Komparacija ELISA i TLC/HPLC metoda za određivanje ZEA i OTA u žitaricama i krmi

Šegvić Klarić, Maja; Pepeljnjak, Stjepan; Cvetnić, Zdenka; Kosalec, Ivan

Source / Izvornik: **Krmiva : Časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme, 2008, 50, 235 - 244**

Journal article, Published version
Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:458223

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

KRMIVA

KOMPARACIJA ELISA I TLC/HPLC METODA ZA ODREĐIVANJE ZEA I OTA U ŽITARICAMA I KRMI

COMPARISON BETWEEN ELISA AND TLC/HPLC METHODS FOR DETERMINATION OF ZEARALENON AND OCHRATOXIN A IN FOOD AND FEED

Maja Šegvić Klarić, Stjepan Pepeljnjak, Zdenka Cvetnić i Ivan Kosalec

Izvorni znanstveni članak
Primljeno: 5. svibnja 2008.

SAŽETAK

Fusarium i *Penicillium* vrste plijesni javljaju se kao najučestaliji kontaminanti žitarica u području umjerene klime. Kao posljedica se mikotoksini zearalenon (ZEA) i okratoksin A (OTA) često nalaze u takvim supstratima u većim ili manjim koncentracijama ovisno o načinu pospremanja usjeva, skladištenju i mikroklimatskim uvjetima. Cilj rada je bio odrediti pojavu ZEA i OTA tijekom 2007. godine u nasumično uzimanim uzorcima žitarica i krmiva (N=37) u individualnim domaćinstvima na području endemske nefropatije (EN) u Hrvatskoj.

Za određivanje ZEA i OTA korišten je kompetativni direktni ELISA test (Veratox®) prema preporukama proizvođača Neogen Europe Ltd. te modificirana metoda visokoučinkovite tekućinske kromatografije (HPLC) prema Frisvad i Thrane (1987) i tankoslojna kromatografija (TLC). Usporedbom metoda određene su granice detekcije i kvantifikacije te korelacije sadržaja ispitivanih mikotoksina.

ZEA je dokazan u 91,9% uzoraka u rasponu od 12,5 μg/kg do 1182 μg/kg (srednja koncentracija 318,3 μg/kg), dok je OTA nađen u 16,2% uzoraka s rasponom od 2,5 μg/kg do 31,7 μg/kg (srednja koncentracija 9,8 μg/kg). Kokontaminacija je dokazana u 13,5 % uzoraka. Utvrđene vrijednosti ZEA i OTA u hrani i krmivu su ispod najvećih dopuštenih količina prema Pravilniku (Narodne novine br. 118. iz 2007.) te odgovaraju i preporukama Europske komisije (EC/576/2006) i EC/1881/2006). Usporedbom metoda, utvrđeno je da najnižu granicu detekcije ima ELISA, a slijedi ju HPLC. Izmjerene koncentracije mikotoksina statistički znajačno koreliraju između ELISA i HPLC metode. Prednost ELISA metode je u jednostavnosti izvedbe (pogotovo za veliki broj uzoraka), osjetljivosti, ekonomskoj isplativosti te ekološkoj prihvatljivosti. Prednost HPLC metode je u analizi više mikotoksina u jednom uzorku.

Ključne riječi: ELISA i TLC/HPLC metode, zearalenon, okratoksin

Maja Šegvić Klarić, Stjepan Pepeljnjak, Zdenka Cvetnić i Ivan Kosalec, Zavod za mikrobiologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska, E-pošta: ikosalec@pharma.hr.

UVOD

Zearalenon (ZEA) je sekundarni metabolit nekih vrsta *Fusarium*, najčešće vrste *F. graminearum*, dok su najznačajniji producenti okratoksina A (OTA) plijesni iz skupine *Aspergillus ochraceus* te neke vrste u sekciji *Flavi* i *Nigri* i vrsta *Penicillium verrucosum* (Kuiper-Goodman i Scott, 1989; Heenan i sur., 1998). Ove plijesni kao i njihovi sekundarni metaboliti ZEA i OTA česti su kontaminanti žitarica i krme te predstavljaju opasnost za zdravlje životinja i ljudi. Naime, ZEA ima estrogeni učinak u domaćih životinja, posebice svinja, dok je OTA odgovoran za nefrotoksično (uzrokuje akutne i kronične lezije bubrega), teratogeno, imunosupresivno i karcinogeno djelovanje (JECFA, 2000, 2001). Za OTA se pretpostavlja uloga u etiologiji endemske nefropatije u ljudi koju karakterizira progresivna renalna fibroza, tumori urinarnog sustava te karcinom zdjelice, mokraćovoda i mokraćnog mjehura (IARC, 1993; Krogh, 1980; Pfohl-Leszkowicz i sur., 2002; Radavanovic i sur., 1991).

