



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET



Jovana Kos

Aflatoksini: analiza pojave, procena rizika i optimizacija metodologije određivanja u kukuruzu i mleku

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

**Prof. Dr Marija Škrinjar
Dr Jasna Mastilović**

Kandidat:

Jovana Kos, dipl. inž.

Novi Sad, 2015.

Univerzitet u Novom Sadu

Tehnološki fakultet

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska publikacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Autor: AU	Jovana Kos, dipl. inž.
Mentor: MN	Dr Marija Škrinjar, redovni profesor Dr Jasna Mastilović, naučni savetnik
Naslov rada: NR	Aflatoksini: analiza pojave, procena rizika i optimizacija metodologije određivanja u kukuruzu i mleku
Jezik publikacije: JP	Srpski, latinica
Jezik izvoda: JI	Srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina

Godina: 2015.
GO

Izdavač: Tekst autora
IZ

Mesto i adresa: Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija
MA

Fizički opis rada: 7 poglavlja, 208 stranica, 44 slike, 79 tabela,
FO 256 literaturnih navoda

Naučna oblast: Biotehničke nauke
NO

Naučna disciplina: Prehrambeno inženjerstvo
ND

Predmetna
odrednica: Aflatoksini, kukuruz, mleko, ELISA, tečna
PO hromatografija

UDK

Čuva se: U biblioteci Tehnološkog fakulteta u Novom
ČU Sadu, Bul. cara Lazara 1, 21000 Novi Sad

Važna napomena: Nema
VN

Izvod:
IZ

Dosadašnji objavljeni literaturni podaci ukazuju da aflatoksini, usled njihovog dokazanog toksičnog, mutagenog, teratogenog i kancerogenog efekta na organizam ljudi i životinja, predstavljaju najpoznatiju i najrizičniju grupu mikotoksina. Nasuprot navedenom, dostupna naučna i stručna literatura iz Republike Srbije ukazuje na nedostatak sistematski sprovedenih monitoringa učestalosti pojave aflatoksina. Kao sirovine za ispitivanje pojave aflatoksina, u ovoj doktorskoj disertaciji, odabrani su kukuruz i mleko. Kukuruz je odabran jer predstavlja jednu od najzastupljenijih žitarica u Srbiji. Navedena činjenica dodatno povećava potrebu za istraživanjem, jer pojava aflatoksina u velikoj meri utiče i na kvalitet kukuruza, kao i smanjenje prinosa i ekonomskog profita zemlje. Cilj da se ispita mleko proistekao je iz činjenice da ono usled velike frekventnosti u ishrani, predstavlja namirnicu sa najvećim potencijalnim rizikom za unos aflatoksina u organizam ljudi.

Analiza pojave aflatoksina u kukuruzu obuhvatila je 1000 uzoraka, sakupljenih tokom perioda od četiri godine (2009-2012.). Dobijeni rezultati ukazali su da aflatoksini nisu detektovani u uzorcima kukuruza iz 2009., 2010. i 2011. godine. Međutim, od 700 analiziranih uzoraka kukuruza iz 2012., čak 553 (79%) bilo je kontaminirano aflatoksinima. Značajne razlike u pojavi aflatoksina u kukuruzu, iz različitih proizvodnih godina, mogu se objasniti izuzetno toplim i suvim vremenskim uslovima zabeleženim u 2012. godini. Sušni vremenski uslovi bili su povoljni za razvoj plesni i sintezu aflatoksina u kukuruzu, a takođe su u velikoj meri doprineli i visokom nivou pojave aflatoksina M1 (AFM1) u mleku. Analiza 200 uzoraka različitih kategorija kravljeg mleka pokazala je da je AFM1, sa koncentracijama od 0,01 do 1,20 ug/kg, detektovan u 198 (98,7%) uzoraka. Na osnovu određenih koncentracija AFM1 u uzorcima mleka, prikupljenih informacija o prosečnom unosu mleka, telesnoj težini različitih starosnih kategorija i polova 1500 ispitanika, procenjen je rizik od unosa AFM1. Dobijeni rezultati ukazali su da su sve ispitane starosne kategorije, a posebno deca, izložena visokom riziku od unosa AFM1 u organizam preko kontaminiranog mleka. Usled svega navedenog, proizilazi potreba za kontinuiranim praćenjem pojave aflatoksina u kukuruzu i AFM1 u mleku, sa ciljem zaštite stanovništva od rizika povezanih sa njihovim dokazanim toksičnim i kancerogenim efektima. Tokom poslednjih godina, došlo je do povećane tražnje za razvojem osetljive, tačne, jednostavne i brze metode, čijom primenom će se obezbediti pouzdano određivanje različitih aflatoksina pri niskim koncentracijama. Usled toga, ELISA metode, kao i metode tačne hromatografije sa različitim detektorima (HPLC-FLD, HPLC-UV light-FLD, LC-MS/MS) su razvijene, optimizovane i validovane. Validacija je izvršena prema smernicama odgovarajućih evropskih Regulative, analizom sertifikovanih referentnih materijala i spajkovanih uzoraka. Dobijeni parametri validacije potvrdili su da se sve primenjene metode sa visokom pouzdanošću mogu koristiti za određivanje aflatoksina u kukuruzu, odnosno AFM1 u mleku. Validovane metode su zatim primenjene za analizu aflatoksina i AFM1 u prirodno kontaminiranim uzorcima kukuruza i mleka. Analizom prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza uočeno je da koncentracija aflatoksina u velikoj meri zavisi od neravnomerne raspodele aflatoksina unutar čvrstih uzoraka. Pored toga, analiza uzoraka kukuruza iz skladišta, takođe je ukazala na neravnomernu raspodelu ukupnih plesni, vrste *Aspergillus flavus*, kao i aflatoksina. S druge strane, dobijeni koeficijenti

korelacije ($> 0,9$) između primenjenih metoda za određivanje AFM1 u mleku, ukazali su da među dobijenim rezultatima postoji snažna korelacija, koja može poticati i od relativno homogenije raspodele AFM1 unutar tečnih uzoraka.

Datum prihvatanja 09.06.2014.

teme:

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

KO

dr Eva Lončar, redovni profesor, Tehnološki fakultet, Novi Sad, predsednik

dr Marija Škrinjar, redovni profesor, Tehnološki fakultet, Novi Sad, mentor

dr Jasna Mastilović, naučni saradnik, Naučni institut za prehrambene tehnologije, Novi Sad, mentor

dr Vojislava Bursić, docent, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, član

University of Novi Sad
Faculty of Technology

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number:

ANO

Identification

number:

INO

Document type:

Monographic publication

DT

Type of record:

Textual material, printed

TR

Content code:

PhD Thesis

CC

Author:

Jovana Kos

AU

Mentor:

Dr Marija Škrinjar, full professor

MN

Dr Jasna Mastilović, research associate

Title:

Aflatoxins: occurrence analysis, risk
assessment and optimization of its
determination in maize and milk

TI

Language of text:

Serbian, latin

LT

Language of abstract:

Serbian / English

LA

Country of

Republic of Serbia

publication:

CP

Locality of Vojvodina
publication:
LP

Publication year: 2015.
PY

Publisher: Author's reprint
PU

Publication place: Serbia, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
PP

Physical description: 7 chapters, 208 pages, 44 figures, 79 tables, 256
PD references

Scientific field: Biotechnical sciences
SF

Scientific discipline: Food engineering
SD

Subject / Key words: Aflatoxins, maize, milk, ELISA, liquid
SKW chromatography

UDC

Holding data: Library of Faculty of Technology, Novi Sad
HD

Note:
N

Recent studies have demonstrated that aflatoxins (AFs) represent the best known and most intensively researched mycotoxins in the world, with proven toxic, mutagenic, teratogenic and carcinogenic effects on human and animal health. However, up to the author's knowledge, there are no investigations concerning the occurrence of AFs in food or feed from Republic of Serbia. For that purpose, maize and cow's milk samples were chosen as matrixes for investigation. Maize is selected because it represents one of the major crops grown in Serbia and presence of AFs leads to reduction of maize quality as well as significant economical losses. On the other hand, milk has the greatest demonstrated potential for AFs introducing into the human diet since it represents one of the main foodstuffs in human

nutrition.

An investigation regarding occurrence of AFs in maize included 1000 samples collected during four years period (2009-2012). Obtained results indicate that AFs were not detected in maize samples collected during 2009-2011 period. However, among 700 analyzed maize samples from 2012 even 553 (79%) samples contained AFs. Significant differences in occurrence of AFs in maize could be contributed to extremely hot and dry weather conditions noted during maize growing season 2012. Described weather conditions were favorable for mould growth and AFs synthesis in maize and also could be the possible reason for high contamination frequency of aflatoxin M1 (AFM1) in milk. Analysis of 200 cow's milk samples showed that AFM1 were detected in 198 (98.7%) samples in concentrations ranged from 0.01 to 1.20 µg/kg. On the basis of the obtained AFM1 concentrations in cow's milk samples, collected information about average milk intake and mean body weight (bw) for different age's categories, mean ingestion of AFM1 in ng/kg per bw per day were estimated. Obtained results showed that all age's categories, especially children, are exposed with high risk related to presence of AFM1 in milk.

Based on everything stated above, presence of AFs in maize and AFM1 in milk should be continuously controlled in order to protect the population from risks associated with its proven toxicity and carcinogenicity. During recent years, there has been an increase in demand for development of sensitive, accurate, simple and fast method which is reliable to detect AFs and AFM1 at low concentrations. For that purpose, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), high performance liquid chromatography with fluorescence detector (HPLC-FLD; HPLC-UV light-FLD) and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) were optimized and validated. The method validation was performed according European Union Regulative using certificated reference material as well as spiked blank maize and milk samples. The obtained validation parameters indicate that all applied methods are suitable for determination of AFs in maize as well as AFM1 in milk samples. Afterwards, validated methods were applied for analysis of natural contaminated maize and milk samples. Analysis of natural contaminated maize samples indicate that determined AFs concentration mostly depends of uneven distribution of AFs in solid samples. Furthermore, analysis of maize samples from different warehouses indicates an uneven distribution of moulds, *Aspergillus flavus*

and AFs. On the other hand, obtained correlation coefficients (>0.9) indicate that strong correlation exists between applied methods for AFM1 determination. Relatively homogeneous distribution of AFM1 in liquid samples could be the possible reason for obtained strong correlation between applied methods.

Accepted by science board: 09.06.2014.

ASB

Defended on:

DE

Thesis defend board: DB
dr Eva Lončar, full professor, Faculty of Technology, Novi Sad, chairman

dr Marija Škrinjar, full professor, Faculty of Technology, Novi Sad, menthor

dr Jasna Mastilović, research associate, Institute of Food Technology, Novi Sad, menthor

dr Vojislava Bursić, assistant professor, Faculty of Agricultural, Novi Sad, member

LISTA SKRAĆENICA

AFB1	Aflatoksin B1
AFB2	Aflatoksin B2
AFG1	Aflatoksin G1
AFG2	Aflatoksin G2
AFM1	Aflatoksin M1
AFM2	Aflatoksin M2
AFS	Ukupni aflatoksini
a_w	Aktivnost vode
CE	Koliziona energija
CRM	Sertifikovani referentni materijal
DAD	Detektor sa nizom dioda
DNA	Dezoksiribonukleinska kiselina
EC	Evropska komisija
EDI	Procenjeni dnevni unos
EFSA	eng. „European Food Safety Authority“
ELISA	eng. „Enzyme Linked Immunosorbent assay“
ELSD	eng. „Evaporative light-scattering“
ESI	Elektron sprej jonizacija
EU	Evropska unija
FAO	eng. „Food and Agriculture Organization of the United States“
FDA	eng. „Food and Drug Administration“
FLD	Fluorescentni detektor
FV	Napon fragmentacije
GAP	Dobra poljoprivredna praksa
GC	Gasna hromatografija
GMP	Dobra proizvođačka praksa
HACCP	eng. „Hazard Analysis Critical Control Point“
HI	Indeks opasnosti
HPLC	Tečna hromatografija visokih performansi
IARC	eng. „International Agency for Research on Cancer“
IMC	Imunoafinitetne kolone
JECFA	eng. „Joint Expert Committee on Food Additives“
LC-MS/MS	Tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom

LISTA SKRAĆENICA

LD	Letalna doza
LOD	Limit kvantifikacije
LOQ	Limit detekcije
MDK	Maksimalno dozvoljena količina
MMC	eng. „Matrix matched calibration”
MS	Masena spektrometrija
RS	Republika Srbija
RSD _r	Relativna standardna devijacija u uslovima ponovljivosti
RSD _R	Relativna standardna devijacija u uslovima reproduktivnosti
Rt	Retenciono vreme
SC	eng. „Solvent calibration curve”
SCF	eng. „Scientific Committee on Food”
SIM	eng. „Selected ion monitoring”
SPE	Čvrsto-fazna ekstrakcija
SSE	Odnos povećanja i smanjenja signala
TDI	Dozvoljeni dnevni unos
TFA	Trifluorsirćetna kiselina
TLC	Tankoslojna hromatografija
TM	Telesna masa
WHO	Svetska zdravstvena organizacija
λ_{em}	Talasna dužina emisije
λ_{ex}	Talasna dužina ekscitacije
PBS	Fosfatni puffer
UBP	Ukupan broj plesni
cfu	eng. „colony forming unit”
UHT	eng. „ultra high temperature”
SRV	Srednja vrednost
SD	Standardna devijacija
PDSI	Indeks jačine suše
Z indeks	Palmerov indeks suše

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Pregled literature	3
2.1. Mikotoksini.....	3
2.2. Aflatoksigene vrste roda <i>Aspergillus</i>	5
2.3. Aflatoksini.....	7
2.3.1. Fizičko hemijske osobine aflatoksina	10
2.3.2. Aflatoksini u kukuruzu	12
2.3.3. Aflatoksin M1 (AFM1) u mleku	19
2.3.4. Aflatoksikoze	21
2.3.5. Zakonske regulative.....	27
2.4. Određivanje aflatoksina.....	30
2.4.1. Uzorkovanje	32
2.4.2. Metode pripreme uzoraka.....	34
2.4.3. ELISA.....	41
2.4.4. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC).....	42
2.4.4.1. Fluorescentni detektor (FLD)	44
2.4.4.2. FLD sa UV light detektorom.....	46
2.4.4.3. Maseni spektrometar	48
2.4.5. Validacija metoda.....	53
3. Cilj rada	57
4. Materijal i metodi	59
4.1. Ispitivani uzorci.....	59
4.1.1. Kukuruz	59
4.1.2. Mleko	62
4.2. Hemikalije i reagensi	63
4.3. Oprema.....	66
4.4. Određivanje aflatoksina u kukuruzu	67
4.4.1. ELISA.....	67
4.4.1.1. Određivanje ukupnih aflatoksina	67
4.4.1.2. Određivanje AFB1	68
4.4.2. Tečna hromatografija.....	69
4.4.2.1. Priprema uzoraka.....	69
4.4.2.1.1. Imunoafinitetne kolone	70
4.4.2.1.2. MycoSep kolone.....	70
4.4.2.1.3. QuEChERS	71
4.4.2.1.4. Ekstrakcija	71

4.4.3. Hromatografski uslovi	72
4.4.3.1. HPLC-FLD.....	72
4.4.3.2. HPLC-UV light-FLD.....	73
4.4.3.3. LC-MS/MS.....	73
4.5. Određivanje ukupnog broja plesni i vrste <i>Aspergillus flavus</i> u kukuruzu	74
4.6. Određivanje AFM1 u mleku	75
4.6.1. ELISA.....	75
4.6.2. Tečna hromatografija.....	76
4.6.2.1. Priprema uzoraka.....	76
4.6.2.2. HPLC-FLD.....	76
4.6.2.3. LC-MS/MS.....	77
4.7. Validacija metoda.....	78
4.8. Procena rizika za unos AFM1 preko mleka.....	81
4.9. Statistička obrada podataka	82
5. Rezultati i diskusija	83
5.1. Analiza pojave aflatoksina u kukuruzu.....	83
5.1.1. Period od 2009. do 2012. godine.....	83
5.1.2. 2012. godina.....	85
5.2. Analiza pojave AFM1.....	97
5.3. Procena rizika pojave AFM1 u mleku	105
5.4. Optimizacija metodologije određivanja aflatoksina u kukuruzu	112
5.4.1. ELISA.....	112
5.4.1.1. Validacija metode za određivanje ukupnih aflatoksina	113
5.4.1.2. Validacija metode za određivanje AFB1.....	114
5.4.1.3. Analiza prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza	115
5.4.2. HPLC-FLD.....	119
5.4.2.1. Optimizacija hromatografskih uslova	119
5.4.2.2. Validacija metode.....	121
5.4.2.3. Analiza prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza	123
5.4.3. HPLC-UV light-FLD	127
5.4.3.1. Optimizacija hromatografskih uslova	127
5.4.3.2. Validacija metode.....	129
5.4.3.3. Analiza prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza	130
5.4.4. LC-MS/MS.....	132
5.4.4.1 Optimizacija MS/MS parametara.....	132
5.4.4.2. Optimizacija hromatografskih parametara.....	134
5.4.4.3. Ispitivanje uticaja matriksa.....	136
5.4.4.4. Validacija metode.....	138
5.4.4.5. Analiza prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza	139
5.4.5. Poređenje rezultata analize prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza primenom različitih metoda određivanja aflatoksina.....	145
5.5. Prisustvo i raspodela ukupnih plesni, vrste <i>Aspergillus flavus</i> i aflatoksina u prirodno kontaminiranim uzorcima kukuruza.....	154
5.6. Optimizacija metodologije određivanja AFM1 u mleku	157

5.6.1 ELISA metoda.....	157
5.6.1.1. Validacija metode.....	158
5.6.1.2. Analiza odabranih uzoraka mleka	159
5.6.2 HPLC-FLD	160
5.6.2.1. Optimizacija hromatografskih uslova	160
5.6.2.3. Validacija metode.....	162
5.6.2.4 Analiza prirodno kontaminiranih uzoraka mleka.....	163
5.6.3. LC-MS/MS.....	165
5.6.3.1. Optimizacija MS/MS parametara.....	165
5.6.3.2. Optimizacija hromatografskih uslova	167
5.6.3.3. Validacija metode.....	169
5.6.3.4 Ispitivanje uticaja matriksa.....	170
5.6.3.5. Analiza prirodno kontaminiranih uzoraka mleka.....	170
5.6.4. Poređenje rezultata analiza odabranih uzoraka mleka primenom ELISA, HPLC-FLD i LC-MS/MS metoda.....	172
6. Zaključak	177
7. Literatura	180

1. Uvod

Savremena masovna proizvodnja hrane ima za cilj da obezbedi velike količine hrane koja će zadovoljiti kriterijume za visokim nutritivnim kvalitetom uz težnju da se proizvede zdravstveno bezbedna hrana bez bioloških, fizičkih i hemijskih kontaminenata.

Mikotoksini se ubrajaju u jedne od najpoznatijih i najučestalijih hemijskih kontaminenata hrane. Kao sekundarni produkti metabolizma plesni mogu kontaminirati veliki broj različitih poljoprivrednih i prehrambenih proizvoda, kao i hrane za životinje. Naučni literaturni podaci svedoče da je oko 25% svetske ukupne proizvodnje žitarica kontaminirano bar jednim mikotoksinom. Učestala pojava mikotoksina pored dokazanog višestrukog negativnog dejstva na zdravlje ljudi i životinja, uzrokuje i velike ekonomske gubitke. Sve navedeno utiče na svakodnevni porast istraživanja u oblasti mikotoksikologije. Poslednjih godina, na globalnom nivou, sve više se povećava učestalost kontaminacije hrane mikotoksinima. Kao razlozi ovome, navode se klimatske promene, ali i sve češća i savremenija kontrola njihovog prisustva, podržana osetljivim analitičkim metodama (Scudamore, 2008).

Sa aspekta učestalosti pojave i negativnog uticaja na zdravlje ljudi i životinja, aflatoksini predstavljaju najpoznatiju i najrizičniju grupu mikotoksina. Do danas je poznata i dokazana njihova višestruka štetnost.

Aflatoksine sintetišu plesni iz roda *Aspergillus*. Pojava navedenih plesni kao i sinteza aflatoksina, karakteristična je za područja sa suprotropskom i tropskom klimom. *Aspergillus* plesni i aflatoksini predstavljaju jedne od najčešćih kontaminanata kukuruza, koji se ubraja u najrasprostranjenija žita na svetu i zauzima izuzetno važno mesto u ishrani ljudi, a pre svega životinja (Mejía-Teniente i sar., 2011). Ukoliko je kukuruz koji se koristi za ishranu mlečnih životinja kontaminiran aflatoksinima, postoji velika verovatnoća da će i mleko biti kontaminirano. S obzirom na to da se mleko smatra osnovnom životnom namirnicom koja se svakodnevno konzumira, sistematski sprovedena kontrola prisustva aflatoksina u celom lancu ishrane počevši od kukuruza do mleka je neophodna (Erkekoglu i sar., 2008).

Sprovođenje sistematske kontrole pojave aflatoksina zasniva se na primeni analitičkih metoda, koje treba da zadovolje kriterijume savremene analitičke prakse u pogledu osetljivosti i tačnosti, a da ujedno ispune zahteve vazane za jednostavnost izvođenja, brzine i što pristupačnije cene analize (Kralj Cigić i Prosen, 2009).

Usled izrazitog kancerogenog dejstva, velikog negativnog uticaja na zdravlje ljudi i životinja, kao i velikog uticaja na ekonomske gubitke, aflatoksini čine izuzetan izazov za istraživanja širom sveta. U razvijenim zemljama, istraživanja koja se bave navedenom tematikom su u stalnom porastu. Nasuprot navedenom, dostupna naučna i stručna literatura iz Republike Srbije ukazuje na nedostatak sistematski sprovedenih monitoringa učestalosti pojave aflatoksina. Ujedno, za Srbiju nema ni podataka koji objedinjuju rezultate analize klimatskih uslova na pojavu aflatoksina.

2. Pregled literature

2.1. Mikotoksini

Mikotoksini su sekundarni produkti metabolizma plesni, koje plesni sintetišu u nizu reakcija kataliziranih enzimima od velikog broja biohemijski jednostavnih međuprodukata primarnog metabolizma. Od više stotina hiljada različitih vrsta plesni, oko 200 do 250 su toksigene, odnosno imaju sposobnost da sintetišu mikotoksine (Pitt, 2000; Hussein i Brasel, 2001). Toksigene plesni najčešće pripadaju rodovima *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Alternaria* i *Cladosporium* (Scudamore, 2008). Do danas još uvek nije u potpunosti razjašnjeno zašto plesni sintetišu mikotoksine. Najveći broj istraživanja ukazuje da mikotoksini nisu neophodni za rast plesni, ali imaju značajnu ulogu na eliminaciju drugih mikroorganizama sa kojima se nalaze u istom okruženju (Brase i sar., 2009).

Mikotoksini su visokotoksični kontaminanti hrane za ljude i životinje. Naziv im potiče od grčke reči „mykes“ što znači gljiva i latinske reči „toxicum“ što znači otrov. Do danas je otkriveno oko 400 mikotoksina, a smatra se da ih ima oko nekoliko desetina hiljada. Oni se međusobno razlikuju po vrsti plesni koja ih sintetiše, hemijskoj strukturi, mehanizmu delovanja i toksičnosti. Iako je otkriven veliki broj različitih

mikotoksina, najveća pažnja pridaje se onima koji se najčešće javljaju kao kontaminanti hrane i hrane za životinje (Marasas i sar., 2008):

- aflatoksini,
- ohratoksini,
- zearalenon,
- fumonizini,
- trihoteceni (deoksinivalenon, T-2, HT-2),
- patulin.

Mikotoksini u lanac ishrane mogu dospeti na više načina. Kako gotovo sve biljke mogu biti podloge za rast toksigenim plesnima, do sinteze mikotoksina može doći na polju, tokom berbe, transporta, skladištenja sirovine, prerade, skladištenja gotovih proizvoda i njihove distribucije. Mikotoksini u namirnice životinjskog porekla najčešće dospevaju preko kontaminirane hrane za životinje. Ukoliko životinje konzumiraju hranu kontaminiranu mikotoksinima postoji velika verovatnoća da će se oni akumulirati u različitim tkivima i organima (Scudamore, 2008; Bailly i Guerre, 2009).

Sirovine i proizvodi koji su najčešće kontaminirani mikotoksinima su (Weidenborner, 2008; Scudamore, 2008):

- strna žita (pšenica, raž, zob, ječam, riža),
- žita velikog zrna (kukuruz),
- uljarice (kikiriki, soja, suncokret, pamuk, sirak),
- koštunjavo (orasi, lešnik, badem) i suvo voće (smokve, grožđe),
- pivo i vino (od kontaminiranog grožđa, ječma i drugih žitarica),
- začini,
- kakao,
- mleko i mlečni proizvodi.

Bolesti ljudi i životinja izazvane dejstvom mikotoksina zajedničkim imenom nazivaju se mikotoksikoze. Mnogobrojni literaturni podaci svedoče o neurotoksičnom,

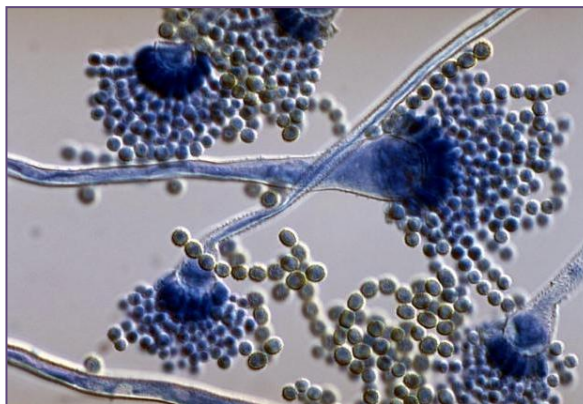
kancerogenom, mutagenom, imunosupresivnom i estrogenom efektu pojedinih mikotoksina. Mikotoksikoze su uglavnom prouzrokovane konzumiranjem kontaminirane hrane, a u manjoj meri nastaju i nakon udisanja mikotoksina ili njihovog unosa preko kože u organizam (International Agency for Research on Cancer, IARC, 1993; IARC, 2002; IARC, 2012).

Stabilnost mikotoksina prema različitim metodama konzervisanja koje se primenjuju u proizvodnji hrane i hrane za životinje dodatno povećava opseg istraživanja usmeren na iznalaženje rešenja za prevenciju tj. smanjenje kontaminacije sirovina toksigenim plesnima i mikotoksinima (Council for Agricultural Science and Technology, CAST, 2003).

Sve navedeno potvrđuje da kontaminacija hrane i hrane za životinje mikotoksinima predstavlja globalni problem. Činjenica da je više od 25% žita u svetu kontaminirano mikotoksinima (Charmley i sar., 1995; Kabak i sar., 2006) povećava potrebu za stalnim istraživanjima u oblasti mikotoksikologije, jer uz negativan uticaj na zdravlje ljudi i životinja (Atroshi i sar., 2002; Azziz-Baumgartner i sar., 2005) pojava mikotoksina uslovljava i velike ekonomske gubitke (Robens i Cardwell, 2003; Coulibaly i sar., 2008).

2.2. Aflatoksigene vrste roda *Aspergillus*

Plesni iz roda *Aspergillus* sintetišu aflatoksine, koji sa aspekta uticaja na zdravlje ljudi i životinja predstavljaju najznačajniju grupu mikotoksina. Od velikog broja *Aspergillus* vrsta, *Aspergillus flavus* (Slika 2.1) i *A. parasiticus* se izdvajaju kao plesni koje najčešće sintetišu aflatoksine (Abbas i sar., 2005). Pojedini literaturni izvori kao potencijalne plesni koje mogu sintetisati aflatoksine navode i vrste *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus* i *A. pseudotamari* (Mishra i Das, 2003).



Slika 2.1. *Aspergillus flavus* (Scheidegger i Payne, 2003)

Aspergillus vrste su veoma rasprostranjene plesni i mogu se naći u vazduhu, zemljištu, kao i na velikom broju različitih supstrata. Prema literaturnim podacima, navedene plesni mogu sintetisati aflatoksine (Vaamonde i sar., 2003; Wilkinson i sar., 2007) u kukuruzu (Molyneux i sar., 2007), različitim vrstama žita i proizvodima od žita (Zinedine i sar., 2007), uljaricama, koštunjavom i suvom voću (Scudamore, 2008), začinima (Hernandez-Hierro i sar., 2009), kakau (Copetti i sar., 2011) i sušenim proizvodima od mesa i sirevima (Rodrigues i sar., 2012). Iako *Aspergillus* plesni najčešće sintetišu aflatoksine na njivi, one mogu sintetisati aflatoksine i tokom žetve, skladištenja sirovine, prerade, posebno tokom sušenja, kao i tokom skladištenja gotovih proizvoda (Schmidt-Heydt i sar., 2011).

Ukoliko postoje odgovarajući fizički, hemijski i biološki uslovi doći će do rasta, razvoja i razmnožavanja *Aspergillus* vrsta, a uz posedovanje genetske predispozicije plesni će sintetisati i aflatoksine (Payne, 1992; Hesseltine, 1979).

Fizički faktori sa najvećim uticajem na rast i razvoj *Aspergillus* vrsta su temperatura i vlaga (Dhanasekaran i sar., 2011). *A. flavus* i *A. parasiticus* mogu sintetisati aflatoksine pri temperaturama od 12 do 41 °C, dok je optimalni interval za sintezu između 25 i 32 °C (Lillehoj, 1983). Najveći broj autora potvrđuje da na temperaturi iznad 27 °C, pri vlažnosti većoj od 62% i sadržaju vlage od 14% dolazi do povećanja sinteze aflatoksina (Royes i Yanong, 2002). Magan i sar. (2004) utvrdili su

da je pri a_w (aktivnost vode) vrednosti od 0,95 produkcija aflatoksina najizraženija na 35 °C, dok je pri a_w vrednosti od 0,99 produkcija aflatoksina najintenzivnija na 33 °C

Od hemijskih faktora, najveći značaj pripisuje se sastavu vazduha i prirodi i sastavu supstrata. Prisustvo pojedinih nutrijenata, pre svega cinka, vitamina, masnih i amino kiselina utiče izuzetno povoljno na razvoj *Aspergillus* vrsta i sintezu aflatoksina (Wyatt, 1991). Takođe, supstrati koji u svom sastavu sadrže veću količinu ugljenih hidrata, kao što su kukuruz, pirinač, pamuk, kikiriki, krompir i soja, takođe su izuzetno pogodni za razvoj *Aspergillus* vrsta i sintezu aflatoksina (Santin, 2005).

Biološki faktori uglavnom su u vezi sa vrstom domaćina. Kako sinteza mikotoksina predstavlja prirodan proces plesni, on je veoma često i neophodan za rast i razvoj plesni. Pre svega jer produkcija toksina u velikoj meri pospešuje tzv. patogenu invaziju plesni na domaćinu tj. biljnoj sirovini.

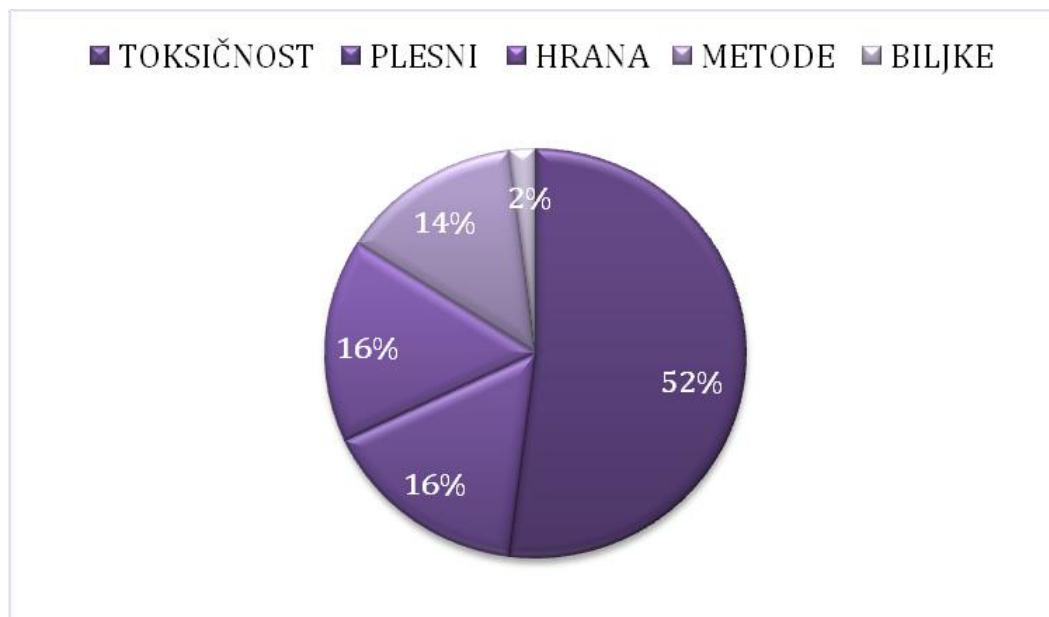
Pored navedenog, pojava suše, oštećenje biljke, prisustvo insekata i glodara, ubrajaju se u faktore sa izuzetno velikim uticajem na razvoj plesni i sintezu toksina. Pojava *Aspergillus* vrsta i aflatoksina takođe je u velikoj meri uslovljena geografskim područjem tj. klimatskim uslovima, kao i primenjenim agrotehničkim merama. Uz postojanje nekih od navedenih povoljnih uslova i genetsku predispoziciju plesni doći će do sinteze aflatoksina (Steyin, 1984; Stack i Carlson, 2003). Ukoliko dođe do sinteze, aflatoksini će se primarno nalaziti u micelijama toksigenih plesni, a u manjoj meri i u sporama (Bennett i Klich, 2003).

2.3. Aflatoksini

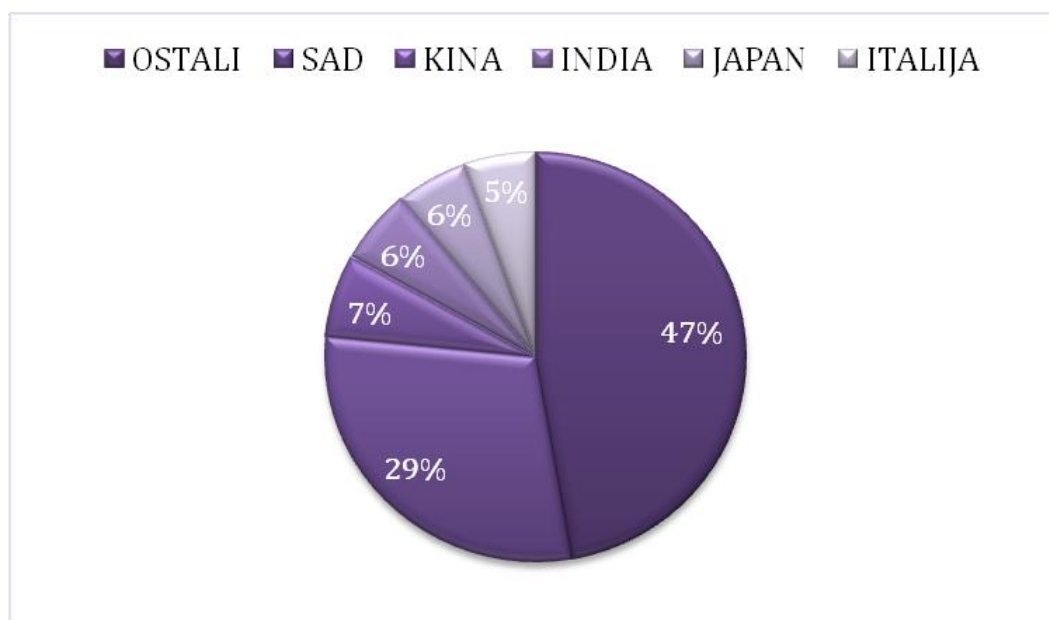
Aflatoksini su dobili ime kombinacijom slova „a“ koje potiče od roda *Aspergillus*, reči „fla“ koja potiče od vrste *A. flavus* i reči „toxicum“ što znači otrov (Ellis i sar., 1991). Kao i drugi mikotoksini, i aflatoksini mogu kontaminirati različite poljoprivredne i prehrambene proizvode, kao i hranu za životinje, i na taj način dovesti do višestrukog negativnog uticaja na zdravlje ljudi i životinja, a ujedno njihova pojava može izazvati i

velike ekonomske gubitke (Greppy i sar., 2002). Aflatoksini se uglavnom javljaju kao kontaminanti u umereno kontinentalnim, suptropskim i tropskim regionima. Glavni izvori aflatoksina su žita, uljarice, orašasti plodovi, suvo koštunjavo voće i začini (Turner i sar., 2009; Salem i Ahmad, 2010).

Usled česte pojave i dokazane štetnosti aflatoksina do danas je objavljeno oko 8000 naučnih radova koji se bave ispitivanjem aflatoksina. Theumer i Rubinstein (2011) objedinili su istraživanja o aflatoksinima za period od 2001. do 2010. godine i ustanovili da je u navedenom vremenskom periodu objavljeno oko 2200 radova u vezi sa aflatoksinima. Na Slici 2.2. prikazane su oblasti ispitivanja koje su bile najviše zastupljene kao i zemlje iz kojih potiče najveći broj radova u vezi sa aflatoksinima. Sa Slike 2.2. može se uočiti da je najveći broj radova posvećen ispitivanju toksičnosti aflatoksina (52%). Približno isti broj radova ($\approx 16\%$) bavio se istraživanjima plesni koje sintetišu aflatoksine kao i hranom koja je njima kontaminirana. Nešto manje radova (14%) bavilo se ispitivanjem metoda za određivanje aflatoksina, dok je najmanje radova (2%) posvećeno ispitivanju biljaka koje su kontaminirane aflatoksinima. Takođe, sa Slike 2.2. primećuje se da je najveći broj radova, u ispitanom periodu od deset godina, objavljen u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), dok je oko pet puta manji broj radova objavljen u Kini, Indiji, Japanu i Italiji. Ukupan broj radova iz navedenih pet zemalja približan je broju radova iz ostalih zemalja sveta.



a)

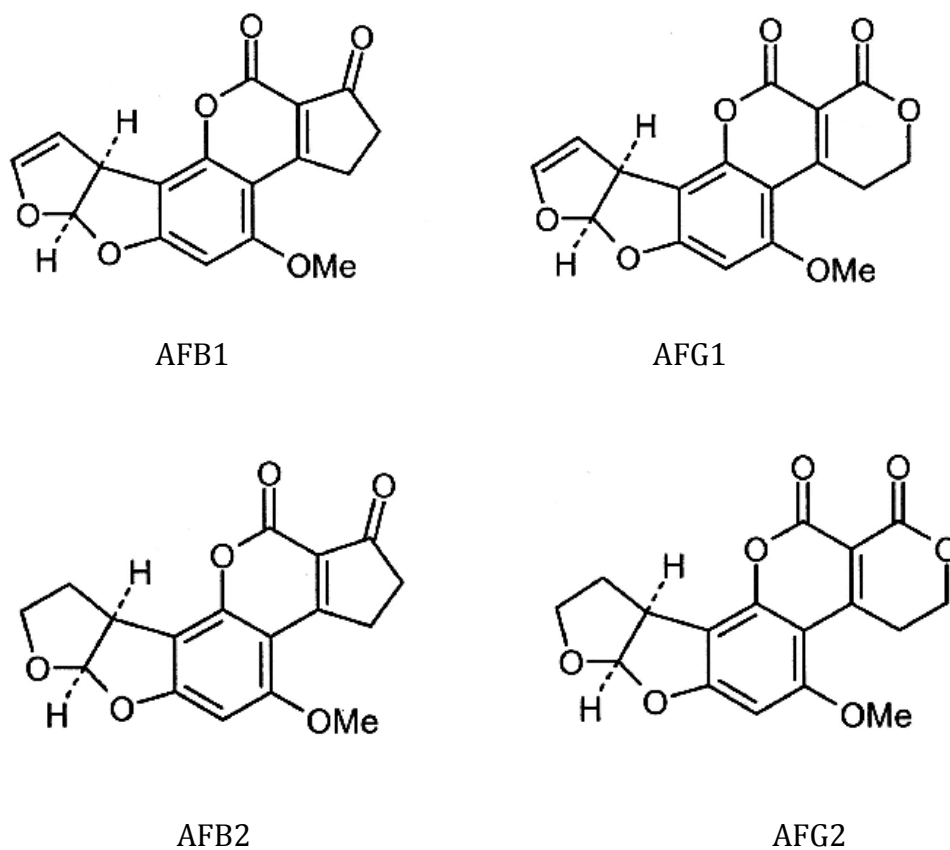


b)

Slika 2.2. Podaci u vezi sa aflatoksinima objavljeni u periodu od 2001. do 2010. godine a) najzastupljenije oblasti ispitivanja b) zemlje iz kojih potiče najveći broj radova (Theumer i Rubinstein, 2011)

2.3.1. Fizičko hemijske osobine aflatoksina

Prema različitim autorima, do danas je otkriveno između 13 i 20 različitih aflatoksina, od kojih se aflatoksin B1 (AFB1), aflatoksin B2 (AFB2), aflatoksin G1 (AFG1), i aflatoksin G2 (AFG2) najčešće javljaju kao kontaminanti hrane i hrane za životinje. Aflatoksine B grupe najčešće sintetizira plesan *A. flavus*, dok aflatoksine G grupe pored plesni *A. flavus* sintetizira i *A. parasiticus* (Weidenborner, 2001; Gurbay i sar., 2010). Strukturne formule navedena četiri aflatoksina prikazane su na Slici 2.3.



Slika 2.3. Strukturne formule aflatoksina

Uz navedena četiri aflatoksina, veoma značajni su i aflatoksin M1 (AFM1) i aflatoksin M2 (AFM2), koji nastaju kao metaboliti AFB1 i AFB2 koji se putem hrane

unose u organizam sisara i mogu se javiti kao kontaminanti mleka i mlečnih proizvoda (Decastelli i sar., 2007; IARC, 2002). Znatno ređe i u minimalnim količinama kao kontaminanti hrane i hrane za životinje mogu biti prisutni i sledeći aflatoksini: AFB2A, AFG2A, AFGM1, AFM2A, AFGM2, AFB3, parazitokol, aflatoksikol (Huchchannavar i Balol, 2011). Od svih navedenih aflatoksina, AFB1 je najfrekventniji, a ujedno i najtoksični sa najizraženijim kancerogenim dejstvom (IARC, 1993).

Aflatoksini se ubrajaju u difuranokumarine koji se prema hemijskoj strukturi mogu podeliti u dve grupe: difurokumarociklopentane (AFB1, AFB2, AFB2A, AFM1, AFM2, AFM2A i aflatoksikol) i difurokumarolaktone (AFG1, AFG2, AFG2A, AFGM1, AFGM2, AFB3). AFB2 i AFG2 su dihidroksi derivati AFB1, odnosno AFG1.

Osnovne osobine aflatoksina B i G rupe, kao i AFM1 prikazane su u Tabeli 2.1.

Tabela 2.1. Osobine aflatoksina

Aflatoksin	Molekulska formula	Molekulska masa	Tačka topljenja (° C)
AFB1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312,3	268-269
AFB2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314,3	286-289
AFG1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,3	244-246
AFG2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,3	237-240
AFM1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,3	299

Aflatoksini su bezbojne do bledo žute kristalne supstance koje intenzivno fluoresciraju u ultravioletnoj oblasti. AFB1 i AFB2 emituju plavu (eng. „blue“), dok AFG1 i AFG2 emituju zelenu (eng. „green“) boju, na osnovu čega su i dobili ime. AFM1, kao derivat AFB1, takođe emituje plavu boju (Mejía-Teniente i sar., 2011).

Aflatoksini su veoma slabo rastvorljivi u vodi (10-30 µg/ml), nerastvorljivi su u nepolarnim rastvaračima, a najbolje se rastvaraju u polarnim organskim rastvaračima kao što su metanol, aceton i acetonitril. Nestabilni su i pri pH vrednostima manjim od 3 i većim od 10 (Cole i Cox, 1981).

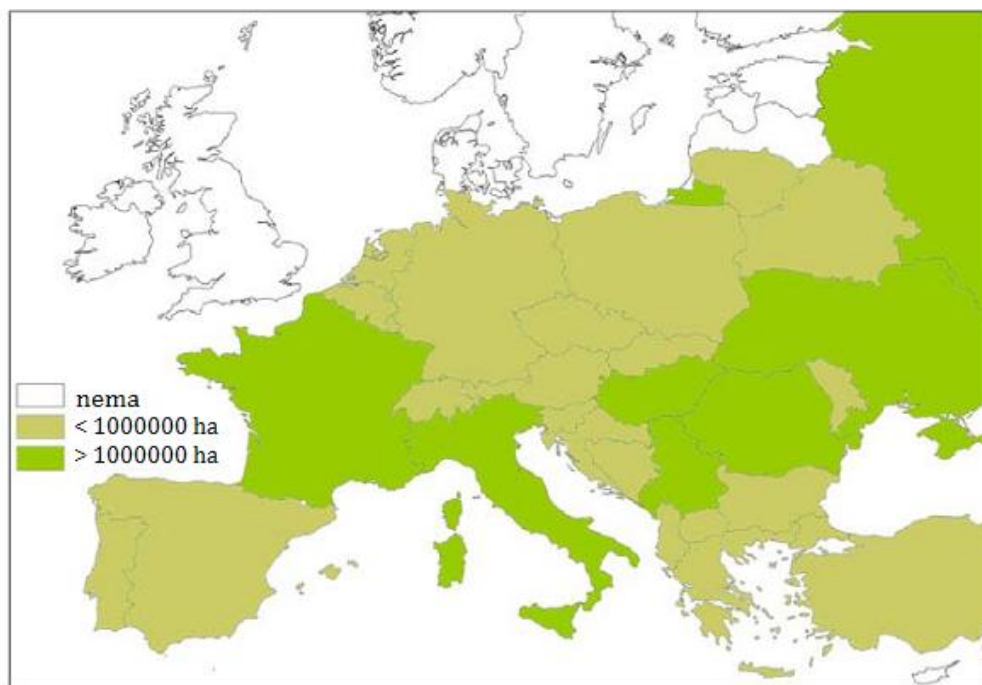
U odsustvu svetlosti i ultravioletnog zračenja, aflatoksini u čvrstom stanju pokazuju veliku stabilnost sa izuzetno visokim tačkama topljenja. Rastvori aflatoksina

u hloroformu i benzenu, čuvani u mraku stabilni su i po nekoliko godina (Scott, 1990). U prisustvu vlage, pojedinih kiselina i baza može doći do narušavanja strukture aflatoksina u dužem vremenskom periodu, i tada uglavnom dolazi do otvaranja laktonskog prstena uz mogućnost dekarboksilacije na temperaturama iznad 100 °C. Neka oksidaciona sredstva, kao što su NaClO, KMnO₄, H₂O₂, Cl₂ i O₃ mogu reagovati sa aflatoksinima i uticati na promenu njihove strukture, što ponekad može usloviti i smanjenje sposobnosti fluorescencije. Uglavnom su mehanizmi ovakvih reakcija još uvek nedovoljno istraženi, kao i to da li produkti koji pri tome nastaju imaju smanjenu toksičnost u odnosu na polazna jedinjenja (Scudamore, 2008). Aflatoksini su stabilni i na dejstvo većine metoda koje se koriste za konzervisanje hrane i hrane za životinje (Smith i sar., 1994; Scudamore, 2004).

2.3.2. Aflatoksini u kukuruзу

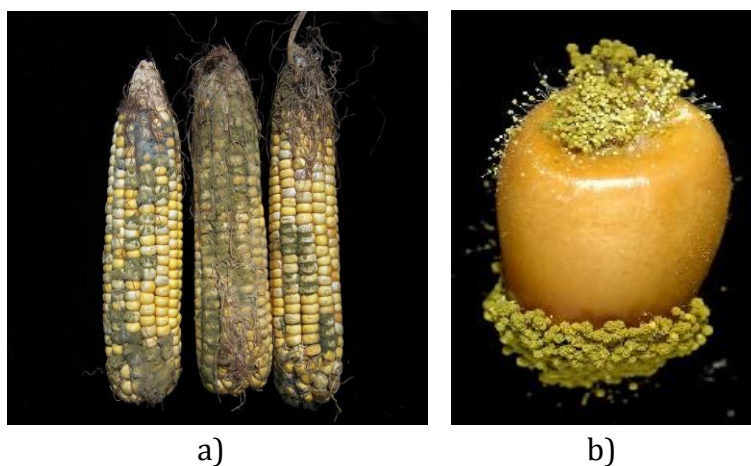
Kukuruz se ubraja u tri najznačajnije žitarice na svetu (Guevara-Gonzales i sar., 2011). U Srbiji je oko 40% obradivog zemljišta namenjeno za proizvodnju kukuruza i u poslednjih nekoliko godina Srbija se ubraja među vodeće proizvođače i izvoznike kukuruza u Evropi (Slika 2.4.).

Najveća količina (80-90%) proizvedenog kukuruza u Srbiji iskoristi se kao komponenta hrane za životinje, a preostala količina se uglavnom koristi za ljudsku ishranu i proizvodnju skroba (Maslac, 2011; 2012).



Slika 2.4. Zastupljenost kukuruza u Evropi (EFSA, 2012)

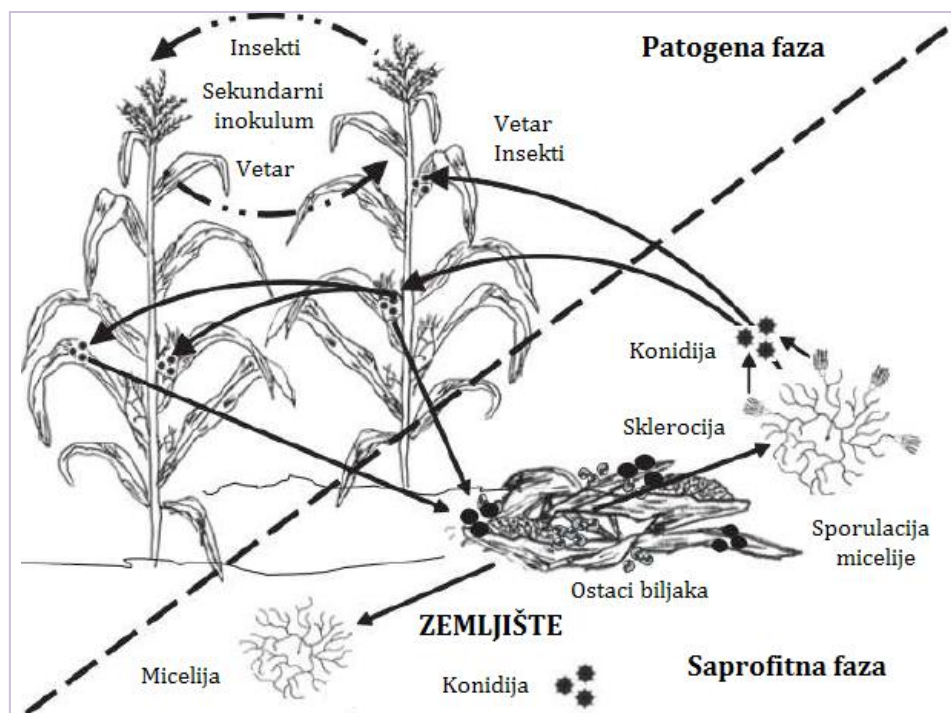
Aspergillus plesni i aflatoksini ubrajaju se u jedne od najčešćih kontaminenata kukuruza (Slika 2.5.). Kukuruz koji raste u izuzetno toplim i vlažnim uslovima u tropskim i subtropskim regionima predstavlja pogodniji supstrat za razvoj aflatoksigenih plesni i sintezu aflatoksina, u odnosu na kukuruz koji raste u područjima sa umerenom klimom (Rustom, 1997).



Slika 2.5. *Aspergillus flavus* na a) klipu kukuruza (Schmidt, 2013) i b) zrnju kukuruza (Loeffler i Miderson, 2010)

Kao što je i ranije istaknuto, ukoliko postoje odgovarajući povoljni uslovi do pojave rasta, razvoja i razmnožavanja *Aspergillus* plesni i sinteze aflatoksina može doći tokom rasta kukuruza na njivi, tokom žetve, transporta, skladištenja i prerade kukuruza (Bankole i Adebanjo, 2003).

Na Slici 2.6. prikazan je ciklus razvoja plesni *A. flavus* u sistemu gajenja kukuruza. S obzirom na to da je *A. flavus* veoma rasprostranjena plesan koja se može nalaziti u zemljištu, vazduhu i ostacima biljnog materijala (Horn i sar., 1998), iz njegovih sklerocija i konidija formiraju se micelije koje proizvode velik broj konidiofora koje se otpuštaju u vazduh. Putem vetra ili insekata konidiofore bivaju nošene do kukuruza. Nakon kolonizacije plesni *A. flavus* na kukuruzu, plesan se može ponašati kao oportunistički patogen. Međutim, u uslovima povišene temperature i smanjene količine vode, biljka postaje osetljivija i *A. flavus* će se dalje preko kanala svile prenositi do klasa i zrna kukuruza (O'Brian i sar., 2007).



Slika 2.6. Ciklus razvoja plesni *Aspergillus flavus* u sistemu gajenja kukuruza (Abbas i sar., 2009)

Ukoliko su pojedini delovi kukuruza oštećeni od strane insekata, ptica ili glodara invazija i prodor plesni će biti intenzivniji (Payne i sar., 1998).

Dakle, razvojni ciklus plesni *A. flavus* može se podeliti u dve glavne faze. Prva faza obuhvata kolonizaciju ostataka biljaka u zemljištu, a druga infekciju delova semena i biljke u razvoju. Tokom proleća u okviru prve faze kada se sklerocija nalazi na površini zemljišta, ona se brzo razvija i formira novi inokulum konidija. Formirani novi inokulumi putem vetra i insekata mogu biti preneti na tek zasejani kukuruz. Tokom perioda rasta kukuruza zaraženi delovi biljke predstavljaju sekundarni inokulum konidija, koji se može ponovo kolonizovati na novim nezaraženim kukuruzima (Horn, 1998). Iako prisustvo insekata nije neophodno za kontaminaciju kukuruza aflatoksinima, njihovo prisustvo znatno doprinosi povećanju kontaminacije. Takođe, pojava visokih koncentracija aflatoksina u kukuruzu veoma često je povezana sa oštećenjem biljke od strane insekata. Navedena pojava skoro uvek se dovodi u vezu sa pojavom kukuruznog moljca, *Ostrinia nubilalis* (Widstrom, 1996).

Ukoliko je na kukuruzu došlo do razvoja *Aspergillus* vrsta, do sinteze aflatoksina će doći ukoliko (Widstrom, 1996; Abbas i sar., 2009):

- plesni imaju genetsku predispoziciju za sintezu aflatoksina,
- postoje odgovarajući spoljašnji uslovi.

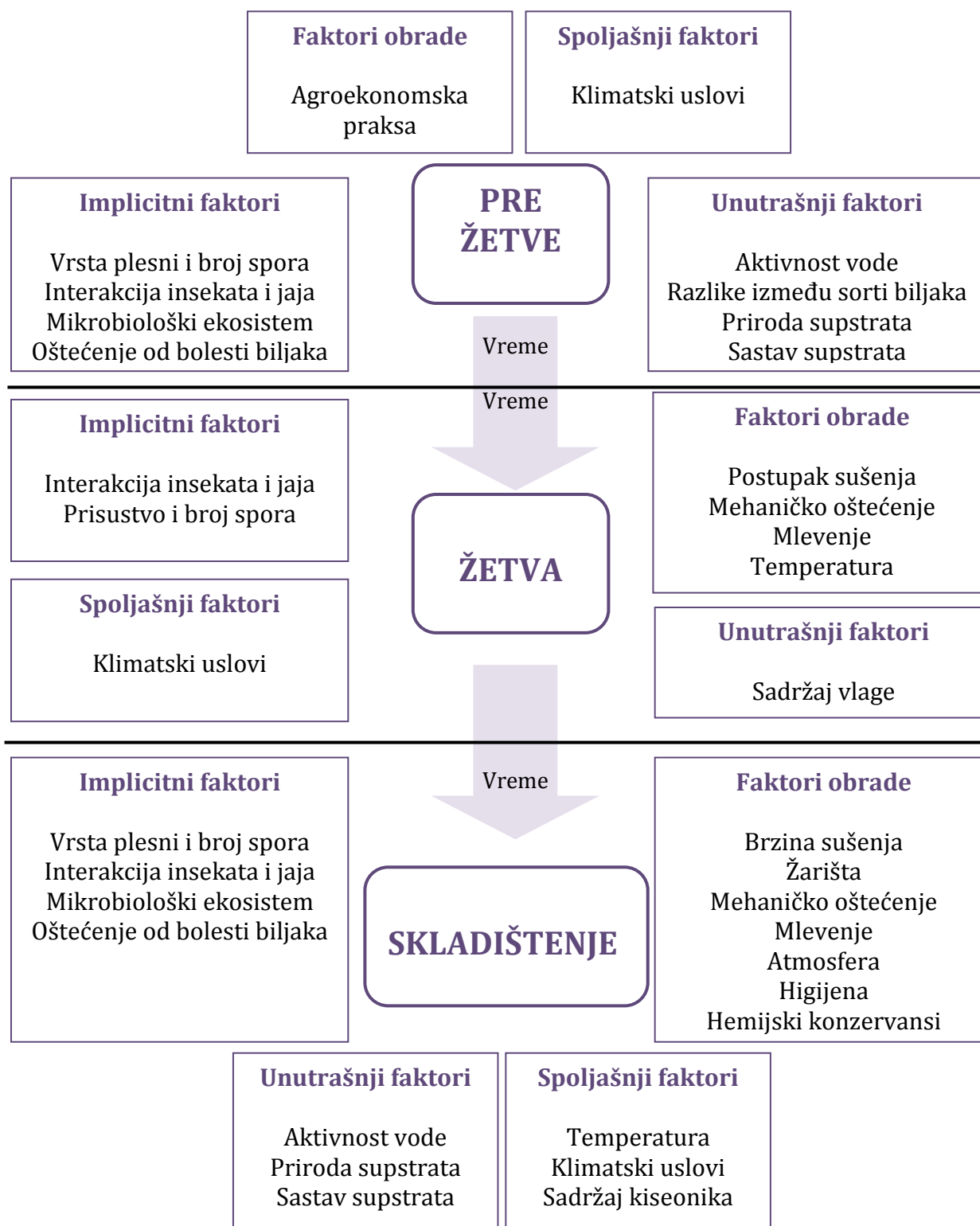
Genetska predispozicija podrazumeva postojanje određenih gena koji omogućavaju sintezu aflatoksina. *A. flavus* sintetisuje aflatoksine na osnovu postojanja 25 identifikovana gena grupisana na 70-kb DNA hromozoma III. Proces sinteze sastoji se od oko 23 enzimske reakcije pri čemu nastaje najmanje 15 međuprodukata (Bhatnagar i sar., 2006; Cary i Calvo, 2008).

Kao dva najvažnija uslova iz spoljašnje sredine navode se temperatura i sadržaj vlage. Sušni uslovi, tj. uslovi povišene temperature i smanjene količine padavina, znatno doprinose povećanju verovatnoće pojave plesni i sinteze aflatoksina u kukuruzu (Payne, 1998). Pojava suše, navodi se kao abiotički faktor sa najizraženijim negativnim efektom na biljku. U sušnim uslovima biljka gubi vodu koja je neophodna za

sve biohemijske procese. Nedostatak vode dovodi biljku u stanje stresa koji uslovljava smanjenje prirodne odbrane i otpornosti biljke i povećava vjerojatnoću razvoja plesni i sinteze aflatoksina (Gosal i sar., 2009; Guevara-González i sar., 2011). Dodatan doprinos razvoju plesni *A. flavus* u uslovima suše proizilazi iz činjenice da je razvoj ostalih plesni pri ovakvim uslovima uglavnom onemogućen, i stoga se smanjuje prirodna konkurencija između različitih vrsta plesni. Međutim, nasuprot tome, pojava suše može usloviti razvoj nekih drugih plesni i sintezu mikotoksina, pre svega pojavu *Fusarium* plesni i sintezu fumonizina (Kos i sar., 2014b). *A. flavus* može obrazovati i sklerocije koji mogu ostati u tom obliku duži period, nakon čega može doći do njegovog razvoja i tokom narednih sezona (Klich i sar., 1994).

Pojava aflatoksina u kukuruзу u velikoj meri zavisi i od sorte kukuruза. U novije vreme veliki broj istraživanja usmeren je na stvaranje novih sorti kukuruза koje će imati veću toleranciju na sušne uslove i pojavu plesni (Marin i sar., 2001; Guevara-González i sar., 2011).

Ukoliko postoje povoljni uslovi do razvoja *Aspergillus* vrsta i sinteze aflatoksina uglavnom dolazi na njivi. Međutim, ukoliko se povoljni uslovi nastave, do daljeg razvoja plesni i sinteze toksina može doći i tokom žetve i skladištenja kukuruза. Sinha (1995) je sve faktore koji doprinose razvoju plesni i sintezi toksina podelio u četiri grupe: unutrašnji-nutritivni, spoljašnji, faktori prerade i implicitni-mikrobiološki faktori. Na Slici 2.7. prikazan je uticaj navedenih faktora na pojavu toksina. Svaki od navedenih faktora ima odgovarajući uticaj tokom tri faze u kojima može doći do razvoja plesni i sinteze toksina: pre žetve, tokom žetve i skladištenja. Faza pre žetve, odnosno period dok je kukuruz još uvek na njivi, u velikoj meri zavisi od vremenskih uslova. I pored postojanja povoljnih vremenskih uslova postoje postupci čijom primenom je moguće uticati na smanjenje pojave *Aspergillus* plesni i sinteze aflatoksina. Pre svega, potrebno je poštovati načela dobre poljoprivredne prakse (eng. „Good Agricultural Practice“, GAP) koja ukazuje na važnost korišćenja otpornijih sorti kukuruза, adekvatno đubrenje, navodnjavanje, kao i primenu odgovarajućih pesticida sa ciljem suzbijanja korova i raznih štetočina.



