osim u Hrvatskoj i u nekim balkanskim zemljama (BiH, Bugarska, Kosovo, Srbija i Rumunjska), pa je zato prozvana balkanska endemska nefropatija (BEN) (Peraica i Rašić, 2012).

Najznačajniji *Fusarium* toksini uključuju nivalenol (NIV), deoksinivalenol (DON), T-2 toksin (T-2), HT-2 toksin (HT-2), zearalenon (ZEA), fuzarenon X (FUS X), diacetoksiscirpenol (DAS), 3-acetildeoksinivalenol (3-ADON) i 15-acetildeoksinivalenol (15-ADON) te fumonizine. Akutno trovanje fumonizinima kod domaćih životinja izaziva tzv. „konjsko ludilo“ (leukoencefalomalacija, fatalna bolest mozga) i svinjski pulmonarni edem. Akutno visoki unos T-2 toksina najčešće izaziva gastrointestinalne i imunotoksične posljedice. Više doze DON-a se povezuju s epidemijama bolesti probavnog trakta kod ljudi, a djeluje i imunotoksično. ZEA je endokrini disruptor zbog građe slične estrogenu (Klapec i Šarkanj, 2012).



Slika 1 Kemijske strukture nekih mikotoksina (Sulyok i sur., 2007)

Po nekim autorima, mikotoksini predstavljaju najvažniji faktor kemijskog rizika u prehrani, važniji od sintetičkih toksikanata, biljnih toksina, aditiva ili ostataka pesticida (Yu i sur., 2008). Većina mikotoksina kemijski je stabilna pa mogu preživjeti skladištenje i preradu namirnica, čak i tretiranje visokim temperaturama (npr. prilikom pečenja kruha, proizvodnje žitnih pahuljica) (Turner i sur., 2009). Prisutnost plijesni u namirnici ne znači nužno prisutnost mikotoksina

(ukoliko plijesan nije dovoljno porasla), ali s druge strane, odsutnost plijesni ne znači da nema mikotoksina jer se mogu zadržati u supstratu dugo nakon nestanka plijesni. Poseban problem predstavlja i pojava tzv. maskiranih mikotoksina koji se u hrani nalaze u promijenjenom obliku. Najčešće je riječ o kemijskoj vezi sa šećerima (npr. DON-3-glukozid, **Slika 1**), pri čemu se takav mikotoksin ne može detektirati uobičajenim metodama što daje krivu sliku o kontaminaciji analiziranog uzorka. Naime, maskirani mikotoksini se, djelovanjem hidrolitičkih enzima crijevne mikroflore, mogu osloboditi u probavnom traktu i djelovati toksično prema konzumentu (Klapec i Šarkanj, 2012).

2.2. PLIJESNI PRODUCENTI MIKOTOKSINA

Plijesni mogu rasti i proizvoditi mikotoksine na plodovima prije žetve, nakon žetve, tijekom procesiranja i skladištenja. Od više od 100 000 vrsta plijesni koliko ih je do danas poznato, preko 200 vrsta ima sposobnost proizvoditi mikotoksine. Za pojavnost plijesni i njihovih metabolita odgovorni su odgovarajući sadržaj vlage, pogodne temperature, prisutnost kisika, fizička oštećenja na usjevima te prisutnost gljivičnih spora.

Mnoge vrste plijesni iz roda *Penicillium* odgovorne su za sintezu čitavog niza mikotoksina. U namirnicama i krmi najraširenija je vrsta *Penicillium cyclopium*, čiji mnogi sojevi proizvode penicilinsku kiselinu. U hladnijim područjima prevladava *P. viridicatum,* koja proizvodi veliki broj mikotoksina, uključujući ohratoksin A. *Penicillium citrinum* plijesan je u manjem postotku zastupljena u odnosu na spomenute, ali su mnogi njezini sojevi odgovorni za proizvodnju citrinina. Ohratoksine proizvodi *Penicillium verrucosum* i više sojeva plijesni *Aspergillus* koji kontaminiraju žitarice i proizvode toksine u polju i u skladištima. Vrste plijesni roda *Fusarium* značajne po produkciji mikotoksina su *F. sporotrichioides, F. roseum, F. graminerarum*, *F. verticillioides*, *F. culmorum*, *F. subglutinans, F. semitectum, F. proliferatum* itd. Česte su u umjerenim i toplim klimatskim zonama, a najčešće kontaminiraju žitarice i proizvode od žitarica (kukuruz, zob, pšenicu, ječam, raž, rižu, soju, brašno, hranu za dojenčad, krmiva, slad, pivo), kikiriki, orahe i neke sireve. Nekoliko *Alternaria* vrsta su poznati producenti toksičnih sekundarnih metabolita. *A. alternata* producira brojne mikotoksine uključujući alternariol, alternariol monometil eter, altenuen, altertoksine I, II, III, tenuazonsku kiselinu i druge manje toksične metabolite. *Alternaria* metaboliti su česti kontaminanti voća, povrća, žitarica i uljarica (Ostry, 2008). Prema Europskoj agenciji za sigurnost hrane (EFSA) ne postoji dovoljno podataka o pojavnosti i toksičnosti *Alternaria* toksina (EFSA, 2011).

2.3. Prisutnost u hrani

Višegodišnja istraživanja u Hrvatskoj pokazuju da mikotoksini učestalo kontaminiraju žitarice (Domijan i sur., 2005), te je sustavna kontrola mikotoksina u hrani i hrani za životinje neophodna kako bi se izbjegli negativni učinci na zdravlje kao i ekonomski gubici u poljoprivredi. U Hrvatskoj se, temeljem godišnjeg plana uzorkovanja, radi kontrola spomenutih vrsta hrane na mikotoksine u laboratorijima za kontrolu hrane koji su ovlašteni za provođenje specijalizirane djelatnosti (HAH, 2012).

Nedavno istraživanje na različitim žitaricama (zob, pšenica, ječam, kukuruz) za ljudsku upotrebu i krmivu proizvedenim u RH utvrdilo je aflatoksine u 24 % uzoraka, a niti u jednom uzorku koncentracija nije bila veća od najveće dozvoljene količine prema važećim pravilnicima (Šegvić Klarić i sur., 2009). U opsežnom istraživanju koje je 2012. godine proveo HAH na uzorcima sastojaka krmiva (sačma soje, kukuruz) koja količinski čine najveći udio svih krmnih smjesa, koncentracija aflatoksina određena je ELISA metodom (HAH, 2012). Koncentracija aflatoksina iznad granice detekcije (1 μg/kg) nađena je u 23 % uzoraka kukuruza i 19 % uzoraka sačme soje, no niti u jednom uzorku nije bila veća od najveće dozvoljene koncentracije prema važećem pravilniku. Rezultati studije upućuju na minimalan rizik za ciljne životinje konzumacijom krmiva pripravljenih od analiziranih sirovina te na zanemariv rizik za potrošače proizvoda animalnog podrijetla koji potječu od životinja hranjenih ovim krmivima.

Fumonizini i plijesni koje proizvode fumonizine vrlo se često nalaze u kukuruzu uzgojenom u Hrvatskoj kao i u stočnoj hrani s višom pojavnošću FB1 u odnosu na FB2 (Šegvić Klarić i sur., 2009). Osim na kukuruzu, plijesni koje proizvode fumonizine nađene su i na pšenici, sojinoj sačmi i grašku (Ivić i sur., 2009). U već spomenutom opsežnom istraživanju zagađenosti kukuruza i sačme soje koje je provela HAH, fumonizini su utvrđeni u 56 % uzoraka kukuruza, dok u sačmi soje nisu detektirani (HAH, 2012). Koncentracije fumonizina u svim uzorcima kukuruza bila je mnogo niža od najviših dozvoljenih koncentracija prema Pravilniku o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje (MPRR, 2010). Iako je učestalost kontaminacije kukuruza s FB1 u Hrvatskoj velika, nađene koncentracije relativno su niske u odnosu na najviše dozvoljene koncentracije za pojedinu namirnicu. Zbog toga sam FB1 ne bi trebao biti javno-zdravstveni problem. Znanstvenici su zabrinuti zbog nalaza drugih mikotoksina u istim namirnicama jer o zajedničkom djelovanju FB1 s drugim mikotoksinima ima vrlo malo istraživanja (Peraica i Rašić, 2012). Jakšić i sur. su 2012. proveli istraživanje pojavnosti fumonizina i deoksinivalenola u pšenici i kukuruzu u Srbiji. Od 75 uzoraka pšenice, 50,7 % je bilo kontaminirano fumonizinima u rasponu koncentracije mikotoksina od 27 do 614 ng/g, dok je

65,3 % bilo kontaminirano DON-om u rasponu koncentracije mikotoksina od 64 do 1604 ng/g. Od 24 uzorka kukuruza, sadržaj fumonizinima u jednom uzorku i DON-a u tri uzorka je bio iznad dozvoljenih granica.

Ohratoksini kontaminiraju žitarice i proizvode toksine u polju i u skladištima. U nekoliko je istraživanja nađeno da se OTA nalazi češće ili u većim koncentracijama u uzorcima namirnica (kukuruz, pšenica) prikupljenim u endemskom kraju, jer je tu zabilježena učestala pojava Balkanske endemske nefropatije, nego u kontrolnim uzorcima (Pavlinić i sur., 2010). OTA je nađen i u hrani, kao i u različitim namirnicama iz drugih krajeva Hrvatske, a koje su namijenjene za ljudsku prehranu (grah, vino, kobasice, kulen) (Šegvić Klarić i sur., 2009).

ZEA se u Hrvatskoj može naći u sijenu, stočnoj hrani, kukuruzu, pšenici i ječmu (Šegvić Klarić i sur., 2009). Već je davne 1977. godine ZEA nađen tankoslojnom kromatografijom u 2,6 % uzoraka kukuruza (Balzer i sur., 1977). Niski postotak uzoraka pozitivnih na ZEA vjerojatno je bio uzrokovan sušnom godinom u kojoj je kukuruz uzorkovan jer je u kasnijim istraživanjima postotak kontaminiranih uzoraka bio od 10 do 100 % (Šegvić Klarić i sur., 2009). Kontaminacija krmiva, kukuruza i drugih žitarica jako ovisi o klimatskim prilikama. U novijim je istraživanjma koncentracija ZEA u hrani i krmivu daleko niža od dozvoljenih koncentracija, što ukazuje na poboljšanje agrotehničkih mjera u Hrvatskoj ili na promjenu mikroflore zbog globalnog zatopljenja (Domijan i sur., 2005).

Za sprječavanje dolaska hrane kontaminirane mikotoksinima na tržište bitna je komunikacija i obavještavanje javnosti o opasnostima i rizicima, te organiziranije pristupanje utvrđivanju količina mikotoksina u hrani i hrani za životinje. Kao važan mehanizam namijenjen upravo za ovu svrhu je i postojanje Sustava žurnog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje (RASFF) na nivou Europske unije kojim se zemlje članice informiraju o pojavi ovih, ali i raznih drugih, opasnosti porijeklom iz hrane. Tijekom 2005. godine uočen je značajan porast obavijesti o prisutnosti mikotoksina u hrani, čak 993, od kojih se 947 odnosilo na aflatoksine (HAH, 2014). U ukupnom broju obavijesti najveći broj se odnosio na orašaste plodove (kikiriki, pistacije, badem, lješnjak, orah), čak 828, zatim sušeno voće i povrće (82) te začinsko bilje (57). Ovaj trend nastavio se i tijekom sljedećih godina.

2.4. Zakonska regulativa

Najvažnijim mikotoksinima je, temeljem opsežne procjene sigurnosti i izloženosti, provedena karakterizacija rizika te utvrđen parametar sigurne izloženosti (TDI) i postavljene maksimalne razine koje se mogu nalaziti u hrani. Podskupine populacije koje bi mogle biti izloženije su one s

višim udjelom žitarica i proizvoda, uključujući dojenčad i malu djecu (npr. dječja hrana, kašice, žitne pahuljice).