Višegodišnja istraživanja u Hrvatskoj pokazuju da ZEA i OTA prosječno kontaminiraju 20-30% uzoraka žitarica pri čemu njihove koncentracije znatno variraju ovisno o mikroklimatskim uvjetima u pojedinim godinama (Pepeljnjak i Šegvić, 2004). Stoga je sustavna kontrola mikotoksina u hrani i krmi neophodna kako bi se izbjegli negativni učinci na zdravlje kao i ekonomski gubici u poljoprivrednoj i animalnoj proizvodnji. U tu svrhu razvijen je veliki broj metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje mikotoksina u hrani kao supstratu. Posljednih dvadeset godina najviše se primjenjuju kromatografske metode koje omogućavaju razdvajanje primarnih i sekundarnih metabolita plijesni te njihovo simultano određivanje u istom uzorku (Lin i sur., 1998). Među kromatografskim metodama za određivanje OTA najviše se primjenjuje visokoučinkovita tekućinska kromatografija (HPLC) koja ima vrlo nisku granicu detekcije (Blesa i sur., 2004). Primjerice, HPLC s fluorescentnom detekcijom za određivanje OTA u krvi, serumu i nekim prehrambenim proizvodima ima granicu detekcije 0,001 μg/L (Zimmereli i Dick, 1995). Međutim, HPLC zahtijeva posebnu obuku osoblja, pročišćavanje uzorka, ima visoku cijenu izvedbe te koristi za zdravlje štetna otapala. Unatoč znatno manjoj osjetljivosti, tankoslojna kromatografija (TLC) je još uvijek popularna te se najčešće koristi kao «screening» metoda. TLC omogućava simultanu analizu više uzoraka na osnovi usporedbe s R_f vrijednosti i UV-Vis spektrom standarda mikotoksina, jednostavne je i po cijeni prihvatljive izvedbe (Lin i sur., 1998). U posljednje vrijeme sve se više primjenjuju imunoenzimske metode (ELISA) koje su visoko specifične (koriste se poliklonska i monoklonska antitijela), osjetljive, jednostavne i brze za izvođenje te ekonomski isplative (Thirumala-Devi i sur., 2000). Stoga je cilj našeg rada bio utvrditi kontaminaciju uzoraka žita i krme sa ZEA i OTA nasumičnim odabirom domaćinstava u nekoliko posavskih sela s etiologijom EN i ujedno usporediti ELISA i TLC/HPLC metode.

MATERIJALI I METODE

Uzorci

Tijekom 2007. godine na području endemske nefropatije (EN) u Hrvatskoj (sela: Pričic, Živike, Lužani i Slavonski Kobaš), nasumično su uzorkovane žitarice i krma u individualnim domaćinstvima. Ukupno je sakupljeno 37 uzoraka, od čega dvanaest uzoraka kukuruza (32,4%) i smjese krmiva (32,4%) te šest uzoraka pšenice (16,2%), četiri uzorka ječma (10,8 %), dva uzorka zobi (5,4 %) i jedan uzorak uljane repice (2,7 %). Od sakupljenih uzoraka, 21 uzorak (56,8 %) bio je iz domaćinstava koja imaju nekoga u obitelji umrlog ili oboljelog od EN.

Iscrpljivanje uzoraka

Neposredno prije analiza, uzroci (10 g) su samljeveni do veličine čestica mljevene kave te iscrpljeni s 50 ml 70% metanola. Dobivene iscrpine su analizirane ELISA i HPLC metodama. Korištena otapala (metanol, acetonitril, octena kiselina) bila su HPLC-čistoće, dok je voda pročišćena primjenom Milli Q™ sustava (Millipore Co., SAD).

Za TLC analizu uzeto je 30 ml metanolne iscrpine koja je zatim iscrpljena s 30 ml kloroforma te filtrirana preko bezvodnog natrij sulfata. Dobivena kloroformska iscrpina je uparena do suha na rotacijskom vakuum uparivaču i otopljena u 0,2 ml kloroforma neposredno prije TLC analize.

TLC metoda

Analiza je provedena korištenjem TLC ploča G-25 UV_{254} (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Njemačka) u sustavu otapala toluen/etil acetat/mravlja kiselina (5:4:1) uz standard ZEA (0,5 mg/ml) i OTA (0,2mg/ml) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) koji su otopljeni u kloroformu. Uzorci su na ploče naneseni u rasponu volumena od 0,3 do 10 μl. Polukvantifikacija je provedena vizualnom usporedbom intenziteta flourescencije sumnjive mrlje u kromatogramu uzorka i standarda mikotoksina pod UV svjetlom valne duljine 366 nm.

ELISA metoda

Za određivanje ZEA i OTA u uzorcima korišten je kompetativni direktni enzimski imunoanalitički (ELISA) test (CD-ELISA, Veratox®) prema preporukama proizvođača Neogen Europe Ltd. (uvoznik Noack d.o.o., Zagreb). Određivanje ZEA i OTA u uzorcima provedeno je nakon postupka iscrpljivanja i ELISA metode te usporedbom apsorbancija na ELISA čitaču mikrojažica (Awareness Stat Fax Reader, Neogen®) sa standardima ZEA (25, 75, 150 i 500 μg/kg)) i OTA (2, 5, 10 i 25 μg/kg). Dobiveni koncentracijski pravci sa snimljenim apsorbancijama na 650 nm (r^2=0,994 za ZEA i r^2=0,986 za OTA) u ovisnosti koncentracija mikotoksina, služili su za određivanje koncentracija ZEA i OTA u uzorcima. Prema proizvođaču, granica detekcije ZEA ovom metodom je 10 μg/kg, granica određivanja 25 μg/kg, a opseg određivanja je do 500 μg/kg pri matriksu pšenice, kukuruza i ječma. Prag detekcije za OTA je 1 μg/kg, granica određivanja je 2 μg/kg, a opseg određivanja je do 25 μg/kg uz matriks kukuruz, marelice, datulje, grožđice, smokve i zelenu kavu.