Slika 2.7. Interakcija između unutrašnjih i spoljašnjih faktora u lancu proizvodnje kukuruza koji utiču na razvoj plesni i sintezu mikotoksina (Magan i sar., 2004)

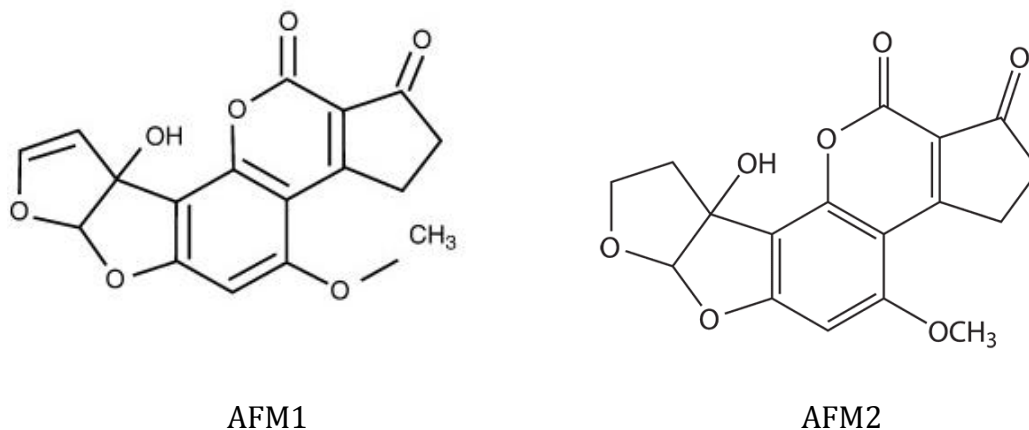
Pojedini autori smatraju da je upotreba otpornijih sorti najbolji način za kontrolu pojave aflatoksina (Bhatnagar, 2010). Da bi se dalje smanjila mogućnost sinteze aflatoksina, žetvu kukuruza potrebno je sprovesti kontrolisanim postupkom u što boljim mogućim vremenskim uslovima. Tokom žetve potrebno je svesti na minimum mogućnost promene vlage kukuruza, kao i svako oštećenje izazvano mehaničkim postupcima, raznim insektima ili štetočinama. Kao što se i vidi na Slici 2.7. faza skladištenja obuhvata veliki broj različitih faktora koji mogu usloviti dalji razvoj plesni i sintezu mikotoksina. Iz tog razloga potrebno je pridržavati se svih načela propisanih dobrom proizvođačkom praksom (eng. „Good Manufacturing Practice“, GMP) kao i HACCP-a (eng. „Hazard Analysis Critical Control Point“) (Codex Alimentarius Commission, 2014). Ukoliko pre skladištenja sirovina nije bila kontaminirana, uslovi skladištenja treba da budu takvi da onemoguće rast, razvoj i razmnožavanje plesni kao i sintezu aflatoksina. Međutim, ukoliko je sirovina kontaminirana potrebno je pre skladištenja sprovesti odgovarajuće postupke koji će u najvećoj meri smanjiti nivo kontaminacije. Neki od tih postupaka su: fizičko razdvajanje, detoksifikacija, biološka ili hemijska inaktivacija (Samarajeewa i sar 1990; Mejia-Teniente, 2011). Pri skladištenju, najbitniji uslovi su sadržaj vlage kukuruza kao i relativna vlažnost okruženja (Wilson, 1994).

Pored svega navedenog, pojava *Aspergillus* plesni i aflatoksina u kukuruzu znatno utiču i na smanjenje kvaliteta i prinosa kukuruza, uslovljavajući velike ekonomske gubitke. Ekonomske gubitke uslovljene pojavom aflatoksina u kukuruzu teško tačno izraziti, ali ipak postoji nekoliko studija koje govore o tome. U periodu od 1990. do 1996. godine SAD su usled pojave aflatoksina izgubile oko 34 miliona dolara, dok su tokom 1998. godine američki farmeri izgubili oko 40 miliona dolara (AMCE, 2010). Istraživanja sprovedena poslednjih godina, ukazuju da godišnji gubici u SAD od pojave aflatoksina u kukuruzu iznose između 100 i 200 miliona dolara (Coulibaly i sar., 2008; AMCE, 2010). Prema Cardwell i sar. (2004) u Africi pojava aflatoksina u žitima svake godine prouzrokuje gubitke od oko 750 miliona dolara. Otsuki i sar. (2011) su preračunali da usled strožijih regulativa Evropske Unije (EU) u vezi sa aflatoksinima,

Afrika zbog nemogućnosti izvoza žita, suvog i koštunjavog voća svake godine gubi oko 670 miliona dolara. Na osnovu ovih i mnogobrojnih drugih navedenih gubitaka uslovljenih pojavom aflatoksina, Jolly i sar. (2009) ipak smatraju da bi jeftinije bilo uložiti u poboljšanje agrotehničkih mera sa ciljem poboljšanja poljoprivredne prakse čijom primenom bi se uticalo na smanjenje pojave aflatoksina.

2.3.3. Aflatoksin M1 (AFM1) u mleku

Do sinteze AFM1 dolazi u organizmu sisara nakon unosa AFB1 preko kontaminirane hrane. Pored AFM1, postoji mogućnost da i AFB2 pređe u metabolit AFM2, ali s obzirom da je AFB2 znatno ređe zastupljen u prirodi, manja je verovatnoća i pojave AFM2 u mleku i mlečnim proizvodima (Gurbay i sar., 2010). Strukturne formule AFM1 i AFM2 prikazane su na Slici 2.8.



Slika 2.8. Strukturne formule AFM1 i AFM2

Veoma brzo, nakon unosa AFB1 putem hrane u organizam sisara, dolazi do njegove transformacije u AFM1. Količina AFM1 u mleku zavisi od: količine unete hrane kontaminirane AFB1, uzrasta, vrste i rase životinje, perioda laktacije, infekcije mlečnih žlezda, zdravstvenog stanja životinje, godišnjeg doba, i dr. (Van Egmond i Dragacci; Duarte i sar., 2013).

Ayar i sar. (2007) su utvrdili da od unete količine AFB1 u organizam životinje između 0,3-6,2% pređe u AFM1, a preostala količina u najvećoj meri bude izbačena iz organizma preko izlučevina ili se akumulira u drugim tkivima i organima. Do danas je objavljeno nekoliko naučnih radova (Nabney i sar., 1967; Van Egmond, 1989; Battacone i sar., 2003) u kojima su autori utvrdili odnos između unete količine AFB1 i stvorene količine AFM1. Navedeni autori došli su do zaključka da veoma brzo nakon unosa AFB1 u organizmu dolazi do konverzije u AFM1 i do njegove ekskrecije u mleko. Najveća količina AFM1 prisutna je u mleku između 6 (Battacone i sar., 2003) i 24 časa nakon konzumiranja kontaminirane hrane. Nakon navedenog perioda količina AFM1 počinje da opada do potpunog eliminisanja nakon 72 do 96 h, ukoliko se u organizam više ne unosi hrana kontaminirana AFB1 (Van Egmond, 1989).

Pojedini autori tvrde da pojava AFM1 u mleku zavisi i od vrste životinje, i da je AFM1 najčešće prisutan u kravljem mleku. Kao mogući razlog navode drugačiji digestivni trakt kod preživara, kao i veću količinu unete hrane, i veću zastupljenost hraniva (kukuruz) koje je češće kontaminirano AFB1 (Barbiroli i sar, 2007; Hussain i sar, 2010). Pored toga, veliki uticaj na pojavu AFM1 u mleku ima i godišnje doba. Naime, tokom jesenjih i zimskih perioda najveći udeo u ishrani mlečnih životinja zauzima kabasta hrana (kukuruz, kukuruzna silaža, smeše) koja je češće kontaminirana AFB1, u odnosu na biljke koje životinje pasu tokom prolećnih i letnjih meseci (Anfossi i sar, 2011; Fallah i sar., 2011).

U ranije objavljenim literaturnim podacima, o termičkoj stabilnosti AFM1, postojali su veoma kontradiktorni podaci (Stoloff i sar., 1975; Oruc i sar., 2006). U novijim radovima, utvrđeno je da je AFM1 stabilan na dejstvo povišenih temperatura, koje se koriste u proizvodnji pasterizovanog i sterilizovanog mleka, mleka u prahu i mlečnih formula za decu. Iz tog razloga potrebno je sprovoditi stalne kontrole prisustva AFM1 u mleku, jer njegovo prisustvo u mleku dovodi do proizvodnje kontaminiranog jogurta, sira, pavlake i drugih mlečnih proizvoda (Tekinsen i Eken, 2008).

2.3.4. Aflatoksikoze

Nakon unosa aflatoksina u organizam ljudi i životinja, u zavisnosti od unete količine i frekventnosti unosa, kao i od starosti, pola, imunog sistema i zdravstvenog stanja jedinice koja konzumira kontaminiranu hranu, može doći do razvoja čitavog niza različitih bolesti. Sve bolesti prouzrokovane aflatoksinima zajedničkim imenom nazivaju se aflatoksikoze (IARC, 2002).

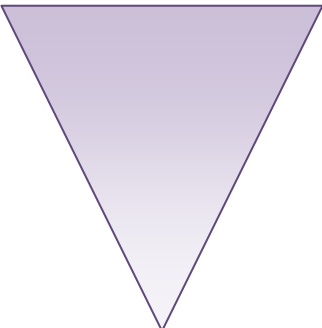
Aflatoksikoze se mogu podeliti u dve grupe:

- akutna intoksikacija, koja dovodi do teškog oštećenja jetre, a neretko i do pojave kancera i smrti,
- hronična intoksikacija.

U kojoj meri će aflatoksini negativno delovati na organizam zavisi od stepena izloženosti, tj. koncentracije aflatoksina, kao i od vremenskog perioda unošenja u organizam. Kao najčešći početni simptomi aflatoksikoza, u slučaju unosa manjih koncentracija aflatoksina u organizam, navode se slabost, umereno povišena temperatura i pad imuniteta. U slučaju unosa manjih koncentracija aflatoksina u dužem vremenskom periodu može doći do čitavog niza poremećaja imunološkog sistema i poremećaja u prometu hranjivih materija. Ukoliko se unose veće koncentracije, navedeni simptomi se intenziviraju uz pojavu akutnih oboljenja praćenih jakim abdominalnim bolom, povraćanjem, žuticom, hepatitisom, kancerom i smrti. Osetljivost na dejstvo aflatoksina varira između vrsta, ali i između starosti jedinki unutar jedne vrste. Dokazano je da najveću osetljivost ispoljavaju mladi organizmi, kao i da se osetljivost povećava u zavisnosti od nivoa testosterona, tako da je muški pol često osetljiviji na negativno dejstvo aflatoksina. Bez obzira o kom organizmu se radi, jetra je primarni organ na koji deluju aflatoksini (Williams i sar., 2004).

U Tabeli 2.2. prikazano je poređenje akutnog i hroničnog dejstva mikotoksina-aflatoksina u odnosu na druga toksična jedinjenja. Iz Tabele 2.2. može se zaključiti da od sedam nabrojanih najčešćih potencijalnih izazivača akutnih oboljenja, mikotoksini zauzimaju četvrto mesto. Međutim, kao potencijalni izazivači hroničnih oboljenja prema Kuiper-Goodman (1998) mikotoksini se nalaze na prvom mestu.

Tabela 2.2. Poređenje akutnog i hroničnog dejstva mikotoksina u odnosu na druga toksična jedinjenja (Kuiper-Goodman, 1998)

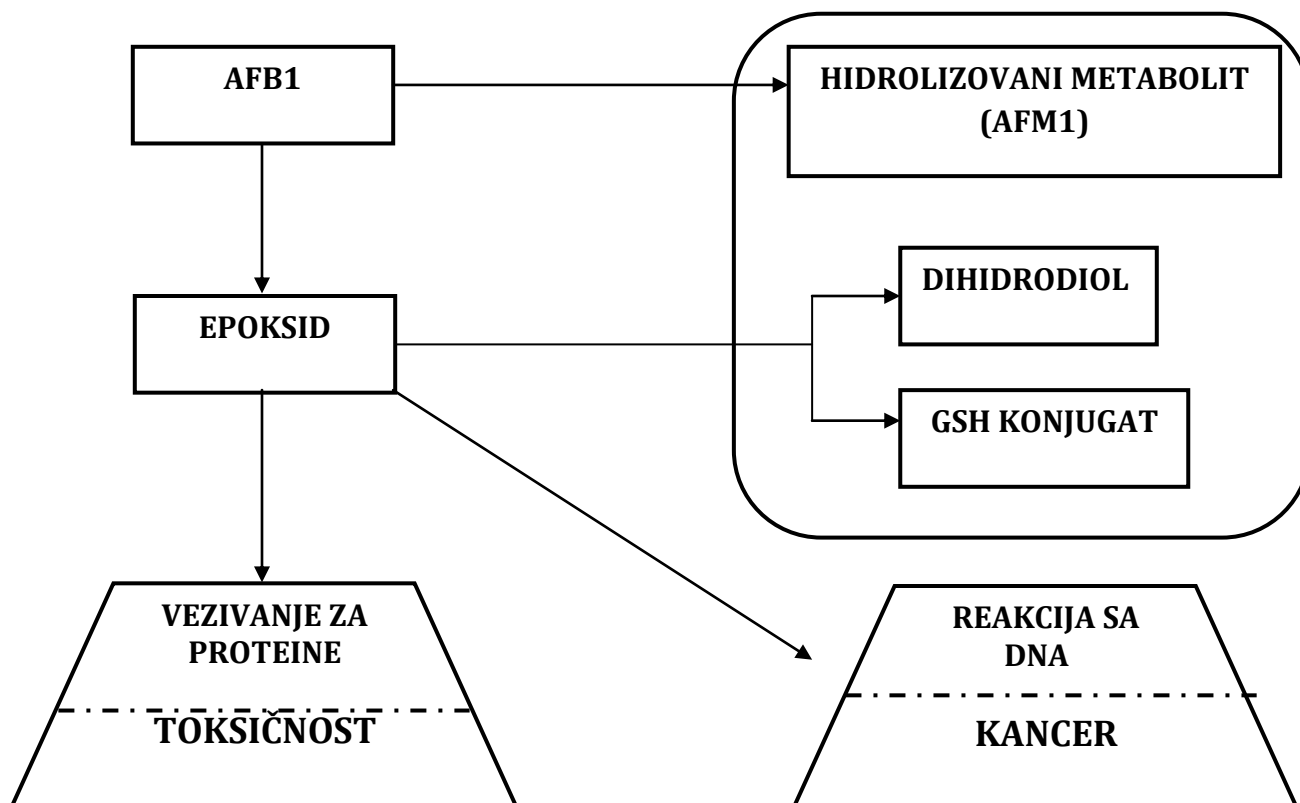
Akutno dejstvo	VISOKO	Hronično dejstvo
Mikroorganizmi		Mikotoksini
Fikotoksini		Antropogeni kontaminanti
Neki fitotoksini		Neki fitotoksini
Mikotoksini		Neuravnotežena ishrana
Antropogeni kontaminanti		Fikotoksini
Ostaci pesticida		Prehrambeni aditivi
Prehrambeni aditivi		Ostaci pesticida
		Mikroorganizmi
NISKO		

Intezitet akutne i hronične toksičnosti aflatoksina je sledeći: AFB1>AFG1>AFB2>AFG2. Najintezivnija toksičnost AFB1 potiče od laktonskog prstena i dvostrukih veza na C-8 i C-9 atomu furanskog prstena (Wogan i sar., 1971; Verma, 2004).

Takođe, hrana za životinje kontaminirana aflatoksinima može izazvati različita akutna i hronična oboljenja životinja: odbijanje hrane, gubitak težine, pad imuniteta, pojavu kancera, umanjeње reproduktivne sposobnosti i smanjenje produkcije, pa i smrt. Pored štetnog dejstva na zdravlje, aflatoksini uneti putem hrane u organizam životinja mogu se akumulirati i u različitim tkivima i organima koji se koriste u ishrani ljudi. Naime, pored AFM1 u mleku, pojedini aflatoksini se mogu naći i u mesu, iznutricama i jajima. Bailly i Guerre (2009) objedinili su veliki broj studija i ustanovili da se sa povećanjem koncentracije aflatoksina u hrani, povećava i njihova

koncentracija u navedenim proizvodima. Ispitivanja su obuhvatila kontaminiranu hranu (koncentracije aflatoksina od 55 do 10000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) i različite životinje koje su je konzumirale u periodu od 8 dana do 4 nedelje. Koncentracije aflatoksina u mesu, jetri, bubrezima, želudcu i jajima kretale su se od 0,02 do 22,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. S obzirom da se nevedene namirnice gotovo svakodnevno koriste u ishrani ljudi, prisustvo aflatoksina u njima dodatno povećava mogućnost pojave aflatoksikoza.

Na Slici 2.9. prikazan je mehanizam i posledice dejstva AFB1 u organizmu životinja. Citohrom P450 enzim prevodi AFB1 u 8,9-epoksid koji direktno reaguje sa proteinima i dezoksiribonukleinskom kiselinom (eng. „deoxyribonucleic acid“, DNA). Reakcija sa proteinima uslovljava pojavu različitih toksičnih efekata, dok reakcija sa DNA uslovljava pojavu kancera. Takođe, AFB1 i epoksid mogu preći i u druge oblike koji mogu ispoljavati toksična dejstva (Eaton i Groopman, 1993).



Slika 2.9. Mehanizam i posledice dejstva aflatoksina B1 u organizmu životinja (Eaton i Groopman, 1993)

Internacionalna agencija za ispitivanje kancera (IARC) po klasifikaciji kancerogenih jedinjenja iz 1993. godine, uvrstila je AFB1 u prvu grupu, u kojoj se nalaze jedinjenja sa izrazitim i dokazanim kancerogenim efektom. Ostali aflatoksini, AFB2, AFG1, AFG2 i AFM1 prema tadašnjoj klasifikaciji uvršteni su u 2B grupu. U navedenoj grupi, nalaze se jedinjenja za koje je utvrđeno da imaju kancerogeni efekat, ali o njihovom kancerogenom efektu još uvek nema dovoljno naučnih dokaza. Prema kasnijoj klasifikaciji iz 2002. godine (IARC) i navedena 4 aflatoksina uvršetna su u jedinjenja prve grupe po kancerogenosti. Do promene klasifikacije došlo je usled povećanog broja istraživanja i dokazane kancerogenosti ispitane na različitim životinjama.

Prvi objavljeni podatak o pojavi aflatoksina i aflatoksikozama potiče iz 1960. godine, kada je više od 100000 mladih ćurića u Engleskoj uginulo nakon konzumiranja hrane kontaminirane aflatoksinima. Ova pojava nazvana je „Turkey X disease“ jer je tada još uvek bilo nepoznato šta je prouzrokovalo ova uginuća (Bradburn i sar., 1994). Neposredno posle toga, zabeležene su nove pojave aflatoksina i uginuća različitih životinja: pačića i pilića (Asplin i Carnaghan, 1961), svinja (Loosmore i Harding, 1961) i teladi (Loosmore i Markson, 1961). Nove epidemije izazvane aflatoksinima uslovile su i intezivna ispitivanja aflatoksina, njihovih osobina, štetnosti i uzroka njihove pojave. Ustanovljeno je i da je pojava aflatoksina kao i čitav niz bolesti koje oni izazivaju karakterističnija za zemlje u razvoju u odnosu na razvijene zemlje. Kao razlozi tome navode se različiti nivoi higijene, različita ishrana, postupci pripreme i čuvanja hrane, i pre svega drugačiji životni standard. Procenjuje se da je oko 4,5 milijarde ljudi u zemljama u razvoju izloženo hroničnim oboljenjima usled unosa aflatoksina preko različitih žitarica (Gebrehiwet i sar., 2007). Dhanasekaran i sar. (2011) smatraju da je pojava aflatoksina i aflatoksikoza, kako kroz istoriju tako i danas, uslovljena pojavom suše, nedostatkom pravilnika koji propisuju njihovu kontrolu, upotrebom kontaminiranih sirovina za dalju proizvodnju, ignorisanjem javnosti njihovog prisustva, kao i ratovima, lošom političkom situacijom i ekonomskom nestabilnošću.

Veoma česta oboljenja ljudi i epidemije izazvane aflatoksinima zabeležene su u Indiji i Keniji. Godine 1974. Tandon i sar. (1977) opisali su epidemiju hepatitisa koja je zabeležena u 200 sela u Zapadnoj Indiji. Epidemija hepatitisa dovedena je u vezu sa konzumiranjem kukuruza kontaminiranog aflatoksinima. Analizama je utvrđeno da su oboleli ljudi u toku mesec dana konzumirali kukuruz koji je bio kontaminiran sa izuzetno visokim koncentracijama aflatoksina, između 2000 i 6000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Epidemija je trajala dva meseca, nakon čega je preminulo 106 osoba (Krishnamachari i sar., 1975). Godinu dana kasnije, Sreenivasamurthy (1975) je opisao uticaj aflatoksina iz hrane na pojavu uvećanja jetre kod dece. Takođe u Indiji, zabeleženo je nekoliko epidemija i uginuća velikog broja živine koja je konzumirala hranu kontaminiranu aflatoksinima (Char i sar., 1982). Pored uginuća živine, aflatoksini su uzrokovali i smanjenje produkcije jaja za 40-85% (Choudary i sar., 1982). Jedna od većih svetskih epidemija aflatoksinima zabeležena je u Keniji (Azziz-Baumgartner i sar., 2005) tokom 2004. godine, ali i narednih godina. U toku 2004. godine 317 ljudi je obolelo, od čega je 215 preminulo. Uzrok epidemije bio je kontaminirani kukuruz, u kome je koncentracija AFB1 iznosila čak i 46000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, što je 2300 puta veća koncentracija od dozvoljenih 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ koje propisuje Pravilnik u Keniji (Onsongo, 2004).

Iako je od otkrivanja aflatoksina do danas prošlo više od pola veka, još uvek je veoma teško utvrditi koliko ljudi je izloženo negativnom uticaju aflatoksina i koliko njih je obolelo od nekog vida aflatoksikoze. Poznata je jedino činjenica da je broj obolelih znatno veći u zemljama u razvoju nego u razvijenim zemljama. Kao prilog ovome navodi se podatak da je pojava raka jetre 2 do 10 puta učestalija u zemljama u razvoju u odnosu na razvijene zemlje (Henry, 1999). Međutim, i pored mogućnosti da se izloženost organizma aflatoksinima prati preko analize različitih metabolita aflatoksina u krvi i mokraći, ovo se još uvek veoma retko primenjuje (Bennett i Klich, 2003).

Svetska zdravstvena organizacija (eng. "World and Health Organization", WHO), Organizacija Ujedinjenih Nacija za Hranu i Poljoprivredu (eng. "Food and Agriculture Organization of the United States", FAO), JECFA (eng. "Joint Expert Committee on Food

Additives”) i SCF (eng. “Scientific Committee on Food”) i pored dokazanog kancerogenog efekta i sposobnosti aflatoksina da prouzrokuju čitav niz negativnih efekata u organizmu ljudi, još uvek nisu odredili dozvoljeni dnevni unos aflatoksina (eng. “tolerable daily intake”, TDI). Međutim, prema navedenim institucijama svaki unos aflatoksina veći od 1 ng/kg telesne mase (TM) predstavlja rizik za pojavu kancera jetre. Iz tog razloga, pomenute institucije savetuju da se unos aflatoksina u organizam putem hrane svede na minimum. Takođe, s obzirom da se usled izuzetne toksičnosti aflatoksina njihovo dejstvo ne može ispitivati na ljudima, za takvu vrstu ispitivanja uglavnom se koriste životinje. Mnogobrojnim istraživanjima ustanovljene su LD₅₀ (eng. „letal doze“; LD) vrednosti za pojedine životinje. LD₅₀ vrednosti definišu se kao letalne doze aflatoksina koje ubiju 50% ispitane populacije životinja. U Tabeli 2.3 prikazane su LD₅₀ vrednosti za pojedine životinje, na osnovu kojih se može zaključiti da su zečevi i pačiči najosetljivije vrste, dok glodari pokazuju najmanju osetljivost na dejstvo aflatoksina.

Tabela 2.3. Akutna toksičnost AFB1 izražena kao jedna oralna doza, LD₅₀ (Newberne i Butler, 1969)

Vrsta	LD ₅₀ mg/kg telesne mase
Zečevi	0,30
Pačiči	0,34
Mačka	0,55
Svinja	0,62
Pas	1,00
Pacov	5,50-7,20
Miš	9,00
Hrčak	10,2

Za AFM1, Kuiper-Godman (1990) izrazio je količinu od 0,2 ng/kg TM/dan kao TDI vrednost. Predloženi nivo za TDI ekvivalentan je riziku od 1:100 000. U zavisnosti od koncentracije AFM1 u mleku i od unosa mleka u organizam, može se proceniti i unos AFM1 (eng. „estimated daily intake“, EDI), a zatim se na osnovu EDI vrednosti može odrediti i indeks opasnosti (eng. „Hazard index“, HI). Na osnovu HI vrednosti

procenjuje se rizik i svaka HI vrednost veća od 1 ukazuje na postojanje rizika za osobe koje konzumiraju kontaminirano mleko.

2.3.5. Zakonske regulative

S obzirom na to da je pojava mikotoksina globalni problem, u svim razvijenim zemljama sveta postoje nadležne službe koje se bave ovom problematikom. Evropska komisija (eng. "European Commission", EC) na nivou Evropske Unije i FDA (eng. "Food and Drug Administration") na nivou SAD-a, predstavljaju dve najrazvijenije institucije koje se bave problemom mikotoksina. Pored navedenih institucija, ovom problematikom bave se i WHO, FAO i JECFA, kao i mnoge druge organizacije. Navedene ustanove propisuju pravila kontrole mikotoksina u prehrambenim proizvodima i hrani za životinje, usvajaju pravilnike o maksimalno dozvoljenim količinama (MDK) mikotoksina, o metodama koje se koriste pri njihovoj analizi, o pravilima uzorkovanja i pripremi uzoraka, kao i mnoga druga pravila i propise.

Na nivou Evropske Unije postoji jedinstven pravilnik koji propisuje MDK za mikotoksine u prehrambenim proizvodima (European Commission, EC/1881/2006). Od 2006. godine do danas usledilo je nekoliko izmena navedenog Pravilnika. U Republici Srbiji (RS) kontrola aflatoksina u prehrambenim proizvodima vrši se na osnovu Pravilnika ("Službeni glasnik RS", 28/2011) koji je 2011. godine delimično usklađen sa navedenim Pravilnikom Evropske Unije. Od 2011. godine do danas usledilo je nekoliko izmena navedenog Pravilnika u Srbiji ("Službeni glasnik RS", 20/2013; "Sl. glasnik RS", 29/2014; "Sl. glasnik RS", 37/2014) sa ciljem njegovog potpunog usklađivanja sa evropskim. Do 2011. godine u Srbiji je bio na snazi Pravilnik iz 1992. godine (Službeni list RS, 5/92) koji se znatno razlikovao od Pravilnika Evropske Unije. Razlike su bile najuočljivije u pogledu mikotoksina i proizvoda koje je bilo potrebno kontrolisati, kao i MDK kontrolisanih mikotoksina. Tek nedavno usklađivanje Pravilnika u Srbiji sa Pravilnikom iz Evropske Unije, može se navesti kao jedan od

razloga nedovoljno sistematski sprovedenih monitoringa i nedostataka publikovanih podataka o pojavi mikotoksina iz Srbije.

Kontrola prisustva aflatoksina u hrani za životinje na nivou Evropske Unije vrši se po Pravilniku EC/32/2002 dok je Pravilnik u Srbiji prvobitno bio delimično usklađen sa navedenim pravilnikom tokom 2010. godine („Službeni glasnik RS”, 4/2010), a njegova poslednja izmena izvršena je tokom 2014. godine („Sl. glasnik RS” 27/2014).

S obzirom da će u ovoj doktorskoj disertaciji biti ispitana pojava aflatoksina u kukuruzu i mleku, MDK aflatoksina za navedene proizvode kao i poređenje MDK sa pojedinim međunarodnim Pravilnicima prikazane su u Tabelama 2.4 i 2.5.

Tabela 2.4. Maksimalno dozvoljene količine (MDK) za AFB1 i ukupne aflatoksine u kukuruzu, prema pravilnicima iz Srbije, Evropske Unije i SAD

Zemlja	Pravilnik	MDK ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
		AFB1	Ukupni aflatoksini (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2)
Kukuruz-hrana za ljude			
Republika Srbija	„Službeni glasnik SRJ” 5/1992	5	10
	„Službeni glasnik RS” 28/2011	5	10
	„Službeni glasnik RS” 20/2013, RS 29/2014	5	10
Evropska Unija	European Commission 1881/2006	5	10
SAD	Food and Drug Administration, 2000.	20	
Kukuruz-hrana za životinje			
Republika Srbija	„Službeni glasnik SRJ” 5/1992		50
	„Službeni glasnik RS” 4/2010, RS 113/2012		50
	„Službeni glasnik RS” 27/2014	30	
Evropska Unija	European Commission 32/2002	20	
SAD	Food and Drug Administration, 2011		20-300*

*U zavisnosti od životinje

Tabela 2.5. MDK za AFM1 prema pravilnicima iz Srbije, Evropske Unije i SAD

Zemlja	Pravilnik	Vrsta uzorka koja se kontroliše	MDK ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Republika Srbija	„Službeni glasnik SRJ“ 5/1992	Mleko i proizvodi od mleka	0,50
	„Službeni glasnik RS“ 28/2011	Sveže mleko, termički obrađeno mleko za proizvodnju mlečnih proizvoda	0,05
	„Službeni glasnik RS“ 20/2013		0,50
	„Službeni glasnik RS“ 37/2014		0,05
	„Službeni glasnik RS“ 72/2014		0,25
Evropska Unija	European Commission 1881/2006		0,05
SAD	Food and Drug Administration, 2011.	Mleko	0,50

SRJ: Savezna Republika Jugoslavija

RS: Republika Srbija

Iz Tabele 2.5. može se uočiti da su u Republici Srbiji vrednosti MDK za AFM1 u mleku najviše puta promenjene. Naime, do 2011. godine MDK za AFM1 u mleku iznosila je 0,50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, nakon čega je promenjena na 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede je usled pojave AFM1 u mleku tokom 2013. godine (Kos i sar., 2014a) ponovo promenilo MDK vrednost na 0,50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Navedena MDK vrednost važila je od 01.03.2013. do 01.07.2014. godine, nakon čega je ponovo vraćena na 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Veoma brzo, nakon 11 dana, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede je na osnovu zahteva proizvođača mleka povećalo MDK vrednost na 0,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

U Tabeli 2.6. prikazano je poređenje MDK za ukupne aflatoksine u hrani za različite regione sveta. Kao što se vidi, najniže vrednosti MDK propisane su u Evropi.

Tabela 2.6. Poređenje propisanih vrednosti MDK za ukupne aflatoksine u hrani u različitim regionima sveta (Food and Agriculture Organization, 2004)

Region	Opseg MDK ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Najučestalije MDK ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Afrika	10-20	10
Azija/okeanija	5-35	15
Evropa	0-10	5
Latinska Amerika	2-35	20
Severna Amerika	15-20	15-20

2.4. Određivanje aflatoksina

Usled činjenice da se aflatoksini, kao kontaminanti hrane za ljude i životinje, nalaze u izuzetno niskim koncentracijama ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ili ng/kg) pri kojima ispoljavaju i toksično dejstvo, za njihovo određivanje potrebne su izuzetno osetljive i precizne metode. Za analizu aflatoksina mogu se koristiti različite tehnike u okviru kojih mogu biti razvijene i različite metode. Koja tehnika i metoda će biti odabrana zavisi od uzorka koji se analizira, dostupnosti opreme za analizu, obučenosti izvršioca, koncentracije aflatoksina, brzine, osetljivosti i cene metode (Turner i sar., 2009).

U savremenoj analitici aflatoksina (AFB1, AFG1, AFB2 i AFB2) najveću primenu ima tečna hromatografija visokih performansi (eng. "high performance (pressure) liquid chromatography", HPLC) sa fluorescentnim detektorom (eng. "fluorescence detector", FLD), a pored navedene tehnike u velikoj upotrebi su i imunoenzimatske metode (eng. "enzyme linked immunosorbent assay", ELISA) kao i kombinovana tehnika tečna hromatografije sa masenom spektrometrijom (eng. "liquid chromatography-mass spectrometry", LC-MS/MS). Ranije je veliku upotrebu u analitici aflatoksina imala i tankoslojna hromatografija (eng. "thin layer chromatography", TLC), koja je zbog visokih vrednosti limita kvantifikacije i loše ponovljivosti gotovo u potpunosti zanemarena (Lin i sar., 1998). Pored navedenih tehnika, za potrebe brze analize aflatoksina, npr. pre skladištenja žitarica u velike silose, koriste se i tzv. brzi testovi (eng. "lateral flow") koji se zasnivaju na imunohromatografskim principima (Reiter i sar., 2009).

Prema literaturnim podacima, ELISA je najzastupljenija tehnika za određivanje AFM1 u mleku i mlečnim proizvodima, a sve više se koriste HPLC-FLD i LC-MS/MS tehnike (Shephard i sar., 2012; Shephard i sar., 2013).

U Tabeli 2.7. predstavljene su tehnike koje se mogu koristiti za analizu aflatoksina, kao i njihove prednosti i nedostaci.

Tabela 2.7. Tehnike koje se koriste za analizu aflatoksina, prednosti i nedostaci (Leslie i sar., 2008)

METODA	PREDNOSTI	NEDOSTACI
TLC	Jednostavno, jeftino, brzo Može se koristiti kao skrining metoda Simultana analiza različitih mikotoksina Dobra osetljivost za aflatoksine	Loša preciznost Adekvatno razdvajanje zahteva dvodimenzionalnu analizu
GC	Dobra osetljivost Automatizovan Omogućava potvrđivanje (MS detektor) Simultana analiza većeg broja različitih mikotoksina	Skupa oprema Specijalizovano visokoobrazovano osoblje Moguće matriks- interference Varijacije kod ponovljivosti i reproduktivnosti Nekada je potrebna derivatizacija
HPLC	Dobra osetljivost Dobra selektivnost Dobra ponovljivost Automatizovano Kratko vreme analize Dostupne oficijalne metode	Skupa oprema Specijalizovano visokoobrazovano osoblje Potrebna derivatizacija
LC/MS	Simultana analiza većeg broja različitih mikotoksina Dobra osetljivost (LC/MS/MS) Omogućava potvrđivanje Nije potrebna derivatizacija	Skupa oprema Specijalizovano visokoobrazovano osoblje Uticao matriksa
ELISA	Jednostavna priprema uzorka Jeftina oprema Dobra osetljivost Simultana analiza velikog broja uzoraka Prihvatljiva kao skrining metoda Ograničena upotreba organskih rastvarača Vizuelna ocena	Moguće matriks- interference Mogući lažni pozitivan/negativan rezultat Moguća reakcija sa vezanim mikotoksinima Zahteva potvrđivanje LC/MS Polukvantitativna
BRZI TESTOVI	Jednostavno, jeftino Brzo (5-10 minuta) Ograničena upotreba organskih rastvarača Prihvatljiva kao skrining metoda Upotrebljivo na svim mestima	Kvalitativna, polukvantitativna Moguće matriks- interference Mogući lažni pozitivan/negativan rezultat Moguća reakcija sa vezanim mikotoksinima

TLC: tankoslojna hromatografija; GC: gasna hromatografija; HPLC: tečna hromatografija visokih performansi; LC/MS: tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom

Kao prilog činjenici da određivanje aflatoksina predstavlja analitički izazov navode se sve faze koje je neophodno sprovesti u toku analize: uzorkovanje, ekstrakcija, prečišćavanje, koncentrovanje, razdvajanje, detekcija, potvrđivanje, kvantifikacija i validacija (Scudamore, 2005). Pored navedenog, treba napomenuti da je i zahteve o visokoj osetljivosti i tačnosti primenjene metode uz adekvatnu pripremu uzorka teško u potpunosti zadovoljiti pri svakodnevnim, rutinskim analizama u praksi. Usled toga, u savremenoj analitici aflatoksina potrebno je pronaći optimalni balans da se primenom što savremenije metode uz minimalnu upotrebu štetnih rastvarača, skupih hemikalija i kraće vreme analize, dobije tačan i pouzdan rezultat (Kralj Cigić i Prosen, 2009; Shephard i sar., 2012).

2.4.1. Uzorkovanje

Kao prvi i jedan od najvažnijih koraka pri analizi aflatoksina navodi se postupak uzorkovanja. Cilj uzorkovanja je da se obezbedi uzorak za laboratorijsku analizu, koji u najvećoj meri reprezentuje karakteristike početnog lota iz kojeg je uzorak uzet. S obzirom da su mikotoksini neravnomerno raspoređeni unutar velikih količina uzoraka (CAST, 2003; Gloria i sar., 2004; Whitaker, 2006), na nivou Evropske Unije propisana je Regulativa u vezi sa uzimanjem uzoraka za analizu mikotoksina (Commission Regulation, EC/401/2006). Prema navedenoj Regulativi, uzorkovanje žita za analizu mikotoksina izvodi se na osnovu smernica prikazanih u Tabeli 2.8.

Tabela 2.8. Veličina i broj sublotova, pojedinačnih i zbirnih uzoraka u zavisnosti od veličine lota (EC/401/2006)

Uzorak	Veličina lota (t)	Veličina ili broj sublotova	Broj pojedinačnih uzoraka	Veličina zbirnog uzorka (kg)
Žita, Proizvodi od žita	≥ 1500	500 t	100	10
	300-1500	3 sublota	100	10
	50-300	100 t	100	10
	< 50	-	3-100*	1-10

*broj pojedinačnih uzoraka zavisi od veličine lota

Iz Tabele 2.8. se vidi da broj subplotova, pojedinačnih uzoraka i veličina zbirnog uzorka zavise od veličine. Ukoliko je ukupna količina žita i proizvoda od žita manja od 50 tona, uzorkovanje se vrši prema Tabeli 2.9. U zavisnosti od težine lota, broj pojedinačnih uzoraka kreće se od 3 do 100, a ukupna količina zbirnog uzorka od 1 do 10 kg.

Tabela 2.9. Broj pojedinačnih uzoraka i veličina zbirnog uzorka za lotove žita čija je težina manja od 50 t

Veličina lota (t)	Broj pojedinačnih uzoraka	Veličina zbirnog uzorka (kg)
≤ 0,05	3	1
0,05-0,5	5	1
0,5-1	10	1
1-3	20	2
3-10	40	4
10-20	60	6
20-50	100	10

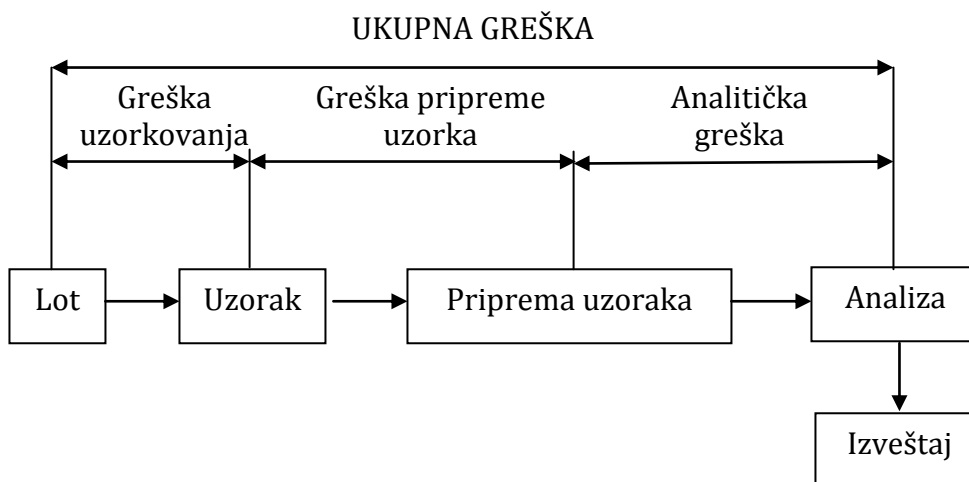
Uzorci žita uzorkovani na opisan način dalje se homogenizuju i usitnjavaju sa ciljem obezbeđivanja laboratorijskog uzorka.

O neravnomernoj raspodeli mikotoksina unutar tečnih uzoraka, kao i o raspodeli AFM1 unutar mleka nema do danas objavljenih literaturnih podataka. Međutim, da bi rezultat laboratorijskog uzorka verodostojno reprezentovao karakteristike lota iz kojeg je uzet, uzorkovanje mleka za analizu mikotoksina (Tabela 2.10) na nivou Evropske Unije takođe je propisano smernicama Regulative (Commission Regulation, EC/401/2006).

Tabela 2.10. Uzorkovanje mleka za analizu mikotoksina

Forma u kojoj se prodaje	Zapremina (l) ili težina (kg)	Minimalni broj pojedinačnih uzoraka	Minimalna zapremina (l) ili težina (kg) zbirnog uzorka
Veća količina	-	3-5	1
Boce/pakovanje	≤ 50	3	1
	50-500	3	1
	> 500	10	1

Da je uzorkovanje izuzetno važan korak pri analizi mikotoksina, ukazao je i Whitaker (2006). On je ukupnu grešku pri analizi mikotoksina izrazio kao zbir grešaka nastalih tokom uzorkovanja, pripreme uzoraka i analitičkog postupka (Slika 2.10.). Pored toga, naveo je i da u greškama tokom mikotoksikološke analize, uzorkovanje može učestvovati i do 82%.



Slika 2.10. Mogući izvori grešaka pri analizi mikotoksina (Whitaker, 2006)

2.4.2. Metode pripreme uzoraka

Bez obzira koja tehnika će biti primenjena za određivanje aflatoksina, veliku pažnju potrebno je posvetiti i odabiru najefikasnije pripreme uzorka koja treba da obezbedi adekvatno prečišćavanje uzorka uz koncentrovanje određivanog analita.

Nakon uzorkovanja i obezbeđivanja reprezentativnog uzorka, laboratorijski uzorak potrebno je pripremiti za analizu. Priprema uzorka za mikotoksikološku analizu sastoji se iz sledećih koraka: ekstrakcija, prečišćavanje uzorka i koncentrovanje određivanog analita.

Ekstrakcija aflatoksina iz kukuruza zasniva se na izdvajanju aflatoksina iz čvrstih faza u tečnu fazu primenom različitih rastvarača. Ekstrakcija je potrebna da bi se omogućilo izdvajanje aflatoksina iz uzorka u onoj koncentraciji koju će biti moguće

detektovati. Od uspešnosti postupka ekstrakcije, tj. od izdvajanja aflatoksina iz uzorka i prenosa u tečnu fazu u velikoj meri zavisi i tačnost (eng. „recovery“) analize. Odabir rastvarača zavisi pre svega od sastava uzorka i hemijskih i fizičkih osobina jedinjenja koje se određuje, kao i od celog analitičkog postupka i svakako cene i štetnosti rastvarača. Stoga je odabir rastvarača kompromis između njegove jačine da efikasno ekstrahuje aflatoksine iz uzorka i da ujedno bude pogodan za dalji analitički postupak (Kralj Cigić i Prosen, 2009).

Ekstrakcija aflatoksina iz kukuruza uglavnom se izvodi organskim rastvaračima ili smešom organskih rastvarača i vode. Smeša metanola i vode najčešća je kombinacija rastvarača za ekstrakciju aflatoksina iz kukuruza koji će biti analizirani primenom ELISA tehnike (Krska i Schuhmacher, 2012). Literaturni podaci navode da su acetonitril i metanol najčešće korišćeni rastvarači za ekstrakciju aflatoksina koji će se određivati primenom HPLC-FLD tehnike (Chun i sar., 2007; Oliveira i sar., 2009; Hepsag i sar., 2014). Uz navedene organske rastvarače koristi se i voda koja dodatno pospešuje ekstrakciju jer prisustvo vode dovodi do bubrenja uzorka i lakšeg i boljeg izdvajanja aflatoksina (Scudamore, 2005). Za ekstrakciju aflatoksina iz uzoraka koji će se analizirati primenom LC-MS/MS tehnike koriste se kombinacije istih organskih rastvarača sa vodom, sa ili bez dodatka kiselina (CH_3COOH , HCOOH).

Zapremina primenjenog rastvarača zavisi od količine uzorka, i najčešće je zapremina rastvarača (ml) 4 do 6 puta veća od mase uzorka (g) (Sulyok i sar., 2006; Ferrer i sar., 2010; Shepard i sar., 2013).

Ekstrakcija AFM1 iz mleka, bez obzira na tehniku određivanja, najčešće se vrši acetonitrilom, a veoma često AFM1 se analizira i bez ekstrakcije tj. direktno iz uzorka (Lee i sar., 2009; Wang i sar., 2012; Malissiova, 2013).

Kada su aflatoksini ekstrahovani iz uzorka, tečnu fazu u koju su prešli, potrebno je prečistiti kako bi se uklonile sve nečistoće koje bi mogle ometati dalju analizu, detekciju i kvantifikaciju. Postupak prečišćavanja zavisi od koncentracije prisutnog aflatoksina, vrste uzorka, primenjene tehnike određivanja, i dr. (Langseth i Clasen, 1998). Pored nabrojanog, postupak prečišćavanja uzorka za analizu aflatoksina u

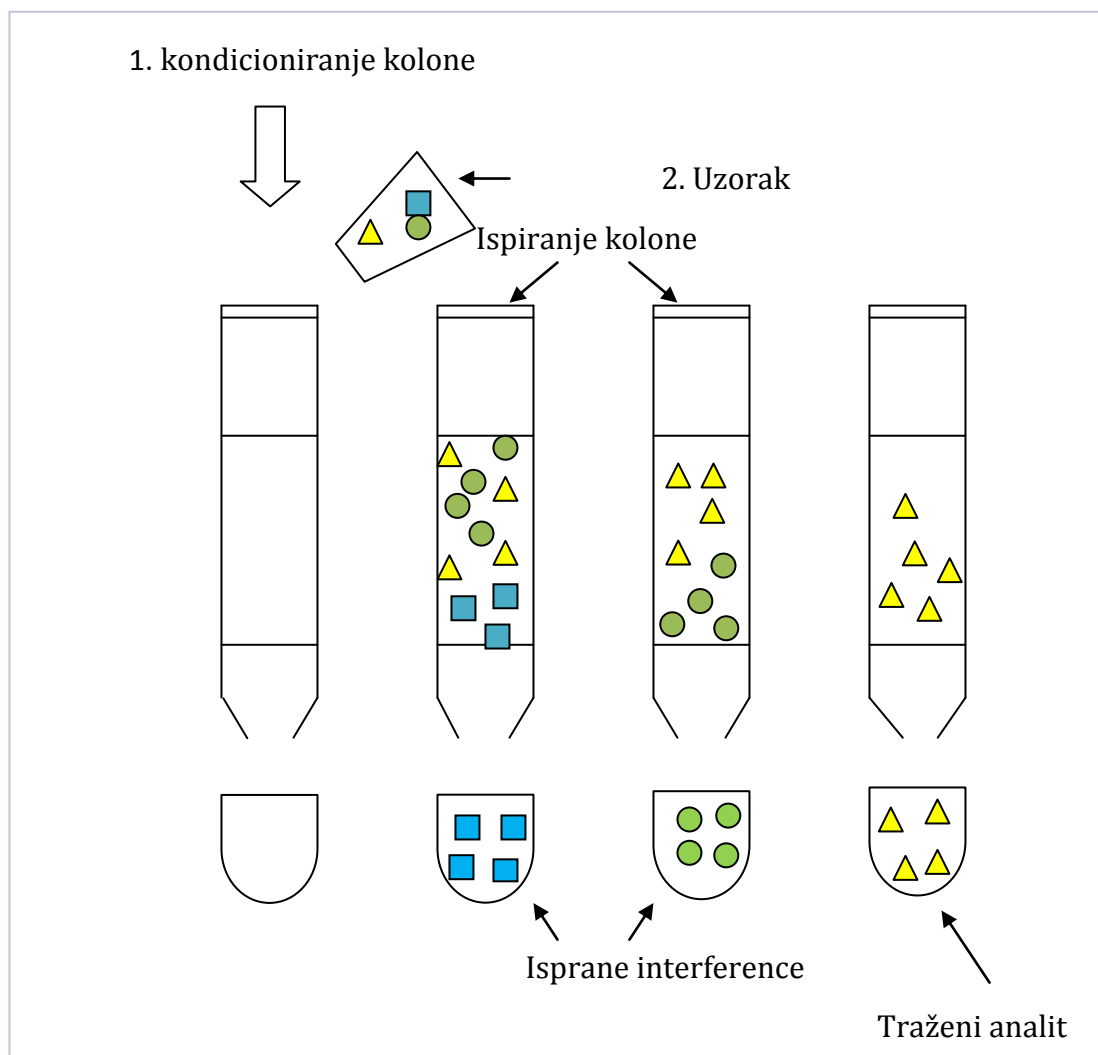
velikoj meri zavisi i od toga da li se analiziraju samo aflatoksini, ili i neka druga jedinjenja (drugi mikotoksini, pesticidi, boje).

Prečišćavanje uzorka ima za cilj da obezbedi što bolje (Krska i Schuhmacher, 2012):

- izdvajanje željenog analita,
- koncentrisanje analita, jer su aflatoksini prisutni u izuzetno malim koncentracijama ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ili ng/kg) i potrebno ih je koncentrisati do koncentracije koju je moguće detektovati,
- uklanjanje interferirajućih komponenti, koje mogu "maskirati" rezultat i otežati određivanje komponenti od interesa (najčešće se radi o visokomolekularnim jedinjenjima: lipidima, ugljenim hidratima i proteinima).

Priprema uzoraka kukuruza za određivanje aflatoksina (AFB1, AFG1, AFB2 i AFG2) primenom ELISA tehnike uglavnom se zasniva samo na ekstrakciji. Određena masa samlevenog uzorka ekstrahuje se u smeši metanola i vode, određeni vremenski period mućka i profiltrira. Za određivanje AFM1 u mleku, primenom ELISA tehnike, uzorak je uglavnom potrebno samo izcentrifugirati.

Za prečišćavanje uzoraka kukuruza i mleka za analizu aflatoksina, primenom HPLC-FLD tehnike koriste se kolone sa različitim punjenjem (aktivni ugalj i aluminijum oksid sa ili bez jonskog izmenjivača, silika gel, fluorisil, i dr.) (Bursić i sar., 2012). Postupak primene navedenih kolona za prečišćavanje uzoraka naziva se čvrto-fazna ekstrakcija (eng. „solid-phase extraction“, SPE). Iako se danas na tržištu mogu pronaći različite SPE kolone, sve one prečišćavaju uzorke po istom principu (Slika 2.11).

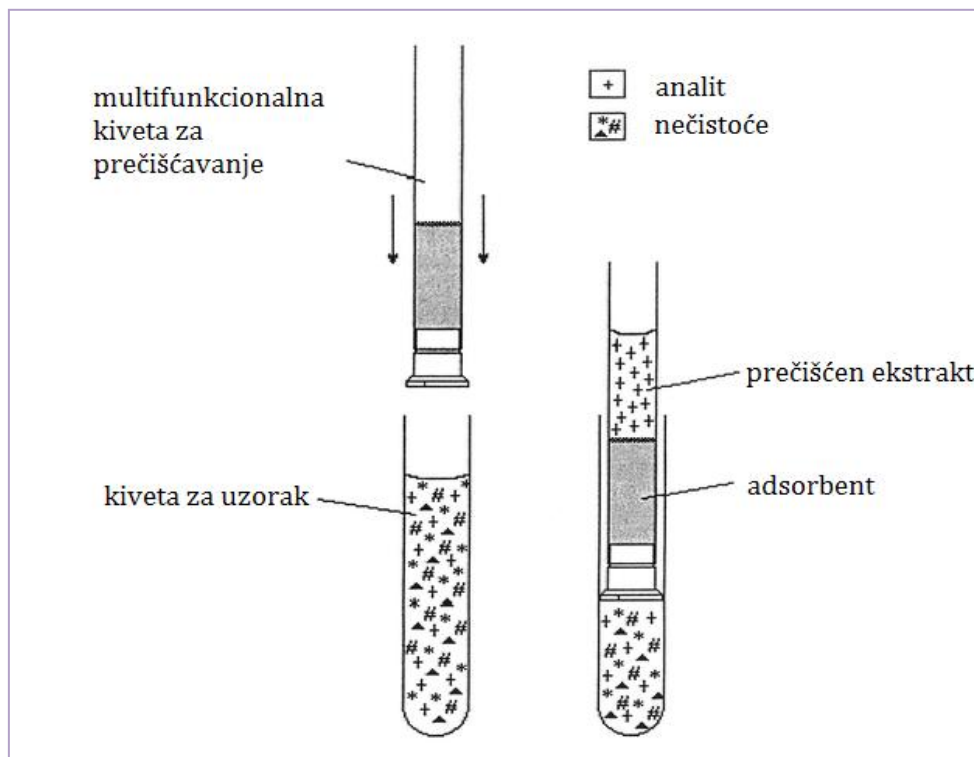


Slika 2.11. Postupak prečišćavanja uzoraka primenom čvrsto fazne ekstrakcije

Kolone se prvo kondicioniraju sa odgovarajućim rastvaračem, a zatim se nanosi uzorak. Nakon toga, sledi ispiranje interferirajućih komponenti i izdvajanje željenog analita (Reiter i sar., 2009).

MycoSep kolone su vrsta SPE kolona koje se veoma često koriste za prečišćavanje uzoraka u kojima će se vršiti određivanje aflatoksina (Slika 2.12.). One su u osnovi multifunkcionalne kolone, pune različitim adsorbentima poput aktivnog uglja, celita, jonoizmenjivačkih smola i dr., i kao takve namenjene su za analizu različitih kompleksnih uzoraka. Čvrsta faza, tj. punjenje kolone, smešteno je u

polietilensku cevčicu između filter-diskova sa gumenim ivicama. Na donjem delu nalaze se krilca koja propuštaju uzorak samo u jednom smeru.



Slika 2.12. Postupak prečišćavanja uzorka primenom MycoSep kolona (Jajić, 2004)

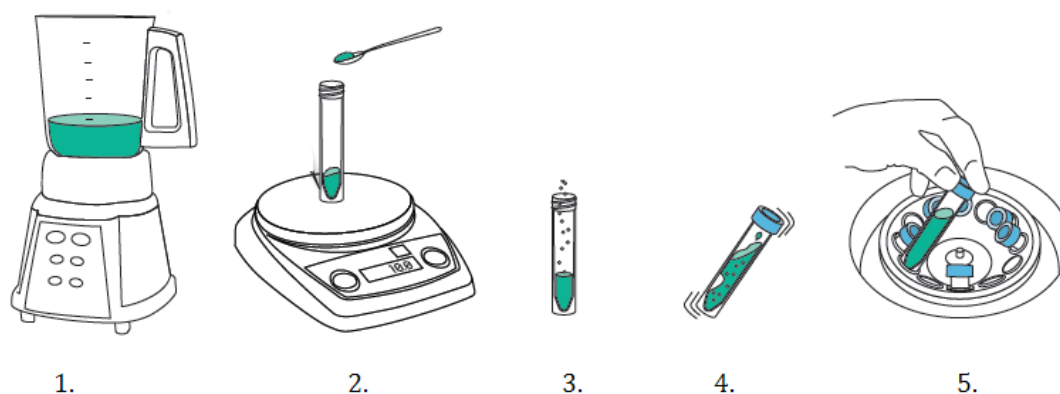
Kada se kolona uroni u epruvetu sa ekstraktom gumeni krajevi diska se pribijaju uz zid epruvete povlačeći ekstrakt uzorka kroz punjenje kolone, tako da se u gornjem delu plastične cevčice, iznad gornjeg filter-diska pojavljuje ekstrakt (Krska, 1998). MycoSep kolone omogućavaju izuzetno brzo prečišćavanje uzorka (10-30 sekundi) i njihova osnovna prednost je odsustvo dugotrajnih ispiranja, jednostavnost upotrebe kao i efikasno uklanjanje interferirajućih supstanci koje ostaju zadržane na koloni (Jajić, 2004).

Primena imunoafinitetnih kolona (eng. „immunoaffinity columns“, IMC) takođe je od izuzetno velikog značaja pri analizi aflatoksina. Ove kolone punjene su antitelima koja su specifična za aflatoksine, ili neke druge mikotoksine. Kada se ekstrakt uzorka

propusti kroz IMC dolazi do specifičnog vezivanja mikotoksina za antitela, dok ostale komponente prolaze kroz kolonu. Nakon ispiranja nepoželjnih supstanci mikotoksin se eluira rastvaračem kao što je metanol, acetonitril ili vodeni rastvor dimetilsulfoksida (Scott i Truckess, 1997). Osnovna prednost ovih kolona je specifičnost koja eliminiše uticaj matriksa i koncentrovanje analita iz velike zapremine ekstrakta čime se postiže niska granica detekcije (CAST, 2003). U poređenju sa MycoSep kolonama, IAC zahtevaju više manuelnog rada.

Danas se na tržištu može pronaći veliki broj različitih SPE i IMC kolona za određivanje aflatoksina, a u zavisnosti od proizvođača i veličine kolone, zavisi i odabir rastvarača, protok kroz kolonu kao i zapremina ekstrakta (CAST, 2003).

U novije vreme za pripremu i ekstrakciju uzoraka kukuruza za analizu aflatoksina primenom LC-MS/MS tehnike koriste se i QuEChERS-i kitovi (akronim koji označava brzu-laku-jeftinu-efikasnu-robustnu-bezbednu metodu; eng. "quick-easy-cheap-effective-rugged-safe) i samo postupak ekstrakcije. Navedeni postupci pripreme uzoraka koriste se uglavnom ako se uz aflatoksine žele odrediti i neka druga jedinjenja (mikotoksini, pesticidi, boje, i dr.). QuEChERS metoda prvobitno je razvijena za analizu pesticida iz voća i povrća od strane Anastassiades i sar. (2003), a zatim je sa izvesnim modifikacijama uvedena i kao metoda za ekstrakciju i prečišćavanje uzoraka za analizu mikotoksina u uzorcima žita i hrane za životinje (Mol i sar., 2008; Desmarchelier i sar., 2010; Zachariasova i sar., 2010). Postupak pripreme uzoraka zasniva se na ekstrakciji mikotoksina vodom i acetonitriplom. Prečišćavanje se obavlja dodatkom različitih soli (najčešće $MgSO_4$, CH_3COONa , $NaCl$) (Slika 2.13.). Danas se na tržištu mogu pronaći QuEChERS kitovi različitih proizvođača.



Slika 2.13. Osnovni princip pripreme uzoraka pomoću QuEChERS-a
1. ekstrakcija; 2. prečišćavanje uz dodatak soli; 3. 4. mućkanje; 5.
centrifugiranje

Priprema uzoraka samo ekstrakcijom bez prečišćavanja u novije vreme koristi se za analizu većeg broja različitih jedinjenja koja će biti analizirana primenom LC-MS/MS metode. Postupak se zasniva na mešanju određene količine uzorka sa odgovarajućim rastvaračem (u odnosu 1:4 do 1:10). Dobijena smeša se zatim meša (od 2 do 60 min), po potrebi centrifugira i profiltrira kroz filter papir. Dobijeni filtrat se ili dalje razblaži mobilnom fazom, ili upari do suva i rekonstituiše u mobilnoj fazi (Sulyok, i sar., 2006; Amate i sar., 2010).

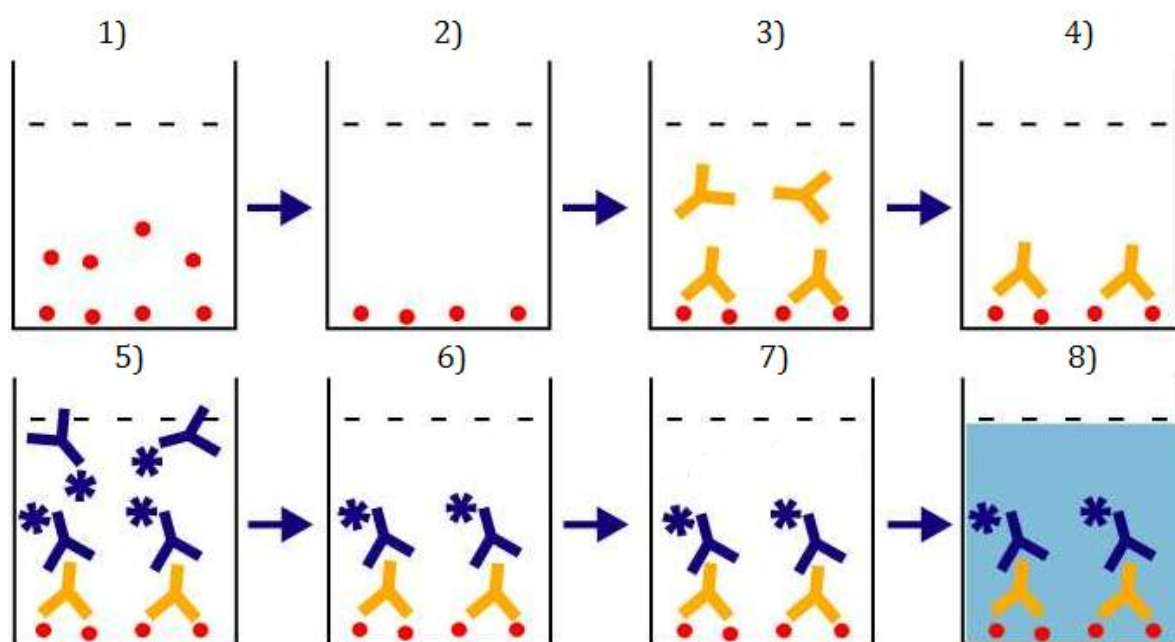
Prednost primene ekstrakcije i QuEChERS kitova u pripremi uzoraka ogleda se u jednostavnosti postupka, brzini i minimalnom utrošku hemikalija. Uz navedene prednosti, kao osnovni nedostatak navedenih priprema uzoraka navodi se uticaj uzorka-matriksa na rezultat (matriks efekat) kao i kontaminacija uređaja usled nedovoljnog prečišćavanja uzorka (Garrido Frenich i sar., 2009).

Nakon ekstrakcije i prečišćavanja uzoraka za analizu aflatoksina, primenom hromatografskih metoda, uzorke je najčešće potrebno koncentrovati. Koncentrovanje se vrši uparavanjem male količine prečišćenog ekstrakta u struji azota ili vazduha. Ovako upareni uzorci dalje se rekonstituišu u odgovarajućoj mobilnoj fazi i analiziraju (Bursić i sar., 2012).

2.4.3. ELISA

ELISA se definiše kao polukvantitativna (Munari i sar., 2003) i/ili kvantitativna (Reiter i sar., 2009) skrining tehnika za određivanje različitih jedinjenja. Do danas je razvijen i veliki broj različitih ELISA test kitova za određivanje aflatoksina (Neogen Veratox®, Lansing, SAD; Tecna S. r. l. Trieste, Italy; Ridascreen, R-Biopharm, Darmstad, Germany; Immunolab GmbH, Kassel, Germany; i dr.). U sastavu svakog test kita, bez obzira na proizvođača, nalazi se set pripremljenih hemikalija: serija standarda aflatoksina, aflatoksin enzim-konjugat, rastvor za ispiranje, reagens za razvoj boje, stop reagens i 48 ili 96 bunarića za analizu.

Bez obzira koji ELISA test kit se koristi za određivanje aflatoksina, princip je isti. Osnovni princip ELISA tehnike prikazan je na Slici 2.14.



Slika 2.14. Osnovni princip ELISA tehnike

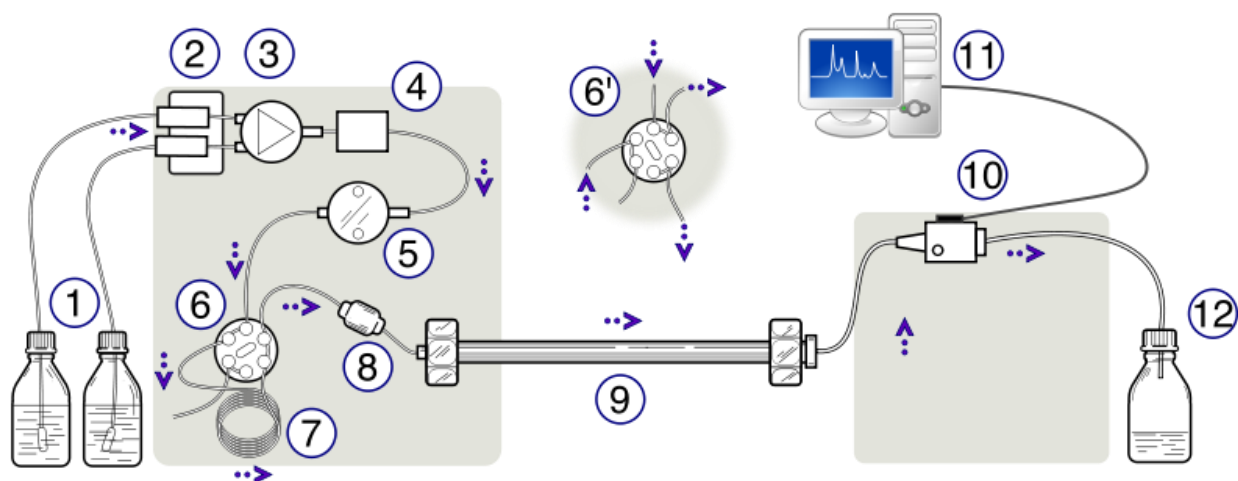
Slobodni aflatoksini iz uzorka i standarda (Slika 2.14., 1, 2) u bunarićima se takmiče sa enzim-vezanim aflatoksinom (konjugatom) za vezivna mesta antitela (Slika 2.14., 3). Nakon perioda inkubiranja (Slika 2.14., 4), bunarići se ispiraju rastvorom za

ispiranje nakon čega se dodaje supstrat koji reaguje sa vezanim konjugatom i dolazi do razvoja boje (Slika 2.14., 5, 6). Posle određenog perioda inkubiranja (Slika 2.14., 7, 8), dodaje se stop reagens i vrši očitavanje intenziteta boje na ELISA čitaču. Koncentracija aflatoksina određuje se na osnovu kalibracione krive standarda i koncentracija je obrnuto proporcionalna intenzitetu razvijene boje.

