



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU, BIOHEMIJU I
ZAŠTITU ŽIVOTNE SREDINE



Mr Sandra Jakšić

Prilog određivanju i rasprostranjenost fumonizina u žitaricama i lekovitom bilju u Srbiji

Doktorska disertacija

Novi Sad, 2014.

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu i na Odeljenju za ispitivanje kvaliteta namirnica i hrane za životinje Naučnog instituta za veterinarstvo "Novi Sad".

Doktorska disertacija je rađena u okviru projekata: „Razvoj novih i poboljšanje postojećih postupaka praćenja i unapređenja kvaliteta životne sredine“ (ON142029) i „Razvoj metoda praćenja i uklanjanja biološki aktivnih supstanci u cilju unapređenja kvaliteta životne sredine“ (ON172042), koje je finansiralo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, kao i u okviru međunarodnog projekta: SEE-ERA.NET PLUS, "Systems to reduce mycotoxins contamination of cereals and medicinal plants in order to preservation native species and traditional products in Romania-Serbia-Croatia area", No. 139 CROSSMICOTOX, kojim je rukovodila prof. dr Biljana Abramović.

Ovom prilikom želim najtoplije da se zahvalim dr Biljani Abramović, redovnom profesoru, koja je kao mentor rukovodila izradom disertacije i najviše mi pomogla u u toku rada. Ceniću uvek njen trud i strpljenje kojim mi je prenela svoje veliko znanje.

Na korisnim sugestijama u toku pisanja disertacije hvala dr Ljiljani Jovanović, redovnom profesoru i dr Zoranu Mašiću, naučnom savetniku.

Dr Igoru Jajiću, vanrednom profesoru, želim da se zahvalim na obezbeđenom delu uzoraka analiziranih u ovoj disertaciji. Hvala na pomoći i izuzetnoj saradnji.

Dr Milici Živkov-Baloš, višem naučnom saradniku, hvala na interesovanju i velikoj pomoći u organizaciji rada na disertaciji.

Dr Borislavu Abramoviću, profesoru u penziji želim da se zahvalim za veliku stručnu pomoć u izradi ekspertnog sistema, a dr Vesni Despotović hvala na pomoći u snimanju spektara na FTIR-u.

Mikrobiološka analiza lekovitog bilja je urađena na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku, te se ovim putem najlepše zahvaljujem dr Jasenki Čosić i njenim saradnicima.

Dragoj kolegici Jasmini Samec, dipl. inž. tehn. se zahvaljujem na ustupljenom referentnom materijalu.

Zahvaljujem se kolegama Odeljenja za mikrobiološko ispitivanje hrane za životinje, a posebno Odeljenja za ispitivanje kvaliteta namirnica i hrane za životinje Naučnog instituta za veterinarstvo "Novi Sad" na pomoći i velikoj kolegijalnosti.

Prof. dr Miroslavu Ćirkoviću, direktoru Naučnog instituta za veterinarstvo "Novi Sad", hvala za izuzetno veliko poverenje koje mi je ukazao u trenutku kada mi je bilo najpotrebnije.

Na kraju, hvala mojim roditeljima na bezuslovnoj ljubavi, podršci i pomoći, a takođe hvala i porodici Jakšić. Svom bratu Aleksandru, kao i Danijeli, Marini i Zoranu želim da se zahvalim što su najvećom i najlepšom podrškom učinili da moja roditeljska savest u toku rada bude mirna.

Najdražima Vukašinu, Katarini i Dejanu hvala za neizmernu ljubav, snagu, inspiraciju i strpljenje.

SADRŽAJ

LISTA SKRAĆENICA	1
1 UVOD	4
2 TEORIJSKI DEO	8
2.1 OSOBINE FUMONIZINA	8
2.1.1 Fizičke i hemijske osobine	8
2.1.2 Toksičnost fumonizina	10
2.2 FUMONIZINI U ŽITARICAMA	12
2.2.1 Uslovi produkcije	12
2.2.2 Prisustvo fumonizina u žitaricama	17
2.3 FUMONIZINI U LEKOVITOM BILJU	20
2.4 SINERGISTIČKO DEJSTVO MIKOTOKSINA	25
2.5 ZAKONSKI PROPISI O FUMONIZINIMA	26
2.6 ODREĐIVANJE FUMONIZINA	31
2.6.1 Uzorkovanje i priprema uzorka	32
2.6.2 Ekstrakcija	34
2.6.3 Prečišćavanje ekstrakta	40
2.6.4 Detekcija i određivanje	44
2.6.4.1 Hromatografske metode	45
2.6.4.2 Molekulska spektroskopija	54
2.6.4.3 Imunohemijska metoda	61
2.7 EKSPERTNI SISTEMI U ANALITIČKOJ HEMIJI	63
3 EKSPERIMENTALNI DEO	68
3.1 UZORCI, HEMIKALIJE I RASTVORI	68
3.2 APARATURA	71
3.3 ANALITIČKI POSTUPCI	74
3.3.1 Priprema uzoraka	74
3.3.2 Tečna hromatografija sa fluorescentnom detekcijom (HPLC–FLD)	75
3.3.3 Imunohemijska (ELISA) metoda	77
3.3.4 Infracrvena spektrometrija sa Furijeovim transformom (FTIR)	77
3.3.5 Statistička analiza	78
4 REZULTATI I DISKUSIJA	79
4.1 OPTIMIZACIJA I VALIDACIJA HPLC–FLD METODE ZA ODREĐIVANJE FUMONIZINA	79
4.2 EKSTRAKCIJA NEORGANSKIM RASTVARAČIMA ZA ODREĐIVANJE FUMONIZINA B ₁ , B ₂ I B ₃ U KUKURUZU HPLC–FLD METODOM I ELISA TESTOVIMA	87
4.2.1 Validacija metoda ekstrakcije neorganskim rastvaračima	88

4.2.2	Ekstrakcione metode neorganskim rastvaračima u analizi uzoraka kukuruza i proizvoda od kukuruza	97
4.3	SADRŽAJ FUMONIZINA U ŽITARICAMA	100
4.3.1	Uticaj tradicionalnog načina skladištenja na produkciju fumonizina u kukuruзу u Srbiji	103
4.3.2	Prisustvo fumonizina i drugih mikotoksina u kukuruзу roda 2009. godine sa područja severne Srbije	105
4.3.3	Sadržaj fumonizina u pšenici i kukuruзу roda 2010. godine u Srbiji	110
4.3.4	Prisustvo fumonizina i aflatoksina u kukuruзу roda 2012. godine	116
4.3.5	Uticaj klimatskih faktora na produkciju fumonizina u žitaricama u Srbiji	118
4.3.6	Rasprostranjenost fumonizina pored aflatoksina u hrani na bazi kukuruза na tržištu Srbije.....	129
4.4	ODREĐIVANJE FUMONIZINA U LEKOVITOM BILJU	133
4.5	PRIMENA FTIR ANALIZE ZA ODREĐIVANJE FUMONIZINA U KUKURUZU.....	141
4.6	EKSPERTNI SISTEM ZA ODREĐIVANJE FUMONIZINA.....	148
5	IZVOD.....	156
6	SUMMARY	161
7	LITERATURA	166
	BIOGRAFIJA	195
	SPISAK RADOVA I SAOPŠTENJA	196
	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	201
	KEYWORDS DOCUMENTATION	203

LISTA SKRAĆENICA

ACN	acetonitril
AOAC	Asocijacija analitičkih udruženja (Association of Analytical Communities)
ANOVA	analiza varijanse (ANalysis Of Variance)
API	jonizacija pod atmosferskim pritiskom (Atmospheric Pressure Ionisation)
APCI	hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation)
ASE	ubrzana tečna ekstrakcija (Accelerated Solvent Extraction)
ATR	umanjena ukupna refleksija (Attenuated Total Reflection)
BMDL ₁₀	referentna doza koja dovodi do 10% odgovora na populaciji (BenchMark Dose Lower confidence limit for a 10% response)
CAD	detektor naelektrisane aerosoli (Charged Aerosol Detector)
CID	disocijacija indukovana koliziom (Collision Induced Dissociation)
CFU	ukupan broj kolonija (plesni) (Colony Forming Unit)
DA	diskretna analiza
DAS	diacetoksiscirpenol
DR	difuziona refleksija
C ₁₈	hemijski modifikovan silicijum-dioksid sa oktadecil-ugljovodoničnim nizom
DON	deoksinivalenol
EC	Evropska komisija (European Commission)
EDTA	etilen- diamin- tetra- sirćetna kiselina
ELISA	imunohemijska metoda (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays)
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
ES	ekspertni sistemi
ESI	elektrosprej jonizacija (Electrospray Ionisation)
EtOH	etanol
EU	Evropska Unija (European Union)
FA	faktorska analiza (Factor Analysis)
FAO	Organizacija za hranu i poljoprivredu (Food and Agriculture Organization)
FB	fumonizini grupe B
FB ₁	fumonizin B ₁

FB ₂	fumonizin B ₂
FB ₃	fumonizin B ₃
FB ₄	fumonizin B ₄
FP	fosfatni pufer
FSO	bezbednost hrane kao cilj (Food Safety Objective)
FTIR	infracrvena spektroskopija sa Furijeovim transformom (Fourier Transform InfraRed spectroscopy)
FTIR–PAS	fotoakustična spektroskopija sa Furijeovim transformom (Fourier Transform InfraRed PhotoAcoustic Spectroscopy)
Fu	<i>Fusarium</i>
GC	gasna hromatografija (Gas Chromatography)
GD	granica detekcije
GO	granica određivanja
HACCP	sistem analize opasnosti i kontrole kritičnih tačaka (Hazard Analysis Critical Control Point)
HFB ₁	hidrolizovan FB ₁ (C ₂₂ -amino-pentol)
HFB ₂	hidrolizovan FB ₂ (C ₂₂ -amino-tetrol)
TOFMS	masena spektrometrija na bazi vremena preleta jona, (Time Of Flight Mass Spectrometry)
HPLC–FLD	tečna hromatografija pod visokim pritiskom–fluorescentna detekcija (High Pressure Liquid Chromatography–FLuorescence Detection)
IARC	Međunarodna organizacija za istraživanje kancera (International Agency for Research on Cancer)
IMA	imunoafinitetna (kolona)
IR–PAS	fotoakustična infracrvena spektroskopija (InfraRed PhotoAcoustic Spectroscopy)
ITMS	masena spektrometrija sa jonskom zamkom (Ion Trap Mass Spectrometry)
KDA	krompirov dekstrozni agar
LC	tečna hromatografija (Liqiud Chromatography)
MCE	2-merkaptioetanol
MeOH	metanol
MLR	višestruka linearna regresija (Multiple Linear Regression)
MRM	praćenje višestrukih reakcija (Multiple Reaction Monitoring)
MS	masena spektrometrija
NBD-F	4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazol, (4-fluoro-7-nitrobenzofurazan)
NIR	spektroskopija u bliskoj infracrvenoj oblasti (Near InfraRed spectroscopy)

OPA	<i>o</i> -ftaldialdehid
OTA	ohratoksin A
PCA	analiza glavnih komponentata (Principal Component Analysis)
PHFB ₁	parcijalno hidrolizovan FB ₁
PLS	parcijalna regresija najmanjih kvadrata (Partial Least Squares)
PSA	primarni sekundarni amin
PMTDI	privremeni maksimalni tolerantni dnevni unos (Provisional Maximum Tolerable Daily Intake)
QuEChERS	brza-laka-jeftina-efikasna-robustna-bezbedna (metoda), (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe)
QqQ	trostruki kvadrupol
RHMZS	Republički hidrometeorološki zavod Srbije
RM	referentni materijal
RSD	relativna standardna devijacija
SAX	jak anjonski izmenjivač (Strong Anion Exchange)
SD	standardna devijacija
SEC	standardna greška kalibracije (Standard Error of Calibration)
SECV	standardna greška međuvalidacije (Standard Error of Cross Validation)
SEP	standardna greška predviđanja (Standard Error of Prediction)
SPE	ekstrakcija na čvrstoj fazi (Solid Phase Extraction)
SPI	standardizovani indeks padavina (Standardized Precipitation Index)
TIRS	tranziciona infracrvena spektroskopija (Transient InfraRed Spectroscopy)
TLC	hromatografija na tankom sloju (Thin Layer Chromatography)
TSP	termosprej (ThermoSPray)
UHPLC	tečna hromatografija pod ultravisokim pritiskom (Ultra High Pressure Liquid Chromatography)
WHO	Svetska zdravstvena organizacija (World Health Organization)

1 UVOD

Fumonizini su mikotoksini koji često kontaminiraju žitarice, a najčešće kukuruz i proizvode od kukuruza (FAO/WHO, 2011a). Produkuju ih plesni iz roda *Fusarium*, a najrasprostranjeniji i direktno povezani sa patogenim efektima su fumonizini B-serije. Fumonizin B₁ je pokazao hepatotoksične i hepatokarcinogene (negenotoksične) efekte kod pacova (Gelderblom *et al.*, 1988, 1991). Izaziva leukoencefalomalaciju kod konja (Plattner *et al.*, 1990) i pulmonalni edem kod svinja (Harrison *et al.*, 1990). Prisustvo fumonizina u kukuruzu je statistički povezano sa kancerom jednjaka kod ljudi u Južnoj Africi (Sydenham *et al.*, 1990b) i Kini (Chu i Li, 1994). Internacionalna agencija za istraživanje kancera je klasifikovala *Fusarium moniliforme* toksine kao potencijalno karcinogene za ljude (klasa 2B karcinogena), slično ohratoksinu A (IARC, 2002).

Prisustvo fumonizina u sirovom kukuruzu zavisi od klimatskih uslova pred žetvu i tokom žetve, kao i od uslova skladištenja (Bacon i Nelson, 1994). Obzirom da je dokazan njihov štetan uticaj na zdravlje ljudi i životinja, velika pažnja se poklanja proučavanju fumonizina, posebno B-serije. Pošto se fumonizini nalaze u malim koncentracijama i u različitim matriksima, postoji potreba za iznalaženjem efikasnih metoda za njihovo kvantitativno određivanje. Do sada je potenciran razvoj hromatografskih metoda, uz korišćenje različitih postupaka prečišćavanja sirovog ekstrakta uzorka. Metoda ekstrakcije ima veliki uticaj na rezultat određivanja fumonizina i zato su urađene brojne komparativne studije sa različitim ekstrakcionim rastvaračima za sirovi kukuruz i proizvode od kukuruza (De Girolamo *et al.*, 2001; Sewram *et al.*, 2003). Do sada su za ekstrakciju fumonizina iz žitarica uglavnom korišćene smeše vode i organskih rastvarača koji s jedne strane zagađuju okolinu, a sa druge poskupljuju analizu. Ne postoji optimalna procedura ekstrakcije koja je primenljiva na sve vrste uzoraka, a dokazan je veliki uticaj temperature i sastava rastvarača na efikasnost ekstrakcije fumonizina iz različitih matriksa (Rice *et al.*, 1995; Meister, 1999; Scott *et al.*, 1999; Lawrence *et al.*, 2000; Kulisek i Hazebroek, 2000; Kim *et al.*, 2002; Sulyok *et al.*, 2006; Pietri i Bertuzzi, 2012). Različiti rastvarači imaju različitu efikasnost za različite matrikse, a njihov izbor utiče na izbor dalje procedure prečišćavanja (Sewram *et al.*, 2003).

Najčešće korišćene i standardizovane metode analize fumonizina zahtevaju uglavnom mnogo vremena, te postoji potreba za razvojem brzih, a ujedno pouzdanih metoda za rutinske

analize velikog broja uzoraka. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovim transformom (FTIR) se kao brza i jednostavna metoda često koristi u kvalitativnoj analizi žitarica, a postoje istraživanja koja pokazuju mogućnost njene primene u detekciji toksigenih plesni i oštećenih zrna, kao indirektnom određivanju prisustva mikotoksina (Gordon *et al.*, 1999; Delwiche i Hareland, 2004; Abramović *et al.*, 2007).

Podaci o monitoringu sadržaja fumonizina u kukuruzu širom sveta ukazuju na važnost i upozoravaju na toksičnost ovih mikotoksina (Soriano i Dragacci, 2004; Stockmann-Juvala i Savolainen, 2008). Budući da su fumonizini uobičajeni kontaminanti kukuruza potrebno je bolje definisati uslove sredine koji favorizuju akumulaciju fumonizina u zrnu kukuruza. U literaturi postoje oprečni stavovi po pitanju mogućnosti produkcije i prisustvu fumonizina na pšenici (Marin *et al.*, 1999; Shephard *et al.*, 2005; Chehri *et al.*, 2010).

U Srbiji nema dovoljno informacija o rezultatima određivanja sadržaja mikotoksina, a naročito fumonizina u hrani na bazi žitarica i uzorcima pšenice (Matić *et al.*, 2009). Hrana na bazi žitarica ima važnu ulogu u tradicionalnoj srpskoj ishrani, ali je isto tako atraktivna u modernoj ishrani, kao takozvana „zdrava hrana“.

Studije su pokazale da istovremeno prisustvo nekoliko mikotoksina može da ispolji sinergističko dejstvo što ima za posledicu više toksičnih efekata nego kada su mikotoksini prisutni pojedinačno (Kubena *et al.*, 1997), te su bitni podaci o eventualnoj prisutnosti više toksina u istim uzorcima.

Poslednjih godina raste konzumacija čajeva u svrhu uživanja i lečenja, a tokom obrade, proizvodnje i skladištenja moguća je kontaminacija biljnog materijala plesnima i mikotoksinima (Aziz *et al.*, 1998; Halt, 1998; Omurtag i Yazicioğlu, 2004; Santos *et al.*, 2009; Monbaliu *et al.*, 2010). Obzirom na literaturne podatke o broju kontaminiranih uzoraka u zemljama poznatim po proizvodnji čajeva (Martins *et al.*, 2001; Omurtag i Yazicioğlu, 2004; Sewram *et al.*, 2006; Katerere *et al.*, 2008), postavlja se pitanje mogućnosti produkcije fumonizina na lekovitom bilju proizvedenom i korišćenom u Srbiji.

Ekspertni sistemi (ES) su oblast primene veštačke inteligencije, a zasnivaju se na ideji da se sposobnost ekspertize, koja je rezultat specifičnog znanja eksperata, prenese sa čoveka na računar. Ovo znanje se zatim pohranjuje u računar i korisnici ga mogu pozvati sa računara za specifične savete kada god je to potrebno. U oblasti analitičke hemije je već razvijen veći broj ES (Abramović, 1996; Abramović *et al.*, 1996; Bonastre *et al.*, 2001; Peris, 2002). U laboratorijama za hemijsku analizu hrane je zamena stručnjaka sa savremenim računarski-podržanim sistemima, možda nešto sporija nego u drugim oblastima analitičke hemije (Peris, 2002), iako ES imaju značajne prednosti. Zbog raznovrsnosti metoda određivanja

fumonizina, razvoj ES u ovoj oblasti pomogao bi analitičarima u rešavanju problema izbora optimalne analitičke metode za određivanje fumonizina u kukuruзу.

Zbog svega navedenog, istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bila su usmerena u nekoliko pravaca: optimizacija analitičkog postupka ekstrakcije fumonizina neorganskim rastvaračima, njihovo određivanje metodama tečne hromatografije i imunoheмиjskim (ELISA) metodama u žitaricama i lekovitom bilju; primena FTIR analize za brzo određivanje fumonizina u žitaricama; izrada ekspertnog sistema za određivanje fumonizina i ispitivanje kontaminiranosti žitarica i lekovitog bilja fumonizinima pored drugih mikotoksina na našem podneblju.

Poboljšanje analitičkog postupka se ogledalo u ispitivanju primene ekološki prihvatljivijih ekstrakcionih sredstava. Pošto su fumonizini rastvorljivi u vodi, u okviru ove doktorske disertacije proučavana je efikasnost ekstrakcije fumonizina pomoću alternativnih sredstava ekstrakcije bez organskih rastvarača, uz primenu imunoafinitetnih kolona za prečišćavanje sirovog ekstrakta. Tako dobijen ekstrakt nakon derivatizacije *o*-ftaldialdehid-2-merkaptetanol- reagensom analiziran je tečnom hromatografijom sa fluorescentnim detektorom (HPLC–FLD). Takođe je ispitana mogućnost primene ovakve ekstrakcije za određivanje ELISA metodom, pomoću dva komercijalna kompleta.

Uporedo sa optimizacijom ekstrakcije i postojećih hromatografskih postupaka, ispitivana je mogućnost korišćenja jednostavnijih i brzih tehnika u poređenju sa standardnom metodom HPLC–FLD (AOAC, 2002). Zbog većito aktuelne potrebe za što bržim i jeftinijim analizama, ispitana je mogućnost primene FTIR metode kao tzv. skrining metode za određivanje fumonizina. U istom cilju su urađena uporedna ispitivanja ELISA metode i HPLC–FLD.

Do danas nije razvijen nijedan ekspertni sistem u oblasti analitike mikotoksina. Zbog velikog broja metoda za određivanje fumonizina, u okviru ove doktorske disertacije rađeno je na razvijanju ekspertnog sistema za rešavanje problema izbora optimalnog analitičkog postupka za određivanje fumonizina u kukuruзу.

Na osnovu prikazane radne hipoteze uočava se potreba za ispitivanjem prisutnosti i sadržaja fumonizina u našoj zemlji jer ne postoji dovoljno podataka o sadržaju ovog mikotoksina u žitaricama i lekovitom bilju. Analiziranje velikog broja uzoraka sa šireg područja Vojvodine izvršeno je radi dobijanja realnije slike o prisutnosti ovog mikotoksina u žitaricama (kukuruz i pšenica) i lekovitom bilju (kamilica, hajdučka trava i majčina dušica). Budući da su fumonizini uobičajeni kontaminanti kukuruза potrebno je bolje definisati uslove sredine koji favorizuju akumulaciju fumonizina u zrnu kukuruза. Proučavanjem

uticaja različitih faktora došlo se do zaključaka da produkcija fumonizina najviše zavisi od lokaliteta i vremenskih uslova (dnevne padavine, dnevna maksimalna i minimalna temperatura, relativna vlažnost), zatim od prisustva insekata i, na kraju, od hibrida (Keller *et al.*, 1997; Orsi *et al.*, 2000; Ono *et al.*, 2002; De la Campa *et al.*, 2005). Zato je ispitivan uticaj navedenih faktora u uslovima naše poljoprivredne proizvodnje na kontaminaciju žitarica fumonizinima.

Uzorci žitarica su prikupljeni sa različitih lokaliteta, kako tokom žetve, tako i nakon skladištenja. Analizirane su i razne sorte pšenice sa različitih lokaliteta u Vojvodini. Uzorci hrane na bazi žitarica su prikupljeni iz redovne prodaje, iz originalnog pakovanja, kao i iz rinfuze. Uzorci lekovitog bilja su prikupljeni sa različitih lokaliteta i od više proizvođača u skladu sa metodologijom uzorkovanja propisanom od strane Evropske komisije (EC, 2006a).

2 TEORIJSKI DEO

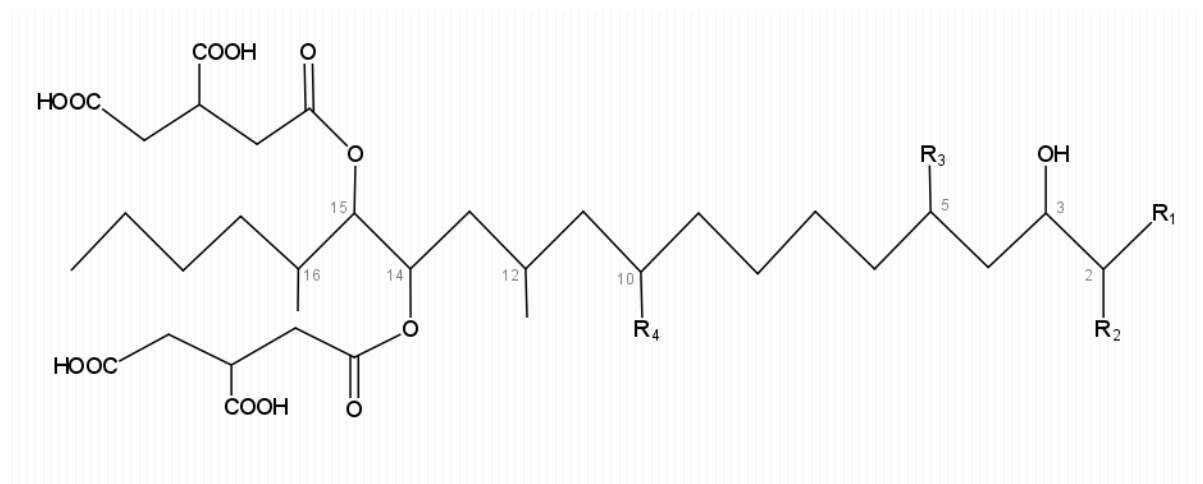
2.1 OSOBINE FUMONIZINA

2.1.1 Fizičke i hemijske osobine

Fumonizini su sekundarni metaboliti plesni *Fusarium moniliforme* Sheldon (poznate i pod imenom *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg), *Fusarium proliferatum* (Matsushima) i *Fusarium nygamai* (Ross *et al.*, 1990; Rheeder *et al.*, 2002). Osim na *Fusariumu*, fumonizini su detektovani i na kulturi *Aspergillus niger* (Frisvad *et al.*, 2007; Månsson *et al.*, 2010). Fumonizini su grupa jedinjenja koja je prvi put izolovana i dokazana 1988. godine (Gelderblom *et al.*, 1988). Široko su rasprostranjeni u prirodi, a najčešće kontaminiraju kukuruz i proizvode od kukuruza (FAO/WHO, 2011a).

Danas je poznato 28 strukturnih analoga fumonizina (Kushiro *et al.*, 2009), koji su grupisani u četiri serije: A, B, C i P (Soriano i Dragacci, 2004). To su polarna jedinjenja čija je osnova dug ugljovodonični niz koji se sastoji od 20, odnosno 19 (C-serija) ugljenikovih atoma. Najrasprostranjeniji i direktno povezani sa patogenim efektima su fumonizini B-serije koji su po svojoj hemijskoj strukturi diestri propan-1,2,3-trikarboksilne kiseline i 2-amino-12,16-dimetilpolihidroksieikosana (Slika 2.1). Obe hidroksilne grupe u položaju C₁₄ i C₁₅ učestvuju u formiranju estara sa terminalnom karboksilnom grupom propan-1,2,3-trikarboksilne kiseline (Bezuidenhout *et al.*, 1988), a u zavisnosti od toga da li su supstituenti R₃ i R₄ vodonikovi atomi ili hidroksilne grupe, razlikuju se FB₁, FB₂, FB₃ i FB₄, dok FB₆ u položaju na C₂ ima hidroksil-amin umesto amino-grupe, a struktura FB₅ je za sada nepoznata (Bartók *et al.*, 2013). Fumonizini grupe A: A₁, A₂ i A₃ su po svojoj strukturi slični FB₁, FB₂ i FB₃, ali je kod njih amino-grupa na položaju C₂ acetilovana. Fumonizini C-serije se u odnosu na B-seriju razlikuju po tome što u položaju C₁ vodonik nije supstituisan metil-grupom. Fumonizini P-serije u položaju C₂ imaju 3-hidroksipiridium-grupu. U novije vreme su identifikovani i izomeri FB₁ i FB₅, kao i izomeri fumonizina P-serije, pomoću savremenih tehnika kao što su tečna hromatografija pod visokim pritiskom sa elektrosprej jonizacijom i masenom spektrometrijom na bazi vremena preleta jona (HPLC–ESI–TOFMS) i masene spektrometrije sa jonskom zamkom (ITMS, Bartók *et al.*, 2010; 2013; 2014). Ukupna zastupljenost FB₅ toksina i njegovih izomera iznosila je 0,9 % od količine glavnog jedinjenja

(FB₁ toksin), što je značajna količina s obzirom na njihovu potencijalnu toksičnost (Bartók *et al.*, 2013).



Fumonizin	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
A-serija				
FA ₁	CH ₃	NHCOCH ₃	OH	OH
FA ₂	CH ₃	NHCOCH ₃	H	H
FA ₃	CH ₃	NHCOCH ₃	OH	OH
B-serija				
FB ₁	CH ₃	NH ₂	OH	OH
FB ₂	CH ₃	NH ₂	OH	H
FB ₃	CH ₃	NH ₂	H	OH
FB ₄	CH ₃	NH ₂	H	H
FB ₆	CH ₃	NHOH	OH	H
C-serija				
FC ₁	H	NH ₂	OH	OH
FC ₂	H	NH ₂	OH	H
FC ₃	H	NH ₂	H	OH
FC ₄	H	NH ₂	H	H
P-serija				
FP ₁	CH ₃	NC ₅ H ₄ OH	OH	OH
FP ₂	CH ₃	NC ₅ H ₄ OH	OH	H
FP ₃	CH ₃	NC ₅ H ₄ OH	H	OH
FP ₄	CH ₃	NC ₅ H ₄ OH	H	H

Slika 2.1 Hemijska struktura glavnih fumonizina (Soriano i Dragacci, 2004; Li *et al.*, 2010; Månsson *et al.*, 2010; Bartók *et al.*, 2014)

Obeležavanjem pomoću stabilnih izotopa utvrđeno je poreklo molekula fumonizina. Osnova molekula potiče od poliketida, metil-grupe na C₁₂ i C₁₆ od metionina, sporedni lanci karboksilne kiseline od glutaminske kiseline i amino grupa od serina (Blackwell *et al.*, 1993).

F. moniliforme i *F. proliferatum* obično proizvode FB₁ u višim količinama u poređenju sa drugim FB (Ross *et al.*, 1990). Neki sojevi su u mogućnosti da proizvode veće

količine FB₃ nego FB₂, a neki FB₂ i FB₄ (Szécsi *et al.*, 2010). Prirodno kontaminirani kukuruz najčešće sadrži FB₁, FB₂ i FB₃ u odnosu 5:2:1 (Sydenham *et al.*, 1992). Male količine fumonizina B₄, fumonizina C₁ (1% od količine FB₁ u prirodno kontaminiranim uzorcima kukuruza) i veoma male količine fumonizina A₁ i A₂ su, takođe, nađene u prirodi (Weidenbörner, 2001).

Formula najzastupljenijeg fumonizina B₁ je C₃₄H₅₉NO₁₅, a relativna molekulska masa mu iznosi 721,84. FB₁ je po svojoj strukturi 2*S*-amino-12*S*,16*R*-dimetil-3*S*,5*R*,10*R*,14*S*,15*R*-penta-hidroksi-eikosan sa esterifikovanim hidroksilnim grupama u položajima C₁₄ i C₁₅ sa terminalnom karboksilnom grupom propan-1,2,3-trikarboksilne kiseline (Soriano i Dragacci, 2004). To je beo higroskopan prah rastvoran u vodi (minimalno 20 mg/ml), metanolu (MeOH) i smeši acetonitrila (ACN) i vode. Stabilan je u smeši ACN–voda (1:1, v/v) 6 meseci na 25 °C, a u MeOH, na temperaturi –18 °C je stabilan do 6 nedelja. Na 78 °C je stabilan 16 h u puferu, pri pH između 3,5 i 9 (IARC, 2002). Fumonizin B₁ se pokazao kao stabilno jedinjenje, jer u uslovima temperature ključanja vodenog rastvora u toku 30 minuta, nakon čega je kultura plesni sušena na 60 °C u toku 24 h nije došlo do promene u koncentraciji toksina. Zagrevanje hrane obogaćene fumonizinima na 220 °C u toku 25 minuta uticalo je na potpuni gubitak toksina, dok je na 190 °C u toku 60 minuta preostalo 40% fumonizina. Zagrevanjem vlažnog kukuruza na 190 °C, zaostaje svega 20–30% toksina (Scot i Lawrence, 1994).

Fumonizin B₁ se ne može razoriti suvim mlevenjem, stabilan je na svetlu i samo se parcijalno razlaže pri različitim uslovima tokom obrade hrane, uključujući proizvodnju žitarica za doručak (Katta *et al.*, 1997; 1999).

Metaboliti fumonizina HFB₁ i HFB₂ nastaju hidrolizom molekula fumonizina, tako da se sporedni lanci trikarboksilne kiseline na C₁₄ i C₁₅ zamenjuju hidroksilnim grupama (Gazzotti *et al.*, 2011). Aktuelan problem u analitici određivanja fumonizina je nedostatak odgovarajućih referentnih materijala i standarda za validaciju metode za hidrolizovane fumonizine (HFB₁, HFB₂ i HFB₃) i FB₆ (FAO/WHO, 2011a).

2.1.2 Toksičnost fumonizina

Hepatotoksični i hepatokarcinogeni (negenotoksični) efekti fumonizina B₁ su uočeni kod pacova (Gelderblom *et al.*, 1991). Takođe, fumonizin B₁ izaziva leukoencefalomalaciju kod konja (Plattner *et al.*, 1990) i pulmonalni edem kod svinja (Harrison *et al.*, 1990). Akutna

toksičnost fumonizina kod ljudi nije potvrđena, ali je prisustvo fumonizina u kukuruzu za ljudsku ishranu statistički povezano sa kancerom jednjaka kod ljudi u Južnoj Africi (Sydenham *et al.*, 1990b), Kini (Chu i Li, 1994), SAD-u (Sydenham *et al.*, 1991), Italiji (Doko *et al.*, 1995), Keniji (Kedera *et al.*, 1999), Brazilu (van der Westhuizen *et al.*, 2003) i Iranu (Shephard *et al.*, 2000). Zbog toga je Internacionalna agencija za istraživanje kancera klasifikovala *F. moniliforme* toksine kao potencijalno karcinogene za ljude (klasa 2B karcinogena), slično ohratoksinu A (OTA; IARC, 2002).

Zbog velike strukturne sličnosti fumonizina sa sfingoidnim bazama (sfingozinom i sfinganinom), FB₁ deluje kao inhibitor N-acetil-transferaza, ključnih enzima u metabolizmu lipida. Na ovaj način, FB₁ inhibira rast ćelije i izaziva akumulaciju slobodnih sfingolipidnih baza, čime se remeti metabolizam lipida kod životinja, biljaka i nekih kvasaca. Sfingolipidi imaju važnu ulogu u membranama i lipoproteinskim strukturama, a time i u regulaciji rasta ćelije i ćelijskoj komunikaciji. Akumulacija sfinganina je povezana sa hepatotoksičnim i nefrotoksičnim efektima. Sa druge strane, akumulacija sfingoidnih baza u serumu i urinu je koristan biomarker, odnosno indikator izloženosti fumonizinima (Riley *et al.*, 1996).

Hidrolizovan FB₁ (HFB₁) i parcijalno hidrolizovan FB₁ (PHFB₁) su detektovani u fecesu preživara (60–90% ukupnog FB₁) hranjenih hranom koja je sadržala FB₁, a njihovo prisustvo je pokazatelj moguće razlike u metabolizmu FB₁ kod preživara i nepreživara. Naime, kod nepreživara, u fecesu je bio dominantan FB₁ (90%; Rice i Ross, 1994). Prisustvo tragova HFB₁ je dokazano i u jetri prasadi hranjenih hranom koja je bila kontaminirana fumonizinima (Gazzotti *et al.*, 2011). HFB₁ je, takođe, detektovan u hrani na bazi kukuruza koja se dobija termičkom obradom, pri visokoj vrednosti pH karakterističnoj za nikstamalizaciju, odnosno alkalno kuvanje pri dobijanju nekih kukuruznih proizvoda (Humph i Voss, 2004). Postoje naučna razmimoilaženja u tumačenju toksičnosti HFB₁ u odnosu na FB₁ (Gazzotti *et al.*, 2011). Naime, prema nekim istraživanjima HFB₁ povećava mogućnost neuroloških oštećenja (Stack, 1998), dok je prema drugima manje toksičan od FB₁ (Burns *et al.*, 2008). Neka istraživanja su pokazala da HFB₁ samo neznatno remeti metabolizam sfingolipida, što ukazuje da bi konverzija FB₁ u HFB₁ mogla da bude dobra strategija da se smanji izloženost FB₁ (Grenier *et al.*, 2012).

Za čist FB₁, najniža određena referentna doza koja dovodi do 10% odgovora na ispitivanoj populaciji miševa (BMDL₁₀) je 165 µg/kg telesne težine po danu, a izveden privremeni maksimalni tolerantni dnevni unos (PMTDI) je 2 µg/kg telesne težine na dan (FAO/WHO, 2011b).

2.2 FUMONIZINI U ŽITARICAMA

2.2.1 Uslovi produkcije

Kao što je već bilo napomenuto, mikotoksini su sekundarni metaboliti plesni. Postoje dve teorije o razlozima njihove produkcije. Prema jednoj, formiranjem sekundarnih metabolita održava se aktivnost plesni kada su iscrpljeni nutrijenti u podlozi, a prema drugoj sekundarni metabolizam sprečava akumulisanje štetnih materija koje bi ugrozile egzistenciju samih plesni (Miller, 2001). *Fusarium* “ear rot” ili “kernel rot” je bolest kukuruza koju pri odgovarajućim klimatskim uslovima i uz pomoć insekata izazivaju plesni *F. moniliforme* i *F. proliferatum* koje proizvode fumonizine (Miller, 1995).

Toksin-proizveduće plesni se mogu podeliti u dve grupe. Prva grupa su “plesni polja” koje napadaju useve i proizvode toksine pre žetve, dok druga grupa “plesni skladištenja” predstavljaju problem nakon žetve. Invazija je u prvom slučaju potpomognuta “plesnima domaćinima” na usevu i nekim biološkim interakcijama (npr. insektima). U drugom slučaju, produkcija je potpomognuta nutrijentima iz same biljke, uslovima sredine – abiotičkim (temperatura, vlažnost) i biotičkim faktorima (Miller, 1995). *F. moniliforme* i *F. proliferatum* su plesni polja koje proizvode fumonizine u uslovima na polju, ali i u uslovima skladištenja. Na 90% kukuruza je prisutan jedan ili oba roda *Fusariuma* (Bacon i Nelson, 1994), pri čemu 65% (Nayaka *et al.*, 2010) do 90% *F. moniliforme* ima potencijal za produkciju fumonizina (Bacon i Nelson, 1994).

Produkcija fumonizina u toku gajenja kukuruza. Iako rodovi *F. moniliforme* na kukuruza proizvode fumonizin širom sveta uključujući Afriku, USA, Francusku, Poljsku, Italiju, Brazil, Argentinu, Indoneziju, Tajland, Filipine i dr., viši nivoi fumonizina su karakteristični za toplije regione sveta (Miller, 2001). Naime, *F. moniliforme* raste na višim temperaturama, a trulež zrna i akumulacija fumonizina su povezani sa sušom, oštećenjima zrna od strane insekata i neodgovarajućim klimatskim uslovima za date hibride (Miller, 2001; Parsons i Munkvold, 2012). Stepen kontaminacije kukuruza fumonizinima zavisi i od geografskog područja, uslova poljoprivredne proizvodnje i hibrida kukuruza (Shelby *et al.*, 1994; Jackson i Jablonski, 2004; Soriano i Dragacci, 2004). Negativna korelacija između kišnog perioda u junu i produkcije fumonizina navela je Shelby *et al.* (1994) na zaključak da sušno vreme pred i u toku oprašivanja može povećati produkciju fumonizina na kukuruza.

Produkciju fumonizina na kukuruзу različitog stepena razvoja, odnosno zrelosti zrna, ispitivali su Warfield i Gilchrist (1999). Oni su zaključili da produkcija toksina zavisi od sastava supstrata i sadržaja vlage. Naime, brojne promene u sastavu zrna se dešavaju tokom sazrevanja, a iako se fumonizini produkuju u svim fazama razvoja zrna, najveća produkcija je zabeležena kod zrna u punoj zrelosti, dok je najslabija bila kod zrna u stadijumu mehurića. Ovo je u skladu sa ranijim zaključkom da *F. moniliforme* rastu i produkuju toksine na starijim ili biljkama pod stresom (Miller, 1995). Biologijom produkcije fumonizina je objašnjeno da se fumonizin produkuje u starom tkivu kukuruza, a da ne bi bio stabilan i biološki aktivan u uslovima rasta kukuruza (Miller, 2001).

Produkcija FB₁ *in vitro* je optimalna pri umerenoj aktivnosti vode i ograničenom sadržaju azota. Produkcija fumonizina se udvostručuje svakih 48 h tokom rasta plesni. Odnos FB₁ i FB₂ signifikantno raste od 4,2 do 5,4 tokom fermentacije. Fumonizin se produkuje pri neuobičajeno niskoj pH (3 – 4) vrednosti (Keller *et al.*, 1997), a po nekim podacima i pri pH 2 (Miller, 2001).

Istraživanja u Zambiji (Schjøth *et al.*, 2009) su pokazala da je veći procenat uzoraka i sa većim sadržajem fumonizina zabeležen na lokalitetima sa srednjom količinom padavina, u odnosu na lokalitete sa visokom količinom padavina. Nije utvrđena korelacija između prosečnog sadržaja FB₁ i FB₂ i padavina u toku godine, odnosno broja kišnih dana ili mesečnih padavina. Isto tako, odlaganje setve za 10 ili 20 dana takođe nema značajan uticaj na sadržaj FB₁ i FB₂, mada je pojedinih godina redukovalo prinos.

Produkcija fumonizina u periodu žetve kukuruza. Faktori okoline kao što su temperatura, vlažnost, suša i dug period kiše pred žetvu i tokom žetve, kao i skladištenje obranog kukuruza u uslovima neodgovarajuće vlage mogu izazvati dodatnu akumulaciju fumonizina (Bacon i Nelson, 1994). Sadržaj vlage u periodu žetve i faze pre sušenja su od značaja za kontrolu rasta plesni i produkciju fumonizina, a podaci o mikoflori zrna mogu ukazati na opasnost od mikotoksina. Prema nekim istraživanjima, 7 do 10 nedelja nakon oprašivanja potreban je skrining infekcije zrna, a pošto koncentracija fumonizina raste od fiziološke zrelosti do žetve, ranija žetva može pomoći u izbegavanju veće kontaminacije (Bush *et al.*, 2004; Parsons i Munkvold, 2012).

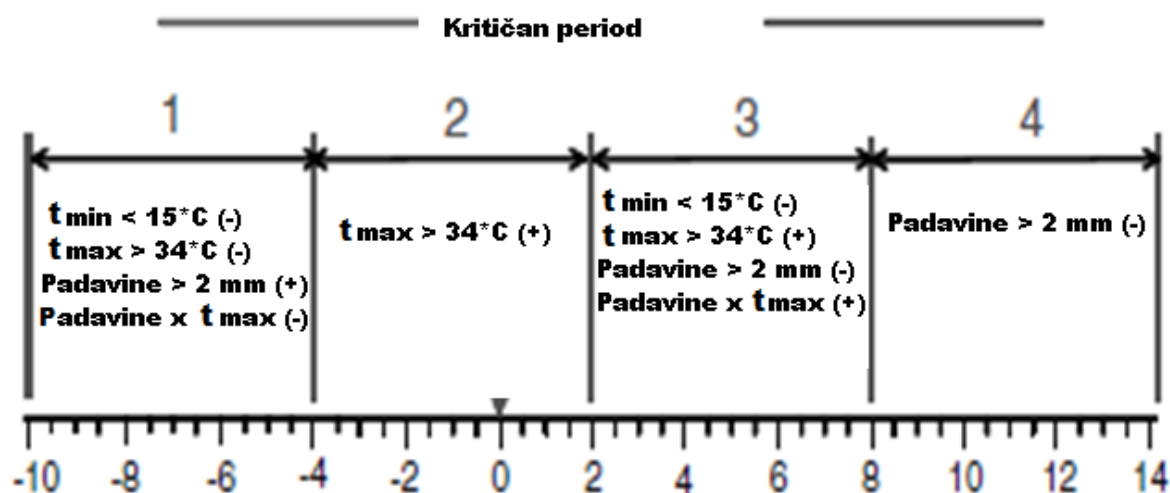
Produkcija fumonizina tokom skladištenja. Ukoliko kukuruz nije osušen da sadrži manje od 14% vlage, moguće je da se produkcija toksina nastavi i tokom skladištenja (Ono *et al.*, 2002). Stoga je brzo sušenje od značaja u inicijalnoj fazi sušenja, obzirom da *Fusarium* sp. ne rastu ispod 0,9 aktivnosti vode i da se time obezbeđuje da se fumonizini ne produkuju tokom skladištenja.

Ispitivanjem uticaja abiotičkih faktora (temperature, sadržaja vlage, aktivnosti vode i relativne vlažnosti) na mikofloru i sadržaj fumonizina u sveže obranom i skladištenom kukuružu, Orsi *et al.* (2000) su zaključili da postoji negativna korelacija između prisutnosti plesni iz roda *Fusarium* i srednje temperature i relativne vlažnosti vazduha, a pozitivna sa sadržajem vlage u žitarici. Negativna korelacija je zabeležena i između FB₁ (FB₂) i relativne vlažnosti vazduha. Pozitivna korelacija je uočena između nivoa FB₂ i sadržaja vlage u žitarici.

Modeli procene pojave plesni i toksina. Na osnovu brojnih istraživanja, u dužem vremenskom periodu, došlo se do zaključka da postoji statistička veza između prisustva određenih mikotoksina i meteoroloških i/ili agrotehničkih faktora. Mnoge studije su objavljene na ovu temu. Proučavanjem niza faktora koji utiču na rast plesni i produkciju toksina u različitim kombinacijama, razvijeni su modeli koji predviđaju pojavu plesni i/ili toksina. Ovi modeli su od značaja i koristi kod procene mogućnosti sintetisanja fumonizina kod asimptomatskih zrna. U daljem tekstu biće prikazani neki od najznačajnijih modela.

De la Campa *et al.* (2005) su zaključili da je fumonizin uobičajeni kontaminant kukuruža te da je potrebno bolje definisati uslove sredine koji favorizuju akumulaciju fumonizina u zrnu kukuruža. Oni su proučili uticaj različitih faktora i zaključili da produkcija fumonizina najviše zavisi od lokaliteta ili vremenskih uslova, zatim od insekata i na kraju od hibrida. Na osnovu toga, razvijen je model koji predviđa koncentraciju fumonizina koristeći varijable kao što su vremenske prilike (dnevne padavine, dnevna maksimalna i minimalna temperatura, relativna vlažnost) i oštećenje insektima. Vremenske prilike tokom četiri perioda rasta kukuruzne svile (4–10. dana pre; 4 dana pre; 2–8 dana posle; 8–14. dana posle formiranja svile) su označena kao kritična za produkciju fumonizina (Slika 2.2). Na osnovu svega, De la Campa *et al.* (2005) su predložili kontrolu insekata i razvoj genetske rezistencije na plesni u cilju smanjenja rizika od kontaminacije fumonizinima.

Battilani *et al.* (2008) su razvili model za procenu nivoa fumonizina na osnovu sistema gajenja u severnoj Italiji. Na osnovu rezultata 438 analiziranih uzoraka kukuruža iz pet regiona u periodu od 6 godina (od 2002. do 2007), zaključili su da je na produkciju fumonizina najviše uticalo: prethodni usevi, zrelost, korišćenje azotnih đubriva, vreme setve i žetve i vlaga zrna. Koristeći ove agronomske podatke i analizirani sadržaj fumonizina, napravili su logistički regresioni model, a glavni parametri su geografska dužina i vremenski period rasta i sazrevanja. Ovaj model nije obuhvatao meteorološke informacije. Autori konstatuju da razvijen model omogućava predviđanje kontaminacije kukuruža fumonizinima.



Dani u odnosu na dan kada je 50% kukuruzne svile formirano

Slika 2.2 Četiri kritična perioda tokom razvoja kukuruzne svile i uticaj varijabli vremena na sadržaj fumonizina u zreloom kukuruzu. Efekat (-) ili (+) pored svake vremenske promenljive pokazuje uticaj na smanjenje ili povećanje produkcije fumonizina (De la Campa et al., 2005).

Maiorano *et al.* su 2009. godine predstavili preliminarnu verziju FUMAgrain, dinamičnog modela procene rizika razvijenog na osnovu podataka o prisustvu fumonizina u severnoj Italiji. Ulazni podaci neophodni za model su:

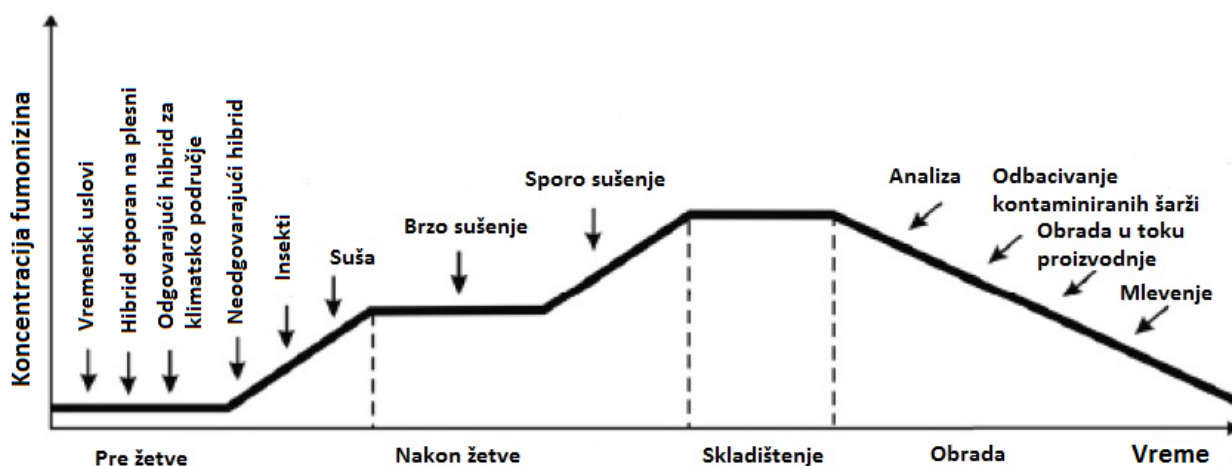
1. datum setve;
2. meteorološki podaci, uključujući temperaturu, relativnu vlažnost, brzinu vetra i intenzitet kiše;
3. informacije o fenološkom razvoju hibrida (cvetanje i sušenje) i
4. informacije o hemijskom tretmanu protiv evropskog kukuruznog moljca.

FUMAgrain daje prvo upozorenje da li postoji rizik na kraju faze cvetanja na osnovu meteoroloških uslova tokom ove faze. Drugo upozorenje sledi nakon sazrevanja, kada se daje procena na osnovu vlage zrna kukuruza, oštećenja od evropskog kukuruznog moljca i rizika sinteze fumonizina. Autori zaključuju da je FUMAgrain model pokazao dobru sposobnost da simulira sintezu fumonizina u zrnu kukuruza u Italiji i pokazao se korisnim u određivanju optimalnog datuma berbe kako bi se postigla bezbednost zrna po zahtevima tržišta.

Froment *et al.* (2011) su razvili Qualimetre[®] model koji predviđa pojavu mikotoksina, a zasnovan je na agro-klimatskim podacima i statističkim podacima o sadržaju mikotoksina u kukuruzu (deoksinivalenol (DON), zearalenon i fumonizin) i pšenici (DON) u Francuskoj i Belgiji.

Torelli *et al.* (2012) su razvili veštačku neuronsku mrežu, model pogodan za predviđanje kontaminacije kukuruza fumonizinima, DON-om i zearalenonom u vreme žetve. Statistička analiza podataka u navedenom istraživanju je pokazala da navodnjavanje, hemijski tretman protiv evropskog kukuruznog moljca i datum žetve značajno utiču na nivo kontaminacije fumonizinima ($p < 0,05$). Autori su zaključili da treba uzeti u obzir meteorološke faktore i agrotehničke mere u predviđanju produkcije toksina. Takođe su pokazali da lokalni uslovi sredine imaju značajan uticaj, čak i na ograničenim geografskim područjima, pa ovaj model ima potencijal za razvoj novog pristupa za brzu kategorizaciju parcela po nivoima fumonizina.

Bezbednost hrane kao cilj (Food Safety Objective, FSO) je koncept procene frekvencije i koncentracije opasnih materija u hrani u vreme potrošnje (CAC, 2007). Ovakav koncept razvijen za bakterijske infekcije, primenjen je i na mikotoksine (Pitt *et al.*, 2013). FSO za fumonizin u kukuruзу je prikazan na Slici 2.3, a objašnjava ekologiju formiranja toksina i mere kontrole dostupne za upravljanje rizikom. Ako je fumonizin prisutan u kukuruзу, glavni koraci za ispunjavanje FSO u procesu obuhvataju vizuelni pregled parcela za procenu štete od gljivica, analize fumonizina, odbacivanje šarži koje ne zadovoljavaju, mlevenje i dalja obrada. Ako odbacivanje nije primenljivo, sortiranje i čišćenje su takođe efikasni za smanjenje fumonizina u kukuruзу.



Slika 2.3 Produkcija fumonizina i mere za smanjenje njegove koncentracije u kukuruзу u cilju dobijanja bezbedne hrane (Pitt *et al.*, 2013).

Uticaj obrade kukuruза na sadržaj fumonizina. Obrada kukuruза tokom proizvodnje hrane utiče na sadržaj fumonizina u proizvodima od kukuruза. Vlažno mlevenje

se koristi za dobijanje kukuruznog skroba, klica i vlakana. Najniži nivoi fumonizina se nalaze u grizu i brašnu koji predstavljaju frakciju sa smanjenom veličinom čestica, a koja se dobija suvim mlevenjem. Veće koncentracije se nalaze u mekinjama i klicama takođe dobijenim suvim mlevenjem, a koje mogu da sadrže fumonizin 29 puta više od kukuruznog griza, 13 puta više od kukuruznog brašna i 3 puta više od celog kukuruza (Resnik, 2006).

Sama termička obrada na temperaturi manjoj od 150 °C malo utiče na koncentraciju fumonizina, dok ekstrudiranje pri proizvodnji žitarica za doručak redukuje sadržaj fumonizina (Jackson i Jablonski, 2004). Pečenje, prženje i ekstrudiranje kukuruza na visokim temperaturama (≥ 190 °C) smanjuje koncentraciju fumonizina u hrani, u količini koja zavisi od vremena kuvanja, temperature, recepta i drugih faktora (Humpf i Voss, 2004). Tako je, na primer, u uslovima proizvodnje hleba od kukuruza (210 °C tokom 60 min), gubitak fumonizina svega 3,1% (Numanogly *et al.*, 2010). Hemijska sudbina fumonizina u pečenoj, prženoj i ekstrudiranoj hrani nije dobro proučena, a nije poznato da li je smanjenje koncentracije rezultat termičkog razlaganja fumonizina ili njihovog vezivanja za proteine, šećere ili druga jedinjenja u hrani (Fandohan *et al.*, 2005). Dall'Asta *et al.* (2009) su pokazali da se vezani fumonizini nalaze u višim koncentracijama u odnosu na slobodni fumonizin u svakom od 21 analiziranog uzorka proizvoda kukuruza. Nikstamalizacija je proces proizvodnje mase (testa) za tortilje i druge proizvode od kukuruza, a podrazumeva zagrevanje do ključanja i natapanje kukuruza u rastvoru kalcijum-hidroksida. Ovaj proces može da smanji koncentraciju ukupnih fumonizina od 50 do 65%, FB₁ 80%, a oko 75% fumonizina prelazi u hidrolizovani oblik kao HFB₁ (Burns *et al.*, 2008; Dombrink-Kurtzman *et al.*, 2000; Palencia *et al.*, 2003).

2.2.2 Prisustvo fumonizina u žitaricama

Fumonizini se najčešće nalaze u kukuruza i različitim proizvodima od kukuruza, a najviše je kontaminiranih uzoraka kukuruza za ishranu životinja. Količina FB₁ je različita u različitim proizvodima, a prisustvo fumonizina je potvrđeno u različitim uzorcima: kukuruznom brašnu, grizu, palenti, kukuruznim pahuljicama, kukuruza šećercu, konzerviranom i smrznutom kukuruza, ekstrudiranom kukuruza, kukuruza kokičaru, hlebu, biskvitu, tortiljama, čipsu, testu, skrobu, dečijoj hrani, pireu, knedlama, supi i dr. (Weidenbörner, 2001). Prisustvo fumonizina utvrđeno je i u pirinču (Weidenbörner, 2001), pšenici, ječmu i soji (Castellá *et al.*, 1999). Povremeno se detektuju i u pivu, verovatno kao

posledica upotrebe kukuruznog griza kao dodatka ili u zamenu za ječam u procesu proizvodnje piva (Scott i Lawrence, 1995; Hlywka i Bullerman, 1999; Maenetje i Dutton, 2007; Tamura *et al.*, 2011).

Zbog njihove rastvorljivosti u vodi, malo je verovatno da se fumonizini bioakumuliraju u životinjskim tkivima. Fumonizini nisu ili su detektovani u ekstremno niskim količinama u mleku, jajima i mesu (Jackson i Jablonski, 2004; Gazzotti *et al.*, 2009).

Dokazano je da *A. niger* proizvodi FB₂ i FB₄ na grožđu i suvom grožđu (Mogensen *et al.*, 2010), kao i na kafi (Noonim *et al.*, 2009).

U okviru 74. izveštaja eksperata komiteta FAO/WHO (2011a) sumirane su informacije o prisustvu fumonizina iz brojnih zemalja sveta (Argentina, Australija, Brazil, Kanada, Kina, Gana, Japan, Republika Koreja, Singapur, Tanzanija, Urugvaj i SAD). Takođe su sumirani rezultati dostavljeni od strane država članica EU (Austrija, Belgija, Kipar, Češka, Estonija, Francuska, Nemačka, Mađarska, Litvanija, Luksemburg, Holandija, Slovačka i Španija). Pored toga, podaci objavljeni u literaturi iz 47 zemalja su takođe uzeti u obzir pri evaluaciji. Većina podataka se odnose na FB₁, FB₂ ili FB₃, uz novije studije koje obuhvataju nekoliko uzoraka prirodno kontaminiranih sa 3-epi-FB₃, FB₄ i FB₆. Tabela 2.1 prikazuje sumirane rezultate sadržaja FB₁, a Tabela 2.2 sadržaj ukupnih fumonizina u hrani za ljude (FAO/WHO, 2011a).

Nadalje, sumirane su informacije o prisustvu fumonizina u hrani za životinje iz izveštaja Brazila, Kine, Japana, Norveške, Južne Afrike i Urugvaja, kao i Belgije, Estonije, Francuske, Mađarske, Litvanije, Holandije i Slovačke i objavljenih istraživanja (Tabela 2.3), koje sadrže podatke o 7060 uzoraka poreklom iz Afrike (4,5%), Amerike (13,3%), Azije (69,8%), Evrope (4,5%) i Australije i Novog Zelanda (7%) (FAO/WHO, 2011a). Koncentracije fumonizina u kukuruzu namenjenom za ishranu životinja su na istom nivou kao i one iz kukuruza za ishranu ljudi (Tabela 2.2).

Tabela 2.1 Sadržaj FB₁ u uzorcima hrane za ljude (FAO/WHO, 2011a)

Vrsta uzorka	Broj uzoraka	% uzoraka < GD ili GO	Srednja vrednost (µg/kg)*	
			Donja granica	Gornja granica
Ječam	175	82	35	44
Heljda	95	100	0	3
Smokve sušene	230	25	238	250
Kikiriki u zrnu	16	81	97	105
Kukuruz	8569	30	1237	1260
Proso	42	86	0	8
Ovas	17	88	1	10
Pirinač	242	96	2	31
Kineska šećerna trska	17	76	35	74
Soja (suva)	137	53	33	34
Kukuruz šećerac u zrnu	740	66	84	94
Pšenica	74	80	38	48

*Prilikom izračunavanja srednje vrednosti sadržaja u uzorcima u kojima je koncentracija bila ispod granice detekcije (GD) ili granice određivanja (GO) je uzeto da imaju vrednost nula (donja granica) ili da su na samoj granici (gornja granica).

Tabela 2.2 Sadržaj ukupnih fumonizina u uzorcima hrane za ljude (FAO/WHO, 2011a)

Vrsta uzorka	Broj uzoraka	Srednja vrednost (µg/kg)*	
		Donja granica	Gornja granica
Ječam	123	51	102
Heljda	96	0	10
Kukuruz	10759	1651	1681
Proso	42	0	18
Ovas	26	1	23
Pirinač	207	1	59
Soja (suva)	106	6	11
Kukuruz šećerac u zrnu	939	131	164
Pšenica	94	0	29

* Prilikom izračunavanja srednje vrednosti sadržaja u uzorcima u kojima je koncentracija bila ispod granice detekcije (GD) ili granice određivanja (GO) je uzeto da imaju vrednost nula (donja granica) ili da su na samoj granici (gornja granica).

Tabela 2.3 Sadržaj fumonizina ($FB_1+FB_2+FB_3$) u hrani za životinje (FAO/WHO, 2011a)

Vrsta uzorka	Broj uzoraka	% uzoraka < GD ili GO	Srednja vrednost ($\mu\text{g}/\text{kg}$)*	
			Donja granica	Gornja granica
Žitarice	384	87	97	313
Kukuruzno glutensko brašno	18	-	3807	3807
Suvo zrno iz destilacije sa rastvorljivom materijom	185	14	1077	1110
Žitarice iz destilacije	78	23	825	883
Gotove smeše	2353	30	691	765
Kukuruz	1927	24	1565	1625
Ostala hrana za životinje	1391	75	339	524
Pirinač	20	95	38	275
Silaža	248	79	184	383
Soja i proizvodi od soje	362	93	52	283
Pšenica	88	89	28	250

* Prilikom izračunavanja srednje vrednosti sadržaja u uzorcima u kojima je koncentracija bila ispod granice detekcije (GD) ili granice određivanja (GO) je uzeto da imaju vrednost nula (donja granica) ili da su na samoj granici (gornja granica).

2.3 FUMONIZINI U LEKOVITOM BILJU

Lekovito bilje ima dugu tradiciju u lečenju različitih bolesti širom sveta. S jedne strane, ono je glavni način lečenja u siromašnim zemljama, a sa druge, postaje veoma popularno i u bogatim zemljama kao “prirodan” način lečenja. Sa rastom njegove popularnosti i nedostatkom odgovarajućih zakonskih propisa, kao i nekontrolisanom distribucijom i prodajom, pored efikasnosti, postaje važno i pitanje njegove zdravstvene bezbednosti (Kosalec *et al.*, 2009). Kao i kod žitarica, mogućnost kontaminacije zavisi od uslova gajenja, tretmana nakon branja, obrade, transporta i skladištenja (WHO, 2007). Najčešći oblici kontaminacije lekovitog bilja obuhvataju biološku kontaminaciju (bakterije, plesni, kvasci, virusi, insekti i dr.), radioaktivnu kontaminaciju (Cs-134, Cs-137) i hemijsku kontaminaciju (pesticidi, đubriva, toksični metali i nemetali, mikotoksini i dr.) (Kosalec *et al.*, 2009; WHO, 2007). Plesni, kao mogući producenti mikotoksina su česti kontaminanti lekovitog bilja, kako nadzemnog dela biljke, tako i korena. Prema Evropskoj Farmakopeji 6

(2008) maksimalan broj ukupnih plesni i kvasaca u farmaceutskim preparatima, odnosno biljnim lekovitim proizvodima u koje se dodaje ključala voda pre upotrebe, iznosi 10^5 kolonija po g ili ml (CFU/g ili CFU/ml), a takođe je propisana maksimalno dozvoljena količina aflatoksina u biljnim lekovima (European Pharmacopoeia 6.0, 2008). U Srbiji je zabeleženo nekoliko istraživanja na temu mikološke kontaminacije lekovitog bilja sa našeg podneblja (Pavlović, 2008; Balaž *et al.*, 2010).

Iako je, obzirom na temperaturnu stabilnost fumonizina (Jackson *et al.*, 1996), malo verovatno da se fumonizini raspadaju na temperaturi ključanja vode pri pripremi čaja, u literaturi nije zabeleženo mnogo istraživanja na temu prisustva fumonizina ili drugih mikotoksina u lekovitom bilju (Tabela 2.4). Najviše je istraživanja na ovu temu u zemljama sa tradicijom pijenja čaja i sa specifičnim biljnim vrstama koje se koriste u ovu svrhu. Tako su u Turskoj, Omurtag i Yazicioğlu (2004) HPLC metodom ispitali 115 komercijalnih čajeva i lekovitog bilja, i u samo dva uzorka utvrdili prisustvo FB₁ i to u koncentracijama 0,160 i 1,487 µg/g. Aziz *et al.* su (1998) u Egiptu ispitali 84 uzorka začina i lekovitog bilja poreklom iz Indije. Pored toga što su najčešće prisutne plesni: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *F. oxysporum* i *Penicilium viridicatum*, u 17 uzoraka je utvrđena kontaminacija aflatoksinom, a u 3 OTA-om, dok penicilinska kiselina, T2 toksin i zearalenon nisu detektovani hromatografijom na tankom sloju (TLC). Martins *et al.* (2001) su detektovali FB₁ u 65,5% biljnih uzoraka u Portugalu. Najveći procenat pozitivnih uzoraka su zabeležili kod crnih čajeva (88,8%, u koncentraciji 80–280 µg/kg). Najveći nivo kontaminacije je bio u listu narandže (350–700 µg/kg), listu i cvetu lipa (20–200 µg/kg), dok je manja kontaminacija zabeležena u svili kukuruza (50–150 µg/kg) i kamilici (20–70 µg/kg). Nijedan uzorak nije bio kontaminiran sa FB₂. U lekovitom bilju u Južnoj Africi 8 od ispitanih 30 uzoraka je sadržavalo FB₁ u koncentraciji 8–1533 µg/kg (Sewram *et al.*, 2006). Ispitivanja iz 2008. godine (Katerere *et al.*, 2008) su pokazala da 13 od 16 ispitanih uzoraka tradicionalnog lekovitog bilja iz Južne Afrike sadrži FB₁ u količini 14–139 µg/kg, dok aflatoksini nisu detektovani. S druge strane, od 84 lekovite biljke u Španiji, 13% je bilo kontaminirano fumonizinima. Osim fumonizina, ovim istraživanjem pomoću ELISA metode, utvrđena je i kontaminacija T2 toksinom (99%), zearalenonom (98%), aflatoksinima (96%), OTA-om (63%), DON-om (62%) i citrininom (61%). Takođe je zabeležen visok nivo kontaminacije sa 4 i više toksina u istim uzorcima (87%). U jednom uzorku kamilice je utvrđeno 90 µg/kg fumonizina i uzorci kamilice su svrstani u 5 najkontaminiranijih uzoraka (Santos *et al.*, 2009).

Pu-erh čaj, koji potiče iz Kine, proizvodi se na specifičan način. Naime, lišće čaja se obrađuje post-fermentacijom pomoću *A. niger* plesni. Ove plesni su poznate kao producenti

mikotoksina. Zato su Haas *et al.* (2013) ispitivali mikološku i mikotoksikološku ispravnost ovog čaja. Aflatoksini i fumonizini nisu detektovani, a u 4 od 36 uzoraka je utvrđena kontaminacija OTA-om u opsegu 0,65–94,7 µg/kg. Halt (1998) je u Hrvatskoj ispitivao prisustvo plesni u 62 uzorka lekovitog bilja i 11 uzoraka čaja. Detektovane su plesni roda *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Alternaria*, *Cladosporium* i *Trichoderma*. *A. flavus* je kontaminirao 18% lekovitih biljaka i 9% biljnih čajeva, a u samo jednom uzorku je TLC metodom detektovan OTA u tragovima. Storari *et al.* (2012) su utvrdili široku rasprostranjenost *Aspergillus* plesni na biljnim čajevima sa švajcarskog tržišta, kao i njihovu mogućnost da proizvode fumonizine i OTA *in vitro*.

Osim analize sirovog biljnog materijala, Monbaliu *et al.* (2010) su razvili multimikotoksinsku metodu za analizu pripremljenih napitaka od lekovitog bilja. U cilju poboljšanja razdvajanja, brzine i osetljivosti, primenili su kolonu sa veličinom čestice 1,7 µm za tečnu hromatografiju sa ultravisokim pritiskom (UPLC) i masenom detekcijom (MS). Oni su zaključili da prethodno razvijena metoda za određivanje mikotoksina u hrani za životinje, koja podrazumeva samo ekstrakciju i injektovanje u UPLC–MS/MS bez prethodnog prečišćavanja ekstrakta, ne može biti primenjena na uzorke lekovitog bilja. Zato su uveli dodatno prečišćavanje ekstrakta na C18 i NH₂-SPE kolonama. Primenom razvijene metode FB₁ je detektovan u samo jednom od 91 analiziranog uzorka.

Kao što se može zaključiti iz ovog pregleda, ispitivani su različiti mikotoksini u različitom lekovitom bilju primenom različitih metoda. Ove metode se razlikuju u svim fazama određivanja, od ekstrakcije, prečišćavanja ekstrakta pa do određivanja (Tabela 2.4). Takođe se može zaključiti da su lekovite biljke pogodan supstrat za rast različitih vrsta plesni koje se često izoluju. Podaci o kontaminaciji mikotoksinima su različiti i zavise kako od vrste ispitivane biljke, tako i od podneblja sa kog su biljke poticale. Najviše je uzoraka kontaminiranih fumonizinima bilo poreklom iz Španije i Južne Afrike. Svakako, treba još jednom napomenuti da nema mnogo dostupnih studija koje obrađuju ovu temu.

Tabela 2.4 Pregled metoda korišćenih za određivanje mikotoksina u lekovitom bilju

VRSTA UZORKA	ODREĐIVANI MIKOTOKSINI	EKSTRAKCIJA	PREČIŠĆAVANJE	ODREĐIVANJE	LITERATURA
Lekovito bilje i začini	Aflatoksin, OTA, zearalenon, T2, penicilinska kiselina	25 g	Kolone sa silikagelom	TLC	Aziz <i>et al.</i> , 1998.
Lekovito bilje i biljni čajevi	Aflatoksin, OTA, zearalenon	25 g, 100 ml 90% ACN	Tečno-tečna ekstrakcija	TLC	Halt, 1998.
Crni čaj i lekovito bilje	FB ₁ i FB ₂	25 g, 50 ml 75% MeOH	SAX	HPLC GO 20 µg/kg	Martins <i>et al.</i> , 2001.
Biljni čaj i lekovito bilje	FB ₁ i FB ₂	25 g, 125 ml 75% MeOH	SAX	HPLC GD 31 µg/kg GO 103 µg/kg	Omurtag i Yazicioğlu, 2004.
Lekovito bilje	Aflatoksin FB ₁	2 g, 0,4 g NaCl, 30 ml 80% MeOH	FumoniTest VICAM AflaTest VICAM	HPLC Potvrda HPLC-MS/MS GD 8 µg/kg	Sewram <i>et al.</i> , 2006.
Lekovito bilje	Aflatoksin	1 g, 1 g NaCl, 25 ml 80% MeOH	Aflatest VICAM	HPLC GD 0,5 µg/kg	Katerere <i>et al.</i> , 2008.
	FB ₁ , FB ₂ i FB ₃	5 g, 25 ml MeOH	SAX	HPLC GD 5 µg/kg	

Tabela 2.4 Pregled metoda korišćenih za određivanje mikotoksina u lekovitom bilju - NASTAVAK

VRSTA UZORKA	ODREĐIVANI MIKOTOKSINI	EKSTRAKCIJA	PREČIŠĆAVANJE	ODREĐIVANJE	LITERATURA
Lekovito bilje i začini	Aflatoksin, OTA, zearalenon, DON, FB, T2, citrinin	12,5 g, 50 ml 50% ACN	SPE kolone Romer 211 Fum	ELISA Ridascreen GD (FB): 83 µg/kg	Santos <i>et al.</i> , 2009.
Čajevi - sirovi materijal	28 toksina i derivata	2 g, 10 ml etilacetat–HCOOH (99:1, v/v)	NH ₂ -SPE, pa zatim C18-SPE GD 2,1–122 µg/kg	UPLC–MS/MS	Monbaliu <i>et al.</i> , 2010.
Čajevi pripremljeni za piće		2 g, 200 ml vode	C18-SPE GD 0,4–46 µg/l		
Izolati plesni sa lekovitog bilja	FB, OTA	0,14 g, 750 µl 75% MeOH	0,45 µm PTFE filter	HPLC–ESI–MS	Storari <i>et al.</i> , 2012.
Pu-erh čaj	Aflatoksin	5 g, 25 ml 70% MeOH	EASI-EXTRACT [®] AFLATOXIN IMA kolona	ELISA Ridascreen HPLC GD 1,7 µg/kg	Haas <i>et al.</i> , 2013.
	FB ₁ , FB ₂ i FB ₃	20 g, 100 ml ACN–MeOH–H ₂ O (25:25:50, v/v/v)	IMA	LC–MS GD 10 µg/kg	
	OTA	10 g, 40 ml ACN–H ₂ O (8:2, v/v)	IMA	HPLC GD 0,5 µg/kg	

2.4 SINERGISTIČKO DEJSTVO MIKOTOKSINA

Od preko 300 danas poznatih mikotoksina, dokazano je da najveći uticaj na zdravlje ljudi i životinja, osim fumonizina imaju aflatoksini, OTA, zearalenon i trihoteceni (Binder, 2007). Osim štetnog uticaja na zdravlje ljudi i životinja, mikotoksini izazivaju velike ekonomske štete.

U programu ispitivanja mikotoksina u hrani za životinje i sirovinama od 2004. godine je ispitano preko 19000 uzoraka na prisustvo aflatoksina, OTA, zearalenona, DON-a i fumonizina (Schatzmayr i Streit, 2013). Preko 64000 analiza je pokazalo da je 72% uzoraka kontaminirano mikotoksinima. U 38% uzoraka je detektovano dva ili više toksina, a autori navode da i niže koncentracije toksina od maksimalno dozvoljenih treba uzeti u obzir jer mikotoksini mogu imati sinergističko dejstvo. Postoji mogućnost istovremenog prisustva različitih plesni na istom usevu. Tako, obzirom da slični uslovi pogoduju rastu plesni *F. moniliforme* i *A. flavus*, kao i produkciji fumonizina odnosno aflatoksina, postoji mogućnost istovremene kontaminacije useva ovim toksinima, ali i kompeticije između *Fusariuma* i *Aspergillus*. Takođe, zabeležena je istovremena kontaminacija useva sa fumonizinom B₁ i drugim mikotoksinima: OTA-om, DON-om, zearalenonom i trihotecenima (Gonzalez *et al.*, 1999; Soriano i Dragacci, 2004; Sangare-Tigori *et al.*, 2006).