HPLC metoda

Visokoučinkovita tekućinska kromatografija (HPLC) primijenjena je za određivanje ZEA I OTA u uzorcima modifikacijom metode prema Frisvad i Thrane (1987). HPLC sustav tvrtke Shimadzu (Shimadzu LC system, Japan) je sastavljen od otplinjača (DGU-14 A), pumpe (FCV-10 AV) i UV-Vis detektora (SPD-10 A). Iscrpljeni uzorci (20 μL) injektirani su u C_{18} 150 × 4.6 mm kolonu za separaciju (CTO-10 A) s veličinom čestica 5 μm (Shimadzu Shim-pack VP-ODS). Netom prije injektiranja uzorka u kolonu, uzorci su filtrirani kroz najlonski filtar 0,45 μm (Nalgene®, Rochester, SAD). Mobilna faza načinjena je miješanjem mobilne faze A koja se sastoji od 0,2 % (V/V) octene kiseline (J. T. Baker®, Mallinckrodt Baker, SAD) u ultra-čistoj vodi (Milli-Q®, Millipore, SAD) te mobilne faze B odn. 100 % acetonitril (J. T. Baker®, Mallinckrodt Baker, SAD). Odjeljivanje sastavnica provedeno je gradijentnom metodom prema programu: 0-ta minuta 10% mobilne faze B te do 13-e minute mobilna faza B raste do 50 %, a u 27-oj minuti dostiže 90 %. Do 30 minute mobilna faza B ekvilibrira na 10 %. Otopina A je imala pH 3,8, a protok mobilne faze je postavljen na 1 mL/min. Mobilne faze su prije upotrebe otplinjene ultrazvukom. Za određivanje ZEA, snimani su kromatogrami na valnim duljinama 270 nm i 254 nm, a za OTA 225 nm i 254 nm. Za oba mjerenja temperatura kolone držana je konstantnom na 30°C. Ukupno vrijeme analize je bilo 30 minuta. ZEA i OTA standardi kupljeni su od Sigme (Sigma-Aldrich Co., SAD). Podatci su analizirani korištenjem Shimadzu VP-CLASS (verzije 6,14) programskog paketa (Shimadzu Deutschland GmbH).

Statistička obrada

Rezultati koncentracija ZEA i OTA u uzrocima uspoređeni su primjenom t-testa (razina značajnosti je postavljena na $p<0,05$) uz korelaciju metoda ELISA, HPLC i TLC koja je obrađena korištenjem programa GraphPad Prism (verzija 5), San Diego, Kalifornija, SAD za Windowse™.

REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati TLC metode

Primjenom metode tankoslojne kromatografije utvrđeni su pragovi detekcije za ZEA od 250 μg/kg te za OTA 60 μg/kg. Ovim kromatografskim postupkom dokazano je prisustvo ZEA u 9 uzoraka (24,3%) u koncentracijama od 333,3 do 2222,2 μg/kg (srednja koncentracija 1238 μg/kg). Najveći broj ZEA pozitivnih uzoraka (6) utvrđen je u Slavonskom Kobašu (srednja koncentracija 1116 μg/kg), dok je po jedan uzorak iz Živika i Lužana sadržavao 1111,1 μg ZEA/kg, odnosno 2222,2 μg ZEA/kg (Slika 2). OTA je dokazan samo u jednom uzorku (2,7 %) u koncentraciji 133 μg/kg (tablice 1 i 2).

Tablica 1. Analiza ZEA u hrani i krmivu ELISA i TLC/HPLC metodama

Table 1. Analysis of ZEA in food and feed using ELISA and TLC/HPLC methods

Vrsta uzorka Sample	ELISA			HPLC			TLC		
	Pozitivni uzorci Positive samples (%)	Srednja vrijednost Mean value (μg/kg)	Min.-maks. vrijednost Min - Max value (μg/kg)	Pozitivni uzorci Positive samples (%)	Srednja vrijednost Mean value (μg/kg)	Min.-maks. vrijednost Min - Max value (μg/kg)	Pozitivni uzorci Positive samples (%)	Srednja vrijednost Mean value (μg/kg)	Min.-maks. vrijednost Min - Max value (μg/kg)
Kukuruz Maize (N=12)	12 (100)	316,5	27,7 - 1182	9 (75)	234,7	31,2-1797,6	3 (25)	1481,4	1111,1-2222,2
Krmna smjesa Feed mixture (N=12)	12 (100)	622,3	49,7 - 1168	8 (67)	814,5	198-1145	6 (50%)	1486,7	333,3-2222,2
Pšenica Wheat (N=6)	4 (66,7)	29,1	12,5 – 50,4	1 (16,6)	-	68	-	-	-
Ječam Barley (N=4)	4 (100)	61,7	34,9-83,6	3 (75)	-	69,9	-	-	-
Zob - Oats (N=1)	1 (100)	-	18,4	-	-	-	-	-	-
Uljna repica Oilseed rape (N=1)	1 (100)	-	55,9	-	-	-	-	-	-
Zbirno - Total (N=37)	34 (91,9)	318,3	12,5 - 1182	23 (62)	521,9	31,2-1797,6	9 (24,3)	1238	333,3-2222,2

Rezulati ELISA metode

Rezultati određivanja ZEA i OTA u uzorcima prikazani su na tablicama 1 i 2. Svi ispitivani uzorci kukuruza, krmnih smjesa i ječma te pšenice kontaminirani su sa ZEA s različitim rasponom koncentracija. Ispitivani uzorci krmnih smjesa sadrže najveće količine ZEA (srednja vrijednost ZEA 622,3 μg/kg), a slijede ih uzorci kukuruza (srednja vrijednost ZEA 316,5 μg/kg). Uzorci pšenice, ječma, zobi i uljne repice sadrže znatno manje koncentracije ZEA (12,5-83,6 μg/kg), u odnosu na kukuruz i krmne smjese. Distribucija ZEA u ispitivanim uzorcima prikazana je na slici 1. Usporedbom uzoraka kukuruza i krmnih smjesa nije uočena statistički značajna razlika u količini ZEA ($p>0,05$; t-test). Isti uzorci bili su pozitivni na OTA (25% i 16,6%) sa srednjim vrijednostima OTA u kukuruzu 12,7 μg/kg, odnosno 9,1 μg/kg u krmnim smjesama, dok je samo jedan uzorak pšenice kontaminiran s OTA (2,6 μg/kg) (tablica 1). Ko-kontaminacija sa ZEA i OTA utvrđena je u 13,5 % uzoraka.