Prema Zakonu o kontaminantima NN 39/13 (HS, 2013), Uredbi Komisije Europskih zajednica br. 1881/2006 (EC, 2006) o najvećim dopuštenim količinama kontaminanata u hrani, Znanstveni odbor za hranu izrazio je svoje mišljenje u pogledu aflatoksina, ohratoksina A, patulina te nekih toksina *Fusarium* plijesni te postavio najveće dopuštene količine navedenih mikotoksina u hrani. Prema Uredbi Komisije Europskih zajednica br. 212/2014 od 6. ožujka 2014. godine kao nadopuna gore navedenog pravilnika, Europska komisija je postavila maksimalnu dozvoljenu količinu citrinina u dodacima prehrani na bazi riže fermentirane s crvenim kvascem *Monascus purpureus* i ona iznosi 2000 µg/kg (EC, 2014).

U pogledu aflatoksina, Znanstveni odbor za hranu izrazio je u svom mišljenju od 23. rujna 1994. da su aflatoksini genotoksične karcinogene tvari. Na temelju tog mišljenja, primjereno je ograničiti ukupni sadržaj aflatoksina u hrani (zbroj aflatoksina B1, B2, G1 i G2) kao i pojedinačni sadržaj aflatoksina B1 koji je daleko najtoksičniji sastojak. Prema navedenoj Uredbi aflatoksin je reguliran za sve žitarice i proizvode od žitarica, uključujući prerađene proizvode na bazi žitarica te najveća dopuštena količina B1 aflatoksina iznosi 2,0 µg/kg, a zbroja B1, B2, G1 i G2 aflatoksina 4,0 µg/kg. Za prerađenu hranu na bazi žitarica i hranu da dojenčad i malu djecu najveća dopuštena količina B1 aflatoksina je 0,10 µg/kg.

EFSA je na zahtjev Komisije, 4. travnja 2006. donijela znanstveno mišljenje u pogledu OTA u hrani i utvrdila tolerirani tjedni unos (TWI) od 120 ng/kg tjelesne težine. Ohratoksin A reguliran je za neprerađene žitarice, sve proizvode dobivene iz neprerađenih žitarica, uključujući prerađene proizvode od žitarica te žitarice namijenjene neposrednoj ljudskoj prehrani, te za prerađenu hranu na bazi žitarica. Najniže dozvoljene koncentracije OTA propisane su za prerađenu hranu na bazi žitarica i hranu da dojenčad i malu djecu (0,50 µg/kg), a najviše za neprerađene žitarice (50 µg/kg).

U pogledu patulina Znanstveni odbor za hranu je 8. ožujka 2000. odobrio privremeni maksimalni tolerirani dnevni unos (PMTDI) od 0,4 µg/kg tjelesne težine.

U pogledu toksina *Fusarium* plijesni, Znanstveni odbor za hranu usvojio je nekoliko mišljenja, kojima je ocijenio deoksinivalenol u prosincu 1999. utvrđujući TDI od 0,2 µg/kg tjelesne težine, zearalenon u lipnju 2000. utvrđujući privremeni TDI od 0,2 µg/kg tjelesne težine, fumonizine u listopadu 2000. utvrđujući TDI od 2 µg/kg tjelesne težine, nivalenol u listopadu 2000. utvrđujući privremeni TDI od 0,7 µg/kg tjelesne težine te toksine T-2 i HT-2 u svibnju 2001. utvrđujući zajednički privremeni TDI od 0,06 µg/kg tjelesne težine.

DON je reguliran za neprerađene žitarice, neprerađenu tvrdu pšenicu, zob i kukuruz, žitarice namijenjene za neposrednu prehranu ljudi, tjesteninu, kruh, prerađenu hranu na bazi žitarica, te za frakcije meljave kukuruza. Najniže dozvoljene koncentracije DON-a propisane su za prerađenu hranu na bazi žitarica (200 µg/kg), a najviše za neprerađenu tvrdu pšenicu i zob te neprerađeni kukuruz (1750 µg/kg). Zearalenon je reguliran za neprerađene žitarice, žitarice namijenjene za neposrednu prehranu ljudi, kruh, prerađenu hranu na bazi žitarica, te za frakcije meljave kukuruza. Najniže dozvoljene koncentracije DON-a propisane su za prerađenu hranu na bazi žitarica (20 µg/kg), a najviše za neprerađeni kukuruz (200 µg/kg). Fumonizini su regulirani za neprerađeni kukuruz, kukuruz namijenjen neposrednoj ljudskoj prehrani, prerađenu hranu na bazi kukuruza te za frakcije meljave kukuruza. Najniže dozvoljene koncentracije fumonizina (ukupno B1 i B2) propisane su za prerađenu hranu na bazi kukuruza (200 µg/kg), a najviše za neprerađeni kukuruz (4000 µg/kg).

2.5. Analitičke tehnike i metode za određivanje mikotoksina

Činjenica da je većina mikotoksina toksična već kod niskih koncentracija ukazuje na potrebu za osjetljivim i pouzdanim metodama za njihovu analizu. Od ključne je važnosti uzimanje reprezentativnog uzorka budući da mikotoksini nisu jednako raspoređeni u zrnu žitarice ili krmivu (Turner i sur., 2008). Simultana analiza većeg broja mikotoksina može biti problem zbog različite strukture i svojstava ovih spojeva. Poseban problem predstavljaju i maskirani mikotoksini za čiju je kvantifikaciju nužno postojanje odgovarajućih standarda ili se uzorak može podvrći kiselinskoj, alkalnoj ili enzimskoj hidrolizi radi oslobađanja mikotoksina iz konjugata. Posljednjih nekoliko godina raste potražnja za jednostavnim, brzim i jeftinijim načinima analize pa su tako na terenu popularni testovi za brzu kvalitativnu analizu poput lateralnog protočnog testa (lateral flow test) te prijenosni uređaji za brzu kvantitativnu analizu (Goryacheva i De Saeger, 2011).

Ekstrakcija mikotoksina iz uzorka ovisi o strukturi ciljnog spoja, pri čemu se polarni metaboliti (npr. fumonizini) ekstrahiraju polarnim otapalima, dok će se organska otapala koristiti za izdvajanje hidrofobnih spojeva poput aflatoksina. Odabir ekstrakcijskog sredstva ili kombinacije otapala ovisi i o vrsti matriksa u kojem se mikotoksini nalaze. Nakon ekstrakcije, kod provedbe većine metoda osim ELISA postupaka te onih koje uključuju primjenu visokoosjetljivih LC-MS/MS uređaja, slijedi predtretman uzoraka tj. prečišćavanje ekstrakta.

Metode koje se primijenjuju uključuju tekućinsko-tekućinsku ekstrakciju koja se bazira na različitoj topljivosti analita u vodenoj i nemješivoj fazi organskog otapala. Postupak je dugotrajan,

ovisan o matriksu i analitima koji se određuju (Turner i sur., 2008). Ekstrakcija superkritičnim fluidima iz matriksa je vrlo učinkovita, ali nije pogodna za rutinsku analizu zbog visoke cijene i potrebe za posebnom opremom. Ekstrakcija na čvrstoj fazi (solid phase extraction, SPE) kombinira ekstrakciju i prečišćavanje te uključuje primjenu jednokratnih kromatografskih kolona kroz koje se ekstrakt propušta. Ovisno o čvrstoj fazi (C18, silikagel, silikati, polimerne smole, ionsko-izmjenjivačke tvari, antitijela, polimeri s molekularnim biljegom (moleculary imprinted polymers, MIP), aptameri i dr. (Maragos, 2009)) nečistoće se zadržavaju na koloni ili se ispiru s kolone, nakon čega se eluira čisti ekstrakt s kolone. SPE je vrlo popularna tehnika i primijenjuje se u brojnim protokolima ne samo zbog brzine i manje potrošnje otapala, nego i zbog učinka koncentriranja analita koje neke izvedbe kolona omogućuju. Također se sve više koristi mikroekstrakcijska SPME (solid phase microextraction) metoda kod koje se primijenjuje sonda na čijem se vrhu nalazi sloj čvrste faze koji se uranja u ekstrakt (Turner i sur., 2009). Za analizu krutina koristi se i disperzija matriksa i čvrste faze (matrix solid phase dispersion, MSPD), pri čemu se miješaju čvrsta faza (dijatomejska zemlja) i uzorak, nakon čega se mješavina prebaci u kolonu i ekstrahira odgovarajućim otapalom.

Separacija analita može se provesti i kromatografskim metodama: tankoslojnom kromatografijom (TLC), visokotlačnom tekućinskom kromatografijom (HPLC), plinskom kromatografijom (GC), ili kapilarnom elektroforezom (CE) (Turner i sur., 2009). Moderna analiza mikotoksina se danas uglavnom oslanja na primjenu HPLC-a koji koristi različite kolone za razdvajanje i prečišćavanje toksina na temelju njihove polarnosti. Detekcija se obavlja uz UV/Vis, fluorescentne detektore, masene spektrometre (MS), itd. Ponekad je nužna pred- ili postkolonska derivatizacija mikotoksina prije detekcije, iako kod većine metoda detekciji prethodi samo prečišćavanje na SPE kolonama i separacija na HPLC-u.

U zadnje je vrijeme vrlo popularna postala enzimskoimunološka metoda ELISA zbog relativno niske cijene, visoke specifičnosti i jednostavne primjene. Kompetitivna verzija tehnike se najčešće koristi i uključuje dodatak konjugata toksina i enzima ekstraktu uzorka. Vezanje konjugata za mikrotitarske pločice s imobiliziranim antitijelom je, zbog kompeticije, obrnuto proporcionalno količini mikotoksina u uzorku, pri čemu se dodaje supstrat koji s enzimom daje obojeni produkt koji se određuje spektrometrijski.

Za postizanje što boljih rezultata spektroskopske se tehnike vrlo često kombiniraju sa separacijskim, pa je riječ o spregnutim tehnikama: tekućinska kromatografija – masena spektrometrija (LC-MS i LC-MS/MS), plinska kromatografija – masena spektrometrija (GC-MS), kapilarna elektroforeza – masena spektrometrija (CE-MS), itd. GC je obično povezan s MS-om,

plameno-ionizacijskim detektorom ili Fourierovim transformacijskim infracrvenim spektrometrom za detekciju hlapljivih tvari.

2.6. Tekućinska kromatografija – tandemska masena spektrometrija (LC-MS/MS)

Tekućinska kromatografija (LC) je analitička tehnika za razdvajanje više komponenata u uzorku. Razdvajanje je bazirano na interakciji analita različitih fizikalnih i kemijskih svojstava između stacionarne faze (pakovanja kolone) i mobilne faze (eluenta). Ovisno o svojstvima dvije faze razlikujemo LC normalnih faza (visoko polarna stacionarna faza, nepolarna mobilna faza), LC obrnutih faza (nepolarna stacionarna faza, polarna mobilna faza), ionsko-izmjenjivačku LC (privlačenje nabijenih čestica sa suprotno nabijenim česticama stacionarne faze), LC isključenjem (razdvajanje prema veličini) ili LC hidrofilnih interakcija (HILIC) (odvajanje polarnih čestica na hidrofilnoj stacionarnoj fazi). Za LC-metode, veliki broj stacionarnih i mobilnih faza je dostupan za optimizaciju i separaciju i LC je široko primijenjena u analitičkim i biokemijskim analizama.

Masena spektrometrija (MS) je analitička tehnika kod koje se nabijeni atomi ili molekule odvajaju s obzirom na njihov omjer mase i naboja (*m/z*). Princip MS-a je ionizacija atoma ili molekula iz uzorka, potom njihova separacija te detekcija. Pomoću takve analize moguće je odrediti kvalitativni sastav analiziranog uzorka, primjerice molekulsku masu ili kemijski sastav, a uz odgovarajući standard i kvantitativni sastav. Kod tandemske MS/MS kombinira se masena spektrometrija u dva koraka s fazom fragmentacije između. MS/MS se može izvoditi kao *tandem-in-space* ili *tandem-in-time*. Kombinacija tekućinske kromatografije s MS/MS-om osigurava „najidealnije“ odvajanje i identifikaciju analita iz smjese što se u tom stupnju ne može postići korištenjem samo jedne od navedenih metoda (Varga, 2010).