U velikom broju *in vitro* i *in vivo* studija istraženi su kombinovani efekti fumonizina i drugih mikotoksina. Tako na primer, Javed *et al.* (1993) su sugerisali da različiti klinički simptomi, redukovan rast i smrtnost kod pilića slično kao što je opisano za “spiking mortality sindrom” mogu biti posledica sinergističke interakcije FB₁ i moniliformina. Kubena *et al.* (1997) su ispitivali individualni i kombinovani efekat hrane za životinje koja je sadržala fumonizin B₁ i diacetoksiscirpenol (DAS) ili OTA na ženskim jedinkama ćurki od izleganja do 3 nedelje starosti. Rezultati indiciraju aditivnu ili manju od aditivne, ali ne i sinergističku toksičnost. Nekoliko fuzarijumskih mikotoksina može biti istovremeno prisutno u hrani ili hrani za životinje, rezultujući interakcijama (D'Mello *et al.*, 1999). Ispitivanje citotoksičnosti fuzarijumskih toksina pojedinačno i u smešama, pokazalo je da su necitotoksične koncentracije individualnih toksina citotoksične u smeši mikotoksina u sledećim kombinacijama: DON–nivalenol, DON–zearalenon, DON–nivalenol–FB₁, DON–zearalenon–FB₁, nivalenol–zearalenon–FB₁ i DON–nivalenol–zearalenon–FB₁ (Wan *et al.*, 2013). Međutim, studije pokazuju neubedljive i ponekad kontradiktorne rezultate

(FAO/WHO, 2011a). U nekim studijama su autori sugerisali da može doći do sinergizma ili antagonizama, ali su u ovim istraživanjima često korišćene samo pojedinačne doze svakog pojedinačnog mikotoksina, te ovakvi studijski dizajni prema FAO/WHO (2011a) nisu dovoljni da se otkrije sinergizam. Obzirom da fumonizini, koliko je do sada poznato, nemaju slično toksično delovanje sa ostalim do sada poznatim mikotoksinima, malo je verovatno da dolazi do jednostavnog aditivnog efekta toksičnog delovanja. Sa druge strane, pretpostavlja se da može doći do nekog oblika interakcije. Od strane FAO/WHO je konstatovano da koizlaganje aflatoksina B₁, jedinjenju sa poznatim genotoksičnim svojstvima, i fumonizinima koji imaju potencijal da indukuju regenerativnu proliferaciju ćelija, može da se smatra zabrinjavajućim (FAO/WHO, 2011a).

U istraživanjima Stojanov-a *et al.* (2013) su nalaze graničnih pojedinačnih maksimalno dozvoljenih količina mikotoksina u hrani za životinje povezali sa kumulativnim efektom mikotoksina koji indikuje kliničke i patomorfološke nalaze.

Sa druge strane, osim što se smatra da može doći do produkcije više metabolita i višestrukih toksičnih efekata, isto tako se zaključuje o inhibitorском delovanju jednih toksina na druge. Tako se može pretpostaviti da fumonizin uticajem na sfingolipide menja produkciju lipida iz acetata i utiče na biosintezu aflatoksina i OTA koji su prema svojoj strukturi poliketidi takođe dobijeni iz acetata (Miller, 1995).

2.5 ZAKONSKI PROPISI O FUMONIZINIMA

Zakonski propisi o fumonizinima u Srbiji i Evropi. Do donošenja Evropskih regulativa (2006) samo su pojedine države imale zakonske propise o maksimalno dozvoljenim količinama fumonizina. Prema predlozima Swiss Federal Office of Public Health (1997), maksimalno dozvoljena količina FB₁ i FB₂ u suvim kukuruznim proizvodima iznosila je 1 mg/kg. French Council of Public Hygiene preporučivao je da maksimalno dozvoljeno prisustvo ukupnih fumonizina u žitaricama bude do 3 mg/kg (Solfrizzo *et al.*, 2001). Nakon toga, u Oficijelnom žurnalu Evropske Unije objavljeni su propisi koji pored drugih kontaminanata regulišu i mikotoksine, a u okviru njih i fumonizine. Tako su Regulativom Evropske komisije br. 1881/2006 (EC, 2006b) ustanovljene maksimalno dozvoljene vrednosti nekih kontaminanata u hrani. Ovim dokumentom su propisani i mikotoksini (aflatoksini, OTA, patulin, DON, zearalenon i fumonizini). Regulativom br. 1126/2007 (EC, 2007) je data izmena pomenute Regulative za fuzarijumske toksine.

U Srbiji su propisane maksimalne dozvoljene količine fumonizina u kukuruзу i proizvodima od kukuruza za ishranu ljudi (Sl. glasnik RS, br. 29, 2014b), čime su ove vrednosti usaglašene sa regulativom EU. Maksimalno dozvoljena količina fumonizina u hrani za bebe i malu decu je obuhvaćena Pravilnikom o kvalitetu dijetetskih proizvoda (Sl. glasnik RS, br. 45, 2010b) i u skladu je sa Regulativom EU (Tabela 2.5).

Tabela 2.5 Pravna regulativa o fumonizinima u hrani u Srbiji (Sl. glasnik RS, 2010b i 2014b) i EU (EC, 2007)

Proizvod	Maksimalno dozvoljene količine ($\mu\text{g FB}_1$ i FB_2/kg)
	Srbija i EU
Neprerađeni kukuruz	4000
Kukuruz za neposrednu ishranu ljudi i proizvodi osim cerealija	1000
Cerealije za doručak na bazi kukuruza i snek proizvodi od kukuruza	800
Frakcije samlevenog kukuruza i proizvodi sa veličinom čestica $> 500 \mu\text{m}$	1400
Frakcije samlevenog kukuruza i proizvodi sa veličinom čestica $\leq 500 \mu\text{m}$	2000
Hrana na bazi kukuruza za bebe i malu decu	200

Preporuke Evropske komisije od 17.08.2006. godine (EC, 2006c) obuhvataju maksimalno preporučene vrednosti za DON, zearalenon, OTA i FB_1 i FB_2 u hrani za životinje. Pravilnikom o izmeni Pravilnika o kvalitetu hrane za životinje (Sl. glasnik RS br. 27, 2014a) su delimično usaglašeni propisi i u ovoj oblasti sa EU, ali ponovo nisu obuhvaćeni fumonizini (Tabela 2.6).

Tabela 2.6 Zakonski propisi o fumonizinima (FB_1+FB_2) u hrani za životinje u EU (2006a)

	Preporučena maksimalna količina (mg/kg; EU)*
Kukuruz i proizvodi	60
Dopunske i potpune smeše:	
Za svinje, konje, zečeve i kućne ljubimce	5
Za ribe	10
Za živinu, telad, jagnjad i mlade	20
Za odrasle preživare i kune	50

*U odnosu na sadržaj vlage u uzorku od 12 %

Maksimalno dozvoljen sadržaj fumonizina u Srbiji nije propisan ni u kukuruzu, niti u smešama za ishranu životinja, iako se zbog povoljnih klimatskih uslova i plodnog zemljišta, u Srbiji najviše uzgaja kukuruz (Tabela 2.7), koji se većinom koristi u ishrani stoke.

Tabela 2.7 Biljna proizvodnja u Srbiji (srednja vrednost 2005–2013. godine)

	Pšenica			Kukuruz		
	Požnjevena površina (ha)	Ukupan prinos (t)	Prinos po jedinici (kg)	Požnjevena površina (ha)	Ukupan prinos (t)	Prinos po jedinici (kg)
Republika Srbija ¹	526505	2024109	3849	1224179	5849491	4785
Centralna Srbija	259055	864199	3341	535919	2084783	3878
Vojvodina	267450	1159910	4343	688260	3764708	5495

Izvor podataka: Republički zavod za statistiku

¹ bez podataka za AP Kosovo i Metohija

Skoro polovina proizvodnje kukuruza potiče od individualnih poljoprivrednih proizvođača (Republički zavod za statistiku, 2009), koji se osim nešto manjeg prinosa suočavaju i sa problemima odgovarajućeg sušenja i skladištenja, odnosno zaštitom kvaliteta obranog kukuruza u pogledu mikološke i mikotoksikološke kontaminacije. Iako postoje podaci o prisustvu fumonizina u kukuruzu i pšenici (Jakšić, 2004; Matić *et al.*, 2009; Vuković *et al.*, 2010; Jakšić *et al.*, 2012; Stanković *et al.*, 2012; Škrbić *et al.*, 2012), a u uzorcima žitarica i hrane redovno se izoluju plesni iz roda *Fusarium*, kao i drugi fuzarijumski mikotoksini (Đilas *et al.*, 2001; Jajić, 2008), u Srbiji se, zbog nepostojanja propisa, prisustvo fumonizina u hrani za životinje uglavnom ne kontroliše.

Mnoge zemlje koje nisu članice EU, kao što su Turska, Bosna i Hercegovina, Norveška i Švajcarska imaju u ovoj oblasti usaglašeno zakonodavstvo sa zakonodavstvom EU, te su uspostavili slične maksimalno dozvoljene količine za fumonizin, (EMAN, <http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=79>).

Zakonski propisi o fumonizinima u svetu. Na međunarodnim tržištima, uključujući Kinu, Japan, Indiju, Saudijsku Arabiju i Zalivske zemlje, Rusiju, Kanadu i mnoge zemlje Latinske Amerike nema definisane maksimalne dozvoljene količine za fumonizin. Razlog može biti činjenica da od strane Codex Alimentarius-a još nije uspostavljena maksimalna dozvoljena količina za fumonizin, mada je u cilju sprečavanja i smanjenja zagađenja mikotoksina u žitaricama, Codex Alimentarius objavio Nacrt o maksimalnim količinama za

fumonizine u kukuruzu i proizvodima od kukuruza i plan uzorkovanja koji sadrži predloge o metodologiji određivanja fumonizina, a koji su u skladu sa regulativama Evropske Unije (Codex Alimentarius Commission, 2014; Tabela 2.8).

U SAD je Federalni biro za hranu i lekove (FDA, 2011) objavio upozorenje sa specifičnim savetodavnim maksimalnim ograničenjima za industriju u vezi određenih supstanci, uključujući i fumonizin (Tabela 2.9).

Tabela 2.8 Maksimalne dozvoljene količine fumonizina u kukuruzu za ljudsku ishranu (Codex Alimentarius Commission, 2014)

Proizvod	Maksimalne dozvoljene količine (FB ₁ +FB ₂ ; µg/kg)
Kukuruz neobrađeni, za ljudsku ishranu	5000
Kukuruzno brašno	2000

Tabela 2.9 Preporučene maksimalne dozvoljene količine fumonizina u kukuruzu za ljudsku ishranu (FDA, 2011)

Proizvod	Preporučene maksimalne dozvoljene količine ukupnih fumonizina (FB ₁ +FB ₂ +FB ₃ ; µg/kg)
Kukuruzni griz i brašno sa sadržajem masti < 2,25%	2000
Kukuruzni griz i brašno sa sadržajem masti ≥ 2,25%	4000
Kukuruzne mekinje	4000
Očišćen kukuruz za proizvodnju testa	4000
Očišćen kukuruz kokičar	3000

U Brazilu je doneta rezolucija o maksimalno podnošljivom nivou za više vrsta mikotoksina, uključujući fumonizine u određenim proizvodima na bazi kukuruza, uključujući i proizvode kao što su kukuruz, brašno i skrob, kao i prehrambeni proizvodi za bebe i malu decu (Tabela 2.10; mycotoxins.info).

U Kini je maksimalan dozvoljen sadržaj fumonizina u potpunim smešama za ishranu životinja 500 µg/kg (<http://www.knowmycotoxins.com/regulations.htm>).

Tabela 2.10 Zakonski propisi o fumonizinima u hrani u Brazilu
(http://www.mycotoxins.info/myco_info/consum_regu.html#brazil)

	Maksimalan sadržaj FB ₁ i FB ₂ (µg/kg)
Neobrađen kukuruz	2000
Obrok od kukuruza	1000
Ostali proizvodi na bazi kukuruza	400
Hrana za bebe na bazi kukuruza	200

American Assotiation of Veterinary Laboratory Diagnosticians preporučuje da potpune smeše za životinje maksimalno mogu da sadrže sledeće količine FB₁: 5 mg/kg za konje, 10 mg/kg za svinje i 50 mg/kg za živinu i goveda (Solfrizzo *et al.*, 2001). Ove preporuke su prihvaćene i od strane US Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine (Tabela 2.11; FDA, 2011).

Tabela 2.11 Preporučene maksimalne dozvoljene količine ukupnih fumonizina
(FB₁+FB₂+FB₃) u hrani za životinje (FDA, 2011)

Vrsta životinja	Preporučeni maksimalni sadržaj ukupnih fumonizina u kukuruza i proizvodima od kukuruza (mg/kg)	Maksimalan udeo kukuruza u smeši (%)	Preporučeni maksimalni sadržaj ukupnih fumonizina u smeši (mg/kg)
Konji i zečevi	5	20	1
Svinje i som	20	50	10
Priplodni preživari, živina i kune	30	50	15
Preživari i kune za tov	60	50	30
Živina za tov	100	50	50
Ostale	10	50	5

Pravilnikom o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja (Sl. glasnik RS, 2014b), nije propisano prisustvo fumonizina u lekovitom bilju. Za lekovito bilje, propisan je jedino OTA u korenu sladićagospinog bilja. Evropskom Farmakopejom 6 (2008) je propisan maksimalno dozvoljen sadržaj aflatoksina B₁ i metoda za njegovo određivanje u biljnim lekovima.

Izvoznici hrane širom sveta suočavaju se sa komplikovanim i zahtevnim standardima koje njihovi proizvodi moraju da zadovolje na različitim ciljnim tržištima. Različiti propisi u različitim zemljama dodatno komplikuju složene zahteve za izvoznike. Zato je na internetu od strane proizvođača testova za mikotoksine (VICAM, 2013), kreirana aplikacija Global Mycotoxin Regulations Tool™ koja sadrži bazu podataka globalnih propisa o mikotoksinima. Ovaj savremeni pristup omogućava korisnicima da na jednostavan i brz način pronađu maksimalno dozvoljene propisane vrednosti za mikotoksine po državi i robi ili vrsti hrane. Obzirom da nije potrebna opšta internet pretraga, ova aplikacija štedi i vreme i resurse.

Uzimajući u obzir veoma različite navike i potrebe ljudi širom sveta, teško je proceniti jedinstven internacionalni maksimalno tolerantan nivo fumonizina. Dok je u nekim krajevima sveta kukuruz mahom hrana za životinje, u drugima je veoma važan i često korišćen u ishrani ljudi. Zato je delimično rešenje ove dileme regulisanje maksimalno dozvoljene vrednosti fumonizina u individualnim državama pomoću nacionalnih pravilnika (Shephard *et al.*, 2013b). Osim teškoća u proceni maksimalno dozvoljenih količina, postoji i dilema u vezi kontaminacije hrane i hrane za životinje sa koncentracijama ispod maksimalno dozvoljenih količina i sa više toksina istovremeno. Istraživanja ukazuju na problem pojave kliničkih i patomorfoloških nalaza mikotoksikoza životinja koji nisu u korelaciji sa laboratorijskim nalazima mikotoksina u hrani. Kumulativni i eventualno sinergistički efekti mikotoksina s jedne, i karakteristike svake životinjske vrste sa druge strane stvaraju specifične okolnosti koje mogu dovesti do mikotoksikoze iako su koncentracije pojedinih mikotoksina u dozvoljenim granicama (Stojanov *et al.*, 2013).

2.6 ODREĐIVANJE FUMONIZINA

Široka rasprostranjenost fumonizina u žitaricama, kao i bolesti kod životinja koje se hrane kontaminiranom hranom i moguća izloženost ljudi fumonizinima putem kontaminirane hrane je podstakla razvoj analitičkih metoda u pravcu njihovog kvantitativnog određivanja u različitim matriksima. Tačno određivanje ovih mikotoksina je neophodno za utvrđivanje izloženosti ljudi ovim toksičnim i karcinogenim sekundarnim metabolitima.

Prema Codex Alimentarius Commission (2014) preporučuje se izbor i korišćenje analitičke metode na osnovu odabranih zadatih kriterijuma kao što su granica detekcije, ponovljivost, reproduktivnost i efikasnost. Ovakav pristup ima prednost kod korišćenja već razvijenih metoda, bez potrebe da se proverava ili modifikuje već specificirana metoda.

Prema ovakvom pristupu, laboratorija je slobodna da koristi metodu koja najviše odgovara njenim kapacitetima (tzv. “fitness for purpose”). Prema Regulativi EC No 401/2006 (EC, 2006a) predloženi parametri kod procene metode su preciznost i prinos (Tabela 2.12).

Tabela 2.12 Kriterijumi za ocenu performansi metode za određivanje fumonizina B₁ i B₂ prema EC Regulation No 401/2006 (EC, 2006a; 2014).

Koncentracija (µg/kg)	Preciznost*		Prinos (%)
	RSD _r (%)	RSD _R (%)	
≤ 500	≤ 30	≤ 60	60 – 120
> 500	≤ 20	≤ 30	70 – 110

*RSD_r - unutarlaboratorijska relativna standardna devijacija - ponovljivost
RSD_R - međulaboratorijska relativna standardna devijacija - reproducibilnost

Sadržaj fumonizina u različitim uzorcima se određuje primenom analitičkih metoda koje se sastoje iz sledećih faza (Abramović *et al.*, 2002): uzorkovanje i priprema uzorka, ekstrakcija toksina, prečišćavanje sirovog ekstrakta primenom različitih kolona i na kraju detekcija i određivanje. Najčešće korišćene metode za detekciju i određivanje fumonizina su: tečna hromatografija sa fluorescentnim detektorom i ELISA metode. Osim ovih metoda, mogu se koristiti TLC metoda, gasna hromatografija (GC), HPLC–MS/MS, fluorimetrija, elektroforeza i dr.

Svaka od navedenih faza biće detaljnije opisana u narednim poglavljima.

2.6.1 Uzorkovanje i priprema uzorka

Mikotoksini su veoma heterogeno raspoređeni u uzorku, te pouzdanost analize u velikoj meri zavisi od uzorkovanja. Mikotoksini mogu biti prisutni u vidljivo oštećenim, ali i u neoštećenim klipovima kukuruza (WHO, 2000). Uzorak je neophodno pažljivo homogenizovati, samleti i uzeti reprezentativan poduzorak. Najčešće se homogen uzorak dobija jednostavnim mlevenjem do čestica veličine manje od 2 mm, a veličina probe je najčešće 25 ili 10 g (Abramović *et al.*, 2002). Noviji ELISA testovi koriste svega 5 g uzorka (R-Biopharm; RomerLabs).

Regulativa Evropske Unije No 401/2006 (EC, 2006a) sa dopunom No 519/2014 (EC, 2014) propisuje metode uzorkovanja i analize za kontrolu nivoa mikotoksina u hrani. U okviru ovih direktiva data je i metoda uzorkovanja žitarica i proizvoda od žitarica za analizu

fuzarijumskih toksina. Tabela 2.13 prikazuje metodu uzorkovanja žitarica, podelu lotova na podlotove i broj poduzoraka u zavisnosti od ukupne količine uzorka, s tim da je preporuka da masa poduzorka bude 100 g.

Kada nije u pitanju zvanična kontrola, ne mora se slediti ova prilično nepraktična, komplikovana i dugotrajna procedura, već se postupa u skladu sa situacijom. Takođe, nekada ekonomski nije isplativo radi uzorkovanja načinjati lotove (šarže) i tada se postupa na alternativan način, ali se vodi računa da uzorak bude reprezentativan, način uzorkovanja potpuno opisan i dokumentovan. U slučaju velikih ambara i silosa, kada su žitarice već uskladištene, takođe nije moguće u potpunosti ispoštovati predloženu proceduru uzorkovanja. U slučaju uzorkovanja u maloprodaji, ukoliko nije moguće slediti predloženu metodu, potrebno je uzeti što reprezentativniji uzorak u količini od minimum 1 kg (EU, 2006a).

Tabela 2.13 Shema uzorkovanja žitarica i proizvoda od žitarica za analizu mikotoksina (EU, 2006a; 2014)

Masa lota (t)	Masa ili broj podlotova	Broj poduzoraka	Ukupna masa uzorka (kg)
≥ 1500	500 t	100	10
> 300 i < 1500	3 podlota	100	10
≥ 50 i ≤ 300	100 t	100	10
> 20 i < 50	-	100	10
> 10 i ≤ 20	-	60	6
> 3 i < 10	-	40	4
> 1 i ≤ 3	-	20	2
$> 0,5$ i ≤ 1	-	10	1
$> 0,05$ i $\leq 0,5$	-	5	1
$\leq 0,05$	-	3	1

Prikupljeni uzorci se čuvaju na hladnom (najčešće na -20 °C) i suvom mestu, i ne smeju biti izloženi sunčevom zračenju (Chu i Li, 1994; Visconti *et al.*, 2001).

2.6.2 Ekstrakcija

Pošto metoda ekstrakcije ima veliki uticaj na rezultat određivanja fumonizina različite komparativne studije su sprovedene od strane brojnih autora, koji su koristili različita ekstrakciona sredstva i metode za ekstrakciju u cilju određivanja fumonizina u kukuruзу i proizvodima od kukuruza (Tabela 2.14). U cilju postizanja kvantitativne ekstrakcije fumonizina, odnosno prečišćavanja ekstrakta kukuruza, predložen je veliki broj smeša rastvarača.

Ne postoji optimalna procedura ekstrakcije fumonizina koja je primenljiva na sve vrste uzoraka, a utvrđen je veliki uticaj temperature i sastava rastvarača na efikasnost ekstrakcije iz različitih matriksa (Lawrence *et al.*, 2000). Različiti rastvarači imaju različitu efikasnost za različite matrikse, a njihov izbor utiče na izbor dalje procedure prečišćavanja (Sewram *et al.*, 2003). Stoga, ako se ispituje jedna vrsta uzorka treba uzeti najbolji rastvarač za njega, a ako se ispituju različiti uzorci, bolje je uzeti "univerzalniji" rastvarač. Interference matriksa igraju značajnu ulogu u mogućnosti ekstrakcije, prečišćavanja i hromatografskog određivanja fumonizina (Sewam *et al.*, 2003). Takođe, potrebno je napraviti razliku između pravih gubitaka, vezivanja i problema koji potiču od matriksa (Scott i Lawrence, 1994).

Fumonizini se u kukuruznim proizvodima mogu nalaziti u vezanom obliku u sličnim koncentracijama kao i u slobodnom obliku (Dall' Asta *et al.*, 2009). Zbog toga su korišćeni različiti rastvarači za ekstrakciju fumonizina iz kukuruznih proizvoda i drugih matriksa. Tako su u ove svrhe korišćeni MeOH i ACN u smeši sa vodom u različitim odnosima, ali i rastvarači kao što su fosfatni pufer (Trucksess *et al.*, 2000; Kulisek i Hazebroek, 2000), boratni pufer (Scott i Lawrence, 1994), 0,1 mol/l HCl (Meister, 1999), etanol (EtOH, Lawrence *et al.*, 2000), uz dodatak natrijumove soli etilendiamintetrasirćetne kiseline i enzima (Kim *et al.*, 2002) i dr. Pored sastava ekstrakcionog rastvarača, temperatura i dinamička homogenizacija takođe imaju značajan uticaj na efikasnost ekstrakcije fumonizina iz različitih matriksa (Rice *et al.*, 1995; Meister, 1999; Scott *et al.*, 1999; Lawrence *et al.*, 2000; Kulisek i Hazebroek, 2000; Kim *et al.*, 2002; Sulyok *et al.*, 2006; Pietri i Bertuzzi, 2012).

Ispitivanjem različitih ekstrakcionih rastvarača: ACN–H₂O (50:50, v/v), MeOH–H₂O (75:25, v/v) i vode za ekstrakciju iz kulture plesni na kukuruзу Rice *et al.* (1995) su zaključili da je efikasnost ekstrakcije FB₁ najbolja sa ACN–H₂O (50:50, v/v) tokom 30 min, dok se sa MeOH–H₂O (75:25, v/v) i vodom postiže ista efikasnost za 8 h ekstrakcije. Sa vodom su

postigli malu efikasnost za FB₂ i FB₃, čak i nakon 24 h. Slične rezultate su dobili i za uzorke kukuruza i hrane za živinu.

Ispitivanje kisele ekstrakcije fumonizina uz primenu imunoafinitetnih (IMA) kolona, je pokazalo manju efikasnost u odnosu na MeOH–H₂O (75:25, v/v), ali je diskutabilno da li je to posledica efikasnosti ekstrakcije ili uticaja kiselog ekstrakta na IMA kolonu (Meister, 1999). Međutim, za neke prirodno kontaminirane kukuruzne proizvode kao što su kačamak, grickalice, tortilje, kukuruz kokičar, boljom se pokazala ekstrakcija sa MeOH–0,1 mol/l HCl kako u kombinaciji sa jakim anjonskim izmenjivačkim (SAX), tako i sa IMA kolonama. Nedostatak kisele ekstrakcije je što je neophodno podesiti pH ekstrakta sa pH 2–5 na pH 5,8–6,5 ako se prečišćava na SAX kolonama. Kod IMA kolona podešavanje pH ekstrakta nije potrebno, jer on raste razblaživanjem ekstrakta sa fosfatnim puferom po proceduri metode. Autori navode da je metoda sa kiselom ekstrakcijom i prečišćavanjem na SAX kolonama dala naročito dobre rezultate za određivanje fumonizina u kukuruznom glutenu i zaključuju da je uzrok tome, verovatno, sama struktura fumonizina koji sadrže nekoliko karboksilnih grupa.

Scott *et al.* (1999) su potvrdili da je ACN–MeOH–H₂O (25:25:50, v/v/v) generalno bolji ekstrakcioni rastvarač nego MeOH–H₂O (75:25 ili 80:20, v/v) pri određivanju fumonizina u prirodno kontaminiranom pirinču i raznim kukuruznim proizvodima, a naglašavaju da se ovim rastvaračima ekstrahuju samo slobodni fumonizini. Proizvodi od kukuruza, ali i sirovi kukuruz mogu sadržati maskirani fumonizin, zbog interakcije sa proteinima (Mangia, 2009). Prisustvo maskiranog, proteinski vezanog, fumonizina je otkriveno tako što je nakon ekstrakcije sa 1% natrijum-dodecil-sulfatom koji rastvara proteine i hidrolize sa 2 mol/l KOH, utvrđeno prisustvo HFB₁ i u uzorcima korn-fleksa koji nisu sadržavali slobodan FB₁ (Kim *et al.*, 2003).

Kulisek i Hazebroek (2000) su u cilju izbegavanja primene organskih rastvarača, poredili nekoliko neorganskih ekstrakcionih rastvarača za ekstrakciju fumonizina (dejonizovana voda, fosfatni puffer, FP), a zatim određivali fumonizin ELISA i HPLC metodom. Poređenjem efikasnosti dejonizovane vode, fosfatnog pufera, MeOH–H₂O (70:30, v/v) i ACN–H₂O (50:50, v/v), zaključili su da su za ekstrakciju malih koncentracija FB₁ podjednako dobri svi ispitani rastvarači, dok su za više nivoe toksina bolji MeOH–H₂O (70:30, v/v) i ACN–H₂O (50:50, v/v). Do sličnih rezultata su došli i Rice *et al.* (1995) koji su dobili najbolju efikasnost sa ACN–H₂O (50:50, v/v). Autori su izabrali FP kao odgovarajući ekstrakcioni rastvarač za ekstrakciju fumonizina, obzirom da je dobijen visok koeficijent determinacije ($r^2 = 0,94$) između ELISA i HPLC metode nakon primene ove ekstrakcije.

Tabela 2.14 Studije o efikasnosti rastvarača za ekstrakciju fumonizina

VRSTA UZORKA	ISPITIVANI EKSTRAKCIONI RASTVARAČI	EKSTRAKCIJA	PREČIŠĆAVANJE I ODREĐIVANJE	ODABRANA EKSTRAKCIJA	LITERATURA
Kukuruzni mafini, mekinje, kukuruzne pahuljice, mešane žitarice za bebe	MeOH–H ₂ O (75:25, v/v) MeOH–0,4 mol/l boratni pufer pH 9,2 (75:25, v/v)	Uzorak:rastvarač (1:3)	SAX, HPLC–FLD (NBD-F)	MeOH–0,4 mol/l boratni pufer pH 9,2 (75:25, v/v)	Scott i Lawrence, 1994.
Kukuruz, hrana za živinu, kultura plesni	ACN–H ₂ O (50:50, v/v) MeOH (75:25, v/v) H ₂ O	10 g, 50 ml Mućkanje 15 min - 8 h	C18 HPLC–FLD (OPA)	30 min ACN–H ₂ O (50:50, v/v)	Rice <i>et al.</i> , 1995.
Kukuruzno brašno, Korn-fleks, Proizvodi od kukuruza	MeOH (75:25, v/v) MeOH–0,1 mol/l HCl (75:25, v/v)	25 g (12,5 g za proizvode), 50 ml, 30 min	SAX IMA HPLC–FLD (OPA)	Za korn-fleks IMA kolone MeOH (75:25, v/v) Za sve ostalo MeOH–0,1 mol/l HCl (75:25, v/v)	Meister, 1999.
Proizvodi od kukuruza, pirinač, pasulj, hrana za bebe	ACN–MeOH–H ₂ O (25:25:50, v/v/v) MeOH–H ₂ O (75:25, v/v) MeOH–H ₂ O (80:20, v/v) 0,1 mol/l Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O–ACN (50:50, v/v) MeOH–0,025 mol/l boratni pufer (75:25, v/v)	10 g, 50 ml 30 min 50 g, 100 ml, 1 min Hrana za bebe	SAX IMA za hranu za bebe HPLC–FLD (OPA)	ACN–MeOH–H ₂ O (25:25:50, v/v/v)	Scott <i>et al.</i> , 1999.
Kukuruzno brašno, čips, korn-fleks, tortilja čips, pirinač	ACN–MeOH–H ₂ O (25:25:50, v/v/v) EtOH–H ₂ O (30:70, v/v) EtOH–H ₂ O (15:85, v/v) H ₂ O	ASE Temp 23, 80 , 120 °C	SAX IMA HPLC–FLD (OPA)	EtOH–H ₂ O (30:70, v/v) Osim za tortilla čips kada je najbolje ACN–MeOH–H ₂ O (25:25:50, v/v/v)	Lawrence <i>et al.</i> , 2000.
Sirup od šećerne trske i žitarice za doručak	MeOH–0,1 mol/l Na ₂ HPO ₄ (pH 3, 50:50, v/v) H ₂ O Puffer pH < 2,5 i > 4,0 MeOH–0,1 mol/l Na ₂ HPO ₄ (70:30, v/v) ACN–0,1 mol/l Na ₂ HPO ₄ (70:30, v/v)	25 g, 100 ml 3 min blendiranje	C18 HPLC–FLD (OPA)	MeOH–0,1 mol/l Na ₂ HPO ₄ (pH 3, 50:50, v/v)	Trucksess <i>et al.</i> , 2000.

Tabela 2.14 Studije o efikasnosti rastvarača za ekstrakciju fumonizina - NASTAVAK

VRSTA UZORKA	ISPITIVANI EKSTRAKCIONI RASTVARAČI	EKSTRAKCIJA	PREČIŠĆAVANJE I ODREĐIVANJE	ODABRANA EKSTRAKCIJA	LITERATURA
Kukuruz	Dejonizovana voda FP FP sa Tween 20 MeOH-H ₂ O (70:30, v/v) ACN-H ₂ O (50:50, v/v)	3 g, 15 ml 30 minuta	ELISA-Neogen HPLC-FLD (OPA)	FP	Kulisek i Hazebroek, 2000.
Korn-fleks, kukuruzno brasno mafini, ekstrudirani kukuruz, hrana za bebe	ACN-H ₂ O (50:50, v/v) MeOH-H ₂ O (75:25, v/v)	10 g; 25 g; 50 ml;100 ml mućkanje 30 min, blendiranje 5 min	IMA SAX HPLC-FLD (OPA)	ACN-H ₂ O (50:50, v/v) bolji sa IMA	De Girolamo <i>et al.</i> , 2001.
Brašno od belog pirinča	ACN-MeOH-H ₂ O (25:25:50, v/v/v) MeOH-ACN-0,1 mol/l Na ₂ EDTA (25:25:50, v/v/v) 0,1 mol/l Na ₂ EDTA pH 6-MeOH (50:50, v/v) 0,1 mol/l Na ₂ EDTA Dodatak α-amilaze i β-glukozidaze	10 g, 50 ml	IMA HPLC-FLD (OPA)	0,1 mol/l Na ₂ EDTA 3x30 min na sobnoj temperaturi	Kim <i>et al.</i> , 2002.
Hrana za bebe	MeOH-H ₂ O (70:30, v/v) MeOH-H ₂ O (70:30, v/v), pH 4,0 MeOH-H ₂ O (80:20, v/v) MeOH-H ₂ O (50:50, v/v) MeOH-ACN-H ₂ O (25:25:50, v/v/v) ACN-H ₂ O (50:50, v/v) ACN-H ₂ O (80:20, v/v) MeOH-0,4 mol/l H ₃ BO ₃ , (75:25, v/v), podešeno na pH 9,2 sa 1 mol/l NaOH MeOH-0,1 mol/l FP, (50:50, v/v), pH 3,0 ACN-0,1 mol/l FP, (50:50, v/v), pH 3,0	10 g, 100 ml 3 min	SAX sa FP Ostalo na C18 HPLC-FLD (OPA)	MeOH-H ₂ O (70:30, v/v), pH 4,0	Sewram <i>et al.</i> , 2003.
Pšenica Kukuruz	MeOH-H ₂ O (50:50; 75:25, v/v) ACN-H ₂ O (50:50; 75:25; 80:20;84:16, v/v) ACN-H ₂ O-CH ₃ COOH (74:25:1, v/v/v) ACN-H ₂ O-CH ₃ COOH (79:20:1, v/v/v)	0,5 g, 2 ml 90 min	Bez prečišćavanja LC-MS/MS	ACN-H ₂ O-CH ₃ COOH (79:20:1, v/v/v) Kompromis za 39 toksina	Sulyok <i>et al.</i> , 2006.
Kukuruzno testo, tortilja, korn-fleks, kukuruzno brašno	ACN-MeOH-H ₂ O (25:25:50, v/v/v) EtOH-H ₂ O (30:70, v/v) MeOH-EDTA (50:50, v/v) H ₂ O; 0,4 mol/l FP	20 g, 200 ml 45 min	IMA LC-MS/MS	0,4 mol/l FP	Pietri i Bertuzzi, 2012.

Lawrence *et al.* (2000) su poredili različite rastvarače za ekstrakciju fumonizina iz različitih kukuruznih proizvoda i pirinča, koristeći ubrzanu tečnu ekstrakciju (ASE). Akcent su stavili na etanol kao najmanje toksičan i najjeftiniji organski rastvarač kao i na vodu. Kao najefikasnije sredstvo za ekstrakciju se pokazala smeša EtOH–H₂O, izuzev pri određivanju fumonizina u tortilja čipsu. Takođe su konstatovali da temperatura nema uticaja na efikasnost ekstrakcije kod obogaćenih uzoraka jer u njima fumonizini nisu prisutni u vezanoj formi kao kod prirodno kontaminiranih uzoraka (Lawrence *et al.*, 2000). Naime, kod nekih uzoraka (taco shells), koncentracija fumonizina se utrostručava, a kod nekih (nacho chips) udvostručava povećanjem temperature od 20–80 °C. Smeša EtOH–H₂O (30:70, v/v) ekstrahuje više fumonizina nego ACN–MeOH–H₂O (25:25:50, v/v/v) na 80 °C. Isto tako se voda na 80 °C, odnosno 120 °C pokazala kao efikasno sredstvo za ekstrakciju FB₁ i FB₂ iz prirodno kontaminiranih proizvoda. Isti autori su zaključili i da dobra efikasnost za FB₁ i FB₂ kod obogaćenih uzoraka ne znači da je metoda ekstrakcije pogodna i za prirodno kontaminirane uzorke. Rezultati su takođe pokazali da je dinamična ekstrakcija dala duplo veće rezultate od statične, jer je bolji kontakt uzorak–ekstrakcioni rastvarač. Ovo se, ipak, prema autorima, može kompenzovati povećanjem temperature.

Kim *et al.* (2002) su proučavali efikasnost ekstrakcije fumonizina iz brašna belog pirinča. Ispitali su uticaj različitih smeša rastvarača, uključujući Na₂EDTA i dodatak enzima, zatim uticaj temperature ekstrakcije (20–60 °C), kao i uticaj pH (2–6) ekstrakcionog rastvarača. Najbolji rezultati su postignuti ekstrakcijom pomoću 0,1 mol/l Na₂EDTA, pri čemu je ekstrakcija ponovljena tri puta za 30 min na sobnoj temperaturi. Takođe su utvrdili nestabilnost dodatih fumonizina u nekim vrstama pirinča u zavisnosti od konzistencije uzorka i sadržaja vode. Pretpostavka da joni metala aluminijuma i gvožđa imaju uticaja na stabilnost se nije pokazala tačnom. Nestabilnost fumonizina je potvrđena i u obogaćenim uzorcima kukuruznog skroba i kačamaka. Autori zaključuju da su potrebna dalja istraživanja o “skrivenim fumonizinima”, vezanim u hrani. Ovim istraživanjem je ukazano na problem nestabilnosti fumonizina u obogaćenim uzorcima, što je važno za međulaboratorijska poređenja.

Ispitivanjem efikasnosti ekstrakcije fumonizina različitim rastvaračima iz hrane za bebe na bazi kukuruza, utvrđeno je da je najefikasniji MeOH–H₂O (70:30, v/v), zakišljen do pH 4 (Sewram *et al.*, 2003). Ovako pripremljeno ekstrakciono sredstvo je efikasnije za 28% od nezakišljenog, što se pripisuje povećanju lipofilnog karaktera molekula fumonizina pri kiselim uslovima, a što pogoduje disocijaciji fumonizina iz matriksa kukuruza. Isti autori su dobili najnižu efikasnost ekstrakcije pomoću smeše MeOH–borna kiselina uz podešavanje

pH na 9,2, što je u suprotnosti sa rezultatima Scott i Lawrence (1994) koji su ispitivanjem efikasnosti ekstrakcije fumonizina iz kukuruznih mekinja zaključili da je MeOH–boratni puffer, pH 9,2 (75:25, v/v) neuporedivo bolji od MeOH–H₂O (75:25, v/v). Ovo ukazuje da sposobnost ekstrakcije nekog rastvarača zavisi u velikoj meri od matriksa uzorka. Kao razloge različite efikasnosti ekstrakcije od matriksa Sewram *et al.* (2003) navode vezivanje fumonizina za proteine, hemijsku reakciju fumonizina sa proizvodima, prisustvo interferirajućih jedinjenja i adsorpciju.

Jedna od perspektivnih tehnika pripreme uzorka je ASE, koja se zasniva na tečnoj ekstrakciji pri povišenoj temperaturi i pritisku. Prednosti ove metode su unapređenje ekstrakcione efikasnosti, smanjenje potrošnje rastvarača, kao i automatizacija koraka ekstrakcije (Kokkonen i Jestoi, 2009). Za određivanje fumonizina u hrani za bebe na bazi kukuruza D'Arco *et al.* (2008) su koristeći svega 3 g uzorka i 22 ml rastvarača za 12 min na 40 °C i 34 atm razvili metodu pripreme za određivanje pomoću HPLC–ESI–MS/MS. Pošto Rice *et al.* (1995) nisu dobili tačne rezultate pri ekstrakciji fumonizina sa vodom na sobnoj temperaturi, Lawrence *et al.* (2000) su koristili ekstraktor, kako bi unapredili ekstrakciju sa vodom i sproveli je na višoj temperaturi i pod pritiskom. Naime, kada se voda zagreva, njena dielektrična konstanta raste i na oko 225 °C je slična konstanti MeOH. Sve vreme pritisak se povećava da bi se voda zadržala u tečnom stanju. Ovi uslovi omogućavaju da viskozitet i površinski napon opadaju, a raste sposobnost ekstrakcije organskih komponenti iz čvrstog matriksa. Sa povećanjem udela vode u ekstrakcionom rastvaraču, uzorci koji sadrže više skroba, sa vodom se “skuvaju” na visokoj temperaturi i formiraju čvrstu pastu. Zato ovi autori preporučuju da se poveća količina dodatog Hidromatriksa™ – dijatomejske zemlje, koja formira poroznu smešu. Ukoliko je filtrat mutan, preporučuju taloženje koekstrahovanih komponenti tokom noći u frižideru, jer može doći do problema na kolonama za prečišćavanje uzoraka, a ovaj korak je obavezan kod ekstrakcije na višim temperaturama sa ekstrakcionim rastvaračima koji sadrže 85–100% vode. Ekstrakcija pomoću ASE zahteva komplikovanu proceduru koncentrisanja, pa su Li *et al.* (2012) razvili metodu ultrazvučne ekstrakcije u ultrazvučnom vodenom kupatilu, nakon koje je sledilo centrifugiranje i filtriranje, a zatim određivanje metodom LC–ESI–MS/MS.

Kao što se može zaključiti, ekstrakcija je važan korak u analizi fumonizina. Na tačnost određivanja veliki uticaj ima izbor ekstrakcionog rastvarača i način ekstrakcije. Dalja ispitivanja su neophodna za iznalaženje efikasnije i jednostavnije ekstrakcije kako slobodnih tako i vezanih tj. skrivenih fumonizina.

2.6.3 Prečišćavanje ekstrakta

Sve kvantitativne tehnike određivanja fumonizina, osim ELISA metoda za jednostavnije vrste uzoraka i, u nekim slučajevima, hromatografije sa masenim detektorom (D'Arco *et al.*, 2008), zahtevaju prečišćavanje sirovog ekstrakta uzorka. Međutim, primena ovakvih HPLC–MS/MS metoda skraćuje radni vek skupih hromatografskih kolona, a mogu se javiti i smetnje u određivanju usled prisustva matriksa uzorka. Zato se u svrhu prečišćavanja sirovog ekstrakta uzorka koriste kolone (kertridži - cartridge) sa različitim sorbentima.

Ekstrakcija na čvrstoj fazi. Uslovi prečišćavanja ekstrakta na čvrstoj fazi, (SPE, solid phase extraction) su prilagođeni za svaku vrstu kolone. Danas veliki broj proizvođača nudi širok izbor slično modifikovanih SPE adsorbenasa na bazi silicijum-dioksida, pa se tako osim klasičnih kolona sa C18 reverznom fazom (RP C18; Rice *et al.*, 1995; Jakšić, 2004) ili kolona sa jakim anjonskim izmenjivačem (AOAC, 1998; Jakšić, 2004), mogu koristiti i različite komercijalne SPE kolone (Tabela 2.15). Princip prečišćavanja ekstrakta pomoću SPE kolona je jednostavan. Naime, punjenje kolone zadržava molekule fumonizina, dok se matriks ne vezuje za kolonu. Nakon ispiranja zaostalog matriksa iz kolone, fumonizin se eluira sa kolone pogodnim sredstvom. Kod MycoSep[®]231Fum (RomerLabs), princip je nešto jednostavniji. U osnovi, to je kolona punjena adsorbentom, materijal za punjenje kolone je smešten u polietilensku cevčicu između filter-diskova sa gumenim ivicama. Na donjem delu se nalaze krilca koja propuštaju uzorak samo u jednom smeru. Kada se kolona uroni u epruvetu sa ekstraktom (Slika 2.4), gumeni krajevi diska se pribijaju uz zid epruvete povlačeći ekstrakt uzorka kroz punjenje kolone, tako da se u gornjem delu plastične cevčice, iznad gornjeg filter- diska pojavljuje ekstrakt. Ove kolone omogućavaju izuzetno brzo prečišćavanje uzorka (10–30 s), bez dugotrajnih ispiranja, uz uklanjanje interferirajućih supstanci koje ostaju zadržane na koloni.

Za svaku vrstu kolona postoji metoda, procedura, koju treba slediti i verifikovati, a nikako slepo primenjivati na „sličnim“ kolonama.

Tabela 2.15 Neke komercijalne SPE kolone za prečišćavanje ekstrakta u cilju određivanja fumonizina (FB₁, FB₂, FB₃) u žitaricama

Proizvođač	Naziv kolone	Ekstrakcija	Detekcija
R-Biopharm*	PuriTox Fumonisin	MeOH–H ₂ O (75:25, v/v)	HPLC
RomerLabs**	MultiSep® 211 Fum	ACN–H ₂ O (50:50, v/v)	TLC, HPLC, HPLC–MS
	MycoSep® 231 Fum	MeOH–H ₂ O (75:25, v/v)	HPLC
Polyintell***	AFFINIMIP®SPE	ACN–MeOH–H ₂ O	HPLC–MS
	FumoZON	(25:25:50, v/v/v)	
Sigma-Aldrich****	SupelTox FumoniBind SPE	MeOH–H ₂ O (75:25, v/v)	HPLC
	Cartridge, LRC	ACN–H ₂ O (50:50, v/v)	

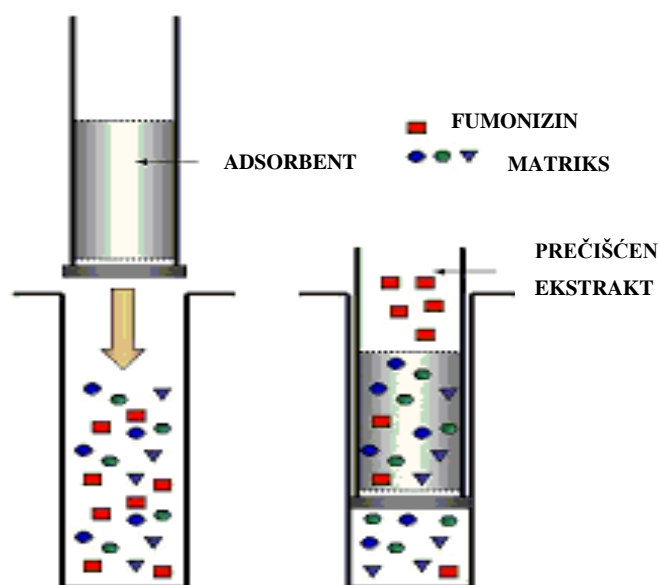
*<http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis/mycotoxins/fumonisin/item/puritox-fumonisin>

**<http://shop.romerlabs.com/en/MycoSep-MultiSep>

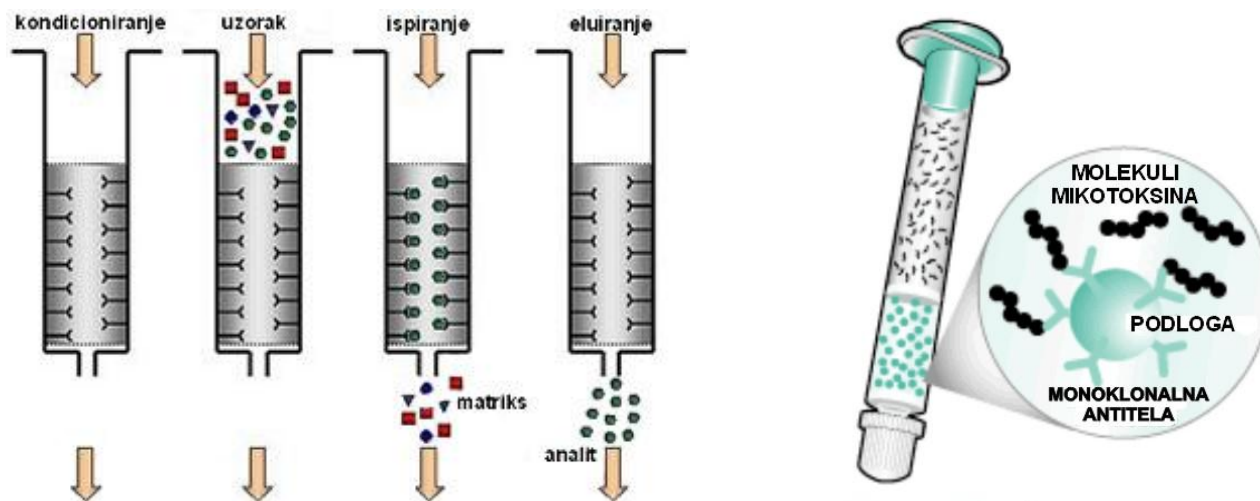
***http://www.polyintell.com/media/110830_an_affinimip_spe_fumozon__025178800_1509_07102011.pdf

****www.sigmaaldrich.com

Imunoafinitetne kolone. Osim već pomenutih adsorbenasa, za punjenje kolone za prečišćavanje sirovog ekstrakta mogu se koristiti i imobilizovana antitela. Ona su pakovana u plastični špric i takve kolone se koriste na isti način kao SPE kolone da selektivno vežu analit iz kompleksnog ekstrakta uzorka žitarica. IMA kolone sadrže imobilizovana antitela koja su specifična za molekule fumonizina te se samo oni zadržavaju, dok se matriks ispere puferom sa kolone (Slika 2.5). Danas su komercijalno dostupne IMA kolone različitih proizvođača, za različite vrste uzoraka (Tabela 2.16), a značajan napredak predstavlja pojava multitoksinskih IMA kolona, jer se na njima dobijeni prečišćeni ekstrakt koristi za istovremeno određivanje više toksina. IMA kolone su selektivnije i specifičnije u odnosu na kolone sa adsorbensima i njihovom primenom se dobijaju hromatogrami bez interferenci pri analizi kukuruza i proizvoda od kukuruza (De Girolamo *et al.*, 2001). Njihov nedostatak je visoka cena, te su zato aktuelna istraživanja u cilju njihove regeneracije i višestrukog korišćenja (Abramović *et al.*, 2005b).



Slika 2.4 Princip prečišćavanja ekstrakta sa MycoSep[®] kolonom (EMAN, <http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=61>).



Slika 2.5 Faze prečišćavanja ekstrakta pomoću IMA kolona (EMAN, <http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=61>), i izgled FumoniTest[™] kolone (<http://chromservis.cz/item/fumonitest-wb-immunoaffinity-hplc-columns-25-box>)

Tabela 2.16 Pregled IMA kolona za određivanje fumonizina

PROIZVOĐAČ	NAZIV KOLONE	GRANICA DETEKCIJE	TOKSINI	EKSTRAKCIJA	ODREĐIVANJE	PRIMENA
R-Biopharm*	AOF MS-PREP®	AB ₁ ; AB ₂ ; AG ₁ ; AG ₂ ; OTA – 0,05 ng/ml FB ₁ ; FB ₂ : 1 ng/ml	AB ₁ , AB ₂ , AG ₁ , AG ₂ , OTA, OTB, FB ₁ , FB ₂ i FB ₃ .	MeOH–H ₂ O (60:40, v/v) ACN–CH ₃ COOH–H ₂ O (74:1:25, v/v/v)	HPLC–MS/MS	Žitarice, hrana za životinje
	FUMONIPREP®	FB ₁ : 5 ng/ml FB ₂ : 10 ng/ml	FB ₁ , FB ₂	ACN–MeOH–H ₂ O (25:25:50, v/v/v)	HPLC–MS/MS	Žitarice, pivo, biber, luk, korn-fleks, kokice
RomerLabs**	FumoniStar™ IAC		FB ₁ , FB ₂ , FB ₃	ACN–MeOH–H ₂ O (25:25:50, v/v/v)	HPLC	Žitarice
VICAM***	Fumonitest™	HPLC:0,016 mg/kg Fluorimetar: 0,25 mg/kg Pivo: 0,4-1,0 ng/ml	FB ₁ , FB ₂ , FB ₃	MeOH–H ₂ O (80:20, v/v)	Fluorimetar ili HPLC	Kukuruz, hrana za živinu, pivo
	Fumonitest200	0,5 mg/kg	FB ukupni	MeOH–H ₂ O (80:20, v/v)	Fluorimetar	Kukuruz, kokičar
	Fumonitest™WB	0,05 mg/kg	FB ₁ , FB ₂ , FB ₃	ACN–MeOH–H ₂ O (25:25:50, v/v/v)	HPLC	Kukuruz
	Myco6in1 ⁺ ®	HPLC–MS/MS: (µg/kg) AB ₁ : 0,6; AB ₂ : 0,3 AG ₁ : 0,4 AG ₂ : 0,8 DON: 4,2; FB ₁ : 1,1; FB ₂ : 0,4; OTA. 0,6; T2: 1,5; HT2: 1,9; Zearalenon: 0,7	Aflatoksini, OTA, DON, FB, T2, HT2, zearalenon, nivalenol	MS/MS: FP, MeOH, ili ACN–H ₂ O–CH ₃ COOH (79,5:20:0,5, v/v/v) FLD: 2% polietilen glikol u FP, MeOH	HPLC–MS/MS HPLC–FLD	Kukuruz, žitarice, jezgrasto voće

* <http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis/mycotoxins/fumonisin>

**<http://shop.romerlabs.com/en/Starline-IAC/FumoniStar-IAC>

***<http://vicam.com/Default.aspx?PageID=4898897>

QuEChERS. Osim navedenih kolona, za pripremu uzorka za određivanje mikotoksina se poslednjih godina koristi i QuEChERS metoda (akronim koji označava brzu-laku-jeftinu-efikasnu-robustnu-bezbednu metodu). Ona je u originalu razvijena radi pripreme uzoraka za određivanje pesticida (Anastassiades *et al.*, 2003), ali nalazi sve veću primenu i za ostale rezidue. Originalna metoda je modifikovana da obuhvati što više pesticida i drugih analita. Poslednjih godina puno se radi na daljem proširivanju primene QuEChERS metode za prirodne kontaminante, mikotoksine, veterinarske lekove i dr. Ukratko, QuEChERS postupak podrazumeva nekoliko koraka. Mućkanje uzorka sa ACN i internim standardom, zatim dodavanje NaCl, MgSO₄ i pufera za odvajanje faza i podešavanje pH. Nakon centrifugiranja, alikvot gornje organske faze se prečišćava SPE metodom sa MgSO₄ i adsorbentom (npr. primarni sekundarni amin - PSA) da se ukloni voda i neželjene interference (šećeri, masne kiseline i dr.), a kod obojenih uzoraka se koristi grafitizirani ugljenični sorbent. Nakon mućkanja i centrifugiranja, dobijeni završni ekstrakt može direktno da se analizira pomoću GC i/ili LC tehnike (Quechers, 2011).

Koristeći QuEChERS, jedan analitičar može pripremiti 8 uzoraka za 45 minuta, koristeći potrošni materijal koji košta svega 1–3 €. Na ovaj način, poboljšana je efikasnost laboratorije ne samo u pogledu smanjenja potrošnje skupih hemikalija, već i u pogledu brzine pripreme uzorka, smanjenja otpada, a manji je i zahtev za prostorom u laboratoriji.

Često korišćeni adsorbens u okviru QuEChERS metoda je PSA koji vezuje fumonizine zbog jonske izmene te se na ovaj način dobija niska efikasnost (Tamura *et al.*, 2011). Zato su Yang i Wu (2012), razvili takvu QuEChERS metodu kod koje su toksine iz kukuruza ekstrahovali sa smešom MeOH–H₂O (75:25, v/v) i u ekstrakt dodali PSA, a nakon toga vezane fumonizine sa PSA su eluirali 1% mravljom kiselinom u MeOH. Nakon razblaživanja i filtriranja, ekstrakt je analiziran pomoću LC–MS/MS.

S obzirom na sve veće zahteve za brzim multitoksinskim metodama, u budućnosti može da se očekuje dalji razvoj imunoafinitetnih i QuEChERS metoda za pripremu, odnosno prečišćavanje ekstrakta uzoraka.

2.6.4 Detekcija i određivanje

Analiza mikotoksina još uvek je izazov za analitičku hemiju, jer su oni uobičajeno prisutni u malim koncentracijama, u kompleksnim matriksima i u različitim kombinacijama. Za određivanje fumonizina, od njihovog otkrića 1988. godine do danas razvijene su različite

metode određivanja (Abramović *et al.*, 2002.; Waskiewicz *et al.*, 2012). Iako se za određivanje fumonizina mogu koristiti gasna hromatografija (Plattner *et al.*, 1990), hromatografija na tankom sloju (Shephard i Sewram, 2004), kapilarna elektroforeza (Maragos *et al.*, 1996), imunoenzimska tehnika (Kulisek i Hazebroek, 2000) i fluorescentna polarizacija (Maragos *et al.*, 2001), najčešće korišćena tehnika je tečna hromatografija (Visconti *et al.*, 2001).

2.6.4.1 Hromatografske metode

Hromatografija na tankom sloju.

Hromatografija na tankom sloju je često korišćena tehnika za proveru prisustva mikotoksina (skrining), jer je jednostavna, brza i jeftina. Međutim, zbog relativno visoke granice detekcije (100 µg/kg za kukuruz i 500–1000 µg/kg za proizvode od kukuruza), uglavnom se koristi samo za detekciju fumonizina (Jakšić, 2004).

Najčešće se primenjuju ploče sa C₁₈ reverznom fazom (Pittet *et al.*, 1992; Rottinghaus *et al.*, 1992), ali je razdvajanje moguće i u normalnoj fazi, na silika-gelu 60 (Sydenham *et al.*, 1990a; Cawood *et al.*, 1991). Reagensi koji se koriste za derivatizaciju fumonizina nakon razvijanja ploče su: ninhidrin (Cawood *et al.*, 1991), vanilin (Pittet *et al.*, 1992), 4-metoksibenzaldehid (*p*-anisaldehid, Sydenham *et al.*, 1990a) i fluoreskamin (Rottinghaus *et al.*, 1992).

Iako je tačnost TLC metode za određivanje FB₁ u uzorcima kukuruza manja u poređenju sa HPLC metodom, TLC je pored ELISA testova najpogodnija za brz skrining velikog broja uzoraka (Schaafsma *et al.*, 1998).

Tečna hromatografija

Tečna hromatografija visoke efikasnosti sa fluorescentnim detektorom. Tečna hromatografija je metoda koja je najviše primenjivana u analitici mikotoksina, pa i fumonizina. Granica detekcije HPLC–FLD metode za određivanje fumonizina je niža od 0,1 mg/kg (Jakšić, 2004).

Pošto su fumonizini dobro rastvorljivi u vodi i u polarnim organskim rastvaračima, razdvajanje fumonizina tečnom hromatografijom izvodi se hromatografijom sa reverznim fazama. Analitička kolona je uglavnom sa C₁₈ punjenjem ili sa C₈, različite dužine, dijametra i veličine čestica. Kao mobilne faze za razdvajanje derivata fumonizina tečnom hromatografijom koriste se različite smeše rastvarača: MeOH i fosfatni pufer, ACN i voda u prisustvu sirćetne kiseline, ACN i fosfatni pufer, kao i smeša ACN, vode i MeOH (Sedova *et*

al., 2004; Abramović *et al.*, 2005b). Ove mobilne faze se koriste za izokratsko ili gradijentno eluiranje, u različitim odnosima. Najčešće korišćen postupak za HPLC razdvajanje fluorescentnih derivata fumonizina je izokratsko eluiranje pomoću smeše MeOH i fosfatnog pufera pri pH oko 3,3 da bi se sprečila disocijacija karboksilnih grupa u derivatizovanim molekulima fumonizina (Shephard *et al.*, 1990). Molekuli fumonizina nemaju specifične hromoforne grupe, te ne apsorbuju zračenje u vidljivoj i UV oblasti spektra elektromagnetnog zračenja, a takođe ni ne fluoresciraju. Stoga je neophodna njihova derivatizacija. Reakcija derivatizacije se zasniva na reakciji amino-grupe u molekulima fumonizina sa različitim reagensima koji grade fluorescentni derivat. Veliki broj reagenasa se koristi za derivatizaciju pre HPLC razdvajanja i određivanja: fluoreskamin (Sydenham *et al.*, 1990a), naftalen-2,3-dikarboksialdehid/kalijum-cijanid (Scott i Lawrence, 1994), 4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazol (4-fluoro-7-nitrobenzofurazan; Scott i Lawrence, 1994), 6-aminohinolil-N-hidroksisukcinimidilkarbammat (Velázquez *et al.*, 1995), 9-fluorenilmetil-hloroformat (Holcomb *et al.*, 1993) i *o*-ftaldialdehid/2-merkaptotanol (OPA–MCE), (Shephard *et al.*, 1990; AOAC, 1998; Sydenham *et al.*, 1996b; AOAC 2002). Od nabrojanih derivatizacionih sredstava, najčešće se koristi OPA–MCE za derivatizaciju fumonizina (Jakšić, 2004).

Tečna hromatografija sa masenim spektrometrom kao detektorom. Konvencionalne metode omogućavaju određivanje jednog ili jedne grupe mikotoksina, a danas se teži iznalaženju multimikotoksinskih metoda koje bi omogućile istovremeno određivanje što većeg broja mikotoksina. Ovaj zahtev savremene analitičke hemije ostvariv je jedino univerzalnom, ali dovoljno selektivnom tehnikom kao što je tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom HPLC–MS ili tandemskom masenom spektrometrijom HPLC–MS/MS. Ove tehnike omogućavaju istovremeno određivanje hemijski različitih jedinjenja, različite polarnosti, bez derivatizacije. Takođe, u ovom slučaju prema nekim autorima, nije potrebno prečišćavanje ekstrakta (D'Arco *et al.*, 2008). MS detekcija daje informacije o strukturi i time osigurava identifikaciju analita, stoga su metode GC–MS i HPLC–MS danas prihvaćene kao visoko pouzdane u potvrdi određivanja rezidua (EC 2002). MS/MS analiza se odvija u dve faze. U prvoj fazi masene separacije se selektuje interesantan jon iz matriksa (obično molekularni jon, protonovani molekularni jon ili molekularni anjon), a u drugoj fazi se vrši masena analiza nakon jonizacije selektovanog jona, čime se postiže veća sigurnost u identifikaciji (Paepens *et al.*, 2005).

HPLC–MS ili HPLC–MS/MS metode su se retko koristile pre 90-tih godina, i to primenom različitih interfejsa, kao npr. termosprej (TSP; Korfmacher *et al.*, 1991; Thakur i

Smith, 1994; 1996), zrakom čestica (particle beam interface, Young i Lafontaine, 1993) i bombardovanje brzim atomima (Korfmacher *et al.*, 1991). Tek sredinom 90-tih, kada su otkrivene prednosti jonizacije na atmosferskom pritisku (API), hemijske jonizacije na atmosferskom pritisku (APCI) i ESI, HPLC–MS ili HPLC–MS/MS postaje zastupljenija metoda u analizi rezidua u hrani i životnoj sredini.

Obzirom da se fumonizini lako jonizuju, prema Plattneru (1999), idealna tehnika za detekciju fumonizina je ESI–MS. Jonizacijom molekula fumonizina se produkuju signali kako u pozitivnom, tako i u negativnom režimu rada. Ovom metodom, Plattner je uspeo da razdvoji i detektuje ne samo fumonizine B-serije, već i A i P analoge. Za fumonizine C-serije nije postignuto dovoljno dobro razdvajanje od fumonizina B-serije, osim za fumonizin C₄ koji se potpuno razdvojio od FB₄. Dobro razdvajanje je postignuto i za hidrolizovane i parcijalno hidrolizovane molekule FB₁, iako nije postignuto potpuno razdvajanje dvaju izomera PHFB₁. Odgovor fumonizina B₁, B₂ i B₃ je praktično identičan. Slobodna amino grupa se mnogo lakše protonuje od karboksilnih grupa, pa je odgovor fumonizina A-serije, kod kojih je amino grupa acetilovana, značajno niži. Silva *et al.* (2009) su utvrdili da ESI ima prednost u odnosu na APCI jer ima veću osetljivost, a jonizacija se vrši direktno u tečnoj fazi na temperaturi okoline što minimizira razlaganje kompleksnih jedinjenja. U pozitivnom režimu rada određuje se protonovani molekulski jon FB₁ m/z 722, a za FB₂ m/z 706, a u negativnom režimu rada molekulski anjon m/z 720 za FB₁ i 704 za FB₂. Osetljivost određivanja je pet puta veća u pozitivnom režimu rada (Silva *et al.*, 2009).

Za određivanje fumonizina koriste se različiti maseni analizatori: jednostruki kvadrupol (Senyuva *et al.*, 2008), trostruki kvadrupol (QqQ; Paepens *et al.*, 2005; D'Arco *et al.*, 2008; Di Mavungu *et al.*, 2009; Vuković *et al.*, 2010; Gazzotti *et al.*, 2011); analizator sa jonskom zamkom (Faberri *et al.*, 2005) i maseni analizator sa vremenom preleta jona (Senyuva i Gilbert, 2008). Kod jednostrukog kvadrupola prati se selektovani jon (SIM režim rada), dok se kod trostrukog kvadrupola (MS/MS detekcije) prati selektovani jon, ali i fragmentirani joni (MRM–praćenje višestrukih reakcija). Fragmentirani joni nastaju sekvencijalnim odvajanjem vode i lanaca trikarboksilne kiseline iz molekula fumonizina, čime se od jona prekursora FB₁ m/z 722 produkuju joni (m/z) 352 i 334, a od FB₂ m/z 706, produkti su joni (m/z) 318 i 336. Pri određivanju fumonizina se kao unutrašnji standardi koriste diklofenak (Faberri *et al.*, 2005), 2-amino-dodekan-1,3-diol (Paepens *et al.*, 2005), izotop FB₁-d₆ (Seefelder *et al.*, 2004), odnosno [U-¹³C₃₄]FB₁ (Li *et al.*, 2010).

LC–MS i LC–MS/MS metode imaju posebnu ulogu u otkriću novih serija fumonizina (A-, C- i P-serije) i u određivanju njihove strukture i biosinteze, zajedno sa NMR spektroskopijom (Zöllner i Mayer-Helm, 2006).

Najvažnija prednost HPLC–MS/MS metode je smanjenje vremena analize, što je naročito važno u slučajevima trovanja životinja (Kokkonen i Jestoi, 2009). Ovi autori su razvili i izvršili validaciju brze i jeftine metode za određivanje 31 mikotoksina u pšenici, ječmu i ovsu.

Kim *et al.* (2003) koriste HPLC–ESI–MS metodu za određivanje fumonizina kao parcijalno i potpuno hidrolizovanih fumonizina u korn-fleksu, nakon hidrolize i ekstrakcije, čime su dokazali da je sadržaj “skrivenih” fumonizina vezanih za proteine 2,6 puta veći od sadržaja određenog konvencionalnim metodama. Dall’Asta *et al.* (2009) su takođe koristili LC–MS/MS metodu za simultano kvantitativno određivanje slobodnih i “maskiranih” fumonizina, odnosno hidrolizovanih metabolita, u kukuruзу i proizvodima od kukuruza. Silva *et al.* (2009) su pokazali da HPLC–MS/MS ima veću osetljivost (12 µg/kg za FB₁ i FB₂) od LC–MS (40 µg/kg za oba fumonizina), dok je u odnosu na HPLC sa fluorescentnom detekcijom derivata fumonizina sa naftalen-2,3-dikarboaldehidom (20 µg/kg za FB₁ i 15 µg/kg za FB₂) sličnog reda veličine. Takođe su zaključili da je HPLC–MS/MS i najtačnija i najpreciznija metoda, uz zanemarljiv efekat matriksa.

Pregled novijih metoda određivanja fumonizina metodom tečne hromatografije sa MS detekcijom je dat u Tabeli 2.17.

Tabela 2.17 Pregled LC–MS/MS metoda za određivanje fumonizina

VRSTA UZORKA I PRIPREMA	USLOVI HPLC	USLOVI MS	PRAĆENI PREKURSOR I/ILI PRODUKT JONI (m/z), GD i GO	LITERATURA
Korn-fleks	C18, 3 μm , 2,0x150 mm, mob. faza: 0,1 % HCOOH i ACN– MeOH, gradijentno, protok 0,2 ml/min	ESI; SIM napon kapilare 3,0 kV, temperatura izvora 120 °C napon na konusu 35–45 V	FB ₁ 722,4; FB ₂ 706,40 PHFB ₁ 564,4; PHFB ₂ 548,4 HFB ₁ 406,4; HFB ₂ 390, 4	Kim <i>et al.</i> , 2003
Hrana za bebe od kukuruza 3 g + 22 ml MeOH ASE	C18, 5 μm , 4,6x150 mm, mob. faza: H ₂ O i MeOH sa 0,5% HCOOH, gradijentno, protok 0,3 ml/min	ESI; MRM napon kapilare 3,20 kV, temperatura izvora 125 °C; koliziona energija 35-40 V napon na konusu 50 V	FB ₁ 722 (352 i 354) FB ₂ i FB ₃ 706 (336 i 318) GO 2 $\mu\text{g/kg}$ za FB ₁ i FB ₂ i 5 $\mu\text{g/kg}$ za FB ₃	D'Arco <i>et al.</i> , 2008.
Hrana za ljude od kukuruza 25 g + 100 ml MeOH–H ₂ O (75:25, v/v) IMA	C18, 5 μm , 4,6x250 mm, mob. faza: H ₂ O i MeOH sa 0,5% HCOOH, gradijentno, protok 0,5 ml/min	ESI; SIM i MRM napon kapilare 3,20 kV, temperatura izvora 125 °C koliziona energija 35-40 V napon na konusu 50 V	FB ₁ 722 (352 i 334); FB ₂ 706 (336 i 318) MS: GD 40 $\mu\text{g/kg}$; GO 110 $\mu\text{g/kg}$; MS/MS: GD 12 i GO 35 $\mu\text{g/kg}$ za FB ₁ i FB ₂	Silva <i>et al.</i> , 2009.
Griz, palenta, pahuljice, brašno, kokičar 10 g+100 ml ACN–MeOH– H ₂ O (25:25:50, v/v/v)	C18 3,5 μm , 100 x 3,0 mm, na 30 °C mob. faza: MeOH–H ₂ O, 70:30, (v/v), 0,5% HCOOH, izokratsko, protok 0,5 ml/min	ESI; MRM napon kapilare 2,0 kV, koliziona energija 40 V za FB ₁ i 35 V za FB ₂ i FB ₃	FB ₁ 722 (352 i 334); FB ₂ i FB ₃ 706 (336 i 318) FB ₁ GD 0,25 $\mu\text{g/kg}$; GO 1 $\mu\text{g/kg}$ FB ₂ i FB ₃ GD 0,5 $\mu\text{g/kg}$; GO 2 $\mu\text{g/kg}$	Vuković <i>et al.</i> , 2010.
Hrana za ljude od kukuruza i hrana za životinje 5 g + 100 ml MeOH–H ₂ O (70:30, v/v); PVDF 0,2 μm	C18, 1,7 μm , 2,1x50 mm, mob. faza: H ₂ O i MeOH sa 0,1% HCOOH, gradijentno, protok 0,3-0,4 ml/min	ESI; MRM: koliziona energija 36-38 V temperatura izvora 140 °C napon na konusu 50 V	FB ₁ 722 (352 i 334) FB ₂ i FB ₃ 706 (336 i 318) GD ($\mu\text{g/kg}$) 30 za FB ₁ , 20 za FB ₂ , i 6 za FB ₃ ; GO ($\mu\text{g/kg}$) 100 za FB ₁ 50 za FB ₂ i 20 za FB ₃	Li <i>et al.</i> , 2010.

Tabela 2.17 Pregled LC–MS/MS metoda za određivanje fumonizina - NASTAVAK

VRSTA UZORKA I PRIPREMA	USLOVI HPLC	USLOVI MS	PRAĆENI PREKURSOR I/ILI PRODUKT JONI (m/z), GD i GO	LITERATURA
Jetra prasića 1 g + 6 ml MeOH–H ₂ O (80:20, v/v) SPE	C18, 5 µm, 2,15x150 mm, mob. faza: ACN–H ₂ O sa 0,3% HCOOH i ACN sa 0,3% HCOOH, gradijentno, protok 0,3 ml/min	ESI; MRM; koliziona energija 20–40 V temperatura izvora 140 °C napon kapilare 3,25 kV napon na konusu 29–40 V	FB ₁ 722 (352 i 334) FB ₂ 706 (336 i 318) HFB ₁ 406 (388 i 370) HFB ₂ 390 (354 i 372) GD 0,05 µg/kg GO 10 µg/kg	Gazzoti <i>et al.</i> , 2011.
Kukuruz Ultrazvučna ekstrakcija 5 g + 25 ml MeOH–H ₂ O (75:25, v/v) 10 min, 120W, 0,22 µm	C18, 3,5 µm, 2,1x150 mm, mob. faza: MeOH–H ₂ O –HCOOH (75:25:0,2, v/v/v) protok 0,2 ml/min	ESI; MRM; koliziona energija 34–38 V temperatura izvora 120 °C napon kapilare 3,25 kV napon na konusu 50 V	FB ₁ 722,4 (352,4 i 334,4) FB ₂ 706,4 (336,4 i 318,4) GD 3,5 µg/kg FB ₁ i 2,5 µg/kg FB ₂ GO 11,7 µg/kg FB ₁ i 8,3 µg/kg FB ₂	Li <i>et al.</i> , 2010.
Kukuruz 2 g+20 ml MeOH–H ₂ O (75:25, v/v), QuEChERS sa PSA	C18, 1,7 µm, 2,1x50 mm, mob. faza: H ₂ O sa 0,1% HCOOH i MeOH, gradijentno, protok 0,3 ml/min	ESI; MRM koliziona energija 32–40 V temperatura izvora 150 °C napon kapilare 3,25 kV napon na konusu 48–50 V	FB ₁ 722,70 (352,29 i 334,28) FB ₂ 706,58 (336,33 i 354,29) GD 0,60 µg/kg FB ₁ i FB ₂ GO 2,0 µg/kg FB ₁ i FB ₂	Yang i Wu, 2012.

Multimikotoksinske metode. Zbog potencijalne opasnosti od sinergističkog delovanja mikotoksina, a u cilju uštede resursa i vremena, sve češće se koriste multimikotoksinske metode. Razvoj ovih metoda je otežan različitom strukturom mikotoksina, kao i različitim i kompleksnim matriksima. To zahteva kompromis u izboru uslova pripreme uzorka. Zbog veoma različite polarnosti različitih mikotoksina, prema Sulyok *et al.* (2006) najbolje je svesti pripremu uzorka na minimum i injektovati sirovi ekstrakt. Međutim, komponente matriksa mogu redukovati efikasnost jonizacije uzorka i potpuno smanjiti signal. Zato su mnogi autori uključili prečišćavanje uzorka ekstrakcijom na čvrstoj fazi, ili na specifičnim kolonama za više mikotoksina (Kokkonen i Jestoi, 2009). Međutim, i tada je primećen uticaj matriksa, a sa druge strane, neke analite nije bilo moguće odrediti. Najbolji način za prevazilaženje ovih teškoća je korišćenje izotopa kao internih standarda, jer oni nisu prisutni u uzorku, a imaju iste hemijske karakteristike kao analiti. Takođe, višestruko injektovanje istog uzorka uz promenu specifičnih MS uslova ili promenu polarnosti unutar iste analize su mogući načini za unapređivanje multimikotoksinskih metoda (Kokkonen i Jestoi, 2009; Zöllner i Mayer-Helm, 2006).

Poređenjem multimikotoksinske metode nakon imunoafinitetnog prečišćavanja ekstrakta sa multiimunoafinitetnim kolonama i “razredi i injektuj” metode bez prečišćavanja ekstrakta, Shephard *et al.* (2013a) su pokazali linearnu korelaciju između ovih metoda za određivanje FB₁ i FB₂, a metoda bez prečišćavanja je dala više vrednosti za fumonizine od metode sa imunoafinitetnim prečišćavanjem.

U Tabeli 2.18 je dat pregled multimikotoksinskih metoda kojima se, između ostalih toksina, određuju i fumonizini.

Tečna hromatografija sa detektorom naelektrisanog aerosoli pomoću korone (Corona CAD). Detekcija koronom naelektrisanog aerosola počinje prevođenjem eluata u kapljice koje se zatim suše i formiraju čestice čija veličina je srazmerna količini analita. Struja pozitivno naelektrisanog gasa sudara se sa česticama analita, pri čemu se naelektrisanje prenosi na čestice. Što su veće čestice, veće je i naelektrisanje. Čestice se transferuju u kolektor gde se meri naelektrisanje izuzetno osetljivim elektrometrom. Na ovaj način se generiše signal koji je u direktnoj srazmeri sa količinom analita. Odgovor dobijen sa Corona CAD za neisparljive analite manje zavisi od hemijske strukture nego što je to slučaj kod drugih detektora. Prvi put je ova metoda uspešno primenjena i preporučena za rutinske analize fumonizina (B₁, B₂ i B₃) u kukuruzu od strane Szekeres *et al.* (2013). Nakon prečišćavanja uzorka na SAX kolonama, prinos je iznosio 82%, a granica detekcije 0,04 mg/kg.