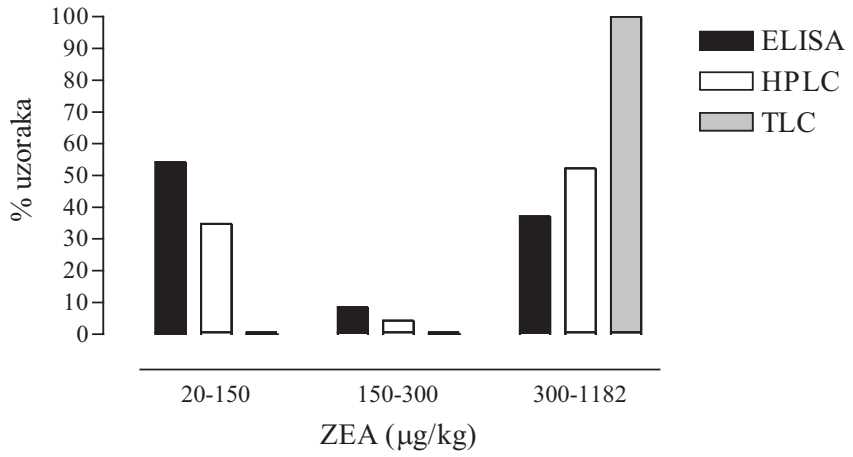
Na osnovi izmjerenih uzoraka na ZEA i OTA, sakupljenih tijekom 2007. u selima Pričic, Živike, Lužani i Slavonski Kobaš može se zaključiti da svi ispitivani uzorci sadrže manje koncentracije mikotoksina od granicama propisanim u *Pravilnika o nepoželjnim i zabranjenim tvarima u hrani za životinje* objavljenim u Narodnim novinama br. 118. u 2007. gdje je maksimalna dozvoljena koncentracija za ZEA u krmivima 3000 μg/kg, a za OTA 250 μg/kg. Navedeni pravilnik usklađen je s europskim zakonom o kakvoći hrane i prati pozitivne propise o sigurnosti hrane (čl. 14. i 16. Zakona o hrani, Narodne novine br. 46. iz 2007.). Prema *Pravilniku o toksinima, metalima, metaloidima te drugim štetnim tvarima koje se mogu nalaziti u hrani* objavljenim u Narodnim novinama br. 16. iz 2005., najveće dopuštene količine OTA u žitaricama iznose 3-5 μg/kg. Jedan uzorak kukuruza iz Slavonskog Kobaša (31,7

μg/kg) sadržavao je OTA u koncentraciji iznad dozvoljene. Isti uzorak također je sadržavao i visoku količinu ZEA (1182 μg/kg). U ostalim uzorcima kukuruza, sadržaj OTA je ispod dozvoljenih granica propisanih *Pravilnikom* (Narodne novine br. 16. iz 2005.). Dopuštena koncentracija ZEA u kukuruzu, kukuruznom brašnu te proizvodima od žitarica prema važećem *Pravilniku* je 200 μg/kg (uz opasku do utvrđivanja konačnih vrijednosti u EU), dok je Regulativa EU br. 1881/2006 slična te donosi granice od 200 μg/kg odnosno 350 μg/kg za neobrađene žitarice (Regulativa EU 1126/2007) za neobrađeni kukuruz, a za druge, neobrađene žitarice ta je granica 100 μg/kg. Iako ZEA ne izaziva toksične učinke slične drugim mikotoksinima (Kosalec i Pepeljnak, 2004), moguće je da kronični unos putem hrane ima određeni toksični učinak na čovjeka. Naime, visoke koncentracije ZEA u kukuruzu za prehranu ljudi, kao i krmnim smjesama ukazuje na vrlo visoku učestalost ovog metabolita plijesni ali i mogućih rezidua ovog ili njemu sličnih metabolita u hrani životinjskog podrijetla. Zanimljivo je da ZEA u krmnim smjesama u koncentracijama do 1 mg/kg uzrokuje smanjen prinos dok u koncentracijama u hrani za svinje od 1,5 do 5 mg/kg uzrokuje hiperestrogenizam (Richard, 2007). Iako s malim mortalitetom, ZEA ima jak estrogeni učinak te se i naziva mikoestrogen ili nesteroidni estrogen. No, do sada nije dokazano da ksenoestrogeni utječu na plodnost i na hormonalnu neravnotežu čovjeka (Bennett i Klich, 2003). Uspoređujući distribuciju ZEA u uzorcima (slika 1) uočava se nepravilna razdioba koncentracija ZEA. Većina uzoraka (N=21) sadrži ZEA u koncentraciji manjoj od 300 μg/kg, dok 13 uzoraka sadrži ZEA u koncentraciji većoj od 300 μg/kg . Usporedbom kontaminacije uzoraka sa ZEA s obzirom na mjesto uzorkovanja (slika 2), može se zaključiti da je srednja koncentracija ZEA veća u uzorcima iz Slavonskog Kobaša (18 uzoraka sa srednjom vrijednosti ZEA 453, μg/kg), slijede uzorci iz Lužana (3 uzorka sa srednjom vrijednošću ZEA 442,3 μg/kg), te uzorci iz Živike (6 uzoraka sa srednjnm vrijednosti ZEA 223 μg/kg). Najmanje ZEA izmjereno je u uzorcima iz Pričca, gdje je u 10 uzoraka srednja vrijednost ZEA bila 117,9 μg/kg. Usporedbom vrijednosti ZEA između uzoraka iz sela Pričac, Živike, Lužani i Slavonski Kobaš nije uočeno značajno odstupanje u koncentraciji ZEA.