Osnovne prednosti ELISA tehnike, u odnosu na druge tehnike za određivanje aflatoksina su: minimalna priprema uzorka, jednostavnost izvođenja i niska cena analize. Međutim, kao glavni nedostaci ELISA tehnike navode se pojava “cross-reactivity” i mogućnost dobijanja lažno pozitivnih rezultata. “Cross-reactivity” definiše se kao sposobnost jedinjenja sa sličnom hemijskom strukturom da reaguju sa antitelima. Usled moguće pojave “cross-reactivity” i dobijanja lažno pozitivnih rezultata, svaki detektovani aflatoksin ELISA metodom treba da bude potvrđen i nekom hromatografskom tehnikom, naročito ako je koncentracija aflatoksina blizu MDK vrednosti (Anklam i sar., 2002).

2.4.4. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC)

Tečna hromatografija visokih performansi ili visokog pritiska je savremena analitička tehnika koja se koristi za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju komponenata iz različitih uzoraka. HPLC tehnikom mogu biti analizirane komponente koje su rastvorene u tečnosti. Na Slici 2.15. prikazana je osnovna šema HPLC-a, kao i njene sastavne jedinice.



Slika 2.15. Osnovna šema HPLC-a (Commons, 2014)

1. posude za mobilnu fazu, 2. degazer, 3. gradient ventil, 4. mešać mobilne faze, 5. visoko-pritisna pumpa, 6. ventil, pozicija injektovanja, 6'. ventil, pozicija ubrizgavanja, 7. petlja injektovanja uzorka, 8. pred-kolona (zaštitna), 9. kolona, 10. detektor, 11. kompjuter, 12. sakupljač otpada ili frakcija

Razvojem savremene analitike i sve većim potrebama tržišta, danas je razvijen i veliki broj različitih modela HPLC-a. Međutim, osnova analize i rada HPLC-a je ista za sve modele. Mala količina (μl) specijalno pripremljenog i prečišćenog uzorka se u struji odgovarajuće mobilne faze injektuje, tj. unosi u sistem. Pod dejstvom pumpe uzorak i mobilna faza bivaju nošeni kroz sistem i uneti na kolonu. Na koloni dolazi do interakcija između komponenata uzorka i stacionarne faze kolone. U zavisnosti od navedenih interakcija, zavisi i vreme zadržavanja komponenata na koloni. Vreme za koje se neka komponenta ispere sa kolone naziva se retenciono vreme (eng. „retention time“, Rt). Komponente se identifikuju na osnovu poređenja njihovog Rt sa Rt standarda. Za svaki HPLC sistem vezan je detektor i kompjuter sa specijalnim softverskim programom, pomoću kojih se dobijaju i obrađuju hromatogrami, i identifikuju i kvantifikuju komponente. Izdvojene komponente sa kolone dolaze u detektor, koji ih registruje i šalje električni signal kompjuteru.

U zavisnosti od komponenata koje se ispituju mogu se koristiti različiti detektori (Kromidas, 2006):

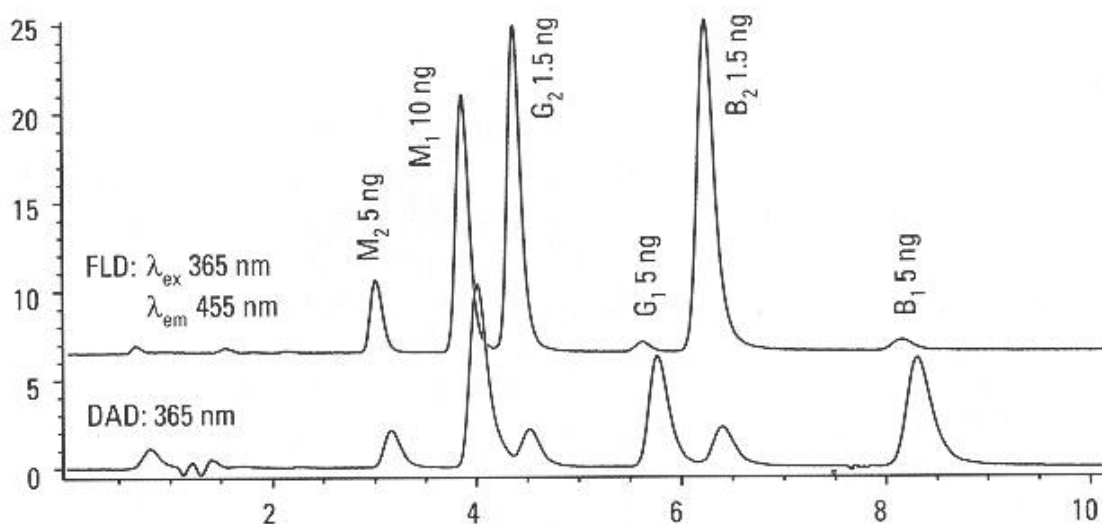
- UV-detektor (eng. „ultra violet“, UV) kada komponenta absorbuje u UV oblasti,
- Detektor sa nizom dioda (eng. „diode array detector“, DAD) kada komponenta absorbuje u UV oblasti,
- fluorescentni detektor (eng. „fluorescence detector“, FLD) ukoliko komponenta ima sposobnost da fluorescira,
- ELSD detektor (eng. „evaporative light-scattering“),
- maseni detektor (eng. „mass spectrometar“, MS),
- i drugi, a postoji mogućnost da se koristi i više detektora pri jednoj analizi.

Svi navedeni detektori, kao izlazni signal jedinjenja koje se određuje, daju pikove koji se zovu hromatogrami. Na osnovu površine pikova standarda različitih koncentracija formira se kalibraciona kriva iz koje se na osnovu površine pika određivanog jedinjenja izračuna njegova koncentracija u uzorku.

U analitici aflatoksina najveću primenu imaju FLD i maseni detektori. Za određivanje aflatoksina, može se koristiti i DAD detektor, ali on nema dovoljnu osetljivost da odredi aflatoksine u koncentracijama na nivou $\mu\text{g}/\text{kg}$, u kojima se oni najčešće javljaju kao kontaminanti hrane i hrane za životinje (Shepard i sar., 2012).

2.4.4.1. Fluorescentni detektor (FLD)

Fluorescentnim detektorom (FLD) mogu se detektovati komponente koje imaju sposobnost da fluoresciraju ili one koje se mogu prevesti u oblik koji može da fluorescira. FLD detektor odlikuje se i do 1000 puta većom osetljivošću od DAD detektora, jer koristi talasne dužine emisije (λ_{em}) i ekscitacije (λ_{ex}). Na Slici 2.16. prikazano je poređenje intenziteta signala različitih aflatoksina na DAD i FLD detektoru.

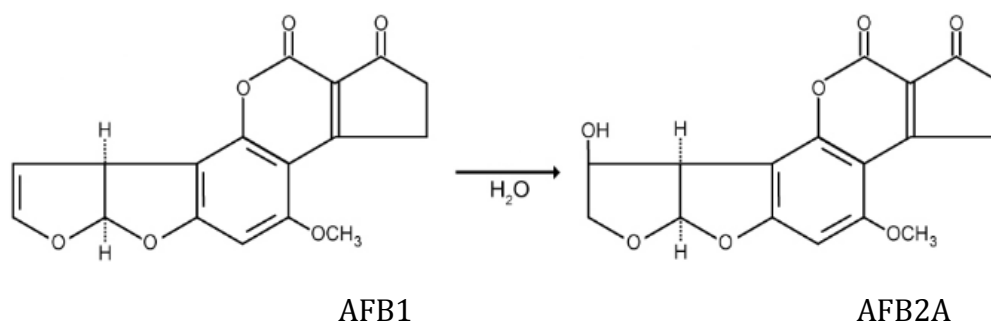


Slika 2.16. Poređenje hromatograma aflatoksina iz istog uzorka na FLD i DAD detektoru (Schuster i sar., 1993)

Fluorescencija je sposobnost supstanci sa specifičnim funkcionalnim grupama da eksituju (pobuđuju) pri kraćim talasnim dužinama i emituju zračenje na višim talasnim dužinama. Intenzitet fluorescencije zavisi od obe talasne dužine, λ_{em} i λ_{ex} , što omogućava selektivno otkrivanje nekih supstanci, jer ujedno suzbija emisije drugih supstanci. Pri izboru rastvarača za ekstrakciju ili mobilnu fazu, mora se voditi računa da oni ne ometaju fluorescenciju komponenti koje se određuju.

AFB2 i AFG2 pokazuju jaku prirodnu fluorescenciju, dok AFB1 i AFG1 slabije fluoresciraju i moraju biti derivatizovani pre detekcije na FLD detektoru. Za povećanje fluorescencije navedenih aflatoksina mogu se koristiti prekolonska (trifluorsirćetna kiselina, TFA) i poslekolonska derivatizacija (jodidi, bromidi, Kobra ćelija). U novije vreme, TFA najviše

se koristi za ovu svrhu. U prisustvu TFA, AFB1 prelazi u AFB2A (Slika 2.17.), dok AFG1 prelazi u AFG2A. Formirani AFB2A i AFG2A pokazuju znatno jaču fluorescenciju od polaznih jedinjenja. Do povećanja fluorescencije dolazi usled ubacivanja vode u furanski prsten AFB1 i AFG1 (Reiter i sar., 2009).



Slika 2.17. Hemijska derivatizacija AFB1 u AFB_{2A} u prisustvu TFA (Reiter i sar., 2009)

TFA se dodaje u uzorak nakon njegovog prečišćavanja i uparavanja. Prvo se doda n-heksan (100-200 μ l), kako bi se izdvojili aflatoksini sa zidova suda u kome je vršeno uparavanje, a zatim se doda TFA (100-200 μ l). Postupak derivatizacije najčešće traje 10 minuta i odvija se na temperaturi do 50 °C. Nakon derivatizacije, smeša n-heksana i TFA se upari i uzorak se rekonstituiše u mobilnoj fazi (Kok, 1994; Oliveira i sar., 2009).

Iako AFM1 ispoljava bolju fluorescenciju od AFB1 i AFG1, za određivanje AFM1 primenom HPLC-FLD metode takođe se u velikoj meri koristi TFA za derivatizaciju. U prisustvu TFA, AFM1 prelazi u AFM2A, a postupak derivatizacije isti je kao i kod AFB1 i AFG1 (Kok, 1994).

2.4.4.2. FLD sa UV light detektorom

Pored navedene hemijske derivatizacije aflatoksina sa TFA, poslednjih nekoliko godina sve više je zastupljena i fotohemijska derivatizacija primenom UV-light sistema. Navedeni sistem poveže se iza HPLC kolone, a ispred FLD detektora. Nakon razdvajanja aflatoksina na hromatografskoj koloni oni idu u UV-light sistem gde dolazi do fotohemijske derivatizacije na talasnoj dužini od 254 nm. AFB1 i AFG1 se derivatizuju u

AFB2A i AFG2A koji ispoljavaju jaču fluorescenciju, dok AFB2 i AFG2 izlase iz sistema nepromenjeni. Nakon derivatizacije, aflatoksini odlaze u FLD detektor.

Navedeni postupak derivatizacije, u poređenju sa hemijskom derivatizacijom sa TFA, ima nekoliko prednosti jer je pre svega smanjena upotreba štetnih hemikalija kao i vreme pripreme uzoraka, a ujedno je i ponovljivost rezultata na višem nivou (Muscarella i sar., 2009).

U Tabeli 2.11. iz literaturnih podataka prikazani su parametri odabranih metoda iz savremene literature za određivanje aflatoksina i AFM1 primenom tečne hromatografije visokih performansi.

Tabela 2.11. Literaturni primeri metoda tečne hromatografije visokih performansi za određivanje ukupnih aflatoksina i AFM1

Analit	Ekstrakcija	Priprema	Mobilna faza	λ_{ex}	λ_{em}	Derivatizacija	Izvor
AFB1 AFG1 AFB2 AFG2	MeOH/H ₂ O =70/30	IAC	MeOH/H ₂ O/ CH ₃ CN =17/70/17	363	440	TFA	Nilufer i sar., 2002.
	MeOH	SPE	CH ₃ CN/H ₂ O =50/50	365	418	TFA	Chun i sar., 2007
	MeOH/H ₂ O =70/30	IAC	MeOH/H ₂ O/ CH ₃ CN =60/20/20	360	440	TFA	Oliveira i sar., 2009
	MeOH/ CH ₃ CN/H ₂ O =51/9/40	OuEChERS	H ₂ O/MeOH/ CH ₃ CN =65/25/10	365	425	/	Sirhan i sar., 2011.
	H ₂ O/CH ₃ CN / MeOH =60/20/30	IAC	MeOH/H ₂ O =87,5/37,5 5 g NaCl	360	430	Kobra ćelija	Hepsag i sar., 2014.
AFM1	/	SPE	MeOH/H ₂ O/ CH ₃ CN =50/20/30	365	450	/	Kim i sar., 2000.
	/	IAC	H ₂ O/ CH ₃ CN =80/20	365	450	TFA	Lee i sar., 2009.
	/	IAC	MeOH/ 2%CH ₃ COOH/ CH ₃ CN =25/40/35	360	430	TFA	Shundo i sar., 2009.
	/	Oasis HLB kertridž	H ₂ O/CH ₃ CN =25/75	365	435	/	Wang i sar., 2012.
	/	IAC	H ₂ O/CH ₃ CN =25/75	365	435	/	Malisiova, 2013.

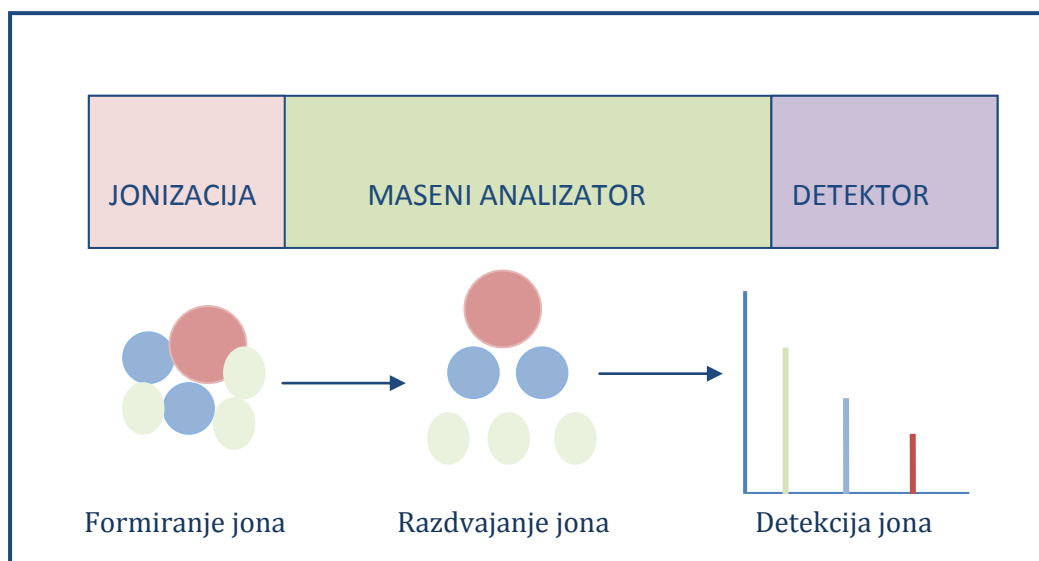
2.4.4.3. Maseni spektrometar

Masena spektrometrija (eng. “mass spectrometry”, MS) je savremena instrumentalna tehnika koja ima veliku primenu usled svojih višestrukih mogućnosti. Upotrebom sprege masene spektrometrije sa tačnom hromatografijom (LC-MS) može se analizirati veliki broj različitih jedinjenja rastvorenih u tečnosti. Bez obzira koji uzorak se analizira masena spektrometrija najčešće se koristi za:

- identifikaciju i kvantifikaciju poznatih jedinjenja,
- identifikaciju nepoznatih jedinjenja,
- upoznavanje hemijske strukture i osobina različitih jedinjenja.

Princip rada masenog spektrometra zasniva se na razdvajanju jonizovanih atoma ili molekula u vakuumu na osnovu razlike mase prema naelektrisanju (m/z). Joni se stvaraju izazivanjem gubitka ili dobitka naelektrisanja neutralnoj vrsti.

Šematski prikaz osnovnog principa masene spektrometrije prikazan je na Slici 2.18.



Slika 2.18. Princip masene spektroskopije

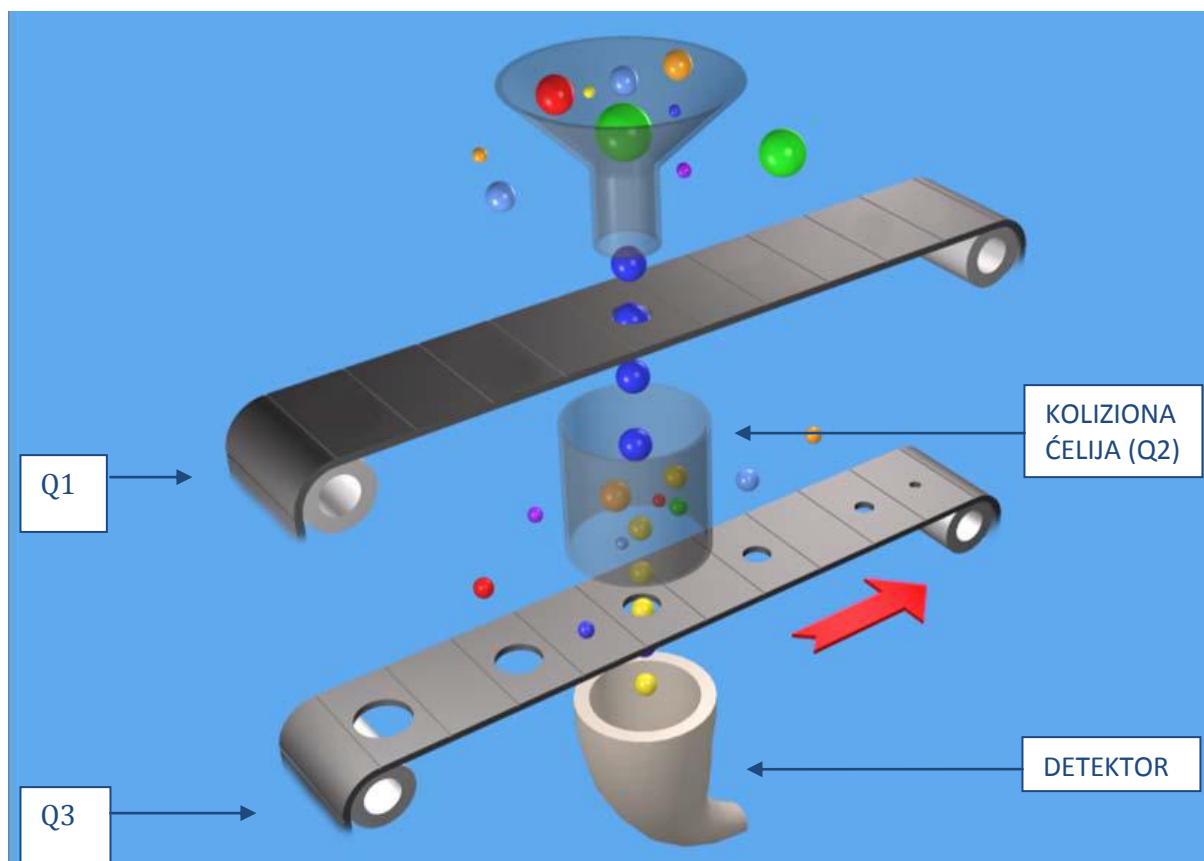
Četiri osnovne komponente masenog spektrometra su: sistem za unošenje uzorka, jonski izvor, maseni analizator i jonski detektor. Uzorak se unosi u jonski izvor direktno ili nakon hromatografskog razdvajanja, i molekuli se zatim u jonskom izvoru pretvaraju u jone. Joni se tada razdvajaju prema njihovom m/z odnosu u masenom analizatoru nakon čega detektor pretvara jonsku energiju u signal (maseni spektar) koji sadrži informaciju o m/z vrednosti, zajedno sa njihovim intezitetom (Ardrey, 2003).

Do danas je otkriven veliki broj tipova jonizacije, sa stalnim inovacijama u postojećim i otkrivanju novih jonizacija. Koji tip jonizacije će biti odabran zavisi od nekoliko faktora, od kojih su najbitniji dostupnost uređaja i tipa jonizacije kao i polarnost određivanog analita, molekulske mase, termičke stabilnosti ispitivanog jedinjenja i od sastava uzorka.

Najveću primenu pri analizi aflatoksina ima elektron sprej jonizacija (eng. „electrospray ionization”, ESI). ESI predstavlja tzv. „meku” jonizacionu tehniku, koja daje protonovani molekularni jon $[M+H]^+$ u pozitivnoj jonizaciji odnosno deprotonovani molekularni jon $[M-H]^-$ u negativnoj jonizaciji, ili adukt jone sa natrijumom, amonijakom ili acetatom. ESI je pogodna za polarna jedinjenja sa molekularskom masom od 100 do 100000 Da (Ardrey, 2003).

Različiti tipovi analizatora se razlikuju prema principu rada, opsegu razdvajanja m/z , preciznosti, rezoluciji, brzini spektralne akvizicije, osetljivosti i dr. Za analizu aflatoksina najčešće se koriste tečni hromatografi sa tri masena analizatora (eng. „triple quadrupole”, LC-MS/MS), čiji je osnovni princip rada prikazan na Slici 2.20. Uzorkak se jonizuje u eksternom u jonizacionom izvoru. Loptice različite boje reprezentuju jone sa različom m/z vrednošću. Kvadrupolni maseni analizatori predstavljeni su kao pokretni kaiševi, koji propuštaju jone samo određene veličine. Nakon jonizacije formirani joni bivaju nošeni do masenog analizatora (masenog filtra, Q1) koji kontroliše kretanje jona i usmerava samo određene prekursor jone ka kolizionoj ćeliji. Koliziona ćelija se smatra drugim kvadrupolom (maseni filter, Q2) koji je najčešće ispunjen nekim inertnim gasom, azotom ili argonom. U kolizionoj ćeliji pod

određenim naponom i u prisustvu inertnog gasa dolazi do fragmentacije i formiranja produkt jona, koji naponom kolizione ćelije bivaju dalje usmereni ka trećem masenom filtru, Q3. Treći maseni analizator propušta samo definisane produkt jone koji se dalje usmeravaju na detektor (Agilent, Concept Guide, 2007).



Slika 2.20. Princip rada kvadrupolnog masenog analizatora (eng. „Triple quadrupole”)

Kvadrupolni tip analizatora ima određene prednosti i mane. Prednosti kvadrupolnog sistema su niska cena u odnosu na druge masene analizatore, mogućnost upotrebe za kvalitativnu i kvantitativnu analizu, sa mogućnošću povećanja osetljivosti u SIM modu (eng. “selected ion monitoring”). Njihov nedostatak je što propuštaju do detektora samo odabrane jone sa određenom m/z vrednosti, dok joni sa različitim odnosom m/z bivaju izgubljeni. Zbog toga se uglavnom upotrebljavaju za ciljane

analize (Vuković, 2012). Pored toga, povećanje ili smanjenje inteziteta signala analita, kao posledica uticaja uzorka-matriksa je glavni problem za LC-MS/MS metode. Iako tačan mehanizam povećanja/smanjenja signala pod uticajem matriksa nije poznat, pretpostavlja se da komponente matriksa utiču na efektivnost jonizacionog procesa, uzrokujući uzajamno pozitivne ili negativne efekte na količinu formiranih jona analita (Hajšlová i Zrostlíková, 2003). Faktori koji mogu negativno uticati na jonizaciju analita su količina komponenata matriksa u injektovanom uzorku, ili korišćenje kolone koja ne omogućava zadovoljavajuće razdvajanje analita od komponenata uzorka. Prema Matuszevski i sar. (1998) izračunavanje matriks efekta zasniva se na injektovanju dve serije standarda. Prva serija sastoji se od standarda odredivanog analita rastvorenih u rastvaraču ili mobilnoj fazi (eng. „solvent calibration curve”, SC). Druga serija sastoji se od uzoraka za koje je prethodno utvrđeno da ne sadrže odredivani analit, u koje je nakon postupka ekstrakcije i prečišćavanja dodat standard (eng. „matrix matched calibration”, MMC). Koncentracije odredivanog analita u seriji MMC moraju da odgovaraju standardima iz serije SC. Iz standarda obe serije formiraju se kalibracione krive, a matriks efekat računa se kao odnos nagiba jednačina prava dve kalibracione krive. Uticaj matriksa na suzbijanje ili na povećanje signala analita (eng. „signal suppression and enhancment”, SSE) izračunava se kao:

$$\text{SSE (\%)} = 100 \times \text{nagib}_{\text{MMC}}/\text{nagib}_{\text{SC}}$$

Ako je uticaj matriksa (SSE) jednak 100%, onda se kaže da ne postoji uticaj matriksa. Ako je %SSE<100, onda postoji supresija jonizacionog procesa dok vrednost %SSE>100 ukazuje da postoji pojačavanje jonizacionog procesa (Arroyo-Manzanares i sar., 2013). Na osnovu postojećih regulativa i literature, trenutno ne postoji ona koja propisuje dozvoljen uticaj matriksa na analitički signal. Frenich i sar., (2011) ustanovili su da se odstupanje od ±20% smatra prihvatljivim odstupanjem.

U literaturnim navodima novijeg datuma objavljeno je nekoliko metoda za odredivanje aflatoksina pomoću LC-MS/MS metoda, i neke od njih su prikazane u Tabeli 2.12.

Tabela 2.12. Literaturni primeri LC-MS/MS metoda za određivanje aflatoksina

Uzorak	Određivani mikotoksini	Masa uzorka (g)	Ekstrakcija	Mobilna faza	Autori
Kukuruz, pšenica	AFS i još 35 drugih mikotoksina	0,5	2 ml CH ₃ CN/H ₂ O/ CH ₃ COOH =79/20/1 mešanje 90 min, centrifuga, filtriranje	MeOH/H ₂ O/HCOOH -gradijent	Sulyok i sar., 2006.
Žitarice	AFS i još 12 drugih mikotoksina	5	10 ml H ₂ O/10 ml 0,5% HCOOH u MeOH/CH ₃ CN (1/1) QuEChERS	0,15% HCOOH +10mM NH ₄ HCOO/0,05% HCOOH u MeOH	Desmarchelier i sar., 2010.
Začini	AFS, boje i pesticidi	1	10 ml CH ₃ CN mešanje 30 min/ultrazvuk 30 min/centrifuga/ filtriranje	H ₂ O/MeOH/5mM NH ₄ HCOO-gradijent	Ferrer i sar., 2010.
Proizvodi od žitarica	AFS, OTA, FUMs, DON, ZEA, T-2, HT-2	10	50ml PBS/mešanje 60 min; 15 ml PBS ekstrakta + 35 ml MeOH/mešanje 60 min/filtriranje IAC -AOFZDT2™	MeOH/H ₂ O=40/60 gradijent sa dodatkom 1mM NH ₄ CH ₃ OO 0,5% CH ₃ COOH	Lattanzio i sar., 2011.
Kukuruz, sušene žitarice	AFS	5	25 ml MeOH/H ₂ O=80/20m ešanje 15 min/centrifuga/ Filtriranje SPE-AflaCLEAN	H ₂ O/CH ₃ CN- gradijent Sa 0,1 % HCOOH	McDaniel i sar., 2011.
Žitarice	AFS, OTA, FUMs, DON, ZEA, T-2, HT-2	10	40 ml CH ₃ CN/H ₂ O/ CH ₃ COOH =79/20/1 mešanje 60 min, centrifuga, filtriranje	CH ₃ CN/H ₂ O/CH ₃ CO OH=20/79/1	Soleimany i sar., 2012.
Mleko	AFM1	20	50 ml CH ₃ CN/vortex 1 min/ultrazvuk 15 min	5mM NH ₄ HCOO/MeOH= 60/40	Wang i sar., 2011.
Mleko	AFM1	2	8 ml CH ₃ CN/vortex 2 min/ultrazvuk 8 min/centifuga Oasis-HLB kertridž	MeOH/H ₂ O gradient	Huang i sar., 2014.

Prikazane metode (Tabela 2.12.) međusobno se razlikuju u zavisnosti od uzorka koji se analizira, načina ekstrakcije i prečišćavanja uzorka kao i od toga da li se analiziraju samo aflatoksini ili se pored njih određuju i drugi mikotoksini. Ono što je zajedničko za sve navedene metode je da se za određivanje polarnih aflatoksina LC-MS/MS metodom koristi elektron sprej jonizacija (ESI) koja dovodi do pozitivne jonizacije aflatoksina. Pri pozitivnoj jonizaciji, za molekule aflatoksina vezuje se jedan proton (atom vodonika) pri čemu im se molekulska masa povećava za jednu jedinicu. Formirani joni nazivaju se prekursor joni. Bez obzira koja LC-MS/MS metoda se koristi za analizu aflatoksina, za maksimalnu fragmentaciju prekursor jona i formiranje produkt jona, potrebno je optimizovati uslove kolizione energije (eng. „collision energy“, CE) i napona fragmentacije (eng. „fragmentation voltage“, FV). Poželjno je da se dobiju bar dva produkt jona, od kojih će jon sa pikom veće površine služiti za kvantifikaciju analita (eng. „quantifier“), a jon manje površine za kvalitativnu potvrdu (eng. „qualifier“).

2.4.5. Validacija metoda

Savremena analitička praksa podrazumeva validaciju svake primenjene metode. Pod validacijom se podrazumeva proces kojim se utvrđuje da li karakteristike izvođenja analitičkog postupka odgovaraju zahtevima nameravanih analitičkih primena (Pappa, 2005). Cilj analitičkog merenja je dobijanje konzistentnih, pouzdanih i tačnih podataka, a validovan analitički metod igra glavnu ulogu u postizanju navedenog cilja (Bursić, 2011).

Na nivou Evropske Unije propisana je Reglativa (EC/657/2002) o pravilima validacije za skrining (ELISA) i konfirmatorne metode (HPLC) za određivanje aflatoksina i drugih pravilnicima regulisanih mikotoksina. Dobijeni parametri validacije treba da budu u skladu sa vrednostima propisanim Reglativom Evropske Unije (EC/401/2006) kao i Tehničkim izveštajem za validaciju i izvođenje metoda za

analizu mikotoksina (European Committee for standardization, Technical Report, CEN/TR 16059, 2010).

Prema navedenim regulativima potrebno je da se odrede sledeći parametric validacije:

- *Granica detekcije, odnosno limit detekcije* (eng. "limit of detection, LOD), koji se definiše kao najmanja koncentracija koja može biti određena-detektovana sa odgovarajućim nivoom poverenja.
- *Granica kvantifikacije, odnosno limit kvantifikacije* (eng. "limit of quantification, LOQ), koji se definiše kao najmanja koncentracija koja može biti kvantifikovana sa prihvatljivom preciznošću i tačnošću.
- *Linearnost*, odnosno sponosnost analitičkog postupka da obezbedi lineranu zavisnost (korelaciju), unutar ispitivanog opsega, između koncentracije (mase) i odgovora detektora. Koeficijent determinacije $R^2 > 0,99$ ukazuje na dobru linearnost.
- *Tačnost* analitičkog postupka izražava bliskost slaganja između vrednosti koja je prihvaćena ili referentna i pronađene vrednosti. Izražava se kao recovery (%). U analitici mikotoksina, predviđeno je da se recovery određuje na osnovu analize sertifikovanog referentnog materijala (CRM). Ukoliko CRM nije dostupan tačnost analitičkog postupka može se odrediti analizom spajkovanog uzorka, tj. uzorka u koji je u poznatoj koncentraciji dodat standard određivanog analita.
- *Ponovljivost* se definiše kao sposobnost istog izvršioca da pod istim uslovima analize istog uzorka u više ponavljanja dobije rezultate čija razlika mora biti u definisanim granicama. Izražava se preko relativne standardne devijacije, RSD_r ;
- *Reproduktivnost* se definiše kao sposobnost istog ili različitih izvršioca da pri istim ili promenljivim uslovima analize istog uzorka u više ponavljanja dobije rezultate čija razlika mora biti u definisanim granicama. Izražava se preko relativne standardne devijacije, RSD_R .
- *Specifičnost* metode određuje se različito u zavisnosti od primenjene metode. Specifičnost ELISA metode zasniva se na postojanju specifičnih antitetla kojima

se mogu određivati samo željeni analiti. Specifičnost hromatografskih metoda utvrđuje se identifikacijom analita na osnovu upoređivanja njegovog spektra i retencionog vremena sa istim identifikacionim karakteristikama kao i odgovarajući standardni rastvor analita. Pored toga, specifičnost LC-MS/MS metode utvrđuje se i identifikacijom određivanog analita na osnovu prekursor i produkt jona. Kod hromatografskih metoda retenciono vreme standarda i određivanog analita ne sme se razlikovati više od 2,5%.

Dobijeni parametri validacije pri analizi aflatoksina moraju zadovoljiti kriterijume propisane evropskom Regulativom za pravilno izvođenje analitičkih metoda za određivanje mikotoksina (EC/657/2002) kao i tehničkim izveštajem za validaciju i izvođenje metoda za analizu mikotoksina (CEN/TR 16059, 2010). Navedeni kriterijum prikazani su u Tabelama 2.13 i 2.14.

Tabela 2.13. Propisane vrednosti za parametre validacije prema European Commission, 657/2002

Kriterijum	Koncentracioni opseg ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Preporučena vrednost (%)
Recovery	< 1,0	50-120
	1-10	70-110
	> 10	80-110
RSD_R	Izračunata iz Horwitz-ove jednačine	Maksimalna vrednost: 2 x vrednost dobijena iz Horwitz-ove jednačine
RSD_r	$\text{RSD}_r = \text{RSD}_R \times 0,66$	

RSD_r -relativna standardna devijacija u uslovima ponovljivosti;

RSD_R -relativna standardna devijacija u uslovima reproduktivnosti.

Tabela 2.14 Propisane vrednosti za neke parametre validacije prema tehničkom izveštaju (CEN/TR 16059)

Kriterijum	Koncentracioni opseg ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Preporučena vrednost
LOQ	≥ 100	MDK x 1/5
	< 100	MDK x 2
Recovery	$\leq 1,0$	50-120%
	1-10	50-120%
	≥ 10	50-120%
RSD _r	$\leq 1,0$	$\leq 30\%$
	1-10	$\leq 25\%$
	10-100	$\leq 20\%$
	≥ 100	$\leq 15\%$
RSD _R	$\leq 1,0$	$\leq 60\%$
	1-10	$\leq 50\%$
	10-100	$\leq 35\%$
	≥ 100	$\leq 30\%$
RSD _{RHorwitz}	$\leq 1,0$	$\leq 45\%$
	1-10	$\leq 36\%$
	10-100	$\leq 25\%$
	≥ 100	$\leq 22\%$

LOQ-limit kvantifikacije;

RSD_r-relativna standardna devijacija u uslovima ponovljivosti;

RSD_R-relativna standardna devijacija u uslovima reproduktivnosti;

RSD_{RHorwitz}-relativna standardna devijacija u uslovima reproduktivnosti izračunata pomoću Horwitz-ove formule.

3. Cilj rada

Podaci objavljeni od strane EFSA (European Food Safety Authority, 2013) ukazuju na učestaliju i sve veću pojavu aflatoksina. Poslednjih godina, pojava aflatoksina uslovljava je razvoj čitavog niza bolesti, koje su neretko poprimale oblik epidemije i dovele do smrti, kako ljudi tako i životinja (Azziz-Baumgartner i sar., 2005; Muthomi i sar., 2009). Dostupna naučna literatura ukazuje da je tokom prethodnih godina zabeležena pojava klimatskih promena koje su pokazale veliki uticaj na pojavu aflatoksina (Abbas i sar., 2002; Cotty i sar., 2011; Wu i sar., 2011). Usled toga, u mnogim zemljama sveta postoji stalna težnja za otkrivanjem uzročnika njihove pojave, uz velika ulaganja u prevenciju, redovnu kontrolu, smanjenje rizika i edukaciju.

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije iniciran je činjenicom da je neophodno početi kontinuirano pratiti pojavu aflatoksina u Republici Srbiji. Kao sirovina za ispitivanje odabran je kukuruz, jer predstavlja jednu od najzastupljenijih žitarica u Srbiji sa prosečnom godišnjom proizvodnjom od oko šest miliona tona, od čega je oko trećina namenjena za izvoz (Maslac, 2012). Navedena činjenica dodatno povećava potrebu za istraživanjem, jer pojava aflatoksina u velikoj meri utiče i na kvalitet kukuruza, kao i smanjenje prinosa i ekonomskog profita zemlje. Ispitivanja će objediniti četvorogodišnje rezultate u okviru kojih će biti sagledani klimatski uslovi,

kao faktori sa najvećim uticajem na pojavu aflatoksina (Abbas i sar., 2002; Cotty i sar., 2011).

S obzirom da se najveća količina proizvedenog kukuruza (80-90%) (Maslac, 2011; Maslac, 2012) u Srbiji iskoristi za ishranu životinja, odlučeno je da se u ovoj doktorskoj disertaciji ispita i pojava AFM1 u mleku, u godini u kojoj je došlo do pojave aflatoksina u kukuruzu. Cilj da se ispita mleko proistekao je iz činjenice da ono usled velike frekventnosti u ishrani predstavlja namirnicu sa najvećim potencijalnim rizikom za unos aflatoksina u organizam ljudi (Erkekoglu i sar., 2008). Iz tog razloga, proceniće se i rizik unosa AFM1 iz mleka. Kako za Srbiju ne postoje zvanični podaci o prosečnom unosu mleka, ovi podaci biće obezbeđeni kroz formiranu anketu koja će obuhvatiti 1500 ljudi različitog pola i starosnih grupa.

Dobijena baza podataka, pored nacionalnog, imaće i međunarodni značaj jer će doprineti povećanju svetskih baza u kojima je do sada bilo veoma malo podataka iz ovog dela Evrope.

Drugi segment istraživanja obuhvatiće ispitivanja u vezi sa primenom različitih metoda određivanja aflatoksina u prirodno kontaminiranim uzorcima kukuruza i mleka. Analiza prisustva aflatoksina B1 (AFB1), kao i ukupnih aflatoksina u kukuruzu biće sprovedena primenom ELISA metoda i tačne hromatografije visokih performansi sa različitim detektorima (HPLC-FLD, HPLC-UV light-FLD, LC/MS-MS). U okviru primene tečnehromatografskih metoda ispitaće se i različiti postupci pripreme uzoraka. ELISA, HPLC-FLD, i LC/MS-MS metode primeniće se sa ciljem određivanja AFM1 u mleku. ELISA metode biće validovane i primenjene prema uputstvu proizvođača test kitova, dok će hromatografske metode biti razvijene, optimizovane i validovane u skladu sa definisanim smernicama evropske Regulative (European Commission, 401/2006).

Dobijena saznanja, u ovoj doktorskoj disertaciji, omogućiće da se stekne uvid u performanse primenjenih metoda i da se poređenjem performansi i rezultata dobijenih nakon analize realnih uzoraka ukaže na mogućnost primene navedenih metoda za analizu aflatoksina.

4. Materijal i metodi

Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je u Naučnom institutu za prehrambene tehnologije u Novom Sadu (FINS).

4.1. Ispitivani uzorci

U ovoj doktorskoj disertaciji odabrani uzorci za ispitivanje su:

- Kukuruz;
- Mleko.

4.1.1. Kukuruz

Za analizu pojave ukupnih aflatoksina (AFB1, AFB2, AFG1 i AFG2) korišćeni su uzorci kukuruza koji su sakupljeni nakon žetvi u periodu od 2009. do 2012. godine. Svi uzorci kukuruza sakupljeni su na teritoriji Autonomne Pokrajine Vojvodine.

Primenom ELISA metode, nakon žetve, svake godine analizirano je po 100 uzoraka kukuruza. S obzirom da je u uzorcima iz 2012. godine utvrđeno prisustvo aflatoksina, tokom navedene godine analizirano je ukupno 700 uzoraka kukuruza. Po 100 uzoraka kukuruza uzorkovano je i analizirano iz različitih skladišta svaki mesec u periodu od sedam meseci (od oktobra 2012. do aprila 2013. godine). Broj analiziranih uzoraka kukuruza po godinama prikazan je u Tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Broj analiziranih uzoraka kukuruza na prisustvo ukupnih aflatoksina po proizvodnim godinama

Metoda određivanja	Proizvodna godina	Broj uzoraka
ELISA	2009	100
	2010	100
	2011	100
	2012	700

700 uzoraka kukuruza analizirano je sa ciljem da se ispita pojava aflatoksina u kukuruzu iz 2012. godine kao i da se stekne uvid da li tokom skladištenja dolazi do promena u nivou kontaminacije ovih mikotoksina.

Za ispitivanje različite metodologije određivanja aflatoksina u kukuruzu, od prirodno kontaminiranih uzoraka iz 2012. godine, odabrano je 30 uzoraka. Uzorci su podeljene u tri grupe na osnovu detektovanih koncentracija aflatoksina: 1-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, između 10-50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i više od 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. U Tabeli 4.2. prikazan je ukupan broj analiziranih uzoraka prirodno kontaminiranih kukuruza, kao i broj analiziranih uzoraka kukuruza unutar različitog koncentracionog opsega aflatoksina.

Tabela 4.2. Broj analiziranih uzoraka kukuruza po svakom postupku pripreme uzoraka i metodi određivanja

Ukupan broj uzoraka	Broj uzoraka	Koncentracioni opseg ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
30	10	1-10
	10	10-50
	10	> 50

Odabranih 30 uzoraka kukuruza analizirano je različitim postupcima pripreme uzoraka kao i različitim metodama određivanja aflatoksina. Primenjeni različiti postupci pripreme uzoraka kukuruza kao i različite metode određivanja aflatoksina u prirodno kontaminiranim uzorcima kukuruza prikazani su u Tabeli 4.3.

Tabela 4.3. Metode određivanja i postupci pripreme uzoraka kukuruza za određivanje aflatoksina

Metoda određivanja	Postupak pripreme uzoraka
ELISA	Ekstrakcija
HPLC/FLD	MycoSep kolone Imunoafinitetne kolone
HPLC/FLD/UV light	MycoSep kolone Imunoafinitetne kolone
LC-MS/MS	MycoSep kolone Imunoafinitetne kolone QuEChERS Ekstrakcija

Radi smanjenja uticaja neravnomerne raspodele aflatoksina unutar prirodno kontaminiranih uzoraka na rezultat, svaki od 30 odabranih uzoraka je pre analize homogenizovan. Masa svakog uzorka iznosila je 500 g.

Sa ciljem ispitivanja raspodele aflatoksina i toksikoprodukujućih plesni unutar veće količine skladištenog kukuruza izvedena su i mikotoksikološka ispitivanja, koja su obuhvatila određivanje ukupnog broja plesni (UBP) i determinaciju plesni *Aspergillus flavus*. Uzorci kukuruza sakupljeni su iz četiri skladišta. Iz svakog skladišta, pri eleviranju kukuruza, uzeto je osam pojedinačnih uzoraka, po principu jedan uzorak na svakih 100 kg. U svakom pojedinačnom uzorku određen je ukupan broj formiranih kolonija (eng. "colony forming unit", cfu) za UBP i *A. flavus*, kao i sadržaj aflatoksina. Sadržaj aflatoksina određen je primenom HPLC-FLD metode, a uzorci su prečišćeni primenom MycoSep kolona.

4.1.2. Mleko

Za analizu pojave, procenu rizika i ispitivanje različitih metoda određivanja AFM1 korišćeni su uzorci kravljeg mleka. Uzorci su prikupljeni od najvećih proizvođača mleka u Srbiji, sa farmi, kao i iz malih pogona za preradu mleka. Za analizu pojave AFM1 primenom ELISA metode analizirano je 200 uzoraka mleka. Kategorije i broj analiziranih uzoraka kravljeg mleka prikazani su u Tabeli 4.4. Uzorci mleka od velikih proizvođača obuhvatili su sve zastupljene kategorije mleka na tržištu: sa udelom mlečne masti od 0,5 do 3,8 %, bez laktoze, obogaćene vitaminima i mleka za kafu.

Tabela 4.4. Kategorije i broj analiziranih uzoraka kravljeg mleka

Proizvođač	Kategorija	Broj uzoraka
Veliki	UHT	96
	Pasterizovano	37
	Organsko	8
Mali	Pasterizovano	19
Farma	Sveže	40

UHT: (eng. "ultra high temperature")

Nakon analize pojave AFM1 primenom ELISA metode i obrade rezultata, odabrano je 15 prirodno kontaminiranih uzoraka mleka. Uzorci mleka su na osnovu detektovanih koncentracija AFM1 podeljeni u tri grupe: < 0,10 µg/kg, između 0,10-0,40 µg/kg i više od 0,40 µg/kg. U Tabeli 4.5. prikazan je ukupan broj analiziranih uzoraka prirodno kontaminiranih mleka, kao i broj analiziranih uzoraka mleka sa različitim nivoima koncentracija AFM1. Uzorci mleka analizirani su u dva ponavljanja.

Tabela 4.5. Broj analiziranih uzoraka mleka po svakom postupku pripreme uzoraka i metodi određivanja

Ukupan broj uzoraka	Broj uzoraka	Koncentracioni opseg (µg/kg)
15	5	< 0,10
	5	0,10-0,40
	5	>0,40

U odabраних 15 uzoraka mleka, prisustvo AFM1 analizirano je primenom tri različite metode. Primenjeni postupak pripreme uzoraka mleka kao i metode određivanja AFM1 prikazane su u Tabeli 4.6.

Tabela 4.6. Primenjene metode određivanja AFM1 i postupci pripreme uzoraka mleka

Metoda određivanja	Postupak pripreme uzoraka
ELISA	Centrifugiranje
HPLC/FLD	Imunoafinitetne kolone
LC-MS/MS	Imunoafinitetne kolone

4.2. Hemikalije i reagensi

Spisak hemikalija i rastvora koji su korišćeni tokom izvođenja eksperimentalnog dela istraživanja dati su u nastavku.

ELISA test kitovi:

- Quantitative Aflatoxin High Sensitivity Test (# 8031) Neogen Veratox® (Lansing, SAD);
- Aflatoxin Quantitative Test kit (# 8030) Neogen Veratox® (Lansing, SAD);
- Tecna S.r.l. Celer B1 (code MA220/MA221, Trst, Italija);
- Tecna S.r.l. I'screen AFLA M1 (code MA418/MA419, Trst, Italija);

Standardi aflatoksina:

- Aflatoksin B1 (čistoće > 99,9%), Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemačka);
- Aflatoksin G1 (čistoće > 99,9%), Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemačka);
- Smeša ukupnih aflatoksina B1, B2, G1, G2 (čistoće > 99,9%), Supelco (Bellefonte, PA, SAD);
- Aflatoksin M1 (čistoće > 98,5%), Supelco (Bellefonte, PA, SAD).

Sertifikovani referentni materijali:

- Prirodno kontaminirani kukuruz, Trilogy® Reference Material A-C-268 (Vašington, SAD);
- Prirodno kontaminirani kukuruz, Progetto Trieste MI1140-2/CM, MI1240-1/CM (Test Veritas, Padova, Italija);
- Prirodno kontaminirano mleko, Progetto Trieste MI1142-1/CM (Test Veritas, Padova, Italija).

Hemikalije:

- Acetonitril (CH_3CN , HPLC čistoće), Merck (Nemačka);
- Amonijum Formijat (NH_4HCOO , LC-MS/MS čistoće), Fluka Analytical (Sigma-Aldrich, SAD);
- Fosfatni puffer (eng. "phosphate buffered saline", PBS: u 1 l vode rastvoreno je 8,01 g NaCl, 0,20 g KCl, 1,78 g Na_2HPO_4 (x 2H₂O) i 0,27 g KH_2PO_4);
- Heksan, Merck (Germany);
- Imunoafinitetne kolone za Aflatoksin M1, AFlaStar™ M1 R-Immunoaffinity Columns, Romer, Romer Labs Inc. (Union, SAD);
- Imunoafinitetne kolone za ukupne aflatoksine, Afla-Ota CLEAN™, LCTech GmbH (Dorfen, Nemačka);
- Kalijum hlorid (KCl, p.a. čistoće), Merck (Nemačka);
- Kalijumdihidrofosfat (KH_2PO_4 , p.a. čistoće), Centrohem (Srbija);
- Metanol (MeOH, HPLC čistoće), J.T.Backer (SAD);
- Metanol (MeOH, LC-MS/MS čistoće), J.T.Backer (Holandija);
- Metanol (MeOH, p.a. čistoće), Zorka Pharma (Srbija);
- Mravlja kiselina (HCOOH , HPLC čistoće), Sigma-Aldrich (Nemačka);
- MycoSep® 224 AflaZon kolone, Multifunctional Columns, Romer Labs Inc (Union, MO, SAD);

- Natrijum dihidrogen fosfat-2 hidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, p.a. čistoće), J.T.Backer, (Danska);
- Natrijum hlorid (NaCl , p.a. čistoće), J.T.Backer (Danska);
- QuEChERS European Standard EN Kits, sadrži smešu soli za ekstrakciju p/n 5982-5650 (4 g anhidrovanog MgSO_4 , 1 g NaCl , 1 g natrijum citrat, 0,5 g dinatrijum citrat seskvihidrat) i tubu za čvrsto-faznu ekstrakciju p/n 5982-5056 (900 mg anhidrovanog MgSO_4 i kombinaciju primarnih sekundarnih amina, PSA), Agilent Technologies, Inc. (Wilmington, DE, SAD);
- Trifluorsirćetna kiselina (TFA, HPLC čistoće), Thermo Fisher Scientific (Engleska);
- Ultračista voda.

Standardni zbirni rastvor aflatoksina. Od osnovnog rastvora koncentracije 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (AFB1 i AFB2) i 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (AFB2 i AFG2) napravljeni su radni rastvori. Postupak je izveden razblaživanjem odgovarajuće zapremine standardnog rastvora sa metanolom. Ovakvi rastvori korišćeni su za razvoj i optimizaciju hromatografskih metoda, kao i validaciju ELISA i hromatografskih metoda. Rastvori su čuvani na $-10\text{ }^\circ\text{C}$ u mraku.

Standardni rastvor AFM1. Od osnovnog rastvora koncentracije 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ napravljeni su radni rastvori. Postupak je izveden razblaživanjem odgovarajuće zapremine standardnog rastvora sa acetonitrilom. Ovakvi rastvori korišćeni su za razvoj i optimizaciju hromatografskih metoda kao i validaciju ELISA i hromatografskih metoda. Rastvori su čuvani na $-10\text{ }^\circ\text{C}$ u mraku.

MMC (eng. matrix-matched standards) standardi. Radi ispitivanja uticaja matriksa na dobijeni rezultat korišćeni su MMC standardi ukupnih aflatoksina (AFB1, AFB2, AFG1 i AFG2) i AFM1. MMC standardi pripremani su na sledeći način: odgovarajući koncentracioni opseg standardnog rastvora ili standardnog zbirnog rastvora dodat je u poslednjem delu procedure pripreme uzoraka prilikom rekonstituisanja uzorka, tj. nakon uparavanja. Za pripremu MMC standarda korišćeni

su uzorci kukuruza i mleka, za koje je prethodno utvrđeno da nisu kontaminirani aflatoksinima, odnosno AFM1.

4.3. Oprema

Tokom izvođenja eksperimentalnog dela istraživanja korišćena je sledeća oprema:

- Analitička vaga (Mettler Toledo, Columbus, SAD);
- Automatske pipete: 10-10 000 μ l (Eppendorf, Hamburg, Nemačka);
- Bočice za autosampler, 2 ml vijalice (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD);
- Centrifuga (Tehtnica, Jugoslavija);
- ELISA čitač (Thermolabsystem, Thermo, Finska);
- Filter papir, Whatman No. 1 (Whatman International Ltd., Maidstone, UK);
- Igle (Romed®, Holandija);
- Kolone: Zorbax XDB C18 (50 × 4,6 mm; 1,8 μ m), (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD);
- Membranski filteri-regenerisana celuloza, prečnika 25 μ m (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD);
- Mlin za mlevenje uzoraka kukuruza, Knifetec™ 1095 (Foss, Hoganas, Sweden);
- Plastični špricevi od 2 ml, Chirana T. Injecta, a.s. (Stara Tura, Slovačka);
- Prikupljanje i obrada podataka: Agilent Mass Hunter Data Acquisition, verzija B.03.01, (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD), Design-Expert 7.0.0. (Stat-Ease, Minneapolis, SAD).
- Sistem za prečišćavanje vode Simplicity UV (Millipore, Bedford, SAD);
- Sistem za uparavanje u struji azota ili vazduha, Reacti-Therm modul (Thermo-Scientific, SAD);

- Tečni hromatograf Agilent 1200 sa sledećim detektorima: DAD 1200, FLD 1200, i maseni 6410B Triple Quad (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD);
- Tehnička vaga (Mettler Toledo, Columbus, SAD);
- Uređaj za fotohemijsku postkolonsku derivatizaciju (eng., “Photochemical Post Column Derivatizer”), UV light, UVC 254 nm (UVE LCTech GmbH, Dorfen, Nemačka);
- Uređaj za mućkanje uzoraka, Griffin šejker (Griffin and George, Wembley, England);
- Vakuum manifold za SPE (Supelco Analytical, Bellefonte, PA, SAD);
- Vorteks uređaj (BOECO, Nemačka).

4.4. Određivanje aflatoksina u kukuruзу

Određivanje aflatoksina u kukuruзу izvršeno je primenom ELISA, HPLC-FLD, HPLC-UV light-FLD i LC-MS/MS metoda. ELISA metode primenjene su na osnovu uputstva proizvođača i zatim validovane, dok su hromatografske metode pre validacije razvijene i optimizovane. U okviru hromatografskih metoda ispitani su i različiti postupci pripreme uzoraka.

4.4.1. ELISA

ELISA metoda korišćena je za analizu prisustva ukupnih aflatoksina i AFB1.

4.4.1.1. Određivanje ukupnih aflatoksina

Za određivanje ukupnih aflatoksina (AFB1, AFB2, AFG1 i AFG2) ELISA metodom korišćena su dva test kita proizvođača Neogen Veratox® (Lansing, SAD): Quantitative Aflatoxin High Sensitivity (HS) Test (# 8031) i Aflatoxin Quantitative Test kit (# 8030).

U sastavu oba kita nalazi se isti set pripremljenih hemikalija: aflatoksin HRP-konjugat, K-Blue® supstrat, stop reagens, po 48 crvenih i providnih bunarića i serija standarda. Aflatoxin HS Test sadrži 5 standarda koncentracija aflatoksina od 0, 1, 2, 4 i 8 µg/kg, dok Aflatoxin Quantitative Test kit sadrži četiri standarda koncentracija 0, 5, 15 i 50 µg/kg. Sa ciljem povećanja broja tačaka na kalibracionoj krivi, napravljen je i standard od 25 µg/kg, mešanjem istih zapreminskih udela standarda od 0 i 50 µg/kg. Postupak metode sproveden je na osnovu uputstva proizvođača.

Masa samlevenog uzorka kukuruza od $5 \pm 0,001$ g ekstrahovana je sa 25 ml 70% MeOH (p.a. čistoće) i mučkana 3 minuta na Griffin šejkeru. Nakon ekstrakcije i filtriranja kroz Whatman No. 1 filter papir uzorak je spreman za analizu.

Na početku ELISA metode 100 µl aflatoksin HRP-konjugata i 100 µl standarda tj. uzorka dodaje se mikropipetom u crvene bunariće. Zatim se sadržaj u crvenim bunarićima promeša tri puta mikropipetom i 100 µl se prenese u providne bunariće čije dno je obloženo antitelima. Nakon inkubacije bunarići se ispiraju destilovanom vodom i dodaje se 100 µl supstrata koji reaguje sa vezanim konjugatom uz razvoj plave boje. Nakon dodavanja 100 µl stop reagensa očitava se intenzitet boje na 650 nm na ELISA čitaču. Koncentracija aflatoksina obrnuto je proporcionalna intenzitetu plave boje. Koncentracija aflatoksina određena je iz kalibracione krive.

Svi uzorci prvobitno su analizirani primenom Aflatoxin HS Test kita. Uzorci koji su imali koncentraciju aflatoksina veću od 8 µg/kg analizirani su ponovo primenom Aflatoxin Quantitative Test kita.

4.4.1.2. Određivanje AFB1

Za određivanje AFB1 primenom ELISA metode korišćen je test kit proizvođača Tecna S.r.l. Celer B1 (code MA220/MA221, Trst, Italija). U sastavu kita nalazi se set pripremljenih hemikalija: AFB1 enzim-konjugat, rastvor za ispiranje, reagens za razvoj boje, stop reagens, 96 belih i providnih bunarića i serija standarda. Aflatoksin B1 test

sadrži 5 standarda sa koncentracijama od 0, 1, 5, 20 i 40 µg/kg. Postupak metode sproveden je na osnovu uputstva proizvođača.

Masa samlevenog uzorka kukuruza od $5 \pm 0,001$ g uz dodatak 1 g NaCl ekstrahovana je sa 25 ml 70% MeOH (p.a. čistoće) i mućkana 3 minuta na Griffin šejkeru. Nakon ekstrakcije i filtriranja kroz Whatman No. 1 filter papir uzorak je spreman za analizu.

Na početku ELISA metode, 100 µl aflatoksin enzim-konjugata i 50 µl standarda, tj. uzorka mikropipetom se doda u bele bunariće. Zatim se sadržaj u belim bunarićima promeša tri puta sa mikropipetom i 100 µl se prenese u providne bunariće čije dno je obloženo antitelima. Nakon inkubacije bunarići se ispiraju pripremljenim rastvorom za ispiranje i dodaje se 100 µl supstrata koji reaguje sa vezanim konjugatom i dolazi do razvoja plave boje. Nakon dodavanja 50 µl stop reagensa očitava se intenzitet boje na 450 nm na ELISA čitaču. Koncentracija AFB1 određena je iz kalibracione krive.

4.4.2. Tečna hromatografija

Za analizu aflatoksina u kukuruзу korišćena je i metoda tečne hromatografije sa detektorima: FLD, UV light-FLD i MS/MS. U okviru navedenih tečnohromatografskih metoda ispitani su i različiti postupci pripreme uzoraka.

4.4.2.1. Priprema uzoraka

Za pripremu uzoraka kukuruza koji će biti analizirani primenom HPLC-FLD i HPLC-UV light-FLD metoda korišćene su imunoafinitetne i MycoSep kolone, dok su za LC-MS/MS analizu pored navedenih postupaka pripreme uzoraka primenjena i QuEChERS tehnika i postupak ekstrakcije.

4.4.2.1.1. Imunoafinitetne kolone

Za pripremu uzoraka kukuruza korišćene su Afla-Ota CLEAN™ kolone (LCTech GmbH, Dorfen). Smeša metanola i vode (MeOH/H₂O=80/20, v/v) korišćena je za ekstrakciju 20±0,001 g samlevenog i homogenizovanog uzorka uz polučasovno mućkanje. Nakon filtriranja, 14 ml ekstrakta rastvoreno je u 86 ml PBS pufera od čega je 50 ml naneto na imunoafinitetnu kolonu. Nakon što je sva tečnost, protokom kap po kap, izašla sa kolone dodato je 10 ml vode za ispiranje. Željeni analiti, tj. aflatoksinu isprani su sa kolone propuštanjem 3 ml MeOH. Sadržaj u kivetu uparen je do suva na ReactiTerm bloku. Nakon uparavanja, sadržaj u kivetu ispran je odgovarajućom mobilnom fazom. Sastav i odnos mobilne faze zavisi od detektora koji će se koristiti u HPLC metodi.

4.4.2.1.2. MycoSep kolone

Priprema uzoraka kukuruza primenom čvrsto-fazne ekstrakcije, izvršena je na MycoSep®224AflaZon kolonama prema uputstvu proizvođača (Romer, Romer Labs Diagnostic GmbH, Tulln, Austria).

Masa samlevenog i homogenizovanog uzorka kukuruza od 25±0,001 g rastvorena je u 100 ml smeše acetonitrila i vode (CH₃CN/H₂O=84/16) i mućkana 30 minuta na Griffin šejkeru. Nakon mućkanja, uzorak je profiltriran (Whatman No. 1) i 5 ml filtrata preneto je u kivetu za uzorak. Multifunkcionalna kolona MycoSep®224AflaZon uronjena je u kivetu sa uzorkom pri čemu je došlo do izdvajanja prečišćenog uzorka. 2 ml prečišćenog uzorka je mikropipetom preneseno u vialu i upareno do suva na ReactiTerm bloku. Nakon uparavanja, pripremljeni uzorak rekonstituisan je u odgovarajućoj mobilnoj fazi, u zavisnosti od detektora koji se koristio za HPLC metodu.

4.4.2.1.3. QuEChERS

Priprema uzoraka kukuruza primenom QuEChERS-a (Agilent Technologies, Inc., Wilmington, DE, SAD) izvedena je na sledeći način: $5 \pm 0,001$ g samlevenog i homogenizovanog uzorka kukuruza rastvoreno je u 10 ml vode i promešano na vorteksu 1 minut. Nakon 30 minuta odstojevanja, dodato je 10 ml CH_3CN i gotove smeše soli za ekstrakciju. Navedena smeša promućkana je i centrifugirana brzinom od 4000 obr/min u trajanju od 5 minuta. Nakon centrifugiranja, izdvojeno je 6 ml gornjeg acetonitrilnog sloja i preneto u tubu koja sadrži 900 mg anhidrovanog MgSO_4 i PSA. Nakon kratkotrajnog mućkanja na vorteksu i centrifugiranja (4000 obrtaja, 5 minuta), gornji izdvojen sloj je profiltriran. Zapremina filtrata od 1ml preneto je u vialu i uparena.

Na ovaj način pripremljeni uzorci kukuruza analizirani su samo primenom LC-MS/MS metode, tako da je upareni uzorak rekonstituisan u 1 ml mobilne faze $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}=50/50$ (uz dodatak 0,1 % HCOOH u obe faze).

4.4.2.1.4. Ekstrakcija

Priprema uzoraka kukuruza primenom ekstrakcije izvedena je na sledeći način: $10 \text{g} \pm 0,001$ g samlevenog i homogenizovanog uzorka kukuruza rastvoreno je u 40 ml smeše acetonitrila i vode ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}=84/16$). Nakon 30 minuta mućkanja, uzorak je profiltriran. Ukupno 4 ml filtrata, upareno je do suva i rekonstituisano u 1 ml mobilne faze $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}=50/50$ (uz dodatak 0,1 % HCOOH u obe faze) i analiziran LC-MS/MS metodom.