Tabela 2.18 Pregled multimikotoksinskih metoda za određivanje fumonizina pored drugih mikotoksina

Vrsta uzorka i priprema	Uslovi HPLC	Uslovi MS/MS	Praćeni prekursor i/ili produkt joni (m/z), GD i GO	Literatura
Kukuruz; 3 mikotoksina 10 g + 45 ml ACN–H ₂ O (75:25, v/v); ASE, Mycosep 226 i SAX	C18, 1,7 μ m, 2,1x50 mm, mob. faza: 5 mmol/l amonijum-acetat sa 1% ACN na pH 4,0 sa HCOOH i 100% ACN, gradijentno, protok 1 ml/min	APCI; CID; relativna koliziona energija: 28%	FB ₁ 722 (704); GD 20 μ g/kg; GO 50 μ g/kg	Royer <i>et al.</i> , 2004.
Pšenica i kukuruz; 39 mikotoksina 0,5 g + 2 ml ACN–H ₂ O–sirćetna (79:20:1, v/v/v); Bez prečišćavanja ekstrakta	C18, 1,7 μ m, 2,1x50 mm mob. faza: MeOH–H ₂ O–CH ₃ COOH (10:89:1, v/v/v) i (97:2:1, v/v/v) sa 5 mmol/l amonijum-acetat; gradijentno, protok 1 ml/min	ESI; MRM temperatura izvora 550°C koliziona energija 41-57 V	FB ₁ 722,5 (334,4 i 704,4); GD 16 μ g/kg FB ₂ 706,5 (336,3 i 688,4); GD 8 μ g/kg HFB ₁ 406,3 (370,3 i 388,3); GD 2,5 μ g/kg	Sulyok <i>et al.</i> , 2006.
Kukuruzno brašno; 20 mikotoksina 1 g + 10 ml ACN–H ₂ O (75:25, v/v) Prečišćavanje C18 i Carbograph-4	C18, 5 μ m, 2,1x250 mm mob. faza: MeOH–H ₂ O sa 25 mmol/l HCOOH, gradijentno, pH 3,8 protok 0,2 ml/min	ESI; MRM temperatura izvora 120°C relativna koliziona energija: 36-38%	FB ₁ 722 (352/334); GO 4 μ g/kg FB ₂ 706 (354/336); GO 2 μ g/kg FB ₃ 706 (354/336) FB ₄ 690 (338/320)	Cavaliere <i>et al.</i> , 2007.
Ječam, ovas, pšenica; 31 mikotoksin ASE ekstrakcija 3 g, 40 ml 90% ACN 100°C i 10,3 MPa Bez prečišćavanja ekstrakta	C18, 5 μ m, 2,1x150 mm mob. faza: H ₂ O sa 0,2% HCOOH; ACN sa 0,2% HCOOH, 1 mmol amonijum acetat i ACN, gradijentno, protok 0,1 i 0,2 ml/min	ESI; MRM temperatura izvora 120°C koliziona energija 35-38 V napon na konusu 48-50 V	FB ₁ 722,6 (334,3 i 352,4); GD 12,5–40 μ g/kg; GO 30–80 μ g/kg FB ₂ 706,6 (336,4 i 318,4); GD 12,5–30 μ g/kg; GO 25–65 μ g/kg	Kokkonen i Jestoi, 2009
Biljni dodaci ishrani; 23 mikotoksina 1 g + 25 ml etil acetat–HCOOH (95:5, v/v); etil-acetat–trifluoro sirćetna kiselina (97:3, v/v) za fumonizine; Prečišćavanje Oasis HLB TM i Carbograph	C18, 5 μ m, 2,1x150 mm mob. faza: H ₂ O–MeOH–CH ₃ COOH (94:5:1, v/v/v) i MeOH–H ₂ O–CH ₃ COOH (97:2:1, v/v/v) sa 5 mmol/l amonijum acetata, gradijentno, protok 0,3 ml/min	ESI; MRM temperatura izvora 150°C koliziona energija 37 V napon na konusu 51 V napon kapilare 3,25 kV	FB ₁ 722,5 (334,4 i 352,3); GD 1 μ g/kg; GO 3 μ g/kg; FB ₂ 706,4 (336,3 i 318,0); GD 0,3 μ g/kg; GO 1 μ g/kg; FB ₃ 706,4 (336,3 i 354); GD 1; GO 3 μ g/kg	Di Mavungu <i>et al.</i> , 2009.
Pivo, 24 mikotoksina 10 ml + 10 ml ACN Prečišćavanje: QuEChERS, dSPE citratna ekstrakciona kolona (MgSO ₄ +NaCl+Na-citrat), pa zatim dSPE C18 kolona	C18, 1,7 μ m, 2,1x50 mm UHPLC mob. faza: H ₂ O i 2% CH ₃ COOH –0,1 mmol/l amonijum acetat–MeOH, gradijent, protok 0,5 ml/min 6,5 min za 15 mikotoksina	ESI; MRM temperatura izvora 120°C koliziona energija 35-40 eV napon na konusu 48–50 V napon kapilare 3 kV	FB ₁ 722 (352 i 334) FB ₂ 706 (336 i 318) FB ₃ 706 (336 i 318) GO 5 ng/ml	Tamura <i>et al.</i> , 2011.

Tabela 2.18 Pregled multimikotoksinskih metoda za određivanje fumonizina pored drugih mikotoksina - NASTAVAK

Vrsta uzorka i priprema	Uslovi HPLC	Uslovi MS/MS	Praćeni prekursor i/ili produkt joni (m/z), GD i GO	Literatura
Pšenica, paprika, biber: 2,5 g + 10 ml H ₂ O sa 2% HCOOH hrana za bebe 10 g bez H ₂ O H ₂ O-ACN QuEChERS ili H ₂ O-ACN za polarne analite	C18, 1,8 μ m, 2,1x100 mm mob. faza: 5 mmol/l amonijum-formijat i 0,2% HCOOH- H ₂ O-MeOH, i 5mmol/l amonijum-formijat -MeOH, gradijentno, protok 0,35-0,55 ml/min	ESI; MRM temperatura izvora 120°C napon na konusu 30 V napon kapilare 3,5 kV	FB ₁ 722,4 (334,3); GO 20-40 μ g/kg FB ₂ 706,3 (336,2); GO 20-40 μ g/kg FB ₃ 706,4 (336,2); GO 20-40 μ g/kg	Lacina <i>et al.</i> , 2012.
Pšenično brašno 11 toksina 5 g 20 ml ACN-H ₂ O (84:16, v/v)	C18, 3 μ m, 2,1x100 mm mob. faza: H ₂ O i MeOH, sa 0,1% CH ₃ COOH i 5 mmol/l amonijum-acetata, gradijentno, protok 0,5 ml/min	ESI; SRM koliziona energija 34-38 eV	FB ₁ 722,6 (352,4 i 334,3) FB ₁ GD 0,05 μ g/kg; GO 0,2 μ g/kg FB ₂ 706,5 (336,3 i 318,3) FB ₂ GD 0,01 μ g/kg; GO 0,03 μ g/kg	Škrbić <i>et al.</i> , 2012.
Kukuruz 9 toksina 10 g sa 50 ml ACN-H ₂ O-CH ₃ COOH (79:20:1, v/v/v) OASIS HLB SPE kolone	C18, 2,2 μ m, 3x75 mm mob. faza: H ₂ O i MeOH, sa 0,1% CH ₃ COOH i 1mmol/l amonijum-acetata, gradijentno, protok 0,3 ml/min	ESI; MRM koliziona energija 50 V	FB ₁ 722,4 (352,4 i 334,4); GD 0,64 μ g/kg; GO 2,12 μ g/kg	Wang <i>et al.</i> , 2013.
Kukuruz, pirinač, badem, kikiriki, pistači 26 toksina 1 g + 5 ml ACN-H ₂ O (85:15, v/v)	C18, 3 μ m, 2,1x100 mm mob. faza: H ₂ O i MeOH, sa 0,1% HCOOH i 10 mmol/l amonijum-formijata, gradijentno, protok 0,5 ml/min	ESI; MRM koliziona energija 53-59,5 V	FB ₁ 722 (352 i 334); GD 2,2-2,8 μ g/kg; GO 7,3-9,9 μ g/kg; FB ₂ 706 (336 i 318); GD 2,2-2,9 μ g/kg; GO 7,4-9,6 μ g/kg (¹³ C ₃₄)-FB ₁ 756 (356 i 374)	Liao <i>et al.</i> , 2013.
Kukuruz Metoda 1-IMA multitoxin prečišćavanje Metoda 2-bez prečišćavanja 20 g + 70 ml FP + 70 ml MeOH	C18, 5 μ m, 2x150 mm mob. faza: H ₂ O i MeOH, sa 0,5% sirćetne kis. i 1mmol/l amonijum-acetata, gradijentno, protok 0,5 ml/min	Q Trap MS/MS	HFB ₁ 406 (370/388) GD 0,1 μ g/kg FB ₁ GD 3-3,9 μ g/kg FB ₂ GD 1,5-3,7 μ g/kg FB ₃ GD 1 μ g/kg	Shephard <i>et al.</i> , 2013a.
Grickalice iz Afrike 23 mikotoksina 2 g + 10 ml 0,1% HCOOH QuEChERS (MgSO ₄ i NaCl)	C18, 5 μ m, 2x150 mm mob. faza: 5 mmol/l amonijum-formijata, i 0,1% HCOOH. u H ₂ O i 5 mmol/l amonijum-formijata u MeOH, gradijentno, protok 0,2 ml/min	Q Trap MS/MS SRM temperatura izvora	FB ₁ GD 25 μ g/kg; GO 70 μ g/kg FB ₂ GD 32 μ g/kg; GO 100 μ g/kg FB ₃ GD 30 μ g/kg; GO 90 μ g/kg	Rubert <i>et al.</i> , 2013.

Tečna hromatografija sa ELSD detektorom (Evaporative light scattering detector).

ELSD detektor je relativno jeftin i jednostavan za korišćenje i nije potrebna derivatizacija (Wilkes *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2008). Zasniva se na primeni laserskog zraka, čiji intenzitet se meri nakon rasipanja od čvrstih čestica analita pomoću osetljivog fotomultiplikatora. Veće čestice imaju veće mase i daju veće rasipanje zračenja. Međutim, ovaj način detekcije nije dovoljno pouzdan, tačan i precizan, naročito za veoma niske i veoma visoke koncentracije analita (Szekeres *et al.*, 2013).

Gasna hromatografija

GC–MS se koristi u ograničenom broju slučajeva za analizu fumonizina, uglavnom za potvrdu hemijske strukture, jer priprema uzorka zahteva mnogo vremena. Uzimajući u obzir njihovu veliku molekulsku masu i polarnost, neophodna je hidroliza molekula fumonizina na manje fragmente i u nekim slučajevima se primenjuje odgovarajuća derivatizacija. Sydenham *et al.* (1990a) nakon prečišćavanja ekstrakta vrše hidrolizu i esterifikaciju 1,2,3-propan-trikarboksilne kiseline i acilaciju aminopolihidroksilnog dela molekula fumonizina, odnosno derivatizaciju fumonizina sa N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamidom (Sydenham *et al.*, 1990b). Detekcija se izvodi plamenjonizacionim ili masenim detektorom (Sydenham *et al.*, 1990a; 1990b). Granica detekcije je manja od 100 µg/kg. Plattner *et al.* (1990) koriste hidrolizu pri čemu dobijena dva proizvoda trimetilpropan-1,2,3-trikarboksilat i C₂₂-aminopentol - kostur fumonizina analiziraju pomoću GC–MS.

2.6.4.2 Molekulska spektroskopija

Fluorimetrija. Fluorimetrija omogućava brže i jednostavnije određivanje fumonizina u poređenju sa tečnom hromatografijom. Međutim, nakon derivatizacije sa OPA–MCE, fumonizini se ne razdvajaju, već se određuje samo njihov ukupan sadržaj. Granica detekcije je 250 µg/kg ili 500 µg/kg, zavisno od instrumenta (VICAM, Product manuals). Pri poređenju rezultata LC i fluorimetrije kod analize prirodno kontaminiranih i obogaćenih uzoraka kukuruza, Duncan *et al.* (1998) dobijaju veoma dobru korelaciju. Međutim, Jakšić (2004) fluorimetrijski dobija za niže vrednosti obogaćivanja rezultate u skladu sa Duncan *et al.* (1998), dok su za viši sadržaj dobijeni viši rezultati od očekivanih. Kao rešenje ovog problema se predlaže kalibracija fluorimetra sopstvenim standardima.

Infracrvena spektroskopija. Obzirom na svoje prednosti, kao što su: laka za izvođenje, brza, neinvazivna i nedestruktivna, ova tehnika je tokom vremena našla primenu u

zaštiti bilja, analizi kvaliteta i bezbednosti hrane i hrane za životinje (Dale *et al.*, 2012), a naročito u kontroli kvaliteta i praćenju procesa proizvodnje u industriji (Pojić i Mastilović, 2013). U tom cilju se koriste spektri snimljeni u različitim opsezima talasnih dužina, različiti načini snimanja i obrade spektara, kao i različite statističke metode za razvoj kalibracionog modela.

Infracrvena spektroskopija je tehnika koja koristi princip indukovanja vibracija unutar funkcionalnih grupa između C=O, C–O, C–H, N–H i O–H za identifikaciju i kvantifikaciju komponenata. Međutim, dobijeni spektri sadrže informacije o ukupnim fizičko-hemijskim karakteristikama ispitivanog uzorka, te su neophodne kvalitativne i kvantitativne hemometrijske metode za razvoj kalibracionog modela. Kalibracioni model definiše odnos između dobijenih spektralnih podataka i sadržaja komponente ili osobine koja se ispituje. Kvalitativne metode, između ostalog, obuhvataju analizu glavnih komponenata (PCA; Kos *et al.*, 2002; Abramović *et al.*, 2007), klaster analizu (Kos *et al.*, 2003; 2004; Abramović *et al.*, 2007) i veštačku neuronsku mrežu (Gordon *et al.*, 1998). Kvantitativne metode su višestruka linearna regresija (MLR; Abramović *et al.*, 2007), parcijalna regresija najmanjih kvadrata (PLS; Della Riccia i Del Zotto, 2013) i druge. Pošto je infracrvena spektroskopija indirektna metoda, veoma je važan kvalitet referentne metode na osnovu koje se razvija kalibracioni model. Tačnost modela se opisuje koeficijentom determinacije (r^2), standardnom greškom kalibracije (SEC), standardnom greškom međuvalidacije (SECV) i standardnom greškom predviđanja (SEP). Komplikovaniji kalibracioni modeli obezbeđuju veću tačnost za trenutni set uzoraka, ali je pitanje u kojoj meri su robusni i pozdani u dužem vremenskom periodu.

Prednosti u odnosu na tradicionalne hemijske hromatografske metode su dovele do razvoja primene srednje ili fundamentalne infracrvene (IR, Tabela 2.19) i bliske infracrvene (NIR, Tabela 2.20) spektroskopije za detekciju plesni i predviđanje prisustva mikotoksina.

Tabela 2.19 Pregled primene IR spektroskopije za detekciju plesni i predviđanje prisustva mikotoksina u žitaricama

VRSTA ANALIZE	OPSEG SPEKTRA (cm ⁻¹)	TALASNI BROJ (cm ⁻¹)	VRSTA UZORKA	REFERENCA
Plesni <i>A. flavus</i>	600–4000 cm ⁻¹ FTIR–PAS	12 regiona spektra 600–4000 cm ⁻¹ Neuronske mreže	kukuruz	Gordon <i>et al.</i> , 1998
Plesni <i>A. flavus</i>	5000–20000 TIRS	4 regiona spektra 1000–1750 cm ⁻¹	kukuruz	Gordon <i>et al.</i> , 1999
Fuzariumske plesni, ergosterol, DON	650–4000 cm ⁻¹ FTIR/ATR	650–4000 cm ⁻¹ PCA	kukuruz	Kos <i>et al.</i> , 2002
Fuzariumske plesni, ergosterol, DON	650–4500 cm ⁻¹ FTIR/ATR	800–1800 cm ⁻¹ PCA	kukuruz	Kos <i>et al.</i> , 2003
Plesni <i>F. graminearum</i> DON	600–1900 cm ⁻¹ FTIR/ATR	800–1800 cm ⁻¹ PLS	kukuruz	Kos <i>et al.</i> , 2004
DON	2500–15385 650–4500 cm ⁻¹ FTIR/DR i ATR	1710–1830 cm ⁻¹ (DR) 1690–1965 cm ⁻¹ (ATR) 1709, 1743 cm ⁻¹ (ATR) PLS, MLR	pšenica	Abramović <i>et al.</i> , 2007

Tabela 2.20 Pregled primene NIR spektroskopije za detekciju plesni i predviđanje prisustva mikotoksina u žitaricama

VRSTA ANALIZE	OPSEG SPEKTRA (nm)	ODABRANE TALASNE DUŽINE I HEMOMETRIJSKI MODELI (nm)	VRSTA UZORKA	REFERENCA
Oštećenje zrna Aflatoksin	366–1700 refleksiona	366; 400–700; 400–2500 Neuronska mreža	kikiriki	Dowell i Windham, 1993
Fuzariumsko oštećenje zrna, DON	400–1700 transmisiona	750, 950, 1050, 1200, 1400, 1500, 1650 PLS	pšenica u zrnu	Dowell <i>et al.</i> , 1999
FB	600–1050 transmisiona 550–1700 refleksiona	650, 710, 935, 990 590, 995, 1200, 1410 PLS i DA	kukuruz u zrnu	Dowell <i>et al.</i> , 2002
Fuzariumsko oštećenje zrna	940–1700 refleksiona	1182, 1242 log(1/R)	pšenica u zrnu	Delwiche, 2003
DON	570–1100 transmisiona	670–1100 PLS	pšenica	Pettersson i Åberg, 2003
Fuzariumsko oštećenje zrna, DON	1000–1700 refleksiona	1200; DON < 1000 log(1/R)	pšenica	Delwiche i Hareland, 2004
Aflatoksin FB	500–1700 refleksiona	750, 1200 DA	kukuruz	Pearson <i>et al.</i> , 2004
Ukupne plesni, <i>F. verticillioides</i> FB ₁	400–2500 400–2500 refleksiona	1430, 1470, 1820, 2140, 2180 1190, 1954–2378 Modifikovana PLS	kukuruz	Berardo <i>et al.</i> , 2005

Tabela 2.20 Pregled primene NIR spektroskopije za detekciju plesni i predviđanje prisustva mikotoksina u žitaricama - NASTAVAK

VRSTA ANALIZE	OPSEG SPEKTRA (nm)	ODABRANE TALASNE DUŽINE I HEMOMETRIJSKI MODELI (nm)	VRSTA UZORKA	REFERENCA
Oštećenje od plesni	200–2500 refleksiona	200–1400; 1400–2500 PLS	pšenica	Siuda <i>et al.</i> , 2006
Fuzariumsko oštećenje zrna	200–2500 refleksiona	200–1400; 200–2500 PLS	pšenica	Balcerowska <i>et al.</i> , 2009
DON	1000–2500 FT–NIR refleksiona	1429, 1905 PLS	pšenica	De Girolamo <i>et al.</i> , 2009
Aflatoksin B ₁	400–2500 NIR i FT–NIR refleksiona	480–600; 870–1200 log(1/R) i PLS	kukuruz, ječam	Fernández-Ibañez <i>et al.</i> , 2009
FB ₁ +FB ₂	650–2500 FT–NIR refleksiona	Ceo spektar 926 talasnih dužina PLS	kukuruz	Gaspardo <i>et al.</i> , 2012
FB ₁ +FB ₂	650–2500 FT–NIR refleksiona	632 talasne dužine PLS	kukuruz	Della Riccia i Del Zotto, 2013.

Obzirom na veoma niske koncentracije mikotoksina u žitaricama, ova tehnika se zasniva na predviđanju prisustva mikotoksina na osnovu identifikacije plesnima oštećenih zrna (Pojić i Mastilović, 2013). Detekcija plesni kao indikatora prisustva mikotoksina prema Kos *et al.* (2002; 2003) zahteva primenu FTIR spektroskopije. FTIR spektroskopija sa umanjenom ukupnom refleksijom (ATR) je pogodna za ispitivanje prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza sa *Fusariumom*, odnosno DON-om. Autori su ponovljivost merenja znatno unapredili prosejavanjem uzorka pre snimanja i snimanjem čestica veličine 100–250 μm , a razvijenom metodom je omogućeno 100% razdvajanje nekontaminiranih uzoraka od onih sa sadržajem DON-a od najmanje 310 $\mu\text{g/kg}$ (Kos *et al.*, 2003). Multivarijantna analiza omogućava da se u obzir uzme više od jedne talasne dužine, tako da se na ovaj način odabere pogodan set talasnih dužina koje dobro reprezentuju spektar, ali da se u isto vreme minimizira uticaj šuma i nevažnih informacija (Kos *et al.*, 2003). Takođe se pokazalo da ATR tehnika zbog postignute bolje klasifikacije i kvantifikacije, a takođe i jednostavnosti korišćenja i lakše interpretacije rezultata ima prednost u odnosu na difuznu refleksiju (DR, Kos *et al.*, 2004).

Za kontrolu toksigenih plesni u poljoprivrednim proizvodima, od strane Gordona *et al.* (1999) predložena je tranziciona infracrvena spektroskopija (TIRS) koja omogućava on-line kontolu kukuruza u zrnu. Iako je fotoakustična infracrvena spektroskopija (IR-PAS) takođe dala dobre rezultate za analizu plesni i toksičnih metabolita u zrnu, nije se pokazala praktičnom jer omogućava samo diskontinualnu analizu pojedinih zrna (Gordon *et al.*, 1999).

Za brzu detekciju DON-a u pšenici Abramović *et al.* (2007) su koristili FTIR spektroskopiju. Kvantifikacija korišćenjem metoda PLS i MLR pokazala je dobru korelaciju sa refrentnom HPLC metodom. Poređenjem rezultata dobijenih pomoću ATR i DR i ovi autori su zaključili da ATR ima određene prednosti u vidu bolje klasifikacije kontaminiranih od nekontaminiranih uzoraka, kao i jednostavnosti i lakšeg korišćenja. Takođe, nađeno je da je moguća procena sadržaja DON-a u pšenici merenjem apsorbanacije na samo dva talasna broja (1709 i 1743 cm^{-1}).

Pored pomenutih primenjenih metoda u srednjoj oblasti IR spektra, za detekciju plesni i predviđanje kontaminacije mikotoksinima često je korišćena i NIR spektroskopija. Prvobitna istraživanja ispitivanja mogućnosti primene refleksionih tehnika u različitim oblastima spektra (NIR, vidljiva i UV) za određivanja plesnima oštećenih zrna kikirikija su pokazala da snimanje u vidljivoj oblasti u kombinaciji sa neuronskim mrežama daje tačnost klasifikacije od 90% (Dowell i Windham, 1993). Ispitivanja u NIR oblasti su se pokazala pogodnim za kvantitativnu procenu vidljivih promena na zrnu žitarica i procenu nivoa DON-

a (Dowell *et al.*, 1999; Delwiche, 2003; Delwiche i Hareland, 2004) i fumonizina (Dowell *et al.*, 2002). Takođe je, na osnovu ove tehnike, razvijen i automatski sistem za klasifikaciju pojedinih zrna žitarica (Dowell *et al.*, 2000; Pearson *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2004). Pearson *et al.* (2004) su uspjeli da, merenjem absorpcije na dve talasne dužine 750 i 1200 nm, korektno identifikuju > 99% zrna kontaminiranih sa > 100 ppb aflatoksina i 100% zrna kontaminiranih sa < 1 ppb, kao nekontaminiranih. Takođe su sa 100% tačnošću klasifikovali zrna sa < 1 ppm kao nekontaminirane i sa > 100 ppm kao kontaminirane fumonizinom. NIR sa nizom dioda je korišćen za brzu analizu pojedinih zrna na *Fusarium* plesni, aflatoksin, i fumonizin (Xie *et al.*, 2000). Balcerowska *et al.* (2009) su proučavali mogućnost primene UV, vis i NIR dela spektra za određivanje prisustva fuzarijumom oštećenog materijala. Nađeno je da se DR spektroskopija u UV opsegu pokazala pogodnijom za ova ispitivanja jer je greška međuvalidacije manja u odnosu na NIR. Instrumenti koji se zasnivaju na refleksiji elektromagnetnog zračenja su se pokazali kao jednostavniji i efikasniji za detekciju fumonizina u pojedinim zrnima kukuruza (Dowell i Maghirang, 2002). Koristeći instrument za merenje propuštenog NIR zračenja za detekciju DON-a u pšenici, Pettersson i Åberg (2003) su zaključili da je na ovaj način moguće razviti model za predviđanje koncentracije DON-a u pšenici u nivou nešto iznad maksimalno dozvoljene količine (500 ppb), ali je potreban veći broj uzoraka za kalibraciju. Rezultati Berardo *et al.* (2005) pokazuju da NIR spektroskopija može tačno da predvidi infekciju plesnima, a posebno *F. verticillioides* na zrnju kukuruza, kao i da kvantifikuje FB₁. Siuda *et al.* (2006) su razvili metodu za određivanje DON-a u pšenici na osnovu snimljenih spektara u opsegu 200–1400 nm. Najbolji rezultati su dobijeni merenjem čestica manjih od 0,18 mm i primenom PLS.

Instrumenti sa Furijeovim transformom (FT–NIR) se sve više koriste zbog visokog odnosa signal-šum, tačnosti definisanja talasne dužine, brzog snimanja spektra i visoke rezolucije (Gaspardo *et al.*, 2012; Della Riccia i del Zotto, 2013). Kalibracioni model za analizu DON-a u pšenici i durum pšenici nakon FT–NIR spektroskopije čestica manjih od 500 µm je dobijen PLS metodom, čijom primenom je postignuto dobro razlikovanje uzoraka sa manje i više od 300 µg/kg (De Girolamo *et al.*, 2009).

Gaspardo *et al.* (2012) su, primenom FT–NIR spektroskopije sa integrisanom sferom i snimanjem spektara metodom difuzne refleksije, razvili model uspešnog predviđanja koncentracija FB₁+FB₂ < 4 mg/kg i > 4 mg/kg. Model sa manjim brojem glavnih komponenata se pokazao tačnijim. Međutim, dobijena je loša međuvalidacija, te su Della Riccia i Del Zotto (2013) unapredili ovaj model korišćenjem 632 talasne dužine umesto 926. Isključivši talasne dužine iz vidljivog dela spektra (650–752 nm), smanjili su šum i razvili

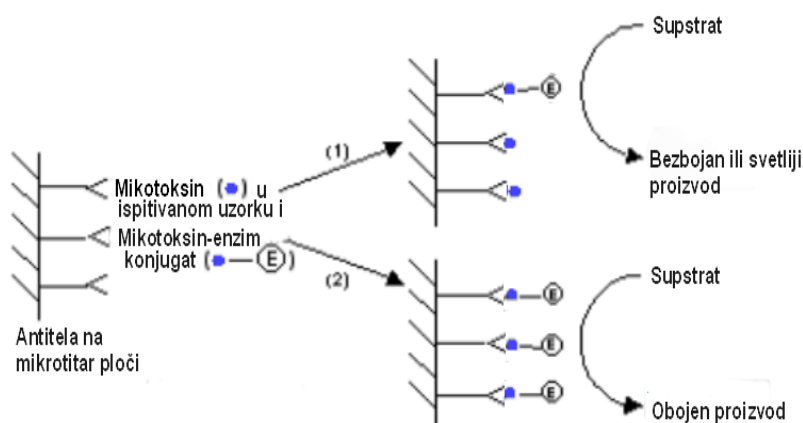
dva hemometrijska modela sa različitim brojem glavnih komponenti. Zatim su 45 uzoraka ispitani razvijenom metodom i prema prvom modelu sa 17 glavnih komponenti, 26 uzoraka je bilo lažno pozitivno (> 4 mg/kg), a prema drugom, sa 21 glavnom komponentom, 22. Zaključili su da su potrebna dalja ispitivanja sa većim setom uzoraka za kalibraciju.

Na osnovu svega izloženog može se konstatovati da je nedostatak primene IR i NIR spektroskopije niska osetljivost, relativno visoka cena instrumenta, neophodnost razvoja kalibracionih modela i korišćenje komplikovanih hemometrijskih i statističkih metoda za obradu dobijenih spektralnih podataka. Zbog toga metode zasnovane na primeni IR spektroskopije za detekciju plesni i predviđanje mikotoksina nisu standardizovane.

2.6.4.3 Imunohemijska metoda

Kao alternativna tehnika klasičnim hromatografskim tehnikama analitike rezidua koje zahtevaju značajne količine organskih rastvarača koji zagađuju životnu sredinu, razvijeni su različiti ELISA testovi, sa poliklonalnim ili monoklonalnim antitelima, sa različitom osetljivošću i granicama detekcije. Osim imunoafinitetnih kolona, ELISA je još jedna imunohemijska tehnika koja se koristi u analitici fumonizina, i to nederivatizovanih molekula. Njihovom primenom se može odrediti samo ukupan sadržaj fumonizina B-serije. ELISA testovi su osetljivi i specifični, jednostavni za izvođenje, relativno jeftini, pogodni za automatizaciju i brzo ispitivanje velikog broja uzoraka, obzirom da nije potrebno nikakvo prečišćavanje ekstrakta. Međutim, njihov nedostatak je mala ponovljivost i primenljivost testova samo na određenu vrstu uzorka. ELISA metode mogu biti korišćene kao brz skrining na polju ili u laboratoriji. Ove metode, međutim, daju generalno viši sadržaj toksina što je verovatno rezultat sporednih reakcija antitela sa jedinjenjima sličnim fumonizinima (Bird *et al.*, 2002; Jackson i Jablonski, 2004).

Danas su dostupni komercijalni ELISA testovi mnogobrojnih proizvođača za određivanje fumonizina (Tabela 2.21). Oni se zasnivaju na kompetitivnoj ELISA metodi (Slika 2.6).



Slika 2.6 Princip određivanja fumonizina pomoću kompetitivnih ELISA testova (EMAN, <http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=21>)

Osnova testa je antigen–antitelo reakcija. Čelije mikrotitar ploče su prekrivene sa specifičnim antitelima prema fumonizinima. Dodaje se standardni rastvor fumonizina (ili rastvor uzorka) i fumonizin "obeležen" enzimom (enzim-konjugat). Slobodan i "obeležen" fumonizin se takmiče za mesta vezivanja na antitelu. Ispiranjem mikrotitar ploče se nevezani enzim-konjugat uklanja, a dodaju se enzim-supstrat i hromogen. Vezani enzim-konjugat prevodi bezbojni hromogen u obojen proizvod. Merenje se izvodi fotometrijski, a apsorpcija je obrnuto proporcionalna koncentraciji fumonizina u uzorku (Bird *et al.*, 2002).

Metoda sa Neogenovim ELISA testom je usvojena kao zvanična AOAC metoda 2001.06 (Bird *et al.*, 2002).

Kulisek i Hazebroek (2000) su poredili HPLC i dve ELISA metode određivanja fumonizina nakon primene različitih sredstava za ekstrakciju i zaključili da su obe korišćene ELISA metode dale više vrednosti za sadržaj toksina od HPLC metode. Oni su ovo pripisali komponentama matriksa koje su strukturno slične fumonizinu, koje ometaju određivanje, ali te komponente nisu identifikovane. Ako se iz analize rezultata isključe rezultati dobijeni nakon korišćenja ACN–H₂O (50:50, v/v) kao sredstva za ekstrakciju, ovi autori dobijaju visok koeficijent determinacije ($r^2 = 0,88$) između ELISA i HPLC metode. Oni, takođe, zapažaju problem pri određivanju visokih koncentracija fumonizina ELISA metodom, tj. kada je potrebno mnogostuko rablažiti pripremljen uzorak. Tada je određivanje nedovoljno pouzdano, te ovi autori preporučuju da, ukoliko je neophodno da se uzorak razblaži više od 500 puta, uzorak bude samo kvalitativno okarakterisan kao “visoko kontaminiran”. Autori

ovaj fenomen dovode u vezu sa kinetikom ELISA metode i daju preporuku da se ELISA metodom rade uzorci u dve probe, tj. dva različita razblaženja.

Tabela 2.21 Komercijalni ELISA testovi za određivanje fumonizina

Proizvođač	Naziv kompleta za test	Vrsta uzorka	Granica detekcije (mg/kg)
R-Biopharm, Inc. <i>www.r-biopharm.com</i>	RIDASCREEN® FAST Fumonisin	Žitarice i hrana za životinje	0,025
Romer Labs, Inc. <i>www.romerlabs.com</i>	AgraQuant® Fumonisin	Žitarice i hrana za životinje	0,2
Tecna S.r.l <i>www.tecnalab.com</i>	I'Screen FUMO	Žitarice	0,025
	Celer FUMO	Žitarice	0,75
Neogen <i>www.neogen.com</i>	Veratox for Fumonisin	Ječam, kukuruz, kokice, soja, pšenica, pirinač	0,2
	Veratox for Fumonisin HS	Ječam, kukuruz, kokice, soja, pšenica, pirinač	0,050
Beacon Analytical Systems Inc <i>www.beaconkits.com</i>	Fumonisin Plate Kit	Kukuruz i proizvodi od kukuruza	
EuroProxima <i>www.europroxima.com</i>	5121 FUM	Kukuruz	0,0023
Immunolab GmbH <i>www.immunolab.de</i>	FUM E01	Kukuruz i žitarice	0,0225
Microplanet Laboratorios <i>www.microplanet-psl.com</i>	Transia® Plate Fumonisisins	Pšenica, ječam, kukuruz, ovas, badem	0,3
Diagnostic Automation, Inc. <i>www.rapidtest.com</i>	AccuDiag™ Fumonisin	Kukuruz i žitarice	0,025
Bioo Scientific <i>www.biooscientific.com</i>	MaxSignal® Fumonisin Test Kit	Žitarice, sušeno meso, riba, hrana za životinje, mleko i zrnavlje	0,010–0,025

2.7 EKSPERTNI SISTEMI U ANALITIČKOJ HEMIJI

Ekspertni sistemi (ES) su oblast primene veštačke inteligencije koja je počela da se razvija sredinom 60-tih godina XX veka (Liao, 2005). Osnovna ideja na kojoj se zasnivaju ES je da se sposobnost ekspertize, koja je rezultat specifičnog znanja eksperata, prenese sa

čoveka na računar. Ovo znanje se zatim pohranjuje u računar i korisnici ga mogu pozvati sa računara za specifične savete kada god je to potrebno. Ekspertni sistemi su moćan i fleksibilan alat za rešavanje različitih problema koji ne mogu biti rešeni klasičnim metodama. Ekspertni sistemi dostižu vrhunac razvoja i korišćenja razvojem interneta, od 1994. godine, jer se razvojem informacionih i komunikacionih tehnologija povećava dostupnost i olakšava prikupljanje podataka.

ES se primenjuju kod rešavanja problema koji se često ponavljaju (nepotrebno i skupo angažovanje stručnjaka-eksperata), kao i u slučajevima gde su moguće nepoželjne greške zbog zamora eksperimentatora. Pored toga, znanje sadržano u ES se lako prenosi i dokumentuje, konzistentno je, a kada se raspodeli na veći broj korisnika postaje i relativno jeftino (Abramović, 1996). Razlika ES i klasičnih opštih programa je u tome što ES imaju sposobnost rezonovanja i u tom smislu se u velikoj meri približavaju ljudskom načinu rada. Naime, ES se zasnivaju na upotrebi znanja, heuristici, procesima zaključivanja. Proces i aktivni i moguće je dobiti objašnjenje kako su došli do određenog rezultata i zbog čega. Međutim, kreativnost, prilagodljivost, široke mogućnosti primanja informacija i znanja i sagledavanja problema su samo neki od elemenata u kojima su eksperti daleko ispred ekspertnih sistema.

Prema Liao-u (2005), metodologije i primene ES su različite, a različitost je rezultat toga što se autori iz raznih oblasti bave ES i primenjuju ih u rešavanju problema u svojoj oblasti. Neke metodologije imaju slične koncepte, a neke aplikacije se preklapaju u raznim metodologijama. Tako, ES bazirani na *pravilima* sadrže informacije dobijene od eksperata i predstavljaju te informacije u formi AKO–ONDA. Ovi ES su našli primenu u različitim oblastima ljudskog delovanja, kao što su: medicina, industrija, ekonomija, biohemija (Schmieder *et al.*, 2014), obrazovanje, poljoprivreda i dr. Osnova ES baziranih na *saznanju* je veštačka inteligencija i oni predstavljaju pokušaj da se razume i podstakne znanje ljudi u kompjuterskim sistemima. Primenjuju se npr. u lečenju, finansijskim analizama i planiranju, poljoprivredi (Sikder, 2009), meteorologiji, prečišćavanju otpadnih voda, hemijskom modelovanju troposfere i dr. *Veštačke neuronske mreže* su model koji imitira biološke neuronske mreže. Koriste se u dijagnostičkim sistemima, kontroli procesa, robotici, biomedicini i dr. *Rasplinuti* (fuzzy) ES uzimaju u obzir širu logiku i nesigurnost, tako da osim odlučivanja DA – NE, obuhvataju i MOŽDA. Razvijene aplikacije su u oblasti tretmana otpadnih voda, pogrešnih dijagnoza hemijskih procesa, ekološkog planiranja, medicinskih dijagnoza, kontrolnih sistema i dr. (Chen *et al.*, 2014). *Rasuđivanje na osnovu slučaja* podrazumeva prilagođavanje ranijih rešenja u cilju rešavanja novih problema, a primenjuje se

u medicini, dizajniranju procesa, obrazovanju preko interneta, modelovanju znanja i dr. Tehnologija *modelovanja* omogućava kvantitativne metode za analizu ekspertskog znanja, a primenjuje se u procesnoj kontroli, medicinskoj analizi, dizajnu transportnih terminala i dr. *Objektivno orijentisana metodologija* kombinuje podatke i obradu tih podataka, pri čemu se kombinuju podaci i programski kod, a primenjuje se u industriji, obrazovanju, informacionim mrežama, inženjeringu, programiranju i dr. U ovoj disertaciji se planira razvoj ES zasnovanog na ovom principu.

ES su glavna oblast primene veštačke inteligencije u hemiji (Ramos *et al.*, 1986). Razvoj ES u oblasti hemije počeo je devedesetih godina prošlog veka (Luinge 1990; van Leeuwen *et al.*, 1990; Buydens *et al.*, 1990; Andreev *et al.*, 1993). Efikasno se mogu primeniti za planiranje eksperimenta, razvoj analitičkih metoda, predviđanje strukture jedinjenja (Karci i Demir, 2009), sintezu jedinjenja i hemijski inženjering (Kadambar i Kotecha, 2015). Cilj ES u analitičkoj hemiji je pomoć u izboru opreme, optimizaciji metoda, analizi reproduktivnosti i robusnosti, testiranju itd. (Nguyen *et al.*, 2014). Prvi razvijeni ES u analitičkoj hemiji su korišćeni za tumačenje strukture jedinjenja na osnovu strukture spektara: DENDRAL (Gray *et al.*, 1981), Meta-DENDRAL (Dessy, 1984a), SEAC (Debska *et al.*, 1981), PROLOG (Luinge, 1990), EXPIRS (Andreev *et al.*, 1993) i dr. Za podešavanje i optimizaciju većeg broja parametara razvijeni su TQMSTUNE (Dessy, 1984b) i ESCA (Buydens *et al.*, 1990).

Veštačka inteligencija i posebno ES, imaju sve veću ulogu u obezbeđivanju „ugrađene“ inteligencije u najnoviju analitičku instrumentaciju na kojoj se zasnivaju glavne metode u analizi hrane (Kohoutek, 2014). Na taj način instrumenti mogu da izaberu najpogodniju proceduru, radni program, da optimizuju radne uslove, a takođe da detektuju i poprave neke nedostatke. Omogućava se kompjuterizacija analitičkog ekspertnog znanja, tako da ES predstavljaju „otelotvorenje ekspertnih veština u okviru računara koji može da donese inteligentnu odluku“. ES pružaju ekspertni nivo izvođenja u slučajevima kada ljudsko ekspertno znanje nije dostupno ili je skupo. Sa druge strane, ES oslobađaju hemičare dosadnog, svakodnevnog posla, omogućavajući im više vremena za instinktivne, intuitivne i maštovite aspekte uvođenja i usavršavanja novih analitičkih metoda. Razvoj ES nije lak posao i zahteva angažovanje specijalista iz dve oblasti: u ovom slučaju iz analitičke hemije i računarskih nauka. Ovi stručnjaci blisko saraduju i istovremeno prikupljaju podatke i primenjuju ih. Tokom rada i validacije, greške se ispravljaju i sistem prilagođava. U mnogim slučajevima promene u ES mogu praviti samo autori, ali je moguće napraviti i dinamičku bazu umesto statičke koja je lakše promenljiva. ES u analizi hrane se primenjuju u

određivanju hemijskih i fizičko-hemijskih parametara u izolovanim pojedinačnim uzorcima hrane, ili u praćenju ključnih analita u procesu proizvodnje (Zhang *et al.*, 2011). U prvoj fazi, ES se razvija u istraživačkoj laboratoriji, a zatim se nakon testiranja i validacije primenjuje u industrijskim laboratorijama.

U laboratorijama za hemijsku analizu hrane je zamena stručnjaka sa savremenim računarski-podržanim sistemima, možda, nešto sporija nego u drugim oblastima analitičke hemije (Peris, 2002), iako ES imaju značajne prednosti, i to:

1. ES mogu da rade 24 časa tokom cele godine bez pauze, a hemičari ne mogu.
2. ES mogu da rade u otežanim radnim uslovima, a hemičari ne.
3. Kopije ES mogu lako biti načinjene za onoliko lokacija za koliko je potrebno, dok je obuka novih analitičara skupa i zahteva mnogo vremena.
4. ES ne zaboravljaju čak i veoma veliki broj parametara koji se često moraju uzeti u obzir tokom analize, a hemičari mogu.
5. ES daju slična rešenja za slične situacije, odnosno slične slučajeve koji su obrađivani na isti način, dok su ljudi više pod uticajem efekata prvenstva (ranije prikupljene informacije dominiraju u donošenju odluka), a savremene informacije imaju mnogo manji uticaj na donošenje odluka.
6. Zabune i greške mogu biti sprečene.
7. Informacije neophodne za donošenje odluka u sistemima koji rade u realnom vremenu se mogu, čak i iz različitih i ponekad veoma udaljenih lokacija, brže obezbediti nego što može čovek.
8. Znanje više stručnjaka, pa čak i iz različitih oblasti nauke, može biti kombinovano u ES što mu daje veću širinu i mogućnosti nego što jedna osoba može da ima.

Međutim, ES se još uvek ne mogu porediti sa hemičarima u analizi hrane i to sa više aspekata:

1. Senzorske sposobnosti: Stručnjaci imaju na raspolaganju širok opseg senzorskih iskustava, dok su savremeni ES još uvek često zavisni samo od simboličkog ulaza.
2. Degradacija: ES veoma često nisu uspešni u slučajevima kada treba da reše problem za koji oni nemaju adekvatni odgovor ili kada je problem izvan njihove oblasti ekspertize.
3. Učenje: Stručnjaci se automatski adaptiraju na promene okoline dok ES nasuprot njima moraju biti ažurirani (inovirani). Međutim, kada se ES povežu sa bazama podataka, sa rezonovanjem zasnovanom na studijama slučaja ili sa neuronskim mrežama, tada se i kod ES može obezbediti i sposobnost učenja.

4. Kreativnost: Analitičari mogu kreativno da reaguju na neobične situacije, dok ES to ne mogu.

Pregledom ES razvijenih u analitičkoj hemiji stiče se uvid u mogućnosti njihove široke primene. Tako je razvijen ekspertni sistem za izbor optimalnog katalitičkog titrimetrijskog postupka (Abramović, 1996). ES su korišćeni u pripremi uzorka za određivanje gvožđa u puteru (Peris, 2002), zatim u automatizaciji procesa praćenja amonijaka u ribnjacima (Chow *et al.*, 1997), kao i kod gravimetrijskog određivanja masti u hrani (Matheson i Otten, 1999). Takođe je multivarijantna analiza hemijskih parametara korišćena za određivanje porekla maslinovog ulja (Sacchi *et al.*, 1998). Automatizacija mikrotalasne digestije u analizi hrane je takođe razvijena pomoću ES čija baza podataka obuhvata 800 procedura validovanih u nekoliko laboratorija (Feinberg *et al.*, 1994). Razvijen je i ES za određivanje optimalnih uslova superkritične tečne ekstrakcije slobodnih masnih kiselina (Fischer i Jefferies, 1995). Kao veoma koristan alat se pokazao ES u oblasti određivanja različitih analita u hrani HPLC metodom (Gros i Gorenc, 1995). Najčešće se primenjuje u situacijama izbora metode, optimizacije i validacije (Molnar, 2002).

U oblasti analitike mikotoksina razvijen je ES koji podatke dobijene metodom infracrvene fotoakustične spektroskopije sa Furijeovim transformom (FTIR-PAS) obrađuje metodologijom veštačke neuronske mreže u cilju odvajanja kukuruza kontaminiranog plesnima producentima aflatoksina (*A. flavus*) od nekontaminiranog kukuruza (Gordon *et al.*, 1998). Takođe su ES korišćeni u razvoju modela predviđanja pojave plesni i mikotoksina na osnovu meteoroloških i agrotehničkih, kao i geografskih varijabli, kao što je opisano u poglavlju 2.2.1.

Osim centralizovanih, razvijeni su i decentralizovani ES, a njihove prednosti su daljinsko upravljanje, rad u realnom vremenu, kao i lako programiranje od strane hemičara. Našli su primenu u praćenju proizvodnog procesa (Linko, 1998), a njihov razvoj je naročito podstaknut razvojem računarskih mreža (Peris, 2002).

Može se zaključiti da ES već imaju važnu ulogu u modernoj hemiji, a u budućnosti se predviđa njihov revolucionarni doprinos analitičkoj hemiji i analizi hrane. Velika prednost ES je njihova isplativost, koja je naročito došla do izražaja sa povećanjem troškova opreme i sirovina, kao i troškova bezbednog rukovanja hemikalijama. Zato ES postaju sastavni deo analitičke hemije u kontroli kvaliteta. Očekuje se da će u narednom periodu ES moći da daju informaciju o sastavu apsolutno nepoznatog uzorka, pri čemu neće potpuno istisnuti hemičare, već će biti njihov koristan asistent (Peris, 2002).

3 EKSPERIMENTALNI DEO

3.1 UZORCI, HEMIKALIJE I RASTVORI

Za ispitivanje efikasnosti ekstrakcionih metoda za određivanje fumonizina korišćeni su referentni materijali (RM) Trilogy TR-F100 (Trilogy Analytical Laboratory, Vašington, SAD), na bazi kukuruza kontaminirani sa FB₁, FB₂ i FB₃ (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Korišćeni RM za ispitivanja efikasnosti ekstrakcije fumonizina

RM	Sadržaj (mg/kg)			Ukupni FB (mg/kg)	SD (mg/kg)	RSD (%)	Opseg (mg/kg)
	FB ₁	FB ₂	FB ₃				
1. Lot #F-C-439	0,6	0,1	< 0,1	0,7	0,1	14,9	0,5–0,9
2. Lot #F-C-441	3,1	0,7	0,2	4,0	0,5	13,4	2,8–5,2

Za ispitivanje efikasnosti ekstrakcije su pored RM korišćeni i jedan prirodno kontaminiran uzorak označen brojem 1 i tri uzorka označeni brojevima 2–4 inokulisani plesnima da produkuju visoke koncentracije fumonizina. Ove visoke koncentracije su važne za evaluaciju metoda za ispitivanje hrane za životinje (EC, 2006c). Osim toga, metode ekstrakcije sa neorganskim rastvaračima su testirane na još 5 prirodno kontaminiranih kukuruza, tri prirodno kontaminirana kukuruzna brašna, dva uzorka palente i dva uzorka korn-fleksa.

Uzorci kukuruza koji su analizirani u cilju određivanja fumonizina i drugih mikotoksina su prikupljeni u vremenskom periodu između 2005. i 2014. godine, neposredno nakon žetve, ali i nakon skladištenja, najčešće sa različitih lokaliteta Vojvodine, ali i ostalih delova Republike Srbije.

Uzorci kukuruza roda 2005. godine su prikupljeni tokom jeseni 2005. godine, sa različitih lokaliteta u Vojvodini. Svi uzorci roda 2005. godine su uzorkovani neposredno nakon skladištenja, iz čardaka. Iz istih čardaka uzorci su ponovo uzeti u martu 2006. godine, u cilju ispitivanja uticaja tradicionalnog načina skladištenja.

Uzorci kukuruza roda 2009. godine su prikupljeni tokom jeseni 2009. sa različitih lokaliteta u Bačkoj. Uzorkovanje je vršeno direktno sa polja, nakon žetve i neposredno nakon skladištenja u silose. Odmah nakon uzorkovanja, urađena je analiza ukupnog broja i

determinacija preovlađujućih rodova plesni. Nakon analize sadržaja vlage, uzorci su čuvani u zamrzivaču na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize na mikotoksine. Pre mikotoksikološke analize, uzorci su temperirani na sobnoj temperaturi. Analize ukupnog broja plesni i sadržaja vlage su urađene po standardnim metodama (Sl. list SFRJ, 25/80; Sl. list SFRJ, 15/87).

Uzorci kukuruza roda 2010. su prikupljeni tokom 2011. sa teritorije Bačke. Uzorkovanje je vršeno iz silosa. Uzorci roda 2011, 2012. i 2013. godine potiču sa teritorije Srbije. To su uzorci koji su stizali u laboratoriju na redovnu kontrolu, ali i uzorci koji su bili pod sumnjom zbog kliničkih problema na terenu.

U cilju ispitivanja prisustva fumonizina u pšenici roda 2010, korišćeno je dvadeset pet sorti ozime pšenice koje predstavljaju većinu sorti uzgajanih u Srbiji od 1955. do 2006. Banatka je domaće proizvodnje, Bankuti 1205 je stara mađarska sorta, San Pastore i Libellula su italijanske sorte, Bezostaja je svetski poznata stara ruska sorta, Zlatna Dolina je hrvatska i Skopljanka je iz Makedonije. Srpske sorte koje su korišćene u istraživanju su razvijene u dva razvojna centra: u Istraživačkom centru za strna žita, Kragujevac (Kragujevačka – 56) i u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu (Sava, Partizanka, Novosadska rana 2, Balkan, Jugoslavija, Lasta, Evropa 90, Pobeda, Novosadska rana 5, Renesansa, Pesma, Ljiljana, Cipovka, Dragana, Simonida, NS 40S i Zvezdana). Proučavane su ozime sorte pšenice koje imaju različito genetsko poreklo i reprezentuju sorte gajene do sada u Srbiji. Uzorci pšenice navedenih 25 zimskih sorti gajenih tokom 2009/2010. uzimani su na sledećim lokacijama: Novi Sad, Sremska Mitrovica i Pančevo. Različite lokacije predstavljaju širok spektar uslova životne sredine i predstavljaju ekološku raznolikost Vojvodine. Odabrane lokacije karakterišu suvo, toplo proleće i leto, neutralna jesen i umereno hladna zima. Na svakoj od lokacija parcele su rotirane sa sojom (*Glycine max* L.). Svim sortama odgovaraju agronomski uslovi za gajenje na navedenim lokacijama. Sorte pšenice su posejane po slučajnom blok-sistemu sa tri ponavljanja na svakoj lokaciji. Svaka parcela se sastojala od 10 redova dužine 5 m, sa razmakom 10 cm (površina je bila 5 m^2). Gustina setve je bila 500 semena/m^2 . Setva je obavljena sredinom oktobra (optimalan termin za setvu) i pšenica je dostigla zrelost krajem juna ili početkom jula. Suzbijanje korova je rađeno ručno. Svi uzorci pšenice su bili asimptomatski (bez vidnih oštećenja klasa). Uzorci su pakovani u plastične kese i skladišteni na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do proleća 2011. godine kada je urađena analiza fumonizina u njima.

Uzorci pšenice roda 2012. godine su prikupljeni neposredno nakon žetve, sa različitih lokaliteta u Vojvodini metodom slučajnog izbora.

Uzorci žitarica za ishranu ljudi su uglavnom nabavljeni iz supermarketa (tokom 2010. godine), sa pijace u Novom Sadu i iz prodavnice na Zlatiboru (decembar 2012).

Uzorci kukuruza (13) u kojima je veštački inokulisana plesan *F. verticillioides* su korišćeni za ispitivanje mogućnosti određivanja sadržaja fumonizina IR spektroskopijom sa Furijeovim transformom.

Uzorci lekovitog bilja su prikupljeni sa tri lokaliteta u Srbiji tokom 2011, 2012. i 2013. godine. Uzorci iz Zapadne Srbije su poreklom sa Zlatibora, a nabavljeni su na pijaci na Zlatiboru direktno od sakupljača lekovitog bilja sa ovog područja. Uzorci iz Istočne Srbije su bili poreklom sa područja Stare i Suve planine, a nabavljeni su od proizvođača iz Gadžinog Hana. Uzorci lekovitog bilja iz organske proizvodnje sa Severa Srbije (Orom) su nabavljeni iz supermarketa u Novom Sadu.

Odmah nakon uzorkovanja, u lekovitom bilju roda 2011. godine urađena je analiza ukupnog broja i determinacija preovlađujućih rodova plesni. Mikrobiološka analiza kontaminacije plesnima lekovitog bilja je urađena na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku prema postupku Vrandečić *et al.* (2011). Biljni delovi lista i cveta isečeni su na komadiće veličine 3–5 mm, a delovi stabljike, na dužinu 0,5–1 cm. Tako pripremljeni uzorci su zasejani na krompirov dekstrozni agar (KDA). U svaku petri ploču stavljena su do 4 biljna dela te su ostavljeni u termostatu na 22 °C i svetlosnom režimu 12 sati dan/12 sati noć. Očitavanje ploča je obavljano na svaka 3 dana, a na većini uzoraka micelijum se razvio do 12. dana. Razvijeni micelijum presejan je na novu KDA podlogu te je nakon početnog porasta, površinski deo micelijuma ponovno presejan na KDA. Mikroskopski pregled obavljen je pomoću Olympus BX-41 i Olympus SZX9 mikroskopa. Morfološka identifikacija plesni do roda obavljena je pomoću standardnih ključeva. Izračunata je učestalost izolacije u % prema sledećoj formuli:

$$\text{Učestalost izolacije} = \frac{\text{broj delova koloniziranih sa plesnima}}{\text{ukupan broj analiziranih biljnih delova}} \times 100$$

Metanol (MeOH) i acetonitril (ACN), korišćeni kao komponente mobilne faze, su bili čistoće za tečnu hromatografiju (HPLC gradijent grade, Merck, Darmstadt, Germany). Isti rastvarači su korišćeni za ekstrakciju. Sve hemikalije su po kvalitetu bile čistoće pro analysi i korišćene su bez naknadnog prečišćavanja. Za pripremanje rastvora je korišćena dejonizovana voda, osim gde je drugačije rečeno.

Standardni rastvori fumonizina. Fumonizin Mix rastvor OEKANAL[®], analitički standard koncentracije 50 µg/ml FB₁ i FB₂ u smeši ACN–H₂O (50:50, v/v), Sigma-Aldrich Article/Product 34143 i FB₃ rastvor OEKANAL[®], analitički standard koncentracije 50 µg/ml u smeši ACN–H₂O (50:50, v/v), Sigma-Aldrich Article/Product 32606 su korišćeni za pripremu rastvora za kalibraciju u masenim koncentracijama: 0,10; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0 i 5,0 µg/ml u ACN–H₂O (50:50, v/v) za svaki toksin. Osnovni rastvori fumonizina B₁ (Sigma, from *F. moniliforme*, approx. 98% TLC) i B₂ (Sigma, from *F. moniliforme*) su pripremljeni u smeši ACN–H₂O (50:50, v/v) u koncentraciji 100 µg/ml za FB₁ i FB₂, odmeravanjem odgovarajuće mase na mikrovagi. Ovi rastvori su stabilni 6 meseci na 4 °C (Visconti *et al.*, 2001). Razblaženiji standardni rastvor FB₁ koncentracije 10 µg/ml i FB₂ koncentracije 5 µg/ml (radni rastvor) je pripremljen odmeravanjem 500 µl osnovnog rastvora FB₁, odnosno 250 µl osnovnog rastvora FB₂ u odmerni sud od 5 ml, koji je, zatim, dopunjen do oznake smešom ACN–H₂O (50:50, v/v). Ovi standardni rastvori su korišćeni za obogaćivanje uzoraka kukuruza, pšenice i lekovitog bilja.

Fosfatni pufar (FP). Odmereno je 8,0 g NaCl (Vetprom-hemikalije, Beograd, Srbija), 1,2 g anhidrovanog Na₂HPO₄ (Merck), 0,2 g KH₂PO₄ (Reanal, Budapest, Mađarska) i 0,2 g KCl (Reanal, Budapest, Mađarska) i rastvoreno u 1 l dejonizovane vode.

***o*-ftaldialdehid–2-merkptoetanol reagens (OPA–MCE).** 40 mg *o*-ftaldialdehida (Sigma, min. 99%) je rastvoreno u 1 ml MeOH, razblaženo sa 5 ml 0,1 mol/l Na₂B₄O₇ i zatim je dodato 50 µl 2-merkptoetanol (Serva, Hajdelberg, Nemačka). Reagens je čuvan u dobro zatvorenom vijalu zaštićen od svetla, a stabilan je 8 dana.

12,5% rastvor amonijaka (Vetprom-hemikalije) korišćen je za podešavanje pH ekstrakta na 8–9, pre prečišćavanja sa MycoSep[®] 231 Fum kolonama.

Mobilna faza. MeOH–0,1 mol/l NaH₂PO₄ (Merck, extra pure) (78:22, v/v) i (70:30, v/v), čiji je pH podešen na 3,35 sa *o*-fosfornom kiselinom (Centrohema, Stara Pazova). Mobilne faze su filtrirane kroz 0,22 µm filter (membranski filter, najlon, LLG, Meckenheim, Francuska) i degazirane u ultrazvučnom kupatilu.

3.2 APARATURA

Za mlevenje uzoraka je korišćen laboratorijski mlin DFY-100A (OIM V.I.A. D.O.O Murska Sobota, Slovenija). Za odmeravanje uzoraka korišćena je analitička vaga Shimadzu

AW320 (Tokio, Japan), a standardi su odmeravani na mikrovagi Sartorius CPA 26P-OCE (Getingen, Nemačka).

Mikotoksini su ekstrahovani iz uzoraka u kivetama za centrifugiranje zapremine 50 ml, a dobijeni sirovi ekstrakti su zatim centrifugirani (Tehtnica LC620, Železniki, Škofija Loka, Slovenija). Sirovi ekstrakt kukuruza je prečišćavan na:

1. Imunoafinitetnim kolonama (FumoniTest™WB, VICAM, Watertown, MA, SAD);
2. Kolonama za ekstrakciju na čvrstoj fazi MycoSep® 231 Fum „puch-through” format, (RomerLabs®, Inc., Vašington, SAD).

Razblažen sirovi ekstrakt uzorka je filtriran kroz 1 µm filter-papir (VICAM, Watertown, MA, SAD) pre prečišćavanja na imunoafinitetnim kolonama. Prečišćavanje ovako filtriranog ekstrakta na IMA kolonama je izvođeno pomoću SPE manifold-a sa vakuum pumpom ručne izrade (Slika 3.1).

Fumonizini su sa kolona eluirani u kruškaste balone za uparavanje od 10 ml, a eluat je zatim uparavan na rotacionom vakuum-uparivaču (Devarot, Elektromedicina, Ljubljana, Slovenija).

Rekonstituisani ekstrakti su nakon derivatizacije fitrirani kroz PTFE filtere (ESF-PT-04-022; 0,22 µm; 4 mm; Kinesis Ltd. Cambridgeshire, Velika Britanija) u vijale sa insertom od 200 µl (Supelco, Bellefonte, SAD). Za precizna odmeravanja je korišćena pipeta zapremine 10–100 µl, Hamilton 710N (Bonaduz, Švajcarska).

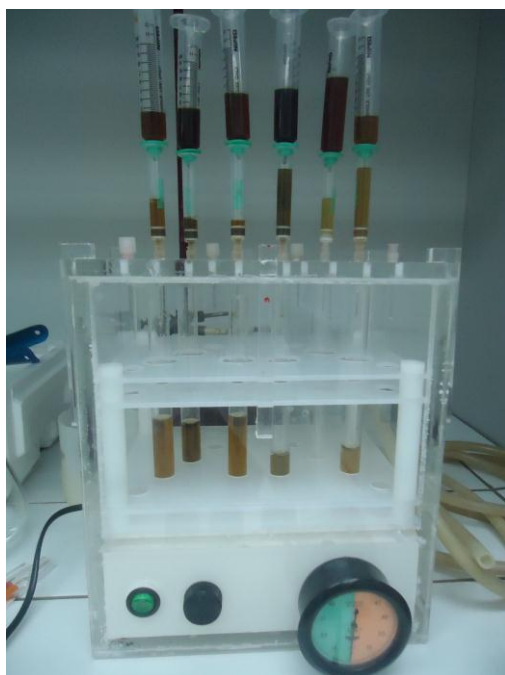
pH mobilne faze je podešavan pomoću pH-metra (Consort C830, Turnhout, Belgija) i mobilna faza je zatim degazirana u ultrazvučnom kupatilu (Sonis 3, Iskra, Šentjernej, Slovenija).

Oprema za tečnu hromatografiju se sastojala od HPLC–FLD sistema Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 Series, sa fluorescentnim detektorom FLD 3100, autosemplerom WPS-3000, degazerom, kvaternom pumpom i Hypersil GOLD kolonom 150 x 3 mm, veličine čestica 3 µm (Thermo Scientific, Germering, Nemačka; Slika 3.2). Sistem kontrolisan pomoću softvera Chromeleon 7 istog proizvođača.

Za određivanje fumonizina ELISA metodom, korišćeni su ELISA kitovi *ELISA AgraQuant® Total Fumonisin Assay 0.25/5.0 RomerLabs®* (Romer, RomerLabs®, Inc., Vašington, SAD) i *ELISA Ridascreen® Fumonisin R3401* (R-Biopharm, Darmstadt, Nemačka). Sadržaj ukupnih aflatoksina, OTA, zearalenona, DON-a i T2 toksina je određen ELISA metodom, pomoću Ridascreen® test kitova (Afla Fast, Art.No. R:5202; Ochratoxin A 30/15 R:1311 i R 5402; Zearalenon R:1401 i R5502; DON Art. No. R:5906 i 5905; T2 toksin

R:5302 (R-Biopharm, Nemačka), sa granicama detekcije 1,75 µg/kg za ukupne aflatoksine, 1 ili 5 µg/kg za ohratoxin A, 1,75 µg/kg ili 25 µg/kg za zearalenon i 18,5 µg/kg ili 74 µg/kg za DON i 50 µg/kg za T2 toksin, kao što će biti napomenuto.

Sadržaj aflatoksina u uzorcima žitarica za ishranu ljudi je određen ELISA kitom Aflatoxin-B1 EIA (code 5121AFB1p, EuroProxima, Arnhem, Holandija) sa granicom detekcije 0,3 µg/kg.

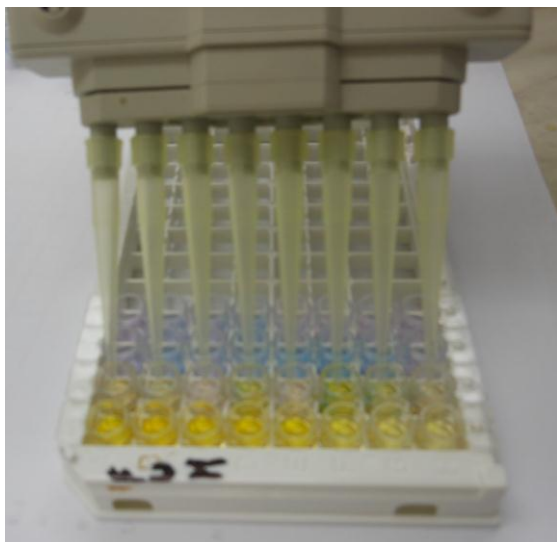


Slika 3.1 Prečišćavanje sirovog ekstrakta.



Slika 3.2 Tečni hromatograf.

Za izvođenje ELISA metode korišćene su varijabilne automatske pipete Eppendorf Research zapremina 10–100 µl i 100–1000 µl (Hamburg, Nemačka), kao i multikanalna varijabilna pipeta Calibra[®], zapremine 20–200 µl, (Socorex Isba S.A., Švajcarska; Slika 3.3). Za fotometrijska merenja ELISA ploča korišćen je Thermo Scientific Multiskan FC ELISA čitač (Šangaj, Kina; Slika 3.4). Specijalni softver Rida[®]Soft Win (Z9999, R-Biopharm, Germany) je korišćen za obradu podataka i izračunavanje koncentracije toksina.



Slika 3.3 Izvođenje ELISA testa.



Slika 3.4 ELISA čitač.

Prilikom određivanja FTIR spektroskopijom, spektri su snimani na Thermo Nicolet Nexus 670 spektrometru (GMI, Ramsey, Minnesota, USA) sa deuterisanim triglicinsulfatom (DTGS) kao detektorom.

3.3 ANALITIČKI POSTUPCI

3.3.1 Priprema uzoraka

Odmah po uzorkovanju, 1000 g svakog uzorka je pripremljeno mlevenjem u laboratorijskom mlinu, tako da > 93% prolazi kroz sito veličine pora 0,8 mm, a zatim je uzorak homogenizovan mešanjem. Tako pripremljeni uzorci su analizirani odmah ili su pakovani u plastične kese i skladišteni u zamrzivaču na -20 °C do analize. Pre svake analize, uzorci su temperirani do sobne temperature.

Priprema obogaćenih uzoraka

Priprema obogaćenih uzoraka kukuruza: 1000 g uzorka kukuruza (sadržaj FB₁ < 0,4 µg/kg; FB₂ i FB₃ < 0,7 µg/kg) je samleveno u laboratorijskom mlinu tako da > 93% uzorka prolazi kroz sito veličine pora 0,8 mm. Nakon toga, uzorak je dobro homogenizovan i 5 g uzorka je odmereno i obogaćeno sa odgovarajućom, poznatom zapreminom standardnih

rastvora FB₁, FB₂ i FB₃. Nakon stajanja na sobnoj temperaturi tokom 60 minuta (Abramović *et al.*, 2005), izvršena je analiza.

Priprema obogaćenog uzorka korn-fleksa je bila ista kao u slučaju analize obogaćenih uzoraka kukuruza, s tim da je 100 g korn-fleksa koji je obogaćivan sadržao FB < 25 µg/kg.

Priprema obogaćenog uzorka ječmenih pahuljica je bila ista kao u slučaju analize obogaćenih uzoraka kukuruza, s tim da je 100 g pahuljica koje su obogaćivane sadržavalo aflatoksin < 0,3 µg/kg.

Priprema obogaćenog uzorka lekovitog bilja: 20 g uzorka lekovitog bilja (sadržaj FB₁, FB₂ i FB₃ ispod granice detekcije HPLC–FLD, Tabela 4.27) je samleveno u mlinu za kafu. Nakon toga, uzorak je dobro homogenizovan i 5 g uzorka je odmereno i obogaćeno sa odgovarajućom, poznatom zapreminom standardnih rastvora FB₁, FB₂ i FB₃. Nakon stajanja na sobnoj temperaturi tokom 60 minuta, izvršena je analiza.

3.3.2 Tečna hromatografija sa fluorescentnom detekcijom (HPLC–FLD)

Princip

Fumonizini su ekstrahovani iz uzoraka kukuruza odgovarajućim rastvaračem. Nakon centrifugiranja (i razblaživanja), sirovi ekstrakt je prečišćen na jednoj od kolona. Finalni ekstrakt uzorka je derivatizovan sa *o*-ftaldialdehidom i 2-merkaptetanolom i analiziran tečnom hromatografijom sa fluorescentnim detektorom.

Ekstrakcija

Za prečišćavanje sa FumoniTestTMWB kolonama, odmereno je 5,0 g uzorka, a zatim ekstrahovano sa 25 ml jednog od naredna četiri ekstrakciona rastvarača:

1. destilovane vode;
2. fosfatnog pufera (pH 7,4);
3. ACN–MeOH–H₂O (25:25:50, v/v/v; Visconti *et al.*, 2001);
4. MeOH–H₂O (70:30, v/v; Kulisek i Hazebroek, 2000).

Za prečišćavanje sa MycoSep[®] 231 Fum kolonama, odmereno je 5,0 g uzorka, a zatim ekstrahovano sa 25 ml MeOH–H₂O (75:25, v/v; Sydenham *et al.*, 1996b).

Fumonizin je ekstrahovan mućkanjem u kiveti za centrifugiranje tokom 10 minuta. Ekstrakt je zatim centrifugiran na 3000 g tokom 10 min.

Prečišćavanje sirovog ekstrakta

Prečišćavanje na FumoniTest™WB kolonama. 5 ml sirovog ekstrakta je razblaženo sa 20 ml FP. Razblažen ekstrakt je, zatim, profiltriran kroz 1,0- μ m mikrofiber filter-papir. 10 ml filtrata je nanošeno na FumoniTest™WB kolonu. Nakon ispiranja kolone sa 10 ml FP, fumonizini su eluirani sa 3 ml MeOH. Eluat je uparen do suva na 60 °C. Uparen ostatak je reekstrahovan sa 200 μ l smeše ACN–H₂O (50:50, v/v). Na isti način su prečišćavani ekstrakti dobijeni sa sva četiri ekstrakciona sredstva. Pored toga, ekstrakt dobijen sa FP je dodatno analiziran tako što je sirovi ekstrakt filtriran kroz 1,0- μ m mikrofiber filter-papir, a 5 ml filtrata je direktno nanošeno na FumoniTest™WB kolonu, tj. sirovi ekstrakt nije dalje razblaživan sa FP.

Za jako kontaminirane uzorke, manja zapremina ekstrakta je prečišćavana na FumoniTest™WB koloni (2 ml uzorka 3, tj. 1 ml uzorka 4) i rekonstituisani uzorak je dodatno razblažen pet puta sa ACN–H₂O (50:50, v/v) kako bi se uklopio u kalibracioni opseg.

Prečišćavanje sa MycoSep® 231 Fum kolonama. Nakon ekstrakcije, pH ekstrakta je podešen na 8–9, pomoću 12,5% rastvora amonijaka. Oko 5 ml ovako pripremljenog ekstrakta je preneto u posebnu epruvetu. Zatim je MycoSep® 231 Fum kolona uronjena u epruvetu sa ekstraktom pri čemu se gumeni krajevi diska pribijaju uz zid epruvete povlačeći ekstrakt kroz punjenje kolone, tako da se u gornjem delu plastične cevčice iznad gornjeg filter-diska pojavljuje prečišćen ekstrakt. 3 ml prečišćenog ekstrakta je preneto u sud za uparavanje i upareno do suva na vakuum-uparivaču. Uparen ostatak je reekstrahovan sa 200 μ l smeše ACN–H₂O (50:50, v/v). Kolona je prema deklaraciji proizvođača za jednokratnu upotrebu.

Derivatizacija i tečna hromatografija

Alikvot od 100 μ l rekonstruisanog ekstrakta je pomešan sa 100 μ l OPA–MCE reagensa, na sobnoj temperaturi, uz mešanje tokom 1 minuta. Derivatizovan rastvor je profiltriran kroz PTFE špic-filter, direktno u vijalu sa insertom. 10 μ l derivatizovanog rastvora je injektovano u HPLC–FLD sistem. Mobilna faza je bila MeOH–0,1 mol/l NaH₂PO₄ (77:23, v/v nakon prečišćavanja na FumoniTest™WB kolonama, odnosno 70:30, v/v nakon prečišćavanja MycoSep® 231 Fum kolonama), podešena na pH 3,35 sa H₃PO₄, protok 0,8 ml/min, talasne dužine ekscitacije 335 nm i emisije 440 nm. Temperatura analitičke kolone je bila 30 °C, a fluorescentnog detektora 50 °C.

Regeneracija FumoniTest™WB kolona. Kolona je nakon korišćenja isprana sa 10 ml FP koji je ostavljen u koloni. Kolona je regenerisana na 4 °C tokom 24 h i nakon toga ponovo korišćena (Abramović *et al.*, 2005b).

3.3.3 Imunohemijska (ELISA) metoda

Za određivanje ukupnih fumonizina, korišćena su dva kita:

1. *ELISA AgraQuant[®] Total Fumonisin Assay 0.25/5.0 RomerLabs[®]* za ukupne fumonizine (FB₁, FB₂ i FB₃) u kukuruzu, USDA/GIPSA odobrena metoda (RomerLabs, www.romerlabs.com) je korišćena prema uputstvu proizvođača (ekstrakcija sa MeOH–H₂O (70:30, v/v), pH ekstrakta je podešen na 7–8). Pri ispitivanju efikasnosti ekstrakcije, ekstrakcija je vršena vodom i FP puferom, a u ekstraktima je takođe podešavan pH.
2. *ELISA Ridascreen[®] Fumonisin R3401* za fumonizine (FB₁, FB₂ i FB₃) u kukuruzu, u opsegu 0–2 mg/kg je korišćena prema uputstvu proizvođača (R-biopharm, www.r-biopharm.de), ekstrakcija sa MeOH–H₂O (70:30, v/v).

3.3.4 Infracrvena spektrometrija sa Furijeovim transformom (FTIR)

Princip

Pri određivanju sadržaja FB FTIR spektroskopijom, uzorci su pripremljeni samo mlevenjem uzorka, nakon čega su snimani IR spektri.

Priprema uzorka

Uzorci kukuruza su pre snimanja FTIR spektara pripremljeni mlevenjem laboratorijskim mlinom tako da je 93% uzorka prosejano kroz sito veličine pora 0,8 mm.

Analiza

Pri snimanju IR spektara interferometar je skenirao brzinom 0,47 cm/s. Svi spektri su snimani sa rezolucijom od 4 cm⁻¹ u intervalu od 650 i 4000 cm⁻¹. Kao pozadina je korišćen vazduh. Da bismo poboljšali odnos signal–šum svaki spektar je dobijen snimanjem 100 skenova. Pre snimanja svakog spektra, bazna linija je snimana pod istim uslovima kako bi se eliminisao mogući uticaj promene kvaliteta vazduha (sadržaj CO₂ i vlage). Furijeova transformacija je izvršena sa korekcijom Mertz faze i primenom Happ-Genzel-ove apodizacione funkcije.

ATR spektroskopija. Korišćen je ZnSe-kristal koji omogućava 12 internih refleksija i dužinu puta od 12 μm. Upadni ugao je bio 45°. Da bi se dobili reproduktivni rezultati korišćen je aplikator za pritisak koji je obezbedivao isti pritisak uzorka na kristal tokom svih merenja (Slika 3.5).