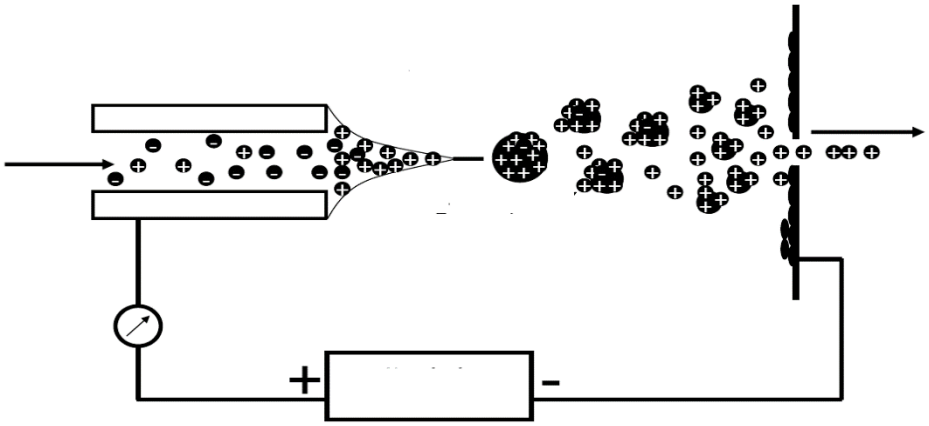
Uzimajući u obzir moguću kontaminaciju prehrambenih proizvoda od strane više različitih mikotoksina i produkciju različitih vrsta mikotoksina koje producira ista plijesan, trend je razviti metode prikladne za istovremenu analizu različitih mikotoksina – multimikotoksinske metode (Malachová i sur., 2014; Sulyok i sur., 2006).

2.6.1. Principi rada

Prije same provedbe LC-MS/MS-a, uzorak se prečišćava, zatim podvrgava kromatografskom razdvajanju i naposljetku masenoj spektrometriji (Weng i Halls, 2001). Prilikom analize može se koristiti interni standard čija molekularna struktura treba biti identična ili što sličnija analitu, dok molekularna masa mora biti različita. Prije analize uzorka masenom spektrometrijom dolazi do promjene faze tekuće-plinovito, a što se postiže ionizacijom. Ionizacija neutralnih molekula predstavlja njihovo prevođenje iz krutog ili tekućeg stanja u plinovito (desorpcija), a svrha ionizacije je lakše manipuliranje ionima nego neutralnim molekulama (The Astbury Centre for Structural Molecular Biology, 2011).

Ionizacija elektroraspršivanjem (ESI) je jedan od najzastupljenijih načina ionizacije kompatibilan sa svim masenim analizatorima. Ionizacija može biti pozitivna i negativna (ovisno o naponu na kapilari i kolektorskoj elektrodi), a ionizacija i nebulizacija se događaju pri atmosferskom tlaku. Optimalna temperatura ionizacije je iznad 100 °C i događa se u struji dušika. Stvaranje iona pomoću ionizacije raspršivanjem (ESI) ovisi o polarnosti analita, odabiru otapala te o eventualnim dodanim modifikatorima za stabilizaciju iona, dok onečišćenja iz otapala negativno utječu na ionizaciju i povečavaju šum na kromatogramu.

Ionizacija se odvija tako da pokretna faza i analit ulaze u ionizator kroz kapilaru (iglu), koja ujedno predstavlja elektrodu pod visokim naponom (2-5 kV) (**Slika 2**). Na vršku igle se formira maglica sastavljena od niza kapljica otapala i nešto uparenog otapala. Kolektorska elektroda privlači tako nabijene kapljice i daje im dodatno ubrzanje. Kako otapalo otparava, tako se kapljice smanjuju. Nakon što se dovoljno smanje da se svi mogući ioni nalaze na površini kapljica, sile kulonskog odbijanja postaju veće od sila napetosti površine i kapljice se otparavaju ili se razbiju na manje kapljice. Analit kristalizira ili prelazi u plinsku fazu. Ioni analita u trenutku napuštanja površine nisu u potpunosti bez otapala, oko njih se, naime, stvara sfera uparenog otapala. Nakon otparavanja kapljica, otvor iza kojeg je visoki vakuum i analizator privlači tako formirane kvazimolekulske ione (Cindrić i sur., 2009).



Slika 2 Shematski prikaz ESI ionizatora (Marquet i Lacahatre, 1999)

Ionizacija uzoraka može se provoditi pod vakuumom ili pri atmosferskom tlaku. Od ionizacijskih tehnika kod atmosferskog tlaka (API) koriste se ionizacija elektroraspršivanjem (ESI), kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (APCI), svjetlosna ionizacija pri atmosferskom tlaku (APPI), ionizacija laserom pri atmosferskom tlaku (APLI), ionizacija soničnim sprejom (SSI), bombardiranje brzim atomima (FAB), laserska desorptivna ionizacija potpomognuta matriksom (MALDI), ionizacija poljem (FI), te desorpcija poljem (FD) (Polletini, 2006).

Razdvojeni ioni se nakon ionizacije ubrzavaju do analizatora mase u kojem se odjeljivanje iona prema njihovom omjeru mase i naboja (*m/z*) odvija pomoću elektromagnetskog polja. Ioni koji napuštaju analizator mase odlaze do detektora, a dobivena informacija se bilježi pomoću odgovarajućeg sustava (računala) te se dobiveni podaci obrađuju pomoću odgovarajućeg softvera.

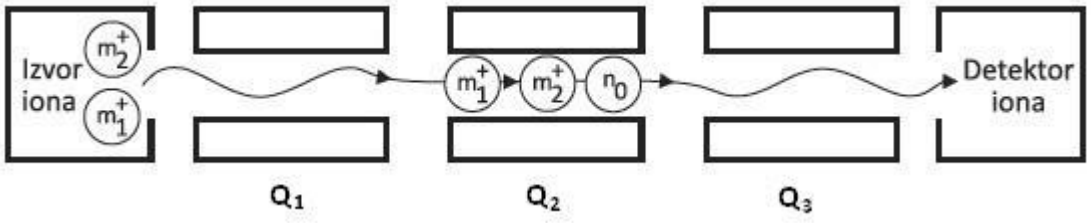
Maseni analizatori se mogu podijeliti na sektorske, ionske zamke, time-of-flight (TOF) uređaje, kvadrupole, FT (Fourier transform) masene analizatore, te uređaje s kombiniranim analizatorima mase. Ionska zamka je analizator pulsirajuće mase jer se zarobljeni ioni izbacuju do detektora prema svojoj masi, a nakon završenog ciklusa ostali ioni se propuštaju preko ionske zamke i ciklus se ponavlja. Ioni se hvataju u središtu prstenaste elektrode, a ionska zamka drži ione u statičnom položaju, za razliku od kvadrupola.

Kod ionske zamke se mjerenje, izolacija odabranih komponenti i fragmentacija odvijaju u istom prostoru (Cutillas i Timms, 2010). Postoje tri različita tipa ionske zamke, a to su kvadrupol ionska zamka, Penning ionska zamka i Kingdon ionska zamka (orbitrap).

Kvadrupol ionska zamka sastoji se od prstenaste elektrode i dva linearna štapa, iako u novije vrijeme postoje uređaji sa setom od četiri elektrode i dvije elektrode. Najčešće se koristi od svih

ionskih zamki zbog pogodnih dimenzija, velike osjetljivosti i brzine snimanja spektra, umjerenog vakuuma i niske cijene.

Uređaji koji se sastoje od kombiniranih analizatora ujedinjuju prednosti svakog od kombiniranih analizatora, a dijele se na trostruke kvadrupole, Q-Trap, qTOF, kvadrupol ionska zamka-orbitrap i kvadrupol ionska zamka-FT (Cutillas i Timms, 2010). Trostruki kvadrupol sastoji se od četiri valjkaste paralelne elektrode (**Slika 3**). Nasuprotne elektrode su spojene i stvaraju jednak napon u isto vrijeme. Primijenjeni napon čine istosmjerni (DC) i izmjenični (RF) napon. Kada ion uđe u kvadrupol privlače ga suprotno nabijene elektrode a kako se napon mijenja periodički, ion uslijed privlačenja i odbijanja od elektrode putuje spiralnom putanjom prema kraju kvadrupola.



Slika 3 Shematski prikaz trostrukog kvadrupola (Cindrić i sur., 2009)

Trostruki kvadrupol sa i bez ionske zamke može se upotrijebiti u nekoliko modova za skeniranje: Q_1 skeniranje, Q_1 višestruko ionsko skeniranje, SRM skeniranje itd. Poseban tip SRM skeniranja je MRM (engl. – Multiple Reaction Monitoring) kod kojega prvi kvadrupol Q_1 odabire ion prekursor analita, dok drugi kvadrupol (Q_2) služi kao kolizijska ćelija gdje dolazi do interakcije iona s kolizijskim plinom (He, N_2, Ar). Nakon sudara s molekulama plina nastaju fragmenti iona prekursora koji se primjenom napona odvode iz kolizijske ćelije te se na temelju omjera mase i naboja odvajaju u trećem kvadrupolu (Q_3).

Kod MRM skeniranja ne skenira se cijelo područje mase nego se podesi nekoliko *m/z* vrijednosti tako da uređaju treba manje vremena za skeniranje, a rezultati su precizniji. Treći kvadrupol može se zamijeniti i s kvadrupol ionskom zamkom kako bi se osigurala kompletna fragmentacija iona prekursora podešena u Q_1. Stvaranje fragmentiranih iona ovisi o nekoliko faktora kao što su jakost kemijske veze, stabilnost produkta, vrijeme između formiranja iona i njegove detekcije itd.

Maseni spektrometar radi u vakuumu koji se postiže u dva stupnja. Rad u vakuumu je bitan jer bi u suprotnom prosječan srednji put, koji predstavlja prosječnu udaljenost između kolizija jednoga iona, bio premaleni analit nikada ne bi dospio do detektora (Varga, 2010).

Nedostatak kvadrupola je niska rezolucija i niska pouzdanost određene mase komponente koja se analizira, ali je moćan alat u analizama u kojima je već poznato kako će se komponenta

fragmentirati. Cilj je detektirati i kvantificirati komponentu u vrlo niskim koncentracijama (Cutillas i Timms, 2009). Nakon izlaska iz masenog analizatora analizirana komponenta s jednim, točno određenim omjerom mase i naboja, dolazi do detektora, koji uglavnom rade na principu proizvodnje električnog signala kada ion dođe do njih. Dobivena informacija se bilježi pomoću računala i obrađuje pomoću odgovarajućeg softvera.

2.6.2. Validacija

Prije nego se metoda odobri za korištenje u analizi mora joj se utvrditi valjanost. Validacijom analitičke metode se osigurava da je odabrana metoda prikladna za kvantitativno mjerenje određenih tvari u specifičnom matriksu. Osnovni parametri validacije su točnost, preciznost, selektivnost, osjetljivost, ponovljivost i stabilnost. Prihvatljivost analitičkih podataka dobivenih metodom je stoga u izravnoj vezi s kriterijima korištenim u validaciji metode (Habschied i sur., 2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog rada bio je utvrditi pojavnost mikotoksina u žitaricama žetve 2013. u Hrvatskoj pomoću LC/MS-MS-a.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Uzorkovanje

Dvadeset i četiri uzorka pšenice (n=10), ječma (n=12) i zobi (n=2) (**Tablica 1**) namijenjena ljudskoj prehrani su prikupljena iz sjeverne, centralne, istočne i južne Hrvatske. Nakon postupka četvrtanja, uzeti su reprezentativni uzorci od po 100 g pojedinog uzorka žitarice te su uzorci samljeveni, spremljeni u plastičnu vrećicu te zamrznuti na -20°C. Zamrznuti uzorci su poslani u Austriju na IFA Tulln i uskladišteni na -20°C do dana analize.