4.4.3. Hromatografski uslovi

Sve hromatografske metode za određivanje aflatoksina u kukuruзу izvedene su na HPLC sistemu Agilent 1200 serije (Agilent Technologies Inc., USA) koji se sastojao od degazera, pumpe, dela za automatsko ubacivanje uzoraka (eng. „autosampler”), termostatisanog dela za hromatografsku kolonu i odgovarajućeg detektora. Razdvajanje aflatoksina postignuto je korišćenjem ZORBAX Eclipse XDB-C18 kolone (50 mm × 4,6 mm; 1,8 μm) (Agilent Technologies Inc., USA) pri temperaturi od 30 °C.

4.4.3.1. HPLC-FLD

Bez obzira na koji način su uzorci kukuruза pripremljeni za analizu aflatoksina, neophodno je izvršiti derivatizaciju za njihovo određivanje na FLD detektora. Pojačanje signala izvršeno je primenom hemijske derivatizacije. Uzorci kukuruза, pripremljeni primenom MycoSep i imunoafinitetnih kolona, nakon prečišćavanja upareni su do suva. Postupak derivatizacije, izvršen je dodatkom 100 μl TFA i 200 μl n-heksana u vialu. Zatvorena viala ostavljena je 10 minuta na 45 °C u ReactiTerm bloku. Derivatizacija je zaustavljena uparavanjem TFA i n-heksana. Sadržaj u viali rekonstituisan je u 1 ml smeše acetonitrila i vode (CH₃CN/H₂O=10/90), mućkan na vorteksu i analiziran na HPLC/FLD.

Mobilna faza sastojala se od vode (A) i smeše metanola i acetonitrila (B), (H₂O/MeOH/CH₃CN=65/17,5/17,5), pri protoku od 0,3 ml/min. Eluiranje i razdvajanje aflatoksina izvršeno je po gradijentnom programu: 35% B na početku analize sa linearnim porastom do 45% B u trajanju od 9 minuta i zatim narednih 6 minuta do 70% B. Vreme povratka na početnih 35% trajalo je 4 minuta. Identifikacija aflatoksina izvršena je pri talasnim dužinama ekscitacije $\lambda_{ex}=365$ nm i emisije $\lambda_{em}=455$ nm. Zapremina injektovanja bila je 10 μl.

4.4.3.2. HPLC-UV light-FLD

Upotrebom kombinacije UV light-FLD detektora izbegava se hemijska derivatizacija aflatoksina, tako da su uzorci kukuruza, pripremljeni primenom MycoSep i imunoafinitetnih kolona, upareni do suva i odmah rekonstituisani u mobilnoj fazi. Mobilna faza sastojala se od vode (A) i smeše metanola i acetonitrila (B), ($H_2O/MeOH/CH_3CN=65/17,5/17,5$). Primenjen je izokratski režim eluiranja sa protokom mobilne faze od 0,3 ml/min. Identifikacija aflatoksina izvršena je pri talasnim dužinama ekscitacije $\lambda_{ex}=365$ nm i emisije $\lambda_{em}=455$ nm. Zapremina injektovanja bila je 10 μ l.

4.4.3.3. LC-MS/MS

Agilent 6410 Triple Quad maseni spektrometar (Agilent Technologies Inc., USA) sa multimod jonskim izvorom i ESI pozitivnom jonizacijom korišćen je za analizu aflatoksina u kukuruзу. MassHunter Workstation Data Acquisition i MassHunter Workstation Qualitative Data Analysis softver izdanje B.03.01 (Agilent Technologies Inc., USA) korišćen je za kontrolu uređaja, prikupljanje i analiziranje podataka. Operativni parametri instrumenta bili su sledeći: temperatura gasa za sušenje 325 °C, temperatura isparivača 220 °C, pritisak gasa (N_2) na raspršivaču 50 psi, protok gasa 5 l/min, napon kapilare 2500 V i napon punjenja 2000 V. MRM (eng. "multiple reaction monitoring") režim rada odabran je za ispitivanje aflatoksina. Najintenzivnije MRM tranzicije odabrane su za svaki aflatoksin. Naponi fragmentora i kolizione energije ispitivanih aflatoksina prikazani su u Tabeli 4.7.

Tabela 4.7. Odgovarajući m/z prekursor joni (Q1), m/z praćeni produkt joni (Q3), naponi fragmentora (FV) i kolizione energije (CE) ispitivanih aflatoksina

Aflatoksin	Q1	Q3	FV (V)	CE (V)
AFB1	313,1	285,1*	150	22
		241,1	135	40
AFG1	329,1	311,1*	160	20
		243,1	160	25
AFB2	315,1	287,1*	135	25
		259,1	150	30
AFG2	331,1	313,1*	160	25
		245,1	160	30

* Tranzicije korišćene za kvantifikaciju

Nakon prečišćavanja uzoraka kukuruza (MycoSep kolone, imunoafinitetne kolone, QuEChers-i, ekstrakcija) i uparavanja, uzorci su rekonstituisani u 1 ml smeše vode i metanola ($H_2O/MeOH=50/50$), sa dodatkom 0,1% $HCOOH$ u obe faze. $HCOOH$ je dodata jer pri pozitivnoj elektrosprej jonizaciji utiče na formiranje $[M+H]^+$ prekursor jona, pri čemu se ujedno povećava osetljivost, rezolucija i oblik pikova.

Mobilna faza sastojala se od metanola (A) i vode (B). Obe faze sadržale su 5mM $HCOONH_4$ i 0,1% $HCOOH$. Eluiranje i razdvajanje aflatoksina izvršeno je pri izokratskom režimu. Protok mobilne faze bio je od 0,35 ml/min, a zapremina injektovanja 20 μ l.

4.5. Određivanje ukupnog broja plesni i vrste *Aspergillus flavus* u kukuruзу

Mikološka ispitivanja obuhvatila su određivanje ukupnog broja plesni (UBP) i determinaciju plesni *Aspergillus flavus* u 1 g uzorka kukuruza.

Određivanje UBP izvršeno je prema horizontalnoj metodi za određivanje broja kvasaca i plesni (SRPS ISO 21527-2, 2011).

Nakon određivanja UBP izvršeno je njihovo presejavanje (monokulturisanje) na podloge za identifikaciju. Konidije i fragmenti hifa sa kolonija plesni za koje se pretpostavilo da su pripadnici roda *Aspergillus* prenešeni su na podlogu po Czapek-u (CYA). Zasejane podloge inkubirane su na temperaturi od 25°C u periodu od 7 dana. Kriterijumi koje su opisali Samson i sar. (2004) i Pitt i Hocking (2009) primenjivani su za identifikaciju vrste *Aspergillus flavus*.

4.6. Određivanje AFM1 u mleku

Za određivanje AFM1 u mleku korišćene su sledeće metode: ELISA, HPLC-FLD i LC-MS/MS metoda.

4.6.1. ELISA

Za određivanje AFM1 ELISA metodom korišćen je test kit I'screen AFLA M1 (code MA418/MA419, Trst, Italija). U sastavu kita nalazi se set pripremljenih hemikalija: aflatoxin M1 enzim-konjugat, rastvor za razblaživanje, enzim-konjugat, rastvor za ispiranje, reagens za razvoj boje, stop reagens, 96 bunarića i serija standarda. Aflatoxin M1 test sadrži sedam standarda koncentracija 0, 5, 10, 25, 50, 100 i 250 ng/l.

Da bi se odvojila masna faza, uzorci mleka pre analize su centrifugirani pri brzini od 3000 obrt/min u trajanju od 10 minuta. Obezmašćeno mleko se dalje koristilo za analizu, a postupak analize sproveden je na osnovu uputstva proizvođača.

Na početku ELISA metode 100 µl AFM1 enzim-konjugata i 100 µl standarda tj. uzorka mikropipetom se doda u bunariće i inkubira 45 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, sadržaj iz bunarića se isprazni, a bunarići isperu pet puta pripremljenim rastvorom za ispiranje. Zatim se doda 100 µl enzim konjugat supstrata i nakon toga ponovo sledi inkubacija (15 minuta) i ispiranje. Dodatkom 50 µl stop

reagensa, završava se analiza i sledi očitavanje intenziteta boje na 450 nm na ELISA čitaču. Koncentracija AFM1 određuje se iz kalibracione krive.

4.6.2. Tečna hromatografija

Za analizu mleka korišćena je metoda tečne hromatografije sa FLD i MS/MS detektorima. Hromatografske metode za određivanje AFM1 u mleku izvedene su na HPLC sistemu Agilent 1200 serije (Agilent Technologies Inc., USA) uz kolonu (ZORBAX Eclipse XDB-C18 kolone; 50 mm × 4,6 mm; 1,8 μm, Agilent Technologies Inc., USA).

4.6.2.1. Priprema uzoraka

Priprema uzoraka mleka za određivanje AFM1 primenom HPLC-FLD i LC-MS/MS metoda izvedena je primenom AFlaStar™ M1 R-imunoafinitetnih kolona (Romer Labs Inc., Union, SAD).

Na imunoafinitetnu kolonu naneto je 50 ml zagrejanog mleka (30 °C). Protok uzorka od jedne kapi u sekundi kroz kolonu podešen je upotrebom vakuum manifolda. Nakon prolaska uzorka kroz kolonu, ona je isprana dva puta sa 10 ml destilovane vode. Eluiranje željenog analita tj. AFM1 izvršeno je sa 1,5 ml MeOH. Sakupljeni eluat uparen je do suva i rastvoren u odgovarajućoj mobilnoj fazi, u zavisnosti da li se analizira na FLD ili MS/MS detektoru.

4.6.2.2. HPLC-FLD

Prečišćeni i upareni uzorak derivatizovan je sa ciljem povećanja intenziteta signala AFM1. Derivatizacija je izvedena na 45 °C uz dodatak 200 μl TFA i 200 μl n-heksana. Nakon 10 minuta, derivatizacija je zaustavljena uparavanjem TFA i n-

heksana. Sadržaj u viali rastvoren je u 1 ml smeše vode i acetonitrila ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}=75/25$), promućkan na vorteksu i analiziran na HPLC/FLD.

Primenjen je izokratski režim eluiranja. Zapremina injektovanja bila je 15 μl , a protok mobilne faze 0,25 ml/min. Identifikacija AFM1 izvršena je pri talasnim dužinama ekscitacije $\lambda_{\text{ex}}=360$ nm i emisije $\lambda_{\text{em}}=450$ nm.

4.6.2.3. LC-MS/MS

Kao i za analizu aflatoksina u kukuruzu, i za analizu AFM1 u mleku korišćen je isti maseni spektrometar (Agilent 6410 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies Inc.) sa istim operativnim parametrima instrumenta (4.4.3.3.). Za AFM1 odabrane su najintenzivnije MRM tranzicije, a vrednosti napona fragmentora i kolizionih energija prikazane su u Tabeli 4.8.

Tabela 4.8. Odgovarajući m/z prekursor jon (Q1), m/z praćeni produkt joni (Q3), naponi fragmentora (FV) i kolizione energije (CE) za AFM1

Aflatoksin	Q1	Q3	FV	CE
AFM1	329,1	273,1*	150	20
		259,1	150	20

* Tranzicija korišćena za kvantifikaciju

Nakon prečišćavanja uzoraka mleka i uparavanja, uzorci su rastvoreni u 1 ml smeše vode i metanola ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}=50/50$), sa dodatkom 0,1% HCOOH u obe faze. Mobilna faza sastojala se od metanola (A) i vode (B). Obe faze sadržale su 5mM NH_4HCOO i 1% HCOOH . Eluiranje AFM1 izvršeno je pri sledećem gradijentnom programu: 70% B na početku analize sa linearnim smanjenjem do 20% B u trajanju od 3,5 minuta, i zatim ponovnim porastom do 70% B u trajanju od 2,5 minuta. Od 6 do 8 minuta zadržan je odnos $A/B=30/70$. Protok mobilne faze bio je 0,5 ml/min, a zapremina injektovanja 30 μl .

4.7. Validacija metoda

Sa ciljem utvrđivanja da li primenjene metode odgovaraju zahtevima nameravanih analitičkih primena, ELISA metoda kao i razvijene i optimizovane hromatografske metode, validovane su u skladu sa zahtevima evropske regulative (EC/657/2002). Navedena regulativa propisuje pravila validacije za skrining (ELISA) i konfirmatorne metode (HPLC) za određivanje aflatoksina i drugih pravilnicima regulisanih mikotoksina.

Primenjenje ELISA, HPLC-FLD, HPLC-UV liight-FLD i LC-MS/MS metode validovane su nakon analize sertifikovanih referentnih materijala (CRM) i realnih uzoraka kukuruza i mleka u koje su dodati odgovarajući standardi (spajkovani uzorci).

CRM-i pripremljeni su za analizu, u zavisnosti od primenjene metode, po istim principima kao i realni uzorci. Spisak korišćenih CRM-a kao i sertifikovane koncentracije određivanih analita prikazane su u Tabeli 4.9.

Tabela 4.9. Korišćeni sertifikovani referentni materijali (CRM) za validaciju ELISA, HPLC-FLD, HPLC-UV liight-FLD i LC-MS/MS metoda

Šifra	Analit	Sertifikovana vrednost ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Proizvođač
A-C-268	AFB1	$4,20 \pm 0,50$	Trilogy® Reference Material (Vašington, SAD)
	AFS	$4,50 \pm 0,50$	
MA1140-2/CM	AFB1	$2,71 \pm 1,35$	Progetto Trieste (Test Veritas, Padova, Italija)
	AFS	$3,34 \pm 1,67$	
MA1240-1/CM	AFB1	$4,98 \pm 3,54$	
	AFS	$6,46 \pm 4,42$	
MI 1142-1/CM	AFM1	$0,053 \pm 0,026$	

AFS-ukupni aflatoksini

U kontrolne uzorke kukuruza, za koje je utvrđeno da ne sadrže aflatoksine, dodati su standardi aflatoksina. Standardi su dodati tako da krajnja koncentracija u uzorku bude $10 \mu\text{g}/\text{kg}$. Koncentracije su odabrane tako da budu na nivou MDK vrednosti, propisanih Pravilnicima Republike Srbije i Evropske Unije ("Službeni glasnik

RS”, 27/2014; EC/1881/2006). Za uzorke mleka u koje je dodat standard AFM1, takođe je prethodno utvrđeno da nisu prirodno kontaminirana. Standardi su dodati tako da krajnja koncentracija AFM1 u uzorku bude 0,05, 0,5 i 1,0 µg/kg. Koncentracije su odabrane tako da budu na nivou MDK vrednosti, propisanih Pravilnicima Republike Srbije i Evropske Unije (“Službeni glasnik RS”, 20/2013; EC/1881/2006).

Prema smernicama evropske regulative (EC/657/2002) određeni su sledeći parametri validacije:

- *Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ)* za ELISA metode propisani su od strane proizvođača kitova, dok su za hromatografske metode one procenjene na osnovu merenja opadajućih koncentracija standarda i merenja odgovora signala pri odnosu signal/šum (eng. “signal/noise”) ($S/N \geq 3$ za LOD i $S/N \geq 10$ za LOQ. LOQ vrednosti definisane su na osnovu tehničkog izveštaja (CEN/TR 16059/2010)
- *Linearnost je* za hromatografske metode određena preko kalibracionih kriva ispitivanih aflatoksina u čistom rastvaraču ili u matriksu (za LC-MS/MS). Kalibracione krive su konstruisane prikazivanjem zavisnosti koncentracija aflatoksina i površina njihovih pikova sa dobijenih hromatograma. Kalibracione krive su konstruisane na osnovu 5 ili više tačaka u tri ponavljanja. Linearnost kalibracionih krivih iskazana je kroz vrednost koeficijenta determinacije (R^2). Za primenjene ELISA metode zavisnost između koncentracije aflatoksina i odgovora detektora (absorbanci) nije linearna, nego logaritamska. Logaritamska zavisnost takođe je iskazana kroz koeficijent determinacije (R^2).
- *Tačnost* u analitici mikotoksina određuje se analizom CRM-a i izražava se kao odnos između dobijene srednje vrednosti i sertifikovane vrednosti. Pored analize CRM-a u ovoj disertaciji tačnost ispitivanih metoda proverena je i analizom spajkovanih uzoraka kukuruza i mleka, za koje je prethodno utvrđeno da ne sadrže aflatoksine, odnosno AFM1. Spajkovanje je izvršeno dodatkom

poznatih koncentracija određivanih analita pre analize i upoređivanjem sa teorijskim koncentracijama. Recovery je izračunavan prema sledećim formulama:

$$R = C_{\text{određena}} / C_{\text{CRM}} \times 100$$

$$R = C_{\text{određena}} / C_{\text{teorijska}} \times 100$$

- *Preciznost u uslovima ponovljivosti* za ELISA i hromatografske metode proverena je analizom istog uzorka, pod istim uslovima analize, od strane istog analitičara u više ponavljanja. Za analizu su korišćeni CRM-ovi, kao i uzorci kukuruza i mleka u koje su dodati odgovarajući standardi aflatoksina.
- *Preciznost u uslovima reproduktivnosti* za ELISA i hromatografske metode proverena je analizom istog uzorka, pod istim uslovima analize, od strane istog ili različitih analitičara u različitom vremenskom periodu, u više ponavljanja. Samo je za primenjene ELISA metode preciznost u uslovima ponovljivosti ispitana analizom CRM-a, usled njegove ograničene količine. Za hromatografske analize korišteni su spajkovani uzorci kukuruza i mleka.
- *Specifičnost* hromatografskih metoda utvrđena je na osnovu poređenja spektara i retencionih vremena određivanih analita sa odgovarajućim standardima, dok je za LC-MS/MS metode, specifičnost dodatno utvrđena identifikacijom određivanih analita na osnovu prekursor i dva produkt jona. Specifičnost ELISA metoda utvrđena je od strane proizvođača test kitova postojanjem specifičnih antitela kojima se mogu određivati samo željeni analiti.

4.8. Procena rizika za unos AFM1 preko mleka

Procena rizika za unos AFM1 u organizam ljudi preko mleka ispitana je na osnovu analize 200 uzoraka kravljeg mleka primenom ELISA metode. Nakon analiza, za procenu rizika odabrane su najmanja, srednja i najveća određena koncentracija AFM1.

S obzirom da za Srbiju ne postoje zvanični podaci o prosečnom unosu mleka, ovi podaci obezbeđeni su kroz formiranu anketu (Tabela 4.10). Takođe, kroz anketu obezbeđeni su i podaci o prosečnoj telesnoj masi (TM) u zavisnosti od pola i starosne kategorije ispitanika. Anketa je obuhvatila 1500 ispitanika različitog pola i starosnih kategorija.

Tabela 4.10. Anketa za prikupljanje podataka o prosečnom unosu mleka u zavisnosti od pola i starosne kategorije

Podaci o ispitanicima		
Godine		
Telesna masa		kg
Pol	Muški	Ženski
Koliko često konzumirate mleko?	1. Svaki dan 2. 4-6 puta nedeljno 3. 1-3 puta nedeljno 4. Nikada	
Koliko mleka popijete u toku dana?	1. < 0,1 l (pola čaše) 2. ≈ 0,2 l (jedna čaša) 3. 0,2-0,5 l 4. 0,5 l- 1 l 5. > 1 l	
Koju vrstu mleka konzumirate?	1. Kravlje 2. Kozije 3. Ovčije 4. Magareće	

Procena unosa AFM1 (EDI) izračunata je na osnovu sledeće formule:

$$\text{EDI}(\text{ng/kg TM/dan}) = [\text{koncentracija AFM1 (ng/kg)}] \times [\text{unos mleka (l/dan)}] / [\text{TM (kg)}]$$

Deljenjem izračunatih EDI vrednosti sa definisanom TDI vrednošću za svaku starosnu kategoriju određena je vrednost indeksa opasnosti (HI).

4.9. Statistička obrada podataka

Pojedini podaci i dobijeni rezultati statistički su analizirani primenom programa STATISTICA 10.0 StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (eng. "data analysis software system"), version 10 (www.statsoft.com).

Analiza značajnosti uticaja klimatskih faktora obavljena je primenom analize varijanse ANOVA (eng. "Analysis of Variance"). Za analizu značajnosti razlika među srednjim vrednostima analiziranih parametara korišćen je Duncan test sa pragom značajnosti 0,05. Dobijene prosečne vrednosti koje se statistički značajno razlikuju obeležene su različitim slovima. Takođe, analiza varijanse ANOVA, primenjena je i za analizu značajnosti razlika između vrednosti koncentracija AFM1, dobijenih primenom različitih metoda određivanja.

5. Rezultati i diskusija

5.1. Analiza pojave aflatoksina u kukuruзу

5.1.1. Period od 2009. do 2012. godine

Analiza pojave aflatoksina u kukuruзу obuhvatila je uzorke kukuruза iz četiri proizvodne godine, 2009-2012. Primenom ELISA metode ispitana je pojava ukupnih aflatoksina (AFB1, AFB2, AFG1 i AFG1). Svake godine, nakon žetve, sakupljeno je i analizirano 100 uzoraka kukuruза. Utvrđeno je da od 300 uzoraka kukuruза iz 2009., 2010. i 2011. godine nijedan uzorak nije bio kontaminiran aflatoksinima u koncentraciji iznad LOQ vrednosti metode, odnosno 1 µg/kg. Nasuprot tome, u prvobitno analiziranih 100 uzoraka kukuruза sakupljenih tokom žetve 2012. godine ustanovljen je visok nivo kontaminacije kukuruза aflatoksinima. Usled toga i sa ciljem detaljnije analize pojave aflatoksina u kukuruзу iz proizvodne 2012. godine, analizirano je ukupno 700 uzoraka. Dobijeni rezultati pokazali su da je 553 (79%) uzorka sadržalo aflatoksine iznad koncentracije 1 µg/kg.

Visok nivo pojave aflatoksina u uzorcima kukuruза iz 2012. godine, kao i odsustvo aflatoksina u analiziranim uzorcima kukuruза iz 2009., 2010. i 2011. godine,

može se dovesti u vezu sa zabeleženim klimatskim uslovima. Naime, klimatski uslovi definišu se kao jedan od najznačajnijih spoljašnjih faktora koji imaju velik uticaj na rast i razmnožavanje *Aspergillus* vrsta i sintezu aflatoksina (Sisson, 1987; Magan i sar., 2004; Cotty i Jaime-Garci, 2008; Wu i sar., 2011). Da bi se razumeo uticaj klimatskih faktora na pojavu aflatoksina u ispitivanim uzorcima kukuruza, pre svega treba istaći da se Srbija nalazi u kontinentalnom klimatskom pojasu i objasniti vremenske uslove koji su zabeleženi u periodu gajenja ispitivanih uzoraka kukuruza (april-septembar, 2009-2012. godine). U Tabeli 5.1. prikazani su osnovni pokazatelji vremenskih uslova za svaku ispitanu godinu, kao i njihovo poređenje sa srednjim vrednostima za višegodišnji period od 1971. do 2000. godine. Višegodišnji period definiše poslednje uobičajene vremenske uslove u Srbiji, odnosno aritmetičku sredinu klimatskih elemenata dobijenih za tri uzastopne decenije. Svi podaci o vremenskim uslovima za period 2009-2012. godine preuzeti su od Republičkog Hidrometeorološkog Zavoda Srbije (Agrometeorološki uslovi u proizvodnoj godini 2008/2009; 2009/2010; 2010/2011; 2011/2012 na teritoriji Republike Srbije).

Tabela 5.1. Vrednosti temperatura i padavina za period april-septembar 2009-2012.

Godina	Devijacija srednje T (° C)	Broj dana T > 30 ° C	Broj dana T > 35 ° C	Broj dana sa padavinama	∑ P (mm)	P (%)
2009	1,8 ^c	37 ^a	2 ^a	38 ^a	269 ^b	77 ^b
2010	0,9 ^a	28 ^b	0,4 ^a	59 ^b	575 ^c	169 ^c
2011	1,6 ^b	39 ^a	5 ^b	36 ^a	240 ^a	69 ^a
2012	2,4 ^d	63 ^c	16 ^c	37 ^a	240 ^a	69 ^a

Različita slova u istoj koloni ukazuju na značajnu razliku ($P < 0,05$) između rezultata prema Dankanovom testu višestrukih intervala

T: temperatura

P: padavine

∑: suma

Iz Tabele 5.1. može se uočiti da je statističkom obradom rezultata ustanovljeno da između sve četiri ispitanu godine postoji statistički značajna razlika u pogledu

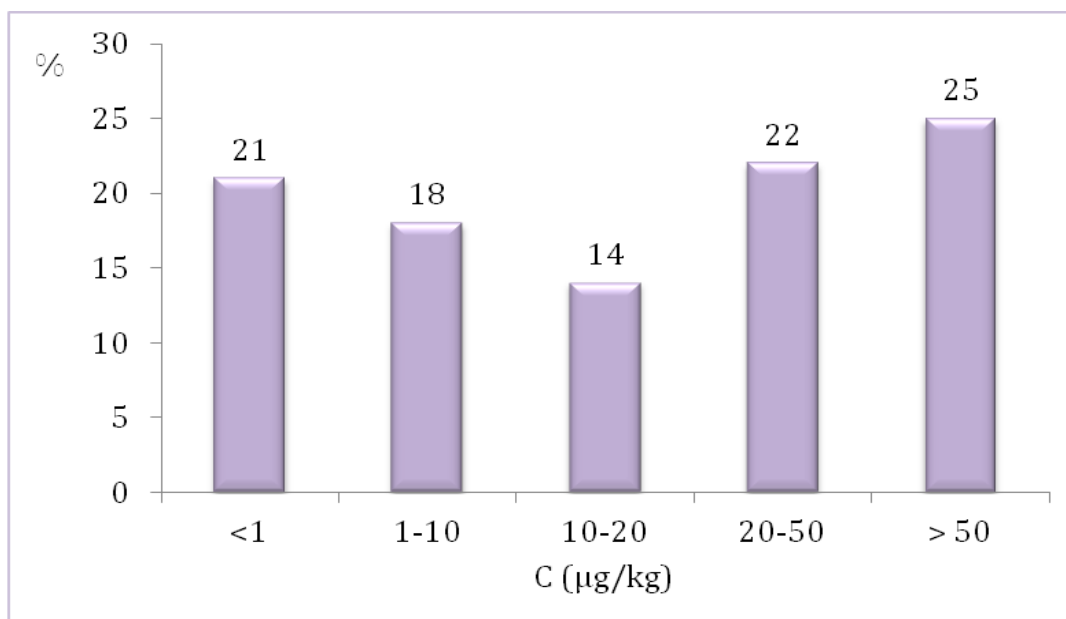
devijacija srednjih temperatura. Najmanja devijacija srednje temperature (0,9 °C) zabeležena je 2010. godine. Devijacije srednjih temperature tokom 2009. i 2011. godine bile su 1,8 °C, odnosno 1,6 °C, dok je najviša devijacija srednje temperature zabeležena tokom perioda od aprila do septembra 2012. godine (2,4 °C). Pored najviše devijacije srednje temperature, tokom 2012. godine zabeležen je i najveći broj dana sa temperaturama iznad 30 °C i 35 °C. Tokom iste godine, zabeležen je skoro duplo veći broj dana sa temperaturama iznad 30 °C, u odnosu na prethodne tri godine. Takođe, broj dana sa temperaturama iznad 35 °C tokom 2012. godine bio je od 3 (2011) do 40 (2010) puta veći. Visoke temperature zabeležene tokom 2012. godine odgovarale su optimalnim temperaturama (25-35 °C) za razvoj i razmnožavanje *Aspergillus* plesni i sintezu aflatoksina (Lillehoj, 1983; Royes i Yanong, 2002).

U pogledu količine padavina, 2010. godina statistički se razlikovala od ostalih ispitivanih godina po količini padavina i broju dana sa padavinama. Takođe, od ispitane četiri godine, jedino je tokom 2010. godine količina padavina bila iznad višegodišnjeg proseka. Period od aprila do septembra 2012. godine, u kojoj je došlo do pojave aflatoksina, u pogledu padavina bila je približna kao i 2011. godina, dok su 2009. godine zabeležene nešto veće količine padavina u odnosu na i 2011. i 2012. godinu.

Potrebno je napomenuti da prikazani osnovni pokazatelji vremenskih uslova u Tabeli 5.1. reprezentuju ceo proizvodni period kukuruza (od aprila do septembra), za svaku ispitanu godinu, dok će za 2012. godinu u kojoj je došlo do pojave aflatoksina pokazatelji vremenskih uslova biti detaljnije izučavani.

5.1.2. 2012. godina

Kako je već ranije istaknuto, u 2012. godini analizirano je 700 uzoraka kukuruza. Rezultati analiza kukuruza iz 2012. godine prikazani su na Slici 5.1.



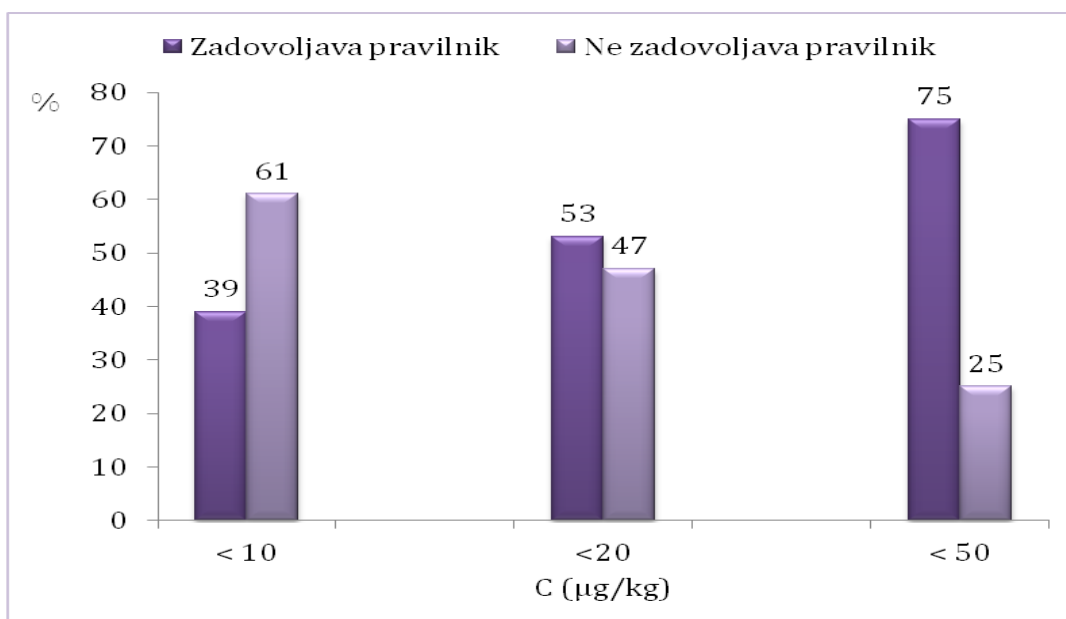
Slika 5.1. Raspodela koncentracija aflatoksina u analiziranim uzorcima kukuruza iz proizvodne 2012. godine

Analiza pojave aflatoksina izvršena je na osnovu podele ispitanih uzoraka prema sadržaju aflatoksina. Svi uzorci su na osnovu određene koncentracije aflatoksina podeljeni u pet koncentracionih opsega. Sa Slike 5.1. može se uočiti da od 700 analiziranih uzoraka kukuruza, 149 (21%) nije sadržalo aflatoksine u koncentraciji iznad 1 µg/kg. Koncentracija između 1 i 10 µg/kg određena je u 123 (18%) uzorka. Pored toga, 101 (14%) i 156 (22%) uzoraka kukuruza sadržalo je aflatoksine u koncentracionom opsegu od 10-20 µg/kg i 20-50 µg/kg, redom. Najveći broj uzoraka, 171 (25%) sadržao je aflatoksine u koncentraciji iznad 50 µg/kg.

700 uzoraka kukuruza, sa ciljem analize pojave aflatoksina, prvobitno je analizirano primenom Quantitative Aflatoxin High Sensitivity Test kita (Veratox® HS, Lansing, SAD) čiji je opseg određivanja od 1 do 8 µg/kg. Nakon toga, svi uzorci (65%) koji su sadržali koncentraciju aflatoksina veću od 8 µg/kg ponovo su analizirani primenom Aflatoxin Quantitative Test kit (Veratox® HS, Lansing, SAD), čiji opseg je od 5 do 50 µg/kg. Uzorci kukuruza koji su sadržali koncentraciju aflatoksina iznad 50 µg/kg (25%) nisu ponovo analizirani ELISA metodom, jer bi to zahtevalo višestruka razblaženja, što bi dodatno povećalo broj i vreme trajanja analize, a ujedno i cenu.

Pored toga, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ je u vreme analiza kukuruza bila i MDK aflatoksina u kukuruзу koji će se koristiti za ishranu životinja („Sl. glasnik RS”, 4/2010), a ujedno i najveća propisana MDK vrednost u poređenju sa svim drugim pravilnicima.

Da bi se ustanovilo koliko kontaminiranih uzoraka kukuruza može da se iskoristi za ishranu ljudi, odnosno ishranu životinja, izvršena je podela uzoraka u zavisnosti od nivoa kontaminacije aflatoksinima. Na Slici 5.2. prikazani su dobijeni rezultati za ukupne aflatoksine u zavisnosti od MDK vrednosti propisanih odgovarajućim pravilnicima.

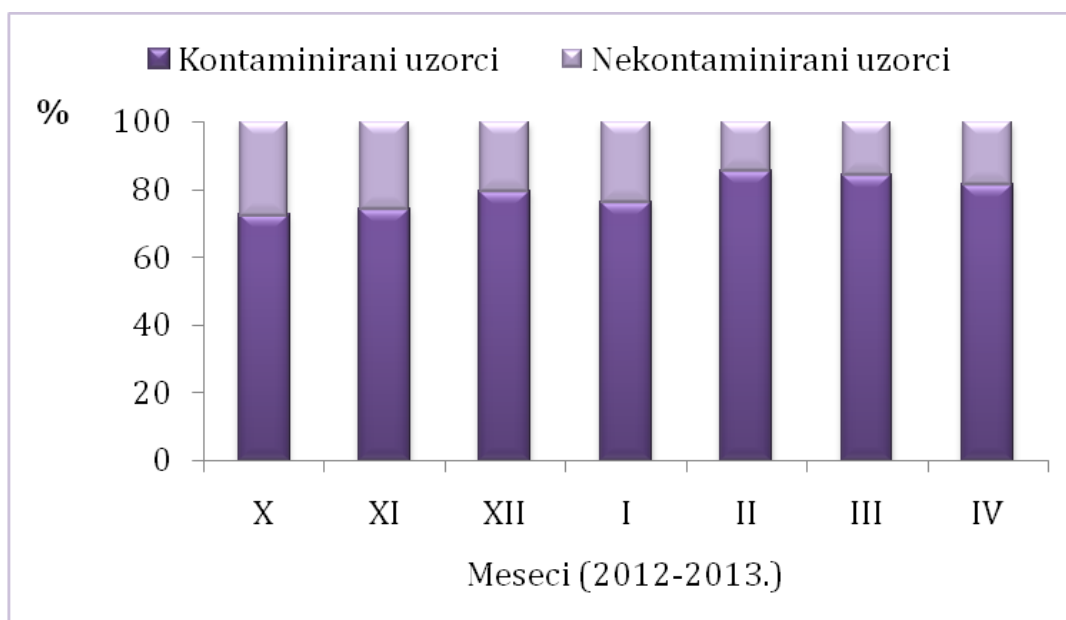


Slika 5.2. Procenat ispravnih i neispravnih uzoraka kukuruza u zavisnosti od propisanih MDK vrednosti za aflatoksine

Prema Pravilniku Republike Srbije („Sl. glasnik RS”, 28/2011 sa izmenama) kao i Pravilniku Evropske Unije (EC/1881/2006), 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ je MDK vrednost za aflatoksine u kukuruзу koji će se koristiti u ishrani ljudi. Prema navedenim pravilnicima, od ukupno 700 analiziranih uzoraka kukuruza svega 273 (39%) bi moglo da se koristi za ishranu ljudi, dok 427 (61%) ne bi moglo da se koristi za navedenu namenu. U pogledu korišćenja kukuruza kao hraniva za ishranu životinja, Pravilnik Evropske Unije (EC/32/2002) propisuje 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ kao MDK za AFB1. S obzirom da literaturni podaci

govore da je od svih aflatoksina u kukuruзу najviše zastupljen AFB1 (Weidenborner, 2001; Kos i sar., 2014c), dobijeni rezultati za ukupne aflatoksine su upoređivani sa MDK za AFB1. U skladu sa tim, 371 (53%) uzorak kukuruza bi mogao da se koristi za ishranu životinja u Evropskoj Uniji, dok 329 (47%) uzoraka ne bi moglo da se iskoristi za tu namenu. Prema Pravilniku Republike Srbije („Sl. glasnik RS”, 4/2010), koji je bio punovažan za vreme analiziranja kukuruza, MDK za ukupne aflatoksine u kukuruзу koji će se koristiti za ishranu životinja iznosila je 50 µg/kg. Od 700 analiziranih kukuruza, 525 (75%) uzoraka je moglo da se iskoristi za ishranu životinja, dok se 175 (25%) uzoraka smatralo neupotrebljivim.

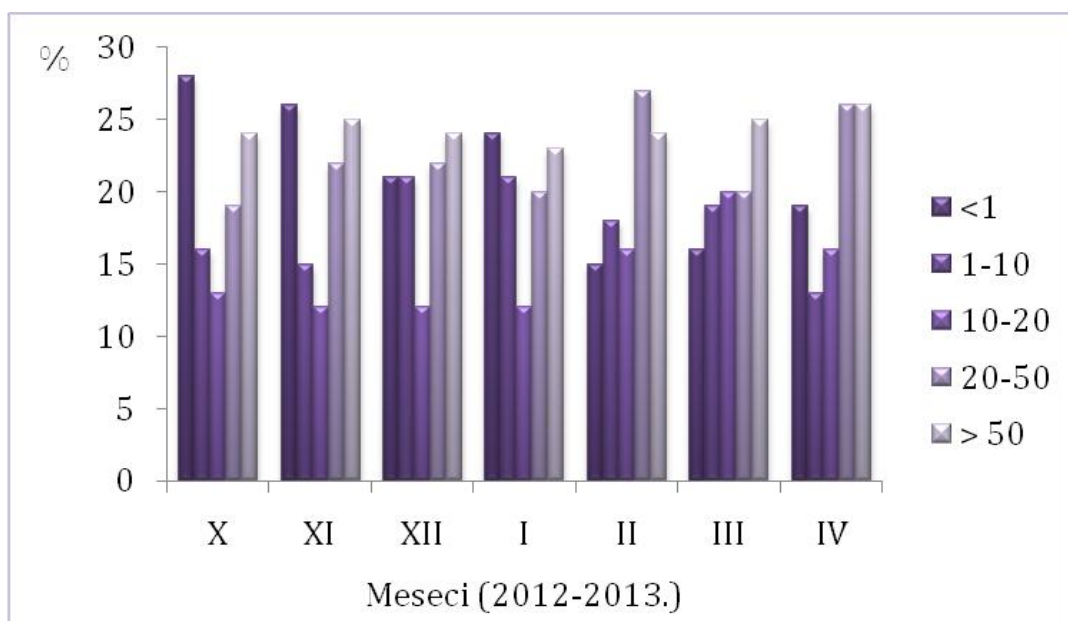
Prikazani rezultati ukazali su na pojavu značajne količine aflatoksina u uzorcima kukuruza iz proizvodne 2012. godine. S obzirom na to da je navedenih 700 uzoraka kukuruza sakupljano iz različitih skladišta u periodu od sedam meseci, iz dobijenih rezultata može se analizirati i uticaj vremena skladištenja na nivo kontaminacije. Na Slici 5.3. prikazana je uticaj vremena skladištenja na pojavu aflatoksina u uzorcima kukuruza sakupljenih u periodu od sedam meseci.



Slika 5.3. Pojava aflatoksina u uzorcima kukuruza analiziranih u periodu od sedam meseci

Svaki mesec sakupljeno je po 100 uzoraka kukuruza iz skladišta, dok su jedino uzorci sakupljeni tokom oktobra meseca analizirani nakon žetve i bez prethodnog skladištenja. Obuhvaćena su skladišta različitih kapaciteta i iz različitih proizvodnih regiona. Ovakav odabir uzoraka izvršen je sa ciljem da se ispita da li tokom perioda skladištenja u realnim uslovima dolazi do promena u nivou kontaminacije kukuruza aflatoksinima. Na osnovu rezultata prikazanih na Slici 5.3. može se primetiti da se procenat kontaminiranih uzoraka kretao od 72% u oktobru do 85% u februaru. Tokom prva četiri meseca skladištenja, od oktobra do januara, bilo je od 72% do 79% kontaminiranih uzoraka, dok je u poslednja tri meseca, od februara do aprila, zabeležen veći broj kontaminiranih uzoraka i njihov procenat kretao se između 81% i 85 %.

Na Slici 5.4. prikazana je raspodela koncentracija aflatoksina u uzorcima kukuruza po analiziranim mesecima. Analizirana je zastupljenost pet koncentracionih opsega aflatoksina.



Slika 5.4. Zastupljenost koncentracija aflatoksina u uzorcima kukuruza analiziranih tokom sedam meseci

Sa Slike 5.4. može se uočiti da se broj nekontaminiranih uzoraka tokom perioda skladištenja menjao, i da je bio najmanji u poslednja tri meseca. Sa smanjenjem broja nekontaminiranih uzoraka, povećavao se broj kontaminiranih uzoraka sa sadržajem aflatoksina u koncentracionom opsegu od 10-20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i 20-50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Procenat uzoraka sa koncentracijama iznad 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ nije se znatno menjao tokom skladištenja i kretao se od 23 do 26%. Takođe, sa Slike 5.4. može se primetiti promena u raspodeli koncentracija aflatoksina. Na početku analiza, a pre skladištenja (oktobar), u 44% uzoraka, koncentracija aflatoksina bila je manja od 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i oni su se mogli koristiti za ishranu ljudi, dok je na kraju skladištenja (april) 32% uzoraka moglo da se iskoristi za navedenu namenu. Prema Pravilniku Evropske Unije (EC/32/2002) u oktobru mesecu je za ishranu životinja moglo da se iskoristi 57% uzoraka, dok je u aprilu taj procenat smanjen na 48%. Navedeni podaci ukazuju da je i pre skladištenja kukuruza postojao visok procenat (72%) kontaminiranih uzoraka, kao i da je tokom skladištenja nastavljena aktivnost *Aspergillus* plesni i dalja sinteza aflatoksina. Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodno objavljenim podacima. Liua i sar. (2006) su ustanovili da je pri skladištenju kukuruza u periodu od godinu dana došlo do povećanja koncentracije aflatoksina za 39%. Pojava povećanja koncentracija aflatoksina i broja kontaminiranih uzoraka tokom perioda skladištenja kukuruza opisana je i od strane autora Hell i sar. (2000), kao i Kaaya i sar. (2006).

Visok nivo kontaminacije uzoraka kukuruza iz proizvodne 2012. godine, kako je već i ranije navedeno, može se dovesti u vezu sa klimatskim uslovima. S obzirom na to da su u Tabeli 5.1. prikazani osnovni pokazatelji vremenskih uslova za ceo period uzgoja kukuruza od aprila do septembra 2012. godine i da je u navedenoj godini zabeležena pojava aflatoksina u kukuružu, odlučeno je da se ispituju vremenski uslovi posebno za svaki mesec u toku perioda gajenja kukuruza. U Tabeli 5.2. prikazane su vrednosti temperatura vazduha za period od šest meseci, dok je na Slici 5.5. prikazano poređenje srednjih temperatura vazduha zabeleženih tokom 2012. godine sa višegodišnjim prosekom temperatura (1971-2000).

Tabela 5.2. Prikaz temperatura vazduha za period april-septembar 2012. godine

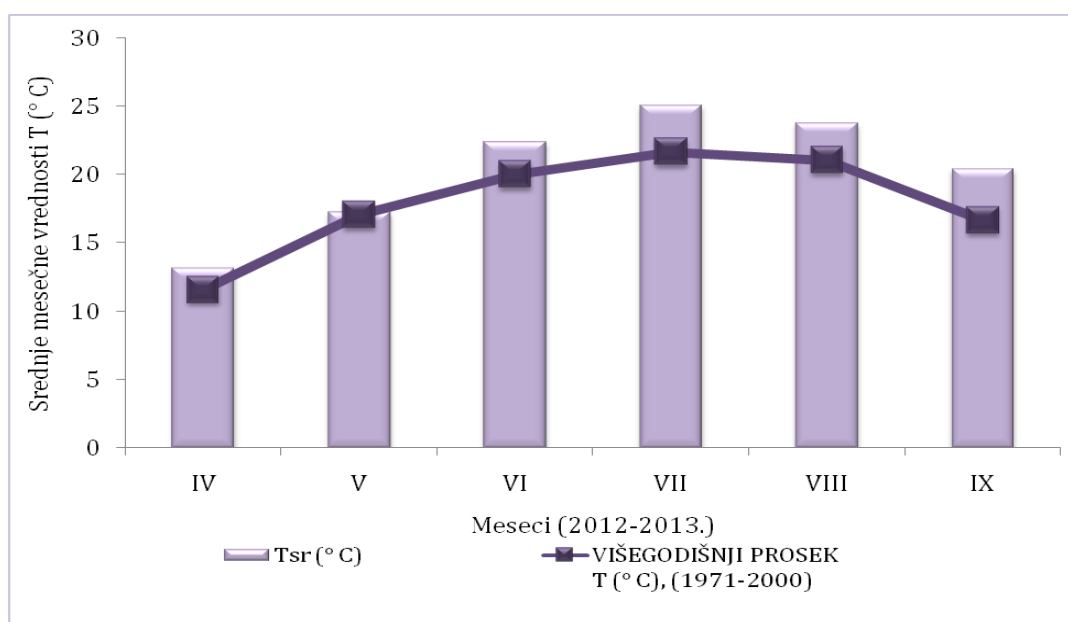
Mesec	Tsr	Δ Tsr	Tmax	Tmin	Br. dana sa T > 30 ° C
April	13,2	1,6	29,4	3,2	0
Maj	17,3	0,2	31,0	6,0	12
Jun	22,4	2,5	35,6	8,3	15,3
Jul	25,1	3,4	37,4	11,6	20
Avgust	23,8	2,7	38,4	7,5	22
Septembar	20,4	3,8	34,2	3,6	8

Tsr: srednja dnevna temperatura vazduha na 2 metra visine (° C)

Δ Tsr: odstupanje srednje dnevne temperatura (° C) vazduha od višegodišnjeg proseka

Tmax-Tmin: apsolutna maksimalna i minimalna temperatura vazduha (° C)

Br. dana sa T > 30 ° C: broj dana sa maksimalnom temperaturom vazduha iznad 30 ° C, tzv. broj tropskih dana



Slika 5.5. Srednje dnevne temperature vazduha za period april-septembar 2012. godine i višegodišnji period (1971-2000.)

Iz prikazanih podataka, može se uočiti da je tokom celog ispitivanog perioda od aprila do septembra 2012. godine zabeležena veća srednja temperatura vazduha u odnosu na višegodišnji prosek. Najveće devijacije srednjih vrednosti temperatura od 2,5 do 3,8 °C zabeležene su u periodu od juna do septembra. Navedeno povećanje vrednosti srednjih temperatura je iznad vrednosti od 2 °C, koje prema EFSA izveštaju (2012) znatno doprinosi povećanju rizika pojave *Aspergillus* plesni i sinteze aflatoksina.

Vrednosti koje karakterišu količinu padavina za period od šest meseci tokom 2012. godine prikazane su u Tabeli 5.3., dok je na Slici 5.6. prikazano poređenje srednjih vrednosti suma padavina zabeleženih tokom 2012. godine u poređenju sa višegodišnjim prosekom (1971-2000.). Iz tih podataka vidi se da je tokom aprila i maja zabeležena količina padavina bila iznad višegodišnjeg proseka, dok je period od juna do septembra 2012. godine bio okarakterisan sa značajno manjim količinama padavina.

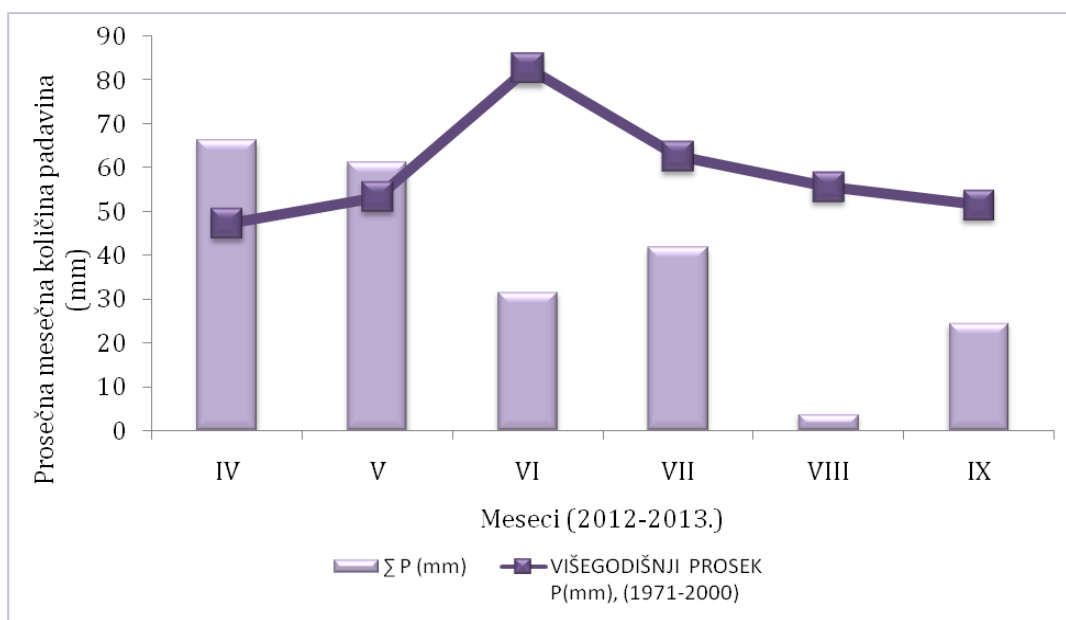
Tabela 5.3. Prikaz padavina za period april-septembar 2012. godine

Mesec	ΣP	$\Delta \Sigma P$	Višegodišnji prosek P	Broj dana sa padavinama
April	66,2	18,9	47,3	12,4
Maj	61,2	7,80	53,4	10,2
Jun	31,5	-51,1	82,7	6,6
Jul	41,8	-20,8	62,6	5,1
Avgust	5,00	-51,9	57,0	1,4
Septembar	24,6	-27,0	51,6	3,8

P: padavina (mm)

ΣP : ukupna količina padavina (mm)

$\Delta \Sigma P$: odstupanje ukupne količine padavina (mm) od višegodišnjeg proseka (1971-2000)



Slika 5.6. Prosečne količine padavina za period april-septembar 2012. godine i višegodišnji period (1971-2000)

Da bi se utvrdilo da li je tokom rasta kukuruza 2012. godine zabeležena suša, koja se definiše kao najjači abiotički faktor koji dovodi biljku u stanje stresa i direktno utiče na pojavu *Aspergillus* plesni i pojavu aflatoksina (Gosal i sar., 2009; Guevara-González i sar., 2011; Wu i sar., 2011), ispitane su vrednosti Palmerovog indeksa suše (Z indeks) i indeksa jačine suše (PDSI). Kao što se može uočiti iz podataka u Tabeli 5.4., jun i avgust su prema vrednosti Z indeksa okarakterisani kao meseci sa ekstremnom sušom, dok su tokom meseca jula zabeleženi uslovi jake suše. Na osnovu PDSI vrednosti, period od juna do avgusta okarakterisan je kao ekstremno sušan, dok je tokom maja i septembra zabeležena jaka suša.

Tabela 5.4. Pokazatelji suše za period april-septembar 2012. godine

Mesec	Z indeks	PDSI
April	0,9	Normalno
Maj	0,8	Normalno
Jun	4,5	Ekstremna suša
Jul	2,1	Jaka suša
Avgust	4,0	Ekstremna suša
Septembar	0,7	Normalno

Z index: Palmerov Z indeks suše/vlage

PDSI: Palmerov indeks jačine suše

S obzirom na to da prikazani podaci ukazuju da je ispitivani vremenski period (april-septembar 2012. godine) bio okarakterisan sušnim uslovima sa višim prosečnim dnevnim temperaturama vazduha i manjim prosečnim količinama padavina, ispitano je i kako su navedeni vremenski uslovi uticali na rast kukuruza od aprila do septembra 2012. godine.

April 2012. godine karakterisalo je značajno toplije vreme sa više padavina nego što je uobičajeno za ovaj mesec. Početkom meseca, usled nepovoljnog stanja vlažnosti površinskog sloja tla bila je i otežana priprema zemljišta i setva kukuruza, kao i nicanje i rast već posejanih hibrida. Suvo i toplo vreme zabeleženo krajem aprila i početkom maja, uticalo je na prosušivanje površinskog sloja tla što je omogućavalo normalan nastavak radova u polju. Nakon toga, u drugoj i trećoj dekadi maja došlo je do

značajnog zahlađenja praćenog obilnim padavinama. Jun 2012. godine karakterisalo je veoma toplo vreme sa znatno manje padavina nego što je uobičajeno. Srednje dnevne temperature tokom većeg dela meseca bile su iznad višegodišnjeg proseka. Iako su toplotni uslovi i veliki broj sunčanih sati povoljno uticali na kukuruz koji je bio u fazi intenzivnog rasta i razvoja, usled velikog deficita padavina znatno je smanjena vlažnost zemljišta. Navedena pojava posebno negativno je uticala na kukuruz, koji sredinom leta ulazi u generativnu fazu razvoja za šta mu je vlaga u zemljištu neophodna. Takođe, u prvoj polovini juna, toplo i nestabilno vreme sa lokalnim pljuskovima pogodovalo je razvoju gljivičnih infekcija, a uočene su i prve štete od larvi kukuruzne zlatice na korenu kukuruza, kao i jajna legla pamukove sovice i jaja kukuruznog plamenca. Opisani uslovi, nastavili su se i u julu 2012. godine, s tim što je veoma toplo vreme i deficit padavina uslovalo stanje ekstremne suše skoro tokom čitavog meseca. Iako je u poslednjoj sedmici jula došlo do osveženja i padavina, procenjeno je da je do tada oko polovine useva kukuruza već bilo sasušeno u toj meri da ga nove količine padavina nisu mogle oporaviti. Ove padavine mogle su popraviti stanje samo kasnije posejanih hibrida kukuruza. S druge strane, ovakve vremenske prilike uslovile su povećanje aktivnosti štetnih insekata, pre svega kukuruzne zlatice. Vremenski uslovi okarakterisani visokim temperaturama i malom količinom padavina nastavili su se i u avgustu. Prosečna količina padavina za avgust 2012. godine iznosila je 5 mm što je znatno manje od višegodišnjeg proseka (51,9 mm). Potreba kukuruza za vodom tokom ovog perioda bila je velika, a pri opisanim vremenskim uslovima zalihe vlage u zemljištu brzo su se trošile i u mnogim poljoprivrednim područjima bile su na minimumu. Takođe, vremenski uslovi pogodovali su i masovnoj pojavi kukuruznog plamenca i pamukove sovice. Letnji vremenski uslovi nastavljeni su tokom septembra, tako da su radovi na berbi kukuruza mogli skoro neometano da se obavljaju (Agrometeorološke informacije, Republički hidrometeorološki savez Srbije, 2012).

Opisani vremenski uslovi smatraju se izuzetno pogodnim za razvoj *Aspergillus* plesni i sintezu aflatoksina, o čemu svedoče mnogobrojni literaturni podaci (Azzis i sar., 2005; Wu i sar., 2011; Karami-Osboo i sar., 2012; EFSA, 2012). Kao prilog

dobijenim rezultatima u vezi sa pojavom aflatoksina u kukuruзу, svedoče i nedavno objavljeni podaci iz Hrvatske (Pleadin i sar., 2014a). Od 633 analizirana uzorka kukuruза, primenom ELISA metode, ustanovljeno je da je 241 (38%) uzorak bio kontaminiran aflatoksinima sa srednjom koncentracijom od 81 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Analizirani uzorci bili su iz proizvodne 2012. godine, koja je bila okarakterisana sličnim vremenskim uslovima kao i u Republici Srbiji. Takođe, rezultati iz Hrvatske koji su obuhvatili uzorke kukuruза iz perioda od 2009. do 2013. godine, ukazali su da je najveća kontaminacija aflatoksinima zabeležena u uzorcima iz 2012. godine (Pleadin i sar., 2014b). Pored objavljenih podataka iz Hrvatske, nema puno objavljenih podataka o pojavi aflatoksina iz drugih zemalja Evrope. Kao razlog tome navode se klimatski uslovi, koji u većem delu Evrope ne pogoduju razvoju *Aspergillus* plesni i sintezi aflatoksina. Najveći broj radova iz Evrope potiče iz Italije, Turske i Rumunije, gde klimatski uslovi u nekim proizvodnim godinama mogu pogodovati razvoju plesni i sintezi aflatoksina (EFSA, 2012).

U Tabeli 5.5. prikazani su neki od objavljenih podataka o pojavi aflatoksina u kukuruзу iz različitih zemalja.

Tabela 5.5.. Pojava aflatoksina u kukuruзу iz literaturnih podataka

Zemlja	Godin a	N(%)	Csr ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Cmax ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Referenca
Argentina	2003	6	1,5	159	Garrido i sar., 2012.
	2004	5	0,5	60,1	
	2005	2	0,5	35,2	
Kenija	2004	53	20,5	46400	Azzis i sar., 2005.
Rumunija	2005	27,3	-	3,92	Braicu i sar., 2008.
Iran	2006	56	10,3	55,8	Karami-Osboo i sar., 2012.
	2007	42	43,2	150,3	
	2008	50	17,7	214,4	
Italija	2007	100	26,3	820	Covarelli, i sar., 2011.
Pakistan	2009	40	10,4	18,5	Luftullah i Hussain, 2012.
	2011	35	12,1	19,5	
Hrvatska	2012	38	81	2072	Pleadin i sar., 2014a.

N (%): procenat kontaminiranih uzoraka

C ($\mu\text{g}/\text{kg}$): srednja vrednost koncentracije aflatoksina

Kao što se može uočiti iz podataka prikazanih u Tabeli 5.5., najveći procenat kontaminiranih uzoraka zabeležen je u Italiji, Iranu i Keniji u onim proizvodnim godinama u kojima su vremenski uslovi okarakterisani kao sušni, imali veliki uticaj na pojavu plesni i aflatoksina.

Pored svega navedenog, potrebno je istaći da su opisani vremenski uslovi zabeleženi tokom proizvodne 2012. Godine, kao i pojava aflatoksina u kukuruзу, u velikoj meri prouzrokovali veoma slab ili prepolovljen rod kukuruza u većini proizvodnih regiona, dok je u nekim područjima rod potpuno izostao. U regionima gde su primenjivane odgovarajuće agrotehničke mere i gde je vršeno navodnjavanje, kukuruz je bio u relativno boljem stanju. Navedenu pojavu potvrđuju i podaci prikazani u Tabeli 5.6., koji su preuzeti sa sajta www.indexmundi.com/agriculture.

Tabela 5.6. Statistički podaci o proizvodnji kukuruza u Republici Srbiji za period 2009-2012: zasejana površina (ha), prinos (Mt), količina za izvoz (Mt)

Godina	Zasejana površina (ha)	Prinos (Mt)	Količina za izvoz (Mt)
2009	1 200 000	6400	1343
2010	1 230 000	6800	2004
2011	1 260 000	6300	2200
2012	1 250 000	3900	300

Preuzeto sa www.indexmundi.com/agriculture

Iako je zasejana površina u ispitivanom četvorogodišnjem periodu bila približna (1,2 Mha), iz Tabele 5.6. vidi se da je prinos kukuruza zasejanog tokom 2012. godine bio skoro upola manji u odnosu na prethodne tri godine. Pored toga, kao što i prethodni literaturni podaci potvrđuju (Charmley i sar., 1995; Otsuki i sar., 2001; AMCE, 2010) pojava suše, *Aspergillus* plesni i aflatoksina u velikoj meri su doprineli i smanjenu ekonomskog profita zemlje jer je izvoz kukuruza smanjen za oko 80 %.

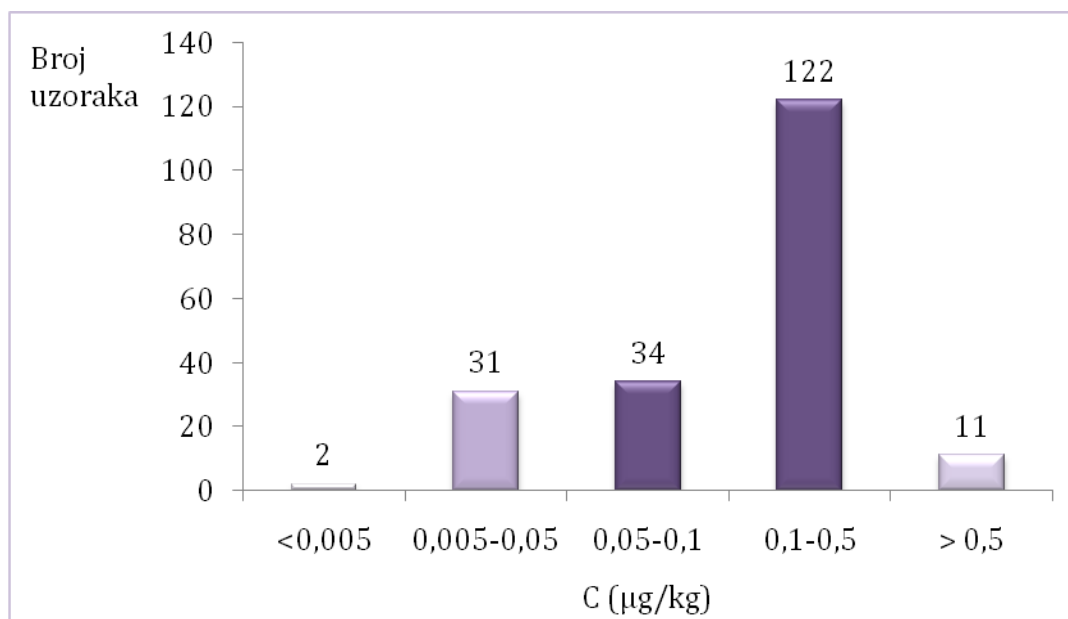
5.2. Analiza pojave AFM1

Usled pojave aflatoksina u uzorcima kukuruza iz proizvodne 2012. godine, odlučeno je da se u ovoj doktorskoj disertaciji ispita i da li pojava aflatoksina u kukuruzu, koji se u Srbiji uglavnom koristi za ishranu životinja, uslovljava i pojavu AFM1 u mleku.

Prema podacima iz 2010. godine u Srbiji postoji oko 200 registrovanih mlekara, od čega su 123 aktivne. Smatra se da postoji i više od navedenog broja mlekara, ali da posluju u oblasti sive ekonomije. Najveći deo tržišta zauzimaju veliki proizvođači mleka (90%), dok srednji (6%) i manji (4%) zauzimaju znatno manji deo. Glavni snabdevači mlekara su manje porodične i veće komercijalne farme, koje su u privatnom ili državnom vlasništvu (Berkum, 2010). Kravlje mleko zauzima oko 99% ukupne proizvodnje mleka u Srbiji, sa prosečnom godišnjom proizvodnjom od oko 1,6 miliona tona. Oko 52% od ukupne količine mleka se preradi u mlekarama. Na tržištu Srbije najzastupljenije je sterilizovano mleko (UHT), zatim pasterizovano i najmanje sveže mleko (Božić i sar., 2009).