Slika 3.5 Thermo Nicolet Nexus 670 spektrometar sa ATR opcijom

Analiza podataka

Snimljeni spektri su sakupljeni bez glačanja, korigovanja bazne linije i drugih korekcija. Spektri su registrovani pomoću programa obezbeđenog od proizvođača spektrometra. Spektri (korišćeni za statističku obradu) su dobijeni kao prosečna vrednost iz 4 ponavljanja ATR merenja, pri čemu je svaki spektar snimljen za novi pod-uzorak. Tako dobijeni uprosečeni spektri su normalizovani. Nakon snimanja i navedene obrade spektara, spektri su prevedeni iz internog Omnic Spectral File u Microsoft Office Excel Comma Separated Values File za dalju analizu podataka. Nekoliko spektralnih prozora je odabrano za analizu podataka. Dalja analiza podataka je izvršena primenom programa PAST (verzija 2.12, Oslo, Norveška). Broj podataka je varirao od 300 do 620 za svaki spektar pri PCA. PCA je zasnovana na kovarijansnom matriksu aktivnih promenljivih. Rezultati su prikazani kao skor/skor grafik. Klusterska analiza relevantnih glavnih komponenti u cilju klasifikacije uzoraka je izvršena korišćenjem Chord-ovog odstojanja i metode prosečnog povezivanja.

3.3.5 Statistička analiza

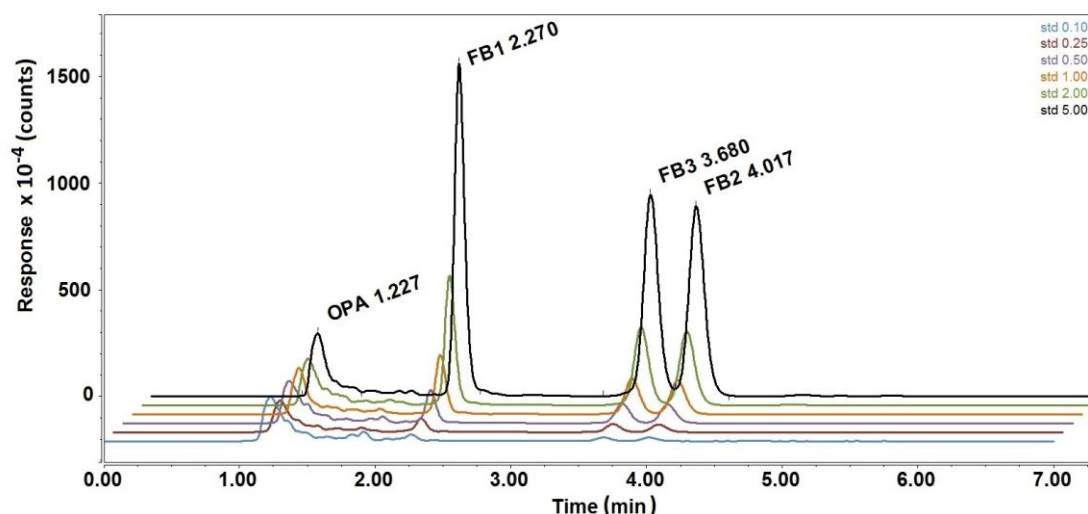
Za analizu dobijenih rezultata u ovoj doktorskoj disertaciji, pored gore navedenih hemometrijskih metoda, korišćeni su različiti statistički testovi: jednofaktorijalna i dvofaktorijalna ANOVA, kao i Tukey-test, t -test, uporedni t -test, Pearsonov koeficijent korelacije, koeficijent determinacije i višestruka regresiona analiza. U ovu svrhu su korišćeni softveri PAST (verzija 2.12, Oslo, Norveška) i Statistica (version 9.1, StatSoft, Inc. 2010).

4 REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 OPTIMIZACIJA I VALIDACIJA HPLC–FLD METODE ZA ODREĐIVANJE FUMONIZINA

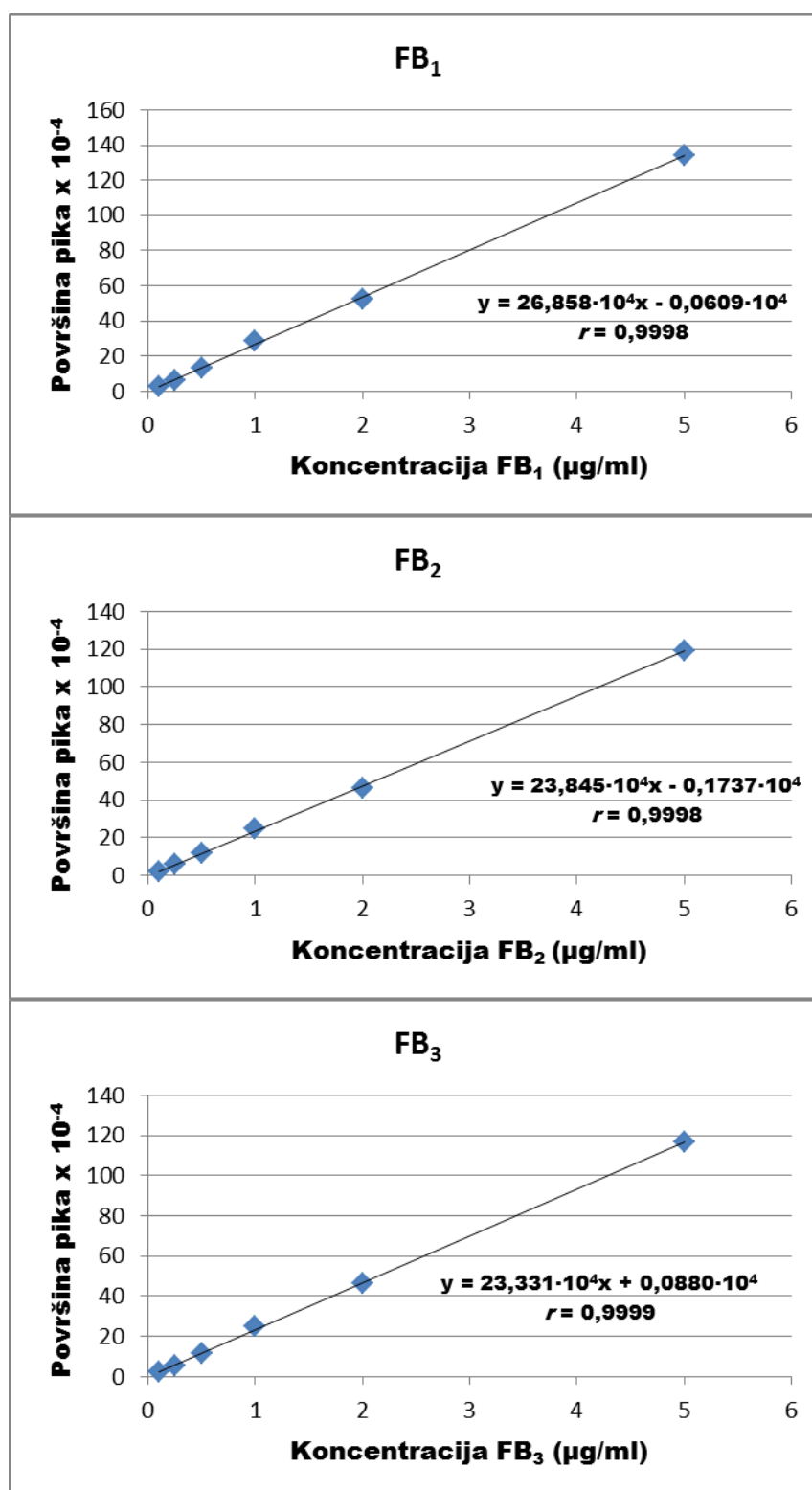
Kao što se iz Teorijskog dela disertacije može zaključiti, u literaturi su opisani različiti eksperimentalni uslovi za određivanje fumonizina tečnom hromatografijom. Obzirom da smo u našim ranijim istraživanjima (Jakšić, 2004) utvrdili prednost primene mobilne faze u sastavu MeOH–0,1 mol/l NaH₂PO₄ (77:23, v/v, pH 3,3), u odnosu na ACN–H₂O–sirćetna kiselina (50:50:1, v/v/v) i MeOH–H₂O–sirćetna kiselina (75:24:1, v/v/v;), za određivanje u ovoj doktorskoj disertaciji je korišćena navedena mobilna faza.

Iako je HPLC–FLD sistem bio opremljen kvaternom pumpom, rad sa dve pumpe, sa odvojenim komponentama mobilne faze: MeOH i 0,1 mol/l NaH₂PO₄ (77:23, v/v i 65:35, v/v) u kome je prethodno podešena pH vrednost na 3,3 nije dao dobro razdvajanje pikova i reproduktivne rezultate. Zato je u daljem radu korišćeno izokratsko eluiranje sa mobilnom fazom MeOH–0,1 mol/l NaH₂PO₄ (77:23, v/v, pH 3,3). Pri protoku mobilne faze od 0,8 ml/min na temperaturi kolone od 30 °C je postignuto odgovarajuće razdvajanje FB₁ od pika OPA, kao i FB₂ od FB₃. Hromatogrami dobijeni za OPA derivate standardnih rastvora FB₁, FB₂ i FB₃ u opsegu koncentracija od 0,1 do 5,0 µg/ml prikazani su na Slici 4.1.



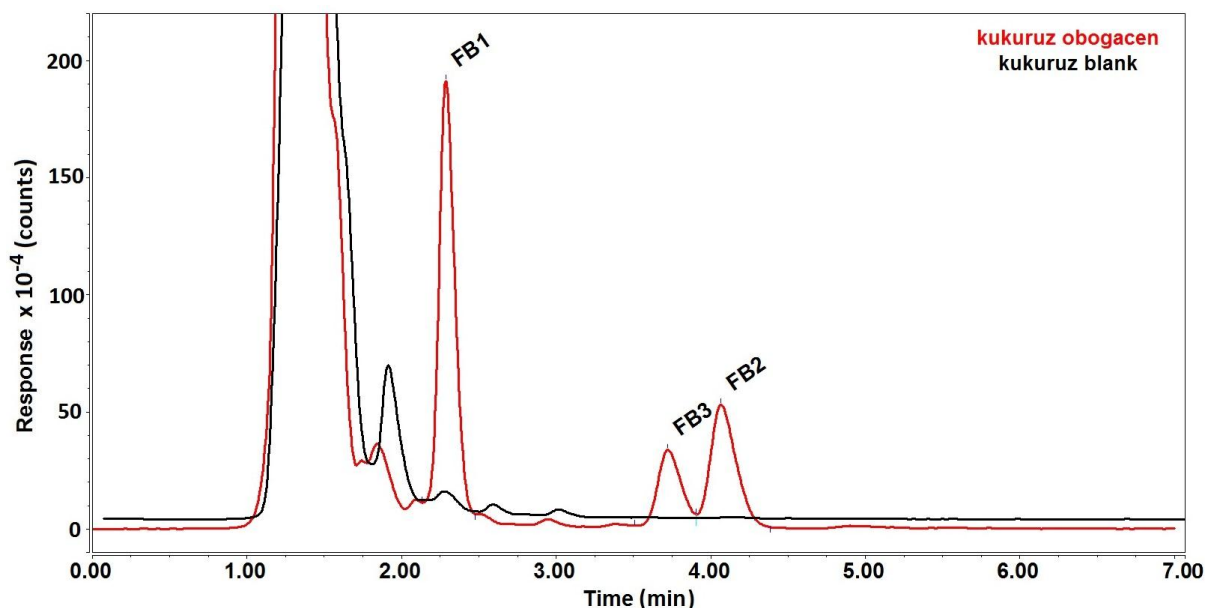
Slika 4.1 Hromatogrami OPA derivata standardnih rastvora FB₁, FB₂ i FB₃ koncentracije 0,1 do 5,0 µg/ml sa prikazanim retencionim vremenom korišćeni za konstruisanje kalibracionih krivih.

Odgovarajuće kalibracione krive su prikazane na Slici 4.2. Kao što se može videti, koeficijent korelacije za sva tri toksina je vrlo visok i iznosi $\geq 0,9998$.



Slika 4.2 Kalibracione krive za određivanje OPA derivata fumonizina B₁, B₂ i B₃ HPLC–FLD metodom. Sastav mobilne faze: MeOH–0,1 mol/l Na₂HPO₄ (77:23, v/v), pH 3,35; protok 0,8 ml/min.

Nakon toga se pristupilo analiziranju i proveru kompletne metode analize koju su ranije razvili Abramović *et al.* (2005b) sa obogaćenim uzorkom kukuruza (Slika 4.3).



Slika 4.3 Hromatogrami uzorka kukuruza pre i nakon obogaćenja sa 500 $\mu\text{g/kg}$ FB_1 , 300 $\mu\text{g/kg}$ FB_2 i 200 $\mu\text{g/kg}$ FB_3 .

U navedenom radu za ekstrakciju je korišćena ekstrakciona smeša ACN–MeOH–H₂O (25:25:50, v/v/v). Rezultati prikazani u Tabeli 4.1 pokazuju zadovoljavajući prinos prema EC Regulativi 401/2006 za FB_1 i FB_2 .

Tabela 4.1 Srednja vrednost prinosa za FB_1 , FB_2 , i FB_3 u obogaćenim uzorcima kukuruza, analizirani metodom HPLC–FLD nakon ekstrakcije sa ACN–MeOH–H₂O (25:25:50, v/v/v) i prečišćavanja sa FumoniTestTMWB kolonama

Srednja vrednost prinosa \pm RSD (%)			
FB_1 sa 500 $\mu\text{g/kg}$	FB_2 sa 500 $\mu\text{g/kg}$	FB_2 sa 300 $\mu\text{g/kg}$	FB_3 sa 200 $\mu\text{g/kg}$
n = 6	n = 3	n = 3	n = 3
90 \pm 2	87 \pm 16	86 \pm 13	67 \pm 10

Isto tako je za optimizaciju i validaciju primenjene analitičke metode određivanja fumonizina urađena analiza dva referentna materijala na bazi kukuruza (Tabela 3.1). Kao što se sa Slike 4.4 može videti, i u ovom slučaju je dobijeno odgovarajuće razdvajanje FB_1 od OPA, kao i FB_2 od FB_3 . Postignuti rezultati određivanja sadržaja FB_1 , FB_2 i FB_3 prikazani su u Tabeli 4.2. Kao što se iz tabele može videti, rezultati dobijeni za RM2 su u saglasnosti sa sertifikovanim vrednostima svih fumonizina. Međutim, u slučaju RM1 za sadržaj FB_2 je

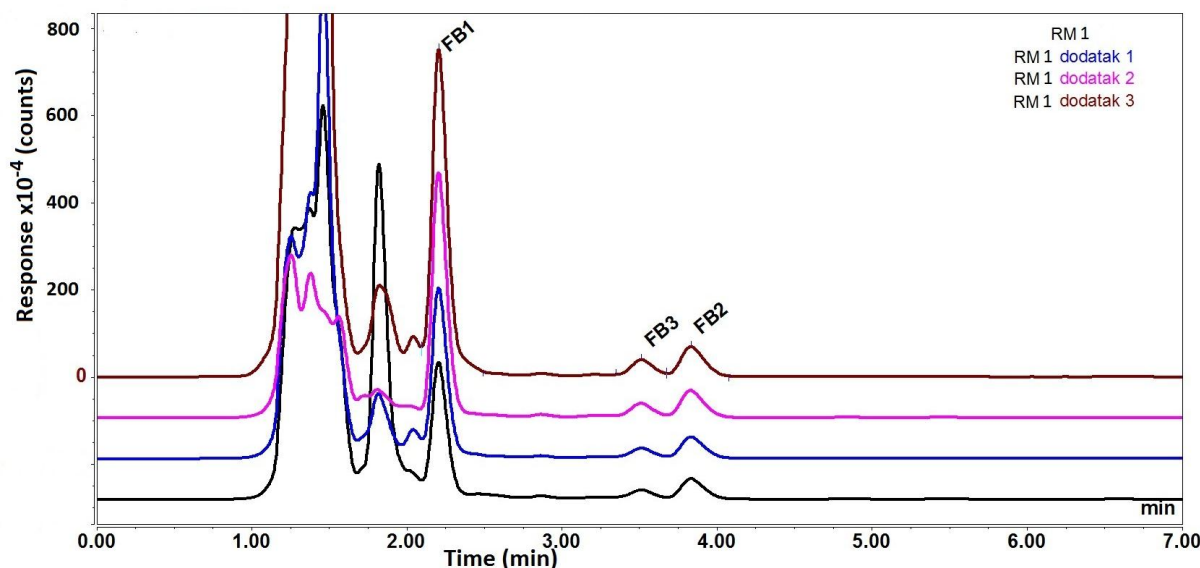
dobijen znatno viši rezultat, tj. prinos je bio veći od onog koji je dozvoljen prema EC Regulativi 401/2006.

Tabela 4.2 Određivanje fumonizina u referentnim materijalima nakon ekstrakcije sa ACN–MeOH–H₂O (25:25:50, v/v/v)

Broj probe	RM1				RM2			
	FB ₁	FB ₂	FB ₃ †	Total FB	FB ₁	FB ₂	FB ₃	Total FB
1	0,552	0,150	0,046	0,748	2,509	0,723	0,261	3,494
2	0,511	0,150	0,071	0,732	2,530	0,708	0,255	3,493
3	0,479	0,135	0,047	0,661	2,812	0,794	0,287	3,894
Srednja vrednost (mg/kg)	0,514	0,145	0,055	0,714	2,617	0,742	0,268	3,627
SD (mg/kg)	0,037	0,009	0,014	0,046	0,169	0,046	0,017	0,231
RSD (%)	7,2	6	26	6,4	6,4	6,2	6,3	6,4
Prinos (%)	86	145	–	102	84	106	134	91

† nije sertifikovano

Da bismo na još jedan način verifikovali razvijenu analitičku metodu, primenjena je metoda standardnog dodatka na referentnom materijalu RM1. Na Slici 4.4 su prikazani dobijeni hromatogrami, a u Tabeli 4.3 dobijeni rezultati određivanja sadržaja FB₁, FB₂ i FB₃, koji su izračunati na osnovu dodate tri različite koncentracije standardnog rastvora svakog od FB.



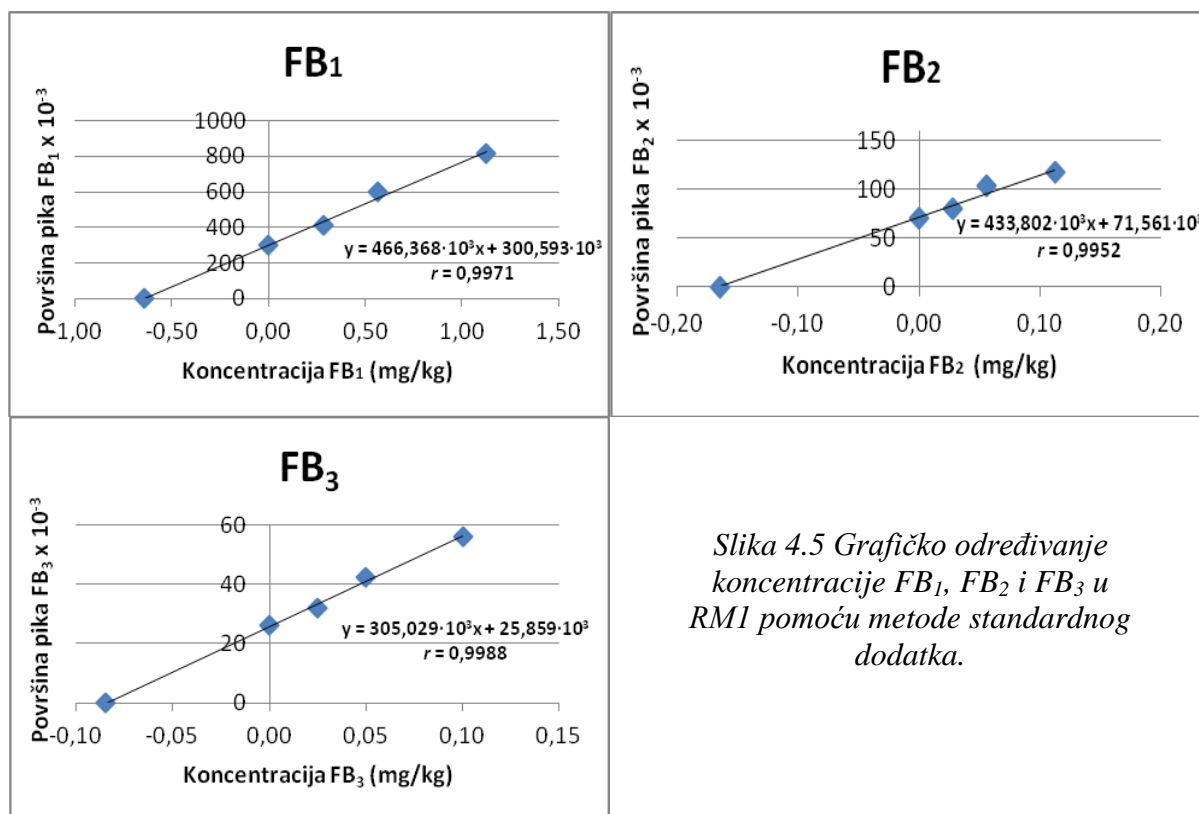
Slika 4.4 Hromatogrami RM1 i RM1 sa tri standardna dodatka, mobilna faza MeOH – 0,1 mol/l NaH₂PO₄ 77:23 (v/v).

Tabela 4.3 Određivanje fumonizina u RM1 metodom standardnog dodatka

Uzorak	FB ₁ (mg/kg)		FB ₂ (mg/kg)		FB ₃ (mg/kg)†	
	Dodato	Rezultat	Dodato	Rezultat	Dodato	Rezultat
RM1 sa:						
Dodatak 1	0,282	0,760	0,028	0,194	0,025	0,108
Dodatak 2	0,564	0,554	0,056	0,119	0,050	0,079
Dodatak 3	1,128	0,654	0,112	0,168	0,100	0,088
Srednja vrednost (mg/kg)		0,656		0,160		0,092
Prinos (%)		109		160		–

† nije sertifikovano

Grafičkom metodom određivanja rezultata standardnog dodatka (Slika 4.5), rezultat određivanja sadržaja FB₁ je bio 0,644 mg/kg (107%), FB₂ 0,165 mg/kg (165%) i FB₃ 0,085 mg/kg. Ovi rezultati potvrđuju dobijenu visoku koncentraciju za FB₂ u RM1, a dobijeni prinos je čak nešto viši. Međutim, treba napomenuti da je ipak sadržaj ukupnih fumonizina u skladu sa sertifikatom korišćenog RM.

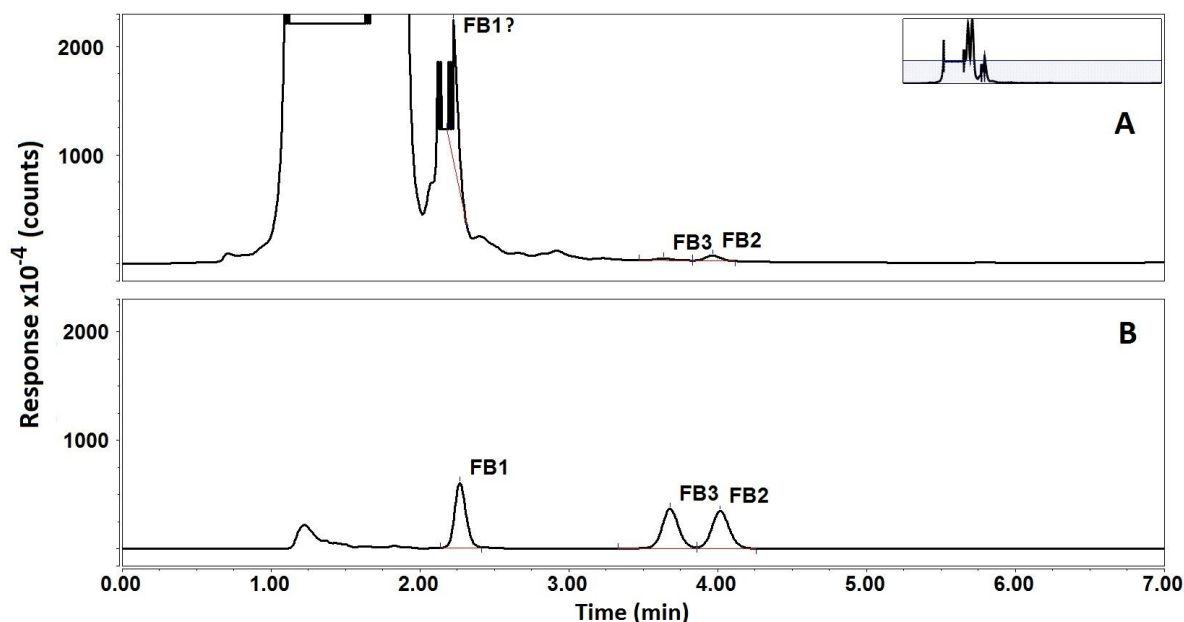


Slika 4.5 Grafičko određivanje koncentracije FB₁, FB₂ i FB₃ u RM1 pomoću metode standardnog dodatka.

U cilju određivanja fumonizina u kukuruzu nakon prečišćavanja sa MycoSep® 231 Fum kolonama bila je neophodna dalja optimizacija mobilne faze. Naime, MycoSep® 231 Fum kolone su kolone za ekstrakciju na čvrstoj fazi, te nisu specifične za fumonizine kao imunoafinitetne kolone. Ekstrakt referentnog materijala RM1 nakon prečišćavanja na ovim kolonama je bio manje čist u odnosu ekstrakt sa FumoniTest™WB kolona (Slika 4.6). Pik koji potiče od OPA, odnosno interferenci eluiranih sa OPA, je bio mnogo veći i razdvajanje FB₁ i OPA nije bilo moguće (Slika 4.7).

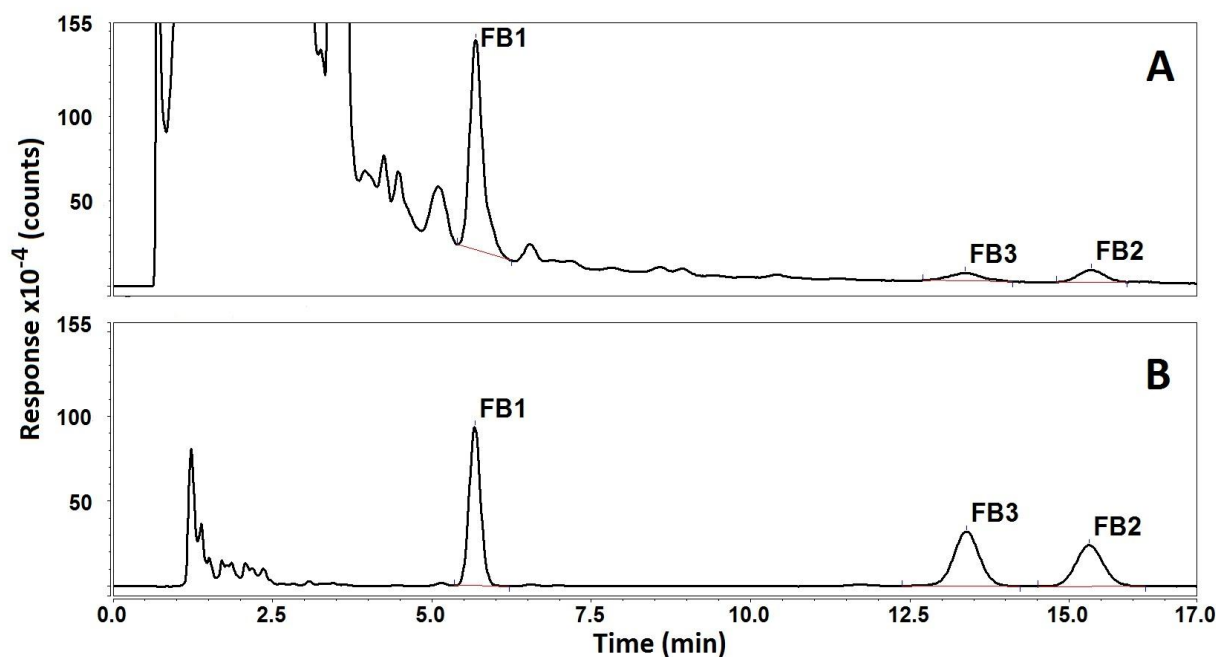


Slika 4.6 Izgled ekstrakta RM1 nakon prečišćavanja na MycoSep® 231 Fum kolonama (ROMER) i FumoniTest™WB (IMA) kolonama.

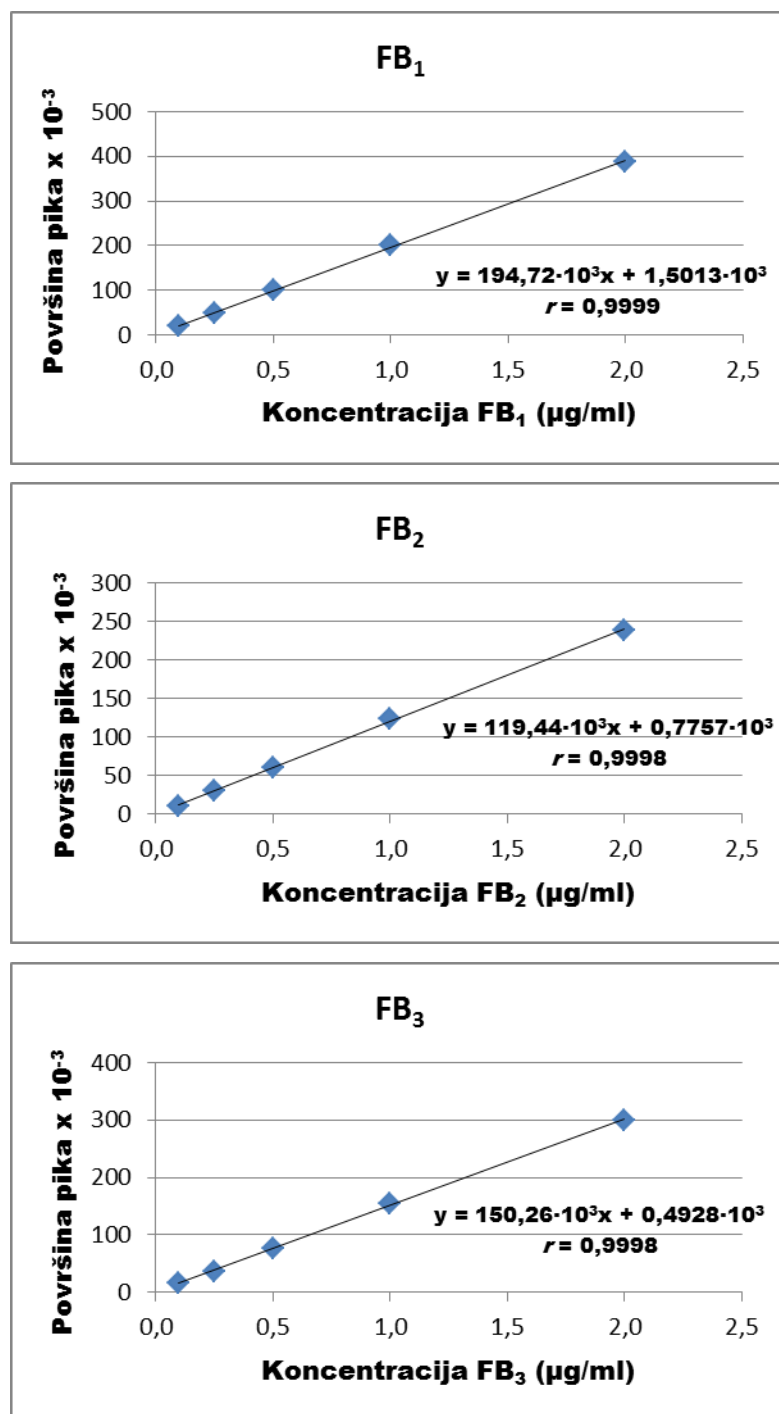


Slika 4.7 Hromatogram dobijen pri određivanju fumonizina u RM1 nakon prečišćavanja na MycoSep® 231 Fum koloni (A) i hromatogram standardnog rastvora FB₁, FB₂ i FB₃ koncentracije 2 µg/ml (B), mobilna faza MeOH – 0,1 mol/l NaH₂PO₄ 77:23 (v/v).

To je bio razlog zbog koga je mobilna faza MeOH–0,1 mol/l NaH₂PO₄ u odnosu 77:23 (v/v) zamjenjena sa istom samo u odnosu 70:30 (v/v) za analizu ovih ekstrakata (Slika 4.8). Sa hromatograma se vidi odgovarajuće razdvajanje pika FB₁, a konstruisane odgovarajuće kalibracione krive su prikazane na Slici 4.9. Jedini nedostatak ovakvog načina eluiranja je taj što analiza znatno duže traje, tj. oko 4 puta. Isto tako, kao što će se videti kasnije, i GD i GO su više.



Slika 4.8 Hromatogram dobijen pri određivanju fumonizina u RM1 nakon prečišćavanja na MycoSep[®] 231 Fum koloni (A) i hromatogram standardnog rastvora FB₁, FB₂ i FB₃ koncentracije 2 µg/ml (B), mobilna faza MeOH–0,1 mol/l NaH₂PO₄ 70:30 (v/v), pH 3,35.



Slika 4.9 Kalibracione krive za određivanje OPA derivata fumonizina B₁, B₂ i B₃ HPLC–FLD metodom. Sastav mobilne faze: MeOH–0,1 mol/l Na₂HPO₄ (70:30, v/v), pH 3,35; protok 0,8 ml/min.

4.2 EKSTRAKCIJA NEORGANSKIM RASTVARAČIMA ZA ODREĐIVANJE FUMONIZINA B₁, B₂ I B₃ U KUKURUZU HPLC–FLD METODOM I ELISA TESTOVIMA (Jakšić *et al.*, DOI 10.1007/s12161-014-0030-5)

Kao što se može videti iz Teorijskog dela disertacije, metode određivanja fumonizina uobičajeno započinju koracima kao što su ekstrakcija i prečišćavanje ekstrakta koji prethode metodama određivanja kao što TLC, LC, GC ili ELISA (Waśkiewicz *et al.*, 2012). Analitičke procedure se uglavnom razlikuju po načinu ekstrakcije, a metoda izbora zavisi od raspoložive opreme i vremena za koje je potrebno završiti analizu. Ekstrakcioni rastvarač i procedura prečišćavanja sirovog ekstrakta su dva kritična parametra u analizi fumonizina (De Girolamo *et al.*, 2001).

Zbog teškoća u dobijanju zadovoljavajuće efikasnosti za određivanje fumonizina u uzorcima kukuruznog testa, Pietri i Bertuzzi (2012) su razvili novu metodu sa jednostavnom ekstrakcijom pomoću 0,4 mol/l fosfatnog pufera (pH 7,4). Ova metoda je u poređenju sa AOAC 2001.04 metodom i drugim objavljenim metodama, dala generalno bolju efikasnost ne samo za testo, nego i za kukuruzno brašno. Međutim, u ovoj studiji fumonizini su kvantifikovani sa HPLC–MS/MS tehnikom. Sa druge strane, Kulisek i Hazebroek (2000) su u cilju izbegavanja opasnog otpada razvili skrining ELISA metodu za određivanje FB₁ u kukuruзу.

Pošto su hromatografsko razdvajanje i fluorescentna detekcija OPA derivata fumonizina, a posebno komercijalni ELISA kitovi manje specifični od MS/MS, cilj ovog dela rada je bio poređenje efikasnosti ekstrakcije fumonizina neorganskim rastvaračima, destilovanom vodom i FP sa standardnom HPLC–FLD metodom i sa dve komercijalne ELISA metode koje se često primenjuju zbog njihove povoljne cene. Ova vrsta ekstrakcije je jeftinija i ekološki prihvatljivija u poređenju sa ekstrakcijom pomoću organskih rastvarača. Istraživanje je urađeno pomoću dva referentna materijala (Tabela 3.1) i uzoraka kukuruza kontaminiranih sa četiri različite koncentracije fumonizina, uključujući visoke koncentracije. Ispitivan je uticaj ovako pripremljenog ekstrakta na hromatografsko razdvajanje i fluorescentno određivanje OPA derivata fumonizina, kao i na određivanje ELISA metodama, korišćenjem dva različita komercijalna kita.

4.2.1 Validacija metoda ekstrakcije neorganskim rastvaračima

Za ispitivanje efikasnosti destilovane vode, kao i FP kao ekstrakcionih sredstava pri HPLC–FLD određivanju fumonizina, primenjena su dva referentna materijala na bazi kukuruza. Kao uporedna metoda, primenjena je metoda kod koje se ekstrakcija izvodi sa ACN–MeOH–H₂O (25:25:50, v/v/v), razvijena od strane Visconti *et al.* (2001) i usvojena od strane AOAC (2002) kao zvanična metoda AOAC 2001.04. za kukuruz, hranu na bazi kukuruza i korn-fleks. Pored navedene, kao uporedne metode u slučaju RM1 su primenjene i one kod kojih se fumonizini ekstrahuju sa MeOH–H₂O (70:30, v/v; Kulishek i Hezebroek, 2000), kao i MeOH–H₂O (75:25, v/v; Sydenham *et al.*, 1996b). U svim slučajevima je sirovi ekstrakt prečišćavan sa FumoniTest™WB kolonama, izuzev u poslednjem slučaju kada je korišćena MycoSep® 231 Fum kolona. U Tabeli 4.4 su predstavljeni rezultati određivanja fumonizina u RM1, a u Tabeli 4.5 za RM2.

Kao što se iz Tabele 4.4 može videti, nema značajne razlike u određenom sadržaju FB₁, FB₂, kao ni ukupnih fumonizina dobijenih primenom obe nove ekstrakcione metode i sertifikovanog sadržaja na nivou značajnosti 0,05. Do istih rezultata smo došli i primenom MeOH–H₂O (70:30, v/v) kao ekstrakcionog sredstva, dok u slučaju primene ACN–MeOH–H₂O (25:25:50, v/v/v) ima značajne razlike u određenom sadržaju FB₂, a primenom MeOH–H₂O (75:25, v/v) u sadržaju FB₂, kao i u slučaju ukupnih fumonizina. Treba napomenuti da ne postoji signifikantna razlika ni u jednom slučaju između određene i sertifikovane vrednosti na nivou značajnosti od 0,01.

Prema EC Regulativi 401/2006 (prihvatljiv prinos između 60% i 120% za nivo kontaminacije FB niži od 500 µg/kg i između 70% i 110% za više nivoe kontaminacije; EC 2006a), zadovoljavajući prinos je dobijen samo korišćenjem destilovane vode kako za pojedinačan, tako i za ukupni sadržaj fumonizina. Primenom ACN–MeOH–H₂O (25:25:50, v/v/v) i MeOH–H₂O (70:30, v/v) kao ekstrakcionog sredstva dobijen je viši prinos od dozvoljenog za FB₂, primenom FP za FB₂ i ukupne fumonizine, a primenom MeOH–H₂O (75:25, v/v) dobijen je viši prinos od dozvoljenog kako za pojedinačni, tako i za ukupni sadržaj fumonizina. Međutim, statistička analiza korišćenjem jednofaktorijalne analize varijanse za pojedinačne fumonizine, kao i za ukupne fumonizine u RM1 za svih pet ekstrakcionih rastvarača (Tabela 4.4), nije pokazala signifikantnu razliku ($p > 0,05$).

REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 4.4 Rezultati određivanja fumonizina u RMI korišćenjem različitih ekstrakcionih sredstava pre HPLC–FLD određivanja sa novim i regenerisanim FumoniTest™ WB kolonama (n = 3)

	ACN–MeOH–H ₂ O (25:25:50, v/v/v)				H ₂ O				FP				FP‡				MeOH–H ₂ O (70:30, v/v)				MeOH–H ₂ O (75:25, v/v)*			
	FB ₁	FB ₂	FB ₃ †	Total FB	FB ₁	FB ₂	FB ₃ †	Total FB	FB ₁	FB ₂	FB ₃ †	Total FB	FB ₁	FB ₂	FB ₃ †	Total FB	FB ₁	FB ₂	FB ₃ †	Total FB	FB ₁	FB ₂	FB ₃ †	Total FB
Srednja vrednost (mg/kg)	0,514	0,145	0,055	0,714	0,592	0,111	0,062	0,764	0,627	0,149	0,058	0,834	0,679	0,133	0,057	0,869	0,500	0,138	0,059	0,697	0,712	0,135	0,088	0,935
SD (mg/kg)	0,037	0,009	0,014	0,046	0,033	0,005	0,007	0,043	0,127	0,020	0,015	0,105	0,050	0,009	0,004	0,061	0,121	0,034	0,018	0,169	0,049	0,008	0,017	0,057
RSD (%)	7,2	6	26	6,4	5,6	5	11	5,6	20,2	13	25	12,6	7,3	6,7	7	7,0	24,3	25	31	24,3	6,8	5,8	19	6,1
Prinos (%)	86	145		102	99	111		109	104	149		119	113	133		124	83	138		100	119	135		134
p [§]	0,055	0,012		0,594	0,705	0,069		0,125	0,425	0,050		0,260	0,110	0,023		0,040	0,290	0,191		0,976	0,058	0,016		0,019
Nakon regeneracije kolone																								
Srednja vrednost (mg/kg)	0,532	0,150	0,062	0,744	0,517	0,102	0,048	0,667	0,573	0,140	0,047	0,760					0,479	0,139	0,040	0,658				
SD (mg/kg)	0,042	0,013	0,002	0,057	0,065	0,015	0,013	0,092	0,068	0,018	0,024	0,110					0,086	0,026	0,015	0,081				
RSD (%)	8,0	8,5	3	7,7	13	15	26	14	12	13	51	14,4					18	19	36	12				
Prinos (%)	89	150		106	86	102		95	96	140		109					80	139		94				
p [§]	0,264	0,113		0,470	0,155	0,837		0,597	0,674	0,191		0,578					0,137	0,121		0,465				

‡ bez razblaživanja sirovog ekstrakta

* MycoSep® 231 Fum kolone.

† nije sertifikovano.

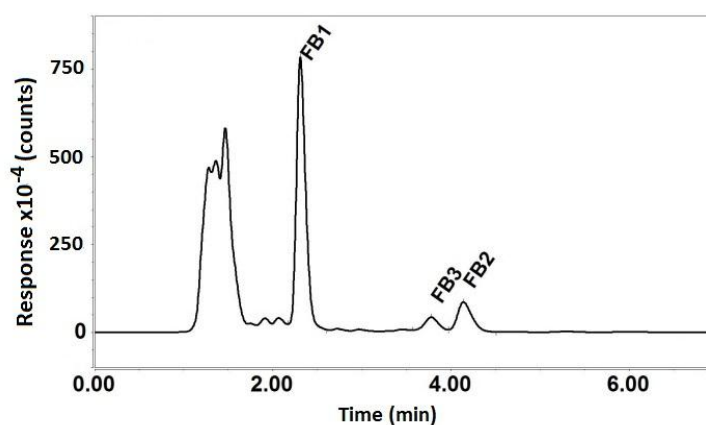
§ t-test vrednost (p vrednost) poređenja podataka dobijenih korišćenjem različitih ekstrakcionih metoda i sertifikovane vrednosti.

Tabela 4.5 Rezultati određivanja fumonizina u RM2 korišćenjem različitih ekstrakcionih sredstava pri HPLC–FLD određivanju sa FumoniTest™ WB kolonama (n = 3)

	ACN–MeOH–H ₂ O (25:25:50, v/v/v)				H ₂ O				FP			
	FB ₁	FB ₂	FB ₃	Total FB	FB ₁	FB ₂	FB ₃	Total FB	FB ₁	FB ₂	FB ₃	Total FB
Srednja vrednost (mg/kg)	2,617	0,742	0,268	3,627	2,635	0,569	0,237	3,441	2,850	0,703	0,261	3,814
SD (mg/kg)	0,169	0,046	0,017	0,231	0,104	0,008	0,001	0,113	0,245	0,041	0,023	0,307
RSD (%)	6,4	6,2	6,3	6,4	3,9	1	0,5	3,3	8,6	5,8	8,8	8,0
Prinos (%)	84	106	134	91	86	81	118	86	92	100	131	95
<i>p</i> ^s	0,039	0,252	0,021	0,108	0,016	0,001	<0,001	0,013	0,220	0,927	0,042	0,405

^s *t*- test vrednost (*p* vrednost) poređenja podataka dobijenih korišćenjem različitih ekstrakcionih metoda i sertifikovane vrednosti.

Pošto prečišćavanje na FumoniTest™WB kolonama zahteva prethodno razblaženje uzorka sa FP, želeli smo da ispitamo mogućnost prečišćavanja sirovog ekstrakta nakon ekstrakcije sa FP bez dodatnog razblaživanja. Na taj način se 2,5 puta veća količina ekstrakta uzorka nanosi na FumoniTest™WB kolonu. Sa Slike 4.10 se može videti da matriks nema uticaja na hromatografsko razdvajanje. Kao što se može videti iz Tabele 4.4, nema značajne razlike između dobijene vrednosti za FB₁ i sertifikovanog sadržaja na nivou značajnosti 0,05, kao ni između dobijene vrednosti za FB₂ i ukupnih fumonizina na nivou 0,01. I u ovom slučaju, dobijen je viši prinos od dozvoljenog prema EC Regulativi 401/2006 kako za pojedinačni, tako i za ukupni sadržaj fumonizina, ali prema jednofaktorijskoj ANOVA, nema signifikantne razlike između pomenutih ekstrakcionih metoda sa FumoniTest™WB kolonama na nivou 0,05.

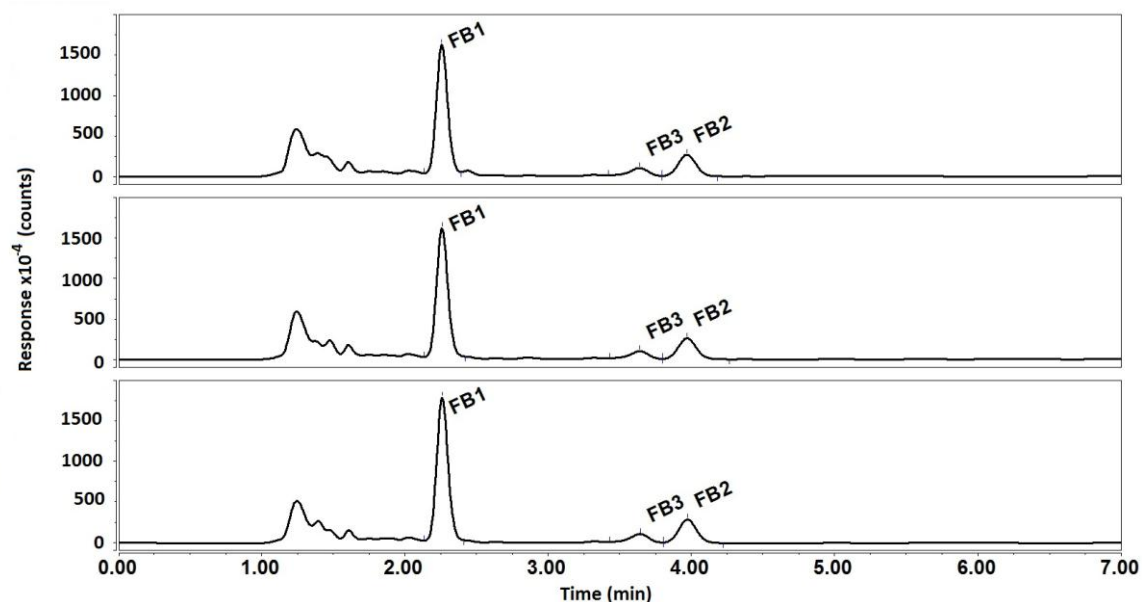


Slika 4.10 Hromatogram dobijen pri određivanju fumonizina u RM1 nakon ekstrakcije sa FP bez razblaživanja (injektovano 17,93 ng FB₁, 3,57 ng FB₂, i 1,55 ng FB₃).

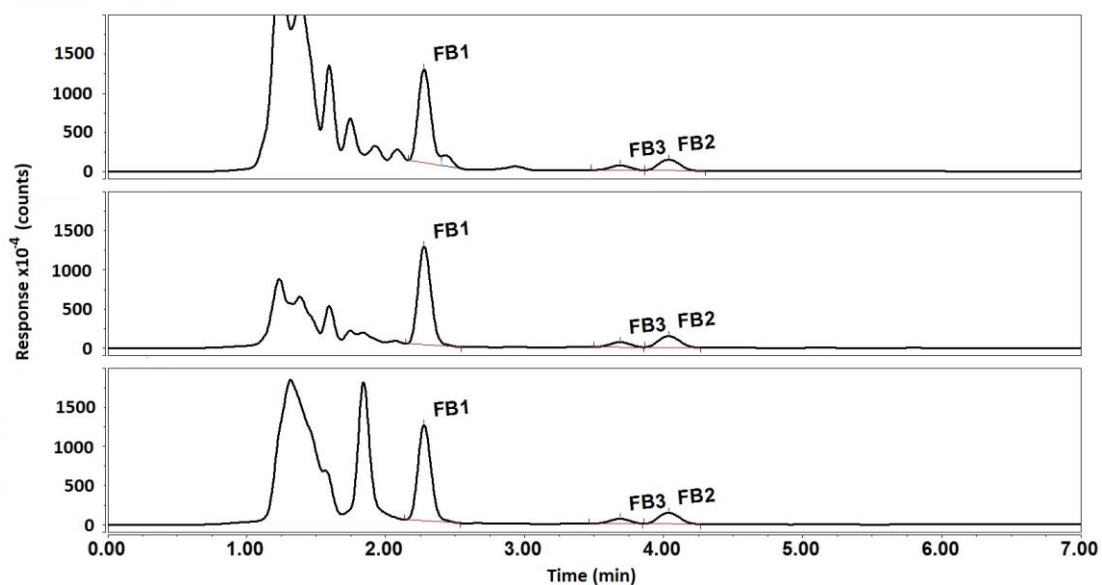
Pri analizi RM2, kao i u svim kasnijim istraživanjima pored dve nove ekstrakcione metode, primenjena je samo AOAC (2002) kao referentna metoda. Kao što se može videti iz Tabele 4.5, najbolje slaganje između određene vrednosti kako pojedinačnih tako i ukupnih fumonizina i sertifikovane vrednosti je dobijen primenom FP kao ekstrakcionog sredstva, odnosno, u slučaju FB₁, FB₂ i ukupnih fumonizina ne postoji signifikantna razlika na nivou 0,05 i za FB₃ na nivou 0,01. U slučaju primene destilovane vode kao ekstrakcionog sredstva ne postoji značajna razlika na nivou 0,01 između određenog sadržaja za FB₁ i ukupnih fumonizina i sertifikovanih vrednosti, dok u slučaju FB₂ i FB₃ postoji signifikantna razlika na pomenutom nivou. Pri analizi RM2 samo je prinos za FB₃ bio viši od dozvoljenog prema EC Regulativi 401/2006 (izuzev u slučaju primene destilovane vode kao ekstrakcionog sredstva). Međutim, prema jednofaktorijalnoj analizi varijanse ne postoji signifikantna razlika ($p > 0,05$) između dobijenog sadržaja za FB₁ i FB₃, kao i ukupnog fumonizina u RM2 primenom sva tri ekstrakciona rastvarača. Samo rezultati određivanja FB₂ korišćenjem jednofaktorijalne ANOVA pokazuju signifikantnu razliku ($p = 0,0024$). Prema Tukey-ovom testu poređenja uparenih srednjih vrednosti postoji signifikantna razlika između vrednosti za FB₂ dobijene primenom destilovane vode kao ekstrakcionog sredstva i druga dva ekstrakciona sredstva ($p < 0,0027$).

FumoniTestTMWB kolone su namenjene za jednokratnu upotrebu, ali naša prethodna istraživanja su pokazala da postoji mogućnost njihove regeneracije sa FP (Abramović *et al.*, 2005). Međutim, pošto su ova ispitivanja sprovedena samo sa standardnim rastvorom, cilj ove disertacije je bio da se potvrdi efikasnost regeneracije kada se kolona koristi za prečišćavanje sirovog ekstrakta referentnih materijala sa različitim koncentracijama fumonizina, i primenom neorganskih ekstrakcionih metoda. Kao što se iz Tabele 4.4 može videti, pri analizi RM1 koji ima niži sadržaj fumonizina, nema signifikantne razlike između određenog sadržaja kako pojedinačnih, tako ni ukupnih fumonizina i njihovog sertifikovanog sadržaja na nivou značajnosti 0,05, primenom svih ispitivanih metoda ekstrakcije uz korišćenje FumoniTestTMWB kolone. I u ovom slučaju dobijen je viši prinos od dozvoljenog prema EC Regulativi 401/2006 za FB₂, ali prema jednofaktorijalnoj analizi varijanse nema značajne razlike između ispitivanih ekstrakcionih metoda sa FumoniTestTMWB kolonama na nivou značajnosti 0,05. Isto tako, nema signifikantne razlike ($p > 0,05$) između rezultata dobijenih pre i nakon regeneracije kolone. Međutim, nizak prinos je dobijen za FB₁ (39%), pa shodno tome i za ukupni sadržaj fumonizina (49%) u RM2, u kome je sadržaj fumonizina bio preko 5 puta veći nego u RM1 (rezultati nisu prikazani u Tabeli 4.5). Primenom *t*-testa, utvrđena je signifikantna razlika između određenog sadržaja za FB₁, odnosno ukupne

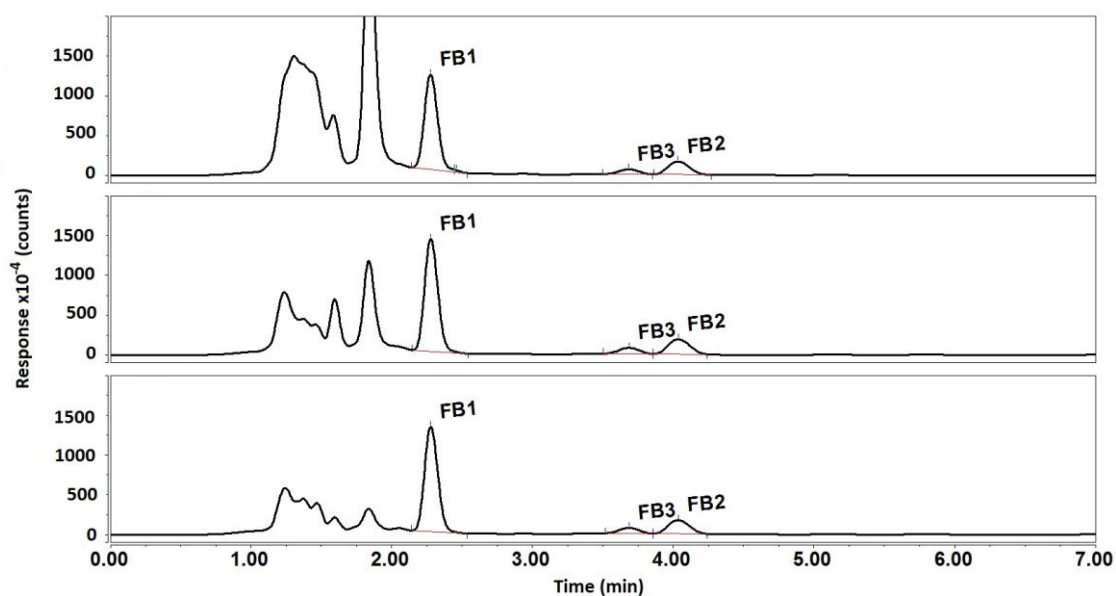
fumonizine i sertifikovane vrednosti ($p = 0,001$, odnosno $0,007$). To znači da nakon prečišćavanja ekstrakta uzorka kukuruza, koji sadrži više od 1 mg/kg ukupnih fumonizina, ili nakon vezivanja $0,4 \text{ } \mu\text{g}$ fumonizina na kolonu, kolone gube mogućnost ponovnog korišćenja. Važno je naglasiti da destilovana voda i FP daju znatno mutnije sirove ekstrakte, verovatno zbog različite sposobnosti ekstrakcije interferenci iz uzoraka kukuruza, u odnosu na smešu organskih rastvarača. Ovo dovodi do pojave pikova, koji potiču od matriksa kukuruza, a koji se eluiraju pre FB_1 (Slike 4.11–4.13). Sličan problem sa interferencama nakon ekstrakcije sa puferom i destilovanom vodom primetili su i Sewram *et al.* (2003), kao i Lawrence *et al.* (2000). Međutim, interferentni pikovi se ne javljaju uvek i mogu se uspešno odvojiti od pika FB_1 . Sa druge strane, rezultati određivanja fumonizina u RM2 sa višim sadržajem fumonizina ukazuju da još uvek ima dovoljno OPA za derivatizaciju fumonizina.



Slika 4.11 Hromatogrami dobijeni pri određivanju FB_1 , FB_2 i FB_3 u RM2 nakon ekstrakcije sa $\text{ACN-MeOH-H}_2\text{O}$ (25:25:50, v/v/v; tri probe).



Slika 4.12 Hromatogrami dobijeni pri određivanju FB_1 , FB_2 i FB_3 u RM2 nakon ekstrakcije sa H_2O (tri probe).



Slika 4.13 Hromatogrami dobijeni pri određivanju FB_1 , FB_2 i FB_3 u RM2 nakon ekstrakcije sa FP (tri probe).

Nadalje, tačnost određivanja ukupnih fumonizina novim ekstrakcionim metodama je ispitivana analizom RM1 sa dva ELISA testa. Rezultati su prikazani u Tabeli 4.6. Kao što se može videti, sa AgraQuant[®] Total Fumonisin Assay se dobija signifikantno viša vrednost u odnosu na sertifikovanu vrednost. Zadovoljavajući prinos je dobijen primenom FP kao ekstrakcionog sredstva ($p = 0,027$), dok se primenom destilovane vode i MeOH- H_2O (70:30, v/v; prizvođačka metoda) dobija signifikantno viši prinos ($p = 0,0002$, odnosno 0,002).

Primenom sva tri ekstrakciona sredstva sa AgraQuant[®] Total Fumonisin Assay prinos je viši od dozvoljenog prema EC Regulativi 401/2006 za ukupne fumonizine. Međutim, prema jednofaktorijskoj ANOVA, nema signifikantne razlike između tri ekstrakcione metode ($p = 0,038$). Kulisek i Hezebroek (2000) su takođe zabeležili više vrednosti dobijene ELISA metodom nego HPLC određivanjem, verovatno zbog prisustva sporednih interferentnih jedinjenja koja su strukturno slična fumonizinima. U slučaju primene Ridascreen[®] Fumonisin testa rezultati su sasvim drugačiji. Naime, u ovom slučaju ne postoji signifikantna razlika na nivou 0,05 između sertifikovane vrednosti i one dobijene primenom destilovane vode i MeOH–H₂O (70:30, v/v), dok je u slučaju primene FP zabeležena signifikantna razlika na nivou 0,05 ($p = 0,019$). Međutim, primenom sva tri ekstrakciona sredstva sa Ridascreen[®] Fumonisin prinos je u saglasnosti sa EC Regulativom 401/2006, i prema jednofaktorijskoj ANOVA nema signifikantne razlike između tri ekstrakcione metode na nivou 0,05. Pored toga, prema jednofaktorijskoj ANOVA, nema signifikantne razlike između određenih vrednosti za ukupne fumonizine dobijene sa Ridascreen[®] Fumonisin i HPLC–FLD sa FumoniTest[™] WB kolonama na nivou 0,05, primenom sve tri pomenute ekstrakcione metode. Poređenjem rezultata AgraQuant[®] Total Fumonisin Assay i HPLC–FLD sa FumoniTest[™] WB kolonama, prema jednofaktorijskoj ANOVA, nema signifikantne razlike, ali na nivou 0,01. Na kraju se može zaključiti prema dvofaktorijskoj analizi varijanse da postoji signifikantna razlika između pomenutih metoda određivanja ($p = 4,4 \times 10^{-7}$), ali da nema signifikantne razlike između ispitanih ekstrakcionih metoda ($p > 0,05$).

Granica detekcije (GD, odnos signal–šum 3:1) i određivanja (GO, odnos signal–šum 10:1) HPLC–FLD metoda su izračunate iz hromatograma standardnog rastvora i iz hromatograma uzoraka kukuruza dobijenih sa različitim rastvaračima za ekstrakciju (Tabela 4.7). Kao što se može videti, niže GD i GO su dobijene nakon ekstrakcije sa ACN–MeOH–H₂O (25:25:50, v/v/v), jer je viši šum bazne linije na hromatogramima nakon ekstrakcije destilovanim vodom i FP. Korišćenje regenerisanih kolona kod svih ekstrakcionih rastvarača povećava GD i GO, ali to povećanje nije značajno. Međutim, u slučaju ekstrakcije sa FP bez razblaživanja sirovog ekstrakta, veći ekvivalent matriksa se nanosi na kolonu za prečišćavanje i injektuje, te su zato GD i GO niže u poređenju sa FP ekstrakcijom sa razblaženjem. Sve dobijene GD su veoma niske i one su na nivou GD koje se postižu MS detekcijom (Cavaliere *et al.*, 2007; D'Arco *et al.*, 2008; Di Mavungu *et al.*, 2009).

Pri ispitivanju uticaja sastava mobilne faze na veličinu GD i GO (standardni rastvor), nađeno je da su primenom mobilne faze MeOH–0,1 mol/l Na₂PO₄ (77:23, v/v), oko 3–5 puta

niže nego primenom 70:30 (v/v), što je i razumljivo imajući u vidu da se fumonizini u prvom slučaju eluiraju brže i samim tim su pikovi viši.

Tabela 4.6 Rezultati određivanja ukupnih fumonizina (FB) u RMI sa različitim ekstrakcionim rastvaračima i različitim metodama određivanja

Metoda određivanja		Metoda ekstrakcije		
		ACN–MeOH–H ₂ O (25:25:50, v/v/v)	H ₂ O	FP
HPLC–FLD	FB (mg/kg)	0,714	0,764	0,834
FumoniTest™WB	SD (mg/kg)	0,046	0,043	0,105
	RSD (%)	6,4	5,6	12,6
	Prinos (%)	102	109	119
	p^{\S}	0,594	0,125	0,260
		MeOH–H ₂ O (70:30, v/v)	H ₂ O	FP
AgraQuant® Total	FB (mg/kg)	0,931	0,930	0,861
Fumonisin Assay	SD (mg/kg)	0,017	0,006	0,047
	RSD (%)	1,8	0,7	5,4
	Prinos (%)	133	133	123
	p^{\S}	0,002	0,0002	0,027
Ridascreen® Fumonisin	FB (mg/kg)	0,659	0,703	0,644
	SD (mg/kg)	0,052	0,004	0,014
	RSD (%)	7,9	0,6	2,2
	Prinos (%)	94	100	92
	p^{\S}	0,305	0,324	0,019

[§] t -test vrednost (p vrednost) poređenja podataka dobijenih korišćenjem različitih ekstrakcionih metoda i sertifikovane vrednosti.

REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 4.7 GD i GO HPLC–FLD metoda korišćenjem različitih metoda ekstrakcije

		FB ₁		FB ₂		FB ₃	
		GD	GO	GD	GO	GD	GO
		(µg/kg)	(µg/kg)	(µg/kg)	(µg/kg)	(µg/kg)	(µg/kg)
^a Standardni rastvor [§]		0,7	2,6	1,4	4,7	1,3	4,3
^b Standardni rastvor [§]		2,2	7,6	8,2	27,5	6,5	21,6
Uzorci kukuruza							
	ACN–MeOH–H ₂ O (25:25:50, v/v/v)	0,4	1,2	0,7	2,2	0,7	2,2
	ACN–MeOH–H ₂ O (25:25:50, v/v/v) (nakon regeneracije kolone)	0,5	1,5	0,9	2,9	0,9	3,1
^a FumoniTest™WB	H ₂ O	1,1	3,6	2,0	6,8	1,9	6,5
	H ₂ O (nakon regeneracije kolone)	1,3	4,3	2,4	8,2	2,3	7,7
	FP	1,5	4,9	2,7	9,1	2,5	8,4
	FP (nakon regeneracije kolone)	1,5	5,1	2,8	9,4	2,6	8,8
	FP bez razblaženja sirovog ekstrakta	0,7	2,2	1,2	4,1	1,1	3,8
^b MycoSep® 231 Fum	MeOH–H ₂ O (75:25, v/v)	1,5	4,9	4,8	16,9	4,9	16,2

[§] µg/l

^a mobilna faza MeOH–0,1 mol/l NaH₂PO₄ (77:23, v/v)

^b mobilna faza MeOH–0,1 mol/l NaH₂PO₄, (70:30, v/v)

4.2.2 Ekstrakcione metode neorganskim rastvaračima u analizi uzoraka kukuruza i proizvoda od kukuruza

Nakon ispitivanja efikasnosti novih ekstrakcionih metoda na referentnim materijalima, iste smo primenili na više prirodno kontaminiranih uzoraka različitih sorti kukuruza sa različitim koncentracijama fumonizina, uključujući visoke koncentracije. Rezultati određivanja fumonizina u pomenutim uzorcima kukuruza su prikazani u Tabeli 4.8. Određivani su metodom HPLC–FLD nakon prečišćavanja sa FumoniTest™WB imunoafinitetnim kolonama. Prema jednofaktorijalnoj ANOVA utvrđena je signifikantna razlika samo u slučaju FB₁ ($p = 0,01$) u uzorku No 2, i FB₂ u uzorcima No 1 ($p = 0,006$) i No 3 ($p = 0,008$). Prema Tukey-ovom testu postoji signifikantna razlika između rezultata određivanja FB₁ u uzorku No 2 dobijenih primenom destilovane vode i FP, kao i destilovane vode i ACN–MeOH–H₂O kao sredstva za ekstrakciju ($p = 0,037$, odnosno $0,009$). Isto tako, signifikantno niži rezultati su dobijeni za FB₂ u uzorcima No 1 i No 3 primenom destilovane vode u odnosu na druga dva ekstrakciona sredstva ($p < 0,011$). Na kraju takođe treba konstatovati, da je za najkontaminiraniji uzorak RSD za sva ekstrakciona sredstva bila najviša. Na osnovu toga se može zaključiti da je verovatno za visoko kontaminirane uzorke potrebna duža ekstrakcija ili homogenizacija.

Dalje, kod uzoraka sa većom kontaminacijom fumonizinima, gde se injektuje manji ekvivalent mase matriksa, tj. gde se dodatno razblažuje uzorak, manje su i interference koje potiču od matriksa (Slika 4.14). Takođe se može zaključiti da su neorganski rastvarači jednako efikasni za ekstrakciju fumonizina iz visokokontaminiranih uzoraka kukuruza kao i AOAC metoda (2002).

Testiranje novih ekstrakcionih metoda je urađeno i na realnim, prirodno kontaminiranim uzorcima kukuruza, kao i proizvodima od kukuruza (kukuruzno brašno, palenta i korn-fleks). Rezultati su prikazani u Tabeli 4.9. Linearnom regresionom analizom je dobijeno da nema signifikantne razlike između dve nove ekstrakcione metode i AOAC metode ($r \geq 0,968$, $p < 0,005$) pri određivanju sadržaja pojedinačnih FB₁, FB₂, FB₃, kao i ukupnih fumonizina u svim analiziranim uzorcima. Generalno, ekstrakcije sa neorganskim rastvaračima su se pokazale kao veoma efikasne za sve tipove realnih, prirodno kontaminiranih uzoraka.

REZULTATI I DISKUSIJA

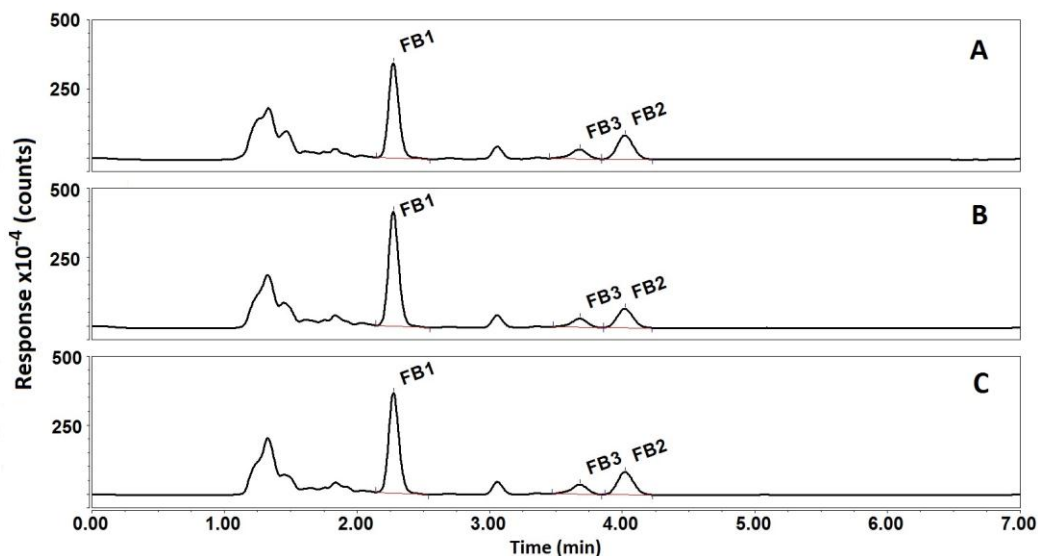
Tabela 4.8 Rezultati određivanja fumonizina u uzorcima kukuruza primenom različitih ekstrakcionih metoda i HPLC–FLD ($n = 3$)

Oznaka uzorka		ACN–MeOH–H ₂ O (25:25:50, v/v/v)				H ₂ O				FP			
		FB ₁	FB ₂	FB ₃	FB	FB ₁	FB ₂	FB ₃	FB	FB ₁	FB ₂	FB ₃	FB
1 ^a	Srednja vrednost (mg/kg)	0,889	0,117	n.o.	1,006	0,899	0,098	n.o.	0,997	0,929	0,116	n.o.	1,045
	SD (mg/kg)	0,047	0,006		0,052	0,055	0,005		0,059	0,059	0,004		0,063
	RSD (%)	5,3	5		5,2	6,1	6		6,9	6,3	3		6,0
2 ^b	Srednja vrednost (mg/kg)	2,72	1,23	0,48	4,43	3,54	1,19	0,54	5,26	2,94	1,24	0,54	4,72
	SD (mg/kg)	0,25	0,27	0,09	0,56	0,26	0,03	0,05	0,29	0,12	0,21	0,08	0,33
	RSD (%)	9	22	19	13	7	3	10	6	4	17	14	7
3 ^b	Srednja vrednost (mg/kg)	15,04	6,61	2,36	24,10	16,66	4,99	2,21	23,86	18,67	6,77	2,77	28,20
	SD (mg/kg)	0,88	0,35	0,42	0,89	1,90	0,42	0,10	2,41	3,26	0,66	0,16	4,05
	RSD (%)	6	5	18	4	11	8	5	10	17	10	6	14
4 ^b	Srednja vrednost (mg/kg)	23,43	7,17	3,11	33,71	26,75	5,85	2,68	35,28	21,91	5,98	2,60	30,49
	SD (mg/kg)	3,33	1,22	0,65	5,18	14,53	2,11	0,85	17,48	3,60	1,20	0,48	5,09
	RSD (%)	14	17	21	15	54	36	32	50	16	20	18	17

n.o.– nije određivano;

^a – prirodno kontaminiran uzorak;

^b – uzorak inokulisan plesnima.



Slika 4.14 Hromatogrami dobijeni pri određivanju FB_1 , FB_2 i FB_3 u uzorku No 3 nakon ekstrakcije fumonizina sa: ACN–MeOH–H₂O (25:25:50, v/v/v) (A); H₂O (B) i FP (C).

Tabela 4.9 Rezultati određivanja fumonizina (mg/kg) u prirodno kontaminiranim uzorcima kukuruza i proizvoda od kukuruza HPLC–FLD metodom sa novim FumoniTest™ WB kolonama

Uzorak	ACN–MeOH–H ₂ O (25:25:50, v/v/v)				H ₂ O				FP			
	FB ₁	FB ₂	FB ₃	FB	FB ₁	FB ₂	FB ₃	FB	FB ₁	FB ₂	FB ₃	FB
Kukuruz												
1	2,316	0,320	0,567	3,203	2,177	0,305	0,549	3,030	2,513	0,399	0,699	3,611
2	1,398	0,369	0,161	1,929	2,128	0,322	0,178	2,628	2,063	0,480	0,221	2,763
3	2,182	0,538	0,240	2,960	2,021	0,525	0,258	2,804	1,981	0,521	0,231	2,732
4	0,626	0,191	0,097	0,914	0,619	0,170	0,093	0,883	0,744	0,158	0,081	0,983
5	2,778	0,558	0,215	3,551	3,324	0,471	0,204	4,000	3,545	0,561	0,222	4,328
Kukuruzno brašno												
1	0,703	0,140	0,066	0,910	0,896	0,152	0,076	1,125	1,000	0,203	0,100	1,303
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Palenta												
1	0,082	0,014	0,007	0,103	0,015	0,005	0,004	0,024	0,110	0,016	0,014	0,140
2	0,051	0,016	0,007	0,074	0,044	0,009	0,003	0,056	0,050	0,015	0,007	0,073
Korn-fleks												
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0,031	0,008	ND	0,040	0,031	0,009	ND	0,041	0,033	0,007	ND	0,040

ND – Nije detektovano

4.3 SADRŽAJ FUMONIZINA U ŽITARICAMA

Iako je HPLC–FLD metoda usvojena od strane AOAC kao zvanična metoda za određivanje fumonizina (AOAC, 2002), ova metoda zahteva prečišćavanje uzorka, značajan utrošak vremena i novca, kao i obučeno osoblje. Obzirom da su dobijeni rezultati primenom Ridascreen® Fumonisin ELISA testa pri određivanju referentnih materijala (Tabela 4.6) pokazali da nema značajne razlike u odnosu na rezultate dobijene sa HPLC–FLD metodom ($p > 0,05$), urađena su dodatna ispitivanja u cilju validacije i ispitivanja primenljivosti, pouzdanosti i preciznosti pomenute ELISA metode, kako bi se koristila u daljim ispitivanjima.

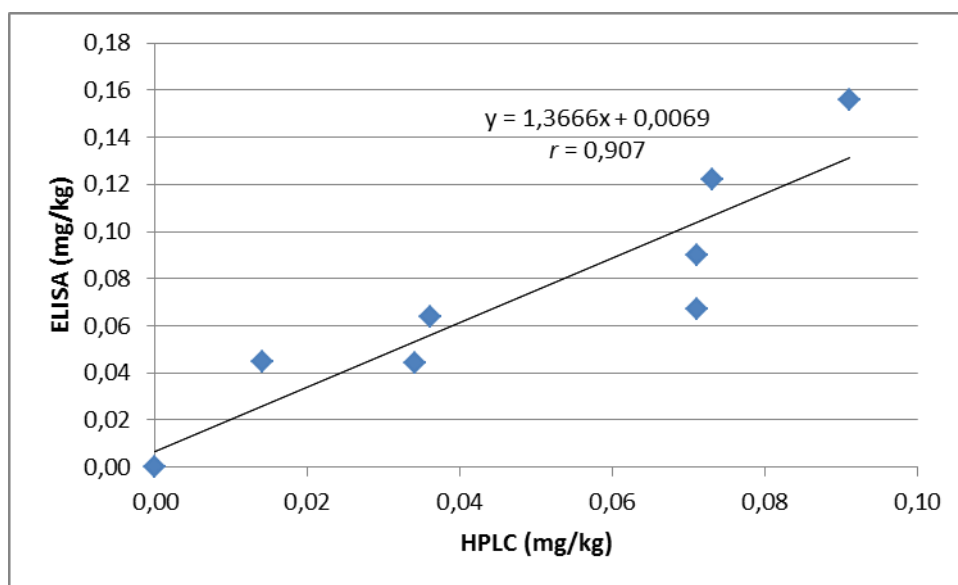
Uzorci sa niskim sadržajem fumonizina su ispitani paralelno HPLC–FLD i ELISA metodom u cilju poređenja preciznosti ovih metoda za određivanje fumonizina u koncentracijama bliskim granicama detekcije i određivanja (Tabela 4.10).