Tablica 1 Podrijetlo analiziranih uzoraka žitarica

Žitarica	Mjesto	Regija Hrvatske
pšenica	Beli Manastir	istočna
pšenica	Čakovec	sjeverna
pšenica	Đakovo	istočna
pšenica	Koprivnica	sjeverna
pšenica	Križevci	sjeverna
pšenica	Požega	centralna
pšenica	Slatina	istočna
pšenica	Valpovo	istočna
pšenica	Vinkovci	istočna
pšenica	Zadar	južna
ječam	Čakovec	sjeverna
ječam	Daruvar	sjeverna
ječam	Križevci	sjeverna
ječam	Nova Gradiška	centralna
ječam	Nova Gradiška	centralna
ječam	Nova Gradiška	centralna
ječam	Nova Gradiška	centralna
ječam	Nova Gradiška	centralna
ječam	Nova Gradiška	centralna
ječam	Nova Gradiška	centralna
ječam	Nova Gradiška	centralna
ječam	Valpovo	istočna
zob	Valpovo	istočna
zob	Čakovec	sjeverna

3.2.2. Kalibracijske otopine mikotoksina

Pojedinačne otopine standarda su pripremljene otapanjem čvrste tvari 295 bakterijskih i fungalnih toksina (Malachová i sur., 2014) u acetonitrilu, ili rjeđe u metanolu, metanol/vodi 1:1 ili u vodi. Pojedinačne otopine standarda su kombinirane u 23 radne otopine i uskladištene na -20°C.

Za svaku analizu multimikotoksinska otopina (mastermix) je svježe pripremljena mješajući 23 radne otopine. Priprema treba biti što brža te se mora izbjegavati izloženost svjetlu zbog nekih fotosenzibilnih mikotoksina. Za postizanje željene koncentracije otopina standarda (STD 1-1000) mastermix se razrjeđuje s otapalom za razrjeđivanje (DS) (acetonitril:voda:octena kiselina; 20:79:1) kako slijedi:

- STD 1: 250 µL mastermix + 250 µL DS
- STD 3: 300 µL STD 1 + 700 µL DS
- STD 10: 100 µL STD 1 + 900 µL DS
- STD 30: 30 µL STD 1 + 970 µL DS
- STD 100: 20 µL STD 1 + 980 µL DS
- STD 300: 300 µL STD 100 + 700 µL DS
- STD 1000: 100 µL STD 100 + 900 µL DS
- Slijepa proba: 500 µL otapala za ekstrakciju (ES) + 500 µL DS

3.2.3. Priprema uzorka

Priprema uzorka je odrađena prema Sulyoku i sur. (2006): 5,00 ± 0,02 g samljevene žitarice je prenešeno u polipropilenske tube za centrifugu. Dodano je 20 mL otapala za ekstrakciju (acetonitril/voda/octena kiselina, 79:20:1) i smjesa je vorteksirana 30 sekundi. Ekstrakcija je nastavljena na GFL3017 tresilici (Burgwedel, Njemačka) na 180 okretaja/min u horizontalnom položaju 90 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon ekstrakcije, tube su ostavljene par minuta da se formira talog. Zatim je 500 µL sirovog ekstrakta prenešeno u HPLC vialice te razrijeđeno sa istim volumenom otapala za razrjeđivanje (DS). Pet µL dobivene otopine je injektirano u LC-MS/MS sistem bez prethodnog pročišćavanja.

3.2.4. Instrument i uvjeti

Mjerenje mikotoksina izvršeno je prema validiranoj metodi prema Malachovoj i sur. (2014). Za izvođenje analize upotrjebljen je QTRAP 5500 LC-ESI-MS/MS sustav (AB SCIEX, Foster City, CA, US) s ionskim raspršivačem kao ionskim izvorom (ESI) i HPLC sustavom serije 1290 (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka). Kromatografsko razdvajanje izvršeno je pri 25 °C na Gemini C18 koloni (Phenomenex, Torrance, CA, US). Eluiranje je provedeno pomoću metanola/vode/octene kiseline (eluent A 10:89:1 i eluent B 97:2:1). Oba eluenta su sadržavala i 5 mM amonijeva acetata. Prikaz ESI-MS/MS parametara za najrelevantnije i detektirane mikotoksine dan je u **Tablici 2**. Analiti su kvantificirani u pozitivnom i negativnom sMRM modu. Kvalitativna i kvantitativna obrada podataka rađena je pomoću softvera Analyst version 1.5.2, odnosno MultiQuant 2.0 softvera.

Tablica 2 Popis najvažnijih i detektiranih analita, njihovih producenata i ESI-MS/MS parametara

Analit	Producenti	Vrijeme zadržavanja (min)	m/z prekursorskog iona	DP (V)	m/z produktnih iona [a]	Kolizijska energija (V) [a]	CXP (V) [a]
15-hidroksikulmorin	*Fusarium* spp.	10,2	272,2	71	237,2/193,2	17/25	16/12
Aflatoksin B1	*Aspergillus* spp.	8,7	313,1	106	285,2/128,1	33/91	16/10
Alternariol	*Alternaria* spp.	11	257	-100	213/215	-34/-36	-11/-11
Altertoksin-1	*Alternaria* spp.	10,2	351,1	-105	315,1/263,2	-24/-44	-7/-11
Alternariol monometil eter	*Alternaria* spp.	12,8	271,1	-95	256/227	-32/-50	-13/-9
Apicidin	*Fusarium* spp.	12,8	622,4	-135	462,2/209	-32/-68	-11/-9
Bovericin	*Fusarium* spp.	14,4	801,5	116	244,2/384,4	47/73	12/10
Brevianamid F	*Penicillium* spp.	7,4	284,1	86	130,1	31/75	8/16
Citrinin	*Penicillium* spp.	11,8	251,1	56	233,2/205,2	25/39	14/12
Kulmorin	*Fusarium* spp.	12,2	256,2	71	221,3/203,2	17/21	14/12
Kurvularin	*Penicillium* spp.	9,7	291,1	-90	122,9/189,9	-38/-40	-7/-9
Dehidrokurvularin	*Penicillium* spp.	8,8	289	-135	175,1/123	-40/-36	-7/-11
Deoksinivalenol	*Fusarium* spp.	5,8	355,1	-70	265,2/59,2	-22/-40	-13/-8
DON-3-glukozid	*Fusarium* spp.	5,6	517,3	-80	427,1/59,1	-30/-85	-11/-7
Emodin	*Penicillium* spp.	14,3	269	-100	224,9/240,9	-38/-38	-11/-13
Eniatin A	*Fusarium* spp.	14,9	699,4	106	210,1/228	43/47	12/18
Eniatin A1	*Fusarium* spp.	14,6	685,4	96	210,1/228,2	41/49	8/20
Eniatin B	*Fusarium* spp.	14	657,5	81	196,3/214,1	45/47	18/18
Eniatin B1	*Fusarium* spp.	14,3	671,4	111	196/210	43/41	12/12
Eniatin B3	*Fusarium* spp.	13,2	629,4	76	196,3/214,3	41/41	10/12
Ergometrin	*Claviceps purpurea*	5,3	326,2	96	208,2/223,2	39/35	14/14
Ergozinin/Ergozin	*Claviceps purpurea*	7,3	548,4	86	223,2/208,2	45/57	14/12
Fumonizin B1	*Fusarium* spp.	9,4	722,5	121	334,4/352,3	57/55	4/12
Fumonizin B2	*Fusarium* spp.	11,3	706,5	126	336,4/318,4	59/51	8/2
HT-2 toksin	*Fusarium* spp.	9,7	442,2	76	263,1/345,1	21/27	19/20
Infektopiron	*Alternaria* spp.	9,4	265	71	83/203,1	35/19	10/10
Kojična kiselina	*Aspergillus* spp.	3,2	143	86	113/69	31/23	10/10
Makrosporin	*Alternaria* spp.	14,1	283	-95	268,1/225	-34/-50	-1/-19
Nivalenol	*Fusarium* spp.	4,8	371,1	-75	281,1/59,1	-22/-42	-15/-7
Ohratoksin A	*Aspergillus* spp.	11,9	404	91	239/102	37/105	16/14
Rubelin D	*Mycosphaerella rubella*	12,8	541,1	-105	360,1/378	-42/-28	-7/-9
Sekalonična kiselina	*Penicillium* spp.	13,3	639,2	121	561,2/589,2	37/33	8/8
Tentoksin	*Alternaria* spp.	10,3	413,3	-105	141/271,1	-30/-24	-11/-5
T-2 toksin	*Fusarium* spp.	10,7	484,3	56	215,2/185,1	29/31	18/11
Triptofol	kvasci	7,8	162,2	81	117,1/143,1	33/35	6/14
Zearalenon	*Fusarium* spp.	11,9	317,1	-110	131,1/175	-42/-34	-8/-13

DP=Napon za razbijanje; CXP=Izlazni potencijal kolizijske čelije; [a] =Vrijednosti su dane u odnosu kvantifikator ion/kvalifikator ion

3.2.5. Validacija

Spiking (obogaćivanje). Obogaćivanje uzoraka je provedeno kako bi se utvrdio prividni recovery (iskorištenje) ciljanih metabolita. Tri najmanje kontaminirana uzorka (svaki 0,25 ± 0,002 g) su obogaćena sa 100 µL mastermixa, dobro izmiješani te uskladišteni na sobnu temperaturu na tamnom mjestu u svrhu uravnoteženja metabolita i matriksa. Sljedeći dan dodan je 1 mL ES i smjesa je stavljena na tresilicu na 180 okretaja/min u horizontalnom položaju 90 minuta. Nakon toga, 300 µL ekstrakta je razrijeđeno s 300 µL DS, vorteksirano 30 sekundi i injektirano u LC-ESI-MS/MS bez prethodnog pročišćavanja.
Prilikom validacije određivani su validacijski parametri linearnost, LOD te iskorištenje.

Linearnost. Nakon izvršene kalibracije dobiveni rezultati prikazani su grafički kako bi se mogla izračunati linearnost. Za svaki mikotoksin prikazana je ovisnost površine dobivenog pika nakon MRM analize i koncentracije mikotoksina, te su dobivene krivulje linearizirane, odnosno korigirane linearnom regresijom. Na temelju odstupanja krivulje od pravca linearne regresije određena je linearnost metode. Općeprihvaćeni kriterij linearnosti je koeficijent determinacije (R^2) veći od 0,99.