Na osnovu navedenih podataka i najveće zastupljenosti kravljeg mleka u odnosu na druga mleka u Srbiji, ispitana je pojava AFM1 u 200 uzoraka kravljeg mleka. Broj uzoraka mleka po kategoriji kravljeg mleka određen je na osnovu zastupljenosti pojedinih kategorija na tržištu. S obzirom na veliki broj uzoraka, analize su izvedene validovanom ELISA metodom, jer je kako je već i ranije napomenuto, ELISA metoda znatno brža u odnosu na hromatografske metode i izvodi se bez prethodne pripreme uzoraka.

Analizom 200 uzoraka kravljeg mleka ustanovljeno je da u samo 2 (1%) uzorka nije pronađen AFM1 u koncentraciji iznad LOQ (0,005 µg/kg) vrednosti metode, dok je 198 (99%) uzoraka sadržalo AFM1 iznad navedene koncentracije. Na Slici 5.7. prikazana je raspodela broja uzoraka na osnovu određenih koncentracija AFM1.



Slika 5.7. Raspodela uzoraka na osnovu sadržaja koncentracije AFM1

Sa Slike 5.7 može se uočiti da je u 31 (15,5%) uzorku mleka koncentracija AFM1 bila u intervalu između LOQ vrednosti i 0,05 µg/kg, dok je 34 (17%) uzoraka sadržalo koncentraciju od 0,05 do 0,10 µg/kg. Najveći broj uzoraka mleka (122, 61%) sadržao je AFM1 u intervalu od 0,10 do 0,50 µg/kg, dok je u 11 (5,5) uzoraka koncentracija bila iznad 0,50 µg/kg. Na osnovu navedenih rezultata može se uočiti da je od 200 analiziranih uzoraka kravljeg mleka, samo 33 (16,5%) uzoraka imalo koncentraciju AFM1 ispod 0,05 µg/kg tj. propisane MDK vrednosti prema Pravilnicima Evropske Unije (EC/1881/2006) i Republike Srbije („Sl. Glasnik RS”, 28/2011, do 01.03.2013.). Usled pojave AFM1 u mleku, u Republici Srbiji promenjena je MDK vrednost na 0,50 µg/kg („Sl. Glasnik RS”, 20/2013, od 01.03.2013. do 01.07.2014.). Prema navedenom Pravilniku, u 11 (5,5%) uzoraka mleka koncentracija AFM1 nije bila u skladu sa novom propisanom MDK vrednosti.

Kao što je i ranije napomenuto, broj i udeo analiziranih kategorija kravljeg mleka u ovoj doktorskoj disertaciji koncipiran je na osnovu dostupnih podataka o njihovoj zastupljenosti na tržištu Republike Srbije. Na osnovu toga, najviše je analizirano uzoraka UHT (48%) mleka, zatim pasterizovanog mleka (18,5%)

proizvedenog u velikim mlekarama, svežeg mleka sa farmi (20%) i pasterizovanog mleka proizvedenog u manjim mlekarama (9,5%). S obzirom na to da u Srbiji postoji samo jedna mlekara koja proizvodi organsko mleko, analizirano je i 8 (6%) uzoraka organskog mleka.

U Tabeli 5.7. prikazani su sumarni podaci u vezi sa pojavom AFM1 po analiziranim kategorijama mleka. Iz prikazanih rezultata može se videti u kojoj meri je svaka ispitana kategorija kravljeg mleka bila kontaminirana AFM1, kao i srednje, minimalne, median i maksimalne koncentracije AFM1.

Tabela 5.7. Prisustvo AFM1 u analiziranim uzorcima kravljeg mleka

Proizvođač	Veliki			Mali		Farma	Ukupno
Kategorija	UHT	P	O	P	S		
N	96	37	8	19	40		200
Opseg koncentracija (µg/kg)	< 0,005	-	-	-	-	2 (5,0)	2 (1,0)
	0,005-0,05	12 (12,5)	4 (10,8)	6 (75)	1 (5,3)	8 (20)	31 (15,5)
	0,05-0,10	14 (14,6)	7 (18,9)	2 (25)	1 (5,3)	10 (25)	34 (17)
	0,10-0,50	70 (72,9)	25 (67,6)	-	11 (57,9)	16 (40)	122 (61)
	>0,50	-	1 (2,7)	-	6 (31,5)	4 (10)	11 (5,5)
Med	0,151	0,178	0,037	0,235	0,124		0,170
SRV	0,165	0,198	0,080	0,372	0,209		0,197
STD	0,094	0,129	0,073	0,308	0,191		0,176
Min	0,019	0,033	0,010	0,044	0,019		0,010
Max	0,410	0,700	0,201	1,200	0,689		1,200

N: Broj uzoraka

P: pasterizovano; O: organsko; S: sveže mleko

Opseg koncentracija: broj (procenat)

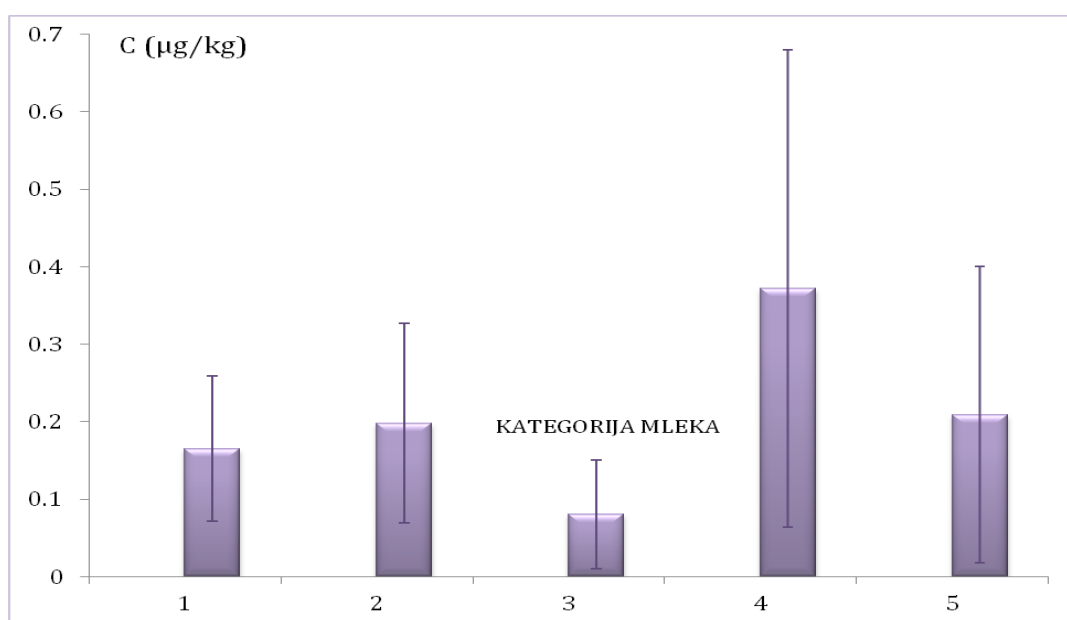
Med: Median (µg/kg)

SRV±SD: Srednja vrednost koncentracije (µg/kg) ± standardna devijacija (µg/kg)

Min-Max: minimalna i maksimalna koncentracija (µg/kg)

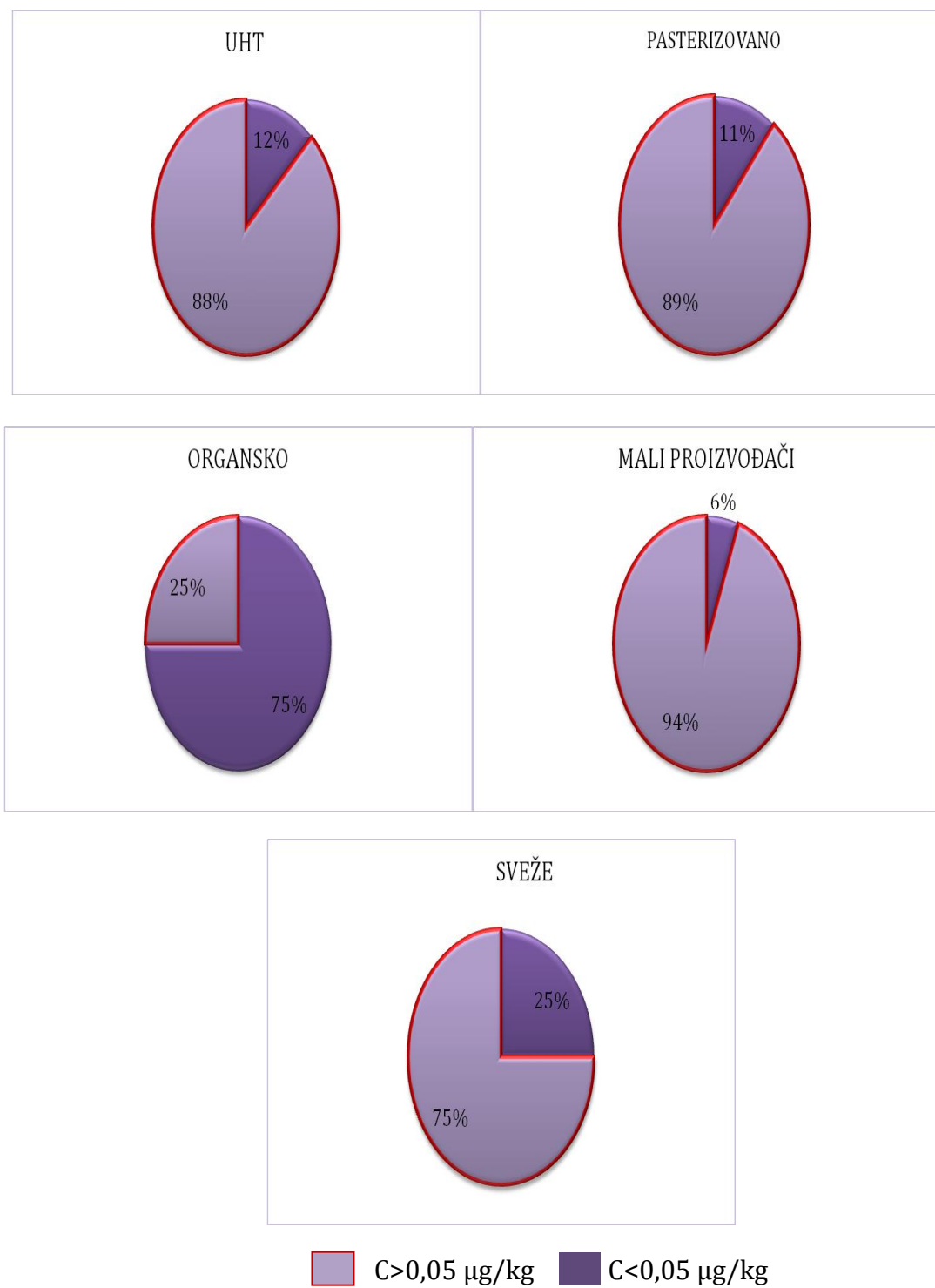
Određene srednje vrednosti koncentracija AFM1 sa standardnim devijacijama za analizirane kategorije kravljeg mleka prikazane su na Slici 5.8. Najveću srednju

vrednost koncentracije AFM1 ($0,372 \pm 0,308 \mu\text{g}/\text{kg}$) sadržala su pasterizovana mleka proizvedena u manjim pogonima. Približne srednje vrednosti AFM1 pronađene su u svežim uzorcima mleka sa farmi ($0,209 \pm 0,191 \mu\text{g}/\text{kg}$), kao i pasterizovanom mleku od velikih proizvođača ($0,198 \pm 0,129 \mu\text{g}/\text{kg}$). Neznatno manja srednja koncentracija AFM1 pronađena je u UHT mleku ($0,165 \pm 0,094 \mu\text{g}/\text{kg}$). Najmanja srednja koncentracija AFM1 ($0,080 \pm 0,073 \mu\text{g}/\text{kg}$) bila je u uzorcima organskog mleka. Treba napomenuti da su sve izračunate srednje vrednosti bile znatno iznad MDK od $0,05 \mu\text{g}/\text{kg}$.



Slika 5.8. Srednje vrednosti koncentracija AFM1 sa standardnim devijacijama za analizirane kategorije mleka (Veliki proizvođači: 1. UHT, 2. Pasterizovano, 3. Organsko; Mali proizvođači: 4. Pasterizovano sa farmi: 5. Sveže mleko)

Na Slici 5.9. prikazano je poređenje ispitanih kategorija mleka prema procentu uzoraka u kojima je koncentracija AFM1 bila iznad MDK ($0,05 \mu\text{g}/\text{kg}$).



Slika 5.9. Procenat ispravnih i neispravnih uzoraka mleka

Sa Slike 5.9. vidi se da je najveći procenat (94%) neispravnih uzoraka bio unutar ispitanih uzoraka pasterizovanog mleka od malih proizvođača. Takođe, može se primetiti da su i ostale vrste ispitanih uzoraka mleka pokazale visok procenat neispravnih uzoraka: 89% pasterizovanih i 88% sterilizovanih uzoraka mleka od velikih proizvođača i 75% uzoraka svežeg mleka sa farmi. Najmanji procenat (25%) neispravnih uzoraka pronađen je kod uzoraka organskog mleka.

Raspon određenih koncentracija AFM1 u 200 analiziranih uzoraka kravljeg mleka kretao se od 0,01 µg/kg u organskom mleku do 1,20 µg/kg u pasterizovanom mleku manjih proizvođača. Najniži nivo kontaminacije organskog mleka može se objasniti rigoroznijom kontrolom hrane za životinje i mleka u poređenju sa konvencionalnim načinom proizvodnje. Međutim, literaturni podaci ukazuju na različite nivoe kontaminacije u organskim i konvencionalnim uzorcima mleka (Ghidini i sar., 2005; Vallone i sar., 2006). Takođe, najviši detektovani nivo AFM1 u pasterizovanom mleku može ukazivati na lošiji stepen kontrole hrane za životinje i mleka kod manjih proizvođača.

Pojava AFM1 u analiziranim uzorcima kravljeg mleka iz 2012. godine može se dovesti u vezu su sušnim vremenkim uslovima i pojavom aflatoksina u kukuruзу (Kos i sar., 2013). Činjenica da je 79% analiziranih uzoraka kukuruza iz 2012. godine bilo kontaminirano aflatoksinima i da se najveći deo proizvedenog kukuruza (80-90%) u Srbiji koristi za ishranu životinja, dodatno potvrđuje prethodno definisan uzrok pojave AFM1 u mleku. Takođe, brojni literaturni podaci ukazuju na uticaj vremenskih uslova na pojavu aflatoksina u žitima, koja se koriste kao komponente hrane za životinje i direktno utiču na pojavu AFM1 u mleku (EFSA, 2010).

Najveći broj objavljenih naučnih podataka o pojavi AFM1 u mleku potiče iz oblasti mediterana i srednjeg istoka, gde su vremenski uslovi pogodni za razvoj *Aspergillus* vrsta, sintezu aflatoksina, a samim tim i pojavu AFM1 u mleku (EFSA, 2010). Objavljeni radovi ukazuju da su u Iranu, Indiji, Tajlandu, Brazilu, Siriji i Keniji zabeležene česte pojave AFM1 u mleku i mlečnim proizvodima (Duarte i sar., 2013). Nasuprot tome, literaturni podaci potvrđuju da je pojava AFM1 u mleku iz evropskih

zemalja znatno ređa, ili je ovaj mikotoksin uglavnom prisutan u koncentracijama ispod MDK (0,05 µg/kg). Neki od objavljenih podataka o pojavi AFM1 u mleku prikazani su u Tabeli 5.8.

Tabela 5.8. Pojava AFM1 u kravljem mleku iz literaturnih podataka

Zemlja	Godina	Metoda	N(%)	N (%) C(AF _{M1})>0,05 µg/kg	Referenca
Nevropske zemlje					
Egipat	2003-2004	ELISA	100	33	Motawee i sar., 2009.
Indija	2004	ELISA	94,4	94,4	Rastogi i sar., 2004.
Sirija	2005-2006	ELISA	95	58,6	Ghanem i Orfi, 2009.
Brazil	2006	HPLC-FLD	95,3	51,5	Shundo i sar., 2009.
Kenija	2006	ELISA	97,8	30,3	Kangethe i Langa, 2009.
Iran	2007-2008	ELISA	78,7	36	Rahimi i sar., 2010.
Tajland	2006-2007	HPLC-FLD	100	64,6	Ruangwises i Ruangwises, 2009.
Evropske zemlje					
Španija	2000-2001	ELISA	5,4	0	Velasco i sar., 2003.
Portugal	2005	HPLC-FLD	65,8	8,2	Martins i sar., 2005.
Turska	2006	ELISA	58,1	47	Unusan, 2006.
Španija	2008	ELISA	78,7	36	Cano-Sanco i sar., 2010.
Hrvatska	2009	ELISA	5	1,6	Bilandžić i sar., 2010.
Grčka	2009-2010	ELISA	46,5	1	Tsakiris i sar., 2013.
Portugal	2011	ELISA	27,5	5	Duarte i sar., 2013.
Turska	2012	HPLC-FLD	30,1	17	Golge, 2014.
Hrvatska	2013	ELISA	17,5	3,86	Bilandžić i sar., 2014.

N (%): procenat kontaminiranih uzoraka

Iz prikazanih podataka u Tabeli 5.8. može se uočiti da je znatno veća pojava AFM1 zabeležena u neevropskim u poređenju sa evropskim zemljama. Procenat kontaminiranih uzoraka mleka kretao se od 78,7% u Iranu do 100% u Egiptu i Tajlandu, dok se procenat uzoraka sa koncentracijom AFM1 većom od 0,05 µg/kg kretao od 30,3% u Keniji do 94,4% u Indiji. Takođe, primećuje se da je pojava AFM1 karakterističnija za evropske zemlje sa toplijom klimom (Turska, Portugal, Španija, Grčka) u odnosu na evropske zemlje sa umerenom klimom.

O pojavi AFM1 u zemljama iz okruženja Srbije ima veoma malo podataka. Najviše publikovanih podataka iz zemalja okruženja potiče iz Hrvatske. Iako su, kako je već i ranije navedeno, u Hrvatskoj tokom perioda rasta kukuruza 2012. godine zabeleženi sušni uslovi koji su usloveli da 38,1% uzoraka kukuruza bude kontaminirano AFB1 sa koncentracijama u intervalu od 1,1 do 2072 µg/kg (Pleadin i sar., 2014a), pojava AFM1 u mleku bila je znatno niža u odnosu na isti period u Srbiji. Od 337 uzoraka kravljeg mleka, 59 (17,5%) uzoraka bilo je kontaminirano AFM1, od čega je u samo 13 uzoraka koncentracija AFM1 bila iznad MDK od 0,05 µg/kg (Bilandžić i sar., 2014). Dakle, u Hrvatskoj je i pored visoke kontaminacije kukuruza zabeležena niža frekventnost pojave AFM1 u mleku. Kao razlog ovome može se navesti činjenica da je Pravilnik o kontroli aflatoksina u kukuruzu iz Hrvatske u potpunosti usklađen sa Pravilnikom Evropske Unije, pri čemu je kontrola kukuruza znatno rigoroznija i učestalija u odnosu na Srbiju. Pored toga, u periodu kada je u Srbiji zabeležena pojava aflatoksina u kukuruzu i mleku na snazi je bio Pravilnik iz 2010. godine („Sl. glasnik RS”, 4/2010). Navedenim Pravilnikom MDK vrednosti za aflatoksin u kukuruzu (50 µg/kg) koji se koristi za ishranu životinja i potpunim smešama za muzne životinje (10 µg/kg) bile su znatno iznad MDK za AFB1 propisanih Evropskim pravilnikom (20 µg/kg odnosno 5 µg/kg).

Pojava AFM1 u mleku iz Srbije do sada je opisana u samo dva rada. Janković i sar. (2009) objavili su da je 3 od 23 analizirana uzorka kravljeg mleka bilo kontaminirano AFM1 iznad 0,05 µg/kg, dok su Polovinski-Horvatović i sar. (2010) godinu dana kasnije objavili da nijedan od 70 analiziranih uzoraka kravljeg mleka nije

sadržao koncentraciju AFM1 iznad 0,05 µg/kg. Nizak nivo kontaminacije i pojave AFM1 u mleku u prethodnim godinama u Republici Srbiji može se objasniti umerenim klimatskim uslovima i odsustvom aflatoksina u kukuruzu i drugim žitima koja se koriste za ishranu mlečnih životinja u Srbiji (Kokić i sar., 2009; Matić i sar., 2010; Kos i sar., 2013).

5.3. Procena rizika pojave AFM1 u mleku

Kao uzorak za procenu rizika u ovoj doktorskoj disertaciji odabrano je mleko, jer ono usled velike frekventnosti u ishrani ljudi predstavlja namirnicu sa najvećim potencijalom za unos aflatoksina u organizam ljudi (Erkekoglu i sar., 2008).

Rizik od pojave AFM1 u mleku procenjen je na osnovu analize 200 uzoraka kravljeg mleka i analize ankete koja je obuhvatila 1500 ispitanika. Anketirani ispitanici podeljeni su u pet starosnih kategorija, a podela je izvršena i na osnovu polova. Obradeni podaci ukazali su nam na prosečnu telesnu masu (TM) i prosečan unos mleka u toku dana (l/dan). Na osnovu navedenih podataka izračunat je i prosečan unos mleka u toku dana po kg TM na dan u zavisnosti od pola i starosne kategorije ispitanika. Dobijeni i obradeni rezultati prikazani su u Tabeli 5.9.

Tabela 5.9. Prosečna telesna masa i unos mleka u zavisnosti od starosne kategorije i pola

Starosna kategorija	Prosečna TM (kg)		Unos mleka l/dan		Unos mleka l/kg TM	
	M	Ž	M	Ž	M	Ž
1-5	14	14	0,44	0,43	0,031	0,030
5-15	38	37	0,42	0,32	0,011	0,009
15-25	74	55	0,44	0,11	0,006	0,002
25-55	90	69	0,21	0,18	0,002	0,003
>55	89	71	0,22	0,23	0,002	0,003

TM: telesna masa

M: muškarci

Ž: žene

Iz rezultata prikazanih u Tabeli 5.9. vidi se da najveću količinu mleka piju deca uzrasta od 1 do 5 godina, kao i da je veći unos mleka karakterističniji za muški pol. Rezultati ankete ukazali su i da je kravlje mleko najzastupljenije (99,3%) i da svega 10 (0,83%) ispitanika ne konzumira kravlje mleko. Nakon dobijanja podataka o prosečnoj TM i unosu mleka u toku dana, pristupljeno je izražavanju rizika odnosno izloženosti različitih polova i starosnih kategorija AFM1 iz mleka. Procenjeni dnevni unos (EDI) za AFM1 izračunat je na osnovu najmanje (0,010 µg/kg), srednje (0,197 µg/kg) i najveće (1,200 µg/kg) određene koncentracije AFM1 u ispitanih 200 uzoraka kravljeg mleka, sa ciljem da se izrazi minimalna, srednja i maksimalna EDI vrednost za AFM1. U Tabeli 5.10. prikazane su EDI vrednosti (ng/kg TM/dan) za AFM1 u zavisnosti od pola i starosne kategorije.

Tabela 5.10. Procena dnevnog unosa (EDI) AFM1 za koncentracije 0,010; 0,197 i 1,200 µg/kg

Starosna kategorija	EDI		EDI		EDI	
	ng/kg TM/dan C=0,010 µg/kg		ng/kg TM/dan C=0,197 µg/kg		ng/kg TM/dan C=1,200 µg/kg	
	M	Ž	M	Ž	M	Ž
1-5	0,31	0,30	6,05	5,87	36,8	35,8
5-15	0,11	0,09	2,19	1,74	13,4	10,6
15-25	0,06	0,02	1,19	0,39	7,18	2,39
25-55	0,02	0,03	0,46	0,52	2,80	3,17
>55	0,02	0,03	0,48	0,65	2,90	3,96

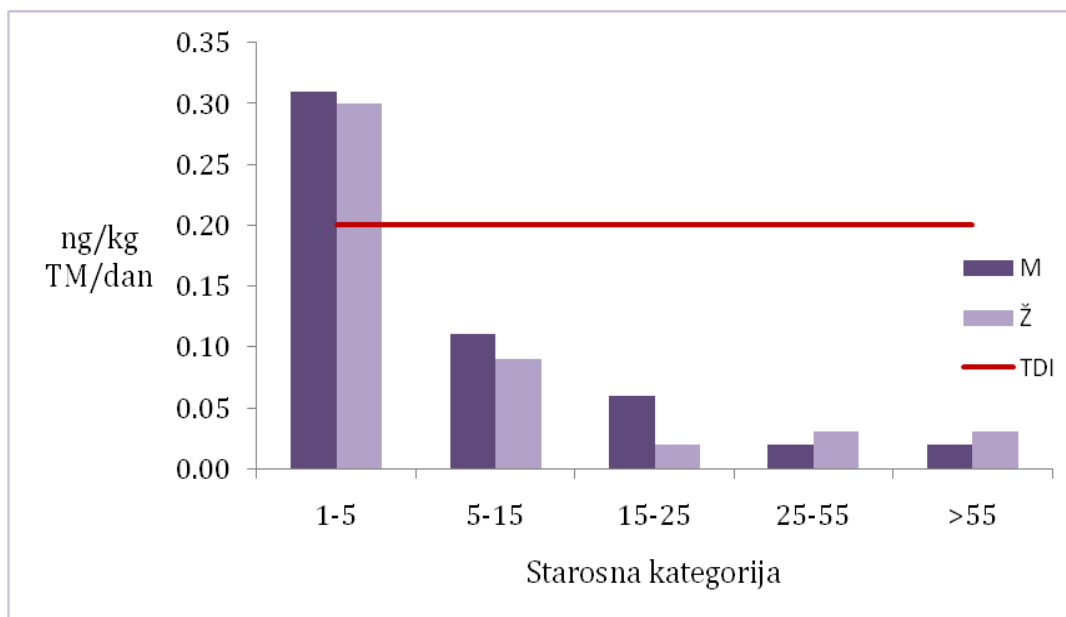
TM: telesna masa

M: muškarci

Ž: žene

Rezultati prikazani u Tabeli 5.10. ukazuju da se EDI vrednosti povećavaju sa smanjenjem starosne kategorije, jer kako je već i ranije naglašeno, deca konzumiraju znatno veće količine mleka u odnosu na njihovu TM. Pri analizi rizika od unosa mleka sa najmanjom određenom koncentracijom AFM1 (0,010 µg/kg) postoji rizik samo kod starosne kategorije dece od prve do pete godine, jer je izračunata EDI vrednost iznad vrednosti od 0,2 ng/kg TM/dan koja prema Kuiper-Goodman (1990) predstavlja TDI vrednost. Kao što se može videti na Slici 5.10., pri unosu mleka sa koncentracijom

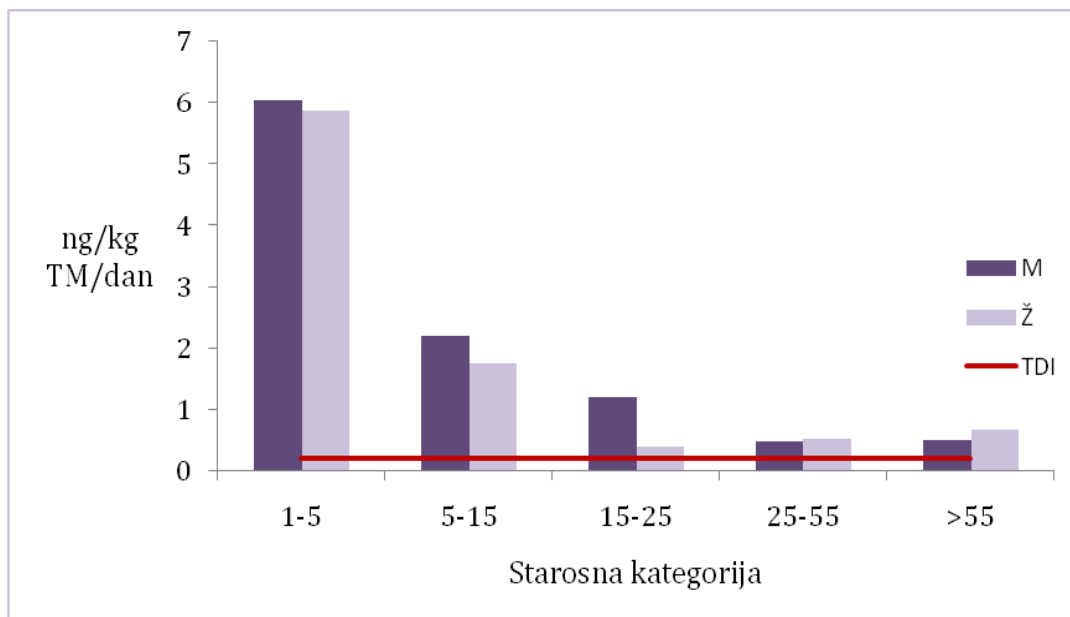
AFM1 od 0,010 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ostale starosne kategorije ne unose količinu iznad 0,2 ng/kg TM/dan.



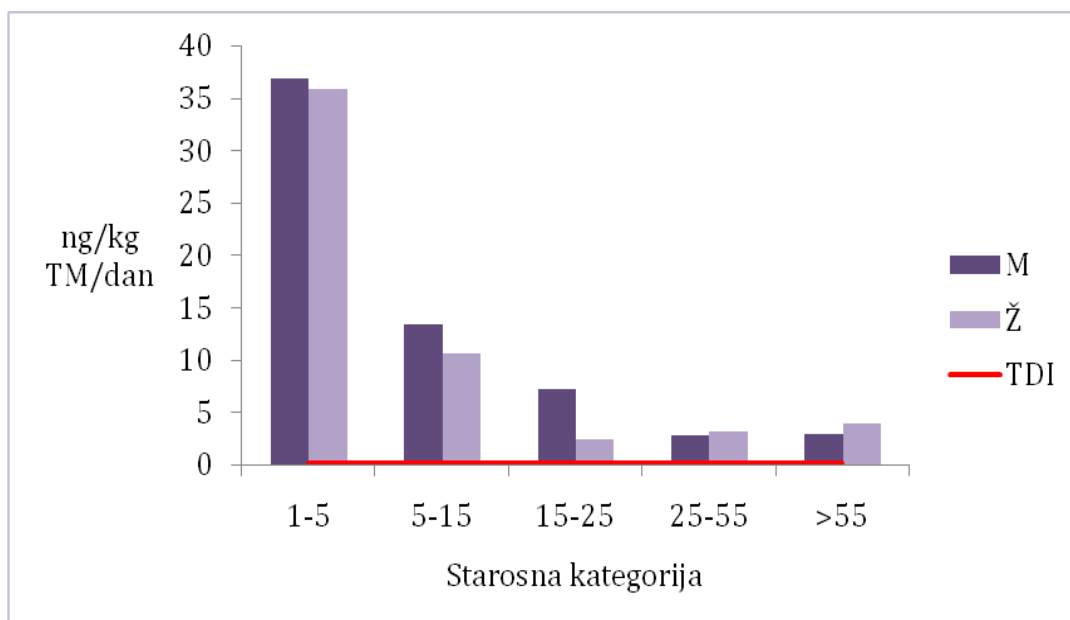
Slika 5.10. Poređenje vrednosti dozvoljenog dnevnog unosa (TDI) sa izračunatim vrednostima za procenjeni dnevni unos (EDI) za C (AFM1)=0,010 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Za mleko sa prosečnom koncentracijom AFM1 od 0,197 $\mu\text{g}/\text{kg}$ postoji rizik, jer je izračunata EDI vrednost iznad TDI vrednosti za sve ispitane starosne kategorije (Slika 5.11.). I pri ovoj koncentraciji najveći rizik je za decu od prve do pete godine.

S obzirom da je ustanovljeno da se konzumiranjem mleka sa koncentracijom AFM1 od 0,197 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za sve starosne kategorije EDI vrednost znatno prevazilazi TDI vrednost, može se zaključiti da bi se konzumiranjem ostalih mleka (79) koja imaju koncentraciju AFM1 veću od 0,197 $\mu\text{g}/\text{kg}$ takođe povećavala EDI vrednost. Pored toga, konzumiranjem mleka sa najvećom određenom koncentracijom AFM1 od 1,20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, dnevni unos AFM1 za sve starosne kategorije bio bi znatno viši od 0,2 ng/kg TM/dan (Slika 5.12).



Slika 5.11. Poređenje vrednosti dozvoljenog dnevnog unosa (TDI) sa izračunatim vrednostima za procenjeni dnevni unos (EDI) za C (AFM1)=0,197 $\mu\text{g}/\text{kg}$



Slika 5.12. Poređenje vrednosti dozvoljenog dnevnog unosa (TDI) sa izračunatim vrednostima za procenjeni dnevni unos (EDI) za C (AFM1)=1,200 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Da bi se procenio rizik usled konzumiranja mleka različitih nivoa koncentracija AFM1, za sve starosne kategorije izračunat je indeks opasnosti (HI) (Tabela 5.11.).

Tabela 5.11. Procena rizika na osnovu ineksa opasnosti (HI)

Starosna kategorija	HI					
	C (AFM1) 0,010 µg/kg		C (AFM1) 0,197 µg/kg		C (AFM1) 1,200 µg/kg	
	M	Ž	M	Ž	M	Ž
1-5	1,54	1,49	30,2	29,3	184	179
5-15	0,56	0,44	10,9	8,70	67,0	53,0
15-25	0,30	0,10	5,95	1,95	35,9	11,9
25-55	0,12	0,13	2,30	2,60	14,0	15,8
>55	0,12	0,17	2,40	3,25	14,5	19,8

M: muškarci

Ž: žene

Svaka izračunata HI vrednost veća od 1 ukazuje na postojanje rizika (Kuiper-Godman, 1990). Na osnovu rezultata iz Tabele 5.11. vidi se da za najmanju određenu koncentraciju AFM1 od 0,010 µg/kg postoji rizik za dečake i devojčice starosti od prve do pete godine. Za ostale ispitane starosne kategorije HI vrednost je manja od 1. Za unos koncentracije AFM1 od 0,197 µg/kg, HI vrednosti kreću se u intervalu od 2,25 do 30,2; dok je za koncentraciju od 1,20 µg/kg interval HI vrednosti od 11,9 do čak 184. Usled dokazanog kancerogenog, mutagenog, teratogenog i imunosupresivnog efekta AFM1 na organizam ljudi (IARC, 2002; Williams i sar., 2004) može se zaključiti da za sve starosne kategorije postoji izuzetan rizik od konzumiranja mleka koje je kontaminirano AFM1. Pored toga, HI vrednosti za dečake, uzrasta od prve do pete godine, koji konzumiraju mleko sa koncentracijama AFM1 od 0,197 µg/kg ili 1,20 µg/kg, iznose 30 odnosno 184, redom. Za devojčice istog uzrasta HI vrednosti za navedene koncentracije iznose 29 odnosno 179. Ovo dodatno povećava rizik i opasnost od konzumiranja kontaminiranog mleka jer prisustvo aflatoksina u ishrani dece, usled njihovog intenzivnog rasta i razvoja, može dovesti do čitavog niza negativnih efekata: mutacije gena, anomalije hromozoma, transformacije ćelija, zaostajanja u rastu i

razvoju, dizbalansu hranjivih materija, kancera, pa i smrti (IARC, 2002; Williams i sar., 2004).

Usled visoke frekventnosti kontaminacije mleka (99%) i uočenog visokog rizika u slučaju konzumiranja kontaminiranog mleka, izvršena je i procena koncentracija AFM1 čijim konzumiranjem u zavisnosti od pola, starosne kategorije, prosečne težine i prosečnog unosa mleka ne bi bio prevaziđen nivo TDI vrednosti (0,2 ng/kg TM/dan). Navedena procena prikazana je u Tabeli 5.12.

Tabela 5.12. Procena dozvoljenih koncentracija AFM1 u zavisnosti od pola i starosne kategorije

Starosna kategorija	M		Ž	
	Maksimalno dozvoljena C (AFM1) µg/kg	N (%)	Maksimalno dozvoljena C (AFM1) µg/kg	N (%)
1-5	0,006	2 (1)	0,006	2 (1)
5-15	0,017	4 (2)	0,021	6 (3)
15-25	0,032	14 (7)	0,095	64 (32)
25-55	0,08	46 (23)	0,07	38 (19)
>55	0,08	46 (23)	0,06	31 (15,5)

N (%): broj i procenat uzoraka koji određeni pol i starosna kategorija smeju da konzumiraju

M: muškarci

Ž: žene

Iz Tabele 5.12. može se zaključiti da dečaci i devojčice uzrasta od prve do pete godine ne bi trebalo da konzumiraju mleko koje je kontaminirano AFM1 u koncentraciji iznad 0,006 µg/kg. Na osnovu toga, navedena starosna kategorija od 200 ispitanih uzoraka mleka, bez postojanja rizika, mogla bi da konzumira samo 2 (1%) uzorka svežeg mleka sa farmi u kojima je koncentracija AFM1 bila ispod navedene koncentracije. U skladu sa navedenim rezultatima i Tsakiris i sar. (2013) su procenili da za decu do treće godine sa prosečnom težinom od 14 kg svaki nivo kontaminacije mleka AFM1 predstavlja rizik.

Dečaci uzrasta od pet do petnaest godina mogli bi da konzumiraju samo 4 (2%) uzorka mleka u kojima je koncentracija AFM1 ispod 0,017 µg/kg, dok bi devojčice istog uzrasta mogle bez rizika da konzumiraju 6 (3%) od 200 uzoraka mleka u kojima je

koncentracija AFM1 ispod 0,021 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Može se uočiti da se sa povećanjem starosne kategorije, i pre svega TM povećava i procenjena dozvoljena koncentracija AFM1, tako da bi ispitanici muškog pola uzrasta od 15 do 25 godina mogli da konzumiraju 14 (7%) uzoraka sa koncentracijama AFM1 nižim od 0,032 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Takođe, sa povećanjem starosne kategorije povećava se TM, ali i smanjuje količina mleka koje se konzumira u toku dana, pa se iz Tabele 5.12. može videti da žene uzrasta od 15 do 25 godina, kao i žene i muškarci uzrasta od 25 do 50 godina, i stariji od 55 godina mogu konzumirati uzorke mleka u kojima je koncentracija AFM1 i iznad 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$, što je MDK vrednost prema pravilniku Evropske Unije (EC/1881/2006). I pored navedene mogućnosti, a usled visoke kontaminacije ispitanih uzoraka mleka, navedene kategorije ispitanika bez rizika bi mogle da konzumiraju između 17 (C (AFM1)<0,032 $\mu\text{g}/\text{kg}$) i 59 (C (AFM1)<0,095 $\mu\text{g}/\text{kg}$) od 200 ispitanih uzoraka mleka.

Prethodni literaturni podaci o proceni rizika usled konzumiranja mleka kontaminiranog AFM1 uglavnom su bili orjentisani na procenu rizika za odrasle osobe, izuzimajući decu. Takođe, u navedenim studijama nisu ispitane prosečne TM i unos mleka za različite polove i starosne kategorije, već su preuzimani nacionalni podaci za odrasle osobe koje u proseku imaju oko 60 kg. Prema Leblanc i sar. (2005) EDI vrednost u Francuskoj iznosi svega 0,01 ng/kg TM/dan, dok za Španiju iznosi 0,305 ng/kg TM/dan (Cano-Sancho i sar., 2010). Zinedine i sar. (2007) su procenili rizik od 3,26 ng/kg TM/dan. Treba napomenuti i da su u navedenim literaturnim podacima procenjeni unosi AFM1 izraženi na osnovu određenih srednjih koncentracija AFM1. Prema istraživanju objavljenom od strane JECFA (2001), koje je obuhvatilo 5 različitih regiona sveta, najveća količina mleka konzumira se u Evropskoj Uniji, dok se najveće koncentracije AFM1 pronalaze na Dalekom Istoku. U skladu sa tim, a kao što se može i videti iz podataka u Tabeli 5.13. najveće EDI vrednosti za AFM1 izražene su za Daleki i Bliski Istok. Iako se u Evropskoj Uniji konzumira najveća količina mleka, usled niske prosečne koncentracije AFM1 (0,023 $\mu\text{g}/\text{kg}$) procenjena je i niža EDI vrednost. Takođe, može se uočiti da su procenjenije EDI vrednosti iz 2001. godine za pet različitih regiona, ispod procenjenih EDI vrednosti u ovoj doktorskoj disertaciji.

Tabela 5.13. Dnevni unos AFM1 preko mleka u pet regiona sveta

Region	Prosečne vrednosti			
	Unos mleka (kg/dan)	AFM1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Unos AFM1	
			ng/dan	ng/kg TM/dan
Evropska Unija	0,290	0,023	6,8	0,110
Latinska Amerika	0,160	0,022	3,5	0,058
Daleki Istok	0,032	0,360	12	0,200
Bliski Istok	0,120	0,005	0,6	0,100
Afrika	0,042	0,002	0,1	0,002

Rezultati preuzeti od Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA, 2001)

5.4. Optimizacija metodologije određivanja aflatoksina u kukuruзу

Za optimizaciju metodologije određivanja aflatoksina (AFB1, AFB2, AFG1 i AFG2) analizirano je trideset odabranih prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruза. Određivanje aflatoksina u kukuruзу izvršeno je primenom ELISA, HPLC-FLD, HPLC-UV light-FLD i LC-MS/MS metode. Sve navedene metode su pre primene na realnim uzorcima validovane, a rezultati analize, prirodno kontaminiranih uzoraka, dobijeni ovim metodama međusobno su upoređeni.

5.4.1. ELISA

ELISA metoda primenjena je radi analize pojave aflatoksina u 1000 uzoraka kukuruза u periodu od 2009. do 2012. godine, kao i za određivanje ukupnih aflatoksina i AFB1 u odabranih trideset prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruза.

5.4.1.1. Validacija metode za određivanje ukupnih aflatoksina

Za određivanje ukupnih aflatoksina primenom ELISA metode, kako je već i ranije napomenuto, korišćena su dva test kita. Za validaciju Quantitative High Sensitivity Test kita i Quantitative Test kita korišćeni su CRM-i sa sertifikovanim vrednostima za ukupne aflatoksine od $4,50 \pm 0,50$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ (A-C-268), odnosno $6,46 \pm 4,42$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ (MA1240-1/CM). Analizom CRM-a za primenjene test kitove ispitana je tačnost metode i preciznost u uslovima ponovljivosti i reproduktivnosti.

LOD i LOQ primenjenih ELISA test kitova određeni su od strane proizvođača (Neogen, Lansing, SAD), dok je preciznost u uslovima ponovljivosti i reproduktivnosti na nivou LOQ-a ispitana analizom najmanjih standarda aflatoksina od 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za prvi, odnosno 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za drugi primenjeni test kit. Na osnovu šest analiza najmanjih standarda u uslovima ponovljivosti i deset analiza u uslovima reproduktivnosti dobijene su vrednosti za RSD_r i RSD_R , a njihove vrednosti kao i svi određeni parametri validacije prikazani su u Tabeli 5.14.

Tabela 5.14. Parametri validacije za određivanje ukupnih aflatoksina primenom ELISA metode

Parametri validacije	Test kit	
	Quantitative High Sensitivity Test	Quantitative Test
LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,50	1,40
LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1,00	5,00
RSD_r (%)	4,86	8,71
RSD_R (%)	6,12	12,6
Recovery (%)	103,2	96,5
RSD_r (%)	8,06	7,54
RSD_R (%)	9,17	9,33
Opseg ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1,00-8,00	5,00-50,0
Kalibraciona kriva	$y = -0,27 \ln(x) + 0,859$	$y = -0,32 \ln(x) + 1,415$
R^2	0,999	0,999

Evropska Regulatora (EC/401/2006) propisuje da recovery vrednost za određivani opseg koncentracija od 1 do 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ treba da bude u intervalu od 70 do

110%, dok po tehničkom izveštaju (CEN/TR 16059, 2010) recovery vrednost može biti u širem intervalu, od 50 do 120%. Dobijene vrednosti za recovery od 103,2% i 96,5% ukazuju na tačnost primenjenih ELISA metoda. Za proveru preciznosti u uslovima ponovljivosti analizirani su navedeni CRM-i, tako što je svaki uzorak analiziran pet puta od strane istog analitičara u toku jednog dana. Dobijene RSD_F vrednosti manje od 25% ukazuju na dobru preciznost metoda. Preciznost u uslovima reproduktivnosti ispitana je analizom navedenih uzoraka od strane dva analitičara u periodu od dva dana. Dobijene RSD_R vrednosti ukazuju na dobru preciznost primenjene ELISA metode ($RSD_R \leq 50\%$; CEN/TR 16059, 2010).

Takođe, u Tabeli 5.14. prikazane su i kalibracione krive za oba primenjena test kita. Na osnovu kalibracionih krivih izvršena je kvantifikacija određivanih aflatoksina. Koeficijenti determinacije od 0,999 ukazuju na visok stepen korelacije između koncentracije aflatoksina i izmerenih absorbanci.

5.4.1.2. Validacija metode za određivanje AFB1

Za određivanje AFB1 primenom ELISA metode korišćen je test kit Tecna S.r.l. Celer B1 (code MA220/MA221, Trst, Italija). Navedeni kit validovan je analizom CRM-a sa sertifikovanom vrednošću AFB1 od $4,98 \pm 3,54$ (MA1240-1/CM).

LOD i LOQ primenjenog ELISA test kita određeni su od strane proizvođača, dok su ponovljivost i reproduktivnost na nivou LOQ-a ispitani analizom najmanjeg standarda od $1 \mu\text{g}/\text{kg}$, na isti način kao i za test kitove za određivanje ukupnih aflatoksina. Određeni parametri validacije prikazani su u Tabeli 5.15. iz koje se može videti da njihove vrednosti zadovoljavaju kriterijume propisane Evropskom Regulativom i tehničkim izveštajem (EC/401/2006; CEN/TR 16059, 2010). Na osnovu toga može se zaključiti da se primenjeni test kit sa dovoljnom osetljivošću, tačnošću i preciznošću može koristiti za određivanje AFB1 u kukuruzu.

Tabela 5.15. Parametri validacije za određivanje AFB1 primenom ELISA metode

Parametri validacije	Test kit
	Tecna S.r.l. Celer B1
LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,30
LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1,00
RSD _r (%)	6,13
RSD _R (%)	8,66
Recovery (%)	105,0
RSD _r (%)	5,78
RSD _R (%)	5,22
Opseg	1,00-40,0
Kalibraciona kriva	$y=-0,688\ln(x)+2,7823$
R ²	0,997

5.4.1.3. Analiza prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza

Za određivanje aflatoksina u odabranih 30 prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza korišćena su tri ELISA test kita. Sa primarnom namenom određivanja ukupnih aflatoksina u koncentracionom opsegu od 1-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ korišćen je Quantitative Aflatoxin High Sensitivity Test kit, dok je za koncentracioni opseg od 5-50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i više od 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ korišćen Aflatoxin Quantitative Test. Za određivanje AFB1 korišćen je Celer B1 test kit. Uzorci koji su sadržali koncentracije koje su izvan opsega primenjenih test kitova, analizirani su ponovo nakon razblaživanja. Međutim, za svaki od navedenih ELISA test kitova postoji i određena „cross reactivity“. U ovom slučaju, „cross-reactivity“ znači da različiti aflatoksini usled slične hemijske strukture, mogu reagovati sa istim antitelima. S obzirom da je od svih aflatoksina, AFB1 najzastupljeniji u prirodi, a ujedno i sa najizraženijim toksičnim i kancerogenim dejstvom, većina proizvođača ELISA test kitova teži da proizvede test kit čijom primenom će u najvećoj meri biti određen samo AFB1. Međutim, kao što je već napomenuto, usled slične strukture aflatoksina, do sad nije razvijen ELISA test kit kojim će se određivati samo AFB1. S tim u vezi, za svaki test kit postoji i procenjena „cross-reactivity“ vrednost. Navedene vrednosti za primenjene ELISA test kitove prikazane su u Tabeli 5.16.

Tabela 5.16. “Cross-reactivity” vrednosti za primenjene ELISA tets kitove

Test kit	Cross reactivity (%)			
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
Quantitative Aflatoxin High sensitivity Test ^a	100	18	13	1
Aflatoxin Quantitative Test ^a	100	31	28	38
Celer B1 ^b	100	5	19	no

^a (Neogen, Veratox, Lansing, SAD)

^b (Tecna S.r.l, Trst, Italija)

no: nije određeno

Iz Tabele 5.16. može se uočiti da svi primenjeni ELISA test kitovi za AFB1 imaju 100% vrednost za “cross-reactivity”, dok je za ostala tri aflatoksina “cross-reactivity” vrednost različita. To znači da će sav prisutan AFB1 u uzorku reagovati sa antitelima, dok će samo navedeni procenti ostalih aflatoksina reagovati sa antitelima.

Trideset odabranih prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza prvobitno je analizirano primenom ELISA test kitova kojima se primarno određuju ukupni aflatoksini. Međutim, usled činjenice da “cross-reactivity” ne ukazuje na raspodelu različitih aflatoksina unutar jednog uzorka, već samo pokazuje koliko određenog oblika aflatoksina ukoliko je prisutan može izreagovati sa antitelima, rezultati su prikazani sa i bez uračunate vrednosti za “cross-reactivity” (Tabela 5.17.).

S obzirom na to da svi upotrebljeni test kitovi imaju “cross reactivity” za AFB1 100%, dobijene vrednosti predstavljaju koncentraciju AFB1. U zavisnosti od prisustva AFB2, AFG1 i AFG2 rezultat za ukupne aflatoksine može biti u navedenim opsezima, bez mogućnosti da se ukaže na njihovo postojanje i tačnu raspodelu.

Primenom test kita (Celer B1) kojim se primarno određuje AFB1, takođe se može na osnovu “cross reactivity” vrednosti za AFB2 i AFG1 odrediti i približan opseg za ukupne aflatoksine (Tabela 5.18.)

Tabela 5.17. Sadržaj AFB1 i ukupnih aflatoksina (AFS) u odabranim uzorcima kukuruza određen ELISA metodom (Quantitative Aflatoxin High sensitivity Test i Aflatoxin Quantitative Test)

Koncentracioni opseg ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								
1-10			10-50			>50		
N	AFB1	AFS	N	AFB1	AFS	N	AFB1	AFS
1	6,74	6,74-8,90	11	32,6	32,6-40,8	21	70,5	70,5-88,1
2	4,51	4,51-5,95	12	18,2	18,2-22,7	22	57,5	57,5-71,9
3	7,56	7,56-9,98	13	46,3	46,3-57,9	23	76,3	76,3-95,4
4	5,63	5,63-7,43	14	41,0	41,0-51,3	24	60,2	60,2-75,2
5	2,80	2,80-3,70	15	29,6	29,6-37,1	25	68,2	68,2-85,2
6	4,10	4,10-5,41	16	21,0	21,0-26,2	26	80,3	80,3-100
7	4,93	4,93-6,51	17	26,7	26,7-33,4	27	114	114-142
8	7,60	7,60-10,0	18	31,9	31,9-39,9	28	120	120-150
9	5,52	5,52-7,29	19	16,4	16,4-20,5	29	112	112-140
10	3,67	3,67-4,85	20	43,4	43,4-54,3	30	86,4	86,4-108

N: broj uzorka

Tabela 5.18. Sadržaj AFB1 i ukupnih aflatoksina (AFS) u odabranim uzorcima kukuruza određen ELISA metodom (Celer B1)

Koncentracioni opseg ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								
1-10			10-50			>50		
N	AFB1	AFS	N	AFB1	AFS	N	AFB1	AFS
1	33,5	33,5-41,5	11	24,4	24,4-30,3	21	54,8	54,8-72,1
2	6,62	6,62-8,21	12	14,0	14,0-17,3	22	30,0	30,0-39,5
3	11,8	11,8-14,6	13	40,0	40,0-49,6	23	37,1	37,1-48,9
4	9,47	9,47-11,7	14	37,8	37,8-46,8	24	45,3	45,3-59,6
5	2,02	2,02-2,50	15	19,8	19,8-24,5	25	67,6	67,6-89,0
6	2,36	2,36-2,92	16	24,8	24,8-30,8	26	45,9	45,9-60,4
7	3,11	3,11-3,85	17	22,6	22,6-27,9	27	61,9	61,9-81,4
8	8,88	8,88-11,0	18	16,6	16,6-20,6	28	85,6	85,6-113
9	5,93	5,93-7,35	19	24,7	24,7-30,6	29	24,5	24,5-32,3
10	7,44	7,44-9,22	20	25,2	25,2-31,2	30	28,7	28,7-37,8

N: broj uzorka

Poređenjem rezultata iz Tabela 5.17. i 5.18. može se zaključiti da 8 od 30 analiziranih uzoraka primenom Celer B1 test kita ne zadovoljava koncentracione opsege definisane primenom Neogen test kitova. Najveći broj rezultata (6) ne odgovara koncentracionom opsegu $>50 \mu\text{g}/\text{kg}$. Ova pojava može se objasniti i nemogućnošću primene Celer B1 test kita, da i pored razblaženja uzoraka, odredi koncentracije AFB1 veće od $40 \mu\text{g}/\text{kg}$. Pored toga, različiti rezultati mogu poticati i od neravnomerne raspodele aflatoksina unutar ispitivanih uzoraka, ali i upotrebe različitih ELISA test kitova koji se mogu odlikovati različitom osetljivošću i specifičnošću antitela (Hongyo, 1992; Trung i sar., 2008).

U slučaju detekcije aflatoksina primenom ELISA metode, i usled navedenih činjenica i dobijenih rezultata, može se zaključiti da postoji potreba za konfirmacijom rezultata dobijenih ELISA metodom. Konfirmacija se vrši sa ciljem provere mogućnosti dobijanja lažno pozitivnih rezultata, kao i da se proveri vrednost dobijene koncentracije, ali i odredi eventualno prisustvo drugih aflatoksina. Za navedenu svrhu koriste se pre svega hromatografske metode.

Upravo usled značajnog broja referenci (Anklam i sar., 2002; EC/657/2002; Zachariasova i sar., 2008) koje ukazuju na neophodnost potvrde rezultata dobijenih primenom ELISA metode, u ovoj doktorskoj disertaciji biće upoređeni rezultati analiza aflatoksina u prirodno kontaminiranim uzorcima kukuruza dobijeni primenom ELISA metoda i hromatografskih metoda (HPLC-FLD, HPLC-UV light-FLD, LC-MS/MS). Takođe, potrebno je napomenuti da su tri koncentraciona opsega 1-10, 10-50 i $>50 \mu\text{g}/\text{kg}$ kontaminacije aflatoksina u trideset odabranih uzoraka kukuruza definisana nakon primene Neogen ELISA test kitova, kao i da će pripadnost uzoraka navedenim opsezima biti proverena primenom hromatografskih analiza.

5.4.2. HPLC-FLD

5.4.2.1. Optimizacija hromatografskih uslova

Optimizacija hromatografskih uslova obuhvatila je variranje svih parametara koji mogu uticati na poboljšanje osetljivosti metode, a da se ujedno obezbedi dobro hromatografsko razdvajanje određivanih aflatoksina.

Radni rastvor smeše standarda aflatoksina (c (AFB1, AFG1)= 50 ng/ml; c (AFB2, AFG2)=15 ng/ml) upotrebljen je za ispitivanje optimalnih hromatografskih parametara. U Tabeli 5.19. prikazani su varirani i odabrani hromatografski parametri za određivanje aflatoksina.

Tabela 5.19. Varirani i odabrani hromatografski parametri za određivanje aflatoksina primenom HPLC-FLD metode

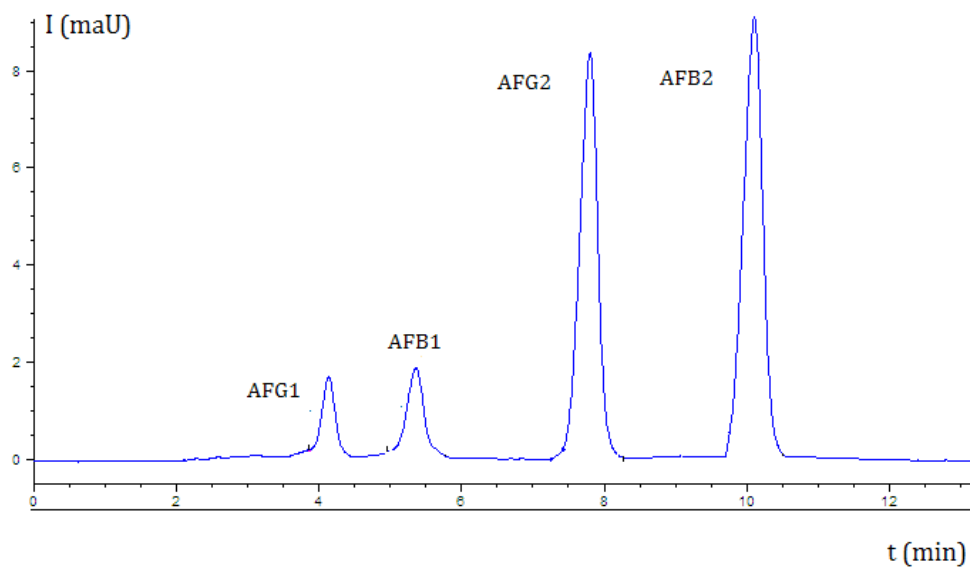
Hromatografski parametri	Opseg variranja	Odabrani uslovi
Odnos rastvarača u mobilnoj fazi	A/B/C=50/25/25 A/B/C=80/10/10	A/B/C=65/17,5/17,5
Brzina protoka mobilne faze (ml/min)	0,2-0,5	0,30
Temperatura kolone (° C)	30-40	30
λ_{em} (nm)	445-465	455
λ_{ex} (nm)	350-370	365

A: H₂O

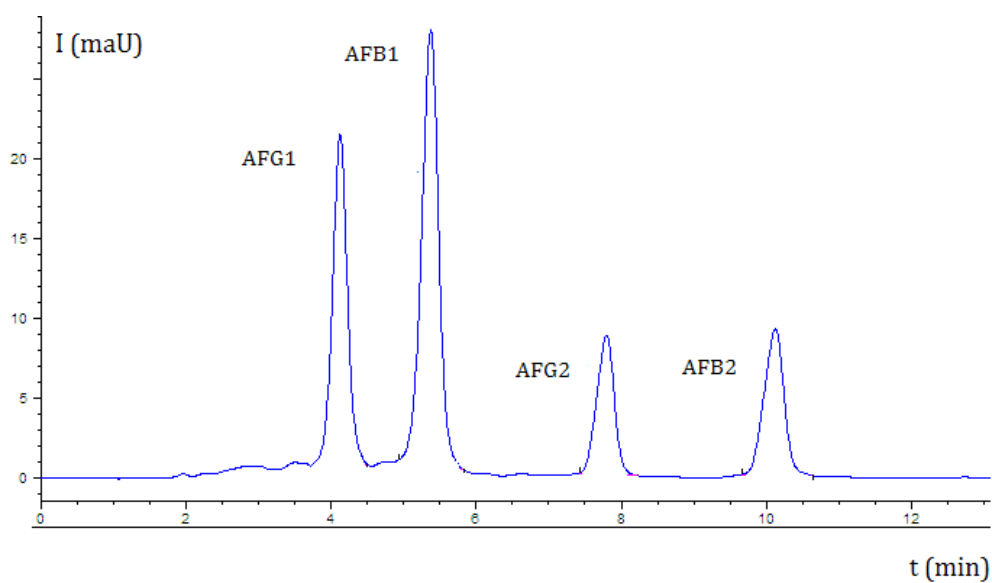
B: MeOH

C: CH₃CN

Primenom optimizovanih hromatografskih uslova dobijen je zadovoljavajući hromatogram određivanih aflatoksina. Na Slici 5.13. (a) prikazan je hromatogram četiri aflatoksina bez derivatizacije sa TFA, dok je na slici pod b) prikazan hromatogram aflatoksina derivatizovanih sa TFA. Sa Slike 5.13. (b) može se primetiti da je dejtvom TFA znatno povećan intenzitet AFB1 i AFG1, dok se intenzitet AFB2 i AFG2 nije promenio.



a)



b)

Slika 5.13. Hromatogrami standarda aflatoksina (c (AFB1, AFG1)=50 ng/ml i c (AFB2, AFG2)=15 ng/ml) a) bez derivatizacije b) sa derivatizacijom sa TFA

Takođe, sa Slike 5.13. može se uočiti da se aflatoksini sa kolone eluiraju po sledećem redosledu i retencionim vremenima: AFG1 $R_t=4,1$ min; AFB1=5,3 min; AFG2

Rt=7,8 min i AFB2 Rt=10,0 min. Relativne standardne devijacije retencionih vremena kretale su se od 0,10% za AFB2 do 0,19% za AFG1.

Nakon optimizacije hromatografskih uslova analizirane su serije standarda aflatoksina sa ciljem formiranja zavisnosti između koncentracija aflatoksina i površine pikova hromatograma. S obzirom da je AFB1 prisutan u svih 30 analiziranih uzoraka i to u širokom koncentracionom opsegu, analizirane su dve serije standarda AFB1. Obe serije obuhvatile su šest standarda različitih koncentracija. Kvantifikacija ostala tri aflatoksina izvršena je na osnovu jedne kalibracione krive od šest standarda različitih koncentracija za svaki aflatoksin. U Tabeli 5.19. prikazani su opsezi korišćenih standarda aflatoksina, kao i dobijene zavisnosti između koncentracija i površine pikova i koeficijenti determinacije.

Tabela 5.19. Karakteristike kalibracionih krivi za određivanje aflatoksina primenom HPLC/FLD metode

Aflatoksin	Koncentracioni opseg (ng/ml)	Zavisnost	R ²
AFB1	1,0-25,0	$y=3,634x-1,333$	0,999
	25,0-200	$y=2,795x+29,44$	0,997
AFB2	1,0-25,0	$y=3,809x-0,818$	0,998
AFG1	1,0-50,0	$y=1,915x-0,987$	0,998
AFG2	1,0-25,0	$y=3,129x-0,759$	0,997

Kao što se vidi iz Tabele 5.19. dobijene vrednosti koeficijenata determinacije iznad 0,997 ukazuju na lineranu zavisnost između koncentracija određivanih aflatoksina i površina hromatograma.

5.4.2.2. Validacija metode

Vrednost LOQ, za određivanje aflatoksina primenom HPLC-FLD metode, zadata je na osnovu smernica koje propisuje tehnički izveštaj (CEN/TR 16059, 2010). Naime, ukoliko je propisana MDK vrednost manja od 100 µg/kg, LOQ vrednost prema navedenom izveštaju mora biti manja ili jednaka broju koji se dobija množenjem MDK

sa 0,4. S obzirom da MDK za AFB1 u kukuruзу koji će se koristiti za ishranu ljudi iznosi 5 µg/kg, LOQ vrednost treba da bude 2 µg/kg ili manje. Za ostala tri analizirana aflatoksina nije propisana MDK, pa su LOQ vrednosti određene kao i za AFB1. Analizom opadajućih vrednosti koncentracija za svaki aflatoksin određena je LOQ vrednost, dok su LOD vrednosti izračunate matematičkim putem (Tabela 5.20.).