Tabela 4.10 Sadržaj FB (mg/kg) u kukuruzu određen HPLC–FLD i ELISA metodom

Uzorak	HPLC–FLD				ELISA
	FB ₁	FB ₂	FB ₃	Ukupni FB	Ukupni FB
1.	0,023	0,008	0,005	0,036	0,064
2.	0,018	0,010	0,006	0,034	0,044
3.	0,048	0,031	0,012	0,091	0,156
4.	0,059	0,010	0,004	0,073	0,122
5.	ND	ND	ND	ND	ND
6.	0,052	0,015	0,004	0,071	0,067
7.	ND	0,010	0,004	0,014	0,045
8.	0,030	0,029	0,012	0,071	0,090

Rezultati prirodno kontaminiranih uzoraka sa niskim sadržajem fumonizina su pokazali da primenom uporednog *t*-testa nema značajne razlike na nivou 0,01 ($p = 0,021$). Pošto se sadržaj FB u analiziranim uzorcima kretao u opsegu 1:6 slaganje rezultata je analizirano i primenom linearne regresione analize. Nađeno je da primenom ove statističke analize takođe nema značajne razlike između metoda ($r = 0,907$, $p < 0,002$; Slika 4.15). Slični rezultati su već prikazani i u literaturi za različite vrste uzoraka (kukuruz, pirinač, pšenica, ječam i dr.). Ghali *et al.* (2009) su ispitivanjem korelacije između ove dve metode

dobili linearni koeficijent determinacije od $r^2 = 0,978$ na nivou značajnosti $p < 0,005$. Ovi autori su paralelnim ispitivanjem 95 uzoraka zabeležili 37 pozitivnih uzoraka ELISA metodom, a 25 HPLC–FLD metodom. Međutim, granice detekcije HPLC–FLD metode su bile više nego ELISA testa, tj. GD za FB₁ je iznosila 50 µg/kg, a za FB₂ 75 µg/kg primenom HPLC–FLD metode, 25 µg/kg FB za ELISA test.



Slika 4.15 Korelacija rezultata merenja dobijenih ELISA i HPLC–FLD metodom za uzorke sa niskim sadržajem fumonizina.

Ono *et al.* (2000) su poređenjem kompetitivne ELISA i HPLC metode takođe dobili visok koeficijent korelacije (0,94), za uzorke sa manje od 10 mg/kg fumonizina. Za uzorke sa više od 10 mg/kg fumonizina, koeficijent korelacije je bio samo 0,66, tj. u ovom slučaju je utvrđena značajna razlika između dobijenih rezultata primenom navedenih metoda. Iako deo rezultata ovog ispitivanja pokazuje da primenjena ELISA metoda daje nešto više vrednosti u odnosu na HPLC, autori zaključuju da se ona može koristiti za skrining fumonizina u kukuruzu uz znatne prednosti što se tiče brzine i jednostavnosti u odnosu na HPLC. Za uzorke sa većom kontaminacijom, autori predlažu višestruko razblaženje uzoraka kako bi se izbegao uticaj matriksa, mada je to neophodno kako bi koncentracija fumonizina bila u opsegu koji je definisan za svaku vrstu ELISA testa.

Više rezultate dobijene ELISA metodom mnogi autori tumače, kao što je već napomenuto, uticajem matriksa, odnosno prisustvom strukturno sličnih jedinjenja fumonizina, koji učestvuju u unakrsnim reakcijama sa antitelima za fumonizine (Sydenham *et al.*, 1996a). Takođe, u nekim ispitivanjima ELISA metoda je dala više

koncentracije jer se ovom tehnikom određuje ukupan sadržaj fumonizina, a HPLC–FLD metodom samo FB₁ i FB₂ (Shelby *et al.*, 1994). Svakako, prirodna kontaminacija sa FB₃ je znatno niža od kontaminacije FB₁ i FB₂ i ovo ne može značajno uticati na razliku u rezultatima.

Obzirom na prikazane rezultate poređenja ELISA i HPLC–FLD kao standardne referentne metode (AOAC, 2002), zaključili smo da ispitana ELISA metoda odgovara nameni („fitness for purpose“), odnosno zahtevima laboratorije za brzim i pouzdanim rezultatima uz minimalne troškove, te se može primeniti za ispitivanje velikog broja uzoraka žitarica. Zato je u daljim ispitivanjima korišćena ova metoda, uz redovnu verifikaciju svakog lota ELISA kitova pomoću obogaćenih uzoraka i/ili referentnih materijala.

Poljoprivredni usevi, posebno žitarice su obično inficirane plesnima roda *Fusarium* i njihovim sekundarnim metabolitima koji imaju štetan uticaj na zdravlje životinja, dobrobit i produktivnost. Podaci o mikološkoj kontaminaciji kukuruza (Djilas *et al.*, 2001; Lević *et al.*, 2009) ukazuju na realnu mogućnost produkcije mikotoksina, a izolati *F. proliferatum* sa različitih lokaliteta u Srbiji su pokazali kapacitet za visoku produkciju fumonizina (Stanković *et al.*, 2008).

Fumonizini u hrani za životinje nisu obuhvaćeni zakonskim propisima Republike Srbije, a u hrani su obuhvaćeni tek od 2010. godine, pa posledično i nema dovoljno podataka o kontaminaciji žitarica, a posebno kukuruza ovim mikotoksinima. U ovoj disertaciji su analizirani kukuruzi roda 2005. i u periodu 2009–2013. godine. U svim uzorcima je određivan sadržaj fumonizina, a u određenim uzorcima su radi ispitivanja određenih korelacija, određivani vlaga, kontaminacija plesnima, kao i drugim mikotoksinima. Tako su kukuruzi roda 2005. godine u cilju ispitivanja uticaja skladištenja na produkciju fumonizina, uzorkovani od individualnih proizvođača, neposredno nakon žetve pri skladištenju i 6 meseci nakon skladištenja. Kukuruz roda 2009. je korišćen za utvrđivanje uticaja vlage u zrnu, kao i prisustva plesni na produkciju fumonizina i drugih mikotoksina. Obzirom na specifične klimatske uslove u proizvodnoj 2010. godini koji su pogodovali produkciji DON-a, uzorci su poslužili za ispitivanje eventualne korelacije između prisustva fumonizina i DON-a. Klimatski uslovi u proizvodnoj 2012. godini su bili pogodni za produkciju aflatoksina u kukuružu, te je ispitana eventualna korelacija fumonizina i aflatoksina.

U narednim poglavljima su prikazani rezultati ispitivanja ovih uzoraka kukuruza.

4.3.1 Uticaj tradicionalnog načina skladištenja na produkciju fumonizina u kukuruзу u Srbiji

U cilju ispitivanja uticaja tradicionalnog načina skladištenja kukuruза u domaćinstvima individualnih proizvođača, tokom jeseni 2005. godine, prikupljeni su sa osam lokacija uzorci kukuruза skladišteni u čardacima u domaćinstvima u Vojvodini i Mačvi. Sa područja Bačke (Lipar, Temerin, Rumenka), Banata (Nakovo), Srema (Putinci, Ruma, Sremska Kamenica) i Mačve (Bogatić) prikupljeni su uzorci iz većeg broja domaćinstava odmah po skladištenju, i nakon toga, u proleće 2006. godine. Odmah po uzorkovanju određen je sadržaj vlage u skladištenim uzorcima kako bi se ispitala eventualna korelacija sa produkcijom toksina tokom skladištenja. Sadržaj fumonizina u prikupljenim uzorcima kukuruза je ispitan ELISA metodom (Tabela 4.11).

Srednja vrednost sadržaja ukupnih fumonizina nakon skladištenja je nešto viša u odnosu na rezultate odmah nakon berbe, a takođe su zabeležene više maksimalne koncentracije fumonizina. Međutim, rezultati uporednog *t*-testa pokazuju da ne postoji značajna razlika u koncentraciji fumonizina pre i nakon skladištenja na nivou 0,05, kao i rezultati linearne regresione analize ($r = 0,030$, $p = 0,880$). Iako povećanje koncentracije nije veliko i značajno, posebno u odnosu na maksimalno dozvoljene vrednosti, daljom analizom dobijenih rezultata (Tabela 4.12), vidi se da je u većem broju uzoraka došlo do povećanja koncentracije fumonizina (54%). U 20% uzoraka nije bilo promene, to su uzorci u kojima nisu detektovani fumonizini pre, a ni posle skladištenja. U 26% uzoraka je došlo do smanjenja koncentracije fumonizina. Kod ovih uzoraka je diskutabilno da li je zaista došlo do razgradnje fumonizina, ili je u pitanju uticaj uzorkovanja, odnosno neravnomerna distribucija toksina u kukuruзу. U literaturi su zabeleženi slični rezultati smanjenja koncentracije toksina tokom skladištenja (Atukwase *et al.*, 2012). Ako se uporedi sadržaj vlage u odnosu na promenu koncentracije FB, može se videti (Tabela 4.12) da srednja vrednost sadržaja vlage, kao ni opseg ne ukazuju na uticaj vlage na navedene promene. Statističkom linearnom regresionom analizom nije utvrđena značajna korelacija između sadržaja vlage pre skladištenja i koncentracije FB pre ($r = 0,189$; $p = 0,276$) ni posle ($r = 0,171$; $p = 0,326$) skladištenja. Na osnovu postignutih rezultata može se zaključiti da je tradicionalni način skladištenja u čardacima odgovarajući, odnosno da ne dolazi do značajnije produkcije toksina u uslovima takvog načina sušenja i čuvanja kukuruза.

REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 4.11 Sadržaj fumonizina u kukuruzu roda 2005. godine pre i nakon skladištenja u čardacima

Lokalitet	Domaćinstvo	Sadržaj vlage u zrnu pre skladištenja (%)	Sadržaj FB (mg/kg)	
			Pre skladištenja	Posle skladištenja
Nakovo	1	17,39	ND	0,054
	2	21,48	ND	ND
	3	14,88	ND	0,034
	4	22,55	0,066	ND
	5	22,04	0,054	ND
	6	23,68	ND	0,083
	7	16,94	0,288	ND
	8	20,19	ND	ND
Putinci	1	25,56	ND	3,30
	2	22,56	0,620	0,651
	3	27,78	ND	0,383
	4	23,45	0,472	0,482
Ruma	1	24,65	0,072	0,606
	2	23,87	0,052	0,493
Sr.Kamenica	1	20,09	ND	ND
Rumenka	1	20,30	0,034	0,339
	2	16,10	0,036	0,151
	3	17,42	ND	0,056
	4	21,47	0,034	ND
	5	13,39	ND	0,162
Temerin	1	20,55	ND	0,079
	2	22,23	0,351	0,707
	3	25,55	0,654	ND
Lipar	1	26,94	0,085	ND
	2	27,57	ND	0,202
	3	27,01	0,069	0,303
	4	26,94	ND	ND
	5	26,10	ND	ND
	6	27,13	0,076	0,031
	7	24,55	0,042	ND
Bogatić	1	25,72	ND	ND
	2	21,88	ND	ND
	3	21,78	0,038	0,046
	4	29,65	ND	0,129
	5	27,79	1,04	0,388
Broj pozitivnih uzoraka (% pozitivnih uzoraka)		/	18 (51)	21 (60)
Srednja vrednost u pozitivnim uzorcima		22,78	0,227	0,413
Opseg koncentracija		13,39–29,65	0,034–1,04	0,031–3,30
Mediana		22,56	0,070	0,202

GD = 25 µg/kg

Tabela 4.12 Uticaj tradicionalnog načina skladištenja na produkciju fumonizina u kukuruзу

Promena koncentracije FB	Broj uzoraka (% pozitivnih uzoraka)	Sadržaj vlage (%)	
		Srednja vrednost	Opseg
Povećanje	19 (54)	22,09	13,39–29,65
Smanjenje	9 (26)	23,88	16,94–27,79
Bez promene	7 (20)	23,20	20,09–26,94

Rezultati ispitivanja uticaja skladištenja kukuruza na sadržaj FB u Srbiji su slični rezultatima dobijenim u drugim zemljama. Ispitivanja uticaja skladištenja tokom 12 meseci na rast plesni *Fusarium* sp. i produkciju fumonizina od strane Ono *et al.* (2002) pokazala su da je broj plesni opao, a da nije bilo značajne promene u produkciji toksina. Ovi uzorci kukuruza su bili osušeni na 11% i 14% vlage, te pomenuti autori smatraju da sušenje ima veliki značaj u očuvanju kvaliteta skladištenog kukuruza. Nakon 140 dana skladištenja u drvenim ambarima, Orsi *et al.* (2000) su zabeležili smanjenje broja kolonija *Fusariuma* sa tendencijom smanjenja srednje koncentracije FB₁, iako je koncentracija varirala. Ovi autori su napomenuli važnost veličine uzorka za procenu varijacije koncentracije fumonizina. Tradicionalni način skladištenja u Ugandi je uticao na dobro sušenje kukuruza (sa 19,2 na manje od 14% vlage u proseku za dva meseca skladištenja), a tokom šest meseci je i frekvencija fuzariumskih plesni značajno opala (za 31,9%). Takođe je i koncentracija fumonizina opala sa 5,7 na 2,8 mg/kg (Atukwase *et al.*, 2012). Prema ovim autorima, smanjenje sadržaja fumonizina je verovatno posledica spoljašnjih (temperatura i relativna vlažnost) i unutrašnjih (sadržaj vlage i jona metala) faktora koji imaju značajnu ulogu u razgradnji fumonizina. Međutim, za bolje razumevanje „sudbine“ fumonizina, neophodna su dalja istraživanja.

4.3.2 Prisustvo fumonizina i drugih mikotoksina u kukuruзу roda 2009. godine sa područja severne Srbije (Jakšić *et al.*, 2011a)

Uzorci kukuruza roda 2009. godine su prikupljeni tokom jeseni iste godine sa različitih lokaliteta u Bačkoj. Obzirom na tipične klimatske uslove za naše klimatsko područje u ovoj proizvodnoj godini, ispitivana je kontaminiranost kukuruza sa područja severne Srbije fumonizinima, drugim mikotoksinima i plesnima, kao i mogući uticaj klimatskih faktora na stepen kontaminacije.

Obzirom na literaturne podatke o uticaju vlažnosti zrna na rast plesni i produkciju toksina, ispitani uzorci su podeljeni u dve grupe, jednu u kojoj je sadržaj vlage bio $\leq 14\%$ i drugu u kojoj je bio $> 14\%$. Dobijeni rezultati mikološke i mikotoksikološke kontaminacije su prikazani u odnosu na sadržaj vlage (Tabele 4.13 i 4.14).

Tabela 4.13 Rezultati mikološke i mikotoksikološke analize uzoraka kukuruza kod kojih je sadržaj vlage $\leq 14\%$

Lokalitet	Sadržaj vlage (%)	Ukupan broj kolonija plesni (x1000/g)	Rod plesni	Ukupni aflatoksini ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Zearalenon ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ukupni fumonizini (mg/kg)
Veternik	11,19	30	Ab	2,25	ND	0,036
Čonoplja	11,77	20	Fu	ND	ND	0,057
Feketić	12,35	160	Fu	4,33	ND	ND
Lalić	12,81	80	Fu	ND	2,24	ND
Ruski Krstur	12,86	20	Fu	1,98	ND	ND
Mali Beograd	13,33	ND	ND	3,04	ND	0,040
Savino Selo	13,40	ND	ND	ND	ND	ND
Zmajevo	13,49	ND	ND	2,98	ND	ND
Lipar	13,47	ND	ND	ND	ND	ND
Stepanovićevo	13,65	8	Fu, Ab	2,08	ND	0,044
Temerin	13,71	220	Ab, Fu	ND	ND	0,143
Ravno Selo	13,71	ND	ND	ND	ND	ND
Bačka Topola	13,91	10	Mu	2,58	ND	ND
Silos 1	12,03	10	Mu	ND	2,43	ND
Silos 2	13,02	300	Ab, Fu	ND	2,94	1,520
Silos 3	11,98	10	Fu	ND	ND	0,098
Silos 4	12,27	100	Fu	ND	3,02	ND
Silos 5	12,60	230	Fu	ND	2,92	0,496
Silos 6	12,34	ND	ND	ND	3,32	0,262
Silos 7	12,56	ND	ND	ND	1,81	0,465
Srednja vrednost*	12,82	59,9		0,96	0,93	0,158
RSD	0,76	92,8		1,42	1,34	0,354
Srednja vrednost pozitivnih uzoraka		92,2		2,75	2,67	0,316
RSD pozitivnih uzoraka		102,0		0,81	0,53	0,457
% pozitivnih uzoraka		65,0	50 (Fu)	35,0	35,0	50,0
Opseg kontaminacije		8–300		1,98–4,33	1,81–3,32	0,036–1,52

ND - nije detektovano, Ab – *Absidia* spp.; Fu – *Fusarium* spp.; Mu – *Mucor* spp; GD za aflatoksin i zearalenon 1,75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i fumonizin 0,025 mg/kg ; *U slučaju gde je ND, pri izračunavanju je uzeto da je 0.

REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 4.14 Rezultati mikološke i mikotoksikološke analize uzoraka kukuruza kod kojih je sadržaj vlage > 14%

Lokalitet	Sadržaj vlage (%)	Ukupan broj kolonija plesni (x1000/g)	Rod plesni	Ukupni aflatoksini (µg/kg)	OTA (µg/kg)	Zearalenon (µg/kg)	Ukupni fumonizini (mg/kg)
Sombor	14,29	15	Fu, Ab	2,34	ND	ND	0,229
Rumenka	14,40	50	Fu, Ab	4,23	1,07	ND	0,430
Svetozar Miletić	14,55	ND		ND	ND	ND	ND
Sivac	14,23	8	Fu	ND	ND	ND	0,257
Odžaci	15,09	25	Fu, Ab	3,93	ND	ND	ND
Kisač	15,25	625	Ab, Pe, Fu	3,09	ND	1,79	ND
Vrbas	15,28	3	Fu	ND	ND	3,39	0,030
Bački Brestovac	15,68	70	Ab, Fu	ND	ND	ND	ND
Crvenka	16,61	ND		2,34	ND	ND	ND
Kucura	16,99	15	Fu	7,01	1,26	ND	ND
Kula	17,29	10	Fu	2,91	1,07	ND	ND
Despotovo	18,03	20	Fu, Pe, Ab	ND	ND	ND	1,440
Futog 1	16,54	10	Fu, Ab	ND	ND	ND	0,036
Futog 2	19,21	10	Fu, Ab, Pe	ND	ND	ND	0,396
Srednja vrednost*	15,96	61,5		1,85	0,24	0,37	0,201
RSD	1,53	163,4		2,21	0,48	0,99	0,389
Srednja vrednost pozitivnih uzoraka		71,7		3,69	1,13	2,59	0,403
RSD pozitivnih uzoraka		178,9		1,65	0,11	1,13	0,502
% pozitivnih uzoraka		85,7	78,6 (Fu)	50,0	21,4	14,3	50,0
Opseg kontaminacije		3–625		2,34–7,01	1,07–1,26	1,79–3,39	0,030–1,44

ND – nije detektovano, Ab – *Absidia* spp., Fu – *Fusarium* spp.; Mu – *Mucor* spp., Pe – *Penicillium* spp.

OTA – ohratoksin A

GD za aflatoksin i zearalenon 1,75 µg/kg; OTA 1 µg/kg i fumonizin 0,025 mg/kg

*U slučaju gde je ND, pri izračunavanju je uzeto da je 0.

U uzorcima sa višim sadržajem vlage, ustanovljena je signifikantno viša kontaminacija plesnima (85,7%) u odnosu na grupu sa nižim sadržajem vlage (65%), u kojima je bio i veći procenat uzoraka kontaminiranih *Fusarium* spp. Isto tako je ustanovljena veća frekvencija pozitivnih uzoraka i srednja vrednost sadržaja ukupnih aflatoksina i OTA pri višem sadržaju vlage. U ovoj grupi je nešto veća i srednja vrednost sadržaja fumonizina, iako je procenat pozitivnih uzoraka isti, a opseg koncentracija sličan. U slučaju kada je sadržaj vlage bio ≤ 14% ni u jednom uzorku nije detektovan OTA.

Ukoliko se analiziraju svi uzorci zajedno (Tabela 4.15), iako je u visokom procentu (73,5%) utvrđena kontaminacija plesnima (> 1000), u svega tri uzorka ukupan broj plesni je bio iznad maksimalno dozvoljenog broja, propisanog važećim Pravilnikom (Sl. glasnik RS, br 4., 2010a). U 64,7% uzoraka utvrđeno je prisustvo plesni iz roda *Fusarium*.

Tabela 4.15 Prosečni rezultati mikološke i mikotoksikološke analize uzoraka kukuruza

	Sadržaj vlage (%)	Ukupan broj kolonija plesni (x1000/g)	Rod plesni	Ukupni aflatoksini (µg/kg)	OTA (µg/kg)	Zearalenon (µg/kg)	Ukupni fumonizini (mg/kg)
Srednja vrednost	14,11	60,6		1,33	0,10	0,70	0,176
RSD	1,93	124,4		1,81	0,33	1,22	0,364
Srednja vrednost pozitivnih uzoraka		82,4		3,22	1,13	2,65	0,352
RSD pozitivnih uzoraka		139,3		1,33	0,11	0,61	0,46
% pozitivnih uzoraka		73,5	64,7 (Fu)	41,2	8,8	26,5	50
Opseg kontaminacije		3–625		1,98–7,01	1,07–1,26	1,79–3,39	0,030–1,52

Fu – *Fusarium* spp.; OTA – ohratoksin A

Može se zaključiti da su fuzariumske plesni i fumonizin najčešće detektovani, ali nema značajne korelacije ($r = 0,159$; $p = 0,418$) između broja plesni i pojave (sadržaja) toksina (Tabela 4.16), što je u skladu sa rezultatima drugih autora (Mngadi *et al.*, 2008). Takođe, zabeležena je kontaminacija toksinima u nekim uzorcima sa manje od 1000 kolonija plesni. Ovo se može objasniti time što su mikotoksini stabilna jedinjenja i mogu opstati u uslovima koji eliminišu plesni koje ih proizvode (Aldred *et al.*, 2004). Opstanak plesni zavisi i od mikrobiološke interakcije i kompeticije, odnosno moguće je da *Fusarium* spp. u uslovima niže vlažnosti inhibira rast *Aspergillus* spp. (Ono *et al.*, 2002), koje nisu izolovane.

Tabela 4.16 Distribucija ukupnog broja plesni i opseg kontaminacije fumonizinima po uzorcima kukuruza

Ukupan broj kolonija plesni (u 1 g)	Broj uzoraka	Broj uzoraka pozitivnih na fumonizin	Opseg koncentracije fumonizina (mg/kg)
< 1000	9	3	0,040–0,465
1000–200000	21	11	0,030–1,44
> 200000	4	3	0,143–1,52

Statističkom analizom je utvrđena značajna korelacija ($p < 0,05$) između sadržaja vlage i kontaminacije *Penicillium* spp. (0,55), *Absidia* spp. (0,35), kao i sadržaja vlage i OTA (0,35). Značajan je i koeficijent korelacije između kontaminacije sa OTA i aflatoksinima (0,61).

U 50% svih analiziranih uzoraka sadržaj fumonizina je bio iznad granice detekcije ELISA metode. Srednja vrednost sadržaja fumonizina u pozitivnim uzorcima je bila 0,352 mg/kg (opseg 0,030 – 1,52 mg/kg). Iako su fumonizini prisutni u kukuruza roda 2009. u Srbiji, ukupan sadržaj fumonizina je ispod maksimalno propisanih/preporučenih količina važećim Pravilnicima EU za ishranu ljudi (4 mg/kg; EC, 2007) i životinja (60 mg/kg; EC, 2006c). Kontaminirani uzorci sadrže i aflatoksine (41,2%), OTA (8,8%) i zearalenon (26,5%). Ni u jednom uzorku nije utvrđena koncentracija ispitivanih toksina iznad maksimalno propisanih/preporučenih vrednosti, ali ne treba izgubiti iz vida hroničan efekat niskih koncentracija toksina.

Dobijeni rezultati su upoređivani sa rezultatima dobijenim u Srbiji 2008. godine od strane drugih autora (Kokić *et al.*, 2009; Matić *et al.*, 2009). Rezultati za fumonizin 2009. godine su slični, dok je našim rezultatima utvrđena viša frekvencija pozitivnih uzoraka na aflatoksine, kao i na zearalenon i OTA, ali u nižoj koncentraciji.

Pošto su formiranje plesni i produkcija toksina uzrokovani faktorima sredine, dobijeni rezultati su diskutovani uzimajući u obzir vremenske uslove pre žetve i tokom žetve. Vegetacioni period 2009. godine je imao uslove uobičajene za klimu Srbije, koji su odstupali od uobičajenih najviše na teritoriji Vojvodine, tj. uslovi vlažnosti su imali karakter suše osim na krajnjem severu. Sredinom jula je bilo i viših temperatura od optimalnih (preko 35 °C) koje su mogle omesti protok faze svilanja kukuruza. Poslednji mesec vegetacije je karakterisalo toplo, suvo vreme (RHZS, 2009). Ovakvi sušni uslovi su verovatno uticali na manju produkciju toksina kojoj pogoduje aktivnost vode od 0,93, odnosno vlažnost od čak 25% (Sanchis i Magan, 2004). Niža produkcija fumonizina u suvljim uslovima sazrevanja je zaključak i naših prethodnih ispitivanja uzoraka iz 2001, odnosno 2002. godine (Jakšić, 2004). Nizak sadržaj fumonizina može se objasniti nedostatkom povoljnih uslova za razvoj plesni, jer je toplo i suvo vreme tokom žetve smanjilo vlažnost zrna.

Na važnost sadržaja vlage za kontrolu rasta plesni i kasniju produkciju fumonizina u fazi između žetve i sušenja ukazali su Ono *et al.* (2002). Sušenje odmah nakon žetve i adekvatni uslovi skladištenja, kao što je već bilo napomenuto, mogu minimizirati produkciju toksina. Dobijeni rezultati ispitivanja kukuruza iz silosa ukazuju na mogućnost dalje

produkcije toksina u silosu 2 (Tabela 4.13) zbog znatne kontaminacije verovatno toksigenim plesnima, obzirom na već produkovanu količinu fumonizina.

Rezultati ispitivanja uticaja promene klime na setvu, cvetanje i sazrevanje žitarica su pokazali najveći uticaj na kukuruz, a koliki je taj uticaj najbolje govori podatak da će se prema projekciji promene klime do 2040. godine, setva i sazrevanje obavljati i do 3 nedelje ranije (Olesen *et al.*, 2012).

4.3.3 Sadržaj fumonizina u pšenici i kukuruзу roda 2010. godine u Srbiji (Jakšić *et al.*, 2012)

Među mikotoksinima koje proizvode plesni *Fusarium* spp., fumonizini su obično prisutni u kukuruзу i proizvodima od kukuruза, dok je DON uobičajeni kontaminant pšenice. U literaturi postoje različita mišljenja o mogućnosti produkcije fumonizina na pšenici. Neki rezultati (Marin *et al.*, 1999) su pokazali da, iako producenti fumonizina rastu na ječmu i pšenici brže nego na kukuruзу, oni ne proizvode fumonizine u tim žitaricama. Proučavani izolati su bili poreklom iz kukuruза i moguća tumačenja su da plesni ne mogu da prilagode svoj metabolizam da proizvode fumonizin na drugim supstratima, ili da hranljive komponente iz pšenice i ječma deluju kao inhibitori sinteze fumonizina, odnosno da samo u kukuruзу postoje komponente koje imaju kapacitet da pokrenu biosintezu ovih toksina. Nasuprot ovim studijama, u literaturi postoje podaci koji ukazuju na značajan potencijal za kontaminaciju fumonizinima kod pšenice inficirane sa *F. proliferatum*, u sličnoj koncentraciji kao kod kukuruза (Sala *et al.*, 1994; Desjardins *et al.*, 2007). Shephard *et al.* (2005) su zaključili da je neophodno da se validovane metode za određivanje fumonizina u kukuruзу validuju i za određivanje fumonizina u pšenici, budući da matriks može da utiče na pojavu lažno pozitivnih rezultata, pre svega skrining metoda. Međutim, postoji nekoliko izveštaja u literaturi o prirodnoj kontaminaciji pšenice, durum pšenice i prehrambenih proizvoda bez kukuruза sa fumonizinima (Kushiro *et al.*, 2009; Palacios *et al.*, 2011; Cirillo *et al.*, 2003b). Preliminarna toksikološka analiza je pokazala da izolati *F. verticillioides* i *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg iz zrna pšenice u Srbiji imaju visok potencijal da proizvedu FB₁, a nedavno istraživanje u Srbiji je pokazalo visoku učestalost, kao i koncentracije FB₁ u zrnima pšenice roda 2005. i 2007. godine (Protić i Protić, 2005; Stanković *et al.*, 2012).

Kao što je u Teorijskom delu navedeno, novija istraživanja ukazuju da mikotoksini mogu imati sinergističke efekte *in vivo* (Javed *et al.*, 2005). Stoga je detekcija različitih

toksina koji su istovremeno prisutni u inficiranim žitaricama korisna da se bolje proceni rizik po zdravlje ljudi i životinja (Cirillo *et al.*, 2003b). Prethodni izveštaji su opisali prisustvo fumonizina u kukuruзу (Jakšić *et al.*, 2011a) i DON-a u pšenici (Jajić *et al.*, 2008), ali ima vrlo malo podataka o njihovoj istovremenoj pojavi u žitaricama u Srbiji (Stanković *et al.*, 2012).

Zbog značaja proizvodnje žitarica u Vojvodini za Srbiju, ispitivali smo prirodnu kontaminaciju 25 različitih sorti pšenice sa tri lokaliteta u Vojvodini fumonizinom i istovremenu pojavu fumonizina i DON-a u 24 skladištena uzorka kukuruza. U istim uzorcima je urađena mikološka analiza koja je pokazala da su plesni roda *Fusarium* bile najzastupljenije u svim uzorcima pšenice (Abramović *et al.*, 2012).

Sadržaj ukupnih fumonizina je određivan ELISA metodom, korišćenjem Ridascreen[®] test kita. Efikasnost kita je određena obogaćivanjem 5 g samlevene pšenice/kukuruza bez toksina (< 25 µg/kg) sa 800 µg FB₁/kg. Određivanje je rađeno u tri probe. Srednja vrednost prinosa fumonizina je bila 78±14% za pšenicu i 110±15% za kukuruz.

Sadržaj DON-a u kukuruзу je određen ELISA metodom, sa Ridascreen[®] test kitom. Ispitivanje efikasnosti određivanja je urađeno u tri probe, obogaćivanjem 5 g samlevenog kukuruza standardnim rastvorom DON-a, u koncentraciji 300 µg/kg. Srednja vrednost prinosa DON-a za kukuruz je bila 86±20%.

Dobijena efikasnost određivanja korišćenih metoda odgovarala je zahtevima za performanse metode prema EC (2006a), i time je potvrđeno da korišćene analitičke metode odgovaraju nameni. Dobijeni rezultati određivanja toksina nisu korigovani na osnovu dobijenog prinosa.

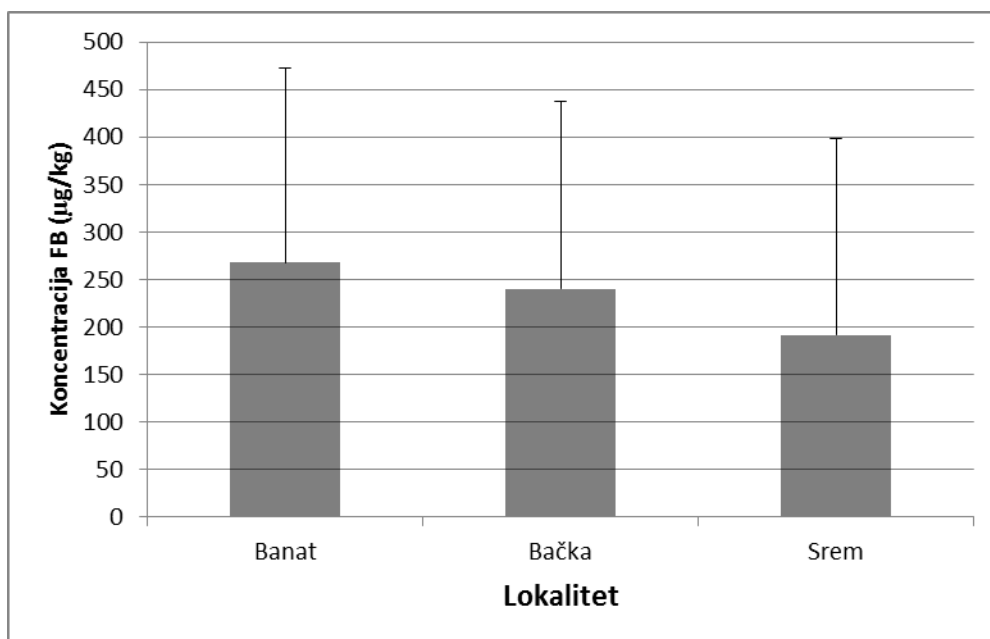
Rezultati ispitivanja ukupnih fumonizina u pšenici su prikazani u Tabeli 4.17 i na Slici 4.16. Fumonizini su nađeni u 52% uzoraka na sva tri lokaliteta. Srednje vrednosti koncentracije fumonizina su iznosile od 192 µg/kg u Sremu do 268 µg/kg u Banatu. U Bačkoj, nivo fumonizina je varirao od 38 do 614 µg/kg, u Banatu 32–586 µg/kg i u Sremu 27–548 µg/kg. U ukupno 36 uzoraka (48%) nije ustanovljeno prisustvo fumonizina, odnosno njihova koncentracija je bila ispod GD. Srednja vrednost sadržaja ukupnih fumonizina u pozitivnim uzorcima je iznosila 233 µg/kg, a količina fumonizina je bila u opsegu 27 do 614 µg/kg. U istim uzorcima nivo kontaminacije DON-om je bio viši nego fumonizinima (Jakšić *et al.*, 2012), a samo u jednom uzorku DON je bio iznad maksimalno dozvoljene vrednosti (1250 µg/kg) prema Pravilnicima EU i Srbije (EC 2006b; Sl. glasnik RS, 2014b).

Tabela 4.17 Sadržaj FB u uzorcima pšenice roda 2010. u Srbiji

Sorta	Lokacija/sadržaj FB ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
	Pančevo	Novi Sad	Sremska Mitrovica
Banatka	ND	ND	28
Bankuty 1205	ND	614	ND
San Pastore	ND	ND	ND
Bezostaja	385	310	ND
Libellula	81	ND	27
Zlatna Dolina	ND	38	ND
Sava	427	359	414
Partizanka	32	ND	ND
NovosadskaRana2	ND	ND	ND
Kragujevacka56	ND	69	50
Balkan	419	ND	ND
Jugoslavia	98	100	38
Skopljanka	ND	ND	ND
Lasta	ND	ND	263
Evropa 90	ND	102	ND
NovosadskaRana5	68	55	37
Pobeda	522	451	548
Renesansa	351	417	525
Pesma	72	84	78
Ljiljana	ND	ND	37
Cipovka	401	ND	ND
Dragana	36	ND	ND
Simonida	ND	441	394
NS 40S	586	ND	ND
Zvezdana	ND	86	52
Br. pozitivnih uzoraka (% pozitivnih uzoraka)	13 (52,0)	13 (52,0)	13 (52,0)
Srednja vrednost	268	240	192
Opseg	32–586	38–614	27–548
Medijana	351	102	52

ND - nije detektovano; GD 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Na osnovu ovih rezultata, ispitali smo postojanje eventualne korelacije između sadržaja fumonizina i DON-a, kao fuzarijumskih toksina. Statistička analiza je pokazala značajnu negativnu korelaciju ($p < 0,05$) samo između srednje vrednosti fumonizina i DON-a na tri lokaliteta (-0,46). Medijana za sadržaj DON-a u uzorcima iz Bačke i Srema je bila viša nego medijana za sadržaj fumonizina, dok je medijana za FB bila viša u Banatu. U 36% uzoraka pšenice, detektovana su oba toksina, DON i FB.



Slika 4.16 Koncentracije (srednja vrednost \pm SD) ukupnih fumonizina u uzorcima pšenice iz različitih regiona Srbije.

U Tabeli 4.18 predstavljeni su rezultati ispitivanja kontaminiranosti kukuruza sa fumonizinima i DON-om. Statistička analiza je pokazala da nema značajne korelacije ($p < 0,05$) između kontaminacije FB i DON-om, ali kao što se može videti na osnovu analize distribucije uzoraka kukuruza prema koncentracijama toksina (Tabela 4.19), uzorci sa višim sadržajem FB uglavnom imaju i viši sadržaj DON-a.

Tabela 4.18 Sadržaj FB i DON-a u uzorcima kukuruza roda 2010. u Srbiji

Toksin	Min (µg/kg)	Max (µg/kg)	Sr. vred (µg/kg)	Pozitivni/ ukup.br. uzoraka	Pozitivni uzorci (%)
FB	60	12800	1084	24/24	100,0
DON	154	16528	1263	22/24	91,7

FB-GD 25 µg/kg; DON-GD 18,5 µg/kg

Tabela 4.19 Distribucija uzoraka kukuruza prema sadržaju FB i odgovarajući srednji sadržaj DON-a

Sadržaj FB (µg/kg)	Broj uzoraka*	Srednja vrednost sadržaja DON-a (µg/kg)
< 100	5	551
100 – 1000	13	427
1000 – 4000	4	1264

* bez dva odbačena uzorka (Nalimov test)

Iako su FB prisutni u 100% uzoraka kukuruza i u višim koncentracijama nego što su ranije zabeležene (Jakšić, 2004), ukupan sadržaj FB je ispod maksimalne vrednosti predložene od strane EU za ishranu životinja (60000 µg/kg), i u samo jednom od uzoraka kukuruza FB su iznad maksimalno propisane vrednosti za ljudsku ishranu (4000 µg/kg), prema regulativi u Srbiji i EU. Sadržaj DON-a je bio u tri uzorka kukuruza (12,5%) iznad maksimalnog nivoa za neobrađen kukuruz (1750 µg/kg).

Vremenski uslovi u Srbiji 2010. godine su se razlikovali od uobičajenih klimatskih karakteristika. Proizvodna godina je bila toplija i mnogo vlažnija kao što će kasnije biti detaljno prikazano. Ovo je značajno uticalo na proizvodnju poljoprivrednih proizvoda. Leto 2010. u Srbiji je bilo veoma toplo i ekstremno toplo, dok su padavine u severnoj Srbiji bile značajno iznad normale i ekstremne. U maju, temperature su bile u normali, dok su padavine u Vojvodini bile ekstremno iznad normale. U junu, julu i avgustu je bilo veoma toplo i avgust je ponovo bio ekstremno kišan (RHZS, 2010). Rezultati pokazuju da su ovakvi uslovi na polju favorizovali razvoj plesni i produkciju toksina. U poređenju sa rezultatima iz 2004, 2005, 2006. i 2007. godine (Jajić *et al.*, 2008), kada su padavine i srednje temperature bile u nivou dugoročne srednje vrednosti, za žetvu 2010. se može reći da je frekvencija i nivo kontaminacije DON-om veća. Vlažni uslovi pre žetve su verovatno uzrokovali veću frekvenciju i viši sadržaj FB u kukuruzu roda 2010. u poređenju sa rodom 2009. godine u Srbiji. Treba napomenuti da je u ovim ispitivanjima kukuruz uzorkovan nakon skladištenja, dok je 2009. uzorkovan neposredno nakon berbe. To znači da su osim vremenskih uslova, neadekvatno sušenje pre skladištenja i uslovi skladištenja mogli uticati na viši nivo kontaminacije uzoraka roda 2010.

Ispitivanjem pšeničnog brašna iz supermarketa u Novom Sadu, Škrbić *et al.* (2012) nisu detektovali prisustvo fumonizina. Ovo se može tumačiti time da se obradom, odnosno mlevenjem smanjuje koncentracija fumonizina (Pitt *et al.*, 2013) ili da nije bio u pitanju rod

iz iste godine. Rezultati kontaminacije pšenice prikazani u doktorskoj disertaciji su nešto drugačiji nego rezultati roda 2005. i 2007. žetvene godine (Stanković *et al.*, 2012), iako se samo nekoliko lokacija i sorti poklapaju u oba istraživanja. Naši rezultati pokazuju nižu frekvenciju oba ispitivana fuzarijumskih toksina kao i niži nivo kontaminacije. S druge strane, frekvencija pozitivnih uzoraka u našem istraživanju je slična sa ispitivanjima pšenice istih autora iz 2008. i 2009. godine kada su zabeležili 55,1, odnosno 66,1% pozitivnih uzoraka i zaključili da više prolećne i letnje temperature, kao i količina padavina pospešuju produkciju fumonizina na pšenici (Stanković *et al.*, 2011).

Dobijeni rezultati su uporedivi sa podacima predstavljenim od strane Chehry *et al.* (2010) za skladištenu pšenicu u Iranu. Koncentracije FB dobijene u ovom istraživanju su niže od detektovanih u Srbiji i iznose 12–155 µg/kg, ali je frekvencija uzoraka kontaminiranih sa FB nešto viša: 68,2% za B₁, 42,6% za B₂ i 31,7% za B₃. Kushiro *et al.* (2009) su detektovali FB u pšenici u Japanu i našli da su količine bile niže od onih koje su generalno prisutne u kukuruzu. Oni su takođe naglasili važnost identifikacije vrsta plesni u pšenici. U preglednom istraživanju o prisustvu FB i DON-a u Turskoj, navedeno je da su ovi toksini detektovani u kukuruzu, ali ne i u pšenici (Omurtag *et al.*, 2007). U ispitivanju mikotoksina u 22 uzorka različitih sorti pšenice u Pakistanu, FB nije detektovan, dok je DON nađen u količini od 100 µg/kg u 12 uzoraka 6 različitih sorti (Sahar *et al.*, 2009). Frekvencija pojave DON-a i nivoi u proizvodima od pšenice i kukuruza za ishranu ljudi u Italiji, su bili mnogo viši nego za FB₁ i FB₂ (Cirillo *et al.*, 2003a). Dobijene koncentracije fumonizina u pšenici u Hrvatskoj su iznosile 182,0–446,6 µg/kg, a 100% uzoraka je bilo kontaminirano i pored primene različitih fungicida (Ivic *et al.*, 2009). U Bosni i Hercegovini je ispitivan sadržaj fumonizina u ječmu, a dobijene koncentracije su bile veoma niske tj. 1,01 do 5,35 µg/kg (Ivic *et al.*, 2011), što je autore navelo na zaključak da ječam nije pogodan supstrat za produkciju fumonizina, čak ni pri visokim kontaminacijama sa fuzarijumskim plesnima. Ako se porede rezultati različitih istraživanja, neophodno je uzeti u obzir različite karakteristike analitičkih metoda koje imaju i različite GD, posebno ako se govori o tome da li je nešto bilo moguće detektovati, kao i različite klimatske uslove o čemu će biti više reči u poglavlju 4.3.5.

Naše istraživanje ukazuje na značajno prisustvo FB i DON-a u žitaricama u Srbiji. Rezultati roda 2010. su interesantni jer su u toj proizvodnoj godini, kao što je već bilo napomenuto bili neuobičajeni vremenski uslovi za klimu u Srbiji te su uticali na poljoprivrednu proizvodnju. Iako su mikotoksini prisutni, može se zaključiti da su ispitivane sorte pšenice u Srbiji dobro prilagođene životnoj sredini čak i pri većim promenama klime, uključujući sušu i ekstremno vlažne uslove.

4.3.4 Prisustvo fumonizina i aflatoksina u kukuruza roda 2012. godine

Istovremena pojava više toksina u kukuruza je uobičajena naročito u područjima u svetu sa toplim i vlažnim klimatskim uslovima. Dve studije o ispitivanju istovremene kontaminacije sa aflatoksinima i fumonizinima u uzorcima kukuruza iz dve oblasti sa visokim rizikom oboljevanja od hepatocelularnog karcinoma kod ljudi su sprovedene u Kini (Ueno *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2001). Ove studije su pokazale visoku kontaminaciju kukuruza aflatoksinima i fumonizinima, kao i da su nivoi fumonizina 10–50 puta veći nego u oblasti niskog rizika od oboljevanja (Ueno *et al.*, 1997). Takođe, visok procenat uzoraka kukuruza je bio istovremeno kontaminiran (14/20) aflatoksinom B₁ i FB₁. U Indiji su uzorci sa vlažnog područja imali višu koncentraciju fumonizina i aflatoksina B₁. Međutim, nije uočena korelacija između koncentracija dva toksina u pojedinačnim uzorcima, što ukazuje na to da se toksini formiraju nezavisno (Vasanthi i Bhat, 1998).

Obzirom na izuzetno ekstremne klimatske uslove tokom 2012. godine u Srbiji, zabeležena je neočekivana i neuobičajeno visoka kontaminacija kukuruza aflatoksinima (Škrinjar *et al.*, 2013). U cilju ispitivanja eventualne korelacije između sadržaja FB i aflatoksina, u određenom broju uzoraka kukuruza iz ove proizvodne godine (Tabela 4.20), analizirani su paralelno ovi mikotoksini.

Tabela 4.20 Sadržaj fumonizina i aflatoksina u uzorcima kukuruza roda 2012. u Srbiji

Toksin	GD (µg/kg)	Min (µg/kg)	Max (µg/kg)	Sr. vred. (µg/kg)	Pozitivni/ ukup. br. uzoraka	Pozitivni uzorci (%)
FB	25	44	20340	2280	67/67	100
Aflatoksini	1,75	2,11	156	37,36	41/67	61

Iako je frekvencija pozitivnih uzoraka bila veća u slučaju FB, koncentracija nije prelazila 21 mg/kg, što je u okviru regulisanih vrednosti za ishranu životinja (EC, 2006c). Nasuprot FB, manji procenat uzoraka je sadržavao aflatoksine iznad GD, ali je 14 uzoraka (21%) bilo neupotrebljivo za ishranu životinja tj. sa koncentracijom ukupnih aflatoksina od preko 50 µg/kg, koja je u tom trenutku bila maksimalno dozvoljena za hraniva prema važećem Pravilniku u Srbiji (Sl. glasnik RS, br. 4, 2010a). Naime, prema novim propisima (Sl. glasnik RS, br. 27, 2014a), maksimalan dozvoljeni sadržaj aflatoksina B₁ u hranivima je 30 µg/kg. Istraživanja drugih autora o aflatoksinu u kukuruza roda 2012. godine u Srbiji su

dala slične rezultate: 56% pozitivnih uzoraka a 15,4% uzoraka sa koncentracijom od preko 50 µg/kg, sa maksimalnom koncentracijom od 145,8 µg/kg (Škrinjar *et al.*, 2013).

Linearna regresiona analiza je pokazala da nema značajne korelacije između kontaminacije FB i aflatoksina ($r = -0,065$; $p = 0,060$).

Sadržaj fumonizina i ostalih mikotoksina u pšenici roda 2012. u Srbiji. Obzirom da su klimatski uslovi 2012. proizvodne godine u Srbiji pogodovali razvoju plesni i produkciji fumonizina i aflatoksina u kukuruзу, prikupljeni su uzorci pšenice u cilju ispitivanja moguće produkcije ovih toksina i na pšenici.

Dobijeni rezultati su pokazali da su ispitani uzorci pšenice bili kontaminirani mikotoksinima u malom procentu i u niskim koncentracijama (Tabela 4.21). Od osam ispitanih uzoraka na samo jednoj lokaciji su detektovani fumonizini, i to u koncentraciji od 83 µg/kg što je tri puta niže od srednje koncentracije 2010. godine. Iako treba istaći značajno manji broj ispitanih uzoraka u 2012. godini, može se još jednom zaključiti da su vlažni uslovi tokom 2010. uticali na višu kontaminaciju pšenice kako fumonizinima tako i DON-om u odnosu na sušnu 2012. godinu. Nadalje, u svega po jednom uzorku su detektovani aflatoksini i T2 toksin, dok OTA i zearalenon nisu detektovani (GD OTA 5 µg/kg, tj. GD zearalenona 25 µg/kg). Ispitivanja svih mikotoksina su rađena ELISA metodama.

Tabela 4.21 Sadržaj fumonizina i drugih mikotoksina u pšenici roda 2012. godine

Lokalitet	Sadržaj toksina (µg/kg)			
	FB	Ukupni aflatoksini	DON	T2 toksin
Zmajevo	ND	ND	289	ND
Rumenka	ND	ND	407	62
Čenej	ND	2,90	ND	ND
Bač	ND	ND	ND	ND
Lovćenac	83	ND	ND	ND
Brestovac	ND	ND	ND	ND
Temerin	ND	ND	ND	ND
Čurug	ND	ND	ND	ND

FB-GD 25 µg/kg; Ukupni aflatoksini GD 1,75 µg/kg;
DON-GD 74 µg/kg; T2 toksin GD 50 µg/kg

4.3.5 Uticaj klimatskih faktora na produkciju fumonizina u žitaricama u Srbiji

Osim analize sadržaja fumonizina u uzorcima kukuruza roda 2005, 2009, 2010 i 2012. godine kao što je prikazano u prethodnim poglavljima 4.3.1–4.3.4 analizirani su i uzorci kukuruza roda 2011. i 2013. godine. Uvid u kontaminiranost kukuruza fumonizinima u Srbiji može se steći na najbolji način prezentacijom podataka za sve ispitivane uzorke u dužem vremenskom intervalu (Tabela 4.22).

Na osnovu iznetih rezultata istraživanja može se zaključiti da od ukupno 235 analiziranih uzorka kukuruza, koncentracija fumonizina u svega 11 uzoraka kukuruza prelazi maksimalnu dozvoljenu količinu fumonizina (4 mg/kg) za sirovi kukuruz za ishranu ljudi prema važećim Pravilnicima (Sl. glasnik RS, br. 29, 2014b; EC, 2010). Obzirom na visoku maksimalno dozvoljenu granicu fumonizina u kukuruzu za ishranu životinja od 60 mg/kg, svi ispitani kukuruzi su odgovarali evropskim preporukama (EC, 2006c). Treba naglasiti da su svi ispitani uzorci bili namenjeni za ishranu životinja. Neki od uzoraka su uzorkovani u cilju monitoringa i redovne kontrole iz skladišta silosa i mešaona hrane za životinje, a neki su bili povezani sa kliničkim problemima na terenu, te su pod sumnjom na mikotoksine, uzorkovani od strane veterinara.

Kao što je već napomenuto, u literaturi nema mnogo istraživanja drugih autora na temu prisustva fumonizina u kukuruzu u Srbiji. Stanković *et al.* (2011) su od 203 ispitana uzorka kukuruza u periodu od oktobra 2007. do juna 2009. godine, fumonizin detektovali u 70,7% uzoraka. Koncentracija FB₁ je varirala u opsegu 0,75–4,9 mg/kg sa srednjom vrednošću od 1,226 mg/kg. Varijacije u koncentraciji fumonizina autori su objasnili različitom otpornošću biljke, kao i stresom usled suše i napada insekata tokom ispitivanog perioda. Naime, najveća frekvencija pozitivnih uzoraka je bila 2007. godine (80,1%) kada su zabeležene visoke temperature vazduha, ali i suša. Kos *et al.* (2014) su ispitivanjem 90 uzoraka kukuruza roda 2012. godine utvrdili da su svi ispitivani uzorci bili kontaminirani fumonizinima i to u koncentraciji 0,5004 do 3,020 mg/kg, a osim toga, u jednom uzorku kukuruza je utvrđena koncentracija fumonizina bila iznad Pravilnikom maksimalno propisane vrednosti od 4 mg/kg. Ovi autori su zaključili da je toplo i suvo vreme 2012. godine pogodovalo produkciji fumonizina.

Tabela 4.22 Sadržaj fumonizina u kukuruzu 2005. godine i u periodu 2009–2013.

Godina	Broj uzoraka	Broj pozitivnih uzoraka	Broj neispravnih uzoraka [§]	Srednja vrednost (mg/kg)*		Koncentracija u pozitivnim uzorcima (mg/kg)		
		(% pozitivnih uzoraka)	(% neispravnih uzoraka)	Donja granica	Gornja granica	Srednja vrednost	Opseg	Mediana
2005	35	18 (51)	–	0,117	0,129	0,227	0,034–1,04	0,070
2009	34	17 (50)	–	0,176	0,188	0,350	0,030–1,52	0,229
2010	24	24 (100)	1 (4)	1,084	1,084	1,084	0,060–12,80	0,216
2011	17	15 (88)	1 (6)	1,316	1,319	1,492	0,117–13,22	0,689
2012	78	76 (97)	8 (10)	2,171	2,172	2,229	0,044–20,34	1,165
2013	47	46 (98)	1 (2)	0,657	0,658	0,672	0,031–4,22	0,309
Ukupno	235	196 (83)	11 (5)	0,920	0,925	1,009	0,030–20,34	0,401

[§]sa sadržajem fumonizina > 4 mg/kg

* Prilikom izračunavanja srednje vrednosti sadržaja u uzorcima u kojima je koncentracija bila ispod granice detekcije (GD 25 µg/kg) je uzeto da imaju vrednost nula (donja granica) ili da su na samoj granici (gornja granica).

Slična istraživanja su zabeležena i u susednim državama: Hrvatskoj, Mađarskoj, Rumuniji i Bugarskoj. Podaci iz 1992. godine pokazuju da je 58% uzoraka bilo pozitivno na FB₁ i 21% na FB₂ u Hrvatskoj, odnosno 50% na FB₁ i 17% na FB₂ u Rumuniji (Doko *et al.*, 1995). Međutim, sadržaj fumonizina je bio niži nego zabeležen u Srbiji, srednja vrednost sadržaja FB₁ u pozitivnim uzorcima je bila 0,020 mg/kg (opseg 0,010–0,060 mg/kg) u Hrvatskoj i 0,010 mg/kg (opseg 0,010–0,020 mg/kg) u Rumuniji, dok su vrednosti za FB₂ bile 0,010 mg/kg u obe države. Suprotno ovome, prema podacima Jurjević *et al.* (1999) i Domijan *et al.* (2005), frekvencija kontaminacije fumonizinima (FB₁+FB₂) u Hrvatskoj 1996, 1997. i 2002. je bila značajno viša, u procentu 99%, 93% i 100%, redom. Srednja vrednost ukupnih fumonizina u pozitivnim uzorcima 1996. je bila 0,645 mg/kg, 1997. 0,134 mg/kg, a 2002. godine 0,4598 mg/kg FB₁, uz tri uzorka (od 49 ispitanih) pozitivna na FB₂ u koncentracijama od 0,0684; 0,1092 i 3,084 mg/kg. Prema analizama kukuruza iz 2007. godine, (Šegvić Klarić *et al.*, 2009), dokazan je zearalenon u 91,9%, fumonizini u 27%, a OTA u 16,2 % uzoraka u prosečnim koncentracijama od 0,3183 mg/kg, odnosno 3,690 i 0,0098 mg/kg.

Sadržaj fumonizina je analiziran u proizvodima od kukuruza 1997. u Mađarskoj (Varga *et al.*, 2004). Fumonizini su detektovani u 67% uzoraka, iako je nivo kontaminacije bio veoma nizak (0,016–0,058 mg/kg).

U susednoj Bugarskoj je analiziran kukuruz na fumonizin i zearalenon, obzirom na klimatske uslove pogodne za fuzarijumske plesni (Manova i Mladenova, 2009). Svega 21% uzoraka kukuruza roda 2007. je bilo pozitivno na zearalenon, a 94,7% na fumonizin u opsegu 0,249–4,050 mg/kg, sa prosečnom vrednošću od 1,150 mg/kg, dok je prema podacima iz 2001. godine 50% uzoraka sadržalo 0,03–6,56 mg/kg fumonizina.

Ispitivanjem prisustva fuzarijumskih mikotoksina u žitaricama u Hrvatskoj, Pleadin *et al.* (2013) su zaključili da je kukuruz najkontaminiranija žitarica, a da je najveći procenat svih analiziranih uzoraka žitarica bio kontaminiran DON-om, zatim zearalenonom, fumonizinom i na kraju T2 toksinom. Međutim najveći procenat uzoraka kukuruza je bio kontaminiran fumonizinima (90%), sa srednjom koncentracijom od 1,756 mg/kg, dok je 39% uzoraka pšenice bilo kontaminirano fumonizinima, a 65% DON-om. Ovi uzorci su bili iz 2011. godine koja je bila toplija i suvlja te autori time tumače generalno manju produkciju fumonizina u odnosu na 2010. godinu (90% pozitivnih i 4,509 mg/kg srednja koncentracija), koja je bila hladna i vlažna (Pleadin *et al.*, 2012).

U periodu 1988–1992. godine sadržaj fumonizina u kukuruзу u Ajovi (USA) je malo varirao, s tim što je najviši nivo od 0,0379 mg/g bio u najsušnijoj 1989. godini (Murphy *et al.*, 1993), a znatno niži nivo 0–0,0016 mg/g 1992, kada je sezona rasta bila izrazito hladna i vlažna (Rice i Ross, 1994).

Dobijene rezultate višegodišnjeg ispitivanja sadržaja fumonizina u Srbiji (Tabela 4.22) smo poredili sa rezultatima prikazanim u studijama FAO/WHO (2011a) prikazanim u poglavlju 2.2.2 (Tabela 2.3), a koji su dobijeni sumiranjem rezultata analize 7060 uzoraka iz celog sveta. Može se videti da je u Srbiji prema našim ispitivanjima zabeležen veći procenat pozitivnih uzoraka i to 83% u odnosu na 76%. Međutim, srednja vrednost sadržaja fumonizina u Srbiji je niža (0,925 u odnosu na 1,625 mg/kg, ako se gleda gornja granica).

Na osnovu prikazanog pregleda može se uočiti da klimatski uslovi veoma doprinose formiranju *F. moniliforme* i *F. proliferatum*, a samim tim i pojavi fumonizina u kukuruзу. Razlike u nivoima kontaminacije kukuruза i pšenice, mogu biti povezane sa agrikulturološkim faktorima i delimično sa varijacijom u osetljivosti kultura prema *Fusarium* vrstama u interakciji sa klimatskim prilikama. Isto tako, neophodno je voditi računa i o primenjenoj metodi za analizu fumonizina, budući da su im granice detekcije različite, a samim tim će i procenat kontaminiranih uzoraka biti različit.

Prema RHMZS (Republički hidrometeorološki zavod Srbije), vlažan vegetacioni period za klimatske uslove Srbije je okarakterisao 2005. godinu. Toplotni uslovi za rast i razviće poljoprivrednih kultura su okarakterisani kao dobri. Suficit padavina u julu je bio posebno izražen u severnoj polovini Republike u odnosu na južnu. Od 15. jula došlo je do postepene stabilizacije vremenskih prilika. Iako je početkom avgusta meseca bilo nekoliko vrlo toplih dana ($t > 30\text{ }^{\circ}\text{C}$), sledile su i veoma velike količine padavina u avgustu i sveže vreme. U prvoj polovini septembra su zabeleženi povoljni uslovi za dozrevanje plodova poljoprivrednih kultura i radove u polju, a nakon toga vlažno i znatno svežije vreme.

Vegetacioni period 2009. godine je, prema izveštaju RHMZS, imao toplotne uslove koji su malo odstupali od uobičajenih. Tokom letnjeg perioda priliv padavina bio je neravnomeran. Odstupanje je bilo najveće na teritoriji Vojvodine, gde su uslovi vlažnosti u ovom periodu imali karakter suše, a na području zapadnog Srema i ekstremne suše. Izuzetak je krajnji sever Vojvodine gde su uslovi vlažnosti bili normalni. Toplo i suvo vreme pogodovalo je pojavi mnogih biljnih štetočina. Poslednja dekada juna i prva jula, ostaće zapamćene po obilnim i svakodnevnim padavinama. Od sredine jula nastupilo je lepo i sunčano vreme. Sredinom jula bilo je i viših temperatura od optimalnih (preko $35\text{ }^{\circ}\text{C}$) koje su

mogle omesti odvijanje faza metličanja, prašenja polena, svilanja i oplodnje kod kukuruza. Suv i topao period nastavljen je i u prvoj dekadi avgusta.

Prema RHMZS, proizvodna 2010. godina bila je nešto toplija (za 1,3 °C), ali i znatno vlažnija, sa 40% većim prilivom padavina u odnosu na višegodišnji prosek (1971–2000). To je u značajnoj meri ometalo poljoprivrednu biljnu proizvodnju. Letnji period je, takođe, imao povećan priliv padavina. U Vojvodini je zabeležen suficit padavina i jako povećana vlažnost. Vegetacioni period 2010. godine imao je toplotne uslove koji su malo odstupali od uobičajenih, međutim jun je obeležen ekstremima u temperaturnom smislu i što se tiče padavina. Druga dekada meseca bila je veoma topla, maksimalne temperature su dostizale vrednosti između 30 i 35 °C. Veoma vlažno vreme sa velikom količinom padavina (60% više od višegodišnjeg mesečnog proseka) i malim brojem sunčanih dana nije pogodovalo jarim usevima. Jul, kao kritičan mesec za vegetaciju jarih useva karakterisalo je toplo vreme i manje padavina u odnosu na prvi deo vegetacionog perioda. Umereno toplo vreme, nešto manje padavina i veliki broj sunčanih sati tokom septembra, odnosno pri kraju proizvodne 2009/2010. godine, povoljno su delovali na procese konačnog zrenja.

Proizvodna 2011. godina, prema RHMZS je bila nešto toplija, za 1,3 °C, sa 17% manjim prilivom padavina u odnosu na višegodišnji prosek (1971–2000. godina). To je u izvesnoj meri ometalo poljoprivrednu biljnu proizvodnju. Poslednji mesec perioda vegetacije, septembar, karakterisalo je znatno toplije vreme od uobičajenog sa izraženim deficitom padavina. Veliki broj sunčanih dana, visoke temperature vazduha i nedostatak obilnijih padavina uticali su na ubrzano zrenje većine ratarskih kultura. Uslovi vlažnosti, su na većem delu teritorije Srbije imali karakter suše. Može se reći da je na slabiji kvalitet i kvantitet prinosa kukuruza uticala nepovoljna kombinacija toplotnih uslova i uslova vlažnosti u periodima godine bitnim za formiranje ploda. Toplo vreme pogodovalo je aktivnosti biljnih štetočina. Nedostatak padavina i visoke temperature vazduha u periodu od 20. juna do 20. jula veoma su se loše odrazile u kritičnim fazama razvoja glavnih prolećnih poljoprivrednih kultura. Do kraja druge dekade jula maksimalne temperature su bile od 30 °C do 35 °C, ali je ponegde zabeleženo i više, 38 °C i 39 °C. Metličanje, svilanje i oplodnja kod kukuruza počeli su ranije i proticali su pod ekstremno nepovoljnim agrometeorološkim uslovima. Vremenske prilike u septembru su uticale da se ranije obavi berba.

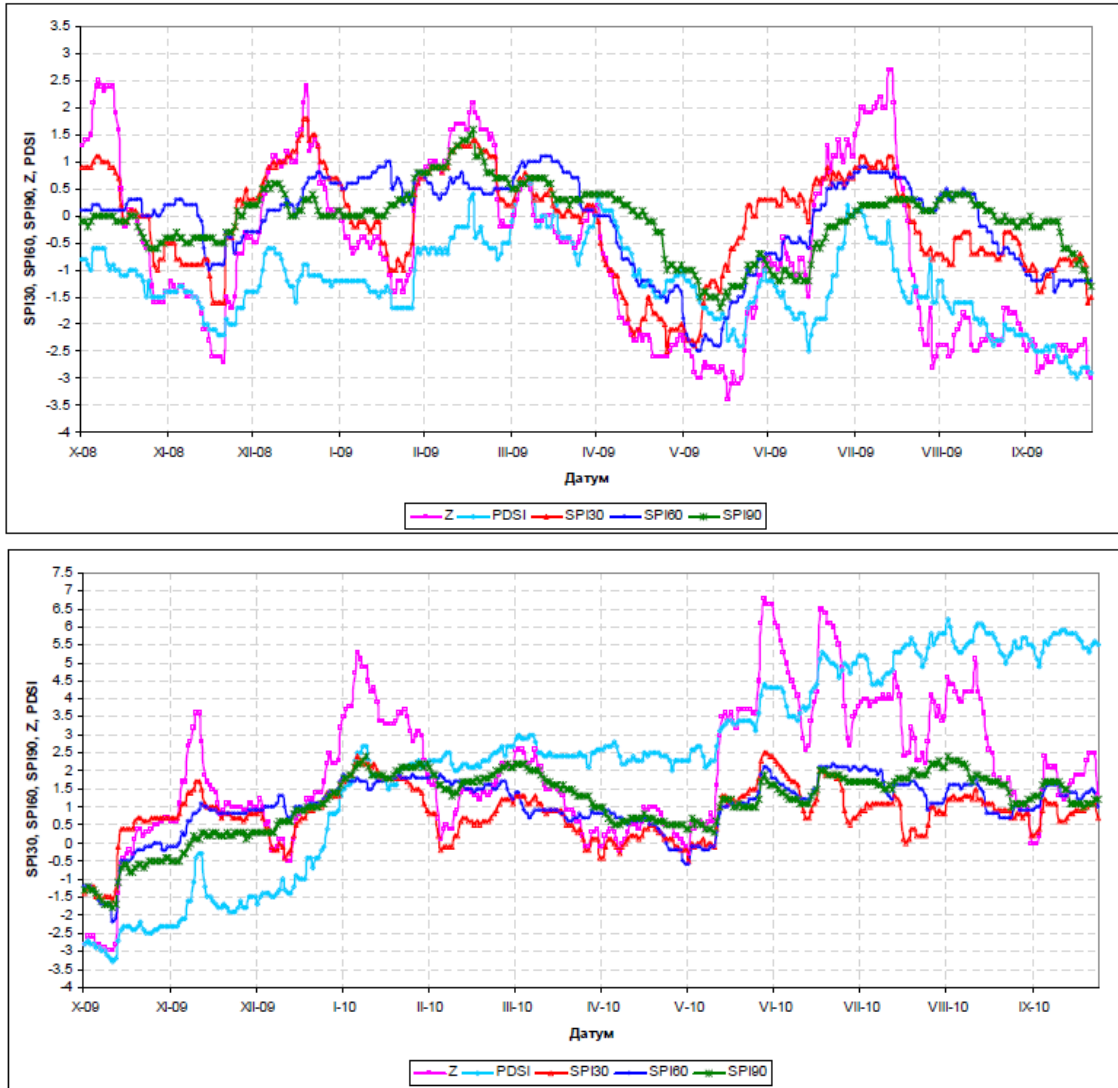
Poizvodnu 2012. godinu u Srbiji karakterisali su brojni hidrometeorološki ekstremi, od hladnih i toplotnih talasa do jake i dugotrajne suše. U Srbiji su od juna do avgusta 2012. godine zabeležena tri toplotna talasa. Pozitivna odstupanja maksimalne dnevne temperature od višegodišnjeg proseka iznosila su i do 13 °C. Dugotrajne, veoma visoke temperature

vazduha u junu, julu i avgustu 2012. godine i veliki deficit padavina prouzrokovali su jaku i ekstremnu sušu na većem delu teritorije Srbije, posledica je bila ubrzano zrenje većine ratarskih kultura. Na slabiji kvalitet i kvantitet prinosa je, pored nepovoljne kombinacije toplotnih uslova i uslova vlažnosti u periodima godine koji su se poklapali sa osetljivim fazama razvoja poljoprivrednih kultura, uticala i nedovoljna primena odgovarajućih agrotehničkih mera. Povoljni su bili uslovi za infekciju fuzarijumom i visoku brojnost štetočina. Vremenski uslovi početkom i sredinom jula, kao što su nedostatak vlage i temperature vazduha preko 35 °C ometali su metličenje, svilanje i oplodnju kod kukuruza. Nasuprot tome biljne štetočine su imale idealne uslove za svoj razvoj i aktivnost. U tom periodu najnepovoljnija situacija bila je u Vojvodini gde je zabeleženo svega 25% prosečnih padavina. Od svih poljoprivrednih kultura najugroženiji je bio kukuruz, koji je već krajem avgusta bio pred berbom.

Proizvodna 2013. godina imala je izvesna odstupanja u odnosu na prosečne karakteristike. Bila je toplija, letnja suša je trajala od sredine jula do kraja druge dekade avgusta. Osim količine bio je nepovoljan i raspored padavina tokom leta. Poslednji mesec perioda vegetacije, septembar, karakterisalo je uobičajeno toplo vreme sa prosečnim količinama padavina. Niska relativna vlaga vazduha i visoke temperature vazduha predstavljali su problem za kukuruz koji se krajem jula nalazio u osetljivoj fazi razvoja. Suvo i toplo vreme pogodovalo je biljnim štetočinama.

Iz ovog pregleda vremenskih prilika u toku proizvodnih godina ispitivanih u ovoj disertaciji, možemo zaključiti da su 2005. i 2009. godina imale klimu koja je najmanje odstupala u odnosu na višegodišnji prosek. Iako je i tokom ovih godina bilo nekih odstupanja, u pogledu temperature i padavina (Slike 4.17–4.19A), ona nisu znatnije uticala na poljoprivrednu proizvodnju. Ovakva prosečna klimatska obeležja nisu uticala na značajniju kontaminaciju fumonizinima, te je frekvencija pozitivnih uzoraka bila oko 50%. Sa druge strane, 2010. godina je imala znatno odstupanje u pogledu, pre svega, viška padavina (Slike 4.17 i 4.18), ali su temperaturni uslovi bili u nivou proseka (Slika 4.19B). Ovakvi vremenski uslovi su očigledno povećali procenat pozitivnih uzoraka na fumonizin, ali i srednju vrednost koncentracije u pozitivnim uzorcima (1,084 mg/kg; Tabela 4.22).

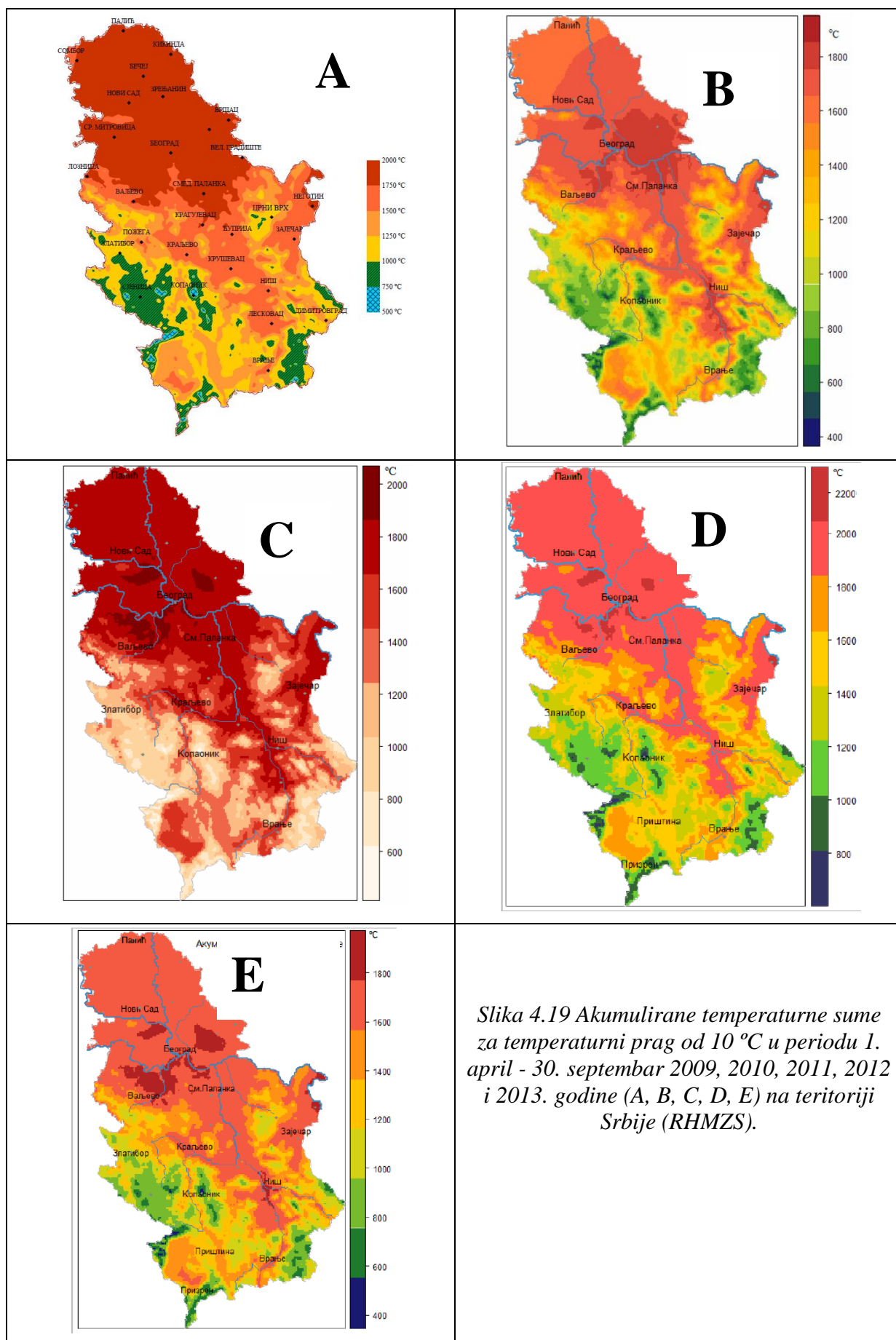
Od 2011. do 2013. imali smo sušne proizvodne godine, sa izrazitim klimatskim promenama 2012. godine. Suša (Slike 4.18 i 4.20) i visoke temperature (Slika 4.19C–E) su očigledno veoma pogodovala produkciji fumonizina, te je pored visokog procenta pozitivnih uzoraka i koncentracija bila viša u odnosu na prethodne godine (2,229 mg/kg), sa čak 10% uzoraka sa više od 4 mg/kg.