Limit detekcije. Za određivanje LOD-a korištene su kalibracijske krivulje temeljem kojih su određene vrijednosti omjera signala i šuma (S/N) za svaki mikotoksin te je izračunat LOD korištenjem formule (**1**):

$$LOD = \frac{C_{MIN} \times 3}{S/N} \qquad (1)$$

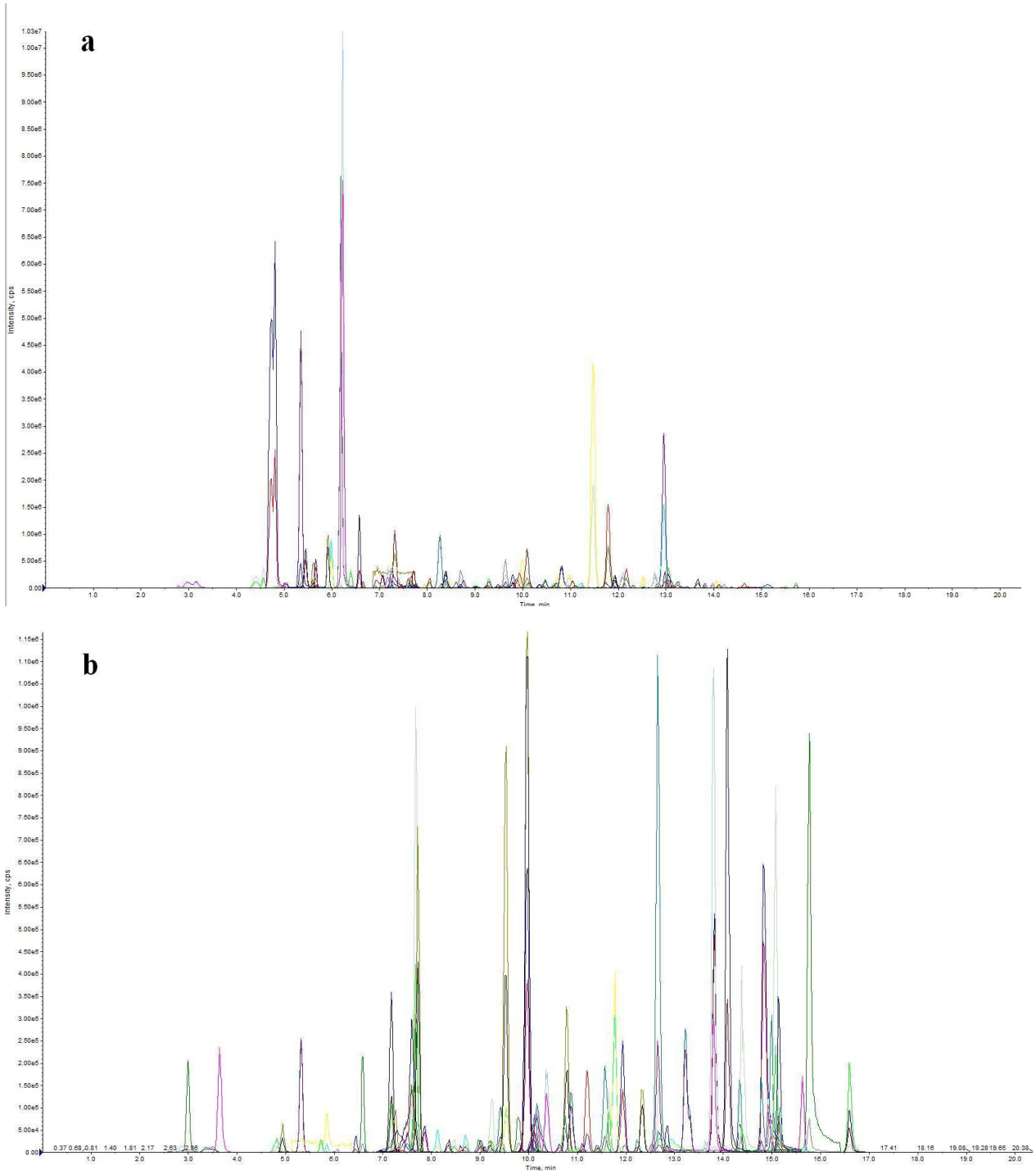
gdje je: C_{MIN} – srednja vrijednost najniže koncentracije kalibracijske krivulje (ng/mL),
S/N – srednja vrijednost omjera signala i šuma kod : C_{MIN}

Recovery (iskorištenje). Za računanje iskorištenja korištena je sljedeća formula (**2**):

$$\text{Iskorišten je} = \frac{100 \times (x_2 - x_1)}{x_{ADD}} \quad (\%) \qquad (2)$$

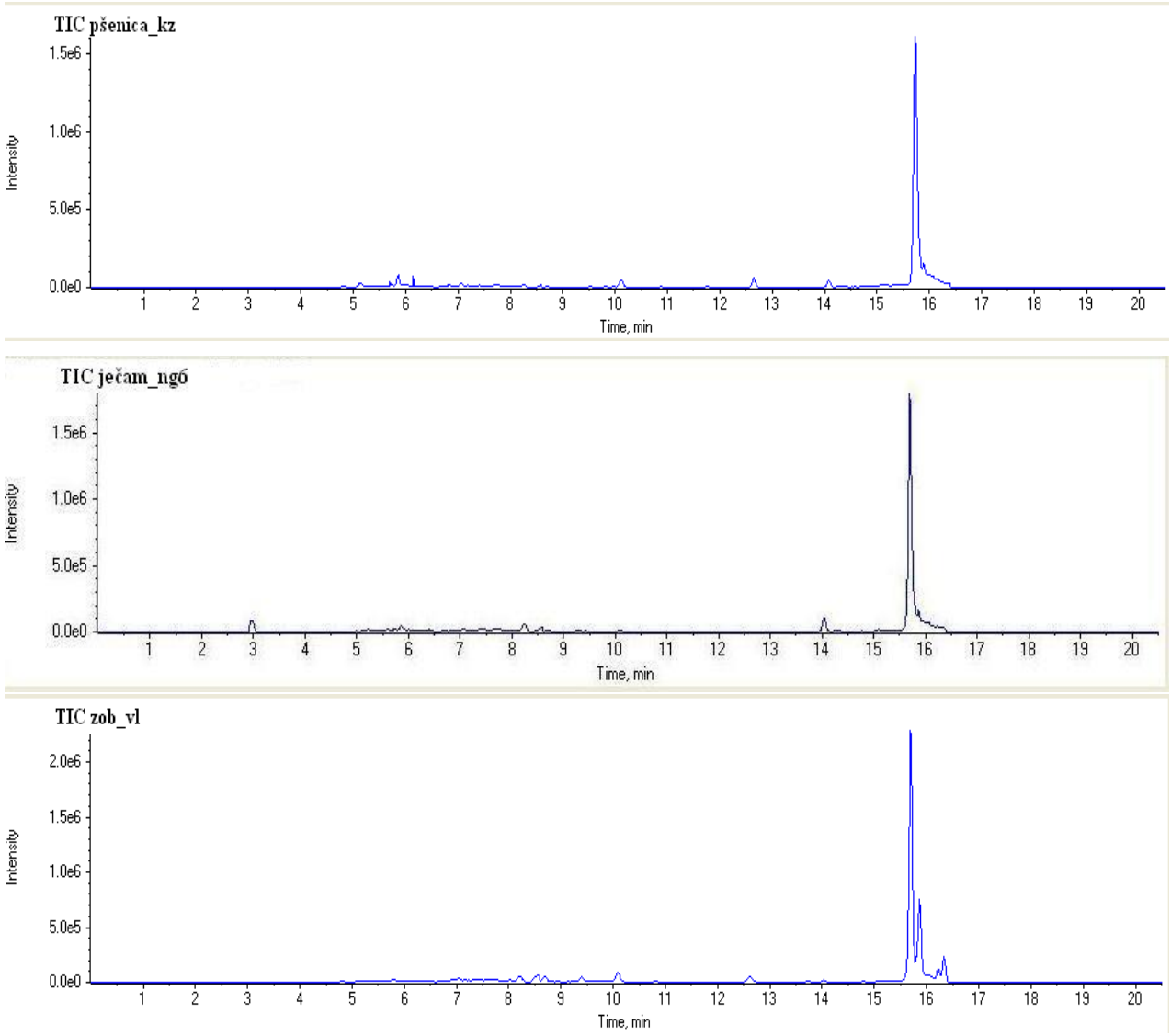
gdje je: x_1 – izmjerena vrijednost koncentracije uzorka bez dodatka mastermixa,
x_2 – izmjerena vrijednost koncentracije obogaćenog uzorka,
x_{ADD} – koncentracija standarda dodanog obogaćenom uzorku.

4. REZULTATI



Slika 4 Kromatogrami standarda

a) u pozitivnom; b) u negativnom modu



Slika 5 Reprezentativni TIC kromatogrami uzorka pšenice, ječma i zobi – svi analiti

Tablica 3 Limit detekcije (LOD), limit kvantifikacije (LOQ) i iskorištenje najvažnijih i detektiranih mikotoksina za uzorke pšenice

Analit	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Iskorištenje (%)
15-hidroksikulmorin	4,000	13,200	118,30
Aflatoksin B1	0,200	0,660	70,40
Alternariol	0,800	2,640	103,67
Alternariol monometil eter	0,160	0,528	106,19
Altertoksin-I	1,000	3,300	103,62
Apicidin	0,160	0,528	106,20
Bovericin	0,100	0,330	110,90
Brevianamid F	0,120	0,396	102,70
Citrinin	11,300	37,290	46,00
Dehidrokurvularin	0,500	1,650	75,60
Deoksinivalenol	1,600	5,280	98,80
Deoksinivalenol-3-glukozid	1,600	5,280	99,00
Emodin	0,150	0,495	107,40
Eniatin A	0,020	0,066	108,10
Eniatin A1	0,050	0,165	100,60
Eniatin B	0,023	0,0759	101,20
Eniatin B1	0,100	0,330	116,70
Eniatin B3	0,001	0,0033	102,30
Ergometrin	0,250	0,825	97,30
Fumonizin B1	5,500	18,150	66,00
Fumonizin B2	2,100	6,930	69,00
HT-2	2,000	6,600	102,90
Infektopiron	25,000	82,500	103,80
Kojična kiselina	1,000	3,300	128,17
Kulmorin	32,000	105,600	99,70
Kurvularin	0,020	0,066	99,70
Makrosporin	0,150	0,495	128,20
Nivalenol	1,600	5,280	85,60
Ohratoksin A	0,400	1,320	106,60
Sekalonična kiselina	1,000	3,300	110,20
T-2	0,300	0,990	103,80
Tentoksin	0,150	0,495	109,80
Triptofol	8,000	26,400	129,80
Zearalenon	0,800	2,640	127,50

Tablica 4 Limit detekcije (LOD), limit kvantifikacije (LOQ) i iskorištenje najvažnijih i detektiranih mikotoksina za uzorke ječma

Analit	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Iskorištenje (%)
15-hidroksikulmorin	4,000	13,200	91,45
Aflatoksin B1	0,200	0,660	70,40
Alternariol	0,800	2,640	104,34
Alternariol monometil eter	0,160	0,528	96,55
Altertoksin-I	1,000	3,300	91,11
Apicidin	0,160	0,528	109,18
Bovericin	0,100	0,330	89,81
Brevianamid F	0,120	0,396	84,52
Citrinin	12,700	41,910	42,00
Deoksinivalenol	1,600	5,280	100,53
Deoksinivalenol-3-glukozid	1,600	5,280	113,65
Emodin	0,150	0,495	88,35
Eniatin A	0,020	0,066	88,35
Eniatin A1	0,050	0,165	92,88
Eniatin B	0,023	0,0759	112,52
Eniatin B1	0,100	0,0033	98,26
Eniatin B3	0,001	0,0033	98,26
Ergometrin	0,250	0,825	78,90
Ergozin	1,000	3,300	98,60
Ergozinin	1,000	3,300	50,11
Fumonizin B1	6,100	20,130	60,00
Fumonizin B2	3,900	12,810	63,00
HT-2	2,000	6,600	110,24
Infektopiron	25,000	82,500	101,30
Kojična kiselina	1,000	3,300	98,19
Kurvularin	0,020	0,066	103,23
Makrosporin	0,150	0,495	104,91
Nivalenol	1,600	5,280	114,65
Ohratoksin A	0,400	1,320	102,50
Rubelin D	0,600	1,980	96,20
Sekalonična kiselina	1,000	3,300	105,26
T-2	0,300	0,990	99,73
Tentoksin	0,150	0,495	101,21
Triptofol	8,000	26,400	98,52
Zearalenon	0,800	2,640	110,89

Tablica 5 Limit detekcije (LOD), limit kvantifikacije (LOQ) i iskorištenje najvažnijih i detektiranih mikotoksina za uzorke zobi