Tabela 5.20. Granice određivanja aflatoksina primenom HPLC-FLD metode

Granice određivanja	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
LOQ (µg/kg)	1,00	1,00	1,00	1,00
LOD(µg/kg)	0,30	0,30	0,30	0,30

Za određivanje aflatoksina u kukuruзу primenom HPLC-FLD metode upotrebljena su dva načina pripreme uzoraka: MycoSep i imunoafinitetne kolone. Priprema uzoraka kukuruза primenom MycoSep kolona validovana je analizom CRM-a A-C-268, dok je priprema uzoraka primenom imunoafinitetnih kolona validovana analizom CRM-a MI1240-1/CM. Parametri validacije za oba primenjena postupka pripreme uzoraka proverena su i analizom spajkovanih uzoraka kukuruза.

Analizom CRM-a i spajkovanih uzoraka ispitane su tačnost i preciznost metode u uslovima ponovljivosti. Preciznost u uslovima reproduktivnosti ispitana je samo nakon analize spajkovanih uzoraka. CRM nije korišćen za ispitivanje preciznosti u uslovima reproduktivnosti, usled njegove ograničene količine. Određivani parametri validacije i njihove vrednosti prikazane su u Tabeli 5.21.

Prikazani parametri validacije u Tabeli 5.21. ukazuju da oba primenjena postupka pripreme uzoraka u kombinaciji sa razvijenom i optimizovanom HPLC-FLD metodom zadovoljavaju propisane normative za tačnost i preciznost metode (EC/401/2006; CEN/TR 16059, 2010). Pored toga, upoređivanjem spektara i retencionih vremena odgovarajućeg standarda i određivanog analita izvršena je identifikacija svakog određivanog aflatoksina, a time je ujedno potvrđena i specifičnost metode.

Tabela 5.21. Parametri validacije za određivanje aflatoksina primenom HPLC-FLD metode

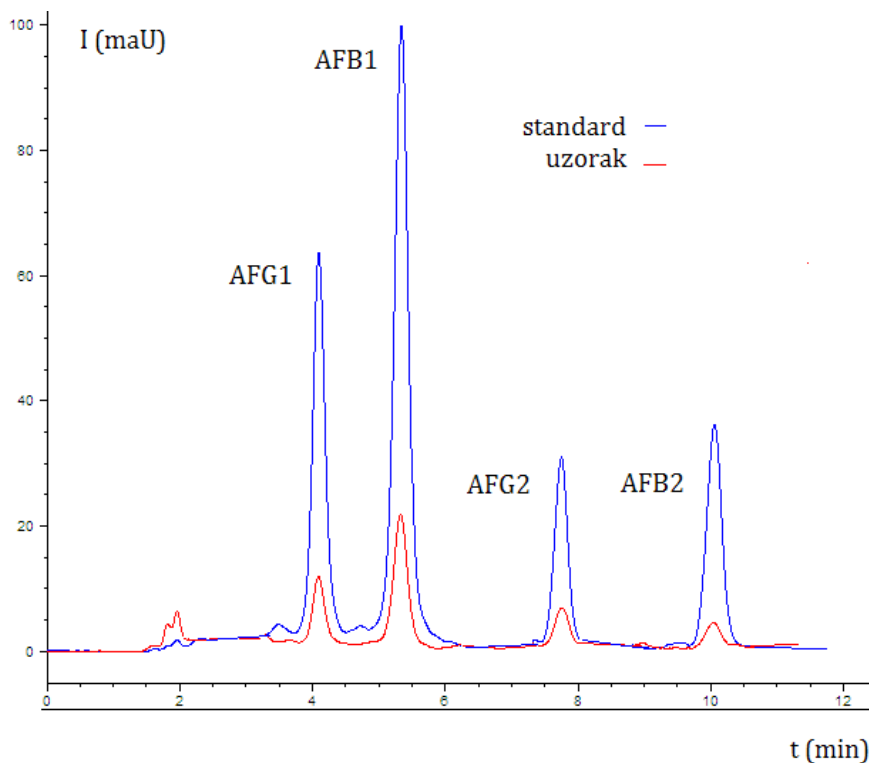
MycoSep kolone					
Parametri validacije	CRM	Sa dodatkom standarda			
		AFB1	AFG1	AFB2	AFG2
Recovery	87,2	83,4	81,5	94,3	95,5
RSD _r	11,2	10,2	9,46	6,68	7,13
RSD _R	no*	13,2	14,3	8,97	8,22
Imunoafinitetne kolone					
Parametri validacije	CRM	Sa dodatkom standarda			
		AFB1	AFG1	AFB2	AFG2
Recovery	89,3	91,8	86,8	92,2	90,4
RSD _r	9,38	8,41	14,6	7,37	10,2
RSD _R	no*	9,13	16,7	7,99	11,4

no*: nije određivano

CRM: sertifikovani referentni materijal

5.4.2.3. Analiza prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza

Razvijena, optimizovana i validovana HPLC-FLD metoda primenjena je za analizu 30 odabranih prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza. Hromatogrami standarda aflatoksina i prirodno kontaminiranog uzorka kukuruza prikazani su na Slici 5.14.



Slika 5.14. Hromatogram standarda aflatoksina c (AFB1, AFG1)=25 ng/ml i c (AFB2, AFG2)=8,3 ng/ml i prirodno kontaminiranog uzorka (broj 17)

Odabranih 30 uzoraka kukuruza za analizu aflatoksina primenom HPLC-FLD metode pripremljeno je primenom MycoSep i imunoafinitetnih kolona. Dobijeni rezultati za uzorke pripremljene primenom MycoSep kolona prikazani su u Tabeli 5.22. Iz prikazanih rezultata vidi se da je primenom MycoSep kolona za prečišćavanje uzoraka kukuruza i HPLC-FLD metode za određivanje aflatoksina, potvrđeno prisustvo aflatoksina u svih 30 analiziranih kukuruza. Na osnovu toga zaključuje se da primenom ELISA metode nisu dobijeni lažno pozitivni rezultati. Takođe, primenom HPLC-FLD metode utvrđeno je da je AFB1 bio prisutan u svih 30 analiziranih uzoraka. Najzastupljeniji aflatoksin, posle AFB1, bio je AFB2 koji je bio prisutan u 19 uzoraka. U 11 uzoraka kukuruza određeno je prisustvo AFG1, dok je prisustvo AFG2 određeno u 6 uzoraka.

Tabela 5.22. Sadržaj AFB1 i ukupnih aflatoksina (AFS) u odabranim uzorcima kukuruza pripremljenih primenom MycoSep kolona i analiziranih HPLC-FLD metodom

Koncentracioni opseg ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								
1-10			10-50			>50		
N	AFB1	AFS	N	AFB1	AFS	N	AFB1	AFS
1	5,55	6,55	11	14,1	19,1	21	74,9	80,4
2	1,52	1,52	12	22,3	27,6	22	83,6	97,8
3	13,7	17,9	13	11,4	11,4	23	86,8	98,9
4	10,2	14,4	14	12,4	12,4	24	175	184
5	1,72	1,72	15	12,5	14,5	25	169	186
6	2,35	3,72	16	20,4	20,4	26	40,1	45,1
7	4,07	4,07	17	17,7	34,1	27	93,2	99,0
8	3,52	4,52	18	34,4	39,1	28	17,2	18,7
9	4,02	5,54	19	24,0	26,0	29	103	126
10	6,62	6,62	20	50,25	54,2	30	64,7	71,4

N: broj uzorka

Koncentracije određenih AFB1, AFB2, AFG1 i AFG2 kretale su se redom u sledećim intervalima: 1,72-175 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 1,10-16,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 1,00-7,95 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i 1,04-5,90 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Iz dobijenih rezultata vidi se i da se najzastupljeniji AFB1 javlja u najvećim koncentracijama, dok se sa smanjenjem udela ostalih aflatoksina smanjuje i njihov opseg koncentracija. Pored toga, utvrđeno je da u 4 od 30 analiziranih uzoraka, koncentracije aflatoksina ne odgovaraju definisanim koncentracionim opsezima, određenim primenom ELISA metode. U uzorcima pod brojem 3 i 4 određene su koncentracije više od 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, u uzorku 20 određena je koncentracija izvan definisanog opsega od 10-50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, dok je u uzorku pod brojem 28 određena niža koncentracija od definisanog opsega (> 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Navedene razlike mogu poticati od neravnomerne raspodele aflatoksina unutar uzorka (Whitaker i sar., 1972; Whitaker, 2006), usled različitih primenjenih tehnika ispitivanja (Shepard i sar., 2013), a ujedno postoji mogućnost da za navedene uzorke nisu dobro definisani koncentracioni opsezi primenom ELISA metode. Iz tog razloga, primenom drugih postupaka pripreme uzoraka kao i drugih metoda određivanja, ispitaće se da li su primenom ELISA metode

definisani dobri koncentracioni opsezi aflatoksina. Sa tom namerom, odabranih 30 uzoraka kukuruza, analizirano je primenom HPLC-FLD metode, nakon prečišćavanja uzoraka i imunoafinitetnim kolonama. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 5.23.

Tabela 5.23. Sadržaj AFB1 i ukupnih aflatoksina (AFS) u odabranim uzorcima kukuruza pripremljenih primenom imunoafinitetnih kolona i analiziranih HPLC-FLD metodom

Koncentracioni opseg (µg/kg)								
1-10			10-50			>50		
N	AFB1	AFS	N	AFB1	AFS	N	AFB1	AFS
1	7,21	8,77	11	10,9	24,5	21	70,9	74,7
2	3,91	3,91	12	17,8	22,1	22	23,5	28,2
3	6,50	12,0	13	34,2	34,2	23	71,3	76,3
4	14,0	14,0	14	16,7	16,7	24	83,8	85,6
5	2,23	2,23	15	14,8	17,2	25	33,1	38,8
6	2,64	4,10	16	26,7	26,7	26	52,7	57,8
7	9,99	9,99	17	23,8	37,0	27	75,4	77,4
8	5,04	8,83	18	38,5	42,9	28	113	114
9	6,12	7,22	19	22,6	23,6	29	86,2	97,0
10	9,87	9,87	20	42,6	43,6	30	94,7	99,8

N: broj uzorka

Rezultati u Tabeli 5.23. još jednom su potvrdili da primenom ELISA metode nisu dobijeni lažno pozitivni rezultati, tj. lažno pozitivne detekcije. U uzorcima kukuruza analiziranim primenom HPLC-FLD metode i imunoafinitetnih kolona za prečišćavanje uzoraka, određeno je kao i nakon prečišćavanja MycoSep kolonama, da je AFB1 bio prisutan u svih 30 analiziranih uzoraka. Koncentracije AFB1 kretale su se u intervalu od 2,23 do 113 µg/kg. Kao i primenom MycoSep kolona, i primenom imunoafinitetnih kolona prisustvo AFB2 određeno je u 19 uzoraka, u kojima su se koncentracije kretale od 1,01 do 5,13 µg/kg. Nasuprot tome, u 10 odnosno 4 uzorka kukuruza određeno je prisustvo AFG1 i AFG2, što je različito od 11 odnosno 6 uzoraka u kojima je određeno prisustvo AFG1 i AFG2 primenom MycoSep kolona. Navedena pojava biće proverena nakon analize uzoraka primenom konfirmatorne LC-MS/MS metode i analize

detektovanih jona. Koncentracije AFG1 i AFG2 kretale su se redom u sledećim intervalima: 1,15-10,3 µg/kg i 1,15-4,80 µg/kg.

5.4.3. HPLC-UV light-FLD

5.4.3.1. Optimizacija hromatografskih uslova

Variranjem hromatografskih parametara, odabrani su oni parametri (Tabela 5.24.) čijom primenom je postignuta odgovarajuća osetljivost metode uz ujedno zadovoljavajuće hromatografsko razdvajanje određivanih aflatoksina.

Tabela 5.24. Varirani i odabrani hromatografski parametri za određivanje aflatoksina primenom HPLC-FLD metode

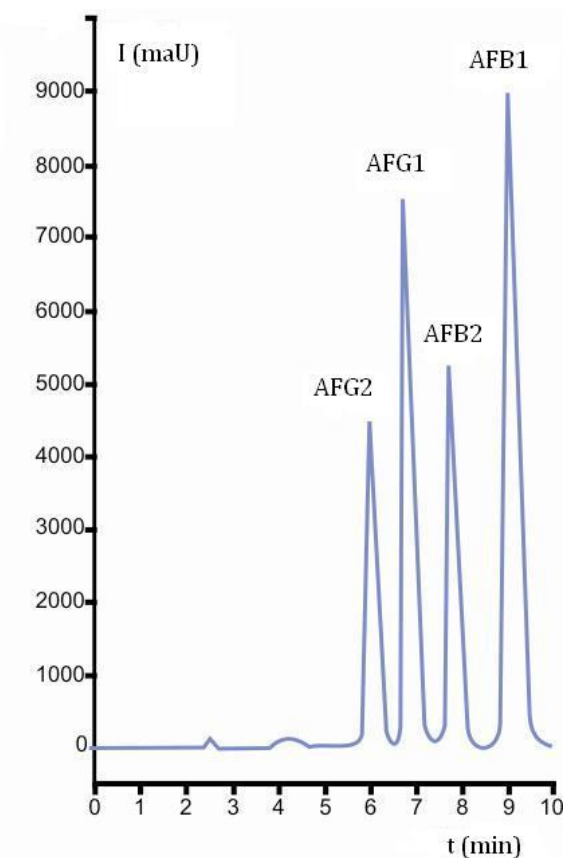
Hromatografski parametri	Opseg variranja	Odabrani uslovi
Odnos rastvarača u mobilnoj fazi	A/B/C=50/25/25 A/B/C=80/10/10	A/B/C=65/17,5/17,5
Brzina protoka mobilne faze (ml/min)	0,2-0,5	0,30
Temperatura kolone (° C)	30-40	30
λ_{em} (nm)	445-465	455
λ_{ex} (nm)	350-370	365

A: H₂O

B: MeOH

C: CH₃CN

Sa Slike 5.15. može se uočiti da se aflatoksini sa kolone izdvajaju pri sledećem redosledu i retencionim vremenima: AFG2 Rt=6,0 min, AFG1 Rt=6,9 min, AFB2 Rt=7,8 min i AFB1 Rt=9,2 min. Relativne standardne devijacije retencionih vremena kretale su se od 0,09 % za AFB1 do 0,15% za AFG2.



Slika 5.15. Hromatogram standarda aflatoksina c (AFB1, AFG1)=50 ng/ml i c (AFB2, AFG2)=15 ng/ml

Zavisnost između koncentracija aflatoksina i površine pikova ispitana je analizom dve serije po šest standarda AFB1, i jednom serijom od šest standarda za AFG1, AFB2 i AFG2. Opsezi korišćenih standarda, kao i dobijene zavisnosti i koeficijenti determinacije prikazani su u Tabeli 5.25.

Tabela 5.25. Karakteristike kalibracionih krivi za određivanje aflatoksina primenom HPLC-UV light-FLD metode

Aflatoksin	Koncentracioni opseg (ng/ml)	Zavisnost	R ²
AFB1	1,0-25,0	$y=24,643x+19,695$	0,999
	25,0-200	$y=57,671x-1217,2$	0,996
AFB2	1,0-25,0	$y=33,435x+35,971$	0,995
AFG1	1,0-50,0	$y=124,69x-97,764$	0,999
AFG2	1,0-25,0	$y=115,59x-123,52$	0,994

Dobijene vrednosti koeficijenta determinacije iznad 0,994 ukazuju na linearnu zavisnost između koncentracija određivanih aflatoksina i površina hromatograma.

5.4.3.2. Validacija metode

Kriterijum za određivanje LOQ vrednosti primenom HPLC-UV light-FLD metode bio je isti kao i kod HPLC-FLD metode. Analizom opadajućih vrednosti koncentracija za svaki aflatoksin, ustanovljeno je da se razvijena i optimizovana HPLC-UV light-FLD može sa dovoljnom osetljivošću primeniti za analizu aflatoksina. Određene LOQ i LOD vrednosti za svaki aflatoksin prikazane su u Tabeli 5.26.

Tabela 5.26. Granice određivanja aflatoksina primenom HPLC-UV light-FLD metode

Granice određivanja	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1,00	1,00	1,00	1,00
LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,30	0,30	0,30	0,30

Kao i za HPLC-FLD metodu, i za određivanje aflatoksina u kukuruзу primenom HPLC-UV light-FLD metode ispitana su dva načina pripreme uzoraka: MycoSep i imunoafinitetne kolone. Takođe, validacija primenom CRM-a i spajkovanih uzoraka kukuruza sprovedena je po istom principu kao i kod HPLC-FLD metode.

Određivani parametri validacije i njihove vrednosti prikazane su u Tabeli 5.27. Propisane vrednosti za recovery, RSD_F i RSD_R (EC/401/2006, CEN TR 16059, 2010) zadovoljene su primenom MycoSep i imunoafinitetnih kolona u kombinaciji sa razvijenom i optimizovanom HPLC-UV light-FLD metodom.

Specifičnost metode utvrđena je identifikacijom analita na osnovu upoređivanja njegovog spektra i retencionog vremena sa istim identifikacionim karakteristikama odgovarajućeg standardnog rastvora analita.

Tabela 5.27. Parametri validacije za određivanje aflatoksina primenom HPLC-UV light-FLD metode

MycoSep kolone					
Parametri validacije	CRM	Sa dodatkom standarda			
		AFB1	AFG1	AFB2	AFG2
Recovery	90,6	94,3	92,6	102,5	104,3
RSD _r	10,0	8,8	10,6	5,12	7,94
RSD _R	no*	7,4	11,5	6,11	9,29
Imunoafinitetne kolone					
Parametri validacije	CRM	Sa dodatkom standarda			
		AFB1	AFG1	AFB2	AFG2
Recovery	91,1	95,2	86,3	94,5	98,4
RSD _r	8,88	7,16	15,9	8,59	9,2
RSD _R	no*	9,25	18,0	10,7	8,4

no*: nije određivano

CRM:sertifikovani referentni materijal

5.4.3.3. Analiza prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza

Rezultati analiza prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza, dobijeni nakon prečišćavanja uzoraka primenom MycoSep kolona, prikazani su u Tabeli 5.28.

Iz rezultata prikazanih u Tabeli 5.28. može se uočiti da određene koncentracije aflatoksina u uzorcima 2, 3, 6, 8, 13 i 22 ne odgovaraju prethodno definisanim koncentracionim opsezima. Iz prvog koncentracionog opsega, koji po ELISA metodi obuhvata uzorke sa koncentracijama aflatoksina ispod 10 µg/kg, 4 od 10 uzoraka ima koncentraciju aflatoksina iznad 10 µg/kg. U uzorcima 4 i 6 je pored AFB1 bio prisutan i AFB2, dok je u uzorku 3 bio prisutan i AFG1. Pojava drugih aflatoksina, pored AFB1, u navedena tri uzorka, kao i nemogućnost primenjenih ELISA test kitova da odrede celokupnu količinu AFB2 i AFG2, mogu poslužiti kao objašnjenje za dobijanje većih koncentracija aflatoksina primenom HPLC-UV light –FLD metode u odnosu na ELISA metodu.

Tabela 5.28. Sadržaj AFB1 i ukupnih aflatoksina (AFS) u odabranim uzorcima kukuruza pripremljenih primenom MycoSep kolona i analiziranih HPLC-UV light-FLD metodom

Koncentracioni opseg (µg/kg)								
1-10			10-50			>50		
N	AFB1	AFS	N	AFB1	AFS	N	AFB1	AFS
1	9,36	9,36	11	26,5	34,2	21	70,9	75,8
2	12,9	12,9	12	28,4	28,4	22	16,9	16,9
3	13,2	18,0	13	45,0	64,1	23	71,3	87,5
4	8,33	8,33	14	40,4	40,4	24	83,8	88,8
5	6,35	6,35	15	29,1	34,1	25	123	141,9
6	12,2	14,5	16	26,7	26,7	26	52,7	58,6
7	9,99	9,99	17	23,8	45,3	27	72,4	76,4
8	13,6	14,96	18	38,5	49,2	28	113	129,9
9	5,60	8,24	19	22,6	24,7	29	86,2	106,3
10	9,82	9,82	20	42,6	45,9	30	94,7	101,3

N: broj uzorka

Razlike u određenim koncentracijama aflatoksina, u navedenim uzorcima, svakako mogu poticati i od neravnomerne raspodele aflatoksina unutar prirodno kontaminiranog uzorka kukuruza, ali svakako i usled greške analize. Takođe, primenom MycoSep kolona u kombinaciji sa HPLC-UV light-FLD metodom potvrđeno je da je AFB1 najdominantniji aflatoksin jer je bio prisutan u svih 30 uzoraka kukuruza. Koncentracija AFB1 kretala se od 5,60 do 123 µg/kg. AFB2 pronađen je u 18 uzoraka sa koncentracijama od 1,15 do 19,0 µg/kg, dok su AFG1 i AFG2 pronađeni u 10, odnosno 3 uzorka, sa koncentracijama od 1,36 do 14, 8 µg/kg odnosno 1,08 do 3,78 µg/kg.

Rezultati dobijeni nakon primene imunoafinitetnih kolona za prečišćavanje prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza i HPLC-UV light-FLD metode prikazani su u Tabeli 5.29.

Tabela 5.29. Sadržaj AFB1 i ukupnih aflatoksina (AFS) u odabranim uzorcima kukuruza pripremljenih primenom imunoafinitetnih kolona i analiziranih HPLC-UV light-FLD metodom

Koncentracioni opseg (µg/kg)								
1-10			10-50			>50		
N	AFB1	AFS	N	AFB1	AFS	N	AFB1	AFS
1	13,4	13,4	11	20,3	28	21	72,1	80,2
2	4,90	4,90	12	24,8	24,8	22	51,3	51,3
3	9,18	12,5	13	31,4	36,8	23	94,5	102
4	11,1	11,1	14	39,8	39,8	24	88,1	94,7
5	1,80	1,80	15	19,9	32,2	25	115	129
6	9,71	11,8	16	19,5	19,5	26	54,4	56,6
7	9,15	9,15	17	29,8	44,5	27	98,3	103
8	7,30	9,49	18	40,1	46,3	28	105	117
9	6,13	9,14	19	39,8	43,6	29	79,6	96,4
10	8,80	8,80	20	25,5	42,7	30	115	117

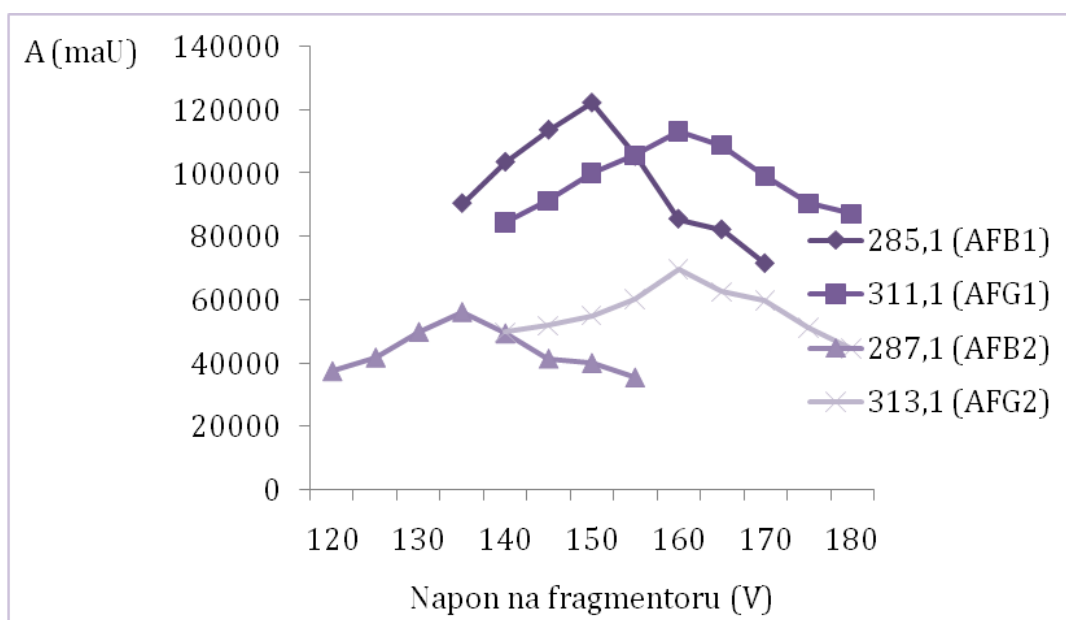
N: broj uzorka

Prema rezultatima iz Tabele 5.29. može se uočiti da je koncentracija aflatoksina u uzorcima 1, 3, 4 i 6 bila viša od definisanog koncentracionog opsega (1-10 µg/kg). U ostalim uzorcima, određene koncentracije aflatoksina zadovoljavaju koncentracione opsege definisane ELISA metodom. Najdominantniji aflatoksin, AFB1, u ispitivanim uzorcima nalazio se u koncentracijama od 6,13 do 115 µg/kg. AFB2 detektovan je u 16 uzoraka sa koncentracijama od 1,07 do 14,1 µg/kg, dok je AFG1 detektovan u 12 uzoraka sa koncentracijama od 1,15 do 14,0 µg/kg. U najmanjem broju uzoraka (3) i sa najmanjim koncentracijama (1,66-2,18 µg/kg) određen je AFG2.

5.4.4. LC-MS/MS

5.4.4.1 Optimizacija MS/MS parametara

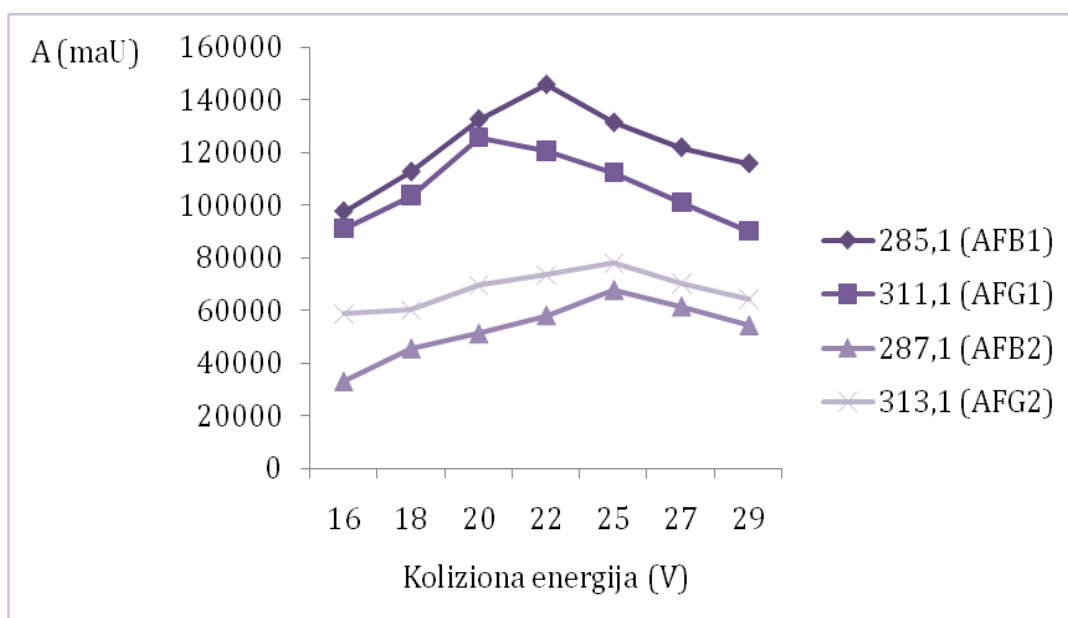
Pre optimizacije hromatografskih uslova rada izvršena je optimizacija MS/MS parametara za koju su korišćeni pojedinačni standardi aflatoksina, koncentracije 1 $\mu\text{g/ml}$ za AFB1 i AFB2 i 0,3 $\mu\text{g/ml}$ za AFB2 i AFG2. Optimizacija se zasnivala na pronalaženju optimalnih tranzicija jona određivanih aflatoksina, kao i njihovih akvizicionih parametara u MRM režimu rada. Optimizacija napona na fragmentoru i kolizionne energije izvršena je postupnim "ručnim" promenama navedenih parametara i proverena primenom automatskog MassHunter Workstation Optimizer softvera. Da bi se obezbedio najjači signali prekursor jona prvobitno je optimizovan napon na fragmentoru. Svaki aflatoksin analiziran je pri 8 različitih napona fragmentora. U zavisnosti od aflatoksina analizirani su naponi od 120 do 180 V. Na Slici 5.16. prikazane su zavisnosti napona na fragmentoru od površine pika za jedan produkt jon za svaki ispitivani aflatoksin.



Slika 5.16. Odnos intenziteta signala (I) i optimizovanih napona na fragmentoru za jedan produkt jon za svaki aflatoksin

Po sedam vrednosti kolizionih energija od 16 do 28 V sa koracima od po 2 V ispitane su za svaki produkt jon (Slika 5.17). Najveće površine pikova ukazale su na

najbolje kombinacije napona na fragmentoru i kolizionih energija za svaki ispitivani jon.



Slika 5.17. Odnos intenziteta signala (I) i optimizovanih kolizionih energija za jedan produkt jon za svaki aflatoxin

5.4.4.2. Optimizacija hromatografskih parametara

Optimizacija hromatografskih parametara za određivanje aflatoksina u kukuruzu primenom LC-MS/MS metode izvedena je analizom smeše standarda aflatoksina (c (AFB1, AFG1)=50 ng/ml i c (AFB2, AFG2)=15 ng/ml).

Varirani i odabrani hromatografski parametri za određivanje aflatoksina prikazani su u Tabeli 5.30.

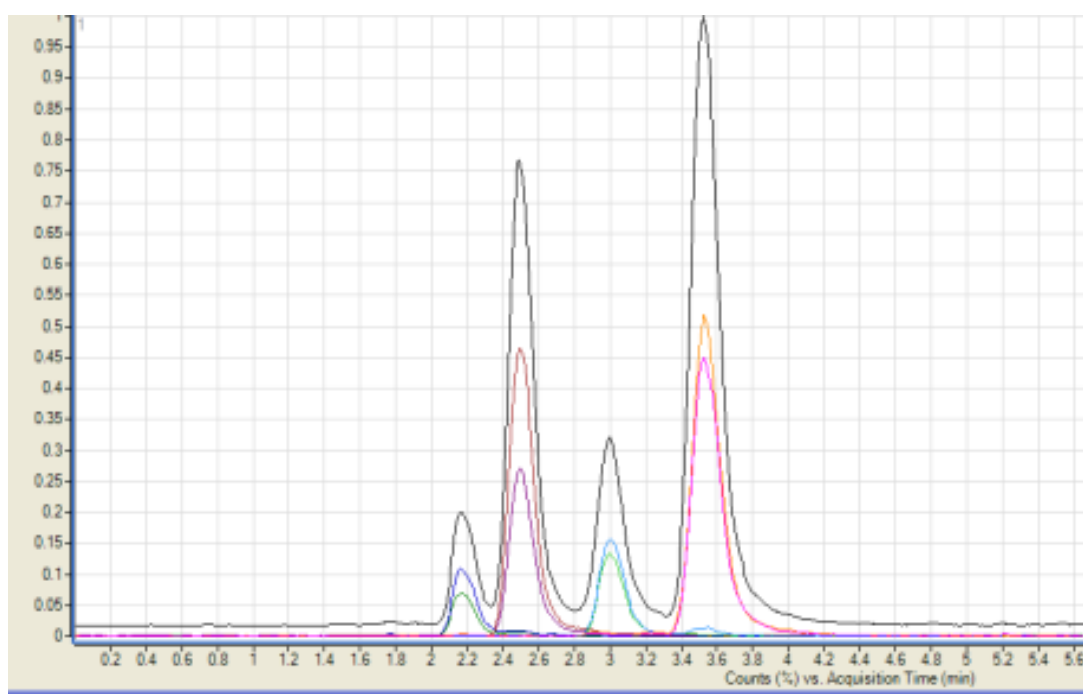
Tabela 5.30. Varirani i odabrani hromatografski parametri za određivanje aflatoksina primenom LC-MS/MS metode

Hromatografski parametri	Opseg variranja	Odabrani uslovi
Odnos rastvarača u mobilnoj fazi	A/B=30-70/70/30	A/B=50/50
Brzina protoka mobilne faze (ml/min)	0,2-0,5	0,35
Temperatura kolone (° C)	30-40	30

A: MeOH, 5mM NH₄HCOO, 0,1% HCOOH

B: H₂O, 5mM NH₄HCOO, 0,1% HCOOH

Ekstrahovani MRM jonski hromatogrami standarda aflatoksina prikazani su na Slici 5.18. sa koje se može uočiti da je primenom optimizovanih MS/MS parametara i hromatografskih uslova postignuto zadovoljavajuće hromatografsko razdvajanje aflatoksina. Aflatoksini se eluiraju sa kolone po sledećem redosledu i retencionim vremenima: AFG2 Rt=2,2 min, AFG1 Rt=2,5 min, AFB2 Rt=3,0min i AFB1 Rt=3,6 min. Relativne standardne devijacije retencionih vremena, izračunate na osnovu osam merenja, kretale su se od 0,9 za AFG2 do 1,3 % za AFB1.



Slika 5.18. Ekstrahovani MRM jonski hromatogrami standarda aflatoksina (c (AFB1, AFG1)= 25 ng/ml, c (AFB2, AFG2)=8,3 ng/ml) sa odabranim tranzicijama

Za ispitivanje zavisnosti između koncentracija ispitivanih aflatoksina i površina pikova hromatograma analizirane su serije standarda. Opsezi ispitivanih standarda, kao i dobijene zavisnosti i koeficijenti determinacije prikazani su u Tabeli 5.31.

Tabela 5.31. Karakteristike kalibracionih krivi određivanja aflatoksina primenom LC-MS/MS metode

Aflatoxin	Koncentracioni opseg (ng/ml)	Zavisnost	R ²
AFB1	1,0-25,0	$y=643,72x+72,65$	0,999
	25,0-200	$y=643,21x+1563$	0,997
AFB2	1,0-25,0	$y=580,34x+21,85$	0,996
AFG1	1,0-50,0	$y=440,8x+259,3$	0,998
AFG2	1,0-25,0	$y=258,54x-134,0$	0,999

Vrednosti koeficijenta determinacije iznad 0,996 ukazuju da koncentracije aflatoksina dobro kooreliraju sa površinama pikova hromatograma.

5.4.4.3. Ispitivanje uticaja matriksa

Za ispitivanje uticaja matriksa pri određivanju aflatoksina u kukuruзу primenom LC-MS/MS metode bilo je potrebno ispitati odnos između kalibracionih krivih čistih standarda u rastvaraču (SC) i standarda koji su dodati u uzorak nakon uparavanja pripremljenih uzoraka (MMC). S obzirom da su LC-MS/MS metodom analizirani uzorci kukuruza pripremljeni primenom Mycosep i imunoafinitetnih kolona, kao i primenom QuEChERS-a i postupka ekstrakcije, bilo je potrebno analizirati MMC standarde nakon svakog od četiri primenjena postupka pripreme uzoraka. Karakteristike formiranih MMC krivih i izračunati matriks efekti prikazani su u Tabeli 5.32.

Na osnovu rezultata iz Tabele 5.32. vidi se da su sva četiri primenjena postupka pripreme uzoraka uslovila smanjenje intenziteta signala pod uticajem matriksa-kukuruza. Smanjenje signala u zavisnosti od primenjenog postupka pripreme uzoraka kretao se u intervalu od 85-93% pri primeni MycoSep kolona, 82-97% sa imunoafinitetnim kolonama, 49-85% sa QuEChERS-ima i 33-78% pri primeni ekstrakcije. S obzirom da su navedeni postupci pripreme uzoraka primenjeni na odabranih 30 prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza, od kojih je svaki kontaminiran sa AFB1, posebno je obrađena pažnja na uticaj matriksa pri određivanju

AFB1. Najmanji uticaj matriksa kod AFB1 primećen je nakon prečišćavanja uzoraka primenom imunoafinitetnih kolona, i on u zavisnosti od ispitivanog opsega, iznosi 97%, odnosno 95%. Nasuprot tome, najveći uticaj na smanjenje matriksa uočeno je nakon primene postupka ekstrakcije, bez dodatnog prečišćavanja, i u tom slučaju smanjenje signala isnosilo je 73% odnosno 78%. Takođe, potrebno je napomenuti da su, zbog uticaja matriksa, koncentracije aflatoksina u prirodno kontaminiranim uzorcima računane na osnovu MMC krivih.

Tabela 5.32. Karakteristike MMC kalibracionih krivih i uticaj matriksa

Aflatoksin	Koncentracioni opseg (ng/ml)	Zavisnost	R ²	Matriks efekat (%)
MycoSep kolone				
AFB1	1,00-25,0	$y=584,4x+105,7$	0,998	91
	25,0-200	$y=598,9+1413,1$	0,998	93
AFB2	1,00-25,0	$y=510,7x+228,1$	0,991	88
AFG1	1,00-50,0	$y=377,6x+339,2$	0,996	86
AFG2	1,00-25,0	$y=218,9x-96,82$	0,998	85
Imunoafinitetne kolone				
AFB1	1,00-25,0	$y=625,7x+71,13$	0,997	97
	25,0-200	$y=609,6x+1980$	0,994	95
AFB2	1,00-25,0	$y=525,9x-6,794$	0,995	91
AFG1	1,00-50,0	$y=413,5x+301,7$	0,996	94
AFG2	1,00-25,0	$y=210,9x-75,72$	0,998	82
QuEChERS				
AFB1	1,00-25,0	$y=547,0x+42,55$	0,997	85
	25,0-200	$y=531,6x+2213$	0,993	83
AFB2	1,00-25,0	$y=282,7x+72,67$	0,995	49
AFG1	1,00-50,0	$y=257,7x+87,7$	0,992	58
AFG2	1,00-25,0	$y=161,9x-71,78$	0,999	63
Ekstrakcija				
AFB1	1,00-25,0	$Y=468,0x-112,4$	0,999	73
	25,0-200	$y=502,0x+352,2$	0,997	78
AFB2	1,00-25,0	$y=314,3x-23,34$	0,986	54
AFG1	1,00-50,0	$y=143,5x+65,87$	0,994	33
AFG2	1,00-25,0	$y=106,9x-20,84$	0,999	41

5.4.4.4. Validacija metode

Da bi se mogli uporediti dobijeni rezultati analize trideset prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza, primenom različitih metoda, odlučeno je da LOD i LOQ vrednosti za LC-MS/MS metodu budu isti kao i za HPLC-FLD i HPLC-UV light-FLD metode (Tabele 5.20. i 5.26.), bez obzira što se primenom navedenih metoda mogu odrediti koncentracije znatno niže od 1 µg/kg.

Validacija LC-MS/MS metode i četiri različita postupka pripreme uzoraka kukuruza izvršena je analizama CRM-a i spajkovanih uzoraka kukuruza. Dobijeni i izračunati parametri validacije prikazani su u Tabeli 5.33.

Dobijene vrednosti za recovery, prikazane u Tabeli 5.33. u skladu su sa zahtevima tehničkog izveštaja (CEN/TR 16059) na osnovu kojeg recovery vrednosti terba da budu u opsegu od 50-120%. Na osnovu toga, može se zaključiti da se sva četiri primenjena postupka pripreme uzoraka mogu koristiti pri određivanju aflatoksina primenom LC-MS/MS metode. Međutim, evropska regulativa (EC, 657/2002) za opseg koncentracija aflatoksina od 1 do 10 µg/kg prihvata recovery vrednosti u intervalu od 70-110%. Manje recovery vrednosti od 70% dobijene su primenom QuEChERS metode za AFG2 (64,9%) kao i primenom ekstrakcije za AFB2 (65,9%). Ostale recovery vrednosti zadovoljile su pravila navedene evropske regulative.

Primenom sva četiri postupka pripreme uzoraka dobijaju se zadovoljavajuće vrednosti koje karakterišu preciznost metoda u uslovima ponovljivosti i reproduktivnosti (Tabela 5.33).

Specifičnost metode utvrđena je identifikacijom svakog aflatoksina sa prekursor jonom i dva produkt jona. Pored toga izvršena je i identifikacija na osnovu poređenja retencionog vremena sa istim identifikacionim karakteristikama kao i za odgovarajući standard.

Tabela 5.33. Parametri validacije za određivanje aflatoksina u kukuruзу primenom LC-MS/MS metode i različitih postupaka pripreme uzoraka

Parametri validacije			
		Recovery (%)	RSD _r (%)
RSD _R (%)			
MycoSep kolone			
CRM		95,8	7,11
Dodatak standarda	AFB1	94,3	4,55
	AFB2	82,6	7,84
	AFG1	92,1	11,9
	AFG2	85,3	8,37
Imunoafinitetne kolone			
CRM		103,2	9,14
Dodatak standarda	AFB1	95,8	7,12
	AFB2	85,6	5,12
	AFG1	91,4	6,56
	AFG2	83,1	9,66
QuEChERS			
CRM		84,1	7,13
Dodatak standarda	AFB1	75,4	8,76
	AFB2	73,1	10,4
	AFG1	82,7	8,05
	AFG2	64,9	11,8
Ekstrakcija			
CRM		82,5	15,2
Dodatak standarda	AFB1	79,5	11,8
	AFB2	65,9	16,3
	AFG1	77,1	13,5
	AFG2	73,8	13,9

no*:nije određivano

CRM: sertifikovani referentni materijal

5.4.4.5. Analiza prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza

Četiri različita postupka pripreme uzoraka u kombinaciji sa razvijenom, optimizovanom i validovanom LC-MS/MS metodom primenjeni su za analizu aflatoksina u 30 odabranih prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza.

Dobijeni rezultati za uzorke pripremljene primenom MycoSep kolona prikazani su u Tabeli 5.34.

Tabela 5.34. Sadržaj AFB1 i ukupnih aflatoksina (AFS) u odabranim uzorcima kukuruza pripremljenih primenom MycoSep kolona i određenih LC-MS/MS metodom

Koncentracioni opseg ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								
1-10			10-50			>50		
N	AFB1	AFS	N	AFB1	AFS	N	AFB1	AFS
1	6,16	7,48	11	13,0	21,1	21	51,4	56,8
2	4,86	4,86	12	12,2	23,3	22	27,7	42,9
3	3,27	6,61	13	13,5	13,5	23	48,6	59,8
4	1,10	1,10	14	17,7	17,7	24	10,5	12,7
5	1,85	1,85	15	11,8	15,0	25	82,7	89,9
6	23,9	26,3	16	9,89	9,89	26	7,03	11,4
7	14,2	14,2	17	58,6	66,5	27	64,5	71,2
8	3,41	3,41	18	15,1	20,6	28	83,9	88,6
9	4,44	6,63	19	26,5	30,2	29	53,8	64,3
10	3,20	3,20	20	36,8	41,7	30	27,5	31,9

N: broj uzorka

Rezultati prikazani u Tabeli 5.34. ukazuju da je AFB1 detektovan u svih 30 uzoraka kukuruza. Najzastupljeniji aflatoksin, posle AFB1, je AFB2, koji je nađen u 18 uzoraka. U 10 od 30 analiziranih uzoraka bio je prisutan AFG1, dok je AFG2 nađen u 5 uzoraka. Koncentracije AFB1, AFB2, AFG1 i AFG2 kretale su se redom u sledećim intervalima: 1,10-83,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1,11-6,67 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2,12-5,55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i 1,40-4,48 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Takođe, iz prikazanih rezultata može se videti da koncentracija aflatoksina u 8 od 30 uzoraka ne zadovoljava koncentracioni opseg definisan ELISA metodom (Tabela 5.17). U uzorcima pod brojem 6 i 7 koncentracija aflatoksina bila je viša od 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Od 10 uzoraka iz koncentracionog opsega 10-50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, uzorak pod brojem 16 imao je manju, a uzorak 17 veću koncentraciju od definisanog opsega. Četiri uzorka (broj 22, 24, 26 i 30), iz trećeg koncentracionog opsega, imala su koncentraciju aflatoksina manju od 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Primenom imunoafinitetnih kolona i LC-MS/MS metode dobijeni su rezultati analize aflatoksina u 30 uzoraka kukuruza, koji su prikazani u Tabeli 5.35

Tabela 5.35. Sadržaj AFB1 i ukupnih aflatoksina (AFS) u odabranim uzorcima kukuruza pripremljenih primenom imunoafinitetnih kolona i određenih LC-MS/MS metodom

Koncentracioni opseg (µg/kg)								
1-10			10-50			>50		
N	AFB1	AFS	N	AFB1	AFS	N	AFB1	AFS
1	3,56	5,22	11	41,9	49,6	21	52,9	57,4
2	4,31	4,31	12	120	125	22	17,5	28,2
3	13,6	16,4	13	10,1	10,1	23	124	133
4	2,95	2,95	14	31,1	31,1	24	70,1	70,1
5	1,10	1,10	15	11,2	14,8	25	46,2	52,4
6	5,88	8,32	16	48,5	48,5	26	90,8	96,5
7	6,12	6,12	17	40,9	48,5	27	178	179
8	1,65	1,65	18	6,57	10,5	28	174	176
9	11,4	11,4	19	32,5	38,6	29	72,3	82,0
10	1,10	1,10	20	106	113	30	166	168

N: broj uzorka

Prikazani rezultati u Tabeli 5.35. ponovo su potvrdili da je svih 30 uzoraka kontaminirano AFB1, ali da se navedeni toksin kao i drugi ispitivani aflatoksini, usled primenjennog drugog postupka pripreme uzorka, metode ispitivanja, kao i neravnomerne raspodele aflatoksina unutar uzorka, u nekim uzorcima nalazi u različitim koncentracijama. Određene koncentracije AFB1 kretale su se u intervalu od 1,10 do 166 µg/kg. AFB2 bio je prisutan u 16 uzoraka sa koncentracijama od 1,01 do 7,13 µg/kg, dok su se koncentracije AFG1 u 10 kontaminiranih uzoraka kretale od 2,27 do 4,23 µg/kg. Najmanji broj uzoraka (5) bio je kontaminiran AFG2 sa koncentracijama od 1,13 do 2,84 µg/kg. Pored toga, može se uočiti da koncentracija aflatoksina u 6 uzoraka (broj 3, 9, 12, 18, 20 i 22) ne odgovara opsegu definisanom primenom ELISA metode (Tabela 5.17).

Daljim ispitivanjima, ispitana je mogućnost primene QuEChERS-a za pripremu uzoraka za određivanje aflatoksina u kukuruзу, a dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 5.36.

Tabela 5.36. Sadržaj AFB1 i ukupnih aflatoksina (AFS) u odabranim uzorcima kukuruза pripremljenih primenom QuEChERS-a i određenih LC-MS/MS metodom

Koncentracioni opseg ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								
1-10			10-50			>50		
N	AFB1	AFS	N	AFB1	AFS	N	AFB1	AFS
1	10,7	10,7	11	27,2	34,7	21	63,1	67,7
2	6,75	6,75	12	18,5	31,2	22	42,3	53,0
3	7,52	9,4	13	30,6	30,6	23	55,4	67,5
4	16,1	16,1	14	39,1	39,1	24	30,4	33,8
5	6,20	6,2	15	21,1	26,5	25	27,1	33,6
6	4,28	6,22	16	21,2	21,2	26	51,4	55,1
7	4,96	4,96	17	29,8	49,9	27	102	106
8	3,15	3,15	18	27,4	34,5	28	88,1	88,1
9	8,80	8,80	19	48,5	52,9	29	77,2	78,3
10	7,20	7,20	20	32,8	36,2	30	107	107

N: broj uzorka

Rezultati iz Tabele 5.36. ukazali su da je koncentracija aflatoksina u pet uzoraka (broj 1, 4, 19, 24 i 25) bila izvan definisanih koncentracionih opsega. Pored toga, utvrđeno je da se u trideset uzoraka kukuruза koncentracija AFB1 kretala od 3,15 do 107 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Trinaest uzoraka bilo je kontaminirano AFB2 sa koncentracijama od 1,15 do 7,39 $\mu\text{g}/\text{kg}$, dok je 9 uzoraka bilo kontaminirano AFG1 sa sa koncentracijama od 1,63 do 7,11 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Kao i primenom drugih postupaka pripreme uzoraka i metoda određivanja, utvrđeno je da je AFG2 bio prisutan u najmanjem broju uzoraka (3) i sa najnižim koncentracijama (1,43-4,44 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Poslednji primenjeni postupak pripreme uzoraka, ekstrakcija, u kombinaciji sa LC-MS/MS metodom ukazao je da koncentracija aflatoksina uzorcima 7, 9 i 15 nije u skladu sa definisanim koncentracionim opsezima (Tabela 5.37). Najzastupljeniji

aflatoksin, posle AFB1, bio je AFB2 (prisutan u 15 uzoraka). U 8 od 30 analiziranih uzoraka bio je prisutan AFG1, dok je AFG2 bio prisutan u 4 uzorka. Koncentracije određenih AFB1, AFB2, AFG1 i AFG2 kretale su se redom u sledećim intervalima: 4,28-107 µg/kg, 1,12-11,5 µg/kg, 1,35-4,64 µg/kg i 1,84-4,13 µg/kg.

Tabela 5.37. Sadržaj AFB1 i ukupnih aflatoksina (AFS) u odabranim uzorcima kukuruza pripremljenih primenom ekstrakcije i određenih LC-MS/MS metodom

Koncentracioni opseg (µg/kg)								
1-10			10-50			>50		
N	AFB1	AFS	N	AFB1	AFS	N	AFB1	AFS
1	6,61	9,76	11	26,3	34,6	21	44,6	50,1
2	5,44	5,44	12	33,4	43,3	22	67,1	78,9
3	7,33	8,97	13	27,5	27,5	23	94,3	111
4	4,18	4,18	14	29,0	29,0	24	78,5	79,6
5	9,22	9,22	15	5,00	6,64	25	91,3	91,3
6	3,64	6,63	16	39,4	39,4	26	46,5	52,8
7	10,2	10,2	17	34,7	49,7	27	116	116,4
8	5,37	5,37	18	16,8	19,0	28	108	119
9	12,4	12,4	19	42,1	43,7	29	91,6	98,0
10	2,15	2,15	20	31,9	34,5	30	86,1	88,9

N: broj uzorka

Iako se LC-MS/MS metoda koristi kao konfirmatorna tehnika, tj. tehnika sa kojom na osnovu prekursor i produkt jona sa sigurnošću može da se potvrdi prisustvo ili odsustvo nekog jedinjenja, dobijeni rezultati primenom ove tehnike i četiri različita postupka pripreme uzoraka ukazali su da postoji razlika u prisustvu pojedinih jedinjenja nakon analize istih uzoraka. U Tabeli 5.38. prikazana je raspodela aflatoksina u 30 prirodno kontaminiranih uzoraka u zavisnosti od postupka pripreme uzoraka. Iz prikazanih rezultata. može se uočiti da je AFB1 određen nakon sva četiri primenjena postupka pripreme uzoraka u svih 30 analiziranih uzoraka kukuruza. AFB2 određen je u različitom broju uzoraka, koji se kretao od 13 nakon primene QuEChERS-a do 18 nakon primene MycoSep kolona. Takođe, razlika u broju kontaminiranih uzoraka

postoji i u slučaju pojave AFG1 i AFG2. Broj kontaminiranih uzoraka sa AFG1 kretao se od 8 nakon primene postupka ekstrakcije do 10 nakon primene MycoSep i imunoafinitetnih kolona.

Tabela 5.38. Raspodela aflatoksina u prirodno kontaminiranim uzorcima kukuruza u zavisnosti od primenjene metode pripreme uzoraka

Aflatoksini određeni primenom LC-MS/MS metode	Metoda pripreme uzoraka			
	MycoSep	IAC	QuEChERS	Ekstrakcija
	Broj kontaminiranih uzoraka			
AFB1	30	30	30	30
AFB2	18	16	13	15
AFG1	10	10	9	8
AFG2	5	5	3	4
AFB1+AFB2	11	9	8	10
AFB1+AFG1	3	2	4	4
AFB1+AFB2+AFG1	2	1	2	no*
AFB1+AFB2+AFG1+AFG2	5	5	3	4

no*: nije određen

Prisustvo AFG2 određeno je u 5 uzoraka primenom MycoSep i imunoafinitetnih kolona, odnosno 4 uzorka primenom ekstrakcije i 3 uzorka primenom QuEChERS-a. Različiti broj određenih pojedinačnih aflatoksina uslovio je i različite zbirne kombinacije aflatoksina. Navedena pojava može se objasniti neravnomernom raspodelom aflatoksina unutar prirodno kontaminiranog uzorka, ali i primenjenim različitim postupcima pripreme uzoraka. Kao što se može uočiti iz Tabele 5.38. najveći broj aflatoksina, pored AFB1, određen je nakon primene MycoSep i imunoafinitetnih kolona za pripremu uzoraka. To ukazuje da primena kolona obezbeđuje najbolje prečišćavanje uzorka, jer je najmanji matriks efekat, a ujedno su njihovom primenom postignute i visoke recovery vrednosti (> 90%). Tabela (5.33.). Takođe, potrebno je naglasiti da su razlike u rezultatima mogle usloviti i veoma česte pojave AFB2, AFG1 i AFG2 na nivou LOQ vrednosti.

5.4.5. Poređenje rezultata analize prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza primenom različitih metoda određivanja aflatoksina

Primenom 4 različite metode za određivanje aflatoksina (ELISA, HPLC-FLD, HPLC-UV light-FLD, LC-MS/MS) u prirodno kontaminiranim uzorcima kukuruza, u kombinaciji sa različitim metodama pripreme uzoraka dobijen je veliki broj rezultata, koji su zbirno u zavisnosti od koncentracionog opsega prikazani u Tabelama 5.39., 5.40. i 5.41. Na ovaj način za svaki uzorak dobijeno je po devet rezultata za AFB1 i ukupne aflatoksine.

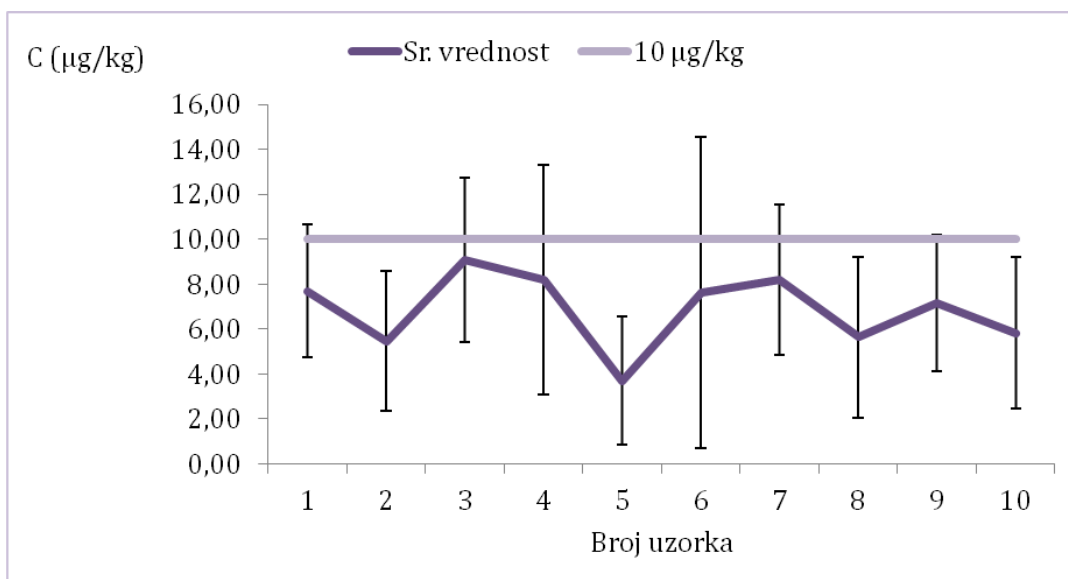
U Tabeli 5.39. prikazani su rezultati za koncentracioni opseg aflatoksina od 1 do 10 µg/kg. Kao što je i prethodno naglašeno, navedeni opseg definisan je nakon analize uzoraka primenom ELISA metode. Iz prikazanih rezultata može se uočiti da u pogledu vrednosti za AFB1, svim primenjenim postupcima analize za uzorke pod brojem 5 i 10, dobijene su koncentracije AFB1 u opsegu od 1 do 10 µg/kg. U dva uzorka (broj 2 i 8) jedan od ukupno devet rezultata bio je iznad 10 µg/kg. Najveći broj uzoraka, pet (broj 1, 3, 6, 7 i 9) imalo je po dva rezultata iznad 10 µg/kg, dok je samo jedan uzorak (broj 4) imao četiri koncentracije AFB1 izvan definisanog koncentracionog opsega.

U pogledu rezultata za ukupne aflatoksine (AFS), kao i za AFB1, koncentracije AFS u uzorcima 5 i 10 bile su u skladu sa definisanim koncentracionim opsegom, dok je kod uzoraka 2 i 8 po jedan rezultat bio iznad 10 µg/kg. Po dva rezultata izvan definisanog opsega dobijena su za uzorke 1, 7 i 9; tri rezultata kod uzorka 6, dok su četiri koncentracije AFS iznad 10 µg/kg pronađene u uzorcima 3 i 4.

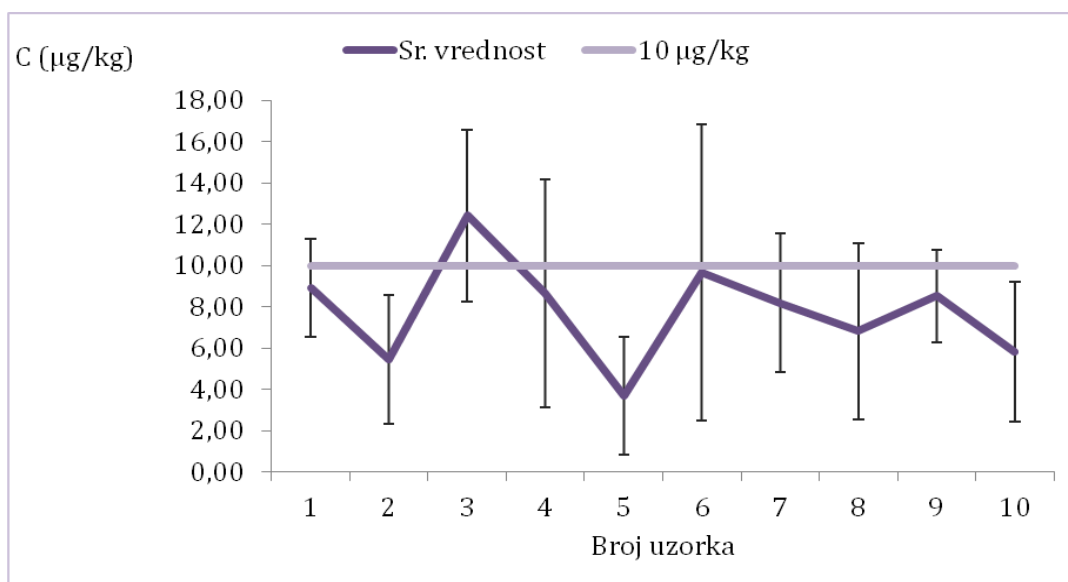
Tabela 5.39. Pregled rezultata analiza prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza dobijenih primenom različitih postupaka pripreme uzoraka i metoda određivanja aflatoksina za koncentracioni opseg 1-10 µg/kg

Metoda određivanja	Metoda pripreme	Analit	Broj uzorka									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ELISA		AFB1	6,74	4,51	7,56	5,63	2,80	4,10	4,93	7,60	5,52	3,67
		AFS	8,90	4,51	9,98	5,63	2,80	5,41	4,93	10,0	7,29	3,67
HPLC-FLD	MycoSep	AFB1	5,55	1,52	13,7	10,2	1,72	2,35	4,07	3,52	4,02	6,62
		AFS	6,55	1,52	17,9	14,4	1,72	3,72	4,07	4,52	5,54	6,62
	IAC	AFB1	7,21	3,91	6,50	14,0	2,23	2,64	9,99	5,04	6,12	9,87
		AFS	8,77	3,91	12,0	14,0	2,23	4,10	9,99	8,83	7,22	9,87
HPLC-UV light-FLD	MycoSep	AFB1	9,36	12,9	13,2	8,33	6,35	12,2	9,99	13,6	5,60	9,82
		AFS	9,36	12,9	18,0	8,33	6,35	14,5	9,99	14,9	8,24	9,82
	IAC	AFB1	13,4	4,90	9,18	11,1	1,80	9,71	9,15	7,30	6,13	8,80
		AFS	13,4	4,90	12,5	11,1	1,80	11,8	9,15	9,49	9,14	8,80
LC-MS/MS	MycoSep	AFB1	6,16	4,86	3,27	1,10	1,85	23,9	14,2	3,41	4,44	3,20
		AFS	7,48	4,86	6,61	1,10	1,85	26,3	14,2	3,41	6,63	3,20
	IAC	AFB1	3,56	4,31	13,6	2,95	1,10	5,88	6,12	1,65	11,4	1,10
		AFS	5,22	4,31	16,4	2,95	1,10	8,32	6,12	1,65	11,4	1,10
	QuEChERS	AFB1	10,7	6,75	7,52	16,1	6,20	4,28	4,96	3,15	8,81	7,20
		AFS	10,7	6,75	9,4	16,1	6,20	6,22	4,96	3,15	8,81	7,20
	Ekstrakcija	AFB1	6,61	5,44	7,33	4,18	9,22	3,64	10,2	5,37	12,4	2,15
		AFS	9,76	5,44	8,97	4,18	9,22	6,63	10,2	5,37	12,4	2,15
AFB1	Sr.vrednost		7,70	5,46	9,10	8,18	3,70	7,63	8,18	5,63	7,16	5,83
	STD		2,97	3,12	3,66	5,11	2,84	6,94	3,35	3,57	3,01	3,37
	MIN		3,56	1,52	3,27	1,10	1,1	2,35	4,07	1,65	4,02	1,10
	MAX		13,4	12,9	13,7	16,1	9,22	23,9	14,2	13,6	12,4	9,87
AFS	Sr.vrednost		8,90	5,46	12,42	8,64	3,70	9,67	8,18	6,81	8,52	5,83
	STD		2,39	3,12	4,15	5,50	2,84	7,18	3,35	4,27	2,22	3,37
	MIN		5,22	1,52	6,61	1,10	1,10	3,72	4,07	1,65	5,54	1,10
	MAX		13,4	12,9	18,0	16,1	9,22	26,3	14,2	14,9	12,4	9,87

Na Slici 5.18. predstavljeni su svi dobijeni rezultati za AFB1 i ukupne aflatoksine po jednom uzorku kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom, prema podacima iz Tabele 5.39.



a)



b)

Slika 5.18. Rezultati analize dobijeni primenom različitih metoda za koncentracioni opseg 1-10 µg/kg predstavljeni kao srednja vrednost a) AFB1 b) ukupni aflatoksini

Iz rezultata prikazanih na Slici 5.18. (a) može se uočiti da se dobijene srednje vrednosti koncentracija AFB1 u svim uzorcima nalaze u definisanom koncentracionom

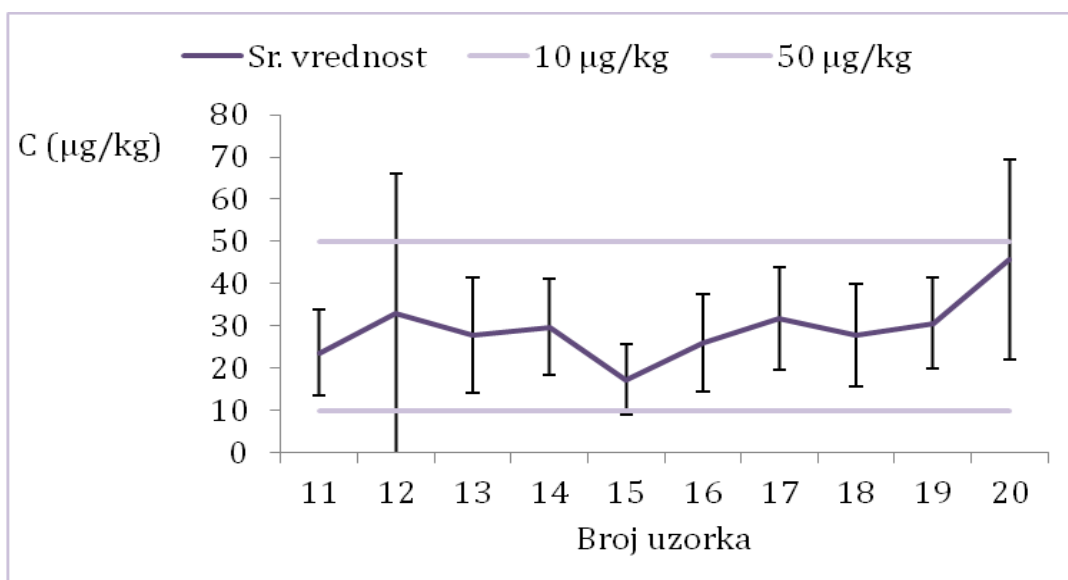
opsegu od 1 do 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, dok vrednosti standardnih devijacija ukazuju da su odstupanja pojedinih rezultata zabeležena kod uzoraka 3, 4, 6 i 7. U pogledu rezultata za ukupne aflatoksine (Slika 5.18. b) može se uočiti da je jedino kod uzorka pod brojem 3 dobijena srednja vrednost iznad 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, dok sa uračunatim vrednostima standardnih devijacija samo kod uzoraka 2, 5 i 10 nije zabeležno odstupanje od definisanog koncentracionog opsega.