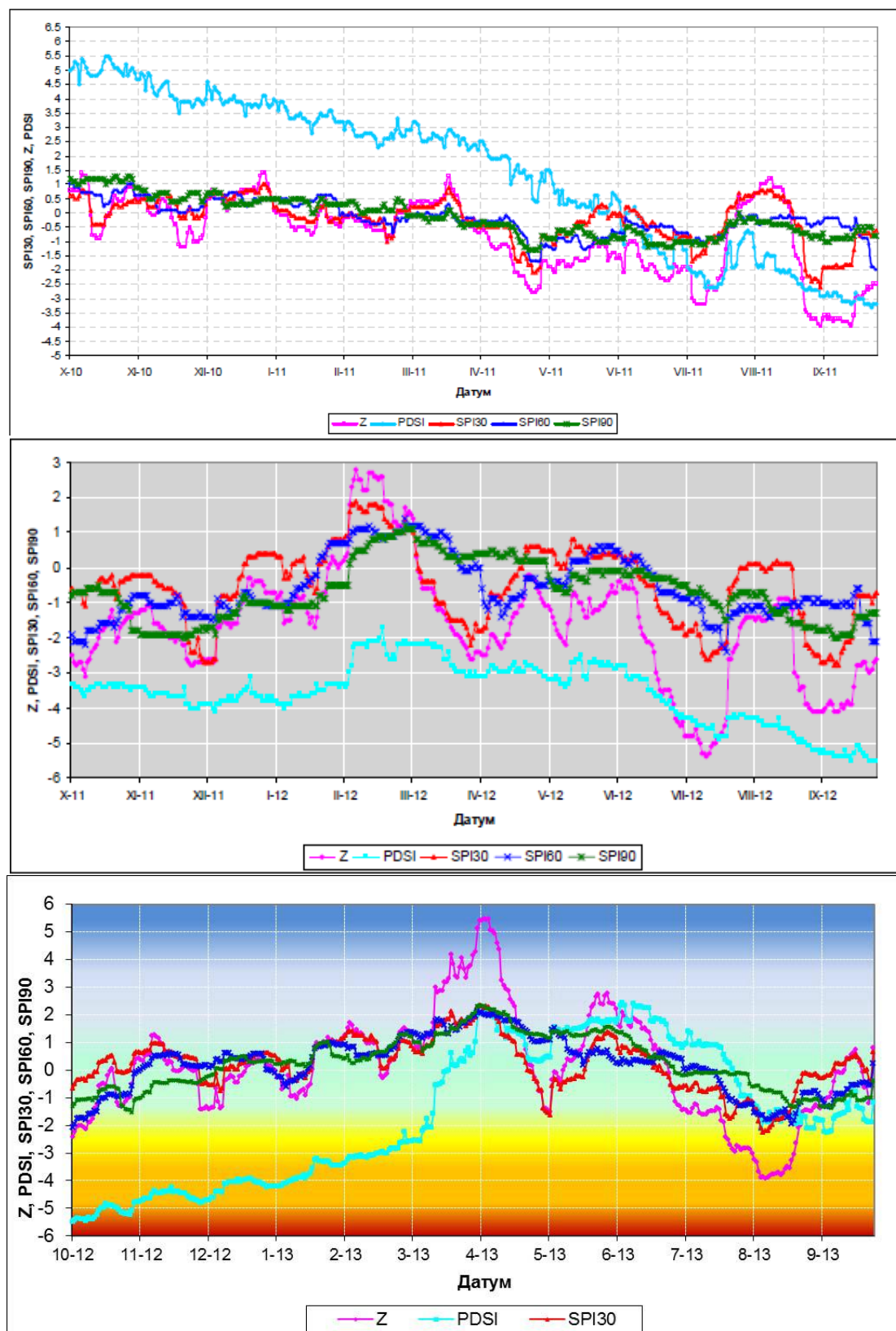
Slika 4.17 Uslovi vlažnosti u Vojvodini u proizvodnoj 2009. i 2010. godini na osnovu vrednosti dnevnih indeksa suše (SPI30, SPI60, SPI90, Z i PDSI); Standardizovani indeksi padavina izračinati su na osnovu količina padavina zabeleženih u prethodnih 30, 60 i 90 dana (SPI 30, SPI 60, SPI 90; RHMZS).

SPI		Палмеров индекс суше		
< - 2.326	Изузетна суша (IC)	Z	PDSI	
-2.325 до - 1.645	Екстремна суша (EC)	< - 2.75	< - 4.0	Екстремна суша (EC)
-1.644 до - 1.282	Јака суша (JC)	- 2.0 до - 2.74	- 3.0 до - 3.9	Јака суша (JC)
-1.281 до - 0.935	Умерена суша (YC)	- 1.25 до - 1.0	- 2.0 до - 2.9	Умерена суша (YC)
-0.934 до - 0.524	Сушно (C)	- 1.24 до 0.99	- 1.9 до 1.9	Нормално (N)
-0.523 до 0.523	Нормално (H)	1.0 до 2.49	2.0 до 2.9	Умерено влажно (UB)
0.524 до 0.934	Мала влага (MB)	2.5 до 3.49	3.0 до 3.9	Јако влажно (JB)
0.935 до 1.281	Умерено влажно (UB)	>3.5	> 4.0	Екстрмно влажно (EB)
1.282 до 1.644	Јако влажно (JB)			
1.645 до 2.325	Екстрмно влажно (EB)			
≥ 2.326	Изузетно влажно (IB)			

Slika 4.18 Objašnjenje skale indeksa suše.

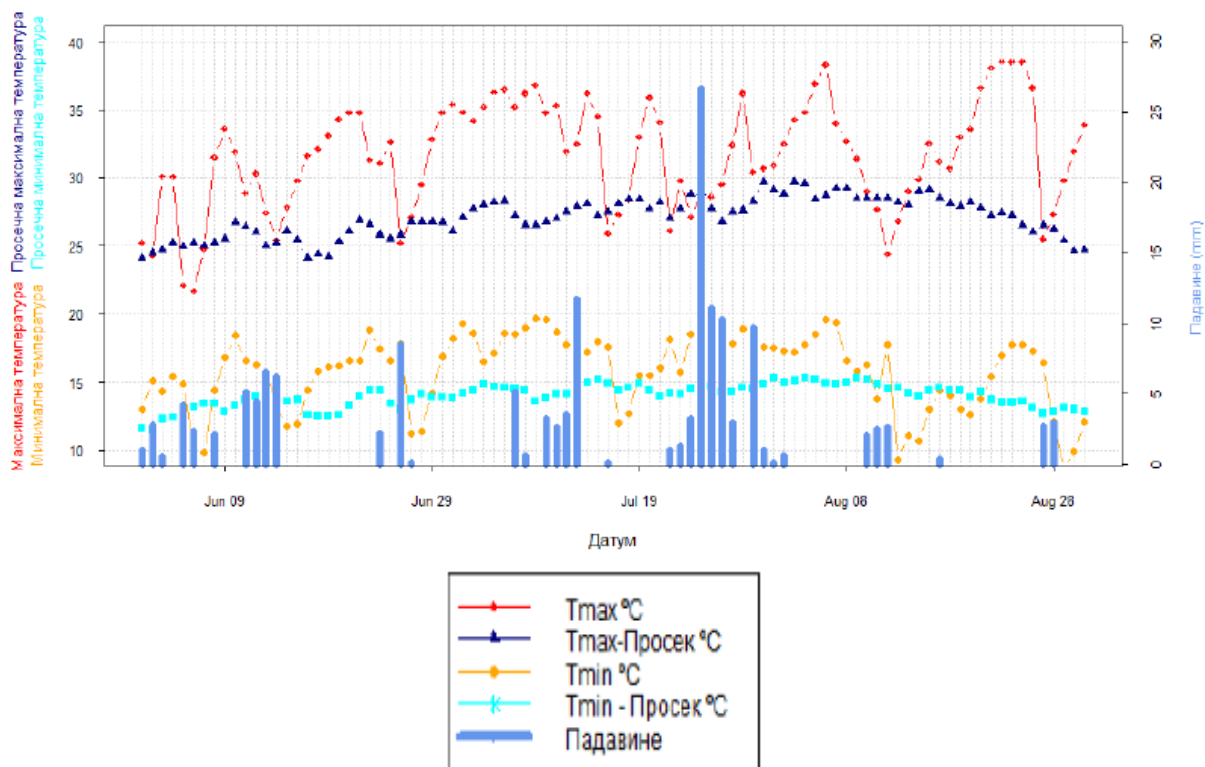


Slika 4.19 Akumulirane temperaturne sume za temperaturni prag od 10 °C u periodu 1. april - 30. septembar 2009, 2010, 2011, 2012 i 2013. godine (A, B, C, D, E) na teritoriji Srbije (RHMZS).



Slika 4.20. Uslovi vlažnosti u Vojvodini u proizvodnim 2011, 2012. i 2013. godini na osnovu vrednosti dnevnih indeksa suše (SPI30, SPI60, SPI90, Z i PDSI; RHMZS).

Leto 2012. godine u Srbiji bilo je najtoplije od kada postoje merenja, sa veoma malom količinom padavina koje su najčešće zahvatale mali deo teritorije zemlje. Izuzetno visoke i minimalne i maksimalne temperature počele su još sredinom juna i zadržale se uz kratkotrajne prekide celo leto (Slika 4.21). Najtopliji i najsušniji period (30. jun–25. jul) na većem delu teritorije poklopio se sa najvažnijim generativnim fazama jarih useva i tako prouzrokovao velike štete u poljoprivrednoj biljnoj proizvodnji koje su se ogledale u veoma visokoj koncentraciji aflatoksina, ali i fumonizina u kukuruzu.

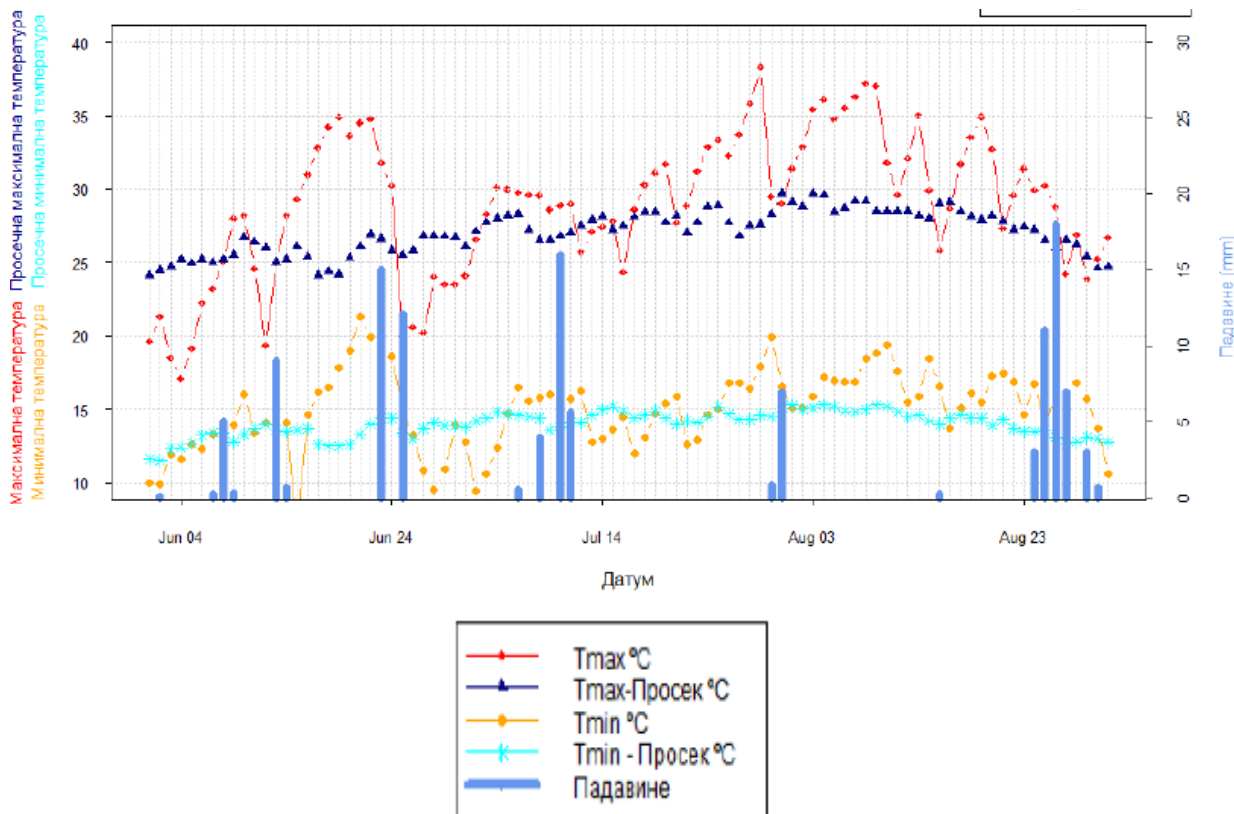


Slika 4.21 Prosečne maksimalne i minimalne temperature vazduha, njihova odstupanja od proseka (1971-2000) i prosečne padavine (mm) u leto (1. jun - 31. avgust) 2012. godine u poljoprivrednom području Srbije (RHMZS).

Leto 2013. godine u Srbiji karakterisalo je ponovo toplo vreme, naročito u drugoj polovini juna i prvoj polovini avgusta, uz obilnije padavine sredinom jula i krajem avgusta (Slika 4.22) Iako se najsušniji deo leta poklopio sa najvažnijim generativnim fazama kukuruza, kao i periodom svilanja koji se u našem regionu odigrava oko 60 dana od momenta nicanja biljaka (tokom meseca jula i prva polovina avgusta), kontaminacija kukuruza nije bila na nivou 2012. godine.

Mogao bi se izvesti zaključak da suša i visoka temperatura najviše pogoduju produkciji fumonizina na našem klimatskom području, iako je njihova frekvencija bila povećana i u vlažnoj 2010. godini. Obzirom da su uzorci 2010. godine prikupljeni tokom cele

godine, a ne samo nakon žetve, ovde se postavlja pitanje uticaja visoke vlage na pravilno skladištenje ovog kukuruza. Što se tiče kontaminacije pšenice, vlažni uslovi 2010. godine su uticali na veću frekvenciju pozitivnih uzoraka, u odnosu na sušnu 2012. godinu.



Slika 4.22 Prosečne maksimalne i minimalne temperature vazduha, njihova odstupanja od proseka (1971-2000) i prosečne padavine (mm) u leto (1. jun - 31. avgust) 2013. godine u poljoprivrednom području Srbije (RHMZS).

Na osnovu analize sadržaja fumonizina i drugih ispitivanih mikotoksina, i agrometeoroloških faktora, može se zaključiti da je umerena klima uslov za mikotoksikološku bezbednost žitarica na teritoriji Srbije. Ukoliko dođe do odstupanja od višegodišnjeg proseka, u smislu suficita padavina, ili do suše, ali i dugotrajnih visokih temperatura, neophodno je primeniti sve raspoložive agrotehničke mere u cilju izbegavanja pojave plesni, bolesti kukuruza i insekata kako bi se izbegao rizik od kontaminacije fumonizinima i drugim mikotoksinima. Dobijeni podaci o koncentracijama fumonizina, ustanovljene korelacije između uslova sredine i skladištenja, kao i sadržaja vlage i plesni sa sadržajem fumonizina, kao i korelacije sadržaja drugih mikotoksina sa fumonizinima mogu poslužiti za postavljanje modela o predviđanju pojave fumonizina na teritoriji Srbije. Visok procenat pozitivnih uzoraka kukuruza obavezuje na češću kontrolu skladištenih uzoraka

tokom cele godine i perioda skladištenja. Ovo istraživanje potvrđuje važnost kontinuiranog praćenja toksina *Fusariuma* u pšenici, kao i u kukuruзу u Srbiji, kao i formiranje baze podataka o njihovom prisustvu pri klimatskim uslovima Srbije. Svakako, dalja istraživanja i analiza uticaja gajenja pojedinih hibrida i primenjenih preventivnih agrotehničkih i agrohemijskih mera u uslovima gajenja u Srbiji bi dala dodatne važne podatke o predvidivosti pojave fumonizina, a sve u cilju pravovremenog delovanja u okviru HACCP sistema (Jakšić *et al.*, 2011b), primenom dobre poljoprivredne, proizvođačke i prakse skladištenja (Nešić *et al.*, 2013), i sprečavanja da toksini dospeju u gotovu hranu za ishranu ljudi i životinja i time nastanu štete pre svega po zdravlje, ali i ekonomiju.

4.3.6 Rasprostranjenost fumonizina pored aflatoksina u hrani na bazi kukuruza na tržištu Srbije (Jakšić *et al.*, 2011c)

Hrana na bazi žitarica, posebno pšenica i kukuruz, ima važnu ulogu u tradicionalnoj ishrani u Srbiji, a takođe je veoma popularna u modernoj ishrani pod imenom “zdrava hrana”. U modernoj ishrani mlađe populacije veoma su popularne žitarice za doručak. Iako žitarice mogu biti izvor kontaminacije mikotoksinima, nema dovoljno informacija o njihovom prisustvu u hrani poreklom iz Srbije.

Tokom 2010. godine, u cilju ispitivanja fumonizina i aflatoksina uzorkovane su žitarice za doručak na bazi kukuruza na tržištu Novog Sada, metodom slučajnog izbora. Nakon mlevenja, homogenizacije, ekstrakcije sa MeOH–H₂O (70:30, v/v) tj. (80:20, v/v) i razblaživanja ekstrakta, sadržaj ukupnih aflatoksina i ukupnih fumonizina je određen ELISA metodama, korišćenjem Ridascreen[®] Fumonisin test kita i Aflatoxin-B1 EIA. Prinos za fumonizin B₁ određen obogaćivanjem uzorka korn-fleksa sa 800 µg/kg je bio 98,0±26,8%, dok je za aflatoksin B₁ određen obogaćivanjem uzorka ječmenih pahuljica sa 3 µg/kg i iznosio je 94,3±12,6%. Dobijeni prinos je odgovarao zahtevima Evropske komisije (EC, 2006a), i time je potvrđeno da korišćene analitičke metode odgovaraju nameni. Dobijeni rezultati određivanja toksina nisu korigovani na osnovu dobijenog prinosa.

Rezultati određivanja sadržaja fumonizina i aflatoksina B₁ u hrani na bazi kukuruza su prikazani u Tabeli 4.23. Dobijeni rezultati pokazuju mnogo niži sadržaj fumonizina od 800 µg/kg što predstavlja maksimalno dozvoljeni sadržaj prema važećim zakonskim propisima (Sl. glasnik RS, 2014b; EC, 2007). Aflatoksini nisu detektovani ni u jednom uzorku hrane na

bazi kukuruza. Pošto aflatoksin nije detektovan, nema korelacije između sadržaja fumonizina i aflatoksina.

Tabela 4.23 Sadržaj ukupnih fumonizina i aflatoksina B₁ u kukuruznim proizvodima za ishranu ljudi, uzorkovano 2010

Broj uzorka	Vrsta uzorka	Sadržaj FB (µg/kg)	Sadržaj aflatoksina B ₁ (µg/kg)
1.	Korn-fleks gold, rinfuz	92	ND
2.	Korn-fleks integralni gold, rinfuz	131	ND
3.	Palenta	77	ND
4.	Corn fleks	ND	ND
5.	Smeša žitarica za doručak	43	ND

FB: GD 25; Aflatoksin B₁: GD 0,3 µg/kg

Prethodna ispitivanja hrane na bazi kukuruza u Srbiji (Matić *et al.*, 2009) pokazala su prisustvo fumonizina u 52,9% od ispitanih 17 uzoraka, i to u opsegu od 58,2 do 600 µg/kg. Treba, međutim, napomenuti da je korišćen test sa višom granicom detekcije (50 µg/kg). Stoga, ako se porede rezultati na osnovu ove granice detekcije, naši rezultati (60% pozitivnih uzoraka) su uporedivi sa prethodnim rezultatima. Vuković *et al.* (2010) su ispitivali slične vrste uzoraka sa tržišta Srbije, a rezultati su pokazali da su svi uzorci (15) bili kontaminirani fumonizinima, u sličnoj koncentraciji kao i u našem istraživanju. Ispitivanje žitarica za doručak iz prodavnica sa tržišta Kanade pokazalo je da je 30% uzoraka sadržalo fumonizine (Roscoe *et al.*, 2008).

Obzirom na neuobičajene klimatske uslove tokom 2012. godine i kontaminaciju kukuruza u Srbiji aflatoksinima, analizirani su proizvodi od kukuruza za ishranu ljudi tokom proleća 2013. godine. Izabrani su proizvodi koji se najčešće koriste u ishrani. Uzorci koji se prodaju kao „tradicionalna, domaća, zdrava hrana“ (uzorci 1–4) nabavljeni su u prodavnici na Zlatiboru (1 i 2) i na pijaci u Novom Sadu (3 i 4). Drugi deo uzoraka je nabavljen iz supermarketa u Novom Sadu (5–9) (Tabela 4.24).

Iako je u svim uzorcima detekovan fumonizin, ni u jednom uzorku njegov sadržaj nije prelazio maksimalno dozvoljenu količinu propisanu Pravilnikom (Sl. glasnik RS, br. 29, 2014b). Mada je analiziran mali broj uzoraka, može se primetiti da je kukuruzno brašno bilo kontaminirano višim koncentracijama fumonizina (srednja vrednost 560 µg/kg) u odnosu na kukuruzni griz (srednja vrednost 105 µg/kg). U 55% ispitanih uzoraka detektovani su

aflatoksini, a obzirom na maksimalno dozvoljenu količinu ukupnih aflatoksina u kukuruзу za ishranu ljudi (4 µg/kg), tri ispitana uzorka nisu upotrebljiva u ishrani ljudi (Tabela 4.24). Posebno treba istaći da su dva od tri neispravna uzorka poreklom iz “domaće radinosti”. Svakako, ovde treba istaći problem mogućnosti sinergističkog uticaja dva toksina. Naime, iako je u dva uzorka (uzorci 2 i 6) sadržaj fumonizina i aflatoksina ispod Pravilnikom maksimalno dozvoljenih vrednosti, u njima su detektovana oba toksina.

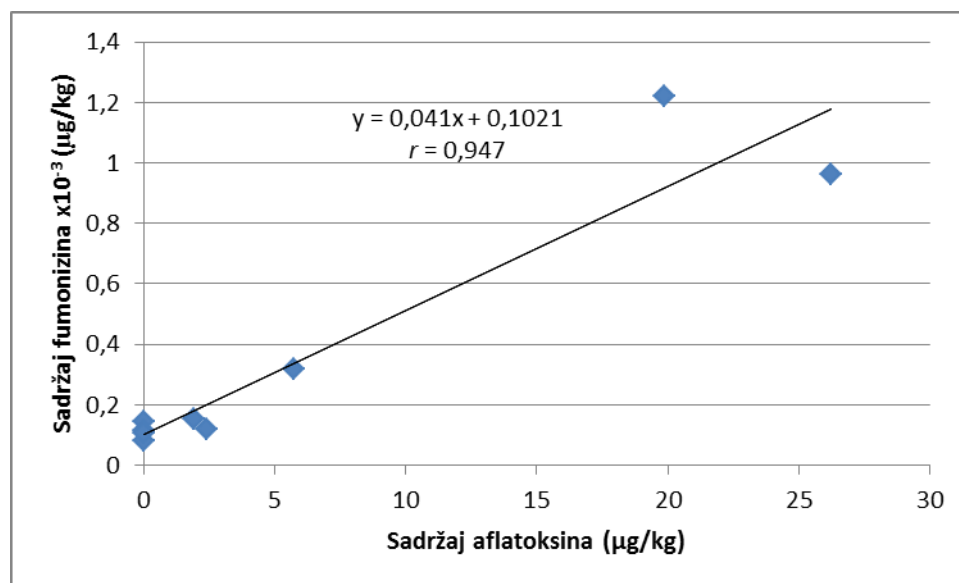
Isti uzorci su ispitani i na sadržaj zearalenona kao fuzariumskog toksina, ali njegovo prisustvo nije dokazano (< 25 µg/kg). Ovo se tumači time što *F. graminearumu* za produkciju zearalenona više odgovara hladnije vreme, a 2012. godina je bila izuzetno topla. Takođe, obzirom na pogodne uslove za razvoj pleni *Aspergillus* spp. i aflatoksina, verovatno su u uslovima kompeticije ove plesni kojima je klima više odgovarala preovladale.

Tabela 4.24 Sadržaj fumonizina i aflatoksina u kukuruznim proizvodima za ishranu ljudi, rod 2012

Red. Br.	Vrsta uzorka	FB (µg/kg)	Ukupni aflatoksini (µg/kg)
1	Belo brasno Zlatibor (sa imenom proizvođača)	1220	19,87
2	Belo brašno Zlatibor (bez imena proizvođača)	154	1,91
3	Kukuruzno belo brašno (Novi Sad pijaca, mleveno na kamenu)	961	26,25
4	Kukuruzno žuto brašno (Novi Sad pijaca, mleveno na kamenu)	145	ND
5	Proizvođačka marka žuto brašno	319	5,71
6	Kukuruzni griz (bez glutena)	119	2,42
7	Kukuruzni griz Bačka	117	ND
8	Palenta Srem	80	ND
9	Proizvođačka marka griz	105	ND

Ukupni aflatoksini (GD 1,75 µg/kg; FB GD 25 µg/kg)

Ispitivanjem moguće korelacije između sadržaja fumonizina i aflatoksina u proizvodima od kukuruza, dobijen je visok linearni koeficijent korelacije ($r = 0,947$; $p < 0,005$), a korelacija je i grafički prikazana (Slika 4.23).



Slika 4.23 Korelacija između sadržaja fumonizina i aflatoksina u proizvodima od kukuruza za ishranu ljudi.

Ovo je posebno interesantno jer ispitivanjem korelacije između sadržaja istih toksina u sirovom kukuruza roda 2012. godine, nije ustanovljena korelacija. Dobijeni rezultati korelacije se mogu tumačiti različitim koncentracijama toksina u različitim delovima zrna kukuruza, što verovatno dolazi do izražaja tokom prerade kukuruza tokom proizvodnje brašna i griza.

U literaturi je dostupan mali broj rezultata određivanja fumonizina i aflatoksina u hrani za ljude. Rezultati ispitivanja keksa i biskvita na sadržaj fumonizina i aflatoksina u Iranu su pokazali kontaminaciju sa oba toksina, ali ispod maksimalno dozvoljenih količina (Azizi i Rouhi, 2013). Ispitivanje kukuruznih proizvoda za ishranu ljudi u Argentini je pokazalo visoku frekvenciju pozitivnih uzoraka na fumonizin (95%), za razliku od aflatoksina, zearalenona i DON-a koji nisu detektovani (Solovey *et al.*, 1999).

Primenjena ELISA metoda se pokazala kao jednostavna i brza za određivanje aflatoksina i fumonizina u žitaricama za ishranu ljudi. Međutim, za hranu za bebe, potrebno je koristiti metodu sa nižom granicom detekcije. Još jedan nedostatak ove metode je određivanje ukupnih aflatoksina i ukupnih fumonizina, međutim, obzirom na propise koji predviđaju maksimalno dozvoljenu koncentraciju i za ukupne aflatoksine i za ukupne fumonizine (B₁ i B₂), rezultati su uporedivi sa referentnim vrednostima važećih propisa.

Na osnovu dobijenih rezultata analize proizvoda od kukuruza iz 2012. godine, ne možemo tvrditi da je hrana na bazi žitarica na tržištu Srbije bezbedna, a procenat pozitivnih uzoraka obavezuje na redovnije analize. Dobijeni rezultati pokazuju da je detaljnija kontrola

u proizvodnji i prometu zakazala, iako su nepovoljni klimatski uslovi i kontaminiranost sirovog kukuruza bili upozoravajući. Posebno zabrinjava kontaminiranost uzorka iz redovne prodaje iz supermarketa, a kontaminiranost “domaćih” proizvoda upozorava da nisu uvek zdraviji i kvalitetniji, što se od takvih proizvoda možda očekuje. Zdravstveno neispravni kukuruzni proizvodi posebno pogađaju populaciju ljudi obolelih od celijakije. Oni su najveći potrošači kukuruznih proizvoda, pa je kod njih veći i unos potencijalnih kontaminanata kukuruza, kao što su fumonizini.

U ovom istraživanju su bili obuhvaćeni najviše korišćeni kukuruzni proizvodi koji su karakteristični za Srbiju. Svakako, kultura ishrane se menja i razvojem tehnologije prerade žitarica, sve je veća ponuda različitih kukuruznih proizvoda i na tržištu Srbije. Povećanjem broja različitih proizvoda na bazi žitarica postavljaju se i zahtevi za razvoj i validaciju novih brzih analitičkih metoda. Naime, obzirom na problem u ekstrakciji vezanih i skrivenih fumonizina u obrađenom kukuruzu (Berthiller *et al.*, 2013), komercijalne ELISA metode bi trebalo dalje usavršavati, pre svega u smislu efikasnije ekstrakcije toksina iz ovih zahtevnijih matriksa.

4.4 ODREĐIVANJE FUMONIZINA U LEKOVITOM BILJU

Iako fumonizini kontaminiraju uglavnom kukuruz, detektovani su i na drugim supstratima. Tako su, u zemljama koje su veliki potrošači čajeva i gde postoji tradicija konzumacije čaja, rađene studije o kontaminiranosti raznih biljnih vrsta mikotoksinima pa i fumonizinima. Međutim, nije standardizovana nijedna analitička metoda za njihovo određivanje u lekovitom bilju. U Srbiji postoje podaci o ispitivanju kontaminacije lekovitog bilja hemijskim kontaminantima (Mihaljev *et al.*, 2014) kao i plesnima (Pavlović, 2008), međutim, nema podataka o eventualnom prisustvu fumonizina.

Obzirom na veoma čestu upotrebu lekovitog bilja, ispitana je kontaminacija plesnima triju biljaka prikupljenih sa tri različita lokaliteta (Tabela 4.25).

Tabela 4.25 Učestalost izolacije i vrsta plesni kod lekovitog bilja roda 2011. godine u Srbiji (n=20)

Biljna vrsta	Lokalitet	Vrsta plesni	Učestalost izolacije (%)
	Zlatibor	<i>Aspergillus</i> sp.	20,0
		<i>Penicillium</i> sp.	20,0
		<i>Alternaria</i> sp.	50,0
Majčina dušica (<i>Thymus serpyllum</i>)	Suva/Stara planina	<i>Mucor</i> sp.	15,0
		<i>Alteranaria</i> sp.	50,0
		<i>Fusarium</i> sp.	25,0
	Orom	<i>Aspergillus</i> sp.	35,0
		<i>Mucor</i> sp.	20,0
		<i>Fusarium</i> sp.	30,0
Kamilica (<i>Matricaria chamomilla</i>)	Zlatibor	<i>Penicillium</i> sp.	20,0
		<i>Mucor</i> sp.	10,0
	Suva/Stara planina	<i>Mucor</i> sp.	40,0
		<i>Aspergillus</i> sp.	25,0
Hajdučka trava (<i>Achillea millefolium</i>)	Zlatibor	<i>Alternaria</i> sp.	70,0
		<i>Aspergillus</i> sp.	30,0
	Suva/Stara planina	<i>Alternaria</i> sp.	25,0
		<i>Mucor</i> sp.	20,0
		<i>Fusarium</i> sp.	30,0
	Orom	<i>Alternaria</i> sp.	50,0
<i>Mucor</i> sp.		20,0	
<i>Fusarium</i> sp.		25,0	

Može se videti da su uzorci poreklom iz istočne (Stara/Suva planina) i zapadne Srbije (Zlatibor) kontaminirani različitim vrstama plesni, dok su uzorci iz istočne i severne Srbije (Orom) međusobno sličniji po vrsti kontaminacije. Između uzoraka sakupljenih iz prirode (Zlatibor i Stara/Suva planina) i uzoraka iz organske proizvodnje (Orom) nema značajne razlike u frekvenciji kontaminacije.

Obzirom na izolovane plesni roda *Fusarium* iz uzoraka hajdučke trave i majčine dušice, kao i zbog literaturnih navoda po kojima je dokazana produkcija fumonizina na kamilici (Santos *et al.*, 2009), ispitivane su ove biljke sa teritorije Srbije.

Iako su u literaturi zabeležene metode za određivanje mikotoksina u čajevima i lekovitom bilju (Tabela 2.4), takođe je navedeno i da je veoma problematično da se primene na drugačije vrste bilja. Svaka biljka je kompleksan matriks za sebe i neophodna je validacija metode analizom obogaćenih uzoraka (Arranz *et al.*, 2006). Analizom obogaćenog uzorka hajdučke trave primenom metode koju su razvili Sewram *et al.* (2006), nismo dobili zadovoljavajuće rezultate, a sličan problem su zabeležili i Katerere *et al.* (2008). Naime, analizom obogaćenog uzorka predloženom ekstrakcijom sa smešom MeOH–H₂O (70:30, v/v) i prečišćavanjem 50 ml ekstrakta na IMA kolonama, postigli smo veoma nizak prinos (30±2% za FB₁ i 26±5% za FB₂) (Tabela 4.26). Sirovi ekstrakt lekovitog bilja je mnogo obojeniji u odnosu na ekstrakt kukuruza (Slika 4.24A), te FumoniTest™WB kolona zadržava mnogo više obojenih interferenci pri prečišćavanju ekstrakta bilja u odnosu na ekstrakt kukuruza (Slika 4.24B). Zbog svega navedenog, dalje smo ispitivali efikasnost metode nakon prečišćavanja manje zapremine (10 ml) sirovog ekstrakta lekovitog bilja na istim kolonama. Na ovaj način je takođe dobijen nizak prinos (36% za FB₁, tj. 38% za FB₂). Sa druge strane, ekstrakt istog obogaćenog uzorka je nakon prečišćavanja na MycoSep® 231 Fum koloni bio znatno obojeniji u odnosu na ekstrakt prečišćen na FumoniTest™WB koloni (Slika 4.24C), te nije injektovan u HPLC–FLD sistem, već je urađeno određivanje ELISA metodom. Na ovaj način je takođe dobijen nizak prinos od 39±3%, dok je ELISA metodom bez prečišćavanja uzorka prinos iznosio 46%. Obzirom da je niska efikasnost dobijena sa različitom količinom prečišćavanog ekstrakta na FumoniTest™WB koloni, kao i bez prečišćavanja ekstrakta, zaključeno je da je ekstrakcija uzorka problematična faza. Zato je dalje rađeno na optimizaciji ekstrakcije obogaćenog uzorka. Ekstrakcijom sa MeOH–H₂O (70:30, v/v) u više porcija, nije postignut viši prinos (44% za FB₁, odnosno 56% za FB₂), ali je došlo do veće ekstrakcije interferenci iz matriksa uzorka, te nije bilo moguće hromatografsko razdvajanje FB₁ od OPA (Tabela 4.26).

Pošto se napici od lekovitog bilja pripremaju ekstrakcijom sa vodom, realnija slika o izloženosti ljudi eventualnim toksinima se dobija takvom vrstom ekstrakcije. Sa druge strane, ispitivanje efikasnosti različitih ekstrakcionih rastvarača u poglavlju 4.2 je pokazalo mogućnost primene destilovane vode i FP za ekstrakciju fumonizina iz kukuruza, kao i mogućnost prečišćavanja FP ekstrakta na Fumonitest™WB kolonama bez razblaživanja. Pošto su uzorci lekovitog bilja kabasti i lagani, nije moguće uraditi ekstrakciju sa odnosom uzorak : rastvarač kao kod kukuruza, već je potrebno više rastvarača, što bi uticalo na povećanje granice detekcije. Nakon preliminarnih ispitivanja i novih saznanja o ekstrakciji kukuruza sa FP do kojih smo došli u toku rada na disertaciji, dalje se ispitivala mogućnost

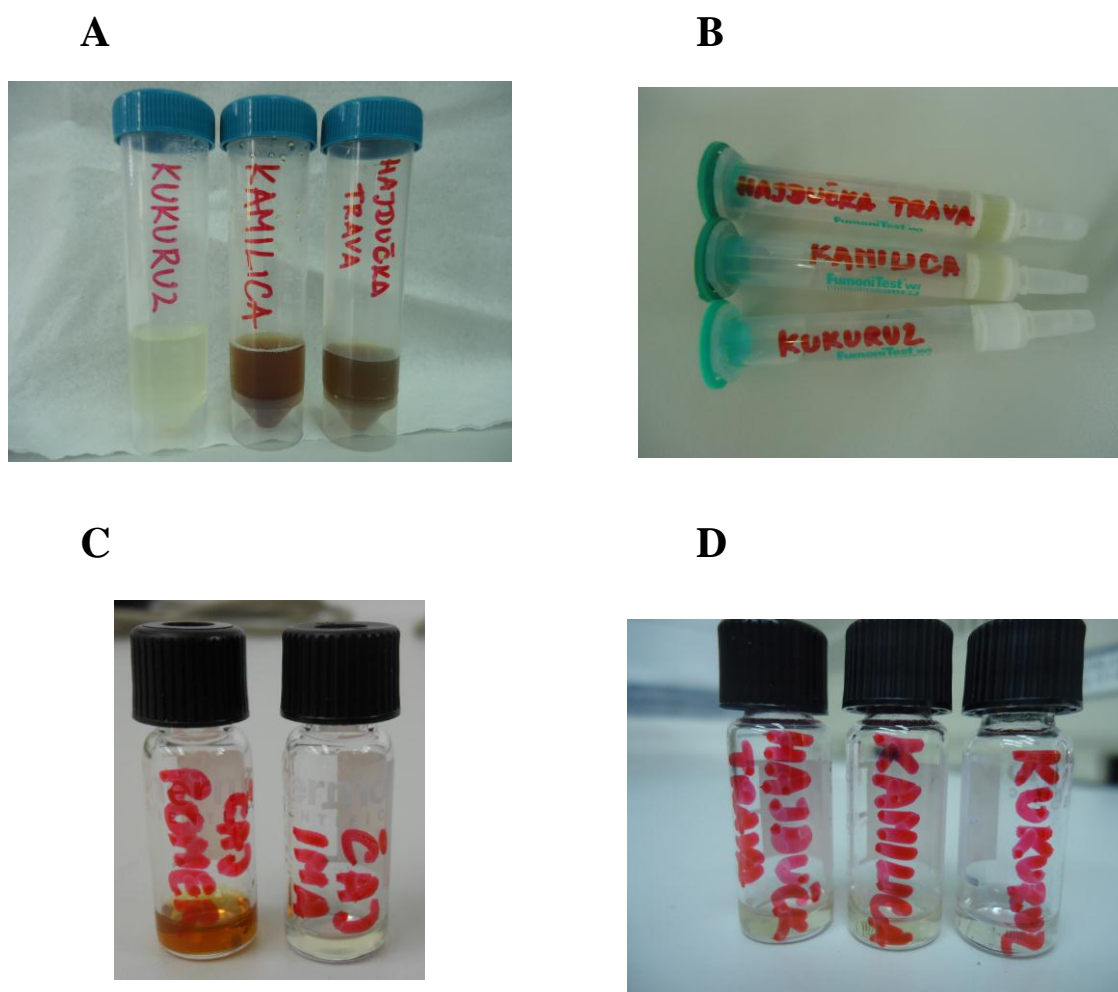
ekstrakcije fumonizina iz lekovitog bilja sa FP i prečišćavanje na FumonitestTMWB kolonama sirovog ekstrakta. Takođe je ekstrakt dobijen sa FP korišćen i za ispitivanje mogućnosti određivanja fumonizina u lekovitom bilju ELISA metodom. U tom cilju, 2 g obogaćenog uzorka lekovitog bilja je ekstahovano sa tri porcije od 20 ml FP u toku 10 minuta. Nakon centrifugiranja i filtriranja kroz mikrofiber filter papir, 10 ml ovako dobijenog sirovog ekstrakta je prečišćavano na FumonitestTMWB kolonama. Fumonizini su zatim određivani HPLC–FLD metodom, a dobijeni prinosi su bili 71% za FB₁ i 64% za FB₂.

Tabela 4.26 Razvoj i validacija metode za određivanje fumonizina u hajdučkoj travi

Ekstrakcija	Prečišćavanje i određivanje	Prinos (%)		Obogaćenje (mg FB ₁ i FB ₂ /kg)
		FB ₁	FB ₂	
2 g+30 ml MeOH–H ₂ O (70:30, v/v) (n = 3)	10 ml+40 ml FP	30±2	26±5	
	50 ml na IMA HPLC–FLD			
	Mycosep [®] 231 Fum kolona Ridascreen [®] Fumonisin	39±3		1
	Bez prečišćavanja ekstrakta Ridascreen [®] Fumonisin	46±6		
2 g+30 ml MeOH–H ₂ O (70:30, v/v)	5 ml+20 ml FP 10 ml na IMA HPLC–FLD	36	38	0,5
2 g+2x30 ml MeOH–H ₂ O (70:30, v/v)	5 ml+20 ml FP 10 ml na IMA HPLC–FLD	44	56	0,5
2 g+3x20 ml MeOH–H ₂ O (70:30, v/v)	5 ml+20 ml FP 20 ml na IMA HPLC–FLD	Nije dobro razdvojen	57	0,5
2 g+3x20 ml FP	10 ml na IMA HPLC–FLD	71	64	0,5

IMA-FumoniTestTMWB

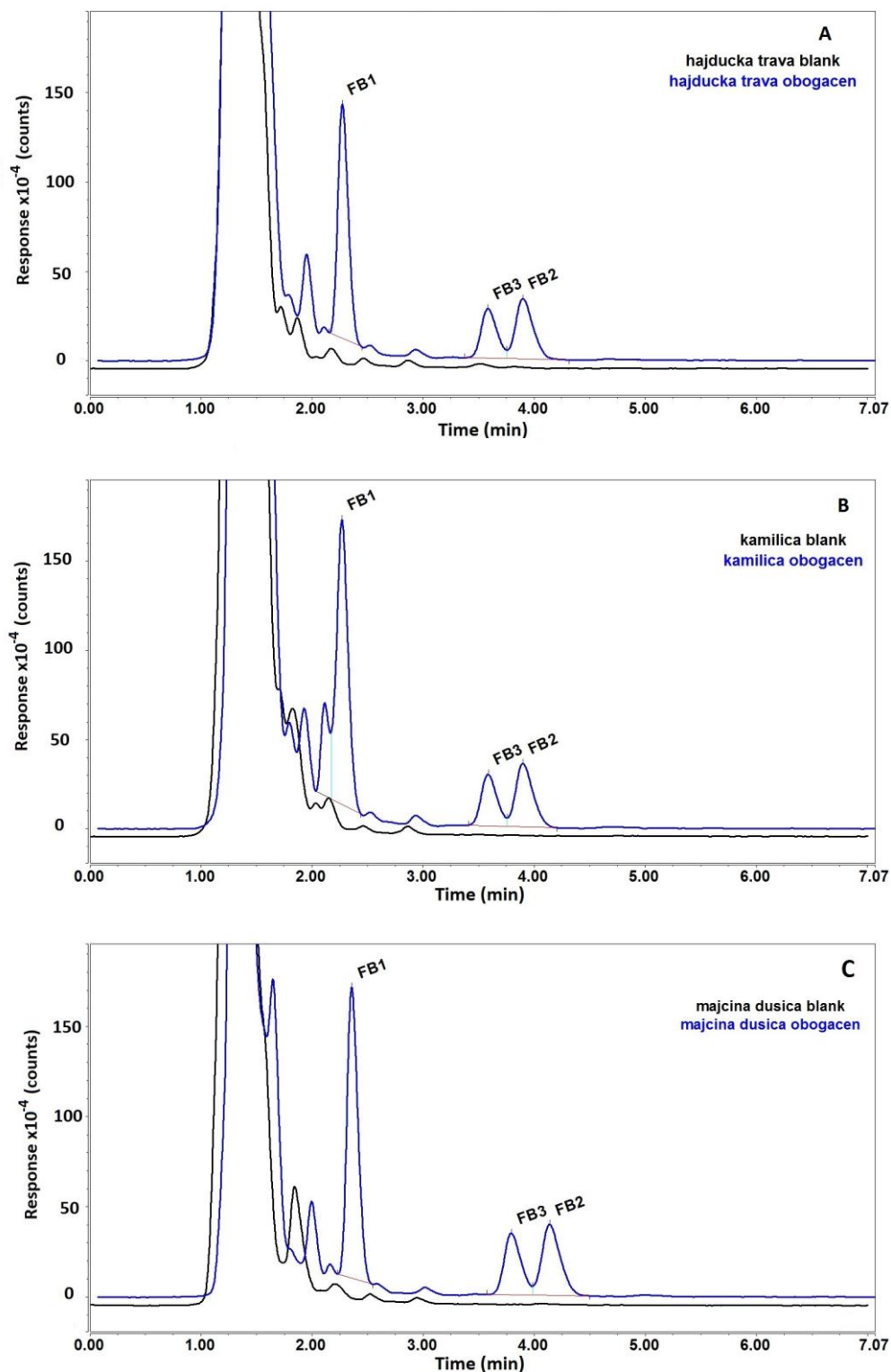
Dalje je primenjena ova metoda ekstrakcije i prečišćavanja za određivanje prinosa pomoću obogaćenih uzoraka sa sva tri fumonizina i za tri ispitivane biljne vrste. Iako su rekonstituisani ekstrakti bili obojeniji nego u slučaju kukuruza (Slika 4.24D), postignuto je dobro razdvajanje pikova (Slika 4.25), a rezultati su pokazali odgovarajući prinos za FB₁ i FB₂ prema EC 401/2006 (Tabela 4.27), dok za FB₃ nisu ni definisani zahtevi za prinos ovom regulativom. Paralelno su fumonizini određivani iz istih sirovih ekstrakata obogaćenih uzoraka i ELISA metodom ali bez prečišćavanja ekstrakta (Tabela 4.27).



Slika 4.24 Ekstrakti lekovitog bilja i ekstrakt kukuruza (A); FumonitestTMWB kolone nakon prečišćavanja ekstrakata lekovitog bilja i kukuruza (B); prečišćeni ekstrakti hajdučke trave na MycoSep[®] 231 Fum (Romer) koloni i FumonitestTMWB koloni (IMA, C); prečišćeni ekstrakti lekovitog bilja i kukuruza na IMA kolonama (D).

Tabela 4.27 Prinos (%) razvijenih HPLC–FLD i ELISA metoda određivanja fumonizina u lekovitom bilju nakon ekstrakcije sa FP, dobijena ispitivanjem uzoraka obogaćenih sa 0,5 mg/kg FB₁; 0,3 mg/kg FB₂ i 0,25 mg/kg FB₃

Biljka	HPLC–FLD				ELISA
	FB ₁	FB ₂	FB ₃	Ukupni FB	Ukupni FB
Hajdučka trava	72	60	49	63	68
Kamilica	91	61	50	75	73
Majčina dušica	88	75	66	79	79



Slika 4.25 Hromatogrami obogaćenih (0,5 mg/kg FB₁, 0,3 mg/kg FB₂ i 0,25 mg/kg FB₃) uzoraka hajdučke trave (A); kamilice (B) i majčine dušice (C), u odnosu na uzorak sa sadržajem toksina ispod GD. Ekstrakcija sa FP, prečišćavanje na FumoniTestTMWB kolonama, mobilna faza MeOH–0,1 mol/l NaH₂PO₄ (77:23, v/v)

Granice detekcije i određivanja fumonizina u pojedinom lekovitom bilju su određene na osnovu odnosa signal:šum 3:1, odnosno 10:1 (Tabela 4.28). Može se zaključiti da su postignute veoma niske GD i GO, kao i da su za određivanje fumonizina u majčinoj dušici najniže, verovatno zbog najnižeg šuma bazne linije. To znači da je ekstrakt uzorka majčine dušice najbolje prečišćen IMA kolonama, u odnosu na hajdučku travu i kamilicu. Ove granice su niže od onih dobijenih nakon ekstrakcije sa MeOH–H₂O (70:30, v/v), tako da veći šum bazne linije još jednom potvrđuje da se više interferenci iz lekovitog bilja ekstrahuje organskim rastvaračem.

Tabela 4.28 GD i GO ($\mu\text{g}/\text{kg}$) HPLC–FLD metode za određivanje fumonizina u lekovitom bilju nakon ekstrakcije sa FP

Toksin	FB ₁		FB ₂		FB ₃	
	GD	GO	GD	GO	GD	GO
Hajdučka trava	1,28	4,25	2,45	8,16	2,17	7,24
Hajdučka trava*	2,32	7,73	3,78	12,59	/	/
Kamilica	1,25	4,17	2,15	7,16	1,91	6,36
Majčina dušica	0,54	1,79	0,22	0,74	0,50	1,66

*ekstrakcija sa MeOH–H₂O (70:30, v/v)

Pošto je potvrđeno da se razvijenom HPLC–FLD metodom nakon ekstrakcije sa FP i prečišćavanja na FumoniTestTMWB kolonama postiže zadovoljavajući prinos (EC, 2006c), odnosno da metoda odgovara nameni, ona je dalje korišćena za ispitivanje prikupljenih uzoraka lekovitog bilja sa različitih lokaliteta u Srbiji (Tabela 4.29). Nakon primene razvijene metode pripreme i HPLC–FLD određivanja, fumonizini nisu detektovani ni u jednom uzorku lekovitog bilja u Srbiji. To znači da, iako su plesni roda *Fusarium* prisutne na lekovitom bilju, one nisu producenti fumonizina u uslovima gajenja, klime, skladištenja i transporta u Srbiji.

Istraživanjem u ovoj disertaciji nisu detektovani fumonizini u lekovitom bilju uzgajanom u Srbiji, a u literaturi su zabeleženi različiti rezultati u drugim podnebljima i na drugim vrstama bilja. Tako su Monbaliu *et al.* (2010) u Belgiji zabeležili samo jedan pozitivan na FB₁ u količini od 76 $\mu\text{g}/\text{kg}$ od 91 ispitivanog uzorka (1,1%), a u pripremljenom napitku od lekovitog bilja nisu detektovali FB₁ iz sirovog biljnog materijala. Zaključili su da je rizik od pojave mikotoksina u uzorcima čaja zanemarljiv i da je teško verovatno da uzimanje čaja može dovesti do konzumacije većih količina mikotoksina. Slične rezultate su

dobili Omurtag i Yazicioğlu (2004), koji su u Turskoj zabeležili 1,7% pozitivnih uzoraka. Suprotno ovome, studije sprovedene u Španiji i Portugalu su pokazale veću frekvenciju pozitivnih uzoraka. Santos *et al.* (2009) su zabeležili 13%, a Martins *et al.* (2001) čak 65,5% uzoraka kontaminiranih sa FB₁. Osim u čajevima, dokazano je prisustvo FB₁, FB₂ i FB₃ u suplementima od belog luka, FB₁ od soje i FB₁ i FB₂ od crne rotkve (Di Mavungu *et al.*, 2009).

Tabela 4.29 Ispitivani uzorci lekovitog bilja sa područja Srbije na prisustvo FB₁, FB₂ i FB₃

Lokalitet	Biljka	Rod
Zlatibor (Zapadna Srbija)	Hajdučka trava	2011
		2012
	Kamilica	2011
		2012
	Majčina dušica	2011
		2012
Stara/Suva planina (Istočna Srbija)	Hajdučka trava	2011
		2012
	Kamilica	2011
		2012
	Majčina dušica	2011
		2012
Orom (Severna Srbija) Organska proizvodnja	Hajdučka trava	2011
		2013
	Majčina dušica	2011
		2012
		2013

O mogućnosti produkcije mikotoksina na lekovitom bilju može se diskutovati i sa drugog aspekta. Naime, Soliman i Badaea (2002) su ispitivanjem uticaja esencijalnih ulja lekovitog bilja na rast plesni zaključili da se ova ulja mogu koristiti za inhibiciju rasta plesni i produkcije toksina. Proučavanjem uticaja ulja 12 vrsta biljaka na *Aspergillus* sp. i *Fusarium* sp. dobijeno je da esencijalna ulja naročito timijana i anisa, a delimično kamilice imaju inhibitorni efekat na plesni i toksine, a koji zavisi od koncentracije ulja. Ovi nalazi jasno

ukazuju na mogućnost praktične primene esencijalnih ulja u inhibiciji produkcije mikotoksina na skladištenim žitaricama, a može da znači da je produkcija toksina na tim biljkama unapred blokirana.

U Južnoj Africi, poznatoj po visokoj kontaminiranosti kukuruza fumonizinima, je zabeležen i veliki procenat pozitivnih lekovitih biljaka na fumonizin (Katerere *et al.*, 2008). Ovi autori navode specifičnost prodaje lekovitog bilja u Južnoj Africi, gde ne postoje prodavnice ili apoteke, već se biljke nabavljaju sa tezge i sa trotoara. Takođe, navode problem pakovanja bilja u najlon kese i transport bez odgovarajuće cirkulacije i vlažnosti vazduha. Može se reći da sličan problem postoji i u Srbiji. Lekovite biljke za pripremu čajeva se prodaju bez kontrole na pijacama i na ulici u turističkim i banjskim centrima ili na raznim sajmovima. Takođe, pakuju se u najlon kese, ili se na licu mesta odmeravaju iz džakova (Slika 4.26). Iako su ispitani uzorci bili ispravni u smislu kontaminacije fumonizinima, sve navedeno može znatno uticati na ostale vrste hemijske i biološke kontaminacije te je neophodno ovakve načine prodaje i pakovanja staviti pod kontrolu.

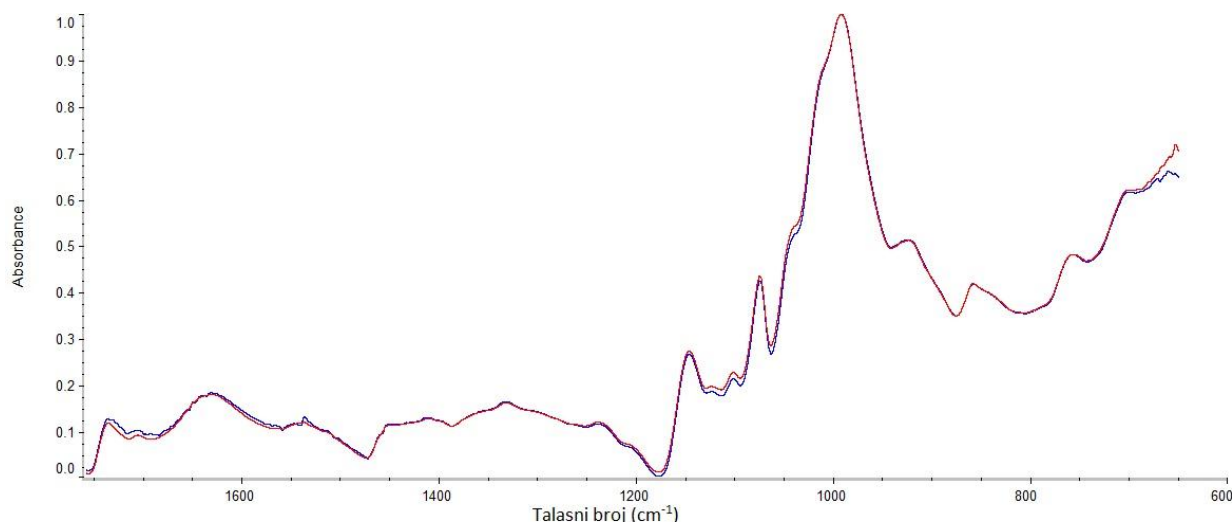


Slika 4.26 Ispitivani uzorci lekovitog bilja u originalnim pakovanjima.

4.5 PRIMENA FTIR ANALIZE ZA ODREĐIVANJE FUMONIZINA U KUKURUZU

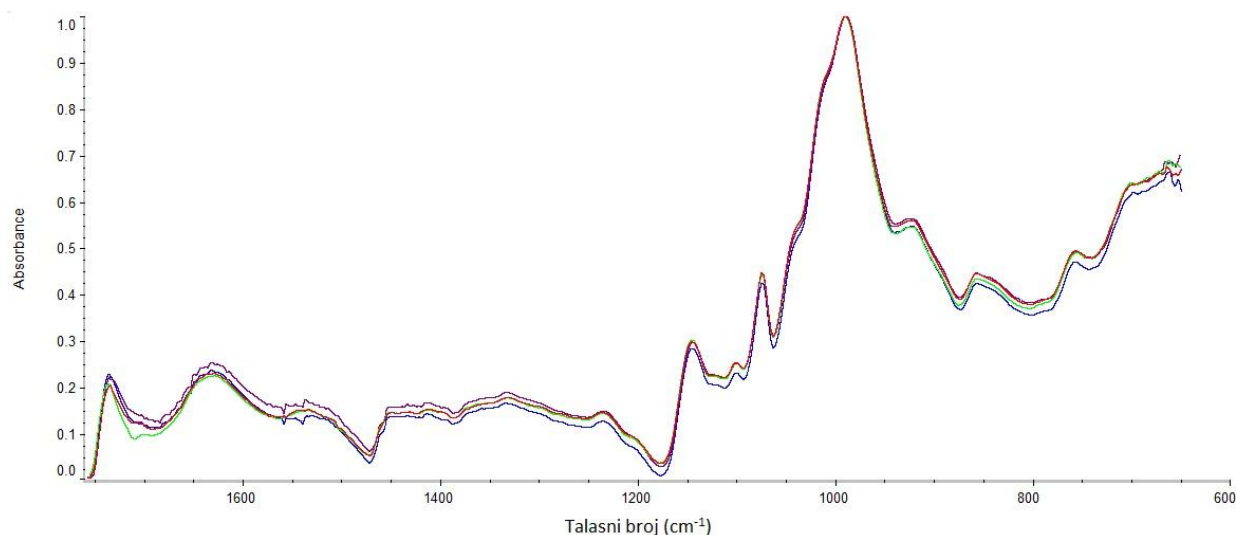
Kao što je već rečeno, zahtevi za brzom i jeftinom, ali i pouzdanom metodom analize mikotoksina u žitaricama su sve veći. Imajući u vidu da se FTIR spektrometrija kao skrining metoda primenjuje za određivanje plesni i mikotoksina u uzorcima žitarica (Poglavlje 2.6.4.2), želeli smo da ispitamo mogućnost primene ove tehnike za određivanje fumonizina u kukuruзу. U tom cilju je analizirano 16 uzoraka kukuruza čiji je sadržaj prethodno određen

ELISA metodom. Kako se ATR tehnika pokazala mnogo pogodnijom za klasifikaciju kontaminiranih uzoraka kukuruza od nekontaminiranih (Abramović *et al.*, 2007), u ovoj doktorskoj disertaciji primenjena je isključivo ATR tehnika. Imajući u vidu rezultate do kojih su došli Abramović *et al.* (2007), prvo je ispitan uticaj veličine čestice na reproduktivnost merenja pri našim eksperimentalnim uslovima. Na Slici 4.27. su prikazani normalizovani FTIR spektri kukuruza pre i nakon dodatnog mlevenja, dobijeni ATR tehnikom. Može se zaključiti da su uzorci bili dovoljno dobro samleveni, te dalje mlevenje nije bilo potrebno.



Slika 4.27 Normalizovani FTIR spektri kukuruza sa sadržajem od 4,91 mg/kg fumonizina pre (plavo) i nakon dodatnog mlevenja (crveno).

Na Slici 4.28 je prikazana ponovljivost normalizovanih FTIR spektara dobijenih ATR tehnikom. Kao što se može videti, u slučaju kada je 90% čestica bilo veličine $\leq 0,8$ mm, ponovljivost spektralnih merenja je bila zadovoljavajuća. Iako je sniman ceo spektar u opsegu 600–4000 cm⁻¹, deo spektra na višim talasnim brojevima od 1170 cm⁻¹ nije prikazan, jer nije bio relevantan za ova istraživanja. Naime, promene u spektru na ~ 3300 cm⁻¹ ukazuju na sadržaj vlage u uzorku jer oscilacije potiču od OH-grupe, te je ovaj deo spektra isključen iz analize zbog nereproduktivnosti procesa sušenja. Na 2925 i 2855 cm⁻¹ su prisutne valentne oscilacije C-H veze koje potiču iz CH₂, a koje zbog svoje nespecifičnosti takođe nisu uzete u obzir. Uticaj promene koncentracije CO₂ u atmosferi izaziva promene u spektru između 2250 i 2400 cm⁻¹, te je i ovaj deo spektra izostavljen iz dalje analize.



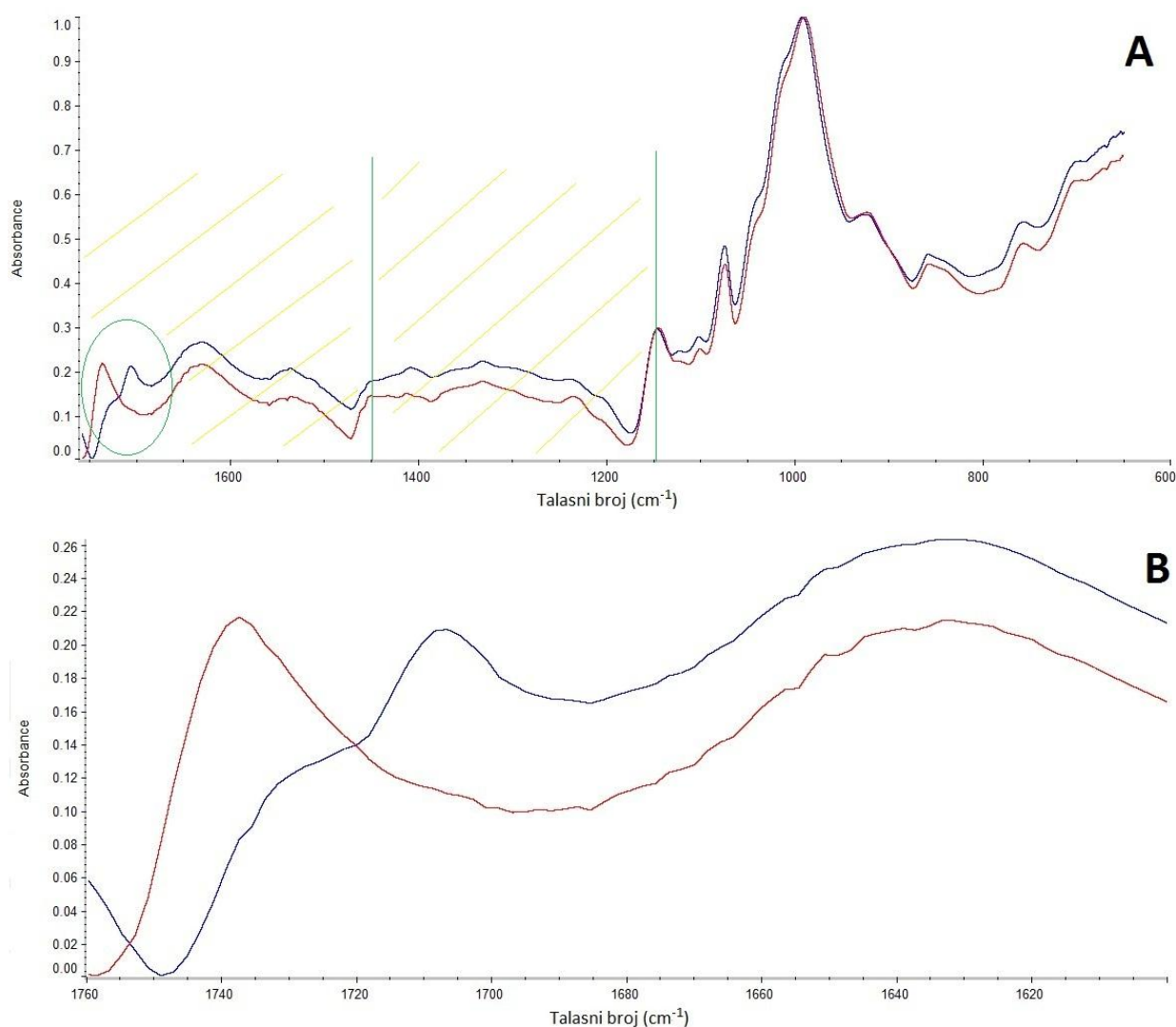
Slika 4.28 Ponovljivost 4 normalizovana FTIR spektra samlevenog kukuruza sa sadržajem od 1,86 mg/kg fumonizina.

Na Slici 4.29 su prikazani spektri uzoraka kukuruza kontaminiranog sa 0,325 mg/kg i 190 mg/kg fumonizina. Kao što se sa Slike 4.29A može videti, iako su razlike između spektara uzoraka kukuruza veoma male, vizuelnom klasifikacijom se uočava promena u spektru uzorka kontaminiranog sa višom koncentracijom fumonizina označenog plavom bojom u odnosu na uzorak sa niskom koncentracijom čiji spektar je označen crvenom bojom, u opsegu 1700–1750 cm^{-1} . Naime, kod spektra uzorka kontaminiranog sa višom koncentracijom mikotoksina se uočava nedostatak pika na 1743 cm^{-1} , ali se zato uočava pojava pika na 1709 cm^{-1} (Slika 4.29B).

Slične promene na spektru pšenice u cilju određivanja kontaminacije pšenice DON-om su već zabeležene u prethodnim istraživanjima (Abramović *et al.*, 2007). Naime, za većinu spektara kontaminirane pšenice karbonilni pik na 1743 cm^{-1} (ATR) je bio niži u odnosu na isti kod nekontaminirane pšenice. Isto tako je otkriveno da je visina ramena na 1709 cm^{-1} (ATR) u korelaciji sa pojavom plesni na pšenici. Slične rezultate su dobili Gordon *et al.* (1998) pri ispitivanju primenljivosti FTIR spektara za detekciju zrna kukuruza inficiranih mikotoksigenim plesnima. Visina ramena je empirijska karakteristika za koju ne postoji biohemijsko racionalno obrazloženje (Gordon *et al.*, 1998). Međutim, našim ispitivanjima nije bio obuhvaćen dovoljan broj ovako visoko kontaminiranih uzoraka da bismo utvrdili korelaciju koncentracije fumonizina sa visinom pomenutog pika.

Za pokušaj izdvajanja relevantnih informacija koje bi poslužile za razdvajanje ostalih ispitivanih uzoraka bile su neophodne multivariantne metode. Brojevi uzoraka na Slikama 4.30–4.32 predstavljaju koncentraciju fumonizina u mg/kg koja je određena ELISA

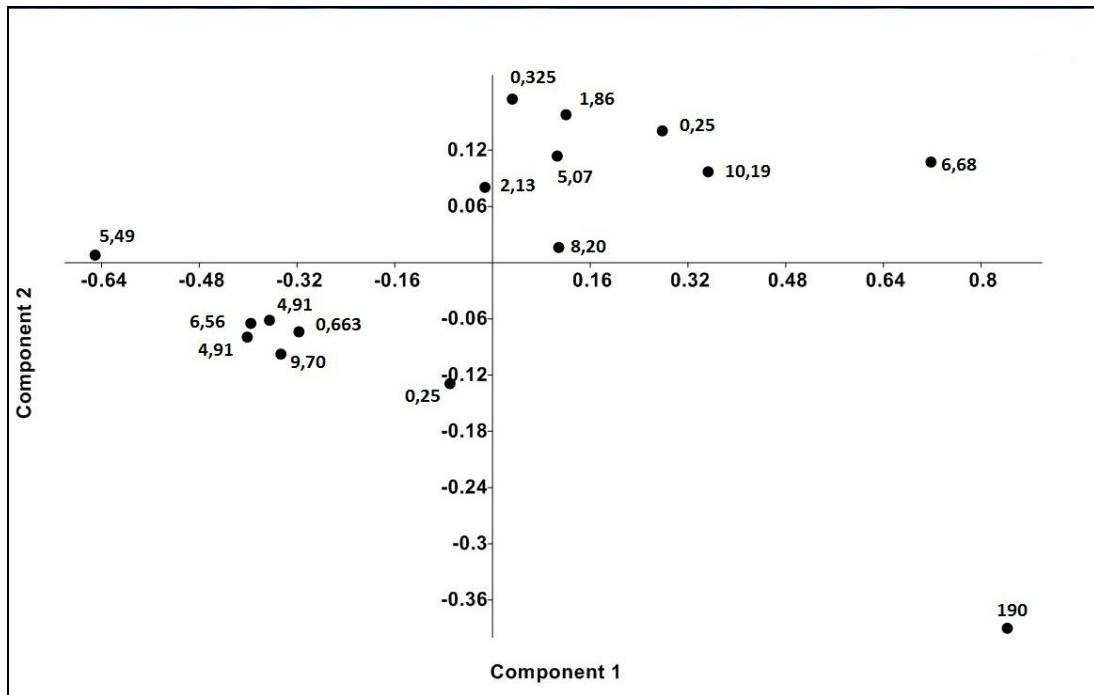
metodom. Pokušano je da se sužavanjem opsega spektra na optimalan, omogućiti zadovoljavajuća klasifikacija. Pokazalo se da je za ATR merenje klasifikacija rezultata dobijenih pomoću PCA i klaster analize bila slična kada su ATR tehnike primenjivane u celom pomenutom regionu spektra (1150–1770 cm^{-1}), kao i kada je isti deo spektra podeljen u dva regiona: 1150–1450 i 1450–1770 cm^{-1} .



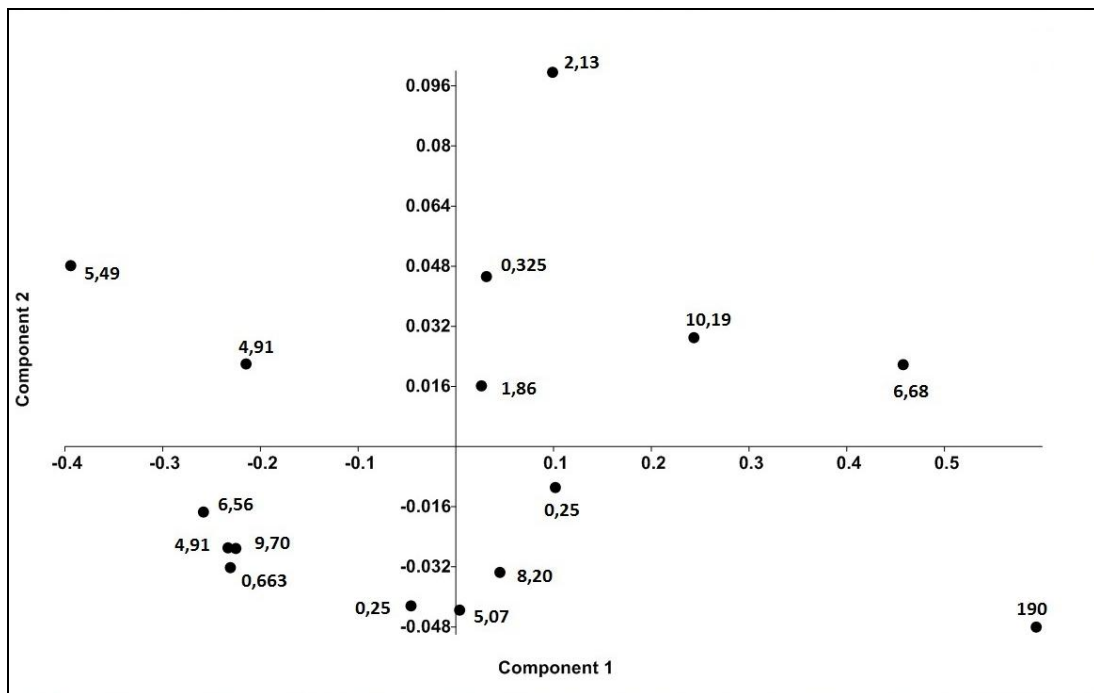
Slika 4.29 FTIR spektri kukuruza sa 0,325 mg/kg (crvena linija) i 190 mg/kg (plava linija) (A); uvećan deo spektra u opsegu 1600–1780 cm^{-1} (B).

Slike 4.30–4.32 prikazuju glavne komponente PC1 i PC2 izračunate iz prosečnih ATR spektara u različitim opsezima spektra. Tretman podataka je bio zadržan na minimumu. Svi podaci su prosek 4 uzastopna merenja, koji su zatim normalizovani. Kao što se može videti, uglavnom je dobijeno dobro razdvajanje između manje kontaminiranih i visoko

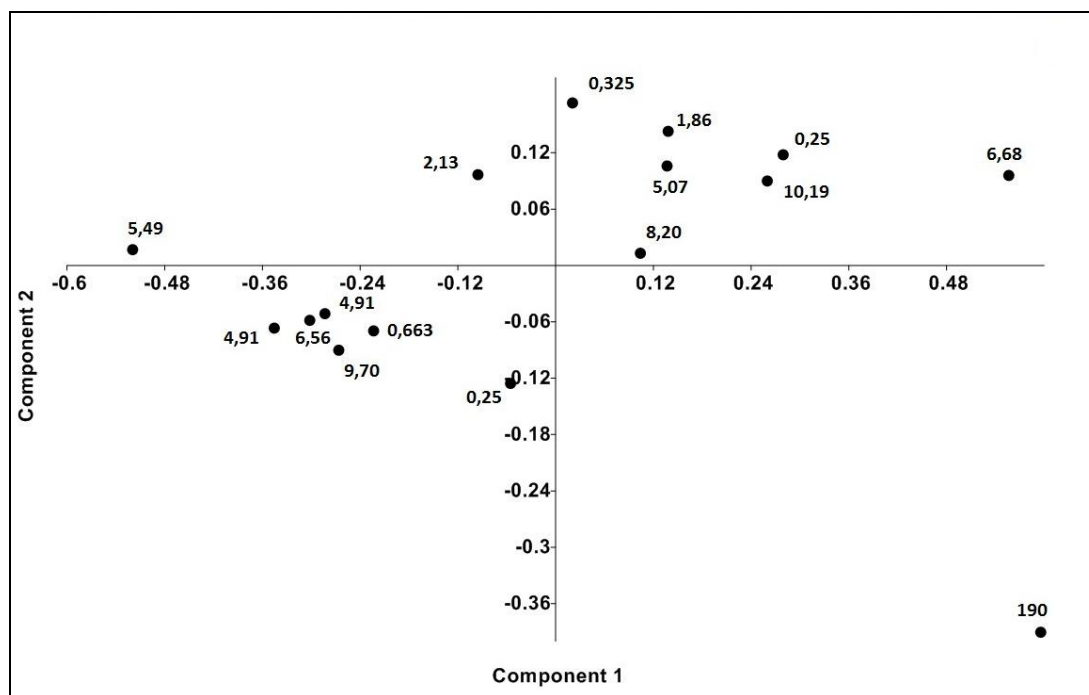
kontaminiranog uzorka. Dva klastera koja obuhvataju manje kontaminirane i visoko kontaminiran kukuruz su jasno razdvojena.



Slika 4.30 PCA prosečnih i normalizovanih FTIR spektara kukuruza sa različitim sadržajem fumonizina. Brojevi uzoraka predstavljaju koncentraciju fumonizina u mg/kg. Analizirani opseg spektra 1150–1770 cm^{-1} .



Slika 4.31 PCA prosečnih i normalizovanih FTIR spektara kukuruza sa različitim sadržajem fumonizina. Brojevi uzoraka predstavljaju koncentraciju fumonizina u mg/kg. Analizirani opseg spektra 1150–1450 cm^{-1} .