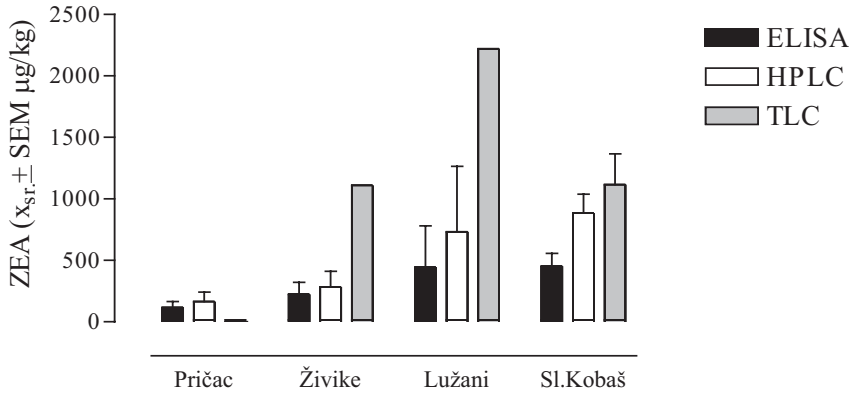
Tablica 2. Analiza OTA u hrani i krmivu ELISA i TLC metodama

Table 2. OTA analysis in food and feed using ELISA and TLC methods

Vrsta uzorka Sample	ELISA			TLC		
	Pozitivni uzorci Positive samples (%)	Srednja vrijednost Mean value (μg/kg)	Min.-maks. vrijednost Min - Max value (μg/kg)	Pozitivni uzorci Positive samples (%)	Srednja vrijednost Mean value (μg/kg)	Min.-maks. vrijednost Min - Max value (μg/kg)
Kukuruz - Maize (N=12)	3 (25)	12,7	2,5 - 31,7	1 (8,3)	-	133
Krmna smjesa Feed mixture (N=12)	2 (25)	9,15	5,4 – 12,9	-	-	
Pšenica - Wheat (N=6)	1 (16,7)	-	2,6	-	-	
Ječam - Barley (N=4)	-	-	-	-	-	
Zob - Oats (N=1)	-	-	-	-	-	
Uljna repica Oilseed rape (N=1)	-	-	-	-	-	
Zbirno - Total (N=37)	6 (16,2)	2,2	25 – 31,7	1 (2,3)	-	133



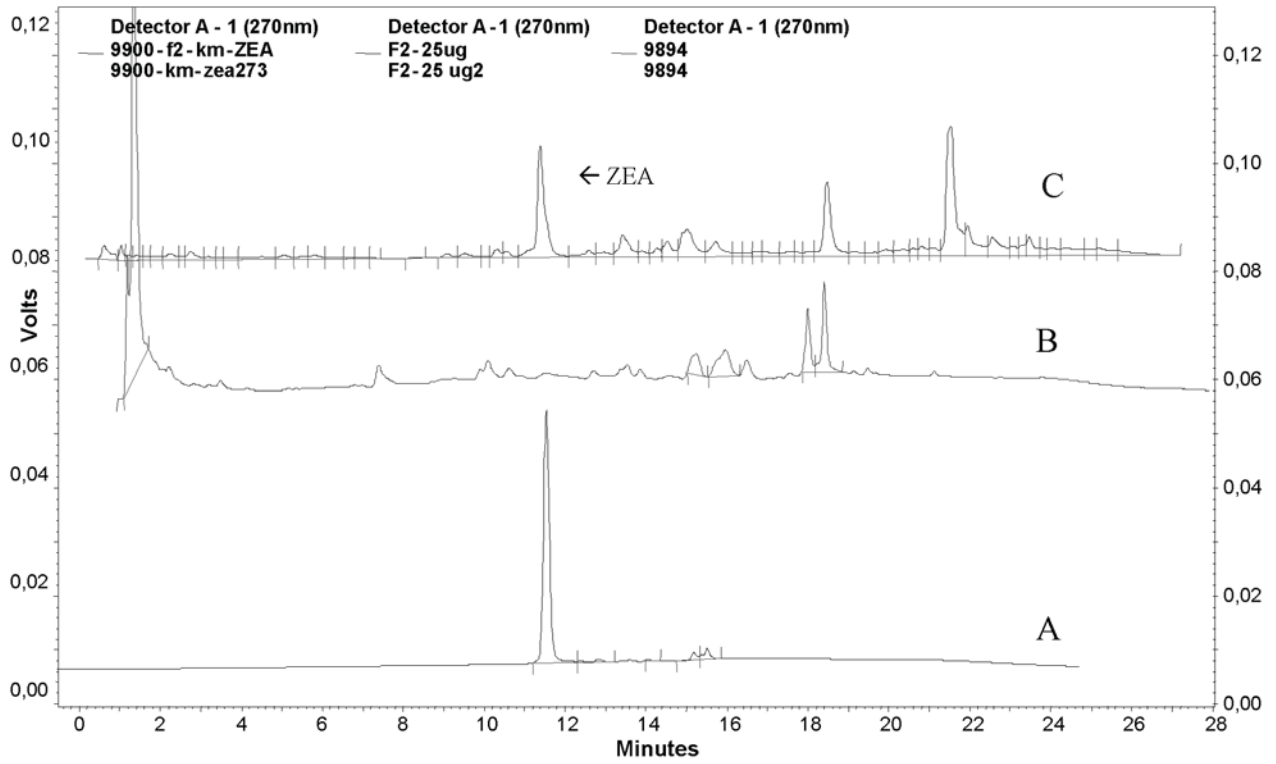
Slika 1. Distribucija koncentracija ZEA u uzorcima ispitivanim ELISA i TLC/HPLC metodama
Fig. 1. ZEA concentrations distribution in samples examined by ELISA, and TLC/HPLC methods