Za koncentracioni opseg od 10 do 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ u pogledu rezultata dobijenih za AFB1 može se uočiti da je u uzorcima 12 i 17 po jedna određena koncentracija veća od 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, dok je u uzorcima 15, 16 i 18 po jedna koncentracija manja od 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Tabela 5.40). Jedino su kod uzorka 20, dva rezultata bila iznad definisanog opsega. Ostali rezultati za koncentraciju AFB1 bili su u skladu sa definisanim opsegom. Kada se posmatraju rezultati u vezi sa koncentracijom ukupnih aflatoksina kod uzorka 20 tri rezultata su iznad definisanog opsega, dok su kod uzoraka 12 i 17 po jedan rezultat iznad, a kod uzoraka 15 i 16 po jedan rezultat ispod definisanog opsega.

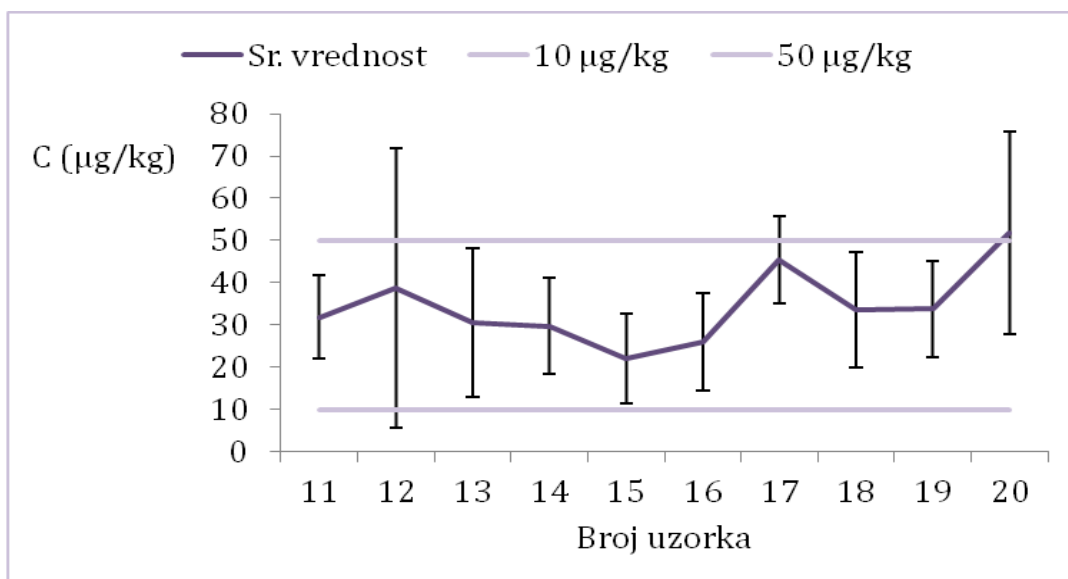
Tabela 5.40. Pregled rezultata analiza prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza dobijenih primenom različitih postupaka pripreme uzoraka i metoda određivanja aflatoksina za koncentracioni opseg 10-50 µg/kg

Metoda određivanja	Metoda pripreme	Analit	Broj uzorka									
			11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ELISA		AFB1	32,6	18,2	46,3	41,0	29,6	21,0	26,7	31,9	16,4	43,4
		AFS	40,8	22,7	46,3	41,0	37,1	21,0	33,4	39,9	20,5	54,3
HPLC-FLD	MycoSep	AFB1	14,1	22,3	11,4	12,4	12,5	20,4	17,7	34,4	24,0	50,2
		AFS	19,1	27,6	11,4	12,4	14,5	20,4	34,1	39,1	26,0	54,2
	IAC	AFB1	10,9	17,8	34,2	16,7	14,8	26,7	23,8	38,5	22,6	42,6
		AFS	24,5	22,1	34,2	16,7	17,2	26,7	37,0	42,9	23,6	43,6
HPLC-UV light-FLD	MycoSep	AFB1	26,5	28,4	45,0	40,4	29,1	26,7	23,8	38,5	22,6	42,6
		AFS	34,2	28,4	64,1	40,4	34,1	26,7	45,3	49,2	24,7	45,9
	IAC	AFB1	20,3	24,8	31,4	39,8	19,9	19,5	29,8	40,1	39,8	25,5
		AFS	28,0	24,8	36,8	39,8	32,2	19,5	44,5	46,3	43,6	42,7
LC-MS/MS	MycoSep	AFB1	13,0	12,2	13,5	17,7	11,8	9,89	58,6	15,1	26,5	36,8
		AFS	21,1	23,3	13,5	17,7	15,0	9,89	66,5	20,6	30,2	41,7
	IAC	AFB1	41,9	120	10,1	31,1	11,2	48,5	40,9	6,57	32,5	106
		AFS	49,6	125	10,1	31,1	14,8	48,5	48,5	10,5	38,6	113
	QuEChERS	AFB1	27,2	18,5	30,6	39,1	21,1	21,2	29,8	27,4	48,5	32,8
		AFS	34,7	31,2	30,6	39,1	26,5	21,2	49,9	34,5	52,9	36,2
	Ekstrakcija	AFB1	26,3	33,4	27,5	29,0	5,00	39,4	34,7	16,8	42,1	31,9
		AFS	34,6	43,3	27,5	29,0	6,64	39,4	49,7	19,0	43,7	34,5
AFB1	Sr.vrednost		23,6	32,8	27,8	29,7	17,2	25,9	31,8	27,7	30,6	45,8
	STD		10,1	33,3	13,6	11,4	8,4	11,6	12,1	12,1	10,8	23,8
	MIN		10,9	12,2	10,1	12,4	5	9,89	17,7	6,57	16,4	25,5
	MAX		41,9	120	46,3	41,0	29,6	48,5	58,6	40,1	48,5	106
AFS	Sr.vrednost		31,8	38,7	30,5	29,7	22,0	25,9	45,4	33,6	33,8	51,8
	STD		9,8	33,0	17,7	11,4	10,7	11,6	10,2	13,6	11,3	23,9
	MIN		19,1	22,1	10,1	12,4	6,64	9,89	33,4	10,5	20,5	34,5
	MAX		49,6	125	64,1	41,0	37,1	48,5	66,5	49,2	52,9	113

Najveća nehomogenost uzorka uočena je kod uzorka 12, u kome se koncentracija AFB1 kretala od 2 do 120 µg/kg, a koncentracija ukupnih aflatoksina od 22,1 do 125 µg/kg. Navedena nehomogenost dobijenih vrednosti kod uzorka 12, kao i raspodela koncentracija AFB1 i ukupnih aflatoksina za druge uzorke iz koncentracionog opsega 10-50 µg/kg prikazani su na Slici 5.19.



a)



b)

Slika 5.19. Rezultati analize dobijeni primenom različitih metoda za koncentracioni opseg 10-50 µg/kg predstavljeni kao srednja vrednost a) AFB1 b) ukupni aflatoksini

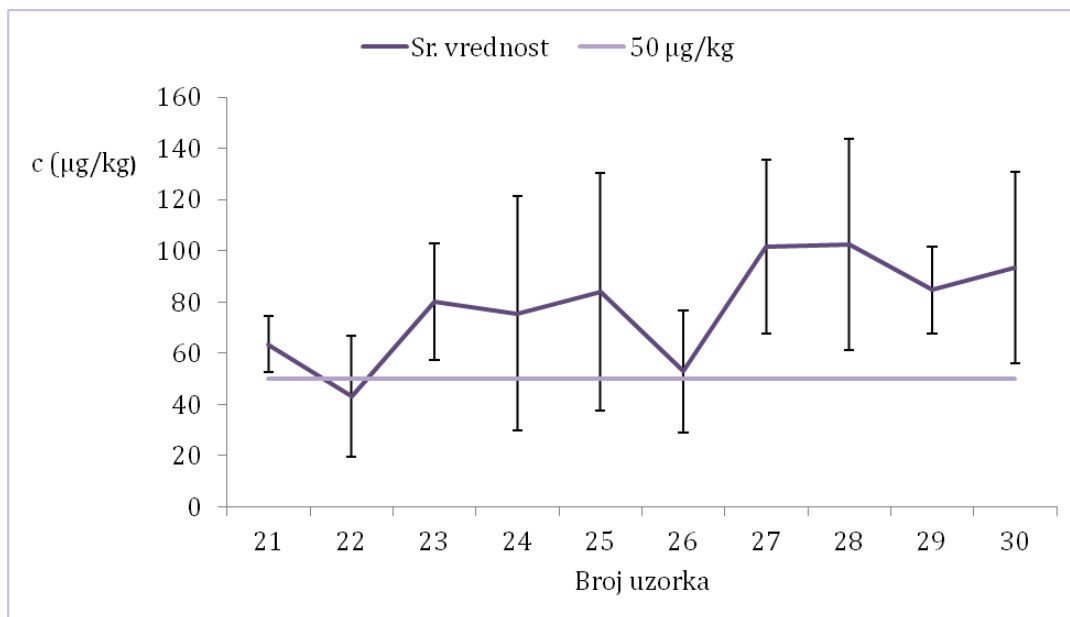
Kako se sa Slike 5.19. (a) vidi, dobijene srednje vrednosti koncentracija AFB1 u svim uzorcima nalaze se u definisanom koncentracionom opsegu od 10 do 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, dok vrednosti standardnih devijacija ukazuju da su odstupanja pojedinih rezultata zabeležena kod uzoraka 12, 15 i 20. Za ukupne aflatoksine (Slika 5.19. b) dobijene srednje vrednosti koncentracija u svim uzorcima nalaze se u definisanom koncentracionom opsegu, dok je sa uračunatim vrednostima standardnih devijacija kod uzoraka 12, 17 i 20 zabeležno odstupanje od definisanog opsega.

U Tabeli 5.41. prikazani su rezultati dobijeni primenom različitih metoda određivanja aflatoksina za koncentracioni opseg iznad 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Iz tih rezultata može se zaključiti da je po jedan rezultat za AFB1 ispod 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dobijen kod uzoraka 21, 24, 27 i 30. Dva rezultata manja od 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dobijena su kod uzorka 26, dok su tri rezultata dobijena kod uzorka 25. Najveći broj odstupanja rezultata za određenu koncentraciju AFB1 pronađeni su kod uzorka 22, u kome je čak pet rezultata imalo je koncentraciju ispod 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. U pogledu rezultata vezanih za ukupne aflatoksine može se uočiti da je po jedan rezultat kod uzoraka 24, 27 i 30 bio manji od 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, dok su dva rezultata manja od 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dobijena kod uzoraka 25 i 26. U slučaju ukupnih aflatoksina, kao i kod AFB1, kod uzorka 22 zabeležen je najveći broj (4) odstupanja rezultata.

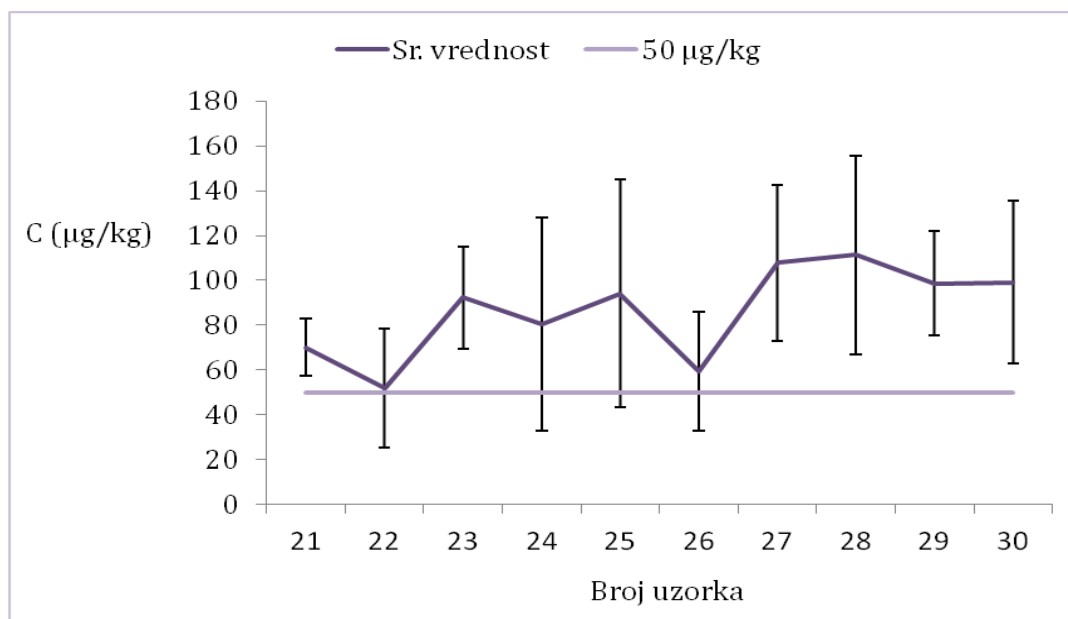
Rezultati prikazani u Tabeli 5.41. prikazani su i grafički na Slici 5.20. preko srednjih vrednosti i standardnih devijacija. Sa Slike 5.20. (a) može se uočiti da jedino srednja vrednost rezultata za koncentraciju AFB1 je ispod definisanog opsega kod uzorka 22, dok su srednje vrednosti ukupnih aflatoksina kod svih uzoraka iznad 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Slika 5.20. b). Međutim, uračunate vrednosti standardnih devijacija kod uzoraka 22, 24, 25 i 26 ukazuju na odstupanja od definisanog koncentracionog opsega.

Tabela 5.41. Pregled rezultata analiza prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza dobijenih primenom različitih postupaka pripreme uzoraka i metoda određivanja aflatoksina za koncentracioni opseg >50 µg/kg

Metoda određivanja	Metoda pripreme	Analit	Broj uzorka									
			21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
ELISA		AFB1	70,5	57,5	76,3	60,2	68,2	80,3	114	120	112	86,4
		AFS	88,1	71,9	95,4	75,2	85,2	100	142	150	140	108
HPLC-FLD	MycoSep	AFB1	74,9	83,6	86,8	175	169	40,1	93,2	17,2	103	64,7
		AFS	80,4	97,8	98,9	184	186	45,1	99,0	18,7	126	71,4
	IAC	AFB1	70,9	23,5	71,3	83,8	33,1	52,7	75,4	113	86,2	94,7
		AFS	74,7	28,2	76,3	85,6	38,8	57,8	77,4	114	97,0	99,8
HPLC-UV light-FLD	MycoSep	AFB1	70,9	16,9	71,3	83,8	123,0	52,7	72,4	113	86,2	94,7
		AFS	75,8	16,9	87,5	88,8	142,0	58,6	76,4	130	106	101
	IAC	AFB1	72,1	51,3	94,5	88,1	115	54,4	98,3	105	79,6	115
		AFS	80,2	51,3	102	94,7	129	56,6	103	117	96,4	117
LC-MS/MS	MycoSep	AFB1	51,4	27,7	48,6	10,5	82,7	7,03	64,5	83,9	53,8	27,5
		AFS	56,8	42,9	59,8	12,7	89,9	11,4	71,2	88,6	64,3	31,9
	IAC	AFB1	52,9	17,5	124	70,1	46,2	90,8	178	174	72,3	166
		AFS	57,4	28,2	133	70,1	52,4	96,5	179	176	82	168
	QuEChERS	AFB1	63,1	42,3	55,4	30,4	27,1	51,4	102	88,1	77,2	107
		AFS	67,7	53,0	67,5	33,8	33,6	55,1	106	88,1	78,3	107
	Ekstrakcija	AFB1	44,6	67,1	94,3	78,5	91,3	46,5	116	108	91,6	86,1
		AFS	50,1	78,9	111	79,6	91,3	52,8	116	119	98,1	88,9
AFB1	Sr.vrednost		63,5	43,0	80,3	75,6	84,0	52,9	101,5	102,5	84,7	93,6
	STD		11,1	23,6	22,8	45,7	46,5	23,7	33,9	41,1	17,0	37,4
	MIN		44,6	16,9	48,6	10,5	27,1	7,03	64,5	17,2	53,8	27,5
	MAX		74,9	83,6	124	175	169	90,8	178	174	112	166
AFS	Sr.vrednost		70,1	52,1	92,4	80,5	94,2	59,3	107,8	111,3	98,7	99,2
	STD		12,9	26,6	22,6	47,3	50,6	26,5	34,7	44,4	23,4	36,4
	MIN		50,1	16,9	59,8	12,7	33,6	11,4	71,2	18,7	64,3	31,9
	MAX		88,1	97,8	133	184	186	100	179	176	140	168



a)



b)

Slika 5.20. Rezultati analiza dobijeni primenom različitih metoda za koncentracioni opseg >50 µg/kg predstavljeni kao srednja vrednost a) AFB1 b) ukupni aflatoksini

Dobijeni rezultati u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju da se na osnovu dobijenih parametara validacije, sve četiri primenjene metode za određivanje aflatoksina u kombinaciji sa različitim postupcima pripreme uzoraka, mogu primeniti za određivanje aflatoksina. Navedena činjenica proizilazi iz rezultata u vezi sa potvrđenom osetljivošću, ponovljivosti i tačnosti primenjenih metoda. Međutim, iz rezultata dobijenih nakon analize prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza, može se zaključiti da neravnomernost raspodele aflatoksina ima izuzetno velik uticaj na rezultat i da je, kako je već i ranije rečeno, iz navedenog razloga veoma teško sa velikom sigurnošću odrediti tačnu koncentraciju aflatoksina u prirodno kontaminiranom uzorku (Remington i Schrok, 1970; CAST, 2003).

Koja metoda, od ispitanih, će biti odabrana za analizu aflatoksina zavisi pre svega od dostupnosti opreme, ali i obučenosti analitičara, i željene brzine i cene analize.

5.5. Prisustvo i raspodela ukupnih plesni, vrste *Aspergillus flavus* i aflatoksina u prirodno kontaminiranim uzorcima kukuruza

Usled neravnomerne raspodele plesni i mikotoksina unutar veće količine skladištenih žitarica veoma je teško, sa visokim stepenom sigurnosti, odrediti tačnu koncentraciju mikotoksina, bez obzira koja savremena analitička tehnika se koristi za njihovo određivanje (Whitaker i sar., 1974; Jewers, 1982; Whitaker, 2006).

Navedena činjenica, kao i dobijeni rezultati prirodno kontaminiranih uzoraka kukuruza primenom različitih metoda, uslovili su nastavak istraživanja u vezi sa ispitivanjem raspodele plesni i aflatoksina unutar veće količine skladištenog kukuruza. Za ispitivanje su odabrana četiri skladišta kukuruza kapaciteta do jedne tone. Iz svakog skladišta, pri eleviranju kukuruza, uzeto je osam pojedinačnih uzoraka, po principu jedan uzorak na svakih 100 kg. U svakom pojedinačnom uzorku određen je ukupan broj formiranih kolonija (eng. "colony forming unit", cfu) za UBP i *A. flavus*, kao i

sadržaj aflatoksina. Sadržaj aflatoksina određen je primenom HPLC-FLD metode, a uzorci su prečišćeni primenom MycoSep kolona. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 5.42.

Tabela 5.42. Sadržaj ukupnog broja plesni, vrste *Aspergillus flavus* i aflatoksina u pojedinačnim uzorcima kukuruza uzorkovanim iz skladišta

Skladište	Pojedinačni uzorci								SRV	STD	MIN	MAX
	1	2	3	4	5	6	7	8				
UBP	85	215	230	190	156	230	160	135	175	50,9	85,0	230
<i>A.flavus</i>	6,50	7,50	8,50	6,20	12,5	57,5	32,0	15,0	18,2	18,0	6,20	57,5
C (AFS)	35,9	37,2	11,6	28,4	10,4	33,4	88,1	40,8	35,7	24,1	10,4	88,1
Skladište	Pojedinačni uzorci								SRV	STD	MIN	MAX
	2	1	2	3	4	5	6	7				
UBP	155	190	320	165	105	230	205	210	197	63,0	105	320
<i>A.flavus</i>	6,10	11,5	16,0	10,0	12,7	30,0	12,5	105	25,5	32,9	6,10	105
C (AFS)	< 1	20,9	57,9	< 1	31,9	45,1	16,5	183	59,3	62,6	16,5	183
Skladište	Pojedinačni uzorci								SRV	STD	MIN	MAX
	3	1	2	3	4	5	6	7				
UBP	320	160	200	260	120	130	90,0	120	175	79,6	90,0	320
<i>A.flavus</i>	40,0	8,00	30,0	22,0	20,0	10,0	7,00	20,0	19,6	11,4	7,00	40,0
C (AFS)	71,9	39,9	53,1	24,4	37,1	23,0	9,50	51,6	38,8	19,9	9,50	71,9
Skladište	Pojedinačni uzorci								SRV	STD	MIN	MAX
	4	1	2	3	4	5	6	7				
UBP	550	350	110	50,0	110	140	170	80,0	195	170	50,0	550
<i>A.flavus</i>	30,0	40,0	20,0	10,0	50,0	18,0	10,0	33,0	26,4	14,4	10,0	50,0
C (AFS)	9,70	100	59,6	< 1	75,2	49,1	54,3	150	71,2	44,4	9,70	150

UBP: ukupan broj plesni

SRV: srednja vrednost

STD: standardna devijacija

MIN: minimalna vrednost

MAX: maksimalna vrednost

UBP i *A. flavus*: ($\times 10^3$ cfu/g)

C (AFS): $\mu\text{g/kg}$

Iz rezultata prikazanih u Tabeli 5.42. vidi se da u svakom od četiri skladišta postoji veliki raspon u broju formiranih kolonija ukupnih plesni i vrste *A. flavus*, kao i određenih koncentracija aflatoksina. UBP kretao se u intervalu 85-230 $\times 10^3$ cfu/g u prvom skladištu, 105-320 $\times 10^3$ cfu/g u drugom skladištu, 90-320 $\times 10^3$ cfu/g u trećem i

50-550 x 10³ cfu/g u četvrtom skladištu. Prema Pravilniku o mikrobiološkoj ispravnosti namirnica u prometu iz 1993. godine, maksimalan broj formiranih kolonija za UBP u kukuruзу bio je 10 x 10³ cfu/g. U svakom od 32 pojedinačna uzorka kukuruза, UBP bio je veći od 10 x 10³ cfu/g. Međutim, stupanjem na snagu novog Pravilnika („Sl. glasnik RS”, 72/2010) UBP u kukuruзу više se ne kontroliše.

U svakom pojedinačnom uzorku određeno je prisustvo plesni *A. flavus*. Broj formiranih kolonija plesni *A. flavus* u pojedinačnim uzorcima iz prvog, drugog, trećeg i četvrtog skladišta kretao se redom: 6,20-57,5 x 10³; 6,10-105 x 10³; 7,00-40,0 x 10³ i 10,0-50,0 x 10³ cfu/g.

Od ukupno 32 analizirana pojedinačna uzorka, samo 2 uzorka iz drugog skladišta i 1 uzorak iz četvrtog skladišta nisu sadržala aflatoksine u koncentraciji iznad 1 µg/kg. Ostali uzorci kukuruза bili su kontaminirani, a raspon koncentracija iz pojedinačnih uzoraka iz prvog, drugog, trećeg i četvrtog skladišta kretao se redom: 10,4-88,1; 16,5-183; 9,50-71,9 i 9,70-150 µg/kg.

Dobijeni rezultati ukazuju na neravnomernu raspodelu plesni *A. flavus* i aflatoksina unutar svakog skladišta. Najizraženija neravnomernost bila je prisutna unutar drugog skladišta, u kome je zabeležen najveći raspon koncentracija aflatoksina (16,5-183 µg/kg), kao i broj kolonija plesni *A. flavus* (6,10-105 x 10³ cfu/g). Pored toga, u istom skladištu od osam analiziranih uzoraka dva uzorka nisu sadržala aflatoksine. Na osnovu raspodele broja kolonija plesni *A. flavus* i koncentracija aflatoksina, može se uočiti da je od svih ispitanih uzoraka u uzorku broj 8 iz drugog skladišta, najveći broj kolonija (105 x 10³ cfu/g) uslovio i najveću koncentraciju aflatoksina (183 µg/kg). Takođe, u istom skladištu u uzorku broj 1 najmanji broj kolonija plesni *A. flavus* (6,10 x 10³ cfu/g) nije doveo do pojave aflatoksina. Međutim, u ostalim uzorcima iz drugog skladišta, kao i iz ostalih skladišta, veći broj kolonija plesni *A. flavus* nije uvek uslovljavao više koncentracije aflatoksina, i obrnuto.

Neravnomerna raspodela plesni *A. flavus* i aflatoksina u kukuruзу konstatovana

u ovoj doktorksoj disertaciji u skladu je sa rezultatima dobijenim od strane Trung i sar. (2008). Pored toga, Whitaker i sar. (1972) opisali su i neravnomernu raspodelu aflatoksina kod uzorka kikirikija.

Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da širok opseg koncentracija aflatoksina ukazuje na teškoću dobijanja tačne koncentracije aflatoksina unutar jednog skladišta (lota), bez obzira na njegovu veličinu (CAST, 2003). Kao posledica toga, a usled veoma česte analize jednog uzorka iz lota, šanse da se dobije rezultat drugačiji od stvarnog su veće od 50% (Remington i Schrok, 1970).

5.6. Optimizacija metodologije određivanja AFM1 u mleku

Za optimizaciju metodologije određivanja AFM1 u ovoj doktorskoj disertaciji ispitano je petnaest odabranih prirodno kontaminiranih uzoraka mleka. Određivanje AFM1 u mleku izvršeno je primenom ELISA, HPLC-FLD i LC-MS/MS metoda. Pre primene na realnim uzorcima ELISA metoda je validovana, a hromatografske metode su optimizovane, razvijene i validovane.

5.6.1 ELISA metoda

Kao što je i ranije istaknuto, ELISA metoda primenjena je za analizu pojave AFM1 u 200 uzoraka kravljeg mleka na osnovu čega je i procenjen rizik od pojave AFM1 u mleku. Od analiziranih 200 uzoraka mleka, odabrano je petnaest sa sadržajem AFM1 u tri koncentraciona opsega. Na osnovu dobijenih rezultata, ELISA će biti upoređena sa hromatografskim metodama.

5.6.1.1. Validacija metode

LOD i LOQ primenjenog ELISA test kita određeni su od strane proizvođača (Tecna S.r.l. I'screen AFLA M1, Trst, Italija) i iznose 0,002 µg/kg, odnosno 0,005 µg/kg. Ponovljivost i reproduktivnost na nivou LOQ-a ispitana je analizom standarda AFM1 od 0,005 µg/kg. Na osnovu šest analiza najmanjeg standarda u uslovima ponovljivosti i deset analiza u uslovima reproduktivnosti dobijene su vrednosti za $RSD_r=3,98\%$ i $RSD_R=4,11\%$.

ELISA metoda validovana je analizom CRM-a i analizama uzoraka mleka u koje je dodat standard AFM1. Određivani parametri validacije kao i njihove vrednosti prikazane su u Tabeli 5.43.

Tabela 5.43. Parametri validacije ELISA metode za određivanje AFM1 u mleku

Parametar validacije	CRM	Koncentracija dodatog standarda (µg/kg)		
		0,05	0,50	1,00
Recovery	107,6	94,3	95,8	96,6
RSD_r	3,54	8,36	7,15	6,43
RSD_R	4,97	17,8	14,2	10,9
Kalibraciona kriva	$y=-0,429\ln(x)+2,595$		$R^2=0,999$	

CRM: sertifikovani referentni materijal

Tačnost metode procenjena je na osnovu analize CRM-a i tri spajkovana uzorka mleka. Dobijene vrednosti za recovery od 94,3-107,6% su u okviru kriterijuma od 50-120% za nivo koncentracija do 1 µg/kg, propisanog evropskom Regulativom i tehničkim izveštajem (EC/401/2006; CEN/TR 16059, 2010).

Preciznost u uslovima ponovljivosti i reproduktivnosti ispitana je analizom CRM-a i tri uzorka mleka sa dodatim standardom AFM1. U uslovima ponovljivosti, svaki uzorak analiziran je od strane istog analitičara, pet puta u toku dana. Dobijene RSD_r vrednosti za ispitane koncentracione nivoe zadovoljavaju kriterijum ($RSD_r \leq 30\%$) propisan gore pomenutim tehničkim izveštajem. Preciznost u uslovima

reproduktivnosti određena je analizom navedenih uzoraka od strane dva analitičara u periodu od dva dana. Dobijene RSD_R vrednosti ukazuju na dobru preciznost primenjene ELISA metode ($RSD_R \leq 60\%$; CEN/TR 16059, 2010).

Takođe, u Tabeli 5.43. prikazana je kalibraciona kriva i koeficijent determinacije, čija vrednost od 0,999 ukazuje na visoku zavisnost između koncentracija AFM1 i očitanih absorbanci.

5.6.1.2. Analiza odabranih uzoraka mleka

Validovana ELISA metoda primenjena je za analizu petnaest odabranih uzoraka mleka. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 5.44.

Tabela 5.44. Sadržaj AFM1 u odabranim uzorcima mleka određen primenom ELISA metode

Koncentracioni opseg ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Broj uzorka	SRV \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
< 0,10	1	0,043 \pm 0,001
	2	0,036 \pm 0,001
	3	0,050 \pm 0,001
	4	0,086 \pm 0,009
	5	0,047 \pm 0,001
0,10-0,40	6	0,254 \pm 0,007
	7	0,231 \pm 0,032
	8	0,189 \pm 0,013
	9	0,105 \pm 0,001
	10	0,253 \pm 0,012
>0,40	11	0,534 \pm 0,070
	12	0,528 \pm 0,157
	13	0,792 \pm 0,203
	14	0,440 \pm 0,016
	15	1,096 \pm 0,226

SRV \pm SD: srednja vrednost koncentracije ($\mu\text{g}/\text{kg}$) \pm standardna devijacija ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Rezultati u Tabeli 5.44. ukazuju da je najbolja ponovljivost rezultata dobijena za koncentracije AFM1 manje od 0,10 µg/kg. Opsezi standardnih devijacija (STD) u navedenom ispitivanom opsegu kretale su se od 0,001 do 0,009 µg/kg. U druga dva ispitivana opsega, dobijene su veće vrednosti STD, posebno za koncentracije veće od 0,25 µg/kg. Kao mogući razlog za pojavu većih STD vrednosti može se navesti potrebno razblaženje uzoraka, jer je 0,25 µg/kg najveća koncentracija AFM1 koja se može odrediti primenjenim test kitom bez razblaženja uzoraka.

Takođe, primenom ELISA metode formirana su tri opsega koncentracija AFM1, a pripadnost uzoraka navedenim opsezima biće ispitana poređenjem dobijenih rezultata sa rezultatima dobijenim primenom hromatografskih metoda.

5.6.2 HPLC-FLD

5.6.2.1. Optimizacija hromatografskih uslova

Optimizacija hromatografskih parametara izvedena je radi pronalaženja optimalnih hromatografskih uslova radi dobijanja zadovoljavajućeg hromatograma i određivanja AFM1 sa dovoljnom osetljivošću. Radni rastvor standarda AFM1 (50,0 ng/ml) upotrebljen je za ispitivanje optimalnih hromatografskih parametara. U Tabeli 5.45. prikazani su varirani i odabrani hromatografski parametri za određivanje AFM1 u mleku.

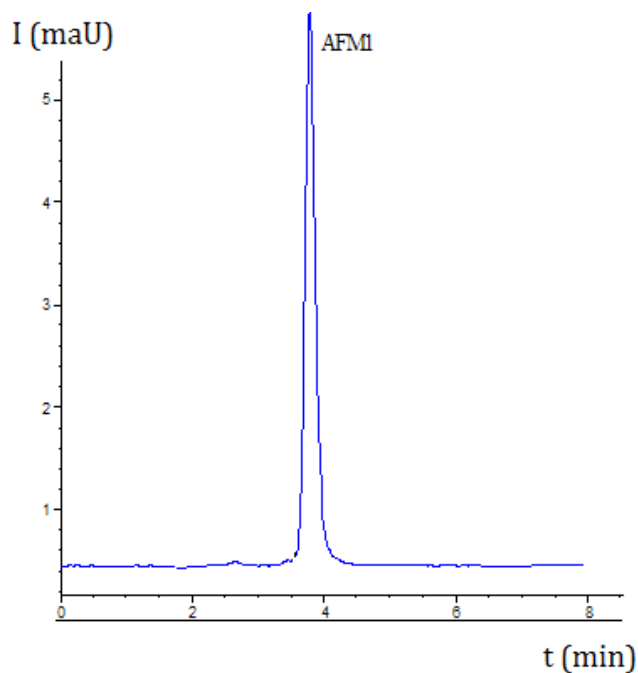
Tabela 5.45. Varirani i odabrani hromatografski parametri za određivanje AFM1 u mleku primenom HPLC-FLD metode

Hromatografski parametri	Opseg variranja	Odabrani uslovi
Odnos rastvarača u mobilnoj fazi	A/B=60-80/40-20	A/B=75/25
Brzina protoka mobilne faze (ml/min)	0,2-0,5	0,25
Temperatura kolone (° C)	30-40	30
λ_{em} (nm)	425-460	450
λ_{ex} (nm)	353-365	360

A: H₂O

B: CH₃CN

Primenom optimizovanih hromatografskih uslova dobijen je zadovoljavajući hromatogram AFM1 (Slika 5.21). AFM1 eluira se sa kolone na retencionom vremenu od 3,8 min, pri čemu relativna standardna devijacija retencionih vremena izračunata na osnovu osam merenja ne prelazi 0,5%.



Slika 5.21. Hromatogram standarda AFM1 (25 ng/ml)

Za utvrđivanje zavisnosti između koncentracije AFM1 i površine pikova hromatograma analizirane su dve serije standarda AFM1. Prva serija obuhvatila je 8 standarda različitih koncentracija AFM1 (0,50; 1,00; 2,50; 5,00; 7,50; 10,0; 15,0 i 20,0 ng/ml), dok je druga serija obuhvatila šest standarda (20,0; 40,0; 50,0; 75,0; 85,0 i 100 ng/ml). U Tabeli 5.46. prikazani su opsezi korišćenih serija standarda AFM1 kao i karakteristike formiranih kalibracionih krivih, odnosno linearnih zavisnosti.

Tabela 5.46. Karakteristike kalibracione krive za određivanje AFM1 primenom HPLC/FD metode

Koncentracioni opseg (ng/ml)	Zavisnost	R ²
0,50-20,0	$y=1,603x-0,133$	0,999
20,0-100	$y=1,261x+4,711$	0,998

Dobijeni koeficijenti determinacije od 0,999 i 0,998 ukazuju da koncentracije AFM1 dobro koreliraju sa površinama pikova hromatograma. Odabrane su dve serije standarda, jer su očekivane koncentracije AFM1 u analiziranim prirodno kontaminiranim uzorcima mleka obuhvatale širok opseg koncentracija.

5.6.2.3. Validacija metode

Vrednost LOQ, za određivanje AFM1 primenom HPLC-FLD metode, zadata je na osnovu smernica koje propisuje tehnički izveštaj (CEN/TR 16059, 2010). Prema navedenom izveštaju LOQ vrednost treba da bude 0,4 puta manja od MDK analiziranog mikotoksina. S obzirom da MDK za AFM1 iznosi 0,05 µg/kg, LOQ vrednost mora biti manja od 0,02 µg/kg. LOQ vrednost od 0,004 µg/kg određena je analizom opadajućih koncentracija standarda AFM1, dok je LOD (0,001 µg/kg) izračunata matematičkim putem.

Validacija HPLC-FLD metode za određivanje AFM1 u mleku izvršena je po istom principu kao i validacija ELISA metode. Korišćenjem uzoraka CRM-a i mleka sa dodatim standardima AFM1 ispitana je tačnost i preciznost metode u uslovima ponovljivosti i reproduktivnosti. Određivani parametri validacije kao i njihove vrednosti prikazane su u Tabeli 5.47.

Dobijene recovery vrednosti od 81,1-86,4%, prikazane u Tabeli 5.47., zadovoljavaju kriterijum od 50-120% za nivo koncentracija do 1 µg/kg propisan evropskom regulativom i tehničkim izveštajem (EC/401/2006; CEN/TR 16059, 2010).

Tabela 5.47. Parametri validacije za određivanje AFM1 primenom HPLC-FLD metode

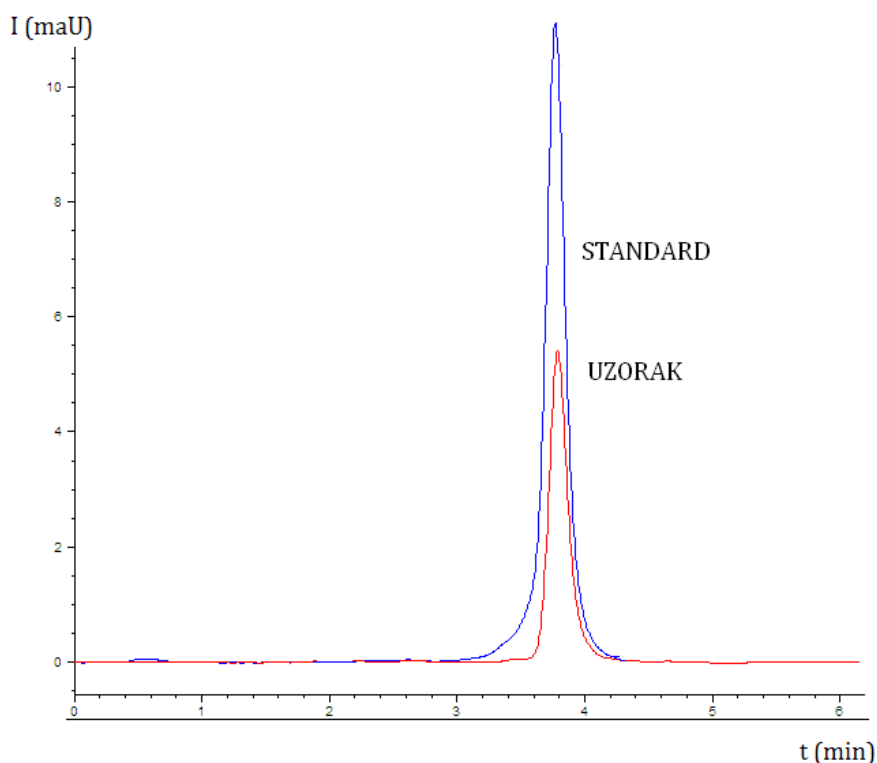
Parametar validacije	CRM	Koncentracija dodatog standarda ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
		0,05	0,50	1,00
Recovery	81,5	84,5	81,1	86,4
RSD _r	5,88	11,3	10,8	9,53
RSD _R	-	23,4	18,2	19,1

CRM: sertifikovani referentni materijal

Vrednosti za RSD_r kretale su se od 5,88% nakon analize CRM-a i od 9,53 do 11,3% za uzorke mleka sa dodatim standardima AFM1. Preciznost u uslovima reproduktivnosti nije ispitana nakon analize CRM-a, usled njegove ograničene količine. Vrednosti za RSD_R dobijene nakon analize spajkovanih uzoraka, bile su u intervalu od 19,1 do 23,4%. RSD_r i RSD_R vrednosti zadovoljavaju kriterijume propisane tehničkim izveštajem (CEN/TR 16059, 2010) i ukazuju na dobru preciznost razvijene HPLC-FLD metode. Pored toga, upoređivanjem spektara i retencionog vremena standarda i AFM1 iz uzoraka izvršena je njegova identifikacija, a ujedno i potvrđena specifičnost metode.

5.6.2.4 Analiza prirodno kontaminiranih uzoraka mleka

Razvijena, optimizovana i validovana HPLC-FLD metoda primenjena je za analizu petnaest odabranih prirodno kontaminiranih uzoraka mleka. Hromatogrami standarda AFM1 i prirodno kontaminiranog uzorka mleka prikazani su na Slici 5.22.



Slika 5.22. Hromatogrami standarda AFM1 (50 ng/ml) i prirodno kontaminiranog uzorka mleka (uzorak 14) snimljen pri optimizovanim hromatografskim uslovima

Rezultati analize za petnaest odabranih uzoraka prirodno kontaminiranih mleka dobijeni primenom HPLC-FLD metode prikazani su u Tabeli 5.48.

Od 15 uzoraka, uzorak pod brojem 9 sa koncentracijom AFM1 0,075 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ne upada u opseg 0,10-0,40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ definisan ELISA metodom. Takođe, dva uzorka sa koncentracijama AFM1 od 0,356 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (broj 12) i 0,352 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (broj 14) ne odgovaraju opsegu $> 0,4 \mu\text{g}/\text{kg}$. Na osnovu vrednosti standardnih devijacija, od pomenuta tri uzorka, samo uzorak 12 sa koncentracijom AFM1 $0,356 \pm 0,015 \mu\text{g}/\text{kg}$ ne zadovoljava opseg definisan ELISA metodom (Tabela 5.44).

Tabela 5.48. Sadržaj AFM1 u odabranim uzorcima mleka određen primenom HPLC-FLD metode

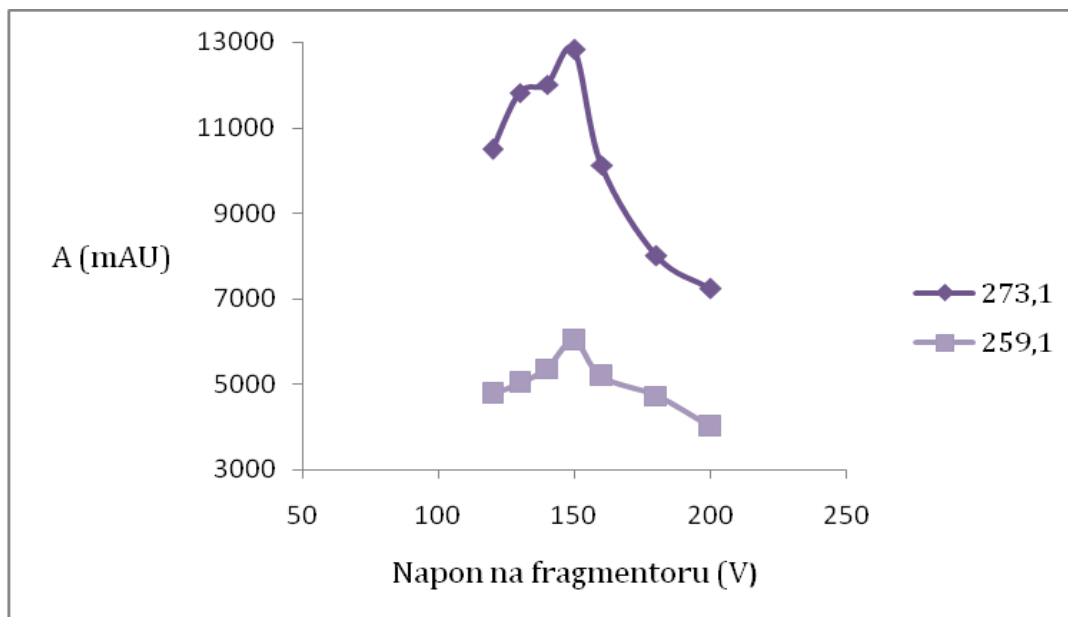
Koncentracioni opseg ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Broj uzorka	SRV \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
< 0,10	1	0,021 \pm 0,017
	2	0,025 \pm 0,015
	3	0,033 \pm 0,009
	4	0,074 \pm 0,011
	5	0,036 \pm 0,013
0,10-0,40	6	0,122 \pm 0,028
	7	0,178 \pm 0,020
	8	0,163 \pm 0,022
	9	0,075 \pm 0,047
	10	0,115 \pm 0,042
>0,40	11	0,421 \pm 0,008
	12	0,356 \pm 0,015
	13	0,670 \pm 0,075
	14	0,352 \pm 0,065
	15	0,760 \pm 0,090

SRV \pm SD: srednja vrednost koncentracije ($\mu\text{g}/\text{kg}$) \pm standardna devijacija ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

5.6.3. LC-MS/MS

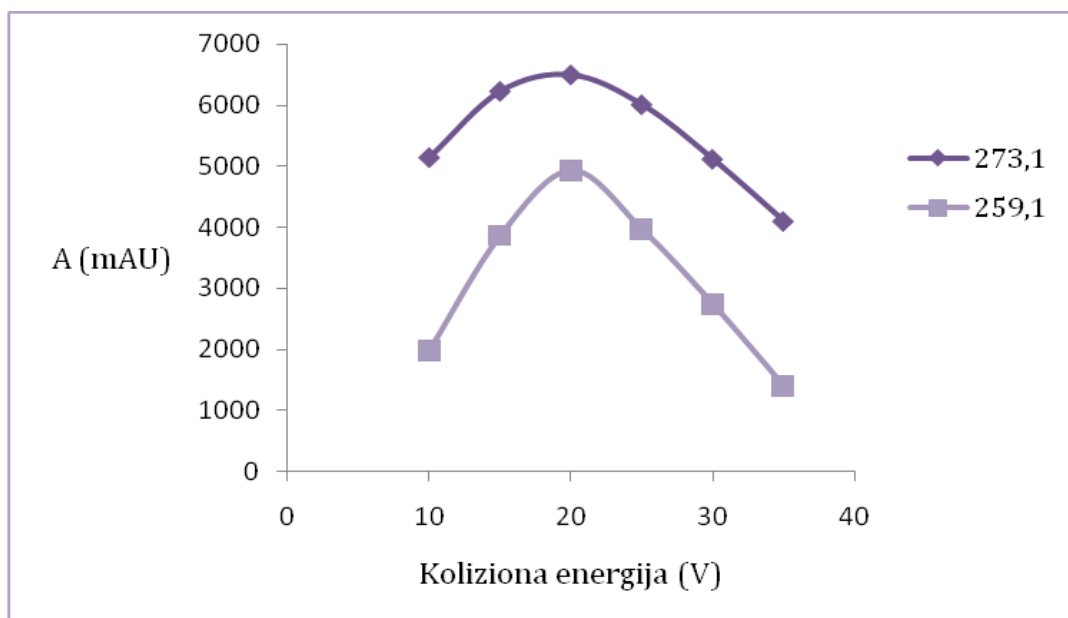
5.6.3.1. Optimizacija MS/MS parametara

Za optimizaciju MS/MS parametra korišćen je standard AFM1 koncentracije 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Optimizacija se zasnivala na pronalaženju optimalnih tranzicija jona AFM1, kao i njegovih akvizicionih parametara u MRM režimu rada. Optimizacija napona na fragmentoru i kolizione energije urađena je na način opisan u poglavlju 5.4.4.1. AFM1 analiziran je pri naponu fragmentora u rasponu od 120-200 V, u koracima između 10 i 20 V. Najveće površine pikova ukazale su da je 150 V optimalan napon na fragmentoru (Slika 5.23.).



Slika 5.23. Odnos inteziteta signala (I) i optimizovanih napona na fragmentoru za produkt jone 273,1 i 259,1

Kolizije energije za dva produkt jona ispitivane su u intervalu od 10 do 35 V. 20 V je odabrana kolizijska energija za oba ispitivana produkt jona (Slika 5.24.).



Slika 5.24. Odnos inteziteta signala (I) i optimizovanih kolizijskih energija za produkt jone 273,1 i 259,1

5.6.3.2. Optimizacija hromatografskih uslova

Optimizacija hromatografskih parametara za određivanje AFM1 u mleku primenom LC-MS/MS metode izvedena je analizom radnog rastvora standarda AFM1 (50,0 ng/ml). U Tabeli 5.49 prikazani su varirani i odabrani hromatografski parametri za određivanje AFM1 u mleku. AFM1 eluiran je u gradijentnom režimu opisanom u Poglavlju 3 (LC-MS/MS, hromatografski uslovi).

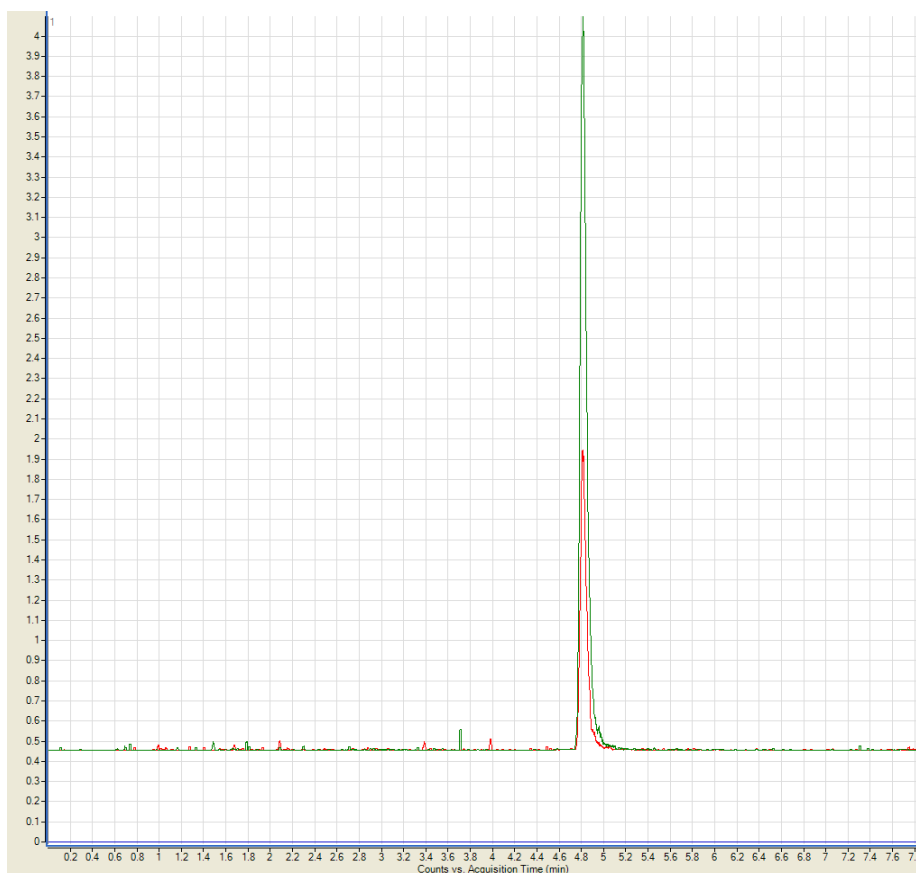
Tabela 5.49. Varirani i odabrani hromatografski parametri za određivanje AFM1 u mleku primenom LC-MS/MS metode

Hromatografski parametri	Opseg variranja	Odabrani uslovi
Odnos rastvarača u mobilnoj fazi	A/B=20-80/80-20	A/B=70/30
Brzina protoka mobilne faze (ml/min)	0,2-0,5	0,50
Temperatura kolone (° C)	30-40	30

A: MeOH, 5 mM NH₄HCOO 1% HCOOH

B: H₂O, 5 mM NH₄HCOO 1% HCOOH

Primenom optimizovanih hromatografskih uslova i MS/MS parametara dobijen je zadovoljavajući hromatogram AFM1 (Slika 5.25). AFM1 se eluira se sa kolone na retencionom vremenu od 4,8 min, pri čemu relativna standardna devijacija izračunata na osnovu osam merenja ne prelazi 1,2%.



Slika 5.25. Ekstrahovani MRM jonski hromatogram standarda AFM1 (c=25 ng/ml) sa odabranom tranzicijom

Da bi se utvrdila zavisnost između koncentracije AFM1 i površine pikova hromatograma analizirane su dve serije standarda AFM1. Prva (0,50; 1,00; 2,50; 5,00; 10,0; i 20,0 ng/ml) i druga (20,0; 40,0; 50,0; 75,0; 85,0 i 100 ng/ml) serija standarda obuhvatile su 6 različitih koncentracija AFM1. U Tabeli 5.50. prikazani su opsezi korišćenih serija standarda AFM1 kao i karakteristike formiranih kalibracionih krivih. Dobijeni koeficijenti determinacije od 0,999 i 0,998 ukazuju da koncentracije AFM1 dobro kooreliraju sa površinama pikova hromatograma.

Tabela 5.50. Karakteristike kalibracionih krivi za određivanje AFM1 primenom LC/MS-MS metode

Koncentracioni opseg (ng/ml)	Zavisnost	R ²
0,50-20,0	$y=44,76x-11,88$	0,999
20,0-100	$y=33,62x+199,1$	0,998

5.6.3.3. Validacija metode

Validacija LC-MS/MS metode za određivanje AFM1 u mleku izvršena je po istom principu kao i validacija HPLC-FLD metode. Da bi se mogli uporediti dobijeni rezultati analize petnaest prirodno kontaminiranih uzoraka mleka primenom različitih metoda, odlučeno je da LOD i LOQ vrednosti za LC-MS/MS metodu budu isti kao i za HPLC-FLD metodu.

Korišćeni su uzorci CRM-a i mleka sa dodatim standardima AFM1, i ispitani su tačnost i preciznost metode u uslovima ponovljivost i reproduktivnost. Određivani parametri validacije kao i njihove vrednosti prikazane su u Tabeli 5.51.

Tabela 5.51. Parametri validacije za određivanje AFM1 primenom LC-MS/MS metode

Parametar validacije	CRM	Koncentracija dodatog standarda ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
		0,05	0,50	1,00
Recovery	71,2	74,4	72,5	80,3
RSD _F	8,22	12,8	11,6	11,5
RSD _R	-	26,7	21,3	20,8

CRM: sertifikovani referentni material

Iz Tabele 5.51. može se uočiti da dobijene vrednosti za recovery 81,1-86,4%; RSD_F 8,22-12,8 i RSD_R 20,8-26,7% zadovoljavaju kriterijume za nivo koncentracija do 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ propisane evropskom regulativom i tehničkim izveštajem (EC/401/2006; CEN/TR 16059, 2010), i ujedno ukazuju na tačnost i dobru preciznost razvijene LC-MS/MS metode.

Specifičnost metode utvrđena je identifikacijom AFM1 na osnovu prekursor i produkt jona. Pored toga izvršena je i identifikacija na osnovu poređenja retencionog vremena sa istim identifikacionim karakteristikama kao i za odgovarajući standard.

5.6.3.4 Ispitivanje uticaja matriksa

Za određivanje uticaja matriksa korišćene su dve serije (0,50-20,0; 20,0-100 ng/ml) SC i MMC standarda. U Tabeli 5.52. prikazane su karakteristike formiranih MMC kalibracionih krivih i izračunati matriks efekti.

Tabela 5.52. Karakteristike MMC kalibracione krive i uticaj matriks efekta

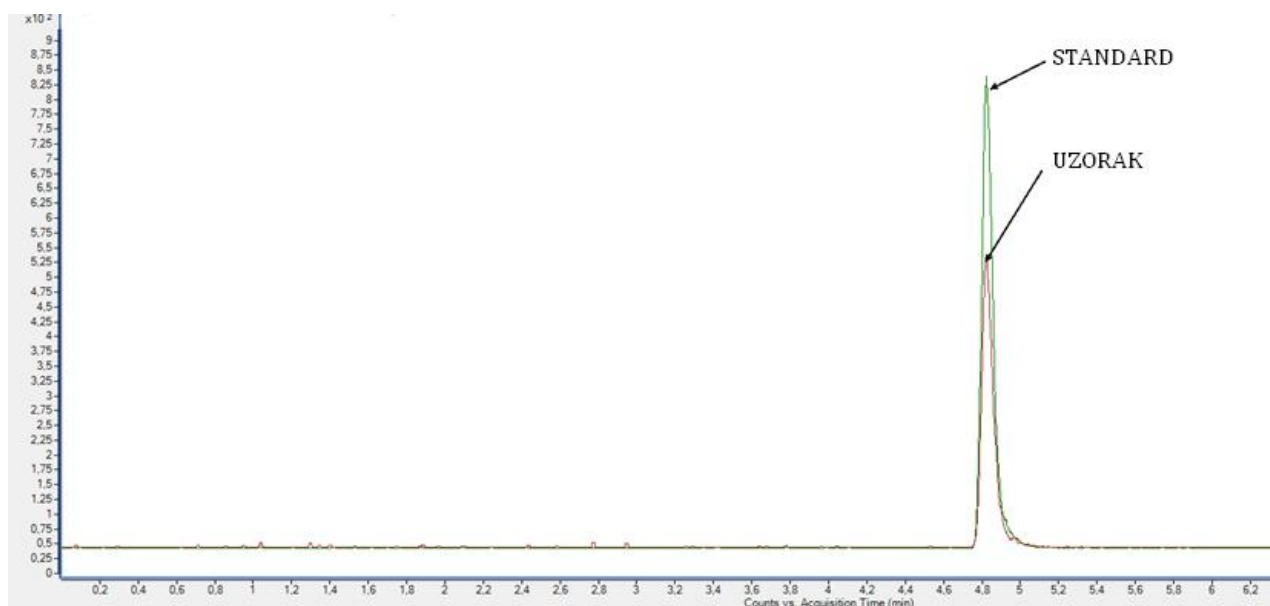
Koncentracioni opseg (ng/ml)	Zavisnost	R ²	Matriks efekat (%)
0,50-20,0	$y=40,44x-11,30$	0,999	90,3
20,0-100	$y=32,05x+120,4$	0,994	95,3

Dobijeni koeficijenti determinacije od 0,999 i 0,994 ukazuju da koncentracije AFM1 iz MMC krivih dobro koreliraju sa površinama pikova hromatograma. Pored toga, iz Tabele 5.52. može se uočiti da je ispitivani matriks-mleko doveo do malog smanjenja analitičkog signala. Odnos nagiba MMC i SC krivih za opseg koncentracija od 0,50 do 20,0 ng/ml ukazuje na smanjenje signala od 9,7%, dok za veće koncentracije od 20,0 do 100 ng/ml smanjenje signala iznosi svega 4,7%. Iz ovoga se može zaključiti da matriks-mleko prečišćeno primenom AflaStar™ M1 R-imunoafinitetnih kolona nema veliki uticaj na smanjenje signala, kao i da je smanjenje signala manje pri većim koncentracijama AFM1.

Određeni uticaj matriksa u ovoj doktorskoj disertaciji u skladu je sa SSE vrednostima dobijenim i objavljenim u dostupnim literaturnim izvorima (Chen i sar., 2005; Škrbić i sar. 2014).

5.6.3.5. Analiza prirodno kontaminiranih uzoraka mleka

Razvijena, optimizovana i validovana LC-MS/MS metoda primenjena je za analizu petnaest odabranih prirodno kontaminiranih uzoraka mleka. Hromatogrami standarda AFM1 i prirodno kontaminiranog uzorka mleka prikazani su na Slici 5.26.



Slika 5.26. Hromatogrami standarda AFM1 (50 ng/ml) i prirodno kontaminiranog uzorka mleka (0,298 $\mu\text{g}/\text{kg}$) snimljen pri optimizovanim hromatografskim uslovima

Rezultati analize za petnaest odabranih uzoraka prirodno kontaminiranih mleka dobijeni primenom LC-MS/MS metode prikazani su u Tabeli 5.53.

Iz dobijenih rezultata može se uočiti da od petnaest uzoraka, samo jedan uzorak (broj 9) sa koncentracijom AFM1 $0,085 \pm 0,007 \mu\text{g}/\text{kg}$ ne upada u opseg $0,10\text{-}0,40 \mu\text{g}/\text{kg}$ definisan ELISA metodom (Tabela 5.44).

Tabela 5.53. Sadržaj AFM1 u odabranim uzorcima mleka određen primenom LC-MS/MS metode

Koncentracioni opseg ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Broj uzorka	SRV \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
< 0,10	1	0,035 \pm 0,013
	2	0,029 \pm 0,007
	3	0,034 \pm 0,010
	4	0,069 \pm 0,020
	5	0,046 \pm 0,017
0,10-0,40	6	0,117 \pm 0,053
	7	0,180 \pm 0,044
	8	0,193 \pm 0,020
	9	0,085 \pm 0,007
	10	0,112 \pm 0,041
>0,40	11	0,524 \pm 0,033
	12	0,445 \pm 0,056
	13	0,778 \pm 0,035
	14	0,326 \pm 0,064
	15	1,501 \pm 0,165

SRV \pm SD: srednja vrednost koncentracije ($\mu\text{g}/\text{kg}$) \pm standardna devijacija ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

5.6.4. Poređenje rezultata analiza odabranih uzoraka mleka primenom ELISA, HPLC-FLD i LC-MS/MS metoda

ELISA, HPLC-FLD i LC-MS/MS metodama analizirano je prisustvo AFM1 u petnaest odabranih prirodno kontaminiranih uzoraka kravljeg mleka. Poređenje dobijenih rezultata prikazano je u Tabeli 5.54.

Iako mnogi literaturni podaci ukazuju da ELISA metoda daje lažno pozitivne rezultate (Anklam i sar., 2002; Rodriques-Velasco i sar., 2003; Singh i sar., 2013), na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 5.54. može se zaključiti da je prisustvo AFM1 određeno primenom ELISA metode potvrđeno i u svih 15 uzoraka primenom HPLC-FLD i LC-MS/MS metoda. Pored toga, može se uočiti da su rezultati dobijeni primenom

ELISA metode malo viši u odnosu na rezultate dobijene hromatografskim analizama, što je u skladu sa prethodno objavljenim literaturnim podacima (Rodrigues-Velasco i sar., 2003; Colak i sar., 2006).