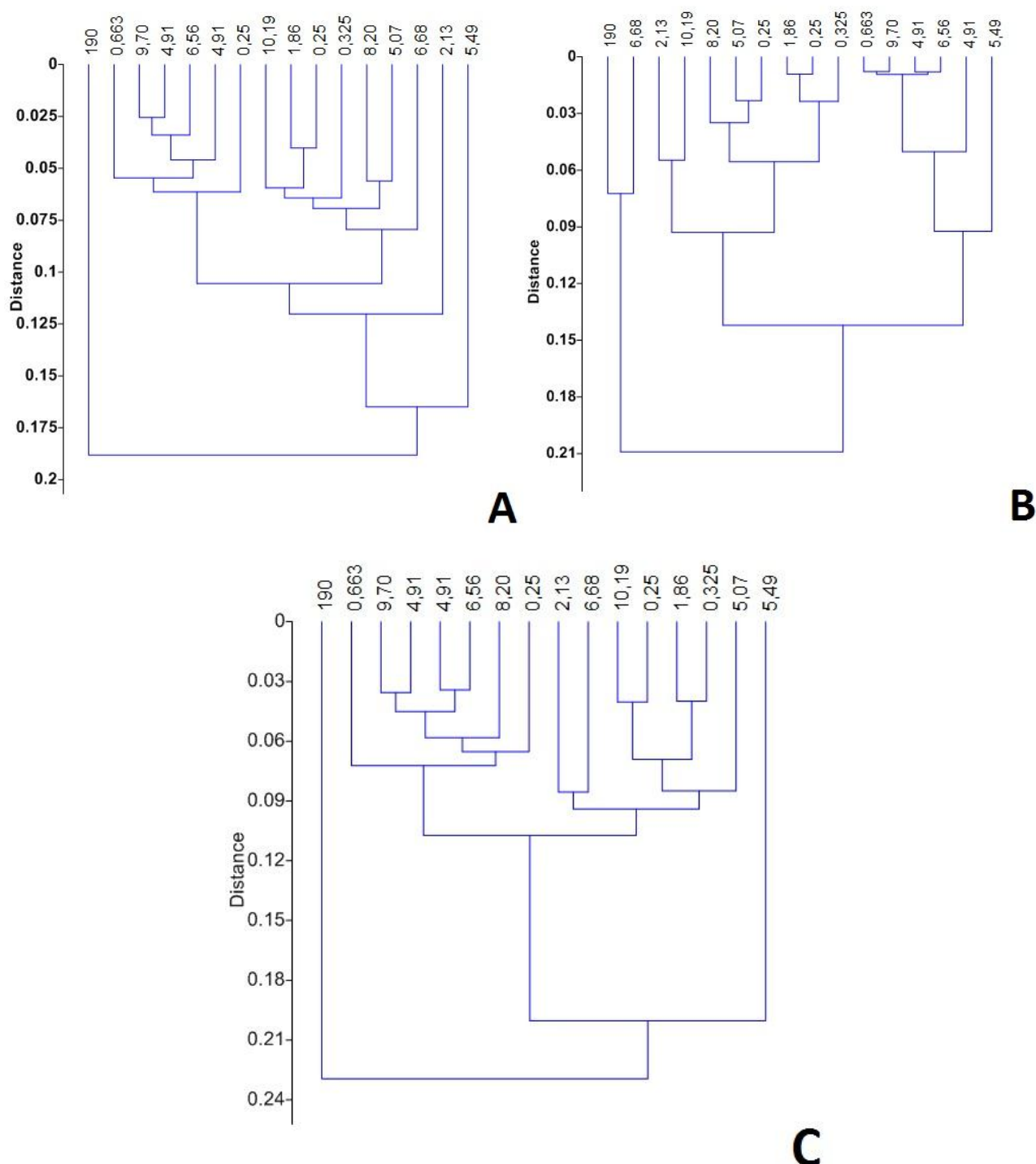


Slika 4.32 PCA prosečnih i normalizovanih FTIR spektara kukuruza sa različitim sadržajem fumonizina. Brojevi uzoraka predstavljaju koncentraciju fumonizina u mg/kg. Analizirani opseg spektra $1450\text{--}1770\text{ cm}^{-1}$.

Ova dva klastera su, takođe, reflektovana u rezultujućem dendrogramu nakon izvršene klaster analize sa prve dve glavne komponente što omogućava korektnu klasifikaciju uzoraka sa manje od 10 mg/kg i uzorka sa 190 mg/kg fumonizina (Slika 4.33). Naime, samo je visoko kontaminirani uzorak grupisan udaljeno od ostalih kontaminiranih uzoraka. Jasno razdvajanje i povezivanje pod-klastera kontaminiranih uzoraka nije bilo odgovarajuće. U slučajevima analize spektra u opsezima $1150\text{--}1770$ i $1450\text{--}1770\text{ cm}^{-1}$, osim što se odvojio uzorak sa 190 mg/kg fumonizina, na uvek sličan način odvojila su se dva klastera uzoraka kukuruza sa sadržajem fumonizina od 2,13 do 10,19 mg/kg. Međutim, u slučaju opsega $1150\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$ uzorak sa 190 mg/kg fumonizina nije jasno odvojen od ostalih uzoraka. Obzirom da ovu podelu ne možemo pripisati razlikama u koncentracijama fumonizina, moguće tumačenje je razlika u strukturi kukuruza koja je povezana sa eventualnim razlikama u uzorcima koje potiču od različitih hibrida (Abramović *et al.*, 2007). Neodgovarajuća klasifikacija je razumljiva ako se ima na umu da su promene u FTIR spektru, na osnovu kojih je izvršena klasifikacija veoma male.

Kao što se iz svega izloženog može zaključiti, na osnovu snimanja spektara nakon primene ATR, od 16 analiziranih uzoraka kukuruza korektno je klasifikovan jedino jako kontaminiran kukuruz sa 190 mg/kg u odnosu na ostale sa sadržajem manjim od 10 mg/kg. Takođe, nađeno je da je za procenu sadržaja fumonizina u kukuruzu ovom tehnikom,

potrebno dalje ispitivanje snimanjem spektara kontaminiranog kukuruza ali istog genotipa, kako bi se izbegao mogući uticaj različitih hibrida na izgled spektra.



Slika 4.33 Dendrogrami klaster analize prosečnih i normalizovanih FTIR spektara (A: 1150–1770; B: 1150–1450 B; C: 1450–1770 cm^{-1}) kukuruza sa različitim sadržajem fumonizina dobijeni primenom Chord-ove razdaljine i metode prosečnog povezivanja. Brojevi uzoraka predstavljaju koncentraciju fumonizina u mg/kg.

4.6 EKSPERTNI SISTEM ZA ODREĐIVANJE FUMONIZINA (Abramović *et al.*, 2005a)

Kao što se može zaključiti iz Teorijskog dela disertacije, metode određivanja fumonizina su veoma raznovrsne i brojne. Izuzetno veliki broj metoda zabeležen u literaturi je razvijen i modifikovan u različitim fazama određivanja, na razne načine (Jakšić, 2004; Berthiller *et al.*, 2014). I pored toga, do sada ove metode nisu na dovoljno jednostavan način na jednom mestu predstavljene. Da bi zainteresovan analitičar odabrao metodu koja zadovoljava potrebe njegove laboratorije, a da u isto vreme njegova laboratorija ispunjava uslove za sprovođenje odabrane metode, potrebno je mnogo vremena. Pre svega, neophodno je pribaviti i proučiti izuzetno obimnu dostupnu literaturu, a zatim odabrati odgovarajuću metodu. Dosadašnje studije koje daju preglede razvijenih metoda su obimne, a često i postupno naknadno dopunjavane. Uprkos svemu navedenom, do danas nije razvijen nijedan ES u oblasti analize mikotoksina koji bi pomogao analitičaru u odabiru metode i vodio ga kroz ceo analitički postupak.

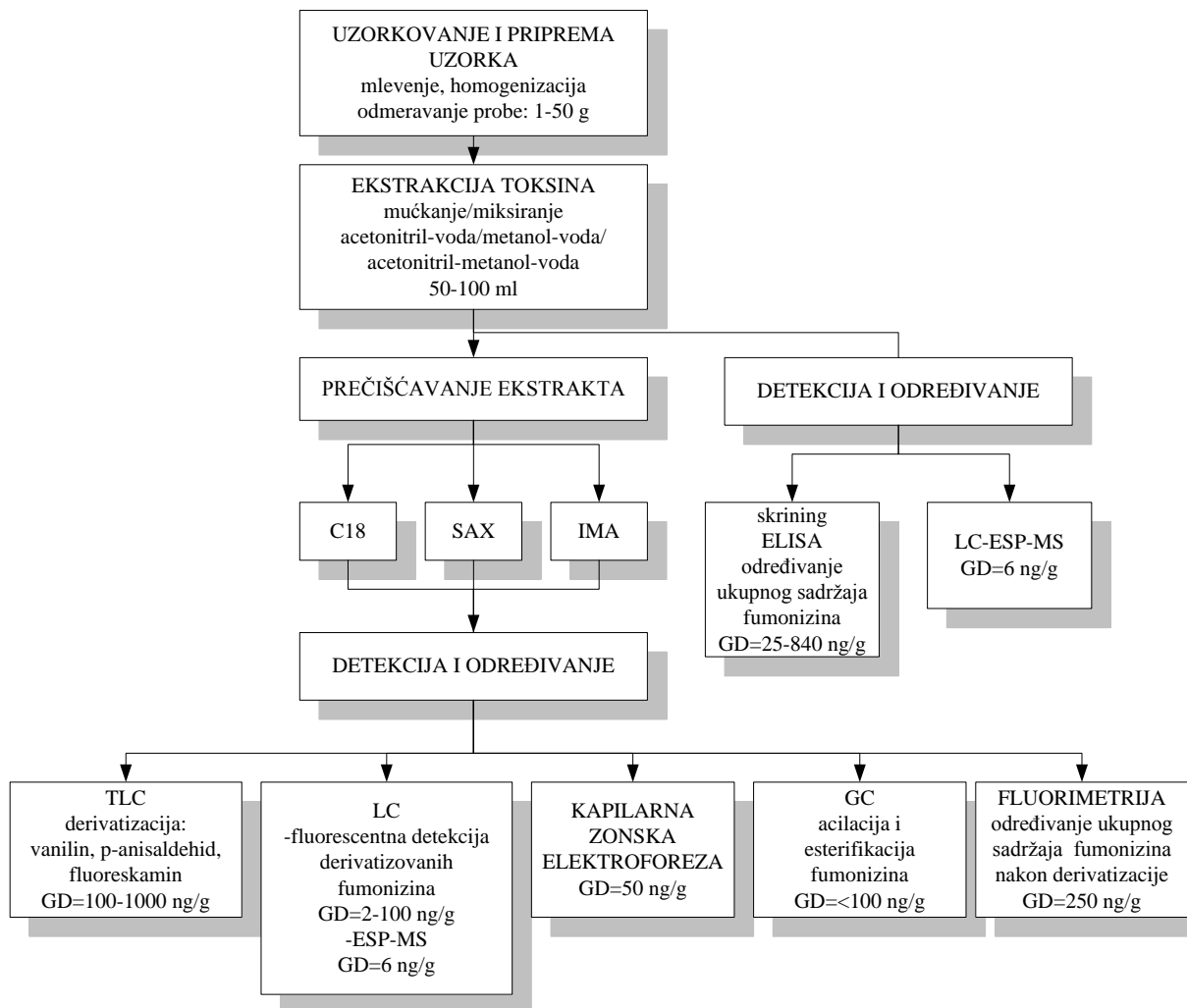
Zbog toga je cilj ove disertacije bio i da se razvije ES za rešavanje problema izbora optimalne analitičke metode za određivanje fumonizina u kukuruzu. Pored toga što se metode za određivanje fumonizina B-serije razlikuju po granici detekcije (Slika 4.34), postoji značajna razlika u ceni koštanja analize, kao i u njenoj dužini trajanja o čemu se vodilo računa pri izradi ES.

Osnova ES je ljuška koja može da radi pod raznim verzijama Microsoft Windows operativnog sistema. U njegovom potpunom uobličavanju i prilagođavanju korisnicima koji ne poznaju dovoljno računarsku tehniku korišćeni su razni alati obuhvaćeni unutar Microsoft Office, kao i softverski alati koji mogu da rade sa Microsoft Windows operativnim sistemom.

Pri razvoju objektno-orijentisanog ES rukovodili smo se idejom da mora da zadovolji nekoliko ciljeva i to:

1. Da bude modularan i lako proširiv.
2. Da se nove informacije i znanja mogu lako ugraditi u ES, a da se pri tome sistem odlučivanja (formalne logike) minimalno ili uopšte ne menja.
3. Da se prikupljanje i priprema podataka i postupaka može nesmetano i samostalno izvoditi od strane eksperata do konačne implementacije u ES, a da se prilikom implementacije olakša komunikacija između eksperta i sistem inženjera, kao i da se obezbedi brza implementacija.

4. Da se jednom razvijen ES može lako prevesti na druge jezike sa minimalnim promenama u sistemu formalne logike, kao i da njegovo inoviranje u tom jeziku bude što jednostavnije.
5. Da se razvijeni ES može lako preuzeti, kao i da se njegovo ažuriranje može lako realizovati putem Interneta.



Slika 4.34 Prikaz metoda za određivanje fumonizina.

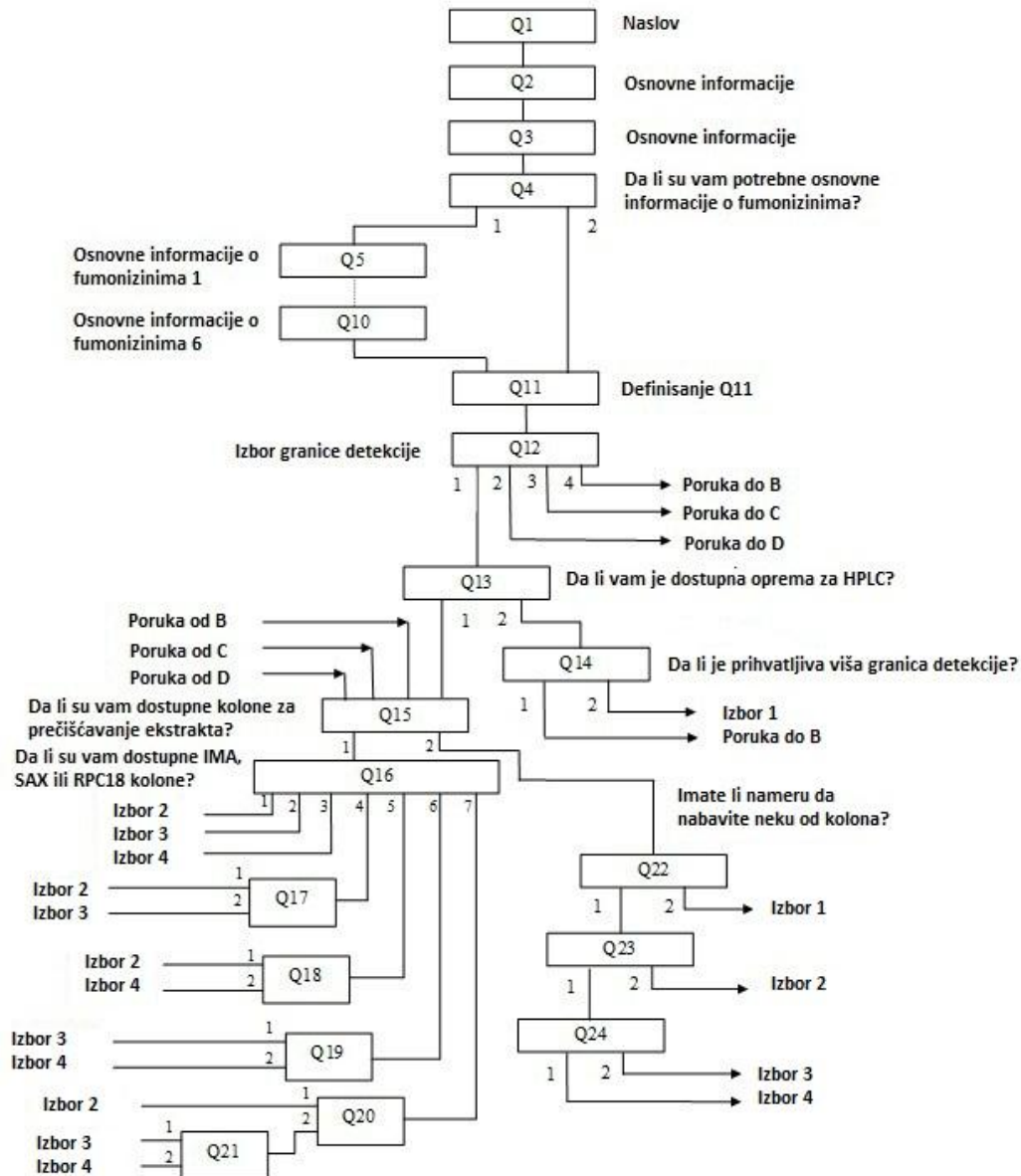
U cilju zadovoljenja ovih zahteva razvili smo ES u kome se često koriste grafički parametri. Sistem formalne logike je uglavnom napravljen tako da radi sa simboličkim parametrima koji su nezavisni od preciznog sadržaja njihove grafičke interpretacije. Na ovaj način smo bili u mogućnosti da razvijemo sistem formalne logike koji je pregledan i lak za proveru i kontrolu, modifikacije ili proširenja. U grafičkoj prezentaciji parametara je

obezbeđena puna sloboda u izboru teksta, jezika, tabela, matematičkih ili hemijskih formula, slika ili crteža.

U razvoju baze znanja je bilo veoma važno da se formalizacija, organizacija i parametrizacija baze znanja realizuju na takav način da budu korisnički orijentisani i da u njima ne bude mogućih nedoumica koje će otežati korisniku odlučivanje. Sistem odlučivanja je načinjen tako da obezbedi korisniku najkraći put do dobijanja odgovora koji treba da bude jasan i nedvosmislen, kao i da se korisnicima obezbede što potpunije informacije o postupcima koje treba da primene. Takođe, u razvoju ovog ES smo izabrali određene kriterijume koji su korišćeni u dizajniranju hijerarhijske strukture, kao i prilikom definisanja izbora za odgranavanje.

U razvoju ES i njegovoj adaptaciji za širok spektar mogućih korisnika čak i onih koji nisu upoznati sa računarskom tehnikom, pored ES ljuske koristili smo i neke od alata koje sadrži Microsoft Office, kao i neke od softverskih alata koji se mogu koristiti sa Microsoft Windows operativnim sistemima. ES je razvijen imajući uvek na umu činjenicu da njegova primena treba da bude maksimalno pojednostavljena, kao i da bude laka za korišćenje kako za specijaliste hemijske kontrole kvaliteta, tako i za one koji to nisu.

U razvoju ekspertnog sistema opredelili smo se za određivanje fumonizina u kukuruzu imajući u vidu da ovi toksini najčešće kontaminiraju upravo ovu žitaricu. Pri izradi ekspertnog sistema je prihvaćen deterministički pristup koji polazi od pretpostavke dobrog poznavanja navedene problematike od strane eksperata iz date oblasti. Sistemom su obuhvaćena rešenja koja su do sada objavljena u literaturi za navedenu oblast, kao i naša iskustva do kojih smo došli tokom ispitivanja pojedinih metoda (Jakšić, 2004). Na osnovu tih informacija, kao i na osnovu zahtevane granice detekcije metode, raspoložive opreme, hemikalija, kao i vremena koje eksperimentator ima na raspolaganju za određivanje, ekspertni sistem daje predlog optimalnog postupka određivanja fumonizina u kukuruzu počevši od uzimanja uzorka za analizu, pripremanja svih potrebnih rastvora, postupka određivanja, izračunavanja rezultata, pa do pregleda relevantne literature. Da bi se dobio uvid u ES kao celinu i njegove pojedine delove formirano je osnovno stablo odlučivanja (Slika 4.35).



Slika 4.35 Dijagram stabla odlučivanja jednog dela ekspertnog sistema za izbor optimalnog postupka određivanja fumonizina.

Na početku rada korisnik dobija osnovne informacije o ES (Slika 4.35, Q2 i Q3) a zatim, ako korisnik želi, i osnovne informacije o fumonizinima (produkcija i prisustvo u prirodi, hemijska struktura fumonizina, toksični efekti fumonizina, karcinogenost, pravna regulativa, granice detekcije različitih metoda, Slika 4.35, Q5-Q10). Ove informacije o fumonizinima pri kasnijem korišćenju ES mogu biti izostavljene. Parametar Q11 je uveden da bi omogućio jednostavnije širenje, odnosno grananje delova ES, kao i radi lakše njegove kontrole. Nakon toga, korisnik bira sa kojom osetljivošću, odnosno GD metode želi da određuje fumonizine (Slika 4.35, Q12). U ovom ES metode su prema GD podeljene u četiri

grupe. Sa najnižom GD je tečna hromatografija (0,01 µg/g), zatim kapilarna zonska elektroforeza (0,05 µg/g), gasna hromatografija i hromatografija na tankom sloju (0,1 µg/g), i ELISA i fluorimetrija (0,25 µg/g). Pošto se metode HPLC–MS/MS ređe koriste u rutinskom radu, one nisu bile obuhvaćene ovim ES. Ukoliko korisnik želi da primeni metodu sa najnižom GD, tj. tečnu hromatografiju (LC) treba da odgovori na pitanje da li raspolaže sa odgovarajućom opremom. Ako je odgovor potvrđan (Slika 4.35, Q13, 1), sledeće pitanje je da li raspolaže sa nekom od kolona (IMA kolonom, SAX kolonom i/ili C₁₈ reverznom fazom), ili ne (Slika 4.35, Q15). Ukoliko je odgovor potvrđan moguće je sedam opcija u zavisnosti da li korisnik raspolaže sa samo jednom od kolona (Slika 4.35, Q16, 1–3), sa dve (bilo koje) kolone (Slika 4.35, Q16, 4–6) ili sa sve tri kolone (Slika 4.35, Q16, 7). Ukoliko raspolaže sa samo jednom vrstom kolona ES mu daje odgovarajući postupak (izbori 2–4). Međutim, ukoliko korisnik ES raspolaže sa više od jedne kolone tada mu se nudi pogodniji postupak koji obezbeđuje hromatogram sa manje interferirajućih pikova. Ukoliko, pak korisnik ne raspolaže sa kolonama (Slika 4.35, Q15, 2) tada mu se predlažu pojedine kolone uz davanje u okviru „HELP“-a dodatnih informacija o njihovim prednostima, odnosno nedostacima (Slika 4.35, Q22–Q24).

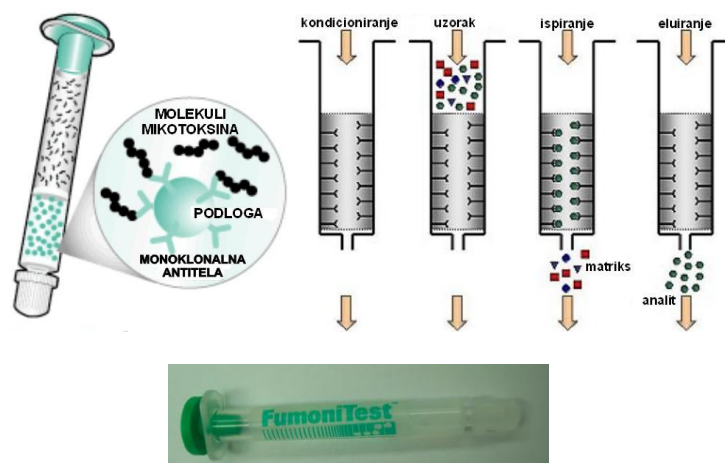
Kao rezultat konsultacije korisnik dobija osnovne informacije o tehnici (u ovom slučaju o LC), zatim detaljan postupak određivanja, polazeći od uzorkovanja, potrebnih hemikalija, kao i pripreme svih neophodnih rastvora, odgovarajuće opreme, pripremanja probe, načina određivanja rezultata, izračunavanja rezultata, i obezbeđuje pregled relevantne literature (Slika 4.36). Način dolaska do jednog ovakvog rešenja regulisan je tačno projektovanim pravilima (Slika 4.37).

Ukoliko, pak korisnik ne raspolaže sa LC treba da definiše da li je za njegovo određivanje fumonizina u kukuruзу prihvatljiva viša GD (Slika 4.35, Q14). Ukoliko je odgovor potvrđan (broj 1) tada se obezbeđuje odvajanje na granu B. Ukoliko je pak odgovor negativan (broj 2) korisnik dobija informaciju da se drugom tehnikom ne može postići željena GD i da je kraj konsultacije (Slika 4.35, izbor 1).

Ukoliko je na početku rada korisnik definisao višu GD izbor metoda je svakako veći (Slika 4.35, grananje prema granama B–D). Tako na primer ako je prihvatljiva GD od 0,25 µg/g korisnik može da primeni pored LC, kapilarnu zonsku elektroforezu, gasnu hromatografiju, hromatografiju na tankom sloju, kao i ELISA i fluorimetriju. Da bi se izbor suzio, tada se korisniku nudi mogućnost izbora metode i na osnovu cene analize, kao i njene dužine trajanja (ne vidi se na Slici 4.35).

APARATURA

Imunoafinitetna kolona (FumoniTest™, Vicam, Watertown, MA, USA). Po deklaraciji kolona je za jednokratnu upotrebu, a kapacitet kolone je $\geq 10 \mu\text{g}$ fumonizina B₁ i B₂. Međutim, prema našim istraživanjima kolona se može primeniti 10 puta nakon regeneracije kako je opisano kasnije.

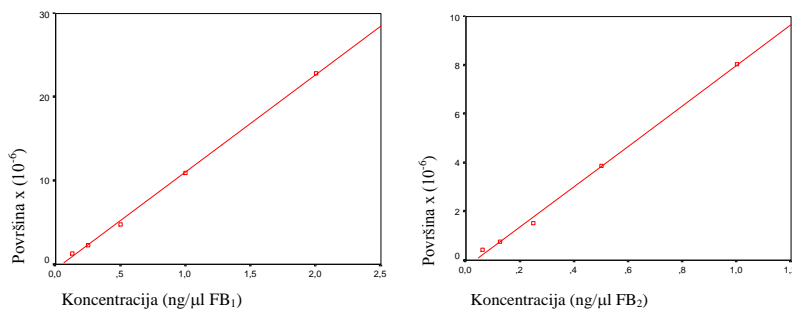


Izgled FumoniTest™ kolone i faze prečišćavanja ekstrakta pomoću IMA-kolona.

ANALITIČKI POSTUPAK (nastavak)

Kalibraciona kriva

Pripremi se kalibraciona kriva pomoću serije standardnih rastvora. Ovi rastvori obuhvataju opseg koncentracija od 0,125 – 2,000 $\mu\text{g/g}$ FB₁ i 0,0625 – 1,000 $\mu\text{g/g}$ FB₂. Kalibracionu krivu treba snimiti pre LC analize i proveriti linearnost.



Kalibracione krive za određivanje FB₁ i FB₂.

Kalibracione krive, koeficijenti korelacije i rezidualne standardne devijacije za određivanje FB₁ i FB₂

Mikotoksin	Opseg koncentracija (ng/μl)	Kalibraciona kriva	Koeficijent korelacije	Rezidualna standardna devijacija
FB ₁	0,125 – 2,000	$y = 11,64 \cdot 10^5 c - 0,57 \cdot 10^6$	0,999	0,37
FB ₂	0,0625 – 1,000	$y = 8,30 \cdot 10^6 c - 0,29 \cdot 10^6$	0,999	0,18

Linearnost je data prema jednačini: $y = mx + b$ (m –nagib, b –odsečak na y -osi).

Linearnost za FB₁ i FB₂ je određena kalibracijom pomoću pet tačaka.

Slika 4.36 Grafička prezentacija jednog dela rezultata konsultacije.

RULES:

 RULE NUMBER: 1

IF:

Ekran 2 OK
 AND Ekran 3 OK
 AND Da li zelite dodatne informacije o fumonizinima? da
 AND info01 OK
 AND info02 OK
 AND info03 OK
 AND info04 OK
 AND info05 OK
 AND info06 OK

THEN:

A1 1

RULE NUMBER: 5

IF:

A1 1
 AND Odaberite granicu detekcije metode kojom zelite da detektujete i odredite sadrzaj fumonizina?
 = 0,01
 AND Za ovo odredjivanje Vam je potreban tecni hromatograf sa fluorescentnim detektorom. Da li raspolazete sa potrebnom opremom?
 DA

THEN:

A2 1

ELSE:

A2 0

RULE NUMBER: 8

IF:

A2 1
 OR: A16 1
 AND Za preciscavanje sirovog ekstrakta kukuruza mogu se primeniti IMA, SAX i RP C18 kolone. Da li raspolazete nekom od njih?
 Da
 AND Kojom od navedenih kolona raspolazete? IMA AND SAX AND RP C18
 AND Da li zelite da primenite kolonu IMA?
 Da

THEN:

Postupak Choice02 - Confidence=10/10
 and REPORT(IMA01.out)
 and REPORT(IMA02.out)
 and REPORT(IMA03.out)
 and REPORT(IMA04.out)
 and REPORT(IMA05.out)
 and REPORT(IMA06.out)
 and REPORT(IMA07.out)
 and REPORT(IMA08.out)
 and REPORT(IMA09.out)

Slika 4.37 Pravila za definisanje jednog rezultata konsultacije.

Pogodne osobine razvijenog ES su njegova transparentnost, jednostavnost za rukovanje i laka nadogradnja. Naime, nezavisna priprema grafičkih parametara

pojednostavljuje saradnju eksperta iz oblasti mikotoksina i dizajnera ES u razvoju i nadogradnji ES. Važno je naglasiti da pri nadogradnji sistem odlučivanja ostaje nepromenjen, a da se postiže značajna efikasnost, brzina i pouzdanost ES. Takođe, olakšava se prevod na druge jezike. ES je jeftino rešenje koje obuhvata znanje eksperta na visokom nivou. Prezentacija važnih informacija u formi šema, tabela, grafika i formula nije uobičajena za konvencionalne ES koji uobičajeno nude manje tekstualnih informacija, ali ima veliku prednost jer omogućava lakše korišćenje ES.

5 IZVOD

Fumonizini su grupa fuzarijumskih mikotoksina koji najčešće kontaminiraju kukuruz, a njihovo prisustvo je utvrđeno i u drugim supstratima. Ovi mikotoksini su svrstani u grupu potencijalno kancerogenih jedinjenja i statistički su povezani sa slučajevima kancera jednjaka kod ljudi, a kod životinja izazivaju različite poremećaje. Uz aflatoksine, ohratoksin A, zearalenon i trihotecene, fumonizini su najviše proučavani i određivani mikotoksini, a njihove maksimalno dozvoljene koncentracije su zakonski regulisane. Zbog niskih koncentracija i različitih vrsta uzoraka, veoma je važno unapređenje metoda za određivanje fumonizina.

Metode za određivanje fumonizina se sastoje od nekoliko koraka koji su od velike važnosti za dobijanje tačnih i pouzdanih rezultata. Ekstrakcija, prvi korak u pripremi uzorka, je važan za dobijanje zadovoljavajućih rezultata. U cilju unapređenja postojećih metoda ekstrakcije fumonizina u smislu iznalaženja jeftinijeg i ekološki prihvatljivijeg ekstrakcionog sredstva, ispitana je mogućnost ekstrakcije fumonizina iz kukuruza vodom i fosfatnim puferom, umesto sa do sada najčešće korišćenom smešom acetonitril–metanol–voda. U ovom istraživanju, ekstrakcione metode bez organskih rastvarača su primenjene za određivanje fumonizina B₁ (FB₁), B₂ (FB₂), i B₃ (FB₃) metodom tečne hromatografije sa fluorescentnim detektorom (HPLC–FLD), kao i ukupnih fumonizina pomoću imunoheimijske metode (ELISA). Prinos HPLC–FLD metode određen na osnovu rezultata analize dva referentna materijala na bazi kukuruza, nakon ekstrakcije destilovanom vodom je iznosio 99±5,6% i 86±3,9% za FB₁; odnosno, 111±5% i 81±1% za FB₂. Nakon ekstrakcije fosfatnim puferom (FP), prinos za FB₁ je iznosio 104±20,2% i 92±8,6%, a za FB₂ 149±13% i 100±5,8%. Za FB₃ prinos je bio 118±0,5% nakon ekstrakcije sa vodom i 131±8,8% sa FP. Korišćenjem dve ELISA metode dobijen je prinos od 100±0,6% i 133±0,7% nakon ekstrakcije sa vodom, dok je primenom ekstrakcije sa FP prinos iznosio 92±2,2% i 123±5,4%. Granice detekcije i određivanja FB₁, FB₂, i FB₃ nakon ekstrakcije neorganskim rastvaračima i određivanja sa HPLC–FLD su bile na nivou µg/kg i nešto više nego primenom ekstrakcije organskim rastvaračima. Nađeno je da nema značajne razlike ($p > 0,05$) između rezultata određivanja individualnih i ukupnih fumonizina u referentnom materijalu primenom ekstrakcije sa neorganskim rastvaračima i AOAC metode, odnosno metoda proizvođača ELISA kitova.

Rezultati određivanja svih fumonizina u svim prirodno kontaminiranim uzorcima nakon ekstrakcije sa FP su u saglasnosti ($p > 0,05$) sa rezultatima AOAC metode.

Iako je preciznost određivanja primenom neorganskih rastvarača nešto manja u poređenju sa organskim ekstrakcionim sredstvima, ona je u skladu sa stavovima Evropske komisije koji se tiču zahteva za analitičke metode (EC, 2006a). Takođe je nađeno da se FumoniTestTMWB kolone mogu koristiti još jednom nakon regeneracije, ukoliko sadržaj fumonizina u uzorcima nije veći od 1 mg/kg ukupnih fumonizina.

Zbog činjenice da su fumonizni često prisutni u uzorcima žitarica širom sveta, a da je dokazano njihovo prisustvo u kukuruзу i pšenici sa našeg klimatskog područja, kao i zbog njihove toksičnosti i stabilnosti, u ovoj doktorskoj disertaciji proučavana je rasprostranjenost kontaminacije u našoj zemlji. Ispitan je sadržaj fumonizina u velikom broju uzoraka radi sticanja potpunijeg uvida u stanje kod nas. Naime, iako postoje tvrdnje da su fumonizini zastupljeniji u tropskim krajevima nego u kontinentalnim, zbog česte izolacije plesni iz roda *Fusarium moniliforme*, producenta fumonizina i u uzorcima našeg klimatskog područja, kao i promene klime tokom poslednjih godina, ispitana je korelacija između vremenskih uslova i produkcije fumonizina. *Fusarium* plesni se razvijaju već u polju, te je produkcija toksina najveća u periodu pre žetve. Međutim, rukovanje žitaricama tokom žetve, kao i uslovi skladištenja mogu pogodovati daljoj produkciji plesni i toksina. Zato je ispitano uticaj navedenih faktora u uslovima naše poljoprivredne proizvodnje na kontaminaciju žitarica fumonizinima. Nakon poređenja rezultata dobijenih primenom HPLC–FLD i ELISA metode, zaključeno je da se za dalje određivanje sadržaja fumonizina u žitaricama primeni ELISA metoda, jer joj je ponovljivost i tačnost u skladu sa zahtevima za analitičke metode za određivanje fumonizina.

U cilju dobijanja što realnije slike o kontaminiranosti fumonizinima žitarica i hraniva proizvedenih u našoj zemlji, u okviru ove doktorske disertacije je analiziran veći broj uzoraka na prisustvo i sadržaj ovih mikotoksina. Ispitani su uzorci kukuruza, sakupljeni tokom višegodišnjeg perioda (2005. i 2009–2013. godine) i pšenice roda 2010. i 2012. godine, sa područja severne Srbije. Ispitivana je kontaminiranost kukuruza sa područja severne Srbije fumonizinima, drugim mikotoksinima (aflatoksinima, ohratoksinom A i zearalenonom) i plesnima, kao i mogući uticaj klimatskih faktora na stepen kontaminacije. Tako je ispitivanje skladištenih uzoraka roda 2005. godine pokazalo da tradicionalni način skladištenja u čardacima ne utiče značajnije na produkciju fumonizina u kukuruзу. Utvrđeno je da je u odnosu na ostale određivane mikotoksine, 2009. godine najveći procenat uzoraka bio kontaminiran fumonizinima, što je verovatno posledica prisustva plesni roda *Fusarium* kao

najzastupljenijih. U kontaminiranim uzorcima je utvrđena koncentracija fumonizina u intervalu od 0,030–1,52 mg/kg. Sadržaj ispitivanih mikotoksina (fumonizina, aflatoksina, ohratoksina A i zearalenona) u 5 od 34 uzorka roda 2009. je bio niži od granica detekcije primenjenih metoda, a 13 od 29 pozitivnih uzoraka su sadržali više od jednog toksina. Sadržaj aflatoksina nije bio viši od propisanih maksimalnih količina u ishrani životinja, dok sadržaj ostalih toksina nije bio viši od propisanih/predloženih vrednosti u Evropskoj Uniji. Od 24 ispitana uzorka kukuruza roda 2010. godine jedan je sadržavao fumonizine a tri deoksinivalenol iznad maksimalno dozvoljene koncentracije. Međutim, u periodu od 2011. do 2013. godine pojava fumonizina je bila vrlo izražena. Tako je 2011. 88% (od analiziranih 17 uzoraka), 2012. 97% (analizirano 78 uzoraka), a 2013. godine čak 98% (od analiziranih 47) uzoraka kukuruza bilo kontaminirano fumonizinima, a srednje vrednosti su iznosile 1,492 mg/kg, 2,229 mg/kg, odnosno 0,672 mg/kg, sa najvišom zabeleženom koncentracijom od 20,34 mg/kg 2012. godine.

Ispitivanje sadržaja ukupnih fumonizina u pšenici roda 2010. godine je pokazalo da je 52% od 75 ispitanih uzoraka sadržavalo fumonizine u koncentraciji 0,027 do 0,614 mg/kg, dok su samo u jednom od 8 ispitanih uzoraka pšenice roda 2012. bili detektovani.

Sumirajući sve rezultate, od ukupno 235 analiziranih uzoraka kukuruza, 83% je bilo kontaminirano fumonizinima, a srednja vrednost koncentracije je iznosila 1,009 mg/kg. U znatno manjem broju analiziranih uzoraka pšenice (83) je utvrđena niža frekvencija kontaminiranih uzoraka od 48%. Rezultati kontaminiranosti useva fumonizinima za svaku godinu pojedinačno su povezivani sa vremenskim prilikama koje su pratile istu. Tako su, prema izveštaju Republičkog hidrometeorološkog zavoda Srbije, količina padavina i prosečne temperature vazduha 2005. i 2009. godine bile u nivou višegodišnjeg proseka, što je verovatno doprinelo sličnom rezultatu kontaminiranosti kukuruza fumonizinima u opsegu od 50–51%. Za razliku od toga, 2010. godina je bila izrazito vlažna, dok su 2011. i 2013. bile sušne i tople, a 2012. godina izrazito sušna. Ako se podaci o klimatskim uslovima uporede sa koncentracijama i frekvencijom pozitivnih uzoraka na fumonizin, može se zaključiti da su klimatska odstupanja od prosečnih u pogledu količina padavina i temperature bila nepovoljna za mikotoksikološku bezbednost kukuruza. Klimatske promene su dovele do sve češćih suša i visokih temperatura koje pogoduju rastu plesni, razvoju biljnih bolesti i štetočina, a time i produkciji toksina.

Na osnovu iznetog, može se reći da su, pored drugih mikotoksina, fumonizini prisutni u kukuruza iz Srbije, mada u relativno niskim koncentracijama. Naime, od ukupno 235 analiziranih uzoraka kukuruza, u svega 11 uzoraka kukuruza su određene količine fumonizina

koje su veće od maksimalno dozvoljenih količina propisanih važećim regulativama u Srbiji i Evropskoj uniji (4 µg/g), a nijedan uzorak nije imao sadržaj veći od 60 mg/kg koliko je maksimalno prihvatljivo u kukuruza koji se koristi za ishranu životinja. Nivoi kontaminacije pšenice su bili znatno niži u odnosu na kukuruz, sa maksimalnom koncentracijom od 0,614 mg/kg. Različita kontaminiranost kukuruza i pšenice fumonizinima u analiziranim uzorcima može se objasniti pre svega različitom osetljivošću analiziranih useva prema *Fusarium* vrstama, odnosno različitom pogodnošću matriksa za produkciju fumonizina.

Takođe je zaključeno da je prisustvo fumonizina potvrđeno u uzorcima kukuruza u poslednjih nekoliko godina u znatno većem procentu, a da su koncentracije slične onima zabeleženim u zemljama u okruženju, uz izvesna odstupanja, obzirom na klimatske uslove. Razlike u kontaminiranosti useva fumonizinima u zemljama regiona su posledica nekoliko faktora. Pre svega činjenice da nije bilo moguće porediti iste žetvene godine, ali i da pojedini autori nisu svoje rezultate povezivali sa klimatskim prilikama.

Da bi se ispitalo prisustvo fumonizina i aflatoksina, različita hrana na bazi žitarica je analizirana ELISA metodama. Korišćene metode su brze, imaju zadovoljavajuću ponovljivost i prinos od 98% za ukupne fumonizine i 94,3% za aflatoksine. U uzorcima iz 2010. godine, sadržaj aflatoksina je u svim materijalima bio ispod granice detekcije, a u četiri od pet analiziranih uzoraka hrane na bazi kukuruza, sadržaj fumonizina je bio iznad granice detekcije, ali ispod maksimalno dozvoljenih vrednosti propisanih za ishranu ljudi. Rezultati ispitivanja uzoraka iz 2012. godine su pokazali da su svi ispitani uzorci bili kontaminirani fumonizinima, a 55% aflatoksinima. Sadržaj fumonizina nije prelazio maksimalno dozvoljenu granicu propisanu važećim Pravilnikom, dok su 3 uzorka bila neispravna zbog višeg sadržaja aflatoksina. Dobijen je visok linearni koeficijent korelacije ($r = 0,947$; $p < 0,005$), između sadržaja fumonizina i aflatoksina u proizvodima od kukuruza. Dobijeni rezultati ispitivanja hrane za ljude pokazuju neophodnost ovakvih kontrola.

Nakon primene razvijene metode koja podrazumeva ekstrakciju fumonizina iz lekovitog bilja pomoću FP, prečišćavanje imunoafinitetnim kolonama i određivanje HPLC–FLD metodom, fumonizini nisu detektovani ni u jednom uzorku lekovitog bilja u Srbiji. To ukazuje da iako su plesni roda *Fusarium* prisutne na lekovitom bilju, one nisu producenti fumonizina na kamilici, hajdučkoj travi i majčinoj dušici u uslovima gajenja, klime, skladištenja i transporta u Srbiji.

U cilju razvoja brze, jeftine, a u isto vreme pouzdane metode analize plesni roda *Fusarium* kao indikatora prisustva fumonizina u uzorcima kukuruza, ispitana je mogućnost primene infracrvene spektroskopije sa Furijeovim transformom. Uzorci kontaminiranog

kukuruza su prethodno kvantifikovani ELISA metodom. Za određivanje fumonizina u uzorcima kukuruza je primenjena tehnika umanjene ukupne refleksije (ATR).

Ekspertni sistemi (ES) se poslednjih dvadesetpet godina primenjuju u sve većem obimu u različitim oblastima ljudske delatnosti kao izvanredno sredstvo za rešavanje kompleksnih problema koji zahtevaju znanje i iskustvo odgovarajućih eksperata. Jedna od tih oblasti je i hemijska analiza u kojoj je već razvijen značajan broj ekspertnih sistema. U okviru ove disertacije je realizovan ES za rešavanje problema izbora optimalnog postupka određivanja fumonizina u kukuruzu, imajući u vidu da ovi toksini najčešće kontaminiraju upravo ovu žitaricu. Rezultati ispitivanja i unapređivanja različitih metoda i izrada ekspertnog sistema daju rešenje u pogledu izbora optimalne metode skrininga i kvantitativnog određivanja fumonizina. Na maksimalno pojednostavljen način za korisnike, na osnovu zahtevane granice detekcije metode, raspoložive opreme, hemikalija, kao i vremena koje eksperimentator ima na raspolaganju za određivanje, ES daje predlog optimalnog postupka određivanja fumonizina u kukuruzu počevši od uzimanja uzorka za analizu, pripremanja svih potrebnih rastvora, postupka određivanja, izračunavanja rezultata, pa do pregleda relevantne literature.

Na osnovu pregleda kontaminiranosti fumonizinima u našoj zemlji zaključuje se o potrebi za redovnom analizom hrane i primenom naprednih tehnologija u proizvodnji hrane i hrane za životinje u cilju smanjenja štetnih uticaja fumonizina. Takođe se na osnovu dobijenih rezultata daje predlog o usaglašavanju zakonske regulative koja se tiče maksimalno dozvoljenih vrednosti fumonizina u hrani za životinje sa Evropskom Unijom.

6 SUMMARY

A contribution to the determination of fumonisins in grain and medicinal plants in Serbia

Fumonisin are a group of *Fusarium* mycotoxins, which are very common contaminants of maize. Their presence has been established in a variety of other substrates. These mycotoxins belong to the group of possibly carcinogenic compounds and are associated with oesophageal cancer in humans and a range of disorders in animal species. Besides the aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and trichotecenes, also fumonisins are the most extensively investigated mycotoxins and their maximum permitted levels are regulated by the relevant law. Low concentrations of these agents and wide variety of samples strongly suggest the need for further improvement of methods for their determination.

The methods for the determination of fumonisins encompass several essential steps that are of great importance for obtaining accurate and reliable results. Extraction, as the first step in the sample preparation, is crucial for a satisfactory recovery. In order to improve the extraction methods of fumonisin by finding a cheaper and ecologically more acceptable extractant, the possibility of fumonisin extraction from maize with water and phosphate buffer instead of the most frequently used acetonitrile–methanol–water mixture was investigated. In this study, extraction methods without organic solvents were applied for the quantification of fumonisins B₁ (FB₁), B₂ (FB₂), and B₃ (FB₃) by HPLC with fluorescence detector (FLD) and of total fumonisins by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The recoveries of the HPLC–FLD determination of two reference materials after extraction with distilled water were 99±5.6% and 86±3.9% for FB₁, and 111±5% and 81±1% for FB₂, while the extraction with phosphate buffer (PB) resulted in the recoveries of 104±20.2% and 92±8.6%; for FB₁ and 149±13% and 100±5.8% for FB₂. For FB₃, the recovery with distilled water was 118±0.5% and with PB 131±8.8%. Two ELISA methods gave the following recoveries for total fumonisins: 100±0.6% and 133±0.7% after the extraction with distilled water and 92±2.2% and 123±5.4% with PB. The limits of detection and quantification using inorganic solvents and the HPLC–FLD method were at the level of µg/kg for all fumonisins, and somewhat higher than those obtained using organic extraction methods. The determination of individual and total fumonisins in the reference material by applying

extraction with inorganic solvents revealed no significant difference ($p > 0.05$) as compared to the AOAC method and methods recommended by ELISA manufacturers.

Results of determination of fumonisins in all naturally contaminated samples after PB extraction are in agreement ($p > 0.05$) with those of AOAC method. Generally, the extraction using inorganic solvents proved to be very effective for all the types of real, naturally contaminated samples.

Although the determination using inorganic solvent is somewhat less precise than the extraction with organic solvents, it is in accordance with the requirements of the European Commission pertaining to analytical methods (EC, 2006a). It was established that FumoniTestTMWB column could be used once more after regeneration, provided that fumonisin content in the samples does not exceed 1 mg/ kg of total fumonisin.

Having in mind the worldwide occurrence of fumonisins in cereals, well-established presence of these toxins in maize and wheat samples in our climatic region as well as its toxicity and stability, this doctoral dissertation is aimed at researching the extent of contamination in our country. Fumonisin content is examined in a large number of samples that enabled a better insight into the situation in our country. In spite of the generally accepted opinion on higher prevalence of fumonisins in tropical regions as compared to the continental area, frequent isolation of fumonisin-producing moulds *Fusarium moniliforme* from samples originating from our climatic region as well as apparent climatic changes of the past few years have prompted the research on the correlation between climatic changes and fumonisin production. *Fusarium* moulds can develop in a field environment, thus the most extensive toxin production occurs before harvest. However, grain handling during harvesting and storage conditions can substantially facilitate mould growth and toxin production. In that respect, we investigated the effects of aforementioned factors on the fumonisins contamination of cereal crops under conditions of agricultural production in our region. Comparison of the results obtained applying HPLC–FLD and ELISA methods revealed that ELISA is appropriate for further determination of fumonisins in cereal crops owing to its repeatability and recovery which are in accordance with the requirements for analytical methods for the determination of fumonisins.

With an aim of obtaining more realistic insight into the extent of fumonisin-contamination of cereal crops and animal feed in our country, this Ph. D. thesis encompassed analysis of large number of samples for the presence and content (level) of these mycotoxins. The analysis included samples collected from the region of northern Serbia throughout the several-year period, that is, maize samples (collected during 2005 and 2009–2013) and wheat

samples (harvest 2010 and 2012). Maize samples originating from the territory of northern Serbia were analyzed for contamination with fumonisins, other mycotoxins (aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone) and moulds. Furthermore, potential effects of climatic factors on the extent of contamination were analyzed. The examination of stored samples from harvest 2005 revealed that traditional storage method in barns does not significantly influence the production of fumonisins in maize. In 2009-harvest samples, fumonisins prevailed over all other determined mycotoxins, which is most likely associated with fungi of the genus *Fusarium* as the most prevalent ones. The concentration of fumonisins in the contaminated samples ranged within an interval of 0.030–1.52 mg/kg. The content of the investigated mycotoxins (fumonisins, aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone) in 5 of 34 samples from 2009-harvest was below the detection level for the applied methods, while 13 out of 29 positive samples contained more than one toxin. Aflatoxin content did not exceed the maximum permitted levels for animal feed, whereas the contents of other toxins were within the range of permitted/recommended levels in the EU. Out of 24 investigated maize samples from 2010-harvest, fumonisin and deoxynivalenol concentrations, above the maximum permitted level for products for human nutrition, were detected in one and three samples, respectively. However, in the period 2011–2013, highly pronounced occurrence of fumonisins was recorded. Thus, 88% (of 17 analyzed samples in 2011), 97% (of 78 analyzed samples in 2012) and even 98% (of 47 analyzed samples in 2013) proved contaminated with fumonisins with average values being 1.492 mg/kg, 2.229 mg/kg and 0.672 mg/kg, respectively. The highest concentration was recorded in 2012 being 20.34 mg/kg

The examination of total fumonisin content in wheat from 2010-harvest revealed the presence of fumonisins at concentrations 0.027–0.614 mg/kg in 52% of 75 analyzed samples. The toxins were detected in only one of eight analyzed wheat samples from 2012-harvest.

Summary analysis of all obtained results revealed fumonisin contamination in 83% of the total of 235 maize samples with average contamination being 1.009 mg/kg. The number of analyzed wheat samples was significantly smaller (83) and characterized by a lower contamination rate, being 48%. The results on the fumonisin-contamination of cereals obtained for each individual year are related with the climatic conditions characteristic for the relevant year. According to the Republic Hydrometeorological Service of Serbia, the precipitation amount and average air temperatures in 2005 and 2009 were within the range of long-term average, which is most probably associated with similar levels of fumonisin-contamination of maize ranging from 50 to 51%. Contrary to that, year 2010 was extremely humid, whereas 2011 and 2013 were dry and warm and the year 2012 was extremely dry.

Comparison of the data on climatic conditions with the concentration and prevalence of fumonisin-positive samples strongly indicates negative effects of climatic deviation from average values for precipitation amount and temperature on mycotoxicological safety of maize. Climatic changes resulted in frequent droughts and extremely high temperatures that favour growth of moulds, development of plant diseases and pests and thus production of toxins.

Based on aforementioned facts, one can state that, along with other mycotoxins, fumonisins are present in the maize in Serbia, yet at relatively low concentrations. Namely, out of 235 analyzed maize samples, fumonisin contents above the maximum permitted levels according to Serbian and EU legislation (4 µg/g) were detected in only 11 maize samples. Neither of investigated samples contained fumonisin level above 60 mg/kg, which is the guidance level for maize used for animal feed. Contamination levels in wheat were significantly lower than those determined in maize, the maximum concentration being 0.614 mg/kg. Different fumonisin contamination rates in maize and wheat samples might be attributed to the different susceptibility of analyzed crops towards *Fusarium* species, that is, different matrix components favouring fumonisin production.

Furthermore, significant increase in the prevalence of fumonisins in maize samples was established for the period of the past few years. The recorded concentrations are similar to those reported in the neighbouring countries, yet with some deviations related to climatic conditions. The differences in reported fumonisin-contamination rates in the countries in this region may be attributed to several factors, e.g., comparison of the same harvest-years was not possible, and some authors did not relate their results with climatic changes.

The presence of fumonisins and aflatoxins in diverse cereal-based food was examined using ELISA methods. The applied methods are rapid; demonstrate satisfactory repeatability and recovery rates 98% and 94.3% for total fumonisins and aflatoxins, respectively. In all samples from 2010-harvest, aflatoxin content was below the detection limit. In four of five analyzed samples of corn-based food, fumonisin content was above the detection limit, yet below the maximum permitted levels for human nutrition. Analysis of samples from 2012 revealed fumonisin-contamination in all investigated samples, whereas aflatoxin-contamination was detected in 55% of samples. The content of fumonisins did not exceed the maximum permitted level prescribed by the relevant Regulation, whereas 3 samples were declared unacceptable due to increased aflatoxin content. High linear correlation coefficient ($r = 0.947$; $p < 0.005$) between fumonisin and aflatoxin contents in maize products was

obtained. The results of the analysis of food for human nutrition strongly suggest the need for such monitoring and control.

Upon applying the developed method implicating extraction of fumonisins from medicinal plants using FP, purification in the immunoaffinity columns and determination by HPLC–FLD method, fumonisins were detected in neither of medicinal plant samples originating from Serbia. This indicated that, though present on medicinal plants, the mould of the genus *Fusarium* do not produce fumonisins on chamomile, yarrow or thyme under climatic, cultivation, transportation and storage conditions in Serbia.

With an aim of developing fast and inexpensive yet reliable method for analyzing the moulds of the genus *Fusarium* as an indicator for fumonisin presence in maize samples, possible application of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was investigated. The samples of contaminated maize were previously quantified applying ELISA. Determination of fumonisins in maize samples was performed utilizing the attenuated total reflection (ATR) technique.

Over the last 25 years, the expert systems (ES) have been increasingly applied in a wide range of fields as an extraordinary method for addressing complex problems requiring knowledge and experience of relevant experts. Numerous expert systems have already been implemented in the field of chemical analysis. Having in mind the highest prevalence of fumonisin-contamination in maize, an ES to solve the problem of selecting an optimal method for determination of fumonisins in corn samples has been developed as a part of this Thesis.. The results of this research, improvement of analytical methods and designing of an expert system offer a potential solution to selecting an optimal screening method and quantitative determination of fumonisins. Based on the required detection limit method, available equipment and chemicals as well as the time available for the examination, this ES provides highly simple recommendations for an optimal systematic procedure for quantification of fumonisins in maize, encompassing the sampling procedure, preparation of required solutions, determination procedure, calculation of the results, and the overview of relevant literature.

The investigation of fumonisin contamination in our country strongly emphasizes the need for continuous monitoring and food analysis applying novel and advanced technologies in food and feed production with an aim of reducing harmful effects of fumonisins. Moreover, based on the obtained results, a proposal for harmonizing standards and regulations on maximum permitted levels of fumonisins in animal feed with those applied in the EU was suggested.

7 LITERATURA

1. Abramović B. (1996) Ekspertni sistem za izbor optimalnog kalitičkog titrimetrijskog postupka, Doktorska disertacija, Fakultet tehničkih nauka, Univerzitet u Novom Sadu.
2. Abramović B.F., Abramović B.K., Obradović D.M., Gaál F.F. (1996) Expert system for catalytic titrimetry. Part 1. Determination of organic acids, *Analyst*, 121: 401–406.
3. Abramović B., Đilas S., Gaál F., Mašić Z. (2002) Metode određivanja fumonizina, *Eko-konferencija 2002, Zdravstveno bezbedna hrana II*, Novi Sad, 127–132.
4. Abramović B., Abramović B., Jakšić S. (2005a) Expert system for determination of fumonisins in corn samples, *Jour. Nat. Sci., Matica Srpska Novi Sad*, 108: 109–119.
5. Abramović B., Jakšić S., Mašić Z. (2005b) Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn samples after reusable immunoaffinity column clean-up. *J. Serb. Chem. Soc.*, 70: 899–910.
6. Abramović B., Jajić I., Abramović B., Ćosić J., Jurić V. (2007) Detection of deoxinivalenol in wheat by Fourier transform infrared spectroscopy, *Acta Chim. Slov.*, 54: 859–867.
7. Abramović B., Jakšić S., Jajić I., Despotović V., Šojić D., Jovanović Lj., Ćosić J., Vrandečić K., Jurković D. (2012) Co-occurrence of Fumonisins and Deoxynivalenol in Wheat and Corn Harvested in Serbia, Chapter 5, E. Alexa, B. Abramović, J. Ćosić, (Eds.), *Occurrence of Fungi and Mycotoxins in Cereals and Medicinal Plants from Romania-Serbia-Croatia Area*, EUROBIT Publishing House, Timisoara, 123–142.
8. Aldred D., Magan N., Olsen M. (2004) The use of HACCP in the control of mycotoxins: the case of cereals. In: Magan N, Olsen M., Eds., *Mycotoxins in food, Detection and control*, CRC, Woodhead publishing limited, Cambridge, England, str. 139–173.
9. Anastassiades M., Lehotay S.J., Štajnbaher D., Schenck F.J. (2003) Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce, *J. AOAC Int.*, 86: 412–431.
10. Andreev G.N., Argirov O.K., Penchev P.N. (1993) Expert system for the interpretation of infrared spectra, *Anal. Chim. Acta*, 284: 131–136.
11. AOAC Official Method 995.15 (1998) Fumonisins B₁, B₂, and B₃ in corn, Liquid chromatographic method, AOAC INTERNATIONAL.

12. AOAC Official Method 2001.04 (2002) Determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn flakes, Liquid chromatography with immunoaffinity column cleanup, AOAC INTERNATIONAL.
13. Arranz I., Sizoo E., van Egmond H., Kroeger K., Legarda T.M., Burdaspal P., Reif K., Stroka J. (2006) Determination of aflatoxin B₁ in medical herbs: interlaboratory study, J. AOAC Int., 89: 595–605.
14. Atukwase A., Kaaya A.N., Muyanja C. (2012) Dynamics of *Fusarium* and fumonisins in maize during storage – A case of the traditional storage structures commonly used in Uganda. Food Control, 26: 200–205.
15. Aziz N.H., Youssef Y.A., El-Fouly M.Z., Mousa L.A. (1998) Contamination of some common medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxins, Bot. Bull. Acad. Sin., 39: 279–285.
16. Azizi I.G., Rouhi S. (2013) The comparison of total fumonisin and total aflatoxin levels in biscuit and cookie samples in Babol Sity, Northern Iran, Iranian J. Publ. Health, 42: 422–427.
17. Bacon, C.W., Nelson, P.E. (1994) Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*, J. Food Prot., 57: 514–521.
18. Balaž J., Aćimović S., Crnobarac J., Adamović D., Jaćimović G. (2010) Some important mycoses of medicinal plants in Južna Bačka, Plant Doctor, 38: 27–32.
19. Balcerowska G., Siuda R., Skrzypczak J., Lukanowski A., Sadowski C. (2009) Effect of particle size and spectral sub-range within the UV-VIS-NIR range using diffuse reflectance spectra on multivariate models in evaluating the severity of fusariosis in ground wheat, Food Addit. Contam., 26: 726–732.
20. Bartók T., Tölgyesi L., Szekeres A., Varga M., Bartha R., Szécsi A., Bartók M., Mesterházy A. (2010) Detection and characterization of twenty-eight isomers of fumonisin B₁ (FB₁) mycotoxin in a solid rice culture infected with *Fusarium verticillioides* by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight and ion trap mass spectrometry, Rapid Commun. Mass Spectrom., 24: 35–42.
21. Bartók T., Tölgyesi L., Szécsi Á., Varga J., Bartók M., Mesterházy A., Gyimes E., Véha A. (2013) Identification of unknown isomers of fumonisin B₅ mycotoxin in a *Fusarium verticillioides* culture by high-performance liquid chromatography/electrospray

- ionization time-of-flight and ion trap mass spectrometry, *J. Liq. Chromatograph.*, 36: 1549–1561.
22. Bartók T., Tölgyesi L., Szécsi Á., Mesterházy Á., Bartók M., Gyimes E., Véha A. (2014) Detection of previously unknown Fumonisin P analogue mycotoxins in a *Fusarium verticillioides* culture by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization time-of-flight and ion trap mass spectrometry, *J. Chrom. Sci.*, 52: 508–513.
 23. Battilani P., Pietri A., Barbano C., Scandolaro A., Bertuzzi T., Marocco A. (2008) Logistic regression modeling of cropping systems to predict fumonisin contamination in maize, *J. Agric. Food Chem.*, 56: 10433–10438.
 24. Berardo N., Pisacane V., Battilani P., Scandolaro A., Pietri A., Marocco A. (2005) Rapid detection of kernel rots and mycotoxins in maize by near-infrared reflectance spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.*, 53: 8128–8134.
 25. Berthiller F., Crews C., Dall’Asta C., De Saeger S., Haesaert G., Karlovsky P., Oswald I.P., Seefelder W., Speijers G., Stroka J. (2013) Masked mycotoxins: A review, *Mol. Nutr. Food Res.*, 57: 165–186.
 26. Berthiller F., Burdaspal P.A., Crews C., Iha M.H., Krska R., Lattanzio V.M.T., MacDonald S., Malone R.J., Maragos C., Solfrizzo M., Stroka J., Whitaker T.B. (2014) Developments in mycotoxin analysis: an update for 2012–2013, *World Mycotoxin J.*, 7: 3–33.
 27. Bezuidenhout S.C., Gelderblom W.C.A., Gorst-Allman C.P., Horak R.M., Marasas W.F.O., Spiteller G., Vleggaar R. (1988) Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 11: 743–745.
 28. Binder E.M. (2007) Managing the risk of mycotoxins in modern feed production, *Anim. Feed Sci. Tech.*, 133: 149–166.
 29. Bird C.B., Malone B., Rice L.G., Ross P.F., Eppley R., Abouzied M.M. (2002) Determination of total fumonisins in corn by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay: collaborative study, *J. AOAC Int.*, 85: 404–410.
 30. Blackwell B.A., Miller J.D., Savard M.E. (1993) Production of carbon 14-labeled fumonisin in liquid culture, *J. AOAC Int.*, 77: 506–511.
 31. Bonastre A., Ors R., Peris M. (2001) Distributed expert systems as a new tool in analytical chemistry, *TRAC-Trends Anal. Chem.*, 20: 263–271.

32. Burns T.D., Snook M.E., Riley R.T., Voss K.A. (2008) Fumonisin concentrations and *in vivo* toxicity of nixtamalized *Fusarium verticillioides* culture material. Evidence for fumonisin–matrix interactions, *Food Chem. Toxicol.*, 46: 2841–2848.
33. Bush B.J., Carson M.L., Cubeta M.A., Hagler W.M., Payne G.A. (2004) Infection and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* in developing maize kernels, *Phytopathology*, 94: 88–93.
34. Buydens L.M.C., van Leeuwen J.A., Mulholland M., Vandeginste B.G.M., Kateman G. (1990) An expert system for the validation of high-performance liquid chromatographic methods, *Trends Anal. Chem.*, 9: 58–62.
35. CAC (Codex Alimentarius Commission) (2007) Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk management and its annex on guidance on microbiological risk management metrics. CAC/GL 63-2007.
http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/10741/CXG_063e.pdf.
Pristupljeno 13.09.2014.
36. Castellá G., Bragulat M.R., Cabañes F.J. (1999) Surveillance of fumonisins in maize-based feeds and cereals from Spain, *J. Agric. Food Chem.*, 47: 4707–4710.
37. Cavaliere C., Foglia P., Guarino C., Motto M., Nazzari M., Samperi R., Laganà A., Berardo N. (2007) Mycotoxins produced by *Fusarium* genus in maize: determination by screening and confirmatory methods based on liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Food Chem.*, 105: 700–710.
38. Cawood M.E., Gelderblom W.C.A., Vleggaar R., Behrend Y., Thiel P.G., Marasas W.F.O. (1991) Isolation of the fumonisin mycotoxins: a quantitative approach, *J. Agric. Food Chem.*, 39: 1958–1962.
39. Chehri K., Jahromi S. T., Reddy K. R. N., Abbasi S., Salleh B. (2010) Occurrence of *Fusarium* spp. and fumonisins in stored wheat grains marketed in Iran, *Toxins*, 2: 2816–2823.
40. Chen T., Jin Y., Qiu X., Chen X. (2014) A hybrid fuzzy evaluation method for safety assessment of food-waste feed based on entropy and the analytic hierarchy process methods, *Expert Syst. Appl.*, 41: 7328–7337.
41. Chow C.W.K., Davey D.E., Mulcahy D.E. (1997) An intelligent sensor system for the determination of ammonia using flow injection analysis, *Lab. Autom. Inf. Manage.*, 33: 17–27.

42. Chrom servis <http://chromservis.cz/item/fumonitest-wb-immunoafinity-hplc-columns-25-box>, Pristupljeno 08.09.2014.
43. Chu F.S., Li G.Y. (1994) Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 847–852.
44. Cirillo T., Ritieni A., Visone M., Cocchieri R.A. (2003a) Evaluation of conventional and organic Italian foodstuffs for deoxynivalenol and fumonisins B₁ and B₂, *J. Agric. Food Chem.*, 51: 8128–8131.
45. Cirillo T., Ritieni A., Galvano F., Cocchieri R.A. (2003b) Natural co-occurrence of deoxynivalenol and fumonisins B₁ and B₂ in Italian marketed foodstuffs, *Food Addit. Contam.*, 20: 566–571.
46. Codex Alimentarius Commission (2014) Working document for information and use in discussions related to contaminants and toxins in the GSCTFF, CF/8 INF/1 March 2014. ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/cccf/cccf8/cf08_INF1e.pdf. Pristupljeno 13.09.2014.
47. D'Arco G., Fernández-Franzón M., Font G., Damiani P., Mañes J. (2008) Analysis of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in corn-based baby food by pressurized liquid extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 1209: 188–194.
48. D'Mello J.P.F., Placinta C.M., Macdonald A.M.C. (1999) *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity, *Anim. Feed Sci. Tech.*, 80: 183–205.
49. Dale L.M., Thewis A., Rotar I., Fernandez Pierna J.A., Boudry C., Vidican R.M., Baeten V. (2012) Chemometric tools for NIRS and NIR hyperspectral imaging, *Bull. UASVM Agriculture*, 69: 70–76.
50. Dall'Asta C., Galaverna G., Mangia M., Sforza S., Dossena A., Marchelli R. (2009) Free and bound fumonisins in gluten-free food products, *Mol. Nutr. Food Res.*, 53: 492–499.
51. Debska B., Duliban J., Guzowska B., Hippe Z. (1981) Computer-aided structural analysis of organic compounds by an artificial intelligence system, *Anal. Chem. Acta*, 133: 303–318.
52. De Girolamo A., Solfrizzo M., Von Holst C., Visconti A. (2001) Comparison of different extraction and clean-up procedures for the determination of fumonisins in maize and maize-based food products, *Food Addit. Contam.*, 18: 59–67.

53. De Girolamo A., Lippolis V., Nordkvist E., Visconti A. (2009) Rapid and non-invasive analysis of deoxynivalenol in durum and common wheat by fourier-transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy, *Food Addit. Contam.*, 26: 907–917.
54. De la Campa R., Hooker D.C., Miller J.D., Schaafsma A.W., Hammond B.G. (2005) Modeling effects of environment, insect damage, and *Bt* genotypes on fumonisin accumulation in maize in Argentina and the Philippines, *Mycopathologia*, 159: 539–552.
55. Della Riccia G., Del Zotto S. (2013) A multivariate regression model for detection of fumonisins content in maize from near infrared spectra, *Food Chem.*, 141: 4289–4294.
56. Delwiche S.R. (2003) Classification of scab- and other mould-damaged wheat kernels by near-infrared reflectance spectroscopy, *Trans. ASAE*, 46: 731–738.
57. Delwiche S.R., Hareland G.A. (2004) Detection of scab-damaged hard red spring wheat kernels by near-infrared reflectance, *Cereal Chem.*, 81: 643–649.
58. Desjardins A.E., Busman M., Proctor R.H., Stressman R. (2007) Wheat kernel black point and fumonisin contamination by *Fusarium proliferatum*, *Food Addit. Contam.*, 24: 1131–1137.
59. Dessy R.E. (1984a) Expert systems Part I, *Anal. Chem.*, 56: 1200A–1212A.
60. Dessy R.E. (1984b) Expert systems Part II, *Anal. Chem.*, 56: 1312A–1332A.
61. Di Mavungu J.D., Monbaliu S., Scippo M.-L., Maghuin –Rogister G., Schneider Y.-J., Larondelle Y., Callebaut A., Robbens J., Van Petegham C., De Saeger S. (2009) LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements, *Food Addit. Contam.*, 26: 885–895.
62. Djilas S., Živkov-Baloš M., Mrdjen M., Mihaljev Ž., Mašić Z. (2001) Kontaminiranost hrane za životinje plesnima tokom 2001. godine, *Vet. ž. Repub. Srp.*, 1: 139–142.
63. Doko M.B., Rapior S., Visconti A., Schjøth J.E. (1995) Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa, *J. Agric. Food Chem.*, 43: 429–434.
64. Dombrink-Kurtzman M.A., Dvorak T.J., Barron M.E., Rooney L.W. (2000) Effect of nixtamalization (alkaline cooking) on fumonisin-contaminated corn for production of masa and tortillas, *J. Agric. Food Chem.*, 48: 5781–5786.
65. Domijan A., Peraica M., Jurjević Ž., Ivić D., Cvjetković B (2005) Fumonisin B₁, fumonisin B₂, zearalenone and ochratoxin A contamination of maize in Croatia, *Food Addit. Contam.*, 22: 677–680.

66. Dowell F.E., Maghirang E.B. (2002) Accuracy and feasibility of measuring characteristics of single kernels using near-infrared spectroscopy, ICC Conference 2002 “Novel Raw Materials, Technologies and Products-New Challenge for Quality Control”, May 2002, Budapest, Hungary.
67. Dowell F.E., Windham W.R. (1993) UV, VIS and NIR properties of peanut kernels, presented at the 1993 ASAE International Winter Meeting, paper No. 933598, ASAE, 2950 Niles Rd., St. Joseph, MI 49085-9659 USA.
68. Dowell F.E., Ram M.S., Seitz L.M. (1999) Predicting scab, vomitoxin, and ergosterol in single wheat kernels using near-infrared spectroscopy, *Cereal Chem.*, 76: 573–576.
69. Dowell F., Psocka J., Maghirang E., Walker D., Wang D., Xie F. (2000) Measuring multiple attributes of single grain kernels using NIRS, AACC 2000, Annual Meeting.
70. Dowell F.E., Pearson T.C., Maghirang E.B., Xie F., Wicklow D.T. (2002) Reflectance and transmittance spectroscopy applied to detecting fumonisin in single corn kernels infected with *Fusarium verticillioides*, *Cereal Chem.*, 79: 222–226.
71. Duncan K., Kruger S., Zabe N., Kohn B., Prioli R. (1998) Improved fluorometric and chromatographic methods for the quantification of fumonisins B₁, B₂ and B₃, *J. Chromatogr. A*, 815: 41–47.
72. EC (European Commission) (2002) Commission decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. 2002/657/EC, O. J., L 285: 33–37. L 221: 8–36.
73. EC (European Commission) (2006a) Commission Regulation No 401/2006 of 23 February 2006, laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs, O. J. 2006, L 70: 12–34.
74. EC (European Commission) (2006b) Commission Regulation of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs 1881/2006, O. J., L 364: 5–24.
75. EC (European Commission) (2006c) Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. 2006/576/EC, O. J., L 229: 7–9.
76. EC (European Commission) (2007) Commission Regulation 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain

- contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products, O. J., L 255: 14–17.
77. EC (European Commission) (2010) Commission Regulation 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins, O. J., L 50: 8–12.
78. EC (European Commission) (2014) Commission Regulation 519/2014 of 16 May 2014 amending Regulation (EC) No 401/2006 as regards methods of sampling of large lots, sices and food supplements, performance criteria for T-2, HT-2 toxin and citrinin and screening methods of analysis, O. J., L 147: 29–43.
79. EMAN, (European Mycotoxin Awareness Network), Sample Preparation Techniques for the Determination of Mycotoxins, <http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=61>, Pristupljeno 08.09.2014.
80. EMAN, (European Mycotoxin Awareness Network), Introduction, <http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=21>, Pristupljeno 14.09.2014.
81. EMAN, (European Mycotoxins Awareness Network), Mycotoxins Legislation Worldwide, <http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=79>, Pristupljeno 08.09.2014.
82. Europroxima, Aflatoxin B1 EIA, A competitive enzyme immunoassay for quantitative analysis of Aflatoxins B1 in food and feed samples. www.europroxima.com
83. European Pharmacopoeia 6.0, Council of Europe, Strasbourg, 2008.
84. Faberi A., Foglia P., Pastorini E., Samperi R., Lagana A. (2005) Determination of type B fumonisin mycotoxins in maize and maize-based products by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using a QqQ linear ion trap mass spectrometer, Rapid Commun. Mass. Spectrom., 19: 275–282.
85. Fandohan P., Zoumenou D., Hounhouigan D.J., Marasas W.F.O., Wingfield M.J., Hell K. (2005) Fate of aflatoxins and fumonisins during the processing of maize into food products in Benin, Int. J. Food Microbiol., 98: 249–259.
86. FAO/WHO – World Health Organization (2011a) Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Seventy-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series 966 <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v966je01.pdf>, Pristupljeno 04.04.2014

87. FAO/WHO (2011b) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 74th Meeting FAO JECFA Monographs 11, Compendium fo food additive specifications, <http://www.fao.org/docrep/014/i2358e/i2358e00.pdf>, Pristupljeno 04.04.2014.
88. FDA (2011) Mycotoxin Regulatory Guidance, National Grain and Feed Association, Washington DC, USA, <http://www.ngfa.org/wp-content/uploads/NGFAComplianceGuide-FDARegulatoryGuidanceforMycotoxins8-2011.pdf>. Pristupljeno 13.09.2014.
89. Feinberg M., Suard C., Ireland R.J. (1994) Development of a fully automated open vessel focused microwave digestion system, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, 22: 37–47.
90. Fernández-Ibañez V. Soldado A., Martínez-Fernández A., de la Roza Delgado B. (2009) Application of near infrared spectroscopy for rapid detection of aflatoxin B1 in maize and barley as analytical quality assessment, *Food Chem.*, 113: 629–634.
91. Fischer M., Jefferies T.M. (1995) Optimization of supercritical fluid conditions for the rapid determination of free fatty acids in soy and cottonseed meals, *J. Agric. Food Chem.*, 43: 1259–1266.
92. Frisvad J.C., Smedsgaard J., Samson R.A., Larsen T.O., Thrane U. (2007) Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger*, *J. Agric. Food Chem.*, 55: 9727–9732.
93. Froment A., Gautier P., Nussbaumer A., Griffiths A. (2011) Forecast of mycotoxins levels in soft wheat, durum wheat and maize before harvesting with Qualimètre®, *J. Verbrauch. Lebensm.*, 6: 277–281.
94. Gaspardo B., Del Zotto S., Torelli E., Cividino S.R., Firrao G., Della Riccia G., Stefanon B. (2012) A rapid method for detection of fumonisins B₁ and B₂ in corn meal using Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy implemented with integrating sphere, *Food Chem.*, 135: 1608–1612.
95. Gazzotti T., Lugoboni B., Zironi E., Barbarossa A., Serraino A., Pagliuca G. (2009) Determination of fumonisin B₁ in bovine milk by LC–MS/MS, *Food Control*, 20: 1171–1174.
96. Gazzotti T., Zironi E., Lugoboni B., Barbarossa A., Piva A., Pagliuca G. (2011) Analysis of fumonisins B1, B2 and their hydrolysed matabolites in pig liver by LC–MS/MS, *Food Chem.*, 125: 1379–1384.
97. Gelderblom W.C.A., Jaskiewicz K., Marasas W.F.O., Thiel P.G., Horak R.M., Vleggaar R., Kriek, N.P.J. (1988) Fumonisin–Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 1806–1811.