Slika 2. Učestalost ZEA prema mjestu uzorkovanja
Fig. 2. ZEA frequency according to place of sampling

Rezultati HPLC metode

Serija od pet različitih koncentracija ZEA i OTA u metanolu (0,05-100 μg/mL te od 100 do 500 μg/mL) unijeta je u HPLC kolonu te određena srednja relativna površina ispod pika nakon tri analize iste otopine standarda mikotoksina u navedenim koncentracijama. Na temelju provedenih analiza te izračuna srednjih vrijednosti površina ispod pika mikotoksina, izračunata je linearnost metode nakon načinjenih kalibracijskih pravaca sa sljedećim podacima za koeficijente korelacije i jednadžbu pravca: za ZEA (r^2=0,999; y=782161x - 201070) i za OTA (r^2=0,995; y= 3E+06x - 50804). Izračunata otpornost (robusnost) metode odnosno promjena pH mobilne faze je 3,78±0,01 (tri neovisna mjerenja) i retencijsko vrijeme (Rt) (na temelju deset neovisnih mjerenja) za ZEA 12,02±0,7 min i OTA 21,6 ± 0,8 min. Čistoća standarda bila je >99,6 %, te je rezolucija pika bila u granicama zahtjeva (Rs≥2). Granica detekcije (uz koeficijent k=3) za ZEA utvrđena je od 10 ng, a granica kvantifikacije (uz koeficijent k=10) 60 ng. Za OTA granice detekcije i kvantifikacije bile su iznad 200 ng. Na temelju provedenih analiza, navedena gradijenta HPLC metoda uz UV/Vis detektor prikladna je za analizu ZEA, no ne i za OTA. Na slici 3. usporedno su prikazani kromatogrami standarda ZEA (a), uzorka negativnog na ZEA (b) te uzorka pozitivnog na ZEA (c).



Slika 3. **Usporedni prikaz kromatograma strandarda ZEA (a), negativnog uzorka (b) i pozitivnog uzorka sa ZEA (c). Retencijsko vrijeme ZEA je 11,4 minute. Kromatogrami su snimljeni na 270 nm.**

Fig. 3. **Comparative presentation of ZEA standard chromatogram (a), negative sample (b) and positive sample with ZEA (c). ZEA retention time is 11.4 min. Chromatograms taken at 270 nm.**

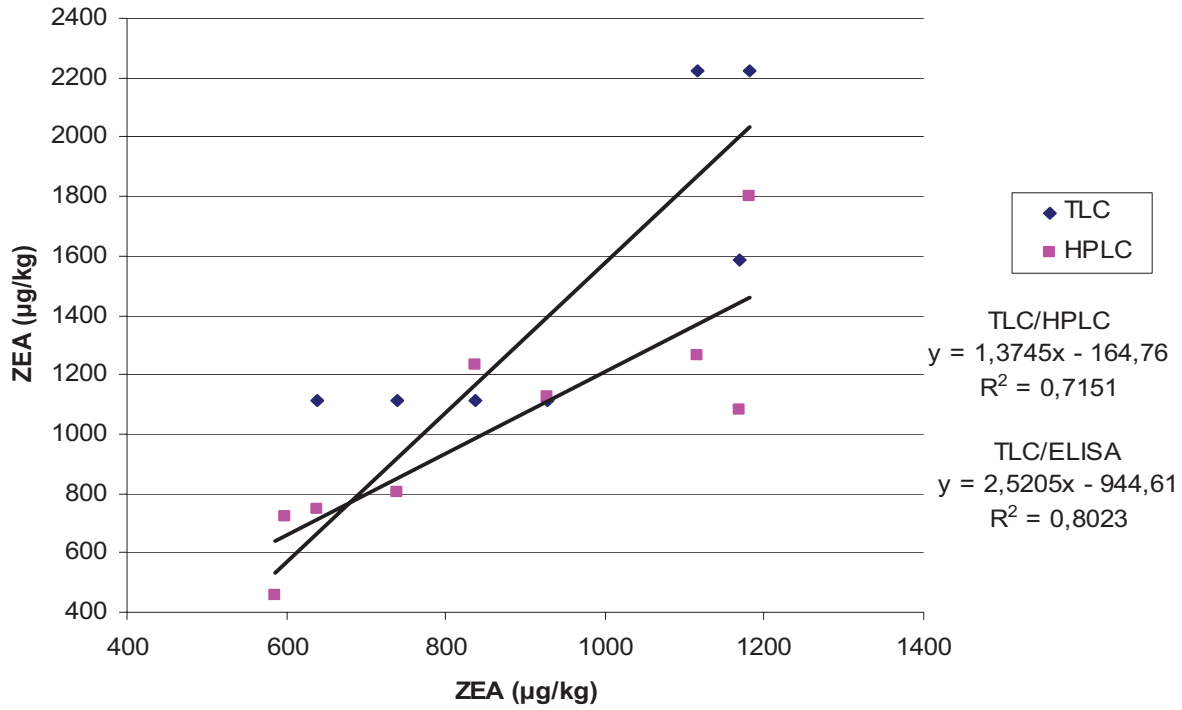
HPLC metodom ZEA je dokazan u 62 uzorka u rasponu od 31,2 do 1797,6 µg/kg, sa srednjom koncentracijom 521,9 µg/kg (tablica 1). Rezultati HPLC analize ZEA distribuirani su slično rezultatima ELISA metode. Najveće koncentracije ZEA utvrđene su u krmnim smjesama (srednja koncentracija 814,5 µg/kg), a zatim u kukuruzu (srednja koncentracija 622,3 µg/kg). Distribucija uzoraka prema podrijetlu također je slična distribuciji dobivenoj ELISA metodom (slike 1 i 2).