Analit	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Iskorištenje (%)
Alternariol	0,800	2,640	94,09
Aflatoksin B1	0,200	0,660	70,40
Alternariol monometil eter	0,160	0,528	97,98
Altertoksin-I	1,000	3,300	93,88
Apicidin	0,160	0,528	98,30
Bovericin	0,100	0,330	96,10
Brevianamid F	0,120	0,396	101,40
Citrinin	13,400	44,220	36,00
Dehidrokurvularin	0,500	1,650	89,50
Deoksinivalenol	1,600	5,280	84,60
Emodin	0,150	0,495	115,40
Eniatin A	0,020	0,066	102,50
Eniatin A1	0,050	0,165	92,80
Eniatin B	0,023	0,0759	97,60
Eniatin B1	0,100	0,330	109,80
Eniatin B3	0,001	0,0033	102,80
Fumonizin B1	4,500	14,850	58,00
Fumonizin B2	1,900	6,270	61,00
HT-2	2,000	6,600	111,40
Infektopiron	25,000	82,500	109,70
Makrosporin	0,150	0,495	121,90
Nivalenol	1,600	5,280	90,50
Ohratoksin A	0,400	1,320	102,50
T-2	0,300	0,990	109,70
Tentoksin	0,150	0,495	117,48
Triptofol	8,000	26,400	100,40

Tablica 6 Pojavnost mikotoksina u žitaricama žetve 2013. u Hrvatskoj

Analit	Žitarica					
	Pšenica (n=10)		Ječam (n=12)		Zob (n=2)	
	F (%)	Sred. konc. (min.-max. konc.) µg kg^{-1}	F (%)	Sred. konc. (min.-max. konc.) µg kg^{-1}	F (%)	Sred. konc. (min.-max. konc.) µg kg^{-1}
Deoksinivalenol	10 (100)	130,1 (9,2-346,8)	12 (100)	113,3 (15,1-456,9)	2 (100)	42,05 (31,6-52,5)
Deoksinivalenol-3-glukozid	4 (40)	6,9 (5,8-8,7)	5 (42)	11,3 (5,8-23)	<LOD	<LOD
Nivalenol	6 (60)	9,6 (6-15,4)	6 (50)	10,2 (7-14,7)	2 (100)	308,5 (21,3-595,6)
T-2	3 (30)	3,2 (1,3-4,5)	9 (75)	3,7 (1,7-14,7)	2 (100)	30,2 (8,1-52,2)
HT-2	2 (20)	29,2 (20-38,5)	5 (41,6)	15,6 (10,1-24,8)	2 (100)	36,8 (13,6-60)
Zearalenon	1 (10)	2,7	1 (8,3)	16	<LOD	<LOD
Aflatoksin B1	0 (0)	<LOD	0 (0)	<LOD	0 (0)	<LOD
Citrinin	0 (0)	<LOD	0 (0)	<LOD	0 (0)	<LOD
Fumonizin B1	0 (0)	<LOD	0 (0)	<LOD	0 (0)	<LOD
Fumonizin B2	0 (0)	<LOD	0 (0)	<LOD	0 (0)	<LOD
Ohratoksin A	0 (0)	<LOD	0 (0)	<LOD	0 (0)	<LOD
Eniatin A	9 (90)	0,4 (0,1-0,7)	10 (83,3)	3,2 (0,1-18,4)	2 (100)	1,9 (1,8-2)
Eniatin A1	10 (100)	2,7 (0,6-5,3)	11 (91,6)	16,5 (0,3-97,8)	2 (100)	12,2 (10-14,3)
Eniatin B	10 (100)	19,9 (0,5-55,4)	12 (100)	39 (0,9-132,2)	2 (100)	13,5 (9,6-17,3)
Eniatin B1	10 (100)	12,9 (1,1-32,6)	12 (100)	41,4 (0,4-186,9)	2 (100)	20 (15,7-24,3)
Eniatin B3	8 (80)	0,01 (0,004-0,03)	9 (75)	0,02 (0,005-0,05)	2 (100)	0,005 (0,004-0,005)
Kulmorin	2 (20)	220,2 (109,5-330,9)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
15-hidroksikulmorin	7 (70)	83,1 (20,6-167,1)	5 (41,6)	105,1 (30,9-207,7)	<LOD	<LOD
Apicidin	4 (40)	1,7 (1,1-2,7)	6 (50)	1,8 (0,9-5,4)	2 (100)	48,2 (22,6-73,8)
Bovericin	6 (60)	0,8 (0,3-1)	3 (25)	2,4 (0,4-4,6)	2 (100)	86,7 (13,5-73,2)
Infektopiron	10 (100)	287,4 (182,5-419,7)	11 (91,6)	242,7 (119-440,4)	2 (100)	501,6 (295,5-707,6)
Tentoksin	10 (100)	8,4 (3,8-15,6)	10 (83,3)	2,1 (0,8-4,6)	2 (100)	33,3 (30,9-35,6)
Makrosporin	6 (60)	3,1 (0,6-12,6)	2 (16,6)	1,1 (0,7-1,5)	2 (100)	1,8 (0,6-3,1)
Alternariol	1 (10)	3,5	1 (8,3)	3,05	2 (100)	16,8 (11,1-22,5)
Alternariol monometil eter	2 (20)	3,7 (0,5-6,8)	1 (8,3)	0,95	2 (100)	4,3 (2,2-6,45)
Altertoksin-I	1 (10)	3,8	1 (8,3)	3,9	2 (100)	3,8 (3,5-4,1)
Emodin	10 (100)	4,8 (0,6-30)	12 (100)	17,1 (4,6-43,1)	2 (100)	3,9 (2,7-5,1)
Brevianamid F	8 (80)	2,1 (0,9-3,1)	12 (100)	8,2 (3,6-21,6)	2 (100)	2,5 (2-3)
Kurvularin	9 (90)	2,2 (0,3-6,4)	2 (16,6)	0,5 (0,4-0,5)	<LOD	<LOD
Dehidrokurvularin	4 (40)	8,4 (1,8-17,6)	<LOD	<LOD	1 (50)	5,9

Tablica 6 (nastavak)

Analit	Žitarica					
	Pšenica (n=10)		Ječam (n=12)		Zob (n=2)	
	F (%)	Sred. konc. (min.-max. konc.) µg kg^{-1}	F (%)	Sred. konc. (min.-max. konc.) µg kg^{-1}	F (%)	Sred. konc. (min.-max. konc.) µg kg^{-1}
Sekalonična kiselina	1 (10)	8,8	1 (8,3)	247,1	<LOD	<LOD
Kojična kiselina	1 (10)	97,7	1 (8,3)	1452,7	<LOD	<LOD
Ergometrin	3 (30)	443,2 (0,9-1327,2)	1 (8,3)	88,7	<LOD	<LOD
Ergozin	<LOD	<LOD	1 (8,3)	53,7	<LOD	<LOD
Ergozinin	<LOD	<LOD	1 (8,3)	113,7	<LOD	<LOD
Rubelin D	<LOD	<LOD	9 (75)	10,6 (3,2-35,6)	<LOD	<LOD
Triptofol	10 (100)	62,9 (30,3-94)	8 (66,6)	108,4 (28,8-232,2)	2 (100)	150,2 (40,4-109,8)

<LOD=ispod limita detekcije; n=ukupan broj uzoraka; F=frekvencija, broj uzoraka kod kojih je detektirana koncentracija mikotoksina iznad LOD-a

Tablica 7 Rezultati screeninga mikotoksina na pšenici (srednje konc. izražene u µg kg^{-1})

Mikotoksin	Sjeverna Hrvatska	Centralna Hrvatska	Istočna Hrvatska	Južna Hrvatska
Deoksinivalenol	139,4	28,3	169	9,2
Deoksinivalenol-3-glukozid	6	<LOD	7,9	<LOD
Nivalenol	8,7	15,4	8,1	<LOD
T-2	1,3	<LOQ	4,1	<LOD
HT-2	<LOQ	<LOD	29,2	<LOD
Zearalenon	2,7	<LOD	<LOD	<LOD
Eniatin A	0,3	0,4	0,4	0,2
Eniatin A1	2,5	2,7	3,1	0,8
Eniatin B	15	14,4	27,9	0,5
Eniatin B1	10,7	11,3	17	1,1
Eniatin B3	0,006	0,007	0,016	<LOQ
Kulmorin	109,5	<LOD	330,9	<LOD
15-hidroksikulmorin	64,1	20,6	123	<LOD
Apicidin	1,4	1,3	2,7	<LOD
Bovericin	1	1	0,4	<LOD
Infektopiron	226,8	358,4	292,2	374,7
Tentoksin	12,8	3,8	7,5	4,6
Makrosporin	0,7	<LOD	1,3	12,6
Alternariol	3,5	<LOQ	<LOD	<LOD
Alternariol monometil eter	6,8	0,5	<LOD	<LOD
Altertoksin-I	3,8	<LOD	<LOD	<LOD
Emodin	12,8	1	1,6	0,6
Brevianamid F	1,2	1,9	2,4	2,5
Kurvularin	2,2	4,4	2	0,4
Dehidrokurvularin	17,6	7,6	4,2	<LOD
Sekalonična kiselina	<LOD	<LOD	8,8	<LOD
Kojična kiselina	97,7	<LOD	<LOD	<LOD
Ergometrin	1,4	<LOD	664,1	<LOD
Triptofol	55,3	66,7	64,2	75,6

Tablica 8 Rezultati screeninga mikotoksina na ječmu (srednje konc. izražene u µg kg^{-1})

Mikotoksin	Sjeverna Hrvatska	Centralna Hrvatska	Istočna Hrvatska
Deoksinivalenol	67,1	131,3	108,1
Deoksinivalenol-3-glukozid	8,6	12,5	10,3
Nivalenol	9	10,8	<LOD
T-2	2,2	4,5	<LOQ
HT-2	10,3	19,2	<LOD
Zearalenon	<LOD	<LOD	16
Eniatin A	3,8	3,5	0,1
Eniatin A1	16,6	18,7	1,06
Eniatin B	65,4	32,4	12,7
Eniatin B1	55,7	40,3	7,2
Eniatin B3	0,04	0,02	0,005
15-hidroksikulmorin	62,9	184,3	30,9
Apicidin	0,9	2,3	1
Bovericin	0,4	3,4	<LOD
Infektopiron	120,3	285	149,2
Tentoksin	3,1	2	1,2
Makrosporin	<LOQ	1,08	<LOD
Alternariol	3	<LOQ	<LOD
Alternariol monometil eter	0,9	<LOD	<LOD
Altertoksin-I	3,9	<LOD	<LOD
Emodin	15,6	17,5	18
Brevianamid F	6,1	9,6	3,6
Kurvularin	<LOD	0,5	<LOD
Sekalonična kiselina	<LOD	274,1	<LOD
Kojična kiselina	1452,7	<LOD	<LOD
Ergometrin	<LOD	88,7	<LOD
Ergozin	<LOD	53,7	<LOD
Ergozinin	<LOD	113,7	<LOD
Rubelin D	9,2	6,4	35,6
Triptofol	35,3	174,8	62,1

Tablica 9 Rezultati screeninga mikotoksina na zobi (srednje konc. izražene u µg kg^{-1})

Mikotoksin	Sjeverna Hrvatska	Istočna Hrvatska
Deoksinivalenol	31,6	52,5
Nivalenol	595,6	21,3
T-2	52,2	8,1
HT-2	60	13,6
Eniatin A	2	1,8
Eniatin A1	14,3	10
Eniatin B	17,3	9,6
Eniatin B1	24,3	15,7
Eniatin B3	0,005	0,004
Apicidin	73,8	22,6
Beauvericin	73,2	13,5
Infektopiron	295,5	707,6
Tentoksin	35,6	30,9
Alternariol	22,5	11,1
Alternariol monometil eter	6,4	2,2
Altertoksin-I	4,1	3,5
Emodin	5,1	2,7
Brevianamid F	3,1	2
Dehidrokurvularin	<LOD	5,9
Triptofol	40,4	109,8

5. RASPRAVA

Na **Slici 4** prikazani su kromatogrami standarda ispitanih metabolita, dok su na **Slici 5** prikazani TIC (*total ion current*) kromatogrami tri različita analizirana uzorka pšenice, ječma i zobi. Svi mikotoksini su praćeni u sMRM modu te su za svaki mikotoksin praćena dva fragmenta (za kvantifikaciju i kvalitativnu provjeru) unutar pet minuta retencijskog vremena.