Tabela 5.54. Poređenje sadržaja AFM1 u odabranim uzorcima mleka određenog primenom ELISA, HPLC i LC-MS/MS metoda

Opseg koncentracija ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Broj uzorka	Primenjene metode		
		ELISA SRV \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	HPLC-FLD SRV \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LC-MS/MS SRV \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
< 0,1	1	0,043 \pm 0,001 ^a	0,021 \pm 0,017 ^a	0,035 \pm 0,013 ^a
	2	0,036 \pm 0,001 ^a	0,025 \pm 0,015 ^a	0,029 \pm 0,007 ^a
	3	0,050 \pm 0,001 ^a	0,033 \pm 0,009 ^a	0,034 \pm 0,010 ^a
	4	0,086 \pm 0,009 ^a	0,074 \pm 0,011 ^a	0,069 \pm 0,020 ^a
	5	0,047 \pm 0,001 ^a	0,036 \pm 0,013 ^a	0,046 \pm 0,017 ^a
0,1-0,4	6	0,254 \pm 0,007 ^b	0,122 \pm 0,028 ^a	0,117 \pm 0,053 ^a
	7	0,231 \pm 0,032 ^a	0,178 \pm 0,020 ^a	0,180 \pm 0,044 ^a
	8	0,189 \pm 0,013 ^a	0,163 \pm 0,022 ^a	0,193 \pm 0,020 ^a
	9	0,105 \pm 0,001 ^a	0,075 \pm 0,047 ^a	0,085 \pm 0,007 ^a
	10	0,253 \pm 0,012 ^b	0,115 \pm 0,042 ^a	0,112 \pm 0,041 ^a
> 0,4	11	0,534 \pm 0,070 ^a	0,421 \pm 0,008 ^a	0,524 \pm 0,033 ^a
	12	0,528 \pm 0,157 ^a	0,356 \pm 0,015 ^a	0,445 \pm 0,056 ^a
	13	0,792 \pm 0,203 ^a	0,670 \pm 0,075 ^a	0,778 \pm 0,035 ^a
	14	0,440 \pm 0,016 ^a	0,352 \pm 0,065 ^a	0,326 \pm 0,064 ^a
	15	1,096 \pm 0,226 ^{ab}	0,760 \pm 0,09 ^a	1,501 \pm 0,165 ^b

Različita slova u istom redu ukazuju na značajnu razliku ($P < 0,05$) između rezultata prema Dankanovom testu višestrukih intervala

SRV \pm SD: Srednja vrednost koncentracije ($\mu\text{g}/\text{kg}$) \pm standardna devijacija ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Statistička analiza varijansi između primenjenih metoda pokazala je da postoji značajna razlika ($p < 0,05$) između rezultata za uzorke 6, 10 i 15. Primenom ELISA metode za uzorke pod brojem 6 i 10 dobijene su koncentracije AFM1 koje se značajno razlikuju od rezultata dobijenih primenom HPLC-FLD i LC-MS/MS metoda. Pored toga, koncentracija AFM1 u uzorku 15 određena LC-MS/MS metodom značajno se razlikuje

od određenih koncentracija primenom druge dve metode. I pored navedenih značajnih statističkih razlika, potrebno je ukazati da je od ukupno 45 rezultata dobijenih primenom tri metode za 15 različitih uzoraka, samo u tri uzorka primećena statistički značajna razlika.

Da bi se ispitala korelacija između primenjenih metoda za određivanje AFM1 u prirodno kontaminiranim uzorcima mleka, dobijeni rezultati analizirani su metodom proste linearne regresije. Korelacija između primenjenih metoda izražena je koeficijentom korelacije (r) za ukupan i tri ispitana opsega koncentracija. Dobijeni rezultati analize prikazani su u Tabeli 5.55.

Tabela 5.55. Korelacija između primenjenih metoda za određivanje AFM1: ELISA/HPLC-FLD; ELISA/LC-MS/MS i HPLC-FLD/LC-MS/MS

Opseg koncentracija ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		ELISA/ HPLC-FLD	ELISA/ LC-MS/MS	HPLC-FLD/ LC-MS/MS
< 0,1	r	0,9748	0,9456	0,9561
	zavisnost	$y=1,062x-0,0182$	$y=0,7760x+0,001$	$y=0,7201x+0,0152$
0,1-0,4	r	0,4938	0,2778	0,9572
	zavisnost	$y=0,326x-0,0635$	$y=0,2090x+0,094$	$y=1,0911x-0,0052$
> 0,4	r	0,9623	0,9851	0,9142
	zavisnost	$y=0,682x-0,0493$	$y=1,7267x-0,456$	$y=2,2602x-0,422$
Ukupan opseg	r	0,9857	0,9651	0,9465
	zavisnost	$y=0,747x-0,0065$	$y=1,2293x-0,0857$	$y=1,5912x-0,0626$

r: koeficijent korelacije

Podaci prikazani u Tabeli 5.55. ukazuju da je za svih 15 analiziranih uzoraka najveći koeficijent korelacije ($r=0,9857$) određen za rezultate dobijene primenom ELISA i HPLC-FLD metoda. Nešto manji koeficijent korelacije ($r=0,9651$) određen je za rezultate dobijene primenom ELISA i LC-MS/MS metoda. Iako su uzorci u ovoj doktorskoj disertaciji za analizu primenom HPLC-FLD i LC-MS/MS pripremani na isti način (imunoafinitetne kolone), poređenjem rezultata dobijena je najmanja korelacija, odnosno r vrednost od 0,9465. Ovaj podatak može se objasniti mogućim gubitkom

analita tokom višestapne pripreme uzoraka primenom imunoafinitetnih kolona (Castegnaro i sar., 2006). Iz tog razloga, Hongyo i sar. (1992) preporučuju da se za poređenje rezultata različitih metoda koriste isti ekstrakti, kako bi se povećala korelacija između upoređivanih metoda. Međutim, Beaver i sar. (1990) tvrde da bi se analizom istih ekstrakata poredile samo metode određivanja, a ne ceo postupak analize. Iz tog razloga u ovoj doktorskoj disertaciji za poređenje HPLC-FLD i LC-MS/MS metoda korišćeni su različiti ekstrakti od istih prirodnih kontaminiranih uzoraka mleka pripremljeni na isti način primenom imunoafinitetnih kolona. Ipak, na osnovu dobijenih koeficijenata korelacije od 0,9857, 0,9651 i 0,9465 može se zaključiti da između rezultata upoređivanih metoda postoji korelacija, jer je $r > 0,9$ (Das i sar., 2009).

U pogledu dobijenih koeficijenata korelacije između ispitivanih metoda za različite opsege koncentracija, može se uočiti da se njegova vrednost kreće u intervalu od 0,2778 do 0,9748. Slaba korelacija, okarakterisana sa $r < 0,5$ (Das i sar., 2009), dobijena je za opseg koncentracija AFM1 od 0,1 do 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dobijenih primenom ELISA metode, u poređenju sa druge dve hromatografske metode. Za ostale ispitivane opsege koncentracija AFM1, dobijeni rezultati primenom tri različite metode pokazale su korelaciju sa vrednostima $r > 0,9$ (Tabela 5.55).

Dobijeni rezultati i visoke vrednosti koeficijenta korelacije između primenjenih ELISA, HPLC-FLD i LC-MS/MS metoda mogu poticati i od relativno homogene distribucije AFM1 u prirodno kontaminiranim uzorcima mleka. Iako je u mnogim literaturnim izvorima (Whitaker i sar., 2006; Krska i Molinelli, 2007; Van Egmond i sar., 2007) kao i u ovoj doktorskoj disertaciji, potvrđena neravnomerna raspodela aflatoksina unutar čvrstog uzorka (kukuruza), do danas nema dostupnih podataka o raspodeli mikotoksina unutar tečnih matriksa.

Takođe, dobijeni rezultati analize prisustva AFM1 u prirodno kontaminiranim uzorcima mleka primenom tri različite metode ne mogu u potpunosti biti upoređeni sa rezultatima iz literature. Prvo, jer do danas nema radova koji porede tri navedene metode, a drugo jer se većina radova koji se bave poređenjem dve metode koncipiraju na analizama uzoraka koji nisu prirodno kontaminirani nego je u njih dodat standard

ispitivanog mikotoksina. Objavljeno je nekoliko radova koji su poredili ELISA i HPLC-FLD metodu za određivanje AFM1 u mleku i mlečnim proizvodima. Kim i sar. (2000) su nasuprot drugim autorima (Rodrigues-Velasco i sar., 2003; Colak i sar., 2006) ustanovili da se primenom ELISA metode dobijaju manje koncentracije AFM1 u odnosu na HPLC-FLD metodu. Pored toga, Dixon-Holland i Katz (1988) kao i Colak i sar. (2006) ustanovili su da između rezultata dobijenih primenom ELISA i HPLC-FLD metode postoji dobra korelacija.

Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju da se sve navedene tri metode kao dovoljno osetljive, ponovljive i tačne mogu koristiti za određivanje AFM1 u prirodno kontaminiranim uzorcima mleka.

6. Zaključak

Na osnovu sprovedenih istraživanja i prikazanih rezultata u ovoj doktorskoj disertaciji mogu se izneti sledeći zaključci:

1. Analizom pojave aflatoksina u uzorcima kukuruza iz četiri proizvodne godine (2009-2012.) utvrđeno je da nijedan od 300 uzoraka kukuruza iz 2009., 2010. i 2011. godine nije bio kontaminiran aflatoksinima. Nasuprot tome, od 700 analiziranih uzoraka kukuruza iz 2012. godine, 553 (79%) uzoraka bilo je kontaminirano aflatoksinima. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su klimatski uslovi u velikoj meri uticali na visok nivo pojave aflatoksina u uzorcima kukuruza iz 2012. godine, kao i odsustvo aflatoksina u analiziranim uzorcima kukuruza iz 2009., 2010. i 2011. godine. Naime, zabeleženi klimatski uslovi od aprila do septembra (2009-2011.) nisu pogodovali razvoju *Aspergillus* plesni i sintezi aflatoksina. Međutim, sušni uslovi zabeleženi tokom 2012. godine u velikoj meri uticali su na pojavu *Aspergillus* plesni i visok nivo kontaminacije kukuruza aflatoksinima. Takođe, analizom po 100 uzoraka

kukuruzu u periodu od sedam meseci, utvrđeno je da tokom perioda skladištenja dolazi do povećanja broja kontaminiranih uzoraka kukuruza.

2. Analizom 200 uzoraka različitih kategorija kravljeg mleka ustanovljeno je da samo 2 (1%) uzorka nisu bila kontaminirana sa AFM1. Ostalih 198 uzoraka sadržalo je AFM1 u koncentracionom intervalu od 0,005 do 1,200 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Takođe, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je najveća srednju vrednost koncentracije AFM1 ($0,372 \pm 0,308 \mu\text{g}/\text{kg}$) određena kod uzoraka pasterizovanih mleka proizvedenih u manjim pogonima, dok je najmanja srednja koncentracija AFM1 ($0,080 \pm 0,073 \mu\text{g}/\text{kg}$) pronađena u uzorcima organskog mleka. Dobijeni rezultati ukazuju da se pojava AFM1 u analiziranim uzorcima kravljeg mleka iz 2012. godine može dovesti u vezu sa klimatskim uslovima i pojavom aflatoksina u kukuruzu. Činjenica da je 79% analiziranih uzoraka kukuruza iz 2012. godine bilo kontaminirano aflatoksini i da se najveći deo proizvedenog kukuruza (80-90%) u Srbiji koristi za ishranu životinja, dodatno potvrđuje prethodno definisan uzrok pojave AFM1 u mleku.

3. Rizik od pojave AFM1 u mleku procenjen je na osnovu analize 200 uzoraka kravljeg mleka i analize ankete koja je obuhvatila 1500 ispitanika. Analizom mleka određene su najmanja, srednja i najveća koncentracija AFM1 u kontaminiranim uzorcima mleka, dok su rezultati ankete ukazali na prosečan unos mleka u zavisnosti od starosne kategorije i pola ispitanika. Dobijeni rezultati u vezi sa procenom rizika ukazuju da se izračunate vrednosti procenjenog dnevnog unosa (EDI) za AFM1 povećavaju sa smanjenjem starosne kategorije, usled znatno većeg unosa mleka u odnosu na telesnu masu (TM). Pri analizi rizika od unosa mleka koje je sadržalo najmanju koncentraciju AFM1 od $0,010 \mu\text{g}/\text{kg}$, uočava se da postoji rizik samo kod starosne kategorije dece od prve do pete godine, dok ostale starosne kategorije ne unose AFM1 u količini iznad vrednosti za dozvoljeni dnevni unos (TDI) od $0,2 \text{ ng}/\text{kg TM}/\text{dan}$. Za mleko sa srednjom i najvećom koncentracijom AFM1, izračunata EDI

vrednost je znatno iznad TDI vrednosti za sve ispitane starosne kategorije. Usled dokazanog kancerogenog, mutagenog, teratogenog i imunosupresivnog efekta AFM1 na organizam ljudi kao i na osnovu izračunatih vrednosti indeksa opasnosti, može se zaključiti da je pojava AFM1 u mleku usloвила postojanje izuzetnog rizika od konzumiranja mleka koje je kontaminirano AFM1.

4. Optimizacijom metodologije određivanja aflatoksina u kukuruza utvrđeno je da primenjene ELISA metode, kao i razvijene i optimizovane HPLC-FLD, HPLC-UV light-FLD i LC-MS/MS metode sa različitim postupcima pripreme uzoraka, zadovoljavaju kriterijume o validaciji metoda propisane odgovarajućih evropskim Regulativama.
5. Primenom navedenih metoda za analizu aflatoksina u prirodno kontaminiranim uzorcima kukuruza, uočeno je da su pojedini dobijeni rezultati izvan prethodno definisanog opsega koncentracija aflatoksina. Navedena pojava objašnjena je na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem raspodele ukupnog broja plesni, vrste *Aspergillus flavus* i aflatoksina u uzorcima kukuruza iz istih i različitih skladišta. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da neravnomerna raspodela ispitivanih plesni i aflatoksina unutar realnih uzoraka kukuruza, u velikoj meri utiče na dobijeni rezultat, bez obzira na primenjenu metodu analize.
6. Optimizacijom metodologije određivanja AFM1 u mleku utvrđeno je da primenjene ELISA metode, kao i razvijene i optimizovane HPLC-FLD i LC-MS/MS metode, zadovoljavaju kriterijume o validaciji metoda propisane odgovarajućih evropskim Regulativama. Primena navedenih metoda za analizu AFM1 u prirodno kontaminiranim uzorcima mleka dovela je do zaključka da ravnomernija raspodela toksina unutar tečnog uzorka u manjoj meri utiče na rezultat, kao i da postoji dobra korelacija između koncentracija AFM1 određenih primenom različitih metoda

7. Literatura

1. Abbas, H., K., Weaver, M., A., Zablutowics, R., M., Horn, B., W., Shier, W., T. (2005). Relationships between aflatoxin production, sclerotia formation and source among Mississippi Delta *Aspergillus* isolates. *European Journal of Plant Pathology*, 112, 283-287.
2. Abbas, H., K., Wilkinson, J., R., Zablutowics, R., M., Accinelli, C., Abel, C., A., Bruns, H., A., Weaver, M. (2009). Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews*, 28, 142-153.
3. Agilent Triple Quad LC/MS System, Concept Guide, (2007). Agilent Technologies, Inc., Wilmington, SAD.
4. Amate, C., F., Unterluggauer, H., Fischer, R., J., Fernandez-Alba, A., R., Masselter, S. (2010). Development and validation of a LC-MS/MS method for the simultaneous determination of aflatoxins, dyes and pesticides in spices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 93-107.

5. AMCE, Aflatoxin Mitigation Center of Excellence. (2010). Preventing Health Hazards and Economic Losses from Aflatoxin. Texas Corn Producers.
6. 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. *International Journal of AOAC*, 86, 412-431.
7. Anfossi, L., Baggiani, C., Giovannoli, C., Giraudi, G. (2011). In: Aflatoxins - Detection, Measurement and Control. I. Torres-Pacheco (Ed.), *Occurrence of Aflatoxin M1 in Dairy Products* (pp. 1-19), InTech Europe, Rijeka, Croatia.
8. Anklam, E., Stroka, J., Boenke, A. (2002). Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. *Food Control*, 13, 173–183.
9. Ardrey, E. R., (2003). In: Liquid Chromatography – Mass Spectrometry, An Introduction, *Mass Spectrometry* (pp. 33-73). Wiley, Chichester, United Kingdom.
10. Arroyo-Manzanares, N., Garcia-Campana, A., M., Gamiz-Gracia, L. (2013). Multiclass mycotoxin analysis in *Silybum marianum* by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a procedure based on QuEChERS and dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*. 1282, 11-19.
11. Asplin, F., D., Carnaghan, R., B., A. (1961). The toxicity of certain groundnut melas for poultry with special reference to their effects on duckling and chickens. *Veterinary Record*, 73, 1215-1219.
12. Atroshi, F., Rizzo, A., Wastermack, T., Ali-Vehmas, T. (2002). Antioxidant nutrients and mycotoxins. *Toxicology*, 180, 151-167.
13. Ayar, A., Sert, D., Con, A., H. (2007). A study on the occurrence of aflatoxin in raw milk due to feeds. *Journal of Food Safety*, 27, 199–207.
14. Azzis-Baumgartner, E., Lindblade, K., Giesecker, K., Rogers, H., S., Kieszak, S., Njapau, H., Schleicher, R., McCoy, L., F., Misore, A., DeCock, K., Rubin, C., Slutsker,

- L. (2005). The Aflatoxin Investigative Group Case control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. *Environmental Health Perspectives*, 113, 1779-1783.
15. Bailly, J., D., Guerre, P. (2009). In: Handbook of Muscle Foods Analysis. L. M. L. Nollet, F. Toldra (Eds.), *Mycotoxins analysis in muscles* (pp. 663-712), CRS Press, Taylor and Francis group, Suite, USA.
16. Bankole, S. A., Adebajo, A. (2003). Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling. *African Journal of Biotechnology*, 2 (9), 254-263.
17. Barbiroli, A., Bonomi, F., Benedetti, S., Mannino, S., Monti, L., Cattaneo, T., Lametti, S. (2007). Binding of Aflatoxin M1 to Different Protein Fractions in Ovine and Caprine Milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 532-540.
18. Battacone, G., Nudda, A., Cannas, A., Cappio Borlino, A., Bomboi, G. Pulina, G. (2003). Excretion of Aflatoxin M1 in Milk of Dairy Ewes Treated with Different Doses of Aflatoxin B1. *Journal of Dairy Science*, 86, 2667-2675.
19. Beaver, R., W., Wilson, D., M., Trucksess, M., W. (1990). Comparison of postcolumn derivatization liquid chromatography with thin layer chromatography for determination of aflatoxins in naturally contaminated corn. *Journal of AOAC International*. 73, 579-581.
20. Bennett, J., W., Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 3, 497-516.
21. Berkum, S. V. (2010). Agriculture in late transition-experience of Serbia, Chapter VI, Integrating into the EU: Challenges for the Serbian dairy supply chain, Published by the Serbian Association of Agricultural Economists – DAES (SAAE), Belgrade, Republic of Serbia.
22. Bhatnagar, D. (2010). Elimination of postharvest and preharvest aflatoxins contamination. 10th International working conference on stored product protection, 27 June-02 June, Section: Microbiology, mycotoxins and food safety, p 425, Estoril, Portugal.

23. Bhatnagar, D., Cary, J., W., Ehrlich, K., C., Yu, J., Cleveland, T., E. (2006). Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia*, 162, 155-166.
24. Bilandžić, N., Božić, Đ., Đokić, M., Sedak, M., Solomun Kolanović, B., Varenina, I., Cvetnić, Ž. (2014). Assessment of aflatoxin M1 contamination in the milk of four dairy species in Croatia. *Food Control*, 43, 18-21.
25. Bilandžić, N., Varenina, I., Solomun, B. (2010). Aflatoxin M1 in raw milk in Croatia. *Food Control*, 21, 1279-1281.
26. Božić, D., Muncan, P., Sevarlić, M. (2009). An assessment of the competitiveness of the dairy supply chain in Serbia. Report in the framework of the FP7 EU financed project AgriPolicy (www.agripolicy.net).
27. Bradburn, N., Coker, R., D., Blunden, G. (1994). The aetiology of turkey 'x' disease. *The International Journal of Plant Biochemistry*, 35, 817.
28. Braicu, C., Puia, C., Bodoki, E., Socaciu, C. (2008). Screening and quantification of aflatoxins and ochratoxin A in different cereals cultivated in Romania using thin-layer chromatography densitometry. *Journal of Food Quality*, 31, 108-120.
29. Bräse, S., Encinas, A., Keck, J., Nising, C., F. (2009). Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chemical Reviews*, 109, 3903-3990.
30. Bursić, V. (2011). Optimizacija hromatografskih metoda i određivanje ostataka fungicida u plodovima krastavaca, Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
31. Bursić, V., Vuković, G., Lazić, s., Bagi, F., Stojanović, T., Brzaković, N. (2012). Analitičke metode određivanja mikotoksina. *Biljni Lekar*, XL, 4, 346-353.
32. Cano-Sancho, G., Marin, S., Ramos, A., J., Peris-Vicente, J., Sanchis, V. (2010). Occurrence of aflatoxin M1 and exposure assessment in Catalonia (Spain). *Revista Iberoamericana de Micología*, 27, 130-135.
33. Cardwell, K., F., Desjardins, D., Henry, S., H. (2004). The Cost of Achieving Food Security and Food Quality. <http://www.apsnet.org/online/festure/mycotoxin/top.html>.

34. Cary, J., W., Calvo, A., M. (2008). Regulation of *Aspergillus* mycotoxin biosynthesis. *Toxin Reviews*, 27, 347-370.
35. Castegnaro, M., Tozlovanu, M., Wild, C., Molini, A., Sylla, A., Pfohl-Leszkowicz, A. (2006). Advantages and drawbacks of immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50, 480-487.
36. Char, N., L., Rao, P., Khan, I., Sarma, D., R. (1982). An outbreak of aflatoxicosis in poultry. *Poultry Adviser*, 15, 57-58.
37. Charmley, L., L., Trenholm, H., L., Prelusky, D., A., Rosenberg, A., (1995). Economic losses and decontamination. *Natural Toxins*, 3, 199-203
38. Chen, C., Li, W., J., Peng, K., Y. (2005). Determination of Aflatoxin M1 in Milk and Milk Powder Using High-Flow Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8474-8480.
39. Choudary, C., Rao, M., R., K., M. (1982). An outbreak of aflatoxicosis in commercial poultry farms. *Poultry Adviser*, 16, 75-76.
40. Chun, H., S., Kim, H., J., Ok, H., E., Hwang, J., B., Chung, D., H. (2007). Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. *Food Chemistry*, 102, 385-391.
41. Codex Alimentarius Commission. (2014). Proposed draft annex for the prevention and reduction of aflatoxins and ochratoxin A contamination in sorghum (CAC/RCP 51-2003), Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Rotterdam, the Netherlands.
42. Colak, H. (2007). Determination of Aflatoxin M1 Levels in Turkish White and Kashar Cheeses Made of Experimentally Contaminated Raw Milk. *Journal of Food and Drug Analysis*, 15, 2, 163-168.
43. Colak, H., Hampikyan, H., Ulusoy, B., Ergun, O. (2006). Comparison of a competitive ELISA with an HPLC method for the determination of Aflatoxin M1 in Turkish White, Kasar and Tulum cheeses. *European Food Research and Technology*. 223, 719-723.

44. Cole, R., J., Cox, R., H. (1981). *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*. Academic Press, New York.
45. Commons, W. (2014). HPLC apparatus. [pristupljeno 10.01.2014.]; Dostupno: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:HPLC_apparatus.svg.
46. Copetti, M., V., Iamanaka, B., T., Pereira, J., L., Fungaro, M., H., Taniwaki, M., H. (2011). Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. *International Journal of Food Microbiology*, 148, 41–44.
47. Cotty, P., J., Jaime-Garcia, R. (2007). Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 109-115.
48. Coulibaly, O., Hell, K., Bandyopadhyay, R., Hounkponou, S., Leslie, J., F. (2008). In: *Mycotoxins: Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade*, J. F. Leslie, R. Bandyopadhyay, A. Visconti (Eds.), *Economic impact of aflatoxin contamination in Sub-Saharan Africa* (pp. 67-76). Cromwell Press, United Kingdom.
49. Council for Agricultural Science and Technology (CAST). (2003). In: *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. Fungal Growth and Mycotoxin Development by Major Mycotoxigenic Fungi* (pp. 20-35). Ames, Iowa, USA
50. Council for Agricultural Science and Technology (CAST). (2003). In: *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. Occurrence of Mycotoxins in Food and Feed* (pp. 36-47). Ames, Iowa, USA.
51. Council for Agricultural Science and Technology (CAST). (2003). In: *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. Management and Detection of mycotoxins* (pp. 86-103). Ames, Iowa, USA.
52. Covarelli, L., Beccari, G., Salvi, S. (2011). Infection by mycotoxigenic fungal species and mycotoxin contamination of maize grain in Umbria, central Italy. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2365-2369.

53. Das, P., Bhattacharyya, D., Bandyopadhyay, S., M., Kim, T. (2009). Person Identification through IRIS Recognition. *International Journal of Security and its Application*, 3, 1, 129-147.
54. Decastelli, L., Lai, J., Gramaglia, M., Monaco, A., Nachtmann, C., Oldano, F. (2007). Aflatoxins occurrence in milk and feed in Northern Italy during 2004-2005. *Food Control*, 18, 1263-1266.
55. Desmarchelier, A., Oberson, J.M., Tella, P., Gremaud, E., Seefelder, W., Mother, P. (2010). Development and comparison of two multiresidue methods for the analysis of 17 mycotoxins in cereals by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 7510-7519.
56. Dhanasekaran, D., Shanmugapriya, S., Thajuddin, N., Panneerselvam, A. (2011). In Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology. R. G. Guevara-Gonzalez (Ed.), *Aflatoxins and Aflatoxicosis in Human and Animals* (pp. 221-254), In Tech Europe, Rijeka, Croatia.
57. Dixon-Holland, D., E., Katz, S., E. (1988). Competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay for detection of sulfamethazine residues in swine urine and muscle tissue. *Association of Official Analytical Chemistry*, 71, 6, 1137-1140.
58. Duarte, S., C., Almeida, A., M., Teixeira, A., S, Pereira, A., L., Falcão, A., C., Pena, A., Lino, C., M. (2013). Aflatoxin M1 in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal exposure. *Food Control*, 30, 411-417.
59. Eaton, D., L., Groopman, J., D. (1993). The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance. Academic Press, London.
60. Ellis, W., O., Smith, J., P., Simpson, J., P., Oldham, J., H. (1991). Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organism's detection and methods of control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30, 403-439.
61. Erkekoglu, P., Şahin, G., Baydar, T. (2008). A Special Focus on Mycotoxin Contamination in Baby Foods: Their Presence and Regulations. *FABAD Journal of Pharmaceutical Science*, 33, 51-66.

62. European Commission (2002). Commission Regulation 2002/32/EC of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed. *Official Journal of the European Parliament*, L 140, 10-21.
63. European Commission (2002). Commission Regulation 2002/657/EC of 14 August 2002 implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, L 221, 8-36.
64. European Commission (2006). Commission Regulation 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. *Official Journal of the European Union*, L 364, 5-18.
65. European Commission (2006). Commission Regulation 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. *Official Journal of the European Union*, L 70, 12-34.
66. European Food Safety Authority, EFSA. (2010). Report for 2010 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. *The EFSA Journal*, 212, 1-64.
67. European Food Safety Authority, EFSA. (2012). Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. *Scientific report submitted to EFSA*, 1-172.
68. European Food Safety Authority, EFSA. (2013). Technical Report for 2013 on the results for Aflatoxins (sum of B1, B2, G1, G2) in cereals and cereal-derived food products. *The EFSA Journal*, 406, 1-11
69. Fallah, A. A., Rahnama, M., Jafari, T., Saei-Dehkordi, S., S. (2011). Seasonal variation of aflatoxin M1 contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. *Food Control*, 22, 10, 1653-1656.
70. Ferrer Amate, C., Unterluggauer, H., Fischer, R.J., Fernández-Alba, A.,R., Masselter, S. (2010). Development and validation of a LC-MS/MS method for the

- simultaneous determination of aflatoxins, dyes and pesticides in spices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 1, 93-107.
71. Food and Agriculture Organization, FAO. (2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Food and Nutrition Paper 81. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
72. Food and Drug Administration, FDA. (2011). Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed.
73. Frenich, A., G., Romero-González, R., Gómez-Pérez, M., Martínez Vidal, J., L. (2011). Multi-mycotoxin analysis in eggs using a QuEChERS-based extraction procedure and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, 4349-4356.
74. Garrido Frenich, A., Vidal Martínez, J., L., Romero-González, R., Aguilera-Luiz, M. (2009). Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 117, 705-712.
75. Garrido, C. E., Hernández Pezzani, C., Pacin, A. (2012). Mycotoxins occurrence in Argentina's maize (*Zea mays* L.), from 1999 to 2010. *Food Control*, 25, 650-665.
76. Gebrehiwet, Y., Ngqangweni, S., Kirsten, J., F. (2007). Quantifying the trade effect of sanitary and phytosanitary regulations of OECD countries on South African foods exports. *Agrekon*, 46, 23-38.
77. Ghanem, I., Orfi, M. (2009). Aflatoxin M1 in raw, pasteurized and powdered milk available in the Syrian market. *Food Control*, 20, 603-605.
78. Ghidini, S., Zanardi, E., Battaglia, A., Varisco, G., Ferretti, E., Campanini, G., et al. (2005). Comparison of contaminant and residue levels in organic and conventional milk and meat products from Northern Italy. *Food and Additives Contaminants*, 22, 1, 9-14.

79. Gloria, E., M., Ciacco, C., F., Lopes Filho, J., F., Ericsson, C., Zocchi, S., S. (2004). Distribution of aflatoxin contamination in maize samples. *Revista Ciencia e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, 24, 1, 79-83.
80. Golge, O. (2014). A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Adana province of Turkey. *Food Control*, 45, 150-155.
81. Gosal, S., S., Wani, S., H., Kang, M., S. (2009). Biotechnology and Drought Tolerance. *Journal of Crop Improvement*, 23, 19-54.
82. Greppy, E. E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effect of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127, 19-28.
83. Guevara-González, R., G., Chapa-Oliver, A., M., Mejía-Teniente, L., Torres-Pacheco, I., Vazquez-Cruz, M., A., Cervantes-Landaverde, J., J., Preciado-Ortiz, R., E., Moreno-Martinez, E., (2011). In: Aflatoxins –Biochemistry and Molecular Biology, *Genetic resistance to drought in maize and its relationship in aflatoxins production* (pp. 151-160). In TechEurope, Rijeka, Croatia.
84. Gurbay, A., Sabuncuoglu, S. A., Girgin, G., Sahin, G., Yigit, S., Yurdakok, M. (2010). Exposure of newborns to aflatoxin M1 and B1 from mothers breast milk in Ankara, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 314–319.
85. Hajšlová J., Zrostlíková J. (2003): Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. *Journal of Chromatography A*, 1000, 181-197.
86. Hell, K., Cardwell, K., F., Setamou, M., Poehling, H., M. (2000). The influence of storage practices on aflatoxin contamination in maize in four agroecological zones of Benin, West Africa. *Journal of Stored Products Research*, 36, 365-382.
87. Henry, S. H., Bosch, F., X., Troxell, T., C., Bolger, P., M. (1999). Reducing liver cancer—global control of aflatoxin. *Science*, 286, 2453-2454.
88. Hepsag, F., Golge, O., Kabak, B. (2014). Quantitation of aflatoxins in pistachios and groundnuts using HPLC-FLD method. *Food Control*, 38, 75-81.
89. Hernández-Hierro, J., M., Garcia-Villanova, R., J., Torrero, P., R., Fonseca, I., M., T. (2009). Aflatoxins and Ochratoxin A in red paprika for retail sale in Spain:

- occurrence and evaluation of a simultaneous analytical method. *Czech Journal of Food Sciences*, 27, 361–365.
90. Hesseltine, C., W. (1979). In: Interactions of mycotoxins in animal production. R. J. Oltjen (Ed.), *Introduction, definition and history of mycotoxins of importance to animal production* (pp. 3-18). National Academy of Science, Washington, DC, USA.
91. Hongyo, K., Itoh, Y., Hifumi, E., Takeyasu, A, Uda, T. (1992). Comparison of monoclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay with thin layer chromatography and liquid chromatography for aflatoxin B1 determination in naturally contaminated corn and mixed feed. *Journal of AOAC International*, 75, 307-312.
92. Horn, B., W., Dorner, J., W. (1998). Soil populations of *Aspergillus* species from section *Flavi* along a transect through peanut-growing regions of the United States. *Mycologia*, 90, 767–776.
93. <http://www.indexmundi.com/agriculture/>
94. Huang, L., C., Zheng, N., Zheng, B., Q., Wen, F., Cheng, J., B., Han, R., W., Xu, X, M., Li, S., L., Wang J., Q. (2014). Simultaneous determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, zearalenone and α -zearalenol in milk by UHPLC–MS/MS. *Food Chemistry*, 146, 242-249.
95. Huchchannanavar, S., Balol, G., B. (2011). Aflatoxins in food chain and their management. *Current Biotica*, 5, 2, 250-263.
96. Hussain, I., Anwar, J., Asi, M. R., Munawar, M. A., Kashif, M. (2010). Aflatoxin M1 contamination in milk from five dairy species in Pakistan. *Food Control*, 21, 122–124.
97. Hussein, H., S., Brasel, J., M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167, 101-134.
98. International Agency for Research on Cancer, IARC (1993). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic

- amines and mycotoxins. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 56. World Health Organization, IARC, Lyon, France, 19–23.
99. International Agency for Research on Cancer, IARC (2002). Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans, vol. 82. World Health Organization, IARC, Lyon, France. 171.
100. International Agency for Research on Cancer, IARC (2012). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 1-104.
101. Jajić, I. (2004). Prilog hromatografskom određivanju deoksinivalenola u kukuruzu, Magistarska teza, Prirodno matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
102. Janković, V., V., Vukojević, J., B., Lakićević, B., M., Mitrović, R., R., Vuković, D., I. (2009). Presence of moulds and aflatoxin M1 in milk. *Proceedings for Natural Science, Matica Srpska Novi Sad*, 117, 63-68.
103. JECFA. (2001). In: Food Additives Series. *Safety evaluation of certain mycotoxins in food*. Prepared by the Fifty-sixth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Geneva, Vol. 47, WHO.
104. Jewers, K. (1982). Mycotoxins in foods: The application of survey and quality control. *The Journal of the Royal Society for the Promotion of Health*, 102, 114–118.
105. Jolly, C., M., Bayard, B., Awuah, R., T., Fialor, S., C., Williams, J., T. (2009). Examining the Structure of Awareness and Perceptions of Groundnut Aflatoxin among Ghanaian Health and Agricultural Professionals and its influence on their Actions. *The Journal of Socio-Economics*, 38, 280-287.
106. Kaaya, A., N., Kyamuhangire, W. (2006). The effect of storage time and agroecological zone on mould incidence and aflatoxin contamination of maize from traders in Uganda. *International Journal of Food Microbiology*, 110, 217-223.

107. Kabak, B., Dobson, A., D., W., Var, I. (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 593-619.
108. Kangethe, E., K., Langa, K., A. (2009). Aflatoxin B1 and M1 contamination of animal feed and milk from urban centers in Kenya. *African Health Sciences*, 9, 218-226.
109. Karami-Osboo, R., Mirabolfathy, M., Kamran, R., Shetab-Boushehri, M. (2012). Aflatoxin B1 in maize harvested over 3 years in Iran. *Food Control*, 23, 271-274.
110. Kim, E., K., Shon, D., H., Ryu, D., Park, J., W., Hwang, H., J., Kim, Y., B. (2000). Occurrence of aflatoxin M1 in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. *Food Additives and Contaminants*, 17, 1, 59-64.
111. Klich, M. A., Tiffany, L., H., Knaphus, G. (1994). Ecology of the aspergilli of soils and litter. *Aspergillus Biology and Industrial Applications*. Edited by Klich, M., A., Bennett, J., W., Butterworth-Heinemann, Boston.
112. Kok, W., T. (1994). Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 659, 127-137.
113. Kokić, B., Čabarkapa, I., Lević, J., Mandić, A., Matić, J., Ivanov, D. (2009). Screening of mycotoxins in animal feed from the region of Vojvodina. *Proceedings for Natural Science, Matica Srpska Novi Sad*, 117, 87-96.
114. Kos, J., Janić Hajnal, E., Škrinjar, M., Mišan, A., Mandić, A., Jovanov, P., Milovanović, I. (2014b). Presence of *Fusarium* toxins in maize from Autonomous Province of Vojvodina, Serbia. *Food Control*, 46, 98-101.
115. Kos, J., Lević, J., Đuragić, O., Kokić, B., Miladinović, I. (2014a). Occurrence and estimation of aflatoxin M1 exposure in milk in Serbia. *Food Control*, 38, 41-46.

116. Kos, J., Mastilović, J., Hajnal, J., E., Šarić, B. (2013). Natural occurrence of aflatoxins in maize harvested in Serbia during 2009-2012. *Food Control*, 34, 31-34.
117. Kos, J., Škrinjar, M., Mandić, A., Mišan, A., Bursić, V., Šarić, B., Janić Hajnal, E. (2014c). Presence of aflatoxins in cereals from Serbia. *Food and Feed Research*, 41, 1, 31-38.
118. Kralj Cigić, I., Prosen, H. (2009). An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. *International Journal of Molecular Science*, 10, 62-115.
119. Krishnamachari, K., A., V., R., Bhat, R., V., Nagarajan, V., Tilak, T., B., G. (1975). Hepatitis due to aflatoxicosis - An outbreak in western India. *Lancet*, 1, 1061-1063.
120. Kromidas, S. (2006). HPLC Made to Measure, A Practical Handbook for Optimization, Wiley WCH, Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
121. Krska, R. (1998). The performance of modern sample preparation techniques for the analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals. *Journal of Chromatography A*, 815, 49-57.
122. Krska, R., Molinelli, A. (2007). Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 1, 145-148.
123. Krska, R., Schuhmacher, R. (2012). In: Mycotoxins Risk Management in Animal Production. E. M. Binder (Ed.), *Mycotoxin analysis* (pp. 119-140). Special Edition World Nutrition Forum, Press Anytime Publishing services, Leicestershire, England
124. Kuiper-Goodman, T. (1990). Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: aflatoxin, ochratoxin and zearalenone. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 68, 1017-1024.
125. Kuiper-Goodman, T. (1998). In: Mycotoxins and Phycotoxins - Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety. M. Miraglia, H. van

- Egmond, C. Brera, J. Gilbert (Eds.), *Food safety: mycotoxins and phycotoxins in perspective* (pp. 25-48), Fort Collins, CO, Alaken Inc.
126. Langseth, W., Clasen, P., E. (1992). Automation of a clean-up procedure for determination of trichothecenes in cereals using a charcoal–alumina column. *Journal of Chromatography A*, 603, 290-293.
127. Lattanzio, V., M., Gatta, S., D., Suman, M., Visconti, A. (2011). Development and in-house validation of a robust and sensitive solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in cereal-based foods. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25, 13, 1869-1880.
128. Leblanc, J. C., Tard, A., Volatier, J. L., Verger, P. (2005). Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from the First French Total Diet Study. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 22, 652-672.
129. Lee, J., E., Kwak, B., M., Ahn, J., H., Jeon, T., H. (2009). Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk in South Korea using an immunoaffinity column and liquid chromatography. *Food Control*, 20, 136-138.
130. Leslie, J., F., Bandyopadhyay, R., Visconti, A., (2008). *Mycotoxins- Detection methods, Management, Public Health and Agricultural trade*, Cromwell Press, United Kingdom.
131. Lillehoj, E.B. (1983). In: Aflatoxin and *A. flavus* in corn. V. L. Diener, R. L. Asquith, J. W. Dickens (Eds.), *Effect of environmental and cultural factors of aflatoxin contamination of developing corn kernels* (p. 112). Southern Coop Serv. Bulletin 279, Craftmaster, Opelika, Ala.
132. Lin, L., Zhang, J., Wang, P., Wang, Y., Chen, J. (1998). Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. *Journal of Chromatography A*, 815, 3-20.
133. Liua, Z., Gaoa, J., Yuc, J. (2006). Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning Province, China. *Journal of Stored Product Research*, 42, 468-479.

134. Loeffler, K., Miderson, S. (2010). Photo Gallery, Cornell University Department of Plant Pathology and Plant Microbe-Biology, Ithaca, USA.
135. Loosmore, R., M., Harding, J., D., J. (1961). A toxic factor in Brazilian groundnut meal causing liver damage in pigs. *Veterinary Record*, 73, 1362-1365.
136. Loosmore, R., M., Markosn, I., M. (1961). Poisoning of cattle by Brazilian groundnut meal. *Veterinary Record*, 73, 813-814.
137. Luftullah, G., Hussain, A. (2012). Studies on contamination level of aflatoxins in some cereals and beans of Pakistan. *Food Control*, 23, 32-36.
138. Magan, N., Sanchis, V., Aldred, D. (2004). In: Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications. D. K. Aurora, M. Dekker (Eds.), *Role of spoilage fungi in seed deterioration* (pp. 311-324). Taylor and Francis Group, CRS Press, United States.
139. Majeed, S., Iqbal, M., Rafique, A., M., Zafar I., S. (2013). Aflatoxins and ochratoxin A contamination in rice, corn and corn products from Punjab, Pakistan. *Journal of Cereal Science*, 58, 446-450.
140. Malissiova, E., Tsakalof, A., Arvanitoyannis, I., S., Katsafliaka, A., Katsioulis, A., Tserkezou, P., Koureas, M., Govaris, A., Hadjichristodoulou. (2013). Monitoring Aflatoxin M1 levels in ewe's and goat's milk in Thessaly Greece: potential risk factors under organic and conventional production schemes. *Food Control*, 34, 241-248.
141. Marasas, W., F., O., Gelderblom, W., C., A., Shephard, G., S., Vismer, H., V. (2008). In: Mycotoxins: Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade. J. F. Leslie, R. Bandyopadhyay, A. A. Visconti (Eds.), *Global Problem in Mycotoxins* (pp. 29-40). Cromwell Press, United Kingdom.
142. Marin, S., Albareda, X., Ramos, A. J. and Sanchis, V. (2001). Impact of environment and interactions of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* with *Aspergillus parasiticus* on fumonisin B1 and aflatoxins on maize grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 1060-1068.

143. Martins, H., M., Guerra, M., M., Bernardo, F. (2005). A six year survey (1999-2004) of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products in Portugal. *Mycotoxin Research*, 21, 192-195.
144. Maslac, T. (2011). US Department of Agriculture (USDA) Grain and Feed Annual. Annual Report on Wheat, Corn and Barley for Serbia.
145. Maslac, T. (2012). US Department of Agriculture (USDA) Grain and Feed, Update on Wheat and Corn for Serbia.
146. Matić, J., Mandić, A., Lević, J., Zdjelar, G., Vasiljević, I., Kokić, B., Čabarkapa, I. (2010). Occurrence of mycotoxins and genetically modified organisms in feed and food containing corn and soybean. XIV International Symposium Feed Technology, Novi Sad 19-21 October, Serbia, 288-294.
147. Matuszewski, B., K., Constanzer, M., L., Chavez-Eng, C., M. (1998): Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations. *Analytical Chemistry*, 70, 882-889.
148. McDaniel, A., Holmes, W., E., Armbrust, K., L., Sparks, D., L., . Brown, A., E. (2011). Effect of Matrix Clean-Up for Aflatoxin Analysis in Corn and Dried Distillers Grains. *Natural Resources*, 2, 250-257.
149. Mejía-Teniente, L., Chapa-Oliver, A., M., Vazquez-Cruz, M., A., Torres-Pacheco, I., Guevara-González, R., G. (2011). In: Aflatoxins - Detection, Measurement and Control. I. Torres-Pacheco (Ed.), *Aflatoxins Biochemistry and Molecular Biology Biotechnological Approaches for Control in Crops* (pp. 317-355), In Tech Europe, Rijeka, Croatia.
150. Meucci, V., Razzuoli, E., Soldani, G., Massart, F. (2010). Mycotoxin detection infant formula milks in Italy. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 27, 64-71.
151. Mishra, H., N., Das, C., A. (2003). A review on biological control and metabolism of aflatoxin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 3, 245-264.

152. Mol, J., Plaza-Bolan, P., Zomer, P., de Rijk, C., Stolker, M., Mulder, J., (2008). Toward a Generic Extraction Method for Simultaneous Determination of Pesticides, Mycotoxins, Plant Toxins, and Veterinary Drugs in Feed and Food Matrixes. *Analytical Chemistry*, 80, 9450–9459.
153. Molyneux, R., J., Mahoney, N., Kim, J., H., Campbell, B., C. (2007). Mycotoxins in edible tree nuts. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 72–78.
154. Motawee, M., M., Bauer, J., McMahan, D., J. (2009). Survey of Aflatoxin M1 in Cow, Goat, Buffalo and Camel Milks in Ismailia-Egypt. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83, 5, 766-769.
155. Munari, L., Charchat, S., Rodrigues, L., Alberto von Muhlen, C., Rose bau, A, Lavinsky, L., Bonorino, C. (2003). An ELISA serum assay for autoantibodies to HSP70 in immune-mediated hearing loss. *Journal of Immunological Methods*, 283, 155–161.
156. Muscarella, M., Iammarino, M., Nardiello, D., Lo Magro, S., Palermo, C., Centonze, D., Palermo, D. (2009). Validation of a confirmatory analytical method for the determination of aflatoxins B1, B2, G1 i G2 in foods and feed materials by HPLC with on-line photochemical derivatization and fluorescence detection. *Food Additives and Contaminants*, 26, 10, 1402-1410.
157. Muthomi, J., W., Njenga, L.,N., Gathumbi, J.,K., Cheminingwa, G.,N. (2009) The occurrence of aflatoxins in maize and distribution of mycotoxin-producing fungi in Eastern Kenya. *Plant Pathology Journal*, 8, 3, 113-119.
158. Nabney, J., Burbage, M., B., Allcroft, R., Lewis. G. (1967). Metabolism of aflatoxin in sheep: Excretion pattern in the lactating ewe. *Food and Cosmetics Toxicology*, 5, 11–17.
159. Newberne, P. M. Butler, W. H. (1969). Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: a review. *Cancer Research*, 29, 236-250.

160. Nilufer, D., Boyacioglu, D. (2002). Comparative Study of Three Different Methods for the Determination of Aflatoxins in Tahini. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 3375-3379.
161. O'Brian, G., R., Georgianna, D., R., Wilkinson, J., R., Abbas, H., K., Wu, J., Bhatnagar, D., Cleveland, T., E., Nierman, W., Payne, G.A. (2007). The effect of elevated temperature on gene expression and aflatoxin biosynthesis. *Mycologia*. 90,232-239.
162. Oliveira, C., A., F., Goncalves, n., B., Rosim, R., E., Fernandes, a., M. (2009). Determination of Aflatoxins in Peanut Products in the Northeast Region of Sao Paulo, Brasil. *International journal of Molecular Sciences*, 10, 174-183.
163. Onsongo, J. (2004). Outbreak of aflatoxin poisoning in Kenya. *EPI / IDS Bulletin*, 5, 3- 4.
164. Oruc, H., H., Cibik, R., Yilmaz, E., Kalkanli, O. (2006). Distribution and stability of aflatoxin M1 during processing and ripening of traditional white pickled cheese. *Food Additives and Contaminants*, 23, 2, 190-195.
165. Otsuki, T., Wilson, J., S., Sewadeh, M. (2001). What price precaution? European harmonization of aflatoxin regulations and African groundnut exports. *European Review of Agricultural Economics*, 28, 263-283.
166. Pappa, H. (2005). Validation. *Pharmacoepial Forum*, 31, 2, 549.
167. Payne, G., A. (1992). Aflatoxin in maize. *CRC Critical Reviews in Plant Science*, 10, 423-440.
168. Payne, G., A. (1998). Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops. In *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, Edited by Sinha K., K., S., Bhatnagar, D., Marcel Dekker, Inc., New York.
169. Payne, G., A., Hagler, W., M., Adkins, C., R. (1998). Aflatoxin accumulation in inoculated ears of field-grown maize. *Plant Disease*, 72, 422-424.
170. Pitt, J., I. (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin*, 56, 184-192.

171. Pitt, J., I., Hocking, A., D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. Springer Science – Business Media, New York, USA.
172. Pleadin, J., Vulić, A., Perši, N., Škrivanko, M., Capek, B., Cvetnić, Ž. (2014a). Aflatoxin B1 occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. *Food Control*, 40, 286-291.
173. Pleadin, J., Vulić, A., Perši, N., Škrivanko, M., Capek, B., Cvetnić, Ž. (2014b). Annual and regional variations of aflatoxin B1 levels seen in grains and feed coming from Croatian dairy farms over a 5-year period. *Food Control*, 47, 221-225.
174. Polovinski-Horvatović, M., Jurić, V., Glamočić, D. (2010). Two year study of incidence of aflatoxin M1 in milk in the region of Serbia. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 25, 5-6, 713-718.
175. Pravilnik o količinama pesticida, metala, metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama (Službeni list Savezne Republike Jugoslavije broj 5/1992).
176. Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje (Službeni glasnik Republike Srbije broj 4/2010; ispravke 27/2012, 113/2012 i 27/2014).
177. Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja (Službeni glasnik Republike Srbije broj 28/2011, ispravke 20/2013, 29/2014, 37/2014 – ispravka i 39/2014; 79/2014).
178. Pravilnik o mikrobiološkim kriterijumima za hranu (Službeni glasnik Republike Srbije broj 72/2010).
179. Pravilnik o mikrobiološkoj ispravnosti namirnica u prometu (Službeni list Savezne Republike Jugoslavije broj 29/1993).

180. Rahimi, E., Bonyadian, M., Rafaei, M., Kazemeini, H., R. (2010). Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 11-15.
181. Rastogi, S., Dwivedi, P., D., Khanna, S., K., Das, M. (2004). Detection of aflatoxin M1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. *Food Control*, 15, 287-290.
182. Reiter, E., Zentek, J., Razzazi, E. (2009). Review on sample preparation strategies and methods used for the analysis of aflatoxins in food and feed. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, 508-524.
183. Remington, R., D., Schrok, M., A. (1970). *Statistics and Applications to the Biological and Health Sciences*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
184. Republički Hidrometeorološki Zavod Srbije. (2009). Agrometeorološki uslovi u proizvodnoj 2008/2009 godini na teritoriji Republike Srbije.
185. Republički Hidrometeorološki Zavod Srbije. (2010). Agrometeorološki uslovi u proizvodnoj 2009/2010 godini na teritoriji Republike Srbije.
186. Republički Hidrometeorološki Zavod Srbije. (2011). Agrometeorološki uslovi u proizvodnoj 2010/2011 godini na teritoriji Republike Srbije.
187. Republički Hidrometeorološki Zavod Srbije. (2012). Agrometeorološki uslovi u proizvodnoj 2011/2012 godini na teritoriji Republike Srbije.
188. Robens, J., Cardwell, K. (2003). The Costs of Mycotoxin Management to the USA: Management of Aflatoxins in the United States. *Toxin Reviews*, 22, 2-3, 139-152.
189. Rodrigues-Velasco, M., L., Calonge-Delso, M., M., Ordonez-Escudero, D. (2003). ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M1 in raw cow's milk. *Food Additives and Contaminants*, 20, 276-280.
190. Rodríguez, A., Rodríguez, M., Andrade, M., J., Córdoba, J., J. (2012). Development of a multiplex real-time PCR to quantify aflatoxin, ochratoxin A and patulin producing molds in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 155, 10-18.

191. Royes, J., B., Yanong, R., P. (2002). Molds in fish feeds and aflatoxicosis. Tropical Aquaculture Laboratory. *Florida Cooperative Extension Service*, 64, 502-510.
192. Ruangwises, S., Ruangwises, N. (2009). Occurrence of aflatoxin M1 in pasteurized milk of the school milk project in Thailand. *Journal of Food Protection*, 72, 1761-1763.
193. Rustom, I., Y., S. (1997). Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, 59, 57-67.
194. Salem, N., M., Ahmad, R. (2010). Mycotoxins in food from Jordan: preliminary survey. *Food Control*, 21, 1099-1103.
195. Samarajeewa, U., Sen, A., C, Cohen, M., D, Wei, C., I. (1990). Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. *Journal of Food Protection*, 53, 6, 489-501.
196. Samson, A., R., Hoekstra, S., E., Frisvad, C., J. (2004). Introduction to Food- and Airborne Fungi. Centraalbureau vor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
197. Santin, E. (2005). In: Mycotoxin Blue Book. D. E. Diaz (ed.), *Mould growth and mycotoxin production* (pp. 225-234). University Press, Nottingham, United Kingdom.
198. Scheidegger, K. A., Payne, G. A. (2003). Unlocking the secrets behind secondary metabolism: A review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews*, 22, 423-459.
199. Schmidt, C., W. (2013). Breaking the Mold New Strategies for Fighting Aflatoxins Environmental. *Health Perspectives*, 121, 9.
200. Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R., Magan, N. (2011). Modelling the relationship between environmental factors, transcriptional genes and deoxynivalenol mycotoxin production by strains of two *Fusarium* species. *Journal of the Royal Society Interface*, 8, 117-126.

201. Schuster, R., Gerhard, M., Rothaupt, M. (1993). Analysis of Mycotoxins by HPLC with Automated Confirmation by Spectral Library, Food Analysis, Hewlett-Packard Company, Application Note.
202. Scott, P., M., Trucksess, M., W. (1997), Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. *Journal of AOAC International*, 80, 941-949.
203. Scudamore, K. (2008). In: Mycotoxins, J. Gilbert, H. Z. Senyuva (Eds.), *Bioactive compounds in Food* (pp. 134-172). Blackwell Publishing Ltd., United Kingdom.
204. Scudamore, K., A. (2004). In: Mycotoxins in Food, Detection and Control. N. Magan, M. Olsen (Eds.), *Control of mycotoxins: secondary processing* (pp. 224-243). Woodhead, Cambridge.
205. Scudamore, K., A. (2005). In: The mycotoxin blue book. D. Duarte (Ed.), *Principles and applications of mycotoxins analysis* (pp. 157-186). Nottingham University Press. United Kingdom.
206. Shephard, G., S., Berthiller, F., Burdaspal, P., A., Crews, C., Jonker, M., A., Krska R., MacDonald, S. (2012). Developments in mycotoxin analysis: an update for 2010-2011. *World Mycotoxin Journal*. 5, 1, 3-30.
207. Shephard, G., S., Berthiller, F., Burdaspal, P., A., Crews, C., Jonker, M., A., Krska, R., Lattanzio, V., M., T. (2013). Developments in mycotoxin analysis: an update for 2011-2012. *World Mycotoxin Journal*. 6, 1, 3-30.
208. Shundo, L., Navas, S., A., Lamardo, L., C., A., Ruvieri, V., Sabino, M. (2009). Estimate of aflatoxin M1 exposure in milk and occurrence in Brazil. *Food Control*, 20, 655-657.
209. Singh, N., A., Kumar, N., Raghu, H., V., Sharma, P., K., Singh, V., K., Khan, A., Raghav, N. (2013). Spore inhibition-based enzyme substrate assay for monitoring of aflatoxin M1 in milk. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 95, 5, 765-777.

210. Sinha, R., N. (1995). In: Stored Grain Ecosystems. D. S. Jayas, N. D. G. White, W.E. Muir (Eds.), *The stored grain ecosystems (pp. 1-32)*. Marcell Dekker, New York, USA.
211. Sirhan, A., Y., Tan, G., H., Wong, R., C., S. (2011). Method validation in the determination of aflatoxins in noodle samples using the QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) and high performance liquid chromatography coupled to a fluorescence detector (HPLC-FLD). *Food Control*, 22, 1807-1813.
212. Sisson, P., F. (1987). In: Afatoxin in Maize. M. S. Zuber, E. B., Lillehoj, B. L., Renfro (Eds.), *The effect of climatic conditions on the incidence and severity of afatoxin in the USA (pp. 172-177)*. Proceedings of the Workshop, CIMMYT, Mexico, USA.
213. Smith, J., E., Lewis, C., W., Anderson, J., G. Solomons, G., L. (1994). In: Mycotoxins in Human Nutrition and Health. A literature review carried out on behalf of the agro-industrial division, E2, Journal of the European Commission Directorate-General XII for scientific research and development, European Commission.
214. Soleimany, F., Jinap, S., Abas, F. (2012). Determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 130, 1055-1060.
215. Sreenivasamurthy, V. (1975). Mycotoxins in Foods. *Proceeding of the Nutrition Society of India*, 19, 1- 16.
216. SRPS ISO 21527-2 (2011). Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za određivanje broja kvasaca i plesni - Deo 2: Tehnika brojanja kolonija u proizvodima sa aktivnošću vode manjom od 0,95 ili jednakom 0,95.
217. Stack, J., Carlson, M. (2003). NF571 *Aspergillus flavus* and aflatoxins in Corn, *Plant Diseases*, C-18, Field Crops, Historical Materials from University of Nebraska, Lincoln, 43.

218. StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (data analysis software system), version 10. www.statsoft.com.
219. Steyin, S. (1984). In: Mycotoxin. V. Betina (Ed.), *Production, Isolation, Separation and Purification* (pp. 223-253). Elsevier Scientific Publisher, Amsterdam, Netherland.
220. Stoloff, L., M., Truckess, M., Hardin, N., Francis, O., J., Hayes, J., R., Polan, C., E., Campbell, T., C. (1975). Stability of aflatoxin M1 in Milk. *Journal of Dairy Science*, 58, 1789-1793.
221. Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R., and 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 Communications in Mass Spectrometry*, 20, 2649-2659.
222. Škrbić, B., Živančev, J., Antić, I., Godula, M. (2014). Levels of aflatoxin M1 in different types of milk collected in Serbia: Assessment of human and animal exposure. *Food Control*, 40, 113-119.
223. Tandon, B., N., Krishnamurthy, L., Koshy, A., Tandon, H., D., Ramalingaswami, V., Bhandari, J., R., Mathur, M., M., Mathur, P., D. (1977). Study of an epidemic of jaundice presumably due to toxic hepatitis in North West India. *Gastroenterology*, 72, 488-494.
224. Technical Report 16059, (2010). CEN/TR, Food analysis-Performance criteria for single laboratory validated methods of analysis for the determination of mycotoxins. European Committee for Standardization, Menagmente Centre, Brussels.
225. Tekinsen, K., K., Eken, H., S. (2008). Aflatoxin M1 levels in UHT milk and kashar cheese consumed in Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3287-3289.
226. Theumer, M. G., Rubinstein, H., R. (2011). In: Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology. R. G. Guevara-Gonzalez (Ed.), *The Evolutionary Dynamics*

- in the Research on Aflatoxins During the 2001-2010 decade* (pp. 305-322). InTech Europe, Rijeka, Croatia.
227. Trung, T., S., Tabuc, C., Bailly, S., Querin, A., Guerre, P., Bailly, J., D. (2008). Fungal mycoflora and contamination of maize from Vietnam with aflatoxin B1 and fumonisin B1. *World Mycotoxin Journal*, 1, 1, 87-94.
228. Tsakiris, I., N., Tzatzarakis, M., N., Alegakis, A., K., Vlachou, M., V., Renieri, E., A., Tsatsakis, A., M. (2013). Risk assessment scenarios of children's exposure to aflatoxin M1 residues in different milk types from the Greek market. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 261-265.
229. Turner, N., Subrahmanyam, S., Piletsky, S. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins. *Analytica Chimica Acta*, 632, 168-180.
230. Unusan, N. (2006). Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk in Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1897-1900.
231. Vaamonde, G., Patriarca, A., Fernández Pinto, V., Comerio, R., Degrossi, C. (2003). Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus section flavi* from different substrates in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 79-84.
232. Vallone, L., Boscariol, D., Dragoni, I. (2006). Aflatoxins in organic milk and dairy products. *Veterinary Research Communications*, 30, 1, 369-370.
233. Van Egmond, H., P. (1989). In: Introduction. H. P. Van Egmond (Ed.), *Mycotoxins in Dairy Products* (pp. 1-10). Elsevier Applied Science, London and New York.
234. Van Egmond, H., P., Dragacci, S. (2001). In: Mycotoxin Protocols. M. W. Trucksess, A. E. Pohland (Eds.), *Liquid Chromatographic Method for Aflatoxin M1 in Milk* (pp. 59-69). Humana Press, Totowa, USA.
235. Van Egmond, H., Schothorst, R., C., Jonker, M., A. (2007). Regulations relating to mycotoxins in food -Perspectives in a global and European context. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389, 147-157.

236. Velasco, M., L., R., Delso, M., M., C., Esudero, D., O. (2003). ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M1 in raw cow milk. *Food Additives and Contaminants*, 20, 276-280.
237. Verma, R., J. (2004). Aflatoxins cause DNA damage. *International Journal of Human Genetics*, 4, 231-236.
238. Vuković, G. (2012). Određivanje ostataka pesticida u dečijoj hrani upotrebom gasne hromatografije i tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom. *Doktorska disertacija*, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
239. Wang, H., Zhou, X., J., Liu, Y., Q., Yang, H., M., Guo, Q., L. (2011). Simultaneous determination of chloramphenicol and aflatoxin M1 residues in milk by triple quadrupole liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3532-3538.
240. Wang, Y., Liu, X., Xiao, C., Wang, Z., Wang, J., Xiao, H. (2012). HPLC determination of aflatoxin M1 in liquid milk and milk powder using solid phase extraction on OASIS HLB. *Food Control*, 28, 131-134.
241. Weidenborner, M. (2001). Encyclopedia of food mycotoxins. Springer, Verlag Heidelberg, Berlin.
242. Whitaker, T., B. (2006). Sampling foods for mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 23, 1, 50-61.
243. Whitaker, T., B., Dickens, J., W., Monroe, R., J. (1972). Comparison of the observed distribution of aflatoxin in shelled peanuts to the negative binomial distribution. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 49, 590-593.
244. Whitaker, T., B., Dickens, J., W., Monroe, R., J. (1974). Variability of aflatoxin test results. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 51, 214-218.
245. Widstrom, N., W. (1996). Advances in Agronomy, In: D. Sparks (Ed.). *The aflatoxin problem with corn grain* (pp. 219-280). Academic Press, New York, USA.

246. Wilkinson, J.R., Yu, J., Bland, J.M., Nierman, W.C., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E. (2007). Amino acid supplementation reveals differential regulation of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* NRRL 3357 and *Aspergillus parasiticus* SRRC 143. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 1308–1319.
247. Williams, J., H., Phillips, T., D., Jolly, P., E., Stiles, J., K., Jolly, C., M., Aggarwal, D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 1106-1122.
248. Wilson, D., M., Payne, G., A. (1994). In: The toxicology of aflatoxins. Human health, veterinary and agricultural significance. D. L. Eaton, J. D. Groopman (Eds.), *Factors affecting Aspergillus flavus group infection and aflatoxin contamination of crops* (pp. 309-325). Academic Press, San Diego, California, USA.
249. Wogan, G., N., Edwards, G., S., Newberne, P., M. (1971). Structure activity relationships in toxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analogs. *Cancer Research*, 31, 1936-1942.
250. World Health Organization, WHO. (2010). Aflatoxin M1 JECFA Food Additives Series 47.
251. Wu, F., Bhatnagar, D., Bui-Klimke, T., Carbone, I., Hellmich, R, Munkvold, G, Paul, P., Payne, G., Takle, E. (2011). Climate change impacts on mycotoxins risks in US maize. *World Mycotoxin Journal*, 4, 1, 79-93.
252. Wyatt, R., D. (1991). In: Mycotoxins in Animal Feeds, J. E. Smith, R. S. Henderson (Eds.), *Poultry* (pp. 577-579). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
253. Zachariasova, M., Hajslova, J., Kostelanska, M., Poustka, J., Krplova, A., Cuhra, P., Hochel, I. (2008). Deoxynivalenol and its conjugates in beer: a critical assessment of data obtained by enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 625, 77-86.

254. Zachariasova, M., Lacina, O., Malachova, A., Kostelanska, M., Poustka, J., Godula, M., Hajslova, J. (2010). Novel approaches in analysis of Fusarium mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 662, 51-61.
255. Zinedine, A., González-Osnaya, L., Soriano, J., M., Moltó, J., C., Idrissi, L., Mañes, J. (2007). Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 25-29.
256. Zinedine, A., Juan, C., Soriano, J., M., Moltó, J., C., Idrissi, L., Mañes, J. (2007). Limited survey for the occurrence of aflatoxins in cereals and poultry feeds from Rabat, Morocco. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 124-127.