Usporedba TLC, ELISA i HPLC metoda

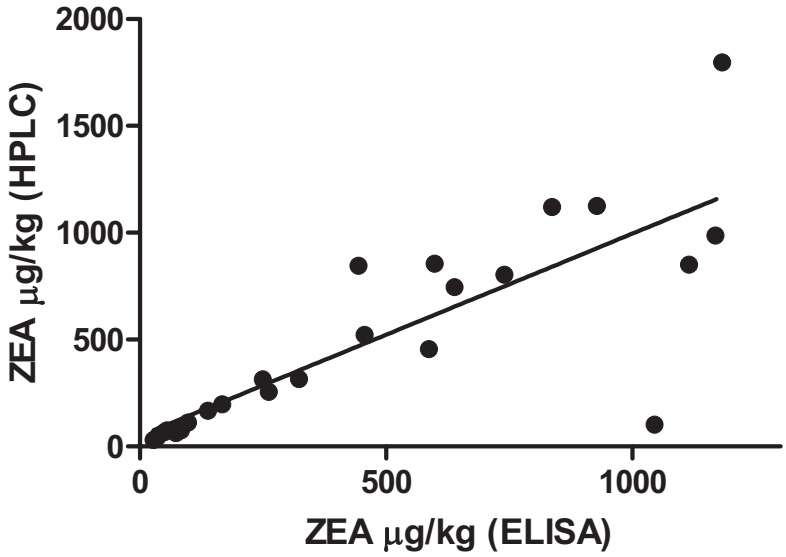
Usporedbom granica detekcije ZEA i OTA primjenom TLC, HPLC i ELISA metoda, najvišu granicu detekcije ima TLC za oba mikotoksina, dok je HPLC postupak pogodan za analizu ZEA s pragom kvantifikacije od 60 ng. Najosjetljivijom se pokazala ELISA metoda koja ima prag kvantifikacije za ZEA 25 µg/kg, a za OTA 2 µg/kg.

Izračunate vrijednosti za ZEA primjenom TLC, ELISA i HPLC metoda su uspoređene te je određen faktor korelacije i jednadžba pravca. Usporedbom TLC i ELISA metoda može se zaključiti da izmjerene koncentracije ZEA primjenom TLC metode (iako s vrlo visokim pragom deteckije za ZEA od 250 µg/kg što je ujedno i veliki nedostatak ove metode) koreliraju s podatcima izmjerenim primjenom ELISA i HPLC metoda (slika 4). Uspoređujući devet uzoraka u kojima je TLC, HPLC i ELISA metodom kvantificiran ZEA, utvrđeni su koeficijenti korelacije r^2=0,80 za odnos TLC/ELISA i r^2=0,72 za odnos TLC/HPLC.

Nadalje, vrlo dobra korelacija (r^2=0,82) za ZEA dobivena je usporedbom izmjerenih koncentracija ZEA primjenom ELISA i HPLC metoda na temelju izmjerenih 25 uzoraka (slika 5).



Slika 4. **Korelacije TLC s ELISA i HPLC metodama za dokazivanje ZEA**
Fig 4. **TLC correlations using ELISA and HPLC methods for proving ZEA**



(r^2=0,816; y=0,9462x+49,931)

Slika 5. **Korelacije između koncentracija dobivenih ELISA i HPLC postupcima**
Fig 5. **Correlations between concentrations obtained by ELISA and HPLC methods**

ZAKLJUČAK

Na temelju analiza ZEA i OTA u nasumično uzorkovanim uzorcima žita i krme s područja EN u Hrvatskoj tjekom 2007. godine može se zaključiti sljedeće: ZEA je prisutan u 91,9 % uzoraka i to u svim uzorcima kukuruza, krme, pšenice, ječma te zobi i uljne repice s najvišim vrijednostima u kukuruzu i krmi (između 27,7 i 1182 μg/kg). OTA je dokazan u osam uzoraka kukuruza, krme i pšenice u rasponu koncentarcija između 2,5 i 31,7 μg/kg. Navedeni pozitivni uzorci na ZEA i OTA (izuzev jednog) odgovaraju nacionalnom i europskom zakonu o prisutnosti ZEA i OTA u žitaricama, odnosno krmi. Nema značajne razlike u nalazima s obzirom na mjesto uzorkovanja, no uzorci iz Lužana i Slavonskog Kobaša pokazuju veće srednje vrijednosti ZEA u uzorcima. Uspordbom analitičkih metoda dokazano je da najnižu granicu detekcije ZEA i OTA ima ELISA, a slijedi ju HPLC metoda. TLC metoda ima najvišu granicu detekcije, a time i određivanja. Uspoređujući koncentracije ZEA u uzorcima između pojedinih metoda, utvrđene su statistički značajne korelacije. ELISA metoda se pokazala najbržom, ekonomski i ekološki prihvatljivom metodom s kojom se može ispitati veliki broj uzoraka u kratkom vremenu bez posebnog stručnog osposobljavanja analitičara, što joj daje prednost nad HPLC i TLC metodama.