-
98. Gelderblom W.C., Kriek N.P., Marasas W.F., Thiel P.G. (1991) Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁, in rats, *Carcinogenesis*, 12: 1247–1251.
 99. Ghali R., Ghorbel H., Hedilli A. (2009) Fumonisin determination in Tunisian foods and feeds. ELISA and HPLC methods comparison. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 3955–3960.
 100. González H.H.L., Martínez E.J., Pacin A.M., Resnik S.L., Sydenham E.W. (1999) Natural co-occurrence of fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins in field trial corn in Argentina, *Food Addit. Contam.*, 16: 565–569.
 101. Gordon S.H., Wheeler B.C., Schudy R.B., Wicklow D.T., Greene R.V. (1998) Neural network pattern recognition of photoacoustic FTIR spectra and knowledge-based techniques for detection of mycotoxigenic fungi in food grains, *J. Food Prot.*, 61: 221–230.
 102. Gordon S.H., Jones R.W., McClelland J.F., Wicklow D.T., Greene R.V. (1999) Transient infrared spectroscopy for detection of toxigenic fungi in corn: Potential for on-line evaluation, *J. Agric. Food Chem.*, 47: 5267–5272.
 103. Gray N.A.B., Crandell C.W., Nourse J.G., Smith D.H., Dageforde M.L., Djerassi C. (1981) Computer-assisted structural interpretation of carbon -13 spectral data, *J. Org. Chem.*, 46: 703–715.
 104. Grenier B., Bracarense A-P. F.L., Schwartzd H.E., Trumel C., Cossalter A.-M., Schatzmayr G., Kolf-Clauw M., Moll W-D., Oswald I.P. (2012) The low intestinal and hepatic toxicity of hydrolyzed fumonisin B₁ correlates with its inability to alter the metabolism of sphingolipids, *Biochem. Pharmacol.*, 83: 1465–1473.
 105. Gros N., Gorenc B. (1995) Expert system for the ion chromatographic determination of alkali and alkaline earth metals in mineral waters, *J. Chrom. A*, 697: 31–43.
 106. Haas D., Pfeifer B., Reitarich C., Partenheimer R., Reck B., Buzina W. (2013) Identification and quantification of fungi and mycotoxins from Pu-erh tea, *Int. J. Food Microbiol.*, 166: 316–322.
 107. Halt M. (1998) Moulds and mycotoxins in herb tea and medicinal plants, *Eur. J. Epidemiol.*, 14: 269–274.
 108. Harrison L.R., Colvin B.M., Greene J.L., Newman L.E., Cole J.R. (1990) Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2: 217–221.

109. Hlywka J.J., Bullerman L.B. (1999) Occurrence of fumonisin B₁ and B₂ in beer. *Food Addit. Contam.*, 16: 319–324.
110. Holcomb M., Thompson H.C.Jr., Hankins L.J. (1993) Analysis of fumonisin B₁ in rodent feed by gradient elution HPLC using precolumn derivatization with FMOc and fluorescence detection, *J. Agric. Food Chem.*, 41: 764–767.
111. Humpf H.-U., Voss K. (2004) Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins, *Mol. Nutr. Food Res.*, 48: 255–269.
112. IARC International Agency for Research on Cancer (2002) Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol 82. Dostupno na: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/mono82.pdf>. Pristupljeno 01.06.2014.
113. Ivić D., Domijan A.-M., Peraica M., Cvjetković B. (2009) Fumonisin B₁ and zearalenone contamination of wheat in Croatia and influence of fungicide treatments, *Phytoprotection*, 90: 31–34.
114. Ivić D., Kovacević B., Vasilj V., Idzaković N. (2011) Occurrence of potentially toxigenic *Fusarium verticillioides* and low fumonisin B₁ content on barley grain in Bosnia and Herzegovina, *J. Appl. Bot. Food Qual.*, 84: 121–124.
115. Jackson L., Jablonski J. (2004) Fumonisin, In: Magan N., Olsen M., Eds., *Mycotoxins in food*, Woodhead publishing limited, Cambridge, England, Woodhead Publishing, str. 367–405. (i referencu citirane u njemu)
116. Jackson L.S., Hlywka J.J., Senthil K.R., Bullerman L.B., Musser S.M. (1996) Effects of time, temperature, and pH on the stability of fumonisin B₁ in an aqueous model system, *J. Agric. Food Chem.*, 44: 906–912.
117. Jajić I. (2008) Prisustvo deoksinivalenola u žitaricama i analitičke tehnike određivanja, Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
118. Jajić I., Jurić V., Glamović D., Abramović B. (2008) Occurrence of Deoxynivalenol in Maize and Wheat in Serbia, *Int. J. Mol.Sci.*, 9: 2114–2126.
119. Jakšić, S. (2004) Prilog hromatografskom određivanju fumonizina B₁ i B₂ u kukuruzu, Magistarska teza, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
120. Jakšić S., Prunić B., Milanov D., Jajić I., Bjelica L., Abramović B. (2011a) Fumonisin and co-occurring mycotoxins in north Serbian corn, *Jour. Nat. Sci., Matica Srpska Novi Sad*, 120: 49–59.

121. Jakšić S., Stojanov I., Živkov-Baloš M., Mašić Z., Mihaljev Ž., Abramović B. (2011b) Mycotoxycological tests from the aspect of the HACCP system and legislation. *Jour. Nat. Sci., Matica Srpska Novi Sad*, 120: 95–102.
122. Jakšić S., Abramović B., Prunić B., Mihaljev Ž., Živkov-Baloš M., Jajić I., Despotović V., Bjelica L. (2011c) Incidence of aflatoxins and fumonisins in cereal food from Serbian market, *J. Agroalim. Processes Technol.*, 17: 108–112.
123. Jakšić S., Abramović B., Jajić I., Živkov-Baloš M., Mihaljev Ž., Despotović V., Šojić V. (2012) Co-occurrence of fumonisins and deoxynivalenol in wheat and maize harvested in Serbia, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 89: 615–619.
124. Jakšić S., Živkov-Baloš M., Mihaljev Ž., Mašić Z., Jajić I., Banić N., Abramović B. Extraction without Organic Solvents in the Determination of Fumonisin B₁, B₂, and B₃ in Maize by HPLC–FLD and ELISA Tests, *Food Anal. Meth.*, DOI 10.1007/s12161-014-0030-5.
125. Javed T., Bennett G.A., Richard J.L., Dombrink-Kurtzman M.A., Côte L.M., Buck W.B. (1993) Mortality in broiler chicks on feed amended with *Fusarium proliferatum* culture material or with purified fumonisin B₁ and moniliformin, *Mycopathologia*, 123: 171–184.
126. Javed T., Bunte R.M., Dombrink-Kurtzman M.A., Richard J.L., Bennet G.A., Côte L.M., Buck W.B. (2005) Comparative pathologic changes in broiler chicks on feed amended with *Fusarium proliferatum* culture material or purified fumonisin B₁ and moniliformin, *Mycopathologia*, 159: 553–564.
127. Jurjević Ž., Solfrizzo M., Cvjetković B., Avantiaggiato G., Visconti A. (1999) Ochratoxin A and fumonisins (B₁ and B₂) in maize from Balcan nephropathy endemic and non endemic areas of Croatia, *Mycotoxin Res.*, 15: 67–80.
128. Kadambur R., Kotecha P. (2015) Multi-level production planning in a petrochemical industry using elitist Teaching–Learning-Based-Optimization, *Expert Syst. Appl.*, 42: 628–641.
129. Karci A., Demir M. (2009) Estimation of pretein structures by classification of angles between α -carbons of amino acids based on artificial neural networks, *Expert Syst. Appl.*, 36: 5541–5548.
130. Katta S.K., Cagampang A.E., Jackson L.S., Bullerman L.B. (1997) Distribution of *Fusarium* molds and fumonisins in dry-milled corn fractions, *Cereal Chem.*, 74: 858–863.

131. Katta S.K., Jackson L.S., Sumner S.S., Hanna M.A., Bullerman L.B. (1999) Effect of temperature and screw speed on stability of fumonisin B₁ in extrusion-cooked corn grits, *Cereal Chem.*, 76: 16–20.
132. Katerere D.R., Stockenström S., Thembo K.M., Rheeder J.P., Shephard G.S., Vismer H.F. (2008) A preliminary survey of mycological and fumonisin and aflatoxin contamination of African traditional herbal medicines sold in South Africa, *Hum. Exp. Toxicol.*, 27: 793–798.
133. Kedera C.J., Plattner R.D., Desjardins A.E. (1999) Incidence of *Fusarium* spp. and levels of fumonisin B₁ in maize in western Kenya, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 41–44.
134. Keller S.E., Sullivan T.M., Chirtel S. (1997) Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B₁: oxygen and pH, *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 19: 305–309.
135. Kim E.-K., Scott P.M., Lau B.P.-Y. (2003) Hidden fumonisin in corn flakes, *Food Addit. Contam.*, 20: 161–169.
136. Kim E.K., Scott P.M., Lau B.P.-Y., Lewis D.A. (2002) Extraction of fumonisins B₁ and B₂ from white rice flour and their stability in white rice flour, cornstarch, cornmeal, and glucose, *J. Agric. Food Chem.*, 50: 3614–3620.
137. Know mycotoxins, <http://www.knowmycotoxins.com/regulations.htm>, Pristupljeno 07.09.2014.
138. Kohoutek H.J. (2014) Intelligent instrumentation: a quality challenge, *Acta Imeko*, 3: 47–55.
139. Kokić B., Čabarkapa I., Lević J., Mandić A., Matić J., Ivanov D. (2009) Screening of mycotoxins in animal feed from the region of Vojvodina, *Proc. Nat. Sci, Matica Srpska*, 117: 87–96.
140. Kokkonen M.K., Jestoi M.N. (2009) A multi-compound LC–MS/MS method for the screening of mycotoxins in grains, *Food Anal. Method.*, 2: 128–140.
141. Korfmacher W.A., Chiarelli M.P., Lay J.O., Bloom J., Holcomb M., McManus K.T. (1991) Characterization of the mycotoxin fumonisin B₁: Comparison of thermospray, fast-atom bombardment and electrospray mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.*, 5: 463–468.

-
142. Kos G., Lohninger H., Krska R. (2002) Fourier transform mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection (FT-IR/ATR) as a tool for the detection of *Fusarium* fungi on maize, *Vib. Spectrosc.*, 29: 115–119.
143. Kos G., Lohninger H., Krska R. (2003) Development of a method for the determination of *Fusarium* fungi on corn using mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection and chemometrics, *Anal. Chem.*, 75: 1211–1217.
144. Kos G., Krska R., Lohninger H., Griffiths P.R. (2004) A comparative study of mid-infrared diffuse reflection (DR) and attenuated total reflection (ATR) spectroscopy for the detection of fungal infection on RWA2-corn, *Anal. Bioanal. Chem.*, 378: 159–166.
145. Kos J., Janić Hajnal E., Škrinjar M., Mišan A., Mandić A., Jovanov P., Milovanović I. (2014) Presence of *Fusarium* toxins in maize from Autonomous Province of Vojvodina, Serbia, *Food Control*, 46: 98–101.
146. Kosalec I., Cvek J., Tomić S. (2009) Contaminants of medicinal herbs and herbal products, *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, 60: 485–501.
147. Kubena L.F., Edrington T.S., Harvey R.B., Phillips T.D., Sarr A.B., Rottinghaus G.E. (1997) Individual and combined effects of fumonisin B₁ present in *Fusarium moniliforme* culture material and diacetoxyscirpenol and ochratoxin A in turkey poults, *Poul. Sci.*, 76: 256–264.
148. Kulisek E.S., Hazebroek J.P. (2000) Comparison of extraction buffers for the detection of fumonisin B₁ in corn by immunoassay and high-performance liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.*, 48: 65–69.
149. Kushiro M., Zheng Y., Nagata R., Nakagawa H., Nagashima H., (2009) Limited surveillance of fumonisins in brown rice and wheat harvested in Japan, *J. Food Prot.*, 72: 1327–1331.
150. Lacina O., Zachariasova M., Urbanova J., Vaclavikova M., Cajka T., Hajslova J. (2012) Critical assessment of extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues and mycotoxins in fruits, cereals spices and oil seeds employing ultra-high performance liquid chromatography –tandem mass spectrometry, *J. Chrom.*, 1262: 8–18.
151. Lawrence J.F., Niedzwiadek B., Scott P.M. (2000) Effect of temperature and solvent composition on extraction of fumonisin B₁ and B₂ from corn products, *J. AOAC Int.*, 83: 604–611.

152. Lević J.T., Stanković S.Ž., Krnjaja V., Bočarov-Stančić A.S. (2009) *Fusarium* species: the occurrence and the importance in agriculture of Serbia, Proc. Nat. Sci., Matica Srpska Novi Sad, 116: 33–48.
153. Li C., Wu Y.-L., Yang T., Huang-Fu W.-G. (2012) Rapid determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with ultrasonic extraction, J. Chrom.Sci., 50: 57–63.
154. Li F.-Q., Yoshizawa T., Kawamura O., Luo X.-Y., Li Y.-W. (2001) Aflatoxins and fumonisins in corn from the high-incidence area for human hepatocellular carcinoma in Guangxi, China, J. Agric. Food Chem., 49: 4122–4126.
155. Li W., Herrman T.J., Dai S.Y. (2010) Rapid determination of fumonisins in corn-based products by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, J. AOAC Int., 93: 1472–1481.
156. Liao S.-H. (2005) Expert system methodologies and applications—a decade review from 1995 to 2004, Expert Syst. Appl., 28: 93–103 (i reference u njemu).
157. Liao C.-D., Wong J.W., Zhang K., Hayward D.G., Lee N.S., Trucksess M.W. (2013) Multi-mycotoxin analysis of finished grain and nut products using high-performance liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry, J. Agric. Food Chem., 61: 4771–4782.
158. Linko S. (1998) Expert systems—what can they do for the food industry? Trends Food Sci. Tech., 9: 3–12.
159. Luinge H.J. (1990) A knowledge-based system for structure analysis from infrared and mass spectral data, Trends Anal. Chem., 9: 66–69.
160. Maenetje P.W., Dutton M.F. (2007) The incidence of fungi and mycotoxins in South African barley and barley products, J. Environ. Sci. Health B, 42: 229–236.
161. Maiorano A., Reyneri A., Sacco D., Magni A., Ramponi C. (2009) A dynamic risk assessment model (FUMAgrain) of fumonisin synthesis by *Fusarium verticillioides* in maize grain in Italy, Crop Prot., 28: 243–256.
162. Mangia M. (2009) Free and hidden fumonisins in maize and gluten-free products, Doktorska disertacija, Faculty of Agriculture, Università degli Studi di Parma, Italija.
163. Manova R., Mladenova R. (2009) Incidence of zearalenone and fumonisins in Bulgarian cereal production, Food Control, 20: 362–365.

-
164. Månsson M., Klejnstrup M.L., Phipps R.K., Nielsen K.F., Frisvad J.C., Gotfredsen C.H., Larsen T.O. (2010) Isolation and NMR characterization of fumonisin B₂ and a new fumonisin B₆ from *Aspergillus niger*, J. Agric. Food Chem., 58: 949–953.
165. Maragos C.M., Bennett G.A., Richard J.L. (1996) Analysis of fumonisin B₁ in corn by capillary electrophoresis, Adv. Exp. Med. Biol., 392: 105–112.
166. Maragos C.M., Jolley M.E., Plattner R.D., Nasir M.S. (2001) Fluorescence polarization as a means for determination of fumonisins in maize, J. Agric. Food Chem., 49: 596–602.
167. Marin S., Magan N., Serra J., Ramos A.J., Canela R., Sanchis V. (1999) Fumonisin B₁ production and growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize, wheat, and barley grain, J. Food Sci., 64: 921–924.
168. Martins M.L., Matrins H.M., Bernardo F., (2001) Fumonisin B₁ and B₂ in black tea and medicinal plants, J. Food Prot., 64: 1268–1270.
169. Massie D.R., Norris K.H. (1965) Spectral reflectance and transmittance properties of grain in the visible and near infrared, Trans. ASAE, 8: 598–600.
170. Matheson A.R., Otten P. (1999) Automation of the Roese-Gottlieb method for fat determination in dairy products using an expert system, Am. Lab. (Shelto), 31:13–19.
171. Matić J.J., Mastilović J.S., Čabarkapa I.S., Mandić A.I. (2009) Mycotoxins as a risk in the grain food, Proc. Nat. Sci., Matica Srpska, Novi Sad, 117: 79–86.
172. Meister U. (1999) Effects of extraction and extract purification on the measurable fumonisin content of maize and maize products. Tests on the efficiency of acid extraction and use of immunoaffinity columns, Mycotoxin Res., 15: 13–23.
173. Mihaljev Ž., Živkov-Baloš M., Čupić Ž., Jakšić S. (2014) Levels of some microelements and essential heavy metals in herbal teas in Serbia, Acta Pol. Pharm. Drug Research, 71: 385–391.
174. Miller J.D. (1995) Fungi and mycotoxins in grain: Implications for stored product research, J. Stored Prod. Res., 31: 1–16.
175. Miller J.D. (2001) Factors that affect the occurrence of fumonisin, Environ. Health Persp., 109: 321–324.
176. Mngadi P.T., Govinden R., Odhav B. (2008) Co-occurring mycotoxins in animal feeds, Afr. J. Biotechnol., 7: 2239–2243.

-
177. Mogensen J.M., Frisvad J.C., Thrane U., Nielsen K.F. (2010) Production of fumonisin B₂ and B₄ by *Aspergillus niger* on grapes and raisins, J. Agric. Food Chem., 58: 954–958.
178. Molnar I. (2002) Computerized design of separation strategies by reversed-phase liquid chromatography: development of DryLab software, J. Chrom. A, 965: 175–194.
179. Monbaliu S., Wu A., Zhang D., Van Peteghem C., De Saeger S. (2010) Multimycotoxin UPLC–MS/MS for tea, herbal infusions and the derived drinkable products, J. Agric. Food Chem., 58: 12664–12671.
180. Murphy P.A., Rice L.G., Ross P.F. (1993) Fumonisin B₁, B₂, and B₃ content of Iowa, Wisconsin, and Illinois corn and corn screenings, J. Agric. Food Chem., 41: 263–266.
181. Mycotoxins.info (stranica na Internetu), Regulations for food, BIOMIN GmbH, http://www.mycotoxins.info/myco_info/consum_regu.html, Pristupljeno 10.06.2014.
182. Nayaka S.C., Shankar A.C.U., Niranjana S.R., Wulff E.G., Mortensen C.N., Prakash H.S. (2010) Detection and quantification of fumonisins from *Fusarium verticillioides* in maize grown in southern India, World J. Microbiol. Biotechnol., 26: 71–78.
183. Nešić K., Jakšić S., Kapetanov M. (2013) Prevention, control and detection of fusarial toxins, Jour. Nat. Sci., Matica Srpska, 124: 91–99.
184. Nguyen T.T., Li Z.Y., Zhang S.W., Truong T.K. (2014) A hybrid algorithm based on particle swarm and chemical reaction optimization, Expert Syst. Appl., 41: 2134–2143.
185. Noonim P., Mahakarnchanakul W., Nielsen K.F., Frisvad J.C., Samson R.A. (2009) Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger* in Thai coffee beans, Food Addit. Contam., 26: 94–100.
186. Numanogly E., Uygun U., Koksel H., Solfrizzo M. (2010) Stability of *Fusarium* toxins during traditional Turkish maize bread production, Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, 2: 84–92.
187. Olesen J.E., Børgesen C.D., Elsgaad L., Palosuo T., Rötter R.P., Skjelvåg A.O., Peltonen-Sainio P., Börjesson T., Trnka M., Ewert F., Siebert S., Brisson N., Eitzinger J., van Asselt E.D., Oberforster M., van der Fels-Klerx H.J. (2012) Changes in time of sowing, flowering and maturity of cereals in Europe under climate change, Food Addit. Contam., 29: 1527–1542.
188. Omurtag G. Z., Yazicioğlu D. (2004) Determination of fumonisins B₁ and B₂ in herbal tea and medicinal plants in Turkey by high-performance liquid chromatography, J. Food Prot., 67: 1782–1786.

-
189. Omurtag G. Z., Yazicioğlu D., Beyoğlu D., Tozan A., Atak G. (2007) A review on fumonisin and trichothecene mycotoxins in foods consumed in Turkey, ARI The bulletin of the Istanbul Technical University, 54: 39–44.
 190. Ono E.Y.S., Kawamura O., Ono M.A., Ueno Y., Hirooka E.Y. (2000) A comparative study of indirect competitive ELISA and HPLC for fumonisin detection in corn of the state of Paraná, Brasil, Food Agr. Immunol., 12: 5–14.
 191. Ono E.Y.S., Sasaki E.Y., Hashimoto E.H., Hara L.N., Correa B., Itano E.N., Sugiura T., Ueno Y., Hirooka E.Y. (2002) Post-harvest storage of corn: effect of bebinning moisture content on mycoflora and fumonisin contamination, Food Addit. Contam., 19: 1081–1090.
 192. Orsi R.B., Corrêa B., Possi C.R., Schammas E.A., Nogueira J.R., Dias S.M.C., Malozzi M.A.B. (2000) Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize, J. Stored Prod. Res., 36: 75–87.
 193. Paepens C., De Saeger C., Van Poucke C., Dumoulin F., Van Calenbergh S., Van Peteghem C. (2005) Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantification of fumonisin B₁, B₂ and B₃ in cornflakes, Rapid Commun. Mass. Spectrom., 19: 2021–2029.
 194. Palacios S.A., Ramirez M.L., Zalazar M.C., Farnochi M.C., Zappacosta D., Chiacchiera S.M., Reynoso M.M., Chulze S.N., Torres A.M., (2011) Occurrence of *Fusarium* spp. and fumonisin in durum wheat grains, J. Agric. Food Chem., 59: 12264–12269.
 195. Palencia E., Torres O., Hagler W., Meredith F.I., Williams L.D., Riley R.T. (2003) Total fumonisins are reduced in tortillas using the tradicional nixtamalization method of Mayan communities. Nutrient interacts and toxicity research communication, J. Nutr., 133: 3200–3203.
 196. Parsons M.W., Munkvold G.P. (2012) Effects of planting date and environmental factors on fusarium ear rot symptoms and fumonisin B₁ accumulation in maize grown in six North American locations, Plant Pathol., 61: 1130–1142.
 197. Pavlović S. (2008) Mikoze značajnih lekovitih biljaka u Srbiji, Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
 198. Pearson T.C., Wicklow D.T., Pasikatan M.C. (2004) Reduction of aflatoxin and fumonisin contamination in yellow corn by high-speed dual-wavelength sorting, Cereal Chem., 81: 490–498.

199. Peris M. (2002) Present and future of expert systems in food analysis, *Anal. Chim. Acta*, 454: 1–11.
200. Pettersson H., Åberg L. (2003) Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals, *Food Control*, 14: 229–232.
201. Pietri A., Bertuzzi T. (2012) Simple phosphate buffer extraction for the determination of fumonisins in masa, maize, and derived products, *Food Anal. Method.*, 5: 1088–1096.
202. Pitt J.I., Taniwaki M.H., Cole M.B. (2013) Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of Food Safety Objectives, *Food Control*, 32: 205–215.
203. Pittet A., Parisod V., Schellenberg M. (1992) Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn-based products from the Swiss market, *J. Agric. Food Chem.*, 40: 1352–1354.
204. Plattner R.D. (1999) HPLC/MS analysis of *Fusarium* mycotoxins, fumonisins and deoxynivalenol, *Nat. Toxins*, 7: 365–370.
205. Plattner R.D., Norred W.P., Bacon C.W., Voss K.A., Petersen R., Shackelford D.D., Weisleder D. (1990) A method of detection of fumonisins in corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia, *Mycologia*, 82: 698–702.
206. Pleadin J., Perši N., Mitak M., Zadavec M., Sokolović M., Vulić A., Jaki V., Brstilo M. (2012) The natural occurrence of T2 toxin and fumonisins in maize samples in Croatia, *Bull. Environ. Contam.*, 88: 863–866.
207. Pleadin J., Vahčić N., Perši N., Ševelj D., Markov K., Frece J. (2013) *Fusarium* mycotoxins occurrence in cereals harvested from Croatian fields, *Food Control*, 32: 49–54.
208. Pojić M.M., Mastilović J.S. (2013) Near infrared spectroscopy – Advanced analytical tool in wheat breeding, trade, and processing, *Food Bioprocess Tech.*, 6: 330–352.
209. Protić N.M., Protić R.J. (2005) Correlation of concentration of fumonisins and yield grain of wheat, *Proc. Nat. Sci. Matica Srpska Novi Sad*, 108: 129–137.
210. QuEChERS (stranica na internetu) <http://quechers.cvua-stuttgart.de/> Pristupljeno 10.05.2014.
211. Ramos L.S., Beebe K.R., Carey W.P., Eugenio S.M., Erickson B.C., Wilson B.E., Wangen L.E., Kowalski B.R. (1986) Chemometrics, *Anal. Chem.*, 58: 294R–315R.
212. R-biopharm, Fumonisin, <http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis/mycotoxins/fumonisin>, Pristupljeno 08.09.2014.

-
213. R-biopharm, PuriTox Fumonisin columns, <http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis/mycotoxins/fumonisin/item/puritox-fumonisin>, Pristupljeno 08.09.2014.
214. R-biopharm, Ridascreen Fumonisin, enzyme immunoassay for the quantitative analysis of fumonisin, Art No 3401. www.r-biopharm.de, Pristupljeno 26.04.2014.
215. Republički zavod za statistiku <http://webrzs.stat.gov.rs/>, Pristupljeno 26.04.2014.
216. Republički zavod za statistiku, Statistički godišnjak, 2009, str. 203.
217. Resnik S.L. (2006) Food processing to reduce the entry of mycotoxins to the food and feed chains. Conference on “Advances in research on toxigenic fungi and mycotoxins in South America ensuring food and feed safety in a mycoglobe context”, Córdoba, Argentina, 15–17 March 2006, 63–65.
218. Rheeder J.P., Marasas W.F.O., Vismer H.F. (2002) Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 2101–2105.
219. RHMZS (Republički hidrometeorološki zavod Srbije) Agrometeorološki uslovi u proizvodnim 2004/2005; 2008/2009; 2009/2010; 2010/2011; 2011/2012; 2012/2013. godinama na teritoriji Republike Srbije. <http://www.hidmet.gov.rs/ciril/meteorologija/agrometeorologija.php>, Pristupljeno 01.06.2014.
220. Rice L.G., Ross P.F. (1994) Methods for detection and quantitation of fumonisins in corn, cereal products and animal excreta, *J. Food Prot.*, 57: 536–540.
221. Rice L.G., Ross P.F., Dejong J., Plattner R.D., Coats J.R. (1995) Evaluation of a liquid chromatographic method for the determination of fumonisins in corn, poultry feed and *Fusarium* culture material, *J. AOAC Int.*, 78: 1002–1009.
222. Riley R.T., Wang E., Schroeder J.J., Smith E.R., Plattner R.D., Abbas H., Yoo H-S., Merrill A.H. (1996) Evidence for disruption of sphingolipid metabolism as a contributing factor in the toxicity and carcinogenicity of fumonisins, *Nat. Toxins*, 4: 3–15.
223. RomerLabs, MycoSep[®]231 Fum Push-through format; AgraQuant Total Fumonisin Assay 0.25–5.0, <http://shop.romerlabs.com/en/MycoSep-MultiSep/MycoSep/MycoSep-231-Fum>, Pristupljeno 08.09.2014.
224. RomerLabs, FumoniStar[™] IAC, <http://shop.romerlabs.com/en/Starline-IAC/FumoniStar-IAC>, Pristupljeno 08.09.2014.
225. Roscoe V., Lombaert G.A., Huzel V., Neumann G., Melietio J., Kitchen D., Kotello S., Krakalovich T., Trelka R., Scott P.M. (2008) Mycotoxins in breakfast cereals from the Canadian retail market: A 3-year survey, *Food Addit. Contam.*, 25: 347–355.
-

-
226. Ross P.F., Nelson P.E., Richard J.L., Osweiler G.D., Rice L.G., Plattner R.D., Wilson T.M. (1990) Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 3225–3226.
227. Rottinghaus G.E., Coatney C.E., Minor H.C. (1992) A rapid, sensitive thin layer chromatography procedure for the detection of fumonisin B₁ and B₂, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4: 326–329.
228. Royer D., Humpf H.-U., Guy P.A. (2004) Quantitative analysis of *Fusarium* mycotoxins in maize using accelerated solvent extraction before liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry, *Food Addit. Contam.*, 21: 678–692.
229. Rubert J., Fapohunda S.O., Soler C., Ezekiel C.N., Mañes J., Kayode F. (2013) A survey of mycotoxins in random street-vended snacks from Laagos, Nigeria, using QuEChERS-HPLC-MS/MS, *Food Control*, 32: 673–677.
230. Sacchi R., Mannina L., Fiordiponti P., Barone P., Paolillo L., Patumi M., Segre A. (1998) Characterization of Italian extra virgin olive oils using ¹H-NMR spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.*, 46: 3947–3951.
231. Sahar N., Ahmed M., Parveen Z., Ilyas A., Bhutto A. (2009) Screening of mycotoxins in wheat, fruits and vegetables grown in Sindg, Pakistan, *Pak. J. Bot.*, 41: 337–341.
232. Sala N., Sanchiz V., Vilaro P., Viladrich R, Torres M., Vinas I., Canela R. (1994) Fumonisin producing capacity of *Fusarium* strains isolated from cereals in Spain, *J. Food Prot.*, 57: 915–917.
233. Sanchis V., Magan N. (2004) Environmental conditions affecting mycotoxins. In: Magan N., Olsen M., Eds., *Mycotoxins in food, Detection and control*, CRC, Woodhead publishing limited, Cambridge, England, str. 262–304.
234. Sangare-Tigori B., Moukha S., Kouadio H.J., Betbeder A-M., Dano D.S., Creppy E.E. (2006) Co-occurrence of aflatoxin B₁, fumonisin B₁, ochratoxin A and zearalenone in cereals and peanuts from Côte d'Ivoire, *Food Addit. Contam.*, 23: 1000–1007.
235. Santos L., Marín S., Sanchis V., Ramos A.J. (2009) Screening of mycotoxin multicontamination in medicinal and aromatic herbs sampled in Spain, *J. Sci. Food Agr.*, 89: 1802–1807.

-
236. Schaafsma A.W., Nicol R.W., Savard M.E., Sinha R.C., Reid L.M., Rottinghaus G. (1998) Analysis of *Fusarium* toxins in maize and wheat using thin layer chromatography, *Mycopathologia*, 142: 107–113.
237. Schatzmayr G., Streit E. (2013) Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: fact and figures, *World Mycotoxin J.*, 6: 213–222.
238. Schjøth J.E., Visconti A., Sundheim L. (2009) Fumonisin in maize in relation to climate, planting time and hybrids in two agroecological zones in Zambia, *Mycopathologia*, 167: 209–219.
239. Schmieder P.K., Kolanczyk R.C., Hornung M.W., Tapper M.A., Denny J.S., Sheedy J.S., Aladjov H. (2014) A rule-based expert system for chemical prioritization using effects-based chemical categories, *SAR QSAR Environ. Res.*, 25: 253–287.
240. Scott P.M., Lawrence G.A. (1994) Stability and problems in recovery of fumonisins added to corn-based foods, *J. AOAC Int.*, 77: 541–545.
241. Scott P.M., Lawrence G.A. (1995) Analysis of beer for fumonisins, *J. Food Prot.*, 58: 1379–1382.
242. Scott P.M., Lawrence G.A., Lombaert G.A. (1999) Studies on extraction of fumonisins from rice, corn-based foods and beans, *Mycotoxin Res.*, 15: 50–60.
243. Sedova I.B., Kiseleva M.G., Zakharova L.P., Eller K.I., Tutel'yan V.A. (2004) Optimization of conditions for the determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn and its products of its processing by high-performance liquid chromatography, *J. Anal. Chem.*, 59: 730–736.
244. Seefelder W., Knecht A., Goßmann M., Kleta S., Büttner C., Humpf H.-U. (2004) Occurrence of fumonisins in asparagus (*Asparagus officinalis* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) from Germany, *Mycotoxin Res.*, 20: 29–30.
245. Senyuva H.Z., Gilbert J. (2008) Identification of fumonisin B₂, HT-2 toxin, patulin, and zearalenone in dried figs by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Food Prot.*, 71: 1500–1504.
246. Senyuva H.Z., Ozcan S., Cimen D., Gilbert J. (2008) Determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn by liquid chromatography/mass spectrometry with immunoaffinity column cleanup: single-laboratory method validation, *J AOAC Int.*, 91: 598–606.
247. Sewram V., Shephard G.S., Marasas W.F.O., de Castro M.F.P.M (2003) Improving extraction of fumonisin mycotoxins from brazilian corn-based infant foods, *J. Food Prot.*, 66: 854–859.
-

248. Sewram V., Shephard G.S., Van Der Merwe L., Jacobs T.V. (2006) Mycotoxin contamination of dietary and medicinal wild plants in the Eastern Cape Province of South Africa, *J. Agric. Food Chem.*, 54: 5688–5693.
249. Shelby R.A., White D.G., Bauske E.M. (1994) Differential fumonisin production in maize hybrids, *Plant Disease*, 78: 582–584.
250. Shephard G.S., Sewram V. (2004) Determination of the mycotoxin fumonisin B₁ in maize by reversed-phase thin-layer chromatography: a collaborative study, *Food Addit. Contam.*, 21: 498–505.
251. Shephard G.S., Sydenham E.W., Thiel P.G., Gelderblom W.C.A. (1990) Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Liq. Chromatogr.*, 13: 2077–2087.
252. Shephard G.S., Marasas W.F.O., Leggott N.L., Yazdanpanah H., Rahimian H., Safavi N. (2000) Natural occurrence of fumonisins in corn from Iran, *J. Agric. Food Chem.*, 48: 1860–1864.
253. Shephard G.S., Westhuizen L., Gatyeni P.M., Katerere D.R., Marasas W.F.O. (2005) Do fumonisin mycotoxins occur in wheat?, *J. Agric. Food Chem.*, 53: 9293–9296.
254. Shephard G.S., Burger H-M., Gambacorta L., Krska R., Powers S., Rheeder J.P., Solfrizzo M., Sulyok M., Visconti A., Warth B., van der Westhuizen L. (2013a) Mycological analysis and mycotoxins in maize from rural subsistence farmers in the former Transkei, South Africa, *J. Agric. Food Chem.*, 61: 8232–8240.
255. Shephard G.S., Kimanya M.E., Kpodo K.A., Gnonlonfin G.J.B., Gelderblom W.C.A. (2013b) The risk management dilemma for fumonisin mycotoxins, *Food Control*, 34: 596–600.
256. Sikder I.S. (2009) Knowledge-based spatial decision support systems: An assessment of environmental adaptability of crops, *Expert Syst. Appl.*, 36: 5341–5347.
257. Silva L., Fernández-Franzón M., Font G., Pena A., Silveira I., Lino C., Mañes J. (2009) Analysis of fumonisins in corn-based food by liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometry detectors, *Food Chem.*, 112: 1031–1037.
258. Siuda R., Balcerowska G., Sadowski C. (2006) Comparison of the usability of different spectral ranges within the near ultraviolet, visible and near infrared ranges (UV-VIS-NIR) region for the determination of the content of scab-damaged component in blended samples of ground wheat, *Food Addit. Contam.*, 23: 1201–1207.

259. Šegvić Klarić M., Cvetnić Z., Pepeljnjak S., Kosalec I. (2009) Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, and zearalenone in cereals and feed, determined by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and thin-layer chromatography, *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, 60: 427–434.
260. Škrbić B., Živančev J., Đurišić-Mladenović N., Godula M. (2012) Principal mycotoxins in wheat flour from the Serbian market: Levels and assessment of the exposure by wheat-based products, *Food Control*, 25: 389–396.
261. Škrinjar M., Jocković Đ., Matijević Z., Kocić-Tanackov S. (2013) Aflatoksini u žitaricama i proizvodima na bazi žitarica - pojava, uticaj na ljudsko zdravlje, zakonska regulativa, *Zbornik referata 47. Savetovanje agronoma Srbije, Zlatibor*, 3–9. 02.2013, 27–32.
262. Sl. list SFRJ, br. 25 (1980) Pravilnik o metodama vršenja mikrobioloških analiza i superanaliza životnih namirnica.
263. Sl. list SFRJ br. 15 (1987) Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i metodama fizičkih, hemijskih i mikrobioloških analiza stočne hrane, čl. 29/6.
264. Sl. glasnik RS, br. 4 (2010a) Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje, čl. 99 i 101.
265. Sl. glasnik RS, br. 45 (2010b) Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda, čl. 51.
266. Sl. glasnik RS, br. 27 (2014a) Pravilnik o izmeni pravilnika o kvalitetu hrane za životinje.
267. Sl. glasnik RS, br. 29 (2014b) Pravilnik o maksimalnim dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja.
268. Solfrizzo M., De Girolamo A., Visconti A. (2001) Determination of fumonisins B₁ and B₂ in cornflakes by high performance liquid chromatography and immunoaffinity clean-up, *Food Addit. Contam.*, 18: 227–235.
269. Soliman K.M., Badeaa R.I. (2002) Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi, *Food Chem. Toxicol.*, 40: 1669–1675.
270. Solovey M.M.S., Somoza C., Cano G., Pacin A., Resnik S. (1999) A survey of fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins contamination in corn-based food products in Argentina, *Food Addit. Contam.*, 16: 325–329.
271. Soriano J.M., Dragacci S. (2004) Occurrence of fumonisins in foods, *Food Res. Int.*, 37: 985–1000.

272. Stack M.E. (1998) Analysis of fumonisin B₁ and its hydrolysis product in tortillas, *J. AOAC Int.*, 81: 737–740.
273. Stanković S., Lević J., Petrović T., Krnjaja V. (2008) Toxicological profile of *F-prolifera* isolated from maize seed, root and stalk, *Cereal Res. Commun., Suppl. B*, 36: 397–398.
274. Stanković S., Lević J., Krnjaja V. (2011) Fumonisin B₁ in maize, wheat and barley grain in Serbia, *Biotechnol. Anim. Husb.*, 27: 631–641.
275. Stanković S., Lević J., Ivanović D., Krnjaja V., Stanković G., Tančić S. (2012) Fumonisin B₁ and its co-occurrence with other fusariotoxins in naturally-contaminated wheat grain, *Food Control*, 23: 384–388.
276. Stockmann-Juvala H., Savolainen K. (2008) A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B₁, *Hum. Exp. Toxicol.*, 27: 799–809.
277. Stojanov I.M., Kapetanov M.C., Potkonjak D.V., Živkov-Baloš M.M., Jakšić S.M., Radulović Prodanov J.Z. (2013) Correlation between the limit values of laboratory and clinical mycotoxicosis, *Jour. Nat. Sci., Matica Srpska Novi Sad*, 124: 325–332.
278. Storari M., Dennert F.G., Bigler L., Gessler C., Broggini G.A.L. (2012) Isolation of mycotoxins producing black aspergilli in herbal teas available on the Swiss market, *Food Control*, 26: 157–161.
279. Sulyok M., Berthiller F., Krska R., Schuhmacher R. (2006) Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20: 2649–2659.
280. Swiss Federal Office of Public Health (1997) Revision d'ordonnance sur les substances étrangères et les composants OSEC (RS 817. 021. 23). Bern, Swiss Federal Office of Public Health, 2 str. (Circular No. 11).
281. Sydenham E.W., Gelderblom W.C.A., Thiel P.G., Marasas W.F.O. (1990a) Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn, *J. Agric. Food Chem.*, 38: 285–290.
282. Sydenham E.W., Thiel P.G., Marasas W.F.O., Shephard G.S., Van Schalkwyk D.J., Koch K.R. (1990b) Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa, *J. Agric. Food Chem.*, 38: 1900–1903.

-
283. Sydenham E.W., Shephard G.S., Thiel P.G., Marasas W.F.O., Stockenström S. (1991) Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs, *J. Agric. Food Chem.*, 39: 2014–2018.
284. Sydenham E.W., Shephard G.S., Thiel P.G. (1992) Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in foods and feeds, *J. AOAC Int.*, 75: 313–318.
285. Sydenham E.W., Shephard G.S., Thiel P.G., Bird C., Miller B.M. (1996a) Determination of fumonisins in corn: evaluation of competitive immunoassay and HPLC techniques, *J. Agric. Food Chem.*, 44: 159–164.
286. Sydenham E.W., Shephard G.S., Thiel P.G., Stockenström S., Snijman P.W., Van Schalkwyk D.J. (1996b) Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂, and B₃ in corn: AOAC- IUPAC collaborative study, *J. AOAC Int.*, 79: 688–696.
287. Szécsi Á., Szekeres A., Bartók T., Oros G., Bartók M., Mesterházy Á. (2010) Fumonisin B₁₋₄-producing capacity of Hungarian *Fusarium verticillioides* isolates, *World Mycotoxin J.*, 3: 67–76.
288. Szekeres A., Budai A., Bencsik O., Németh L., Bartók T., Szécsi A., Mesterházy Á., Vágvölgyi C. (2013) Fumonisin measurement from maize samples by high-performance liquid chromatography coupled with corona charged aerosol detector, *J. Chrom. Sci.*, doi:10.1093/chromsci/bmt173.
289. Tamura M., Uyama A., Mochizuki N. (2011) Development of a multi-mycotoxin analysis in beer-based drinks by a modified QuEChERS method and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Anal. Sci.*, 27: 629–635.
290. Thakur R.A., Smith J.S. (1994) Analysis of fumonisin B₁ by negative-ion thermospray mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 8: 82–88.
291. Thakur R.A., Smith J.S. (1996) Determination of fumonisins B₁ and B₂ and their major hydrolysis products in corn, feed, and meat, using HPLC, *J. Agric. Food Chem.*, 44: 1047–1052.
292. Torelli E., Firrao G., Bianchi G., Saccardo F., Locci R. (2012) The influence of local factors on the prediction of fumonisin contamination in maize, *J. Sci. Food Agric.*, 92: 1808–1814.

-
293. Trucksess M.W., Cho T-H., Ready D.E. (2000) Liquid chromatographic method for fumonisin B₁ in sorghum syrup and corn-based breakfast cereals, *Food Addit. Contam.*, 17: 161–166.
294. Ueno Y., Iijima K., Wang S.D., Dugiura Y., Sekijima M., Tanaka T., Chen C., Yu S.Z. (1997) Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: A 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA, *Food Chem. Toxicol.*, 35: 1143–1150.
295. van der Westhuizen L., Shephard G.S., Scussel V.M., Costa L.L.F., Vismar H.F., Rheeder J.P., Marasas W.F.O. (2003) Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil, *J. Agric. Food Chem.*, 51: 5574–5578.
296. van Leeuwen J.A., Buydens L.M.C., Vandeginste B.G.M., Kateman G. (1990) Expert systems in chemical analysis, *Trends Anal. Chem.*, 9: 49–54.
297. Varga J., Toth B., Mesterhazy A., Teren J., Fazekas B. (2004) Hungary Mycotoxigenic fungi and mycotoxins in foods and feeds in Hungary, in: An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe, ed. Logrieco A., Visconti A., Springer. E-book: <http://books.google.rs>
298. Vasanthi S., Bhat R.V. (1998) Mycotoxins in foods—Occurrence, health and economic significance and food control measures, *Indian J. Med. Res.*, 108: 212–224.
299. Velázquez C., Van Bloemendal C., Sanchis V., Canela R. (1995) Derivation of fumonisins B₁ and B₂ with 6-aminoquinolyl N-hydroxysuccinimidylcarbamate, *J. Agric. Food Chem.*, 43: 1535–1537.
300. VICAM, (2013) Global Mycotoxin Regulations Tool™ <http://www.commodityregs.com> Pristupljeno 10.06.2014.
301. VICAM Product Manuals; <http://vicam.com/Default.aspx?PageID=4898897> Pristupljeno 08.09.2014.
302. Visconti A., Solfrizzo M., De Girolamo A. (2001) Determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity column cleanup: collaborative study, *J. AOAC Int.*, 84: 1828–1837.
303. Vrandečić K., Čosić J., Jurković D., Poštić J. (2011) Mikopopulacija ljekovitoga bilja u Hrvatskoj, *Poljoprivreda* 17: 18–21.
304. Vuković G., Tadić M., Pavlović S., Cindrić M., Ristić M. (2010) Određivanje fumonisina u kukuruzu i proizvodima na bazi kukuruza metodom tečne hromatografije kuplovane sa masenom spektrometrijom, *Zaštita bilja*, 61: 141–150.

-
305. Wan L.Y.M., Turner P.C., El-Nezami H. (2013) Individual and combined cytotoxic effects of *Fusarium* toxins (deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone and fumonisins B₁) on swine jejunal epithelial cells, *Food Chem. Toxicol.*, 57: 276–283.
306. Wang J., Zhou Y., Wang Q. (2008) Analysis of mycotoxin fumonisins in corn products by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection, *Food Chem.*, 107: 970–976.
307. Wang Y., Xiao C., Guo J., Yuan Y., Wang J., Liu L., Yue T. (2013) Development and application of a method for the analysis of 9 mycotoxins in maize by HPLC-MS/MS, *J. Food Sci.*, 78: 1752–1756.
308. Warfield C.Y., Gilchrist D.G. (1999) Influence of kernel age on fumonisin B₁ production in maize by *Fusarium moniliforme*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 2853–2856.
309. Waśkiewicz A., Beszterda M., Goliński P. (2012) Occurrence of fumonisins in food - An interdisciplinary approach to the problem, *Food Control*, 26: 491–499.
310. Weidenbörner M. (2001) Foods and fumonisins, *Eur. Food Res. Technol.*, 212: 262–273.
311. WHO (2000) Environmental Health Criteria 219, FUMONISIN B₁, <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc219.htm>; Pristupljeno 10.06. 2014.
312. WHO (2007) WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues (2007), <http://apps.who.int/medicinedocs/index/assoc/s14878e/s14878e.pdf>, Pristupljeno 08.05.2014.
313. Wilkes J.G., Sutherland J.B., Churchwell M.I., Williams A.J. (1995) Determination of fumonisins B₁, B₂, B₃ and B₄ by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection, *J. Chromatogr.*, 695: 319–323.
314. Xie F., Maghirang E., Pearson T., Wicklow D., Kramer K., Morgan T., Dowell F (2000) NIRS applied to detecting single corn characteristics AACC annual meeting, 5–9.11.
315. Xie F., Pearson T., Dowell F.E., Zhang N. (2004) Detecting vitreous wheat kernels using reflectance and transmittance image analysis, *Cereal Chem.*, 81: 594–597.
316. Yang Q.-F., Wu Y.-L. (2012) Fast determination of fumonisin B₁ and B₂ in corn using a modified QuEChERS method and LC-MS-MS, *Chromatographia*, 75: 1075–1080.
317. Young J.C., Lafontaine P. (1993) Detection and characterization of fumonisin mycotoxins as their methyl esters by liquid chromatography/particle-beam mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.*, 7: 352–359.

318. Zhang K., Chai Y., Yang S.X., Weng D. (2011) Pre-warning analysis and application in traceability systems for food production supply chains, *Expert Syst. Appl.*, 38: 2500–2507.
319. Zöllner P., Mayer-Helm B. (2006) Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 1136: 123–169.

BIOGRAFIJA

Sandra M. Jakšić je rođena 02. decembra 1974. godine u Novom Sadu od majke Nevenke i oca Milana Đilasa. Osnovnu školu je završila u Bačkom Jarku sa prosečnom ocenom 5,00 i dobitnik je diplome “Vuk Karadžić”. Prirodno-matematički smer gimnazije “Jovan Jovanović Zmaj” u Novom Sadu, završila je 1993. godine odličnim uspehom i time stekla diplomu saradnika u prirodnim naukama. Iste godine upisala se na Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu, Odsek za hemiju. Ispite na osnovnim studijama je položila sa prosečnom ocenom 8,50. Diplomski rad pod nazivom “Efekti procesa koagulacije na sadržaj aldehida u podzemnoj vodi nakon primene hipohlorita, hlor-dioksida i ozona” je odbranila 28.01.1999. godine sa ocenom 10 (deset).



Oktobra 1999. godine se upisala na poslediplomske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, Odsek za hemiju, iz oblasti analitičke hemije, pod mentorstvom prof. dr Biljane Abramović. Položila je sve ispite predviđene programom magistarskih studija sa prosekom ocena 9,83. Magistarsku tezu pod nazivom „Prilog hromatografskom određivanju fumonizina B₁ i B₂ u kukuruzu“ je odbranila 01.11.2004. godine.

Od 11.10.1999. do 26.10.2000. je bila zaposlena kao pripravnik, a zatim od 26.10.2000. do 2005. kao istraživač-pripravnik, u Naučnom institutu za veterinarstvo “Novi Sad”, na Odeljenju za ispitivanje hrane za životinje. U zvanje istraživač-saradnik izabrana je 2005. godine. Do sada je bila angažovana na 8 projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije iz oblasti osnovnih istraživanja i tehnološkog razvoja. Osnovna istraživačka interesovanja su joj bezbednost namirnica animalnog porekla i hrane za životinje i primena analitičkih metoda: HPLC, ELISA, AAS, ICP, GC za određivanje toksičnih supstanci (mikotoksini, pesticidi, toksični elementi). Glavne svakodnevne i istraživačke aktivnosti obuhvataju: određivanje osnovnih parametara kvaliteta i zdravstvene bezbednosti hrane i hrane za životinje, uvođenje novih metoda za brže i tačnije određivanje kontaminanata hrane i hrane za životinje, sprovođenje zahteva standarda SRPS 9001:2001 i SRPS 17025:2006 u radu Instituta. Koautor je na ukupno 69 radova i saopštenja. Ima 15 citata i 2 samocitata (izvor Biblioteka Matice srpske). Aktivno se služi engleskim i ruskim jezikom.

Udata je i majka dvoje dece.

Novi Sad, 2014. godina

mr Sandra Jakšić, dipl. hem.

SPISAK RADOVA I SAOPŠTENJA

Rad u tematskom zborniku međunarodnog značaja M14

1. Čosić J., Vrandečić K., Jurković D., Abramović B., Jajić I., Jakšić S., Mycopopulation of cereals in Croatia, Chapter 4.1., E. Alexa, B. Abramović, J. Čosić, (Eds.), Occurrence of fungi and mycotoxins in cereals and medicinal plants from Romania - Serbia - Croatia Area, EUROBIT Publishing House, Timisoara, 2012, str. 87–106.
2. Abramović B., Jakšić S., Jajić I., Despotović V., Šojić D., Jovanović Lj., Čosić J., Vrandečić K., Jurković D., Co-occurrence of Fumonisin and Deoxynivalenol in Wheat and Corn Harvested in Serbia, Chapter 5, E. Alexa, B. Abramović, J. Čosić, (Eds.), Occurrence of Fungi and Mycotoxins in Cereals and Medicinal Plants from Romania-Serbia-Croatia Area, EUROBIT Publishing House, Timisoara, 2012, str. 123–142.

Rad u istaknutom međunarodnom časopisu M22

3. Jakšić S., Živkov-Baloš M., Mihaljev Ž., Mašić Z., Jajić I., Banić N., Abramović B. Extraction without Organic Solvents in the Determination of Fumonisin B₁, B₂, and B₃ in Maize by HPLC–FLD and ELISA Tests, Food Anal. Meth., DOI 10.1007/s12161-014-0030-5

Rad u međunarodnom časopisu M23

4. Vukavić T., Vojinović-Miloradov M., Pavkov S., Đilas S. (2003) Pesticide residues and polychlorinated bipheyls in human colostrum - Seasonal variations in Yugoslavia a decade later, Fresen. Environ. Bull., 12: 215–218.
5. Abramović B., Jakšić S., Mašić Z. (2005) Liquid chromatographic determination of fumonisin B₁ and B₂ in corn samples after reusable immunoaffinity column clean-up, J. Serb. Chem. Soc., 70: 899–910.
6. Jakšić S., Abramović B., Jajić I., Živkov-Baloš M., Mihaljev Ž., Despotović V., Šojić D. (2012) Co-occurrence of Fumonisin and Deoxynivalenol in Wheat and Maize Harvested in Serbia, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 89: 615–619.
7. Jajić I., Krstović S., Glamočić D., Jakšić S., Abramović B. (2013) Validation of an HPLC method for the determination of amino acids in feed, J. Serb. Chem. Soc., 78: 839–850.
8. Mihaljev Ž., Živkov-Baloš M., Čupić Ž., Jakšić S. (2014) Levels of some microelements and essential metals in different herbal teas in Serbia, Acta Pol. Pharm., 71: 386–391.
9. Mihaljev Ž., Čupić Ž., Živkov-Baloš M., Jakšić S. Levels of macroelements and toxic elements in herbal teas, Hemijska ind., DOI:10.2298/HEMIND130424029M

Rad saopšten na skupu međunarodnog značaja štampan u celini M33

10. Mihaljev Ž., Đilas S., Pavkov S. The possibility for the spectrophotometric determination of selenium in pharmacological preparations. Proceedings, 9th Symposium on analytical and environmental problems, Szeged, Hungary, SZAB, 30 September, 2002, 10–13.
11. Abramović B., Đilas S., Gaal F., Mašić Z. Determination of fumonisin B₁ and B₂ in corn by liquid chromatography. Proceedings, II Regional Symposium Chemistry and Environment, Kruševac, June 18-22, 2003, 75–76.
12. Košarčić S., Kovačević M., Stojanović D., Milanov D., Mihaljev Ž., Grgić Ž., Đilas S. Utvrđivanje genotoksičnosti otpadnih voda na mestima proizvodnje namirnica animalnog

- porekla. Međunarodna konferencija Otpadne vode, komunalni čvrsti otpad i opasan otpad, Budva, 10-13. jun, 2003., 101–107.
13. Živkov-Baloš M., Sinovec Z., Jakšić S., Mihaljev Ž., Kovačević M. Using of phytase for the purpose of improving nutritive values and safety of feed for poultry. Obezbeđenje kvaliteta, XI Međunarodni simpozijum tehnologije hrane za životinje, Vrnjačka banja, 30. maj - 3. jun, 2005, 56–63.
 14. Jakšić S., Abramović B., Živkov-Baloš M., Mihaljev Ž., Mašić Z. Application of C18 columns for crude corn extract cleanup in fumonisins B₁ and B₂ determination by liquid chromatography. Obezbeđenje kvaliteta, XI Međunarodni simpozijum tehnologije hrane za životinje, Vrnjačka banja, 30. maj - 3. jun, 2005, 236–244.
 15. Jajić I., Glamočić D., Jurić V., Ivković M., Krstović S., Jakšić S., Abramović B., Urošević M. Incidence of deoxynivalenol in cereals and animal feed samples from 2010 harvest. Food Safety Production, 22 nd International Symposium, Trebinje, 19-25 june, 2011, 37–39.
 16. Mihaljev Ž., Čupić Ž., Živkov-Baloš M., Jakšić S. Total beta activity, potassium-40 activity and residual beta activity in different tea samples. XV International Eco-Conference, 21-24 September 2011, Novi Sad, Proceedings, 2, 281–287.
 17. Živkov-Baloš M., Jakšić S., Mihaljev Ž., Prica N., Stojanov I., Kapetanov M. Rapeseed meal as a by-product from biodiesel production as a feed ingredient., Proceedings book of 6th Central European Congress on Food, Novi Sad, Serbia, 23-26 May, 2012, 1391–1395.
 18. Mihaljev Ž., Živkov-Baloš M., Kapetanov M., Jakšić S. Content of microelements in wild birds in Vojvodina. [International symposium on hunting] 'Modern aspects of sustainable management of game population', Zemun - Beograd, Serbia, 22-24 June, 2012, Proceedings, 134–136.
 19. Kapetanov M., Potkonjak D., Stojanov I., Živkov-Baloš M., Jakšić S. Importance of clinical and pathological diagnostics of mycotoxicosis in fattening turkeys caused by T-2 trichothecene. XV International Symposium Feed Technology, [and] Feed to Food Cost Feed for Health Joint Workshop Novi Sad, 03-05 October, 2012, Proceedings, 304–309.
 20. Živkov-Baloš M., Mihaljev Ž., Jakšić S., Čupić Ž., Kapetanov M. Concentration of arsenic in water and tissues of broilers. Proceedings, 10th International Symposium Modern Trends in Livestock Production, Belgrade, 2 - 4 October, 2013, 776–783.
 21. Mihaljev Ž., Živkov-Baloš M., Kapetanov M., Jakšić S. Determination of toxic elements in wild birds from the area of Vojvodina, 10th International Symposium Modern Trends in Livestock Production, Belgrade, 2 - 4 October, 2013, Beograd, 1196–1203.
 22. Mihaljev Ž., Marić B., Ratajac R., Živkov-Baloš M., Jakšić S. Confirmation of carbofuran poisoning of wildlife. Proceedings, [2nd International symposium on hunting] Modern aspects of sustainable management of game population, Novi Sad, 17-20 October, 2013, 249–253.
 23. Apić J., Babić J., Živkov-Baloš M., Žekić-Stošić M., Ljubojević D., Jakšić S., Petrović J. Antibiotics residues as limiting factor of honey quality. International symposium on animal science 2014, 23- 25 September, Belgrade, Serbia, 455–458.
 24. Ljubojević D., Živkov-Baloš M., Mihaljev Ž., Jakšić S., Đorđević V., Radosavljević V., Ćirković M. Use of probiotics as growth promoters and immunostimulators in fingerlings of cyprinid fish species, International symposium on animal science 2014, 23- 25 September, Belgrade, Serbia, 459–464.
 25. Živkov-Baloš M., Jakšić S., Mihaljev Ž., Obradović S., Ljubojević D., Stojanov I., Jovičin M. Nutritive value of vitaminized silages, XVI International Symposium Feed Technology 2014, 28-30 October, Novi Sad, 187–192.
 26. Ljubojević D., Jakšić S., Živkov-Baloš M., Mihaljev Ž., Puvača N., Prica N., Kapetanov M. Presence of aflatoxins, zearalenone, ochratoxin A and trichothecenes in corn (*Zea Mays*) in Republic of Serbia, XVI International Symposium Feed Technology 2014, 28-30 October, Novi Sad, 193–197.
 27. Mihaljev Ž., Živkov-Baloš M., Čupić Ž., Jakšić S., Katalović B., Ljubojević D. Radioactivity of milk in the territory of Vojvodina, II International Congress Food Technology, Quality and Safety 2014, 28-30 October, Novi Sad, 541–545.

Rad saopšten na skupu međunarodnog značaja štampan u izvodu M34

28. Đilas S., Mihaljev Ž., Živkov-Baloš M. The possibility for application of the method for determination of iodine by kinetic measurement of the iodide catalytic activity. *Metal Elements in Environment, Medicine and Biology*, 4th International Symposium, Timisoara, 2000, 15.
29. Prica N., Živkov-Baloš M., Mihaljev Ž., Jakšić S.: Sadržaj natrijumhlorida u proizvodima od mesa. *Međunarodno 56. savetovanje industrije mesa Meso i proizvodi od mesa - bezbednost, kultura, razvoj, kvalitet života*, Tara, 12-15. Jun, 2011, Zbornik kratkih sadržaja, 75–76.
30. Petrović J., Mihaljev Ž., Živkov-Baloš M., Jakšić S., Milanov D.: Heavy metal distribution in dairy products from Serbia. 3rd ICOST Feed for Health Conference COST, Copenhagen, 7-9 Nov, 2011, Programme and Abstracts, 19.
31. Jakšić S.M., Abramović B.F., Prunić B.Z., Mihaljev Ž.A., Živkov Baloš M.M., Jajić I.M., Despotović V.N., Bjelica L.J. Incidence of aflatoxins and fumonisins in cereal food from Serbian market, The 2nd International Conference on Food Chemistry & Technology, Temišvar, 2011, P3.
32. Abramović B., Jakšić S., Jajić I., Živkov-Baloš M., Mihaljev Ž., Despotović V., Šojić D. Natural contamination and co-occurrence of fumonisins and deoxynivalenol in wheat and corn samples. Abstract book of 6th Central European Congress on Food, Novi Sad, Serbia, 23-26 May, 2012, 274.
33. Mihaljev Ž., Kartalović B., Prica N., Jakšić S., Živkov-Baloš M. The presence of pesticides and toxic elements in meat and internal organs of game (region of Vojvodina). Abstract book of 3rd International Symposium on hunting, Beograd, Serbia, 26-28 September, 2014, 76.

Rad u vodećem časopisu nacionalnog značaja M51

34. Đilas S., Živkov-Baloš M., Mihaljev Ž., Mrđen M., Mašić Z. (2001) Hemijska, mikrobiološka i mikotoksikološka ispravnost smeša za ishranu životinja u periodu od januara 1999. do januara 2000. godine, *Vet. glasnik*, 55: 61–67.
35. Mihaljev Ž., Živkov-Baloš M., Đilas S. (2001) Rezultati merenja teških metala i ostalih mikro- i makro elemenata u medu, *Vet. glasnik*, 55: 167–172.
36. Živkov-Baloš M., Đilas S., Mihaljev Ž., Sinovec Z., Baltić M. (2003) Uticaj fitaze na klaničke karakteristike i kvalitet mesa brojlera, *Savremena poljoprivreda*, 52: 191–194.
37. Mašić Z., Adamović M., Đilas S., Mihaljev Ž. (2003) Mikotoksini u patofiziologiji ishrane goveda, *Vet. glasnik*, 57: 191–199.
38. Stojanov I., Petrović J., Ratajac R., Jakšić S., Živkov-Baloš M., Stojanović D. (2009) Influence of immune stress factors on the presence and shedding of *Campylobacter jejuni* in poultry, *Biotech. Anim. Husbandry*, 25: 1123–1129.
39. Jakšić S., Stojanov I., Živkov-Baloš M., Mašić Z., Mihaljev Ž., Abramović B. (2011) Mycotoxicological tests from the aspect of the HACCP system and legislation, *Jour. Nat. Sci. Matica srpska, Novi Sad*, 120: 95–102.
40. Jakšić S., Prunić B., Milanov D., Jajić I., Bjelica L., Abramović B. (2011) Fumonisins and co-occurring mycotoxins in north Serbian corn, *Jour. Nat. Sci. Matica srpska, Novi Sad*, 120: 49–59.
41. Jajić I., Jevtić R., Jurić V., Krstović S., Telečki M., Matić J., Đilas-Jakšić S., Abramović B. (2011) Presence of deoxynivalenol in small-grain samples from 2009/10 harvest season, *Jour. Nat. Sci. Matica srpska, Novi Sad*, 120: 19–24.
42. Stojanov I., Prodanov-Radulović J., Pušić I., Kapetanov M., Ratajac R., Jakšić S. (2011) Dermatomycosis-conditions that contribute to the disease development, *Jour. Nat. Sci. Matica srpska, Novi Sad*, 120: 231–243.
43. Jakšić S., Jajić I., Nešić K., Stojanov I., Živkov-Baloš M., Mihaljev Ž., Abramović B. (2013) Interlaboratory comparison for determination of ochratoxin A by ELISA in maize, *Jour. Nat. Sci. Matica srpska, Novi Sad*, 124: 77–84.

44. Nešić K., Jakšić S., Kapetanov M. (2013) Prevention, control and detection of fusarial toxins, Jour. Nat. Sci. Matica srpska, Novi Sad, 124: 91–99.
45. Jajić I., Krstović S., Perišić B., Jakšić S., Bursić V., Abramović B. (2013) Presence of zearalenone in the most commonly grown wheat cultivars in Serbia, Jour. Nat. Sci. Matica srpska, Novi Sad, 124: 101–109.
46. Kapetanov M., Potkonjak D., Stojanov I., Živkov-Baloš M., Jakšić S. (2013) Clinical and pathomorphological diagnostics of mycotoxicosis in parent poultry flock caused by T-2 trychotecene, Jour. Nat. Sci. Matica srpska, Novi Sad, 124: 137–143.
47. Stojanov I., Kapetanov M., Potkonjak D., Živkov-Baloš M., Jakšić S., Prodanov-Radulović J. (2013) Correlation between the limit values of laboratory and clinical mycotoxicosis, Jour. Nat. Sci. Matica srpska, Novi Sad, 124: 325–332.
48. Živkov-Baloš M., Jakšić S., Mihaljev Ž., Čupić Ž., Stojanov I., Apić J., Jovičin M. (2013) Mikroelementi i teški metali u mleku krava sa različitih lokaliteta Srbije, Vet. glasnik, 67: 317–328.

Rad u časopisu nacionalnog značaja M52

49. Mihaljev Ž., Mašić Z., Živkov-Baloš M., Đilas S. (2000) Toksični elementi u mleku i proizvodima od mleka, Preh. ind., 11: 27–29.
50. Stojanov I., Jakšić S., Prodanov J. (2007) Presence and importance of saprophyte fungal organisms on dog skin, Jour. Nat. Sci. Matica srpska, Novi Sad, 113: 261–265.
51. Prica N., Živkov-Baloš M., Mihaljev Ž., Jakšić S., Kapetanov M. (2012) Sadržaj nitrita i ukupnog fosfora u proizvodima od mesa na novosadskom tržištu, Arh. vet. med., 5: 69–75.
52. Prica N., Živkov-Baloš M., Mihaljev Ž., Jakšić S., Stojanov I. (2013) Sadržaj natrijumhlorida u proizvodima od mesa, Arh. vet. med., 6: 71–79.

Rad u naučnom časopisu M53

53. Djilas S., Živkov-Baloš M., Mrđen M., Mihaljev Ž., Mašić Z. (2001) Kontaminiranost hrane za životinje plesnima tokom 2001 godine, Vet. ž. Repub. Srp., 1: 139–142.
54. Abramović B., Jakšić S., Mašić Z. (2005) Efficiency of crude corn extract clean-up on different columns in fumonisins determination, Jour. Nat. Sci. Matica srpska, Novi Sad, 108: 95–102.
55. Abramović B., Abramović B., Jakšić S. (2005) Expert system for determination of fumonisins in corn samples, Jour. Nat. Sci. Matica srpska, Novi Sad, 108: 109–119.
56. Mihaljev Ž., Živkov-Baloš M., Jakšić S. (2008) Mogućnost određivanja vitamina B12 u vitaminskim predmešama i dodacima hrani za životinje metodom AAS, Arh. vet. med., 1: 73–78.
57. Jakšić S., Mihaljev Ž., Živkov-Baloš M., Mašić Z. (2009) Validacija metode totalnog sagorevanja za određivanje sirovih proteina u hrani za životinje, Arh. vet. med., 2: 79–89.
58. Jakšić S., Abramović B., Prunić B., Mihaljev Ž., Živkov-Baloš M., Jajić I., Despotović V., Bjelica L. (2011) Incidence of aflatoxins and fumonisins in cereal food from Serbian market, J. Agroalim. Processes Technol., 17: 108–112.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u celini M63

59. Mašić Z., Kljajić R., Mihaljev Ž., Živkov-Baloš M., Đilas S.: Teški metali u životnoj sredini kao faktor poremećaja zdravlja životinja. Zbornik radova i kratkih sadržaja, '13.Savetovanje veterinarara Srbije', Zlatibor 11-14. Septembar, 2001, 115–126.
60. Mašić Z., Sinovec Z., Živkov-Baloš M., Đilas S., Mihaljev Ž.: Stočna hrana kao faktor poremećaja zdravlja svinja. Zbornik radova i kratkih sadržaja, '14.Savetovanje veterinarara Srbije', Zlatibor 10-14. septembar, 2002, 33–45.

61. Živkov-Baloš M., Šarić M., Mihaljev Ž., Đilas S.: Nivoi toksičnih elemenata i ostalih mineralnih materija u pšenici, Eko-konferencija 2000, Novi Sad, 27-30. Septembar, 2000, 267–272.
62. Đilas S., Mašić Z., Živkov-Baloš M., Mihaljev Ž.: Mikotoksini u mleku i proizvodima od mleka. Savremeni trendovi u mlekarstvu, Jugoslovenski mlekarski simpozijum, Zlatibor, 29.mart-02. april, 2000, 72–77.
63. Abramović B., Đilas S., Gaal F., Mašić Z.: Metode određivanja fumonizina, Eko-konferencija Novi Sad, 25-28 septembar, 2002, 127–132.
64. Đilas S., Abramović B., Mašić Z.: Rasprostranjenost fumonizina i metode njihovog određivanja, 15.Savetovanje veterinarara Srbije, Zlatibor 09-13. septembar, 2003, 110–118.
65. Mihaljev Ž., Jakšić S., Živkov-Baloš M.: Sadržaj selena u kukuruza sa različitih lokaliteta u Republici Srbiji. Bezbednost i kvalitet, X Simpozijum tehnologije stočne hrane sa međunarodnim učešćem, Vrnjačka banja, 19-23. oktobar, 2003, 260–265.
66. Mašić Z., Bočarov-Stančić A., Sinovec Z., Đilas S., Adamović M.: Mikotoksini u hrani za životinje u Republici Srbiji, X Simpozijum tehnologije stočne hrane sa međunarodnim učešćem, Vrnjačka banja, 19-23. oktobar, 2003, 290–298.
67. Abramović B., Abramović B., Jakšić S.: Object-oriented approach in the development of an expert system on example of the determination of fumonisins.Zbornik radova, Osmo nacionalna konferencija sa međunarodno učestvo - ETAI 2007, Ohrid, Republika Makedonija, 19-21. novembar, 2007, I1-2, 6.

Rad saopšten na skupu nacionalnog značaja štampan u izvodu M64

68. Mihaljev Ž., Živkov-Baloš M., Đilas S.: Riblje brašno i fosfatna mineralna hraniva kao mogući izvor kontaminacije toksičnim elementima. Knjiga izvoda, 4 Jugoslovenski simpozijum Hemija i zaštita životne sredine sa međunarodnim učešćem, Zrenjanin, Jugoslavija, 23-26. septembar, 2001, 190–192.
69. Abramović B., Jakšić S.: Primena anjonskog izmenjivača za prečišćavanje sirovog ekstrakta kukuruza u cilju određivanja fumonizina tečnom hromatografijom. Program i Izvodi radova, XLII Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Novi Sad, 22-23. januar, 2004, 25.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Autor: AU	mr Sandra Jakšić, dipl. hem.
Mentor: MN	dr Biljana Abramović, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
Naslov rada: NR	Prilog određivanju fumonizina u žitaricama i lekovitom bilju u Srbiji
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski/Engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2014
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad
Fizički opis rada: FO	broj poglavlja 7; strana 204; literaturnih citata 319; tabela 51; slika 48
Naučna oblast: NO	Hemija
Naučna disciplina: ND	Analitička hemija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	fumonizini, tečna hromatografija, ELISA, ekstrakcija, žitarice, lekovito bilje, FTIR, ekspertni sistem
UDK	
Čuva se: ČU	U biblioteci Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, PMF, Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3

Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	Ispitana je mogućnost ekstrakcije fumonizina iz kukuruza sa vodom i fosfatnim puferom, umesto sa smešom acetonitril–metanol–voda. Ekstrakcione metode neorganskim rastvaračima su uspešno primenjene za određivanje fumonizina B ₁ , B ₂ i B ₃ metodom tečne hromatografije sa fluorescentnom detekcijom, kao i ukupnih fumonizina pomoću imunohemijske metode. Analiziran je veći broj uzoraka na prisustvo i sadržaj fumonizina. Ispitani su uzorci kukuruza (235), sakupljeni tokom višegodišnjeg perioda (2005. i 2009–2013. godine) i pšenice (83) roda 2010. i 2012. godine, sa područja severne Srbije. Ispitana je kontaminiranost kukuruza sa područja severne Srbije fumonizinima, drugim mikotoksinima i plesnima, kao i mogući uticaj klimatskih faktora na stepen kontaminacije. Rezultati kontaminiranosti useva fumonizinima za svaku godinu pojedinačno su povezivani sa vremenskim prilikama koje su pratile istu. Različita hrana na bazi žitarica je analizirana ELISA metodama. Razvijena je ELISA i metoda tečne hromatografije sa fluorescentnom detekcijom za određivanje fumonizina u tri vrste lekovitog bilja sa područja Srbije. Ispitana je mogućnost primene infracrvene spektroskopije sa Furijeovim transformom za određivanje fumonizina. Razvijen je ekspertni sistem za rešavanje problema izbora optimalnog postupka određivanja fumonizina u kukuruзу.
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	15.12.2011.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: KO	<p>Predsednik: dr Ljiljana Jovanović, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>Mentor: dr Biljana Abramović, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>Član: dr Zoran Mašić, naučni savetnik Naučnog instituta za veterinarstvo “Novi Sad” u Novom Sadu</p> <p>Član: dr Igor Jajić, vanredni profesor Poljoprivrednog fakulteta, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>Član: dr Milica Živkov-Baloš, viši naučni saradnik Naučnog instituta za veterinarstvo “Novi Sad” u Novom Sadu</p>

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCE
KEYWORDS DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monography type
Type of record: TR	Printed text
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	MSc Sandra Jakšić
Mentor: MN	Dr. Biljana Abramović, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad
Title: TI	A contribution to the determination of fumonisins in grain and medicinal plants in Serbia
Language of text: LT	Serbian (Latin alphabet)
Language of abstract: LA	Serb./Engl.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2014
Publisher: PU	Author's reprint
Pub. Place: PP	Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3 Novi Sad
Physical description: PD	chapters 7; pages 204; literature 319; 51 tables; 48 pictures
Scientific field: SF	Chemistry
Scientific discipline: SD	Analytical Chemistry
Keywords: UC	fumonisin, HPLC, ELISA, extraction, grain, medicinal plants, FTIR, expert system
Holding data: HD	In Department's of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Library, Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad

Note: N	None
Summary: AB	<p>Possibility of fumonisin extraction from maize using water and phosphate buffer instead of acetonitrile-methanol-water mixture was examined. The methods of extraction without organic solvents have successfully been applied for the determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ using liquid chromatography-fluorescence detection method, as well as total fumonisins using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Large number of samples was analyzed for the presence and content of fumonisins. Maize samples (total 235) collected throughout several-year period (2005 and 2009-2013) and wheat samples (total 83) from 2010 and 2012 harvest originating from the territory of northern Serbia were analyzed. Contamination of maize originating from the territory of northern Serbia with fumonisins and other mycotoxins and moulds was examined, as well as the potential impact of climatic factors on contamination level. The results on the fumonisin-contamination of cereals obtained for each individual year are related with the climatic conditions characteristic for the relevant year. A variety of cereal-based food was analyzed using ELISA methods. Improved liquid chromatography-fluorescence detection method and ELISA for the determination of fumonisins in three medicinal plant species from the territory of Serbia were developed. Possible application of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) for quantification of fumonisin was investigated. An expert system to solve the problem of selecting an optimal method for determination of fumonisins in maize has been developed.</p>
Accepted by the Scientific Board on: AC	15.12.2011.
Defended: DE	
Thesis defend board, DB	<p>President: PhD Ljiljana Jovanović, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad Mentor: PhD Biljana Abramović, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad Member: PhD Zoran Mašić, Principal Research Fellow, Scientific Veterinary Institute "Novi Sad" Member: PhD Igor Jajić, Associate Professor, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad Member: PhD Milica Živkov-Baloš, Senior Research Associate, Scientific Veterinary Institute "Novi Sad"</p>