U 24 uzorka žitarica iz Hrvatske analizirana na 295 bakterijskih i fungalnih toksina utvrđena su 32 različita mikotoksina. Određivani su i najrelevantniji mikotoksini, no njihova prisutnost nije utvrđena. Granica detekcije (LOD) za detektirane mikotoksine, korigirana za iskorištenje, kretala se između 0,001 i 32 μg kg^{-1} (**Tablice 3, 4** i **5**). Iskorištenje se kretalo između 74,03 i 127,5 %, te prelazi prihvatljivi raspon od 120 % za ZEA u uzorcima pšenice (**Tablica 3**). Zbog višeg iskorištenja od propisanog, dobivene vrijednosti za ZEA se mogu uzeti kao orijentacijske. Ovakav rezultat iskorištenja može biti posljedica utjecaja matriksa koji štiti mikotoksin od raspadanja zbog čega je rezultat viši u stvarnom uzorku s obzirom na standard. Za ostale detektirane mikotoksine iskorištenja su u skladu s Pravilnikom o izmjenama i dopunama Pravilnika o planu uzorkovanja i metodama analiza za službenu kontrolu količina mikotoksina u hrani (MZ, 2012).

Tablica 6 prikazuje da su analizirane žitarice iz Hrvatske kontaminirane sa ukupno 32 fungalna metabolita. Najčešći metaboliti (nađeni u svim uzocima) pšenice, ječma i zobi bili su *Fusarium* mikotoksini: DON u rasponu koncentracije mikotoksina od 9,2 do 456,9 μg kg^{-1} te depsipeptidi eniatin B (0,5-132,2 μg kg^{-1}) i eniatin B1 (0,4-186,9 μg kg^{-1}). Od ostalih *Fusarium* mikotoksina po pojavnosti ih slijede eniatin A1 (0,3-97,8 μg kg^{-1}) u 95,8 % uzoraka, eniatin A u 87,5 % uzoraka (0,1-18,4 μg kg^{-1}), eniatin B3 u 79,2 % uzoraka (0,004-0,05 μg kg^{-1}), nivalenol u 58,3 % uzoraka (6-595,6 μg kg^{-1}), T-2 toksin u 58,3 % uzoraka (1,3-52,2 μg kg^{-1}), 15-hidroksikulmorin u 54,5 % uzoraka pšenice i ječma (20,6-207,7 μg kg^{-1}), apicidin u 50 % uzoraka (0,9-73,8 μg kg^{-1}), bovericin u 45,8 % uzoraka (0,3-73,2 μg kg^{-1}), DON-3-glukozid u 40,9 % uzoraka (5,8-23 μg kg^{-1}), HT-2 toksin u 37,5 % uzoraka (10,1-60 μg kg^{-1}), ZEA u 9,1 % uzoraka pšenice i ječma (2,7-16 μg kg^{-1}) te kulmorin u 20 % uzoraka pšenice (109,5-330,9 μg kg^{-1}). Od metabolita plijesni vrste *Alternaria* u uzorcima pšenice, ječma i zobi utvrđeni su: infektopiron u 95,8 % uzoraka u rasponu koncentracije od 119 do 707,6 μg kg^{-1}, tentoksin u 91,66 % uzoraka (0,8-35,6 μg kg^{-1}), makrosporin u 41,66 % uzoraka (0,6-12,6 μg kg^{-1}), alternariol u 16,66 % uzoraka (3,05-22,5 μg kg^{-1}), AME u 20,8 % uzoraka (0,5-6,8 μg kg^{-1}) te altertoksin-1 u 16,66 % uzoraka (3,5-4,1 μg kg^{-1}). Od metabolita plijesni vrste *Penicillium* u svim uzorcima pšenice, ječma i zobi utvrđen je emodin u rasponu koncentracije od 0,6 do 43,1 μg kg^{-1}, u 91,6 % uzoraka utvrđen je brevianamid F (0,9-21,6 μg kg^{-1}), u 50 % uzoraka pšenice i ječma utvrđen je kurvularin (0,3-6,4

μg kg^{-1}), u 41,6 % uzoraka pšenice i zobi utvrđen je dehidrokurvularin (1,8-17,6 μg kg^{-1}) a 9,1 % uzoraka pšenice i ječma bilo je kontaminirano sa sekaloničnom kiselinom (8,8-247,1 μg kg^{-1}). Od metabolita plijesni vrste *Aspergillus* utvrđena je kojična kiselina i to u 9,1 % uzoraka pšenice i ječma. Od ergot alkaloida utvrđeni su ergometrin u 18,2 % uzoraka pšenice i ječma, te ergozin i ergozinin u 8,3 % uzoraka ječma u koncentracijama 53,7 odnosno 113,7 μg kg^{-1}. Utvrđeni mikotoksini drugih rodova plijesni bili su rubelin D u 75 % uzoraka ječma (3,2-35,6 μg kg^{-1}) te triptofol u 83,3 % uzoraka žitarica (28,8-232,2 μg kg^{-1}).

Rezultati višegodišnjih studija u Hrvatskoj pokazale su učestalu kontaminaciju žitarica *Fusarium* mikotoksinima što bi moglo imati značajne sigurnosne implikacije na zdravlje ljudi i životinja te uzrokuje značajne ekonomske gubitke. Studije provedene prijašnjih godina su ukazale na konstantnu prisutnost mikotoksina u žitaricama sjevero-zapadne Hrvatske, kao i ovisnost pojavnosti i koncentracije mikotoksina i klimatskih uvjeta (Domijan i sur., 2005; Pleadin i sur., 2012). Sedmogodišnje istraživanje provedeno u Hrvatskoj u periodu 1998-2004 godine (Sokolović i Šimpraga, 2006), pokazalo je da su uzorci žitarica i krmiva bili kontaminirani s DON-om u 41 %, a sa T-2 toksinom u 16,8 % slučajeva.

U svom radu iz 2011. godine, Vulić i suradnici (2011) su izvijestili o visokim koncentracijama T-2 i HT-2 toksina u uzorcima zobi (32,94 μg kg^{-1}). Autori su skrenuli pozornost na nedostatak podataka o pojavnosti ovih mikotoksina u Europi, kao i potrebu za analiziranjem većeg broja uzoraka žitarica kako bi se mogao dobit uvid u njihovu prisutnost.

Pleadin i sur. (2012) ispitivali su pojavnost DON-a i ZEA na kukuruzu iz Hrvatske, čija je žetva obavljena u listopadu 2010. godine nakon perioda rasta uz iznimno visoku količinu padalina i niske temperature. Analizirano je ukupno 40 uzoraka kukuruza iz sjevernih, središnjih i istočnih dijelova Hrvatske. DON je detektiran u 85 % uzoraka s maksimalnom koncentracijom od 17,92 mg kg^{-1}, dok je ZEA utvrđen u 87,5 % uzoraka uz najvišu koncentraciju od 5,11 mg kg^{-1}. Visoke koncentracije DON-a i ZEA se mogu objasniti velikom količinom padalina i niskim temperaturama tijekom rasta koji su mogli dovesti do povećane kontaminacije kukuruza *Fusarium* plijesnima i produkcije njihovih sekundarnih metabolita. Također, značajno viši rezultati su mogući i zbog razlike u primjeni analiziranih žitarica koje su u njihovom radu prvenstveno bile namijenjene stočnoj ishrani.

Hrvatska agencija za hranu (HAH) je 2012. godine provela opsežnu studiju s ciljem prikazivanja stanja kontaminacije dominantnih krmiva (sačma soje, kukuruz) aflatoksinima, zearalenonom, deoksinivalenolom te fumonizinima na 300 uzoraka iz vegetacijske godine 2011. Aflatoksin je otkriven u 20 % uzoraka u rasponu od 1-10 μg kg^{-1}, deoksinivalenol je otkriven u 27 % uzoraka u rasponu od 55-500 μg kg^{-1}, fumonizin je otkriven u 33 % uzoraka u rasponu od 220-2000 μg kg^{-}

[1], a zearalenon u 12 % uzoraka u rasponu od 16-100 µg kg^{-1} (HAH, 2012). U ovom radu deoksinivalenol je otkriven u 100 % uzoraka u rasponu od 9-457 µg kg^{-1},a zearalenon u 8,3 % uzoraka u rasponu od 2,7-16 µg kg^{-1}.

U studiji Pleadin i sur. (2013) ELISA metodom su analizirana ukupno 181 uzorka kukuruza, pšenice, ječma i zobi prikupljeni iz šest hrvatskih regija. Ispitivane su koncentracije DON-a, ZEA, fumonizina te T-2 toksina. Najkontaminiranija žitarica bio je kukuruz, s DON-om kao najzastupljenijim *Fusarium* mikotoksinom (52,5 %), kojeg su slijedili ZEA (40,5 %), fumonizini (37,5 %) i T-2 toksin (33 %). Četiri uzorka kukuruza i jedan uzorak pšenice sadržavala su koncentracije mikotoksina veće od dozvoljenih. S obzirom na toplo i suho razdoblje, autori smatraju da ovakva kontaminacija nije uzrokovana klimatskim uvjetima nego drugim faktorima. U analiziranim uzorcima žitarica u ovom radu, DON je također bio najzastupljeniji *Fusarium* mikotoksin (100 %), T-2 toksin je utvrđen u 58,3 % uzoraka te su svi utvrđeni *Fusarium* mikotoksini bili ispod dozvoljenih granica.

Tablice 7, 8 i 9 prikazuju rezultate screeninga mikotoksina na pšenici, ječmu i zobi po pojedinim regijama Republike Hrvatske (sjeverna, srednja, istočna i južna). Od reguliranih mikotoksina svi su zadovoljili odredbe Europske komisije koje su prihvaćene hrvatskim Zakonom o kontaminantima (HS, 2013).

Žitarice najbolje uspijevaju u kontinentalnoj klimi (istok, sjever te središnji dio Hrvatske) na područjima s dubokim, umjereno vlažnim tlom te optimalnom temperaturom. U Republici Hrvatskoj je tijekom razdoblja od 2008. do 2010. godine pod žitaricama bilo prosječno 556 tisuća hektara, a proizvodilo se prosječno 3,1 milijuna tona. U proizvodnji i površinama na kojima se sije najzastupljeniji je kukuruz s godišnjom proizvodnjom od 1,5 do 2,5 mil. t., zatim slijedi pšenica s godišnjom proizvodnjom od 600 000 do 1 000 000 t te ječam s oko 200 000 t (MP, 2012). Ostale žitarice – zob, raž, tritikale, sirak, proso i heljda siju se u znatno manjim količinama.

Biosinteza mikotoksina u žitaricama, može biti pod utjecajem nekoliko važnih čimbenika koji uključuju klimatske uvjete, mehanička oštećenja, štete od insekata, mineralnu ishranu bilja, brzinu sušenja nakon žetve, uvjete skladištenja, itd. (HAH, 2012). Visoke koncentracije mikotoksina obično su povezane s klimatskim uvjetima, pri čemu su najkritičniji faktori za formaciju plijesni i proizvodnju mikotoksina vlaga i temperatura. Niže prosječne razine kontaminacije za uzorke podrijetlom iz istočne, sjeverne i središnje Hrvatske dobiveni u ovom radu mogu se objasniti činjenicom da su 2013. godine toplinske prilike istraživanih regija Hrvatske za vrijeme cvatnje i žetve bile normalne do tople i sušne, prema podacima Hrvatskog

hidrometeorološkog zavoda (DHMZ, 2013). Južnu regiju Hrvatske karakterizirale su tople do vrlo tople toplinske prilike što potkrepljuje činjenicu niske kontaminiranosti žitarice te regije.

Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) zahtjeva dodatna mišljenja i podatke o pojavnosti i toksičnosti nereguliranih mikotoksina: bovericina i eniatina, nivalenola, DON-3-glukozida, moniliformina, *Alternaria* toksina, diacetoksiscirpenola (EFSA, 2014), zbog čega su rezultati u ovom radu od izrazitog značaja.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Najčešći metaboliti (nađeni u svim uzorcima) pšenice, ječma i zobi bili su *Fusarium* mikotoksini i to DON s najvišom utvrđenom koncentracijom od 456,9 μg kg^{-1} te depsipeptidi eniatin B s najvišom koncentracijom 132,2 μg kg^{-1} i eniatin B1 s najvišom koncentracijom od 186,9 μg kg^{-1}. Od ostalih *Fusarium* mikotoksina po pojavnosti ih slijede eniatin A1 (95,8 %), s najvišom koncentracijom od 97,8 μg kg^{-1}, eniatin A (87,5 %) s najvišom koncentracijom 18,4 μg kg^{-1}, eniatin B3 (79,2 %) s najvišom koncentracijom 0,05 μg kg^{-1}, nivalenol (58,3 %) s najvišom koncentracijom 595,6 μg kg^{-1}, T-2 toksin (58,3 %) s najvišom koncentracijom 52,2 μg kg^{-1}, 15-hidroksikulmorin (54,5 %) pšenice i ječma s najvišom koncentracijom 207,7 μg kg^{-1}, apicidin (50 %) s najvišom koncentracijom 73,8 μg kg^{-1}, bovericin (45,8 %) s najvišom koncentracijom 73,2 μg kg^{-1}, DON-3-glukozid (40,9 %) s najvišom koncentracijom 23 μg kg^{-1}, HT-2 toksin (37,5 %) s najvišom koncentracijom 60 μg kg^{-1}, ZEA (9,1 % uzoraka pšenice i ječma) s najvišom koncentracijom 16 μg kg^{-1} te kulmorin (20 % uzoraka pšenice) s najvišom koncentracijom 330,9 μg kg^{-1};
2. Od metabolita plijesni roda *Alternaria* u uzorcima pšenice, ječma i zobi utvrđeni su: infektopiron (95,8 %) s najvišom koncentracijom 707,6 μg kg^{-1}, tentoksin (91,66 %) s najvišom koncentracijom 35,6 μg kg^{-1}, makrosporin (41,66 %) s najvišom koncentracijom 12,6 μg kg^{-1}, alternariol (16,66 %) s najvišom koncentracijom 22,5 μg kg^{-1}, AME (20,8 %) 6,8 μg kg^{-1} te altertoksin-1 (16,66 %) s najvišom koncentracijom 4,1 μg kg^{-1};
3. Od metabolita plijesni roda *Penicillium* u svim uzorcima pšenice, ječma i zobi utvrđen je emodin s najvišom koncentracijom od 43,1 μg kg^{-1}, u 91,6 % uzoraka utvrđen je brevianamid F s najvišom koncentracijom 21,6 μg kg^{-1}, u 50 % uzoraka pšenice i ječma utvrđen je kurvularin s najvišom koncentracijom 6,4 μg kg^{-1}, u 41,6 % uzoraka pšenice i zobi utvrđen je dehidrokurvularin s najvišom koncentracijom 17,6 μg kg^{-1} a 9,1 % uzoraka pšenice i ječma bilo je kontaminirano sa sekaloničnom kiselinom s najvišom utvrđenom koncentracijom 247,1 μg kg^{-1};
4. Od metabolita plijesni roda *Aspergillus* utvrđena je kojična kiselina i to u 9,1 % uzoraka pšenice i ječma s najvišom koncentracijom od 1452,7 μg kg^{-1};
5. Utvrđeni ergot alkaloidi bili su ergometrin u 18,2 % uzoraka pšenice i ječma, te ergozin i ergozinin u 8,3 % uzoraka ječma u koncentracijama 53,7 odnosno 113,7 μg kg^{-1};
6. Utvrđeni mikotoksini drugih rodova plijesni bili su rubelin D u 75 % uzoraka ječma s najvišom koncentracijom od 35,6 μg kg^{-1} te triptofol u 83,3 % uzoraka žitarica s najvišom koncentracijom od 232,2 μg kg^{-1};

7. Regulirani mikotoksini DON i ZEA su ispod dozvoljenih granica, za DON je u najkontaminiranijem uzorku utvrđeno 36,6 % od regulirane koncentracije, dok je za ZEA 16 % od regulirane koncentracije utvrđeno u najkontaminiranijem uzorku žitarice.
8. Mikotoksini čije prisustvo je trenutno neregulirano dobar su pokazatelj opće kontaminiranosti uzoraka mikotoksinima te svakako daju korisne informacije za uzgajivače i proizvođače hrane.

7. LITERATURA

Balzer I, Bogdanić C, Mužić S: Natural contamination of corn (*Zea mays*) with mycotoxins in Yugoslavia. *Annales de la nutrition et de l'alimentation* 31:425-430, 1977.

Bennett JW, Klich M: Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16:497-516, 2003.

Cindrić M, Marković A, Horvatić A: Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina* 45:218-232, 2009.

Cutillas, PR, Timms JF: *LC-MS/MS in proteomics. Methods and applications*. Springer, London, 2010.

DHMZ, Državni hidrometeorološki zavod: *Praćenje klime. Ocjena mjeseca, sezone i godine*. DHMZ, 2013. http://klima.hr/ocjene_arhiva.php [30.06.2014.]

Domijan AM, Peraica M, Jurjević Ž, Ivić D, Cvjetković B: Fumonisin B1, fumonisin B2, zearalenone and ochratoxin A contamination of maize in Croatia. *Food Additives and Contaminants* 22:677-680, 2005.

EC, European Commission: *Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs*. OJ L 364, 2006.

EC, European Commission: *Commission Regulation (EU) No 212/2014 of 6 March amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of the contaminant citrinin in food suplements based on rice fermented with red yeast Monascus purpureus*. OJ L 67, 2014.

EFSA, EFSA Panel on contaminants in the food chain: Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal* 9:2407, 2011.

EFSA, European Food Safety Authority: *Mycotoxins*. EFSA, 2014. http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/mycotoxins.htm#efsa_activities [30.06.2014.]

EMAN, Mycotoxin Awareness Network: *Mycotoxins in cereals: sources and risks*. EMAN, 2014. http://www.mycotoxins.org [17.05.2014.]

Goryacheva IY, De Saeger S: Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection in foodant feed. U *Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed*, str. 135-167 Woodhead Publishing, 2011.

Habschied K, Šarkanj B, Zec Zrinušić S, Krstanović V, Rupčić Ž, Sakač N: LC-MS/MS metode za simultano određivanje više *Fusarium* toksina. U *6th International Scientific/Professional*

Conference Agriculture in Nature and Environment Protection, str. 258-263. Glas Slavonije, Osijek, 2013.

HAH, Hrvatska agencija za hranu: *Mikotoksini u hrani*. HAH, 2014. http://www.hah.hr/zanimljivosti.php?cid=4&id=400&page=1 [18.05.2014.]

HAH, Hrvatska agencija za hranu: *Znanstveno mišljenje o mikotoksinima u hrani za životinje*. HAH, 2012.

HS, Hrvatski sabor: *Zakon o kontaminantima*. *Narodne novine* 39/13, 2013.

Ivić D, Domijan AM, Peraica M, Miličević T, Cvjetković B: *Fusarium* spp. contamination of wheat, maize, soybean, and pea in Croatia. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 60:435-442, 2009.

Jakšić S, Abramović B, Jajić I, Živkov Baloš M, Mihaljev Ž, Despotović V, Šojić D: Co-occurrence of fumonisins and deoxynivalenol in wheat and maize harvested in Serbia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 89:615-619, 2012.

Klapec T, Šarkanj B: *Opasnosti vezane uz hranu, Kemijske i fizikalne opasnosti*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2012.

Malachova A, Sulyok M, Beltrán E, Berthiller F, Krska R: Optimisation and validation of a quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *Journal of Chromatography A, in press,* 2014.

Maragos CM: Recent advances in the development of novel materials for mycotoxin analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395:1205-1216, 2009.

MP, Ministarstvo poljoprivrede RH: *Godišnje izvješće o stanju poljoprivrede u 2011. godini.* MP, Zagreb, 2012.

MPRR, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja RH: *Pravilnik o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje*. *Narodne novine* 80/10, 2010.

MZ, Ministarstvo zdravlja RH: *Pravilnik o izmjenama i dopunama Pravilnika o planu uzorkovanja i metodama analiza za službenu kontrolu količina mikotoksina u hrani*. *Narodne novine* 71/12, 2012.

Murphy PA, Hendrich S, Landgren C, Bryant CM: Food mycotoxins: An update. *Journal of Food Science* 71:R51-R65, 2006.

Ostry V: *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal* 1:175-188, 2008.

Pavlinić I, Puntarić D, Bošnir J, Lasić D, Barušić L, Jergović M, Miškulin M, Puntarić I, Vučić K: Istraživanje ohratoksina A u ječmu – doprinos mikotoksinskoj hipotezi nastanka endemske nefropatije. *Medica Jadertina* 40:59-65, 2010.

Peraica M, Rašić D: Akutne i kronične mikotoksikoze u ljudi. *Krmiva* 54:81-87, 2012.

Pleadin J, Sokolović M, Perši N, Zadravec M, Jaki V, Vulić A: Contamination of maize with deoksynivalenol and zearalenone in Croatia. *Food Control* 28:94-98, 2012.

Pleadin J, Vahčić N, Perši N, Ševelj D, Markov K, Frece J: *Fusarium* mycotoxin's occurrence in cereals harvested from Croatian fields. *Food Control* 32:49-54, 2013.

Polettini A: *Applications of LC-MS/MS in toxicology*. Pharmaceutical Press, 2006.

Sokolović M, Šimpraga B: Survey of trichothecene mycotoxins in grains and animal feed in Croatia by thin layer chromatography. *Food Control* 16:733-740, 2006.

Sulyok M, Berthiller F, Krska R, Schuhmacher R: Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20:2649-2659, 2006.

Sulyok M, Krska R, Schuhmacher R: A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389:1505-1523, 2007.

Šegvić Klarić M, Cvetnić Z, Pepeljnjak S, Kosalec I: Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins and zearalenon in cereals and feed, determined by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and thin-layer chromatography. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 60:427-434, 2009.

The Astbury Centre for Structural Molecular Biology: *An introduction to mass spectrometry*. 2014. http://www.astbury.leeds.ac.uk/facil/MStut/mstutorial.htm [11.05.2014.]

Turner HW, Subrahmanyam S, Piletsky SA: Analytical methods for determination of mycotoxins. *Analytica Chemica Acta* 632:168-180, 2009.

Varga E: Validation and application of an LC-MS/MS based multi target method for the determination of mycotoxins in nuts and dried grapes. *Diplomski rad.* University of Natural Resorces and Applied Life Science, Beč, 2010.

Vulić A, Pleadin J, Perši N: Determination of T-2 and HT-2 toxins in commodities and feed in Croatia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 86:294-297, 2011.

Weng N, Halls TDJ: Systemic troubleshooting for LC-MS/MS. Part 2: Large scale LC-MS/MS and automation. *BioPharm* 15:22-26,49, 2002.

Yu J, Mohawed SM, Bhatnagar D, Cleveland TE: Substrate-induced lipase gene expresion and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus. Journal of Applied Microbiology* 95:1334-1342, 2003.

Zöllner P, Leitner A, Berner D, Kleinova M, Jodlbauer J, Mayer BX, Lindner: Improving LC-MS/MS analysis in complex food matrices. Part 1 – Sample preparation and chromatography. *LC-GC Europe* 3-8, 2003.