Zahvale

Autori najsrdačnije zahvaljuju tvrtki Noack d. d. (Zagreb) na ustupljenim ELISA testovima i ELISA čitaču. Rad je dijelom sufinanciran projektom br. 006-0061117-1242 Ministrastva znanosti, obrazovanja i športa RH.

LITERATURA

1. Bennett, J. W., Klich, M. (2003): Mycotoxins. Clin. Microbiol. Rev. 16: 497–516.
2. Blesa, J., Berrada, H., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J. (2004): Rapid determination of ochratoxin A in cereals and cereals products by liquid chromatography. J. Chromatograph. A, 1046:127-131.
3. Frisvad, J. C., Thrane, U. (1987): Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and UV-VIS spectra (diode array detection). J . Chromatograph. 404:195-214.
4. Heenan, C. N., Shaw, K. J., Pitt, J. I. (1998) Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. J. Food Mycology 1**:** 67–72.
5. IARC (1993). Ochratoxin A. In: Some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monographs on the evolution of carcinogenic risks to humans, Vol. 56. Geneva: International Agency for Research on Cancer, pp. 489–521.
6. JECFA (2000): Zearalenone. In: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (ur.), Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO/FAO Food additives Series 44. IPCS – International Programme on Chemical Safety. WHO, Geneva.
7. JECFA (2001): Ochratoxin A. In: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (ur.), Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO/FAO Food additives Series 47. IPCS – International Programme on Chemical Safety. WHO, Geneva.
8. Kosalec, I., Pepeljnjak, S. (2004): Najznačajniji mikotoksini i mikotoksikoze, Praxis vet. 52:169-181.
9. Kuiper-Goodman, T., Scott, P. M. (2002): Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A, Biomed. Environ. Sci. 2:179–248
10. Lin, L., Zhang, J., Wang, P., Wang, Y., Chen, J. (1998): Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. J. Chromatograph. 815:3–20.
11. Krogh, P. (1980): Causal association of mycotoxic nephropathy. Medical Mycol. Zbl. Bakt. Suppl. 8:291-299.
12. Pepeljnjak, S., Šegvić, M. (2004): An overview of mycotoxins and toxigenic fungi in Croatia. In: Logrieco, A., A. Visconti (ed.): An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 33-50.
13. Peterson, S. W. (2000): Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. In: R.A. Samson and J.I. Pitt, Editors, Classification of *Penicillium* and *Aspergillus*: Integration of modern taxonomic methods, Harwood Publishers, Reading, United Kingdom, pp. 323–356.
14. Pfohl-Leszkowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I. N., Castegnaro,M. (2002): Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. Food Addit. Contam. 19**:**282–302.

15. Radavanovic, S., Jankovic, S., Jeremovic, J. (1991): Incidence of tumours of urinary organs in focus of Balkan endemic nephropathy, Kidney Int. 40 (Suppl. 34): 75–77.
16. Richard, J. L. (2007): Some major mycotoxins and their mycotoxicosesan overview. Int. J. Food Microbiol. 119:3–10.
17. Thirumala-Devi, K., Mayo, M.A., Reddy, G., Reddy, S.V., Delfosse, P., Reddy, D.V. (2000): Production of polyclonal antibodies against ochratoxin A and its detection in chilies by ELISA. J. Agr. Food Chem. 48: 5079-5082.
18. Zimmerli, B., Dick, R. (1995): Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. J. Chromatograph. 666: 85-99.

SUMMARY

Fusarium and *Penicillium* are the most common mould species that contaminate cereals in the mild climatic zone. Therefore, zearalenone (ZEA) and ochratoxin A (OTA) are frequently detected in these substrates in different concentrations depending on storage and microclimatic conditions. The purpose of this study was to determine the frequency and concentrations of ZEA and OTA in cereal and feed samples randomly collected in individual households of endemic nephropathy region (EN) in Croatia. Direct competitive ELISA test kit was used for ZEA and OTA determination according to manufacturer instructions. Results of ELISA method as well as limits of detection (LOD) and quantification were compared with high performance liquid chromatography (HPLC) and thin layer chromatography (TLC) methods. Correlation between results was also analysed. ZEA was detected in 91.9% of samples ranging between 12.5 and 1168 μg/kg (mean 318.3 μg/kg), while OTA was recovered from 16,2% of samples in concentrations ranging from 2.5 μg/kg to 31.7 μg/kg (mean 9.8 μg/kg). ZEA and OTA simultaneously occurred in 13.5 % of samples. Detected values of mycotoxins were under the permissible levels according to Croatian law (Narodne novine No. 118/2007 and European Commission (EC/576/2006 and EC/1881/2006). The lowest LOD was obtained by ELISA followed by HPLC. Mycotoxin concentrations detected by ELISA significantly correlate with results obtained by HPLC. ELISA provide an attractive and promising method for OTA and ZEA detection in food due to high specificity, sensitivity, simplicity (analysis of high number of samples) and it is ecologically more acceptable than chromatographic methods. Advantage of HPLC method is multiple mycotoxin detection and quantification in one sample.

Key words: ELISA i TLC/HPLC methods, zearalenon, ochratoxin